دراسة مقارنة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من اخماج الجهاز التناسلي لـــلأبقار والتربة وتحديد مقاومتها للمضادات الحيوية وأنتاجها لمركباتSiderophores

حسين جواد كاظم جميلة راضي أسماعيل

كلية الطب البيطري /جامعة القادسية

تأريخ التسليم 1/2/2009
تأريخ القبول 7/9/2009

الخلاصة

تم اجراء هذة الدراسة لمقارنة عزلات *Pseudomonas aeruginosa* التي تم الحصول عليها من مواقع مختلفة من التربة في محافظة القادسية مع عزلات اخرى من نفس البكتريا تم الحصول عليها من حالات التهاب الرحم للابقار من المستشفى البيطري في القادسية وحددت مقاومة هذة العزلات ل(٩)من المضادات الحيويةوهي Streptomycin,ErythromycinCiprofloxacinGetamycin,Lincomycin,Nalidixicacid,Rifampici, Chloramphenical , واختبرت قدرة هذة العزلات ايضا على انتاج مركبات Siderophores بينت النتائج ان العزلات من الحالات المرضية اظهرت مقاومة عالية لاغلب المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة ماعدا مضادCiprofloxacin بينما العزلات المأخوذة من التربة كانت مقاومة لمضادي Tetracyclin, Lincomycin في حين اظهرت درجات متفاوتة من التحسس تجاه بقية المضادات وكان مضاد Ciprofloxacin بالدرجة الاولى ولقد اظهرت النتائج ان العزلات من الحالات المرضية قد استطاعت انتاج مركبات Siderophores بينما لم تستطيع جميع العزلات التابعة لنفس النوع والمعزولة من التربة من انتاج هذة المركبات اذ ان ٣٦٪ من عزلات التربة قد اعطت نتيجة سالبة .

Comparative study to *pseudomonas aeruginosa* isolated from infected caws Gentealia and the soil and determine its resistant to some antibiotics and its produce siderophors compounds

AL-Shweely J.R.E. **AL-Jawad H.J.K.**

College of vet. Medicine
University of AL-Qadisiya

Abstract

This study was conducted to compare *pseudomonas aeruginosa* strains which obtained from the soil of AL-Qadisiya governorate with the strains of cows infected by metritis in the vet hospital AL-Qadisiya for (9) antibiotics ; Ciprofloxacin Erythromycin, Streptomycin, Gentamycin, Tetracyclin, Chloramphenical , Rifampicin, Nalidixic acid, Lincomycin, and ability of these strains to produce siderphores compounds. The results of the strains which loslated from pathological cases showed high ratio of resistanace to most of antibiotics which used in the study except ciprofloxacin .where the strains which loslated from the soil was resistance to tetracyclin and Lincomycin and showed differential degrees of sensitivity to others the ciprofloxacin came at first. the result of this study also showed the strains from pathological caese could produce siderophorse compound where was all strain which lsolated from the soil of AL-Qadisiya give negative test for producing siderophores compounds.

المقدمة

تعد الزوائف الزنجارية العائدة للعائلة Pseudomonaicea من الكائنات المجهرية الواسعة الانتشار في الطبيعة اذ تتواجد في التربة والمياه وعلى بعض النباتات وفي الانسان والحيوانات (١) كما انها تعد من اهم المسببات الخمجية في قطعان تربية الابقار اذان لها دور مهم في اخماج الجروح والجهاز التناسلي الانثوي مابعد الولادة والاجهاض والتهاب العظم وتجرثم الرحم والتهاب الضرع (١و٢) وفي السنوات الاخيرة ازدادت اهمية هذة البكتريا من الناحية الطبية والبيطرية بسبب ما احدثته من اصابات جديدة وخطرة في المستشفيات وفي القطعان ذات التربية المفتوحة اضافة لتطور مقاومتها للمضادات الحيوية نتيجة للاستعمال غير المنتظم لهذة المضادات (٣) من ناحية اخرى تمتلك السيدومواناس اهمية كبيرة بسبب قدرة البعض منها على انتاج مركبات Siderophores (٥و٤) من هنا جاءت اهمية هذة الدراسة في مقارنة مقاومة عزلات السيدومواناس المستحصلة من مواقع مختلفة من التربة في محافظة القادسية ومن حالات مرضية واردة الى المستشفى البيطري في القادسية في مقاومتها العديد من المضادات الحيوية المستعملة كعلاجات وقدرتها على انتاج مركبات Siderophores

المواد وطرق العمل

١- العزلات البكتيرية :

