تأثير مركبات السالسيلات في بكتريا *KIebsiella pneumoniae pneumoniae* المعزولة من اصابات سريرية مختلفة

حواء محمد ناصرالمُلا، اليس كريكور ملكونيان، سهام صبري شوكت

مركز ابحاث ابن سينا–الشركة العامة لصناعة الادوية. سامراء–العراق

الاستلام : 2004 /3/13 القبول : 2005/3/23

الملخص

درس تأثير مركبات السالسيلات في بكتريا *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* بأستعمال تراكيز مختلفة من حامض الأستيل سالسيلك(ACSA) وحامض السالسيلك (SA) وسالسيلات الصوديوم(SS).أظهرت النتائج أنه بزيادة تراكيز مركبات السالسيلات يزداد أختزال تصنيع متعدد سكريد المحفظه، وتبين من الفحص بالمجهر الألكتروني النافذ أن معدل سمك طبقة متعدد سكريد المحفظة للبكتريا غير المعاملة بمركبات السالسيلات كان 245 نانوميترا ، في حين أصبح معدل سمك طبقة متعدد سكريد المحفظة للبكتريا المعاملة بتركيز 300 مايكروغرام /مليلتر بحامض الأستيل سالسيلك وحامض السالسليك وسالسيلات الصوديوم63.5 نانوميتر و54.3 و50 نانوميتر لتكون النسب المئوية للأختزال 74.8% و77.83% و 79.59% على التوالي.

أظهرت نتائج تأثير مركبات السالسيلات في الحساسية للمضادات الحيوية الأموكسيكلاف والسيفوتاكسيم والاميكاسين والسبروفلوكساسين والدوكسيسايكلين عدم تأثر فعالية المضادين الاموكسيكلاف والسيفوتاكسيم ببقاء قيم التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) ثابتة ،في حين زادت فعالية المضاد الاميكاسين بأنخفاض قيم الـ MIC مرتين الى اربعة مرات الأانه قلت فعالية المضاد السبروفلوكساسين والدوكسيسايكلين بازدياد قيم الـMIC مرتين الى أربعة مرات.

تم أختبار تأثير مركبات السالسيلات في التصاق بكتريا *K. pneumoniae pneumoniae* على الخلايا الطلائيه للأنسان وأظهرت النتائج أن هناك أنخفاض يسير في عدد الخلايا الملتصقة لعدد من العزلات وبفروق غير معنوية بين البكتريا المعاملة وغير المعاملة ولجميع المركبات . ألاأن الفروق كانت معنوية ($P<0.01$) بين التصاق العزلات المقاومة والحساسة للمضادات الحيوية والتي كانت قابلية التصاقها أضعف من العزلات المقاومة.

تم أختبار تأثير مركبات السالسيلات في التهام بكتريا *K. pneumoniae pneumoniae* من قبل كريات الدم البيض المتعدد أشكال النوى(PMN s) وأظهرت النتائج زيادة كبيرة في معامل البلعمة والنسبة المئوية للبلعمة وبفروق معنوية ($P<0.01$)بين البكتريا غير المعاملة والبكتريا المعاملة بتركيز 300 مايكروغرام /مليلتر لكل من حامض الأستيل وحامض السالسيلك الصوديوم.

The Effect of Salicylate Compounds on K. pneumoniae pneumoniae Isolated from Different Clinical Infections

Abstract

The effect of Salicylate compounds against *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* was studied by using different concentrations of Acetylsalicylic acid (ACSA), Salicylic acid (SA) and Sodium salicylate (SS). Reduction of capsular polysaccharide (CPS) production increased with the increment of Salicylate compounds concentrations.

Transmission electron microscopy study showed that the average thickness of CPS for untreated bacteria with Salicylate compounds was 245 nm while 63.5 nm, 54.3 nm and 50 nm for the bacteria treated with 300 µg/ml of ACSA, SA and SS respectively, with reduction percentages of CPS 74.08%, 77.83% and 79.59% respectively. The results of testing the effect of Salicylate compounds on antibiotics sensitivity (Amoxiclave, Cefotaxime, Amikacin ,Ciprofloxacin and Doxycyclin) revealed that the activity of Amoxiclave and Cefotaxime were not affected when MIC values were not changed. However, Amikacin activity increased when MIC values decreased to 2 - 4 folds, while Ciprofloxacin and Doxycyclin activity decreased when MIC values increased to 2 – 4 folds. The results regarding the effect of Salicylate compounds on the adhesion of *K. pneumoniae pneumoniae* on human epithelial cells showed mild decrease in the number of adhered cells in some of the isolates, with non-significant differences between the treated and untreated bacteria for all compounds. Yet, the differences were significant ($P<0.01$) between the adherence of resistant and sensitive isolates to antibiotics, hence the adherence ability of the sensitive isolates was weaker than the resistant ones.

The effect of Salicylate compounds on phagocytic activity of the polymorphnuclear leukocytes toward *K. pneumoniae pneumoniae* was demonstrated by the increase in the phagocytic index and percent phagocytosis. The differences were significant ($P<0.01$) between the untreated and treated bacteria with 300 µg/ml of ACSA, SA and SS .

المقدمة

تمتاز بكتريا *Klebsiella* بامتلاكها عوامل ضراوة تمكنها من الأختزال والتضاعف داخل جسم المضيف وأهم هذه العوامل هي المحفظة التي تمكنها من الأفلات من البلعمة ومقاومتها لعوامل المصل القاتل للبكتريا (Serum resistant) مما يجعلها أكثر أنتشارا وأشد ضراوة، ان بكتريا *Klebsiella* الطافرة الفاقدة للمحفظة تكون اقل ضراوة للفئران نتيجة لزيادة البلعمةوالقتل [1] ،كما انها تنتج كميات كبيرة من متعدد السكريد المحفظي مما يساعد ها لتكوين غشاء حيوي (Biofilm) والذي يتداخل مع اختراق ودخول المضادات الحيوية [2]. وفي الاوان الاخير ارتفع معدل الوفيات الناتجة عن اصابات الـ*Klebsiella* مما يدل على ان العلاج الحالي غير مناسب لهذه البكتريا نظرا لزيادة مقاومتها للمضادات الحيوية المشفرة من قبل البلازميدات [3] , [4] مما دفع الحاجة الى ايجاد وسائل وقائية وعلاجية بديلة.

