ISSN: 1991-8941

استخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex PCR لتشخيص بعض انواع البكتريا المرضية الموجبة لصبغة كرام وتحديد مقاومتها للمضادات الحياتية

تماره عدنان منديل* احمد عبد الجبار سليمان** احمد محمد تركي*

*جامعة الانبار/كلية العلوم

**جامعة الانبار/ مركز دراسات الصحراء

الخلاصة:-تم جمع ٤٥٠ عينة مختلفة من الحالات المرضية (أدرار, جروح, حروق , خروج , ومسحات الأنف والبلعوم) خلال الفترة من تشرين الثاني ٢٠١٤ ولغاية شباط ٢٠١٥ . شخصت٦٠ عينة منها على انها ***Staph. aureus*** و ٣٥ عينة ***Strep. pyogenes*** باستخدام طرق التشخيص المظهري والزرعي والبايو كيميائي وللتأكيد شخصت باستخدام جهاز الفايتك **Vaitek**. أظهرت نتائج اختبار مقاومة العزلات لـ ١٠ من المضادات الحياتية من مختلف المجاميع تباينا في مقاومتها لهذه المضادات, واختيرت ١٠ عزلات من كل جنس على أساس التباين في مقاومة المضادات. صممت عدد من البوادئ للكشف عن البكتريا باستخدام جين متميز فيها وللكشف أيضا عن مقاومتها للمضادات باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد **multiplex PCR**, وأظهرت نتائج التضاعف بعد الترحيل إن كل عزلات ***staph. Aureaus*** تحتوي على الجين ***femA*** والذي يمكن ان يتخذ كمؤشر تشخيصي وكل عزلات ***strep. Pyogenes*** تحتوي على الجين ***Tu(tuf)*** , وفي نفس التفاعل تم الكشف عن وجود جينات مقاومة سبعة من المضادات الحياتية العائدة الى مجاميع مختلفة (**Amp, tetR, Tri, Gen, Imp, Qnl and mecA**) حيث احتوت كل عزلات ***staph. aureus*** على جين **Qnl,Tri ,tetR,mecA, Gen, Imp** في حين تباينت في احتواءها على **Amp**اما عزلات ***strep. Pyogenes*** . فقد احتوت على جينات **mecA,Amp,gen,tri** وتباينت في احتوائهاعلى جين **Qnl** حيث لم يظهرفي جميع العزلات ومن خلال هذه الدراسة يمكن استثمار تقنية البلمرة التسلسلية المتعددة في تشخيص البكتريا من النماذج المرضية وبصورة دقيقة وتشخيص مقاومتها للمضادات الحياتية الشائعة الاستعمال بوقت قصير وجهد اقل ودون الرجوع للفحوصات الروتينية المعروفة.

Keywords:- multiplex PCR, antibiotic resistance, strep. Pyogenes,staph. aureus

المقدمة :

تعد البكتريا الموجبة لصبغة كرام من أهم الكائنات التي يمكن ان تسبب العديد من الإمراض المنتشرة عالميا التي يتراوح تأثيرها من الإمراض البسيطة وصولا الى الامراض التي تهدد حياة الإنسان بسبب امتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على إحداث الإصابة (1) . لذا اصبح تلوث الحروق والجروح بالأنواع البكتيرية مسالة شائعة في ردهات الحروق والجروح خاصة بعد العمليات مما ادى الى ارتفاع نسبة الوفيات بها (2) . وان اغلب الممرضات الشائعة والمسببة للالتهابات هي *staphylococcus aureus* , *Streptococcus* اذ ازدادت الاهمية المرضية لهذه الانواع بسبب ما أحدثته من إصابات عديدة وخطيرة في المستشفيات (3). يعد النوع *staphylococcus aureus* من اهم الانواع البكتيرية الانتهازية الممرضة اذ يسبب عدة اصابات منها التهابات الجروح وتكون البثرات والتقرحات والتهابات الحروق كما يمكن ان يسبب التهاب العظام والتهاب الثدي والسحايا وتجرثم الدم والالتهاب الرئوي وتقيح الغشاء الجنبي الا انه يشكل الفلورا الطبيعية للأنف والجلد في الاشخاص الاصحاء (4) . تكون هذه البكتريا مهمة جدا لكونها تسبب الالتهابات المستوطنة في المستشفيات التي من الصعب استئصالها والقضاء عليها والتي تظهر كأعظم مسبب للالتهابات المتعلقة بالمجتمع وبالتالي القضاء عليها يحتاج الى تكاليف اقتصادية عالية ولحد الان فان هذه البكتريا في حالة زيادة مستمرة وانتشار واسع في جميع انحاء العالم(5) . . تحتوي المكورات الذهبية على العديد من الجينات التي تكون موجودة بها او التي يعتقد انها انتقلت اليها من بكتريا اخرى إذ ان جين *mec*A يعد من الجينات الاساسية لها في حين ان الجين SCC*mec* يعتقد انه انتقل اليها من بكتريا *Staph. Sciure* (6) . في حين يعد الجين *Fem*A من العوامل المشفرة كروموسوميا ويكون موجودا طبيعيا في المكورات العنقودية الذهبية اضافة الى انه يكون ضروريا للتعبير عن مستويات المقاومة للمثيسيلين وهذا الجين*Fem*A يشفر للبروتين *Fem*A الذي يساهم بصناعة الجدار الخلوي في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية (7) . ويعد هذا الجين من اول الجينات المكتشفة كما يعتبر *Fem*A كصفة مميزة

