دراسة حساسية بكتريا *S.aureus* و *E.coli* و *Ps.aeruginosa* المعزولة من بيئة مستشفى الرمادي التعليمي لمطهريَّ الكلورهيكسيدين وهايبوكلورات الصوديوم

محمود مصطفى عبد الحسين المهداوي ومعاذ يوسف عبد الكريم الكربولي
كلية العلوم/ جامعة الأنبار

الخلاصة

جمعت 420 عينة من مواقع بيئية مختلفة في مستشفى الرمادي التعليمي شملت الأرضيات والجدران والهواء والأبواب والنوافذ والمغاسل شخصت منها 41 عزلة لبكتريا *S.aureus* و24 عزلة لبكتريا *E.coli* و22 عزلة لبكتريا *Ps.aeruginosa* وأختبرت حساسية 12 عزلة منتخبة (أربع عزلات لكل نوع) من الأنواع الثلاث للبكتريا تجاه مطهريَّ الكلورهيكسيدين وهايبوكلورات الصوديوم من خلال تحديد التراكيز المثبطة الدنيا Minimum Inhibition Concentrations (MICs) والتراكيز القاتلة الدنيا Minimum Bacericidal Concentrations (MBCs) من خلال استخدام طريقة التخفيف بالمرق Broth Dilution Method ثمَّ حدد زمن القتل للمطهرين المستخدمين في الدراسة تجاه العزلات المنتخبة. بينت النتائج أن مطهر الكلورهيكسيدين (الهيبتين) كان أعلى كفاءة من هايبوكلورات الصوديوم (القاصر) تجاه بكتريا *S.aureus*، *E.coli* و *Ps. aeruginosa* إذ تراوحت قيم MICs للهيبتين ما بين (4–256) مايكروغرام/ مل فيما تراوحت قيم MICs لهايبوكلورات الصوديوم ما بين (128–3000) مايكروغرام/ مل، كما أظهرت النتائج أن قيم MBCs للكلورهيكسيدين تراوحت ما بين (8–512) مايكروغرام/ مل فيما كانت قيم MBCs لهايبوكلورات الصوديوم قد تراوحت ما بين (256–4000) مايكروغرام/ مل، وسجلت النتائج ان زمن القتل للمطهرات الكيميائية المستخدمة تجاه ثلاث عزلات للبكتريا المنتخبة بعد تعريضها للتراكيز القاتلة الدنيا للمطهرين قد تراوح ما بين ما بين (10–15) دقيقة للكلورهيكسيدين وما بين (20–35) دقيقة تجاه هايبوكلورات الصوديوم كما بينت النتائج أن بكتريا *S. aureus* كانت الأكثر حساسية تجاه كلا المطهرين تلتها *E.coli* فيما كانت بكتريا *Ps. aeruginosa* الأكثر مقاومة.

الكلمات المفتاحية: المطهرات الكيميائية، حساسية البكتريا للمطهرات الكيميائية، بيئة المستشفيات.

A Study of sensitive *S. aureus, E.coli* and *Ps. aeruginosa* for chlorhexidin and sodium hypochlorite in Ramadi Teaching Hospital

M. M. A. AlMahdawy and M. Y. A. Al-Karboly
College of Science/ University of Anbar

Abstract

420 Samples were collected from some environmental locations in Ramadi Teaching Hospital included Floors, Walls, Air Windows, Doors and Sinks, 41 Isolates for *S. aureus*, 24 Isolates for *E.coli* and 22 Isolates for *Ps. aeruginosa* were diagnosed and Sensitive of 12 isolates for these bacteria toward Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite were tested through determination MICs and MBCs and killing Times by used Broth Dilution Method, Chlorhexidine were high efficacy from Sodium Hypochlorite toward *S. aureus E. coli* and *Ps. aeruginosa*, MICs were range between 4-256 µg/ml for Chlorhexidine and 128-3000 µg/ml for Sodium Hypochlorite, MBCs were range between 8-512 µg/ml for Chlorhexidine and 256-4000 µg/ml for Sodium Hypochlorite and Killing Time for three isolates after exposed to MBCs were range between 10-15 min for Chlorhexidine and between 20-35 for Sodium Hypochlorite, In

the finally *S.aureus* bacteria was the high sensitively for both disinfectants followed by *E. coli* but *Ps. aeruginosa* was the high resistance for both disinfectants.
Keywords:Chemical Disinfectants, Bacterial sensitive for chemical disinfectants, Hospital Environment
E. mail: alkarboly1977@gmail.com

