

تأثير خلط مضادات البيتا لاكتام مع الأمينوغليكوسايد على المتقلبات

المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية

خالد عبد الكاظم الطائي حسن فاضل ناجي

جامعه بابل ، كلية العلوم، قسم علوم الحياة

الخلاصة

عزلت ٤٢ عزلة لبكتريا المتقلبات من ٣٧٥ عينه سريرييه . ٢٦ عزله تم عزلها من ٢٤٠ عينه أخذت من الأغشية الحيوية الرقيقة للعدد الطبية العلاجية و ١٦ عزله تم عزلها من ١٣٥ عينه إدرار أخذت من القثاطر البولية لمرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية. شخصت العزلات اعتمادا على خصائصها المظهرية (الزرعية والمهجرية) والاختبارات الكيموحيوية. بلغ عدد عزلات *Proteus mirabilis* ٣٨ عزله (٩٠.48%) بينما كانت ٤ عزلات (٩.52%) عائدة للنوع *P. vulgaris*. ولم تظهر الأنواع الأخرى من المتقلبات في العينات المدروسة . اختبرت حساسية العزلات لخمسة من مضادات البيتا لاكتام (بنسيلين-ج ،أموكسلين ، سيفوتاكسيم، سفتازديم وامبنيم)، إذ أبدت عزلات الأغشية الحيوية مقاومة عالية مقارنة بعزلات الإدرار. كانت تراكيز المثبط الأدنى لعزلات الأغشية الحيوية اعلى مما هو عليه لعزلات الإدرار، في حين كان لخلط مضادات البيتا لاكتام (اموكسلين و سيفوتاكسيم) مع الأمينوغليكوسايد (اميكاسين و جنتاميسين) تأثيرا تآزريا تجاه عزلات المتقلبات ذات المقاومة المتعددة . تبين هذه الدراسة إن للأغشية الحيوية المتكونة على العدد الطبية العلاجية دور مهم في حماية البكتريا من تأثير المضادات الحيوية وهذا قد يزيد من ظهور السلالات ذات المقاومة المتعددة.

Effect of β -Lactam Antibiotics Combination with Aminoglycosides on Multidrug Resistance *Proteus*

Abstract

A total of forty two *Proteus* isolates were isolated from 375 clinical samples. Twenty six isolates were isolated from 240 samples of biofilms of medical devices and 16 isolates were isolated from 135 samples of catheters of patients suffering from urinary tract infections. The isolates were identified depending on their morphological properties (cultural and microscopical) and biochemical tests. Of these isolates, 38 isolates (90.48%) were *P. mirabilis* and 4 isolates (9.52%) were *P. vulgaris*, the other species of *Proteus* did not appear in the samples of this study. The antibiotics sensitivity of the isolates were tested against five of β -Lactam antibiotics (pencillin-G, amoxicillin ,cefotaxime , ceftazdime and impenem), the biofilm isolates showed high resistance in comparison with urine isolates. The minimum inhibition concentrations of biofilm isolates were high than these of urine isolates, while the combination of β -Lactam antibiotics (amoxicillin and cefotaxime) with aminoglycosides (amikacin and gentamycin) showed synergistic effect against multidrug resistance of the isolates. This study showed that the biofilms formation on medical devices have significant role in protection of bacteria from antibiotics, and these may be increased the appearance of multidrug resistance strains.

