P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2014 ,(8), (1) :00-00

(*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة

Open Access

دراسة بعض معايير المناعة الخلطية الناتجة عن تمنيع الفئران البيض سلالة Balb/c ببكتريا الكليبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* المضعفة بالمواد الطبيعية

محمد جمال منصور ليث مصلح نجيب عبد الوهاب بديوي حسين

جامعة الانبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2013/00/00
تاريخ القبول: 2014/5/6
تاريخ النشر: / / 2022

DOI: 10.37652/juaps.2014.122635

الكلمات المفتاحية:

الكليبسيلا الرئوية ،
التآزر ،
المواد الطبيعية ،
التمنيع ،
المناعة الخلطية.

الخلاصة:

تم عزل وتشخيص بكتريا الكليبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*، ودراسة حساسيتها لبعض المضادات الحيوية وتأثير بعض المواد الطبيعية (العسل والثوم) ضد هذه البكتريا وبيان الأثر التآزري لعمل هذه المواد مع المضادات الحيوية، إذ اظهرت النتائج أن لتداخل العسل وعصير الثوم مع المضادات الحيوية تأثيراً معنوياً في زيادة حساسية *K. pneumoniae* تجاه المضادات الحيوية.، ونميت *K. pneumoniae* في وسط المرق المغذي الحاوي على تراكيز مختلفة من العسل وعصير الثوم، وأجري لها اختبار الحساسية للمضادات الحيوية، واستعملت هذه العزلة في دراسة معايير المناعية الخلطية Humoral immunity، إذ استخدمت طريقة Single Radial Immunodiffusion Test Kits لقياس كمية الأجسام المضادة والمتممات، إذ اظهرت النتائج أرتفاعاً معنوياً في مستوى أنواع الأجسام المضادة IgA، IgM، IgG ومستوى بروتينات المتمم نوعي C_3 ، C_4 للمجاميع الممنعة بالمقارنة مع مجموعتا السيطرة السالبة والموجبة.

المقدمة:

تعد الكليبسيلا الرئوية Klebsiella pneumoniae من الممرضات الانتهازية Opportunistic pathogens وأحد مسببات الخمج المكتسب في المستشفيات، وتمتاز بمقاومتها العالية للمضادات الحياتية لإنتاجها إنزيمات البيتا لاكتاميز، وتمتلك العديد من عوامل الضراوة Virulence factors كمتعدد السكريد الدهني Lipo Poly Saccharide (LPS) وامتلاكها المحفظة التي تعد عامل فوعة مهما وهو يرتبط بأمراضيتها بشكل رئيس، ولها القدرة على مقاومة الخلايا البلعمية العدلة (1).

وتمتاز بكتريا K. pneumoniae بكونها عصيات سالبة لملون گرام، غير متحركة، لا هوائية اختيارية وتمتلك كبسولة بارزة متعددة السكريات (2).

كما يمكن لهذهِ العصيات أن تنتظم على شكل أفراد (Singles) أو أزواج (Pairs) وقد تنتظم على شكل سلاسل قصيرة (Short chains) وهي غير مكونة للأبواغ وتتميز مستعمراتها بصفتها المخاطية اللزجة (3).

ونتيجة الاستخدام المفرط للمضادات الحياتية أدى إلى مقاومة البكتريا العالية، وهذه المشكلة تعد أحد أكبر المشاكل التي تواجه العالم (4)، وعلى الرغم من تطور المضادات الحياتية بشكل كبير خلال العقود الثلاثة الأخيرة إلا أن الأحياء المجهرية تمكنت من تطوير عدة آليات لمقاومة هذه المواد بسرعة أكبر، مما جعل العالم في مواجهة تطور مستمر في المقاومة للبكتريا مع تطور بطيء في إنتاج مضادات حياتية جديدة (5).

إن تطور وانتشار المقاومة للمضادات الحياتية، فضلاً عن نشوء سلالات جديدة من العوامل المسببة للمرض، يشكل مصدر قلق

* Corresponding author at: College of Science, University of Anbar

E-mail address:

كبير للباحثين والأطباء والمجتمع والصحة العامة. والقدرة على العلاج الناجح للمرض يعتمد على تطوير أدوية جديدة (6).

اتجهت الدراسات العالمية الحديثة إلى استخدام المواد الطبيعية ومنها العسل للقضاء على البكتريا المسببة للأمراض، واستقطب العلاج بعسل النحل اهتمام العديد من الباحثين نظراً لكونه علاجاً أميناً وليس له تأثيرات جانبية، وأن العلاج بالعسل يدعى Apitherapy وهو أحد العلوم المعتمدة حديثا (7)، إذ أشارت العديد من البحوث إلى التأثير المثبط والقاتل للعسل تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لملون كرام. من جانب آخر فإن الفعالية الكبيرة التي تظهرها نبات الثوم أو مستخلصاتها تجاه عدد من الكائنات يعزى إلى تنوع محتواها من المركبات الداخلة في تركيبها ويمكن الحصول عليها باتباع طرائق الفصل المختلفة (8). كما يحتوي الثوم على مركب الاليسين Allicin الفعال ضد العديد من البكتريا ولاسيما في العصير المستخرج من الثوم الطازج ويمتلك تأثيراً مضاداً للبكتريا الموجبة والسالبة لملون كرام وله القدرة السريعة على اختراق جدار الخلايا البكتيرية (9).

