التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Moraxella catarrhalis* المعزولة من إصابات القناة التنفسية

د.عباس شاكر جواد
قسم التحليلات المرضية / كلية العلوم /جامعة الكوفة

الخلاصة

جمعت خلال فترة البحث 344عينة من اصابات القناة االتنفسية واصابات الاذن الوسطي للفترة من ايلول 2006 لغاية تشرين الثاني 2007 . شخصت 60 عزلة بكترية (17.4%) على انها تعود لبكتريا *Moraxella catarralis* من عينات القشع ومسحات الاذن و الانف و الحنجرة، فضلا عن مسحات اللوزتين وبنسبة (6.7,11.7، 27.6 ،30,12.5) % على التوالي اعتمادا على الصفات الزرعية والمظهرية ، فضلا عن الفحوصات الكيميائية الحياتية والفحص التاكيدي باستخدام نظام API-NH. اذ كانت 31 عزلة (16.3%) من العينات الماخوذة من الذكور مقابل 29 عزلة (18.8%) حصل عليها من عينات الاناث .

درست بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Moraxella catarrhalis*, ،اذ اظهرت النتائج ان 58 عزلة (96.7%) تمتلك عوامل الالتصاق با لخلايا الطلائية ، بينما اظهرت 22 عزلة (36.7%) قدرتها على انتاج الانزيم المحلل للبروتين (البروتيز) ، مقابل 54عزلة (90%) منتجة للانزيم المحلل للدهون ، في حين لم تظهر أي من العزلات قدرة على انتاج الانزيم الحال للدم ،وكذلك اعطت جميع العزلات نتيجة سالبة لفحص التحري عن انتاج المحفظة .

المقدمة

تتصف بكتريا *Moraxella catarrhalis* بانها مكورات مزدوجة ،الواحدة منها تكون كلوية تشبة حبة الفاصوليا(kidney been- shap) تترتب بشكل مفرد او تجمعات ثنائية او رباعية ، هوائية ا ختيارية ، غير متحركة ،غير مكونة للسبورات . موجبة لفحص الكاتليز والاوكسديز ومنتجة للانزيم المحلل للدهون ، تختزل النترات الى نتريت وتميع الجيلاتين (Brook *et al.* ,2004) .معظم عزلاتها المرضية غتر قادرة على تخمير السكريات وتحتاج الى اوساط اغنائية لغرض النمو فهي تنمو جيدا في وسط اكار الدم ووسط اكار الدم الساخن ، درجة الحرارة المثلى للنمو هي 36 م وتحتاج الى رطوبة ووفرة 5-10% ثاني اوكسيد الكاربون (Hancock ,1991).

تعد بكتريا *M. catarralis* من النبيت الطبيعي (normal flora) للقناة التنفسية العليا للانسان ، غير انها تكون احيانا من المسببات المرضية لاصابات القناة التنفسية عند الاطفال والبالغين مسببة التهاب الاذن الوسطى (Otitis media) ، التهاب الجيوب الانفية(Sinunititis) و التهاب القصبات(Bronchitis) وذات الرئة (Pneumonia) وفضلا عن التهاب الحنجرة (Laryngitis) واصابات العيون(Ocular infections) (Verduin *et al.*,2002).

يعتبرها بعض الباحثين من الممرضات المهمة للقناة التنفسية السفلى ، خاصة عند كبار السن والمصابين بالانسداد الرئوي، و تعد من المسببات المرضية المهمة لاصابات القناة التنفسية المكتسبة من الستشفيات(Nosocomial infections) (Fung *et al.* 1992).تعزى قدرة هذه البكتريا على احداث الاصابة لامتلاكها لعدد من عوامل الضراوة المتمثلة بانتاج كلا النوعين من السموم الداخلية والخارجية وامتلاكها لعوامل الالتصاق باالخلايا الطلائية للانسان ،فضلا عن عن انتاجها لبعض الانزيمات كالانزيم المحلل للبروتين (Protease) و الانزيم المحلل للدهون (Lipase) وانتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز(beta lactamase) (Hancock ,1991).

طرائق العمل

--جمع العينات

جمعت خلال فترة البحث 344 عينة مرضية بشكل مسحات من المرضى الذين يعانون من اصابات القناة التنفسية واصابات الاذن الوسطى المراجعين للعيادات الاستشارية للانف والاذن والحنجرة والعيادة الاستشارية للامراض الصدرية والباطنية في مستشفى الصدر التعليمي في محافظة النجف الاشرف ، للفترة من اذار 2006 لغاية كانون الثاني 2007.

