دراسة دور بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Serratia marcescence* في المقاومة للمضادات الحيوية

هناء سليم يوسف
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم، جامعة بغداد

الخلاصة

بعد اجراء الفحوصات التشخيصية على عشر عزلات من بكتريا *Serratia marcescence* أجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية المختلفة، و فحص القابلية على افراز الانزيم المحلل لمضادات بيتا لاكتام لجميع العزلات.

عزلت بروتينات الغشاء الخارجي و أخذ معدل كمية البروتين لأربع عزلات الأكثر مقاومة للمضادات و عزلتين اقل مقاومة للمضادات تحت الأختبار. و من خلال الدراسة وجد ان بكتريا *S.marcescence* ذو مقاومة عالية لمدى واسع من المضادات الحيوية، و ان هذهذ المقاومة تعود لعوامل عديدة مثل افراز البنسلينيز بالاشتراك مع بروتينات الغشاء الخارجي و تعمل هذهِ العوامل متآزرة مع بعضها لمقاومة المضادات الححيوية و منع تأثيرها.

المقدمة

اكتسبت بكتريا *S.marcescence* اهمية طبية في العقدين الأخيرين لمالها من دور في احداث الاصابات المرضية المختلفة، مثل: التهابات الحروق و الجروح، و التهابات المجاري البولية، و غيرها من الامراض الخطيرة ولاسيما في الاشخاص ذوي المناعة الضعيفة و الراقدين في المستشفيات [1].

ان الاصابة الناجمة عن بكتريا *S.marcescence* صعبة العلاج بسبب مقاومتها لمدى واسع من المضادات الحيوية [2]، اذ تلعب الانزيمات المثبطة للمضادات الحيوية [3]، و بروتينات الغشاء الخارجي [4] دورا" كبيرا" في مقاومة هذهِ المضادات. فقد بين الباحث Palomer و جماعته [5] ان النفاذية للمضادات الحيوية لبكتريا *S.marcescence* بسبب الغشاء الخارجي يعتمد على المستضد الجسمي O (O-somatic antigen) و السلسلة الجانبية (O-side chain) و ان الطفرات التي ينقصها هذا المكون تمتاز بانخفاض قيمة التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضادات البيتا لاكتام مقارنة بالعزلات الابوية، و ان استرجاع المستضد (O) يستعيد قيمة التركيز المثبط الادنى. و قد بين الباحث على ان النفاذية تعتمد على المستضد الجسمي O. بينما ذكر الباحث Ito و جماعته [6] ان المقاومة للبنسلينات و منها (Imipenem) يعود الى انتاج انزيم Metallo-β-Lactamase المحمول على البلازميد في حين بين الباحث chong و جماعته ([7]) و Nikaido [8] ان المقاومة تعود الى بروتينات (Porine) الموجودة في الغشاء الخارجي و هي تعمل حاجزا" نفاذيا" تمنع مرور المضادات.

المواد و طرائق العمل

الاوساط الزرعية

الاوساط الزرعية هي Nutrient broth و Nutrient agar و MacChonkey agar و Muller Hinton Agar و اقراص المضادات الحيوية.

العزلات

تم الحصول على العزلات من المصادر الآتية عزلتان من التهابات الحروق، و لجروح،و عزلتان من حصى الكلية، و ثلاث عزلات من التهابات المجاري البولية و ثلاث عزلات من البيئة الخارجية (تجمعات مائية مؤقتة).

التشخيص

تم التشخيص بالطرائق الروتينية بالاعتماد على الفحوصات المجهرية فضلا" عن الى الفحوصات البايوكيميائية. اجريت الاختبارات اعتماداً على ماورد في انظمة التشخيص المعتمدة وتم التأكد من التشخيص باستعمال نظام EPI 20E (Biomerux).

استعملت طريقة كيربي (Baure-Kirby) لأختبار الحساسية للمضادات الحيوية و مقارنة النتائج بالمصدر [9].

