ISOLATION OF *KLEBSIELLA* SPP. FROM SOME MEATS

N. SOULEMAN*, A. AL-MARIRI** and I. HAMAD***

* Plant Biology Department, Faculty of Sciences, University of Damascus, Syria.
** Molecular Biology and Biotechnology Department, Atomic Energy Commession, Syria.
*** Ecology Department, Faculty of Sciences, University of Damascus, Syria.

ABSTRACT

Received at: 7/3/2012

Accepted:

Meats often contains micro-organism which may cause disease, Including *Klebsiella* spp. Which cause wide range of disease states, notably pneumonia, urinary tract infections (UTIs), and bacteremia. The aim of this study was collected 100 samples of meats (Calf, sheep, chicken) from the meats shops present in the different area in Damascus and countryside in a sterile container, for isolated *Klebsiella* and growing it on Selective Media to identify and characterize its morphology, biochemical and Molecular Characteristics by using Polymerase chain reaction PCR. Colonies of the microorganisms were counted on difference media then isolated from a selective media. The colonies of *Klebsiella* isolated are circular, dome-shaped. 3-4 mm diameter with mucoid aspect, stickiness and surrounded by capsule. Our results showed that 46% of examined specimen contained *Klebsiella* spp. The results showed that it can investigate of *Klebsiella* in meats samples by biochemical reactions and polymerase chain reaction. In next study we will be produced primers To differentiate between two types of *Klebsiella* (*K. pneumoniae* and *K. oxytoca*).

Key words: *Klebsiella spp., Raw Meats, Biochemical tests, Polymerase chain reaction (PCR).*

عزل جراثيم الكلِبْسيلَّة *Klebsiella* SPP. من بعض اللحوم

نور سليمان ، أيمن المريري ، ابتسام حمد

تحتوي اللحوم على كائنات حية دقيقة منها ما يسبب الأمراض. ومن ضمنها الكلِبْسيلَّة *Klebsiella* spp. والتي يمكن أن تُسبب العديد من الحالات المرضية، ولاسيَّما الالتهاب الرئوي، إنتانات المسالك البولية، وتجرثم الدم. يهدف هذا البحث إلى جمع ١٠٠ عينة من عينات اللحوم (عجل، ضأن، دجاج) من متاجر بيع اللحوم في دمشق وريفها، في أوعية معقمة، لعزل الكليبسيلة وزراعتها على أوساط انتقائية وتحديد صفاتها المورفولوجية والحيوية الكيميائية والجزيئية باستخدام التفاعل السلسي للبوليمراز PCR. تم إحصاء عدد المستعمرات بعد زرع اللحوم على أوساط مختلفة، وثم تمّ عزلها على وسط انتقائي. ظهر شكل مستعمرات الكلِبْسيلَّة المعزولة دائرية محدبة قطرها ٣-٤ مم، ذات حواف مخاطية ولزجة، وتكون محاطة بمحفظة. وقد أظهرت النتائج أن حوالي ٤٦% من العينات المدروسة تحوي جراثيم الكلِبْسيلَّة. أظهرت النتائج أنه يمكن التحري عن الكلِبْسيلَّة في عينات اللحوم بواسطة التفاعلات الحيوية الكيميائية وبواسطة التضخيم السلسلي للبوليمراز، وقد يتم في دراسة لاحقة انتاج مرئسات نوعية للتتميز بين نوعين من جراثيم الكلِبْسيلَّة، النوع الرئوي والنوع المُعَجل للولادة.

الكلمات المفتاحية: *الكلِبْسيلَّة، اللحوم، الاختبارات الحيوية الكيميائية، التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR.*

INTRODUCTION
المقدمــة

تعد اللحوم من أكثر أنواع الأغذية عرضة للفساد بسبب سهولة نمو الأحياء الدقيقة فيها، وخاصة الجراثيم التي يمكن أن تغزو اللحوم من مصادر مختلفة، فقد تكون من مصدر حيواني داخلي؛ فهي توجد ضمن الجهاز الهضمي للحيوان خاصة (القولون)، وعلى الجلد وغيرها، أو تكون من مصدر خارجي عن طريق مهاجمتها للذبيحة بعد ذبح الحيوان. وما ان تصل هذه الأحياء إلى اللحم حتى تجد الوسط الملائم للنمو والتكاثر، نظراً لأنه يحتوي على العديد من العناصر الغذائية الضرورية لنموها. لذلك من المهم التحري عن وجود أنواع من الجراثيم الممرضة في اللحوم، مثل: الايشريشيا القولونية *E. coli* والشيغيلة *Shigella* والسالمونيلة *Salmonella* والكلِبْسيلَّة *Klebsiella* التي هي هدف دراستنا.

