دراسة عوامل ضراوة البكتريا *Alcaligenes* المعزولة من إصابات المجاري البولية لمرضى داء السكر

زياد ذنون الرسام و أديبة يونس شريف

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

الملخص :

أظهرت نتائج الدراسة قدرة جميع عزلات بكتريا *Alcaligenes* على إنتاج إنزيمات β-lactamase والمادة المخاطية و عدم قدرتها على إنتاج إنزيمات الليستثيز ، اللايبيز ، البروتيز و الانزيم الحال للحامض النووي منقوص الأوكسجين والذيفان العصبي . بينت النتائج قدرة عزلات البكتريا *A. faecalis* على الالتصاق بسطوح الخلايا الطلائية البولية المعزولة من إدرار مرضى داء السكر دون سواهم . أبدت عزلات البكتريا *Alcaligenes* مقاومة تجاه العديد من المضادات الحيوية ومنها Amoxcillin و Sulfonamides و Cefotaxime ، بينما كانت حساسة تجاه المضادات الحيوية Amikacin و Ciprofloxacin و Neomycin .

كلمات المفتاح: عوامل ضراوة ، *Alcaligenes* .

المقدمة :

تتصف بكتريا *Alcaligenes* بكونها خلايا عصوية قصيرة تتواجد في التربة الرطبة وفي البيئات المائية ، كما عزلت من منتجات الألبان والبيض الفاسد ومن الخضراوات الطازجة [1] . ولم يأخذ أفراد هذا الجنس نصيبهم من الاهتمام إلا في مطلع التسعينات من القرن المنصرم ، بعد أن ثبتت مسؤولية هذه البكتريا عن إحداث إصابة المجاري البولية الوبائي لمرضى التثبيط المناعي الراقدين في المستشفيات [2 , 3] . كما عزلت من إصابة الإذن الوسطى وقرحة ملتحمة العين والتقرحات الجلدية وخاصة قرحة القدم للمرضى المصابين بداء السكر فضلاً عن عزلها من الدم وسائل النخاع ألشوكي وأغشية الدماغ [4 , 5] . بالرغم من تحديد سبل انتقالها داخل ردهات المستشفى عن طريق المحاليل الطبية الملوثة وأيدي الكادر الطبي [6] .

داء السكر وعلاقته باصابات المجاري البولية:

تساهم التراكيز المرتفعة لسكر الكلوكوز المطروح في الإدرار بزيادة لزوجة سطوح الخلايا الطلائية البولية التي بدورها تسهل التصاق الخلايا البكتيرية عليها ، فضلا عن الضعف الحاصل في إفراز مضادات الالتصاق في الجهاز البولي والمتمثلة Oligosaccharides و Glycoprotein الذي يدعى Tamm-Horsfall-Protein (THP) والذي يعمل على تغطية سطوح الخلايا الطلائية البولية ويحول دون التصاق الجراثيم على سطوحها [7] . إضافة لما يوفره إدرار مرضى داء السكر الغني بالكلوكوز من وسط ملائم لنمو وتضاعف الجراثيم [8] . وان قلة فعالية المثانة وفشلها في طرح كامل محتواها من الإدرار جراء الخلل العصبي الناتج عن الإصابة بداء السكر يعد عاملاً معززاً للالتصاق ونجاح الغزو البكتيري للمثانة [9] .

المواد و طرائق العمل :

جرى التحري عن عدد من عوامل الضراوة المحتملة في عزلات بكتريا *Alcaligenes* ومنها *A. xylosoxidans xylosoxidans* ، *A. xylosoxidans denitrificans* و *A.faecalis* المعزولة من اصابات المجاري البولي [10] .و اشتملت الدراسة على ما يأتي :

1 . التحري عن إنزيم الليستثيز (الفوسفولايبيز–C) وإنزيم اللايبيز ، استخدم في هذا الاختبار وسط Egg - Yolk Agar المحضر محلياً بإضافة صفار البيض الطازج Fresh Egg Yolk بنسبة 15% إلى وسط الاكار المغذي Nutrient Agar المعقم بالموصدة والمبرد إلى درجة حرارة (50-55) °م ، لقحت أطباق من الوسط السالف الذكر بمستعمرات نقية من البكتريا قيد الدراسة وحضنت بدرجة حرارة (37) °م ولمدة (24-48) ساعة . تم الكشف عن إنزيم الليستثيز بغمر الطبق بكمية كافية من محلول مشبع بكبريتات النحاس ($CuSO_4$) ولمدة (20) دقيقة ، وبعد ازالة الفائض من المحلول جفف الطبق في الحاضنة لمدة (30) دقيقة ، أستدل على تحلل الدهن بوساطة إنزيم اللايبيز بظهور لون ازرق مخضر في مناطق النمو [11] .

