Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 42 No.1 (2026): 60 -71

مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 42-عدد 1 (2026): 60- 71

الكشف عن النمط الوراثي البلازميدي للبيتالاكتاماز واسعة الطيف ESBLS في عزلات جراثيم *E. coli* من المخلفات السائلة لصرف بعض مستشفيات جامعة دمشق

آسيا أحمد خطاب*[1]، عدنان أحمد علي نظام[2]، لينة عبد الكريم الأمير[3]

قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، ميكروبيولوجيا
asia.khattab@damascusuniversity.edu.sy
أستاذ دكتور في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، ميكروبيولوجياتطبيقية (ميكروبيولوجيا المياه)
a.nizam@damascusuniversity.edu.sy
باحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية. دمشق. سوريا، ميكروبيولوجيا جزيئية، alamir@ncbt.gov.sy

تاريخ الإيداع: 2024/03/12
تاريخ القبول: 2024/07/20

حقوق النشر : جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

الملخص

أمكن في البحث الحالي تحديد نوع إنزيمات البيتالاكتاماز في بعض عزلات جراثيم *E. coli* المعزولة من المخلفات السائلة لصرف بعض مستشفيات جامعة دمشق، واستخلاص البلازميدات بطريقة الغلي والطريقة القلوية، وقد بيّنت النتائج أن الطريقة الفضلى لعزل البلازميدات هي الغلي. وللتأكد من كون الصفة محمولة على البلازميدات أُجريت عملية تحييد للبلازميدات بطريقتين الأولى برفع درجة حرارة الحضن إلى 42 مْ وإعادة الاستزراع 8-10 مرات والطريقة الثانية بإضافة مركب SDS (بتراكيز 1.25% و2.5% و5%) عند استزراع الخلايا، وقد تبين أن رفع درجة الحرارة هي الطريقة الأفضل. واستعمل نمطين من المثبطات الإنزيمية clavulanic acid و sulbactam لتحديد الإنزيم الذي تنتجه المعزولات قيد الدراسة، كما انتُقيت مجموعتان من المرئسات تنتميان إلى نمطين مختلفين (CTX و SHV) تعودان إلى الصف نفسه بغرض تحديد المجموعة التي ينتمي إليها الإنزيم. بينت النتائج أن البيتالاكتاماز واسعة الطيف (ESBLS) تنتمي إلى الصف A وهي الأكثر تواتراً ضمن هذ البحث لاسيما تلك التي تعود إلى المجموعة CTX.

الكلمات المفتاحية: البيتالاكتاماز، البيتالاكتاماز واسعة الطيف، تحييد البلازميد، المخلفات السائلة للمستشفيات

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

Detection of the plasmid-borne of Extended Spectrum Beta-Lactamases in *E. coli* isolates from some Damascus University's hospital wastewater

Asia Ahmad Khattab[1], Adnan Ahmad Ali Nizam [2], Lina Abd Alkarem Alamir [3]

Department of Plant Biology, Faculty of Science, Damascus University, microbiology asia.khattab@damascusuniversity.edu.sy

Prof. Dr. Department of Plant Biology, Faculty of Science, Damascus University, a.nizam@damascusuniversity.edu.sy

Researcher. National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria, molecular microbiology, alamir@ncbt.gov.sy

Received: 12/03/2024
Accepted: 20/07/2024

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract

The type of beta lactamases was determined in *Escherichia coli* isolates from waste water of some of Damascus University's hospitals. Plasmids were extracted using the boiling method and the alkaline method. Results showed that boiling method is the most convenient method for plasmid extraction. Plasmid curing was carried out by applying two methods; the first was by incubation at 42 C° and subculturing 8-10 times, the second method was by adding SDS concentration of 1.25%, 2.5% and 5%. The best curing result was obtained using the subculturing method at 42C°.

Two types of enzyme inhibitors (Clavulanic acid and sulbactam) were used to determine the type of the beta lactamase produced by the studied isolates. DNA primers used in this study belonged to two different groups (SHV and CTX) to determine the group to which enzymes belong. Results obtained showed that ESBLS of class A belonging to group CTX appeared to be most frequent among the studied isolates

Key Words: Beta-lactamase, ESBLS, plasmid curing, hospital waste water.

المقدمة Introduction

يعدّ التغير الوراثي في الجراثيم المسؤول عن المقاومة للصادات الحيوية غالباً، ويشمل: المقاومة الصبغية والترانسبوسونية والبلازميدية التي تحمل مورثات عديدة ترمز للإنزيمات التي يمكنها تفكيك الصادات الحيوية، وقد تحتوي الخلية أكثر من نسخة وكذلك بأحجام مختلفة (Davies; 1994, Blair; *et al.* 2014). وقد بيّنتْ الاختبارات على الجراثيم المقاومة للصادات التي تعود لأنواع مختلفة مثل الإشريكية القولونية *Escherichia coli* أن 44% من العزلات تحمل بلازميدات مقاومة للصادات (Abiodun; 2012).

تتفكك صادات البيتالاكتام بعدد من إنزيمات البيتالاكتاماز واسعة الطيف Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) التي تنتجها الأمعائيات، وهذه الإنزيمات تسبّب مشكلة صحية كبيرة في المستشفيات والمجتمع (Maina *et al.*; 2012)، إذ تحلمه كلاً من الجيل الأول والثاني والثالث والرابع من السيفالوسبورينات والمونوباكتام، لكنها تتثبط بعدد من المثبطات مثل clavulanic acid وsulbactam وtazobactam، وتتميز بمورثات Bla SHV وBla TEM، برغم أن معظم المورثات المكتشفة حديثاً هي تراكيب متنقلة transposon مثل Bla CTX-M وBla GES وBla VEB-1 (Jacoby *et al.*; 1991, Bonnet *et al.*; 2000, Pitout *et al.*; 2006, Manoharan *et al.*; 2011, Moghaddam *et al.*; 2015).

يمكن أن يحدث تحييد البلازميدات على نحو طبيعي إذا كان البلازميد يحمل مورثات لحماية الخلية تحت ظروف معينة، إذ تتوقف عملية تضاعف البلازميدات داخل الخلية عند زوال هذه الظروف، وقد يكون التحييد قسرياً لأسباب أخرى مثل الاستزراع المتكرر للخلايا، أو تغيير pH أو النمو في درجات حرارة عالية ولكن دون المميتة الذي يؤدي إلى زيادة نضوحية الأغشية وخروج البلازميد، أو تتحيد البلازميدات عند استعمال بعض المواد مثل: Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) وEthidium Bromide (ETBR) وAcridine Orange (AO) (Paul *et al.*, 2019).

يهدف البحث الحالي إلى تحديد المجموعة التي ينتمي إليها البيتالاكتاماز الذي تنتجه بعض عزلات *E. coli* الموجودة في عينات المخلفات السائلة لمستشفيات جامعة دمشق، وتحديد البلازميد الحامل للمورثة المرمزة للإنزيم، نظراً إلى الانتشار الواسع لمقاومة الصادات الحيوية لاسيما السيفالوسبورينات وانتقال المقاومة إلى الجيل الثالث منها في المجتمع المحلي.