سميت الكلِبْسيلَّة *Klebsiella* من قبل عالم الأحياء المجهري الألماني إدوين كليبس (١٨٣٤-١٩١٣)، وهي جراثيم عصوية، تتراوح أبعادها من (0.3-0.1μm) x (0.6-6.0 μm)، سالبة الغرام، محاطة بمحفظة، تترتب بشكل مفرد، أو أزواج، أو سلاسل قصيرة، تتوافق مع التعريف العام لفصيلة الإمعائيات *Enterobacteriaceae*، ماعدا الكلِبْسيلَّة وبيليس *K. mobilis*، لا هوائية اختيارية (Garrity, 2005)، غير متحركة، تخمر اللاكتوز، موجبة اليوريـاز، غير منتجـة لغـاز كبريت الهيدروجين H_2S، مستعمراتها مخاطية، وأحيانا تكون لزجة ملتصقة بسطح الآجار (Guetta *et al*., 2003). تُفرز الكلِبْسيلَّة ذيفاناً داخلياً متحملاً للحرارة نسبياً، ونذكر من أهم الأعراض السريرية التي يحرضها الذيفان الداخلي: الحمى، وتحرير وسائط الالتهاب، واستنزاف بروتينات المتممة، إضافةً إلى فرط ضغط الدم (Dokladny *et al*., 2010)، كما أنها تفرز أنزيم يورياز (Urease) الذي يلعب دوراً هاماً في آفة الجهاز البولي، حيث يقوم بحلمهة البولة إلى أمونيا وغاز ثاني أوكسيد الكربون (CO_2)، مما يؤدي إلى تحول فوسفات المغنزيوم إلى مركب مشبع وتحـول فوسفـات الكالسيوم إلى الشكل البلوري مما يُسَبِّب حدوث خلل وظيفي في الكلية وهو أحد مظاهر الالتهابات في الجهاز البولي؛ وبهذا تعتمد إمراضية الكلِبْسيلَّة على النمط الجرثومي وعوامل الفوعة (Augustin *et al*., 2009). إن الغالبية العظمى من الإصابات بهذه الجراثيم ترتبط بعدوى المستشفيات وتشير الدراسات العلمية أن الكلِبْسيلَّة تسبب حوالي ٨% من حالات العدوى الجرثومية في المستشفيات، في الولايات المتحدة الأمريكية وأوروبا (Brooks *et al*., 2004)، حيث تُصيب وبالدرجة الأولى المرضى في المستشفيات الذين يعانون من نقص في المناعة، الأطفال، مرضى السكري، المدمنين على الكحول، والذين يعانون من انسداد رئوي مزمن (Anderson *et al*., 2006)، وقد وضعت الكلِبْسيلَّة بين ثمانية من أهم مسببات العدوى بالمستشفيات إذ تأتي بالمرتبة الثانية بعد الإيشيريشيا القولونية *E. coli* (Anonymous, 2002). هناك ٧ أنواع مختلفة من جراثيم الكلِبْسيلَّة التي تبدي تشابهاً في الحمض النووي DNA (Garrity, 2005). ومن أكثر هذه الأنواع أهميةً من الناحية الطبية هي الكلِبْسيلَّة الرئوية *K. pneumoniae*، حيث تُعد من أهم الممرضات سريرياً من بين الإمعائيات، وبدايةً عُرِفَت بأنها تُصيب جهاز التنفس، مسببة الالتهاب الرئوي بشكل أساسي، ويمكن أن تؤدي إلى التهاب واسع النطاق، ومن ثم النزف فالموت (Rosen *et al*., 2008). تليها الكلِبْسيلَّة المُعجِلة للولادة *K. oxytoca* التي تُشبه الرئوية بكونها تُحْدِث آفة في الجهاز التنفسي، وتسبب التهاب الغشاء المخاطي الأنفي، والدم والتهاب الأذن الوسطى القيحي الحاد (Bleich *et al*., 2008). يتميز النوع المُعجل للولادة عن باقي الأنواع بكونه ايجابي الأندول كما أن لها خصائص نمو مختلفة قليلاً حيث أنها يمكن أن تنمو على وسط يحوي Melezitose ولا تنمو على وسط يحوي 3-hydroxybutyrate بينما ينمو عليه النوع الرئوي (Högenauer *et al*., 2006). تعد جراثيم الكلِبْسيلَّة (الرئوية والمُعجِلة للولادة) من العوامل الممرضة الانتهازية التي تسبب للإنسان أمراضاً خطيرة قد تؤدي إلى الوفاة. فقد تسبب التهابات رئوية حادة لمرض ذات الرئة، إنتانات بولية وتناسلية وهضمية، التهاب القولون، تجرثم الدم Bactermia، وفي حالات نادرة تسبب التهاب السحايا (Rodrigues, 2008).

MATERIALS and METHODS
مواد البحث وطرائقه

١- المواد:

أوساط الاستنبات والزرع:

ماء الببتون الموقي Buffered Pepton Water (BPW)، وسط ايوسين ميثيلين بلو آجار Eosin Methylen blue Agar (EMB) Agar، وسط ماكونكي آجار MacConkey Agar، وسط سيمون سترات Simon citrat، وسط لوريا بيرتان Luria Bertani Agar (LB)، وسط مانيتول سولت آجار Manitol Salt Agar (MSA)، ومنمي عام مع الصاد الحيوي الفانكومايسين (LB+Van 25 mg/ml).

مواد الاختبارات الحيوية الكيميائية:

ماء أوكسجيني (٣%)، ستريبات أوكسيداز BBL^{TM}DrySlide^{TM} (BD,USA)، KOH، ألفا نفتول، أحمر الميتيل، وسط MR-VP، كاشف الأندول Indole test reagent (Ehrlich Kovacs). وسط Ttriple Sugar Iron Agar،

وسط Sulfur reduction-Indole production- Motility (SIM)، وسط MacConkey Agar، وسط Simon citrat، أملاح التترازوليوم Tetrazolium Salts.

مواد عزل الجينوم الجرثومي:
الوقاء TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)، SDS 10%، بروتيناز K 20mg/ml، NaCl 5M، CTAB NaCl، كلوروفورم إيزوأميل الكحول (24:1)، فينول كلوروفورم إيزوأميل الكحول (25:24:1)، إيزوبروبانول، إيتانول 70%.

مواد التفاعل السلسلي للبوليميراز والرحلان:
وقاء 10X PCR (200mM Tris-HCl pH8.8, 100mM KCl,100mM $(NH_4)_2SO_4$, 1mg/ml BSA, 1% Triton)، $MgSO_4$، نكليوتيدات (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)، أنزيم DNA بوليميراز، مرئسات نوعية الجدول [١]، هلامة الآجاروز 1.5% (W/V)، الوقاء 1X TAE المحضر من الوقاء 50X TAE (0.4M Tris-Base, 10mM EDTA pH 8.0, 57.1 ml Glacial Acetic Acid).

