



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم



دراسة الفعل التآزري للمعززات الحيوية أو الدقائق النانوية
مع مضاد Levofloxacin للسيطرة على نمو *E. coli*
المعزولة من أخماج المسالك البولية

رسالة

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة
من قبل الطالبة

بيداء رحيم محمد

بكالوريوس علوم الحياة/جامعة ديالى (2005)

أشرف

م.د. عمار رياض قاسم

أ.د. زينب محمد نصيف

2020 م

1441هـ

المقدمة

Introduction

تنتمي بكتريا الاشريكية القولونية *E. coli* الى النبيت الطبيعي المعوي في الانسان والحيوان وتكون علاقة تعايشية مفيدة مع مضيفها بانتاجها بعض المغذيات مثل الفيتامينات والاشارات الرئيسية لتنظيم الاستجابة المناعية وكذلك توفير الحماية لمضيفها من الممرضات الخارجية (Yan and Polk, 2004). تكتسب بعض سلالات هذه البكتريا جينات الضراوة التي تمنحها القدرة على احداث امراض خطيرة في داخل الامعاء وخارجها تصنف هذه السلالات الممرضة الى الاشريكية القولونية الممرضة للامعاء المسببه للاسهال (*Diarrheagenic E. coli* (DEC), والاشريكية القولونية المسببة لامراض خارج معوية (*ExPEC*) (*Extraintestinal pathogenic E. coli* (ExPEC) (Kaper et al., 2014). تتضمن كل مجموعة سلالات مرضية تشترك فيما بينها بعوامل الضراوة وتسبب امراضا مماثلة الى (*Marrs et al., 2005*). تعود بكتريا الاشريكية القولونية المسببة لآخماج المسالك البولية UPEC الى ExPEC وتتميز بقدرتها على التواجد في القناة الهضمية دون احداث المرض, ولكن عند توفر الظروف الملائمة فانها تصيب اماكن اخرى في جسم المضيف بما في ذلك الدم والجهاز العصبي المركزي والمسالك البولية مسببةً عدد من الامراض الخطيرة, تعد بكتريا UPEC المسبب الرئيس لآخماج المسالك البولية المكتسبة من المجتمع بنسبة (80-90) % (Foxman, 2014).

تعد آخماج المسالك البولية *Urinary tract infection* من أكثر الامراض انتشاراً بالخاص عند الاطفال ، فهي تُعد من المشاكل التي تأتي بالمرتبة الثانية بعد أمراض الجهاز التنفسي ضمن الامراض المكتسبة بالمجتمع (*Community-acquired infections*) في حين تحتل المرتبة الاولى ضمن الامراض المكتسبة من المستشفيات (*Nosocomial infections*) (Todar , 2008). وأن جميع الأمراض الناتجة من استيطان الاحياء المجهرية في الكلية والمثانة واختراق انسجة المسالك البولية تُعرف بأخماج المسالك البولية (Spurbeck et al., 2013). تمتلك البكتريا المسببة لاصابات المسالك البولية العديد من عوامل الضراوة منها الأخمال *fimbria* والتي تُمكنها من الألتصاق على البطانة الظهارية للقناة البولية، والغشاء الحيوي *Biofilm* والبكتريوسن *Bacteriocin* والمحفظة *Capsule* وحاملات الحديد *Siderophores* التي تمكنها من غزو المسالك البولية واحداث الخمج ، وفي معظم الحالات ترافق الخلايا القيقحية *Pus cells* حالات الاصابة باخماج المسالك البولية (Cheesbrough, 2012). كما تنتج مجموعة من السموم من ضمنها *Hemolysin* وعامل التنخر السام للخلايا *1_* مسببةً اضراراً جسيمة في انسجة المضيف وتسهل

عملية انتشار البكتريا (Agarwal *et al.*, 2012). يعزى الاثر الكبير في انخفاض معدلات الإصابة باخماج المسالك البولية لاكتشاف المضادات الحيوية وكنتيجة للاستعمال العشوائي والمفرط ظهرت العديد من السلالات البكتيرية المقاومة وتزداد صفات المقاومة البكتيرية بشكل طردي مع زيادة استعمال المضادات ، جاعلا بذلك علاج الامراض يواجه صعوبة كبيرة ، لذا وجب اجراء اختبارات الحساسية الدوائية على الجرثومة المعزولة لمعرفة المضاد الحيوي الملائم للقضاء عليها (Hamedi *et al.*, 2009).

