SEBHA UNIVERSITY JOURNAL VOL.03 NO. 1 2024
DOI: 10.51984/SUCP.V3I1.3488

مجلة جامعة سبها
Sebha University Journal

Journal homepage: https://sebhau.edu.ly/journal/index.php/CAS

تحديد ارتباط مقاومة المضادات الحيوية بالبلازميد

*نجوى شحات الجعراني علي[1] و احمد علي الجنقه[2]

[1]قسم علم الحيوان ، كلية العلوم ، جامعة سبها، ليبيا
[2]قسم التقنية الحيوية، كلية العلوم ، جامعة سبها، ليبيا

الملخص

تشكل مقاومة المضادات الحيوية في البكتيريا المسببة للأمراض مشكلة تهدد الصحه العامة. وان انتشار جينات المقاومة وعدم توفر مضادات فعالة يزيد من تفاقم حجم المشكلة، وانه عندما تكون جينات المقاومة موجودة على البلازميدات تكون مسؤولة عن انتشار الجينات المقاومة للمضادات الحيوية ،ويعتبر التحول الوراثي احد طرق انتقال البلازميدات. تهدف هذه الدراسة لتحديد ارتباط مقاومة المضادات الحيوية بالبلازميد، وحيث استخدمت عزلات سالبة الجرام متمثلة في بكتيريا E.coli ،واجري لها اختبار الحساسية للمضادات الحيوية،ولتحديدارتباط المقاومة بالبلازميد تم تحييد البلازميد باستخدام Ethidium Bromide (Et.Br)وSodium dodecyl sulfate (SDS).بينت النتائج حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية مقاومتها العالية لمجموعة Phenico، Cephalosporin، Tetracycline، Glycopeptide، Macrolid، Polymyxins، β- Lactamase ، وكانت حساسة لباقي المضادات، وكان اعلى تحسس للمجموعة Fluoroquinolones، Nitrofuran. وأظهرت نتائج فحص المحتوى الوراثي الجزيئي ان بكتيريا E.coli9 احتوت على ثلاثة حزم بلازميدية، و E.coli12 احتوت على حزمة من بلازميد بالإضافة لبلازميد كبير،واظهرت نتائج تحييد المقاومة فقدان المقاومة للمضادين Erythromycin و Chloramphenicol ،و أن انتقال البلازميدات هو عامل رئيسي يؤثر على مقاومة المضادات الحيوية التي يحملها البلازميد ،ويمكن تحييد البلازميدات باستخدام Et.Brو SDS،وانه يمكن انتقال المقاومة بالبلازميدات بالتحول الوراثي وبالتالي يمكن اكتساب جينات المقاومة للمضادات الحيوية.و ان البلازميد تحمل جينات مقاومة المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية:

ازالة البلازميد
ايتيديوم بروميد
مضاد حيوي
مقاومة البلازميد
نقل الجينيات الأفقي

Determine the association of antibiotic resistance with the extra chromosome

*Najwa shahat jaarany ali[1] , Ahmed ali aljangaa[2]

[1]Faculty of Science, Sebha University, Libya
[2]Faculty of Environment and Natural Resources, Wide Alshatti University, Libya

Keywords:

Antibiotic
Ethidium Bromide
horizontal gene transfer plasmid
resistance
plasmid curing

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a major public health problem. And that the spread of resistance genes and the lack of effective antibiotics exacerbates the problem, and that when resistance genes are present on plasmids, they are responsible for the spread of antibiotic resistance genes, Genetic transformation is a method of transmitting plasmids. This study aims to determine the association of antibiotic resistance with the extra chromosome. The bacteria was isolates of Gram-negative bacteria represented by E.coli. Sensitivity test of the bacterium against antibiotics was established, To study the role of plasmids in antibiotics resistance, curing experiment was using Ethidium Bromide (Et.Br), Sodium dodecyl sulfate. The results showed bacteria to resistant antibiotics of the Phenicol.Cephalosporin .Tetracycline. Glycopeptide .Macrolid .Polymyxins .β- Lactamase, AND sensitive to the OTHER ANTIBIOTIC, and were detected high sensitive to fluoroquinolones, Nitrofuran. The results of the molecular genetic content assay showed of the bacteria E.coli9 that contained three plasmid bundles, and E.coli12

*Corresponding author.
E-mail addresses: nj.khalifa@sebhau.edu.ly, (A. A. aljangaa) aljangaa@yahoo.com
Article History : Received 25 January 2024 - Received in revised form 13 May 2024 - Accepted 25 May 2024

contained a bundle of plasmid in addition to a large plasmid, Results showed the loss of resistance of the antibiotic Erythromycin and Chloramphenicol, and that resistance can be transmitted by plasmids by horizontal gene transfer (genetic transformation). Thus, antibiotic resistance genes can be acquired .The plasmid bears antibiotic resistance.

المقدمة

تشكل زيادة مقاومة المضادات الحيوية في البكتيريا المسببة للأمراض مشكلة تهدد الصحه العامة[1]، فتحدث مقاومة المضادات الحيوية عندما تكتسب البكتيريا القدرة على مقاومة المضادات الحيوية المصممة لقتلها، وبالتالي يمكن أن تسبب أمراضًا كان من السهل علاجها بالمضادات الحيوية لتصبح غير قابلة للعلاج، وغالبًا ما يكون القضاء على البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية أكثر صعوبة وأكثر تكلفة في بعض الحالات [2]، حيث اذا استمرت هذه المقاومة فان العدوى التي تسببها هذه البكتيريا ستؤدي لموت ملايين الأشخاص، الأهم من ذلك أن السبب الرئيسي والمعترف به عموما لأنتشار جينات مقاومة المضادات الحيوية هو حدوث الطفرات الجينية[3] و النقل الأفقي للجينات بواسطة البلازميد داخل الأنواع وفيما بينها [4].

فالبلازميدات هي عناصر وراثية منتشرة في المجتمعات البكتيرية، فبعضها يحتوي على جينات مفيدة، مثل جينات مقاومة المضادات الحيوية و العاثيات ومقاومة المعادن الثقيلة [5]،فعادة تحمل البلازميدات جينات المقاومة لمضاد حيوي معين أو عدد من مضادات الحيوية في البكتيريا [6]،فمن هذه البلازميدات ما تحمل جينات المقاومة لمجموعة من المضادات الحيوية منها مجموعة البيتا-لاكتام واسعة الأنتشار Extended spectrum β-lactamases (ESBLs)، والجينات المقاومة للكوليستين والبوليميكسين ،وجينات مقاومة مجموعة الكينولون [7].

ولمعرفة الدور الذي تلعبه البلازميد في مقاومة المضادات الحيوية يتم التخلص من البلازميدات عن طريق استخدام عوامل المعالجة مثل الإيتيديوم بروماید Et.Br، أو وكبريتات دوديسيل الصوديوم SDS او الأكريدين البرتقالي AO [6]. ،حيث يعتبر التخلص من البلازميد بمعاملة النمو البكتيري بعوامل المعالجه إجراءً هامًا لإثبات العلاقة بين صفة وراثية وحمل بلازميدات معينة لها، حيث لا يتم التعبير عن الصفات المظهرية المرتبطة بالبلازميد في المشتقات المعالجة[8]،فتعمل عوامل المعالجة على عزل البلازميد من النمو البكتيري، حيث تعد هذه الطريقة جيدة لمواجهة مقاومة المضادات الحيوية لأنها تعمل على القضاء على جينات مقاومة المضادات الحيوية المحمولة على البلازميد [7].

