Rafidain Journal of Science
Vol. 30, No. 3, pp.16-26, 2021

DOI: 10.33899/rjs.2021.168911

https://rsci.mosuljournals.com

التحري عن انزيمات AmpC في بعض انواع الجراثيم السالبة لصبغة كرام بالطريقة المظهرية والجزيئية

ISSN: 1608-9391
e-ISSN: 2664-2786

Received:15/2/2021
Accepted:14/6/2021

سحر لقمان السليم **اديبة يونس شريف**

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

Sahar.alsaleem@uomosul.edu.iq Shareefadeeba@yahoo.com

الملخص

تم في هذه الدراسة التحري عن قدرة بعض الأنواع الجرثومية السالبة لصبغة كرام والمعزولة من حالات مرضية مختلفة على انتاج انزيمات AmpC بالطرائق المظهرية والجزيئية، حيث بلغت نسبة تواجدها (40.6%) باستخدام قرص المضاد Cefoxtin، حيث أن هذا المضاد يستخدم للتحري عن العزلات التي بإمكانها انتاج انزيمات AmpC، وكان لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* اعلى نسبة حيث بلغت (15.5 %) تلتها جرثومة *Klebsiella pneumoniae* (12.5 %) اما بطريقة المستخلص الثلاثية الابعاد فقد بلغت نسبة تواجدها (13.2 %) والتي تعتمد على استخدام المستخلصات الانزيمية الخام بدلا من الخلايا الجرثومية الحية. اعلى نسبة كان لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* (12.5 %) تلتها جرثومة *Klebsiella pneumoniae* (9.3 %)، فيما بلغت نسبة تواجد الانزيم بطريقة Disk antagonism test (37.5 %) والتي تعد من افضل الطرائق في التحري عن هذه الانزيمات وكان اعلى نسبة فيها لجرثومة *Klebsiella pneumonia* (15.6 %)، اما بالطرق الجزيئية فقد تم استخدام تقنية الـ PCR للكشف عن الجين المشفر لهذا الانزيم، حيث بلغت نسبة عزل الجين bla_{AmpC} (33.3%) وكانت اعلى نسبة لجرثومتي *Klebsiella pneumonia*، *Pseudomonas aeruginosa* بلغت (13.3%).

الكلمات الدالة: انزيمات AmpC، مقاومة الجراثيم السالبة لصبغة كرام، Cefoxtin.

المقدمة

ظهرت المقاومة للجراثيم الحياتية بين بعض اجناس الجراثيم السالبة لصبغة كرام وانتشرت في جميع انحاء العالم وتكون كل من جرثومة *E.coli* و*Klebsiella pneumoniae* و*Pseudomonas aeruginosa* من اكثر انواع الجراثيم المعوية التي غالبا ما تكون مقاومة للمضادات الحيوية (Gurung *et al*., 2020)، حيث تتم هذه المقاومة من خلال انتاج انزيمات بيتا لاكتاميز مثل انزيمات بيتا لاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum Betalactamase (ESBL) وانزيمات AmpC والتي تشكل تهديا خطيرا في معالجة الالتهابات التي تسببها هذه الانواع من الجراثيم (Perez *et al*., 2016).

ولهذه الانزيمات المائية Hydrolytic enzyme القابلية على ابطال فعالية مضادات بيتا لا كتام قبل ان تتمكن هذه المضادات من الوصول الى البروتينات الرابطة للبنسلين Penicilin binding proteins والتي تتواجد على الغشاء السايتوبلازمي والتي تشارك في المراحل النهائية من تركيب الببتيدوكلايكان والذي يعتبر العنصر الرئيس في تركيب جدار الخلايا الجرثومية(Subhas *et al*., 2020).

إن أنزيمات AmpC β-lactamase لها أهمية كبيرة تُشَفَّر لها من قبل جينات كروموسومات العديد من أنواع الجراثيم المعوية وأنواع أخرى من الجراثيم، وأن هذه الانواع الجرثومية تكون مقاومة للـ Cephalothin، Cefazolin والـ Cefoxitin ومعظم أنواع البنسلينات ومثبطات البيتالاكتاميز، وتكون انزيمات AmpC في العديد من الأنواع الجرثومية مستحثة ويعبر عنها بمستويات عالية من خلال الطفرة، وهذا التعبير العالي لهذا الانزيمات يمنح الجراثيم مقاومة لمدى واسع من السيفالوسبورينات (Singhal *et al*., 2005; Black *et al*., 2005).

حَظيت أنزيمات AmpC باهتمام كبير في نهاية السبعينيات باعتبارها عوامل مقاومة للمضادات الحيوية في العصيات السالبة لصبغة كرام، وتعتبر هذه الأنزيمات من أنزيمات السيفالوسبورينات القادرة على تحليل حلقة البيتالاكتام إلى حد ما (Bush *et al*., 1995; Nancy, 2003).

تكون جينات العديد من هذه الأنزيمات محمولة على البلازميدات، وجدت في أنواع جرثومية والتي تكون فاقدة لجينات أنزيمات AmpC المحمولة على الكروموسومات بشكل طبيعي كما في جرثومة *Klebsiella pneumoniae* ، *Proteus mirabils* و*Salmonella* spp ويعتقد بأن مثل هذه الأنزيمات تنشأ من خلال انتقال جيناتها الكروموسومية إلى البلازميدات (Dunn *et al*., 2000; Philippon *et al*., 2002).

