دراسة مقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لمضادات الكوينولونات

د. رياض عبد الحسين دلول 1 و الاء محمد محمود٢

١ و٢ قسم علوم الحياة / كلية العلوم الجامعة المستنصرية .

الخلاصة

تم الحصول على ١٠٠ عزلة تعود لبكتريا *P.aeruginosa* من عينات سريرية مختلفة شملت الجروح والحروق والأدرار والتهابات الاذن الوسطى والبلعوم .

أختبرت حساسية العزلات لثمانية أنواع من مضادات الكوينولونات المختارة في البحث أظهرت النتائج أن ٤٤% من العزلات كانت مقاومة للسبروفلوكساسين و ٥٥.٣% من العزلات مقاومة للنورفلوكساسين و٦٠% ليفوفلوكساسين و٥٠% العزلات قاومة الينورفلوكساسين ٧%من العزلات قاومة أفلوكساسين و٣٠% من العزلات قاومة لوموفلوكساسين و ٨٠% من العزلات قاومة مضاد Enoxacin في حين قاومة العزلات بشكل ١٠٠% مضاد Naldasic acid .

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للسبروفلوكساسين وينورفلوكساسين وافلوكساسين للعزلات قيد الدراسة التي أظهرت مقاومه تجاه هذا المضاد في فحص الحساسيه بالاقراص، وقد بينت النتائج ان قيمة MIC تراوحت بين (٨-٥١٢) مايكروغرام /مل .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.

بيَنت نتائج التحري عن جينات *qnrA* و*qnrB* في بكتريا *P.aeruginosa* جينات المقاومة *qnrA* هي الأكثر إنتشارا بين العزلات بالمقارنة مع qnrB .

Key word :_P.aeruginosa* ,Quinolones , *qnrA

Study Quinolones resistant in *pseudomonas aeruginosa*

Riad Abd AlHussain Delool 1, Alaa Mohammed Mahmood 2.

Received 5 September 2012 ; Accepted 7 October 2012

Abstract

Study included (100) isolate of *P.aer*uginosa and identification From different sample including Wound ,burn , Urine , Otitis media and throut infection . The sensitivity of these isolate were tested against eight type of quionlones antibiotic .the result appear peracentage of resistance (44%) for ciprofloxacin and (55.3%) for Norfloxacin and (60%)for Levofloxacin and (50%) isolate resistant E norfloxacin and (7%) resistant ofloxacin and all isolate resist Naldasic acid .

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for isolate resist of Ciprofloxacin ,Ofloxacin and Enorfloxacin by test ing disces method sensitive . and (MIC) valus for them between (8) µg\ml and (512)µg\ml **.**

The result of Gel electroph orph es appear ed some isolated quinolones resist contented asingle plasmid bandand tow plasmid band . using poly merase chain reaction to determinated resistance gene *qnr*A & *qnr* B in*P.aeruginosa*.. *qnr A* gene is more diffusion between *P.aeruginosa* isolates .

Key word :***P.aeruginosa* ,Quinolones ,** *qnr*A

المقدمة

بكتريا *P.aeruginosa* سالبة لصبغة كرام هوائية غير مخمرة لسكر اللاكتوز وتفرز العديد من الصبغات منها صبغة البايوسيانين (Pyocyanin) التي تكون ذات لون ازرق مخضر ويمكن ملاحظة الصبغات على سطح الطبق الزرعي و صبغة اخرى في صبغة البايوفردين (Pyoverdin) (Fluorescein) ذات لون اصفر مخضر وتتألق هذه الصبغة عند تعرضها للاشعة فوق البنفسجية UV، وتكون هذه الصبغات غير سامة (٢)، ان بكتريا *P.aeruginosa* جراثيم 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 (١). 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،إذ 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) ظهرت مركبات أخرى ضمن الجيل الثاني مثل Norfloxacin ، Ofloxacin ، Pefloxacin وغيرها (٦) .

تكون هذه المضادات ذات تأثير قاتل للبكتريا ، تتداخل مع أيض الدنا عن طريق تثبيط إنزيمين هما Topoisomerase II

أو ما يعرف بـgyrase DNA في البكتريا السالبة لملون كرام والإنزيم الآخر هو Topoisomerase IV في البكتريا الموجبة لملون كرام (٧)، بدأت هذه المقاومة بشكل تدريجي بحصول طفرة مفردة في الموقع الهدف للمضاد وهو إنزيم Topoisomerase IV أو حصول طفرات إضافية لأنزيم DNA gyrase(٨).