ان العوامل العلاجية التي تختزل انتاج المحفظةمثل السالسيلات والبزموث تمنح مساعدة فعالة للعلاج الموجود ضد البكتريا المحاطة بمحفظة [5],[6],[7],[8],[9] .ونظرا لاهمية بكتريا *Klebsiella* من حيث انتشارها وقدرتها العالية لاستيطان السطوح الطلائية وسطوح العدد الطبية ومقاومتها للمضادات الحيوية المختلفة أرتأينا اجراء هذه الدراسة التي تهدف الى دراسة تاثير مركبات السالسيلات في هذه البكتريا من حيث :أختزالها لمتعدد سكريد المحفظة،و حساسيتها للمضادات الحيوية ،والتصاقها بالخلايا الطلائية،والتهامها من قبل الخلايا البلعمية.

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية والوسط المستعمل: اختيرت 4 عزلات تعود لتحت النوع*K. pneumoniae pneumoniae* لكونها الاكثر شيوعاً بين الانواع التابعة لجنس *Klebsiella* التي تم الحصول عليها من دراستنا السابقة (قيد النشر)،ونميت العزلات (وهي K2من حالات تجرثم الدم و K10 من اخماج المسالك التنفسية و K25 من اخماج الحروق و K54 من اخماج المسالك البولية) في وسط الحد الادنى M9 المدعم [2],[10].

تاثير مركبات السالسيلات في اختزال متعدد سكريد المحفظة: حضرت تراكيز مختلفة من حامض الاستيل سالسيك وحامض

السالسيلك وسالسيلات الصوديوم بتركيز نهائي 50، 100، 200، 300، 400، 800، 1600، 3600 مايكروغرام/ مليلتر وتركيز نهائي للخلايا البكتيريه 10^5 خليه مكونه لمستعمرة / مليلتر، حضنت الانابيب بدرجة 37 م° لمدة 18 ساعه، تم حساب عدد الخلايا البكتيريه الحيه لكل مليلتر من التركيز بعمل سلسله من التخافيف العشريه وزرعها على وسط الاكار المغذي، وقيست الامتصاصية على طول موجي 600 نانوميتر ثم رسمت العلاقة بين التراكيز والامتصاصيه ولوغاريتم عدد الخلايا البكتيريه الحيه [5].

الفحص بالمجهر الالكتروني النافذ للتحري عن اختزال المحفظة:

زرعت البكتريا في وسط الحد الادنى M9 المدعم باضافة مركبات السالسيلات وبتركيز نهائي 300 مايكرو غرام/ مليلتر مع سيطرة لا تحتوي مركبات السالسيلات وحضنت بدرجة 37 م° بحاضنه هزازاة باهتزاز 70 دورة بالدقيقة لمدة 18 ساعة، تم حصاد الخلايا البكتيريه بترسيبها بسرعه 3000دورة بالدقيقة ولمدة (30) دقيقة.جمع الراسب في انبوب معقم لتحضير مقاطع باعتماد طريقة الطمر [11].

تحديد التراكيز المثبطه الدنيا (MIC):

اجري الاختبار حسب طريقة التخافيف المتسلسلة [12] للمضادات المنتخبه (اختير مضاد حيوي واحد لكل مجموعه من المضادات الاموكسيكلاف من مجموعه البنسيلينات والسيفوتاكسيم من مجموعه السيفالوسبورينات والاميكاسين من مجموعه الامينوكلايكوسيدات والسبروفلوكساسين من مجموعه الكينولونات والدوكسيسايكلين من مجموعه التتراسيكلينات) لوحدها وللمضادات الحيويه بوجود مركب السالسيلات بتركيز نهائي 50، 100 مايكروغرام/ مليلتر.

اختبار التصاق البكتريا على الخلايا الطلائية للانسان:

تم خلط 0.5مليلتر من عالق البكتريا (10^8 خليه مكونه لمستعمرة/ مليلتر) مع 0.5 مليلتر من عالق الخلايا الطلائية (معزولة من ادرار انثى سليمه من التهاب المسالك البوليه وضبط العدد الى 10^6 خليه طلائيه/ مليلتر) حضنت الانابيب بدرجة 37م° لمدة 60 دقيقه في حاضنه هزازة 70 دورة بالدقيقة وصبغت بملون غرام وفحصت بالمجهر الضوئي على قوة تكبير X100 وسجلت النتائج بحساب معدل الخلايا البكتيريه الملتصقة بـ 50 خليه طلائيه [13].

اختبار البلعمه من قبل خلايا الدم البيض المتعددة اشكال النوى (PMNs): اضيفت 160 مايكرولتراً من عالق خلايا الدم البيض (المحضرة من دم اصحاء بالغين باعتماد الطريقة الموصوفة كريشام وجماعته [14] وضبط العدد الى $2x10^6$) و 160 مايكرولتراً من العالق البكتيري ($2x10^7$ خليه مكونه لمستعمرة/ مليلتر) و 80 مايكرولترا من المصل الطبيعي للارنب (Normal rabbit serum) (مركز الرازي). ثم حضن الخليط بدرجة 37م° بحاضنه هزازة 60 دورة بالدقيقة لمده 30 دقيقية وصبغت بصبغة لشمن وفحص بالمجهر الضوئي على قوة تكبير X100 وتم حساب معامل البلعمه (Phagocytic Index) والنسبه المؤيه للبلعمه (Percent phagocytosis) كماياتي [8],[9]:

- **معامل البلعمه = عدد البكتريا المرتبطه مع 100 خليه بلعميه PMN.**
- **النسبه المؤية للبلعمه = عدد الخلايا البلعميه الملتهمه للبكتريا / عدد الخلايا البلعميه الكلي X 100.**

