P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2017,11 (3) :01-14

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

الكشف عن جينات المقاومة المكتسبة للفانكومايسين في العزلات المحلية *Escherichia coli* وعلاقتها مع طرز المقاومة الأخرى

شهد هشام محمود * احمد محمد تركي * الهام عبد الهادي خلف **

*جامعةالانبار – كلية العلوم

**وزارة الصناعة و المعادن–مركز الرازي

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/11/26
تاريخ القبول: 2017/12/28
تاريخ النشر: 22 / 6 / 2018

DOI: 10.37652/juaps.2017.145219

الكلمات المفتاحية:

فانكومايسين،
جينات المقاومة المكتسبة،
Escherichia coli،
PCR،
16SrRNA.

الخلاصة:

شملت هذهِ الدراسة جمع 374 عينة سريرية (الادرار، الجروح، الحروق، خروج) من مستشفى ابن البلدي للولادة، مستشفى اليرموك التعليمي ومستشفى الامام علي في بغداد وغير سريرية (ماء نهر دجلة في بغداد و تربة حدائق) ومن كلا الجنسين ومن مختلف الأعمار للتحري عن وجود بكتريا *Escherichia coli* اذ تم عزل وتشخيص 77 عزلة لبكتريا *Escherichia coli* وبنسبة 20.58%، استنادا الى الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية ونظام Api-20 E وجهازVITEK2. اجري اختبار الحساسية لجميع عزلات البكتريا للمضاد الحيوي الفانكومايسين على وسط آكار مولر– هنتون بإستعمال طريقة الانتشار بالأقراص، واظهرت النتائج 73 عزلة لبكتريا *Escherichia coli* المقاومة ونسبة مقاوتها 94.81% و4 عزلات *Escherichia coli* ذات المقاومة المتوسطة وبنسبة 5.19% ولغرض التشخيص الدقيق للعزلات بالطرائق الجزيئية، تم استخلاص الدنا الكروموسومي والبلازميدي للعزلات المنتخبه (الحاوية على بلازميدات) (31 عزلة)، اذ استخدم بادئ نوعي متخصص لجين*16SrRNA* لتشخيص بكتريا *Escherichia coli* المعزولة وكانت نسبة ظهور هذا الجين 100% وعلى ضوء نتائج المقاومة والحساسية للمضاد الحيوي الفانكومايسين والتشخيص الجزيئي، تمَ اختيار 29 عزلة سريرية وعزلتين بيئية لبكتريا*Escherichia coli* لغرض الكشف والدراسة الجزيئية ولأول مرة بالقطر عن الجينات المقاومة للفانكومايسين في هذهِ البكتريا التابعة للعائلة المعوية، واستخدمَ كل من الدنا الكروموسومي والبلازميدي في تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، اذ تم التحري عن الجينات المقاومة للفانكومايسين لهذهِ العزلات البكتيرية، بإستخدام بادئات نوعية متخصصة لجينات المقاومة لهذا المضاد (*VanC, VanB, VanA*) وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز امتلاك البكتريا المعزولة ولأول مرة بالقطر لجميع جينات المقاومة (*VanC, VanB, VanA*) على الدنا البلازميدي او الكروموسومي او البلازميدي والكروموسومي معاً وبنسب متباينه.

المقدمة:

تعد بكتريا*Escherichia coli* من النبت الطبيعي في الامعاء ولكن بعض سلالاتها يمكن ان تتسبب في عده امراض للانسان في حاله تواجدها في بيئات مختلفه من جسم الانسان, وان بعض سلالات

* Corresponding author at: College of Science, University of Anbar.

E-mail address: Shahad_eye@yahoo.com

scherichia coli يمكن ان تتواجد في القناه الهضمية وخاصه الامعاء، اما الممرضه منها والتي تتواجد خارج الامعاء فانها تسمى بمجموعه الاشيريشا القولونية الممرضة الخارج معوية[1] والتي باستطاعتها ان تحدث اصابه في مناطق اخرى غير معوية وقد تكون احدى سلالاتها موجوده في الامعاء الا انها لا تسبب اي حاله مرضية

في المنطقة المعوية. [2] وتعد بكتريا *Escherichia coli* من اهم الممرضات المسببة للالتهابات وازدادت الاهمية المرضية بسبب ما تحدثه من اصابات خطيرة في المستشفيات[3] و بسبب امتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي تؤهلها في احداث الإصابة [4] .ان معالجة الاصابات البكتيرية يمكن ان تكون صعبة وسبب تكرار الاصابة في البكتريا المرضية المقاومة للمضادات الحياتية والتي اصبحت مشكلة في معالجة الامراض , وتعد مقاومة البكتريا لعمل المضادات الحيوية من التحديات التي تواجـه الباحثين[5]. وان زيادة المقاومة للمضادات الحياتية اتت من خلال التغيرات الوراثية والفسلجية التي تطورت نتيجة الضغوط الانتخابية ولسوء استعمال هذه المضادات الحياتية في المعالـجات الطبية ادى الى تطويـر مقاومـة البكتريا لهذه المضادات الحيوية[6]. وتختلف اليات المقاومة اعتمادا على السلالة والمضاد الحيوي المستعمل وتركيزه واصبحت هذه المقاومة العالية المتعددة محط الاهتمام الصحي العالمي خاصة بعد ظهور الزيادة في مقاومة الجيل الثالث للسيفالوسبورينات من قبل البكتريا و خاصة(*E.coli , pnemoniae Klebsiella*) التي اصبحت مشكله العالم نتيجة لزيادة أستعمال المضادات الحيوية و مقاومتها [7]. و بما ان الافراط في استعمال المضادات الحيويـة وظهـور قـدرة انتقـال المقاومة بواسطة البلازميدات الناقلة والجينات[8] فان الخيارات العلاجية للاصابات البكتيرية تكون محدود بسبب المقاومة العابرة للجينات[9] . فاصبحت البلازميدات تقدم مساهمة كبيره في اكتساب الصفات الجديده مثل مقاومة المضادات الحيوية وعوامل الضراوة [10]، وقد اظهرت احدى الدراسات بان الجين *VanA* المقاوم للفانكومايسن موجود في كلا من الدنا الكروموسومي و البلازميدي[11] . كما أشارَ عدد من الباحثون[12] أن انتشار البكتريا المعوية ذات المقاومة المتغيرة بسبب عناصر كابحة للجين *VanA* وعدم امكانية تشخيصها من خلال الطراز المظهري وتحديد الآليات الجزئيـة التي حدثت داخلياً والتي أدت الى تغييرها الى عزلة مقاومة للفانكومايسين من خلال الانتقال الأفقي لجين *VanA*،وبسبب اجهادات المقاومة التي اتسمت بها البكتريا في استعمال العلاجات المختلفة فقد تطورت تقنيات التشخيص الجزيئي بشكل سريع ودقيق[13]، كما وهناك امكانية في الكشف عن الجينات المقاومة للمضادات الحياتية وتعيينها من خلال استخدام تقنية ال PCR للوصول الى اعطاء علاج شافي للاصابات البكتيرية , ومن خلال احدى الدراسات الحديثه حول امراضية *E. coli* [14] قام الباحثين بالتحقق بشكل واضح لانماط التعبير الجيني التي تشفر لبعض عوامل الضراوه لبكتريا *E. coli* التي تصيب الخلايا الطلائية في المسالك البولية المصابه بمرض (UPEC) (uropathogenic *E.coli*)ومن خلال هذه الدراسه تم تقييم علاقة جينات الضراوه مع جينات المقاومة للمضادات الحياتية في نفس السلالات المسببة لهذا المرض، وبرهنت على مشاركتها المحتمله في التهاب المسالك البولية وطريقه تطور المرض. و كنتيجة للانتشار الوبائي لبكتريا*E. coli* في المستشفيات فقد سجلت نسبه عالية من الامراض التي تسببها هذه السلالات التي تتسم بمقاومة متعددة للمضـادات الحياتية[15]. ونظرا لطول الفترة المستغرقة في تشخيص البكتريا ومقاومتها للمضادات الحياتية للوصول الى اعطاء علاج شافي من الاصابات البكتيرية , فقد تم تصميم هذه الدراسة لتحقيق الاهداف الاتية : الكشف عن مقاومة العائله المعوية لمضاد الفانكومايسين وعلاقته مع طرز المقاومة الأخرى،الكشف عن البكتريا المقاومة لمضاد الحيوي الفانكومايسين للعائله المعوية بالطرائق الجزيئية.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 344 عينة مرضية من (مستشفى اليرموك التعليمي ,مستشفى ابن البلدي و مستشفى الامام علي) من نماذج مختلفة (الإدرار، الخروج، الجروح، الحروق) و للفتره من 31 / /2016 7 لغاية 29 / / 12 2016 لكلا الجنسين ومن مختلف الأعمار. بالإضافة إلى 30 عينه بيئية (ماء نهر دجله و تربة حدائق) من مختلف مناطق بغداد حيث تم قشط 10سم من سطح التربه و اخذت بعمق يتراوح ما بين 5- 10سم ووضع 1 غرام من التربه في القناني البلاستيكية المعقمة و نقلت الى المختبر، حيث يتم اضافة 9مليلتر من المحلول الفسلجي المعقم ويتم مجانستها واخذ 1 مل من كل عينه لزراعتها، كما تم جمع عينات من المياه باستخدام قناني (بحجم 100 مليلتر) معقمة من مياه نهر دجله و نقلت الى المختبر لغرض ترشيحها على ورق الترشيح (0.45 مايكرون) لزراعتها.

