دراسة أمراضية عدد من الأنواع التابعة لمجموعة الجراثيم العصوية السالبة لصبغة كرام غير المخمرة بما يتعلق بأنزيم الفوسفاتيز الحامضي والاسيتايل كولين استريز والليسيثينيز واللاييز

قصي عبد القادر الجلبي[١] ، باسمة أحمد عبد الله[١] و ندى فاضل الراوي[٢]

[١] قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

[٢] كلية طب نينوى، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

الملخص:

تضمنت الدراسة التحري عن الأنزيمات التي تؤدي دورا في امراضية عدد من الأنواع التابعة لمجموعة الجراثيم العصوية السالبة لصبغة كرام غير المخمرة وهي:

Moraxella lacunata, Acinetobacter lwoffii, Acinetobacter baumannii Alcaligenes spp, *Achromobacter* groups, *Pseudomonas aeruginosa Alcaligenes xylosoxidans* var.*xylosoxidans (A.x.x.)*

المعزولة من عينات سريرية. ومن هذه الأنزيمات أنزيم الفوسفاتيز الحامضي والاسيتايل كولين استريز والليسيثينيز واللاييز ، وأظهرت النتائج أن النوعين *A. baumannii* و *P. aeruginosa* اعطيا اعلى فعالية لهذه الأنزيمات. ودرس تأثير عدد من المضادات في إنتاجها، إذ أظهرت تأثيرا نسبيا في إنتاج هذه الأنزيمات من قبل الأنواع قيد الدراسة اعتمادا على نوع المضاد ونوع الجرثومة.

المقدمة:

يثير العديد من أفراد مجموعة الجراثيم العصوية السالبة لصبغة كرام غير المخمرة مشاكل في حقل الصحة العامة، إذ تعد معظم أفرادها مهاجمات ثانوية (Secondary Invaders) ، وقليل منها يعد ممرضاً رئيساً للإنسان مثل النوع *Bordetella pertussis* المسبب لمرض السعال الديكي (Whooping Cough) والنوع *Moraxella lacunata* المسبب لأحد أنواع التهاب ملتحمة العين والمسمى (Purulant Conjuctivitis) والنوعين *Acinetobacter baumannii* و *Pseudomonas aeruginosa* اللذين يشاركان في أحداث التهابات الحروق والجروح (22,7,30,14,13) .

تؤدي بعض الأنزيمات دوراً كبيراً في امراضية الجراثيم حيث تحرر أفراد المجموعة أنزيمات محللة للخلايا والتي تسمى بالسموم الخارجية Exotoxins (3) ، وهذه بدورها تحطم أغشية خلية المضيف مثل أنزيم الليسيثينيز أو الفوسفولاييز (Phospholipase C) وأشارت الدراسات إلى وجوده في الخمائر (18) والحيوانات(8) والجراثيم(4,23,27,6,12,2). وأنزيمات كولين استريز (Choline Esterase CLE) الموجودة في أنواع كثيرة من الكائنات الحية منها اللبائن (33) والجراثيم (15) والطفيليات (26) والنباتات (11) . وأنزيم الفوسفاتيز الحامضي (Acid Phosohatase Ac. Pase) الذي دلت الدراسات إلى وجوده في اللبائن(٣٤) والطفيليات(5) والنباتات الراقية (20)، والجراثيم (29,1). قام الباحث Lisa وجماعته سنة 1994 (٢٣) بإجراء دراسة مقارنة لهذه الأنزيمات في النوع *P. aeruginosa* وإن أعلى فعالية حصل عليها كانت لأنزيم الفوسفولاييز مما يؤكد دوره المهم في إمراضية النوع فضلاً عن أنزيم الفوسفاتيز الحامضي وأنزيمات كولين أستريز.

تعمل هذه الأنواع الثلاثة من الأنزيمات على تحطيم المركبات الحاوية على الكولين في مكونات الخلية، إن أنزيمات (PLC) و(Ac. Pase) والفوسفاتيز القاعدي (Alkaline Phosphatase Alk. Pase) تحلل الليبيدات المفسفرة في أنسجة المضيف وتحطم مركب (Phosphorylcholine) محررة مادة الكولين والفوسفات اللاعضوي وهذه النواتج ضرورية لنمو الجراثيم واستمرارها (24)، وهذا يفسر حقيقة إمكانية هذه الجراثيم وبخاصة *P. aeruginosa* من استعمار مختلف أنسجة الجسم في مختلف الظروف البيئية.

المواد وطرق العمل:

١- تحضير خلايا الجراثيم غير المعاملة والمعاملة بالمضادات الحيوية المنتخبة .

