Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

دراسة تشخيصية لبكتريا *Pseudomonas aeuroginosa* ومناعية لمتعدد السكريد الشحمي المستخلص منها

وجدان رضا تاج الدين

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم / جامعة بابل

الخلاصـــة

تم جمع 115 عينة تمثلت بـ (42 عينة جروح و38 عينة حروق و17 عينة ادرار و10 عينة من اخماج الاذن و8 من المهبل من مستشفى الحلة التعليمي ومستشفى بابل للولادة والاطفال في محافظة بابل وللفترة الواقعة بين ايلول 2010- حزيران 2011 .وقد تم الحصول على 45 عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeuroginosa* وشخصت العزلات وفق الاختبارات المظهرية والكيموحيوية وباستعمال نظام Api 20 E.وكانت نسبة العزل من مواقع الاصابة المختلفة كالاتي: اخماج الجروح 18 عزلة (40%) والحروق 15 عزلة (33..33%) ، وان عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من الادرار جاءت بالمرتبة الثالثة 8 (17.77%). تلتها تلك المعزولة من الاذن 3(6.66%) ثم العزلات المعزولة من المهبل 1(2.22%).

تم استخلاص متعدد السكريد الشحمي من بكتريا *Pseudomonas aeuroginosa* المعزولة من الجروح.وقد تم تمنيع الارانب النيوزيلندية البيضاء (باستخدام ثلاثة حيوانات لكل تجربة) بعمر 3-2 شهر بمستضد متعدد السكريد الشحمي فضلا عن إستخدام المساعد المناعي فروبند الكامل (Complete Freunds' Adjuvant)وبعد انتهاء مدة التمنيع حددت بعض معايير الاستجابة المناعية الجهازية الخلطية للارانب الممنعة بمستضد الجرثومة ومقارنتها مع حيوان السيطرة الممنع بماء الملح الطبيعي .

دلت نتائج الدراسة الحالية ان مستضد الجرثومة قد ادى الى استجابة مناعية جهازية خلطية التي تم تحديدهاباستخدام فحص الانتشار المناعي القطري لتحديد مستويات تركيز الكلوبيولينات المناعية (IgA وIgM و IgG) ومكونات المتمم (C3و C4) ومعدل تركيز البروتين الكلي حيث ازداد معدل تركيز الكلوبيولينات المناعية ومكوني المتمم ومعدل تركيز البروتين لحيوانات الاختبارفقد ازدادت فيها حيث بلغ معدل تركيز IgM (304.3) mg/dl و كان معدل تركيز IgG (1907.4.) mg/dl اما معدل IgA فقد بلغ (493.6) مقارنة بحيوانات السيطرة حيث بلغت مستويات IgM و IgG و IgA 208.7و1488.4 و433.6على التوالي امابالنسبة لمكون المتمم الثالث فقد بلغ(93.4)mg/dl وبلغ معدل تركيز المكون الرابع (13.4) mg/dl وايضا ازداد معدل تركيز البروتين الكلي حيث بلغ (15.3) gm/dl وجميع هذه القيم هي للحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي ولقد كانت نتائج كل الاختبارات معنوية وعند مستوى احتمالية (P< 0.05) عند مقارنتها مع حيوانات السيطرة .

المقدمة

تعد جراثيم *Pseudomonas. aeruginosa* ممرضات انتهازية(Opportunistic Pathogen) من النادر ان تسبب المرض في الأشخاص السليمين ، لكنها عالية الضراوة في المرضى ذوي الميكانيكيات الدفاعية الضعيفة مسببه التليف الكيسي (Cystic fibrosis) واخماج القناة البولية (UTI) وتجرثم الدم (Bacteremia) واخماج العين(Eye Infections) واخماج الاذن (Ear infections) واخماج الجلد (Skin infections) واخماج الجهاز العصبي المركزي(Central Nervous system infections) والتهاب شغاف القلب (Endocarditis) واخماج العظم والمفصل (Bone and Joint infections). وان الطيف الواسع من الامراض الناتجة من قبل *P. aeruginosa* يعتمد على امتلاكها عوامل ضراوة متعددة (Gorbach *et al.*, 1996).

تعود امراضية جرثومة *P. aeruginosa* الى عوامل الضراوة المختلفة التي تمتلكها وتشتمل على عوامل الضراوة المرتبطة مع الخلية (Cell associated V.F.) وتشتمل على الشعيرات(Pili) و(alginate) ومتعدد السكريد الشحمي (Lipopolysacchaerides) وعوامل الضراوة الخارج خلوية (Extracellular V.F.) وتشتمل على الذيفان الخارجي A (Exotoxin A) والذيفان المعوي)(Enterotoxin و Exoenzyme S والصبغات والانزيمات.

ان قدرة *P. aeruginosa* على غزوالانسجة تعتمد على مقاومتها لعملية البلعمة(Phagocytosis)والدفاعات المناعية للمضيف (Host Immune defenses) وافرازها للانزيمات الخارجية والذيفانات التي تحطم الحواجز الفيزيائية وتشارك في الغزو البكتيري (Chan *et al.*, 1984; Boucher *et al.*, 1996; Monday and Schiller, 1996; Heale *et al.*, 2001) . ان الغزو الموضعي وصفات التخريب تكون ذات علاقة متبادلة إذ

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

تحرر *P. aeruginosa* عدد من الانزيمات الخارجية او الذيفانات التي تعمل انتقائيا على انسجة المضيف المختلفة مثل انزيمات Alkaline protease و Elastase وانزيم التجلط Coagulase وhemolysin وLipase وgelatinase وDNase وPhosphatase alkaline وLecithenase وLeukocidin فضلاً عن حاملات الحديد Siderphore و الذيفان المعوي(Wilhelm *et al*., 1999; Ernst *et al*., 1999)

