



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة القادسية - كلية العلوم  
قسم علوم الحياة

# تعديل المضادات الحيوية لقتل أكبر عدد ممكن من البكتريا المقاومة

بحث مقدم إلى مجلس قسم علوم الحياة / كلية العلوم

وهو من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس / علوم الحياة

اعداد الطالبة

نور كاظم حسين

بإشراف

م.م. هند حمزة عبد الحسين

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿الَّذِينَ آمَنُوا وَتَطْمَئِنُّ قُلُوبُهُمْ بِذِكْرِ

اللَّهِ أَلَّا يَذْكُرِ اللَّهُ تَطْمَئِنُّ الْقُلُوبُ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة الرعد الآية (٢٨)



# " الشكر والتقدير "

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على اشرف الانبياء والمرسلين محمد (صلى الله عليه واله وسلم) واهل بيته الطيبين الطاهرين.

الحمد لله الذي انار لي دربي واخذ بيدي لأكمل مشواراً طويلاً لم ارجوا به الا قربه ولطفه ورحمته وسخر لي جمعاً من خلقه اعانوني وكانوا لي سنداً

أما بعد...

فإني اتقدم بالشكر الجزيل إلى اساتذتي الذين كانوا لي شمساً مضيئة على مر الزمان،

كما واقدم اجمل عبارة شكر وتقدير لابد ان تسبق حروفنا وتنتهي سطورنا معبرة عن صدق

المعاني النابعة من القلب الى استاذتي ومشرفتي الفاضلة (م.م. هند حمزة عبد الحسين) لإكمال

بحثي.

## Abstract الخلاصة

آليات مقاومة البكتيريا للمضاد الحياتي في تطور مستمر ، لذلك لابد من البحث عن اليات ومسارات جديدة تستهدف تطوير تأثير هذه المضادات ، ومن هذه الالات التآزر والذي يعتبر أحد انواع التداخلات الدوائية.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم فعالية مجموعة من المضادات الحياتية (Amoxicillin ، Penicillin ، Gentamycin) بصورة مفردة و متآزره مع المضاد الحيوي Vancomycin من خلال دراسة الية عملها وقابلية نفاذها للخلية البكتيرية بأستخدام بكتيريا *E.coli* معزولة من اطفال مصابين بالاسهال من مستشفى الديوانية العام وبالمقارنة مع سلالة *E.coli* حاوية على طفرة وراثية (حساسة للمضاد الحيوي Vancomycin) لدراسة التآزر الزوجي بين الفانكوميسين (Vancomycin) ومجموعة من المضادات الحياتية أعلاه ، كان أكبر قطر تثبيط تم الحصول عليه عند مزج المضادين (Gentamycin + Vancomycin) عند تركيز ( 50 mM) حيث كان قطر التثبيط (30mm)، ولم يلاحظ اي تأثير قاتل عند مزج Vancomycin مع المضادات الأخرى حتى بأعلى تراكيز مستخدمة.

### مقاومة المضادات الحيوية Resistant of Antibiotics

مقاومة المضادات الحيوية هي قدرة هذه الكائنات المجهرية الدقيقة على تحمل مفعول المضاد الحيوي. تستطيع بعض الانواع من البكتيريا مقاومة المضادات بواسطة الطفرات العشوائية. الدراسات الحديثة أوضحت ان الاستعمال المفرط للمضادات الحيوية له تأثير كبير على نشوء اجيال بكتيرية مقاومة ، مثال ذلك الافراط في استعمال المضادات الحيوية واسعة الطيف مثل (السيفالوسبورين) يقوم بتسريع عملية تطور المقاومة للمضاد الحيوي الميثيسيلين. وهناك أسباب أخرى تطور عملية مقاومة هذه ،مثل وصف الطبيب للمضاد الحيوي الغير مناسب لحالة المريض الى جانب استعمال المضادات الحيوية بصورة دورية ومستمرة كمواد إضافية للطعام وخاصة في المواشي لتشجيع نموها (Boyle & Daum, 2007). توصل العلماء في الفترة الاخيرة الى ان البروتين البكتيري من نوع (Lex A) يلعب دوراً هاماً في التغير الوراثي البكتيري (Boyle & Daum, 2007; Cirs et al., 2005).

### المضادات الحيوية حسب تأثيرها على الخلية البكتيرية

لأحداث فعل مؤثر للمضاد الحيوي على الخلية البكتيرية يجب ان يحصل تماس مباشر بين المضاد والموقع المخصص له داخل الخلية البكتيرية بحيث لا يؤثر أي تأثير سلبي على خلايا جسم المضيف الطبيعية. وبذلك يمكن تصنيف المضادات الحيوية حسب تأثيرها على البكتيريا:

#### ١. المضادات الحيوية التي تعمل على الجدار الخلوي :

المضادات الحيوية التي تعمل على منع تخليق الجدار الخلوي البكتيري هي البنسلينات والسيفالوسبورينات ومشتقاتها حيث يكون عملها هو منع تكوين الجسور الببتيدية في طبقة الببتيدوكلايكان. ويجب ان يكون تأثير هذه المضادات على الجدار الخلوي قبل تصنيعه بصورة كاملة اي عندما تكون الخلايا البكتيرية في طور الانقسام اي قبل تكون الجسور الببتيدية للجدار الخلوي مما يجعل البكتيريا حساسة للضغط الاوزموزي ومن ثم موتها.

#### ٢. المضادات الحيوية التي تعمل على الغاء البلازمي

من هذه المضادات الحيوية هي (Polymyxin, Colisten).

