الكشف عن جينات qnrA & qnrS في بكتريا *P.aeruginosa* المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين باستخدام تقنية PCR ودراسة انتقال هذه الجينات بالاقتران البكتيري

د. رباح نجاح جبار ١ومحمد فرج المرجاني ٢و د. رياض عبد الحسين دلول ٣ والاء محمد محمود ٤

(١) مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين.
(٢و٣) قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية .
(٤) مستشفى بعقوبة التعليمي .

الملخص

جمعت ٤٠٥ عينه سريرية من حالات مرضية مختلفة شملت الجروح والحروق والأدرار والتهابات الاذن الوسطى والبلعوم ومن اعمار مختلفة لكلا الجنسين للكشف عن مقاومة عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مستشفى بعقوبة التعليمي في محافظة ديالى لمضادات الكوينولونات والكشف عن وجود جينات المقاومة *qnrA* و*qnrS* في عزلات هذه البكتريا .
تم الحصول على ١٠٠ عزلة تعود لبكتريا *P.aeruginosa* من العينات اعلاه . أختبرت حساسية العزلات لثمانية أنواع من مضادات الكوينولونات ،اذأظهرت النتائج أن مضاد السبروفلوكساسين افضل المضادات في علاج هذه البكتريا .وقد بينت النتائج ان قيمة MIC للسبروفلوكساسين تراوحت بين (٨-٥١٢) مايكروغرام /مليلتر .أظهرت نتائج ترحيل الدنا المستخلص من العزلات المقاومة لمضاد ات الكوينولونات المستخدمة في البحث أحتواء بعض العزلات على حزمة بلازميدية واحدة وعزلات أخرى أحتوت على حزمتين بلازميدية. بيّنت نتائج التحري عن جينات *qnrA* و*qnrS* في بكتريا *P.aeruginosa* ان جينات المقاومة *qnrA* هي الأكثر إنتشارا بين العزلات وقد نجحت عملية الاقتران البكتيري وانتقال صفة مقاومة مضاد السبوفلوكساسين مع العزلة القياسية *E.coli* MM294 .

Keywords : *P.aeruginosa* , Ciprofloxacin , *qnr*A

Detection qnrA & qnrS genes in bacteria *P.aeruginosa* resistance to ciprofloxacin using PCR technique and study the transmission of these bacterial genes in conjugation

RabhN.Jabr1, Mohammed F. Al-Marjani 2 and Riadh A,Dalool3
Alaa M. Mahmood 4

Received 3 December 2013 ; Accepted 13 April 2014

Abstract

The study included and diagnose (100) isolates of *Pseudomonas. aeruginosa* from (405) sample from patients admitted to Hospital Baquba educatinol for investigate spread Quinolone resistant *P.aeruginosa* isolates . One handred isolates of *P. aeruginosa* were recoverd in current study .The results also showed that multiple isolates resistance towards the the Kinds of quinolones used in the study . The success of four isolates of bacterial achieve conjugation bacteria were transferred resistant prescription Ciprofloxacin at the same time ,

