الاستجابة المناعية لبعض مكونات الغلاف الخلوي للكلبسيلة الرئوية المسببة لمرض ذات الرئة على القداد (الهامستر)

*وعد زعير **د. ندى محفوض

الملخص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص 13 عزلة من جراثيم الكلبسيلة الرئوية من مرضى مراجعين للمخابر الخاصة في مدينة حمص مشخصين بإصابتهم بذات الرئة وبأعمار مختلفة هدفت أيضاً إلى استخلاص المحفظة الجرثومية المغلفة لجراثيم الكلبسيلة الرئوية والتحري عن الأضداد المتشكلة في حيوان التجربة (القداد) المحقون بها.

اخضعت للتجربة (12) هامستر سوري (قداد) قسمت إلى 4 مجاميع كل مجموعة تحتوي على 3 هامسترات، تم تحضير المعلق الجرثومي لتحديد الجرعة الممرضة بتحضير التمديدات من (10^{-1} -10^{-9}) وحقن 1000 µl من كل تمديد في منطقة غشاء البريتوان أما مجموعة الشاهد فحقنت ب 1000 µl من محلول PBS العقيم واختير التمديد10^{-6} الذي بلغ عدد الجراثيم عنده (7× 10^4 CFU/ml) كون جميع الهامسترات المحقونة بهذه الجرعة من الجراثيم ظهرت عليها علامات مرضية ولم تؤدي إلى نفوقها.

استخلصت المحفظة الجرثومية وتم تأكيد خلوها من البروتينات والدهون واعتماداً على المنحني القياسي لسكر الغلوكوز فقد بلغ تركيز المحفظة 5.82 mg/ml ، وحقنت الهامسترات ب 3 جرعات معززة كل جرعة 200 µl من مستضد المحفظة (CPS) في منطقة غشاء البريتوان وبفاصل 14 يوم بين الجرعة والأخرى وتمّ وزن الجسم خلال هذه الأيام وعند اليوم 14 تم حقن الهامسترات بالجرعة الممرضة وبعد 3 أيام تم سحب الدم واجراء تعداد دموي وتمّ وزن الكبد والطحال وحقنت مجموعة أخرى بالجرعة الممرضة فقط فأظهرت النتائج أن هناك فروق معنوية ($P < 0.05$) في وزن الجسم للهامسترات المحقونة بمستضد المحفظة والجرعة الممرضة بالمقارنة مع مجموعة الشاهد، في حين لم يكن هناك فروق معنوية في وزن الكبد والطحال. أظهرت نتائج التعداد الدموي وجود فروق معنوية عالية ($P<0.01$) في تعداد اللمفاويات للمجموعة المحقونة بالجرعة الممرضة فقط والمحقونة بالجرعة الممرضة ومستضد المحفظة والجرعة 10^{-5} ومستضد المحفظة وزيادة معنوية ($P<0,05$) في الخلايا البيضاء المحببة (GRA). كما تم اجراء اختبار الانتشار المناعي Ouchterlony test وأظهرت النتائج تحفيز استجابة مناعية في الهامستر حيث تم تمديد التركيز الأساسي للمحفظة البالغ 5.82 ملغ / مل بإجراء سلسلة تمديدات للحصول على تركيز محفظة مكافئ للمصل الممدد والذي بلغ 58.2 ميكروغرام/ مل من مستضد المحفظة الذي كافأ التمديد النصفي الأول للمصل وأعطى الخط الترسيبي وهذا يدل على وجود تكافؤ ما بين تركيز المستضد والمصل وتحفيز الاستجابة المناعية الخلطية.

الكلمات المفتاحية: كلبسيلة رئوية، هامستر، مستضد المحفظة، جرعة ممرضة، اختبار الانتشار المناعي اشترلوني.

.....

*طالبة ماجستير في قسم علم الحياة-كلية العلوم-جامعة حمص-سورية.

**أستاذ مساعد في قسم علم الحياة-كلية العلوم- جامعة حمص- سورية.

Immune response to some components of the cell envelope of Klebsiella pneumoniae causing pneumonia in hamsters.

***Waad Zair ** Nada Mahfoud**

Abstract

The study included the isolation and diagnosis of 13 isolates of Klebsiella pneumonia bacteria from patients of different ages who visited private laboratories in the city of Homs and were diagnosed with pneumonia. It also aimed to extract the encapsulated bacterial portfolio of Klebsiella pneumonia spores and investigate the antibodies formed in the injected experimental animal (Kaddad).

(12) Syrian hamsters (kaddad) were subjected to our experiment, divided into four groups, each group containing three hamsters; the bacterial suspension was prepared to determine the pathogenic dose by preparing extensions of ($10^{-1} – 10^{-9}$) and injecting 1000 µL of each concentration in the area of the peritoneum, the control group was injected with 1000 µL of sterile PBS solution and the dilution was selected 10^{-6}, the number of germs reached (7×10^{4} CFU/ml) the fact that all hamsters injected with this dose of germs showed signs of illness and did not lead to their death.

The bacterial capsule was extracted and made sure that it was free of proteins and fats, and its concentration was measured, as it reached 5.82 mg/ml; the hamsters were injected with three booster doses of

each dose of 200 µL of Capsular antigen (CPS) in the area of the peritoneum with an Interval of 14 days between one dose and the other and the body was weighed during these days and on Day 14 the hamsters were injected with the pathogenic dose. After three days, the blood was drawn A blood count was taken, and the liver and spleen were weighed. Another group was injected with the pathogenic dose, and the results showed significant differences ($p< 0.05$) in the body weight of hamsters injected with capsular antigen and the pathogenic dose compared with the control group. At the same time, there were no significant differences in the weight of the liver and spleen.

The results of the blood count showed highly significant differences ($P<0.01$) in the lymphocyte of the group injected with the pathogenic dose only and injected with the pathogenic dose and capsular antigen, dose $10^{-5}$and capsular antigen, and a significant increase ($P<0,05$) in granulocyte leukocytes (GRA). An Ouchterlony test was also performed and the results showed stimulation of an immune response in hamsters, The initial capsular concentration of 5.82 mg/ml was extended by a series of extensions to obtain a capsular concentration equivalent to the diluted serum, which amounted to 58.2 µg/ml of capsular antigen which indicates the existence of parity between the concentration of antigen and serum and stimulation of the humoral immune response.

