فحص حساسية عزلات جرثومة *Acinetobacter baumannii* والتحري عن فئة الجينات التابعة لـ *bla_{oxa}* و *adeABC* المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية

شكيبه يونس شريف

أديبة يونس شريف

دينا نوفل وجيه

دائرة صحة نينوى

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

كلية النور الجامعة

(أُستلم 2018/6/20 ؛ قُبِل 2018/11/1)

الملخص

أظهرت ثمان عزلات تابعة للنوع *Acinetobacter baumannii* مقاومة مطلقة بنسبة 100% لمضادات، Ticarcillin، Piperacillin، Gentamicin، Cefotaxime ، Ciprofloxacin، Ceftriaxone ، Ampicillin، Trimethoprim-sulfamethoxazol، 100% فيما كانت متوسطة المقاومة لمضاد Tobramycin إذ بلغت نسبة المقاومة 50% وكانت قليلة المقاومة للمضاد Netillin والـ Amikacin إذ بلغت نسبة المقاومة لهما (37.5%). وبغية التحري عن أسباب المقاومة تم الكشف عن تواجد الجينات *bla_{oxa51}* و *bla_{oxa23}*، إذ سجل تواجدهما بنسبة 100% و 87.5% على التوالي فيما لم يتم الكشف عن الجين *bla_{oxa58}* في جميع عزلات *A.baumannii* التي أكدت مقاومتها لمضادات بيتالاکتام، كما اثبتت الدراسة تواجد الجين *adeB* الذي يُسهّم في عملية ضخ المضاد الحيوي إلى خارج الجرثومة والتنظيم الجيني لجينات *adeR* و *adeS* التي أكد وجودها مقاومة الجرثومة للمضادات الحيوية. فيما بينت النتائج ان مقاومة عزلات جرثومة *A.baumannii* لمضادات البيتالاکتام والكاربابانيم كان بوساطة جينات *bla_{oxa51}*، *bla_{oxa23}* وان دور نظام الضخ *adeABC* كان محدوداً بسبب غياب الجين التنظيمي *adeS* عن هذا النظام لمعظم العزلات.

الكلمات الدالة: *A.baumannii*، PCR، *bla_{oxa51}*، *bla_{oxa23}*، *bla_{oxa58}*، *adeB*، *adeS*، *adeR*.

Sensitivity Testing of *Acinetobacter baumannii* and Detection of some Resistance Genes Affiliate of *bla_{oxa}* and *adeABC*

Dena N. Wajeih

Alnoor University College

Adeeba Y. Shareef

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

Shakeeba Y. Shareef

Nineveh Health Department

ABSTRACT

Eight isolates of *Acinetobacter baumannii* showed absolute resistance (100%) to Ampicillin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Cefotaxime, Gentamicin, Piperacillin, Ticarcillin, Trimethoprim-sulfamethoxazol, while it showed moderate resistance (50%) to Tobramycin and low resistance to each of Amikacin and Netillin (37.5%).

For the detection of the causes of resistance *bla_{oxa51}* genes, *bla_{oxa53}* genes were detected at a rate of 100% and 87.5% respectively, while the gene *bla_{oxa58}* was not detected in all *A.baumannii* isolates which confirmed its resistance to B-lactam antibiotics, the results also confirms the

presence of the gene *adeB* which plays role in efflux pump mode of resistance as well as the regulatory genes of *adeR* and *adeS* of which their presence confirm the bacterial resistance to antibiotics.

The results showed that the resistance of *A.baumannii* to B-lactam and Carbapenem antibiotics were mediated by *bla_{oxa23}*, *bla_{oxa51}* and the role of AdeABC was restricted due to the absence of the *AdeS* regulatory gene from most isolates.

Keywords: *A.baumannii* , PCR, *bla_{oxa51}*, *bla_{oxa23}*, *bla_{oxa58}*, *adeB*, *adeS*, *adeR*.

المقدمة

تعد جرثومة *Acinetobacter baumannii* من الجراثيم العسوية السالبة لصبغة جرام غير المخمرة لسكر اللاكتوز والمسببة لعدوى المستشفيات ولذلك تعد من أهم أنواع جنس *Acinetobacter*، إذ تم عزلها من الجهاز التنفسي والجروح والدم وشغاف القلب ومن سائل النخاع الشوكي، تنمو في درجات حرارة بين 15-44⁰م والمقاومة للعديد من المضادات الحيوية (Mims *et al.*, 2004; Adams and Koch, 2010).

ركزت دراسات المقاومة للمضادات الحيوية لجرثومة *A.baumannii* على عدة آليات منها نفاذية الغشاء الخارجي وإنتاج أنزيمات تعمل على تثبيط فعالية المضاد الحيوي مثل أنزيمات β -lactamase وتغيير موقع ارتباط المضاد الحيوي بالموقع الفعال و تنشيط عملية ضخ المضاد الحيوي الى خارج الخلية الجرثومية، وأوضح الباحثون أن سرعة انتشار المقاومة في هذه الجرثومة تتم من خلال العناصر الناقلة او من خلال حدوث الطفرات (Sun *et al.*, 2012).