2 . اختبار الكشف عن انتاج انزيم البروتييز ، اجري الاختبار بتلقيح عزلات نقية من البكتريا قيد الدراسة على أطباق حاوية على وسط اكار الدم الأساس Blood Agar Base و المضاف إليه (7.5%) من الحليب المنزوع الدسم (Skim milk) ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37) °م ولمدة 48 ساعة [12] .

٣. الكشف عن فعالية الإنزيم المحلل للحامض النووي منقوص الأوكسجين ، تم تلقيح وسط DNase المجهز من قبل شركة (Oxoid) والمحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة بمستعمرات نقية للبكتريا قيد الدراسة ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37) °م ولمدة (24) ساعة ، تم غمر الطبق بحامض الهيدروكلوريك HCl (1 ع) ، إن تكون هالة شفافة حول المستعمرات يعد دليلاً على النتيجة الموجبة [13] .

٤. التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز، اتبعت الطريقة الايودية (Iodometric method) في التحري عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم β-Lactamase ، تم اجراء هذا الاختبار باضافة (0.1) سم^3 من محلول البنسلين (G) بتركيز (6000) مايكروغرام / سم^3 في انبوبة اختبار صغيرة ، نقلت مستعمرات نقية الى انبوبة الاختبار ، وتركت بدرجة حرارة الغرفة ولمدة (30) دقيقة لكي يحدث التفاعل الانزيمي ، اضيفت قطرتان من محلول النشا ، وقطرة من محلول يود كرام (Gram Iodine) للانبوبة ، ظهور اللون الازرق الغامق مباشرة كنتيجة لحصول التفاعل بين النشا والايودين ، مزجت محتويات الانبوبة جيداً وتركت في درجة حرارة الغرفة ،

ان ظهور الون الأبيض او اختفاء اللون الازرق خلال اقل من (10) دقائق يعد دليلاً على انتاج البكتريا لانزيمات الـ β-Lactamases [3 , 14] .

٥. التحري عن إنتاج المادة المخاطية ، استخدم مرق Trypticase Soy broth المجهز من قبل شركة (Oxoid) والمحضر حسب تعليمات الشركة ، وزع الوسط في قناني نظيفة ، وعقم باستخدام الموصدة بدرجة حرارة (121) °م وضغط واحد جو ولمدة (15) دقيقة ، لقح الوسط بمستعمرات فتية من البكتريا *Alcaligenes* مع مراعاة استخدام مجموعة من قناني الوسط غير الملقحة كمجموعة للسيطرة . حضنت القناني بدرجة حرارة (37) °م لمدة (24) ساعة ، وبعد التحضين أهمل محتوى القناني وأضيفت إليها قطرات من صبغة السفرانين ، وتركت لمدة دقيقة مع مراعاة تدوير القناني لكي تصطبغ الجدران الداخلية بشكل كامل ، وضعت القناني بشكل مقلوب على ورقة الترشيح للتخلص من صبغة السفرانين ، إن اصطباغ الجدران الداخلية للقناني باللون الأحمر يعد دليلاً على ايجابية الاختبار [15] .