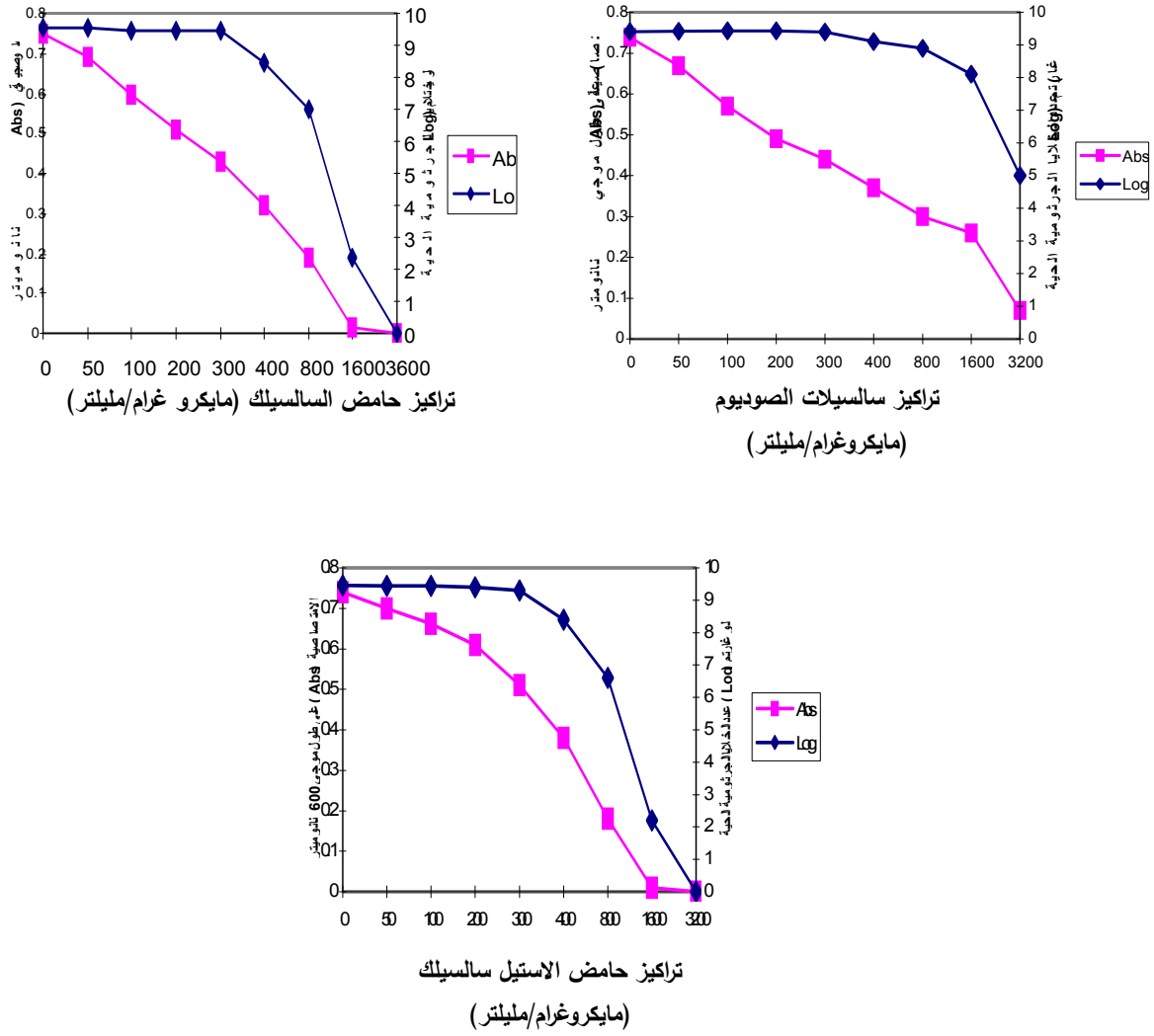
النتائج والمناقشه:

1. تأثير مركبات السالسيلات في المحفظة

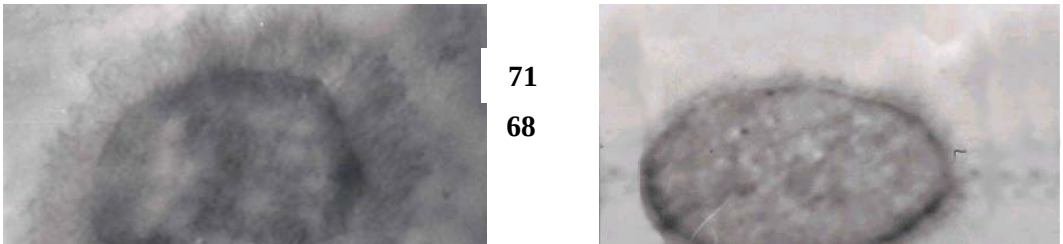
دُرس تأثير التراكيز المختلفة من حامض الاستيل سالسيلك وحامض السالسيلك وسالسيلات الصوديوم في معدل عكورة المزروع ولوغارتم العدد الحي للخلايا البكتيرية،اذ لم يلاحظ أي تأثير مثبط للنمو في تركيز 300 مايكروغرام / مليلتر او اقل لهذه المركبات ببقاء عدد الخلايا البكتيرية الحية ثابتا وان الانخفاض بعكورة الوسط ناتج من تثبيط تصنيع متعدد سكريد المحفظة الحر والمرتبط(الشكل1)، والتأثير القاتل للبكتريا بمركبات السالسيلات يكون ثانوياً الى ان يؤثر في تقليص انتاج متعدد سكريد المحفظة. واظهرت نتائج فحص المقاطع الرقيقة بالمجهر الالكتروني النافذ ان سمك طبقة متعدد سكريد المحفظة المحيطة بالخلية البكتيرية بدون معاملة بمركبات السالسيلات كان 245 نانوميتر(الشكل 2) في حين كان معدل سمك طبقة متعدد سكريد المحفظة 63.5 نانوميتر للخلايا البكتيرية المعاملة بحامض الاستيل سالسيلك و54.3 نانوميتر للخلايا البكتيرية المعاملة بحامض السالسيلك و50 نانوميتر للخلايا البكتيرية المعاملة بسالسيلات الصوديوم (300 مايكروغرام / مليلتر لكل

مركب) لتكون نسبة الاختزال 74.08 % و 77.83 % و 79.59 % على التوالي، تتفق هذه النتائج مع دراسات اخرى [5],[8] اظهرت بأن مركبات السالسيلات وضمن تراكيزها العلاجية (350 مايكروغرام / مليلتر) تختزل متعدد سكريد المحفظة لبكتريا *Klebsiella* الى حوالي 80 % . من الآليات التي تفسر دور مركبات السالسيلات في اختزال متعدد سكريد المحفظة هو ان تصنيع متعدد سكريد المحفظة يتطلب مصدر للطاقة وان مركبات السالسيلات تقوم بفصل الفسفرة التأكسدية الذي يختزل طاقة الادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP)، فيكون تصنيع متعدد سكريد المحفظة حساساً للكبح عندما تقل مصادر الطاقة [15]. كما ان السالسيلات يمكن ان تدمص (Adsorb) الى الطبقة الثنائية الدهون للغشاء مما يزيد من قوة الشحنة السالبة للغشاء حيث تقع انزيمات التصنيع الحيوي لمتعدد سكريد المحفظة وهذا بدوره يقوم بسحب الايونات الموجبة المطلوبة لتصنيعها [5].

