

## عزل سلالات الإشريكية الكولونية E.coli من المخلفات السائلة لمستشفيات جامعة دمشق واختبار حساسيتها لصادات البيبتالاكتام

اسيا خطاب<sup>1</sup>، أ. د. عدنان علي نظام<sup>2</sup>، أ. د. لينة الأمير<sup>3</sup>

1. قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق

2. الهيئة العامة للتقانة الحيوية

3. الهيئة العامة للتقانة الحيوية

### الملخص:

هدفت الدراسة الحالية التي تمت على مستشفيات جامعة دمشق الأسد والأطفال والمواساة والتوليد إلى تقييم وجود Escherichia coli المقاومة لصادات البيبتالاكتام وتحديد نسبة العزلات المنتجة لإنزيم البيبتالاكتاماز في المخلفات السائلة لهذه المستشفيات، فقد تم عزل 150 عزلة E.coli من المخلفات السائلة للمستشفيات السابقة، وأجريت اختبارات الحساسية على عدد من صادات البيبتالاكتام التي تعود إلى مجموعة البنسيلينات ومجموعة السيفالوسبورينات من الأجيال الأول والثاني والثالث. وبلغت نسبة المقاومة 100% للسيفالوسبورينات (CFR) و Cefadroxil (CZ) و Cephalexin (CL) من الجيل الأول و Cefapodoxime (CDP) من الجيل الثالث، بينما بلغت نسبة المقاومة 86% تجاه Cefactor (CFC) من الجيل الثاني، وبلغت 93% تجاه Cefatoxime (CTX) و 80% تجاه Cefaperazone (CPZ) و 78% تجاه Ceftriaxone (CTR) من الجيل الثالث أما نسبة المقاومة تجاه Amoxyllin (AMX) فبلغت 93%، وقد تحمل 42% من العزلات التراكيز العالية من Cefterioxon (CTR) وصلت إلى 500 µg/ml، وبينت النتائج أن 88% من العزلات المقاومة مفرزة لإنزيم البيبتالاكتاماز.

تاريخ الإيداع: 2022/03/02

تاريخ الموافقة: 2022/08/08



حقوق النشر: جامعة دمشق-سورية،  
يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب  
الترخيص

CC BY-NC-SA 04

**الكلمات المفتاحية:** بيتالاكتام، سيفالوسبورينات، إنزيم البيبتالاكتاماز، المخلفات السائلة للمستشفيات

## Isolation of Escherichia coli from effluents of some Damascus University hospitals and determination of their susceptibility to Beta lactams Antibiotics

Asia Khattab<sup>1</sup>, D.Adnan Ali Nizam <sup>2</sup>, D. Lina Alamir <sup>3</sup>

1. Plant Biology Department, Faculty of Science, Damascus University

2.National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria

3.National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria

### Abstract:

A survey on several Damascus university hospitals was carried out to determine the presence of E.coli resistant to beta lactams antibiotic and to determine the percentage of isolates that secreted Beta-lactamase in the liquid effluents of these hospitals. The number of isolates was 150 for E. coli.

Sensitivity tests using a number of Beta Lactam antibiotics belonging to the group of penicillins and cephalosporins of the first and second and third generation were conducted. The percentage of resistance to first generation of cefalosporin group of Cefadroxil (CFR), Cefazolin (CZ), Cephalexin (CL), and third generation Cefapodoxime (CDP) reached 100%, while the percentage of resistance towards Cefaclor (CFC) from the cephalosporin second generation reached 86%, and it reached 93% toward Cefatoxime (CTX),and 80 % toward Cefaperazone (CPZ), and%78 towards Ceferioxon (CTR), all belonging to the third generation cephalosporins.As for the resistance of E.coli isolates towards penicillins they reached 93% towards Amoxycillin, while 42% of the isolates tolerated high concentration of 500µg/ml of Ceftriaxone.Results also showed that 88% of the resistant isolates produced Beta-lactamase.

**Key word:** Beta lactam. Beta-lactamase, Cephalosporins, Hospital's Effluent

**المقدمة:**

تحتوي مياه صرف المشافي على العديد من المواد المطروحة، فهي تحوي أنواع من المخلفات السائلة الخطيرة وجراثيم ممرضة بأعداد كبيرة وذات قدرة عالية على مقاومة الصادات الحيوية الناتجة عن أقسام الأمراض السارية، كما يسبب انتشار المواد الصيدلانية في البيئة مشكلة بيئية، وقد قُيِّمت العديد من الدراسات تأثير وجود المواد الصيدلانية والصادات الحيوية في البيئة (Hussain et al., 2016; Cruz-Morato et al., 2014; Vo et al., 2019; Nonfodji et al., 2020).

أظهرت الدراسات وجود جراثيم مقاومة للصادات الحيوية على نطاق واسع في مياه الصرف الصحي والطبي ومحطات المعالجة (Rizzo et al., 2013; Haller et al., 2018)، ويحدث انتشار بلاسميدات مقاومة الصادات الحيوية في محطات المعالجة بشكل أساسي بينما يحدث ذلك بنسبة 10% فقط في البيئة خارج محطات المعالجة (Munck et al., 2015).

تعد صادات البيتا لاكتام أكثر الصادات الحيوية استعمالاً في العيادات والمشافي حيث تشكل 60% من الصادات الحيوية المستعملة في العالم (Wong, 2017)، كونها الأكثر فعالية في المعالجة والأكثر تحملاً من قبل المرضى، ولكن إنزيمات البيتا لاكتاميز المنتجة من الجراثيم تحطم أغلب صادات البيتا لاكتام بحلمة الرابطة الأميدية في حلقة البيتا لاكتام مما يسبب مشكلة في المعالجة عند حدوث عدوى جرثومية (Chen et al., 2013)، وتقع المورثات المرزمة لإنزيمات البيتا لاكتاميز على الصبغي الجرثومي أو على البلاسميدات أو على الترانسبوزونات مما يسبب الانتشار السريع والواسع لهذه المورثات (Wong, 2017; Haller et al., 2018).

لوحظ في الآونة الأخيرة انتشار الجراثيم التي تنتمي إلى عائلة الجراثيم المعوية Enterobacteriaceae المقاومة للعديد من الصادات الحيوية Multi-Drug Resistance، وبإمكان إنزيمات البيتا لاكتاميز ذات الطيف الواسع Exetened-spectrum-beta lactamase (ESBL) المنتجة منها تحطيم الجيل الأول والثاني والثالث من السيفالوسبورينات (Abd elrahman et al., 2020)، وتستعمل المثبطات الإنزيمية مثل Clavulanic acid و Sulbactam لتثبيط عمل هذه الإنزيمات (Chen et al., 2013; Bush et al., 2019).