تعتمد الاستجابة المناعية في المناعة الخلطية على تكوين الأجسام المضادة المتخصصة بالمستضدات الغريبة وتنتج الأجسام المضادة من خلايا مشتقة من الخلايا اللمفاوية البائية B– lymphocytes تعرف بخلايا البلازما Plasma cells (10).

المواد وطرائق العمل :

تشخيص العزلة : شخصت عزلة الكليبسيلا الرئوية بالأعتماد على الخصائص الزرعية والفحوصات الكيموحياتية كما ورد في (11) و (12) و(13).

اختبار الحساسية للمضادات الحياتية:

استخدم عدد من المضادات الحياتية المجهزة من شركة Bioanalysis التركية وذلك باتباع طريقة الانتشار بالأقراص Disk diffusion method بالاعتماد على طريقة (14).

جمع المواد الطبيعية

العسل Honey: تم الحصول على العسل الطبيعي من أحد المناحل في مدينة الرمادي ، إذ جمع وخلص من الشوائب وبقايا الشمع، ثم زرع على وسط الآكار المغذي للتأكد من عدم تلوثه بالأحياء المجهرية، وبعدها وضع في حاويات زجاجية معقمة وحفظ في درجة حرارة 4 مْ لحين الاستخدام.

عصير الثوم الطازج : استخدم الثوم العراقي المتوفر في السوق المحلية، تم تقشيره ومزج 10 غم من فصوص الثوم المقطعة مع 25مل من الماء المقطر المعقم ومزج في خلاط كهربائي واستخدم مباشرة في اختبار الفعالية الضد ميكروبية (15).

اختبار الفعالية الضد ميكروبية للعسل وعصير الثوم

استخدمت طريقة الانتشار من الأقراص Disks diffusion method وحسب طريقة (16).

اختبار التداخل بين المضادات الحياتية والمواد الطبيعية

أجري اختبار التداخل لعزلة *K. pneumoniae* ، إذ نقلت 3–5 مستعمرات نقية إلى أنابيب محتوية على 3 مل من محلول الملح الطبيعي بتركيز 4.5 غم/ لتر من ملح الطعام NaCl، وقورنت كثافة المعلق الناتج مع أنبوبة ماكفرلاند القياسية التي تعادل 0.5 Mf (1×10^8) خلية/ مل. ثم غمرت ماسحة قطنية معقمة بالعالق البكتيري، وأزيل الفائض من العالق بتدوير الماسحة Swab على الجدران الداخلية للأنبوبة، ثم نشر المعلق البكتيري على وسط مولر هنتون الصلب، وتركت الأطباق لمدة 3–5 دقائق لتتشرب العالق إلى أن تجف تماما، وبعدها تثبت أقراص المضادات الحياتية باستخدام ملقط معقم، ثم وضع فوقها 25 µl من المواد الطبيعية (عسل وعصير الثوم الطازج)، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 18–24 ساعة، وبعدها قيس قطر منطقة التثبيط (ملم) للمضاد مع المادة الطبيعية علماً ان المواد الطبيعية استخدمت لمعرفة فعالتها على اقراص من ورق الترشيح المعقمة بقطر 6 ملم.

تنمية عزلات *K. pneumoniae* بتراكيز مختلفة من المواد الطبيعية في وسط المرق المغذي واختبار حساسيتها تجاه المضادات الحياتية

استخدمت أربعة تراكيز من المواد الطبيعية (5، 10، 15، 20)%، وبعد إضافة تراكيز المادة الطبيعة إلى أنابيب تحوي 10 مل من وسط المرق المغذي، لقحت الأنابيب بالعالق البكتيري بمقدار 100 µl لكل تركيز، بعدها حضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°، ثم أجري اختبار حساسية البكتريا تجاه المضادات الحياتية، وبعدها قيس قطر منطقة التثبيط (ملم) للمضادات وقورنت مع أقطار مناطق التثبيط للعزلة البكتيرية قبل المعاملة.

الترحيل الكهربائي Electrophoresis العمودي للبروتينات الخام Crude proteins لخلايا بكتريا *K. pneumoniae* المتكسرة

أجريت عملية النبذ المركزي للأنابيب في التجربة السابقة والخاصة بعزلة *K. pneumoniae* ، أهمل الراشح وغسل الراسب مرتين بالماء المقطر المعقم، ثم نقل الراسب إلى جفان خزفية ونقلت إلى التجميد السريع وتركت مدة 24 ساعة، بعدها سحق الراسب المتجمد ثم أدخل مرة أخرى إلى التجميد لمدة ساعة وأعيدت عملية السحق مرة اخرى ، نقل الراسب إلى أنابيب ابندروف ثم رحلت كهربائيا، إذ استخدمت طريقة Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) كما أوردها (17) .

الحيوانات المختبرية:

استعملت ذكور الفئران البيضاء السويسرية سلالة Balb/c Swiss mice بواقع 30 فأر بعمر 6–7 أسابيع في هذه الدراسة وتم الحصول عليها من مركز الرقابة الدوائية– بغداد.

