Histopathological Effects of Burkholderia Mallei Isolated from Patients with Wound Infections on Mice

Dr.May Talib Flayyih
Department of Biology , College of Science , University of Baghdad/ Baghdad
Bushra Ali Kahdum
Department of Biology , College of Science , University of Baghdad/ Baghdad
Hala Moaed Radeef
Department of Biology , College of Science , University of Baghdad/ Baghdad
Email:uot_magaz@yahoo.com

Received on: 11/12/2011 & Accepted on:7/6/2012

ABSTRACT

The histopathological effects 0f B. mallei on four organs (kidney, spleen, lung and liver) of mice injected with (10^4, 10^6, 10^8) CFU/ ml were studied. The results showed that the bacteria induced histopathological effects in all organs. In kidney the effects characterized by cytoplasmic vacculation and infiltration of inflammatory cells in addition to congestion and shrinkage of the glomeruli of the kidney,while effects in spleen characterized by enlargement of white pulp and necrosis in parenchymal tissue with formation of germinal center. Lung sections showed thickness in alveolar walls and infiltration of inflammatory cells with odema and congestion of blood vessels. Liver sections showed cytoplasmic vacculation and infiltration of inflammatory cells.

Key Words: *Burkholderia mallei* , Histopathological Effects, Wound Infections

التأثيرات المرضية النسجية لبكتريا Burkholderia mallei المعزولة من اخماج الجروح في الفئران

الخلاصة

درست التأثيرات المرضية النسجية لبكتريا B. mallei في اربع اعضاء وهي الكلية والطحال والرئة والكبد للفئران المحقونة بالاعداد (10^4, 10^6, 10^8) خلية مكونة للمستعمرة/مل، فأظهرت النتائج ان البكتريا احدثت تغيرات مرضية نسجية في جميع الاعضاء، تميزت في الكلية بحدوث تفجي بسيط في الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية وارتشاح خلايا التهابية مع احتقان دموي وتنخر في الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية مع انكماش في الكبيبة, اما الطحال فتميز بحدوث توسع اللب الابيض على حساب اللب الاحمر مع حدوث تنخر في النسيج البرنكيمي المكون للطحال ووجود مركز جرثومي (germinal center).
وقداظهرت مقاطع نسيج الرئة وجود تثخن في جدار الحويصلة الرئوية وارتشاح للخلايا الالتهابية مع وذمة (odema) و احتقان دموي , بينما اظهرت المقاطع النسجية للكبد حدوث تفجي مع ارتشاح بؤري للخلايا الالتهابية منتشرة بين خلايا الكبد.

https://doi.org/10.30684/etj.31.1B.14
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

المقدمة

تتميزبكتريا Burkholderia mallei بكونها عصيات سالبة لملون كرام موجبة للاوكسيديز غير متحركة وتعد ممرض اجباري للحيوان حيث ان الخيول والقردة والبغال مضائف طبيعية لها , وبامكان هذه البكتريا اصابة انواع مختلفة من الحيوانات مثل الفئران والارانب وخنازير غينيا والهامستر وحتى الاسود والكلاب التي تتغذى على لحوم ملوثة بهذه البكتريا [1، 2] . يصاب الانسان عرضياً بالبكتريا عند التعامل مع هذة الحيوانات حيث يكون الافراد الذين هم بتماس مباشر مع الحيوانات المصابة كذلك العاملين بالمختبرات عرضة للاصابة بهذه البكتريا حيث تنتقل عن طريق الجلد والاستنشاق [3 ، 4]. وتسبب البكتريا حالات مرضية اهمها الرعام (glanders) الذي من اهم اعراضه التهاب الغد اللمفاوية والتهاب الجهاز التنفسي مع حمى ويمكن ان يتحول المرض الى حالة مزمنة وتصل نسبة الوفيات الى حوالى 50% كما تسبب البكتريا ذات الرئة وتنخر للقصيبات وافات جلدية تتطور الى خراجات [5 , 6 ،7] وتمتلك البكتريا عوامل فوعة (virulence factors) عديدة مثل انتاجها للمحفظة ولانزيمات عديدة منها اللاييز والبروتييز ومقاومتها للبلعمة وامتلاكها نظام افراز النمط الثالث (type III secretion) فقد اثبتت تجارب التطفير ات كل من المحفظة ونظام افراز النمط الثالث ضرورية لامراضية البكتريا واحداث الاصابة في الحيوانات المختبرية[10,9,8] كما تمتلك البكتريا جينات تشفر لانتاج لواصق (adhesions) تساهم بإلتصاق البكتريا بالخلايا الطلائية للقناة التنفسية [11]

اظهرت البحوث ان الهامستر الذهبي هو اكثر الحيوانات تحسساً وتأثراً بهذه البكتريا لذا يعد الحيوان المختبري النموذجي لدراسة امراضيتها حيث بالامكان احداث الاصابة عند الحقن بجرعة اقل من (10 CFU) وحدة مكونة للمستعمرة ، وظهور الاعراض بعد يومين من الحقن ، ولوحظ ان احداث الاصابة بالفئران يتطلب حقنها بجرع تصل الى 1.2×10^4 وحدة مكونة للمستعمرة[7] . ونظرا لخطورة بكتريا *B. mallei* كسلاح جرثومي تم التركيز في الاونة الاخيرة على تطوير لقاح فعال ضد انواع بكتريا ***Burkholderia*** الشديدة الامراضية وبشكل خاص النوعين المتقاربين وراثياً *B. mallei* و ***B. pseudomallei*** فاللقاح المنتج ضد احدهما يكون فعال ضد كلا النوعين [13,12] .

نظرا لتزايد اهمية بكتريا *B. mallei* كممرض للانسان في السنوات الاخيرة لذا استهدف هذا البحث دراسة امراضية بكتريا *B. mallei* المعزولة من اخماج الجروح و تحديد تأثيراتها المرضية النسجيةلاعضاء الكلية والطحال والرئة لأناث الفئران البيض .

المواد وطرائق العمل

- بكتريا *B. mallei* : استخدمت عزلة بكتيرية تم عزلها من مسحات جروح لمرضى مصابين باخماج الجروح والانسجة الرخوة من احد مستشفيات بغداد(14). نميت العزلة على وسط ماكونكي اكار (MacConkey agar) ووسط اكار الدم وبعد تنقية المستعمرات النامية تم ملاحظة لون وشكل الخلايا بعد صبغها بملون غرام وفحصها بالمجهر الضوئي وتم تأكيد التشخيص باستخدام الاختبارات الكيموحيوية وحسب ماجاء في [15] وباستخدام اختبار API 20 NE .