مادة الحفظ: غليسيرول 50%.

٢- الطرائق:

٢- ١ جمع العينات Sample collection:
بلغ عدد العينات ١٠٠ عينة، من اللحوم (عجل، ضأن، دجاج). وقد جُمِعَت من مناطق مختلفة من دمشق وريفها.

٢-٣ معالجة العينات Sample processing:
بعد بعد سحق 0.5 غ من العينة المدروسة:
تم الاستنبات الأولي غير الاصطفائي في وسط ماء الببتون الموقي Water Buffered Peptone (BPW) في الدرجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

- تم الاستنبات الاصطفائي على وسط ايوسين ميثيلين بلو آجار EMB ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.
- تم انتقاء المستعمرات المخاطية ذات الهالة الوردية، ذات المحفظة لإجراء:
- التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) باستخدام مرئسات نوعية.
- اختبارات حيوية كيميائية (الأوكسيداز، الكاتالاز، اليورياز، غاز كبريت الهيدروجين H_2S، الأندول، تخمر السكاكر).

٢-٤ مراحل العمل:

- **التعداد العام الكلي :**

قبل التحري عن وجود الكلِبْسيلَّة في عينات اللحوم، نقوم بإجراء التعداد الكلي للإمعائيات وللكلِبْسيلَّة على وسط ايوسين ميثيلين بلو آجار EMB، وإجراء التعداد العام الكلي للجراثيم على وسط منمي عام هو لوريا بيرتان آجار Luria Bertani Agar (LB) ومنمي عام مع الصاد الحيوي الفانكومايسين (LB+Van 25 mg/ml) لتنمية سلبيات الغرام دون ايجابيات الغرام، ووسط مانيتول سولت آجار Manitol Salt Agar (MSA) لتنمية ايجابيات الغرام.

- **عزل الكلِبْسيلَّة من عينات اللحوم:**

يتضمن زرع جراثيم الكلِبْسيلَّة *Klebsiella* spp. عدة مراحل:

١- مرحلة الاستنبات الأولي: تم سحق 0.5 غ من العينة وتنميتها في 4.5 مل من ماء الببتون الموقي (BPW) بالدرجة 37°م لمدة ٢٤ ساعة.

٢- مرحلة الاستنبات الاصطفائي: حيث يؤخذ 10 µl من الوسط السابق ويتم زرعها على وسط ايوسين ميثيلين بلو أجار (EMB)، ثم تحضن بالدرجة 37°م لمدة ٢٤ ساعة. وللحصول على هذه الجراثيم نقيةً تؤخذ مستعمرة مفردة وتزرع على وسط ايوسين ميثيلين بلو آجار (EMB) وتكرر هذه العملية حتى نحصل على طبق يحوي مستعمرات نموذجية فقط.

٣- توصيف المستعمرات Colony characteristics:
تبدو مستعمرات الكلِبْسيلَّة النموذجية على وسط ايوسين ميثيلين بلو آجار (EMB): كبيرة قطرها بين (٣- ٤ مم)، محدبة الشكل، مخاطية، غامقة بنفسجية ذات هالة وردية. تُنتقى هذه المستعمرات من أجل تلوينها.

٤- الفحص المجهري:

- **صبغة غرام Gram Staining:**

يُحضر الغشاء الجرثومي ثم يُلون بواسطة طريقة غرام، كالتالي:

١. يُغمر المحضر بمحلول البلورات البنفسجية لمدة ٣٠ ثانية.
٢. يُغسل المحضر بالماء لإزالة الفائض من الملون.
٣. يُغمر المحضر بمحلول لوغول لمدة ٣٠ ثانية.
٤. يُغسل المحضر بالماء لإزالة الفائض من المحلول.
٥. يُغمر المحضر بمزيل اللون (كحول + أسيتون) لمدة ١٥ ثانية.
٦. يُغسل المحضر جيداً بالماء حتى لا يبقى أثر لمزيل اللون.
٧. يُغمر المحضر بمحلول الفوكسين الممدد لمدة ٣٠ ثانية.
٨. يُغسل المحضر بالماء ويُجفف، ويُفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الغاطسة.

- **تلوين المحفظة Capsular staining:**

١. يُحضر الغشاء الجرثومي ويثبت بالطريقة المعتادة (استخدام الكحول مع تجنب استخدام الماء) -لأن المحفظة تذوب بالماء.
يُغمر الغشاء بمحلول ٣٠% من صبغة الفوكسين القاعدية، وتُمرر الصفيحة فوق اللهب حتى يبدأ الملون بالتبخر.
٢. يُغسل الغشاء بمحلول كبريتات النحاس ٢٠%.
٣. يُغمر الغشاء في محلول أزرق المتيلين ١%، ثم يُغسل بالماء.
٤. تُجفف الصفيحة وتُفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الغاطسة.

