

تأثير المصل الطبيعي (غير الممنع) على الجراثيم المعزولة  
من حالات ذات الرئة في الأغنام

محمد علي حمد و مزاحم ياسين العطار  
فرع الاحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، موصل، العراق

(الاستلام ١٤ آذار ٢٠٠٥؛ القبول ٢٨ شباط ٢٠٠٦)

الخلاصة

أجريت الدراسة على تسعة أنواع جرثومية تضمنت (المانهيميا الحالة للدم، المكورات العنقودية الذهبية، اركانوبكتريوم القيحية، المكورات السبحية القيحية، الزوائف الزنجارية، الكلبسيلا الرئوية، الإشريكية القولونية، الموراكزلا الضائية، عصيات ستلس) عزلت من حالات ذات الرئة في الأغنام. استخدم في هذا الاختبار مصل طبيعي (غير الممنع) مأخوذ من عدة أنواع من الحيوانات هي الأغنام والأبقار والخيول حيث أظهرت جميع أنواع الجراثيم المعزولة مقاومة واضحة للتأثير القاتل لهذه المصول باستثناء جراثيم العصيات و الزوائف فقد كانت حساسة للتأثير القاتل للمصل، بينما كانت جراثيم الموراكزلا الضائية حساسة لمصل الخيول فقط، بينما أظهرت جراثيم الزوائف الزنجارية وعصيات ستلس مقاومة واضحة عند معاملتها بالامصال المزال منها المتمم.

**EFFECT OF THE NATURAL SERUM (NON-IMMUNIZED) ON THE  
BACTERIA ISOLATED FROM PNEUMONIC LUNG IN SHEEP**

M. A. Hamad and M. Y. AL-Attar<sup>1</sup>

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of  
Mosul, Mosul, Iraq.

**ABSTRACT**

Normal serum bactericidal activity study were carried out against nine bacterial species (*Mannheimia haemolytica*, *Staphelococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Moraxella ovis*) isolated from pneumonial lungs in sheep by the use of a normal non immunized serum collected from normally healthy sheep, cattle, horses. All species of bacteria were resistant for serum effect except *B. subtilis* and *Pseudo. aeruginosa* which were sensitive for all types of serum, while *Moraxella ovis* was sensitive for horse serum only, but *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* were resistant to complement free serum.

المقدمة

يعد التأثير القاتل للمصل الطبيعي من دفاعات الجسم المناعية غير المتخصصة ضد الجراثيم الغازية، ويمثل نظام المتمم (Complement System) أساس هذه الآلية إذ يلعب دوراً مهماً في الدفاع الأولي والحماية ضد الإصابات الجرثومية في المضائف غير الممنعة

<sup>1</sup> Author for correspondence, E-mail: mozahimalattar@yahoo.com

(٤-١). يتواجد المتمم في المصول الطبيعية لجميع اللبائن والحيوانات الواطنة كالطيور والأسماك والبرمائيات (٦،٥) و يتألف نظام المتمم من ١٧ بروتيناً على الأقل وتعطى المكونات الأساسية له أرقاماً متسلسلة فهي تبدأ بالمكون (C1) وتنتهي بالمكون (C9) فضلا عن عوامل بروتينية أخرى (٧). يعمل المتمم كمنظومة متتابعة حيث إن تنشيط أحد مكوناتها يؤدي إلى تنشيط المكون التالي وهكذا إلى أن يتكون المعقد المهاجم للغشاء للخلية الجرثومية يدخل منه الأنزيم الحال (Lysosoyme) ويهضم طبقة الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) للجدار الخلوي ليؤدي في النهاية إلى التحلل الخلوي (Cytolysis) (٨). لذلك تم إجراء هذه الدراسة لمعرفة وتحديد الجراثيم الحساسة لهذا التأثير القاتل للمصل الطبيعي وكذلك لتحديد دور المتمم في هذه الآلية.

### المواد وطرائق العمل

#### الانواع الجرثومية المستخدمة:

تم استخدام تسعة انواع جرثومية هي جراثيم مانهيميا الحالة للدم، المكورات العنقودية الذهبية، اركانوبكتريوم القيحية، المكورات السبحية القيحية، الزوائف الزنجارية، الكلبسيلا الرئوية، الاشريكية القولونية، الموراكزيبا الضأنية، وعصيات ستلس. وكانت هذه الجراثيم معزولة من حالات ذات الرئة فى الاغنام تم تشخيصها ودراسة بعض خواصها الكيموحيوية من قبل (٩).

