P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (3) :166-171

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

تحديد الجين *vanA* المشفر لمقاومة الفانكومايسين على الدنا الكروموسومي والبلازميدات في المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من خمج الجروح.

مشتاق طالب صالح* احمد محمد تركي** ميادة عبدالله شيحان**

*جامعة الانبار – كلية الصيدلة

**جامعة الانبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127640

الكلمات المفتاحية:

الجين *vanA* ،
الفانكومايسين ،
المكورات العنقودية الذهبية ،
خمج الجروح.

الخلاصة:

في هذه الدراسة تم تحديد المقاومة للفانكومايسين مبدئيا من خلال نمو العزلات على وسط مولر هنتون اكار الحاوي على الفانكومايسين بتركيز (٦ مايكروغرام / مل) وكانت نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد ٢٥%(٢٤/٩٦)، وقد عزل الدنا الكروموسومي والبلازميدات بالاعتماد على طرق قياسية وعند تضخيم الجين *vanA* ذي الحجم ١٠٣٢ زوج قاعدي والترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ظهر أن ٥٠% (٢٤/١٢) من العزلات المقاومة للفانكومايسين تمتلك هذا الجين على الدنا الكروموسومي و٢٠,٨% (٢٤/٥) تمتلكه على البلازميدات.

المقدمة

يعتبر الفانكومايسين Vancomycin هو العلاج المفضل لعلاج الالتهابات الناتجة عن المكورات العنقودية المقاومة للمثيسلين ولكن الاستخدام الخاطئ والإفراط في استخدام هذا المضاد أدى الى ظهور نوعين من المقاومة للمضادات الكلايكوببتيدية النوع الاول هي المكورات العنقودية المتوسطة المقاومة للفانكومايسين Intermediate Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* التي تتعلق بتثخن الجدار الخلوي والعبور الضئيل لهذا المضاد عبر الجدار الخلوي وينتج عن ذلك تراكم جزيئات D– alanyl – D– alanine (D–Ala–D–Ala) أما النوع الثاني هي المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للفانكومايسين Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* الناتجة عن اكتساب الاوبرون *VanA* operon من بكتريا *Enterococcus spp.* الذي ينتقل على القافز *Tn1546* وينتج عنه مقاومة عالية المستوى [1,2] وفي هذا النوع من المقاومة يقوم المضاد بتثبيط صنع الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة لصبغة كرام عن طريق ارتباطه بنهايات C-terminal –D-Ala-D-Ala لبوادئ الببتيدوكلايكان الخماسية pentapeptide precursor of peptidoglycan مسببة غلق تفاعلات نقل الببتيدات والكلايكوسيدات transglycosylation and transpeptidation reaction [3] وسجلت أول حالة مقاومة عالية المستوى للكلايكوببتيدات في البكتريا المعوية enterococci سنة ١٩٨٨[4] بعد ثلاثين سنة تقريباً من دخول هذا المضاد في المجال الطبي ومنذ ذلك الوقت انتشرت حالة المقاومة للكلايكوببتيدات عبر العالم وهناك سبعة انواع من المقاومة التابعة لوجود الجينات في بكتريا enterococci (VanA,B,C,D,E,G,and,L) يقابلها الاوبرونات الخاصة بها vanA,B,C,D,E,G and L operones.

المواد وطرق العمل

جمع العينات

أستخدمت المسحات القطنية الجاهزة المجهزة بوسط تناقل Transport medium المصنعة من شركة Greiner Germany في جمع نماذج الجروح من ١٦٧ مريضاً راقدين ومراجعين للعيادات

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Pharmacy .E-mail address:

الإستشارية في مستشفى الرمادي العام ولمختلف الفئات العمرية ولكلا الجنسين للفترة من شباط ولغاية تموز ٢٠١٣.

تشخيص العزلات

تم تشخيص العزلات بالإعتماد على الفحوصات البكتريولوجية. والكيموحيوية إعتماداً على المصادر العلمية المتبعة لتشخيص البكتريا [5, 6].

