

عزل وتشخيص بكتريا *Bacteroides fragilis* وتحديد التأثير التآزري لبعض المضادات الحيوية المستخدمة في علاج المرضى المصابين بهذه البكتريا في مستشفى سامراء العام

أسامة ناظم نجرس ، سراب خليل حسين

قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة تكريت

الملخص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص بكتريا *B.fragilis* من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى سامراء العام للمدة الواقعة بين 2013/9/1 وحتى 2014/5/1، إذ تم جمع (150) عينة و توزعت العينات المرضية ما بين (100) عينة من المرضى المصابين بالإسهال و (50) عينة من المصابات المصابات بالمضاعفات التي تلي العمليات الجراحية النسائية والالتهابات المهبليّة .

أظهرت النتائج ان (5) عينات فقط من مجموع عينات الاسهال أعطت نمو جرثومي موجب لبكتريا *B.fragilis* وبنسبة (5%)، كما بينت هذه الدراسة أن الاطفال حديثي الولادة والاطفال من ذوي الاعمار الاقل من 5 سنوات هم الاكثر عرضة للإصابة بالإسهال الناتج عن بكتريا *B.fragilis* حيث كانت نسبة الاصابة (7%) (11%) على التوالي، إما بالنسبة للمسحات المأخوذة من المصابات المصابات بالمضاعفات اللاحقة للعمليات الجراحية النسائية والالتهابات المهبليّة فقد أظهرت النتائج وجود نمو لبكتريا *B.fragilis* في (3) عينات وبنسبة (6%)، حيث تبين ان الفئة الشبابية من النساء اللواتي تتراوح أعمارهن بين (14-20) سنة هن الاكثر عرضة للإصابة بالالتهابات المهبليّة والمضاعفات التي تلي العمليات الجراحية النسائية.

كما أختبرت حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة ازاء (17) نوع من المضادات الحيوية، حيث أظهرت النتائج أن بكتريا *B.fragilis* مقاومة وبشكل كبير للعديد من المضادات الحيوية، حيث أظهرت نسبة مقاومة لمضادات Eh,VA, TOB, AK, CTX, P PRL وبنسب وصلت الى (100%، 100%، 75%، 62%، 87%، 62%، 87%، 75%) على التوالي، بينما أظهرت حساسية عالية إتجاه مضادات M, C, DA, AX, IMP, G حيث وصلت نسبة حساسيتها الى (100%) في كل نوع من هذه المضادات.

كما تم حساب التركيز المثبط الأدنى MIC لمضادات Rif, M, AMP, G, CIP, CTX, Eh ضد العزلات قيد الدراسة حيث تبين ان أكثر التآزرات فعالية ضد *B.fragilis* هو التآزر بين CIP و CTX وبنسبة (60%) من مجموع العزلات، كما أظهر التآزر بين مضادي M و Rif فعالية واضحة ضد العزلات قيد الدراسة وبنسبة (75%) من مجموع العزلات المقاومة.

المقدمة

للإسهال (4). كما وتسبب *B. fragilis* بشكل خاص خراجات بطنية، Peritonitis، و التهاب الصفاق، و Intra _abdominal abscesses، وأصابات الجروح البطنية، و التهابات الدماغ (السحايا)، و التهاب الكبد، و التهابات الجهاز التناسلي الأنثوي (5).

كما يمكن علاج المضاعفات الناتجة عن الإصابة ببكتريا *B.fragilis* بأستعمال مضادات حيوية شائعة الاستعمال منها Piperacillin, Ampicillin, Clindmycin, Metronidazol, Carbapenems, Imipenem, Cefoxitin، ولكن المقاومة ضد هذه المضادات بدأت ملاحظتها وبشكل متكرر، فالعديد من الدراسات أظهرت أن *B.fragilis* مقاومة لكل من Cefoxitin, Clindamycin (6).

وقد وجد العلماء طريق جديدة لتقليل مقاومة الأنواع البكتيرية ضد المضادات الحيوية وكذلك لتقليل سمية بعضها خصوصا عندما تكون سامة في تراكيزها العالية، وذلك بعمل خلطات تآزرية بين الانواع المختلفة للمضادات الحيوية، وقد اعطى الكثير منها نتائج فعالة ضد العديد من الأنواع البكتيرية، ومن الخلطات التآزرية التي أعطت فعالية ضد *B. fragilis* هي أستعمال Gentamycin بالتآزر مع Metronidazole مرة ومع Pencillin مرة اخرى (7)، وبين مضادي Metronidazole و Rafmbin (8)، وبين مضادي

على الرغم من امتلاك جسم الانسان لأنظمة دفاعية متعددة متمثلة بالجهاز المناعي الذي يمنع الاحياء الدقيقة وغيرها من العبث بأنسجته وخلاياه، الا ان بعض الكائنات الدقيقة تمتلك القابلية على التغلب على هذا الجهاز وأضعافه من خلال الذيفانات التي تنتجها (1). ومن هذه الكائنات الدقيقة ما يمكن ان تسبب الاصابات اللاهوائية الناتجة عن الفلورا الطبيعية الأنتهازية اللاهوائية anaerobic bacteria والتي يمكن أن تسبب أمراض مرتبطة مع أمراضية شديدة، حيث من السهل أن نغفل عن أعراضها السريرية (2).

يعد جنس *Bacteroides* من أكبر المجموعات البكتيرية اللاهوائية الممرضة، وهي عصيات سالبة لصبغة كرام، وقد اكتشفت في أواخر القرن التاسع عشر، حيث تسبب الامراض للإنسان وأن الاصابات التي يسببها هذا الجنس معروفة الآن وشائعة وبعض الاحيان تكون مهددة للحياة (3).

ويعتبر النوع *Bacteroides fragilis* من النبيت الطبيعي Normal Flora للامعاء والقناة التناسلية الانثوية والفم، وتعد من أكثر أنواع البكتروبيدز الممرضة شيوعاً لكونها انتهازية، كما وتعد النوع الوحيد من أنواع البكتروبيدز الذي يرتبط بشكل كبير مع مرض الاسهال من خلال إنتاجها سموم Enterotoxigenic Bacteroides (ETBF) و التي لها دور اساسي في الآلام البطنية المصاحبة

كما تم اجراء كل من الاختبارات التالية: اختبار أنتاج كيريتيد الهيدروجين Production of Hydrogen test و اختبار المثيل الاحمر MR test واختبار اليوريز Urease test و اختبار الحركة Motality test

اختبار تخمر السكريات Sugar fermentation

اختبار تحلل الاسكولين Esculin analysis

اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics sensitivity test

أجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على وسط مولر هنتون آكار اعتمادا على ما ورد في (10).