تشخيص العزلات

استعمل نظام أبي 20 للعائلة المعوية (API-20E) لتشخيص العزلات البكتيرية حيث اتبعت تعليمات الشركة المجهزة Biomerieux، بعدها تم اجراء التشخيص باستعمال جهاز Vitek 2)

(System المجهز من شركةBioMerieux لتشخيص العزلات البكتيرية بدرجة عالية من الدقة بعد التأكد منها بوساطة الاختبارات الكيموحيوية الأولية.

الكشف عن بكتريا *Escherichia coli* المقاومة للفانكومايسين

تم عمل فحص الحساسية لجميع عزلات (*E.coli*) بواقع ثلاثة مكررات باستخدام مضاد Vancomycin (30 µg) المجهز من شركة الرازي وذلك باتباع طريقة الانتشار بالأقراص باستعمال وسط مولر –هنتون اكار و بالاعتماد على طريقة (Kirby–Bauer) المذكورة من قبل العالم [16] وهي الطريقة *الأكثر* استخدام لاختبار الحساسية لكونها بسيطة واقتصادية وهذه الطريقة مثبتة من قبل اللجنة الوطنية (NCCLS) على مستوى المختبرات السريرية، تم تحضير العالق البكتيري في هذه التجربه بتركيز 1.5×10^{8} cfu/mL ومقارنتها بمحلول ماكفرلند رقم 0.5 (McFarland No. 0.5) لمعايرة كثافة اللقاح البكتيري في فحص الحساسية لمضاد الفانكومايسين و مجهز من شركة Himedia (الهند)، حضنت الاطباق بدرجة 37 درجه مئوية لمدة 24 ساعه . وقيست اقطار التثبيط باستخدام المسطرة و قورنت باقطار التثبيط القياسية (CLSI , 2013).

عزل الدنا الكروموسومي

استخلصت عينات الدنا الكروموسومي للعزلات البكتيرية المنتخبه المقاومة للفانكومايسين باستخدام عدة استخلاص الدنا البكتيري المنتجة من شركة Geneaid الكورية.

استخلاص وتنقية الدنا البلازميدي

استخلص *الدنا* البلازميدي للعزلات باستخدام عدة استخلاص الدنا البلازميدي المنتج من شركة QIAGEN .

قياس نقاوة وتركيز الحامض النووي (الكروموسومي والبلازميدي)

تم قياس *نقاوة* وتركيز الدنا المستخلص باستخدام جهاز Nano drop–spectrophotometer.

– تفاعلات الـ PCR (تقنية التفاعل التسلسلي لأنزيم البلمرة الـ DNA)

جدول (1) يمثل الظروف المثلى لكوثرة *16SrRNA*

المرحلة	درجة الحرارة المئوية	الوقت	عدد الدورات
مرحلة المسخ الأولي للدنا	95	5 دقائق	دورة واحدة
مسخ الدنا	95	1 دقيقة	35 دورة
الالتحام	57	30 ثانية	
الاستطالة	72	1 دقيقة	
مرحلة الاستطالة النهائية	72	5 دقيقة	دورة واحدة

جدول (2) يمثل مزيج التفاعل الامثل لتشخيص الجين *16SrRNA*

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
GoTaq®Green Master Mix	12.5
البادئ الأمامي لجين *16SrRNA* (10 pmol)	2
البادئ العكسي لجين *16SrRNA* (10pmol)	2
DNA(100 ng /µL)	3
Free nucleas D.W	5.5
الحجم النهائي	25

التحري عن جين المقاومة للفانكومايسين VanA gene على الدنا الكروموسومي بواسطة PCR استخدم مزيج التفاعل الامثل الموضح في جدول (3) .

الجدول (3) مزيج التفاعل الامثل لتضاعف للدنا الكروموسومي.

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
GoTaq®Green Master Mix	12.5
البادئ الأمامي لجين *Van A* (10pmol)	2
البادئ العكسي لجين *Van A* (10 pmol)	2
DNA(100 ng/µL) الكروموسومي	3
الماء الخالي من الأيونات	5.5
الحجم النهائي	25

التحري عن جين المقاومة للفانكومايسين VanA gene على الدنا البلازميدي بواسطة PCR استخدم مزيج التفاعل الموضح في جدول (4) .

الجدول (4) مزيج التفاعل الامثل لتضاعف للدنا البلازميدي.

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
GoTaq®Green Master Mix	12.5
البادئ الأمامي لجين *VanA*(10 pmol)	3
البادئ العكسي لجين *VanA*(10 pmol)	3
DNA (50 ng/µL) البلازميدي	5
الماء الخالي من الأيونات	1.5
الحجم النهائي	25

برنامج التفاعل لـ Towch down PCR لتضاعف *VanA* gene

جدول (5) يمثل الظروف المثلى لكوثرة VanA

المرحلة	درجة الحرارة المئوية	الوقت	عدد الدورات
مرحلة المسخ الأولي للدنا	94	5 دقائق	دورة واحدة
مسخ الدنا	94	1 دقيقة	10 دورة
الالتحام	58	40 ثانية	
الاستطالة	72	1 دقيقة	
مسخ الدنا	94	1 دقيقة	25 دورة
الالتحام	54	40 ثانية	
الاستطالة	72	1 دقيقة	
الاستطالة النهائية	72	5 دقيقة	دوره واحده

التحري عن جين مقاومة الفانكومايسين VanB gene الى الدنا الكروموسومي بواسطة PCR استخدم مزيج التفاعل الموضح في جدول (6).

الجدول (6) مزيج التفاعل الامثل لتضاعف الدنا الكروموسومي.

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
GoTaq®Green Master Mix	12.5
البادئ الأمامي لجين *VanB*	2
البادئ العكسي لجين *VanB*	2
DNA(100 ng/µL) الكروموسومي	3
الماء المقطر الخالي من الأيونات	5.5
الحجم النهائي	25

التحري عن جين مقاومة الفانكومايسين VanB gene على الدنا البلازميدي بواسطة PCR استخدم مزيج التفاعل الموضح في جدول (7).

الجدول (7) مزيج التفاعل الامثل لتضاعف الدنا البلازميدي .

