التحري عن عوامل الضراوة لجرثومة K.pneumoniae المعزولة من حالات التهاب التجويف الانفي

صبحي حسين خلف
كلية التمريض
جامعة الموصل

شاكر غازي
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة الموصل

الاستلام ٢٠٠٨ / ٠٦ / ٠١

القبول ٢٠٠٨ / ٠٩ / ١٠

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae were isolated in a percentage of (20%) of rhinitis which the identification tests were carried done.

The tests for virulence factors that could be produced by these spesies were also done and resugts showed that all spesies have the ability of serum resistance, successful adhesion on respiratory epithelial surfaces, heamagglutination of RBCof human, rabbit, sheep, capsule production, and the Lipopolysaccharides which isolated from bacteria have toxic effect on laboratory mice when injected in peritoneum

الخلاصة

تم عزل جرثومة K. pneumoniae بنسبة (٢٠%) من حالات التهاب التجويف الأنفي وأجريت عليها اختبارات التحري عن عوامل الضراوة التي من الممكن ان تمتلكها الجرثومة وأظهرت النتائج ان جميع السلالات كانت شديدة المقاومة للمصل، لها القدرة على الالتصاق الناجح بسطوح الخلايا الظهارية التنفسية على إحداث التلازن الدموي لكريات الدم الحمر للإنسان والأرانب والأغنام وامتلاكها للمحفظة، كما أظهرت طبقة متعدد السكريد الدهني LPS المعزولة من الجرثومة تأثيراً سمياً على الفئران المختبرية عند حقنها داخل غشاء الخلب.

المقدمة

أفراد هذا النوع عصيات سالبة الكرام، مستقيمة ذات قطر (٠.٣ – ١.٠) مايكروميتر وطول (٠.٦ – ٦.٠) مايكروميتر تمتلك غلافاً سميكاً، تكون مستعمرات كبيرة مخاطية لزجة شبيهة بالقبة Dome-like colonies، تخمر مدى واسع من السكريات من ضمنها سكر اللاكتوز، تحلل اليوريا ببطئ ، غير متحركة، لاهوائية اختيارية، لا تحتاج إلى متطلبات نمو خاصة، غير منتجة لـ H_2S، غير محللة للجيلاتين، تستهلك السترات، موجبة لاختبار Voges proskaeur test (١،٢).

تنتمي الجرثومة الى مجموعة اشباه الق ولونيات Coliforms التي تضم أجناساً أخرى منها Enterobacter، Citrobacter، Serratia وهي انتهازية Opportunistic والإصابة الأولية تحدث بهذه الجراثيم عند ضعف الحالة المناعية وتحطم دفاعات المضيف الطبيعية(٣).

تتوطن الجرثومة القناة المعوية بنسبة (٥ – ٣٥%) ومنطقة الحلقوم Oropharynx بنسبة (١ – ٦%) كما تتواجد في الجلد بصورة مؤقتة خاصة ف ي المستشفيات ومراكز العناية المركزة، يزداد نسبة توطن الجرثومة إلى (٢٠%) في المرضى الراقدين في المستشفيات وخاصة المثبطين مناعياً ومرضى السكري المدمنين على الكحول، أعراض الرئة المزمنة(4).

تمتلك الجرثومة العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من إحداث العديد من الإصابات الانتهازية المكتسبة من المستشفيات وتشمل هذه العوامل الأهداب (Fimbriae) Pili، حاملات الحديد Siderophores، الغلاف Capsule، متعدد السكريد الدهني Lipolysaccharide، الذيفان المعوي Enterotoxin، المقاومة لتأثير المصل Serum resistance (5).

تعد الجرثومة م ن الجراثيم شديدة المقاومة لبروتينات المصل التي تعد من عوامل الضراوة المهمة الأولية لان التأثير القاتل للمصل يعد الخط الأول لدفاعات المضيف الطبيعية بعد عملية البلعمة(٦).

ان التصاق الجراثيم المرضية بسطوح أنسجة المضيف تمكنها من تثبيت نفسها على المضيف من خلال مقاومة الانسياب الاعتيادي لسوائل الجسم المختلفة (٧).

