The Selective Pressure Effect of Antiseptics on the Patterns of Resistance in *Staphylococcus aureus*

تأثير الضغط الانتخابي للمطهرات على نمط مقاومة بكتريا العنقوديات الذهبية للمضادات الحيوية

م. كوكب عبدالله حسين السعدي
جامعة كربلاء / كلية العلوم

الخلاصة

تم في هذا البحث جمع عينات لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* من المستشفى التعليمي / كلية الطب/ جامعة بابل عن طريق اخذ مسحات من بيئة المستشفى وبعض المرضى الراقدين والمراجعين للمستشفى ،ثم خضعت العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها الى الفحوصات البكتريولوجية والكيموحياتية لغرض تشخيصها .

كذلك تم في هذا البحث اجراء فحص الحساسية لعزلات بكتريا *S.aureus* حيث استخدمت المضادات امبسلينAm ، ميثاسلين ME ،نيومايسين N، اوكسوسلين OX ، فنكومايسين VA .ثم عرضت عزلات *S.aureus* الحساسة للميثاسلين MSSA الى نوعين من المطهرات المستخدمة في مستشفى الحلة الجراحي وهما اليود بتركيز اصلي 20% وبرمنغنات البوتاسيوم بتركيز 1 غم / 10 مل ولمجموعة تخافيف تم تحضيرها بشكل متسلسل

أظهرت النتائج انتشار بكتريا *S.aureus* في بيئة المستشفى التعليمي / كلية الطب / جامعة بابل حيث بلغت نسبتها 38.88% ،وكانت جميع عزلات *S.aureus* المقاومة والحساسة للميثيسلين كانت مقاومة للفنكومايسين بنسبة 42.85% ،اما مقاومتها لمضاد الامبيسلين فكانت جميع العزلات مقاومة أي بنسبة 100% في حين اختلفت المقاومة لمضاد الاوكسوسلين بلغت النسبة 75% التي تطابقت تماماً مع المقاومة لمضاد النيومايسين .

ومن النتائج التي تم التوصل اليها في هذا البحث ان تخفيف 10^{-1} من مطهر اليود (المستخدم في المستشفى بتركيز اصلي 20%) كان كافياً لقتل البكتريا الحساسة للميثسيلين والتي هي قيد البحث في حين ان تخفيف (10^{-1}) من المطهر الأخر وهو برمنغنات البوتاسيوم (المستخدم في المستشفى بتركيز اصلي 1 غم/10 مل) لم يكن كافياً لإحداث نفس النتيجة حيث تم الحصول على النمو البكتيري في هذا التخفيف .

اخيراً كانت نتائج المقاومة للعزلة الحساسة للميثسيلين MSSA بعد عملية التعريض للمطهرات سالفة الذكر هو تحول العزلة الحساسة للميثسيلين الى متوسطة الحساسية كذلك اختلفت مقاومتها لكل من الفنكومايسين والاوكسوسيلين أي حصول مقاومة متعددة بالنسبة للمطهر الاول (اليود) ، اما بالنسبة للمطهر الثاني (منغنات البوتاسيوم) فبقيت عزلة MSSAحساسة

Abstract

Isolates of *Staphylococcus aureus* had been collected from Education hospital of college of medicine /Babylon University by taking a swabs from hospital environment and patient ,then bacteriological and biochemical tests were performed to identify the bacterial isolates .

All isolates of *S. aureus* were submitted to antibacterial susceptibility test using Ampicillin (AM), Methicillin (ME), Neomycin (N), Oxacillin (OX),and Vancomycin (VA). Mithacillin sensitive *S.aureus* (MSSA) were exposured to two types of disinfectant which used ordinarily in serial dilution from stock concentration of Iodine 2% and Pottasium permanganate 1g/10 ml .

The results showed a wide spreading of *S.aureus* in the environment of Education hospital of college of medicine /Babylon University at rate reached to 38.88% and all isolates both Methicilline resistance *S.aureus* (MRSA) and Methicillin sensitive *S.aureus* (MSSA)were resist to Vancomycin at rate 42.85% , while the rate resistance of all isolates towards Ampicillin the was 100% , and the resistance to Oxacilline was disappear to all isolates at rate reached to 75%, these results were matched with resistance Neomycin.

