دراسة تأثير الفعل التآزري لمثبطات البيتالاكتاميز مع بعض مضادات البنسلينات المستخدمة ضد بكتريا Proteus mirobilis المسببة لاخماج المسالك البولية

د. محمد فضل سالم الميسري

د. حسن محمد حسن الرهوي

قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة عدن

د. فضل احمد سعيد الجشاعه

أستاذ الميكروبيولوجي المساعد – كلية العلوم - جامعة اب

الخلاصة

تم الحصول على (٢٢) عزلة من بكتريا ***Proteus mirabilis*** المعزولة من مرضى مصابين بأخماج المجاري البولية، إذ درست قابلية العزلات على مقاومة المضادات الحيوية التابعة لمجموعة البنسلينات ، ومحاولة معرفة نوع ميكانيكية المقاومة لتلك العزلات بوساطة إضافة مثبطات البيتالاكتاميز، فضلاً عن التحري عن أي من هذه المثبطات أكثر تأثيراً . بينت نتائج الدراسة أن مثبط البيتالاكتاميز حامض الكلافيولنيك كان الأفضل عند خلطه مع المضاد الحيوي الأمبيسلين مقارنة مع مثبط البيتالاكتاميز السلباكتام عند خلطه مع المضاد الحيوي نفسه، إذ استطاع حامض الكلافيولينك أن يقلل عدد العزلات المقاومة (فقط ١٠ عزلات)، في حين انخفض عدد العزلات المقاومة باستعمال السلباكتام إلى ١١ عزلة فقط، فضلاً عن كون تأثير مثبط حامض الكلافيولينك عند خلطه مع الأمبيسلين هو الأفضل في خفض قيم MICs بالمقارنة مع استعمال توليفة حامض الكلافيولينك-الامبيسلين.

أظهرت النتائج أن هناك (٩) عزلات لم تكن منتجة للبيتالاكتاميز، على الرغم من مقاومة تلك العزلات للمضادات الحيوية المدروسة، وهذا ما يوضح امتلاك هذه العزلات لميكانيكيات أخرى غير إنتاج البيتالاكتاميز.

المقدمة

أدى الاستخدام الواسع والعشوائي للمضادات الحيوية الى ظهور عزلات بكتيرية مقاومة ، لذا تعد البكتريا الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية من أكثر العوامل المرضية أهمية وتهديد للحياة لاسيما التي لها مقاومة لمضادات البيتالاكتام واسعة الاستخدام عن طريق أحدى الميكانيكيات المعروفة جيدا وهي انتاج البيتالاكتاميز. يمكن التغلب على هذه الانزيمات اما بتحوير نواة البيتالاكتام للسلسلة الجانبية لمضاد البنسلين او بإضافة مثبط البيتالاكتاميز [٩].

الطرق الأكثر تكرارا في مقاومة البكتريا لهذه التوليفات (مع مثبط البيتالاكتامير) هو الإنتاج العالي أو المفرط للبيتالاكتاميز غير المحور نتيجة لوجود نسخ عديدة من البلازميدات أو تحوير بروتينات الغشاء الخارجي مما يحد من تناول توليفة المضاد الحيوي أو كلا الطريقتين [١].

تعد هذه الدراسة استمراراً لدراسة سابقة إذ تهدف الى معرفة هل ان الـ (٢٢) عزلة التي قاومت الثلاثة المضادات (الامبسلين والاموكسيسلين والبيراسلين) بنسبة ١٠٠% والتي ايضا بينت احتواء بعضها للبيتالاكتاميز الى معرفة آلية مقاومتها لتلك المضادات بسبب إفرازها البيتالاكتاميز التي تقوم بكسر حلقة البيتالاكتام أم ان لديها ميكانيكيات أخرى للمقاومة كفشل المضاد في الاختراق والوصول الى البروتين المرتبط بالبنسلين(Penicillin-binding Proteins(PBPs أو خفض الفة ارتباط المضاد بالـ(PBPs) [٦].

