

المحاضرة 9: اختبار مولدات الحرارة Pyrogens Test

مولدات الحرارة Pyrogens

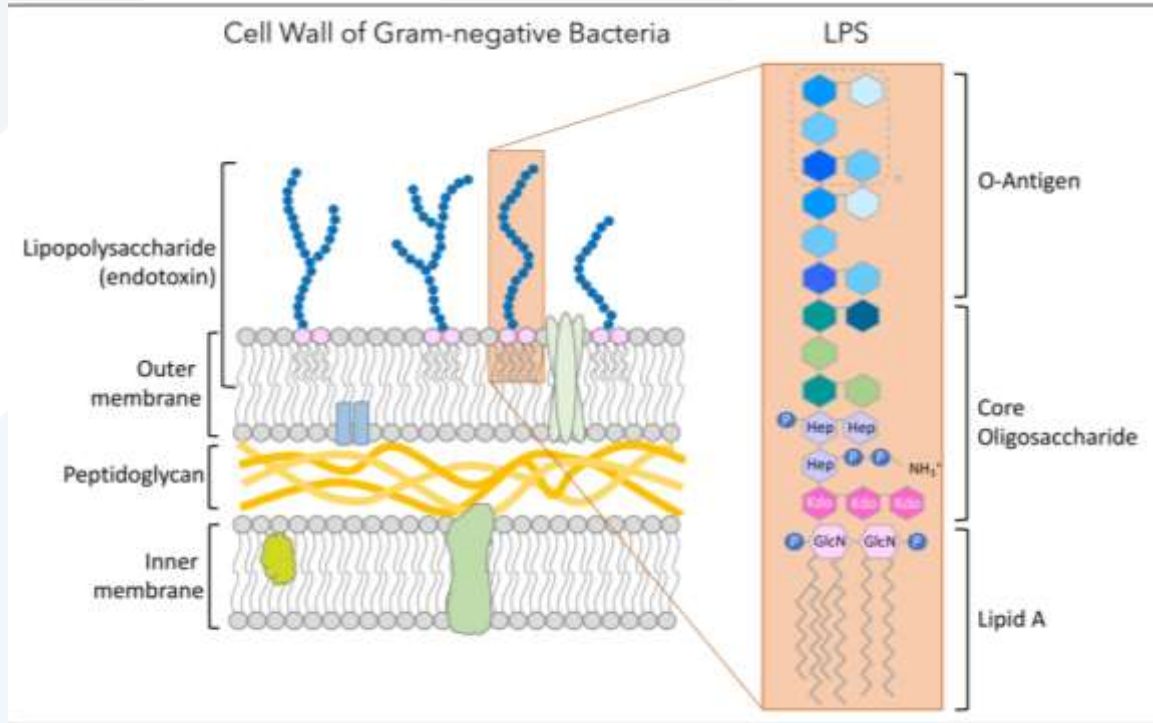
مولدات الحرارة عند الجراثيم سلبية الغرام هي الذيفان الداخلي، عند الجراثيم إيجابية الغرام هي الببتيدوغليكان، عند الفطور هي عديد السكر في الغلاف الخارجي.

مولدات الحرارة غير ممرضة بحد ذاتها، لكن الخلايا المناعية في الجسم تراها كدليل على وجود الميكروبات، لذلك تتعرض استجابة مناعية فطرية. وفي حال دخول كمية كبيرة منها إلى الدم أو السائل الدماغي الشوكي فإنها سوف تسبب صدمة حرارية أو فشل في الأعضاء مما قد يؤدي إلى الموت.

الذيفان الداخلي Endotoxin

هو مكون في الجدار الخلوي للجراثيم سلبية الغرام، عبارة عن عديد سكريد شحمي (LPS) يتألف من اللبيد A وعديد السكر والمستضد O antigen. يعتبر الاندوتوكسين أهم أنواع مولدات الحرارة Pyrogens. تتحرر الذيفانات الداخلية عند تحطم الخلية الجرثومية، كما في أثناء عملية تعقيم الأشكال الحقنية، لذلك تخضع الأشكال الحقنية لاختبار الذيفان الداخلي إلى جانب اختبار العقامة.

أما الذيفان الخارجي Exotoxin فهو يوجد بشكل أساسي عند الجراثيم إيجابية الغرام. تصنعه وتطلقه للخارج وهي حية.



مصادر مولدات الحرارة:

1. الماء: يمكن تخليصه من البيروجينات بالتقطير أو التحال العكسي.
2. الأجهزة: تعالج بالحرارة الجافة بدرجة 250 ° لمدة 45 دقيقة أو 650 ° لمدة دقيقة واحدة.
3. العبوات البلاستيكية: يفضل ان يتم التحضير بتقنية النفخ والتعبئة والاعلاق لحمايتها من التلوث بالمحرات لان عملية إزالتها تخرب العبوات.