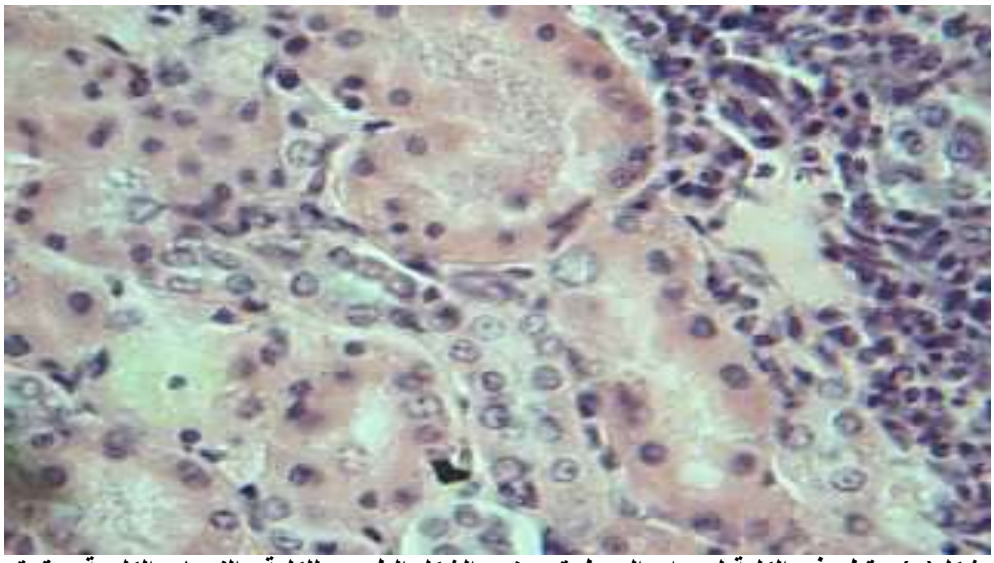
- دراسة التأثيرات المرضية النسجية في الفئران المحقونة بالبكتريا : استخدمت اناث فئران بيضاء بعمر 8 اسابيع وبوزن(25 – 30) غم من بيت الحيوانات في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد ، قسمت الى ثلاثة مجاميع (تضمنت كل مجموعة ٣ فئران) و حقنت بالمزروع البكتيري المنمى بنقيع القلب والدماغ وبالاعداد (10^4, 10^6, 10^8) خلية مكونة للمستعمرة/مل وبواقع 0.1 مل في غشاء البريتون وبواقع ثلاث فئران لكل تركيز , وبعد خمسة ايام تم قتلها بقطع

النخاع الشوكي تشريح الفئران واعداد مقاطع نسجية لكل من الكلية والطحال والكبد والرئة [16].

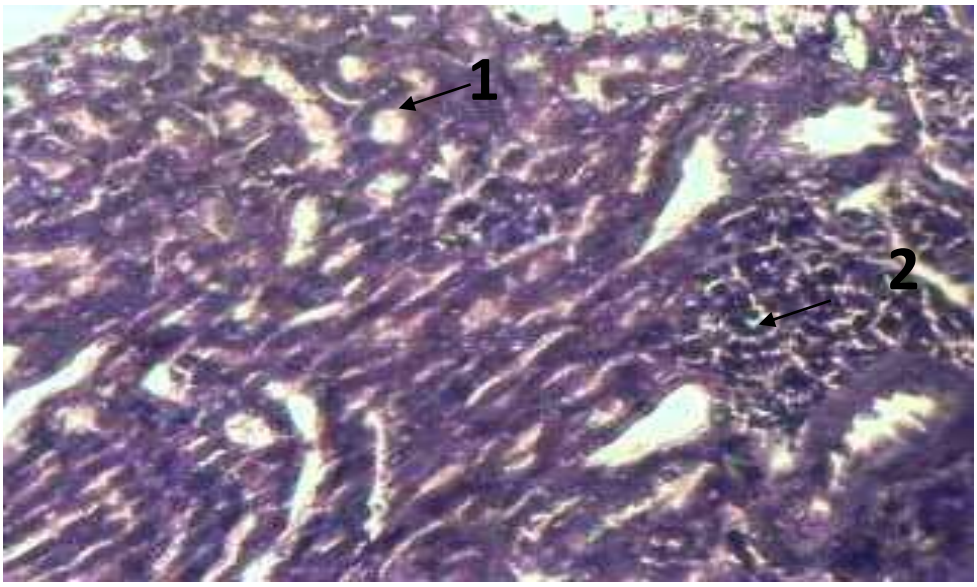
النتائج والمناقشة

تم دراسة التأثيرات المرضية النسجية لبكتريا B. mallei في الفئران المحقونة فأظهرت النتائج ان البكتريا سببت عدة تغيرات مرضية نسجية وكما يلي :

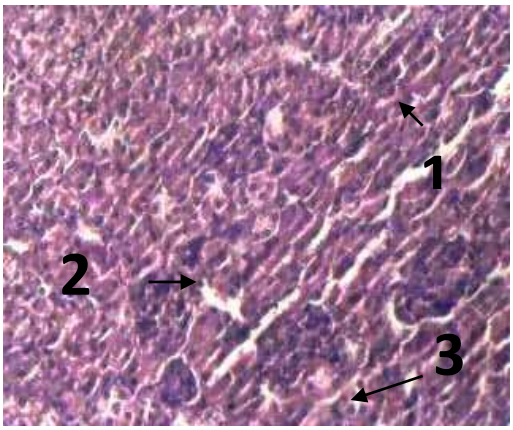
- الكلية Kidney: اظهرت المقاطع النسجية لكلى الفئران المحقونة بالبكتريا وبالاعداد (10^4, 10^6) خلية مكونة للمستعمرة/مل مقارنة بحيوان السيطرة شكل (1) حدوث تفجي(cytoplasmic vacculation) بسيط في الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية وارتشاح خلايا التهابية بسيط مع احتقان دموي (congestion) في الفئران المحقونة بالعدد 10^6خلية مكونة للمستعمرة / مل شكل(2) و(3) ، وازدادت شدة التأثيرات في الفئران المحقونة بالعدد 10^8خلية مكونة للمستعمرة / مل حيث لوحظ وجود تفجي مع تنخر(necrosis) في الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية واحتقان دموي(congestion) مع انكماش في الكبيبة (shrinkage of the glomeruli) شكل(4) .



