قيمة نقطة التعادل الكهربائية وفعالية إنزيم البيتالاكتاميز لعزلات *Proteus mirabilis* المسببة لالتهابات المسالك البولية

محمد فضل الميسري
قسم علوم الحياة ،كلية العلوم والتربية (زنجبار) ، جامعة عدن- اليمن
DOI: https://doi.org/10.47372/uajnas.2015.n1.a06

الملخص

جمعت عينات من أشخاص يعانون التهابات في المسالك البولية، تم الحصول على عزلات بكتيرية تابعة لـ*Proteus mirabilis* . شخصت بنظام *api*20E ثم فحص الحساسية تجاه المضادات الحيوية، جرى اختبار قابلية العزلات لإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز بوساطة طريقة اليود السريعة، وقد أعطت (19)عزلة نتيجة موجبة لهذا الفحص، ثم اختبرت قدرتها في إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وأُجرى ذلك بإتباع طريقة الأقراص المتاخمة وقد أعطت (3) عزلات نتيجة موجبة لهذا الفحص، وهي التي أُجري لها ترحيل في هلام الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة لتقدير نقطة التعادل الكهربائي وقد أطلق عليها عزلات (UP_3,UP_2,UP_1) وبينت احتوائها على حزم بروتينية وكانت قيمة pH هي (5.6، 7.4 و5.4) على التوالي.

الكلمات المفتاحية: *Proteus mirabilis*، pH ، المسالك البولية.

المقدمة:

تزداد مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية يوماً بعد يوم, وبكتريا *Proteus mirabilis* تعد من بين الأجناس المهمة طبياً، ولكونها توجد منتشرة في المياه والمجاري والترب وفي فضلات الإنسان والحيوان كونها جزء من الفلورا الطبيعية للأمعاء[9] تحدث الإصابة فقط عندما تغادر مكانها الطبيعي في الأمعاء إذ تعد من مسببات التهاب المسالك البولية.

لذا فإنَ من أهم عوامل الضراوة التي تحدثها هي أنتاج إنزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا وينتج غاز الامونيا وبذلك يزيد الرقم الهيدروجيني (pH) لذا يكون الإدرار قلوي في حالات التهاب المسالك البولية الناتج عن الإصابة بهذه البكتريا مما يؤدي إلى ترسب الأملاح في المثانة مسببة تكَون الحصى، ومنذ أن استخدم الإنسان المضادات الحيوية عوامل علاجية كان التثبيط أو تعطيل هذه المضادات بأنزيمات البيتالاكتاميز يمثل الميكانيكية الرئيسة للمقاومة خاصة للعصيات السالبة لصبغة جرام [1] وتُعرف إنزيمات البيتالاكتاميز بأنها إنزيمات بكتيرية متغايرة تقوم بتحليل حلقة البيتالاكتام في البنسلينات والسيفالوسبورينات مؤديه إلى كسر حلقه البيتالاكتام في المضاد الحيوي، وتوجد في أنواع كثيرة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة جرام[7].وقد وجد [12] أنَ عزلات *Proteus mirabilis* قد أعطت إنزيمات SHV-2، TEM-26وSHV-5.

أجريت هذه الدراسة لمعرفة قيم نقطة التعادل الكهربائي للعزلات المدروسة لما له من أهمية في معرفة الجوانب الوبائية لهذه العزلات وأنواع الإنزيمات التي تنتجها والتي قد تكون من أحد العوامل مقاومة العزلات للمضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل:

تم إجراء هذه الدراسة في مختبرات معهد التقنية الإحيائية في جامعة بغداد.

جمع العينات والتشخيص الكيموحيوي:

تم جمع العينات من الإدرار لأشخاص يعانون من التهابات المسالك البولية وزرعت على وسط الماكونكي أجار وأجار نقيع الدم ثم شخصت باستخدام نظام *api*20E المُجهز من قبل شركة (*bioMerieux*)وجرى اختبار

فحص الحساسية بوساطة طريقة [8]، و اختبار التركيز المثبط الأدنى للمضادات باستخدام طريقة (difold dilution) كما ورد في [7].

الكشف عن إنزيمات البيتالاكتاميز والبيتالاكتاميزات واسعة الطيف:

تم الكشف عن إنتاج العزلات لإنزيمات البيتالاكتاميز بطريقتي الأنابيب الشعرية وطريقة اليود السريعة وفق ما ذكره [13,12].في حين تم إنتاج العزلات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) عن طريق الأقراص المتاخمة بوساطة أقراص المضادات الحيوية وفق طريقة[15,6] وتم استخدام العزلة القياسية *E. coli* ATCC الحساسة للمضادات الحيوية والخالية من الإنزيم لقياس فعالية الإنزيم.