المقدمة

استخدمت المطهرات الكيميائية Chemical Disinfectants في عمليات التطهير في المنازل والمراكز الصحية والمستشفيات لغرض القضاء على الميكروبات وتقليل عددها (1)، ويعدُّ مطهر هايبوكلورات الصوديوم المعروف تجاريا بالقاصر Bleach من مركبات الكلور Chlorine Compounds التي تنتمي لمجموعة الهالوجينات Halogenes ويستعمل بشكل واسع في عمليات التطهير للأسطح والأرضيات والآلآت والأدوات الجراحية كما يستخدم في غسيل أغطية الأسرَّة والستائر (2)، وأشار (3) أنَّ القاصر يعدُّ من المطهرات ذات الفعالية واسعة المدى تجاه العديد من الميكروبات وذلك من خلال تحطيمه لخلاياها من خلال إنتاجه لحامض الهايبوكلوراس Hypochlorous Acid الذي يسبب تحطيم خلاياها إذ يعدُّ ذلك الحامض عاملاً مؤكسداً قوياً يتحد مباشرة مع بروتينات الأغشية الخلوية وأنزيمات خلايا الميكروبات وبينت (4) أنَّ كفاءة القاصر تتحدد بالعديد من العوامل أهمها التركيز المستعمل ودرجة الحرارة والرقم الهيدوجيني ومدة التعرض، أما الكلورهيكسيدين فينتمي إلى مجموعة المركبات ثنائية الكواندين Diguanidine Compounds ويعرف تجارياً بالهيبتين Hibitane ويعدُّ مطهراً قاتلاً للبكتريا Bactericidal الموجبة والسالبة لصبغة غرام بتدميره لأغشيتها الخلوية إضافة إلى أنه يستخدم بشكل واسع كمطهر للجلد والجروح كما أنَّ الهيبتين يستخدم في عمليات التطهير لأسطح المناضد والأدوات والآلآت الجراحية (5). تعدُّ مقاومة الميكروبات للمطهرات الكيميائية من أهم الصعوبات والمشاكل التي تواجه عمليات التطهير في المستشفيات (6)، كما يسهمُّ الإستخدام العشوائي والتخفيف المفرط للمطهرات المستخدمة إلى نشوء سلالات من الميكروبات ذات مقاومة عالية لها (7) كما أنَّ عدم المعرفة المسبقة للتراكيز القاتلة للميكروبات لدى العاملين في مجال التطهير في المستشفيات أو قلة الخبرة لدى العاملين في مجال التطهير أو عدم وجود كادر متخصص في عمليات التطهير أو عدم كفاءة المطهرات المستخدمة أو استعمال مطهرات منتهية الصلاحية Expire Date أو سوء التخزين لتلك المواد في بعض الأحيان تسهم تلك العوامل في نشوء سلالات من الميكروبات مقاومة للعديد من المطهرات الكيميائية (8، 9). لقد جاءت الدراسة للتحري عن حساسية بكتريا *S.aureus* و *E.coli* و *Ps.aeruginosa* لمطهريَّ الكلورهيكسيدين وهايبوكلورات الصوديوم من خلال تحديد التراكيز المثبطة الدنيا MICs والتراكيز القاتلة الدنيا MBCs وزمن القتل Killing Time للمطهرين المستخدمين تجاه العزلات المنتخبة للبكتريا.

المواد وطرائق العمل

أولا: عزلات البكتريا: استخدمت خلال الدراسة ثلاثة أنواع من البكتريا شملت بكتريا *S.aureus* و*E.coli* و *Ps. aeruginosa* عزلت من مواقع بيئية منتخبة في مستشفى الرمادي التعليمي وبواقع 4 عزلات لكل نوع ودرست الصفات المظهرية للبكتريا المنماة على الأوساط الزرعية وتم تأكيد التشخيص باستخدام بعض الإختبارات الكيموحياتية كما استخدمت عدة نظام التشخيص API Staph المجهزة من شركة (France) Biomeriux في التشخيص التأكيدي لبعض عزلات بكتريا *S.aureus*.

ثانياً: المطهرات الكيميائية: تم الحصول على مطهر الكلوروهيكسيدين من شركة الرحمة للأدوية والمستلزمات الطبية بتركيز 5% وهايبوكلورات الصوديوم من شركة كلوروكس بتركيز 5.25% وأستخدم المطهران بتركيز 5% وعدت كمحاليل خزينة Stock Solution وكما موضح في الجدول (1).