وأدى الاهتمام بالبلازميدات كنواقل وراثية إلى تطوير مجموعة متنوعة من الأساليب لإدخال الحمض النووي(DNA) البلازميدي في أنواع بكتيرية مختلفة [9]، من هذه الطرق التحول الوراثي حيث يتم فيها ادخال حمض نووي من خارج الخلية ودمجه في بكتيريا معينة ولنجاح هذه العملية تتطلب العديد من الشروط، بما في ذلك الحمض النووي الحر (DNA) والبكتيريا المتلقية المختصة، ويجب دمج الحمض النووي المنقول في الجينوم المتلقي أو اضافته كبلازميد، يجب أن تكون الخلايا البكتيرية في حالة كفاءة وليتم نقل DNA بشكل فعال[4]

الهدف من هذه الدراسة: تهدف هذه الدراسة لتحديد ارتباط مقاومة المضادات الحيوية بالبلازميد.

المواد وطرق العمل

العزلات المختبرة للدراسة :تم الحصول على العزلات البكتيرية لهذه الدراسة من البنك البكتيري بمعمل الأبحاث بقسم علم النبات جامعة سبها. وهي عزلات سالبة الجرام متمثلة في *E.coli9* ، *E.coli12*وتشير الأرقام لتسلسل العينات من بين العينات المحفوظه.

اختبار الحساسية :تم إجراء اختبار الحساسية بطريقة الانتشار وفقا لطريقة [10]لدراسة مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية مع إتباع تعليمات اللجنة الوطنية لمعايير المختبرات الطبية الأمريكي كما يلي:

1- تم تنمية البكتيريا على الوسط المغذي الصلب Muller Hinton agar.

2- تم حضر معلق بكتيري بأخذ مسحة لمستعمرة واحدة بواسطة اللوب البلاستيك وحقنها في 5مل من الوسط السائل و مقارنة مع محلول مكفرلاند القياسي تركيزه 0.5 الذي يعادل ($1.5*10^8$ خلية /ملليلتر)[11].

3- تم بواسطة الماسح القطني نشر المعلق البكتيري بحذر على سطح الآجار المغذي بحيث يتم مسح الطبق بكامله.

4- تم توزيع المضادات الحيوية على سطح الوسط بواسطة إبرة معقمة أو ملقط معقم بواقع 6 أقراص للطبق الواحد موضحة في الجدول (1)، بحيث يكون المسافة عن المضاد و الاخر حوالي من 2-3سم.

5– ومن تم حضنت الأطباق بشكل مقلوب عند 37ºم لمدة 24ساعة، واخذت النتائج بملاحظة مناطق التثبيط المتكونة حول اقراص المضادات الحيوية [12]،كرر الأختبار ثلاث مرات.

استخلاص DNA البلازميدي:تم إتباع طريقة التحلل القلوي alkaline lysis كما جاء في(Fritsch *et al*.,2011) [13] لعزل الDNA البلازميدي، تم العزل بمعمل الابحاث بجامعة سبها، وتتضمن هذه الطريقة الخطوات الأتية:

1- تم زراعة العزلة البكتيرية على وسط الأجار المغذي Nutrient agar و حضن لمدة من 18- 24 ساعة.

2. تم نقل مستعمرة من النمو البكتيري إلى 5مل من وسط السائل المغذي NB ثم حضنت في الحضانة الهزازة تحت درجة 37ºم لمدة 18 ساعة.

3. رسب النمو البكتيري باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق، تم التخلص من الطافي وغسل الراسب بمحلول كلوريد الصوديوم، ثم وضعت الأنابيب مقلوبة على أوراق الترشيح، وذلك لغرض تجفيف الراسب.

4. تم إضافة 100ul من المحلول المنظم الأول (Resuspension solution) وتركت الأنابيب في الحضانة عند 37ºم لمدة 30دقيقة ،ثم تم إضافة 200ul من المحلول المنظم الثاني (lysis solution)ويتم مزج الخليط بلطف وحرص، وضعت بعد ذلك الانابيب في الثلاجة لمدة 5دقائق، ثم تمت إضافة 150ulمن المحلول المنظم الثالث (Neutralizing solution) ويمزج الخليط جيدا بقلب الانبوب لأعلى واسفل بلطف وحرص فيتكون مزيج يشبه اللبن الرائب، وتوضع الأنابيب في ثلج مهروش لمدة 5دقائق.

5. تم اجري الطرد المركزي للأنابيب لمدة 10 دقائق 14000 دورة في الدقيقة، وملاحظة تكون راسب ابيض أسفل الأنابيب (حطام الخلايا) تم نقل السائل الطافي لأنابيب جديدة، ثم أضيفت لها ضعف حجمها ايثانول مركز وتركت عند 0-4م° لمدة 24ساعة.

6.تم أجري طرد مركزي للأنبوبة لمدة 10 دقائق، 14000 دورة في الدقيقة، وملاحظة تكون راسب ابيض أسفل الأنبوبة، وتم التخلص من الكحول وغسل الراسب بالإيثانول تركيزه 70%، أذيب راسب DNA في 25-100ميكرولتر من الماء المقطر المعقم.

الكشف عن DNA :باستعمال هلام الأجاروز تركيزه0.7% وجهاز الهجرة الكهربائية Electrophoresis تم الكشف عن تواجد الحمض النووي البلازميدي من عدمه وفقا لطريقة (Fritsch *et al*., 2011 ،[13, 14] حيث تم تحضير هلام الأجاروز بتركيز 0.7% (0.7 جم أجاروز+100مل1xTAE) بعد ذلك تم صب الجل في القالب المخصص وترك لمدة 20د حتى تحول للقوام الصلب، ومن ثم وضع الهلام داخل جهاز الهجرة الكهربائية المحتوي على محلول TAE. وتم خلط 4 ميكرولتر من صبغة التحميل Bromo-phenol blue وEt.Br واضيف اليها 18ميكرولتر من محلول جمض النووي البلازميدي المراد الكشف، وبحرص يتم وضع هذه المكونات في حفر الهلام يترك ليرحل لمدة ساعة ونصف.

وتم فحصه بنقل الجل الى جهاز UV Trans-illuminator وتم تصويره بكاميرا BDA camera.

تحديد ارتباط المقاومة بالبلازميدات :لتحديد ارتباط المقاومة للمضادات الحيوية بالبلازميد ثم اتباع طريقة (Zaman *et al*., 2010) [6] لإزالة البلازميدات من داخل الخلايا البكتيرية كالتالي:

1. تم استخدام المضادات التي اظهرت عزلات *E.coli* صفة المقاومة لها وهي Oxacillin(1µg)، Chloramphenicol(30µg)، Cephalothin(30µg) ، Erythromycin(30µg).

2. حضرت اطباق من وسط المولر هنتون وشبعت هذه الأطباق بالمضادات المنتخبة للدراسة OX، C، KF، E بحيث كل طبق يحتوي على مضاد لغرض استخدامه لتحديد الخلايا التي فقدت البلازميد نتيجة المعاملة بالعوامل المعالجة(المحييدات). حيث تم استخدام تراكيز من Et.Br (125)ميكروجرام لكل ملي ،و SDS بتركيز(10%) لتحييد البلازميد ،حيث تم تنمية البكتيريا المنتخبة للدراسة مع المضادات المقاومة لها لمدة 24 ساعة ،تم اجري تخفيفات تسلسلية من هذه العينة المنماة لنحصل على تركيز 10^3 خلية لكل ملي.

