IRAQI Academic Scientific Journals
Samarra Journal of Pure and Applied Science
SJPAS
مجلة سامراء للعلوم البحتة والتطبيقية
www.sjpas.com
p ISSN: 2663-7405
e ISSN: 2789-6838

التشخيص الجزيئي مع دراسة نمط حساسية المضادات الحيوية للبكتريا المرضية المعزولة من أخماج تسمم الدم في مستشفيات مدينة الرمادي

مريم نوري صكر1*، هناء عبد اللطيف ياسين 2

1- قسم علوم الحياة، كلية التربية للبنات، جامعة الانبار، العراق
2- كلية التربية للبنات، جامعة الانبار، العراق

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
https://doi.org/10.54153/sjpas.2025.v7i1.897

معلومات البحث:

تأريخ الاستلام: 2024/04/19
تأريخ التعديل: 2024/05/09
تأريخ القبــول: 2024/06/20
تأريخ الــنشر: 2025/03/30

الكلمات المفتاحية:

العزلات البكتيرية، تسمم الدم، التشخيص الجزيئي، المضادات الحيوية

معلومات المؤلف

الايميل:
mar22w4006@uoanbar.edu.iq

الموبايل:07829239296

الخلاصة:

جمعت 150 عينة من أخماج تسمم الدم للمرضى في مستشفى النسائية والأطفال و مستشفى الرمادي التعليمي العام في مدينة الرمادي(محافظة الانبار) خلال الفترة من 2023/7/31 الى 2023/11/1، زرعت العينات على وسط الدم الصلب و وسط الجكليت الصلب و وسط الماكونكي الصلب و وسط المانيتول الملحي الصلب، اظهرت النتائج ان 36 عينة دم من مجموع 150 عينة كانت إيجابية الزرع بينما 114 عينة كانت سلبية الزرع، اشارت نتائج تشخيص العزلات البكتيرية أنّ المسبب الأكثر للإصابة بتسمم الدم هي بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. بنسبة 61% من مجموع العزلات البكتيرية، تليها بكتريا الكلبسيلا الرئوية *klebsiella pneumoniae* بنسبة 28%، ثم بكتريا الزوائف الزنجارية *pseudomonas aeruginosa* بنسبة 11% من مجموع العزلات البكتيرية وهي اقل نسبة في حدوث الإصابة بانتان الدم، إذ شخصت العزلات بواسطة الاختبارات البكتريولوجية والبايوكيميائية وجهاز الفايتك كما تم تأكيد تشخيصها جزيئيا بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، بالإضافة الى ذلك تم اختبار المقاومة لعشرة أنواع من المضادات الحيوية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة بطريقة الانتشار حول الاقراص، شملت المضادات كل من(Amikacin و Doxycilline و Augmentin وLinezolid و Imipenem و Levofloxacin و Trimemtheprim و Gentamicin و Rifampicin و Aztreonam)، أوضحت نتائج اختبار المقاومة للمضادات الحيوية اختلاف كبير في نسب المقاومة والحساسية للانواع البكتيرية.

المقدمة

يعد تسمم الدم مشكلة صحية تهدد حياة المرضى، اذ ترتفع معدلات الإصابة والوفيات فتصل الى 30 مليون حالة سنويًا في كل ارجاء العالم [1]، غالبا ما تحدث الإصابة بتسمم الدم المكتسب في المستشفيات بسبب البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل المكورات العنقودية الغير مخثرة للبلازما والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* وكذلك البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل بكتريا *pseudomonas* و *klebsiella* [2].

إنّ زراعة الدم أفضل وسيلة حديثة لتوفير المعلومات اللازمة للكشف عن مجاميع متنوعة من مسببات انتان التي من ضمنها البكتريا الهوائية واللاهوائية ونتيجة لتأخر نتائج الزرع إلى 24 ساعة أو أكثر يعطى للمريض الادوية التجريبية خوفا من فقدان حياته بسبب انتان الدم، اذ يواجه الأطباء صعوبة في تشخيص المزارع السلبية بسبب تناول المريض المضادات الحيوية قبل التأكد من الإصابة الفعلية للانتان؛ وحتى لا يحصل مثل هذا الارباك من الضروري التوقف عن استخدام المضادات الحيوية التجريبية عند استبعاد الإصابة، اما للكشف عن الفيروسات والطفيليات وبعض الفطريات المسببة لتسمم الدم فتستخدم وسائل إضافية أخرى[3]،يزداد الخطر الذي يسببه مرض تسمم الدم Septicemia عند تباطؤ التدخل لذلك من المهم ان يتم التحديد المبكر

للانتان والعلاج المنظم [1]. بصورة عامة لم يتم إيجاد علاج مثالي لحالات الانتان أو حتى التخفيف من حدته على مختلف المراحل [4]، تعد البكتريا المقاومة للأدوية المتعددة من مسببات حدوث انتان الدم بما في ذلك بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين Methicillin-Resistant *S. aureus* التي توجد بصورة طبيعية في البيئة وكذلك على جلد الأشخاص الأصّحاء كما يكثر تواجدها في الانف، ولكن عند دخول هذه البكتريا الى مجرى الدم وتكاثرها داخله تسبب التهابات خطيرة يصعب علاجها[5].

تشكل مقاومة مضادات الميكروبات مصدر خطر وقلق كبير على الصحة العامة، كما إنها تعتبر عبئ مالي وصحي ثقيل على الافراد الذين يعانون من المرض ونظام الرعاية الصحية والبيئة [7،6]، في عام 2050 من المحتمل ان يتخطى معدل العدوى المقاومة 10 ملايين سنويا، وبسبب العدوى المقاومة فأن مقاومة مضادات الميكروبات تمثل مشكلة عالمية[8]. هدفت الدراسة إلى عزل الأنواع البكتيرية المسببة لحالات تسمم الدم وتشخيصها بواسطة الطرق التقليدية وتأكيد التشخيص جزيئيا بواسطة تقنية PCR بالإضافة الى دراسة مدى مقاومتها للمضادات الحيوية.

