مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 24 (2) 2011

حساسية بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اخماج المجاري البولية لمضادي Ciprofloxacin و Lomefloxacin

سوسن محمد كريم، صباح عبد اللطيف بلال
قسم علوم الحياة، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية
قسم الاحياء المجهرية، كلية الطب ، جامعة النهرين

استلم البحث في: 5، ايار، 2010
قبل البحث في : 9، تشرين الثاني، 2010

الخلاصة

جمعت 450 عينة ادرار من مرضى يعانون من التهابات المجاري البولية من مستشفى آزادي العام في كركوك للمدة من تشرين الاول (2007) والى غاية آذار (2008) .

اظهرت نتائج الزرع البكتريولوجي الاولي باستخدام وسطي اكار الدم والمكونكي ظهور زرع موجب في (168) عينة من مجموع (450) عينة بنسبة (37.3 %) زرع موجب ، ومن خلال التشخيص المورفولوجي والكيموحيوي تم الحصول على انواع عديدة من العزلات البكتيرية ، شكلت بكتريا *Escherichia coli* النسبة الكبرى للعزل بواقع (100) عزلة من المجموع الكلي للعزلات البكتيرية والبالغ (190) عزلة وبنسبة (52.63 %) .توزعت الـ (100) عزلة بين (77) من الاناث و (23) من الذكور .

اختبرت حساسية عزلات بكتريا *E.coli* المئة اتجاه (13) نوعاً من المضادات الجرثومية المستعملة في علاج التهابات المجاري البولية ، وقد وجد ان هنالك تفاوتاً في نسبة حساسيتها لهذه المضادات . أظهرت النتائج ان العقار المطهر للمجاري البولية Nitrofurantoin هو الاكثر تاثيراً في بكتريا *E.coli* , أذ بلغت نسبة المقاومة له (14 %) ،فيما اظهرت عزلات بكتريا *E.coli* مقاومة عالية لباقي المضادات : sulphamethoxazole (100 %) ، Ampicillin (99 %) ، Cephalexin (62 %) ، Agumentin (58 %) ، Nalidixic acid (54 %) ، Trimethoprim (52 %) ، Piperacillin (45 %) ، Ceftriaxone (40 %) ، Lomefloxacin (39 %) ، Cefotaxime (39 %) ، Ciprofloxacin (37 %) ، Co-trimxazole (37 %) .

درست التراكيز المثبطة الدنيا MIC لمضادي Ciprofloxacin وLomefloxacin واظهرت النتائج ارتفاع في قيم MIC اذ أعطت ثمان عزلات من بكتريا *E.coli* قيمة (400<µg/ml) من مضاد Ciprofloxacin وبنسبة (19.5%) في حين كانت خمس عزلات من بكتريا *E.coli* بقيم MIC (400<µg/ml) وبنسبة(11.6 %) لمضاد Lomefloxacin .

درست قابلية عزلات بكتريا *E.coli* ،على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المحدودة بطريقة الأنابيب الشعرية واظهرت النتيجة ان (61 %) من العزلات كانت موجبة الفحص عندما تغير لون الدليل الفينول الاحمر من اللون الاحمر الى الاصفر خلال (15) دقيقة .عند استخدام طريقة الاقراص المتاخمة للتحري عن انتاج انزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف وجد ان نسبة العزلات المنتجة لها قد بلغت (18 %) عندما اعطت (11) عزلة من اصل (61) عزلة نتيجة موجبة ،وقد ابدت تسع عزلات منتجة لانزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف مقاومتها لمضادات مجموعة الكوينولينات (Naldixic acid و Ciprofloxacin و Lomefloxacin) وبنسبة(72.7%) .

الكلمات المفتاحية :اخماج المجاري البولية ،حساسية بكتريا *E.coli*، التراكيز المثبطة الدنيا MIC لمضادي Ciprofloxacinو Lomefloxacin

المقدمة

تعد التهابات المجاري البولية اكثرانواع الالتهابات شيوعا وحدوثاً بين الافراد وتعرف على إنها إصابة المسالك البولية بالاحياء المجهرية (بكتريا – فايروسات – فطريات – طفيليات) [1].

إن هذه الممرضات لها القدرة على احداث الاصابة للانسان في أي مرحلة عمرية ،ان البكتريا هي الممرض الاكثر شيوعاً في احداث التهابات المجاري البولية ولاسيما السالبة لملون كرام وتحديداً بكتريا *E.coli* ، أذ تشكل نسبة (90 %) من اصابات التهابات المجاري البولية الحاد وصولاً الى التهاب الكلية و الحويض المزمن (Pylonephritis) [1]

تعد بكتريا *E.coli* من مكونات الفلورا الطبيعية بالامعاء ولها اهمية كبيرة في المحافظة على توازن البيئة المعوية والفعالية الفسلجية الا انها تعد بكتريا انتهازية (Opportunistic Bacteria) عند تغير موقعها الأصلي (الامعاء) الى اماكن اخرى محدثة اصابات مختلفة لا سيما التهابات المجاري البولية ،و الاسهال ، واصابات الجروح والقرح السريرية ، والالتهابات الرئوية ،والتهابات السحايا الدماغية والتسمم الدموي ، التي قد يكون احداها سبباً للموت فضلاً عن اصابات الحيوانات التي تسبب هلاكات وخسائر اقتصادية فادحة[2] .

تعود قدرة بكتريا *E.coli* على احداث اصابات مختلفة الى ما تمتلكه من عوامل ضراوة اهمها الاهداب (Pili) والى امكانيتها السريعة في تطوير وتنويع آلياتها لمقاومة المضادات الحيوية المختلفة ولاسيما الشائعة منها في علاج التهابات المجاري البولية أذ أي مضاد ينتج حديثاً ما يلبث مدة وتظهر سلالة مقاومة له مما يجعل المضاد غير فعال وفاقد قابليته على العلاج والشفاء من الاصابة .

ان ظهور العديد من السلالات البكتيرية المقاومة لواحد او اكثر من المضادات الحيوية المهمة من الناحية العلاجية اصبحت مشكلة خطيرة من الناحيتين الاقتصادية والصحية لذا كان الهدف من هذه الدراسة :

– التحري عن المسببات البكتيرية الاكثر شيوعاً لاحداث التهابات المجاري البولية وعلاقتها ببعض العوامل التي تساهم في حدوث الاصابة مثل (العمر والجنس) .

