جامعة الإسكندرية
ALEXANDRIA
UNIVERSITY

Alexandria University
Medical Research Institute
Department of Microbiology

Phenotypic and Genotypic Patterns of Beta Lactam Resistance among *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates

Thesis

Submitted to Department of Microbiology
Medical Research Institute - Alexandria University
In partial fulfillment of the requirements for the degree of

Ph.D

In

Diagnostic and Molecular Microbiology

By

Amira Gaber Ali Hassan ElBaradei
B.Sc. of Pharmaceutical Sciences, 2005
M.Sc. in Diagnostic and Molecular Microbiology, 2012
Alexandria University

Medical Research Institute
Alexandria University
2016

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.M
Serial No : 188
Classification : 616.01

الملخص العربى

ينتشر ميكروب الصديد الاخضر بكثرة في اوساط بيئية مختلفة. كما يمكن عزله من مصادر حية مختلفة بما فيها الانسان. يستطيع هذا الميكروب الانتشار في المجتمع و المستشفيات من خلال قدرته على استخدام الحد الادنى من الاحتياجات الغذائية و قدرته على تحمل مجموعة متنوعة من الظروف المحيطة.

ويشكل ميكروب الصديد الأخضر تحديا علاجيا خطيرا لعلاج العدوى المكتسبة من المجتمع ومن المستشفيات. كما أن اختيار المضادات الحيوية المناسبة لبدء العلاج ضروري لتحسين النتائج السريرية.

تضم عائلة البيتا لاكتام البنسلين ومشتقاته، السيفالوسبورين، الكاربابينيمات، المونوباكتام ومثبطات البيتا لاكتاميز .مقاومة البكتيريا للبيتا لاكتام تتزايد بمعدل كبير وأصبحت مشكلة شائعة .وهناك عدة آليات لمقاومة الميكروبات للبيتا لاكتام .و تعد الآلية الأكثر شيوعا والأكثر أهمية التي تمكن البكتيريا من أن تصبح مقاومة للبيتا لاكتام هو انتاج انزيم البيتا لاكتاميز.

تصنيف أمبلر هو الأكثر استخداما لتصنيف إنزيمات البيتا لاكتاميز وهو يقسمها إلى أربع فئات (أ)، (ب)، (ج) و (د) على أساس تسلسل الأحماض الأمينية. ويحتوي الجزء الفعال من الفئة (أ) على سيرين. اما الفئة (ب) فهي البيتا لاكتاميز الفلزية التي تحتاج إلى عنصر الزنك. وفي وقت لاحق تم تعيين فئة جديدة من إنزيمات البيتا لاكتاميز، وهي الفئة (ج)التي تحتوي ايضا على سيرين في الجزء الفعال، ويعرف أعضائها باسم AmpC. ثم، تم تعين فئة أخرى من إنزيمات البيتا لاكتاميز تعرف باسم OXA هي الفئة (د).

وقد لوحظ في كثير من الأحيان مقاومة ميكروب الصديد الأخضر للكاربابينيم. ويمكن أن تعزى هذه المقاومة جزئيا لوجود إنزيم الكربابينيميز الذي يحلل الكاربابينيم.

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد نمط المقاومة المظهرية للبيتا لاكتام بين العزلات السريرية لميكروب الصديد الأخضر والتعرف على العوامل الوراثية المسؤولة عن مقاومة البيتا لاكتام.

وقد اشتملت هذه الدراسة على ٣٣ عزلة من ميكروب الصديد الأخضر والتي تم عزلها من العينات السريرية المقدمة إلى قسم الميكروبيولوجي في معهد البحوث الطبية بجامعة الإسكندرية.