وتعد مضادات البيتا لاكتام من المضادات واسعة الطيف حيث تعمل على توقف عملية بناء الجدار الخلوي للجرثومة وتكون ذا تأثير قاتل للجرثومة وتنتج مقاومة الجرثومة لمضادات البيتا لاكتام عن إنتاج أنزيمات β -lactamase حيث تعمل هذه الأنزيمات على تحليل حلقة البيتا لاكتام وبذلك تسبب المقاومة للبنسلينات والسيفالوسبورينات والكاربابانيم (السليم وشريف، 2018 ; Maragakis and Perl, 2008).

وتصنّف مضادات الكلايكوسيدات الامينية ضمن المضادات القاتلة للجرثومة، إذ تؤثر في بروتينات الغشاء البلازمي من خلال تكوين بروتينات غير طبيعية تتداخل ضمن الغشاء البلازمي، تتسبب في فقدان وظيفته وموت الجرثومة نتيجة تأثيرها باختلاف التركيز بين داخل الخلية وخارجها (Mims *et al.*, 2004; Adams and Koch, 2010).

في حين تتداخل مضادات السلفوناميد مع ايض الخلية الجرثومية اذ تمنع بناء حامض الفولك الذي يعد من المركبات المهمة في بناء الاحماض النووية RNA و DNA، وتعد هذه المضادات من مشابهات المركب Para aminobenzoic acid الذي يعد من المركبات المهمة في بناء حامض الفولك، وبسبب زيادة انتشار جين *erm* وغيرها من جينات المقاومة لهذه المضادات تم تحويل المضاد إلى المركب المتكون من Sulfamethaxol مع Trimethoprim (محمود وشريف، 2018; Pommerville, 2011).

تعد عائلة RND جينات ناقلة غشائية من نوع Proton antiporters التي تستعمل التدرج في البروتونات لتقوية الضخ، وان التبادل يكون بين أيون واحد للهيدروجين H⁺ لكل جزيئة منقولة، ويتكون نظام RND من *adeB* الذي يعد البروتين الناقل للعديد من المضادات وهو يمثل الناقل الرئيس حيث يعمل على نقل المواد (المضادات الحيوية، السموم) فالجين *adeA* يشفر لتكوين البروتين المساعد في المسافة البينية وهو يتوسط التعابر بين المكونين AdeB و AdeC، وهو مماثل للبروتينات الغشائية (MFP) ويعمل على تقريب الغشائين الخارجي والداخلي ويثبت تركيب بروتينات الغشاء الخارجي (OMP)، أما الجين *adeC* فيشفر لبروتين يظهر كقناة في الغلاف الخارجي، ويتكون *adeB* من اثنتي عشرة قطعة غشائية (Transmembrane segment)

(TMS) تعمل على تكوين انحناءين طويلين بين TMS1 و TMS2 و TMS7 و TMS8 يتم نقل المواد المختلفة خلال عملية تدرج البروتونات الكيمو كهربائية Electrochemical gradient of protons من خلال الغشاء كما هو موضح في الشكل (1) (Paulsen, 2003; Eswaran *et al.*, 2004).

الشكل 1: موقع نظام الضخ adeABC في الخلية الجرثومية

Amg – aminoglycosides, Flu – fluoroquinolones, Tet – tetracyclines, Clo– chloramphenicol, Ery – erythromycin, Tri – trimethoprim, EthBr –ethidium bromide, Tge – tigecycline. (Wieczorek *et al.*, 2008).

وتشير التجارب التي أجراها من قبل Marchand *et al.*, (2004) إلى وجود جين *adeS* يمثل أصلاً لتعبير جينات *adeABC*، فضلاً عن ذلك إشارته إلى أن تعبير مضخات *adeABC* يقع تحت سيطرة مكونات النظام الثنائي المتكون من *adeS* و *adeR*، ويقع نظام الضخ *adeABC* ضمن تأثير مؤثرات بيئية تعمل على تنشيط نظام الضخ أو تثبيطه، كما ذكر أن الجينات التنظيمية *adeR* و *adeS* تعد المتحكم في تعبير نظام الضخ *adeABC* فتتوسط الجينات التنظيمية يسهم في زيادة تغيير نظام الضخ *adeABC* وبالتالي زيادة مقاومة الجرثومة للمضادات الحيوية في تنشيط جين *adeS* لتكوين مسار *sensor kinase* والذي يسهم في عملية التحسس واستلام الإشارة ويتحسس اية تغيرات قد تؤثر في الخلية الجرثومية من خلال منطقة التحسس ويرسل الإشارة بواسطة المنطقة النهائية الى الاستجابة التنظيمية فيعمل على زيادة عملية تعبير جينات *adeABC* بعد استلام الإشارة ويشفره جين *adeR* كما موضح في الشكل (2) وعملية الإرسال واستلام الإشارة المحفزة تكون خلال عملية الفسفرة وإن دور الجينات التنظيمية يكون أساسياً عن طريق حدوث طفرة في النيوكليوتيدات اذ يتحول الكوانين الى ادنين (G الى A) في الجين *adeR* وهذا التحول يعمل على تحويل الحامض الاميني الاسبارتك الى الحامض الاميني الاسباراجين في حين لا يحدث تغيير في الجين *adeS* (Wieczorek *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2018).