وفريدة لبكتريا *staph. aureus* وهو غير موجود في بقية الانواع الاخرى إذ يعد كجين تشخيصي لها بصورة جزيئية من خلال استعمال تفاعل الـ PCR (8) .

تعد بكتريا *streptococcus pyogenes* من اكثر انواع بكتريا *streptococcus* التي تتسبب في إصابة وإمراض جميع اجهزة الجسم المختلفة وأنسجته عدا العظام والالياف العضلية , تتواجد في الانف والفم وعلى الجروح وتنتقل عادة من شخص الى اخر بالاحتكاك المباشر او من خلال التنقل او مشاركة الادوات للشخص المصاب او عن طريق الطعام او العطاس او السعال بالقرب من الشخص او الطعام المكشوف واكثر الامراض التي تسببها هذه البكتريا هي الحمى القرمزية , التهاب النسيج الخلوي والتهاب كبيبات الكلى الحاد (9) . تحتوي بكتريا *Strepto. pyogenes* على العديد من الجينات التي تعطيها صفة المقاومة للمضادات الحياتية وبالتالي احداث الاصابة داخل الجسم الحي دون ان تتأثر , من هذه الجينات جينات tetM , *tet* L , *tet* K , *tet* O , *erm* B وهذه تقاوم مضادات التتراسايكلين (10) . في حين يعد جين Ef-TU واحداً من اهم العوامل الرئيسية التي تساعد في البناء الحيوي للبروتين حيث يعد TU هو عامل استطالة يشفر له من قبل جين *Tuf* , يوجد حوالي واحد او ثلاثة من Tuf في الجينوم الواحد وهذا يعتمد على النوع البكتيري وعلى محتوى البكتريا من G+C فالبكتريا الموجبة لصبغة كرام تحمل Tuf واحد فقط لان محتواها من G+C قليل لذلك صمم الـ PCR لعمل قطع كثيرة وبتتابعات من هذا الجين لذا يعد الجين التشخيصي لبكتريا *Strepto. pyogenes* الذي يكون مميز لها إذ يوجد نوعين من هذا الجين Tuf هما *Tuf*A و*Tuf*B والنوع *Tuf*A هو الذي يكون موجود في بكتريا *Strepto. pyogenes* اما النوع *Tuf*B فيوجد في *Bacillus* و *Listeria* و *Staphlococcus* وهذا الجين الموجود في بكتريا *Strepto. pyogenes* يكون مشابة للجين الذي يساعد في انقسام الخلايا (11)

المواد وطرائق العمل

جمع العينات وتشخيص العينات:-تم جمع (٤٥٠) عينة من حالات مرضية مختلفة شملت (الادرار , الحروق , الجروح , الخروج , القشع , التهابات الانف والاذن ,التهاب اللوزتين) من مستشفى الرمادي التعليمي العام وللفترة من تشرين الثاني ٢٠١٤ ولغاية شهر شباط ٢٠١٥. وأجريت الفحوصات المجهرية والكيموحيوية اعتماد على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا (12 ; 13) اضافة الى استخدام نظام (ابي ٢٠ Staph) و استخدام نظام (ابي ٢٠ Strepto) واخير تم استخدام التشخيص الكيموحيوي باستخدام جهاز Vitek 2 system .ومن ثم اختبرت مقاومة العزلات للمضادات الحياتية بطريقة الأقراص وحسب ما مذكور (14) للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الحياتية باستخدام مجموعة من أقراص المضادات الحياتية المجهزة من قبل شركة oxoid البريطانيةالجدول (١)

جدول (١) أقراص مضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية

N	Antibiotic	الرمز	التركيز مايكروغرام/ قرص
1	Tobramycin	TOB	10
2	Chloramphenicol	C	30
3	Gentamicim	Gen	15
4	Cefotaxime	CTX	30
5	Pencillin	P	10
6	Ampicillin	AmP	10
7	tetracycline	TE	30
8	Imipenem	IPM	10
9	Naldix acid	NA	30
10	Vancomycin	VAC	30
11	Cefepime	FEP	30
12	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	COT	25

استخلاص وتنقية الدنا الجينومي:-استخلصت عينات دنا الجينومي للعزلات البكتيرية البالغ عددها ٢٠عزلة بكتيرية باستخدام عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتريا المنتج من شركةGeneaid ذي الرقم التسلسلي GBB101

البادئات المستخدمة:- يبين الجدول (٢) البادئات النوعية والتي تم تصميمها بشكل خاص لهذه الدراسة والتي تستهدف جينات الهدف (gentamycin, qnl, hlyA,KcaA, femA, Tu(tuf), trimethoprim, tetR, AMP, mecA, impenem) وفقاً لما ذكر (15) والتي جُهزت بشكل مسحوق مجفد (Lyophilized) من شركة (BIONEER), وقد تمت إعادة تذويبها بحجم من الماء المقطر والمعقم بحسب توصيات الشركة للحصول على محلول خزين لكل بادئ بتركيز (١٠٠Pmol/µl) ثم حفظ هذا المحلول الخزين بدرجة حرارة -٢٠ مْ .