تمنيع الفئران:

قسمت الفئران على ست مجاميع وكل مجموعة تضم خمس فئران ووضعت في أقفاص خاصة بدرجة حرارة 26 م ولقحت كما يلي:

المجموعة الأولى: السيطرة السالبة واستخدم فيها محلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS).

المجموعة الثانية: السيطرة الموجبة واستخدم فيها وسط المرق المغذي

المجموعة الثالثة: معاملة ببكتريا *K. pneumoniae* المقتولة بالموجات فوق الصوتية.

المجموعة الرابعة: معاملة راسب خلايا *K. pneumoniae* والمعلق بـ 3 مل Normal Saline.

المجموعة الخامسة: معاملة ببكتريا *K. pneumoniae* المعاملة بالعسل.

المجموعة السادسة: معاملة ببكتريا *K. pneumoniae* المعاملة بعصير الثوم.

منعت الفئران بالمستضدات المختلفة ، إذ حقنت تحت الجلد بكمية 0.5 مل وبعد 14 يوماً أعطيت جرعة تمنيع معززة للجرعة الأولى بالكمية نفسها وبعد 21 يوماً سحب الدم من الفئران وأُجريَ فحوصات المناعة الخلطية.

فحوصات المناعة الخلطية

التقدير الكمي لمستوى أضداد الكلوبيولينات المناعية (IgA,IgM,IgG) وبروتينات نظام المتمم (C3,C4) في المصل

استخدمت طريقة (Single Radial Immuno Diffusion) الانتشار المناعي الشعاعي في الهلام إذ تم استعمال العدة المجهزة من شركة (LTA) على وفق تعليمات الشركة المجهزة و حسب مبدأ (18)إذ وصف العلاقة الخطية بين تركيز المستضد ونصف قطر حلقة الترسيب المناعي التي تتكون في الأكار المحتوي على الأضداد النوعية لذلك المستضد

التحليل الإحصائي:

تم تحليل البيانات باستخدام اختبار تحليل التباين Analysis of variance test (ANOVA) لمعرفة معنوية المعاملات المختلفة على وفق تصميم العشوائية الكاملة Complete randomized design (CRD) واختبرت الفروق المعنوية بين متوسطات المعايير المدروسة على وفق اختبار دنكن Duncan's multiple range test وكذلك استخدام أقل فروق معنوية معدل Least signification difference test (LSD) عند معنوية ($P<0.05$). وتم ذلك باستخدام البرنامج Statistical package of social sciences (SPSS).

النتائج :

البكتريا – ظهرت مستعمرات بكتريا *K. pneumoniae* على وسط الماكونكي بشكل مستعمرات وردية ذات قوام مخاطي، واعطت نتيجة سالبة لاختبار إنتاج حلقة الأندول Indol ونتيجة سالبة لاختبار أحمر المثيل Methyl Red ، وكانت سالبة لاختبار الحركة ، كما اعطت فحصا موجبا لاختبار استهلاك السترات Citrate utilization والفوكس بروسكاور Vogas proskaur.

حساسية *K. pneumoniae* للمضادات الحياتية

اظهرت النتائج حساسية *K. pneumoniae* للمضادات Amikacin، Ciprofloxacin، Gentamicin ، Ceftriaxone، Cefotaxime، في حين كانت مقاومة للمضادات Amoxicillin، Cefixime، Rifampicin، Trimethoprim، Cefalexine ، وبلغ اعلى معدل لأقطار التثبيط للمضاد الحيوي Ciprofloxacin

(29.6) ملم، في حين سجل المضاد الحيوي Cefotaxime اقل معدلا للتثبيط بقطر (10.6) ملم وكما في الجدول(1).

تأثير التداخل بين العسل والمضادات الحياتية على حساسية *K. pneumoniae*

اظهرت النتائج أن لتداخل العسل مع المضادات الحياتية تأثير معنوي في زيادة حساسية الكليبسيلا الرئوية تجاه المضادات الحياتية. إذ بلغ معدل أقطار تثبيط المضادات CTXH, CROH, CNH, CIPH, AKH مع العسل (35.6، 43.3، 37.6، 34.6، 34.6) ملم على التوالي بعدما كانت لوحدها (14.6، 29.6، 21.6، 13.6، 10.6) ملم على التوالي، في حين لايوجد تأثير لتداخل العسل مع المضادات CL, RA, TMP, CFM, AX إذ لم تبدِ هذه المضادات أي فعالية تجاه الكليبسيلا الرئوية وكما في الجدول(2).

تأثير التداخل بين عصير الثوم والمضادات الحياتية على حساسية الكليبسيلا الرئوية *K. pneumoniae*

اظهرت النتائج أن لتداخل عصير الثوم مع المضادات الحياتية تأثير معنوي في زيادة حساسية الكليبسيلا الرئوية تجاه المضادات الحياتية. إذ بلغ معدل أقطار تثبيط المضادات CTXG, CROG, CNG, CIPG, AKG مع عصير الثوم (26.6، 35.6، 30.6، 25.6، 25.6) ملم بعدما كانت لوحدها (14.6، 29.6، 21.6، 13.6، 10.6) ملم على التوالي، في حين لا يوجد تأثير لتداخل عصير الثوم مع المضادات CL, TMP, RA, CFM, AX إذ لم تبدِ هذه المضادات أي فعالية تجاه الكليبسيلا الرئوية وكما في الجدول (3).