الشكل 2: موقع جينات نظام الضخ adeABC والجينات التنظيمية adeSR

(Magnet *et al.*, 2001)

هدفت الدراسة الحالية إلى:

- 1 - تحديد حساسية جرثومة *A. baumannii* إزاء مجموعة من المضادات الحيوية.
- 2- تحديد بعض جينات المقاومة للمضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل

استعملت ثماني عزلات لجرثومة *A.baumannii* المعزولة من مرضى الحروق الراقدين في المستشفى والمشخصة في دراسة سابقة بالطرائق التقليدية واشروطة (20) API المجهز من قبل شركة Bio meriux الفرنسية على النحو الآتي:

1 - اختبار الحساسية للمضادات الحيوية: استعملت طريقة Kirby و Bauer (1966) القياسية لاختبار حساسية لعزلات *A.baumannii* للمضادات الحيوية, Gentamicin, Doxycylin, Ciprofloxacin, Cefotaxime, Ceftriaxone, Ampicillin, Amikacin, Ticarcillin, Tetracycline, Trimethoprim-sulfamethoxazo, Tobramycin, Piperacillin, Netilmicin, Imipenem, (Pommerville, 2011).

تم قياس منطقة التثبيط بالمليمتر وعدت الجرثومة حساسة (S) Sensitive أو مقاومة (R) Resistant أو متوسطة الحساسية (I) Intermediate حسب المعدلات القياسية لقطر منطقة التثبيط المناظرة للمواصفات القياسية الواردة في الثوابت المختبرية العالمية (CLSI, 2012).

2- الكشف عن جينات المقاومة، وتتضمن:

أ: استخلاص الحامض النووي الجيني لجرثومة *A.baumannii* باستخدام عدة الاستخلاص التي جهزتها شركة OMEGA الأمريكية وقياس مدى تركيز ونقاوة الـ DNA باستخدام جهاز Nano drop الذي قدمته شركة Thermo 2000 spectrophotometer الأمريكية.

ب: تفاعلات PCR: اجري التفاعل باستخدام البادئات المجهزة من قبل شركة Certifirate of analysis الأمريكية وباستعمال عدة Premix وحسب تعليمات الشركة المصنعة Bioneer الكورية وبحجم نهائي 20µL من (الماء المقطر 1 µl DNA، template 15 µl, Premix 2 µl, Primer reverse 1 µl, Primer forward 1 µl, adeR تم زيادة حجم الدنا بمقدار ضعفين وبتكرير 100 نانوغرام وبعد إتمام جميع الإضافات مزجت مكونات التفاعل جيداً لمدة 8 ثوان في جهاز الطرد المركزي الدقيق Microcentrifuge، وأدخلت الأنابيب في جهاز المبلر الحراري Thermocycler بحذر وعناية لإنجاز التفاعل بإتباع البرنامج الخاص لكل بادئ كما مبين في (الجدول 1 و2).

الجدول 1: تسلسل البودائ المستخدمة في الدراسة

الجين	تتابع البادئ	الحجم	المصدر
<i>bla_{oxa51}</i>	F : 5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' R : 5'- TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	353bp	(Nowak et al., 2012)
<i>bla_{oxa23}</i>	F : 5'-GGAATTCCATGAATAAATATTTTACTTGC-3' R : 5'-CGGGATCCCGTTAAATAATATTCAGGTC-3'	589bp	(Mugnier et al.,2010)
<i>bla_{oxa58}</i>	F : 5'-CGATCAGAATGTTCAAGCGC-3' R : 5'-ACGATTCTCCCCTCTGCGC-3'	528bp	(Poirel et al., 2005; Ozen et al., 2009)
<i>adeB</i>	F : 5'-GTATGAATTGATGCTGC-3' R : 5'-CACTCGTAGCCAATACC-3'	979bp	(Huys et al., 2005)
<i>adeR</i>	F : 5'-ATGTTTGATCATTCTTTTCTTTTG-3' R : 5'-TTAATTAACATTTGAAATATG-3'	687bp	(Srinivasan et al., 2009)
<i>adeS</i>	F : 5'-TATGAAAAGTAAGTTAGGAAT-3' R : 5'-TTAGTTATTCATAGAAATTTT-3'	1072bp	(Coyne et al., 2010)

الجدول 2: البرامج المستخدمة لتفاعلات الـ PCR

المصدر	برنامج التفاعل	الجين
(Nowak et al., 2012)	94C ⁰ for 5min, 30 cycles of 94C ⁰ for 25s, 52C ⁰ for 30s 72C ⁰ for 50s, 72C ⁰ for 6min	<i>bla_{oxa51}</i>
(Mugnier et al., 2010)	95C ⁰ for 10min, 35 cycles of 95C ⁰ for 1min , 55C ⁰ for 1min, 68C ⁰ for 2min , 68C ⁰ for 5min	<i>bla_{oxa23}</i>
(Poirel et al., 2005 ; Ozen et al., 2009)	94C ⁰ for 10min, 35 cycles of 94C ⁰ for 1min , 55C ⁰ for 1min, 72C ⁰ for 3min , 72C ⁰ for 5min	<i>bla_{oxa58}</i>
(Huys et al., 2005)	94C ⁰ for 5min, 25 cycles of 94C ⁰ for 30s , 55C ⁰ for 1min, 72C ⁰ for 1min , 72C ⁰ for 7min	<i>AdeB</i>
(Srinivasan et al., 2009)	95C ⁰ for 5min, 30 cycles of 95C ⁰ for 30s , 46C ⁰ for 1min, 72C ⁰ for 1min , 72C ⁰ for 10min	<i>AdeR</i>
(Coyne et al., 2010)	95C ⁰ for 3min, 35 cycles of 95C ⁰ for 1min , 55C ⁰ for 30s, 72C ⁰ for 1min , 72C ⁰ for 10min	<i>AdeS</i>