تمت الدراسة الحالية على المخلفات السائلة لمستشفيات جامعة دمشق (الأطفال والأسد والمواساة والتوليد)، وذلك لأن معظم المنشآت الصحية في مدينة دمشق تتخلص من المياه العادمة الناتجة عنها عبر تصريفها في شبكة الصرف الصحي دون القيام بأية معالجة لها (مخيبر، 2017)، وهدفت إلى التحري عن وجود الاشريكية القولونية E.coli في المخلفات السائلة لهذه المستشفيات واختبار حساسيتها لصادات البيتا لاكتام وتقييم إنتاجها لإنزيمات البيتا لاكتاميز. مواد البحث وطرقه:

الاعتيان: تم جمع 50 مل من ماء المجرور الرئيسي قبل المحطة في حال وجودها لكل مشفى بمعدل عينة كل 15 يوم وثلاث مكررات لكل عينة خلال ثلاث أشهر متتالية 8 و9 و10 لعام 2020، وجمعت العينات في عبوات معقمة ومحكمة الإغلاق، ثم وضعت العبوات في حاوية مبردة لحين الوصول إلى المختبر وأجريت التحاليل اللازمة عليها مباشرة عند الوصول إلى المختبر وقد أجريت التحاليل في مختبرات قسم علم الحياة النباتية بكلية العلوم بجامعة دمشق ومختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وبلغ عدد العينات 72 عينة.

التعداد العام للجراثيم وعزل المستعمرات: استعمل وسط الآغار المغذي Nutrient agar بغرض التعداد العام للجراثيم لكل مجموعة من العينات، ووسط زرقة الميتلين EMB لانتقاء الجراثيم العائدة إلى فصيلة الأمعائيات والمخمرة لسكر اللاكتوز، ووسط شابمان لتحديد وجود العنقوديات Staphylococcus في المخلفات السائلة للمستشفيات المذكورة سابقاً وذلك بأخذ 1مل من العينة ونشرها على سطح الآغار المغذي ووسط EMB بعد إجراء التمديدات بمحلول فيزيولوجي 0.9% NaCl وفق السلسلة 1:10 و 1:100 و 1:1000 و 1:10000 و 1:100000 وحضنت الأطباق في الدرجة 37 °C لمدة 24 ساعة.

تشخيص وانتخاب العزلات التي تعود إلى فصيلة الأمعائيات: استعمل وسط EMB لتحديد العزلات سالبة صبغة غرام حيث تم نشر 1 مل من العينة من التمديد 1:100000 بغرض الحصول على مستعمرات منفردة وتم انتخاب المستعمرات التي تعود إلى

E.coli والتي تعطي لمعة معدنية خضراء بعد الحضانة في الدرجة 37 °C لمدة 24 ساعة، كما أجريت الاختبارات التشخيصية لتأكيد النوع الجرثومي، حيث استخدمت الأوساط Kilgler Iron Agar بغرض الكشف عن تخمير سكر السكروز واللاكتوز والغالكتوز وإنتاج غاز H<sub>2</sub>S واستعمل وسط Simon Citrate Agar بغرض الكشف عن استهلاك السترات مصدر وحيد للكربون وأجري اختبار الأوكسيداز Oxidase باستعمال كاشف Dimethyl-4-phenylenediamine الذي يعطي لون بنفسجي في حال إيجابية الاختبار بعد إضافته إلى ورقة ترشيح مبللة بالمعلق الجرثومي، وأجري اختبار الكاتالاز Catalase باستعمال كاشف H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> الذي يعطي فقاعات في حال إيجابية الاختبار عند إضافته على صفيحة زجاجية تحمل جزء من المستعمرة الجرثومية، واختبار الإندول باستعمال كاشف Kovacs الذي يشكل حلقة حمراء في طبقة الكحول في حال إيجابية الاختبار عند إضافة قطرات منه لمرق البيتون الذي يحوي الجرثومة تم حضانها 24 ساعة بدرجة حرارة 37 °C (Hawkey et al, 1989).

اختبار التحسس للصادات:

- اختبار التحسس بطريقة الأقراص: أجري اختبار الحساسية على الصادات الحيوية باستعمال وسط مولر هنتون وباستعمال عدد من صادات البييتالاكتام بطريقة الأقراص وهي Amoxycillin (AMX 25µg) من البنسيلينات وعدد من السيفالوسبورينات منها Cefazolin (CZ 30µg) و Cephalexin (CL 30µg) و Cefadroxil (CFR 30µg) التي تعود للجيل الأول منها و Cefaclor (CEC 30µg) الذي يعود للجيل الثاني، و Cefatoxime (CTX 30µg) و Cefaperazone و CPZ 75µg) و Cefapodoxime (CPD 10µg) و Cefterioxon (CTR 30µg) التي تتبع للجيل الثالث، وتمت إضافة جراثيم E.coli إلى وسط مولر هنتون بفرش 700 µL من معلق جرثومي حاوي على E.coli ذو درجة عكارة 0.5 ماكفارلاند بعد تنمية الجراثيم في المرق المغذي Nutrient broth مدة 24 ساعة وتم حضان الأقطاب بعد إضافة الأقراص إليها في الدرجة 37 °C لمدة 24 ساعة (Shahid et al., 2009; Bush and Bradford, 2019).
- اختبار التحسس بطريقة الحفر: تم اختيار الصاد الحيوي Cefterioxon ممثلاً عن السيفالوسبورينات كونه الأكثر استعمالاً في المشافي واختبر تأثيره على E.coli بطريقة الحفر إذ تم تحضيره بعدة تراكيز هي 31.25 µg/ml و µg/ml 62.5 و 125 µg/ml و 250 µg/ml و 500 µg/ml منحلّة في الماء المقطر المعقم، حيث صنعت حفر في وسط مولر هنتون الصلب بقطر 6 mm، بعد نشر جراثيم E.coli على وسط مولر هنتون بحجم 700 µL من معلق جرثومي حاوي على E.coli ذو درجة عكارة 0.5 MAC تمت تنميتها في المرق المغذي Nutrient broth مدة 24 ساعة، حيث احتوت كل حفرة على 50 µL من أحد التراكيز السابقة لـ Cefterioxon، وتم قياس أقطار هالات التنشيط بعد الحضانة في الدرجة 37 °C لمدة 24 ساعة (Bhatta et al., 2010; Sethi et al., 2013).
- التحري عن وجود إنزيمات البييتالاكتيميز في السلالات التي أبدت مقاومة: تم التحري عن وجود أنزيم البييتالاكتيميز بإضافة الصاد الحيوي Cefterioxon بتركيز 250 µg مع المثبط الإنزيمي Sulbactam 125 µg إلى وسط مولر هنتون بطريقة الحفر كما ذكر في الفقرة السابقة (Bhatta et al., 2010; Sethi et al., 2013)، واستعمل الصاد الحيوي Cefaperazone 75 µg مع المثبط الإنزيمي Sulbactam 25 µg (CPS 100) والصاد الحيوي Amoxycillin 25 µg مع المثبط الإنزيمي Clavulanic Acid 5 µg (AUG30) على وسط مولر هنتون بطريقة الأقراص كما وردت سابقاً، وتم قياس أقطار هالات التنشيط بعد الحضانة في الدرجة 37 °C لمدة 24 ساعة (Aronoff, 1984; Bush et al., 2019).
- الدراسة الإحصائية: أجريت التجربة 6 مرات بمعدل 3 مكررات في كل مرة ببرنامج SPSS نسخة 22 لمعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها حيث استعمل اختبار one way anova و two way anova لمقارنة متوسطات المتغيرات جميعها في المستشفيات الأربعة المدروسة واستعمل في الدراسة برنامج Excel 2019 .