المواد وطرق العمل

جمع العينات Collection of samples

جمعت 150 عينة من اخماج تسمم الدم للمرضى في مستشفى النسائية والأطفال و مستشفى الرمادي التعليمي العام في مدينة الرمادي ولكلا الجنسين وبمختلف الاعمار(أطفال وبالغين)، خلال الفترة من 2023/7/31 الى 2023/11/1، كانت 36 عينة دم من مجموع 150 إيجابية الزرع، سحبت عينات الدم من المرضى مع مراعاة ظروف التعقيم التامة، اذ عقمت منطقة سحب الدم بالكحول الاثيلي 70% وبعدها مسحت بالايودين10% ثم تترك المنطقة لتجف وبعدها يتم سحب الدم بواسطة المحقنة المعقمة وينقل الى القناني الخاصة بجهاز التنبيه البكتيري Bact Alert، عند ظهور مؤشر يدل على وجود البكتريا على شاشة الجهاز تخرج القناني من الجهاز وتزرع العينات على الأوساط التالية: وسط اكار الدم Blood agar، و وسط اكار الدم المطبوخ Choclate agar، و وسط اكار الماكونكي MacConkey agar ، و وسط اكار المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar وبعدها توضع الاطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 مْ. ولتشخيص العزلات البكتيرية استخدمت الاختبارات البكتريولوجية والكيموحيوية و جهاز (Vitek-2) بالإضافة الى تأكيد التشخيص جزيئيا بواسطة تقنية PCR.

تشخيص العزلات البكتيرية بأستخدام PCR

استخلاص DNA من العزلات البكتيرية

استخلص DNA من جميع العزلات البكتيرية، وذلك وفق إرشادات الشركة (Promega) المجهزة للعدة المستخدمة في الاستخلاص وكما يلي:

1- بعد تنشيط العزلات البكتيرية على وسط Brain-Heart Infusion Broth يتم وضع 1 مليلتر من المزروع البكتيري في ابندروف ثم ترسب بأستخدام Centrifuge وبسرعة(13000 دورة) في الدقيقة الواحدة وذلك لمدة دقيقتين، اذ يهمل الرائق بعدها و يأخذ الراسب.

2- يضاف 80 مايكروليتر من Phosphate Buffer Saline للعزلات التي تتفاعل بشكل إيجابي مع صبغة كرام وذلك لإسالة الخلايا العالقة وبعدها يضاف لها 20 مايكروليتر من انزيم اللايسوزايم Lysozyme، اذ يساعد هذا الانزيم على تفكيك طبقة الببتيدوكلايكان layer Peptidoglycan. بعد ذلك يتم مزج المحاليل المضافة مع العزلات داخل الانابيب ثم توضع داخل thermomixerعند 45 مْ وذلك لمدة ساعة.

3- يتم اضافة 200 مايكروليتر من Lysis Buffer لجميع العزلات البكتيرية؛ وذلك لتفكيك الغشاء الخلوي Cell Membrane، ثم يضاف 20 مايكروليتر من Protenase K، بعدها تمزج الانابيب جيدا بواسطة Vortex ثم توضع في جهاز thermomixer .

4- يضاف 200 مايكروليتر من محلول Binding buffer للعزلات وتمزج مع العينات بصورة جيدة بواسطة المازج Vortex، بعدها يتم ادخال العزلات الى thermomixer ولمدة 10 دقائق.

5- يضاف 200 مايكروليتر من الايثانول للعزلات وتمزج العينات بواسطة المازج Vortex، ثم ينقل المحلول الى filter spin column وبعدها يتم استخدام جهاز النبذ المركزي Centrifuge للتخلص من الأشياء التي تم تحليلها سابقا للحصول على DNA البكتيري.

6- في هذه الخطوة يتم غسل سطوح الحامض النووي البكتيري، حيث يتم وضع الفلتر الحاوي على الحامض النووي لكل عزلة في انبوبة جمع جديدة Collection tube ويضاف لكل عزلة 500 مايكروليتر من Washing 1 ثم تنبذ بواسطة Centrifuge

بسرعة 13000 دورة لكل دقيقة.ثم يتم التخلص من المحلول عن طريق اهمال انبوبة الجمع اما spin column الحاوي على الحامض النووي فيوضع داخل انبوبة جمع جديدة.

7- يضاف 500 مايكروليتر من Washing 2 للحصول على DNA نقي (أي خالي من أي شوائب او محاليل قد تكون عالقة فيه)، ثم ينبذ بواسطة Centrifuge بسرعة 13000 دورة لكل دقيقة. حيث يتم اهمال محلول الغسل ويبقى spin column الحاوي على الحامض النووي النقي.

8- يوضع spin column الحاوي على DNA النقي في ابندروف جديدة ثم يضاف 200 مايكروليتر من Elution Solution؛ يساعد هذا المحلول على اذابة الحامض النووي، يتم وضع العينة بعدها بجهاز Mini SpinCentrifuge بسرعة (13000 دورة) في الدقيقة، حيث يتم الاحتفاظ بالحامض النووي داخل الابندروف ويهمل spin column، ثم يتم تسجيل معلومات العينة على الانبوبة.

9- لقياس تركيز DNA داخل الانبوبة يضاف 1 مايكروليتر من الحامض النووي و 1 مايكروليتر من (الصبغة الفلورنسية المخففة مع 199 مايكروليتر من محلول TAE) الى الانبوبة ثم ترج وتحضن في الظلام لمدة 10 دقائق، ويقاس تركيز DNA بواسطة جهازQuantus Fluorometer بوحدة النانو غرام/ المايكروليتر.