تكمن خطورة الإصابة بهذه البكتريا في مقاومتها لمضادات متعددة ، وقابليتها على إكتساب عوامل وراثية تشفر لمقاومة العديد من المضادات الجرثومية منها السبروفلوكساسين، وتبادلها مع بكتريا أخرى ، ويمكن ان تكون مصدراً لنشر جينات المقاومة عن طريق الإقتران ضمن النوع نفسه أو الأنواع الأخرى العائدة للجنس نفسه ، أو الأجناس البكتيرية الأخرى ، وبالتالي *صعوبة علاجها مما يزيد من ضرورة إيجاد بدائل جديدة لعلاج الإصابات الناتجة عنها ، 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 وqnrB* في العزلات المحلية لبكتريا *P.aeruginosa* المقاومة الكوينولونات .

طرائق العمل

١-العزلات البكتيريه

جمعت عينات سريرية مختلفة شملت الجروح والحروق والأدرار و التهاب الاذن الوسطى والتهاب البلعوم للتحري عن بكتريا *P.aeruginosa*. 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 المستخدمة في الدراسة بطريقة الاقراص على وسط مولر هنتون الصلب ، وتم تحديد المقاومة والحساسية أعتماداً على الاقطار القياسية حسب CLSI(١٠).

٣-تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC)

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضادات السبروفلوكساسين وينورفلوكساسين وافلوكساسين بطريقة التخافيف المتضاعفه المتسلسله بالوسط الزرعي سائل وحسب ما ورد في (١١).

٤-عزل DNA البكتيري

تم عزل دنا عزلات البكتريا المقاومة لمضادالسبروفلوكساسين ونورفلوكساسين و افلوكساسين وليفوفلوكساسين وينورفلوكساسين باعتماد عدة أستخلاص الدنا المجهزة من شركة promega (USA) من العزلات البكتيرية المشخصة ورحلت نتائج الاستخلاص باستعمال هلام الاكاروز (٠.٨%).

٥- الكشف عن الجين *qnrA*و*qnrB*

أختيرت البوادئ النوعية المُستهدفة لجينات *qnrA*و*qnrB* في بكتـــريا *P.aeruginosa* وفقاً لما ذكر في (١٢ و ١٣) إذ تم تحضير محاليلها الخزينة حسب تعليمات شركة Alpha DNA المُجهزة لها بإستعمال الماء المقطر اللأأيوني المُعقم للحصول على تركيز (١٠٠) بيكومول\مايكروليتر ، وقد تم إجراء التفاعل التضاعفي حسب ماذكر من قبل (١٢ و ١٣) .

النتائج والمناقشة

تم الحصول على ١٠٠ عزلة تعود لبكتريا*P.aeruginosa* من عينات سريرية مختلفة شملت الجروح والحروق والأدرار والتهاب الاذن الوسطى والدم . شخصت العزلات البكتيرية النامية مبدئياً اعتماداً على صفاتها المظهرية عند تنميتها على وسط آكار الدم وأكار المكونكي في ظروف هوائية بدرجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة ، فظهرت مستعمراتها صغيرة شاحبة غير مخمرة لسكر اللاكتوز عند تنميتها على وسط ماكونكي. أظهر الفحص المجهري للشرائح المصبوغة بملون كرام عصيات مكورة مرتبة بهيئة ثنائية سالبة للصبغة هذا يتوافق و مميزات بكتريا وحسب ما ورد في (٩) وعند تنمية العزلات على وسط السيدومونس أكار تظهر المستعمرات الصبغات الخضراء الغير مفلورة وزرقاء المخضرة المفلورة (١٤).

أختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة لمضادات السبروفلوكساسين و النورفلوكساسين و ليفوفلوكساسين، أظهرت النتائج أن ٤٤% من العزلات كانت مقاومة للسبروفلوكساسين و ٥٥.٣% من العزلات مقاومة للنورفلوكساسين و ٦٠%ليفوفلوكساسين و٥٠% العزلات قاومة الينورفلوكساسين ٧%من العزلات قاومة أفلوكساسين و٣٠% من العزلات قاومة لوموفلوكساسين و ٨٠% من العزلات قاومة مضاد Enoxacin في حين قاومة العزلات بشكل ١٠٠% مضاد Naldasic acid

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للسبروفلوكساسين وينورفلوكساسين وافلوكساسين للعزلات قيد الدراسة التي أظهرت مقاومه تجاه هذا المضاد في فحص الحساسيه بالاقراص، بينت النتائج ان قيمة MIC تراوحت بين (٨-٥١٢) مايكروغرام /مل

لاحظ (١٥) وجود مقاومة متعددة للمضادات بين عزلات بكتريا *P.aeruginosa* وقد وصلت نسبة المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين الى ٥٨% ، كذلك وجد (١٦) مقاومة عالية بين عزلات بكتريا *P.aeruginosa*ليفوفلوكساسين وصلت ل ٤٥%.

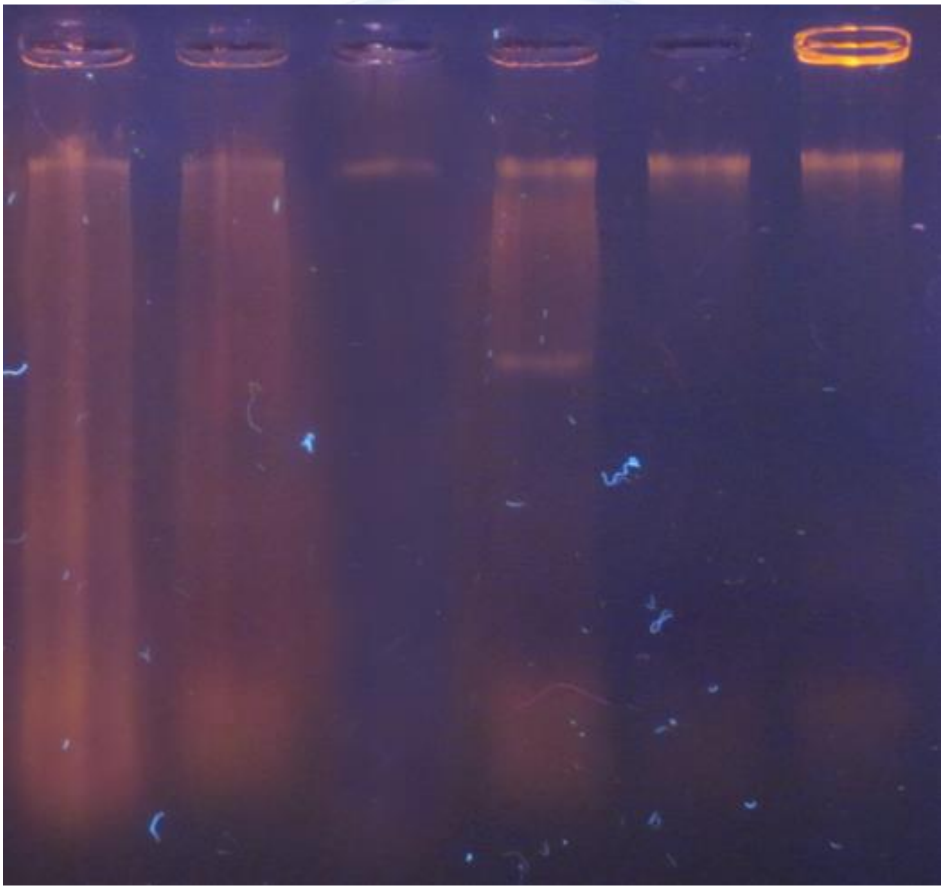
أظهرت نتائج ترحيل الدنا المستخلص من العزلات المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين ونورفلوكساسين و افلوكساسين وليفوفلوكساسين وينورفلوكساسين أحتواء بعض العزلات على حزمة بلازميدية واحدة وعزلة واحدة تحتوي على حزمتين

بلازميدية (شكل ١).تتفق هذه النتيجة مع ماذكره (١٧) من احتواء عزلات بكتريا *P.aeruginosa*التي درسها على حزمة بلازميدية مفردة بحجم متقاربة ، ووجد (١٨) اكثر من حزمة بلازميدية مختلفة الأحجام من ١٥-٢٢٥ kb في بكتريا *P.aeruginosa* التي درسها .