Keywords: Klebsiella pneumonia, hamster, capsular antigen, pathogen dose, immune diffusion test Ouchterlony.

.....

*Student of Master Degree in Department of Biology- Faculty of Science- Homs University- Syria.

**Associate Professor- at Degree in Department of Biology- Faculty of Sciences- Homs University- Syria.

المقدمة:

ينتمي جنس الكلبسيلة إلى فصيلة الامعائيات (*Enterobacteriaceae*) وهي جراثيم عصوية الشكل، سلبية صبغة غرام، تتواجد على هيئة أزواج أو سلاسل قصيرة، يتراوح عرضها بين (1–0.3) ميكرومتر أمّا طولها فيتراوح بين (6 –0.6) ميكرومتر، وهي جراثيم غير متحركة لا هوائية اختيارية درجة الحرارة المثلى لنموها هي (37) مْ [1]. تخمر هذه الجراثيم سكر اللاكتوز Lactose، وقادرة على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون وتنتج انزيم اليورياز Urease، وانزيم لايسين دي كاربوكسيلاز Lysin decarboxylase لكنها غير منتجة لإنزيم الاورثينين دي كاربوكسيلاز ornithine decarboxylase، سلبية الاوكسيداز oxidase وفحص الاندول وفحص أحمر الميثيل وايجابية الكاتالاز catalase ولفحص فوكس بروسكاور voges Proskauer كما أن أنواع هذه الجراثيم تمتلك القابلية على تثبيت النتروجين [2,3]أما درجة الحموضة الأمثل لنمو الكلبسيلة تتراوح بين (8–6) pH [4].

تعد جراثيم الكلبسيلة ممرض انتهازي يمكن أن يحدث إصابة في أي مكان من الجسم والعدوى السائدة هي التهابات الجهاز التنفسي والتهابات المسالك البولية، وفي كثير من الأحيان يسبق العدوى استعمار الجهاز الهضمي حيث يُعتقد أنه مستودع لانتقال الجراثيم [5] كما أنها مقاومة لعملية البلعمة لاحتوائها على المحفظة وهي المستضد الأكثر أهمية في حماية الكلبسيلة الرئوية [6]، إذ تغلَف جراثيم الكلبسيلة بالمحفظة حيث تتكون من سكريات متعددة معقدة [7] وتشكل المحفظة حزماً سميكة من الهياكل الليفية التي تغطي السطح الجرثومي في طبقات ضخمة، بالتالي تظهر مستعمرات الكلبسيلة مخاطية متلألئة ذات قوام لزج [8] هذا يؤدي إلى حماية الجراثيم من البلعمة بوساطة الخلايا الحبيبية متعددة الأشكال من ناحية

ويمنع قتل الجراثيم بوساطة عوامل المصل من ناحية أخرى، يطلق على مادة المحفظة اسم المستضد (K) وتتكون من 4 إلى 6 سكريات وأحماض يورنيك كما تم العثور على مكونات غير سكرية مثل مجموعة الفورميل أو الأسيتيل والبيروفات المرتبطة بالكيتال [9]. ومن عوامل الضراوة التي تشترك بإمراضيتها أيضاً عوامل الالتصاق المتمثلة بالخمل وانتاج الذيفانات الداخلية مثل متعدد السكريد الشحمي، بيَن [6] إن لهذه الجراثيم القدرة على تحفيز الجهاز المناعي وبالذات المناعة الخلطية المتمثلة بإنتاج الأجسام المضادة والتي تؤدي دوراً هاماً في القتل أو المساعدة عن طريق البلاعم بعملية الطهاية opsonisation وهذا ما أكده الباحث [10] إلى أن هذه الجراثيم والمسماة K. pneumonia cps ذات المحفظة السميكة لها دور فاعل في تحفيز انتاج الأجسام الصادة. أما فيما يخص المناعة الخلوية فتعتمد قابلية المضيف وبشكل عام في الدفاع ضد الإصابات الجرثومية على التخلص السريع من الجراثيم بوساطة الخلايا العدلة Neutrophiles والبلاعم الكبيرة Macrophages إذ تقوم هذه الخلايا بالتعرف على الجراثيم ثم التهامها وقتلها بعملية البلعمة [6].

عوامل الضراوة:

-مستضدات المحفظة:Capsule antigen

تصنع العديد من أنواع الجراثيم كميات كبيرة من مواد خارج خلوية مؤلفة من متعدد سكريد ويطلق عليها مصطلح (Capsule) أو المادة المخاطية (Slime layer) وهي وحدات متكررة من متعدد السكريد تتكاثف بشكل طبقة وثيقة الارتباط وتحيط بالخلية

الجرثومية [11] وهي مركبات مناعية وغير سامة وقد تم استخدامها كحاثات في اللقاحات البشرية التجريبية السابقة [12]، وبناءً على تنوع مكونات السكريد في المحفظة والهياكل والمستضدات المختلفة تم تقسيم المحفظة في الكلبسيلة الرئوية إلى 79 نمط مصلي على الأقل، تمَّ وصف 8 أنواع k1 K2 K5 K16 K20 K54 K57 KN1 والأكثر شيوعاً هو K1 و K2 [13].

تعد المحفظة في جراثيم *Klebsiella* من عوامل الضراوة المحورية القادرة على إحداث الإمراضية في المضيف [14] تحتوي على حامض Hyaluronic acid كما في جراثيم *Streptococcus* أو حامض Sialic acid كما في جراثيم *Neisseria meningitis* [15] وتقوم المحفظة بحماية الجراثيم والتهرب من الجهاز المناعي للمضيف وذلك بمقاومتها للبلعمة والمتممة والببتيدات الصادة وذلك حسب دراسات سابقة أظهرت أن أنواع المحفظة K1,K2 تفتقر إلى المانوز والرامنوز والتي يمكن التعرف عليها من خلال مستقبلات البلاعم لحث البلعمة [16].

ليست كل الأنماط المصلية مرتبطة بالإمراضية في هذه الجراثيم إلا أنه في دراسة سابقة للأنماط المصلية لعينات جُمعت من الصينيين في الدول الآسيوية تبين أن معدلات الاستعمار المعوي للأنماط المصلية (K1,K2) كانت بين 18,8 – 87,7 % [17].