تعد عملية الالتصاق بسطوح خلايا المضيف الخطوة الأولى الأساسية في الاستعمار الناجح وبالتالي إحداث المرض من قبل الجراثيم الممرضة . اذ تمتلك أفراد العائلة المعوية أنواعاً مختلفة من الأهداب التي لها دور كبير في زيادة ضراوتها(٨).

تمتلك جرثومة *K. pneumoniae* نوعين رئيسيين من الشعيرات هما Type I pili او تسمى بـ Mannose Sensitive Haemagglutenation (MSHA) و Type 3 pili او تسمى بـ Mannose Resistant Haemagglutenation (MRHA) وهذه التسمية اعتماداً

على تأثير سكر المانوز على إحداث عملية التلازن لكريات الدم الحمراء بالإضافة إلى وجود أنواع من الأهداب نادرة الوجود (٥).

تمتلك الجرثومة السكريات المتعددة الغلافية التي لها دور مهم وأساس في إحداث الإصابة من خلال مقاومة وتثبيط تنشيط الجزء C3b للمتمم (٥).

كما تحرر الجرثومة كميات كبيرة من السكريات الغلافية المرتبطة مع الذيفان الداخلي والتي تزيد من ضراوة الجرثومة في إحداث الإصابات لانها ترتبط مع الجسام المضلدة وتمنع حدوث عملية الاشتهاء والبلعمة(9).

كما تعد طبقة متعدد السكريد الدهني عامل ضراوة مهم للجرثومة إذ ان عند عند موت الخلية البكتيرية او انقسامها يتحرر LPS (Endotoxin) والذي يرتبط ببروتينات البلازما وتتفاعل مع المستقبلات الموجودة على Macrophage و Monocytes وخلايا المضيف الأخرى وتحفزها على إنتاج السايتوكينات وتنشيط بروتينات المتمم وحزمة الت خثر ، ينتج عنها أعراض الصدمة السمية وهي ارتفا ع درجة حرارة الجسم، انخفاض ضغط الدم، تحطم جدران الأوعية الدموية، تصلب الشرايين وتجلطها، نقصان في كمية الدم المزودة إلى أعضاء الجسم مثل الرئة والكلية (11,10)

المواد وطرائق العمل

١- العينات:

تم عزل ٢٠ سلالة من جرثومة K.pneumoniaeمن حالات التهاب التجويف الأنفي وزرعت على وسط MacConkey agar.

٢- اختبارات التحري و الاختبارات الكمياحيوية:

أجريت اختبارات التحري على العزلات التي ظهرت على شكلا مستعمرات وردية مخاطية مخمرة لسكر الاكتوز على وسط اكار الماكونكي والتي شملت : صبغة كرام، اختبار فعالية انزيم السايتوكروم وانزيم الكتاليزو اجريت عليها الاختبارات الكيمياحيوية التالية:

اختبار الاندول، المثيل الاحمر، الفوكس_بروسكور، استهلاك السترات، اختبار إنتاج الغازوال H2S، اختبار الحركة، اختبار إنتاج انزيم اليوريز، اختبار تخمر السكريات(12).

٣- اختبار الحساسية للمصل Serum sensitivity test :

تم اعتماد طريقة (١٣) لتحديد حساسية العزلات للمصل البشري غير الممنع، وتم حساب النسبة المئوية لبقاء الجراثيم في المصل وذلك بمقارنة عدد الخلايا في حالة المعاملة مع المصل مع أنبوب السيطرة حسب طريقة(١٤).

٤- التحري عن وجود المحفظة Capsule:

استخدمت طريقة الحبر الهندي الجافة Dry capsule India ink للتحري عن طبقة الكبسول للجرثومة حسب ما جاء في (١٥).

٥- اختبار التلازن الدموي Haemagglutination test:

تم إجراء الاختبار حسب ما جاء في (٢،١٦) وتضمن الاختبار تحضير المعلق الجرثومي بتركيز (١٠١١) خلية بكتيرية /سم ٣، تحضير معلق كريات الدم الحمر للإنسان ، الأرانب ، الأغنام، كما تم التعرف على نوع الأهداب المشاركة في عملية الالتصاق بإجراء اختبار التلازن الدموي بطريقة الشريحة(١٧).

