Vol. 3, No. 5 and 6, P. (97-105)A

التحـــري عـــن جيـــن oxa-١٠ و per-١ في عـــــزلات جرثومـــة Pseudomonas aeruginosa المعزولة من مرضى الحروق في مدينة كـربلاء

*ضواء محمد الخطيب * وفاء صادق الوزني ** ياسمين خضير الغانمي

* قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة كربلاء، العراق

** قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة كربلاء، العراق

تاريخ الاستلام: 1 / Nov / 2015

تاريخ قبول النشر: 11 / Dec / 2016

Abstract

The present study aimed to obervation frequency of germ pseudomonas aeruginosa among burn patients in the city of Karbala, and the investigation of oxa-10 and per-1 gene in isolated germ p.aeruginosa multi-antibiotic-resistant study included the collection of 64 skin swabs of burn patients Recumbent to the Teaching Hospital Hussein in Karbala For the period from 2-2014 to -16 16-8- 2014 indicated the results of diagnostic tests for germ p.aeruginosa ownership of (35) isolation to this germ. Results showed sensitivity tests that the (20) isolates of germ P.aeruginosa were high resistance to most antibiotics studied reaching resistance percentage for each of the Cefatotaxime (88.6%), Ceftazidime (85.7%) and (85.7%) in Meropenin while reached (77.1%) resistance to the antibiotic Gentamycin. genetically detection owing isolates produced b-lactamases enzymes multiple resistance (per-1 and oxa-10 gene) using the enzyme polymerase chain reaction technique (PCR) where polymerization results showed that the presence of oxa-10 gene percentage (54.1%) and The percentage of the presence of per-1 gene is (31.4%) of the the total isolates. so the emergence of a partial pack size (760) base pairs of the gene oxa-10 and (927) base pairs of the gene per-1.

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى بيان نسبة تردد جرثومة الزوائف الزنجارية Pseudomonas aeruginosa بين مرضى الحروق في مدينة كربلاء، والتحري عن جين oxa-10 و per-1 في عزلت جرثومة p.aeruginosa المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية شملت الدراسة جمع (64) مسحة جلدية من مرضى الحروق الراقدين في مستشفى الحسين التعليمي في كربلاء للفترة من 2014/2/16 الى 2014/8/16 اشارت نتائج الاختبارات التشخيصية لجرثومة p.aeruginosa عائدية (35) عزلة لهذه الجرثومة.

اظهرت نتائج الاختبارات الحساسية ان (20) عزلة من جرثومة P.aeruginosa كانت عالية المقاومة لاغلب المضادات الحيوية المدروسة حيث بلغت نسبة مقاومتها لكل من Ceftazidime (85.7%)، Cefatotaxime (88.6%) و Meropenin (85.7%) في حين وصلت مقاومتها الى (77.1%) للمضاد الحيوي Gentamycin . تم الكشف وراثيا عن امتلاك العزلات ذات المنتجة المقاومة المتعددة لجينات البيتالاكتميز (جين per-1 وoxa-10) باستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل (PCR) حيث اظهرت نتائج البلمرة ان تواجد جين oxa-10 بنسبة (51.4%) وكانت نسبة تواجد جين (31.4%) per-1 من مجموع العزلات الكلي .وذلك بظهور حزمة ذات حجم جزئي (760) زوجاً قاعدياً لجين oxa-10 و(927) زوجاً قاعدياً لجين per-1.

1. المقدمة

تعرف الحروق بانها اي ضرر يصيب الجلد البشري نتيجه الانتقال الكبير للطاقه (الحراريه، الاشعاعيه، الكيمائيه، الكهربائيه)الى جسم الانسان [1] ، كما تعتبر الحروق واحدة من أكثر الحالات المرضية اضراراً بالصحة النفسية والبدنية لما تسببه من أثار نفسية قاسية احياناً تتطلب خضوع المريض الى جلسات التأهيل الصحي والنفسي بعد الحرق [2]. ان تجنب تلوث الحروق بين المرضى المصابين بالحروق تعتبر المشكلة الاكبر والاكثر خطورة بسبب تعطل حواجز الجلد من جهة واعتبار وحدة رعاية الحروق (BCU) Burn unit care موقع وبائي للجراثيم بسبب احتواءه على احياء مجهرية عالية المقاومة للمضادات الحياتية من جهة اخرى [3،4].