Keywords : *P.aeruginosa* , Ciprofloxacin , *qnr*A

المقدمة

بكتريا *P.aeruginosa* سالبة لصبغة كرام هوائية غير مخمرة لسكر اللاكتوز وتفرز العديد من الصبغات منها صبغة البايوسيانين (Pyocyanin) ويمكن ملاحظة الصبغات على سطح الطبق الزرعي و صبغة اخرى هي صبغة البايوفردين (Fluorescein) (Pyoverdin) وتتألق هذه الصبغة عند تعرضها للاشعة فوق البنفسجية UV (١) ان بكتريا *P.aeruginosa* انتهازية (Opportunistic pathogen) وتكون مترممة على الانسان (Common Human Saprophyte) ونادرا ما تسبب اصابات للاشخاص الاصحاء الا انها تستطيع ان تسبب اصابات خطيرة في المضائف المصابة بالكبت المناعي Immunocompromsed hosts كما انها تسبب الاخماج الناجمة عن نقل الاعضاء Organ Transplant Infection. وتسبب العديد من الأصابات مثل تجرثم الدم وذات الرئةوالتهاب المجاري البولية والحروق والجروح (١، ٢) تظهر مقاومة متعددة للمضادات الحيوية(MDR) مما يزيد من خطورة انتشار مثل هذه العزلات المرضية (٣). اكتشفت الكوينولونات عام ١٩٦٢ من قبل العالم Lescher ، وكان المضاد الجرثومي الأول هو Nalidixic acid المشتق من المركب naphthyridine ١,٨.اذ كان الاستعمال مقتصراً على معالجة أخماج المجاري البولية الناجمة عن البكتريا السالبة لملون كرام ، بعد ذلك تطورت هذه المجموعة لتصبح أكثر أهمية وتأثيراً في معالجة الاخماج البكتيرية (٤) إن استعمال هذه المضادات الجرثومية يعد نقلة نوعية في المعالجة السريرية خلال فترة أواسط الثمانينات ،فقد أظهرت هذه المضادات فعالية في معالجة الاخماج البكتيرية الخطرة مثل التهاب البروستات (Prostitis)،والتهاب نقي العظم (Osteomyelitis)، والتليف الكيسي (Cystic fibrosis)،والحمى التايفوئيدية (Typhoid fever)(٥) .تم تطوير مركبات أخرى ضمن الجيل الثاني مثل Norfloxacin ، Ofloxacin ، Pefloxacin وغيرها (٦) . هذه المضادات ذات تأثير قاتل للبكتريا ، تتداخل مع تضاعف الدنا عن طريق تثبيط إنزيمين هما Topoisomerase II أو ما يعرف بـDNA gyrase في البكتريا السالبة لملون كرام والإنزيم الآخر هو Topoisomerase IV في البكتريا الموجبة لملون كرام (٧). ويمكن ان تكون مصدراً لنشر جينات المقاومة عن طريق الإقتران ضمن النوع نفسه أو الأنواع الأخرى العائدة للجنس نفسه او الأجناس البكتيرية الأخرى . مما يزيد من صعوبة علاجها و ضرورة إيجاد بدائل جديدة لعلاج الإصابات الناتجة عنها (٨).

هناك العديد من الدراسات المحلية حول مقاومة بكتريا *P.aeruginosa* 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 لهذه البكتريا المقاومة للسبروفلوكساسين.

طرائق العمل

١-العزلات البكتيريه

جمعت عينات سريرية مختلفة شملت الجروح والحروق والأدرار و التهاب الاذن الوسطى والتهاب البلعوم للتحري عن بكتريا *P.aeruginosa* بواقع (٤٠٥) عينة. زرعت العينات على وسط اكار الدم ثم نقلت الى الأوساط الأنتقائية بعدها شخصت العزلات اعتماداً على الصفات المجهرية والزرعية وحسب ما جاء في (٩).

٢-فحص الحساسية للمضادات المايكروبية

تم أختبار حساسية العزلات تحت الدراسة لمضادات الكينولونات ciprofloxacinبطريقة الاقراص على وسط مولر هنتون الصلب ، وتم تحديد المقاومة والحساسية أعتماداً على الاقطار القياسية حسب CLSI٢٠٠٩(١٠).

٣-تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC)

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضاد السبروفلوكساسين بطريقة التخافيف المتضاعفه المتسلسله بالوسط الزرعي السائل وحسب ما ورد في (١١).

٤-عزل DNA البكتيري

تم عزل دنا عزلات البكتريا المقاومة لمضادالسبروفلوكساسين باعتماد عدة أستخلاص الدنا المجهزة من شركة promega (USA) ورحلت نتائج الاستخلاص باستعمال هلام الاكاروز (٠.٨%) وكذلك أستخلص الدنا البلازميدي من نفس العزلات وحسب (١٢).

٥- الكشف عن الجين *qnrA* و*qnrS*

أختيرت البوادئ النوعية المُستهدفة لجينات *qnrA* و*qnrS* في بكتـــريا *P.aeruginosa* وفقاً لما ذكر في (١٣ و ١٤) إذ تم تحضير محاليلها الخزينة حسب تعليمات شركة Alpha DNA المُجهزة لها بإستعمال الماء المقطر اللاأيوني المُعقم للحصول على تركيز (١٠٠) بيكومول\مايكروليتر ، وقد تم إجراء التفاعل التضاعفي حسب ماذكر من قبل (١٣ و ١٤) .