أهمية البحث وأهدافه:

تشكل الكلبسيلة الرئوية سبباً لالتهاب الجهاز التنفسي والسبب الثاني الأكثر شيوعاً لالتهاب المسالك البولية وازداد خطر الإصابة بهذه الجراثيم بعد مقاومتها للعديد من الصادات الحيوية. لذلك قمنا في دراستنا بتسليط الضوء على سكريات المحفظة الجرثومية لمعرفة أثر حقن هذه المحفظة الجرثومية في حيوان التجربة من الناحية المناعية وقدرة هذا الحيوان على تشكيل أضداد لهذا المستضد، وأيضاً لشح الدراسات المتعلقة بهذه الجراثيم مناعياً جاءت هذه الدراسة لتهدف إلى ما يلي:

1- عزل وتشخيص جراثيم الـ *Klebsiella pneumonia* من مرضى مصابين بإصابات تنفسية.

2- استخلاص المحفظة الجرثومية المغلفة لجراثيم الكلبسيلة والتحري عن الأضداد المتشكلة في حيوان التجربة (القداد) المحقون بها.

المواد وطرائق العمل

الأوساط الزرعية المستخدمة:

حضرت الأوساط الزرعية الملائمة لنمو العزلات الجرثومية حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الأس الهيدروجيني إلى 7 ثم عقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 15 رطل/ انش^2 لمدة 15 دقيقة، ومن ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها [18].

-جمع العينات:

جمعت (13) عزلة من الكلبسيلة الرئوية من مرضى ذات الرئة المراجعين للمخابر الخاصة في مدينة حمص في الفترة ما بين (22/11/2022- ولغاية 5/1/2023). زرعت العزلات على وسط آغار الدم وآغار مكونكي، وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24-18ساعة.

-تشخيص العزلات الجرثومية والصفات المجهرية:

شخصت العزلات الجرثومية من خلال دراسة الصفات الزرعية العامة للمستعمرات النامية على وسط آغار ماكونكي وآغار الدم، وبعدها درست أشكال المستعمرات الظاهرة وحددت على أساس لونها وحجمها وشكلها وقوامها. ثم أجري الفحص المجهري بعد صبغها

بصبغة غرام [19] وفُحصت تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي للتعرف على شكلها وتجمعها.

-اجراء الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية:

اجريت الاختبارات الكيموحيوية الآتية كما جاء في [18]:

1- اختبار الاوكسيداز والكاتالاز

2- اختبار إطلاق غاز الاندول

3- اختبار احمر الميثيل والفوكس بروسكاور

4- اختبار تمثيل السترات

وبالمقارنة مع النتائج المرجعية المبينة في [13] تم التشخيص الأولي لجراثيم K. pneumoniae بعد اجراء كافة الاختبارات البيوكيميائية المذكورة وتأكيدها بنظام API 20 E.

-اختبار التحسس للصادات الحيوية Antibiotic susceptibility test

حُسست العزلات الجرثومية المدروسة لصادات حيوية شائعة الاستخدام، اتبعت طريقة الانتشار بالآغار باستخدام أقراص مشبعة بالصادات الحيوية [20]، ثمّ تمّ تقييم نتائج الحساسية للصادات الحيوية بعد قياس أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص.

استخلاص السكريات المتعددة الكلية وتقدير كميتها:

تم استخلاص السكريات المتعددة الكلية وتقدير كميتها حسب طريقة Allen el al, (1987) [21].

الكشف عن البروتينات:

تم الكشف عن وجود البروتينات بالاعتماد على طريقة Bradford حسب [22].

الكشف عن الدهون: تم الكشف عن وجود الدهون بالاعتماد على طريقة الأكرولين حسب [23].

المرحلة الأولى: تهيئة حيوانات التجربة وتحديد الجرعة الممرضة للكلبسيلا الرئوية Infective dose:

استعمل في هذه التجربة (12) هامستر سوري (القداد) مع مراعاة نظافة مياه الشرب والعلف والتعقيم بين الحين والآخر، وضعت الهامسترات في أماكن مفروشة بنشارة الخشب وتمّ تغذية الحيوانات باستخدام العلف الجاهز ومياه الشرب العادية.

لتحديد الجرعة الممرضة التي تظهر علامات مرضية على الهامستر ولكن لا تؤدي إلى موته حُضّر العالق الجرثومي وذلك بأخذ 10 مل من مرق نقيع القلب والدماغ المعقّم ولُقّح بـ 1مل من مزروع حديث من الـ *klebsiella pneumonia* وحضن بدرجة حرارة 37م° مدّة 18ساعة، ثم أُجري لها عملية طرد مركزي وبسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدّة 5 دقائق، ثمّ غسل راسب الخلايا مرتين بمحلول دارئ ملحي فوسفاتي PBS معقّم ذو pH 7.2، عُلّق الراسب بـ 1000 ميكرولتر من PBS ومُزج جيداً وحُددت عكارته بالمقارنة مع أنبوب ماكفرلاند 0.5، ثمّ حضرت التمديدات الآتية:

(10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7}، 10^{-8}،10^{-9}) ومن كل تمديد تمّ عد الخلايا باستخدام طريقة العد بالأطباق وتدوين النتائج، اختيرت التمديدات (10^{-5}،10^{-6}، 10^{-7}) وأخذ من هذه التمديدات الثلاث 1000 ميكرولتر وحقنت بمنطقة غشاء البريتوان للهامستر.

قُسّمت الهامسترات إلى 4 مجاميع كل مجموعة تحتوي على 3 هامسترات حُقنت المجاميع الثلاثة الأولى بـ 1000 ميكرولتر من كل تمديد في منطقة غشاء البريتوان أمّا المجموعة الرابعة فقد عدت مجموعة شاهد وحقنت بـ 1000 ميكرولتر من PBS وتمّ مراقبة الحيوانات مدة 15 يوم لتحديد الجرعة الممرضة غير المميتة وفق ما جاء في [24]

المرحلة الثانية:

تم سحب دم الهامسترات المحقونة وتم تعداد الخلايا الدموية بعد 15 يوم من الحقن ومقارنتها مع تعداد الخلايا الدموية للشاهد المحقون بـ 1000 ميكرولتر PBS بمنطقة غشاء البريتوان.

