إفراز أنزيم ß-lactamase من قبل بعض البكتريا السالبة لصبغة كرام المسببة لالتهاب الاذن الوسطى المزمن في مدينة الناصرية

ماجدة غازي مكطوف[١] و حسام محمد كريدي[٢]

[١] كلية الطب، جامعة ذي قار، الناصرية، جمهورية العراق

[٢] كلية العلوم، جامعة ذي قار، الناصرية، جمهورية العراق

الملخص:

عزلت المسببات البكتيرية لمرض التهاب الإذن الوسطى المزمن في مدينة الناصرية للفترة من /2004/7 إلى /2004/12 والتي تمثلت ب : *Pseudomonas aeruginosa , Proteus mirabilis, Proteus vulgaris Escherichiacoli*

وأجري لها فحص الحساسية للمضادات الحياتية بطريقة Baur-Kirby ثم أخذت المقاومة منها لمضاد Ampicillin واجري لها فحص إنتاج أنزيم ß-lactamase بطريقة الأنابيب الشعرية المباشرة Direct capillary tube.

وكان الهدف من الدراسة ، معرفة سبب مقاومة مضاد Ampicillin من قبل هذه البكتريا لأهمية هذا المضاد ومضادات ألß-lactam في علاج الأمراض عموما واستخدامها المتكرر في علاج هذا المرض، فقد اظهر البحث النتائج التالية:-

40 عزلة لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*. المقاومة لمضاد ألAMP 32 عزلة. الفارزة لأنزيم ß-lactamase (25) عزلة أي78% من العزلات المقاومة. في حين كانت هناك،21 عزلة من بكتيريا *Proteus mirabilis* المقاومة منها18 والفارزة لأنزيم 11 عزلة أي بنسبة 61% من العزلات المقاومة. 13عزلة بكترية ل*Proteus vulgaris* المقاومة منها11 والفارزة للأنزيم 8 عزلات أي بنسبة 72.7%. وأخيرا 26 عزلة لبكتريا *E.coli* جميعها مقاومة لمضاد Ampicillin والفارزة للأنزيم منها 21 عزلة أي بنسبة 80.7%.

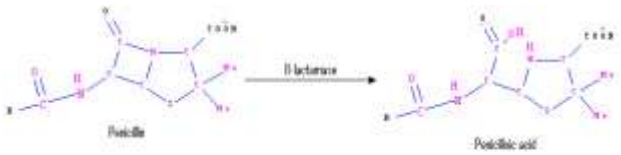
وقدرت إنتاجية الأنزيم حسب الوقت فكانت أعداد البكتريا التي أظهرت إنتاج للأنزيم خلال الخمس دقائق الأولى هي 6 عزلات لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وعزلة واحدة لبكتريا *Proteus mirabilis* وعزلتان لبكتريا *Proteus vulgaris* و6 عزلات لبكتريا *E.coli* في حيث كانت أعداد البكتريا التي أظهرت إنتاج للأنزيم بعد (15) دقيقة كانت 10 ,5 ,0 ,4 على التوالي اعلاه.

المقدمة:

إن الاستخدام العشوائي المتزايد لمضادات ألß-lactam أدى إلى ظهور سلالات مقاومة لهذه المضادات، وبعد إنتاج أنزيم ß-lactamase الأكثر أهمية في مقاومة مضادات ß-lactam في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام حيث يعمل على تحوير جزيئة المضاد وتثبيطه قبل الوصول إلى موقع الهدف(1).

يعود سبب انتشار المقاومة لمضادات ß-lactam في اغلب الأحيان إلى طبيعة العوامل الو راثية المشفرة لأنزيمات ألß-lactamase والتي غالبا ما تكون موجودة على بلازميدات اقترانية مما يسهل انتقالها بين الأجناس البكتيرية المختلفة فضلا عن وجود الأنزيمات المشفرة من قبل الكر وموسوم أو جين قافز(2) حتى وصل عدد أنزيمات ألß- lactamase 255 نوع (3).