جدول (1) المطهرات الكيميائية المستخدمة في الدراسة

الإسم العلمي	الإسم التجاري (المحلي)	التركيز التجاري (غم/100 مل)	الرقم الهيدروجيني (pH)	الشركة المصنعة (المنشأ)
Chlorhexidine	الهيبتين (Hibitane)	5	5.87	ALRahma (Jordan)
Sodium hypochlorite	القاصر (Bleach)	5.25	11.38	شركة كلوروكس (سعودي)

استخدمت المطهرات في أعلاه بتركيز 5% وعدت كمحاليل خزينة Stock Solution.

ثالثاً: تحضير تراكيز المطهرات: حضرت سلسلة التراكيز 2، 4، 8، 16، 32، 64، 128، 256، 512، 1024، 2048، 3000، 4000، 5000 مايكروغرام/ مل من المحاليل الخزينة لكلا المطهرين.

رابعاً: تحضير العالق البكتيري: نقلت عينة من مزرعة البكتريا النامية على وسط الأكار المغذي إلى أنابيب حاوية على 5 مل من وسط نقيع القلب والدماغ وحضنت الأنابيب بدرجة 37 م° ثم قورنت العكورة مع عكورة أنبوبة ماكفرلاند القياسية (No 0.5) Macfarl and Standard وأستخدم العالق في تحديد التراكيز المثبطة والقاتلة الدنيا للمطهرين الكيميائيين تجاه العزلات المنتخبة من البكتريا.

خامساً: طريقة التخفيف بالمرق Broth Dilution Method:

استخدمت الطريقة وحسب ما جاء في (11) في تحديد MICs للمطهرات الكيميائية إذ حضرت أنابيب حاوية على 1 مل من المرق المغذي Nutrient Broth ثم أضيفت تراكيز المطهرات المحضرة مسبقا إلى الأنابيب الحاوية على وسط المرق المغذي ولقحت بعد ذلك الأنابيب بالعالق البكتيري (مكررين لكل تركيز) وحضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 16–24 ساعة وحدد MICs للمطهرات الكيميائية بانه أقل تركيز للمطهر الكيميائي الذي يمنع ظهور نمو مرئي وغير مرئي للميكروبات.

سادساً: تحديد التراكيز القاتلة الدنيا للمطهرات الكيميائية: حددت التراكيز القاتلة الدنيا MBCs للمطهرات الكيميائية حسب (11) بنقل 100 مايكرولتر من الإنبوبتين التي تلي الإنبوبة التي حدد فيها MICs والخالية من العكورة بواسطة ماصة دقيقة إلى أطباق حاوية على أوساط الأكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37م°ولمدة 24 ساعة وحدد MBC للمطهر الذي يمثل أقل تركيز الذي يؤدي لقتل 99.9% من المايكروبات وإنعدام النمو على الأوساط الزرعية الصلبة.

سابعاً: تحديد زمن القتل للمطهرات الكيميائية: حدد زمن القتل للمطهرين تجاه ثلاث عزلات لبكتريا *S.aureus* و *E.coli* و *Ps.aeruginosa* وفقاً لما ورد في (16) بنقل 100 مايكرولتر من عالق البكتريا إلى الأنبوبة الحاوية على التركيز المراد اختباره وحضنت الإنبوبة بدرجة حرارة 37م° لمدة (5، 10، 15، 20، 25، 30، 35، 40، 45، 50، 55، 60) دقيقة ونقل جزء من العالق بعد الفترات الزمنية أعلاه وزرع على وسط الأكار المغذي وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37م°ولمدة 24 ساعة وحددً زمن القتل الذي يمثل الزمن اللازم لتعريض البكتريا للمطهر الكيميائي بالتركيز المحدد الذي يؤدي إلى عدم نمو الميكروبات على الأوساط الزرعية الصلبة.

النتائج

اختيرت 12 عزلة لبكتريا *S.aureus*، *E.coli* و *Ps.aeruginosa*. وحددت MICs للكلورهيكسيدين (الهيبيتين) وهايبوكلورات الصوديوم (القاصر) تجاه عزلات البكتريا بطريقة التخفيف بالمرق إذ تراوحت MICs ما بين 4–256 و128–3000 مايكروغرام/ مل على التوالي وكما موضح في الجدول (2).