٦- اختبار التحري عن سمية الذيفان الداخلي:

تم استخلاص متعدد السكريد الدهني باستخدام طريقة الباحثين Chester and Meadow (١٨)، كما تم حقن (٠.١) سم^3 بتركيز (١) ملغم/سم^3 من LPS المستخلص من العزلة قيد الدراسة في ثلاث ة فئران بالغة بطريقة الحقن داخل الخلب Intraperitoneal، فضلاً عن حقن (٠.١) سم^3 من المحلول الملحي الفسيولوجي في مجموعة السيطرة التي تضم ثلاثة فئران لغرض مقارنة التأثير (١٩).

اختبارات الالتصاق Adherence tests:

تم عزل الخلايا الظهارية الفموية من الغشاء المخاطي الفموي Buccal mucosa بطريقة الباحث(٢٠). واجري اختبار الالتصاق حسب طريقة الباحث (٢١).

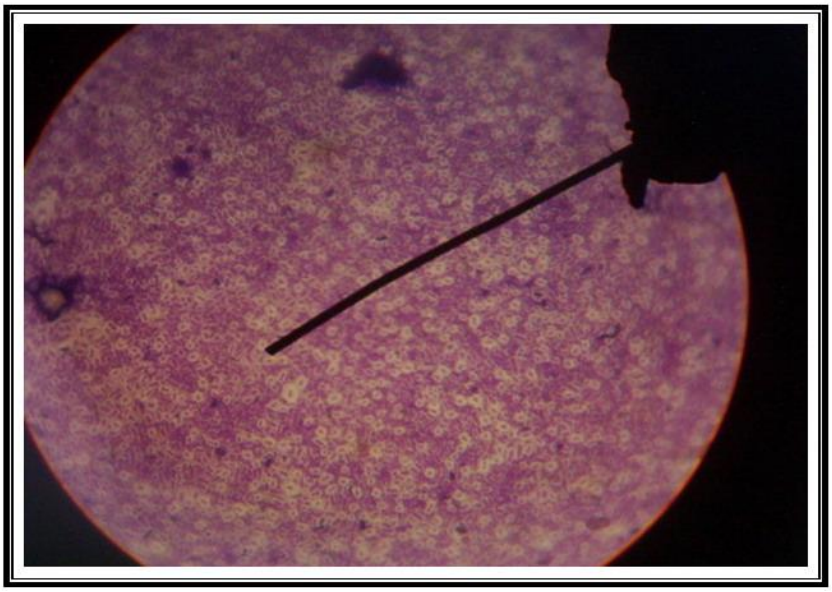
النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج اختبار الحسا سية للمصل ان جميع العزلات كانت شديدة المقاومة للمصل اذ بلغت نسبة البقاء ٢١٠%.اتفقت النتيجة مع دراسة (٢٢) الذي وجد ان عزلات *K. pneumoniae* المعزولة من الإصابات المختلفة كانت شديدة المقاومة لفعالية المصل.

ان النمط المصلي للعزلات له علاقة وثيقة بدرجة المقاو مة للمصل اذ أشار الباحث (٢٣) إلى ان النمط المصلي O_1 هو الأكثر مقاومة لفعالية المصل بين العزلات السريرية.

كما ان سمك طبقة الغلاف عامل مهم لمقاومة فعالية المصل إذ أشار الباحث(24) إلى انه كلما ازداد سمك الطبقة كلما ازدادت قابلية الجرثومة على مقاومة هذه الفعال ية من خلال حجب المستضدات الجسمية للجرثومة عن مكونات المتم.

توضح الصورة (١) المحفظة للجرثومة قيد الدراسة التي ظهرت على شكل هالة مضيئة حول الخلايا، واتفقت النتيجة مع دراسة (25 ;26) الذين أشاروا إلى ان اغلب العزلات السريرية لجرثومة *K. pneumoniae* تنتج غلافاً سميكاً يحيط بشدة بسطح الجرثومة والذي يعد احد عوامل الضراوة المهمة للجرثومة اذ تقاوم عملية البلعمة. وأظهرت النتائج امتلاك جميع السلالات المعزولة من التهاب التجويف الأنفي للغلاف وهذا يؤكد أهمية الغلاف في إحداث اخماج الجهاز التنفسي العلوي و السفلي من خلال مقاومتها للببتيدات المضادة للجراثيم و هذا ما أكده الباحث(27).