مواد البحث وطرائقه Materials and Methods

عزل الجراثيم: عُزلت الإشريكية القولونية *E. coli* من المخلفات السائلة لمستشفيات جامعة دمشق وهي المواساة والأسد والأطفال والتوليد، ثم أجري تعريف للنوع اعتماداً على مظهر المستعمرة والاختبارات الحيوية الكيميائية، وتحديد حساسيتها لمجموعة من صادات البيتالاكتام، والكشف عن البيتالاكتاماز (خطاب وآخرون، 2023)، وتم تحديد الإنزيمات واسعة الطيف بطريقة NCCLS حسب (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) التي تعتمد على طريقة الانتشار القرصي المضاعف فقد تمت المقارنة بين قطر هالة التثبيط في حال إضافة قرص يحتوي على الصاد الحيوي بمفرده وقطر هالة التثبيط عند إضافة قرص يحتوي على الصاد مع المثبط Clavulanic acid 5µg وقرص آخر يحتوي على الصاد الحيوي مع المثبط Sulbactam15 µg (وكانت الأقراص منتجة من قبل شركة Abtek) (Giriyapur, *et al.*, 2011; Tenover *et al.*, 2003).

استخلاص البلازميد بعد تنمية الجراثيم في المرق المغذي nutrient broth بإضافة 10 ميكرولترات من الخلايا المنشطة لكل 1 مل من المرق المغذي الحاوي على السفترياكسون بتركيز 150 مكغ/ مل مدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م، استُخلص البلازميد بطريقتي الغلي Boiling method (Dillon, 1985) والطريقة القلوية Alkaline method (Bennet *et al.*, 1986).

– طريقة الغلي Boiling method (Dillon, 1985; Nazik *et al.*, 2011): تم تثفيل 1.5 مل من المرق المغذي الحاوي على الجراثيم بسرعة 4000 دورة / دقيقة وفصل الطافي عن راسب الخلايا، وغسلت الخلايا بعدها بـ500 ميكرولتر من المحلول TE (0.01 مول من Tris base مع 0.001 من EDTA عند pH 8) وأعيد تثفيلها بالطريقة السابقة نفسها، ثم أُضيف لراسب الخلايا 380 ميكرولتر محلول STET (0.05 مول من محلول Tris base و 0.05 مول من EDTA وسكروز 8% وتريتون Triton x100

عند pH 8) و20 ميكرولتر من إنزيم الليزوزيم ذي التركيز 10 ملغ/ 1 مل والمذاب في محلول STET، وحضن المزيج بدرجة حرارة 37 م مدة 60 دقيقة. ثم وضع المزيج في الثلج مباشرة مدة 60 دقيقة ونقل بعدها إلى حمام مائي بدرجة الغليان مدة دقيقة ثم أعيد إلى الثلج مباشرة وترك مدة 60 دقيقة وتم التثفيل بعدها بدرجة حرارة 4 مْ وبسرعة 10000 دورة / د مدة 10 دقائق، فصل الطافي ونقل إلى أنبوب آخر وأضيف إليه حجم مماثل من محلول ترسيب البروتين (كحول إيزوايميلي وكلورفورم بنسبة 48:2) مع الرج بلطف، ثم وضع في الثلج مدة 30 دقيقة وأعيد تثفيل المزيج بعدها بسرعة 10000 دورة/ د مدة 10 دقائق بدرجة حرارة 4 مْ، عندئذ أخذت منه الطبقة العليا وأضيف إليها ما يعادل حجمها حجمين من الإتانول 96% المبرد مع التحريك البطيء وأعيد وضعه في الثلج مدة 60 دقيقة وتم التثفيل بعدها مدة 45 دقيقة بسرعة 10000 دورة/ د ثم تم التخلص من الرائق، وغسل الراسب بـ 50 ميكرولتراً من الإتانول 70% بعدها أزيل الإتانول وطُبّق التجفيف بقلب الأنبوب على ورق ترشيح، وتمت إذابة الـ DNA في 20 ميكرولتر من محلول TE السابق الذكر.

2– الطريقة القلوية Alkali method (Bennet et al, 1986): ثفل 1.5 مل من المرق المغذي الحاوي على الجراثيم ثم غسلت الخلايا بمقدار 500 مل من الموقي السابق ذكره (TE)، ثم أضيف إليها 100 ميكرولتر من المحلول الحال للخلايا (الليزوزيم بتركيز 1 ملغ/1 مل و50 ميليمول غلوكوز و10 ميلي مولر من EDTA و25 ميليمولر من Tris HCl عند pH 8). تم تحضين المزيج مدة 20 دقيقة في درجة حرارة 37م، أُضيف إلى المزيج السابق 200 ميكرولتر من محلول SDS القلوي (1% SDS و 0.2 مولر من NaOH)، وبعد 5 دقائق أُضيف 150 ميكرولتراً من أسيتات الصوديوم بتركيز 3 مولر ودرجة حموضة pH 4.8. يثفل المزيج مدة 10 دقائق بسرعة 10000 دورة / د ونقل 400 مل من الطبقة المائية العلوية إلى أنبوب جديد وأضيف إليها 1 مل إتانول 96% ثم وضع المزيج في الثلج لحين الإراقة وثفل بعدها مدة دقيقتين لترسيب DNA في اسفل الانبوب، وبعد تبخر الطافي أضيف إلى الراسب 400 ميكرولتر من محلول Tris acetate (50 ميلي مولر Tris و100 ميلي مولر من أسيتات الصوديوم). أُجريت عملية التخلص من البروتين باستعمال محلول الكلوروفوم والكحول الإيزوايميلي المذكور في الفقرة السابقة، وبعد أخذ الطبقة العليا رسب DNA بالإتانول 96% المبرد بما يعادل ضعفي حجم الطافي وأضيف إليها 200 ميكرولتر من ثنائي إتيل الإيتر، أجري التثفيل مع التبريد مدة 15 دقيقة بسرعة 10000 دورة/ د، وفصلت طبقة الإيتر وبعد تبخير الإيتر تشكل راسب DNA الذي أذيب في 20 ميكرولتر محلول TE.

تحييد البلازميد: أُجري تحييد البلازميد بطريقتين:

الطريقة الأولى: كانت بتكرار الاستزراع على وسط المرق المغذي Nutrient Broth دون إضافة صاد حيوي، وحضن مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 42 م، وكان ذلك بواقع ثلاث مكررات لكل عزلة من العزلات الخمس المدروسة، بعد تكرار العملية مرات عدة لحين فقد الصفة المدروسة (مقاومة السيفالوسبورينات)، كما أُجريت عملية الاستزراع بعد كل عملية نقل على وسط يحتوي على الصاد الحيوي السفترياكسون بتركيز 150 مكغ /مل للتأكد من فقدان السلالة للصفة المدروسة بعد إعادة الاستزراع وحددت النسبة المئوية لذلك (Sachit *et al., 2018*).