– دراسة حساسية عزلات بكتريا *E.coli* لمضادات مجموعة الكوينولينات وغيرها من المضادات شائعة الاستعمال في علاج التهابات المجاري البولية بغية التعرف على المضادات الأكثر تأثيراً

– تحديد قيم التركيزالمثبط الادنى MIC لمضادي Ciprofloxacin , Lomefloxacin

–التحري عن قابلية عزلات بكتريا *E.coli* على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المحدودة والواسعة الطيف منها وربط ذلك مع مقاومة البكتريا للمضادات الاخرى .

طرائق العمل

- **جمع العينات**

جمعت 450 عينة ادرار من اشخاص يعانون من اعراض التهاب المجاري البولية ومن كلا الجنسين وباعمار مختلفة من مستشفى ازادي العام في كركوك للمدة الواقعة مابين (27-10-2007) ولغاية (19-2-2008) . اخذ الانموذج من المرضى بطريقة العينة الوسطية (Midstream urine) ووضعت في قناني معقمة ذي غطاء محكم ، كان اخذ الانموذج قبل بدء المريض باخذ المضادات الحيوية [3].

- **فحص العينات**

اجري الفحص المجهري العام للادرار (General urine examination) وتم ذلك عن طريق اجراء طرد مركزي لعينات الادرار المجموعة من المصابين ،اهمل الراشح و اخذ الراسب في قعر الأنبوبة، وضع الراسب على شريحة زجاجية نظيفة ووضع فوقها غطاء الشريحة، فحصت تحت المجهر تحت قوة (X10) للتحري عن وجود خلايا قيحية وكريات الدم الحمراء والخلايا الطلائية اذ يعد وجودها مؤشراً على الاصابة بالتهاب المجاري البولية [4] .

- **زرع العينات**

زرعت عينات الادرار التي تم جمعها خلال (20–30) دقيقة حداً اقصى من وقت اخذ العينة وباستعمال ناقل زرع قياسي على الوسط الاغنائي(اكار الدم) والوسط التفريقي (المكونكي اكار) وحضنت الاطباق بالحاضنه بدرجه حرارة 37م مدة (18–24) ساعة.

- **تشخيص البكتريا**

استعملت عدد من الفحوصات التشخيصية لتشخيص العزلات البكتيرية:وحسب ماورد في [4] :

- **التشخيص المورفولوجي**
- **الفحص المجهري**
- **الاختبارات الكيموحيوية**

1: إختبار الاوكسديز (Oxidase test)

2 : إختبار الكاتليز (Catalase tset)

3 : إختبار إنتاج الإندول (Indol test)

4 : إختبار احمر المثيل (Methyl Red test)

5 : إختبار فوكس بروسكاور (Voges – proskauer test)

6 : إختبار إستهلاك السترات (Citrate Utilization test)

7 : إختبار تخمر السكريات الثلاثية (Triple – sugar iron agar)

8 : إختبار إنتاج اليوريز (Urease test)

- **فحص حساسية البكتيريا للمضادات الجرثومية**

إستعملت طريقة (1966) . Bauer-Kirby إذ لقحت انابيب إختبار حاوية على (2) مل من المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline بمستعمرة واحدة من العزلات المدروسة النامية بوسط اغنائي بوساطة الناقل الزرعي القياسي المعقم من كل مزروع وإضافته الى المحلول في انبوبة الاختبار وبعد رج الانابيب بصورة جيدة باستعمال المازج الدوار (Vortex)

قورنت العكورة المتكونة مع ثابت العكورة القياسي (Macfarland Standard) للحصول على خلايا بعدد (1.5×10^{8}) خلية / مل .

استعمال وسط (Muller- Hinton agar) لإجراء هذا الفحص ،زرع على سطح الوسط الزرعي بوساطة قطيلة معقمة (Swabs) بغمر كل قطيلة داخل انبوبة الاختبار الحاوية على العالق البكتيري ومن ثم رفعها من سطح السائل ، ثم الضغط على القطن جيدا عند حافات الانبوبة الزجاجية للتخلص من السائل الزائد ،بعدها تم التخطيط على سطح الوسط الزرعي بثلاثة إتجاهات (طريقة فرش الحصير).

تركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة مدة (5) دقائق وقد استعملت اقراص المضادات الحيوية فقد نقلت الاقراص إلى سطح الطبق المزروع بوساطة ملقط معقم ذو نهاية رفيعة مع ترك مسافة كافية بين قرص واخر لتلافي حدوث تداخل بين مناطق التثبيط ، حُضنت الاطباق بدرجة حرارة(37 مْ) مدة (24) ساعة ، قيست بعدها مناطق التثبيط حول اقراص المضادات الحيوية بالمليميتر بوساطة مسطرة مدرجة ، فسرت النتائج وعدت البكتيريا حساسة (S) ، مقاومة (R) اومتوسطة المقاومة (I) وكما موضح في جدول رقم

(1) وحسب المواصفات الواردة فيNCCLS [5] فضلاً عن مقارنة النتائج مع نتائج العزلة القياسية (*E.coli* 25922 ATCC) سيطرة سالبة .

- **تحضير اقراص مضاد السلفميثاكسزول**

تم تحضيرها حسب ما ورد في [5] اذ استخدمت اقراص ذو قطر 6 مليمتر من اوراق ترشيح نوع واتمان رقم (Whatman No.1). عقمت الاقراص بوساطة المؤصدة ، حضرمضاد السلفميثاكسزول باذابة (1) غم من المضاد في (50) مل الماء المقطر الساخن ثم اضيفت له بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) عياري (2.5) لحين ذوبان المضاد ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى(100) مل ، واضيفت (0.005) مل من محلول المضاد المحضر على كل ورقة بوساطة ماصة دقيقة ثم تركت لتجف للحصول على تركيز نهائي (300µg / Disc) .

- **فحص حساسية البكتريا للمضادات الجرثومية بوجود دم الخيول المتحلل**

استعمل لهذا الفحص وسط مولر–هنتون الصلب الحاوي على دم الخيول المتحلل بنسبة (4 %) لفحص حساسية البكتريا اتجاه المضادات الجرثومية (Co-trimoxazole،Sulphamethoxazole،Trimethoprim) [6].