المواد وطرائق العمل

١- جمع العينات وتشخيصها :

جمعت العينات من أشخاص يعانون من أخماج المسالك البولية، ثم زرعت على وسطي أكار الماكونكي واكار الدم باستخدام ناقل زراعي قياسي يحمل ٠,٠١ مل. حضنت الأطباق المزروعة في درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة ثم شُخصت المستعمرات باستخدام نظام api20E المجهز من قبل شركة (Bio Merieux) الفرنسية .

٢-اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية :

٢-١ – فحص الحساسية بأستخدام اقراص المضادات الحيوية :

استخدمت الطريقة المتبعة من قبل [٧] لاختبار حساسية العزلات لـ (١٢) مضاداً حيوياً منها (٦) مضادات من مجموعة البيتالاكتام من بينها (٤) من مجموعة البنسلينات .

٢-٢ قياس التركيز المثبط الادنى :

٢-٢-١ بدون مثبطات البيتالاكتاميز :

استخدمت طريقة التخافيف المتضاعفة difold dilution كما ورد في [٣] لحساب التركيز المثبط الأدنى لـ (٣) مضادات من مجموعات البنسلينات (الامبسلين والاموكسيسلين والبيراسيلين).

٢-٢-٢ مع مثبطات البيتالاكتاميز:

تم قياس التركيز المثبط الأدنى للمضادات المدروسة مع مثبطات البيتالاكتاميز لمعرفة مدى فاعلية هذه المثبطات في زيادة فاعلية المضادات إلا أننا لم نحصل على هذه المثبطات بصورة حرة مفردة ما عدا نوعاً واحداً هو الكلافولنيك اما السلباكتام فقد كان موجود بصورة خليط مع مضاد الامبسلين بنسبة ١:٢ مجهز من شركة النيل (مصر) والتازوباكتام مخلوط مع البيراسليين بنسبة ١:٨ وقد اتبعت الطريقة [٩ و٤]

٢-٣التحري عن انتاج البيتالاكتاميز :

استخدمت طريقة اليود السريعة وطريقة الأنابيب الشعرية للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج البتيالاكتامير وفق طريقة [١٢] ، إذ عدت النتيجة موجبة عند تحول اللون البنفسجي إلى الأبيض

خلال عدة دقائق بعد إضافة الكاشف (النشا- اليود) استخدمت سلالتان قياسيتان كسيطرة موجبة السلالة *E.coli* J53 RP4 وكسيطرة سالبة السلالة *E.coli* ATCC25922

النتائج والمناقشة

اختبار حساسية المضادات الحيوية :

نتائج فحص الحساسية باستخدام اقراص المضادات الحيوية :

جرت عملية فحص الحساسية لـ (١٢) مضادا وكان الهدف من هذه الدراسة معرفة العزلات المقاومة لثلاثة مضادات من مضادات مجموعة البنسلينات المستخدمة في هذه الدارسه وهي الامبسلين والاموكسيسلين والبيراسيلين وقد استخدمت هذه الدارسه لتكملة الخطوات اللاحقة للعزلات التي قاومت هذه المضادات الثلاثة أي انها قاومتها بنسبة ١٠٠% واقل مقاومة سجلتها العزلات هي لمضاد السبروفلوكساسين وبنسبة ١٠% والشكل (١) يوضح مدى حساسية العزلات للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص .

قياس التركيز المثبط الادنى :

بدون مثبطات البيتالاكتامز :

هدفت الدراسة لمعرفة التراكيز المثبطة الدنيا للمضادات الامبسلين والاموكسيسلين والبيراسلين. استخدم مضاد الامبسلين بالتركيز القياسي الموصوف والمعتمدة نقطة التوقف فيه وفق [٨] وهي ٣٢ مكغم/ مل وبذلك فان التركيز الذي تقاومه البكتيريا عند هذا الرقم او اكبر منه فان البكتريا تعد مقاومة واذا قل التركيز عن هذا الرقم عدت البكتيريا حساسة وقد كان عدد البكتيريا التي قاومت هذا المضاد (٢٢) عزلة أي جميعها وبنسبة ١٠٠% إذ تراوحت قيم الـ MIC لهذه العزلات بين (٢٥٦- ١٠٢٤) مكغم / مل .