نتائج التعداد العام لأعداد الخلايا الجرثومية: تم اختبار 72 عينة لإجراء التعداد على وسط الآغار المغذي وعلى وسط EMB، حيث تم نشر نفس العينات على الوسطين المذكورين وكانت النتائج كما في الجدول (1)، وهي نسب مرتفعة مقارنة بالدراسات العالمية، فقد بين Ojer-Usoz وزملاؤه أن العدد الأكثر احتمالاً للامعائيات في 1مل بين 9.2-8\*10<sup>2</sup> وبين Beyene أن العدد الأكثر احتمالاً للامعائيات تراوح بين 1.23\*10<sup>6</sup> – 1.9\*10<sup>6</sup> بينما تراوح العدد الأكثر احتمالاً MBN للجراثيم - 3.31\*10<sup>9</sup> 2.03\*10<sup>9</sup> في الدراسة التي أجراها Haller وزملاؤه وتراوح العدد بين 1.75–2.47\*10<sup>9</sup> في الدراسة التي أجراها Wang وزملاءه (Wang et al, 2017; Beyene, 2011, Haller 2018; Ojer-Usoz, 2014).

#### نتائج الدراسة الإحصائية للتعداد العام لأعداد الخلايا الجرثومية:

أثبتت نتائج اختبار one way anova و two way anova لمقارنة متوسطات المتغيرات جميعها في المستشفيات الأربعة المدروسة ببرنامج SPSS نسخة 22 وجود فروق معنوية بين متوسطات أعداد الجراثيم النامية على وسطي الآغار المغذي العادي ووسط EMB للمستشفيات الأربعة بقيمة P = 0.000 و عدت القيمة P<0.05 قيمة يعتد بها إحصائياً بمستوى ثقة 95% كما في الجدول (1)، ويعود ذلك إلى طريقة معالجة المخلفات السائلة في كل مستشفى حيث إن مستشفى الأسد الجامعي هو الأقل عدداً من حيث تنوع الأجناس والعدد الكلي للجراثيم فيه نظراً إلى احتوائه على خزان تخمير يعمل بطريقة الحمأة المنشطة active sludge، بينما يحتوي مستشفى الأطفال والتوليد على أحواض ترشيح، أما مستشفى الموساة فهو الأكثر عدداً من حيث تنوع الأجناس والعدد الكلي للجراثيم فهو يحتوي على أحواض ترسيب.

الجدول (1). نتائج الدراسة الإحصائية لمتوسط أعداد الخلايا مضرورياً بالعدد 10<sup>5</sup> في 1 مل من المخلفات السائلة للمستشفيات حيث كان عدد المكررات 18 لكل مستشفى.

2 WAY ANOVA		Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: القيمة							
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.		
Corrected Model	670000.382 <sup>a</sup>	7	95714.340	8.334	.000		
Intercept	2795305.340	1	2795305.340	243.396	.000		
المشفى	445127.076	3	148375.692	12.920	.000		
العامل	20330.007	1	20330.007	1.770	.186		
المشفى * العامل	204543.299	3	68181.100	5.937	.001		
Error	1561907.278	136	11484.612				
Total	5027213.000	144					
Corrected Total	2231907.660	143					
a. R Squared = .300 (Adjusted R Squared = .264)							
1 WAY ANOVA (NA)		ANOVA					
NA							
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.		
Between Groups	500484.042	3	166828.014	14.770	.000		
Within Groups	768087.833	68	11295.409				
Total	1268571.875	71					
Descriptive							
NA							
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound	

الاسد الجامعي	18	79.889	56.4414	13.3034	51.821	107.957	15.0	220.0
المواساة	18	246.722	148.0023	34.8845	173.122	320.322	90.0	540.0
الاطفال	18	57.556	96.3396	22.7075	9.647	105.464	.0	332.0
التوليد	18	220.667	103.9711	24.5062	168.963	272.370	48.0	400.0
Total	72	151.208	133.6683	15.7530	119.798	182.619	.0	540.0
1 WAY ANOVA (EMB) ANOVA								
EMB								
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.		
Between Groups		149186.333	3	49728.778	4.260	.008		
Within Groups		793819.444	68	11673.815				
Total		943005.778	71					
Descriptive								
EMB								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
الاسد	18	80.722	51.7787	12.2044	54.973	106.471	15.0	200.0
المواساة	18	197.222	93.8538	22.1216	150.550	243.895	69.0	368.0
الاطفال	18	137.944	155.1347	36.5656	60.798	215.091	.0	480.0
التوليد	18	93.889	105.5411	24.8763	41.405	146.373	13.0	400.0
Total	72	127.444	115.2466	13.5819	100.363	154.526	.0	480.0



الشكل (1). التعداد على وسط EMB في 1 ml

تشخيص وانتخاب العزلات التي تعود إلى فصيلة الأمعائيات: تم تصنيف العزلات الجرثومية التي عزلت من العينات السابقة إلى الأجناس التالية وذلك اعتماداً على شكل المستعمرة على الأوساط الاصطناعية واعتماد اختبارات محددة في الجدول (2)، فأمكن الحصول على *Enterobacter* و *Pseudomonas* التي شكلت الغالبية العظمى و *Klebsiella* التي كانت بنسبة أقل وظهرت عزلة واحدة *Proteus* وخمس عزلات *Staphylococcus aureus* بأعداد ومئة وخمسون عزلة *E.coli* وهذا يتوافق مع الأجناس الجرثومية التي ظهرت في الدراسات العالمية (Ojer-Usoz et al, 2014, Wang et al 2017, Galvin, 2010; Kaur, 2020)، بينما كانت النسبة الأعلى لـ *E.coli* في الدراسة التي أعدها كل من Nagarajan و Haller (Nagarajan and Radhakrishna, 2015; ) Nonfodji et al, 2020; Haller et al, 2018.

أمكن عزل 150 عزلة شخّصت على أنها جرثومة *E.coli* حيث أعطت لون أخضر معدني على وسط EMB وقد طابقت النتائج ما ورد في دليل Bergey 2012 كما في الجدول (2) وقد بلغ عددها 120 عزلة من مستشفى المواساة و 10 عزلات من مشفى الأطفال و 18 عزلة من مستشفى التوليد بينما كانت شبه معدومة في عينات الأسد فقد بلغ عددها 2 عزلات.

نتائج اختبار تحسس عزلات E.coli اتجاه تراكيز مختلفة من Ceftetriaxon : أظهر اختبار الحساسية أن 78% من عزلات E.coli مقاومة Ceftetriaxon كما يظهر في الشكل (2 و 9) والجدول (3) علماً أن تركيز Ceftetriaxon في قرص التحسس 30 µg وهي نسبة قريبة من ما أظهره Haller فقد بلغت نسبة مقاومة الجيل الثالث من السيفالوسبورينات الى 82% شملت كل من CRO و CAZ (Tamma, 2018; Kresken et al, 2016; Haller et al, 2018).

بينما قاومت 42% من العزلات تركيز عالي من Ceftetriaxon وصل إلى 500 µg/ml كما يظهر في الجدول (3) والشكل (3 و 4 و 9). الجدول (2). بعض الاختبارات المستعملة في تحديد اجناس الجراثيم المعزولة من المخلفات السائلة لمستشفيات جامعة دمشق.

