

دراسة المعايير السريرية في الارانب المحقونة ببعض مستضدات بكتريا الكلبسيلا الرئوية المعزولة من حالات التهاب الضرع في الأغنام

مريم عصام حميد

خالد محمود حمادي

الجامعة العراقية/ كلية التربية - قسم علوم الحياة

drkhalidmh0@gmail.com

mariam.essam19981998@gmail.com

مستخلص

تضمنت هذه الدراسة جمع ما يقارب 200 عينة سريرية من الاغنام المصابة بالتهاب الضرع خلال الفترة من 2022-9-15 الى 2022-12-15 وظهرت النتائج الحصول على 2 عزله تعود لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* شخصت هذه البكتريا مختبريا من خلال الزرع البكتريولوجي على الوسط اكار الماكونكي إضافة الى وسط اكار الدم والتشخيص الكيمو حيوي. والتشخيص التوكيدي للبكتريا باستخدام جهاز الفايترك Vitek-2 compact System. كذلك تم استخلاص وتنقية المستضد لمتعدد السكاريد الشحمي (LPS) من جدران البكتريا المعزولة باستخدام Gel Filtration chromatography أجريت تجربتين لقياس مدى إمرضيه هذا المستضد اذ تضمنت التجربة الاولى دراسة الجرعة الممرضة للمستضد LPS اذ تم حقنه في خمسة مجاميع من الارانب وبتراكيز مختلفة (300,600,900,1000,1200,1500,1800,2200) مايكرو غرام لكل كيلو غرام تم تجريب الارانب عن طريق الفم ومن خلال ملاحظة الارانب على مدى أسابيع تم التأكد من ان الجرعة الممرضة لهذه الارانب كانت (1800 µg/kg) اما التجربة الثانية فتضمنت دراسة القابلية الامراضية من خلال دراسة بعض المعايير مثل النبض والحرارة اضافة الى التنفس... الخ وذلك من خلال تجريب ثلاثة مجاميع من الارانب المجموعة الاولى حقنت بالمستضد LPS الممرض والمجموعة الثانية حقنت بالانتجين المقتول (Killed antigen). (فضلا عن المجموعة الثالثة التي عدت مجموعة السيطرة والتي حقنت بالماء المقطر. لقد ظهرت نتائج التجربة الاولى ارتفاع في درجات الحرارة بعد اليوم الأول من التجريب وبفارق معنوي 0.001 في المجموعة المحقونة بالانتجين المقتول على عكس مجموعة المقارنة والتي كانت تتمتع فيها الارانب بصحة جيدة وسجلت قراءة طبيعية لدرجات الحرارة. اظهرت نتائج معدل ضربات القلب قبل التجريب مستوى طبيعي في المجاميع الثلاثة وبعد التجريب ب 48 ساعة كان هناك زيادة معنوية في معدل الضربات للمجموعتين المحقونتين بمستوى معنوي 0.001 على عكس مجموعة المقارنة التي أظهرت نتائج طبيعية طول مدة التجربة. اما بالنسبة لمعدلات التنفس فقد كانت ضمن المستوى الطبيعي في وقت الصفر للمجاميع الثلاثة وبعد التجريب بالبكتريا سجلت زيادة معنوية في معدلات التنفس بمستوى (0.001) في المجموعتين المحقونتين على عكس مجموعة المقارنة التي أظهرت معدلات تنفس طبيعية على طول مدة التجربة.

الكلمات المفتاحية: الكلبسيلا الرئوية ، المعايير السريرية ، مستضدات ، التهاب الضرع ، الأغنام .

Study of clinical parameters in rabbits injected with some *Klebsiella pneumoniae* antigens isolated from cases of mastitis in sheep.

Mariam Esam Hamed

Khalid Mahmood Hammadi

Department of Biology, College of Education, Al-Iraqia University, Baghdad, Iraq

mariam.essam19981998@gmail.com

Corresponding author: drkhalidmh0@gmail.com

Abstract:

This study included the collection of approximately 200 clinical samples from sheep infected with mastitis during the period from 9/1/2022 to 12/15/2022. The results showed that 2 isolates were obtained belonging to the *Klebsiella pneumoniae* bacteria. This bacterium was diagnosed laboratory through bacteriological culture on MacConkey agar medium in addition to blood agar and biochemical test. Confirmatory diagnosis of bacteria were done by using the Vitek-2 compact system. The lipopolysaccharide (LPS) antigen was also extracted and purified from the isolated bacterial walls using gel filtration chromatography. Two experiments were conducted to measure the pathogenicity of this antigen. The first experiment included studying the infective dose of the LPS antigen, as it was injected into five groups of rabbits at different concentrations (300,600,900,1000, 1200, 1500,1800, 2200) micrograms per kilogram. The rabbits were dosed orally, and by observing the rabbits over a period of weeks, it was confirmed that the infective dose for these bacteria was (1800 µg/kg). The second experiment included a study of pathogenicity by studying some criteria such as Pulse, temperature, and breathing. This was done by dosing three groups of rabbits: the first group was injected with the pathogenic LPS antigen, and the second group was injected with the killed antigen. (In addition to the third group, which was considered the control group, which was injected with distilled water. The results of the first experiment showed an increase in temperatures after the first day of dosing, with a significant difference of 0.001 in the group injected with the killed antigen, in contrast to the comparison group, in which the rabbits were in good health and recorded a normal reading. For temperatures, the results of the heart rate before dosing showed a normal level in the three groups, and 48 hours after dosing, there was a significant increase in the heart rate for the two groups injected with a significant level of 0.001, in contrast to the comparison group, which showed normal results throughout the duration of the experiment. As for the respiratory rates, they were Within the normal level at time zero for the three groups, and after dosing with bacteria, a significant increase in respiratory rates was recorded at the level of (0.001) in the two injected groups, in contrast to the comparison group, which showed normal respiratory rates throughout the duration of the experiment.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, clinical parameters, antigens, mastitis, sheep

الشركة المصنعة ومن ثم تعقم بالمؤصدة عند درجة حرارة 121 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة ومن ثم يترك الوسط ليبرد ومن ثم يخلط جيدا ويصب في اطباق معقمة .

الفحوصات البيوكيميائية

- اختبار انزيم الكتاليز

تم اجراء هذا الفحص من خلال نقل مستعمرة صغيرة نامية على وسط الماكونكي الصلب بعمر 24 ساعة الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة يضاف لها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂ بتركيز 3% يعتبر ظهور فقاعات دليل على ان الفحص إيجابي وعلى العكس من ذلك عندما لا تظهر فقاعات فهذا مؤشر على سلبية الفحص⁽⁶⁾

- اختبار انزيم الاوكسيديز

اخذت مستعمرة نامية من على وسط الماكونكي الصلب بعمر 24 ومن ثم فرشها على ورقة ترشيح مبللة بكاشف الاوكسيديز والذي تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة له يعد ظهور اللون البنفسجي بعد 2 - 10 ثانية دليل على إيجابية الفحص وعدم تغير اللون في هذه المدة دليل على ان الفحص سالب⁽⁶⁾.

- اختبار تخمر السكريات الثلاثية باستعمال وسط

Triple sugar iron agar (TSI)

اجري هذا الاختبار للكشف عن قابلية البكتريا على تخمر سكر اللاكتوز والسكروز والكلوكوز وذلك باستخدام عروة الناقل المعقمة باللهب نقلت مسحة صغيرة من البكتريا النامية على وسط الماكونكي ونشرت على وسط TSI المائل المحضر في انابيب الاختبار حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 18 - 24 ساعة يعتبر الفحص موجبا عند تحول لون كاشف احمر الفينول الى اللون الأصفر، بينما يكون الفحص سالبا اذا احتفظ الوسط بلون الكاشف⁽⁷⁾.

المقدمة

تعد بكتريا الكلبسيلا الرئوية - *Klebsiella pneumoniae* احد اهم أنواع البكتريا المعوية - *Enterobacteriaceae* اكتشفت عام 1834 من قبل العالم الألماني Edwan Klebs يسبب هذا النوع من البكتريا العديد من الامراض للإنسان والحيوان حيث يمكن ان يسبب التهاب الرئة المكتسب إضافة الى التهاب المسالك البولية والانتان الدمى⁽¹⁾ يعبر جنس الكلبسيلا عن نوعين من المستضدات متواجدة على سطح خلاياها الأول هو عديد السكاريد الدهني (المستضد O)، يوجد منه 9 أنواع . والثاني هو جزيئات كبيرة هو جزيئات كبيرة من عديد السكاريد (LPS) المكون للمحفظة البكتيرية (المستضد K)، وهي سموم بكتيرية تتكون من دهون وسكريات متعددة ويوجد منها حوالي 77 نوع⁽²⁾.

طرق العمل

تحضير الأوساط الزرعية

وسط تبيع الجيلاتين

حضر هذا الوسط من خلال اذابة 12 غرام من الجيلاتين في 100 مليلتر من المرق المغذي ومن ثم وزع على انابيب وتم تعقيمها بالمؤصدة، تم استعمال هذا الوسط للكشف عن قدرة الجرثومة على انتاج انزيم gelatinase⁽³⁾⁽⁴⁾.