أما بالنسبة للمضاد الثاني وهو الاموكسيسلين فنقطة التوقف لهذا المضاد هي ٣٢ مكغم / مل وقد قاومته العزلات قيد الدراسة وتراوحت قيم الـ MIC لهذا بين (٢٥٦ -١٠٢٤) مكغم / مل .

اما المضاد الثالث فهو البيراسلين الذي قاومته ايضا العزلات جميعا ونقطة التوقف لهذا المضاد هي ١٢٨ مكغم / مل وتراوحت قيم الـ MIC لهذا المضاد بين (٢٥٦-١٠٢٤) مكغم / مل. الا انها أي العزلات التي كانت قيم الـ MIC لها ١٠٢٤ مكغم / مل عددها (٣) عزلات بينما التي قيم الـ MIC لها ٥١٢ مكغم / مل عددها (١٣) ، و(٦) عزلات كانت قيم الـ MIC لها ٢٥٦ مكغم / مل وقد تعود هذه المقاومة لتلك العزلات الى قدرتها على إفراز البيتالاكتاميز القادرة على كسر حلقة البيتالاكتام لهذه المضادات كواحدة من ميكانيكيات المقاومة . وقد وجد [١١] ان البكتريا السالبة لصبغة كرام يوفر TEM-1 لاكتاميز المنجزة بواسطة البلازميد الميكانيكية الرئيسة لمقاومة اللاكتام.

مع مثبطات البيتالاكتاميز :

استخدمت مثبطات البيتالاكتاميز في قياس التركيز المثبط الأدنى لمعرفة ما إذا كانت العزلات المدروسة تعود فيها المقاومة للمضادات المدروسة إلى إنتاج البيتالاكتاميز التي تبطل عمل المضادات من خلال كسر حلقة البيتالاكتام فيها مما يجعلها تفقد فاعليتها تجاه البكتريا [٣] .

أظهرت النتائج شكل (٢) أن الفعل التازري لمضاد الامبسلين مع كل من مثبطي البيتالاكتاميز حامض الكلافولنيك والسلباكتام انه تم تراجع كبير في فاعلية المضاد بوجود احد المثبطات إذ بقت (١٠ و ١١) عزلة على التوالي من أصل (٢٢) عزلة مقاومة لهذا المضاد لوحده ويظهر الشكل تراجع في قيم الـ MIC بحيث تراوحت بين (٤ و٣٢) مكغم/ مل عدا (٩) عزلات بقى فيها القيم لـ MIC كما هي ويعتقد بان هذه العزلات ا لاتعود المقاومة فيها الى انتاجها البيتالاكتاميز وهي التي تم التحري عنها في دارسه سابقة وأظهرت فعلا انها لاتنتج هذه الانزيمات بينما تأثرت باقي العزلات ، وبقى عزلتان في مستوى المقاومة وفقا لنقطة التوقف لهذا المضاد وبوجود المثبط السلباكتام اذ خفض المثبط القيم لهذه العزلتين من (١٠٢٤) مكغم/ مل الى (٣٢) مكغم / مل . بينما بقى عزلة واحدة بوجود الكلافولنيك مع الامبسلين في مستوى المقاومة إذ انخفضت القيم الى (٣٢) مكغم / مل ويظهر الشكل (٢) ان فاعلية الامبسلين مع حامض الكلافولنيك أفضل من الامبسلين مع السلباكتام مع عزلات ***P.mirabilis*** إذ وجد [٢] انه من الناحية النوعية، حامض الكلافولنيك هو مثبط أكثر قوة لفاعلية البيتالاكتاميز TEM في الخلايا النامية مقارنة مع السلباكتام لمنع نمو ***P.mirabilis*** إذ وجد انة مع (٢,٥) مكغم امبسلين / مل يتطلب وجود (٠,٥) مكغم/ مل فقط من حامض الكلافولنيك مقارنة مع (١٠) مكغم سلباكتام / مل وهذه النتائج تتفق مع ما توصلنا اليه .