ومن أحد عوامل الضراوة المهمة امتلاكها لمتعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide)أو الذيفان الداخلي (Endotoxin) وهو من المكونات الأساسية لجدران خلايا الجراثيم السالبة لملون غرام ويلعب دوراً مهماً في التداخل الحاصل بين التراكيب السطحية لكل من الخلية الجرثومية والمضيف وكذلك يعمل على حماية الخلية الجرثومية ووقايتها من التحطيم بالمتمم والخلايا البلعمية وكذلك له دور مهم في الالتصاق والاستيطان يتألف متعدد السكريد الشحمي من ثلاثة أجزاء هي الشحم Lipid A (A) واللب Core والسلسلة الجانبية O- (O-side chain)، لكن منطقة الشحم A هي المسؤولة عن الفعالية السمية وأن حدة الإمراضية والسمية تتطلب وجود السلسلة الجانبية التي تسمى المستضد الجسمي إذ تعود إليها الصفة المستضدية، وتتميز بتنوع وتغاير كبيرين (Coering *et al*.,2008).ونظرا لاهمية هذه الجراثيم في احداث طيف واسع من الامراض الجهازية لذا ارتأت الدراسة الحالية على :-

1. عزل جرثومة *P. aeruginosa* من مواقع الاصابة المختلفة وتشخيصها
2. تحضير مستضد الجرثومة *P. aeruginosa* متعدد السكريد الشحمي
3. استخدام الحيوان المختبري الارنب موديلا للدراسة من خلال تمنيعه بالمستضد متعدد السكريد الشحمي لمعرفة بعض معايير الاستجابة المناعية الخلطية لهذه الجرثومة .

المواد وطرائق العمل

تم جمع 115 عينة من الجروح و والحروق وادرار والاذن والمهبل بوساطة مسحات معقمة محفوظة داخل انابيب اختبار حاوية على وسط مرق منقوع المخ والقلب Brain Heart Infusion Broth Medium وحضنت جميع العينات في المختبر بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة

جمعت العينات المرضية من الاطفال والبالغين ومن الذكور والاناث من مستشفى الحلة التعليمي ومستشفى بابل للولادة والاطفال في محافظة بابل وللفترة الواقعة بين ايلول 2010- حزيران 2011 .

1-عزل وتشخيص البكتريا

استخدمت الاوساط التالية لعزل وتشخيص البكتريا***P. aeruginosa***

- **وسط الاكار المغذي** Nutrient Agar Medium حضر حسب تعليمات شركة Oxoid.
- **وسط اكار الماكونكي** MacConkey's Agar Medium
- **وسط اكار الدم** Blood Agar Medium
- **وسط King A medium (Pyocyanosel agar)**

استخدم هذا الوسط لغرض تشخيص واظهار الصبغة المنتجة من قبل *Pseudomonas* ويتكون من : Peptone 20غم وMagnesium chloride 1.4 غم وPotassium sulfate 10 غم و agar 13.6 غم. اذيبت جميع هذه المكونات في 1 لتر من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني عند 7.2 يضاف له 10 مل من الكليسيرول ويمزج ويسخن ويعقم بالموصدة بدرجة 121 °م ولمدة 15 دقيقة (Collee *et al*., 1996) .

- وسط Pseudomonas selective Agar (Cetrimide Agar)

وسط انتقائي لعزل وتشخيص *P. aeruginosa* يستخدم (Cetyl trimethyl ammonium bromide) cetrimide لغرض التثبيط الانتقائي للمتعايشات الطبيعية Normal flora عدا جرثومة *P. aeruginosa* ويتكون الوسط من Peptone 20 غم وMagnesium chloride 1.4 غم و Potassium sulfate 10 غم و Cetrimide 0.3 غم و Agar 13.6 غم اذيبت جميع هذه المكونات في 1 ليتر من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني عند7.2 يضاف له 10سم^3 كليسيرول يمزج ويسخن يعقم بالموصدة بدرجة 121 °م ولمدة 15 دقيقة (Finegold and Martin, 1982)

انتخبت بعدها المستعمرات النامية التي تتصف بكونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز والمحللة للدم تحللا كاملا من نوع hemolytic-□ أو تحللا جزئيا والتي تكون مستعمراتها قد انتجت الصبغة على وسط King A والتي نمت ولم تتثبط على الوسط الانتقائي للـ *P. aeruginosa* وسط Cetrimide agar . تم عمل مسحات من المستعمرات النائية النامية وصبغت بصبغة كرام لملاحظة الشكل الخلوي وطبيعة اصطباغ الجرثومة تجاه صبغة كرام .

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

ثم اجريت العديد من الاختبارات البايوكيميائية التشخيصية التي شملت اختبار الاوكسديز والاندول واختبار المثيل الاحمر واختبار فوكس بروسكور واختبار القدرة على استهلاك السترات والقدرة على الحركة وانتاج H_2S . تم التاكد من التشخيص الروتيني الذي اجري على جرثومة *P. aeruginosa* باستخدام العدة التشخيصية (Biomeriuex) API 20E Analytical profile lndex وحفظت العزلات على موائل الاكارلغرض اجراء الفحوصات الاخرى

2- وسط انتاج السكر المتعدد الشحمي LPS

(a)- وسط تنشيط البكتريا Initial medium

حضر الوسط باذابة (20) غم من الكلوكوز Glucose، (1) غم من NH_4Cl و (5.44) غم من KH_2PO_4 في لتر من الماء المقطر المعقم، اضيف اليه (6) مل من محلول الاملاح المعدنية(0.1 غم من $CaCl_2$ و 0.4 غم من $FeSO_4.7H_2O$ و 0.075 غم من $MnSO_4.7H_2O$ في كمية قليلة من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم النهائي الى لتر) (Marques *et al.*, 1986).

