علاقة الطبقة المخاطية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بالمقاومة لبعض المضادات الحياتية

انوار علي عبد الله   ذكرى عبد العالي عبد   انوار كاظم حسين   زينب محمد جاسم

كلية العلوم- جامعة بابل   كلية الطب-جامعة بابل

الخلاصة

تم في هذه الدراسة تحديد التراكيز المثبطة الدنيا(MIC) Minimal Inhibitory Concentration لاربعة من المضادات الحيوية وهي Amikacin، Gentamycin Rifampicin، Ciprofloxacin لـ (22) عزلة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من اخماج الحروق والجروح والتهاب المجاري البولية.

اظهرت العزلات صفة المقاومة تجاه Gentamycin، Ciprofloxacin اذ تراوحت قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC لتلك المضادات مابين(64-210µg\ml)، (32-70µg\ml) على التوالي. في حين تراوحت قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC مابين (7-25 µg\ml),(4-20µg\ml) لمضادات Amikacin, Rifampicin على التوالي.

كما تم الكشف عن قابلية العزلات المقاومة والحساسة للمضادات على انتاج الطبقة المخاطية Slime layer وتقدير كميتها بجهاز المطياف الضوئي. اذ اظهرت العزلات المقاومة زيادة في كمية الطبقة المخاطية تراوحت مابين (0.5-1.5) =O.D بينما العزلات الحساسة المنتجة للطبقة المخاطية اعطت O.D=(0.3-0.4) .

Abstract

Twenty two of *P. aeruginosa* were isolated of patients suffering from burn، wound and urinary tract Infections، was determind Minimal Inhibitory Concentration (MIC) towards Four antibiotics، Amikacin، Gentamycin، Rifampicin and Ciprofloxacin.

The results showed high resistance to Gentamycin and Ciprofloxacin at the MIC values were (64-210)µg\ml (32-70)µg\ml respectively. Whereas some isolates showed susceptible to Amkacin and Rifampicin، since the MIC values were (7-25)µg\ml and (4-20)µg\ml respectively.

The isolates showed ability to produce extracellular slime substance and the amount of slime layer ، were estimated by spectrophotometer. The results showed relationship between the slime layer quantity and an increasing in the MIC value ,the optical density of the slime layer of resistant isolates was (0.5-1.5) compared with sensitive isolates was (0.3-0.4).

المقدمة

تستوطن بكتريا *P. aeruginosa* المستشفيات وتعد ثاني اهم المسببات للاخماج المكتسبة من المستشفى بعد بكتريا *E. coli* ، وتعد من الممرضات الانتهازية التي تنتقل بين ردهات المستشفيات، لاسيما في وحدات العناية المركزة ووحدات الحروق وفي ردهات الجراحة البولية، لذلك تعزل غالبا من الحروق الملوثة والقرح السريرية وجروح العمليات ومن الاذن الوسطى والمسالك البولية (Wang *et al.*, 2005).

تمتلك *P. aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة التي تضمن لها القابلية على احداث الاصابة لذلك فهي تبدي مقاومة عالية لعدد من المضادات الحيوية، كما ان لها القابلية على مقاومة (وحتى التكاثر) في المحاليل المطهرة الاعتيادية المستعملة في المستشفيات (Labarea *et al.*, 1998) .

وفي دراسة اجريت في اليابان من قبل Sekiguchi وجماعته (2005) حول نمط الحساسية لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية المرافقة لعمليات القسطرة، اذ أبدت البكتريا مقاومة عالية تجاه مضادات الامينوكلايكوسايد Aminoglycoside ويعزى السبب الى انتاجها انزيم Acetyltransferase، الذي يقوم بتحوير المضاد وبالتالي فقدان فعاليته.

