الارتقاء بالبحوث العلمية طريقنا لخدمة المجتمع

تحديد الفعالية التثبيطية لبعض أنواع المعززات الحيوية ضد بكتريا *Klebsiella pneumonia* المعزولة من التهاب المسالك البولية للمصابين بداء السكري وغير المصابين به

زمن حميد محمد البو عباس ، هالة عبد الخالق عوض الحديثي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

معلومات البحث

الكلمات المفتاحية: المعززات الحيوية ، التهاب المسالك البولية، *Klebsiella pneumonia* ، داء السكري

الاسم: زمن حميد محمد البو عباس

البريد الاليكتروني:

رقم الهاتف:

الملخص

شملت الدراسة الحالية جمع مئتين وخمسين عينة إدرار من المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية المصابين بالسكري وغير المصابين بهِ في مستشفى تكريت (صلاح الدين العام) ومستشفى بغداد التعليمي / مدينة الطب المختبرات التعليمية / مدينة الطب وللفترة من حزيران 2017 الى شهر كانون الثاني 2018 لكلا الجنسين ولفئات عمرية مختلفة تراوحت من 1-79 سنة. أظهرت نتائج الزرع الاولي لعينات الإدرار 129 عينة موجبة للنمو و 121 عينة سالبة للنمو البكتيري وأن عدد المصابات من الإناث كان 80 بنسبة 32 % بينما كان عدد المصابين من الذكور 170 بنسبة 68% من مجموع 250 عينة.

عملية العزل والتشخيص تضمنت مجموعتين من مرضى التهاب المسالك البولية مصابين بالسكري وغير مصابين بالسكري ، تم إجراء الزرع المايكروبي والفحص المجهري والإختبارات الكميوحيوية وقد عزلت بكتريا *Escherichia coli* بعدد (58) عزلة وبنسبة (32%) بعدد (32) عزلة وبنسبة (12.8%)، للمرضى المصابين بالسكري وعزلت بعدد (26) وبنسبة (10.4 %) لغير مرضى السكري. وعزلت بكتريا *K.pneumonia* بعدد (44) وبنسبة (17.6%) وبعدد (22) بنسبة (8.8%) لمرضى السكري ولغير مرضى السكري، في حين كانت نسبة العزل لبكتريا *Proteus* بعدد (12) عزلة وبنسبة (4.8%) تضمنت (4) عزلات وبنسبة (1.6%) لمرضى السكري و(8) عزلة بنسبة (3.2 %) لغير مرضى السكري، عزلت بكتريا *Citrobacter* بعدد (6)عزلة وبنسبة (2.4 %) إذ كانت (1) وبنسبة (0.4%) لمرضى السكري و(5) عزلات لغير مرضى السكري بنسبة (2 %) تليها بكتريا *Enterobacter* بعدد (4) عزلة وبنسبة (1.6 %) لمرضى السكري فقط. وقد عزلت بكتريا *Serratia marcesens* بعدد (3) وبنسبة (1.2 %)، إذ عزلت (1) وبنسبة (0.4) لمرضى السكري و(2) عزلة وبنسبة (0.8) لغير مرضى السكري، وعزلت بكتريا *Pseudomonas* بعدد (2) وبنسبة (0.8 %) لمرضى السكري. اختبرت حساسية العزلات البكتيرية (22) مضاداً حيوياً ولمجاميع مختلفة التي ظهرت فيها أعلى نسبة حساسية لمضادي Imipenem، Ciprofloxacin على التوالي في حين واجهت بعض المضادات مقاومة عالية وبنسبة 100% والمتمثلة بكل من Ampicillin, Erythromycin , Pipracillin , Nitrofuranation . درست الفعالية التضادية لأربعة أنواع من المعززات الحيوية تجاه بكتريا *K.pneumonia* المعزولة من مرضى السكري وغير المصابين بالسكري، وسجلت أعلى فعالية تثبيطية من قبل بكتريا المعزز الحيوي *Lactobacillus acidophilus* وبقطر (25ملم) في حين لم يظهر المعزز الحيوي *Lactobacillus Plantarium* أي تأثير تثبيطي سواءً للمصابين بالسكري أو لغير المصابين به.

المقدمة

تعتبر أخماج المسالك البولية (UTI) من المشاكل الصحية الشائعة في مجتمعات الدول النامية والمتقدمة التي تشكل النسبة الأكبر من المسببات البكتيرية وخصوصاً عند الأطفال والنساء والأشخاص المصابين بالعجز الكلوي ونقص المناعة والمصابين بداء السكري، إذ

يصل أعداد المصابين بأخماج المسالك البولية بما يقدر حوالي 250 مليون إصابه في كلّ سنة[1]. ويعد إلتهاب المسالك البولية أحد أهم المشاكل الطبية التي تعاني منها معظم دول العالم وفي العراق قد تحتل المرتبة الأُولى من مجموع الأخماج البكتيرية نسبة قد تصل إلى (23%)[2]. تزداد خطورة عدوى إلتهاب المسالك البولية بارتفاع تركيز السكر في البول، ممّا يزيد من قدرة الأحياء المجهرية على النمو في البول لأنه يوفر بيئة ملائمة لنمو الأحياء المجهرية [3] ووجد أن معدل حدوث الأصابة بمرض السكري في أنحاء العالم في تزايد ملفت للنظر وعلى المدى البعيد وهو يمتلك أثار خطيرة على الجهاز البولي والتناسلي ممّا جعل مرضى السكري عرضة لعدوى المسالك البولية [4]ويعد جنس الكليبسيلا *Klebsiella* أحد أعضاء العائلة المعوية Enterobactriaceae السالبة لصبغة كَرام[5]. تتواجد بكتيريا الكلبسيلا بشكل طبيعيflora normal في القناة الهضمية للحيوان والأنسان، لكن حال مغادرتها لمكان تواجدها الطبيعي أو حصول خلل في الجهاز المناعي للمضيف فإنّها تصبح انتهازية ممرضة وبإمكانها أن تسبب العديد من الأمراض الخطرة[6]. ولقد تطورت في السنوات الأخيرة سلالات مقاومة للمضادات الحيوية وهي ظاهرة طبيعية تنتج حال تبادل صفات المقاومة بين الأنواع البكتيرية و تنتج هذه الصفة عند الأفراط أوسوء الاستعمال للمضادات الحياتية من قبل المرضى أو أفراد المجتمع الطبي لأنها تؤدي إلى إنخفاض المناعة ممّا يؤدي إلى توافر الظروف الملائمة للأحياء المجهرية الذي يؤدي إلى تطور مادتها الوراثية بشكل يمكنها من البقاء والحياة عند المعاملة بالمضادات الحياتية [7].

