تحديد بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Pasteurella multocida* المعزولة من إصابات الإنسان والحيوانات الحقلية

Determination of some Virulence Factors of *Pasteurella multocia* isolated from Human and Farm Animals infections

سوسن ساجد الجبوري إسماعيل كاظم شبر * صفاء عبد الهادي*
كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية
*وزارة العلوم والتكنلوجيا

Sawsan S. AL-jubori * Ismail K. Shobar * Safaa Abdul-Hadi
College of Science\ Al-Mustansiriyah University
*Ministry of Science and Technology

المستخلص

أمكن الحصول على 21 عزلة من بكتريا *Pasteurella multocida* من نماذج مختلفة شملت مسحات من الجروح الناجمة عن عضات الكلاب والقطط وعينات القشع والادرار من الإنسان فيما شملت العينات الحيوانية أخذ مسحات الأنف وعينات من دم قطعان الماشية فضلا عن اخذ عينات من أنسجة دواجن ميتة مصابة بكوليرا الدجاج . عزلت البكتريا باستخدام وسط اكار الباستورلا-مالتوسيدا الانتخابي ثم شخصت اعتمادا على عدد من الفحوص المورفولوجية والبايوكيميائية فضلا عن التشخيص بنظام api 20E . تم التحري عن قابلية العزلات عن انتاج عدد من عوامل الضراوة اذ أظهرت النتائج قابلية 18 عزلة 85.7% على إنتاج الأنزيم المحلل للدهن Lipase كما بينت الدراسة أن هنالك 9 عزلات شديدة الضراوة للفئران من مجموع 21 (42.8%) ، وقد تراوح وقت الهلاك ما بين (10-24) ساعة بعد حقن الحيوانات بغشاء البريتون . استطاعت بعض من العزلات من إنتاج السموم المنخرة للجلد ، وظهرت النتيجة الموجبة من خلال حصول تقيح وتنخر شديدين بعد حقن خنازير غينيا تحت الجلد . فيما يخص نتائج فحص الحساسية للمضادات الحيوية فقد ظهر هنالك تفاوت في استجابة هذه العزلات اذ قاومت بعض منها وبشدة اغلب المضادات المستعملة في الوقت الذي استجابت بعض منها لهذه المضادات . اختبر المستخلص الخام للعزلة PMA20 للتحري عن قابليته لتحفيز خلايا دم الإنسان اللمفاوية على الانقسام في الزجاج اذ بينت النتائج قدرته المحفزه وبلغ معامل الانقسام 1.2% مقارنة مع نموذج السيطرة .

Abstract

Twenty one Isolates of *Pasteurella multocida* were obtained from different clinical specimens of human and farm animals' infections. Human specimens included wounds swabs taken after cats and dog's bits beside the urine and sputum samples. The animal samples were nasal swabs and blood samples taken from chattels, also the poultry tissues of infected chicken with fowl cholera were collected. Bacterial isolates were isolated using *Pasteurella multocida* selective agar (PMSA) then identified doing different morphological, biochemical tests followed by api 20E diagnosis. The ability of the bacterial isolates to produce different virulence factors were studied, 18 isolates 85.7% were able to produce Lipase enzyme. Results of pathogenicity study on Lab. animals (mice) showed that there were 9 highly virulent isolates among the 21 (42.8%). The killing time was in between (10-24) hrs after injected the mice's intraperitoneally. Some of the isolates showed their ability to produce the dermonecrotic toxin and the positive result appeared as highly purulent, dermonecrotic lesions after injection Genia pig intradermally. Results of antibiotic sensitivity test revealed that there were considerable variations in isolates susceptibility. Some of the isolates were highly resisted most of the used antibiotics while others were not. The crude

Key words: *Pasteurella multosida*, virulence factors, stimulation human lymphocyte

bacterial extract from PMA20 isolate was tested to determine its ability to stimulate human lymphocytes division *in vitro*, results showed that the extract was able to stimulate cells division when the mitotic index was 1.2% as compared with the positive control.