الكشف عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للفانكومايسين

تم اختيار العزلات التي أظهرت مقاومة للاوكساسيلين للكشف عن مقاومتها للمضاد الفانكومايسين بالطرق التالية:

١. الكشف عن المقاومة لـ Vancomycin بطريقة الصب على أطباق الاكار (وسطي اكار المولر هنتون ووسط اكار المانيتول المالح) الحاويان على الفانكومايسين بتركيز ٦ مايكروغرام / مل.

٢. تحديد التركيز المثبط الادنى MIC للفانكومايسين لهذه العزلات بطريقة التخفيف بالمرق المغذي.

عزل الـدنا الكرموسومي

تم استخلاص الـ DNA الكروموسومي بطريقة المسح القاعدي وباستخدام.promega kit

التقدير الكمي للـدنا الكرموسومي DNA quantitation

حضرت نماذج الـ DNA من البكتريا قيد الدراسة *Staphylococcus aureus* وقدرت كمياً بأخذ (٢٠) مايكروليتر من الدنا وأضيف له ٩٨٠ مايكروليتر من TE buffer ثم مزجت جيداً وقيست الأمتصاصية عند الطول الموجي باستخدام جهاز ألمطياف ألضوئي Spectrophotometer واستخدام TE buffer كمحلول سيطرة (Blank) وتقدر نقاوة الدنا من حاصل قسمة قراءة الامتصاصية عند طول موجي ٢٦٠ نانوميتر على قراءة الامتصاصية على طول موجي ٢٨٠ نانوميتر [7]. وحفظت جميع النماذج بدرجة حرارة – ٢٠ °م لحين الاستخدام.

تركيز الـ DNA(DNA concentration) مايكروغرام/ مايكروليتر = (القراءة عند الكثافة الضوئية بطول موجي٢٦٠) × الكل/ حجم النموذج × الثابت (٥٠ مايكروغرام/١٠٠٠مايكروليتر) والناتج يقدر بواسطة (التركيز × الحجم الكلي).

خطوات تفاعل الكوثرة Polymerase Chain Reaction الخاصة بـ الجين المراد تحديده.

الجدول التالي يوضح خطوات تفاعل الكوثرة الخاصة بـ الجين المراد دراستها.

جدول رقم (١) يوضح خطوات تفاعل الكوثرة(PCR) الخاصة بتضخيم الجين *vanA* gene.

مسخ بادئي Initial Denaturation	١٠ دقيقة	٩٤ °م	
مسخ Denaturation	٣٠ ثانية	٩٤ °م	٣٥ cycles دورة
اتحاد والتحام Annealing	١ دقيقة	٥٠ °م	
استطالة Extension	١:٣٠ثانية	٧٢ °م	
استطالة نهائية Final Extension	١٠ دقيقة	٧٢ °م	
Hold temperature	١٠ دقيقة	٤ °م	

تتابع البادئ الخاص بالجين *vanA* Sequences of gene *vanA* Primer

VanA F 5' ATGAATAGAATAAAAGTTGC3' 1032 bp

VanA R 5' TCACCCCTTTAACGCTAATA 3

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

تم تشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية في (١٦٧) عينة من عينات الجروح جمعت من المرضى المشمولين بالدراسة في مستشفى الرمادي العام وقد عزلت بنسبة ٥٧,٥% (٩٦/١٦٧) واعتمد تشخيص البكتريا في هذه العينات على الصفات الزرعية لمستعمراتها النامية على وسط mannitole salt agar واكار الدم blood agar. واظهر الفحص المجهري والتصبيغ بصبغة كرام انها مكورات موجبة لصبغة كرام وتنتظم على هيئة تجمعات وعناقيد العنب grape like shape وغير مكونة للابواغ وغير متحركة باختبار فحص الحركة ، أما نتائج الاختبارات الكيموحيوية للعزلات فكانت كما هو مبين في الجدول (٢).

جدول رقم (٢) يبين نتائج الاختبارات الكيموحيوية للعزلات قيد الدراسة.