٦. التحري عن الذيفان العصبي، تم اجراء هذا الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا *Alcaligenes* على انتاج الذيفان العصبي حيث تم استخدام وسط Casamino acid – yeast extract (CAYE) المتكون من (2) غم casamino acid و (0.6) غم خلاصة الخميرة yeast extract و (0.25) غم كلوريد الصوديوم (NaCl) و (0.871)غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) في (100) سم^3 ماء مقطر مضافاً اليه (1%) من الاملاح النادرة المذابة في حامض الكبريتيك (0.001 ع) التي تشمل كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$ (0.5%) وكلوريد المنغنيز $MnCl_2$ (0.5%) وكلوريد الحديديك $FeCl_3$ (0.5%) وكلوكوز بنسبة (0.25%) . تم ضبط الدالة الحامضية للوسط على (7.3) وعقم بالموصدة بدرجة حرارة (121) °م وضغط واحد جو ولمدة (15) دقيقة ، لقحت القناني بمستعمرات فتية للبكتريا ، وحضنت لمدة (24) ساعة بدرجة حرارة (37) °م ، بعد ذلك جمعت البكتريا باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد من نوع (MSE) على سرعة (8000 xg) ولمدة (30) دقيقة وبدرجة حرارة (4) °م ، تم التخلص من الطافي ، وغسل الراسب ثلاث مرات باستخدام محلول الملح الفسيولوجي Normal salin ، رسبت الخلايا باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بالسرعة ذاتها وبنفس الوقت ودرجة الحرارة السابقة ، تم التخلص من الطافي وعلقت الخلايا المترسبة بـ (100) سم^3 من الماء المقطر والمضاف اليه (30) سم^3 من الكلوروفورم ، تركت الخلايا في درجة حرارة الغرفة لمدة (3) ايام ، تم اجراء الطرد المركزي المبرد بنفس السرعة والوقت للخلايا المتحللة ، اخذ الطافي Supernatant وتم ترسيب البروتينات الذائبة باستخدام كبريتات الامونيوم . بعد ذلك تم التخلص من كبريتات الامونيوم بإجراء عملية الديلزة Dialysis . حقن (0.1) سم^3 من الناتج في غشاء الخلب Intraperitoneal لذكور الفئران بعمر (6-8) أسابيع وبوزن (18-20) غم تقريباً ، و باستخدام ثلاثة مكررات ، كما حقن (0.1)سم^3 من الملح الفسيولوجي في عدد من فئران السيطرة ، عزلت الفئران في اقفاص خاصة محددة ، تركت الفئران لمدة (7) ايام مع ملاحظة النتائج يومياً [16] .

٧. اختبار حساسية عزلات البكتريا *Alcaligenes* للمضادات الحيوية المختلفة ، تم اجراء اختبار حساسية بكتريا *Alcaligenes* بانواعها الثلاثة المعزولة *A. faecalis* و *A. xylosoxidans* و *A. xylosoxidans denitrificans* و *A. xylosoxidans xylosoxidans* للعديد من المضادات الحيوية وذلك باتباع طريقة Kirby-Bauer المحورة والمعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية وباستخدام وسط اكار مولرهنتون (Mueller –Hintan Agar) المجهز من قبل شركة (Oxoid) اما اقراص المضادات الحيوية فقد تم الحصول على بعضها جاهزة من شركة (Oxoid) والبعض الاخر حضرت مختبرياً وحسب التراكيز المستخدمة عالمياً وكما جاء في توصيات منظمة الصحة العالمية ، حضر معلق من البكتريا الفتية في المحلول الملحي الفسيولوجي وغمرت مسحة قطنية معقمة في المعلق ، تم التخلص من المعلق الزائد بمسحها على الجدران الداخلية للانبوب ، نشر المعلق على سطح الطبق وسط اكار مولرهنتون ، تركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5) دقائق لكي تجف ، بعدها تم تثبيت اقراص المضادات الحيوية على سطح الطبق بوساطة ملقط معقم ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة (37) °م لمدة (24)ساعة، تم قياس قطر منطقة التثبيط لكل قرص وجرى تحديد العزلات الحساسة والمقاومة من خلال جداول طريقة Kirby-Bauer الخاصة بفعالية المضادات الحيوية [17] .

٨. التحري قابلية بكتريا *A.faecalis* على الالتصاق بالخلايا الطلائية البولية ، استخدم هذا الاختبار لدراسة قابلية التصاق البكتريا *Alcaligenes.faecalis* على سطوح الخلايا الظهارية للمجاري البولية Uroepithelial cells وكما ياتي:

1- **عزل الخلايا الظهارية من المجاري البولية Uroepithelial cells isolation** ، عزلت الخلايا الظهارية البولية من ادرار امرأة سليمة ، كما عزلت خلايا ظهارية بولية من ادرار جديد لإمرأه لاتعاني من أية مشاكل في المجاري البولية لكنها تشكو من اصابة قديمة بداء السكر، اخذ (30) سم^3 من الادرار ورشح الجزء الاكبر منه خلال ورقة ترشيح معقمة ، غسلت الخلايا المترسبة على ورقة الترشيح ثلاث مرات باستخدام محلول الفوسفيت المنظم عند الدالة الحامضية (7) المعقم وباستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (3000 xg) لمدة (5) دقائق ، علق الراسب بمحلول الفوسفيت المنظم ورشح كلياً خلال ورقة ترشيح تاركاً الخلايا الظهارية البولية موزعة بشكل عشوائي على سطح ورقة ترشيح ، نقلت هذه الخلايا الى غطاء شريحة عن طريق ضغط الغطاء على سطح ورقة الترشيح وتركه ليجف في الهواء لمدة (15) دقيقة [18].