وقد تم التعرف على عزلات ميكروب الصديد الأخضر باستخدام الاختبارات البيوكيميائية. وخضعت جميع العزلات التي استوفت الصفات الاساسية لميكروب الصديد الأخضر للتحليل البروتيومي للتعرف عليها باستخدام تقنية MALDI-TOF MS والتي أجريت على جهاز Ultraflex TOF/TOF(Bruker Daltonics). وتسمح هذة التقنية بالتعرف على نوع البكتريا حتى مستوى النوع اذا كان المعيار الرقمي اكبر من ٢ و حتى مستوى الجنس اذا تراوح المعيار الرقمي بين (١,٧-١,٩٩). اما المعايير الرقمية الاقل من ١,٧ فلا تسمح بالتعرف الدقيق على نوع البكتريا

تم تحديد حساسية ميكروب الصديد الأخضر عن طريق اختبار انتشار القرص. و تم استخدام أقراص سيفتازيديم أو سيفوتاكسيم ومعه قرص به نفس المحتوى مضاف إليه حمض الكلافيولانيك للكشف المظهري عن البيتا لاكتاميز واسعة المجال "ESBL" كما تم الكشف عن وجود إنزيم الكاربابينميز عن طريق اختبار هودج المعدل.

أما بالنسبة للفئة (ب) وهي البيتا لاكتاميز التي يحتوي على الزنك، فقد تم الكشف عنها باستخدام قرص واحد من الإميبينم وحده وقرص آخر يحتوي على الإميبينم مضاف إليه EDTA.

الكشف المظهري عن فئة (ج) من البيتالاكتاميز AmpC، تم باستخدام اختبار مزيج القرص باستخدام قرص سيفتازيديم أو سيفوتاكسيم وحده وآخر مضاف إليه حمض البورونيك.

تم الكشف الوراثي عن جينات البيتالاكتاميز باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR). تم استخراج الحمض النووي للبكتيريا باستخدام طريقة الغليان.

جينات الفئة (أ) من انزيمات البيتا لاكتاميز هي: *blaSHV*، *blaPER*، *blaTEM*، *blaCTX-M*، *blaVEB*، *blaGES*، *blaPSE-1*، و جينات الفئة (ب) هي: *blaVIM*، *blaIMP*، *blaNDM-1*، *blaSPM-1*، *blaGIM-1* أما جينات الفئة (د) فهي: *blaOXA-1*، *blaOXA-2*، *blaOXA-10*.

تم اختيار خمسة وثلاثون عزلة موجبة لاختبار الأوكسيديز وغير مخمرة للاكتوز تم الحصول عليها من قسم الأحياء الدقيقة- معهد البحوث الطبية- جامعة الاسكندرية. وبفحص شكل المستعمرة و ووجود الصبغات المميزة والقدرة على النمو في درجة حرارة ٤٢°.

هذه الخمسة وثلاثون عترة التي يظن بأنها ميكروب الصديد الأخضر تم الكشف عليها باستخدام MALDI-TOF MS وتم تشخيص ٣٣ منها على أنها ميكروب الصديد الأخضر بينما تبين أن واحدة هي السودوموناس رسزنوفورتنس و والأخرى هي الاستينوتروفوموناس مالتوفيليا. خمسة وعشرون عترة (٧٥,٨٪) من الثلاثة وثلاثين عترة المشخصة على أنها ميكروب الصديد الأخضر حققت معيار رقمي أعلى من (٢,٠٠) وهذا سمح بتشخيصها على مستوى الجنس والنوع. بينما ثمان عترات (٢٤,٢٪) حققت معيار رقمي أقل يتراوح ما بين (١,٧٠-١,٩٩). هذه العترات تم تشخيصها على أنها ميكروب الصديد الأخضر بما أن نمط البروتين أظهر مطابقة فقط مع هذا الكائن الدقيق.

اثنى عشر عترة (٣٦,٣٪) من ميكروب الصديد الأخضر تم عزلها من عينات مسحة الجرح يليها أحد عشر عترة (٣٣,٣٪) تم عزلها من عينات بول و سبع عترات (٢١,٣٪) تم عزلها من عينات مأخوذة من عدوى الجهاز التنفسي.

هذا وقد كانت الغالبية العظمى من عترات ميكروب الصديد الأخضر(٩٣,٩٤٪) مقاومة للايميبينم والميروبينم والجيل الثالث والرابع من السيفالوسبورين (السيفتازيديم والسيفيبيم) (٩٠,٩١٪)، ومن ناحية أخرى لوحظ وجود مقاومة أقل من ذلك بكثير للأزتريونام، بيبيراسيلين و مزيج بيبراسيللين / تازوباكتام (٢١,٢١٪، ٤٢,٤٢٪، ٤٢,٤٢٪ على التوالي).

