استخلاص الذيفانات المعوية الثابتة بالحرارة لجرثومة *Yersinia enterocolitica*

د. نوال عزيز خليل
فرع الأحياء المجهرية / كلية الطب البيطري
جامعة الموصل

د. أميرة محمود الراوي
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة الموصل

الاستلام **2011 / 01 / 30**
القبول **2011 / 06 / 01**

ABSTRACT

Extraction of heat-stable enterotoxin of *Yersinia enterocolitica* and dosage suckling mice with toxin were done, then sections to study histological changes for some animal organs were prepared.

Histopathological changes and necrosis were reported in intestine, liver and lungs of mouse after injection with heat-stable enterotoxin.

الخلاصة

تـم اسـتخلاص الـذيفانات المعويـة الثابتـة بـالحرارة **Heat-stable enterotoxin** لجرثومـة *Yersinia enterocolitica* وجرعت الفئران الرضيعة بالذيفان ,ثم حضرت مقاطع لدراسة التغيرات النسيجية على بعض أعضاء الحيوانات.

أظهرت التغيرات النسيجية حدوث تغيرات وافات تنخرية في الأمعاء والكبد والرئة للفئران بعد تجريعها بذيفان الجرثومة الثابت بالحرارة.

المقدمة

تنتمي جرثومة *Yersinia enterocolitica* إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae التي تعد أكبر المجاميع الجرثومية المهمة من مجموعة العصيات السالبة لصبغة كرام حيث يكون موقعها الرئيسي في القناة المعوية للإنسان والحيوان[1]. وقد شخصت اليرسينيا لأول مرة من الباحث (Alexander Yersin) عام (1894).

تشير الدراسات إلى قدرة جرثومة *Yersinia enterocolitica* على إنتاج الذيفانات المعوية الثابتة بالحرارة والمشفرة بجينات *Yst* التي تعد عاملاً من عوامل الضراوة وهو المسؤول عن حالة الإسهال الذي قد يرافقه التقيؤ ويكون أكثر وجوداً في العزلات المأخوذة من الإنسان عنها من الحيوان والماء والحليب الخام والأطعمة والتي تظهر تأثيراتها بتحطيم الطبقة المخاطية للأمعاء مثل خلايا اللفائفي والأعور والقولون وتحفيز الغشاء المرتبط بإنزيم Guanylate Cyclase الذي يؤدي إلى زيادة فيCyclic Guanosine Monophosphate (cGAMP) مما يؤدي إلى طرح السوائل والأملاح في تجويفها مسببا الإسهال فضلا عن امتلاك هذه الجرثومة لجينات الالتصاق *Ail gene* وجينات الدخول *Inv gene* تساعد الجرثومة في الالتصاق والدخول إلى الخلايا الطلائية، واحد هذه الذيفانات هو الذيفان المعوي الثابت بالحرارة Stable Enterotoxin (ST) والذي ينتج من الجراثيم الممرضة المعوية و *E. coli* و *Vibro cholera Yersinia enterocolitica* و*Klebsiell*a spp [3,2].

كما أشارت العديد من الدراسات أن الذيفان المعوي ثابت بدرجة حرارة100 °م لمدة 15 ثانية وله مقاومة عالية للأس الهيدروجيني ضمن مدى بين (2.2–8.0) وثابت عند الخزن لمدة طويلة وله مقاومة عالية للتحلل الأنزيمي.[5,4].

أشارت الدراسات أن إنتاج الجرثومة للذيفان المعوي الثابت يعتمد على عدة عوامل منها مصدر عزل الجرثومة والنمط المصلي Serotype والنمط الحيوي Biotype وتخمرها للرامينوز وتفاعلات الاسكولين والسالسين حيث أن السمية تظهر أكثر في العزلات التي تكون من الأنماط المصلية 0:8 ,0:3 ,0:9 ولها علاقة بأمراض الإنسان.[8,7,6].

يعد اختبار تجريع الفئران الرضيعة من أفضل الاختبارات للكشف عن الذيفات المعوية الثابتة بالحرارة.[9].

المواد وطرائق العمل

1. الحيوانات المختبرية Laboratory Animals :

استخدم فئران رضيعة بعمر (4) أيام عدد (6) وبوزن (2.4-2.7) غم للتحري عن إنتاج الذيفان المعوي الثابت بالحرارة.

