----- مجلة علوم الرافدين، المجلد17، العدد9، خاص بعلوم الحياة، ص 236-242، 2006-----

التحري عن المستضدات البروتينية لجرثومة المكورات المعوية المرضية بطريقة الهجرة الكهربائية

جورجيت نيسان شمعون حنو

فرع الاحياء المجهرية

كلية الطب البيطري

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2003/7/30 ؛ تاريخ القبول 2003/9/22)

الملخص

اجريت الدراسة للتعرف على المستضدات البروتينيـــة لجرثومـــة المكـــورات المعويـــة البرازيـــة *Enterococcus faecalis* والمعزولة من التهاب شغاف القلب وخمج القناة البولية كما استخدمت السلالة القياسية لهذا النوع لغرض المقارنة ، فصلت هذه المستضدات بتقنية الهجرة الكهربائية باســـتخدام هـــلام متعدد الاكريلاميد مـــع Sodium Dodecyle Sulphate (SDS) بعـــد ان حـــضر المعلـــق البروتينـــي لمستضدات السلالات المرضية والقياسية للجرثومة. بينت نتائج الفصل وجود حزم بروتينية متعددة فـــي المعلق البروتيني المحضر من السلالة المرضية المعزولة من التهاب شغاف القلب وباوزان جزيئية تقرب من 68000 ، 65000 ، 50000 ، 44000 دالتون ، كما اعطت السلالة المعزولة من خمج القناة البوليـــة حزمة بروتينية واحدة وبوزن جزيئي 30000 ، وظهرت حزمة بروتينية واحدة وبوزن جزيئي 22000 دالتون في معلق السلالة القياسية .

Detection of Proteins Antigens of Pathogenic Enterococci by Electrophoresis

Goerget N. Hanno

Department of Microbiology

College of Veterinary Medicine

Mosul University

ABSTRACT

The study was conducted to investigate proteinal antigens of *Enterococcus faecalis* strains which isolated from Endocarditis and urinary tract infection, as well as standard strain was used for comparison. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electro-

phoresis was used for separation of these proteins after preparation of proteinal antigens suspensions from clinical and standard strain.

Many protein bands were emerged in the protein suspension of Endocarditis strain with molecular weight 68000, 65000, 50000 and 44000 dalton, while one band was shown in UTI strain with molecular weight 30000 dalton. As well as one protein band was shown in standard strain suspension with molecular weight 22000.

المقدمة

تمتلك بعض سلالات جرثومة المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* صفات مهمة تؤدي دورا مهما في امراضيتها اذ تمكنها من الدخول الى الدم ومقاومة دفاعات المضيف واحداث امراض عديدة منها خمج القناة البولية والتجرثم الدموي والتهاب شغاف القلب الذي يعد من اخطر الامراض التي تسببها هذه الجرثومة (Murray and Weinstock, 1999) . وجد ان قابلية الجرثومة على احداث هذا المرض يعود الى امتلاكها لمستضدات بروتينية او كلايكوبروتينية فضلا عن عوامل الالتصاق ومواد التجمع Aggregation substances والتي تؤدي دوراً مهما في عملية التصاق واستيطان الجرثومة بانسجة القلب واحداث الضرر فيه (Nallapareddy et al., 2000) . لوحظ ان هذه المستضدات هي من ضمن عوامل الضراوة التي تمتلكها السلالات المرضية فقط لهذه الجرثومة اذ تساعد هذه البروتينات مع حامض اللايبوتايكويك Lipoteichoic acid من التصاق *E. faecalis* بتجمعات الصفائح الدموية والفايبرين (Aitichsion et al., 1986; 1987) . ان هذه الجرثومة اكثر ميلاً للالتصاق بالفايبرونكتين Fibronectin من بقية المكورات الموجبة لصبغة كرام المسببة لمرض التهاب شغاف القلب وذلك للالفة الزائدة الموجودة لهذه المستضدات مع صمامات القلب (Schaechter et al., 1999) . تم التعرف على مدى مساهمة هذه المستضدات في امراضية الجرثومة عن طريق دراسة التصاق هذه الجرثومة بالخلايا الحقيقية النواة في المزارع النسيجية (Gatermann et al., 1992)، اذ لوحظ ان اغلب السلالات المرضية للنوع *E. faecalis* والمعزولة من اصابات مختلفة كأخماج القناة البولية والتهاب شغاف القلب تحتوي على هذه البروتينات وان لها اهمية بالغة في فهم ميكانيكية الامراضية وفي عملية التشخيص والمعالجة (Sulaiman et al., 1996; Xu et al., 1997)، ولهذه الاهمية اجريت هذه الدراسة للتحري عن وجود هذه البروتينات ومقارنتها بين السلالات المرضية والقياسية .