المقدمة

P. mirabilis, *P. vulgaris* وثلاثة أنواع غير مسماه هي *Proteus* 4, 5 and 6 وهي سلالات النوع *P. myxofaciens* (Zych *et al.*,2005). تكون المتقلبات الغشاء الحيوي الرقيق ويعد هذا الغشاء احد عوامل ضراوتها (O`Toole *et al.*,2000) ، كما تلعب ظاهره الانثيال (Swarming) دور مهم في تكوينه (Jones *et al.*,2005) . تظهر السلالات المكونة للغشاء الحيوي مقاومه للمضادات الحيوية مقارنة بالسلالات غير المكونة له (Delgado *et al.*,2007) ، إذ يقوم الغشاء الحيوي باختزال وصول المضاد الحيوي إلى البكتريا داخل الغشاء وبالتالي تصل بتركيز غير قائله لها كذلك يساعد على انتقال الجينات بين الإحياء المكونة له. (Ehrlich *et al.*,2002) . إن الاستخدام المستمر والعشوائي للمضادات الحيوية أدى إلى ظهور سلالات ذات مقاومه متعددة للمضادات الحيوية وهو احد الأسباب الرئيسة لانتشار الأمراض المرتبطة بالمجتمع والمكتسبة من المستشفيات (Kumer *et al.*,2006 ; Nucleo *et al.*,2010) . إن لخلط المضادات الحيوية تأثير على حيوية البكتريا، فقد أشار Young (١٩٧١) إلى استخدام خليط من الجنتاميسين والكاربنيم في علاج البكتريا السالبة لصبغه غرام والمسببة لتسمم الدم والإصابات المكتسبة من المستشفيات، كما بين Aaron وجماعته (٢٠٠٥) أهمية خلط بعض المضادات الحيوية في علاج البكتريا ذات المقاومة المتعددة في مرضى التهاب المجاري البولية. وفي دراسة حديثة (Forrest and Tamura, 2010) أكد على إن تقليل خطورة مقاومة الإحياء المهجرية تتم بخلط المضادات الحيوية مع بعضها مما يؤدي إلى زيادة فعاليتها من خلال تآزرها . وفي العراق تسجل يوميا العديد من الإصابات الناتجة عن هذه البكتريا لذلك فقد هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة مدى تأثير خلط مضادات البيبتلاكتم (اموكسلين والسيفوتاكسيم) مع الامينوكلايكوسايد (اميكاسين وجنتاميسين) على حيوية عزلات المتقلبات ذات المقاومة المتعددة المعزولة من الاغشية الحيوية الرقيقة للعدد الطبية العلاجية والإدرار لمرضى التهاب المجاري البولية.

المواد وطرائق العمل

١. جمع العينات

أخذت مسحات من الأغشية الحيوية المتكونة على العدد الطبية العلاجية المستخدمة (القثاطر البولية، العدد داخل الرحمية وعدد تثبيت الكسور) بواسطة مسحات قطنية معقمة و عينات إدرار من أكياس القثاطر البولية (بعد رجاها لعدة مرات) لمرضى التهاب المجاري البولية لكلى الجنسين وبأعمار تراوحت بين ٥-٣٣ سنة والراقدن في مستشفى الحلة التعليمي ومستشفى النسائية والأطفال في مدينة الحلة. نقلت العينات إلى المختبر لغرض إجراء التجارب اللاحقة عليها وتم جمع العينات خلال الفترة من تشرين الأول / ٢٠١٠ ولغاية شباط / ٢٠١١.

٢. العزل والتشخيص

عزلت البكتريا بعد زرع العينات أنفة الذكر على وسطى أكار الدم (Mast) Blood agar base وإكار الماكونكي MacConkey agar (Biolife) بتقنية التخطيط . شخصت العزلات اعتمادا على الخصائص المظهرية للمستعمرات على الأوساط الزرعيه والخلايا تحت المجهر الضوئي بعد إن صبغت بصبغه غرام وكذلك على الفحوصات الكيموحيوية حسب ما ذكر في Macfaddin (٢٠٠٠).

٣. الحساسية الدوائية

اختبرت حساسية العزلات تجاه المضادات الحيوية بنسلين-ج، اموكسلين، سيفوتاكسيم، سيفتازديم وامينيم المجهزة بشكل اقراص من شركه Bioanalyse-Turky وبتراكيز ١٠ وحدة دوليه، ٢٥، ٣٠، ٣٠ و ١٠ مايكروغرام/قرص على التوالي، وقدر التركيز المثبط الأدنى بتقنية Macro-dilution technique حسب ما جاء في NCCLS (٢٠٠٧).

٤. خلط المضادات الحيوية

اختبرت العزلات البكتيرية بخلط ١٠ مايكروكرام /مل من الاموكسلين والسيفوتاكسيم مع ٥ مايكروغرام/مل من الاميكاسين والجنتاميسن بطريقة Half-chess board التي أشار إليها Garrod وجماعته (١٩٧٨).