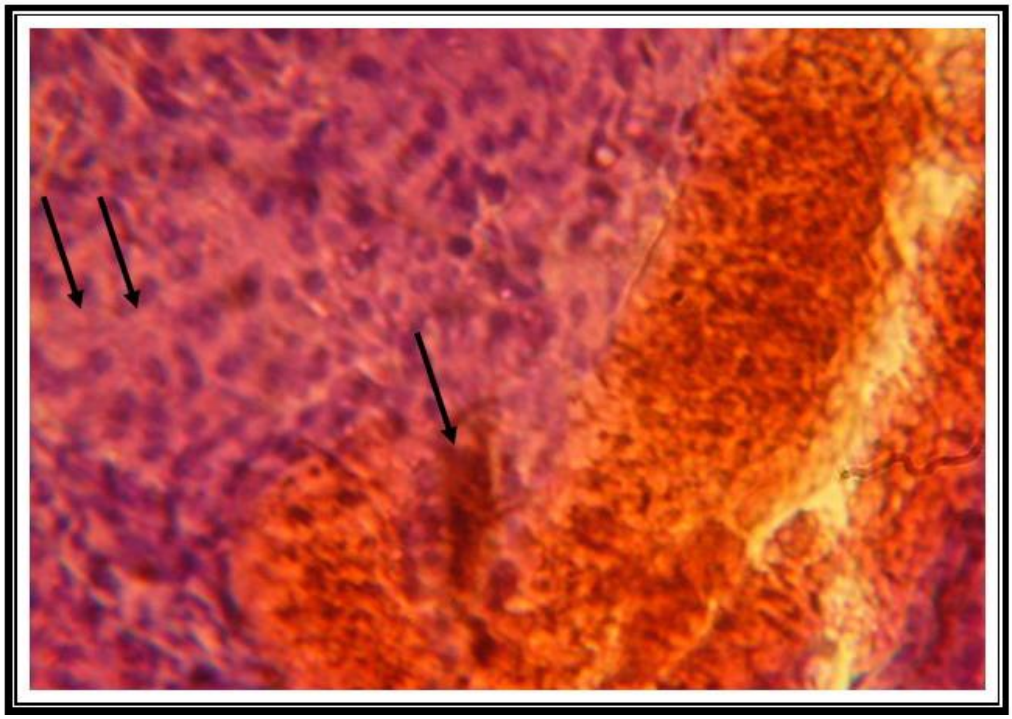


صورة (١) : صورة مجهرية توضح المحفظة في جرثومة *K. pneumoniae* مصبوغة بصبغة الحبر الهندي.

وبينت نتائج حقن متعدد السكريد الدهني في الفئران المختبرية حدوث نفوق الفئران المحقونة بعد (٣) أيام من الحقن مع عدم تأثر الفئران المحقونة بالمحلول الملحي الفسيولوجي،

