التحري عن إنزيمات AmpC بيتالاكتاميز في العزلات السريرية لبكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosas* في مستشفيات مدينة النجف

[1]الهام جواد كاظم **[2]علي محسن المحنة** **[2]سامر عبد الصاحب الهلالي**

[1]كلية التربية للبنات/ جامعة الكوفة

[2]كلية الطب/ جامعة الكوفة

الخلاصة

تعد *Pseudomonas aeruginosa* من أهم المسببات للإصابة المكتسبة في المستشفيات. تمتلك هذه العزلات في كثير من الأحيان القدرة على مقاومة مدى واسع من المضادات الحيوية. هدفت هذه الدراسة للتعرف على انتشار أنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC في العزلات السريرية لهذه البكتريا. تم الحصول على 37 عزلة سريريه لبكتريا *Ps. aeruginosa* من مستشفيات النجف، وأُجري فحص الحساسية الدوائية لها تجاه 16 نوعاً من المضادات الحيوية فكانت جميع العزلات مقاومة على الأقل لثلاثة من أصناف المضادات الحيوية، لذلك عُدّت هذه العزلات متعددة المقاوم Multi drugs- resistant (MDR). أظهرت نتائج فحص الحساسية الأولي لبكتريا *Ps. aeruginosa* أنّ 10 (27%) عزلات كانت مقاومة للسيفوكسيتين، اختُبرت قابلية هذه العزلات على إنتاج إنزيمات AmpC باختبارين هما اقراص AmpC وModified three dimensional وكذلك اختبرت على احتوائها للمورثة bla_{AmpC}، وقد أعطت 4 عزلات نتيجة موجبة لجميع الاختبارات. اختبرت هذه العزلات أيضا في احتوائها على بعض مورثات البيتالاكتاميز، وتبين إن عزلة واحدة كانت حاملة للمورث bla_{SHV} وعزلة كانت حاملة للمورثات bla_{SHV} و bla_{TEM} و bla_{CTX-M} وعزلة كانت حاملة للمورثين bla_{SHV} و bla_{CTX-M}. تبين الدراسة انتشار المقاومة المتعددة بين عزلات *Ps. aeruginosa* وظهور عزلات منتجة لأنزيمات AmpC . هذه العزلات تشكل تحديا كبيرا لمستقبل العلاج بالمضادات الحيوية.

المقدمة

تمتلك بكتريا *Ps. aeruginosa* حساسية قليلة تجاه معظم مضادات الحياة المستعملة في العلاج الطبي ، إذ تحتوي على العديد من الآليات لمقاومة مضادات الحياة منها إفراز إنزيمات محللة مثل إنزيمات البيتالاكتاميز، أو آلية غير إنزيمية منها مضخات التدفق المعاكس متعددة العقار (Multi drugs -efflux pumps) أو آلية نفاذية الغشاء الخارجي (Cavallo *et al.*, 2000). اكتشف إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز في هذه البكتريا وصنفت إلى مجموعات اعتماداً على الركيزة التي تعمل عليها أو مواقع جيناتها التي قد تحمل على ألدنا البلازميدي أو ألدنا الكروموسومي، وتعمل هذه الإنزيمات على مجموعة مضادات البيتالاكتام (Jiang *et al.*,2006). تعد إنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC مجموعة مهمة وواسعة الانتشار ولها القابلية على مقاومة مجاميع مضادات البيتالاكتام نوع Oxyimino-7-α-methoxy-cephalosporin ولا تتأثر بمثبطات البيتالاكتاميز مثل الكلافولانيت والسالباكتام والتازوباكتام (Jacoby and Bush., 2009). وهذه الإنزيمات تكون على نوعين، إمّا ذات منشأ كروموسومي (محفزة) أو بلازميدي، ففي كثير من الأنواع البكتيرية نجد أنّ إنزيمات AmpC المحفزة تنتج بشكل طبيعي، ولكن بمستويات منخفضة جداً، ولكنها نوعياً تتحفز بشكل كبير جداً بوجود أحد مضـــــادات البيتالاكتام، ومنها الســيفوتاكسيم والســيفوكسيتين (Arora and Bal, 2005)، وفي السنوات الأخيرة تم رصد إنزيمات AmpC ذات منشأ بلازميدي. والآن هنالك أكثر من 20 إنزيماً مختلفاً من إنزيمات AmpC وجد أنّها من أصل بلازميدي(Jacoby and Bush, 2009). بسبب ارتفاع نسبة مقاومة بكتريا *Ps. aeruginosa* لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة في الوقت الحاضر، ولوجود دراسات قليلة حول إنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC في العراق بشكل عام وفي محافظة النجف بشكل خاص، وخصوصاً في مجال الدراسة الجزيئية مع المقاومة المتسارعة لهذه البكتريا، ارتأينا أن يكون هدف دراستنا هو معرفة انتشار هذه الانزيمات في العزلات السريرية لبكتريا *Ps. aeruginosa* المعزولة من مصدرين مهمين للإصابة تشمل إصابات المجاري البولية والحروق.