جدول (٢) البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

اسم البادىء	تسلسل القواعد □3→5□	حجم الجين المستهدفbp
femA-F	CGCAAACTGTTGGCCACTAT	162
femA-R	TCACTGGACCGCGATTTGAA	
Tu(tuf)-F	CCGTGGTACTGTTCGTGTCA	265
Tu(tuf)-R	GTGACGTCCACCTTCGTCTT	
MecA-F	CCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCA	656
MecA-R	GGGTGGATAGCAGTACCTGAGCCA	
Gen-F	ATCCCGCAACAGCCCGGGACTTA	600
Gen-R	AACCTGAAGGCTCGCAAGAGCG	
Amp-F	TTCCCACGCTACTGGTGTGGCT	458
Amp-R	GGCCGGTAACGCTTTCTCACCA	
Qnl-F	CGCAGCGACTTTCGACGTGCTA	374
Qnl-R	AGTGATGCACCCGCTAGGTTCGT	
Imp-F	CTGGTGCTGCAATGGCGGATGA	280
Imp-R	GTGCTTGCACCCCATGGACGAA	
TetR-F	GCTTTGCTCGACGCCTTAGCCAT	267
TetR-R	CCCCACAGCGCTGAGTGCATATAA	
Tri-F	TGGAGTTATCGGGAATGGCCCTG	104
Tri-R	TCTTGCGTCCAACCAACAGCCA	

.; femA:Staphaminoacyltransferase .; Tu(tuf):Streptococcus pyogenes strain CCUG 4207 elongation factor gene . ; mecA:methicillin ; Gen :gentamycin ;Amp : ampicillin ; Qnl: qunolate ; imp: imipenem ; tetR: tetracycline ; tri : trimethoprim

خليط تفاعل Multiplex PCR PreMix–:ستخدم هذا الخليط المجهز من قبل شركة (BioNEER) المتكون من المحلول المنظم لعمل انزيم البلمرة PCR bufferوالنيوكليدات منقوصة الاوكسجين dNTPs وانزيم بلمرة الدنا pfu DNA polymerase و Pyrophosphatase and pyrophosphate وصبغة Stapilizer and trcking dye.كما استعمل الدليل الحجمي ١٠٠ DNA Ladder لمعرفة احجام القطع الناتجة بعد التضاعف كما استعمل الدليل 1Kb لمعرفة سلامة الدنا المستخلص من العزلات البكتيرية

التحري عن الجينات البكتيرية باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل Multiplex PCR:–حضر مزيج التفاعل الرئيسي غير الحاوي على الDNA المستخلص من عينات العزلات البكتيرية لعمل تفاعل Multiplex PCR لكل من بكتريا (*Staph. aureus , Strep. pyogenes*) كل بكتريا على حدة وتم تحضير مزيج تفاعل لعشر عينات DNA من هذه الانواع البكتيرية بالإضافة الى ذلك تم اضافة عينة سيطرة سالبة لكل نوع بكتيري مع البادئات التي من المفترض ان تعطي نتيجة سالبة لهذه الانواع البكتيرية ليصبح عدد العينات الكلية لكل مزيج تفاعل ١١ عينة ومن ثم وزع محلول التفاعل الرئيسي على انابيب سعة ٠.٢ مليليتر وبحجم ٢٣ مايكروليتر لكل انبوبة بعدها اضيف الى كل انبوبة ٢ مايكروليتر من الـ DNA الخاص لكل عينة ليصبح الحجم النهائي لكل عينة ٢٥ مايكروليتر باستثناء السيطرة السالبة كما موضح جدول (٣) بعدها أدخلت في جهاز المبلمر الحراري باستعمال البرنامج المناسب في التضاعف ثم حمل المزيج في حفر هلام الأكاروز المحضر بتركيز ١.٥% للكشف عن وجود الجينات .