الطريقة الثانية: بتكرار الاستزراع على المرق المغذي نفسه مضافاً إليه مركب SDS بتركيز 1.25 – 2.5 – 5%، كلاً على حدة، بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة من العزلات الخمس المدروسة، والتحضين مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م، ثم نقل 1 مل من المستزرع السابق إلى وسط الآغار المغذي Nutrient Agar والتحضين مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م، ثم نقل جزء من كل مستعمرة نامية إلى وسط الآغار المغذي الذي أُضيف إليه الصاد الحيوي السفترياكسون بتركيز 150 مكغ/مل، والتحضين مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ لتحديد الحساسية للسيفالوسبورينات وحددت النسبة المئوية لذلك (Treivors, 1986).

الكشف عن البلازميد بعد اجراء عملية التحييد: بعد تنمية الجراثيم في المرق المغذي nutrient broth بإضافة 10 ميكرولتر من الخلايا المنشطة لكل 1 مل من المرق المغذي الحاوي على السفترياكسون بتركيز 150 مكغ/ مل مدة 24 ساعة عند درجة حرارة

37 م، ثم استُخلص البلازميد بطريقة الغلي المذكورة سابقاً وبالطريقة السابقة نفسها تختبر الخلايا المحيّدة دون إضافة الصاد الحيوي السفترياكسون في وسط التنشيط واستخلصت البلازميدات المتبقية بطريقة الغلي أيضاً.

الرحلان الكهربائي للبلازميدات المعزولة: أُجري الرحلان باستعمال هلامة الآغاروز بتركيز 0.8% وعند فرق كمون 80 ميلي فولت، وقد أخذ 10 ميكرولترات من كل عينة من عينات DNA وأضيف إليها 3 ميكرولتر من دارئة التحميل، وكان الترحيل بغمر الهلامة في دارئة 1x TBE وبإضافة مؤشرين للوزن الجزيئي (المنتجين من قبل شركة Intronbio) أحدهما M2 بمدى 10000 – 250 bp والآخر M1 بمدى 1500 –100bp لمقارنة الوزن الجزيئي لعصابات البلازميدات التي تم الحصول عليها.

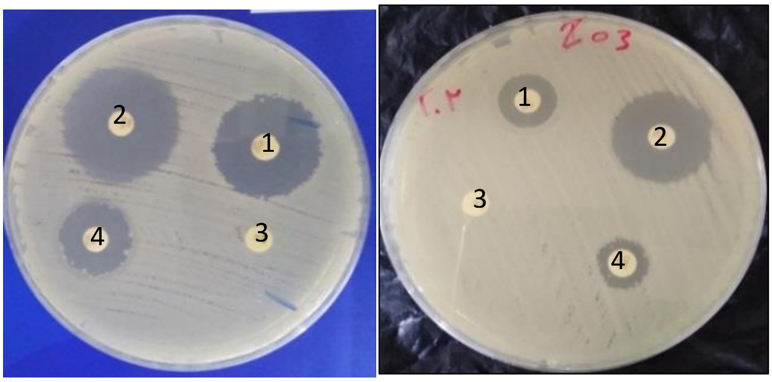
تفاعل البوليميراز التسلسي PCR: مُزجت عينة DNA البلازميدي ذات التركيز 100 نانوغرام مع المرئسات بتركيز 10 ميلي مول ومع مكونات عدة master mix (المنتجة من قبل Vivantis والتي تحوي taqDNA polymerase وdNTPs و, Mg Cl 2)، وأُخذت نواتج التفاعل لإجراء الرحلان الكهربائي الذي أُجري بطريقة رحلان البلازميدات نفسها مع تعديل تركيز هلامة الآغاروز التي أصبحت 1.5%، وباستعمال مؤشرين للوزن الجزيئي مصنعين من قبل شركة Intronbio الأول M2 بمدى 1500 –100 bp والآخر M3 بمدى 1000–50bp لتحديد وزن العصابات الناتجة. وحدد نمط البيتالاكتاماز بعد التأكد من وجود البلازميدات بالرحلان الكهربائي والحصول على نواتج PCR بنجاح، وباستعمال نوعين من المرئسات المناسبة (المنتجة من قبل شركة Macrogen) للكشف عن المجموعة التي ينتمي إليها الإنزيم ضمن الدراسة CTX وSHV، كما في الجدول 1 ووفق برنامج PCR المطبق كالآتي:
(94°C 2 min→35 x [94°C 1 min, 55°C 30 second, 72°C 1 min] →72°C 7 min →4°C)
:(Momtaz et al., 2012; Bajaj et al., 2015; Messele et al., 2017; Saiful Islam et al., 2022)

الجدول 1. المرئسات المستعملة في اختبار PCR

المرئس	تتابع المرئس		Amplicon (bp)	Annealing Temperature (°C)
BLa CTX	CTX-F	ACAGCAGATAATTCGCAA	599	58
	CTX-R	AACCAGATCACCGCGATA		
BLa SHV	SHV-F	TCGCCTGTGTATTATCTCCC	768	52
	SHV-R	CGCAGATAAATCACCACAATG		