الاختبار	الجنس					
	E.coli	Enterobacter	Pseudomonas	Klebsiella	Staphylococcus	Proteus
وسط EMB	نمو	نمو	نمو	نمو	لم تنمو	نمو
وسط سايمون سترات	-	+ -	+	+	-	+
وسط شابمان					+	
وسط غليكلر	اقع الانبوب	اصفر	احمر	اصفر	اصفر	اسود
	أعلى الانبوب	اصفر	احمر	احمر	اصفر	احمر
	إنتاج غاز	+	+	-	+	
اختبار	أوكسيداز	-	-	+	-	-
	كاتلاز	+	+ -	+	+	+
	الأندول	+	-	-	-	-

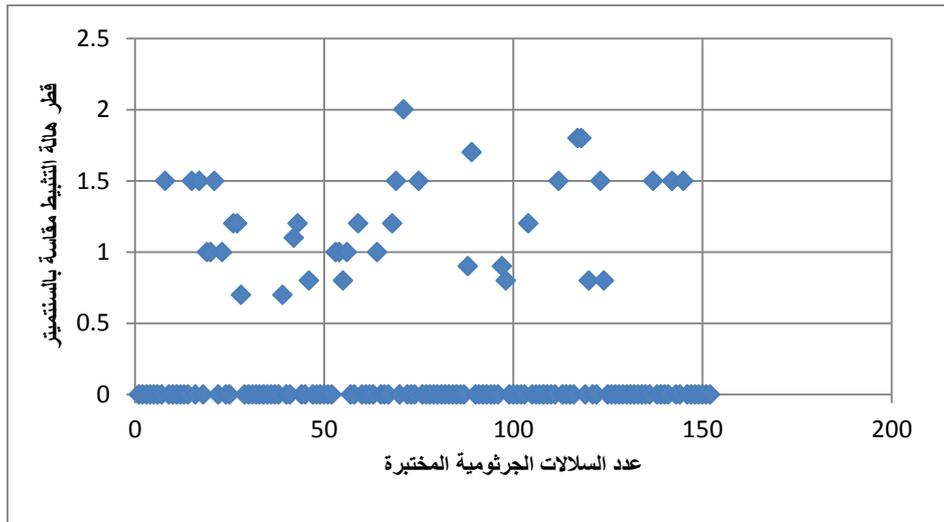
\*لون أصفر في قاعدة الأنبوب + لون أصفر في أعلى الأنبوب = الجرثومة مخمرة اللاكتوز والغلوكوز

\*لون أصفر في قاعدة الأنبوب + لون أحمر في أعلى الأنبوب = الجرثومة مخمرة للغلوكوز وغير مخمرة لللاكتوز

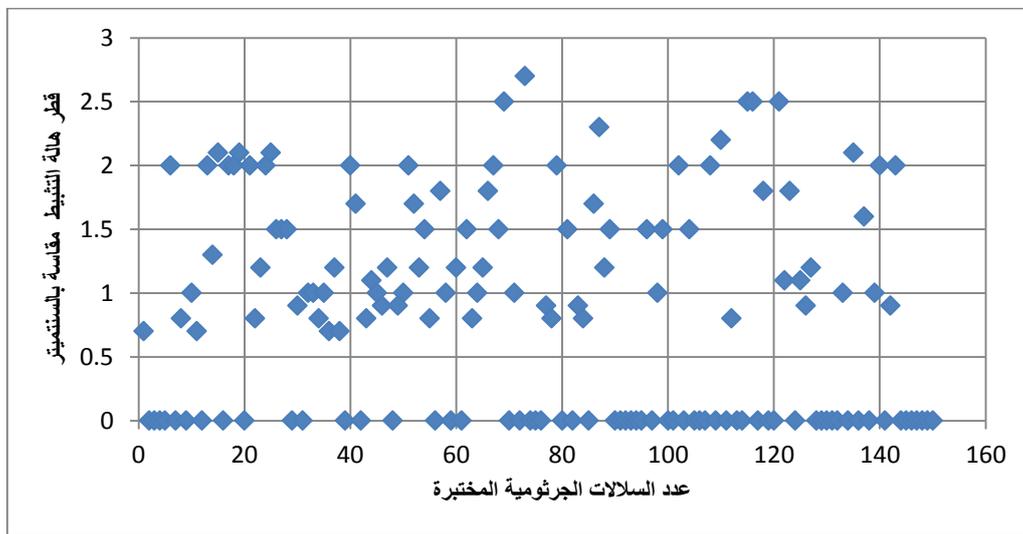
\*لون أحمر في قاعدة الأنبوب + لون أحمر في أعلى الأنبوب = الجرثومة غير مخمرة للسكربين وذلك حسب الدليل من شركة biolife

الجدول (3). قدرة عزلات E.coli على تحمل تراكيز متعددة من Ceftetriaxon باستعمال طريقة الحفر.

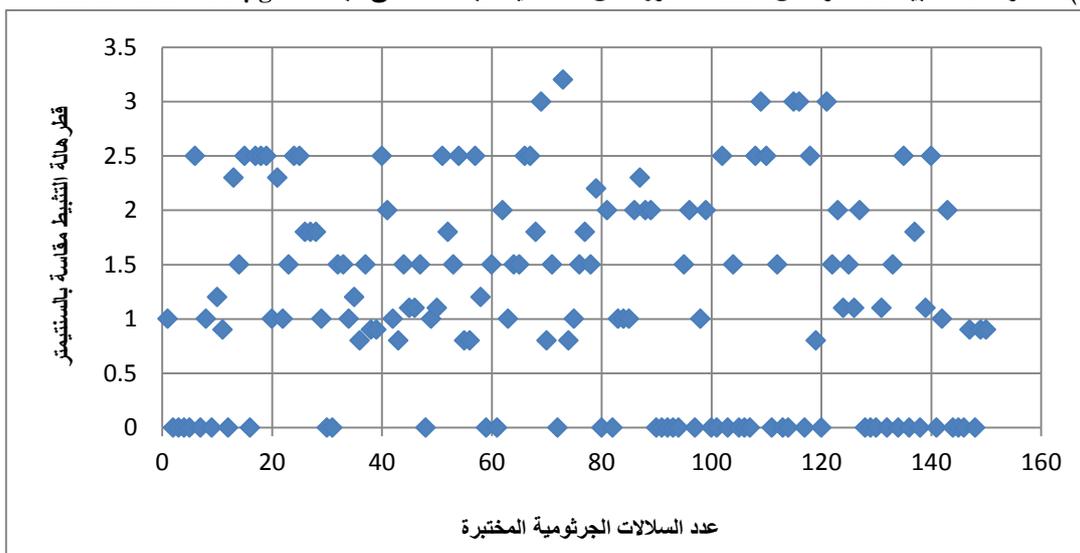
أقل تركيز أظهر حالة التنشيط	نسبة المقاومة
التركيز 500 µg/ml	42%
التركيز 250 µg/ml	20.15%
التركيز 125 µg/ml	7.4%
التركيز 62.5 µg/ml	9.7%
التركيز 31.25 µg/ml	22.39%



الشكل (2). أقطار حالات تثبيط 150 عزلة من E.coli معزولة من مستشفيات جامعة دمشق تجاه Ceftriaxon 31.25 µg/ml