تم تنمية الجراثيم قيد الدراسة في وسط (Brain Heart Infusion Broth B.H.I.B.) من مزرعة الجراثيم الحاوية على (10^5) خلية / سم^3 وبعمر (18) ساعة وحضنت في درجة حرارة (37)^O م لمدة (18) ساعة. كما تم تحضير الجراثيم المعاملة بالمضادات الحيوية المنتخبة وهي Cefotaxime و Norfloxacin و Amikacin وتم اختبار تأثير كل منها على أنواع الجراثيم قيد الدراسة وذلك بإضافة المضاد بالتركيز المثبط لنصف عدد الجراثيم إلى الوسط الزرعي.B. H. I. B وقد تم تحديد التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا باستخدام طريقة العكارة Turbidity Method (٣٥) وطريقة العد بالاطباقPlate Count Method (36) ، وحضنت أيضا في درجة حرارة (37)^O م لمدة (18) ساعة . تم جمع الخلايا بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة(8000×g) لمدة (30) دقيقة بدرجة حرارة (4)^{O}م وغسلت الخلايا باستخدام محلول الملح الفسيولوجي ثم فصلت باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد (32).

٢- تحضير المستخلص البروتيني وتقدير كمية البروتين .

تم وزن (0.2) غم (وزن رطب) من الراسب الذي تم الحصول عليه في الفقرة (1) ، وعلق في دارئ الترس (Tris–HCl Buffer) والحاوي على (EDTA) ، وتم تفجير الخلايا باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية (Ultrasonic) وبواقع ذبذبة(24.000) / ثانية لمدة (30) ثانية، كررت هذه العملية(4)مرات مع فترات توقف لمدة(15) ثانية لمنع ارتفاع درجة حرارة المزيج, فصل الراشح عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي الفوقي المبرد لغرض ترسيب الخلايا غير المتكسرة(32). وتم تقدير كمية البروتين باستخدام طريقةLowry وجماعته سنة 1951 (٢٥).

٣- فعالية أنزيم الفوسفاتيز الحامضي

حددت فعالية الأنزيم في المستخلص البروتيني اعتمادا على الطريقة الموضحة من قبل Hassan و Coombs سنة 1987 (١٩)، إذ تكون خليط التفاعل (0.4) سم٣ من محلول خلات الصوديوم بتركيز (50) ملي

مولار ودالة حامضية (pH 5.5) والمادة الأساس P – Nitrophenyl Pyrophosphate بتركيز (5) ملي مولار ، بدأ التفاعل بإضافة المستخلص البروتيني المحضر في الفقرة (2) ، وحضن المزيج بدرجة حرارة (37)ْم لمدة (30) دقيقة وأوقف التفاعل بإضافة (1) سم^3 من هيدروكسيد الصوديوم NaOH (0.1) عياري ، قدرت الامتصاصية باستخدام المطياف الضوئي بطول موجي (410) نانوميتر ، وتم التعبير عن فعالية الأنزيم بعدد نانومولات النيترو فينول (Nitrophenol) الناتجة/دقيقة/ملغم بروتين باستخدام معامل الحيود المولاري

(Molar Extinction Coefficient =14.3 x 10^{-3} M^{-1} cm^{-1}) .

٤- الكشف عن فعالية أنزيم اسيتايل كولين استريز

حددت فعالية الأنزيم باستخدام طريقة الأقطاب الكهربائية اعتمادا على طريقة Mohammad وجماعته سنة 1997 (٢٨) المحورة ، وذلك بقياس الدالة الحامضية (pH) للمحاليل عند بدء وانتهاء فترة التحضين ، حيث يحلل هذا الأنزيم مادة الأساس الاستيل كولين ليعطي حامض الخليك والكولين ويمكن أن يتفكك حامض الخليك ليعطي أيون الهيدروجين والذي يؤدي إلى الانخفاض في الـ (pH) ، فالتغير في الـ pH يعطي فكرة عن الفعالية الأنزيمية ، حيث أضيف (0.2) سم٣ من المستخلص البروتيني المحضر في الفقرة (2) إلى (3) سم٣ من الماء المقطر في أنابيب اختبار عريضة سعة (10) سم٣ ومزج المحلول ، ثم أضيف (3) سم٣ من المحلول الدارئ المحضر من إذابة : (1.237)غم من باربيتال الصوديوم (Sodium Barbital) و (0.163) غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (Potassium Dihydrogen Sodium Chloride) و(35.07) غم من كلوريد الصوديوم (Sodium Chloride) ، في (900) سم٣ من الماء المقطر وتم ضبط الدالة الحامضية بدرجة (8.1 pH) ثم أكمل الحجم إلى لتر .