3.تمت اضافة 0.5 ملي من العينة المنماة مع 4.5 ملي من الوسط السائل NB يحتوي على تركيزات مختلفة من العوامل المحيدة (SDS، Et.Br) وبذلك يصبح التركيز 10^3 خلية لكل ملي ،تم حضنت العينة في حضانة هزاز عند 150 دورة في الدقيقة لمدة 48 ساعة.

4. بعد ذلك تم تخفيف العينة مرة اخرى لتركيز 10^3 خلية لكل ملي ب N.S معقم.

5.تم نشر 10 ميكرو من المزرعة على وسط مولر هنتون ووضع في الحضانة لمدة 24 ساعة وملاحظة نمو الطباق.

6.يتم اخذ المستعمرات بشكل عشوائي وعن طريق النسخ الكلوني يتم طباعة على الطبق مولر هنتون المجموعة الضابطة (لا يحتوي مضاد حيوي) والطبق المشبع بالمضاد الحيوي المقاومة لها وهي OX، C، KF، E ، ومن تم تركت الأطباق في الحضانة لمدة 24 ساعة عند 37^0م.

7. تم الكشف عن الخلايا التي فقد البلازميد بمقارنة نمو المستعمرات البكتيرية النامية على الطبق المجموعة الضابطة مع تلك الموجودة على الطبق الحاوي على المضادات الحيوية، المستعمرات التي ظهرت على الطبق المجموعة الضابطة ولكنها فشلت في النمو على الطبق الحاوي على المضاد هي العزلات التي من المحتمل ان تكون قد فقدت البلازميد نتيجة فقدها المقاومة للمضادات الحيوية. يتم تأكيد هذا الأختبار باخذ المستعمرات النامية واعادة زراعتها على الأطباق المشبعه بالمضاد وطبق الخالي من المضاد كشاهد ويتم تسجيل النتيجه بمقارنة النمو على الطبق الحاوي على المضاد و الخالي من المضاد.

التحول الوراثي بواسطة الثقب الكهربي تم اتباع طريقة Green & Sambrook, 2020) [15] كالتالي:

1.يتم تنمية مستعمرة واحدة حديثة النمو من البكتيريا الحساسة للمضادات *E.coli*$9^{C,E,KF,OX}$ ، *E.coli*$12^{C,E,KF,OX}$ في 5مل من الوسط المغذي السائلNB لمدة ساعتين ونصف، يتم ترسيب البكتيريا بالطرد المركزي لمدة 5دقائق, عند سرعة 14000دورة.

2.يتم التخلص من الوسط المغذي، ويتم اضافة 20مل من الجلسرول تركيز 10%، وتترك العينة في الثلج عند 0-4م°، لمدة 5-10د.

3.يتم عمل طرد مركزي للعينة لمدة 5-10د عند سرعة 14000 دورة، ثم التخلص من السائل.

يتم اعادة تعليق العينة في 5مل جلسرول تركيز 10%، وتترك العينة عند درجة حرارة0-4م° لمدة 10-30ثانية.

4.يتم تحضير عدد من الأنابيب المعقمة، بحيث تعلم الانبوبة الاولى بـ(-DNA) كونترول لا يتم اضافة الحمض النووي البلازميدي لها، الثانية بـ(DNA+) يتم اضافة الحمض النووي البلازميدي لها ،وتوزع عينة الخلايا المراد اجراء تحول وراثي لها على هذه الأنابيب بالتساوي.

5.يتم اضافة 5-10 ميكرولتر من (pDNA) الذي تم عزله سابقا، الى الأنابيب المعلمة بـ(DNA*E.coli9*+) و(DNA*E.coli12*+)، حيث يتم استخدام عينات pDNA المعزول من عينات *E.coli9*، *E.coli12* قبل المعاملة بـEt.Br .

6.يتم اخذ 100-150 ميكرولتر من كل عينة المحضرة سابقا وتضاف إلى الأنابيب المخصصة لجهاز النبضات الكهربية ويتم عمل نبضة الكهربائية بجهد (4000v) لإجراء التحول الوراثي

7.ثم تسحب العينات وتوضع في أنابيب معقمة ومعلمة كما في خطوة رقم (4)، تم توضع العينات عند 0-4م° لمدة 10ث، وبعد ذلك تضاف اليها 1ملي من الوسط المغذي السائلNB وذلك لتنشيط الخلايا وتترك في الحضانة الهزاز عند 37م° لمدة ساعة.

8. يتم تحضير اطباق وتشبع بالمضادات الحيوية التي تم استخدامها في اختبار ارتباط المقاومة اظهرت صفة الحساسية لها وهي E ، OX،KF ،C.

9.يتم زراعة 100ميكرولتر من البكتيريا على وسط مغذي صلب يحتوي على المضاد الحيوي معلم بـ-Dكشاهد لنمو الخلايا البكتيرية الغير مضاف لها DNA وثم تزرع العينات المضاف لها DNA على الأطباق المشبعة بالمضادات الحيوية والمعلمة بـD+، تترك العينات في الحضانة عند 37م° لمدة 12-16ساعة، ومن تم يتم تسجيل النتائج بملاحظة المستعمرات النامية.

10.ولدراسة علاقة ارتباط المقاومة للمضادات الحيوية ثم اخذ المستعمرات النامية وزراعتها على الأطباق التي تم تحضيرها كما في خطوة 8، ويتم الزرع عليها بالطبعة او النسخ الكلوني باستخدام Replica حيث يتم الطبعة على

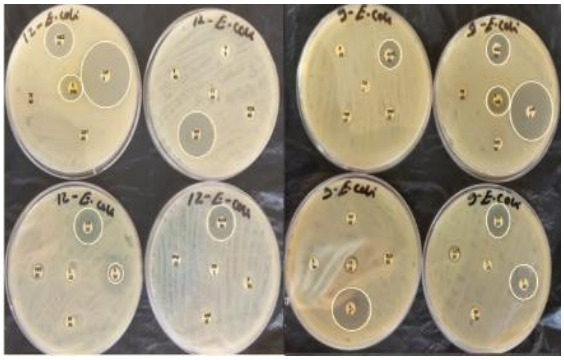
الأطباق الحاوية على المضادات الحيوية بالإضافة الى طبق خالي من المضادات ككنترول .

التحليل الإحصائي :تم تحليل البينات بحساب المتوسط الحسابي والإنحراف المعياري باستعمال برنامج (Microsoft office excel 2007).

النتائج والمناقشة

نتائج اختبار الحساسية

بينت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية أن البكتيريا *E.coli* كانت مقاومة لمجموعة من المضادات الحيوية (Ampicillin، Penicillin G، Cefoxtin، Cephalothin، Chloramphenicol، Imipenem، Oxacillin، Vancomycin، Doxycycline، Tetracycline، Ceftazidim، Erythromycin، Cloistinsulphate) حيث أظهرت المقاومة الكاملة لهذه المضادات كما موضحة في الجدول (1) و شكل (1).



شكل 1 توضح نتائج اختبار الحساسية لعزلات *E.coli* (9،12) حيث نلاحظ قطر التثبيط حول المضادات AUG، CN S، MEZ، F، CIP، NA ومقاومة البكتيريا لباقي المضادات.