أظهرت اغلب سلالات *P. aeruginosa* استجابة لمضاد الكاربنسلين مع بدايات استعماله لعلاج مختلف الإصابات، ومع مرور الوقت ابدت السلالات مقاومة لتراكيز عالية منه(Lowbury *et al*., 1969)، كما برزت ظهور المقاومة المتعددة لعدد من المضادات شملت انواع البنسلينات والتتراسايكلين والكلورامفنكول اضافة الى الجنتامايسين العائد الى مجموعة الامينوكلايكوسايد (Gaynen *et al*., 1985) من المشاكل التي تواجه الكادر الطبي هي التغيير في نمط استجـابة بكتريا *P. aeruginosa* لعدد من المضادات الحيوية خلال وبعد فترة المعالجة، وذلك لامتلاكها العديد من العوامل المساعدة على احداث الاصابة كالاسواط flagella والاهداب pili والانزيمات الحالة اضافة الى وجود الطبقة المخاطية المهمة بعملية الارتباط ومن ثم التكاثر واحداث العديد من الاصابات المؤدية الى غزو الانسجة بالاضافة الى امتلاكها الذيفانات مثل Exotoxin A،Exotoxin S وكذلك Cytotoxin الذي يمتلك خاصية قتل خلايا الدم البيض متعددة النوى (Vasil, 1986).

المواد وطرائق العمل

1. العزلات

تم جمع 22 عزله لبكتريا *P. aeruginosa* من الجروح والحروق والتهاب المجاري البولية من كلا الجنسين وباعمار تراوحت مابين (26-65) عاما في مستشفى الحلة التعليمي، شخصت العزلات بالاعتماد على (Macfaddin, 2000).

2. اقراص المضادات الحيوية

تم استخدام مجموعة من المضادات الحيوية لاختبار حساسية البكتريا تجاه عدد من المضادات الحيوية المجهزه من شركة Oxoid شملت Gentamycin ،Ciprofloxacin، Rifampicin،Amikacin .

3. قياس التركيز المثبط الادنى

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

استخدمت طريقة (Fingold and Baron,1986) في تحديد اقل تركيز تثبيطي MIC للمضادات الحيوية .

4. قابلية العزلات على انتاج الطبقة المخاطية

اتبعت طريقة Christensen وجماعته (1982) في الكشف عن قابلية انتاج العزلات قيد البحث عن الطبقة المخاطية وتضمنت الطريقة مايلي:-

1. تنقل 20 مستعمرة لكل عزله الى 50 مل من وسط Tryptic Soy Agar وتحضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48 ساعة.

2. يزال الوسط من الانابيب ويضاف 2 مل من صبغة السفرانين، ترج لتصبيغ جدار الأنبوب، ثم يزال الفائض من الصبغة، تترك الأنابيب مقلوبة لتجف لمدة 15 دقيقة وتقرا النتائج، اصطباغ جدار الانبوب بصبغة السفرانين يعتبر نتيجة موجبة.

3. تذاب المكونات الملتصقة بجدار الانبوب بـ 1مل من الكحول الاثيلي (95%) ثم يخفف بالماء المقطر بنسبة 9:1 وتقرا الكثافة الضوئية O.D بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 500 نانوميتر.

النتائج والمناقشة

عزلت 22 عزله لبكتريا *P. aeruginosa* من حالات مرضية تضمنت الحروق والجروح والتهاب المجاري البولية من مستشفى الحلة التعليمي من كلا الجنسين. جدول (1).

جدول (1) : اعداد ومصادر عزلات *P. aeruginosa*

المصدر / **النوع**	الحروق %	الجروح %	التهاب المجاري البولية %	العدد الكلي %
P.aeruginosa	18 (81.8%)	3 (13.6%)	1 (4.5%)	22(100%)

تشير النتائج المبينة في الجدول (2) الى قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC للمضادات الحيوية Gentamycin، Ciprofloxacin، Amikacin، Rifampicin الى وجود تباين كبير في قيم الـ MIC بين العزلات، فقد بلغت عدد العزلات المقاومة للمضادات المذكورة انفا 14 عزله، اذ تراوحت قيم الـ MIC لتلك المضادات مابين (64-210) µg\ml، (32-70)µg\ml،(7-25)µg\ml، (4-20)µg\ml لمضادات Gentamycin،Ciprofloxacin، Amikacin ، Rifampicin على التوالي. في حين تراوحت قيم الـ MIC للعزلات الحساسة مابين (1-5) µg\ml, (0.4-1) µg\ml,(0.5-1)µg\ml ، (0.1-0.3)µg\ml للمضادات Gentamycin،Ciprofloxacin ، Amikacin ، Rifampicin علىالتوالي.