الجدول (2) التراكيز المثبطة الدنيا (مايكروغرام/ مل) للمطهرين تجاه عزلات البكتريا

العزلات البكتيرية	الكلورهيكسيدين	هايبوكلورات الصوديوم
S. aureus 3*	4	128
S. aureus 11*	8	256
S. aureus 27*	16	512
S. aureus 38*	4	128
E. coli 2*	64	512
E. coli 9*	32	512
E. coli 16*	16	1024
E. coli 23*	32	512
Ps. aeruginosa 1*	256	1024
Ps. aeruginosa 5*	256	2048
Ps. aeruginosa 14*	128	3000
Ps. aeruginosa 22*	128	1024

وتراوحت قيم MBCs للكلورهيكسيدين وهايبوكلورات الصوديوم ما بين 8–512 و256–4000 مايكروغرام/ مل على التوالي وكما مبين في الجدول (3).

الجدول (3) التراكيز القاتلة الدنيا (مايكروغرام/ مل) للمطهرين تجاه عزلات البكتريا

العزلات البكتيرية	الكلورهيكسيدين	هايبوكلورات الصوديوم
S.aureus 3*	8	256
S.aureus 11*	16	256
S.aureus 27*	32	1024
S.aureus 38*	8	256
E.coli 2*	128	1024
E.coli 9*	64	512
E.coli 16*	32	1024
E.coli 23*	64	1024
Ps.aeruginosa 1*	512	2048
Ps.aeruginosa 5*	512	2048
Ps.aeruginosa 14*	256	4000
Ps.aeruginosa 22*	256	2048

وبينت النتائج أنَّ الزمن اللازم لقتل عزلات *S.aureus*، *E.coli* و *Ps.aeruginosa* عند تعريضها للمطهرين وبتراكيزهما القاتلة الدنيا قد تراوح ما بين (10–15) دقيقة تجاه الكلورهيكسيدين وما بين (20–35) دقيقة تجاه هايبوكلورات الصوديوم وكما موضح في الجدول (4).

الجدول (4) زمن القتل (دقيقة) لعزلات البكتريا بعد تعريضها للمطهرين

العزلات البكتيرية	زمن القتل/ دقيقة	
	الكلورهيكسيدين	هايبوكلورات الصوديوم
S. aureus 11*	10	20
E. coli 9*	15	25
Ps. aeruginosa 1*	15	35

***رقم عزلة البكتريا المنتخبة**

المناقشة

أظهرت الأنواع الثلاثة للبكتريا حساسية متفاوتة تجاه المطهرين المستخدمين بتراكيزهما المثبطة والقاتلة إذ بينت النتائج أنَّ بكتريا *S.aureus* كانت الأكثر حساسية تلتها بكتريا *E. coli* فيما كانت بكتريا *Ps. aeruginosa* الأكثر مقاومة تجاه المطهرين بتراكيزهما الواطئة وأتفق ذلك مع (14) وقد يعزى السبب نتيجة لتكوينها الغشاء الحيوي Biofilm وقد يكون السبب إلى طبيعة تركيب جدران خلايا بكتريا المكورات الموجبة لصبغة غرام التي تتركب جدرانها من مادة الببتيدوكلايكان إضافة إلى حامض التيكوئيك Techoic Acid فيما تمتلك جدران خلايا