٦ – تجربة الاقتران البكتيري

أجريت عملية الاقتران البكتيري بين العزلات المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين و العزلة القياسية *Ecoli* MM 294 وحسب (١٥) .

النتائج والمناقشة

تم الحصول على ١٠٠ عزلة تعود لبكتريا *P.aeruginosa* حسب نظام API 20 NE من عينات سريرية مختلفة الشكل (١) . بواقع (٣٧) عزلة من اخماج الجروح و(٣١) عزلة من أخماج الأذن الوسطى و(٢٠) عزلة من عينات الادرار و(١٠) عزلة من الحروق و (٢) عزلة من التهابات البلعوم بنسب (٩.١ %)و(٧.٦ %) و(٤.٩ %) و(٥. 2 %) و(٠.٥ %) من اجمالي مجموع العينات على التوالي واظهرت الدراسة الحالية أعلى نسبة اصابة ببكتريا *P.aeruginosa* من اخماج الجروح اذ بلغت نسبة (٣٧%) وهذا متفق مع دراسة قام بها(16) في شمالي شرقي نيجيريا على (١٠٦) عزلة تعود لبكتريا *P.aeruginosa* من مرضى مختلفة اعمارهم وبلغت نسب الاصابة (٣٩.٢ %)لاخماج الجروح وعينات الادرار بنسبة (٢٠%) من عزلات بكتريا *P.aeruginosa* مايدل على دور هذه البكتريا في التهاب المسالك البولية خاصة لدى المرضى الذين يخضعون لعملية القسطرة وقد يعزى السبب الى عوامل الالتصاق التي تمتلكها هذه البكتريا والتي تسهل عملية التصاقها بمواد القســطرة ومقاومتهــا للعــديد من مضــادات الحيــوية من خلال تواجــدها ضمــن غشــاء حيــوي كثيف ThicK biofilmاما نسبة بكتريا *P.aeruginosa* المسببة لاخماج البلعوم فقد بلغت ٢% في الدراسة الحالية وهذه النتيجة تتفق مع ماتوصل اليه (١٧) في السودان اذ تمكنوا من عزل (٦٧) عزلة تعود الى بكتريا *Pseudomonas* من مصادر سريرية مختلفة ووجدوا ان هناك عزلة واحدة من التهابات االبلعوم .

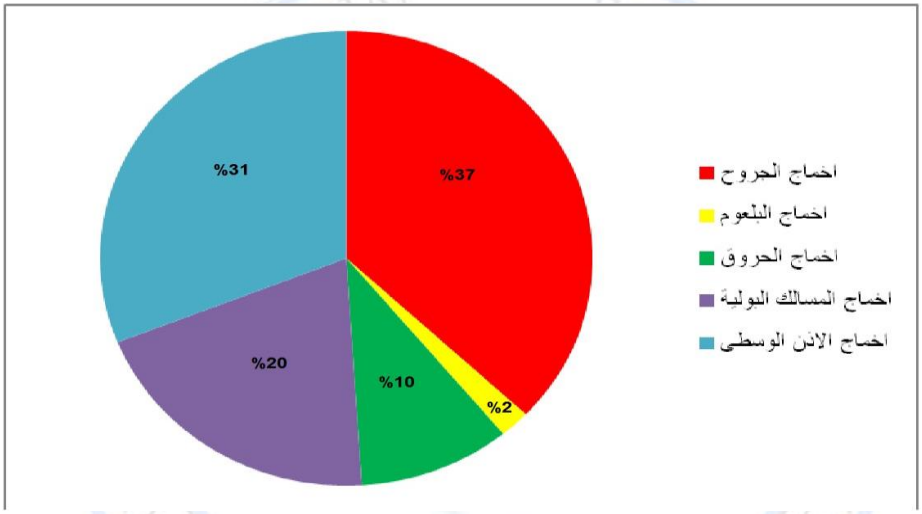
أختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة لثمانية أنواع من مضادات الكوينولونات ، أظهرت النتائج أن ٩% من العزلات كانت مقاومة للسبروفلوكساسين و ١٩ % من العزلات مقاومة للنورفلوكساسين و ٤٥% ليفوفلوكساسين و٣٤ %من العزلات قاومت الينورفلوكساسين و٣٥%من العزلات قاومت أفلوكساسين و٤٧% من العزلات قاومت لوموفلوكساسين و ٨٠% من العزلات قاومت مضاد Enoxacin ،كانت جميع العزلات مقاومة بنسبة ١٠٠% مضاد حامض النالدكسك الشكل (٢) واظهرت الدراسة الحالية انخفاضا نسبيا في مستوى مقاومة مضاد السبروفلوكساسين وهذا يتفق مع (١٨) الذين وجدوا ان نسبة مقاومة مضاد السبروفلوكساسين هي ٤% واظهرت نتائج الدراسة الحالية ان العزلات التي قاومت مضاد السبروفلوكساسين تقاوم باقي انواع مضادات الكينولونات الاخرى المستخــدمة في الدراســة مضاد السبروفلوكساسين من المضادات الحديثة المصنعة خصيصا لمعالجة اخماج المتسببة عن بكتريا *P.aeruginosa* وهذا يتفق مع (17) اذ اشاروا الى ان عزلات *P.aeruginosa* التي قاومت مضاد السبروفلوكساسين تقاوم باقي انواع مضادات الكينولونات الاخرى المستخدمة في دراستهم . يرجع سبب مقاومة مضادات الكينولونات وبالاخص مضاد السبروفلوكساسين الى تاثير المضاد على انزيم DNA gyrase المسؤول عن الارتباط الفائق لحلزون DNA و topoisomerase IV وحصول طفرات في الدنا الكروموسومي في بكتريا *P.aeruginosa*