ومن الاتجاهات الحديثة حالياً استعمال المعززات الحيوية لغرض تعزيز المناعة والقضاء على العدوى البكتيرية وتعد أجناس *Lactobacillus* من المعززات الحيوية المهمة لكونها غير مرضية، غير منتجة للسموم ،منتجة للعديد من الانزيمات ،الفيتامينات، على الالتصاق بجدران الأمعاء، وإفرازها للمواد المثبطة للأحياء المجهرية المرضية فضلاً عن تواجدها في الأمعاء والمسالك البولية والفم إذ تساهم في التوازن الصحي الطبيعي[8]. فضلاً عن المميزات النافعة لبكتريا المعززات الحيوية التي تكمن في مقاومتها للمضادات الحيوية ومنحها الفائدة الكبيرة للاشخاص الذين يعانون من انخفاض في المستوى الطبيعي لفلورا الامعاء الناتجة من المعالجة بالمضادات الحيوية [9],[10].

لذا هدفت دراستنا الحالية الى تحديد الفعالية التثبيطية لبعض المعززات الحيوية تجاه بعض أنواع بكتريا *K. Pneumonia* المتعددة لمقاومة المضادات الحيوية ومقارنة الفعالية التثبيطية للمعززات الحيوية والمضادات الحيوية بين مرضى التهاب المسالك البولية للمصابين بداء السكري وغير المصابين به.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات: تم في هذه الدراسة جمع 250 عينة إدرار من مرضى التهاب المسالك البولية المصابين بالسكري وغير المصابين بالسكري في مستشفى تكريت صلاح الدين العام، مستشفى بغداد التعليمي /مدينة الطب والمختبرات التعليمية / مدينة الطب وللفترة من شهر حزيران 2017 إلى كانون الثاني 2018 وقد تراوحت أعمارهم من 1-79 سنة ، لكلا الجنسين ولفئات عمرية مختلفة، وقد فضل جمع العينات عند الصباح الباكر مع توصية المريض بتنظيف منطقة ما حول الإحليل وترك الانسياب الأولي للإدرار وجمع عينات الإدرار الوسطية Mid-Stream urine تجنبا للتلوث وقد تم جمع العينات باستعمال قناني زجاجية نظيفة ومعقمة ، ثم نقلت إلى المختبر لإجراء الفحص المجهري والزرع على وسط آكار الماكونكي MacConkey agar ثم العزل والتشخيص .تم جمع المعلومات من قبل المرضى عن طريق أعداد الاستمارة الاستبيانية المتضمنة الجنس ،العمر ،السكن ،استخدام المضادات ،الاصابة بداء السكري والتهاب المسالك البولية.

البكتريا التي تم إجراء الدراسة عليها: تم تحديد بكتريا ***pneumonia Klebsiella*** في هذه الدراسة لكونها ثاني مسبب شائع بعد بكتريا *Escherichia coli* في المسالك البولية ولما تسببه من الالتهابات القاتلة في الاشخاص الذين يعانون من أمراض مزمنة وضعف الجهاز المناعي ولان هذه البكتريا شائعة في المستشفيات لذا تعد واحدة من أهم التهديدات المقاومة للعقاقير على الصحة العامة.

عزل البكتريا

عزل وتشخيص العزلات البكتيرية: تم تنقية العزلات البكتيرية وذلك بإعادة زراعتها على وسط أكَار الماكونكَي ووسط أكار الدم ووسط أكَار الايوسين أزرق المثلين (EMB) ووسط الأكَار المغذي بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37مْ. شخصت المستعمرات البكتيرية مبدئيا إستنادا على الصفات الشكلية والزرعية على الأوساط الزرعية التي تتضمن حجم ولون وحافات و إرتفاع المستعمرات فضلاً عن قدرتها لتخمير سكر اللاكتوز وقابليتها على إنتاج المادة المخاطية وأنتاج الهيمولايسين .تم ملاحظة صفات الخلايا مجهرياً بعد تصبيغها بصبغة كرام ثم إجراء الاختبارات الكميوحيوية بالإستناد على مصنف بيركي [11].

الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة: وسط أكار الماكونكي MacConkey وسط أكار الايوسين أزرق المثيلين (EMB) Eosin Methylene blue ، وسط الاكار المغذي Nutrient agar، وسط المرق المغذي– broth Nutrient ، وسط أكار ثنائي السكريات مع الحديد Kligler Iron Agar، وسط أكار اليوريا Urea agar ،وسط ماء البيتون Peptone water، وسط سترات السايمون Simmon citrate Medium، وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain Heat infusion broth

أختبار الحساسية للمضادات الحياتية

Antibiotic susceptibility testing

اختبرت حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية وفق طريقة Kriby-Bauer method كما ورد في [12].

1- حضر العالق البكتيري وذلك بنقل (3-4) مستعمرات من مزرعة نقية وحديثة بعمر 24 ساعة إلى أنابيب إختبار تحتوي على 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي Normal saline والتأكد من مجانسة المحلول مع الرج الخفيف ثم تقارن العكورة لإنبوب العالق البكتيري مع محلول العكورة القياسي ماكفرلاند Macfarland القياسي 1.5×10^8خلية / مل.

2- نشر العالق البكتيري بإستخدام مسحات معقمة (Swabs) ذات نهايات معقمة على سطح أكار مول- هنتون Muller-Hinton gar المحضر مسبقا، تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة (5- 10) دقائق.

3- وضعت أقراص المضادات الحيوية بإستعمال ملقط معقم شرط أن تكون الأبعاد متساوية بواقع (5-6) أقراص في كل طبق ،حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة.

4- قرأت النتائج من خلال ملاحظة مناطق التثبيط Inhibition zone حول كل قرص ثم تم قياس قطر منطقة التثبيط بالملمتر بإستعمال مسطرة مدرجة وحسب ما جاء في [13].