المواد وطرائق العمل

العزل والتشخيص

تمّ الحصول على 142 عينة سريرية (قُسّمت بواقع 102 إدرار، و 40 حروق) من مستشفى الزهراء التعليمي للولادة والأطفال، ومستشفى الصدر التعليمي العام في محافظة النجف للفترة من تشرين الثاني 2009ولغاية شباط 2010 ، شخصت عزلات *Ps. aeruginosa*، بالاعتماد على كل من *et al.* (1996) Collee و(2000) MacFaddin.

فحص الحساسية للمضادات الحيوية

اختبرت الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الأقراص اعتمادا على *et al.* (1966) Bauer.تم اختيار المضادات الحيوية بالاعتماد على CLSI (2010) والمجهزة من شركة Bio analyse (Turkey) حيث تضمنت: الببراسيللين (100 مايكروغرام)، التيكرسيللين (75 مايكروغرام)، السيفوكسيتين (30 مايكروغرام)، السيفتازيديم (30 مايكروغرام)، السيفوتاكسيم (30 مايكروغرام)، السيفترياكسون (30 مايكروغرام)، الاميبينيم (10 مايكروغرام)، الميروبينيم (10 مايكروغرام)، الازتريونيم (30 مايكروغرام)، الاميكاسين (30 مايكروغرام)، الجنتاميسين (10 مايكروغرام)، التوبراميسين (10 مايكروغرام)، السيبروفلوكساسين (5 مايكروغرام)، النورفلوكساسين (10 مايكروغرام)، الليفوفلوكساسين (5 مايكروغرام)، والاموكسيكلاف (20 مايكروغرام اموكسيسيللين + 10 مايكروغرام كلافولانيت).

الكشف عن أنزيمات AmpC

1- اختبار Modified Three Dimension Extract (MTDE)

نقل نمو بكتيري (10-15 ملغم) بعمر 24 ساعة من أطباق المولرهنتون الصلب إلى أنابيب نبذ مركزي صغيرة (Eppendorf tubes). عُلّقت الكتلة البكتيرية بماء الببتون ودُوّرت بواسطة المنبذه بقوة 3000 دورة/ دقيقه لمدة 15 دقيقة، تم غسل النمو البكتيري بالمحلول الملحي الفسيولوجي لمرتين وحضر المستخلص الإنزيمي بطريقة الإذابة والتجميد لعشر مرات. تمّ نشر نمو بكتيري حديث للبكتريا *Escherichia coli* ATCC 25922 القياسية على أطباق مولر هنتون الصلب ووضع قرص سيفوكسيتين (30 مايكروغرام) في وسط الطبق وتم عمل شقوق بطول 3سم على سطح الوسط الصلب بواسطة شفرة معقمة وعلى بعد 3 ملم من قرص السيفوكستين كما تم عمل حفرة صغيرة في نهاية كل شق بواسطة ماصة باستور معقمة وبالضغط على سطح الاگار، وضع حوالي 30 مايكروليتر من مستخلص الإنزيم في هذه الحفر ولكل عزله على حدة. وتركت الأطباق لمدة 5- 10دقائق إلى أن جف المحلول ثم قُلّبت وحُضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة. إن العزلات التي أظهرت اختزالاً واضحاً في منطقة التثبيط حول قرص السيفوكسيتين اعتبرت منتجة لإنزيمات AmpC (Singhal *et al.*, 2005).

2 - اختبار أقراص AmpC (AmpC Disk Test)

زُرعت أطباق مولر هنتون الصلب بنمو حديث لبكتريا *E. coli* ATCC 25922 القياسية وتم اخذ أقرا ص معقمة (6 ملم) من ورق الترشيح ثم رُطبت بالمحلول الملحي الفسيولوجي (20 مايكروليتر) وتم تلقيح هذه الأقراص ببعض مستعمرات للعزلات البكتيرية قيد الدراسة، وضعت الأقراص الملقحة بجانب قرص السيفوكستين وملامسة له وحضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة، إنّ ظهور تسطح أو تثلم في منطقة التثبيط بالقرب من القرص الملقح بالبكتريا دليل ايجابية الاختبار وان الأنزيم بلازميدي المنشأ (Singhal *et al.*, 2005) .

3- اختبار التضاد بين الأميبينيم والسيفتازيديم (Ceftazidim-Imipenem antagonism, CIA)

أجري هذا الاختبار للكشف عن إنزيمات AmpC المحفزة حيث وضع قرص الاميبينيم (10مايكروغرام) على بعد 20 ملم (من الحافة إلى الحافة) عن قرص سيفتازيديم (30 مايكروغرام) على طبق مولر هنتون الصلب الملقح من عالق بكتيري مقارن مع أنبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5) وحضنت الأطباق بدرجة37 مº لمدة 24ساعة، ولغرض المقارنة تم وضع قرص السيفوكستين أيضاً على بعد 20 ملم عن قرص الاميبينيم، ويُستدلّ على الفعل ألتضادي (نتيجة موجبة) من خلال الاختزال الحاصل بمنطقة التثبيط حول قرص السيفتازيديم المجاور لقرص الاميبينيم أو قرص السيفوكستين (Cantarelli *et al.*, 2007).

