مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد العشرون - المجلد الأول - علوم الحياة - تشرين أول 2022 م
doi.org/10.52866/esj.2022.01.20.10

دراسة مناعية للأرانب المحقونة تجريبيا ببكتريا الكليبسيلا الرئوية والمعزولة من التهابات المجاري البولية في الأنسان

حسام مجيد محمد ، خالد محمود حمادي
الجامعة العراقية / كلية التربية -قسم علوم الحياة

مستخلص:

هدفت هذه الدراسة الى عزل بكتريا الكليبسيلا الرئوية من إصابات الجهاز البولي في الانسان ودراسة تقييم الاستجابة المناعية للأرانب بعد حقنها تجريبياً بهذه البكتريا. حيث اختيرت احدى العزلات النشطة المعزولة من عينات الادرار في الأنسان، لذا تم استعمال 45 ارنباً محلياً من كلا الجنسين في تجربتين، استعمل في التجربة الأولى 20 ارنباً (قُسمت الى خمس مجاميع كل مجموعة تحوي على أربعة ارانب وحُقنت الأربع مجاميع الاولى بواقع 1مل من كل تركيز في منطقة الخلب (Intraperitoneal) اما المجموعة الخامسة فقد عُدت مجموعة سيطرة وحُقنت ب 1 مل من محلول PBS) لتقدير الجرعة الممرضة لبكتريا الكليبسيلا الرئوية حيث اختيرت المجموعة التي تمتاز بظهور علامات مرضية ولكن بدون هلاكات. اما الارانب المتبقية (25 ارنباً) فقد قسمت عشوائياً الى مجموعتين المجموعة الأولى (أ) تكونت من 15 ارنبا تم حقنها بالجرعة المصيبة (والتي كانت 5×10^8 CFU/ml) في منطقة الخلب (التجويف البريتوني) اما المجموعة (ب) والتي تكونت من 10 ارانب فقد حقنت بمحلول دارئ الفوسفات الملحي PBS أيضا في منطقة الخلب واعتبرت كمجموعة سيطرة . تم اجراء الدراسة المناعية لتقييم الاستجابة المناعية (الخلوية والخلطية)، ففي اليوم (21) بعد الحقن تم اجراء فحوصات المناعة الخلوية، حيث أظهرت نتائج فحص الحساسية المتأخر(فحص الجلد) زيادة معنوية في سمك الجانب الأيمن لبطن الارانب المحقونة من المجموعة (أ) مقارنة مع مجموعة السيطرة (ب) اذ بلغ اعلى متوسط للسمك بعد 48 ساعة من الحقن ثم بدء بالتراجع بعد 72 ساعة ، اما فحص مؤشر البلعمة فقد ازداد بشكل واضح في المجموعة المصابة (أ) حيث اعطى نسبة (35.20 ± 1.9) مقارنة بمجموعة السيطرة (ب) التي أعطت نسبة (14.60 ± 1.4). اما بخصوص فحص الاستجابة المناعية الخلطية والتي تم فيها قياس نسبة الكلوبيولين المناعي نوع (G) IgG عن طريق اختبار الفحص المناعي المرتبط بالأنزيم (ELASA) بعد الإصابة التجريبية في الارانب حيث أظهرت نتائج هذا الفحص ارتفاع ملحوظ في معدل قياس الاجسام المضادة IgG في المجموعة (أ) بلغت أقصاها في الأسبوع الرابع بعد الحقن اذ كانت (7.5±0.51) ومن ثم اخذت هذه النسبة بالانخفاض في الأسبوع السادس اذ كانت (5.68±0.15)، اما معدل قياس الاجسام المناعية IgG في مجموعة السيطرة (ب) فلم تظهر أي ارتفاع ملحوظ في قراءاتها على مدار الأسابيع الأربعة اذ كانت (4.02±0.10) و(3.98±0.07) و(3.93±0.11) و(3.99±0.07) و(3.96±0.09) في وقت الصفر والاسبوع الثاني والثالث والرابع والسادس بالتتابع.

الكلمات المفتاحية: الكليبسيلا الرئوية، المجاري البولية، الأنسان، دراسة مناعية.

Immunological study of rabbits experimentally injected with *Klebsiella pneumoniae* isolated from human urinary tract infections.