قيست الدالة الحامضية بعد المزج الجيد للمحاليل والتي تمثل قيمة $p H_1$ ، ثم أضيف (0.12) سم٣ من محلول (Acetyl Choline Iodide) بتركيز (7.5%) وبعد المزج ، حضن في حمام مائي بدرجة حرارة (37)ْم لمدة (30) دقيقة وقيست الدالة الحامضية بعد التحضين والتي تمثل قيمة pH_2 ، إن فعالية الأنزيم تساوي: Δ pH / 30 min = $pH_1 - pH_2$

٥- استخدم وسط (Egg Yolk Agar) المحضر محليا بإضافة صفار بيض طازج (Fresh Egg Yolk) إلى وسط (Nutrient Agar) المعقم والمبرد إلى درجة حرارة (55)ْم بنسبة (15%) ، لقح الوسط بمستعمرات نقية من أفراد المجموعة وحضن في الظروف المثالية لمدة (24–48) ساعة، تم الاستدلال على فعالية أنزيم الليسيثينيز بتكون مناطق رائقة حول المستعمرات النامية مقارنة مع نوع جرثومي ينتج الأنزيم وهو *Staphylococcus aureus* ووسط سيطرة غير مزروع.

يطلق على هذا النوع من الاختبارات اسم الاختبارات المشتركة (Combined Tests)، إذ يمكن التحري في الوقت نفسه عن فعالية أنزيم آخر يؤدي دورا مهما في أمراضية هذه الجراثيم وهو أنزيم اللايبيز، والذي تم الكشف عنه بغمر الوسط بكمية كافية من محلول مشبع لكبريتات النحاس($CuSO_4$) مدة(20) دقيقة، أزيل الفائض من المحلول وجفف الطبق بوضعه في الحاضنة لمدة قصيرة، إن ظهور لون أزرق مخضر في مواقع تحلل الدهن دلالة على فعالية أنزيم تحلل الدهون (10,9).

التحليل الإحصائي:

حللت النتائج إحصائيا واختبرت باستخدام طريقة دنكن (Duncan Method) لمعرفة فيما إذا كان هناك فرق معنوي بين الأنواع قيد الدراسة غير المعاملة والمعاملة بالمضادات الحيوية المنتخبة في تقدير البروتين الكلي والتحري عن عدد من الأنزيمات التي تؤدي دوراً في أمراضية أنواع المجموع

النتائج:

١- مقارنة كمية البروتين وقدرة إنتاج عدد من أنزيمات الامراضية لأنواع مجموعة الجراثيم المنتخبة قيد الدراسة:

يوضح الجدول (١) أن أفراد *Alcaligenes spp.* أكثرها محتوى للبروتين الكلي وكانت أعلى فعالية لأنزيم الفوسفاتيز الحامضي والليسيثينيز في النوع *P. aeruginosa*، بينما كانت أعلى فعالية لأنزيم اسيتايل كولين استريز في النوع *A. baumannii* ، وان أعلى إنتاج لأنزيم اللايبيز كان لأفراد *Achromobacter* groups

الجدول (١) مقارنة كمية البروتين وقدرة إنتاج عدد من أنزيمات الامراضية لأنواع مجموعة الجراثيم المنتخبة قيد الدراسة

الأنواع	كمية البروتين مايكروغرام/ ملغم وزن جاف	فعالية أنزيم		القدرة على إنتاج أنزيم	
		الفوسفاتيز الحامضي نانومول/دقيقة/ ملغم بروتين	اسيتايل كولين استريز ΔpH ١ ٣٠ دقيقة	* الليسيثينيز	** اللايبيز
A.baumannii	٢٤٣ ± ٦	٢٠,٥ ± ٧,٩	٠,٢٨٢ ± ٠,٠٥٨	+ + +	+
A.lwoffii	١٢٣ ± ١	١٤,٨ ± ٨,٣	٠,٠٣٤ ± ٠,٠٠٨	__	__
M.lacunata	١٨٧ ± ٥	٢٦,٥ ± ٥,٦	٠,٢٠٩ ± ٠,٠٠٢	__	__
P.aeruginosa	١٧٠ ± ٥	٣١,١ ± ٣,٣	٠,١٩٢ ± ٠,٠١٤	+ + + +	+ +
Achromobacter Groups	١٧٧ ± ٣	٢٠,٤ ± ٢,٦	٠,٠٩ ± ٠,٠٠٢	+ +	+ + +
***Alcaligenes* spp.**	٢٤٧ ± ١	١٤ ± ٤,٥	٠,٠٤١ ± ٠,٠٠٢	__	__
A.x.x.	١٣٠ ± ١,٥	١٣,٣ ± ٨,٦	٠,٠٨٤ ± ٠,٠٠٨	+ +	+ +

*(–): لا يوجد تحلل ، (+): تحلل لمسافة (1-3) ملليمتر ، (++): تحلل لمسافة (٤–٧) ملليمتر. (+++): تحلل لمسافة (٨–١١) ملليمتر، (++++): تحلل لمسافة (١٢– ١٤) ملليمتر. ** (–): لا يوجد لون ، (+): لون ازرق مخضر فاتح ، (++): لون ازرق مخضر (+++): لون ازرق مخضر غامق جدا ،(16).

