الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* متعددة المقاومة باستعمال CHROM agar ESBLs

أ. م . د. رنا مجاهد عبدالله

عباس فالح مهدي

جامعة بغداد / كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم

الملخص:

تم الحصول على (٧٥) عزلة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من اصل (100) عزلة جمعت من حالات مرضية مختلفة شملت الجروح والحروق والتهابات الاذن الوسطى وعينات الادرار والدم .

اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية ل(١٢) مضاد حيوي تابع لمجموعة البيتالاكتام واظهرت العزلات تباينا واضحا في مقاومتها للمضادات الحيوية حيث كانت مقاومة لمضادات (Ampicillin ؛ Carbencillin ؛Cephalexin ؛ Cefotaxime؛ Ceftriaxone؛ Amoxicillin/clavulanic) بنسبة (١٠٠) % فيما اظهرت مقاومة لمضاد Ceftazidime بنسبة (81.33) % ولمضاد Cefepime بنسبة (70.66) % ؛ واظهرت العزلات اقل مقاومة لمضاد Piperacillin وبنسبة (37.33) % ولمضاد Meropnem بنسبة (33.33) % ولمضاد Aztreonam وبنسبة (22.66) % ولمضاد Imipenem بنسبة (17.33) %.

واظهرت نتيجة الكشف عن انتاج العزلات لانزيمات البيتالاكتاميز ان (٥٦) عزلة كانت منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز وبنسبة (74.66)%. بينما اظهرت نتيجة الكشف عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs باستعمل وسط الكروماجين الخاص للكشف عن هذه الانزيمات (٦٠) عزلة منتجة للانزيم وبنسبة (٨٠) %.

اظهرت اغلب العزلات مقاومة متعدده لاكثر من مضاد حيوي تابع لمضادات البيتالاكتام حيث تراوحت مقاومة العزلات من (٦) الى (١٢) مضاد حيوي.

المقدمة :-

بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الانواع البكتريا السالبة لصبغة كرام وتعد من الانواع واسعة الانتشار وهي بكتريا انتهازية تسبب العديد من الامراض للاشخاص المصابين بنقص المناعة ؛ وتسبب العديد من الامراض المكتسبة من المستشفيات nosocomial infection وتسبب التهابات الحروق والجروح ؛ إصابة الأنسجة والتليف الكيسي والتهابات الاذن الوسطى (١) اضافة انها تصيب الاشخاص المصابين بفيروس نقص المناعة المكتسبة HIV وتكون لهذه البكتريا مقاومة عالية للعديد من المضادات الحيوية وتطور مقاومتها باستمرار اضافة الى امتلاكها للمقاومة المشتركة لانواع مختلفة من المضادات (٢) (٣).

ان من اسباب المقاومة البكتريا للمضادات الحيوية هو تغيير نفاذية الغشاء الخارجي Outer membrane permeability وامتلاكها لانظمة الدفق efflux systems اضافة الى تغير في بروتينات Penicillin binding proteins اضافة الى امتلاك البكتريا الى انزيمات Carbapenemase وامتلاكها للعديد من انزيمات β-lactamases من النوع A, B, D (٤) (٥) وان هذه الانزيمات يشفر لها جينات محموله على الكروموسومات ومنها انزيمات Cephalosporinase وانزيمات Carbapenemase وقد تكون هذه الجينات متنقلة عبر جينات قافزة او عبر البلازميدات (٦). ويوجد انواع اخرى من الانزيمات PSE والتي تكون على انواع منها PSE-1 و PSE-4 والتي وجدت في بكتريا *P. aeruginosa* التي تكون فعالة ضد مضادات Penicillins وتكون مثبطة ايضا لمثبطات البيتالاكتاميز (٧) ؛ اضافة الى انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز المعدنية والتي تضم العديد من الانواع والتي حدد ٦ منها (IMP, VIM, SPM, GIM,SIM , NDM) في كل من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و بكتريا *Acienetobacter baumannii* والتي عزلت من عدة دول اوربية ومنها فرنسا اسبانيا ايطاليا و الالمانيا واليونان بينما كان اكثر نوع منتشر من هذه الجينات هو جين VIM حيث عرف ٣٩ نوع منه واكتشف اول مرة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في فرنسا عام ١٩٩٦ ويعد النوع VIM-2 من اكثر الانواع انتشارا في البكتريا المرضية (٦).