2- **الالتصاق على الخلايا الظهارية البولية للانسان Adherence to human uroepithelial cells**، تم تلقيح وسط المرق المغذي Nutrient broth بمستعمرات فتية من البكتريا *A.faecalis* ، وحضنت بدرجة حرارة (37) °م ولمدة (24) ساعة بعد ذلك جمعت الخلايا البكتيرية بوساطة جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (5000 xg) ولمدة (10)

دقائق ، وعند درجة حرارة (4) °م ، علقت الخلايا بمحلول الفوسفيت المنظم الى تركيز (10^8) خلية /سم^3 ، تم وضع غطاء الشريحة الزجاجية الحاوي على الخلايا الظهارية البولية المحضرة في الفقرة (1) في طبق بتري معقم ، واضيف اليه (5) سم^3 من معلق البكتريا لغرض اتمام عملية الالتصاق وحضنت بدرجة حرارة (37) °م لمدة ساعة واحدة مع مراعاة تحريك الطبق كل (15) دقيقة ، بعدها تم غسل غطاء الشريحة الزجاجية بمحلول الفوسفيت المنظم مرتين وذلك لازالة البكتريا غير الملتصقة بالخلايا الظهارية ، وتم تثبيت الخلايا الظهارية بالميثانول لمدة (15) دقيقة ، ثم غسل الغطاء مرتين بمحلول الفوسفيت المنظم وصبغت بصبغة كمزا بتركيز (30%) ولمدة (20) دقيقة لصبغ الخلايا الظهارية البولية ، بعدها ازيلت الصبغة وغسلت بالماء المقطر وتركت الاغطية لتجف ، تم وضع الاغطية بشكل مقلوب على الشريحة الزجاجية ، وبعد ذلك تم حساب عدد الخلايا الملتصقة في (50) خلية ظهارية بولية تم اختيارها بشكل عشوائي ، استخدمت عينات سيطرة شملت خلايا ظهارية لوحدها ، واجري التحليل الاحصائي لاعداد البكتريا الملتصقة بالخلايا الظهارية البولية [18] .

النتائج و المناقشة :

أظهرت نتائج الدراسة عدم قدرة عزلات البكتريا *Alcaligenes* على إنتاج إنزيم الليستثيز (الفوسفولايبيز–C) واللايبيز ، وهذا يشير إلى أن امراضيتها تعتمد على عوامل أخرى حيث إن إنزيم الليستثيز يعمل على تحطيم الدهون المفسفرة في أغشية الخلايا مما يؤدي إلى تحلل الخلايا وموت النسيج [19] . بينت النتائج عدم قدرة العزلات قيد الدراسة على إنتاج إنزيم البروتيز، الذي يعد من عوامل الضراوة المهمة في أمراضية البكتريا من خلال هدم الكلوبيولين المناعي ومكونات نظام المتمم [20] . كما لم تستطع أي من عزلات البكتريا *Alcaligenes* إنتاج الإنزيم الحال للحامض النووي منقوص الأوكسجين وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه [2].

أظهرت النتائج امتلاك جميع عزلات البكتريا *Alcaligenes* قيد الدراسة القدرة على إنتاج إنزيمات β-lactamase ، و استدل على النتيجة الموجبة من خلال ظهور اللون الأبيض في الأنبوبة بعد إضافة الكاشف (ايودين كرام Gram iodine) مباشرة ، وقد جاءت هذه النتيجة متفقة مع ما ذكره [21] بان غالبية أفراد جنس *Alcaligenes* تمتلك القدرة على إنتاج إنزيمات β-lactamase وان القلة من سلالات *Alcaligenes* التي لا تمتلك هذه الإنزيمات (β-lactamase) ثبت امتلاكها للإنزيمات Penicillin amidase بدلا عنه [14 , 22] .

كما أظهرت نتائج التحري عن إنتاج المادة المخاطية قدرة جميع عزلات البكتريا *Alcaligenes* على انتاج هذه المادة والتي ظهرت من خلال اصطباغ الجدران الداخلية للانبوب الزجاجي المنماة فيه بصبغة السفرانين ، إذ تعتبر المادة المخاطية واحدة من النواتج الايضية المختلفة للبكتريا والتي تلعب دوراً مهماً في تثبيت البكتريا على السطوح فضلاً عن حمايتها من تأثير المضادات الحيوية وعملية البلعمة داخل جسم المضيف ومن الجفاف عند وجودها في المحيط الخارجي [23 , 24] .