أنزيم AmpC هو أحد أنزيمات السيفالوسبورينات والتي تثبط بشكل ضعيف بحامض الكلافيولين Clavulinic acid والتي يمكن تمييزها عن أنزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBL من خلال قابليتها على تحليل السيفالوسبورينات بالإضافة إلى سيفالوسبورينات أخرى واسعة الطيف، المضاد الوحيد الفعال ضد العزلات المنتجة لأنزيمات AmpC وESBL هو الـ Carbapenem، ومع ذلك فلقد انتشرت مقاومة لهذا النوع من المضادات والذي غالباً ما يعزى إلى إنتاج أو تكوين أنزيمات Metallo-β-lactamase التي تعد محللة لكل أنواع مضادات البيتالاكتام ومن ضمنها السيفالورسبورينات الواسعة الطيف والـ Carbapenems (Hancock, 1998; Livermore and Woodford, 2002; Nordman and Poirel, 2002).

يستخدم مضاد الـ Cefoxitin لغرض التحري عن الأنواع الجرثومية المنتجة لهذه الانزيمات ويعتبر الـ Cefoxitin من المضادات الشبه مصنعة والتي تمتاز بثباتيتها العالية لأنواع عديدة من انزيمات بيتالاكتاميز (Patel *et al*., 2010). إنَّ المقاومة الجرثومية لمضاد Cefoxitin قد يرجع إلى آليات مقاومة أخرى غير أنزيمات AmpC مثل فقدان نفاذية البورينات في الجراثيم السالبة لصبغة گرام والتي تعتبر إحدى ميكانيكيات المقاومة حيث وجد Hernandez *et al*., (1999).

المواد وطرائق العمل

العينات:

استخدم في الدراسة عدد من الانواع الجرثومية السالبة لصبغة كرام والتي شملت *Ps.aeruginosa*، *E.coli*، *K.pneumoniae*، *Acinetobacter bumannii* والتي تم عزلها من دراسة سابقة من حالات مرضية مختلفة شملت التهابات الاذن الوسطى، الانف، الحنجرة، العيون، الحروق، القصبات الهوائية، الادرار، الدم، الجروح والمهبل، والتي تم تشخيصها بالطرق الكيموحيوية وبالاعتماد على (Koneman *et al*., 1997; MacFaddin, 2000)، وتم تأكيد تشخيصها باستخدام اشرطة API.

التحري عن انزيمات الـ AmpC بالطرق المظهرية

Detection of AmpC β-lactamase by Morphological Methods

استخدمت في هذه الدراسة عدة طرائق لغرض التحري عن هذه الانزيمات:

اختبار التحري الأولي عن أنزيمات الـ AmpC Initial Screening Test for AmpC Enzymes

أجري هذا الاختبار وذلك بتلقيح وسط اكار مولر هنتون، بمعلق جرثومي فتي مكافئ في عكارته للانبوب رقم (0.5) من أنابيب ماكفرلاند القياسية ووضع قرص مضاد الـ Cefoxitin في وسط الزرع الجرثومي وحضنت الاطباق لمدة (18-24) ساعة بدرجة حرارة (35) م°، بعدها تم قياس قطر منطقة التثبيط حول القرص ومقارنتها مع قياسات الـCLSI الخاصة بهذا الاختبار، وعدت العزلات التي تعطي منطقة تثبيط بقطر (14) ملم أو أقل مقاومة وبالتالي موجبة لاختبار التحري الأولي عن أنزيمات الـ AmpC (CLSI, 2010).

الاختبار التأكيدي بطريقة المستخلص ثلاثية الابعاد المحورة

Confirmatory test by Modified three-Dimensional Extract Method.

لقح وسط اكار مولر–هنتون بعزلة جرثومية فتية حساسة لمضاد الـ Cefoxitin ثم تم وضع أربعة اقراص من مضاد Cefoxitin (30mg) على سطح الطبق، وباستخدام شفرة معقمة تم عمل أربعة شقوق وبطول 3 سم لكل شق وبمسافة (3) ملم من كل قرص، كما تم عمل حفر صغيرة في نهاية كل شق باتجاه مركز الطبق باستخدام Pasture Pipette على سطح الاكار، هذه الحفر تسهل من ملء الشقوق بالمستخلصات الانزيمية وبواقع (10) مايكروليتر لكل شق، ثم ترك الطبق لمدة (5-10) دقائق بشكل صحيح إلى أن جفت المستخلصات المضافة ثم حضنت بدرجة حرارة (35) م° ولمدة (18-24) ساعة. وعند ظهور تشوه في منطقة تقاطع الشق مع منطقة التثبيط نتيجة موجبة للاختبار ودليلا على وجود انزيمات الـ AmpC (Manchanda and Singh, 2003).

التحري بطريقة Disk Antagonism test

العزلات التي اظهرت مقاومة لـ Cefoxitin وحسب توصيات الـ NCCLS اجري لها هذا الاختبار إذ لقح وسط اكار مولر–هنتون بالمعلقات الجرثومية الفتية وضع قرص الـ Cefoxitin في وسط الطبق ووضع قرصين مضادين الـ Cefotaxim والـ Ceftazidime على بعد (15) ملم من مركز القرص الوسطي. حضنت الاطباق بدرجة حرارة (35) م° لمدة (18-24) ساعة، أن حدوث التضاد بين قرص الـ Cefoxitin ومضادي السيفالوسبورينات، عد دليلاً على وجود انزيمات الـ AmpC (Sanders *et al*., 1982; Parveen *et al*., 2010).