الغشاء البلازمي يحيط بكل السايكوبلازم وينظم عملية نفاذية المواد الى داخل وخارج الخلية بصورة اختيارية حيث تحدث عملية النقل الفعال بالإضافة الى وجود عدد كبير من الانزيمات المسؤولة عن عملية النقل. مثال

ذلك (Polymyxin) الذي يسبب حدوث ثقب ببولوجية من خلال تداخله بين جزيئات الغشاء السيتوبلازمي وبالتحديد بين طبقة البروتين والدهون المفسفرة أو التأثير على الانزيمات الناقلة عبر الاغشية وتنشيط عملها من خلال التأثير على التبادل الأيوني للمواد الداخلة والخارجة للخلية البكتيرية وذلك يؤدي إلى موت الخلية البكتيرية.

٣. المضادات الحياتية التي تعمل على مواقع تصنيع البروتينات مثل Aminoglycosides, Tetracycline, Chloramphenicol, Macrolides :

يستطيع قسم من هذه المضادات الحياتية منع تكوين سلسلة الاحماض الامينية بينما يستطيع القسم الآخر من هذه المضادات الحياتية منع عملية الترجمة للحامض النووي الرايبوزي المراسل (mRNA) وتعتبر هذه المضادات مثبطة للبكتيريا (Bacteriostatic) إذا كان تأثيرها المباشر على تخليق البروتينات الوظيفية وتعتبر هذه المضادات الحياتية قاتلة (Bacteriosidal) إذا كان تأثيرها المباشر على تخليق البروتينات التركيبية.

٤. المضادات الحياتية التي تعمل على الاحماض النووية :

يمكن تقسيم المضادات الحياتية التي تؤثر على الاحماض النووية إلى :

أ. مضادات حياتية تتداخل جزيئاتها مع الاواصر الهيدروجينية الرابطة للقواعد النايروجينية المتقابلة للسلسلتين المتقابلتين في شريط (DNA) مما يؤدي الى ايقاف عملية التضاعف من خلال التأثير على انفصال شريطي (DNA)

ب. مضادات حياتية تستطيع احداث تغييرات جوهرية في السلسلة الواحدة للحزون حيث تقوم بالتداخل بين القواعد النايروجينية مما يؤدي الى تغيير في تسلسل القواعد النايروجينية وبالتالي تنشيط عملية التضاعف وابقافها مثل المضاد الحياتي (Actinomycin).

مضادات حياتية تستطيع الارتباط مع (DNA) بتكوين أواصر معه حيث تكون هذه الاواصر بين حلقات الحزون (DNA) مما يؤدي الى تفكك الحزون المتضاعف .

ت. مضادات حياتية تؤثر مباشرة على عملية الاستنساخ اي تصنيع الحامض النووي (RNA) من خلال الارتباط مع انزيم البلمرة (RNA-polymerase) مثل المضاد الحيوي (Rifamycin).

ث. مضادات حياتية لها تأثير على انزيم (DNA-gyrase) المسؤول عن فتح جزيئة الحزون المتضاعف مما يعيق عملية فك الحزون مثل الكيتونات (الربيعي، ٢٠١١).

# أستعراض المراجع

## آليات المقاومة للمضادات الحيوية

### 1- General

ظهرت صفة المقاومة لدى لسلاسل البكتيرية يعزى لحصولها على واحد أو أكثر من الجينات المقاومة للمضادات والتي قد يرجح ان تكون بسبب الفشل العلاجي أو فرط الاستخدام . ويمكن تعقيد هذه الظاهرة في تنوع الانواع البكتيرية والمضادات الحيوية. وقد حفز وجود البكتيريا المسببة للأمراض نتيجة لمقاومة للمضادات الى البحث عن مسارات وتقنيات جديدة يمكن ان تستهدف هذه الظاهرة وتقلل من تأثيرها وقد تم اختبار طريقة دمج المضادات الحيوية بأقل تركيز من اجل تثبيط نشاط البكتيريا المرضية لتقليل الاثار الجانبية التي قد تنتج من استخدام مضاد حيوي واحد بتركيز عالي ولكي تحصل على تقنية جديدة في القضاء على البكتيريا بأسرع وقت ممكن.

### 2- Resistance of Antibiotic

### مقاومة المضادات

في الثلاثينيات لاحظ Felmming ظهور اشكال من المقاومة وقد تأكد من ذلك من ظهور البكتيريا المقاومة للبنسيلين بعد خمس سنوات من وصف هذا المضاد ، فإذا كانت هذه الظاهرة في البداية ليست واسعة الانتشار ولم تقلق المختصين ، فهي الآن مشكلة صحية كبيرة وعامة.

وبعد ٢٠ عام ، فإن اكتشاف مضادات حيوية جديدة ونادرة وفعالة في علاج الامراض البكتيرية أدى بالوقت نفسه الى تطور أنواع واشكال المقاومة لهذه المضادات لدى البكتيريا.

مقاومة المضادات الحيوية يمكن ان تكون إما طبيعية او مكتسبة وعادة ما تكون جينات المقاومة الطبيعية هي الكروموسومات والخلايا التي تنتقل الى الاجيال اثناء الانقسام البكتيري. بينما المقاومة المكتسبة تنتج من التعديلات على التراث الجيني (طفرة في الجين الكروموسومي واكتساب جين جديد يحمل على البلازميد الاقتراني).

وقد ترجح جينات المقاومة التي ادخلت حديثاً في الكروموسوم من خلال ظواهر التحول أو ظهور اعادة التركيب (Sanders et al., 2001; Lozniewski & Rabavd, 2010).

توجد ثلاث استراتيجيات من المقاومة في البكتيريا:



## ١. انتاج انزيمات محللة او معطلة للمضاد الحيوي

مثل انزيمات  $\beta$ -Lactamases التي تكون مسؤولة عن مقاومة  $\beta$ -Lactam ( Tomson & Smith, 2000). تفرز هذه الانزيمات في منطقة Periplasmic من البكتيريا في تحلل المضادات الحيوية المتكونة من حلقة  $\beta$ -Lactam مثل البنسيلين او السيفالوسبورين.