10- يتم حفظ العينات لحين الاستخدام عند درجة - 20 مْ.

تحضير محاليل البوادئ

خففت البوادئ الامامية والخلفية لغرض الحصول على تركيز 100 بيكومول/ميكروليتر، اذ تم إضافة 250 ميكروليتر من Ion-free water الى كل من البادئ الامامي والخلفي وذلك وفق تعليمات الشركة الكورية المصنعة؛ لتصبح بوادئ خزينة يتم حفظها عند درجة حرارة - 20 مْ. ولكل نوع بكتيري يمزج 10 ميكروليتر من البادئ الخزين مع 90 ميكروليتر من الماء المقطر الخالي من الايونات بواسطة جهاز المازج الدوار Vortex للحصول على بادئ بتركيز 10 بيكومول/ ميكروليتر. الجدول 1 يوضح البادئات المستخدمة في الدراسة.

الجدول 1: البادئات المستخدمة في الدراسة العائدة للجين 16SrRNA

تسلسل	اسم البكتريا	تتابع البادئ		الحجم الجزيئي	درجة حرارة الارتباط
1	Pseudomonas aeruginosa	F	TGCCTGGTAGTGGGGGATAA	506	54
		R	GGATGCAGTTCCCAGGTTGA		
2	Klebsiella pneumoniae	F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1501	45
		R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
3	Staphylococcus aureus	F	TGTCGTGAGATGTTGGG	270	47
		R	CGATTCCAGCTTCATGT		
4	Staphylococcus hominis	F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1513	45
		R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
5	Staphylococcus haemolyticus	F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	1387	53
		R	GGGCGGTGTGTACAAGGC		
6	Staphylococcus epidermidis	F	GGCGACTTTCTGGTCTGTAACT	285	55
		R	CTAGAGGGGTCAGAGGATGTCA		

البادئ الامامي: F ، البادئ العكسي: R

التحري عن جين التشخيص 16SrRNA بأستخدام PCR

بأستخدام تقنية PCR بواسطة جهاز التدوير الحراري Thermal cycler شخصت الانواع البكتيرية عن طريق التحري عن جين التشخيص 16SrRNA، حيث تم تحضير خليط التفاعل من 12.5 ميكروليتر من Green Master Mix و 4 ميكروليتر من عينة الحامض النووي المستخلص من العزلات البكتيرية بالإضافة الى 1 ميكروليتر من Fowerd Primer و1 ميكروليتر من

Reverser Primer، كما يتم إضافة 6.5 من الماء المقطر الخالي من الايونات، للحصول على 25 ميكروليتر من الحجم النهائي للخليط، يتم خلط المكونات بعد تحضيرها بواسطة جهاز المازج الدوار Vortex ، ثم توضع العينات داخل جهاز التدوير الحراري Thermal cycler بعد ضبط البرنامج الخاص بالعينات الموجودة، حيث تختلف درجة حرارة ارتباط البوادئ بأختلاف الأنواع البكتيرية فهي تتراوح بين (45-55) مْ للعينات البكتيرية قيد الدراسة، كما هو موضح في الجدول 2. يتم بعد ذلك اخذ 10 ميكروليتر من (ناتج تضاعف الجين) وتوضع بدقة على هلام الاكاروز لغرض الترحيل الكهربائي.

الجدول 2: ضبط برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل بما يتناسب مع العينات

التسلسل	الخطوات	
1	المسخ الاولي للحامض النووي DNA عند درجة حرارة 94 مْ دورة واحدة لمدة 30 ثانية.	
2	في هذه الخطوة 30 دورة تشمل ما يلي:	
	2-1: مسخ Denaturation الحامض النووي DNA عند درجة حرارة 94 مْ لمدة 30 ثانية.	
	2-2: عملية ارتباط البوادئ annealing مع الحامض النووي لمدة 60 ثانية عند درجة حرارة تختلف بأختلاف البوادئ كما يلي:	
	54 مْ	*Pseudomonas aeruginosa*
	45 مْ	*Klebsiella pneumoniae*
	47 مْ	*Staphylococcus aureus*
	45 مْ	*Staphylococcus hominis*
	53 مْ	*Staphylococcus haemolyticus*
	55 مْ	*Staphylococcus epidermidis*
	2-3: استطالة البوادئ Extension عند درجة حرارة 68 مْ لمدة 60 ثانية.	
3	الاستطالة النهائية لشريط الحامض النووي DNA عند درجة حرارة 68 مْ دورة واحدة لمدة 5 دقائق.	
4	عملية التبريد بدورة واحدة عند درجة حرارة 4 مْ.	

الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA على هلام الاكاروز

حضر الاكاروز بتركيزات مختلفة حسب حجم الجين المراد ترحيله، حيث تراوح تركيز الاكاروز بين 1-2 % في 100 مل من دارئ Tris Acetate EDTA Buffer بتركيز 1X (TAE electrophoresis)، حيث وضع الاكاروز مع TAE في بيكر زجاجي Beaker وغلف البيكر بواسطة السليفون ثم ادخل الى Microwave لمدة دقيقة الى دقيقتين لغرض اذابة الاكاروز بالدارئ، وبعدها ترك المحلول ليبرد قليلا عند درجة حرارة(50-55) مْ، ثم يضاف 4 مايكروليتر من(صبغة Red Safe) الى المحلول وتمزج بواسطة تحريك البيكر بصورة جيدة، كما يتم تحضير صفيحة الاسناد للاكاروز وبعدا يتم صب الاكاروز مع الحرص على عدم تكون الفقاعات اثناء الصب وبعدها يتم غرس المشط المسؤول عن تكون الحفر داخل الصفيحة الحاوية على الاكاروز وتثبيته بشكل صحيح، ثم يترك ليتصلب الاكاروز لمدة نصف ساعة داخل الصفيحة، بعدها يزاح المشط من الصفيحة، ويحمل الاكاروز الى الحوض الخاص بالترحيل، ويتم تحميل عينات ال DNA داخل الحفر عن طريق اخذ 10 مايكروليتر من كل عينة ووضعها داخل الحفر مع وجود الدليل الحجمي، اذ ترحل العينات مع الدليل الحجمي لمدة ساعة كاملة مع ضبط مجهز القدرة عند 80 فولت، وبعدها يفحص الاكاروز (تحت الاشعة فوق البنفسجية) UV عن طريق جهاز التصوير الهلامي Gel Documentation و يتم تصوير الحزم بواسطة كاميرا رقمية، حيث يتم تقدير الاحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة مقارنة مع الدليل الحجمي المستخدم والمرحل مع هذه العينات.

اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية

اجري الاختبار بطريقة النشر حول الاقراص حسب ماجاء في Johan واخرون [9]. شملت الدراسة اختبار(36)عزلة بكتيرية تعود لحالات تسمم الدم، اذ تم اختيار 10 مضادات حيوية: Amikacin، Doxycilline، Augmentin، Linezolid، Imipenem، Levofloxacin، Trimemtheprim، Gentamicin، Rifampicin، Aztreonam.

النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج تشخيص العزلات البكتيرية ان المسبب الأكثر للإصابة هي بكتريا المكورات العنقودية اذ كانت نسبتها 61% من مجموع العزلات البكتيرية، تليها بكتريا الكلبسيلا الرئوية التي بلغت نسبتها في حدوث الإصابة 28% ، تليها بكتريا الزوائف الزنجارية بنسبة 11% من مجموع العزلات البكتيرية وهي اقل نسبة في حدوث الاصابة. وكما موضح في الجدول 3. كما أظهرت النتائج ان نسبة الإصابة بأنتان الدم للأطفال تفوق نسبة الإصابة للبالغين وهذا يرجع لعدة أسباب من ضمنها ضعف مناعة الاطفال مقارنة بالبالغين، واحتمالية العدوى الأكبر من الام في الأيام الأولى من الولادة، كما ان تلوث جو وأدوات المستشفى سبب في عدوى الاطفال اكثر من غيرهم، بالإضافة الى ذلك بينت النتائج ان اعلى نسبة إصابة بأنتان الدم في الذكور والتي بلغت اعدادها 12 عزلة وبنسبة 67% وفي الاناث بلغت 6 عزلات بنسبة 33% وان السبب في اختلاف نسبة الإصابة بين الذكور والاناث غير واضح وقد يعود الى عوامل وراثية وعوامل مناعية وهرمونية.

جدول 3: يوضح أنواع البكتريا المعزولة من أخماج تسمم الدم وعدد العزلات ونسبها المئوية

العزلات البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية
Staphylococcus haemolyticus	6	%16.7
Staphylococcus hominis	6	%16.7
Staphylococcus epidermidis	6	%16.6
Staphylococcus aureus	4	%11
Klebsiella pneumoniae	10	%28
Pseudomonas aeruginosa	4	%11
مجموع العزلات	36	%100

أظهرت نتائج الدراسة الحالية سيادة البكتريا الموجبة لصبغة كرام المتمثلة بـ بكتريا المكورات العنقودية التي بلغت نسبتها 61% على البكتريا السالبة لصبغة كرام التي شملت بكتريا الكلبسيلا وبكتريا الزوائف الزنجارية حيث كان مجموع نسبتهما 39% في حدوث الإصابة بالتسمم الدموي وهذا يتفق مع نتائج دراسة Abbas [10] اذ وجد ان نسبة البكتريا الموجبة لصبغة كرام كانت 60%، وتتوافق النتائج كذلك مع ما توصل اليه Li واخرون [11] في الصين، وكذلك توافقت مع الدراسة التي أجراها Mariani واخرون[12] في سويسرا التي أوضحت هاتين الدراستين ان السبب الأساسي للاصابة بأنتان الدم في الاطفال كانت البكتريا الموجبة لصبغة كرام. وعلى النقيض من الدراسة الحالية أظهرت بعض الدراسات نتائج معاكسة بينت فيها ان البكتريا السالبة لصبغة كرام هي المسبب الأساسي للإصابة بالتسمم الدموي وهذا شائع في البلدان المتوسطة الدخل كما قد يرجع السبب لمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بشكل اكثر خطورة في الآونة الأخيرة[15,14,13].

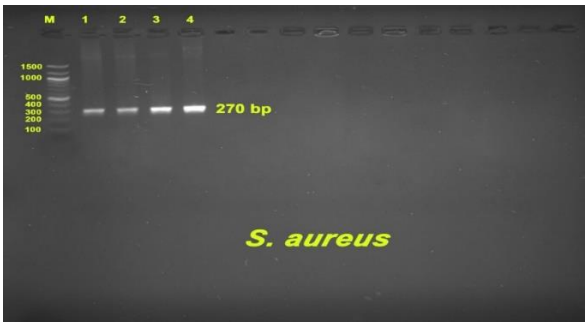
بينت نتائج الدراسة الحالية ان اكثر العزلات البكتيرية كانت من بكتريا المكورات العنقودية السلبية التخثر للبلازما والتي شملت كل من بكتريا(*Staphylococcus haemolyticus*، *Staphylococcus hominis*، *Staphylococcus epidermidis*) بنسبة 50%، اما المكورات العنقودية المخثرة للبلازما (*Staphylococcus aureus*) فبلغت نسبتها 11%، اما البكتريا السالبة لصبغة كرام والتي من ضمنها الكلبسيلا الرئوية(*Klebsiella pneumoniae*) فكانت نسبتها 28%، تلتها بكتريا الزوائف الزجارية(*Pseudomonas aeruginosa*) حيث بلغت نسبتها 11% وقد توافقت نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل اليها Abbas [10] التي أجريت في العراق وبينت ان المكورات العنقودية هي المسبب الأكثر شيوعا للانتنان. كما أوضحت دراسة أجريت في الصين ان المكورات العنقودية السلبية التخثر هي المسبب الرئيسي لتسمم الدم البكتيري بنسبة 40.23% [16].