الكشف عن إنتاج أنزيمات الكاربابينميز (Detection of carbapenemase production)

اعتمد اختبار Hodge المحور من قبل Lee *et al.* (2001) للكشف عن أنزيمات السيرين كاربابنميز واعتمد اختبار التثبيط المحتمل بطريقة انتشار القرص (Inhibitor-potentiated disk diffusion test) المعتمد من قبل Lee *et al.* (2003) في الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية.

تقنية سلسلة تفاعل أنزيم البلمرة (PCR)

تم استخلاص الDNA من الخلايا البكتيرية بالاعتماد على عدة Wizard Genomic DNA (Promiga,USA) أما البادئات المستعمل والمذكورة تفاصيلها في الجدول (1) فقد جهزت من شركة Alpha DNA, Montreal. استخدم جهاز الدورات الحرارية (Gene Amp thermal cycle, Singapore) لتضخيم التسلسلات الوراثية المدخلة لبادئ DNA ،وحُضّر مزيج PCR بأخذ حجم 12.5 مايكروليتر من محلول المزيج الأخضر الرئيس (Promiga) بتركيز نهائي (1x) و5 مايكروليتر من مستخلص DNA إذ استُخدم كقالب (Template)، ولغرض الحصول على تركيز نهائي يساوي 40 بيكامول/مايكروليتر لكل بادئ، أضيف 2.5 مايكروليتر للبادئ الأمامي (بتركيز 16 بيكامول/ مايكروليتر) و 2.5 مايكروليتر (من 16بيكامول/مايكروليتر) للبادئ العكسي وأكمل الحجم إلى 25 مايكروليتر بالماء الخالي من الإنزيم المحلل وتم ضبط جهاز الدورات الحرارية وكما هو موضح في جدول (2). ثم رُحّلت النواتج على هلام الاگاروز بتركيز1%. تم توضيح الأحزمة (Bands) باستخدام UV-transilluminator بعد التصبيغ ببروميد الاثيديوم.

جدول (1): بـادئـات DNA (DNA primers) المستخدمة في الدراسة

إسم البادئ		تسلسل القواعد النيتروجينيه	Product Size (Bp)	المصدر Reference
bla_{TEM}	F	5-AGCGATCTGTCTAT-3	822	Paterson *et al.*, 2003
	R	5-AAACGCTGGTGAAAGTA-3		
bla_{SHV}	F	5-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3	753	Hujer *et al.*, 2006
	R	5-ATGCGTTATATTCGCCTGTG -3		
bla_{CTX-M}	F	5-ACCGCGATATCGTTGGT-3	550	Bhattacharjee*et al.*, 2007
	R	5-CGCTTTGCGATGTGCAG-3		
bla_{AmpC}	F	5-GAGCCCGTTTTATGCACCCA-3	550	Paterson *et al.*, 2003
	R	5-ATCAAAACTGGCAGCCG		
bla_{IMP}	F	5-AACCAGTTTTGCYTTACYAT-3	587	Yin *et al.*, 2008
	R	5-CGGCCKCAGGAGMKCTTT-3		
bla_{VIM}	F	5-GAGCAAGTCTAGACCGCCCG-3	633	Yin *et al.*, 2008
	R	5-ATTCCGGTCGGRGAGGTCCG-3		
bla_{GES}	F	5-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3	846	Kiratisin *et al.*, 2008
	R	5-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3		
bla_{PER}	F	5-CGTATGAAAAGGACAAT-3	978	Wang *et al.*, 2004
	R	5-AGTCAGCGGCTTAGATA-3		
bla_{VEB}	F	5-GCCTATGACCAGTGTT-3	961	Wang *et al.*, 2004
	R	5-GCGGTAATTTAACCAGA-3		

جدول (2) الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية PCR

المورثات	الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية				
	المسخ الأولي (دورة واحدة)	(35) دورة			الاستطالة النهائية (دورة واحدة)
		المسخ	التثبيت	الاستطالة	
bla_{AmpC} bla_{TEM} bla_{SHV} bla_{CTX-M}	94 / دقائق3مْ	94/ ثانية30مْ	57/ ثانية30مْ	72/ دقيقة1مْ	72 / دقائق7مْ
bla_{IMP} bla_{VIM} bla_{PER} bla_{VEB}	94/دقائق5مْ	94/دقيقة1مْ	57 / دقيقة1مْ	72 / دقيقة2مْ	72/دقائق7مْ

النتائج

تم تشخيص 37 (26%) عزلة *Ps. aeruginosa*، تضمنت 10(9.9 %) عزلات من عينات الإدرار و27 (67.6%) عزلة من مسحات الحروق. اجري فحص الحساسية الدوائية للعزلات قيد الدراسة و أظهرت النتائج إن جميعها كانت مقاومة على الأقل لثلاثة من أصناف المضادات الحيوية المختبرة لذلك اعتبرت متعددة المقاومة. يبين الجدول (3) إن العزلات أبدت مقاومة عالية نسبيا لمضادات البيتالاكتام بينما كانت جميعها حساسة للميروبينيم، كما يظهر الجدول إن 10 (37%) عزلات كانت مقاومة للسيفوكسيتين.