الترجيل الكهربائي لـ DNA في هلام الاكاروز:

تم الترحيل على هلام الاكاروز بإتباع الخطوات الآتية (Mahon et al., 2011)

1- حضر هلام الاكاروز بتركيز 0.8% (15 TBE مل، الاكاروز 1.2 غم، ماء مقطر 135 مل) وذلك للكشف عن عينات الدنا الجيني، وحضر بتركيز 1% (15 TBE مل، الاكاروز 1.8 غم، ماء مقطر 135 مل) و2% (15 TBE مل، الاكاروز 3.6 غم، ماء مقطر 135 مل) وبتركيز 1.5% (15 TBE مل، الاكاروز 2.25 غم، ماء مقطر 135 مل) للكشف عن نتائج تفاعل PCR من، حيث تمت الإذابة بدرجة الغليان عن طريق وضعه في جهاز Microwave ثم ترك ليبرد إلى درجة حرارة 50 م°.

2- ركب قالب الهلام ثم وضع المشط.

3- سكب الاكاروز في القالب، وترك الهلام الى ان يتصلب ثم رفع المشط.

4- أضيف 5 مايكروليتر من دارئ التحميل الى 10 مايكروليتر من DNA ثم وضع في الحفر.

5- وضع القالب مع الهلام في الحوض المملوء بـ 1X من TBE وغطى المحلول سطح الهلام.

6- شغل مجهز القدرة Power Supply وضبط عند 60 فولت و90 امبير مدة 90-100 دقيقة.

7- صبغ هلام الاكاروز بصبغة بروميد الاثيديوم لمدة ثلاث ساعة.

8- فحص الهلام في جهاز الـ E-Graph. وعند وجود تركيز عال من بروميد الاثيديوم نقل الى حوض آخر يحوي ماءً مقطراً لإزالة الصبغة الزائدة.

9- قدرت الأوزان الجزيئية لـ DNA اعتماداً على الدليل الحجمي الخاص معروف الوزن الجزيئي DNA Ladder 100bp اذ أعطى هذا الدليل في هلام الاكاروز اثني عشرة حزمة أو إحدى عشرة حزمة ذات أحجام جزيئية معروفة وحسب الشركة المصنعة Biolab البريطانية وشركة Promega الأمريكية.

النتائج و المناقشة

أجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية لعزلات جرثومة *A. baumannii* الثمانية ضد أربعة عشر نوعاً من المضادات كما موضح في الصورة (1) وللكشف عن نمط مقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة سجلت النتائج من خلال قياس أقطار مناطق التثبيط حول الاقراص ومقارنتها مع ما ورد في الجداول (CLSI, 2012) اذ لوحظ ان عزلات جرثومة *A. baumannii* امتلكت مقاومة عالية جداً للعديد من المضادات الحيوية حيث كانت المقاومة بنسبة (100%) لمضادات Ampicillin، Piperacillin، Trimethoprim-Sulfamethoxazol، Gentamicin، Cefotaxime، Ciprofloxacin، Ceftriaxone

Ticarcillin ، كما موضح في (الجدول 3) فيما اختلفت مقاومة الجرثومة للمضاد الحيوي الـ Amikacin وبنسبة 37.5% ولـ Doxycyclin 87.5% ولـ Imipenem 75% و Tetracycline 75% ولـ Tobramicin 50% و Netilmicin 37.5% فيما كانت نسبة العزلات الحساسة لـ Amikacin 37.5% ولـ Doxycyclin و Imipenem 12.5% لكل منهما ولـ Tobramicin 50% و Netilmicin 62.5% والعزلات الجرثومية متوسطة الحساسية للمضاد Amikacin بنسبة 25% ولـ Imipenem و Tetracycline بنسبة 12.5% لكل منهما.

1 Netilmicin

4 Amikacin

7 Gentamicin

2 Cefotaxime

5 Ticarcillin

8 Pepracillin

3 Ceftriaxone

6 Ampicillin

9 Imipenem

الصورة 1: اختبار الحساسية لإحدى عزلات جرثومة *A.baumannii* للمضادات الحيوية

الجدول 3: العزلات الجرثومية التابعة للنوع *A.baumannii* المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية ونسبها المئوية

العزلات المقاومة (%)	العزلات متوسطة الحساسية (%)	العزلات الحساسة (%)	اسم المضاد الحيوي
(37.5) 3	(25) 2	(37.5) 3	Amikacin
(100) 8	—	—	Ampicillin
(100) 8	—	—	Ceftriaxone
(100) 8	—	—	Cefotaxime
(100) 8	—	—	Ciprofloxacin
(87.5) 7	—	(12.5) 1	Doxycyclin
(100) 8	—	—	Gentamicin
(75) 6	(12.5) 1	(12.5) 1	Imipenem
(100) 8	—	—	Piperacillin
(75) 6	(12.5) 1	(12.5) 1	Tetracycline
(100) 8	—	—	Ticarcillin
(100) 8	—	—	Trimethoprim-sulfamethoxazol
(50) 4	—	(50) 4	Tobramicin
(37.5) 3	—	(62.5) 5	Netilmicin

