# تأثير التمنيع بمستضدي الخمل ومتعدد السكريد الشحمي لجرثومة المتقلبة الشائعة ( *Proteus vulgaris*) في التغيرات المرضية النسجية لبعض الأعضاء الداخلية

*باسل رزوق فرج رزوق**

استلام البحث 15، كانون الاول، 2013
قبول النشر 1، حزيران، 2014

**الخلاصة**:
هدفت الدراسة إلى معرفة تأثير التمنيع بمستضدي الخمل و متعدد السكريد ألشحمي في التغيرات النسجية للأرانب من خلال استعمال 15 أرنباً محلياً ومن كلا الجنسين بوزن تراوح بين 1500-2000غم. قسمت عشوائيا إلى ثلاث مجاميع (5 حيوان لكل مجموعة ) .حقنت المجموعة الأولى بمستضد1مل ( 200 مايكروغرام/مل/حيوان) تحت الجلد والثانية بمستضد الخمل 1مل ( 200 مايكروغرام/مل/حيوان) تحت الجلد وتركت المجموعة الثالثة بوصفها مجموعة سيطرة سالبة وحقنت بمحلول دارئ الفوسفات الملحي (1) مل تحت الجلد .ثم حقنت المجموعة الأولى والثانية بالجرعتين نفسيهما بعد مرور أسبوعين كجرعة تقوية واجري فحص التحدي للمجاميع كافة بعد مرور 5 أسابيع على تمنيع الحيوانات بجرعة بلغت $10^7$x5 وحدة مكونة للمستعمرة /مل بحقنها بالخلب ، وقتلت الحيوانات بعد مرور 7 أيام من جرعة التحدي.
أظهرت النتائج أن المجموعة المحقونة بمستضد الخمل بينت وجود ارتشاحات كثيفة للخلايا وحيدة النواة في الكبد والكلية إلا أن الطحال لم يظهر وجود تغيرات مرضية نسجية واضحة مقارنة بالمجموعة الملقحة بمستضد متعدد السكريد الشحمي ومجموعة السيطرة السالبة ، كما أظهرت ارتشاحاً خفيفاً في الخلايا وحيدة النواة في الطبقة تحت الطلائية في حين أظهرت المجموعة المحقونة بمستضد متعدد السكريد الشحمي وجود فرط تضخم في الخلايا الطلائية وارتشاح في الخلايا وحيدة النواة في الصفيحة اللبادية للأمعاء الدقيقة مقارنة بمجموعة السيطرة والتي اظهرت وجود تجمعات لهذه الخلايا في تلك الصحيفة لذا نستنتج أن التمنيع بمستضد الخمل يرفع من مقاومة الحيوان للإصابة بجرثومة المتقلبة الشائعة بصورة أفضل من التلقيح بمتعدد السكريد الشحمي.

**الكلمات المفتاحية:جرثومة المتقلبة الشائعة ، مستضد الخمل ، مستضد متعدد السكريد الشحمي.**

## المقدمة:

أن إفراد جنس المتقلبة (*Proteus*) واسعة الانتشار في الطبيعة وبيئتها المختلفة ، إذ توجد في التربة والمياه الملوثة ، كماتوجد في فضلات الإنسان والحيوان [1].

تعود جرثومة المتقلبة الشائعة (*P.vulgaris* ) إلى جنس المتقلبة الذي ينتمي إلى عائلة الجراثيم المعوية ( Enterobacteriaceae) [2]. وهي جزء من النبيت الطبيعي لجسم الإنسان والحيوان في القناة المعدية المعوية ، وتسبب تقرح الجروح ، التهاب الجيوب ألأنفية ، التهاب الجهاز [3] ، والتهاب المثانة وتقيح الكلى فضلا عن كونها ممرضة للأسماك ،الكلاب، خنازير غينيا والفئران . [4]تمتلك هذه الجرثومة العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على غزو وإصابة الخلايا الطلائية البولية لقدرتها على أنتاج العديد من الإنزيمات والسموم وبعض التراكيب السطحية كمتعدد السكريد المحفظي (Capsule Polysaccharide) ومتعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide) والخمل (Fimbriae) [5].كما تمتلك ظاهرة الحركة التموجية (Swarming phenomenon) التي لها دور مهم فيزيادة ضراوة الجرثومة و أمراضيتها إذ تساعدها على الانتشار من موقع إلى أخر ومن ثم اجتياح خلايا الثوي من خلال زيادة إفراز أنزيم حال الدم وبروتين الفلاجين (Flagin) [6] . كما أن لها القدرة على تغير تركيب بروتين الاسواط (Flagellin) الذي يعد من المستضدات المؤثرة في الجهاز المناعي [7].اما الخمل فهو عبارة عن تراكيب خيطية طويلة تقع على سطح الجرثومة بأعداد كبيرة نحو 500 خملة / خلية جرثومية [8] ، له دور في التصاق الجرثومة على أنسجة المضيف واستيطانها [9]؛ من خلال المسلك الدموي ، على الطبقة المخاطية لحوض الكلية في الخلايا المتنية البولية ( Renal parenchyma cell ) وأحداث تغيرات والتهابات في الكلية مسببةً التهاب الحويض الكلوي[10]. امامتعدد السكريد الشحمي فله دور مهم في ارتباط الجرثومة بسطوح الخلايا الطلائية عن طريق مستقبلات خاصة موجودة على سطوح هذه الخلايا

