مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (1) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (1) 2016

تقييم فاعلية بعض الصادات الحيوية في منع التصاق بعض أنواع الجراثيم المعزولة من الغلاف الحيوي(Biofilm) in vitro

الدكتور فهيم عبد العزيز*
الدكتورة لينة الأمير**
بشرى العيسى***

(تاريخ الإيداع 3 / 12 / 2015. قبل للنشر في 11 / 2 / 2016)

□ ملخّص □

يهدف البحث إلى تقييم فاعلية بعض الصادات الحيوية في منع التصاق بعض الأنواع الجرثومية المعزولة من الغلاف الحيوي (Biofilm) المتشكل في أنظمة مناهل بعض مزارع الدجاج البياض ودجاج اللحم(الفروُج)، درست فاعلية خمس صادات حيوية (Erythromycin،Fluoromphinicol، Gentamycin، Ciprofloxacin، Doxycycline) ضد ثلاث أنواع جرثومية هي (المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، الإشريكية القولونية *Escherichia coli*، العُطيفة الصائمية *Campylobacter jejuni*) وذلك باستخدام طبق المعايرة (المايكروتيتر) MTP، وتم قياس النتائج بـجهاز (الإليزا) قارئ الميكروتيتر Microplate reader LT-4000 (UK) لقياس قيم الكثافة الضوئية Optical Density (OD) عند طول الموجة 630 نانوميتر.

أظهرت النتائج وجود اختلافات متفاوتة في حساسية الجراثيم للصادات الحيوية المستخدمة، فكانت العنقودية الذهبية مقاومة لكل الصادات الحيوية المدروسة ، وكانت أعلى فاعلية مع الدوكسي سايكلين (26.3%)، بينما كانت نتائج الجنتامايسين (15.2%)، في حين لم يُبدِ الفلورومفينيكول فعالية واضحة في منع الالتصاق (1.8%)،أما ا لأرثرومايسين والسيبروفلوكساسين فقد كان تأثيرهما واضح في زيادة الالتصاق وتشكيل غلاف حيوي.

بالنسبة لفاعلية الصادات المضادة لالتصاق الإشريكية القولونية والعُطيفة الصائمية كانت أعلى مع الفلورومفينكول إذ بلغت (29.5%) و(31.8%) على التوالي وتناقصت فاعليته مع تناقص تركيزه (17.9%) و(23.5%)، أما الدوكسيسايكلين فقد كان تأثيره واضحاً في تحريض الجرثوم على زيادة الالتصاق وتشكيل الغلاف الحيوي بكل التراكيز. كما أظهرت النتائج وجود مقاومة للإريثرومايسين من قبل جراثيم التجربة، وارتفاع نسبة المقاومة مقابل كل الصادات الحيوية المدروسة باستثناء الفلورفينيكول الحديث الاستعمال، وتراجع في فعالية كل من الجنتامايسين والدوكسي سايكلين ضد الجراثيم السلبية لصبغة غرام (الإشريكية القولونية والعُطيفة الصائمية).

الكلمات المفتاحية: غلاف حيوي، جراثيم، صادات حيوية، طبق المعايرة المكروية(المايكروتيتر)

** أستاذ – قسم الإنتاج الحيواني– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
***أستاذ مساعد/رئيس قسم التقانات الحيوية الغذائية والصناعية – الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق– سورية.
*طالبة دراسات عليا (دكتوراه)– قسم الإنتاج الحيواني – كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (1) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (1) 2016

Evaluation the Efficacy of some Antibiotic to Prevet the adherence of some Isolated bacteria from biofilms in vitro

Dr. Abdelaziz F.[*]
Dr. Lina Alamir[**]
Bushra ALissa[***]

(Received 3 / 12 / 2015. Accepted 11 / 2 /2016)

□ ABSTRACT □

The research aims to evaluate the efficacy of some antibiotics to prevent the biofilm formation by some isolated bacteria from biofilms in poultry watering systems in poultry farms (broiler flocks, laying hens) It had worked on three bacteria species, isolated from biofilm in poultry watering systems were *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni*. We evaluated efficacy of five different antibiotics, fluorophinicol, Erythromycin, *Ciprofloxacin*, Gentamycin, Doxycycline. Bacterial identification and Disk diffusion test were carried out through standard procedures. Evaluation of the anti adherence efficacy of the antibiotics were carried out by using The microtiter plate assay and then the OD was measured at 660 nm using an ELISA reader. The results indicated the relative differences antibiotic resistance within the biofilm to different antibiotic. *Staphylococcus aureus* was resistant to all the studied antibiotics, the highest effectivenees with Doxycycline(26.3%) followed by Gentamycin (15.2%) in second place, while fluoromphinicol didn't give clear effectivenss in preventing adhesion of bacteria(1.8%), either Erythromycin and *Ciprofloxacin influence was evident in increased adhesion and forming the biofilm* For effective antibiotics anti adhesion *Escherichia coli* and *Campylobacter* was higher with fluoromphinicol (29.5%), (31.8%) which decreasing effectivenss(17.9%), (23.5%). Either Doxycycline had clear impact on inciting the bacterium increased adhesion and formation the biofilm in all cconcentrations. The results also showed the presence of high bacterial resistance against and high resistance against to all the antibiotic except fluoromphinicol which new usage and Doxycycline in the effectivenss, and decreased effectivenss in each of Gentamycin against negative gram bacteria.

Keywords: Biofilm, bacteria, antibiotics, Microtiter Plate.