قياس التركيز المثبط الأدنى

تم التحري عن التركيز المثبط الأدنى بإتباع طريقة تخافيف الوسط الزراعي الصلب الوارد ذكرها في (10).

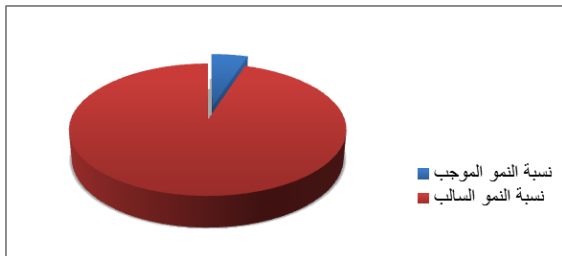
التأثير التآزري للمضادات الحيوية Synergy of Antibiotic

استخدمت طريقة Jubran (11), وذلك بقياس التركيز المثبط الأدنى لكل مضاد على حدة، وقياس التركيز المثبط الأدنى لكل مضادين معا واستعملت طريقة التخفيف باستخدام الاكار والموصوفة في (10).

النتائج والمناقشة

العزل Isolation

أخذت (150) عينة من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى سامراء العام، ومن عينات سريرية مختلفة شملت (100) عينة من المرضى المصابين بالإسهال وبأعمار مختلفة و (50) عينة من المريضات اللاتي يعانين من المضاعفات اللاحقة للعمليات الجراحية النسائية والتهابات المهبل، وقد أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1) أن نسبة الاصابة بالإسهال الناتج عن بكتريا *B. fragilis* كانت (5%) فقط من مجموع عينات الاسهال البالغ عددها (100) عينة. وهذا يطابق ما وجدته (12) , حيث أكد أن *B. fragilis* على الرغم من كونها فلورا طبيعية في الامعاء الا انها ممكن أن تسبب الاسهال في حالات كثيرة.



شكل (1-4) النسبة المئوية لمعدل نسبة عزل بكتريا *B. fragilis* من المرضى المصابين بالإسهال

كما بينت نتائج الزرع البكتيري للمسحات المأخوذة من المضاعفات الحاصلة بعد العمليات الجراحية النسائية والالتهابات الداخلية للجهاز التناسلي الاثوي أن نسبة النمو الموجب لبكتريا *B. fragilis* كانت (6%) من مجموع الاصابات الكلي البالغ عددها (50) عينة، و كما

Ciprofloxacin و Cefotaxim حيث أستنتج العلماء أن الفعالية التآزرية بين هذين النوعين مهمة جداً في التخلص من الأصابات الناتجة عن البكتريا اللاهوائية وخاصة *B. fragilis* (9).

ولأهمية هذه البكتريا من حيث كونها فلورا طبيعية انتهازية، حيث تنتهز فرص ضعف الجهاز المناعي وتبدأ بتسبب الامراض المختلفة والتي من المهم إيجاد علاج أمثل لمحاربتها والتخلص من خطورتها لذا هدفت هذه الدراسة الى:

1- عزل وتشخيص بكتريا *B. fragilis* في حالات مرضية مختلفة مثل الاسهال، الآلام البطنية، والتهابات الجهاز التناسلي الاثوي.

2- إجراء فحص حساسية العزلات لأنواع مختلفة من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال لهذا النوع من البكتريا .

3- عمل خلطات تآزرية بين أنواع المضادات الحيوية ضد العزلات التي تمتلك صفة المقاومة ضدها وبشكل منفرد .

4- بيان تأثير الخلطات التآزرية على خفض التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية التي لها تأثيرات سامة في التراكيز العالية او التي لها اثار جانبية كبيرة.

المواد وطرائق العمل

جمعت العينات للدراسة من الحالات المرضية كالإسهال، والتهابات القناة التناسلية الاثوية والتهابات العمليات الجراحية النسائية المختلفة (شق العجان، رفع المبايض، العمليات القيصرية) من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى سامراء العام/ صلاح الدين، في المدة الممتدة من شهر ايلول 2013 ولغاية شهر مايو 2014، ولأعمار من (1-60) سنة وواقع (150) عينة. إذ توزعت ما بين (100) عينة من المرضى المصابين بالاسهال، و (50) عينة للالتهابات النسائية، حيث دونت المعلومات الخاصة بكل مريض. و نقلت العينات الى شعبة المايكرو/قسم السيطرة النوعية / معمل ادوية سامراء بواسطة مسحات قطنية معلقة في الوسط الناقل..

زرع العينات

زرعت العينات المنقولة بواسطة الوسط الناقل Brain heart broth الى المختبر مباشرةً على الوسط الزراعي الخاص بعزل النوع *B. fragilis* وهو الوسط الانتقائي Bile esculin agar وحضنت بدرجة حرارة (37°C) لاهوائياً باستخدام عدة الزرع اللاهوائي *Anaerobic jar*.

تشخيص العزلات البكتيرية

1- التشخيص البكتريولوجي الاولي

2- الفحوصات الكيموحيوية

اختبار الكتاليز Catalase test

اختبار الاوكسيديز Oxidasetest

اختبار الاندول Indole test

اختبار إنزيم التخثر Coagulase test وهو نوعين:-

A- اختبار إنزيم التخثر المرتبط (اختبار الشريحة Slid test)

B- اختبار إنزيم التخثر (اختبار الانبوية Tube test)

ما بين (0-2) سنة، أما بالنسبة للفئة العمرية التي تضمن المرضى ذوي الاعمار ما بين (31-60) سنة، فقد أظهرت النتائج أن نسبة الإصابة بالإسهال الناتج عن *B. fragilis* ضئيلة جداً مقارنة لإصابتها للاطفال فقد عزلت عذلة واحدة لمريض يعاني الاسهال من أصل (24) مريض ونسبة (4.16%)، وهذا يطابق تماماً ما وجدته (16) الذي عزلها من مريض واحد في عمر (60 سنة) يعاني من الاسهال، هذا قد يعود لكون المناعة الطبيعية لحديثي الولادة وكبار السن في المرحلة المتأخرة من العمر تكون ضعيفة جداً لذا يكونوا أكثر عرضة للإصابة بالمرضات وخاصة الانتهازية (17).

