Study the effect of the toxin extracted from the *E.coli* bacteria in the pathogenesis and virulence of *E.coli*

دراسة تأثير الذيفان المستخلص من بكتريا *E.coli* في إمراضية وضراوة بكتريا *E.coli*

أ.م.د. ذكرى عدنان جواد وقار عدنان حمدان
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة كربلاء
البحث مستل من رسالة ماجستير الباحث الثاني

الخلاصة:

إستخدمت في هذه الدراسة عزلة محلية من بكتريا *E.coli* ، و تم إستخلاص الذيفان حال الدم (Hemolysin) منها بعد تنميتها في الوسط المعرف كيميائيا Chemical Defined Media (CDM) وتم تنقيته جزئيا بالترسيب بكبريتات الأمونيوم وكان أعلى تخفيف أعطى تحلل لكريات الدم (للراشح) 32/1 (320 وحدة/ مليلتر) ، أما بعد التنقية الجزئية وجد أن التخفيف (1/ 64) سبب تحلل 50% من كريات الدم مقارنة مع المنحنى القياسي لكلوريد الصوديوم ، وتم حساب الجرعة المهلكة لنصف الفئران من الذيفان حال الدم وكذلك تأثير الجرعة المهلكة للنصف من الذيفان على قيمة الجرعة المهلكة للنصف من بكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان حال الدم معزولة من البراز وعلى ضراوتها ، أكدت نتائج البحث الدور الذي يلعبه الذيفان حال الدم في إمراضية وضراوة بكتريا *E.coli* من خلال إنخفاض الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) لهذه البكتريا عند حقنها مع التركيز القاتل لنصف الفئران من الذيفان (1.56 مايكروغرام / مليلتر) من (3.16×10^7 خلية/ مليلتر) إلى (2.3×10^6 خلية / مليلتر) . كما إن لحقن تراكيز مختلفة من الذيفان حال الدم تأثير على عيوشة الفئران حيث إن تركيز الذيفان الذي أعطى فعالية تحلل (100 و 90) % أعطى نسبة هلاك 100% بينما التركيز الذي أعطى فعالية تحلل 50% سبب هلاك 50% من الفئران كما إن حقن الفئران بتراكيز مختلفة من الذيفان ، التراكيز التي أعطت فعاليات تحلل (100،90،70،50،25) % ، مع الجرعة القاتلة للنصف لبكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان أدت إلى زيادة نسبة هلاك الفئران حيث إن الجرعة القاتلة للنصف مع التركيز الـ(100)% تسبب هلاك 100% من الفئران .

الكلمات المفتاحية :الذيفان حال الدم ، الجرعة المهلكة للنصف ، الفعالية التحللية

الهدف من الدراسة : يهدف البحث إلى دراسة تاثير الذيفان حال الدم المستخلص من بكتريا *E.coli* على إمراضية وضراوة بكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان.

Abstract

A local isolation of *E.coli* bacteria used in these study, and The toxin (Hemolysin) were extracted from it after their culture in the Chemical Defined Media (CDM). Hemolysin extraction was done and partialy purification applied, by using ammonium sulfate. It was found that filtrate contained hemolytic activity at a level higher than that before purification and was the highest dilution gave the hemolytic activity on blood cells 1/32 (320 units / ml)before the partial purification, but after partial purification found that dilution (1/64) caused degradation of 50% of the blood cells compared to the standard curve of sodium chloride, LD_{50} of the mouse for the toxin was calculated and the effect of LD_{50} of the toxin on the value of LD_{50} of the bacteria *E.coli* (non hemolytic) isolated from the stool, The results of the research confirmed role of the toxin on the pathogenesis and virulence of *E.coli* bacteria through lowering LD_{50} of this bacteria when injected in the mice with LD_{50} of the toxin (1.56 micrograms / mL) from (3.16×10^7 cells / mL) to (2.3×10^6 cells / mL).

The injection of different concentrations of the toxin in mice effect on the viability of the mice where the concentration of the toxin that gave hemolytic activity (100, 90%) gave the percentage loss of 100%, while the concentration of the toxin that gave hemolytic activity 50% cause death of of 50% of the mice. Also injection of concentrations different from the toxin, the concentrations that gave hemolytic activity (100,90,70,50,25%), with the lethal dose of the *E.coli* bacteria is not producing toxin led to increase the proportion of the loss of the mice.

Key words : Hemolysin , LD_{50} , Hemolytic activity

المقدمة :