المواد وطرائق العمل

تم تنقية سلالتي النوع *E. faecalis* والمعزولتين من التهاب شغاف القلب وخمج القناة البولية والسلالة القياسية لهذا النوع *E. faecalis* cod. No. 5430 (معهد باستور وتم الحصول عليها من كلية العلوم/ قسم علوم الحياة/ جامعة الموصل) في مرق نقيع القلب والمخ Brain heart Infusion Broth لمدة

18–24 ساعة وفي درجة حرارة 37 م° وفي جو 5% ثاني اوكسيد الكربون باستخدام ناقوس الشمعة اذ جمعت الخلايا بالطرد المركزي المبرد وبسرعة 6000xg ولمدة 10 دقائق ثم علقت في 20 سم^3 من 0.7% فورمالين في محلول الملح الفسيولوجي المتعادل 0.9% لمدة ساعة واحدة وفي درجة حرارة 4م°، غسل المعلق الجرثومي بمحلول الفوسفات المنظم وبرقم هيدروجيني 7 ثلاث مرات بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 10000xg ولمدة 10 دقائق ثم علق في 2سم^3 من 0.3% فورمالين وحفظ في 4°م لحين استعماله (Arduion et al., 1994; Leiro et al., 1996) .

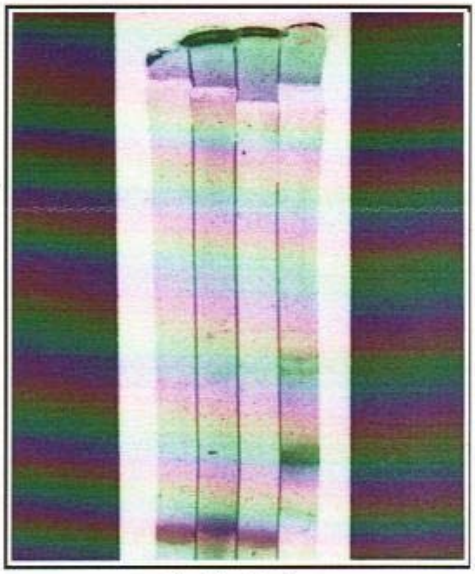
جففت المعلقات بجهاز التجفيد Lyphilizer ثم استخدمت تقنية الهجرة الكهربائية باستخدام SDS Sodium dodecyl sulfate مع متعدد الاكريلاميد Polyacrylamide لفصل المستضدات المحضرة اعلاه وتم الفصل بطريقة Laemmli في سنة (1970) اذ علقت المستخلصات في دارئ تريس Trishydrochloride buffer وبرقم هيدروجيني 6.8 واجريت عملية الاذابة والتسخين في حمام مغلي ولمدة 3 دقائق بعدها فصلت المستضدات باستخدام 7.5% هلام الفصل Separating polyacrylamide gel وبمقدار 6 ملي امبير/انبوب بجهاز الهجرة الكهربائية Vertical disc electrophoresis. ثم عينت الاوزان الجزيئية التقريبية وباستخدام بروتينات قياسية معلومة الوزن الجزيئي مثل البومين مصل الابقار 67000 ولايسوزايم 14388 والبيروكسديز 40000 والتربسين 23800 (Robyt and White, 1987) .

النتائج والمناقشة

توضح الصور (1 و 2) الحزم البروتينية للمعلقات المحضرة من البروتينات القياسية والمستضدات المحضرة من السلالات المرضية والسلالة القياسية ، كما يبين (الجدول 1) عدد هذه الحزم والاوزان الجزيئية لها ، إذ اظهرت نتيجة الفصل بتقنية الهجرة الكهربائية ان مستضد البروتين المحضر من السلالة المرضية *E. faecalis* المعزولة من التهاب شغاف القلب يحتوي على اربعة حزم بروتينية وباوزان جزيئية تقريبية 68000 ، 65000 ، 50000، 44000 دالتون في حين ظهرت حزمة بروتينية واحدة في المستضد المحضر من سلالة *E. faecalis* المعزولة من خمج القناة البولية وبوزن جزيئي 30000 دالتون ، كما اعطت السلالة القياسية البرازية لهذا النوع حزمة بروتينية واحدة وبوزن جزيئي 25000 دالتون .

اظهرت الاوزان الجزيئية ذات القيم العالية التي ظهرت في السلالات المرضية لجرثومة المكورات المعوية المعزولة من التهاب شغاف القلب وخمج القناة البولية وجود كمية عالية من البروتين مقارنة بالسلالة القياسية وقد تعزى ضراوة هذه السلالات إلى وجود هذه التراكيز العالية من البروتين .

