

التحري عن بعض عوامل الضراوة لجراثمة *Serratia marcescens*

المعزولة من التهابات الجروح

عامرة علي احمد¹ أديبة يونس شريف حمو النعمان²

¹ فرع العلوم الطبية الأساسية ، كلية التمريض ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

² قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص

تم في هذه الدراسة التحري عن قدرة جراثيم *Serratia marcescens* المنتجة وغير المنتجة للصبغة على إنتاج أنزيمي الفوسفولايبيز واللايبيز إذ تبين ان جميعها كانت منتجة لهما كما أظهرت جميعها قدرتها لإفراز أنزيمات البيتا-لاكتاميز β -Lactamase والتي تلعب دوراً في مقاومتها للمضادات الحيوية التي تحتوي على حلقة β -Lactamase ، وان جميع عزلاتها بنمطها المنتج وغير المنتج للصبغة لها القدرة لإفراز الزيفان العصبي الذي أدى إلى قتل الفئران المختبرية خلال فترة تراوحت ما بين (7-10) ساعات وان هذا الزيفان كان اشد تأثيراً في العزلات غير المنتجة للصبغة .

المقدمة

تعد جراثمة *Serratia marcescens* من الملوثات الشائعة للأجهزة الطبية ومعظم إصاباتنا تظهر عند المرضى الراقيدين في المستشفيات [1] وهي ممرض انتهازى ظهرت أهميتها السريرية فقط في العقود الثلاثة الأخيرة ، ونادراً ما تسبب الإصابات المكتسبة من المجتمع Community acquired وهي تعزل بنسب كبيرة من اخماج المستشفيات [2] .

وقد ثبت أنها تسبب (4.6%) من إصابات الجهاز التنفسي ، و(2%) من حالات إنتان الدم ، و(2.4%) من اخماج الجروح ، و(1.9%) من التهابات المجاري البولية [3] ، ويتميز هذا النوع من الجراثيم بقدرته على النمو في الأوساط البسيطة ومقاومته للمضادات الحيوية والمعقمات وبقدرته على الالتصاق على السطوح [4] .

وهي عصيات سالبة كرام ، هوائية أو لا هوائية اختيارية ، متحركة بوساطة اسواط محيطية peritrichous flagella تنتمي إلى عائلة الجراثيم المعوية واسعة الانتشار في الطبيعة إذ عزلت من مصادر مختلفة شملت الإنسان والحيوان والتربة والمياه (الأنهار ، البحار ، الجداول ، العيون) كما عزلت من أنظمة تطهير المياه [5] .

بعض سلالاتها تنتج صبغة حمراء تدعى (Prodigiosin) التي لا تذوب في الماء ، وتكون غير منتشرة ، وهي عبارة عن (-3-methyl-2-methoxy-6-methoxyprodigiosin) [6] .

وتكون سلالاتها غير المنتجة للصبغة هي السائدة في العديد من الإصابات السريرية [7] . تنتج جراثيم *S. marcescens* عدداً من الأنزيمات والذيفانات مثل الأنزيم المحلل للحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNase) (Deoxy ribonuclease) وأنزيم الجيلاتينيز واللايبيز (Lipase) والليسيثينيز (Lecithinase) والكاييتيز (Chitinase) [8] .

كما يعد الزيفان الداخلي احد عوامل ضراوتها إذ تمكن الباحثون (Schultz et al., 1997) من توضيح تقرحات القرنية واحمرارها نتيجة حقن الزيفان الداخلي المستخلص من عزلاتها في عين الأرنب وبجرعات مختلفة ، وأشار (Izdebska, 1971) إلى احتمالية إنتاجها للزيفان العصبي الذي ثبت إنتاجه من قبل جراثمة *Proteus mirabilis* والذي يعد نوعاً من السموم الخارجية المؤثرة في الخلايا العصبية .

طريقة العمل

تم الحصول على السلالات *Serratia marcescens* المدروسة من قسم علوم الحياة كلية العلوم (أربع عزلات غير منتجة للصبغة وعزلتين منتجة للصبغة) .