Additionally, The results in this study were revealed the iodine disinfectant at dilution 10^{-1} of (from the stock concentration 20%) was sufficient to kill the Methicillin sensitive *S.aureus* while, the same dilution of Potassium permanganate was insufficient to kill the bacteria by it's ability to grow in this dilution .

Finally , the results of MSSA after exposure to Iodin, and potassium permanganate disinfectants showed a transformation of *S.aureus* from Methacillin sensitive to moderate ,also the pattern of resistance was differed toward Vancomycin and Oxacilline by appearing a multiple resistance to iodine, while in Pottasium permangant MSSA remain sensitive .

المقدمة

مع إن العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* هي جزء من البكتريا المتعايشة طبيعياً في أجسامنا لكن منها مايسبب مدى واسع من الاخماج وبالأخص سلالات بكتريا العنقوديات الذهبية المقاومة للميثاسيلين Methicillin Resistant *S.aureus* (MRSA) والتي تمثل مشكلة صحية متزايدة في جميع مستشفيات العالم بسبب مقاومتها للمضادات الحيوية الشائعة الاستخدام في علاج اخماج العنقوديات الذهبية [1].

تعد عزلات العنقوديات الذهبية المقاومة للميثاسيلين (MRSA) من بكتريا العنقوديات الذهبية المكتسبة لجينات المقاومة لكل المضادات الحيوية العائدة للبنسلينات، متضمنة الميثاسيلين وبقية مضادات مجموعة البيتالاكتام ذات الطيف المحدود، كان اول اكتشاف للبكتريا المقاومة للميثاسيلين في عام 1961 في الولايات المتحدة الامريكية ،لكنها حالياً واسعة الانتشار في بيئة المستشفيات [2].

تقاوم السلالات المقاومة للميثاسيلين كل المضادات من مجموعة البيتالاكتام متضمنة البنسلينات والسيفالوسبورينات ،بالإضافة الى ان سلالات MRSA تحمل بلازميدات تسبب المقاومة لمضادات متعددة اخرى . معظم سلالات MRSA تكون حساسة لكل من trimethoprim-sulfamethoxazole و rifampin [3].

تستخدم العديد من العوامل المطهرة لمنع الاصابات ويُظهر الاستخدام المفرط للمطهرات نقصان حساسية سلالات MRSA للمطهرات مثال ان تصبح مقاومة للمطهرات [4].

من الصعوبة السيطرة على الاصابات المتسببة عن بكتريا MRSA بسبب تطور مقاومتها للعقاقير و كان vancomycin خلال العشر سنوات الماضية يستخدم كعلاج رقم واحد ضد سلالات MRSA، مع ذلك فقد اختزلت حساسيتها اذ اصبحت مقاومة كلياً للـ vancomycin [5].

ان المواد القاتلة (المطهرات ، المواد الحافظة والمعقمات) هي مركبات حرجة لستراتيجيات التدخل المستخدمة في المجال الطبي لمنع انتشار الامراض المتسببة عن عدوى المستشفيات و تستخدم للصحة الشخصية ولمنع التلوث العرضي للممرضات [6].

اهداف الدراسة :

1. عزل وتشخيص بكتريا العنقوديات الذهبية المقاومة للميثاسلين .
2. دراسة تأثير المطهرات الكيمياوية في تحويل سلالات بكتريا العنقوديات الذهبية الحساسة للميثاسيلين Methicillin Sensitive *S. aureus* (MRSA) الى سلالات مقاومة للميثاسيلين Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA).