٢-تأثيرعدد من المضادات الحيوية في كمية البروتين وقدرة إنتاج عدد من أنزيمات الامراضية لأنواع مجموعة الجراثيم المنتخبة قيد الدراسة:

أظهرت النتائج أن نسب تأثير المضادات المستخدمة في الدراسة على البروتين الكلي وأنزيم الفوسفاتيز الحامضي والاسيتايل كولين استريز لم تتجاوز (٥٠%) كما هو موضح في الجداول (٢ ، ٣ و ٤) . ماعدا النوعين *A. baumannii* و *P. aeruginosa* المعاملين لمضاد Cefotaxime ، إذ تأثر إنتاج أنزيم الفوسفاتيز الحامضي بهما بنسبة (٥٠%) للأولى و(٥٧%) للثانية، وهذا ما أكدته النتائج الإحصائية بملاحظة الفروق المعنوية في فعالية الأنزيم عند مستوى ($p<0.05$) لإفراد النوعين المعاملة بالمضاد عنها في غير المعاملة . ويوضح الجدول (٥) أن أكثر المضادات تأثيرا في إنتاج أنزيمي اللسيثينيز واللايبيز هما المضادان Norfloxacin و Amikacin وأن أكثر الأنواع المدروسة مقاومة للتغير في إنتاج الأنزيمين هي أفراد النوع *A. baumannii* .

الجدول (2) كمية البروتين بالمايكروغرام/ملغم وزن جاف للأنواع قيد الدراسة غير المعاملة وللمعاملة بالمضادات الحيوية المنتخبة

الأنواع	كمية البروتين	النسبة المئوية للكمية	النسبة المئوية لتأثير المضاد
A.baumannii غير معامل	٦ ± ٢٤٣*A	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxime	٥ ± ٢٤٢ A	99.6	0.4
معامل بالمضاد Norfloxacin	٧ ± ٢٤٠ A	99	1
معامل بالمضاد Amikacin	٣ ± ١٨٦ B	77	23
M.lacunata غير معامل	٥ ± ١٨٧ A	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxcime	٢ ± ١٨٠B	96	4
معامل بالمضاد Norfloxacin	٤ ± ١٦٧ C	89	11
معامل بالمضاد Amikacin	٦ ± ١٦٦ C	89	11
P.aeruginosa غير معامل	٥ ± ١٧٠ A	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxime	٧ ± ١٠٣D	61	39
معامل بالمضاد Norfloxacin	٣ ± ١٢٥ C	74	26
معامل بالمضاد Amikacin	٢ ± ١٣٨ B	81	19
Achromobacter groups غير معامل	٣ ± ١٧٧ A	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxime	٤ ± ١٧٦ A	99	1
معامل بالمضاد Norfloxacin	٥ ± ١٦٥ B	93	7
معامل بالمضاد Amikacin	٤ ± ١٧٠ BA	96	4
***Alcaligenes* spp.** غير معامل	١ ± ٢٤٧ A	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxime	١ ± ٢٠٦ B	83	17
معامل بالمضاد Norfloxacin	١ ± ٢٠٤ B	83	17
معامل بالمضاد Amikacin	١ ± ٢٠٦ A	99.6	0.4

* الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة لكل نوع تدل على وجود فروقات معنوية للنوع بعد معاملته بالمضادات عند مستوى احتمال (0.05) والعكس صحيح بحسب اختبار دنكن وكل قيمة تمثل معدل لثلاثة مكررات .

الجدول (3) فعالية أنزيم الفوسفاتيز الحامضي للأنواع قيد الدراسة غير المعاملة والمعاملة بالمضادات الحيوية المنتخبة