شملت العينات 100 مسحة من اصابات الذن الوسطى ، 60 مسحة من اصابات الحنجرة 75 مسحة من المرضى المصابين بالتهاب اللوزتين و29 مسحة من المصابين بالتهاب الجيوب الانفية، بالاضافة الى 80 عينة قشع من المصابين بذات الرئة .

--زرع العينات

زرعت العينات على اوساط زرعية مناسبة شملت وسط اكار الدم، واكار الدم الساخن chocolate agar (Biolife ,Italy) وحضنت بحرارة 37 م˚مع توفر ظروف (5-10) CO_2 في قنينة تقليل الاوكسجين (قنينة النمو الاهوائي) لمدة 24 ساعة .

التشخيص المختبري

--تشخيص العينات المختبرية

شخصت العزلات البكتيرية التابعة ل *Moraxella catarrhalis* اعتمادا على (MacFaddin , 2000) وفقا للمعايير التالية :

1- الصفات الزرعية و المظهرية
2- الفعالية الانزيمية و الكيميائية الحياتية التي شملت :-
a –فحص الكتاليز
b-فحص الاوكسيديز
c-فحص اختزال النترات
d-فحص تمييع الجيلاتين
e-فحص تخمر السكريات
f-فحص الحركة باستخدام وسط الاكار شبه الصلب .
g- التشخيص النهائي باستخدم نظام التشخيص API-NH.(Biometrix- france)

--التحري عن عوامل الضراوة :

1-التحري عن المحفظة باستخدام الحبر الهند ي بطريقة التصبيغ السلبي((negative stain) .
2-التحري عن عوامل الالتصاق بالخلايا الطلائية للانسان ،باستخدام الادرار الوسطي للاناث الصحيحات .
3- التحري عن انتاج الانزيم المحلل للبروتين (البروتيز) باستجدام وسط الحليب(skim milk)
4- التحري عن الانزيم المحلل للدهون (اللايبز) باستخدام السط الحاوي على مادة التوين –80
5- التحري عن الانزيم الحال للدم (الهيمولايسين) باستخدام كريات الدم من نوع O.

النتائج والمناقشة:-

درست الصفات الزرعية للمستعمرات من حيث شكلها ، خواصها ، لونها ، عتمتها وكونها محللة او غير محللة للدم ، فضلا عن الصفات المظهرية اذ تظهر على الشريحة المصبغة بهيئة ازواج ثنائية سالبة لصبغة كرام ، واستخدمت في التشخيص الفعاليةالانزيمية والفعالية الكيميائية الحياتية للعزلات المدروسة كتشخيص اولي ، وتاكيدها باستخدام نظام التشخيص API-NH كتشخيص نهائي للعزلات .

اذ اظهرت نتائج التشخيص ان 60 عزلة من مجموع 344 عزلة وبنسبة (17.4%) تعود لبكتريا *M.catarrhalis* وحسب التوصيفات التي اقترحها الباحث (Holt *et al*.,1994) .

توزعت العينات (جدول -1) بـ 30 عزلة (30%) من اصابات الاذن الوسطى ، مقابل 10 عزلات (12.5%) لهذه البكتريا حصل عليها من عينات القشع ، بينما كانت 8 ، 7 ، 5 عزلات وبنسبة 27% ، 11.7% ، 6.7 % قد عزلت من مسحات الانف و مسحات الحنجرة ومسحات اللوزتين على التنوالي . وبذلك فأن وجود بكتريا *M.catarrhalis* كان اكثر شيوعاً في العينات الماخوذة من مسحات الاذن مقارنة ببقية الحالات المرضية الاخرى ويمكن ان يعزى سبب ارتفاع نسبة عزل هذه البكتريا الى زيادة انتشارها كممرضات انتهازية في المستشفيات مسببة العديد من الاصابات المكتسبة من المستشفيات كما ان زيادة مقاومتها لمضادات الحياة المستخدمة في علاج اصابات القناة التنفسية والاستخدام العشوائي لهذه المضادات الاثر في ارتفاع نسبتها في احداث الاصابة (Sutlon *et al*.,2000) .