(b)- وسط انتاج السكر المتعدد الشحمي Production medium

حضر الوسط باذابة (20) غم من الكلوكوز، (0.5) غم من NH_4Cl، (2.72) غم منKH_2PO_4 و (6) مل من محلول الاملاح المعدنية (Marques *et al.*, 1986).

3- **الحيوانات المختبرية** Laboratory animals

استعملت الأرانب النيوزيلندية البيضاء بعمر (2 – 3) شهر وبوزن (1 – 1.5) كيلوغراماً.وضعت الحيوانات في أقفاص داخل البيت الحيواني مع مراعاة نظافة ماء الشرب والعلف مع تعقيم الأقفاص بين الحين والآخر. و اجري عليها قبل التجربة بعض الاختبارات للتأكد من عدم وجود أي اصابة تجعل الحيوان خارج التجربة (Schnider *et al.*, 1990)

4- الدراسة المناعية في الأرنب لمستضدمتعدد السكريد الشحمي

- **استخلاص متعدد السكريد الشحمي**

اتبعت طريقة (Learen *et al.* 1987) المحورة من قبل (Nuaman, 2002) وكما ياتي :

-نميت العزلة المأخوذة على وسط الاكار المغذي في حاضنة بدرجة حرارة 28°م ولمدة (24) ساعة، بعدها حفظت بدرجة حرارة (4)° م لحين الاستعمال.

- نشطت البكتريا على الوسط الاولي Initial medium اذ زرعت البكتريا في وسط التنشيط وحضنت بدرجة حرارة 28 – 32° م ولمدة (18) ساعة.
- نقل (2%) من وسط التنشيط الى وسط الانتاج Production medium وهو افضل وسط لانتاج السكر المتعدد الشحمي (Nuaman, 2002) وحضنت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 28° م ولمدة (72) ساعة.
- اضيفت مادة $EDTA\text{-}Na_2$ (وزنها الجزيئي 338.25) الى وسط الانتاج بتركيز 2 ملي مول، وضعت الدوارق في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 37° م ولمدة (30) دقيقة.
- عوملت الخلايا بجهاز الذبذبات فوق الصوتية Ultra sonicator لمدة (30) ثانية بتردد قدره (20) ذبذبة في الثانية لتكسير الخلايا مع مراعاة استخدام الثلج المجروش.
- رسبت الخلايا بجهاز المنبذة المبردة نوع (Sigma)بقوة (27420 g) لمدة نصف ساعة عند درجة حرارة 4 °م.
- جمع الراشح ونبذ بالقوة نفسها ولمدة ساعة للتخلص من جميع بقايا الخلايا البكترية.
- اضيف الاسيتون الى الراشح بنسبة 5 : 1 (حجم/حجم) وترك بدرجة حرارة 4° م لمدة (24) ساعة للحصول على السكر المتعدد الشحمي بشكل دقائق عالقة بيضاء.
- استخدم جهاز Rottary evaporator بدرجة حرارة 40 – 50° م لغرض الحصول على راسب السكر المتعدد الشحمي بشكل سائل كثيف لزج.
- صبت المادة في طبق بتري ونقلت الى الحاضنة بدرجة 32 ° م ولمدة (48) ساعة لغرض تجفيفها، وحفظت لحين الاستعمال.

- **التنقية الجزئية للسكر المتعدد الدهني** Partial purification of lipopolysaccharide (LPS)

استخدمت طريقة (Sandford,1979) لتنقية السكر المتعدد الشحمي المحورة من قبل (Nuaman,2002).

- اذيب السكر المتعدد الشحمي في الماء الخالي من الأيونات Deionized water بنسبة 60 ملغم/مل، وترك المحلول لمدة (24) ساعة بدرجة حرارة 4° م كي يترسب السكر المتعدد الدهني.

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

- اعيد اجراء الخطوة السابقة على الراسب المستحصل اربع مرات للحصول على الـ LPS ذي اللون الابيض.
- اذيب الـ LPS في الماء الخالي من الايونات بنسبة 60 ملغم/مل ثم اضيف الاسيتون الى محلول LPS بنسبة 5 : 1 وترك المزيج في درجة حرارة 4 °م لمدة (24) ساعة للحصول على راسب الـ LPS.
- اضيف 20 مل من الاسيتون الى راسب الـ LPS لازالة الماء منه، ووضع في درجة حرارة 4 °م لمدة (24) ساعة.
- جفف راسب LPS في درجة حرارة 60°م لمدة (15) دقيقة، ثم حفظ لحين الاستعمال.

- **الكشوفات الكيميائية اللونية على السكر المتعدد الدهني**

تم الكشف عن الكربوهيدرات، البروتينات، الدهون والاحماض النووية باستخدام- كشف مولش و كشف بايوريت و كشف الأكرولين و كشف بايلعلى التوالي (Plummer, 1978)

- **المساعدات المناعية**

تم استخدام المساعد المناعي الكامل فروند Complete Freunds' Adjuvant (Difco.USA).

