الكشف عن الجينات qnrA و qnrS في العزلات المحلية لبكتريا Acinetobacter baumannii المقاومة للسبروفلوكساسين

محمد فرج المرجاني [1] ، مهدي حسين نحيل [2] ، عماد قانع[3] والاء محمد محمود[4]

[1، 4] قسم علوم الحياة - كلية العلوم - الجامعة المستنصرية
[2، 3] قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة الكوفة

الخلاصة

تم الحصول على 15 عزلة لبكتريا *Acinetobacter baumannii* من عينات سريرية مختلفة شملت الجروح والحروق والأدرار وسائل النخاع الشوكي والدم. اختبرت حساسية العزلات لمضادات السبروفلوكساسين والنورفلوكساسين واليفورفلوكساسين أظهرت النتائج أن 60% من العزلات كان مقاومة للسبروفلوكساسين و 73.3% مقاومة للنورفلوكساسين واليفورفلوكساسين. تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للسبروفلوكساسين للعزلات قيد الدراسة التي أظهرت مقاومة تجاه هذا المضاد في فحص الحساسية بالاقراص، وقد بينت النتائج ان قيمة MIC تراوحت بين (4-512) مايكروغرام / مل. أظهرت نتائج ترحيل الدنا من العزلات المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين أحتواء بعض العزلات على حزمة بلازميدية واحدة. بينت نتائج التحري عن جينات qnrA و qnrS في بكتريا *Acinetobacter baumannii* أن جينات المقاومة qnrA هي الأكثر إنتشارا بين العزلات المحلية والمقاونة مع qnrS

الكلمات المفتاحية : ***Acinetobacter baumannii*** ، **Ciprofloxacin** ، **qnrA** ، **qnrS** ، **plasmid** .

الكشف عن الجينات qnrA و qnrS في العزلات المحلية لبكتريا *Acinetobacter baumannii* المقاومة للسبروفلوكساسين

محمد فرج المرجاني ، مهدي حسين نحيل ، عماد قانع و الاء محمد محمود

Detection of qnrA &qnrS in Ciprofloxacin Resistant *Acinetobacter baaumannii*

Mohammed F. Al-Marjani [1], Mahdi H. Nahil [2], Emad Q. Khadim[3] and Alaa Mohammed Mahmod [4]

[1, 4] Department Of Biology - Collage of Sciences - Al-Mustansiriyah University
[2, 3] Department Of Biology - Collage of Sciences - University of Kufa
[1]smkm@uomustansiriyah.edu.iq

Received: 28 August 2012 Accepted: 26 September 2012

Abstract

Fifteen (15) *Acinetobacter baaumannii* isolated and identied from differentclinical samples including wounds , burns , Urine , CSF and blood . the sensitivity of these isolate were tested against Ciprofloxacin , Norfloxacin and levofloxacin . the result revealed that preacentance (60%) of them are resistant for ciprofloxacin and (73.3%) for levofloxacin and norfloxacin. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for isolates resistant for Ciprofloxacin by using sensitive disces method. (MIC) valus for them was between (4-512) ug/ml. The result of Gelelectrophorphes revealed that Ciprofloxacin resistant isolates possase asingle plasmid band. Using poly merase chain reaction to determinate resistance gene qnrA &qnrS in *Acinetobacter baaumannii*. qnrA gene is more frequent in local Acinetobacter baaumannii isolate.