* وحدة الامراض المشتركة/كلية الطب البيطري /جامعة بغداد/بغداد / العراق.

[11]؛ كما أن له دوراً كبيراً في امراضية الجرثومة[1] .
ولغرض مقارنة تاثير مستضدي الخمل ومتعدد السكريد الشحمي في التغيرات المرضية النسجية لبعض الاعضاء الداخلية في الارانب صممت هذه الدراسة.

## المواد وطرائق العمل:

1. العزلة الجرثومية:
عزلت جرثومة المتقلبة الشائعة (*P.vulgaris*) من أغنام مصابة ، ونميت مستعمراتها على وسط أكار الماكونكي ،وسط نقيع القلب والدماغ ،مرق نقيع القلب والدماغ ، وسط MR-VP وسط ماء البيبتون ، أكار ثلاثي السكريد- الحديد وسط أكارSimon citrate وسط اختبار إزالة مجموعة الأمين Phenylalanine Deamination ، حضرت الأوساط الزرعية بحسب تعليمات الشركة المصنعة ، عقمت الأوساط بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121م° وضغط15باوند/انج$^2$ ولمدة 15 دقيقة . حفظت العزلات الجرثومية على وسط مائل الاكار المغذي بدرجة حرارة 37 م° لمد 24 ساعة وحفظت بدرجة حرارة الثلاجة 4 م° الى حين أجراء الاختبارات التشخيصية [13,12]. وتم تأكيد التشخيص باستعمال اختبار api .
2. استخلص مستضد متعدد السكريد الشحمي - (Lipopolysacchorid LPS) :حضّر وفق الطريقة الموصوفة من قبل [14].
3. استخلاص والتنقية الجزيئية لبروتين الخمل : حضّر بروتين الخمل وفق الطريقة الموصوفة من قبل [15].
4. قياس البروتين : تم قياس كمية البروتين بطريقة البايرويت [16].
5. حيوانات التجربة : استعمل 15 أرنباً محلياً من كلا الجنسين وبوزن تراوح بين 1500-2000غم، قسمت إلى ثلاث مجاميع بواقع 5 حيوانات لكل مجموعة ،حقنت المجموعة الأولى بمستضد بروتين الخمل بجرعة 1مل ( 200 مايكروغرام/حيوان) تحت الجلد والثانية بمستضد السكريد الشحمي بجرعة 1مل (200 مايكروغرام/حيوان) تحت الجلد وتركت المجموعة الثالثة بوصفها مجموعة سيطرة وتم حقن 1مل من محلول داريء الفوسفات الملحي تحت الجلد.وحقنت المجموعتان الاولى والثانية بالجرعتين بنفسيهما بعد مرور أسبوعين كجرعة التقوية .
6. جرعة التحدي : اجري فحص التحدي بعد مرور 5 أسابيع من تمنيع الحيوانات للمجاميع الثلاث بحقنها بعالق جرثومي بجرعة 1مل /حيوان( $5X10^7$ وحدة مكونة للمستعمرة /مل) في البريتون[17].
7. التغيرات المرضية النسجية: اجري الفحص المرضي النسجي لبعض الأعضاء الداخلية (الكبد،الطحال ، الكليتان والأمعاء) بعد7 أيام من جرعة التحدي وحفظت النماذج بالفورمالين ( 10% ) ، وتم تحضير شرائح نسجية تراوح سمكها بين 5-6 مايكروميتر وباستعمال طريقة القوالب الشمعية وصبغ بصبغة الهيماتوكسين- ايوسين (Haematoxyline-Eosine) [18] .