الكثير من سلالات بكتريا *E.coli* تمتلك القدرة على تحليل خلايا الدم الحمراء ، يعد [1] أول من حصلا على الذيفان حال الدم (Hemolysin) بواسطة ترشيح الخلايا النامية على وسط (Alkaline meat infusion broth) فيما بعد وصف [2] نوعين من الذيفان حال الدم منتجة من قبل بكتريا *E.coli* بإستخدام الوسط الزرعي (Alkaline meat infusion broth) الأول الذيفان حال الدم ألفا(α haemolysin) وهو قابل للترشيح (Filterable) وأطلق عليه (AH) والثاني الذيفان حال الدم بيتا (β haemolysin) يكون مرتبط بالخلية ، كلا النوعين ينتج منطقة شفافة (Clear) على وسط غراء الدم وذكر أن سلالات بكتريا *E.coli* يمكن في نفس الظروف أن تنتج كلا النوعين كما أكد إختلاف النوعين حيث وجد أن المصول المضادة المعدة ضد الذيفان حال الدم المرتبط (β haemolysin) لاتعمل على الذيفان حال الدم ألفا الحر (α haemolysin) ، وفي عام (1969)تم وصف نوع ثالث من الذيفان حال الدم ألفا من قبل [3] وهو الذيفان حال الدم كاما (γ Hemolysin) من الطفرات المقاومة للمضاد Nalidixic acid حيث يحفز إنتاج هذا النوع من الذيفان حال الدم ألفا عندما تنمى البكتريا على وسط حاوي على هذا المضاد ، ويختلف الكاما هيمولايسين عن النوعين السابقين بكونه لايؤثر على كريات الدم الحمراء للإنسان والأرانب بينما يؤثر على كريات دم الحيوانات الأخرى ، إن العديد من الدراسات الحديثة أثبتت أن إنتاج الذيفان حال الدم ألفا يكون شائع لدى بكتريا *E.coli* المعزولة من إصابات خارج الأمعاء في الإنسان (Extraintestinal Infection) أكثر من تلك المعزولة من البراز، وإن سلالات إشريشيا القولون المسببة لإلتهابات المجاري البولية تنتج أنواع مختلفة من الذيفان حال الدم ألفا [4] .

يتصف الذيفان حال الدم ألفا بقدرته على تحليل كريات الدم الحمراء ، فضلاً عن مهاجمة خلايا الجهاز المناعي [5] مثل كريات الدم البيضاء متعددة أشكال النوى (Polymorphonuclear) ووحيدة النوى (Monocyte) وخلايا القعدة (Basophilis) والخلايا اللمفاوية (Lymphocyte) [6]، وذكر [7] أن الذيفان حال الدم ألفا يفقد هذه الخلايا وظيفتها مثل البلعمة (Phagocytosis) و الإستجابة للجذب الكيميائي (Chemotaxis) على أية حال فإن الأغشية الخلوية هي الأهداف الرئيسية لهذا السم .

المواد وطرائق العمل :

- العزلات البكتيرية:

تم الحصول على أربعة عزلات من بكتريا *E.coli* من مختبر الصحة العام من مرضى مصابين بخمج السبيل البولي وتم تشخيصها بإستخدام الفحوصات البايوكيميائية والـ Api والتحري عن قابلية هذه العزلات على إنتاج الذيفان حال الدم وإختيار العزلة الأكثر كفاءة في إنتاج الهيمولايسين أضافة إلى عزلة من بكتريا *E.coli* معزولة من البراز من مستشفى الأطفال في كربلاء لإستخدامها في تحديد الجرعة المهلكة للنصف (كونها غير منتجة للهيمولايسين).

حيوانات التجربة

تم إستعمال فئران بيض سويسرية من نوع(Albino mice)، ذكور بعمر(6)أسابيع تتراوح أوزانها بين(20- 25) غرام ووضعت في البيت الحيواني وتم توفير درجة الحرارة المناسبة لها و ماء الشرب النظيف والعلف ، وقسمت في أقفاص منفصلة إلى مجاميع .

- إنتاج الهيمولايسين

زرعت العزلات في وسط (Brain Heart Infusion) لمدة (10) ساعة ثم نقلت وحضنت في الوسط المعرف كيميائيا" (Chemical Defined Media) المحضر حسب [8] (موزعة في دورقين) بدرجة حرارة (37 م) وبأستخدام حاضنة هزازة لمدة 14 ساعة . تم أخذ الراشح بعد إجراء الطرد المركزي على سرعة (3000 دورة / دقيقة) لمدة (30) دقيقية وعند درجة حرارة (4 م) بعدها تم ترشيح المزروع بإستخدام ورق ترشيح قطر ثقوبه (0.22) مايكرومتر[9].

تنقية الذيفان حال الدم جزئيا

وفقا لما جاء في [1, 10] تم ترسيب الخلايا البكتيرية وإستخلاص الراشح الحاوي على الذيفان وترشيحه بالمرشحات الغشائية وتم ترسيب الذيفان بإستخدام كبريتات الأمونيوم وبعدها تم تجفيده (Lyophilized).

قياس الفعالية التحللية كميا ونوعيا

المنحنى القياسي لتحلل الدم بإستخدام تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم

تم تحضير تراكيز متدرجة من محلول كلوريد الصوديوم وذلك بإستخدام الماء المقطر، إذ تم مزج (1) من كل تركيز مع (1) من كريات الدم الحمراء للخراف المغسولة والمعلقة بالدارئ الفسلجي ،حضنت الأنابيب بعد ذلك بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة بعدها رسبت الأنابيب بسرعة (1500 دورة / دقيقة) لمدة (30 دقيقة) ،تمت قراءة الإمتصاصية للراشح بعد فصله عن الراسب بإستخدام الطول الموجي (540nm) بعد ذلك تم إستخراج التركيز الذي يسبب تحلل دموي نسبته (50%) (50% Hemolysis) .