Hussam Majeed Mohammad Khalid Mahmood Hammadi
AL- Iraqia University / College of Education - Department of biology

Abstract :

This study aimed to isolate *Klebsiella pneumoniae* bacteria from urinary tract infections in humans and study of the immune response of rabbits after being experimentally injected with this bacteria. After that, one of the active isolates from urine samples in human was chosen, so that were used 45 local rabbits of both sexes , in two experiments. In the first experiment, 20 rabbits (It was divided into five groups, each group containing four rabbits, and the first four groups were injected with 1 ml of each concentration in the intraperitoneal area, and the fifth group was treated as a control group and injected with 1 ml of PBS solution.) were used to estimate the infective dose of *Klebsiella pneumoniae* bacteria which characterized by the appearance of signs of disease but without fatalities . The remaining rabbits (25 rabbits) were randomly divided into two groups. The first group (A) consisted of 15 rabbits. They were injected with the estimated infective dose (5×10^8) CFU/ml) in the peritoneal area, while group B, which consisted of 10 rabbits, were injected with phosphate-buffered saline (PBS) solution also in the peritoneal area and was considered as a control group. Where an immunological study was conducted to determine the effectiveness of the cellular and humoral immune response. On the 21st day after the injection, cellular immunoassays were conducted. The results of the delayed sensitivity test (skin examination) showed a significant increase in the thickness of the right side of the abdomen of the injected rabbits from group (A).Compared with the control group (B), where it reached the highest mean of thickness after 48 hours of injection and then started to decline after 72 hours. As for the examination of the phagocytosis index, it increased clearly in the affected group (A), which gave a percentage (35.20 ± 1.9) compared to the control group (B) which gave a ratio (14.60 ± 1.4.) As for the examination of the humoral immune response, in which the proportion of immunoglobulin (G) IgG was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELASA) test after experimental infection in rabbits. The results of this examination showed a significant increase in the rate of measuring IgG antibodies in group (A), reaching its maximum in the fourth week after the injection. Where it was (7.5 ± 0.51) and then this percentage began to decrease in the sixth week where it was (5.68 ± 0.15), while the rate of measuring IgG antibodies in the control group (B) did not show any significant increase in its readings over the four weeks where it was (4.02 ± 0.10), (3.98 ± 0.07), (3.93 ± 0.11), (3.99 ± 0.07) and (3.96 ± 0.09) at the time of zero, the second, third, fourth and sixth weeks, respectively.

Key words: *Klebsiella pneumonia*, urinary tract , humans , Immunological study .

المقدمة

الكليبسيلا الرئوية هي بكتيريا سلبية الغرام وهي أحد أعضاء عائلة البكتيريا المعوية، وتكون عصوية الشكل، غير متحركة، غير مكونة للابواغ، ذات كبسولة بارزة مكونة من عديد السكر. تسبب العديد من الأمراض مثل ذات الرئة والتهاب الجهاز البولي وانتان الدم اذ يكون الموطن الطبيعي لها القناة المعوية للإنسان والحيوان ، وان هذه العائلة واسعة الانتشار في الطبيعة فهي توجد في مختلف البيئات مثل التربة والمياه [1] ، كما تعد بكتريا الكليبسيلا الرئوية من الممرضات الانتهازية Opportunistic Bacteria تتواجد هذه البكتريا في الانسان والحيوان اذ يمكنها ان تستعمر الانسجة الجسمية المختلفة كالجلد والبلعوم والمسالك البولية [2].

إن بكتريا الكليبسيلا الرئوية من الجراثيم التي لها القدرة على تحفيز الجهاز المناعي المتمثل بالمناعة الخلطية والخلوية بالإضافة الى الحواجز الميكانيكية التي لها دور مهم في السيطرة على إصابات هذه البكتريا [3] . وقد بين [4]. إن لهذه البكتريا القدرة على تحفيز الجهاز المناعي وبالذات المناعة الخلطية المتمثلة بإنتاج الاجسام المضادة Abs والتي تؤدي دورا مهما في القتل او المساعدة عن طريق البلاعم بعملية البلعمة Phagocytosis [5]. وهذا ما أكده [6]، الى إن هذه البكتريا والمسماة *K.Pneumoniae* CPS ذات المحفظة السميكة لها دور فاعل في تحفيز انتاج الاجسام المضادة ، اما فيما يخص المناعة الخلوية فتعتمد قابلية المضيف وبشكل عام في الدفاع ضد الإصابات البكتيرية على التخلص السريع من البكتريا بواسطة الخلايا العدلة Neutro-philes والبلاعم الكبيرة Macrophages اذ تقوم هذه الخلايا بالتعرف على البكتريا ثم التهامها وقتلها بعملية البلعمة [7].