تأثير تنمية *K. pneumoniae* في الوسط الزرعي الحاوي على تراكيز مختلفة من العسل (5 ، 10 ، 15 ، 20) % وحساسيتها تجاه المضادات الحياتية :

أظهرت النتائج ان التركيز 5% فقط الذي أظهر نمواً بكتيرياً في حين أن التراكيز (10، 15، 20)% ثبطت نمو العزلة البكتيرية وكما في الجدول(4).

تأثير تنمية الكليبسيلا الرئوية *K. pneumoniae* في الوسط الزرعي الحاوي على تراكيز مختلفة من عصير الثوم (5 ، 10 ، 15 ، 20) % وحساسيتها تجاه المضادات الحياتية:

أظهرت النتائج ان التركيز 5% من عصير الثوم فقط الذي أظهر نمواً بكتيرياً في حين أن التراكيز (10، 15، 20)% ثبطت نمو العزلة البكتيرية وكما في الجدول (5)

نتائج الترحيل الكهربائي لعزلة *K. pneumoniae* النامية بالوسط الزرعي الحاوي على تركيز 5% عسل و 5% عصير الثوم الطازج

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي وجود حزم جديدة للعزلة النامية بتركيز 5% تختلف عن العزلة الأصلية، في حين تشابهت نتائج الترحيل الكهربائي للعزلات النامية في التراكيز (10، 15، 20)% مع العزلة الأصلية (عزلة السيطرة).

وأجريت نفس التجربة السابقة ولكن باستخدام عصير الثوم الطازج بدلاً من العسل واستخدمت نفس التراكيز وتشابهت مع نتائج الترحيل السابقة باستخدام العسل ماعدا أختلاف موقع الحزمة الجديدة وكما موضح بالصورة (1).

حساسية الكليبسيلا الرئوية *K. pneumoniae* للمضادات الحياتية قبل التنمية وبعد وبعدها في الوسط الزرعي الحاوي على تركيز 5 % عسل و 5 % عصير الثوم .

اظهرت النتائج وجود فروقات معنوية عند مستوى ($P<0.05$) في استجابة الكليبسيلا الرئوية وازدياد حساسيتها تجاه المضادات الحياتية CTX, CRO, CN, CIP, AK إذ بلغت معدلات أقطار التثبيط (29، 42.6، 33، 14.6، 18) ملم على التوالي بالنسبة لمعاملة العسل بتركيز 5% بعدما كانت لوحدها (14.6، 29.6، 21.6، 13.6، 10.6) ملم على التوالي قبل معاملتها بالعسل ، كما اظهرت النتائج زيادة حساسية *K. pneumoniae* النامية في وسط المرق المغذي الحاوي على تركيز 5% عصير الثوم الطازج تجاه المضادات الحياتية CTX, CRO, CN, CIP, AK إذ بلغت معدلات أقطار التثبيط (24.3، 36، 30.6، 22.6، 19) ملم بعدما كانت (14.6، 29.6، 21.6، 13.6، 10.6) ملم قبل المعاملة ومما ميز هذه التجربة هو استجابة *K. pneumoniae* وحساسيتها 100% للمضاد الحيوي Cefixime بعدما كانت مقاومة 100% لهذا المضاد وفي كلتا المعاملتين بالعسل و عصير الثوم بتركيز 5% وكما في الجدول (6) .

نتائج المناعة الخلطية :

تأثير حقن المستضدات المختلفة لبكتريا *K. pneumoniae* على مستوى الأجسام المضادة نوع IgG, IgM. IgA ملغم/ 100 مل.

يوضح الجدول (8) نتائج تأثير حقن المستضدات المختلفة لبكتريا *K. pneumoniae* على مستوى الأجسام المضادة نوع IgG, IgM, IgA (صورة 2) أظهرت النتائج ارتفاع مستويات الأجسام المضادة معنوياً في المعاملات بالمقارنة مع مجموعتي السيطرة السالبة والموجبة. فسجل أعلى فرق معنوي في المجموعة المعاملة براسب الخلايا البكتيرية وبلغ للجسم المضاد نوع IgA 231.84 في حين كان في مجموعتا السيطرة السالبة والموجبة 170.32، 174.48 على التوالي. أما بالنسبة للجسم المضاد نوع IgM للمعاملة نفسها فبلغ 148.38 في حين بلغ في مجموعتي السيطرة السالبة والموجبة 122، 125.16 على التوالي. أما الجسم المضاد نوع IgG فبلغ 1389.84 في المعاملة نفسها بالمقارنة مع مجموعتا السيطرة السالبة والموجبة 942.74 و950 على التوالي. كما أظهرت النتائج أن المجاميع المحقونة بالبكتريا المعاملة بالعسل و المعاملة بالثوم تسلك سلوكاً مشابهاً للمجموعة المحقونة بالبكتريا المقتولة بالموجات فوق الصوتية بالنسبة للأجسام المضادة نوع IgG, IgA لاحظ جدول (7).