تحضير مستخلصات أنزيمات AmpC الخام Preparation of Crude AmpC Enzyme Extracts

تم نقل مزارع فتية من الجراثيم النامية على وسط اكار مولر–هنتون إلى انابيب طرد مركزي معقمة، علق النمو في وسط ماء الببتون ومن ثم رسبت الخلايا باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (3000rpm) ولمدة (15) دقيقة، ومن ثم غسل

الراسب بمحلول دارئ ملح الفوسفات الفسلجي ثلاث مرات، وعلق الراسب في محلول (0.2) مولار من Sodium acetate، عرض لسبع دورات من التجميد والتذويب باستخدام حمام مائي بدرجة حراة (37) م° وباستخدام الطرد المركزي المبرد لمدة (30) دقيقة. يتم الحصول على الراشح الحاوي على المستخلصات الانزيمية. ولغرض التأكد من نقاوة المستخلصات الانزيمية وعدم وجود خلايا حية، تم زرع المستخلصات على وسط اگار الماكونكي، حفظت المستخلصات بدرجة حراة (20-) م° لحين استخدامها (الحسو، 2006).

الكشف الجزيئي عن جينات انزيمات بيتالاكتاميز المعدنية

1. استخلاص الـ DNA من العزلات الجرثومية:

تم استخدام العدة المجهَّزة من قبل شركة Omega الامريكية لغرض استخلاص الحامض النووي DNA من العزلات الجرثومية قيد الدراسة، حيث تم تلقيح وسط Trypton soy broth بالمستعمرات الجرثومية الفتية ومن ثم حضنت بدرجة حرارة (35) م° لمدة (18-24) ساعة، بعدها تم اتباع خطوات الاستخلاص وحسب تعليمات الشركة المجهزة، وبعد اجراء عملية الاستخلاص حفظت مستخلصات الحامض النووي بالتجميد عند درجة (20-) م°.

2. تقدير تركيز ونقاوة DNA

تم تقدير التركيز والنقاوة للحامض النووي DNA المستخلص من العينات التي شملتها الدراسة باستخدام جهاز الـ Biodrop Spectrophotometer انكليزي المنشأ.

3. الكشف عن انزيمات الـ AmpC بطريقة الـ PCR.

تم الكشف عن انزيمات الـ AmpC بالاعتماد على طريقة (Senda *et al*., 1996) للكشف عن الجين bla_{AmpC}، تم تجهز بوادئ تسلسلات الـ DNA لانزيمات الـ AmpC من شركة The midland certified reagent company INC. (Texas)

$^{5-}$ GTGACCAGATACTGGCCACA $^{-3}$
$^{5-}$ TTACTGTAGCGCCTCGAGGA $^{-3}$

4. التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA باستخدام تقنية الـ PCR

أُجري الاختبار باعتماد جهاز التضخيم الحراري (Mastercycler Personal, Eppendorf) الالماني المنشأ وبالخطوات الآتية:

1- تم تعقيم مكان العمل والاجهزة قبل البدء بالعمل باستخدام الفورمالين ثم ارتداء الكفوف والكمامات المعقمة لتجنب حصول التلوث.

2- رقمت انابيب ابندروف حجم (0.2) سم^3 المعقمة بعدد العينات المختبرة.

3- حضر خليط من محتويات التفاعل لسهولة انجاز العمل حيث تم تحضير الخليط بمعدل 25 مايكروليتر من الحجم التفاعلي لكل انبوب والذي يتكون من:

المكونات	الحجم
Gotag^R Green Master Mix	12.5µl
F-R primer, 10mm	3 µl
DNA template	4 µl
Nuclease free water	5.5 µl

4- مُزجت محتويات انابيب ابندروف بجهاز Vortex Mixer.

5- وضعت انابيب ابندروف الحاوية على المواد اعلاه في جهاز Thermal Cycler وتمت برمجة الجهاز حسب البرنامج الخاص بالباديء:

المسخ الاولي initial denaturation عند درجة حرارة (95) م° لمدة دقيقتين تبعتها (35) دورة من المسخ denaturation عند درجة (95) م° لمدة 30 ثانية، تم الارتباط annealing عند درجة (60) م° لمدة 45 ثانية، والاستطالة extension عند درجة (72) م° لمدة دقيقة واحدة وأخيرا الاستطالة النهائية عرض لدرجة (72)° م لمدة سبعة دقائق لغرض اكمال عملية التضخيم (Senda *et al*., 1996).

طريقة الترحيل الكهربائي للـDNA في هلام الاكاروز:

تم الكشف عن عينات الـ DNA، وناتج تفاعلات PCR بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis باتباع الخطوات التالية:

1- حُضِّرَ الأكاروز بتركيز 1% بإذابة 2غم من الأكاروز في 200 سم^3 من محلول TAE 1X buffer، وذلك للكشف عن الـ DNA الذي تم استخلاصه وتمت الإذابة في درجة الغليان، وتُرِكَ المحلول ليبرد إلى درجة حرارة 55°م.