جدول (٣) مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل

المكونات	الحجم لعينة واحدة (µl)	التركيز النهائي
الماء المقطر	8	ـــــ
Green pre mix	5	1x
Primer forward	5	Pmol/µl20
Primer reverse	5	Pmol/µl20
DNA template	2	ـــــ
الحجم النهائي	25	ـــــ

النتائج والمناقشة

بعد اجراء الفحوصات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المعزولة من مستشفى الرمادي التعليمي تم تشخيص ٩٥ نوع من البكتريا الموجبة لصبغة كرام والتي شملت بكتريا , *Staph. aureus* *Strep .pyogenes* وذلك اعتمادا على الصفات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية وباستخدام ApiE20,Api staph, Api strep وكذلك استخدام جهاز الـ Vitek2 . شخصت العزلات المرضية التي بلغت ٦٠عزله لبكتريا *Staph. aureus* اذ اظهر الفحص المجهري والتصبيغ بصبغة كرام بانها مكورات موجبه لصبغة كرام تنتظم على هيئة تجمعات او عناقيد العنب . تم تشخيص ٣٥ عزلة من بكتريا *Strep pyogenes*.اعتمادا على الصفات المزرعية والمظهرية والكيموحيوية إذ أظهرت المستعمرات النامية على وسط الدم الصلب أنها ملساء براقة شفافة ,صغيرة الحجم ,تشبه قطرات الماء ,غير منتظمة الحافه وتحاط هذه المستعمرة بمنطقة تحلل كامل من نوع بيتا والذي يكون قطر التحلل اكبر تقريبا بمرتين من قطر المستعمرة نفسها .

اجري اختبار مقاومة المضادات بطريقة الاقراص لتحديد مدى حساسية او مقاومة هذه العزلات البكتيرية تجاه ١٢ نوع من المضادات الحيوية , اعتمادا على قطر منطقة التثبيط المحيطة بأقراص المضادات ومقارنتها بأقطار التثبيط القياسية الواردة في (NCCLS 2013) إذ يوضح الجدول (4) العدد الكلي للعزلات البكتيرية المختبرة وعدد العزلات الحساسة والمقاومة والمتوسطة المقاومة للمضادات الحيوية قيد الدراسة إذ اوضحت النتائج ان معظم العزلات البكتيرية كانت مقاومة لأغلب المضادات الحيوية وهذه النتيجة متوقعة بسبب الاستعمال المفرط والعشوائي للمضادات الحيوية فضلا عن تطور اليات المقاومة التي تمتلكها البكتريا ضد اغلب المضادات الحيوية المستخدمة في العلاج (16) وكان الهدف الرئيسي من اجراء هذا الاختبار هو الحصول على اعلى واقل عزلة لكل من العزلات البكتيرية المعزولة من حالات مرضية مختلفة والتي اعطت مقاومة او حساسية ضد اقراص المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة

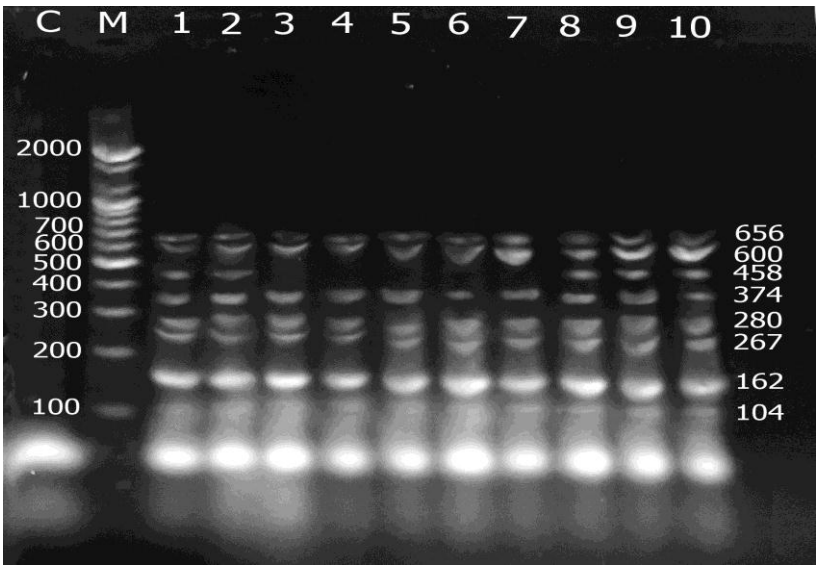
جدول رقم (4) تأثير المضادات الحيوي المختلفة تجاه الانواع البكتيرية الاربعة

اسم البكتريا		*Staph.aureus*			*Strept.pyogenus*		
العدد		60			35		
ت	اسم المضاد	R	I	S	R	I	S
1	Tobramycin	33	0	27	20	0	15
2	Chloramphenicol	24	0	36	7	0	28
3	Gentamycin	36	0	24	16	0	19
4	Cefotaxime	51	0	9	22	0	13
5	Pencillin	60	0	0	35	0	0
6	Ampicillin	48	0	12	35	0	0
7	Tetracycline	56	0	4	10	12	13
8	Imipenem	8	0	52	4	3	28
9	Naldixic acid	54	0	6	25	1	9
10	Vancomycin	18	0	42	7	0	28
11	Cefepime	58	0	2	29	1	5
12	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	51	0	9	33	0	2