جدول (3) توزيع النسب المئوية للمقاومة تجاه مضادات الحياة لعزلات *Ps. aeruginosa* وفق مصادر عزلها

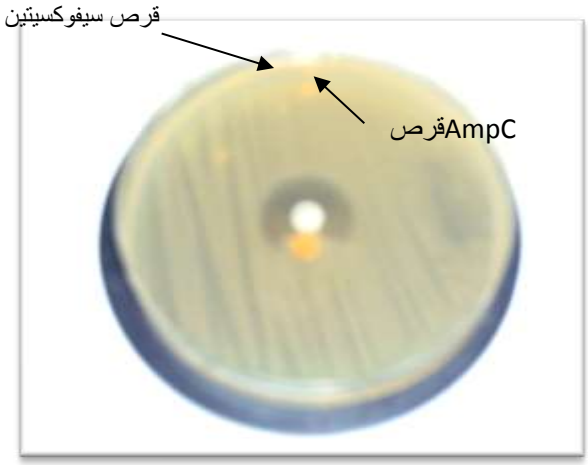
المضادات الحيوية	عدد العزلات المقاومة (%)		العدد الكلي للعزلات المقاومة (%)
	(عزلة(27حروق	(عزلة(10إدرار	
التايكارسلين	25(92.6%)	5(50%)	30(81.1%)
الببراسيللين	25(92.6 %)	9(90%)	34(91.9%)
السيفوكسيتين	(25.9%) 7	(30%) 3	10(27%)
السيفوتاكسيم	23(85.2%)	9(90%)	32 (86.5%)
السفترياكزون	27(100%)	8(80%)	35(94.6%)
السيفتازيديم	26(96.3%)	9(90%)	35(94.5%)
الازتريونيم	25(92.6%)	8(80%)	33(89.2%)
الاموكسيكلاف	26(96.3%)	9(90%)	35(94.6%)
الاميكاسين	10(37%)	0(0.0%)	10(27%)
الجنتاميسين	24(88.9%)	3(30%)	27(73%)
التوبرامايسين	23(85.2%)	0(0.0%)	23(62.2%)
السبروفلوكساسين	20(74.1%)	0(0.0%)	20(54.1%)
الليفوفلوكساسين	8(29.6%)	0(0.0%)	8(21.6%)
النورفلوكساسين	14(51.9%)	0(0.0%)	14(37.8%)
الاميبينيم	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
الميروبنيم	22(81.5%)	4(40%)	26(70.3%)

اختبرت قابلية العزلات المقاومة للسيفوكستين على إنتاج أنزيمات AmpC، وأظهرت نتائج جميع الاختبارات الموضحة في الجدول (4) قدرة 4 عزلات (ثلاثة من مسحات الحروق وواحدة من عينة إدرار) على إنتاجها. ويوضح الشكل (1) اختبار MDTD في الكشف عن أنزيمات AmpC والذي يظهر عزلتين أبدت اختزالا في أبعاد منطقة التثبيط باتجاه قرص السيفوكستين.

جدول (4): عزلات *Ps. aeruginosa* المقاومة للسيفوكستين والمنتجة لأنزيمات AmpC

نوع العينة	عدد العزلات	عدد (%) العزلات المقاومة للسيفوكسيتين	عدد (%)عزلات المنتجة لإنزيمات AmpC		
			MTDT	اختبار أقراص AmpC	إنتاج المورث bla_{AmpC}
الإدرار	10	3)30(%	1) 10(%	1) 10(%	1) 10(%
الحروق	27	7) 26(%	3) 11.1(%	3) 11.1(%	3) 11.1(%
المجموع	37	10) 27(%	4)10.9(%	4)10.9(%	4)10.9(%

أظهرت النتائج التي بيّنها جدول (4) بأنّ نفس عدد العزلات التي أعطت نتيجة موجبة لإختبار MTDTكانت موجبة أيضاً في إختبار أقراص AmpC وكما موضح في الشكل (2) . كما أظهرت جميع العزلات المقاومة للسيفوكستين عدم قدرتها على إنتاج أنزيمات AmpC المحفزة باستخدام اختبار CIA.



شكل (2): إختبار قرص AmpC للكشف عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC في العزلة PAB 32 *Ps. aeruginosa* وتظهر نتيجة موجبة قويةشكل 1: اختبار قرص AmpC للكشف عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC في العزلة

كما بينت نتائج الدراسة الحالية قابلية 4\37 (10.8%) من العزلات قيد الدرس على إنتاج إنزيم AmpC

في اختبار التحري عن إنتاج المورث bla_{AmpC} بطريقة تفاعل إنزيم البلمرة كما موضح في الشكل (4)

تم اختبار العزلات الحاملة للمورثة bla_{AmpC} في احتوائها على مورثات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وأظهرت النتائج المبينة في جدول (5) احتواء العزلة PAB14 على المورثة bla_{SHV} وامتلاك العزلة PAB32 على المورثات bla_{SHV} و bla_{TEM} و $bla_{\text{CTX-M}}$ أما العزلة PAB 37 فقد احتوت على المورثتين bla_{SHV} و $bla_{\text{CTX-M}}$.