أما بالنسبة للمضاد الثاني الاموكسيسلين فقد استخدم مع المثبط كلافولينك وقد اظهرت النتائج ان (١٠) عزلات فقط بقت مقاومة منها (٩) غير منتجة للبيتا لاكتاميز وعزلة واحدة فقط انخفض بها التركيز المثبط الادنى من (١٠٢٤) مكغم / مل الى (٣٢) مكغم / مل وهي نقطة التوقف لهذا المضاد ويبين الشكل (٣) تلك النتائج .

أما بالنسبة لمضاد البيراسيلين استخدم مع كل من الكلافولنيك والتازوباكتام وذلك المضاد مع توليفة هذين المثبطين أظهر ان (٩) عزلات فقط هي التي قاومت الفعل التآزري للمضادات مع كلا من المثبطين وقد وضح إن تلك العزلات هي التي لا تنتج البيتالاكاميز وبالتالي فهي معتمدة في مقاومتها للمضاد على ميكانيكيات أخرى ويبين الشكل (٤) ان الفعل التآزري للبيراسيلين مع الكلافولنيك افضل منه في حالة البيراسلين مع التازوباكتام . إذ وجد [٥] ان معدل السلالات المرضية ***P.mirabilis*** المنتجة البيتالاكتاميز واسعة الطيف ازدادت الى (٨,٨%) خلال الفترة من (٩٧-١٩٩٩) وبالفعل التآزري للبيراسلين مع التازوبكتام تم إبطال المقاومة اذ كانت قيم الـ MIC ≤ ٢٥٦ مكغم / مل مقابل ≤ ٢ مكغم / مل على التوالي. أما [٤] فقد وضح بان الكلافولنيك اكثر المثبطات فاعلية عند اختياره بصورة عامل مفرد فقد خفض الـ MIC للبيراسلين (٢-١٦) مرة اقل من التازوباكتام ، كما انه وضح ان الكلافولنيك بصورة عامة اكثر فاعلية مع البيراسلين مقارنة مع التازوباكتام وان الفاعلية المتفوقة لحامض الكلافولنيك يمكن ان يكون لها علاقة مع فاعليته الاصلية العالية أو إلى أن اختراقه هو الافضل. وقد وجد [١٣] ان جميع مثبطات البيتالاكتاميز المختبرة زيدت بشكل ملحوظ فعال عامل البيتالاكتام الذي تضاف اليه .

التحري عن انتاج البيتالاكتاميز :

أظهرت الدراسة أن عدد العزلات التي أعطت نتيجة موجبة لهذا الفحص كان (١٣) عزلة بنسبة (٥٩%) أي أن هناك (٩) عزلات كانت مقاومة لمضادات الامبسلين والاموكسيسلين والبيراسيلين الا انها لم تكن منتجه للبيتالاكتاميز. ان قدرة البيتالاكتاميز على حماية البكتريا السالبة لصبغة كرام من مضادات البيتالاكتام ترتبط ذاتيا مع معدل نفوذ المضاد خلال الغشاء الخارجي للبكتريا فكلما زاد معدل النفوذ ازداد تركيز المضاد في الفسحة البلازميدية واصبح من الصعب على البيتالاكتاميز توفير الحماية والعكس [١٠] ويبين الجدول (١) تلك النتيجة.