الاختبارات	Gram – staining	Oxidase	Catalase	Coagulase	Motility	Thermonuclease	Haemolysis	Growing on MSA
النتيجة	+	+	+	+	-	+	α - 42% β-58%	1

+:جميع العزلات اعطت نتيجة موجبة

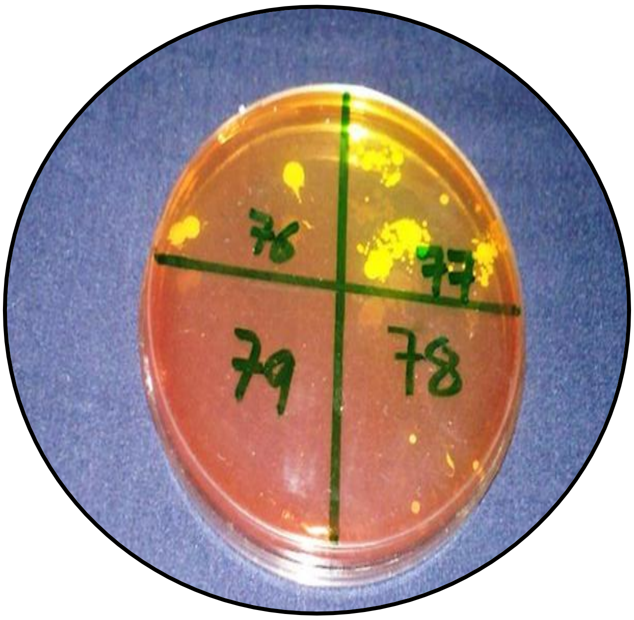
–:جميع العزلات اعطت نتيجة سالبة

Mannitol salt agar -:MSA

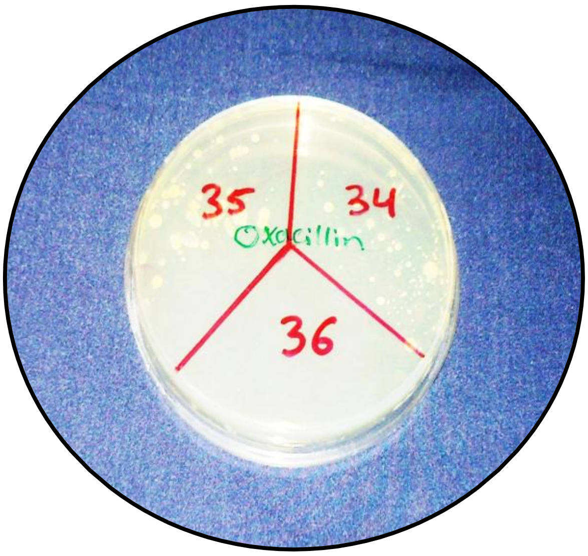
إن إنتاج أنزيم *nuc*lease يعتبر مؤشر قوي potent indicator للمكورات العنقودية الذهبية المرضية *Staphylococcus aureus* على مدى العقود الاخيرة [8] وان جميع عزلات *Staphylococcus aureus* قيد الدراسة ١٠٠% كانت منتجة له وان فعالية هذا الانزيم thermo*nuc*lease في العزلات السريرية تكون بسبب تكسر او تحطم DNA الموجود في الوسط الزرعي عن طريق انتاج هذا الانزيم الذي له القدرة على تحطيم DNA [9].

الكشف الاولي عن المقاومة للمثيسيلين والفانكومايسين باستخدام طريقة اطباق الاكار.

بعد استخدام اوساط Muller-Hinton agar ووسط Mannitol salt agar الحاويين على المضادين الاوكساسيلين والفانكومايسين بتركيز ٦مايكروغرام/مل و ١٦مايكروغرام/مل لكل من المضادين وعلى التوالي وبصورة منفردة. وذلك للكشف مبدئيا عن المقاومة للمثيسيلين والفانكومايسين فظهور النمو في الاطباق دليل على مقاومة هذه البكتريا للمضاد الموجود في الوسط الزرعي كما في الشكل رقم (١) و(٢).