أما بالنسبة للمسحات المأخوذة من المضاعفات اللاحقة للعمليات الجراحية والالتهابات المهبلية فقد وزعت المريضات قيد الدراسة الى أربع مجاميع، المجموعة الاولى تضمنت المريضات اللواتي تراوحت اعمارهن ما بين (14-20) سنة، المجموعة الثانية من (21-30) سنة، المجموعة الثالثة من المريضات ما بين (31-40) سنة، أما المجموعة الرابعة فكانت من المريضات اللواتي تجاوزت أعمارهن (40) سنة .

وقد أظهرت النتائج تواجد بكتريا *B. fragilis* كمسبب مرضي في الفئات الشبابة من النساء اللواتي تتراوح أعمارهن ما بين (14-20) سنة لعزلتين من أصل (5) عزلات ونسبة (40%)، إما الفئة من (21-30) سنة فقد كانت نسبة العزل (4%) لعزلة واحدة من أصل (23) عذلة، وهذا قد يعزى الى أن الزواج المبكر دائماً يكون في النساء اللواتي لم يكملن دراستهن وذوات الثقافة المحدودة، أو لزيادة عدد مرات مراجعتن للمستشفى كونهن من الفئة العمرية التي ترغب بالحصول على مولود في كل سنة وحسب العادات والتقاليد السائدة في المجتمع.

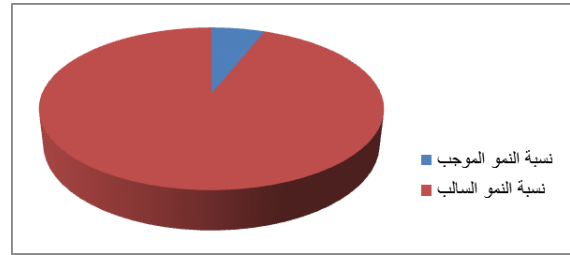
نسبة العزل على أساس التوزيع الجغرافي

وزعت نتائج العزل من اصابات الاسهال على أساس منطقة السكن، تم عزل (3) عزلات من أصل (77) مريضاً ونسبة (3.8%) كانوا من سكنة المدينة Urban، في حين كان الإصابة (2) مريضاً من أصل (23) مريضاً ونسبة (8%) من سكنة الريف Rural، إذ من الواضح عدم وجود ارتباط بين نسبة الإصابة ومنطقة السكن وهذا يعود الى تنامي ثقافة المجتمع الريفي، وهذا طابق ما جاء به (18).

كما وزعت نتائج الإصابة بالنسبة للمسحات المأخوذة من النساء المصابات بالمضاعفات التي تتبع العمليات الجراحية النسائية، إذ تم الحصول على عزلتين من أصل (39) عذلة ونسبة (5.1%) من سكنة المدينة Urban، في حين تم الحصول على عذلة واحدة من أصل (11) عذلة ونسبة (9%) من سكنة الريف Rural، إذ من الواضح أيضاً عدم وجود ارتباط بين نسبة الإصابة ومنطقة السكن. وربما يعود ذلك الى تنامي ثقافة المجتمع الريفي، وهذه النتائج لا تتفق مع ما جاء به (19) الذي لاحظ زيادة الإصابة في المجتمع الريفي.

النسبة المئوية للعزلات البكتيرية على اساس نوع الاسهال ونوع العملية الجراحية :

موضح في شكل (2)، وهذا يتفق مع ما جاء به (13) الذي لاحظ وجود البكتريا اللاهوائية بعد تواجد البكتريا الهوائية في الفترة الاولى من الإصابة وذلك لسرعة انقسامها.



شكل (2-4) النسبة المئوية لمعدل نسبة المريضات المصابات بالالتهابات التي تتبع العمليات الجراحية النسائية والالتهابات المهبلية

التشخيص Identifecation

أظهرت نتائج الزرع البكتيري البكتريا بشكل مستعمرات دائرية، محدبة، وذات حافات مميزة، ولون بني غامق مائل الى اللون الأسود على وسط الاسكولين، كما أظهرت نتائج التصيبغ أن البكتريا عصيات سالبة لصبغة كرام، كما بينت نتائج الاختبارات أن عزلات بكتريا *B. fragilis* المعزولة كانت منتجة لانزيم الكتاليز، وغير منتجة لانزيم الأوكسيديز، وأعطت نتائج سالبة لاختبار اليوريز، واختبار الاندول، وموجبة لاختبار تحمل أملاح الصفراء بنسبة (20%) في وسط Bile esculin agar وتحلل الاسكولين. بينما أعطت العزلات نتائج سالبة لاختبار المثيل الاحمر وأختبار التخثر لكونها غير منتجة لإنزيم Bound Coagulase، كما أعطت نتائج موجبة لاختبار إنتاج غاز H₂S، أما بالنسبة لتخمير السكريات فقد أعطت نتائج موجبة لاختبارات تخمر كل من الكلوكوز، الفركتوز، المانوز، اللاكتوز، الزايلوز، والسكروز، بينما أعطت نتائج سالبة لأختباري التخمر لكل من التريهالوزوالسوريتول وبهذا نستطيع تمييزها عن بكتريا *B. distasonis* التي تعطي نتائج موجبة لهذين السكرين (14).