اجري فحص انتاج انزيم البنسلينيز حسب المصدر [10] ، وبأختصار نقل قطرة من معلق كثيف لبكتريا *S.marcescence* النقية الى انبوبة تحتوي على 0.1 سم^3 من محلول مضاد البنسلين G بتركيز 6.000 مكغم/سم^3 و تركت بدرجة حرارة الغرفة مدة نصف ساعة، ثم اضيف لها قطرتان من محلول النشا المائي بتركيز 1% (وزن/حجم)، بعد ذلك اضيف قطرة من محلول اليود الى الانبوبة و مزجت جيداً و لوحظ تغير اللون الازرق الى الابيض خلال اقل من 10 دقائق و هذا دليل على انتاج الانزيمات المحللة لمضادات البيتالاكتام.

استخلاص و تقدير بروتينات الغشاء الخارجي

تمت الطريقة على وفق ماورد في لمصدر [11] (Osborn,1980)، اذ نقل 1 سم^3 من مزرعة سائلة بعمر 18 ساعة الى لتر واحد من وسط نقيع الدماغ والقلب لسائل. حضن الدورق بحرارة 37 م° و مدة 18 ساعة.

جمعت الخلايا بعد لحضن باستخدام جهاز الطرد المركزي مدة 30 دقيقة بسرعة (8000×g) و حرارة 4 م°. علقت الخلايا و غسلت ثلاث مرات باستخراج محلول الملح الفسيولوجي، و تم نبذ العالق باستخدام جهاز الطرد المركزي بالطريقة لسابقة نفسها. جففت الخلايا بوضعها في انبوبة صغيرة مغلقة بسداد قطني ووضعت في الحاضنة بحرارة 40 م° و مدة 24 ساعة و استخلصت بروتينات الغشاء الخارجي بتعليق 10 ملغم من الخلايا البكتيرية الجافة في 10 سم^3 من المحلول لملحي المنظم Tris-HCl Buffer بتركيز 0.05 مولار و دالة الحموضة قيمتها تساوي 7.8 (pH=7.8) الحاوي على EDTA بتركيز 1 ملي مولار لأزالة المواد اللاخلوية و بحرارة 4 م°. حطمت الخلايا باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية (Ultrasonic) بتسليط 24.000 ذبذبة / ثانية لمدة 15 ، و كررت العملية اربع مرات مع مدة توقف لتبريد المحلول للحفاظ على حرارة 4 م°، فصل الراشح عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة g×6000 لمدة ساعة بحرارة 4 م°. اذيب الراسب في المحلول المنظم ترس الحامضي (Tris-HCl) بتركيز 0.05 مولار و دالة حموضة مقدارها 7-8. تم تركيز البروتين باستعمال طريقة الفرز لغشائي و استعمال السكروز و تم الحفظ بحرارة -20 م° لحين الاستعمال.

قيست كمية البروتين باستعمال طريقة Witakar & Granum و باستخدام المعادلة:

تركيز البروتين (ملغم/سم^3)=الامتصاصية بطول موجي$_{235nm}$ – الامتصاصية بطول موجي$_{280nm}$

2.51

النتائج و المناقشة

شخيصت العزلات المنماة على وسط آكار المكونكي استناداً الى الشكل المظهري و المجهري و فضلا عن الى الطرائق الكيميائية و تم تأكيد التشخيص باستعمال نظام APIE20. و قد جاءت النتائج مطابقة لطرائق التشخيص المعتمدة و بكتريا *Serratia marcescence* تنتمي الى عائلة *Enterobacteriaceae* اذ تؤدي بروتينات الغشاء دور في مقاومتها للمضادات الحيوية فضلا" عن الى امكانية انتقال بلزميدات المقاومة ضمن افراد العائلة [13].

من خلال الدراسة وجدنا ان جميع العزلات كانت فارزة لانزيم β-Lactamase الذي يثبط البنسلينات جدول (1).