شكل رقم (١) توضح الكشف الاولي عن المقاومة للمثيسيلين على وسط Mannitol salt agar الحاوي على الاوكساسيلين حيث تظهر المستعمرات المقاومة لهذا المضاد في العزلات S76 ،S77 ،S78

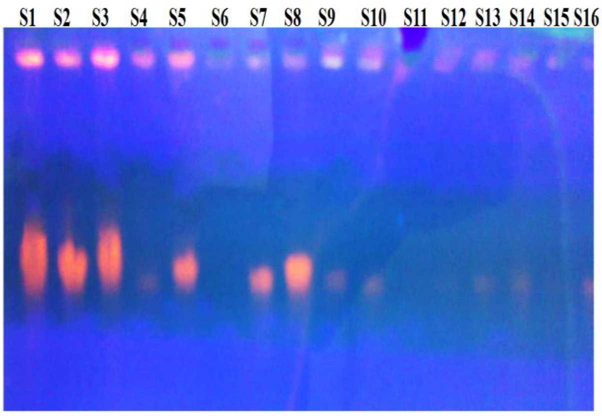


شكل (٢) يوضح الكشف الاولي عن المقاومة للفانكومايسين على الحاوي على الفانكومايسين حيث تظهر Muller_ Hintone agar المستعمرات المقاومة له في العزلة S34،S35 ولم يظهر أي نمو في العزلة S36

استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين الـ DNA.

ترحيل الحامض النووي قبل اجراء تفاعل الكوثرة (Pre-PCR).

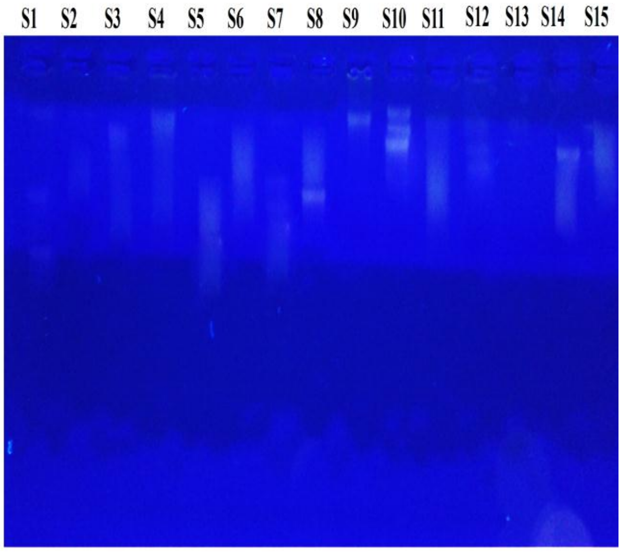
تم عزل الـ DNA من عزلات المكورات العنقودية الذهبية قيد الدراسة باستخدام promega kit وبعد قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص Specctrophotometer ومن ثم تطبيق المعادلة الخاصة بذلك ثم تم ترحيل الحامض النووي على هلام الاكاروز وكانت النتيجة كما في الشكل(٣).



شكل رقم (٣) يوضح نتيجة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (0.7%) بصبغة بروميد الاثيديوم قبل اجراء تفاعل الكوثرة Pre –PCR لجينوم المكورات العنقودية الذهبية.

استخلاص البلازميدات :

تم استخلاص البلازميدات بطريقة التحلل القاعدي المحورة modified alkaline lysis method باستخدام (Geneid kit) وتم ترحيل البلازميدات على هلام الاكاروز.



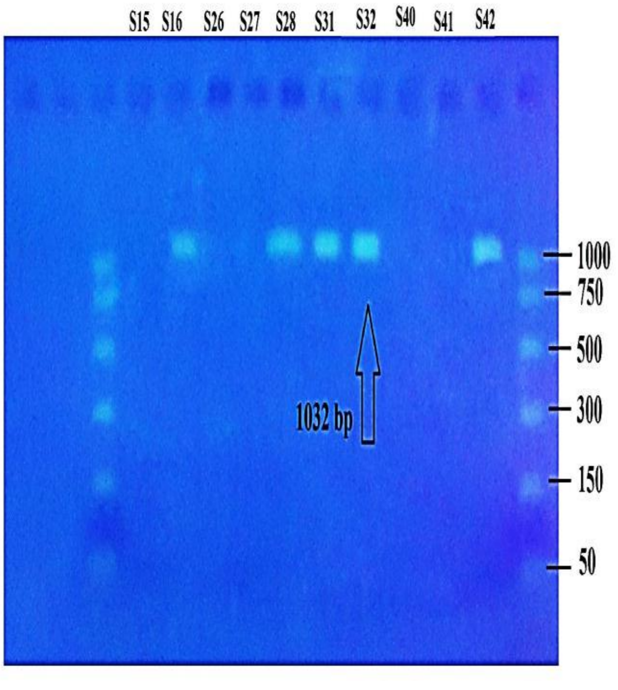
شكل رقم (٤) يوضح نتيجة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (0.7%) بصبغة Redsafe stain قبل اجراء تفاعل الكوثرة pre_PCR لبلازميدات المكورات العنقودية الذهبية

تحديد الجينات *van A* و*van B* في العزلات المرضية المقاومة للفانكومايسين.