النتائج والمناقشة Result and Discussion

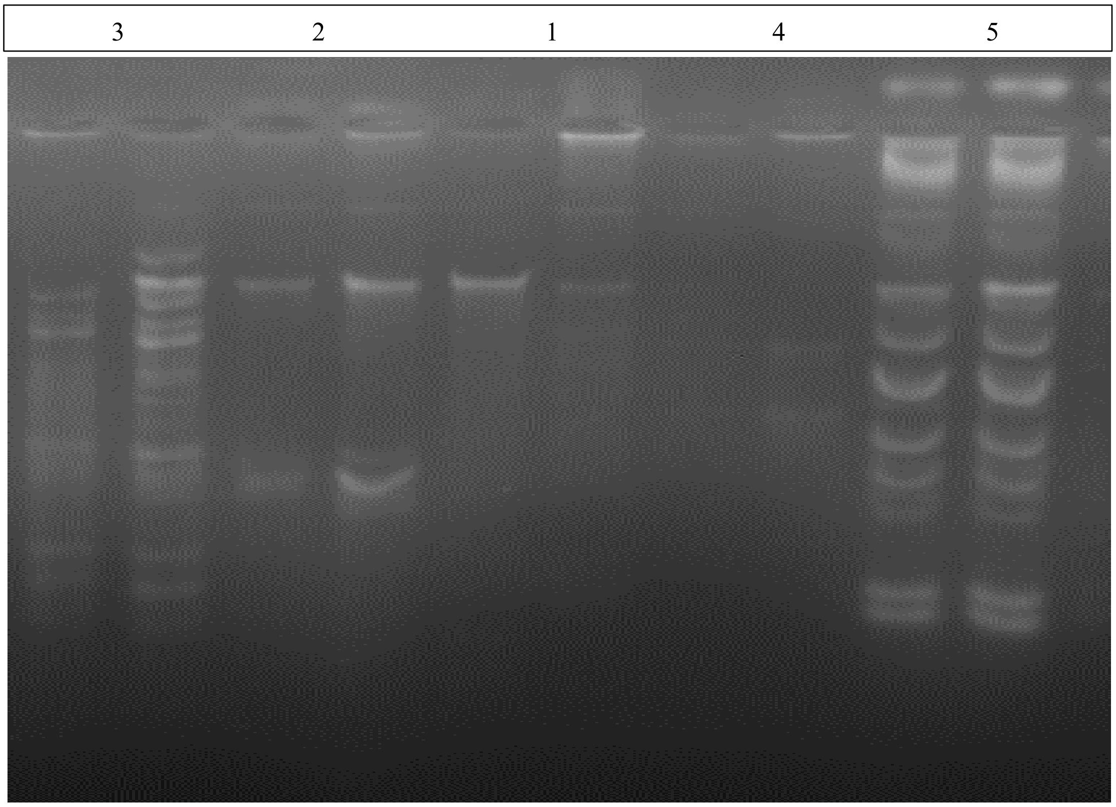
نتائج عزل الخلايا الجرثومية: اختيرت 5 عزلات من 150 عزلة من جراثيم الإشريكية القولونية المعزولة من مخلفات مستشفيات جامعة دمشق (خطاب وآخرون، 2023)، نظراً إلى مقاومتها لجميع السيفالوسبورينات المدروسة في البحث المنشور سابقاً (خطاب واخرون، 2023) والتي تعود إلى الجيل الأول والثاني والثالث منها، كما أظهرت القدرة على إنتاج البيتالاكتاماز أيضاً الذي يتثبط بمركبات Sulbactam وClavulanic acid، فقد تبيّن ازدياد قطر هالة التثبيط عند استعمال Ceftriaxone 30µg /Sulbactam15µg وCefoperzone 75µg /Sulbactam25µg مقارنة باستعمال Ceftriaxone وCefoperzone كلاً بمفرده، وكذلك الأمر عند استعمال Amoxyllin 25µg / Clavulanic acid 5µg مقارنة باستعمال Amoxyllin بمفرده، وهذا يؤكّد أن الإنزيم ينتمي إلى الصف A كما في الشكل1 ، ويعد من الإنزيمات واسعة الطيف ESBLS لأن النتيجة أظهرت تحسس المعزولات للصاد الحيوي Cefatoxime 30µg المضاف إليه Clavulanic acid 10µg في وسط النمو وتتوافق هذه النتائج مع نتائج Pestariati وSwedan (Poole, 2004; Swedan *et al.*, 2019; Pestariati *et al.*, 2021).



الشكل 1. حساسية عزلتين مقاومتين Cefteriaxon معزولة من مستشفيات جامعة دمشق تجاه الصادين Amoxycillin وCefaperazone مع المثبطين Clavulanic acid وSulbactam

1. يمثل حساسية العزلة تجاه Cefaperazone و2. يمثل حساسية العزلة تجاه Cefaperazone مع المثبط Sulbactam و3. يمثل حساسية العزلة تجاهAmoxycillin
4. يمثل حساسية العزلة تجاهAmoxycillin مع المثبط Clavulanic acid

نتائج استخلاص البلازميد: بينت النتائج وجود عدد كبير من البلازميدات بأوزان جزيئية مختلفة تحملها الإشريكية القولونية *E. coli* إذ تراوح العدد بين 2–12 بلازميداً بعد مقارنة عدد العصابات الناتجة عند استخلاص البلازميد بطريقة الغلي، وقد اتضح ذلك بعد إجراء الرحلان على هلامة الآغاروز بتركيز 0.8% وتطبيق فرق كمون 80 ميلي فولت (الشكل 2)، وقد تبين في البحث الذي أُجري بفضل Swedan (Swedan *et al.*, 2019) وجود 1–10 بلازميدات، وقد تباين عدد وحجم البلازميدات باختلاف العزلات (Lim *et al.*, 2015).

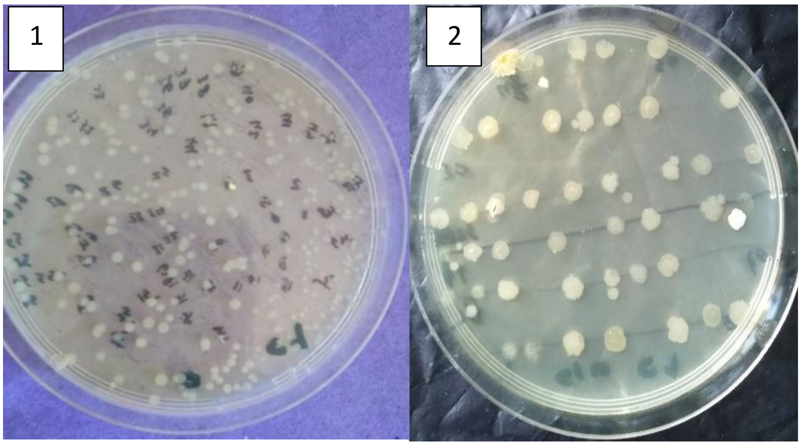


الشكل 2. أعداد البلازميدات بطريقة الغلي قبل إجراء عملية تحييد للبلازميدات في 5 عزلات من *E. coli* حيث تحوي 3 العزلة 12 بلازميد اما العزلة 2 فتحوي 3 بلازميد اما العزلة 1 فتحوي 2 وتحوي العزلة 4 فتحوي 2 بلازميد بينما العزلة 5 فتحوي 10 بلازميدات

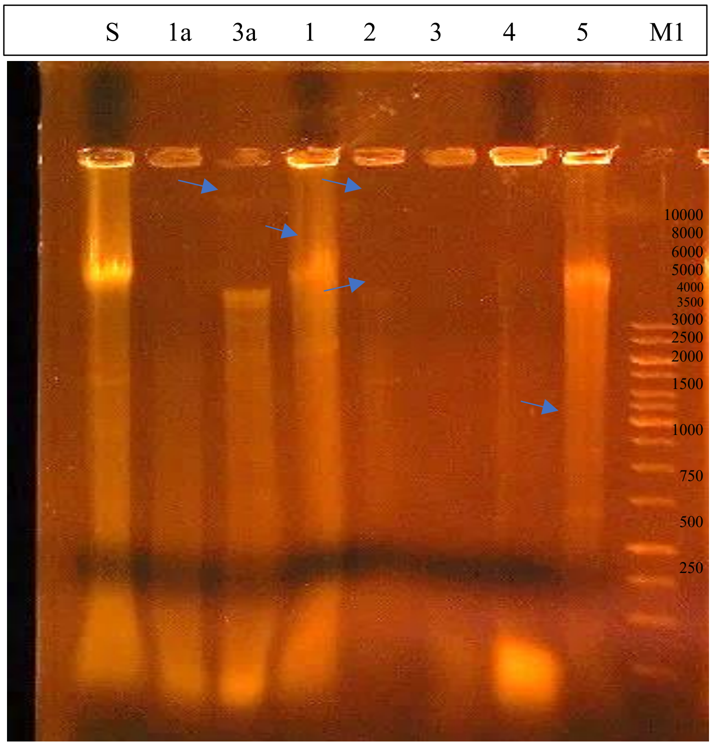
*تمثل الأرقام 1–5 العزلات المدروسة بمعدل مكررين لكل عزلة