الأنواع	الفعالية النوعية نانومول/دقيقة/ملغم بروتين	النسبة المئوية للفعالية	النسبة المئوية لتأثير المضاد
A.baumannii غير معامل	1.9 ± 20.5 * B	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxime	٠,٢± 10.3 D	50	50
معامل بالمضاد Norfloxacin	١,٥± 14.5 C	71	29
معامل بالمضاد Amikacin	٢,٣± 21.8 A	107	+7
M.lacunata غير معامل	٣,٦± 26.5 A	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxcime	١,٦± 16.2 C	61	39
معامل بالمضاد Norfloxacin	٢,٤± 16.4 C	62	38
معامل بالمضاد Amikacin	٣,١± 20.8 B	78	22
P.aeruginosa غير معامل	3.3 ± 31.3 B	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxime	١,١± 13.3 D	43	57
معامل بالمضاد Norfloxacin	٣,١± 32.1 A	103	+3
معامل بالمضاد Amikacin	٠,١± 18.2 C	58	42
***Achromobacter* groups** غير معامل	1.6 ± 20.4 A	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxime	0.8 ± 11.2 D	55	45
معامل بالمضاد Norfloxacin	2.1 ± 15.7 C	77	23
معامل بالمضاد Amikacin	7.2 ± 17.4 B	85	15
***Alcaligenes* spp.** غير معامل	٢± 14 A	100	0
معامل بالمضاد Cefotaxime	١,٥ ± 9 D	64	36
معامل بالمضاد Norfloxacin	١± 11 B	79	21
معامل بالمضاد Amikacin	0.9 ± 10 C	٧١	29

* الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة لكل نوع تدل على وجود فروقات معنوية للنوع بعد معاملته بالمضادات عند مستوى احتمال (0.05) والعكس صحيح بحسب اختبار دنكن وكل قيمة تمثل معدل لثلاثة مكررات .

الجدول (4) فعالية أنزيم اسيتايل كولين استريز للأنواع قيد الدراسة غير المعاملة والمعاملة بالمضادات الحيوية المنتخبة

الأنواع	فعالية الأنزيم ΔpH\ 30 دقيقة	النسبة المئوية للفعالية	النسبة المئوية لتأثير المضاد
A.baumannii غير معامل	0.058 ± 0.282 * A	١٠٠	٠
معامل بالمضاد Cefotaxime	٠,٠١٤± 0.265 B	٩٤	٦
معامل بالمضاد Norfloxacin	٠,٠٠٨± 0.173 D	٦١	٣٩
معامل بالمضاد Amikacin	٠,٠١٤± 0.214 C	٧٦	٢٤
M.lacunata غير معامل	٠,٠٠٢ ± 0.209 A	١٠٠	٠
معامل بالمضاد Cefotaxcime	٠,٠٠ ± 0.205 A	٩٨	٢
معامل بالمضاد Norfloxacin	٠,٠٢ ± 0.200 A	٩٦	٤
معامل بالمضاد Amikacin	٠,٠٠٨ ± 0.202 A	٩٧	٣
P.aeruginosa غير معامل	٠,٠١٤± 0.192 A	١٠٠	٠
معامل بالمضاد Cefotaxime	٠,٠٠١ ± 0.181 B	٩٤	٦
معامل بالمضاد Norfloxacin	٠,٠٠١± 0.165 C	٨٦	١٤
معامل بالمضاد Amikacin	٠,٠٠٧ ± 0.153 D	٨٠	٢٠
***Achromobacter* groups** غير معامل	٠,٠٠٢± 0.09 A	١٠٠	٠
معامل بالمضاد Cefotaxime	٠,٠٠٥± 0.07 B	٧٩	٢١
معامل بالمضاد Norfloxacin	٠,٠٠٣± 0.053 C	٥٩	٤١
معامل بالمضاد Amikacin	٠,٠٠١± 0.049 C	٥٤	٤٦
***Alcaligenes* spp.** غير معامل	٠,٠٠٢ ± 0.041 A	١٠٠	٠
معامل بالمضاد Cefotaxime	٠,٠٠١ ± 0.040 A	٩٩	١
معامل بالمضاد Norfloxacin	٠,٠٠٢ ± 0.039 A	٩٧	٣
معامل بالمضاد Amikacin	٠,٠١١± 0.041 A	١٠١	+ ١

* الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة لكل نوع تدل على وجود فروقات معنوية للنوع بعد معاملته بالمضادات عند مستوى احتمال (0.05) والعكس صحيح بحسب اختبار دنكن وكل قيمة تمثل معدل لثلاثة مكررات .

الجدول (٥) قدرة الأنواع المنتخبة قيد الدراسة على إنتاج أنزيم الليسثينيز واللاييز قبل وبعد معاملتها بالمضادات الحيوية المنتخبة