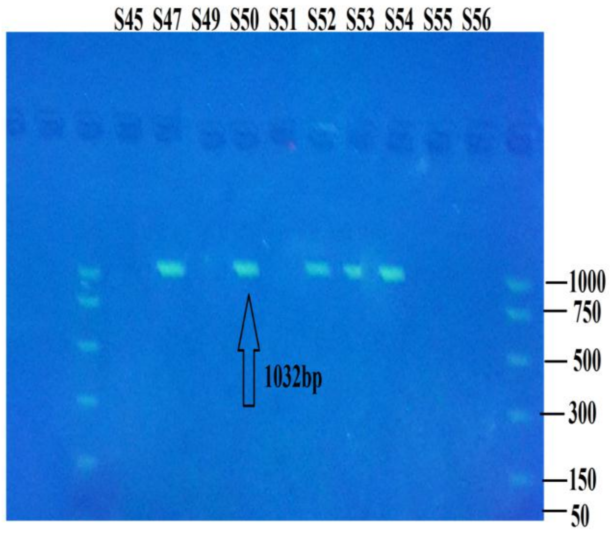
من خلال هذه الدراسة كانت نسبة المقاومة للفانكومايسين هي ٢٥% من خلال اختبار الاطباق الحاوية على ذلك المضاد بتركيز (٦مايكروغرام/مل) أي ان ٢٥% من العزلات كانت مقاومة مبدئيا للفانكومايسين عند المسح الاولي لتحديد المقاومة لهذا المضاد وفي دراسة اخرى [10] وعند اجراء المسح او الكشف الاولي لتحديد المقاومة للفانكومايسين وجد ان ٢٨% من العزلات كانت مقاومة لهذا المضاد.

وبعد الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز تم تحديد الجين *vanA* في (١٢) عزلة أي بنسبة (٥٠) % كما هو واضح على الـ DNA الكروموسومي في الشكل (٥) ، اما على البلازميدات فقد تم تحديد *van A* في (٥) عزلات اي بنسبة ٢٠,٨% كما في الشكل (٦).

يعتقد ان الآلية الحقيقة للمقاومة للفانكومايسين في بكتريا *Staphylococcus aureus*ناتجة عن اكتساب مجموعة جينات *vanA* التي تشفر المقاومة للفانكومايسين في بكتريا *Enterococcus* وقد أنجزت هذه الظاهرة مختبريا واثبت وجود sex pherones في بكتريا *Staphylococcus aureus* يساعد على انتقال هذه الجينات من *Enterococcus* spp. وان تحرر sex pherones من بكتريا *Enterococcus* القريب من بكتريا *Staphylococcus aureus* يؤدي الى انتقال البلازميد المشفر لمجموعة جينات *van A* genes لهذه البكتريا[11]. وبعد دخول بلازميد المكورات المعوية enterococci الى بكتريا *Staphylococcus aureus* فانه أما يبقى محافظ على نفسه دون أن يندمج مع الكروموسوم ويعبر عن نفسه ذاتيا [12] وان التعبير عن جينات المقاومة للفانكومايسين تحث فقط عند وجود ذلك المضاد أي تحت تأثير الضغط الانتخابي selective pressure له [13]. وان ظهور المقاومة للمضادات الكلايكوببتيدية كان نتيجة الاستخدام العشوائي واللامنطقي وبدون وصفة طبية لهذه المضادات وان ظهور العزلات المقاومة المتوسطة المقاومة VRAS وVISA ينتج من الضغط الانتخابي selective pressure للفانكومايسين [14, 15].



