Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.6/ NO.1/ Year : 2014
URL: http://www.kufabiojournal.org/

دراسة الحساسية المايكروبية لعزلات محلية من بكتريا *Ps.aeruginosa* ضد مضاد Norfloxacin

الخلاصة

تم الحصول على 51 عزلة تعود لبكتريا *Ps.aeruginosa* من عينات سريريه مختلفه شملت الدم والادرار والقشع والتهابات الجروح والتهابات الحروق من مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد للفترة من 2012/1/2 لغاية 2012/3/1 للتحري عن بكتريا *Ps.aeruginosa*أظهرت نتائج اختبار فحص الحساسية ضد ستة أنواع من المضادات مقاومة جميع العزلات لمضاد Ticarcilin / Clavulanic acid وكانت 96.07% من العزلات مقاومة لمضادOxacillin و76.4% مقاومة لمضاد Azlocillin وكانت نسبة مقاومة لمضادNorfloxacin 39.21% وكذلك ظهرت نسبة مقاومة لمضاد Levofloxacin 27.45% بينما سجلت اقل نسبة مقاومة لمضاد Piperacillin / Tazobactam (25.49%), تراوحت قيم التركيز المثبط الادنى (MIC_s) لمضاد Norfloxacin للعزلات التي أبدت مقاومة لهذا المضاد (1024 – 128) مايكروغرام/مل , تم الكشف عن مدى قابلية العزلات على انتاج البكتريوسين بطريقة اقراص الاكار (Cup disc)، وتم الحصول على عزلتان منتجة للبكتريوسين من مجموع (10) عزلة وبنسبة 20% , وكانت العزلتان المنتجة للبكتريوسين حساسة للمضاد Norfloxacin .

المقدمة

تمتاز بكتريا *Ps.aeruginosa* بكونها عصيات مستقيمة سالبة لصبغة كرام و ذات ابعاد (3-1.5 ×0.5) مايكروميتر او ذات انحناء بسيط تتحرك بصورة نشطة Active motile بوساطة سوط قطبي Polar flagellum مفرد ، وهي بكتريا هوائية اجبارية Strick aerobic تمتاز بفعاليتها الايضية المؤكسدة Oxidative metabolism موجبة لاختباري الاوكسديز والكتاليز ولا تخمر السكريات المختلفة الا انها تخمر سكر الكلوكوز وتنتج حامضاً ولا تنتج غازاً وكما انها تحلل اليوريا بشكل بطيء وغير مكونة للسبورات وكما ان بعض سلالاتها لها القدرة على تكوين المحفظة Capsule ، وتمتاز بقابليتها على استهلاك السترات كمصدر كاربوني (1) .

من الصفات المميزة لهذه البكتريا هي انتاجها للصبغة الخضراء المزرقة Pyocyanin أو Pyocyanosyl الذائبة في الماء ، اذ تبدو المستعمرات النامية باللون

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.6/ NO.1/ Year : 2014
URL: http://www.kufabiojournal.org/

الأخضر الفستقي المنتشر في جميع الوسط ، وهذه الصبغة هي السبب في انبعاث رائحة الفاكهة المتعفنة التي تشبه رائحة العنب المتخمر من الوسط الزرعي الذي تنمو فيه هذه البكتريا (2) .

تُعدّ بكتريا الزوائف الزنجارية المسبب الرئيس في أحداث اخماج المستشفيات Nosocomial Infection ، فهي جراثيم انتهازية Opportunistic تسبب العديد من الاخماج المكتسبة وخاصة اخماج المجاري البولية (UTI) والاصابات الحادة للحرق الشديدة (3) تكون بكتريا *Ps.aeruginosa* المنتجة لانزيمات (metallo-β-lactamase) مقاومة ليس فقط لمجموعة β-lactams ولكن أيضا تكون مقاومة لجموعة aminoglycosides ومجموعة fluoroquinolones لذلك تكون الادوية المستعملة لمعالجة الاصابات التي تسببها هذه البكتريا قليلة لذلك تكثف الدراسات للتحري عن أنزيمات (metallo-β-lactamase) ومن اجل الحصول على العلاج المثالي لحالات الاصابة الحرجة التي تسببها هذه البكتريا لغرض الحد من انتشار هذه المقاومة (4). تمتلك البكتريا العديد من عوامل الامراضية التي هي السبب الرئيس في إحداث الإصابات والعامل الاول هو افرازها لأنزيمات التحليل Elastase الذي له انشطة عدة متعلقة بالضراوة ، اذ يقوم بتحليل بروتين الكولاجين Collagen ، كما يقوم بتفكيك البروتينات المناعية IgA و IgG ويمنع تفاعل المتمم Complement (5).