2- تم تركيب قالب الهلام Gel tray ثم وُضِعَ المشط Comb لِصُنعِ الحفر wells التي تستخدم لتحميل عينات الـ DNA.

3- سُكِبَ الأكاروز في القالب مع ملاحظة تجنب تكون فقاعاتٍ هوائيةٍ، وتُرِكَ الهلام إلى أن تصلب ثم رفع المشط.

4- أُضيف 5 مايكرو ليتر من صبغة التحميل إلى 10 مايكرو ليتر من نواتج تضخيم الجينات قيد الدراسة ثم وضعت في الحفر.

5- وُضِعَ القالب مع الهلام في الحوض المملوء بـ 1X من TAE حيث غطى هذا المحلول سطح الهلام.

6- تم تشغيل مجهز القدرة Power Supply وضُبِطَ عند 80 فولت مدة 90 دقيقة.

7- صُبِغَ هلام الأكاروز بصبغة بروميد الاثيديوم عن طريق غمرها بالماء المقطر الحاوي على هذه الصبغة لمدة ساعة.

8- فحص الهلام في غرفة مظلمة، وذلك بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه على جهاز U.V، وصُوِّرَ الهلام باستخدام كاميرا رقمية.

9- قُدِّرَ الحجم الجزيئي لقطع DNA بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل الحجمي القياسي DNA-Ladder (Sambrook and Russel, 2001).

النتائج والمناقشة

ان زيادة اعداد الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية تعتبر احدى أكبر المشاكل الصحية في الدول المتقدمة والذي يؤدي بدوره الى زيادة الرقود في المستشفيات وزيادة تكاليف المعالجة اضافة الى زيادة اعداد الامراضية والوفيات حيث يعتبر انتاج انزيمات بيتا لاكتاميز الميكانيكية الرئيسية لمقاومة مضادات بيتا لاكتام (Pokharel and Adhikari, 2020; Pokharel *et al*., 2019).

نتائج التحري عن أنزيمات AmpC

تعتبر أنزيمات AmpC أحد أنزيمات بيتالاكتاميز التي تحلل بشكل مميز الـ Cephalosporins الضيقة والواسعة المدى والتي تقاوم التثبيط بالـ Clavulinic acid، Sulbactam والـTazobactam، و إنَّ العديد من العصيات السالبة لصبغة كرام تنتج أنزيمات AmpC المحمولة جيناتها على الكروموسومات وعند انتاجها بشكل كبير قد تسبب مقاومة للـ Aztreonam والـ Cephamycin. (Thompson, 2010)

يستخدم اختبار المقاومة لمضاد الـ Cefoxitin للتحري عن العزلات التي بإمكانها انتاج أنزيمات AmpC، ويوضح (الجدول 1) النسبة المئوية لعزلات الجراثيم السالبة لصبغة كرام والمنتجة لأنزيمات AmpC باستخدام اختبار التحري الاولي عن هذه الانزيمات، حيث كانت (13) عزلة من مجموع (32) مقاومة لمضاد الـ Cefoxitin أي بنسبة (40.6%) وكان لعزلات جرثومتي *K. pneumoniae, Ps.aeruginosa* اكبر نسبة بين الأنواع الجرثومية الأخرى إذ بلغت (15.5 و12.5) على التوالي

من المجموع الكلي للعزلات المقاومة لمضاد الـ Cefoxitin، فيما كانت نسبة جرثومة *E.coli* المقاومة له بنسبة (6.2%). وذلك لحدوث تداخل في نتيجة فعالية كلا الانزيمين بنفس الوقت لوجودهما معاً بنفس العزلة البكتيرية.

الجدول 1: النسب المئوية للعزلات الجرثومية الموجبة لاختبار التحري الاولي عن أنزيمات الـ AmpC.

النوع الجرثومي	عدد العزلات المختبرة	النسبة المئوية من المجموع الكلي
E. coli	10	2 (6.2)
K. pneumonia	9	4 (12.5)
Ps.aeruginosa	9	5 (15.5)
A.bumannii	4	2 (6.2)
Total	32	13 (40.6)

إنَّ ظهور النسبة القليلة من العزلات الموجبة لأنزيمات AmpC قد يعود سببه إلى احتمال تواجد أنزيمات ESBL والمترافقة مع أنزيمات AmpC في نفس العزلة ويعبر عنها بشكل متساوٍ مما يؤدي إلى حجب أحدهما للآخر عند التحري عن أنزيمات AmpC، وغالبا ما تتصف الجراثيم المنتجة لانزيمات ESBL بانها ذات تعبير مشترك Co-expression مع انزيمات AmpC والتي تشكل تهديدا خطيرا لتشخيص ومعالجة الجراثيم الممرضة المنتجة لهذه الانزيمات (Ogefere *et al*., 2016)، ولقد اكدت الكثير من الدراسات بان استخدام قرص مضاد السيفوكستين يعتبر اختيار ضعيف للكشف عن الجراثيم المنتجة لانزيمات AmpC، وهذا قد يعود سببه لوجود ميكانيكيات بديلة للمقاومة غير انزيمات AmpC مثل الطفرات التي تحدث لقنوات البورين Porin channel والتي قد تؤدي الى اعطاء نتائج موجبة كاذبة وبالتالي تحسب كمقاومة للسيفوكستين (Subhas *et al*., 2020)، كما أنّه في كل العزلات التي كانت موجبة لـ AmpC لايمكن التمييز بين الأنزيمات التي كانت جيناتها محمولة على الكروموسوم أو على البلازميدات والتي تحتاج إلى طرائق جزيئية تأكيدية (Patel *et al*.,2010).