و من خلال الجدول نفسه نلاحظ ان معظم العزلات المأخوذة من حالات مرضية كانت فاقدة لملون Prodigiosin و هي تحتل نسبة 71.4% من مجموع العزلات المرضية، في حين الفارزة للملون تحتل نسبة 28.5%، بينما كانت نسبة 66% من عزلات البيئة الخارجية و تمتلك القابلية على افراز الملون و هذا ماجاء مطابقا" لما حصل عليه [14]، اذ بين ان العزلات المرضية غالباُ ماتكون فارزة للملون و قد اوضحت الدراسة[16، 15] ان لظروف الزرع، و درجة حرارة الحضن، و ملح الطعام و الايونات، و الضوء كلها عوامل تؤثر في افراز الصبغة و بما ان اغلب العزلات المرضية كانت فاقدة للملون لذلك لايعد الملون عامل فياعة للبكتريا [14] .

اعتمد في الدراسة على المضادات المتوافرة في الاسواق و المستعملة لعلاج الحالات المرضية المتسببة عن بكتريا السالبة لملون كرام.

عند ملاحظة جدول (2) نجد ان هناك مقاومة متعددة لغلب المضادات الحيوية، و ان هذهِ المقاومة ناجمة عن سوء استعمال المضادات الحيوية التي تسبب في انتقاء العزلات المقاومة و التحفيز على افراز الانزيمات المثبطة للمضادات كماانها تؤدي الى تغيير في نفاذية الغشاء الخارجي بسبب تغير في تركيبه الكيميائي و الذي يؤدي الى عدم السماح للمضاد بالنفاذ او تثبيط المضاد بحيث لايعمل على البكتريا[7،8] و ان سيفالوسبورينات الجيل الرابع فعالة ضد بكتريا *S.marcescence* بسبب قلة الالفة بينها و بين انزيم البنسليناز[17، 18].

كما اوضح Palomar و جماعته ان الطفرات التي ينقصها السلسلة الجانبية O تقلل قيمة MICs لذلك اشار الى دور السلسلة O في نفاذية المضادات عبر الغشاء الخارجي[5] .

اما بالنسبة الى مضادات الامينوكلايكوسايدات فيلاحظ ان هنالك مقاومة 100% لمضاد الجنتامايسين و تعزى هذهِ المقاومة فضلا" عن حاجز النفاذية الى وجود انزيمات تعمل على تحوير هذهِ المضادات و هذهِ الانزيمات محمولة على البلازميد و يمكن انتقالها بين افراد العائلة [3] و ان الانزيمات المثبطة التي تؤثر على مضادات الامينوكلايكوسايد مثل الجنتامايسين و الاميكاسين تكون محمولة على بلازميد يتراوح حجمهُ 10-20Kb.

نلاحظ من الجدول (2) ان مضاد الـ Amikacin هو الانسب لعلاج حالات البكتريا المتعددة المقاومة.نلاحظ اقل مقاومة كانت للجيل الرابع من السيفالوسبورينات و هو Cephotaxim و Cephtriexone و لا يقتصر استعمالها ضد هذهِ البكتريا فقط و انما يستعمل لجميع افراد عائلة البكتريا المعوية صعبة العلاج[17].

بالنسبة الى قياس كمية بروتين الغشاء الخارجي جدول (3) وجدنا ان اكثر العزلات مقاومة و هي S_1 ، S_4 ، S_5 ، S_{10} كمية البروتين لها كانت على التوالي 2.71 ، 2.97 ، 2.07 ، 2.51 و معدل كمية البروتين لها كانت 2.56 مكغم/سم^3 و هذهِ العزلات كانت جميعها عديمة القابلية على فرز الملون و هي عالية المقاومة للمضادات هذهِ النتائج موافقة للنتائج التي حصل عليها[14].

في حين ان العزلات الاقل مقاومة نسبياً للمضادات الحيوية و هي S_2 و S_9 فارزة للملون و كمية بروتينات الغشاء الخارجي كان على التوالي 1.78 ، 1.65 و معدل كمية البروتين 1.71 و هي اقل من كمية بروتينات الغشاء الخارجي للبكتريا الفاقدة للملون .