#### المصول المستخدمة:

١. مصل طبيعى تم جمعه من ثلاثة انواع مختلفة من الحيوانات هي الاغنام، الابقار، والخيول. وهذه الحيوانات كانت ظاهريا سليمة، وغير ممنعة.  
٢. مصل مزال منه المتمم: تم تثبيط المتمم بوضع المصول المجموعة فى حمام مائى بدرجة ٥٦°م لمدة نصف ساعة (١٠،٤).

#### اختبار حساسية الجراثيم للمصول المستخدمة:

١. المصل الطبيعى: اضيف ٠.٦ مللتر من المصل الطازج غير الممنع الى ٠.٤ مللتر من معلق الجراثيم الفنية بعد حساب العدد الحى لكل نوع من الجراثيم. كما حضر انبوب سيطرة حاوى على ٠.٦ مللتر من المحلول الملحى الفسلجى و اضيف اليه ٠.٤ مللتر من المعلق الجرثومى يحوي مالا يقل عن  $10^9$  CFU/0.1ml، بعد ذلك حضنت الانابيب فى درجة حرارة ٣٧°م لمدة ثلاثة ساعات مع رجها بين فترة واخرى (٣، ١١) وبعد انتهاء فترة الحضانة تم حساب عدد الجراثيم الحية / مللتر بالطريقة القياسية للعد بالأطباق حسب طريقة (١٢) ومن ثم مقارنة عدد الخلايا فى حالة المعاملة بالمصل مع انبوب السيطرة.

٢. المصل المزال منه المتمم: اجريت عليه نفس الخطوات السابقة.

### النتائج

#### الحساسية للمصل الطبيعى:

أظهرت جميع الجراثيم المستخدمة مقاومة واضحة للتأثير القاتل للمصل باستثناء جراثيم الزوائف الزنجارية، وعصيات ستلس حيث كانت حساسة للتأثير القاتل للمصول المستخدمة، اذ كانت اعداد هذه الجراثيم فى المجموعة المعاملة بالمصل اقل من اعدادها فى مجموعة السيطرة بينما اظهرت جراثيم الموراكزيبا الضأنية حساسية لمصل الخيول فقط جدول رقم (١).

#### الحساسية للمصل المزال منه المتمم:

أظهرت جرثيم الزوائف الزنجارية وعصيات ستلس مقاومة عالية لهذا المصل المزال منه المتمم، وكان المصل وسط ملائم لنمو هذه الجرثيم حيث كانت اعداد هذه الجرثيم فى المجموعة المعاملة بالمصل اكثر من اعدادها فى مجموعة السيطرة جدول رقم ٢. والجدول رقم ٣ يوضح المقارنة ما بين المجموعة المعاملة بالمصل الأعتيادى (الطبيعى) والمجموعة المعاملة بالمصل المزال منه المتمم.

جدول رقم ١: نتائج تأثير المصل الطبيعى على اعداد الجرثيم\*

ت	نوع الجرثومة	مجموعة السيطرة Control	مصل الخيول horse Serum	مصل الأبقار Cattle Serum	مصل الأغنام Sheep Serum
١.	<i>Mannheimia haemolytica</i>	$6 \times 10^9$	$5 \times 10^9$	$5 \times 10^9$	$6 \times 10^9$
٢.	<i>Staphylococcus aureus</i>	$4 \times 10^9$	$4 \times 10^9$	$4 \times 10^9$	$4 \times 10^9$
٣.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	$3 \times 10^9$	$2 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	$3 \times 10^9$
٤.	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	$3 \times 10^9$	$4 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	$4 \times 10^9$
٥.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$4 \times 10^9$	$4 \times 10^9$	$4 \times 10^9$	$4 \times 10^9$
٦.	<i>E. coli</i>	$2 \times 10^9$	$2 \times 10^9$	$2 \times 10^9$	$2 \times 10^9$
٧.	<i>Moraxella ovis</i>	$2 \times 10^9$	$9 \times 10^8$	$2 \times 10^9$	$2 \times 10^9$
٨.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$8 \times 10^9$	$7 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$
٩.	<i>Bacillus subtilis</i>	$6 \times 10^9$	$9 \times 10^8$	$8 \times 10^8$	$7 \times 10^8$

\*CFU/ 0.1ML

جدول رقم ٢: يوضح مقاومة الجراثيم لتأثير المصل المزال منه المتمم.