وبينت نتائج تفاعل الـ PCR للجين *bla_{oxa51}* تواجده في جميع عزلات جرثومة *A.baumannii* كما مبين في الصورة (2)، وأما بالنسبة للجين *bla_{oxa23}* فأظهرت النتائج تواجده في جميع العزلات الجرثومية ما عدا العزلة الجرثومية رقم أربعة إذ لم يظهر الجين على الرغم من المحاولات المتكررة كما موضح في الصورة (3)، وعدم تواجد الجين *bla_{oxa58}* في جميع العزلات الجرثومية على الرغم من المحاولات المتكررة لتفاعل الـ PCR كما موضح في الصورة (4):

الصورة 2 : نتائج تضاعف DNA لعزلات جرثومة *A.baumannii* باستخدام تقنية PCR لجين *bla_{oxa51}*

الصورة 3: نتائج تضاعف DNA لعزلات جرثومة *A.baumannii* باستخدام تقنية PCR لجين *bla_{oxa23}*

الصورة 4: نتائج تضاعف DNA لعزلات جرثومة *A.baumannii* باستخدام تقنية PCR لجين *bla_{oxa58}*

عند مقارنة نتائج اختبار تفاعل الـ PCR واختبار فحص الحساسية ظهرت العزلات الجرثومية التي امتلكت الجين *bla_{oxa23}* مقاومة للمضاد الحيوي Imipenem إذ بلغت نسبة المقاومة له (75%) ونسبة ظهور الجين (87.5%) كما موضح في الصورة (3) و(الجدول 4)، أما العزلة رقم 4 فقد كانت حساسة للمضاد Imipenem، وفيما يتعلق بالجين *bla_{oxa58}* فقد بينت النتائج عدم امتلاك أية عزلة من العزلات الثمانية لهذا الجين على الرغم من تطبيق أكثر من برنامج لتفاعل PCR لهذا الجين، إن ظهور جينات *bla_{oxa51}* و *bla_{oxa23}* في العزلات الجرثومية يعد أحد أسباب مقاومة الجرثومة لمضادات الكاربينيم وكذلك المضادات الحاوية على حلقة البيتا لكتام (Mahon et al., 2011).

الجدول 4: العلاقة بين الجينات *bla_{oxa51}* و *bla_{oxa32}* و *bla_{oxa58}* و *adeB* و *adeR* و *adeS* وبين حساسية عزلات جرثومة *A.baumannii* للمضادات الحيوية

العزلات المضاد والجين	1	2	3	4	5	6	7	8
Ticarcillin	R	R	R	R	R	R	R	R
Tobramycin	S	R	S	S	R	S	R	R
Tetracycline	S	R	I	R	R	R	R	R
Netilimicin	S	R	S	S	R	S	S	R
Piperacillin	R	R	R	R	R	R	R	R
Imipenem	R	R	R	S	R	R	R	I
Gentamicin	R	R	R	R	R	R	R	R
Doxycyclin	R	R	R	R	R	S	R	R
Ciprofloxacin	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefotaxime	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxone	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin	R	R	R	R	R	R	R	R
Amikacin	S	R	S	S	R	I	I	R
<i>AdeS</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>AdeR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>AdeB</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>bla_{Oxa58}</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{Oxa23}</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>bla_{Oxa51}</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

رموز الشكل: ظهور الجين (+) عدم ظهور الجين (-) مقاومة (R) حساسة (S) معتدلة الحساسية (I)

كما بينت نتائج الدراسة عدم ظهور الجين *adeB* في العزلات الجرثومية الأولى والخامسة وظهوره في باقي العزلات كما موضح في الصورة (5)، والصورة (6) بينت ظهور الجين *adeR* في جميع العزلات الجرثومية اما بالنسبة للجين *adeS* فقد لوحظ وجوده في العزلة الجرثومية الثامنة فقط وعدم ظهوره في باقي العزلات الجرثومية كما في الصورة (7).

الصورة 5: نتائج تضاعف DNA لعزلات جرثومة *A.baumannii* باستخدام تقنية PCR لجين *adeB*

الصورة 6: نتائج تضاعف DNA لعزلات جرثومة *A.baumannii* باستخدام تقنية PCR لجين *adeR*

الصورة 7: نتائج تضاعف DNA لعزلات جرثومة *A.baumannii* باستخدام تقنية PCR لجين *adeS*

لوحظ في (الجدول 4) أن تأثير نظام الضخ adeABC في مقاومة الجرثومة لمضادات البيبتاكتام محدود، وأن وجود جينات *bla_{oxa23}* و *bla_{oxa51}* تعد احد أسباب المقاومة في العزلات الجرثومية قيد الدراسة، إذ عَدَّ Sinha و Srinivasa (2007) أن نظام الضخ adeABC قليل الأهمية في مقاومة الجرثومة لمضادات الكاربابنيم، وبينت نتائج دراسة Huang et al. (2010) وجود الجين *bla_{oxa51}* في جميع عزلات جرثومة *A.baumannii* البالغة 50 عزلة جرثومية والمعزولة من الصين وذكر أن الجين *bla_{oxa23}* يتواجد في العزلات الجرثومية المقاومة لمضادات Carbapenems البالغة 22 عزلة جرثومية ولم تظهر الدراسة أية نسبة لوجود الجين *bla_{oxa58}* والجين *bla_{oxa24}* في جميع العزلات الجرثومية المتبقية على الرغم من امتلاك العزلات الجرثومية لجين *adeB* في العزلات الحساسة لـ Carbapenems.