نسب تواجد العزلات حسب الفئات العمرية

وزع المرضى المصابين بالإسهال قيد الدراسة على خمس مجاميع، المجموعة الاولى تضمنت المرضى حديثي الولادة ممن لا تتجاوز اعمارهم السنة الواحدة، المجموعة الثانية تضمنت المرضى الذين تراوحت أعمارهم ما بين (1-5) سنة، المجموعة الثالثة تضمنت المرضى ذوي الاعمار الذي تراوحت ما بين (6-16)، المجموعة الرابعة تضمنت ذوي الاعمار ما بين (17-30)، والمجموعة الخامسة تضمنت المرضى ذوي الاعمار التي تراوحت ما بين (31-60) سنة. أظهرت النتائج أن حديثي الولادة والاطفال ذوي الاعمار الأقل من 5 سنوات هم الأكثر عرضة للإصابة بالإسهال الناتج عن ضراوة بكتريا *B. fragilis* من الفئات العمرية الاخرى، إذ عزلت (2) عزلات من أصل (43) ونسبة (7%) لحديثي الولادة، و(2) عذلة من اصل (17) ونسبة (11%) للأطفال الاصغر من 5 سنوات، جاءت هذه النتائج مطابقة لما ما جاء به (15) حيث تم الحصول على (53) عذلة من أصل (879) عينة ونسبة (6%) من الاطفال اللذين تتراوح أعمارهم

من قبل البكتريا تحت الظروف اللاهوائية وحدث فشل متكررا كمال اتصال هذا المضاد الحيوي بالرابيوسوم الهدف (23) كما أظهرت النتائج أن العزلات مقاومة بشكل كبير لسيفالوسبورينات الجيل الثالث ومنها Cefotaxime وبنسبة (62.5%) وهذا مماثل لما وجدته (24) والتي وجدت أن بكتريا *B. fragilis* مقاومة وبشكل كبير له بينما وجد (25) وجماعته أن عزلاته مقاومة بنسبة (60%)، وقد تعود هذه المقاومة لكون البكتريا تفرز إنزيمات يطلق عليها السيفالوسبورينيز Cephalosporinases التي تحطم حلقة البيتا لكتام الموجودة في نواة السيفالوسبورينات وبالتالي تفقد فاعليتها القاتلة للبكتريا. بينما أظهرت العزلات حساسية عالية تجاه مضادات Carbapenem واسعة الطيف ومنها Imipenem وبنسبة (100%) ، وهذا يتفق مع ما جاء (26) الذين اشاروا الى فعالية هذا المضاد ضد العصيات السالبة لكرام، إذ كانت المقاومة ضده أقل من (1%) .

إما مضاد Gantamycin فجميع العزلات كانت حساسة له وبنسبة (100%)، جاءت هذه النتائج مشابهة تماماً لنتائج (27) الذي أظهرت عزلاته حساسية عالية إتجاهه حيث يعمل الجنتاميسين على الزيادة في تكوين الحوامض الامينية للخلية الجرثومية ينتج عنها خلل في التوازن الخلوي وتوقف في الفعاليات الابضية للخلية (28).

كما أظهرت مجموعة الكنولونات ومنها Ciprofloxacin تأثير كبير على العزلات قيد الدراسة وبنسبة (87.5%) وهذه النتائج جاءت مطابقة لما جاء به، (29) الذي أستنتج أن هذا المضاد فعال جداً ضد *B. fragilis*، إذ يعمل من خلال تثبيط DNA الخلية البكتيرية عن طريق تثبيطه لانزيم الايزوميريز (Isomerase II) أحد أنزيمات DNA Gyrase (30).

كما أبدت العزلات مقاومة عالية ضد مجموعة المضادات الكلايكوبيبتيدية وبالاخص Vancomycin وبنسبة (87.5%) وهذه النتيجة جاءت مقاربة لما جاء به (31) الذي أبدت عزلاته مقاومة كبيرة ضده وتأتي هذه المقاومة من عدم قدرة هذا المضاد من أختراق مسامات الغشاء الخارجي للبكتريا (32). في حين كانت عزلات *B. fragilis* قيد الدراسة حساسة جداً لمضاد Clindamycin وبنسبة (100%) وهذا مطابق لما جاء به (33) إذ أظهرت عزلاته حساسية عالية اتجاهه. كما اعطت جميع العزلات حساسية تامة لمضاد Metronidazol وبنسبة (100%) أيضاً جاءت هذه النتائج متفقة مع ما جاء به (34) والذي أفاد بأنه يمكن ضم هذين المضادين مع المضادات المستخدمة في علاج الجروح البطنية وذلك لطول فترة بقائهم بصورة فعالة في مصلى الشخص ولفترات طويلة وخاصة الميترونيدازول إذ يبلغ نصف عمره (7-8) ساعات نسبة الى نصف عمر الكلنداميسين البالغة (3) ساعات تقريباً، لكن خالفت هذه النتائج ما جاء به كل من (35)(36) إذ عزلوا *B. fragilis* مقاومة لمضاد الكلنداميسين والميترونيدازول، قد يعود سبب المقاومة الى أشاعة استخدامهما.

وزعت نتائج الدراسة الحالية على أساس نوع الاسهال، إذ تبين أن (5) عزلات من المصابين بالإسهال المائي الناتج عن *B. fragilis* من أصل (93) عزلة وبنسبة (5.3%)، بينما لم تعزل *B. fragilis* من عينات البراز الدموي من مجموع المرضى المصابين به والبالغ عددهم (7) مرضى فقط ، ومن هذا يتبين عدم وجود ارتباط بين نوع الاسهال ونسبة الاصابة، وقد يعود السبب لكون النوع ETBF لم تسبب نخر أو تآكل للأنسجة المبطنة للأمعاء وبالتالي عدم وجود دم في البراز، أو كون الاصابة طفيفة أو في مراحلها الاولى. جاءت هذه النتائج مشابهة لما جاء به (20) الذي عزلها من عينات الاسهال المائي .

أما بالنسبة للمسحات المعزولة من المضاعفات التي تتبع العمليات الجراحية النسائية والالتهابات المهبلية، فقد تم الحصول على عزله واحدة من المريضات اللاتي أجريت لهن عملية شق العجان من أصل (13) عزلة وبنسبة (7.6%)، عزلة واحدة من اللاتي أجريت لهن عملية رفع الاكياس المبيض من أصل (3) عزلات وبنسبة (33.3%)، إما المريضات اللاتي يشكين من التهابات مهبلية فقد عزلت *B. fragilis* أيضاً من عزلة واحدة من أصل (19) عزلة وبنسبة (5.2%)، في حين لم يتم عزلها من المضاعفات الحاصلة بعد العمليات القيصرية ورفع الرحم. إذ اظهرت النتائج أنه لا يوجد أي ارتباط بين نسبة الاصابة ببكتريا *B. fragilis* ونوع العملية الجراحية، قد يعود ذلك الى كثرة الانواع البكتيرية المسببة للالتهابات المختلفة التي تتبع العمليات الجراحية النسائية، أو كون هذه الالتهابات ناشئة عن الجهة السطحية للجروح الناتجة عن العملية الجراحية والتي تكون معرضة لوجود الاوكسجين الذي يحد من تواجد الانواع اللاهوائية.