ان امتلاك البكتريا لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBL والتي بدورها تتطور بسرعة من مجموعة البيتالاكتاميز ويتم التشفير لهذه الانزيمات عبر جينات محموله على الكروموسوم او البلازميد في العديد من انواع البكتريا وتعمل على تحليل مضادات البيتالاكتام والتي تودي الى حصول مقاومة مشتركة لمحموعة البيتالاكتام (٨) وتتشارك ايضا في قابليتها على تحليل مضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات ومضاد Aztreonam وان هذه الانزيمات تشفر من قبل جينات TEM-1 , TEM-2 SHV-1 بواسطه الطفرات التي تحصل الاحماض الامينة في الموقع الفعال لانزيمات البيتالاكتاميز. وقد تكون البلازميدات مسؤوله عن انتاج انزيمات واسعة الطيف والتي تكون مسؤوله عن مقاومة انواع اخرى من العلاجات ومنها مجموعة مضادات الامينولايكوساید (٩)

وفي الاونه الاخيرة ظهرت اوساط الكروماجين لتشخيص البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام بالاعتماد على وسط واحد وذلك بملاحظة التغيير اللوني للمستعمرة بالاعتماد على انزيمات متخصصه تنتجها البكتريا تتحد مع مكونات الوسط وبذلك يمكن بالاعتماد عليه بالتشخيص السريع للبكتريا اضافة الى ظهور اوساط الكروماجين التي تستعمل للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج بعض الانزيمات المهمة والمتخصصة مما بسهل عملية التشخيص ومعرفة قابلية البكتريا لمقاومة المضادات الحيوية وتحديد العلاج بالسرعه الممكنه (١٠).

المواد وطرائق العمل :-

١. جمع العينات :- جمعت (100) عزلة من حالات مرضية مختلفة تضمنت التهابات (الجروح ؛ الحروق ؛ المجاري البولية ؛ الاذن الوسطى ؛ الدم) للفترة من ٢٠١٤/٩/١ لغاية ٢٠١٤/١١/٣٠. ومن عدة مستشفيات في بغداد(مستشفى الطفل المركزي ؛ مدينة الامامين الكاظمين الطبية ؛ ابن البلدي ؛ الصدر ؛ مستشفى الحروق ؛ المختبرات التعليمية).
٢. تشخيص البكتريا :- تم تشخيص العزلات باستعمال الاوساط الزرعية التقليدية ومنها وسط MacConkey agar و وسط Blood agar وسط Citrimide agar و وسط Pseudomonas agar ووسط الكروماجين اكار CHROMagar Orientation . واستعمل الفحوصات Oxidase و Catalase وللتشخيص النهائي استعمل عدة التشخيص API 20 E وبعد التشخيص تم الحصول على (٧٥) عزلة تعود الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* (١١).

٣. اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية :- اعتمدت طريقة Kirby baure المذكورة في (١٢) لاجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية وباستعمال وسط Muller Hinton agar واستعمل كل من مضادات (Ampicilli ؛ Piperacillin؛ Carbencillin؛ Cephalexin ؛ Ceftazidime ؛ Cefotaxime ؛ Imipenem ؛ Amoxicillin/clavulanic ؛ Cefepime ؛ Ceftriaxone ؛ Aztreonam ؛ Meropnem) وتمت مقارنة النتائج مع الجداول القياسية المذكورة في (١٣) لتحديد قطر منطقة التثبيط.

٤. الكشف عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز :- اعتمدت طريقة اليود القياسية السريعة للكشف عن انتاج العزلات لانزيمات البيتالاكتاميز وكما ذكر في (١٤) .