تشترك العديد من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام في احتوائها على مستضدات بروتينية مثل المكورات السبحية *Streptococcus* والمكورات العنقودية الموجبة والسالبة للكواكيوليز Coagulase negative *Staphylococci* ، اذ تؤدي هذه البروتينات دوراً مهما في زيادة امراضية هذه الجراثيم

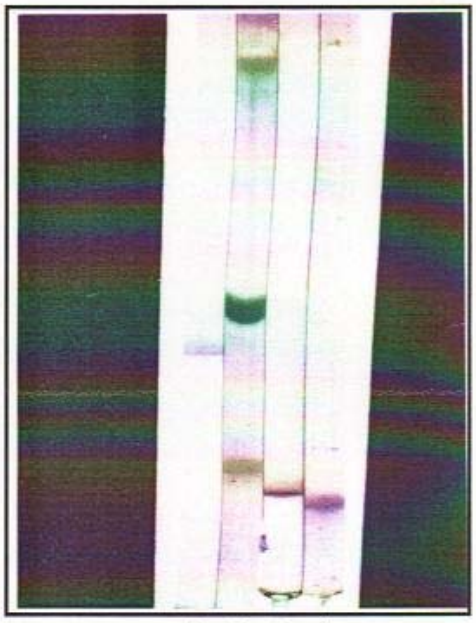


4 3 2 1

الصورة 1:

الحـــزم البروتينيـــة للمعلـــق البروتينـــي للمستضدات *E. faecalis* المرضية والقياسية

1. معزولة من شغاف القلب
2. قياسية
3. خمج القناة البولية
4. قياسية



4 3 2 1

الصورة 2:

الحزم البروتينية للبروتينات القياسية

1. بيروكسيديز
2. ألبومين مصل الابقار
3. لايزوزايم
4. تربسين

(Gatermann et al., 1992) . ولوحظ ان هذه البروتينات توجد بوفرة في الغلاف البروتيني لخلايا المكورات السبحية وتمثل محددات مستضدية رئيسية لمجاميع هذه الجرثومة (Goldschmidt et al., 1990) . وكما تمثل هذه المستضدات البروتينية عامل استيطان رئيسي في المكورات الموجبة لصبغة كرام بصورة عامة والمكورات السبحية بصورة خاصة (Yu et al., 1997)، ويسهم التركيب الكيمياوي لهذه البروتينات والمتكون من وحدات محبة وغير محبة للماء وذيول مشحونة من زيادة عملية استيطان الجرثومة للانسجة (Homonyolo and Lee, 1996) .

وكما لوحظ ان العديد من هذه المستضدات البروتينية في المكورات السبحية والمعوية والمعزولة من الحالات المرضية تحفز على التداخل بين انواع جنس المكورات المعوية والانواع المختلفة للمكورات السبحية او بين هذه الجراثيم وبين الخلايا الحقيقية النواة (Gatermann et al., 1992) .

كما تشترك هذه المستضدات البروتينية مع عوامل التلازن السطحية التي تمتلكها هذه الجرثومة في عملية تلازن كريات الدم الحمر (Carvalho and Teixeira, 1995)، وتفرز المستضدات البروتينية اثناء الاصابة وتحفز الجهاز المناعي للمضيف لذلك يمكن الاستفادة منها في التشخيص المصلي لمرض التهاب شغاف القلب باستخدام اختبار الاليزا لان التشخيص المختبري لهذه الجرثومة في هذا المرض احياناً يعطي نتائج سالبة (Planes et al., 1996) .

ذكر بان انتاج هذه البروتينات يعتمد على الظروف المستخدمة لتنمية الجرثومة مختبريا او خارج جسم الكائن الحي اذ وجد ان هذه الجرثومة تنتج هذه البروتينات بعد تنميتها في المصل او في وسط مرق نقيع القلب والمخ في حين ان هذه السلالات تكون فاقدة لها بعد تنميتها في الاوساط المحضرة من مواد كيمياوية(Lambert et al., 1990) .

الجدول 1: الاوزان الجزيئية التقريبية للمستضدات البروتينية لجرثومة *E. faecalis* المرضية والقياسية.

السلالة	المصدر	عدد الحزم	الوزن الجزيئي (دالتون)
E. faecalis	قياسية	1	22000
E. faecalis	خمج القناة البولية	1	30000
E. faecalis	التهاب شغاف القلب	4	44000 ، 50000 ، 65000 ، 68000

جاءت هذه الدراسة مقاربة لدراسة الباحث Kjerulf وجماعته في سنة (1998) والذي اشار الى وجود حزم بروتينية اضافية في المستضدات المحضرة من سلالة *E. faecalis* المعزولة من التهاب شغاف القلب مقارنة بحزم اقل عدداً في سلالات *E. faecalis* والمعزولة من حالات مرضية اخرى ، كما بينت دراسة كلونة الجين وجود جينات متخصصة لانتاج هذه البروتينات في سلالات *E. faecalis*

المسؤولة عن التهاب شغاف القلب (Kjerulf et al., 1998)، اوضحت دراسة الباحث Sasaki في سنة (1991) وجود مستضدات بروتينية مشتركة بين انواع معينة من مجاميع عائدة للجراثيم الموجبة لصبغة كرام وباوزان جزيئية مقاربة 48000 و 42000 دالتون .