- **قياس التركيز المثبط الادنى Determination of minimal inhibitory concentration**

استعملت طريقة التخافيف المتسلسلة المتضاعفة (Two fold dilution Method) لكل من المضادين الجرثوميين(Lomefloxacin ,Ciprofloxacin)

حضر اولاً وسط مولر–هنتون اكار في قناني زجاجية نظيفة وبمقدار (14) مللتر لكل قنينة بعدها عقمت بالمؤصدة وتركت لتبردت إلى (50 مْ) ،ثم اضيف لها (1) مللتر من كل تركيز من التراكيز النهائية للمضادات الجرثومية المستعملة في التجربة والمحضرة حسب الجدول رقم (2) الى الأوساط الزرعية ، رجت الأوساط جيدا بعد إضافة المضاد وصبت في اطباق معقمةومعلمة بالتراكيز المطلوبة وكما موضح بالجدول رقم (2).

حضر العالق البكتيري من خلال اجراء تخافيف عشرية (10^{-2}) لمزارع البكتريا المنماة على وسط مولر – هنتون السائل بعمر(18–24) ساعة باستعمال المحلول الملحي الفسلجي ثم سحب(5) مايكروليتر من التخافيف بوساطة ماصه دقيقه ، ووضعت القطرات على الوسط الزرعي في الاطباق الحاوية على تراكيز المضادات ثم تركت الأطباق فتره في درجة حرارة المختبر لحين جفاف القطرات ثم قلبت الاطباق ووضعت بالحاضنة في درجة حرارة (37 مْ) لمدة (24) ساعة

ساعة . كررت العملية لكافة المزارع بالتسلسل وباستعمال مكررين للتركيز الواحد .تم مقارنة النتائج مع نتائج العزلة القياسية(*E.coli* ATCC 25922) كسيطرة سالبة[7] .

- **الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز**

1 :طريقة الأنابيب الشعرية:

أستعملت هذه الطريقة للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز وذلك حسب ما ورد في [8] وكما يأتي:

1- أضيف (2) مل من محلول أحمر الفينول (0.5%) الى قنينة حاوية على (1000000) وحدة دولية عالمية من بنسلين جي المذاب في (16.6) مل من الماء المقطر المعقم.

2- أضيفت قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز (1) عياري الى ان تحول لون المحلول الى اللون البنفسجي ، ضبط الرقم الهيدروجيني الى (8.5) .

3- غمس طرف الأنبوبة الشعرية في محلول المضاد المحضر أعلاه حتى وصل الى مسافة (1-2)سم

4- مررت الأنبوبة الشعرية على مستعمرة بكتيرية بعمر 24 ساعة حتى لامست المستعمرة المحلول داخل الأنبوبة الشعرية مع تجنب حدوث فقاعات بين المحلول والمستعمرة.

5- حضنت الأنبوبة الشعرية عموديا عند درجة حرارة الغرفة.

6- قرأت نتيجة الفحص ، وتعد موجبة عند تغير لون المحلول في الأنبوبة الشعرية الى اللون الأصفر خلال 15 دقيقة .

7- أستخدمت العزلة القياسية *E.coli* ATCC25922 للمقارنة السالبة .

2:الكشف عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum B-lactamase ESBLs:

استعملت طريقة الأقراص المتاخمة Disc approximation للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك حسب ما ورد في [9] وكمايأتي:

1- حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة من خلال تلقيح انابيب إختبار حاوية على (2) مل من المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline بالعزلات المدروسة باخذ جزء من المستعمرات النامية بوسط اغنائي بوساطة الناقل الزرعي القياسي المعقم من كل مزروع وإضافته الى المحلول الفسلجي في انبوبة الاختبار وبعد رج الانابيب بصورة جيدة باستخدام المازج الدوار (Vortex) ؛ وقورنت العكورة المتكونة مع ثابت العكورة القياسي (Macfarland Standard) .وبعدها تم الزرع على سطح الوسط الزرعي (Muller-Hinton agar) بوساطة قطيلة معقمة Swab بصورة كاملة ، تركت الأطباق مدة (5) دقائق لتجف.

2- وضع قرص يحتوي على خليط من
(30 µg/ Disc) Amoxicillin/ Clavulanic acid
في وسط الطبق الزرعي الملقح . بعد ذلك رتبت أقراص المضادات الحيوية Cefotaxime,Ceftriaxone Pipracillin, على بعد 3 سم من مركز قرص خليط المضاد / المثبط.

3- حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مئوية لمدة 18-24 ساعة.

4- وبملاحظة مناطق التثبيط فأن حدوث أتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وواحد أو أكثر من الأقراص المذكورة دليل على النتيجة الموجبة أي أنتاج العزلة للأنزيم وكما هو مبين :

A- Amoxacillin+Clavulanic acid(Agumentin)
B- Piperacillin
C- Cefotaxime
D- Ceftriaxone

النتائج والمناقشة

- **العزل والتشخيص**

تم الحصول في هذه الدراسة على (190) عزلة بكتيرية من مرضى يعانون من اعراض التهابات المجاري البولية ،وقد لوحظت مواصفات تلك العزلات على الاوساط الزرعية لغرض معرفة اهم المسببات المرضية البكتيرية الشائعة المسببة لهذا المرض ،اذ ان الاعتماد على طرائق التشخيص المختبرية مهم لغرض معرفة نوع المسبب الجرثومي ومن ثم اختيار العلاج الأمثل لألتهابات المجاري البولية .[10]

توزعت النسبة المئوية بين العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة كما موضح في الجدول (3) .

- **توزيع عزلات بكتريا *E.coli***

اظهرت نتائج هذه الدراسة ان عدد عزلات بكتريا *E.coli* المسببة لالتهابات المجاري البولية هي (100) عزلة توزعت بين (67) عزلة بنسبة (67 %) من المرضى المراجعين للعيادة الخارجية و(32) عزلة بنسبة (32 %) من المرضى الراقدين بالمستشفى وعزلة واحدة بنسبة (1 %) من مرضى حالات الطوارئ وكما ومبين بالشكل (1).