شكل (٥) يوضح نتيجة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(٢%) بصبغة Red safe حيث يلاحظ الحزم المضخمة للجين vanA من عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للفانكومايسين حيث تم تحديد الجين في العزلات (S16, S28, S31, S32, S42) بينما لم يتم تحديد هذا الجين في العزلات (S15, S26, S27,S40 , S41).باستخدام الدليل الحجمي bench top على اليمين واليسار كمعلم لتعيين حجم الجين.



شكل (٦) يوضح نتيجة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(٢%) بصبغة **Red safe** حيث يلاحظ الحزم المضخمة للجين **vanA** من عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للفانكومايسين حيث تم تحديد الجين على البلازميدات في العزلات (**S47, S50, S52, S53 54**) بينما لم يتم تحديد هذا الجين في العزلات (**S45, S49, S51, S55, S56**).باستخدام الدليل الحجمي **bench top** على اليمين واليسار كمعلم لتعيين حجم الجين.

المصادر:

1- Baptista M, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P, Arthur M (1997). Mutation leading to increased levels of resistance to glycopeptides in vanB type enterococci. Mol.Microbiol.25:93-105.

2 - Sakoulas G, Moise -Boder PA , Schentag J, Forrest RC, Moellering JR, Eliopoulos GM (2004). Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin resistant Staphylococcus aureus bacteremia.J.clin.Microbiol.42:2398 -2402.

3- Patel JB , Jevitt LA , Hageman J, McDonald LC, Tenover FC (2008). An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus. J.Clin. Infect. Dis.42:1652-1654.

4- Kirkpatrick BD, Marrington SM , Smith D , Marcellus D, Miller C, Dick D, Karanfil L , Perl TM (1999).An outbreak of vancomycin dependent Enterococcus faecium in a bone marrow transplant unite.Clin.infect.Dis.29:1268-1273.

5- Baron ET, Peterson LR, Finegold SM. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.19th ed.Toronto : Mosby company 1994: 352-385.

6- Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley Jt, Williams ST.Berges's manual of determination bacteriology.9th ed. USA 1994.

7- Samborook J, Fritch EF , Maniatis T (1989).Molecular cloning a laboratory Mnual (2nd ed). Cold soring , Harbor Laboratory Press.New York.

8- DiSalvo JW(1958). Deoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci.Med Tech Bull.9:191-196.

9- Lachica RVF , Genigeorgis C, Hoeprich PD(1971). Metachromatic agar diffusion methods for detecting Staphylococcal nuclease activity.J.Appl.Microbiol.21:585-587

10- Subhankari P, Santanu KM , Manjursi B , Somenath R (2011). Isolation and identification of vancomycin resistant Staphylococcus aureus from post operative pus sample.AJMS 4(2):152-168. Al Ameen J. Med Sci4(2):152-168.

11- Showsh SA , De Boever RH , Clewell DB (2001). Vancomycin resistant plasmid in Enterococcus faecalis that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by Staphylococcus aureus.Antimicrob agent chemother.45:2177-2179.

12- Perichon B and Courvalin P (2009).VanA type vancomycin resistant Staphylococcus aureus.Antimicrob agent chemother.53.4580-4587.

13- Courvalin P (2006).Vancomycin resistant in gram positive cocci.Clin Infect Dis.42:S25 – S34.

14- Gardate S , Wu SW, Gill S, Tomasz A (2006). Role of VraSA in antibiotic resistant and antibiotic induced stress response in Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin.J. Antimicrobial agent and chemother.50: 3424 – 3434.

15- Pillaia SK, Wennersten C, Venkatarman et al (2009).Development of reducd vancomycin susceptible Stapylococcus aureus.clin infect Dis.49:1169.

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the common causes of hospital and community acquired infections and treatment of Staphylococcal infections is complication because ability of this bacteria species to resistant to antibiotics.In this study vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* were grew on Muller hintone agar contain vancomycin (6µg / ml) with percentage 25% (24/96) , Genomic DNA and plasmids isolated from isolates using standard producers. *VanA* gene amplification using PCR and suitable primers. The amplification gene was produced 1032bp at agarose gel electrophoresis.*VanA* gene was detected in 50% (12/24) on chromosomal DNA and in 20.8% (5/25) on plasmid of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*.