دراسة الفعالية التضادية للمعزلات الحيوية أتجاه بكتريا *Klebsiella pneumonia* الجسم الحي

درست الفعالية التضادية لاربع أنواع من المعززات الحيوية *(Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus Casie, Lactobacillus Plantarium, Streptococcus thermophilus)*.وقد تم الحصول على هذه المعززات من جامعة تكريت كلية الزراعة تجاه بكتريا *Klebsiella pneumonia* قيد الدراسة وباستخدام طريقة الانتشار في الحفر.

Well diffusion method وفقا لما ورد [14] .

1- زرعت بكتريا *Klebsiella pneumonia* في مرق نقيع القلب الدماغ Brian heart Infusion broth وتم تحضنيها لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37مْ .

2- تم تلقيح وسط Man Rogosa Sharp (MRS broth). ببكتريا المعزز الحيوي Probiotic كلا منهما على حدى وحضنت في ظروف قليلة التهوية الى مايقارب 48 ساعة وبدرجة حرارة 37مْ

3- نبذت الأنابيب الحاوية على مزروع بكتريا المعززات الحيوية Probiotic بسرعة 6000 دورة بالدقيقة ولمدة 20 دقيقة لترسب خلايا المعزز الحيوي وأخذ الراشح وأهمل الراسب.

4- عقم الراشح باستخدام مرشحات غشائية بقطر Millipore filter بقطر 0.45 واهمل الراسب.

5- حضر عالق بكتيري من المزروع البكتيري وبتركيز 1.5×10^8خلية بكتيرية /مل وقورنت كثافة العالق مع كثافة محلول ماكفرلاند القياسي Macfarland ذو عكورة 0.5.

6- أخذ (0.1) العالق البكتيري لبكتريا *Klebsiella pneumonia* وبتركيز 1.5×10^8خلية بكتيرية / مل ونشر على سطح الاطباق الحاوية على وسط Mellur Hinton agar باستخدام مسحات قطنية معقمة Cotton swab باتجاهات مختلفة وتركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15دقيقة.

7- أستخدم ثاقب فليني لعمل حفر بقطر (6 ملم) على سطح اطباق Mellur Hinton agar المزروع ببكتريا *Klebsiella pneumonia*.

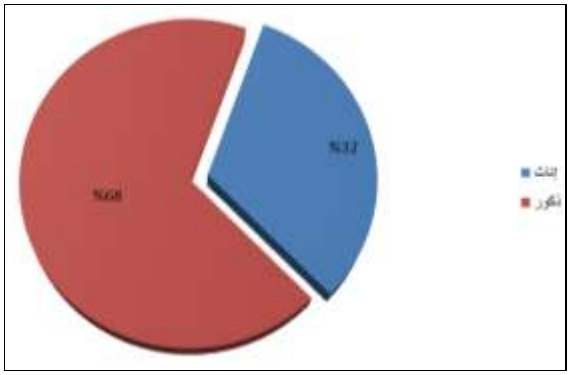
8- أضيف (100) مايكروليتر من راشح البروبآيتك وحضنت الأطباق في ظروف اعتيادية التهوية وبدرجة حرارة 37مْ.

9- قرأت النتائج وذلك بقياس قطر منطقة التثبيط للنمو حول كل حفرة بالملم.

النتائج والمناقشة

جمع العينات Sample collection

تم جمع 250 عينة أدرار من مرضى التهاب المسالك البولية المصابين بالسكري وغير المصابين بالسكري من مستشفى (تكريت صلاح الدين)، ومستشفى بغداد التعليمي /مدينة الطب ،والمختبرات التعليمية / مدينة الطب وللفترة من شهر حزيران 2017 إلى كانون الثاني 2018 والذين تتراوح أعمارهم من (1-79) سنة وقد توزع مرض التهاب المسالك البولية للمرضى المصابين بالسكري وغير المصابين به وبينت نتائج الدراسة الحالية (80) حالة لدى الإناث وبنسبة 32% و(170) حالة لدى الذكور وبنسبة (68%) وبمعدل 2.12:1 الذكور أكثر من الإناث في هذه الدراسة.



الشكل (4-1) توزيع العينات حسب الجنس لمرضى إلتهاب المسالك البولية المصابين بالسكري وغير المصابين به.

بينت نتائج هذه الدراسة أن نسبة حدوث الأصابة للذكور المصابين بالسكري وللفئة العمرية (45-55) كانت (2.4%) تليها الفئات 79-(66) بنسبة (2.35 %) و (56-65) بنسبة (1.17%). أما بالنسبة للأناث المصابات بالسكري فسجلت أعلى نسبة أصابه للفئتين العمريتين (56-65)، (66-79) بنسبة (6.2%) ، في الوقت الذي سجلت نسبة أصابه (2.3%) للفئة العمرية (45-55). يظهر من خلال هذه النتائج أن نسبة حدوث الاصابة متقاربة بين الفئات العمرية. في حين سجلت المجموعة الثانية لمرضى التهاب المسالك البولية الغير مصابة بالسكري من الذكور أعلى نسبة أصابه للفئة العمرية (13-24) بنسبة (2.9%) تليها الفئة العمرية (24-39) وبنسبة (2.3%) والفئة (1-12) كانت أقل نسبة (1.7%) . أما

بالنسبة للأناث فقد سجلت أعلى نسبة إصابة للفئة العمرية (1-12) سنة وبنسبة (6.2%) تليها الفئتين (13-24)، (25-39) بنسبة (3.25%) وقد بينت نتائج التحليل الأحصائي وجود فروق معنوية بين نسبة الإناث إلى الذكور للمرضى المصابين بالسكري و غير المصابين وكذلك للفئات العمرية عند $P \leq 0.05$ و $P \leq 0.01$. كما موضح في الجدول(4-1).(4-2).