- **تردد بكتريا *E.coli* ضمن الأجناس والفئات العمرية**

اظهرت نتائج هذه الدراسة ان الاشخاص الذين يعانون من التهابات المجاري البولية هم اغلبهم من النساء ، أذ بلغت نسبة الاناث (77%) فيما كانت نسبة الذكور (23%) وكما موضح بالشكل (2).

- **نتائج اختبار حساسية بكتريا *E.coli* للمضادات الجرثومية**

تظهر السلالات البكتيرية في غالبية الاحيان مقاومة متعددة لانواع مختلفة من المضادات الحيوية نتيجة لسوء استعمالها في علاج مختلف الامراض ، اذا اصبح من الشائع جداً بالمستشفيات عزل سلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيويةلا سيما مضادات البيتالاكتام ضمن افراد العائلة المعوية [11] كذلك مضادات المجموعة الامينو كلايكوسيدية ومضادات الكوينولينات ضمن البكتريا السالبة لملون كرام التي تسبب الاصابات المكتسبة من المستشفيات والتي تتواسط مقاومتها البلازميدات عادة وكما اظهرت نتائج هذه الدراسة مبين في جدول رقم (4) يوضح نسب مقاومة بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية المستخدمة.

ان ارتفاع نسب المقاومة البكتيرية اتجاه مضادات الكوينولينات ربما يعود الى حدوث تحولات بمنطقة الهدف (المتمثلة بالانزيمات التي ترجع الدنا لحالة اللف الفائق DNA gyrase) ،او في زيادة انظمة الدفق و ربما تعود الى مجاميع نسيلة احادية وهذه الاخيرة غير مشتقة من مجاميع نسيلة حساسة ذات ضراوة عالية (أي مقاومة) ، تتعلق بالخلفية المتطورة لهذه النسيلة وهنالك اليات اخرى لمقاومة الكوينولينات مازالت غير معروفة [12].

- **نتائج اختبار حساسية بكتريا *E.coli*للمضادات الجرثومية بوجود دم الخيول**

انَ احتواء الوسط الزرعي في تركيبه على كمية من Thymidine ممكن أن يعكس التاثير المثبط لمضادات Co-trimoxazole و Trimethoprim وSulphamethoxazole فعلى الرغم من أن الكمية قليلة إلا انه بامكانها أن تجعل منطقة تثبيط النمو الملاحظة تبدو اصغر من (20mm) و قد تعمل على عدم اظهار منطقة تثبيط النمو (لايوجد منطقة تثبيط)

مما يؤدي إلى اعطاء نتيجة خاطئة عند فحص حساسية البكتريا لهذه المضادات [13] . وأن اضافة دم الخيول المتحلل بنسبة (4-5 %) الذي يحتوي على انزيم Thymidine phosphorlase يعمل على تحويل Thymidine الى Thymin والاخير يكون فعله التثبيطي اقل على هذه المضادات وإظهار النتيجة الحقيقية لحساسية البكتريا لهذه المضادات [6] ،كما موضح في الصورة (1) والجدول رقم (4).

اختبرت حساسية بكتريا *E.coli* لهذه المضادات واظهرت نتائج الدراسة أن البكتريا قاومت مضاد Sulphamethoxazole وبنسبة (100 %) هي اعلى نسبة مقاومة أبدتها بكتريا *E.coli* اتجاه المضادات المستعملة والسبب في ذلك يعود ربما إلى قدرة البكتريا على زيادة انتاج مركب P-amino benzoic acid(PAPA) و قدرتها على تغيير مساراتها الايضية [14]. فيما قاومت بكتريا *E.coli* مضاد Trimethoprim بنسبة (52%) وابدت عزلة واحدة مقاومة متوسطه له (1 %) ، كما موضح بالجدول رقم (4) ويعزى سبب مقاومة العزلات لهذا المضاد الى امتلاكها لبلازميد المقاومة R plasmid الذي يشفر الى نوع من انزيم Dihydrofolate reductase الذي يكون اكثر مقاومة لفعل المضاد من الانزيم الطبيعي [15] .

اظهرت نتائج هذه الدراسة مقاومة بكتريا *E.coli* بنسبة(37 %) لمضاد Co-trimoxazole هو مضاد خليط من مضادي (Trimethoprim+Sulphamethoxazole) بنسبة (1:20) ، وهذه النتائج لا تتوافق مع الدراسات المحلية التي تشير الى ارتفاع مقاومة بكتريا *E.coli* وربما يعود السبب الى مكونات الوسط الزرعي المستعمل التي تعمل على تثبيط عمل المضاد .

قياس التركيز المثبط الادنى

استعمل نوعان من المضادات الجرثومية من مجموعة الكوينولينات الجيل الثاني (الفلوروكوينولينات) احدهما شائع الاستعمال في مستشفياتنا لعلاج التهاب المجاري البولية وهو Ciprofloxacin والثاني Lomefloxacin يستعمل ايضاً لعلاج لتهاب المجاري البولية ولكنه لم يدخل القطر (غير متداول) في تحديد التراكيز المثبطة الدنيا .

يلاحظ من النتائج ارتفاع نسبة المقاومة للمضادين وبتراكيز عالية بصورة ملحوظة ،ويلاحظ ارتفاع عدد العزلات المقاومة لمضاد Ciprofloxacin بتراكيز عالية في حين العزلات انفسها تكون مقاومة لمضاد Lomefloxacin ولكن بتراكيز اقل كما موضح بالشكل (3) ويعود السبب في ذلك الى انتشار المقاومة لمضاد Ciprofloxacin المتداول في المستشفيات والعيادات الخارجية وحتى بدون وصفة طبية .