تعتبر جرثومة psedomonas aeruginosa مسؤولة عن اعلى نسبة اصابة بين مرضى الحروق لكونها بكتريا انتهازية ومتنوعة التمثيل الغذائي ،تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من اجتياز الدفاعات المناعية لجسم المريض . تتواجد في جميع لبيئات حيث تتواجد في التربه وتفضل سطح البيئات الرطبه ولها القدره على التكيف مع كافة الضروف ومقاومه العديد من المضادات الحياتيه التي تمكنها من البقاء على قيد الحياة [5].

ان احد الاليات مهمة التي تمتلكها تلك البكتريا هي انتاجها انزيمات البيتالاكتميز حيث ان هـذه الإنـزيـمات أصبحت شائعة جداً لقابليتها على الإنتقال بسهولة بين الاجناس البكتيرية السالبة لصبغة غرام بواسطة عملية الإقتران (Conjugation)، كما تتميز الكثير من الاجناس البكتيرية السالبة لصبغة غرام بامتلاكها انزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية بصورة طبيعية التي تجعل مقاومة للعديد من المضادات الحياتية [6]، كما تعتبر بكتريا الزوائف الزنجارية المصنع الوحيد لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف نوع PER-1 ((Pseudomonas extended resistance، تلك الانزيمات التي تعود الى صنف A حسب تصنيف Ambler والتي لها القدرة على مقاومة العديد من المضادات الحياتية من خلال قدرتها العالية على تحليل السيفالوسبورينات المتمثلة بكل من Penicillins، Ceftazidime، Cefotaximeو Aztreonam، ولكنه غير فعال على تحليل المضاد الحيوي Cephamycin و Carbapenem [7،8].

تمتلك البكتريا مجموعة اخرى من انزيمات البيتالاكتام التي تعود إلى الصنف D حسب تصنيف Ambler أطلق عليها انزيمات (Oxacillinase OXA ESBL) وهي شديدة الفعالية ضد المضادَين الحيويَين الاوكساسيلين(Oxacillin)، والكلوكساسيلين (Cloxacillin)، كما عرفت بامتلاكها قدراً كبيراً من التغايرات في تسلسل الحوامض الأمينيـــة الخـاص بهـا [9]، فهي متـواجـدة في انـواع مختلفة من البكتريا السالبة لصبغة كـرام خصوصا العائلة المعوية Enterobacteriaceae، والتي تمنحها القدرة على مقاومة الجيل الثالث من السيفالوسبورينات وخصوصاً كل من، Ceftazidime، Cefotaxime وAztreonam [7] . نظرا لعدم وجود معلومات كافية عن مدى تكرار انزيمات البيتالاكتميز واسعة الطيف في عزلات جرثومة p.aerugenosia التي تسوطن المستشفيات في العراق بصورة عامة ومحافظة كربلاء بصورة خاصة والتي تكون مسؤولة عن اغلب حالات الوفيات بين مرضى الحروق لذا كان من الواجب التحري عن قابلية عزلات تلك الجرثومة عن انتاج انزيمات البيتالاكتميز لغرض وضع حلول منطقية لتلك المشكلة .

2. المواد وطرائق العمل

1.2. جمع العينات

تم جمع (64) مسحة جلدية من مرضى الحروق الراقدين في مستشفى الحسين التعليمي في محافظة كربلاء للفترة من 2014/2/16 لغاية 2014/8/16 ومن مختلف الاعمار وجمعت العينات بواسطة ماسحات معقمة احادية الاستعمال و زرعت بعد ساعتين فقط على اوساط زراعية مختلفة (عامة وانتقائية) لغرض عزل جرثومة Pseudomonas aeruginosa.

2.2. الزرع والتشخيص المختبري للعزلات الجرثومية

تم زرع العينات على الاوساط الزرعية) المغذي الصلب وواكار الدم الصلب والماكونكي الصلب ثم حُضنت الأطباق بدرجة (37) م° لمدة (24) ساعة ثم درست صفات المستعمرات النامية على الاوساط الزرعية وصفات الخلايا البكتيرية تحت المجهر الضوئي المركب بعد تصبيغها بصبغة كرام وملاحظة شكل وترتيب ولون الخلاياكما درست الصفات الكيموحيوية الاولية للعزلات النامية اكدت نتائج تلك الفحوصات باستخدام نظام Api (20) و vitak