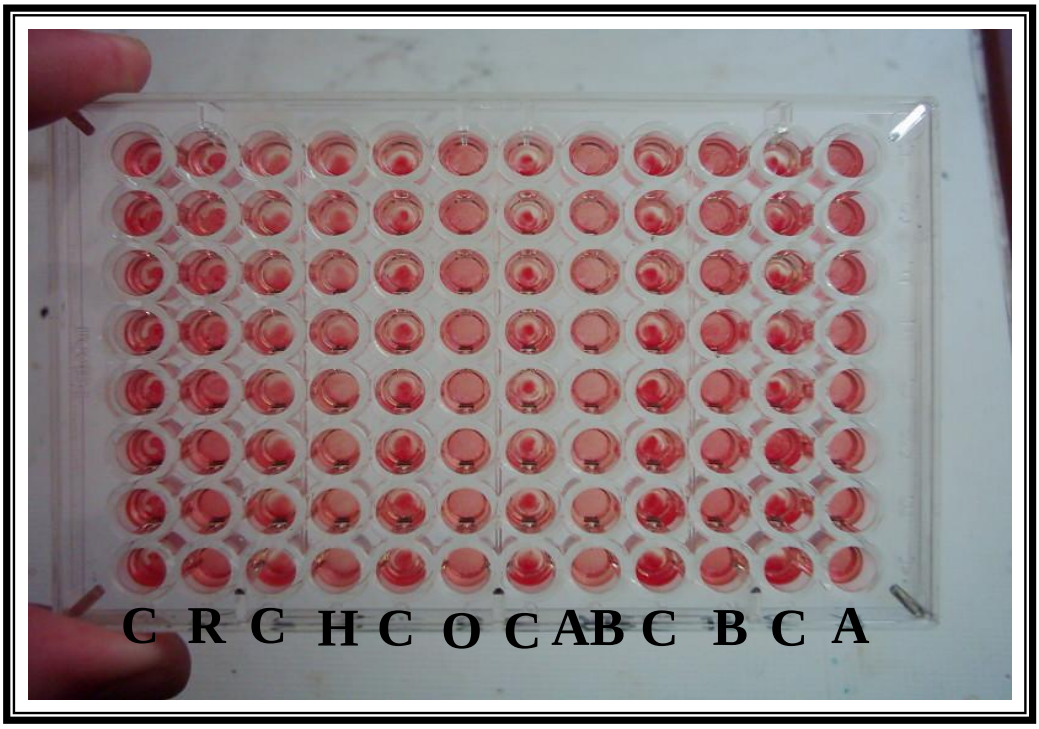
كذالك بينت المقاطع النسيجية لكبد ورئة الفئران المحقونة بالـ (LPS) حدوث احتقان شديد في الأوعية الدموية وفي الفراش الشعري Capillary bed، ارتشاح الخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات بهيئة بؤر في نسيج الكبدوتنكس فجوي في هيولي الخلايا الكبدية كما موضح بالصورة (٢).

اتفقت النتيجة مع دراسة (١٩) الذين أكدوا على ان الذيفان الداخلي للجرثومة يسبب زيادة في نفاذية الأوعية الدموية و حصول تخثرات فيها وكذالك حدوث تجمع للصفيحات الدموية بشكل كبير في الرئتين والكبد والتي تتحطم مما يحدث تحطم الأنسجة بالإضافة إلى انخفاض الضغط الشديد ثم حدوث الوفاة.



صورة (٢): مقطع في نسيج كبد مخمج بجرثومة K. pneumoniae بعد ٢٤ ساعة من الخمج يوضح الاحتقان الشديد في الوريد المركزي(←) مع التنكس الفجوي(←)، قوة تكبير 400X، الصبغةH & E

وأظهرت نتائج اختبار التلازن الدموي اختلاف العزلات في نوع التلازن التي أنتجتها إذ أعطت 14 (70%) عزلة تلازناً موجباً مع جميع فصائل الدم للإنسان وكريات الدم الحمر للأغنام والأرانب بوجود سكر الم انوز (MRHA) وأعطت 6 (30%) عزلة تلازناً دموياً موجباً مع نفس مجاميع الدم بعدم وجود سكر المانوز (MSHA). والصورة(٣) توضح الاختبار إذ ان النتيجة الموجبة ظهرت على شكل شبكة مغطية لكل مساحة الحفرة واتفقت النتيجة مع دراسة الباحث (١٦) اللذان وجدا ان اغلب العزلات السريرية المعزولة من اخماج الإنسان أعطت تلازناً دموياً بوجود سكر المانوز وان نسبة ضئيلة جداً (٢%) من عزلات *K. pneumoniae* المعزولة من البيئة أعطت تلازناً دموياً وهذا يؤكد على أهمية الشعيرات للجرثومة في إحداث اخماج الجهاز التنفسي إذ تساعدها على الالتصاق على ال خلايا الظهارية التنفسية وعلى كريات الدم الحمر وملازنتها والتي تعد كخطوة تمهيدية في إحداث الخمج.