تحييد البلازميد: بينت النتائج أن تحييد البلازميد من *E.coli* باستعمال SDS بالتراكيز المدروسة (1.25 – 2.5 – 5%) لم يكن مجدياً، فلم تؤثر هذه التراكيز في مقاومة المعزولات للسفترياكسون (الشكل 3)، وهذا يتوافق مع ما ذكره Thabit الذي أكد أن SDS

بتركيز 1.2% أعطى نشاطاً قليلاً 10/1 جداً على جراثيم المتقلبة *Proteus*، وقد بيّنت الدراسات أن التراكيز 8% و 10 % و12% كانت فعالة جداً في تحييد البلازميدات عند الزائفة *Pseudomonas*، وكان التركيز المناسب 10% عند المتقلبة، وقد انخفض العدد الكلي للبلازميدات إلى 1–4 بلازميدات بعد إجراء التحييد بتكرار الزرع من 8 – 12 مرة على وسط لا يحتوي على الصاد الحيوي وبرفع درجة الحرارة إلى 42 م (الشكلان 2 و5) (El-Baghdady, 2009; Paul *et al.*, 2019; Thabit *et al.*, 2020).



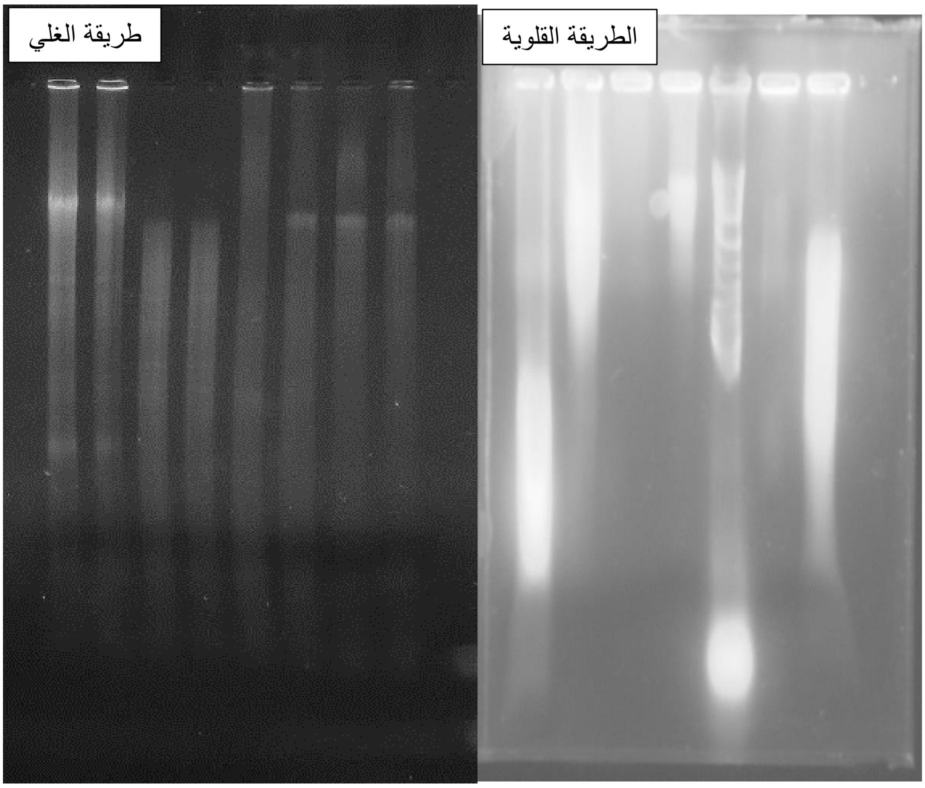
الشكل 3. نمو العزلات المعرضة لمادة SDS على الوسط 1 الخالي من Ceftriaxone ونمو العزلات على الوسط 2 الذي يحتوي على Ceftriaxone بعد 24 ساعة من الحضن.



الشكل 5. انخفاض أعداد البلازميدات في العزلات الخمس من *E.coli* بعد التحييد.

الأرقام من 1–5 هي المعزولات المدروسة، S عزلة شاهدة حساسة للصادات المدروسة، a1 وa3 تعني عزلة فاقدة للصفة بعد التحييد

الطريقة الأفضل لاستخلاص البلازميد: كانت طريقة الغلي مدة دقيقة واحدة هي الطريقة الأفضل فقد أعطت عصابات أوضح من الطريقة القلوية، ويعود ذلك إلى احتواء *E. coli* على كميات كبيرة من الإندونكلياز Endonuclease التي تحلمه الرابطة الفُسفاتية ثنائية الإستر ضمن سلسلة النكليوتيد التي تسبب تقطع الدنا DNA وهي تتعرض للتخريب بالغلي كما هو موضح بالشكل 6 (Zhou *et al*., 1997; Roy *et al*., 2018; Sasagawa, 2018).