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للسبروفلوكساسين للعزلات قيد الدراسة التي أظهرت مقاومه تجاه هذا المضاد في فحص الحساسيه بالاقراص، بينت النتائج ان قيمة MIC تراوحت بين (٨-٥١٢) مايكروغرام /مليلتر . لاحظ باحث(19) وجود مقاومة متعددة للمضادات بين عزلات بكتريا*P.aeruginosa* .

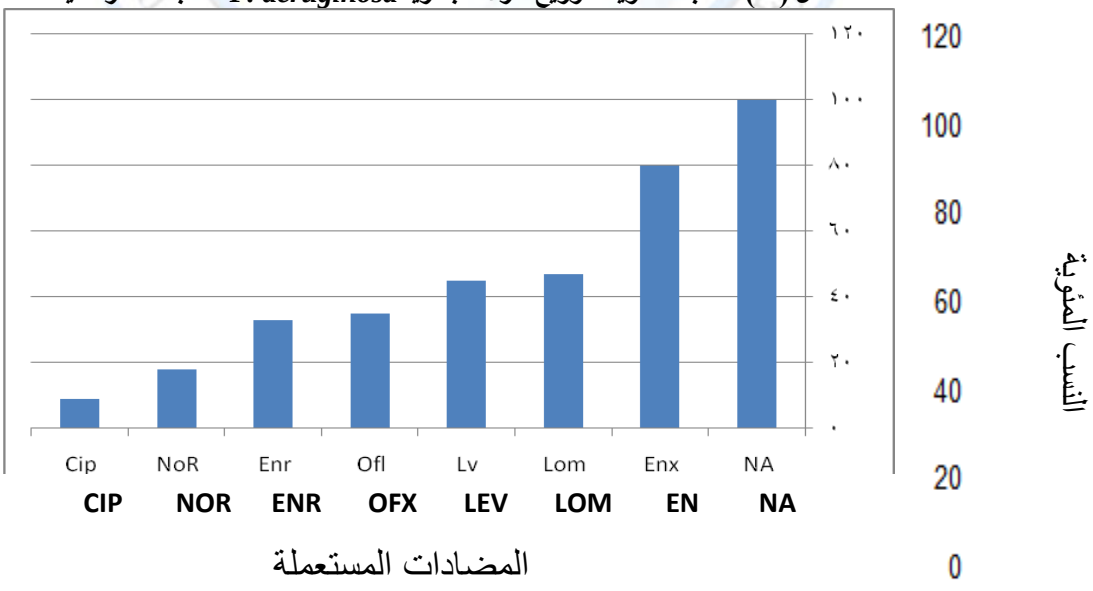
أظهرت نتائج ترحيل الدنا المستخلص من العزلات المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين أحتواء بعض العزلات على حزمة بلازميدية واحدة وأخرى احتوت على حزمتين بلازميديتن (شكل ٣).

