Iraqi Journal of Science
ISSN: 0067-2904
GIF: 0.851

دراسة مقارنة بين امراضية الايشريكية القولونية المقاومة للسيفتازيديم و الحساسة له في كلى ومثانة الفئران البيض

علي حسون حمادي[1] و محمد قيس العاني[2] و حارث جبار فهد المذخوري[3]*
[1]قسم علوم الحياة، كلية التربية/الطارمية، الجامعة العراقية، العراق
[2]قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الانبار ، العراق
[3]قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد، بغداد، العراق

الخلاصة

هدفت الدراسة الى مقارنة بين بكتريا *E. coli* التي تمتلك مقاومة لمضاد السيفتازديم والحساسة له ، حيث استعمل في هذه التجربة اثنتا عشرة فأرة قسمت بشكل عشوائي إلى اربع مجاميع المجموعة الأولى حقنت بالمحلول الفسلجي مع مضاد السيفتازديم (بالتركيز تحت المثبط الادنى) و المجموعة الثانية حقنت بالعزلة *Escherichia.. coli* 11 المقاومة لأكبر عدد من المضادات قيد الدراسة و المجموعة الثالثة حقنت بالعزلة *E. coli* 11 مع مضاد السيفتازديم (بالتركيز تحت المثبط الادنى) اما المجموعة الرابعة فقد حقنت بالعزلة الحساسة لوحدها. لم يظهر الفحص النسيجي اي تغيرات نسيجية في الكلية والمثانة لفئران المجموعة الاولى. و وجد من خلال الدراسة الحالية أن التغييرات النسيجية في فئران المجموعة الثالثة كانت اقل من تلك التي شوهدت في فئران المجموعة الثانية. في ذات الوقت لوحظ ان العزلة الحساسة احدثت تغييرات نسيجية شديدة في كلى و مثانة الفئران اكثر مما احدثته العزلة الحاملة لمورثات المقاومة لمضادات البيتا لاكتام.

A Comparative Study between Pathogenicity of Ceftazidime Resistant and Sensitive *Escherichia coli* in White Mice Kidneys and Bladder

Ali H. Hammadi[1], Mohammed Q. Alani[2], Harith J. F. Al-Mathkhury[3]*
[1]Department of Biology, College of Education, Iraqi University, Iraq
[2]Department of Biology, College of Science, University of Anbar.Iraq
[3]Department of Biology, College of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Abstract

Twelve albino mice was divided randomly into four groups comprising A through D injected with ceftazidime at sub MIC, *Escherichia.. coli* 11, *Escherichia.. coli* 11 with ceftazidime solution, and standard strain, respectively. Histopathological sections did not show any changes in respect to group A. however, group C suffered signs of infection less than those appeared in group B sections. Simultaneously, group D suffered intense histpathological changes more than other groups infected with resistant isolate.

Keywords: *Escherichia. Coli*, Ceftazidime , Anti-biotic .

Email: harithfahad@scbaghdad.edu.iq

المقدمة

تعد بكتريا ايشريكيا القولون *Escherichia coli* من اهم الميكروبات المرضية التي تشترك في احداث التلوث الميكروبي والمسببة لحوالي 90% من خمج المجاري البولية ومن الاجناس البكتيرية المتكرر الحدوث وبشكل خاص عند النساء [1] اذ لابد من الاشارة الى ان سبب اختيار بكتريا القولون كمحور بحث الدراسة الحالية هو انها ذات قدرة على احداث العديد من الاخماج وذلك لامتلاكها العديد من عوامل الفوعة المهمة و كذلك امتلاكها لبعض الجينات التي تشفر لمقاومة المضادات الحياتية [2].

لقد كان لاكتشاف المضادات الحياتية الاثر الكبير في انخفاض معدلات خمج المجاري البولية و منها مضادات البيتالاكتاميز، و يمتلك الكائن المجهري عدة اليات للمقاومة: انتاج انزيمات قادرة على تحليل جزيئة المضاد او اجراء تحوير في المضاد لتحوله الى جزيئة خاملة فاقدة الفعالية. ومن اهم الانزيمات انزيمات البيتالاكتاميز المحطمة لمضادات مجموعة البنسلينات والسيفالوسبورينات التي تعد من اهم العوامل الرئيسة لفشل الكثير من حالات العلاج [3] و يسيطر على انتاج هذه الانزيمات عوامل وراثية محمولة اما على الكروموسوم او البلازميد [4].