الأنواع	القدرة على إنتاج أنزيم	
	الليسيثينيز *	اللاييز **
نوع السيطرة *Staph. aureus*	++++	–
A.baumannii غير معامل	+++	+
معامل بالمضاد Cefotaxime	++	+
معامل بالمضاد Norfloxacin	++	+
معامل بالمضاد Amikacin	++	+
M.lacunata غير معامل	–	–
معامل بالمضاد Cefotaxime	–	–
معامل بالمضاد Norfloxacin	–	–
معامل بالمضاد Amikacin	–	–
P.aeruginosa غير معامل	++++	++
معامل بالمضاد Cefotaxime	+++	++
معامل بالمضاد Norfloxacin	++	+
معامل بالمضاد Amikacin	++	+
Achromobacter groups غير معامل	++	+++
معامل بالمضاد Cefotaxime	+	++
معامل بالمضاد Norfloxacin	+	++
معامل بالمضاد Amikacin	+	++
Alcaligenes spp. غير معامل	–	–
معامل بالمضاد Cefotaxime	–	–
معامل بالمضاد Norfloxacin	–	–
معامل بالمضاد Amikacin	–	–

* (–): لا يوجد تحلل ، (+) : تحلل لمسافة (1-3) ملليمتر ، (++) : تحلل لمسافة (٤–٧) ملليمتر (+++) : تحلل لمسافة (٨–١١) ملليمتر ، (++++) : تحلل لمسافة (١٢–١٤) ملليمتر .** (–): لا يوجد لون ، (+) : لون ازرق مخضر فاتح ، (++) : لون ازرق مخضر متوسط ، (+++) : لون ازرق مخضر غامق جداً .

المناقشة:

اهتمت الدراسة الحالية بتسليط الضوء على امراضية عددا من الأنواع التابعة لمجموعة الجراثيم العصوية السالبة لصبغة كرام غير المخمرة إذ يبين الجدول (١) التنافس القائم بين النوعين *A. baumannii* و *P. aeruginosa* في الحصول على أعلى القيم لهذه الأنزيمات وهذا يفسر حقيقة الانتشار الكبير لهما في العينات السريرية وبخاصة النوع *P. aeruginosa* (37,39) . ومن المحتمل أن يكون سبب انتشار هذا النوع هو إنتاجه لأنزيم الفوسفاتيز الحامضي والليسيثينيز وربما يكون سبب انتشار *A.baumannii* هو أنزيم اسيتايل كولين استريز ، فضلاً عن تفوق الأنواع الأخرى على الأقل بنوع واحد من هذه الأنزيمات . كما يظهر الجدول التفوق المطلق للقيم في النوع *A.baumannii* عنه في *A.lwoffi* ، إذ كانت الصورة لهذه القيم معكوسة بين النوعين من أقصاها إلى أدناها أو فقدانها أحيانا ، وهذا يحل لغز قلة انتشار النوع الثاني فضلاً عن حساسيته للمضادات الحيوية (17,31) ، وربما يعزى سبب التأثيرات النسبية لهذه المضادات هو ان آلية العمل لا تعتمد على البروتين بالدرجة الأساس وبخاصة المضادين Cefotaxime و Norfloxacin ، إذ قد تؤثر على أهدافها المحددة في الخلية ، أما عن Amikacin والذي يُعد بروتين الخلية الجرثومية أحد أهدافه فقد اثر على البروتين الكلي للنوع *A.baumannii* بنسبة (٢٣%) ولم يكن له تأثير على أنزيم الفوسفاتيز الحامضي بل اقتصر تأثيره على أنزيم اسيتايل كولين استريز وأنزيم الليسيثينيز ، واختلف تأثيره باختلاف الأنواع قيد الدراسة (38) ، كما تباين تأثير المضادات المنتخبة على أنزيم الليسيثينيز واللاييز بتباين الأنواع المنتجة لهذه الأنزيمات . وأشارت العديد من البحوث إلى دور هذه الأنزيمات في امراضية الجراثيم إذ يحطم أنزيم اسيتايل كولين استريز خلايا المضيف الحاوية على مركبات الكولين مثل استيل كولين (Acetyl Choline) في الخلايا الطلائية للقرنية وإن تحطيمها يؤدي إلى التهاب القرنية، ومن المركبات الأخرى هي (Dipalmitoyl Phosphatidylcholine) على سطح الرئة ومادة (Phosphatidylcholine) في أغشية الخلايا (23) ، ويعمل أنزيم الفوسفاتيز الحامضي على تحليل استرات الفوسفات في خلايا الجسم وتحرير الفوسفات اللاعضوي العنصر الضروري لنمو الجراثيم واستمرارها ، وربما يبطل عمل الخلايا متعددة النوى (Neutrphile) في قتل الجراثيم من خلال تثبيط قدرتها على تكوين الأوكسجين السام (٢٩) ، ويعمل أنزيم الليسيثينيز على تحطيم الدهنيات المفسفرة في أغشية الخلايا مما ينتج عنه تحلل خلايا النسيج وموتها ، كما يعمل على فصل معقدات البروتينات الدهنية Lipoprotien Complex (39,21) .

المصادر:

1- Aragon, V., Kurtz, S. and Cianciotto, N. P. (2001). *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection. Infection and Immunity, 69 : 177-185.