6-4 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

تم اختبار حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة أزاء (17) نوع من المضادات الحيوية، إذ أبدت العزلات مقاومة متباينة للمضادات الحيوية كما موضح في الجدول رقم (1). فقد أبدت مقاومة كبيرة للبنسلينات مثل Ampicillin, Piperacillin, وبنسبة (100%, 100%, 75%) على التوالي ويعود سبب ذلك الى توالد أجيال *B. fragilis* المقاومة للبنسلينات لتطويعها أفران أنزيم β -Lactamas الذي يعمل على تغيير تركيب البنسلينات، انتقلت هذه النتائج مع ما جاء به (21) الذي لاحظ عدم فعالية البنسلينات ضد *B. fragilis* إذ كانت عزلاتهم مقاومة بنسبة (100%) للبنسلين وللبيراسلين بنسبة (42.7%).

كما أظهرت *B. fragilis* حساسية عالية لمضاد Amoxicillin وبنسبة (100%) وهو من البنسلينات واسعة الطيف، إذ يعمل على تثبيط تكوين البروتين من خلال الارتباط بالوحدة (30S) الريبوسومي عند نقطة ارتباطه ب Amino acyle tRNA على المعقد الريبوسومي mRNA من الجانب المستقبل. وهذا مخالف لما جاء به (22) إذ أشار الى أن البكتريا مقاومة بشكل كبير لهذا المضاد وبنسبة (93%) وقد يعود سبب المقاومة لحصول نقص في أمتصاص المضاد

(10) كأساس في حساب الاستجابة وتمثل التركيز الامثل الذي يمكن أن يصله المضاد في المصل بحيث يوفر أعلى حد من المعالجة. يوضح جدول (2) قيم MIC للمضادات الحيوية الاثنية (المترونيدازول، السيروفلووكساسين، والسيفوتاكسيم والريفامبين، الجنتاميسين، والامبسلين، والارثروميسين).

جدول (2) نتائج التركيز المثبط الأدنى للعزلات قيد الدراسة

G	AM	Eh	CIP	CTX	Rif	MTZ	MIC Mg/ml
....	256
....	2	128
....	3	64
....	4	3	32
....	2	16
....	1	4	8
....	2	4
....	7	2	2
....	2	1
8	2	0.5
....	6	6	0.25
....	2	0.125

* الرقم الموجود امام كل تركيز يمثل عدد العزلات التي لم تنمو عند ذلك التركيز

التأثير التآزري للمضادات الحيوية على العزلات

التأثير التآزري لمضاد Ciprofloxacin مع المضادات الحيوية الأخرى

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3) أن الفعالية التآزرية لمضاد Ciprofloxacin مع Cefotaxime كانت واضحة في (3) عزلات مقاومة لمضاد Cefotaxime من أصل (5) عزلات، أي بنسبة (60%)، حيث أن حساسية العزلات لمضاد Ciprofloxacin ساعدت في تقليل المقاومة ضد Cefotaxime. وهذه النتائج مقارنة للنتائج التي حصل عليها (9) إذ أشار الى أن (44%) من العزلات المقاومة لمضاد Cefotaxime تأثرت بوجود مضاد Ciprofloxacin وحصل انخفاض في قيم MIC عند تآزرهما معاً وهذا النوع من النتائج مهم جداً وخاصة في الجانب العلاجي الطبي ضد البكتريا اللاهوائية، قد يعود السبب الى قدرة مضاد Ciprofloxacin على تسهيل دخول مضاد Cefotaxime الى داخل الخلية البكتيرية. وعلى الرغم من فعالية مضاد السيروفلووكساسين على البكتريا قيد الدراسة الا أن يعيب عليه تأثيراته الجانبية الكبيرة إذ أنه من المضادات التي تنتمي إلى مجموعة الفلوروكوينولون والتي وجد أنها قد تسبب الغثيان، والصداع، ودوران، واضطرابات المعدة، كما إن الاستخدام الطويل لها قد يسبب أضراراً في المفاصل، لذلك نادراً ما يعطى للأطفال وصغار السن (40)، لذا من المهم تقليل جرسته وازداده مضاد حيوي آخر ليدعم عمله.

إما بالنسبة لتآزر مضاد Ciprofloxacin مع مضاد Mitronidazol فقد أظهرت النتائج أن تأثير التآزر بينهما ضعيف جداً لعزلة واحدة فقط وبنسبة (20%)، قد يعود السبب لكون جميع

إما مضاد Chloromphenicol فقد كانت جميع العزلات حساسة له وبنسبة (100%) أيضاً، وهذا مطابق لما وجدته (16) إذ كانت جميع العزلات حساسة له، فالكلورمفينيكول يعتبر مضاد فعال بشكل كبير ضد عزلات *B. fragilis*. وبهذا يكون في بعض الاحيان أفضل من مضاد الميترونيدازول في علاج بعض الحالات وخاصة حالات الالتهابات اللاحقة للعمليات الجراحية.

كما أعطت العزلات قيد الدراسة مقاومة عالية ضد مضاد Erythromycin وبنسبة (75%)، وهذا مطابق لما جاء به كل من (37) إذ لاحظوا أن تأثير الارثروميسين ضعيف تجاه البكتريا قيد الدراسة حيث كانت جميع عزلاتهم مقاومة له والتي قد تعود هذه المقاومة الى عدم قدرة الخلايا البكتيرية من تركيز المضاد داخلها اما بإعاقه عبوره الاغشية أو بتشكيل آلية طرد جزيئاته خارج الخلية بفعالية Efflux pump، أو بتشكيل أنزيمات بكتيرية تعمل على أسترة الارثروميسين Erythromycin esterase مما يفقده فعاليته (38).