المصادر الاجنبية

Aitchison, E.J., Lambert, P.A. and Farrell, I.D., 1986. Antigenic composition of an Endocarditis associated isolate of streptococcus faecalis and identification of its glycoprotein antigens by ligand blottin with lections. J. Med. Microbiol. 21: pp.161-167.

Aitchison, E.J., Lambert, P.A., Smith, E.G. and Farrell, I.D., 1987. Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* Endocarditis immunoblotting of surface protein antigens. J. Clin. Microbiol. 25(2): pp.211-215.

Arduino, R.C., Palaz, K.J., Murray, B.E. and Rakita, R.M., 1994. Resistance of *Enterococcus faecium* to neutrophil mediated phagocytosis. Infect. Immun. 62(12): pp.5587-5594.

Carvalho, M.G.S. and Teixeira, L.M., 1995. Haemagglutination properties of *Enterococcus*. Curr. Microbiol. 30: pp.265-268.

Gatermann, S., Kreft, B., Marrei, R. and Wanner, G., 1992. Identification and characterization of surface associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*. Infec. Immun. 60: pp.1055-1060.

Goldschmidt, R.M., Thoren, G.M., Curtiss, R., 1990. Regions of the *Streptococcus sobrinus* SpaA gene encoding major determinants of antigen. I.J. Bacteriol. 172: pp.3988-3401.

Homonylo, M.K. and Lee, S.F., 1996. Role of the cterminus in antigen PI surface localization in Streptococcus mutans and two related cocci. J. Bacteriol. 178: pp.801-807.

Kjerulf, A., Espersen, F., Gutschik, E., Majcherczyk, P.A., Hougen, H.P., Rygaard, J. and Holby, N., 1998. Serological diagnosis of experimental *Enterococcus faecalis* endocarditis. APMIS 106: pp.997-1008.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: pp.680-685.

Lambert, P.A., Shorrock, P.J., Aitchison, E.J., Domingue, P.A.G., Power, M.E. and Costerton, J.W., 1990. Effect of invivo growth conditions upon expression of surface protein antigens in *Enterococcus faecalis*. FEMS Microbiology Immunology 64: pp.51-54.

Leiro, J., Toranzo, A.E.,. Esteve, J., Lainas, J., Barga, T.L. and Uberia, F.M., 1996. The humoral immune response of turbot to recently isolated pathogenic enterococcus strains. Vet. Microbiol. 18: pp.29-39.

Murray, B.E. and Weinstock, G.M., 1999. Enterococci: New aspects of an old organism. Proceedings of American Physicians Association. Vol. 11(4): pp. 328-334.

Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Hook, M. and Murray, B.A., 2000. *Enterococcus faecalis* adhesion mediates to attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type. Infection and Immunity. 68(9): pp.5218-5224.

Planes, A.M., Bermejo, B., Torons, M.P. and Acralis, F.F., 1996. Serological study in patients with *Streptococcal endocarditis*, Med. Clin. 107: pp.693-697.

Robyt, F.T. and White, J.B., 1987. Biochemical technique theory and practice. Books/Cole publishing Co., USA.

Sasaki, T., 1991. Evidence that mycoplasmas gram-negative bacteria, and certain gram positive bacteria share a similar protein antigen. J. Bacteriol. 173: pp. 2398-2400.

Schaechter, M., Caryengleber, N.C., Eisenstein, B.I. and Medoff, G., 1999. Mechanisms of microbial disease. 3rd ed., Lippinott Williams and Wilkins, USA.

Sulaiman, A., Rakita, R.M., Arduino, R.C., Stechelberg, J.M., Singh, K.V. and Murray, B.E., 1996. Serological investigation of Enterococcal infections using Western bolt. Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15: pp.826-829.

Xu, Y., Jian, L., Murray, B.E. and Weinstock, G.M., 1997. *Enterococcus faecalis* antigens in human infections. Infect. Immun. 65(10): pp.4207-4215.

Yu, H., Nakano, Y., Yamashita, Y., Oho, T. and Koga, T., 1997. Effect of antibodies against cell surface protein antigen PAC-glucosyltransferase fusion proteins on glucan synthesis and cell adhesion of streptococcus mutans. Infec. Immune. 65: pp.2292-2298.