ت	نوع الجرثومة	Control	Horse Serum	Cattle Serum	Sheep Serum
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	$6 \times 10^9$	$8 \times 10^9$	$7 \times 10^9$	$9 \times 10^9$
2.	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	$2 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	$4 \times 10^9$

جدول رقم ٣: يوضح المقارنة بين اعداد الجراثيم المعاملة مع المصل بوجود المتمم وبعدهم وجوده (مصل الأغنام).

ت	نوع الجرثومة	مجموعة السيطرة	المعاملة مع المصل بوجود المتمم	المعاملة مع المصل المزال منه المتمم
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	$6 \times 10^9$	$7 \times 10^8$	$9 \times 10^9$
٢.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	$4 \times 10^9$

### المناقشة

بينت نتائج اختبار فحص الحساسية للمصل الطبيعي غير الممنوع ان جراثيم المانهيميا الحالة للدم، جراثيم المكورات العنقودية الذهبية، المكورات السبحية، الايشريشيا القولونية، اركانوبكتريوم القيحية، أظهرت جميعها مقاومة واضحة للتأثير القاتل للمصل (الجدول رقم ١ و ٢)، وهذه كانت مطابقة لنتائج (١٣) باستثناء الايشريشيا القولونية حيث وجدها حساسة للتأثير القاتل للمصل.

كذلك كانت جراثيم الكلبسيلا الرئوية مقاومة للتأثير القاتل للمصل وهذه كانت مطابقة لنتائج (١٤) حيث وجد أن جميع عزلات هذه الجرثومة مقاومة للتأثير القاتل للمصل. أما جراثيم العصيات والزوائف الزنجارية فقد كانت حساسة للتأثير القاتل للمصل، وقد كانت جراثيم الموراكزيبلا حساسة للتأثير القاتل لمصل الخيول فقط. بينما أوضحت نتائج اختبار فحص الحساسية للمصل المثبط فيه المتمم على جراثيم العصيات والزوائف الزنجارية أن هذه الجراثيم كانت مقاومة جداً للتأثير القاتل للمصل المزال منه المتمم وكان المصل وسط ملائم لنمو هذه الجراثيم حيث كانت أعداد هذه الجراثيم في المجموعة المعاملة بالمصل (المثبط فيه المتمم) أكثر من أعداد هذه الجراثيم في مجموعة السيطرة (الجدول رقم ٣)، وهذا يثبت أن المتمم هو الأساس في هذه الآلية القاتلة (١-٤).

إن مقاومة جراثيم مانهيميا هيمولتكا للتأثير القاتل للمصل يعزى إلى وجود المحفظة المتكونة من متعدد السكريات Polysaccharide حيث تمنع ميكانيكية القتل بواسطة المتمم وكذلك تمنع البلعمة والقتل داخل الخلايا لجراثيم المانهيميا، وهذا ما أوضحه كل من (١٥-١٠).

١٧) حيث أشاروا إلى إن جراثيم المانهيميا ذات المحفظة كانت تظهر مقاومة للفعل القاتل للمصل، بينما التي ليس لها محفظة لم تكن كذلك ومن ناحية أخرى فقد أدت إزالة المحفظة تجريبياً من السلالات المقاومة للمصل إلى أن تصبح حساسة أو مستعدة للفعل القاتل للمصل، في الحقيقة تعمل المحفظة على حماية الغشاء الخارجي للجراثومة أكثر من تثبيطها لتكوين المركب الفعال الذي يهاجم ذلك الغشاء الخارجي (١٧، ١٨).

بينما تعزى مقاومة المكورات السبحية والمكورات العنقودية واكرانوبكتريوم القيقية إلى فشل المتمم (المرتبط على سطح الجدار الخلوي للجراثومة) على اختراق طبقة الببتيدو كلايكان (Peptidoglycan) السميكة، وهذا ما أشار إليه (١٩)، كذلك كانت جراثيم الايشريكية القولونية مقاومة للتأثير القاتل للمصل ويعتقد أن سبب المقاومة هو وجود المستضد المحفظي (K) الذي يحمي بعض العتر الخشنة من الايشريكية القولونية من فعالية المصل القاتل (٢٠).