كما تم استخدام طريقة المستخلص الثلاثية الأبعاد للتحري عن أنزيمات AmpC وكان أول من وصف هذه الطريقة هو Thomson وجماعته (1984) والتي تعتمد على استخدام المستخلصات الانزيمية الخام بدلاً من الخلايا الجرثومية الحية والتي يتبين فيها بأن المقاومة لمضاد الـ Cefoxitin يعود سببه إلى انتاج هذه الأنزيمات دون غيرها من آليات المقاومة.

إنَّ استخدام هذه الطريقة في التحري عن أنزيمات AmpC له بعض المحددات منها صعوبة استخلاص هذه الأنزيمات اضافة إلى احتمالية تلوثها في أثناء العمل واخذ الحذر عند سكب المستخلصات داخل الشقوق وتجنب السكب الزائد للمستخلص فيها، حيث ان ملء الشقوق بشكل متجانس دون طفح المستخلص على سطح الاگار يعد من احد مشاكل هذه الطريقة، ولغرض تجاوز هذه المشكلة أجرى الباحث Manchanda وجماعته (2003) تحوير على هذه الطريقة من خلال عمل حفر دائرية صغيرة في بداية الشقوق باستخدام ماصة باستور معقمة، ولهذه الحفر اهمية حيث تعمل على احتواء الكمية الزائدة من المستخلصات التي تسكب في الشقوق بعيداً عن المنطقة التي يحصل فيها تشويه distortion لمنطقة التثبيط، كما انها تسهل من عملية ملء الشقوق بالمستخلصات الانزيمية.

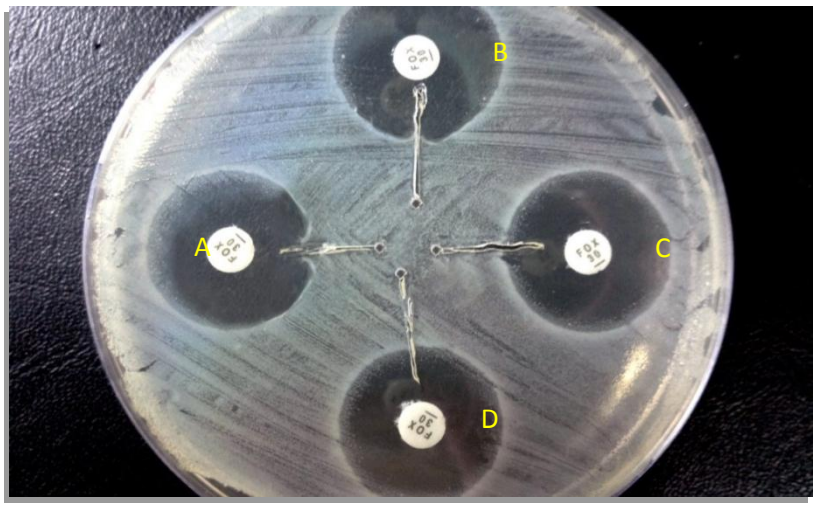
يوضح (الجدول 2) نتائج هذا الاختبار باستخدام طريقة المستخلص الثلاثية الابعاد حيث اعطت (10) عزلات من مجموع (32) عزلة نتيجة موجبة أي بنسبة (31.2%) في التحري عن هذه الانزيمات، بلغت فيها اعلى نسبة لجرثومة *Ps.aeruginosa* (12.5%) تلتها جرثومة *K.pneumoniae* (9.3%).

الجدول 2: النسب المئوية للعزلات الجرثومية الموجبة لاختبار المستخلص ثلاثية الابعاد المحورة

النوع الجرثومي	عدد العزلات المختبرة	النسبة المئوية من المجموع الكلي
E. coli	10	(6.2) 2
K. pneumonia	9	(9.3) 3
Ps.aeruginosa	9	(12.5) 4
A.bumannii	4	(3.1) 1
Total	32	(31.2) 10

بينت النتائج قلة نسب الانتاج للانزيم من قبل العزلات باستخدام هذه الطريقة وقد يعزى السبب إلى أنَّ معظم العزلات تمتلك الجين bla_{AmpC} ولكنها من الممكن أنْ لا يتم التعبير عنها في كل العزلات وهذا يعني انها قد تمتلك ما يسمى بالجين الصامت Silent gene، أو أنَّ تعبير هذا الجين يكون بمستوى منخفض بحيث لايمكن الكشف عنه بالطرائق الاعتيادية، كما أنَّ اختلاف العزلات من منطقة إلى أخرى قد ينتج عنه اختلاف في امتلاكها لهذا الجين (Manchanda and Singh., 2003).

