تأثير الالجنيت الخام في أمراضية جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من عينات سريرية

أ. م. د. وفاء صادق محسن الوزني / جامعة كربلاء ـ كلية العلوم ـ قسم علوم الحياة
* سحر عبد الرضا جابر / جامعة كربلاء ـ كلية العلوم ـ قسم علوم الحياة

* البحث مستل من رسالة طالبة الماجستير سحر عبد الرضا جابر

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة التحري عن جرثومة الزائفة الزنجارية(*Pseudomonas aeruginosa*) في 52 عينة جمعت من مستشفيات الحسين(ع) , الاطفال و النسائية و التوليد في محافظة كربلاء والتي توزعت بين عينات سريرية كالإدرار , الدم , القشع وكل من مسحات الاذن الوسطى و الحروق. حيث عزلت بنسب متغايرة في العينات السريرية تمثلت 45.4% من عينات الادرار و 27.2% من مسحات الحروق في حين عزلت بنسبة 13.6% من كل من مسحات الاذن الوسطى و عينات القشع بينما اعطى الدم نسبة عزل وصلت الى 9.1% فقط.

اكدت نتائج الدراسة الحالية , الدور الذي يلعبه الالجنيت في زيادة امراضية وضراوة جرثومة *P. aeruginosa* ذلك من خلال الانخفاض الواضح في الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من هذه الجرثومة عند وجود الالجنيت بتركيز 20 مايكروغرام / 0.1 مليلتر لتصل الى 2.34×10^{6} خلية جرثومية / مليلتر بالمقارنة مع قيمتها البالغة 3.16×10^{7} خلية جرثومية / مليلتر عند عدم وجود الالجنيت .

كما ان لحقن تراكيز مختلفة من الالجنيت مع قيمة الجرعة القاتلة النصفية (LD_{50}) الاثر في زيادة النسبة المئوية للهلاك لتلك الفئران لتصل الى 100% للفئران المحقونة بالجرعة القاتلة النصفية سويةً مع التركيز20 مايكروغرام / 0.1 مليلتر من الالجنيت ذلك التركيز الذي زاد ايضاً القدرة الاجتياحية لجرثومة *P. aeruginosa* حيث لوحظ ذلك من خلال حساب لوغارتيم العدد الجرثومي الحي المسترد من اعضاء الفئران المصابة بالخلايا الجرثومية وبوجود تراكيز متزايدة من الالجنيت الذي ادى الى حصول زيادة طردية في لوغاريتم العدد الجرثومي الحي المسترد بزيادة التركيز ليصل الى 2.85 , 2.84 , 2.75 و 2.70 من كل من الكبد , الطحال , الكلى و الرئة على التوالي عند وجود التركيز 20 مايكروغرام / 0.1 مليلتر من الالجنيت الخام .

Abstract

This study was achieved to investigate the bacterium *P. aeruginosa* in 52 samples collected from the hospitals AL-Hussein Hospital, Children and Obstetrics & Gynecology in the governorate of Karbala, which distributed among the clinical samples as urine , blood, sputum and swabs from ear and burns . *P. aeruginosa* was isolated in percentage of 45.4% from urine samples and 27.2% from burn swabs while isolated in 13.6% from each of mid ear swabs and sputum samples while in blood , the isolation reached 9.1% .

The results of this study confirmed the important role of alginate in increasing pathogenicity and virulence of *P. aeruginosa* , shown in the apparent decrease in (LD_{50}) of the bacterium with alginate concentration 20 µg/0.1 ml for up to 2.34×10^{6} germ cell/ ml compared with a value of 3.16×10^{7} germ cell/ ml in the absence of alginate .

Also , the injection of different concentrations of alginate with (LD_{50}) effect the percentage of mice dead for up to 100% , with a concentration 20 µg/0.1 ml of alginate . This concentration , which also increased the ability of the bacterium *P. aeruginosa* invasion that have been observed by calculating the logarithm number of bacterial neighborhood retrieved from the members of the mice infected cells germ and in the presence of increase concentration of alginate which led to a increase proportional in the logarithm of the number of bacterial neighborhood retrieved increase the concentration for up to 2.85, 2.84, 2.75 and 2.70 from liver , spleen , kidney and lung , respectively , when there is a concentration 20 µg/0.1ml of crude alginate .

المقدمة Introduction

تعد جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* أكثر انواع الجنس*Pseudomonas* شيوعاً وتأتي اهميتها لدورها الممرض للإنسان , أذ تعد من اهم الممرضات المسببة للإصابة الثانوية (Secondary infections) , وذلك لكونها منتهزة الفرص (Opportunistic) خاصة عند انخفاض كفاءة الجهاز المناعي في المصابين ببعض الامراض المزمنة مثل التليف الكيسي الرئوي (Cystic fibrosis) و المصابين بمتلازمة العوز المناعي المكتسب (Acquired Immuno Deficiency(AIDS)) Syndrome فضلاً عن مرضى السرطان(Cancer), والمصابين بالحروق(Burn)[2,1] .

تكمن ضراوة *P. aeruginosa* في انتاجها للعديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على الغزو و الاستيطان واحداث الضرر النسيجي , وغزو مجرى الدم و الانتشار في مناطق الجسم المختلفة[3]. اذ يعد الالجنيت احد عوامل الضراوة المهمة في إمراضيه هذه الجرثومة من خلال قدرته على حمايتها بالإضافة الى تداخلاته المعقدة مع النظام المناعي للمضيف[4]. اذ ان وجود الالجنيت يحفز ضراوة الجرثومة في احداثها للاصابات المزمنة (Chronic infections) ويمنع الاستساغة البكتيرية (Bacterial Opsonization) بالشكل الذي يعرقل عملية البلعمة , فضلاً عن دوره في تغليف الخلية الجرثومية ومن ثم تمويه تعرف الخلية البلعمية عليها يضاف الى ذلك حماية الجرثومة من الاهداب الموجودة في الجهاز التنفسي ومن فعل الاجسام المضادة و المتمم , كما يجعل الجرثومة اكثر مقاومة للعديد من المضادات بسبب عدم قدرة تلك المضادات على النفاذ خلاله . واليه تعود الخاصية المخاطية للجرثومة والتي تسبب تجمع الخلايا الجرثومية بشكل غشاء حيوي(Biofilm) الذي يلعب دوراً رئيساً في ضراوتها[6,5].

ومع تزايد الاخماج بجرثومة *P. aeruginosa* في السنوات الاخيرة أزدادت البحوث حول دراسة عوامل ضراوتها للوقوف عند اهم تلك العوامل التي يعد الالجنيت واحداً من اهمها لدوره في جعل تلك الجرثومة ذات مقاومة عالية للعديد من المضادات الحيوية المتداولة, الشيء الذي جعلها مسؤولة عن احداث العديد من الاصابات خصوصاً تلك المكتسبة من المستشفيات .

ونظراً لكون الالجنيت قادراً على توليد استجابة مناعية حسب ماشارت بعض الادبيات[7] , فقد كان من الضروري المحاولة في دراسة تاثيراته على امراضية وضراوة بكتريا الزوائف الزنجارية لذا هدفت الدراسة :

1: استخلاص الالجنيت من جرثومة *P. aeruginosa* .

2: دراسة بعض تأثيرات الالجنيت الخام في امراضية جرثومة *P. aeruginosa* من خلال :

أ : ملاحظة تأثير الالجنيت الخام على الجرعة القاتلة النصفية لجرثومة *P. aeruginosa* .

ب: دراسة تأثير الالجنيت الخام على القابلية الاجتياحية لجرثومة *P. aeruginosa* في اعضاء الحيونات المختبرية المصابة .