التشخيص الجزيئي

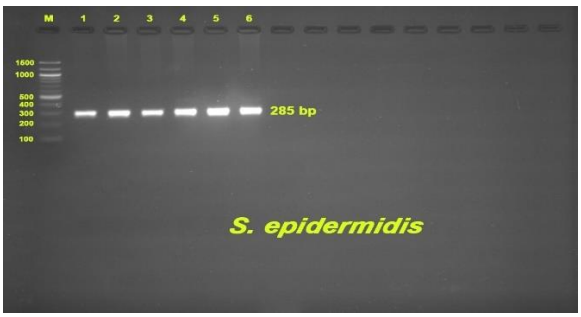
الكشف عن جين التشخيص لبكتريا المكورات العنقودية.*Staphylococcus* spp

تم الكشف عن وجود الجين المستهدف في جميع العزلات البكتيرية اعتمادا على نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل تضاعف الحمض النووي DNA بأستخدام الجين التشخيصي 16SrRNA وهو احد الجينات المستخدمة في تشخيص بكتريا *Staphylococcus* ، اذ تم الكشف عن وجود الجين الخاص ببكتريا *Staphylococcus aureus* ذات الوزن الجزيئي 270 bp زوج قاعدي، والجين التشخيصي لبكتريا *Staphylococcus epidermidis* ذات الوزن 285 bp زوج قاعدي، وكذلك الجين

الخاص ببكتريا *Staphylococcus hominis* ذات الوزن 1513 bp زوج قاعدي، والجين الخاص ببكتريا *Staphylococcus haemolyticus* ذات الوزن 1387 bp زوج قاعدي وتم التحقق من ذلك من خلال ظهور الحزم بمستوى واحد لكل نوع بكتيري وحسب الحجم الجزيئي لكل نوع وكما موضح في الاشكال 4,3,2,1.

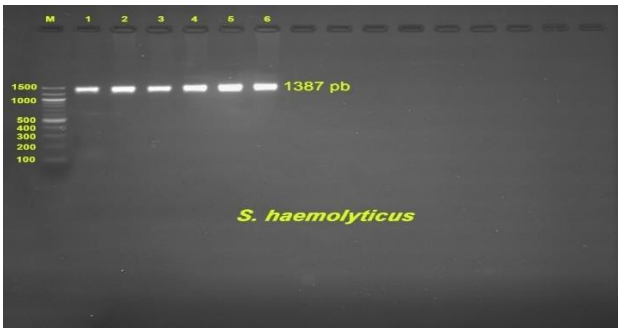


الشكل 1: الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA على هلام الاكاروز بتركيز 2% لبكتريا *Staphylococcus aureus* عند فرق جهد 80 فولت ولمدة 60 دقيقة



الشكل 2: الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA على هلام الاكاروز بتركيز 2% لبكتريا *Staphylococcus epidermidis* عند فرق جهد 80 فولت ولمدة 60 دقيقة

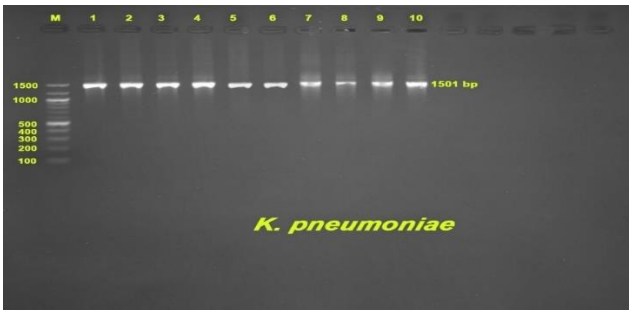
الشكل 3: الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA على هلام الاكاروز بتركيز 1% لبكتريا *Staphylococcus hominis* عند فرق جهد 80 فولت ولمدة 60 دقيقة



الشكل 4: الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA على هلام الاكاروز بتركيز 1% لبكتريا *Staphylococcus haemolyticus* عند فرق جهد 80 فولت ولمدة 60 دقيقة

الكشف عن جين التشخيص لبكتريا الكليبسلا الرئوية *K. pneumoniae*

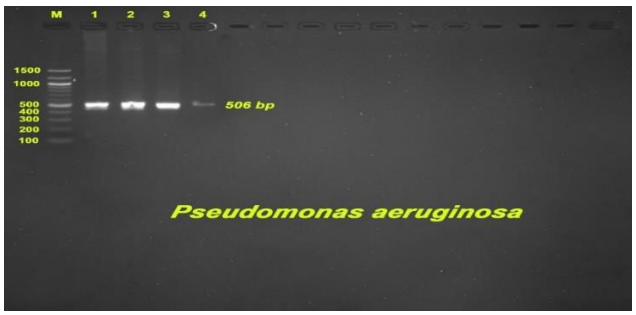
اشارت نتائج التسلسل الجيني للبكتريا الرئوية *K. pneumoniae* الى انها موجودة في جميع العزلات، حيث يبلغ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة 1501 bp وتتوافق هذه النتائج مع نتائج Maleki واخرون [17] الذي اثبت ان كل عزلات *K. pneumoniae* تحتوي على الجين 16SrRNA. وكما موضح في الشكل 5.



الشكل 5: الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA على هلام الاكاروز بتركيز 1% لبكتريا *K. pneumoniae* عند فرق جهد 80 فولت ولمدة 60 دقيقة.