[*] **Professor, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[**] **Assistant Professor , National Commission of Biotechnology , Damascus, Syria.**
[***] **Postgraduate Student, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة :

يُعرف الغلاف الحيوي الجرثومي Bacterial Biofilm بأنه تجمّعات كثيفة معقدة ومنظمة من الخلايا الجرثومية المحبوسة داخل قالب من البوليميرات خارج الخلوية Extracellular polymeric substances والمتكون بشكل أساسي من عديدات السكاريد الخارجية التي تنتجها الخلايا و تتواجد غالباً بحالة ارتباط(التحام) غير معكوس irreversibly مع مناطق تماس السطوح المختلفة على شكل مجاميع متعددة الخلايا . ويعد الغلاف الحيوي شكل من أشكال الحماية والبقاء الإستراتيجي surviving strategy للجراثيم في الظروف غير الملائمة ، إذ يتشكل على مختلف السطوح الحيوية Biotic Surfaces والسطوح الصلبة غير الحية أو الخاملة Inert Surfaces (Simone *et al.*, 2007). يختلف سلوك الجراثيم الموجودة ضمن غلاف حيوي بشكل كبير عن نظرائها من العوالق planktonic cells إذ تبدي تلك الجراثيم اختلافات مظهرية كبيرة عن السلالة الأصلية التي تنمو بشكل حر، وتشمل هذه الاختلافات تغيرات في الحركة و زيادة إنتاج عديد السكاريد الخارجي واستقلاب أقل ومقاومة عالية، ويختلف تعبيرها الجيني فقد وجد أن جينات الحركة تُثبَّط بعد أن تلتصق الجراثيم بالسطح، كما يفوق معدل التبادل في المادة الوراثية ضمن الغلاف الحيوي ذلك الموجود في العوالق مما يسمح بانتشار جينات المقاومة للصادات الحيوية (Donlan and Costerton, 2002; Morar & Morva., 2012).

أثبتت العديد من الدراسات أن الخلايا الجرثومية ضمن الغلاف الحيوي الجرثومي أكثر مقاومة للصادات الحيوية وقد تزداد المقاومة لتصل إلى 100 –1000 ضعف، فيما لو قورنت بنظرائها من العوالق. (Olson *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2007; Allan *et al.*, 2011) . تتم هذه المقاومة بآلية واحدة أو بعدة آليات منها التركيب البنيوي للخلية الجرثومية structure of Bacteria إذ تستجيب الجراثيم للتغيرات المحيطة بها من خلال تغييرات نمطية في إنظيماتها الفعالة، وتركيب جدارها الخلوي وكذلك بالبنى السطحية، وتشمل تلك التغيرات النمطية الجزيئات الهدف للصادات الحيوية، كما تحد سماكة الغلاف الحيوي Biofilm Thickness من الفاعلية العلاجية المرتقبة للصادات الحيوية لأنها تمنع نفوذها من خلال طبقة الغلاف الحيوي الجرثومي السميكة ، بالإضافة إلى أن معدل النمو البطيء والمتغير للجراثيم يجعلها بشكل عام أقل حساسية للصادات الحيوية (Merle *et al.,* 2002; Folsom *et al.*, 2010) .

يمتلك عديد السكاريد الخارجي المنتج من الخلايا المكونة للغلاف الحيوي شحنة كهربائية سالبة لها القدرة على ربط عدد كبير من جزيئات الصادات الحيوية التي تحاول الوصول إلى الخلايا المغموسة Cell Embedded داخل مطرس matrix الغلاف الحيوي (Sala *et al.*, 2012). كما أن ارتفاع النشاط الأنظيمي للخلايا الجرثومية خارج الخلية Extracellular enzymatic activity يساعد في تخريب الصادات الحيوية (Kolari, 2003). في حين أكدت دراسات أخرى أن تغيُّر تراكيز المواد المغذية والظروف البيئية داخل الغلاف الحيوي يؤثر في فاعلية الصادات الحيوية (Konig, 2001). ولقد بيّن استخدام مجهر المسح الليزري المحرقي Confocal Scanning Laser Microscopic (CSLM) أن الصادات يمكن أن تخترق الغلاف الحيوي لكن ليس بالشكل الكافي للوصول إلى الخلايا المتكتلة والمستعمرات المجهرية Microcolony ضمنه، وتؤثر مادة السطح أيضاً في مقاومة الغلاف الحيوي للصادات فقد رصدت تقارير عديدة زيادة مقاومة المكورات العنقودية عندما تكون ملتصقة إلى السطوح البلاستيكية (Alamoury, 2001).

إن آلية مقاومة الغلاف الحيوي للصادات الحيوية معقدة بشكل كبير وغير واضحة أو مفهومة بعد لأنها تتأثر بعوامل كثيرة وتختلف بشكل كبير من جراثيم إلى أخرى (Lewis *et al.,* 2001; Mah & O'Toole 2011) ويشكل الاستخدام المتزايد للصادات الحيوية بهدف الوقاية أو العلاج من الأمراض المعدية عند الدواجن أو عند استعمال البعض منها كمنشطات نمو growth promoters مشكلة كبيرة في جميع أنحاء العالم، إذ كانت مستويات الصادات الحيوية في تغذية الدواجن تتراوح بين 5– 10g /كغ في عام 1950 وزادت بنسبة عشرة إلى عشرين ضعف منذ ذلك الحين (Apata ., 2009). ويتواكب هذا الاستخدام الواسع للصادات الحيوية بمخاطر متعددة تأتي في مقدمتها تطور المقاومة الدوائية للجراثيم الممرضة للدواجن والتي تتعداها ليشمل الميكروفلورا الطبيعية والممرضة عند الدواجن (نيصافي،2009 ;2002 , Mc Ewen *et al*) .

أهمية البحث وأهدافه :

أصبح مؤكداً الدور الهام للغلاف الحيوي كمصدر للعدوى بمسببات الأمراض الجرثومية عند الدواجن، ومقاومة الجراثيم للصادات الحيوية مما يشكل خطورة صحية وإنتاجية في مجال صناعة وإنتاج الدواجن، ينتج عنها خسائر اقتصادية كبيرة متعلقة بهدر الأدوية من الصادات الحيوية واستبعاد أو نفوق الطيور المريضة. ولذلك كان هدف البحث تقييم فاعلية بعض الصادات الحيوية المستخدمة بشكل واسع لأغراض وقائية أو علاجية في مزارع دجاج اللحم والبيض في سوريا، في منع بعض الأنواع الجرثومية من تشكيل غلاف حيوي (biofilm) في المختبر In vitro باستخدام طريقة المعايرة المكروية (المايكروتيتر MTP) وتحديد مستوى تأثير الصادات المدروسة تحت شروط المختبر، للمساهمة في تثبيط تآزر الجراثيم المشكلة للغلاف، وللمساهمة بوضع الإجراءات الوقائية والعلاجية الناجعة إذا اقتضى الأمر ضد مسببات الأمراض الجرثومية الموجودة في الغلاف الحيوي لتوصيلات مياه المناهل في مزارع الدواجن.