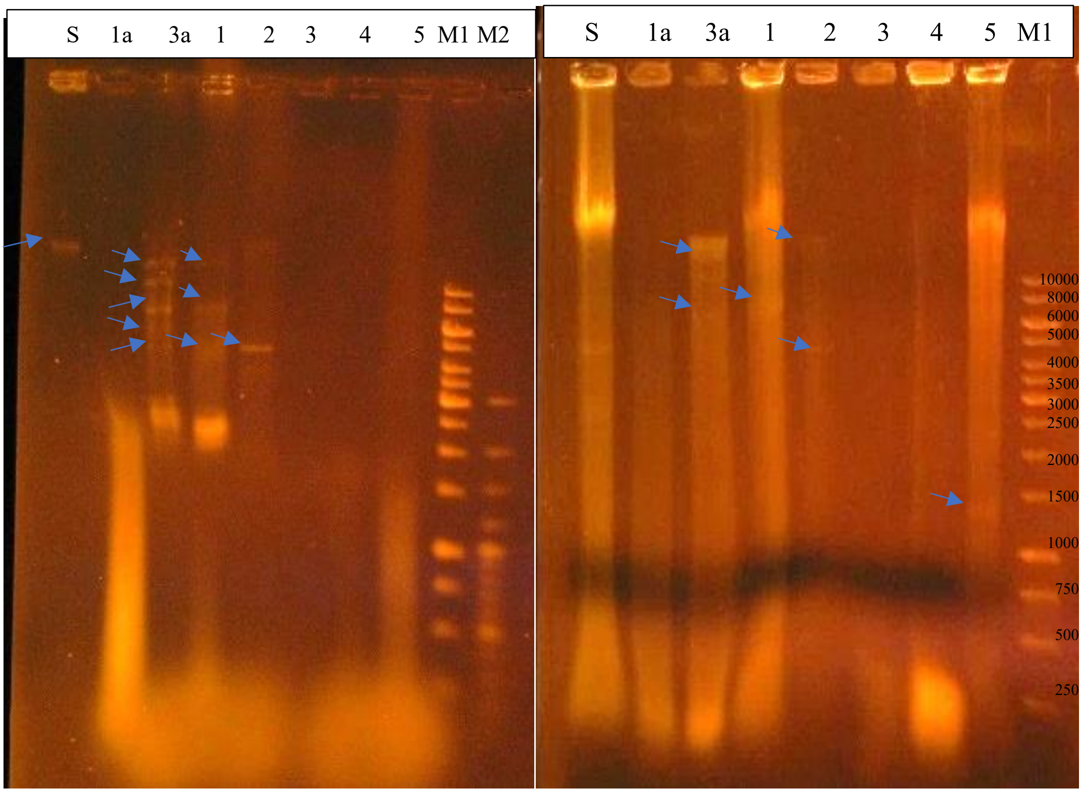


الشكل 6. الفرق بين استخلاص البلازميد بالغلي والطريقة القلوية.

وزن البلازميد: بعد تحليل الهلامة باستعمال برنامج gel analyzer (الشكل 7)، ومطابقتها مع المنحنى المعياري للمؤشرين المعياريين M1 و M2 المذكورين سابقا ومقارنتها بالمعزولات الفاقدة للصفة بعد التحييد تبين أن وزن البلازميد المحيد يتراوح بين Kb2.1 وKb 7.6، وهذا يتفق مع الأوزان التي ظهرت في تجربة Nazik وزملائها (Nazik *et al*., 2011).

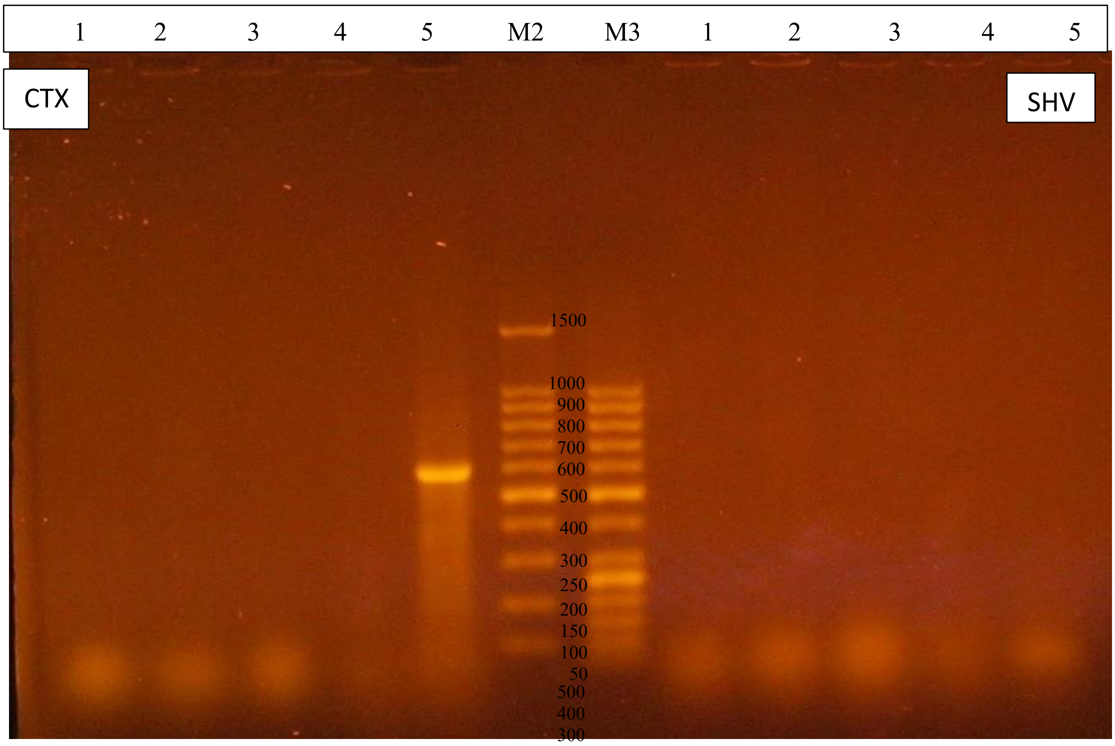
نتائج تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR: أظهرت نتائج تفاعل PCR بعد إجراء الرحلان أن المرئس CTX المستعمل للكشف عن المورثة المحمولة على البلازميد والتي ترمز إلى البيتالاكتاماز واسع الطيف ESBLS من الصف A أعطى عصابة واحدة أي حصل كنتيجة إيجابية لارتباط المرئس مع البلازميد المطلوب الكشف عنه في العزلة رقم 5؛ مما يدل على أن المورثة Bla CTX محمولة على البلازميد، ولم تظهر نتيجة الرحلان لناتج PCR مع المرئس SHV أي عصابة فلم يرتبط مع أي من البلازميدات المعزولة لجميع المعزولات المدروسة كما هو موضح في الشكل 8، كما بينت النتائج أن الوزن الجزيئي للعصابة الناتجة عن تفاعل PCR كان bp569 والذي قيس بعد حساب RF = 0.464 ومطابقتها مع المنحنى المعياري للمؤشرين الجزيئين المعياريين bp50 وbp100 باستعمال برنامج gel analyzer 2010 كما هو موضح بالشكل 9، وقد أُجريت دراسة مماثلة استعمل فيها الباحثون Bajaj وزملاؤه المرئس CTX وحصلوا على ناتج PCR أعطى عصابة ذات وزن جزيئي bp599 وهي نتيجة مقاربة للحاصل في هذا البحث، وعند المقارنة بنتائج Gen Bank في موقع NCBI (GenBank: MT634151.1 وGenBank: MZ442611.1) تبين أن المورثة التي أمكن الكشف عنها تعود إلى CTX_M15 وتحمل على البلازميد عادة، كما بينت دراسات عديدة أن نواتج PCR أظهرت قيم للأوزان الجزيئية مقاربة bp550 فيما يخص المورثة Bla CTX، وهي مورثة يكثر انتشارها عند *E. coli* أكثر من انتشار مجموعتي المورثات

Bla SHV Bla TEM والتي ترمز للبيتالاكتاماز واسع الطيف ESBLS المنتشرة في آسيا وأوروبا، كونها محمولة على قطع DNA منتقلة (Poole *et al*, 2004; Bajaj *et al*, 2015; Al-Mijalli *et al*, 2016; Albarraq *et al*., 2017; Aziz *et al*., 2020).