تم استخدام (٢١) عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تم عزلها وتشخيصها من مواقع من التربة في محافظة القادسية وتم استخدام الاوساط الزرعية الانتخابية والفحوصات الكيموحيوية ، كما استخدمت في الدراسة (٢٤) عزلة من *Pseudomonas aeruginosa*تم الحصول عليها من (٥٢) حالة مرضية من اخماج الجهاز التناسلي الانثوي في الابقار والواردة الى المستشفى البيطري / القادسية

٢- اختبار حساسية عزلات السيدومواناس للمضادات الحيوية :

اتبعت طريقة Bauer وجماعته (٧) لقياس حساسية السيدومواناس المختلفة للمضادات الحيوية وفق الخطوات الاتية :

A – تحضير الوسط الزرعي : استخدم وسط Muller-Hinton لهذا الغرض اذ حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة للوسط ثم عقم بالموصدة وبعد ذلك برد الى درجة حرارة ٤٥مْ ثم صب في الاطباق المعقمة وبعد تصلبه وضع في الثلاجة لحين استخدامه

B – تحضير عالق البكتريا : تم نقل مستعمرة واحدة نامية على وسط الاكار المغذي بواسطة ناقل الزرع Loop انبوبة حاوية على ٥ مل من المرق المغذي المعقم ثم وضع في الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة بدرجة ٣٧ مْ خفف الزرع البكتيري بأستعمال المحلول الفسيولوجي الى التخفيف ٢-١٠ .

C- تلقيح اطباق الاختبار : نقل ٠.١ من الزرع البكتيري المخفف بواسطة Muller-Hinton Micropipette بأستخدام الناشر الزجاجي Spreader بصورة متجانسة ، تركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة (٢٠-١٠) دقيقة .

D- وضع الاقراص : بواسطة ملقط معقم تم نقل اقراص مضادات الحيوية بأوعيتها الى سطح الطبق المزروع بعزلات السيدومواناس وضغط على سطح القرص بخفه ، وضعت ٥ اقراص من مضادات الحيوية في كل طبق ،استخدم طبقين لكل عزلة وتلافيا لحصول تداخل بين مناطق التثبيط فقد تركت مسافة بين قرص واخر ، حضنت الاطباق بوضع مقلوب على درجة الحرارة (٣٧ مْ) لمدة (٢٤) ساعة وقد شملت المضادات الحيوية المستخدمه : Gentamycin، Lincomycin Ciprofloxacin ، Chloramphenical ، Nalidixic acid، Tetracyclin، Streptomycin ، Rifampicin، Erythromycin .

E – قراءة النتائج : تم قياس منطقة التثبيط (وهي المنطقة الشفافة المحيطة لقرص المضاد الحيوي ومن ضمنها قطر القرص نفسة والخالية من النمو الجرثومي) بالمليمتر بواسطة مسطرة مدرجة ثم قورنت بالمعدلات القياسية بالمضادات الحيوية المثبتة بجدول (٣) وحسب (٨) .

٣- اختبار قدرة عزلات السيدومواناس في انتاج مركبات الـSiderophores :

لمعرفة قدرة البكتيريا على انتاج مركبات Siderophores فقد تم اتباع طريقة Chrome Azural Sulfonate (CAS) والواردة في Shwyn&Neilands ووفقا للخطوات التالية :

١- تم زرع البكتريا بعد تنشيطها في انابيب اختبار على وسط (IDCM) Iron deficient culture medium (١٠) .

٢- اخذ من الانابيب ٠.١ مل من رواشح البكتريا بواسطة Micropipette ووضع في الحفرة الموجودة في الصفيحة البلاستيكية ثم وضعت فوقها قطرة من كاشف (CAS) . اذ عد تغير لون الكاشف من الازرق الداكن الى اللون الوردي خلال مدة (١٠) دقائق فحصا موجبا بهذا الاختبار في حين بقاء اللون ازرقا يدل على انتاج هذه المركبات من قبل البكتريا

النتائج

١-حساسية عزلات السيدوموناس المعزولة من التربة والحلات المرضية للمضادات الحيوية

اظهرت نتائج اختبار (٢١) عزلة من *Pseudomonas aeruginosa* تم الحصول عليها من مواقع مختلفة من ترب محافظة القادسية تجاه مضادات حيوية مختلفة تباينت هذة العزلات في حساسيتها لتلك المضادات اذ كانت جميع *Pseudomonas aeruginosa* حساسة بدرجة ١٠٠٪ للمضاد الحيوي Ciprofloxacin فيما كان المضاد الحيوي Gentamycin بالدرجة الثانية.