تأثير حقن الفئران بمستضدات *K. pneumoniae* على معدل تركيز بروتينات المتمم نوع C3 و C4 ملغم/ 100 مل.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي ارتفاعاً معنوياً في معدل تركيزي المتممين C3، C4 في المجاميع المحقونة بمستضدات *K. pneumoniae* ، إذ بلغ أعلى مستوى للمتمم C3 في المجموعة المعاملة براسب الخلايا البكتيرية تليه المجموعتان المعاملتان بالبكتريا المضعفة بالعسل والمضعفة بالثوم ومن ثم المجموعة المعاملة بالبكتريا المقتولة بالموجات فوق الصوتية. أما بالنسبة لمستوى المتمم C4 فكانت المجاميع المعاملة براسب الخلايا البكتيرية والمعاملة بالبكتريا المضعفة بالعسل والمضعفة بالثوم لا تظهر فروقاً معنوية فيما بينها في حين هنالك فرق معنوي مع المجموعة المعاملة بالبكتريا المقتولة بالموجات فوق الصوتية. كما أظهرت جميع المعاملات فرقاً معنوياً عند مستوى ($P<0.05$) مقارنةً مع مجموعتا السيطرة السالبة والمجموعة ولكلا النوعين من المتممات C3، C4 لاحظ الجدول (8).

المناقشة :

تشير العديد من الأبحاث إلى الفعل التآزري Synergism بين العسل والمضادات الحياتية وازدياد حساسية البكتريا تجاه المضادات الحياتية، إذ بين (19) الفعل التآزري بين العسل والمضادات Tetracycline, Oxacillin, Mupirocin, Imipinem ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* إذ إن لتداخل العسل مع هذه المضادات دوراً كبيراً في زيادة حساسية العزلات تجاه المضادات، إذ تعطي أقطار تثبيط أكبر مما لو استخدمت المضادات لوحدها أو العسل لوحده.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده (20) في زيادة حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية الممزوجة مع العسل مما يوضح الفعل التآزري بينهما.

كما تتفق نتائج دراستنا مع ما وجده (21) في الفعل التآزري بين عصير الثوم والمضادات الحياتية من خلال ازدياد أقطار التثبيط باستخدامها ممزوجة بالمقارنة مع استخدام كل واحد منهما على حدة. وذكر (22) أن استخدام مزيج الثوم والمضادات الحياتية يسمح بتخفيض جرعة المضادات الحياتية المختارة وضمان التقوية العلاجية.

أظهرت النتائج أن هنالك تفاوتاً كبيراً في حساسية عزلات *K. pneumoniae* للمضادات وحدها من جهة وتغير حساسيتها عند استخدام المضادات مع المواد الطبيعية من جهة أخرى، وهذا يعود إلى الفعل التآزري ما بين المادة الطبيعية والمضاد الحيوي. إذ ذكر (23) أن العسل يحتوي على مركب الكريستين Quercetin الذي يزيد من نفاذية الغشاء البلازمي، كما يؤدي إلى فقدان البكتريا لقدرتها على تصنيع Adenosine Tri Phosphate.

الملاحظ من الدراسة الحالية أن المضادات التي تعمل على تثبيط بناء البروتين أبدت فعالية تآزرية كبيرة فالمضادات Ciprofloxacin, Amikacin, Gentamicin سجلت فعالية تآزرية مهمة وهي تتفق مع ما وجده (24) إذ بين أن التداخل بين عدد من المستخلصات والمضادات التي تعمل على تثبيط بناء البروتين كان أعلى من المضادات التي تثبط حامض الفولك فتليها المضادات التي تعمل على بناء الجدار الخلوي ثم المضادات المثبطة لبناء الأحماض النووية.

من جانبٍ آخر يعود زيادة حساسية العزلات البكتيرية تجاه عصير الثوم الممزوج مع المضاد الحيوي إلى الفعل التآزري لمركب Allicin مع المضادات الحياتية الذي يؤدي إلى تفاعلات كيميائية مع

مجموعة SH لإنزيمات مختلفة مثل Thioredoxin reductase, alcohol dehydrogenase, RNA polymerase مما يؤثر في استجابة العزلات وحساسيتها تجاه المضادات المختلفة (25).

وتعزى أسباب ازدياد حساسية عزلات *K. pneumoniae* بعد معاملتها بالعسل بتركيز 5% وعصير الثوم بتركيز 5% إلى الفعل التآزري بين المواد الطبيعية والمضادات الحياتية أو تداخل هذه المواد مع مسالك الأيض المختلفة في البكتريا، أو تؤثر على التمثيل الحيوي للأحماض الأمينية والدهنية وهذا يتفق مع كل من (26) و (27). كما وجد(28) أن معاملة الخلايا البكتيرية بتراكيز مختلفة من العسل تؤثر على دهون الغشاء ومن ثم يغير من حساسيتها تجاه المضادات الحياتية.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما ذكره (29) الذي بين أن الإصابة ببكتريا *K. pneumoniae* يؤدي إلى زيادة في إنتاج أنواع الأجسام المضادة IgG, IgM, IgA. وقد يعزى الارتفاع في مستويات الأجسام المضادة في الفئران المعاملة إلى قدرة مستضدات *K. pneumoniae* على تحفيز توالد الخلايا اللمفاوية.

كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (30) إذ وجد ارتفاعاً معنوياً في مستويات الأضداد من نوع IgG, IgM, IgA، إذ عدّ أن الزيادة في تركيز هذهِ الأضداد مؤشراً إلى تطور المناعة الخلطية. كما تتفق نتائج الدراسة الحالية مع (31) الذي وجد أن تركيز الأضداد من نوع IgG, IgM, IgA ارتفع معنوياً في الأرانب الممنعة ببكتريا *E. coli* بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

كما أظهرت نتائج دراستنا الحالية أن تمنيع الفئران بمستضدات الكليبسيلا الرئوية تؤدي إلى ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى C3 وC4 في جميع المعاملات بالمقارنة مع مجموعتا السيطرة السالبة والموجبة وهذا يتفق مع دراسة (32) في دراسة بعض المظاهر المناعية الناتجة من حقن بكتريا *P. aeruginosa* المضعفة بالحرارة في الحيوانات المختبرية، إذ ارتفع معنوياً مستوى بروتيني المتمم C3 وC4 في المعاملات بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة (29) في الارتفاع المعنوي لتركيز عاملي المتمم C_3، C_4 في الأرانب المحلية الممنعة بالكليبسيلا المضعفة بالحرارة .

جدول (1) حساسية عزلة *K. pneumoniae* للمضادات الحيوية

المضادات	*K. pneumoniae* قطر التثبيط (ملم)
AK	14.6
CIP	29.6
CN	21.6
AX	0
CFM	0
CRO	13.6
CTX	10.6
TMP	0
RA	0
CL	0

جدول (2) تأثير التداخل بين العسل والمضادات الحيوية على حساسية *K. pneumoniae* .

المضادات	*K. pneumoniae* قطر التثبيط (ملم)
Honey	31
AKH	35.6
CIPH	43.3
CNH	37.6
AXH	0
CFMH	0
CROH	34.6
CTXH	34.6
TMPH	0
RAH	0
CLH	0

جدول (3) تأثير التداخل بين عصير الثوم والمضادات الحيوية على حساسية *K. pneumoniae*

المضادات	*K. pneumoniae* قطر التثبيط (ملم)
Garlic	23.6
AKG	26.6
CIPG	35.6
CNG	30.6
AXG	0
CFMG	0
CROG	25.6
CTXG	25.6
TMPG	0
RAG	0
CLG	0

جدول (4) تأثير تنمية *K. pneumoniae* في وسط المرق المغذي الحاوي على تراكيز مختلفة من العسل .

المعاملة	*K. pneumoniae*
5 % Honey	+
10 % Honey	-
15 % Honey	-
20 % Honey	-

جدول (5) تأثير تنمية *K. pneumoniae* في وسط المرق المغذي الحاوي على تراكيز مختلفة من عصير الثوم .

المعاملة	*K. pneumoniae*
5 % Garlic	+
10 % Garlic	-
1 5 % Garlic	-
20 % Garlic	-

جدول (6) حساسية *K. pneumoniae* للمضادات قبل التنمية وبعدها في وسط المرق المغذي الحاوي على تركيز 5% عسل و 5 % عصير الثوم الطازج.

		معاملة العسل 5 % اقطار التثبيط (ملم)	معاملة الثوم 5 % اقطار التثبيط (ملم)
AK	قبل المعاملة	14.6	14.6
	بعد المعاملة	29	24.3
CIP	قبل المعاملة	29.6	29.6
	بعد المعاملة	42.6	36
CN	قبل المعاملة	21.6	21.6
	بعد المعاملة	33	30.6
AX	قبل المعاملة	0	0
	بعد المعاملة	0	0
CFM	قبل المعاملة	0	0
	بعد المعاملة	22	20.3
CRO	قبل المعاملة	13.6	13.6
	بعد المعاملة	14.6	22.6
CTX	قبل المعاملة	10.6	10.6
	بعد المعاملة	18	19
TMP	قبل المعاملة	0	0
	بعد المعاملة	0	0
RA	قبل المعاملة	0	0
	بعد المعاملة	0	0
CL	قبل المعاملة	0	0
	بعد المعاملة	0	0

جدول (7) تأثير حقن الفئران بمستضدات *K. pneumoniae* على معدل تركيز الأجسام المضادة نوع IgG, IgM, IgA ملغم/ 100 مل ± الخطأ القياسي (SE)

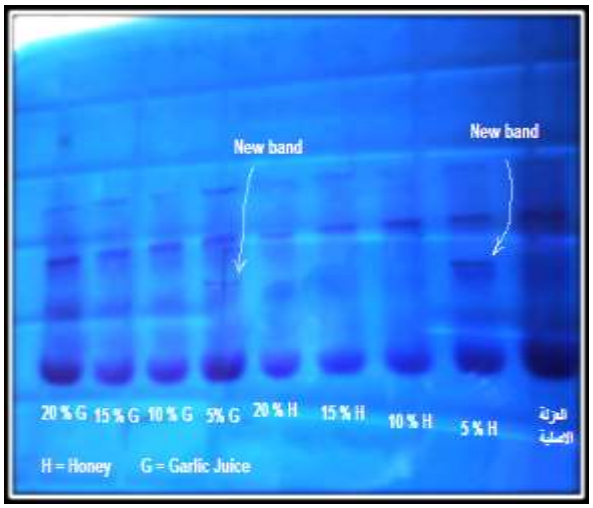
	IgG	IgM	IgA
السيطرة السالبة Phosphate buffer	942.74 ±27.45 c	122 ±3.87 C	170.32 ±6.11 c
السيطرة الموجبة Nutrient broth	950 ±19.2 c	125.16 ±1.2 C	174.48 ±5.35 c
بكتريا مقتولة بـSonicator	1252.14 ±18.73 b	130.58 ±3.15 bc	206.94 ±5.65 b
راسب خلايا بكتيرية	1389.84 ±37.8 a	148.38 ±2.55 A	231.84 ±4.33 a
بكتريا مضعفة بالعسل	1260.7 ±24.57 b	139.4 ±3.74 ab	213.68 ±6.57 b
بكتريا مضعفة بالثوم	1262.6 ±20.07 b	139.92 ±3.60 ab	211.55 ±10.22 b

*الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى وجود اختلافات معنوية بين المتوسطات للمعاملات عند مستوى معنوية (P<0.05).

جدول (8) تأثير حقن الفئران بمستضدات *K. pneumoniae* على معدل تركيز بروتينات المتمم نوع C3 و C4 ملغم/ 100مل ± الخطأ القياسي (SE)

	C3	C4
السيطرة السالبة Phosphate buffer	106.1 ±2.81 d	49.42 ±1.4 d
السيطرة الموجبة Nutrient broth	108.5 ±3.28 d	49.74 ±1.56 d
بكتريا مقتولة بـSonicator	138± 2.25 c	61.16± 1.74 C
راسب خلايا بكتيرية	156.28 ±2.35 a	72.16 ±1.04 A
بكتريا مضعفة بالعسل	146.16 ±1.82 b	68.3 ±1.23 Ab
بكتريا مضعفة بالثوم	146.68 ±2.94 b	68.75 ±1.94 Ab

*الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى وجود اختلافات معنوية بين المتوسطات للمعاملات عند مستوى معنوية (P<0.05).



صورة (1) صورة الترحيل الكهربائي للبروتينات الخام لعزلة *K. pneumoniae*

صورة (2) حلقة الترسيب المناعي في قياس تركيز الأجسام المضادة نوع IgG, IgM, IgA وبروتينات المتمم نوع (C3 , C4).

المصادر

1- Hansen, D. S. ; Aucken, H. M. ; Abiola, T. and Podschun, R.(2004). Recommanded Test Panel For Differentiation Of *Klebsiella* Species on The Basis Of Trilateral Interlaboratory Evaluation Of 18 Biochemical Tests . J . Clin . Microbiol . 42(8):3665-3669 .

2- Umebobiamiwa, L.B. and Berkwitz, M.D.(2009).Klebsiella infection Klebsiella spp. as nosocomial pathogens : epidemiology , taxonomy , typing methods, and pathogenicity factors. Clin.Microbial.Rev, 11(4):589-603 .

3- Baron, S. (2004). Medical Microbiology. 4th Ed. (Cited In 2004, Julay / 24). Available From : NCBI .Galveston .USA.

4- Graham, Jay P.; Lance B.; Price, Sean L. Evans,; Thaddeus K.; Graczyk,. and Silbergeld Ellen K.(2009). Antibiotic Resistant Enterococci and Staphylococci Isolated From Flies Collected Near Confined Poultry Feeding Operations. STOTEN-11054; No Of Pages 10.

5- Kwakman P. H. S.; De Boer, L. ; Ruyter-Spira, C. P. ;Creemers-Molenaar ,T. ; Helsper, J. P. F. G. ; Vandenbroucke-Grauls , C. M. J. E. ; Zaat, S. A. J. ; and Te Velde A. A. (2011). Medical-Grade Honey Enriched with Antimicrobial Peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant Pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 30(2): 251–257.

6- Frey, FM., and Ryan, M.(2010). Antibacterial Activity Of Traditional Medicinal Plants Used by Haudenosaunee Peoples Of New York State. BMC Complem Altern Med;10:64.

7- Obi, C.L.; Ugoji, E.O.; Edun, S.A.; Lawal, Anyiwo, S.F. and Anyiwo, C.E. (2000). The Antibacterial Effect of Honey on Diarrhea. Causing Bacterial Agent Isolated In Lagos, Nigeria, African J. of Med Sci. 23:257-260.

8- Amagase H, Petesch BL, Matsuura .(2001) Intake of Garlic and Its Bioactive Components.J Nutr.;131(3s):955S-62S.

9- Miron,T.; Rabinkov,A.; Mirelman,D.; Wilchek,M. and Weiner, L. (2000). The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. Biochim Biophys Acta. ;1463(1):20-30.

10- Powrie, F. and Coffman, R.L. (1993). Cytokine regulation of T-cell function: potential for the therapeutic intervention. Immunol. 14: 270-274 .

11- Macfaddin, J.F.(2000). Biochemical Tests For Identification of Medical Bacteria . 3 rd ed. Lippincott , Williams And Wilkins . Philadelphia . London .

12- Collin, C.H. ,Grange, J.M. and Lyne, P.M.(1989). Microbiological Methods .6thed.Butter Worth's and Co. Publication .U.K.

13- Vandepitte J; Engback K; Piote P; and Heuk, C. (1991). Basic Laboratory Procedures In Clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva

14- Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherries, J. C. and Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Tests by A Standarized Single Disk Method. Am. J. Clin. Path. 45:493-496.