طرائق البحث ومواده:

نفذ البحث في مخبر الدواجن بكلية الزراعة في جامعة تشرين، ومخبر التقانة الحيوية الغذائية والصناعية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق خلال الفترة الممتدة من كانون ثاني – كانون أول من العام 2014.

الجراثيم المعزولة المستخدمة

استخدمت في الاختبارات ثلاثة أنواع من الجراثيم :المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، الإشريكية القولونية *Escherichia coli* ، العُطيفة الصائمية *Campylobacter jejuni*، تم عزلها من الغلاف الحيوي المتشكل داخل أنابيب المناهل في بعض مزارع الدواجن (فروج ودجاج بياض)، الموزعة في مناطق مختلفة من الساحل السوري، يُتبع فيها نظام الرعاية الأرضية ونظام الرعاية في أقفاص ويستخدم بعضها نظام مناهل آلية معلقة hanging automatic watering والبعض الآخر يستخدم نظام مناهل ذات الحلمة الأتوماتيكية Automatic nipple drinkers.

لقد صُنفت الجراثيم وأنواعها في دراسة سابقة (حسب الطرق المرجعية المعتمدة) الخصائص الزرعية على الأوساط العامة والنوعية (الانتقائية والتمييزية) وصبغة غرام ومجموعات التنميط الجرثومي API 20 E, API Staph, API Campy] API من الشركة الفرنسية (bioMérieux)، ثم حفظت في وسط المرق المغذي مع

الغليسرين (50 مل غليسرين + 50 مل المرق المغذي) في المجمدة بالدرجة – 20 مْ . نُشطت العزلات الجرثومية بإعادة الزرع قبل كل تجربة في وسط (BHIA) وحُضنت عند الدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة، وبعدها تم تحضير معلق جرثومي subculture لكل نوع يعادل (10^5– 10^6 CFU/ml) والذي يقابل 0.5 في أنابيب ماكفرلاند. وقد فُحصت العزلات الجرثومية من ناحية تحسسها للصادات الحيوية باستعمال أقراص التحسس للصادات الحيوية حسب طريقة Bauer and Kirby Technique (Hudzicki, 2009)، وتم العمل فقط على العترات المقاومة ويظهر الجدول(1) العترات الجرثومية المصنفة بحسب دليل الـ [API 20 E, API Staph, API Campy].

الجدول(1)العترات الجرثومية المصنفة بحسب دليل الـ [API 20 E, API Staph, API Campy].

العترات الجرثومية المعزولة	الوسط الانتقائي	صبغة غرام	API	الرقم حسب Api
Escherichia coli	MacConkey Agar	_	API 20 E	144572
Campylobacter Jijuni	آجار الفيبريو كوليراTCBS Agar –	_	API Campy	11168
Staphylococcus aureus	آجار شابمان Mannitol salt agar	+	API Staph	6733751

-الأوساط الزرعية المستخدمة:

مرق مغذي NB Nutrient Broth

مرق موللر هينتون Muller Hinton Broth

آجار مرق المخ والقلب Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

– **طبق (صفيحة) المعايرة الميكروتيتر (MTP) Micro titer plate** المعقم المكون من 96 حفرة ذات قعر مسطح flat bottom وهو جهاز بسيط يسمح بقياس قدرة الجراثيم على الالتصاق واستخدمت في هذه الطريقة المواد الآتية:

- وسط (HiMEDIA) Tryptic soy broth (TSB)
- محلول فوسفاتي ملحي منظم Phosphate buffer saline(Pbs)
- صبغة الكريستال البنفسجية Crystal violet (CV): بتركيز 1%.
- محلول الإيتانول % 95 وأحواض مائية مناسبة لغسل الصفيحة وماصة أوتوماتيكية micropipette وسواتر زجاجية مناسبة.
- جهاز إليزا (قارئ المايكروتيتر) ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Aassay) .

-الصادات الحيوية المختبرة Tested Antibiotics : تم استخدام مساحيق جافة لبعض الصادات الحيوية شائعة الاستخدام أو التطبيق حالياً في معالجة أمراض الدواجن الجرثومية أو الوقاية منها في مزارع الدواجن، وهي : (Fluoromphinicol، Erythromycin، Gentamycin، Ciprofloxacin، Doxycycline).

-تحديد التراكيز العظمى المثبطة للعترات الجرثومية المدروسة:

حضرت تراكيز من الصادات الحيوية المدروسة تمثل التراكيز العظمى المثبطة المتناقصة Maximum concentration in serum (C_{max}, $C_{max1/2}$, $C_{max\ 1/4}$, $C_{max\ 1/8}$) بوساطة طريقة التمديد بالمرق broth dilution method حسب (Wiegand *et al.*, 2008) لتحديد التراكيز العظمى المثبطة للجراثيم (C_{max}) إذ يضاف 0.1 مل من مستنبت سائل لكل نوع من الجراثيم المختبرة عمره 18-24 ساعة إلى 9.9 مل من المرق المغذي مضاعف التركيز وعقيم ثم أضيف 1 مل من هذا المعلق إلى كل أنبوب من سلسلة أنابيب(عشرة أنابيب تحوي 1 مل من تمديدات مضاعفة للصاد المختبر 1، 2، 4 .....) كل واحد يحوي 1 مل من محلول الصاد الحيوي وعدد الجراثيم بحدود (10^5- 10^6 CFU/ml) حضنت الأنابيب بدرجة 37م لمدة 48 ساعة وحددت الـ C_{max} بأنها أعلى تركيز يظهر منع نمو، كررت التجربة مرتين بنفس الوقت وكانت قيم الـ C_{max} للفلوروفنيكول (35ug/ml)، الإرثرومايسين (20ug/ml)، الجنتامايسين (9ug/ml)، السيبروفلوكساسين (0.28ug/ml)، الدوكسي سايكلين (3.6ug/ml).