المقدمة

تعد بكتريا *Pasteurella multocida* واحدة من الممرضات الشائعة بين الحيوانات الحقلية اذ انها تصيب الابقار والجاموس مسببة مرض عفونة الدم النزفية ، كما انها تصيب الأغنام والماعز وتتميز اصابتها بحدوث هلاكات مفاجئة [1] . اما الاصابة في الخنازير فتكون شديدة وينجم عنها حالة التهاب الانف الضامر [2] فضلاً من اعتبارها عالية الضراوة في الدواجن وينجم عن الاصابة بها مرض كوليرا الدجاج والدجاج الرومي [3] . الى جانب الاصابات في الحيوانات فأنه من الممكن انتقال البكتريا الى الإنسان اذ عزلت في حالات التهاب القصبات الهوائية الحادة ولسان المزمار[4] كما وهنالك حالات مرضية مسجلة أخرى كحالات اصابة الجهاز العصبي المركزي والتهاب السحايا [5]، والتهابات المجاري البولية [6] . ان حالات الاصابة في الانسان الأكثر شيوعاً تلك المتزامنة مع خدوش وعضات الكلاب والقطط اذ تشكل الاصابات الموضعية النسبة الاكبر في مجمل الاصابات بالبكتريا بسبب تواجدها الطبيعي في التجويف الفمي والبلعومي لهذه الحيوانات [7] . هنالك تقارير سنوية من مختلف انحاء العالم عن عزل هذه البكتريا من عضات الكلاب والقطط والمضاعفات الناجمة عنها [8] . يسهل الاصابة ببكتريا *P. multocida* لامتلاكها لعدد من عوامل الضراوة كأفرازها للأنزيمات والذيفانات فضلا عن امتلاكها للبلازميدات المسؤولة عن مقاومة عدد من المضادات الحيوية [7، 9] . تهدف هذه الدراسة الى عزل وتشخيص البكتريا من حالات مرضية متنوعة للإنسان و للحيوانات في العراق هذه البكتريا كذلك لتحديد بعض من عوامل الضراوة التي تمتلكها الى جانب دراسة مقاومتها واستجابتها لعدد من المضادات الحيوية سيما شائعة الاستعمال في علاج الاصابات الناجمة عنها فضلا عن دراسة قدرة المستضد الخام للبكتريا على تحفيز الخلايا اللمفاويه للانسان على الانقسام في الزجاج *in vitro*.

المواد وطرائق العمل

مصدر العزلات البكتيرية :- جمعت 215 عينة من مصادر مختلفة للفترة الواقعه ما بين اب 2001- ايلول 2002 ، وشملت نماذج الإنسان مسحات الجروح ناجمة عن عضات الكلاب والقطط ، وكذلك عينات قشع من مراجعي معهد مكافحة التدرن . فيما يخص النماذج الحيوانية فقد أخذت مسحات من الأنف وعينات دم من الحيوانات الحقلية (الأبقار، والأغنام ، الماعز) وكذلك عينات من انسجة دواجن مصابة أو ميتة نتيجة مرض كوليرا الدجاج.

العزل والتشخيص : زرعت العينات المأخوذة مبدئياً في وسط نقيع القلب والدماغ السائل ، وحضنت النماذج بدرجة 37C لمدة 18 ساعة . نقل بعدها مليء ناقل من المزارع اعلاه الى وسط باستوريلا مالتوسيدا الانتخابي (PMSA). حضنت الاطباق بوجود نسبة (5-10)% غاز CO_2 بدرجة 37C لمدة 18 ساعة [10] ، ومن ثم نقلت الى وسط اكار الدم . اجريت عدد من الفحوص المورفولوجية والمتضمنة صبغ شرائح محضره من مستعمرات البكتريا الناميه على وسط اكار الدم بصبغة المثلين الازرق للتحري عن ظاهرة الاصطباغ ثنائي الاقطاب (Bipolar staining) وعمل فحص الكبسولة . اجريت ايضا عدد من الفحوص الكيموحيوية للتشخيص المبدئي [11] فيما استخدمت أشرطة api20E لغرض التشخيص النهائي . قورنت نتائج التشخيص مع نتائج العزلة carter A *Pasteurella multocida* .

التحري عن بعض عوامل ضراوة البكتريا

انتاج الانزيم المحلل للدهون Lipase: أتبعت طريقتا الاطباق (plate method) والطريقة المحورة التي اجريت ايضا في الاطباق ولكن بعد اضافة الكاشف الاحمر المتعادل [12] وذلك للتحري عن انتاج انزيم Lipase بوجود المادة الاساس Tween 80 . عدت النتيجة موجبة في الطريقة الاولى عند ظهور منطقة معتمة تحيط مستعمرات البكتريا بعد (2-7) ايام من التحضين ، في الوقت الذي اعتمد فيه تغير لون الكاشف من اللون الاحمر الى الوردي الفاتح كنتيجة موجبة في الطريقة الثانية .