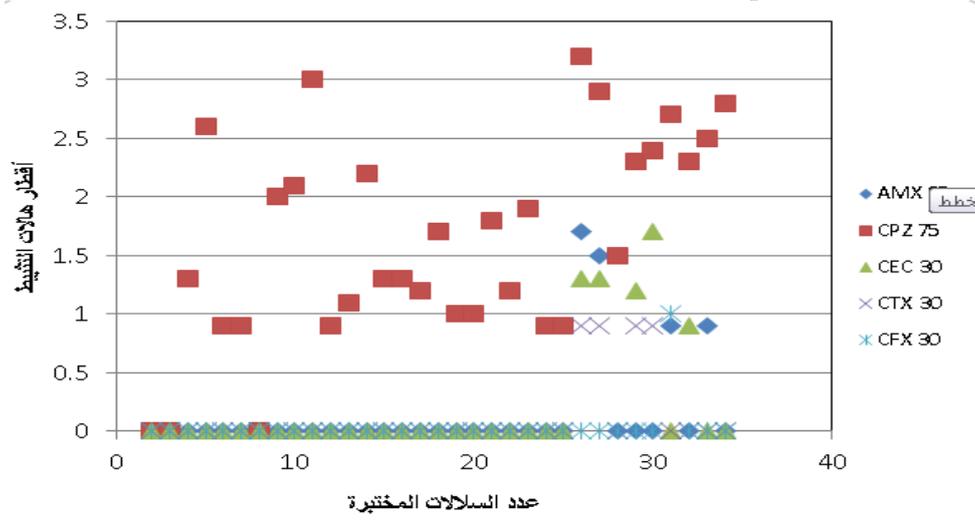


الشكل (3). أقطار حالات تثبيط 150 عزلة من E.coli معزولة من مستشفيات جامعة دمشق تجاه Ceftriaxon 250 µg/ml.

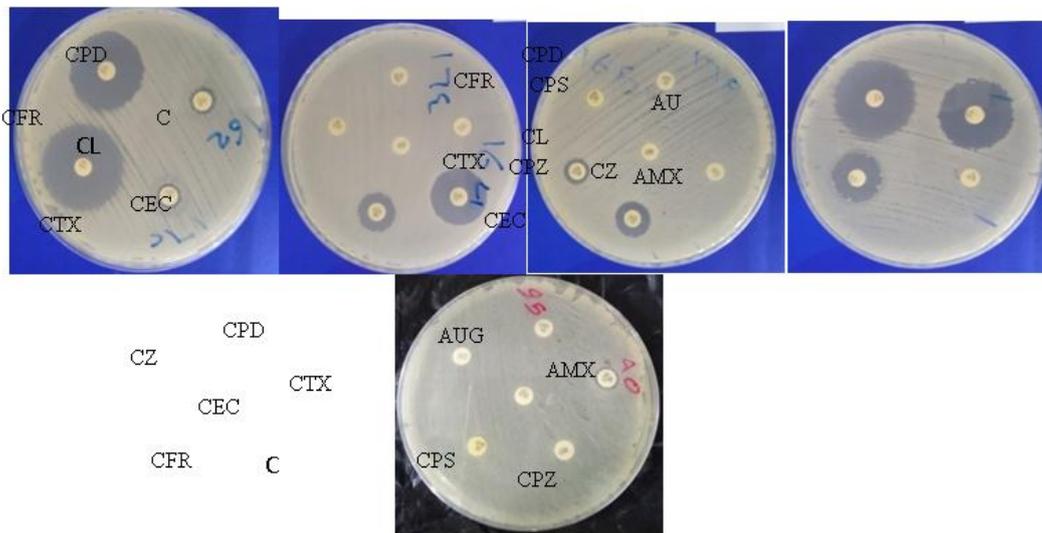


الشكل (4). أقطار حالات تثبيط 150 عزلة من E.coli معزولة من مستشفيات جامعة دمشق تجاه Ceftriaxon 500 µg/ml

وتبين وجود مقاومة عالية جداً تجاه بقية السيفالوسبورينات أيضاً، مقارنة مع ما توصل إليه العديد من الدراسات التي بينت وجود مقاومة لصادات البيتا لاكتام من قبل E.coli في مياه المخلفات السائلة للمستشفيات، وذلك عند اجراء الاختبار على 31 عزلة تم اختيارها من المجموعة المقاومة للـ Ceftriaxon السابقة، إذ بلغت نسبة المقاومة عند اجراء اختبار الأقراص 100% اتجاه CFR و CZ و CL من الجيل الأول للسيفالوسبورينات و CPD من الجيل الثالث، بينما وصلت نسبة المقاومة إلى 86% اتجاه CEC من الجيل الثاني و 80% اتجاه CPZ من الجيل الثالث للسيفالوسبورينات، ووصلت نسبة المقاومة إلى 93% اتجاه صادات CTX من الجيل الثالث للسيفالوسبورينات و AMX من البنسيلينات كما يظهر في الشكل (5 و 6) والجدول (4). (Ojer-Usoz et al, 2014; Cruz-Morato et al, 2014; Hocquet et al, 2016; Kaur et al, 2020)



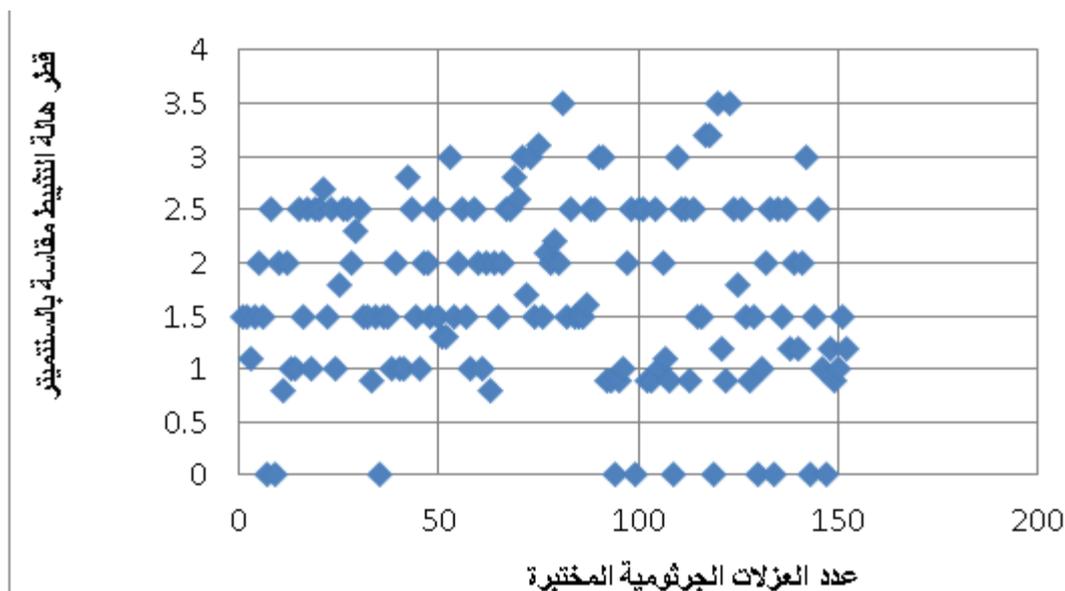
الشكل (5). أقطار هالات تثبيط 31 عزلة E.coli مقاومة لـ Ceftriaxon معزولة من مستشفيات جامعة دمشق تجاه عدد من السيفالوسبورينات الأخرى و Amoxicillin.



