دراسة التفاعل المصلي التلازني المعكوس بين جرثومتي Klebseilla pneumonia وEnterobacter cloacae

رسمية عبد ابو ريشة ؛ نغم شاكر و بايولوجي ياسمين لطيف

كلية العلوم ، قسم علوم الحياة.

الخلاصة

استهدف البحث دراسة التفاعل المصلي بين جنس Enterobacter و klebseilla لغرض التأكد من وجود أو عدم وجود تفاعل مصلي بين المصول المحضرة ضد الجرثومتين حيث حُقن أرنبان بعالق جراثيم Klebseilla pneumoniae و Enterobacter cloacae بعد معاملتها بالفورمالين. لغرض الحصول على المصول الممنعة التي أُستخدمت في اختبار التلازن المباشر. واستخدم ارنب آخر كسيطرة حيث حُقن بالمحلول الملحي الفسيولوجي (Saline). تراوحت عيارية مصول الارانب الممنعة المحضرة ضد بكتيريا Klebseilla بين (640–2560) في تفاعل المماثل Homologous وتراوحت بين (20–40) في تفاعل Hetrologous مع عالق جراثيم Enterobacter . في حين تراوحت عيارية الاضداد للمصول الممنعة ضد جراثم Enterobacter بين (640–1280) في تفاعل Homologous وتراوحت بين (10–20) في تفاعل Heterologous مع عالق جراثيم Klebseilla .وكانت حدود العينة لمصول السيطرة هي (76، 96.5) على التوالي. تبين من هذا عدم وجود تفاعل تصالبي بين مصول جراثيم Klebseilla وعالق جراثيم Enterobacter وبين مصول جراثيم Enterobacter وعالق جراثيم Klebseilla ،أي تفاعلات Heterologous . يتبن من هذه النتائج عدم وجود تفاعل تصالبي بين المصول الموجبة للجرثومتين وخلايا الجراثيم المقتولة، تعطي هذه النتائج مؤشراً حول امكانية استخدام المستضدات الجسمية لهذه الجراثيم في تشخيصها مصلياً.

المقدمة:

تعد الكليبسيلة الرئوية (Klebseilla pneumonia) من الممرضات الانتهازية (apportunistic) pahogenes واحدى مسببات الخمج المكتسب في المستشفيات (Hospital acquired infections) .(1،2) وهي من الاجناس العائدة للعائلة المعوية (Enterobacteriacae)، عزلت الكليبسيلة الرئوية من المياه السطحية والمجاري والتربة والسطوح المخاطية للانسان والمسببة لخمج المجاري البولية والتنفسية وانتان الدم .(3)، وعرفت بانها مسببة للامراض المتوطنة (Endemic diseases) والوبائية (epidemic) بسبب قدرتها على استيطان الاغشية المخاطية ومقاومتها للمضادات الحيوية (4). تتميز هذه الممرضات بأنها عصيات سالبة لملون غرام حاوية على كبسولة مكونة من عديد السكريد وهي لاهوائية اختيارية وغير متحركة وتمتلك العديد من عوامل الضراوة (Virulence factors) وهذه الصفة اكسبتها القدرة على الامراضية (5،6).

جنس Enterobacter هو أيضاً من الاجناس العائدة للعائلة المعوية Enterobacteriacae، يضم الجنس عدة انواع، واكثر الانواع المعروفة هما النوعين Aerogenes و Cloacae (7). وهي من الاجناس المنتهزة للفرص تميز بانها عصيات سالبة لملون غرام متحركة بعضها حاوية على كبسولة، هوائية اختيارية، تخمر سكر اللاكتوز والكلوكوز بدون انتاج H_2S (8،9).

تمتلك العائلة المعوية (Enterobacteriacae) ثلاثة مجاميع من التراكيب المستضدية وهي المستضدات السطحية O- Antigen المتمثلة بالـ Lps والمستضدات K وهي مستضدات الكبسولة للأجناس الحاوية على الكبسولة اضافة إلى المستضدات H-Antigen وهي Flagellar Antigrn للأجناس الحاوية على Flagella وجد أن بعض أفراد العائلة المعوية تمتلك مستضدات متشابهة وهذا يعني وجود تفاعل تصالبي بين مستضداتها عند أجراء تفاعلات التلازن. ووجد أن أغلب التفاعلات المتصالبة تعود للمستضدات السطحية O- Antigen حيث وجد أن مستضدات جنس E.Coli تتفاعل تصلابياً مع مستضدات جنس Providencia (10) كما أن جنس Shigella تمتلك مستضدات متشابهة مع جنس E.Coli (11). لذا أستهدف البحث دراسة وجود أو عدم وجود تفاعل تصالبي (Cross reaction) بين مستضدات جنس

klebseilla و Enterobacter في محاولة لتشخيص هذه الأجناس مصلياً.