- برنامج التمنيع

حقنت ثلاث ارانب بمستضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* (متعدد السكريد الشحمي) إضافة إلى المساعد المناعي (AL-Thahab.,2006) وتم حقن ثلاثة حيوانات بالملح الطبيعي Normal saline كسيطرة

5- الاختبارات المناعية على الامصال

بعد جمع الدم بالأنابيب المعقمة والخالية من مانع التجلط نقل الى المختبر ثم تركت الأنابيب ليتخثر الدم بعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 3000 دورة/ دقيقة ثم تم فصل المصل بواسطة انابيب باستور معقمة ووضعت في انابيب حفظ العينات (Frei *et al.*, 1995).

- **الانتشار المناعي الشعاعي Radial immunodifussion (RID)**

تم تحديد مستوى الكلوبيولينات المناعية lgG، lgM، lgA والمتمم C_3 ، C_4 الموجودة في المصل المفصول من الارانب المجرعة بمستضدات جرثومة ***P. aeruginosa*** بطريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد حسب مبدأ Mancini وجماعته (1965) التي وصفت العلاقة الخطية بين تركيز المستضد و نصف قطر حلقة الترسيب المناعي التي تتكون في الاكار المحتوي على الاضداد النوعية لذلك المستضد .وكذلك حسب ماورد في تعليمات الشركة المصنعة المرفقة مع الاطباق الخاصة بهذا الفحص إذ ان الهلام Gel الحاوي على الحفر يحوي على الضد احادي المناوعة يتم انتشار النموذج بشكل شعاعي خلال الهلام والمستضد يكون حلقة راسب مع الضد الاحادي ويتم احتساب النتيجة بوساطة جدول القياسات المرفق مع عدة الفحص وكانت

- **قياس تركيز البروتين الكلي**

تم قياس تركيز البروتين الكلي للمصل بالاعتماد على الطريقة اللونية Colorimetric method حيث يتفاعل ايون النحاس مع الاصرة الببتيدية في الوسط القاعدي ليكون معقدا لونيا (Tietz .,1999)

ولقد استخدمت المحاليل الجاهزة من شركة (Biolabo,France)

6 -التحليل الإحصائي

حللت النتائج إحصائيا باستخدام اختبار تحليل التباين باتجاه واحد Anova one way كما واستخدم اقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) للبحث عن وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة وعلى مستوى معنوية (0.05) وثبتت النتائج بشكل (المعدل الحسابي ± الانحراف المعياري) (Dawed and Al-Yas ,1991).

النتائج والمناقشة Results and Discussion

- عزل جرثومة ***Pseudomonas aeruginosa***

تم عزل (45) عزلة من جرثومة *P. aeruginosa* من مجموع (115) عينة جروح و حروق وادرار ومهبل وكانت نسبة العزل من مواقع الاصابة المختلفة كالاتي: اخماج الجروح 18 عزلة (40%) والحروق 15 عزلة (33..33%) ، وان عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من الادرار جاءت بالمرتبة الثالثة 8 (17.77%). تلتها تلك المعزولة من الاذن 3(6.66%) ثم العزلات المعزولة من المهبل 1(2.22%)(الجدول (1)).

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

جدول (1) اعداد ونسب عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من مواقع الاصابة المختلفة.

ت	نوع العينة	عددالعينات	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزل %
1	عينات الجروح	42	18	40
2	عينات الحروق	38	15	33.33
3	عينات ادرار	17	8	17.77
4	عينات الاذن	10	3	6.66
5	عينات المهبل	8	1	2.22
	المجموع	115	45	100

يتبين من الجدول (1) ان عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من اخماج الجروح والحروق اعطت اعلى نسبة بلغت 18 عزلة (40%)و15 عزلة(33.33%) على التوالي، وان عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من الادرار جاءت بالمرتبة الثالثة 8 (17.77%). تلتها تلك المعزولة من الاذن 3(6.66%) ثم العزلات المعزولة من اخماج الاذن 2(3.85%) .

ان نتائج هذه الدراسة كانت مقاربة لنتائج دراسات (Hamood *et al.*, 1996a) الذي عزل جرثومة *P. aeruginosa* من ثلاثة مواقع اصابة هي الجروح بنسبة 37% والقناة البولية بنسبة 33% والرغامي بنسبة 30% من مجموع 75 عزلة لتحديد تأثير البيئة الموضعية داخل جسم المضيف على قدرة *P. aeruginosa* على انتاج عوامل الضراوة الخارج خلوية المختلفة مثل Exoenzyme S وExotoxin A و Phospholipase C وElastase . ودراسة (الراوي ، 1999) التي عزلت جرثومة *P. aeruginosa* بنسبة 55% من مجموع 567 عينة من مواضع اصابات مرضية مختلفة وتشتمل على الجروح بنسبة 41.3% والحروق بنسبة 35.6% والمجاري البولية بنسبة 30% والاذن الوسطى بنسبة 25% والكسور بنسبة 23.3% .. ودراسة (الطريا ، 2002) التي عزلت جرثومة *P. aeruginosa* بنسبة (44%) من مناطق مختلفة من جسم الانسان وتشتمل على الاذن والادرار والجروح وعنق الرحم والقشع بنسبة 43.7% و 27.1% و 14.5% و 10.4% و 4.2% على التوالي من مجموع 48 عزلة لدراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية على نمو هذه الجرثومة .