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
GoTaq®Green Master Mix	12.5
البادئ الأمامي لجين *VanB*	2
البادئ العكسي لجين *VanB*	2
DNA (50 ng/µL)البلازميدي	5
الماء المقطر الخالي من الأيونات	3.5
الحجم النهائي	25

برنامج التفاعل لتضاعف جين VanB

جدول(8) يوضح الظروف المثلى لكوثرة *VanB* gene

المرحلة	درجة الحرارة المئوية	الوقت	عدد الدورات
مرحلة المسخ الأولي للدنا	95	5 دقائق	دورة واحدة
مسخ الدنا	95	1 ثانية	35 دورة
الالتحام	55	30 ثانية	
الاستطالة	72	1 دقيقة	
مرحلة الاستطالة النهائية	72	5 دقيقة	دورة واحدة

التحري عن جين مقاومة الفانكومايسين*VanC* gene على الدنا الكروموسومي بواسطة PCR استخدم مزيج التفاعل الموضح في الجدول (9).

الجدول (9) مزيج التفاعل الامثل لتضاعف الدنا الكروموسومي.

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
GoTaq®Green Master Mix	12.5
البادئ الأمامي لجين *VanC*	2
البادئ العكسي لجين *VanC*	2
DNA(100 ng/µL)الكروموسومي	3
Free nucleas D.W	5.5
الحجم النهائي	25

التحري عن جين مقاومة الفانكومايسين *VanC* gene على الدنا البلازميدي بواسطة PCR استخدم مزيج التفاعل الموضح في الجدول (10).

الجدول (10) مزيج التفاعل الامثل لتضاعف الدنا البلازميدي.

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
GoTaq®Green Master Mix	12.5
البادئ الأمامي لجين *VanC*	2
البادئ العكسي لجين *VanC*	2
DNA(50 ng/µL)البلازميدي	5
Free nucleas D.W	3.5
الحجم النهائي	25

برنامج التفاعل لتضاعف جين VanC

جدول (11) يوضح الظروف المثلى لكوثرة *VanC* gene

المرحلة	درجة الحرارة المئوية	الوقت	عدد الدورات
مرحلة المسخ الأولي للدنا	94	5 دقائق	دورة واحدة
مسخ الدنا	94	1 دقيقة	35 دورة
الالتحام	52	30 ثانية	
الاستطالة	72	1 دقيقة	
مرحلة الاستطالة النهائية	72	5 دقيقة	دورة واحدة

يبيّن جدول (12) البادئات التي صممت من قبل الباحث لهذه الدراسة باستخدام برنامج primers 3 plus و التي تستهدف جين 16SrRNA والجينات المقاومة لمضاد الفانكومايسين وجهزت بشكل مسحوق مجفد (Lyphilized) من شركة IDT Integrated DNA Technologies)) وقد تم إعادة تذويبها بحسب توصيات الشركة.

جدول (12) يبين البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

اسم البادئ	تسلسل القواعد 3 → 5	حجم الجين الهدف bp
VanA-F	GGGAAAACGACAATTGC	731
VanA-R	GTACAATGCGGCCGTTA	
VanB-F	ATGGGAAGCCGATAGTC	634
VanB-R	GATTTCGTTCCTCGACC	
VanC-F	GGTATCAAGGAAACCTC	800
VanC-R	TTCCGCCATCATAGCT	
16 *SrRNA*-F	GGATTAGATACCCTGGTAG TCC	331
16 *SrRNA*-R	TCGTTGCGGGACTTAACCC AAC	

النتائج و المناقشه:

العزل و التشخيص:

شملت الدراسة على جمع 374 نموذج من عينات سريرية لحالات مرضية مختلفة (الادرار، الخروج، الجروح، الحروق) وبيئية شملت التربة وماء نهر دجله لمدينة بغداد. تم جمع العينات السريرية من مستشفى ابن البلدي، واليرموك التعليمي، ومستشفى الإمام علي، للتحري عن وجود بكتريا *E.coli* في هذهِ العينات، شخصت العزلات المرضية لبكتريا *E.coli* بالطرائق التقليدية حيث ظهرت جميع العزلات النامية على وسط الـ MacConkey agar بشكل مستعمرات دائرية الشكل، وردية اللون، مخمرة للاكتوز، وعلى وسط (EMB) تكون بلون معدني براق، وظهرت تحتَ المجهر كعصيات صغيرة سالبة لملون كرام عند صبغها وأعطت نتائج الاختبارات الكيموحيوية كما في جدول (13)، وبناءاً على مجمل هذهِ الاختبارات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية ظهرَ انها تحمل صفات بكتريا الـ *E.coli* ولتأكيد هذا التشخيص استخدمَ نظام Api – 20 E للعائلة المعوية و جهاز $Vitek_2$ ويعتبر هذا التشخيص ذو تخصصية عالية، وأستناداً على نتائج التشخيص حصلنا على 77 عزلة لبكتريا الـ *E.coli* و بنسبه مئوية بلغت 20.58 %.

جدول (13) الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا الـ *E.coli*

اسم العزلة	Gram stain	Urease	Motility	Indol	Methylred	Vogas-Proskaure	Cimmon citrate	Cataluse	Oxidase	H_2S	Liquefication	Glucose	Lactose	Co_2
Escherichiq coli	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+

(+)= Positive (−)= Negative

إذ أظهرت نتائج العزل لهذهِ الحالات (الادرار، الجروح، الحروق، خروج) أن أكثر أعداد البكتريا المعزولة التي تم الحصول عليها كانت من عينات الادرار بنسبة 27.10% تليها عينات الخروج بنسبة 24.70% ثُم عينات الحروق بنسبة 17.07% والنسبة السريرية الأقل التي تمَ الحصول عليها هي عينات الجروح بنسبة 14.28% أما عينات التربة وماء نهر دجلة فإن نسبة العزل كانت 6.66% و 13.33% على التوالي، كما أن النسبة المئوية لجميع العينات التي أعطت فحص موجب 20.58% . اذ إن زيادة نسبة انتشار هذهِ البكتريا في المستشفيات وسرعة الإصابة بها كانت نتيجة انتشار الأوبئة والأمراض في المستشفيات بسبب هذهِ البكتريا [15] وهذه النسبه لا تتفق مع دراسه أخرى[13] فقد حصل باحثي هذه الدراسة على نسبة مئوية للإصابة بالـ *E.coli* كانت 27.06% لعزلات من حالات مرضية مختلفة. في حين حصلت أحدى الباحثات [17] على نسبة عزل 26.66% من ادرار نساء حوامل مصابات بداء السكري وهي نسبة مشابهة وتتوافق مع نتائج الدراسة الحالية، اما النسبة المئوية لتواجد هذهِ البكتريا في نماذج الخروج فقد ذكر باحثان[18] بأنهما قد حصلا على نسبة 24.28% لهذهِ البكتريا في نماذج خروج الأطفال في مستشفى ابن الأثير التعليمي للأطفال والراقدين والوافدين في مستشفى ابن سينا التعليمي في مدينة الموصل وهذهِ النتيجة تتوافق تماماً على ما تم الحصول علية في الدراسة الحالية (24.70%)، كما أشارَت دراسة أخرى حديثة [19]بأنه تم الحصول على نسبة 21.39% لتواجد نفس البكتريا في خروج لأطفال والبالغين مصابين بالإسهال الحاد في مستشفى ابن سينا في ايران، أما النسبة المئوية لتواجد هذهِ البكتريا في الحروق فقد أشار احد العلماء [20] الذي جمعَ نماذج الحروق من مستشفى مدينة الطب في بغداد وكانت النسبة التي حصلَ عليها 6.0% وهذهِ النتيجة لا تتوافق مع نتائج الدراسة الحالية، ويعزى السبب الى اختلاف عدد العزلات ومدة العزل و اختلاف في موقع العزل بالنسبه الى مدينة بغداد اذ ان الدراسة الحالية تركزت لاكثر من موقع من العاصمة . أما النسبة المئوية لتواجد هذهِ البكتريا في نماذج الجروح فقد أشارت الباحثة [21] بأنها قد حصلت على نسبة 12% من جروح في مستشفى الرمادي التعليمي وتتقارب هذهِ النسبة مع ما تمَ الحصول عليه في الدراسة الحالية (14.28%).