تحضير مستخلصات البكتريا:

نُميت العزلات المدروسة في وسط (SoyTrypticaseborth)(شركة Oxoid)على37م^0 ثم الحصول على الخلايا البكتيرية باستخدام النبذ المركزي (5000دورة /دقيقة لمدة 15دقيقة).أُهمِل الرائق وأخذ الراسب وغسل بعدها بمحلول دارئ الفوسفات مرتين، ثم بعدها علقت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات (3مل) ,مزقت الخلايا بوساطة جهاز الذبذبات فوق الصوتية (Soniprep 150) لمدة 4×20ثانية نبذ عالق الخلايا بجهاز المنبذة1000دورة/دقيقة لمدة20دقيقة ثم اخذ الرائق وأهمل الراسب، حفظ الرائق الذي يمثل الإنزيم الخام في درجة (°20-)حتى حين الاستعمال.

تقدير البيتالاكتاميز:

أجري ترحيل كهربائي للإنزيم في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة وفق الطريقة الموصوفة من قبل [12,4] بأخذ(100) مايكروليتر محلول النموذج الذي أضيف إلى الهلام بعد غلي محلول النموذج لمدة 5دقائق لحصول دنترة البروتينات ; أغلقت الدائرة لتعطي تياراً قدره 2.5مل أمبير/هلام صعد التيار حتى بلوغ الدليل (صبغة البروموفينول الأزرق) حافة هلام الفصل العليا لتعطي تياراً قدرة 6مل أمبير/هلام استمرت العملية أربع ساعات مع التبريد على درجة حرارة (4م°) أوقف التيار عند بلوغ الصبغة الطرق القاصي . ثم استكملت الخطوات الأخرى حتى ظهور الحزم البروتينية. أجريت عملية التمركز بالتشابه الكهربائي (Isoelectric focusing) في هلام متعدد اكريل امايد بوجود الامفولايت ذو مدى pH(10-3.5)" وفق طريقة [14].فعالية الإنزيم التي تم قياسها وفق طريقة [2] باستخدام محلول كاشف اليود-نشأ- وبوجود محلول البنسلين "G"كركيزة (مادة أساس).

ثم قيست الامتصاصية الأولية على طول موجي 620نانومتر بوساطة جهاز المطياف الضوئي (spectrophotometer),حُضنت النماذج لمدة 5دقائق بدرجة 37م° .ثم قيست الامتصاصية النهائية على نفس الطول الموجي وحسبت الفعالية الإنزيمية اعتماد على تناقص لون الكاشف (اليود-نشا) خلال تحلل البنسلين "G" بفعل الإنزيم. وتُعرف وحدة الفعالية: بأنَّها كمية الإنزيم التي تحلل [1]مايكرو مول من مادة الأساس عند ظروف القياس[5].

النتائج والمناقشة:

التحري عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز:

تم التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز باستخدام طريقة اليود السريعة وقد أعطت(19) عزلة نتيجة موجبة لهذا الفحص و أعطت (5) عزلات نتيجة موجبة للفحص قوية جداً وذلك لكونها أعطت النتيجة للفحص خلال (1-5) الدقائق الأولى منه في حين أعطت(12) عزلة نتيجة موجبة متوسطة للفحص بعد مرور(5-10) دقائق منه و أعطت(2)فقط نتيجة ضعيفة جداً وذلك لكونها أعطت نتائج موجبة للفحص بعد مرور(10-15)دقائق منه. وقد بيَّن [11]أنَّ هذه العزلات قد قاومت مضادات البيتالاكتام مما يدل على امتلاكها كميات كافية من هذه الإنزيمات في الفسحة البيربلازمية التي تقوم بتحليل حلقة البيتالاكتام في البنسلين لإنتاج حامض البنسلويك ثم يقوم حامض البنسلويك المتكون باختزال معقد نشأ- ايودين (شكل (1)).

التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف:

أكثر الاختبارات المستخدمة هو اختبار الأقراص المزدوجة بوجود الكلافولنيك تعتمد النتيجة الموجبة للفحص استناداً إلى حدوث اتساع في منطقة التثبيط بين القرص الحاوي على حامض الكلافولنيك وبين واحد أو أكثر من الأقراص الحاوية على، cefotaxime ، ceftazidime ، piperacilin أعطت (3) عزلات نتيجة موجبة لهذا الفحص و اتفقت النتائج مع ما توصل إليه [7] إذ لُوحِظ أنَّه قد تأثرت عزلات سريريه معزولة عن التهابات المسالك البولية بفعل التأثير ألتآزري لخليط اموكسسلين- كلافولنيك اسيد شكل(2).