تمتلك مضادات Quinolnes طيفاً واسعاً من الفعالية ضد الكثير من البكتريا ، وتعمل على تثبيط تخليق DNA البكتيري عن طريق تثبيط عمل انزيم Topoisomerase II أو ما يعرف DNA gyrase المسؤول عن جعل الكروموسوم البكتيري فائق اللف، لذلك يحدث الموت السريع للبكتريا (6) ، فضلاً عن تثبيط عمل انزيم Topoisomerase IV مما يسبب ذلك أعاقة انفصال الدنا المتضاعف (Replicated DNA) أثناء عملية الانقسام الخلوي (7).

تقاوم البكتريا مضادات الكوينولينات من خلال حدوث تغيير في موقع الهدف لأرتباط المضاد الى الأنزيم، إذ يحدث التغير في GyrA الذي يعد من الوحدات البنائية لأنزيم DNA gyrase (7). من المضادات المهمة التابعة لهذه المجموعة مضاد Levofloxacin و Norfloxacin نظرا لخطورة الاصابات التي تسببها بكتريا *Ps.aeruginosa* المقاومة لمضادات الكوينولينات جاءت هذه الدراسة لتهدف الى عزل بكتريا *Ps.aeruginosa* من المصادرالسريرية المقاومة للكوينولون ومعرفة مدى حساسيتها.

المواد وطرائق العمل

❖ **العزلات البكترية :** جمعت عينات سريرية مختلفة شملت الدم والادرار والقشع والتهابات الجروح والتهابات الحروق من مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد للفترة من 2012/1/2 لغاية 2012/3/1 للتحري عن بكتريا *Ps.aeruginosa* ، وتم تشخيص العزلات اعتمادا على الصفات

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.6/ NO.1/ Year : 2014
URL: http://www.kufabiojournal.org/

المظهرية والزرعية واجراء الاختبارات الكيموحيوية واستعمال عدة التشخيص Api 20E وحسب ماجاء في (8).

❖ فحص حساسية البكتيريا لمضادات:

اختبرت حساسية عزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* (51) عزلة لمضادات Norfloxacin ومضاد Levofloxacin ومضادات Ticarcilin / Clavulanic acid , Oxacillin , Azlocillin , Piperacillin / Tazobactam , المجهزة من شركة Bioanulys (Turkey) والمجهز من شركة Mast (England) باستعمال وسط مولر هنتون الصلب (Mueller-Hinton agar) وتم اعتماد الاقطار القياسية حسب ماجاء في CLSI (9).

❖ تحديد التركيز المثبط الأدنى لمضاد Norfloxacin

أستخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة (Two fold dilution method) على وسط مولر هنتون الصلب لتحديد MIC_s لمضاد Norfloxacin حسب ما جاء في (10).

❖ الكشف عن عزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* المنتجة للبايوسين

طريقة أقراص الاكار Cup disc: حسب الطريقة المذكورة في (11) وعدت بعض العزلات منتجة (producing isolate)، والبعض الآخر دالة (Indicator isolate) . استعملت الطريقة الآتية في الكشف عن العزلات المنتجة للبكتريوسين وكالآتي:

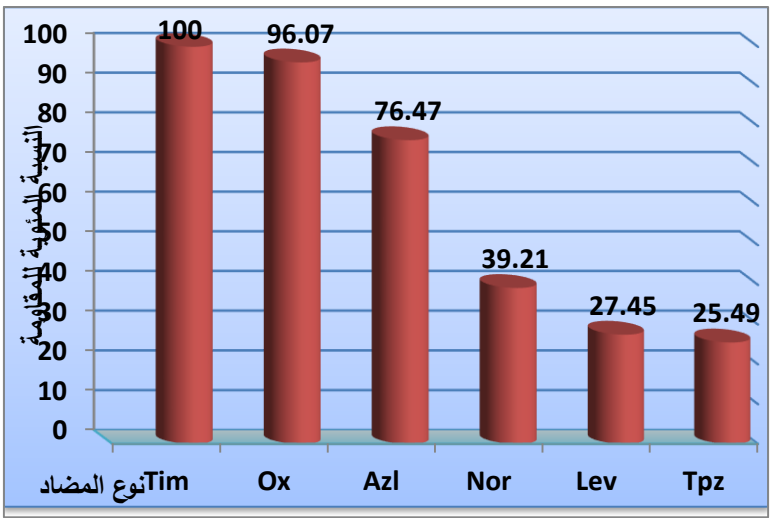
زرعت بكتريا *Ps.aeruginosa* المنماة مسبقا في وسط أكار نقيع القلب والدماغ وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط أكار Trypticase soy agar (TSA)، ثم حضنت الإطباق في درجة حرارة 37 ْم لمدة 24 ساعة. وبعد الحضن عملت أقراص في هذا الوسط ووضعت على سطح الاكار المغذي والمنشور عليه بالناشر مقدار 0.1 مل من مزروع كل من عزلات الاختبار البكتيرية المذكورة بعد أن ثبت عدد الخلايا المزروعة بمقدار 10^8 خلية / مليلتر بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي المحضر ثم حضنت الإطباق بدرجة حرارة 37 ْم لمدة 24 ساعة، بعدها قيس قطر منطقة التثبيط حول الأقراص.

النتائج والمناقشة

تم الحصول على (51) عزلة تعود لبكتريا *Ps.aeruginosa* من مصادر سريرية مختلفة شملت الدم والادرار والقشع والتهابات الجروح والتهابات الحروق, من مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد.

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.6/ NO.1/ Year : 2014
URL: http://www.kufabiojournal.org/

أختبرت حساسية العزلات جميعها (51) عزلة لستة مضادات حيوية وقد اظهرت النتائج مقاومه جميع العزلات وبنسبة 100% لمضاد Ticarcilin / Clavulanic acid وكانت 96.07% من العزلات مقاومة لمضاد Oxacillin و76.47% مقاومة لمضاد Azlocillin وكانت نسبة مقاومة لمضاد Norfloxacin 39.21% وكذلك ظهرت نسبة مقاومة لمضاد Levofloxacin 27.45% بينما سجلت اقل نسبة مقاومة لمضاد Piperacillin / Tazobactam (25.49%) (شكل1). من جانب اخر أظهرت(3) عزلات بنسبة(5.88%) مقاومة متوسطة لمضاد Norfloxacin , وأظهرت عزلة واحدة(1) بنسبة (1.96%) مقاومة متوسطة لمضاد Levofloxacin. تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما توصل له (12) الذي وجد أن نسبة المقاومة لمضاد Norfloxacin (42%) بين 65 عزلة درسها الباحث وكان بعض هذه العزلات تحمل مقاومة لمضادات اخرى من مجاميع Fluoroquinolones.



شكل-1: النسب المئوية لمقاومة عزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* للمضادات المايكروبية

Tim : Ticarcilin (75 mcg)/Clavulanic acid (10 mcg), Ox : Oxacillin (1 mcg), Azl : Azlocillin (75 mcg), Nor : Norfloxacin (10 mcg), Lev : Levofloxacin (5 mcg), Tpz : Piperacillin (100 mcg)/Tazobactam (10 mcg).

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC_s) لمضاد Norfloxacin للعزلات التي أبدت مقاومة لهذا المضاد, وقد أظهرت النتائج (جدول 1) أن قيم MIC_s تراوحت بين(128 – 1024) مايكروغرام/مل.قد يعود الأختلاف في مديات قيم MIC_s بين (128 – 1024) مايكروغرام/مل الى تنوع مصادر جمع العينات فقد جمعت عينات من مصادر سريرية مختلفة ومن مواقع جغرافية مختلفة وبالتالي تختلف العزلات في مدى تعرضها للمضادات وبتراكيز مختلفة .