Key word: ***Acinetobacter baaumannii*, Ciprofloxacin , qnrS ,qnrA, plasmid**

المقدمة

بكتريا *Acinetobacter baumannii* سالبة لصبغة كرام هوائية غير مخمرة لسكر اللاكتوز، وهي من الممرضات الانتهازية تسبب العديد من الأصابات مثل تجرثم الدم وذات الرئة والتهاب المجاري البولية والحروق والجروح (1،2) تظهر مقاومة متعددة للمضادات الحيوية (MDR) مما يزيد من خطورة انتشار مثل هذه العزلات المرضية(3). اكتشف الكوينولونات عام 1962 من قبل العالم Lescher ، وكان المضاد الجرثومي الاول هو nalidixic acid المشتق من المركب naphthyridine 1،8، إذ كان الاستعمال مقتصراً على معالجة اخماج المجاري البولية الناجمة عن البكتريا السالبة لملون كرام، بعد ذلك تطورت هذه المجموعة لتصبح اكثر اهمية وتأثيراً في معالجة الاخماج البكتيرية (4). ان استعمال هذه المضادات الجرثومية يعد نقلة نوعية منالمعالجات السريرية خلال فترة اواسط الثمانينات ، فقد اظهرت هذهالمضادات فعالية في معالجة الاخماج البكتيرية الخطرة مثل التهاب البروستات (Prostitis) ، والتهاب نقي العظم (steomyelitis) والتليف الكيسي (Cystic fibrosis) ، والحمى التايفوئيدية (Typhoid fever) (5) ظهرت مركبات اخرى ضمن الجيل الثاني مثل Norfloxacin , Ofloxacin , pefloxacin وغيرها (6). هذه المضادات ذات تأثير قاتل للبكتريا ، تتداخل مع ايض الدنا عن طريق تثبيط انزيمين هما Topoisomerase II او ما يعرف بـ DAN gyrase في البكتريا السالبة لملون كرام والإنزيم الاخر هو Topoisomerase IV في البكتريا الموجبة لملون كرام، بدأت هذهالمقاومة بشكل تدريجي بحصول طفرة مفردة في الموقع الهدف للمضاد وهو انزيم Topoisomerase IV او حصول طفرات اضافية لانزيم DAN gyrase(7)و(8). تكمن خطورة الاصابة بهذه البكتريا في مقاومتها لمضادات متعددة ، وقابليتها على اكتساب عوامل وراثية تشفر لمقاومة العديد من المضادات الجرثومية منها السبروفلوكساسين ، وتبادلها مع بكتريا اخرى ، ويمكن ان تكون مصدراً لنشر جينات المقاومة عن طريق الاقتران ضمن النوع نفسه او الانواع الاخرى العائدة للجنس نفسه، او الاجناس البكتيرية الاخرى ، وبالتالي صعوبة علاجها مما يزيد من ضرورة ايجاد بدائل جديدة لعلاج الاصابات الناتجة عنها ، هناك العديد من الدراسات المحلية حول مقاومة بكتريا *Acinetobacter baumannii* لمضادات الكوينولونات الا ان الدراسات حول هذه المقاومة على المستوى الجزيئي تكاد تكون قليلة جدا لذا جاءت هذه الدراسة للكشف عن جينات qnrA و qnrS في العزلات المحلية لبكتريا *Acinetobacter baumannii* المقاومة للسبروفلوكساسين.

طرائق العمل

1- العزلات البكتيرية البيئية

جمعت (100) عينة سريرية مختلفة شملت الجروح والحروق والادرار وسائل النخاع الشوكي والدم للتحري عن بكتريا *Acinetobacter baumannii* . زرعت العينات على وسط اكار الدم ثم نقلت الى الاوساط الانتقالية بعدها شخصت العزلات اعتماداً على الصفات المجهرية والزرعية وحسب ما جاء في (9).

2- فحص الحساسية للمضادات المايكروبية

تم اختبار حساسية العزلات تحت الدراسة لمضادات السبروفلوكساسين والنورفلوكساسين وليفوفلوكساسين بطريقة الاقراص على وسط مولر هنتون الصلب ، وتم تحديد المقاومة والحساسية اعتماداً على الاقطار القياسية حسب CLSI (10).

3- تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضاد السبروفلوكساسين

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضاد السبروفلوكساسين بطريقة التخافيف المتضاعفة المتسلسلة بالوسط الزرعي الصلب وحسب ما ورد في (11).