كما يلاحظ ان العزلات (42،51،59،100) التي ابدت استجابة معتدلة لمضاد Ciprofloxacin في فحص الحساسية Disc method قد تحولت الى مقاومة في فحص MIC ،اما في مايخص مضاد Lomefloxacin فقد ابدت العزلات (33،42،49،52،60،92) استجابة معتدلة له في فحص Disc method لكن عند اجراء فحص MIC تحولت العزلات (33،60) الى حساسة عند تركيز (1.6µg/ml) في حين العزلات (49،52) ابدت استجابة معتدلة ايضا عند تركيز (µg 6.25/ml) الا ان العزلات (42،92) تحولت الى عزلات مقاومة وهذا يشير الى احتمالية وقوع اخطاء بالعمل او في ظروف التجربة لان قيم MIC تعطي دلالة اكثر وضوح ان الاستمرار باستعمال مضادات الفلوروكوينولنات للاغراض العلاجية يزيد من نسبة نشوء مقاومة لها [16]

تمتلك بكتريا *E.coli* آليات الدفق Efflux system التي تعمل على قذف مضاد Ciprofloxacin خارجاً مما يجعل قيم MIC مرتفعة له [17] ويساعدها في ذلك طبيعته الكيميائية المحبة للماء Hydrophilic وحجمه الصغير (القلب مكون من حلقتين) جعلت منه ركيزة لانظمة الدفق norE , mdf A التي بزيادة تعبيرها تزداد نسبة قذف المضاد [18].ان قذف المضاد خارج الخلية البكتيرية يجعل من تركيزه داخلها قليل (تركيز تحت المثبط Sub inhibitory concentration) مما يسمح

للخلية البكتيرية من حدوث طفرة تلقائية في الموقع الهدف DNA gyrase لعمل المضاد ومن ثم حدوث المقاومة [19].

- قابلية عزلات بكتريا ***E.coli* على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز**

لغرض تحديد العزلات البكتيرية المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز اختيرت طريقة الأنابيب الشعرية (Capillary method) المعتمدة على انتاج حامض Penicilloic acid نتيجة لعمل انزيمات البيتالاكتاميز ، وتعد هذه الطريقة من الطرائق السريعة في اعطاء النتائج اذا استعمل .Pencillin G ركيزة Substrate لهذا الفحص كونه يوفر مسحاً اولياً شاملاً لجميع انواع انزيمات البيتالاكتاميز ويعد تحول لون الدليل Phenol red من الاحمر الى الاصفر نتيجة موجبة [20] .

استطاعت (61) عزلة بكترية من انتاج انزيمات البيتالاكتاميز وبنسبة (61 %) ، ان بعض العزلات ابدت مقاومة لمضادات البيتالاكتام على الرغم من عدم انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز مما يدل على وجود آليات اخرى لمقاومة مضادات البيتالاكتام منها التغير في موقع الهدف ،او في بروتينات الغلاف الخارجي [21]هذا يتفق مع ما اشار اليه Rice *et al* [22] من ان انتاج انزيم البيتالاكتاميز ليس الميكانيكية الوحيدة التي تلجا اليها البكتريا لمقاومة مضادات البيتالاكتام .

- **قابلية عزلات بكتريا *E.coli* على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف**

تعد طريقة الاقراص المتاخمة (Disk approximation) من الطرائق المعتمدة في التعرف على قابلية العزلات البكتيرية في انتاج انزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف ،أذ اعتمدت نتيجة الفحص استناداً الى حدوث منطقة اتساع بمنطقة التثبيط بين القرص المركزي الحاوي على مضاد Augmentin الذي يتكون من (Amoxacillin + Clavulanic acid) والاقراص الاخرى الحاوية على Cefotaxime و Ceftriaxone و Piperacillin

اظهرت نتائج هذه الدراسة تمكن (11) عزلة بنسبة (18.03 %) من اصل (61)عزلة بكتريا *E.coli* منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز من انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف التي لها القدرة على مقاومة السيفالوسبورينات الجيل الثالث والبنسلينات الحديثة فضلاً عن مضادات البيتا لاكتام القديمة وكما يظهر بالصورة رقم (2). يمتلك عدد كبير من افراد العائلة المعوية بلازميد يشفر لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs التي تعمل على تحليل السيفالوسبورينات التي تمتلك سلاسل جانبية حاوية على (Oxyimino) وكل المضادات الحاوية عليها[23] ،ان اغلب عزلات بكتريا *E.coli* المعزولة من التهابات المجاري البولية تمتلك انزيم البيتالاكتاميز CTX-M الذي يمتلك الفة عالية لمضاد Cefotaxime [24] اشار كل من[25] الى ان اغلب عزلات بكتريا *E.coli* التي تمتلك انزيم CTX-M-15 تكون مقاومة لمضادات البيتالاكتام الحديثة فضلاً عن مقاومتها مضادات الكوينولينات والامينوكلايكوسيدية ، هذا يتفق مع نتائج هذه الدراسة أذ اظهرت العزلات (77،62،53،25،18،15،14،10) ذات القدرة على انتاج انزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف ESBLs مقاومة لمضادات الكوينولينات أذ بلغت نسبتها (72.7 %) و .وربما يعود السبب في ذلك الى وقوع جينات المقاومة للمضادات الحيوية على بلازميد مقاومة واحد .

المصادر

1. Nicolle, LE. (February 2008). Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. Urol. Clin. North Am. 35 (1): 1-12, v
2. Todar, K.(January 2007).Pathogenic *E.coli* . University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.U.S.A. Online Textbook of Bacteriology.
3. Rose, P.W. & Peutherer, J.F.(1987).Clinical Microbiology .U.k.

4. Atlas, R. A.; Parks, L. C. and Brown, A. E. (1995). Laboratory manual experimental microbiology.1st ed. Mosby-Year book.: 312.