وقد أظهرت أغلب العزلات حساسية كبيرة ضد مضاد Rifampin وبنسبة (75%)، وهذا مقارب لما جاء به (16) (25) للذان وجدا عزلاتهم حساسة بنسبة (100%) و(88.24%) على التوالي. فالمقاومة ضد هذا المضاد نادراً ما تحدث، إذ يستعمل هذا المضاد كأحد الصفات التشخيصية لجنس *Bacteroides* (25).

جدول (1) يوضح النسبة المئوية لاعداد *B. fragilis* المقاومة للمضادات الحيوية

نوع البكتريا	نوع المضاد الحيوي	النسبة المئوية	الرمز
<i>B. fragilis</i>	Piperacillin	%100	PRL
	Ampicillin	%100	AM
	Pencilin	%75	P
	Amoxicillin	%0	AX
	Cefotaxime	%62.5	CTX
	Impenimm	%0	IMP
	Amikacin	%87.5	AK
	Tobramycin	%62.5	TOB
	Gentamycin	%0	G
	Ciprofloxacin	%12.5	CIP
	Tetracyclin	%12.5	TE
	Vancomycin	%87.5	VA
	Clindamycin	%0	DA
	Metronidazole	%0	M
Chloromphenicol	%0	C	
Erythromycin	%75	Eh	
Rifampin	%25	Rif	

4-7 تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)

حددت قيم MIC للمضادات الحيوية وتبين من النتائج أن الفعالية التثبيطية للمضادات الحيوية تختلف من مضاد الى آخر حسب نوع المضاد الحيوي ونوع العزلات وحسب حساسية العزلات له، ويعرف التركيز المثبط الأدنى بأنه أقل تركيز يمنع النمو المرئي للبكتريا بعد حضانة (18) ساعة بدرجة حرارة (37 °C) (39).

خضعت عزلات الدراسة لـ (7) مضادات حيوية، وحددت حساسية العزلات اعتماداً على نقطة التوقف Break point المثبتة من قبل

بالرغم من كون الريفامبين يعتبر واسع الطيف ويستعمل لعلاج العديد من الاصابات البكتيرية الا انه يحذر من استخدامه لوحده، وذلك لسهولة تطور المقاومة اتجاهه والتي تحدث نتيجة لتغيير ألفة إنزيم البوليميراز له أو نتيجة لنقصان نفاذيته الى داخل الخلية البكتيرية (32).

جدول (4) قيم MIC الناتجة عن الفعالية التأزرية للمضادات الحيوية

العزلات	MIC M	MIC Rif		MIC Eh		MIC G	
		Rif	Rif+M	Eh	Eh+M	G	G+M
عزلة 1	2	8	8	32	32	8	8
عزلة 2	2	8	1	32	8	8	2
عزلة 3	0.25	8	4	32	32	8	1
عزلة 4	0.25	8	0.5	32	32	8	8
عزلة 5	0.25			16	4		
عزلة 6	0.25			16	16		

*M=Mitronidazole, Rif=Rifampin, Eh= Erythromycin, G=Gentamycin

* الارقام الموجودة في الجدول تمثل قيم الحد الأدنى من تراكيز المضادات التي منعت نمو البكتريا

أظهر مضادى Mitronidazole و Erythromycin فعالية تأزرية في (2) عزلة من أصل (6) عزلات أي بنسبة (33.3%)، وهذا مقارب لما جاء به (8) إذ أظهرت نتائجها فعالية تأزرية بنسبة (13%) من مجموع العزلات.

بينما أظهرت النتائج أن هناك فعالية في تآزر كل من Mitronidazole مع Gentamycin لعزلتين من أصل (4) وبنسبة 50%، وهذا مقارب لما جاء به (7) الذي وجد فعالية تأزرية بين هذين المضادين في (7) سلالات من أصل (14) سلالة وبنسبة (50%). قد يعود السبب الى زيادة في معدل عبور المضادين الى داخل الخلية البكتيرية وبالتالي زيادة تركيزهما داخلها وزيادة فعلهما القاتل.

the anaerobe survey: historical prerespective and review of the most recent data (2005-2007). Clin. Infect. Dis. 50:s26_s33. PMID: 20067390. DOI: 10.1086/647940.

7- Brook, I. (1984). Synergistic combinations of antimicrobial agents against anaerobic bacteria. The pediatric infectious disease journal. V6.

8- Ralph, E. D. and Amateks, Y. (1980). Potentially synergistic antimicrobial combinations with Metronidazole against *Bacteroides fragilis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. P. 379-382.

9- Whiting, J. L.; Chang, N.; Chow, A. W. (1987). Interaction of ciprofloxacin with clindamycin, mitronidazole, cefoxitin, cefotaxime, and mezlocillin against gram-positive and gram-negative anaerobic bacteria. Antimicrob. Agents. Chemother, 31(9): 1379.

10- CLSI. clinical and laboratory standards institute. (2011). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria Approved standard M11-

العزلات حساسة لكلا المضادين ولاتوجد أي مقاومة واضحة، وهذا مشابه لما وجدته، (41). قد يكون من المفيد أستعمالهما معاً فقط للتقليل من التأثيرات الجانبية لكلا المضادين من خلال تقليل الجرعة المخصصة للاستخدام البشري بدلاً من إعطائهم بشكل منفرد وبالتالي تتداخل الاعراض المرضية على الطبيب المعالج، حيث أن مساوئ استخدام الميترونيدازول تفوق أحياناً الاعراض المرضية الجانبية.

