جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية الطب البيطري

عزل الكلبسيلا الرئوية من مصادر مختلفه وأستخلاص وتنقية متعدد السكر الشحمي فضلاً عن دراسة الحساسية لمستخلصات نباتية محدده

رسالة

مقدمة الى مجلس كلية الطب البيطري – جامعة ديالى

كجزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في الأحياء المجهرية البيطرية

من قبل

عبير غسان منذر الأغا

اشراف

الأستاذ الدكتور

نزار جبار مصلح الخفاجي

الأستاذ المساعد الدكتور

عامر خزعل صالح العزاوي

2018 ميلادي

1439 هجري

الخلاصة

لعزل وتمييز ودراسة أمراضية وحساسية الكليبسيلا الرئويه لمستخلصات نباتيه معينه, جمعت 40 عينه من مصادر مختلفه وأخضعت العينات للزرع على الوسط المغذي ووسط مكونكي ومن ثم تم تمييزها من خلال الفحص الشكلي للمستعمرات المزروعه على وسط المكونكي متزامنة مع الأختبارات الكيموحيويه بأستخدام نظام التحليل API –20E .تم أجراء تفاعل سلسلة البلمرة PCR لتأكيد عزلات الكليبسيلا الرئوية. تم أستخلاص متعدد السكري الدهني كيميائياَ وتنقيته من خلال التبادل الآيوني الكروماتوغرافي بأستخدام ثنائي الاثيل امين ايثايل– سليلوز (DEAE–Cellulose) و من خلال الترشيح الهلامي كروماتوغرافي بأستخدام سيفروز CL–6B و حدد وزنة الجزيئي من خلال قياس الحجم المطروح Void volume للعمود وحجم LPS elution volume وحجم البروتين القياسي Standard protein elution volume . تم دراسة أمراضية الكليبسيلا الرئوية على 20 أرنبا من سلالات مختلطه و 15 حمام داجن مع و بدون التعرض للمتعدد السكر الشحمي المنقى من الكليبسيلا الرئوية. قسمت الأرانب الى 4 مجاميع I, II, III and VI ,بينما قسم الحمام الى مجموعتين I and II. حقنت المجموعه الثالثه من الأرانب داخل الصفاق بمتعدد السكري الشحمي(3g/100PBS) مرتين مفصوله ب48 ساعه وعرضت المجموعه الرابعه الى الجرعه السابقه عن طريق الفم مرتين مفصوله ب48 ساعه. بينما عرضت المجموعه الثانيه من الحمام الى متعدد السكر الشحمي بجرعة(1.5g/100PBS) داخل العضله مرتين مفصوله ب48 ساعه. بعد 7 أيام من أعطاء الجرعه الثانيه من متعدد السكر الشحمي; تم أعطاء معلق الكليبسيلا الرئويه(10^5cell/ml) لكل المجاميع بأستخدام الطرق التاليه: تم حقن (1ml) داخل الصفاق

للمجموعه الأولى والثالثه من الأرانب, بينما أعطيت للمجموعه الثانية والرابعة(2ml) عن طريق الفم. تم أعطاء (2ml) من متعدد السكر الشحمي عن طريق الفم لكلا المجموعتين من الحمام. خلال 6 ايام من التعرض للمعلق البكتريي تم مراقبة كل الحيوانات لملاحظة العلامات السريرية الواضحة, ثم قياس وزنها, أجراء أختبار زمن النزف وزمن التخثر ومن ثم جمع عينات من الدم لأجراء فحوصات المصل الكيموحيوية(ناقل الأمين الألنين, الأسبارتيت ناقل الأمين و البليروبين الكلي) وفحوصات الدم (تركيز خضاب الدم، والنسبة المئوية للخلايا المرصوصة، العدد الكلي لكريات الدم الحمر، والعدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض) قبل وبعد أنتهاء التجربه بالأضافه الى تقدير الفعالية البلعمية بطريقة أختزال نايتروبلو تيترازوليم والتثبيط لنمو البكتيريا للمصل, ثم تم التضحية بالحيوانات, تشريحها وفحصها لملاحظة التغيرات المرضيه العيانيه. أخذت العينات من القلب, الرئة, الكلى والأمعاء للفحوصات النسيجيه المرضيه. ، فضلاً عن أجراء الصفة التشريحية وجمع عينات نسيجية من القلب، والرئة، والكلى والأمعاء للفحص النسيجي المرضي. كما تم تحديد حساسية عزلة من البكتريا للمستخلصات المائية والميثانولية لبعض النباتات الطبية المهمة والشائعة بطريقتي الحفر والأقراص على الآكار. شملت النباتات (لب الرمان ، وثمار البمبر ، وأزهار اللنتانا ، وثمار اللنتانا، وبذور الخروع ، وثمار السبحبح) فضلاً عن تحديد التركيز المثبط الأدنى والتركيز قاتل للجراثيم الأدنى . كشفت نتائج الدراسة انه من 40 عينة عزلت الكليبسيلا من 4عينات بول من افراد في المستشفيات ، و2 عينه مسحة من منخر الأغنام. أظهرت المستعمرات المزروعة على الماكونكي شكل قبة، عالية المخاطية اللزجة ومخمرة لللاكتوز، وأكد هذا بأجراء String test والذي عند رفع المستعمرة بالعروة يرتفع تقريباً الى اكثر من 6 ملم فوق الآكار. أكد الفحص بنظام تحليل API–

