عزل وتشخيص الايشيركيا القولونية المنتجة للبيتا لاكتام الواسعة الطيف من فروج اللحم في مدينة أربيل، العراق

ميس نبيل محمد عبدالله الشاروك[١] و عبدالواحد أحمد حسن[٢]

[١] فرع الاحياء المجهرية البيطرية، [٢] فرع الصحة العامة البيطرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، موصل، العراق

(الإستلام ١٤ نيسان ٢٠١٧؛ القبول ١٣ أيار ٢٠١٧)

الخلاصة

عزلت وشخصت الايشيركيا القولونية *Escherichia coli* المنتجة لانزيم البيتا لاكتام واسعة الطيف من فروج اللحم المجزور في محلات بيع الدجاج الحي في مدينة أربيل، العراق حيث فحصت ٤١ عينة براز من الاعورين لفروج اللاحم وللفترة من كانون الثاني الى نيسان عام ٢٠١٦. عزلت الجراثيم المعوية المنتجة لانزيم البيتا لاكتام واسعة الطيف مظهرياً بأستخدام وسط الماكونكي المضاف له سيفاتوكسيم cefotaxime (١ ملغم/لتر) وشخصت العزلات بالاختبارات الكيموحيوية والنمو على وسط تي بي إكس TBX agar وجهاز الفايتك-٢ المدمج VITEK-2 compact. فحصت ٣٤ عزلة للايشيركيا القولونية و أربعة من متقلبات الميرابالس *Proteus mirabilis* للكشف عن المقاومة للبيتا لاكتام واسعة الطيف مظهرياً بطريقة الانتشار في الاكار وبأستخدام أقراص المضادات الميكروبية 68DC MAST® ESβL discs وتحتوي على cefpodoxime و ESBL inhibitor+cefpodoxime و cefpodoxime+AmpC inhibitor و cefpodoxime+ESBL inhibitor+AmpC inhibitor وأقراص المضادات الميكروبية 67DC MAST® ESβL discs وتحتوي على cefpodoxime و cefpodoxime+clavulanate و ceftazidime و ceftazidime+clavulanate و cefotaxime و cefotaxime+clavulanate. كانت نتائج أقراص 68DC أن ٢٣,٧% من الايشيركيا القولونية مقاومة للسيفبودوكسيم ونتائج أقراص 67DC أن ٧٣,٧% من الايشيركيا القولونية و ٧,٩% من متقلبات الميرابالس مقاومة لواحد او أكثر من السيفبودوكسيم والسيفتازيديم والسيفوتاكسيم. كانت النتائج النهائية أن ٧٨,٠% من العينات مقاومة للبيتا لاكتام وللـ أي إم بي سي الواسعة الطيف. يعتبر هذا البحث أول دراسة مظهرية لكشف الايشيركيا القولونية المقاومة للبيتا لاكتام وللـ أي إم بي سي الواسعة الطيف في فروج اللاحم في العراق. نستنتج أن الدواجن السليمة يمكن أن تكون مصدراً رئيسياً لهذه الجراثيم وإمكانية إنتقالها للإنسان عن طريق السلسلة الغذائية وعن طريق الاتصال المباشر والبيئة المحيطة وبذلك تثير المخاوف حول الصحة العامة وسلامة لحوم الدواجن والعواقب السلبية من حيث العلاج الدوائي بسبب إنتشار المقاومة للمضادات الحيوية.

Isolation and identification of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from brolier in Erbil, Iraq

M.N. Al-Sharook[1] and A.A. Hassan[2*]

[1] Department of Vetreinary Microbiology, [2] Department of Veterinary Public Health, University of Mosul, Moaul, Iraq
[*]Corresponding author: e-mail: abdulhassan@daad-alumni.de

Abstract

Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from slaughtered broilers in retail market that sell live chickens in Erbil city, Iraq. Forty-one cloacal fecal samples from broiler caecum were investigated from January to April 2016. ESBLs strains were isolated using MacConkey agar supplemented with cefotaxime 1 mg/l and the isolates were identified phynotypically by biochemical tests, TBX agar and VITEK-2 compact system. A total of 34 *Escherichia coli* and 4 *Proteus mirabilis* were analysed for determination of ESBL/AmpC by disc diffusion test using antimicrobial 68DC MAST® ESβL discs group including cefpodoxime, cefpodoxime + ESBL inhibitor, cefpodoxime + AmpC inhibitor and cefpodoxime + ESBL inhibitor + AmpC inhibitor and 67DC MAST® ESβL discs group including cefpodoxime, cefpodoxime + clavulanate, ceftazidime, ceftazidime + clavulanate, cefotaxime and cefotaxime + clavulanate. The phenotypic results showed that in group

68DC discs 23.7% *E. coli* were resistant to cefpodoxime and in group 67DC discs 73.7% of *E. coli* and 7.9% of *P. mirabilis* were resistance to one or more of the cefpodoxime, ceftazidime and ceftazidime. Final results revealed that 78.0% of samples were ESBLs/ AmpC positive. This study is the first examination to determine phenorypically *E. coli* producing ESBLs/AmpC in broiler chickens in Iraq. Conclusion, the healthy broiler can be a major source of ESBLs/AmpC and the possibility that transmitted to humans through the food chain, direct contact and the surrounding environment raises the concerns about public health and safety of poultry meat and the negative consequences of drug therapy that causes the spread of antibiotic resistance.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

