دراسة حصلية لعزلات العنقوديات الذهبية المحلية المكونة للمحفظة ومقاومتها للمضادات الحيوية

رسالة مقدمة الى

كلية العلوم - جامعة بغداد

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير

في علوم الحياة

« الاحياء المجهرية »

من قبل

ماجدة محمود حسن الكرخي

شوال ١٤١٥ آذار ١٩٩٥

دراسة بصلية
لعزلات العنقوديات الذهبية المحلية المكونة للمحفظة
ومقاومتها للمضادات الحيوية

رسالة مقدمة الى
كلية العلوم - جامعة بغداد
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير
في علوم الحياة
" الاحياء المجهرية "

من قبل
ماجدة محمود حسن الكرخي

شوال ١٤١٥ آذار ١٩٩٥

اقرار المشرف على الرسالة

أشهد بأن هذه الرسالة جرت تحت أشرافي في كلية العلوم بجامعة بغداد وهي جزء من متطلبات درجة ماجستير علوم في علوم الحياة/ الاحياء المجهرية.

التوقيع:

المشرفة: الدكتورة اليس كريكور ملكونيان

اللقب العلمي: استاذة مساعدة

التاريخ: ٢٨/ ٢/ ١٩٩٥

بناءً على التوصيات المتوفرة، أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع

الاسم: د. بندر محمد الراوي

رئيس لجنة الدراسات العليا

في قسم علوم الحياة

اقرار لجنة المناقشة

نشهد اننا اطلعنا على هذه الرسالة وناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد انها جديرة بالقبول لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / الاحياء المجهرية .

التوقيع :

الاسم : الدكتور فاروق خالد العكيدي

اللقب العلمي : استاذ

(رئيس اللجنة)

١٩٩٥/٦/٤

التوقيع :

الاسم : الدكتور زكي عبد الغني گورگيس

اللقب العلمي : استاذ مساعد

(عضو) ١٩٩٥/٦/٤

التوقيع :

الاسم : الدكتور نبيل غانم الطويل

اللقب العلمي : استاذ مساعد

(عضو)

١٩٩٥/٦/٤

التوقيع :

الاسم : الدكتورة اليس كريكور ملكونيان

اللقب العلمي : استاذ مساعد

(عضو) المشرفة ١٩٩٥/٦/٤

مصادقة عمادة كلية العلوم

الاسم : الدكتورة هدى صالح عباش

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

١٩٩٥/٦/٥

بسم الله الرحمن الرحيم

ويسألونك عن الروح قل الروح من أمر ربي

وما أوتيتم من العلم إلا قليلا

صدق الله العظيم
(سورة الإسراء - آية ٨٥)

الاهـــداء...

بعض شديد الايمان يثير البكاء...
وبكائي بدموع فرحة الى بذرة قد زرعوها
في اديم قلبي فانبتت ثمراً حلواً فأحببت ان
اتذوقه فاحتجبت عنه لاقدمه الى..

- من طواه الكفن فأنطفأ نوره وبقي ذكره...
والدي رحمة واخلاصاً

- من أوجب الله في القرآن طاعتها...
والدتي براً واحساناً

- من احترق ولم ينضب...
خالي وفاءاً وتقديراً

ماجدة

شكر وتقدير

يسعدني في الوقت الذي انهي فيه رسالتي هذه ان اتقدم بالشكر الجزيل وفائق التقدير الى استاذتي الفاضلة الدكتورة اليس كريكور ملكونيان لاقتراحها موضوع البحث واشرافها الباشر عليه والجهود القيمة في التوجيه والمتابعة .

كما واسهب شكري الجزيل الى الدكتور عبد الوهاب الشيخلي من مستشفى الرشيد العسكري والسيد صلاح هادي من منظمة الطاقة الذرية للمساعدة القيمة وتهيئة بعض مستلزمات البحث ، والاخ العزيز مشتاق طالب لمساندته ومساعدته القيمة لي طوال البحث .

كما واتقدم بفائق الشكر والتقدير الى كل من الاخت هناء من مختبر الصحة العامة في بعقوبة والاخت ذرى فخري من مستشفى عام بعقوبة والاخت نسرين من مختبر مستشفى الشهيد عدنان خير الله والست بثينة من مستشفى بغداد / مدينة صدام الطبية والمختبرات التعليمية لمساعدتهن في توفير العزلات السريرية .

وقفة اجلال وتقدير للجهود المبذولة من قبل الاخت العزيزة عواطف صابر والدكتور علي حمود خلال فترة البحث والكتابة .

كماأ توجه بالشكر والتقدير لرئاسة قسم علوم الحياة وجميع منتسبيه الافاضل وخاصة السيد عصام صادق . ولا انسى ان اتقدم بالشكر والتقدير لزملائي طلبة الدراسات العليا وأخص بالذكر منهم الصديقة ريم حازم والاخوان ليث جبار وحارث جبار .

واخيراً لاتفي كلمات الشكر والتقدير لمن كانوا خير عون لي طيلة فترة دراستي . . . والدتي العزيزة . . . خالي . . . اخوتي . . . اخواتي . واخص بالذكر اختي العزيزة مروة .

وفي الختام اسأل الله العلي القدير الطاعة والتوفيق لما فيه الخير .

