دراسة تأثير الذيفان المعوي (Enterotoxin) المنتج من بكتريا *Vibrio cholerae* على عملية البلعمة خارج الجسم الحي

رسمية عبد أبو ريشة سناء رحمن عليوي** هدى سهيل عبد****

استلام البحث 18، كانون الثاني، 2009
قبول النشر 12، أيار، 2009

الخلاصة:
أستخلص الذيفان المعوي الخام المنتج من عزلة لبكتريا *Vibrio cholerae* بطريقة الطرد المركزي المبرد، ثم تم تعقيمه بأستخدام ورق الترشيح ذي قطر ثقب 0.22 مايكروميتر، تمت دراسة تأثير الذيفان المعوي الخام في قابلية الخلايا البلعمية على عملية البلعمة خارج الجسم الحي بأستخدام 20 عينة دم لاشخاص أصحاء ومعاملتها بالذيفان المعوي. وقد بينت النتائج ان معامل البلعمة لعينات الدم المعامل بالذيفان المعوي مساوياً 42.9% مقارنة بالسيطرة حيث بلغ معامل البلعمة 64%. وهذا يعني ان هنالك تأثيراً سلبياً للذيفان المعوي المنتج من بكتريا *Vibrio cholerae* على فعالية الخلايا البلعمية.

الكلمات المفتاحية: Phagocytosis ,Enterotoxin,*Vibrio cholera*

المقدمة:

جنس Vibrio من الاجناس السالبة لملون غرام، عصيات منحنية (Curved shaped) متحركة بواسطة سوط قطبي واحد، لاهوائية اختيارية (Facultative anaerobic)[1]. يعود جنس Vibrio الى عائلة الضمات (Vibrionaceae)[2].

يعد النوع *Vibrio cholerae* أكثر الانواع التابعة للجنس أنتشاراً ومسبباً الامراض للانسان، حيث تنقل الاصابة للانسان عن طريق تناول الماء والاغذية الملوثة وتسبب الالتهابات المعوية والاسهال المائي [4,3] نظراً لانتاجها الكثير من عوامل الامراضية ومنها الذيفان المعوي Enterotoxin والذي يطلق عليه (Choleragen)[5]، والذي تعود له أمراضية البكتريا بالدرجة الاساس حيث يكون المسؤول عن فقدان السوائل والاملاح من الامعاء وحدوث الاسهال المائي. حيث يحفز دورة CAMP Cyclic Adenosine Mono Phoshates . [8,7,6] ويعتبر الذيفان المعوي من العوامل التي تحفز الجهاز المناعي الخلطي والخلوي [10,9].

أستهدف البحث الحالي دراسة تأثير الذيفان المعوي في عملية البلعمة خارج الجسم الحي وبالتالي دوره في أمراضية البكتريا وتأثيره في مناعة الجسم.

المواد وطرائق العمل:

- **العزلة:-** تم الحصول على عزلة بكتريا *Vibrio cholerae* النوع NAG= (Nonagglutinable) من مختبر الصحة المركزي/ بغداد والمشخصة مسبقاً، ثم أعيد تشخيصها للتأكد من نقاوتها من خلال زرعها على وسط TCBS وبأستخدام نظام Api20E وفقاً لـ [11].
- **أنتاج الذيفان المعوي من بكتريا *Vibrio cholerae*.**
أنتج الذيفان المعوي من عزلة *Vibrio cholerae*، وفق طريقة [12]. حيث تم تلقيح 500 مليلتر من وسط نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth)، ثم تم حضن الوسط بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة وبعد التأكد من نقاوة المزروع، تم الحصول على الذيفان المعوي المستخلص بأجراء عملية الطرد المركزي المبرد (Cooling Centrifuge) لعالق البكتريا بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة نصف ساعة، ثم رشح الراشح بأستخدام المرشحات ذي قطر ثقب 0.22 مايكروميتر ويمثل هذا الراشح الذيفان المعوي الخام.
- **قياس فعالية الذيفان المعوي الخام:-**
تم قياس فعالية الذيفان المعوي الخام بأستخدام طريقة الفأر الرضيع (Suckling mouse method) وفقاً لطريقة [13]. حيث أخذت 5 فئران رضيعة بعمر 4-5 أيام، وتم وزنها قبل تجريعها بالذيفان المعوي. ثم تم تجريعها بالذيفان المعوي وبواقع 0.5 مليلتر لكل فأرة. كما جرعت مجموعة اخرى من الفئران بمحلول ملحي فسيولوجي Normal salin (سيطرة). ثم وزنت الفئران بعد التجريع بعد مرور يومين حيث يلاحظ الفرق في وزن

* أستاذ مساعد/جامعة بغداد/كلية العلوم/قسم علوم الحياة.
** مدرس مساعد/جامعة بغداد/كلية العلوم/قسم علوم الحياة.
*** مدرس مساعد/جامعة بغداد/كلية العلوم للبنات/قسم علوم الحياة.