بعض الجراثيم المعوية مثل الايشيركيا القولونية *Escherichia coli* والكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* والبروتيس ميريبالس *Proteus mirabilis* وأنواع السالمونيلا لها المقدرة على إنتاج أنزيمات البيتا لاكتام β-Lactamase التي تحلل ما يقرب من جميع المضادات الحيوية نوع البيتا لاكتام كالسيفالوسبورينات cephalosporins عن طريق كسر حلقة البيتا لاكتام المفتوحة β-lactam ring open وتعطيل الخصائص الجزيئة المضادة للجراثيم (١). تعتبر مقاومة المضادات الحيوية antimicrobial resistance (AMR) واحدة من المشاكل المهمة التي تواجه الرعاية الصحية في جميع أنحاء العالم حيث تؤثر على علاج الأمراض المعدية الناجمة عن الاحياء المجهرية (٢)، فقد سُجل في أوروبا نحو ٢٥,٠٠٠ حالة وفاة بسبب العدوى المقاومة للمضادات الحيوية (٣) وفي الهند تشير التقديرات في عام ٢٠١٣ الى حصول ٥٨ الف حالة وفاة بإنتان الدم عند الأطفال حديثي الولادة نتيجة العدوى بالجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية (٤). إن إستخدام المضادات الحياتية بشكل واسع النطاق في الثروة الحيوانية يساهم في ظهور جراثيم مقاومة للمضادات الحياتية عن طريق الانتقاء الطبيعي natural selection مما يكون لها انعكاسات مهمة على الصحة العامة. وتمثل الحيوانات والاغذية ذات المنشأ الحيواني المصدر الرئيسي للجراثيم المعوية المقاومة للبيتا لاكتام واسعة الطيف وبالاخص الايشيركيا القولونية بإعتبارها أحد المسببات للالتهابات المعوية في الانسان والتي تنتقل عن طريق الأغذية foodborne bacteria من خلال سلسلة إنتاج الغذاء سواء أثناء المعاملة أو التصنيع (٥-١٠)، وأكدت دراسة قام بها Vieira وآخرون الى وجود إرتباط وثيق بين إنتشار جراثيم مقاومة للمضادات الحياتية من عزلات الايشيركيا القولونية في الإنسان والدواجن والخنازير والماشية (١١)، وقد درست الجراثيم المنتجة لانزيم البيتا لاكتام الواسعة الطيف من مصادر حيوانية مختلفة والمواد الغذائية ذات المنشأ الحيواني في معظم دول العالم (١٢-١٦).

ويعتبر البحث الحالي أول دراسة في العراق لعزل وتشخيص الجراثيم المعوية المنتجة لأنزيم البيتا لاكتام واسع الطيف مظهرياً ومن الفروج اللاحم في المرحلة الاخيرة من التربية والمجزور في محلات بيع الدجاج الحي live poultry markets من مناطق جغرافية مختلفة من مدينة أربيل.

المواد وطرائق العمل

تحضير العينات والعزل الافتراضي للجراثيم المقاومة للبيتا لاكتام

جمعت ٤١ عينة من الاعورين لفروج اللاحم المجزور من محلات بيع الدجاج الحي من ١١ منطقة جغرافية في مدينة أربيل، العراق. أعتمد البروتوكول 2013/625/EU (١٧) في عزل وتشخيص الجراثيم المعوية المقاومة للبيتا لاكتام، وذلك بأخذ ١ غم من البراز من منطقة الاعورين بشكل معقم ونقلت الى أنبوبة تحتوي ٩ مل من محلول ماء الببتون المتعادل المعقم Buffered (Merck, Germany) peptone water (BPW)، وضعت ألانابيب في الحاضنة (Memmert; Germany) بدرجة ٣٧° م لمدة (٢±) ٢٢ ساعة. نقلت بعد ذلك عروة كاملة على وسط الماكونكي المضاف له ١ ملغم سيفوتاكسيم/ لتر وقد أطلق عليه إسم MC^+ agar. حضنت الاطباق بدرجة ٣٧° م لمدة (٢±) ٢٢ ساعة وعند وجود نمو على الوسط سجلت إفتراضياً بأن العزلة presumptive isolation مقاومة للسيفوتاكسيم (البيتا لاكتام). من كل عينة اختير ٢-٤ عزلات نقية ومختلفة مظهرياً ليكون عدد الكلي ١٤٦ عزلة جمعت من ٤١ عينة. زرعت العزلات مرة أخرى على طبق MC^+ من أجل دراسة صفاتها المظهرية كالشكل واللون والحجم والتخمر. زرعت العزلات النقية مرة أخرى على وسط المولر هنتون Müller Hinton (MH) (Merck, Germany) ليتم تشخيص مقاومتها وتصنيفها لاحقاً.