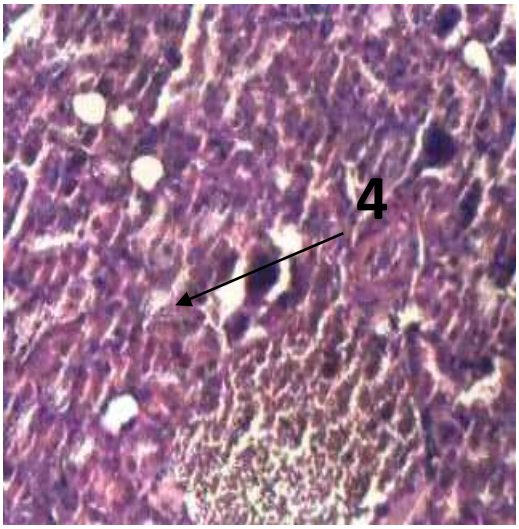
شكل(1) مقطع في الكلية لحيوان السيطرة يوضح الشكل الطبيعي للكلية والنبيبات الكلوية وبقوة تكبير 100X (H& E).



شكل (2) مقطع في نسيج كلية فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^4 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر فيه حدوث تفجي بسيط في الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية وارتشاح خلايا التهابية بسيط مع احتقان دموي وبقوة تكبير 100X(H& E).1:تفجي ،2:إرتشاح .

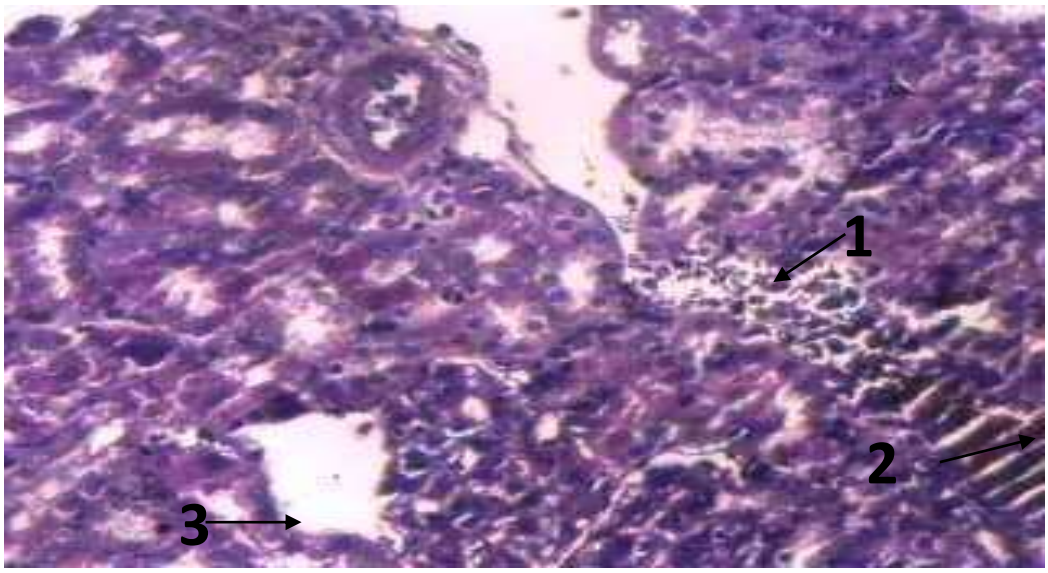


A



B

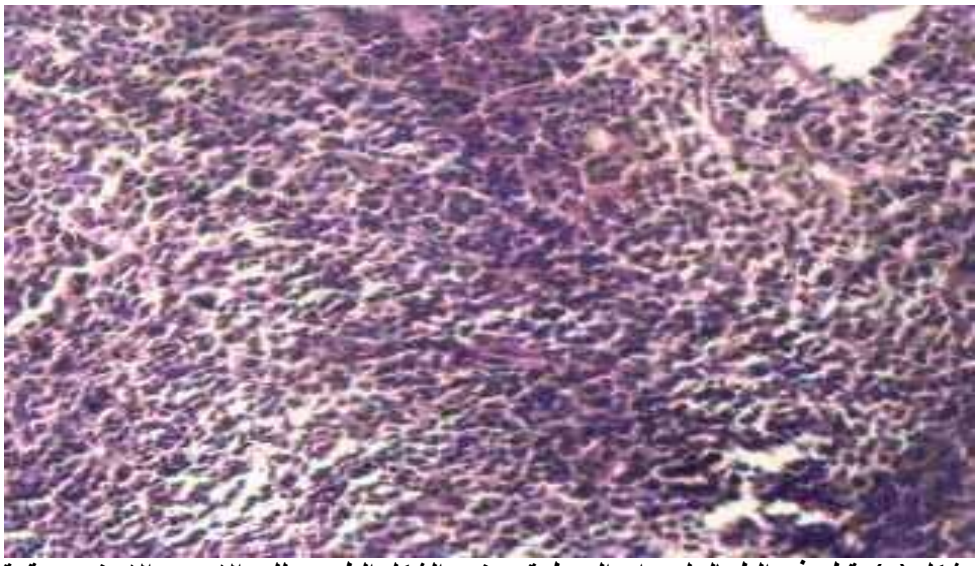
شكل (3)A وBمقطع في نسيج كلية فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر فيه وجود تفجي مع تنخر في الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية واحتقان دموي مع انكماش في الكبيبة وبقوة تكبير 10X(H& E).1:تفجي،2:انكماش،3:تنخر،4:احتقان.



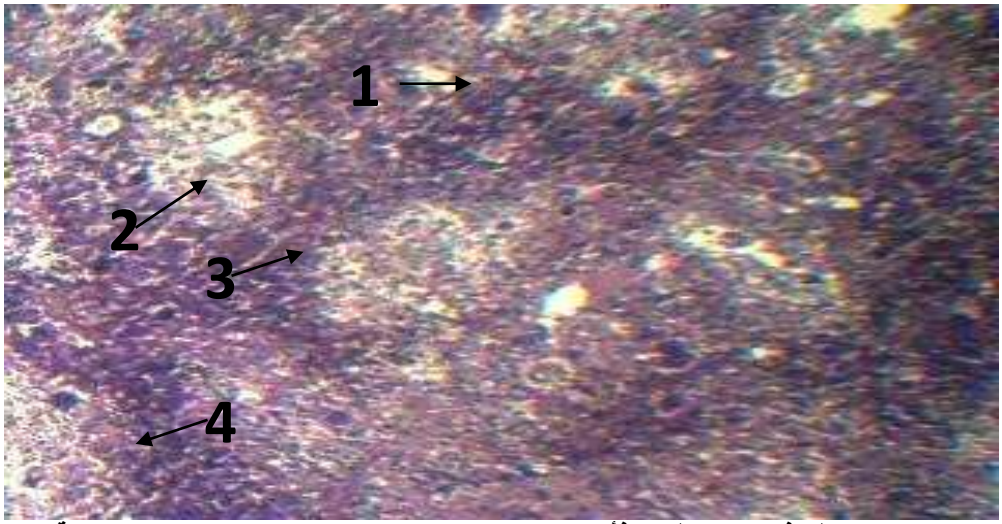
شكل (4) مقطع في نسيج كلية فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^8 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر فيه حدوث تفجي بسيط في الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية وارتشاح خلايا التهابية مع احتقان دموي وبقوة تكبير 100X(H& E).1:ارتشاح،2:احتقان،3:تفجي .