## ٢. تغيير او تعديل هدف المضاد الحيوي *Modification of the antibiotic target*

اهداف المضادات الحيوية الاساسية هي البروتينات ، وان حدوث اي طفرات فيها تؤدي الى فقدان معرفة المضاد بالبروتين وبالتالي تصبح غير نشطة كما في حالة Pbp أو ما يسمى ( Penicillin binding protein) التي هي عبارة عن انزيمات تجمّع الببتيدوكلايكان في جدار الخلية البكتيرية (transsglycosid/ transpeptids) والتي تستهدف  $\beta$ -Lactam وجزء منها البنسيلين (Hakenbek & Coyette, 1998).

## ٣. الحد من تركيز المضادات الحيوية *Reduction of Intracellular antibiotic concentration*

المقاومة الطبيعية للمضادات الحيوية ترتبط بنفاذية جدار الخلية البكتيرية وخاصة البكتيريا السالبة لكرام فجار الخلية البكتيرية يتكون من غشائين: خارجي وداخلي مفصول بمساحة محيطية وعدد من الجزيئات مثل (Oligosaccharides, Peptidoglycan and Soluble proteins) الموجودة في الببتيدوكلايكان و ( Lipopolysaccharides ) في الغشاء الخارجي والمسؤولة عن تصلب الغشاء الخارجي وضعف انتشار الجزيئات عبر جدار الخلية البكتيرية (Nikaido, 2003). تركيز المضادات الحيوية داخل الخلايا يمكن ان يقلص بشكل كبير عند حدوث تعديل او نقل المضادات من قبل المنظمات الخلوية الى خارج الخلية (Li & Nikaido, 2004).

## التآزر بين المضادات الحيوية :

يستخدم مصطلح التآزر للإشارة الى أحداث تأثير اكبر عند تعاضد عاملين مختلفين قياسا بتأثير كل عامل منهم على حدى ويعتبر التآزر احد انواع التداخلات الدوائية والتي تحدث عندما تؤثر ما على فعالية الدواء عندما يتم ادخال المضادين الحيائيين معا ، فعندما يزداد تأثير هذين المضادين يسمى هذا تآزراً. مثال ذلك عندما نستخدم المضاد الحيائي Amoxicillin مع Clavulanic acid فإن ذلك يزيد من فرص التغلب على مقاومة المضاد الحيائي.

**وهناك نوعين من التآزر بين المضادات الحيوية هما:**

١. التآزر المضاف : يحدث عندما يكون تأثير النهائي مساوي لمجموع تأثير المضادين الحيائيين معاً
٢. التآزر المحسن: عندما يكون تأثير المضادين الحيائيين اكبر بكثير من تأثير هذين المضادين الحيائيين مجتمعين .

### الفانكوميسين (Vancomycin)

الصيغة الكيميائية : C<sub>66</sub>H<sub>75</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O<sub>24</sub>

الزمرة : الببتيدات السكرية glycopeptides

التأثير : يستعمل هذا المضاد الحيوي للسيطرة على العدوى الناتجة بسبب البكتيريا الموجبة لصبغة كرام وخاصة العنقوديات الذهبية المقاومة للبنسيلين.

موقع التأثير: يثبط عملية بناء الجدار الخلوي البكتيري ويغير من نفوذية غشاء الخلية البكتيرية وكذلك له القابلية على التداخل ومنع تصنيع (RNA).

الاستخدام: يعتبر هذا المضاد الحيوي من المضادات النشطة في علاج البكتيريا الموجبة لصبغة كرام الهوائية واللاهوائية. كما ان له تأثير مؤازر عندما يستخدم مع مضادات حيائية أخرى. كما يستعمل في علاج الجهاز التنفسي وخاصة القسم الاسفل والتهاب الامعاء والقولون (Levin, D. , 2006).

## اموكسيلين Amoxicillin

الصيغة الكيميائية  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$

الزمرة = مضادات البيتا لاكتام  $\beta$ - Lactam antibiotic

التأثير : له القدرة على الامتصاص بواسطة الجسم في حالة اعطائه عن طريق الفم. يستطيع تثبيط البكتيريا المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز. لذا يتم مزج غالبا مع مثبط  $\beta$ -lactamase وهو Clavulanic acid (Thornhill, MH , 2011).

موقع التأثير : يثبط تكوين جدار الخلية البكتيرية من خلال تثبيط الترابط بين سلاسل البوليمرات الببتيدوكلايكان الخلية والتي تكون جزء مهم من الخلايا البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام .

الاستخدام : يستخدم هذا المضاد الحيوي لعلاج عدة امراض منها: التهاب القصبات الهوائية ، التهاب الرئتين ، التهاب الانف والاذن والحنجرة، التهاب المجاري البولية والتهاب الجلد.

## الجنتاميسين (Gentamycin)

الصيغة الكيميائية :  $C_{21}H_{43}O_7$

الزمرة: الامينوكلايكوسيدات

التأثير : يعتبر هذا المضاد الحيوي فعال ضد كل من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وله القابلية على التآزر مع العديد من المضادات الحيوية من زمرة البيتالاكتام. وخاصة للتأثير على بكتيريا *Klebsila*, *Proteus*, *Enterobacter* وانواع بكتيرية اخرى.

موقع التأثير: يقوم الجنتاميسين بتثبيط تصنيع الجدار الخلوي البكتيري.

الاستخدام: يستخدم هذا المضاد الحيوي في علاج عدة امراض منها: التهاب الرئتين Penumonia والتهاب المرارة Cholecystitis والتهاب حويص الكليتين الحاد acute pyenloephritis والتهاب البروستات Prostatitis .

## البنسيلين Penicillin

الصيغة الكيميائية:  $C_6H_{11}N_2O_4S$

## الزمرة : البيتالاکتام $\beta$ -lactam

التأثير: يعتبر البنسيلين مضاد حيائي قاتل للجراثيم حيث يقوم بالتداخل ومنع عملية بناء الجدار الخلوي. وذلك بربط نوعين من الاحماض الامينية هما (الانين و جليسين) بسلسلة مختلفة من متعدد البيتيد المكون للجدار الخلوي البكتيري.