المواد وطرق العمل: -

- الحيوانات المختبرية المستعملة في التجربة:

تم جمع 45 أرنباً بالغا ذكوراً واناثاً تم تربيتها في بيت خاص وكان معدل اوزانها 1400 غم وغذيت هذه الحيوانات طول فترة التجربة جيدا على العلف الأخضر (الجت) وكانت الأرضية مفروشة بنشار الخشب تبدل أسبوعياً وقد تم حجزها قبل البدء بالتجربة لمدة 10 – 15 يوم لغرض التكيف ومراقبة حالتها الصحية.

جمع العينات: جمعت (100) عينة إدرار من مرضى مستشفى الطارمية العام / بغداد لأشخاص يعانون من التهابات المجاري البولية ومن كلا الجنسين، وثُبتت المواصفات للأشخاص الذين تم اخذ العينات منهم (حالة المريض الصحية، العمر، تكرار المرض، اخذ العلاج، مراجعة الأطباء) اذ كانت تؤخذ العينات من الادرار الوسطي وتوضع في انابيب نظيفة ومعقمة.

تصميم التجربة: تم اجراء التجربة على حيوانات مختبرية وهي الارانب وبواقع 45 ارنبا محليا حيث قمنا بإجراء تجربتين استخدم في التجربة الاولى 20 ارنب وفي التجربة الثانية 25 أرنب وهي كالاتي:

1. التجربة الأولى:

حساب الجرعة المصيبة لبكتريا

Klebsiella pneumoniae

استُعمل 20 ارنبا في هذه التجربة لتحديد الجرعة المصيبة Infective dose (ID) التي تُظهر علامات مرضية على الحيوان ولكن لا تؤدي الى موته اذ حُضر العالق البكتيري وذلك بأخذ 10 مل من وسط مرق نقيع القلب والدماغ BHI broth وزرعت فيه العينة المعزولة وبعد حضنها في درجة حرارة 37م^0 لمدة 18 ساعة أجريت لها عملية طرد مركزي مبرد وبسرعة

8000 rpm دورة/ دقيقة ولمدة 15 دقيقة بعد ذلك غُسل الراسب بمحلول ملحي بالفوسفات PBS ذو الاس الهيدروجيني PH 7.2 وتم تعليقه ب 1 مل من نفس المحلول ومن ثم خفف الى عشرة اضعاف وهي (10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} ، 10^{-7} ، 10^{-8} ،10^{-9} ، 10^{-10}) وبالاعتماد على طريقة (1986) APHA للعد البكتيري الحيوي فقد تم اختيار مجموعة من التخافيف وتجريبها على الحيوانات لاعتمادها كجرعة ممرضة غير مميته وهذه التخافيف هي (22×10^{-6} خلية، 10×10^{-7} خلية، 5×10^{-8} خلية، 2×10^{-9} خلية) . قُسمت الارانب الى خمس مجاميع كل مجموعة تحوي على أربعة ارانب وحُقنت الأربع مجاميع الاولى بواقع 1مل من كل تركيز في منطقة الخلب (Intraperitoneal) اما المجموعة الخامسة فقد عُدت مجموعة سيطرة وحُقنت ب 1 مل من محلول PBS ذو الاس الهيدروجيني PH 7.2 وتم مراقبة الحيوانات لمدة 30 يوم لملاحظة الحيوانات الحية من الميتة واختيار الجرعة المصيبة (ID) وفقا لما جاء به [8]، والتي اظهرت علامات المرض على الحيوانات دون ان تؤدي الى موتها.

2. التجربة الثانية:

العدوى التجريبية للأرانب ببكتريا *K. pneumoniae* عن طريق الحقن بمنطقة الخلب

صممت هذه التجربة اعتمادا على ما جاء به [9] مع اجراء بعض التعديلات الضرورية كالاتي:

- أُختير 25 ارنبا متقاربة بالوزن الى حد ما وحُضرت وعُزلت عن باقي الارانب لمدة أسبوعين قبل التجربة.
- أُستُعمل ماء للشرب مغلي ومبرد في مدة التجربة.
- بعد ان تكيفت الحيوانات على مكان التجربة قُسمت الى مجموعتين وهي:

– المجموعة (ا) التي تكونت من 15 أرنب اذ تم حقنها في منطقة الخلب بالجرعة الممرضة (ID).

