معدل تواجد و الكشف الجزيئى عن إنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال فى العزلات الإكلينيكية لأنواع السودوموناس اوروجونوزا

رسالة مقدمة
كجزء مكمل لدرجة الماجستير فى العلوم الصيدلية
(الميكروبيولوجيا و المناعة)

مقدمة من
الصيدلاني/ هاني رشاد عبدالصابر هاشم
بكالوريوس العلوم الصيدلية
جامعة قناة السويس – ٢٠٠٢

كليـــــة الصيدلـــة
جامعة قناة السويس

٢٠١٣

تحت إشراف

الأستاذ الدكتور/ صـــلاح الدين محمد عبدالله

استاذ الميكروبيولوجى والمناعة – كلية الصيدلة

جامعة قناة السويس

الأستاذ الدكتور/ علاء الدين محمود شوقى حسنى

استاذ الميكروبيولوجى والمناعة – كلية الصيدلة

جامعة القاهرة

الدكتور/ نورا فهمي محمود

مدرس الميكروبيولوجى والمناعة – كلية الصيدلة

جامعة قناة السويس

مقدمة:

تعتبر *سودوموناس ارجونوزا* من أكثر أنواع البكتيريا انتشارا فى الطبيعة مثل فى الماء، فى التربة وعلى اسطح النبات والحيوان و خاصة الأسطح الدافئة والرطبة، حيث يمكن عزلها بسهوله شديدة من تلك البيئات. وتتميز هذه البكتريا بقدرتها على النمو فى المحاليل المائية، المطهرات، المياه المقطرة، والمنظفات مسببة بذلك تلوثها وكذا تلوث الاجهزة الطبية فى المستشفيات، وبهذا تعتبر من أكثر أنواع البكتريا التى تسبب العدوى المكتسبة من المستشفيات مثل عدوى الجهاز البولى ،عدوى الجهاز التنفسى، التهاب الجلد، تسمم الدم وغيرها. خاصة فى حالات المرضى ذوى المناعة الضعيفة مثل مصابى الحروق، السرطان، و الايدز، حيث تمثل عدوى السودوموناس ارجونوزا حوالى ١٠-٢٠% من العدوى المكتسبة من المستشفيات. تم تسمية *سودوموناس ارجونوزا* فى عام ١٨٧٢م نسبة إلى الكلمة اللاتينية "ارجونوزا" والتى تعنى "أخضر" حيث كانت أول ميكروب يعطى للصديد لوناً أخضر. وتحدث العدوى بهذا الميكروب نتيجة اختراقه أنسجة الجسم المختلفة إلى جانب افرازه للعديد من السموم والانزيمات المدمرة لخلايا الجسم المصاب بالعدوى وترجع مقاومة بكتريا السودوموناس ارجونوزا العالية للمضادات الحيوية للعديد من الأسباب مثل قلة نفاذية بروتين الغشاء الخارجى، و إفرازها للعديد من الإنزيمات التى تقلل فعالية المضاد الحيوى مثل إنزيم البيتالاكتاميزو غيرها من الأسباب الآخر

وتتميز هذه البكتريا بمقاومتها الطبيعية للكينولونات والعديد من الضادات الحيويه نتيجة لوجود بروتين الغشاء الخارجى الذى يمنع وصول مختلف الضادات الحيويه لداخل الخلية و من ثم إلى الأنزيم المستهدف، إلى جانب مضخات الطرد التى تلعب دوراً هاماً فى مقاومةهذه البكتريا للمضادات الحيويه.

يعد إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال فى الميكروبات سالبة الجرام من الأمور الهامة للصحة العامة. وهى عبارة عن مجموعة إنزيمات تقاوم المضادات الحيوية (البيتالاكتام) حيث إن لها القدرة على مقاومة مجموعة البنسيلين و مجموعة السيفالوسبورين ويتم تثبيط أغلبها بواسطة حامض الكلافيولينيك و السالباكتام و التازوباكتام. هناك عدة انواع من إنزيمات البيتالاكتاميز و قد تم عزل أول جين منها عام ١٩٦٥. والآن هى الاكثر انتشارا فى عائلة الانتيروباكترياسى. وتسبب الميكروبات المنتجة لهذه الإنزيمات العديد من الأمراض أهمها عدوى المجارى البولية والصديد واللنهاب الجلدي و وغيرها حيث يواجه المرضى المصابين بها نسبة خطورة عالية عند تعرضهم للعلاج خصوصا باستخدام السيفالوسبورين.