4- عزل DNA البكتيري

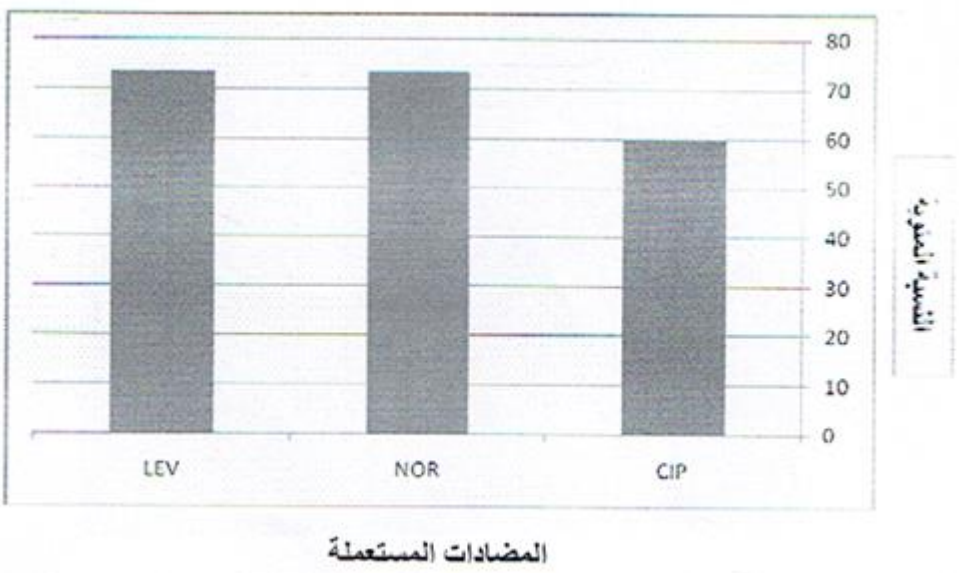
تم عزل دنا عزلات البكتريا المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين باعتماد عدة استخلاص الدنا المجهزة من شركة promega (USA) من العزلات البكتيرية المشخصة ورحلت نتائج الاستخلاص باستعمال هلام الاكاروز (%0.8)

5- الكشف عن الجين qnrA و qnrS

اختيرت البوادئ النوعية المستهدفة لجينات qnrA و qnrS في بكتريا *Acinetobacter baumannii* وفقاً لما ذكر في (12، 13) إذ تم تحضير محاليها الخزينة حسب تعليمات شركة Alpha DNA المجهزة لها باستعمال الماء المقطر اللايوني المعقم للحصول على تركيز (100) بيكومول \ مايكروليتر، وقد تم اجراء التفاعل التضاعفي حسب ما ذكر من قبل (12،13) .

النتائج والمناقشة

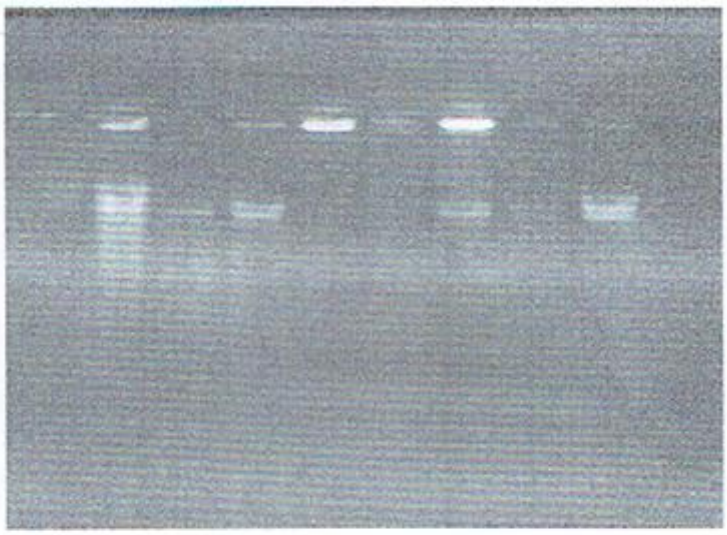
تم الحصول على 15 عزلة تعود لبكتريا*Acinetobacter baumannii* من(100) عينة سريرية مختلفة شملت الجروح والحروق والادرار وسائل النخاع الشوكي والدم. اختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة لمضادات السبروفلوكساسين والنورفلوكساسين واليفورفلوكساسين أظهرت النتائج أن 60% من العزلات كان مقاومة للسبروفلوكساسين و 73.3% مقاومة للنورفلوكساسين واليفورفلوكساسين (شكل 1). تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للسبروفلوكساسين للعزلات قيد الدراسة التي أظهرت مقاومة تجاه هذا المضاد في فحص الحساسية بالاقراص، بينت النتائج ان قيمة MIC تراوحت بين (4-512) مايكروغرام / مل.