تشخيص العزلات المعوية المقاومة للبيتا لاكتام

شخصت ١٤٦ عزلة من الجراثيم المعوية بإستخدام إختبار هيدروكسيد البوتاسيوم 3% وإختبار الاوكسيديز وإختبار كبريتيد الهيدروجين والاندول والحركة SIM (١٨). زرعت العزلات على وسط تي بي إكس Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) (acumedia, USA) الانتخابي للايشيركيا القولونية حيث يكون لون المستعمرة أزرق مخضر(الشذري) أما عند ظهور الوان أخرى فأعتبرت أنواع أخرى من العائلة المعوية (١٨). اختيرت ٤١ عزلة وبواقع عزلة لكل عينة لعمل التشخيص التأكدي بجهاز الفايتك-٢ المدمج VITEK-٢ compact بإستخدام بطاقة الجراثيم السالبة الكرام GN ID Card وحسب تعليمات الشركة المنتجة (BioMérieux, France).

الكشف عن مقاومة الجراثيم للبيتا لاكتام مظهرياً

اختيرت ٣٨ عزلة شملت على ٣٤ عزلة للايشيريشيا القولونية و ٤ للمتقلبات ميرابالس التي أظهرت المقاومة للبيتا لاكتام على وسط MC^{+} agar والتي شخصت بجهاز الفايتك-٢ المدمج سابقاً وذلك لدراسة مقاومتها لانزيم البيتا لاكتام مظهرياً بإجراء إختبار الانتشار في الاكار agar diffusion test على وسط مولر هنتون إعتماداً على (١٩) حيث إستخدامت مجموعتين من أقراص المضادات الميكروبية antimicrobial discs: المجموعة الاولى (MAST, USA) 68DC MAST® ESβL discs وتحتوي على أربع أقراص وهي cefpodoxime (disc A) و cefpodoxime (disc B) +ESBL inhibitor و cefpodoxime+AmpC inhibitor (disc C) و cefpodoxime+ESBL inhibitor+AmpC inhibitor (disc D) والمجموعة الثانية من أقراص المضادات الميكروبية هي 67DC MAST® ESβL discs وتحتوي على ست أقراص وهي cefpodoxime (disc Z1) و cefpodoxime+clavulanate (disc Z2) و ceftazidime (disc Z3) و ceftazidime+clavulanate (disc Z4) و cefotaxime (disc Z5) و cefotaxime+clavulanate (disc Z6). زرعت جميع العزلات على وسط المولر هنتون وحضـنت الاطباق بدرجة ٣٧° م لمدة (±٢) ٢٢ ساعة. بعد ذلك أخذت ١-٢ مستعمرة ومزجت في أنبوبة تحتوي على ٢ مل من محلول الملح الفسيولوجي بتركيز ٠,٤٥% (BioMerieux) وتم قياس تركيز الجراثيم بجهاز قياس كثافة الجراثيم Mcfarland Densichek plus، (BioMérieux) للحصول على محلول جرثومي معلق بتركيز ٠,٥ مكفرلاند Mcfarland، بعد ذلك غمرت مسحة قطنية معقمة sterile swab في المحلول ووزعت المسحة على طبق المولر هنتون بعمل تخطيط على كامل سطح الطبق بثلاثة اتجاهات وأخيراً حركت المسحة على حافة الطبق بشكل دائري لإزالة المحلول المتبقي على الطبق، زرعت كل عزلة على طبقين من المولر هنتون، بعد ذلك وضعت ألاقراص الاربعة (A, B, C, D) للمجموعة 68DC على طبق الاول من وسط مولر هنتون وألاقراص الستة (Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6) للمجموعة 67DC على الطبق الثاني لمولر هنتون بواسطة ملقط معقم. حضنت الاطباق بدرجة ٣٧° م لمدة (±٢) ٢٢ ساعة وتم قياس نطاق التثبيط inhibition zone بجهاز القدمة ذات الورنية الإلكترونية Electronic digital caliper150 mm, (China) و سجلت نتائج نطاق التثبيط.

تفسير قياس نطاق التثبيط للاستدلال على حساسية أو مقاومة العزلة للبيتا لاكتام

تم تفسير ذلك إعتماداً على تعليمات الشركة المنتجة (MAST, USA) وكما يلي.

المجموعة 68DC: من خلال هذه المجموعة حسبت اولاً المقاومة للبيتا لاكتام ESBL screening وثانياً حسبت المقاومة للـ أي إم بي سي AmpC screening وثالثاً حسبت المقاومة للبيتا لاكتام ومسح المقاومة للـ أي إم بي سي سويةً ESBL screening and AmpC.

وحسبت المقاومة للبيتا لاكتام ESBL screening رياضياً بـ (أولاً) بنقصان (*Minus*) نطاق التثبيط B من A وبنقصان D من C و (ثانياً) بحساب الاختلاف differennce بين B و D وحساب الاختلاف بين A و C وتكون العزلة مقاومة للبيتا لاكتام أذا كانت أكثر من ٥ ملم في القراءة (أولاً) وأقل من ٤ ملم في القراءة (ثانياً).

ولحساب المقاومة للـ أي إم بي سي AmpC screening تم ذلك رياضياً (أولاً) بنقصان نطاق التثبيط D من B و بنقصان C من A و (ثانياً) بحساب الاختلاف بين B و A وحساب الاختلاف بين D وC فأذا كانت أقل من ٥ ملم في القراءة (أولاً) وأكثر من ٤ ملم في القراءة ثانياً فستكون العزلة مقاومة للـ AmpC.

