

دراسة بعض التغيرات المناعية الناتجة عن تلقيح الأرانب المحلية ببكتريا *Klebsiella* المضعفة

يوسف رافع جمعة العاني\* ، ليث مصلح نجيب\*\* ، عبد الوهاب بديوي حسين\* ، هديل محمد فياض\* ، عاصف

حسن عبد الرزاق\* وأيوب إبراهيم علي

\*كلية الطب البيطري/ جامعة الأنبار

\*\*كلية العلوم/ جامعة الأنبار

## الخلاصة

أجريت الدراسة على 9 أرانب محلية، وزعت على ثلاث مجاميع، المجموعة الأولى، والثانية حقنت ببكتريا *Klebsiella* المضعفة، وحقنت المجموعة الثالثة بالمحلول الفسلجي واعتبرت كمجموعة سيطرة. وبعد فترة 25 يوم حقنت المجموعة الثانية بلقاح نفس البكتريا غير المضعفة. استخدمت طريقة Single Radial Immunodiffusion Test Kits لقياس كمية الأجسام المضادة والمتمم. أظهرت النتائج ان هناك فروقا معنوية عالية في تركيز عامل المتمم C<sub>4</sub> وبلغ أعلى تركيز لهذا النوع 20 ملغم/100 مل مقارنة بالسيطرة إذ بلغت 11 يرافقها زيادة ويفرق معنوي لوزن الجسم ومستويات كمية IgG والذي بلغ أعلى مستوى له 856.33 مقارنة بالسيطرة 504.33 ملغم/100 مل و IgA الذي بلغ أعلى تركيز له 181.33 مقارنة بالسيطرة إذ بلغت 125.66 في حين لم تكن الفروق معنوية في أعداد مكونات كريات الدم البيضاء وتركيز عامل المتمم C<sub>3</sub>.

### Study of some immunological changes resulted from vaccination of local rabbits with attenuated *Klebsiella*

Y. R. J. Al-Ani\*, L. M. Najeeb\*\*, A. B. Hussain\*, H. M. Fayyadh\*, A. H. Abdul-Alrazik\* and A. I. Ali\*

\*College of Veterinary Medicine\ University of Anbar

\*\*College of Science\ University of Anbar

## Abstract

This study carried out on 9 local rabbits which divided into three groups; the first and second groups injected with attenuated *Klebsiella* while, the third group injected with physiological saline and considered as control group. After 25 days, rabbits of second group injected again with the same not attenuated bacteria. The results revealed that there is highly significant differences in concentrations of complement C<sub>4</sub>, in addition to significant increase in body weight, levels of IgA and IgG, whereas there were no significant differences in WBC counts and concentration of complement C<sub>3</sub>.

## المقدمة

الكليسيلا هي بكتريا معوية اكتشفها لأول مره العالم Edwin Klebs في القرن التاسع عشر، وهي سالبة لصبغة جرام غير متحركة، سالبة لاختبار الاوكسيديز، بيضوية الشكل Short bacilli، وبشكل عام حاوية على المحفظة (1) وبالاعتماد على التشابه والاختلاف في تتابع DNA تم الكشف على سبعة أنواع منها، وهي:

1. *Klebseilla pneumonia*.
2. *Klebseilla ozaenae*.
3. *Klebseilla rhinoscleromatis*.
4. *Klebseilla oxytoca*.
5. *Klebseilla planticda*.
6. *Klebseilla terrigena*.
7. *Klebseilla ornithinolytica*.

ويعتبر النوع الأول من أهم الأنواع الممرضة للإنسان، في حين يعد النوعان الثالث والرابع من الأنواع السائدة المسببة لمختلف الالتهابات في جسم الإنسان كالتهابات الجهاز التنفسي العلوي، ان لبكتريا الكليسيلا خمسة أنواع (2)، وهي:

1. *Klebseilla granulomatis*.
2. *Klebseilla oxytoca*.
3. *Klebseilla pneumonia*.
4. *Klebseilla singaporensis*.
5. *Klebseilla variicola*.

النوعين الثاني والثالث يسببان العديد من الأمراض للإنسان والحيوان كمرض ذات الرئة والتهاب المجاري البولية، وتجرثم الدم، والتهاب الأنسجة الرخوة، والإسهال، والسحايا، والتهاب العظام، والذي ساعد في ذلك بعض التداخلات وخصوصا الجراحية منها، كالقسطرة القلبية والبولية، والتنفس الاصطناعي (3).