$$\%50 \text{ Hemolysis} = 1A/A \times \%100$$

حيث A1 :- تمثل قيمة الإمتصاصية العظمى

A:- تمثل قيمة الإمتصاصية الصغرى

تركيزكلوريد الصوديوم (غم/100مل)	الإمتصاصيةعلى طول موجي (540 نانوميتر)	نسبة التحلل الدموي
%0.90	0.010	0.8
%0.85	0.010	0.8
%0.80	0.011	0.88
%0.75	0.012	0.96
%0.70	0.014	1.12
%0.65	0.09	7.2
%0.60	0.14	11.2
%0.55	0.23	18.4
%0.50	0.33	26.4
%0.45	0.42	33.6
%0.40	0.54	43.2
%0.35	0.65	52
%0.30	0.76	60.8
%0.25	0.83	66.4
%0.20	0.91	72.8
%0.15	1. 2	89.6
%0.10	1.50	100
%0.0	1. 53	100

تم قياس فعالية الذيفان حال الدم ألفا في الراشح حسب [11] ، تم قياس الفعالية التحللية للراشح الخام وكذلك للذيفان المنقى جزئيا بعد الترسيب بكبريتات الأمونيوم والتجفيد ، بإذابة (100) مايكروغرام من الذيفان في مليلتر واحد من المحلول الفسيولوجي وعمل منه عدة تخافيف وتم إختيار التراكيز التي أعطت فعالية تحللية (100-90-70-50-25) % بالمقارنة مع المنحنى القياسي لإستعمالها في التجارب المناعية .

التأثيرات الإمراضية للذيفان حال الدم

أ--تحديد الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50})للفئران من عالق بكتريا *E.coli* غير المنتجة للهيمولايسين

ثم عمل تخافيف عشرية من العالق البكتيري (بكتريا غير منتجة للذيفان) (10^9،10^7,10^6,10^5,10^4،10^8،10^3 خلية / مليلتر) ، وتم حقن الفئران في الخلب بواقع (1مليلتر) لكل فأرة من التراكيز أعلاه حيث قسمت الفئران إلى مجاميع بواقع 5 فئران حيث حقنت كل مجموعة بتركيز معين إضافة إلى مجموعة السيطرة المحقونة بالدارئ الملحي الفسلجي وتم حساب عدد الفئران الميتة بعد مرور ثلاثة أيام من بدء التجربة وتحديد الجرعة القاتلة للنصف حسب ماجاء في [12].

ب- حساب الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية المحقونة بالذيفان حال الدم ألفا

تم تحضير تراكيز من الذيفان حال الدم ألفا الخام التي أعطت فعاليـــــة (100- 90 - 70- 50 - 25) وقسمت الفئران إلى (5) مجاميع وبواقع (4) فئران لكل مجموعة ، حقنت كل مجموعة بـ (1مليلتر) لكل فأرة داخل البريتون (Intraperitoneally) وبعد ثلاثة أيام تم إيجاد الجرعة المهلكـــة للنصف من خلال حساب عدد الفئران الحية والميتة ضمن المجموعة الواحدة حسب ماجاء في [12] .

جـ- بيان تأثير الذيفان حال الدم ألفا في قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المحقونة ببكتريا *E.coli*

في هذه التجربـــــــة تم خلط (0.5) مليلـــــتر من كل تركيـــــز من تراكيـــــز العــــالق الجرثــــومي المستعملــــــة (10^3 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7, 10^8, 10^9) خلية / مل مع (0.5) مليلتر من تخفيف الذيفان حال الدم ألفا الخام الذي أهلك نصف عدد الفئران، ثم حقنت الفئران بـ (1) مليلتر لكل فأرة من كل خليط داخل تجويف البريتون (Intraperitoneally) وبواقع (5) فئران للخليط الواحد إضافة إلى مجموعة السيطرة التي حقنت بـ1 مليلتر من الدارئ ، وبعد ثلاثة أيام تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل جرعة وحسبت الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران بوجود الذيفان حال الدم ألفا حسب ماجاء في [12].

د- بيان تأثير التراكيز المختلفة من الذيفان حال الدم ألفا الخام على ضراوة جرثومة *E.coli* غير المنتجة للهيمولايسين:

1- تم إستعمال تراكيز الذيفان حال الدم ألفا الخام التي إستخدمت أعلاه ثم تم خلط (0.5) مليلتر من كل تخفيف مع (0.5) مليلتر من العالق البكتيري (الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران) .
2- قسمت الفئران المختبرية إلى (6) مجاميع كل مجموعة تضم (5) فئران وحقنت كل مجموعة بـ (1) مليلتر لكل فأرة من كل خليط (الحاوي أحد تخافيف الذيفان حال الدم ألفا الخام والعالق البكتيري) وبعد ثلاثة أيام تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل جرعة .