جدول (3) قيم MIC الناتجة عن الفعالية التأزرية للمضادات المتآزرية قبل

وبعد التآزر مع Ciprofloxacin

العزلات	MIC C	MIC CTX		MIC M	
		CTX	CTX+C	M	M+C
عزلة (1)	2	128	16	2	2
عزلة (2)	2	64	1	2	1
عزلة (3)	2	128	128	0.25	0.25
عزلة (4)	2	64	64	0.25	0.25
عزلة (5)	8	64	64	0.25	0.25

* C= Ciprofloxacin, CTX= Cefotaxim, M= Mitronidazole

* الارقام الموجودة في الجدول تمثل قيم الحد الأدنى من تراكيز المضادات التي منعت نمو البكتريا

التأثير التآزري لمضاد Metronidazol مع المضادات الحيوية الأخرى

يوضح جدول (4) الفعالية التأزرية لمضاد Mitronidazol مع كل من مضاد Rifampin و Erythromycin و Gentamycin كلاً على حدة، إذ أظهرت النتائج الموضحة في الجدول أن الفعالية التأزرية لكل من Mitronidazol مع Rifampin كانت واضحة في (3) عزلات من أصل (4) عزلات مقاومة وبنسبة (75%)، أي أن هذين المضادين معاً أظهرتا فعالية تأزرية ضد العزلات قيد الدراسة، كما جاءت هذه النتائج متفقة مع ما جاء به (42) الذي أشار الى أن هذا النوع من التآزر فعال جداً لعلاج الاصابات البكتيرية المسببة لمرض كروهن والتي تسببه الانواع البكتيرية اللاهوائية وخاصة *B. fragilis*. و المصادر

1- العبيدي، شيماء منشد مرشد (2011). دراسة فعالية بعض المستخلصات النباتية على أنواع جرثومية ممرضة معزولة من مرضى في مستشفى تكريت التعليمي. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت.

2- Shoemaker, N. B.; Vlamakis, H.; Hayes, K. and Salyers, A. A. (2001). Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides spp.* and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. Appl. Environ. Microbiol. 67:561-568.

3- Bergers, S. (2014). Gideon Guide to Medically Important Bacteria. Gideon, Inc. ISBN: 1617558427.

4- Hartmeyer, G. N.; Soki, J.; Nagy, E. and Justesen, U.S. (2012). Mult -idrug resistant *Bacteroides fragilis* group on the rise in Europe. Journal of Medical Microbiology. 61: 1784-1788.

5- Besty, T. and Keogh, J. (2005). Microbiology Demystified. The Mc-Graw-Hill Companies.

6- Snyderman, D. R. ; Jacobus, N. V.; Mc Dermott, L. A.; Ruthazer, R. et al. (2011). Lessons learned from

- 24- السلوم, رضاب هادي (1989). عزل وتشخيص الجراثيم السالبة لغرام الهوائية واللاهوائية من الجروح البطينية وتأثير المضادات الحيوية عليها. رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة بغداد.
- 25- Akhi, M. T.; Chotaslou, R.; Shirinzadeh, M.; Pirzadeh, T.; Behazad, N. M. (2013b). Comparison of E-test and disk diffusion test for antibiotic resistance testing of enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from stool. Jundishapur Journal of Microbiology. 6(5): e9800.
- 26- الحسو, محمود زكي وخلف, صبحي حسين. (2013). مقارنة بعض العصيات المعوية السالبة لصبغة كرام المعزولة من أصابات الجهاز التنفسي الشفلي لمضادات البيتا- لاكتام. مجلة علوم الراقدين, المجلد 24, العدد 6, ص 66-79.
- 27- Pauer, H.; Cavalcanti, V. N. S.; Teixeira, L. F.; Santos-Filho, J.; Vommaro, C. R.; Poliveira, C. S. C. A.; Ferreira, O. E. and Domingues, S. P. C. M. R.(2013). Inactivation of fibronectin binding Ton B dependent protein increases adhesion properties of *Bacteroides fragilis*. Jurnal Medical Microbiology. Vol,62. No.1, pt10: 1524-1530.
- 28- الشبيب, اسفار شهاب. (2009). علم الاحياء المجهرية الطبي والمضادات الحيوية والمعقمات. عمان. الاردن.
- 29- Talan, T. (2000). Comparison of ciprofloxacin (7days) and Trimethoprim - sulfmethoxazole (14days), uncomplicated pyelonephritis in women: arandomized trial. JAMA. 283: 1583-1590.
- 30- Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D.A. (2005). Microbiology. W.M. C. Brown publisher, New York .
- 31- Stiefel, U.; Nerandzic, M. M.; Pultz, J. M. and Ponskey, J. C. (2014). Gastrointestinal colonization with a cephalosporinase-producing *Bacteroides* species preserves colonization resistance agents vancomycin-risistance *Enterococcus* and *Clostridium difficile* in cephalosporin treated mice. DOI: 10.1128/AAC.02782-14.
- 32- باباي, حنان أحمد حبيب. (2012). المضادات الحيوية : طرق العمل, المصادر, المقاومة . (مترجم), الرياض, جامعة الملك فهد. (النشر الاصيلي سنة 2003).
- 33- Fille, M., Mango, M., Lechner, M. and Schumann, R. (2006). *Bacteroides fragilis* group: tends in resistance. Curr. Microbiol. 52: 153-157.
- 34- Wang, D. F.; Liao, H. C.; Lin, T. Y.; Sheng, H. W. and Hsueh, R. P. (2014). Trends in the susceptibility of commonly encountered clinically significant anaerobes to 16 antimicrobial agents, including fidaxomicin and rifaximin, Northern-Tawin. J. Clin. Microbiol infect Dis. 33:2041-2052.
- 35- Karlowsky, A. J.; Walkty, J. A.; Adam, J. H.; Baxter, R. M.; Hoban, J. D. and Zhanel, G. G. (2011). Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010-2011: CANWARD surveillance study.
- A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- 11- Jubran, S. (1986). Isolation and Identification of Bacteria from Traumatic Wound and their Sensitivity Pattern of Antibiotic. Athesis of M. S. Degree in Bacteriology AL-mostansiryra University.
- 12- Mayers, L. L.; Shoop, D. S.; Stackhouse, L. L.; Newman, F. S.; Flaherty, R. J.; Leston, G. W. and Sack, R. B. (1987). Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 25(12): 22330.
- 13- Selkon, J. B. (1981). The bacteriology of war wound. J. Roy. Naval Med serv,67:160-164.
- 14- Brooks, G.; Carroll, K. C.; Butel, J.; Morse, S. (2012). Jawetz Melnick, and Adelbergs Medical Microbiology. 2thed. Mc Graw Hill Professional.
- 15- Ramamorthy, D.; Pazhani, G.; Sarker, A.; Nandy, K. R.; Rajendran, K.; Sur, D. and Ramammurthy, T. (2013). Case Control study on the Role of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* as a case of diarrhea among children in Kalkata, India. DOI: 10.173/1/Journal.
- 16- Yehya, M.; Hamze, M.; Mallat, H. and Dabbousi, F. (2013). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolated from stool samples in north Lebanon. Braz. J. Microbiol. Vol.44.No,35 aopaulo , July/ sept.
- 17- Klosterman, L. (2009). Immune system (The amazing human body). Marshal Cavendish Corporation. New York. Tarytown.
- 18- Pop. M.; Walker, W. A.; Paulson, J.; Lindsay, B.; Antonio, M.; et. al. (2014). Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota. Compostion genome biology. DOI. 10\1186.
- 19- Danmd, U. and Sjmd, C. (2003): After cesarean section in the rural origin in the oslo; Department of obstetrics and Gynocology; Arnold balmer Childrean and Woman Hospital in the Floredia , 20(2): 63-67 .
- 20- Shiryaev, A. S.; Remacle, G. A.; Chernov, V. A.; et.al.(2013). Substrate cleavage profiling suggest a distinct function of *Bacteroides fragilis* metalloproteinases (Fragilysin and Metalloproteinase II) at the microbiome inflammation. Cancer Interface. clinical microbiology and infection diseases.
- 21- Jamal, W.; AL-Hashem, G. and Rotimi, O. V.(2014). Antimicrobial resistance among anaerobes isolate from clinical specimens in Kuwait hospitals : comparative analysis of year data. Anaerobes. Antibiotic, Resistance, Kuwait.
- 22- Nakano, V.; Silva, A. D. N.; Rafael, V.; Marino, C.; Wexler, H. M. and Avila-Compos, M. J. (2011). Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. Clinics, Vol. 66, No.4.
- 23- Fong. W. I. and Karl-Darlica, A. (2008). Antimicrobial resistance and implications for the 21 st Century. Springer Science and Business Media, LLC. ISBN: 978-0-387-72417-1. P208-225.

