التحري عن وجود الكلبْسيلّة *Klebsiella* SPP. في لحم الدجاج

نور سليمان [1]، د. أيمن المريري[2]، أ. د. ابتسام حمد [3].

[1] قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق – سورية

[2] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية – هيئة الطاقة الذرية – سورية

[3] قسم العلوم البيئية – كلية العلوم – جامعة دمشق – سورية

الملخص:

غالباً ما يحتوي اللحم الخام على الكائنات الحية الدقيقة التي تسبب الأمراض. ومن ضمنها الكلبْسيلّة *Klebsiella* spp. والتي يمكن أن تُسبب العديد من الحالات المرضية، ولاسيّما الالتهاب الرئوي، إنتانات المسالك البولية، و تجرثم الدم. تم جمع 55 عينة من عينات لحم الدجاج من متاجر بيع اللحوم في دمشق وريفها، ضمن أوعية معقمة، ثم تم إحصاء عدد المستعمرات بعد زرع اللحوم على أوساط مختلفة، وثم تمّ عزل الكلبْسيلّة على وسط انتقائي. إن شكل مستعمرات الكلبْسيلّة المعزولة دائرية محدبة قطرها 3–4 مم، ذات حواف مخاطية ولزجة، وتكون محاطة بمحفظة. ومن ثم تمّ تحديد هويتها من خلال التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR، والاختبارات الحيوية الكيميائية. وقد أظهرت النتائج أن حوالي 38% من العينات المدروسة تحوي جراثيم الكلبْسيلّة.

الكلمات المفتاحية: الكلبْسيلة، لحم خام، الاختبارات الحيوية الكيميائية، التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR.

المقدمة:

يعد لحم الدجاج أحد أنواع اللحوم المتوفرة في الأسواق المحلية والعالمية وعليها طلب متزايد نتيجة انخفاض ثمنه مقارنة مع بقية أنواع اللحوم فضلاً لاحتوائه على نسب مرتفعة من البروتين مع احتوائه على كميات من الفيتامينات والأملاح المعدنية مما جعله مادة غذائية أساسية في حياتنا اليومية (Wiesenfeld *et al.*, 2005). تشير إحصائيات مركز السيطرة على الأمراض (CDC) في مختلف البلدان التي يرتفع فيها معدل استهلاك اللحوم أن اللحوم كمجموعة غذائية تشكل أهم المجاميع الغذائية المسؤولة عن حالات العدوى والتسممات الغذائية، ويمكن القول أنه يعزى إلى اللحوم ما نسبته 50% من إجمالي الحالات، حيث شكلت لحوم الدجاج ما نسبته 37% ، بينما شكلت بقية أنواع اللحوم ما نسبته 13%. إن لحوم الدجاج بأنواعها من الأغذية سريعة التلف إذا ما حُفظت أو خُزنت في ظروف غير جيدة وذلك لوجود أعداد وأنواع من الأحياء الدقيقة على سطحها. إن أعداد هذه الأحياء يختلف تبعاً لعدة عوامل يأتي في مقدمتها مدى الالتزام بتطبيق الشروط الصحية أثناء عمليات الذبح والخزن والتداول. لذلك من المهم التحري عن وجود أنواع من الجراثيم المعرضة فيها، مثل: الايشريشية القولونية *E. coli* والشيغيلة *Shigella* والسالمونيلة *Salmonella* والكليبسيلّة *Klebsiella* التي هي هدف دراستنا. كان الهدف من هذه الدراسة التحري عن مستوى تلوث لحم الدجاج الخام الموجود في الأسواق المحلية بجراثيم الكليبسيلّة ولما لذلك من تأثير على الصحة العامة.

سميت الكليبسيلّة من قبل عالم الأحياء المجهري الألماني إدوين كليبس (1834-1913)، وهي جراثيم عصوية سالبة الغرام، تتراوح أبعادها من (0.6-6.0µm) x (0.1-0.3µm)، محاطة بمحفظة، تترتب بشكل مفرد، أو أزواج، أو سلاسل قصيرة، تتوافق مع التعريف العام لفصيلة الإمعائيات

Enterobacteriaceae، غير متحركة ماعدا الجنس *K. mobilis*، لا هوائية اختيارية ، تخمر اللاكتوز، موجبة اليورياز، غير منتجة لغاز H_2S، مستعمراتها مخاطية، وأحيانا تكون لزجة ملتصقة بسطح الأغار(Garrity, 2005). تُفرز الكلبسيلّة ذيفاناً داخلياً متحملاً للحرارة نسبياً، الذي يُعدّ مسؤولاً عن حالات التسمم الغذائي (Dokladny *et al.*, 2010)، كما أنها تفرز أنزيم يورياز (Urease) الذي يلعب دوراً هاماً في آفة الجهاز البولي، وبهذا تعتمد إمراضية الكلبسيلّة على النمط الجرثومي وعوامل الفوعة (Augustin *et al.*, 2009)، 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)، هناك 7 أنواع مختلفة من جراثيم الكلبسيلّة التي تبدي تشابهاً في الدنا (Brooks *et al.*, 2004). ومن أكثر هذه الأنواع أهميةً من الناحية الطبية هي الكلبسيلّة الرئوية *K. pneumoniae*، حيث تُعد من أهم الممرضات سريرياً من بين الإمعائيات، وبدايةً عُرِفت 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 الكلبسيلّة المُعجلة للولادة *K. oxytoca* التي تُشبه الرئوية بكونها تُحدث 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).

