تأثير جرثومة *Proteus mirabilis* على تحفيز التبلور في الادرار البشري♦

أميرة محمود محمد الراوي
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم

رشا نزار حسون السعدون
قسم علوم الحياة/ كلية التربية للبنات

جامعة الموصل

ABSTRACT

The study involved the effect of *P. mirabilis* on stimulation of crystallization in human urine and the formation of struvite stones *in vitro* during limited period of time. Human urine samples were collected from non-infected people with urinary tract infections and inoculated with *P. mirabilis* with control sample. After incubation a number of test were done including turbidity test, pH and chemical analysis, as well as the appearance of crystals and precipitates were followed and tested by light microscope and photographed.

الخلاصة

شملت الدراسة تأثير جرثومة *Proteus mirabilis* على تحفيز عملية التبلور في الادرار البشري وتكوين حصى الستروفايت Struvite stones في الزجاج *In vitro* ضمن فترة زمنية محددة، حيث جمعت نماذج من الادرار البشري لاشخاص غير مصابين باخماج القناة البولية ولقحت بجرثومة *P. mirabilis* مع ترك نموذج للسيطرة دون تلقيح، وبعد التحضين اجريت عدد من الاختبارات تضمنت قياسات العكورة والدالة الحامضية والفحوصات الكيميائية للنماذج. كما تمت متابعة ظهور الرواسب والبلورات وفحصت بالمجهر الضوئي وصورت فوتوغرافياً.

المقدمة

تقوم الكلية بترشيح الدم وطرح الفضلات الناتجة مع الادرار فاذا كانت مادة الفضلات لا تذوب بشكل كامل في الادرار فانها تتبلور وتساعد على تكوين حصى الكلى اذ يحتوي الادرار البشري الاعتيادي على مواد مضادة للتبلور تمنع هذه المكونات من التبلور والترسب ومن ثم تكوين حصاة (1).

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4–5 أيلول 2007

توجد انواع عديدة من الحصى البولية تختلف من حيث الشكل والحجم والموقع والتركيب الكيميائي وهناك اربعة انواع من الحصى الشائعة في مختلف انحاء العالم هي الحصى الكلسية calcium stones وحصى ستروفايت struvite stones وحصى حامض اليوريك uric acid stones والحصى السيستينية cystine stones وتختلف نسب الإصابة بهذه الانواع من الحصى بين مناطق العالم المختلفة باختلاف الموقع الجغرافي وطبيعة المناخ والعادات الغذائية للشعوب ومستوى الرعاية الصحية (2) .

يمثل انزيم اليوريز عاملاً اساسياً يساعد على تكوين الحصى تنتجه الجراثيم المحللة لليوريا والذي يسبب فرط الاشباع الموضعي والترسب وتبلور فوسفات الكالسيوم والمغنيسيوم لتكوين بلورات

كاربونات- apatite $[Ca_{10}(PO_4)_6.CO_3]$ وبلورات struvite $(MgNH_4PO_4.6H_2O)$ على التوالي (3) .

تتكون حصى الاخماج نوع struvite عند وجود الاخماج البولية لاسيما المرتبطة بالجراثيم المنتجة لليوريز منها *Proteus*، *Pseudomonas*، *Klebsiella* و *Staphylococcus* وتكون كبيرة عادة وتملأ حوض الكلية بتفرعاتها داخل كؤوس الكلية ولاسيما عندما تكون من النوع Staghorn stones (4).

تعد المتقلبات اكثر العصيات سبباً في تكوين الحصى الالتهابية اذ تمثل اكثر من (70%) من الجراثيم المعزولة من هذه الانواع من الحصى ويعزى السبب في ذلك ليس لانها اكثر الاجناس الجرثومية قدرة على انتاج اليوريز فحسب بل لمقاومتها ايضاً التراكيز العالية من اليوريا فضلاً عن قابلية النمو في الاوساط القاعدية وتحليل اليوريا للحصول على احتياجاتها من الطاقة والنتروجين من اليوريا والامونيوم (5).