التحري عن أنزيمات الـ β -Lactamases :

اتبعت الطريقة الايودية (Iodometric method) في التحري عن قدرة عزلات *Serratia marcescens* على إنتاج أنزيم β -Lactamases حيث تم إضافة (0.1)سم³ من محلول البنسلين (G) بتركيز (6.000) مايكرو غرام/سم³ في أنابيب اختبار صغيرة ، وحضر معلق كثيف من الجراثمة في هذه الأنابيب وذلك بنقل المستعمرات النقية إلى الأنبوبة ، وتركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة (30) دقيقة كي يحدث تفاعل أنزيمي ، أضيفت (2) قطرة من محلول النشا المحضر بإذابة (1) غم من مسحوق النشا في (100)سم³ من الماء المقطر وسخن جيداً حتى يذوب النشا كلياً ، ثم أضيفت (1) قطرة من محلول يود كرام (Gram Iodine) إلى الأنبوبة وقد ظهر اللون الأزرق الغامق مباشرة نتيجة لحصول التفاعل بين محلولي النشا والايودين ، مزجت جيداً وتركت لمدة دقائق في درجة حرارة الغرفة وعند ظهور اللون الأبيض خلال اقل من (10) دقيقة فان ذلك دليلاً على إنتاج أنزيمات β -Lactamases [9] .

التحري عن أنزيم الليسيثينيز (الفوسفولايبيز) واللايبيز

Detection of Lecithinase (Phospholipase-C) and (Lipase)

استخدم وسط (Egg yolk Agar) المحضر محلياً بإضافة صفار بيض طازج (fresh Egg yolk) إلى وسط الاكار المغذي (Nutrient Agar) المعقم والمبرد إلى درجة حرارة (55)م° بنسبة (15%) ، لقح الوسط بمستعمرات نقية من جراثمة *S. marcescens* وحضن في درجة حرارة (37)م° لمدة (24-48) ساعة ، تم الاستدلال على فعالية أنزيم الليسيثينيز بتكون مناطق رائقة حول المستعمرات النامية ، يطلق على هذا النوع من الاختبارات المشتركة (Combined Tests) ، إذ يمكن التحري في الوقت نفسه عن فعالية أنزيم آخر يؤدي دوراً مهماً في امراضية هذه الجراثيم وهو أنزيم اللايبيز ، الذي تم الكشف عنه بغمر

وان أفراد هذه الجرثومة تتميز باحتوائها على أنزيم β -Lactamases من النوع المعدني (β -Lactamases Metallo) والذي يحمل على الجين *Gene blaimp (blaIMP)* [13]. في حين تظهر أنزيمات β -Lactamases الواسعة الطيف (ESBLs) على البلازميدات الكبيرة التي تحمل جينات المقاومة المتعددة [14]، ولكون جرثومة *S. marcescens* من الجراثيم التي تحمل صفة المقاومة المتعددة [15] لذا فقد تكون حاوية لهذا النوع من الأنزيمات .

تم التحري عن إنتاج أنزيم الليسيثينيز واللايباز من قبل جرثومة *S. marcescens* لكلا النمطين المنتج وغير المنتج للصيغة، حيث أظهرت جميع السلالات المذكورة نتيجة موجبة لإنتاج أنزيم الليسيثينيز وذلك بظهور مناطق رائقة حول المستعمرات النامية (الصورة (1)).

كذلك أظهرت جميع العزلات المنتجة وغير المنتجة للصيغة نتيجة موجبة لأنزيم اللايباز بظهور لون ازرق مخضر في مواقع تحلل الدهن والذي يستدل بواسطته على فعالية الأنزيم .



صورة (1) : إنتاج أنزيم الليسيثينيز من قبل جرثومة *S. marcescens*

يعمل أنزيم الليسيثينيز على تحطيم الدهون المفسفرة في أغشية الخلايا مما يؤدي إلى تحليلها وموت النسيج وهو يعمل على فصل معقدات البروتينات الدهنية (Lipoprotein Complex) في الوسط الحاوي على صفار البيض ويسمى التفاعل (Lecithovitellin) الذي يستخدم للتحري عن امراضية عدد من الجراثيم فضلاً عن أهميته في تشخيص بعضها مثل جرثومة المطنبات *Clostridium perfringens* إذ يعمل على تحطيم خلايا الأنسجة المصابة ويحلل كتل كريات الدم الحمر . ويسمى الأنزيم فيها بذييفان $\alpha(x)$ toxin ، ويكشف عنه بإضافة مضاد الذيفان (Antitoxin) إلى نصف الوسط الزرعي ويلقح الوسط بنصفه بهذا النوع من الجراثيم ، ان عدم حدوث التحلل في النصف الحاوي على مضاد الذيفان دليل على وجود النوع المفردة منه [16,11] .