توضح الصورة (1) النتيجة الموجبة لهذا الاختبار والتي يظهر فيها حدوث تشوه في منطقة التثبيط نتيجة لفعل المستخلصات الانزيمية الحاوية على أنزيمات AmpC والتي تعمل على تحليل مضاد الـ Cefoxitin المنتشر في الوسط وظهور النمو في المنطقة التي يتقاطع فيها الشق مع منطقة التثبيط. وقد اظهرت العديد من الدراسات الوبائية بان العزلات الجرثومية المنتجة لأنزيمات AmpC تم الحصول عليها من المرضى الراقدين في المستشفيات (Manchanda *et al*., 2006).



الصورة 1: نتيجة اختبار التحري عن أنزيمات الـ AmpC لجرثومة *K.penumoniae* بطريقة المستخلصات ثلاثية الابعاد المحورة باستخدام وسط مولر – هنتون

(A- B) نتيجة موجبة تشوه في منطقة التثبيط

(C- D) نتيجة سالبة

يوضح (الجدول 3) النسب المئوية للعزلات الموجبة لاختبار Disk Antagonism test حيث اظهرت (12) عزلة من مجموع (32) نتيجة موجبة لهذا الاختبار كانت اعلى نسبة فيها لجرثومة *K.pneumoniae* (15.6%) تلتها جرثومة *Ps.aeruginosa* (12.5%)، وتوضح الصورة (2) قدرة مضاد الـ Cefoxitin على احداث حالة تضاد مع مضادات بيتالاكتام الاخرى مثل Cefotaxime و الـ Ceftazidime ومن المقترح ان تكون الآلية المسؤولة عن حالات التضاد تتضمن حث أنزيمات

بيتالاكتاميز بوساطة مضاد الـ Cefoxitin وحدوث منافسة على مواقع الارتباط في الخلية الجرثومية (Sanders *et al*., 1982).

الجدول 3: النسبة المئوية للعزلات الجرثومية الموجبة لاختبار Disk antagonism test

النوع الجرثومي	عدد العزلات المختبرة	النسبة المئوية من المجموع الكلي
E. coli	10	2 (6.2)
K.pneumoniae	9	5(15.6)
Ps.aeruginosa	9	4 (12.5)
A.bumannii	4	1 (3.1)
Total	32	12 (37.5)

الصورة 2: نتيجة اختبار التحري عن أنزيمات الـ AmpC لجرثومة *K.penumonia* بطريقة Disk Antagonism test باستخدام وسط مولر – هنتون

وعند مقارنة الجداول الثلاثة (1)، (2)، (3) في التحري عن أنزيمات AmpC في العزلات الجرثومية السالبة لصبغة گرام نجد أنَّ طريقة التحري الأولي تُعدُّ من الطرائق المفضلة في التحري عن هذه الأنزيمات إذ أعطت نسبة تحري قدرها (37.5%) تلتها طريقة التحري الاولي بنسبة (40.6%)، ثم طريقة المستخلص ثلاثية الابعاد المحورة بنسبة (31.2%). أنَّ المقاومة لمضاد Cefoxitin قد يعود لعدة أسباب منها الانتاج العالي لأنزيمات AmpC الكروموسومي والتحطيم الداخل خلوي للمضاد الحيوي ووجود العديد من انظمة الدفق الخلوي efflux pump وانخفاض نفاذية الغشاء الخارجي ووجود عوامل مقاومة متنقلة محمولة على البلازميدات وضعف ارتباط المضاد مع المستقبلات الموجودة على سطح الخلية الجرثومية (Patel *et al*., 2010).

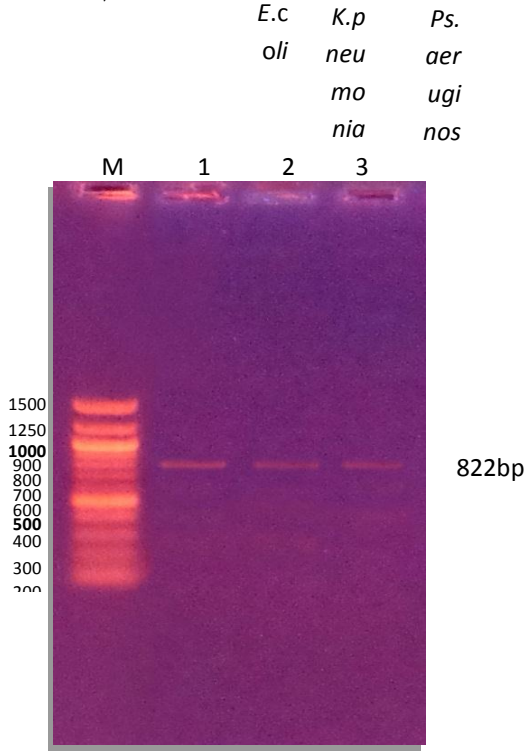
ولأن الطرائق المظهرية لا تميز أو تفرق بين أنزيمات AmpC الكروموسومية أو المحمولة على البلازميدات فانه يستوجب استخدام الطرائق الجزيئية مثل تقنية الـ PCR لغرض التحري عنها، ويوضح (الجدول 4) النسب المئوية لعزل جينات bla_{AmpC} من العزلات الجرثومية السالبة لصبغة گرام.