٥. الكشف عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs :- وللكشف عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs للعزلات قيد الدراسة استعمل وسط الكروماجين الخاص للكشف عن انزيمات ESBLs وتم تحضير الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك باذابة (٣٣) غرام في(١) لتر من الماء المقطر تم ترك يغلي بدرجة (١٠٠) م° ثم عقم بدرجة (١٢١) م° لمدة (١٥) دقيقة وترك ليبرد بدرجة(٤٥-٥٠) م° من اجل اضافة supplement

٦. تحضير supplement :- وذلك حسب تعليمات الشركة المصنعة ويتم باذابة 0.57 غرام في (١٠) مل ماء مقطر معقم ويخلط جيدا باستعمال vortex من اجل ان يتجانس المحلول ثم يضاف الى CHROMagar Orientation المبرد بدرجة حرارة (٤٥-٥٠) م° ويخلط جيدا للحصول على وسط CHROMagar ESBL ثم يصب في اطباق معقمة وتحفظ في الظلام لحين الاستعمال.

النتائج والمناقشة :-

بعد اجراء التحليلات اللازمة لتشخيص البكتريا وبالاعتماد على(١١) تم الحصول على (٧٥) عزلة تعود الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من اصل (100) عزلة جمعت من حالات مرضية مختلفة شملت الجروح والحروق والتهابات الاذن الوسطى وعينات الادرار والدم. وبين (٢) ان اعلى نسبة للاصابة بالبكتريا كانت لحالات التهابات المجاري البولية بنسبة (51.1) % تليها التهابات الجروح بنسبة (41.3) % والتهابات الاذن الوسطى في حين ذكر (١٥) ان اكثر اصابة لبكتريا *P. aeruginosa* كانت لالتهابات الحروق حيث كانت ٢٠ عزلة من ٤٥ عينه تليها التهابات المجاري البولية والتهابات الاذن الوسطى.

اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية ل(١٢) مضاد حيوي يعود لمجموعة البيتالاكتام واظهرت العزلات تباينا واضحا في مقاومتها للمضادات الحيوية حيث كانت مقاومة لمضادات (Ampicillin ؛ Carbencillin؛ Cephalexin؛ Cefotaxime ؛ Amoxicillin/clavulanic؛ Ceftriaxone) بنسبة (١٠٠) % فيما اظهرت مقاومة متباينه لكل من مضادات Ceftazidime (81.33)% ومضاد Cefepime بنسبة (70.66)% ومقاومة لمضادات Piperacillin وبنسبة (37.33)% ؛ واظهرت العزلات اقل مقاومة لمضاد Meropnem بنسبة (33.33)% ولمضاد Aztreonam وبنسبة (22.66)% ولمضاد Imipenem بنسبة (17.33)% ويمكن ملاحظة النسب المئوية لمقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية المختلفة في الشكل (١).

وقد بينت العديد من الدراسات ان البكتريا لها القابلية على مقاومة المضادات الحيوية المختلفة وبالاخص مضادات البيتالاكتام ذلك بسبب انتاجها الى الانزيمات ومنها انزيمات Cephalosporinases والتي تكون من اهم انواع انزيمات β-lactamase والتي تشفر لها جينات محموله على الكرموسوم اضافة الى انواع اخرى من الانزيمات منها PSE-1 , CARB-3 , CARB-4 , PSE-4 والتي وجدت في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* والتي تكون مسؤوله عن مقاومة مضادات Penicillins ومضادات Antipseudomonal cephalosporins , cabapenems , aztreonam (٧).