جدول (١) يبين قابلية العزلات P.mirabilis لانتاج البيتالاكتاميز

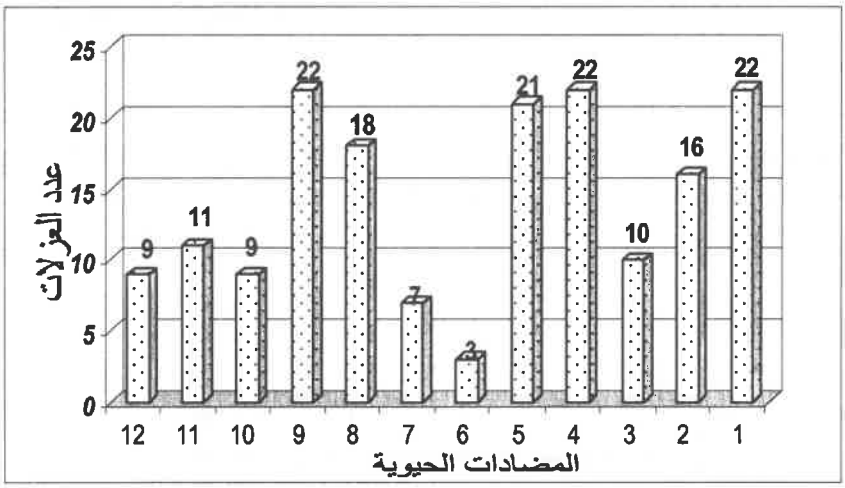
العزلة	انتاج الانزيمات	العزلة	انتاج الانزيمات
UP1	+++	UP12	-
UP2	++	UP13	-
UP 3	++	UP14	+
UP4	+++	UP15	++
UP5	++	UP16	-
UP6	++	UP17	-
UP7	-	UP18	-
UP8	+++	UP19	+
UP9	-	UP20	+ +
UP10	++	UP21	-
UP11	++	UP12	-

+++ : إنتاج عالي للإنزيمات يؤدي إلى حدوث تغيير سريع يلون الكاشف خلال الـ ٥ الدقائق الأولى للفحص .

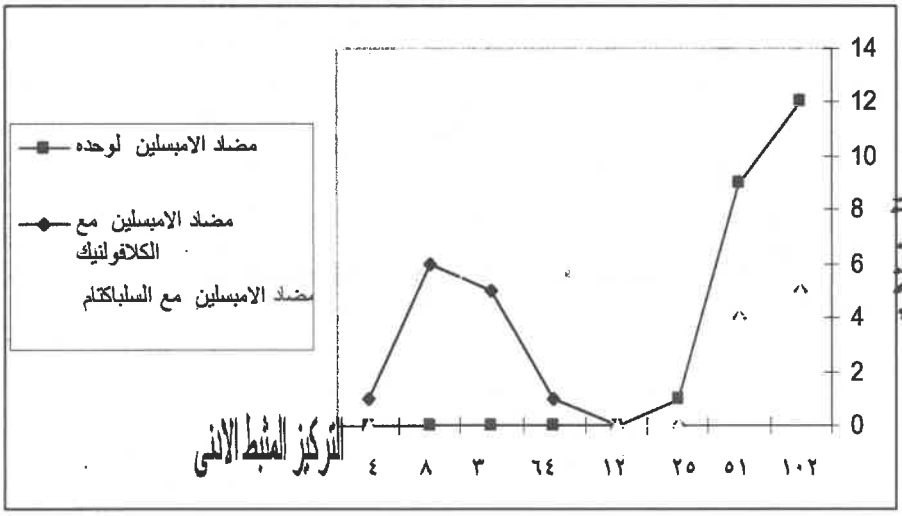
++ : إنتاج متوسط للإنزيم يؤدي إلى حدوث تغيير بلون الكاشف خلال الـ ١٥ دقيقة الأولى للفحص .

+ : إنتاج ضعيف للإنزيم يؤدي إلى حدوث تغيير بلون الكاشف بعد الـ١٥ دقيقة الأولى للفحص .

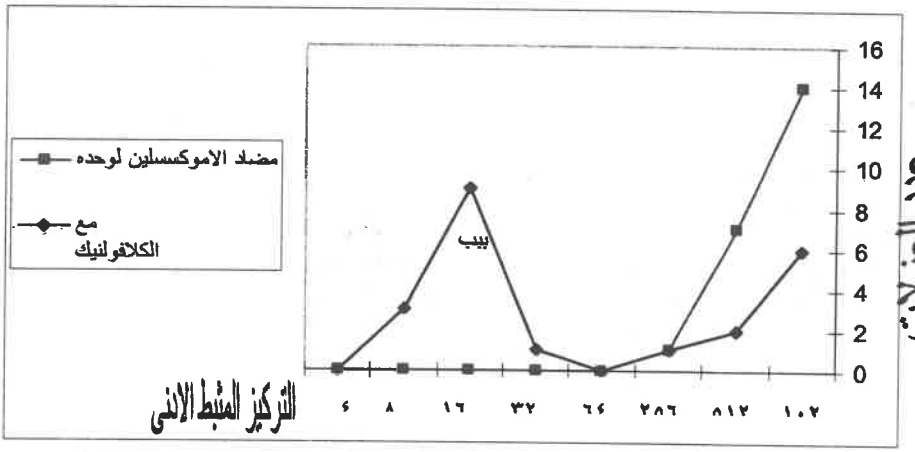
- : غير منتجة للإنزيم.