- الطحال Spleen : اظهرت المقاطع النسجية لطحال الفئران المحقونة بالبكتريا وبالاعداد(10^4, 10^6) خلية مكونة للمستعمرة/مل (مقارنة بحيوان السيطرة شكل 5) حدوث تأثيرات مناعية تمثلت بتوسع اللب الابيض على حساب اللب الاحمر مع وجود خلايا مولدة للصفيحات الدموية مع حدوث تغيرات نسيجية تمثلت بحدوث تنخر في النسيج البرنكيمي المكون للطحال وكانت هذه التأثيرات

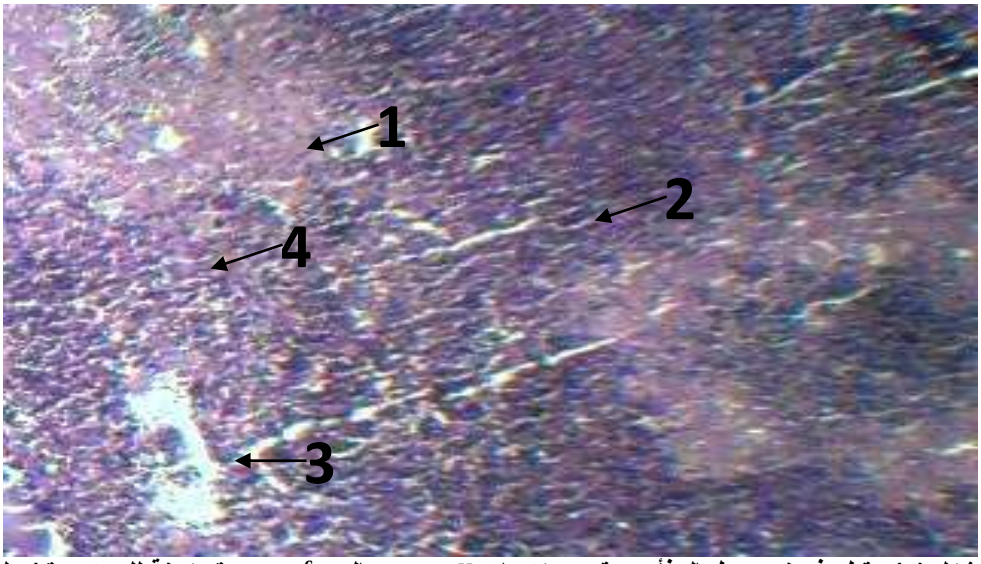
اشد في الفئران المحقونة بالعدد 10^8 خلية مكونة للمستعمرة / مل مع وجود وسط جرثومي (germinal center) شكل (6 و7 و8).



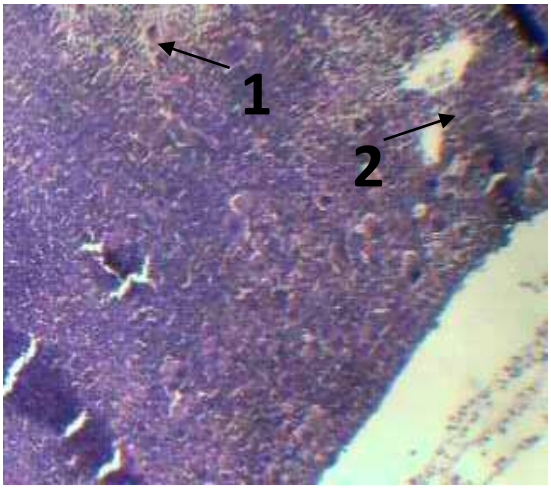
شكل (5)مقطع في الطحال لحيوان السيطرة يوضح الشكل الطبيعي للب الاحمر والابيض وبقوة تكبيX 10(H& E).



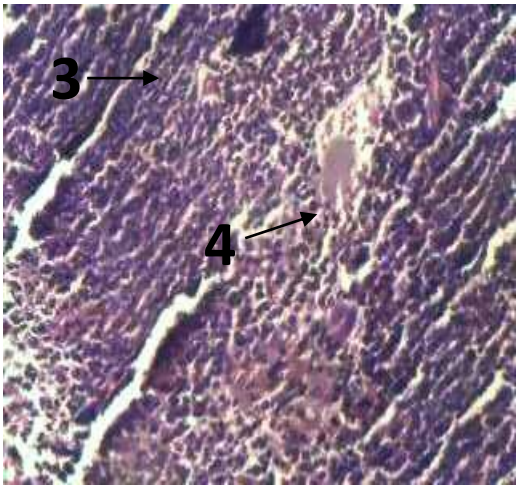
شكل (6) مقطع في نسيج طحال فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^4 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر حدوث توسع اللب الابيض على حساب اللب الاحمر مع وجود خلايا مولدة للصفيحات الدموية وحدوث تنخر في النسيج البرنكيمي المكون للطحال وبقوة تكبير ٤٠X (H& E). 1 :تنخر،2:توسع اللب البيض،3:اتحسار اللب الاحمر،4:خلايا مولدة للصفيحات المويةِ.



شكل (7) مقطع في نسيج طحال فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر حدوث توسع اللب الابيض على حساب اللب الاحمر مع وجود خلايا مولدة للصفيحات الدموية وحدوث تنخر في النسيج البرنكيمي المكون للطحال وبقوة تكبير X٤٠ (H& E).1:توسع اللب الابيض ،2:اللب الحمر،3 :خلايا مولدة للصفيحات الدموية، 4: تنخر.



