Histopathological effects of *Citrobacter freundii* in mice
التأثيرات المرضية النسيجية لجرثومة *Citrobacter freundii* في الفئران

أ.م.د. ذكرى عدنان جواد
قسم علوم الحياة – كلية العلوم / جامعة كربلاء

الخلاصة :

تم في هذا البحث التحري عن التأثيرات المرضية النسيجية التي تحدثها جرثومة*Citrobacter freundii* في أعضاء الفئران البيض أذ تم الحصول على العزلة المستخدمة في الدراسةمن براز طفل حديث الولادة يعاني من الاسهال المائي الحاد حيث بين الفحص المجهري العام خلو برازه من الفطريات والطفيليات في حين أظهر الزرع المختبري لعينة البراز نمو كثيف لجرثومة الـ *Citrobacter freundii* .

شخصت البكتريا بالاعتماد على الخصائص المظهرية والاختبارات البايوكيمياوية وتم تأكيد التشخيص باستخدام نظام Api 20 E للعائلة المعوية .

لغرض معرفة الجرعة تحت المميتة والتي عند حقنها في الفئران يتسنى لنا دراسة التغيرات النسيجية في أعضاء تلك الفئران ،تم اجراء تجربة للتعرف على الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران LD_{50} حيث وجد من خلالها ان هذه الجرعة حوالي 3.16×10^6خلية جر ثومية \فأرة ومن نتائج هذه التجربة تم التوصل الى الجرعة الممرضة تحت المميتة وهي حوالي10^6خلية جر ثومية \فأرة أذ أخذت اعضاء الفئران المحقونة بها وتم دراسة التغيرات المظهرية لها ثم قطعت وصبغت لفحص التغيرات النسيجية مجهرياً.

بينت نتائج البحث ان هنالك تاثيرات مرضية نسيجية لاعضاء الفئران تمثلت بوجود الوذمة والتنخروهجرة الخلايا المناعية والنزف الدموي في نسيج الكبد ولوحظ اللتنخر ايضاً في نسيج الكلية اما نسيج الطحال فقد عانى من تجمع خلايا الـMegakaryocytes ولوحظ التهاب القصبات الحاد والاحتقان الدموي وتنخر الخلايا ضمن نسيج الرئة وزيادة في اعداد البلاعم الكبيرة . من خلال ما تقدم يتضح بان هذه الجرثومة لها القدرة على احداث الامراض الجهازية لوحظ ذلك من خلال نتائج استردادها من الاعضاء المذكورة بنسب مختلفة.

Abstract :

The research carry out the investigation of histopathological effects of *Citrobacter freundii* in mice ,the isolate used was obtained from neonate suffering from acute watery diarrhea whom general stool examination showed no parasites,no fungi but culture showed heavy growth of *Citrobacter freundii* .

The isolate was identified according to morphological and biochemical properties and the identification was confermed by using Api 20 E system.

In order to know the sublethal dose for mice intraperitoneally injection, the LD_{50} experiment was done for *Citrobacter freundii* which was about 3.16×10^6 cell/mouse.

Mice were injected with 10^6 cell/mouse and grossly and histopathological changes of selected organs were studied.

The microscopic examination of stained tissue sections of organs obtained from mice injected with sublethal doses of *Citrobacter freundii* revealed that this bacteria have severe effects in the tissues obtained from (liver, lung, intestine and kidney). In liver there was odema, hemorrhage, immune cells migration and necrosiswhich is seen also in kidney. The main histopathological changes that seen in spleen was the agrigation of megakaryocytes but in lung there was acute bronchiolitis, cells within the lung tissue and increase of macrophages numbers.

It was clear from these results that *Citrobacter freundii* caused systemic infection which indicated by the reisolation of this organism from mice organs in different ratios.

البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث

المقدمـــة :

يعد الجنس *Citrobacter* من أحد أجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae، ويوجد بشكل طبيعي في براز الإنسان والحيوانات الأخرى فضلاً عن وجوده في المياه والتربة والأغذية والمجاري. إلا أنه عرف مؤخراً كممرض انتهازي Opportunistic pathogen، إذ تم عزله من عينات سريرية مختلفة كعينات البراز والإدرار وعينات القشع والدم إذ تعد الأنواع التابعة له مسببات للاخماج المكتسبة من المستشفى Nosocomial infections والأخماج المختلفة لاسيما في الأشخاص المثبطين مناعياً Immunocompromized (1,2).

يسبب النوع *C. freundii* الأخماج الغازية Invasive infections والانتهازية كالتهاب السحايا Meningitis وتقيحات الدماغ Brain abscesses وكذلك يسبب خمج السبيل البولي Urinary tract infection وحالات الإسهال عند الأطفال فضلاً عن خمج الجروح بما فيها جروح العمليات، وأن المعرفة بإمراضية جرثومة الـ *C. freundii* المتضمنة قابليتها على الغزو هي غير معروفة (3,4).

يمتلك النوع *C. freundii* عوامل امراضية أو فوعة عديدة متمثلة بالذيفان المعوي الثابت والمتأثر بالحرارة (5,6,7,8) Heat stable and labile enterotoxin، وذيفان الفيرو Verotoxin (9)، فضلاً عن إنتاجه لإنزيم اليوريز Urease (10). وتمتلك خلاياه الخمل Fimbriae (11) التي تساعدها في الالتصاق على سطوح الخلايا الطلائية المبطنة للمسالك البولية والتناسلية والمعوية والتنفسية وتمتلك البروتين الخارجي المكون للثغور Pore forming outer membrane protein (12) فضلاً عن امتلاك بعض السلالات لمستضد الفوعة Vi antigen (13)، ومن أحد عوامل الفوعة المهمة هو امتلاكها لعديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide أو الذيفان الداخلي Endotoxin وهو من المكونات الأساسية لجدران خلايا الجراثيم السالبة لملون غرام ويلعب دوراً مهماً في التداخل الحاصل بين التراكيب السطحية لكل من الخلية الجرثومية والمضيف وكذلك يعمل على حماية الخلية الجرثومية ووقايتها من التحطيم بالمتمم والخلايا البلعمية وكذلك له دور مهم في الالتصاق والاستيطان، (14).

يعد النوع *C. freundii* مسببا مهما للـ Hospital acquired bacteremia إذ عزلت من عينات الدم والقشع (2,15,16,17,18) والتهاب السحايا Meningitis وتقيحات الدماغ Brain abscesses (3,19,20).

وذكرت جاندا و جماعتها (21) أن النوع *C. freundii* هو من أكثر الأنواع شيوعاً وانتشاراً، إذ أمكن عزله من معظم مناطق الجسم ويحتل المرتبة الرابعة من حيث وجوده في عينات الخروج بعد كل من *C. youngae* و*C. braakii* و *C. werkmanii*.

عرفت جرثومة *C. freundii* كمسبب لخمج السبيل البولي في البالغين، إذ تم عزلها من عينات الإدرار لمرضى مراجعين Outpatients (22,23)، إلا أن دورها كمسبب لهذا الخمج في الأطفال غير معروف، ولكن عزلت من خمج السبيل البولي في الأطفال بسبب هذه الجرثومة (17).

عزلت الـ *C. freundii* من حالات قليلة من المرضى البالغين المصابين بخمج المستشفيات تراوحت أعمارهم ما بين 72 و71 سنة ومن كلا الجنسين اكتسبوا هذه الاخماج بعد إجراء الجراحة العصبية وأيضاً من حالات التهاب السحايا في البالغين ضعيفي المناعة والذين أجريت لهم الجراحة العصبية (4,24).

وتم عزل الـ *C. freundii* بنسبة قليلة من قشع الأشخاص المعمرين ومن كلا الجنسين الذين يعانون من ذات الرئة الشديد Severe pneumonia والمكتسب من المستشفى Hospital acquired pneumonia (25).

سجلت بعض الحالات النادرة من الاخماج التي تسببها الـ *C. freundii* مثل خراج الطحال Splenic abscess وخراج الكبد Hepatic abscess، وهي مشاركة في التهاب قناة الصفراء والأذن الوسطى إذ عزلت مع الـ *Escherichia coli* من خمج الصفراء إذ سببت تقيح الكبد في مرضى الأورام الكبدية، وكذلك التهاب شغاف القلب Endocarditis في المعمرين (15,26,27,28).