تمتلك الكليسيلا نوعين من المستضدات الأول: هو المستضد الجسمي [O] والذي هو عبارة عن متعدد سكري دهني، والثاني: المستضد المحفظي [K] والذي هو عبارة عن متعدد سكري وبالاعتماد على الأنواع المصلية (antisera)، هناك تسعة أنواع من المستضد [O] و77 نوعا من المستضد [K] (2) وان دخول أي من هذه المستضدات سواء بشكلها المفرد أو بشكل الخلية الحية يؤدي إلى تحفيز الجهاز المناعي بإنتاجه للأجسام المضادة (4). أشار الباحث (5) إلى قدرة الكليسيلا على إنتاج مواد حيوية تطرح إلى الخارج Biofilm والتي تعمل على إعطائها القدرة على الالتصاق بمختلف السطوح مما يساعدها على بقائها حية باستيطانها لتلك السطوح مما يزيد في مقاومتها لمختلف وسائل الدفاع الموجودة في الجسم. أوضح الباحث (6) ان الإصابة ببكتريا الكليسيلا يؤدي إلى زيادة في الكلوبولينات المناعية والمترافقة مع مناعة كامنة في جسم الكائن الحي تجاه ذلك النوع. وعلى هذا الأساس جاءت هذه الدراسة المتضمنة إنتاج لقاحات من الكليسيلا والتي بدورها تزيد من مقاومة الجسم لذلك النوع.

### المواد وطرائق العمل

- اللقاح: تم التأكد من عائدة العزلة *Klebsiella* والمأخوذة من مختبرات مستشفى النسائية والأطفال في مدينة الرمادي وذلك بعد إجراء بعض الاختبارات والمتضمنة الصبغ بصبغة كرام وزراعتها على بعض الأوساط الزرعية الخاصة إضافة الى بعض الاختبارات البايوكيميائية كاختبار الاندول واختبار فوكاس بروس كاور (vp) واختبار اختزال السترات (1)، حضر اللقاح من هذه العزلة وضعف بالحرارة لغاية الدرجة الحرارية ما قبل القتل الكلي وحسب الطريقة المتبعة في (6).

- الحيوانات المختبرية : تم استعمال 9 أرانب متجانسة محلية، قسمت إلى ثلاث مجاميع معزولة عن بعضها، المجموعة الأولى والثانية تم تمنيعها بـ 50 مل بطريقة الحقن تحت الجلد من محلول المزرعة (المرق المغذي) المضعف وبطريقة العد بالأطباق تبين انه يحوي على  $10 \times 26^4$  خلية/مل، في حين ان المجموعة الثالثة تركت كسيطرة. بعد 14 يوما تم تمنيع المجموعة الأولى والثانية بنفس مواصفات اللقاح الأول، وبعد 25 يوما حقنت المجموعة الثانية بمحلول مزرعة بكتريا *Klebsiella* النامية في محلول المرق المغذي الغير مضعفه والحاوي على  $10 \times 3^4$  خلية/مل وكما ورد في (7).
- الصفات المدروسة: بعد 3 أيام من الحقن الأخير تم إجراء عدة قياسات تضمنت وزن الجسم والكبد والطحال وحساب العدد التفريقي لمكونات كريات الدم البيضاء وأعداد الأجسام المضادة IgG؛ IgM بالإضافة إلى تركيز العامل المتمم C<sub>3</sub> و C<sub>4</sub> للحيوانات قيد البحث وكما ورد في (8).
- التحليل الإحصائي: صممت التجربة بالاعتماد على التصميم العشوائي الكامل وحللت إحصائيا باستعمال الفرق الأقل معنويا ما بين المعاملات وشخصت الفروق كما ورد في (9).