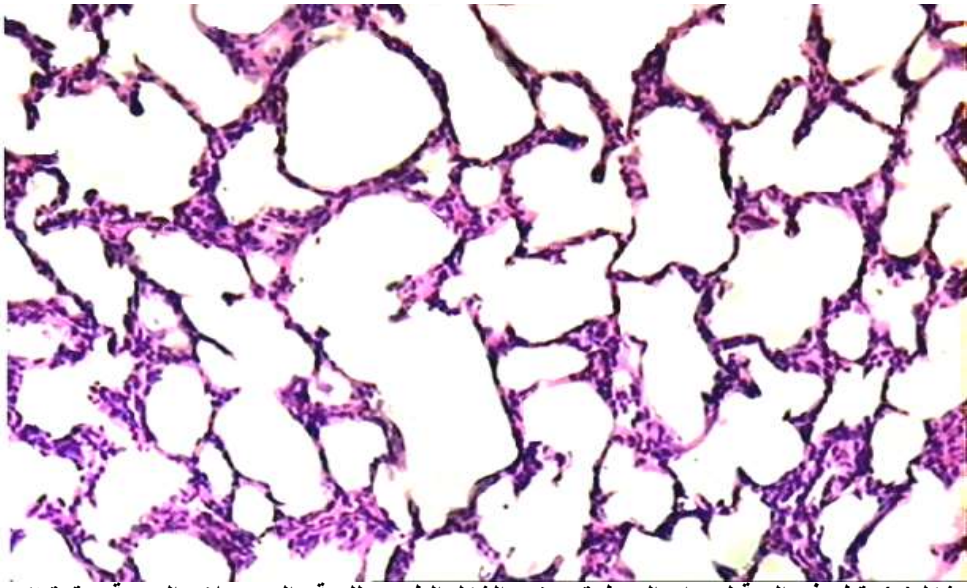
A



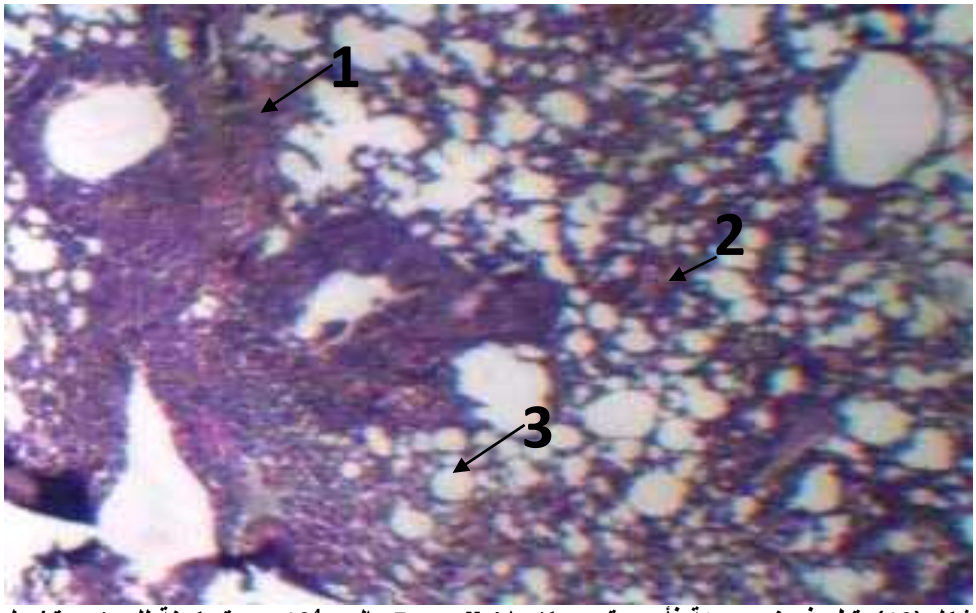
B

شكل (8)A و B) مقطع في نسيج طحال فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر حدوث توسع اللب الابيض على حساب اللب الاحمر مع وجود خلايا مولدة للصفيحات الدموية وحدوث تنخر في النسيج البرنكيمي المكون للطحال مع وجود مركز جرثومي وبقوة تكبير 40X(H& E). 1 : تنخر مع مركز جرثومي 2: توسع اللب الابيض 3: تنخر 4: خلايا مولدة للصفيحات الدموية .

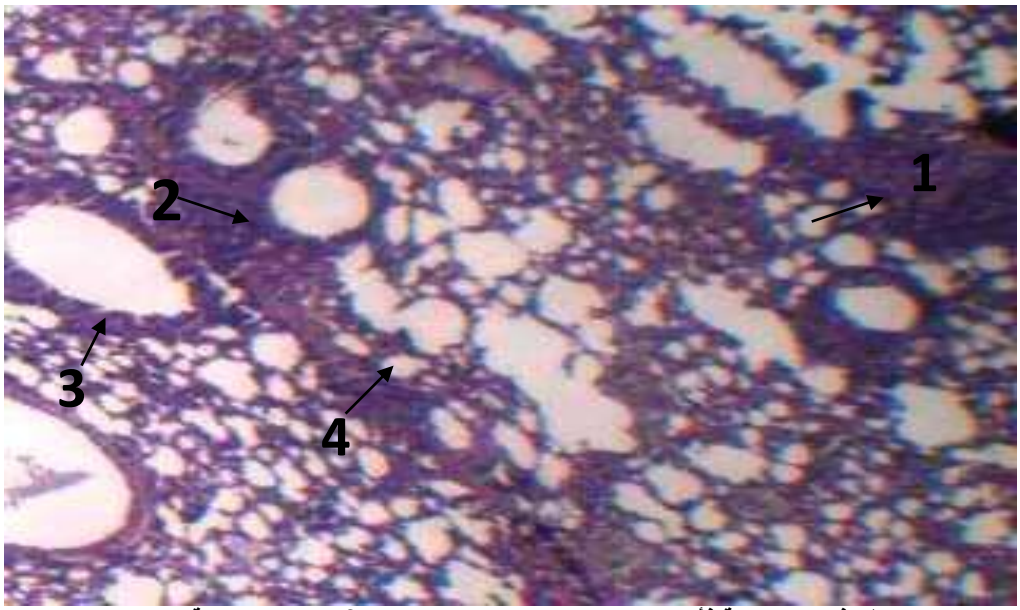
- الرئة Lung : اظهرت المقاطع النسجية لرئة الفئران المحقونة بالبكتريا وبالاعداد(10^4, 10^6) خلية مكونة للمستعمرة/مل (مقارنة بحيوان السيطرة شكل9) وجود تثخن بسيط في جدار الحويصلة الرئوية وارتشاح للخلايا الالتهابية مع وذمة (odema) شكل (10)مع احتقان دموي (شكل 11). وازدادت شدة التأثيرات في الفئران المحقونة بالعدد 10^8خلية مكونة للمستعمرة / مل حيث لوحظ وجود احتقان دموي وارتشاح خلايا التهابية خصوصا حول القصيبات الرئوية مع تثخن في جدار الحويصلات الرئوية (شكل12).