-طريقة طبق المعايرة المكروية (المايكروتايتر) MTP :

تم وضع 100 ميكرولتر من المعلق الجرثومي في الحفر ثم أضفنا 100 ميكرولتر من تراكيز الصادات الحيوية المراد دراستها، مع إبقاء حفر الشاهد (Control) دون إضافة أي تركيز من الصاد الحيوي العياري، غُطي طبق الاختبار بوساطة ساترة زجاجية عقيمة وتم التحضين لمدة 48 -72ساعة بدرجة 37 م°، ثم غُسل ثلاث مرات ضمن حوض مائي مع التحريك الخفيف للتخلص من الجراثيم غير الملتصقة أضيف 200 ميكرولتر من محلول صبغة بنفسجية الكريستال إلى كل الحفر، وبعد 10 دقائق وضمن حرارة الغرفة غسلت الحفر بماء مقطر معقم للتخلص من كمية الصبغة الزائدة، عند الجفاف التام أضيف 200 ميكرولتر من الإيثانول% 95، وبعد 15 دقيقة وضع الطبق في جهاز الإليزا لقياس قيم الكثافة الضوئية Optical Density (OD) للمحلول والتي تعكس الكثافة الجرثومية الملتصقة عند طول موجة 630 نانوميتر، قُرأت النتائج بمقارنة الكثافة الضوئية للعينة الحاوية على الصاد الحيوي مع الكثافة الضوئية للشاهد أو العياري (الجراثيم بدون الصاد الحيوي) وحُددت النسبة المئوية لفاعلية لصاد الحيوي المضادة للالتصاق بحساب مقدار التناقص في قيمة الكثافة الضوئية والتي تعكس بالمقابل التناقص في عدد الجراثيم الملتصقة، حُسبت النسبة المئوية لفلعلية الصاد الحيوي المضادة للالتصاق الجرثومي وفق المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة لمئوية للالتصاق} = \left[\frac{\text{الكثافة الضوئية للجراثيم الملتصقة بوجود الصاد الحيوي}}{\text{الكثافة الضوئية للجراثيم الملتصقة بغياب الصاد الحيوي}}\right] \times 100$$

النتائج والمناقشة:

أولاً- النتائج:

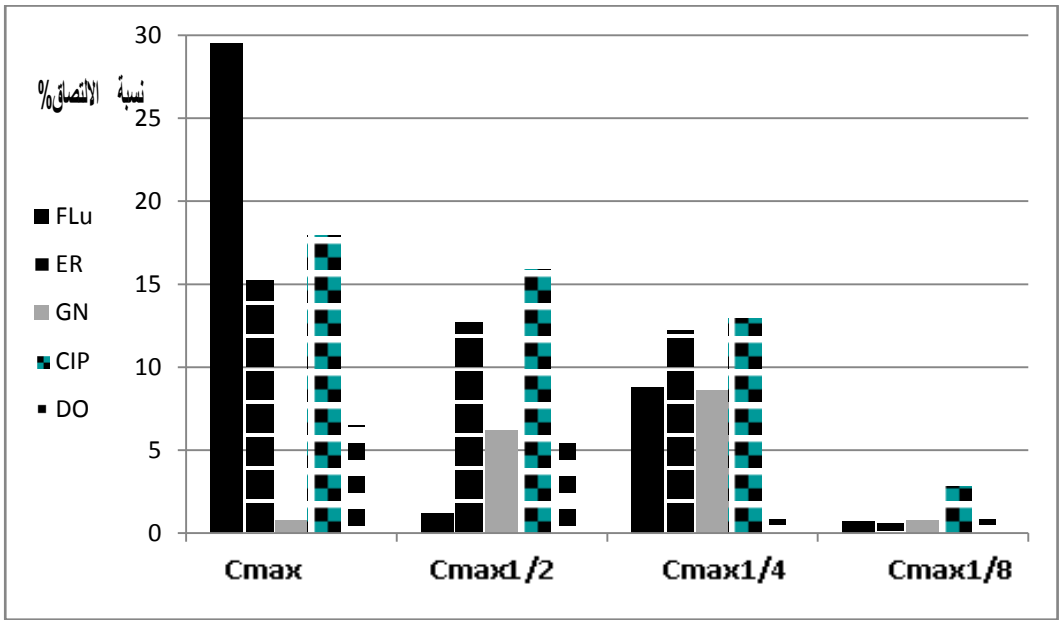
فاعلية الصادات المانعة لالتصاق المكورات العنقودية الذهبية :

أظهرت المكورات العنقودية الذهبية مقاومة لكل الصادات الحيوية المدروسة، وكانت أعلى فاعلية مع الدوكسي سايكلين إذ كانت نسبة نقص التصاق البكتريا % 26.3 عند التركيز C_{max}، وانخفضت الفاعلية بتناقص التراكيز إلى أن وصلت إلى % 0.6 مع التركيز $C_{max\ 1/8}$، وتلاه الجنتامايسين ثانياً إذ كانت نسبة نقص

الالتصاق 15.2% عند التركيز C_{max} وتناقصت إلى 12.7 % عند التركيز $C_{max\ 1/2}$، أما التراكيز المنخفضة فقد حرّضت على زيادة الالتصاق وبلغت نسبة الزيادة 0.6% مع $C_{max\ 1/4}$، و 0.6 % مع $C_{max\ 1/8}$ و لم يُبدِ الفلوروميفينيكول فعالية واضحة إذ كانت نسبة النقص في الالتصاق 1.8%- عند C_{max} في حين أدت التراكيز المنخفضة إلى زيادة الالتصاق بنسبة 6.1% عند التركيز $C_{max\ 1/2}$ و 0.8% عند التركيزين $C_{max\ 1/4}$ و $C_{max\ 1/8}$ أما الإرثرومايسين والسيبروفلوكساسين فقد كان تأثيرهما واضحاً في زيادة الالتصاق وتشكيل غلاف حيوي كما موضح بالجدول(2) ويبيِّن الشكل(1) العلاقة بين التراكيز المختلفة للصادات الحيوية والالتصاق البكتيري في حالة العنقودية الذهبية.