ضراوة البكتريا للحيوانات المختبرية : أجري الاختبار بحقن فئران بيضاء (لمكررين لكل بكتريا) بمقدار 0.1 مل من التخفيف الثاني من مزرعة بكتيرية منماة في وسط مرق نقيع القلب والدماغ وبعمر 18 ساعة . حقنت البكتريا في غشاء البريتون (Intraperitoneally) ، وتم مراقبة الفئران على فترات منتظمة من وقت الحقن .

لوحظت اهم التغيرات المورفولوجية البادية على الفئران المحقونة فيما تم دراسة الهيئة العامة والمتغيرات لانسجة الحيوان الميت بعد تشريحه عقب هلاكه [12] .

التحري عن الذيفان المنخر للجلد Dermonecrotic Toxin (DNT)

اعتمد [13] للتحري عن الذيفان المنخر للجلد DNT ، وذلك من خلال حقن خنازير غينيا بالمستخلص المحضر من ثلاث عزلات من البكتريا التي اتسمت بضراوتها الشديدة للفئران (في الفحص اعلاه) في بشرة المنطقة البطنية للحيوان وكلا على انفراد . سجلت النتائج الايجابية عند حدوث موقع التهاب تنخري اكبر من 5 ملميتر بعد مرور 48 ساعة من الحقن .

التحري عن مقاومة البكتريا لعدد من المضادات الحيوية : أعتمدت طريقة الباحثون [14] لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية واستخدمت لهذا الغرض عدد من المضادات المبينة تراكيزها لكل قرص وكما يلي:

Amoxacillin (25µg), Ampicillin (10µg), Cephalexin(30µg). Erythromycin (15µg), Gentamicin (10µg), Kanamycin (30µg) Chloramphenicol (30µg), Clindamycin (10µg), Neomycin (10µg), Novobiocin, penicillin G (30µg), Tetracycline (30µg). Lincomycin (2µg). Sulfonamide (10µg).

عدت النتيجة موجبة من خلال تكون مناطق تثبيط محسوبة حول قرص المضاد الحيوي ثم قورنت النتائج مع القياسات العا لمية NCCLs [15] .

التحري عن قدرة المستضد الخام للبكتريا على تحفيز انقسام الخلايا اللمفاوية للانسان

حضر المستضد الخام لخلايا البكتريا المقتوله بلفورمالين تركيزه النهائي 0.3حجم/حجم حسب ما ورد في [16] وباستخدام محلول دارئ الفوسفات الملحي ذو الاس الهيدروجيني 7.2 لتعليق الخلايا على ان تصل مقدار الكثافه 0.25 (ما يعادل 30×10^8 خليه) بعد قراءته عند طول موجي 600 نانوميتر . تم الكشف عن القدرة التحفيزيه للمستضد الخام بعمل تراكيز متسلسله منه (10^{-1}-10^{-3}) ، واضافتها الى الوسط الزرعي RPM1-1640 الخاص بتنمية الخلايا اللمفاوية في الزجاج (*in vitro*) ومعاملتها بعدد من المحاليل االدارئه والمثبتة تباعا ومن ثم تحضير شريحة وصبغها بصبغة كمزا [17] . حسب معامل الانقسام ومعامل الارومة (Blastogenic index) حسب ما جاء في [18] ، وقورنت النتائج مع السيطرة الموجبة متمثلة بمحفز نمو خارجي لا نوعي Phytohemagglutinin (PHA) .

النتائج والمناقشة

اعتمدت في هذه الدراسة عينات متنوعة لعزل البكتريا سيما جروح مرضى تعرضوا لعضات الكلاب والقطط . شملت الدراسة ايضا عينات قشع مصابين بالتهابات رئوية ، فيما اعتمدت مسحات الافرازات الانفية وعينات الدم للحيوانات الحقلية بهذا الصدد اشار الباحثان Baddour and Endom الى ان ما مجموعه (85-90) % من مجمل العضات التي يتعرض لها الانسان هي عضات كلاب ، وما بين (5-10) % عضات قطط اما عضات القوارض فتمثل (2-3) % وتعزل البكتريا بنسبة 20% من هذه الحالات [19] . من خلال التنمية والعزل على الوسط الانتخابي Agar (PMSA) *Pasteurella multocia* ظهرت المستعمرات صغيرة دائرية سوداء اللون شكل (1) نتيجة ترسب مادة توليرات البوتاسيوم الموجودة في الوسط في داخل الخلية [10] .

شكل (1): مستعمرات بكتريا *P.multocida* منماة على وسط الوسط الانتخابي(PMSA)
***Pasteurella multocia* Agar**

اما على وسط اكار الدم فقد ظهرت المستعمرات صغيرة الى متوسطة الحجم دائرية ملساء تميل للون الرمادي وغير محلله للدم تنبعث منها رائحه عفونة وصفها البعض بكونها تشبه رائحة عش الغراب سيما في الاطباق المغلقه لفترات طويله وهذا ما يميزها عن النوع *P. heamolytica* [10] .