20E ان الكليبسيلا المعزولة كانت *Klebsiella pneumoniae* . بأستخدام اختبار تفاعل سلسلة البلمرة PCR الذي أكد وجود الجين wbbZ العائد للبكتريا حيث كشفت الدراسة عن انه فقط ستة عزلات (15%) كانت موجبة للجين wbbZ في السلالة المجتاحة للنسيج والتي أظهرت خاصية حركة مطابقة على 2% من هلام الأكاروز، بينما البقية كانت سالبة للتضخيم بواسطة جين wbbZ وبهذا تعتبر عزلات سالبة من *Klebsiella pneumoniae* . أربعة عينات (44.4%) (عينات بول من الأنسان) ، و2 عينة (100%) (مسحات من منخر الأغنام) كانت موجبة *Klebsiella pneumoniae*. ولدت العزلات الموجبة حزمه مخصصة للحامض النووي 567 bp. كشف الجزء الأمراضي ان التغيرات السريرية أظهرت ان وزن الجسم للأرانب أنخفض في المجاميع الأربعة , أطالة زمن النزف بشكل ملحوظ في المجموعة الأولى والثالثة وأقل منه للمجوعتين الثانيه والرابعه, بينما طال زمن التخثر بشكل ملحوظ في كل المجاميع. أظهر فحص الدم ان تركيز خضاب الدم, النسبه المئوية للخلايا المرصوصة وعدد كريات الدم الحمر هبط بشكل ملحوظ في كل المجموعات. التغيرات في فحص الدم كانت أوضح في المجموعة الثالثة. تغييرات قليلة غير ملحوظة في العدد الكلي للخلايا البيض مع أرتفاع ملحوظ للخلايا متغايرة الحبيبات وأنخفاض قليل في الخلايا اللمفيه في كل مجاميع الأرانب, تغييرات قليله بالنسبة للبقية من خلايا الدم البيض. أظهرت نتائج فحص فعالية البلعمة المستوى الأعلى في المجموعة الثالثة من الأرانب والأوطأ في المجموعة الأولى. أظهرت نتائج فحص تثبيط المصل أن الكثافة كانت الأعلى في المجموعة الأولى من الأرانب، بينما لم تظهر المجموعات الأخرى أي تغيير ملحوظا في كل من الأرانب و الحمام، مما يعني ان كل المجموعات أظهرت تثبيط للنمو الجرثومي بالمقارنة مع وسط السيطرة بأستثناء المجموعة الأولى من

الأرانب.كشف أختبار وظائف الكبد الكيموحيوي أرتفاع مستويات ناقل الأمين الألنين في المجموعة الثالثة من الأرانب وكانت الزيادة قليله في بقية المجاميع من الأرانب والطيور. بينما ارتفع مستوى الأسبارتيت ناقل الأمين بشكل ملحوظ للمجوعتين الثانية والرابعة من الأرانب والمجموعتين الأولى والثانية من الحمام, بينما كانت الزيادة في مستوى الأسبارتيت ناقل الأمين مهملة في المجموعتين الأولى والثالثة من الأرانب. أرتفع مستوى البليروبين الكلي بشكل ملحوظ في كل المجموعات من الأرانب والطيور بأستثناء المجموعة الثالثة من الأرانب. لوحظت التغييرات المرضية العيانيةفي كل من الرئة, الكلى, المعدة, الأمعاء, القلب والدماغ. تضمنت الآفات النسيجية أرتشاح الخلايا الألتهابية في كل من الأعضاء التالية: القلب، والكبد، والمعدة، والرئة والكلى وكذلك أحتقان الأوعية الدموية في الكبد والرئة، تنكس الكلى, وتنكس الكبد الدهني، فضلا عن تحطم الجداران السنخية في الرئة. كشفت نتائج فحص الحساسية للمستخلصات النباتية أن النطاق التثبيطي للمستخلص الكحولي بطريقة القرص كانت الأعلى في مستخلص الرمان الميثانولي تلاه السنا، زهور اللنتانا، ثمار اللنتانا، ثمار البمبر، الخروع وأخيرآ عجينة الخروع على التوالي. أظهرت كل المستخلصات نطاق تثبيط أوسع من أقراص المضادات الحيوية القياسية المستخدمة بالتجربة (أموكسيكلاف، دوكسيسايكلين، سيفوكسايم). كان التثبيط معتمدا على التركيز، حيث كان النطاق الأضيق في 100ملغم/مل مستخلص الخروع والنطاق الأوسع في 300 ملغم/مل مستخلص الرمان. بينما في المستخلص المائي طريقة الاقراص ، أظهرت كل المستخلصات نطاق أوسع ضد *Klebsiella pneumoniae* بالمقارنة مع أقراص السيطرة. كان التثبيط معتمدا على التركيز، النطاق الأوسع في مستخلص الرمان تلاه السنا، ثمار البمبر، ثمار السبحبح، سيقان السبحبح وأخيرآ ازهار اللنتانا على التوالي. كان