ان بكتريا *S.marcescence* هي بكتريا انتهازية لها القابلية على احداث الاصابة للاشخاص ذوي المناعة الضعيفة و لها القابلية على اكتساب المقاومة لأغلب المضادات الحيوية عن طريق انتقال جينات المقاومة من افراد عائلة البكتريا المعوية الاخرى كما تمتلك القابلية على تحوير بروتينات الغشاء الخارجي لتصبح قليلة النفاذية[19].

كما ان بروتينات نظام Multidrug efflux pumps تعمل على مواد اساس مختلفة و ان نتاجية و فعالية هذهِ البروتينات تتأثر بعوامل عديدة و ان انتاجها يكون كبيرا" في السلالات الممرضة، و ان هذا النظام يعتمد على الطاقة و قد وجد انه يؤدي دورا" في السلالات الممرضة، و ان هذا النظام يعتمد على الطاقة و قد وجد انه يؤدي دورا" اساسيا" في مقاومة *Pseudomonas aeroginosa* و بقية افراد العائلة المعوية.

لعلاج الاصابات الناجمة عن هذهِ البكتريا متعددة المقاومة يستعمل خليط من مضادين او اكثر مثل مضاد من مجموعة الامينوكلايكوسايدات فالامينو كلايكوسايدات تحفز القتل السريع و اختزال الطعم، بينما يقوم مضاد البيتالاكتام بمنع اعادة النمو [20].

المصادر

1. Korner,R.J.; Nicol, A. and Reeves, D.S.(1994). Ciprofloxacin resistant *Serratia marcescence* endocarditis as a complication of non-Hodgkin's lymphoma. J.infect. 29:73-76.
2. Sleigh,J.D.(1983).Antibiotic resistance in *Serratia marcescence*. BMJ.287:1651-1653.
3. Garcia,D.C.; Woloj,G.M.; Pileiro,S. and Sordelli,O.(1995). An 8-years study of resistant to amikacin in gram-negative bacilli isolated from patient with nosocomial infections at one hospital in Argentina.J.Mcd.Microbiol.42:283-390.
4. Nikaido,H.(1994).Prevention of drug access to bacterial targets : Permeability barriers.Science.15:382-388.
5. Palomars,J.: Puig,M.; Montilla, R. and Loren JG.(1995). Lipopolysaccharide recovery restores susceptibility levels towards β-lactamase in *S. marcescence*. Microbios.82:21-26.

6. Ito, H. ; Arakawa,Y.; Ohsuka,S. and Wacharotayankum,R. (1995).Plasmid-mediated dissemination of the metallo-β-lactamase gene blatmp among clinically isolated strains of *Serratia marcescence*. Antimicrobial Agents Chemoth.39:824-829.
7. Chong,Y.; Lee,K.; and Kwon O.H.(1993).Invitro activities of cefepime against *Enterobacter cloacae*, *S. marcescence*, *Pseudomonas aeruginosa* and other aerobic Gram-negative bacilli.I.Antimicrob.Chemoth.32 Suppl.B:21-29.
8. Nikaido,H.; Liu,W.; and Rosenberg,E.Y.(1990).Outer membrane permeability and β-lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methaloxyimmo substituents.Antimicrob Agents.Chemoth.34:337-342.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standars (NCCLs).(1989).Peromance standars for antibacterial susceptibility testing.
10. Roseblatt,J.E. and Neumann.(1978).A rapid test for pencillinase. Am.J. Clin.Pathology.89:351-354.
11. Osborn, M. J. and Wu ,H.C.(1980).Proteins of the outer membrane of gram negative bacteria Ann.Rev.Microbiol. 34:369-422.
12. Witakar,R.J. and Grannum,P.E.(1980).An absolute methand for protein determination based on deference in absorbance 235 , 280.Anal.Biochemisery.109:156-159.
13. Grimont, PAD , Grimont,F.(1984). *Serratia* in Krieg N.R. Holt, J.G.(eds) Bergey's Mannual of systematic bacteriology Vol.I. Baltemore, Williams and Wilkins.477- 484.
14. Philips,I. and King A.(1977). *Serratia marcescence* in hospital practice.Lancet 1, 538.
15. Williams, R.P.; Gott C.L.; and Qadri,S.M.H.(1971).Influence of temper true of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescence* . J.Bacteriol.106:438-443.
16. Silverman, M.P. and Munoz,E.F.(1973).Effect of iron and salt on prodigiosin synthesis in *Serratia marcescence* .J.Bacteriol.114,999-1006.
17. Bellido,F.; Pechere,J.C. and Hancock,R.E.W.(1991).Novel method for measurement of outer membrane permeability to new β-lactamase in intact *Enterobacter cloacae* cells Antimicrob. Agents,Chemother.35,68-72.
18. De Champs,C.; Henqwell,C. and Guelon,D.(1993).Clinical and bacteriological study of nosocomial infection due to *Enterobacter aerogenes* resistant to impenem.Clinic Microb.13:123-127.
19. Nikaido,H.(1989).Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance.33(11):1831-1836.
20. Carbon,C.(1991).Impact of the antibiotic dosage schedule of efficacy in experimental endocarditis. J.Infect.Dis.supp.74:164-172.