طرائق العمل

1- جمع العينات السريرية Specimens Collection

تم جمع 52 عينة خلال الفترة من شهر تشرين الثاني 2009 ولغاية شهر نيسان 2010 , واخذت هذه العينات من مواقع و مصادر مختلفة من كل من مستشفى الحسين(ع) , ومستشفى الاطفال و مستشفى النسائية و التوليد في كربلاء المقدسة . تضمنت 15 عينــة ادرار,21 مسحة حروق , 5 مسحة اذن الوسطى , 6 عينة قشع و 5 عينة دم .

2- العزل Isolation

جمعت عينات الادرار , وتم اختبارها خلال مدة زمنية لا تزيد عن ساعة , كما تم اخذ عينات مسحات الحروق والاذن باستعمال المسحات القطنية الحاوية على مرق نقيع القلب و الدماغ (Brain Heart Infusion Broth). كما جمعت عينات القشع بتوصية المريض بتوليد القشع و بصقه في وعاء معقم , اما عينات الدم فقد تم جمعها بسحب الدم من الوريد باستعمال محقنة طبية معقمة , وتم تلقيح وسط مرق نقيع القلب و الدماغ بعينة الدم بحيث تكون نسبة الدم الى الوسط 10:1 وحضنت القناني الملقحة بالدم مدة (1-7) ايام بدرجة حرارة 37 م ولوحظ ظهور علامات النمو الجرثومي في الوسط المنشط كالعكورة , وتخثر الدم او تكون طبقة النمو السطحي .

زرعت العينات السريرية جميعها على وسط غراء الدم (Blood Agar) بوصفه وسط عزل عام واغنائي ووسط غراء الماكونكي (MacConkey Agar) بوصفه وسطاً اختيارياً و تفريقياً للجراثيم السالبة لصبغة غرام . وحضنت الأطباق هوائياً بدرجة 37 م مـدة 24 ساعة .

3- التشخيص Identification

شخصت جرثومة *P. aeruginosa* اعتماداً على مصنف بيرجي [8] وذلك من خلال التعرف على الخصائص الزرعية و المظهرية وباستخدام الاختبارات الكيموحيوية و الفسلجية ووفق ما جاء به كل من [11,10,9].

4- استخلاص الالجنيت Extraction of Alginate

أ- استخلاص الالجنيت بالكحول الاثيلي البارد

بأعتماد الطريقة المتبعة من قبل Kashef,Learn [13,12]

ب- الكشوفات الكيمياوية اللونية للالجنيت .

تم الكشف عن الكربوهيدرات و البروتينات وحسب ماورد في طريقة Plummer [14] :

ج- التحليل الكيميائي لمستخلص الالجنيت الخام

اتبعت طريقة Dubois [15] لتقدير كمية الكربوهيدرات الكلية في مستخلص الالجنيت الخام.

كما اتبعت طريقة Bradford [16] في تقدير البروتينات في مستخلص الالجنيت الخام.

5- التأثيرات الامراضية للالجنيت الخام في الحيوانات المختبرية

أ- تحديد الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الحيوانات المختبرية المحقونة بجرثومة *P. aeruginosa*

تم تلقيح وسط مرق نقيع القلب و الدماغ بجرثومة *P. aeruginosa* وحضن بدرجة حرارة 37 م مدة 18 ساعة بعدها تم ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بسرعة3000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة بعد ذلك تم غسل الخلايا مرتين بدارئ الفوسفات الملحي (Phosphate Buffer Saline) 0.1 مولاري وعلقت بعدها بالدارئ نفسه. وتمت قراءة الامتصاصية للعالق البكتيري على طول موجي 600 نانوميتر وصولاً إلى كثافة بصرية (1) للحصول على عالق بكتيري بتركيز 1×10^9 CFU لكل مليلتر حسب ما بينته العلاقة بين الكثافة البصرية والعدد الحي للجراثيم[17]، والذي عملت منه سلسلة تخافيف عشرية للحصول على التراكيز الخلوية التالية 10^8 ، 10^7 ، 10^6 ، 10^5 ، 10^4 ، 10^3 خلية / مليلتر .

قسمت الفئران إلى 7 مجاميع وبواقع 5 فئران لكل مجموعة حقنت كل مجموعة بواقع1 مليلتر لكل فأرة بأحد التراكيز الجرثومة (10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 ، 10^7 ، 10^8 ، 10^9) خلية / مليلتر داخل تجويف الخلب (Intraperitoneally) ، أما مجموعة السيطرة فقد حقنت بدارئ الفوسفات الملحي المعقم ، وبعد خمسة أيام تم حساب عدد الفئران الحية والميتة ضمن المجموعة الواحدة ، وتم إيجاد الجرعة المهلكة للنصف حسب ما جاء في طريقة Reed and Muench [18] .

ب - بيان تأثير التراكيز المختلفة من الالجنيت الخام على ضراوة جرثومة*P. aeruginosa*

تم في هذه التجربة حقن خمسة مجاميع من الفئران المختبرية داخل الخلب (Intraperitoneal) بتراكيز مختلفة من الالجنيت الخام (1 ، 2.5 ، 5 ، 10 ، 20) مايكروغرام / 0.1 مليلتر مع خلط 0.1 مليلتر من العالق الجرثومي بتركيز 1×10^7 خلية / مليلتر . أكمل الحجم إلى 0.5 مليلتر باستعمال دارئ الفوسفات الملحي وترك كل خليط لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ثم حقنت الفئران المختبرية بـ 0.5 مليلتر لكل فأرة من كل خليط وبواقع 5 فئران للخليط الواحد . وبعد خمسة أيام تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل جرعة وحسبت الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران .

ج- بيان تأثير مستخلص الالجنيت الخام في قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المحقونة بجرثومة *P. aeruginosa*

تم في هذه التجربة إعادة الخطوات المعمول بها في التجربة السابقة ولكن مع خلط 0.1 مليلتر من كل تركيز من تراكيز العالق الجرثومي المستعملة ابتداءً من التركيز1×10^9 خلية/مليلتر مع 0.1 مليلتر من الالجنيت الخام بتركيز 20 مايكروغرام / 0.1 مليلتر . أكمل الحجم إلى 0.5 مليلتر باستعمال دارئ الفوسفات الملحي وترك كل خليط لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ثم حقنت الفئران بـ 0.5 مليلتر لكل فأرة من كل خليط داخل تجويف الخلب وبواقع 5 فئران للخليط الواحد . وبعد خمسة أيام تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل جرعة وحسبت الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران بوجود الالجنيت .

د - تاثير الالجنيت على القابلية الاجتياحية لجرثومة *P. aeruginosa*

تم اخذ ستة مجاميع من الفئران تحتوي الواحدة منها 5 فئران حيث حقنت المجموعة الاولى بالطريقة بنفسها المتبعة في التجربة السابقة وبعد مرور 48 ساعة تم تشريحها, وتم أخذ أجزاء من الكبد و الطحال و الرئة و الكلى كلاً على حدة , ثم هرست تلك الاجزاء مع 1 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي وتم مجانسة العالق المتكون بواسطة المازج الدوار(vortex), وعملت التخافيف العشرية منها وزرعت على وسط غراء الدم وحضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ثم تم حساب العدد الجرثومي لكل تخفيف وبعد ذلك عملت مسحة من المستعمرات النامية على الوسط وتم تلوينها بصبغة غرام, وأجري لها فحص الكاتالايز و الاوكسيديز وباقي الفحوصات البايوكيميائية للتأكد من كونها جرثومة *P. aeruginosa* .