لقد كانت مضادات البيتالاكتام فعاله ضد انواع البكتريا السالبة لصبغه كرام وضد العائلة المعويه وكانت تظهر فعالية ضد بكتريا *Pseudomonas* وكان هذه المضادات مستقرة ومقاومة لانزيمات البيتالاكتاميز ولكن بدات تزداد مقاومة البكتريا لهذه المضادات والسبب يعود الى انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo beta lactamase التي تعمل على تحلل مضادات البيتالاكتام واسعة الطيف (١٦)

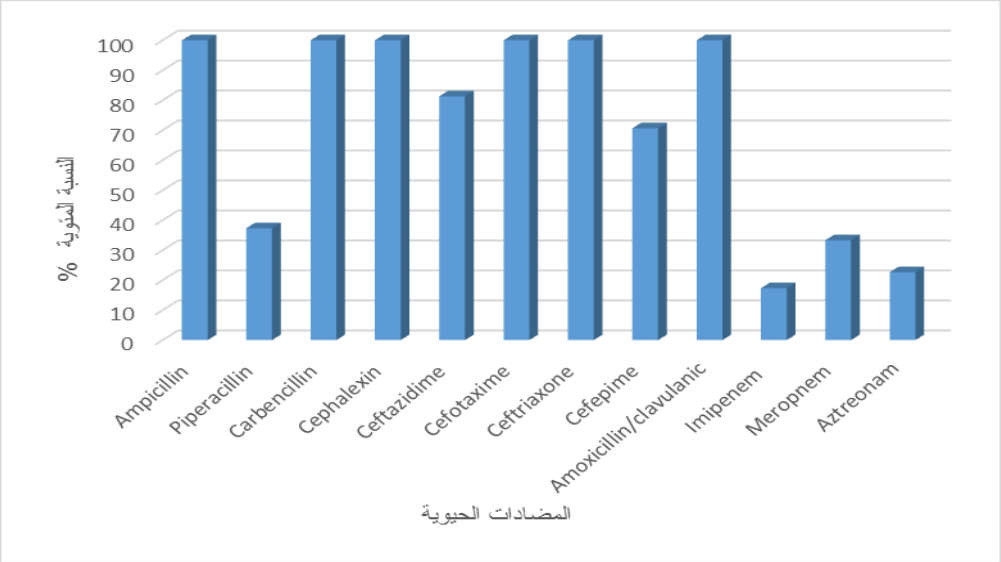
تم الكشف عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز باعتماد طريقة اليود القياسية السريعة للكشف عن انتاج العزلات لانزيمات البيتالاكتاميز واظهرت النتيجة ان (٥٦) عزلة كانت منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز وبنسبة (74.66) %. في حين بينت نتائج الكشف عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs باستعمل وسط الكروماجين الخاص للكشف عن هذه الانزيمات ان (٦٠) عزلة منتجة للانزيم وبنسبة (٨٠)% ويمكن ملاحظة عدد العزلات والنسب المئوية لانتاج الانزيمات في جدول (١). وبيت الدراسات الحديثة

ان استعمال وسط الكروماجين من الطرق السريعة من اجل الكشف عن مقاومة البكتريا للمضادات الحيويه حيث استعمل وسط CHROM agar KPC خاص للكشف عن مقاومة بكتريا *Enterobacteriaceae* لمضاد Carbapenem (١٧).

بينت الدراسات (٦) ان قابلية البكتريا التابعة للعائلة المعوية اضافة الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز وانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs والتي تطورت مقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام خلال ٢٠ سنه الماضية بسبب الجينات المشفرة لانزيمات البيتالاكتاميز والتي تنتقل عبر البلازميدات مما ساعد على انتشارها ضمن مجاميع مختلفة من البكتريا وعبر مختلف دول العالم. وقد وجد في دراسه في مصر ان اكثر انواع انزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف التي تنتجها بكتريا *P. aeruginosa* كانت من نوع OXA-10 في حين كان اكثر انواع انزيمات البيتالاكتاميز التي تنتجها نفس البكتريا من نوع VIM-2 (٤).