الجدول (1) توزيع الإصابة حسب الجنس والفئة العمرية لمرضى التهاب المسالك البولية للمصابين بالسكري

العدد	ذكور مصابة بالسكري		إناث مصابة بالسكري		العدد الكلي	النسبة المئوية
	العدد	النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %		
55-45	5	2.4	3	3.75	8	3.2
65-56	2	1.17	4	6.25	6	2.4
79-66	4	2.35	4	6.25	8	3.2
المجموع	11	6.47	11	6.47	22	8.8

الجدول (2) توزيع الأصابة حسب الجنس والفئات العمرية لمرضى التهاب المسالك البولية الغير مصابين بالسكري

العدد	ذكور غير مصابة بالسكري		أناث غير مصابات بالسكري		العدد الكلي	النسبة المئوية
	العدد	النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %		
1-12	2	1.17	5	6.25	7	2.8
13-24	5	2.94	3	3.75	8	3.2
25-39	4	2.35	3	3.75	7	2.8
المجموع	11	6.47	11	13.75	22	8.8

عزل وتشخيص البكتريا Isolation and identification of bacteria

شخصت المستعمرات البكتيرية مبدئياً وفقاً لصفاتها الشكلية والزرعية من خلال تنميتها على الأوساط الزرعية الآتية (وسط أكَار الماكونكَي، وسط أكَار الأيوسين أزرق المثلين EMB، وسط أكَار الدم Blood agar). والمتضمنة شكل ولون المستعمرات، الحجم والقابلية على تخمر سكر اللاكتوز على وسط الماكونكَيMacConkey agar، إنتاج الهيمولاسين Hemolycin وقدرتها على إنتاج المادة المخاطية. فضلاً عن الفحص المجهري لمعرفة الخصائص الشكلية وترتيب الخلايا والقابلية على الارتباط بملون كَرام Gram stain [15],[16] الكميوحيوية Biochemical test التي تتضمن IMViC واختبار Catalase واختبار الأوكسيديز Oxidase وغيرها من الاختبارات الكميوحيوية وقد ظهرت نتائج الزرع المختبري الأولي للعينات من مجموع (250) عينة أعطت (129) عينة موجبة للنمو البكتيري و(121) عينة سالبة للنمو البكتيري. وباستعراض النتائج الموضحة في الجدول ،أظهرت بكتيريا *Ecoli* أكثر انواع البكتيريا سيادة بعدد (58) وبنسبة عزل (32.2%) للمرضى المصابين بالسكري وغير المصابين حيث تم عزلها بعدد (32) وبنسبة عزل (12.8%) من مرضى السكري ،وبعدد (26) وبنسبة عزل (10.4) لغير مرضى السكري .أن سيادة بكتريا *Ecoil* المعزولة من الادرار في هذه الدراسة تتفق مع عدد من الدراسات فهي تتفق مع الباحث[17]. الذي عزلها بنسبة (30.61%) وتتفق مع دراسة [18] .الذي عزلها بنسبة (30%). وأشارت دراسة في الأردن أن نسبة العزل لهذه البكتريا بلغت (82%)[19] . واختلفت نتائجنا مع [20] إذ أحتلت بكتريا *Ecoil* الصدارة في قائمة البكتريا المعزولة من الإدرار وبنسبة (80%). وأشارت دراسة في السعودية إلى أن نسبة العزل لبكتريا *Ecoli* كانت (39.5%) [21] أما بكتريا *Klebsiella pneumonia* تم عزلها بعدد (44) بنسبة (17.6) إذ كانت (22) عزلة لمرضى السكري و(22) لغير مرضى السكري وبنسبة (8.8) على التوالي ، تتفق نتائجنا مع[22]. إذ سجل نسبة عزل (16.8 %) . وتختلف نتائجنا مع ما توصل إليه الباحث [23]. في النجف إذ عزلها بنسبة (3%) وعزلت بنسبة (26%) للباحث[24]. تظهر أهمية هذه البكتريا في إحداث أخماج المسالك، لكونها إحدى أنواع البكتريا الطبيعية Normal flora في الأمعاء الغليظة والتي تؤدي إلى حدوث تلوث المجرى البولي فضلاً إلى قدرتها على تكوين المحفظة Capsule التي تقيها من الظروف غير الملائمة وتساعدها في مقاومة دفاعات الجسم المناعية التي تتمثل في البلعمة Phagocytosis فضلاً عن إمتلاكها عوامل الألتصاق مثل الاهلاب التي تزيد من فرصتها في إحداث الأصابة[25]. وأظهرت نتائج [26] نسبة عزل *K.pneumonia* (74.7%) وأشارت دراسة محلية أن نسبة عزل 93% لهذه البكتريا وقد تم عزل بكتريا *Proteus* بعدد (12) و بنسبة (4.2%) وكانت (4) عزلات لمرضى السكري وبنسبة (1.6%) و (8) عزلات وبنسبة (3.2%) لغير مرضى السكري، اختلفت نتائجنا مع ما توصل إليه الباحث أحمد الذي عزل (65%)[27]. وفي دراسة أُخرى عزلت بكتريا*Proteus* بنسبة (36%)[28]. السلالات أما النوع *Citrobacter freundii* أعطت نسبة عزل (2.4 %) وكانت عزلة

واحدة لمرضى السكري وبنسبة (1.4%) (5) عزلات لغير مرضى السكري وبنسبة عزل (2 %) وهي تتفق مع[29]. وتقارب نتائج [18].التي بلغت (1%) . وتختلف مع الدراسة التي أجراها [30]. في مدينة الحلة إذ كانت نسبة عزلها (14%) تليها بكتريا *Enterobacter* الذي عزلت من مرضى السكري فقط بعدد (4) وبنسبة (1.6%) تتفق هذه الدراسة مع[31]. الذي عزلها بنسبة (1.7) وتختلف مع [32]. الذي عزلها بنسبة (16%). وقد عزلت بكتريا *Serratia marcesens* في الدراسة الحالية بعدد (2) عزلة لمرضى السكري وبنسبة (0.8 %) وعزلة واحدة لغير مرضى السكري ونسبة (0.4 %) حيث كانت نسبة العزل (1.2%) وهي تتفق مع دراسة قام بها الباحث [33] وتختلف مع دراسة قام بها الباحث [34]. والتي كانت نسبة العزل (3.5 %). تليها بكتريا *Pseudomonas* وعددها(2) عزلة وبنسبة (0.8%). ويعزى سبب هذه الاختلافات في النسب إلى عدد العينات التي جمعت خلال فترة الدراسة أو تطور مقاومة بعض السلالات.