كما ان هناك دراسات كثيرة حول امتلاك البكتريا لجينات مقاومة المضادات الحياتية يؤدي الى فقدان جينات اخرى قد تشفر للموائمة البيئية او جينات الفوعة [5] . مقابل ذلك تذكر بحوث اخرى ان وجود المضاد قد يؤدي الى زيادة الفوعة وضرر النسيج، مما حدا بنا لاقتراح هذا الموضوع لتحقيق **هدف الدراسة:**

التحري عن إمراضيه البكتريا والتسبب في ضرر النسيج بوجود المضاد التي تمتلك مقاومة ضده مقارنة مع عدم وجوده وكذلك مع إمراضيه السلالة الحساسة (كسيطرة). بناء على نتائج هذا البحث يمكن توجيه التفكير في اختيار العلاج المناسب لكل حالة .

المواد و طرائق العمل

الدراسة داخل الجسم الحي In-vivo study

عزلات الايشيريكية القولونية *E. coli* isolates

استعملت العزلة *E. coli* 11 المقاومة للبيتالاكتام و التي تمتلك ثلاث جينات تشفر لانزيمات البيتالاكتاميز موسعة الطيف (bla_{VIM}, bla_{TEM}, bla_{PER}) و العزلة القياسية *E. coli* ATCC 25922 والتي تمثل العزلة الحساسة. اخذت هذه العزلات من قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد. اعيد تشخيصها بالطرائق التقليدية و كذلك باستعمال انظمة Api 20 E و Vitek 2.

الحيوانات المختبرية Experimental Animals

اختيرت الفئران البيض من نوع *Mus musculus* بعمر 9-12 أسبوعا عدد 12 من الإناث معدل أوزانها 18 – 25 غراماً وبصحة جيدة، وتم الحصول عليها من وحدة البحوث التجريبية /التقنيات الاحيائية/ جامعة النهرين ، ووضعت في أقفاص معدنية. فرشت بنشارة الخشب مع العناية بنظافة الأقفاص وتستبدل كل ثلاث أيام. وضعت الحيوانات طوال مدة الدراسة عند ظروف مختبرية موحدة من حيث التهوية و درجة الحرارة التي كانت بحدود 20 ± 26 م. أعطيت الحيوانات عليقة خاصة والتي كانت محتوياتها عبارة عن علف مركز تم الحصول عليها من كلية الزراعة/قسم الثروة الحيوانية/جامعة بغداد. قسمت الحيوانات عشوائيا الى اربع مجاميع بواقع ثلاث حيوانات في كل مجموعة و على النحو الآتي :

1. مجموعة A : مجموعة السيطرة والتي حقنت بمحلول المضاد السيفتازديم بحجم 0.1 مليلتر وبتركيز 512 مايكروغرام / مل (و الذي يمثل التركيز تحت المثبط الادنى) مع محلول الملح الفسلجي.
2. مجموعة B : حقنت بعالق البكتريا المقاومة *E. coli* 11 بحجم .0.1 مليلتر وتركيز 1×10^8 وحدة مكونة للمستعمرة.
3. مجموعة C: حقنت بخليط من عالق البكتريا المقاومة *E. coli* 11 مع مضاد السيفتازديم بحجم 0.1 مليلتر وتركيز 512 مايكروغرام / مل (و الذي يمثل التركيز تحت المثبط الادنى) من المضاد وتركيز البكتريا 1×10^8 وحدة مكونة للمستعمرة.
4. مجموعة D : حقنت بعالق البكتريا *E. coli* الحساسة للمضاد بحجم 0.1 مليلتر و تركيز 1×10^8 وحدة مكونة للمستعمرة.

طريقة الحقن

استعملت طريقة [6] لحقن المجموعات المختارة فبعد افراغ مثانة الحيوان من الادرار بالضغط قليلا على بطن الحيوان. عقمت المنطقة المحيطة بفتحة الجهاز البولي بالكحول الاثيلي بتركيز 70% ومن ثم ادخلت القشطرة (ذات قطر 0.6 ملم) ، ومن اجل حقن

الحيوان ثبتت القثطرة بمحقنة طبية سعة 1 مل. تركت مجاميع الفئران مدة 24 ساعة بدون ماء. بعد مرور ثلاثة ايام على الحقن شرحت مجاميع الفئران واخذت اعضاء الكلية والمثانة ووضعت في فورمالين (10%) لمدة 24 ساعة، بعدها تم تحضير المقاطع النسيجية لدراسة التأثيرات المرضية فيها بالاعتماد على [7].