R: Resistance. I: Intermediate S: Sensitive

الكشف عن جينات بكتريا *Staph. aureus*:-في هذه الدراسة ومن خلال استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل Multiplex PCR وباستخدام ثمان بوادي حيث تبين عند دمج الجينات الثمانية (*femA* , *mecA* ,Imp , Amp , gen , Qnl, *tetR* , tri) في تفاعل واحد اذ اظهرت النتائج الموضحة في صورة (١) وجود الجين التشخيصي اضافة الى جينات البوادئ للمضادات الحيوية (*mecA,* gen , Qnl , *tetR,* tri, Imp) بنسبة ١٠٠% في جميع العزلات البكتيرية المدروسة مع ظهور حزم واضحة في العزلات ذات الارقام المحلية (١ , ٢ , ٨ , ٩ , ١٠) بالنسبة للبادئ Amp ولم يظهر هذا البادئ في بقية العزلات . وهذا التباين قد يعزى الى التغاير الوراثي في التركيب الجيني ولذا لا تظهر جميع العزلات انها تمتلك هذا الطراز الوراثي لهذا الجين على الرغم من وجود الطراز المظهري له (17) . وقد وجد (18) حزم واضحة لجين *mecA* في سلالات بكتريا *Staph. aureus* مقارنة ببكتريا *staph epidermis* على الرغم من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية قد اظهرت نتائج للكثير من المضادات عند استعمال طريقة الاقراص انها مقاومة ١٠٠%

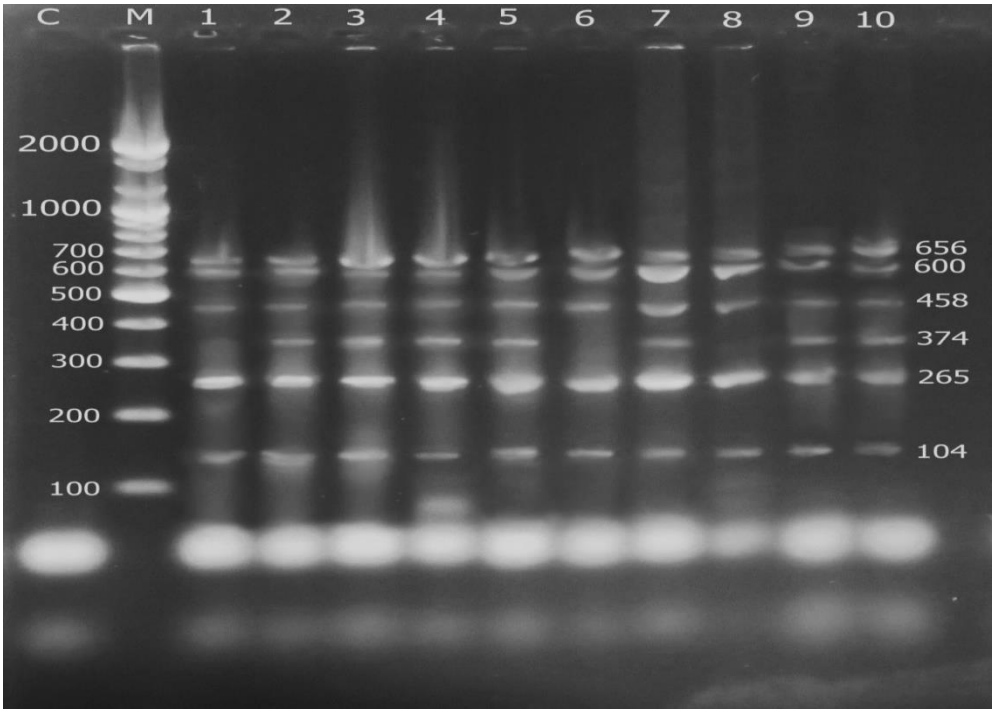
للمضادات الحيوية الا ان عند تحليل الـPCR اظهرت نتائج مختلفة فمثلا Gentamycin على الاقراص اظهر مقاومة ١٠٠% لكن عند استخدم PCR اظهرت الجينات بنسبة ٧٥% , وان مقاومة بكتريا *Staph. aureus* للمضادات الحيوية تكون مرتبطة بسببين رئيسيين وهو وجود جين *mecA* الذي يشفر للبروتينات المرتبطة بالبنسلين وان مقاومة المكورات العنقودية تنتج من اكتساب الجين *mecA* من بكتريا *Staph. sciuri* اما السبب الثاني هو وجود جين الـ *FemA* الذي يشترك بالبناء الحيوي للجدار الخلوي للبكتريا وان هذا الجين مهم في التعبير عن المقاومة في المكورات العنقودية إذ يوجد فقط في هذه البكتريا (19) ومن خلال النتائج التي حصلنا عليها نجد ان هناك تطابق ما بين المقاومة للمضادات الحياتية بالطريقة الكلاسيكية (طريقة الانتشار حول الاقراص) والتشخيص الجيني باستخدام الـ PCR وهذا مطابق لحد ما مع ما حصل عليه (20) الذي وجد ان هناك علاقة بين المقاومة الكلاسيكية ونتائج فحص Multiplex PCR للكشف عن الجينات المقاومة للمضادات الحيوية حيث اثبت وجود ٢٨ عزلة مقاومة للـ Oxacillin و methicillin كانت تحمل جين *mecA* اما العزلات التي كانت مقاومة للـ gentamycin فكانت تحمل الجين aacA–aphD ومضاد trtracycline كان مسؤول عن مقاومته جين tetM و tetK . في حين ذكر (21) وجود ارتباط ما بين البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص ونتائج فحص الجينات باستخدام Multiplex PCR اذ وجد ان الجين المسؤول عن مقاومة البكتريا للمضاد gentamycin هو *aacA–aphD* اما مقاومتها لمضاد Oxacillin فكانت تعتمد على وجود جين *mecA* اضافة الى ذلك تتوافق النتائج لحد ما مع ما وجده (22) في دراسته عند مقارنة الصفات المظهرية بالجينية للمقاومة للمضادات الحيوية باستخدام Multiplex PCR من ان ١٣٩ عزلة تحمل جين *mecA* من اصل ٢٩٨ عزلة بيمنا مظهريا ٩٤ عزلة منها كانت تبدي لمضاد gentamycin ووجد ان ١٧ عزلة منها فقط كانت تمتلك جين gen , بالإضافة الى انه وجد ان ١٦٥عزلة مظهريا كانت تقاوم مضاد erythromycin ووجد ان هذه العزلات جميعها كانت تمتلك جينات مقاومة هذا المضاد بينما كانت ١٢١ عزلة منها تحمل جينات مقاومة tetracyclin وهما جيني *tetM* و *tetK* على الرغم من ان ١٠٦ عزلة فقط كانت مظهريا مقاومة لهذا المضاد . وهذا يتطابق مع النتائج من ان المقاومة لا تكون معتمدة بالأساس على الصفات المظهرية وتكون محمولة بالأساس على جينات خاصة للمقاومة والتي قد تكون في بعض الاحيان موجودة ولكن متوقفة عن العمل فقد ظهرت الجينات ولكن نتائج المقاومة لها بطريقة الاقراص كانت حساسة للمضادات الحيوية بالرغم من ان نتائج التشخيص الجيني اظهرت وجود الجينات .