الجدول (3) يوضح الاختبارات الكميوحيوية

الإختبار / البكتريا	الاندول	المثيل الاحمر	فوكس بروسكاور	سيمون ستريت	وسط ثلاثي السكر والحديد	اليوريز	الاوكسيديز	الكاتاليز
Escherichia coli	+	+	_	_	A/A_g	_	_	+
Klebsiella pneumonia	_	_	+	+	A/A_g	+	_	+
Proteus mirabilis	_	+	V	+	K/Ag H2S	+	_	+
Citrobacter freundii	_	+	_	_	K/Ag H2S	_	_	+
Enterobacter cloacae	_	_	+	+	K/Ag	V	_	+
Serratia marcescens	_	+	+	+	A/A	V	_	+
Pseudomonas aeruginosa	_	_	_	+	K/NC	_	+	+

جدول (4) توزيع الأجناس البكتيرية ونسبها المئوية للمرضى المصابين بالسكري وغير المصابين بالسكري

أسم البكتيريا	لمرضى السكري	النسبة المئوية (%)	لغير مرضى السكري	النسبة المئوية (%)	العدد الكلي	النسبة المئوية (%)
Escherichia coli	32	12.8	26	10.4	58	32
Klebsiella pneumonia	22	8.8	22	8.8	44	17.6
Proteus v	4	1.6	8	3.2	12	4.2
Citrobacter	1	0.4	5	2	6	2.4
Enterobacter	4	1.6	0	0	4	1.6
Serratia marcesens	2	0.8	1	0.4	3	1.2
Pseudomonas aeruginosa	2	0.8	0	0	2	0.8
المجموع	67	26.8	62	24.8	129	51.6

أختبار الحساسية للمضادات الحيوية

Susceptibility for antibiotics

تم أختبار حساسية عزلات بكتريا *K .pneumonia* والبالغ عددها (44) أتجاه (22) مضادًا حيوياً تعود لأصناف مختلفة بطريقة الانتشار عبر الاقراص، علما أن العزلات البكتيرية كانت (22) عزلة لمرضى المسالك البولية المصابين بالسكري و(22) عزلة لمرضى المسالك البولية غير المصابين بالسكري. والتي قسمت الى عزلات حساسة ومقاومة ، من خلال مقارنة القطر التثبيطي للنمو مع القيم القياسية الواردة في[34].

درست القابلية التثبيطية لمجموعة الكاربابينيم Carbapenems والتي تضم مضادي Impenem و Meropenem من أكثر المضادات فعالية أتجاه العصيات السالبة لكرام وقد بينت نتائج الحساسية لهذه المضاد نسبة (100%) لمضاد Impenem للمرضى المصابين بالسكري والغير مصابين في حين كانت نسبة الحساسية لمضاد Meropenem (54.5) لمرضى السكري و(59.0%) للمرضى غير المصابين بالسكري. في حين سجلت دراسة الحساسية لمضاد Ciprofloxacin بنسبة (81.9 %) لمرضى السكري و (86.8%) لغير المصابين به ويعزى سبب المقاومة لهذين المضادين إلى واحد من هذه الآليات إنخفاض نفاذية الغشاء الخارجي، تطور آليات التدفق ، تغيير موقع الهدف الذي يحدث من قبل DNA gyrase.

دراسة الفعالية التضادية للمعززات الحيوية

Antagonism activity Probiotic species against *K.pneumonia* bacteria

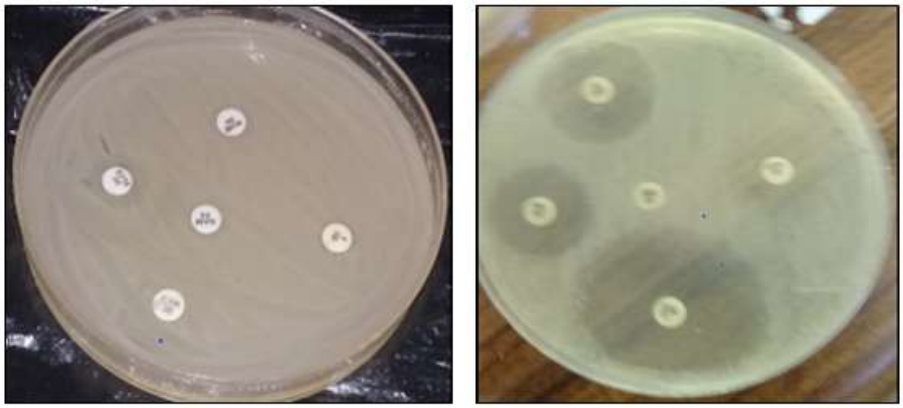
إنَّ انتشار البكتريا المقاومة للمضادات الحياتية هي إحدى أهم التهديدات التي تؤثر على نجاح معالجة الأمراض الميكروبية وقد ساعد الاستعمال الواسع للمضادات الحيوية من تطور المقاومة ، وسوء الاستعمال للمضادات الحيوية من قبل المرضى أو أفراد المجتمع الطبي أدى إلى ظهور سلالات مقاومة [35]. لذا أتجه العديد من سكان العالم إلى الطب البديل لضمان معالجة صحية أولية[36]. وقد أُختبرت الفعالية التضادية لأربعة أنواع من المعززات الحيوية *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus Casie, lactobacillus Plantarium, streptococcus thermophilus*) ضد بكتريا *Klebsiella pneumonia* باستخدام طريقة الإنتشار في الحفر. وقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية قابلية أنواع البروبايتك تجاه بكتريا *K.pneumonia* إذ أظهرت النتائج أن بكتريا المعزز الحيوي*L.acidophillus* سجلت أعلى فعالية تثبيطية تجاه بكتريا *K. pneumonia* وبقطر تثبيطي (25ملم) في حين لم يظهر بكتريا المعزز الحيوي *Plantrium* أي تأثير تثبيطي تجاه بكتريا *K.pneumonia* سوى للمصابين بالسكري أو غير المصابين. وأظهرت المعززات الحيوية *Casie , L.thermophillus*، فعالية تثبيطية تجاه بكتريا الكلبسيلا للمرضى المصابين بالسكري بقطر تثبيطي (20ملم)، (15ملم) على التوالي وتطابق الأقطار التثبيطية لهذين المعززين وبقطر (15،20) ملم لغير مرضى السكري ، وأقل قطر تثبيطي لمرضى السكري على التوالي (8،12) ملم وأقل قطر تثبيطي لهذين المعززين بقطر تثبيطي على التوالي (11،11) لغير مرضى السكري سجلت النتائج الواردة أعلى فعالية تضادية تجاه بكتريا *Klebsiella pneumonia* قياساً بالأنواع الأخرى وبقطر (25ملم) من قبل المعزز الحيوي *L.acidophillus* للمرضى الغير مصابين بالسكري وقد سجلت (6) سلالات مقاومة لبكتريا *K. pneumonia* مقاومة واضحة أتجاه *L.acidophillus* لغير مرضى السكري وثماني سلالات مقاومة *K.pneumonia* لمرضى السكري ، تعزى القابلية التثبيطية للمعزز الحيوي لكونه يتطلب إلى متسلمات Receptor على سطح الخلية كذلك تتفق نتائجنا مع[37]. وتتفق نتائجنا مع ما ذكر [38].