النتائج والمناقشة

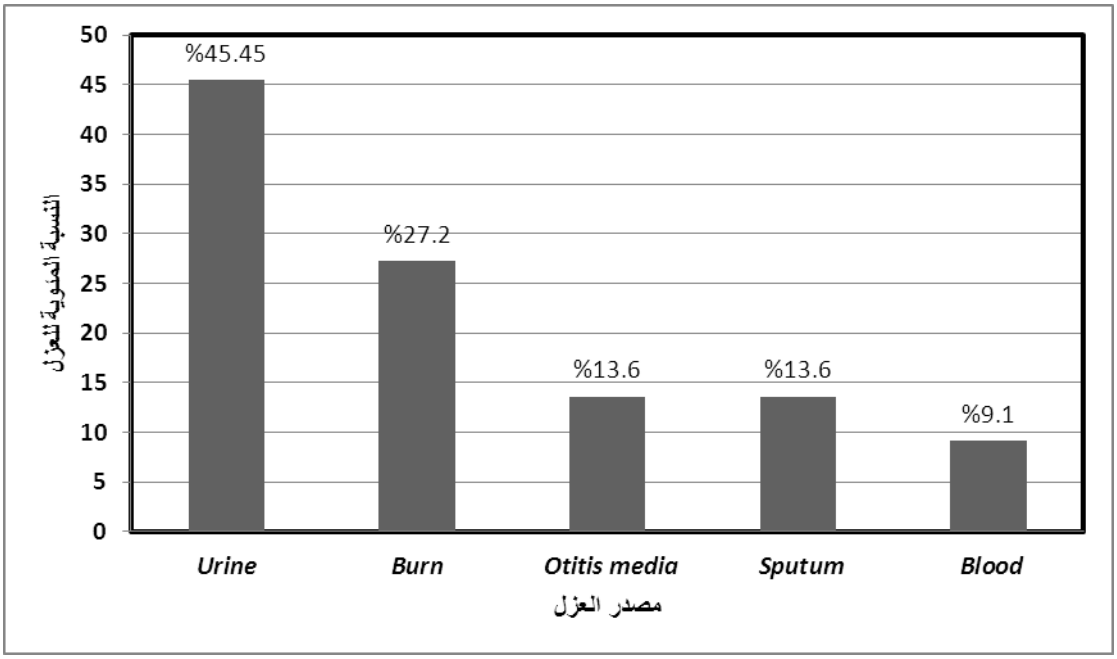
أ - نتائج العزل من العينات السريرية

تم خلال الدراسة الحالية الحصول على22 عزلة من جرثومة *P. aeruginosa* من مجموع 52 عينة ولوحظ من الشكل(1) ان نسبة العزل الاكبر كانت ضمن عينات الادرار اذ بلغت45.4% من المجموع الكلي تلتها نسبة العزل من عينات الحروق اذ بلغت 27.2%, في حين تفاوتت نسب العزل من المجموعات الاخرى للعينات اذ بلغت نسبة العزل في كل من مسحات الاذن الوسطى و القشع13.6% , أما عينات الدم فقد كانت نسبة العزل للجرثومة حوالي 9.1% فقط من المجموع الكلي .

اختلفت هذه النتيجة مع الدراسة التي قام بها[19] اذ بلغت نسبة عزل جرثومة *P. aeruginosa* من عينات الحروق حوالي 62%تلتها نسبة العزل من عينات الادرار 8% من مجموع 50 عينة فقط , في حين توافقت نتائج دراستنا مع نتائج الدراسة التي قامت بها [20] التي اكدت على أن نسبة العزل الاكبر كانت من الادرار20 % تلتها نسبة العزل من الحروق و البالغة 12% وماثلها في ذلك نتائج دراسة اجريت في الهند و التي اوضحت ان نسبة عزل جرثومة *P. aeruginosa* سجلت أعلى معدلاتها من عينات الادرار 30.5% و الجروح 30% [21]. في حين أشارت دراسات أخرى أجريت في فرنسا الى تماثلت نسب العزل من عينات الحروق و الجروح 13% بينما كانت بأعلى المعدلات من عينات القشع 32% [22].

لوحظ عند مقارنة النتائج أن نسب توزيع العزلات حسب مواضع الاصابة وتبعاً لأختلاف أماكن جمع العينات بأختلاف المستشفيات وقابلية انتشار الجرثومة في مختلف أنحاء جسم الانسان ونظراً الى ماتمتلكه من عوامل الضراوة التي تمكنها من الانتشار , وكذلك قد يرجع الى درجة الاهتمام بالنظافة ونوع المعقمات و المطهرات في المستشفيات [23] . كما أعزى الباحثيين القابلية العالية

لجرثومة *P. aeruginosa* لأحداث الاصابة في المرضى الراقدين في المستشفيات لما تمتلكه من عوامل الضراوة فضلاً عن قابليتها العالية لتحمل التطرف العالي في الظروف البيئة بالإضافة الى ما تهيئه بيئة المستشفيات من أوساط مناسبة لنمو تلك الجرثومة وزيادة فرصتها لمهاجمة المرضى الراقدين فيها لكونهم مرضى ضعيفي الجهاز المناعي لما يعانون من امراض واصابات مختلفة [24].



شكل (1) النسبة المئوية لعزل جرثومة *P. aeruginosa* من العينات السريرية .

ب ـ اختيار العزلة الاكثر كفاءة في انتاج الالجنيت :

تم اجراء اختبار التحري عن وجود الالجنيت باستخدام اختبار تصبيغ الأنبوب بالسفرانين لكافة العزلات المحصل عليها في هذه الدراسة , حيث أظهرت النتائج وجود اختلاف واضح بين العزلات في شدة التصبيغ بالسفرانين ومن تلك النتائج تم اختيار العزلة الجرثومية التي عزلت من عينة الأدرار المشار لها بالرمز PS1 والتي أظهرت قابلية عالية على تصبيغ الأنبوب بالسفرانين واعتماداً على النتائج المحصل عليها في دراسة مقاومة وحساسية العزلات الجرثومية للمضادات الحيوية كانت العزلة المختارة من العزلات ذات المقاومة العالية لأغلب المضادات الحيوية المستعملة في حين كانت العزلات الحساسة لاغلب المضادات الحيوية غير كفوءة في انتاج الالجنيت من خلال القابلية الضعيفة التي اظهرتها في فحص تصبيغ الانبوب بالسفرانين , لهذا تم اختيار العزلة المذكورة من بين العزلات الاخرى لاستخدامها في منوال الدراسة اذ تم استخلاص الالجنيت منها واستخدامه في منوال الدراسة الحالية .

ج ـ استخلاص الالجنيت

1- الترسيب بالكحول المطلق البارد

بينت نتائج استخلاص الألجنيت من العزلة المختارة الحصول على كمية مناسبة من مستخلص الالجنيت الخام , اذ تعد طريقة استخلاص الالجنيت بوساطة الترسيب بالكحول المطلق البارد من أكثر الطرق شيوعاً وفعالية و التي اتسمت بسهولتها وعدم تطلبها المواد الكيمياوية الكثيرة فضلاً عن قصر زمنها حيث كانت الظروف المختبرية و الزرعية التي توفرت في تنمية العزلة الأثر الكبير في انتاج الكمية الوفيرة من مادة الالجنيت و هذا مايؤكد أن عملية انتاج الالجينت تخضع للظروف البيئة و عوامل التغذية [25].