شكل (١) يبين عدد العزلات وعدد المضادات الحيوية التي قاومتها تلك العزلات

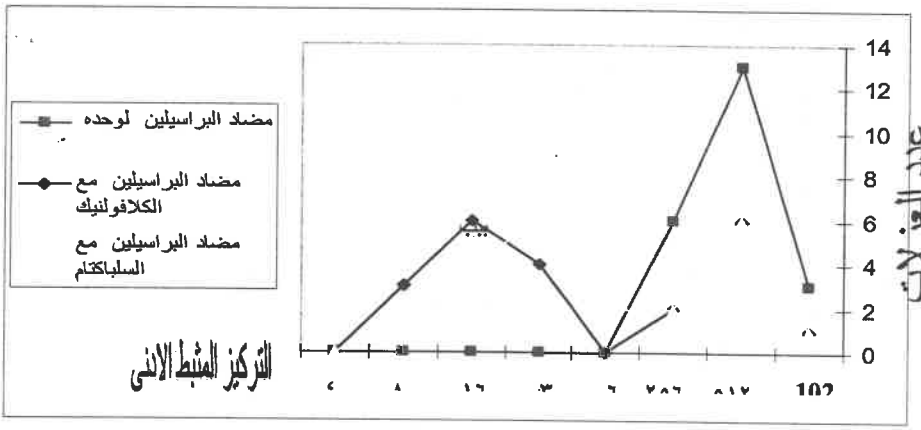


شكل (٢) يبين الفعل التآزري لمضاد الامبسلين بدون ومع مثبطات البيتالاكتاميز وعدد العزلات التي قاومتها



شكل (٣) يبين الفعل التآزري لمضاد الاموكسيسلين بدون ومع مثبطات البيتالاكتاميز وعدد العزلات التي قاومتها

شكل (٤) يبين الفعل التآزري لمضاد البراسلين بدون ومع مثبطات البيتالاكتاميز وعدد العزلات التي قاومتها



المصادر

1-Blazques, J;Baquero, M;Canton, R; Alos,I.and Baquero.F.(1993). Characterization of a new TEM-type B-lactamase resistant to Clavulanate ,sulbactam ,and tazobactam in clinical isolato of Escherichia coli .Antimicrob.Agents Chemother :37:2059-2063.

2- Easton,C,J.and Knowles ,J.R.(1984) Correlation of th effect of B-lactamase inhibitors on the B-lactamese in growing Caltures of Gram-negative bacteria with their effect on the isolated B-lactamase Antimicrobail Agent and Chemotherapy 26:358-363 .

3- Koneman,E.W;Schreckenberger,P.C;Allen,S.Dn,W.C.Jr.and Janda ,W;M.(1992). Color . Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fourth Edition ,J.B.Linppincott Company .Philadelphia

4- Kuck,N.A;Jacobus,N,V;Peterson,P.J;weiss,W.J.andTest.R.T.(1989). Compart Ive in vitro and in vivo activities of Piperacillin Combined with B-lactamase inhibitorstazobactam ,Clavulanic acid and sulbactam .Antimicrob .Agents chemother .33:1964-1969.

5- Luzzaro ,F;Perilli ,M.;Amicosante,G.;Lombardi ,G:Belone. A; Bianchi.C. and Toniolo,A.. (2001).Properties of multidrug–resistant .ESBL-Producing Proteus mirabilis isolates and Possible role of beta –lactam/beta-lactmase inhibitor combinations .Int.J.Antimicrob Agents 17:131-135.