– المجموعة (ب) التي تكونت من 10 أرانب والتي عُدت مجموعة سيطرة وحُقنت بمحلول PBS في منطقة الخلب.

الاختبارات المناعية

1: اختبارات المناعة الخلوية

– اختبار فرط الحساسية من النوع المتأخر

أُجري هذا الفحص في الأسبوع الثالث بعد الحقن لحيوانات التجربة الثانية واعتمادا لما جاء في [10] اذ تم إزالة الشعر على جانبي الحيوان في منطقة البطن بشكل دائري وتم حقن محلول المستضد القابل للذوبان لبكتريا *K. pneumoniae* الذي حُضر في الفقرة 6-2-3 بواقع 0.1 مل في الجانب الأيمن من البطن داخل ادمة الجلد اما الجانب الايسر فقد حُقن بمحلول PBS ذي الرقم الهيدروجيني PH 7.2 بنفس الكمية وتم الحقن باستعمال المحقنة البلاستيكية النبيذة الخاصة بحقن الانسولين ذات سعة 1 مل بعد ذلك تمت قراءة وتسجيل النتائج والمتمثلة بسمك الجلد بعد 24 و 48 و 72 ساعة على التوالي بعد الحقن في المجموعتين كلاهما.

– الكشف عن مؤشر البلعمة:

أُجري هذا الفحص اعتمادا على ما جاء به [11] الذي يتم فيه الكشف عن مؤشر البلعمة Phagocytosis ومدى نشاط الابتلاع للخلايا البلعمية في دم حيوانات المجموعة المصابة ومجموعة السيطرة اذ تم اخذ 0.25 مل من دم الارانب المعالج بالهيبارين مع 0.25 مل محلول هانكس(المحضر في الملحق رقم 1) مع 0.05 مل من معلق الخميرة (المحضر في الملحق رقم 2) ووضعت هذه الكميات في انابيب معقمة وحضنت بدرجة حرارة 37م^{0} لمدة 30 دقيقة بعد ذلك حُضرت مسحة دم من الخليط على شريحة زجاجية شفافة وتُركت لكي تجف بدرجة حرارة الغرفة وتم

تثبيتها بالميثانول وصُبغت بصبغة Geimsa 10 ٪ لمدة 10 دقائق بعدها غُسلت الشريحة بماء الحنفية وتُركت لكي تجف وتم فحصها بالمجهر بواسطة العدسة الزيتية، حيث يتم تعداد 200 خلية عل الأقل بصورة عشوائية وطُبقت المعادلة الاتية لحساب النتيجة :

$$\text{مؤشر البلعمة٪} = \frac{\text{عدد الخلايا التي تبتلع الخميرة}}{\text{العدد الإجمالي للخلايا البلعمية}}$$

2 : اختبارات المناعة الخلطية

- فحص الكلوبولين المناعي نوع IgG في مصل دم الارانب

تم حساب تركيز IgG في مصل دم الارانب بالاعتماد على تقنية Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELASA) (حسب الملحق3) اذ جُمعت عينات الدم من المجموعتين كلاهما A وB في كل من الأسبوع الثاني والثالث والرابع والسادس بعد حقن الجرعة الممرضة ID وتم فصلها والحصول على المصل وحفظه بالتجميد بدرجة حرارة _20م^0 لحين اجراء الفحص [12]

النتائج والمناقشة :

التجربة الأولى حساب الجرعة الممرضة (ID)

تم تحديد الجرعة الممرضة لبكتريا *K. Pneumoniae* بعد حقن الارانب في منطقة الخلب بمجموعة من التراكيز التي تم ذكرها سابقا وقد تبين ان مقدار الجرعة الممرضة (ID) لهذه البكتريا هو (3×10^9 خلية) اذ تم تقدير ذلك عبر حساب مجموعة الارانب الحية والميتة في المجاميع المحقونة ولمدة أربعة أسابيع متتابعة بعد الحقن، اذ كانت ارانب هذه المجموعة المحقونة بهذا التركيز جميعها على قيد الحياة لكن ظهرت عليها اعراض الإصابة بهذه البكتريا وهي حمى واسهال وبول حليبي اللون وفقدان الشهية والبلادة ونقصان في الوزن.