## النتائج:

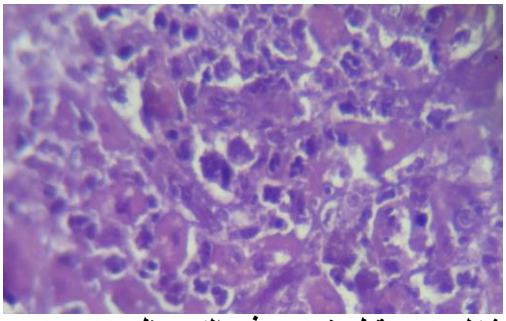
**الكبد** : لم تظهر المجموعة الممنعة بمستضد الخمل حصول تغيرات مرضية نسجية في الكبد، في حين وجدت هنالك تجمعات للخلايا وحيدة النوى في المنطقة البوابية وحول الاقنية الصفراوية في المجموعة الممنعة بمتعدد السكريد الشحمي ، أما مجموعة السيطرة فكان هنالك تجمعات للخلايا وحيدة النوى في متن الكبد وحول الأوعية الدموية مع توسع في الجيبانيات .(الأشكال ،9،5،1).

**الطحال**: لم تظهر المجموعة الممنعة بمستضد الخمل وجود تغيرات مرضية نسجية واضحة ، في حين تمثلت التغيرات المرضية النسجية في المجموعة الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي بحصول فرط تنسج معتدل في اللب الأبيض مقارنة بمجموعة السيطرة التي أظهرت حصول احتقان في الأوعية الدموية وفرط تنسج معتدل في اللب الأبيض .( الأشكال ،11،7،3).

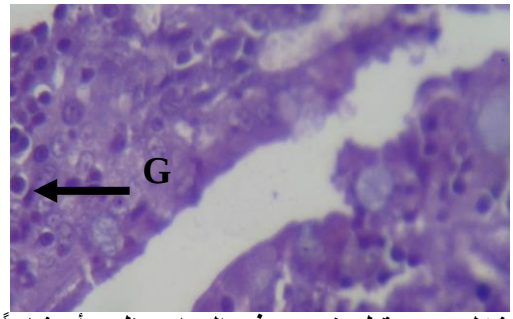
**الكلية:** أظهرت المجموعة الممنعة بمستضد الخمل ارتشاحاً للخلايا وحيدة النوى في النسيج البيني وحول الأنابيب البولية ، أما المجموعة الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي فأظهرت حصول احتقان الأوعية الدموية وارتشاح الخلايا وحيدة النوى بين الأنابيب البولية مع تليف وزيادة في سمك المحفظة الكبيبية مقارنة بمجموعة السيطرة والتي أظهرت كذلك وجود ارتشاح الخلايا وحيدة النوى في النسيج البيني وتنخر في الخلايا المبطنة للأنابيب البولية مع توسع في أحواض الكبيبات.( الأشكال 12،8،4).
**الصائم:** أظهرت المجموعة الممنعة بمستضد الخمل حصول ارتشاح خفيف للخلايا وحيدة النوى في الطبقة تحت الطلائية في حين بينت المجموعة الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي عدم حصول تغيرات نسجية واضحة فيما عدا وجود فرط تضخم في بعض الخلايا و أرتشاح معتدل للخلايا وحيدة النوى في الصفيحة اللبادية مقارنة بمجموعة والسيطرة التي أظهرت ايضا وجود تجمعات للخلايا وحيدة النوى في هذه الصفيحة .(الأشكال2 ،6 ،10).