صورة (١) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex PCR للسلسلةالـDNA باستعمال البوادئ , *femA* , *mecA ,Imp , Amp , gen , Qnl, tetR , tri* على هلام الأكاروز بتركيز ١.٥%M: الدليل الحجمي100bp C: معاملة السيطرة السالبة 1–10:ارقام العزلات لبكتريا *Staph. aureus*, .

- **الكشف عن جينات *Strept. Pyogenes***:-تم استعمال مزيج البادئات (Tu(tuf) , mecA , Amp, Qnl, gen, tri) مع استبعاد بادئي tetR , Imp وذلك بسبب قربهما من الجين التشخيصي , اظهرت صورة (٢) احتواء جميع العزلات على الجين التشخيصي Tu(tuf) اضافة الى احتوائها على جينات مقاومة المضادات (mecA, Amp, gen, tri) اما جين Qnl فقد خلت منه العزلات ذات الارقام المحلية (١, ٦ , ٨)إذ ان هذه العزلات ابدت تباينا في حساسيتها ومقاومتها للمضادات الحيوية المستعملة ومنه انعكس هذا التباين على وجود الجينات في هذه العزلات التي اظهرت تباينا واضحا في محتواها من الجينات خصوصا جين مقاومة مضادات *Qnl* الذي ظهر في قسم من العزلات والقسم الاخر لم يظهر بها هذا الجين . اذ كشف (23) عن وجود جينات *ermA, ermB, mef(A/E)* المقاومة لمضادات الـ Macrolide اضافة الى جينات *tetM , tetO , tetK , tetL* المقاومة لمضاد Tetracyclin باستخدام Multiplex PCR وتباين ظهور هذه الجينات في العزلات التي تم استخدامها وقد وجد ان استخدام هذه التقنية هي افضل من الـ PCR الاعتيادي لسهولة الكشف عن سبع جينات بتفاعل واحد ودقة النتائج المتحصل عليها من هذه التقنية . وكذلك استخدم (24) تفاعل Multiplex PCR مع اربع بوادىء

صورة (٢) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex PCRلسلسلةالـDNA باستعمال البوادئ , *Tu(tuf) , mecA , Amp, Qnl, gen, tri* , على هلام الأكاروز بتركيز ١.٥% M: الدليل الحجمي 100bp, C: معاملة السيطرة السالبة , 10-1:ارقام العزلات لبكتريا *Strep. pyogenes*, .