وسط تخمر اللاكتوز

يستخدم هذا الوسط لقياس قابلية البكتريا على تخميرها للسكريات مثل glucose, lactose⁽⁵⁾ وتم استخدام مجموعة من المواد في تحضير هذا الوسط مثل السكر 10 غ وصبغة الفينول الأحمر 0.4% وماء مقطر 100 مل والمرق المغذي 0.4 غم

وسط الماكونكي الصلب

حضر وسط الماكونكي الصلب حسب تعليمات

التنقية

تم تقييم أربعة وأربعين جزءًا مجمعًا لأول مرة لتقدير البروتين من خلال قراءة الامتصاصية لكل جزء عند 220 نانومتر. بعد ذلك، تمت معالجة كل جزء بطريقة حمض الفينول الكبريتيك لتحديد محتوى الكربوهيدرات، ثم تمت قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 490 نانومتر⁽⁷⁾.

-تقدير البروتين بطريقة برادفورد

تم تقدير تركيز البروتين في العينات من خلال طريقة

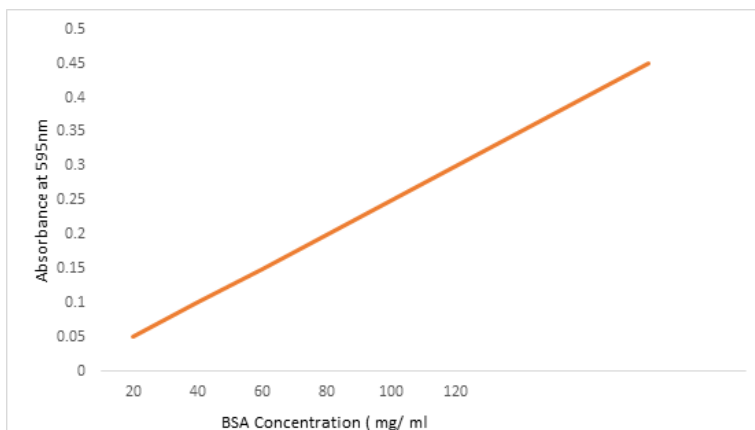
لبرادفورد (1976) (Kruger, 2002) على النحو التالي:

- ألبومين المصل البقري المحلول القياسي:

حضر المحلول القياسي لألبومين المصل البقري (100 ملغ/مل) عن طريق إذابة 100 غرام من المستضدات البوتاسيوم الحمضية في 10 مل من الماء المقطر⁽⁸⁾.

المنحنى القياسي للبروتين

حضرت تراكيز متسلسلة من ألبومين المصل البقري (10، 20، 30، 40، 50، 60، 80، 90 و 100 ملغ/مل) عن طريق إضافة كميات مناسبة من المياه المقطرة المعقمة إلى أحجام معينة من ألبومين المصل البقري. ثم تم رسم الامتصاص مقابل التركيز المقابل من ألبومين المصل البقري، بينما في الأنبوب الفارغ، تم إضافة (20 مل) من الماء المقطر بدلاً من ذلك. تم خلط كمية (20) ul من ألبومين المصل البقري الخام مع (50) ul من (1M) NaOH مع التحريك المستمر لمدة (2 - 3) دقيقة، ثم تم إضافة (1) مل من Coomassie Brilliant Blue G-250 مع الهز. بعد 3 دقائق من الحضانة في درجة حرارة الغرفة تم قياس الامتصاص عند (595 نانومتر) بواسطة مقياس طيف ضوئي. تم رسم العلاقة الخطية بين امتصاص وتركيز البروتين وتم استخدام المنحنى المعياري الذي تم الحصول عليه لتقدير تركيز البروتين.



الشكل رقم (1) المنحنى القياسي للألبومين المصل البقري لتحديد تركيز البروتين

ج. - H_2SO_4 محلول (98 %).

حفظ وإدامة العزلات

بعد ان تم تشخيص العزلات بواسطة جهاز الفايكس وتم الحصول على عزلات تعود لبكتريا الكلبسيلا الرئوية تم تنمية احدى هذه العزلات المأخوذة من حليب الأغنام على وسط مرق نقيع القلب

تركيز الكربوهيدرات⁽⁹⁾

* محلول لتحديد تركيز الكربوهيدرات:

أ. محلول قياسي الغلوكوز

تم تحضيره عن طريق إذابة الجلوكوز 1 ملغرام في 10 مل من الماء المقطر.

ب. محلول الفينول (5 %) يذوب في الماء المقطر.

خلال العزل البكتيري للعينات التي تم اخذها من الاغنام المصابة بالتهاب الصرع وجود بكتريا الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* حيث تم التأكد من وجودها من خلال تمكنها من النمو على وسط اختياري تفرقي مثل وسط الماكونكي الذي يعد وسطا ذو طبيعة اختيارية لكونه يسمح بنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام وفي الوقت نفسه يفرق بين البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز الذي يعد مصدرا مهما للكربون⁽⁵⁾.