**المناقشة:**

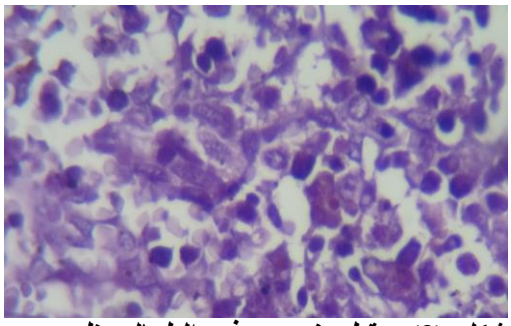
تعد جرثومة المتقلبة من الكائنات المجهرية الممرضة التابعة للعائلة المعوية [19]. كما أن لموقع الإصابة الجرثومية استجابة التهابية تؤدي إلى تجمع الخلايا البلعمية وبروتينات المصل في موقع الآصابة وخاصة العدلات والتي تلتهم الجراثيم وتقتلها [20]. وان تلك الآستجابة قد تؤثر في طبيعة الاستجابة المناعية للمضيف .وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما ذكره [21] من أن تأثير مستضد الخمل كان أفضل من مستضد متعدد السكريد الشحمي في خفض أعداد الخلايا الجرثومية الغازية للأعضاء الداخلية ، والتي أظهرت الأعضاء الداخلية ( الطحال ، الكبد ، الكلية و الامعاء) استجابة التهابية معتدلة في المجموعة الممنعة بمستضد الخمل مقارنة مع بالمجموعة الممنعة بمستضد السكريد الشحمي، فضلا عن كون متعدد مستضد السكريد الشحمي له القدرة على الارتباط مع بروتين $CD_{14}$على سطح خلايا البلاعم ويحفزها على أنتاج المدورات الخلوية [22] ، وان تلك المدورات $L_1$ و TNF- $\alpha$ تحث الجزيئات الملتصقة على الخلايا البطانية للأوعية الدموية على ارتشاح خلايا البلاعم من الدم إلى موقع الإصابة والتي تفرز العديد من المدورات الخلوية لتصبح المنطقة ملتهبة وان اغلب هذه الخلايا من النوع $CD_4$ [20]، وان تلك الاستجابة قد عكست الارتشاح الكثيف للخلايا وحيدة النوى في الكبد والكلية وحصول فرط تنسج في الطحال . كذلك أشار [21] إلى أن مستضد الخمل يعطي معياراً عالياً من الأضداد مقارنة بمستضد متعدد السكريد الشحمي ، وكذلك ذكرت [23] ان مستضد الخمل يعطي استجابة مناعية خلوية جيدة في الأرانب الملقحة . وقد وجد [21] إصابة الأرانب غير الممنعة بشدة وأظهرت معظم الأعضاء الداخلية احتقاناً واضحاً في الاوعية الدموية وبقعاً تنخرية في الكبد وتضخم الطحال مقارنة بالمجاميع الممنعة بمستضدي الخمل ومتعدد السكريد الشحمي .لذا نستنتج بان التمنيع بمستضد الخمل يقلل من التاثير المرضي النسجي في الاعضاء الداخلية بشكل اكبر مقارنة بمتعدد السكريد الشحمي لجرثومة المتقلبة الشائعة .



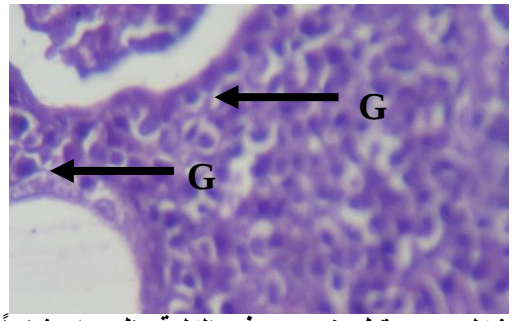
**شكل (1) مقطع نسجي في الكبد يظهر عدم وجود تغيرات مرضية واضحة في المجموعة الممنعة بمستضد الخمل (صبغة هيماتوكسلين - ايوسين 40 X).**



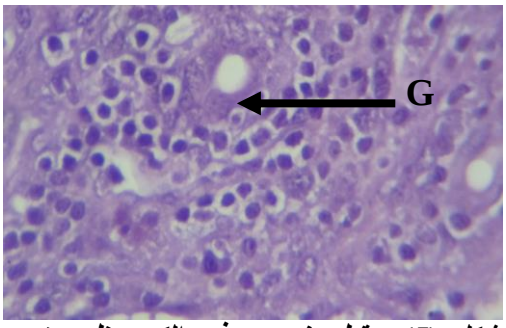

**شكل (2) مقطع نسجي في الصائم يظهر أرتشاحاً قليلاً للخلايا وحيدة النوى (G) في الطبقة تحت الطلائية في الممنعة بمستضد الخمل (صبغة هيماتوكسلين - ايوسين 40X).**