أن بكتريا المعزز الحيوي *Lactobacillus* لها تأثير فعال إتجاه الأنواع البكتيريا وتأثير تثبيطي أتجاه بكتريا *K.pneumonia* تتفق هذه الدراسة مع ما ذكر في[39] .أن وجود عدد من بكتريا *Lactobacillus* لها تأثير فعال إتجاه بعض الانواع البكتيرية الممرضة وخاصة المعززات التابعة للأنواع الاتية , *L.Casie L.acidophillus , L.plantarium* التي لها القابلية التثبيطية لنمو عدد من البكتريا الموجبة والسالبة لكَرام ، تعزى التأثيرات التثبيطية خارج الجسم الحي لسلالات مقاومة للمضادات الحياتية من قبل تضادية المعززات الحيوية Probiotic وذلك إلى ما تنتجه من أحماض عضوية وبشكل أساسي حامضي (Lactic acid، Acetic acid) الذي يؤدي إلى خفض pH الوسط وبذلك يوفر بيئة غير ملائمة لنمو البكتريا وتعود التأثيرات التثبيطية من قبل بكتريا *Lactobacilli* إلى ما تنتجه من أحماض عضوية والمتمثلة بحامض اللاكتك الذي يعمل على إذ ابه الدهون وهذا ما يمكنها من الأنتشار خلال غشاء وسايتوبلازم الخلية [40] فضلاً عن أنتاج العديد من المواد المثبطة مثل بيروكسيد الهيدروجين، Acetaldehyde و Diacetaldehyde وإنتاج متعدد السكريات [41],[42]. تنتج بكتريا *Lactobacillus* البكتريوسينات ومواد مشابه للبكتريوسينات ومن المحتمل تنتج Bio surfactants [43]. وتعرف البكتريوسينات المنتجة من قبل *Lactobacillus* إنها بكتريوسينات ذو فعالية حياتية عالية نتيجة تفاعلها مع مواقع معينة في البكتريا الممرضة [44]. تظهر تأثيرات حامض اللاكتك ضد الممرضات نتيجة تداخلها مع ثباتية أغشية الخلية إذ يعمل على تثبيط ألية النقل الفعال و وضائف طبيعية متنوعة [45] وتكمن الأهمية لثنائي أوكسيد الكاربون في تخمر بكتريا حامض اللاكتك المتغايرة للتخمر والذي يسهم في القابلية التضادية للمعزز الحيوي من خلال تخليق بيئة لاهوائية والتي تحدث خلل في قابلية التنافس [46] .

الصورة (1) الأقطار التثبيطية لرواشح بكتريا المعززات الحيوية تجاه بكتريا *Klebsiella pneumonia*

تم استخدام مضاد Ciprofloxacin الذي يعتبر Control بالنسبة لأقطار تثبيط البروبايتك حيث وجد معدل قطر مضاد Ciprofloxacin ضد بكتريا *Klebsiella pneumonia* لمرضى التهاب المسالك البولية المصابين بالسكري 18.7 ولمرضى التهاب المسالك البولية غير المصابين بالسكري يساوي 21.4 في حين وجد معدل الأقطار التثبيطية للمصابين بالسكري لبكتريا المعزز الحيوي *Lactobacillus Casie, Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus* (5.4، 8.0، 10)على التوالي.

اما معدل تثبيط بكتريا المعزز الحيوي ضد بكتريا *Klebsiella pneumonia* لمرضى التهاب المسالك البولية غير المصابين بالسكري فكانت *Lactobacillus acidophilus* ، *Lactobacillus Casie*. *Streptococcus Thermophilus* (7.0 ، 8.6 ، 9.0) على التوالي. نستنتج من ذلك أن الفعالية التثبيطية لبكتريا المعززات الحيوية ذات تأثير متوسط بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin وذات تأثير عالي بالنسبة للمضادات التالية Ampicillin, Nitrofuranation, Pipracillin, Erythromycin التي واجهت مقاومة عالية بنسبة 100% من قبل بكتريا *Klebsiella pneumonia*.



الصورة (2) توضح الحساسية لمضاد Ciprofloxacin الصورة (3) توضح المقاومة لمجموعة من المضادات

الجدول (5) الاقطار التثبيطية الناتجة عن المعاملة بالمعززات الحيوية للمرض المصابين بالسكري

المعززات / رقم العزلة	*Lactobacillus Casie*	Lactobacillus Acidophilus	*Streptococcus thermophilus*	Lactobacillus *Plantrium*
Kp1	--	14	16	-
Kp2	14	16	15	-
Kp3	-	-	-	-
Kp4	-	12	14	-
Kp5	-	-	-	-
Kp6	8	9	12	-
Kp7	11	14	20	-
Kp8	10	10	14	-
Kp9	11	14	16	-
Kp10	10	20	13	-
Kp11	--	-	-	-
Kp12	-	-	-	-
Kp13	-	-	12	-
Kp14	15	-	12	-
Kp16	9	11	19	-
Kp17	11	14	17	-
Kp18	-	-	-	-
Kp19	-	20	10	-
Kp20	-	-	-	-
Kp21	10	12	15	-
Kp22	10	12	15	-
المعدل	5.4	8.0	10	-

الجدول (6) الاقطار التثبيطية الناتجة عن المعاملة بالمعززات الحيوية لمرضى التهاب المسالك البولية لغير المصابين بالسكري

المعززات / رقم العزلة	*Lactobacillus Casie*	*Lactobacillus Acidophilus*	*Lactobacillus Thermophilus*	*Lactobacillus Plantrium*
Kp23	-	-	-	-
Kp24	-	-	-	-
Kp25	10	25	20	-
Kp26	15	-	-	-
Kp27	12	-	-	-
Kp28	-	15	18	-
Kp29	-	20	15	-
Kp30	11	10	14	-
Kp31	11	12	12	-
Kp32	-	10	-	-
Kp34	-	-	-	-
Kp35	15	-	12	-
Kp36	-	10	12	-
Kp37	11	15	16	-
Kp38	15	16	20	-
Kp39	10	10	11	-
Kp40	11	13	17	-
Kp41	12	8	12	-
Kp42	11	13	15	-
Kp43	-	-	-	-
Kp44	11	13	16	-
المعدل	7.0	8.6	9.5	-

المصادر

[1] Ahmad, W.; Jamshed , F. and Ahmad, W. (2015). Frequency of Escherichia coli in patients with community acquired urinary tract Infection and their resistant pattern against some commonly used Antibacterial . J . Ayub. Med Coll. Abbottabbad .; 27 (2): 333- 337.

