

تنشيط المناعة باستخدام exotoxin A ضد الإصابة بميكروب *Pseudomonas aeruginosa* في فأر التجارب المحروق

من اهم الميكروبات التي تصيب الانسان بالعدوى في المستشفيات ميكروب *Pseudomonas aeruginosa* يؤدي الى تسمم الدم بالسُموم البكتيرية الخارجية والوفاه. ويمكن زياده المناعة باستخدام exotoxin A المستخلص من فأر التجارب المحروق المصاب بنفس البكتيريا .

المقدمة

ميكروب *Pseudomonas aeruginosa* من الميكروبات الانتهازية التي لا تخمر السكريات وعصوي الشكل وسالب التفاعل مع صبغه جرام ومن اهم مسببات المرض في المستشفيات ويسبب تسمم الدم والوفاه . ومعدل الوفيات يزداد بعد الإصابة بالبكتيريا وخاصة بالبكتيريا الانتهازية الممرضة والسالبة التفاعل مع صبغه جرام . ومن الاشياء المهمة لمقاومه هذه البكتيريا المضادات الحيوية المختلفة ولكن هذه البكتيريا تقاوم المضادات الحيوية وحتى بعد تطور هالم تستطيع المضادات الحيوية خفض معدل الوفيات .

وهذا يعطى اهميه كبيره للإصابة بالبكتيريا كأساس لعمل لقاحات مؤثره وعلاجات مناعيه فعاله . البكتيريا *P. aeruginosa* تنتج العديد من المركبات

خارج الخلية مثل السموم الخارجية ومن بينها Aexotoxin ، exoenzyme ، S ، phospholipase ، hemolysins وكلها عوامل فتك قوية . وقد ثبت دور Aexotoxin في احداث التسمم والوفاه وذلك باستخدام 60-80 ng/mouse . وبعد الحقن بجرعه واحده بتركيز 80 ng من exotoxin A نكتشف وجود تليف وانتفاخ في خلايا الكبد بعد 48ساعه ونزيف بالرئة وتليف بالكلية. وفي الخلايا حقيقه النواه عندما تتعرض للسموم الخارجية exotoxin A ويتحول الى انزيم نشط وينقل نصف adenosineDiphosphate من ribose NAD يؤدي الى عدم تنشيط عامل الإطالة رقم 2 ويثبط عمليه تكوين البروتين . وعلى العكس عندما يسبق السموم جرعه عاليه من المصل المضاد anti-exotoxin A تزداد قدره المريض على مقاومه ومكافحه التسمم الدموي بميكروب *P. aeruginosa*.

وفي هذا البحث تم تحديد القدرة المناعية للمصل المستخلصة من السموم الخارجية exotoxin A المنتجة من *P. aeruginosa* في فأر التجارب المحروق.

النتائج والمناقشة

الفئران التي اكتسبها بالمناعة من مصل السموم نصف المنقاه exotoxin A من الميكروب *P. aeruginosa* و الفئران الذي لم يكتسب مناعة والذي حرق للجلد في منطقه الفخذ والذي تم حقنه بجرعه 10^8 CFU من ميكروب *P. aeruginosa* (وهي الجرعة القاتلة) . وبعد مرور 70 يوم من المتابعة. اكتشف مضاد السموم (Antitoxin) والسموم الخارجية (exotoxin A) في الدم باستخدام CIEP . وكميه الاجسام المضادة تتراوح من 1:16 الى 1:512 في الفئران المكتسبة بالمناعة باستخدام ELISA (جدول 1).

Table 1: Antitoxin titer of immunized mice using ELISA

(جدول 1) كميته الاجسام المضادة للسموم الخارجية في الفئران مكتسبه المناعة باستخدام جهاز الاليزا .

Antitoxin titer	No. (%)
1:16	2 (4.5)
1:32	8 (17.8)
1:64	10 (22.2)
1:128	15 (33.3)
1:256	5 (11.1)
1:512	5 (11.1)

اثناء فتره المتابعة ثلاث فئران ماتت من مجموع العدد في التجربة بنسبه (6.3%) ، ومجموعها الفئران محروقه الفخذ والتي لم تأخذ مصل تنشيط المناعة ماتت كلها بعد ثلاثة اسابيع بسبب السموم الخارجية المنتجة من الحقن (العدوى) بميكروب *P. aeruginosa*. وفي المجموعة الفئران محروقه الفخذ والتي اخذت المصل يتم حقنها (بعدوى) بتركيزات مختلفة من ميكروب *P. aeruginosa* (1.5×10^8 CFU/mL) ويبدأ الكشف عليها بعد يوم واحد من حقن الجرح والى ان ينخفض المستوى الى الصفر بعد اسبوعين .

وفي مجموعه الفئران التي لم تأخذ المصل يزداد عدد المستعمرات الميكروبية لمدة 6 ايام بعد الحقن بميكروب *P. aeruginosa* ومعظم الفئران تموت (80%) في خلال نفس الفترة و (جدول 2) يظهر عدد المستعمرات الميكروبية ، ومعدل المتبقي حي ، ونتائج مزرعة الدم والطحال والكبد في المجموعة غير المحصنة .