بكتريا العصيات السالبة لصبغة غرام طبقة خارجية من متعدد السكريد الدهني تحيط بطبقة الببتيدوكلايكان يكسبها مقاومة تجاه العديد من المطهرات الكيميائية كونها تسبب عائقا في اختراق المطهرات لتلك الطبقة إضافة إلى امتلاك بعض سلالات البكتريا السالبة لأنظمة الدفق التي تكون بمثابة حاجز يحدُّ من تأثير تلك المواد كما أنَّ الطفرات الحاصلة في القنوات البروتينية المعروفة بالبورينات Porins التي توجد في جدران خلايا بكتريا العصيات السالبة إذ تعمل الطفرات على غلق أو تضييق القنوات وبذلك تمنع أو تحدُّ من دخول المواد القاتلة إلى داخل الخلية (12). فيما بينت النتائج أنَّ الكلورهيكسيدسن كان الأسرع في قتل العزلات المنتخبة للبكتريا وتلاه مطهر هايبوكلورات الصوديوم واتفق هذا مع (13، 15) وقد يعزى السبب في التباين في القيم المسجلة لزمن القتل للعزلات تجاه التراكيز القاتلة للمطهرين لتركيب الجدران الخلوية للبكتريا المنتخبة فضلاً عن المقاومة التي تمتلكها بعض البكتريا إضافة إلى الحساسية التي تبديها بعض أنواعها تجاه المطهرات وبتراكيزها الواطئة أو قد يعزى السبب إلى التكرار في استخدام نفس المواد في عمليات التطهير أو تخفيفها بصورة عشوائية مما يسهمُّ في نشوء مقاومة لها من أنواع محددة من الميكروبات فضلا عما تمتلكه بعض أنواع البكتريا من مقاومة طبيعية تجاه العديد من المطهرات بتراكيزها الواطئة وخاصة بكتريا الزوائف الزنجارية *Ps.aeruginosa* لذا ينصح عادة استخدام مطهرات كيميائية مكونة من خليط من المواد لضمان الحصول على نتائج أفضل في عمليات التطهير.

المصادر

1. Russell, A. D.; Hugo, W. B. & Ayliffe, G. A. T. (2008). Principles and Practice of Disinfectant, Preservation and Sterilization. Oxford, Blackwell Scientific Publications, England., PP. 245-263.
2. Tortora, G. J.; Funke, B. R. & Case, C. L. (1998). Microbiology. 6th Ed., Wesley Longman, Inc., USA, PP. 118-121.
3. Pelczar, M. J.; Reid, R. D. & Chan, E. C. S. (1977). Microbiology.4th Ed. Mc Graw Hill, Inc. USA., PP. 212-225.
4. الخفاجي، زهرة محمود. (2008). التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزيئية)، جمهورية العراق وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا. ص 185-293.
5. Messanger, S.; Goddard, P. A.; Dettmar, P. W. & Maillard, J. Y. (2001). Determination of the antibacterial efficacy of several antiseptic tested on skin by"ex-Vivo"test. J. Med. Microbiol., 50:284-292.
6. Rutala, W. A.; Stiegel, M. M.; Sarubbi, F. A. & Weber, D. J. (1997). Susceptibilit of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants. Infect. Cont. Hosp. Epidemiol., 18: 417-421.
7. Cole, E. C.; Rutala, W. A. & Samsa, G. P. (1984). Disinfectant testing using a modified use-dilution method: collaborativestudy. J. Assoc. off. Anal. Chem., 56: 981-1032.
8. Guimaraes, M. A.; Tibana, A.; Nunes, M. P. & Santos, K. R. N. (2000). Disinfectant and antibiotic activities a Comparative analysis in Brazilian hospital bacterial isolates. Braz. J. Microbiol., 31(3):2-7.
9. Moreillon, P. (2000). Means of bacterial resistance. Rev. Med. Suisse Romand., 120: 642-644.
10. Mitchell, B. A.; Brown, M. H. & Skurray, R. A. (1998). QAC Mulyidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, Biguanidines, and Guanyl hydrazones Antimicrob. Agents Chemother., 42(2):474-476.

11. Levinson, W. & Jawetz, E. (2004). Medical Microbiology and Immunology. Examination and board Review. 8thed Lang Medical Brooks McGraw-Hill. New York., PP. 143-187.
12. Penna, T. C. V.; Mazzola, P. G. & Martins, A. M. S. (2001). The efficacy of chemical agent in cleaning and disinfection program. J. BMC. Infect. Dis., 1:16-31.
13. الشويلي، شهرزاد نجم عبد الله. (2004). تأثير بعض المطهرات والمعقمات على بعض أنواع السالمونيلا والشيكيلا المعزولة من حالات الإسهال. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
14. الندَّاوي، تحرير هادي. (2005). دراسة تأثير بعض المطهرات على بعض أنواع البكتريا المعزولة من مرضى وصالات العمليات الجراحية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
15. الخزعلي، ختام علي عبيد. (2009). دراسة مقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و*Staphylococcus aureus* المعزولة من أخماج الحروق والجروح للمضادات الحيوية وبعض المطهرات. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
16. Narendranathe, N. V.; Hynes, S. H.; Thomas, K. C. & Ingeld, W. M. (1997). Effect of Lactobacilli and Yeast catalysed ethanol fermentation. J. Appl. Environ. Microbiol., 63(11): 4158-4163.