تمت تربية الحيوانات المختبرية في بيت الحيوانات في كلية العلوم في درجة حرارية بين (24-22)°م وبظروف صحية كاملة.

2. الجراثيم:

تم الحصول على جرثومة *Yersinia enterocolitica* من مختبر الأحياء المجهرية / كلية العلوم / جامعة الموصل وتم تنشيطها وتنميتها على وسط (CIN Novobiocin Cefsulodin Irgasan) باعتباره الوسط الانتخابي لها، والمجهز من شركة BioMerieux وحضر كما ورد في تعليمات الشركة المجهزة وعقم بدرجة (121)° ولمدة (15) دقيقة.

3. الكشف عن الذيفانات المعوية Detection of Enterotoxin :

اختبرت عزلات جرثومة*Yersinia enterocolitica* في قدرتها على إنتاج الذيفان المعوي، حيث استخدم لهذا الغرض وسط (CAYE). القياسي الحاوي على أحماض كازامينية وخلاصة الخميرة (Casammino Acids – Yeast extract), مع إضافة (1%) من الأملاح النادرة المذابة في حامض الكبريتيك (0.0001) عياري والتي تشمل كبريتات المغنسيوم $MgSO_4$ (5%) وكلوريد المغنيز $Mncl_2$ (0.5%) وكلوريد الحديدك $Fecl_3$ (0.5%) ثم ضبط الدالة الحامضية للوسط على (7.3) [10].

بعد تحضير الوسط وزع على دوارق زجاجية سعة (150) مللتر بمقدار (10) مللتر/دورق، لقح بـ(1)سم^3 من وسط المرق المغذي النامية فيه جرثومة *Yersinia enterocolitica* وبعمر (18-24) ساعة. نقلت الدوارق إلى حاضنة هزازة بحركة دورانية قدرها (200) rpm ولمدة (24) ساعة وبدرجة (25)°م. رسبت الخلايا الجرثومية بعد فترة التحضين باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة (8000 xg) مدة (30) دقيقة وبدرجة (4)°م، رشح الطافي باستخدام مرشحات Millipore filter أقطار ثقوبها (0.45) مايكروميتر، وجمع الراشح في قناني معقمة وأجري التحري عن الذيفان المعوي بالاعتماد على الباحثين.[12,11] حيث تم تجريع راشح المزرعة لبعض العزلات بحجم (0.1)سم^3 للفئران الثلاث الرضع بعمر (1-4) أيام والمعزولة عن أمهاتها قبل التجريع استخدام أنبوب التجريع المعدي المطاطي Polyethlene stomach tube قطره الخارجي (0.6) ملم مرتبط بمحقنة سعة (1) سم3 مع إضافة قطرتين من صبغة ايفانز الزرقاء Evans Blue بتركيز (2%) إلى راشح التجريع لتوضيح قراءة النتائج. تركت الحيوانات بعد التجريع بدرجة حرارة الغرفة لمدة (2–4) ساعات بعدها قتلت باستخدام الكلوروفورم وفتح التجويف البطني وأزيلت الأمعاء لكل من الحيوانات الثلاثة ووزنت مجتمعة ثم وزنت بقايا أجسامها وعدت النتيجة موجبة إذا تعدى الوزن (0.083) غم. كما تم عمل مقاطع نسيجية للأمعاء المتضخمة لدراسة التغيرات النسيجية وصورت مجهرياً.[13].

حضرت الشرائح النسجية طبقاً لما ذكر في [14] حيث غسلت العينات المثبتة بمحلول الفورمالين الدارئ المتعادل بالماء لمدة ساعة ووضعت في تراكيز كحولية تصاعدية (70%، 80%، 90%، 100%) لمدة (30) دقيقة لكل تركيز، بعدها وضعت العينات في محلول الزايلين Xylene ساعتان وكررت ثلاث مرات ساعة لكل مرة لترويقها. ثم نقلت إلى شمع البارافين النقي من نوع Papaplast بدرجة انصهار (58)°م لمدة (24) ساعة وبعدها تم عمل بلوكات وقطعت بجهاز تقطيع (المشراح) لتحضير شرائح نسجية بسمك (5-6) مايكروميتر، ثم صبغت العينات بصبغة هيماتوكسلين ديلافيد وصبغة الايوسين وفحصت تحت المجهر وصورت فوتوغرافياً لملاحظة التغيرات المرضية.