كما بين (الجدول 4) أن العزلات (3,2) و (7,6) تمتلكان الجينات نفسها، بينما كشفت مقارنة فحص الحساسية للمضادات الحيوية أنها تختلف في المقاومة وقد يعزى سبب ذلك لامتلاك العزلات الجرثومية على جينات أخرى تمكنها من مقاومة المضادات الحيوية (Chuang et al., 2011; Asadollahi et al., 2012).

وبين (الجدول 4) احتواء جميع العزلات الجرثومية الثمانية على جين *adeR* ونسبة بلغت (100%)، وفيما يتعلق بالجين *adeS* كما موضح في الصورة (7) فقد أظهرت العزلة رقم (8) احتوائها على هذا الجين في حين لم يظهر هذا الجين في أي من العزلات الجرثومية الأخرى على الرغم من تطبيق أكثر من برنامج لتفاعل PCR، فضلا عن ظهور كل من الجينين *adeB* و *adeR* في العزلة نفسها، وعند دراسة حساسية هذه العزلة للمضادات الحيوية أظهرت هذه العزلة مقاومة عالية للمضادات الحيوية، وظهور الجين *adeB* بنسبة بلغت (75%) في العزلات الجرثومية (8,7,6,4,3,2) ولم يظهر في العزلات الجرثومية رقم (1, 5) وقد ذكر Nemec (2007) أن جينات *adeA* و *adeB* تظهر بنسبة (82%)، أما الجينات التنظيمية فظهرت بنسبة (40%) في عزلات جرثومة *A.baumannii*، وفي العزلة الجرثومية ذي الرقم واحد فقد تبين عدم احتوائها على جين *adeB* وعند ملاحظة نتائج فحص الحساسية لهذه العزلة الجرثومية تبين انها كانت حساسة لمضادات الكلاريكسيدات الأمنية وحساسة للمضاد الحيوي Tetracycline بالإضافة إلى عدم ظهور الجين التنظيمي *adeS* في هذه العزلة الجرثومية، وأظهرت العزلة ذي الرقم اثنين مقاومة عالية لجميع المضادات الحيوية المستخدمة على الرغم من عدم وجود الجين التنظيمي *adeS* في هذه العزلة، وربما يرجع السبب في ظهور جين *adeB* الى وجود آلية أخرى لمقاومة المضادات الحيوية في هذه العزلة، كما أشار et al., (2007) Peleg عند دراسته لمقاومة جرثومة *A.baumannii* للمضاد الحيوي Tigecycline الذي يعد من مضادات مجموعة التتراسايكلينات، وأن جميع العزلات الجرثومية المقاومة والحساسة لهذا المضاد الحيوي أظهرت احتوائها على الجين *adeB* على الرغم من عدم وجود طفرة في الجينات التنظيمية وزيادة التركيز المثبط الأدنى لهذا المضاد الحيوي، وتعبير جين *adeB* قد يشير إلى وجود آلية أخرى لضخ المضاد الحيوي خارج الجرثومة.

وتشير العديد من الدراسات إلى أن جينات *bla_{oxa23}* و *bla_{oxa58}* و *bla_{oxa51}* هي المسؤولة عن مقاومة مضادات الكاربابنيم، كدراسة (2012) Sevillano et al. التي أجراها في مدينة بوليفيا وأشار فيها إلى انتشار جين *bla_{oxa58}* بين جرثومة *A.baumannii* الذي يعد السبب في مقاومة الجرثومة لمضادات الكاربابنيم فضلا عن امتلاكه جميع عزلات هذه الجرثومة على الجين التشخيصي *bla_{oxa51}*، وأوضحت دراسة (2012) Lambiasi et al. التي أجراها في إيطاليا أن جميع عزلات هذه الجرثومة المشخصة بجين *bla_{oxa51}* تمتلك الجين *bla_{oxa58}* في حين أن عدداً قليلاً منها فقط يمتلك الجين *bla_{oxa23}*، وذكر (2007) Villegas et al. أن 65 عزلة لهذه الجرثومة من أصل 66 عزلة تمتلك الجين *bla_{oxa23}* و 66 عزلة لهذه الجرثومة كانت حاوية للجين *bla_{oxa51}*.

أما دراسة (Lopes et al., 2013) فقد كشفوا عن احتواء عدد كبير من عزلات جرثومة *A.baumannii* على الجين *bla_{oxa}58* والجين *bla_{oxa}51* اللذين يمنحها صفة المقاومة لمضادات الكاربابنيم، وفي إحدى الدراسات التي أجريت بين عامي 2003 و 2008 شملت دول مختلفة من العالم منها فرنسا وأستراليا والبرازيل ومصر وليبيا والبحرين والإمارات العربية المتحدة والجزائر وجنوب أفريقيا وفيتنام، تم فيها عزل جرثومة *A.baumannii* من المرضى في وحدة العناية المركزة في المستشفيات ومن حالات مرضية مختلفة أظهرت العزلات مقاومة عالية للمضادات Ticarcillin و Ceftazidime و Imipenem و Meropenem وتوصل الباحثون إلى أن امتلاك الجرثومة لجين الـ *bla_{oxa}23* على الكروموسوم الجرثومي أو على البلازميد هو الذي يمنح الجرثومة مقاومة لهذه المضادات (Mugnier et al., 2010).