5. National Committee For Clinical Laboratory Standareds (2002). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A. Scott,s Dignostic Microbiology . IIth. Edmosby .PP: 138-40.
6. Ganad, L.P.; Lambet,H.P. and O'Grady. F.O.(1981).Antibiotic& Chemotheraputic.5th ed. P.475-476.
7. Water worth, P. M.(1978).Quantitative methods for bacterial sensitivity testing in: laboratory methods in antimicrobial chemotherapy ,by Reves,D.S. ,Philips,I. Williams,J.d. and wise,R. p:21-40.churchill living stone.
8. Koneman, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C; and Winn,W.C.Jr.(1992). Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology.4th ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia.
9. Jarlier, V.; Nicolas, M.; Fournier, G.; and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β-Lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev. Infect. Dis. 10(4): 867-78.
10. 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.
11. Silva, J. ; Gatica, R. ; Aguilar, G. ; Becerra, Z. ; Garza-Ramos, V. ; Velazquez, M. ; Miranda, G. ; Leanos, B. ; Solorzano, F. and Chaniz, G. E.(2001). Out break of infection with extended , spectrum β-Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. J. Clin. Microbiol. 39:3193-96.
12. Johnson, R. J.; Kuskowski, A. M. ; O'Bryan, T. T.; Raul, C. and Raz, R. (2005). Virulence Genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from women with acute uncomplicated cystitis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49: 26-31.(Abst.).
13. Lalitha, M.K.(2005) Manual on antimicrobial susceptibility testing. (under the auspices of Indian Association of Medical Microbiologists.
14. Katzung, B.G. (2001). Basic & Clinical Pharmacology.8th ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill .
15. Nester, E.W; Anderson, D.G; Roberts, C.E; Pearsall, N.N. and Nester, M.T. (2001). Microbiology a Human Perspective. 3rd ed. McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
16. Ena J, Amador C, Martinez C,and Ortiz de la Tabla V. (1995) Risk factors for acquisition of urinary tract infections caused by ciprofloxacin resistant *Escherichia coli.* J Urol.;153(1):117-120.
17. Yang, S.; Clayton, SR. and Zechiedrich, EL.(2003). Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. :51(3):545_556.
18. Bush, K. and Goldschmidt, R.(2006) Effectiveness of uoroquinolones against gram-positive bacteria. Curr Opin Investig Drugs. :1(1):22-30.
19. Ma, D.; Cook, DN.; Alberti, M.; Pon, NG.; Nikaido, H. and Hearst, JE.(1993) Molecular cloning and characterization of acrA and acrE genes of *Escherichia coli*.J. Bacteriol;175(19):6299-6313.
20. Bush, K.; Jacoby, G.A.; and Medeirose, A.A.(1995). A Functional classification scheme for β -lactamase and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents. Chemother. 39(6): 1211-1233.

21. Mims, C.A.; Palyfair, J. HL.; Roitt, I.M.;Wakelin, D. and Williams, R.(1995).Medical Microbiology. Times Mirror International Publishers Ltd.Hongkong.

22. Rice, L.B.; Willeg, S.H.; Papanicolaou, G.A. Mederriors, A. and Jacoby, G.A.(1990). Outbreake of Ceftazidium resistance caused by extended Spectrum β - Lactamases at Mussach usetts Chronic- Care Racility. Antimicrob. Agents. Chemother.34: 2193-219
23. Emery, C. L. and Weymouth,L. A. (1997). significance of extended-spectrum β-lactamases in a tertiary-care medical cente J. Clin. Microbiol.35:2061-2067.
24. Woodford, N.; Ward, E. and Kaufmann M.E., et al.(2006). Molecular characterization of *Esherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum ß-lactamase (ESBL)in the United kingdom. Health Protection Agency.
25. Livermore, DM. and Hawkey, PM.(2005).CTX-M changing the face of ESBLs in the UK. J Antimicrob Chemother. 56:451–4.

جدول رقم (1) أقراص المضادات الحيوية المستعملة ومواصفاتها Antimicrobial Disc [5]

الشركة المصنعة	قطر منطقة التثبيط بالملم			تركيز القرص مايكروغرام	الرمز	المضاد الحيوي	ت
	R≤	I	≥S				
Bioanalyse (Turkey)	11	12–13	14	10	AM	Ampicillin	1
	13	14–17	18	10+20	AMC	Amoxicillin+Clavulanic acid (Agumentin)	2
	14		23	30	CTX	Cefotaxime	3
	13	15–22	21	30	CRO	Ceftriaxone	4
	15	14–20	21	5	CIP	Ciprofloxacin	5
	18	16–20	22	10	LOM	Lomefloxacin	6
	13	19–21	19	30	NA	Naldixic acid	7
	14	14–18	17	300	F	Nitrofurantoin	8
	14	15–16	18	100	PRL	Piperacillin	9
		15–17					
Himedia (India)	10	11–15	16	5	Tr	Trimethoprim	10
SDI (العراق)	10	11–15	16	+1.25 23.75	CO	Trimethoprim+ Sulphamethoxazol (CO-trimoxazole)	11
حضر في المختبر	12	13–16	17	300	ST	Sulphamethoxazole	12
مركز أبحاث الرازي	14	15–17	18	30	Kf	Cephalexin	13

البكتريا الحساسة = S

البكتريا المعتدلة المقاومة = I

البكتريا المقاومة = R

جدول رقم (2) تراكيز المضادات الجرثومية المتسلسلة المضاعفة

التركيز النهائي في اطباق الاكار1:15	التركيز الوسطي لمحلول المضاد	ماء مقطر معقم مل	التركيـــــز الاولـــــي لمحلـــــول

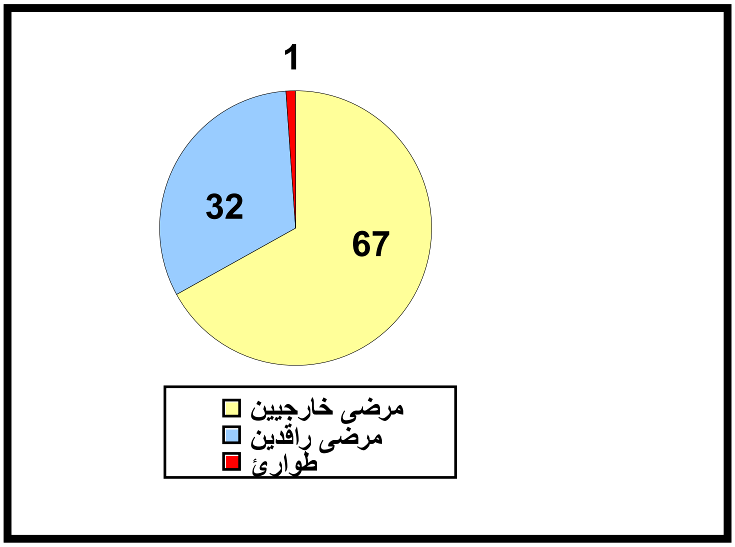
المضاد مايكروغرام / مل			مايكروغرام / مل	
___	6000	0	6000	400
2	6000	2	3000	200
2	3000	2	1500	100
2	1500	2	750	50
2	750	2	375	25
2	375	2	187.5	12.5
2	187.5	2	93.75	6.25
2	93.75	2	46.87	3.125
2	46.87	2	23.43	1.6
2	23.43	2	11.71	0.8
2	11.71	2	5.85	0.4
2	5.85	2	2.92	0.2