موقع التأثير: ايقاف تصنيع الجدار الخلوي البكتيري.

الاستخدام: يستخدم هذا المضاد الحيائي لعلاج المكورات الرئوية والمكورات السحائية ( Walling, Anne D, ) (2006).

## بكتيريا *Escherichae coli*

تعتبر بكتيريا الاشيرشيا كولاي (*E.coli*) مستوطن طبيعي (Normal flora) في الامعاء الدقيقة والغليظة للانسان وكذلك الحيوان . اكتشفت اول مرة من قبل العالم (Escherich) عام ١٨٨٥ . تتواجد باعداد كبيرة في البراز وقد تتواجد بصورة طبيعية في المياه والتربة وكذلك المواد الغذائية تتميز هذه البكتيريا بوجود سلالات عديدة منها المتحرك هوائية المعيشة او لاهوائية اختيارية تتراوح درجة حرارة نوها من (٣٠ - ٣٧) درجة مئوية . تميل للعيش في البيئة القاعدية البسيطة والتي تتراوح فيها الدالة الحامضية PH (٧,٢ - ٧,٥)

هنالك بعض السلالات الممرضة من هذه البكتيريا والتي لها القدرة على احداث الضرر وتسبب العديد من الامراض مثل التهاب الامعاء او المجاري البولية والمرارة وقد تسبب تحلل كريات الدم الحمراء مما يسبب الاسهال الدموي وارتفاع درجة حرارة الجسم . درجة الحرارة العالية تسبب هلاك البكتيريا ففي درجة حرارة (٥٥) درجة مئوية تموت البكتيريا خلال ساعة واحدة وفي درجة حرارة (٦٠) درجة مئوية تموت البكتيريا خلال (١٥) دقيقة.

طريقة العدوى بهذا النوع من البكتيريا هو عن طريق تناول المنتجات الحيوانية كاللحم الغير مطبوخ جيداً وشرب الماء الغير المعقم والحليب الغير مبستر (Frank, 1988).

في حال حدوث الاصابة بهذه البكتيريا عند الاطفال الصغار فإنها تسبب التهاب الامعاء الشديد المصحوب بحالات مغص معوي والتقيؤ والاسهال الشديد مع ارتفاع درجة الحرارة والتي قد تصل الى (٣٩) درجة مئوية (Kornacki, 1982). حدوث الاصابة عند الكبار وخاصة التهاب الامعاء فإنها قد تتضاعف الى التهاب البريتون أو الزائدة الدودية او السحايا او الكلى .

إن وجود هذه البكتيريا بصورة طبيعية في الامعاء لها القدرة على انتاج بعض الفيتامينات مثل K2, E, B والمهمة لجسم الانسان . وقد اكتشف مؤخراً ان هذه البكتيريا تقوم بكبح نمو البكتيريا السل الرئوي . من الفيتامينات المهمة التي يمكن من خلالها تشخيص الاصابة ببكتيريا (*E.coli*) هي البول والغائط وافرازات الأنف والحنجرة وكذلك تستطيع الحصول على عينات من الاشخاص المتوفين لغرض تشخيص الاصابة بهذه البكتيريا مثل المرارة والكبد والرئة والطحال ومحتويات الامعاء والدم .

العلاج الخاص لهذا النوع من البكتيريا هو اعطاء المحاليل الفسيولوجية عن طريق الوريد لتعويض السوائل المفقودة من الجسم واعطاء بعض المضادات الحياتية الحديثة وبعض الفيتامينات مثل فيتامين C وفيتامين B2, B1 (الانصاري ، ٢٠١١).

## الهدف من البحث:

تقليل الاثار الجانبية الناتجة من استخدام المضادات الحياتية بأيجاد طرق بديل للتاثير على البكتيريا المقاومة للتراكيز الواطئة للمضادات الحياتية ومنها تآزر المضادات الحيوية الفعالة بتراكيز قليلة ومؤثرة في الوقت نفسه.

جدول (١) الاجهزة والادوات المختبرية المستعملة والشركة المصنعة لها.

الشركة المصنعة (المنشأ)	أسم الجهاز
Marubeni (Japan)	١. حاضنة Incubator
Diakyo	٢. مؤصدة Autoclave
Concord (Labanon)	٣. ثلاجة Refrigerator
Gallen Kaamp ; (Engaland)	٤. ميزان حساس الكتروني Sensitive electronic balance
John Botten ; Engaland	٥. الناقل الزرع القياسي Standard Wire loop
South Korea; (labtech)	٦. كابينة الزرع المجهرية Laminar flow cabinet
Al-Hani (USA)	٧. اطباق بلاستيكية Disposable petri dishes
BBL; (USA)	٨. دورق مخروطي Conical flasks

أولاً: البكتيريا المستخدمة : استخدمت بكتيريا E.coli حاوية على طفرة وراثية (حساسة جزئياً للفانكوميسين)  
 لدراسة التآزر بين المضاد الحيوي Vancomycin و ٣ أنواع من المضادات الحيوية التي تعتبر من فئات وظيفية مختلفة