اظهرت نتائج التحري عدم قدرة عزلات البكتريا *Alcaligenes* قيد الدراسة على إنتاج الذيفان العصبي ، ونظراً لثبوت دور البكتريا *Alcaligenes* في إحداث الإصابات الوبائية للمجاري البولية لدى مرضى التثبيط المناعي [3] . وإصابة المثانة في الأطفال والبالغين [25] والتهاب الإذن الوسطى الحاد [2] . لذلك فأنها قد تستخدم في امراضيتها عوامل أخرى غير إنتاج الذيفان العصبي والإنزيمات سالفة الذكر .

بينت نتائج اختبار الحساسية لـ (22) مضاداً حيوياً (اعتمادا على جداول طريقة Kirby-Bauer الخاصة بفعالية المضادات الحيوية) مقاومة الأنواع الثلاثة المعزولة *A. xylosoxidans xylosoxidans* و *A. xylosoxidans denitrificans* و *A.faecalis* لاكثر من مضاد حيوي واحد ، وهو مايعرف بالمقاومة المتعددة (الجداول١ ، ٢ ، ٣) ، حيث أعطت الأنواع الثلاثة مقاومة مطلقة وبنسبة (100%) للمضادات الحيوية Amoxcillin, Ampicillin, Cloxacilillin, Cefixime, Nalidixicacid, Amoxycillin, Clavulanat, Nitrofurantoin, Cefotaxim , , Rifampicin, Cephalothin , Carbenicillin, و Ceftriaxon ، وأعطت حساسية مطلقة بنسبة (100%) للمضادات الحيوية Amikacin , Ciprofloxacin و Neomycin ، بينما تباينت حساسيتها لبقية المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة وكما مبين في الجداول (١ ، ٢ ، ٣) . إن المقاومة الكبيرة التي أظهرتها أفراد البكتريا *Alcaligenes* للمضادات قد يعزى إلى اكتسابها لبلازميدات المقاومة التي تنتقل إليها من أفراد العائلة المعوية [22] ، وخاصة للمضاد الحيوي Cefotaxim إذ أعطت جميع العزلات مقاومة مطلقة له ، بينما أظهرت حساسية مطلقة في دراسة [21] . وقد تعزى مقاومة المضادات بشكل عام إلى عدم نفاذية الغشاء الخارجي للبكتريا الذي يعيق نفاذ المضاد الحيوي إلى الداخل [26] ، فضلاً عن قدرة أفراد هذا الجنس على إنتاج إنزيمات β-lactamase الذي يتواجد بتراكيز قليلة في محيط الخلية ويزداد إنتاجه بطريقة الحث ليصل إلى تراكيز عالية [27] . وقد علل [14] مقاومة البكتريا *Alcaligenes* للمضادات الحيوية إلى امتلاكها للجينات المسؤولة عن التشفير لإنتاج إنزيم Penicillin amidase ، وقد تساعد المواد المخاطية التي تفرزها البكتريا *Alcaligenes* على توفير الحماية من خلال حجب الخلية البكتيرية عن تأثير المضاد الحيوي ، كما ان الاستخدام الخاطئ والعشوائي للمضادات الحيوية أدى إلى ظهور سلالات مقاومة تميزت بقابليتها على الانتشار السريع وإحداث الإصابة ، وللحصول على الكفاءة العلاجية للمضاد الحيوي وتجنب ظهور السلالات المقاومة ، يتوجب اختبار حساسية البكتريا للمضاد الحيوي وتحديد قيمة الجرعة المعطاة حيث ثبت وجود علاقة وثيقة بين الاستخدام الواسع للمضادات الحيوية في المستشفيات وانتشار الأجناس المقاومة لها [28].

الجدول (١) النسب المئوية للعزلات الحساسة والمتوسطة الحساسية والمقاومة لبكتريا *A.faecalis* تجاه المضادات الحيوية المختلفة .