المواد وطرائق العمل:

العزلة الجرثومية:

أستخدمت في هذا البحث عزلة سريرية واحدة من جرثومة *C. freundii* مصدرها براز طفل حديث الولادة مصاب بالإسهال شخصت العزلة الجرثومية بالاعتماد على مصنف بيرجي (1) وبرينر وجماعته (29) وباستعمال الطرائق المتبعة من قبل (30,31) وباستعمال الاختبارات الكيموحيوية والمظهرية واهمها استعمال نظام API 20E للعائلة المعوية Bio Merieux

الحيوانات المختبرية Lab Animals

استعملت إناث الفئران السويسرية Swiss mice البيضاء بأعمار 8 – 10 أسبوع وتراوحت أوزانها بين 20 – 25 غراماً إذ تم الحصول عليها من كلية الطب في جامعة النهرين. وضعت الحيوانات في أقفاص داخل البيت الحيواني مع مراعاة نظافة ماء الشرب والعلف مع تعقيم الأقفاص بين الحين والآخر.

تحديد الجرعة المهلكة للنصف LD_{50} لجرثومة الـ *C. freundii*

تحضير العالق الجرثومي

تم تلقيح وسط مرق التريبتيك صويا Tryptic soy broth بالعزلة الجرثومية *C. freundii* وحضن بدرجة 37م مدة 18 ساعة بعدها تم ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة ثم تم غسل الخلايا مرتين بدارئ الفوسفات الملحي PBS وعلقت بعدها بالدارئ نفسه وتمت قراءة الامتصاصية للعالق الجرثومي على طول موجي 600 نانوميتر وصولاً إلى كثافة بصرية 1 أو ما يعادل 1×10^{8}وحدة مكونة للمستعمرة CFU(Colony forming unit) لكل ملليتر حسب ما بينته العلاقة بين الكثافة البصرية والعدد الحي للجراثيم، ومن هذا العالق تم الحصول على عوالق جرثومية حاوية على الأعداد 10^{9}، 10^{8}، 10^{7}، 10^{6}، 10^{5}، 10^{4} خلية جرثومية/ملليتر.

حقن الفئران بالعالق الجرثومي لتحديد الجرعة المهلكة للنصف (LD_{50})

قسمت الفئران إلى 7 مجاميع وبواقع 5 فئران لكل مجموعة وحقنت كل مجموعة بواقع 1 ملليتر لكل فأرة بأحد التراكيز الجرثومية 10^{4}، 10^{5}، 10^{6}، 10^{7}، 10^{8}، 10^{9} خلية/ملليتر داخل البريتون Intraperitoneally ، أما مجموعة السيطرة فقد حقنت بدارئ الفوسفات الملحي PBS بواقع 1 ملليتر لكل فأرة داخل البريتون، وبعد مرور 5 أيام تم حساب الفئران الميتة والحية ضمن المجموعة الواحدة، وتم إيجاد الجرعة المهلكة للنصف حسب ما جاء في (32).

التغيرات الظاهرية الملحوظة على الفئران المصابة وأعضائها

لوحظت العلامات المرضية البادية على الفئران المحقونة بالعالق الجرثومي وكذلك تم أخذ أوزانها وأوزان فئران السيطرة وتم بعد ذلك تشريح الفئران وعرضت الأحشاء الداخلية إلى الفحص بالعين المجردة لتعيين وجود العلامات المرضية أو غير الطبيعية على الأعضاء مقارنة بفئران السيطرة وتم أخذ وزن الكبد والرئة والكلى والطحال لتحديد نسبة وزنها إلى وزن الجسم مقارنة بفئران السيطرة.

دراسة التغيرات المرضية النسيجية لأعضاء الفئران

تمت دراسة التغيرات المرضية في أنسجة الأعضاء (الكبد ،الرئة ،الطحال ،الأمعاء والكلى) المنتخبة من الفئران بعد مرور 72 ساعة من الحقن بوساطة تثبيت وتقطيع الأعضاء إلى شرائح نسيجية وفق (33)، وتم تصبيغ الشرائح بالهيماتوكسيلين والايوسين وفق الطريقة المتبعة من قبل(34) .

استرداد جرثومة *C. freundii* من أعضاء الفئران المصابة بالعالق الجرثومي

حقنت مجموعة مكونة من 5 فئران بـ 10^{6} خلية جرثومية لكل فأرة وبعد مرور 48 ساعة تم تشريحها وتم أخذ 0.1 غرام من الكبد والطحال والرئة والكلى كل على حدة ثم هرست عينات تلك الأعضاء مع 1 ملليتر من دارئ الفوسفات الملحي PBS وتمت مجانسة العالق المتكون بوساطة المازج الدوار وعملت التخافيف العشرية وتم زرعها على وسطي غراء الدم والماكونكي وحضنت الأطباق بدرجة 37م مدة 24 ساعة بعد ذلك عملت مسحة مجهرية من المستعمرات النامية على الأطباق وتم تلوينها بملون غرام وأجري أيضاً إعادة فحص الكاتاليز والاوكسيديز واختبار الحركة وكذلك تنميتها على وسط Xylose lysine deoxycholate XLD agar للتأكد من عدم التلوث بجراثيم أخرى.

أجري أيضاً زرع عينات الدم ومحتويات الأمعاء لهذه الفئران وكذلك لفئران السيطرة التي تم حقنها بدارئ الفوسفات الملحي PBS

النتائج والمناقشة

كانت نتائج الاختبارات المزرعية والكيموحيوية نتائج افتراضية تم اكمالها باستعمال نظام Api 20E، الشكل 1.

شكل -1- الاختبارات التشخيصية التأكيدية لجرثومة *C. freundii* باستعمال نظام Api 20 E system

لقد أكد العديد من الباحثين على ضرورة استعمال هذا النظام التشخيصي، إذ استعمله يورك وجماعته(35) بدلاً عن الاختبارات الكيموحيوية لوصفه إياها بأنها مكلفة ومرهقة وبطيئة، أما أوهارا وجماعتها (36) فقد أكدت على إمكانية التغلب على التنوع في الاستجابة للاختبارات الكيموحيوية بوضعها مفتاحاً تشخيصياً افتراضياً لأنواع الجنس *Citrobacter* يمكن إكماله بالاعتماد على نظام Api 20E وعلى العكس من ذلك أشار ألدوفا وجماعته(37) إلى أن استعمال الاختبارات الكيموحيوية في تشخيص الأنواع التابعة لجنس الـ *Citrobacter* هو الأفضل ولم يوصِ باستعمال نظام الـ Api 20 E بسبب عدم احتواء القوائم المرجعية المرفقة على أسماء الأنواع الجديدة من الجنس آنذاك.

تحديد الجرعة المهلكة للنصف LD_{50} من عالق جرثومة *C. freundii*

عند حقن 6 تراكيز متدرجة من العالق الجرثومي للـ *C. freundii* في خلب الفئران، وجد أن الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران من هذا العالق هي حوالي 3.16×10^{6} خلية/مليلتر لكل فأرة، وهي واقعة بين التركيزين 10^{6} – 10^{7} خلية/ مليلتر لكل فأرة و بنسبة مئوية للهلاكات 25% و75% على التوالي بعد مرور 72 ساعة، كما هو مشار إليه في الجدول 1 والشكل 2. في حين استعمل أواهي وجماعته(38) تركيز 10^{5} خلية/ فأرة لإحداث الخمج في الفئران، وذكر أن هذا التركيز من عالق جرثومة *C. freundii* يؤدي إلى هلاك الفئران خلال يومين، من جهة أخرى وجد تورانزو وجماعته (39) أن الجرعة المهلكة LD_{50} من عالق جرثومة *C. freundii* هي أكثر من 5×10^{7} ووصفها حينذاك بأنها ذات فوعة ضعيفة Low virulence.

إن هذا الاختلاف في التركيز الجرثومي المؤدي إلى إهلاك وقتل نصف عدد الفئران بين هذه الدراسة والدراسات الأخرى ربما يعود إلى اختلاف العزلات المستخدمة في الدراسة واختلاف مصادر عزلها، فضلاً عن أن جرثومة *C. freundii* تمتلك العديد من عوامل الفوعة كالذيفانات المعوية وذيفان شبيه الشيجاShiga like toxin وكذلك بروتينات الغشاء الخارجي، ومما لاشك فيه فأن هذه العوامل تساعد في هلاك الحيوانات المختبرية.