أن طريقة ترسيب الالجنيت باستخدام الكحول المطلق البارد , تعد من الطرق الاولى التي تحرر كميات كبيرة من مادة الالجنيت مقارنة بالنسبة القليلة جداً من مكونات الجدار الخلوي للجرثومة كالبروتينات وغيرها و التي تعد من الملوثات لهذا المستخلص بالإضافة الى ان استخدام عملية الطرد المركزي المبرد بسرعة عالية سيعمل على ترسيب تلك الملوثات و التخلص منها [26] .

2- نتائج الكشوفات اللونية للمستخلص

بعد اجراء عملية الاستخلاص باستخدام الكحول المطلق البارد والتخلص من الشوائب بعملية الديلزة تمت معاملة المستخلص بعدد من الكشوفات اللونية فعند اجراء كشف مولش كان لظهور حلقة ارجوانية اللون بين المستخلص وحامض الكبريتيك دلالة واضحة لوجود الكربوهيدرات في المستخلص[14], كما لم يتلون المستخلص باللون البنفسجي عند معاملته بكاشف البايوريت مما يؤكد خلو المستخلص من البروتينات. الشيء الذي توصل اليه Govan وجماعته [27] الذين أوضحوا أن مستخلص الالجنيت

يحتوي بصورة رئيسة على كمية كبيرة من الكربوهيدرات مقارنةً ببقية الملوثات كالبروتينات و الاحماض النووية حيث يعتقد أن استعمال السرعة العالية في عملية النبذ المركزي المبرد يساعد في ترسيب اغلب الملوثات بكفاءة عالية.

كما لوحظ عند حساب تركيز الكربوهيدرات في المستخلص ان تركيز الكاربوهيدرات في المستخلص الخام هو 200 مايكروغرام / مل .

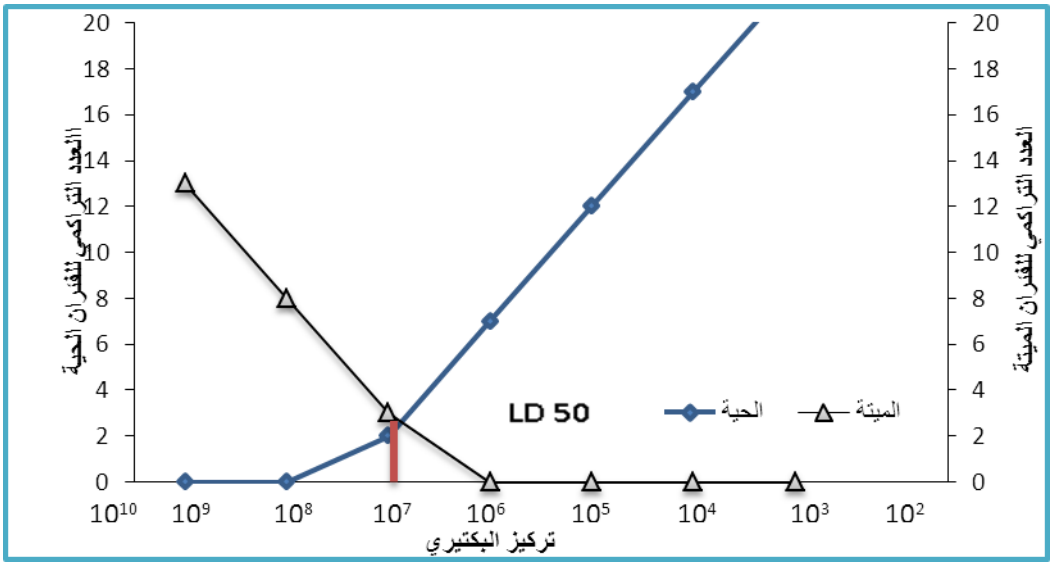
3- تأثير المستخلص الخام للالجنيت في امراضية جرثومة *P. aeruginosa*

أ – تحديد الجرعة القاتلة للنصف(LD_{50}) من الحيوانات المختبرية المحقونة بجرثومة *P. aeruginosa*:

وجد ان الجرعة التي ادت الى هلاك 50% من تلك الفئران خلال5 أيام كانت 3.16×10^{7} جرثومة حية/مليلتر. الجدول (1) و الشكل (2) يوضحان العلاقة بين عدد الخلايا الجرثومة الحية /مليلتر من العالق الجرثومي على المحور السيني وعدد الفئران الحية و الميته على المحور الصادي حيث تم أيصال الخط بين النقاط للعمودين و بالتالي حصل على خطين , نقطة التقائهما تمثل الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران و المتمثلة بالتركيز (3.16×10^{7}) جرثومة حية /مليلتر الذي حسب بالمعادلة وفق طريقة [18] .

جدول (1) : تحديد الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية المحقونة بجرثومة *P. aeruginosa* .

عدد الخلايا الحية	عدد الفئران المحقونة	عدد الفئران الحية	عدد الفئران الميتة	العدد التراكمي		العدد الكلي للفئران الحية والميتة	النسبة المئوية للهلاك
				الحي	الميت		
10^{9}	5	0	5	0	13	13	100
10^{8}	5	0	5	0	8	8	100
10^{7}	5	2	3	2	3	5	50
10^{6}	5	5	0	7	0	7	0
10^{5}	5	5	0	12	0	12	0
10^{4}	5	5	0	17	0	17	0
10^{3}	5	5	0	22	0	22	0



الشكل (2): تحديد الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية المحقونة بجرثومة *P. aeruginosa* .

كانت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليهSchook [28] , الذي وجد أن الجرعة المميتة لـ 50% من الفئران كانت 5.3×10^{7} جرثومة حية / مليلتر.

وفي دراسة اخرى وجد أن عدد خلايا جرثومة *P. aeruginosa* المميتة لنصف عدد الفئران هو 2.8×10^{8} جرثومة حية / مليلتر[29].

وفي حين بين العبيدي [30] ان 7.4×10^7 جرثومة حية / مليلتر قادرة على قتل (50%) من الفئران المحقونة بجرثومة *P. aeruginosa*. في حين توصل باحث أخر الى أن عدد خلايا جرثومة *P. aeruginosa* القادرة على موت نصف عدد الفئران هو 1.2×10^4 جرثومة حية / مليلتر [31].

تعزى اسباب الاختلاف الظاهر في التركيز الجرثومي المؤدي الى قتل نصف عدد الفئران في تلك الدراسات الى امراضية السلالة المستخدمة في التجربة ومكان عزلها وامتلاك جرثومة *P. aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة المرتبطة بالخلية و المفرزة منها , ومما لاشك فيه أن هذه العوامل مجتمعة لها تأثير بصورة مباشرة على قيمة الجرعة المهلكة لنصف عدد الحيوانات المختبرية.

ب- تاثير الالجنيت على ضراوة جرثومة *P. aeruginosa*

تم اعادة الخطوات المعمول بها في اعلاه ولكن تم حقن كل فأرة بالجرعة القاتلة النصفية التي تم تحديدها سابقاً و البالغة 1×10^7 مع تراكيز مختلفة من الالجنيت و البالغة 20,10,5,2.5,1 مايكروغرام /0.1 مليلتر وكما موضح في الجدول (2) الذي يوضح وجود زيادة ملحوظة بالنسبة المئوية للهلاك مع زيادة تركيز الالجنيت الخام حيث أدى حقن الفئران بـ 20 مايكروغرام /0.1 مليلتر من الالجنيت الخام مع الجرعة القاتلة النصفية من الجرثومة الى موت الفئران المحقونة بنسبة 100% الشيء الذي يؤكد الدور المهم الذي يلعبه الالجنيت في زيادة ضراوة الجرثومة. أذ يعتقد أن للالجنيت فعالية في حماية الجرثومة داخل جسم العائل من خلال الدور الذي يلعبه في تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) للجرثومة بالشكل الذي يجعلها مقاومة للفعاليات المناعية للمضيف كالبلعمة و المتممات و الفعل القاتل للمصل مما يساعد على تطوير الاصابة من موضعية الى جهازية قاتلة للمضيف[32] .