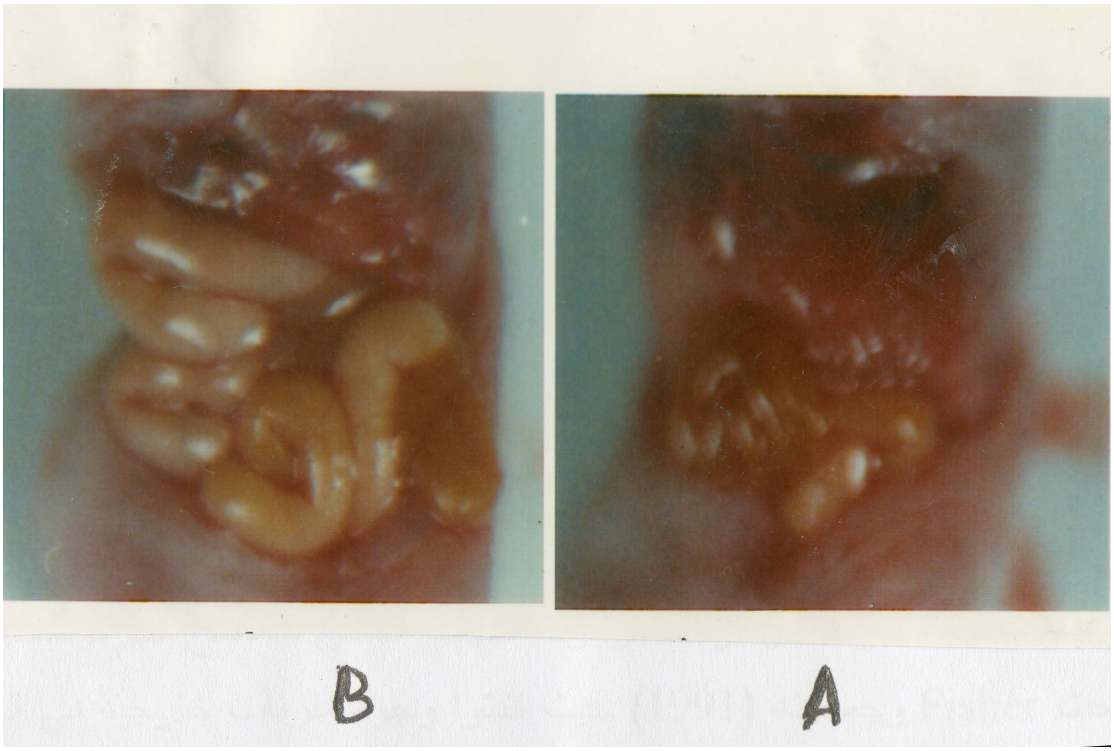
النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج دراستنا الحالية أن تحضين الفئران الرضيعة لمدة ساعتين أدى إلى انتفاخ واضح للأمعاء قياساً إلى أمعاء حيوان السيطرة كما مبين في الصورة (1) في حين أن وزن الأمعاء بقي ثابتاً بعد مرور (4) ساعات من التحضين. وبما أن معدل وزن الأمعاء للرضع الثلاثة مقسومة على معدل وزن بقايا أجسامها مجتمعة في حالة تحضينها ساعتين أعطت قيمة (0.092) فهذا يدل على ايجابية الاختبار لأن القيمة المعتمدة (0.083) هي الفاصل بين الاختبارين الموجب والسالب [9] فما زاد كأن موجباً وما قل كان سالباً وهذه النتيجة جاءت متفقة مع دراسة الباحثين[13] اللذين اعتمدا مدة التحضين ساعتين لتكون الأفضل في دراستهما عن الذيفانات المعوية الثابتة بالحرارة الخاصة بجرثومة *Yersinia enterocolitica* ، في حين أن النتيجة تصبح سالبة بعد مرور (4) ساعات وقد يعزى إنتاج الذيفان في فترة تحضين ساعتين ليكون الأفضل إلى عدة عوامل منها الوسط المستعمل في تهيئة الذيفان الثابت بالحرارة، والأس الهيدروجيني للوسط، فضلاً عن درجة الحرارة المستعملة للتحضين والمحافظة على إبقائها ثابتة خلال أجراء التجربة[16,15] .