2- مواد البحث و طرائقه:

2-1 المواد:

أوساط الاستنبات والزرع:

ماء الببتون الموقي Buffered Pepton Water (BPW)، وسط إيوزين أزرق المتيلين Eosin Methylen blue Agar (EMB Agar).

مواد الاختبارات الحيوية الكيميائية:

ماء أوكسجيني 3%، ستريبات أوكسيداز BBL™DrySlide™ (BD,USA)، KOH، ألفا نفتول، أحمر الميتيل، وسط MR-VP، كاشف الأندول Indole test reagent (Ehrlich Kovacs). وسط الكبريت-الأندول-الحركة (SIM) Sulfur reduction-Indole production- Motility، 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)200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM KCl,100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1mg/ml BSA, 1% Triton، $MgSO_4$، نكليوتيدات (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)، أنزيم DNA بوليميراز، مرنسات نوعية الجدول رقم [1]، هلامة الأغاروز 1.5% (W/V)، الوقاء 1X TAE المحضر من الوقاء 50X TAE (0.4 M Tris-Base, 10 mM EDTA pH 8.0, 57.1 ml Glacial Acetic Acid).

مادة الحفظ: غليسيرول 50%.

2-2 الطرائق:

2-2- 1 جمع العينات Sample collection:

بلغ عدد العينات 55 عينة، من لحم الدجاج. وقد جُمِعَت من مناطق مختلفة من دمشق وريفها في الفترة الواقعة مابين 2011/10/1 و 2012/2/1.

2-2-3 معالجة العينات Sample processing:

بعد سحق 0.5 غ من العينة المدروسة:

تم الإغناء الأولي غير الاصطفائي في وسط ماء البيبتون الموقي Buffered Water Peptone (BPW) في الدرجة 37°م لمدة 24 ساعة.

- تم الإغناء الاصطفائي في وسط EMB 37°م لمدة 24 ساعة.
- تم انتقاء المستعمرات المخاطية ذات الهالة الوردية، ذات المحفظة لإجراء:
- التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) باستخدام مرئسات نوعية.
- اختبارات حيوية كيميائية (الأوكسيداز، اليورياز، غاز كبريت الهيدروجين H_2S، تخمر اللاكتوز، الأندول).

2-2-4 مراحل العمل:

- التعداد العام الكلي:

قبل التحري عن وجود الكلبسيلّة في عينات اللحوم، نقوم بإجراء التعداد الكلي للإمعائيات وللكلبسيلّة على وسط EMB.

عزل الكلبسيلّة من عينات اللحوم:

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

1- مرحلة الإغناء الأولي غير الاصطفائي: تم سحق 0.5 غ من العينة وتنميتها في 4.5 مل من ماء البيتون الموقي بالدرجة 37°م لمدة 24 ساعة.

2- مرحلة الإغناء الاصطفائي: حيث يؤخذ 0.1 µl من الوسط السابق ويتم زرعها على وسط (EMB)، ثم تحضن بالدرجة 37°م لمدة 24 ساعة. وللحصول على هذه الجراثيم نقيةً تؤخذ مستعمرة مفردة وتزرع على وسط (EMB) وتكرر هذه العملية حتى نحصل على طبق يحوي مستعمرات نموذجية فقط.

3- توصيف المستعمرات Colony characteristics:

تبدو مستعمرات الكلبسيلّة النموذجية على وسط (EMB): كبيرة قطرها بين (3- 4 مم)، محدبة الشكل، مخاطية، غامقة بنفسجية ذات هالة وردية. تُنتقى هذه المستعمرات من أجل تلويثها.

4- الفحص المجهري:

- **صبغة غرام Gram Staining:**

يُحضر الغشاء الجرثومي ثم يُلون بواسطة طريقة غرام.

تلوين المحفظة Capsular staining:

1. يُحضر الغشاء الجرثومي ويثبت بالطريقة المعتادة (استخدام الكحول مع تجنب استخدام الماء) -لأن المحفظة تذوب بالماء- .

يُغمر الغشاء بمحلول 30% من صبغة الفوكسين القاعدية، وتُمرر الصفيحة فوق اللهب حتى يبدأ الملون بالتبخر.

2. يُغسل الغشاء بمحلول كبريتات النحاس 20%.
3. يُغمر الغشاء في محلول أزرق المتيلين 1%، ثم يُغسل بالماء.
4. تُجفف الصفيحة وتُفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الغاطسة.