بينت بعض الدراسات زيادة انتشار بكتريا *M.catarrhalis* في احداث اصابات القناة التنفسية ، وقد يعود سبب ذلك الى كون هذه البكتريا هي احدى مكونات النبيت الطبيعي للقناة التنفسية وخاصة في منطقة البلعوم الانفي مما يسهل انتقالها الى مناطق اخرى من القناة مسببة حدوث الاصابة لا سيما لدى الاشخاص الذين يعانون ضعف في الجهاز المناعي بفعل طبيعتها الانتهازية عند انتقالها من بيئة الى اخرى غير بيئتها الطبيعية (Collsos *et al* .,1992) .

بينت النتائج زيادة نسبة عزل هذه البكتريا من الاناث . اذ بلغت نسبة عزلها (18.8%) مقابل نسبة عزل 16.3% من مجموع العينات الماخوذه من الذكور ان زيادة نسبة عزل هذه البكتريا من الاناث ربما يعود الى زيادة اصابيات القناة التنفسية في الاناث عنه في الذكور نتيجة لتعرضهم الى الظروف المختلفة مثل الغبار اثناء التنظيف ومزاولة اعمال المنزل، فضلا عن ان الاستخدام المفرط لمواد التجميل يزيد من حساسية الاغشية المخاطية المبطنة للقناة التنفسية للاصابة بالبكتريا المختلفة (Ikeh *et al*.,1993) .

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة لهذه البكتريا والتي تزيد من قدرتها على احداث الاصابة اذ اظهرت النتائج (جدول -3) ان 58 عينة بنسبة (96.2 %) تمتلك عوامل الالتصاق بالخلايا الطلائية للانسان متمثلة بالشعيرات (Fimberia) التي تمكنها من الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للقناة التنفسية حيث يعد الالتصاق الخطوة الاولى لحدوث الاصابة (Hager *et al.*,1987) .

اوضحت النتائج ان 54 عينة (90%) منتجة للانزيم المحلل للدهون .اذ يعد هذا الانزيم من الانزيمات المهمة في امراضية البكتريا حيث يعمل على تحطم المواد الدهنية في الانسجة مما يسهل من غزو او انتشار البكتريا لانسجة الجسم المختلفة (Perez *et. Al.*, 1990) .

تبين من النتائج ان 22 عزلة(36.7 %) اعطت نتيجة موجبة لفحص التحري عن انتاج الانزيم المحلل للبروتين. اذ يعد الانزيم المحلل للبروتين من الانزيمات المهمة المساهمة في امراضية البكتريا حيث تعمل هذه الانزيمات على تحلل المركبات البروتينية بالدم والانسجة مما يزيد من احتمالية تواجد هذه البكتريا لقدرتها على تحليل المركبات البروتينية بالدم مثل Transferrins حيث تعمل على زيادة امراضيتها (Perez *et al.*, 1990).

لوحظ من خلال النتائج ان البكتريا ليس لها القدرة على انتاج الانزيم الحل للدم ، اذ ان جميع العزلات اعطت نتيجة سالبة للفحص ، وهذا يتفق مع ما جاء به Catlin (1991) عندما اكد ان جميع انواع Moraxella ومنها *M.catarrhalis* تكون غير محللة الدم وتبين ايضا ان جميع العزلات غير قادرة علىتكوين المحفظة ، وهذا ما اكده Mltenkvist *et al* . (2003) في دراسته على عدم احتواء بكتريا *M.catarrhalis* على المحفظة .

جدول (1) عزلات بكتريا *M.catarrhalis* موزعة حسب العينات المرضية المعزولة منها .

نوع العينة	الجمـــوع الكلـــي للعينات	العينات الموجبة	النسـبة المئويـة للعينـات الموجبة
الاذن الوسطى	100	30	%30
القشع	80	10	%12.5
مسحات الانف	29	8	%27.6
مسحات الحنجره	60	7	%11.7
مسحات اللوزتين	75	5	%6.7
المجموع	344	60	%17.4

جدول (2) عزلات بكتريا *M.catarrhalis* موزعة حسب جنس المرضى .

نـــــوع العينة	الذكور			الاناث			المجموع		المجمـــــوع الكلي
	موجبة	سالبة	المجـمـوع	مـوجبـة	سالبة	المجـمـوع	موجبة	سالبة	
مســـحات الاذن الوسطى	14	27	41	16	43	59	30	70	100
القشع	6	47	53	4	23	27	10	70	80
مســـحات الانف	4	15	9	4	6	10	8	21	29
مســـحات الحنجره	4	31	35	3	22	25	7	53	60
مســـحات اللوزتين	3	39	42	2	31	33	5	70	75
المجموع (%)	31 (16.3	159 83.7 (	190	29 18.8 (	125) 81.2 (	145	60	284	344

جدول (3) عوامل الضراوة لبكتريا *M .catarrhalis* .