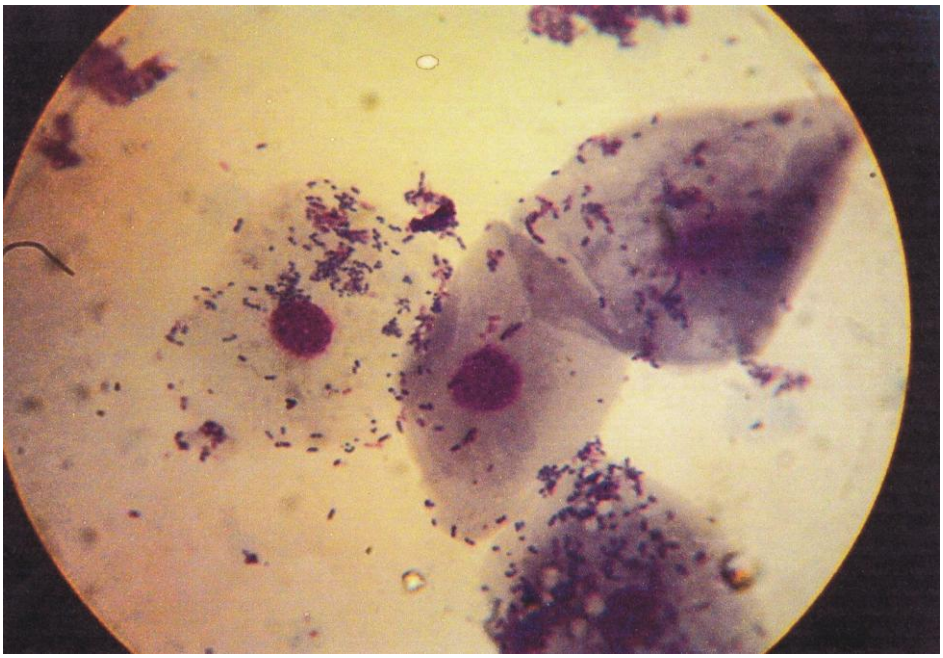


صورة (٣): قدرة عزلات جرثومة *K. pneumoniae* على إحداث التلازن الدموي لكريات الدم الحمر للإنسان والأغنام والأرانب. (A، B، AB، O) فصائل دم الإنسان H كريات دم الحمر للأغنام، R كريات الدم الحمر للأرانب، C سيطرة

أشارت نتائج اختبارات الالتصاق إلى قابلية العزلات العالية ع لى تحقيق الالتصاق الناجح مع الخلايا الظهارية الفموية اذ بلغ معدل التصاق الجرثومة (٢.٨ ± ٦٥.٨) جرثومة /خلية والصورة (٤) توضح قدرة سلالات الجرثومة للالتصاق على الخلايا الظهارية الفموية للإنسان وقد أظهرت العزلات اختلافاً في قابليتها ع لى الالتصاق وهذا قد يعود إلى اختلاف النمط الغلافي او نوع الشعيرات المشاركة في الالتصاق.

ان امتلاك هذه الجرثومة القدرة العالية على الالتصاق على الخلايا الظهارية للقناة التنفسية يزيد من قابليتها على استعمار الجرثومة للمسارات التنفسية العليا وتكاثرها وتطور حالات ذات الرئة بالإضافة إلى ذالك تصبح هذه الخلايا كمستودع والتي يمكن ان تنتهز الفرصة وتنتشر عند الظروف غير الطبيعية للمضيف وهذا ما أكده الباحثان (٢٨).

ان التصاق جرثومة *K. pneumoniae* المعزولة من التهاب الأنف على الخلايا الظهارية للقناة التنفسية قد يعود إلى امتلاك الجرثومة أنواع مختلفة من الشعيرات اذ أشار الباحث (٢٠) إلى ان العزلات السريرية من جرثومة *K. pneumoniae* المعزولة من إصابات القناة التنفسية تمتلك قدرة هائلة على الالتصاق على الخلايا الظهارية الفموية.



صورة(٤): قدرة عزلات جرثومة *K. pneumoniae* للالتصاق على الخلايا الظهارية الفموية للانسان

المصادر

1) Holt, J. G., Kriey, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Lippncott. Williams & Willikins

2) Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmian, B. P., and Simmons, A. (1996). Mackie and Mcarteny. Paractical Medical Microbiology. 14th ed., Churchill Livingston, Inc., New York. pp. 97 – 123.