تقدير نقطة التعادل الكهربائي:

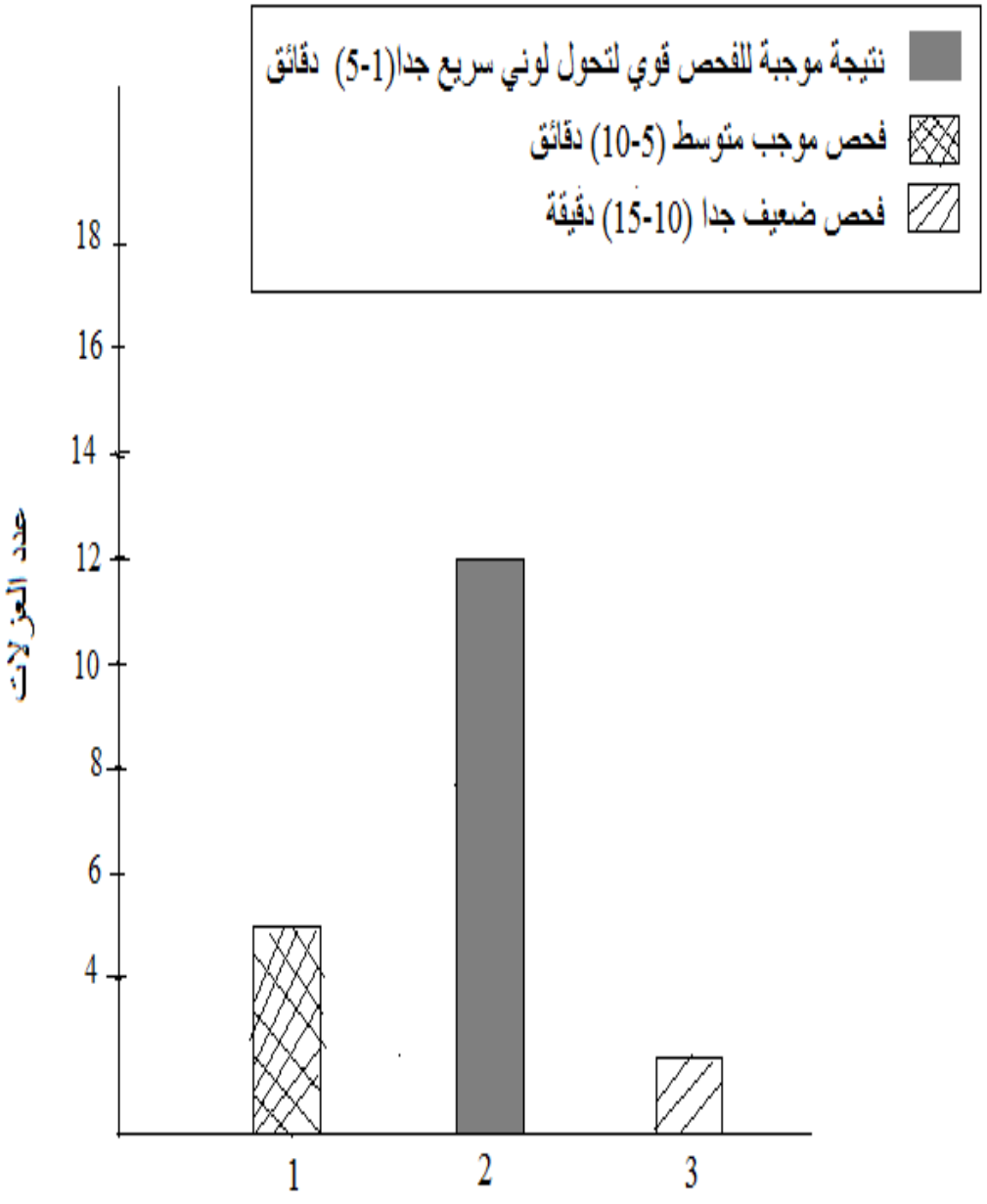
تم اختيار ثلاث عزلات من البكتريا التي أعطت نتائج سريعة عند التحري عن إنتاجها لإنزيم البيتالاكتاميز بوساطة طريقتي الأنابيب الشعرية واليود السريعة وهي عزلات قاومت أكثر من أربعة مضادات حيوية من ضمنها مجموعة البيتالاكتام ,مما يدل على أنَّ العزلات تنتج إنزيمات البيتالاكتاميز في الفسحة البيربلازمية التي تعمل على تحليل حلقة البيتالاكتام في البنسلين [3].