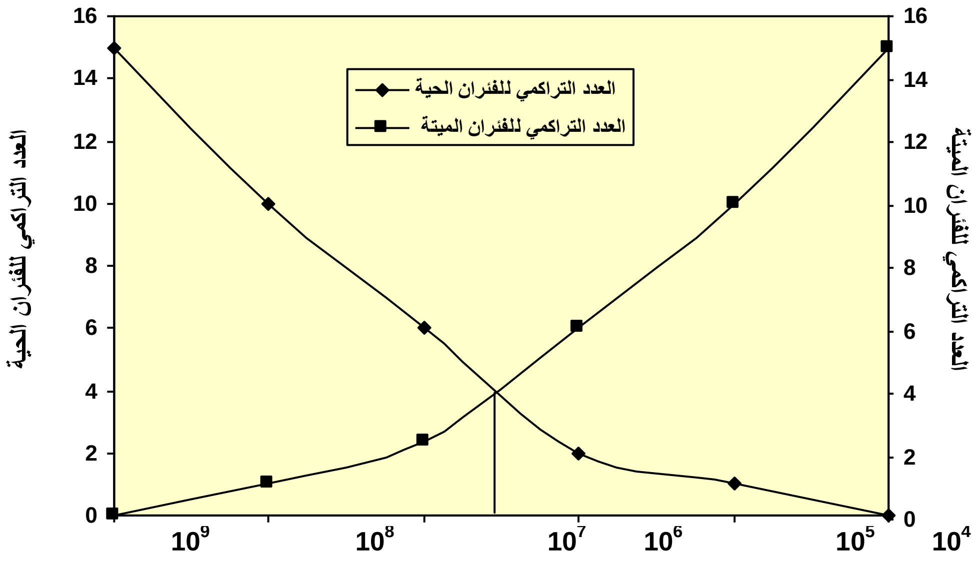
جدول -1- نتائج الجرعة المهلكة للنصف LD_{50} من جرثومة *C. freundii*

عدد الخلايا الجرثومية لكل مليلتر	عدد الفئران المعاملة	عدد الفئران الميتة	عدد الفئران الحية	العدد التراكمي للفئران الميتة	العدد التراكمي للفئران الحية	مجموع الأعداد التراكمية	النسبة المئوية للفئران الميتة %
10^9	5	5	0	15	0	15	100
10^8	5	4	1	10	1	11	90.9
10^7	5	4	1	6	2	8	75
10^6	5	1	4	2	6	8	25
10^5	5	1	4	1	10	11	9.09
10^4	5	0	5	0	15	15	0

المسافة النسبية $= \frac{25-50}{25-75}$

$0.5 = \frac{25}{50}$

الجرعة المهلكة 50 $= 10^{6+0.5} = 10^{6.5} = 3.16\times10^6$ خلية جرثومية / مليلتر



شكل -2- الجرعة المهلـكة للنصف LD_{50} للفئران من جرثومة *C. freundii*

التغيرات المرضية الناجمة عن إصابة الفئـران بجرثومة *C. freundii*

أولاً: التغيرات الظاهرية Grossly Changes

جرت متابعة الحيوانات بعد حقنها بعالق خلايا جرثومة *C. freundii* وقد لوحظ وجود الفئران بشكل محتشد ومرتعش، مع وجود أعراض الإجهاد وعدم الأكل وحدثت حالات الإسهال لبعض منها.

أظهر الفحص العياني للأعضاء بعد تشريح الحيوان وجود تغيرات مظهرية لأعضاء الفئران المحقونة بالعالق الجرثومي 10^6 خلية/ملليتر لكل فأرة، تتلخص هذه التغيرات في تغير لون الكبد والطحال وميلهما إلى اللون الداكن، وكذلك وجود الاحتقان الدموي في الكبد وزيادة الحجم عن الطبيعي، إن هذه التغيرات تعطي مؤشراً حول وجود آفات مرضية شديدة تمت دراستها بشكل جيد في الفحص المجهري للمقاطع النسيجية.

كما أخذت أوزان أعضاء الفئران نسبة إلى أوزان أجسامها مقارنة بحيوانات السيطرة المحقونة بدارئ الفوسفات الملحي PBS وبإجراء التحليل الإحصائي اختبار – T وجد أن الحقن بالعالق الجرثومي 10^6 خلية/ملليتر لكل فأرة كان له تأثير كبير إذ لوحظ وجود فروق معنوية عالية $p<0.001$ مقارنة بالسيطرة إذ أظهرت زيادة في نسبة وزن الأعضاء الكبد، الرئة و الكلية إلى وزن الجسم , الجدول 2 , إذ كان هنالك فرق عالي المعنوية $p<0.001$ بين نسبة وزن الطحال إلى وزن الجسم للفئران المحقونة بجرثومة *C. freundii* وفئران السيطرة إذ بلغت 0.49 و 0.5 على التوالي، وذلك بسبب حدوث التضخم في الطحال بتأثير الصفة التقسيمية للخلايا اللمفاوية Mitogenecity التي يمتلكها عديد السكريد الشحمي (40).

جدول-2 -نسبة وزن العضو إلى وزن الجسم للفئران المحقونة بالعالق الجرثومي وفئران السيطرة، ± الخطأ المعياري SE.

العضو	نسبة وزن العضو / وزن الجسم ± الخطأ القياسي (SE)	
	سيطرة	معاملة
الكبد	4.08 ± 0.081	8.97 ± 0.101
الطحال	0.54 ±0.092	0.49 ± 0.012
الرئتين	0.51 ± 0.023	1.19 ± 0.0383
الكلية	0.55 ± 0.032	0.82 ± 0.0266

ثانياً : التغيرات النسيجية المرضية Histopathological Changes

أثبتت نتائج الدراسة النسيجية وجود تأثيرات مرضية نسيجية شديدة في أعضاء الفئران ناجمة عن أخماجها بجرثومة *C. freundii* ، وكانت الأعراض المرضية التي تمت ملاحظتها في المقاطع النسيجية مقاربة لما ذكره (41) في أن أعراض الخمج بالجراثيم السالبة لملون غرام تتمثل بتنخر الأنسجة (Necrosis) وتحطم الأوعية الدموية ووجود الخثرة فيها مما يؤدي بدوره إلى الموت، وقد عزي سبب هذه الأعراض المرضية من قبل العديد من الباحثين إلى امتلاك هذه الجراثيم لعديد السكريد الشحمي الذي يتصف بأن له فعل ممرض مباشر على الخلايا الهدف، أو من خلال تفاعله مع خلايا الجهاز المناعي إذ يعمل على تحفيزها لتحرر الوسائط الالتهابية Proinflammatory mediators مثل السايتوكينات Cytokines وهذه الأخيرة لها القدرة على إحداث تغيرات فسلجية ومرضية، ناهيك عن وجود مستقبلات عديد السكريد الشحمي على سطوح الخلايا المختلفة سواء كان حراً أو مغلفاً للخلايا الجرثومية وهذه المستقبلات ممثلة بالبروتينات المرتبطة بعديد السكريد الشحمي (LPS binding protein) (42,43).

ولكن جرثومة الـ *C. freundii* تمتلك العديد من عوامل الامراضية مثل الذيفانات المعوية وذيفان شبيه الشيجا Shiga like toxin والذيفان الخلوي وبروتينات الغشاء الخارجي وعوامل الالتصاق المتمثلة بالخمل Fimbriae فضلاً عن عديد السكريد الشحمي إذ تعمل هذه العوامل متآزرة معاً في إحداث التغيرات المرضية (14,44,45,46).

في الكبد، التغيرات النسيجية كانت شديدة بتأثير الجرثومة تمثلت بوجود الـ Odema وحصول تفجي خلايا الكبد وتورمها وتغلظ الأنوية وكذلك ارتشاح الخلايا الالتهابية ضمن متن الكبد وهجرة خلايا الـ PMN (Polymorphonuclear leukocytes) ووجود النزف الدموي فضلاً عن فقدان الأشكال السداسية لنسيج الكبد وتنخره , الشكلين 5 و6 بالمقارنة مع السيطرة ,الشكل 4 .

وأكد أشيكاوا وجماعته (47) إن تقيحات الكبد ناجمة عن انتقال جرثومة *C. freundii* من كيس الصفراء إلى الكبد وربما تعود الى حدوث الاستجابة المناعية لتلك الجرثومة. أما بشأن طحال الفئران المحقونة بالعالق الجرثومي فاقتصرت التغيرات المرضية على النزف الدموي والاحتقان الشديدين في اللب الأحمر وتكون الـ Odema و ارتشاح الخلايا PMN والـ Megakaryocyter الشكل 8 بالمقارنة مع السيطرة ,الشكل7 .