تميزت مستعمرات البكتريا بكبر حجمها وذات اللون وردية براق وذات قوام مخاطي لزج، وهي من اهم الصفات التي تميزت بها البكتريا. اما على وسط اكار الدم فظهرت المستعمرات شفافة ولماعة اضافة الى انها كانت غير قادرة على تحليل الدم. اظهرت نتائج العزل البكتيري للعينات المأخوذة عن وجود 2 عزلة لبكتريا الكلبسيلا الرئوية من مجموع 130 عينة من الاغنام المصابة بالتهاب الصرع في منطقة المصلحية والعبايجي.

التشخيص المجهرى

وضحت نتائج الفحص المجهرى لاحد العزلات التي اخذت من عينات لبن الاغنام بعدما تم تحضير الشرائح المجهرية على انها بكتريا لا تصطبغ بصبغة كرام وتكون على شكل عصيات مستقيمة وتظهر قصيرة وفي بعض الاحيان تظهر بشكل ثنائيات مفردة او مزدوجة ذات نهايات مدورة قصيرة، وردية، وهذا يتوافق مع ما بينه⁽¹²⁾.

التشخيص بوساطة جهاز الفايترك

يوفر هذا الجهاز 64 فحص من الفحوصات الكيمو حيوية، حيث اجري الفايترك لجميع عزلات البكتريا بوساطة هذا الجهاز وذلك للتأكد من انها من ضمن جنس الكلبسيلا الرئوية. حيث تمت عملية التوكيد من العزلات في مختبر كلكامش في منطقة الحارثية حيث اظهرت عينات لبن الاغنام عن وجود 2

والدماغ بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة و ثم تم زراعتها على وسط الكار المغذي المائل وحفظت بدرجة حرارة 4 درجة مئوية في الثلاجة وتم استخدام هذه العزلات في العمل اليومي مع الاخذ بعين الاعتبار تجديدها وادامتها بشكل دوري حيث يتم تنشيطها بداية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ وبعد ذلك يتم إعادة زرعها على وسط الاكار المغذي المائل⁽⁵⁾.

طريقة تحضير اللقاح القاتل Killed Antigen

يتم تحضير اللقاح الكامل للخلايا بالاعتماد على طريقة⁽¹⁰⁾ من خلال زرع البكتريا على وسط Loria- LB (Bertani) وحضنت بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وتم حصدها بطريقة الطرد المركزي بواسطة PBS PH7.2 ومن ثم تم قتلها باستخدام 0.3 من PBS PH7.2 , وتم غسل المعلق البكتيري الذي تم احتضانه في 37 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة ثلاث مرات بواسطة PBS PH7.2 مع طرد مركزي مبرد عند 3000 دورة في الدقيقة الواحدة لمدة 15 دقيقة ثم تم تخفيف المعلق البكتيري الناتج مع PBS PH7.2 وفقا لأنبوب ماكفرلاند (رقم 1) 3×10^6 CfU/ml .

فحص العلامات السريرية

تم اجراء الفحوصات السريرية للأرناب بشكل يومي ولمدة ثمان أيام متتابة بعد التجريع وشمل الفحص السريري مراقبة العلامات غير الطبيعية اذ تم قياس كل من درجة الحرارة ومعدل التنفس ومعدل ضربات القلب واي تغيرات في السلوك او الشهية او البراز وذلك بناء على ما جاء به⁽¹¹⁾ وتمت المقارنة بين المجاميع الثلاثة وتسجيل أي حالة موت تحدث .

النتائج والمناقشة

العزل البكتيري:

تم جمع 200 عزلة بكتيرية من الأغنام وشكلت نسبة 2% من مجموع العزلات المجموعة ولقد تبين

66٪ ومع دراسة⁽¹⁶⁾ حيث بلغت نسبة مقاومتها اتجاه مضاد Gentamicin حوال 50٪ وقد اظهرت البكتريا نسب مختلفة ومتفاوتة اتجاه هذه الفحوصات اظهرت البكتريا المعزولة مقاومة عالية اتجاه بعض المضادات مثل Penicillin و-Erythro-Amikacin, Amoxicillin, mycin.

اذ كانت نسبة مقاومتها لمضاد Amikacin 90٪ وهي نسبة تتفق مع الدراسات التي اجراها كل من⁽¹⁵⁾ و⁽¹⁷⁾ حيث توصلوا من خلال دراساتهم ان نسبة المقاومة اتجاه هذه المضادات هي 100٪ على التوالي وسبب مقاومة البكتريا لهذه المضادات هو الاستعمال المتكرر لها لسنوات عديدة وعلى العكس فأن هذه النسب اختلفت عن الدراسات التي قدمها كل من⁽¹⁶⁾ و⁽¹⁸⁾ اذ توصلوا الى ان نسبة مقاومة البكتريا تجاه مضاد Amikacin تبلغ حوالي 63٪ و 33٪ على التوالي. اظهرت بكتريا الكلبسيلا الرئوية مقاومة اتجاه مضادات Ciprofloxacin, Topramycin بنسبة 8٪ و 86٪ وهو يتوافق مع ما جاء في دراسة⁽¹⁶⁾.