النتائج والمناقشة

أخذت ٢٤٠ عينة مختلفة المصادر من الاغشية الحيويه للعدد الطبية العلاجيه و١٣٥ عينة إدرار لمرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية . كانت ٢٤٠ عينة موجبة للنمو البكتيري و ١٣٥ عينة سالبه لها، وقد يعود السبب في عدم نمو البكتريا في العينات هو لكون الاصابه ناتجة عن بكتريا تحتاج إلى أوساط زرعيه أو ظروف بيئيه خاصة لعزلها أو قد يكون المريض استخدم مضادات حيوية مثبته لنموها. يوضح الجدول ١ عدد عزلات بكتريا المتقلبات والتي بلغت ٤٢ عزله، شخصت ٣٨ عزله لبكتريا *P. mirabilis* (٩٠.48%) بينما كان عدد عزلات *P. vulgaris* ٤ عزلات (٩.52%). فقد وجد Almarjani (2000) في دراسته حول التهابات المجاري البولية الناتجة عن جنس المتقلبات أن نسبة الاصابة ببكتريا *P. mirabilis* كانت ٨٥.١٤ % مقارنة ببكتريا *P. vulgaris* التي كانت ١٤.٨٦%. أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن نسبة الإصابة ببكتريا المتقلبات في الإناث كانت ٥٧.٢% وهي اكبر مما هو عليه في الرجال (٤٢.٨%) كما موضح في الجدول ٢. اتصفت العزلات بظاهرة الانثيال على وسط أكار الدم، وكانت رائحتها تشبه رائحة السمك الفاسد، ولون مستعمراتها الشاحب على وسط أكار الماكونكي وهي عصيات سالبه لصبغه غرام تميزت بظاهرة تعدد الإشكال بين العصوي والمنحني عندما فحصت تحت المجهر الضوئي بعد إن صبغت بصبغه غرام ويبين الجدول ٣ نتائج الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا المتقلبات.

جدول ١. أنواع وإعداد والنسب المئوية لعزلات بكتريا المتقلبات.

نوع العينة	عدد العينات	عدد عزلات المتقلبات		النسب المئوية للعزلات (%)
		<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	
مسحات القناطر البولية	١٤٠	٢	١٦	٤٢.٨
مسحات العدد داخل الرحمية	٨٠	١	٧	١٩
مسحات عدد تثبيت الكسور	٢٠	٠	١	٢.٣
ادرار من مرضى التهاب المجاري البولية	١٣٥	١	١٤	٣٥.٩
المجموع	٣٧٥	٤	٣٨	١٠٠

جدول ٢. توزيع عزلات المتقلبات اعتماداً على جنس المريض.

النسب المئوية للعزلات (%)	عزلات الادرار		عزلات الاغشيه الحيويه		الجنس
	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	
٥٧.٢	١	٨	٢	١٣	إناث
٤٢.٨	١	٦	٠	١١	ذكور

أظهرت نتائج اختبارات الحساسيه الدوائيه والموضحة في الجدول ٤ ان جميع عزلات المتقلبات كانت مقاومه لمضادات البنسلينات المستخدمه (بنسلين-ج والاموكسلين) وهذه النتائج مشابهه لما اشار اليه Delgado وجماعته (٢٠٠٧) ، وقد يعود سبب المقاومه لانتاج انزيمات β -Lactamase ، ولكون هذه المضادات عائدة للاجيال القديمه فأن اغلب عزلات المتقلبات طورت اليات مقاومه ضدها . اشارت نتائج الدراسه الحاليه الى تباين المقاومه لمضادات السيفالوسبورينات اذ كانت جميع عزلات المتقلبات مقاومه للسيفوتاكسيم وان ٨٠ % من عزلات المتقلبات كانت مقاومه للسيفتازديم ، وهذا يشابه ما اشار اليه Okesola و Mankanjuola (٢٠٠٩).

جدول ٣. الاختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا المتقلبات.

<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	الاختبارات الكيموحيوية	ت
+	+	اختبار الكاتليز	1.
-	-	ختبار الاوكسيديز	2.
+	-	اختبار الاندول	3.
+	+	اختبار احمر المثل	4.
-	V	اختبار فوكس بروسكاور	5.
V	V	اختبار استهلاك السترات	6.
+	+	انتاج اليوريز	7.
+	+	اختبار تميع الجيلاتين	8.
+	+	انتاج H ₂ S	9.
+	+	انتاج Ornithin decarboxylase	10.
+	+	انتاج اللايبيز	11.
-	-	تخمير اللاكتوز	12.
+	-	تخمير المالتوز	13.
-	-	تخمير المانوز	14.
V	+	تخمير المانتول	15.
+	+	تخمير الفركتوز	16.
+	+	تخمير الكالكتوز	17.
+	+	اختبار الحركه	18.

الرموز: + نتيجة موجبه ، - نتيجة سالبه ، V متغايره النتيجة.