الكشف عن جين التشخيص لبكتريا الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa*

أظهرت النتائج وجود الجين المستهدف في جميع العزلات البكترية للزوائف الزنجارية عندما تم الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل تضاعف ال DNA بأستخدام البادئ للجين 16SrRNA والذي يعد اكثر الجينات موثوقية لتشخيص *P. aeruginosa* ذات الوزن الجزيئي 506 bp زوج قاعدي كما هو موضح في الشكل 6، وهذا يؤكد صحة النتائج التشخيصية التقليدية والمورفولوجية والكيميائية الحيوية التي تبين ان هذه العزلات هي بكتريا *P. aeruginosa*، السمة السائدة لهذا الجين موجودة في جميع عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية وتتوافق هذه النتائج مع ما توصل اليه Al-Dahmoshi واخرون [18] الذي أوضح ان جميع عزلات الزوائف الزنجارية تمتلك الجين 16S rRNA.



الشكل 6: الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA على هلام الاكاروز بتركيز 2% لبكتريا *P.aeruginosa* عند فرق جهد 80 فولت ولمدة 60 دقيقة

اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية

أظهرت النتائج تفاوت في نسبة مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية، فكانت نسبة المقاومة لبكتريا *S.hominis* لكل من Amikacin، Augmentin، Gentamicin ، Aztreonam، هي 100%، 100%، 83.3% ، 100% على التوالي، ان السبب في مقاومة البكتريا للمضاد الحيوي Amikacin، قد يرجع الى وجود الانزيمات التي تمنع المضاد الحيوي Amikacin من الاتحاد مع (وحدات فرعية 30 s) من الريبوسوم في البكتريا الموجبة لصبغة كرام، وان مضاد Amikacin يعد من ضمن فئة Aminoglycosides [19] ، اما بالنسبة للمضادين Doxycilline، Linezolid، فكانت البكتريا حساسة لهما بنسبة 100%. (كما موضح في الجدول 4)

وبالنسبة لبكتريا *S.aureus* فكانت مقاومتها للمضادات Amikacin، Gentamicin، Aztreonam ، بنسبة 50%،50%،100% على التوالي ، بينما كانت *Staphylococcus aureus* حساسة لكل من Doxycilline، Linezolid، Trimemtheprim بنسبة 100% ، و كانت نسبة حساسيتها للمضادين Augmentin ، Rifampicin 75%، اما بالنسبة

للمضادين Levofloxacin ، Imipenem فكانت نسبة الحساسية اتجاهما 50%، ان مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية قد تكون نتيجة لحدوث طفرات بين العزلات البكتيرية؛ وذلك بسبب سوء استعمال المضادات الحيوية من قبل المرضى، وبالتالي تطور البكتريا مقاومتها ضد المضادات الحيوية، فتقل نفاذية هذه المضادات للبكتريا او من خلال تأثير البكتريا على انزيم DNA gyrase [20].

بينت النتائج ان مقاومة بكتريا *S.haemolyticus* للمضادات الحيوية Augmentin، Levofloxacin، Aztreonam بنسبة 50% ،50%،100% على التوالي، بينما كانت مقاومة البكتريا للمضادات Amikacin، Gentamicin، Rifampicin بنسبة 33.3% وكانت النتيجة متوافقة مع الدراسة التي اجراها Saeed واخرون [21]، اما مضادات Doxycilline، Trimemtheprim، Linezolid فكانت البكتريا حساسة لكل منهم بنسبة 100%.

اما بكتريا *S.pidermidis* فأظهرت النتائج مقاومتها للمضادات الحيوية Augmentin، Rifampicin، Aztreonam بنسبة 50%،50%،100% على التوالي، ومقاومتها بنسبة 33.3% لكل من المضادات Amikacin، Doxycilline، Linezolid، Trimemtheprim، Gentamicin، ان نتائج مقاومة *S. epidermidis* لمضاد Gentamicin كانت متوافقة مع الدراسة التي اجراها Sarathbabu واخرون[22]، في حين كانت نسبة حساسيتها للمضادين Imipenem، Levofloxacin هي 100% ،83.3% على التوالي.

أوضحت نتائج اختبار مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *K.pneumoniae* مقاومتها لكل من المضادات Amikacin، Augmentin، Linezolid، Rifampicin بنسبة 100%، و مقاومتها للمضادين Trimemtheprim ، Gentamicin هي 70%، 60% على التوالي، وقد يكون سبب ذلك قدرة بكتريا *K.pneumoniae* على انتاج الاغشية الحيوية، اذ أوضحت الدراسة التي اجراها عبد الرحيم واخرون [23] بأن البكتريا المنتجة للاغشية الحيوية تكون اكثر قدرة على مقاومة المضادات الحيوية من البكتريا الغير منتجة لهذه الاغشية، في حين كانت نسبة حساسيتها للمضادين Imipenem، Levofloxacin 90%، 70% على التوالي .

اما بكتريا الزوائف الزجارية *P.aeruginosa* *فكانت مقاومتها للمضادات الحيوية*Augmentin، Linezolid، Trimemtheprim،Rifampicin بنسبة 100%، بينما كانت مقاومتها للمضادين Doxycilline، Aztreonam بنسبة 75%، في حين كانت حساسيتها للمضادات Imipenem، Levofloxacin،Gentamicin بنسبة 100% ،وهذا يختلف مع الدراسة التي بينت ان نسبة مقاومة *Pseudomonas aeruginosa* للمضاد الحيوي Imipenem كانت 27% [24]. ومن الجدير بالذكر ان تواجد العزلات البكتيرية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية في المستشفيات تشكل خطر كبير وهي ما تسمى بعدوى المستشفيات، اذ تتسبب عدوى المستشفيات بوفاة 5000 شخص سنويا في دول العالم المتقدمة [25].

الجدول 4: الاعداد والنسب المئوية للعزلات البكتيرية المقاومة والحساسة للمضادات الحيوية.