عزلة من مجموع اكثر من 200 عينة اي بنسبة 1٪ وهذا على عكس ما جاء به⁽¹³⁾ الذي كان قادرا على عزل هذه البكتريا بنسبة ما يقارب 16٪ من مجموع 50 عينة من الاغنام

فحص حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية

تم اجراء عدة فحوصات لاختبار حساسية بكتريا الكلبسيلا الرئوية اتجاه المضادات الحياتية. وذلك من خلال الاعتماد على طرق خاصة منها طريقة انتشار القرص بناء على ما جاء به⁽¹⁴⁾.

حيث تم اختيار تسعة مضادات للحساسية من مجاميع مختلفة وهي Amoxicillin, penicillin, tobra mycin, Levofloxacin, Gentamicin, Amikacin, Cefotaxime, Ciprofloxacin, Erythromycin.

كانت البكتريا ذات مقاومة قليلة لمضادات Levofloxacin, Gentamicin حيث بلغت نسبتها 60٪ و 59٪ على التوالي وهي تتوافق مع ما جاء به⁽¹⁵⁾ التي كانت نسبة مقاومة مضاد ال Levofloxacin حوالي

جدول (1) يبين مقاومة بكتريا الكلبسيلا الرئوية للمضادات الحيوية

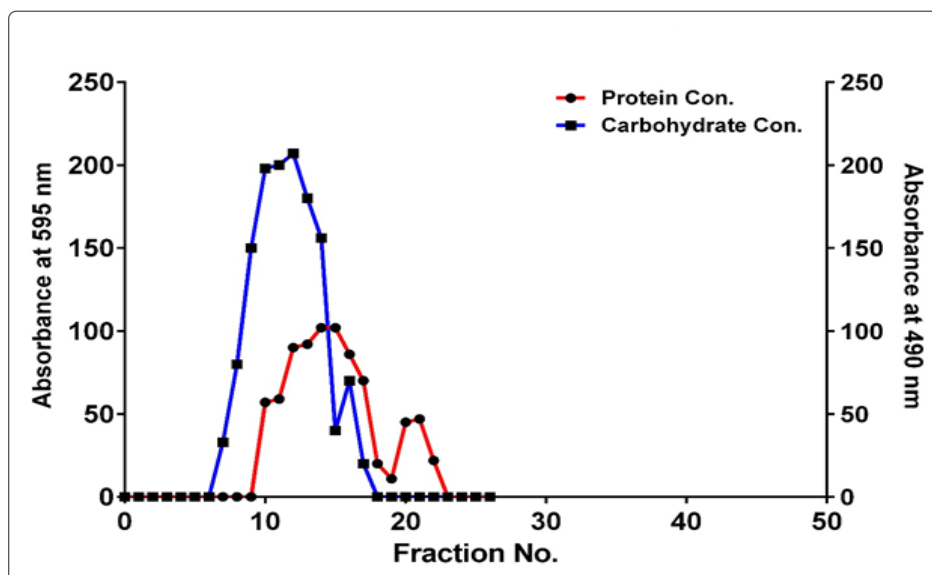
المضادات الحيوية	نسبة المقاومة
Amikacin	90%
Gentamicin	60%
Levofloxacin	59%
Tobramycin	86%
penicillin	100%
Amoxicillin	100%
Erythromycin	100%
Ciprofloxacin	8%
Cefotaxime	70%

الشحمي LPS الخام المستخرج من *Klebsiella pneumoniae* عن طريق تقدير محتويات البروتين وفقاً لبرادفورد (1976) اعتماداً على المنحنى القياسي

تنقية عديد السكاريد الشحمي LPS بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي
تم إجراء التوصيف الكيميائي لعديد السكاريد

لكل مكون (بروتين وكربوهيدرات) في الشكل ادناه وكانت النتائج 200 ميكروجرام/مل و145 ميكروجرام/مل لكمية CHO الخام والمنقاة على التوالي اعتماداً على المنحنى القياسي للجلوكوز .