جدول (1): قابلية عزلات *S.marcescence* على افراز ملون Prodigiosin و انزيمات β-Lactamase

رقم العزلة	مصدر العزلة	القابلية على افراز ملون Prodigiosin	القابلية على افراز انزيمات β-Lactamase
1	التهاب الحروق	−	+
2	التهاب الجروح	+	+
3	حصى الكلية	−	+
4	حصى لكلية	−	+
5	التهاب المجاري البولية	−	+
6	التهاب المجاري البولية	+	+
7	التهاب المجاري البولية	−	+
8	بيئة خرجية	+	+
9	بيئة خارجية	+	+
10	بيئة خارجية	−	+

جدول (2): حساسية بكتريا *S.marcescence* للمضادات الحيوية المختلفة استناداً للمصدر (9)

المضاد الحيوي	تركيز المضاد مكغم/قرص	العزلات الحساسة العدد (%)	عزلات متوسطة لحساسية العدد (%)	العزلات المقاومة العدد (%)
Ampicillin	10	(0.0)0	(0.0)0	(100)10
Amoxycillin	25	(30)3	(10)1	(60)6
Amikacin	30	(40)4	(40)4	(20)2
Gentamicin	10	(0.0)0	(0.0)0	(100)10
Nalidixic acid	30	(30)3	(30)3	(40)4
Cephalexin	30	(30)3	(20)2	(50)5
Cephotaxime	30	(40)4	(40)4	(20)2
Cephtricxone	30	(70)7	(20)2	(10)1

جدول (3): كمية البروتين في الغشاء الخارجي لبكتريا *S.marcescence* مقاسة بالمكغم/سم^3

العزلة	كمية البروتين
S_1*	2.71
S_2	1.78
S_3*	2.35
S_4*	2.27
S_5*	2.07
S_6	3.07
S_7*	2.44
S_8	1.05
S_9	1.65
S_{10}*	2.51

Study of the Role of the Outer Membrane Proteins of *Serratia marcescence* in Resistant to Antibiotics

H. S. Yossef
Department of Biology , College of Science , University of Baghdad

Abstract

After diagnostic tests on ten isolates of *S. marcescence*, were made an examination of sensitivity to various antibiotics and checking the ability to produce β-lactamase of all isolates.

The outer membrane protein quantity was determined in $\mu g/cm^3$ for all isolates. The results showed that *S. marcescence* have antibiotic multiresistant and all isolates had the ability to produce β-lactamase and its resistance may arise from more than two mechanisms like overproduction of antibiotic inactivation enzymes and the decrease of permeability by outer membrane protein.