اظهرت النتائج مقاومة عالية للعديد من مضادات البيتالاكتام حيث اظهرت (١١) عزلة مقاومتها (١٢) مضاد ؛ (٢) عزلة اظهرت مقاومة (١١) مضاد و(٧) عزلات اظهرت مقاومتها (١٠) مضادات واظهرت (١١)عزلة مقاومتها الى (٩) مضادات في حين اظهرت (٢١) عزلة مقاومتها الى (٨) مضادات حيوية واظهرت (١٨)عزلة مقاومتها الى (٧) مضادات واخيرا اظهرت (٥) عزلات مقاومتها الى (٦) مضادات حيوية واظهرت النتائج ان جميع العزلات التي كانت مقاومة لاكثر من مضاد كانت منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز وانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs ويمكن ملاحظة عدد العزلات وعدد المضادات الحيوية التي قاومتها بالشكل (٢). واتفقت النتائج مع (٤) ان جميع عزلات بكتريا *P. aeruginosa* التي كانت منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs كانت مقاومة لمضادات البيتالاكتام وبالاخص Ceftazidime.

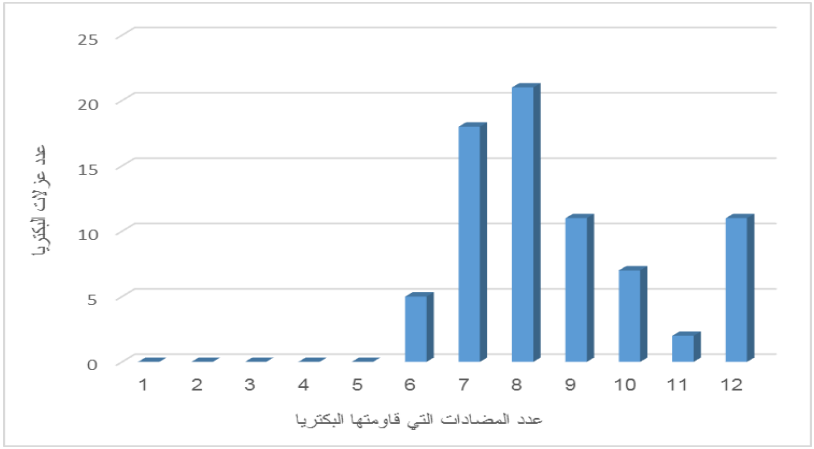
وقد بينت العديد من الدراسات ان انتاج انزيمات البيتالاكتاميزهو السبب الرئيسي لمقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام وان امتلاك البكتريا مقاومة مشتركة لاكثر من مضاد وذلك لانتاجها انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs والتي تسبب زيادة في مقاومة المضادات الحيوية وبالاخص Ceftazidime , Aztreonam وقد تحصل طفرات في جينات المشفرة لهذه الانزيمات مما يجعلها مقاومة لمضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات وCefepime (٧).



شكل (١) يوضح النسب المئوية لمقاومة البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لمجاميع مختلفة من مضادات البيتالاكتام.

انتاج العزلات لانزيمات البيتالاكتاميز	انتاج انزيمات البيتالاكتاميز (%)	انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs (%)
العزلات المنتجة	٥٦ (74.66)	٦٠ (٨٠)
العزلات غير المنتجة	١٤ (25.33)	١٠ (٢٠)
العدد الكلي	٧٥ (١٠٠)	٧٥ (١٠٠)

جدول (١) يوضح عدد العزلات والنسب المئوية لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز وانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف.



شكل(٢) يوضح عدد عزلات البكتريا وعدد المضادات الحيوية التي قاومتها.