تم تحديد نقطة التعادل الكهربائي للعزلات المدروسة وتم ترحيل المستخلص الخام المستحصل عليه من التكسير بالأمواج فوق الصوتية في هلام متعدد اكريل امايد بوجود المواد الماسخة للتأكد من احتواء تلك العزلات على حزُم بروتينية، إذ أظهر التمركز بالتشابه الكهربائي التحليلي للمستخلص للعزلات البكتيريةUP_1وUP_2وUP_3 بوجود مضاد البنسلين "G" مادة أساس في القطع المرحلة في هلام الاكريل امايد والامفولايت، إذ تم قراءة الفعالية بوساطة جهاز المطياف الضوئي قبل الحضن وبعده. .أظهرت الحزم في القطع (12، 9، 13) للعزلات المدروسة على التوالي أعلى فعالية لإنزيم البيتالاكتاميز.

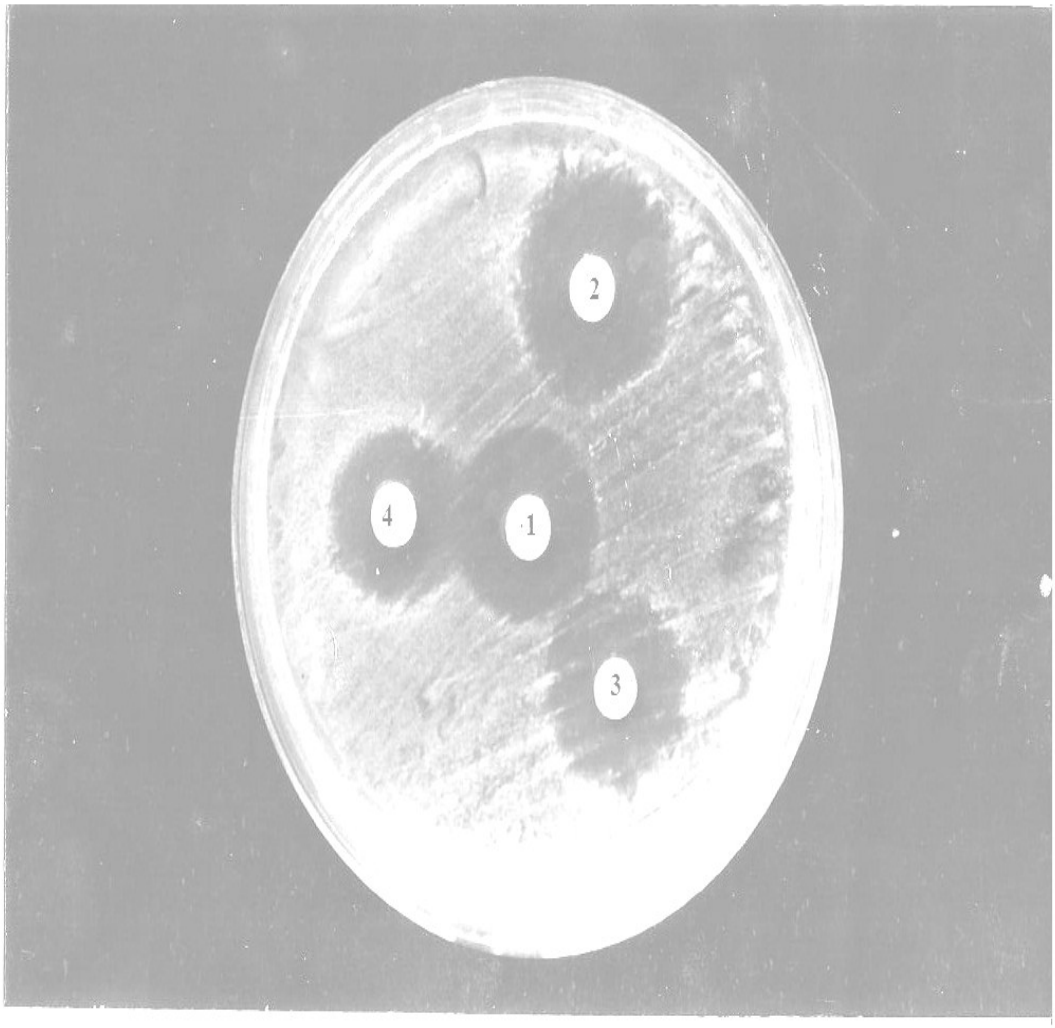
قاومت هذه العزلات المضادات المدروسة من مجموعة البيتالاكتام .وتميزت بإنتاج عالي لإنزيمات البيتالاكتاميز فضلاً عن إعطائها نتيجة موجبة عند التحري عن الإنزيمات واسعة الطيف.