جدول (2) : التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) مقاسة بالميكروغرام/ مل لبكتريا
P. aeruginosa

النوع	**عدد العزلات**	**Gentamycin µg\ml**	**Ciprofloxacin µg\ml**	**Amikacin µg\ml**	**Rifampicin µg\ml**
P.aeruainosa المقاومة	14	64-210	32-70	7-25	4-20
P.aeruginosa الحساسة	8	1-5	0.4-1	0.5-1	0.1-0.3

يبين الجدول (3) تحديد كمية الطبقة المخاطية المنتجة من قبل العزلات المقاومة والحساسة للمضادات الحيوية، اذ وجد ان كمية الطبقة المخاطية المنتجة من قبل العزلات المقاومة للمضادات Rifampicin، Gentamycin، Ciprofloxacin، Amikacin تراوحت مابين (0.7-0.8)،(0.8-1)، (0.6-1.1) ، (1.5-0.5) مقارنة بالعزلات الحساسة والتي بلغت (0.1-0.2)،(0.1-0.2)، (0.2-0.3)، (0.3-0.4) لمضادات Rifampicin، Amikacin، Ciprofloxacin، Gentamycin على التوالي.

جدول (3) :الكثافة الضوئية للطبقة المخاطية المنتجة من العزلات المقاومة والحساسة للمضادات الحيوية

النوع	**Gentamycin**	**Ciprofloxacin**	**Amikacin**	**Rifampicin**
P.aeruginosa المقاومة	0.5-1.5	0.6-1.1	0.8-1	0.7-0.8
P. aeruginosa الحساسة	0.3-0.4	0.2-0.3	0.1-0.2	0.1-0.2

تنشا مقاومة *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية عن طريق اليات متعددة منها انتاج أنزيمات لها القابلية على تحطيم المضادات الحيوية مثل انزيمات البيتالاكتميز، او تغير نفاذية الغشاء الخلوي لمنع دخول المضاد الحيوي الى منطقة الهدف، فضلا عن قابليتها على تغيير المسارات الايضية (Vasil., 1986).

ذكر الباحث Brown (1975) ان بعض مستشفيات العالم متقيدة باستخدام مضاد واحد لعلاج مرضاها مما ادى الى ظهور سلالات طافرة من بكتريا *P. aeruginosa*. كما اظهرت سلالات جديدة ذات مقاومة عالية ضد مضادات Cefoperazin، Piperacillin، Moxalactam إضافة إلى Cefoxitin وعزي السبب الى حصول طفرة كروموسومية نتيجة استخدام المضاد الاخير Sanders and Sanders (1988).

تلعب الطبقة المخاطية وانتاج المحفظة في بكتريا *P. aeruginosa* دورا مهما في الامراضية واكتساب المقاومة فهي احد العوامل المؤدية الى ظهور صفة المقاومة للمضادات الحيوية. تمتاز الطبقة المخاطية بلزوجتها فهي تركيب هلامي رخو الترابط، يحيط ببعض انواع البكتريا مما يمكنها من الالتصاق بمواد اخرى. فالبكتريا الحاوية على المحفظة Capsule او الطبقة المخاطية Slime Layer تقاوم خلايا الجسم البلعمية Phagocytic cells التي تبتلع وتحطم البكتريا (Bayer *et al*., 1992) .

تم في هذه الدراسة الكشف عن قابلية العزلات على انتاج الطبقة المخاطية ومن ثم تقدير كميتها في العزلات المقاومة والحساسة. اوضحت النتائج بان العزلات المقاومة للمضادات الحيوية والتي اعطت قيم عالية لـ MIC ، أعطت كمية مرتفعة من انتاج الطبقة المخاطية مقارنة مع العزلات الحساسة للمضادات الحيوية. تتطابق هذه النتائج مع مالشار اليه الذهب (2004) حول حساسية 60 عزله لبكتريا *Staphylococcus aureus* ، اذ كانت كمية الطبقة المخاطية المنتجة من قبل العزلات المقاومة أكثر مقارنة بالعزلات الحساسة . فالطبقة المخاطية تعمل على تغليف الخلية البكترية بعدة طبقات مكونة اغشية رقيقة حيوية تعرف باسم Biofilm، فهي تعمل كعازل يمنع نفود المضاد الحيوي الى داخل الخلية البكترية ومن ثم يضفي عليها صفة المقاومة (Kirisits *et al*., 2004; Ramphal and Pier. 1985; Stapper *et al*., 2007)، لذلك فالطبقة المخاطية عامل مهم لاكتساب الخلية البكترية المنتجة المقاومة للمضادات الحيوية، وبالتالي الاستعمار واطالة فترة العلاج (Evans *et al*., 1991).