وجد ان المستضدات السطحية لاغلب فراد العائلة المعوية متشابهة في التركيب ولها القدرة على التفاعل التصالبي لهذا استهدف البحث دراسة وجود ا و عدم وجود تفلعل تصالبي بين المستضدات الجسمية Somatic Antigens بين جنسي Klebseilla و Enterobacter .

المواد وطرائق العمل:

تم الحصول على عزلتين جرثومة K. pneumoniae و E. cloacae من خلال عزلها من اصابات الجروح (Wound infections) لمرضى راقدين في مستشفى اليرموك التعليمي . شرخصت العزلتين باستخدام نظام Api20E والفحوصات البايوكيميائية وبعد التأكد من نقاوة العزلتين استخدمت لغرض تحضير عالق الجراثيم لاستخدامها لاحقاً في اختبار التلازن.

تحضير عالق الجراثيم وعملية الحقن:

حضر عالق جرثومتي K. pneumoniae و E. cloacae حيث تم معاملتها بالف ورمالين وبتراكيز 1% لغرض قتل الجراثيم ثم غسلت ثلاث مرات بالمحلول الفيسيولوجي وبعدها علقت الجراثيم بالسلاين وبتركيز x1 10^8 خلية/ مل. واستخدمت لغرض حقن الحيوانات المختبرية والحصول على المصول الممنعة، حيث حقن ارنبان بعالق جرثومتي Klebseilla واخرى بعالق Enterobacter ،كما حقن ارنب اخر بالمحلول الفيسيولوجي لتحضير مصول السيطرة وتم الحقن اعتماداً على الجدول الاتي، رقم (1).

جدول (1)

برنامج الحقن لتحضير مصول جرثومتي Enterobacter و Klebseilla.

	الجرعة الاولى/ مل	الجرعة الثانية/مل	الجرعة الثالثة/ مل
الاسبوع الاول	0.2	0.3	0.4
الاسبوع الثاني	0.6	0.8	1.0
الاسبوع الثالث	1.5	2.0	2.0
الاسبوع الرابع	3.0	3.0	3.0

بعد انتهاء فترة الحقن تركت الحيوانات لمدة اسبوع ثم سحبت الدماء بطريقة طعنة القلب من الحيوانات المحقونة ثم حضرت المصول الموجبة المحسسة لكلا الجرثومتين ومصول السيطرة وضعت بدرجة −20م لحين اسخدامها في تفاعل التلازن وحساب العيارية، تم الحصول على قيمة حد العتبة باستخدام المعادلة التالية:

$$\text{Thershold value} = \text{Mean} \pm 2(\text{SD})$$

ومن خلال حساب حد العتبة يمكن تحديد وجود او عدم **وجود تفاعل تصالبي.**

تحضير المصول لتفاعل التلازن المباشر:

ثبط العامل المتمم للمصول الممنعة للجراثيم Klebseilla و Enterobacter ومصول السيطرة وذلك بوضع المصول بحمام مائي بدرجة حرارة 56 م لمدة 30 دقيقة وذلك لضمان اتلاف العامل المتمم ، ثم عملت منها تخافيف مضاعفة للمصول مع البدء بالتخفيف العشري (10/1) ومنه حضرت تخافيف مضاعفة باستخدام محلول دارئ الفوسفات الملحي ذي باء هاء 7.2 في التخافيف.

بعد ذلك حضرت الصحيفة لخاصة بالتلازن (Microplate) وتم وضع حجم 0.05 مل من كل تخفيف في الحفر الموجودة في الصحيفة ابتداءاً بالتخفيف 10/1 بعد ذلك اضيف 0.05 مل من عالق الخلايا ولكلتا الجرثومتين وبالتراكيز المختلفة. حضرت في الوقت نفسه عينة السيطرة تتكون من محلول دارئ الفوسفات مضافاً اليها عالق جرثومة Klebseilla وعينة سيطرة اخرى تتكون من درائء الفوسفات مضافاً اليها عالق جرثومة Enterobacter . ثم رجت الصحيفة ووضعت بدرجة 37م لمدة ساعة . ثموضعت في الثلاجة لليوم التالي وقرأت النتائج . استخدمت مصول السيطرة لحساب حد العتبة (threshold value) لغرض مقارنة النتائج احصائياً للمصول الموجبة للجراثيم.