2-2-5 التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR:

أُجري تفاعل الـ PCR على المستعمرات النموذجية النامية على وسط (EMB) بعد عزل الجينوم الجرثومي لها وفق مايلي:

1. نُمّيت الجراثيم في ماء البيتون الموقي ثم ثُقّلت لمدة 5 دقائق بسرعة 4000 rpm وفي الدرجة 4+ مْ وتمّ التخلص من السائل الطافي.
2. حُلّ الراسب في 567 µl من الموقي TE بوساطة الميكروبيبيت، ثم أُضيف له 30 µl من الـ 10% SDS و 3 µl من الـ 20 mg/ml proteinase K. مُزج المجموع وحُضن لمدة ساعة بالدرجة 37°م مع الرج بسرعة 1000 rpm.
3. أُضيف 100 µl من الـ 5M NaCl ومُزج جيداً ثم أُضيف 80 µl من محلول الـ CTAB/NaCl. مُزج المجموع وحُضن لمدة 10 دقائق بالدرجة 65°م مع الرج بسرعة 1000 rpm.
4. أُضيف 780 µl من الـ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ومُزج ثم ثُقّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ونُقل الطافي إلى أنبوب جديد مع تجنب سحب أي جزء من الطبقة الوسطى البروتينية.
5. أُضيف للطافي حجم مماثل من الـ phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ومُزج ثم ثُقّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ونُقل الطافي بعدها إلى أنبوب جديد مع تجنب سحب أي جزء من الطبقة الوسطى البروتينية.
6. أُضيف إلى الطافي النهائي كمية من الإيزوبروبانول تعادل 0.6 مل من حجمه ومُزج بلطف بقلب الأنبوب 4-6 مرات حتى يترسب الدنا DNA

حيث يظهر بشكل خيوط سابحة في السائل ثم ثُفّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ثم تمّ التخلص من الإيزوبروبانول بلطف لتجنب رمي الدنا DNA.

7. غُسِل الراسب بإضافة 1 مل من الإيثانول 70% ثم ثُفّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm وتمّ رمي الطافي وجُفّف الراسب بوساطة جهاز الـ Concentrator (شركة Eppendorf).
8. تمّ حل الراسب الناتج في 25 µl من الموقي TE ثم قيس تركيزه بوساطة جهاز المطيافية (Nano Drop) ومُدّد للوصول إلى تركيز يساوي 100 ng/µl.

أُجري التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR على الدنا DNA المعزول من باستخدام البادئات النوعية الموضحة في الجدول رقم [1].

الجدول رقم [1]: البادئات النوعية المستخدمة لجنس الكلبسيلة.

	Sequence	Size
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 [2]: المواد المستخدمة في تفاعل الـ PCR

Materials	Final conc. µl	25 µl PCR
Genomic DNA	200-500 ng	5 µl DNA (100 ng)
Primer 1 -10 µM	20 µM	1 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 [3]: شروط تفاعل الـ PCR

		Temperature	Time
	Initial denaturation	95°C	5 mins
35 Cycle	**Denaturation**	95°C	30 sec
	Annealing	60°C	30 sec
	Extension	72°C	1 min
	Final Extension	72°C	10 mins

ومن ثم تمّ الكشف عن نواتج الـ PCR باستخدام هلامة الأغاروز1.5% (W/V) المحضرة في الوقاء 1X TAE والترحيل على فولطية 85 V لمدة نصف ساعة. تمّ الاحتفاظ بالمستعمرات المؤكدة في الـ BPW مع الغليسيرول 50%، ومن ثم حُفظت بالدرجة -80°م من أجل الدراسات اللاحقة.

2-2-6 الخصائص الحيوية الكيميائية Biochemica Identification:

أُجريت على العزلات المؤكدة عن طريق تفاعل الـ PCR بأنها كليبسيلّة، الاختبارات الحيوية الكيميائية التالية:

* **اختبار الحركة:** أُجري باستعمال الأغار نصف الصلب (وهو ماء البيتون الموقي المضاف إليه كمية من الأغار) 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:** أجري باستعمال سترييات (BD,USA) BBL™DrySlide™ حيث يُوضع عليها جزء من المستعمرة فإذا تغير اللون إلى الأزرق البنفسجي يُعتبر التفاعل إيجابياً، في حين يُعتبر سلبياً إذا لم يتغير اللون.
* **اختبار تخمير اللاكتوز:** تمّ باستعمال أطباق ماكونكي آغار الحاوي على سكر اللاكتوز، إذ تقوم الجراثيم المخمرة للاكتوز بإنتاج مركبات حمضية تخفض الـ pH إلى أقل من 6.8 مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه على مشعر لوني هو الأحمر السعتدل neutral red.
* **اختبار استقلاب السترات:** أجري 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 الـ pH مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه على مشعر لوني هو أزرق بروموتيمول.
* **اختبار حلمهة البولة Urease:** أجري باستعمال أنابيب تحوي على وسط البوريا 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 إنتاج غاز كبريت الهيدروجين H_2S:** أجري باستعمال أنابيب تحوي على وسط SIM، ثم حُضِنَ المُستَنبَت في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة، في حال تشكل لون أسود ضمن الوسط فهذا يدل على أن الجراثيم قد أنتجت غاز كبريت الهيدروجين H_2S.
* **اختبار إنتاج الأندول Indole Production Test:** أجري باستعمال أنابيب تحوي على وسط SIM ، ثم حُضِنَ المُستَنبَت في درجة حرارة