كما يعد النوع *P. mirabilis* المسبب الاول لحصى struvite في الكلى اذ يمثل (90%) من حالات الإصابة التي تسببها الانواع الاخرى من اجناس المتقلبات الموثقة سبباً لاخماج القناة البولية المعقدة لاسيما في المرضى مستخدمي القثاطر لفترات طويلة اذ تمتلك جرثومة *P. mirabilis* العديد من عوامل الضراوة التي تعبر عن قدرتها العالية على احداث الإصابة منها ظاهرة العج وانتاج انزيم اليوريز وقابلية الغزو للخلايا وانتاج الهيمولايسين والانزيمات المحللة للبروتينات وامتلاكها بروتينات الغلاف الخارجي وتكوين الاغشية الحيوية Biofilms فضلاً عن التصاقها بالانسجة الطلائية البولية بوساطة الاهداب (6) .

ان الخصائص الفريدة لمحفظة متعدد السكريات Capsule Polysaccharide (CPS) لجرثومة *P. mirabilis* فضلاً عن طبقة متعدد السكريات الدهني

Lipopolysaccaharide (LPS) في تجميع مكونات الادرار حول خلايا الجرثومة، يساعد على تسريع تكوين البلورات وتعزيز الارتباط والالتصاق لتكوين الحصى الالتهابية وهذا يشير الى دور السكر في تعزيز التبلور وتكوين حصى struvite في حالة الإصابة باخماج القناة البولية (7) .

ولاجل تسليط الضوء على اهم الجراثيم ذات العلاقة بحصى الكلى وهي جرثومة *P. mirabilis* التي تعد اكثر انواع الجراثيم ارتباطاً بالحصى الالتهابية استهدف البحث فهم الية دور الجرثومة على تحفيز التبلور في الادرار البشري بوجود المواد المضادة للتبلور الطبيعية وتحديد مكونات البلورات كيميائياً.

مواد وطرائق العمل

تهيئة المزرعة

تم عزل وتشخيص جرثومة *P. mirabilis* من ادرار مريض مصاب بحصى الكلى واخماج القناة البولية اعتماداً على ما ورد في (8) وحفظت على موائل الاكار المغذي. تم تهيئة مزارع منها بتلقيح خلايا الجرثومة في وسط مرق نقيع المخ والقلب Brain Heart Infusion Broth (BHI) وحضنت بدرجة 37 م مدة 10 ساعات.

تحضير الكواشف والمحاليل

- كاشف Eriochrome Black T

حضر الكاشف اعتماداً على (9) بمزج (0.5) غم من (Eriochrome Black T) مع (4.5) غم من (hydroxyl amine hydrochloride) ويذاب الخليط في (100) سم^3 من (95%) من ايثانول او الكحول الايزوبروبيلي Isopropyl alcohol كاشف Eriochrome Black T

- محلول الامونيا المنظم Ammonia Buffer Solution

حضر المحلول باذابة (16.9) غم من كلوريد الامونيا في (143) سم^3 هيدروكسيد الامونيوم المركز ثم اضيف (1.25) غم من (Mg-EDTA) واكمل الحجم الى (250) سم^3 بالماء المقطر ثم حفظ في قنينة محكمة السد (9).

- محلول Na_2-EDTA (0.01M)

حضر المحلول باذابة (3.723) غم من (Na_2-EDTA) في لتر من الماء المقطر وحفظ المحلول في اواني زجاجية 9).

- محلول ترس المنظم Tris Hydrochloride Solution

حضر المحلول باضافة (5) سم3 من حامض الهيدروكلوريك (0.2 M) و (50) سم^3 من (Hydroxmethyl-Aminomethan) الى (50) سم^3 من الماء المقطر وضبطت الدالة الحامضية للمحلول على (9.0) (10).

- محلول مولبيدات الامونيوم Ammonium Molybdate

حضر المحلول باذابة (25) غم من مولبيدات الامونيوم في (175) سم^3 من الماء المقطر. اضيف بهدوء (280) سم^3 من حامض الكبريتيك المركز الى (400) سم^3 من الماء المقطر وبعد ان يبرد يضاف اليه محلول المولبيدات ويخفف الى لتر بالماء المقطر (9).

- محلول كلوريد القصديروز Stannous Chloride

حضر المحلول باذابة (2.5) غم من كلوريد القصديروز احادي الماء $SnCl_2.H_2O$ في (400) سم^3 من الكليسرول سخن في حمام بدرجة حرارة (60)م لمدة (30) دقيقة ويرج جيدا الى ان تتم الاذابة (9).