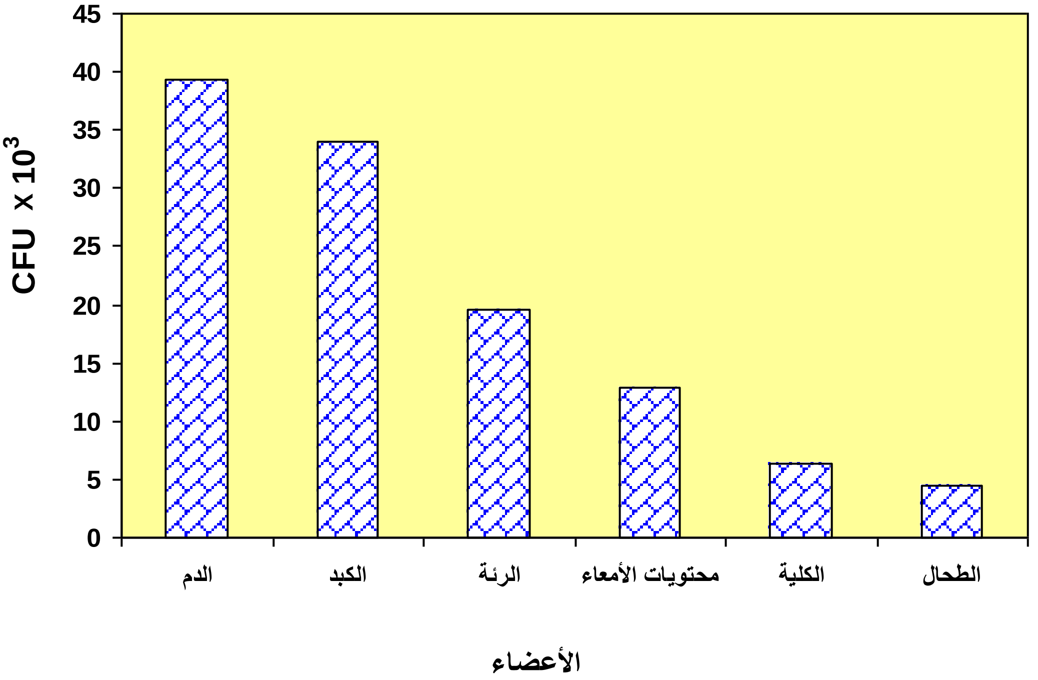
لوحظ وجود التنخر ضمن نسيج الكلية وتورم بطانة الأنبيبات البولية والاحتقان الدموي والنزف الدموي مع توسع اللمة الشعرية وكذلك وجود الـ Odema كما في الشكل 11 بالمقارنة مع السيطرة ,الشكل 12. إن إمراضية هذه الأعضاء يتطلب الاستيطان الذي يحدث بوساطة التصاق الخلايا الجرثومية (48).

أما بالنسبة لنسيج الرئة للفئران المحقونة بالعالق الجرثومي فقد لوحظ وجود عدد من التغيرات المرضية تمثلت بحالة التهاب القصيبات الحاد Acute brochiolitis والاحتقان الدموي وتنخر ضمن النسيج الظهاري للاسناخ الرئوية وزيادة في أعداد خلايا الـ Alveolar macrophage والوذمة Odema وتثخن نسيج القصيبات الرئوية وحدوث الانتفاخ الرئوي Emphysema، الشكل 10بالمقارنة مع السيطرة ,الشكل9 .

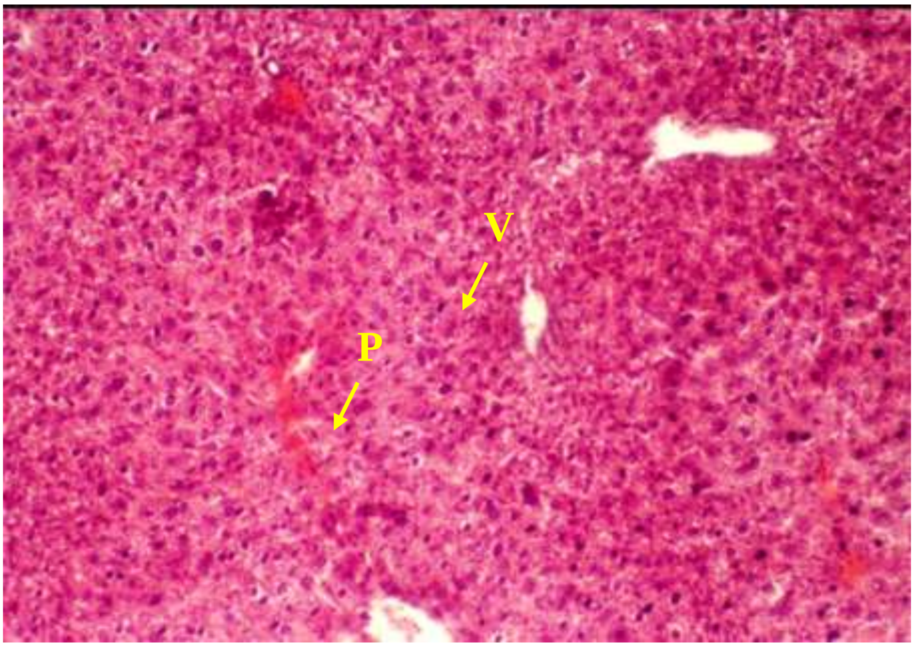
إن المعلومات حول ميكانيكيـة الامراضية لجرثومة الـ *C. freundii* هي قليلة ونادرة إلاّ أن العديد من الباحثين أشـاروا إلى أن هذه الجرثومة تمتاز بقابليتـها على الوصول إلى الأنسجة العميقة داخل الجسم من خلال غزوها لبطانة الأمعاء والمثانة للإنسان (3) وكذلك غزوها للخلايا المبطنة للأوعية الدموية الدماغية للإنسان(HBMEC (Human brain myoendothelial cell وكذلك الخلايا المبطنة للأوعية الدموية (19).

وبذلك تكون لها القدرة على إحداث الاخماج الجهازية Systemic infections والغازية Invasive infection (20,38,49). وتتضح قابلية الغزو من خلال نتائج استرداد الجرثومة من الأعضاء المختلفة للفئران ومحتويات أمعاءها ودماءها. الشكل (3) وبالتحليل الإحصائي باستعمال اختبار T وجد أن الدم حقق فرقاً معنوياً $p<0.01$ من حيث استرداد الجرثومة إذ بلغ معدل عدد CFU في دم الفئران بعد مرور 48 ساعة حوالي 39.4×10^3 CFU/ ملليتر من الدم. ويليه الكبد والرئة بمعدلات استرداد 34×10^3 ، 19.6×10^3 CFU/ غرام على التوالي، في حين كان أقل استرداد جرثومي من الطحال 4.4×10^3 CFU/غرام.

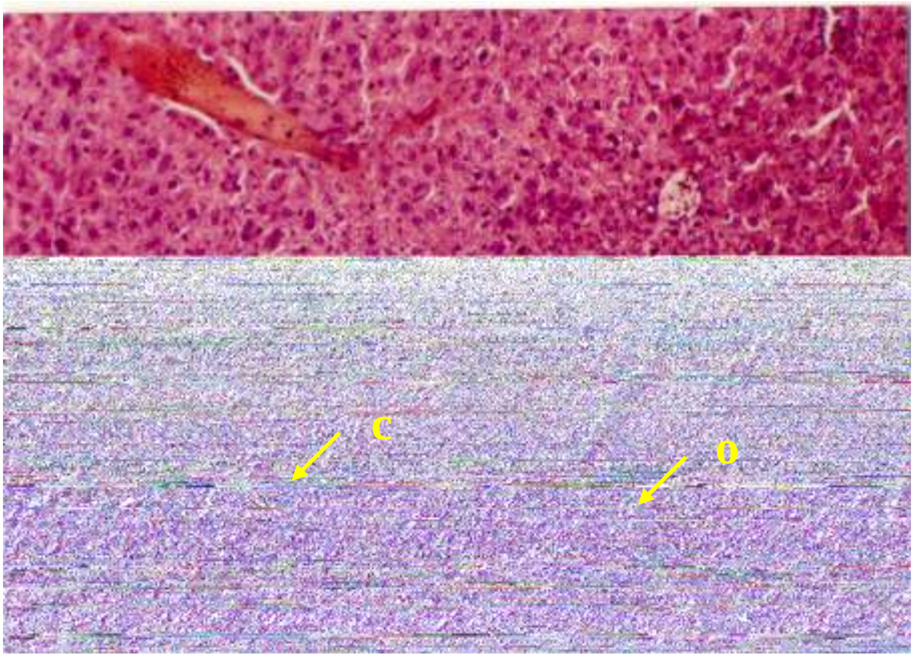
لوحظ أن التغيرات النسيجية لأمعاء الفئران المحقونة بعالق الخلايا الجرثومية تمثلت بحالة الضمور Atrophy في الزغابات وامتلاء الزغابات بالخلايا اللاتهابية نتيجة الارتشاح وظهور حالة التنخر Necrosis ضمن النسيج الظهاري للزغابة مع النزف الدموي فضلاً عن التنكس Degeneration في الزغابات ولوحظ أيضاً نقص شديد في الخلايا الكأسية Goblet cells وهي حالة مصاحبة لحالة الضمور، الشكلين 14 و 15بالمقارنة مع السيطرة ,الشكل13 وكانت متقاربة مع ما وجدته الهاشمي (44) عند حقنها الذيفانات المعوية لعزلة محلية من جرثومة *C. freundii* في الفئران الرضيعة وكذلك ما وجدته عبد الحسين (50) عند حقن الفئران بعالق الخلايا الجرثومية *Plesiomonas shigelloides* المنتجة للذيفانات المعوية، إذ أن التغيرات المرضية للأمعاء تلخصت بحدوث تنخر في الخلايا المبطنة للأمعاء وحدوث ارتشاح الخلايا الالتهابية والنزف الدموي Hemorrhage والوذمة Oedema. إن ذلك التقارب ربما يعود إلى إفراز هذه الجرثومة إلى الذيفانات المعوية التي تؤدي إلى حدوث تغيرات في بطانة الأمعاء الدقيقة والغليظة(6,51) .