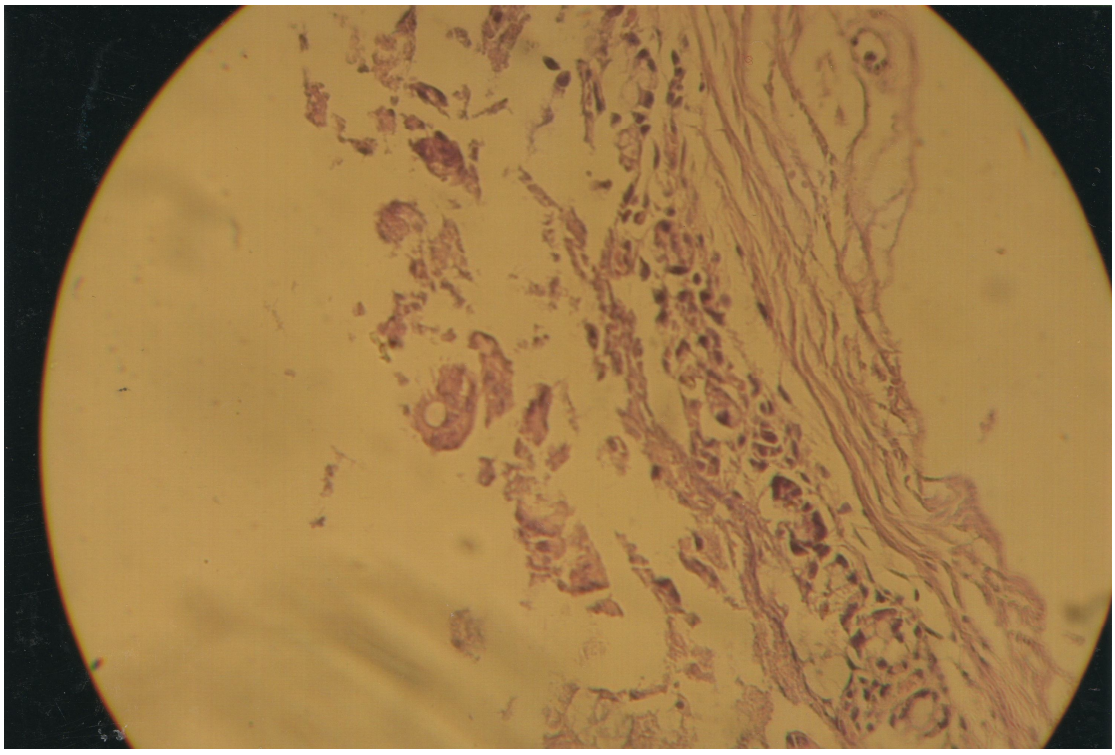
أظهرت الفئران المخمجة علامات سريرية بالخمول وبطيء الحركة والامتناع عن الطعام، كما لوحظت آفات مرضية نسجية في الأمعاء تمثلت باختفاء المعالم الطبيعية لطبقات الأمعاء مع وجود ارتشاح للخلايا الالتهابية تتمثل بالعدلات ووحيدة النواة، كما لوحظ وجود احتقان شديد في الأوعية الدموية الرئوية مع نفاخ رئوي شديد فضلاً عن ارتشاح خلايا التهابية متعددة أشكال النوى وتثخن جدار البعض من الاسناخ الرئوية. كما وجد احتقان الأوعية الدموية مع أخر في بعض من خلايا الكبد وارتشاح طبقة الخلايا الالتهابية وكما هو موضح في الصور [4,3,2].

هذه النتائج جاءت مطابقة لنتائج الباحث [17] حيث أشار إلى ظهور مناطق صغيرة من النزف بشكل أجمالي في فصوص الرئة مع ارتشاح للخلايا متعددة النوى تمتد إلى الحويصلات الرئوية وتحطيمها، مع وجود عقد بيضاء دهنية ضمن الطحال وظهور نخر في الطحال والكبد والرئتين فضلاً عن وجود نخر في الطبقة المخاطية للأمعاء واحتوائها على أعداد هائلة من العدلات، أما في اللفائفي تظهر تجمعات للعدلات بين الغشاء المخاطي والعقد اللمفاوية مع زيادة خلايا متعددة النوى في صفحة Lamina Proporia.