تأثير جرثومة *P. mirabilis* على تحفيز التبلور في الادرار البشري

استخدمت ثلاثة نماذج من الادرار البشري لشخص غير مصاب باخماج القناة البولية (pH = 5.8) حجم كل منها (100) سم^3 عقم الادرار بطريقة الترشيح باستخدام ورق الترشيح (Millipore Membrane) حجم الثقوب (0.45) مايكرومتر وبعد التعقيم لقح نموذجان منها بجرثومة *P. mirabilis* عمرها (10) ساعات نامية في مرق نقيع المخ والقلب BHI بحجم (1) سم^3 من اللقاح لكل منهما وترك النموذج الثالث للادرار بوصفه محلولا للسيطرة، وحضنت النماذج في درجة (37) م مدة 24 ساعة واجريت خلالها قياسات للعكورة Turbidity باستخدام جهاز المطياف الضوئي (qallenhamp-spectronic 21) والدالة الحامضية للنموذج الاول في بداية التلقيح وفي نهاية كل ساعة لغاية (8) ساعات ثم اخذت القياسات نفسها بعد (12) ساعة و (24) ساعة من بداية التلقيح فضلا عن ذلك تمت متابعة ظهور الرواسب والبلورات في النموذج الثاني واخذت عينات منها وفحصت بالمجهر الضوئي وصورت فوتوغرافيا كما اجريت الفحوصات اللونية بالطرق الكيميائية لقسم من العينات لتحديد مكوناتها.

الفحص اللوني لمكونات الرواسب بالطرق الكيميائية

اعتمد في الكشف ما ورد في (9) كما يأتي :

اولا : الكشف عن ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم

اذيبت عينة من الرواسب في (75) سم^3 من الماء المقطر الخالي من مكونات العسرة، اضيف (1) سم^3 من محلول الامونيا المنظم الى (25) سم^3 من محلول العينة للوصول الى

pH يساوي (10). اضيفت قطرة الى قطرتين من الدليل السائل Eriochrome Black T وسحح المحلول باضافة محلول (Na_2 EDTA) ببطء مع الرج الى ان يتغير اللون من الاحمر الخمري الى الازرق عند وصول نقطة التعادل، ظهور اللون الازرق دلالة على ان النتيجة موجبة.

ثانيا : الكشف عن ايونات الفسفور

استخدم كلوريد القصديروز للكشف عن ايونات الفسفور في العينة وكما يلي :

اضيف (4) سم^3 من محلول مولبيدات الامونيوم الى (25) سم^3 من محلول العينة المقشوطة بالماء المقطر، اضيف (10) قطرات من محلول كلوريد القصديروز المحضر في الفقرة نفسها. ان ظهور اللون الازرق دلالة على وجود ايونات الفسفور.

النتائج والمناقشة

تأثير جرثومة *P. mirabilis* على تحفيز التبلور في الادرار البشري

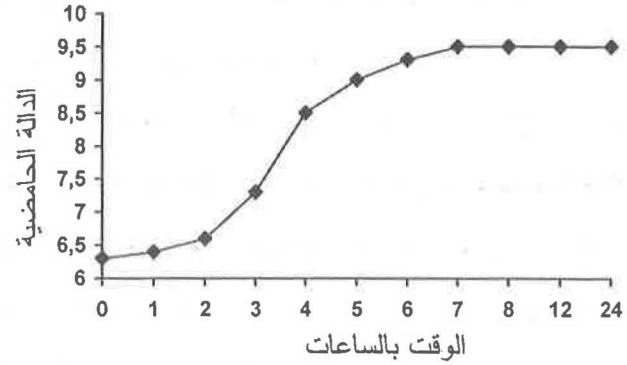
بعد تحضين ثلاثة نماذج معقمة من الادرار البشري (pH = 5.7) حجم كل منها (100) سم^3 أثنان منها ملقحة بالجرثومة *P. mirabilis* بنسبة (1%) من حجم الادرار لكل منهما والثالث محلول سيطرة، تم قياس العكورة والدالة الحامضية للنموذج الأول عند بداية التلقيح وكل ساعة ولغاية (8) ساعات كما سجلت أيضا قياسات في الساعة (12) والساعة (24) من بداية التلقيح كما موضح في الجدول (1).