حظي أنزيم اللايباز باهتمام متميز من قبل الباحثين إذ ثبت إفرازه من قبل العديد من الجراثيم ، منها جرثومة *Ps. aeruginosa* ، *A. baumannii* [17] وعزل الباحثون [18] هذا الأنزيم من جرثومة *S. marcescens* ، وبين الباحثون [19] وجود ثلاث جينات مسؤولة عن

الوسط بكمية كافية من محلول مشبع بكبريتات النحاس (CuSO_4) مدة (20) دقيقة ، أزيل الفائض من المحلول وجفف الطبق بوضعه في الحاضنة لمدة قصيرة ، ان ظهور لون ازرق مخضر في مواقع تحلل الدهن دلالة على فعالية أنزيم تحلل الدهون Lipase [10,11].

إنتاج الذيفان : Production of toxin

تم استخلاص الذيفان العصبي حسب ما ذكره (Izdebska, 1971) من جرثومة *S. marcescens* من كلا النمطين المنتج وغير المنتج للصيغة ، وتم استخدام وسط Casamino acid-yeast extract (CAYE2) المتكون من (2غم) Casamino acid و (0.6غم) من خلاصة الخميرة (Yeast-extract) و (0.25) غم كلوريد الصوديوم (NaCl) و (0.871) غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) في (100) سم³ ماء مقطر والمضاف إليه (1%) من الأملاح النادرة المذابة في حامض الكبريتيك (0.001) غم التي تشمل كبريتات المغنسيوم (MgSO_4) و (0.5%) وكلوريد المنغنيز (MnCl_2) و (0.5%) وكلوريد الحديد (FeCl_3) مع الكلوكون المضاف بنسبة (0.25%) (Ahren et al., 1990) . ضبط الـ PH عند (7.3) وعقم بالموصدة بدرجة حرارة (121) م° ، لمدة (15) دقيقة ، جمعت جراثيم *S. marcescens* المزروعة على وسط CAYE_2 والمحضنة عند درجة حرارة (37) م° ، ولمدة (24) ساعة باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد من نوع (MSE) وعلى سرعة (8000xg) لمدة (30) دقيقة عند درجة حرارة (4) م° ، وغسلت (3) مرات بالمحلول الملحي الفسلي ، ورسبت الخلايا بالسرعة ذاتها ، أخذت الخلايا الناتجة ، وعلقت بـ (100) سم³ من الماء المقطر ، وأضيف إليها (30) سم³ كلورفورم ، وتركت الخلايا في درجة حرارة الغرفة لمدة (3) أيام ، اجري الطرد المركزي بالسرعة نفسها للخلايا المتحللة ، واخذ الطافي (Supernatant) ، وتم ترسيب البروتينات باستخدام كبريتات الامونيوم ، ثم حقن (0.1) مل من الناتج في غشاء الخلب peritoneum لذكور الفئران بعمر (6-8) أسابيع وبوزن (18) غم ، تم استخدام ثلاثة مكررات لكل عذلة من عزلات *S. marcescens* الأربع المراد اختبار قدرتها على إنتاج الذيفان العصبي ، وتم حقن (0.1) مل من الوسط غير المزروع في عدد من الفئران كمجموعة سيطرة ، عزلت الفئران ثم تمت قراءة النتائج حسب طريقة (Izdebska, 1971) .

النتائج والمناقشة

تم اختبار قدرة جرثومة *S. marcescens* المنتجة وغير المنتجة للصيغة على إنتاج أنزيمات β -Lactamases حيث أظهرت جميع عزلات جرثومة *S. marcescens* المنتجة وغير المنتجة للصيغة نتيجة موجبة لإنتاج الأنزيمات β -Lactamases حيث استدل على إنتاجها لهذه الأنزيمات بظهور اللون الأبيض في الأنبوبة مباشرة بعد إضافة الكاشف الأخير (ايودين كرام Gram's Iodine) لجميع العزلات عدا واحدة منها أعطت اللون الأبيض بعد مرور (15) دقيقة من إضافته والذي قد يعود إلى قلة تركيزه في هذه السلالة لتحول عدد اقل من جزئيات البنسلين G إلى حامض البنسلونيك [12] .