جدول 1 يوضح نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لعزلات *E.coli*

اسم المضاد الحيوي	رمزه وتركيزه	*E.coli9*	*E.coli12*
Augmentin	AUG30	R	R
penicillin G	P10	R	R
Ampicillin	AMP30	R	R
Oxacillin	OX1	R	R
Imipenem	IPM10	R	R
Mezlocillin	MEZ75	S	S
Chloramphenicol	C10	R	R
Cephalothin	KF10	R	R
Cefoxtin	FOX30	R	R
Ceftazidim	Caz30	R	R
Gentamycin	CN10	R	R
Streptomycin	S10	S	R
Tetracycline	TE15	R	R
Doxycycline	DXT30	R	R
Vancomycin	VA5	R	R
Erythromycin	E10	R	R
Nalidixic acid	NA30	S	S
Ciproflaxacin	CIP5	S	S
Cloistinsulphate	CT30	R	R
Nitrofurantion	F300	S	S

R=مقاومة،S=حساسة معتمد على [16]

من النتائج التي المعروضة في الجدول تبين ان جميع عزلات *E.coli* اظهرت مقاومة عالية لمجموعة Phenico، Cephalosporin، Tetracycline، Glycopeptide، Macrolid، Polymyxins بنسبة 100%، بينما كانت نسبة المقاومة لمجموعة β- Lactamase 89% وكانت حساسة لباقي المضادات، وكان اعلى تحسس للمجموعة Fluoroquinolones، Nitrofuran بنسبة 100%.

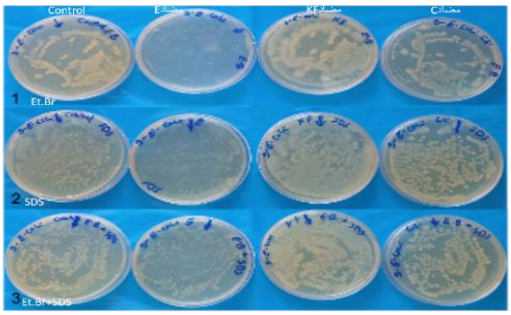
وهذه النتيجة تشابهت مع دراسة[17]حيث أظهرت نتائجه مقاومة بكتيريا *E.coli* للمضاد Penicillin G، واختلفت نتائجه في مقاومة *E.coli* للمضاد Chloramphenicol.

وتشابهت هذه النتيجة مع دراسة [18]،[19]حيث كانت عزلات *E.coli* مقاومة بنسبة 100% للمضاد AMP، P، العديد من الدرسات أكدت على ان 90% من بكتيريا *E.coli* تكون مقاومة لمجموعة بيتا لاكتام نتيجة افراز بيتالاكتاميز [20].

وتشابهت مع دراسة[21] التي حدت نسبة مقاومة بكتيريا *E.coli* للمضاد جينتامايسين بنسبة 53.2% وكانت حساسة للمضاد نيتروفيورنت بنسبة تحسس 90.3% وهي نتيجة مقاربة لماجاء في دراستنا الحالية، تعمل مضادات البيتا لاكتام على كسر حلقة البيتا لاكتام في مجموعة البنسلين والسيفالوسبورينات، وتثبيط تكون طبقة الببتيدوجليكان وبالتالي تثبيط تكون الجدار الخلوي ،وقد تكون سبب المقاومة لأفراز انزيم البيتالاكتاميز والتي تكون مسئول عن ذلك بلازميد او كروموسوم [22].

تحديد ارتباط المقاومة بالبلازميدات

بينت النتائج ان Et.Br نجح في ازالة البلازميد افضل من العاملين الأخرين كما موضح في الشكل (2، 3).

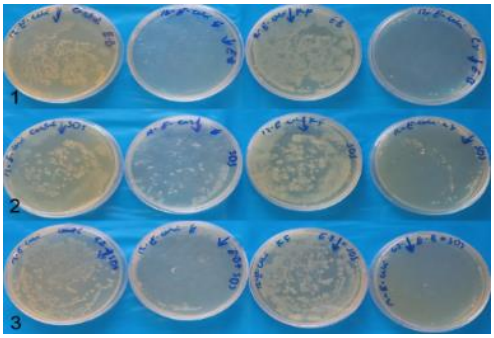


شكل2 توضح تحديد ارتباط المقاومة بالبلازميد لبكتيريا *E.coli9*

توضح الشكل نتائج المعاملة يشير 1 الى نتيجة المعاملة بالأتيديوم بروميد فنجد نمو المستعمرات في طبق المجموعة الضابطة الخالي من المضادات وغياب نمو المستعمرات في الطبق الحاوي على المضاد اريترومايسسن ونموها في الأطباق الحاوية على المضاد KF،و C ،وتشير 2 نتيجة المعاملة SDS نمو المستعمرات في الطبق المجموعة الضابطة وايضا في جميع الاطباق المشبعة بالمضادات التي كانت مقاومة لها. تشير3 للمعاملة بالأتيديوم بروميد وSDS فنجد نمو المستعمرات في جميع الأطباق بما فيها الحاوية على المضادات المقاومة لها.

حث تبين ان المستعمرات فقدت المقاومة للمضادين E و C في حالة المعاملة Et.Br فقط للعزلات *E.coli9* ، *E.coli12* كما موضح في الجدول (2).

مقارنة بأطباق المجموعة الضابطة (الخالية من المضادات الحيوية) في المعاملات الثلاثة ،وتباين نمو المستعمرات في باقي الأطباق المشبعة بالمضادات الحيوية والمعاملة SDSو للمعاملة بالمزيج بين Et.Br وSDS.



شكل 3 توضح تحديد ارتباط المقاومة بالبلازميد لبكتيريا *E.coli12*

1 تشير للمعاملة بـEt.Br فنجد نمو المستعمرات في طبق المجموعة الضابطة الخالي من المضادات وغياب نمو المستعمرات في الطبق الحاوي على المضاد Eو المضاد C ونموها في الطبق الحاوي على المضاد KF ،OX.و2 تشير نتيجة المعاملة SDS نمو المستعمرات في الطبق المجموعة الضابطة وعدم نموها في الطباق المشبعة بالمضادات Eو C وهذا يدل على فقدان المقاومة لهذه المضادات، تشير3 للمعاملة بالمزيج بين Et.Br وSDS اعطت نتيجة مقاربة لما اعطته المعاملة بالSDS.

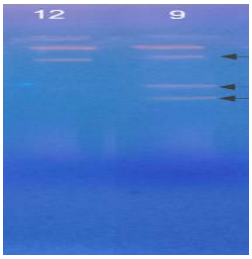
جدول 1 يوضح تغير انماط الحساسية بعد المعاملة بـEt.Br

بكتيريا	قبل معاملةEt.Br	بعد المعاملةEt.Br
E.coli9	MEZ ,NA ,CIP ,F	MEZ ,NA ,CIP ,KF ,E
E.coli12	MEZ ,NA ,CIP ,F	MEZ ,NA ,CIP ,KF ,E ,C

من النتائج المعروضة في الجدول لتحليل تحييد البلازميد وقياس حساسية المضادات الحيوية للعزلات البكتيرية ذات المقاومة لأكثر من مضاد حيوي حيث كانت عزلات *E.coli9* و*E.coli12* حساسة للمضادات (MEZ ,NA ,CIP F,) فبعد التحييد تبين انها فقدت مقاومتها لأثنين من المضادات الحيوية (KF ،OX) من اصل اربعة مضادات حيوية كانت مقاومة لها وثم دراستها في هذا الأختبار للعزلة *E.coli9* وهذه المضادات هي (KF، OX، E، C) وبذلك اصبحت حساسة بنسبة 30% بعد معاملتها بـEt.Br ،اما *E.coli*12 تبين انها فقدت مقاومتها لثلاثة من المضادات الحيوية من اصل اربعة مضادات حيوية ثم دراستها في هذا الأختبار و كانت مقاومة لها فبعد معاملتها بـEt.Br فقدت مقاومتها بنسبة 30% للمضادات الحيوية فاصبحت حساسة لهذه المضادات (MEZ ,NA ,CIP , F,KF ,E ,C).