المواد وطرائق العمل

1- عزلات البكتريا

تم في هذا البحث جمع عينات من المستشفى التعليمي في كلية الطب / بابل عن طريق اخذ مسحات من بيئة المستشفى ومسحات جلدية لبعض المرضى الراقدين والمراجعين للمستشفى خلال الفترة من 2009/12/15 الى 2010/2/15 وكانت عدد المسحات الماخوذة 18 مسحة ومن مصادر مختلفة كما هو مبين في جدول رقم 1 وقد اظهرت سبعة منها وجود لنمو بكتيري بينما لم تظهر البقية أي نمو بكتيري

جدول 1: يبين العينات ومصادر الحصول عليها

رقم المسحة	مصدرها
1	شباك ممر الطابق العلوي
2	مقبض باب المصعد
3	ارضية ردهة الكلية الصناعية
4	ارضية ردهة الكلية الصناعية
5	مسحة جلدية لمريض راقد في ردهة الكلية الصناعية
6	مسحة جلدية لمريض راقد في ردهة الكلية الصناعية
7	مسحة جلدية لمريض راقد في ردهة الكلية الصناعية
8	مسحة جلدية لمريض راقد في ردهة الكلية الصناعية
9	مسحة جلدية لمريض راقد مصاب بتكسر كريات الدم
10	مسحة جلدية لمريض لم تشخص حالته
11	مغاسل ردهة الرجال
12	ارضية المختبر
13	مناضد المختبر
14	مناضد المختبر
15	مناضد مختبر الدم
16	مسحة جلدية لمريض مراجع
17	مسحة جلدية لمريض مراجع
18	مسحة جلدية لمريض مراجع

2- تشخيص العينات

خضعت العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها الى الفحوصات البكتريولوجية والكيموحياتية لغرض تشخيصها والتي تضمنت التلوين بملون كرام ، النمو على وسط المانيتول الملحي الصلب وملاحظة قابلية العزلات على تخمير المانيتول ، فحص الكاتليز ، فحص انتاج انزيم التجلط وتنميتها على وسط الدم الصلب ودراسة نوع التحلل لكريات الدم الحمرحسب ماجاء في [7].

3- فحص الحساسية

تم في هذه الدراسة اجراء فحص الحساسية لعزلات بكتريا *S.aureus* بطريقة الانتشار بالاطباق وحسب ماجاء في [8] حيث استخدمت المضادات امبسلينAm ، ميثاسلين ME ،نيومايسين N، اوكسوسلين OX ، فنكومايسين VA، وبالتراكيز المبينة في جدول رقم 2.

جدول 2 : يبين رموز المضادات المستخدمة وتراكيزها

اسم المضاد الحيوي	رمز المضاد الحيوي	فاعلية المضاد الحيوي disc potency	مصدر المضادات الحيوية
امبسلين	Am	10	Bioanlyse (Turkey)
ميثاسلين	ME	5	
نيومايسين	N	30	
اوكسوسلين	OX	1	
فنكومايسين	VA	30	

4- التعريض للمطهرات

تم تعريض عزلة *S.aureus* الحساسة للميثاسلين MSSA الى نوعين من المطهرات المستخدمة في المستشفى وهما اليود بتركيز اصلي 20% وبرمنغنات البوتاسيوم بتركيز 1 غم / 10 مل ولمجموعة تخافيف تم تحضيرها بشكل متسلسل وحسب ماجاء في [9].

زُرعت الانابيب الحاوية على التخافيف 10^{-1}،10^{-2}،10^{-3} من المطهرات المضافة الى وسط زرعي سائل بالبكتريا قيد البحث وتُركت لتنمو في درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة ثم تم التحري عن وجود او عدم وجود نمو ،واخُتير تركيز المطهر ماقبل التركيز القاتل وغُسلت خلايا البكتريا بعد فصلها بجهاز الطرد المركزي وبسرعة 4500 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق باستخدام المحلول الملحي الفسلجي ومن ثم أُجري فحص الحساسية للبكتريا النامية بهذا التركيز وقُورنت النتائج مع نتائج الفحص قبل التعريض للمطهر[9].