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

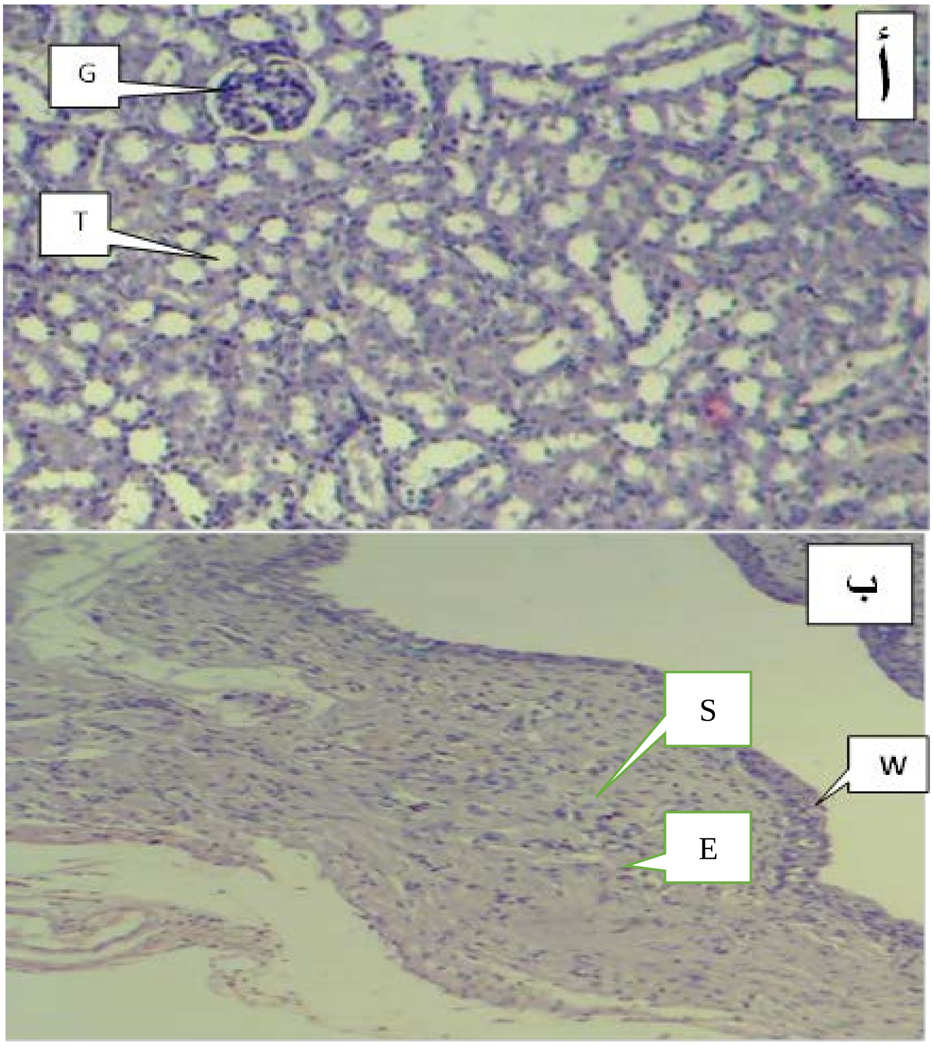
حللت النتائج احصائيا باستعمال تحليل التباين و معامل الارتباط و أقل فرق معنوي اعتمادا على برنامج SPSS الاصدار 17 لعام 2013. عدت الفروق معنوية عندما تكون قيمة P اقل من 0.05 [8].

النتائج والمناقشة

الدراسة داخل الجسم الحي

بينت الدراسة حصول تغييرات نسيجية متنوعة و كانت النتائج كالآتي:

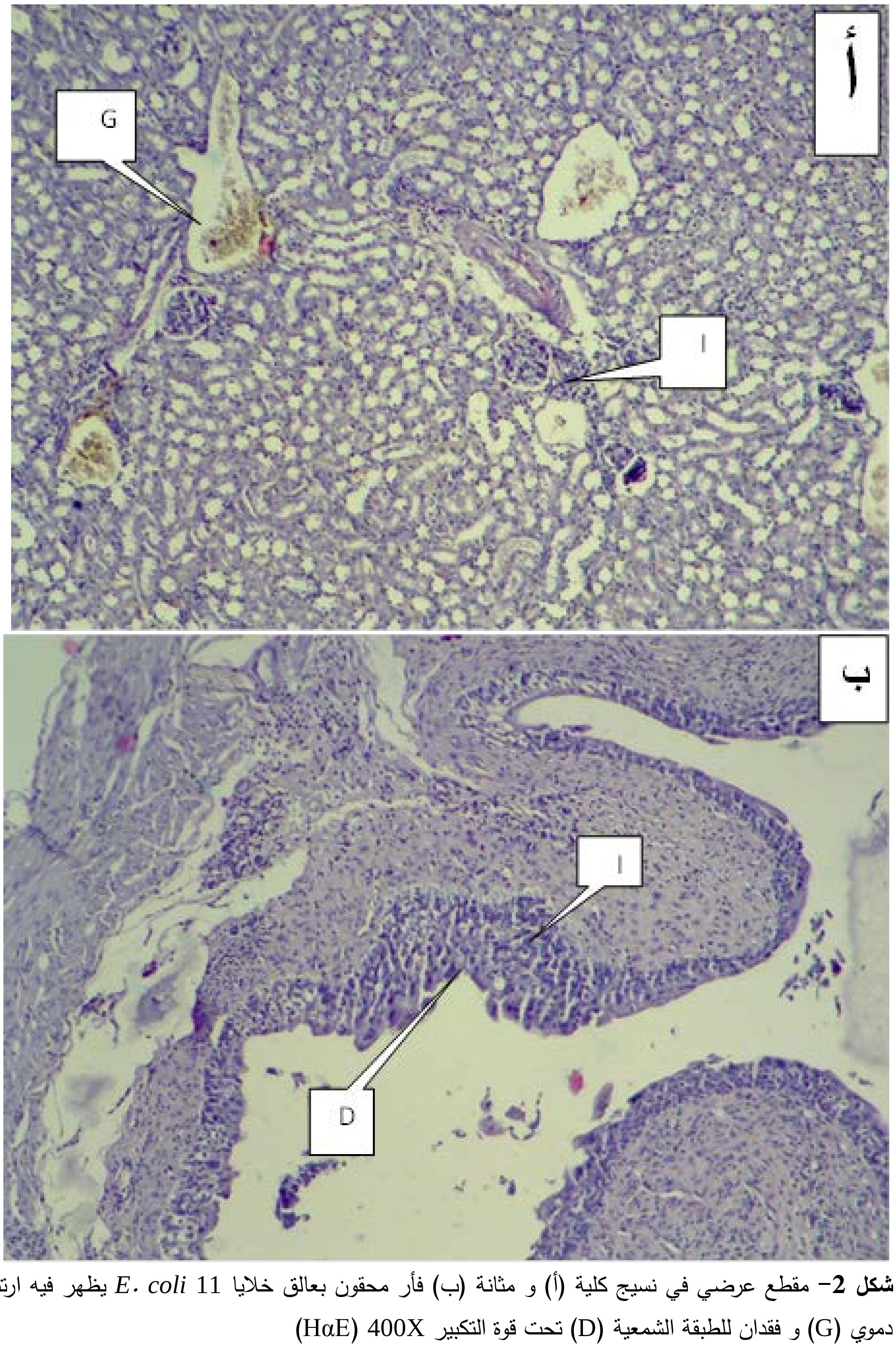
مجموعة A (مجموعة السيطرة)



شكل 1- مقطع عرضي في نسيج كلية (أ) و مثانة (ب) فأر السيطرة يظهر فيه الكبيبة الكلوية (G) و النبيبات الكلوية (T) و النسيج الظهاري المبطن للمثانة (E) و الطبقة الشمعية(المخاطية)(W) و الطبقة تحت المخاطية (S) بشكلها الطبيعي .400X (HαE).