ولحساب المقاومة للبيتا لاكتام ومسح المقاومة للـ أي إم بي سي معاً screening ESBL and AmpC فتم ذلك رياضياً بـ (أولاً) بنقصان نطاق التثبيط D من C و (ثانياً) بحساب الاختلاف بين B و A واعتبرت العزلة مقاومة أذا كانت أكثر من ٥ ملم في القراءة (أولاً) وأقل من ٤ ملم في القراءة (ثانياً).

وللتاكد من ان العزلات مقاومة او حساسة للبيتا لاكتام فقد تم تأكيد ذلك بالمجموعة 67DC.

المجموعة 67DC: تم قراءة نتائج المجموعة 67DC أيضاً رياضياً بـ (أولاً) بنقصان نطاق التثبيط Z2 منZ1 (ثانياً) بنقصان Z4 من Z3 و (ثالثاً) بنقصان Z6 من Z5 وتعتبر العزلة مقاومة أذا كانت القراءة في واحد او أكثر من نتائج أولاً أو ثانياً أو ثالثاً ٥ ملم وأكثر.

النتائج

أعتبرت ١٤٦ عزلة الممثلة لـ ٤١ عينة والتي نمت على وسط MC^{+} agar بشكل إفتراضي أنها عزلات مقاومة للبيتا لاكتام حيث أظهرت المستعمرات ألوان مظهرية مختلفة شملت اللون الاحمر البنفسجي واللون الوردي الخفيف والشكل الدائري ومستعمرات بحجم ٣-٦ ملم، كما تم تمييز المستعمرات المخمرة للاكتوز التي تغير لون الوسط الى اللون الوردي الغامق وكان عددها ١٢٩ عزلة والمستعمرات غير المخمرة للاكتوز وتظهر بلون وردي شاحب والتي كان عددها ٢٥ عزلة. شخصت جميع العزلات بإختبار هيدروكسيد البوتاسيوم ٣% فأعطت جميع العزلات صفة المخاطية على الشريحة الزجاجية وبذلك أعتبرت العزلات سالبة لصبغة كرام. ويبين الجدول ١ نتائج إختبار الاوكسيديز ووسط الكبريتيد والاندول والحركة (SIM) و وسط تي بي إكس TBX لجميع العزلات وتقسيمها الى أربع مجاميع.

اختيرت ٤١ عزلة بواقع عزلة لكل عينة لتشخيصها بجهاز الفايتك- ٢ المدمج VITEK 2 compact وقد كانت النتائج أن ٣٤ عزلة (٨٢,٩%) تعود الى الايشيركيا القولونية وخمس عزلات

(١٢,٢%) تعود الى متقلبات الميرابالس *P. mirabilis* وعزلتين (٤,٩%) تعود الى زوائف شتوتزيري *Pseudomonas stutzeri*.

المقاومة لانزيم البيتا لاكتام مظهرياً

أختيرت ٣٤ عزلة من الايشيريكيا القولنية و ٤ عزلات من متقلبات ميرابالس (أهملت العزلة الخامسة لمتقلبات ميرابالس لكون العزلات الاربعة الاولى ممثلة كذلك أهملت عزلتي زوائف شتوتزيري لكونها ليست من الجراثيم المعوية) لاختبارها للكشف عن المقاومة لانزيم البيتا لاكتام مظهرياً بأقراص D68C فتبين أن ٩ عزلات (٢٣,٧%) من الايشيركيا القولونية مقاومة للسيفبودوكسيم (جدول ٢). أما نتائج أقراص المجموعة الثانية D67C فكان ٢٨ عزلة (٧٣,٧%) من الايشيركيا القولونية وثلاث عزلات (٧,٩%) من متقلبات الميرابالس مقاومة لواحد او أكثر من البيتا لاكتام السيفبودوكسيم والسيفتازيديم والسيفوتاكسيم (جدول ٣) [حيث اعتبرت العزلة الخامسة لمتقلبات الميرابالس مقاومة ايضا" لذلك كان العدد النهائي ٣٢ عينة موجبة]. لذلك كانت النتائج النهائية أن ٣٢ من ٤١ عينة (٨٧,٠%) مقاومة للبيتا لاكتام وللـ أي إم بي سي الواسعة الطيف (جدول ٤).

جدول ١: تشخيص الجراثيم الى أربع مجاميع إعتماداً على الاختبارات الكيموحيوية و وسط تي بي إكس

الجراثيم	عدد العزلات و (%)	الاختبارات التشخيصية والكيموحيوية					
		هيدوركسيد البوتاسيوم	الاوكسيديز	M	I	S	لون المستعمرات على وسط تي بي إكس
الايشيركيا القولونية	١٢٩ (٨٨,٤)	+	-	+	+	-	ألازرق المخضر
جرلثيم تعود للعائلة المعوية	٥ (٣,٤) نوع أ	+	-	-	-	+	أبيض
	٧ (٤,٨) نوع ب	+	-	+	-	+	
جرلثيم لا تعود للعائلة المعوية	٥ (٣,٤)	+	+	-	-	-	أصفر بني