ان اختزال حجم المحفظة يعني نقص في شدة ضراوة هذه البكتريا [16],[17] وقد لوحظ أن قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) للبكتريا ذات المحفظة الكبيرة أقل بحوالي 10^5 خلية بكتيرية من البكتريا ذات المحفظة الصغيرة [17].



الشكل (1): تأثير مركبات السالسيلات في العكورة والنمو لبكتريا *K.pneumoniae pneumoniae*



البكتريا معاملة بمركبات السالسيلات البكتريا غير معاملة بمركبات السالسيلات

الشكل (2): اختزال متعدد سكريد المحفظة لبكتريا *K.pneumoniae pneumoniae*

2. تأثير مركبات السالسيلات في حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

بعد تحديد قيم التراكيز المثبطة الدنيا للمضادات للعزلات المنتخبة (K54 ,K25, K10, K2) أضيف حامض الاستيل سالسيلك وحامض السالسيلك وسالسيلات الصوديوم وبتركيز نهائي 50 و 100 مايكروغرام /مليلتر، اظهرت النتائج زيادة فعالية المضاد الحيوي الاميكاسين وذلك بانخفاض قيم التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) مرتين إلى أربعة مرات بإضافة مركبات السالسيلات جدول (1). وفيما يتعلق بالعزلة K25 التي أظهرت مقاومتها لجميع المضادات الحيوية المستعملة مع حساسية متوسطة للمضاد الاميكاسين، إلا أن قيمة الـ MIC لها كانت 32 مايكروغرام/مليلتر وهي بذلك تكون مقاومة لهذا المضاد أيضا حسب قيم الـ MIC القياسية المسجلة في المصادر العالمية [18], [19] وعند إضافة حامض الاستيل سالسيلك وحامض السالسيلك بتركيز 50 و 100 مايكروغرام/مليلتر للوسط الحاو مضاد الاميكاسين، انخفضت قيمة الـ MIC للمضاد الاميكاسين الى 8 مايكروغرام/مليلتر. وعند اضافة سالسيلات الصوديوم بتركيز 50 مايكروغرام/مليلتر انخفضت قيمة الـ MIC إلى 16 مايكروغرام/مليلتر وبتركيز 100 مايكروغرام/مليلتر انخفضت قيمة الـ MIC إلى 8 مايكروغرام/مليلتر وهذا يعني أنها أصبحت حساسة لهذا المضاد.أما العزلة K54 التي كانت قيمة الـ MIC لها 16 مايكروغرام/مليلتر وهي بذلك متوسطة الحساسية لمضاد الاميكاسين وهو المضاد الوحيد الذي اظهر فعالية إزاء هذه العزلة، وعند إضافة حامض الاستيل سالسيلك وسالسيلات الصوديوم بتركيز 50 و100 مايكروغرام/مليلتر وحامض السالسيلك بتركيز 50 مايكروغرام/ مليلتر انخفضت قيمة الـ MIC مرتين (اصبحت قيمتها 8 مايكروغرام/مليلتر) وعند إضافة حامض السالسيلك بتركيز 100 مايكروغرام/مليلتر انخفضت قيمة الـ MIC أربعة مرات (قيمتها 4 مايكروغرام/مليلتر) أي أصبحت حساسة لهذا المضاد . تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسات أخرى [6],[20],[21] أشارت إلى زيادة فعالية الامينوكلايكوسيدات من 2-4 مرات لبكتريا *K.pneumoniae* ، كما لوحظ وجود تآزر بين الامينوكلايكوساید ومركبات السالسيلات في بكتريا *E.coli* إذ تزداد فعالية الكانامايسين وبقية الامينوكلايكوسيدات باضافة مركبات السالسيلات [22]. من الآليات المحتملة لزيادة فعالية المضاد الاميكاسين باضافة مركبات السالسيلات هي:

ا-السالسيلات لها تأثير مماثل لمادة الـ EDTA مع الامينوكلايكوساید في بكتريا الـ *Pseudomonas a* من خلال عملها كعامل كلابي لسحب الأيونات الموجبة ثنائية التكافؤ (Chelate divalent cations) المضادة لنشاط الامينوكلايكوساید [23].

ب-السالسيلات تؤثر من خلال نشاط له علاقة بالسلسلة التنفسية (Respiratory chain related activity) وذي صلة بنظام نقل الإلكترونات وضروري كناقل للأيونات الموجبةِ(Anionic)للامينوكلايكوساید [24].

ج-تركيب السالسيلات قد يكون له تأثير يسهم في امتصاص الامينوكلايكوساید أو قابلية تأثر على الموقع الهدف مثل الرايبوسومات [22] .

د-ان مضادات الامينوكلايكوسيدات ذات الشحنة الموجبة لا تتطلب قنوات متخصصة لدخول المضاد وان السالسيلات تعمل على زيادة نفاذية الجزيئات ذات الشحنة الموجبة [21] .

اظهرت نتائج الدراسة عدم تأثر فعالية المضاد الاموكسيكلاف والسيفوتاكسيم بإضافة أي من مركبات السالسيلات, ولا توجد دراسة حول تأثير مركبات السالسيلات في هذه المضادات لبكتريا *Klebsiella*, إلا أنه لوحظ أن نفاذية الغشاء الخارجي للسيفالوسبورينات تقل إلى خمس مرات مقارنة بالوسط الخالي من السالسيلات وانه يزيد مقاومة بكتريا الـ *E. coli* تجاه السيفالوسبورينات [25].

اما المضاد السبروفلوكساسين فقد زادت قيم الـ MIC مرتين إلى أربعة مرات؛ إذ تباينت العزلات في تأثرها بإضافة مركبات السالسيلات جدول (2) ، فالعزلتان K2 و K54 زادت قيم الـ MIC لها مرتين أما العزلتان K 10 و K 25 فقد زادت قيم الـ MIC مرتين بإضافة مركبات السالسيلات بتركيز 50 مايكروغرام/مليلتر وزادت قيم الـMIC أربعة مرات بإضافة مركبات السالسيلات بتركيز 100 مايكروغرام/مليلتر .