المضاد	التركيب الكيميائي والزمرة	موقع التأثير	ثانياً: الاستخدام
<b>Vancomycin</b>	<b>C<sub>66</sub>H<sub>75</sub>CL<sub>2</sub> NaO<sub>24</sub></b> <b>glycopeptides</b> الببتيدات السكرية	يثبط عملية بناء الجدار الخلوي ويغير من نفاذية غشاء الخلية البكتيرية وكذلك له القابلية على التداخل ومنعتصنيع (RNA)	يعتبر هذا المضاد الحيوي من المضادات النشطة في علاج البكتيريا الموجبة لصبغة كرام الهوائية واللاهوائية . كما ان له تأثير مؤازر عندما يستخدم مع مضادات حيوية اخرى كما يستعمل في علاج الجهاز التنفسي وخاصة القسم الاسفل والتهاب الامعاء والقولون
<b>Gentamycin</b>	<b>C<sub>21</sub>H<sub>43</sub>O<sub>7</sub></b> الامينوكلوكوزيدات	يقوم الجنتاميسين بتثبيط تصنيع الجدار الخلوي البكتيري	يستخدم هذا المضاد الحيوي في علاج عدة امراض منها التهاب الرئتين <b>Pneumonia</b> والتهاب المرارة <b>cholecystitis</b> والتهاب حويض الكليتين الحاد <b>acute pyelonephritis</b> والتهاب البروستات <b>Prostatitis</b>



<b>Pencillin</b>	<b>C6H11N2O4S</b> <b>Betalactams</b> البيتالاکتام	ایقاف تصنیع الجدار الخلوي البكتيري	يستخدم هذا المضاد الحياتي لعلاج المكورات الرئوية والمكورات السحائية
<b>Amoxicillin</b>	<b>C16H19N3O5S</b> مضادات البيتالاکتام	يثبط تكوين جدار الخلية البكتيرية من خلال تثبيط الترابط بين سلاسل البوليمرات الببتيدوكلايكان الخطية والتي تكون جزء مهم من الخلايا البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام	يستخدم لعلاج عدة امراض منها التهاب القصبات الهوائية ، التهاب الرئتين، التهاب الانف، والاذن والحنجرة ، التهاب المجاري البولية، التهاب الجلد

ثالثاً: لغرض تحقيق التازر بين المضادات الحيوية لقتل البكتيريا ، تم مزج التراكيز مع بعضها . تم مزج المضاد الحيوي Vancomycin مع كل من المضاد الحيوية التالية Amoxicillin , Penicillin, Gentamycin حيث استخدمت طريقة الاقراص في عملية المزج وكانت طريقة المزج كالاتي :

\*في تركيز (10mm) تم مزج (50ml) من تخفيف Vancomycin مع (50ml) من تخفيف المضاد الحيوي Antibiotic

\*في تركيز (20mm) تم مزج (200ml) من تخفيف Vancomycin مع (200ml) من تخفيف المضاد الحيوي Antibiotic

\*في تركيز (50mm) تم مزج (250ml) من تخفيف Vancomycin مع (250ml) من تخفيف المضاد الحيوي Antibiotic

رابعاً:

١. تحضير محاليل المضادات الحيوية : تم تحضير stock (المحلول الخزين ) لكل من المضادات . وتم تحضيره كالاتي:

-إذا كان التركيز الكلي للمضاد (٥٠٠) يتم اذابة (٢,٥) ملي غرام في (1ml) من الماء المقطر.

-إذا كان التركيز الكلي للمضاد (٦٥٠) يتم اذابة (٣,١) ملي غرام في (1ml) من الماء المقطر .

تم استخدام ثلاث محاليل لكل مضاد وتم عمل هذه المحاليل كالاتي:

➤ تركيز (10mm) : في بيكر زجاجي تم مزج (900ml) من الماء المقطر مع (100ml) من (stock) المحلول الخزين للمضاد .

➤ تركيز (20mm): في بيكر زجاجي تم مزج (600ml) من الماء المقطر مع (400ml) من (stock) المحلول الخزين للمضاد.

➤ تركيز (50mm): في بيكر زجاجي تم مزج (500ml) من الماء المقطر مع (500ml) من (stock) المحلول الخزين للمضاد.

## ٢. الاوساط الزرعية

تم استخدام وسط MacConkey agar كوسط زرعى لتنمية بكتيريا E.Coli وكانت الشركة المصنعة لهذا الوسط هي (Oxoid) . وتم تحضير هذا الوسط الزرعى حسب تعليمات هذه الشركة المصنعة له وكما مثبت على العبوة . وتم التحضير كالاتي:

تم وزن (١٣,٥)غم من الباوذر الخاص بالوسط وتم اذابة الباوذر في ٢٥٠ مل من الماء المقطر وتم تعقيمه بجهاز المؤصدة (Autoclave) وعند درجة حرارة (١٢١م) وضغط (١٥ باوند) لمدة ٦٠ دقيقة.

## ٣. المحاليل البكتيرية:

بعد اكمال عمل التخافيف لكل من المضادات التالية Vancomycin, Penicillin, Gentamycin, Amoxicillin ، تم الحصول على ١٢ تخفيف ، ٣ تخافيف لكل مضاد بعد تحضير الوسط الزرعى MacConky agar تم اخذ ثلاث اطباق بتري وتم صب الوسط الزرعى فيها وتركه فترة ليتصلب في الاطباق بواسطة Loop تم تخطيط ونشر بكتيريا *E.coli* على الوسط الزرعى، بعدها تم غمس اوراق ترشيح مثقوبة على شكل اقراص للمضادات في التخافيف حيث تم غمس ورقة ترشيح واحدة في كل تخفيف و وضعها في طبق بتري حيث كانت كل ورقة ترشيح موضوعة في الطبق تدل على تركيز معين للمضاد. وتم تسجيل كل

المعلومات الخاصة بتركيز المضاد على الطبق من الخارج وبعدها تم تغليف الاطباق بنايلون شفاف حفاظاً على الاطباق من التلوث وتم حضن الاطباق بشكل مقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧° ولمدة ٢٤ ساعة. بعد مرور ٢٤ ساعة من حضن الاطباق في الحاضنة تم تسجيل نتائج تثبيط بكتيريا *E.coli* من قبل تراكيز المضادات المستخدمة.