لألومين المصل البقري ومحتويات الكربوهيدرات وفقاً⁽¹⁹⁾ اعتماداً على المنحنى القياسي لـ الجلوكوز. التنقية تم توضيح العلاقة بين الامتصاص وعدد الكسر



الشكل (2) تنقية عديد السكاريد الشحمي LPS بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامية بواسطة Sepharose-6B colom

جدول (2) حساب الجرعة الممرضة
لبكتريا الكلبسيلا الرئوية في الارانب

الارانب الميتة	الارانب الحية	الجرعات	رقم المجموعة
0	5	300 µg /kg	1
0	5	600 µg /kg	2
0	5	900 µg /kg	3
3	2	1000 µg /kg	4
2	3	1200 µg /kg	5
2	3	1500 µg /kg	6
0	5	1800 µg /kg	7
5	0	2200 µg /kg	8

وبناء على ذلك يتبين ان الجرعة الممرضة لبكتريا الكلبسيلا الرئوية هي 1800 ml وهي تتفق مع الجرعة التي اعتمدها⁽²⁰⁾ في دراسته لامراضية هذه البكتريا على

نتائج التجربة الامراضية على الارانب
التجربة الأولى : حساب الجرعة الممرضة (الممرضة)
(ID) لانتجين متعدد السكاريد الشحمي (LPS)
تم تجريب الارانب عن طريق الفم وذلك لتحديد الجرعة الممرضة لبكتريا الكلبسيلا الرئوية بتركيزات مختلفة والتي تم ذكرها سابقا ومن خلال ملاحظة الارانب على مدى أسابيع تم التأكد من ان الجرعة الممرضة لهذه الارانب كانت (1800 µg /kg) حيث تم التأكد من ذلك من خلال حساب مجموعة الارانب الحية والميتة في المجاميع المجرعة ولمدة أربعة أسابيع متتالية بعد التجريب حيث ظهرت ارانب هذه المجموعة المجرعة بهذا التركيز اعراض إصابة بهذه البكتريا بعد 24 ساعة من التجريب وهي اسهال قوي وحمى ونقصان في الوزن.

دراسة سابقة⁽¹³⁾ لامراضية هذه البكتريا على الارانب.

درجة الحرارة

تم ملاحظة ارتفاع في درجات الحرارة بعد اليوم الأول من التجريع وبفارق معنوي 0.01 في المجموعة المجرعة باللقاح القاتل على عكس مجموعة المقارنة والتي كانت تتمتع فيها الارانب بصحة جيدة وسجلت قراءة طبيعية لدرجات الحرارة فيها اما مجموعة LPS أظهرت زيادة في ارتفاع درجات الحرارة بعد التجريع بـ 48 ساعة وبفارق معنوي 0.01 وذلك عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة وبدأت درجات الحرارة بالزيادة من الأسبوع الثالث بعد التجريع حيث سجلت مجموعة المستضد المقتول درجة حرارة في اليوم الثالث بلغت 39.3±0.4 والتي كانت تعتبر عالية مع مقارنتها مع مجموعة LPS التي بلغت 38.7±0.3 وهكذا على طول مدة التجربة كما هو موضح في الشكل ادناه ..

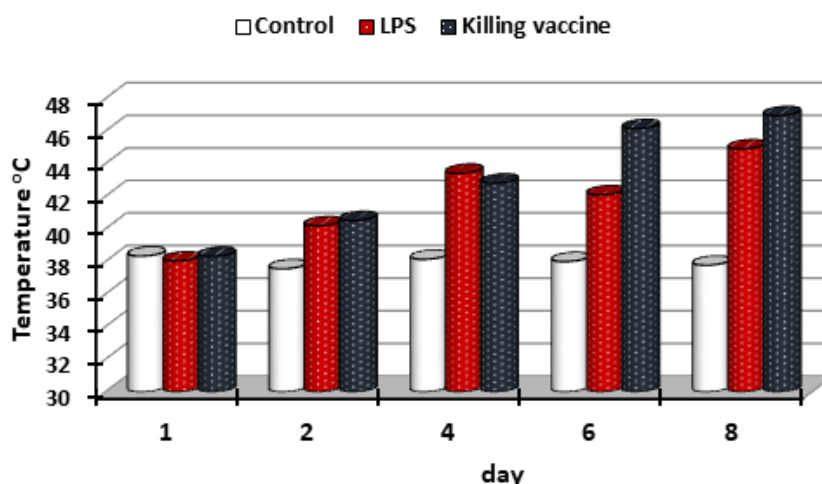
وان السبب في ارتفاع درجات الحرارة في المجموعتين هوانتاج البيروجينات الذاتية في السيتوكين الأول il-1 وهي تدور في مجرى الدم وتحفز التنظيم الحراري في منطقة تحت المهاد وتسبب الحمى⁽²²⁾ و⁽²³⁾ وهي على عكس ما جاء به⁽²⁰⁾ في دراسته التي اجراها سابقا للأرانب المجرعة ببكتريا الكلبسيلا الرئوية .