الفئـران بسـبب زيـادة وزن الامعـاء نتيجـة تجريعها بالذيفان المعوي الذي يسبب أرتشاح الماء والاملاح في الامعاء، في حين لم يلاحظ أي تأثير على فئران السيطرة.

- **دراسة تأثير الذيفان المعوي الخام عى عملية البلعمة:-**

1- فحص البلعمة (Phagocytosis):-

أجري هذا الاختبار وفق طريقة (14)، لتقيـيم قابليـة الخلايـا البلعميـة (PMNs) Polymorphonuclear cells علـى الالتهام، أذ أستخدم عالق بكتريا *E. coli* بوصفه مستضداً (Antigen).

2- تحضير نموذج الدم للفحص:-

أستعمل الـدم خـلال 1-2 سـاعة مـن جمعـه لاجـراء الفحـص لضـمان فعاليـة الخلايـا الملتهمة.

سحب الدم لعشرين شخص أصحاء ظاهرياً في انابيب اختبار معقمة مغطاة بمادة السليكون لضمان عدم ادمصاص الخلايا الملتهمة على الزجاج لقابليتها العالية على ذلك، كما احتوت الانابيب على مادة مانعة للتخثر (الهيبارين) بتركيز 50 وحدة دولية/مليلتر، كما تم مراعاة عدم احتواء الانابيب على مادة الازايد لكي لاتتـأثر فعاليـة الخلايـا البكتيريـة والخلايـا الملتهمة.

3- طريقة أجراء الفحص:-

- تم مزج 1 مليلتر من الدم مع 1 مليلتر من عـالق البكتريـا بتركيـز 1×10^6 خلية/مليلتر (أذا استخدم المحلول الفسيولوجي Normal salin لعمل العالق) في انابيب اختبـار مطليـة بالسـليكون معقمـة ولـتكن السيطرة، بينما احتوت الانابيب الاخرى على 0.1 مليليتر من الذيفان المعوي الخام أضافة الى المواد أعلاه.
- وضع المزيج للانابيب أعلاه في حمام مائي بدرجـة 37 مْ لمـدة 30 دقيقـة مـع التحريـك البطئ.
- بعد انتهاء مدة الحضن اخذت قطرة من المزيج ووضعت على شريحة زجاجية وعمل منها مسحة وترك في جو الغرفة ليجف بشكل كامل.
- صبغ الغشاء بأضافة قطرات من صبغة ليشمان لمدة 1-2 دقيقة ثم خففت الشريحة بالدارئ الخاص بالصبغة وتركت لمدة 5-10 دقائق بعدها غسل الغشاء بالماء.
- تم حساب عدد الخلايا الملتهمة بالمجهر الضوئي على قوة تكبير 1000، حسبت عدد الخلايا الملتهمة وكما في المعادلة الاتية:-

$$\text{معامل البلعمة} = \frac{\text{عدد الخلايا الملتهمة}}{\text{عدد 100 خلية ملتهمة وغير ملتهمة}} \times 100$$

$$\text{تثبيط البلعمة} = \frac{64 \quad 42.9}{64} \times 100 = 33\%$$

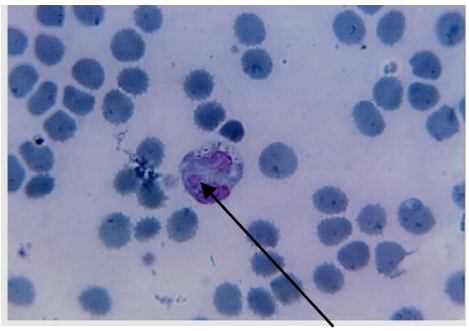
النتائج والمناقشة:

من خلال قياس معامل البلعمة لعينات الدم المعاملة بالذيفان المعوي الخام المنتج من بكتريا *Vibrio cholerae* مقارنة بعينات الدم السيطرة، اظهرت النتائج انخفاض واضح في معامل البلعمة، حيث وجد ان معامل البلعمة مساوياً 42.9%مقارنة بمجموعة السيطرة حيث بلغ 64% كما هو مبين في جدول (1)، من هذه النتائج نلاحظ أن الذيفان المعوي المنتج من هذه البكتريا له تأثيراً مثبطاً وسلبياً على عملية البلعمة من خلال خفض معامل البلعمة (صورة 1، 2). وهذه النتائج جاءت مطابقة لنتائج ابحاث سابقة والتي أشارت الى تأثير الذيفان المعوي المنتج من بكتريا *Vibrio cholerae* في خلايا الدم الحمر والبيض وتحطيم اغشيتها وتقليل فعاليتها المناعية [15]. كما أشارت مصادر اخرى الى دور الذيفان المعوي المنتج من بكتريا *Escherichia coli* والذي يشابه الذيفان المنتج من بكتريا *Vibrio cholerae* على خلايا متعددة اشكال النوى MNsP التي لها دور في عملية البلعمة وبالتالي التأثير على عملية البلعمة [16]. كما تشير المصادر الى دور الذيفانات المنتجة من بكتريا *Vibrio cholerae* وبكتريا *Escherichia coli* كعوامل مؤثرة على مناعة الجسم الخلوية [17]. كما اشارت مصادر الى تأثير الذيفان المعوي المنتج من بكتريا *Vibrio cholerae* في خلايا الدم الحمراء والبيضاء ومنها خلايا البلعمة وبالتالي تأثيرها سلبياً في عملية البلعمة من خلال تحطيم اغشية الخلايا ومن ثم ابطال عملها [18].

نستنتج من هذا البحث ان للذيفان المعوي المنتج من بكتريا*Vibrio cholerae* تأثيراً سلبياً على كفاءة عملية الخلايا البلعمية في عملية الالتهام وبالتالي التأثير في مناعة الجسم.

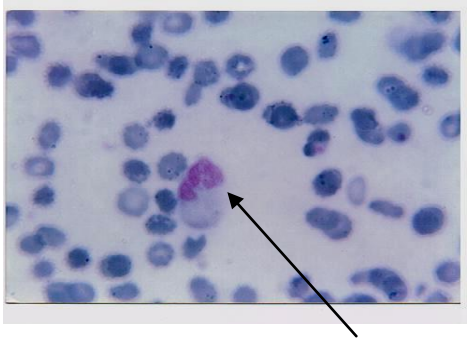
جدول (1): النسبة المئوية للخلايا البلعمية في عدد من عينات الدم المعاملة بالذيفان المعوي الخام وعينات السيطرة

عدد العينات	نسبة الخلايا الملتهمة % لعينات السيطرة	نسبة الخلايا الملتهمة% لعينات الدم المعامل بالذيفان الخام
1	45	27
2	66	50
3	60	28
4	46	30
5	52	35
6	55	40
7	69	42
8	75	36
9	56	43
10	66	40
11	68	31
12	57	51
13	72	40
14	52	42
15	54	48
16	60	48
17	56	53
18	75	49
19	68	60
20	72	35
معامل البلعمة	المعدل 64%	المعدل 42.9%
تثبيط البلعمة	33%	



خلايا بلعمية ملتهمة
Phagocytic cell

صورة (1): توضح خلايا بلعمية ملتهمة لبكتريا *E. coli*



خلايا بلعمية غير ملتهمة
Non Phagocytic cell

صورة (2): توضح خلايا بلعمية غير ملتهمة لبكتريا *E. coli*

المصادر:

1- Baily, W. R. and Scott, E. G. 1970. Diagnostic microbiology (3rd) ed. The C. V. mosby Co., St. Louis.
2- Jawetz, E., Melnick, J. K. and Adelbery, E. A. 2001. vibrio, *campylobacter*, *Hacmophilus* and assocated bacteria. (18 chp.) eds: In: Medical microbiology 22nd. ed: Appleton and lange middle easted librarredulbin, 235-241.
3- Pierce, N. F., Greenouch, W. B. and Carpentw, C. J. 1971. *Vibrio cholerae* enterotoxin and its mode of action. Bacteriol. Rev. 35 (1): 1-13.
4- Elliot, E. L.; Kaysner, C. A. and Tamplin,N.L.2001 *vibrio cholerae*, V. Parahaemolyticus, V. vulnificus and other *vibrio* spp. Bacteriological Analytical Manual online. Chapter 9. Center for food Safety and Applied Nutrition.
5- Blake, P. A., Weaver, R. E., and Hollis, D. G. 1980.disease of humans (other then cholera) caused by vibrio. Annu. Rev. microbial. 34: 341- 367.
6- Kossaczka, Z., Shiloach, J. and szu. S. C. 2000. *Vibrio cholerae* O139. Conjugate vaccines. Synthesis and immunogenicity of *Vibrio cholerae* O139. Capsular polysaccharide conjugate with