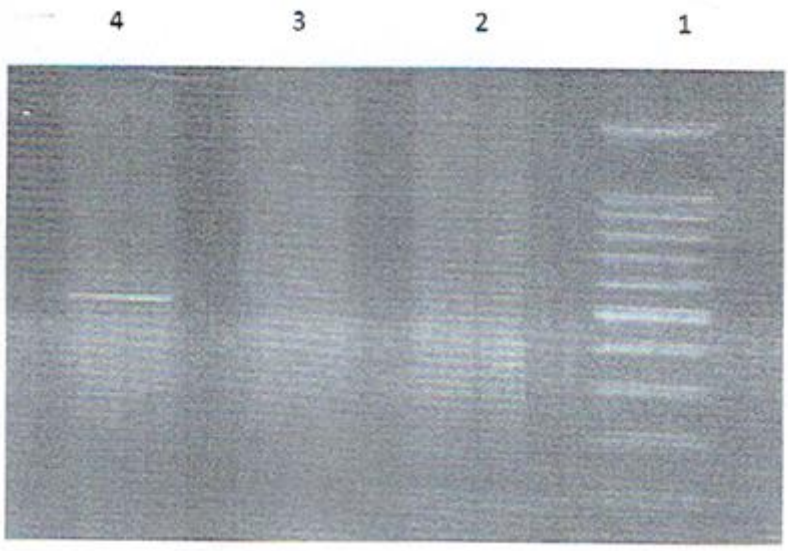
الشكل (1) النسب المئوية لمقاومة عزلات الدراسة للمضادات المايكروبية بطريقة الانتشار من الاقراص

لوحظ وجود مقاومة متعددة للمضادات بين عزلات بكتريا *Acinetobacter baumannii* وقد وصلت نسبة المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين الى 95% ، كذلك وجد البحث مقاومة عالية بين عزلات بكتريا *Acinetobacter baumannii* للسبروفلوكساسين وصلت ل 91%(14،15). اظهرت نتائج ترحيل الدنا المستخلص من العزلات المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين احتواء بعض العزلات على حزمة بلازميدية واحدة (شكل 2) . تتفق هذه النتيجة مع ما ذكره الباحث من احتواء عزلات بكتريا *Acinetobacter baumannii* التي

درســـها على حزمة بلازميدية بحجم 40 KB ، ووجد الباحث اكثر من حزمة بلازميدية مختلفة الاحجام من 15-56 kb في بكتريا Acinetobacter التي دســـها (2،16). بينت نتائج التحري عن جينات qnrA و qnrS في بكتريا *Acinetobacter baumannii* ان جينات المقاومة qnrA هي الاكثر انتشـــاراً بين العزلات المحلية بالمقارنة مع qnrS (شكل 3). ووجد ان عزلات بكتريا العائلة المعوية المقاومة للسبروفلوكساسين كانت تحوي جين qnrA وان هذه المقاومة تنتقل بين الانواع المختلفة بالاقتران البكتيري (17). ذكر الباحث ان جينات qnr محمولة على بلازميد Pmg252 في العزلات السريرية لبكتريا Klebsiella pneumoniae تحمل صفة مقاومة الكوينولونات(18)، كذلك لاحظ الباحث شـــيوع جينات qnrA بين عزلات العائلة المعوية(19). تم الكشـــف عن مقاومة الكوينولونات المرتبطة بالبلازميدات والمسؤول عنها الجين qnrA الباحث سـنة 1998 تم الكشـف عن وجود الجين qnrA في بكتريا *Acinetobacter baumannii* المقاومة للكيوينولونات(20،21)



الشكل (2) المحتوى البلازميدي لعزلات بكتريا *Acinetobacter baumannii* المقاومة للسبروفلوكساسين



الشكل (3) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *P . aeruginosa* باستعمال البوادىء النوعية لجين qnrA

المسار (1) الدليل الحجمي المسار (2) العزلة 3 المسار (3) العزلة 7 المسار(4) العزلة 8