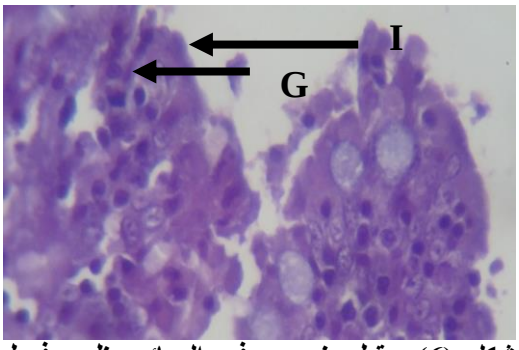
**شكل (3) مقطع نسجي في الطحال يظهر عدم وجود تغيرات مرضية واضحة في المجموعة الممنعة بمستضد الخمل (صبغة هيماتوكسلين - ايوسين 40X).**



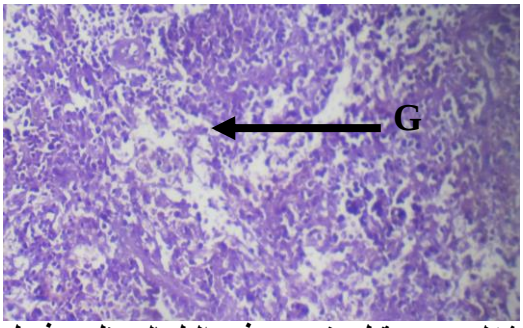

شكل (4) مقطع نسيجي في الكلية يظهر ارتشاحاً للخلايا وحيدة النوى في النسيج الخلالي (G) في المجموعة الممنعة بمستضد الخمل (صبغة هيماتوكسلين - ايوسينX 40).



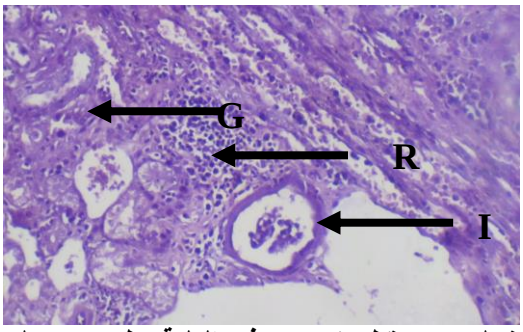

شكل (5) مقطع نسجي في الكبد يظهر تجمع الخلايا وحيدة النوى (G) في المنطقة البوابية وحول الاقنية الصفراوية في المجموعة الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي (صبغة هيماتوكسلين - ايوسين 40X).



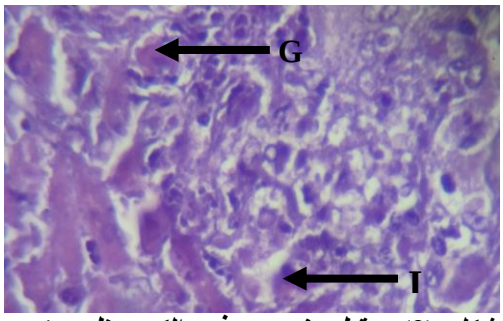

شكل (6) مقطع نسجي في الصائم يظهر فرط تضخم في الخلايا (I) مع ارتشاح معتدل للخلايا وحيدة النوى في الصفيحة اللبادية (G) في المجموعة الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي (صبغة هيماتوكسلين ايوسين 40X).



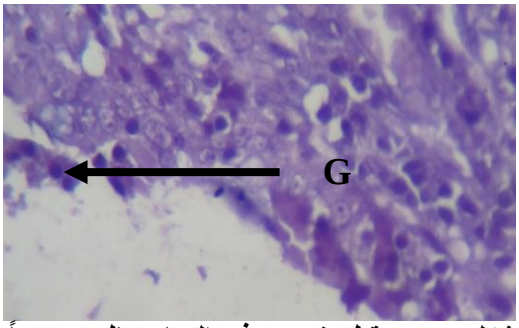

شكل (7) مقطع نسجي في الطحال يظهر فرط تنسج في اللب الابيض (G) في المجموعة الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي (صبغة هيماتوكسلين ايوسين 40X).