من الصفات المورفولوجية المهمه لهذه البكتريا ظهورها بشكل عصيات قصيرة بلون غامق عند طرفي الخلية بعد صبغها بلـ المثلين الازرق مكونة ما يعرف بظاهرة الاصطباغ ثنائية القطب شكل (2) ، وتعد من الصفات التشخيصيه لهذا النوع ، وتتضح هذه الظاهرة أكثر في الشرائح المحضرة من الانسجة المصابة او من عينات الدم الملوثة بالبكتريا، ويعود سبب حدوثها لتمركز المكونات السايتوبلازميه عند طرفي الخلية [10] . من صفاتها المورفولوجية الأخرى تكوينها للمحفظة سيما في العزلات شديدة الضراوة . حاليا يتم اعتماد التقنيات الحديثة مثل اعتماد 16 S rRNA [8] والجينات المحفوظة المتكررة بتقنية REP-PCR للتشخيص الدقيق فضلا عن استعمال Housekeeping genes [20] .

شكل (2): شريحة محضرة من عينة دم ملوثة ببكتريا الباستوريلا مصبوغة بصبغة كرام (X1000)

اعتمادا على الفحوصات المورفولوجية و الكيموحيوية ، ومن ثم التشخيص بنظام api 20E أمكن الحصول على 21 عزلة من بكتريا *P. multocida* جدول (1) موزعة بواقع 10 عزلات مصدرها الانسان كان بينها 6 عزلات من مسحات الجروح الناجمه من عضات كلاب وقطط و (4) من القشع . اما العزلات التي مصدرها الحيوانات فقد بلغت (11) عزلة موزعة ما بين عينات من انسجة دواجن مصابة ومسحات انفية من اغنام وماعز وابقار وبواقع (3 ، 4 ،4) على التوالي .

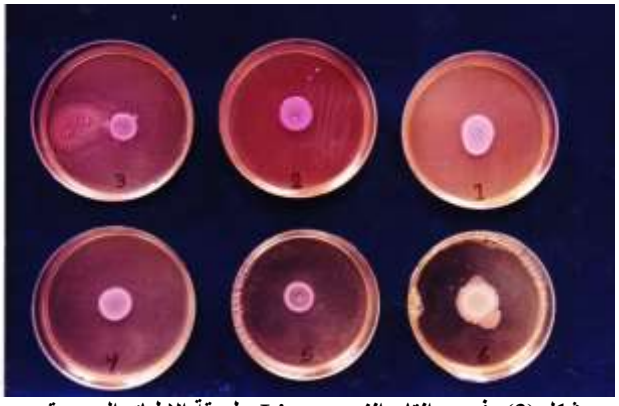
جدول (1): توزيع عزلات *P. multocida* حسب مصدر ونوع العينة

مصدر العزل	نوع العينة	عدد العينات الكلي	اعداد عزلات *P. multocida*	نسبة العزل
إنسان	مسحات جروح من عضات كلاب وقطط	50	6 PMH_1, PMH_2,PMH_3, PMH_4, PMH_5, PMH_6	%12
	قشع	50	4 PMH_7, PMH_8, PMH_9, PMH_{10}	%8
	أدرار	10	-	%0
دواجن	أجزاء من انسجة مصابة. وكوليرا دجاج	20	4 PMA_1, PMA_2, PMA_3, PMA_4	%20
اغنام وماعز	مسحات انفية وعينات دم	50	3 PMB_1, PMB_2, PMB_3	%20
ابقار	مسحات انفية	35	4 PMB_4, PMB_5, PMB_6, PMB_7	%11.4
	المجموع	215	21	%9.7

H: عزلات مصدرها الانسان وA: عزلات مصدرها الدواجن وB: عزلات مصدرها الابقار والاغنام