المضاد الحيوي	تركيز المضاد	العزلات الحساسة	العزلات المتوسطة	العزلات المقاومة

الجدول (٢) النسب المئوية للعزلات الحساسة والمتوسطة الحساسية والمقاومة لبكتريا *A. xylosoxidans denitrificans* تجاه المضادات الحيوية المختلفة

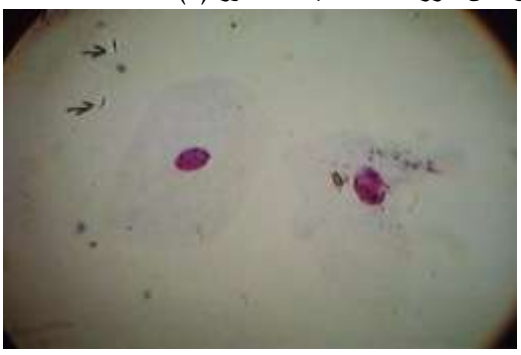
المضاد الحيوي	تركيز المضاد مايكرو غرام/ قرص	العزلات الحساسة العدد (%)	العزلات المتوسطة الحساسية العدد (%)	العزلات المقاومة العدد (%)
Chloramphenicol	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Neomycin	25	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Doxycycline	30	(0.0)0	(33.3)1	(0.0)0
Cefixime	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Cloxacillin	5	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Ampicillin	10	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Amoxiclav	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Tobramycin	10	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Sulfonamides	300	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Nitrofurantoin	300	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Amoxicillin	25	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Naldixic acid	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Carbenicillin	100	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Cephalothin	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Gentamycin	30	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Pefloxacillin	25	(33.3)1	(0.0)0	(66.6)2
Ciprofloxacin	100	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Rifampicin	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Amikacin	30	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Tetracycline	30	(33.3)1	(0.0)0	(66.6)2
Cefotaxime	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Ceftriaxon	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3

	مايكرو غرام/ قرص	العدد (%)	الحساسية العدد (%)	العدد (%)
Chloramphen -icol	30	(0.0)0	(66.6)2	(33.3)1
Neomycin	25	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Doxycycline	30	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Cefixime	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Cloxacillin	5	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Ampicillin	10	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Amoxiclav	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Tobramycin	10	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Sulfonamides	300	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Nitrofurantoin	300	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Amoxicillin	25	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Naldixic acid	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Carbenicillin	100	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Cephalothin	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Gentamycin	30	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Pefloxacillin	25	(33.3)3	(66.6)2	(0.0)0
Ciprofloxacin	100	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Rifampicin	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Amikacin	30	(100)3	(0.0)0	(0.0)0
Tetracycline	30	(66.6)3	(33.3)1	(0.0)0
Cefotaxime	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3
Ceftriaxon	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)3

الجدول (٣) النسب المئوية للعزلات الحساسة والمتوسطة الحساسة والمتوسطة الحساسة والمقاومة لبكتريا *A. xylosoxidans xylosoxidans* تجاه المضادات الحيوية المختلفة

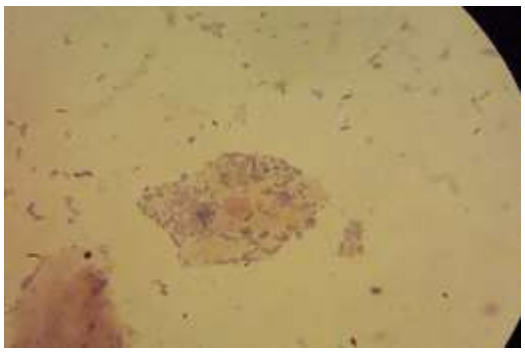
المضاد الحيوي	تركيز المضاد مايكرو غرام/ قرص	العزلات الحساسة العدد (%)	العزلات المتوسطة الحساسية العدد (%)	العزلات المقاومة العدد (%)
Chlorampheni-col	30	(25)1	(0.0)0	(75)3
Neomycin	25	(100)4	(0.0)0	(0.0)
Doxycycline	30	(25)1	(0.0)0	(75)3
Cefixime	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Cloxacillin	5	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Ampicillin	10	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Amoxiclav	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Tobramycin	10	(25)1	(25)1	(50)2
Sulfonamides	300	(0.0)0	(25)1	(75)3
Nitrofurantior	300	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Amoxicillin	25	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Naldixic acid	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Carbenicillin	100	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Cephalothin	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Gentamycin	30	(25)1	(50)2	(25)1
Pefloxacillin	25	(25)1	(25)1	(50)2
Ciprofloxacin	100	(100)4	(0.0)0	(0.0)0
Rifampicin	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Amikacin	30	(100)4	(0.0)0	(0.0)0
Tetracycline	30	(25)1	(25)1	(50)2
Cefotaxime	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)4
Ceftriaxon	30	(0.0)0	(0.0)0	(100)4

أظهرت نتائج اختبار الالتصاق على الخلايا الطلائية البولية عدم قدرة عزلات البكتريا *A. faecalis* الالتصاق على الخلايا الطلائية البولية المعزولة من ادرار النساء السليمات، صورة (١) .