هي *speB , ermB, ermT, ermR, mef* للتعرف على بكتريا *strep* ومقاومتها لمضادات Macrolide وهذه النتائج تتطابق نسبيا مع نتائج الدراسة الحالية . بينما وجد (25) ان مقاومة الاريثرومايسين تعزى لوجود جين *mefA* ومن مجموع ٢٦ عزلة مقاومة للـ Maicrolide فقط ٢٠ عزلة منها اعطت فحصاً موجبا لوجود جين *mefA* , وهذا التباين في نتائج الدراسات يعود الى الاختلاف في المنطقة الجغرافية اذ تؤثر في نوع العامل الوراثي وجينات الكائن المجهري الممرض , ولطبيعة المنطقة والتوزيع الجغرافي للعزلات البكتيرية تأثير على وجود الجينات المقاومة للمضادات الحيوية في هذه البكتريا . فقد وجد (26) ان في البلدان المتوسطة الدخل تكون هذه البكتريا مقاومة لمضادات Erythromycin , clindamycin ظاهريا وجينيا وعزى سبب هذه المقاومة الى وجود جين *mefA* بينما في دول امريكيا اللاتينية مثل الارجنتين وجد ان المقاومة لهذه المضادات لا تكون محمولة على جين *mefA* فقط وانما وجود جين اخر للمقاومة هو *ermB* بينما في اوربا وجد ان جين المقاومة *ermB* والذي تعزى المقاومة له . بينما (10) فقد حصل على ٣٦ عزلة من هذه البكتريا كانت مقاومة لمضاد tetracycline بسبب احتوائها على اربع جينات مختلفة إذ كان جين *tetM* يمثل النسبة العالية في هذه العزلات يتبعه *tetO* ثم *tetK* و *tetL* كما لاحظ ان هناك ارتباط بين مقاومة tetracycline

ومضاد macrolide واستدل عليها من خلال وجود او ظهور جينين هما *tetM* و *ermB* .

المصادر

1- Pena. I , Picazo. J.J ,Rodrigueu- Avail .C and Rodrigueu- Avail. I (2014) . J. Antimicrob .Agents 43(5) 460- 464.

2- Chiu SK ,Wu TL, Chuang YC, Lin JC ,Fung CP ,Lu PL (2013) . Nationalsurveil- lance study on carbapenemnon-susceptible Klebsiella pneumoniae in Taiwan: the emergenceandrapiddisseminationofKPC-2carbapenemase.PLoSOne ;8:e69428.

3- Bexiga, R., Koskinen, M.T., Holopainen, J., Carneiro, C., Pereira, H., Ellis, K.A.,Vilela, C.L.,(2011). Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. J. Dairy Res. 78, 49–55.

٤- التومي , عبد الرزاق سليمان , محمد محمد الامام , عبد الباسط رمضان ابو زويده (٢٠١٣) . اساسيات التشخيص البكتيريولوجي المعملي والسريري , مركز بحوث التقنيات .

5- Stefani S, Chung DR and Lindsay JA. (2012).Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) :Global Epidemiology and Harmonisation of typing methods .International ajaournal of Antimicrobial Agent .39(4):273-282.

6- Chiara Montanari , Diana I. Serrazanetti , Giovanna Felis , Sandra Torriani , Giulia Tabanelli , Rosalba Lanciotti and Fausto Gardini . (2015). New insights in thermal resistance of staphylococcal strains belonging to the species Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus lugdunensis and Staphylococcus aureus. J Food Control ; 50 : 605 – 612 .

7- Hwang SY,Kim sh, Jang EJ,Kwon NH,Park YK K HC ,Jung wk ,kim J.M. and parkY.H.(2007) .Novel multiplex PCR for detection of Staphylococcus aureus superantigen and its application to raw meat isolates in korea .J.food Microb. 3941:1_7 .

8- Al-Talib. Hassanain , Chan Yean Yean , Alyaa Al-Khateeb , Habsah Hasan, Manickam Ravichandran (2014) . Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by a newly developed dry reagent-based polymerase chain reaction assay . Journal of Microbiology, Immunology and Infection . 47, 484- 490 .

9- Podbielksi and Andreas .(2007). Flexible architecture of streptococcus pyogenes FeT Genome region : Finally the clue for under standing purulent skin disease and long term persistence ., J Backeriol. 189 : 1181 – 1184 .

10- Iciar Rodriguez-Avial, Carmen Rodriguez-Avial , Esther Culebras, Juan J. Picazo, (2003) . Distribution of tetracycline resistance genes tet(M), tet(O), tet(L) and tet(K) in blood isolates of viridans group streptococci harbouring erm(B) and mef(A) genes. Susceptibility to quinupristin/dalfopristin and linezolid . International Journal of Antimicrobial Agents ; 21 : 536-541 .

11- Danbing .Ke , Maurice Biossinot , Ann Huletsky , Francois Picard , Johanne Frentte , Marc oullette , Paul H.Ray and Michel G. Bergeron (2000) . Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in enterococci . J Bacterial . 182 (24) : 6913 -6920 .

12- Baron ,E.J. and Finedgold , S.M. (1990) Diagnostic microbiology . 8th ed . Mosby –Year – Book . Inc. Missouri . USA.

13- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stalyt, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey`s manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Publication. 9th ed. London, New York.