المجموعة (B) الحقن بعالق البكتريا *E. coli* 11

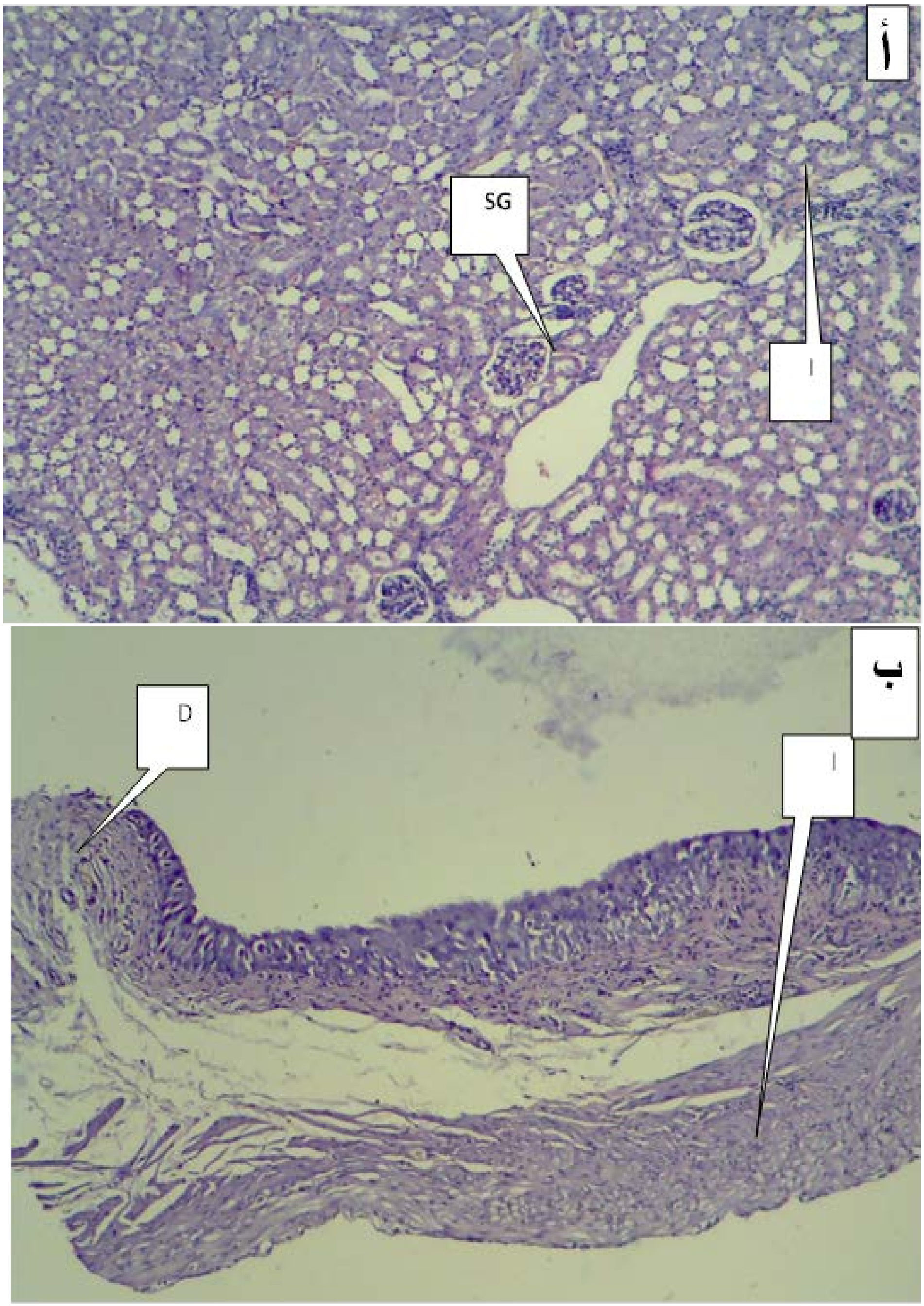
اظهرت المقاطع النسيجية لكلى الفئران المحقونة بعالق البكتريا *E. coli* 11 وجود نزف دموي (Hemorrhage) و ارتشاح للخلايا الالتهابية (Infiltration of inflammatory cells) و كما هو موضح في الشكل- 2 أ. في حين اظهرت مقاطع المثانة وجود ارتشاح للخلايا الالتهابية و فقدان الطبقة الشمعية (الشكل- 2 ب).



شكل 2- مقطع عرضي في نسيج كلية (أ) و مثانة (ب) فأر محقون بعالق خلايا *E. coli* 11 يظهر فيه ارتشاح للخلايا الالتهابية (I) واحتقان دموي (G) و فقدان للطبقة الشمعية (D) تحت قوة التكبير 400X (HαE)

المجموعة C الحقن بعالق البكتريا *E. coli* 11 مع مضاد السيفتازيديم

ادى الحقن بخليط البكتريا مع المضاد (بتركيز تحت المثبط الادنى) الى تقلص في حجم الكبيبة وارتشاح بسيط للخلايا الالتهابية (شكل- 3 أوب). اما نسيج المثانة فقد لوحظ فيه ارتشاحا بسيطا للخلايا الالتهابية وفقدان الطبقة الشمعية المبطنة لطبقة للنسيج الظهاري .