ظاهريا، وجد أن البيتا لاكتاميز واسعة المجال "ESBL" منتشرة في ١١ عترة (٣٦,٧٪) من أصل ثلاثين عترة مقاومة للجيل الثالث والرابع السيفالوسبورين من ميكروب الصديد الأخضر.

كان اختبار مزيج القرص باستخدام قرص سيفتازيديم و آخر مضاف إليه حمض الكلافيولانيك وباستخدام قرص السيفوتاكسيم و آخر مضاف إليه حمض الكلافيولانيك ايجابياً في عشر عترات وخمس عترات على التوالي.

أجري الكشف عن جينات البيتا لاكتاميز واسعة المجال "ESBL" وهي الفئة (أ) من البيتالاكتاميز في الثلاثين عترة من عترات ميكروب الصديد الأخضرالمقاومة المقاومة للجيل الثالث والرابع السيفالوسبورين ووجد أن أربعة وعشرين عترة (٨٠٪) من ميكروب الصديد الأخضر تحتوي على تلك الجينات. ووجد أن *blaGES* موجود في ١٥ (٥٠٪) من العترات، يليه *blaVEB* الذي وجد في عشر عترات (٣٣٪) ، ثم *blaTEM* الذي وجد في تسع عترات (٣٠٪). هناك عدد أخر من الجينات تم الكشف عنه بمعدل أقل وهي *blaPER* الذي وجد في ثلاث عترات (١٠٪) ، و *blaPSE-1*الذي وجد في عترتين (٦,٦٪) وأخيرا *blaSHV* الذي وجد في عترة واحدة (٣,٣٪) وقد وجد أن هناك سبع عترات كانت تحتوي على ثلاث جينات وست عترات كانت تحتوي على جينين فقط. وقد وجد *blaGES* منفردا في ثمان عترات بينما لم يمكن توجد اي من جينات الفئة (أ) من البيتالاكتاميز في ست عترات.

من بين الاثنين وثلاثين عترة من ميكروب الصديد الأخضر المقاومة للاميبينم والميروبينم وجد أن ٢٣ عترة (٧١,٩٪) كانت مظهرياً ايجابية للفئة (ب) وهي البيتا لاكتاميز التي يحتوي على الزنك. أما بالكشف الجيني فقد وجد أن ٢٧ عترة (٨٤,٤٪) من أصل ٣٢ كانت تحتوي على جينات الفئة (ب) من البيتالاكتاميز.

تسع عترات فقط (٢٨,١٪) من أصل الاثنين وثلاثين عترة المقاومة للاميبينم والميروبينم، كانت ايجابية لاختبار هودج المعدل بينما ٢٣ عترة (٧١,٩٪) كانت ايجابية لاختبار الإميبينم مضاف إليه الإيثيلين ثنائي الأمين رباعي حمض الأسيتسك.

من ضمن جينات الفئة (ب) من البيتالاكتاميز، جين *blaVIM* فقط هو الذي وجد في ٢٧عترات (٨٤,٤٪) من أصل ٣٢ عترة مقاومة للانيبينم والميروبينم. بينما لم يتم الكشف عن أي من باقي جينات الفئة (ب) من البيتالاكتاميز وهي *blaIMP*، *blaSPM*، *blaGIM* و*blaNDM* في هذه العترات.

لم يكن أي من عتراتنا منتجة للفئة (ج) من البيتالاكتاميز AmpC بما أن اضافة حمض البورونيك لأي من القرصين سيفتازيديم أو سيفوتاكسيم ام تنتج عنه أي زيادة في محيط المنطقة المثبطة من العترة موضع الفحص بمقدار≤ ٥ مم.

كان تحفيز انتاج الفئة (ج) من البيتالاكتاميز AmpC غير ممكن باستخدام اختبار تقريب القرص (D–test) لأن التلاتين عترة من ميكروب الصديد الأخضر كانت مقاومة لكل من السيفتازيديم والسيفوتاكسيم.

وجد جين *blaOXA-10* في ١٦ عترة (٤٨,٥٪) من أصل الثلاثة وثلاثين عترة من ميكروب الصديد الأخضر.

هذه الدراسة أكدت أن مقاومة ميكروب الصديد الأخضر للبيتا لاكتام متعدة العوامل.