المناقشة

تعتبر المضادات الحيوية ركيزة أساسية في الرعاية الصحية للانسان وكذلك في الثروة الحيوانية للحفاظ على صحة الحيوان وتحسين وزيادة الانتاجية وتساهم هذه الممارسات الى زيادة وإنتشار الجراثيم المقاومة للأدوية في كل من الانسان والحيوانات مما يشكل تهديدا كبيراً على الصحة العامة (٢١،٢٠). تمثل الحيوانات والاغذية ذات المصدر الحيواني مخزناً إبتدائياً primery reservior للعديد من الجراثيم التي تنتقل عن طريق الاغذية foodborne bacteria ومن ضمنها الجراثيم المعوية وبالاخص الايشيركيا القولونية بإعتبارها مسببات للالتهابات المعوية في الانسان وقد أشار Van Boeckel وأخرون (١٠) الى ان الاستخدام الواسع النطاق للمضادات الحياتية في الثروة الحيوانية يساهم عن طريق الانتقاء الطبيعي natural selection إلى ظهور جراثيم مقاومة للمضادات الحياتية يكون لها انعكاسات مهمة على الصحة العامة (١٠). إن الجراثيم المقاومة للمضادات الحياتية ذات المنشأ الحيواني يمكن أن تنتقل إلى الإنسان عن طريق البيئة والمنتجات الغذائية وعن طريق الاتصال المباشر للاشخاص العاملين في الانتاج الزراعي (٩،٨،٦،٥). وقد درست الجراثيم المنتجة لانزيم للبيتا لاكتام الواسعة الطيف في معظم دول العالم من مصادر حيوانية مختلفة والمواد الغذائية ذات المنشأ الحيواني (١٢-١٦).

وتنتشر محلات بيع وجزر الدجاج اللاحم الحي live poultry market في مدينة أربيل بكثرة ذلك لاقبال بعض المستهلكين على هكذا نوع من اللحوم (حلال Hallal). علماً إن طريقة الذبح والتجهيز وإزالة النفايات الصلبة والصرف الصحي والآلات والمعدات غير خاضعة للمعايير والشروط الصحية مما يؤدي ذلك الى إنتشار الجراثيم المعوية وربما المقاومة منها لتلوث الذبيحة (المنتجات الغذائية) والعمال عن طريق الاتصال المباشر وكذلك البيئة وبناءاً على ذلك فقد تم في هذا البحث الكشف عن الجراثيم المعوية المقاومة للبيتا لاكتام واسعة الطيف وتشخيصها مظهرياً من عينات برازية من الاعورين لفروج اللاحم المجزور في محلات بيع الدجاج الحي من ١١ منطقة جغرافية من مدينة أربيل كون الدواجن أو برازها يمثل المصدر الرئيسي لأنتشار هذه الجراثيم في البيئة (٢٢). ولتحقيق ذلك تم تحديد طريقة للعزل الافتراضي لهذه الجراثيم من عينات البراز لفروج اللاحم المجزور على وسط الماكونكي الحاوي على سيفاتوكسيم بتركيز ١ ملغم /لتر بناءً على هيئة سلامة الأغذية الأوروبية (EFSA) (٢٣) والمعتمدة كذلك في العديد من البحوث حيث إستخدام Reglier-Poupet وأخرون وKolar وأخرون (٢٥،٢٤) التركيز نفسه في وسط chromID ESBL (bioMérieux, France) ذات خواص مولدات اللونchromogenic properties لعزل الجراثيم المعوية المقاومة للبيتا لاكتام من الاعورين للدواجن، كذلك إستخدام Randall وأخرون وBörjesson وأخرون (٢٧،٢٦) وسط CHROMagar ECC (CHROMagar, France) الحاوي نفس التركيز للسيفاتوكسيم لعزل الايشيركيا القولونية المقاومة للبيتا لاكتام من الاعورين من دجاج اللحم والديك الرومي. وإستخدم Odenthal وأخرون وسط MC^{+} لعزل للجراثيم المعوية المقاومة للسيفاتوكسيم من عينات حليب الخزانات الكبيرة bulk tank milk (٢٨).

جدول ٢: النتائج النهائية لجميع العزلات (٣٨) لانزيم البيتا لاكتام لمجموعة 68DC

رقم العينة ورمزها	نتائج قطر نطاق التثبيط (ملم) على وسط MH Inhibition zone (Z) diameter in mm on MH agar				نتائج البيتا لاكتام ESBLs	نتائج أي إم بي سي AmpC	نتائج البيتا لاكتا و أي إم بي سي ESBL & AmpC
	ZA	ZB	ZC	ZD			
1 d	0	23	12	22	-	-	-
2 c	0	0	23	26	-	-	-
3 b	0	20	0	21	+	+	+
4 b	0	0	23	23	-	-	-
8 b	0	23	11	23	-	-	-
9 a	0	21	14	22	-	-	-
10 b	0	24	15	25	-	-	-
11 a	0	20	10	20	-	-	-
12 c	0	23	0	24	+	+	-
13 b	0	0	26	26	-	-	-
14 a	0	0	25	25	-	-	-.
15 d	0	27	19	27	-	-	-
16 c	0	0	22	22	-	-	-
17 c	0	0	22	23	-	-	-
18 a	0	24	11	24	-	-	-
19 a	0	22	10	23	-	-	-.
20 b	0	23	13	24	-	-	-
21 c	0	21	9	22	-	-	-
22 b	0	23	13	23	-	-	-
23 c	0	21	11	22	-	-	-
24 a	0	17	0	17	+	+	-
25 a	0	21	10	23	-	-	-
26 a	0	21	10	21	-	-	-
27 b	0	22	10	23	-	-	-
28 a	14	13	31	32	-	-	-
29 c	0	20	0	20	+	+	-
30 b	0	23	5	24	+	+	-
31 c	0	21	8	21	-	-	-
32 a	0	19	0	20	+	+	-
33 c	0	21	10	22	-	-	-
34 d	0	19	0	20	+	+	-
35 c	0	0	23	23	-	-	-
36 c	0	21	9	22	-	-	-
37 b	0	22	0	20	+	+	-
40 c	0	19	10	20	-	-	-
41 d	0	22	8	22	-	-	-
42 a	0	21	10	19	-	-	-
46 a	0	19	0	20	+	+	-