النتائج

تم الحصول على 6 عزلات من بكتريا MRSA وعزلة واحدة من MSSA ، حيث أظهرت النتائج انتشار بكتريا *S.aureus* في بيئة المستشفى حيث بلغت نسبتها 38.88% واظهرت هذه العزلات انماط مختلفة من المقاومة للمضادات كما هو موضح في جدول 3 ،حيث ان جميع عزلات *S.aureus* المقاومة والحساسة للميثيسلين كانت مقاومة للفنكومايسين بنسبة 42.85% ،اما مقاومتها لمضاد الامبيسلين فكانت مقاومة بنسبة 100% في حين اختلفت المقاومة لمضاد الاوكسوسلين حيث بلغت نسبة 75% والتي تطابقت تماماً مع المقاومة لمضاد النيومايسين . ومن النتائج التي تم التوصل اليها هي ان تخفيف 10^{-1} من مطهر اليود (المستخدم في المستشفى بتركيز اصلي 20%) كان كافياً لقتل البكتريا الحساسة للميثسيلين في حين كان التخفيف (10^{-1}) من المطهر الأخر وهو برمنغنات البوتاسيوم (المستخدم في المستشفى بتركيز اصلي 1 غم/10 مل) لم يكن كافياً لإحداث نفس النتيجة حيث تم الحصول على النمو البكتيري في هذا التركيز .اما النتائج الخاصة بمقاومة العزلة الحساسة للميثاسلين بعد التعريض للمطهرات فموضحه في جدول 4،والذي يظهر تحول العزلة الحساسة للميثسيلين الى متوسطة الحساسية كذلك اختلفت مقاومتها لكل من الفنكومايسين والاوكسوسيلين أي حصول مقاومة متعددة بالنسبة للمطهر الاول (اليود) ، اما بالنسبة للمطهر الثاني فبقيت حساسة

جدول 3 : نتيجة فحص الحساسية

رقم العينة	Am	ME	N	OX	VA
4	R	R	R	R	R
6	R	R	S	S	M
10	R	R	R	R	R
12	R	S	S	S	S
16	R	R	R	R	R
17	R	R	S	S	S
18	R	R	S	S	S

R= مقاومة S= حساسة M= متوسطة الحساسية حسب [10] و [11]

جدول 4 : يبين نتيجة فحص الحساسية للمضادات الحيوية بعد التعريض للمطهرات

رقم العينة	التخفيف واسم المطهر	Am	ME	N	OX	VA
12	10^{-2} اليود	R	M	S	R	R
	10^{-1} برمنغنات البوتاسيوم	R	S	S	S	S

المناقشة

اظهرت نتائج البحث انتشار بكتريا *S.aureus* في بيئة المستشفى حيث بلغت نسبة 38.88% وتتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه[12] في دراسته التي ذكر فيها انتشار بكتريا *S.aureus* بنسبة 43% في بيئة المستشفى التعليمي في المملكة العربية السعودية ، وقد بلغت نسبة عزلات بكتريا MRSA منها 85.71% حيث ان معدل انتشار مقاومة جراثيم المكورات العنقودية الذهبية للمضادات الحيوية في زيادة متسارعة وخصوصاً في العدوى المكتسبة في المستشفيات [13]. وهذا ماشار اليه [14] في دراسته التي ذكر فيها مسؤولية MSRA عن اخماج او عدوى المستشفيات .

وقد اظهرت النتائج ان جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة والحساسة للميثاسيلين كانت مقاومة للفنكومايسين بنسبة 42.85% وتتفق هذه النتيجة مع [3] الذي ذكر ان عزلات *S.aureus* الحساسة للفنكومايسين تحولت الى مقاومة وقد سجل اول ظهور لهذه الحالة في اليابان عام 1995.

اما مقاومتها لمضاد الامبسيلين فكانت جميع العزلات مقاومة أي بنسبة 100% في حين اختلفت المقاومة لمضاد الاوكسوسلين حيث بلغت نسبة 75% وهي مطابقة تماماً مع مقاومة مضاد النيومايسين .