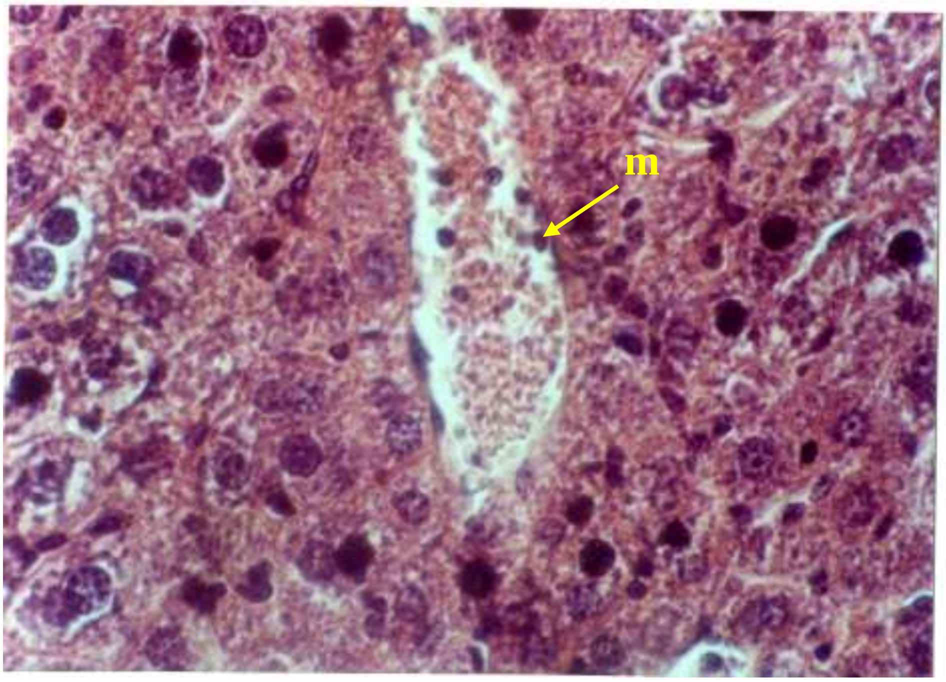
شكل -3- استرداد الجرثومة *C. freundii* من أعضاء الفئران المحقونـة بتركيز 10^6 / فأرة من العالق الجرثومي



شكل -4- مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS)، مصبغ بالهيماتوكسيلين والايوسين، بقوة تكبير 100X، يوضح P: الخلية الكبدية، V الوريد المركزي

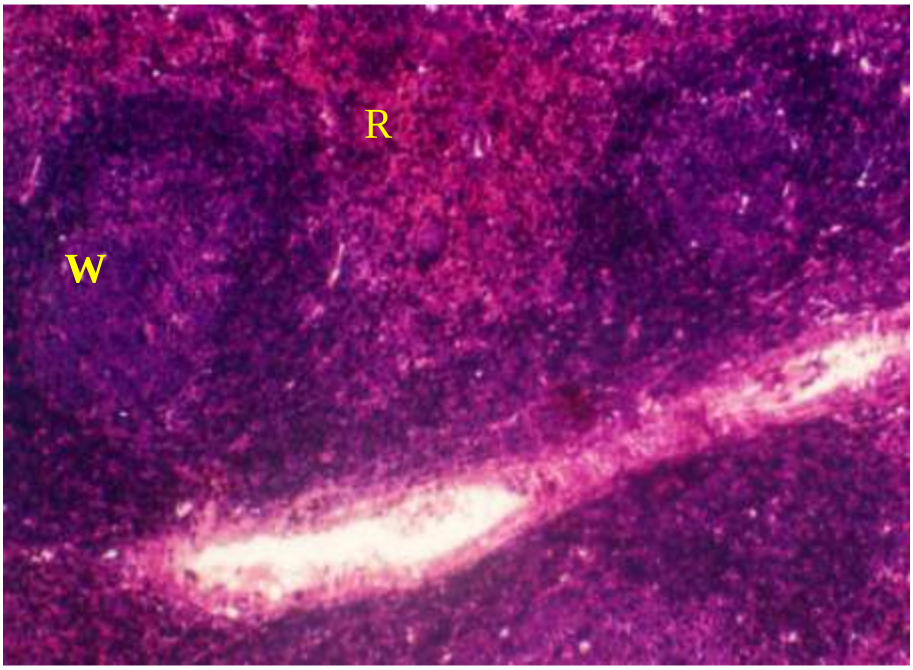


شكل -5- مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بتركيز 10^6 خلية/ملليتر من عالق جرثومة *C. freundii*، مصبغ بالهيماتوكسلين والايوسين، بقوة تكبير 100 X، يوضح: o الوذمة، c الاحتقان الدموي.

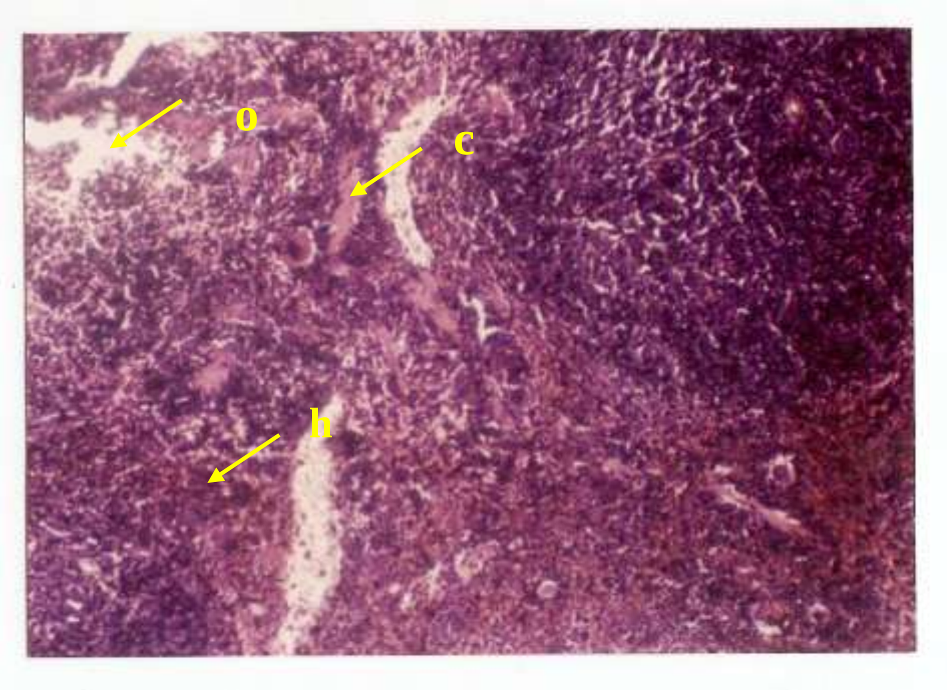


شكل -6- مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 10^6 خلية/ملليتر من عالق جرثومة *C. freundii*، مصبغ بالهيماتوكسلين والايوسين، بقوة تكبير X 400، يوضح: m هجرة الخلايا الالتهابية ضمن الوعاء الدموي