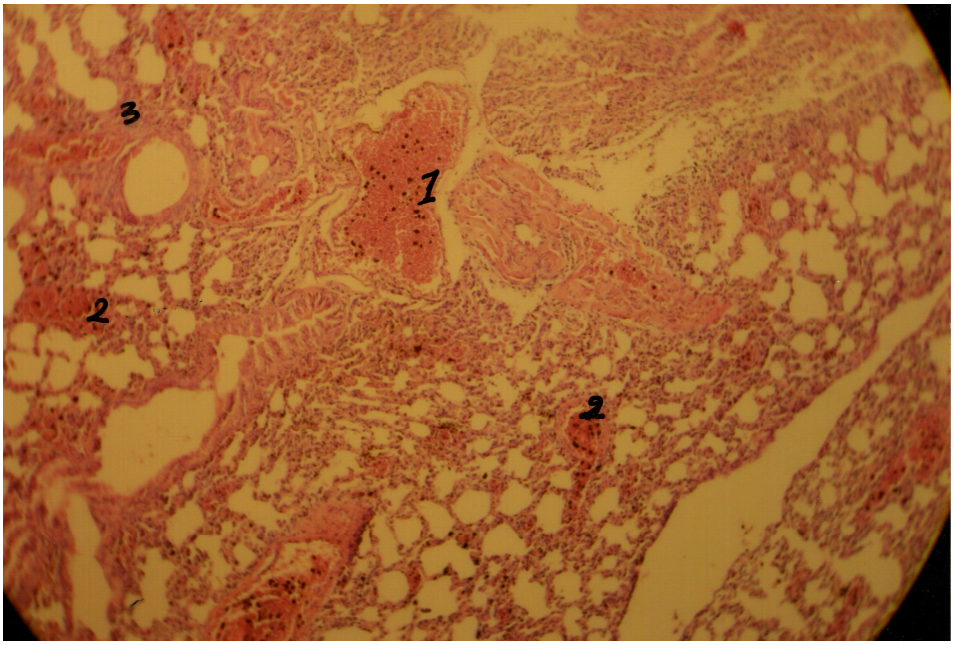
إن إصابة الحيوانات المختبرية بجرثومة تشبه إصابة الإنسان *Yersinia enterocolitica* المكتسبة طبيعياً حيث تؤدي إلى إصابة Systemic Biogenic Infection وتشمل الكبد والرئة حيث يتكون اختراق هائل من العدلات بهذه الأعضاء في مراحل متقدمة من الإصابة يؤدي إلى تكوين خراجات كبيرة [18] وبما أن الفئران المعاملة بالذيفان المعوى هي فئران رضيعة لذا تكون مقاومتها للذيفان ضعيفة فضلاً عن أن الخلايا الظهارية لا تزال خاملة من ناحية الأداء الوظيفي، وهذا يبين عدم قابلية الفئران على مقاومة ما يسببه الذيفان من آفات مرضية والتي تتمثل في حدوث آفات نخرية والتهابية لنسيج الأمعاء الأعضاء الأخرى[6].



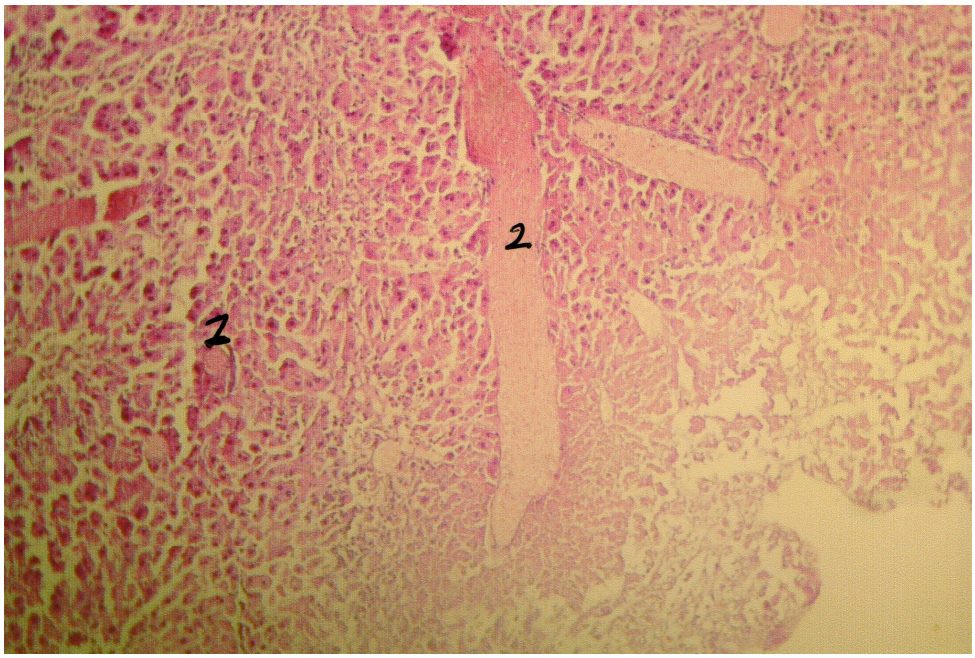
الشكل(1): امعاء الفئران الرضيعة بعد حقنها بالذيفان المعوي الثابت بالحرارة (A)-اختبار السيطرة،(B)-الأختبار الموجب