الجدول 4: نتائج تفاعل PCR للتحري عن الجين bla_{AmpC} في العزلات الجرثومية السالبة لصبغة كرام

النوع الجرثومي	عدد العزلات المختبرة	النسبة المئوية من المجموع الكلي
E. coli	5	1 (6.6)
K. pneumonia	4	2 (13.3)
Ps.aeruginosa	4	2 (13.3)
A.bumannii	2	0 (0)
Total	15	5 (33.3)

بلغت اعلى نسبة تحري عن الجين bla_{AmpC} لجرثومتي *K.pneumoniae* و *Ps.aeruginosa* (13.3%) تلتها جرثومة *E. coli* بنسبة (6.6%)، وتوضح الصورة (3) نتائج الترحيل الكهربائي لـ DNA العزلات الموجبة المتضاعف بتقنية الـ PCR وظهور حزم شريط DNA لعدد من العينات للـ DNA المستخلص عند الحجم الجزيئي (822 bp) الخاصة بالبادئ المستخدم دليلاً على وجود الجين bla_{AmpC} على كروموسوم العزلات المختبرة.

وإنَّ النسب القليلة لعزل هذا الجين قد يعود سببه إلى أنَّ جينات هذه الأنزيمات محمولة على البلازميدات اكثر من كونها محمولة على الكروموسومات إضافةً إلى أن قلة عدد العينات كان سبباً في قلة عزل هذا الجين، لذا فإنَّ استخدام الطرائق الجزيئية يعد ضرورياً لغرض التفريق بين أنزيمات AmpC الكروموسومية عن البلازميدية، فاذا كانت الطرائق الجزيئية غير متوفرة فإنَّ الكشف عن العزلات المنتجة لأنزيمات AmpC يجب أنْ يتم باستخدام الطرائق التأكيدية المظهرية والتي من شأنها تمييز انتاج أنزيمات AmpC عن غيرها من آليات المقاومة لغرض الحد من انتشارها والسيطرة عليها (Thomson, 2010).



الصورة 3: نواتج تفاعل الـ PCR للكشف عن الجين bla_{AmpC} للعزلات السالبة لصبغة كرام

إنَّ استخدام الطرائق الجزيئية يعد ضرورياً لغرض التفريق بين أنزيمات AmpC الكروموسومية عن البلازميدية، فاذا كانت الطرائق الجزيئية غير متوفرة فإنَّ الكشف عن العزلات المنتجة لأنزيمات AmpC يجب أنْ يتم باستخدام الطرائق التأكيدية المظهرية والتي من شأنها تمييز انتاج أنزيمات AmpC عن غيرها من آليات المقاومة لغرض الحد من انتشارها والسيطرة عليها (Thomson, 2010).

الاستنتاجات

اظهرت نتائج التحري عن انزيمات Ampc امتلاك الجراثيم السالبة لصبغة كرام لانزيمات بيتالاكتاميز المعدنية وخاصة في النوع *Ps.aeruginosa*.

المصادر

Black, J.A.; Moland; E.S.; Thomson, K.S. (2005). AmpC disk test for detection of plasmid mediated AmpC β - lactamases. *J. Clin Microbiol*., **43**, 3110- 3113.

Bush, H; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. (1995). A functional classification Scheme for beta-Lactamase and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*, **39**, 1211-1233.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2010). "Performance Standards for Antimicrobial Disk Tests". Approved standard, 9th ed. CLSI Document M2- A9, **26** (1): Wayne PA: 2010.

Dunne, E.F.; Fey, P.D.; Kludt, P.; Reporter, R.; Mostashari, F.; Shillam, P.; Wicklund, J.; Miller, C.; Holland, B.; Stamey, K.; Barrett, T.J.; Basheed, J.K.; Tenover, F.C.; Ribot, E.M.; Angulo, F.J. (2000). Emergence of domestically acquired ceftriaxone- resistant *Salmonella* infections associated with AmpC β-lactamase. *J. America. Med. Ass*., **284**, 3131-3156.

Gurung, S.; Kafle, S.; Dhungel, B.; Adhikari, N.; Shrestha, U.T.; Adhikari, B.; Ghimire, P. (2020). Detection of OXA-48 gene in carbapenem-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from urine samples. *Infect. Drug Resist*., **13**, 2311.

Hernandez- Alles, S.; Benedi, V.; Martinez, L.; Pascual, A.; Aguilar, A.; Tomas, J.M. (1999). Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. Antimicrob. *Agent Chemoth*., **43**, 937-939.

Koneman E.W.; Allen, S.D.; Danda, W.M.; Schreck, E.; Winn, W.C. (1997). "Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology". 5th ed. Lippin-cot-Raven publisher, Philadelphia, USA.

Livermore, D.M.; Woodford, N. (2002). Carbapenemase a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol*., **3**, 489-495.

Macfaddin, J. F. (2000). "Biochemical Tests for Identification Bacteria". Lippincott Williams and Wilkens. Philadelphia, USA.

Manchanda, V.; Singh, V. (2003). Occurrence and detection of AmpC β-Lactamases among gram negative Clinical isolates using a modified three- dimensional test at Guru Teg Bahadur Hospital, Delhi, India. *J. Antimicrob. Chemother*., **51**, 415-418.

Manchanda, V.; Singh, N.P.; Shamweel, A.; Eideh, H. K.; Thukral, S. S. (2006). Molecular epidemiology of clinical isolates of AmpC producing *Klebsiella pneumoniae*. *Ind. J. Med. Microbiol*., **24**(3), 177.