بعد الحصول على نتائج لتثبيط بكتيريا *E.coli* من قبل المضادات المستخدمة تم مزج مضاد Vancomycin مع المضادات التالية (Gentamycin ، Amoxicilin ، Penicillin) وتم المزج بنسب وتراكيز محددة . وذلك لغرض تحقيق التآزر بين المضادات الحياتية لقتل البكتيريا. بعد اكمال مزج المضاد Vancomycin مع المضادات الاخرى تم الحصول على ٩ تخافيف. تم غمس اوراق ترشيح متقوية على شكل اقراص للمضادات في التخافيف. حيث تم غمس ورقة ترشيح واحدة في كل تخفيف و وضعها في اطباق بتري حاوية على الوسط المغذي MacConky agar ويحتوي هذا الوسط على بكتيريا *E.coli* تم تخطيطها ونشرها مسبقاً قبل وضع اقراص المضادات وتم التخطيط للبكتيريا على الوسط تم بواسطة Loop وتم تسجيل كل المعلومات الخاصة بتركيز المضاد على الطبق من الخارج وبعدها تم تغليف الاطباق بنايلون شفاف حفاظاً على الاطباق من التلوث وتم حضن الاطباق بشكل مقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧° ولمدة ٢٤ ساعة . وبعد مرور ٢٤ ساعة من حضن الاطباق في الحاضنة تم تسجيل نتائج تثبيط بكتيريا *E.coli* من قبل تراكيز المضادات المستخدمة.

## النتائج والمناقشة :

جدول (١) تأثير تراكيز متعددة من المضادات الحيوية على بكتيريا *E. coli*

Antibiotic	C 10mM	C 20mM	C 50mM
Penicillin	0 Zero	5mm	20mm
Gentamycin	10mm	40mm	80mm
Amoxicillin	20mm	50mm	60mm

\* C = concentration

- عند اختبار المضاد الحيوي Penicillin لاحظنا عدم وجود اي نسبة تثبيط لنمو البكتيريا في تركيز (10mM) في حين ارتفعت قليلاً عند (20mM) ليصل قطر التثبيط إلى (5mm) وعند (50mM) الى (20mm).

- كان اكبر قطر تثبيط تم الحصول عليه من تركيز (50mM) في المضاد الحيوي Gentamycin حيث بلغ قطر التثبيط (80mm)، في حين لم يلاحظ اي تأثير قاتل لهذه المضادات حتى بأعلى تركيز مستخدم.

- والمضاد الحيوي (Amoxicillin) كان قطر التثبيط (20mm) عند تركيز (10mM) وعند تركيز (20mM) كان قطر التثبيط (50mm) وفي تركيز (50mM) كان قطر التثبيط (60mm)

جميع النتائج التي ظهرت في الجدول رقم (١) أعلاه تمت ضمن درجة حرارة ٣٧م ولمدة ٢٤ ساعة .

جدول (٢) تأثير تراكيز متعددة من Vancomycin على بكتيريا *E. coli*

المضاد	قطر التثبيط عند تركيز 10 mM	قطر التثبيط عند تركيز 20 mM	قطر التثبيط عند تركيز 50 mM
Vancomycin	0.5mm	1.5mm	3mm

المضاد الحيوي Vancomycin كان اكبر قطر تثبيط تم الحصول عليه في تركيز (50 mM) حيث بلغ قطر التثبيط (3mm)، كما موضح في الجدول (٢) أعلاه .

### نتائج تأزر المضادات الحيوية قيد الدراسة مع Vancomycin

أظهرت النتائج عند مزج Vancomycin مع Penicillin عند تركيز 10 mM كان قطر التثبيط (4 mm) وعند تركيز (20 mM) كان قطر التثبيط (10mm)، أما عند تركيز (50 mM) كان قطر التثبيط (15mm).

- عند مزج المضاد الحيوي Vancomycin مع Gentamycin عند تركيز (10 µM) كان قطر التثبيط (10mm) وعند تركيز (20 mM) كان قطر التثبيط (15mm) ، أما عند تركيز (20 mM) أرتفع الى (30mm).

- اما نتيجة تأزر Vancomycin مع Amoxicillin عند تركيز (10mm) كان قطر التثبيط (10mm) وعند تركيز (20 mM) كان قطر التثبيط (15mm) ، أما عند تركيز (50 mM) فقد سجل أعلى قطر التثبيط بلغ (20mm).

كان أكبر قطر تثبيط تم الحصول عليه عند تأزر المضادين Vancomycin ، Gentamycin عند تركيز (50mM) حيث كان قطر التثبيط (30mm)، ولم يلاحظ اي تأثير قاتل عند مزج المضاد Vancomycin مع المضادات المستخدمة حتى بأعلى تراكيز مستخدمة.

### المناقشة / الاستنتاجات / التوصيات

تكون بكتيريا السالبة لصبغة غرام (G-) عادة مقاومة للمضاد الحيوي (Vancomycin) بسبب عدم قابلية هذا المضاد الحيوي على اختراق الغشاء الخارجي للبكتيريا.

استخدمنا بكتيريا *E.coli* معزولة من أطفال مصابين بالاسهال من مستشفى الديوانية العام وتمت مقارنة النتائج مع سلالة *E.coli* الحاوية على طفرة وراثية (حساسة جزئياً ل Vancomycin ) تم الحصول عليها من معهد الوراثة /جامعة بغداد لدراسة التأزر بين المضاد الحيوي (Vancomycin) و ٣ أنواع من المضادات الحيوية التي تعتبر من فئات وظيفية مختلفة.

حيث تم ملاحظة ان هناك تآزر قوي بين (Vancomycin , Gentamycin) وكذلك (Vancomycin, ) حيث ظهرت هذه التأثيرات قوية بما يكفي لإظهار نشاط المضاد الحيوي (Amoxicillin) ضد بكتيريا (*E.coli*) بتركيز منخفضة الى (6.25) g/ml.