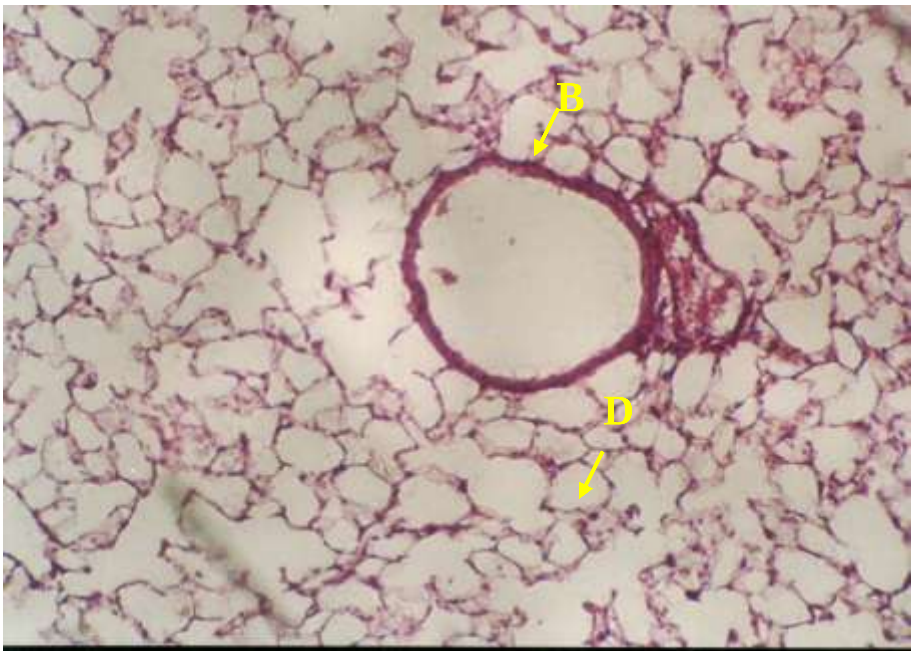
.



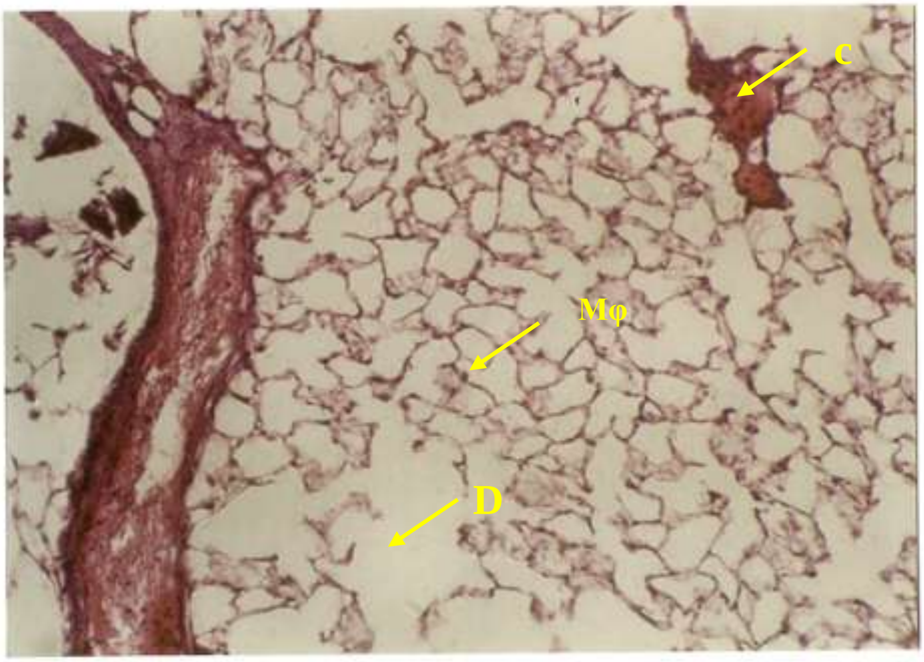
شكل -7- مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS)، مصبغ بالهيماتوكسيلين والايوسين، بقوة تكبيرة 100 X، يوضح: W: اللب الأبيض، R: اللب الأحمر



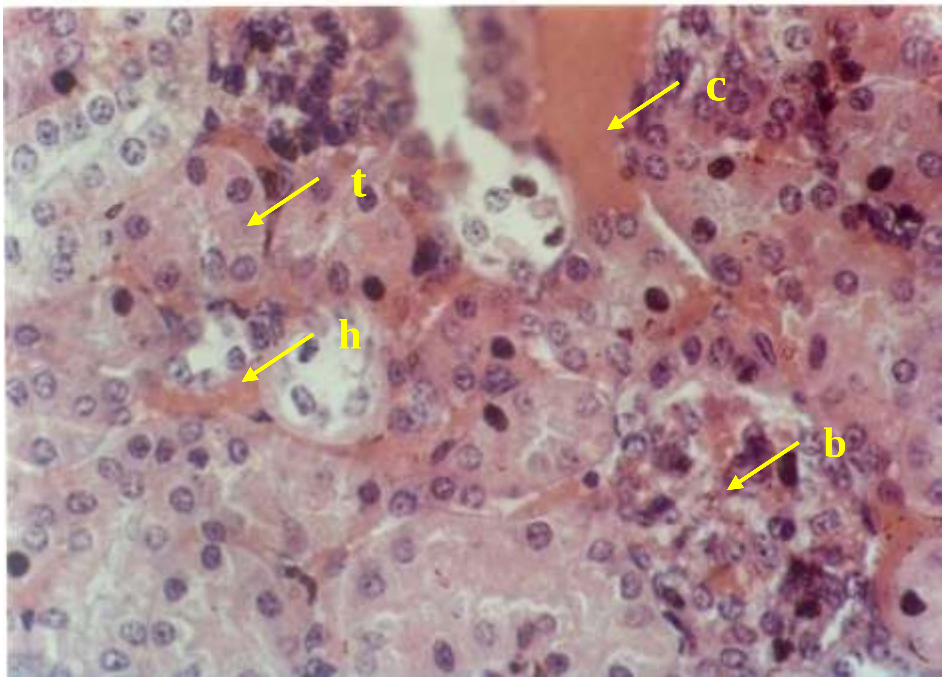
شكل -8- مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بـ 10^6 خلية/ملليتر من عالق جرثومة *C. freundii*، مصبغ بالهيماتوكسلين والايوسين، بقوة تكبير X 100، يوضح: h النزف الدموي، c الاحتقان الدموي، O: الوذمة.



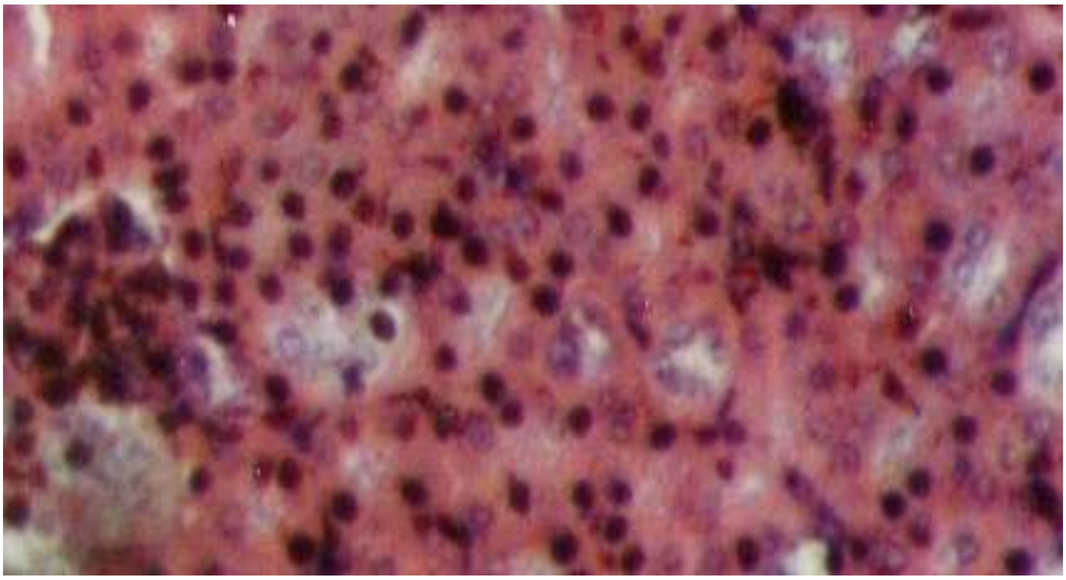
شكل -9- مقطع نسيجي لرئة فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS)، مصبغ بالهيماتوكسيلين والايوسين، بقوة تكبيرة 100 X، يوضح: D قناة رئوية، B قصيبة.