النتائج والمناقشـة :

إستخدمت أربعة عزلات محلية من بكتريا *E.coli* من مرضى مصابين بخمج السبيل البولي وتم تشخيصها ثم تم التحري عن قابليتها على إنتاج الذيفان حال الدم ألفا

التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج الذيفان حال الدم ألفا

أختبرت قابلية عزلات بكتريا *E.coli* الأربعة على إنتاج الذيفان حال الدم ألفا نوعيا بتنميتها على وسط آكار الدم وملاحظة مناطق التحلل حول المستعمرات إذ تم إختيار العزلة التي تنتج مناطق تحلل أكبر ، وكميا بقياس كمية الهيموغلوبين المتحرر نتيجة فعالية الذيفان حال الدم ألفاعلى كريات الدم الحمراء وإعتمادا على ذلك تم إختيار العزلة الأكثر كفاءة في إنتاج الذيفان حال الدم ألفـــا لإكمال باقي التجارب ، إستخدمـــــت طريقة قياس فعاليـــــة تحلل الدم كميا على كريات الدم الحمراء أيضا من قبل [13] فهي تعد طريقة جيدة لقياس فعاليـــــة الذيفان حال الدم ألفا إعتمادا على قابليتـــــه على تحليل كريات الدم الحمراء و ذلك يعني أن الفعالية التحللية يمكن أن تتم في الوسط الصلب (آكار الدم) وكذلك في الوسط السائل الحاوي على كريات الدم الحمراء مما يفسر أن الهيمولايسين هو بروتين يمتلك فعالية إنزيمية (Enzyme-like activity) على العموم حساب الفعالية التحللية كميا بواسطة تقنية سلسلة التخافيف هي لحساب كمية الذيفان بالوحدات (Units) ولكن التحري عن القابلية على إنتاج الذيفان تعتمد على الطريقة المباشرة وهي ملاحظة التحلل على وسط آكار الدم .

تم قياس الفعالية التحللية لراشح العزلة الأكثر كفاءة في إنتاج الذيفان بعد إجراء الطرد المركزي والترشيح حيث تم عمل سلسلة من التخافيف مع 2% من كريات الدم الحمراء وكانت الفعالية التحلليـــــة للراشح 320 وحدة تحلل / مليلتر حيث إن أعلى تخيف أعطى تحلل هو 1/ 32 وهي نفس الفعالية التي تم تحديدها في دراسة [14] وكانت مقاربة للفعالية التي حددتها دراسة [15] الذين حصلو على 300 وحدة / مليلتر ولكن النتيجة التي حصلنا عليها تختلف عن الفعالية التي حصل عليها [6] و تم قياس الفعالية التحللية للذيفان الخام بعد تنقيته جزئيا أيضا بعد إجراء الترسيب بكبريتات الأمونيوم والتجفيد جدول (1) .

جدول (1) الفعالية التحللية لتراكيز مختلفة من الهيمولايسين المنقى جزئيا

تركيز الهيمولايسين الخام (مايكروغرام /مل)	الإمتصاصيةعلى طول موجي(540nm)	نسبة التحلل الدموي
100	1.77	120
(2/1) 50	1.50	100
(4/1)25	1.37	90
(8/1)12.5	1.25	80
(16/1) 6.25	1.037	70
(32/1) 3.125	0.92	61
(64 /1)1.56	0.73	50
(128 /1) 0.78	0.53	35
(256/1) 0.39	0.38	25
(512 /1) 0.195	0.16	10
(1024 / 1) 0.097	0.02	1.3

لوحظ إزدياد فعالية الذيفان بعد إجراء عمليات التنقيـــة (الترسيب بكبريتات الأمونيوم والتجفيد) حيث أصبحت الفعاليـة (الـ 50%) 640 وحدة تحـــلل / مليلتر بالمقارنة مع المنحنى القياسي (Standerd curve) ، و كان أعلى تخفيف سبب تحلل كريات الدم في دراســـــة [14] هو 128/1 (1280وحدة / مليلتر) .

تم إختيار تراكيز الذيفـــــان التي أعطت فعاليـــة تحلل (100 ، 90 ، 70 ، 50 ، 25) % في التجارب اللاحقة.

يعد الذيفـــــان حال الدم ألفا من عوامـــــل الضراوة المهمة للبكتريا إذ يـعد من البروتينات القليلـــــة المفرزة إلى الخارج من بكتريـا *E.coli* [16 ، 17] ويزيد من فوعتها حيث إن إنتاج هذا الذيفان يسبب تحطم الأنسجة مما يسرع إنتشار البكتريا ويحرر المغذيات اللازمة لنمو البكتريا من المضيف وكذلك يحورمسارات الإشارة للمضيف (Host signaling pathways) مؤثرا على عدة عمليات منها الإستجابة الإلتهابيـــــــة والـ Host cell survival والديناميكيـــــة الهيكليـــة الخلوية Cytoskeletal dynamics [18] .

التأثيرات الإمراضية للهيمولايسين في الحيوانات المختبرية

لمعرفة تأثير الذيفان حال الدم ألفا الخام المستخلص من بكتريا *E.coli* على ضراوة بكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان حال الدم ألفا في الفئران المختبرية تم تحضير تراكيز من بكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان وحقنها في فئران بيض وبواقع (5) فئران لكل تركيز، من جدول رقم (2) وجد أن الجرعة التي ادت الى هلاك (50%) من تلك الفئران خلال (5) أيام كانت (10^7 بكتريا حية / مليلتر) ويوضح شكل (1) العلاقـة بين عدد الخلايا البكتيريـــة 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 (10^7) بكتريا حية /مليلتر الذي حسب بالمعادلـة التالـــية وفق طريقـــة [12].