### النتائج

- البكتريا : ظهرت مستعمرات بكتريا الكلبسيلا على وسط ماكونكي بشكل مستعمرات وردية ذات قوام مخاطي مرتفعة عن الوسط بقطر 5-7 ملم سالبه لاختبار الاندول والسترات وموجبه لاختبار Vp في حين ظهرت مستعمرات البكتريا المعاملة بدرجات حرارية مختلفة ولفترات زمنية مختلفة وخصوصا المجموعة ما قبل القتل الكلي للبكتريا 56 م لمدة 40 دقيقة بنسبة قتل تجاوز 96% بأنها ذات مستعمرات صغيرة ضعيفة النمو مدببة ذات لون أبيض.
- الحيوانات المختبرية: أظهرت النتائج أن هناك زيادة معنوية (  $P < 0.05$  ) في وزن الجسم للأرانب المحقونة ببكتريا الكلبسيلا المضعفة (المجموعة الأولى) والأرانب المحقونة ببكتريا الكلبسيلا المضعفة إضافة إلى جرعة التحدي (المجموعة الثانية) بالمقارنة مع الأرانب غير المحقونة بكلا المعاملتين (المجموعة الثالثة)، في حين لم تكن هذه الفروقات معنوية في وزن الكبد والطحال (جدول 1).

جدول (1) معدل وزن (غم) الجسم والكبد والطحال لمجموعة السيطرة بالمقارنة مع المجموعة المعاملة ببكتريا الكلبسيلا المضعفة والمجموعة المحقونة بجرعة التحدي

ت	نوع المعاملة	معدل وزن الجسم	معدل وزن الكبد	معدل وزن الطحال
1.	مضعفة	740a	31.433a	0.286a
2.	مضعفة+ تحدي	775a	35.126a	0.403a
3.	السيطرة	670b	29.07a	0.346a
4.	LSD	50.3	16.42	0.237

من جانب آخر أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية عالية (  $P < 0.01$  ) للعامل المتمم C<sub>4</sub> وزيادة معنوية (  $P < 0.05$  ) في كمية الأجسام المناعية IgG و IgA في حين لم تكن الفروق معنوية في نتائج العامل المتمم C<sub>3</sub> في مجموعة الأرانب المحقونة ببكتريا الكلبسيلا المضعفة مقارنة مع مجموعة السيطرة (جدول 2).

جدول (2) اختلاف تركيز الأجسام المناعية والعوامل المتممة بين مجموعة السيطرة والمحقونة ببكتريا الكلبسيلا المضعفة

ت	نوع المعاملة	IgA	IgG	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>

11a	120.33	504.33a	125.66a	السيطرة	.1
20b	162.33	856.33b	181.33b	مضعفة	.2
2.2	42	142	27.12	LSD	.3

نتائج تعداد أنواع كريات الدم البيضاء أظهرت انه لم يكن هناك فروقا معنوية ما بين دم مجموعة الأرناب المحقونة ببكتريا الكلبسيلا المضعفة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (جدول 3).

**جدول (3) معدل أعداد أنواع كريات الدم البيضاء% في مجموعة السيطرة والمحقونة ببكتريا الكلبسيلا المضعفة**

ت	نوع المعاملة	Neutrophil	Monocytes.	Lymphocytes.	Esinophil.
.1	السيطرة	11	8	6.33	2
.2	مضعفة	25	9.67	9	5

### المناقشة

أوضحت نتائج الدراسة ان هناك زيادة معنوية ( $P<0.05$ ) في وزن الجسم للمجموعة الأولى والثانية المحقونة ببكتريا *Klebsiella* المضعفة وهي تتفق مع ما أشار إليه (10، 11) من ان زيادة الوزن تنتج بفعل تغيير في بعض المسارات الايضية والتي كانت ربما بسبب دخول اللقاح وبالتالي تعد مؤشرا أوليا لاستجابة الحيوان المختبري لذلك اللقاح، نتائج اختبار العامل المتمم  $C_4$  أكدت وجود هذه الاستجابة وبمعنوية عالية ( $P<0.01$ ) للجهاز المناعي للحيوانات المحقونة (المجموعة الأولى والثانية) متمثلة بزيادة تركيز هذا العامل وهذه النتائج تتفق مع ما وجدته (11) الذي سجل زيادة معنوية بهذا العامل للأرناب المحقونة ببكتريا *Pseudomonas aeroyenosa* المضعفة ومع ما وجدته (12) الذي سجل زيادة معنوية في هذا العامل للأرناب النيوزيلندية المحقونة ببكتريا اميبا النسيج *Entamoeba histolytica* وفسر ذلك بان تفاعل الضد والمستضد يقود إلى تنشيط فعل الجهاز المتمم. أظهرت نتائج اختبار  $IgG$  وجود زيادة معنوية ( $P<0.05$ ) للأرناب المحقونة ببكتريا *Klebsiella* المضعفة وهي تتفق مع ما وجدته كلا من (11، 13) أما نتائج  $IgA$  فهي تتفق مع ما وجدته (14) الذي أشار إلى وجود زيادة معنوية ( $P<0.05$ ) في الحيوانات المختبرية الملقحة وتختلف مع ما وجدته (11) الذي لم يجد هذه الزيادة وربما يعود ذلك إلى اختلاف اللقاح المستعمل في التجربة. أوضحت نتائج اختبار  $C_3$  عدم وجود فروقات معنوية ما بين المعاملة والسيطرة والتي تتفق مع ما وجدته (15) وفسر ذلك إلى عدم استقرارية أو ثبات العامل المتمم  $C_3b$  مما يجعل الكشف عن هذه الاستجابة لهذا العامل غير واضحة. بينما فسر (2) ذلك بسبب وجود المحفظة التي بدورها تمنع الاستجابة وخصوصا نوع  $C_3b$ .