جدول (3) الانواع والاجناس البكتيرية المعزولة من الادرار ونسبتها المئوية

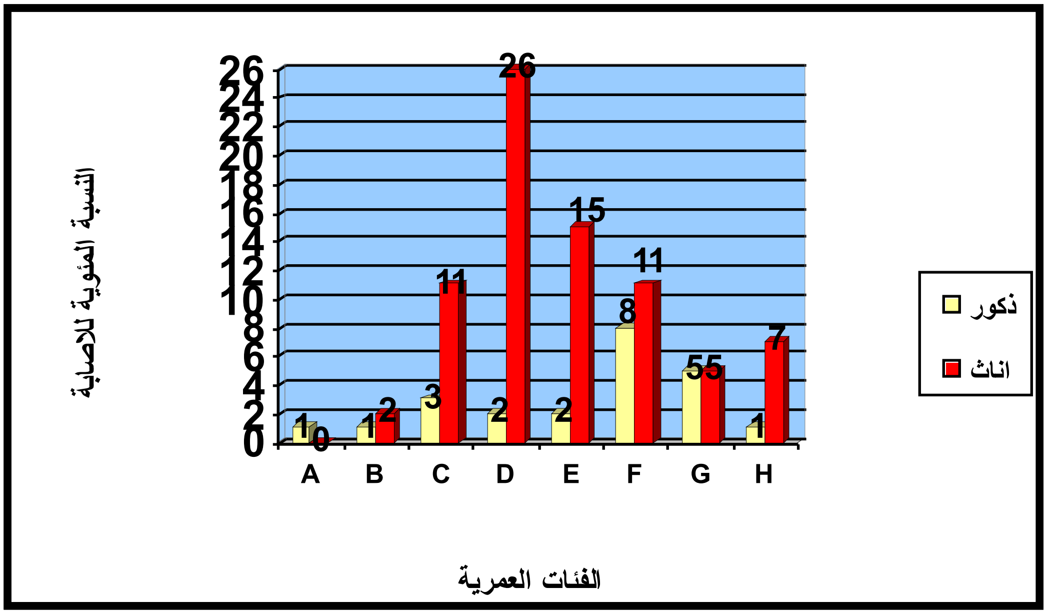
الاجناس البكتيرية	عدد العزلات	100 %
Escherichia coli	100	52.63
Staphylococcus spp.	22	11.57
Streptococcus spp.	20	10.52
Proteus. Spp.	15	7.89
Pseudomonas aeruginosa	14	7.36
Acinetobacter spp.	8	4.21
Citrobacter spp.	5	2.63
Klebsiella spp.	4	2.10
Enterobacter spp.	2	1.05

جدول (4) مقاومة بكتريا *E.coli* للمضادات الجرثومية

النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات الحساسة	عدد العزلات المعتدلة	عدد العزلات المقاومة	المضاد الجرثومي	ت
% 100	0	0	100	Sulphamethoxazole	1
% 99	1	0	99	Ampicillin	2
% 62	18	20	62	Cephalexin	3
% 58	39	3	58	Amoxicillin+ Clavulanic acid	4
% 54	43	3	54	Naldixic acid	5
% 45	47	8	45	Piperacillin	6
% 40	52	8	40	Ceftriaxone	7
% 39	55	6	39	Cefotaxime	8
% 39	55	6	39	Lomefloxacin	9
% 37	59	4	37	Ciprofloxacin	10
% 14	75	11	14	Nitrofurantoin	11

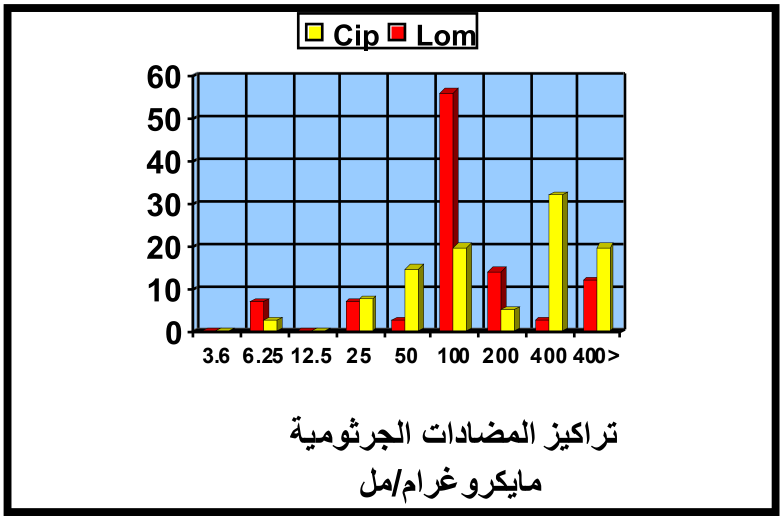


شكل (1) توزيع عزلات بكتريا *E.coli* بين المرضى المصابين

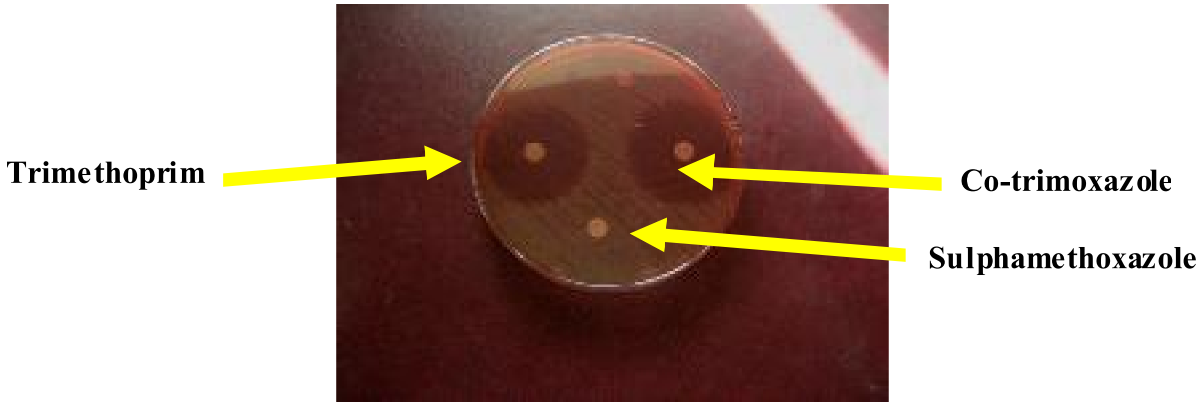


F=(41-50) E=(31-40) D=(21-30) C=(11-20) B=(1-10)   A=(1≤)
H=(≥60) G=(51-60)