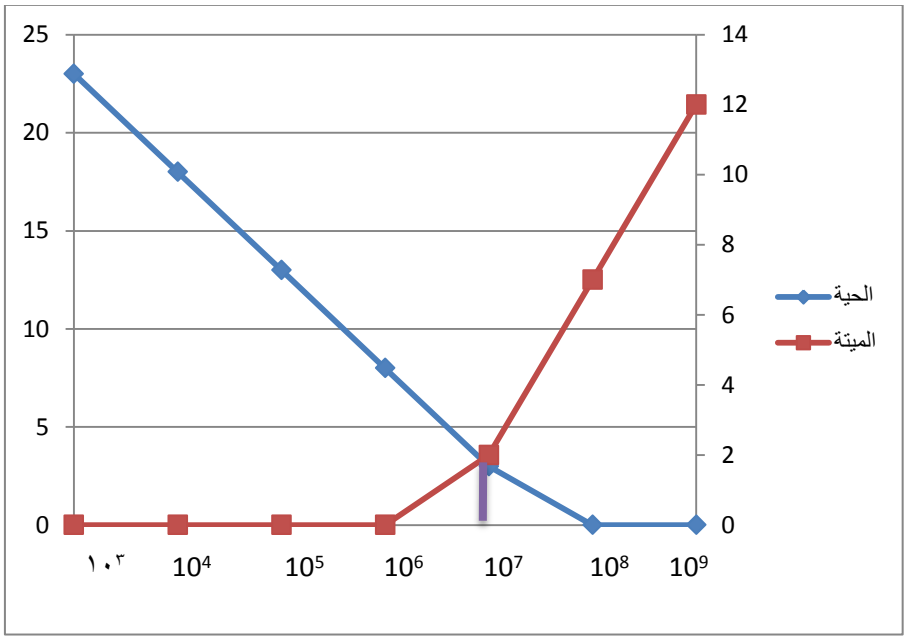
جدول (2) : الجرعة القاتلة للنصف(LD_{50}) من الفئران المختبرية لبكتريا *E.coli* غير منتجة للهيمولايسين

عدد الخلايا البكتيرية	عدد الفئران المحقونة	عدد الفئران الحية	عدد الفئران الميتة	العدد التراكمي للأحياء	العدد التراكمي للأموات	العدد الكلي للفئران الحية والميتة	النسبة المئوية للهلاك
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

50- النسبة المئوية للفئران الميتة في التركيز الادنى من 50%

$$\text{المسافة النسبية} = \frac{\text{النسبة المئوية للفئران الميتة في التركيز الاعلى من 50 \%}}{\text{النسبة المئوية للفئران الميتة في التركيز الادنى من 50 \%}} - \text{النسبة المئوية للفئران الميتة في التركيز الادنى من 50 \%}$$

المسافة النسبية $= 50 - 0 / 100 = 0 = 0.5 = 10^{7+0.5} = 10^{7.5} = 3.16 \times 10^7$ خلية / مليلتر



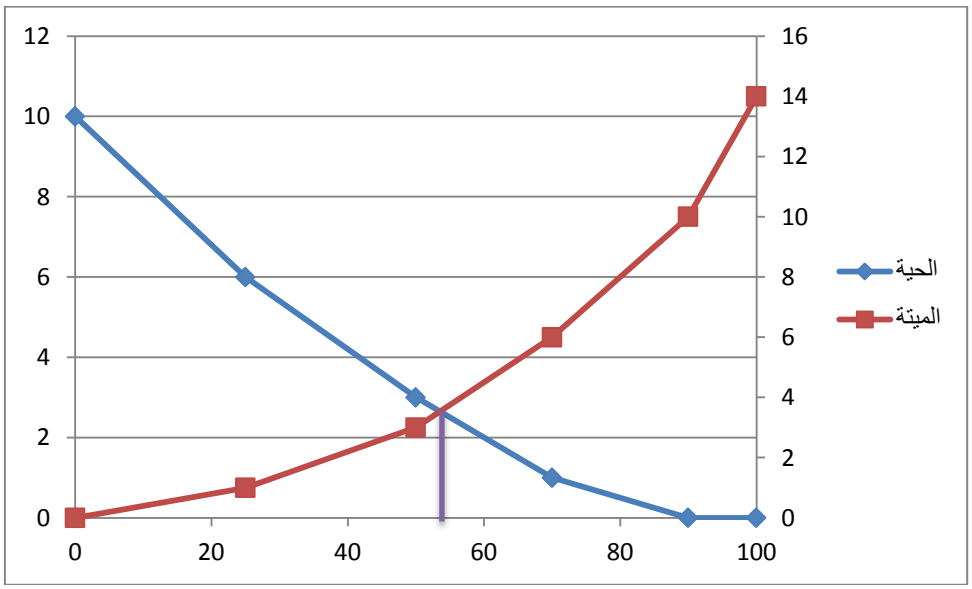
الشكل :(1) الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية لبكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان

تبين النتائج أن الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران من بكتريـــا *E.coli* غير منتجـــــة للذيفان هي (3.16×10^7) بينما في دراسة [19] كانت الجرعة (10^8) لم تعطي أي نسبـــــة هلاك ، تعزى اسباب الاختلاف في التركيز البكتيري المهلك للفئران بين الدراسات الى عوامل عدة منها شدة إمراضية السلالة البكتيرية المستخدمة والمكان الذي عزلت منه إضافة إلى عوامل الضراوة التي تمتلكها سواءاً السطحية أو المفرزة ، هذه العوامل مجتمعة لها تأثير على قيمة الجرعة المهلكة لنصف عدد الحيوانات المختبرية.