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.6/ NO.1/ Year : 2014
URL: http://www.kufabiojournal.org/

جدول (1) قيم MIC التي أبدتها العزلات المقاومة لمضاد Norfloxacin

رقم العزلة	MICs مايكروغرام/مل	رقم العزلة	MICs مايكروغرام/مل
6	1024	40	1024
11	1024	41	1024
12	256	42	1024
16	1024	43	1024
18	1024	45	1024
24	1024	46	1024
27	1024	47	128
30	256	48	1024
32	1024	49	1024
33	1024	50	1024
35	1024	51	1024
39	1024		

تم التحري عن عزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* المنتجة للبكتريوسين من خلال استخدام Trypticase soya agar . فقد كان قطر التثبيط قد تراوح بين(10-18) ملم , لقد تم اختيار (10) عزلات من مجموع (51) عزلة كانت منها (5) عزلات مقاومه و(5) اخرى حساسه للمضاد Norfloxacin , اظهرت نتائج العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسين وباستخدام طريقة (Cup disc) كما موضح في الجدول (2) أن هنالك عزلتان منتجة للبكتريوسين من مجموع (10) عزلة وبنسبة 20% , وكانت العزلتان المنتجة للبكتريوسين حساسة للمضاد Norfloxacin , وعليه توصلت هذه الدراسة إلى أن إنتاج البكتريوسين العزلات البكترية ليست له علاقة في مقاومة مضاد Norfloxacin .

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.6/ NO.1/ Year : 2014
URL: http://www.kufabiojournal.org/

جدول (2): يبين عزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* تحت الاختبار وقابليتها على انتاج البكتريوسين وعدد العزلات الحساسة لها .

ت	العزلات المنتجه	قطر منطقة التثبيط بالملم	العزلات الضد
1	P_{S10}	17	21
	P_{S19}	13	
2	P_{S10}	14	49
	P_{S19}	14	
3	P_{S10}	16	20
	P_{S19}	10	
4	P_{S10}	10	51
	P_{S19}	13	
5	P_{S10}	18	19
	P_{S19}	14	
6	P_{S10}	13	42
	P_{S19}	18	
7	P_{S10}	13	10
	P_{S19}	13	
8	P_{S10}	13	45
	P_{S19}	20	
9	P_{S10}	14	41
	P_{S19}	18	
10	P_{S10}	12	22
	P_{S19}	13	

في حين لم تتمكن العزلات البكتيرية الاخرى من انتاج البكتريوسين . ان اختلاف نسب العزلات المنتجة بين دراسة واخرى يعتمد على العزلات البكتيرية الدالة بصورة اساسية، وان عزل عزلتان منتجة للبكتريوسين لايعني بصورة قاطعة ان العزلات المتبقية غير منتجة، فقد تكون منتجة وبسبب عدم وجود العزلة الدالة لها لم تظهر انتاجيتها . وقد تكون العزلة الدالة متحسسة لنوع معين من البكتريوسين لكن اظهار الفعالية القاتلة يعزى الى افتقارها للمستقبلات الخاصة بنقله , او قد ينتج البكتريوسين لكن بكميات قليلة لاتتمكن من قتل الخلية الحساسة (13) . قد تتعرض البكتريا الى طفرات معينة لسبب أو لآخر مما قد ينتج عنه فقدان المستقبلات الخاصة للبكتريوسين وبالتالي تصبح العزلة الدالة مقاومة , فقد اشار (14) الى ان حدوث تحوير بالمستقبلات الخاصة للكولسين نتيجة حدوث طفرات تؤدي الى ان تكون العزلات مقاومة . كل ما سبق ذكره يتعلق بالكائن المجهري نفسه , لكن الوسط الذي تجري فيه عمليات اختبار التحري له دوراً مميزاً ومهماً في اظهار العزلات المنتجة والعزلات الدالة لها , اذ ان للنوع وتركيز وعمق طبقة الاكار اهمية بالغة في ذلك , كما تراعى كثافة العزلة الدالة، فمن المفضل ان لا تزيد عن (10^5 - 10^6) خلية/ مل , فقد اشار (15) الى ان الكولوسين المنتج من بكتريا *E.coli* وان

كان بكميات قليلة فانه يتمكن من اظهار فعله القاتل . واشار (16) ايضا الى وجود Sidrophorase في الوسط تثبط فعل الكولوسين من خلال تنافسها معه للارتباط بالمستقبلات على سطح الخلية الحساسة , وبذلك تمنعه من اظهار فعاليته.