* جميع العزلات من الايشيركيا القولونية بإستثناء العزلات 15a و28a و 40c و 42a فهي من متقلبات الميرابالس، MH = وسط المولر هنتون، + = مقاوم للبيتا لاكتام، - = حساسة للبيتا لاكتام.

جدول ٣: النتائج النهائية لجميع العزلات (٣٨) لانزيم البيتا لاكتام لمجموعة 67DC

النتيجة النهائية البيتا لاكتام result final ESBLs	نتائج قطر نطاق التثبيط (ملم) على وسط MH Inhibition zone (Z) diameter in mm on MH agar						رقم العينة ورمزها*
	Z6 (CTX/CV2)	Z5 (CTX)	Z4 (CAZ/CV)	Z3 (CAZ)	Z2 (CPD/CV)	Z1 (CPD)	
+	31	17	28	25	23	0	1 d
-	24	22	18	18	0	0	2 c
+	18	12	31	25	23	0	3 b
-	23	22	18	17	0	0	4 b
+	42	12	32	23	25	0	8 b
+	30	16	28	24	22	0	9 a
+	15	17	28	22	24	0	10 b
+	33	15	30	25	21	0	11 a
+	34	12	32	18	23	0	12 c
-	30	30	20	18	0	0	13 b
-	27	26	20	19	0	0	14 a
+	40	18	35	34	22	0	15 d
-	26	23	18	17	0	0	16 c
-	26	23	17	17	0	0	17 c
+	40	12	30	23	25	0	18 a
+	38	11	31	21	24	0	19 a
+	30	9	29	20	23	0	20 b
+	31	11	29	23	23	0	21 c
+	33	13	30	26	23	0	22 b
+	30	15	27	23	21	0	23 c
+	34	0	28	14	19	0	24 a
+	31	13	31	26	23	0	25 a
+	43	18	29	25	23	0	26 a
+	34	11	29	21	21	0	27 b
-	29	29	28	30	13	14	28 a
+	32	14	29	24	22	0	29 c
+	34	13	31	24	22	0	30 b
+	32	12	27	23	22	0	31 c
+	29	12	29	24	22	0	32 a
+	32	12	29	24	21	0	33 c
+	33	13	29	23	20	0	33 b
+	33	13	29	23	20	0	35 c
+	30	11	27	22	20	0	36 c
+	30	11	26	22	20	0	37d
+	32	16	31	26	21	0	40 c
+	33	10	28	19	22	0	41 d
+	33	16	31	28	20	0	42 a
+	29	10	25	14	20	0	46 a

* جميع العزلات من الايشيركيا القولونية بإستثناء العزلات 15a و28a و40c و 42a فهي من متقلبات الميرابالس، MH = وسط المولر هنتون، + = مقاوم للبيتا لاكتام، - = حساسة للبيتا لاكتام

جدول ٤: توزيع العزلات (٣٨) إعتماداً على نتائج الاختبارات المظهرية لانزيم البيتا لاكتام

نوع الجراثيم	أعداد الجراثيم (%)	النتائج بناءاً على التفاعل مظهرياً		
		وسط MC^{+}	D68C	D67C
الايشيركيا القولونية	٩ (٢٣,٧)	+	+	+
الايشيركيا القولونية	١٩ (٥٠)	+	-	+
متقلبات الميرابالس	٣ (٧,٩)	+	-	+
الايشيركيا القولونية	٦ (١٥,٨)	+	-	-
متقلبات الميرابالس	١ (٢,٦)	+	-	-