جدول (5): عزلات *Ps. aeruginosa* الحاملة للمورثة bla_{AmpC} ومورثات أنزيمات البيتالاكتاميز ذات الطيف الواسع

رمز العزلة	أنواع المورثات		
	$bla_{\text{AmpC}}+bla_{\text{SHV}}$	$bla_{\text{AmpC}}+bla_{\text{TEM}}$	$bla_{\text{AmpC}}+ bla_{\text{CTX-M}}$
PAB14	+	-	-
PAB32	+	+	+
PAB37	+	-	+

أظهرت النتائج إن جميع العزلات المقاومة للسيفوكستين لم تعط ناتج تضخم في جهاز PCR لكل من المورث bla_{IMP} والمورث bla_{VIM} كما إنها أعطت نتائج سالبة لفحص IPD وهذا يعني عدم احتوائها على أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية، بينما أبدت 4 عزلات نتيجة موجبة لاختبار Hodge المحور أي إنها منتجة لأنزيم السيرين كاربابينميز من نوع KPC (شكل 3).

شكل (3): القابلية على إنتاج إنزيم KPC من قبل عزلات *Ps. aeruginosa* نمو بكتريا *E. coli* ATCC 25922 القياسية حول تخطيط العزلات قيد الاختبار دلالة على إيجابية الاختبار، وإنّ العزلة *Ps. aeruginosa* PAU1 و *Ps. Aeruginosa* PAU2و*Ps. aeruginosa* PAB32 تُظهر إختزالاً قوياً في أبعاد منطقة التثبيط باتجاه قرص الأميبينيم، أما العزلة*Ps. aeruginosa* PAB1 فقد أعطت نتيجة متوسطة.

المناقشة

تعتبر أنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC من إنزيمات السيفالوسبورينيز ضعيفة التثبيط بالكلافونيت، وهي ذات أهمية سريرية، ربما بسبب كونها تصنع مقاومة لمدى واسع من مضادات البيتالاكتام والتي تتضمن مضادات السيفومايسين (α-methoxy-β- lactams) مثل السيفوكسيتين والسيفالوسبورينات ذات الطيف الضيق والواسع ومثبطات البيتالاكتاميز التعاضدية والأزتريونام (Schmidtke and Hanson, 2006). أظهرت نتائج الاختبارات المظهرية أنّ 27% من العزلات كانت مقاومة للسيفوكسيتين، وهذا يعني أنّ هذه العزلات ربما تكون منتجة لإنزيمات AmpC، إذ إنّ الطراز المظهري لمقاومة السيفوكسيتين ممكن أن يكون نتيجة التعبير الفائق لإنزيم AmpC الكروموسومي، أو اكتساب إنزيم AmpC البلازميدي، أو ربما يكون نتيجة عدد من آليات المقاومة غير المتخصصة الأخرى، مثل اختزال نفاذية فتحات الغشاء الخارجي، أو بسبب نظام الضخ الخارجي، أو باجتماع هذه العناصر (Arora and Bal, 2005)، إن انتشار المقاومة للسيفوكسيتين بين العزلات السريرية يكون مختلفاً من بلد إلى آخر، ومن مؤسسة صحية إلى أخرى (Fang *et al.*, 2008)، ففي دراسة أجريت في الهند، حصل Arora and Bal (2005) على27 (10%) عزلة بكتيرية سالبة لصبغة كرام مقاومة للسيفوكسيتين، حصلت. إنّ سلالات *Ps. aeruginosa* المقاومة للسيفاميسين نوعاً ما غير شائعة، ولكن الاستعمال الواسع لمضادات البيتالاكتام ربما ساهم في تطور وانتشار هذه السلالات (Fang *et al.*, 2008). يمكن الاعتماد على فحص أقراص السيفوكستين كاختبار أولي، ومع ذلك فهو اختبار غير متخصص في الكشف عن إنتاج AmpC، إنّ النتائج التي تم الحصول عليها من الاختبارات الثلاثة تشير إلى أنّ طريقة أقراص السيفوكستين على الرغم من سهولتها وبساطة استعمالها، إلا أنّها قد تعطي نتيجة موجبة خاطئة وغير صحيحة عن عدد العزلات المنتجة لإنزيمات AmpC، إذ إنّ المقاومة قد تكون ناتجة عن آليات أخرى غير إنتاج AmpC (Black *et al* ., 2005)، وعلى الرغم من كون اختبار الأبعاد الثلاثة المعدل ذو حساسية عالية- كاختبار أولي-ولكنه أكثر صعوبة وأعلى تكلفة من بقية طرق الكشف (Thomson and Sanders,. 1992). أما اختبار أقراص AmpC فهو من الاختبارات الاعتيادية السهلة والدقيقة المستعملة في الكشف عن العزلات الحاملة لإنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC، إذ إنّ هذا الاختبار يميّز بين مقاومة السيفوكستين المتسببة عن إنتاج AmpC والمقاومة التي تنتجها آليات أخرى، مثل اختزال نفاذية الغشاء الخارجي، أو آلية التعبير الفائق لمضخات الدفق الخارجي (Livermor, 2007). إنّ التمييز بين هذه الآليات يُعتبر حالياً من المشاكل التشخيصية المهمة في المختبرات التي تحتاج الكشف عن إنزيمات AmpC، وقد أظهرت النتائج التي بيّنها جدول (4) بأنّ نفس عدد العزلات التي أعطت نتيجة موجبة لاختبار MTDT كانت موجبة أيضاً في اختبار أقراص AmpC. وقد أظهرت الكثير من الدراسات اللاحقة إن اختبار أقراص AmpC دقيق في الكشف عن إنزيماتAmpC بلازميدية الصنع، وكذلك في الكشف عن مستوى الإنتاج العالي لإنزيمات AmpC كروموسومية الصنع في العائلة المعوية (Black *et al* 2005)، إنّ هذا الاختبار من الاختبارات السريعة والدقيقة في الكشف عن العزلات الحاملة لإنزيمات AmpC، ومن الممكن استعماله في الفحوص الروتينية التي تجرى في المختبرات السريرية في العراق. وفي دراسة مماثلة أجريت في Aligarh في الهند كانت نسبة عزلات *Ps. aeruginosa* التي تحمل إنزيم AmpC 20% (Shahid *et al.,* 2003). كذلك فان نتائج التحري عن مورثة bla_{AmpC} في الدراسة الحالية تشير إلى دقة النتائج التي تم الحصول عليها من اختباري MTDT وأقراصAmpC .تنتج إنزيمات AmpC المحفزة عادة من قبل أنواع البكتريا السالبة لصبغة غرام، ولكن مستوى إنتاجها يبقى منخفضاً ما لم تحفز بإحدى مضادات البيتالاكتام، مثل السيفوكستين والسيفتازيديم، أو مثبطات البيتالاكتام التعاضدية، مثل الكلافولانيت (Jacoby, 2009)، إذ إنّ وجود إحدى هذه المضادات سيؤدي إلى تحفيز عملية إنتاج إنزيمات AmpC عدة مئات من المرات. إنّ إنزيمات AmpC الكروموسومية عادة ما تكون محفزة، بينما تكون أنزيمات AmpC ذات المنشأ البلازميدي غير محفزة (Philippon *et al.*, 2002)، وقد سجل Cantarelli *et al.*(2007) طريقة للكشف عن إنزيمات