استخدامت البدائل الحيوية من ضمنها البكتريا النافعة probiotic لزياده مقاومة سلالات *E. coli* للمضادات الحيوية (Lu and Koeris, 2011). عرفت ال Probiotics من قبل FAO/WHO عام 2001 "بأنها الكائنات الحية المجهرية التي عندما تستهلك بكميات مناسبة تمنح فوائد صحية للمضيف " تعد بكتريا حامض اللاكتيك Lactic Acid Bacteria مجموعة رئيسية من بكتريا ال Probiotic واهم اجناسها هو جنس Lactobacilli, تتميز بنشاطها المضاد للميكروبات من خلال انتاج العديد من الاحماض العضوية مثل (حامض اللاكتيك, حامض الخليك, بيروكسيد الهيدروجين, الايثانول, الاسيتون, CO₂, والبكتريوسينات التي تستخدم كمواد حيوية حافظة وكبدائل للمضادات الحيوية التقليدية (Suskovic *et al.*, 2010), وكذلك دورها في تعديل المحتوى الميكروبي في القناة الهضمية, الالتصاق التنافسي الى الطبقة المخاطية والظهارية (Kechagia *et al.*, 2013).

اضهرت تقنية العلاج بالجسيمات النانوية كعوامل مضادة للميكروبات واسعة الطيف نظراً لخصائصها الفيزيائية والكيميائية الوظيفية الواسعة, واقعياً بينت الدراسات أن الجسيمات النانوية NPs قادرة على كسر القيود التي تواجه المضادات الحيوية لذلك قد تحدث نقطة تحول أخرى في العلاج الدوائي في هذا الصدد, يرجع السبب في امكانية استخدام المواد النانوية كعوامل مضادات للميكروبات بديلة لقدرتها على تثبيط طيف واسع من الميكروبات المرضية من خلال عبور الحواجز الغشائية الصعبة ، إيصال وتثبيط مستمر لمسببات الأمراض داخل الخلايا وقدراتها التعقيمية (Yah and Simate, 2015). تشمل الاليات المضادة للميكروبات لل NPs تدمير الاغشية الخلوية , غلق مسارات الانزيم , احداث تغييرات في تصنيع الجدار الخلوي الميكروبي وتعطيل مسارات تصنيع الحامض النووي الميكروبي (Galdiero *et al.*, 2011). تمثل جسيمات اكاسيد المعادن مثل MgO و CuO فئة جديدة من العوامل المضادة للميكروبات والتي تمت دراستها بشكل واسع لخصائصها المميزة وتطبيقاتها المحتملة في الصناعات الغذائية والبيئية والرعاية الصحية (Hajipour *et al.*, 2013). تعد جسيمات أوكسيد المغنسيوم MgO النانويه مضادات بكتيرية واعدة نتيجة

الخلاصة

زيادة انتشار المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية واحدة من المشاكل الصحية الرئيسية في جميع أنحاء العالم ، مما يهدد عصر المضادات الحيوية الأكثر استخدامًا في علاج الاخماج. دعت الحاجة إلى تطوير استراتيجيات علاجية جديدة ضد الكائنات الحية الدقيقة المقاومة للأدوية المتعددة مثل مزيج من المضادات الحيوية المختارة كبدلاً مناسباً. تضمنت الدراسة جمع 200 عينة أدرار من الذكور والاناث وبمختلف الاعمار من المرضى المراجعين والمقيمين في مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي للفترة من 2018/9/15 ولغاية 2018/12/15.