تعتمد ميكانيكية عمل أنزيم أل(ß-lactamase)على تثبط عمل هذه المضادات بكسرها آصرة الاميديه Amid bound الموجودة في حلقة ß-lactamase مسببة تحطم جزيئة المضاد ليتحول بعدها إلى مركب فاقد الفعالية. يطلق على المركب الناتج من تكسير البنسلينات اسم حامض البنسلويك penicilloic acid, ويحتوي على مجموعتين حامضيتين في حين أن هناك مجموعة واحدة في المركب الأصلي شكل (1) ويكون حامض penicilloic acid مستقرا(4).



شكل رقم (١)

تسيطر العديد من العوامل الو راثية على إنتاج أنزيم ß-lactamase وتصنف

1 - Chromosomal-ß-lactamase

تنتج الأنزيمات الكروموسومية من البكتريا السالبة لصبغة كرام كما في البكتريا المعوية و *Pseudomona aeruginosa*، حيث تفضل مضادات السيفالوسبورينات على البنسلينات كمادة أساس (5).

2-أنزيمات التي تتوسطها بلازميدات ß- Plasmid-mediated (lactamase)

تعد هذه الأنزيمات الأكثر أهمية في البكتريا السالبة (2). فقد وصلت عدد البلازميدات المشفرة لأنزيمات ß-lactamase إلى أكثر من 75 بلازميد مختلف في العصيات السالبة لصبغة كرام (6).

3-أنزيمات ß-lactamase التي تتواسطها الجينات القافزة (Transposons-mediated ß-lactamases)

يؤدي انغراز الجينات القافزة في البلازميدات أو الكر وموسوم لاسيما في الجينات التركيبية إلى تغير في الطراز الو راثي للكائن ألمجهري والى إظهار صفة المقاومة لمضاد معين. تحتوي الجينات القافزة على جينات مقاومة لعدد من المضادات مثل الامبسلين والتتراسكلين والكاناماسين والأكثر شيوعا تلك التي تعود إلى عائلة Tn3 المشفرة لأنزيمي TEm-1 و TEm-1 (7).

وهنا لا بد من الإشارة إلى أن هناك طرق أخرى لمقاومة البكتريا لمضادات ال- ß-lactam وتغير حاجز النفاذيه (١)

وكان الهدف من الدراسة ، معرفة سبب مقاومة مضاد Ampicillin من قبل هذه البكتريا لأهمية هذا المضاد ومضادات ألßlactam- في علاج الأمراض عموما واستخدامها المتكرر في علاج هذا المرض.

المواد وطرق العمل:

زرعت نماذج مسحات الاذن على وسط MacConkegy agar وشخصت البكتريا الناميه باستخدام عدة الفحص API-20E للتشخيص السريع للعزلات البكتيرية وفقا لما جاء في النشرة المرفقة مع عدة الفحص واعتمادا على تعليمات الشركة المصنعة Bio-merieux الفرنسية واجري لها فحص الحساسية للمضادات الحياتية بطريقة Bauer-Kirby (٨) لتقدير مدى حساسية البكتريا للمضادات الحياتية، حيث استخدم مضاد الامبسلين Ampicillin بتركيز (25 mg) وقرأت النتائج بمقارنة أقطار مناطق التثبيط مع قرياناتها في جداول قياسية خاصة (9) .

٢-استخدمت طريقة الأنابيب الشعرية المباشرة(Direct capillary tube) للكشف عن قابلية العزلات المرضية على إنتاج أنزيم ßlactamase- وحسب ما ورد في . koneman et al (10). يمكن تقدير إنتاجية الأنزيم حسب الوقت:

(+++)إنتاجية الأنزيم عالية، تؤدي إلى تغير في الدليل خلال الخمس دقائق الأولى.

(++)إنتاجية الأنزيم متوسطة تؤدي إلى تغير في الدليل خلال العشر دقائق الأولى.

(+)إنتاجية الأنزيم قليلة، يحصل التغير بعد الدقائق الأخيرة من ربع ساعة من بدأ التفاعل.