كانت ٣٠% من عزلات الاغشيه الحيويه مقاومه لمضاد الامينيم ، اذ تعزى الفعاليه العاليه للامينيم لكونه مقاوم لانزيمات البيبتالاكتيميز، فقد اشار Singh وجماعته (٢٠١٥) الى ان سبب مقاومه المضادات الحيويه من قبل البكتريا قد يعود الى انتاج انزيمات β -Lactamase او تقليل عبور المضادات الى داخل الخليه من خلال تغيير نفاذية غشائها الخلوى او تغير موقع الهدف . يقوم الغشاء الحيوي بمنع وصول المضادات الحيويه الى البكتريا المكونه له بتراكيز قائله مما يحفزها على تطوير آليات مقاومه جديده للمضادات الحيويه وقد يكون هذا ايضا هو احد الاسباب لانتشار الاصابه المكتسبه من المستشفيات والمتسببه من البكتريا المكونه للاغشيه الحيويه.

جدول ٤. تأثير مضادات البيبتالاكتيم على عزلات بكتريا المتقلبات.

المجموعه	المضاد الحيوي	التركيز (مايكروغرام/قرص)	النسب المئويه للمقاومه (%)	
			عزلات الاغشيه الحيويه	عزلات الادرار
بنسلينات	بنسلين ج	١٠ (وحده دوليه)	١٠٠	١٠٠
	اموكسلين	٢٥	١٠٠	١٠٠
سيفالوسبورينات	سيفوتاكسيم	٣٠	١٠٠	١٠٠
	سيفتازديم	٣٠	٨٠	٨٠
كارباينيم	امينيم	١٠	٣٠	٠

يبين الجدول ٥ نتائج اختبار التركيز المثبط الادنى، اذ وجد زياده في قيمه لعزلات الاغشيه الحيويه (١٢٨) عما هو عليه لعزلات الادرار (٦٤) لمضادات الاموكسلين والسيفوتاكسيم ، اما مضاد الامينيم فلم يظهر اى اختلاف في قيم تراكيز المثبط الادنى لعزلات الاغشيه الحيويه عما هو عليه لعزلات الادرار ، فقد اكد Olson وجماعته (٢٠٠٢) زياده قيم تراكيز المثبط الادنى لعزلات الاغشيه الحيويه عن تلك غير المكونه له والعائده لنفس السلالات البكتيرية ، اما Hola وجماعته (٢٠٠٤) فقد اشار الى ان قيم تراكيز المثبط الادنى كانت عاليه لسلالات بكتريا *Staphylococcus epidermidis* المكونه للاغشيه الحيويه . ان زياده قيم التركيز المثبط الادنى لعزلات الاغشيه الحيويه هو دليل على مقاومتها العاليه للمضادات الحيويه والدور الذي يلعبه الغشاء الحيوي في انتشار البكتريا المكتسبه للمقاومه .

جدول ٥. قيم التركيز المثبط الادنى لعزلات بكتريا المتقلبات.

اسم المضاد	التركيز المثبط الأدنى لعزلات الإدرار (مايكروغرام/مل)	التركيز المثبط الأدنى لعزلات الاغشيه الحيويه (مايكروغرام/مل)
اموكسلين	٦٤	١٢٨
سيفوتاكسيم	٦٤	١٢٨
امينيم	١٦	١٦

اما الجدول ٦ فيوضح نتائج خلط مضادات البييتالاكتم (اموكسلين و سيفوتاكسيم) مع مضادات الامينوكلايكوسايد (اميكاسين و جنتاميسين) فقد اظهرت فعلا تآزريا تجاة العزلات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية . اشار Drago وجماعته (٢٠٠٥) الى ان خلط مضادات البييتالاكتم والامينوكلايكوسايد هو العلاج الامثل للاصابات الشديده والمتسببه بواسطه البكتريا العصويه السالبه لصبغه غرام والمقاومه للعديد من المضادات الحيوية ، إذ تسهل مضادات البييتالاكتم دخول مضادات الامينوكلايكوسايد الى موقع هدفها من خلال منع تكوين طبقة البييتيدوكلايكان مما يزيد من نفاذيه جدار الخليه . بين Dales وجماعته (٢٠٠٩) ان استخدام خليط من مضادات الامينوكلايكوسايد والسيفالوسبورينات يزيد من علاج البكتريا السالبة لصبغه غرام ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والمعزولة من الاغشية الحيوية ، اما Feglo وجماعته (٢٠١٠) فقد وجد ان ٧٠% من عزلات المتقلبات كانت مقاومة للسيفوتاكسيم بسبب انتاجها لانزيمات البييتالاكتم واسعة الطيف.

جدول ٦. تاثير خلط مضادات البييتالاكتم مع الامينوكلايكوسايد على عزلات الاغشية الحيوية المتعدده المقاومه.

المضاد الحيوي	جنتاميسين	اميكاسين	سيفوتاكسيم	اموكسلين
اموكسلين	-	-	+	+
سيفوتاكسيم	-	-	+	
اميكاسين	+	+		
جنتاميسين	+			

الرموز: + وجود نمو ، - عدم وجود نمو .