أثبتت الدراسات ان المضاد الحيوي الفانكوميسين (Vancomycin) له تأثير فعال ضد بعض مسببات الامراض الموجبة لصبغة كرام المقاومة للأدوية ومع ذلك فإن الحجم الكبير ل (glycopeptide) يحول دون فعاليته المفيدة ضد الالتهابات البكتيرية السالبة لصبغة كرام (Nikaido , 1989) .

ان تآزر المضادات الحيوية مع (Vancomycin) ضد البكتيريا السالبة لصبغة كرام سيكون قيماً وفعالاً في علاج العدوى التي تسببها العوامل الممرضة المقاومة للمضادات الحياتية مثل بكتيريا (*E.coli*) (Lockhart , 1993).

اجناس *E.coli* بعضها حاوية على طفرة وراثية متمثلة بالجينات المؤثرة على الغشاء الخارجي للبكتيريا خاصة جين (*surA*) وجين (*smpA*) حيث وجد أنها تزيد من حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي Vancomycin ، كذلك وجد في الأونة الأخيرة ان سلالات (*E.coli mutants*) التي تفتقر إلى (DCD) (dextine deoxy cytidine) أنها أكثر حساسية للفانكوميسين (Vancomycin) (Justice, 2005; Tamae, 2008; Kang , 2014).

يعد انتشار البكتيريا المرضية المقاومة للأدوية مشكلة كبيرة تهدد الصحة العامة ، التحدي هو ايجاد طرق بديلة وجديدة للتغلب على ظاهرة مقاومة المضادات الحياتية وعلى وجه الخصوص مقاومة البكتيريا السالبة لكرام المضادات الحيوية التي تحجب غشائها الخارجي بفعل التأثير العديد من الادوية الفعالة ، وبالتالي ركز الكثير من الباحثين على المنتجات الطبيعية المشتقة من مصادر غير تقليدية مثل النباتات (Appendino, 2012; Shiu ,Rahman, 2012; Gibbons, 2008)، الكائنات الدقيقة البحرية (Jang , Nam , 2013) و الحشرات (Freitak, Knorr, 2012).

الاستراتيجيات الجديدة تتطوي على صنع مشتقات كيميائية جديدة من قائمة المضادات الحيوية على اساس التصميم الهيكلي للمضادات الحيوية باستخدام معلومات مثل البنية ثلاثية الأبعاد (Lee & Hurdle, 2014; Carney & Schmitz, 2014)، أو ربط الادوية بالببتيدات التي يمكن ان تمر عبر الاغشية لتسهيل دخولها الى الخلية (Geller & Greenber, 2014).

الاستراتيجيات الاندماجية للمضادات الحيوية توفر مدى واسع من العلاجات الدوائية ( Cottarel & Wierzboewski, 2007)، ايضاً اثبت (Collins and Coworkes) أن نواتج محددة يمكن ان تحفز عمل (aminoglycosides) على بكتيريا *E.coli, Staphylococuss aureus* (Allison et al. , 2011).

كذلك يعتبر أحد العوامل المحفزة يقوم بتنبيه البكتيريا السالبة لصبغة غرام بتأثير المضاد الحيوي الفانكوميسين (Vancomycin). الذي يعتبر مضاد حيوي غليكوبيبتيدي (glycopeptide antibiotic) الذي يعمل على ازالة او عرقلة بلمرة الببتيدوكلايكان (peptidoglycan polymerstain) عن طريق الارتباط بـ (peptidyl-D-alanine) (Baron & Williams, 1984) في حين لا يستطيع ان يخترق الغشاء الخارجي.

في هذا الصدد أظهر (Coworkers and Collins) أن الفضة تسبب تحسس *E.coli* لمجموعة المضادات الحيوية بما في ذلك الفانكوميسين (Vancomycin) (Morones et al . 2013)، بينما (Wink and Coworkers) أثبت أن (EDTA) تحفز نشاط (Vancomycin plus themol) (Hamoud et al., 2013).

في هذا البحث فحصنا نتائجنا بدايةً بتأثير المضادات الحيوية بصورة منفردة كما في الجدول (١) وبصورة مزدوجة كما في الجدول الثاني (٢). بالنسبة للمضادات المتآزرة تم مزجها كلاً حسب آلية عمله وتأثيره على البكتيريا وجدارها الخلوي حسب ما حصلنا عليه من المصادر العلمية المعتمدة.

في الواقع اظهرت المضادات المثبطة لتخليق الجدار الخلوي مثل (Amoxicillin, Gentamycin) تفاعلات ظاهرة ونتائج جيدة في تثبيط نمو البكتيريا المستخدمة حسب التراكيز المذكورة سابقاً.

في نهاية المطاف. هدفت دراستنا الى اظهار كيفية استخدام التآزر بين المضادات الحياتية ضد البكتيريا السالبة لصبغة كرام والتي اغلبها بكتيريا مقاومة للمضادات الحيوية ، حيث تدعم بياناتنا والمعلومات التي حصلنا عليها ان الفانكوميسين (Vancomycin) يعمل بطريقة تختلف جوهرياً عن تلك المستخدمة في المضادات الحيوية الاخرى المثبطة لجدار الخلية البكتيرية. في الوقت الذي يركز فيه بحثنا على فهم المبادئ البيولوجية اساسية لعملية التآزر للتقليل من تأثير التركيز العالي للمضادات الحيوية على جسم الانسان فإن هناك قضايا سريرية يجب معالجتها بمزيد من الدراسات والبحوث. والاهم من ذلك هو أن هنالك حاجة ملحة لاكتشاف مضادات حيوية جديدة يمكن استخدامها بتركيز قليلة ومؤثرة على البكتيريا واكتشاف طرق يمكن من خلالها البدء بالتفكير في استخدام الفانكوميسين (Vancomycin) ضد هذه البكتيريا.