المرحلة الثالثة: اختبار سلامة عديد السكريد المحفظي للكلبسيلا الرئوية

تمّ حقن 3 من الهامسترات بمقدار 1000 ميكرولتر من مستضد السكريد المحفظي بمنطقة غشاء البريتوان ومراقبتها مدة أسبوع للتأكد من عقامة اللقاح المستعمل على حيوان التجربة (عدم ظهور علامات مرضية على الفئران دليل على عقامة اللقاح) [25].

المرحلة الرابعة:

وزن الهامسترات قبل الحقن ثم حقن الهامسترات بـ 3 جرعات معززة كل جرعة 200 ميكرولتر من (CPS) في منطقة غشاء البريتوان وبفاصل 14 يوم بين الجرعة والأخرى ووزن الجسم خلال هذه الأيام وعند اليوم الـ 14 حقن الهامسترات بالجرعة الممرضة من الجراثيم وفي اليوم الثالث تمَ سحب الدم وقرأت النتائج ثم تمّ تشريح الهامسترات ووزن كل من الكبد والطحال.

المرحلة الخامسة: اختبار الانتشار المناعي Ouchterlony test:

تم اجراء اختبار الانتشار المناعي عن طريق إجراء سلسلة تمديدات لـ (CPS) ووضعت في الحفرة المركزية وسط الطبق كلّاً على حدة وتمديدات المصل الصاد وضعت في الحفر الخارجية ظهور خط الانتشار المناعي يعني النتيجة إيجابية.

النتائج والمناقشة:

-الصفات المزرعية:

تمت دراسة الصفات المزرعية على وسط الآغار المغذي فأظهرت نتائج الزرع مستعمرات بيضاء ملساء زبدية القوام مدورة ومحدبة وجميع هذه الصفات تتفق مع المواصفات العامة لمستعمرات الكلبسيلة الرئوية التي تم ذكرها في [26]، وعلى وسط ماكونكي باعتباره وسط تفريقي – انتقائي، فهو انتقائي من جهة لأنه يحتوي على صبغة Crystal Violet المثبطة لنمو الجراثيم الموجبة لصبغة غرام كما يحتوي على ملح Bile salt المثبط لنمو الجراثيم السالبة لصبغة غرام ما عدا مجموعة الجراثيم المعوية (Enteric Bacteria) ومن ناحية أخرى يعد هذا الوسط وسطاً تفريقياً لأنه يميز بين الجراثيم المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز، فيحتوي هذا الوسط على اللاكتوز والأحمر المتعادل الذي يعد دليلاً للرقم الهيدروجيني (pH Indicator) لذا فإن المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز تنتج حامضاً يعمل على تغيير اللون إلى الأحمر [27] ، لذلك بدت المستعمرات مخاطية القوام زهرية اللون بسبب قدرة الجراثيم على تخمر اللاكتوز، أما على وسط الآغار المدمى

فقد كانت شفافة لماعة مع عدم قدرتها على تحلل الدم وكان التحلل من النوع غاما وجميع هذه الصفات تتفق مع الصفات العامة لمستعمرات الكلبسيلة الرئوية التي تم ذكرها في [28] [29].

-**الفحص المجهري بعد تلوينها بصبغة غرام:** بينت نتائج الفحص المجهري للعزلات الجرثومية بعد تحضير الشرائح المجهرية كما ذكر سابقاً في [19] أن جراثيم الكلبسيلة الرئوية أخذت شكل عصيات حمراء اللون كونها (سالبة لصبغة غرام) مستقيمة أطرافها مستديرة وهذا ما يتفق مع ما بينه [29].

-**الاختبارات الكيموحيوية للجراثيم:**

أجريت الاختبارات الكيموحيوية وشُخصت *K. pneumonia* بالاعتماد على صفاتها المظهرية والاختبارات الكيموحيوية وفق الجدول (1).

الجدول (1): الاختبارات الكيموحيوية والزرعية لتشخيص جراثيم *K. pneumonia*

اسم الاختبار	نتيجة الاختبار
Oxidase test	-
Catalase test	+
Indol production test	-
Methyl red test	-
Voges proskauertest	+
Citrate utilization test	+

وبالاعتماد على نتائج الاختبارات المجهرية والزرعية والكيموحيوية وفقاً لما ورد في [9] إن العزلات هي من نوع *K. pneumonia* وللتأكد من التشخيص تمّ استخدام عدّة التشخيص Api20 E التي تمتاز بالسهولة والسرعة لتأكيد نتائج التشخيص الكيموحيوي جدول (2).

جدول (2): نتائج اختبارات المسطرة البيولوجية Api 20 E على الكلبسيلة الرئوية

الاختبار	النتيجة
Orth−Nitrophenyl−β−Galactoside (ONPG)	+
Decarboxylation of the amino acid arginine by arginine De hydrolase (ADH)	−
Decarboxylation of the amino acid lysine by lysine decarboxylase (LDC)	+
Decarboxylation of the amino acid ornithine by ornithine decarboxylase (ODC)	−
Utilization of citrate as only carbon source (CIT)	+

–	Production of hydrogen sulfide (H2S)
+	Test for the enzyme urease (URE)
–	Tryptophan deaminase (TDA)
–	Indole test production (IND)
+	The Voges–Proskauer test (VP)
–	Test for the production of the enzyme gelatinase which liquefies gelatin (GEL)
+	Fermentation of glucose (GLU)
+	Fermentation of Mannose (MAN)
+	Fermentation of inositol (INO)
+	Fermentation of sorbitol (SOR)
+	Fermentation of rhamnose (RHA)
+	Fermentation of sucrose (SAC)
+	Fermentation of melibiose (MEL)
+	Fermentation of amygdalin (AMY)
+	Fermentation of arabinose (ARA)

-نتائج مقاومة العزلات الجرثومية لبعض الصادات الحيوية:

حُددت مقاومة العزلات الجرثومية قيد الدراسة تجاه 7 صادات حيوية شائعة الاستخدام وتمّ قياس قطر منطقة التثبيط اعتماداً على طريقة Bauer– Kirby كما أوصت CLSI باستخدام آغار موللر هنتون [20] وقد استعملت مجموعة من صادات الأمينوكلايكوسيدات ومجموعة البنسلينات ومجموعة السيفالوسبورينات ومجموعة الكاربابينيمات.

أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة تجاه صاد Cefotaxime وهو من سيفالوسبورينات الجيل الثالث وبلغت النسبة 69,23 % وهذه نتيجة توافق [30] إذ كانت مقاومة العزلات لهذا الصاد 70 % وتختلف هذه النتائج عن دراسات الباحثين [11] [31] إذ بلغت نسبة المقاومة 100 % و 81,8% على التوالي تجاه هذا الصاد ويعود الاختلاف في مقاومة هذا الصاد إلى الاستعمال الواسع له وامتلاك بعض جراثيم الكلبسيلة الرئوية بلازميد كبير الحجم يمنحها المقاومة لصاد Cefotaxime [32].

وأظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة لصاد Ceftriaxone والذي يعود إلى مجموعة السيفالوسبورينات الجيل الثالث وبلغت النسبة 76,92% حيث تختلف هذه النتائج عن دراسة [33] حيث بلغت نسبة المقاومة 27 % وقد يكون هذا مرتبطاً بامتلاك انزيمات β– lactamase (السيفالوسبوريناز) التي تكون قادرة على تعطيل السيفالوسبورينات من خلال شطر حلقة β– lactam للدواء [33].

بلغت نسبة مقاومة العزلات قيد الدراسة تجاه الصاد Amikacen وهو من مجموعة الصادات الأمينوكلايكوسيدات واسعة الطيف التي تعمل على مواقع تخليق البروتينات في الخلايا الجرثومية وتعود هذه المقاومة إلى تحوير الانزيمات [34] 15,38% وهي نتيجة قريبة لما توصل إليه [33] حيث بلغت النسبة 17,5 % وتختلف عن [30] إذ بلغت نسبة المقاومة 90 % ويعود السبب في المقاومة نتيجة الاستعمال المتكرر لهذه الصادات منذ سنوات.

من جهة أخرى بلغت حساسية العزلات قيد الدراسة تجاه صاد Amikacin في هذه الدراسة 53,84 % وكانت النسبة متقاربة مع ما جاء [36] حيث بلغت نسبة الحساسية لهذا الصاد 56 % ولا تتفق مع [11] [36] حيث بلغت 81,8 % و66 % على التوالي، ويعود سبب حساسية العزلات لهذا الصاد بسبب نطاق علاجه الضيق Narrow Therapeutic Index والمتمثل بسميته داخل الجسم وآثاره الجانبية [37].

من مجموعة البنسلينات التي تعمل على منع تركيب جدار الخلية الجرثومية /Amoxi Clavulanic –Acid وجد أن مقاومة الجراثيم في دراستنا لهذا الصاد كانت بنسبة 69,23% تتفق مع ما ورد في دراسة [38] حيث كانت نسبة المقاومة 69 % ولا تتفق مع [39] إذ بلغت نسبة المقاومة 82 %.

أما صاد Imipenem الذي ينتمي لمجموعة البيتا لاكتام فهو مقاوم لمعظم انزيمات البيتالاكتاميز، لكن يتحطم بالانزيم الكلوي Dehyropeptidase عندما يعطى لوحده لذا يعطى مع مركب Cilastatin لمنع هذا التثبيط [40].

من نتائج فحص الحساسية لهذا الصاد كانت نسبة حساسية العزلات قيد الدراسة 76,92 % حيث تختلف هذه النسبة عما جاء في دراستي [31] [11] فقد بلغت نسبة الحساسية للعزلات 100% لهذا الصاد.

لوحظ أن العزلات قيد الدراسة مقاومة بنسبة 30,76 % اتجاه صاد Meropenem أما بالنسبة لحساسية هذا الصاد فقد بلغت في هذه الدراسة 46,15 % ولا تتفق مع ما ورد في [41] حيث كانت نسبة الحساسية 92,5 %.

من خلال هذه النتائج التي توصلنا إليها تبين أن معظم العزلات كانت مقاومة لأكثر من صاد حيوي في حين سجلت أعلى نسبة حساسية لصاد Imipenem لذلك يمكن أن يكون هذا الدواء الأفضل لعلاج حالات الالتهاب الناتجة عن الكلبسيلة الرئوية.

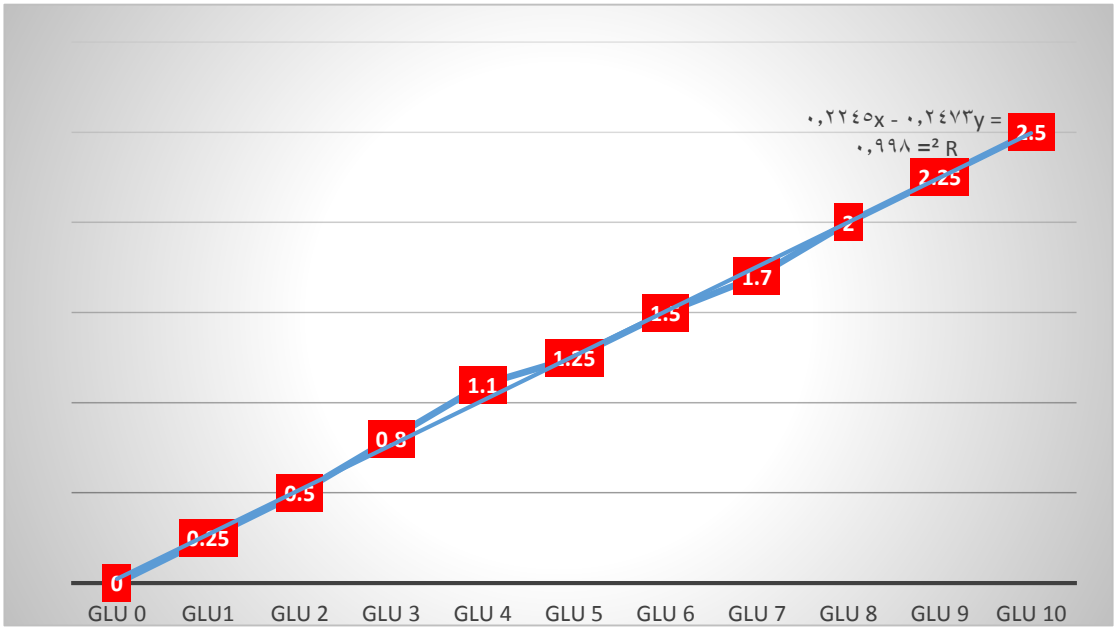
-نتيجة الكشف عن خلو مستضد المحفظة من البروتينات والدهون:

بينت نتيجة الكشف عن خلو مستضد المحفظة (ذات التركيب الكيميائي عديد السكريد) المبين في [11] من البروتينات وكانت النتيجة سلبية وذلك حسب طريقة Bradford [22] وخلوها من الدهون لعدم ظهور بخار ورائحة لاذعة وهذا ما ذكر في طريقة الأكرولين

[23] وبالاعتماد على المنحنى القياسي للغلوكوز فقد بلغ تركيز السكريات في مستضد المحفظة 5.82 ملغ / مل. جدول (3). شكل (1).

جدول (3): يوضح نتائج تراكيز مختلفة للغلوكوز عند طول موجة 440 نانومتر

تركيز الغلوكوز	OD 440 nm
0	**0.0**
1	**0.25**
2	**0.5**
3	**0.8**
4	**1.1**
5	**1.25**
6	**1.5**
7	**1.7**
8	**2**
9	**2.25**
10	**2.50**



شكل (1): المنحنى القياسي لتراكيز مختلفة من الغلوكوز

-تحديد الجرعة الممرضة لجراثيم الكلبسيلة:

تم تحديد الجرعة الممرضة لجراثيم الكلبسيلة الرئوية بعد حقن الهامسترات في منطقة غشاء البريتوان بمجموعة التمديدات التي تم ذكرها سابقاً وبلغ عدد الجراثيم

(7 ×10^4 CFU/ml) للتمديد 10^{-6} حيث أن جميع الهامسترات المحقونة بهذه الجرعة من الجراثيم كانت على قيد الحياة ولكن ظهرت عليها أعراض مرضية وهي حمى، بول حليبي، وخمول. كانت هذه الأعراض مشابهة لما جاء في [6] في حين تختلف النتيجة في الجرعة الممرضة فقد بلغت في دراسته

(3×10^9 CFU/ml) كما وتختلف معه من حيث حيوانات التجربة المستخدمة فقد اعتمد في تجربته على الارانب أما في دراستنا فقد تم الاعتماد على الهامستر السوري.

- التحقق من عقامة وسلامة اللقاح:

تم التحقق من عقامة مستضد المحفظة عن طريق زرع 1000 ميكرولتر من المحفظة على الآغار المغذي والآغار المدمى ولم يظهر أي نمو جرثومي على الأوساط وبعد حقنها بالهامستر لم يظهر عليها أعراض مرضية.

- سحب الدم من الهامستر:

تم سحب الدم من الهامستر بعد 3 أيام من الحقن واجراء عدة قياسات تضمنت وزن الجسم والكبد والطحال وحساب العدد التفريقي لكريات الدم البيضاء وذلك حسب [42] جدول (4,5).

جدول (4): نتائج تعداد أنواع الكريات الدم البيضاء في مجموعة الشاهد والمحقونة بالجرعة الممرضة من جراثيم الكلبسيلة الرئوية ومستضد المحفظة

المعاملة	المعاملات				sig
	الشاهد	جرعة ممرضة فقط	مستضد المحفظة + جرعة ممرضة 6	مستضد المحفظة + جرعة ممرضة 5	
لمفاويات	64.6 ± 7.49	72.64 ± 8.31	57.8 ± 6.08	13.3 ±3.04	0.004**
الخلايا البيضاء المحببة 10^3/ml GRA	0.33 ± 0.007	0.12 ± 0.02	0.17 ± 0.02	1.31 ± 0.08	0.019*

أظهرت النتائج وجود فروق معنوية عالية ($P< 0.01$) في تعداد اللمفاويات وزيادة معنوية ($P<0.05$) في الخلايا البيضاء المحببة (GRA) وهذا يختلف مع ما وجده [42] الذي لم يجد فروق معنوية في معدل أعداد الكريات البيضاء وذلك ربما بسبب اختلاف حيوان التجربة المستخدم واستخدامه لجراثيم الكلبسيلة المضعفة فقط في تجربته.

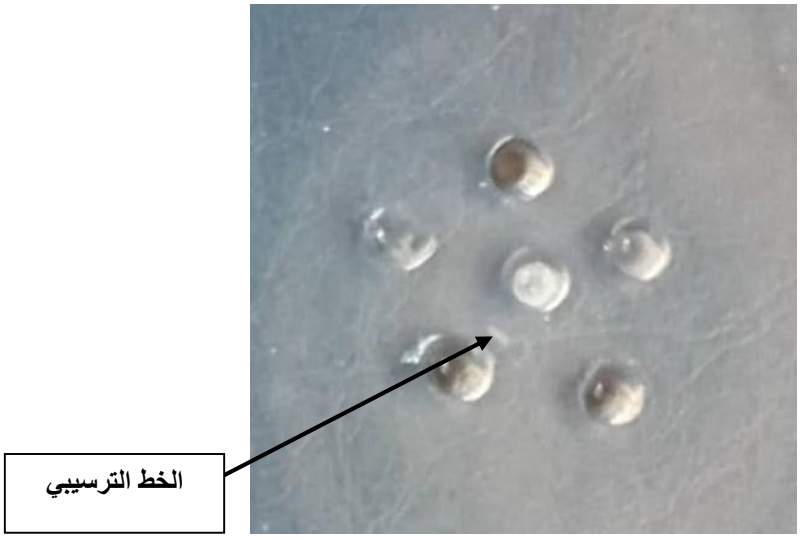
جدول (5): نتائج وزن الجسم والكبد والطحال مقدراً بالغرام (g) لمجموعة الشاهد بالمقارنة مع المجموعة المحقونة بالجرعة الممرضة فقط ومستضد المحفظة فقط والجرعة الممرضة ومستضد المحفظة معاً