وتم تحديد الجرعة المميتة للنصف (LD_{50}) من خلال حقن تراكيز مختلفة من الذيفان حال الدم ألفا الخام التي أعطت نسبـــة تحلل (100 ، 90 ، 70 ، 50 ، 25) % في الفئران المختبريـــــة وبواقع (4) فئران لكل تركيز في البريتون بالإضافة لمجموعـــة السيطرة التي حقنت باالمحلول الفسيولوجي .

جدول (3) : الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية من الذيفان حال الدم ألفا

تراكيز الذيفان الخام (فعالية التحلل)	عدد الفئران المحقونة	عدد الفئران الحية	عدد الفئران الميتة	العدد التراكمي للأحياء	العدد التراكمي للأموات	العدد الكلي للفئران الحية والميتة	النسبة المئوية للهلاك
100	4	0	4	0	14	14	100
90	4	0	4	0	10	10	100
70	4	1	3	1	6	7	86
50	4	2	2	3	3	6	50
25	4	3	1	6	1	7	14
N.S.	4	4	0	10	0	10	0



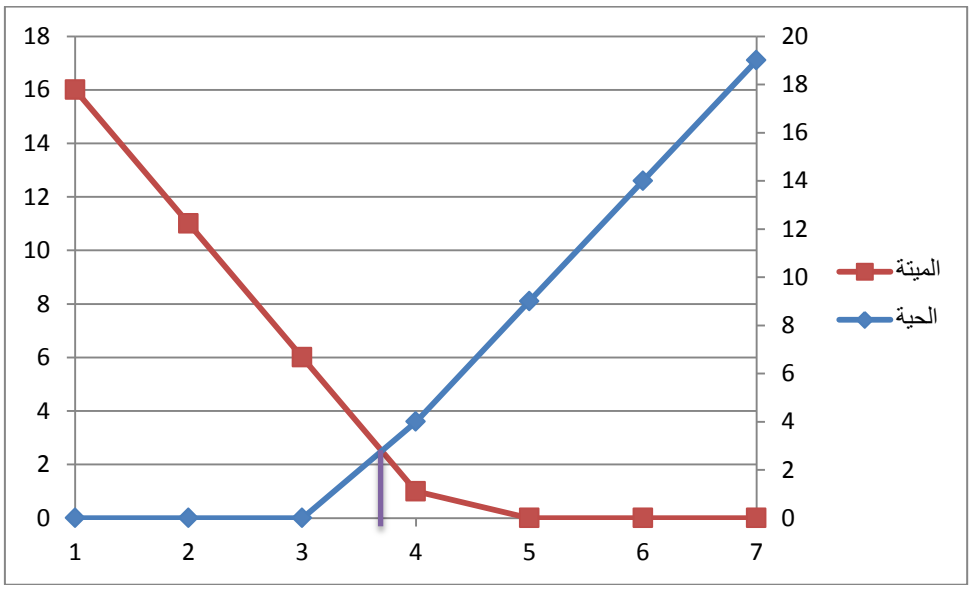
الشكل :(2) الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية للذيفان حال الدم

لوحـــظ من الجدول أعلاه أن الجرعـــــة المهلك
ـــــة لنصف الفئران من الذيفـــان حال الدم ألفا هي التركيز الذي أعطى فعاليـــــة تحلل (50) % أي التركيز (1.56 مايكروغرام / مليلتر) في حين كانت النتيجـــــة التي تم تحديدها في دراســـــة (20، 21) أكبر ، بينما كانت هذه الجرعة أعلى من الجرعة التي تم تحديدها في دراسة [14] والتي كانت 1.25 مايكروغرام / مليلتر ، وربما يعود السبب في ذلك الإختلاف إلى أن فعالية الذيفان حال الدم ألفا تختلف بإختلاف السلالة المنتجة له وأيضا قد يكون السبب إختلاف إستجابة الحيوانات المختبرية إضافة لظروف التجربة [14]

ولبيان تأثير الذيفان حال الدم ألفا الخام على قيمة الجرعة المهلكة للنصف لبكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان تم حقن الفئران بخليط من تراكيز العالق البكتيري بالتراكيز المستخدمة سابقا بخلط (0.5 مليلتر) من كل تركيز مع (0.5 مليلتر) من تركيز الذيفان حال الدم ألفـــا الذي أدى لقتل نصف عدد الفئران ، حيث لوحظ أن الجرعة التي ادت الى هلاك نصف عدد الفئران في هذه الحـــــــالة كانت (2.3×10^6 بكتريا / مليلتر) و المحسوبة وفق طريقة [12] .