***فحص الحساسية للمضادات الحياتية**

استخدمت طريقة الانتشار بالاقراص Kirby،(1969) Dick diffusion لاختبار حساسية جميع العزلات الجرثومية تجاه الضادات الحياتية حيث زرعت انابيب الاختبار الحاوية على وسط المرق المغذي وحضنت عند درجة (37) م° لمدة (2-8) ساعة او لحين ظهور العكرة التي قورنت بانبوبة مكفرلاند القياسية (0.5) نشر خلايا العالق الجرثومي على وسط مولر- هنتون باستعمال ماسحة قطنية بشكل متجانس ثم تثبيت اقراص المضادات على سطح الطبق باستخدام ملقط معقم بواقع خمسة اقراص للطبق الواحد،ثم حضنت الاطباق عند درجة (37)م° لمدة (18) ساعة. قرئت النتائج بقياس اقطار مناطق التثبيط بالمليمتر ومقارنتها مع الاقطار القياسية لهذه المضادات المحددة (CLSI،2012) [10] **.لتحديد العزلات الحساسة والمقاومة حيث تم انتقاء (20) عزلة جرثومية والتي كانت مقاومة لاغلب المضادات الحيوية المستخدمة لاجراء الاختبارات الجزيئة.**

3.2. تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل

تم استخلاص الـ DNA من (20) عزلة جرثومة P. aeruginosa من حسب الطقم المجهز شركة Geneaid **وباعتماد الغليان حسب طريقة (Yan etal.2006) واستخدم الDNA** المشفر لجين oxa-10 و per-1.

حيث حضر خليط التفاعل Reaction mixture من المواد المدرجة في الجدول (1)

جدول (1): يوضح المواد المستخدمة في تحضير خليط التفاعل Reaction mixture

اسم المادة	الكمية µl
pre mix	25
Primer	4
DNA	5
Disttle water	11
Total	32.5

أدخلت الأنابيب بعناية في جهاز PCR لإجراء التفاعل وباستعمال البرنامج المناسب في التضاعف. وان ظروف التفاعل الخاصة بالبرايمر OXA-10 والبرايمر PER-1 التي تم توضيحها في الجدول (2) و(3) على التوالي.

جدول (2): يوضح ظروف التفاعل الخاصة بالبرايمر OXA-10

نوع الخطوة	درجة الحرارة (°C)	الوقت	عدد الدورات
initial denaturation	94	5 min	31
Denaturation	94	45 sec	31
Annelaling	58	45 sec	31
Extension	72	30 sec	31
Final extension	72	7 min	31
Hold	4		1

جدول(3): يوضح ظروف التفاعل الخاصة بالبرايمر PER-1

نوع الخطوة	درجة الحرارة (°C)	الوقت	عدد الدورات
initial denaturation	94	5 min	31
Denaturation	94	45sec	31
Annealing	45	45 sec	31
Extension	72	30 sec	31
Final extension	72	7 min	31
Hold	4		1

4. النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية انه من (64) مسحة جلدية من مرضى الحروق تم عزل (35) عزلة عائدة لجرثومة P. aeruginosa وبعد اجراء كافة الفحوصات البايوكيميائية والتاكيدية لتلك العزلات تم اجراء فحص الحساسية لها تجاه (7) انواع من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال في مستشفى محافظة كربلاء.

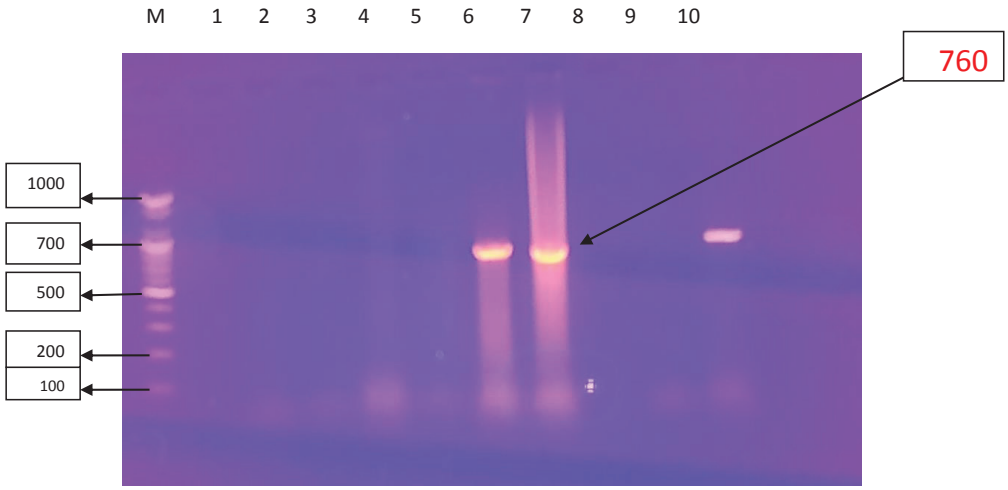
حيث ظهر جليا وكما مبين في الجدول (4) ان اغلب العزلات كانت مقاومة لاغلب المضادات الحيوية المستخدمة حيث كانت نسبة المقاومة عالية لكل من المضاد الحيوي **Cefototaxin** (88.6%)، **Ceftazidime** (85.7%) **Meropenin**، (85.71) و**Oxacillin** (71) اما المضاد الحيوي **Immpenin** فقد كانت نسبة حساسية العزلات له اعلى والتي بلغت (60%) مائلة في ذلك كل من المضاد الحيوي **Amikacin** (54.3) وكل من المضاد الحيوي **Ciprofloxacin** و **Gentamycin** حيث بلغت نسبة الحساسية لهم (51.4%) و(22.86%) على التوالي.

جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما حصل عليه **Nisani** [11] وبلال [12] والذين توصلو الى ان نسب المقاومة لمضاد سيفوتاكسيم كانت (86.5%) وسيفتازيديم (96.3) .اكد العديد من الباحثين أنّ مقاومة البكتريا للكثير من المضادات ومنها مضادات **β -lactam** تزداد بزيادة إستهلاك هذه المضادات، وإنّ أحد أسباب هذه المقاومة يعود إلى إنتاج البكتريا لعدد كبير من إنزيمات **β –lactamase** المحطمة لهذه المضادات نتيجة التعرض المستمر ولفترات طويلة لتلك المضادات [13] .

جدول (4): مقاومة بكتريا الزوائف للمضادات الحيوية الشائعة الاستخدام لعلاج الحروق

المضاد الحيوي	حساسة (S)	النسبة %	مقاومة (R)	النسبة %
Immpenin	21	60	14	40
Ciprofloxacin	18	51.4	17	48.6
Meropenin	5	14.3	30	85.71
Amikacin	19	54.3	16	45.71
Cefatotaxime	4	11.4	31	88.6
Ceftazidime	5	14.3	30	85.7
Gentamycin	27	77.14	8	22.86
Oxacillin	10	28.6	25	71.4

تعتبر مشكلة مقاومة P.aerginosa للمضادات الحياتية من اهم المشاكل المسجلة لدى مرضى الحروق في مستشفى الحسين التعليمي في كربلاء حيث اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان عزلات تلك البكتريا مقاومة لاغلب المضادات الحيوية شائعة الاستعمال وخصوصا مضادات البيتالاكتام. درست قابلية (20) (عزلة) كانت مقاومة لاغلب المضادات الحيوية تحمل جينات الرئيسية المسؤولة على انتاج كل من انزيم OXA-10 و انزيم PER-1 (باعتبارهما من الانزيمات الاساسية التي تكسب البكتريا صفة المقاومة) بواسطة تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction) باعتماد البوادئ الخاصة لكل من تلك الانزيمات حيث اظهرت ناتج تضخيم amplification حجم الجزئي (760) زوج قاعدي للجين المسؤول عن انزيم OXA-10 كما الموضح في الشكل (1) بينما كانت نسبة نتائج تضخيم لجين المسؤول عن انزيم PER-1 ظهور حزمة ذات حجم جزئي (927) زوج قاعدي حيث كانت نسبة تواجد الجين الاول (85%) من بين جميع العزلات اما الجين PER-1 فقد تواجد بنسبة (55 %) من العزلات وكما موضح في الجدول (5). بينت العديد من الدراسات وجود المجموعة الجينية المنتجة لمضادات البيتالاكتميز في العزلات التي تعود الى بكتريا P.aeruginosa ففي الدراسة اجريت في ايـران وجـد ان نسبة تواجد PER-1 و OXA– 10 وصلت إلى (49.3 %) و (74.6%) على التوالي [14] .أما في دراسة أجريت في تركيا لوحظ إن نسبة جين PER-1 هي (11.23%) في العزلات البكترية والجين OXA-10 بنسبة (17%) في تلك العزلات، في حين بينت في دراسة اخرى ارتفاع في نسب جين PER-1 وOXA-10 لتصل الى (68.3% و 92.7%) على التوالي [15]. وهي نتائج التي كانت مقاربة الى نتائجنا بصورة كبيرة حيث يعتقد ان السبب في ذلك يرجع بصورة كبيرة الى الاستعمال العشوائي والغير موجه للعديد من المضـادات الحيوية .لجرثومة ***p.aerugenosa***، تركيز الهلام (8.0%)، الفولتية 70 (فولت) لمدة 60 (دقيقة)