شكل -10- مقطع نسيجي لرئة فأرة محقونة بـ 10^6 خلية/ملليتر من عالق جرثومة *C. freundii*، مصبغ بالهيماتوكسلين والايوسين، بقوة تكبير X 100، يوضح: h النزف الدموي، c الاحتقان الدموي، D القناة الرئوية، Mφ البلاعم الحويصلية.

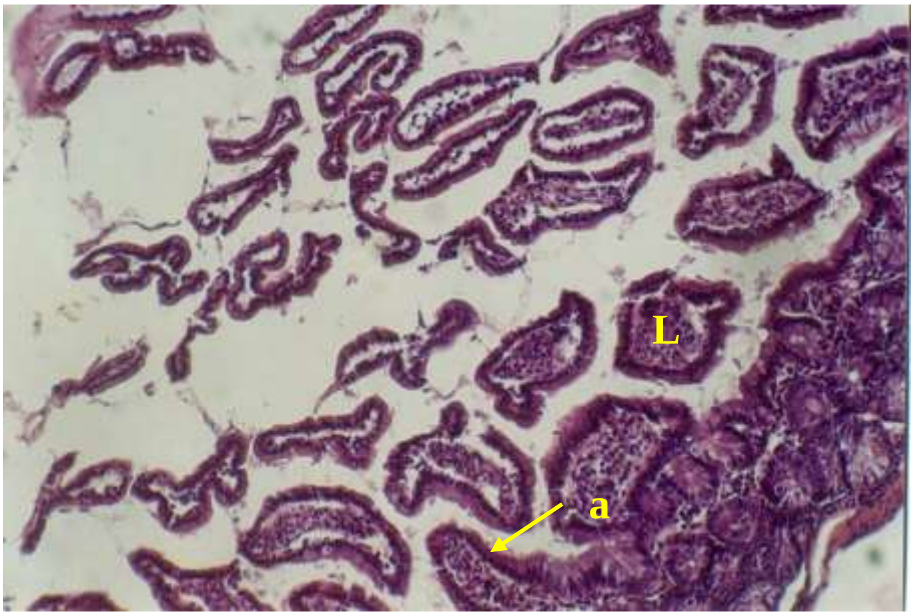


شكل -11- مقطع نسيجي لكلية فأرة محقونة بـ 10^6 خلية/ملليتر من عالق جرثومة *C. freundii*، مصبغ بالهيماتوكسلين والايوسين، بقوة تكبير X 400، يوضح: h النزف الدموي، c الاحتقان الدموي، b توسع اللمة الشعرية، t تورم الخلايا المبطنة للأنبيبات الكلوية.

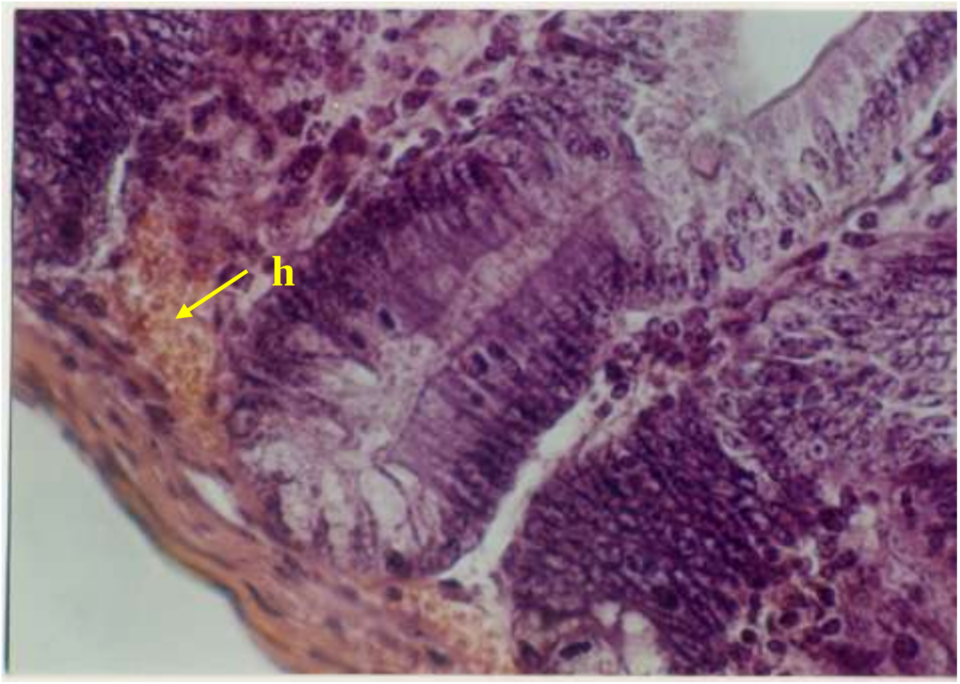


شكل -12- مقطع نسيجي لكلية فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS)، مصبغ بالهيماتوكسيلين والايوسين، بقوة تكبيرة 400 X، يوضح: G الكبيبة الكلوية، الانبيب البولي .

شكل -13- مقطع نسيجي لأمعاء فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS)، مصبغ بالهيماتوكسيلين والايوسين، بقوة تكبيرة 100 X، يوضح l الصفيحة الأصلية، s الطبقة تحت المخاطية، n الطبقة العضلية الخارجية.



شكل -14- مقطع نسيجي لأمعاء فأرة محقونة بـ 10^6 خلية/ملليتر من عالق جرثومة *C. freundii*، مصبغ بالهيماتوكسلين والايوسين، بقوة تكبير X 100، يوضح: a ضمور الزغابات، L تجمع الخلايا اللمفاوية (لطخ باير) (Peyer's patches)



شكل -15- مقطع نسيجي لأمعاء فأرة محقونة بـ 10^6 خلية/ملليتر من عالق جرثومة *C. freundii*، مصبغ بالهيماتوكسلين والايوسين، بقوة تكبير X 400، يوضح: h النزف الدموي.

المصـــــادر

1- Holt, J.C.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stahley, J.T. and William, S.T. (1994). Bergy's manual of determinative bacteriology, 9th ed., USA.

2- Kim, P.W.; Harris, A.D.; Roghmann, M.; Morrisjr, J.G.; Strinivasan, A. and Perncevich, E.N. (2003). Epidemiological risk factor for isolation of ceftriaxone-resistant versus susceptible *Citrobacter freundii* in hospitalized patients. *Antimicrob. Agen. Chemother. 47*: 2882-7.

3- Oelschlaeger, T.A.; Gurry, P. and Kopecko, D.J.; (1993). Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Compylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc. Natl. Acad USA. 90*: 6884-8.

4- Lu, C.H.; Chang, M.N.; Chuang, Y.C. and Chang, H.W. (1999). Gram-negative bacillary meningitis in adult postneurosurgical patients. Surg. Neurol. 52(5): 443-4.

5- Giannella, R.A. (1995). *Escherichia coli* heat stable enterotoxins, Guanylins and their receptors: what are they and what do they do? *J. Lab. Clin. Med. 125*: 173-81. (Cited by: 2002, الهاشمي).

6- Schmitt, C.K.; Meysick, K.C. and O'Brien, A.D. (1999). Bacterial toxins: Friends or foes? *Emerg. Infect. Dis. 5*(2): 224-34.

7- Holmgren, J. (1985). Toxins affecting intestinal transport process, The virulence of *Escherichia coli*, Review and methods, pp. 177-191, London, Academic press.

8- Chart, H. (2002). *Vibrio, Mobiluncus, Gardenella* and *Spirillium*. P. 296-303. In: Greenwood, D.; Slack, R.C.B. and Pautherer, J.F. (ed.). Medical Microbiology, 6th ed. Churchill Livingstone, New York.

9- Tschape, H.; Prager, R.; Streckel, W.; Fruth, A.; Tietze, E. and Bohmc, G. (1995). Verotoxigenic *Citrobacter freundii* assotiated with sever gastroenteritis and cases of hemolytic uremic syndrom in nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiol. Infect. 114*(3): 441-50.

10- Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

11- Ernest, R.K., Domobroski, D.M. and Merrick, J.M. (1990). Anaerobiosis Type 1 fibriae and growth phase are factors that affect invasion of Hep2 cells by *Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 58*: 2014-6.

12-Spierngs,G.;Ockhuijsen,C.;Hofstra,H.andTommassan,J.(1992).Characterization of *Citrobacter freundii* Pho E gene and development of specific oligonucleotides . *FEMS Microbiol. Lett. 78(2-3)* :199-204.

13- Houng, H.S.; Noon, K.F.; Ou, J.T. and Baron, L.S. (1992). Expression of Vi antigen in *Escherichia coli* K_{12}: Characterization of Vi aB from *Citrobacter freundii* and identity of Vi aA with RCSB. *J. Bacteriol. 174*(18): 5910-5.