وبالتالي فإن الجرعة المصيبة (ID) لبكتريا *K.Pneumoniae* التي تم اعتمادها في هذه الدراسة هي (3×10^9 CFU/ml) وهذا مقارب لدراسات سابقة اجراها [13] اللذان اكدا ان الجرعة المصيبة (ID) تتراوح بين (10^5 _ 10^{10} CFU/ml) ، وأيضاً تكاد تتفق مع الجرعة التي اعتمدها [14] في دراسته لإمراضية نفس البكتريا على الارانب والتي بلغت (2×10^9 CFU/ml) كما انها قريبة الى حد ما مع ما جاءت به [15] في دراستها لإمراضية بكتريا *Salmonella enteritidis* والتي تنتمي الى العائلة المعوية Entero-bacteriaceae على الارانب اذ بلغت الجرعة المصيبة لها (4.5×10^8 CFU/ml).

نتائج الفحوصات المناعية

1. نتائج اختبارات المناعة الخلوية

- نتائج اختبار فرط الحساسية من النوع المتأخر DTH Test

لقد أظهرت نتائج هذا الاختبار في هذه الدراسة زيادة معنوية عند مستوى ($P \leq 0.05$) في سمك الجلد من جهة اليمين للمجموعة المحقونة عند مقارنتها بمجموعة السيطرة وان هذه الزيادة بلغت اعلى مستوى لها في اليوم الثاني من الحقن أي بعد 48 ساعة ومن ثم بدأت في اليوم الثالث بالانخفاض، اما مجموعة السيطرة فلم تظهر أي تغيرات في سماكة جلد البطن، لقد تم اعتماد هذا الاختبار لتقييم الاستجابة المناعية الخلوية اذ يتم الحقن بمستضدات بكتيرية او فطرية او فايروسية داخل ادمة الجلد تؤدي الى حدوث استجابة مناعية خلوية ينتج عنها سماكة واحمرار في موقع الحقن [16] ويعتمد اختبار DTH على قدرة الخلايا التائية

ونشاطها على التعرف على المستضدات وافراز المدورات الخلوية (الانترلوكينات) (IL-1) التي بدورها تعزز انتشار وتمايز الخلايا التائية الأخرى وتقوم هذه الأخيرة بإفراز الانترلوكين (IL-2) بهيئة عامل جذب كيميائي للخلايا الضامة الى منطقة الحقن إضافة الى ذلك فإن الخلايا التائية تقوم بإفراز الانترفيرون (IF-Y) الذي يساعد على تجمع الخلايا الحالة والخلايا الالتهابية ولاسيما الخلايا وحيدة النواة والخلايا البلعمية الى موقع الحقن ومن ثم تؤدي هذه العوامل مجتمعة الى زيادة سماكة جلد الحيوان المحقون بالمستضد مقارنة مع مجموعة السيطرة [17].

وهذه النتائج تتفق مع دراسات سابقة اجراها [18] على الارانب المحقونة ببكتريا الكليبسيلا الرئوية ودراسات [19] الذين استعملوا هذا الاختبار مقياسا للاستجابة المناعية الخلوية للفئران المحقونة بمستضد بكتريا *Salmonella enteritidis*.

- نتائج الكشف عن مؤشر البلعمة

أظهرت نتائج الكشف عن مؤشر البلعمة زيادة معنوية عند مستوى ($P \leq 0.05$) بين المجموعة المحقونة A اذ بلغت (35.20 ± 1.9) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة B التي كانت نسبتها (14.60 ± 1.4).

تم استعمال الخميرة المقتولة في هذا الاختبار اذ انه من المعروف يمكن ان يتم تعزيز نشاط مضادات الميكروبات (الخلايا الدفاعية) ضد العامل الممرض المحدد او المستضدات الغريبة الداخلة الى الجسم، وبما ان بكتريا *K.Pneumoniae* لها القدرة على تحفيز عملية البلعمة Phagocytosis وذلك بإطلاق بعض الانزيمات كإنزيم Proteases ومن ثم يتم القضاء على البكتريا بواسطة نشاط البلعمة او بواسطة عامل محفز اخر [20]، وتعد عملية البلعمة اهم الية دفاعية ضد مسببات الامراض الخاصة [21].