13- Takeda, T., Takada, Y. and Ohtomo, N. 1978. Detection of cholerae enterotoxin activity in suckling hamster. J. Infect. Immun. 19 (2): 752- 754.

14- Furth, R. V., Theeda, L. V. and Leiji, P. C. 1985. In vitro determination phagocytosis and intracellular killing by PMW "Hand book of experimental immunology" Blakwell Scientific publication (3th ed). Vol. 2. P: 1-14.

15- Nathaniel, F. P., Pierce, W. B. and Charles; C. J. 1971. *vibrio cholerae* and its mode of action. Bacteriol. Rev. 35 (1): 1-13.

16- Bergman, M. J., Richard, L. G. and Gerald, L. M. 1978. Interaction of polymorphonuclear Neutriophil with *E. coli*, effect of enterotoxin on phagocytosis killing, chemotaxis, and cyclic AMP. J. clin. Invest. 61: 227- 234.

17- Hewlett, E. L., Guerrant, R. G. and Greenough, W. B. 1974. Toxins of *vibrio cholerae.* and E. Coli stmulate Adenylate cyclase in rat fat cells. Nature. (Lond.) 249: 371- 373.

18- Richards, K. L. and Steven, D. D. 1978. Pathlogical effects of *vibrio cholerae* and enterotoxigenic *E. coli* and there exotoxins on Eukaryotic cells. Microbiol. Rev. 42 (3): 592- 613

recombinatc diphtheria toxin mutant in mice. J. infect. Immun. 68 (9): 5037- 5043.

7- Arita, M., Takeda, T. and Miwatani, T. 1986. Purification and characterization of *vibrio cholerae* Non- 01 heat stable enterotoxin. J. infect. Lmmun. 52 (1): 45- 49.

8- Guerrant, R. L., Walker, D. H. and weller, P. F. (2000) Food infection diseases, principle, pathogens and practice (9th ed) vol (1). W. H. O Churchill living stone, London, tokyo.

9- Agarwal, S. C and Sundarej, T. 1976. cell mediated immunity in *vibrio cholerae* with ribonucleic acid and protein. Lystates. J. infect. Immun. 14: 363- 387.

10- Sanyl, S. C., Neogl, P. K. B. and AL- mahmud, A. K. A. 1984. Anew- enterotoxin produced by *vibrio cholerae*. J. Diarr. Dis. Res. 2(1): 3-12.

11- Hot. J. G., Kreig, N. R., Sheath. P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. Berge's manul of determination bacteriology (9th ed.): p. 532- 553. Williams and wilkins, U. S. A.

12- Mekalanos, J. J. and Romig, W. R. 1977. Simple method for purifying choleragenoid, the natural toxoid, of *vibrio cholerae*. J. Infect. Immun. 16(3): 789- 795.

Effect of *vibrio cholerae* enterotoxin on phagocytosis in vitro

Rasmyia Abid Aburisha* ***Sanaa Rahman*****
Huda Suhail Abid**

*Assistant Prof. Dr. Department of Biology, College of Science, University of Baghdad.
**Assistant lecturer/ Department of Biology, College of Science, University of Baghdad.
***Assistant lecturer/ Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad.

Abstract:

Enterotoxin of *Vibrio cholerae* was extracted by cooling centrifuge at 6.000 rpm for 30 minntes. and filtrated by using milipore filter (0.22 µm).
The effect of crude enterotoxin on phagocytosis was studied by measuring the phagocytic index for 20 blood sample which were collected from healthy people and treated with enterotoxin in addition to control samples.
From the results we found that phagocytic index of blood sample which were treated with enterotoxin was 42.9% while the phagocytic index of control blood samples was 64%. This means that there is a negative effect for the enterotoxin resulted from vibrio choleaa on the activity of phagocytic index.