الهدف من الدراسة:

- عزل و تعريف ميكروب السودوموناس *ارجونوز*.
- الكشف عن إنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال فى هذا الميكروب باستخدام اختبارات الحساسية .
- إجراء الاختبارات التأكيدية للكشف عنها.
- الكشف الجزيئى عن هذه الإنزيمات بإستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل.
- مقارنة الطرق المستخدمة فى الكشف عن هذه الإنزيمات.

خطة الدراسة:

تم تجميع عدد ٤٨ عينة *سودوموناس ارجونوز* تتمثل فى عينات بول وبراز وصديد و مسحات من الأذن. وقد تم التجميع من المستشفى الجامعي بالإسماعيلية ومعمل الإسماعيلية التخصصى في الفترة من ابريل و حتى نوفمبر ٢٠١١ حيث تم زرعها على مستنبت السترميد و المستنبت الأولى للعزل و مستنبت الماكونكى.

كما تم التعرف عليها باستخدام عدد من الاختبارات الكيموحيوية مثل الوكسيديز والهيدروجين برواكسيد وسبغه الجرام وبعد ذلك تم التأكد باستخدام API 20NE System.

بعد ذلك تم الكشف عن إنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال فى هذه العزلات عن طريق إجراء عدد من إختبارات الحساسية باستخدام المضادات الحيوية الاتية: الأمبيسيلين و السيفازولين و السيفوروكسيم و السيفتازيديم والسيفوتاكسيم والسيفترياكسون و الإميبينيم والأزتريونام و السيفوكسيتين و السيفيبيم و الأموكسيسيللين-كلافيولينيك آسيد والسيبروفلوكسلسين والجنتاميسين. كما تم الكشف الجزيئى عنها عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن جين *bla*(TEM), *bla*(SHV), *bla*(CTX-M), *bla*(OXA),*bla*(OXA-10) .
bla(OXA-4), *bla*(PER-1), *bla*(VEB-1) and *bla*(GES-1) و أخيرا المقارنة بين جميع الطرق المستخدمة فى الكشف.

نتائج الدراسة:

أظهرت نتائج الدراسة ان جميع العينات المعزولة هى *سودوموناس ارجونوز*. وقد أظهرت االدراسة وجود عدد ٣٨ (٧٩.٢%) عينة منتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل و قد كانت جميع العينات المنتجة لهذه الانزيمات منتجة كالاتي.

13عينه لجين vebو٢٥ عينه لجين CTX-Mو٢٣ عينه لجين GES و ٣ عينات لجين TEM

علما بان الجينات الاتيه لم يتم اكتشافها في هذه الدراسه وهي PER وOXA وOXA-4 وSHV , وOXA-10

أما عن اختبارات الحساسية فى الكشف عن إنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال فقد أسفرت عن وجود ٣٤ عينات فقط منتجة لهذه الإنزيمات الحيوى سيفتازيديم فقد أظهرت وجود ١١ عينة

<u>نستخلص من هذه الدراسة:</u>.

- تعتبر *سودوموناس ارجونوزا* من أكثر أنواع البكتيريا مقاومه للمضادات الحيويه
- الكشف الجزيئى عن إنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال هو الطريقة المثلى
- تعد مجموعة الكاربابينيم هى افضل طريقة لعلاج العدوى بإنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال.
- انتاج VEBوGES و CTX-M وTEM جين فى ميكروب تعتبر *سودوموناس ارجونوزا وهذه تعتبر اول دراسه في مصر*.
- يعتبر المضاد الحيوى سيفتازيديم من اهم المضادات الحيوية فى الجيل الثالث للسيفالوسبورين للكشف عن بإنزيمات البيتالاكتاميز ممتدة المجال.

.