: نتائج اختبارات المناعة الخلطية

- نتائج فحص الكلوبولين المناعي نوع IgG في مصل دم الارانب بتقنية ELASA

أظهرت معدلات قياس فحص الكلوبولين المناعي IgG نتائج مختلفة بين المجموعتين (المحقونة والسيطرة) اذ بدأت معدلات القياس بالارتفاع بدءا من الأسبوع الثاني في المجموعة المحقونة اذ بلغت (4.72 ± 0.15) وكان هناك فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بينها وبين مجموعة السيطرة اما معدلات القياس في الأسبوع الثالث فقد بلغت (5.19 ± 0.18) وكان هناك أيضا فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بينها وبين مجموعة السيطرة في حين بلغت معدلات القياس اقصى ارتفاع لها في الأسبوع الرابع اذ بلغت (7.51 ± 0.51) بفارق معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) عن مجموعة السيطرة اما في الأسبوع السادس فقد بدأت معدلات القياس بالانخفاض اذ بلغت (5.68 ± 0.15) مع وجود فارق معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بينها وبين مجموعة السيطرة ، اما معدلات القياس في مجموعة السيطرة فلم تظهر أي فرق معنوي في قراءاتها بدءا من وقت الصفر الى الأسبوع السادس بعد الحقن.

ان هذه الزيادة الحاصلة في معدل قياس IgG في المجموعة المحقونة A يشير الى تحفيز الاستجابة المناعية نتيجة إصابة الحيوانات بالجرعة الممرضة من بكتريا *K. Pneumoniae* وهذا ما وصفه [22]، كما أشار [23] إن بكتريا الكليبسيلا الرئوية الحاوية على cap-sular polysaccharide CPS لها القدرة على تحفيز انتاج الاجسام المضادة إضافة الى العوامل المختلفة التي تؤثر على IgG المصل كالتركيب الجيني للحالة المناعية والعوامل البيئية، وفي الغالب يرتبط ارتفاع

مستوى IgG بزيادة انتاج الخلايا اللمفاوية وقد لوحظ في هذه الدراسة ان الارانب المحقونة تجريبيا كانت قادرة على احداث استجابة مناعية خلطية تتمثل بإنتاج الاجسام المضادة ضد بكتريا *K. Pneumoniae* وان هذا الإنتاج بدء بالارتفاع من الأسبوع الثاني بعد الإصابة ليصل ذروته في الأسبوع الرابع ومن ثم بدء بالانخفاض من الأسبوع السادس وهذا يتفق مع ما جاء به [24] الذي قام بفحص الكلوبولين المناعي IgG من أربعة أسابيع الى سنتين لأربعة عشر مريض يعانون من حمى التيفوئيد بتقنية ELASA اذ بلغت اعلى نسبة ارتفاع IgG خلال الأسبوع الرابع ، كما إن هذه النتائج تتفق مع نتائج دراسة محلية أجرتها [25] على الفئران المحقونة ببكتريا *Salmonella mbandaka* التي تعود الى العائلة المعوية حيث بلغت اعلى نسبة لفحص IgG في الأسبوع الرابع بعد الحقن ثم بدأت بالانخفاض عند الأسبوع الثامن.

نستنتج من هذه التجربة إن الجرعة الممرضة (ID) القادرة على احداث العدوى في الارانب كانت ($CFU/ml\ 10^9$ x3) في هذه الدراسة التي أدت الى ظهور العلامات المرضية دون موت الحيوان كذلك اوضحت الدراسة إن الإصابة ببكتريا الكليبسيلا الرئوية أدى الى حدوث استجابة مناعية خلوية ظهرت في اليوم 21 بعد الحقن واستجابة مناعية خلطيه تمثلت بارتفاع الاجسام المضادة IgG في الأسابيع الاربعة بعد الإصابة.

المصادر

1-Martin, R. M. and Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front. Cell. Infect.Microbiol.8 (4):1-15

2-Vasaikar, S.; Obi, L.; Morobe, I. and Bisi-Johnson, M. (2017). Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of *Klebsiella* isolates in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa. Int. J. Microbiol. 42: 1-7.

3-Anto, J. (2013). Investigating the effects of oral microbial biofilms on oral epithelial cells. PhD thesis, Veterinary and Life Sciences, College of Medical, Glasgow university.

4-Castinel, R.; Kittel Berger, W. E.; Pomeroy, P. J.; Duignan, B. L.; Chilvers and I. S. Wilkinson. (2008). Humoral Immune Response to *Klebsiella* spp. In New Zealand Sea

5-Held TK, Trautmann M, Mielke ME, Neudeck H, Cryz SJ Jr, Cross AS. (1992). Monoclonal antibody Against *Klebsiella* capsular Polysaccharide reduces severity and hematogenic spread of experimental *Klebsiella pneumoniae* Infect. Immun.; 60 (5):1771_1778.