الشكل (6). حساسية 31 من عزلة من E.coli مقاومة Ceftriaxon تجاه مجموعة من السيفالوسبورينات الأخرى.

إنتاج إنزيم البيتا لاكتاميز: بينت النتائج أن 88% من العزلات المقاومة كانت منتجة لإنزيم المقاومة البيتا لاكتاميز لدى اختبار نمو العزلات بوجود الصاد الحيوي Ceftriaxon بتركيز 250 µg/ml مع المثبط الإنزيمي Sulbactam بتركيز 125 µg/ml كما في الشكل (7)، وهي نسبة مرتفعة مقارنة مع الدراسات العالمية الأخرى حيث تراوحت النسبة بين 19% في عام 2000 حتى 59% في عام 2015 في مياه صرف المستشفيات (Hocquet et al, 2016) بينما بلغت النسبة 7.1% من السلالات المقاومة المعزولة من

عينات بول (Kresken et al, 2016). وعند دراسة تأثير أقراص الصاد الحيوي Cefaperazone مع المثبط Sulbactam (CPS100) ودراسة تأثير الصاد الحيوي Amoxycillin مع المثبط Clavulanic acid (AUG 30) على مجموعة العزلات المقاومة السابقة التي بلغت 31 عزلة تبين أن نسبة 93 % من العزلات المقاومة تفرز أنزيم البيبتاكتيميز، وكانت حساسية الإنزيم تجاه المثبتين المستخدمين متقاربة حيث كانت نسبة فعالية المثبط Clavulanic acid مساوية 93% بينما كانت نسبة فعالية المثبط Sulbactam مساوية 100% كما في الشكل (8 و9 و10) والجدول (4)، وتعد نسبة فعالية المثبط Clavulanic acid مساوية 93% مرتفعة حيث بلغت في الدراسات الأخرى 28.1% (Kresken et al, 2016).



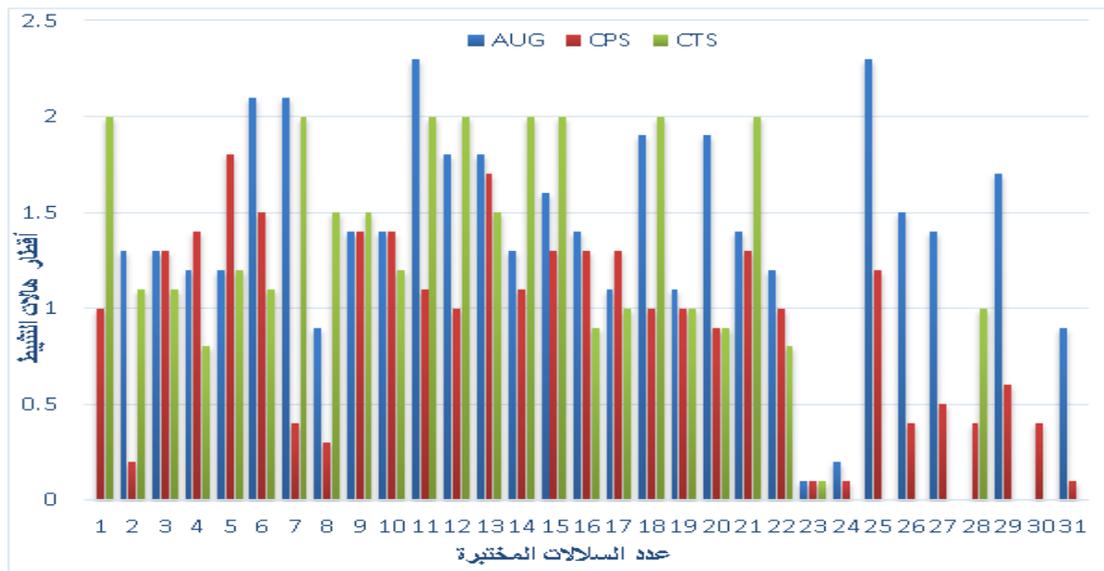
الشكل(7).أقطار هالات تثبيط 150 عزلة من E.coli معزولة من مستشفيات جامعة دمشق تجاه Ceftiraxon 250 µg/ml و Sulbactam 125 µg/ml

الجدول (4). تحسس 31 عزلة مقاومة Ceftiraxon معزولة من مستشفيات جامعة دمشق تجاه عدد من السيفالوسبورينات الأخرى ومقارنتها مع تأثير تراكيز مختلفة من Ceftiraxon.

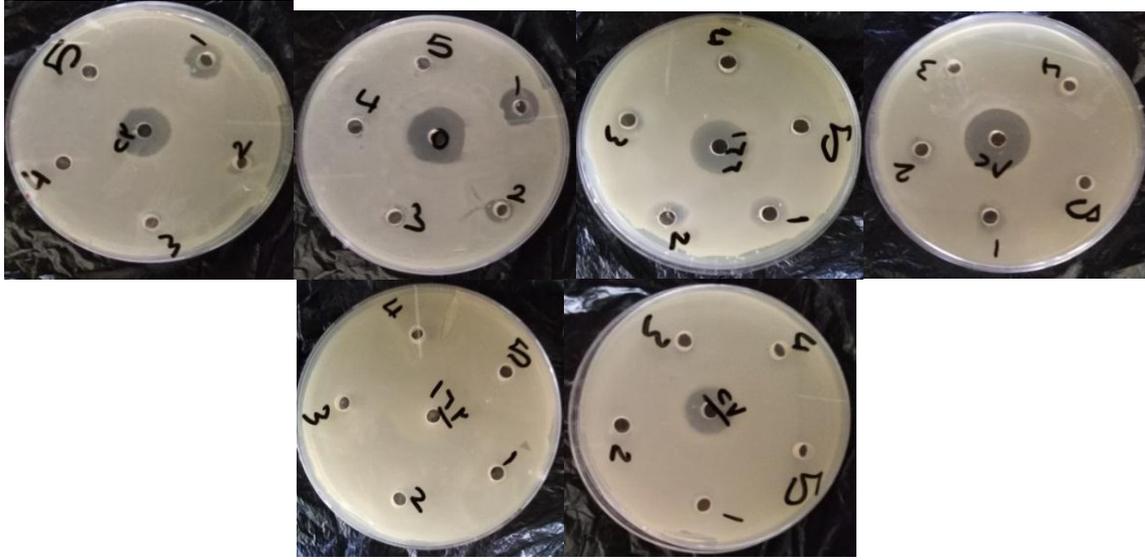
أعلى تركيز CTR	قطر هالة التثبيط مقدراً بالسنتيمتر											رقم السلالة	
	CTS 45	CTR 30	CPS100	CPZ 75	Aug 30	AMX 25	CEC 30	CTX 30	CZ 30	CFR30	CL 30		CPD 10
250>=	2	0	2.3	1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	169
500>=	1.1	0	2.8	2.6	1.3	0	0	0	0	0	0	0	198
500>	1.1	0	2.2	0.9	1.3	0	0	0	0	0	0	0	203
500>	0.8	0	2.3	0.9	1.2	0	0	0	0	0	0	0	172
500>	1.2	0	1.8	0	1.2	0	0	0	0	0	0	0	27
500>	1.1	0	3.5	2	2.1	0	0	0	0	0	0	0	99
125>=	2	0	2.5	2.1	2.1	0	0	0	0	0	0	0	167
250>=	1.5	0	3.3	3	0.9	0	0	0	0	0	0	0	95
250>=	1.5	0	2.3	0.9	1.4	0	0	0	0	0	0	0	166
500>	1.2	0	2.5	1.1	1.4	0	0	0	0	0	0	0	70
125>=	2	0	3.3	2.2	2.3	0	0	0	0	0	0	0	133
125>=	2	0	2.3	1.3	1.8	0	0	0	0	0	0	0	85
250>=	1.5	0	3	1.3	1.8	0	0	0	0	0	0	0	114
500>=	2	0	2.3	1.2	1.3	0	0	0	0	0	0	0	161
500>=	2	0	3	1.7	1.6	0	0	0	0	0	0	0	111
500>=	0.9	0	2.3	1	1.4	0	0	0	0	0	0	0	202
500>	1	0	2.3	1	1.1	0	0	0	0	0	0	0	29
125>=	2	0	2.8	1.8	1.9	0	0	0	0	0	0	0	97