صورة (١):عدم قدرة عزلات البكتريا *A.faecalis* للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية المعزولة من إدرار النساء السليمات قوة التكبير × 1000 ، الصبغة كمزا

في حين تمكنت البكتريا *A. faecalis* من الالتصاق على الخلايا الطلائية البولية المعزولة من إدرار النساء المصابات بداء السكر صورة(٢).



صورة (٢): قدرة عزلات البكتريا *A.faecalis* للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية المعزولة من إدرار نساء مصابات بداء السكر قوة التكبير × 1000 ، الصبغة كمزا

وهذا يشير إلى أن البكتريا *A. faecalis* هي بكتريا انتهازية وتتسبب في إحداث الإصابات الثانوية التي تترافق مع الأمراض الأخرى و لا تستطيع إحداث الإصابة في الأشخاص الأصحاء ، فضلاً عن ذلك فان النقص في انتاج المواد المثبطة للالتصاق والمتمثلة Oligosaccharides و Glycoprotein الذي يدعى Tamm-Horsfall-Protein (THP) لدى مرضى داء السكر وزيادة لزوجة سطوح الخلايا الطلائية البولية جراء الطرح المستمر للكلوكوز في الإدرار تعد من العوامل المشجعة لالتصاق البكتريا ونجاحها في الغزو [7 , 29] .

المصادر :

1- R.E. Buchanan and N. E. Gibbon (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th. ed., The Williams and Wilkin Com., USA, pp. 273-275.

2- J. Bizet and C. Bizet (1997). Strain of *Alcaligenes faecalis* from clinical material . J. Infect. 35, 167-169.

3- M. D. Thomas tayeri and L. D. Kelly (1993). *Alcaligenes faecalis* corneal ulcer in a patient with cicatricial pemphigoid. Am. J Opthal.

4- L . Saiman ; Y. Chen ; S. Tabibi ; P. Gabriel ; J. Zhou ; L. Lai and S. Whittier (2001) . Identification and antimicrobial susceptibility of Alcaligenes xylosoxidans isolated from patients with cystic fibrosis . J . clin . microbiol . 2001 November , 39 (11) : 3942-394 .

5- J. G. Holt ; N. R. Krieg ; P.H.A. Sneath ; J. T. Staley and S. T. Williams (1994). Bergeys manual of determinative bacteriology. 9th. ed., Williams and Wilkins Comp., USA, Baltimor. pp. 71-75,125-126.

6- C. Legrand and E. Anaissie (1992). Bactermia due to *Achromobacter xylosoxidans* in patients with cancer. Clin. Infect. Dis. 14:479-484.

7- I. M. Hoepelman (1994). Urinary tract infection in patients with diabetes mellitus. International J. Antimicrob. Agent, 4:113-116.

8- L. P. Solomon (2002). Utis prevention and treatment. Diabetes Forecast, 55 (8) : 3-28.

9- K. Kitami (1991). Vesico urethrol dysfunction of diabetic patients. Nippon, Hinyokika, Gakkai, Zasshi. 82(7): 1074-1083.

10- Z .T. Al-Rassam and A .Y . Shareef (2006) . Urinary tract infections caused by *Alcaligenes spp* . in diabetic patients **(** Accepted for publication) . Raf . J. Sci .