المصادر العربية

الذهب، أزهار عمران لطيف،.(2004) . تاثير الطبقة المخاطية للمكورات العنقودية الذهبية في المقاومة للمضادات الحيوية. مجلة جامعة بابل/ العلوم الصرفة والتطبيقية. المجلد 9، العدد 3.

المصادر الاجنبية

Bayer، A. S.; Susan، P.; Marcelo، C.; Ramos، C. C.; Nast، F.E. and Neal، L.S. (1992). Effects of alginase on the natural history and antibiotic therapy of experimental endocarditis caused by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*.Infec. and Immunity. 3979-3985.

Brown، M. R. (1975). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. 1 st Ed. John Wiley and Sons. London.

Christensen، G.D.; Simpson، W.A. and Brsno، E. H. (1982). Adherence of slime producting Strains of *Staph. epidermidis* of smooth surface. Infect. Immun. **37:** 38-326**.**

Evans، D.J.; Allison، D.G.; Brown، M. R. and Gilbert، P.(1991). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards Ciprofloxacin: effect of specific growth rate. J. Antimicrob Chemother **27**: 177-184.

Finegold، S. M. and Baron، E. J. (1986). Diaganostic Microbiology. 7th. Ed. The C.V. Mosby Company U.S.A. p. 175-201.

Gaynen، R. P.; Weinstein، R.A.; Chamberlis، W. and Kabins، S.A. (1985). Antibiotic-resistant flora in nursing home patients admitted to hospital. Arch. Intern. Med. 145: 1804-1807.

Kirisits، M.; Margolis، J.J.; Purevdorj-Gage، B.L.; Vaughan، B.; Chopp، D.L.; Stooddley، P. and Parsek، M.R.(2007). Influence of the hydrodynamic enviroment on Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms.J. Bacteriology. **189:** 8357-8360.

Labarea، J. A.; Pegues، D.A.; Wagar، E.A.; Hindler، J. A.، and Bruchner، D.A.(1998). Some things rotten، Anosocomial outbreak of Malodorous *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Infect. Dis. 26: 1440-1446.

Lowbury، E. J.; Kidsom، A.; Lilly، H. A.; Aylifle، G. A. and Jones، R. J(1969). Emergence of strains highly resistant to Carbenicillin . Lancet. 448-452.

Macfaddin، J. E. (2000). Biochemical Test For Identification Of Medical Bacteria." 3rd ed". Lippin cott Williams. Philadelphia، U. S.A.

Ramphal، R. M. and Pier، G. B. (1985).Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal epitheal cells. Infect. Immun. 47: 1-4.

Stapper، A. P.; Narasimhan، G.; Ohman، D.E.; Hentzer، B. M.; Molin، S.; Kharazm، A.; Hoiby، Niels. And Mathee، K.(2004). Alginate production affects *pseudomonas aeruginosa* biofilm development and archtecture، but is not essential for biofilm formation. J. Med. Microbiol. **53:** 679-690.

Sanders، C. C. and Sanders، W. E. J. (1988). Heterogenicity of class 1 β- Lactamase expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. 32 (12): 1893-1895.

Sekiguchi، J. I.; Asagi، T.; Akiyama، T. M.; Fujino، T.; Kobayshi، I.; Morita، K.; *et al*. (2005). Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused outbreak in a Neurosurgery Ward and It's *aac (6') –Iae* Gene cassette encoding a novel Aminoglycoside Acetyltransferase. Antimicrob. Agents.And Chemoth. 49(9): 3734-3742.

Vasil، M. L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa*. Biology mechanisme of virulence، epidemiology، J. Pediatrics. 108(5): 800-805.

Wang، E. W. MD.، Jae، Y.; Mary ، E. P. M.; Rebort ، N. M.; steren ، S.; Richard ، A. C. (2005). Otopathogenic *psendomonas aeurginosa* strains as competent b--iofilm formers. J. Otolaryngology- Head and Neck surgery. B1: 983-989.