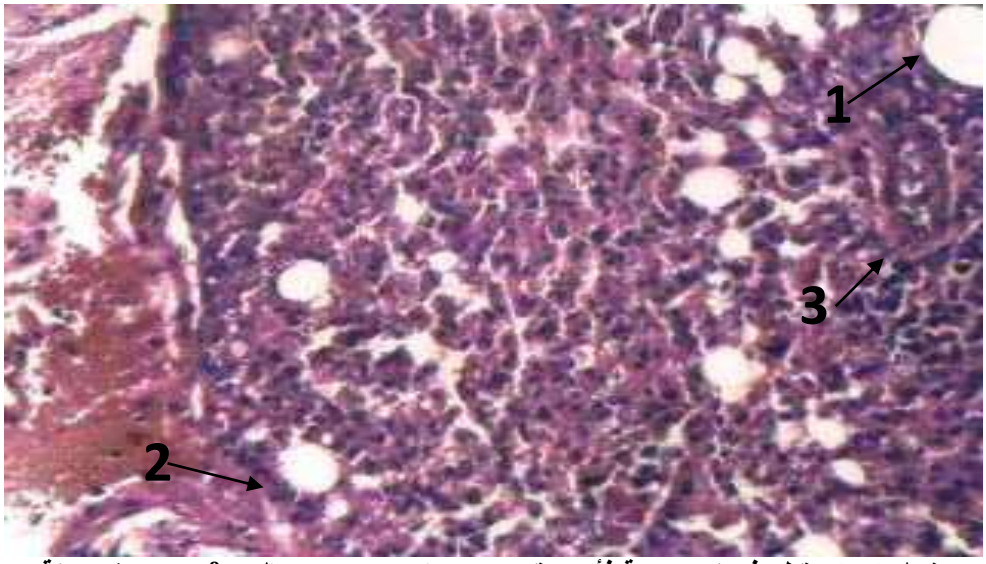
شكل(9)مقطع في الرئة لحيوان السيطرة يوضح الشكل الطبيعي للرئة والحويصلات الرئوية وبقوة تكبير 100X(H& E).



شكل (10)مقطع في نسيج رئة فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^4 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر وجود تثخن بسيط في جدار الحويصلة الرئوية وارتشاح للخلايا الالتهابية مع وذمة (odema) وبقوة تكبير ٤٠X(H& E). 1. تثخن ،2وذمة، 3:ارتشاح.

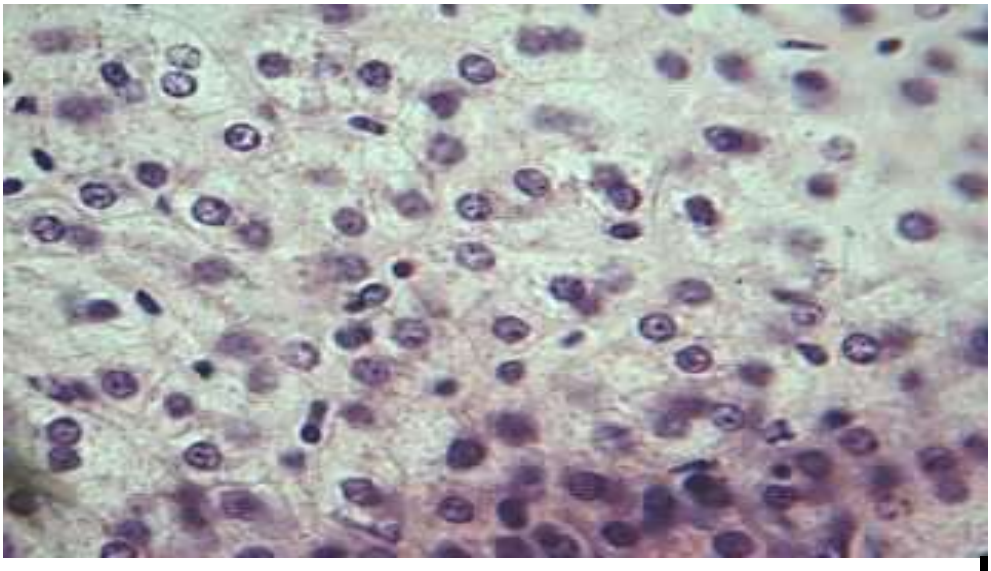


شكل (11) مقطع في نسيج رئة فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر وجود تثخن بسيط في جدار الحويصلة الرئوية وارتشاح للخلايا الالتهابية مع وذمة (odema) (و احتقان دموي وبقوة تكبير ٤٠X(H& E) .1.احتقان،2ارتشاح،3تثخن4وذمة.

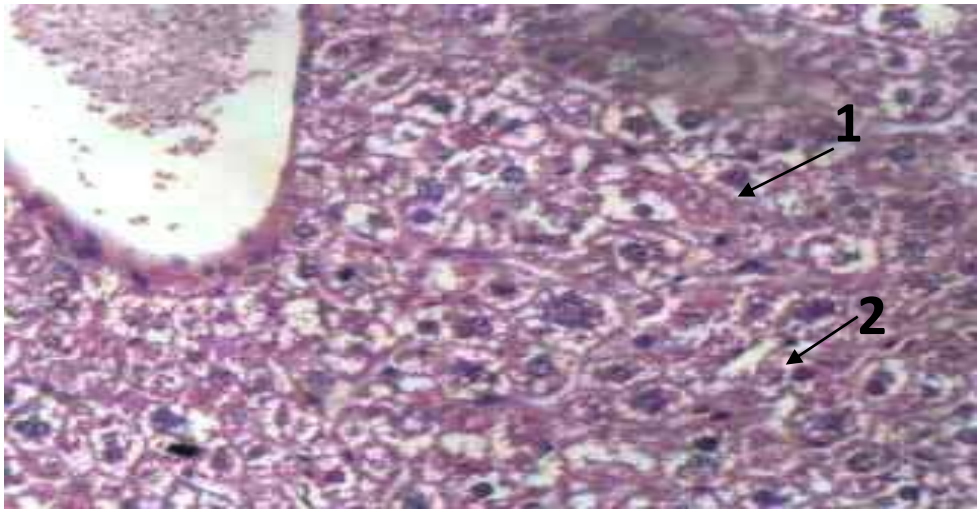


شكل (12) مقطع في نسيج رئة فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^8 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر وجود احتقان دموي وارتشاح خلايا التهابية خصوصا حول القصيبات الرئوية مع تثخن في جدار الحويصلات الرئوية وبقوة تكبير 100X(H& E) .1.تثخن ،2احتقان،3ارتشاح