٢-٥- التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR:

أُجرِي التفاعل السلسلي للبوليمراز (PCR) على المستعمرات النموذجية النامية على وسط ايوسين ميثيلين بلو آجار (EMB) بعد عزل الجينوم الجرثومي لها وفق مايلي:

١. نُمِّيَت الجراثيم في ماء الببتون الموقي ثم نُفِلَت لمدة 5 دقائق بسرعة 4000 rpm وفي الدرجة 4+ مْ وتمَّ التخلص من السائل الطافي.
٢. حُلَّ الراسب في 567 µl من الموقي TE بوساطة الممص الصفري، ثم أُضيف له 30 µl من الـ SDS 10% و 3 µl من الـ proteinase K 20 mg/ml. مُزِج المجموع وحُضِن لمدة ساعة بالدرجة 37°م مع الرج بسرعة 1000 rpm.
٣. أُضيف 100 µl من الـ 5M NaCl ومُزِج جيداً ثم أُضيف 80 µl من محلول الـ CTAB/NaCl. مُزِج المجموع وحُضِن لمدة 10 دقائق بالدرجة 65°م مع الرج بسرعة 1000 rpm.
٤. أُضيف 780 µl من الـ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ومُزِج ثم ثُفِّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ونُقِل الطافي إلى أنبوب جديد مع تجنب سحب أي جزء من الطبقة الوسطى البروتينية.
٥. أُضيف للطافي حجم مماثل من الـ phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ومُزِج ثم ثُفِّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ونُقِل الطافي بعدها إلى أنبوب جديد مع تجنب سحب أي جزء من الطبقة الوسطى البروتينية.
٦. أُضيف إلى الطافي النهائي كمية من الإيزوبروبانول تعادل 0.6 مل من حجمه ومُزِج بلطف بقلب الأنبوب 4-6 مرات حتى يترسب الدنا DNA حيث يظهر بشكل خيوط سابحة في السائل ثم ثُفِّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ثم تمَّ التخلص من الإيزوبروبانول بلطف لتجنب رمي الدنا DNA.
٧. غُسِل الراسب بإضافة 1 مل من الإيتانول 70% ثم ثُفِّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm وتمَّ رمي الطافي وجُفِّف الراسب بوساطة جهاز الـ Concentrator (شركة Eppendorf).
٨. تمَّ حل الراسب الناتج في 25 µl من الموقي TE ثم قِيس تركيزه بوساطة جهاز المطيافية (Nano Drop) ومُدِّد للوصول إلى تركيز يساوي 100 ng/µl.

أُجري التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR على الدنا DNA المعزول من باستخدام البادئات النوعية الموضحة في الجدول رقم [١].

الجدول رقم ١: البادئات النوعية المستخدمة لجنس الكلِبْسيلَّة.

	التسلسل Sequence	الحجم
Klebrib-1	5'- GTAATGTCTGGGAAACTGCC-3'	1500 bp
Klebrib-2	5'- CCACCTTCCTCCAGTTTATC-3'	

أُجري التفاعل بحجم 25 µl ويوضح رقم [2] المواد المستخدمة في التفاعل، في حين يوضّح الجدول رقم [3] الشروط اللازمة لحدوث هذا التفاعل.

الجدول رقم ٢: المواد المستخدمة في تفاعل الـ PCR

Materials	Final conc. µl	25 µl PCR
Genomic DNA	200-500 ng	٥ µl DNA (100 ng)
Primer 1 -10 µM	20 µM	١ µl
Primer 2-10 µM	20 µM	
dNTPs 20 mM	0.4 mM	0.5 µl
Buffer 10X	1X	2.5 µl
MgSO4 50 mM	3 Mm	1.5 µl
Taq 5U	2 U	0.2 µl
H_2O	----	16.3 µl

الجدول رقم ٣: شروط تفاعل الـ PCR

		درجة الحرارة	**الزمن**
	Initial denaturation	95°C	5 mins
35 Cycle	Denaturation	95°C	30 sec
	Annealing	٦٠°C	30 sec
	Extension	72°C	1 min
	Final Extension	72°C	10 mins

ومن ثم تمَّ الكشف عن نواتج الـ PCR باستخدام هلامة الآجاروز 1.5% (W/V) المحضرة في الوقاء 1X TAE والترحيل على فولطية 85 V لمدة نصف ساعة.

تمَّ الاحتفاظ بالمستعمرات المؤكدة في الـ BPW مع الغليسيرول 50%، ومن ثم حُفِظت بالدرجة -80°م من أجل الدراسات اللاحقة.

٦-٢ الخصائص الحيوية الكيميائية Biochemical Identification:

أُجرِيَت على العزلات المؤكدة عن طريق التفاعل السلسلي للبوليمراز (PCR) بأنها كلِبْسيلَّة، الاختبارات الحيوية الكيميائية التالية:

- **اختبار الحركة**: أُجري باستعمال الآجار نصف الصلب (وهو ماء الببتون الموقي المضاف إليه كمية من الآجار) والمضاف إليه أملاح التترازوليوم Tetrazolium Salts (وهو ملون حيوي يحافظ على الخلايا الجرثومية ويصبغ الجراثيم باللون الأحمر ولا يصبغ الوسط)، حيث يتم التلقيح بطريقة الوخز، فإذا كان الجرثوم متحرك يُلاحظ تفشي اللون الأحمر بالوسط حسب حركة الجرثوم، أما إذا كان الجرثوم غير متحرك فيلاحظ اللون الأحمر مكان الوخز فقط.
- **اختبار الأوكسيداز**: أُجرِي باستعمال ستريبات BBL™DrySlide™ (BD,USA) حيث يُوضع عليها جزء من المستعمرة فإذا تغير اللونَ إلى الأزرق البنفسجي يُعتبر التفاعل إيجابياً، في حين يُعتبر سلبياً إذا لم يتغير اللون.
- **اختبار الكاتالاز**: أُجرِيَ باستعمال الماء الأكسجيني (٣%)، حيث يُوضع هذا الأخير على شرائح زجاجية ثمَّ يوضع فوقها جزء من المستعمرة، يُعتبر التفاعل إيجابياً في حال ظهور فقاعات، ويكون سلبياً في حال عدم ظهورها.
- **اختبار تخمير اللاكتوز**:أُجرِيَ باستعمال أطباق تحتوي على وسط ماكونكي آجار MacConkey Agar الحاوي على سكر اللاكتوز، إذ تقوم الجراثيم المخمرة للاكتوز بإنتاج مركبات حمضية تخفض درجة تركيز الأيون الأيدروجيني (pH) إلى أقل من 6.8 مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه على مشعر لوني هو الأحمر المعتدل neutral red.
- **اختبار استقلاب السترات**: أُجري باستعمال أنابيب تحوي على وسط سيمون سترات الذي يحوي على سيترات الصوديوم، إذ أن الجراثيم التي يمكن أن تفكك السترات هي وحدها تستطيع النمو على هذه الوسط، وتنتج مركبات قلوية ترفع قيمة درجة تركيز الأيون الأيدروجيني (pH) مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه على مشعر لوني هو أزرق بروموتيمول.