وعند استخلاص الحمض النووي البلازميدي للبكتيريا المستخدمة كماهو موضح في الشكل (4)، فتبين ان *E.coli9* احتوت على ثلاثة حزم بلازميدية (بلازميد صغير)، و*E.coli12* احتوت على حزمتين (بلازميد كبير والبلازميد الصغير)، وبذلك قد يكون احدى هذه البلازميدات مسؤول عن نمط المقاومة للمضادات الحيوية. وهذا مشابه لدراسة [23] لتحديد المحتوى البلازميدي لعدد 16عزلة معزولة من التهاب المجاري البولية، 14عزلة لبكتيريا *E.coli* و2 لبكتيريا *S.aureus*، حيث احتوت بعض عزلات بكتيريا *E.coli*على حزمة بلازميدية واحدة بينما البعض الأخر احتوى على حزمتين فقط ،اما بكتيريا *S.aureus* بعضها احتوى على حزمه واحده وبينما خلو الأخرى من البلازميدات.

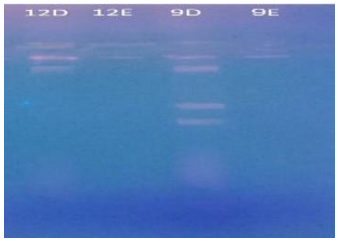
وكانت مقاربة لما جاء في دراسة [24] بينت نتائجه إن (14) عينة من بكتيريا *E.coli*احتوت على بلازميدات تراوحت عددها ما بين 1-7حزم بلازميدية ،و ان بكتيريا *E.coli ATCC 25922* احتوت على 6 بلازميدات، و في بكتيريا *S.aureus*وجد أن (6) عينات من أصل(15) عينة احتوت على بلازميدات تراوحت عدد هذه البلازميدات ما بين1-3 حزم بلازميدية، وان (8) عينات لم تظهر اي وجود للبلازميدات، و وجد ان بكتيريا *S.aureus ATCC* 22923احتوت على4 بلازميدات، كما وجد بلازميد واحد كبير في كل من عينات بكتيريا *E.coli*و*S.aureus* ، وتشابهت ايضا مع دراسة [25] حيث تحصل في نتائجه احتواء بكتيريا *E.coli* على ثلاثة حزم بلازميدية ووضح ان هذه البلازميدات او احداها قد تحمل جين المقاومة لهذه المضادات.



شكل 4 نتائج فحص المحتوى البلازميدي لبكتيريا *E.coli*

E.coli12=12، E.coli9=9

وعند عزل الDNAالبلازميدي من العينات المعاملة بـEt.Br تبين من خلال نتائج الترحيل كما موضحه في الشكل (5) عدم ظهور حزم البلازميد وذلك نتيجة المعاملة بالإيتيديوم والذي سبب في تلف وفقدان البلازميدات، وهذا يتفق مع ماجاء في دراسة [7] الذي اشار بان العوامل المعالجة Et.Br و الأكردين البرتقالي AO تعتبر من عوامل تداخل الحمض النووي وهي من العوامل المهمة لطرد البلازميد ووجد ان لها نشاط مضاد للبلازميدات في العديد من البكتيريا بما فيها بكتيريا *E.coli*.

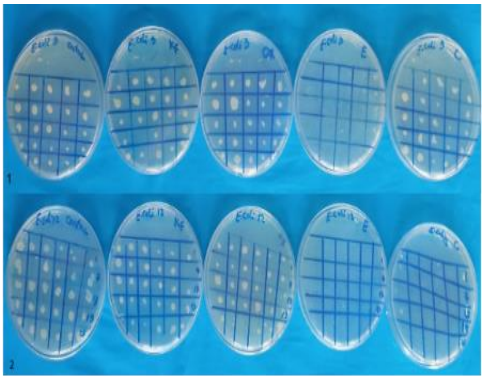


شكل 5 نتائج دراسة تاثير المعاملة بالأثيديوم على عزلات *E.coli*

تشير 9E ،12Eالى العينة *E.coli9*، *E.coli12* معاملة بـEt.Br ، بينما تشير 9D ،12Dالي عينة *E.coli9* و *E.coli12* قبل المعاملة كاشاهد.

تأكيد ارتباط المقاومة بالبلازميد

من النتائج التي تحصلنا عليها اعطت مؤشرًا أوليًا بان مقاومة المضادات الحيوية مرتبطة بالبلازميد، حيث تم مقارنة مستوى مقاومة المضادات وحساسيتها التي عبرت عنها الخلايا البكتيرية التي تم الحصول عليها بواسطة المعاملة بـEt.Br؛وذلك بمقارنة المستعمرات النامية على الأطباق المشبعة بالمضادات مع طبق المجموعة الضابطة، فنجد نمو جميع المستعمرات النامية على طبق المجموعة الضابطة واختلف عدد المستعمرات النامية على الأطباق المشبعة بالمضادات كما موضح في الشكل (6) وجدول (3)، حيث لم يحجث نمو للبكتيريا على الطبق المشبع بالمضاد C لعزلة *E.coli12* ونموها على الطبق المشبع بالمضاد C لعزلة *E.coli9*، وعدم نمو جميع العزلات *E.coli12*،*E.coli9* على الأطباق المشبع بالمضاد الأريترومايسين(E) فبتالي يأكد فقدها لمقاومة هذا المضاد نتيجة فقد البلازميد المسئول عن نمط المقاومة، ونمت معظم المستعمرات على الأطباق المشبعة بالمضادات الحيوية OX، KF لجميع العزلات *E.coli12*،*E.coli9* .



شكل 6 تأكيد ارتباط المقاومة بالبلازميد لبكتيريا *E.coli* كما موضح في الشكل حيث *E.coli9*=1، *E.coli12*=2، فنجد نمو جميع المستعمرات في الطبق المجموعة الضابطة وغيابها بالكامل في الطبق المشبع بالمضاد E لكلا العينتي*E.coli9* ، *E.coli12*،وعدم نموها في الطبق المشبع بالمضاد C للعينة *E.coli12*.

جدول 2 نسبة التحييد للعزلات البكتيرية المعاملة بEt.Br

العزلات البكتيرية	النسبة المئوية لتحييد الDNA البلازميدي بواسطة المضادات			
	E	KF	OX	C
E.coli9	100	0	0	33.3
E.coli12	100	0	0	100

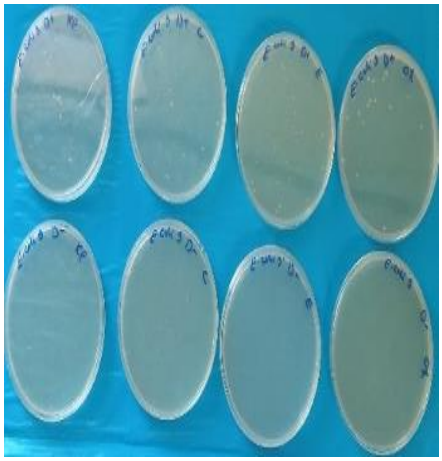
100=عدم نمو جميع المستعمرات اي نسبة التحييد 100% ،اي نجاح Et.Br في ازالة المقاومة ،0=جميع المستعمرات قاومت المضاد اي فشل Et.Br في ازالة المقاومة اي نسبة التحييد 0%