تماثلت الأعراض مع ما حصل عليه الباحث Izdebska (1971) عند حقنه الفئران المختبرية بالذيفان العصبي المنتج من قبل جرثومة *Pr. mirabilis* ومع نتائج الباحثة النقار (2000) التي أكدت إنتاج الذيفان من قبل ثماني سلالات لجرثومة *M. morganii* وكذلك مع دراسة الباحثة محمد (2001)، التي أوضحت إنتاجه من قبل ثلاث سلالات من جرثومة *Staphylococcus* شملت الجراثيم *Staph. epidermis* و *Staph. saprophuticus* و *Staph. xylosus*. وبإتباع الطريقة نفسها ومن الجدير بالذكر أن أعراض الذيفان العصبي المنتج من قبل جرثومة *S. marcescens* للنمطين المنتج للصبغة وغير المنتج لها ظهرت على الحيوان بعد ساعات عديدة من الحقن، وتسببت في موت الحيوان خلال (7) ساعات في السلالات غير المنتجة للصبغة، بينما كانت خلال (10) ساعات في السلالات المنتجة مما يدل على شدة ضراوة السلالات غير المنتجة للصبغة، في حين أشارت الباحثة النقار (2000) ظهور الأعراض على عدد من الحيوانات المحقونة بالذيفان العصبي بعد (36) ساعة من الحقن، وإن موتها كان خلال (48) ساعة من الحقن، في حين بينت دراسة الباحثة محمد (2001)، أن الأعراض ظهرت مبكراً على الحيوانات قيد الاختبار بعد عدة دقائق من الحقن ونفق في مدة لا تتجاوز (15) دقيقة.

وتوضح نتائج الذيفان العصبي المنتج من قبل سلالات جرثومة *S. marcescens* أن السلالات غير المنتجة للصبغة أكثر ضراوة من سلالاتها المنتجة لها وهذا يؤكد ما أوضحتها السلالات السابقة (Viola, 1983; Ding and Williams, 1989).

إفرازه هي Lip B, C, D genes إذ ينعلم وجوده في السلالات الطافرة غير الحاوية على هذه الجينات. اعتمدت طريقة الباحث (Izdebska, 1971) لتحضير الذيفان العصبي إذ تم تحضير واختبار هذا الذيفان كما جاء في طريقة العمل، وتم اختبار (4) عزلات بواقع عزلتين منتجة للصبغة، وعزلتين غير منتجة لها. أظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة، إذ ظهرت على الحيوان الذي تم حقنه داخل الخلب بالذيفان المحضر أعراض عصبية، منها صعوبة الحركة بعد الحقن بعدة ساعات أعقبها شلل الأطراف الخلفية (Paralysis)، وكما موضح في الصورة (2) وصعوبة في التنفس نفق بعدها الحيوان.



صورة (2): تأثير الذيفان العصبي المعزول من جرثومة *S. marcescens* (شلل الأطراف الخلفية).

المصادر

book on habitats, Isolation & Identification of bacteria, vol.2, Springer-verlag, Berlin, pp.1187-1200.

9. Leranoz, S.; Orus, P.; Berlanga, M.; Dalet, F. and Vinas, M. (1997). New fimbrial adhesins of *Serratia marcescens* isolated from urinary tract infections: Description and properties. J. Urol., 157:694-698.

10. Aucken, H. M. and Pitt, T. L. (1998). Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Serratia marcescens* with respect to O and K sero types. J. Med. Microbiol., 47:1105-1113.

11. Lennette, E. H.; Balows, A.; Hausler, W. J. and Shadomy, H. J. (1991). "Manual of clinical microbiology". 14th ed., American Society for Microbiology, Washington, pp.1005-1006.

12. Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996). Mackie and McCartney, "Practical medical microbiology", 14th ed., Churchill Livingstone Inc., New York.

13. Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. and Swan, R. H. A. (1975). "Medical Microbiology", 12th ed., Longman group Ltd., New York.

14. Foley, J. H. and Perret, C. J. (1962). Screening bacterial colonies for penicillin's production. Nature, 195:287-288.

15. Hirakata, Y.; Izumikawa, K.; Yamaguchi, T.; Takemura, H.; Tanaka, H.; Yoshida, R.; Matsuda, J.; Nakano, M.; Tomono, K.; Maesaki, S.; Kaku, M.; Yamada, Y.; Kaminira, S. and Kohno, S. (1998). Rapid detection and Evaluation of clinical characteristics of emerging multiple drug resistant Gram-Negative rods

1. النقار، سحر سالم (2000). دراسة على جرثومة *Morganella morganii* المعزولة من الأطفال الرضع المصابين بالإسهال، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

2. محمد، نادية محمود (2001). دراسة تشخيصية وإمراضية للمكورات العنقودية السالبة لأنزيم التجلط المعزولة من خمج السبيل البولي لدى الإناث في سن النضوج بمدينة الموصل، رسالة ماجستير كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

3. Tabbara, K. F. and Hyndiuk, R. A. (1987). Infection of the Eye. 2nd ed., Brown and Comp., Boston, pp.341.

4. Knowles, S.; Herra, C.; Devitt, E.; O'Brien, A.; Mulvihill, E.; McCann, S. R.; Browne, P.; Kennedy, M. J. and Keane, C. T. (2000). An out breaks of multiply resistant *Serratia marcescens* the importance of persistent carriage. Bone Marrow Transpl., 25:873-877.