والله الموفق

ماجدة

الخلاصة

تضمن محور هذه الدراسة التحري عن وجود المحفظة في عزلات العنقوديات الذهبية Staphylococcus aureus ، ودراسة مدى حساسية هذه العزلات للمضادات الحيوية المتوافرة محلياً واستخلاص متعدد سكريد المحفظة لدراسة قابليته التمنيعية في الحيوانات المختبرية .

لقد تم عزل وتشخيص ٢٥٤ عزلة من العنقوديات الذهبية من مجموع ٢٥٨ عزلة عنقوديات سريرية جمعت من اماكن مختلفة من الجسم (الانف والاذن والبلعوم والجروح والعمليات وقروح في الجلد ومسحات المهبل والاحليل والادرار والحروق ومستنبتات الدم والسائل النخاعي الشوكي) وكانت جميع العزلات المشخصة مخمرة للمانيتول ومنتجة لانظيم مختر البلازما الحر (Free coagulase) والاسيتوين (Acetoin) ، والانظيم محلل الدنا (DNase) ومحلل الدم (Hemolysin) من النوع بيتا .

كما تم التحري عن وجود المحفظة في هذه العزلات بأجراء ثلاثة اختبارات وهي :-

١- النمو المنتشر في غراء الصل الطري (Serum soft agar)ذو الاس الهيدروجيني التعادل (٧ر٢) والقاعدي (٨ر٤) .

٢- سالبية التفاعل لعامل التكتل(Negative reactivity for clumping factor) .

٣ - الهالة الشفافة حول الخلايا عند تصبيغها بالحبر الهندي بالتحضير الرطب .

وقد تم استناداً الى الاختبارات الثلاثة عزل ١٠٣ عزلة منتجة للمحفظة من مجموع ٢٥٤ عزلة فتية للعنقوديات الذهبية (٤٠ر٩٤٪) بالمقارنة اظهرت العزلات المحفوظة المعاد استنباتها لعدد مختلف من المرات على الاوساط الزرعية الاصطناعية تحفظاً اقل مقداره (٤٢ر٢٠٪) .

واظهرت نتائج اختبار حساسية العزلات الفتية للمضادات الحيوية مقاومة مختلفة ، حيث كانت جميعها مقاومة للمضاد الحيوي بنسلين -جي (١٠٠٪) ، وبنسب مختلفة للسلفوميثوكزازول (٢٣ر٩٤٪) والستربتومايسين (٧ر٨٠٪) ، وان اعلى حساسية لهذه العزلات كانت مع المضاد الحيوي الاموكسيلين (٨٤ر٢٨٪) .

وبالاعتماد على طريقة الهضم الانظيمي والترسيب النهائي بالكحول الاثيلي تم استخلاص متعدد سكريد المحفظة لعزلتين محفّظة احداهما مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستخدمة (عزلة ١١) والاخرى حساسة لستٍ من هذه المضادات (عزلة ٢٩) ، وقد تم اختبار قابلية كل من متعدد السكريد المستخلص

والخلايا المحفظة المقتولة بالحرارة في تمنيع الحيوانات المختبرية ، فتبين ان المستضد المستخلص منع جيد في كل من الارانب والفئران وكانت الخلايا المحفظة المقتولة بالحرارة اكثر فاعلية في تحفيز الاستجابة المناعية بتكوين الاضداد النوعية لتعدد سكريد المحفظة .

وتم اثبات وجود الضد النوعي لتعدد السكريد في المصل المحضر من خلال الاختبارات الآتية :-

١-أختبارالانتشار المناعي الثنائي في الهلام (اوختر لوني)(Double immuuodiffuoion in gel) .

٢-أختبار التلازن الدموي السالب (Passive haemagglutination test)للمصل المضاد لتعدد السكريد المستخلص والتلازن المباشر(Direct agglutination) في حالة المصل المضاد للخلايا المحفظة الكاملة .

٣- تحول شكل المستعمرات النامية في وسط الغراء الطري المضاف اليه المصل المنع .

٤-أمتصاص الصول المضادة مع المستضد الخاص به .

وقد اظهر المصل المضاد خصوصية مصلية في اختبار الترسيب المناعي الثنائي في الهلام مع المستضد المستخلص من العزلة الناظرة في حين لم يظهر اي ترسيب عند استعمال متعدد السكريد المستخلص من عزلة محفّظة مختلفة ، كذلك الحال في اختبار تحول شكل المستعمرات النامية في وسط الغراء الطري المضاف اليه المصل المنع المحضر .

قائمة المصطلحات العلمية

Absorption	امتصاص
Adjuvant	مساعد
Adsorption	امتزاز
Capsule	محفظة
Capsular type	النمط المحفظي
Capsular serotyping	التنميط المحفظي
Cerebrospinal fluid	السائل النخاعي الشوكي
Clumping factor	عامل التكتل
Compact colony Forming Active Substance (CCFAS)	المادة الفعالة المكونة للمستعمرة التراصة
Compact variant	المتغايرة التراصة
Degradation	نكوص ، تدَرّك
Dialysis	ديلزة
Diffuse colony	المستعمرة المنتشرة
DNase	الانظيم محلل الدنا
Double immuno diffusion in gel	الانتشار المناعي الثنائي في الهلام
Encapsulation	التحفّظ
Fibrinogen	فايبرينوجين
Fibrinolysin	حال الفايبرين
Haemagglutination	التلازن الدموي
Hemolysin	حال الدم
India ink	الحبر الهندي
Invasiveness	القدرة على الغزو