(--)لا يحصل أي تغير في الدليل. (10)

النتائج والمناقشة:-

أظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد (Ampicillin) 100%, 84.6%, 82.7%, 80% لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، *Proteus mirabilis* ، *Proteus vulgaris* و *E.coli* على التوالي. جدول رقم (1).

جدول رقم (١): النسبه المئويه للعزلات المقاومه لمضاد Ampicillin

انواع العزلات	عدد العزلات	القاومة لمضاد Ampicillin	النسبة المئوية
Pseudomonas aeruginosa	٤٠	٣٢	%٨٠
Proteus mirabilis	٢١	١٨	%٨٢,٧
Proteus vulgaris	١٣	١١	%٨٤,٦
E.coli	٢٦	٢٦	%١٠٠

أما إنتاج الأنزيم من البكتريا المقاومة فقد كان 80.7%, 72.7%, 61%, 78% على التوالي أعلاه. كما في الجدول رقم (2).

جدول رقم (٢): النسبه المئويه للعزلات المنتجه لانزيم ال ßlactamase-

انواع العزلات	اعداد العزلات المقاومة لمضاد Ampicillin	اعداد العزلات الفارزة لانزيم ß-lactamase	النسبة المئوية
Pseudomonas aeruginosa	٣٢	٢٥	%٧٨
Proteus mirabilis	١٨	١١	%٦١
Proteus vulgaris	١١	٨	%٧٢,٧
E.coli	٢٦	٢١	%٨٠,٧

في حين كانت إنتاجية الأنزيم حسب الوقت هي (15) خمسة عشر عزلة بكتيرية المنتجة لهذا الأنزيم أظهرت نتيجة موجبة خلال الخمس دقائق الأولى كانت مقسمة 6و1و 2 و 6 . لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus mirabilis* ، *Proteus vulgaris* و *E.coli* على التوالي في حين أن هناك تسعة عشر عزلة بكتيرية اظهر ايجابية الإنتاج بعد خمسة عشر دقيقة وكانت مقسمة1، 5 ، ٠,٠ 4 حسب التوالي أعلاه، كما في الجدول رقم (3).

جدول رقم (٣): كفاءة انتاجية انزيم ßlactamase- للعزلات المقاومه لمضاد ال Ampicillin

انواع العزلات	عدد العزلات التي اظهرت تفاعل موجب حسب الوقت		
	٥ دقائق +++	١٠ دقائق ++	١٥ دقائق +
Pseudomonas aeruginosa	٦	٩	١٠
Proteus mirabilis	١	٥	٥
Proteus vulgaris	٢	٦	٠
E.coli	٦	١١	٤

ظهور نسبة المقاومة هذه تعود لإنتاج أنزيم ßlactamas- ضد المضاد الحيوي ampicillin في السلالات المحلية دلاله على تطورها ومما يحذر منه هو ازدياد انتخاب هذه السلالات عن طريق الاستعمال المتزايد لهذه المضادات بصورة غير مسيطر عليها. اذ ذكر(١١) تكمن خطورة إنتاجية هذا الأنزيم كونها ترجع إلى مقاومة كروموسومية أو بلازميدية.

حيث اكتشفت عزله لبكتريا أل*Pseudomonas aeruginosa* تحمل صفة المقاومة لمضاد Cefatoxime و Pincillines وكانت هذه الصفة مشفرة بلازميديا(12) .

تنتج اغلب أنزيمات واسعة الطيف (E.S.Bls) Extended-spectrum ßlactamase- عن طريق حدوث طفرات في الجينات البلازميدية المشفرة لأنزيمات ßlactamas- العادية 10- OXv، SH v-1 ، TEM -13، TEM-2 ، TEM-1 مؤديا إلى تغير في تناسق أو ترتيب الموقع الفعال(Active Site) للأنزيم و بالتالي إلى زيادة ألفة إلى مركبات الاوكسي أمينو بيتالاكتام (13).