Reference

1. Cheluvappa, R. , Shimmon, R. ; Dawson, M. ; Hilmer, S.N. and Le Couteur, D. G. (2008). Reactions of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin with reduced glutathione. Acta Biochimica Polonica. 55 (3): 571–580.
2. Olayinka, A.T. Olayinka, B.O. and Onile, B.A. (2009). Antibiotic susceptibility and plasmid pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from the surgical unit of a university teaching hospital in north central Nigeria. International Journal of Medicine and Medical Sciences. 1(3) pp.079-083.
3. Finlayson, E. A. and Brown, P.D. (2011). Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. West Indian Med J. 60 (1): 24-32.
4. Zafer, M. M.; Al-Agamy, M. H.; El-Mahallawy, H.A.; Amin, M. A. and Ashour, M. S. (2014). Antimicrobial resistance pattern and their beta- lactamase encoding genes among Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cancer patient. Bio Med Research International. 1-8.
5. Aboulmagd, E. and Alsultan, A.A. (2014). Synergic bactericidal activity of novel antibiotic combination against extreme drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. African Journal of Microbiology Research. 8(9):856-861.
6. Al-Marjani, M.F. ; Jafere, F.N. ; Abdul Hussain, M.T. ; Mezeal, E.A. ; Sahtte , Z. A. ; Hamza, A. H. , Shanuor, K. J. and Asmaeal, M.H. (2008). Study of B-lactamases producing Enterobacteria isolated from German cockroach (Blatella germanica) in hospitals. Diala. Jour. 29.
7. Bonomo, R. and Szabo, D. (2006). Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. CID.43(2):546-556.
8. Feglo,P. and Opoku, S. (2014). AmpC beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* isolates at the Komfo Anoke Teaching Hospital, Kumasi, Ghana. Journal of Microbiology and Antimicrobials. 6(1):13-20.
9. Mereuta, A.I; Badescu, A.C.; Dorneanu, O.S.; Iancu, L. S. and Tuchilus, C. G. (2013). Spread of VIM-2 metallo beta lactamase in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii clinical isolates from Iasi, Romania. Revisia Romana de Medicina de Laborator. 21(4). 423-430.
10. Samra, Z. Heifetz , M. ; Talmor , J. Bain , E . and Bahar , J. (1998). Evaluation of Use of a New Chromogenic Agar in Detection of Urinary Tract Pathogens. Journal of Clinical Microbiology. 36 (4): 990–994.
11. Baron, E. J.; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007).Bailey and Scott،s Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. Missouri.
12. Vandepitte , J. ; Verhaegen , J. ; Engbaek , K. ; Rohner,P. ; Piot , P. and Heuck , C. C. (2003). Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology. 2nd ed. World Health Organization Geneva. PP. 109-120.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;* Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M 100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
14. Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology. 14th ed. Churchill Livingston.
15. Daini, O. A. and Charles- Onyeaghala, C.G. (2012).Plasmid- mediated aminoglycoside resistance of clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa*. Global Advanced Research Journal of Microbiology Vol. 1(4) pp. 052-056.
16. Senda, K. Arakawa , Y. Ichiyama , S. Nakashima, K. Ito, H. Ohsuka , S. Shimokata, K. Kato, N. and Ohta , M . (1996). PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. J Clin Microbiol. 34(12):2909-13.
17. Samra, Z.; Bahar, J. Madar-Shapiro, L. Aziz, N; Isral, S and Bishara, J. (2008). Evaluation of CHROMagar KPC for Rapid Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*_ Journal of Clinical Microbiology. 46(9): 3110–3111.

Detection of ESBLs in multi resistance *Pseudomonas aeruginosa* using CHROM agar ESBLs.

Abbas F. Mehdi and Asst. Pro. Dr. Rana M. Abdullah

Department of Biology, College of Education Ibn-Al Haitham, University of Baghdad.

We obtained (75) isolate of *Pseudomonas aeruginosa* out off (100) isolate collected from different cases including wounds, burns, otitis media, urine and blood sample.

The isolates showed different sensitivity to antibiotics, all isolates were resistant to Ampicillin, Carbencillin, Cephalexin, Cefotaxime, Ceftriaxone, Amoxicillin / clavulanic (100) %. Most bacteria isolates was resistance to Ceftazidime (81.33)% , Cefepime (70.66)%, Piperacillin (37.33)% and Meropnem (33.33)% , while these isolates showed less resistance to Aztreonam (22.66) % and Imipenem (17.33)%.

A Fifty six (74.66%) of bacteria isolates were β – lactamase positive and 60 (80%) of isolates were ESBLs positive.

Most of isolates were showed multi-resistance to antibiotic, which ranged (6-12) antibiotic