- **اختبار حلمهة البولة Urease**: أُجري باستعمال أنابيب تحوي على وسط اليوريا Urea، إذ تقوم الجراثيم التي تصطنع أنزيم اليورياز بتفكيك البولة إلى نشادر والذي يتحول بدوره إلى فحمات الأمونيوم التي تقلون الوسط مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه على مشعر لوني هو حمرة الفينول.
- **اختبار تخمر السكاكر(اللاكتوز والغلوكوز والسكروز):** أُجري باستعمال أنابيب تحوي على وسط ثلاثي سكر الحديد Triple Suger Iron Agar (عادة يوزع في الأنابيب بحيث يكون قسم قائم وقسم مائل)، و يكون لون الوسط أحمر لأنه يحتوي على مشعر لوني هو حمرة الفينول، يلقح بطريقة الوخز للقسم القائم وبطريقة التخطيط للقسم المائل، وبعد الزرع نستطيع تمييز الحالات الموضحة في الجدول رقم [٤].

الجدول رقم ٤: حالات نمو الجراثيم على وسط ثلاثي سكر الحديد

النتائج (المائل /القائم)	الرمز	التفسير
أحمر/أصفر	K/A	تخمر الغلوكوز فقط
أصفر/أصفر	A/A	تخمر السكاكر الثلاثة
أحمر/أحمر	K/K	لم يتخمر أي من السكريات الثلاثة
حدوث انشقاق بالوسط	G	انطلاق غاز أثناء تخمر السكر
وجود لون أسود في منتصف الأنبوب (انطلاق غاز كبريت الهيدروجين H_2S)	H_2S	تحول كبريتات الحديد إلى كبريت الحديد الأسود

- **اختبار إنتاج غاز كبريت الهدروجين H_2S:** أُجري باستعمال أنابيب تحوي على وسط SIM، ثم حُضِنَ المُسْتَنْبَت في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة، في حال تشكل لون أسود ضمن الوسط فهذا يدل على أن الجراثيم قد أنتجت غاز كبريت الهدروجين H_2S.
- **اختبار إنتاج الأندول Indole Production Test**: أُجري باستعمال أنابيب تحوي على وسط SIM ، ثم حُضِنَ المُسْتَنْبَت في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.استخدم هذا الاختبار للكشف على قابلية بعض أنواع من الجراثيم على تحليل الحامض الأميني وإنتاج الأندول. ويتم الكشف عن الأندول بإضافة قطرات من كاشف الكوفاكس kovax reagent للوسط الزرعي المحضّن 24 ساعة، إنَّ تشكل حلقة حمراء في قمة الأنبوب هو مؤشر لنتيجة ايجابية بينما عدم تغير اللون و تشكل حلقة صفراء مؤشر لنتيجة سلبية.
- **اختبار أحمر الميتيل والفوكس بروسكاوير**: أُجريَ تنمية الجراثيم في (3) مل من وسط MR-VP وهو وسط يضم بيبتون ووقاء وغلوكوز أو ديكستروز، ثم حُضِنَ المُسْتَنْبَت في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة، ثم تُقسم العينة إلى قسمين ليتم إجراء اختبار أحمر الميتيل على أحدهما واختبار الفوكس بروسكاوير على الآخر.
- **اختبار أحمر الميتيل**: أُجريَ بإضافة بضع قطرات من مشعر أحمر الميتيل إلى المُسْتَنْبَت، إذ يدل تغير اللون إلى الأحمر على إيجابية التفاعل (pH الوسط أصغر من 4)، حيث تقوم بعض أنواع الجراثيم بتحويل الغلوكوز أو الديكستروز إلى مركبات حمضية ثابتة مثل حمض اللبن أو حمض الخل أو حمض النمل وبذلك تتغلب هذه المركبات الحمضية على الموقي، ويصبح الوسط حمضياً، أما تَغَيُّر اللون إلى البرتقالي (pH الوسط يساوي 7) وإلى اللون الأصفر (pH الوسط أكبر من 7) فيدلان على أن التفاعل سلبي.
- **اختبار الفوكس بروسكاوير**: أُجريَ بإضافة 0.5 مل إلى المستنبت من الكاشف A- هيدروكسيد البوتاسيوم- (KOH) و0.5 مل من الكاشف B- ألفا النفتول- (α-naftol)، إذ يدل تغير اللون إلى الأحمر على إيجابية التفاعل، حيث يكشف هذا الاختبار عن الأحياء المنتجة للأسيتوئين (أسيتيل ميثيل كاربينول) الذي يتأكسد بوجود هيدروكسيد البوتاسيوم إلى دي أسيتيل، والذي يتفاعل بدوره منتجاً اللون الأحمر، أما ظهور اللون النحاسي فيدل على سلبية التفاعل.