الارانب والتي بلغت 2×10^9 ml/CFU وأيضا تتوافق مع نتائج⁽²¹⁾ في دراستها لامراضية احد أنواع البكتريا التابعة للعائلة المعوية وهي بكتريا- Salmonella enteritidis على الارانب حيث بلغت الجرعة المصيبة لها حوالي 4.5×10^8 CFU/mL

التجربة الثانية : دراسة المعايير السريرية للأرانب

الاعراض السريرية :

تم مراقبة العلامات السريرية خلال أسبوع فعند بداية التجربة كانت جميع العلامات ضمن المستوى الطبيعي للثلاث مجاميع وكانت الثلاث مجاميع لا تعاني من أي مشكلة في الوزن والبراز والبول وبعد التجريع بـ 24 ساعة تم ملاحظة تغير في العلامات السريرية للمجموعتين المجرعتين وبشكل يومي حيث تم ملاحظة حدوث اسهال في المجموعة المجرعة بالتركيز الممرض استمر ليومان ومن بعدها تم سجلت حالات هلاك في المجموعة بعد ذلك حدث نقصان ملحوظ في الوزن إضافة الى خمول وقلة في الحركة وكان هذا ملحوظا في المجموعتين في اليوم الرابع بعد التجريع بحيث لا يتحرك الحيوان الا بالتحفيز هذه العلامات بدأت تزول تدريجيا بعد اليوم الخامس من التجريع ولم تظهر أي تغيرات في مجموعة المقارنة وهذا يتوافق مع

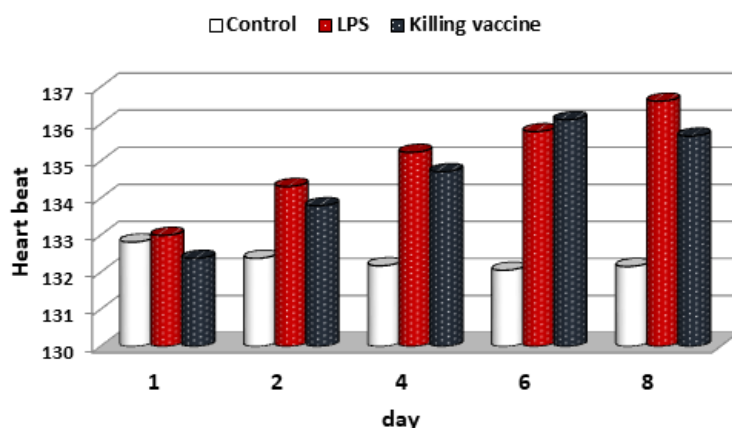


شكل (3) يوضح الفرق في درجات الحرارة على طول مدة التجربة للمجاميع الثلاثة (الانتجين المقتول و LPS والسيطرة)

ضربات القلب

للمجموعتين المجرعتين بمستوى معنوي 0.001 على عكس مجموعة المقارنة التي أظهرت نتائج طبيعية طول مدة التجربة وهذه تتفق مع دراسة⁽²⁰⁾ لأمراضية هذه البكتريا على الارانب .

اظهرت نتائج معدل ضربات القلب قبل التجريع مستوى طبيعي في الثلاث مجاميع وبعد التجريع بـ 48 ساعة كان هناك زيادة معنوية في معدل الضربات

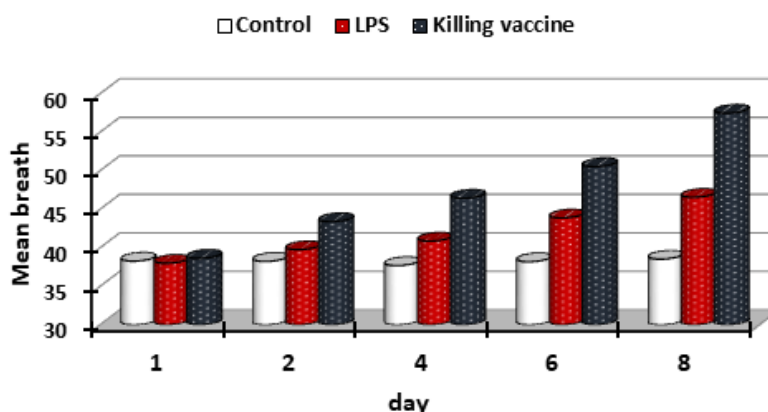


شكل (4) يوضح الفرق في معدل ضربات القلب للمجاميع الثلاثة (الانتجين المقتول و LPS والسيطرة)

معدل التنفس

معدلات التنفس هو حالة العطش التي تنتج عن الحمى والاسهال وذلك لتعويض الخسائر الحاصلة في السوائل مما يزيد من معدلات الايض ومن ثم تزويد الخلايا بالأكسجين الضروري وهذا يتفق مع ما جاءت به⁽²⁴⁾ في دراستها على بكتريا الايشريشية القولونية والتي تعود الى نفس عائلة بكتريا الكلبسيلا الرئوية .