In vitro	في الزجاج
In vivo	في الحي
Lipase	الليباز
Microcapsule	المحفظة الدقيقة
Micro precipitation reaction	تفاعل الترسيب الدقيق
Opsonic requirements	متطلبات الطهاية
Opsonin	الطاهي
Osteomyelitis	التهاب العظام
Passive protection	وقاية منفعلة
Phage typing	تنميط عاثي
Polysaccharide	متعدد السكريد
Pseudocapsulation	التحفظ الكاذب
Pseudodiffuse colony	المستعمرة المنتشرة الكاذبة
RNase	الانظيم محلل الرنا
Serotyping	تنميط مصلي
Serum soft agar	غراء المصل الطري
Specific capsular reaction	تفاعل المحفظة النوعي
Thrombin	الثرومبين
Thrombin like products	النواتج شبيهات الثرومبين

المحتويات

قائمة الجداول والاشكال والملاحق

قائمـــة الصـــور

المحتويات

الموضوع	الصفحة
المقدمة	١
الفصل الأول	٣
١- استعراض المراجع	٤
١-١ - نبذة تاريخية عن العنقوديات الذهبية المحفّظة	٤
١-٢ -الكشف عن وجود المحفظة	٥
١-٢-١ - الطرائق المجهرية	٥
١-٢-١-١ - المجهر الضوئي	٥
١-٢-١-أ - التصبيغ الموجب	٥
١-٢-١-ب - التصبيغ السالب بالحبر الهندي	٥
١- طريقة المسحة الجافة	٥
٢- طريقة المسحة الرطبة	٦
١-٢-١-٢- المجهر الالكتروني	٦
١-٢-٢ -الطرائق المصلية	٧
١-٢-٢-١ - تفاعل المحفظة النوعي	٧
١-٢-٢-٢- تقنية غراء المصل الطري	٧
١-٢-٢-٣ - عامل التكتل	٨
١-٢-٢-٤- اختبار التألق المناعي	٩
١-٣ - وجود المحفظة في العزلات السريرية	١٠
١-٤ -التحفّظ الكاذب	١٠
١-٥ -استخلاص متعدد سكريد المحفظة	١١
١-٦- التركيب والمكونات الكيمياوية لمتعدد سكريد المحفظة	١٣

الموضوع	الصفحة
١-٧ -الصفات البايولوجية للعزلات المحفّظة	١٤
١-٧-١- ضعف او فقدان قابلية التنميط العاثي	١٤
١-٧-٢- امراضية العزلات المحفّظة	١٥
١-٧-٣- مقاومة البلعمة المطهية	١٦
١-٨- التنميط المصلي للمحفظة	١٧
الفصل الثاني	١٨
٢-المواد وطرائق العمل	١٩
٢-١- المواد	١٩
٢-١- الاجهزة	١٩
٢-١-٢- الاوساط الزرعية	٢٠
٢-١-٣- المحاليل الكيمياوية والكواشف	٢٢
٢-١-٢- اقراص المضادات الحيوية	٢٣
٢-١-٥- محاليل ومواد استخلاص متعدد سكريد المحفظة	٢٣
٢-١-٦- محاليل ومواد الانتشار المناعي الثنائي في الهلام	٢٣
٢-١-٧- مواد اختبار التلازن النموي السالب	٢٤
٢-١-٨- محاليل ومواد التلازن المباشر	٢٤
٢-١-٩- الحيوانات المختبرية	٢٥
٢-١-١٠- العزلات الجرثومية	٢٥
٢-٢- طرائق العمل	٢٦
٢-٢-١- جمع وتشخيص العينات	٢٦
٢-٢-١-١- جمع العينات	٢٦
٢-٢-١-٢- تشخيص عينات العنقوديات الذهبية	٢٧

الموضوع	الصفحة
٢-٢-٢- تشخيص العنقوديات الذهبية المحفّظة	٢٩
٢-٢-٢-١- التصبيغ بالحبر الهندي	٢٩
٢-٢-٢-٢- اختبار عامل التكتل	٢٩
٢-٢-٢-٣- اختبار النمو في وسط غراء المصل الطري	٢٩
٢-٢-٣- اختبار حساسية العزلات المحفّظة للمضادات الحيوية	٣٠
٢-٢-٤- استخلاص متعدد سكريد المحفّظة	٣٢
٢-٢-٥- تحضير المصل المضاد	٣٥
٢-٢-٥-١- المصل المضاد للخلايا المحفّظة الكاملة	٣٥
٢-٢-٥-٢- تحضير المصل المضاد لمتعدد السكريد المستخلص	٣٦
٢-٢-٥-٢-١- تحضير المصل المضاد في الارانب	٣٦
٢-٢-٥-٢-٢- الحقن في الفئران	٣٧
٢-٢-٦- الكشف عن الاضداد النوعية للمحفظة	٣٧
٢-٢-٦-١- الطريقة النوعية	٣٧
٢-٢-٦-٢- الطريقة الكمية	٣٨
٢-٢-٦-٢-١- طريقة التلازن الدموي السالب	٣٨
٢-٢-٦-٢-١-١- تحضير عالق كريات الدم الحمراء المحسسة بالمستضد	٣٨
٢-٢-٦-٢-١-٢- تعيين كمية المستضد المثلى باستعمال المصل المضاد الموجب لمتعدد السكريد	٣٩
٢-٢-٦-٢-١-٣- معايرة نماذج المصول المضادة لمستخلص متعدد السكريد	٤٠
٢-٢-٦-٢-٢- التلازن المباشر	٤١
٢-٢-٧- تأثير المصل المضاد على تحول شكل المستعمرات النامية في وسط غراء المصل الطري	٤١
٢-٢-٨- امتصاص المصول المضادة مع متعدد السكريد المستخلص	٤٢