من جانب اخر اظهرت هذة العزلات مقاومة عالية تجاة المضادات Tetracyclin. Rifampicin. Erythromycin . Nalidixic acid.Lincomycin. وكما يظهر في الجدول (١).

جدول (١) العدد والنسبة المئوية لحساسية ومقاومة*p.aeruginosa* المعزولة من التربة للمضادات الحيوية

Antibiotics	Sensitive		Intermediate		Resistan	
Ciprofloxacin	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
	٢١	١٠٠	٠	٠٠	٠	٠٠
Gentamycin	٢٠	٩٥	٠	٠٠	١	٤.٧
Tetracyclin	٢	٩.٥	٠	٠٠	١٩	٩٠.٤
Erythromycin	٥	٢٣.٣	٠	٠٠	١٦	٧٦
Streptomycin	٧	٣٣.٣	٨	٣٨	٦	٢٨.٥
Rifampicin	٣	١٤	٠	٠٠	١٨	٨٥.٧
Chloramphenical	٩	٤٢.٨	٦	٢٨.٥	٦	٢٨.٥
Lincomycin	٠	٠٠	٠	٠٠	٢١	١٠٠
Nalidixic acid	٣	١٤	٠	٠٠	١٨	٨٥.٧

اما العزلات المستحصلة من الحالات المرضية والبالغة (٢٤) عزلة فقد كانت مقاومة لحد ما لمعظم المضادات الحيوية فيما اظهرت حساسية عالية تجاه مضاد Ciprofloxacin وبنسبة (٨٣.٣ %) يلية مضاد Gentamycin وبنسبة (٦٢.٥٪) وحسب الجدول رقم (٢)

جدول (٢) العدد والنسبة المئوية لحساسية ومقاومة*p.aeraginosa* المعزولة من الحالات المرضية للمضادات الحيوية

Antibiotics	Sensitive		Intermediate		Resistan	
Ciprofloxacin	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
	20	83.3	4	16.6	0	00
Gentamycin	15	62.5	4	16.6	5	20.8
Tetracyclin	0	00	0	00	24	100
Erythromycin	0	00	0	00	24	100

Streptomycin	0	00	0	00	24	100
Rifampicin	0	00	0	00	24	100
Chloramphenical	0	00	0	00	24	100
Lincomycin	0	00	0	00	24	100
Nalidixic acid	0	00	0	00	24	100

جدول (٣)اقطار التثبيط القياسية للمضادات الحيوية (NCCLS)

(Natianal committee of cilinical labroratory standard)

المضادات الحيوية	التركيز مايكرو غرام / قرص	قطر التثبيط بالمليمتر		
		حساسة	متوسط المقاومة	مقاومة
Ciprofloxacin	٥	٢١	١٦-٢٠	١٥
Gentamycin	١٠	١٥	١٣-١٤	١٢
Tetracyclin	٣٠	١٨	١٥-١٨	١٤
Erythromycin	٣٠	١٨	١٥-١٨	١٤
Streptomycin	٥	٨	٩	١٠
Rifampicin	٥	٨	-	٨
Chloramphenical	٣٠	١٨	١٣-١٧	١٢
Lincomycin	١٠	١٥	١٠-١٤	٩
Nalidixic acid	٣٠	١٩	١٥-١٨	١٤

٢- مقارنة نتائج حساسية السيدوموناس المعزولة من التربة والحالات المرضية للمضادات الحيوية .

اظهرت النتائج ان هناك اختلافا واضحا بين عزلات السيدوموناس المعزولة من التربة والحلات المرضية في مقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة اذ أظهرت العزلات المأخوذة من الحالات المرضية مقاومة شديدة للمضادات الحيوية في حين أظهرت العزلات المستحصل عليها من التربة حساسية لها بأستثناء مضادي Ciprofloxacin , Gentamycin التي أبدت فيها السيدوموناس المعزولة من التربة حساسية متقاربة تجاهها .

٣- انتاج مركبات Siderophores

تباينت قابلية عزلات السيدوموناس المأخوذة من الحلات المرضية ونفسها المأخوذة من التربة في قابلية انتاجها لمركبات Siderophores أذ أظهرت العزلات من الحالات المرضية قابلية عالية على انتاج مركبات Siderophores في حين أظهرت العزلات المأخوذة من التربة اختلافا في قدرتها على انتاج هذه المركبات وبحسب المناطق المعزولة منها أذ ظهرأن أعلى انتاج لهذة المركبات كان من العزلات المستحصلة من تربة منطقة السنية وبنسة ١٠٠٪ تلتها عزلات تربة منطقة الجامعة وبنسبة ٨٣٪ ومن ثم عزلات تربة الديوانية

المناقشة

من خلال النتائج التي تم استعراضها في هذه الدراسة فقد تعزى المقاومة العالية لعزلات السيدوموناس المستحصلة من التربة لأغلب المضادات الحيوية المستخدمة الى المقاومة الطبيعية للعصيات السالبة لصبغة كرام للعديد من المضادات الحيوية اوان كمية المضادات في الاقراص المستخدمة غير كافية لتثبيط هذة البكتيريا (١١) مع العلم ان تراكيز هذه الاقراص هي من شركات عالمية.