اختبار حساسية بكتريا *Escherichia coli* لمضاد الفانكومايسين(. 30 µg)

أجري اختبار الحساسية لبكتريا *Escherichia coli*، ضدَ المضاد الحيوي الفانكومايسين بطريقة الاقراص لتحديد مدى حساسية او مقاومة هذهِ العزلات اتجاه هذا المضاد الحيوي، إعتماداً على قطر منطقة التثبيط المحيطة بأقراص الفانكومايسين ومقارنتها بأقطار التثبيط

القياسية الواردة في NCCLS, 2013، . وقد تمّ اختبار حساسية بكتريا *E.coli* للفانكومايسين باستخدام 77 عزلة وتبين من النتائج بأن نسبة مقاومة هذهِ البكتريا بلغت 94.81% (73 عزله مقاومة و بقطر تثبيطي من 8 – 10 ملم) والمقاومة المتوسطة 5.19 % (4 عزلات ذات مقاومة متوسطة و بقطر تثبيطي من 13 –14 ملم) صوره (1) إذ أوضحت هذهِ النتائج إن معظم العزلات البكتيرية كانت مقاومة للفانكومايسين وهذهِ النتيجة متوقعة بسبب الاستعمال العشوائي والمفرط لهذا المضاد الحيوي.

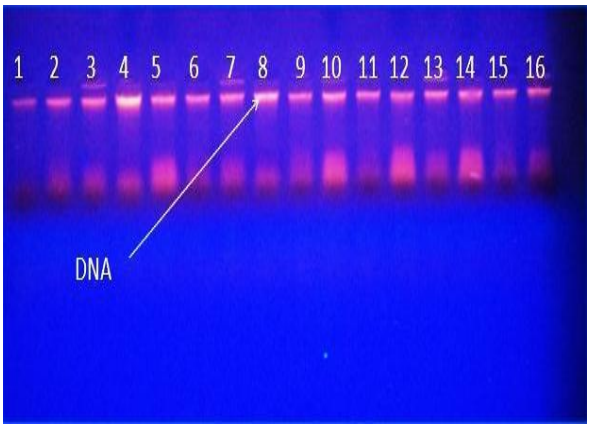
صوره (1) مظهر سطحي لوسط زرعي يوضح اقطار مناطق التثبيط لبكتريا *E.coli* لمضاد الـ Vancomycin (متوسطة المقاومه)

استخلاص الدنا الكروموسومي من العزلات البكتيرية:

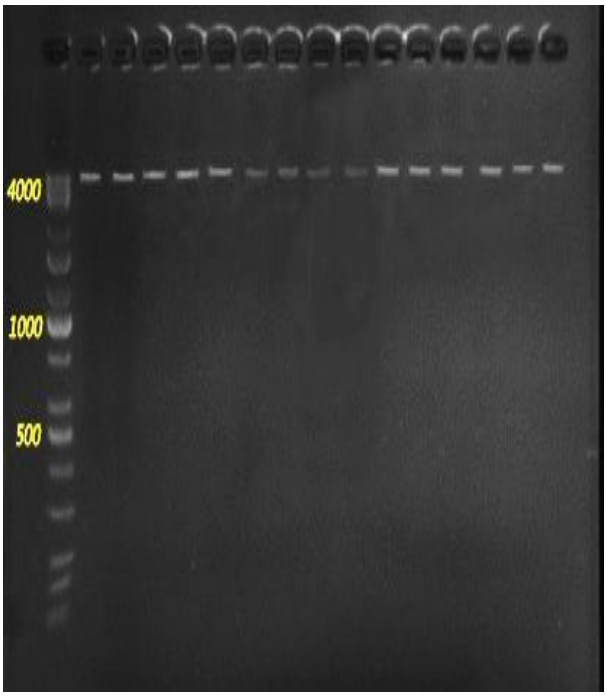
استخلص الدنا الكروموسومي لـ 31 عزلة من بكتريا *E.coli*، التي انتخبت من العينات التي حصلنا عليها وبعد ترحيل الدنا المستخلص على هلام الأكاروز أظهرت النتائج وجود الحزم وبشكل واضح في جميع العزلات المنتخبة، حيث كانت نقاوة الدنا الكروموسومي من 1.8– 2.0 وبتركيز من 200–600 نانوكرام / مايكرولتر .

استخلاص الدنا البلازميدي من العزلات البكتيرية:

أستخلص الدنا البلازميدي لجميع العزلات المنتخبة من العينات التي تمَ الحصول عليها، وكان بنقاوة 1.0– 1.8وبتركيز من 25–130 نانوكرام /مايكرولتر .



صوره (2) ترحيل الدنا الكروموسومي لعزلات من بكتريا *E.coli* على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، باستعمال ظروف ترحيل 5 Volt /cm لمدة ساعتين.

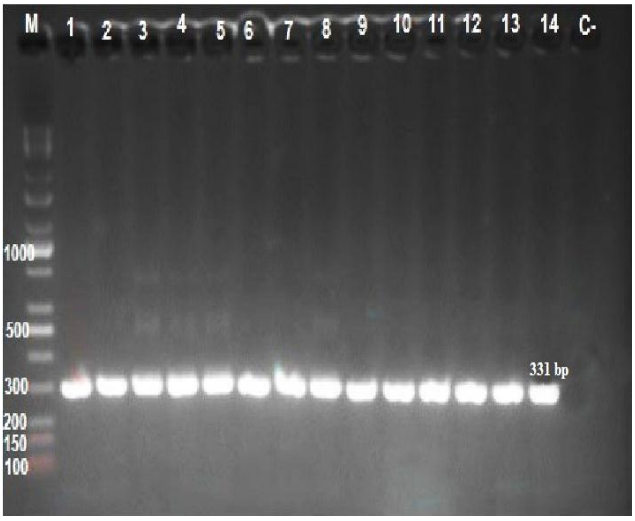


صوره (3)ترحيل الدنا البلازميدي لعزلات من بكتريا *E.coli* على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، باستعمال ظروف ترحيل 5 Volt /cm لمدة ساعتين.

التشخيص الجزيئي لبكتريا العائله المعوية باستخدام جين *16S rRNA* بواسطة PCR

استخدم بادئ نوعي ومتخصص لجين *16SrRNA* لتشخيص بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من عينات مرضية و بيئية وحددت الظروف المثلى لتفاعل الـ PCR، و اجري فحص البلمرة على 31 عزلة بعد تشخيصها بالطرائق التقليدية والطرائق الحديثة (Vitik2)، اظهرت النتائج وجود جين *16SrRNA* في جميع عزلات بكتريا

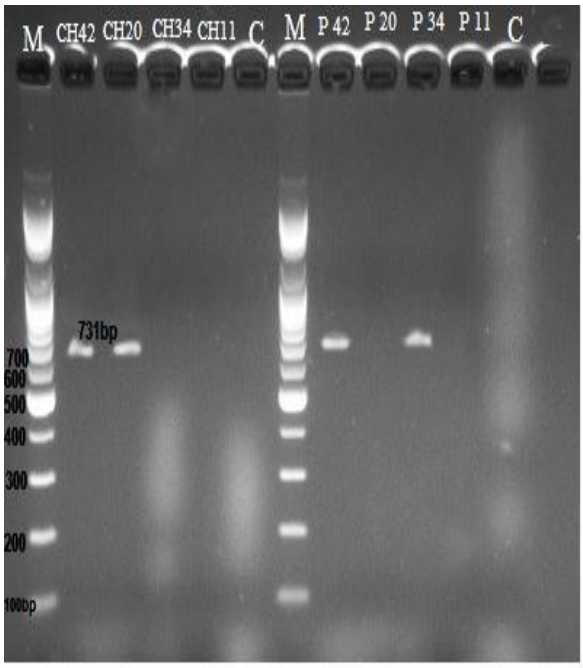
Escherichia coli بنسبة 100%, وهذا دليل على كفاءة هذه الطريقة في التشخيص لذا يمكن عدها طريقة تشخيصية فاعلة.