## المصادر العربية :

- عبد الرحمن ، سعيد ناجي (٢٠٠٨) دراسة تأثير المضادات الحيوية البركة والثوم على جرثومة الايشيريشيا كولاي المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية في مستشفى الاطفال الجامعي . رسالة جامعية.
- عباس حسين منير الربيعي ، ٢٠١١. الية عمل المضادات الحياتية.

## المصادر الاجنبية :

- Appen G, Gibbons, S. , Giana A, Pagani A., Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM, 2008. Antibacterial cannabinoids from cannabs sativa:a structure–activity study .J Nat prod 71:1427–1430
- shiuwk , rahman mm ,curry J ,stapleton ,ziahm , malkinson JP,gibbons s.2012.antibacterial acylphloroglucinols from hypericum olympisum J Nat prod 75:336–343.
- Jang KH, Nam SJ , locke JB , Kauffman CA, Beatty DS, paul LA,fenica LW.2013.anthracycline ,a potent anthrax antibiotic from amarinederived actinomycete. Anyew chem Int Ed Engl 52:7822–7824.
- Freitag D, Knorr E, Vogel H, Vilcinskas A. 2012. Gender– and stressor–Specific micro RNA expression in Tribolium castaneum . Biol let 8 : 308–311.
- Lee RE, Hurdle JG, Liu J., Bruhn DF, Sherman MS, Vaddady PK, Zeng Z, QiJ, Akbergenov R, Das S, Madhura DB , Rathic, Trivedi A. , Villellasc, Lee RB, Rakesh, Waid yarachchi SL, Sun D, Mc Neil MR, Ainsa, JA., Boshoff HI, Gonzalez– Juarrero M, Meibohm B, Boettger Ec , Lenaerta AJ. 2014. Spectinamidea: anew class of Semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux. Nat Med 20: 152–158.



- Carney DW, Schmitz KR, Truong JV, Sauer RT, Sello J , 2014. Restriction of the Conformational dynamics of the Cyclic acyldepsi- peptide antibiotics improve their antibacterial activity. *J Am Chem Soc* 136 : 1922 –1929.
- Geller BL, Greenberg DE . 2014. Peptide- Conjugated Phosphorodiamidate. *Their Deliv* 5: 243– 245.
- Frank J.F. 1988. Enteropathogenic Escherichia Coli. *Food Technol* 42(4): 192– 193.
- Kornacki, J.L. and Marth E.H 1982. Foodborne illness caused by Escherichia coli : A review . *J. Food Protect* 45: 1051–1067.
- Adams. M.R and Moss M. O. 1995 . *Food Microbiology– The royal Society of chemistry*. Cambridge, U.K.
- Stamm. 1984.
- Doyle, M. P and Schoeni , J.L 1984 Survival and growth Characteristics of E.Coli associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ Microbiol* 48(4) 855.856. –
- Nikaido H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents chemother* a UCLA Faculty Devel Opment Award. –
- Lock hart SR, Abramson MA, Bee kmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ, Quinn JP, Doern GV. 2007. Antimicrobial resistance among gram- negative bacilli causing infections in intensive care unit Patients in the united states between 1993 and 2004. *J clin Microbial* 45: 3352 – 3359.
- Cottarel G, Wierzbowski J. 2007. Combination drugs , an emerging option for antibacterial therapy . *trends Biotech* 25: 547–555.
- Allison KR, Brynildesn MP, Collins J J. 2011. Metabolite-enabled eradication od bacterial Persisters by aminoglycosides. *Nature* 473: 216–220.

- Barna JC, Williams DH. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of Vancomycin group. *Annu Rev Microbiol* 38: 339–357.
- Morones–Ramirez JR, Winkler JA, Spina CS, Collins JJ. 2013. Silver enhances antibiotic activity against Gram negative bacteria. *Sci. Transl Med* 5:190 ra 81.
- Hamoud R, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. 2013. Synergistic interactions in two– drug and three drug combinations (thymol, EDTA and Vancomycin) against multidrug resistant bacteria including E.coli. *Phytomedicine* 21 : 443–447.
- Justice SS, Hunstad DA , Harper JR , Duguay AR, Pinker JS. BaunJ Frieden C, Sihavy JJ, Hultgren SJ. 2005. Periplasmic peptidyl prolylcis– Trans iso merases are not essential For Viability , but Sur A is required for pilus biogenesis in E.coli. *J Bacteriol* 187: 7680–7686.
- Tamae C, Liue A, Kim K, Sitz D, Hong J, Beket E, Bui A, Solalmani P, Tran KP, rang H, Miller JH. 2008. Determination of antibiotic hypersensitivity among 4000 single gene Konckout mutants of E.coli. *J Bacteriol* 190: 5981 – 5988.
- Kang TM, Yuan J, Zhou A, Beppler C, Miller J H. 2014. Deoxycytidine deaminase – deficient E.coli strains disply acute Sensitivity to cytidine, adenosine , and guanosine and increased sensitivity to arrange of antibiotics , including Vancomycin. *J Bacteriol* 196: 1950– 1957.
- Boyle– ravra S, Daum RS (2007). Community acquired methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* the role Pantou–Valentine Leukocidin. *Lab invest.* 87: 3–9.
- Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crecy – Laqrad Y, Craig WA, Romesberg FE(2005). Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotics resistance. *Plos Bio.* 36): e176.
- Maria Soledad Fernandez Alfonso. Mariano Ruiz Gayo. *Fundamentos de Farmacologi Basica Clinic*. Puplished by steve Bob Billy Joe, 2005. Page(232).

- Thornhill, MH. 2011. Impact of the nice guideline recommending cessation of antibiotic prophylaxis for prevention of infective endocarditis before and after study. *MBJ (clinical research)* 342: d 2392.
- Levine, D (2006). Vancomycin: A History *clin infect Dis.* 42: 55 – 512.
- Walling, Anne D. 2006. Tips From other Journals – Antibiotic use During Pregnancy and Lactation. *American Family Physician.* 2015.