اما مقاومة العزلات المستحصلة من الحالات المرضية لمعظم المضادات الحياتية فقد يعزى السبب لسوء استخدام تلك المضادات (١١) اوقد يعود الى طول فترة الخمج الذي يتناسب طرديا مع ازدياد المقاومة (١٢) اضافة الى ذلك فقد تنتقل المقاومة عن طريق البلازميدات اوقد يعود الى قدرة البكتريا على انتاج (ESBLa) B-lactamase –Extended spectrum التي تعمل على تحطيم مضاد B- lactamase عن طريق عرقلة تخليق Peptidoglycan .

ومن ملاحظة نتائج المقارنة بين مقاومة المضادات الحيوية بين كل من عزلات السيدوموناس الماخوذة من التربة والعزلات نفسها المستحصل عليها من الحالات المرضية فقد اظهرت اختلافا واضحا وقد يعزى هذا الاختلاف الى عدم قدرة العزلات الماخوذة من التربة في انتاج (ESBLa) كما ان استعمال المضادات الحيوية من قبل الاطباء البيطريين بشكل غير منتظم قديكون سبب مضاف في اكتساب العزلات المرضية لحالة المقاومة وهذا يتفق مع (١٣) ويبدو من نتائج الدراسة ان مقاومة السيدوموناس للمضادات الحيوية تختلف باختلاف الموقع الجغرافي حيث ان هناك احتمال لحدوث انتقال العزلات البكتيرية بين المناطق المختلفة جغرافيا كحركة الابقار بين المراعي وغيرها (٢)

أظهرت كل من عزلات الحالات المرضية وعزلات التربة قدرة على انتاج مركبات Siderophores وهذه النتائج تتفق مع (٦) في قدرة هذه العزلات التابعه لهذا النوع على انتاج هذه المركبات وبالاخص في حالة حصول قلة في تواجد الحديد في الوسط التي تعيش فيه البكتريا

المصادر

1- pallen ,M.J.,A.C., Antonio,A.,and Dunbar ,K.(2001).Tanvs, Microbial.9:97-101.

2- Jawitz,Melinck,J.L. and Addberg,.E.A.(2004).Medical microbiology.23ed long-Medical publications.California.

3- Jawitz,E.Melnick,J.L.and Addlberg,E.A,(2001).Medical microbiology.22ed Appleton,and long MC Graw-Hill.

4- Murray,P.R,Baron,E,Jorgensen,J.H.Renller M.A.Yoken R.H.(2003).Manual of clinical microbiology 8th ed. ASM,press,Washington, USA.

5- Posey,J.E. Cherardini,F.C.(2000).Lack of role for Iron in lyme disease.Pathogens science 288:1651-1653.

6- Loper,J.E. (1988).Role of fluorescent siderophor production in biological control by pseudomonas fluorecens strain .phytopathology.78,166-172 .

7- Bauer,A.W. Kirby ,W.M.M.sheriis ,G.C.and Turek, M . (1966).Antibiotic susceptibility testing by astandardizied single disk method . J.Clin-path . 44:439-496 .

8- NCCLS , National Committee for clinical Labortory Standards (2002).performance standards for antimicrobial susceptibility testing . Document M.100-510.National Committee for clinical Laboratory Standards,Wayne , pa.

9- Schwyn,Band Neilands ,J.B.(1987).Universal chemical assay for the determination of siderophores .Anl , Biochem. 160:47-56 .

10- Seaman , J.C.Alexander, D.B.Loeppert R. H. and Zuberer, D.A.(1992),The Railability of Iron from various solid- phase iron sources to asiderophores producing pseudomonas strain J. of plant Nutrition 15 (10)2221-2233.

11- Styriak , J,Laukova A. Fallgren ,C. wadsstrom T. Lyiungh . antibiotic sensitivity of enterococci from Wild herbivoresed . microbial Rev .

12- Topley W,G. Balows .A. sussman , M . (1998). Microbiology and microbial infections ,9th ed . Vol2,p.587-617.

13- Poole, K. (1994) . Bacterial multidrug resistance emphasis on efflux . mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. (Review). J. Antimicrobial chemotherapy , 34 (4):453 .