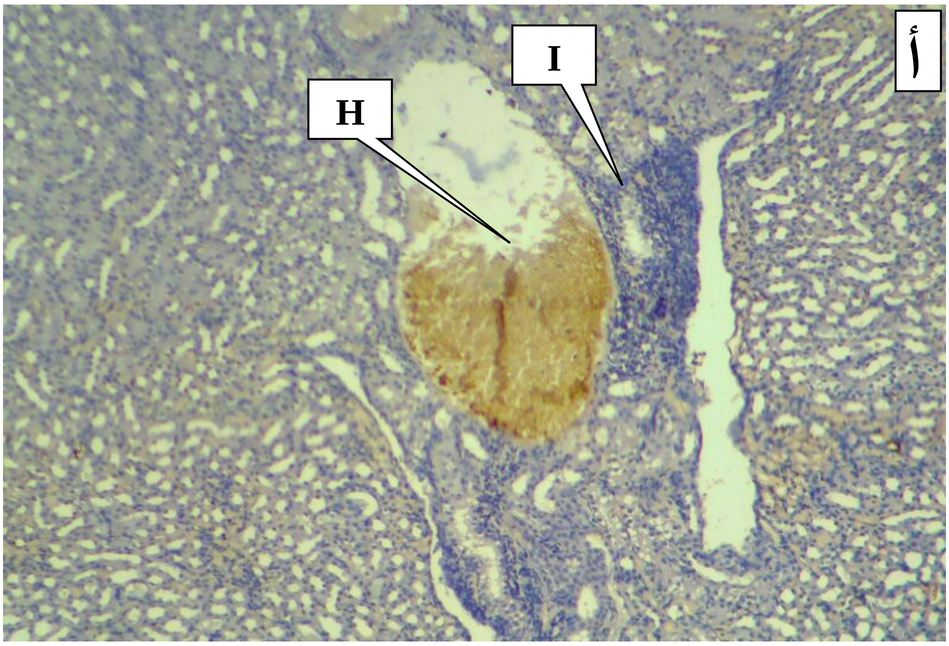


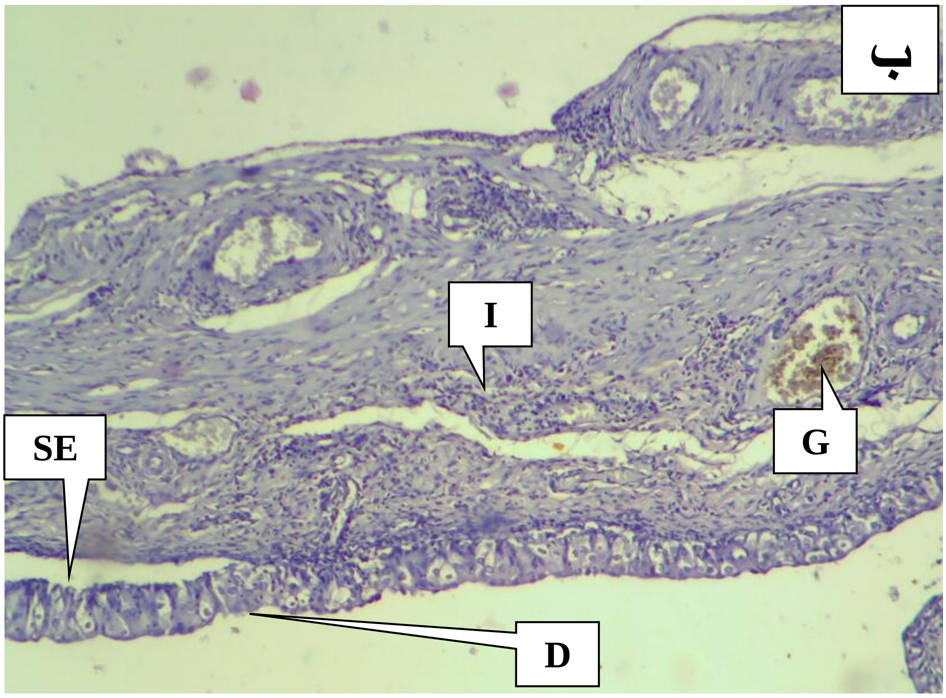
شكل 3- مقطع عرضي في نسيج كلية (أ) و مثانة (ب) فأر محقون بعالق خلايا 11 *E. coli* مع مضاد السيفتازيديم يظهر فيه ارتشاح للخلايا الالتهابية (I) و فقدان للطبقة الشمعية (D) وتجزؤ الكبيبة (SG) تحت قوة التكبير 400X (HαE).

المجموعة D الحقن بعالق البكتريا الحساسة *E. coli*

نتج عن الحقن بالبكتريا الحساسة الى تغيرات نسيجية شديدة مثل الارتشاح الكبير في الخلايا الالتهابية و تقلص في حجم الكبيبة و نزف دموي هائل (شكل 4 أ). اما نسيج المثانة فقد لوحظ فيه ارتشاحا كبيرا للخلايا الالتهابية وفقدان الطبقة الشمعية وانسلاخ النسيج الظهاري (شكل- 4 ب).

من الجدير بالذكر ان هذه المجموعة تخدم هدف الدراسة وهو مقارنة التغيرات النسيجية الناتجة عن بكتريا مقاومة واخرى حساسة.