References

- Aaron S. S. D.; Vandemheen, K. L.; Ferris, W. and 20 other authers. (2005). Combination of antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated multiresistans bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 366: 463-471.
- Almarjani, M.F.(2000). Multiple antimicrobial resistance and some virulence factors of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection and study of their plasmid content. M. Sc. Thesis, College of Science, University of Al-Mustansiriya. (In Arabic).
- Dales, L. ; Ferris, W. ; Vandemheen, K. and Aaron, S. D. (2009). Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. Eur. J .Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28:1275–1279.
- Delgado ,M. F; Conteras. M; Amado. M. A. G; Gueneau. P. and Suarez, P. (2007). Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan Oysters. Rev. Inst. Med.Trop. S. Paulo 49(6): 355-359.
- Drago,L. ;Elena,D. V. ;Lucia ,N.;Lordana,T. and Maria,R. G.(2005). In vitro selection of resistance in *Pseudomonas aerogenosa* and *Acinetobacter* Spp. by lovfloxacin and cibrofloxacin alone and in combination with β -lactam and amikacin. J. Antimicrob. Chemother.56 (2): 353-359.

- Ehrlich,G.D. ; Veeh,R. ; Wang,X. ; Costerton,J.W. ; Hayes,J.D. ; Hu,F.Z. ; Daigle,B.J. ; Ehrlich,M.D. and Post,J.C. (2002). Mucosal biofilm formation on middle ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA*. 287 (13) : 1710-1715.
- Feglo, P.K. ; Gbedema, S.Y. ;Quary, S.N.A.;Adu-Sarkodie,Y. and Opoku-Qkrah, C. (2010). Occurrence species distribution and antibiotic resistance of *Proteus* isolates: A case study at the Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana . *Inter. J. Pharm. Sci.* 1(9) : 347-352.
- Forrest, G. N. and Tamura, K. (2010). Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clin. Microb. Rev.* 23(1): 14-34.
- Garrod,L.P.; Reeves,D.S.; Phillips,I.; Williams,J.D. and Wise,R. (1978). Laboratory method in antimicrobial chemotherapy. Livingstone, NewYork. P:31-49.
- Holá,V. ; Růzicka,F. and Votava,M. (2004). Differences in antibiotic sensitivity in biofilm-positive and biofilm-negative strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 53(2): 66-69.
- Jones,B.V.; Mahenthalingam,E. ; Sabbuba,N.A. and Stickler,D.J. (2005). Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. *J. Med . Microbiol.* 54: 807-813.
- Kumar, M. S.; Lakshmi, V. and Rajagopalan,R. (2006). Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteriaceae Spp. isolated at a tertiary care institute. *Ind. J. Med. Micro.*, 24: 208-211.
- Macfaddin J.F.(2000). Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Williams and Wilkins. Co. Philadelphia,USA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2007). Performers' standards for antimicrobial susceptibility testing. 7th ed. approved standerd M2-A6 and M7-A7, Wayne, pa, USA.
- Nucleo,E.; Fugazza,G.; Migliavacca,R.; Spalla,M.; Comelli,M.; Paganil,L.; and Debiaggi,M. (2010). Differences in biofilm formation and aggregative adherence between B-lactam susceptible and B-lactamases producing *P. mirabilis* clinical isolates. *New Microbiologia.* 33: 37-45.
- Okesola, A.O and Makanjuola,O. (2009). Resistance to third- cephalosporins and other antibiotics by enterobacteriaceae in Western Nigeria. *American J. Inf. Dis.* 5 (1): 17-20.
- Olson, M.; Ceri, H.; Moreck, D.; Buret,A. and Read, R. (2002). Biofilm bacteria : formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66(2): 86-92.
- O,Toole,G.; Kaplan,H.B.; and Kolter, R.(2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- Singh,V.; Sharma,L.; Kanta,R.; Sharma,S.;Chauhan,S. and Chauhan,R.K. (2010). Antimicrobial activity of *Proteus* bacteria isolated from raw milk of paonta valley. *Int. J. Phar. Bio. Sci.* 1(2): 1-4.
- Young ,L. S. (1971). Gentamicin clinical use with carbancillin and in vitro with recent isolates of *Pseudomonas* Spp. *J.infect. Dis.*124 (202): 224-228.
- Zych,K.; Siwiniska,M. and Sidorczyk,Z. (2005). Serological classification and epitope specificity of *Proteus penneri* S29 lipopolysaccharide. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53: 540-545.