أظهرت 105 عينة والتي شكلت %52.5 نموا موجبا على الاوساط الزرعية الملائمة (وسط الماكونكي الصلب, وسط الدم الصلب, وسط الايوسين أزرق المثيل الصلب) أما العينات التي لم تُظهر نموا فكانت 95 عينة وبنسبة %47.5 , تم تشخيص العزلات بأستخدام الاختبارات البكتريولوجية و الكيموحياتية فتبين أن بكتريا *Escherichia coli* كانت من أبرز مسببات التهاب المسالك البولية حيث بلغ عدد العزلات 60 عزلة بنسبة %30 من مجموع العينات توزعت العزلات بين 15 عزله من الذكور و45 عزلة من الاناث . وتمّ تأكيد التشخيص وأختبار الحساسية بإستخدام جهاز VITEK 2 compact اتجاه 17 مضاد حياتي مختلف .أختير المضاد الحياتي levofloxacin بسبب ظهور العزلات المقاومه له وبنسبة %30 .

أستخدمت طريقة Broth dilution لأيجاد قيمة التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC) للمضاد Levofloxacin , بينت النتائج ان MIC للمضاد كان بتركيز 40 مايكروغرام/مل ضد عزلات *E. coli* اقطار التثبيط بين 7 ± 0.25 و 8.1 ± 0.3 ملم بالتركيز المذكور اما بتركيز 20,10 مايكروغرام/مل فلم يبدي المضاد الحيوي اي قدرة تثبيطية ضد العزلات. و بينت النتائج أيضا أن عزلات *E. coli* كانت حساسة لرواشح بكتريا المعززات الحيوية وبنسبة %100. فُدرت الفاعلية التثبيطية للرواشح بطريقة الانتشار بالحفر Agar-well diffusion حيث تراوحت مناطق التثبيط بين 12 ± 0.1 و 12.2 ± 0.05 ملم لراشح بكتريا *L. acidophilus* , و 10 ± 0.09 و 11 ± 0.05 ملم لراشح بكتريا *B. coagulans* . شملت الدراسة بحث الفاعلية التثبيطية التأزرية عند خلط رواشح هذه البكتريا مع المضاد الحياتي Levofloxacin .

اظهرت نتائج تقدير الفاعلية التثبيطية لخليط راشح بكتريا *L. acidophilus* مع المضاد الحياتي Levofloxacin ضد عزلات بكتريا *E. coli* بطريقة Agar well diffusion مع المضاد

لمقاومتها لظروف المعالجة القاسية ويعتمد نشاطها المضاد للميكروبات على حجمها وتركيزها , توجد ثلاث اليات مقترحة لعملها وهي: تكوين انواع الاوكسجين التفاعلية ROS, تداخل الجسيمات مع الخلية البكتيرية وتأثيرها القلوي وبالتالي تحطم الخلية (Tang and Lv,2014). و في دراسته اجريت من قبل Raffi وآخرون (2010) أثبتوا ان التراكيز العالية من النحاس كانت قاتلة لخلايا بكتريا *E. coli* حيث تلتصق الجسيمات الى جدار الخلية البكتيري وتخترق الغشاء الخلوي مما يؤدي الى خروج السايوبلازم وتحله مسببا موت الخلية.

وبناءً على ذلك فقد أُجريت الدراسة الحالية بحسب الاهداف الآتية:

1. عزل وتشخيص بكتريا اشيريكية القولون المرضية من عينات الادرار من مرضى أخماج المسالك البولية وتوصيف العزلات باستخدام طرائق التشخيص التقليدية و التشخيص باستخدام VITEK 2 Compact system .
2. تقدير الفاعلية التثبيطية لراشح عزلتي بكتريا حامض اللاكتيك *L. acidophilus* و *B. coagulans* ضد *E. coli* المسببة لأخماج المسالك البولية بطريقة Agar well diffusion.
3. تصنيع جسيمات أوكسيد المغنسيوم النانوية MgO NPs وجسيمات اوكسيد النحاس النانوية CuO NPs بطريقة Sol-Gel.
4. تقييم الفاعلية التثبيطية والتركيز المثبط الأدنى لكل من جسيمات MgO و CuO ضد عزلات بكتريا *E. coli* بطريقة Agar well diffusion و Broth macrodilution على التوالي.
5. تقييم الفعل التثبيطي التآزري للجسيمات النانوية والفعل التثبيطي التآزري لراشح عزلتي بكتريا حامض اللاكتيك LAB مع المضاد الحياتي levofloxacin تجاه عزلات *E. coli* بطريقة Agar well diffusion.