شكل 4-مقطع عرضي في نسيج كلية (أ) و مثانة (ب) فأر محقون بعالق خلايا *E. coli* الحساسة يظهر فيه ارتشاح للخلايا الالتهابية (I) واحتقان دموي (G) و فقدان للطبقة الشمعية (D) و انسلاخ الطبقة الظهارية تحت قوة التكبير (SE) 400X (HαE)

تسبب *E. coli* التهاب الكلية والحويضة الحاد (Acute Pyelonephritis) و الكلية المصابة تكون صغيرة الحجم، ونتيجة لا لتهاب الكلى والكبيبات يحدث تدهور شديد في الوظائف الكلوية وانخفاض في معدل الترشيح الكبيبي ويسمى بقصور الكلية (Renal Failure)و غالباً ما يترافق بارتفاع الكرياتين والبوتاسيوم والفوسفات [9].

وجد من خلال الدراسة الحالية أن التغييرات النسيجية في الفأر المحقون بالعزلة الحاملة لاكثر من مورث مقاومة لمضادات البيتا لاكتام مخلوطا مع المضاد (السيفتازيديم) كانت اقل من تلك التي شوهدت في الفئران المحقونة بالعزلة ذاتها ولكن بدون السيفتازيديم، مما يؤكد ان المضاد قد اثر في الخلية البكتيرية و منعها من انتاج عوامل الفوعة. في ذات الوقت لوحظ ان العزلة الحساسة احدثت

تغييرات نسيجية في كلى و مثانة الفئران اكثر مما احدثته العزلة الحاملة لمورثات المقاومة لمضادات البيتا لاكتام، الامر الذي يؤكد ان العزلات الحساسة تمتلك عوامل فوعة اكثر و اشد من نظيراتها المقاومة.

اوضح Gustafsson و جماعته [10]. ان استحثات طفرات مقاومة للسبروفلوكساسين او لحامض الفوسيديك في سلالات بكتريا *Staphylococcus epidermidis* جعلها اقل قدرة على التنافس مع نظيراتها غير الطافرة على استيطان الجلد في الانسان. و بين Koh و جماعته [11]. ان بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فشلت في اجتياج الطحال عندما استحث فيها طفرة لمقاومة الكاربابينيمات. كما ذكر Skurnik و جماعته [12]. ان هناك فهما عاما بان المقاومة للمضادات الحياتية يحمل معه تكلفة باهضه و سالبة تتمثل بانخفاض في معدل النمو داخل المضيف و انخفاض في معدل الانتقال والانتشار (Transmission) اي بمعنى اخر انخفاض عام في الفوعة.

في حين وجد Miskinyte و Gordo [13] حوالي 67% من سلالات *E. coli* الطافرة لمقاومة الستربتومايسين كانت اكثر قدرة على العيش داخل خلاي البلعم الكبير (Macrophage) من تلك السلالات الحساسة للمضاد نفسه و لكنها عانت من نقصان كبير في معدل النمو. و في دراسة اخرى، تبين ان بكتريا *Mycobacteriuum tuberculosis* الحساسة للمضادات الحياتية احدث تنخرا في نسيج الرئة اكثر بكثير من نظيرتها المقاومة [14]. وايضا اورد Franco و جماعته [15]. ان مضاد السبروفلوكساسين قد احدث تغييرات نسيجية شديدة في رئة الفئران المحقونة ببكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تمثلت بارتشاح هائل للخلايا الالتهابية داخل نسيج البارنكيمي في القصيبات الرئوية اكثر مما احدثته الخلايا الحساسة لنفس المضاد.

أورد الباحثون Marciano [5] و اخرون ان وجود المورثات الخاصة بمضادات البيتا لاكتام و خصوصا TEM-1 في سلالات البكتريا السالبة لصبغة غرام قد لا يرغم البكتريا على فقدان الموائمة للبيئة و بالتالي فقدان الفوعة فقد وجدوا ان بعض سلالات *E. coli* لا تتاثر بوجود هذه المورثات في حين تتأثر فوعة بكتريا *Salmonella enterica* بوجود هذه المورثات.

وجد في سلالات *E. coli* الحاملة لمورثات OXA-24 و OXA-10-like و SFO-1 و المسؤولة عن مقاومة مضادات البيتا لاكتام، نقصان في ارتباطات الجسور العرضية الرابطة لطبقة الببتيدوكلايكان مما أدى الى فقدان الموائمة البيئية داخل و خارج الجسم الحي [16] . و في السياق نفسه أورد Albarracin و جماعته [17]. ان وجود طفرات تتعلق بالمقاومة لمضادات البيتا لاكتام و خصوصا تلك المتعلقة بالبروتينات الرابطة للبنيسيلين أدى الى انخفاض معدل الانقسام في بكتريا *Streptococcus pneumoniae* و كذلك أثر في موائمتها و عيوشيتها داخل و خارج الجسم الحي.