جدول (4): الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية من بكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان مع الذيفان حال الدم ألفا

عدد الخلايا الحية	الذيفان ذو فعالية %50	عدد الفئران المحقونة	عدد الفئران الحية	عدد الفئران الميتة	العدد التراكمي للأحياء	العدد التراكمي للأموات	العدد الكلي للفئران الحية والميتة	النسبة المئوية للهلاك
10^9	50	5	0	5	0	16	16	100
10^8	50	5	0	5	0	11	11	100
10^7	50	5	0	5	0	6	6	100
10^6	50	5	4	1	4	1	5	20
10^5	50	5	5	0	9	0	9	0
10^4	50	5	5	0	14	0	14	0
10^3	50	5	5	0	19	0	19	0



شكل (3): الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) من الفئران المختبرية المحقونة بجرثومة *E.coli* غير منتجة للذيفان مع الذيفان حال الدم ألفا

50- النسبة المئوية للفئران الميتة في التركيز الادنى من 50%

المسافة النسبية = ـــ-

النسبة المئوية للفئران الميتة في التركيز الاعلى من 50 % - النسبة المئوية للفئران الميتة في التركيز الادنى من 50 %

المسافة النسبية $= 50 - 20 \ / \ 100 - 20 = 0.57 = 10^{6 + 0.375} = 10^{6.375} = 2.34 \times 10^{6}$ خلية / مليلتر

عند مقارنة قيمة الجرعة المهلكة لنصف العدد من الفئران المحقونة ببكتريا *E.coli* التي تم تحديدها بغياب الذيفان حال الدم ألفا و البالغة (3.16×10^{7} خلية / مليلتر) مع تلك التي تم تحديدها بوجود الذيفـان حال الدم ألفا (2.34×10^{6} خلية / مليلتر) ظهر وبشكل واضح أن وجود الذيفان حال الدم ألفا عمل على تقليل الجرعة المهلكة للنصف لبكتريا *E.coli* مما يؤكد دور الذيفان حال الدم ألفا في زيادة ضراوة البكتريا وامراضيتها . فقد اكد عدد من الباحثين على دور الذيفان حال الدم ألفا في مقاومة تلك الجرثومة للعوامل البيئية الصعبة مما يزيد من مقاومتها للجهاز المناعي للمضيف لأحداث الاصابة . أن حقن البكتريا غير الضارية مع الهيمولايسين قد يعطي تأثير تآزري (أي تأثير مضاعف) بينما حقن أعداد كبيرة من الخلايا البكتيرية غير الضاريــــــــة لايتمكن من إحداث الهلاك [19] .

وتم حقن كل فأرة بالجرعة تحت القاتلة النصفية من بكتريا *E.coli* غير المنتجة للذيفان التي تم تحديدها سابقاً و البالغة (10^{7}) مع تراكيز مختلفة من الذيفان حال الدم ألفا و التي تعطي فعالية تحلل (100 ، 90 ، 70 ، 50 ، 25) % وكما موضح في الجدول (5) الذي يوضح وجود زيـادة ملحوضــــة بالنسبة المئويـــــة للهلاك مع زيادة تركيز الذيفان حال الدم ألفا الخام حيث أدى حقن الفئران بـ (0.5 مليلتر) من تركيز الذيفان حال الدم ألفا الخـــــام الذي أعطى فعاليـــــة تحلل (100 ، 90) % مع الجرعة القاتلة للنصف من البكتريا الى موت الفئران المحقونة بنسبة (100%) مما يؤكد دور الذيفان حال الدم ألفا في زيادة ضراوة البكتريا .

جدول (5): تاثير الذيفان حال الدم ألفا على ضراوة جرثومة *E.coli* غير منتجة للذيفان في الفئران

عدد الخلايا البكتيرية	تركيز الهيمولايسين مكعب/ مل	عدد الفئران	الحية	الميتة	العدد التراكمي للأحياء	العدد التراكمي للأموات	العدد الكلي للفئران الحية والميتة	النسبة المئوية للهلاك
10^{7}	100	5	0	5	0	16	16	100
10^{7}	90	5	1	4	0	13	13	100
10^{7}	70	5	1	4	2	7	9	78
10^{7}	50	5	2	3	4	3	7	43
10^{7}	25	5	5	0	9	0	9	0

شكل (4): تاثير الذيفان حال الدم ألفا على ضراوة بكتريا *E.coli* غير منتجة للذيفان في الفئران

أكدت العديد من الدراسات أن الذيفان حال الدم ألفا هو من أهم عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا *E.coli* ويكون شائع في السلالات المسببة لإلتهاب المجاري البولية أكثر من السلالات المعزولة من براز الأشخاص الطبيعين [23,22] وأنه المسؤول عن شدة إمراضيتها حيث لاحظ [2] أن سلالات بكتريا *E.coli* المنتجة للذيفان تكون أكثر ضراوة على الفئران من السلالات الأخرى غير المنتجة له .

ذكر [24] أن فقدان القدرة على إنتاج الذيفان حال الدم ألفا في السلالات المسببة لخمج السبيل البولي ينتج عنه فقدانها لشدة ضراوتها .

كما أكد [25] أن إضافة تتابع DNA يشفر للذيفان حال الدم لسلالة *E.coli* معوية غير ضارية وغير منتجة للذيفان معزولـة يؤدي لزيادة ضراوتـــها على الفئران .