أظهرت الدراسة أنَّ العزلة (UP_1) كانت قيمة نقطة التعادل الكهربائي (pH) لها (5.6) والفعالية الإنزيمية (1.8) وحدة/مل شكل (3). أما العزلة (UP_2) فقد كانت قيمة (pH) لها (7.4) وبلغت الفعالية الإنزيمية لهذه العزلة (1.44) وحدة/مل شكل (4).أما العزلة (UP_3) فقد كانت قيمة (pH) لها (5.4) والفعالية الإنزيمية (1.11) وحدة/ مل شكل(5).

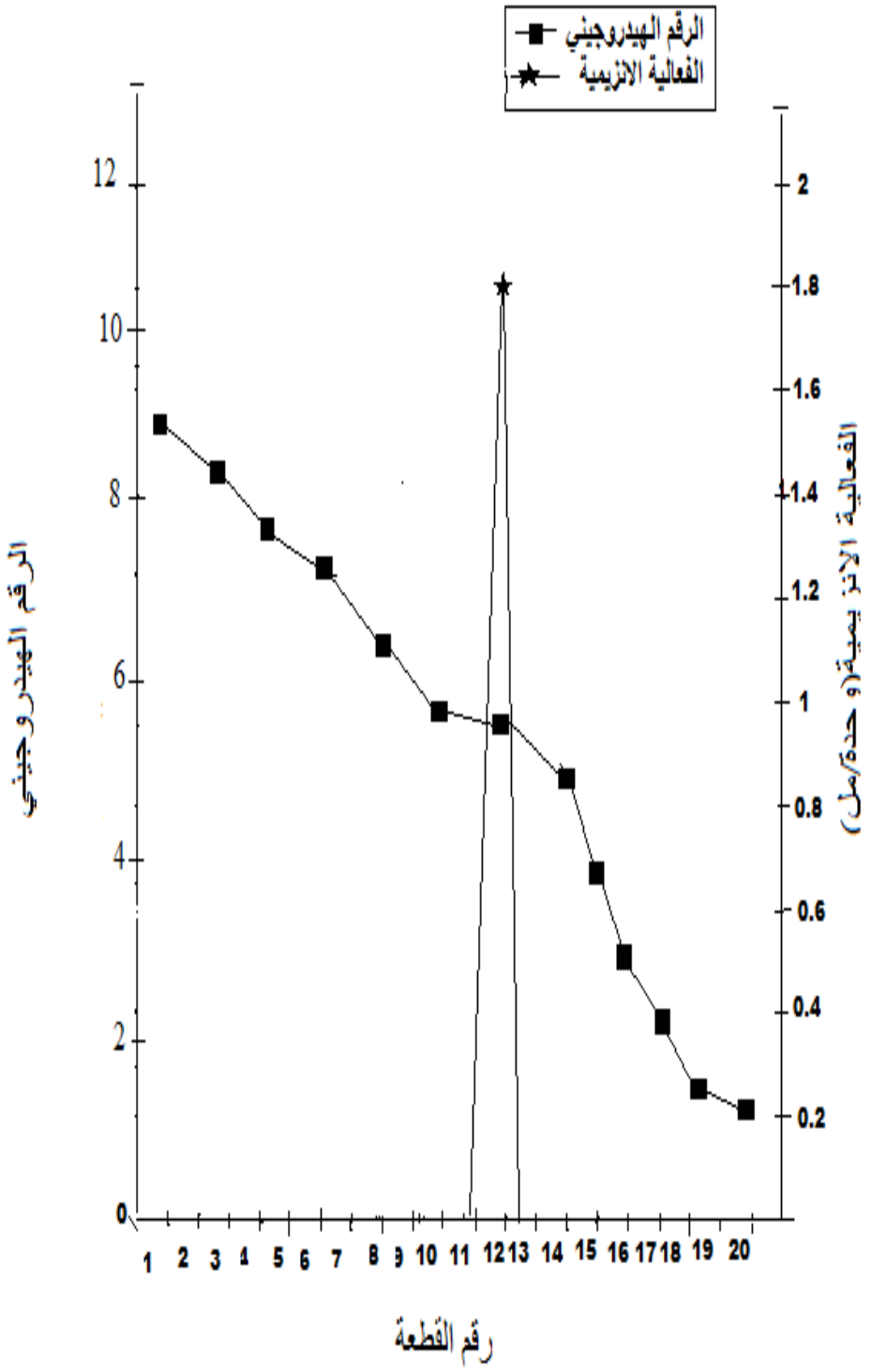
ومما سبق سلفاً تبين أن نتائج تلك الدراسة تتفق في ما توصلنا إليه من نتائج [12 و16]. ومن الملاحظ في هذه الدراسة لقيم نقطة التعادل الكهربائي للعزلات المدروسة مختلفة وهو دليل على أنَّ هذه العزلات تمتلك أنواعاً مختلفة من إنزيمات البيتالاكتاميز الأمر الذي يُبين الجوانب الوبائية لهذه العزلات من حيث امتلاكها لأنواع مختلفة من هذه الإنزيمات إذ بيَّن [10، 11 و 12] أنَّ هذه الأنواع مختلفة وفق قيم نقطة التعادل الكهربائية.