واكد احد الباحثين الى انه كلما زادت قابلية جرثومة *P. aeruginosa* على انتاج الالجنيت كلما قلت الجرعة اللازمة لاحداث الاصابة اي اصبحت الجرثومة اكثر ضرواه[33].

ان تواجد الالجنيت بتراكيز متغايرة سيساعد بصورة كبيرة في زيادة قدرة الجرثومة على احداث الاصابة المركزية في الحيوانات المختبرية بالشكل الذي يعتمد بصورة أساسية على دوره في حماية التجمعات الخلوية Biofilm الجرثومي التي يكون لها تداخلات معقدة مع مكونات الجهاز المناعي الذاتي للمضيف [34], ان النتيجة توصل اليها Lied وجماعته [36] توضح بصورة كبيرة ان الالجنيت لايؤثر فقط على التصاق البكتريا وتكوين وحماية التجمعات الحيوية وأنما يلعب دور مهم في حماية الخلايا الجرثومية لبكتريا *P. aeruginosa* من الجهاز المناعي للإنسان من حيث انه يلعب دور في اثارة الخلايا البلعمية من جهة ويقف عائق في عملية ابتلاعها من جهة اخرى لذلك فأن لحقن السلالات الجرثومية مع نسب متغايرة من الالجنيت المنقى ستعمل على زيادة قدرة الجرثومة بل احداث وتطوير الاصابة المركزية في الفئران وبتالي هلاكها عندما يقترن ذلك بقدرة الجرثومة العالية على تكوين تلك التجمعات الخلوية والا فأنه تحت بعض الظروف التي تقف عائق في تكوين تلك التجمعات سيكون لدور الالجنيت الاثر الاقل في حماية الجرثومة وبتالي سيتم ابتلاعها من قبل الخلايا البلعمية وقتلها .

جدول (2): تأثير مستخلص الالجنيت الخام لجرثومة *P. aeruginosa* على الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) للجرثومة نفسها .

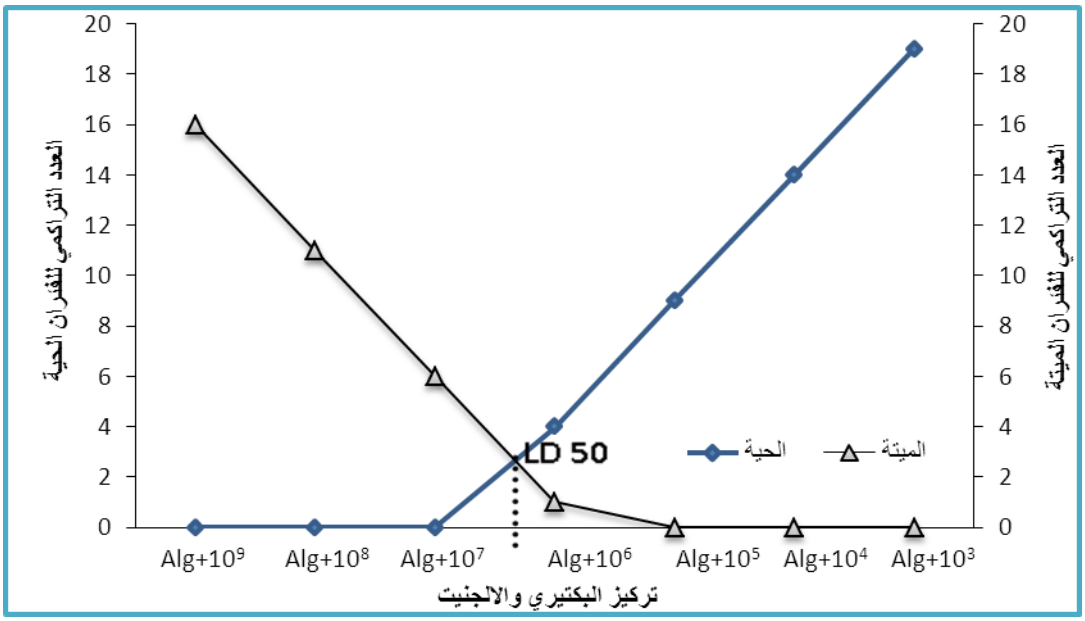
عدد الخلايا الحية	تركيز الالجنيت مايكروغرام/0.1 مل	الجرعة الكلية	عدد الفئران	الحية	الميتة	العدد التراكمي		العدد الكلي للفئران الحية والميتة	النسبة المئوية للهلاك
						الحي	الميت		
10^7	20	0.5	5	0	5	0	23	23	100
10^7	10	0.5	5	1	4	1	18	19	94.7
10^7	5	0.5	5	1	4	2	14	16	87.5
10^7	2.5	0.5	5	0	5	2	10	12	83.3
10^7	1	0.5	5	0	5	2	5	7	71.4

ج – تأثير المستخلص الخام للالجنيت على قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الحيوانات المختبرية المحقونة بجرثومة *P. aeruginosa* :

تم اعادة الخطوات المعمول بها سابقاً مع حقن كل فأرة بتركيز20 مايكروغرام/ 0.1 مليلتر من الالجنيت الخام مع التخافيف الجرثومية المختلفة وكما موضح بالجدول (3) والشكل (3), حيث لوحظ أن الجرعة التي ادت الى هلاك نصف عدد الفئران في هذه الحالة كانت 2.34×10^6 جرثومة حية / مليلتر و المحسوبة باستخدام نفس المعادلة المبينة وفق طريقة [18].

جدول (3): تحديد الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية المحقونة بتخافيف متسلسلة من خلايا جرثومة *P. aeruginosa* وبتركيز (20 مايكروغرام/0.1 مليلتر) من مستخلص الالجنيت الخام .

عدد الخلايا الحية	تركيز الالجنيت مايكروغرام /0.1 مل	الجرعة الكلية	عدد الفئران المحقونة	عدد الفئران الحية	عدد الفئران الميتة	العدد التراكمي		العدد الكلي للفئران الحية والميتة	النسبة المئوية للهلاك
						الحي	الميت		
10^9	20	0.5	5	0	5	0	16	16	100
10^8	20	0.5	5	0	5	0	11	11	100
10^7	20	0.5	5	0	5	0	6	6	100
10^6	20	0.5	5	4	1	4	1	5	20
10^5	20	0.5	5	5	0	5	0	9	0
10^4	20	0.5	5	5	0	5	0	14	0
10^3	20	0.5	5	5	0	5	0	19	0