شكل (2) : الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل لجين OXA 10 لجرثومة *p.*aerugenosa،تركيز الهلام (0.8)%،الفولتية (70)فولت لمدة (60) دقيقة

جدول (5): النسب المئوية لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف في جرثومة **P. aeruginosa**

درجات الحرق	عدد العزلات	أنواع إنزيمات البيتالاكتاميز	
		bla_{oxa-10}	bla_{per-1}
حرق البسيط	5	3 (%60)	1(%20)
حرق المتوسط	6	6(%100)	3(%50)
حرق الشديد	9	8(%88.9)	(%77.8)7
المجموع	20	17 (%85)	10 (%55)

5. الاستنتاجات

كانت جميع عزلات جرثومه Ps. aeruginosa المعزوله من الحروق مقاومه لاغلب المضادات الحيويه شائعه الاستعمال في المستشفى الشئ الذي يشكل تحديا علاجيا كبيرا بالاضافه الى قدره تلك العزلات على انتاج انزيمات البيتالاكتميز واسعة الطيف التي تعرف عليها من خلال الكشف عن امتلاك تلك العزلات لكل من جين PER-1 و OXA-10باستخدام تفاعل انزيم البلمرة PCR.

المصادر

[1] Arena, G.; Cordova, S.; Gavin, A.; Palamara, P. and Rimajova, M. Injuryin Western Australia: A review of best practice, stakeholder activity, legislation, and recommendations. Perth: The University of Western Australia, (2002).

[2] Shriner, G. Resident orientation manual, University of Texas, Medical Branch Blocker Burn Unit, (2000).

[3] Roberts SA, Findlay R, Lang SD. Investigation of an outbreakof multi-drug resistant Acinetobacter baumannii in an intensive care burns unit. J Hosp Infect; 48 : 228- 32 , (2001).

[4] Falk PS, Winnike J, Woodmansee C, Desai M, Mayhall CG.Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a burn unit.Infect Control Hosp Epidemiol, 21 : 575- 82, (2000).

[5] Shaan L.Gellatly &Robert E.W.Hancock, pseudomonas aerugenosia:New insight into pathogensis and host defences, (2013).

[6] Livermore, D. M. and Woodford, N., "The blactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter." Trends Microbiol 14: 413 - 420, (2006).

[7] Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum b-lactamases. Clin Microbiol Infect,14:42–52, (2008).

[8] Aktas Z, Poirel L, Salcıoglu M, Ozcan PE, Midilli K, Bal C, et al. PER-1- and OXA-10-like b-lactamases in ceftazidime- resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. Clin Microbiol Infect,11:193–8, (2005).

[9] Pai, H.; Wonkim, J.; Kim, J.; lee, J.; CHOE, K. W. and Gotoh, N. Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 480 – 484, (2001).

[10] CLSI (2012a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests;

Approved Standard—Eleventh Edition . 32 (1).Clinical Laboratory standards institute .Wayne.PA, USA

[11] Nisani، A. L. S. Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* and determination of some Virulence Factors using specific Genetic Markers. College science.Tikrit university, (2011).

[12] **بلال** ، الهام جواد كاظم. التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز في العزلات السريرية في بكتريا الزوائف الزنجارية في مدينة النجف .رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات .جامعة الكوفة، (2010) .

[13] Van Delden, C. and Iglewski, B.H. Cell to cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerging Infectious Disease, 4(4): 1- 14, (1998) .

[14] Mirsalehian, A. Feizabadi, M. Nakhjavani, F.A. Jabalameli, F. Goli, H.& Kalantari, N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*.36: 70 - 4, (2010).

[15] Vahaboglu, H .Ozturk, R. Aygun، G. et al. Wide-spread detection of PER-1 type extended-spectrum b-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother . 41: 2265 - 9, (1997)

[16] Shahcheraghi, F. Nikbin, V.S. Feizabadi, M.M. revalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in Tehran. Microb Drug Resist ;15:37–9, (2009).