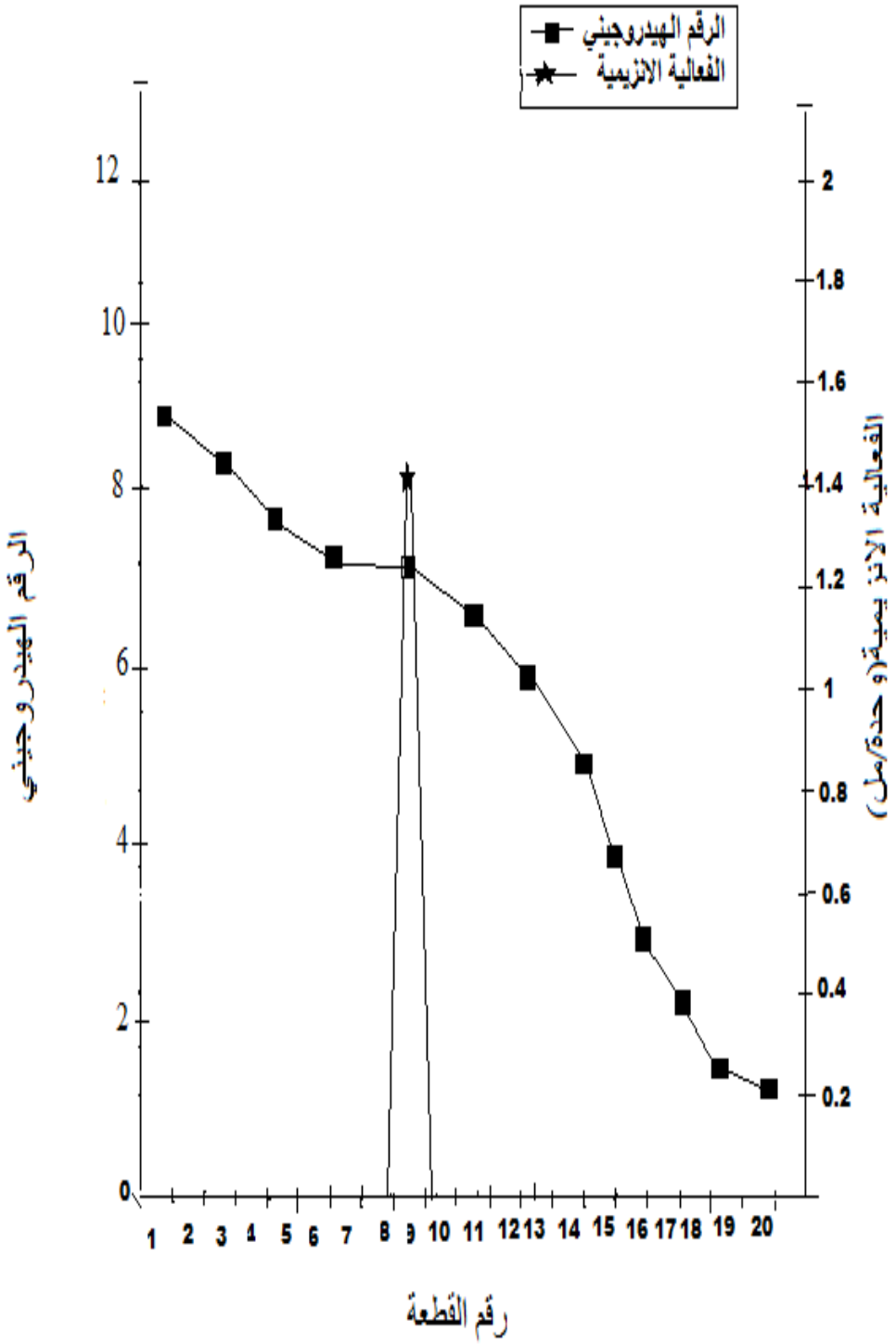
شكل (1) قابلية العزلات لانتاج انزيم البيتالاكتاميز