النتائـــج والمناقشـــة:

أستخدمت طريقة التلازن المباشر بين المصول الممنعة ضد الجرثومتين ومستضدات هذه الج راثيم بسبب توفر أمكانية ومواد هذا العمل وعدم أستخدام تقنيات أكثر حساسية مثل طريقة ELISA بسبب عدم توفر امكانيتها والأجهزة الخاصة بطريقة ELISA، حيث وجد من خلال دراسة

اختبار التلازن المباشر بين المصول الممنعة لجراثيم Enterobacter وخلايا مقتولة للجراثيم نفسها في تفاعل المماثل (Homologous) وبين جراثيم Klebseilla والمصل الممنع لجراثيم Enterobacter في تفاعل المختلف (Heterologous) ان العيارية للاضداد تراوحت بين (1280-640) و (20-10) على التوالي، في حين تراوحت عيارية الاضداد بين (2560-640) في تفاعل المماثل بين عالق خلايا Klebseilla والمصل الممنع لنفس الجراثيم اي تفاعل المماثل في حين تراوحت العيارية بين (40-20) في تفاعل المختلف مع عالق جراثيم Enterobacter ، جدول رقم (2).

جدول (2)

عيارية الاجسام المضادة في مصول جراثيم Klebseilla ومصول جراثيم Enterobacter في تفاعلات الـ Homologous والـ Heterologous.

العيارية		المصول
خلايا Enterobcater معاملة بالفورمالين	خلايا K. pneumoniae معاملة بالفورمالين	مصل ممنع ضد K. pneumoniae
640	20	1
2560	40	2
		مصل ممنع ضد جراثيم Enterobacter
10	640	1
20	1280	2
96.5	76	Thershold value مصول السيطرة

وكانت قيم حدود العتبة لمصول السيطرة هي (96.5،76) على التوالي (جدول 3) وعند مقارنة النتائج لوحظ عدم وجود تفاعل تصالبي بين المصول الممنعة ضد جراثيم Klebseilla وEnterobacter مع مستضدات الجراثيم للجرثومتين في تفاعل Heterologous ، في حين ان هنالك تفاعل وعيارية عالية للاضداد في تفاعلات الـ Homologous .

جدول (3)

عيارية الاضداد في مصول السيطرة وحدود العتبة.

العيارية		المصول
خلايا Enterobcater معاملة بالفورمالين	خلايا Klebseilla معاملة بالفورمالين	Control
10	20	1
10	10	2
20	40	3
40	20	4
20	22.5	**المعدل**
96.5	76	**حدود العتبة**

اشارت الابحاث السابقة الى حدوث تفاعل تصالبي بين المستضدات السطحية بين بعض اجناس العائلة المعوية واجناس اخرى سالبة لملون غرام (12).وفي دراسات اخرى اجريت باستخدام طريقة ELISA والانتشار المناعي كانت النتائج حدوث تفاعل تصالبي بين مصول جراثيم بعض افراد العائلة المعوية وهذا عائد الى تشابه في تركيب مكونات الجدار ومنها Endotoxin للجراثيم(13،14)، كما وجد تفاعل تصالبي بين جنس Salmonella وجنس Brucella في تفاعل التلازن الدموي المنفعل باستخدام مصول اشخاص مصابين بالجرثومتين(16). في حين اشارت ابحاث اخرى عدم وجود تفاعل تصالبي بين اجناس سالبة لملون غرام ومنها جنس Salmonella typhi و E. coli و Campylobacter (16) أشارت هذه الأبحاث إلى أن أمتلاك جنس ال Klebseilla للكبسولة قد يعطيها السبب في عدم تفاعل المصول المضادة للأجنا س الأخرى التابعة للعائلة المعوية معها مصلياً.

حيث أشارت الأبحاث السابقة عدم وجود تفاعل تصالبي بين المصول العائدة لجنسي Klebseilla وEnterobacter (17) في حين أشارت مصادر أخرى إلى عدم وجود تشابه في السموم المنتجة من قبل جنس Enterobacter مع السموم المنتجة من جنس Shigella وهذا يعطي تفاعل تصالبي بين الجنسين (18).