فمن خلال النتائج المعروضة في الجدول تباين نمو المستعمرات للعزلة *E.coli9* و*E.coli12* على الطبق المشبع بالمضاد E ،C حيث كان نسبة التحييد 100% ،33.3% و 100% ،100%على التوالي، و قد يرجع الى فقد البلازميد الحامل لجين مقاومة لهذه المضادات، في حين كانت نسبة التحييد للمضادين OX، KF هي0% اي لم تفقد المستعمرات مقاومتها قد تكون جينات المقاومة محمولة على الكروموسوم ،وقد يرجع الإختلاف في نسب التحييد بين عزلتين *E.coli9* و*E.coli12* لأختلاف محتوهما من البلازميدات، ان الألية التي تعمل بها العومل المعالجة على البكتيريا فهي تسبب بفقدان البلازميد وتحطيم الغشاء الخارجي وتغير في سمك طبقة البيبتيدوجليكان [6]، وهذه مشابه لدراسة [7] للتخلص من المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي تنقلها البلازميدات باستخدام Et.Br و AO حيث لاحظ تغير في نمط الحساسية للمضادات الحيوية بعد المعالجة حيث ازدادت حساسية 13 عزلة *E.coli* للمضادات الحيوية المختلفة بعد المعالجة Et.Br،بينما اظهرت 7 عزلات *E.coli* ازدياد حساسيتها تجاه المضادات الحيوية بعد المعالجة AO، بينما اظهرت 7 من اصل 13 عزلة *E.coli* تغيرا في نمط الحساسية للمضادات الحيوية بعد المعالجة بالخليط Et.Br و AO، بينما 12 عزلة *E.coli* لم تظهر اي تغير في نمط الحساسية للمضادات الحيوية ،وايضا تشابهت مع دراسة [26] حيث استخدموا Et.Br وAO و SDS كعوامل كيميائية أشارت النتيجة إلى إيجابية العلاج.، و أن Et.Br هو عامل معالجة أفضل من AO و SDS.

وتشابهت ايضا مع دراسة [27] في دراسته لكيفية القضاء الفعال على مقاومة الأدوية والعوامل الجنسية في *E.coli* بواسطة SDS أظهرت نتائجه أن بكتيريا *E.coli* فقدت مقاومتها للأدوية وأصبحت حساسة للتتراسيكلين عن طريق العلاج بـ SDS بينما كان عامل الجنس (F) سليمًا.

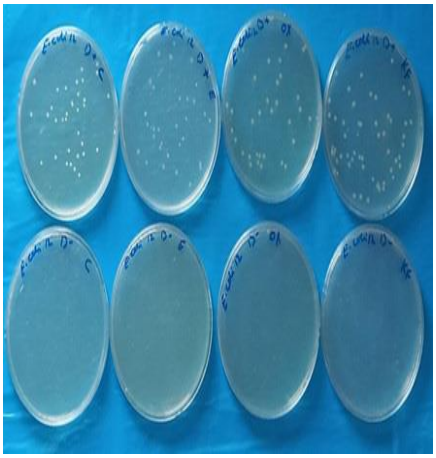
نتائج التحول الوراثي

تم استخدام جهاز النبضات الكهربية (Electroporation) لإدخال DNA البلازميدي للخلايا البكتيرية ليتم التحول الوراثي باتباع طريقة [15]كما وضح في طرق العمل سابقا ،فكانت النتائج كما موضحة في الشكل (8،7)، حيث تظهر النتائج نمو المستعمرات البكتيرية على الأطباق المعلمة بDNA+ والتي اضيف لها الحمض النووي البلازميدي وهذا يدل على دخوله داخل الخلية البكتيرية ونجاح عملية التحول الوراثي حيث اكسبها مقاومة المضادات التي فقدتها نتيجة المعاملة بالمحييدات، وغيابها في الأطباق المشار لها بـD- .



شكل7توضح نتائج التحول الوراثي لبكتيريا *E.coli9*

تشير D+الى ان العينة مضافة لها DNAالبلازميدي، كما تشير D-الى ان العينة لم يضاف لها DNAالبلازميدي اي كونترول وهي تمثل العينة المعاملة بالأيتيديوم برومايد لم يجرى لها تحول وراثي، KF، C،E، OX هي المضادات التي تم انتخابها لإجراء التحول الوراثي حيث فقد البكتيريا مقاومتها بعد المعاملة بEt.Br، كما توضح الشكل نمو بعض المستعمرات البكتيرية على الأطباق المشار لها بD+ ،وغيابها في الأطباق المشار لها ب-D.

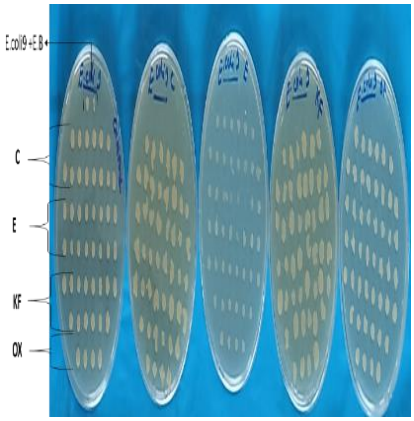


شكل 8 توضح نتائج التحول الوراثي لبكتيريا *E.coli12*

الشكل المعروضة توضح نمو عدد من المستعمرات على اطباق D+ اي اطباق التحول الوراثي حيث نلاحظ نمو المستعمرات على اطباق المشبعة بالمضادات الحيوية C، E،OX،KF يعني نجاح التحول الوراثي وغياب نمو المستعمرات على اطباق المجموعة الضابطة-D

تبين نتائج التحول الوراثي للبكتيريا *E.coli* نمو عدد من المستعمرات على الأطباق D+ للمضادات KF ،C،E ،OXحيث كان متوسط عدد هذه المستعمرات 27 ،20 ،35 ،18 على التوالي لبكتيريا *E.coli9* ،و 63، 33، 39، 38 مستعمرة لبكتيريا *E.coli12* على التوالي ،اي اكتسبت جين المقاومة المنقولة لهاعن طريق التحول الوراثي.

واظهرت نتائج تحديد علاقة ارتباط المقاومة بين المضادات الحيوية باستخدام النسخ الكلوني Replica فتبين النتائج نمو جميع المستعمرات للعينة المحولة وراثيا *E.coli9* على طبق المجموعة الضابطة والاطباق المشبعة بالمضادات الحيوية ماعدا الصف الأول منها المتكون من حفرتين والذي يمثل عينات ضابطة موجة اي العينة المعاملة بالأيتيديوم بروماید والمعلمه ب *E.coli9 +E.B* كما في الشكل (9)، فنجد عدم نموها على الأطباق المشبعة بالمضادات الحيوية لفقدها قدرتها على المقاومه نتيجة المعاملة Et.Br الذي جعلها حساسة لهذه المضادات.