الجدول _1: الدالة الحامضية وعكورة الادرار البشري في النموذج الأول خلال (24) ساعة

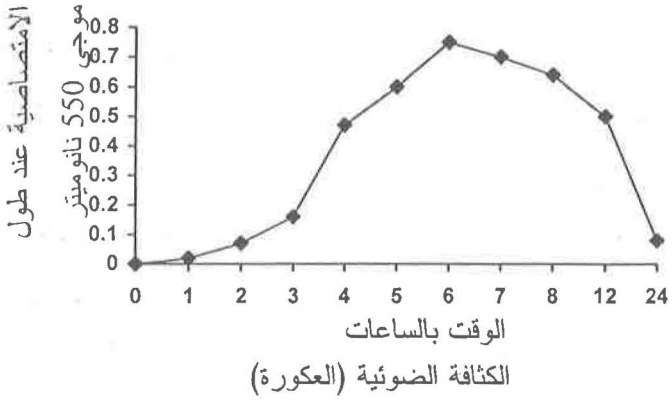
الوقت (بالساعات)	الوسط الزرعي في النموذج الأول للادرار البشري	
	الدالة الحامضية (PH)	العكورة (Turbidity) (550nm) O.D
0	6.3	0
1	6.4	0.02
2	6.6	0.07
3	7.3	0.16
4	8.5	0.47
5	9.0	0.60
6	9.3	0.75
7	9.5	0.70
8	9.5	0.64
12	9.5	0.50
24	9.5	0.08

تبين من النتائج ان الدالة الحامضية والكثافة الضوئية بدأت بالزيادة بسرعة كما موضح في الشكلين (1) و (2) على التوالي حيث وصلت قيمة الدالة الحامضية 8.5 خلال (4) ساعات ثم ازدادت لتصل الى 9.5 عند الساعة السابعة من بداية التلقيح واستقرت على هذا المستوى حتى نهاية مدة التحضين، أما بالنسبة للعكورة فقد وصلت أعلى قيمة عند الساعة السادسة ثم بدأت بالانخفاض بشكل ملحوظ بعد (8) ساعات من بداية التلقيح بسبب الدالة الحامضية العالية للوسط الزرعي وتراكم النواتج الأيضية للجراثيم مما يؤدي الى تثبيط النمو فضلا عن الالتصاقات الجرثومية على السطوح الداخلية للقنينة المغمورة بالادرار اذ وصلت العكورة الى (0.08) بعد (24) ساعة من بداية التلقيح .

وما تقدم يشير الى قدرة جرثومة *P. mirabilis* على النمو والتكاثر في الادرار البشري وانتاج أنزيم اليوريز ورفع قاعدية الادرار وعند مقارنة هذه النتائج مع قدرة الجرثومة على ذلك في الادرار الصناعي في تجربة المزرعة المستمرة (11) لاحظنا ان الادرار الصناعي بديل مكافيء للادرار البشري في تجارب الزجاج فضلا عن ذلك ان المواد المضادة للتبلور الطبيعية الموجودة في الادرار لم يظهر لها تأثير على قدرة الجرثومة في النمو والتكاثر وعلى فعالية أنزيم اليوريز في رفع قاعدية الادرار وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره الباحث Mclean (12)من ان مضادات التبلور في الادرار البشري عند إضافتها الى الادرار الصناعي الملقح بجرثومة *P. mirabilis* ليس لها أي تأثير على قابلية الجرثومة على النمو والتكاثر في الادرار الصناعي وعلى فعالية أنزيم اليوريز وقاعدية الادرار.



الشكل (1): منحنى تغير الـ pH مع الزمن بفعل جرثومة *P. mirabilis* في الادرار البشري



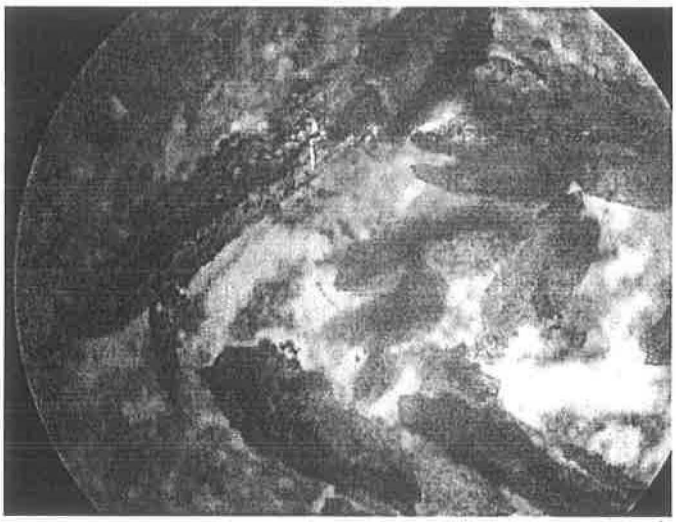
الشكل (2): منحنى تغير عكورة الادرار البشري مع الزمن مقاساً بالكثافة الضوئية