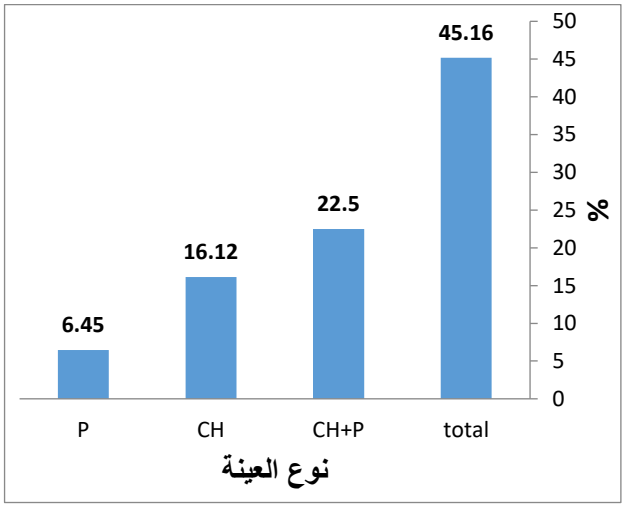
صوره (4) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الدنا الكروموسومي باستعمال البادئ 16SrRNA (331bp) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، M:الدليل الحجمي 100 bp،(1-14)عزلات موجبه،C معاملة السيطره السالبه.

الكشف عن جينات *Van* في بكتريا *Escherichia coli*

اجري اختبار تفاعل تضاعف سلسلتي الدنا الكروموسومي والبلازميدي بإستخدام الـ PCR (تفاعل البلمرة المتسلسل) باستعمال البادئات *VanA* و *VanB* و *VanC* بصور منفردة مع مزيج تفاعل الـ PCR (Conventional PCR) لـ 31 عزله من الدنا الكروموسومي والبلازميدي المنتخبة على أساس مقاومتها للمضاد الحيوي الفانكومايسين، وبعد ترحيل ناتج الـ PCR لعينات الدنا الكروموسومي والبلازميدي على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفحصه بالأشعة فوق البنفسجية ظهرت الحزم الناتجة من التضاعف اذ كانت نسبة ظهور جين *VanA* الكلية 45.16% والتي كان عددها 14 عزلة منها 7 عزلات وبنسبة 22.5% على الدنا الكروموسومي والبلازميدي معاً وكانت عدد العزلات التي تواجد فيها هذا الجين على الدنا الكروموسومي فقط هي 5 عزلات بنسبة 16.12%، أما العزلات التي وجد فيها الجين *VanA* على الدنا البلازميدي فهي عزلتين وبنسبة 6.45% . شكل (1)، صوره (5).



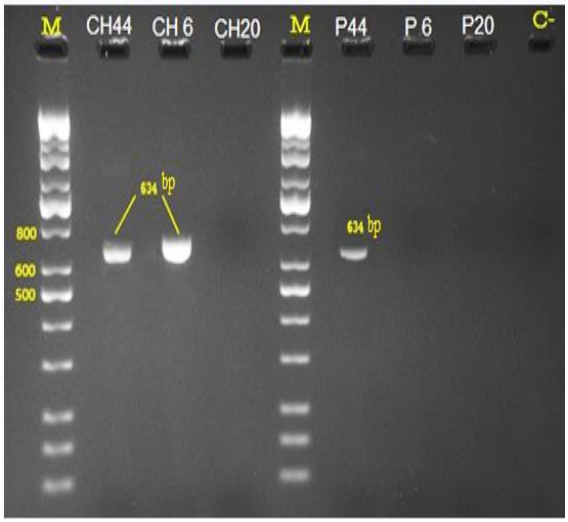
صوره (5) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلتي الدنا الكروموسومي و البلازميدي باستعمال البادئ VanA (731bp) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، M :الدليل الحجمي 100 bp،C معاملة السيطره السالبه،CH:يمثل الدنا الكروموسومي لاربع عزلات من E.coli،P:يمثل الدنا البلازميدي لاربع عزلات من بكتريا E.coli



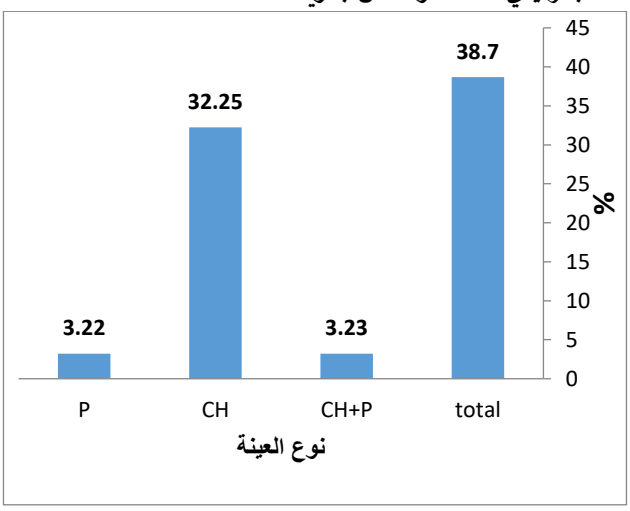
شكل (1) النسب المئوية لظهور جين VanA في بكتريا E.coli، total :النسبة المئوية الكلية لظهور الجين VanA، CH+P :النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا الكروموسومي و البلازميدي معا،P:النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا البلازميدي،CH: النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا الكروموسومي.

اما نسبة ظهور جين *VanB* الكلية فهي 38.70% و عدد العزلات التي ظهر فيها الجين 12 عزلة و عدد العزلات التي وجد فيها الجين *VanB* على الدنا الكروموسومي 10 عزلات وبنسبة 32.25%،

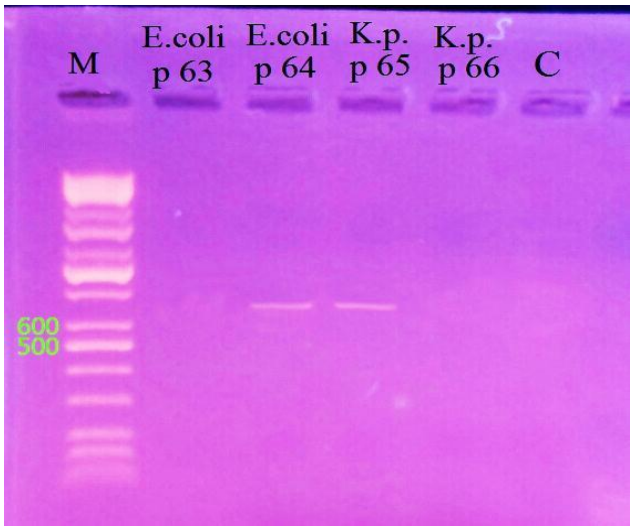
أما عدد العزلات التي تواجدَ فيها هذا الجين على الدنا الكروموسومي والبلازميدي معاً فكانت عزلة واحدة وبنسبة 3.23% شكل (2)، صوره (6)، كما وجد هذا الجين على الدنا البلازميدي في عزله واحده فقط (عزله رقم 64 عزله بيئية) صوره (7) و بنسبة 3.22%.



صوره (6) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلتي الدنا الكروموسومي و البلازميدي باستعمال البادئ *VanB* (634bp) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، M:الدليل الحجمي 100 bp، C معاملة السيطرة السالبة،CH:يمثل الدنا البلازميدي لثلاثة عزلات من *E.coli*، P:يمثل الدنا البلازميدي لثلاثة عزلات من بكتريا *E.coli*.