الجدول(2): فاعلية الصادات المانعة للالتصاق ضد العنقودية الذهبية.

التراكيز	Flu	ER	GN	CIP	DOx
C_{max}	1.8-	1.6+	15.2-	1.9+	26.3-
$C_{max1\2}$	6.1	3.1+	12.7-	7.8+	17.9-
$C_{max1\4}$	0,8	11.7+	0.6+	7.8+	3.9-
$C_{max\ 1/8}$	0,8	22+	0.6+	14.5+	0.6-



الشكل(1) العلاقة بين التراكيز المختلفة للصادات الحيوية والالتصاق البكتيري في حالة العنقودية الذهبية

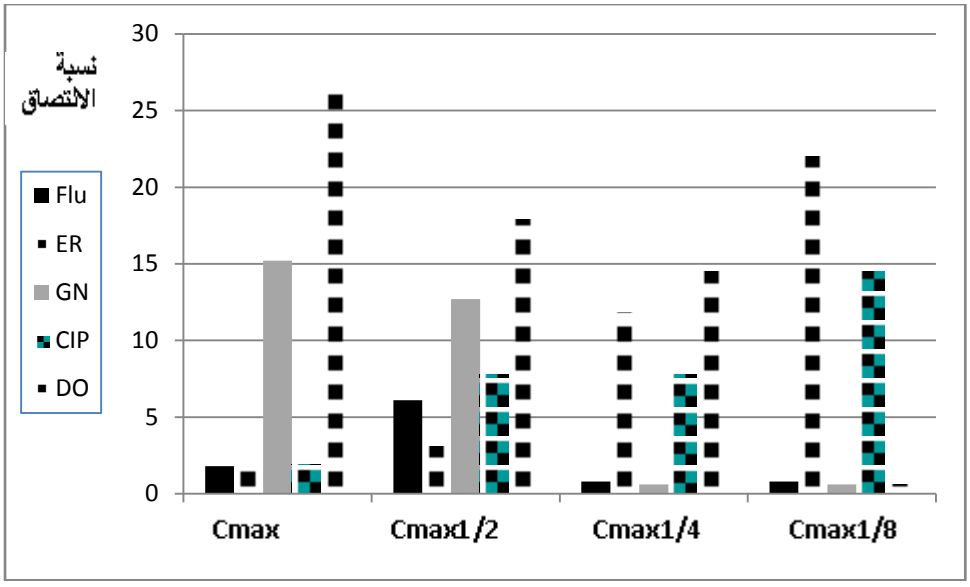
فاعلية الصادات الحيوية المانعة لالتصاق الإشريكية القولونية :

أظهرت النتائج أعلى فاعلية كانت مع الفلوروفينكول عند C_{max} 29.5% وتناقصت فاعليته مع تناقص تركيزه إلى أن وصلت إلى 7.5 % عند التركيز $C_{max\ 1/8}$. بينما حافظ السيبروفلوكساسين على فاعليته في انقاص الالتصاق مع تراكيزه المختلفة، إذ بلغت أعلى فاعلية 17.9 % عند C_{max} وتناقصت بنقص التركيز إلى أن بلغت 2.8 % عند $C_{max\ 1/8}$، أما الإرثرومايسين فقد حقق نسبة التصاق 0.6 % عند $C_{max\ 1/8}$، وبالنسبة للجنتامايسين

والدوكسيسايكلين فقد ساهما في تحرّيضهما على زيادة الالتصاق بكل تراكيزه، ويبيِّن الجدول(3) فاعلية الصادات المانعة لالتصاق الإشريكية القولونية، كما يوضح الشكل(2) العلاقة بين التراكيز المختلفة للصادات الحيوية والالتصاق في حالة الإشريكية القولونية.

الجدول(3): فاعلية الصادات الحيوية المانعة للتصاق الإشريكية القولونية .

التركيز	flu	ER	GN	CIP	DO
C_{max}	29.5−	15.2−	0.8+	17.9−	6.5+
$C_{max1\2}$	11.8−	12.7−	6.2+	15.9−	6.2+
$C_{max1\4}$	8.8−	12.2−	8.6+	12.9−	0.8+
$C_{max\ 1/8}$	0.7−	0.6+	0.8+	2.8−	0.8+



الشكل(2): العلاقة بين التراكيز المختلفة للصادات الحيوية والالتصاق في حالة الإشريكية القولونية

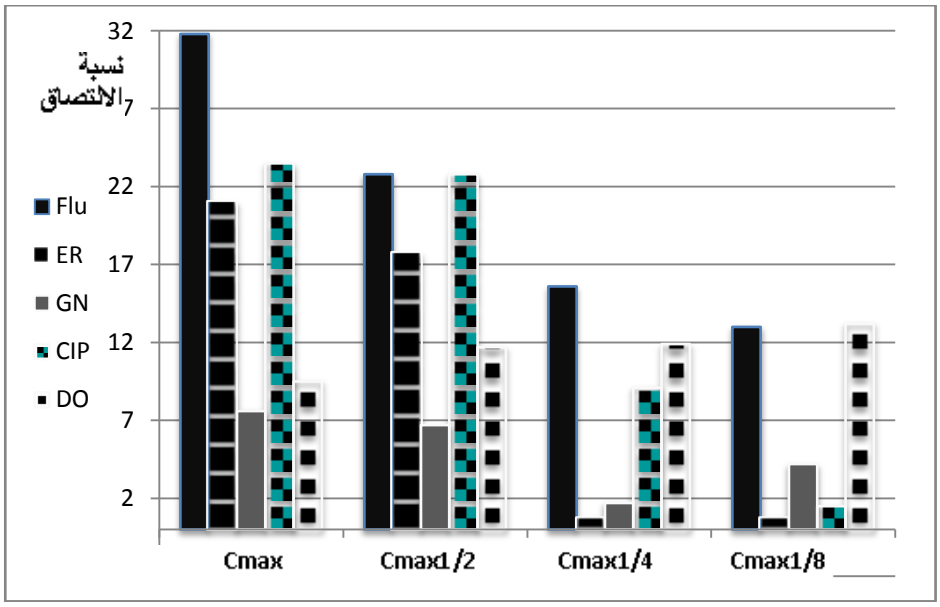
فاعلية الصادات المضادة للالتصاق ضد العُطيفة الصائمية :