ATM	RA	CN	TMP	LEV	IPM	LZ	AMC	DO	AK		نوع البكتريا
6 %100	4 %66.7	5 %83.3	3 %50	1 %16.7	3 %50	0	6 %100	0	6 %100	R	*Staphylococcus hominis*
0	2 %33.3	0	3 %50	3 %50	3 %50	6 %100	0	6 %100	0	S	
0	0	1 %16.7	0	2 %33.3	0	0	0	0	0	I	
4 %100	1 %25	2 %50	0	1 %25	1 %25	0	1 %25	0	2 %50	R	*Staphylococcus aureus*
0	3 %75	1 %25	4 %100	2 %50	2 %50	4 %100	3 %75	4 %100	1 %25	S	
0	0	1 %25	0	1 %25	1 %25	0	0	0	1 %25	I	

6 %100	2 %33.3	2 %33.3	0	3 %50	0	0	3 %50	0	2 %33.3	R	*Staphylococcus haemolyticus*
0	4 %66.7	2 %33.4	6 %100	3 %50	5 %83.3	6 %100	3 %50	6 %100	3 %50	S	
0	0	2 %33.3	0	0	1 %16.7	0	0	0	1 %16.7	I	
6 %100	3 %50	2 %33.3	2 %33.3	0	0	2 %33.3	3 %50	2 %33.3	2 %33.3	R	*Staphylococcus epidermidis*
0	3 %50	3 %50	4 %66.7	5 %83.3	6 %100	4 %66.7	3 %50	4 66.7	4 %66.7	S	
0	0	1 %16.7	0	1 %16.7	0	0	0	0	0	I	
7 %70	10 %100	6 %60	7 %70	0	0	10 %100	10 %100	2 %20	10 %100	R	*K.pneumoniae*
2 %20	0	1 %10	3 %30	7 %70	9 %90	0	0	3 %30	0	S	
1 %10	0	3 %30	0	3 %30	1 %10	0	0	5 %50	0	I	
3 %75	4 %100	0	4 %100	0	0	4 %100	4 %100	3 %75	1 %25	R	*P.aeruginosa*
0	0	4 %100	0	4 %100	4 %100	0	0	0	2 %50	S	
1 %25	0	0	0	0	0	0	0	1 %25	1 %25	I	

Amikacin-AK, Doxycilline-DO, Augmentin-AMC, Linezolid-LZ, Imipenem-IPM, Levofloxacin-LEV, Trimemtheprim-TMP, Gentamicin-CN, Rifampicin-RA, Aztreonam-ATM

الاستنتاجات

1- اظهرت الدراسة ان المسبب الاكثر للاصابة بتسمم الدم هي بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp التي بلغت نسبتها 61 %، تليها بكتريا الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* بنسبة 28%، ثم بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*بنسبة 11%.

2- ان التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية كان متطابق مع التشخيص بواسطة الاختبارات البكتريولوجية و الكيموحيوية وكذلك مع التشخيص بواسطة جهاز2-Vitek

3- تفاوتت نسب مقاومة العزلات البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام للمضادات الحيوية.

References

1. Evans, L; Rhodes, A.; Alhazzani, W.; Antonelli, M.; Coopersmith, C. M.; French, C.; ... and Levy, M. (2021). Executive summary: surviving sepsis campaign: international guidelines for the management of sepsis and septic shock 2021. *Critical care medicine*, *49*(11), 1974-1982.
2. Stoll, B. J. (2004). Section 2—-Infections of the Neonatal Infant: Pathogenesis and Epidemiology. *Nelson Textbook of Pediatrics. 17th ed. Saunders*, 623-640.
3. Bromiker, R.; Elron, E.; and Klinger, G. (2020). Do neonatal infections require a positive blood culture?. *American journal of perinatology*, *37*(S 02), S18-S21.
4. Bullock, B.; and Sepsis, M. B. B. (2023). StatPearls Publishing LLC: Tampa. *FL, USA*.
5. Taylor, T. A.; and Unakal, C. G. (2022). Staphylococcus aureus .Updated 2022 Feb 14. Stat Pearls [Internet]. Stat Pearls Publishing, Treasure Island, FL. Available from .

6. Al-Omari, A.; Al Mutair, A.; Alhumaid, S.; Salih, S.; Alanazi, A.; Albarsan, H.; ... and Al Subaie, M. (2020). The impact of antimicrobial stewardship program implementation at four tertiary private hospitals: results of a five-years pre-post analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *9*(1), 95.
7. Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; ... and Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet infectious diseases*, *19*(1), 56-66.
8. Klinker, K. P.; Hidayat, L. K.; DeRyke, C. A.; DePestel, D. D.; Motyl, M.; and Bauer, K. A. (2021). Antimicrobial stewardship and antibiograms: importance of moving beyond traditional antibiograms. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, *8*, 20499361211011373.
9. Johan, P.; Harley, I.; and Prescott, M. (2003). Laboratory Exercise in Microbiology. *McGraw-Hill. USA*, *484*, 149-1538.
10. Abbas, R. M. (2021). *Association of interleukin-6 and interleukin-11 with neonatal sepsis in Diyala Province* (Doctoral dissertation, Diyala University).
11. Li, J.; Xia, S.; Liu, Y.; Zhang, S.; and Jin, Z. (2022). Bacteriological profile and antibiotic susceptibility pattern of neonatal septicemia and associated factors of ICU Hospitalization Days. *Infection and drug resistance*, 427-438.
12. Mariani, M.; Parodi, A.; Minghetti, D.; Ramenghi, L. A.; Palmero, C.; Ugolotti, E.; ... and Castagnola, E. (2022). Early and late onset neonatal sepsis: epidemiology and effectiveness of empirical antibacterial therapy in a III level neonatal intensive care unit. *Antibiotics*, *11*(2), 284.
13. Abdul-Rahman, S. M.; and Khider, A. K. (2020). Neonatal sepsis: Bacteriological profile, molecular detection and antimicrobial susceptibility test among pre-term pediatrics in Erbil city, Iraq. *Zanco Journal of Medical Sciences (Zanco J Med Sci)*, *24*(2), 256-273.
14. Tsegaye, E. A.; Teklu, D. S.; Bonger, Z. T.; Negeri, A. A.; Bedada, T. L.; and Bitew, A. (2021). Bacterial and fungal profile, drug resistance pattern and associated factors of isolates recovered from blood samples of patients referred to Ethiopian Public Health Institute: cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, *21*, 1-10.
15. Wen, S. C.; Ezure, Y.; Rolley, L.; Spurling, G.; Lau, C. L.; Riaz, S.; ... and Irwin, A. D. (2021). Gram-negative neonatal sepsis in low-and lower-middle-income countries and WHO empirical antibiotic recommendations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, *18*(9), e1003787.
16. Wang, J.; Zhang, H.; Yan, J.; and Zhang, T. (2022). Literature review on the distribution characteristics and antimicrobial resistance of bacterial pathogens in neonatal sepsis. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, *35*(5), 861-870.
17. Maleki, D.; Jahromy, S. H.; Karizi, S. Z.; and Eslami, P. (2016). The prevalence of acrA and acrB genes among multiple-drug resistant uropathogenic Escherichia coli isolated from patients with UTI in Milad Hospital, Tehran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, *4*(1), 39785-39785.
18. Al-Dahmoshi, H. O. M. (2013). Genotypic and phenotypic investigation of alginate biofilm formation among Pseudomonas aeruginosa isolated from burn victims in Babylon, Iraq. *Science Journal of Microbiology*, *2013*.