الموضوع	الصفحة

الفصل الثالث	٤٣
٣- النتائج	٤٣
٣-١- جمع العينات وتشخيصها	٤٤
٣-٢- التحري عن العزلات المحفظة	٤٤
٣-٣- اختبار مقاومة العزلات المحفّظة للمضادات الحيوية	٤٨
٣-٤- اختبار العزلة المنتخبة لاستخلاص متعدد السكريد والتجارب المناعية	٥٠
٣-٥- استخلاص متعدد سكريد المحفظة	٥٠
٣-٦-تحضير المصل المضاد للخلايا المحفظة ومتعدد سكريد المحفظة	٥٢
٣-٧- اختبار الانتشار المناعي الثنائي في الهلام	٥٥
٣-٨- تأثير المصل المضاد النوعي على تحول شكل المستعمرات النامية في وسط غراء المصل الطري	٥٧
٣-٩- امتصاص المصول المضادة مع متعدد السكريد المستخلص النوعي	٥٧
الفصل الرابع	٦٠
٤- المناقشة	٦١
٤-١- جمع العينات وتشخيصها	٦١
٤-٢- وجود المحفظة في عزلات العنقوديات الذهبية السريرية	٦٣
٤-٣- استخلاص متعدد سكريد المحفظة	٦٤
٤-٤- الخواص المناعية والمصلية لمتعدد السكريد	٦٥
٤-٥- تأثير المصل المضاد على تحول شكل المستعمرات النامية في وسط غراء المصل الطري	٦٧

الموضوع	الصفحة
٤-٦- حساسية العزلات المحفّظة للمضادات الحيوية	٦٨
الاستنتاجات	٧٠
التوصيات	٧١
المصادر	٧٢
الملاحق	٨٧
الملخص باللغة الانكليزية	

قائمة الجداول والأشكال والملاحق

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
(١)	انواع وتراكيز واقطار التشبيط القياسية للمضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية لعزلات العنقوديات الذهبية المحفظة .	٣١
(٢)	عدد ومصادر عزلات العنقوديات الذهبية	٤٥
(٣)	تلازن العزلة المحفظة (١١) مع المصل المضاد النوعي الممتص وغير الممتص مع متعدد السكريد الخاص به .	٥٩

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
(١)	النسبة المئوية (٪)لمقاومة العزلات المحفظة للمضادات الحيوية .	٤٩
(٢)	الاستجابة المناعية في الارانب ضد متعدد سكريد المحفظة والخلايا المحفظة المقتولة بالحرارة للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية و متعدد سكريد المحفظة للعزلة (٢٩)الحساسة للمضادات الحيوية .	٥٣
(٣)	الاستجابة المناعية في الفئران ضد متعدد سكريد المحفظة للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية .	٥٥

رقم الملحق	العنوان	الصفحة
(١)	عدد ومصادر العنقوديات الذهبية المحفوظة	٨٨

(٢)	النسبة المئوية لمقاومة العزلات المحفظة للمضادات الحيوية .	٨٩
(٣)	الاستجابة المناعية في الارانب ضد متعدد سكريد المحفظة والخلايا المحفظة المقتولة بالحرارة للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية ومتعدد سكريد المحفظة للعزلة (٢٩) الحساسة للمضادات الحيوية .	٩٠
(٤)	الاستجابة المناعية في الفئران ضد متعدد سكريد المحفظة للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية .	٩١

قائمة الصور

رقم الصورة	العنوان	الصفحة
(١)	طبيعة نمو ثلاث عزلات عنقودية ذهبية في وسط غراء المصل الطري ذو الاس الهيدروجيني ٢ر٧ . ٤ر٨	٤٦
(٢)	الخلايا الجرثومية لعنقوديات ذهبية بعمر ١٨ ساعة ، مصبغة بالحبر الهندي بطريقة التحضير الرطب .	٤٧
(٣)	طبيعة نمو العزلة (١١) في وسط غراء المصل الطري .	٥١
(٤)	تفاعل الانتشار المناعي الثنائي للمصل المضاد لمتعدد سكريد العزلة (١١) .	٥٦
(٥)	تأثير المصل المضاد على تحول خلايا العزلة (١١) النامية في وسط غراء المصل الطري .	٥٨

المقدمة

يعود جنس العنقوديات Staphylococcus الى عائلة Micrococaceae ، وتتميز خلايا هذا الجنس بشكلها الكروي المنتظم والتي توجد بهيئة منفردة او مزدوجة او رباعية وغالباً ما تكون بشكل عناقيد غير منتظمة (Sneath et al., 1986) .

وتعد العنقوديات الذهبية Staphylococcus aureus اهم الانواع التابعة لهذا الجنس لكونها مسبباً رئيساً للامراض وللعديد من الوفيات على الرغم من التدابير الوقائية المتخذة واستعمال العديد من المضادات الحيوية (Fournier et al.,1984) .