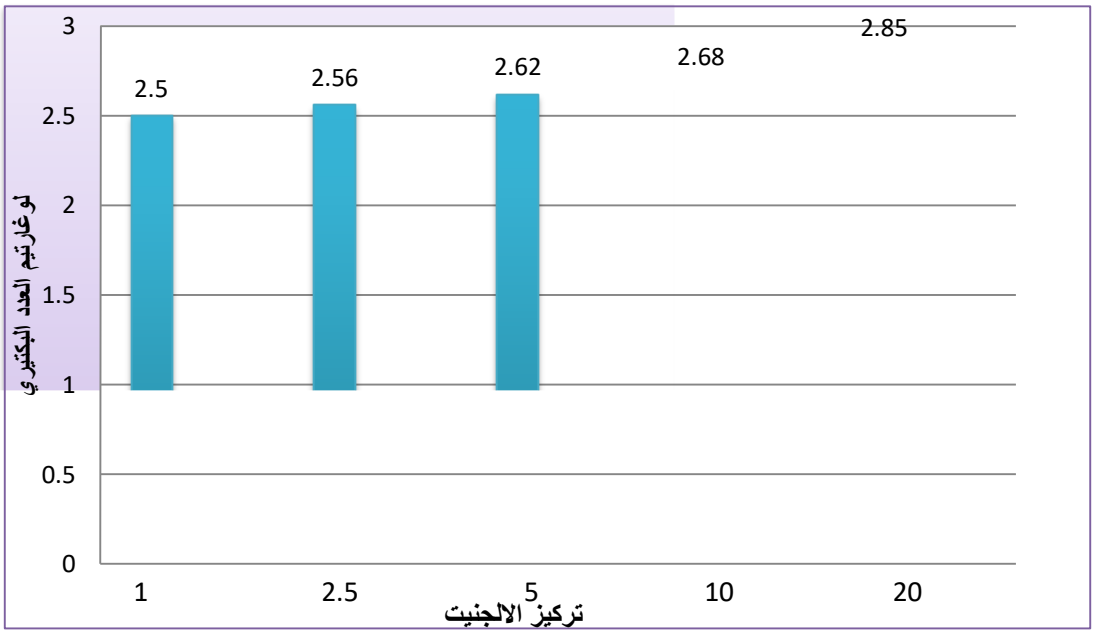
شكل(3): تحديد الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية المحقونة الخلايا بتخافيف متسلسلة من جرثومة *P. aeruginosa* وتركيز20 مايكروغرام/0.1 مليلتر من مستخلص الالجنيت.

عند مقارنة قيمة الجرعة المهلكة لنصف العدد من الفئران المحقونة بجرثومة *P. aeruginosa* المحصل عليها بوجود الالجنيت بتركيز (20 مايكروغرام/ 0.1 مليلتر) و البالغة (2.34×10^6 جرثومة حية / مليلتر) مع تلك التي حصل عليها بدون الألجنيت نفسه (3.16×10^7 جرثومة حية / مليلتر) حيث ظهر جلياً أن وجود الالجنيت بهذا التركيز عمل على تقليل الجرعة المهلكة النصفية لجرثومة *P. aeruginosa* الشيء الذي يؤكد دور الالجنيت في زيادة ضراوة الجرثومة وامراضيتها , فقد اكد عدد من الباحثين على دور الالجنيت في مقاومة تلك الجرثومة للعوامل البيئية الصعبة من جهة التي تعمل بدورها على جعلها من الممرضات واسعة الانتشار وخصوصاً في بيئة المستشفيات , وعلى زيادة مقاومتها للجهاز المناعي للمضيف اثناء انتشارها داخل جسم العائل لأحداث الاصابة . وفي دراسة مقارنة بين ضراوة سلالات من جرثومة *P. aeruginosa* الطبيعية واخرى غير قادرة على أنتاج الالجنيت من خلال حذف الجين المنتج له وراثياً لوحظ ارتفاع قيمة الجرعة القاتلة النصفية للسلالات المشفرة مقارنة بالسلالات الطبيعية[33].

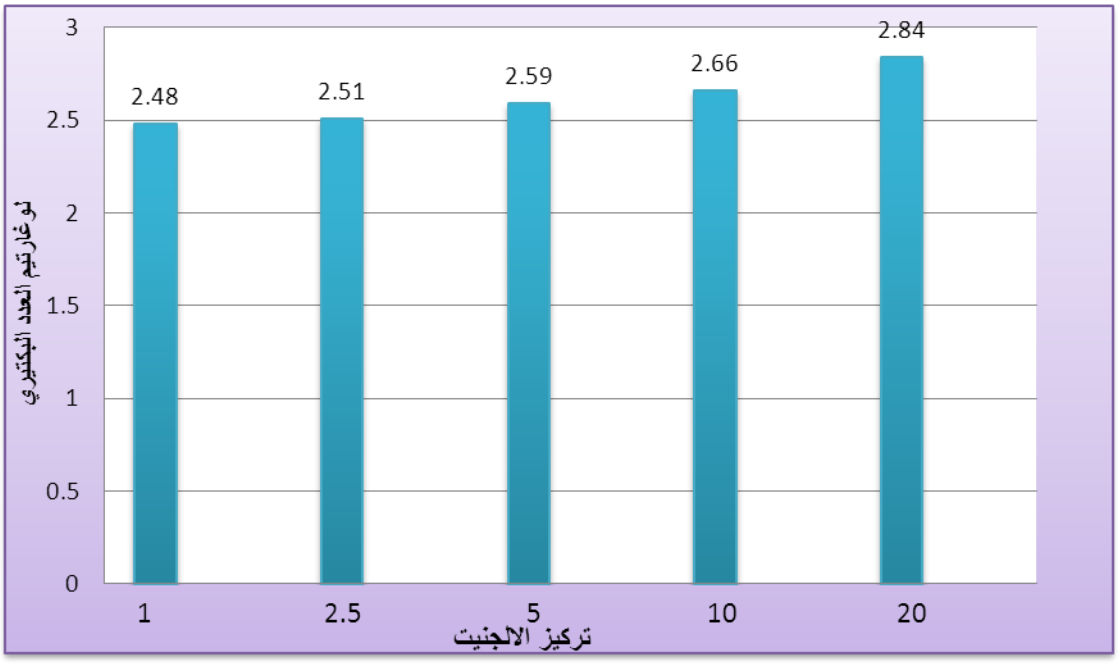
د- تاثير الالجنيت على القابلية الاجتياحية لجرثومة *P. aeruginosa* في أعضاء الحيوانات المختبرية المصابة .

تمت متابعة الحيوانات المختبرية التي تم حقنها بالجرعة القاتلة النصفية من جرثومة *P. aeruginosa* و البالغة $10x1^7$ جرثومة حية / مليلتر سويةً مع تراكيز متدرجة من الالجنيت الخام 20,10,5,2.5,1 مايكروغرام / 0.1 مليلتر وبعد مرور 48 ساعة تم تشريح الفئران حيث لوحظ حدوث تغيرات نسيجية عيانية واضحة في كبد وطحال و كلى ورئات الفئران , تمثلت تلك التغيرات بتضخم كل من الكبد و الطحال بالاضافة الى لونها المائل الى السواد مقارنة مع السيطرة بالاضافة الى تكون بقع لونية بيضاء مصفرة فيها, كما ظهرت البقع اللونية ذاتها في كلى الفئران المصابة مع ميل رئاتها الى الابيضاض.