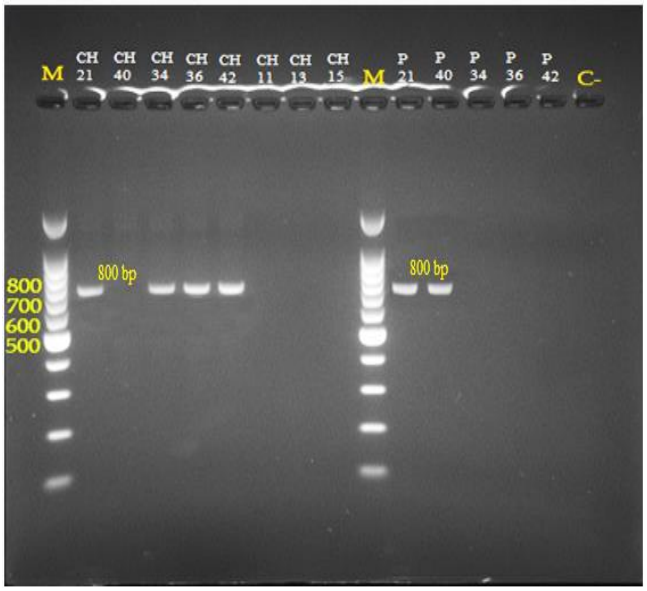


شكل (2) النسب المئوية لظهور جين VanB في بكتريا E.coli، total :النسبة المئوية الكلية لظهور الجين VanB، CH+P : النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا الكروموسومي و البلازميدي معا،P:النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا البلازميدي،CH: النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا الكروموسومي.



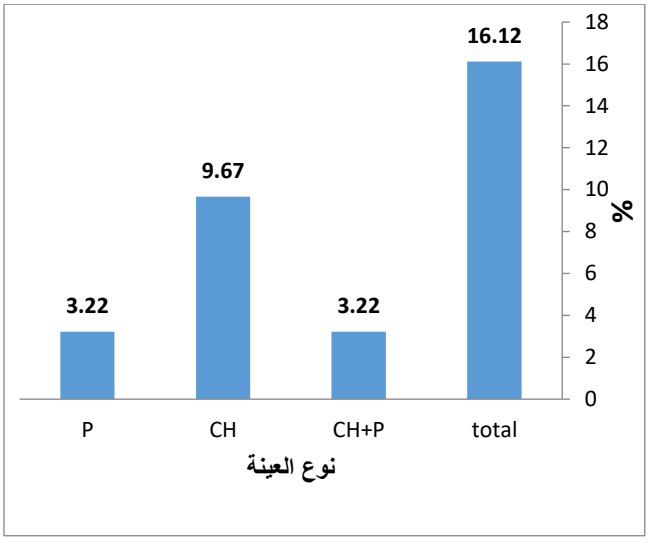
صوره (7) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الدنا البلازميدي باستعمال البادئ VanB (634bp) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، M:الدليل الحجمي 100 bp، C معاملة السيطره السالبه،P:يمثل الدنا البلازميدي لعزلتين بيئية من بكتريا E.coli و عزلتين بيئية من بكتريا Klebseilla (K.p.).

أما ما يخص نسبة ظهور الجين *VanC* الكلية لهذه البكتريا كانت16.12% وعدد العزلات التي ظهر فيها الجين هي 5 عزلة, كما ان هنالك 3 عزلات تواجد فيها هذا الجين على الدنا الكروموسومي فقط وبنسبة 9.67% وعزلة واحدة وجد فيها هذا الجين على الدنا الكروموسومي والبلازميدي وبنسبة 3.22%، ووجد هذا الجين على الدنا البلازميدي في عزله واحده فقط وبنسبة 3.22% شكل(3)، صوره (8).



صوره (8) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلتي الدنا الكروموسومي و البلازميدي باستعمال البادئVanC (800bp) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، M:الدليل الحجمي 100 bp، C معاملة السيطرة

السالبة،CH:يمثل الدنا الكروموسومي لثمانية عزلات من P،E.coli:يمثل الدنا البلازميدي لخمسة عزلات من بكتريا E.coli

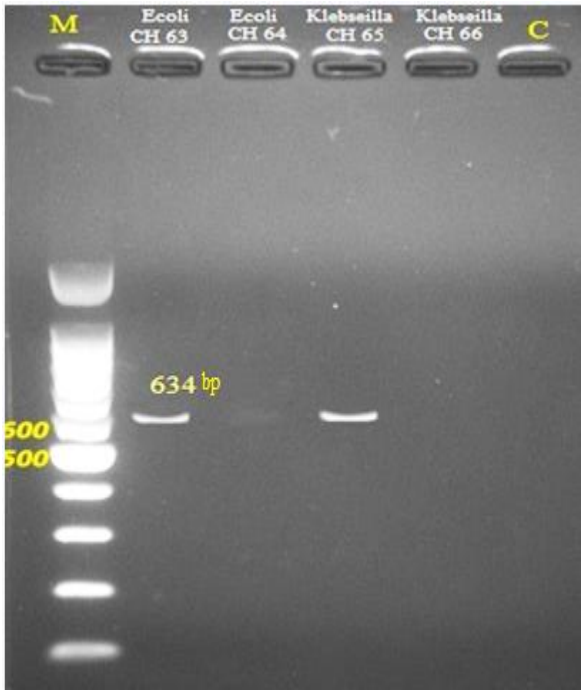


شكل (3) النسب المئوية لظهور جين VanC في بكتريا E.coli، total :النسبة المئوية الكلية لظهور الجين VanC، CH+P :النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا الكروموسومي و البلازميدي معا،P:النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا البلازميدي،CH: النسبة المئوية لتواجد الجين على الدنا الكروموسومي.

وقد عزى الباحث[22] ظهور الجين *VanA* في عزلات بكتريا *E.coli* وعدم ظهور جين *VanB* لان *VanA* أكثر شيوعاً كما أشارَ الى أن هذهِ الدراسة الاولى التي تم الكشف عن ظهور هذا الجين في تركيا لعزلات بكتيرية عائدة للعائلة المعوية.

اختلفت نتائج الدراسه الحالية مع دراسات اخرى حول الوزن الجزيئي للجين *VanA* وذلك لاختلاف تصميم البادئات لكل دراسة، حيث برهنت الدراسة الحالية بأن الوزن الجزيئي لجين *VanA* هو 731 bp في حين بينت دراسة أخرى[23] صممت البادئ لدراستها بوزن جزيئي 1030 bp، اما العالم [24] فقد بين ان ناتج الجين المدروس بوزن جزيئي 1114 bp كما و حصل[25] على الجين نفسه بوزن جزيئي 433 bp، كما أشارت دراسة أخرى [23] بأن نسبة 40 % من عزلات *Streptococcus epidermis* ظهر فيها الجين *VanA* ولم يظهر الجين *VanB* علماً بأنها قد جمعت 90 عزلة لحالات مرضية مختلفة (الادرار والحروق والجروح). وأشارَ العالم[26] الذي كانت دراسته على مسحات من مخرج الحمام وحصل على الجين *VanA* وبنسبة 8.33% من بكتريا *Enterococcus faecalis*، كما أظهرت نتائجه ظهور الجين*VanC* بنسبة 16.66% من بكتريا *Enterococcus galinarum* وتوافقت نتائج ظهور الجين *VanC* بنسبة 16.12% في الدراسة الحالية مع نتائج نفس العالم [26] و هي 16.66%، كما

وذكرَ مجموعة من الباحثين [27] في بحثهم الذي جمع فية 95 عزلة من مختلف بكتريا *Enterococcus spp.* (*Ent. Faecium , Ent. Durans*) وكانت نسبة تواجد جين *VanB* هي 7.3% مع عدم ظهور جين *VanC* و *VanA*، وأشارت الباحثة[28] التي عملت على عزل وتشخيص *Staphylococcus spp.* لـ 86 عزلة سريرية و 73 عزلة بيئية اظهرت نتائجها وجود عزلة واحدة طرازها الجيني *VanA* وطرازها المظهري *VanB* استنادا الى شدة حساسيتها لمضاد الفانكومايسين، حيث تتوافق هذهِ النتائج مع ما تمَ الحصول علية في الدراسة الحالية حيث أظهرت وجود عزلة واحدة فقط من بكتريا *E.coli* الطراز المظهري *VanB* والطراز الجيني *VanA* وهي عزلة رقم 42 صوره (5)، و توافقت النتائج مع نتائج الباحث[29] الذي عمل على 17 عزلة من بكتريا *Enterococcus spp.* وعزى وجود الوبائية الى ظهور عزلات تمتلك الطراز المظهري *VanB* والطراز الجيني *VanA* التي تسبب الاصابات السريرية، و من نتائج هذهِ الدراسة ترحيل نواتج PCR وظهور الجين *VanB* لعزلتين *E.coli* بيئية رقم 63 على الدنا الكروموسومي صوره (9) و 64 على الدنا البلازميدي صوره (7) اذ تقاربت النتيجه مع نتائج الباحثة [28] التي ظهرَ في نتائج دراستها الجين *VanB* في عزلة بيئية واحدة.