تعود ضراوة العنقوديات الذهبية الى افرازها للعديد من الانظيمات والذيفانات المختلفة ، حيث وجد ان لهذه الجراثيم القابلية على افراز مواد خارج خلوية عديدة لها فعاليات حيوية متعددة وعلى مدى واسع، ومنها الانظيم الحال للدم(Hemolysin) وحال الفايبرين (Fibrinolysin) وانظيم الليباز (Lipase) وانظيم مختر البلازما (Coagulase) فضلاً عن محطم الخلايا البيضاء (Leucocidin) وحال الدنا (DNase) (Cohen,1986) • هذا الى جانب العديد من الذيفانات مثل الذيفانات المعوية (Enterotoxins) السببة للتسمم الغذائي ، والذيفانات المسببة للانتان الدموي والتهاب شغاف القلب واخماج الجروح والقروح والتهابات الجلد والدمامل ومتلازمة الصدمة السمية (Toxic Shock Syndrome)[TSS] ، فضلاً عن متلازمة تقشر الجلد (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome)[SSSS] (Rasmussen,1975) •

وعلى الرغم من تعدد الامراض الناتجة عن هذه الجرثومة الا ان هناك الكثير من البحوث التي تشير الى كون هذه العوامل ليست اساسية في عملية بدء الاصابة او قدرة هذه الجراثيم على الغزو (Invasiveness) (Foster,1963;Karakawa et al.,1985)

فضلاً عن اشارة العدد الآخر منها الى اهمية بعض مكونات سطح الخلية الجرثومية في هذه الامراضية حيث تحدد هذه التراكيب التصاق الجرثومة لانسجة المضيف ثم الاستيطان حيث يتم الاتصال الاولي مع عوامل المضيف الخلوية والخلطية (البلاعم والاضداد والتتم وغيرها)(Sompolinistky et al.,1985) .

حيث اشار العديد من الادبيات الى اهمية بعض المكونات السطحية مثل حامض التايكويك وبروتين A في

التداخل مع ميكانيكية مقاومة الضيف لهذه الجراثيم (Aly et al.,1980;Kaplan and Tenennbaum,1982;Sheagren, 1984) والى اشتراك متعدد سكريد محافظ العديد من الجراثيم في الغزو والاجتياح مثل Niesseria meningitidis , Klebsiella pneumoniae , Haeamophilus infleunzae , Streptococcus pneumoniae and group B Streptococci (Robbins et al. ,1980 ; Sheagren,1984) حيث يتوسط متعدد سكريد المحفظة عملية مقاومة البلعمة المقبّلة (Opsonic phagocytosis) لهذه الجراثيم . وعلى الرغم من تأكيد دور متعدد السكريد في الامراضية للكائنات الحاوية عليه ، وتزايد الاخماج الناتجة عن الاصابة بالعنقوديات الذهبية فضلاً عن تكرار البحوث والتقارير المتعلقة بوجود المحفظة ضمن هذا النوع فأنه من الثير للانتباه عدم وجود اية دراسة في القطر حول العزلات المحفّظة المحلية وعليه كان الهدف من هذه الدراسة التحري عن وجود المحفّظة في العزلات السريرية ونسبها ، معرفة العلاقة بين وجود المحفظة والمقاومة للضادات الحيوية المتوافرة محلياً فضلاً عن محاولة استخلاص ودراسة متعدد السكريد الخاص بها ومعرفة قابليته التنيعية في الحيوانات المختبرية .

الفصـــل الاول

أستعراض المراجع

١-استعراض المراجع

١-١- نبذة تاريخية عن العنقوديات الذهبية المحفظة

تعد الباحثة كلبرت (Gilbert,1931) من الرواد في عزل وتشخيص العنقوديات الذهبية المحفّظة (Encapsulaled Staphylococcus aureus) بعد تشريح جثة لجندي متوفى نتيجة اصابته بالتهاب شغاف القلب التقيح (Pyogenic endocarditis) . وقد تم الاستدلال على وجود المحفظة من خلال الهالة الشفافة غير الصبوغة والتي قدر قطرها بحوالي ٣ مايكرون والمحيطة بالخلايا الجرثومية عند تصبيغها بالحبر الهندي (India ink) وقد اتصفت مستعمرات هذه العزلة بكونها رطبة ولزجة واكثر شفافية من مستعمرات العنقوديات الذهبية الاخرى ، كما اظهرت العزلات التي قام هنركسن (Henriksen,1948) بعزلها من المصابين بالتهاب البلعوم المزمن (Chronic pharyngitis) مخاطية عالية وكانت لها صفات العنقوديات الذهبية الاعتيادية فضلاً عن كونها رطبة وذات محفظة واضحة وكبيرة عند تصبيغها بالحبر الهندي بطريقة التحضير الرطب .

كما نجح برايس ونيلاند (Price and Kneeland , 1954) في عزل وتوصيف عزلة عنقوديات ذهبية محفّظة نتيجة حقن العزلة الاصلية غير المحفظة في بيوض الفراخ الحاوية على الاجنة ، وقد اظهرت عند اعادة استنباتها مستعمرات مخاطية ذات نمو مائي لزج يشبه عزلات الجراثيم العائدة للنوع Klebsiella pneumoniae ، وقد درست هذه العزلة بشكل موسع فيما بعد من قبل العديد من الباحثين (Wiley,1959,1961 ; Wiley and Wonnacott , 1962 ; Wiley 1963;Mudd , 1965 ; Wiley and Maverakis, 1968) وعرفت باسم عزلة الجروح (Wound isolate) .