المصادر

1. Munoz-price, L. S. and Weinstein , R. A. (2008. (Acinetobacter infection. N. Engl. J. Med. 358.1281-1271:
2. Pardesi ; Yavankar, S.P. & chopade, B.A. (2007). Plasmid distribution & antimicrobial susceptibility patterns of Acinetobacter genospecies from healthy skin of a tribal population in western India., Indian J Med res 125, January 2007, pp 79-88
3. Abbo, A., S. Novon-venezia, O. Hammer-Muntz, T. Krichali, Y. Siegman-Igra, and Y. carmeli.(2005) . Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Emerg. Infect. Dis. 11:22-29
4. Ball,P. (2000). Quinolones generations : natural history or natural selection? Antimicrob. Agent. Chemother. 46:17-24

5. Ball,P.; Fernalld,A. and Tillotson,G.(1998). Therapeutic advances of new fluroquinolones. Expert opinion in Lnvestigational Drugs. 7:761-783
6. Katzung, B. G. (2001). Basic and Clinical pharmacology. 9th ed. Mc Grow-Hill company . U. S. A.
7. Drlica, k. and zhao,x. (1997). DNA gyrase, topoisomerase VI and 4-quinolones . Microbiol. Rev. 61:377-392
8. Ng,E.Y.; Trucksis,M. and Hooper,D.C. (1996).Quinoloens resistance mutations in topoisomerase IV : relationship to the flqa locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluroquinolones in staphylococcus aureus. Antimicrob. Agent. Chemother. 40:1881-1888
9. Forbes, B.A; sahm, D.F. &weissfeld, A.S. (2007) Baily and scott s:Diagnostic Microbiology. 12th edition. Mosby,lnc.Baltimore USA. P:266-277
10. Clsi (2009) performance standards for Antimicrobial susceptibility testing, 19th supplement, clsi document M100-s19. 29(3). Clsi, wayne, Pennsylvania, USA.
11. Alaiem, A.M (2008).Antibiotic resistant S.aureus infection studies in hospitals. Athesis , middle east technical university.
12. Mammeri, H.,M. van de loo, L. poirel, L. Martinez- Martinez, and p. nordmann. (2005) emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in escherichia coli in europe. Antimicrob. Agents chemother. 49:71-76.
13. Poirel, L., T. Vu Nguyen, A. Weintraub, C. leviandier, and p.nordmann. (2006) . plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrs in enterobacter cioacae. Clin. Microbial. Infect. 12:1012-1023.
14. Adams-haduch,j.m. ; Paterson,d.l.; sidjabat,H.E.etal.(2008). Genetic Basis of Multidrug Resistance in Acinetobacter baumannii clinical lsolates at a tertiary medical center in pennsylvania., antimicrob. Agents chemother. 52(11): 3837-3843.
15. Hujer, k.m.; hujer, a.m. ; Edward; a.etal . (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant acinetobacter sp. Lsolates from military and civilian patients treated at the walter reed army medical center., antimicrob. Agents chemother. 50(12): 4114-4123.

16. Deshpande, lm. And chopade, ba.(1994) plasmid mediated silver resistance in acinetobacter baumannii. Biometals ; 7 : 49-56.

17. Xu, x.; we,s.; ye, x.; liu,y; shi,w. ; zhang, y. and wang , m. (2007) prevalence and expression of the plasmid-mediated Quinolone resistance determinant qnra. Antimicrob agents chemother. 51(11):4105-4110

18. Jacoby , g.a. ; chow, n. and ken , b. (2003) waites prevalence of plasmid-mediated Quinolone resistance antimicrob agents chemother., 47(2): 559-562.

19. El-essawy a.k., abu shady h.m. and el-biaa b. m. (2011) the emergence of plasmid mediated quinolone resistance genes qnra, qnrrb, and qnrs among Egyptian clinical isolates of enterobacteriaceae. African journal of microbiology research . 5(30): 5384-5397,

20. Martinez- Martinez, l., a. pascual, and G.A. Jacoby(1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 351:797-799

21. Touati , A. ; brasme, l.;benallaoua, s.;Gharout, A.; Madoux, J. and De champs, c.(2008) Diagn Microbiol lnfect Dis. ;60(3):287-9