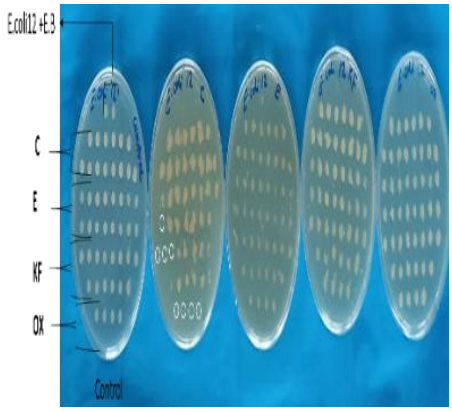
شكل 9 توضح تحديد علاقة ارتباط المقاومة بين المضادات الحيوية لبكتيريا *E.coli*9 المحولة وراثيا

الصف الأول (الحفرتين) عينة معاملة بالأتيديوم بروماید *E.coli9 +E.B* نجدها نمت في الطبق كونترول وعدم نموها في الأطباق المشبعة بالمضادات الحيوية وذلك لفقدها نمط المقاومة نتيجة معاملتها بالأتيديوم بروماید ،الصفين التاني والثالث هذه الحفر زرعت بالمستعمرات المقاومة للمضاد C ، والصفين الرابع والخامس هذه الحفر زرعت بالمستعمرات المقاومة للمضاد E ،والصفين السادس و السابع هذه الحفر زرعت بالمستعمرات المقاومة للمضاد KF ،الصف الثامن الأخير هذه الحفر زرعت بالمستعمرات المقاومة للمضاد OX .

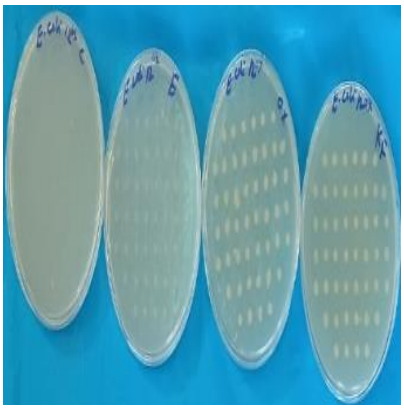
وكانت نتيجة العينة المحولة وراثيا *E.coli12* مقاربة لنتيجة المتحصل عليها *E.coli9* ولكنها اختلفت عنها قليلا كما موضحة في الشكل (10)،حيث نجد عدم نمو جميع المستعمرات المقاومة للمضاد OX على الطبق المشبع بالمضاد C وليتم تأكيد هذه النتيجة تم اعادة زراعة المستعمرات المحولة وراثيا النامية على الطبق المشبع بالمضاد OX وزراعتها على اطباق مشبعة بالمضادات C، E، KF، OX.

ومن النتائج التي المبينة غياب بعض المستعمرات للمضاد سيفالوتين KF فنجد لا توجد علاقة ارتباط بين المضاد C وOX كما موضحة في الشكل (9)، وكانت ارتباط المقاومة بين المضاد C وKF حيث نسبة ارتباطهما 78 % كما موضحة في الشكل (11).

ومن نتائج تأكيد ارتباط المقاومة بين OX ومضادات C، E، KF، OX وجدنا نمو جميع المستعمرات على الأطباق المشبعة بالمضادات E، KF، OX كما موضحه في الشكل (10) وعدم نموها على الطبق المشبع بالمضاد C وهذا ياكد بانه لايوجد ارتباط للمقاومة بين هذين المضادين ،وبالتالي نستنتج من هذه النتائج انه قد يكون جين واحد مسئوول عن المقاومة المتعددة للمضادات E، KF، OX او اليلات متعددة مسئوولة عن نمط المقاومة.



شكل 10 توضح تحديد علاقة ارتباط المقاومة بين المضادات الحيوية C، E، KF، OX لبكتيريا *E.coli12* المحولة وراثيا ،الدوائر البيضاء توضح المستعمرات التي لم تنمو ،نجد نمو المستعمرات على معظم الأطباق فيما عدا المثلة بدوائر بيضاء



شكل 14تحديد علاقة ارتباط المقاومة بين المضاد OX المضادات الحيوية C ، K،E لبكتيريا *E.coli12* المحولة وراثيا حيث نلاحظ نمو جميع المستمعرات على جميع الأطباق ماعدا طبق المشبع بالمضادC

وبشكل عام نستنتج ان هناك عدد من الجينات التي تتحكم في نمط المقاومة لهذه المضادات، او يكون جين واحد لديه عدد من الأليلات المتحكمة في أكثرمن مظهر للمقاومة للمضادات الحيوية، فبتالي من النتائج التي تحصلنا علىها يمكن وضع مؤشرا مبدئيا للتركيب الجيني Genotype لبكتيريا *E.coli9* و*E.coli12* كماموضح في الجدول(4).

جدول 3 يوضح النمط الجيني لبكتيريا *E.coli12, E.coli 9*

بكتيريا	Genotype
E.coli9	C^R, KF^R, E^R, OX^R
E.coli12	C^R, KF^R, E^R, OX^R

وهذه النتيجة مشابه لما جاء في [25] درس مقاومة البلازميدات للأموكسيسيلين والسيبروفلوكساسين في عزل *E.coli* المسببة لعدوى المسالك البولية، ومن نتائجه التي تحصل علىها ان بكتريا *E.coli* تحتوي على بلازميد مقاوم للمضادات الحيوية وقدرتها على نقل جينات المقاومة من خلال النقل الجيني الأفقي. حيث كانت *E.coli* المعزولة مقاومة للمضادات AMX و AMP و CIP. لذلك تم استخدامها كمانح وتم اختيار *E.coli* DH5α كمتلقي لكونها حساسة لهذه المضادات الحيوية. تم إجراء كل من الاقتران والتحول. أظهرت النتائج أن بكتيريا *E.coli* DH5α اكتسبت جين المقاومة المنقولة لهاعن طريق الاقتران والتحول. فالتحول الوراثي هو العملية التي يتم فيها استيعاب أجزاء من من الحمض النووي خارج الخلية ودمجها بواسطة بكتيريا معينة [4] وبينت الدراسات أن البلازميدات يمكن أن تلعب دورًا في اكتساب مقاومة الأدوية المتعددة عن طريق النقل الجيني المتكرر ، كما تم وصف البلازميدات

على أنها شفاء أخير للبكتيريا المقاومة للأدوية ،واشارت العديد من الدراسات ان للبلازميدات دور مهم في اكتساب المقاومة للعديد من المضادات الحيوية ،وان البلازميدات عبارة عن قطع كروموسومية إضافية من الحمض النووي DNA قادرة على التكاثر بشكل مستقل عن الجينوم وهي مهمة في انتشار الجينات المقاومة للمضادات الحيوية[1] .

و يمكن نقل البلازميدات من خلية إلى أخرى ، وبالتالي قد تحمل مجموعات من المعلومات الجينية المتخصصة مثل البلازميدات المقاومة للأدوية (عوامل R) عند انتقالها لخلية اخرى قد تكسبها صفة المقاومة البكتيريا للأدوية [2].

ويمكن أن يحمل البلازميد الواحد الجينات التي تشفر لمقاومة العديد من الأدوية (مقاومة الأدوية المتعددة - MDR) مثل الستربتومايسين والكلورامفينيكول والتتراسيكلين والسلفوناميدات [2].

تشمل مقاومة المضادات الحيوية المشفرة بالبلازميد معظم ، إن لم يكن كل فئات المضادات الحيوية المستخدمة ومن أبرزها السيفالوسبورينات والفلوروكينولونات والأمينوغليكوزيدات [28].