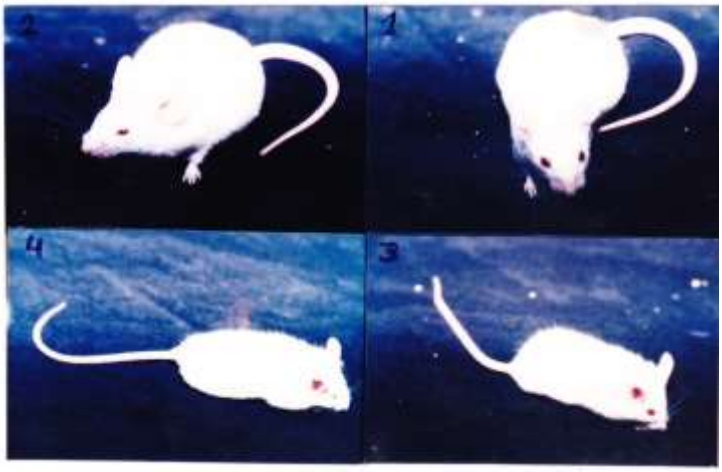
لقد ذكرت بعض المصادر الى ان نسبة عزل البكتريا من جروح عضات الحيوانات تصل الى 50% من عضات الكلاب و 75% من عضات القطط وهذا يرجع لكون البكتريا متعايشة بالتجويف الفمي لهذه الحيوانات ، وان أفضل النماذج لعزل البكتريا من الحيوانات هي المسحات الانفية والبلعومية وهذا مؤشر طبيعي لتمركز البكتريا في المجاري التنفسية العليا لهذه الحيوانات [9] . في دراسة اخرى اشار باحثون الى عزل البكتريا من الجرذان السوداء المتواجدة في حقول الدواجن المصابة بالكوليرا كحامل للبكتريا carrier ، وقد بلغت نسبة العزل 54% من مجمل المسحات البلعومية لترتفع النسبة الى 62% من مسحات المستقيم [21] .

بنيت نتائج فحص التحري عن انتاج انزيم Lipase مقدرة 18 عزلة من مجموع 21 (نسبة 85.7%) على أعطاء نتيجة موجبة والتي ظهرت بشكل راسب فاتح اللون يتجمع حول المستعمرات لتكوين منطقة معتمة (Opaque zone) بعد أسبوع من التحضين في الوقت الذي لاتظهر فيه مثل هذه الحالة حول المستعمرات الفاقدة لقدرة انتاج هذا الانزيم . يأتي تكون الراسب من جراء انشطار المادة الأساس لعمل الانزيم متمثلة بمادة Tween 80 الى احماض دهنية حرة وكحول ويعقب ذلك تفاعل هذه الاحماض الدهنية مع ايونات الكالسيوم الموجودة في وسط اكار Tween 80 لينتج عنها املاح الاحماض الدهنية التي تترسب حول المستعمرة [12] . لقد اتسمت طريقة الاطباق بسهولة اجراءها فضلاً عن امكانية اختبار عدد من العزلات في الطبق نفسه. اما فيما يخص الطريقة المحورة فهي تماثل الطريقة الاولى المجراة في الاطباق ولكن بعد اضافة كاشف احمر المتعادل لوسط Tween 80 فكانت اكثر سرعة ودقة في اظهار النتيجة الموجبة وتغير لون الكاشف الى وردي شكل (3) غير ان اعداد العزلات موجبة الفحص كانت نفسها كما في الطريقة الاولى .



شكل (3): فحص انتاج انزيم Lipase بطريقة الاطباق المحورة
أ.النتيجة الموجبة للعزلات PMA_4 PMB_7, PMH_1 , PMH_4, للاطباق 2,3,4,5
ب. النتيجة السالبة للعزلات PMH_2 وPMB_4 للاطباق 1,6

أوضحت نتائج دراسة ضراوة البكتريا للفئران البيضاء ان هنالك 9 عزلات من مجموع 21 (42.8%) كانت ضارية جداً للفئران وسببت هلاكها خلال (10-24) ساعة بعد الحقن . لقد كانت مصادر هذه العزلات مختلفة اذ ان ثلاثة منها كان مصدرها من الانسان موزعة ما بين عزلتين هما (PMH_1، PMH_5) من جروح عضات الحيوانات وعزلة واحدة (PMH_4) من عينة قشع لمريض بالتهاب المجاري التنفسية . اما العزلات الحيوانية فقد بلغ عددها 6 عزلات كانت مصادر عزل اربعة منها (PMA1, PMA_2, PMA_3, PMA_4) من الدواجن المصابة بحالة كوليرا حادة فيما كان مصدر العزلتين الاخيرتين (PMB2، PMB6) من ابقار واغنام مصابة بذات الرئة وبذلك تفوقت العزلات الحيوانية بضراوتها يهذا الجانب مقارنة مع العزلات التي مصدرها الانسان . لقد ظهرت الاعراض السريرية بعد مدة وجيزة من الحقن وتمثلت بالخمول وقلة الشهية مع زيادة في سرعة التنفس وانتصاب شعر الحيوان المحقون واستمرت الاعراض المذكورة في الأزدياد مصحوبة بحالة رقود



وخمول الى حين الهلاك شكل (4) .