عموما يمكن الخلوص الى ان وجود موروثات لمقاومة المضادات الحياتية قد اضاف عبئا على الفعاليات الحياتية للخلايا البكتيرية من خلال تصنيع بروتينات و احماض نووية جديدة و بالتالي افقدها جزء كبيرا من الطاقة التي تحتاجها لبناء عوامل الفوعة وهنا نجد ان التغييرات النسيجية كانت اشد في حالة البكتريا الحساسة لعدم وجود هذا العبء.

المصادر

1. Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S. and Morse, S.A. **2007**.*Jawetz ,Melnick and Adelbergs Medical Microbiology* . 24th.ed. The McGraw- Hill Companies , Inc. New York.P:224-232.
2. Farshad, S.,and Emamghoraishi, F. **2010**. A. Association of virulent genes *hly*, *sfa*, *cnf-1* and *pap* with antibiotic sensitivity in *Escherichia coli* strains isolated from children with community-acquired UTI. *Iran Red Crescent Med J*12:33–37.
3. Izdebski ,R, A., Baraniak, J., Fiett, A., Adler ,M. ,Kazma ,J., Salomon,C. ,and Gniadkowski**. 2013**. Clonal structure, extended-spectrum β-lactamases and acquired AmpC-type cephalosporinases of Escherichia coli populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries..*Antimicrob AgentsChemother*,57(1):309.
4. Bush, k.; Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A. **1995**. Functional classificationscheme for β- lactmase and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agent. Chemther* .39(6):1211-1233.
5. Marciano, D., Karkouti, O., and Palzkill, T. **2012**. A fitness cost associated with the antibiotic resistance enzyme SME-1 *B*-lactamase. *Genetics*. 176: 2381–2392.
6. Mctaggart, L.A., Rigby, R.C and Elliot, T.S. **1990** The pathogenicity of urinary traet infection associated with *Escherichia coli.Journal of Medical Microbiology*.32:41-53.
7. Alan, R. **1994**. *Culture of Animal cells. Amanual of Basic Technique*.3rd ed ,liss,Inc.New York.

8. عبد المحسن ، اشرف عبد الاعلى. **2010**. *تطبيقات محسوبة ببرنامجيات* . مكتبة ام القرى. القاهرة *SPSS V.17 for windows Assisstat Beta 7.5*
9. Karpman, D., Connell, M., Svenson, M., Scheutz, F., Alm, P. and Svanborg, C. **1997**.The associated between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *E. coli*. *J. Infect. Dis*. 151:775-782.
10. Gustafsson, I., O. Cars, and D.I. Andersson. **2003**. Fitness of antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis* assessed by competition on the skin of human volunteers. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* 52;258-263.
11. Koh, A., Priebe, G.,and Pier, G. **2005**. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. *Infect. Immun*. 73(4):2262–2272.
12. Skurnik, D., Roux, D., Cattoir, V., Danilchanka, O., Lu, X., Yoder-Himes, D., Han, K., Guillard, T., Jiang, D., Gaultier, C., Guerin, F., Aschard, H., Leclercq, R., Mekalanos, J., Lory, S., and Pier, G. **2013**. Enhanced *in vivo* fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 110(51):20747-20752.
13. Miskinyte, M. and Gordo, I. **2012**. Increased Survival of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* inside Macrophages. Antimicrob. *Agents Chemother*. 57(1):189-195.
14. Fernández, A., Pérez, A., Ayala, J., Mallo, S., Rumbo-Feal, S., Tomás, M., Poza, M., and Bou, G. **2012**. Expression of OXA-type and SFO-1 β-lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. *J. Antimicrob. Agents Chemother*. p. 1877–1884.
15. Franco, B., Montanari, S., Cigana, C., Bertoni, G., Oliver, A., and Bragonzi, A. **2012**. Antibiotic pressure compensates the biological cost associated with *Pseudomonas aeruginosa* hypermutable phenotypes in vitro and in a murine model of chronic airways infection. J. *Antimicrob. Chemother*. 67:p.962-969.
16. Albarracin Orio AG., Pin˜ as GE., Cortes PR., Cian MB.,and Echenique J. **2011** Compensatory evolution of pbp mutations restores the fitness cost imposed by b-bactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* 7(2): e1002000.
17. Smith, K., Saini, D., Bardarov, S., Larson, M., Frothingham, R., Gandhi, N., Jacobs Jr., W., Sturm, and Lee, S. **2014**. Reduced virulence of an extensively drug-resistant outbreak strain of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *PLoS One*. 9(4): e94953.