لوحظ اختلاف التأثير باختلاف التركيز، إذ أظهرت النتائج أن أعلى نسبة نقص في الالتصاق كانت مع الفلوروفينكول (% 31.8، عند التركيز C_{max} و تراجعت الفاعلية بتناقص التراكيز ولوحظ السلوك نفسه مع الإريثرومايسين فقد أعطى أعلى فعالية مضادة لالتصاق بالتراكيز العالية فقط21% عند التركيز C_{max} وبلغت نسبة نقص الالتصاق 17.7% مع التركيز $C_{max1\2}$ إلا أنه لم تُبدِ تراكيزه الأخرى أي تأثير مهم مضاد للالتصاق، أما السيبروفلوكساسين فقد حافظ على فاعلية مضادة للالتصاق بالتراكيز المختلفة ولُوحظ أن الجنتامايسين كان فعالاً فقط عند التركيزC_{max} و $Cmax_{1\2}$ بنسبة نقص % 7.6 و 6.7 على التوالي، مع ملاحظة أن الفاعلية تناقصت مع تناقص التراكيز إلا أن التراكيز $C_{max\ 1/4}$ و$C_{max\ 1/8}$ حرّضت على زيادة الالتصاق بنسبة % 4.2 و % 1.7على التوالي أما الدوكسي سايكلين فقد كان تأثيره واضحاً في تحريض هذه الجراثيم على زيادة الالتصاق وتشكيل الغلاف

الحيوي بكل التراكيز ، ويبيِّن الجدول(4) فاعلية الصادات الحيوية المضادة للالتصاق ضد العُطيفة الصائمية. ويوضح الشكل(3) العلاقة بين التراكيز المختلفة للصادات الحيوية والالتصاق في حالة العُطيفة الصائمية.

الجدول(4): فاعلية الصادات الحيوية المضادة للالتصاق ضد العُطيفة الصائمية.

DO	CIP	GN	ER	flu	التراكيز
9.2+	23.5−	7.6−	21−	31.8−	C_{max}
11.7+	22.8−	6.7−	17,7−	22.8−	$C_{max1\backslash2}$
11.9+	9.1−	1.7+	0.7	15.6−	$C_{max1\backslash4}$
13.2+	1.5−	4.2+	0.7	13−	$C_{max\ 1/8}$



الشكل(3): العلاقة بين التراكيز المختلفة للصادات الحيوية والالتصاق في حالة العُطيفة الصائمية .

ثانياً– المناقشة:

أظهرت الدراسة قابلية جميع الجراثيم المدروسة على تشكيل غلاف حيوي جرثومي في المختبر، كما كشفت اختبارات كفاءة الصادات الحيوية المدروسة عن تطور مقاومة للجراثيم ضمن الغلاف الحيوي وهذا يتوافق مع دراسات أخرى أشارت إلى دور الغلاف الحيوي في حماية الجراثيم كحاجز أمام وصول الصاد الحيوي إليها والذي يتفاعل مع الطبقات السطحية والهلامية المحيطة تاركاً الخلايا الجرثومية تنمو بدون رقابة مسببةً الأمراض والانتانات (Whiteley *et al.*, 2001 ; John *et al.*, 2006) كما كشف Hons (2011) ضعف نفوذية الغلاف الحيوي ما يمنح الخلايا الجرثومية المختبئة ضمنه وقتاً كافيا لتطوير عوامل مقاومة للصادات الحيوية مثل تخريب تلك الصادات إنظيمياً لتفقدُ فعاليتها على الطبقات السطحية للغلاف الحيوي دون أن تنفُذ من خلاله وقد تكون هذه الإنظيمات مثبتة ضمن عديد السكاريد الخارجي لذلك فإنها يمكن أن تقيد أو تخرب جزيئات الصاد الحيوي وهذا ما يفسر انخفاض فاعلية بعض الصادات وانعدامها أحياناً مع انخفاض التراكيز (Anderl *et al;* 2003). أما بالنسبة للفاعلية المضادة للالتصاق تبيِّن

الجداول(2،3،4) وجود تباين كبير في النتائج فيما يتعلق بالمقاومة للصادات الحيوية للأنواع الجرثومية المختبرة، فقد أعطى الدوكسيسايكلين أعلى فاعلية مضادة لالتصاق العنقوديات الذهبية ومنع التصاق الجراثيم لكن فقط بتراكيز عالية وانخفضت الفاعلية مع انخفاض التراكيز، وكان قد كشف Moise وزملائه (2002) انتشار ممرضات كثيرة تشمل المكورات العنقودية الذهبية والمكورات المعوية والعقديات القيحية ذات المقاومة العالية لمشتقات الفلوروكوينولون. وأظهر الجنتامايسين أيضاً فعاليتة بالتراكيز العالية فقط في حين كان غير فعال ضد الجراثيم بتراكيزه المنخفضة، على العكس فقد حرض على الالتصاق وقد فُسر ذلك بكونه صاد ذو فاعلية قليلة ضد المكورات العنقودية والعقدية بشكلها الحر، وبالتالي لا يستطيع القضاء عليها عندما تكون ملتصقة وضمن غلاف حيوي بل على العكس يعرضها إلى إجهادات *stress* تحفزها على زيادة الالتصاق كإحدى آليات الحماية والحفاظ على الحياة .