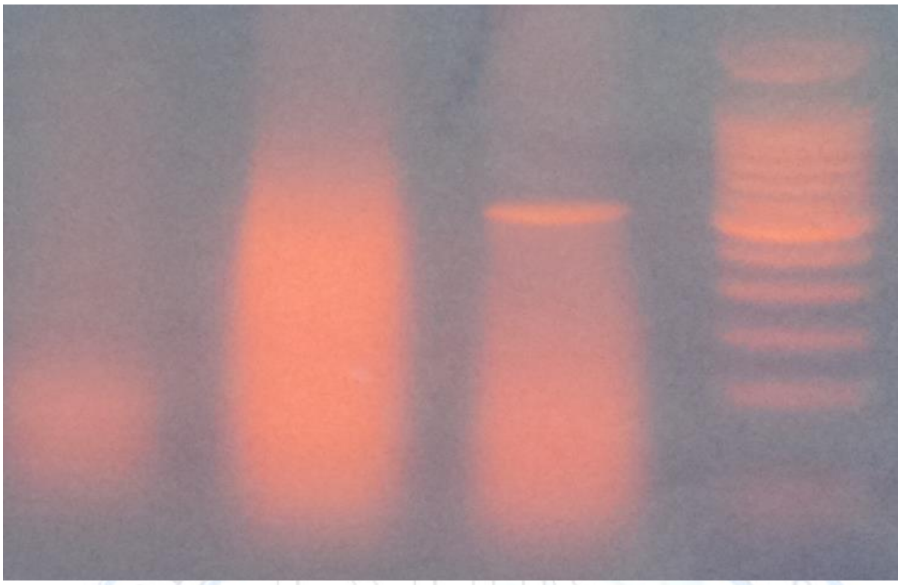
ذكر (١٩) ان جينات *qnr* محمولة على بلازميد pMG252 في العزلات السريرية لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* تحمل صفة مقاومة الكوينولونات ، كذلك لاحظ (٢٠) شيوع جينات *qnrA* بين عزلات العائلة المعوية. تم الكشف عن مقاومة الكوينولونات المرتبطة بالبلازميدات والمسؤول عنها الجين *qnrA* سنة ١٩٩٨ (١٩) ، وكشف (18) عن وجود الجين *qnrA* في بكتريا *P.aeruginosa*المقاومة للكوينولونات

بيَنت نتائج التحري عن جينات *qnrB* , *qnrA* في بكتريا *P.aeruginosa* أن جينات المقاومة *qnrA* هي الأكثر إنتشارا بين العزلات المحلية بالمقارنة مع*qnrB* (شكل ٢) . وجد (٢١و٢٢) ان عزلات بكتريا العائلة المعوية المقاومة للكوينولونات كانت تحوي جين *qnrA* وان هذه المقاومة تنتقل بين الأنواع المختلفة بالاقتران البكتيري .

.



شكل (١) المحتوى البلازميدي لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* المقاومة لمضادات الكوينولونات



شكل (٢) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعلPCR لبكتريا *P.aeruginosa*بإستعمال البوادئ النوعية لجين *qnrA*

المسار (١) الدليل الحجمي المسار (٢) العزلة ٣ المسار (٣) العزلة ٧ المسار (٤) العزلة٨

المصادر

1- **Author ,S. and R ussell, W.** (2010) *pseudomonas* infection . updated ife 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 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 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-**Ng,E.Y.;** Trucksis,M. and Hooper,D.C. (1996).Quinolones 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.12thedition. 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-**Alalem**، A.M (٢٠٠٨) .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 N′Guyen, A. Weintraub, C. Leviandier, and P. Nordmann. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS in *Enterobacter cloacae*. Clin. Microbiol. Infect. 12:1021-1023.

14- **Brown P., D. and Izunda , A.**(2004). Antibiotics resistance in clinical isolates of *P.aeruginosa* in Jamaica . Version ISSN 1020-4989.

15- **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.

16- **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.

17- **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

18- **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

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

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

21- **El-Essawy A. K.,** Abu Shady H.M. and El-Biaa B. M.(2011) The emergence of plasmid mediated quinolone resistance genes qnrA, qnrB, and qnrS among Egyptian clinical isolates of Enterobacteriaceae. African Journal of Microbiology Research . 5(30): 5384-5397,

22- **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.