AmpC المحفزة بين سلالات البكتريا المعوية، وهي اختبار التضاد بين السيفتازيديم والأميبينيم. كما إنّ هذا الاختبار يستند على التأثير المحفز القوي لمضاد الأميبينيم على هذه الإنزيمات، الأمر الذي يؤدي إلى حصول تضاد مع التأثير المحلل للسيفتازيديم. وتختلف مضادات البيتالاكتام في قابليتها التحفيزية، فالبنزيل بنسيلين والأمبيسيلين والأموكسيسيلين والسيفالوسبورينات ذات الطيف الضيق، مثل السيفالوثين والسيفازولين، تعتبر محفزات قوية ومادة أساس جيدة لإنزيمات AmpC. ويُعدّ الأميبينيم محفزاً قوياً، لكنّه أكثر إستقرارية ضد الفعل ألتحللي لهذه الإنزيمات، أمّا مضادات السيفوتاكسيم والسيفترياكسون والسيفيبيم والببراسيللين والأزتريونام فهي تُعدّ محفزات ضعيفة ومواد أساس ضعيفة، ولكن بالإمكان تحليلها إذا كانت كمية الإنزيم الذي يتكون نتيجة الفعل التحفيزي لهذه المضادات كافياً (Pai *et al.*,2001) وإنّ وجود السلالات الحاملة لإنزيم AmpC المحفز ممكن أن يؤدي إلى فشل العلاج بالمضادات الحيوية المستعملة حاليا، وخصوصاً تلك التي لها تأثير محفز قوي، مما يسبب فشل العلاج بتلك المضادات (Arora and Bal, 2005). وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم امتلاك عزلات *Ps. aeruginosa* المقاومه للسيفوكستين لإنزيمات AmpC الكروموسومية المحفزة، وهذا يدل على كون إنزيم AmpC المكتشَف في العزلات الأربعة قد يكون من النوع الذي يتوسطه البلازميد. أظهرت النتائج في الجدول (5) احتواء ثلاث عزلات على مورث bla_{AmpC} ومورثات مختلفة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف. إن هذه المورثات تتموضع عادة على بلازميدات كبيرة متعددة المقاومة للعقاقير (Moland *et al.*, 2003)، لذلك فان كلا النوعين من المورثات يرتبط مع المقاومة للكثير من المضادات الحيوية مما يقلل فرص نجاح الخيارات العلاجية، ويعدّ ذلك مؤشراً خطراً على انتشار العزلات ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية في مستشفيات النجف. بينت الدراسة أنّ جميع العزلات المقومة للسيفوكستين غير حاملة للمورثات bla_{IMP} و bla_{VIM}، وهذا يشير إلى إنّ المقاومة التي أبدتها عزلات *Ps. aeruginosa* لمضاد الميروبينيم ممكن أن يكون سببها إحدى الآليات المتعددة الأخرى، مثل آلية المقاومة المتسببة عن اختزال بروتين البورين ، أو عن فقـــــدان أحد الثغور بسبب طفـــرة وراثية، أو مضـــخات الـــدفق (Livermore and Woodford, 2006)، أو ربما تكون ناتجة عن وجود تسلسلات أخرى لإنزيمات IMP وVIM، إذ إنّه بمجرد تغيير القاعدة النايتروجينية الگوانين محل القاعدة النايتروجينية الأدنين في النيوكليوتايد 443 في تركيب المورث سيولد نسخة مغايرة للنسخة المستبدلة، إضافة إلى إحتمال قدرة تلك العزلات على إنتاج إنزيمات السيرين كاربابينيميز مثلKPC وكانت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لدراسة أجراها Carvalho *et al.* (2005) في مستشفى في شمال البرتغال، فقد وجد هؤلاء الباحثون أنّ نسبة 96.3% من أصل 27 عزلة *Ps. aeruginosa* كانت مقاومة للاميبينيم والميروبينيم في الفحوص المظهرية، ومع هذا جاءت نتائج التضخيم لمورثات bla_{IMP} وbla_{VIM} سالبة لجميع العزلات، عدا عزلة واحدة أعطت نتيجة موجبة لمورث bla_{VIM}. كما أظهرت النتائج في الدراسة الحالية أنّ جميع العزلات أعطت نتيجة سالبة لاختبار التثبيط المحتمل بطريقة انتشار القرص ، وهنا نجد أنّ نتائج الفحص المظهري والوراثي اتفقت في عدم احتواء العزلات قيد الدراسة لإنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية، ولكن بيّنت الدراسة الحالية إمتلاك 4 عزلات إنزيم الكاربابينيميز نوع سيرين بيتالاكتاميز والمعروف بـ KPC. إنّ هذا الإنزيم يحلل جميع مضادات البيتالاكتام وهو يتثبط بالكلافولانيت ووجوده يكون على بلازميدات غير إقترانية يتم الكشف المظهري عن وجود إنزيم KPC بواسطة فحص Hodge المحور(Lee *et al*., 2001) . نستنتج من الدراسة الحالية قدرة بعض العزلات السريرية لبكتريا *Ps. aeruginosa* المعزولة من مستشفيات النجف على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC مما يشكل تحديا علاجيا كبيرا لذلك توصي الدراسة بتقنين استعمال المضادات الحيوية في علاج الإصابات إلي تسببها هذه البكتريا .