15- Reuter HD, Koch HP, and Lawson LD. (1996). Therapeutic Effects and Applications of Garlic and Its Preparations. In: Garlic. The Science and Therapeutic Application Of Allium sativum L and Related Species (Koch HP, Lawson LD, Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Pp. 135-512.

16- Jarosz , J. and Lipa , J.J. (1990). Fungistatic an Fungicidial activity of Albarep and garlic juice against phytopathologenic fungi . Rocz . Nauk Rol . Ser . E .20:53-59.

17- Hames, B. and Rickwood, D.(1984). Gel Electrophoresis Of Proteins, Apractical Approach . (3rd Ed.) . IRL Press Limited . England .

18- Mancini, G.; Carbonara, A.O. and Hermans, J.F. (1965). Immunochemical Quantization of Antigen by Single Radial Immunodiffusion. Immu .Che., 2:235-254.

19- Jenkins R., Cooper R.(2012) Improving Antibiotic activity against wound Pathogens with Manuka Honey In Vitro. Plos one 7(9): E45600.

20- Collee, G. J.; Faser, G. A.; Marmion, B. and Simmons, A. (1996). Mackie and Mccartney. Practical Medical Microbiology.14thed. Churchill Livingstone, New York.

21- Ivana, Ć., Jovalekic, M. and Jegorovic, B.(2012). In Vitro Antibacterial Activity of Garlic and Synergism between Garlic and Antibacterial Drugs. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 64 (4), 1369-1375 .

22- Palaksha, M.N., Mansoor Ahmed, and Sanjoy Das.(2010). Antibacterial activity of garlic extract on streptomycin-resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli solely and in synergism with streptomycin. Vol : 1 Issue : 1 Page : 12-15

23- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., and P. C. Calder (1997). Antimicrobial Action Of Propolis

28- Hassanain A.T., Alyaa A.K., and Karim A.J.(2010). Antimicrobial Effect of Malaysian Honey on Some Human Pathogens: An In Vitro Study. Int Med J Malaysia; 9(2): 15-18.

29- Al-Ani, Najeeb, Hussain, Fayyadh, Abdul-Razik, and Ali.(2011). Study Of Some Immunological Changes Resulted From Vaccination Of Local Rabbits With Attenuated Klebsiella .Al-Anbar J. Vet. Sci.,Vol;4 No2.

30- Mc Sorly ;S.J.S. and Castalonga M. (2002). Tracking Salmonella specific CD4T cells in vivo reveals a local Mucisal response to a disseminated infection immunity., 16:328.

31- Alaa , J. Hassan, Shakir, H. Al-alwany and Hassan F. Naji. (2007). Humoral and Cellular Immune Response against Escherichia coli In Vivo. Med Jo.of Babylon. Vol. 4 No.3 and 4.

32- Hussain, A. B.; Fiadh, H. M.; Almaadhidy, A. H.; Najeb, L. M. and Shaker, E. A. (2010). Study of some immunization effect against attenuated Pseudomonas aerugenosa In Local Rabbits. Al-Anbar J.Vet.Sci., 3(1): 83- 90.

and Some of Its Components: The Effects On Growth, Membrane Potential and Motility Of Bacteria. Microbiol. Res. 152, 239–246.

24- Betoni JE, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, and Fernandes Junior A.(2006). Synergism Between Plant Extract and Antimicrobial Drugs Used On Staphylococcus aureus Diseases. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.101: 387-390.

25- Fry FH, Okarter N, Baynton-Smith C, and Kershaw MJ, .(2005). Use Of A Substrate/Alliinase Combination To Generate Antifungal Activity In Situ. J Agric Food Chem. 9; 53: 574-580.

26- Kathleen, A. Carrado, Argonne National Labs.(2004): Honey, It's Chermistry. The Food Network Alton Brown's Good Eats Episode On Honey.

27- Gilmour, R.; Messner, P. Guffanti, A.A.; Kent, R.;Scheberl, A.; Kendrick, N. and Krulwich, T.A.(2000): Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analyses Of Ph-Dependent Protein Expression In Facultatively Alkaliphlic Bacillus Pseudofirmus OF4 Lead To Characterization Of An S-Layer Protein With A Role In Alkaliphily. J. Bacteriol..P. 5969-5981.

STUDY OF SOME HUMORAL IMMUNITY PARAMETERS POST MICE IMMUNIZATION MICE WITH KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATTENUATED WITH NATURAL PRODUCTS

M. J. MANSOUR L. M. NAJEEB A. B. HUSSAIN

ABSTRACT

Isolated and well identified K. pneumoniae, was included in this study the sensitivity to some antibiotics and the impact of certain natural products (honey and garlic) against these bacteria and Impact Statement synergistic action of these products with antibiotics, as the results showed that interference honey and garlic juice with antibiotics significant effect in increasing the sensitivity of the K. pneumoniae to antibiotics, and were grown K. pneumoniae in the nutrient broth containing different concentrations of honey and garlic juice, and tested the susceptibility for the same antibiotics mentioned. The isolation of K. pneumoniae is used in this study of humoral immune indicators. As a method is used Single Radial Immunodiffusion Test Kits to measure the levels of antibodies and complement proteins, the results showed a significant increase in the level antibodies types IgA, IgM, IgG and complement proteins C3, C4 for immunization groups compared with positive and negative control groups.