لوحظ خلال الساعتين الأولى والثانية من بداية التلقيح والتحضين للادرار البشري (النموذج الثاني) حدوث ارتفاع في عكورة الوسط فيما كان الارتفاع أكثر وضوحا خلال الساعة الثالثة حيث وصلت قيمتها الى (0.16) ووصلت الـ pH (7.3) وخلال الساعة الرابعة والخامسة حدث أقصى تغير في الـ pH حيث ارتفع من 7.3 الى 9 مما يؤشر زيادة كبيرة في انتاج أنزيم اليورير نتيجة توفر الظروف الملائمة لنمو الجرثومة في الوسط القاعدي وقد رافق ذلك حدوث أقصى معدل تغير في العكورة حيث ارتفعت من 0.16 الى 0.60 فضلا عن ذلك لوحظ تكون رواسب قليلة في المحلول وخلال الساعة السادسة استمرت عكورة الوسط بالتزايد حتى وصلت أعلى قيمة لها (0.75) فيما لوحظ انخفاض في عكورة الوسط خلال الساعة السابعة ومع بداية الساعة الثامنة لوحظ زيادة واضحة في كمية الرواسب مع

ظهور تكتلات بلورية واضحة للعيان مع ظهور التصاقات لزجة على السطح الزجاجي الداخلي للقنينة المغمورة في الادرار كما موضح في الصورة (1).

الصورة (1): الالتصاقات اللزجة والرواسب والتكتلات البلورية المتكونة بفعل جرثومة *P. mirabilis* في الادرار البشري ومقارنتها بنموذج السيطرة

وقد كشف الفحص بالمجهر لعينة من الرواسب عن وجود كميات كبيرة من مواد غير متبلورة فضلا عن تكتلات بلورية مصفحة متعددة السطوح وغير مستقيمة الحافات كما موضح في الصورة (2) مما يشير الى بطء عملية التبلور.

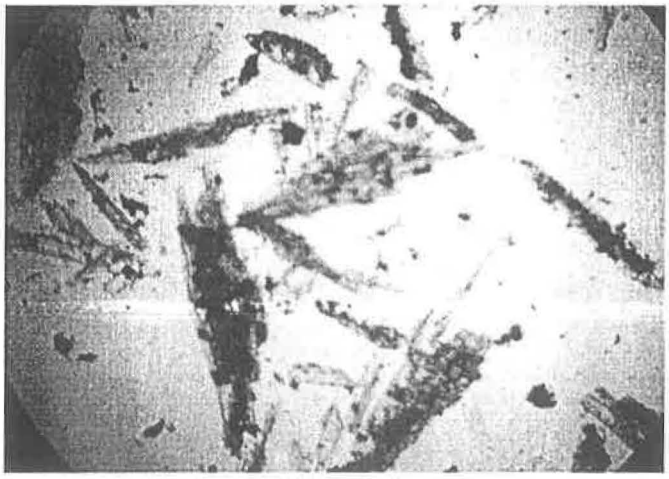


الصورة (2): التكتلات البلورية والمواد غير المتبلورة في عينة من رواسب الادرار البشري للساعة الثامنة (قوة التكبير 400X)

أ- التكتلات البلورية ب- المواد غير المتبلورة

ان ظهور البلورات والرواسب الابتدائية في الادرار البشري قد ثبطت بشكل ملحوظ حيث كانت معظم الرواسب من مواد غير متبلورة وان ظهور البلورات حدث عند الساعة الثامنة من بداية التلقيح وأشكالها المشوهة وحافاتها غير المستقيمة دلالة على بطء نمو البلورة عند pH أعلى من 9.0 وهذا يشير الى ان التبلور السريع لبلورات struvite بين pH يساوي 7.3 وpH يساوي 9 لم يحدث كما هو الحال في الادرار الصناعي وان بلورات كاربونات apatite لم تتوفر لها فرصة التبلور وهذا يفسر ظهور كمية كبيرة من المواد غير المتبلورة فضلا عن ذلك لم تتوفر الفرصة لبلورات struvite بالتبلور خلال مدى pH من 8.5 الى 9 مما يشير أيضا الى ان عدم تبلور بلورات struvite ضمن فترة التبلور السريع .