تتفق هذه النتيجة مع ماذكره (20) من احتواء عزلات بكتريا *P.aeruginosa* التي درسها على حزمة بلازميدية مفردة بحجوم متقاربة ، ووجد (21) اكثر من حزمة بلازميدية مختلفة الأحجام من ١٥-٢٢٥ kbp. تظهر النتائج شيوع أنتشار جينات *qnr* A بين عزلات بكتريا *P.aeruginosa* مقارنة مع جينات *qnr* S الشكل (٤) .لاحظ (٢٠) شيوع جينات *qnrA* بين عزلات العائلة المعوية. تم الكشف عن مقاومة الكوينولونات المرتبطة بالبلازميدات والمسؤول عنها الجين *qnrA* سنة ١٩٩٨ (22) ، وكشف (23)عن وجود الجين *qnrA* في بكتريا *P.aeruginosa* المقاومة للكوينولونات .

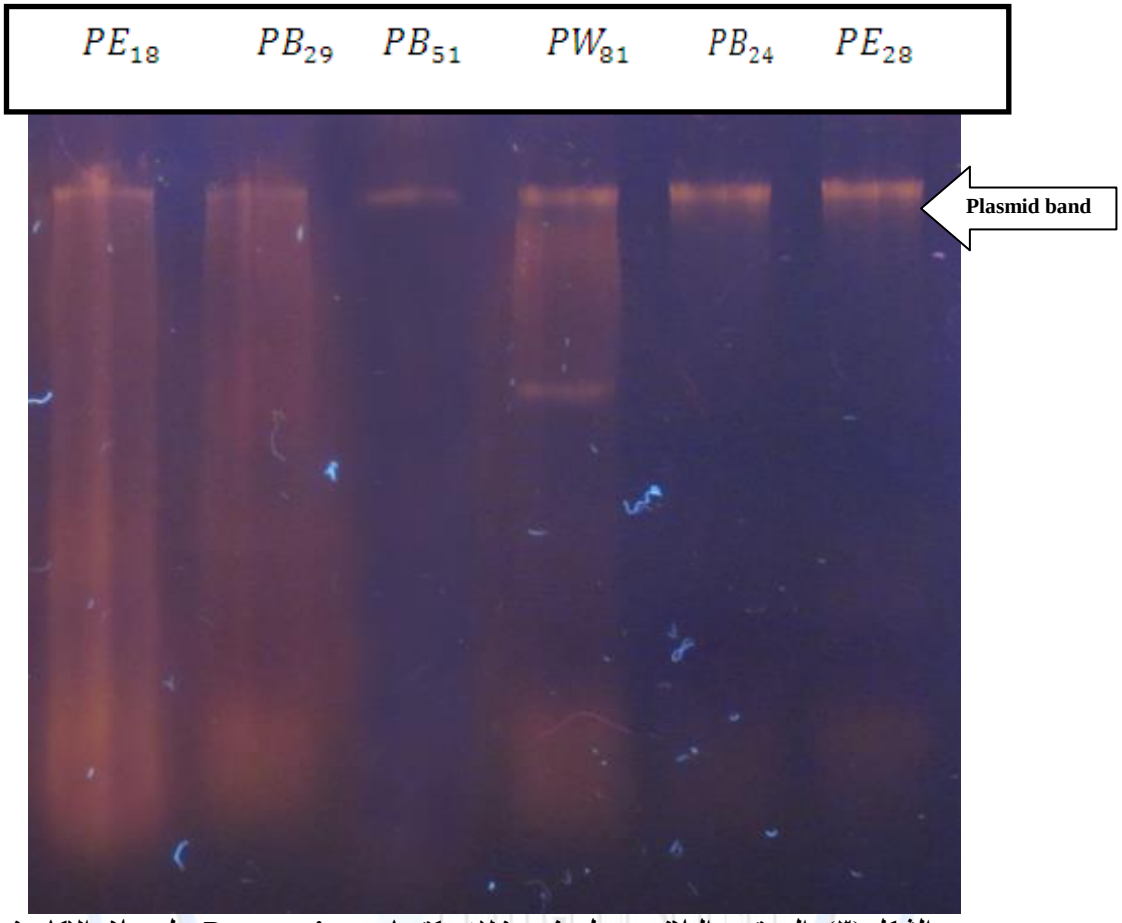
ان نجاح عملية الاقتران البكتيري بين عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين والعزلة القياسية *E.coli* MM 294 قيد الدراسة وأنتقال صفة مقاومة مضاد السبروفلوكساسين مما يدل على ان جينات *qnr* A&*qnr*S محمولة على بلازميدات أقترانية. وضح الباحثون (24) انتقال جين *qnr* بالاقتران البكتيري و زيادة التركيز المثبط الأدنى لمجموعة من البكتريا السالبة لصبغة كرام بعد حصول اقتران بكتيري