### المصادر

1. Ryank, J. & Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4<sup>th</sup> ed., McGraw hill. P. 370.
2. Umebobiamiwa, L. B. & Berkwitz, M. D. (2009). *Klebsiella* Infection *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogen city factor. Clin. Microbial. Rev., 11(4): 589- 603.

3. Kaijser, B. & Nimmich, W. (1981). Immuno-electrophoretic pattern of Klebsilla and K antegins. Int, Archs Allergy a ppl. Immun, 64: 80- 83.
4. Brown, M. & Smith, A. (2003). Antimicrobial Agent and Biofilms. Medical Implications of Biofilms, PP. 36-38.
5. Trautmann, M.; Ruhnake, M.; Rukawnia, T. & Whitfield, C. (1997). O-antigen seroepidemiology of *Klebsiella* clinical isolates and implication for immunoprophylaxis of *Klebsiella* infections, Clin. Duagn., Lab Immunol., 4 (5): 550- 555.
6. نجيب، ليث مصلح. (2007). إنتاج البكتريوسينات من بكتريا حامض اللبنيك ودراسة بعض خواصه. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم/ جامعة الانبار
7. Bacharach, G.; Banai, M.; Bardinestn, S.; Hoida, G.; Genizi, A. & Brecover, H. (1994). The bearing of delayed type hypersensitivity in brucella Melitensis-sensitizes Guines pigs. Infect. Immun., 62 (12): 5361- 5366.
8. الدراجي، حازم جبار؛ الحياني، خالد وليد؛ علي صباح الحسني. ( 2008 ). فسلفة دم الطيور. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، كلية الزراعة- جامعة بغداد.
9. Steel, R. G. D. & Tirrie, J. H. (1980). Principle and procedure of statistic. 2<sup>nd</sup> (ed). McGraw Hill, New York.
10. ساوا، مؤيد إبراهيم. (1986). مدخل إلى علم المناعة البيطرية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل.
11. Hussain, A. B.; Fiadh, H. M.; Almaadhidy, A. H.; Najeb, L. M. & Shaker, E. A. (2010). Study of some Immunization effect against attenuated *pseudomonas aeruginosa* in Local rabbits. Al-Anbar J. Vet. Sci., 3 (1): 83- 90.
12. شاكر، إسراء عدنان. ( 2009 ). التأثيرات المناعية لمستضدات الاميبا الحالة للنسيج على الأرانب النيوزيلندية البيضاء، رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة الأنبار.
13. Eric, T. W.; Haiping, L.; Nancy, D. K. & Daniel, J. W. (2009). A fusion protein vaccine containing oprfepitio 8, oral, and type A and B, flagellins promotes enhanced clearance of non mucoid *pseudomonas aeruginosa*. Infect Immune. 77 (6): 2356-66.
14. Herbirt, Y.; Reynolds, R.; Thompson, R. E. & Henry, B. P. (1974). Development of cellular and humeral Immunity in the respiratory tract of rabbits to *pseudomonas lipopolysaccharide*. The J. of Clin. Investigation., 53: 1351- 1358.
15. Anja, K.; Josephin, L.; Christine, G. & Stefan, M. (2007). Immune Evasion of human pathogen *pseudomonas aeruginosa* Elongation factor Tuf is a factor H and plasmogen Binding protein. The J. of Immunol., 179: 2979-88.