في دراسة أخرى أجراها (Lee et al., 2010) في إحدى المستشفيات في كوريا تم عزل هذه الجرثومة وكانت مقاومة لجميع مضادات البيتا لكتام وسجل أحتوائها للجين *bla_{oxa}23* على الكروموسوم الجرثومي وليس على البلازميد، كما سجل وجود بعض السلالات المقاومة الفاقدة لهذا الجين وذكر ان سبب المقاومة يعود إلى امتلاكها لنوع آخر من الجينات التي تكسبها المقاومة لمضادات الكاربابنيم.

وذكر (Heritier et al., 2005) أن وجود جينات *bla_{oxa}23* و *bla_{oxa}58* و *bla_{oxa}40* على البلازميد الجرثومي لجرثومة *A.baumannii* تُسهِم في انتقال المقاومة بين الجراثيم بإحدى طرائق الانتقال الوراثي وتسهم في زيادة تشفير جينات *adeABC* التي تعمل على ضخ المضاد، كما وتُسهِم في اكتساب المقاومة لمضادات البيتا لكتام وتصنف جينات *adeABC* ضمن عائلة Resistance nodulation cell division (RND) التي تعد إحدى خمس عوائل لضخ المضادات الحيوية والسموم خارج الخلية الجرثومية، حيث ان اي تحويل في بروتينات الغشاء الخارجي يُسهِم في عملية الضخ اذ شخص نظام الضخ *adeABC* في جرثومة *A.baumannii* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية في عام 2001 حيث تقع جينات *adeABC* على الكروموسوم الجرثومي، كما تتواجد العديد من المضخات في الجراثيم السالبة لصبغة جرام وترتبط بالمقاومة للمضادات الحيوية وتعد إحدى عوامل الضراوة فيها ومن الممكن أن تتواجد في الجراثيم الموجبة لصبغة جرام (Magnet et al., 2001; Marchand et al., 2004).

وركزت دراسة (Nemec et al., 2007) في العلاقة بين حساسية المضاد الحيوي Netilmicin مع نظام ضخ المضاد الحيوي *adeABC*، إذ اتضح أن العزلات التي كانت حساسة لهذا المضاد الحيوي كانت سالبة لظهور واحد أو أكثر من الجينات، ووجد ان (0.9%) من العزلات الجرثومية كانت موجبة لجينات *adeA* و *adeB* و *adeC* و *adeR* وسالبة لظهور جين *adeS* وحساسية لمضاد الحيوي Netilmicin، أما أغلبية العزلات الجرثومية التي كانت مقاومة للمضاد الحيوي Netilmicin فقد كانت تحمل جينات *adeA* و *adeB* و *adeS* و *adeR* كما أشار إلى أن 91% من السلالات تحتوي في الأقل واحداً من الجينات الخمسة (*adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeS*, *adeR*).

المصادر العربية

السليم، سحر لقمان؛ شريف، أدبية يونس (2018). التحري عن انزيمات بيتا لكتاميز المعدنية (نوع IMP) في بعض أنواع الجراثيم السالبة لصبغة كرام بالطرق المظهرية والجزيئية. مجلة علوم الرافدين، 7(1)، 9-1.

محمود، هبة خالد؛ شريف، أدبية يونس (2018). استخدام تفاعل سلسلة البلمرة (PCR) في تشخيص جرثومة *Listeria monocytogenes* وتحديد مقاومتها لبعض المضادات الحيوية. مجلة علوم الرافدين، 27(1)، 17-30.