شكل (4): مراحل تطور الاصابة في الفئران المختبرية المحقونة بمستخلص العزلة PMA 4
1. سيطرة سالبة فأر محقون بمحلول ملحي فسلجي 2. فأر محقون بعد مرور ساعة
3.فأر محقون بعد مرور 4 ساعات (خمول) 4. فأر محقون بعد 9 ساعات (رقود الحيوان وانتصاب الشعر قبل الموت)

اما بالنسبة للآفات المرضية العيانية التي ظهرت على اعضاء الفئران بعد تشريحه فكانت متباينة في حدتها ، وتميزت بأحتقان الرئتين واحتواء سطحها على مناطق بيضاء اللون صلدة ودائرية ، ورافق الحالة حدوث احتقان وتضخم الطحال والكبد [5] . لقد اشارت بعض المصادر الى تفوق بكتريا *P. multocida* على بكتريا *Streptococcus Pneumonia* المسببة لذات الرئة من حيث ضراوتها للفئران المختبرية فالفئران المحقونة وريدياً بالنوع الاول تصل للكبد والطحال والرئة والتجويف البريتوني خلال فترة سريعة مسببة هلاك الحيوان خلال (9-12) ساعة اما اذا حقنت عن طريق البريتون فانها تبدأ بالتكاثر بعد 15 دقيقة من الحقن وتسبب قتل سريع لها [22] . في دراسة مسحية اجريت في شمال الاردن لمعرفة وبائية وانشار التهاب الجيوب الانفية والمنخر في قطعان الماشية تمكن الباحثان فيها من عزل *P.multocida* , *P.haemolytica* بنسبة (13،50)%على التوالي كانت جميع العزلات مميتة للفئران البيضاء السويسرية ومنتجة لعدد من عوامل الضراوة واستطاع 48% منها من تلوين كريات الدم الحمراء [23] .

أما بالنسبة لأختبار التحري عن انتاج الذيفان المنخر للجلد (DNT) فقد اختير لهذا الغرض ثلاثة من العزلات التي اتسمت بضرواتها الشديدة للفئران في الفحص السابق وهي PMH1، PMA4،PMB6 المعزولة من اصابة انسان وكوليرا دواجن ومسحات انفيه لابقار على التوالي . لقد استطاعت العزلة PMA4 المعزوله من كوليرا الدواجن من اعطاء النتيجة الموجبة خلال 24 ساعة من حقن المنطقة البطنية من خنازير غينيا بالمستخلص المحضر من العزلة المذكورة متفوقه بذلك بضراوتها عن باقي العزلات المختاره اذ ظهرت النتيجة الايجابية من خلال حصول تنخر المنطقة المحقونة وتآكلها فضلاً عن اسودادها وتقيحها بشكل حاد . يعد عامل DNT في عوامل الضراوة الحادة والهامة في البكتريا سيما في حالات اصابة الخنازير الاعتيادية اذ انه يسبب حدوث تآكل وضمور الخطم فيها فضلاً عن تطور الاصابة لحصول تضخم وانسمام الطحال ثم موت الحيوان [7] . وفق النتائج السابقة يمكن القول ان ضراوة العزلات التي مصدرها الانسان والحيوانات متقاربة ، غير ان

عزلات كوليرا الدجاج كانت ضارية اكثر نوعما . فيما يخص نتائج استجابة العزلات قيد الدراسة لبعض المضادات الحيوية فقد تبين ان مدى حساسية هذه العزلات كانت متباينة جدول (2) . ففي الوقت الذي استجابت به كافة العزلات لكل من المضادات Kanamycin, Erythromycin, Cephalexin, Chloramphenicol فقد كانت مقاومة وبنسبة 100% لكلاً من Clindamycin و Lincomycin . في حين بلغت نسبة مقاومة Nevobiocin ، Sulfonamide ، Streptomycin مقدار (90.47 ، 80.95 ، 76.19) وعلى التوالي وتباينت نسب مقاومة باقي المضادات . هنالك أشارات حول أفضلية استخدام البعض من هذه المضادات في علاج الأصابات الناجمة عن بكتريا *P. multocida* نظراً لما تتمتع به من فعالية عالية ضد البكتريا فضلاً عن قلة أعراضها الجانبية . من هذه المضادات المستعملة علاجياً هي السيفالوسبورينات بانواعها كما يستعمل خليط من Amoxacillin/Clavulanic acid(Augmentin) اما الاشخاص الذين لديهم حساسية لمجموعة البتالاكتام فيستعمل Doxycycline ، Metronidazole فضلا عن استعمال مضاد Erythromycin [23] ، هنالك اشارات الى فاعلية المعالجة بمضاد Aztreonam وهو من مجموعة ال Monobactam من مضادات مجموعة البيتالاكتام [1] . أن صفة المقاومة المتعددة لأكثر من مضاد حيوي واردة جداً في الباستوريلا وغالباً ما يسيطر عليها بلازميدات المقاومة أو تكون مسيطرة عليها كروموسومياً ولوحظ ايضا توا سط هذه البلازميدات انتاج العديد من ذيفانات هذه البكتريا [7] .