RESULTS and SISCUSSION

النتائج والمناقشة

يُوضح الجدول رقم [٥] أن التعداد العام للجراثيم أكبر من ١٠^{٩} خلية/مل، وأن التعداد العام للجراثيم سالبة الغرام يتراوح بين 10^3 x 5.4 إلى 10^6 x 2.7 خلية/مل؛ بينما كان تعداد الجراثيم موجبة الغرام يتراوح بين $5x10^2$ إلى $7.5x10^3$ خلية/مل للعينات المدروسة. كان تعداد الإمعائيات بين$5x10^2$ حتى $7.5x10^3$ منها كان تعداد جراثيم الكلِبْسيلَّة من 2.5x 10^2إلى $1.9x10^4$.

الجدول رقم ٥: التعداد العام الكلي للجراثيم على أوساط مختلفة

لوريا بريتان آجار LB (cfu/ml)	منمي عام مع صاد حيوي (الفانكومايسين) LB-VAN (cfu/ml)	ماتينول سولت آجار MSA (cfu/ml)	ايوسين ميثيلين بلو آجار EMB (cfu/ml)	
			تعداد الإمعائيات	تعداد الكلِبْسيلَّة
$> ١٠^{٩}$	$5.4x10^3 – 2.7x10^6$	$5x10^2$-$7.5x10^3$	$5x10^2$-$7.5x10^3$	$2.5x\ 10^2$- $1.9x10^4$

شكلت الكلِبْسيلَّة النامية على الوسط الانتقائي ايوسين ميثيلين بلو آجار EMB مستعمرات كبيرة محدبة مخاطية، ثخانتها حوالي (٣.٠ µm) وطولها حوالي (١.٠ µm)، بلون بنفسجي غامق ذات هالة وردية، بدت الكلِبْسيلَّة تحت المجهر الضوئي بشكل عصيات قصيرة rod-shaped، سالبة لصبغة الغرام، محاطة بمحفظة.

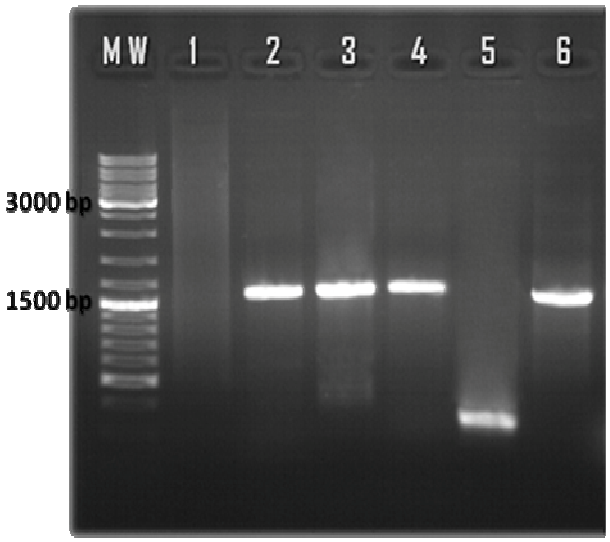
على أساس شكل المستعمرات على الوسط الإنتقائي تم انتقاء ٤٦ عزلة من أصل ١٠٠ عينة، يُوضح الجدول رقم [٦] نتائج التحري عن *Klebsiella* في ١٠٠ عينة لحم حيث وُجِدت في ٤٦ عينة موزعة على النحو التالي: ٢٣ عينة لحم عجل و١٤ عينة لحم ضأن و٩ عينة لحم دجاج.

الجدول رقم ٦: النسبة المئوية لعزلات الكلِبْسيلَّة من عينات اللحوم المدروسة

المادة الغذائية	عدد العينات	عدد عزلات الـ *Klebsiella*	النسبة المئوية
العجل	٣٥	٢٣	%٦٥.٧
الضأن	٣٠	١٤	%46.6
الدجاج	٣٥	٩	%25.7

ثم إجراء التفاعل السلسلي للبوليمراز، حيث يُوضح الشكل رقم [1] تفاعل الـ PCR على المستعمرات النموذجية لتمييز الكلِبْسيلَّة في عينة اللحوم الملوث، وذلك باستعمال البادئات النوعية لجنس الكلِبْسيلَّة (الجدول رقم ١).

الشكل [1] كشف DNA الكلِبْسيلَّة بواسطة الـ PCR



الشكل ٣: ناتج التفاعل السلسلي للبوليميراز على هلامة الأجاروز 1.5% (W/V)

MW. واسم DNA جزيئي.

١- عينة بدون دنا (شاهد سلبي)

٢- كلِبْسيلَّة معزولة من بعض عينات لحم عجل

٣- كلِبْسيلَّة معزولة من بعض عينات لحم الدجاج

٤- كلِبْسيلَّة معزولة من بعض عينات لحم الخاروف

٥- عينة *Enterobacter sakazakii* مع مرئساتها النوعية (شاهد ايجابي).

٦- كلِبْسيلَّة عيارية (شاهد إيجابي).