6- Mandell,G.L;Bennet,J.E. and Domlim,R.(1995).Principles and practice of infections diseases .Fourth edition n.Churchill livingstone I inc .London .

7- National Committee for Clinical Laboratory Standards .(2000). Methode for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grw aerobically ;Approved standard M7-A5.5th .ed.- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.

8- NCCLS.(2002). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing . Twelfth Infoormation supplement >

9- Qadri, S.M.H; Ueno, Y; Postle ,A.G and Cunha ,B.A. (1996). Antibacterial activity of Tazocin™ (Piperacillin/ tazobactam) against 1296 clinical isolates from atertiary care center .Annals of Sudia Medicine. 16:377-380 .

10- Sanders ,C.C.(1992).B- lactamases of Gram Negative Bacteria :New Challenges for new Drugs . Clinical Infections Disease .14;1089- 1099 .

11-Sideraki, V; Hung , W; Palzkill ,T and Gilbert, H.F.(2001).A secondary drug resistance mutation of TEM -1- lactamase that suppresses misfolding and aggregation .Proc . Natl.A cad .Sci .U.S.A. Vol ,98. lssue 1,283-288 .

12-Sykes , R.B (1987) . Methods for detecting Beta – lactamase . P: 64-69 In laboratory methods in antimicrobial chemotherapy –By David ,S;Ian P; David W. and Richard W 1st ed. Churchill Living Stone Edinburg .London .

13-Waxler , H.M; Molitoris , E. and Finegold ,S.M.(1991).Effect of B- latamase inhibitors on the activities of various B-lactamase against anaerobic bacteria .Antimicrobial Agents and Chemotherapy .35:1219-1224

ملحق يوضح التراكيز المثبطة الدنيا للمضادات الحيوية المستخدمة ضد عزلات بكتريا Proteus mirabilis

التركيز المثبط الادنى ملغم / مل	مضاد الامبسلين			مضاد الاموكسسلين		مضاد البراسيلين		
	لوحده	مع الكلافولنيك	مع السلباكتام	لوحده	مع الكلافولنيك	لوحده	مع الكلافولنيك	مع السلباكتام
1024	12	5	5	١٤	٦	٣	١	١
٥١٢	٩	٤	٤	٧	٢	١٣	٦	٦
٢٥٦	١	-	-	١	١	٦	٢	٢
١٢٨	-	-	-	-	-	-	-	-
٦٤	-	-	-	-	-	-	-	٢
٣٢	-	١	٢	-	١	-	٤	٧
١٦	-	٥	٩	-	٩	-	٦	٣
٨	-	٦	٢	-	٣	-	٣	١
٤	-	١	-	-	-	-	-	-

STUDY OF SYNERGISTIC EFFECT OF B-LACTAMASE INHIBITORS WITH SOME PENICILLINS GROUP AGAINST PROTEUS MIRABILIS ISOLATED FROM PATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTIONS

Dr. Al-Maisary, M.F.S.* Dr.Al-Rahawy, H.M.H.* Dr. Al-Gosha'ah, F.A.S**
***University of Aden/ College of Education/Dep. Biology ** University of Ibb/ College of Science/Dep. Microbiology**

ABSTRACT

Twenty-two isolates of *Proteus mirabilis* isolated from patients with urinary tract infections(UTIs), the ability of the isolates to resist antibiotics belonging to penicillins group was studied, trying to know the type of mechanism of resistance of these isolates by addition of β-lactamase inhibitors, as well as examination of which one of these inhibitors has more effect than another.

The results showed that the clavulanic acid was the best when mixed with ampicillin in comparison with the sulbactam mixed with the same antibiotics; the clavulanic acid decreased the number of resistant isolates (only 10 isolates), while the number of resistant isolates were lowered by using sulbactam t0 (11) isolates, Also the effect of clavulanic acid with ampicillin was the best in decreaseing of MICs values in comparison with the effect of salbactam-ampicillin.

The results revealed that nine isolates were not producing β-lactamase, in spite of their resistanve to studied antibiotics, and this explain possession of these isolates to another mechanisms of resistance than β-lactamase production.