جدول (2) :نسب مقاومة عزلات *P. multocida* (21عزلة) للمضادات الحيوية باستخدام الاقراص

المضاد الحيوي	الرمز	العزلات المقاومة من مجموع 21عزله			نسبة المقاومة %
		العزلات البشرية	العزلات الحيوانية	العدد الكلي	
Choramphenicol	C	0	0	0	0
Cephalexin	CL	0	0	0	0
Erythromycin	E	0	0	0	0
Kanamycin	K	0	0	0	0
Ampicillim	Amp	1	0	1	4.76
Amoxicillin	Amx	1	0	1	4.76
Penicillin	P	1	1	2	9.52
Tetracycline	TE	1	2	3	14.29
Gentamicin	GM	3	1	4	19.04
Trimethoprim & Sulphamethexazol	SXT	0	5	5	28.8
Streptomycin	S	9	7	16	76.2
Sulfonamide	Sul	8	9	17	80.95
Novobiocin	NB	10	9	19	90.47
Clindamycin	CC	10	11	21	100
Lincomycin	L	10	11	21	100

فيما يخص نتائج الكشف عن استجابة خلايا الدم اللمفاوية للمستضد الخام للعزلة PMA4 فقد اظهرت النتائج قدرة هذا المستضد على تحفيز انقسام الخلايا اللمفاوية اذ بلغ معامل الانقسام 1.2%مقارنة مع نموذج السيطرة الموجبة المتمثل بالمحفز PHA اذ بلغ معامل الانقسام له 1.3% في الوقت الذي بلغ فيه معامل الارومة (BI) مقدار(32،33.3)%على التوالي مما يعطي انطباعا على تشابه فاعلية المستضدين الى حد كبيرجدول (3) .

جدول(3): النسب المئوية لمعاملي الانقسام والارومة لخلايا الانسان اللمفاوية لنموذج السيطرة (PHA) و نماذج الستخلص الخام لبكتريا*P. multocida*

المعاملات	التخفيف	معامل الانقسام%MI	معامل الارومة%BI
السيطرة الموجبة (PHA)	بدون تخفيف	1.3	33.3
المستضد الخام للبكتريا	بدون تخفيف	1.2	32.0
	1/10	1.0	28.1
	1/100	0.6	15.3
	1/1000	0.08	9.10

MI:Mitotic index , BI: Blastobenic index , PHA: Phytoheaggluinin.

لقد اظهرت التخافيف المتسلسلة للمستضد البكتيري تحفيزا متفاوتا لخلايا الدم اللمفاوية على الانقسام مما يعطي انطباعا على حصول استجابة لهذا المستخلص الخام . تاتي هذه التجربة كمحاولة اولية لتحضير لقاح قادر على

تحفيز استجابة مناعية ضد الاصابة بالبكتريا . لقد استخدم [25] الجزء البروتيني الحاوي النهاية N-terminal fragment للسموم الخلوية المعروفة باسم *P.multocida* toxin (PMT) والمنتج من عزلة مسببة لتآكل الخطم في الخنازيرللنمط المصليD في تحضير لقاح لهذا النوع ولوحظ حصول استجابة مناعية قوية ضد سموم هذه البكتريا، واعتبر كلقاح مرشح جديد ضد البكتريا . من المؤمل اجراء تجارب تكميلية لمستضدات البكتريا المنقاة وتحديد الاستجابة المناعية لها .