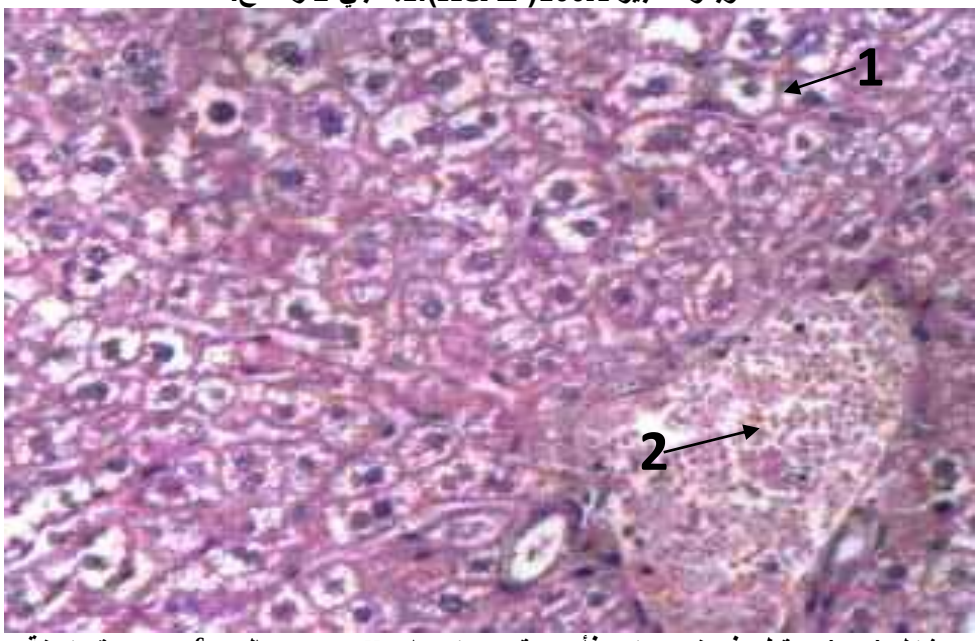
- الكبد Liver : اظهرت المقاطع النسجية لكبد الفئران المحقونة بالبكتريا وبالاعداد (10^4, 10^6, 10^8) خلية مكونة للمستعمرة/مل(مقارنة بحيوان السيطرة شكل ١٣) حدوث تفجي مع ارتشاح بؤري للخلايا الالتهابية منتشرة بين خلايا الكبد ولم يلاحظ حدوث زيادة بشدة التأثيرات عند زيادة اعداد البكتريا شكل(14 و 15 و 16) .



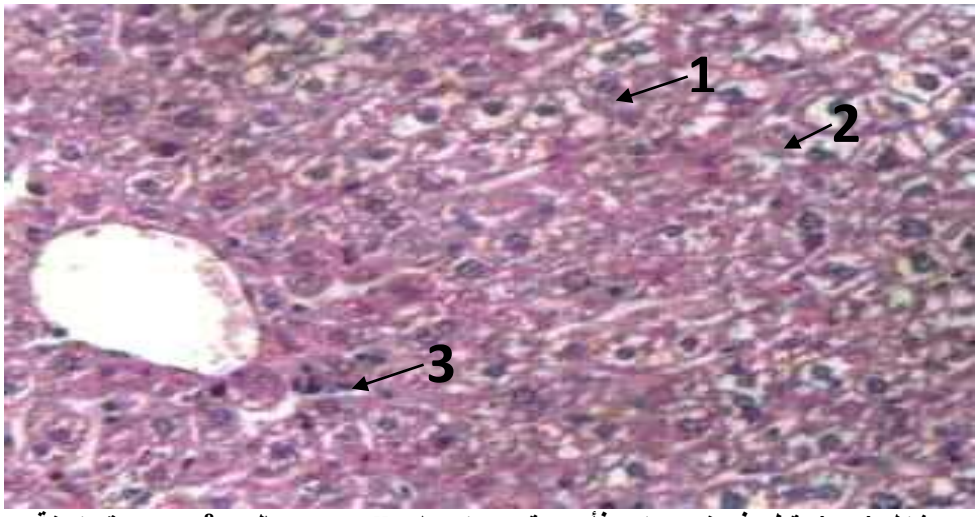
شكل (13) مقطع في الكبد لحيوان السيطرة يوضح الشكل الطبيعي لخلايا الكبد وبقوة تكبير 100X(H& E).



شكل (14) مقطع في نسيج كبد فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^4 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر حدوث تفجي مع ارتشاح بؤري للخلايا الالتهابية منتشرة بين خلايا الكبد وبقوة تكبير 100X(H& E).1.تفجي،2ارتشاح.



شكل (15) مقطع في نسيج كبد فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر حدوث تفجي مع ارتشاح بؤري للخلايا الالتهابية منتشرة بين خلايا الكبد وبقوة تكبير 100X(H& E).



شكل (16)مقطع في نسيج كبد فأر محقون ببكتريا *B. mallei* بالعدد 10^8 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ويظهر حدوث تفجي مع ارتشاح بؤري للخلايا الالتهابية منتشرة بين خلايا الكبد وبقوة تكبير 100X(H& E).1:تفجي،2احتقان،3ارتشاح.

اصابة الفئران *ببكتري*ا B. mallei عن طريق الاستنشاق ينتج عنه خمج حاد في الجهاز التنفسي يتميز بتكون افآت (lesions) في الرئة من\ اليوم الاول للاصابة مع ظهور ارتشاح للخلايا الالتهابية ثم يبدأ ظهور التنخر (necrosis) خلال 3 – 10 ايام وبشكل معتمد على الجرعة المستخدمة [17]. اما الانسجة البشرية الماخوذة من اعضاء مختلفة لمرضى مصابين ببكتريا *B.*pseudomallei اظهرت وجود افآت (lesions) تتراوح بين الحادة والمزمنة مع التهاب حبيبي (granulomatous inflammation) غير محدد بنسيج معين , ففي خمس خزع نسيجسة مختلفة لوحظ وجود التهاب موضعي او التهاب منتشر مع التهاب تنخري حاد (acute necrotizing inflammation) رافقه ارتشاح لاعداد مختلفة من الخلايا العدلة والخلايا البلعمية واللمفاوية وخلايا عملاقة (giant cells) تمثل خلايا بلعمية عملاقة (giant macrophages) [18].