أما المضاد الدوكسيسايكلين فقد زادت قيم الـ MIC لها مرتين إلى أربعة مرات جدول(3) . وهذه النتائج مقاربة لنتائج دومينيكو [20] كما لوحظ نفس التأثير في بكتريا *E.coli* [26] . وسبب ذلك هو ان السالسيلات تثبط تكوين قنوات البورين للغشاء الخارجي لبكتريا *Klebsiella* [27] وهذا ما يثبط فعالية هذه المضادات لانها تنتقل عبر قنوات البورين خلال الغشاء الخارجي بوساطة بروتينات الغشاء الخارجي Omp F.

الجدول (1): تأثير مركبات السالسيلات في حساسية *K.pneumoniae pneumoniae* للمضاد الاميكاسين

العزلات المنتخبة	قيم التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) للمضاد الاميكاسين (مايكروغرام/مليلتر)						
	السيطرة	إضافة مركبات السالسيلات (مايكروغرام/مليلتر)					
		حامض الاستيل سالسيلك		حامض السالسيلك		سالسيلات الصوديوم	
		50	100	50	100	50	100
K2	1	0.5	0.5	1	0.5	1	0.5
K10	1	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25
K25	32	8	8	8	8	16	8
K54	16	8	8	8	4	8	8

السيطرة = مضاد الاميكاسين لوحده

الجدول(2): تأثير مركبات السالسيلات في حساسية جراثيم *K.pneumoniae pneumoniae* للمضاد السبروفلوكساسين

العزلات المنتخبة	قيم التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) للمضاد السبروفلوكساسين (مايكروغرام/مليلتر)						
	السيطرة	إضافة مركبات السالسيلات (مايكروغرام/مليلتر)					
		حامض الاستيل سالسيلك		حامض السالسيلك		سالسيلات الصوديوم	
		50	100	50	100	50	100
K2	0.0312	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
K10	0.062	0.125	0.5	0.125	0.5	0.125	0.5
K25	64	64	128	64	128	64	128
K54	16	32	32	32	32	32	32

السيطرة = مضاد السبروفلوكساسين لوحده

الجدول(3): تأثير مركبات السالسيلات في حساسية *K.pneumoniae pneumoniae* للمضاد الدوكسيسايكلين

العزلات المنتخبة	قيم التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) للمضـ 73 يسايكلين(مايكروغرام/مليلتر)						
	السيطرة	إضافة مركبات السالسيلات (مايكروغرام/مليلتر)					
		حامض الاستيل سالسيلك		حامض السالسيلك		سالسيلات الصوديوم	
		50	100	50	100	50	100
K2	4	8	16	8	16	8	16

K10	1	4	4	4	4	4	4
K25	128	512	512	256	512	256	512
K54	256	512	512	512	512	512	512

السيطرة = مضاد الدوكسيسايكلين لوحده.

3. تأثير مركبات السالسيلات في التصاق بكتريا *K. pneumoniae pneumoniae* على الخلايا الطلائية للإنسان

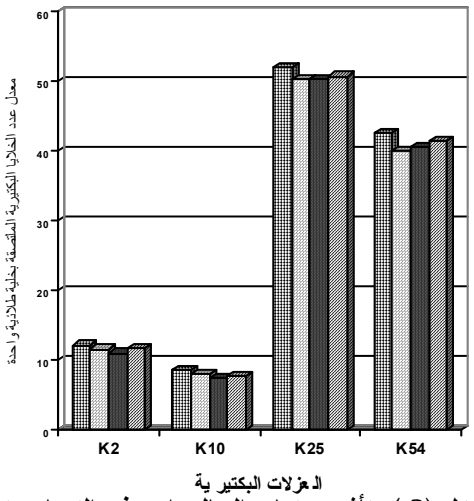
دُرس التصاق البكتريا على الخلايا الطلائية للانسان واظهرت نتائج الدراسة وجود اختلافات في قابلية العزلات قيد الدراسة على الالتصاق اذ اظهرت العزلتان K2 و K10 الحساسة لاكبر عدد من المضادات الحيوية قابلية التصاق اضعف بشكل واضح من العزلتين K25 و K54 المقاومة لاكبر عدد من المضادات اذ كانت معدلات الخلايا البكتيرية الملتصقة بخلية طلائية واحدة 12.1 و 8.57 و 52 و 42.58 على التوالي. واظهر تحليل النتائج احصائياً وفق طريقة تحليل التباين (ANOVA) وباستعمال طريقة الفرق المعنوي الاصغر (L.s.d) وجود فروق معنوية بمستوى $p<0.01$ بين التصاق العزلة K2 على الخلايا الطلائية والتصاق العزلتين K25 و K54 وكذلك فيما يتعلق بالعزلة K10 والعزلتين K25 و K54 وهذه النتيجة تتفق مع دراسات اخرى [28],[29] وجدوا فيها ان بلازميد المقاومة يشفر لبروتين الالتصاق غير الهدبي CF 29K، وان المورث المشفر لـ CF29K والمورث المشفر للمقاومة يقعان على قطعة واحدة واقعة على بلازميد المقاومة الاقتراني ذي الوزن الجزيئي 185 كيلو قاعدة واكتشفت اهداب التصاق جديدة KPF28 توجد في اغلب سلالات *Klebsiella* المنتجة لانزيمات البيتالاكتماز واسعة الطيف [29].

ادت معاملة العزلات K54, K25, K10, K2 بمر 74 السالسيلات وبتركيز نهائي 300 مايكروغرام / مليلتر الى حدوث انخفاض يسير في معدلات عدد الخلايا البكتيرية

الملتصقة لكل خلية طلائية اذ اصبحت المعدلات 11.53 و 8.71 و 50.28 و 40.07 بعد معاملتها بحامض الاستيل سالسيلك ، واصبحت المعدلات 10.95 و 7.42 و 50.35 و 44.6 بعد معاملتها بحامض السالسيلك ، اصبحت المعدلات 11.64 و 7.61 و 51.71 و 41.5 بعد معاملتها بسالسيلات الصوديوم، واظهرت نتائج التحليل الاحصائي باستعمال اختبار t-test للمقارنات الزوجية عدم وجود فروق معنوية بين السيطرة والمعاملة بمركبات السالسيلات(الشكل3)، وان الاختزال الكبير في حجم المحفظة لا يؤثر في الالتصاق. وهذا يتفق مع وركر [30] الذي لاحظ أن الالتصاق لا يعتمد على وجود المحفظة, في حين لوحظ [31],[32] أن التصاق بكتريا *Klebsiella* المحاطة بمحفظة يكون اقل من التصاق المتغايرات غير المحاطة بمحفظة.