References

1. Barrett, J.; and Frey, R. H. (2006). Animal bite infections. Article in HealthAtoz. USA.
2. Mercy, A. E.; Salerian, M.; Richard, R. B. and Robertson, G. (1986). Isolation of toxigenic *Pasteurella multocida* from an Outbreak of atrophic Rhinitis pigs. Aus. Veter.J. 63(8): 256-258.
3. Blanchong, J. A.; Samwel, M. D.; Goldberg, D. R.; Shadduck, D.J. and Lehr, M. A. (2006). Persistence of *Pasteurella multosida* in wetlands following avian cholera outbreaks. J. Wild life Disease.42(1): 33-39.
4. Rydberg, J. and White, P. (1993). *Pasteurella multocida* as a Cause of acute Epiglottitis. Lancet. 341-381.
5. Thomas Lafeber(MD). (2006). *Pasteurella multocida* infections. (Article). Department of intrrnal medicine. Medical University of South Carolina.
6. Koch, C. A.; Mabce, C. L.; Robyn, J. A.; and Metz, E. N. (1996) Exposure to domestic Cots: risk Factor for *Pasteurellaa multocida* Peritonitis in Liver cirrhosis. Am. J. Gastro. Enterol. 91 (7): 1447-1449.
7. Seleim, R. S. (2005). Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from animal origin. (Article). Animal Health Research institute. Egypt.
8. Christensen, H.; Bisgaurd, M.; Angen, O.; Frederiksen, W. and Olsen, J.F. (2005). Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants including isolates from large –cat bits wounds.J.Clinical Microbio.43(1):259-270.
9. Kuhnert, P. and Christensen, H. (2008). Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspect. Caister Academic press.
10. Moore, M. K.; Chubbs, L. C. and Gates, R. H. (1994). A new selective enrichment procedure for isolating *Pasteurella multocida* from avain and environmental samples. Avian Dis. 38:317-324.
11. Cowan, S. T (1986). Manual for the identification of medical bacteria. 2 nd Ed. Gabbridge University press. USA.
12. AL-Hasnawi, S. (2002). A. study of virulence Factors and Plasmid Content in *Pasteurella multocida* isolated from Human and farm animals. MSc. thesis. College of Science. AL-Mustansiriya University.
13. Magyar. T. (1989). Study of the toxin-producing ability of *Pasteurella multocida* in mice. Acta. Vet. Hung. 37(4): 319-325
14. Andrews, J. M.; Jevons, G. and Brenwald, N. (2004). Susceptibility testing *Pasteurella multocida* BSAC standardized methodology. J. Antimicrobial chemoth. 54(5): 962-964.

15. National Committee for Clinical laboratory Standers (1987). Methods for dilution Antimcrobial Susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7- Villanova. PA.

16. Murkkar, T .K. (1979). Immunogenic of a chemotropically extracted protective antigen of *Pasteurella multocida* type A (Bovin origin) against Experimental Pasteurellosis in mice .J. General Microbiology. 113:37-43.

17. Shubber, E.; Altaif, K.; AL-Khateeb, G.; Salman, M.; and Mahdi, H. (1992). Cytogenesis studies on blood lymphocytes from sheep infected with *Fasciola gigantica* and treated with AL-Bendazole.The Iraqi J.Vet. Med. 15:10-23.

18. 18-King, M.T.; Wild, K.; Gock, E.and Eckhardt, K. (1982). 5-Brd Urdu tablets with improved depot effect analysis *in vitro* of SCE in bone marrow. J. Immunology.116:668-675.

19. Baeldour, L.M. and Endom, E. (2008). Patient information: Animal bites. Up to date for patients. (Article)USA.

20. Stahel, A. B.; Richard, K.; Kuhnert, H. and Korezak, M. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* and related isolates from rabbits in Switzerland. J.Veterinary diagnostic Investigation. 21(6):793-802.

21. Mwankon, E. S.; Odugho, M.D.; Javander, L.D.; Musa, V. and Boss, S. (2009). Investigation on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in Black rats (Rattus rattus) in a commercial quail farm. African J. Clin. And Experimental Microbio. 10(1): 2-9.

22. Woolcock, J. B .and Collins, F. M. (1975). Immune mechanism in *Pasteurella multocida* infected mice. Infection and immunity.13(3): 949-957.

23. EL-Sukhon, S. N. and Abu-Kuhail, N. M. (2004). Role of an association between *Pasteurella* species and *Oestrus ovis* in Frontal Sinusitis and Rhinitis in Awassi sheep in Northern Jordan.29th World Congress of the World small Animal Veterinary Association.

24. Greewood, D.; Finch, R.; Dawey, P. and Wilcox, M. (2007). Antimicrobial chemotherapy. 5th Ed. Oxford University press .UK.

25. Seo, J.; Lee, S.; Lee, J. And Kim, T. (2010). Protective potential an attenuated *Pasteurella multocida* which expresses only the N-terminal truncated fragment of *Pasteurella multocida* toxin.Can. J.Vet. Res.74 (1):25-29.