في حين قام كوهن ومورس (Cohen and Morse,1959) بوصف عزلة سمث المعروفة للعديد من الباحثين في هذا المجال ، كما تجدر الاشارة الى ان دراسات لاحقة (Wiley and Maverakis, 1968;Maverakis and Wiley, 1969) قد اثبت وبشكل مؤكد وجود المحفظة لعزلة سمث وان عزلتي الجروح وسمث تمثلان انواعاً محفظية مختلفة .

١-٢- الكشف عن وجود المحفظة Detection of capsule

١-٢-١ - الطرائق المجهرية

١-٢-١-١- المجهر الضوئي

١-٢-١-أ- التصبيغ الموجب :-

بالاعتماد على حقيقة كون المحفظة رقيقة جداً ولزجة وعادة ماتنتشر فوق سطح الشريحة الزجاجية فقد بقيت دون خطوط واضحة ومحددة في التحضيرات التصبيغية، كما ان تثبيت المسحة حرارياً غالباً مايؤدي الى تشويه المحفظة التي سوف تتسطح وتنتشر ويصعب ملاحظتها بعدذلك بوضوح. وعليه فان افضل صورة يمكن ملاحظة المحفظة فيها هي في التحضيرات الرطبة للحبر الهندي (Gilbert,1931). وعلى الرغم من اشارة ليونز (Lyons,1937) الى تمكنه من ملاحظة المحفظة اعتماداً على تصبيغ المسحة المأخوذة من النزروع الفتي بعمر ٣ ساعات والنامي في مرق خلاصة اللحم ، ثم تصبيغها بالكاربول فوكسين المخفف ، ومن ثم بأزرق مثيل لويفلر القاعدي (Loeffler alkaline methylene blue) ، الا ان سبنك (Spink,1939) فشل في الكشف عن المحفظة باستعمال طريقة ليونز ما يدل على ان هذه الطريقة غير كفؤة في التحري عن وجود المحفظة بسبب ميل الاخيرة الضعيف تجاه الصبغات مايؤدي الى استعمال بعض الثبتات الخاصة مسببة بذلك زيادة في احتمال تعرضها للانكماش (Duguid,1951) .

١-٢-١-ب - التصبيغ السالب بالحبر الهندي

بسبب العتمة العالية للصبغة وعدم قابلية جزيئاتها على النفاذ في هلام متعدد السكريد فأن الحبر الهندي سوف يعطي خلفية واضحة للكشف عن وجود المحفظة والتي تظهر كهالة شفافة محيطة بالخلايا الجرثومية عند تصبيغ الاخيرة بالحبر الهندي (Duguid,1951) . ويتم التصبيغ بالحبر الهندي بطريقتين :-

١- طريقة المسحة الجافة Dry india ink film

قام العالم هام (Hamm,1907) بوصف هذه الطريقة المعتمدة على تعليق المستعمرة الفتية في محلول الكلوكوز المزوج مع الحبر الهندي وعمل مسحة خفيفة تثبت بالكحول الثيلي حيث تمكن من الكشف عن وجود المحفظة في العديد من انواع الجراثيم . الا ان الانكماش الحاصل احياناً نتيجة لعملية التثبيت يؤدي الى ترك مناطق غير مصبوغة حول الخلية معطياً دليلاً كاذباً على وجود المحفظة ، او مايعرف بالمحفظة الكاذبة (Baehr and Kantor,1912) .

٢- طريقة المسحة الرطبة Wet india ink film

استعملت كلبرت (Gilbert,1931) هذه التقنية في تصبيغ عزلتها التي اظهرت هالة واضحة شفافة. وبالاعتماد على الملاحظات السالفة الذكر قام دوگي (Duguid,1951) بمقارنة طرائق تصبيغ مختلفة واثبت ان هذه الطريقة هي الاكثر نجاحاً وامكانية في التطبيق حتى للمحافظ الدقيقة (Microcapsules) مظهراً حجمها دون الانكماش الناتج عن التثبيت بالحرارة او التجفيف بالطرائق الاخرى .

هذا وبين تومسك (Tomcsik,1956) ان كلا من التصبيغ السالب والموجب يمثلان تفاعلات لانوعية للمحفظة كما وعمل بيكر ولوسلي (Baker and Loosli,1966) على حسم الجدل حول كون العزلات محفظة حقيقياً بوجوب اظهارها الهالة الشفافة عند تصبيغها بالحبر الهندي .

وقد استعملت هذه الطريقة من قبل العديد من الباحثين (Mudd and Decourcy ,1965; Yoshida et al., 1970;Yoshida,1971; Chomarat et al., 1985) بالاقتران مع واحدة او اكثر من الطرائق الاخرى لتشخيص العزلات المحفظة كما ان يوشيدا (Yoshida,1971) قد استبعد العزلات التي لاتظهر محفظة واضحة تحت المجهر الضوئي باستعمال هذه الطريقة حتى لتلك العزلات التي اظهرت ايجابية للاختبارات التشخيصية الاخرى .