الشكل(2): مقطع عرضي لأمعاء فأر محقون بالذيفان المعوي للجرثومة بعد ساعتين ،يوضح اختفاء ونخر طبقات الأمعاء والوذمة.الصيغة الهيماتوكسلين والأيوسين.قوة التكبير250X.



الشكل (3): مقطع لنسيج رئة فأر محقونة بالذيفان المعوي للجرثومة بعد ساعتين،يوضح الأحتقان الشدشد في الأوعية الدموية الرئوية(1،2) فضلا عن تثخن جدار الأسناخ الرئوية (3). صبغة الهيماتوكسلين والأيوسين.قوة التكبير 370X



الشكل (4): مقطع عرضي لنسيج كبد فأر محقون بالذيفان المعوي للجرثومة بعد ساعتين،يوضح نخر لبعض من خلايا الكبد (1)، مع احتقان الأوعية الدموية (2). صبغة الهيماتوكسلين والأيوسين.قوة التكبير 370

المصادر

1) Bhaduri, S. Wesley., I.. and Bush , E. (2005) . Apply Environmental Microbiology. 71(11).p:7117-7121.

2) Navarro, F. Sonnested ., M . Teter ., K. (2010). Toxine. 2(5): 1134-1147.

3) Sulakvelidze, A., Kreger, A., Joseph, A., Robins, R. M. and Fasano, A. (1999). Infect. Immun., 67(2): 122-129.

4) Schiemann, D. A. (1989). In: Doyle, M. P. (Ed). Foodborn bacterial pathogens. Marcel Dekker, New Work. Pp. 601-672.

5) Doyle, M. P. and Cliver, D. O. (1990). Acad. Inc. New Work. Pp: 224-

6) Lepka, D. kerrinnes ., T. Skiebe., E. Hahn., B. Fruth., A.Wilharm., G.(2009) Journal of Biomedicine & Biotechnology. 2: 39-43.

7) Andrea, E.Daniel., S .Richard., F. and Jorg., R. (2009) .American Society For Microbiology. 75(18): 5809 – 5813.

8) Gierczynski, R. J.Szych., W. S . Wordak., and Jagielski. M. (2009). J .Clin. Microbiol . 47: 1225 -1228 .

9) Dean, A. G., Ching, Y., Willams, R. G. and Harden, L. B. (1972). J. Infect. Dis. 125: 407-411.

10) Chik, H. PAI and Vera Mors (1977). Am. Soc. Microbiol. 18(3): 908-911.

11) Delor, I., Kaeckenbeeck, A. Wauters, G. and Cornelis, G. R. (1990). Infect Immun. 58: 2983-2988.

12) Weagant, S., Feng, P. and Stanfield, J. T. (2001). U. S. Food and Drug Adminsteration. Center of food safety and Applied Nutrition.

13) Nunes, M. and Ricciardi, P. (1981). J. Clin. Microbiol. 13(4):783-786.

14) Luna, L. G. (1968). 3rd ed, McGraw-Hill Book Comp, New York, pp. 38-76.

15) Serafim, M. B, Monterio, A. R. and de castro, A. F. (1983). J. Clin. Microbiol. 17(5): 799-808.

16) Grant, T., Bennett-Wood, V. and Robins-Browne, R. M. (1998). Infect. Immun. 66(3): 1113-1120.

17) Philips, B. C. (1975). Infect. Immun. 11(1): 164-170.

18) Oellerich, M. F. Jacobi C. A. Frenud., S.Niedung., K. Bach., Trulzsch., K. (2007). Infect. Immun. 75(8): 3802 - 3811.