وبعد (24) ساعة من بداية التلقيح والتحضين في دراستنا أخذت عينات من التكتلات البلورية ووجد أنها مغطاة بمادة لزجة ومخاطية تلتصق عليها بعض مكونات الادرار وعند الفحص المجهري لهذه العينة بعد تثبيت البلورات بإضافة قطرة من المنظم الترس (pH = 9) لوحظ ان الكتل البلورية تتكون من عدة بلورات ملتصقة فيما بينها وبأشكال مختلفة وقد ظهرت مكونات الادرار الملتصقة فيها كما موضح في الصورة (3).



الصورة (3): اشكال البلورات من عينة من الرواسب بفعل جرثومة *P. mirabilis* في الادرار البشري بعد 24 ساعة من التلقيح (قوة التكبير400X)

وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره الباحثان Stegmayer و Stegmayer (13) ان الفحص المجهري للادرار البشري الملقح بجرثومة *P. mirabilis* خارج الجسم الحي بعد التحضين بدرجة حرارة (37)م° لمدة 24 ساعة يكشف وجود تكتلات بلورية فضلا عن ذلك نقصان واضح في محتوى الادرار العالق من الكالسيوم والمغنيسيوم وان التلقيح بالجرثومة الميتة لا يؤدي الى تكوين ترسبات بلورية فضلا عن ذلك أشار الباحث Griffith (14) أن

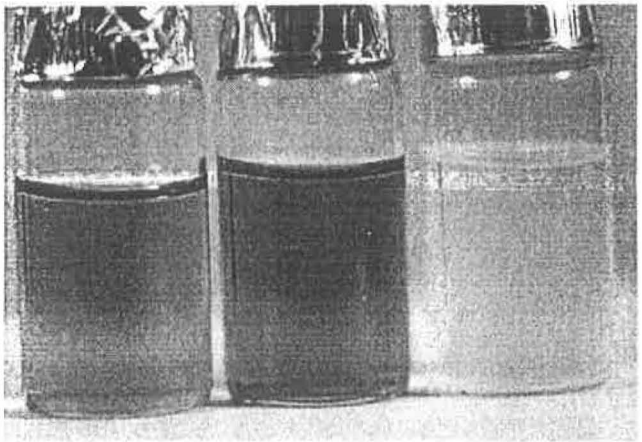
البروتينات المخاطية للمضيف من سطوح الأنسجة الطلائية تعمل كنواة لتكوين الحصى فضلاً عن الكأس السكري الذي يعمل على جذب والتصاق مكونات الادرار.

الفحص اللوني لمكونات الرواسب بالطرق الكيميائية

أولا : الكشف عن أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم

بينت نتائج اختبار الكشف عن أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم وجود الأيونات بدلالة تغير اللون الى اللون الأحمر الخمري Wine red ثم الى اللون الأزرق كما موضح في الصورة (4).

بعد إضافة محلول الأمونيا المنظم (pH = 10) الى محلول الرواسب المقشوطة فان الأيونات الموجبة تصبح غير ذائبة نتيجة القاعدية العالية للمحلول وعند إضافة الدليل Eriochrome Black T تغير لون المحلول الى الأحمر الخمري دلالة على وجود أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم وعند التسحيح بإضافة محلول Na_2EDTA ببطء وبكميات كافية أحتلت جميع أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم موقع أيونات الصوديوم الموجودة في مادة التسحيح (Na_2EDTA) مما أدى الى تغير اللون الأحمر الخمري الى الأزرق دلالة على اختفاء هذه الأيونات من المحلول نتيجة لارتباطها بمادة التسحيح وتكوين مركبات معقدة ذائبة وهذه النتيجة مطابقة لما ورد في طريقة التسحيح باستخدام EDTA للكشف عن العسرة الناتجة عن أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم (9).