- **التشخيص Identification**

زرعت جميع العينات المأخوذة من المرضى على الاوساط الزرعية وشخصت عزلات *P. aeruginosa* على هذه الاوساط وذلك بدراسة شكل المستعمرات النامية حيث ظهرت على وسط Nutrient agar مستعمراتها كبيرة لها مظهر مرتفع وحافات مسطحة ، لها رائحة تشبه رائحة العنب grape like odor ، وتنتج صبغة Pyocyanin ، وتكون موجبة لاختبار الاوكسديز بـ 10 ثواني . كما ظهرت المستعمرات على وسط Blood agar مخاطية Mucoid اظهرت تحللا كاملا للدم β-hemolytic أو تحللاً جزئياً -□ hemolytic ، وظهرت المستعمرات على وسط MacConkey agar شاحبة لانها غير مخمرة لسكر اللاكتوز . وظهرت مستعمرات معظم عزلاتها على وسط King A كبيرة مميزة نتيجة لافرازها صبغات متعددة الالوان .

كما نمت هذه الجرثومة على الوسط الانتقائي Cetrimide agar الحاوي على مادة Cetrimide التي لا تؤثر على نمو *P. aeruginosa* وتثبط بقية الكائنات . وقد تم اختيار اوساط الدراسة هذه ذلك لتوفرها في المختبر وسهولة تحضيرها تركيبيا ، فضلا عن تميزها بالتحري السريع عن *P. aeruginosa* خلال فترة (24) ساعة .

ومن نتائج الفحص المجهري للمسحات الجرثومية المصبوغة بصبغة كرام ظهرت جرثومة *P. aeruginosa* سالبة لهذه الصبغة وعلى شكل عصيات قصيرة .

- الاختبارات الكيموحيوية **Biochemical Tests**

اظهرت نتائج الاختبارات الكيموحيوية ان جميع العزلات اعطت نتيجة موجبة لفحص الاوكسديز وانتاج الصبغة ونتيجة سالبة لفحص Urease ومن اختبارات IMViC امكن التأكد من نقاوة *P. aeruginosa* فاعطت جميع العزلات نتائج سالبة لاختبار الاندول والمثيل الاحمر وفوكس بروسكور ونتيجة متغيرة لاختبار السترات .

عند استعمال وسط Kligler تلون الجزء المائل Slant وقعره باللون الاحمر دليل على عدم تخمر السكريات في هذا الوسط كذلك لم يتولد الغاز أو الراسب الاسود نتيجة النمو . وقد كانت جميع العزلات متحركة ،

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

وغير منتجة لغاز H_2S . وبينت النتائج قدرة جميع العزلات على النمو في درجة حرارة 42 °م ، تكون مخمرة لسكر الكلوكوز ، وغير مخمرة لسكر لاكتوز وسكروز .

كانت النتائج التشخيصية للاختبارات الكيموحيوية والتي اجريت على عزلات *P. aeruginosa* مطابقة لما ورد من انظمة التشخيص المعتمدة (Baron and Finegold, 1990; Collee *et al.*, 1996; Koneman *et al.*, 1997) .

- تشخيص عزلات جرثومة *P. aeruginosa* بنظام API20E

وهو نظام الاختبارات المتعددة Multitest systems ، ويعد واحدا من اهم الفحوصات التشخيصية السهلة والذي يمتاز بالدقة والسرعة لتشخيص جرثومة *P. aeruginosa* واجري هذا الاختبار على عزلات المعزولة لجرثومة *P. aeruginosa* وقد افادت العديد من الدراسات لاستخدام هذا النظام لتشخيص هذه الجرثومة (Holt *et al.*, 1994; Collee *et al.*, 1996; Koneman *et al.*, 1997) .

ونظرا ان البكتريا سجلت اعلى نسبة اصابة في الجروح ارتاينا ان نجرى الجوانب المناعية عاى عزلة معزولة من اصابات الجروح .

- **الكشوفات الكيميائية اللونية على متعدد السكريد الشحمي**

تم التاكد من ان المادة المستخلصة من جرثومة ***P. aeruginosa*** هي سكر متعدد دهني بكشوفات مولش، بايوريت، اكرولين وبايل، وذلك بانه اظهر كشف مولش على السكر المتعدد الشحمي نتيجة موجبة بظهور حلقة ارجوانية اللون في منطقة تماس السائلين مما يدل على وجود الكربوهيدرات في هذه المادة، في حين اعطى كشف بايوريت نتيجة سالبة وذلك بعدم تكون اللون البنفسجي مما يدل على عدم وجود البروتينات في هذه المادة. واظهر كشف الاكرولين نتيجة موجبة وذلك بانبعاث رائحة تزنخ الدهن. واخيراً فقد اظهر كشف بايل نتيجة سالبة، وذلك بعدم تكون اللون الأخضر – المزرق، وهذا دليل على خلو المادة من الاحماض النووية.

الدراسة المناعية في الحيوان المختبري (الارنب):

- **تركيز الكلوبيولينات المناعية**

الكلوبيولينات المناعية (الاضداد) عبارة عن بروتينات كاربوهيدراتية لها القدرة على التفاعل النوعي مع المستضد الذي ينبه الجهاز المناعي على تخليق تلك الاضداد ، وتنتج الكلوبيولينات المناعية بشكل عفوي من الخلايا البائية جراء التحفيز بالمستضدات المتعددة وان الجزءالاكبر منها يقع ضمن كلوبيولين–كاما ولكنها قد توجد ضمن كلوبيولين– بيتا (Roitt.,2001 ; Brook *et al* .,2007)

استخدمت طريقة الانتشار المناعي الشعاعي Radial immunodifussion(RID) لتقدير تركيز الكلوبيولينات المناعية IgG و lgM و IgA الموجودة في مصول الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي لبكتريا ***P. aeruginosa*** المعزولة من الجروح الدراسة.