2- Aragon, V., Rossier, O. and Cianciotto, N. (2002). Legionella pneumophila genes that encode lipase and phospholipase C activities. Microbiology, 148 : 2223-2231.

3- Arpigny, J. L., and Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes : classification and properties. Biochem. J. 343 : 177-189.

4- Baine, W. B. (1985). Cytolytic and phospholipase C activity in Legionella species. J. General Microbiol., 131: 1383 – 1391 .

5- Bates, P., Hermes, I. and Dwyer, D. (1989) *Leishmania donovani*: Immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. Exp. Parasitol. , 68: 335 – 346.

6- Beveridge,T. J. (1999). Structures of gram – negative cell walls and their derived membrane vesicles. J. Bacteriol. 181 : 4725 -4733.

7- Carr, E., Eason, H., Feng, S., Hoogenraad, A., Croome, R., Soddell, J., Lindrea, K., Seviour, R. (2001). RAPD-PCR typing of *Acinetobacter* isolates from activated sludge systems designed to remove phosphorous microbiologically. Journal of Applied Microbiology, 90 : 309-319.

8- Chin, J. C. and Watts, J. E. (1988). Biological Properties of Phospholipase C purified from a fleecerot isolated of *Pseudomonas aeruginosa.* J. General Microbiol. 134, 256: 2575.

9- Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996). Mackie & McCartney" Practical Medical Microbiology" 14th ed. Churchill Livingstone Inc., New York.

10- Cruickshank, R.: Duguid, J. P; Swan, R. H. A. (1975). "Medical Microbiology" Vol. 2, The

Practice of medical Microbiology. 12th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.

11- Ernst, M. and Hartman, E., (1980). Biochemical characterization of an acetylcholine–hydrolyzing enzyme from bean (Phaseolue *valgaris* cultivar St Andreas) seedings. Plant Physiology., 65:447– 450.

12- Farn, J. L. ,Strungnell, R. A. ,Hoyne, P. A. ,Michalski, W. P. and Tennent, J. M. (2001). Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis* . J. Bacteriol. 183: 6717-6720.

13- Funke, G., Frodl, R. and Sommer, H. (2004). First comprehensively documented case of *Paracoccus yeei* : infection in human. J. Clini. Micobiol. 42 : 3366-3368.

14- Funke, G. and Funke-Kissling, P. (2004). Evaluation of the new VITEK 2 card for identification of clinically relevant gram – negative rods. J. Clin. Microbiol., 42 : 4067-4071.

15- Garber, N., and Nachshon, I. (1980). Localization of cholinesterase in *Pseudomonas aeruginosa* strain K. J. General Microbiol., 117: 279 – 283.

16- Gillies, R.R., and Dodds, T.C. (1973). Clostridia. In bacteriology illustrated , 3rd (Edn.) , Longman group LTD.

17- Grimont, P. A. D., and Bouvet, P. J. M. (1991). Taxonomy of *Acinetobacter*, P. 25–36. In Towner, K. J., Bergogne–Berezin, E. and Fewson, C. A. (ed.), The biology of *Acinetobacter* taxonomy, clinical importance, molecular biology, Physiology, industrial relevance, Plenum Press, New York.

18- Grossman, S., Oestreicher, G., Hogue, P. K., Cobley, J. G. and Singer, T. P. (1974). Microanalytical determination of the activities of phospholipases A. C. and D and their mixtures. Analytical Biochmistry., 58: 301–309.

19- Hassan, H. and Coombs, G. (1987). Phosphomonoesterase of *leishmania mexicana* and other flagellates. Mol. Biochem. Parasitol., 23, 285–296.

20- Kalbunde, T., Stahl, B., Suerbaum, H., Hahner, S., Karas, M., Hillenkamp, F., Krebs, B. and Witzwl, H. (1994). The amino acid sequence of the red kidney bean Fe (III) – Zn (II) Purple acid phosphatase. Eur. J. Biochem. , 226: 369 – 375.

21- Khattabi, E. L., Ockuijsen, C., Bitter, W., Jaeger, K.-E., and Tommassen, J. (1999). Specificity of the lipase-specific foldases of gram – negative bacteria and the role of the membrane anchor. Mol. Gen. Genet., 261 : 770-776.

22- Koneman, EW. , Allen, S. D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Jr, W.C.W. (1997). "Color Atlas and Text Book of Diagnostic icrobiology". 5th e. J. B. Lippincott–Raben publishers, Philadelphia., Pp. 253–318.

23- Lisa, T. A., Lucchesi, G. I. Domenech, C. E. (1994). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to the choline metabolism through the action of cholinesterase, acid phosphatase- and phospholipase C. Current Microbiology, 29: 193-199.