يُلاحظ في المسار ١ هو ناتج PCR لعينة خالية من DNA (شاهد سلبي للتقنية). إن المسارات (٢-٣-٤) هي عصابات دنا الجراثيم المعزولة من عينات اللحوم على أوساط انتقائية، والتي تكافئ في الحجم الجزيئي ١٥٠٠ أساس آزوتي لعصابة الكلِبْسيلَّة العيارية (حصلنا عليها من مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية) الموجودة في المسار ٦؛ بينما كان المسار ٥ نتيجة التقانة الايجابية لعينة *Enterobacter sakazakii* مع مرئساتها النوعية، مما يؤكد العزل النوعي لجنس الكلِبْسيلَّة من هذه العينات. يُلاحظ من الشكل أنه يمكن استخدام تقنية PCR لتمييز الكلِبْسيلَّة في عينات اللحوم الملوثة. لتحديد الكلِبْسيلَّة المعزولة من عينات اللحوم، تم إجراء الاختبارات الحيوية الكيميائية على كل الجراثيم التي تم نموها على الوسط الانتقائي. حيث بدت معظم الكلِبْسيلَّة المعزولة، غير متحركة، سالبة الأكسيداز، إيجابية للكاتالاز، مخمرةَ لسكر اللاكتوز، مخمرة لسكريّ الغلوكوز والسكروز، بعض هذه العزلات نمت على وسط سيمون سترات وقلون الوسط، وغير منتجة لغاز كبريت الهيدروجين H_2S. أنتجت بعض سلالات الكلِبْسيلَّة المعزولة أنزيم اليورياز، وأثبتت بعض أنواع هذه الجراثيم القابلية على تحليل الحامض الأميني وإنتاج الأندول بعد الحضن بدرجة ٣٧مْ، وكانت من النوع *K. oxytoca* وهذا يتوافق مع نتائج الدراسات العالمية حول هذه الجراثيم (Garrity, 2005). إن نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية تشير إلى أن الكلِبْسيلَّة المعزولة هي من نوعين مختلفين أو أكثر. تم الحصول على السلالات العيارية المستخدمة في هذه الدراسة من مخبر الميكروبيولوجيا والمناعيات في هيئة الطاقة الذرية السورية، (Kp = *K. pneumoniae* - *Ko = *K. oxytoca**). يُوضح الجدول رقم [٧] نتيجة هذه الاختبارات لبعض المستعمرات المعزولة من اللحوم.

الجدول رقم ٧: نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية للكلِبْسيلَّة

العينات	الحركة	الأوكسيداز	الكاتالاز	تخمر اللاكتوز	استقلاب السترات	البولة	ثلاثي سكر الحديد	كبريت الهدروجين	الأندول	VP	MR
*Kp	-	-	+	+	+	+	A/A, G	-	-	-	+
*Ko	-	-	+	+	+	+	A/A, G	-	+	-	+
١٨ عزلة	-	-	+	+	+	+	A/A, G	-	+	-	+
٢١ عزلة	-	-	+	+	+	+	A/A	-	-	-	+
٤ عزلات	+	-	+	+	-	+	A/A, G H_2O	+	-	-	+
٣ عزلات	-	-	+	-	-	+	K/A	-	-	-	+

إنَّ الكلِبْسيلَّة واسعة الانتشار، وهي تمتلك اثنين من البيئات، الأول: تكون في البيئة حيث توجد في المياه السطحية، مياه الصرف الصحي، التربة، وعلى النباتات؛ والثاني: حيث تكون مستعمرة للسطوح المخاطية عند الثدييات (الإنسان، الأبقار، والأغنام...الخ) (Curtis *et al*., 2008). احتلت منذ سنوات المقام الأول بين أمراض المستشفيات الخمجية الانتهازية، فهي تستطيع أن تسبب خمجاً تالياً في كل آفة (Maltezou *et al*., 2009). هناك اهتمام كبير عند حدوث

الأمراض بسبب جراثيم الكلِبْسيلَّة، حيث تمتلك هذه الجراثيم آليات للدفاع كونها تمتلك مستضدات محفظية (K) المرمزة للمحفظة التي تقاوم عملية البلعمة، وتقاوم درجة الحرارة ١٠٠ مْ. كما أنها تملك نظام أنزيمي (مثل الكاتالاز) يُعدّ من آليات الدفاع ضد البالعات الكبيرة، حيث أن البالعات تمتلك المقدرة على إرجاع الأكسجين إلى ماء أكسجيني أو أكسجين فعّال، وتعدّ هاتين الجزيئتين سامتين للجراثيم ولذلك فإن الكاتالاز يحفّز عودتهما إلى أكسجين عادي وماء (Nordmann *et al.*, 2009)، ولذلك تُعدّ الكلِبْسيلَّة موجبة الكاتالاز. لقد أظهرت نتائجنا أنه يمكن التحري عن الكلِبْسيلَّة في عينات اللحوم بواسطة التفاعلات الحيوية الكيميائية وبواسطة التضخيم السلسلي مستخدمين مرئسات نوعية للمورثة 16sRNA المحافظة ضمن الجنس.

إن تقنية الـ PCR لا تستغرق سوى يوم واحد، وهذا يفيد في إمكانية استخدامها كطريقة عيارية في الكشف عن الكلِبْسيلَّة. كما أنها تقنية تجنب العاملين في مخابر الجراثيم من الإصابة بهذه الجراثيم، وهي أسرع وأكثر حساسية من الاختبارات الحيوية الكيميائية ونعتقد أنها ستكون المعتمدة في المستقبل للتحري عن الكلِبْسيلَّة في عينات اللحوم (Min Wang *et al.*, 2008). أظهرت الخصائص الشكلية والحيوية كيميائية أن نسبة الكلِبْسيلَّة في اللحوم بمختلف أنواعها ٤٦% وهذا ما يتوافق إلى حد ما مع Stiles و Lai-King حيث كانت نسبة تواجد الكلِبْسيلَّة ضمن دراستهما ٤٦% (Stiles and Lai-King, 1981). بينما لم تتوافق نتائجنا مع Messaoudi وزملاؤه حيث كانت نسبة الكلِبْسيلَّة في اللحوم ٣٣.٣% (Messaoudi *et al.*, 2009). ونعتقد أن سبب الاختلاف في نسبة الفلورا من الكلِبْسيلَّة في البيئة المحيطة بالحيوانات في ألمانيا عنه في سورية. لاحظنا أن عدد الدراسات التي تبحث عن الكلِبْسيلَّة في اللحوم الخام قليل نسبياً وذلك قد يكون بسبب عدم تواجدها ضمن الفلورا الطبيعية للحوم، أو أنه تقليدياً يتم التحري عن الكلِبْسيلَّة ضمن الوجبات السريعة والعينات الطبية لأنها تعتبر من الجراثيم التي تنتقل عبر عدوى المستشفيات. لكن رغم ذلك أظهرت نتائجنا نسبة لا بأس بها من الكلِبْسيلَّة ضمن عينات اللحوم الخام مما يدل على جدوى الدراسة من تطوير اختبار تفريقي للكلِبْسيلَّة ضمن اللحوم؛ كما أنه يجب متابعة البحث لتحديد الفوعة المرضية لهذه العزلات لمعرفة فيما إذا كانت تُساهم في إصابة الجهاز البولي-التناسلي أو الجهاز التنفسي أو حتى تجرثم الدم. وللأسباب السابقة الذكر كان الهدف من دراستنا في التحري عن الكلِبْسيلَّة في عينات اللحوم لكي تكون الخطوة الأولى في دراسة وبائية هذه الجراثيم في محافظتي دمشق وريفها. وحالياً نحن في صدد متابعة أبحاثنا حول اختبار حساسية ومقاومة عزلات الكلِبْسيلَّة المعزولة في مخابرنا لبعض الصادات الحيوية المستخدمة في علاج مرضى الالتهابات الرئوية وتحديد فعاليتها في هذه المعالجة.