5. Herra, C. M. and falkiner, F. R. (2001). *Serratia marcescens*. Gen. Descrip., 1-16.

6. Parment, P. A. (1997). The role of *Serratia marcescens* in soft contact lens associated ocular infections. Acta. Ophthal. Scand., 67-71.

7. Grimont, P. A. D., Grimont, F. and Dulong, D. E.; Rosnay, H. L. C. (1977). Taxonomy of the Genus *Serratia*. J. Gen. Microbiol., 98:39-66.

8. Grimont, P. A. D. and Grimont, F. (1981). The genus *Serratia*. In Starr, M. et al. (eds.) The prokaryotes a hand

- lipase which lacks an N-terminal signal peptide. J. Bacteriol., 177:6381-6389.
21. Schultz, C. L.; Morck, D. W.; McKay, S. G.; Olson, M. E. and Buret, A. (1997). Lipopolysaccharide induced acute red eye and corneal ulcers. Ex-Eye-Res., 64(1):3-9.
 22. Izdebska, S. K. (1971). Toxins of proteus mirabilis. Inkadis, S.; Montie, T. C. and Ajl, S. J. (ed.), "Microbial Toxins". Vol.2A, Academic press Inc., New York, pp.337-356.
 23. Ahren, C. M.; Jertborn, M.; Herclik, L.; Kaijser, B. and Svennerholm, A. M. (1990). Infection with bacterial enteropathogens in Swedish travelers to south-east Asia. A prospective study. Epidemiol. Infect., 105:325-333.
 24. Viola, D. G. (1989). Enzymic polymorphism prodigiosin production and plasmid fingerprinting in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol., 27:860-868.
 25. Ding, M. J. and Williams, R. P. (1983). Biosynthesis of prodigiosin by white strains of *Serratia marcescens* isolated from patients. J. Clin. Microbiol. 7:476-480.
 - carrying the Metallo- β -Lactamase Gene blaImp. Antimicro. Agent and Chemother., 42(8):2006-20011.
 16. Aksaray, S.; Dokuzoguz, B.; Guvener, E.; Yucesoy, M.; Yulug, N.; Kocagoz, S.; Unal, S.; Cetin, S.; Calangu, S.; Gunaydm, M.; Leble bicioglu, H.; Esen, S.; Bayar, B.; Willke, A.; Fidik, D.; Tuncer, I.; Baysar, B.; Gunseren, F. and Mamikoglu, L. (2000).
 17. Craven, P. C.; Jorgensen, J. H.; Kaspar, R. L. and Drutz, D. J. (1977). Amikacin therapy of patients with multiply Antibiotic-Resistant *Serratia marcescens* infection. Am. J. Med., 62:902-910.
 18. Pelczar, M. J.; Chan, E. C. S. and Pelczar, M. F. (1981). "Elements of Microbiology". McGraw-Hill book Co., New York, pp.389.
 19. A. B.; Panfilova, Z. I.; Vasiunine, E. A. (2000). Isolation and properties of extracellular lipase of native (B-10) and mutant (M-2) *Serratia marcescens* strains. Prikl. Biokhim. Microbiol. 36(4):402-411.
 20. Akotsuka, H.; Kawai, E.; Omori, K. and Shibatani, T. (1995). The three genes lip B, lip C, and lip D, involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens*

Investigation of some virulence factors of *Serratia marcescens* isolated from infected wounds

Amera Ali Ahmed¹, Adeba Younis Al-Nomaan²

¹ Basic Sci. Dept., College of Nursing, Mosul University, Mosul, Iraq

² Dept. of Biology / College of Science Mosul University, Mosul, Iraq

Abstract

This study proves the ability of pigmented and non pigmented strains of *Serratia marcescens* to produce phospholipase and lipase enzymes, as well as β -Lactamase which plays an important role in their resistance to antibiotics. These strains secrete neurotoxin which causes death to laboratory animals within a period of (7-10) hours, in addition the neurotoxin of non-pigmented strains was more toxic than those produced by pigmented strains.