يوضح الجدول (2) ادناه ان مستضد متعدد السكريد الشحمي سبب زيادة في معدل تركيز الكلوبيولينات المناعية لحيوانات الاختبار مقارنة مع حيوانات السيطرة .

جدول (2) معدل تركيز الكلوبيولينات المناعية
(mg/dl)

نوع الاختبار	الحيوانات الممنعةبالمستضد	حيوانات السيطرة
IgM S.D.±M	3.3±304.3	2.7± 208.7
IgG S.D.±M	32.2±1907.4	20.4±1488.4
IgA S.D.±M	15.3±493.6	18.2±433.6

ومن الجدول (2) نلاحظ حدوث ارتفاع معنوي في معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgM لمصل حيوانات الاختبار الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي المستخلص من بكتريا Pseudomonas aeruginosaعند مقارنتها مع حيوانات السيطرة وقد اتفقت هذه النتائج مع (الخفاجي،2010)التي وجدت ان التمنيع باحد مكونات الغشاء الخارجي يؤدي الى تحفيز زيادة انتاج الاجسام المضادة ومنها IgM كما واتفقت هذه النتائج مع (Al-Alwany,2006) الذي وجد ارتفاع للضد IgM عند تمنيع الارانب بمستضدات ال *E.coli* ومنها المستضد المقتول .كذلك فان التمنيع بمتعدد السكريد الشحمي يحفز الخلايا البائية لانتاج الاجسام المضادة كالجسم المضاد IgM دون الاعتماد على الخلايا التائية(Levinson.,2008). ان الضد IgM هو اول كلوبيولين مناعي يولد في الاطفال الرضع واول كلوبيولين يمر في مجرى الدم خلال مرحلة الاصابة إذ يفرز في

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

الاستجابة المناعية الاولية ويظهر على سطح الخلايا البائية وهو يكون بشكل خماسي الاذرع Pentamer ويشكل 10%من الكلوبيولينات المناعية للمصل وله دور مهم في الاستجابة المناعية حيث يرتبط بقوة مع المتمم وهذا يؤدي الى قتل الجراثيم ويشترك في تفاعلات الضد –المستضد (Brooks *et al* .,2004) ويتم تحفيز انتاجه في الاطفال الرضع ضد الالتهابات الحاصلة في القناة الهضمية نتيجة الاصابة بالجراثيم المرضية (Krebber.,1997).

نلاحظ الارتفاع المعنوي للضد IgG لمصول حيوانات الاختبار مقارنة مع حيوانات السيطرة(جدول2)واتفقت ايضا مع كل من (Andrew *et al* 2001; Michinaga *et al* .,2001) الذين اشاروا الى ان حقن الحيوان المختبري بمتعدد السكريد الشحمي للجراثيم المعوية يؤدي الى تحفيز الخلايا البائية لانتاج الضد IgG .ان الضد IgG هو الوحيد الذي يتمكن من المرور عبر المشيمة وكذلك يبقى في المصل دائما في الاستجابة المناعية الثانوية ويزداد تركيزه خلال الالتهابات وله تاثير مهم في معادلة سموم الجراثيم والفايروسات وله اهمية كبيرة في تثبيت المتمم (Roitt.,2001) .

اما تركيز الكلوبيولين المناعي IgA فنلاحظ من خلال الجدول (2) ان تركيزه ارتفع معنويا في مصول الحيوانات الممنعة بمستضدات الجرثومة مقارنة بحيوانات السيطرة .ان هذا الكلوبيولين يوجد بشكلين مصلي IgA احادي القطعة وافرازي S-IgA ويكون ثنائي القطعة (Reddy.,2010) .
واتفقت ايضا مع Malin *et al* (1996) الذي اشار الى ان تمنيع الحيوانات بالمستضدات الجرثومية ممزوجا مع المساعد المناعي سوف يزيد من تخصص وكمية افراز الضد IgA .

- **تركيز مكونات المتمم C3 وC4**

يعد نظام المتمم الوسيط الاولي لتفاعلات الاضداد والمستضدات ويتالف هذا النظام من 20 نوعا او أكثر من البروتينات المختلفة كيميائيا ومناعيا موجودة في بلازما الدم بصورة طبيعية وتشكل 15%من بروتينات البلازما تقريبا ويختلف المتمم عن الضد في الصفات الكيميائية والحيوية والمناعية ويكون عطوبا بدرجة حرارة 56مْ لمدة نصف ساعة(Barrett.,1988; Roitt.,2001;Coering *et al* .,2008) .

تم قياس تركيز مكوني المتمم C3و C4 الموجودة في مصول الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي باستخدام طريقة الانتشار المناعي الشعاعي ايضا .ويتبين من خلال الجدول (2) حدوث زيادة في معدل تركيز مكون المتمم C3 و C4 لحيوانات الاختبار مقارنة مع حيوانات السيطرة وعلى مستوى احتمالية$P < 0.05$.

جدول (3) معدل تركيز مكوني المتمم C3وC4 (mg/dl)

نوع الاختبار	الحيوانات الممنعة بالمستضد	حيوانات السيطرة
C3 S.D.±M	3.2±93.4	0.8± 78.5
C4 S.D.±M	3.1±13.4	1.1±10.6

ومن خلال الجدول (3) نلاحظ ارتفاعا معنويا لتركيز جزئي المتمم الثالث والرابع على التوالي في مصول حيوانات الاختبار الممنعة بمستضدات جرثومة *C.freundii* عند مقارنتها مع تركيز هذه الاجزاء في حيوانات السيطرة .