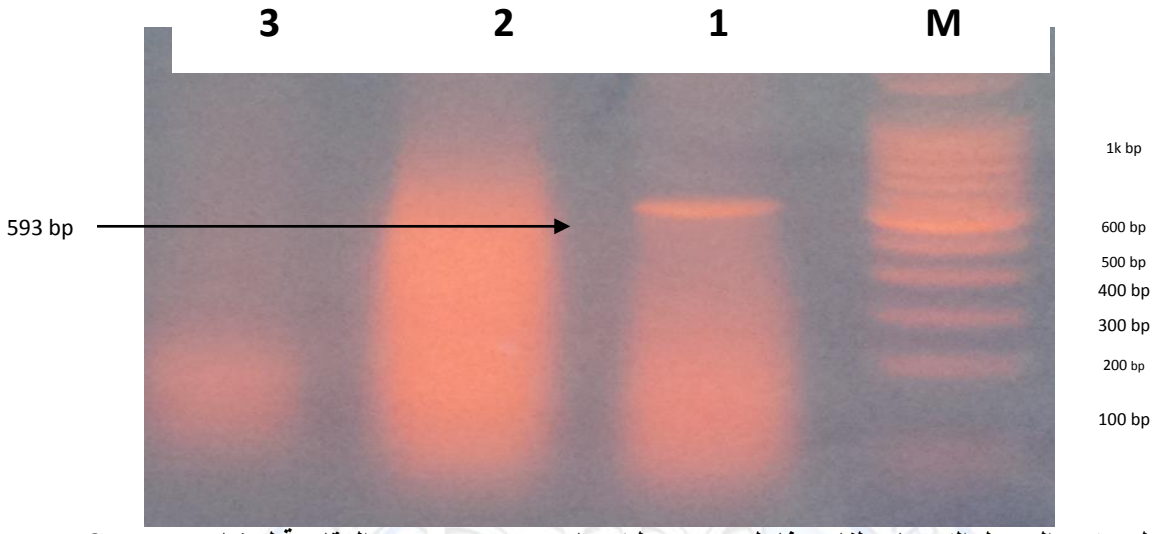
الشكل (١) النسبة المئوية لتوزيع عزلات بكتريا *P. aeruginosa* حسب مصدر العينة



شكل (٢) مقاومة عزلات لبكتريا *P.aeruginosa* للمضادات المايكروبية المستعمله



الشكل (٣) المحتوى البلازميدي لبعض عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على هلام الاكاروز بتركيز 0.8%وفرق جهد ٧(فولت /سم)المستخلص حسب طريقة Schremph وجماعته(١٩٩٣)



الشكل (٤) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل (PCR) لبكتريا *P.aeruginosa* المقاومة لمضاد Ciprofloxacin باستعمال بوادىء نوعية لجين *qnr*A على هلام الاكاروز بتركيز ١.٥ %وفرق جهد ٧ فولت /سم لمدة ساعة ونصف .