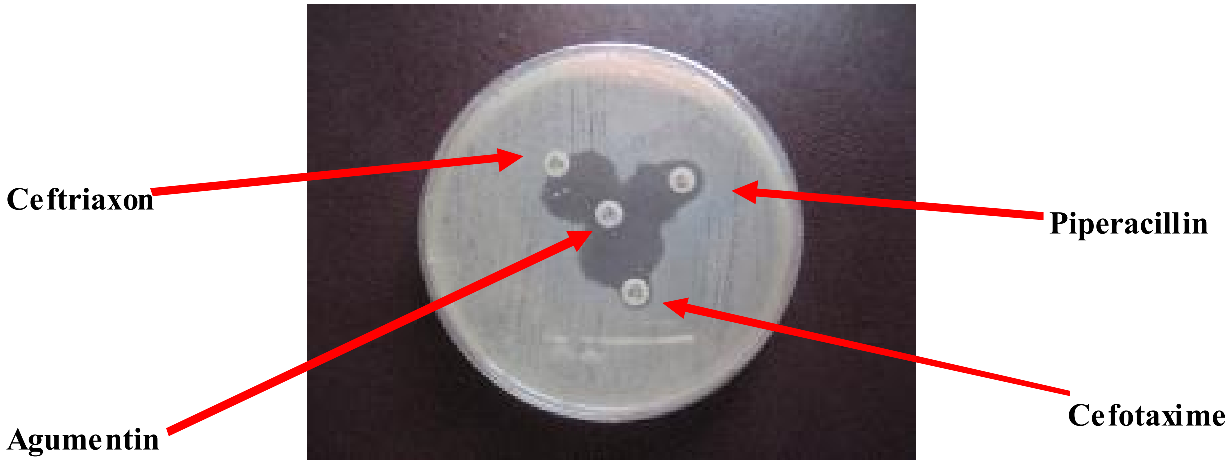
شكل (2) تردد بكتريا *E.coli* ضمن الاجناس والفئات العمرية



شكل (3) النسبة المئوية لمقاومة عزلات بكتريا *E.coli* لتراكيز متسلسلة من مضادي Ciprofloxacin و Lomefloxacin



صورة (1) تظهر فعالية المضادين Co-trimoxazole و Trimethoprim بإضافة دم الخيول المتحلل الى وسط مولر –هنتون الصلب المزروع ببكتريا *E.coli* العزلة (8)



صورة(2) قابلية عزلات بكتريا *E.coli* على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف العزلة (6)

IBN AL- HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI.   VOL.24 (2) 2011

Sensitivity of Bacteria *Escherichia coli* Iisolated from Urinary Tract Infection toward Ciprofloxacin and Lomefloxacin.

S. M. Kareem ,S.A. Bilal

Department of Biology, College of Science, University of Al- Mustansiryah
Department of Biology, College of Medical , University of Al- Nahreen

Received in: 5, May, 2010
Accepted in: 9, November, 2010

Abstract

Four hundred and fifty urine samples were collected from patients suffering from urinary tract infection from the General Azadi hospital in Kurkuk province ,during the period of october 2007 till march 2008 .

Results of bacteriological culture revealed that (168) out of (450) studied samples (37.3%) gave positive culture using blood agar and macConkey agar ; different species of bacterial isolates were detected using morphological and biochemical tests ,from these isolates the highest percentage of the isolates were from *Escherichia coli* when it was (100) isolates out of (190) isolate (52.63%) . one hundred isolates were distributed between (77) from females and (23) from males

The susceptibility of *E.coli* isolates towards (13) types of antimicrobial agents commomly used in treatment of urinary tract infection were tested *in vitro* . Variations in susceptibility against antimicrobial were found. The antiseptic drug Nitrofurantoin showed the highest activity on *E.coli* when the resistance reached (14 %) , from the other hand *E.coli* isolates showed great resistance to other antimicrobial : sulphamethoxazole was (100 %) ,Ampicillin (99 %) ,Cephalexin (62 %) ,Agumentin (58 %) , Nalidixic acid (54 %) , Trimethoprim (52 %) , Pipracillin (45 %) , Ceftriaxone (40 %) , Lomefloxacin (39 %) , Cefotaxime (39 %) , Ciprofloxacin (37 %) and to Co-trimxazole was (37 %) .

Minimal inhibitory concentration (MIC) for Ciprofloxacin and Lomefloxacin were studied and the results showed higher values in MIC. MIC values for eight isolates of bacteria *E.coli* were so high they were (400> µg/ml) for Ciprofloxacin were (19.5%) while five isolates of bacteria *E.coli* were with MIC value of (400>µg/ml) with (11.6%) to Lomefloxacin .

The ability of bacteria *E.coli* isolates to produce ß-lactamase enzyme using Capillary tubes method was studied. The results showed (61 %) of these isolates gave positive results when the red cloer of the indicator phenol was changed from red to yellow within (15) minuets .When using Disc approximation method to detect the ability to production Extended Spectrum ß-lactamase enzyme (ESBLs) out of (61)isolates only (11)isolates were positive (18 %); Nine ESBLs producer showed high resistance to antimicrobial Quinolones (Naldixic acid ,Ciprofloxacin and Lomefloxacin) with percentage reached (72.7%) .

Key word: Urinary Tract Infection **,** Sensitivity of bacteria *E.coli* , Minimal inhibitory concentration (MIC) for Ciprofloxacin and Lomefloxacin