- production of SHV-5beta lactamase. J. Clin. Microbiol, 34(2):p 358-363.
- 40- **Haser**, A. R. (2013). Antibiotic basics for clinicians, The ABC of choosing the right antibacterial agent. 2nded. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore. Pp 87-88.
- 41- **Choudhary**, M. and Payasi, A. (2014). Emerging Metronidazole Resistance in Anaerobes and Mapping their Susceptibility Behaviour. American Journal of Infectious Diseases.10(2): 56-63.
- 42- **Goldberg**, N. D.; Valdlamudi, A. and Parrish, N.(2015). Treatment of Refractory Crohns Disease and Pyoderma Gangrenosum with a Combination Regimen of Rifaximin, Gentamycin and Metronidazole. Case Rep Gastroenterol, 9:25-28.
- Antimicrob. Agents Chemother. DOI; 10. 1128/AAC. 05823-11.
- 36- **Meggersee**, R. L. (2014). Metronidazole resistance in clinical *Bacteroides fragilis* isolates from Groote Schuur Hospital, Cape Town, South Africa. Dept of Molecular Cell Biology.
- 37- **Galvao**, B. P.; Meggersee. R. L. and Abratt, V. R. (2011). Antibiotic resistance and adhesion potential *Bacteroides fragilis* clinical isolates from Cape-Town, South Africa. Anaerobe. 17(4): 142-6.
- 38- **شاهين**, عمر أحمد و شاهين، رند عمر. (2008). المضادات الحيوية. الطبعة الثالثة، عمان الاردن، دار الفكر.
- 39- **Franch**, GL.; Shanon, KP. and Simmons, N. (1996). Hospital outbreak of *Klebsiella pneumonia* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam, beta-lactamase inhibition combinations hyper

Isolation and Identification of *Bacteriodes Fragilis* and Determination of the Synergist Effect of Some Antibiotics Used in Treatment Patients Infected with this Bacteria in Samarra Hospital

Osama Nathem Nijris , Sarab Khalil Huseen

Department of Biology , College of Education of the Pure Sciences , University of Tikrit , Tikrit , Iraq

Abstract

The study deals with isolating and identifying of *B.fragilis* from patients entered and visited the state hospital in samarra from 1/9/2013 to 1/5/2014. (150) samples were collected and the patients' samples are distributed into (100) samples taken from the patients having diarrhea and (50) samples taken from the female patients having complication followed the female surgical operations and the vaginal inflammation.

The results show that only (5) samples from all the diarrhea samples develop positive bacteriological growth by *B. fragilis* at ratio (5%). This study demonstrated that the new-born infants and children who are less than 5 years are the most exposed to diarrhea caused by *B. fragilis* that the ratio of the infection is (7%) (11%) respectively, whereas the results for the smears taken from the female patients having complication followed the female surgical operations and the vaginal inflammation show growth to *B. fragilis* in (3) samples and at ratio (6%), it is evident that the adult group of the women ranged between (14-20) years are the most exposed to the vaginal inflammations and the complication that followed the female surgical operation.

It also tests the susceptibility of the bacterial isolates against (17) types of the antibiotic. The results appear that the *B. fragilis* bacteria are extremely resistant to numerous antibiotics, so it appears a ratio of resistance to antibiotics (PRL), (AM), (P), (CTX), (AK), (TOB), (V), and (Eh). Their ratios are reaches (100%, 100%, 75%, 62%, 87%, 62%, 87%, 75%) respectively, whereas the *B. fragilis* are show a highly susceptibility against the antibiotics (C), (M), (DA), (AX), (IMP) and (G), so the ratio of their susceptibility reaches to (100%) in each type of these antibiotics.

It also calculates the minimum inhibitory concentration (MIC) for the antibiotics: (M), (AM), (G), (CIP), (CTX) , (Eh) and (G). It is also tests the synergical activity for these antibiotics against the isolates under-studied, which proves that the most effective synergies against *B.fragilis* is the synergy between (C) and (CTX) at ratio (60%) than the other isolates group. The synergy between (M) and (Rif) is shows an evident effect against the under-studied isolates with ratio (75%) from all the resistant isolates.