النتائج المسجلة تمثل معدل عدد الخلايا البكتيريه الملتصقة بخلية طلائية واحدة (معدل لـ 50 خلية طلائية) (معدل لثلاثة تجارب)

ان النتائج التي اظهرت انخفاضا يسيراً في عدد الخلايا الملتصقة قد يفسر أن للسالسيلات تاثيراً على مستضدات عوامل الاستيطان او عوامل الالتصاق الاخرى، ولا توجد دراسة سابقة حول تاثير مركبات السالسيلات في التصاق بكتريا *Klebsiella* على الخلايا الطلائية، الا ان هناك دراسات اشارت الى أن السالسيلات تغلق التعبير لمستضدات عوامل الاستيطان لبكتريا *E.coli* [33],[34] .و أشار فاربر و ولف [35] الى دور حامض السالسيلك في تقليل التصاق البكتريا السالبة لملون غرام بضمنها بكتريا *Klebsiella* على القثاطر الطبية لاكثر من 95% مما يقلل حدوث الاصابات الناجمة عن استعمال القثاطر وان سالسيلات الصوديوم اظهرت فائدة في تقليل الالتصاق البكتيري على العدسات اللاصقة والبوليمرات الطبية [36],[37].



الشكل (3): تأثير مركبات السالسيلات في التصاق بكتريا

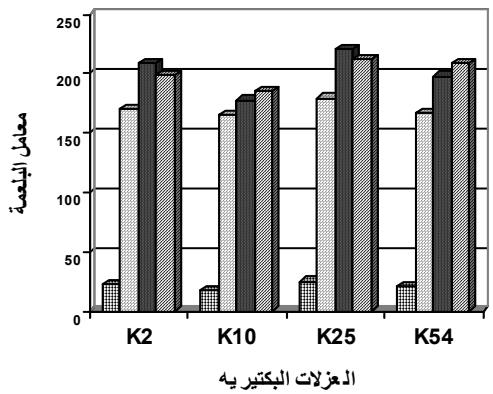
على الخلايا الطلائية *K. pneumoniae pneumoniae* للإنسان.

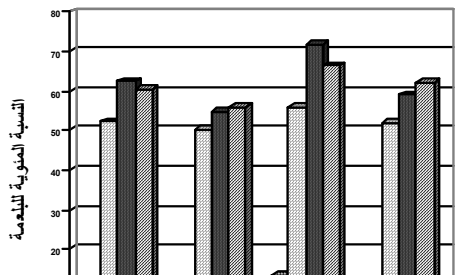
السيطرة الخلايا البكتيريه غير معاملة بمركبات السالسيلات.
ACSA الخلايا البكتيريه معاملة بحامض الاستيل سالسيلك.
SA الخلايا البكتيريه معاملة بحامض السالسيلك.
SS الخلايا البكتيريه معاملة بسالسيلات الصوديوم.
تركيز الخلايا الطلائية 10^5 خلية طلائية /مليلتر
تركيز العالق البكتيري10^8 خلية مكونة لمستعمرة/مليلتر
بعد فترة حضن 60 دقيقة بدرجة 37م^o

4. تأثير مركبات السالسيلات في التهام بكتريا *K. pneumoniae pneumoniae* من قبل خلايا الدم البيض المتعددة اشكال النوى:

تم حساب معامل البلعمة والنسبة المئوية للبلعمة بتنمية العزلات باضافة حامض الاستيل سالسيلك وحامض السالسيلك وسالسيلات الصوديوم وبالتركيز تحت المثبط لنمو البكتريا 300 مايكرو غرام/مليلتر مقارنة بالسيطرة السالبة الخالية من مركبات السالسيلات، واظهرت النتائج ان المعاملة بمركبات السالسيلات عززت الالتهام بدرجة كبيرة وان معدلات معامل البلعمة كانت في حدها الادنى 23، 18.5، 25، 20.5 للعزلات المنتخبة غير المعاملة بمركبات السالسيلات K2 و K10 و K25 و K54 على التوالي وعند معاملتها بحامض الاستيل سالسيلك اصبحت 170، 165.5، 179.5، 167 اما عند معاملتها بحامض السالسيلك فكانت 208.5 ، 178، 221، 198، في حين اصبحت معدلات معامل البلعمة 198.5، 185.5، 213.5، 209 على التوالي بعد معاملتها بسالسيلات الصوديوم. اما معدلات النسبة المئوية للبلعمة فكانت 11.7%، 8.75%، 13.21%، 10.5% للعزلات غير المعاملة بمركبات السالسيلات K2 و K10 و K25 و K54 على التوالي، في حين اصبحت 52.2% و50.14% و 55.64% 51.71% بعد معاملتها بحامض الاستيل سالسيلك و62.42% و54.71% و 71.72% و 59% بعد معاملتها بحامض السالسيلك واصبحت 60.28% و56.07% و 66.35% و 62.15% على التوالي بعد معاملتها بسالسيلات الصوديوم (الشكل 4). وان الزيادة الكبيرة في عدد الخلايا الملتهمة بعد المعاملة بمركبات السالسيلات نتيجة لاختزال حجم المحفظة ولان أي نقصان في حجم المحفظة او فقدانها يجعل مهمة الخلايا البلعمية سهلة في القضاء على البكتريا.إن الاليات التي تفسر دور مستضد المحفظة في حماية البكتريا من البلعمة هي تثبيط تنشيط مكون المتمم C3b الذي يشترك بالمراحل الأولية لعملية البلعمة، ووجود المحفظة يتداخل مع عملية الطهاية. ان مقاومة المحفظة لتاثير المتمم يتحقق بتزويدها بالشحنة السالبة التي تغلف سطح الخلية [38] وان المصل غير المعامل بالحرارة (الذي يحوي المتمم) يزيد من البلعمة لسلالات *Klebsiella* الطافرة K^-O^+ K^-O^- (غير محاطة بمحفظة) ولكنه لا يزيد البلعمة للسلالة الام K^+O^+ (المحاطة بمحفظة) ممل يدل على ان المحفظة تتداخل مع قدرة المتمم للطهاية [39]. ان المحفظة أهم عامل من عوامل الضراوة لبكتريا *Klebsiella* وان البكتريا الطافرة الفاقدة لمستضد المحفظة ينتج عنها اختزال ضراوة بكتريا *Klebsiella* للفئران من خلال زيادة البلعمة والقتل بوساطة كريات الدم البيض المتعددة أشكال النوى أو المصل أو كليهما [1].