19. Hu, Y.; Liu, A.; Vaudrey, J.; Vaiciunaite, B.; Moigboi, C.; McTavish, S. M.; ... and Coates, A. (2015). Combinations of β-lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *PLoS One*, *10*(2), e0117664.
20. Guo, Y.; Song, G.; Sun, M.; Wang, J.; and Wang, Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in Staphylococcus aureus. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 107.
21. Saeed, C. H.; AL-Otraqchi, K. I.; and Mansoor, I. Y. (2015). Prevalence of urinary tract infections and antibiotics susceptibility pattern among infants and young children in Erbil city. *Zanco Journal of Medical Sciences (Zanco J Med Sci)*, *19*(1), 915_922-915_922.
22. Sarathbabu, R. M. B. B. S.; Rajkumari, N.; and Ramani, T. V. (2013). Characterization of Coagulase negative Staphylococci isolated from urine, pus, sputum and blood samples. *Int J Pharm Sci Inven*, *2*, 37-46.
23. Abdelraheem, W. M.; Abdelkader, A. E.; Mohamed, E. S.; and Mohammed, M. S. (2020). Detection of biofilm formation and assessment of biofilm genes expression in different Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *Meta Gene*, *23*, 100646.
24. Panda, S. S.; Singh, K.; Pati, S.; Singh, R.; Kant, R.; and Dwivedi, G. R. (2022). Pseudomonas aeruginosa: pathogenic adapter bacteria. *Antimicrobial Resistance: Underlying Mechanisms and Therapeutic Approaches*, 113-135.
25. Flake, P.; Moorby, P.; Golson, S.; Salz, A.; and Davidmann, S. (2020). Verilog HDL and its ancestors and descendants. *Proceedings of the ACM on Programming Languages*, *4*(HOPL), 1-90.

IRAQI Academic Scientific Journals

Samarra Journal of Pure and Applied Science

SJPAS

www.sjpas.com

p ISSN: 2663-7405
e ISSN: 2789-6838

Molecular Diagnosis with Study of the Antibiotics Susceptibility Pattern of Pathogenic Bacteria Isolated from Septicaemia Infections in Hospitals of Al-Ramadi City

Maryam Noori Seger[1*], Hana Abdel Latif Yassin[2]
1- Department of Biology, College of Education for Women, University of Anbar, Iraq
2- College of Education for Women, University of Anbar, Iraq

Article Information

Received: 19/05/2024
Revised: 09/05/2024
Accepted: 20/06/2024
Published: 30/03/2025

Keywords:

bacterial isolates, septicemia, molecular diagnosis, antibiotics.

Corresponding Author:
Maryam Noori Seger

E-mail: mar22w4006@uoanbar.edu.iq
Mobile: 07829239296

Abstract

One hundred fifty samples of septicemia infections were collected for patients at the Women's and Children's Hospital and Ramadi General Teaching Hospital in the city of Ramadi (Anbar Governorate) during the period from 31/7/2023 to 1/11/2023. The samples were cultured on blood agar medium, chocolate agar medium, MacConkey agar medium, and mannitol salt agar medium, The results showed that 36 blood samples out of a total of 150 samples were culture positive, while 114 samples were culture negative, The results of the diagnosis of bacterial isolates indicated that the most common cause of septicemia is *Staphylococcus* spp. Bacteria, in the rate of 61% of the total bacterial isolates, Followed by *Klebsiella pneumoniae* bacteria at the rate of 28%, Then *Pseudomonas aeruginosa* bacteria at the rate of 11% of the total bacterial isolates, which is the lowest percentage in the incidence of infection of septicemia, The isolates were diagnosed using bacteriological and biochemical tests and the Vitek-2 device, and their diagnosis was confirmed molecularly using polymerase chain reaction (PCR) technology, In addition, the resistance to ten types of antibiotics was tested for the bacterial isolates under study using the disc diffusion method. The antibiotics included (Amikacin, Doxycilline, Augmentin, Linezolid, Imipenem, Levofloxacin, Trimemtheprim, Gentamicin, Rifampicin, and Aztreonam); the results of the resistance test showed Antibiotics have a significant difference in resistance and sensitivity rates among bacterial species.