النطاق الأضيق في مستخلص زهور اللنتانا والنطاق الأوسع في مستخلص الرمان. أظهر التركيز التثبيطي الأدنى ضد *Klebsiella pneumoniae* فقط سيقان وثمار السبحبح بتركيز 1600ملغم/مل تركيز تثبيطي للنمو الجرثومي بينما المستخلص الميثانولي لثمار البمبر، بذور الخروع وثمار اللنتانا بتركيز 800 و 1600ملغم/مل بينما الرمان بتركيز 1600ملغم/مل ولم تظهر عجينة الخروع أي تأثير تثبيطي.أظهر التركيز الأدنى القاتل للجراثيم للمستخلص المائي لكل من سيقان السبحبح ، والرمان وأزهار اللنتانا بتركيز 1600ملغم/مل بينما المستخلص الميثانولي لكل من الرمان وثمار اللنتانا بتركيز 800ملغم/مل ومستخلص أزهار اللنتانا وثمار البمبر بتركيز 1600ملغم/مل.

1-Introduction

Klebsiella species are ubiquitous pathogens and can occur in nature. It has two common habitats; the first one is namely the general environment and the second namely as mucosal surfaces of all mammals. On their human host the saprophyte can be located in the respiratory tract and intestines, whereas the growth of the bacteria is merely considered to be transiently colonized on the human clinical specimens and animals (Casolari *et al.*, 2005). In the environment, it can be found to exist in diver locations, including surface water, sewage, soil and even on trees, plants, roots and vegetables (Kumar *et al*., 2011).

K. pneumoniae is an opportunistic pathogen that causes several kinds of infections, including bacteremia, urinary tract infection in human and animal (Ramphal and Ambrose, 2006 and Tsai *et al*., 2008). Klebsiella species have 9 O antigens, of which O1 is the most common serotype among clinical *K. pneumoniae* isolates (Hansen *et al*., 1999).

The ability of the PCR to identify the pathogens rapidly is helpful. There are several reports of detection of Klebsiella species by RT-PCR recently. Previously many types of PCR were used to detect these pathogens (Turton *et al*., 2010), also many research's work on phylogenetic analysis through whole genome sequencing after screening of PCR product for defining the details of the epidemiology and transmission of the infection in different parts of the world (Karkey *et al*., 2015).

K. pneumoniae has two major virulence factors, capsular polysaccharide (CPS) and lipopolysaccharide (LPS). The K type and O type of *K. pneumoniae* both have important clinical and epidemiological significance. The lipopolysaccharide (LPS) O-antigen is the main surface antigen, which contribute to the virulence of this species and determines the O-serotype of *K. pneumoniae* isolates (Fang *et al.,* 2007).

LPS is a main surface antigen composes of three parts, lipid A, core, and O antigen, which is the outermost component and is a polysaccharidic side chain and also containing different numbers of oligosaccharide repeating units (RU). O antigen (O-PS) structures define O-serotypes of Klebsiella strains and is responsible for the resistance of bacteria to complement-mediated killing (Albertí *et al.*, 1996).

The lipid A anchors the LPS molecule into the outer membrane and is also an endotoxin, stimulating the immune system through agonism of Toll-like receptor 4 (TLR4) which is present on macrophages, dendritic cells and other cell types inducing NF-kB mediated production of cytokines (Alexander and Rietschel, 2001).

Klebsiella LPS O-antigens have been suggested as potential target antigens for immunotherapy as an alternative to antibiotic treatment (Hsieh *et al.*, 2014; Follador *et al.*, 2016 and Szijarto *et al.*, 2016).

In recent years, the drug resistance to human pathogenic bacteria was observed from different parts of the world. Also, the drug-resistant bacteria and fungal pathogens have further complicated the treatment of infectious diseases in immunocompromised, AIDS and cancer patients (Rinaldi, 1991; Diamond, 1993 and Robin *et al.*, 1998). For this reason, many science searches were interested in alternative therapies by using of natural products, especially those derived from plants to produce a variety of compounds of known therapeutic properties (Harborne and Baxter, 1995; Schmeda-Hirschmann and Yesilada, 2005).

It is expected that plant extracts showing target sites other than those used by antibiotics will be active against drug-resistant microbial pathogens and have been shown to produce promising results for anticancer, antimicrobial, anti- diabetic, anti-inflammatory and antioxidant properties (Schmeda- Hirschmann and Yesilada, 2005 and Gaurav *et al.*,2010).

Extract of *Punica granatum* and Pomegranate fruit have been reported to have various medical values including constituent immense biological activities such as antibacterial (Longtin, 2003).

Aims of the study :

1. Isolating and Molecular Identifying of *Klebsiella pneumoniae* from different sources of different human and animal samples.

2. Purifying the capsular polysaccharide antigen of *K. pneumoniae* in order to be used to study its effect on experimental infection of rabbits and pigeons with *K.pneumoniae.*

3. Exploring the antibacterial effects of aqueous and methanol extracts of some famous and important medicinal plants by using both of disc and well agar diffusion methods.