المصادر

Arora, S. and Bal, M. (2005). AmpC β-lactamases producing bacterial isolates from Kolkatta hospital. India J. Med. Res., 122: 242-333.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Truck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., 36: 493-496.

Bhattacharjee, A., Sen, M. R., Anupurba, S., Prakash, P. and Nath, G. (2007). Detection of OXA-2 group extended-spectrum β-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* from India. J. Antimicrob. Chemother. Advance Access published July 10.

Black, J. A., Moland, E. S. and Thomson, K. S. (2005). AmpC disc test for detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β-lactamases. J. Clin. Microbiol., 43: 3110-3113.

Cantarelli, V. V., Inamine, E., Brodt, T. C. Z., Secchi, C., Cavalcante, B. C. and Pereira, F. D. (2007). Utility of the cetazidime-imipenem antagonism test (CIAT) to detect and confirm the presence of inducible AmpC β-lactamases among *Enterobacteriaceae*. Braz. J. Infect. Dis., 2: 237-239.

Carvalho, M. J., Saavedra, M. J., Correia, A., Castro, A. P. and Duarte, A. (2005). Metallo- β-lactamase in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Portuguese hospital and identification of a new VIM-2 like enzyme. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Copenhagen/Denmark, April 2-5.

Cavallo, J. D., Fabre, R., Leblanc, F., Nicolas-Chanoine, M. H., Tabaut, A. and GERPB. (2000). Antibiotic susceptibility and mechanisms of β-lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study (1996). J. Antimicrob. Chemother., 46: 133-136.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests; twentieth informational supplemented. M100 S20. Vol. 29, No. 3.

Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmiom, B. P. and Simmon, A. (1996). Mackie and McCarteny, Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone inc., USA.

Fang, D. Xi-wei, X., Wen-qi, S., Ping, L., Sang-jie, Y., Yong-hong, Y. and Xu-zhuang, S. (2008). Characterization of multidrug resistant and metallo β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from pediatric clinic in China. Chin. Med. J., 121: 1611-1616.