[2] AL- Karawyi, A. M.; AL- Jubouri, S. A. and Alasadiy, Y. D. (2012). Molecular Detecation of Ampc Family Genes Encoding Antibiotic Resistance.

[3] Baloch ,G.H .; M .H.; Madhudas C .; Devrajani , B. R. and Ali Shaha Z. (2011). urinary tract infection frequency and pattern in patients with diabetes mellitus. professional Med J.; 18 (3): 466-469

[4] Shill, M.C.; Huda, N. H.; Moain, F. B. and Karmakar, U. K (2010). Prevalence of Uropathogens in Diabetic patients and their Corresponding Resistance pattern: result of a Survey Conducted at Diagnostic centers in Dhaka, Bangladesh. Oman Med. J 25 –(4) : 282 -285

[5] Umeh, O.; Berkowitz, L.; Shepp, D.; Talavera, FJ.; Mylonakia, E and Cunha, B. (2006). Infectious disease, Klebsiella infection. J. eMd Icine ., 2

[6] Ryan, K .; Ray. C. G.; Nafees, A.; Drew, W. L. and James, p. (2010) −Sherris Medical Microbiology. (5 th ed) . H ill publishing company New york .

[7] Nelson, J. M.; Chiller T. M.; Powers J. H.; Angulo F. J (2010). Fluor quinolones resistant Campylobacter Speciesandthithdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: A public health success story Clin Infect Dis 44 : 97

[8] Brashear, M. M.; Gillil and, S.E. and Buck, L. M. (2003). Bile salt decojugation and cholesterol removal from medium by lactobacillus Casei . J . D airy Sci .vol . (81) . : 2103

[9]Salminen, S.; Von Wrigth, A.; Morelli.; Marteau, P.; Brassart, D.; devos, W.M.; fonden, R.; saxelin, M.; Collins, K.; G. Mogensen G.; Birkeland, S. E .; Mattila Sandholm, T. (1998). International Journal of food Microbiology 44:

[10]Cebeci, A and Gurakan, C. (2003). Properties of potential Probiotic Lactobacillus planatarum strains . food Microbiol. 20: 511 – 518.

[11]Holt, J.G; Krieg ,N.R, Sneath, P.H.A, Staley, J.T; Williams, S.T.(1994) determinable of bacteriology 9th ed. William Berge's manual And Wilkins, Baltimore.

[12]Brown, A. E. (2007). Bensons Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology. 10th ed. McGraw- Hill comp. lnc. USA.P. 102-263.

[13]Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). The performance standard for antimicrobial suscptipility testing ; Twenty fourth informational Supplement . Vol. 34 (1).

[14] Blomberg, L. A.; Henriksson, M and Conway, p.L. (1993). inhibition Of adhesion of Ecoli K88 to piglet mucus by lactobacillus APP. Environ. Microbial

[15] Barone, E. J.; Peterson, L.R. α finegold, S. (1999). Diagnostic microbiology. 9th ed Baily and Scotts. The .C . V . Mosby Company.

[16] Collee, J. G.; Fraser AG, Marmion, B.P; Simons, A. (1996). Microbiology. 14th ed., Churchil living stron New york . P. 413 – 423.

[17] محمد ، سعدي عبد الكريم جاسم .(2016). عزل وتشخيص بكتريا *Klebsiella pneumonia* والكشف عن الجين bla kpc باستخدام تقنية PCR واعتماد البرايمرات المتخصصة جامعة الانبار. رسالة ماجستير.

[18] المزروعي، عثمان سعد مطلك (2017). التأثير التراكمي للمستخلصات المائية والكحولية لنباتي الفجل والزنجبيل على بعض الانواع المعزولة من أخماج المسالك البولية في مدينة تكريت. رسالة ماجستير ،كلية العلوم ،جامعة تكريت.

[19] Abu–Shqra, Q. (2000). Occurrence and antibiotic sensitivity of Enterobacteriaceae isolated from group of Jordanian Patients with Community acquired UTIs. Cytobios. 101 (396) : 15 -21 .

[20] Gupta, K.; Hooton, T. M.; and Stamm, W. E. (2001) . Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infection. Am . Intern. Med. 135 : 41 – 50 .

[21] ال سماعيل السوداني، أستبرق علي مكلف .(2004) . تأثير خلاصة ثمرة البلوط Quercus النامي في العراق في البكتريا المسببة لتسوس الاسنان. رسالة ماجستير – كلية العلوم. جامعة ذي قار.

[22] AL–Tememi, L. A.; AL-mosawi R.M. and Ali M.A. Prevalence of some urinary tract bacterial pathogens, 1,4,34- 25.

[23] حسن ، كوثر عدنان (2013). عزل بكتريا القولون المعوية والكلبسيلا من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية ، المجلة الأكاديمية العراقية 175، 3، 179.

[24] Rammo, R. N.N. (2013) Inhibitory Effect of cranberry fruit Extracts on Adhesion of urinary tract infection Bacteria 16,4,138.

[25] Cardozo, L. (1996). Post- menopausal cystitis Urinary Problems, including infection, are common and distressing in older woman . Brit. Med . J. 313: 129.

[26] Acheampong, D. O.; Boamponsem, L. K and Feglo, P.K. (2011). Occurrence and species distribution of Klebsiella Isolates : A case study at Komfo Anokye teaching hospital (Kath) in Ghana, Advances in Applied Science Research , 2 (4) : 187 – 193 .

[27] Ahmad, W.; Jamshed, F. and Ahmad, W.(2015). Frequency of Escherichia coli in patients with community acquired urinary tract Infection and their resistant pattern against some commonly used Antibacterial . J . Ayub . Med Coll. Abbottabbad.; 27 (2): 333- 337.