تم تحليل نتائج معامل البلعمة والنسبة المئوية للبلعمة باستعمال اختبأر t للتفريق بين المعدلات (السيطرة مع كل معاملة من مركبات السالسيلات) واظهرت النتائج وجود فروق معنوية وبمستوى $p<0.01$ لكل من حامض الاستيل سالسيلك وحامض السالسيلك وسالسيلات الصوديوم.وهذه النتائج تتفق مع نتائج دراسات دومينيكو و سالو [7],[8],[38] اذ وجدوا ان المعاملة بالسالسيلات تزيد من قابلية التهام بكتريا *K. pneumoniae* من قبل خلايا الدم البيض متعددة اشكال النوى. ان تحفيز البلعمة بعوامل اختزال المحفظة تمثل طريقة جديدة للعلاج المناعي وشكل جديد لتحوير التمنيع(Immune modulation) ، ن بكتريا *Klebsiella* تنتج متعدد سكريد حر ومرتبط.وان معاملة بالسالسيلات تحدد تعبيركلا من متعدد السكريد الحر والمرتبط وبذلك تجعل البكتريا حساسة للبلعمة [39]، وان السالسيلات يعزز العلاج المناعي [38] .





الشكل (4): تأثير مركبات السالسيلات في التهام بكتريا *K. pneumoniae pneumoniae* من قبل خلايا الدم البيض المتعددة اشكال النوى

البكتريا منماة بدرجة 37 م لمدة 18 ساعة على وسط الحد الادنى M9 المدعم

السيطرة الخلايا البكتيريهة غير معاملة بمركبات السالسيلات.

ACSA الخلايا البكتيريه معاملة بحامض الاستيل سالسيلك.

SA الخلايا البكتيريه معاملة بحامض السالسيلك.

SS الخلايا البكتيرية معاملة بسالسيلات الصوديوم.

تركيز خلايا PMNs 2×10^6 خلية PMN/مليلتر

تركيز العالق البكتيريه 2×10^7 خلية مكونة لمستعمرة/مليلتر

بعد فترة حضن 30 دقيقة بدرجة 37م.

النتائج المسجلة تمثل عدد الخلايا البلعمية الملتهمة للبكتريا/ عدد الخلايا البلعمية الكلي x 100 (معدل لثلاثة تجارب)

References

1. Simoons-Smith, A.M.; Vught, J.V. and Maclaren,D.M. (**1986**). *The rol of K-antigens as virulance factors in Klebsiella.* J. Med. Microbiol. 21:133-137.
2. Domenico, P.; Diedrich, D.L. and Cunha, B.A. (**1989a**). *Quantitative extraction and purification of Exopolysacchraides form Klebsiella pneumoniae*. J. Microbiol. methods., 9:211-219.
3. Kabha,K.; Nisimov, L.; Athamna, A.; Keisari, Y. Parolis, H.; Parolis, L.; Grue, R.M.; Schlepper-Schafer, J; Ezekowitz, A.R.B.; Ohman D. and Ofek, I. (**1995**). *Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in Klebsiella pneumoniae.* Infect.Immun. .63(3): 847-852.
4. Roilides, E.; Kyriakides, G.; Kaditsoglou, I.; Farmaki, E.; Venzon, D.; Katsaveli and Kremenopoulos, G. (**2000**). *Septicemia due to multiresistant Klebsiella pneumoniae in a aneonatal case. control study.* Am. J. Perinatol. 17(1): 35-9.
5. Domenico, P.; Schwartz, S. and Cunha, B.A. (**1989b**). *Reduction of Capsular Polysaccharidie Production in Klebsiella pneumoniae by Sodium Salicylate*. Infect. Immun.,57(12):3778-3782.
6. Domenico, P.; Landolphi, D.R. and Cunha, B.A. (**1991**). *Reduction of capsular polysaccharide and potentiation of Aminoglycoside inhibition in Gram-negative bacteria by Bismuth subsalicylate.* J. Antimicrob. Chemother., 28:801-810.
7. Domenico, P.; Salo, R.J.; Staus, D.; Hutson, J.C and Cunha, B.A (**1992b**). *Salicylate or Bismuth salts Enhance opsonophagocytosis of Klebsiella pneumoniae* . Infection., 20(2) :66-71.
8. Salo, R.J.; Domenico, P.; Tomas, J.M.; Straus, D. C.; Merino, S.; Bened, V.-J. and Cunha, B.A. (**1995**). *Salicylate Enhanced Exposure of Klebsiella Subcapsular Components*. Infection, 23(6): 371-377.
9. Domenico,P.;Johson,W.G.and Straus,D.C. (1982). Lobar pneumonia in rats produced by clinical Isolates of Klebsiella pneumoniae. Infect. Immun., 37(1): 327-335.
10. Sambrook, J.; Fritgah, E. and Maniatis, T. (**1989**). *Molecular Cloning: a laboratory manual.* . 2nd edition. New York.
11. Hayat, M. A. (**1986**). *Basic techniques from transmission electron Microscopy*. Acad. Press. INC. Harcourt Jovanovich. SanDiego.
12. Baron, E.J.; pelerson, L.R. and Finegold, S.M. (**1994**). Enterobacteriaceae. *In: Bailey and scott's Diagnostic Microbiology,* 9th edition, Mosby-year book Inc, USA.
13. Hagberg, L.; Jodal, U.; Korhnen, T.K.; Lidin Janson, G.; Linberg, U. and Eden C.S. (**1981**). *Adhesion, Hemagglutination,and Virulence of Escherichia coli causing Urinary tract infections.* Infect. Immun., 31(2): 564-570.
14. Grisham, M.B.; Engerson, T.D.; McCord, J.M. and Jones, H.P. (**1985**). *A Comprative study of Neutrophil Purification and Function.* J. Immunol. Meth., 82:315-320.
15. Haas, R.; Parker, W.D.; Stumpf, D. and Eguren, L.A. (**1985**). *Salicylate induced loose coupling: protonmotive force*

measurements. Biochemical pharmacology 34: 900-2.