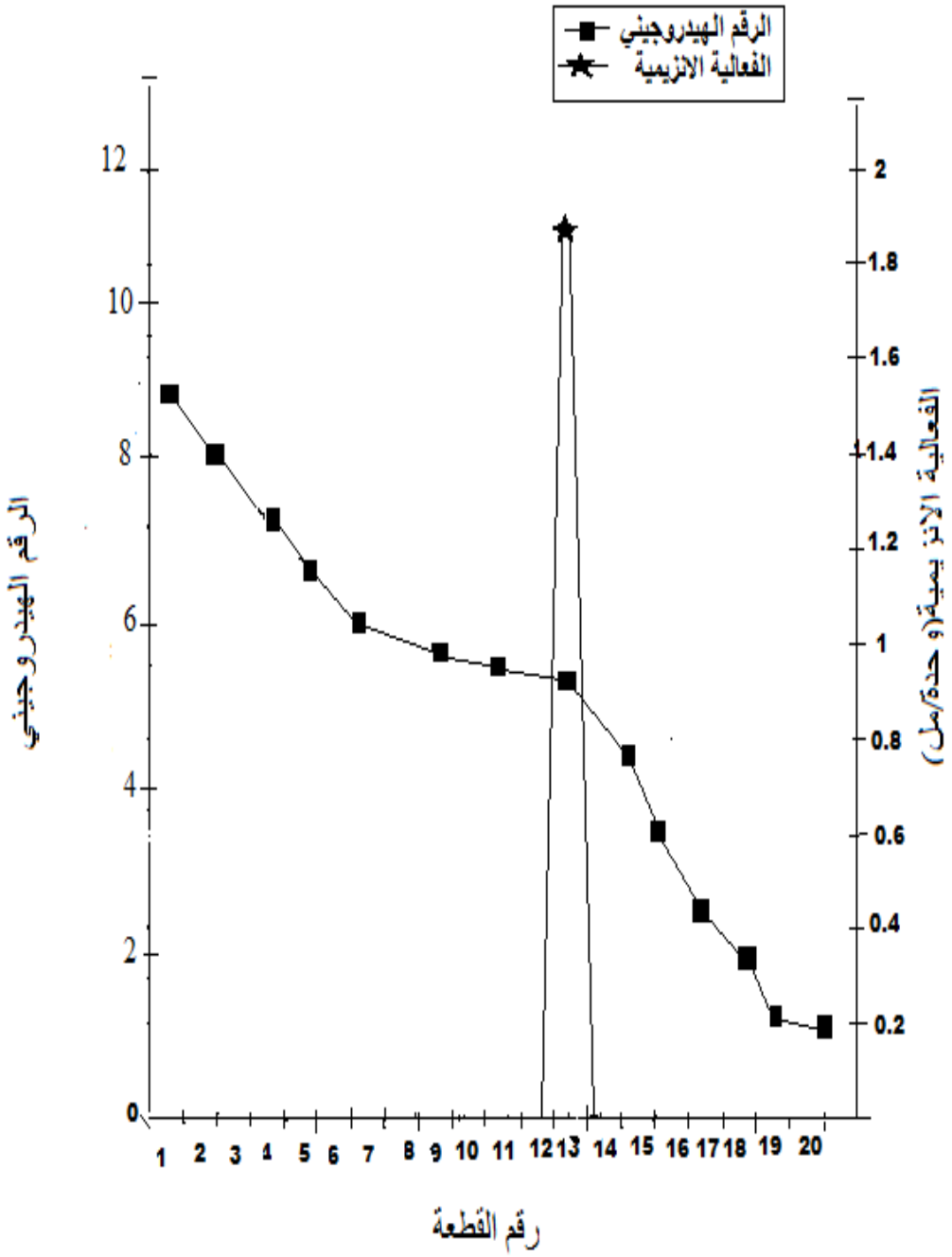
شكل(2) انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة UP3
1-مضاد اموكسيسلين / كلافولينك
2-مضاد السيفتا زيديم
3-مضاد الببراسيلين
4-مضاد السيفوتاكسيم



شكل(3)قيمة نقطة التعادل الكهربائي pI والفعالية الانزيمية للعزلة UP1



شكل(4)قيمة نقطة التعادل الكهربائي pI والفعالية الانزيمية للعزلة UP2



شكل(5)قيمة نقطة التعادل الكهربائي pI والفعالية الانزيمية للعزلة UP3

المراجع:

1. **Baron, E.J.; Petreson, L.R. & Finegold, S.M. (1998).** Microorganism encounter in urinarytractin Baily & Scott's Diagnostic Microbiology.(10th)ed. Mosby Company U.S.A.**(2)**
2. **Bhat-Hegde, B.K.& Shivanda, P.G. (1994).** Effect of trace metals on production of and β.lactamases by *Staphylococcus aureus*. Indian J. of experimental Biology.32(7):492-494.
3. **Bhat, K. G.; Joseph, K.M.& Shivanda, P.G. (1993).** New Microbiological Method The Detection of staphylococcal β-Lactamase. Indian J.Exper.Biol.3.1:653-654.
4. **Garfin, D. E. (1990).** Purification procedures : electrophoreses methods in : Methods enzymology (eds. Murray, E.D. and Deutscher, P)Academic press,Newyork.182;425-441.
5. **Jacoby, G.A. & Carreras, I. (1990).** Activities of β-lactam antibiotics againt *Escherichia coli* strains producing extended-specrtumβ-lactamases .Antimicrob. Agentschemother .34(5) :858-862.
6. **Jarliar, V; Nicolas, M.; Fournier, G. & Philippon, A. (1988).** Extended board spectrum β-Lactamases confeming transferable resistance to newer β-Lactam agents in Enterobacteriaceae :Hospital prevalence and susceptibility patterns.Rev.infe .Dis.10(4):867-878.
7. **Karachalios, G.N. (1985).** Randomized Comparative study of Amoxicillin-Clavulonic acide and Co-Trimoxazole in the treatment of acute urinary tract infection in adult J.Antimicrob.Agents chemother.28(5):693-694.
8. **Koneman, E.W.; Shreckenberger, P.C. & Allen, S.D. (1992).** Book of Diagnostic Microbiology .fourth Edition J.B.LippincottCompany.philadelphia.
9. **Luzzaro, F.; Perill, M.; Amicasante, G.; Lombardi, G.; Beloni, R.; Zollo, A.; Bianchi, C.; & Toniolo, A. (2001).** Properties of multidrug-resistant ESBL-producing *proteus mirabilis*isolates and possible role of beta-lactam/beta lactamase inhibitor combination Int Antimicrob Agent17:131-135.
10. **O'May, G.A.; Jacobsen, S.M.; Longwell, M.; Stoodley, P.; Mobley, H.L.T. & Shirtliff, M.E. (2009).** The high-affinity phosphate transporter Pst in *proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation. Microbiology,155:1523-1535.
11. **Paul, G.C.; Gerbaud, G.; Bure, A.M; Philippon, A.M; Pangon, B. & Courvalin, P. (1989).** TEM-4,anew plasmid mediated.β-lactamase that hydrolyzed broad spectrum Cephalosporin in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Antimicrob,Agent chanother.33:1958-1963.
12. **Pitout, J.D.D.; Thomson, K.S.; Hanson, N.D.; Ehrhardt, A.F.; Moland, E.S. & Sanders, C.C. (1998).** β-Lactamases Responsible for Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins in *Klebsiellapneumonia,Escherichacoli,and proteus mirabilis* Isolates Recovered in South Africa.Antimicrob Agents Chemother.42(6):1350-1354.
13. **Sykes, R.B. (1978).** Methods for detecting Beta-lactamase p:64-69.In laboratory methods in antimicrobial chemotheraphy-By David,S;lan,p;David,W.and Richard,W.1st ed.Churchill Living Stone din burg.London.
14. **Wrigley, C.W. (1971).** Gel electrofocusing criteria for homogeneity .In"Methods in Enzymology " vol.22(W.Z.Jarody ed.)Academic press.NewYork.
15. **Yilmaz, N.O. (2013).** Detection of plasmid-mediated Amp C β-lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*. Indian JMed Microbiol,31:53-9.

The value of isoelectric focusing and betalactamase enzymatic activity of *Proteus mirabilis* that causes urinary infection

Mohammed Fadhl Al-Maisary
Dept. Biology – Faculty of Science and Education (Zingbar) – University of Aden- Yemen
DOI: https://doi.org/10.47372/uajnas.2015.n1.a06

Abstract

Samples were collected from patients infected with UTI, *Proteus mirabilis* were found and tested by *api20E* and antimicrobial susceptibility was done for isolates against 16 antimicrobial agents the results of detection of *β-lactamase* enzymes revealed that 19 bacterial isolates were gave positive results , while only 3 gave positive results of detection of extended spectrum *β-lactamase* (ESBLs) .The isoelectric focusing for isolates (UP_1, UP_2,and UP3) and enzymatic activity were determined, and the pH value was found as 5.6,7.4,and 5.4 respectively.

Key words: *Proteus mirabili*s, pH, Urinary Infection.