المعاملة	المعاملات				sig
	الشاهد	جرعة ممرضة فقط	مستضد المحفظة فقط	مستضد المحفظة + جرعة ممرضة	
وزن الجسم	102 ± 2.14	103 ± 3.27	105.33 ± 4.08	106 ± 3.11	0.047*
وزن الكبد	4 ± 0.53	5 ± 0.29	4 ± 0.76	6 ± 0.88	0.16 (N.S)
وزن الطحال	1 ± 0.07	1 ± 0.05	1.3 ± 0.03	1 ± 0.04	0.54 (N.S)

من جانب آخر أظهرت النتائج أن هناك فروق معنوية ($P<0.05$) في وزن الجسم للهامسترات المحقونة بالجرعة الممرضة والمحقونة بمستضد المحفظة بالمقارنة مع الهامسترات غير المحقونة بكلا المعاملين وهذا ما أكدته دراسة [42] أن الزيادة في وزن الجسم تنتج عن التغيير في بعض المسارات الأيضية والتي كانت ربما بسبب دخول مستضد الى جسم الهامستر وهذا مؤشر لاستجابة الهامستر للمستضد، في حين لم يكن هناك فروق معنوية في وزن الكبد والطحال.

- **نتائج اختبار الانتشار المناعي Ouchterlony test:**

أظهرت نتائج اختبار الانتشار المناعي Ouchterony تحفيز استجابة مناعية خلطية في الهامستر حيث بلغ تركيز مستضد المحفظة (58.2 µg/ ml) والمصل الذي أعطى الخط الترسيبي هو التخفيف النصفي الأول وهذا يدل على وجود تكافؤ ما بين تركيز المستضد والمصل الصاد مما أدى إلى تشكيل معقد ضد– مستضد وتحفيز استجابة مناعية خلطية وهذا ما أكدته بعض التجارب التي أجريت في أمريكا حيث أن مستخلص المحفظة متعددة السكريد تحفز المناعة الخلطية وتمنح الحماية ضد عدوى K. pneumoniae [43].



الشكل (2): الخط الترسيبي عند التخفيف النصفي الثاني

الاستنتاجات:

1-أظهر اختبار Ouchterlony حدوث استجابة مناعية خلطية بعد حقن مستضد المحفظة في الغشاء البريتواني للهامستر.

2-تركيز مستضد المحفظة (58,2 µg/ ml) هو التركيز الأفضل لتحفيز الاستجابة المناعية في دراستنا.

التوصيات:

1- التوسع في دراسة الناحية المناعية لمستضد المحفظة بهدف إيجاد لقاح فعال ضد جراثيم الكلبسيلة الرئوية.

2- اجراء دراسة مناعية متقدمة عن مستضد محفظة الكلبسيلة الرئوية.

المراجع:

[1]. Pavan, H. K., Shreevatsa, B., Dharmashekara, C., Shruthi, G., Prasad, K. S., Patil, S. S., & Shivamallu, C. (2022). Review of known and unknown facts of Klebsiella pneumoniae and its relationship with antibiotics. *Biomedical & Pharmacology Journal*, *15*(2), 643-650.

[2]. Sharmeen, R., Hossain, M. N., Rahman, M. M., Foysal, M. J., & Miah, M. F. (2012). In vitro antibacterial activity of herbal aqueous extract against multi-drug resistant Klebsiella sp. Isolated from human clinical samples. *International Current Pharmaceutical Journal*, *1*(6), 133-137.

[3]. Hansen, D. S., Aucken, H. M., Abiola, T., & Podschun, R. (2004). Recommended test panel for differentiation of Klebsiella species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *Journal of clinical microbiology*, *42*(8), 3665-3669.

[4]. Mitrea, L., & Vodnar, D. C. (2019). Klebsiella pneumoniae—A useful pathogenic strain for biotechnological purposes: Diols biosynthesis under controlled and uncontrolled pH levels. *Pathogens*, *8*(4), 293.

[5]. Struve, C., & Krogfelt, K. A. (2004). Pathogenic potential of environmental Klebsiella pneumoniae isolates. *Environmental microbiology*, *6*(6), 584-590

[6] . محمد، حسام مجيد، حمادي، خالد محمود. (2022). دراسة مناعية للأرانب المحقونة تجريبيا ببكتريا الكلبسيلة الرئوية والمعزولة من التهابات المجاري البولية في الإنسان. مجلة الدراسات التربوية والعلمية، العدد 20، قسم علم الحياة، كلية التربية، الجامعة العراقية. ص 94- 101.

[7]. Ørskov, I., & Ørskov, F. (1984). 4 serotyping of Klebsiella. In *Methods in microbiology* (Vol. 14, pp. 143-164). Academic Press.

[8]. Amako, K. A. Z. U. N. O. B. U., Meno, Y. U. K. O., & Takade, A. K. E. M. I. (1988). Fine structures of the capsules of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli K1. *Journal of bacteriology*, *170*(10), 4960-4962.

[9]. Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, *11*(4), 589-603.

[10]. Darwesh, M. F. (2012). Test of efficacy of capsular polysaccharide antigen of Klebsiella pneumonia in stimulation of immune response in albino mice. *Al-Qadisiyah Medical Journal*, *8*(14), 15-25.

[11]. Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A., & Klemm, P. (2005). Capsule and fimbria interaction in Klebsiella pneumoniae. *Infection and immunity*, *73*(8), 4626-4633.

[12]. Singh, S., Wilksch, J. J., Dunstan, R. A., Mularski, A., Wang, N., Hocking, D., … & Strugnell, R. A. (2022). LPS O antigen plays a key role in Klebsiella pneumoniae capsule retention. Microbiology Spectrum, 10(4), e01517-21.

[13] Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence factors in hypervirulent Klebsiella pneumoniae. *Frontiers in microbiology*, *12*, 642484.

[14] Damian, M., Usein, C. R., Palade, A. M., Ceciu, S., & Cosman, M. (2009). Molecular epidemiology and virulence characteristics of Klebsiella pneumoniae strains isolated from hospital-associated infections. *The Open Epidemiology Journal*, *2*(1).