6-Wu M.F. Yang, C.Y., Lin T. L., Wang, J. T., Yang, F.L., Wu, S.H., 4Hu B. S. Chou T. Y., Tsai M.D., Lin C. H. and Hsieh1 S. L. (2009). Humeral Immunity against Capsule Polysaccharide Protects the Host from *magA_ Klebsiella pneumoniae*-Induced Lethal Disease by Evading Toll-Like Receptor 4 Signaling. Infection and Immunity 77(2):615_621.

7-Soulas, C.; Baussant, T.; Aubry, J. P.; Delneste, Y.; Caron, G.; Renno, T.; Bonnefoy, J.Y. & Jeannin, P. (2000). Outer membrane Protein A (omp A) binds to and activates human Macrophages J. Immunol. 165(12):2335-2340.

8-Reed, L. J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimation fif-

ty percent end points. Am. J. Hug. 27(3):493_498.

9-Freter, R. (1956). ''Experimental enteric Shigella and Vibrio infection in mice and guinea pigs''. J. Exp. Med.; 104: 411-418.

10-Hudson L. and Hay F.C. (1980). Practical Immunology 2nd. Black well scientific. Pub: London., Uk. (24):1119_1124.

11-Weber,B;Nickol,M.;Jaggar,K.S. and Saelinger, C. B .(1982). Interaction of pseudomonas exoproducts with phagocytic cell .Can.J.Microbiol.,28:679-685.

12-Leitner, G.; Uni, Z.; Cahaner, A.; Gutman, M. and Heller, D. E. (1992). Replicated divergent selection of broiler chickens for high or low early antibody response to *Escherichia coli*: vacc. Poul. Sci. ,71: 27-37.

13-Blaser, M. J. and Newman, L. S. (1982). A review of human salmonellosis: Infective dose. Reviews of Infectious Diseases.; 4: 1096-1106.

14- **العنبكي، جاسم هادي موسى (2020).** عزل وتمييز البكتريا الأكثر شيوعا من ناحية الامراض المشتركة في اللحم ومنتجات اللحم مع دراسة الامراضية للبكتريا الأكثر انتشارا منها. رسالة ماجستير/ كلية الطب البيطري / جامعة ديالى.

15- **محمد، آيات جاسم (2019).** التغيرات السريرية والمرضية في الأرانب المصابة تجريبيا بجرثومة *Salmonella enteritidis* والمعزولة من الأنسان. رسالة ماجستير / كلية الطب البيطري / جامعة ديالى.

16-Sadaoka, K., Okamoto, S., Gomi, Y., Tanimoto, T., Ishikawa, T., Yoshikawa, T., Roy, L. k.; Watson, D.L. and Ian, G. (2011). Inflammatory and immunological Response in Skin and peripheral lymph of sheep following intracutaneous injection of Staph. aureus. Inflammation, Vol. 11 (2) p:175-188.

17-Roy, L. k.; Watson, D.L. and Ian, G. (2011). Inflammatory and immunological Response in Skin and peripheral lymph of sheep following intracutaneous injection of Staph. aureus. Inflammation, Vol. 11 (2) p:175-188.

18-**الربيعي، احمد محمد جواد علوان (2011) .** استخلاص بعض المستضدات من جرثومة Klebsiella pneumoniae المعزولة من الجهاز البولي للإنسان والاغنام ودراسة القابلية الإمراضية والتمنيعية لها في الارانب. رسالة ماجستير/ كلية الطب البيطري جامعة بغداد

19-Strindeli, L.; Lena Degling Wikingsson, and Ingvar Sjoholm. (2002). ''Extracellular Antigens from Salmonella enteritidis Induce Effective Immune Response in Mice after Oral Vaccination'' Infect Immun. 70(3): 1434–1442.

20-Magnusson, U. (1999). Longitudinal study of lymphocyte subsets and major histocompatibility complex-class II expressing cells in mammary glands of sows. Am. J. Vet. Res.; 60: 546-548.

21-Nordhaug, M. L.; Nesse, L. L.; Norcross, N. L. and Gudding, R. (1994). A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. Clinical parameters. J. Dairy Sci.; 77: 1267-1275.

22-Kang, H. Y.; Srinivasan, J. and Curtiss ,R.(2002).'' Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live *attenuated Sal-*

monella enterica serovar typhimurium Vaccine". Infection and immunity; Apr., p. 1739–1749 Vol. 70, No. 4.