500>	1	0	2.2	1.2	1.1	0	0	0	0	0	0	87
500>	0.9	0	2.8	1.9	1.9	0	0	0	0	0	0	66
125>=	2	0	2.2	0.9	1.4	0	0	0	0	0	0	92
500>	0.8	0	1.9	0.9	1.2	0	0	0	0	0	0	100
500>=	1	0	3.3	3.2	1.8	1.7	1.3	0.9	0	0	0	91
30=	0	0	3	2.9	1.7	1.5	1.3	0.9	0	0	0	165
30=	0	0	2.7	1.5	2.3	0	0	0	0	0	0	22
30=	0	0	2.7	2.3	1.5	0	1.2	0.9	0	0	0	103
30=	0	0	2.9	2.4	1.4	0	1.7	0.9	0	0	0	164
30=	2	1	3.1	2.7	0.9	0.9	0	0	0	0	0	192
30=	0	0	2.9	2.3	1.7	0	0.9	0	0	0	0	1
30=	0	0	2.9	2.5	0.9	0.9	0	0	0	0	0	161
30=	0	0	2.9	2.8	0.9	0	0	0	0	0	0	162

يمثل: EC 30= Cefaclor CFR 30= و CL 30= Cephalexin و CPD 10 = Cefapodoxime CZ 30= Cefazolin  
 CPZ 75= Cefaperazone و CTR 30= Ceftetriaxon و CTX 30= و Cefadroxil  
 Aug 30= moxycillin و CPS100= Cefaperazone75 +Sulbactam 25 و CTS 45= Ceftetriaxon30+ Sulbactam15 و  
 AMX 25= Amoxycillin و 25+ Clavinic Acid 5

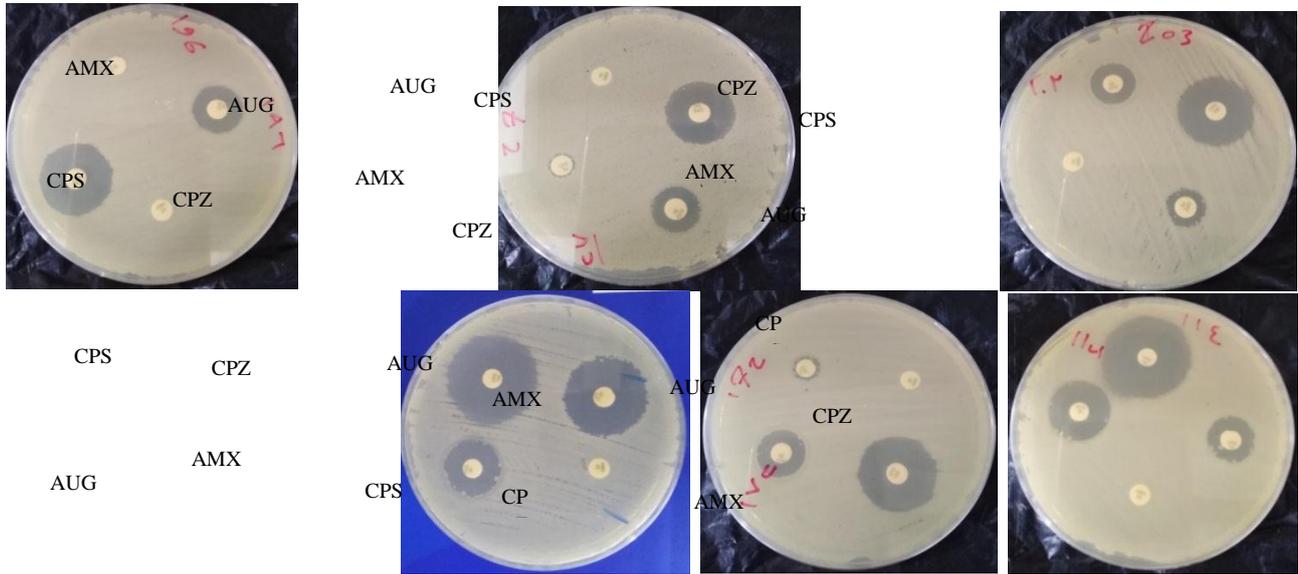


الشكل (8). فعالية المثبتين Sulbactam و Clavulanic acid على إنزيمات البيتا لاكتيميز المنتجة من 31 عزلة من E.coli مقاومة للـ Ceftetriaxon



الشكل (9). حساسية 150 عزلة من معزولة من مستشفيات جامعة دمشق على تراكيز مختلفة من Cefterioxon

\* يمثل الرقم 5 Cefterioxon بتركيز  $31.25 \mu\text{g} / \text{ml}$ ، ويمثل الرقم 4 Cefterioxon بتركيز  $62.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ، ويمثل الرقم 3 Cefterioxon بتركيز  $125 \mu\text{g} / \text{ml}$  ويمثل الرقم 2 Cefterioxon بتركيز  $250 \mu\text{g} / \text{ml}$ ، ويمثل الرقم 1 Cefterioxon بتركيز  $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ ، ويحوي البئر في مركز الطبق Cefterioxon بتركيز  $250 \mu\text{g} / \text{ml}$  مع sulbactam بتركيز  $125 \mu\text{g} / \text{ml}$  والرقم في المركز يمثل رقم العزلة.



الشكل (10). حساسية 31 عزلة مقاومة Cefterioxon معزولة من مستشفيات جامعة دمشق تجاه Cefaperazone و Cefaperazone

مع المثبط Amoxycillin و Sulbactam ومع المثبط Clavulanic acid.