في هذه الدراسة لم نجد اي تفاعل تصالبي بين مصول الممنعة ضد جرثومتي Klebseilla وخلايا جراثيم

Enterobacter. مما يشير الى امكانية استخدام مصول الجراثيم في تشخيص هذه الجراثيم مصلياً.

المصادر

[1] Holt, J.G., N. R. Krieg, P.H. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams, 1994. Bergey`s Manual of determinative bacteriology, 9th.ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

[2] Jawetz, E., J.L. Melnick, E.A. Adlberg, and G.E. Broof.,1991. Phagocytosis. P: 113-115. In. med. Microbial Rev. 19th.ed. London.

[3] Pittet, D.N. and R.P. Wenzel, 1993 association of secondary and tolymicrobial nosocomial blood stream infection with higher mortality. Eur. J. clin. Microbial. Infect. Dis. 12:813-819.

[4] Lucet, J.C., S. Cherret., D. Dere, D. Vanjak and B. Regnier, 1996. Outbreak of multiply resistant enterobacteriacae in an intensive care unit ; Epidemiology. Risk factors for accquistion. Clin. Infect. Dis. 22:430-436 (Abst.).

[5] Gray, G. W. and S.G. Wknson, 1965. The effect. Of Ethylendiamine tetra acetic acid of the cell wall of some Gram-negative bacteria J. gen.Microbial. 93:385.

[6] Kauffmann, F. 1949. On the serology of the Klebseilla O group. Acta. Microbial;. Scand(26)381-406.

[7] Regal, A.D., Rosi, C., Charrel., R. and Bollet. C. (1997) j. clin. Microbial, 35 (4):1008-1010.

[8] Falikiner, F.R.(1992). Enterobacter in hospital. J. Hosp. infect. 20: 137-140.

[9] Roberts,D.P.; Dery.P.D. and Buyur, J.J. (1999). Importance of PFKA for rapid grow cloacae during colonzination of crop seed. Applied and Enviro. Mirobial . V.66.

[10] Aleksic , S. and Bockemucl, J. (1999) Yersinia and other Enterobacteriacae I λ : manual of clinical microbiology 7th . ed. Muvray PR etla. American society for microbiology

[11] Bopp, Ca. etal. Escherichia, Sheglla and salmonella. (1999) In. manual of clinical microbiology, 7th ed. Muvray. PR. Etal. American society for microbiology.

[12] Hoffmann, H. and Andress, R.P. 2003. "Population geneics of the nomen species colacae. Applied and Envirom. Microbial. 69 (20).

[13] Hewett, J.A.and Roth, R.A. (1993). Hepative and extrapthology of bacterial LPS. Pharm. Rev. American. Sociaty for microbiology. U.S.A. 54(4): 283-411.

[14] Jertborne,M. and Srennerholm, A.M. (1990). Serum Antibody responses to bacterial enterpathogenes in swedish, traveller to south east Asia. Scand. J. Inf. Dis. 22(6):699-704.

[15] Al- meani, S.A.L.(1994) Cross reactivity between Anti-Salmonell and anti- Brucella antibodies in the sera o patients with typhoid fever and Brucellosis. College of Science, Baghdad University. M.Sc. thesis.

[16] Al- Musawi, R.A.A. (2000) Study of Cross reactivity between Compylobacter and Salmonella by passive haemagglutination reaction. College of Science. Baghdad Univesity. M.Sc. thesis.

[17] Platt, H. Atherton, J.G. orskov, I . (1976) Klebsiella and entrobacter organisms isolated from horses. J. of Hygiene, vol. 77, P.P 401-408.

[18] Adrienne, W. P. and James. C. P. (1996). Enterobacter cloacae producing shiga – like toxin II – related cytotoxin associated with case of hemolytic 0 uvemic syndrome . J. of clin. Microbial. (43)2.

Abstract:

Two albino-rabbits were immunized against Klebseilla pneumoniae and Enterobacter aerogenes using formalin killed bacteria. In order to obtain immunized sera for agglutination test. Another rabbit was used as control which was injected with physiological sline. The titer of sera obtained from immunized against Klebseilla ranged (640-2560) homologous reaction by direct agglutination while the titer in the Heterologous reaction was (20-40) the titer of sera mmunized against Enterobacter range from (640-1280) in homologous reaction and (10-20) in Heterologous reaction. The ther sold value of control sera was (76-96.5) respectively. These results gave indication of no. cross reactively between immunized sera of Klebseilla & Enterobacter, and this inturn gave us a good induction for using somatic antigen, For sera diagnosis of these bacteria.