في مجموعه الفئران التي لم تأخذ المصل يزداد عدد المستعمرات الميكروبية لمدة 6 ايام بعد العدوى بميكروب *P. aeruginosa* وتكون نسبه موت الفئران (80%) في نفس الفترة. (جدول 2) يبين عدد المستعمرات، ومعدل المتبقي حي ، ونتائج مزرعة الدم والطحال والكبد في الفئران التي لم تأخذ المصل. ومزرعة الطحال والكبد ايجابيه بنسبه 76% من الفئران ماتت

تماما بعد 6 ايام من الحقن . والسموم الخارجية Exotoxin A اكتشفت في الدم بعد يومان من العدوى ويكون قابل للاكتشاف لمدة 6 ايام .

(جدول 2) يبين نتائج مزارع الدم والطحال والكبد في مجموعه الفئران التي **لم تأخذ** المصل من حيث عدد المستعمرات ، المتبقي حي ، ونسبه وجود السموم الخارجية (exotoxin A) بعد العدوى بميكروب *P. aeruginosa*

Post-inoculation time (day)	Number of animals alive (survival rate, %)	CFU/mL from inoculated burns	Exotoxin A in sera (%)*	Positive culture (%)		
				Liver	Spleen	Blood
1	25 (100)	1×10^8	-	-	-	-
2	25 (100)	1.14×10^8	2 (8)	-	-	2 (8)
3	12 (48)	1.25×10^8	8 (32)	2 (8)	2 (8)	8 (32)
4	8 (32)	1.6×10^8	8 (32)	8 (32)	8 (32)	8 (32)
6	5 (20)	1.7×10^8	3 (12)	5 (20)	5 (20)	3 (12)

* detected with CIEP

وفى مجموعه الفئران التي اخذت المصل الجدول رقم 3 يظهر عدد المستعمرات ومعدل البقاء وكميه السموم الخارجية exotoxin وكميه مضاد السموم الخارجية anti-exotoxin A ونتائج مزارع الدم والطحال والكبد. وكما هو متوقع ،لو يكتشف سموم خارجيه exotoxin A في الدم باستخدام CIEP وذلك ربما يكون بسبب تعادل (neutralization) السموم بواسطة مضاد السموم (antitoxins)المتكون بعد التحصين بالمصل . والعدوى الميكروبية يكون معظم مشاكلها بعد العمليات الجراحية الحرارية وخصوصا في الدول النامية . و 75% من نسبة الموت بعد الحريق تكون بسبب العدوى بميكروب *P. aeruginosa*.

(جدول 3)يبين نتائج مزارع الدم والطحال والكبد في مجموعه الفئران التي **أخذت** المصل من حيث عدد المستعمرات ، المتبقي حي ، ونسبه وجود السموم الخارجية (exotoxin A) بعد العدوى بميكروب *P. aeruginosa*

Post-inoculation time (day)	Number of animals alive (survival rate, %)	CFU/mL from inoculated burns	Exotoxin A in sera (%) [*]	Positive culture (%)	Number of animals alive (survival rate, %)		
					Liver	Spleen	Blood
1	48 (100)	1.5×10^8	ND	48 (100)	-	-	-
4	48 (100)	1.4×10^7	ND	48 (100)	-	-	-
7	47 (98)	1.3×10^6	ND	47 (100)	1 (2)	1 (2)	1 (2)
11	46 (96)	1.2×10^5	ND	47 (98)	1 (2)	1 (2)	1 (2)
14	45 (94)	1×10^4	ND	45 (94)	1 (2)	1 (2)	1 (2)

ND, not detectable by CIEP; ^{*} neutralizing antibody detected

ويتم دائما عزل ميكروب *P. aeruginosa* من جروح الحروق والذي يسبب التسمم الدموي والوفاه ، وهو ميكروب انتهازى ومنتشر في كل مكان ، وغير مخمر للسكريات ، وعصوي سالب لصبغه جرام ويستطيع اصابه المرضى المصابين بضعف المناعة.

وعلاج عدوى جروح الحروق بميكروب *P. aeruginosa* يكون بالمضادات الحيوية ولكنه يعطلها بمقاومته للمضادات الحيوية ، ومعظم السلالات المقاومة للعديد من الأدوية يتم عزلها من عدوى جروح الحروق . ونحتاج الى مصل (vaccine) فعال . وبعد استعمار العدوى مكان الحروق بميكروب *P. aeruginosa* ينتج العديد من العوامل القاتلة للإنسان مثل elastase ، alkaline protease ، exotoxin A التي تؤثر على انسجه العائل . وجرعه كبيره من (المصل) مضاد السموم antitoxin والمضاد

للسموم الخارجية A exotoxin لمرضى الجروح المحروقة والمصابين
بميكروب *P. aeruginosa* يقلل خطر تسمم الدم والوفاه.