#### الاستنتاجات:

1. يوجد تأثير كبير لدرجة الحرارة في أجناس الجراثيم الموجودة في المخلفات السائلة للمستشفيات الأربعة الأسود والمواساة والتوليد والأطفال.
2. يبين تقييم Escherichia coli المقاومة لصادات البيتاالاكتام ازدياد مقاومة مجموعة البنسيلينات ومجموعة السيفالوسبورينات بين الأجيال حتى بلغت نسبة المقاومة 100%.
3. تحمل 42% من العزلات التراكيز العالية من Cefterioxon (CTR) وصلت إلى  $500 \mu\text{g} / \text{ml}$

4. بينت النتائج أن 88% من العزلات المقاومة مفرزة لإنزيم البيتا لاكتاماز.
5. ليس هناك جدوى من المعالجة بالسفترياكسون والجيل الأول والثاني والثالث من السيفالوسبورينات إلا في حال إضافة مثبط إنزيمي لإنزيم البيتا لاكتاماز نظراً إلى تحمل الجراثيم لتراكيز عالية من السفترياكسون.

## المراجع:

1. مخبير، حنان. (2017). واقع ادارة النفايات الطبية السائلة في عدد من مستشفيات مدينة دمشق  
The reality of liquid medical waste management in Damascus hospitals, Eastern Mediterranean Health Journal , past issues, volume 23, issue 2.
2. Abd elrahman M. A. A., Roshdy. H. Samir, A. H. Hamed E. A, (2020). Antibiotic resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Escherichia coli isolates from imported 1-day-old chicks, ducklings, and turkey poult, Veterinary World, V 13(6).1037-1044.
3. Aronoff. S. C, Jacobs. M. R, Johenning. S, Yamabe. S, (1984). Comparative activities of the 3-Lactamase Inhibitors YTR 830, Sodium Clavulanate, and Sulbactam combined with Amoxycillin or ampicillin, American Society For Microbiology Antimicrobial Agents and Chemotherapy, V 26, N 4, P.580-582
4. Beyene.H and Redaie.G, (2011). Assessment of waste stabilization ponds for the treatment of hospital wastewater: the case of hawassa university referral hospital, World Applied Sciences Journal, V (15)1. 142-150.
5. Bhatta. D. R, Kapadnis. B. P, (2010). production optimization and characterization of bioactive compound against Salmonella and Bacillus Subtilis KBB isolated from nepal. Scientific World J, V 8, N 8, P. 19-26
6. Bush. K, Bradford. P. A, (2019). b-Lactams and b-Lactamase Inhibitors: an overview, Spring Harbor Laboratory Press, doi: 10.1101/cshperspect.a025247
7. Chen. J, Shang. X, Hu. F, Lao. X, Gao. X, Zheng. H, Yao. W,( 2013).  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An update, Bentham science publishers,13,P. 1389-5575
8. Cruz-Morato. C, Lucas. D, Llorca. M, Rodriguez-Mozaz. S, Gorga. M, Petrovic. M, Barceló. D, Vicent. T, Sarrà. M, Marco-Urrea. E, (2014). Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. Science of the Total Environment, 493, p. 365–376.
9. Galvin. S, Boyle. F, Hickey. P, Vellinga. A, Morris . D, Cormican. M, (2010). Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant escherichia coli bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources, American Society for Microbiology ,V 76, N 14, p. 4772–4779
- 10.Haller. L, Chen. H, Ng. C, Le. T. H, Koh. T. H, Barkham. T, Sobsey. M, Gin, K. Y. H, (2018). Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase- producing bacteria from hospital effluents in Singapore. Science of the Total Environment V 615, p. 1119–1125.
- 11.Hocquet. D, Muller. A, Bertrand. X, (2016). What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. Journal of Hospital Infection. DOI: 10.1016/j.jhin.2016.01.010
- 12.Hussain. S, Naeem. M, Chaudhry. M. N, (2016). Estimation of Residual Antibiotics in Pharmaceutical Effluents and their Fate in Affected Areas, Pol. J. Environ. Stud. V25, N 2, p. 607-614
- 13.Hawkey. P. M, Lewis, D, A, (1989). Medical bacteriology a practical approach.IRLpress. p167-221.
- 14.Kaur. R, Yadav. B, Tyagi. R.D, (2020). Microbiology of hospital wastewater, current developments in biotechnology and bioengineering. chapter 4.p 104-110.
- 15.Kresken. M, Körber-Irrgang. B, Biedenbach. D. J, Batista. N, Besard. V, Cantón. R, García-Castillo. M, Kalka-Moll. W, Pascual. A, Schwarz. R, Van Meensel. B, Wisplinghoff. H, Seifert. H, (2016). Comparative in vitro activity of oral antimicrobial agents against Enterobacteriaceae from patients with community-acquired urinary tract infections in three European countries. Clinical Microbiology and Infection V 22, N 1, P. 63.e1–63.e5
- 16.Munck. C, Albertsen. M, Telke. A, Ellabaan. M, Nielsen. P. H, Sommer. M. A, (2015). Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. Nature Communications. DOI: 10.1038/ncomms 9452.
- 17.Nagarajan. P, Radhakrishna. L, (2015). Isolation and preliminary characterization of bacterial from liquid hospital wastes, International Journal Of Pharmtech Research, V 8, N 2, P. 308-314
- 18.Nonfodji. O. M, Fatombi. J. K, Ahoyo. T.A, Boya. B, Baba-Moussa. L. S, Aminou. T, (2020). Effects of KMnO4 amounts on antibacterial properties of activated carbon for efficient treatment of northern Benin hospital wastewater in a fixed bed column system. International Journal Of Hygiene And Environmental Health 229.

19. Ojer-Usoz, E. O. Gonza' lez, D. Garcí'a-Jalo'n, I. Vitas, A. I, (2014). High dissemination of extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants. *water research* V 56,p. 37- 4 7
20. Rizzo. L, Manaia. C, Merlin. C, Schwartz. T, Dagot. C, Ploy. M.C, Michael. I, Fatta-Kassinou. D,(2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review, *Science of The Total Environment*, V 447, p. 345-360.
21. Sethi .S, Kumar. R, Gupta. S, (2013). Antibiotic production by microbes isolated from soil. *International Journal of Pharmaceutical Science And Research*. V 4, N 8, P. 2967-2973
22. Shahid. M, Sobia. F, Singh. A, Malik. A, Khan. H. M, Jonas. D, Hawkey, P. M, (2009). Beta-lactams and Beta-lactamase-inhibitors in current- or potential- clinical practice: a comprehensive update. *Critical Reviews In Microbiolog*,V35,N2,P:81-108. <http://www.informapharmascience.com/mcb>
23. Tamma P. D, Pierce. V. M, Cosgrove. S. E, Lautenbach. E, Harris. A, Rayapati. D, Han. J. H, (2018). Can the ceftriaxone breakpoints be increased without compromising patient outcomes?. *Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America*. *OFID* 5(6): 139. DOI: 10.1093/ofid/ofy139
24. Vo. T. K. Q, Bui. X. T, Chen. S. S, Nguyen. P. D, Cao. N. D. T, Vo. T. D. H, Nguyen. T. T, Nguyen. T. B, (2019). Hospital wastewater treatment by sponge membrane bioreactor coupled with ozonation process, *Sci, Chemosphere*,V230, p.377-383
25. Wang, Q., Wang, P., Yang, Q., (2017). Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Sci. Total Environ*. 621, 990–999.
26. Wong. D, Duin. D.V, ( 2017) *Novel Beta-Lactamase Inhibitors: unlocking their potential in therapy*. Springer International Publishing Switzerland, *Drugs* V 77, P. 615–628.