produced by *Alcaligenes species*. Institute pasteur/ Elsevier, Paris Res. Microbiol. 144, 221-227.
22- Z. Ignatova ; S. Stoeva ; B. Galunsky ; C. Hornle ; A. Nurk ; E. Piotraschke ; W. Voelter and V. Kasche (1998). Proteolytic processing of penicillin amidase from *Alcaligenes faecalis* cloned in *E. coli* yields several active forms . Biotech. Letter, 20 (10) : 977-982.
23- J.P. Harley and L. M. Prescott (1996). Microbiology 3th ed, WCB, MC Graw-Hill. Boston. USA. pp. 35-40; 459-462.
24- K. Talaro and A. Talaro (1996). Foundation in Microbiology , Second ed. W.M.C. Brown publisher USA. PP:95-96.
25- W. M. Dunne and S. Maisch (1994). Epidemiological Investigation of infections due to *Alcaligenes species* in children and patients with cystic Fibrosis: use of Repetitive-Element- Sequence polymerase chain reaction. J. Clin. Infect. Dis., 20: 836-841.
26- F. Gunseren ; L. Mamikoglu ; S. Ozturk ; M. Yucesoy ; K. Biberoglu ; N. Yulug ; M. Doganay ; B. Sumerkan and M. Gunaydin (1999). A surveillance study of antimicrobial resistance of gram negative bacteria from intensive care unite in eight hospitals in Turkey. J. Antimicrob. Chem., 43:373-378.
27- U. Hechler ; M. V. D. Weghe ; H.H. Martin and J. M. Frere (1989). Over produced B-Lactamase and the outer membrane barrieras resistance factors in *Serratia mercescens* highly resistant to B- Lactamase stable B –Lactam Antibiotics. J.Gen. Micro. Biol., 135:1275-1290.
28- G. F. Brook ; J. S. Butel and S. A. Morse (1998). Jawetz, melnick, and Adelberg's medical microbiology, 21st. ed., Appleton and Lange , A. and Simon and Schuter company, Middle East Eddition, Lebanon. pp. 234-235.
29- Y. Obana ; K. Shibata and T. Nishino (1991). Adherence of *Serratia marcescens* in the pathogensis of urinary infections in diabetic mice. J. Med. Microbiol. 35(2): 93-97.
11- J. G. Collee ; A. G. Fraser ; B. P. Marmion and A. Simmons (1996). Mackie and McCarteny " Practical medical microbiology" . 14th ed., Churchill Livingston Inc., New York.
12- E. H. Lennette ; A. Balow ; W. J. Hausler and H. J. Snadom (1985). Manual of clinical microbiology. 4th. ed., American Society for microbiology, Washington, D. C. pp. 1051-1107.
13- J. F. MacFaddin (1985). Biochemical test for identification of medical bacteria . 2nd. Ed, Waverly press, ine., Boltimore, USA. pp 411-418.
14- A. Pal and T. B. Samanta (1999). β- Lactamase-Free penicillin Amidase from *Alcaligenes spp*. : Isolation strategy, Strain characteristics, and Enzyme Immobilization. Current. Microbiol, 39: 244-248.
15- G. D. Christensen ; W. A. Simpson ; A. L. Bisno and E. H. Beachey (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun. 37:318-326.
16- S. K. Izdebska (1971). Toxin of *Proteus mirabils*. 337-356 in : Kadis, S. ; Montie, T. C. ; A. J.I, S. J. microbial toxin, 2A. Academic press, inc. New York.
17- L. Vandepitte ; K. Engbac ; P. Piot and C. Heuch (1991). Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology (WHO) –Genuva. pp. 21-38; 82-95.
18- J. F. Van Den Bosch ; S. U. Verboom ; P. Postma ; J. deGraaf and D. M. MacLaren (1980). Mannose sensitive and Mannose resistant adherence to human uroepithelial cells and urinary virulence of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 29:226-233.
19- T.A. Lisa ; G. I. Lucchesi and C. E. Domenech (1994). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to the cholin metabolism through the action of cholinesterase , acid phosphatase- and phospholipase C. Current Microbiology, 29:193-199.
20- J. Travis ; J. Potempa ; H. Maeda (1995). bacterial proteinases pathogenic factors . Trends in Microbiol. 3 : 405-407.
21- C. Bizet ; B. Picard ; M. Kiredjian and P. Goullet (1993). Distinctive electrophoretic pattern of esteases

Virulence factors study of *Alcaligens* isolated from urinary tract infection of diabetic patients

Al-Rassam , Z .T and Shareef , A .Y
Department of Biology, College of Science, University of Mosul , Mosul , Iraq

Abstract:

The study showed that, all isolates of *Alcaligenes* were able to produce β- lactamase and Slime layer while they were incapable to produce Lecithenase, Lipase, DNase and Neurotoxin. They were also exhibited a sepecific affinity to adhere to epithelial cells which were isolated from diabetic urine. Moreover , *Alcaligenes* isolates showed absolute resistance to several antibiotics such as Amoxcillin, Sulfonamides and Cefotaxime, while they were sensitive to Amikacin, Ciprofloxacin and Neomycin .

Key words : Virulence factors , *Alcaligens*