+ = مقاومة للبيتا لاكتام مظهرياً، - = حساسة للبيتا لاكتام مظهرياً

وللتحري عن العزلات المقاومة للبيتا لاكتام مظهرياً فحصت العزلات بالمجموعة 68DC فكان ٢٣,٧ % من الايشيركيا القولونية مقاومة للسيفبودوكسيم (CPD10) وعند فحص العزلات بالمجموعة 67DC كان ٧٣,٧% من الايشيركيا القولونية و ٧,٩% من متقلبات الميرابالس المقاومة لواحد او أكثر من السيفبودوكسيم cefpodoxime (CPD10C) والسيفتازيديم ceftazidime (CAZ30C) والسيفوتاكسيم cefotaxime (CTX30C). لذلك كان ٧٨,٠% من العينات موجبة للجراثيم المقاومة للبيتا لاكتام. وبالمقارنة مع نتائج لدراسات أخرى فإن دول كثيرة فحصت عينات دواجن أو مواد غذائية ذات منشأ حيواني او عينات او مسحات من حيوانات مختلفة للكشف عن الانواع الجرثومية المنتجة لانزيم البيتا لاكتام الواسعة الطيف (١٢-١٦،٢٩،٣٠). ففي السويد أشار تقرير برنامج رصد مقاومة المضادات الميكروبية البيطرية السويدي (SVARM) الى التحري عن الايشيركيا القولونية المنتجة لانزيمات البيتا لاكتام الواسعة الطيف و الـ أي إم بي سي الواسعة الطيف في اللحوم الماشية والخنازير ودجاج اللحم المستوردة والتي جمعت من متاجر البيع بالتجزئة وعينات من دجاج اللحم السويدي جمعت من مجازر الدواجن في السويد فكانت عينات لحم البقر تحتوي على الايشيركيا القولونية المقاومة بنسبة ٠-٨% ولحم الخنزير بنسبة ٢-١٣% ومن لحم الفروج بنسبة ١٥-٩٥%. وكان أعلى نسبة (٩٥%) في لحوم الفروج المستوردة من أمريكا الجنوبية تليها لحوم الدجاج الأوروبي (٦١%) ولحم الفروج الدنماركي (١٥%) و ٤٤% من لحم الفروج السويدي ومن الجدير ذكره ان السويد والدنمارك لا تستخدم السيفالوسبورين في حقول إنتاج الدجاج اللاحم ويعتقد في السويد أن حدوث الجراثيم المنتجة للمقاومة يعود ذلك إلى انتشارها من قطعان التربية المستوردة إلى قطعان إنتاج الدجاج اللاحم السويدي (٣١)، وفي النمسا فحصت عينات براز جمعت من الخنازير والأبقار والدجاج والأغنام أثناء الذبح وعينات من حليب خام جمعت من خزان الحليب وعينات من لحم الخنزير و البقر فكانت النتائج أن ١٥,٣% و ١٣,٧% و ٨,٦% و ٦٣,٤% من العينات المعزولة من الخنازير والأبقار والأغنام والدجاج موجبة للجراثيم المقاومة للبيتا لاكتام على التوالي (٣٢)، وفي دراسة أخرى في إيطاليا كان الهدف منها تقييم ٥٦ عزلة من الجراثيم المعوية مظهريا وجينياً كمنتجة لانزيم للبيتا لاكتام والتي تم الحصول عليها من ١٠٠ مسحة برازية جمعت من حيوانات المزرعة فكان ٣٦% من العزلات إيجابية لانزيم للبيتا لاكتام الواسعة الطيف (٣٣). في بولندا فحصت عينات من لحم الخنزير ولحوم البقر ولحم الدجاج جمعت من مجازر مختلفة من بولندا وتم تحديد ١١,٧% من العزلات مظهرياً منتجة لانزيم للبيتا لاكتام الواسعة الطيف و ٤.٥% من العزلات منتجة للـ أي إم بي سي الواسعة الطيف (٣٤). وفحص في تركيا عينات لحم الدجاج، وحليب البقر الخام و جبن حليب البقر الخام فكان ٥٢,٧% و ٤٣,٦% و ٣,٧% من العينات على التوالي تحتوي على عزلات منتجة لانزيم للبيتا لاكتام الواسعة الطيف (٣٥).

يتضح مما تقدم أن الايشيركيا القولونية المنتجة لانزيمات البيتا لاكتام وللـ أي إم بي سي الواسعة الطيف يمكن عزلها من براز الدواجن وان البحث الحالي كشف عن الجراثيم المنتجة لانزيم البيتا لاكتام الواسعة الطيف في دجاج اللحم وأن الطرق المظهرية مفيدة ويمكن الاعتماد عليها لتقييم مدى إنتشار الجراثيم المقاومة للبيتا لاكتام في الحيوانات او الغذاء المنتج منها ولكن لا يمكن من خلال الطرق المظهرية معرفة او مقارنة أن كانت هذه الجراثيم وعزلاتها ذات صفات وخواص مشابه لتلك الجراثيم او العزلات المعزولة من الانسان وإن إنتقالها الى الانسان والبيئة المحيطة به ولمعرفة ذلك يتطلب دراسة الصفات الجينية المسؤولة عن المقاومة والتي يمكن من خلالها تحديد العلاقة الوراثية ودرجة النشوء والتطور بين العزلات ذات المصادر المختلفة (٣٦).

المصادر

1. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β-Lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev. 2010;23:160-201.
2. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. Nature Rev. Microbiol.2006;4:36-45.
3. EMA and ECDC. European medicines agency and European centre for disease prevention and control.The bacterial challenge: time to react a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Stockholm. 2009.
4. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R,

Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. Lancet Infect Dis. 2013;13:057-1098.