[15]. Clements, A., Gaboriaud, F., Duval, J. F., Farn, J. L., Jenney, A. W., Lithgow, T., ... & Strugnell, R. A. (2008). The major surface-associated saccharides of Klebsiella pneumoniae contribute to host cell association. *PLoS One*, *3*(11), e3817.

[16]. Athamna, A. B. E. D., Ofek, I. T. Z. H. A. K., Keisari, Y., Markowitz, S., Dutton, G. G., & Sharon, N. (1991). Lectinophagocytosis of encapsulated Klebsiella pneumoniae mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infection and immunity*, *59*(5), 1673-1682.

[17]. Lin, Y. T., Siu, L. K., Lin, J. C., Chen, T. L., Tseng, C. P., Yeh, K. M., ... & Fung, C. P. (2012). Seroepidemiology of Klebsiella pneumoniae colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries. *BMC microbiology*, *12*, 1-7.

[18]. Varghese, N., Joy, p.p. (2014). Microbiology laboratory manual.

[19]. Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The gram stain. *Bacteriological reviews*, *16*(1), 1-29.

[20]. Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol.

[21]. Allen, P., Hart, C. A., and Saunders, J. R. (1987). Isolation from *Klebsiella* and characterization of two rcs genes that activate colonic acid capsular biosynthesis in Escherichia coli. Microbiology, 133(2), 331-340.

[22]. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.

[23]. A.O.A.C. (2008). Offical methods of analytical chemists international arligton, Viriginia, USA.

[24]. Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World journal of virology*, *5*(2), 85.

[25]. الشمرى، مهدى حسين محيل. الرماحى، انغام جاسم محمد علي. الفتلاوي، حقى عبد العباس. (2010). امكانية استخدام مستضد Virulence Antigen كلقـــاح ضد البكتيريـــا Salmonella *typhi* فى حيوان المختبر. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة (2) 2.

[26]. Adwan, G. (2016). *Prevalence and molecular characterization of β-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from North of Palestine*. An-Najah National University. Nablus. Palestine.

[27]. Jung, B., & Hoilat, G. J. (2022). MacConkey medium. In *StatPearls [internet]*. StatPearls Publishing.

[28] Al-Jader, Z. W., & Ibraheem, S. N. (2022). Molecular detection of some pathogenic bacteria (Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli) from human saliva. *Journal of Microbial Biosystems*, *7*(1), 32-38.

[29]. Wu, X., Liu, J., Feng, J., Shabbir, M. A. B., Feng, Y., Guo, R., ... & Wang, Y. (2022). Epidemiology, environmental risks, virulence, and resistance determinants of Klebsiella pneumoniae from dairy cows in Hubei, China. *Frontiers in microbiology*, *13*, 1-14.

[30]. محمد، حسام مجيد. حمادي، خالد محمود. (2022). عزل وتشخيص بكتريا الكلبسيلة الرئوية من إصابات المجاري البولية في الإنسان ودراسة حساسيتها للصادات الحيوية. مجلة الدراسات التربوية والعلمية، العدد 20، قسم علم الحياة، كلية التربية، الجامعة العراقية. ص 154-158.

[31]. حمدي، نغم معد. نجيب، ليث مصلح. (2016). عزل وتشخيص بكتريا الكلبسيلة *klebsiella spp* من مواقع بيئية مختلفة واجراء دراسة مقارنة لحساسية العزلات تجاه بعض الصادات الحيوية. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة. العدد الأول. كلية العلوم. جامعة الأنبار. ص1-6.

[32]. Li, L., & Lim, C. K. (2000). A novel large plasmid carrying multiple β-lactam resistance genes isolated from a Klebsiella pneumoniae strain. *Journal of applied microbiology*, *88*(6), 1038-1048.

[33]. Nasehi, L., SHAH, C. F., Nikbin, V. A. S., & Nematzadeh, S. H. (2010). PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran. 13 (3). 111-118.

[34]. Hashim, S. T., Saleh, T. H., Abdul, F. R., & AL-Rubaii, B. A. L. (2020). Mechanism action and resistance style of antibiotics. *International Journal of Medical and Biomedical Studies*, *4*(2). 128-136.

[35]. Sarojamma, V., & Ramakrishna, V. (2011). Prevalence of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae isolates in tertiary care hospital. *International Scholarly Research Notices*, *2011*(1), 1-5.

[36]. Shilpa, K., Thomas, R., & Ramyashree, A. (2016). Isolation and Antimicrobial sensitivity pattern of Klebsiella pneumoniae from sputum samples in a tertiary care hospital. *Int J Biomed Adv Res*, *7*(2), 53-57.

[37]. Aquino, M., Tinoco, M., Bicker, J., Falcão, A., Rocha, M., & Fortuna, A. (2023). Therapeutic drug monitoring of amikacin in neutropenic oncology patients. *Antibiotics*, *12*(2), 373.

[38]. Jamil, I., Zafar, A., Qamar, M. U., Ejaz, H., Akhtar, J., & Waheed, A. (2014). Multi-drug resistant Klebsiella pneumoniae causing urinary tract infections in children in Pakistan. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(4), 316-319.

[39]. Toroglu, S., & Keskin, D. (2011). Antimicrobial resistance and sensitivity among isolates of Klebsiella pneumoniae from hospital patients in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, *13*(6). 942-946.

[40]. المرجاني، محمد فرج. (2011). الصادات الحيوية المقاومة البكتيرية للصادات الحيوية. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

[41]. Amin, A., Ghumro, P. B., Hussain, S., & Hameed, A. (2009). Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from a Tertiary Care Hospital in Pakistan. *Malaysian Journal of Microbiology*, *5*(2), 81-86.

[42]. العاني، يوسف رافع جمعة. نجيب، ليث مصلح. وآخرون. (2011). دراسة بعض التغيرات المناعية الناتجة عن تلقيح الأرانب المحلية ببكتريا *klebsiella* المضعفة. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، العدد (2)، كلية الطب البيطري، كلية العلوم، جامعة الأنبار. ص 188 – 192.

[43]. Ahmad, T. A., El-Sayed, L. H., Haroun, M., Hussein, A. A., & El Sayed, H. (2012). Development of immunization trials against Klebsiella pneumoniae. *Vaccine*, *30*(14), 2411-2420.