16. Domenico, P.; Tomas, J.M.; Merino, S.; Rubires, X. and Cuncha, B.A. (**1999)**. *Surface antigen exposure by Bismuth dimercoprol suppression of Klebsiella pneumoniae capsular polysaccharide.* Infect. Immun. 67(2): 664-669.
17. Cryz, S.J.; Furer, E.and Gcrmanier, R. (**1984**). *Experimental Klebsiella pneumoniae Burn wound sepsis: Role of Capsular polysaccharide*. Infect.Immun.,43(1):440-441.
18. Antibiogramme (**1981**). *Determination dela sensibilite auxagents antibacteriens. Method des disques.* Institute Pasteur production.
19. Physicians Genrx (***1996***). *The complete Drug Reference*. Mosby Year Book.
20. Domenico, P.; Hopkins, T. and Cunha, B.A. (**1990**). *The effect of sodium salicylate on antibiotic susceptibility and synergy in Klebsiella pneumoniae* J. Antimicrob. Chemother.,25:343-351
21. Domenico,P.; Stranus, D.C.; Woods,D. and Cunha,B.A. (**1993**). *Salicylate Potentiates Amikacin Theropy in Rodent Model of Klebsiella pneumoniae.* Infection. J. Infect. Dis., 168:766-769.
22. Aumercier, M,; Murray, D.M. and Rosner, J.L. (**1990**). *Potentiation of susceptibility to aminoglycosides by salicylate in Escherichia coli. Antimicrob*. Agents Chemother. 34 (5): 786-791.
23. Hancock, R.E.W. (**1981**). *Aminoglycoside uptake and mode of action-with special reference to streptomycin and gentamicin. Antagonists and mutants.* J. Antimicrob. Chemother. 8:249-276.
24. Bryan, L.E. and Kwan, S. (**1983**). *Roles of ribosomal binding membrane potential and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and genermicin. Antimicrob. Agents*. Chemother. 23: 835-845.
25. Foulds, I.; Murray, D.M.; Chai, T, T. and Rosner, L (**1989**). *Decreased permeation of cephalosporins through the outer membrane of Escherichia coli Grown in salicylates.* (**2000**). *Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by Klebsiella pneumoniae*. Infect.
33. Kunin C.M.; Tong, H.H.; Guerrant R.L. and Bakaletz. L. (**1994**). *Effect of salicylate, bismuth, osmolytes, and tetracycline resistance on experssion of fimbriae in Escherichia coli infect.* Immun. 62: 2178-2186.

Antimicrob. Agents Chemother. 33(4): 412-417.

26. Rosner, J.L. (**1985**). *Nonheritable resistance to chloramphenicol and other antibiotics induced by Salicylates and other chemtatic repellents in Escherichia coli. K-2*. Proc. Nat Acad Sci USA. 8771-4. Cited by: Domenico, P.; Stranus, D.C.; Woods, D. and Cunha, B.A. (**1993**). *Salicylate Potentiates Amikacin Theropy in Rodent Model of Klebsiella pneumoniae* Infection. J. Infect. Dis., 168:766-769.
27. Sawai, T.; Hirano, S. and Yamaguchi, A. (**1987**). *Repression of porin synthesis by salicylate in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens.* FEMS. Microbiol. Lett., 40: 233-237.
28. Darfeuille-Michand, A.; Jallat, C.; Aubel, D.; Sirot, D.; Rich C.; Sirot, J. and Joly, B. (**1992**). *R-plasmid-encoded adhesive factor in Klebsiella pneumoniae strains responsible for human nosocomial infections.*, Infect. Immun. 60(1): 44-55. .(Abstract).
29. Di-Martino, P.; Bertin, Y.; Girardeau, J.; Livrelli, V.; Joly, A. and Dareeuille Michaud, A. (**1995**). *Molecular charicterization and adhesive properties of CF29K, an adhesion of Klebsiella pneumoniae strains involved in nosocomial infections.* Infect. Immun., 63(11): 4336-4344.
30. Wurker, M.; Beuth, J.; Ko.hl; parzondo, A. and pulverer, G. (**1990**). *Type of fimbriation determines adherence of Klebsiella to human epithelial cell.* Int. J. Med. Microbiol., 274(2):239-245.
31. Favre-Bonte, S.; Joly, B. and Forestier, C. (**1999**). *Consequences of Reduction of Klebsiella pneumoniae capsule expression on interactions of this bacterum with Epithelial Cells*. Infect. Immun., 67(2): 554-561.
32. Sahly, H.; Podschun, R.; Oelschlaeger, T.A.; Greiwe, M.; Parolis, H.;Hasty,D.; Kekow, J.; Ullmann,U.; Ofek, I. And Sela, S.

77

34. Kunin, C.M.; Tong, H.H. and Backaletz, L.O. (**1995**). *Effect of salicylate on expression of flagella by Escherichia coli and Proteu*s, Providencia and Pseudomonas spp.
35. Farber, B.F. and Wolff, A.G. (**1993** b). *Salicylic acid prevent the adherence of bacteria to silastic catheters*. J. Biomed .Mater. Res., May; 27(5):599-602.(Abstract)
36. Farber, B.F.; Hsieh, H.C.; Donnenfeld, E.D.; perry, H.D.; Epstein, A. and Wolff, A. (**1995**). *Anovel antibiofilm technology for contact lens solution*. Ophthalmology, 102 (5):831-836.
37. Tomlinson, A.; Simmons, P.A., D.V. and McFadyen, A.K. (**2000**). *Salicylate inhibition of acanthamoeba attachment to contact lenses*. Ophthalmology 107: 112-117.
38. Williams, P.; Lambert, P.A.; Haigh, C.G. and Brown, M.R. W. (**1986**). *The influence of the O and K antigens of Klebsiella aerogenes on surface hydophobicityand susceptility to phagocytossis and antimicrobial agents*. J. Med. Microbiol., 21:125-132.
39. Domenico, P.; Salo, R.J.; Cross, A.S. and Cunha B.A. (**1994**). *Polysaccharide capsule mediated Resistance to Opsonophagocytosis in Klebsiell apneumoniae*. Infect. Immun., 62(10): 4495-4499.