اما بالنسبة لمعدلات التنفس فقد كانت ضمن المستوى الطبيعي في وقت الصفر وبعد التجريع بالبكتريا سجلت زيادة معنوية في معدلات التنفس بمستوى (0.001) في المجموعتين المجرعتين على عكس مجموعة المقارنة التي أظهرت معدلات تنفس طبيعية على طول مدة التجربة ويعود السبب في زيادة



شكل (5) يوضح الفرق في معدل ضربات القلب للمجاميع الثلاثة (الانتجين المقتول و LPS والسيطرة)

J.K.,Rebers P.A. And Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* 28:350-356

10- paton, J.C.; Rogers,T.J.; Morona,R.; And Paton, A.W.(2001). Oral Administration of Formaldehyde-Killed Recombinant Bacteria Expressing a Mimic of the Shiga Toxin Receptor Protects Mice from Fatal Challenge with Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*; Vol. 69; No. 3;p.1389–1393.

11- Radošits O., Gay C.; Hinchcliffe K. and Constable P(2007) *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats and horses*. 10th ed. Elsevier Ltd. Philadelphia, USA.: 674.

12- Forbes, B.A.; Daniel, F.S. and Alice, S.W. (2007). *diagnostic microbiology*. 12th ed., Mosby Elsevier company, USA.

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

14- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. and Truck, M.(1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 43:493-496.

15- قادر، روزكار أنور. (2018) التحري عن حساسية الجراثيم المعزولة من إدرار مرضى الفشل الكلوي في مدينة كركوك لبعض المضادات الحيوية وتأثير مستخلصات شنا شيل الذرة عليها. رسالة

المصادر: References

1- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F (1994). "Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function". *FASEB J.* 8 (2): 217-25.

2- Ryan KJ; Ray CG, eds. (2004). *Sheris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. p. 370. ISBN 978-0-8385-8529-0.

3- 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.

4- Cruickshank RC, Dugnid JP, Marmion BP, Swain RH.(1975). *Medical Microbiology* 12th edition. vol(11). London: Churchill Livingstone

5- Atlas, R. M.; Parks, L. C. and Brown, A. E. (1995). *Laboratory Manual of Experimental Microbiology*. Mosby-Year book, Baltimore 412 416..

6- Markey, B.; Leonard, F.; Archambault, M.; Cullinane, A. and Maguire, D. (2013). *Clinical veterinary microbiology*. Second edition, Mosby, Elsevier.; 246-249

7- 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 .

8- Bradford, M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *J. Annu.Biochem.*;Vol. 72;pp 248-254.

9- Dubios,M.K.,Gilles K.A.,Hamilton

- ماجستير / كلية العلوم جامعة كركوك.
- 16- نيال دانية (2016). تقضي بعض الأنواع الجرثومية المسببة للإنتانات القيحية ودراسة حساسيتها تجاه المضادات الحيوية. رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة حلب.
- 17-Bradford, M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *J. Annu. Biochem.*;Vol. 72;pp 248-254.
- 18-Dubios,M.K., Gilles K.A.,Hamilton J.K., Rebers P.A. And Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substance.*Anal.Chem.* 28:350-356
- 19- ناصر، ه. صالح، س. م. والشيباني، أ. ب. (2013). المناعة الخلطية الوقائية التي يسببها عديد السكاريد الدهني LPS المدمج في الجسيمات الشحمية في الفئران ضد عدوى *Shigella flexneri*. مجلة جامعة النهرين، 16(3)، 213-205. ناصر، ه. صالح، س. م. والشيباني، أ. ب. (2013). المناعة الخلطية الوقائية التي يسببها عديد السكاريد الدهني LPS المدمج في الجسيمات الشحمية في الفئران ضد عدوى *Shigella flexneri*. مجلة جامعة النهرين، 16(3)، 213-205.
- 20- حميد، تقى عبد الكريم (2016). دراسة مقارنة للمحتوى البلازميدي للبكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من عينات بيئية وسريرية. رسالة ماجستير / كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم / جامعة بغداد.
- 21- دخيل، خلود حامد. (2009). عزل وتشخيص بعض الأنواع البكتيرية المرافقة لالتهابات المجاري البولية عند النساء الحوامل المصابات بالسكري Type 2 ومقاومتها لبعض المضادات الحيوية. مجلة
- الهندسة والتكنولوجيا، المجلد 27، العدد 16.
- 22- العنبيكي، 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.
- 23- محمد، آيات جاسم (2019) التغيرات السريرية والمرضية في الأرناب المصابة تجريبيا بجرثومة *Salmonella enteritidis* والمعزولة من الإنسان. رسالة ماجستير / كلية الطب البيطري / جامعة ديالى.
- 24- لطيف، الاء نزار (2018) دراسة سريرية مرضية ومناعية للأشربيشيا القولونية (H7:0157) المعزولة من الإنسان في الأرناب. رسالة ماجستير / كلية الطب البيطري / جامعة ديالى.