ان التمنيع بالمستضدات الجرثومية ومنها مكونات الجدار الخلوي يؤدي الى تنشيط مسار المتمم الكلاسيكي وبالتالي زيادة تركيز اجزاء المتمم C3 و C4 (Glauser *et al*.,1991) وهذامتفق مع نتائج الدراسة الحالية .اما بالنسبة للزيادة الحاصلة لاجزاء المتمم في الحيوانات الممنعة بمتعدد السكريد الشحمي فانه يحفز المتمم من خلال طريقين حيث انه يحفز المسار التقليدي للمتمم عندما يرتبط مع الاجسام المضادة المتخصصة له (Morrison and Ulevitch, 1978) والطريق الثاني الذي من خلاله يتم تنشيط المسار البديل للمتمم مباشرة بواسطة متعدد السكريد الشحمي وحده اي غير مرتبط مع الاجسام المضادة (Reddy, 2010) وهذا متفق مع نتائج الدراسة الحالية .

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

- **تركيز البروتين الكلي**

استخدمت الطريقة اللونية (Colorimetric method) لتقدير البروتين الكلي في مصول الحيوانات الممنعة بمتعدد السكريد الشحمي و حيوانات السيطرة

اظهرت نتائج اختبار قياس تركيز البروتين الكلي في المصل(جدول 3) ارتفاعا في معدل تركيز البروتين الكلي لحيوانات الاختبار الممنعة بالمستضد مقارنة بحيوانات السيطرة .

جدول(4) معدل تركيز البروتين الكلي في المصلgm/dl

الحيوانات	تركيز البروتين S.D.±M
الحيوانات الممنعة بالمستضد	0.4±15.3
حيوانات السيطرة	0.15 ±5.6

ومن الجدول (4) نلاحظ ارتفاعا معنويا في تركيز البروتين الكلي لمصول الحيوانات الممنعة بمتعدد السكريد الشحمي عند مقارنتها مع حيوانات السيطرة وقد يعود سبب زيادة البروتين الكلي الى زيادة في اعداد الخلايا البائية المحفزة بمتعدد السكريد الشحمي سواء كانت معتمدة على الخلايا التائية (مستضد بروتينات الغشاء الخارجي) او غير المعتمدة على الخلايا التائية (مستضد متعدد السكريد الشحمي) التي تزيد من انتاج الاجسام المضادة وايضا يؤدي تحفيز متعدد السكريد الشحمي للخلايا البائية الى زيادة في تصنيع RNA وDNA والبروتين(Peavy *et al.*, 1973) وايضا ان انتاج الخلايا المحفزة للعديد من المواد الالتهابية كالسايتوكينات كنتيجة للاستجابة الخلوية ضد المستضدات الجرثومية قد يؤدي الى زيادة البروتين (Reddy.,2010) .

اثبتت الدراسات التي اجريت على مستضدات جرثومة *Shigella sp* ان تلك المستضدات حفزت الجهاز المناعي وادى الى زيادة في بروتينات المصل للحيوانات الممنعة بتلك المستضدات (Charkrabarti and Sinha.,1996) وجاءت هذه الدراسة مقاربة لنتائج الدراسة الحالية

المصادر العربية

الخفاجي نور سلمان. (2010) دراسة بكتريولوجية ومناعية لبكتريا *Citrobacter freundii*في الارنب ..رسالة ماجستير . كلية العلم .جامعة بابل

الراوي ، ندى فاضل . (1999) ، دراسة تشخيصية وفسلجية لعدد من الاجناس التابعة لمجموعة الجراثيم العصوية السالبة غير المخمرة . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل .

الطريا ، رنا خالد احمد غائب . (2002) ، تأثير بعض المستخلصات النباتية في نمو جرثومتي *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* المعزولتين من مناطق مختلفة من جسم الانسان . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل .

المصادر الاجنبية

Al-Alwany, S.H.M.(2006). Study Of Antigenicity Of Enteropathogenic *Escherichia coli* In Local Rabbits *(Oryctolagus cuniculus)*. M. Sc. Thesis. Babylon (Arabic) University.

AL-Thahab , A. A. L.(2006). Cryptic Meningitis and Some Aspects of Its Local and (Arabic) Systemic Immunity. Ph.D. Thesis. Babylon University.

Andrew, J.S.; Macpherson, A.L.; Gregory, R.H.; Brenard,O.; Gordon, D.; &Rolf, M.Z.(2001). IgA production without μ or S chain expression in developing B cells . Center for Molecular and Immunology ,U.S.A. 2: 625-631.

Baron, E.J. and Finegold, S.M. (1990). Diagnostic Microbiology, Bailey and Scott's. 8th ed., C.V. Mosby Company, St. Louis, pp. 386-407.

Barrett, J.T. (1988). Immunodeficiency Text Book of Immunology . 5th ed. Mobsy. Co.

Boucher, J.C.; Martinez-Salazar, J.; Schurr, M.J.; Mudd, M.H.; Yu, H. and Deretic, V. (1996). Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. J. Bacteriol., 178(2): 511-523.

Brooks, G. F.; Butel J. S.; Carroll, K.C and Morse S. A. (2007). Jawtez, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 24rd ed. Lange Medical books .McGraw-Hill Companies.USA.

Chan, R.; Lam, J.S.; Lam, K. and Costerton, J.W. (1984). Influence of culture conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol., 19(1): 8-16.

Charkrabarti, S. & Sinha, A.K.(1996). Antibody response to outer membrane protein in *Shigella dysenteriae* type 1 infection with special refrence to appearance of murine antibodies . Indian .J. Med. Res.104: 127-142.