١-٢-١-٢- المجهر الالكتروني Electron microscope

بما أن المحفظة مادة لزجة تقع خارج جدار الخلية الصلب فان افضل الطرائق للكشف عن وجودها تعتمد على الاسس المظهرية ومنها استخدام المجهر الالكتروني مع الحذر والدقة الواجب اتخاذها لتجنب ازالة مادة المحفظة بالغسل المتكرر ولمنع حدوث الانكماش خلال التثبيت والتصبيغ بسبب المحتوى المائي العالي للمحفظة(Sompolinisky et al،1985) ويستعمل الصل الضاد النوعي عادة ليساعد على ثبات وتماسك الخلايا ، وعلى الرغم من ان هذه الطريقة غير عملية في دراسة عدد كبير من العزلات الا انها تعد ضرورية احيانا كون ان معظم العزلات السريرية لاتنتج محفظة واضحة ومرئية تحت المجهر الضوئي فضلا عن انها قد تنتج مايسمى بالمحفظة الدقيقة (Albus et al.,1988) ، هذا وقد استعملت هذه الطريقة من قبل العديد من الباحثين في الكشف عن المحفظة(Sompolinisky et al.,1985 ; Melly et al.,1974 ; Lee et al.,1987 ; Chomarat et al.,1989)

١-٢-٢- الطرائق المصلية Serological methods

١-٢-٢-١- تفاعل المحفظة النوعي Specific capsular reaction

ويعرف بانه تفاعل بين المصل المضاد للمحفظة والجراثيم الحاوية عليها والذي يصبح فيه من السهل الكشف عن هذه المحفظة ، لقد حاول ليونز (Lyons,1937) اظهار هذا التفاعل مع عزلاته من دون نجاح يذكر . في حين نجح برايس ونيلاند (Price and Kneeland,1954) في اظهار هذا التفاعل للعزلة المحفظة (RLM) عند تفاعلها مع المصل المضاد المحضر ضد هذه العزلات مشيراً الى الخصوصية المصلية لهذا التفاعل (Serological specificity). لقد وصف توسك (Tomcsik,1956) هذا التفاعل بانه تفاعل ترسيب دقيق في محيط الخلية (Microprecipitation reaction) . كما استعمل هذا التفاعل من قبل مود وديكورسي (Mudd and Decourcy,1965) ومن ثم مود (Mudd,1965) في دراسة عزله ويلي للجروح .

يبدو من الصعوبة بمكان فهم صياغة مصطلح تفاعل الترسيب المحيطي الموصوف وعليه فقد استعمل هذا التفاعل الذي اطلق عليه اسم تفاعل المحفظة النوعي من قبل العديد من الباحثين (Wiley,1959,1963; Wiley and Maverakis,1968; Maverakis and Wiley ;1969) . ويعد الباحثان ويلي ووناكوت (Wiley and Wonnacott, 1962) اول من نجحا في اظهار تفاعل المحفظة النوعي مع المتغايرات المنتشرة (Diffuse variants) لعزلة سمث .

١-٢-٢-٢- تقنية غراء المصل الطري Serum Soft Agar technique (SSA)

لم يكن استعمال وسط الغراء الطري وشبه الصلب هو الوحيد هنا ، فقد استعمل وارد ورد (Ward and Rudd,1938) وبايك (Pike,1946) هذا الوسط في تفريق العقديات Streptoccci ، كما استعمل مكارتي وجماعته (Mccarty et al. , 1946) التغيرات الظهرية في هذا الوسط كدلالةعلى التحول (Transformation) في العقديات الرئوية Streptococcus pneumoniae .

لقد ذكر فنكلستين وسلكين (Finkelstein and Sulkin,1958) المكونات الاساسية لوسط الغراء الطري الحاوي على المصل في دراستهما لعزلات العنقوديات السالبة والموجبة لانظيم مختر البلازما الحر (Free coagulase) ، حيث تمكنا من تمييز الستعمرات الى نوعين بالاعتماد على شكلها في هذا الوسط . كما استعمل الامي وكيلي (Alami and Kelly,1959) بعد ذلك هذا الوسط للتحري المتزامن عن كل من عامل التكتل (Clumping factor) وانظيم مختر البلازما الحر في نظام واحد .

هذا ويعد الباحث يوشيدا من اكثر الباحثين المهتمين في مجال العنقوديات الذهبية المحفّظة وقد استعمل هذه التقنية في تحضير وسط غراء الصل الطري المحور عن وسط العنقوديات رقم ١١٠ وذلك لتحفيز العديد من العزلات على اظهار خصائص نمو مشابهة لتلك التي لعزلة سمث . حيث اوضح يوشيدا واكستدت (Yoshida and Ekstedt , 1968a) بان العزلات التي عرضت انتشاراً اكثر عند نموها في هذا الوسط كانت اكثر امراضية عند حقنها بالفئران التجريبية . وباستعمال هذا الوسط نفسه تمكن يوشيدا من الكشف عن الاختلافات في الانواع المحفظية وباستعمال الصل الضاد النوعي حيث تمكن من تشخيص ثلاثة انواع محفظية مختلفة عن بعضها والتي سميت بالانواع المحفظية A,B,C(Yoshida,1971).كما تمكن الباحث نفسه من عزل نمط محفظي رابع اطلق عليه النوع D(Yoshida,1972) .

لقد استعملت هذه الطريقة بشكل واسع من اجل تشخيص العزلات المحفّظة للعنقوديات الذهبية وعلى الرغم من ويت (Witte,1957) وكذلك يوشيدا ومنگيشي (Yoshida and Minigishi, 1976) قد لاحظوا خصائص اضافية مهمة في تشخيص هذه العزلات منها عدم القابلية على التنميط العاثي او الصلي فضلاً عن تفاعل عامل التكتل السالب فان اوبدبيك ونوركروس (Opdebeek and Norcross,1983) قاما بتمييز العزلات المحفظة بالاعتماد على خصائص النمو المنتشر في وسط غـراء الصل الطري فقط .