أما جراثيم الكلبسيلا الرئوية المعزولة والتي كانت مقاومة أيضاً للتأثير القاتل للمصل فيعزى سبب مقاومتها إلى وجود المستضدات المحفظية (K-antigen) التي تغطي جزيئات متعدد السكر يد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) وبذلك تفشل في تنشيط المتمم بينما في العزلات الحاوية على متعدد السكريد الشحمي الملساء الموجودة على سطح الجراثومة تنشيط المتمم ولكن تبقى مقاومة للتأثير القاتل للمتمم والسبب أن ارتباط مركب (C3b) يكون بعيد عن غشاء الخلية ولذلك فإن المركب النهائي الحال Lytic Final Complex والذي هو (C5b-9) (المركب الذي يهاجم الغشاء) لا يتكون (١، ٣). وقد أكد (٢١) إن متعدد السكريد الشحمي وخاصة للكلبسيلا الرئوية هو الأساس في مقاومة التأثير القاتل للمصل.

#### المصادر

1. Williams P, Peter AL, Brown MR, Jones RJ. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum killing and phagocytosis. J General Microbiology 1983; 129: 2181-2191.
2. Thomas JM, Benedi VJ, Ciurana B, Jofri J. Role of capsule and O antigen in resistance of *klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. Infect Immun 1986; 54: 85-89.
3. Merino S, Camprubi S, Alberti S. Benedi VJ, Tomas JM. Mechanisms of *klebsiella pneumoniae* resistance to complement mediated killing. Infect Immun 1992; 60: 2529-2535.
4. Atlas RM. Principles of Microbiology. 1<sup>st</sup> ed. Baltimore: Mosby-year Book 1995: 280-295.
5. Barret JT. Textbook of Immunology. 4<sup>th</sup> ed. CV Mosby Company 1983: 170-180.
6. Taloro K, Taloro. A. Foundations in Microbiology. 1<sup>st</sup> ed. Boston: WCB Puplishers 1996: 220-224.
7. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. Iowa: WMC Brown Communication 1993: 648-651.
8. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 3<sup>rd</sup> ed. Iowa: WMC Brown Communication 1996: 633-636.
٩. حمد، محمد علي. عزل وتشخيص المسببات الجرثومية لذات الرئة في حملان التسمين. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل ٢٠٠٠.
10. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. Blackwell Science 2003: 138-143.

11. Chang WY, Lee JH, Deng WL, Fu TF, Peng HL. Virulence and outer memberane properties of a gal U mutant of *klebsiella pneumoniae* CG43. *Microb Patho* 1996; 20: 255-261.
12. Cruickshank R, Duguid JP, Marmion BP, Swain RHA. *Medical Microbiology Vol. 2, The Practice of Medical Microbiology*. 12<sup>th</sup> ed. England: Churchill Livingstone 1975: 195-207.
١٣. السخن، صائب نظمي. عوامل الضراوة لعزلات جرثومية معزولة من حالات التهاب الرئة في الاغنام في شمال الاردن. *مجلة الطبيب البيطري* ١٩٩٨؛ ١٤ : ٩٨-١٠١.
١٤. الحسو، محمود زكى سليمان. عزل وتشخيص جرثومة الكلبسيلا الرئوية ودراسة بعض صفاتها الامراضية والمزرعية. رسالة ماجستير، كلية العلوم-قسم علوم الحياة، جامعة الموصل ١٩٩٩.
15. Confer AW, Panciera RJ, Clinkenbeard KD, Mosier DA. Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. *Can J Vet Res* 1990; 54: 48-52.
16. Morishita TY, Snipes KP, Carpenter TE. Serum resistance as an indicator of virulence of *Pasteurella multocida* for turkeys. *Avian Dis* 1990; 34: 888-892
17. Hansan LM, Hirsh DC. Serum resistance correlated with encapsulation of avian strains of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 1989; 2: 177-184.
18. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. Edinburgh: Mosby 2004: 254-258.
19. Johanson KA, Grossman N, Schmitz M, Levire L. C3 binds preferentially to long chain lipopolysaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella monotevide* . *J Immunol* 1986; 136: 170-175.
20. Opal S, Cross A, Emski PG. K- antigen and serum sensitivity of rough *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1982; 37: 959-960.
21. Niyogi SK, Paol A, Mitra U, Dutta P. E nteroaggregative *Klebsiella pneumonia* in association with childhood diarrhea. *Indian J Medical Research* 2001; 21: 34.