المسار M الدليل الحجمي (100bp DNA Ladder)

المسار 1 ناتج عملية التضخيم لجين *qnr*A في دنا العزلة (PB_{51})

المسار ٢ ، ٣ عدم ظهور ناتج في دنا العزلة (PB_{24} ، PW_{63})

PB_{51} * : *P.aeruginosa* (*p*)، (B) : معزولة من الحروق ، (٥١) رقم العزلة

المصادر

1- Author ,S. and Russell, W. (2010) *Pseudomonas* infection . b 25

2- Houser, A.R. and Sriram, p. (2005) . Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections tacking the conundrum of drug resistance postgraduate Medicine 117(1):41-8.

3-Barlow, G. and Nathwani, D.(2005) . IS. Antibiotics resistance a problem, a practical guide for hospital clinical. Post. Med. J. , 81:680-692. 4-Ball,P. (2000). Quinolones generations : natural history or naturalselection? Antimicrob. Agent. Chemother. 46:17

5-Ball,P.; Fernalld,A. and Tillotson,G. (1998). Therapeutic advances of new fluroquinolones. Expert Opinion in Investigational 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. Mol. Biol. Rev.61:377-392

8- Karah, N.(2008). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in Norwegian and Swedish clinical isolates of *Escherchia Coli* and *Klesiella SPP* . Master's thesis of medical microbiology

9-Forbes, B.A.; Sahm, D.F. &Weissfeld, A.S. (2007) Baily and Scott s:Diagnostic Microbiology.12th edition. Mosby,Inc. 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- Morello, J.A.; Granto, P.A. and Mizer, H.E.(2003). Laboratory manuals and work book in microbiology : applications to patient care. (17th edition). The McGraw-Hill companies p:97-98

12- Schremph, M.; Humphreys, G.; Willshaw, G.A. and Aderson, E.S.(١٩٩٣). A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA Biochim. Biophys. Acta 383, 457-463

13-Cattoir V.,C.; Laurent ,P.; Rotimi, V.; soussy and Nordmann,P. (2007) Multiplex PCR for detection of Plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enter bacterial isolates. Journal of Antimicrobial chemotherapy. 60, 394-397.

14-Jacoby, A. G.; Nancy C. and Ken, B.W.(2003) . prevalence of plasmid-mediated Quinolone resistance . Antimicrobial. Agents Chemotherapy , 47(2):559.

١٥- O'Connell . M.(1984). Genetic Transfer in prokaryotes transformation , transduction and Conjugation:2-13 in Advanced Molecular Genetic by publisher, A. and Timmis. K. Springer Ver lugberlin.

16-Okon,K. ; Agukwe, P.C.; Oladosua, W.; Balogun, ST. and Uba, A.(2010). Antibiotic Resistant pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical Specimen in a tertiary Hospital in northeastern Nigeria. The internet Journal of Microbiology250,257.

17-Daini O.A.**;** Effiong, MJ and Ogbolu, OD.(2008) . Quinolones Resistance and R-Plasmids of clinical isolates of Pseudomonas species. Sudan JMS Vol.3, No.2.

18-Abdullah, R.M.; Samaan, S.F. and AL-Shwaikh, A.M. (2010) . study the effect of antibiotic combination of beta – Lactam and amino glycoside with another group of antibiotics and their synergism effect. Journal of Arab Board of Health specialization, Vol.11, No.1

19- Vojtova, V.; Kolar, M.; Hricova, K.; Uvizl, R.; Neiser, J.; Blahut, L. and Urbanek, K.(2011). Antibiotic utilization and *Pseudomonas aeruginosa* resistance in intensive care units New Microbiological, 34, 291-298.

20- Qasim ,K.W. (2006) Effect of some chemical and physical facter s on *pseudomonas aeruginosa* membrane permeability .M.S.C. thesis College of Sciences . Baghdad University

21- Strahilevitz, J.; Jacoby , G.A.; Hooper, D.C. and Robicsek , A.(2009) . plasmid-mediated Quinolone resistance: a Multifaceted threat clin. Microbial. Rev. 22(4): 664

22- Martinez-Martinez, L., A., Pascual,A. and G. A. Jacoby**(** 1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 351**:**797-799

23- Jacoby , G.A. ; _Chow, N. and Ken, B. (2003) Waites Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Antimicrob Agents Chemother. , 47(2): 559–562.

24- Cai, X.; Congrong, L.; Huang, J. and Li, Y. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolones resistance qnr genes in central China. African Journal of Microbiology Vol.5(8) pp.975-978