Coering, R.V.; Dockrell, H.M.; Mims, C .; Zuckerman, M.;Wakelin, D.; Roitt, I.M. and Chiodini, P.L.(2008). Mims, Medical Microbiology. 4th ed.mosby Elsevier .

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). "Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology". 14th ed., Churchill Livingstone, New York, pp. 413-423.

Dawed, K.; and Al-Yas, Z.A.(1991): Statastical Methods In Agricultural Researches: Mosul university.(Arabic)

Finegold, S.M. and Martin, W.J. (1982). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 6th ed., C.V. Mosby Company, USA, pp. 253-265.

Frei, J.; Heuck, C.; Riesen, W.and Laug; IT. (1995). Production of basic diagnostic laboratory reagents. WHO regional publication, Eastern Mealitterranean series.

Glauser, M.; Zanetti, G.; Baumgartner, J. and Cohen, J.(1991). Septic shock pathogenesis . Lancet. 338: 732-736.

Gorbach, S.L.; Bartlett, J.G. and Blacklow, N.R. (1996). "Infectious Disease". 2nd ed., Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 1824-1837.

Hammod, A.N.; Griswold, J.A. and Duhan, C.M. (1996a). Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections. Journal of Surgical Research, 61: 425-432.

Heale, J.P.; Pollard, A.J.; Crookall, K.; Stokes, R.W.; Simpson, D.; Speert, D.P.; Tsang, A. and Bonnie, M. (2001). Two distinct receptors mediate nonopsonic phagocytosis of different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Dis., 183(8): 1-15.

Holt, J.C.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stahley, J.T. and William, S.T. (1994). Bergy's Manual Of Determinative Bacteriology. 9th ed., USA.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., J.B. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A., pp. 253-274.

Krebber, A.(1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybirdomas and spleen cell repertoires embloying areengineered phage disblay system . J.Immunol.Methods.201:35-55.

Levinson, W. (2008). Review of Medical Microbiology and Immunology . 10th ed. McGraw-Hill comp. Inc, USA.

Michinaga, O.; Kensuke, S.; Koji, N.; Masakeshi, T.; Hamabata, T.; and Shinji, T.(2001). Protective effect of Lactobacillus casei strain shirota on shiga

toxin-producing Escherichia coli O157:117 infection in infant rabbit . Infect &ImmunIty .69: 1101-1108.

Monday, S.R. and Schiller, N.L. (1996). Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: The role of AlgL (Alginate lyase) and AlgX. J. Bacteriol., 178(3): 625-632.

Morrison, D. and Ulevitch, R.(1978). The effects of of bacterial endotoxin on host mediation systems. Areview . Am. J.Path. 93: 527.

Nuaman, I. T. (2002). Modulation of immune response in BALB/c mice against infection with hydatid disease by polysaccharide extracted from *Pseudomonas* (Arabic) *aeruginosa*. M. Sc. Thesis. Mosul University.

Peavy, D.; Shands, J.; Adler, W. and Smith, R.(1973). Selective effects of bacterial endotoxin on various subpopulations of lymphoreticular cells. J. Infect . Dis. 128:83.

Plummer, D. T. (1978). An Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill Book Company Limited.

Reddy, K.R. (2010). Microbiology &Parasitology .4th ed. Paras Medical Puplisher. New Delhi.

Roitt, I.; Brostoff. J.; and Male, D.(2001). Immunology. 6th ed . Harcourt publisher limited. Mosby. London.

Sandford, P. A. (1979). Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Exocellular Microbiol. Polysaccharide. 36:266-333.

Schnider, E. ; Volecker, G.; and Hsude, W. (1990). Age and set dependent on phospholipids concentration in human erythrocyte. I.Z. Med. Labo. Diag. 31: 86-89.

Tietz, N. W.; Burtis, C. A.; Ashwood, E.R. and Saunders, W.B. (1999). Text Book Of Clinical Chemistry .3rd Ed. 477-530.

Wilhelm, S.; Tommassen, J. and Jaeger, K.E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 181(22): 6977-6986.

Abstract

One hundred fifteen specimens were collected from Al-Hilla teaching hospital , Babylon maternity and children hospital during a period from september 2010 toJune 2011. These specimens include 42 wound, 38 burn 17 urine 10 ear infections and 8 specimens from vagina swabs. It were found that only 45 isolates *Pseudomonas aeuroginosa*of were isolated All isolates were diagnosed using biochemical tests and Api20E system .18 isolates (40%)from wound infections,15 isolates(33.33%)from burns ,8 isolates (17.77%)from urine,3isolate (6.66%) from ear infections and one isolate from vagina(2.22%) .

Pseudomonas aeuroginosa antigen was used in this study lipopolysacharied The immunization (by these antigens in addition to using Complete Freunds' Adjuvant) of rabbits was done by using three rabbits (2-3) months for it. After the immunization period (one month) humoral systemic immune response parameters to test animals were studies and compared with control animals which immunized with normal saline .

The humoral immune response was studied by using direct , radialimmunodiffusion test (it was used to determine the immunoglobulins and complement part concentration) and total protein concentration test. The results were higher compared with control group immunoglobulin, complement and total protein

Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.7/ NO.2/ Year : 2015
http://www.kufabiojournal.org

concentrations. The concentration of IgM (304.3)gm/dl , IgG concentration was (1907.4) gm/dl and IgA concentration (493.6) gm/dl were higher compared with IgM, IgGand IgA concentration of control group(208.7, 1488.4,433.6). The concentration of C3 was (93.4) gm/dl , C4 concentration was (13.4) gm/dl and total protein concentration (15.3) gm/dl. All these results for animals immunized with LPS were significant at ($P<0.05$) compared with control animals.