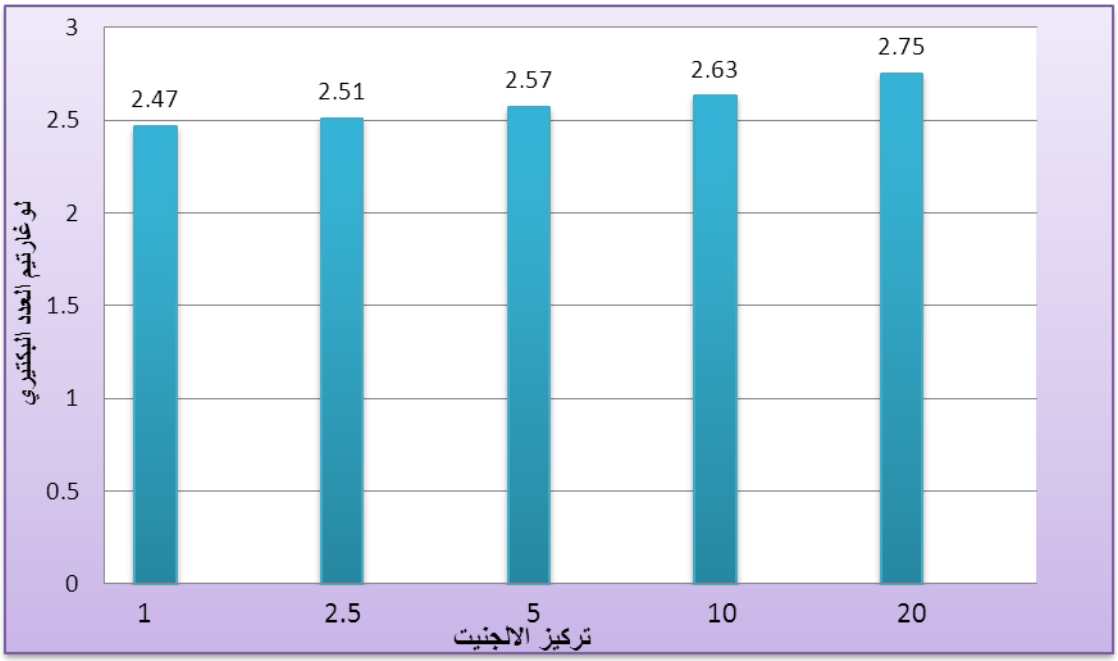
درست القابلية الاجتياحية لجرثومة *P. aeruginosa* من خلال متابعة لوغاريتم عدد الوحدات المكونة لمستعمرات جرثومة *P. aeruginosa* المستردة من الاعضاء المختلفة للحيوانات المختبرية كالطحال, الكبد, الكلية و الرئة وكما موضح في الاشكال (4), (5),(6) و(7) على التوالي والتي تبين ظهور زيادة متدرجة في عدد الجراثيم المستردة من تلك الاعضاء مما يدل على الدور الفعال الذي تلعبه الزيادة في تركيز الالجنيت المحقون على زيادة القابلية الاجتياحية للجرثومة و بالتالي زيادة امراضيتها حيث يعتقد ان ذلك يعود الى قابلية الالجنيت على حماية الجرثومة من الفعل القاتل للجهاز المناعي وبالتالي تساعد في جعل الخلايا الجرثومية مجتمعة سوية بالشكل الذي يقلل تاثير النظام البطاني الشبكي في الاعضاء المختلفة ويساعدها على البقاء فيها لفترة اطول وبالتالي زيادة اعدادها . ان ارتفاع معدلات الاسترداد في كل من الكبد و الطحال يعود الى زيادة الاصابة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام التي تعمل على حث الاستجابة الالتهابية الداخلية المنشأ التي تؤدي الى حدوث الصدمة السمية او الاصابة بالانتان [36] . ان هذا التحفيز يعود الى وجود الالجنيت في جدار الخلية الجرثومية و الذي يعتبر عامل ضراوة مهم في جرثومة *P. aeruginosa* من خلال حمايتها كمضاد للبلعمة فضلاً عن دوره في الالتصاق الجرثومي بخلايا المضيف . كما عزلت جرثومة *P. aeruginosa* من كلى ورئة الفئران المحقونة حيث أن اصابة هذه الاعضاء يتطلب الاستيطان الذي يحدث بواسطة التصاق الخلايا الجرثوميــة الذي يلعب الالجنيت الدور الاساسي فيه [37].



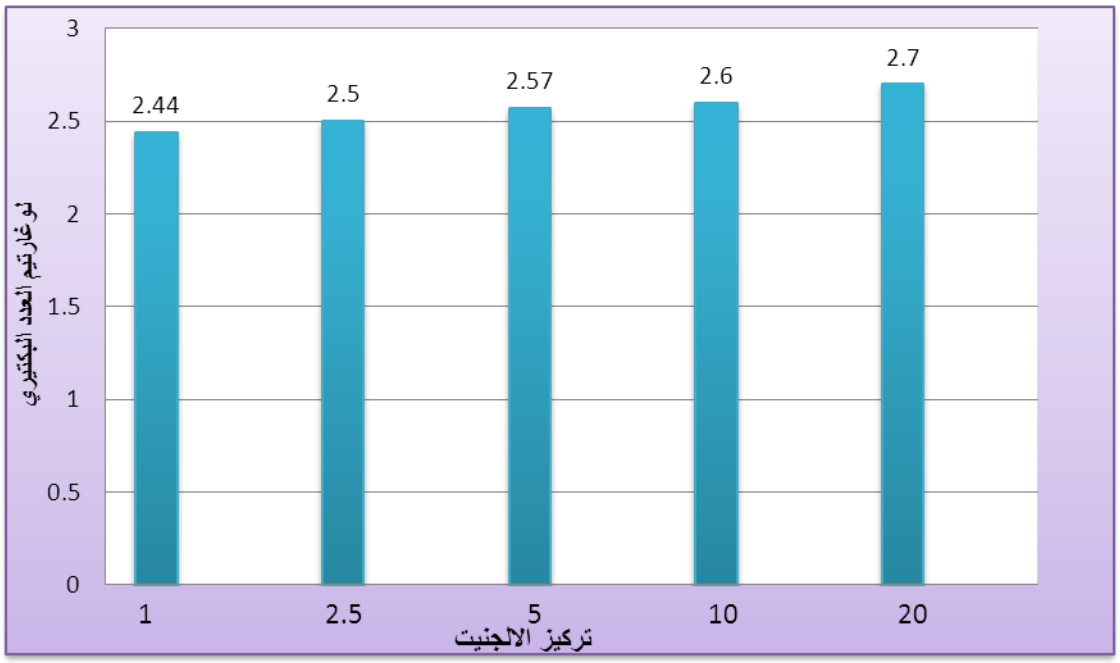
الشكل (4) : استرداد جرثومة *P.aeruginosa* من كبد الفئران المحقونة بتركيز 10^7/ فارة من العالق الجرثومي مع تراكيز مختلفة من الالجنيت.



الشكل (5) : استرداد جرثومة *P.aeruginosa* من طحال الفئران المحقونة بتركيز 10^7/ فارة من العالق الجرثومي مع تراكيز مختلفة من الالجنيت.



الشكل (6) : استرداد جرثومة *P.aeruginosa* من كلى الفئران المحقونة بتركيز 10^7/ فارة من العالق الجرثومي مع تراكيز مختلفة من الالجنيت.



الشكل (7) : استرداد جرثومة *P.aeruginosa* من رئة الفئران المحقونة بتركيز 10^7/ فارة من العالق الجرثومي مع تراكيز مختلفة من الالجنيت.