Hujer, K. M., Hujer, A. M., Hulten, E. A., Bajaksouzian, S., Adams, J. M., Donskey, C. J., Ecker, D. J., Massire, C., Eshoo, M. W., Sampath, R., Thomson, J. M., Rather, P. N., Craft, D. W., Fishbain, J. T., Ewell, A. J., Jacobs, M. R., Paterson, D. L. and Bonomo, R. A. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from military and civilian patients treated at the walter reed army medical center. Antimicrob. Agents Chemother., 50: 4114-4123.

Jacoby, J. A. and Bush, K. (2009)."Amino acid sequences for extended-spectrum and inhibitor resistant ß-TEM, SHV and OXA lactamases". from http://www.lahey.org/Studies/.

Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F. and Lu, Y. (2006). Detection of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 50: 2990-2995.

Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C. and Saifon, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing

health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family. Antimicrob. Agents Chemother., 52: 2818-2824.

Lee, K., Chong, Y., Shin, H. B., Kim, Y. A., Yong, D. and Yum, J. H. (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase- producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin. Microbiol. Infect., 7: 88–91.

Lee, K., Lim, Y. S., Yong, D., Yum, D. H. and Chong, Y. (2003). Evaluation of the Hodge test and imipenem EDTA double disc synergy test for differentiating metallo β-lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol., 41: 4623-4629.

Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Coque, G. M. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford Rossolini, N., Arlet, G. and Ayala, J. T. (2007). "CTX-M: changing the face of extended spectrum β-lactamases in Europe". J. Antimicrob. Chemother., 59: 165-174.

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

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

Moland, E. S., Black, J. A., Hossain, A., Hanson, N. D., Thomson, K. S. and Pottumarthy, S. (2003). "Discovery of CTX-M-like extended-spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* isolates from five US States." Antimicrob. Agents Chemother., 47: 2382-2383.

Pai, H., Wonkim, J., Kim, J., lee, J., Choe, K. W. and Gotoh, N. (2001). Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother., 45: 480-484.

Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., Bonomo, R. A. and the International Klebsiella Study Group. (2003). "Extended-Spectrum β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type β-lactamases." Antimicrob. Agents Chemother., 47: 3554-3560.

Philippon, A. and Lagrange, P. H. (2002). Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13: S17-S19.

Schmidtke, A. J. and Hanson, N. D. (2006). "Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated β-lactam resistance." Antimicrob. Agents Chemother., 50: 2030-2037.

Shahid, M., Malik, A. and Sheeba. (2003). Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmids and AmpC β-lactamases isolated from hospitalized burn patients in a tertiary care hospital of North India. FEMS Microbiol Lett., 228:181-186.

Singhal, S., Mathor, T., Khan, S., Upadhyay, D. J., Chugh, S., Gaind, R. and Rattan, A. (2005). Evaluation of methods for AmpC β-lactamases in Gram-negative isolates from tertiary care hospital. Ind. J. Microbiol., 23: 120-124.

Thomson, K. S. and Sanders, C. C. (1992). Detection of extended-spectrum β-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. Antimicrob. Agents Chemother., 36:1877-1882.

Wang, C. X. and Mi, Z. H. (2004). IMP-1 metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in the People's Republic of China. J. Antimicrob. Chemother., 54: 1159-1160.

Yin, X., Hou, T., Xu, S., Ma, C., Yao, Z., Li, W. and Wei, L. (2008). Detection of drug resistance-associated genes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumanii*. Microbial. Drug Resist., 14: 145-150.

Detection of AmpC-β-Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Najaf Hospitals

Elham J. Belal[1], Ali M. Almohana[2], Samer, A. Al-Hilali[2]

[1]College of Education for Girls, University of Kufa

[2] college of Medicine, University of Kufa

Summery

Pseudomonas aeruginosa is of the major causes of hospital acquired infection. The isolates have often been observed to display considerable resistance to multiple antibiotics, hence the aim of this study is to identify the dissemination of AmpC β-lactamase in clinical isolates of this bacteria. A total of 37 *Ps. aeruginosa* isolates were obtained from Najaf hospitals. The isolates were tested for their antibiotic resistance against 16 types of antibiotics. All the isolates were found to be resistant to a minimum of 3 classes of antibiotics, hence, the isolates were considered multidrug resistant. The primary antibiotic susceptibility test revealed that 10 (27%) isolates were cefoxitin resistant. These isolates were tested for their ability to produce AmpC β-lactamases using two methods, AmpC disk and modified three dimensional, also examined for the presence of bla_{AmpC} gene. The AmpC enzymes production was confirmed in only 4 isolates. These isolates were examined for the presence of some extended-spectrum β-lactamases genes. Results revealed that 1 isolate carried $bla_{SHV,}$ 1 isolate carried $bla_{SHV,}$ bla_{TEM} and bla_{CTX-M} and 1 isolate carried bla_{SHV} and bla_{CTX-M}. According to the results carried out in this study, the AmpC producing *Ps. aeruginosa* represent a serious therapeutic challenge.