الاستنتاجات

لقد أظهرت نتائجنا أنه يمكن التحري عن الكلِبْسيلَّة في عينات اللحوم بواسطة التفاعلات الحيوية الكيميائية وبواسطة التضخيم السلسلي مستخدمين مرئسات نوعية للمورثة 16sRNA المحافظة ضمن الجنس.

REFERENCE

Anderson, D.J.; Engemann, J.J.; Harrell, Carmeli, L.J.Y.; Reller, L.B. and Kaye, K.S. (2006): Predictors of mortality in patients with bloodstream infection due to ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, V. 50, pp. 1715–1720.

Anonymous, (2002): The cost of antibiotic resistance: effect of resistance among *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* on length of hospital stay. Infect. *Control Hosp. Epidemiol*, V. 23, pp. 106–108.

Augustin, A.; Seng Duong, L.; Kalavsky, E.; Liskova, A.; Kisac, P. and Krcmery, V. (2009): Colonization with cefotazime-resistant *Enterobacter* spp. and *Klebsiella* spp. in HIV-positive Cambodian children decreases with immune reconstitution after HAART. *J. Chemother*., V. 21, pp. 232-233.

Bleich, A.; Kirsch, P.; Sahly, H.; Fahey, J.; Smoczek, A.; Hedrich, H.J. and Sundberg, J.P. (2008): Klebsiella oxytoca: opportunistic infections in laboratory rodents. Lab Anim., V.42, pp. 369-375.

Brooks, S.E.; Walczak, M.A.; Malcolm, S. and Hameed, R. (2004): Intrinsic *Klebsiella pneumoniae* contamination of liquid germicidal hand soap containing chlorhexidine. *Infect. Control Hosp Epidemiol.*, V. 25, pp. 883–885.

Curtis, L.; Nakipoglu, Y.; Kucuker, M.A.; Katranci, H. and Derbentli, S. (2008): Need for more environmental control of *Klebsiella* and other gram negative infections. Saudi Med J., V.29, pp. 1069.

Dokladny, K.; Lobb, R.; Wharton, W.; Thomas, Y. and Moseley, P. (2010): LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: possible role of NF-$_K$B, *Cell Stress Chaperones*, V.15, pp. 153–163.

Garrity, M. (2005): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *Department of Microbiology and Molecular Genetics*, V.2, pp. 716-724.

Guetta, O.; Milas, M. and Rinaudo, M. (2003): Structure and properties of a bacterial polysaccharide from a *Klebsiella* strain (ATCC 12657). *Bio. Macro. Molecules*., V. 4, pp. 1372-1379. Handling. Applied and Environmental Microbiology, V.41, pp. 867-872.

Högenauer, C.; Langner, C. and Beubler, E. (2006): Klebsiella oxytoca as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *The New England Journal of Medicine*. V. 355, pp 2418-2426.

Maltezou, H.C.; Giakkoupi, P.; Maragos, A.; Bolikas, M.; Raftopoulos, V.; Papahatzaki, H.; Vrouhos, G.; Liakou, V. and Vatopoulos, A.C. (2009): Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete. *Journal of Infection*, V. 58, pp. 213-219.

Messaoudi, A.; Gtari, M.; Boudabous, A. and Wagenlehner, F. (2009): Identification and susceptibility of *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. isolated from meat products. African Journal of Microbiology Research, V.3, pp. 362-369.

Min Wang; Boyang Cao; Qunfang, Yu.; Lei Liu; Qili Gao; Lei Wang and Lu Feng J Clin. (2008): Microbiol Analysis of the 16S–23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Region in *Klebsiella* Species. *J.clin. Microbiol.,* V. 46, pp 3555–3563.

Nordmann, P.; Cuzon, G. and Naas, T. (2009): The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet. Infect. Dis., V.9, pp. 228–236.

Rodrigues, P.; Almeida, AM.; Bertoni, BW. And Rclr, P. (2008): Assessment of Genntic relationship between *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* samples isolated from a dental office. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop.*, V.14, pp. 703-718.

Rosen, D.A.; Pinkner, J.S.; Jones, J.M.; Walker, J.N.; Clegg, S. and Hultgren, S.J. (2008): Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. *Infect. Immun.*, V.76, pp. 3337-3345. Stiles, M. Lai-King, NG., 1981. Enterobacteriaceae Associated with Meats and Meat.