5. Graham JP, Boland JJ, Silbergeld E. Growth promoting antibiotics in food animal production: An Economic Analysis. Public Health Rep. 2007;122:79-87.
6. Price LB, Graham JP, Lackey LG, Roess A, Vailes R, Silbergeld E. Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among US poultry workers. Environ Health Perspect. 2007;115:1738-1742.
7. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:117-123.
8. Silbergeld, EK, Graham J, Price LB. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. Annu Rev Public Health. 2008;29:151-169.
9. Smith TC, Gebreyes WA, Abley MJ, Harper AL, Forshey BM, Male MJ, Martin HW, Molla BZ, Sreevatsan S, Thakur S, Thiruvengadam M, Davies PR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. PLoS ONE. 2013;8:e63704.
10. Van Boeckela ThP, Brower Ch, Gilbert M, Grenfell BT, Levina SA, Robinsoni TP, Teillanta A, Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. PNAS. 2015;112:5649-5654.
11. Vieira AR, Collignon P, Aarestrup FM, McEwen SA, Hendriksen RS, Hald T, Wegener HC. Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: An Ecological Study. Foodborne Pathog Dis. 2011;8:1295-1300.
12. Cardinale E, Colbachini P, Perrier-Gros-Claude JD, Gassama A, Aidara-Kane A. Dual emergence in food and humans of a novel multiresistant serotype of *Salmonella* in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 35:c:1,2. J Clin Microbiol. 2001;39:2373-2374.
13. Costa D, Poeta P, Brinas L, Saenz Y, Rodrigues J, Torres C. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. J Antimicrob Chemother. 2004;54:960-961.
14. Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K. Extended-spectrumbeta-lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 9:3533-3537.
15. Aarestrup FM, Hasman H, Agerso Y, Jensen LB, Harksen S, Svensmark B. First description of blaCTX-M-1-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production. Journal Antimicrobial Chemotherpy. 2006;57:1258-1259.
16. Abdallah HM, Reuland EA, Wintermans BB, Al Naiemi N, Koek A, Abdelwahab A, Ammar A.M, Mohamed AA, Vandenbroucke-Grauls CM. Extended-spectrum β-lactamases and/or carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Zagazig, Egypt. PLoS One. 2015;10:e0136052. doi:10.1371.
17. Hasman H, Agersø Y, Hendriksen R, Cavaco LM, Guerra-Roman B. Laboratory Protocol: Isolation of ESBL, AmpC and carbapenemase producing *E. coli* from caecal samples. Final protocol, November 2014; Version 1. DTU Food National Food Institute. 1-11.

١٨. الحمداني، مها هاشم عبد الكريم، حسن، عبد الواحد أحمد. التقييم النوعي الجرثومي لجبن الأغنام الابيض المحلي في أسواق مدينة الموصل. المجلة العراقية للعلوم البيطرية. ٢٠١٧؛٣١: ١-٦.

19. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: 2014; www.clsi.org/membership.
20. CDDEP. Center for Disease Dynamics, Economics and Policy. State of the World's Antibiotics. Washington, D.C. 2015;1-84.
21. O'Neil J. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. The review on antimicrobial resistance, 2015;1-44.
22. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. Clin Microbiol Rev. 2013;26:744-758.
23. EFSA. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum- -lactamases and/or AmpC -lactamases in food and food producing animals. EFSA J. 2011;9:2322.
24. Reglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, Fortineau N, Poyart C, Nordmann P, Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of *Enterobacteriaceae* producing extendedspectrum beta-lactamases. J Med Microbiol. 2008;57:310-315.
25. Kolar M, Bardon J, Chroma M, Hricova K, Stosova T, Sauer P, Koukalova D. ESBL and AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in poultry in the Czech Republic. Veterinarni Medicina. 2010;55:119-124.
26. Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. J Antimicrob Chemother. 2011;66:86-95.
27. Börjesson S, Egervärn M, Lindblad M, Englunda S. Frequent Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase- and transferable AmpC Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden. Appl Environ Microbiol. 2013;7:2463-2466.
28. Odenthal S, Akineden Ö, Usleber, E. Extended-spectrum β-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in bulk tank milk from German dairy farms. Int J Food Microbiol. 2016;238:72-78.
29. Schaumburg F, Alabi AS, Frielinghaus L, Grobusch MP, Köck R, Becker K, Issifou S, Kremsner PG, Peters G, Mellmann A. The risk to import ESBL-producing Enterobacteriaceae and *Staphylococcus aureus* through chicken meat trade in Gabon. BMC Microbiol. 2014;14:286.
30. Tschudin-Sutter S, Frei R, Stephan R, Hächler H, Nogarth D, Widmer AF. Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: a threat from the kitchen. Infect Control Hosp Epidemiol. 2014;35:581-584.
31. Bengtsson B. Börjesson S, Englund S, Ericsson-Unnerstad H, Greko C, Grönlund-Andersson U, Landén A, Pringle M. Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring (SVARM) 2011. National Veterinary Institute. 2012.pp:1-64.
32. Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res. 2012;8:3-9.
33. Stefani S, Giovanelli I, Anacarso I, Condò C, Messi P, De Niederhäusern S, Bondi M, Iseppi R, Sabia C, Prevalence and characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in food-producing animals in Northern Italy. New Microbiol. 2014;37:551-555.
34. Wasiński B, Różańska H, Osek J. Occurrence of extended spectrum β-lactamase- and AmpC-producing *Escherichia coli* in meat samples. Bull Vet Inst Pulawy. 2013;57:513-517.
35. Tekiner IH, Özpınar H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* from foods of animal origin. Braz J Microbiol. 2016;47:444-451.
36. Olsen RH, Bisgaard M, Löhren U, Robineau B, Christensen H. Extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. Avian Pathol. 2014;43:199-208.