أما ا لإرثرومايسين والسيبروفلوكساسين فقد كان تأثيرهما واضحاً في زيادة التصاق المكورات العنقودية وتشكيلها للغلاف الحيوي، وقد فسر الباحث Braga (1998) بأن معالجة هذه المكورات بتراكيز معينة من السيبروفلوكساسين تؤدي إلى زيادة التعبير عن البروتين الرابط للفيبرينوكتين، وبالتالي زيادة قدرتها على الالتصاق . أيضا تحريض هذين المضادين الحيويين على زيادة الالتصاق يعود إلى اعتبار أن وجود الصاد الحيوي بحد ذاته بيئة معادية ومجهدة لذا تُطور الخلايا الجرثومية استجابةً لهذه الظروف مورثاتٍ مسوؤلة عن زيادة الالتصاق (Braga, 1998) أما بالنسبة للعُطيفة الصائمية والإشريكية القولونية فقد أظهرت النتائج أن الصادين الحيويين الفلوروفينكول والإرثرومايسين أعطيا نتائج جيدة في منع الالتصاق، وبرر Oviedo وزملائه (2000) ذلك بأن هذه الصادات تؤثر في مستوى DNA مؤدية إلى نقص في تشكُل الخمل على سطح الجرثوم، بالإضافة إلى تبدلاتٍ بنيوية في الخلية الجرثومية تتمثلُ بتشكل الخلايا الخيطية Filamentous واندماج الجدار الخارجي وانكماش الهيولى، وتؤثر كل هذه التبدلات على قدرة الخلية الجرثومية على الالتصاق. كما حافظ السيبروفلوكساسين على فاعلية مضادة للالتصاق بالتراكيز المختلفة وفسر Wojnicz وزملائه 2007 بأن هذا الصاد أيضاً يُحدث تبدلات بنيوية في الخلية الجرثومية تتمثل بالخلايا الخيطية والتي تمتلك فرصة للالتصاق ضعيفة أو معدومة وتؤثر كل هذه العوامل في تثبيط الالتصاق الجرثومي، إلا أن الخلايا الجرثومية تستمر بإنتاج وحيدات الخمل حتى بوجود تراكيز تحت مثبطة وأن هذه التبدلات الشكلية أنفة الذكر تظهر بشكل أقل في حالة التراكيز المنخفضة مما يفسر نقص فاعلية السيبروفلوكساسين مع تناقص التركيز. وقد تعمد الجراثيم إلى مقاومة صادات حيوية وإنتاج غلاف حيوي بسماكة أكبر يصعُبُ على الصاد الحيوي نفوذها (Whiteley et al; 2001) وهذا ما يُفسر نسب الالتصاق العالية في حالة الدوكسيسايكلين بالنسبة للجراثيم المقاومة له (الإشريكية القولونية والعُطيفة الصائمية) ويبقى استخدام الصادات الحيوية بجرعات غير كافية بشكل عام من الأسباب الرئيسية لحدوث حالات المقاومة الجرثومية، كما توجد معطيات كثيرة في صناعة الدواجن تشير إلى تطور المقاومة الدوائية عند الجراثيم الممرضة في طيور دجاج اللحم (الفروُج) والبياض (Mc Ewen *et al* , 2002).

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات

– لم تؤدي الصادات المستخدمة إلى إنقاص الالتصاق بشكل كامل بل حصل تناقص متفاوت في معدل الالتصاق الجرثومي.

– وجود مقاومة جرثومية للإريثرومايسين وارتفاع نسبة المقاومة مقابل كل الصادات الحيوية وتراجع في فاعلية كل من الجنتامايسين والدوكسيسايكلين.

– أظهرت الصادات الحيوية غير المستعملة سابقاً مثل الفلورفينيكول تأثيراً فعالاً ضد بعض الجراثيم المستخدمة في الاختبار .

التوصيات

– التعامل الوقائي مع الالتصاق الجرثومي وتشكل الغلاف الحيوي في تقنيات مزارع الدواجن وتحسين نوعية المواد والطلاء المستخدمة في تصنيع مستلزمات الدواجن لاسيما المناهل التي تساعد ق در الإمكان في منع التصاق الكائنات الدقيقة بطريقة نشطة.

– الحفاظ على بيئة معقمة لا تسمح بتراكم الجراثيم، وتطبيق إجراءات التنظيف الفعال والتطهير المضمون الذي يزيل الغلاف الحيوي ويحد من تواجد ونمو الأحياء الدقيقة.

– استخدام الصادات الحيوية بتراكيزها الفعالة وبالاعتماد على اختبارات التحسس في اختيار الصاد الأنسب لقتل الجراثيم الممرضة الموجودة ضمن الغلاف الحيوي.

– الاستئصال الكامل للجراثيم ضمن الغلاف الحيوي يستوجب اعتماد مشاركات دوائية بين أكثر من صاد حيوي.

– البحث المستمر في الأساليب التي تعالج وجود الغلاف الحيوي وتضمن فعالية عالية ضد الجراثيم المعنِّدة لطيف واسع من الصادات الحيوية.

المراجع

1 خيصافي، علي. دور اختباارت التحسس في تقييم فاعلية أهم الصادات الحيوية المستخدمة في علاج بعض الأمراض الجرثومية التي تصيب مزارع الفروج سورية /مجلة جامعة تشرين للدارسات والبحوث العلمية – سلسلة العلوم البيولوجية المجلد(31) العدد (3) 2009 ,61– 55.