24- Liu, P. V. (1974). Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Dis. 130, S94 – 99.

25- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and R and all, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265 – 275. Lui, A. Becejac, S., Krvavica, S., and Coric, D., (1963). On the activity and localization of cholinesterase in *Ascaris summ* (Goeze). Veterinarski Arhiv., 33: 307 – 312.

26- Lui, A. Becejac, S. Krvavica, S. and Coric, D. (1963). On the activity and localization of cholinesterase in *Ascaris summ* (Goeza). Veterinarski Arhiv., 33: 307-312.

27- Merino, S., Aguilar, A., Noguerase, M. M., Regue, M., Swift, S. and Tomas, J. M. (1999). Cloning sequencing and role in virulence of two phospholipase (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. Serogroup O:34. Infect. Immunol., 67: 4008-4013.

28- Mohammad, F. K., Faris, G. A. M. and Al–Kassim, N. A. (1997). A modified electrometric method for measurement of erythrocyte Acetylcholine activity in sheep. Vet Human Toxicol 39: 337–339.

29- Noda, M., Shibata, K., Sawa, Y., Shimokoube H. and Watanabe, T. (1994). Purification and characterization of acid phosphatase from *Mycoplasma fermentans*. Microbial. Immunol., 38: 103 – 107.

30- Schreckenberger, P. C., Daneshvar, M. I., Weyant, R. S., and Hollis, D. G. (2003). *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram – negative rods, p: 749-779. In Murray P.R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., andYolken, R.H.(ed.), Manual of clinical microbiology, 8th edition. ASM press, Washington, D. C.

31- Seifert, H., Schulze, A., Baginski, R. and Pilferer, G.(1994). Plasmid DNA Fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. J. Clinical Microbiol., 32: 82 – 86.

32- Shareef, A. Y. (1998). The molecullar effect of some plant extracts on the growth and metabolism of some gram positive and gram negative bacteria. (Ph. D) Thesis, University of Mosul, Iraq. (In Arabic).

33- Sketelj, J., and Brzin, M. (1980). 16s–Acetylcholin–esterase (EC 3.7.1.1.) in endplate–free regions of developing rat diaphragm. Neurochem Res., 5: 653 – 658.

34- Stepan, J. Lau, K., Mohan, S., Singer, F. and Baylink, D. (1990). Purification and N–terminal amino acid sequence of the tartrate–resistant acid phosphatase from human Osteoclastoma: evidence for a single structure. Biochem. Biophys. Res. Commun.,68: 792–800.

35- Suh , B. , sapirot , T. , Jones , R. , Satishchandran , V. and Truant , A. L. (1995) . In vitro activity of B – Lactamase inhibitors against clinical isolates of Acinetobacter species . Diagn . Microbiol . Infect. Dis.,21 : 111 – 114.

36- Tateda , K ; Hirakat Y. ; Furuya , N. ; Ohno , A. and Yamaguchi , K. (1993) . " Effects of sub – MICs of erythromycin and other macrolide antibiotics on Serum sensitivity of Pseudomonas aeruginosa" . Antimicrob . Agents Chemother. 675 – 680.

baumannii strains isolated in Spain due to an epidemic strain. J. Clin. Microbiol. 37 : 758-761.

39- Wilhelm, S. Tommassen, J. and Jaeger, K. E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* . J. Bacteriol.,181 : 6977-6986.

37-Thomson, P. D., Garner, W. L. and Rodriguez, J. L. (1994). Burn Wounds: Infection and healing. Am. J. Surg., 167: 46s–51s.

38- Vila, J., Ruize, J., Navia, M., Becerril, B., Garcia, I., Perea, S., Lopez – Hernandes, I., Alamo, I., Ballester, F., Planes,M., Martinez – Beltran, J., Jimenez de., Anta, T. (1999). Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter*

Pathogenicity of some species belong to non-fermentative gram negative bacilli bacteria group and it's relationship to the action of acid phosphatase, acetylcholin esterase, lecithinase & lipase

Kusai A. Al-Chalbi[1], Basima A. Abdullah[1] and . Nada F. Al-Rawi[2]

[1] *Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Mosul, Iraq*

[2] *College of Ninavah Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq*

Abstract:

The study detected the enzymes those may play a role in the pathogenicity of some species belong to non-fermentative gram negative bacilli such as: *Acinetobacter baumannii, Acinetobacter lwoffii, Moraxella lacunata, Pseudomonas aeruginosa, Achromobacter* groups, *Alcaligenes* spp. and *Alcaligenes xylosoxidans* var. *xylosoxidans* (*A.x.x*), which isolated from clinical specimens. These enzymes are: acid phosphatase, acetylcholin esterase, lecithinase and lipase. *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were found to give the higher activity of these enzymes.