صوره (9) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الدنا الكروموسومي باستعمال البادئVanB (634bp) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، M:الدليل الحجمي 100 bp،C معاملة

السيطره السالبه،CH:يمثل الدنا الكروموسومي لعزلتين من بكتريا E.coli بيئية وعزلتين بيئية من بكتريا Klebseilla

اذ قدم مجموعة من الباحثين[30] دراسة حول المجتمعات المايكروبية في التربة وقدموا توصيف للجينات التي تمنح مقاومة اتجاه المضادات الحياتية لسلالة غير مقاومة من بكتريا *E.coli* من خلال الية انتقال بين الخلايا الجرثومية تعرف cell to signaling cell اذ حددوا ما يقرب على 3000 جين مانح للمقاومة لمضادات مختلفه، وتظهر هذهِ الدراسة بوضوح وجود تنوع إستثنائي من الجينات المقاومة للمضادات الحياتية في الطبيعة.

وكان من اهم نتائج دراسة أجريت في بوخارست[31] الذي قامَ بعزل 23 عزلة من المكورات المعوية في رومانيا واستخلصَ الدنا البلازميدي لهذهِ العزلات حيث وجد جين *VanA* على الدنا البلازميدي في 12 عزلة وبنسبة 52.17% مع عدم ظهور الجين *VanB* و *VanC* في هذهِ العزلات وهذهِ النتائج لم تتفق مع تمَ الحصول علية في الدراسة الحالية، وكانت من نتائج هذا البحث امتلاك بكتريا الـ *E.coli* للطرز الثلاثه من جينات *Van*، كما قامَ مجموعة من الباحثين المصريين[32] بإجراء تجارب إصابة الاسماك بالمكورات المعوية المقاومة للفانكومايسين حيث لاحظوا ظهور جين *VanC* في عزلتين من بكتريا *Enterococcus gallinarum* وكذلك *VanA* في أحد عزلات بكتريا *Enterococcus faecalis* وكانت نتائج بحثهم قد سلطت الضوء على الدور المحتمل للبيئات المائية القريبة من الأنشطة البشرية في تحديد انماط المقاومة المايكروبية للمكورات المعوية التي إستردت من الأسماك واشاروا الى ضرورة الاستمرار في مثل هذهِ الدراسات لبيان خزانات مقاومة المضادات الحيوية في البيئة المائية،

وضح مجموعة من الباحثين[33] بأن هنالك بلازميدين: الأول pAMβ1 في بكتريا *Enterococcus faecalis* وبلازميد pIP501 في بكتريا *Streptococcus spp.* هما المسؤولان عن نشر المقاومة الحيوية لمضادات مختلفة الى بكتريا الموجبة لملون كرام، كما وضحت نتائج بحث اخر [34] الى أن البلازميد pIP501 أظهرَ القابلية على الانتقال الى بقية بكتريا السالبة لملون كرام مثل بكتريا *Escherichia coli*، كما اكد[35] على قابلية هذهِ البلازميدات للإنتقال من خلية الى اخرى والتي تتضمن عدد من البلازميدات التي تشفر للجين *tre*.

المصادر

1-Korzeniewska , E.; Korzeniwska, A. and Harnisz, M. (2013). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 91:96-102.

2-Nielsen, K.L., Dynesen, P.; Larsen, P. and Frimodt-Moller, N. (2014). Faecal Escherichia coli from patients with Escherichia coli urinary tract infection (UTI) and healthy controls who have never had UTI. J. Med. Microbiol. 25:1083-1099.

3-Bexiga, R .; Koskinen, M.T.; Holopainen, J.; Carneiro, C.; Pereira, H.; Ellis, K.A. and Vilela, C.L. (2011) . Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. J. Dairy Res., 78: 49–55.

4-Pena,I,; Picazo, J.J; Rodriguez-Avial, C.; Rodriguez-Avial, I. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1 -producing Klebsiella pneumoniae ST11

Resistant Reference Strain, Enterococcus faecium ATCC 51559. Genome a Journals.asm.org. 3 (5): 1-2.

12- Sivertsen,A.;Pedersen,T.;Larssen,K.W.;Bergh,K.;Ronning,T.G.;Andreas Radtke,A. and Hegstada, K. (2016). A Silenced VanA Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci.American Soc. Microbiol . Chemother. 60 (7).4119-4127.

13-Lu ,X.; Nie ,S.; Xia,C.; Huang,L.; He,Y.; Wu,R.; and Zhang,L.(2014). A rapid two-step algorithm detects and identifies clinical macrolide and beta-lactam antibiotic resistance in clinical bacterial isolates. J. Microbiol. Methods. 102 : 26–31.

14-Paniagua- Conteras , G.L.; Hernandez- Jaimes, T.; Monroy – Perez, E.; Vaca-Paniagua, F.; Diaz-Velasguez, C.;Uribe-Garcia, A. and Vaca, S. (2017) . Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic Escherichia coli strains. Microbial. Pathogensis, 103:1-7.

15-Ben-Ami , R.; Rodriguez-Ban, O. J.; Arslan, H.; Pitout, J.D.D.; Quentin, C.; Calbo, E.S.; Azap, O.K.; Arpin, C.; Pascual, A.; Livermore, D.M.; Garau, J. and carmeli, Y. (2009). Amultinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing Entrobacteriaceae in non-hospitalized patients. J.Clin. Infect. Dis.,49:682-690.

16-VandePitte J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, C.C. (1991) . Basic Laboratory Procedures in Clinical bacteriology. WHO., Geneva., P: 78-110.

17-الشويلي، شهرزاد نجم عبدالله.(2012). عزل وتشخيص البكتريا المسببة لالتهابات المسالك البولية عند النساء الحوامل المصابات وغير المصابات بداء السكري ومن اطفالهن حديثي الولادة و دراسة مقاومتها للمضادات الحياتية. مجلة علوم المستنصرية .المجلد 23،العدد 1.

isolates. Int. J. Antimicrob . Agents. 43(5):460 - 464.

5-Moura , I.; Torres, C.; Somalo, S.; Igrejas,G .and Poeta,P. (2013) . Genomic Description of Antibiotic Resistance in Escherichia coli and Enterococci Isolates from Healthy Lusitano Horses. J. Equine Vet. Sci. , 33(12) : 1057–1063.

6-Koo, H.J. and Woo, G.J. (2011). Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in Escherichia coli isolated from meat and meat products. Int. J. Food Microbiol.,145:407-13 .

7-Matsumura, Y.; Tana Ka, M.; Yamamoto, M.; Nagao, M.; Machida, K.; Ito, Y.; Takakura, Sh.; Ogawa, K.; Yoshizawa, A.; Fujimoto, Y.; Okamoto, Sh.; Uemoto, Sh. and Ich Iyama, S. (2015). High prevalence of carbapenem resistance among plasmid mediated AmpC B-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae during outbreaks in liver transplantation units. Int. J. antimicro.agents. 45: 33-40.

8-Shamweel ,A. and Ashraf, A. (2015). Phenotypic and molecular characterization of nosocomial K. pneumoniae isolates by ribotyping. J. Adv. Med. Scie. 60: 69–75.