2- ANDERL J. N; ZAHLLER J. AND ROE F. *Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin*, 2003, JAC. 47: 1251-1256,

3- ALAMOURY.A. MOUSTAFA .M () *Postantiotic effect of chemotherapeutic agents on biofilm forming catheter infectionus bacteria* , 2001, PhD thesis in pharmacy, Faculty of pharmacy, Aleskandareia University, Egypt, 23-26

4- ALLAN N.D, OMAR A., HARDING M.W.2 AND OLSON M.E. A rapid, high-*throughput method for culturing, characterizing and biocide efficacy testing of both planktonic cells and biofilms Science against microbial pathogens*: communicating current research and technological advances , 2011, 864 – 871

5- APATA D.F *Antibiotic Resistance in Poultry* **,** International Journal of Poultry Science, 2009, 8 (4): 404-408,

6- BRAGA P.C; SASSO M.D; MACI S. CEFODIZIME *effects of sub-inhibitory concentrations on adhesiveness and bacterial morphology of Staphylococcus aureus and Escherichia coli: comparison with cefotaxime and ceftriaxone.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1997. 39, 79-84,.

7- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. *Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. *Clin. Microbiol. Rev*., 2002, **15**(2),167-193.

8- FOLSOM. P JAMES, RICHARDS LEE, , BETSEY PITTS, FRANK ROE, GARTH D EHRLICH, ALBERT PARKER, AURÉLIEN MAZURIE, STEWART PHILIP, *Physiology of Pseudomonas aeruginosa in biofilms as revealed by transcriptome alysis. BMC Microbiology*, 2010, 10:294

9- FRANK , KRISTI L; REICHERT, EMILY J; PIPER, KERRY E AND PATEL , ROBIN. *In Vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of Staphylococcus lugdunensis Clinical Isolates.* Antimicrob Agents Chemother. Mar, 2007, 51(3): 888–895

10- JOHN G. THOMAS, MS, PHD; LINDSAY A. NAKAISHI, B.S *Managing the complexity of a dynamic biofilm Production on Its Resistance to Chlorine* Center for Food Safety and Department of Food Science and Technology University of Georgia, Griffin, American Dental Association, JADA, 2006, Vol. 137

11- KONIG, C., S. SCHWANK, AND J. BLASER. *Factors compromising antibiotic activity against biofilm of Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 2001, 20(1): 20-26.

12- KOLARI MARKO *Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces* Electronic publication available at Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki ethesis. 2003

13- LEWIS K., *Riddle of Biofilm Resistance*. *Antimicrob. Agents hemother.*, 2001, 45(4), 999- 1007 .

14- MERLE E. OLSON, HOWARD CERI, DOUGLAS W. MORCK, ANDRE G. BURET, and RONALD R. READ (2002). *Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics* Can J Vet Res. April; 66(2): 86–92

15- MAH T.F.C., G.A. O'TOOLE, *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. trends in Microbiology*. 2001, 9(1), 34, 39.

16- MC EWEN, S.A; FEDORKA ;CRAY, P.J *Antimicrobial use and resistance in animals* . Clin Infect Dis, 2002, Vol. 34, 93-106.

17- MORAR .C. S. ; MORVA, O. C. A. *Antibiotic resistance of gram negative bacteria isolated from meat surface biofilm.* Romanian Biotechnological Letters, 2012, Vol. 17, No. 4.

18- MOISE A. PAMELA, FORREST ALAN, BIRMINGHAM C. MARY AND SCHENTAG J. JEROME *The efficacy and safety of linezolid as treatment for Staphylococcus aureus infections in compassionate use patients who are intolerant of,or who have failed to respond to, vancomycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2002) 50, 1017–1026

19- NATHANON TRACHOO SONGKLANAKARIN J. SCI. *Biofilms and the food industry*. Technol., 2003, 25(6) : 807-815

20-

OLSON, MERLEE; CERI, HOWARD*;* MORCK, DOUGLAS*;* BURET, ANDRE G*;* READ, RONALD R. *Biofilm bacteria: formation and compaative susceptibility to antibiotics.* Can J Vet Res. (2002). 66(2): 86–92

21- OVIEDO P; QUIROGA M; PEGELS E; HUSULAK E. AND VERGARA M. *Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enterotoxigenic Escherichia coli virulence factors*. J. Chemother. , 2000, 12, 487-490.

22- HONS (HUI SAN WONG) ., BSC. *comparative evaluation of lanktonic and biofilm modes of growth in salmonella typhimurium* thesis of Doctor of Philosophy Murdoch University Perth, Western Australia 2011.

23- HUDZICKI, J. (2009) *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. ASM Microbe Library. American Society for Microbiology*. http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol

24- SALA. CLA DIA, ADRIANA MORAR1,OLIMPIA COLIBAR, ATTILA ALEXANDRU MORVAY. *Antibiotic resistance of gram negative bacteria isolated from meat surfacebiofilm*. Romanian Biotechnological Letters, 2012, Vol.17, No.4.

25- SIMONE CRISTINA MARQUES; JAÍNE DAS GRAÇAS OLIVEIRA SILVA, HILSDORF PICCOLI. *formation of biofilms by staphylococcus aureus on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected Chemical Sanitizers*. Brazilian Journal of Microbiology 2007, 38:538-543.

26-WALTER Marshall.,Roe Frank; Bugnicourt Amandine; Franklin Michael.*Contribution of antibiotic penetration,oxygen limitation, and low growth rate, metabolic activity to tolerance of Pseudomonas aeroginosa biofilm to ciprofloxacin and tobramycin . Antimicrob Agents Chemother*; 2003. 47(1): 317-323..

27-WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK RE. *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. Nat Protoc. 2008;3(2):163-75

28-WHITELEY MARVIN, M. GITA BANGERA, ROGER E. BUMGARNER MATTHEW R. PARSEK& GAIL M. TEITZEL§, STEPHEN LORY& E. P. GREENBERG. *Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biolms.* NATURE. 2001|VOL 413 | 25

29-WOJNICZ D; KLAK M; ADAMSKI R. AND JANKOWSKI S. *Influence of Subinhibitory Concentrations of Amikacin and Ciprofloxacin on Morphology and Adherence Ability of Uropathogenic Strains.*Folia Microbiol. 2007, 52 (4), 429-436.