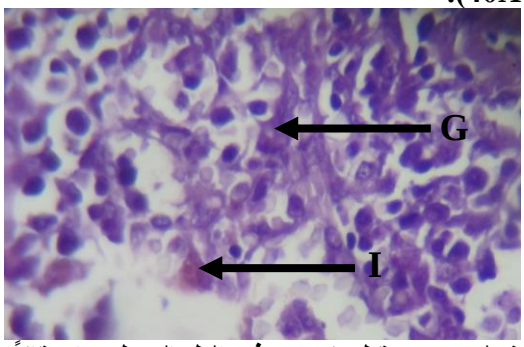

شكل (8) مقطع نسيجي في الكلية يظهر حصول احتقان في الاوعية الدمية(G) وارتشاح للخلايا وحيدة النوى (R) بين الانابيب البولية مع وجود التليف وزيادة سمك محفظة الكبية(I) في المجموعة الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي (صبغة ايوسين هيماتوتوكسينX 40).



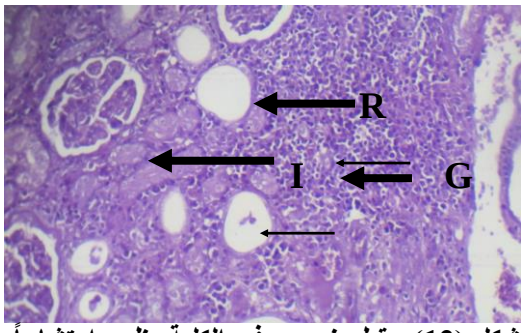

شكل (9) مقطع نسجي في الكبد يظهر تجمعاً للخلايا وحيدة النوى (G) حول الاوعية الدموية مع توسع الجيبانيات (I) في مجموعة السيطرة (صبغة هيماتوكسلين ايوسين 40X).




**شكل (10) مقطع نسجي في الصائم يظهر تجمعاً للخلايا وحيدة النوى(G) في الصفيحة اللبادية في مجموعة السيطرة (صبغة هيماتوكسلين - ايوسين 40X).**




**شكل (11) مقطع نسجي في الطحال يظهر احتقاناً في الاوعية الدموية (I) مع فرط تنسج معتدل (G) في اللب الابيض في مجموعة السيطرة (صبغة هيماتوكسلين - ايوسين 40X).**




**شكل (12) مقطع نسجي في الكلية يظهر ارتشاحاً للخلايا وحيدة النوى (G) مع تنخر في الخلايا الطلائية للانابيب البولية (I) مع توسع في الكبيبة (R) في مجموعة السيطرة (صبغة هيماتوتوكسين - ايوسين 40X).**

**المصادر:**


1. R'oz'alski,A;.Sidorczyk,Z. and Kotelko, K.(1997). Potential virulence factors of *Proteus bacilli.* Microbiol. Mol.Biol.Rev;61:65-89.
2. Karlowsky, J.A.; Jones, M.E.; Thornsberry, C.; Friedland, I.R. and Sahm,D.F. (2003). Trend in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in United States from 1980- 2001. Antimicrobial Agents and Chemoth; 47 (5): 1672-80.
3. Jacqueline, F. ; Jean, M. and Michele, M. (2008). "Action of lysozyme on penicillin –Induced Filament of *Proteus vulgaris* "J Bacteriol.,120 (2) :929-933.
4. Sameeh, (2007). BVSc, MVetSc, Diplomate ABVP, Diplomate ACVIM, Associate Blood DC, Studdert VP, Gay CC. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 2007. 2172 pp.
5. Virella, G. (1997). Microbiology and Infections Diseases. 3rd ed. Awaverly Company, Wroclaw, U.S.A.
6. Murphy, C.A. and Belas,R. (1999).Genomic rearrangements in the flagella in genes of *Proteus mirabilis* Mol. Microbiol;31:679-690.
7. Hay, N.A.; Tipper, D.J.; Gygi, D. and Hughes, C. (1999). A novel membrane protein influencing cell shape and multicellular swarming of *protues mirabilis*. J. Bacterial., 181: 2008-2016.
8. Klemm, P. and Schembri, M. A. (2000). Bacterial adhesins: functions and structure. Int. J. Med. Microbiol;290:27-35.
9. Svanborg-Eden, C.; Eriksson, B.; Hanson, L.A.; Jodal, U.; Kallser, B.; Lidin-Janson, G.; Lindberg, U. and Olling, S. (1978). Adhesion to normal human uroepithelial cells of *Escherichia coli* from children with various forms urinary tract infection. J. Pediater; 39:398-403.
10. Johnson, J.R.; Swanson, J.L.; Barela, T.J. and Brown, J. (1997). Receptors specifity of variant Gal. (Alpha- 4). Gal. Binding pap G. adhesion. J. Infect. Dis., 175: 373-381.