المصادر

1. Hogan , D.A. ; Vik, A. and Kolter , R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum–sensing molecule influences Candida albicans morphology . Mol.Microbiol . 54 (5): 1212-1223.
2. Ahangarzadeh –Rezaee , M. ; Behzadiyan – Nejad ,Q. ; Owlia , P. and Najjar-Pirayeh , S. (2002) . In vitro activity of imipenem and ceftazidime against mucoid and non- mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Iran . Aech . Iranian . Med . 5(4) : 251-254 .
3. Mohamed , H . A. (2004) . Some studies on *Pseudomonas species* in chicken embryos and broilers in Assiut governorate . Ass. Univ . Bull . Environ . Res . 7 (1) : 23-30 .
4. Leid , J.G.; Willson , C.J. ; Shirtliff , M.E. ; Hassett , D.J. ; Parsek , M.R. and Jeffers , A.K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-γ - Mediated macrophage killing . J.Immun. 175 : 7512-7518 .
5. Pritt , B. ; Brien , L.O. and Winn , W. (2007) . Mucoid *Pseudomonas* in cystic fibrosis . Microbiol . Infect . Dis . 128 : 32-34 .
6. Wozniak , D.J. ; Wyckoff , T.J.O. ; Starkey , M. ; Keyser , R. ; Azadi , P. ; Toole , G.A.O. and Parsek , M.R.(2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms . J. Microbiol . 100 (13) : 7907-7912 .
7. Pennington , J.E. ; Peir , G.B. ; Sadogg , J.C. and Small , G.J. (1986). Active and Passive immunization strategies for *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia . J.Infect . Dis . 8(4):426-433.
8. Holt , J.G. ; Krieg , N.R. ; Sneath , P.H. ; Stahley , J.T. and Williams , S.T.(1994). Bergey's manual for determinative bacteriology . 9th ed. Williams and Wilkins USA .
9. MacFaddin , J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria . 1st ed. , The Williams and wilkins , Baltimore , USA.
10. Collee , J. G. ; Marmion , B.P.;Fraser , A. G. and Simmons , A . (1996). Mackie and McCartney medical microbiology. 14th ed., The Churchill Livingstone . Inc. USA.

11. Baron , E.J. ;Petersonee , L.R. and Finegoldens , S.M.(1995). Bailey scotts Diagnostic microbiology . 9th ed., The C.V. mosby Company .USA .

12. Learn , D.B. ; Brestel , E.P. and Seetharama , S. (1987). Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* . Infect . Immun . 55 : 1813-1818.

13. Kashef , N.; Nejad , Q.B. ; Peerayen ,S.N. ; Hosseini ,K.M. ;Moazeni , M. and Djavid , G.E. (2006). Synthesis and Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate – tetanus toxoid conjugate .J. Med . Microbiol . 55: 1441-1446.

14. Plummer , D. T. (1978) . An introduction to practical biochemistry . McGraw – Hill book company limited .

15. Dubois , N. ; Cilles , K.A. ; Hamilton , J.K. ; Rebers , P.A. and Smith , F. (1956). Colorimetric methods for detection of sugars and related substances . Anal . Chem . 28 (3) : 350- 360 .

16. Bradford , M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding . Analytical biochemistry , 72 : 248-254 .

17. Pena , J. ; Fu , Z. ;Schwarzer , C. and Machen , T.E. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* inhibition of flagellin – activated NF- KB and Interleukin – 8 by human airway epithelial cells . Infect. Immun. 77 (7) : 2857-2865 .

18. Reed , L.J. and Muench ,H. (1938). Asimple method of estimating fifty percent endpoints . Amr . J. Hugiene . 27 (3) : 493-498 .

19. قاسم , خالد وليد .(2006). تاثير بعض العوامل الكيميائية و الفيزيائية في حساسية بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً لمضادات الحياة , رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة بغداد .

20. باصات , ديمة نزار فرج .(2006). تاثير المستخلصات المائية و الكحولية لنباتي سم الفراخ و القريص على بعض عوامل الضراوة و الدنا البلازميدي لبكتريا *Pseudomonas aeruginos*a المعزولة محلياً , رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة بغداد

21. Puri , J. ; Revathi,G. ; Kundra,P .and Talawar,V .(1996). Activation of third generation cephalosporins against *Pseudomonas aeruginosa* in high risk hospitals units .Indian.J.Med.Sci.50(7):239-243.

22. Cavallo,J.D. ; Fabre,R .; Leblanc,F.; Nicolas-Chanoine,M.H .; Tabaut,A .and GERPB.(2000).Antibiotic susceptibility and mechanism of β-lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa* . J . Antimicrob . Chemother .46:133-136.

23. Fleiszig, S.M. ;Wiener-Kronish, J.P. ;Miyazaki, H.; Vallas,V. ; Mastov,K.E. ;Kanada,D.; Sawa,T.; Benedict,T.S. and Frank,D.W. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* –mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S.Infect.Immun.65(2):579-586.

24. Wolf ,P. and Elsasser-Beile , U. (2009). *Pseudomonas* exotoxin A : from virulence factor to anti-cancer agent. J. Med. Microbiol . 299 : 161-176 .

25. May , T. B. ; Shinadarger , D. and Retal , M . (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* infections of cystic fibrosis patients . Clin . Microbiol . Rev . 4 : 191-206 .

26. Kashef , N.; Nejad , Q.B. ; Peerayen ,S.N. ; Hosseini ,K.M. ;Moazeni , M. ; Rezvan , H. and Motlagh , B.A. (2005). Preliminary investigation on the isolation of alginate produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* . Ann. Microbiol . 55(4): 279 – 282.

27. Govan , J.R.W. ; Sarasola , P. ; Taylor , D. J. ; Tatnell , P.J. ; Russell , N.J. and Gacesa , P. (1992).Isolation of a mucoid alginate – producing *Pseudomonas aeruginosa* strain from the equine guttural pouch .J.Clin . Microbiol . 30 (3) : 595-599 .

28. Schook, L. B. ; Carrick , L. ;JR. and Berk , R. S. (1976). Murine gastrointestinal tract as a portal of entry in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infections . Infect. Immun. 14 (2):564-570.

29. Blackwood , L.L. ; Stone , R.M. ;Iglewski , B.H. and pennington . J.E. (1983) . Evalution of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as avirulence factor in acute lung infection . Infect . Immun . 39(1) : 198-201 .

30. العبيدي , ايسر عصام محمود .(1996). تاثير المعدلات المناعية المستخلصة من بكتريا *Nocardia asteroids* على الاصابات البكتيرية في الفئران , رسالة ماجستير. كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية.

31. Yashizumi , S. ;Takahashi , Y. ; Murata , M. ; Domo , H. ; Furuya , N. ; Ishii , Y. ; Matsumoto , T. ; Ohno , A . ; Tateda , K. ; M iyazaki , S. and Yamaguchi , K. (2001). The in vivo activity of olamufloxacuin (HSR-903) in systemic and urinary tract infections in mice . J. Antimicrob. Chemother. 48 : 137-140 .

32. Goldberg , J . B. ; Coyne , M.J. ; JR. ; Necly , A.N. and Holder , I.A. (1995) . Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa* AlgC mutant in aburned – mouse model of infection . Infect . Immun . 63 (10) : 4166-4169 .

33. Chang , W.S. ; Mortel , M. ; Nielsen , L. ; Guzman , G.N. ; Li , X. and Halverson , L. J. (2007) . Alginate production by *Pseudomonas putida* creats a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance underwater- limiting conditions . J.Bacteriol . 189 (22) : 8290-8299 .

34. Lied , J.G. (2009) . Bacterial biofilms resist key host defenses . J. Microbiol . 4 (2) : 66-70 .

35. Leid , J.G.; Willson , C.J. ; Shirtliff , M.E. ; Hassett , D.J. ; Parsek , M.R. and Jeffers , A.K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-γ - Mediated macrophage killing . J.Immun. 175 : 7512-7518 .

36. الكرخي , منال خالد محمد . (2001). دراسة امراضية بكتريا *Acinetobacter baumanni* المعزولة محلياً , رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة بغداد.

37. Agarwal , G. ; Kapil , A. ; Kabra . S.K. ; Das , B.K. and Dwivedi , S.N. (2005). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in india . Bmc ,Microbiol . 5(43) : 1471-2180 .