أن خطورة هذه الأنواع من البكتريا التي تحتوي على بلازميدات قابليتها على نقل جينات المقاومة للمضادات خصوصا جينات المشفرة لأنزيم ß-lactamas حيث إنها تعتبر من ملوثات مياه الأنهار في مدينة الناصرية أكثر من أي مدينة أخرى والاستحمام بهذه المياه يعتبر من الطرق الأكثر شيوعا للإصابة بهذه البكتريا وخصوصا إصابة الإذن الوسطى. وتكون

الإصابة بهذه البكتريا على الأكثر من النوع المزمن مما يستدعي دراستها لبحث الأسباب.

لقد أجريت العديد من الدراسات الإحصائية عن مدى انتشار المقاومة عن طريق هذه الأنزيمات بين السلالات المرضية ومن هذه الدراسات التي أجراها Sousa وجماعته (14) بينوا فيها أن نسب إنتاج أنزيمات ß-lactamas لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، *Klebsiella pneumonia*، *E.coli* ، *Proteus mirabilis* ، *Proteus vulgaris* على التوالي. 7.3%, 17.5%, 18.6%, 23.5%, 22.5% في حين أظهرت نتائج بحثنا نسب أعلى لنفس البكتريا المستخدمة في البحث أعلاه، ربما يرجع السبب إلى الاستخدام العشوائي المتزايد في المنطقة لمضادات ß-lactamas والتلوث الكبير بهذه البكتريا.

وتمت دراسة أخرى في البرتغال لتحديد مدى انتشار مقاومة مضادات ß-lactamas جمعت فيها 2036 عزلة من بكتريا *E.coli* من المرضى الراقدين في وحدة الطوارىء ووجد أن نسبة مقاومة الأمينو بنسلين كانت 55.3% وجاءت أغلب العزلات منتجة لأنزيم ß-lactamase (15).

وذكرت الباحثة الجبوري (1) في الدراسة التي أجرتها أن 89% من بكتريا *E.coli* المعزولة محليا كانت مقاومة لمضاد الامينوبنسلين وكان 56% منها منتجة لأنزيم ß-lactamase.

تنتج معظم أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام أنزيمات ß-lactamase والتي تمتلك ألفة للبنسلينات وا لسيفالو سبو رينات أو كليهما. وتأتي في المقدمة أفراد العائلة المعوية وال*Pseudomonas aeruginosa* (16)

أما من ناحية سرعة إنتاجية الأنزيم (إنتاج الأنزيم حسب الوقت) يمكن تفسير نتائج الفحص المختلفة اعتمادا على تركيز الأنزيم الموجود في الفسحة البريبلازمية (Periplasmic space) (10) إن اختزال الكاشف احمر الفينول يعتمد بصورة أساسية على تركيز انزيم البنسلين المطلق، فضلا عن أن لكلا من الحرارة ومقدار الأس الهيدروجيني دورا في زيادة أو نقصان الفعالية الأنزيمية، لهذا يمكن القول أن العزلات التي أعطت فحصا موجبا سريعا لها من الجزيئات الأنزيم كافية لتحويل أكبر عدد ممكن من الجزيئات البنسلين إلى حامض البنسلوك وبالتالي تسرع النتيجة الموجبة (12).

أحيانا تكون الأنزيمات الموجودة في البكتريا من النوع الكروموسومية المحفزة والتي تحتاج لوقت لتكوينها عندها ستعطي فحصا متأخرا أو ربما سالبا لذا يتم اللجوء إلى استعمال طرائق أكثر دقة للتحري عن تراكيز الأنزيم المنتجة سيما استعمال طريقة النايتروسفين الخاصة بالتحري عن الكميات الضئيلة المنتجة للأنزيم (7).

References:

1-Sanders, C.C.(1992.ß-lactamase of Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. Clin infect. Dis. 14:1089-1099)

2-Bush,K; Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A. (1995)A functional classification Scheme for ß-lactamase and it's correlation with molecular structure.Antimicrob. Agents. Chemother.36(6):1911-1933.