Nancy, D. H. (2003). What do we need to know for the future? *J. Antimicrob. Chemother*., **52**, 2-42.

Nordman, P.; Poirel, L. (2002). Emerging Carbapenemases in gram negative aerobes. *Clin Micropbiol. Infect*., **8**, 321-331.

Ogefere, H.O.; Osikobia, J.G.; Omoregie, R. (2016). Prevalence of AmpC β-lactamase among Gram-negative bacteria recovered from clinical specimens in Benin City, Nigeria. *Tropic J Pharmaceut Res*., **15**:1947–1953. doi:10.4314/tjpr.v15i9.20.

Parveen, M.; Harish, R.; Parija, S.C. (2010). AmpC Beta Lactamases among Gram negative clinical Isolates from tertiary Hospital, South India. *Brazi. J. Microbiol*., **41**, 596-602.

Patel, M.H.; Trivedi, G.R.; Patel, S.M.; Vegad, M.M. (2010). Antibiotic susceptibility pattern in urinary isolates of gram-negative bacilli with special reference to AmpC β - Lactamase in a tertiary care hospital. *Urol Ann*, **2**, 7-11.

Perez, F.; El-Chakhtoura, N.G.; Papp-Wallace, K.M.; Wilson, B.M.; Bonomo, R.A. (2016). Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can

we apply "precision medicine" to antimicrobial chemotherapy? *Expert Opin Pharmacother*. **17**, 761–781.

Philippon, A.; Arlet, G.; Jacoby, G.A. (2002). Plasmid- determined AmpC type β- Lactamases Antimicrob. *Agents Chemother*, **46**, 1-11.

Pokharel, S; Adhikari, B. (2020). Antimicrobial resistance and over the counter use of drugs in Nepal. *J. Glob. Health*., **10,** 010360. doi:10.7189/jogh.10.010360.

Pokharel, S.; Raut, S.; Adhikari, B. (2019). Tackling antimicrobial resistance in low-income and middle-income countries. *BMJ Glob Health*. **4**, e002104. doi:10.1136/bmjgh-2019-002104.

Sambrook, J.; Russell, D.W. (2001). "Molecular Cloning". 3rd ed., Cold spring Harbor Laboratory Protocols, Cold Spring Harbor, New York.

Sanders, C.C.; Sanders, W.E.; Goering, R.V. (1982). In vitro antagonism of Beta-lactam antibiotic by cefoxitin. *Antimicrobial. Agents Chemoth*., **21**, 968- 975.

Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S. (1996). PCR detection of metallo β - lactamase gene (bla_{IMP}) in gram- negative rods resistant to broad- spectrum β - lactamase. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 526-529.

Singhal, S.; Mathur, T.; Khan, S.; Upadhyay, D.J. (2005). Evaluation of method for ampC β - Lactamase in gram negative clinical isolate from tertiary care hospital. *Indian J. Med. Microb*., **23**, 120- 124.

Subhas C.A.; Milan K.U.; Anil, K.S.; Meharaj, A.; Krishus, N.; Binod, D.N.; Nabaraj, A.; Biond, L.; Komal, R.R. (2020). Plasmid-mediated AmpC β -lactamase CITM and DHAM genus among gram-negative clinical isolates. *J. Inf. Drug Resist*. **13**(13), 4249—4261 Doi; https://org/10.2147/idr.s284751.

Thapa Shrestha, U.; Shrestha, S.; Adhikari, N. (2020). Plasmid profiling and occurrence of beta-lactamase enzymes in multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Kathmandu, Nepal. *Infect Drug Resist*. **13**, 1905–1917. doi:10.2147/IDR.S250591

Thomson, K.S. (2010). Extended spectrum β - lactamase, AmpC and Carbapenemase Issues. *J. Clin. Microbiol*., **48**, 1019- 1025.

Thomsons, K.S.; Mejglo, Z- A.; Pearce, G.N.; Regan, T.J. (1984). 3- Dimensional Susceptibility testing of beta- lactam auibiotics. *J. Antimicrob. Chemother*., **13**, 45- 54.

Detection of AmpC Enzyme in Gram Negative Bacteria by Phenotypic and Molecular Methods

Sahar L. Al-Saleem **Adeba Y. Sharif**

Department of Biology / College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

In this study, the ability of some gram-negative bacteria isolated from different clinical samples to produce AmpC enzymes by phenotypic and molecular methods was investigated. The percentage of its occurrence was (40.6 %) by the use of cefoxitin disk as this antibiotic is used to screen for isolates that can produce this enzymes, the highest rate was for bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (15.5 %) followed by *Klebsiella pneumoniae* (12.5 %), as for the three dimensional extraction method, the percentage of this enzyme reached (13.2 %), which depend on the use of crude enzymatic extracts instead of live microbial cells, the highest rate was for *Pseudomonas aeruginosa* (12.5 %) followed by *Klebsiella pneumoniae* (9.3 %), (37.5 %) by using disk antagonism test method which is one of the best methods for investigating these enzymes. As for molecular methods PCR assay was used to detect the bla_{AmpC} gene encoding for this enzyme, the highest percentage was for *Klebceiala pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* reached (13.3 %).

Keywords: AmpC Enzymes, Cram-negative bacteria, Cefoxtin.