[28] زين العابدين، صلاح سلمان وأحمد زهراء عايد (2017) التحري عن أنزيمات البيتا لاكتاميز المستحثة في بكتريا *Klebsiella pneumonia* المعزولة من نماذج مرضية مختلفة في مدينة كركوك كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كركوك

[29] Brooks, G. F.; Butel, J. C. and Morse, S. A. (2007). Jawetz , Melinick, J. L. and Adlebebergs Medical Microbiology, 24th ed. Alange medical book.

[30] الشبيب، عبد الرسول عويد و ثويني قاسم نجم. (2015). مقاومة أستخدام الاوساط الزرعية الروتينية والمحورة للكشف عن البكتريا الفاقدة للجدار والمعزولة من خمج السبيل البولي، 3، 1، 98.

[31] الكبيسي، أغا. (2017).عزل وتشخيص الجراثيم المسببة لالتهاب المجاري البولية للإنسان ودراسة حساسيتها تجاه المضادات الحيوية، المجلد (39) العدد (18) مجلة جامعة البعث.

[32] Tektook, N. K.; Ammer A. M. and Eptissam, Y.P .(2016). Anti-bacterial susceptibility Pattern of Acinetobacter baumannii isolated from urine of pregnant women in Baghdad .

[33] العبدلي، ياسر عادل جبار. (2010). استخلاص وتنقية مركب الكاتشين من الشاي الاخضر (Camellia sinesis) وتأثيره التأزري على البكتريا المسببة لالتهاب المجاري البولية .رسالة ماجستير، كلية التربية العلوم، جامعة المستنصرية.

[34] Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). The performance standard for antimicrobial suscptipility testing; Twenty fourth informational Supplement. Vol. 34 (1). USA.

[35] FAO /WHO. (2001). Healthy and Nutritional Properties of probiotics in food including power milk with live lactic Acid Bacteria Report from Joint food and Agriculture Organization (WHO) expert consullations Argentina, 1-34 .

Flemming, H. and Win gender, J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8: 623 – 633.

[36] Amdekar, S.; Dwivedi, D.; Roy, P; Kushwah, S and Singh, V. (2010). Probiotics: multifarious oral Vaccine against infections traumas . Immunology and medical microbiology (59): 299 -307 .

Jawwet, S.E ; Melnick, L .and Adelberg , E.(2013). Review of [37]
Medical microbiology (20th ed) pp-127-221 :247-249.

[38] Adenike, A. O. A. Mopelola and J. Adeleye. (2007). in vitro antimicrobial characteristics of bacteria cinproducing lactobacillus strains from Nigerian indigenous fermented foods. Afri J. Biotechno., So 6(4): 445–453.

[39] Ayad, E. H.; Nashat, S. and EI- soda, M. (2012). selection of lactic acid bacteria from traditional Egyption dairy products. food microbial 21: 715 – 725.

[40] Gottschalk, G. (1988). Chapter 8 Bacterial fermentation, pp 223-224. In Bacteria Metabolism, 2nd ed . Springer - Ver Lag , Newyork, U. S. A

[41] Caplice , E and Fitzgerald , G . F . (1999) . Int . J. Food Microbiol, 50 131 -149

[42] Rozalski, A.; Sidorczyk, Z& Kotelko, k.(1997). Potential virulence factors of proteus bacilli: Microbial Mol. Biol. Rev. 16: 65-89

[43] Millete, M.; Luquet, F. M and L acroix, M. (2006). In vitro growth control of selected pathogens by Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus Casei - fermented milk Letters in Applied Microbiology, 44, 314 -319 .

[44] Cadirci, H. and Citak, S. (2005). Acomparison of two B. Methods used for Measuring Antagonistic Activity of lactic acid bacteria Pakistan. J . Nut . 4 (4): 237 -241.

[45] Rios, J. Recio, M.C & Villar, A. (1988). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. J. Ethnophrmacol . 21 :139 – 152

[46] Eklund,. T. (1984). The effet of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the membrane vesicles. Int. J. Food Microbiol. 1:179-185.

Determination of the inhibitory efficacy of certain Probiotics against *Klebsiella pneumonia* Isolated from Patients with Diabetes mellitus and non-Diabetic Patients

Zammen H. Mohammad , ALabasy, Halah A.A. Al –Hadithi

Biology Department , College of Sciences , Tikrit University , Tikrit , Iraq

Abstract

The current study included the collection of 250samples from UTI patients infected with diabetes and without diabetes In Tikrit Hospital (Salahuddin General) and Baghdad Educational Hospital / Medical City Educational laboratories / medical city and for the period from June 2017 to January 2018 for both sexes and for different age groups ranging from 1-79 years. The result of primary calture showed 129 positive growth samples and 121 negative bacterial growth samples And the number of infected female was 80% by 32%, while the number of infected males 170 by 68% of the total 250 samples.

The process of isolation and diagnosis included two groups of patients with urinary tract infection ; infected with diabetes and without diabetes *Escherichia coli* was isolated with 58 isolates and 32% with 32 isolates and 12.8% in patients with diabetes. And isolated by (26) and by (10.4%) for non-diabetics, *K.pneumonia* was isolated by 44 (17.6%) and by 22 (8.8%) for diabetics and non diabetic patients, While the isolation rate of *Proteus* was 12 isolates and 4.8% including isolates and 1.6% for diabetics and 8% isolation for diabetics, *Citrobacter* was isolated by 6 isolates (2.4%), (1), by 0.4% for diabetics, and 5 isolates for non-diabetics (2%) Followed by *Enterobacter* with 4 isolates and 1.6% for diabetics only. *Serratia marcesens* were isolated by 3% and 1.2% by isolating 1 and 0.4 for diabetics, 2 isolates by 0.8 for non-diabetics, isolating *Pseudomonas* by 2 and 0.8% For diabetics.

The sensitivity of the bacterial isolates (22) was tested for antibiotic and for different groups with the highest sensitivity of Imipenem and Ciprofloxacin, respectively, while some of the antibodies encountered a high resistance of 100%, such as Ampicillin, Pipracillin, Erythromycin and Nitrofuranation. The antibiotic activity of four strains of *Kpneumonia* isolated from diabetics and non-diabetic patients was studied. The highest inhibitory efficacy was recorded by *L. acidophilus* and 28 mm diameter, while plantarium showed no inhibitory effect for both patients Diabetes or non-infected.