3) Barros, J. C. S., Pinherio, S. R., Bozza, M., Filho, F. J. G., Bello, A. R., Lopes, U.G. and Pereira, J. A. A. (1999). Mem, Inst. Oswalldo Cruz, Riodejanerio, 94 : 795 – 802.

4) Braundwald, E., Hauser, S. L., Fauci, A. S., Lonho, D. L., Kasper, D. L. and Jameson, J. L., (2001). Harrison's principles of Internal Medicine, 15th ed. McGraw-Hill Company, USA. 115 – 123.

5) Sahly, H., and Podschun, R. (1997). Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4: 393 – 399.

6) Poschun, R. and Ullmann, U. (1998). Clin. Microbiol. Rev., 11 (4): 589 – 603

7) Taylor, P. W. (1983).. Microbiol. Rev., 47: 46 – 83.

8) Reid, G., Sobel, J. D. and Melling, J. (1990). Rev. Infect. Dis., 9: 480 – 485.

9) Ofek, I., and Doyle, R. J. (1994). Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.

10) Domenico, P. Salo, R. J., Cross, A. S., and Cunha, B. A. (1994). Infect. Immun., 63 : 495 – 499

11) Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. (2002). Microbiology. 3rd ed., The McGraw Hill Comp. Inc., U.S.A. pp. 101 – 103.

12) Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. and Yolken, R. H. (1999). Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. American society for Microbiology: Asm press. Washington. D. C. pp. 80 – 82.

13) McFaddin, J. F. M. (1985). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria, Williams & Willkins. Baltimore. USA. pp. 100 – 105.

14) Podschun, R., Teske, E., Ulmann, U. (1991)., Zentbl. Hyg. Umweltmed., 192: 279 – 285.

15) Hughes, C., Phillips, R. and Roberts, A. P. (1982). Infect. Immun., 35: 270 – 275.-١٤

16) Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P. and Swan, R. H. A. (1975). Medical Microbiology, 12th ed. Longman Group Ltd., New York. pp. 80 – 95.

17) Podschun, R., and Sahly, H. (1991). Zentbl. Hyg., 191: 49 – 52.

18) Tomoyukit, I., Yosako, A. B. E., Masafumi, N., Akira, I. and Kanji, T. (1983).. J. Infect. Immun., 39 (3): 1307 – 1315.

19) Chester, I. R. and Meadow, P. W. (1973).. J. Gene. Microbio., 78: 305 – 318.-١٨

20) Endo, Y., Yokochi, T., Matsushita, M., Fujita, T. and Takata. H. (2001).. J. Endotoxin Research. 7 (6): 451 – 455.

21) Hornick, D. B., Allen, B. L., Horn, M. A. and Clegg, S., (1992).. Infect. Immun., 60: 1577 – 1588.

22) Woods, D. E., Straus, D. C., Johanson, W. G., Berry, V. K. and Bass, J. A. (1980)..Infect. Immun., 29 (3) : 1146 – 1151.

٢٣) الحسو، محمود زكي سليمان (١٩٩٩). عزل وتشخيص جرثومة *Kleb. pneumoniae* ودراسة بعض صفاتها الامراضية والزرعية، رسالة ماجستير، جامعة الموصل.

24) Mizuta, K., Ohta, M., Mori, M., Hasegawa, T., Nakashima, I. and Kato, N. (1983).. Infect. Immun., 40: 56 – 61.

25) Alvarez, D. S., Merino, J. M., Tomas, V. J., Bendi, and Alberti, S. (2000).. Inf. Immun., 68 : 953 – 955.

26) Baron, E. J., Peteerson, L. and Fingold, S. M. (1994). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9th ed. Hoffman Press, USA. pp. 112 – 153.

27) Kabha, K., Nissimov, L., Athamm, A., Keisari, Y., Parolis, H., Parolis, L. A., Crue, R. M., Sharfer, J. S., Ezekowitz, A. R., Ohman, D. E. and Ofek, I. (1995). Infect. Immun., 63 (4) : 847 – 852.

28) Ganz, T. (2002).. J. Clin. Investing., 109 : 693 – 697.

29) Williams, P., Tomas, J. M. (1990).. Rev. med. Microbiol., 1: 196 – 204.