نستنتج من هذه الدراسة أن الذيفان حال الدم ألفا يزيد من ضراوة بكتريا *E.coli* وبالتالي يقلل من الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران

المصـــــــــــادر:

1. **Lovell, R., and T. A. Rees. (1960).** A filterable haemolysin from Escherichia coli. *Nature (London)* 188:755-756.
2. **Smith, H. W., and M. A. Lingood. (1971).** Observations on the pathogenic properties of the K88, hly, and ent plasmids of Escherichia coli with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med. Microbiol*. 4:467.
3. **Walton JR, Smith DH (1969)** . New hemolysin (τ) produced by Escherichia coli. *J Bacteriol* 98:304–305.
4. **Jorgensen SE, Short EC, Kurtz HJ, Mussen HK, Wu GK (1976)** .Studies on the origin of the α-hemolysin produced by Escherichia coli. *J Med Microbiol* 9:173–189.
5. **DeBoy, J. M., I. K. Wachsmuth, and B. R. Davis. 1980**. Hemolytic activity in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 12:193-198.
6. **Short, E. C., Jr., and H. J. Kurtz. (1971)**. Properties of the hemolytic activities of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 3:678-687.
7. **Bhakdi S, Martin E. 1991** . Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun*.;59(9):2955–2962
8. **Snyder, I., S ., and Zwadyk, P .** (1969) : Some Factors affecting production and assay of *Escherichia coli* hemolysins . *J . Gen . Microbiol* . 55 : 139 – 143

9- **مسلم، ساهرة نصيف. (2005).** دراسة وراثيـــة وكيموحيوية على الهيمولايسين المنتج من بكتريا الـ *Aeromonas hydrophila* والمعزولة من المياه السطحية والمصابين بالأسهال ، رسالة دكتوراه ، كليـــة العلوم – الجامعة المستنصرية.

10- Schindel , C. ; Zitzer , A; Schulte , B.; Gerhards , A ; Stanlty , P.; Hughes ,C.; Koronkis , V.; Bhakdi, S , and Palmer , M. (2001) : Intraction of Escherichia coli hemolysin with biolgical membrane . *Eur . J. Biochem* .268: 800 – 808.

11- Figuriredo, P., Catani, C. and Yano, T. (2006). Serum high-density lipoprotein (HDL) inhibits in *Vibrio* enterohemolysin (Ehly) activity produced by enteropathogenic *E.coli*. FEMS *Immnol. Med. Microbiol*. 38:53-57.

12- Reed, L.J.; Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints". *The American Journal of Hygiene* **27**: 493–497

13- Kumar , S. and lindorfer , R. K . (1962) : The characterization of staphylococcal toxin . 1. The electrophoretic migration of the alpha – hemolytic , dermonecrotic . Lethal and leukocidal activities of crude hemolysin . *J. Exp : Med* . 115 : 1095 .

14-الحميداوي ، طالب فالح . (2005) . النشاط الهيمولايسيني لبكتريا إشريكيا القولون المسببة لإلتهابات المجاري البولية ومقاومتها لمضادات الحياة.

15- Jorgensen SE, Short EC, Kurtz HJ, Mussen HK, Wu GK (1976) .Studies on the origin of the α-hemolysin produced by Escherichia coli. *J Med Microbiol* 9:173–189.

16- Mackman , N. J.; Nicaud , M.; Gary , L., and Holand , L.B.(1986) : Secretion of hemolysin by *Escherichia coli* . *Curr . Top . Microbiol Immunol* . 125:159 – 181 .

17- Springer , W ., and Goebel , W . (1980) : Synthesis and Secretion of hemolysin by *Eschericmia coli . J . Bact* . 144 (1) : 53 – 59 .

18- Wiles, T. J. , Kulesus R. R, and Mulvey M. A., (2008). “Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*,” *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 85, no. 1, pp. 11–19.

19- Addison K. May,* Robert G. Sawyer, Thomas Gleason, Anne Whitworth, and Timothy L. Pruett. 1996. In Vivo Cytokine Response to Escherichia coli Alpha-Hemolysin Determined with Genetically Engineered Hemolytic and Nonhemolytic E. coli Variants. *Infection and Immunety* , Vol. 64, No. 6 2167–2171.

20- Cavalieri, S. J., and I. S. Snyder. 1982. Effect of *Escherichia* coli alpha hemolysin on human peripheral leukocyte function in vitro. *Infect. Immun*. 37:966-974.

21- Cavalieri, S. J., and I. S. Snyder. 1982. Effect of *Escherichic coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte viability in vitro. *Infect. Immun*. 36:455-461.

22- Brooks, H. J. L., F. 0. Grady, M. A. McSherry, and W. R. Cattell . 2006. Uropathogenic properties of *Escherichia coli* in recurrent urinary tract infection. *J. Med. Microbiol*. 13:578.

23- DeBoy, J. M., I. K. Wachsmuth, and B. R. Davis. 1988. Hemolytic activity in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia* coli. *J. Clin. Microbiol.* 12:193-198.

24- van den Bosch, J. F., L. Emody, and I. Ketyi. (1988). Virulence of haemolytic strains of *Escherichia coli* in various animal models. *FEMS Microbiol. Lett*. 13:427-430.

25- Welch, R. H., E. P. Dellinger, B. Minshew, and S. Falkow. (1988). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature (London)* 294:665-667.