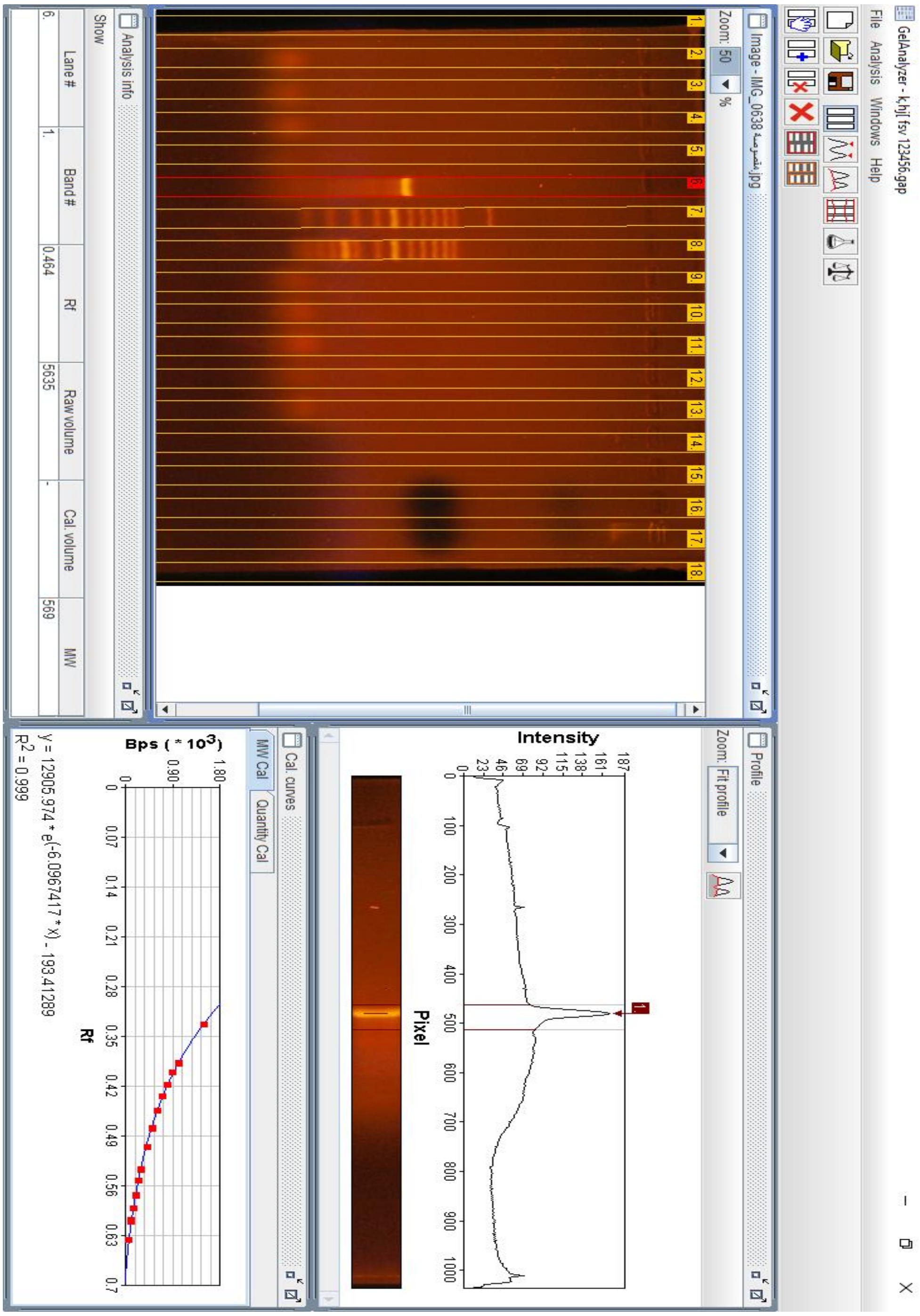


الشكل 7. مقارنة بين أعداد وأوزان البلازميدات بعد التحييد للعزلات الخمس من *E. coli* مقارنة بالمؤشرين الجزئيين M1 و M2

* a1 و a3 تعني عزلة فاقدة للصفة بعد التحييد و S تعني عزلة شاهدة حساسة للصادات المدروسة



الشكل 8. نتائج تفاعل PCR للمعزولات الخمس من جراثيم *E. coli* مقارنة بالمؤشرين الجزئيين M2 و M3 ويظهر ارتباط المرئس مع البلازميد المطلوب الكشف عنه في العزلة رقم 5 فقط.



الشكل 9. نتائج PCR مع البرايمر ctx باستعمال برنامج gel analyzer والمؤشر bp100.

الاستنتاجات Conclusion

تحتوي المخلفات السائلة لصرف مستشفيات جامعة دمشق على *E. coli* مقاومة للسيفوتاكسيم وعدد آخر من السيفالوسبورينات، وقد أظهرت مقاومة للصادات Amoxyllin/ Clavulanic acid و Ceftriaxone /Sulbactam، وتحمل هذه المعزولات المقاومة طيفاً واسعاً من مورثات البيتالاكتاماز ؛ مما يجعلها الأصل السريري المحتمل للعديد من الأمراض الإنتانية ويقتضي أن تأخذ المستشفيات بالمعالجة المسبقة لمياه الصرف الصحي من المستشفى لتجنب التهديد المرتبط بهذه الأنواع من الجراثيم في حالة التسرب والتعرض البشري.