ومن ملاحظة جدول 4 والذي يوضح نتائج المقاومة للعزلة الحساسة للميثسيلين MSSA (عزلة رقم 12) بعد عملية التعريض للمطهرات سالفة الذكر وبالتخافيف المبينة في المواد وطرائق العمل نجد تحول العزلة الحساسة للميثسيلين الى متوسطة الحساسية كذلك اختلفت مقاومتها لكل من الفنكومايسين والاوكسوسيلين أي حصول مقاومة متعددة بالنسبة للمطهر الاول (اليود) ، اما بالنسبة للمطهر الثاني فبقيت حساسة . ،ويُعزى سبب تحول سلالات MRSA مقاومة لكل مضادات مجموعة البيتالاكتام متضمنة البنسيلينات والسيفالوسبورينات الى ان MRSA تحمل بلازميدات تقود الى مقاومة للعديد من المضادات الحيوية الاخرى [3] . حيث يُعتقد وحسب الدراسات المختبرية ان التعريض للمواد الحيوية القاتلة (biocides) المطهرات والمعقمات والمواد الحافظة ينتج عنه اختزال حساسية العزلات للمضادات الحيوية وللمواد الحيوية القاتلة بواسطة اليات المقاومة الطبيعية او المكتسبة بالاضافة الى امتلاك الاحياء المجهرية قابلية التكيف عند التعريض للمواد الحيوية القاتلة عن طريق اكتساب بلازميدات او جينات قافزة التي تجعل هذه الاحياء المجهرية مقاومة وان نفس هذه الستراتيجيات التي تكسب البكتريا اليات المقاومة للـ biocides تمنحها قابلية المقاومة ضد المضادات الحيوية [6]. بالاضافة الى الاستخدام غير المنتظم للمنظفات والمضادات البكتيرية في المنازل ينتج عنه خطر ظهور البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية ضمن افراد العائلة [15] .

Refernces

1- Junti, K.(2004).Surface Protein PIS of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – role in adhesion, invasion and pathogen, and evolutionary aspects.

2-Methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* http//www.cdc.gov/ncidod/hip/ARESIST/mrsafaq.htm.

3- Lou Tripoil, M.D. ; Josef Bick, M.D.(2003).Spot light methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *HIV* Education *Prison Project* :**6**(12).

4- Noguchi,N; Nakaminami, H. ;Nishijima, S.;Kurokawa,I. So[2], H.and Sasatsu, M. (2006). Antimicrobial Agent of Susceptibilities and Antiseptic Resistance Gene Distribution among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with Impetigo and Staphylococcal Scalded Skin syndrome.*J.Clinical Microbiology*. **44** (6) :2119-2125.

5- Yang, X. Y.;Li, C. R. Lou, R. H. ;Wang, Y. M.Zhang, W. X.;Chen, H.Z.; Huang,Q. S.; Han, Y.X.;Jiang, J.D. and You, X. F. (2007). In vitro activity of reacombinant lysostaphin against *Staphylococcus aureus* isolates from hospital in Beijing, China. *J.Medical Microbiology*. **56**:71-76.

6- Albert, T.; Sheldon, J.(2005). Antiseptic "Resistance": Read or Perceived Threat.J. Antimicrobial Resistance **40**(1) :1650-1656.

7- Collee, J.G.; Fraser, M.G.; Marmion, B.P. and LSimmons, A. (1996). Makie and Mccarteny Practical Medical Microbiology. 14th ed.,the Churchill Livingston Inc.,U.S.A.

8- Atlas, R.M.; Parks, L.C.; and Brown, A.E. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. Mosby- Yaer-book, Inc, U.S.A.

9- Morello, J.A.; Mizer, R.N. and Granato, P.A. (2006). Laboratory manual and work book in Microbiology: Application to Patient care .8th ed. McGraw Hill com. New York . 98-99.

10- Wesley,A.V. (1998). Basic microbiology.7th ed., School of medicine. Vin.of Virginia.

11- Johnson, T.R. and Case, C.L. (1995). Laboratory Experiments in Microbiology. 4th Edition.

12- Abussaud, M.J.(1991). Prevalence of nosocomial infections in a Saudi Arabian teaching hospital. J.Hosp. Infect. 17(3):235-238.

13- حميد ،عيضة.علي. (2008) . التنميط الجيني للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثاسلين في مستشفى الخرطوم التعليمي . جامعة النيلين ،السودان.المركز الوطني للمعلومات.

14- Cherkaoui, A.; Renzi, G.;Francois, P. and Schrenzel, J. (2007). Comparisionof four hromogenic media for culture based scrrrning of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.J.Medical Microbiology***56**:500-503.

15- Alello, A. E.; Marshall, B.; Levy, S.B.; Latta, P.D.; Lin, S.X. Larson, E. (2005). Antibacterial cleaning products and drug Resistance. *J.Infect. Dis.***11**(10).