14- Vandepitte, J. ; Engback, K. ; Piot, P. and Heuck, C.C.(1991).Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO., Geneva. , PP: 78-110.

15- Arif,Sehand K. and Salih, layla I.F. (2010). Identification of Different Categories of Diarrheagenic Escherichia coli in Stool Samples by Using Multiplex PCR Technique . J. Medical Sciences. 2(5): 237-243.

16- Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF (2006) . The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic Escherichia coli in Europe and Canada. J Antimicrob Chemother ;57:666–72.

17- Melican, K. ; Sandoval, R. M. ; Abdul-Kader ; Josefsson, L. ; Tanner, G. A. ; Molitoris, B. A. and Richter-Dahlfors, A. (2011) . Uropathogenic Escherichia coli P and type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction . PLoS Pathogens , 7 (2): 100-112.

18- Francis. M, Francois j. p , Louis G , Paul H. Roy , Marc Ouellette (2000) . Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patient sinfected after cardiac surgery . j .

of Antimicrobial chemotheraoy ; 46 : 527-533.

19- Al-Talib H , Yean CY, Al -Khteeb A, Hassan H, Singh KB, Al- Jashamy K, Ravichandran A (2009). Apentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus and Panton _Valentine Leucocidine .J.BMC Microb .9:1471-2180.

20- Birgit Strommenger, Christiane Kettlitz, Guido Werner, and Wolfgang Witte ., (2003) . Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Staphylococcus aureus . journal of clinical microbiology; 41 (9) : 4089–4094.

21- Su Mi Choi, Seung-Han Kim ,Hee-Jung Kim , Dong-Gun Lee, Jung-Hyun Choi, Jin-Hong Yoo, Jin-Han Kang , Wan-Shik Shin, Moon-Won Kang .(2003). Multiplex PCR for the Detection of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Methicillin Resistance among Staphylococcus Species . J Korean Med Sci ; 18: 631-6.

22- Nizami Duran, Burcin Ozer, Gulay Gulbol Duran , Yusuf Onlen and Cemil Demir (2012). Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in staphylococci . Indian J Med Res. 135 : 389-396 .

23- Surbhi Malhotra-Kumar, Christine Lammens, Jasper Piessens, and Herman Goossens .(2005) . Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Macrolide and Tetracycline Resistance Determinants in Streptococci . antimicrobial agents and chemotherapy, 49 (11) , p. 4798–4800 .

24- Louis Davignon, Elizabeth A. Walter, Kate M. Mueller, Christopher. P and Barrozo .(2005) . Use of Resequencing Oligonucleotide Microarrays for Identification of Streptococcus pyogenes and Associated Antibiotic Resistance Determinants . journal of clinical microbiology, 43 (11) : 5690–5695 .

25- Vanesa Reijtman , Paula Gagetti , Diego Faccone , Sofía Fossati , Patricia Sommerfleck, Claudia Hernández, Patricia Bernáldez, Horacio Lopardo, and Alejandra Corso . (2013) . Macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae isolated from Argentinian pediatric patients suffering from acute otitis media . J Rev Argent Microbiol ;45(4):262-266 .

26- Corso A, Faccone D, Galia C, Gagetti P, Rodríguez M, Pace J and Regueira M, (2009). The Argentinean SIREVA working group. Prevalenceof mef and ermB genes in invasive pediatric eritromycinresistance Streptococcus pneumoniae isolates from Argentina. Rev Argent Microbiol.;41:29-33.

Using Multiplex PCR Technique for Detection of Some Pathogenic Gram Positive bacteria and Determination of Its Antibiotic Resistance

Abstract:- 450 samples were collected from different pathological cases (urine, wounds, Burns, stool, and nasal and pharyngeal swabs) from November 2014 through February 2015. 60 samples were diagnosed as *Staph. aureus* and 35 samples were *Strep. pyogenes* using phenotypic, cultural and biochemical diagnosis features and definitely diagnosed with Vaitek test. Results of antibiotic resistance against different antibiotics showed variations in their resistance to these antibiotics, and 10 isolates were selected of each gender on the basis of variation in antibiotic resistance. A number of primers were designed to detect bacteria use distinct gene and also to detects resistance to antibiotics using multiplex PCR. Agarose gel electrophoresis for polymerization reaction showed that all *Staph. aureus* isolates had *fem*A which might be used as detection marker where all *Strep. pyogenes* had *Tu(tuf)*, in the same reaction of multiplex PCR ,detection of seven genes related with resistance to different antibiotic groups (Amp, tetR, Tri, Gen, Imp, Qnl and mecA) were done, all *Staph. aureus* contained Imp,Gen,*mec*A, *tet*R,Tri, and Qnl genes while its varied in their contain of Amp gene . Also all *Strep. pyogenes* had Tri,Gen,Amp and *mec*A genes while its varied in their contain of Qnl which not detected in all isolates. From this study it's easy to use multiplex PCR to detect pathogenic bacteria along with their antibiotic resistance without need to long routine work.