9-Matsumura, Y.; Yamamoto, M.; Nagao, M.; Hotta, G.; Matsushima, A. and Ito, Y. (2012) . Emergence and spread of B2-ST131-O25b,B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum β- lactamase-producing Escherichia coli in Japan .J. Antimicrob. Chemother. 67 :2612–2620.

10- Wardal,E.; Gawryszewska,I.; Hryniewicz,W.; Sadowy,E.(2013) . Abundance and diversity of plasmid-associated genes among clinical isolates of Enterococcus faecalis . Plasmid., 70:329–342.

11-Sung ,K.; Khan,S.; Marasa,B.;Min,S.; Kweon,O.; Mohamed,N. and Cernigliaa,C.(2015). Draft Genome Sequence of a VanA-Type Vancomycin-

18-العكيدي،محسن ايوب عيسى. والعكيدي، انغام جبار علوان. التحري عن السلالة *E.coli* O157:H7 ضمن مسببات الاسهال الدموي للأطفال دون سن الخامسة في محافظة نينوى. (2013). مجلة تكريت للعلوم الصرفة، مجلد18، العدد(1) الصفحات (1-16).

19-Alikhani ,M.Y.; Hashemi,S.H.; Aslani,M.M. and Safar Farajnia,S.(2013) Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic Escherichia coli isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran.Iranian J. Microbiol., 5 (1) : 42-47.

20-AL-kaabi,S.A.G.(2013) Bacterial Isolates and their Antibiograms of Burn Wound Infections in Burns Specialist Hospital in Baghdad. Baghdad Science Journal.,10(2):331-340.

21-AL-Ithawy ,T.A.A.M. (2015) . Molecular diagnosis of bacteria which are important pathogically and determining their resistance to antibiotics by using Multiplex PCR. M.Sc. thesis College of Science, AL-Anbar University ,Iraq.

22-Cardak, M.; Altug, G.; Ay, M. and Erol, O.(2016) . Distribution of antibiotic resistance and the presence of vancomycin-resistance genes (VanA and VanB) in Enterobacteriaceae isolated from the Sea of Marmara, the Canakkale Strait and the Istanbul Strait, Turkey.Int. J. Oceanog. Hydrobiolo. Volume 45, Issue 2, June . p: 182-190.

23-Barees,M.K.A.(2014) . Autolysin Gene Detection in Vancomycin Resistant Staphylococcus epidermidis. M.Sc. thesis, College of Science, Baghdad University, Iraq.

24-Lim, Y.; Jana, M.; Luong, T.T. and Lee, C.Y.(2004). Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol.186:722–729.

25-Kariyama, R.;Mitsuhata, R.; Chow, J .W.; Clewell, D. B.; Kumon, H.(2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J. Clin. Microbiol . 38:3092–3095.

26-Radimersky,T.; Frolkova1,P.; Janoszowska1,D.; Dolejska1,M.; Svec,P.; Roubalova1,E.; Cikova1,P.; Cizek,A. and Literak,I.(2010). Antibiotic resistance in faecal bacteria (Escherichia coli, Enterococcus spp.) in feral pigeons. J.App. Microbio.109, 1687–1695 .

27-Buyukyoruk, S.; Dayaz,N.; Gencay,Y.; Beyaz,D. and Kocak,P.(2014). Species distribution, molecular characteristics and vancomycin resistance gene profiles of Enterococcus sp. isolates from farmhouse cheeses in western Turkey. Int. J. Dair. Tech., 67(1) :103-109.

28-Hadi,Z.A.(2013) . Determination of Vancomycin and Teicoplanin resistance type in Methicillin Resistant_ Staphylococcus spp. isolated from clinicl and enviromental sources. M.Sc. thesis, College of Science, AL- Mustansiriyah University ,Iraq.

29-Somily,A.M.;Al-Mohizea,M.M.; Absar,M.M.; Amal J. Fatani,A.J.; Ridha,A.M.; Al-Ahdal,M.N.; Senok, A.C.and Al-Qahtani,A.A.(2016) Molecular epidemiology of vancomycin resistant enterococci in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. Microbial. Pathogenesis, 97:79-83.

30-McArthur, A.G.; Waglechnera, N,; Nizama, F .; Yana, A.; Azada, M. A.; Baylayc, A. J.; Bhullara, K.; Canovaa, M.J.; Pascalea, G.D.; Ejima, L.; Kalana, L.; Kinga,A.M.; Kotevaa, K.; Morara, M.; Mulveyd,M.R,;O Briena,J.S.; Pawlowskia,A.C.; Piddockc, L.J.V.; Spanogiannopoulosa ,P.; Sutherlanda, A.D.; Taylora,P.L.; Thakera,M.; Wanga,W.; Yana, M.; Yua,T. and Wrighta, G.D. (2013) .The

comprehensive antibiotic resistance database. Antimicrob Agents Chemother.American soc. Microbio. 57: 3348–3357

31-Algbori ,S.K.M.(2017) . Antibiotic resistance markers in Enterococcus sp. nosocomial isolates. M.Sc. Thesis , College of Science , Bucharest University,Romania.

32-Osman,K.M.; Ali,M.N.; Radwan,I.; Elhofy,F.; Abed,A.H.; Orabi,A. and Fawzy,N.M.(2016) . Dispersion of the Vancomycin Resistance Genes VanA and VanC of Enterococcus Isolated from Nile Tilapia on Retail Sale: A Public Health Hazard. Frontiers in Microbiology Front. Microbiol. Article 1354 , 7:1-9.

33-Palmer, K.L.; Kos,V.N. and Gilmore,M.S.(2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology . 13:632–639.

34-Kurenbach, B.; Bohn, C.; Prabhu, J.; Abudukerim, M.; Szewzyk, U. and Grohmann, E.(2003) . Intergeneric transfer of the Enterococcus faecalis plasmid pIP501 to Escherichia coli and Streptomyces lividans and sequence analysis of its tra region. Plasmid, 50:86-93.

35-Grohmann, E.; Muth, G. and Espinosa, M. (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. Microbiol Mol. Biol. Rev., 67(2): 277-301.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2017,11 (3) :01-14

Detection of acquired resistance genes for vancomycin in local isolates *Escherichia coli* and its relationship with other resistance models

Shahad Hisham Mahmood , Ahmed Mohamed Turkey and Ilham Abdulhadi Khalaf

Shahad_eye@yahoo.com

Abstract

This study included the collection of 374 samples (distributed according to the source of collection) as clinical samples (urine, wounds, burns, feces) from Ibn – Al – Baladi childbirth Hospital, AL- Yarmouk Teaching Hospital and Imam Ali Hospital in Baghdad, from both genders of different ages. As well as environmental samples (Tigris river water in Baghdad and soil samples) were collected from Baghdad region at the same period. The bacterial isolation and identification were conducted on a total of 77 isolates of *Escherichia coli* (20.58%) after their testing on culture media , microscopic examination with the biochemical tests by using Api – 20 E and VITEK2. The results of sensitivity test against vancomycin showed that 73 isolates of *Escherichia coli* resistant (94.18%) and 4 isolates with intermediate resistance (5.19%) were performed on Muller-Hanton agar using disk diffusion method . Chromosomal and plasmid DNA were extracted for 31 isolates in a molecular techniques for precise identification. Molecular detection was achieved for all isolates (of various pathogens) by using a specific *16SrRNA* gene . Owing to the resistance and sensitivity results obtained with the method diagnosis,29 clinical and 2 environmental samples were selected for detection and molecular study . This molecular study detected the vancomycin resistance genes of *Enterobacteriaceae* in Iraq for the first time . Both chromosomal and plasmid DNA were used in PCR technique to diagnose the Vancomycin resistance genes by using specific primers (*VanA,VanB,VanC*) . Results of the electrophoresis on agarose gel cleared that all isolated *Escherichia coli* possessed resistance gene on their plasmid DNA or chromosomal DNA or on both of them with variable ratios .