المصادر الأجنبية

- Adams, M.P.; Koch, R.W. (2010). "Pharmacology Connections to Nursing Practice". Pearson. U.S.A. pp. 787-843
- Asadollahi, P.; Akbari, M.; Soroush, S.; Taherikalani, M.; Asadollahi, K.; Sayehmiri, K.; Maleki, A.; Maleki, M.H.; Karimi, P.; Emaneini, M. (2012). Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burned patients. *Elsevier*, 1-6.
- Chuang, Y.C.; Sheng, W.H.; Li, S.Y.; Lin, Y.C.; Wang, J.T.; Chen, Y.C.; Chang, S.C. (2011). Influence of Genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* Bacteremia. *Clin. Infect Diseases* .**52**(3), 352-360.
- Coyne, S.; Guigon, G.; Courvalin, P.; Perichon, B. (2010). Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* .**54**(1), 333-340.
- Eswaran, J.; Koronakis, E.; Higgins, M.K.; Hughes, C.; Koronakis, V. (2004). Three`s company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**(6),741-747.
- Heritier, C.; Poirol, L.; Lambert, T.; Nordmann, P. (2005). Contribution of acquired Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* .**49**(8), 3198-3202.
- Huang, J.; Huang, J.; Yu, F.; Wang, X.; Li, G. (2010). AdeABC efflux pump: less important role in *Acinetobacter baumannii* against carbapenems. *African J. Microbiol Res.* **4**(20), 2148-2152.
- Huys, G.; Cnockaert, M.; Nemec, A.; Swings, J. (2005). Sequence-based typing of *adeB* as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbio.* **43**(10), 5327-5331.
- Lambiase, A.; Piazza, O.; Rossano, F.; Pezzo, M.D.; Tufano, R.; Catania, M.R. (2012). Persistence of carbapenem – resistant *Acinetobacter baumannii* strains in an Italian intensive care unit during a forty-six month study period. *New Microbiology* .**35**, 199-206.
- Lee, K.; Lee, M.A.; Lee, C.H.; Lee, J.; Roh, K.H.; Kim, S.; Kim, J.J.; Koh, E.; Youg, D.; Chong, Y.; The KONSAR group. (2010). Increase of Ceftrazidime and Fluoroquinolone – resistant *Klebsilla pneumoniae* and Imipenem –resistant *Acinetobacter* spp. in Korea: analysis of KONSAR study Data from 2005 and 2007. *Yonsei Med J.* **51**(6), 901- 911.
- Lopes, B.S.; Gallego, L.; Amyes, S.G.B. (2013). Multi-drug resistance profiles and the genetic features of *Acinetobacter baumannii* isolates from Bolivia. *J. Infect. Dev. Ctries.* **7**(4), 323-328.
- Maragakis, L.L.; Perl, T.M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Antimicrobial Resistance* .**46**, 1254-1263.
- Magnet, S.; Courvalin, P.; Lambert, T. (2001). Resistance-Nodulation-Cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454. *Antimicrobial agent and Chemotherapy* .**45**(12), 3375–3380.
- Mahon, C.R.; Lehmen, D.C.; Manuseis, G. (2011). "Diagnostic Microbiology". 4th ed. Saunders Elsevier. USA . pp.1-931.
- Marchand, I.; Damier-Piolle, L.; Courvalin, P.; Lambert, T. (2004). Expression of the RND-Type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* .**48**(9), 3298–3304.
- Mims, C.; Dockrell, H.M.; Goering, R.V.; Roitt, I.; Wakelin, D.; Zuckerman, M. (2004). "Medical Microbiology". 3rd ed. Elsevier mosby. United Kingdom.
- Mugnier, P.D.; Poirol, L.; Naas, T.; Nordmann, P. (2010). Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infect Diseases* .**16**(1), 35-40.

- Nemec, A.; Maixnerova, M.; Reijden, T.J.K.V.D.; Broek, P.J.V.D.; Dijkshoorn, L. (2007). Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Antimicrob Chemother.* **26**(60), 483-489.
- Nowak, P.; Paluchowska, P.; Budak, A. (2012). Distribution of *bla_{OXA}* genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol.* **35**, 317-325.
- Ozen, N.; Ergani, A.; Naas, T.; Ogunç, D.; Gultekin, M.; Colak, D.; Nordmann, P. (2009). Outbreak of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Turkey. *The Open Antimicrobial Agents J.*, **1**, 1-8.
- Paulsen, I.T. (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**(5), 446-451.
- Peleg, A.Y.; Adams, J.; Paterson, D.L. (2007). Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **51**(6), 2065-2069.
- Poirel, L.; Marque, S.; Heritier, C.; Segonds, C.; Chabanon, G.; Nordmann, P. (2005). OXA-58, a Novel Class D-B-Lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **49**(1), 202-208.
- Pommerville, J.C. (2011). "Alcama's Fundamentals of Microbiology". 9th ed. Jones and Bartlett publishers. USA.
- Sevillano, E.; Fernandez, E.; Bustamante, Z.; Zabalaga, S.; Rosales, I.; Umaran, A.; Gallego, I. (2012). Emergence and clonal dissemination of carbapenem-hydrolysing OXA-58 producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bolivia. *J. Med. Microbio.* **61**, 80-84.
- Sinha, M.; Srinivasa, H. (2007). Mechanisms of resistance to carbapenems in meropenem resistant *Acinetobacter* isolates from clinical samples. *Official Publication of Indian Association of Medical Microbiologists.* **25**(2), 121-125.
- Srinivasan, V.B.; Rajamohan, G.; Pancholi, P.; Stevenson, K.; Tadesse, D.; Patchanee, P.; Marcon, M.; Gebreyes, W.A. (2009). Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Bio. Med. Central.* **8**(21), 1-10.
- Sun, J.R.; Perng, C.L.; Chan, M.C.; Morita, Y.; Lin, J.C.; Su, C.M.; Wang, W.Y.; Chang, T.Y.; Chiueh, T.S. (2012). A Truncated AdeS kinase protein generated by ISAbal insertion correlates with tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLOS one Biology.* **7**(11), 1-14.
- Villegas, M.V.; Kattan, J.N.; Correa, A.; Lolans, K.; Guzman, A.M.; Woodford, N.; Livermore, D.; Quinn, J.P. (2007). The Colombian nosocomial bacterial resistance Study Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, **51**(6), 2001-2004.
- Wieczorek, P.; Sacha, P.; Hauschild, T.; Zorawski, M.; Krawczyk, M.; Trynieszewska, E. (2008). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* – the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia. Histochem. Cytobiol.* **46**(3), 257-267.
- Zhang, Y.; Li, Z.; He, X.; Ding, F.; Wu, W.; Luo, Y.; Fan, B.; Cao, H. (2018). Overproduction of efflux pumps caused reduced susceptibility to carbapenem under consecutive imipenem-selected stress in *Acinetobacter baumannii*. *J. Infection and Drug Resistance.* **29**(11), 457-467.