11. Hewett, G.A.and Roth, R.A. (1993). Hepatic and extra hepatic path biology of bacterial LPS. Parma. Rev. 45(4): 381-408.
12. MacFaddin J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3ed. Lippincott Williams and Wilkins, London.
13. Collee, J.G.; Marmion, B.P.; Fraser, A.G. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology. 14th ed. Longman Singapore Publishers Ltd, Singapore: 363-373.
14. Woodard, L. F. and Toone , N. (1980). Allergenic activity and biochemical analysis of three soluble antigen preparation from *brucella abortus* strain 45/20. Am .J. Vet. Res;41 (1): 114-116.
15. Wary,S.K.;Hull,S.L.;Cook,R.G.; Barrish, J. and Hull,R.A. (1986) Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesion from a uropathogenic isolates of *Proteus mirabilis* . Infect.Immun; 54(1):43-45.
16. Jozef,H.M. and Harro , P.(2002). Urea in ulmann's encyclopedia of industrial chemistry. Whiley-VCH, Weinheim.doi:10.1002/14356007.a 27-333.
17. Miles, A.A.; Misra, S.S. and Irwin, J.V. (1938). The estimation of the bactericidal power of blood .J. Hyg;38:732-746.
18. Luna,L.C. (1968). Manual of histological staining methods. The armed forces institute of pathology ,3rd ed. McGraw Hill Book Co. New York.
19. Penner, J. L. (1984). Genus XI *Proteus.* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Kreig, N. R. and Holt, J. G., eds.). William and Wilkins Baltimore, MD:491-494.
20. Jayapal,V.(2007).Fundamentals of Medical Immunology .1sted .Jaypea Brothers ,Medical Publishers LTD. New Delhi: 180-189.
21. Razook,B.R.(2010).The isolation of *Proteus vulgaris* from human and sheep urinary tracts to evaluate some antigens for immunization in rabbits. MSc thesis. Vet. Med. College-Baghdad University.
22. Tizard, I.R. (2009). Veterinary Immunology an Introduction .8thed .Saunders Elisever:81-88 ; 369-379.
23. Al-Samarrae, E.A. (2011). Evaluation of *Proteus vulgaris* fimbriae antigen by delayed type hypersensitivity (DTH)-skin test in rabbits.Iraq.J.Vet.Med;35(1): 100-106.

# Immunization effect of *Proteus vulgaris* fimbrial and lipopolysaccharide antigens in histopathological changes in some internal organ

***Basil Razook Faraj Razook****

*Zoonotic disease unit/vet.med.college/Baghdad-Iraq.

## Abstract:

The aim of this study to conduct the effects of fimbrial and lipopolysacchride (LPS) immunization is on the pathohistological changes in rabbits, Fifteen rabbits of both sexes (Weight 1500-2000 gm) divided into three groups (5 animals of each group). The first group was immunized by 1ml (200µg /animal) of fimbrial subcutaneously the second group gave 1 ml ( 200 µg /animal) LPS while the third group was left as negative control group that injected 1 ml phosphate buffer control subcutaneously. First and second groups recived the same dose after two weeks give as booster dose. All animals challenged after 5 weeks of immunization by$5X10^7$CFU/ml *Proteus vulgaris* intra peritoneally .After 7 days from challenge all the animals, sacrificed for histopathological examination .

The results showed that the fimbrial group had a severe infiltrations of mononucleart cells in liver and kidney ,but there was no clear histopathological changes observed in the spleen compared with lipopolysaccharide and control group . Also this group showed a slight mononuclear cells infiltration in lamina properia of intestine ;while the lipopolysaccharide group showed hypertrophy of epithelial cells with a mild mononuclear cells infiltration in lamina properia as compared with the control group that showed presence of mononuclear cells aggregation in the lamina properia .Our conclusion That the defense of animals against *Proteus vulgaris* more efficient in fimbrial antigen than lipopolysaccharide antigen by decrease the pathological effects of this bacteria.