المصادر

1. Brooks,G.F. ; Butel, J.S. and Morse, S.A.(2004). Alange Medical Book. Jawetz, Melnic and Adelberg,s , Medical Microbiology. 23rd ed. McGraw Hill Companies, United States.
2. Todar, K. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* . J. of Bacteriol. 22(6) : 330- 355.
3. Chugani S, Greenberg EP (2007) The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression. Microb Pathog 42(1):29–35.
4. Oie S, Fukui Y, Yamamoto M, Masuda Y, Kamiya A (2009). *In vitro* antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo lactamase- producing *Pseudomonas aeruginosa* BMC Infect. Dis., 10(9):123.
5. Hirakata, Y. ; Yamagochi, T. ; Nakano, M. ; Izumikawa, K. and Mine, M. (2003). Clinial and bacteriological characteristics of *IMP*-Type metallo-β Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* .Clin. Infec. Dis. Society of America, 37 : 26-32.
6. Peterson LR. Currently available antimicrobial agents and their potential for use as monotherapy. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14 Suppl 6: 30-45.
7. Woodford N. Biological counterstrike: Antibiotic resistance mechanisms of gram-positive cocci. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11 Suppl 3: 2-21.
8. Forbes,B.; Sahm, D. &Weissfeld, A.(2002). Bailey and Scott,s Dignostic Microbiology . 11th ed Mosby .PP: 138-40.
9. CLSI (Clinical & Laboratory Standards institute) (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th supplement, CLSI document M100-S19. 29 (3). CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.6/ NO.1/ Year : 2014
URL: http://www.kufabiojournal.org/

.10 Alalem ,A.M. (2008). Antibiotic resistant *S.aureus* infection studies in hospitals .Ph.D, Middle East Technical University.Turkey.

.11 Line ,J.E.;Svetoch,E.A. ; Erslaanov, B.V.;perelygin ,V.V.;Mitsevich ,E.V.;Mistevich ,I.P.; Levechuk ,V.P.;Sevetoch ,O.E. ;Seal ,B.S. ;Siragusa ,G.R. and Stern ,N.J. (2008). Isolation and purification Enteriocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram - positive and Gram –negative bacteria .Antim. Agents and Chemoth . 52(3) :1094- 1100 .

.12 Eman, Sh.E.; Salah Ab.; Alaa , M. Shawki and Abeer G. Comparison between Outer Membrane Protein Profile of Fluoroquinolones Sensitive and Resistant *P. aeruginosa* Isolated from Egyptian Patients. J. of American Science, 2011;7(1).

.13 Tagg, S.R. ; Dajani,A.S. & Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocin of gram positive bacteria. Bacteriol.Rev., 40 : 722–756.

.14 Cursino,L.; Smarda,J.;Chartone,E. & Nascimento,A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. Braz.J.Microbiol., 33:196-217.

.15 Richardson , H., Emslie-smith , A.H. and senior , B.W. (1968). Agar Diffusion Method for the Assay of colicins . App. Microb ., 16: 1468-1447.

.16 Housden, N.; Loftus, S.; moore, G. & Kleanthous, C.(2005). Cell enty meehauism of enzymatic bacterial colicins: Porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding. Proc. Natl.Aced. SCI. USA., 102: 13849-54.

ABSTRACT

Fifety one isolates were collected from different clinical samples included blood, urine, wound and burn swabs infection from different hospitals in Baghdad during the period from 2\1\2012 to 1\3\2012 . The

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.6/ NO.1/ Year : 2014
URL: http://www.kufabiojournal.org/

results of sensitivity test for Six types antibiotics of isolates, showed that, (100%) of isolates were resistant to Ticarcilin / Clavulanic acid , (96.07%) were resistant to Oxacillin and (76.47%) were resistant to Azlocillin, and (39.21%) were resistant to Norfloxacin , and (27.45%) were resistant to Levofloxacin, While the lowest resistance was (25.49%) to Piperacillin / Tazobactam , The range of the minimum inhibitory concentrations of Norfloxacin were (128-1024 µg\ml), The ability of isolates to produce bacterocin were detected by method Cup disc ,Results revealed that two isolates were able to produce bacteriocin from ten isolates with 20%. and there two isolates which produce for bacteriocin were sensitive for Norfloxacin antibiotic.