3-Korta-LP and mobashery-S(1999). Mechanistic and clinical aspects of ß-lactam antibiotics and ß-lactamase. Arch-Immnnol-Ther-Exp-warsZ. 47(4):211-216.

4-sykes, R.B. and Mathew, M.(1976).The ß-lactamase of Gram-negative bacteria and their role in resistance to ß-lactamase antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 2:115-157.

5-Brown, M.R.(1975) resistance of pseudomonas aeruginosa. 1st Ed.John Wiley and sons. London.

6-Jacoby, G.A.(1994). Genetics of Extended-spectrum ß-lactamase Eur.J.Clin.Microbiol. Infect, Dis.supplement 1:2-11

7-Jacoby, G.A.(1995). 4 Pon aletter received at 25.7.1995.

8-Baner, A.M. and Kirby, W.M.(1966) Antibiotics susceptibility testing by a standarised single disc method. AM.J.clin.Pathol.45:493-496.

9-W.H.O.(1991).Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. Geneva. P:72-93.

10-Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M. and Schrecken Berger P.C.(1992).Color Plates and Text of Diagnostic Microbiology fourth edition J.B. Lippincott company Philadelphia.

11-Cole, st. and Nicolas, MH.(1986)ß-lactamase resistance mechanisms in gram negative bacteria. Microbiological Sciences 1:334-39.

12-Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A.(1991).more extended spectrum ß-lactamase, Antimicrob. Agents chemother.35:1697-1704.

13-Wiedman, B., Kleibe, and Kresken, M.(1989). The epidemiology of ß-lactamases.J. Antimicrob. Chemother 24(suppIB). 1-22.

14-Sousa J.C.;Carneio, G., Peike, M.L. and Rebelo, I.(1991). Characterization of ß-lactamases encodes by pathogenic strains Antimicrob. Chemother. 27(4):437-445(Abstract)

15-Jacoby, G.A. and Sutton, L.(1985). ß-lactamases and ß-lactam resistance in Escherichia coli.Antimicrob . Agents Chemother . 28(5) :703-705 .

16-Spratt ,B.G.(1983).Penicillin proteins and the future of binding β-Lactamase Antibiotic .J. General Microbiology 129:1247.1260.

17-الجبوري: سوسن ساجد محمد علي (1997) دراسة وراثية وجزيئية لأنزيم البيتالاكتاميز المنتج من البكتريا السالبة لكرام المعزولة محليا. رسالة دكتوراه، كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية.

Secretion ß-lactamase Enzyme from some Gram negative Bacteria Causing Chronic Otitis Media disease In Nassriya

Majida ghazi magtooph[1] and Husam-M.Kredy[2]

[1] *College of Medicine, University of Di Ghar, Alnasiria, Iraq*
[2]*College of Science, University of Di Ghar, Alnasiria, Iraq*

Abstract:-

Bacterial isolates *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* ,*Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*] were collected from patients with chronic otitis media in Nassriya city from 7/2004 to 12/2004 and tested for antibiotic sensitivity test using Baur-Kirby method and test the ability produce ß-lactamase using Ampicillin resistance isolates by direct capillary tube method.

From forty isolates of *pseudomonas aeruginosa*,32 isolates were resistant to Ampicillin and just 25 isolates produce ß-lactamase enzyme.

From 21 isolates *Proteus mirabilis*, 18 isolates were resistant to Ampicillin and just 11 isolates produce Enzyme.

From 13 isolates *Proteus vulgaris* ,11 isolates were resistant to ampicillin and just 8 isolates produce ß-lactamase enzyme. The finally from 26 isolates of *E. coli* all were resistant to Ampicillin just 21 isolates produce ß-lactamase Enzyme.

Estimation of enzyme production with time showed that during the first 5 minutes . six isolate of *pseudomonas aeruginosa* , one isolates from *proteus mirabilis* , two isolates of *Proteus vulgaris* and six isolates of *E- coli* but after 15 minutes , 10, 5 , 0 and 4 isolates produce this enzyme respectively.