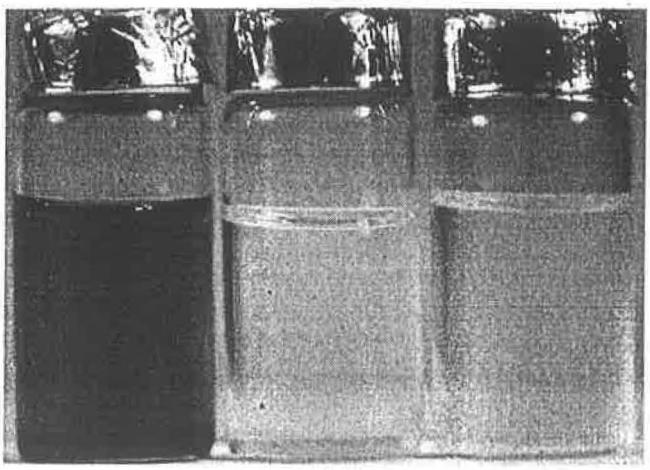


الصورة (4): نتائج الكشف عن ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم

ثانيا : الكشف عن أيونات الفسفور

بينت نتائج اختبار الكشف عن أيونات الفسفور وجود الأيونات بدلالة ظهور اللون الأزرق كما موضح في الصورة (5) وهذه النتيجة مطابقة لما ورد في طريقة الكشف عن الفسفور(9) أظهرت نتيجة الاختبارين السابقين ان الرواسب من سطوح الزجاجية المغمورة في الأدرار البشري المتكونة بفعل جرثومة *P. mirabilis* تحتوي على أيونات الكالسيوم

والمغنيسيوم والفسفور وهذه النتيجة مطابقة لما أشار اليه الباحث Mclean (15) ان تحليل الرواسب أعلاه باستخدام جهاز Energy dipersive x-ray analysis يكشف وجود الكالسيوم والمغنيسيوم والفسفور التي تمثل المكونات الرئيسية لبلورات struvite .



الصورة (5): نتيجة الكشف عن ايونات الفسفور

المصادر

1.Robert J.C. , Web site: http://www.urosurgeryhouston.com.htm(2003).
2.Ziyadeh F.N. and Goldfarb S. ," Nephrolithiasis". In Dc Dale, DD Federman, eds. ACP Medicine, Section 10, Chap. 12. New York: WebMD (2005).
3.Mathorea R.B.; Kok D.J.; Verduin C.M. and Nijman J.M., In fect. Immun. Dec.; Vol. 70, No. 12, p. 7022-7032(2002).
4.Hruska K. A.," struvite stones". CECIL. Text Book of Medicine(2004).
5.Coker C.; Poore, C. A.; Li X. and Mobley H. L. T., Microbs Infect. 2 : 1497 – 1505(2000).
6.Sabbuba N. A., Mahenthiralingam E. and Stickler D. J., J. Clin. Microbiol. Nov.; Vol. 14, No. 11, p. 4968-4965 (2003).
7.Torzewska A., Staczek P. and Rozalski A. , J. Med. Microbiol. Jun.; 52: 471-477(2003).
8.Koneman E. W., Allen S. D., Janada W. M., Schreckenberger P. C. and Winn W. C., "Color atlas and text book of diagnostic microbiology". 5th ed., Lippincott-Raben publishers, Philadelphia, USA(1997).
9.Rand M. C., Greenberg A. E. and Taras M. J.," Standard methods for the examination of water and waste". 4th. Ed., American Public health Association(1976).
10.Atlas R. M, Brown A. E. and Parks L. C. ,"Laboratory manual experimental microbiology". Mosby-Year book, Inc(1999).
11.AL_Rawi M. M. and AL_Sa,doon N. H. , j.Sci.Raf.(2006).
12.Mclean R. J. C., DowneY J., Clapham L. and Nickel J. C., J. Urol. Nov.; 144 (5) : 1267-1271(1990).
13.Stegmayr B. and Stegmayr B. , J. Urol. Nephrol. 17(2): 197-203(1983).
14.1Griffith D. P., struvite stones. kidney Intl. 13 : 372 – 382(1978).
15.Mclean R.J., Nickel J.C. Noakes V.C. and Costerton J.W. , Infect. Immun. Sep; 49 (3) : 805-811(1985).