الخلاصة والأستنتاج

انتشار مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية اصبحت مشكلة تهدد الصحه العالمية ،ومع عدم وجود مضادات حيوية جديدة وفعالة والأنتشار السريع لجينات المقاومة للمضادات الحيوية عبر التحول الوراثي ادى لزيادة وتفاقم حجم المشكلة.لذلك تم في هذه الدراسة تحديد ارتباط مقاومة المضادات الحيوية بالبلازميد، فخلصت هذه الدراسة ان البكتيريا المدروسة تميزت بقدرتها العالية على مقاومة المضادات الحيوية المستخدمة ،وتبينت نتائج تحديد المحتوى الوراثي احتواء بكتيريا E.coli على حزمتين من البلازميدات ماعدا E.coli9 التى احتوت على ثلاثة حزم بلازميدية، و ان مقاومة المضادات. الحيوية مرتبطة بالبلازميد فعند معاملة العينات المنتخبة للدراسة بـEt.Br وSDS تبين ان البكتيريا المعاملة اصبحت حساسة للمضادات التي اظهرت مقاومتها قبل المعاملة ،و بذلك نستنتج من هذه الدراسة ان مقاومة المضادات الحيوية مرتبطة بالبلازميد، وان البلازميدات هي المسئول الأول عن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، وانه يمكن طرد هذه البلازميدات عند معاملتها باEt.Brو SDS ويمكن كسب صفة المقاومة بنقل البلازميدات من خلية الى خلية اخرى من خلال التحول الوراثي.

قائمة المراجع

[1]- F. Svara and D. J. J. B. e. b. Rankin, "The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance," vol. 11, no. 1, pp. 1-10, 2011.

[2]- F. Zaima, "A study on relationship of Plasmids with Azithromycin and Ciprofloxacin Resistance in isolates causing Urinary Tract Infection," BRAC Univeristy, 2018.

[3]- J. L. J. D. D. T. T. Martinez, "General principles of antibiotic resistance in bacteria," vol. 11, pp. 33-39, 2014.

[4]- Y. Liu, Z. Tong, J. Shi, Y. Jia, K. Yang, and Z. J. M. Wang, "Correlation between exogenous compounds and the horizontal transfer of plasmid-borne antibiotic resistance genes," vol. 8, no. 8, p. 1211, 2020.

[5]- P. E. Turner, E. S. Williams, C. Okeke, V. S. Cooper, S. Duffy, and J. E. J. E. Wertz, "Antibiotic resistance correlates with transmission in plasmid evolution," vol. 68, no. 12, pp. 3368-3380, 2014.

[6]- M. Zaman, M. Pasha, and M. Akhter, "Plasmid curing of Escherichia coli cells with ethidium bromide, sodium dodecyl sulfate and acridine orange," *Bangladesh Journal of Microbiology*, vol. 27, no. 1, pp. 28-31, 2010.

[7]- M. A. Hassan, M. S. Rasool, F. A. Ansari, and S. U. J. I. J. o. P. Kazmi, "Plasmid-Borne Drug Resistance Elimination Potential of Ethidium Bromide and Acridine Orange in Multidrug Resistant and Extensive Drug Resistant Escherichia Coli," vol. 18, no. 2, pp. 35-42, 2020.

[8]- E. N. Mbim, C. I. Mboto, U. O. J. A. J. o. m. Edet, and Health, "Plasmid profile analysis and curing of multidrug resistant bacteria isolated from two hospital environments in Calabar Metropolis, Nigeria," vol. 1, no. 1, pp. 1-11, 2016.

[9]- J. Saunders and V. A. Saunders, "4 Bacterial Transformation with Plasmid DNA," in *Methods in microbiology*, vol. 21: Elsevier, 1988, pp. 79-128.

[10]- A. Bauer, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method," *Am J clin pathol*, vol. 45, pp. 149-158, 1966.

[11]- السعدي، ز. ح. ع. و الشويخ، ر. م. ع. ا. 2019. الكشف المظهري والجزيئي عن انظمة الدفق *Efflux Pumps* في بكتيريا *Escherichia coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية. ماجيستير، إبن الهيثم – جامعة بغداد.

[12]- NCCLS, *National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility testing*. Pennsyl vania, 2002.

[13]- E. F. FRITSCH, T. MANIATIS, and J. SAMBROOK, "Molecular cloning : a laboratory manual," *Cold Spring Harper Laboratory Press*, 2011.

[14]- E. Akila, M. Usharani, and R. Rajavel, "Metal (II) complexes of bioinorganic and medicinal relevance: Antibacterial, Antioxidant and DNA cleavage studies of tetradentate complexes involving O, N-donor environment of 3, 3′-dihydroxybenzidine-based Schiff bases," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, no. 2, pp. 573-581, 2013.

[15]- M. R. Green and J. Sambrook, "Transformation of Escherichia coli by Electroporation," *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2020, no. 6, p. pdb. prot101220, 2020.

[16]- CLSI, "Clinical & Laboratory Standards institute " *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI* vol. 31, pp. 1-163, 2011.

[17]- M. A. Mahmood, "The antibacterial effect of silver nanoparticles on some bacterial pathogens," *Iraqi Journal of Physics*, vol. 10, no. 18, pp. 56-61, 2012.

[18]- O. Aiyegoro, O. Igbinosa, I. Ogunmwonyi, E. Odjadjare, O. Igbinosa, and A. J. A. J. o. M. R. Okoh, "Incidence of urinary tract infections (UTI) among children and adolescents in Ile-Ife, Nigeria," vol. 1, no. 2, pp. 13-19, 2007.

[19]- B. Navaneeth, S. Belwadi, and N. J. T. d. Suganthi, "Urinary pathogens' resistance to common antibiotics: a retrospective analysis," vol. 32, no. 1, pp. 20-22, 2002.

[20]- الخضيري، م. ك. ع ، جياد، ش. ش. 2016. تشخيص بكتريا المسببة لالتهاب المجاري البولية وذات المقاومة الدوائية المتعددة المعزولة من المرضى المراجعين لمدينة الصدر التعليمية في النجف *Escherichia coli* ماجيستير، جامعة الفرات الاوسط/ كوفة.

[21]- R. Gautam *et al.*, "Antimicrobial susceptibility patterns of Escherichia coli from various clinical sources," *Journal of Chitwan Medical College*, vol. 3, no. 1, pp. 14-17, 2013.

[22]- غازي، ر. ث.، السماك، ا. غ. 2020. التأثير التازري لدقائق الزنك النانوية والمضاد الحيوي Erythromycin على بكتيريا *Staphylococcus aureus* المقاومة المعزولة من اصابات مختلفة ، مجلة علوم الرافدين ، 30، 54-67.

[23]- سلمان، ا. م. ع. 2012. تحديد المحتوى البلازميدي للبكتريا المعزولة من اصابات التهابات المجاري البولية. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة، 4، 231-236.

[24]- زكي، ا. ا. ع. 2005. عزل و تشخيص البلازميدات من بكتيريا مقاومة للمضادات الحيوية. جامعة آل البيت، الأردن.

[25]- S. Suhani, A. Purkaystha, M. K. Begum, M. Islam, and A. J. C.

M. Azad, "Plasmids for amoxicillin and ciprofloxacin resistance in Escherichia coli isolate causing urinary tract infection," vol. 6, no. 284, p. 2, 2017.

[26]- V. Letchumanan, K.-G. Chan, and L.-H. J. F. i. m. Lee, "An insight of traditional plasmid curing in Vibrio species," vol. 6, p. 735, 2015.

[27]- M. Tomoeda, M. Inuzuka, N. Kubo, and S. J. J. o. b. Nakamura, "Effective elimination of drug resistance and sex factors in Escherichia coli by sodium dodecyl sulfate," vol. 95, no. 3, pp. 1078-1089, 1968.

[28]- P. J. B. j. o. p. Bennett, "Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria," vol. 153, no. S1, pp. S347-S357, 2008.