References المراجع

1. خطاب. آسيا، علي نظام. عدنان، الأمير. لينة (2023). عزل سلالات الإشريكية الكولونية *E. coli* من المخلفات السائلة لمستشفيات جامعة دمشق واختبار حساسيتها لصادات البيتالاكتام، مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، العدد39:(3).
2. Abiodun A. O. (2012), Antibiotic - resistant plasmids in bacteria from food, water and clinical sources, *Microbiology, Federal University of Agriculture*, Abeokuta
3. AlBarraq A. A, El-Badawy M. F, Al-Qarni M.A, Al-Saedi S. S, Al-Sufyani W. M, Osaim F. E, Shohayeb M. M. (2017), Prevalence of *bla* TEM, *bla* SHV and *bla* CTX-M among β-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from tertiary care hospitals in Taif, Saudi Arabia, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 12 (1), https://doi.org/10.9790/3008-1201031116
4. Al-Mijalli S. HS. (2016), Extended-Spectrum β-Lactamase Enzymes (ESBLs) Produced by *Escherichia coli* Urinary Pathogens at Riyadh, Saudi Arabia. J *Antimicrob Agents*, 2(3): 125. https://doi.org/10.4172/2472-1212.1000125
5. Aziz Z. S., Alag R. N. (2020). Detection of ESBLs *CTX-M* Gene of *E.coli* Isolated from Clinical Cases in Maysan Province, *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*,14(1), https://doi.org/10.37506/v14/i1/2020/ijfmt/192925
6. Bajaj P., Singh N. S., Kanaujia P. K., Jugsharan Singh Virdi J. S. (2015). Distribution and molecular characterization of genes encoding CTX-M and AmpC β-lactamases in *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. *Science of the Total Environment* ,505: 350–356. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.084.
7. Bennett P. M, J. Heritage J, Hawkey P. M. (1986). AD ultra-rapid method for the study of antibiotic resistance plasmids, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , 18:421-424
8. Blair J. M. A., Webber M. A., Baylay A. J., Ogbolu D. O., Piddock L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance Antimicrobials Research Group, *nature reviews microbiology,* 13: 40- 50, https://doi.org/10.1038/nrmicro3380
9. Bonnet R., Sampaio J. L., Chanal C., Sirot D., De Champs C., Viallard J. L., (2000). Anovel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in Serratia marcescens isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 3061-8.
10. Davies J. (1994). Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes, *Science* , 264: 375-385
11. Dillon J. R., Nasim A., Nestmann E. R. (1985). Recombinant DNA methology. *John wiely and Sons*.(eds). USA
12. El-Baghdady K. Z., Abooulwafa M. M., Ghobashy M. O., Gebreel M. H. (2009). Plasmid mediated virulence factors of some *Proteus* isolates. *Egypt. Acad. J. biolog. Sci.,* 1(1): 7-22. https://doi.org/10.21608/eajbsg.2009.16713
13. Giriyapur R. S., Nandihal N. W., Banavathi K. V. S., Patil A. B., Chandrasekhar M. R., (2011). Comparison of disc diffusion methods for the detection of extended-spectrum beta lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, *journal of laboratory physicians*, 3(1):33-6,https://doi.org/ 10.4103/0974-2727.78561
14. Jacoby G. A., Sutton L. (1991). Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(1):164-9.
15. Lim Y. K., Lee Mi-K., Tae-Hyoung Kim T-H. (2015). Management of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Positive Gram-Negative . Bacterial Urologic Infections, *Urogenit Tract Infect*,10(2):84-91. https://doi.org//10.14777/uti.2015.10.2.84
16. Maina D., Revathi G., Kariuki S., Ozwara H. (2012). Genotypes and cephalosporin susceptibility in extended-spectrum beta-lactamase producing *enterobacteriaceae* in the community, *J Infect Dev Ctries* , 6(6):470-477.
17. Manoharan A., Premalatha K., Chatterjee S., Mathai M. (2011). Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases among Enterobacteriaceae with their *in vitro* antimicrobial susceptibility. *Indian Journal of Medical Microbiology,* 29(2): 161-4.
18. Messele Y. E., Abdi R. D., Yalew S. T., Tegegne D. T., Bezina Arega Emeru B. A., Gebremeskel Mamu Werid G. M. (2017). Molecular determination of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from raw meat in Addis Ababa and Bishoftu, Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16:55. https://doi.org/10.1186/s12941-017-0233-x.

19. Moghaddam M. J. M., Mirbagheri A. A., Salehi Z., Habibzade S. M. (2015). Prevalence of Class 1 Integrons and Extended Spectrum Beta Lactamases among Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* Isolates from North of Iran. *Iranian Biomedical Journal* 19 (4): 233- https://doi.org/10.7508/ibj.2015.04.007
20. Momtaz H., Rahimi E., Moshkelani S. (2012). Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. *Veterinarni Medicina,* 57 (4): 193–197
21. Nazik H., Bektöre B., Öngen B., Ilktaç M., Özyurt M., Kuvat N., Baylan O., Kekülluöglu H., Haznedaroglu T., Kelesoglu F. M. (2011). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Escherichia coli* Urinary Isolates from Two Teaching Hospitals in Turkey: Coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 Type _B-lactamases. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research June*, 10 (3): 325-333 https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.9.
22. Noboru S. (2018). Plasmid Purification. *intechopen* Provisional chapter, https://doi.org/ 10.5772/intechopen.76773
23. Paul D., Chanda D., Chakarvarty A., Bhattacharjee A. (2019). An insight into analysis and elimination of plasmids that encodes metallo-_-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa.* Journal Pre-proof, Elsevier, DOI: 10.1016/j.jgar.2019.09.002
24. Pestariati S. (2021). Detection of CTX-M Gene in *Escherichia coli* Producing Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. International Journal of Medical Science and Clinical Invention,8(9):5610-5614. https://doi.org/10.18535/ijmsci/v8i09.05 e
25. Pitout J. D. D., Hamilton N., Church D. L., Nordmann P., Poire L. (2006). Development and clinical validation of a molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type β-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 13(3):291-7. https://doi.org/ 10.1111/j.1469-0691.2006.01645.x
26. Poole K. (2004). Resistance to β-Lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci*. 61. https://doi.org/ 10.1007/s00018-004-4060-9
27. Roy U., Archana Mishra A., Jana P., Sutanu Karmakar S. (2018). Study on Different Plasmid Isolation Procedures, *Int. J. Pure App. Biosci* , 6 (5): 533-541. https://doi.org/10.18782/2320-7051.6988
28. Sachit S. M., Al-Oqaili R. M., Salman I. M., Majeed H. Z., Najim S. Y., Shieer A. M. (2018). Use High Temperature as a Curing to Change Antibiotic Resistance of *Salmonella Typhi, Journal of Global Pharma Technology*:10(08):86-89
29. Saiful Islam Md. S., Abdus Sobur Md. A., Rahman S., Ballah F. M., Samina Ievy S., Siddique M. P., Rahman M., Abdul Kafi Md., Tanvir Rahman Md. (2022). Detection of *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaCMY*, and *blaSHV* Genes Among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Migratory Birds Travelling to Bangladesh. *Microbial Ecology* 83:942–950. https://doi.org/10.1007/s00248-021-01803-x
30. Swedan S., Abu Alrub H. (2019). Antimicrobial Resistance, Virulence Factors, and Pathotypes of Escherichia coli Isolated from Drinking Water Sources in Jordan. *Pathogens* (8) 86. https://doi.org/10.3390/pathogens8020086.
31. Tenover F. C., Raney P. M., Williams P. P., Rasheed K., Biddle J. W., Oliver A., Scott K., Fridkin S. F., Jevitt L., McGowan J. E. (2003). Evaluation of the NCCLS Extended-Spectrum -Lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during project ICARE, *Journal Of Clinical Microbiology*41(7):3142–3146. https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3142–3146.2003
32. Thabit A., Abd El-Sabour E., Nafie A., El-Mokhtar M., Biomy Y. (2020). Detection of *proteus* species in diabetic wounds and Their antibiotic resistance profile analysis, *Bull. Pharm. Sci., Assiut University*, 43(1): pp. 1-10.
33. Treviors J. T. (1986). Plasmid curing in bacteria (Curing; plasmids; protoplasts; intercalating dyes; incompatibility). *FEMS. Micobiol. Rev*. 32: 149-157.
34. Zhou A., Jiang X., Xu X. (1997). Improved Alkaline Lysis Method for Rapid Isolation of Plasmid DNA . *BioTechniques*, 1997: 23(4):592-594.