طرق التخلص من البيروجينات

- ◆ الحرارة الرطبة غير فعالة
- ◆ الحرارة الجافة
- ◆ التسخين بوجود مادة مؤلكلة او مؤكسدة في الدرجة 80 ° لمدة 10 دقائق
- ◆ الادمصاص على مواد لها إلفة عالية للبيروجينات
- ◆ التثفيل الفائق الذي يفصل البيروجينات اعتماداً على وزنها الجزيئي
- ◆ الترشيح الفائق
- ◆ التحال العكسي
- ◆ التقطير

طرق اختبار الذيفان الداخلي:

◆ اختبار مولدات الحرارة بالأرانب Rabbit Pyrogen Test

منذ عام 1942 كانت الأرانب تستخدم لكشف وجود مولدات الحرارة. اختبرت الأرانب لوفرتها وتشابه استجابتها لمولدات الحرارة مع الانسان.

يتم حقن المنتج المراد فحصه في وريد الأذن لعدة أرانب، بجرعة لا تتجاوز 10 مل/كغ. بالنسبة لتحري البيروجينات في الأجهزة والأدوات نقوم بغسلها بسائل خالي من المحرات، ثم تحقن نواتج الغسل في وريد الارانب. وتراقب حرارتهم لمدة 3 ساعات.

بعض الأدوية لا يمكن اجراء هذا الاختبار معها لأنها ذات تأثير يرفع حرارة الجسم مثل البروستاغلاندينات ومضادات السرطان.

ترفض المادة المفحوصة في حال:

- ارتفاع حرارة نصف الأرانب بمقدار 0.6 درجة مئوية على الأقل.
- او ارتفاع حرارة كل الأرانب بمتوسط قدره 0.5 درجة على الأقل.

❖ اختبار حلاية الخلايا المتحولية لسرطان حدوة الحصان (LAL) Limulus Amebocyte Lysate

ثم تم اكتشاف خواص دم سرطان حدوة الحصان (Limulus polyphemus) horseshoe crab الذي يتميز بأنه يتخثر عند تعرضه للاندوتوكسين. لاحقاً عام 1974 تم اعتماد الاختبار من قبل هيئة الغذاء و الدواء الأمريكية FDA تحت اسم حلاية الخلايا المتحولية لسرطان حدوة الحصان (LAL) Limulus Amebocyte Lysate لكشف أو معايرة الديقان الداخلي. يسمح دستور الأدوية الأمريكي بوجود 0.25 Endotoxin Units في الماء المعد للحقن والماء المعد للحقن العقيم.

الحلاية المتحولية Amoebocyte lysate تحضر بتجفيد (تجفيف بالتجميد) الكريات البيض المتحولية Amebocyte لسرطان حدوة الحصان، ثم تحل الجفافة في ماء خاص خالي من الاندوتوكسين.

سرطان حدوة الحصان



لدينا ثلاث طرق لأجراء اختبار LAL

1. طريقة العلقة Gel-Clot Technique تعتمد على تشكيل علقة كالجيل، وهي الأكثر استخداماً
 - تمزج كمية متساوية من العينة (ماء، دواء) مع حلاية الخلايا المتحولية في أنبوب اختبار
 - تحضن في الدرجة 37 مئوية لمدة 60 دقيقة
 - يقلب الأنبوب ويلاحظ تشكل علقة أو جيل ملتصقة في قعر الأنبوب دليل على وجود كمية كافية من الديقان الداخلي

2. طريقة قياس العكارة Turbidimetric Technique في هذه الطريقة يمكن معايرة كمية الديقان الداخلي التي تتناسب مع سرعة تشكل العكر المقاس بجهاز الطيف الضوئي.
3. الطريقة اللونية Chromogenic Technique التي تعتمد على تشكل لون نتيجة تفكك مقعد بيتيد-مولد لون. أيضاً تمكننا من معايرة كمية الديقان الداخلي التي تتناسب مع شدة اللون المقاس بجهاز الطيف الضوئي.

سلبيات اختبار LAL

- ♦ يكشف فقط البيروجينات من نوع الاندوتوكسين.
- ♦ بعض الأدوية تثبط التخثر مثل مضادات التخثر فلا يمكن اجراء الاختبار عليها.
- ♦ بعض أنواع الاندوتوكسينات لا تعطي نتيجة إيجابية بهذا الاختبار.

❖ الطرق البديلة لاختبار الالتهاب الداخلي

تم تطوير طرق جديدة لتحري الالتهاب الداخلي لا تعتمد على سحب دم سرطان حدود الحصان، حفاظاً على هذا النوع من الكائنات. من هذه الطرق:

1. طريقة تفعيل الوحيدات Monocyte Activation Test

تستخدم هذه الطريقة الكريات البيض من نوع الوحيدات المأخوذة من دم الانسان، وتقيس كمية السيتوكينات التي تطلقها هذه الخلايا عند تعرضها للالتهاب الداخلي. تحاكي هذه الطريقة ما يحصل في أجسامنا عند تعرضنا للاندوتوكسين.

2. طريقة العامل C المؤشب (rFC) Recombinant Factor C

تعتمد على أخذ DNA المرمز للعامل المخثر C في دم سرطان حدود الحصان وتأشيبه بوضع هذا ال DNA في بلازميد جرثومي، لتصبح الجراثيم مصنعة للبروتين C. يتفاعل العامل C المؤشب مع الاندوتوكسينات بنفس طريقة العامل الأصلي، ويؤدي لتفكيك ركازة مفلورة. تقاس شدة الفلورة الناتجة لمعايرة كمية الاندوتوكسين.