23-Fung, C. P.; Hu, B. S.; Chang, F. Y.; Lee, S. C.; Kuo, B. I.; Ho, M.; Siu, L. K. and Liu, C. Y. (2000). A 5-year study of the seroepidemiology of Klebsiella pneumoniae: High prevalenceof capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy. J. Infect. Dis. 181(6):2075–2079.

24- Sarasombath, S.; Banchuin, N.; Sukosol, T. Rungpitarangsi, B. and Manasatit, S. (1987)." Systemic and Intestinal Immunities after Natural Typhoid Infection". Journal of clinical microbiology, June, p. 1088-1093.

25- **شلال، زينة شاكر.** (2011). دراسة سريرية ومناعية لجرثومة *Salmonella mbandaka* المعزولة من الإنسان في الفئران. رسالة ماجستير/ كلية الطب البيطري / جامعة ديالى.

- الملاحق : Appendix

1- محلول هانكس ذو الملح المتوازن Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

تم تحضير هذا المحلول على النحو الاتي:

الخطوة الأولى تحضير محلول A Stock

حضر بإذابة المواد الاتية في 100 مل من الماء المقطر D.W :

Nacl	16 g.
$MgSO_4\ 7H_2O$	0.4 g.
$Cacl_2$	0.28 g
Kcl	0.8 g.

الخطوة الثانية تحضير محلول B Stock

حضر بإذابة المواد الاتية في 100 مل من الماء المقطر D.W :

Na_2HPO_4	0.3 g
KH_2PO_4	0.12 g
Glucose	2 g
Phenol red	0.2 g

ومن ثم حُضر المحلول النهائي وذلك بمزج محلول A مع محلول B مع الماء المقطر D.W بنسبة 18:1:1 على التتابع ثم تم ضبط pH على 7.2 ورُشح المحلول بورق ترشيح بحجم 0.22 µm وحفظ بدرجة حرارة 4 م 0 لحين استعماله (Metcalf et al ., 1986).

2- تحضير معلق الخميرة المقتولة Preparing the killed yeast suspension

حضر هذا المعلق وفقا لما جاء في Metcalf et al., (1986) وذلك بمزج 50 غرام من خميرة الخبز Saccharomyces cerevisiae مع 150 مل من محلول ملحي معقم ثم وضع الخليط في حمام مائي لمدة ساعة وبعدها تم ترشيح المعلق بواسطة طبقة مزدوجة من الشاش الطبي المعقم وأخيرا تم حفظه بواسطة التجميد لحين استعماله.

3 - البروتوكول الخاص بحساب تركيز Rab-bit Immunoglobulin G (IgG) باستعمال ELISA KIT وحسب الشركة المجهزه:

1- تم تحضير جميع الكواشف قبل البدء بإجراء الفحص ، وعمل نسختين لكل من المعايير القياسية والعينات .

2- إضافة المعيار القياسي : حددت حفر المعايير القياسية وأضيف 50 µl من المحلول القياسي إلى الحفر القياسية .

3- إضافة العينات : اضيف 10 µl من عينات

الإختبار ، ثم نضيف40 µl من المحلول المخفف إلى عينات الإختبار .

4- تم إضافة 100 µl من كاشف HRP-conjugate reagent لكل الحفر (القياسية والعينات) ومن ثم تم تغطية الحفر بواسطة غطاء الحفر Cover plate، وبعدها حضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 60 دقيقة .

5- غسل الحفر بواسطة 400 µl من محلول الغسل Wash solution وتكرار عملية الغسل خمس مرات بإستعمال زجاجة بخاخة مع مراعاة إزالة سائل الغسل بصورة جيدة في كل مرة ، وبعد الغسل الأخير تم قلب اللوحة وتنشيفها جيدا بمناشف ورقية نظيفة .

6- اضيف 50µl من محلول Chromogen A و 50µl من محلول Chromogen B لجميع الحفر ومن ثم مزج المحلولين بهدوء ، وبعدها حضن بدرجة 37م° لمدة 15 دقيقة ، بعيداً عن الضوء .

7- تم إضافة 50 µl من محلول التوقف Stop solution لجميع الحفر Well ، يتم تغير لون الحفر من اللون الأزرق إلى اللون الأصفر.

8- بعدها تم قراءة الكثافة البصرية Optical Density عند 450 نانوميتر بإستخدام لوحة قارئ الإليزا في غضون 15 دقيقة .