14- Todar, K. (2002). Bacteriology home page: mechanisms of bacterial pathogenicity: Endotoxins. (Internet).

15- Clemente-Gonzalez, C.; Ruiz-Aguire, J.; Vilert-Garrfofa, E. and Garcia-Bragado, F. (1999). *C. freundii* endocarditis. *An. Med. Interna. 16*(7): 363-4. (Medline).

16- Doran, T.I. (1999). The role of *Citrobacter* in clinical disease of children. *Rev. Clin. Infect. Dis. 28*: 384-94.

17- Gill, M.A. and Schutze, G.E. (1999). *Citrobacter* urinary tract infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J. 18*: 889-92.

18- Chen, Y.S.; Wong, W.W.; Fung, C.P.; Yu, K.W. and Lin, C.Y. (2002). Clinical features and antimicrobial susceptibility trends in *Citrobacter freundii* bacteremia. *J. Microbiol. Immunol. Infect. 53*: 109-114.

19- Badger, J.L.; Stins, M.F. and Kim, K.S. (1999). *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial Cells. *J. Infect. Immun. 67*(8): 4208-20.

20- Ratner, A.J.; Mosca, R.S. and Zucker, H.A. (2002). *Citrobacter* mediastinitis following cardiac surgery in neonate. *J. Infect. 44*: 52-8.

21- Janda, J.M.; Abbott, S.H.L.; Chenug, W.K.W. and Hanson, D.F. (1994). Bicochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol. 32*(8): 1850-4.

22- Zhanel, G.G.; Karlowsky, J.A,; Hrding, G.K.; Garric, A.; Mazzull, T. and Low, D.E. (2000). A canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients, comparison of the activities of Trimethoprim-sulfomethoxazol, Ampicillin, Mecillinam-Nitrofurantan, and Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agen. Chemother. 44*(4): 1089-92

23- Manganello, S.; Tayara, A.; Perazzi, B.; Neira, L.; Famiglietti, A.; Pugliese, L.; Santini, P. and Vay, C. (2001). Characterization and distribution of *Citrobacter* species in university hospital. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin. 19*(1): 11-4.

24- Tang, L.M.; Chen, S.T. and Lui, T.N. (1994). *Citrobacter* meningitis in adults. *Clin. Neurol. Neurosurg. 96*(1): 52-7.

25- Matsui, S. and Nakazawa, T. (1994). Clinical bacteriology and empiric therapy for hospital-aquired pneumonia in the elederly at a national leprosarium-Nippon. *Kyobu. Shikkan. Gakkai. Zasshi. 32*(9): 851-5. (Medline).

26- Layanze, B.F.; Lopes, M.G.; Diez, G.F.; Glavez, M.C. and Collado, R.A. (1998). *Citrobacter freundii* a rare cause of hepatic abscess. *An. Med. Interna. 15*(8): 452.

27- Ishikawa, H.; Kanai, T.; Ono, T.; Shimoyama, Y.; Aizawa, K.; Ishide, H. Saiton, Y.; Hata, H.; Aoki, A.; Okuda, S. and others. (1999). Analysis of cases with liver abscess following transcathter arterial chemoemobilization (TAE) for malignant hepatic tumors. *Gan. To. Kagaku. Ryoho. 21*(13): 2233-6. (Abstract).

28- Green, B.T. (2001). Splenic abscess: report of six cases and review of the literature. *Am. Surg. 67*(1): 80-5.

29- Brenner, D.J.; O'Hara, C.M.; Grimont, P.A.D.; Janda, J.M.; Falsen, E.; Aldova, E.; Ageron, E., Schindler, J.; Abbot, S.H. and Steigerwalt, A.G. (1999). Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. Nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 10) and *Citrobacter murliniae* sp. Nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 11). *J. Clin. Microbiol. 37*(8): 2619-24.

30- Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

31- Collee, J.G.; Barrie, P.M.; Andrew, G.F. and Simmons, A. (1996). Testes for the identification of bacteria. P: 131-149. In: Mackie and McCarthey; practical medical microbiology, 14th ed. Livingstone, New York.

32- Reed, J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg. 27*: 493-7.

33- Humason, C.L. (1972). Animal tissue technique. 3rd ed. W.H. Freeman company. P 641.

34- Drury, R.A. and Walington, E.A. (1980). Calton's histological techniques, 5th ed. Oxford Univ. Press.

York, M.K.; Brooks, G.F. and Fiss, E.H. (1992). Evaluation of the auto SCAN-W/A rapid system for identification and susceptibility testing of gram-negative fermentative bacilli. *J. Clin. Microbiol. 30*(11): 2903-10.

36- O'Hara, C.M.; Roman, S.B. and Miller, M.J. (1995). Ability of commercial identification systems to identify newly recognized species of *Citrobacter*. *J. Clin. Microbiol. 33*(1): 242-5.

37- Aldova, E.; Schindler, J.; Sourek, J.; Nemec, A. and Urbaskova, P. (1997). Detection and identification of *Citrobacter sedlaki* in the Czech republic. Zentralbl-Bakteriol. *285*(3): 389-96. (Medline).

38- Iwahi, T.; Okonogi, K.; Yamazaki, T.; Shiki, S.H.; Kondo, M.; Miyake, A. and Imada, A. (1992). *In vitro* and *in vivo* activities of SCE-2787, a new parenteral cephalosporin with a broad antibacterial spectrum. *Antimicrob. Agent. Chemother. 36*(7): 1358-66.

39- Toranzo, A.E.; Cutrin, J.M.; Roberrson, B.S.; Nunez, S. Abell, J.M.; Hetrick, F.M. and Baya, A.M. (1994). Comparison of the taxonomy, serology, drug resistance transfer and virulence of *Citrobacter freundii* strains from mammals and poikilothermic hosts. *Appl. Environ. Microbial. 60*(6): 1789-97.

40- Skidmore, B.J.; Chiller, J.M.; Morrison, D.C. and Weiyle, W.O. (1975). Immunogenic properties of bacterial lipopolysaccharide: Correlation between the the mitogenic, adjuvant and immunogenic activities. *J. Immunol. 114*(2): 770-5.

41- Milano, S.; Arcoleo, F.; D'agostino, P. and Cillari, E. (1997). Interaperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokines and nitrate secretion in blood. *Antimicrob. Agen. Chemother. 41*(1): 117-21.

42- Hewett, G.A. and Roth, R.A. (1993). Hepatic and extra hepatic pathobiology of bacterial LPS. *Pharma. Rev. 45*(4): 381-408.

43- Luchi, M. and Morrison, D. (2000). Comparable endotoxic properties of lipopolysaccharides are manifest in diverse clinical isolates of gram-negative bacteria. *Infect. Immun. 68*(4): 1899-904.

44- الهاشمي، أنعام سامي نور حيدر. (2002). مرضية جرثومة *Citrobacter freundii* وذيفاناتها المعزولة من بعض حالات الإسهال عند الرضع بمدينة الموصل، رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة الموصل.

45- Gibott, A.; Saridakis, H.O.; Pelayo, J.S.; Tagliavi, K.C. and Falcao, D.P. (2000). Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholera* non-Ol, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shiglloides* from cambe stream. *J. Appl. Microbiol. 89*: 70-5.

46- Proulx, F.; Seidman, E.G. and Karpman, D. (2001). Pathogensis of shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res. 50*: 163-71.

47- Ishikawa, H.; Kanai, T.; Ono, T.; Shimoyama, Y.; Aizawa, K.; Ishide, H. Saiton, Y.; Hata, H.; Aoki, A.; Okuda, S. and others. (1999). Analysis of cases with liver abscess following transcathter arterial chemoemobilization (TAE) for malignant hepatic tumors. *Gan. To. Kagaku. Ryoho. 21*(13): 2233-6. (Abstract).

48- الكرخي، منال خالد محمد. (2001). دراسة امراضية بكتريا *Acinetobacter baumanni* المعزولة محلياً، رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة بغداد.

49- Fukuoka, T. Ohya, S.; Utsui, Y.; Takenouchi, T.; Koga, T.; Masnda, N.; Kawada, H.; Kakuta, M.; Kubota, M.; Ishii, C. and Others. (1997). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of Cs-834., a noval oral carbapenem. *Antimicrob. Agen. Chemother. 41*(12): 2652-63.

50- عبد الحسين، بشرى إسماعيل. (2006). دراسة الذيفانات المعوية لبكتريا *Plesiomonas shigellodes* المعزولة محلياً، رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة بغداد.

51- Scotland, S.M. (1988). Toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symp. 65*: 1095-1295.