عوامل الضراوة	العينات الموجبة	النسبة المئوية

عوامل الالتصاق	58	%96.2
انتـــاج الانـــزيم المحلـــل للبروتين	22	%36.7
انتـــاج الانـــزيم المحلـــل للدهون	54	%90
انتاج الانزيم الحال للدم	0	%0
انتاج المحفظة	0	%0

Refrences :-

- **Brook**,G.F.;Butel ,J.S. and Morse ,S.A(2004) .Jawetz, , Melnick and Adelberg's medical Microbiology ,23rd ed.,McGraw Hill co.,New York.
- **Catlin** ,B.W.(1991):Branhamellaceae family Non; aproposed family to accommodate the genera Branhamella and Moraxella.Int.J syst.Bacteriol,41:320-323.
- **Collasos** , P.,S ;Heiniger ,N. ;Troller, R. And Aebie (1991) :Salivary antibodies directed against outer membrane protein of Moraxella caterrhalis in healthy adults infection. Immun., 71:6793-6798.
- **Fung** C.P.; Powell,M.;Seymour,A.;Yuan,M. and Williams,J.D.(1992):The antimicrobial susceptibility of Moraxella .catarrhalis isolated in England and Scotland in 1991 .J.Anhimicrob.Chemother.,30:47-55.
- **Hager,H**.; Verghese.;Alvares,S. and Berk,S.L.(1987);Branhamella catarrhalis respiratorg infection .Rev. infect.Dis.9:1140-1149.
- **Holt,J**.G.Krieg,N.R,;Sneath,P.H.;Stalaey,J.T.and Williams,S.(1994):Bergy's Manual of Determination Bacteriology.9th ed.Williams and Wlkins Co.Baltimore,London.
- **Ikeh**,E.I.;Adebayo,E.O,Oknonghae,H.O.andIghagboja,L.S.(1993):Bacteriolog y of chronic dis charging ears in children of Jos ,Northren Nigeria Medical practitioner,26:1-4.
- **Hancock**,R.E.(1991):Bacterial outer membrane evolving concepts-ASM News.57:175-182.
- **Mellenkvist**,A;Nords,T.;Hallden,C.and Riesbeck,K.(1992):The Moraxella catarrhalis immunoglobulin binding protein MiD has conserved sequences and is regulated by a mechanism corresponding to phase variation .J.Bacteriol,185:2285-2295.
- **Meier**,P.S.;Heiniger.N.;Troller,R. and Aebi,C.(2003):Salivary antibodies directed against onter membrane protein of M. catarrhalis in healthy adults infect .Immun.71:6793-6798.
- **Perez**,J.L;Pulido,A.;Gomez,E.;Sanca. And Martin ,R.R.(1990):Supperoxol and amino peptidase test for identification of pathogenic Niesseria spp-and **Moraxella** catarrhalis.Eur.J.Microbiol .Infect .Dis .9:421-424.
- **Sutlon** ,D.V.;Derkay,C.S.;Darrow,D.H. and Strasnick ,B,(2000):Resistant bacteria in middle ear fluid at the time of tympanotony tube surgery .Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.109:24-29.
- **Verduim** ,C.M.;Hol,C.;Fleer A. and Belkum ,A.(2002): Moraxella catarrhalis from emerging to Established pathogen .Clin.Microbiol.Rev.15:125-144.

Invistigation some of virulence factors of *Moraxella catarralis* isolated from respiratory tact infections

Absrtact

344 samples were collectd from respiratory tract infections, from March 2006 to January 2007 .Thebacterial isolates where identified basd on colony morphology, biochemical reactions and confirmed using API-NH identification system. 60 isolates(17.4%) identified as a *Moraxella catarrhalis*, isolated from sputum ,ear, nose, bronchial and tonsillitis swabs in (12.5 ,30 ,27.6 ,11.7 and 6.7)% respectively . 31 (16.3%) isolates were recovered from males samples versus 29 (18.8%) isolates from females. Some virulence factors *of Moraxella catarrhalis* were studied ,the results revealed that 58 (96.7%) isolates have adhesion factors to humans epithelial cells. 22 (36.7%) isolates have ability to produced protease enzyme . Versus , 54 (90%) isolates produced lipase . however no isolates have ability to produced heamolysin. As well as no isolates produced capsule