وقد اشار Ulrich and Deshazer [7] ان الفئران المحقونةببكتريا *B. mallei* بجرع تصل الى 1.2×10^4 وحدة مكونة للمستعمرة تظهراصابة بالبكتريا وتبدأ بالموت في اليوم الرابع من الحقن ثم تموت جميعها في اليوم الخامس اما الفئران المحقونة بجرع اقل فانها تقاوم ولايحدث الموت في الايام الخمسة الاولى من الاصابة ،في حين اشار Santanirand *et al.* [19] ان اصابة الفئران عند حقنها في غشاء البريتون وموتها يتطلب جرع اكبر من 10^6 CFU وان الجرع الاصغر من ذلك تسبب تأثيرات واضحة في كبد وطحال الفئران يمكن ان تزول بعد 3– 4 اسابيع اما البكتريا التي تستطيع المقاومة والبقاء في الجسم فانها تسبب خمج مزمن لفترة تتراوح بين 2 - 16 شهر الذي ينتهي فيما بعد بموت جميع الفئران , وان مقاومة الجسم لخمج البكتريا الحاد يعتمد بشكل مباشر على انتاج الكاما انترفيرون (IFN-γ) في الجسم الحي والحماية السريعة التي يوفرها هذا العامل منذ اليوم الاول للاصابة هي التي تحدد كون الاصابة حادة ام تتحول الى اصابة مزمنة . و من اهم اعرض اصابة الفئران هو ارتفاع شديد بدرجة الحرارة ثم ينتج تسمم للدم (septicemia) الذي يعتبر من اهم العوامل التي تسبب ارتفاع نسبة الوفيات بهذه الاصابة واظهرت الفحوصات النسيجية ان البكتريا تحدث تأثيرات مرضية نسيجية في كل من الرئة والطحال والكبد والعضلات الهيكلية وان اكثر الاعضاء تأثرا هو الطحال حيث تتكون خراجات شديدة (splenic abscesses) وخصوصا في حالة الاخماج المزمنة [٢١,20,7].

References

[1].Parker, M.1990.Glanders and melioidosis. In : Principles ofBacteriology , Virology andImmunity , 8th ed. M.T.Parker and L.H.Collier (eds), Topley &Wilsins.B.C,Decker,Philadlephia,Pa. p 392-394.

[2].Miller,W.R.;Pannell,L.; Cravitz,L.;Tanner,W.A.and Rosebury,T.1948. Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyce spseudomallei* II.Virulence and infectivity for animals .J.Bacteriol.55:127 – 135.

[3].Fritz,D.L.;Vogel,P.;Brown,D.R.;Deshazer,D.andWaag,D.M.2000.Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (Burkholderia mallei)**.**Vet.Pathol.37:626–636

[4].Galyovm, E.E.; Brettm, P.J. and Deshazer, D. 2010 . Molecular insights into Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei pathogenesis. Annu. Rev .Microbiol.***64:****495-517.*

[5]. Burtnick, M.N.; Brett,P.J. and Woods, D.E. 2002. Molecular and physical characterization of Burkholderia mallei O antigens. J. Bacteriol . 184(3)**:**849-852. [6]. Ulrich,R.L.; Deshazer,D. ; Hines . H.B. and Jeddeloh, J. A. 2004. Quorum sensing : a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of Burkholderia mallei .Infect.Immun.72(11):6589 – 6596.

[7]. Ulrich,R.L.and Deshazer,D. 2004.Type IIIsecrection : a virulence factor delivery system essential for the pathogenicity of Burkholderia mallei . Infect.Immun. 72 (2): 1150 – 1154.

[8].Deshazer , D. ;Waag,D.M. ;Fritz, D.L. and Wood,D.E. 2000. Identification of a Burkholderia mallei polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant . Microb.Pathog.30:253 – 269.

[9].Ribot ,W.J. and Ulrich, R.L .2006. The animal pathogen-like type III secretion system is required for the intracellular survival of Burkholderia mallei within J774.2 macrophages. Infect. Immun **,** 74**(7)**:4349-4353.

[10].Antonov,V.A.;Tkachenko,G.A.;Altukhova,V.V.;Savchenko,S.S.;Zinchenko, O.V.; Viktorov ,D.V.; Zamaraev ,V.S.; I,lyukhin,V.I. and Alekseev, V.V. 2008.Molecular identification and typing of Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei: when is enough enough?. Trans. R .Soc. Trop .Med. Hyg. 102 Suppl 1:S134-9.

[11]. Balder,R.; Lipski,S.; Lazarus,J.J.; Grose,W.; Wooten,R.M.; Hogan,R.J.; Woods, D.E.and Eric R Lafontaine . 2010. Identification of Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei 13dhesions for human respiratory epithelial cells. BMC Microbiology. **10:**1186/1471-2180-10-250

[12]. Gilad ,J.2007.Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei: the causative micro-organisms of glanders and melioidosis.Recent. Pat. Antiinfect .Drug Discov. 2(3):233-41.

[13]. Mark Estes,D. ; Dow,S.D.; Schweizer,H.P. and Torres,A.G..2010. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders. Expert. Rev. Anti .Infect. Ther. 8(3): 325–338.

[14].Flayyih, M.T.; Kahdum,B.A. and Radeef,H.M. 2009.Isolation of *Burkholderia mallei* from patients with wound infection and study their virulence . Al-Kufa University J. Biology. 1(1): 467-475.

[15]. Collee,J.G.; Fraser,A.G.; Mormion,B.P.and Simmons,A.1996.Mackie & MacCartney Practical Medical Microbiology.14thed. Churchil Livingstone, Neuyork.

[16].Humason, G.1972.Animal Tissue Technique .3rd. W.H.Freeman Company, San Francisco.p:641.

[17]. Dannenberg, A.M.Jr. and Scott, E.M. 1958.Melioidosis: pathogenesis and immunity in mice and hamsters. I. Studies with virulent strains of Malleomyces pseudomallei. J Exp Med. 107(1):153-66.

[18].Wong, K.T,; Puthucheary ,S.D. and Vadivelu, J.1995. The histopathology of human melioidosis. Histopathology. 26(1):51-5.

[19].-Santanirand,P.;Harley,V.S.;Dance,D.A.B.;Drasar,B.S.and Bancroft,G.J.1999. Obligatory Role of Gamma Interferon for Host Survival in a Murine Model of Infection with Burkholderia pseudomallei . Infect Immun. 67(7): 3593–3600.

[20].Larsen,J.C.andJohnson,N.H.2009.Pathogenesis of Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei. Mil. Med. 174(6):647-51.

[21].-Cheng,A.C.andCurrie,B.J.2005.Melioidosis:epidemiology, pathophysiology, and management. Clin. Microbiol. Rev.18:383–416.