كما اشارت شومارا وجماعتها (Chomarat et al. , 1985) الى ان النمو المنتشر في غراء الصل الطري القاعدي (أس هيدروجيني ٨ر٤) والتفاعل السالب لعامل التكتل قد تكون كافية لتشخيص العزلات المحفظة ، على الرغم من ان عدم القابلية على التنميط العاثي والصلي قد تلاحظ بشكل واسع بين هذه العزلات .

١-٢-٢-٣- عامل التكتل Clumping factor

تنتج العنقوديات الذهبية انظيم مخثر البلازما بشكلين الاول انظيم التخثر المرتبط (Bound coagulase) ويسمى ايضاً بعامل التكتل وهو المسؤول عن اختبار الشريحة (Slide test) والثاني انظيم التخثر الحر (Free coagulase) . وهو المسؤول عن اختبار الانبوبة (Tube test) والذي يتحرر الى الوسط الزرعي . يعمل الاول على الفايبرنيوجين مباشرة ويقوم بتحويله الى الثرومبين او شبيهاته (Thrombin like products) ويسهم في حدوث الخثرة التي تترسب على سطح الخلايا مسببة تكتلها ، في حين يعمل الثاني على البروثرومبين (Duthie,1954) .

أن فقدان بعض العزلات لعامل التكتل يعود في معظم الاحيان الى امتلاكها المحفظة والتي هي عبارة عن متعدد سكريد اولي ويعمل على تغطية هذا العامل ويمنعه من القيام بدوره . كما ان تنمية الكائنات المجهرية في ظروف مشجعة لتكوين المحفظة يساعد على نمو مستعمرات ذات مخاطية عالية وسالبة لعامل التكتل ، كما ان غسل هذه الطبقة المخاطية لمرات متعددة بالمحلول الفسيولوجي يؤدي الى ازالة هذه الطبقة المخاطية ومن ثم تصبح الخلية موجبة لهذا العامل مما يدل على ان متعدد سكريد المحفظة يعمل على تغطية الانظيم المرتبط على سطح الخلية (Yoshida and Ekstedt,1968a) . هذا وقد استعمل هذا الاختبار من قبل العديد من الباحثين في تشخيص العزلات المحفّظة للعنقوديات الذهبية (Yoshida and Takeuchi 1970;Yoshida,1971, 1972; Chomarat et al., 1985) .

١-٢-٢-٤- اختبار التألق المناعي Immunofluorescent test

لقد قام يوشيدا وجماعته (Yoshida et al. , 1979) وبالاعتماد على تقنية كلارك وشيبرد (Clark and Shepard,1963) بتطوير تقنية الاضداد المتألقة من اجل الكشف عن الانواع المحفظية المختلفة بين عزلات العنقوديات الذهبية غير المحفّظة وباستعمال مصول الارانب المضادة للانواع المحفظية المعروفة حينها ، حيث تم الكشف عن مستضدات المحفظة في اكثر من ٩ر٣١ ٪ من العزلات غير المحفّظة في حين كانت نسبتها ٢٣ ٪ عند استعمال تقنية غراء المصل الطري المحورة باستعمال المصول المضادة النوعية للانواع المحفظية المستعملة من قبل يوشيدا وجماعته (Yoshida et al.,1974) مقدماً الدليل على حساسية هذه الطريقة .

لقد اكدت النتائج فرضية يوشيدا وجماعته (Yoshida et al.,1969) من ان السلالات غير المحفّظة هي الاخرى لها القابلية الوراثية على انتاج المحفظة وتكوينها في الحي .

كما استعمل يوشيدا ومنگيشي (Yoshida and Minigishi,1976) هذه الطريقة في تأكيد نتائج التنميط المحفظي المستحصل عليها بوساطة غراء المصل الطري المستعملة من قبل يوشيدا (Yoshida,1971,1972) .

١-٣- وجود المحفظة في العزلات السريرية

لقد تمكن يوشيدا (Yoshida et al.,1970) وبالاعتماد على تشخيص العنقوديات الذهبية المحفّظة بوساطة غراء الصل الطري والتصبيغ السالب بالحبر الهندي من عزل ٣٧ محفظة من مجموع ٨٧٥ (٢ ر٤ ٪). وتمثل هذه النسبة عشرة اضعاف النسبة التي توصل اليها روجرز (Rogers , 1966) مسبقاً والتي كانت(٤ر٠٪) وقد اشار يوشيدا الى ان النسبة العالية التي حصل عليها تعود الى العزلات الفتية (Fresh isolates) والتي لم يعاد استنباتها . في حين اشار دزيارسكي (Dziarski , 1981) الى ان المحفظة توجد في ٥-٤٥٪ من العزلات الفتية للعنقوديات الذهبية ، كما افترض اوبدبيك ونوركروس (Opdebeek and Norcross,1983) الى ان العزلات تعد محفظة اذا ما اظهرت نمو منتشر في غراء الصل الطري المحور عن وسط العنقوديات رقم ١١٠ . وقد وجد هذان الباحثان بالاعتماد على هذا المعيار ان ٩٣ ٪ من العزلات الفتية هي عزلات محفّظة .

في حين توصل سمبولنسكي وجماعته (Sompolinisky et al.,1985) وباستعمال طريقة التنميط المحفظي الى ان ٩٠٪ من العزلات الفتية هي عزلات محفظة .

لقد اشار العديد من الباحثين الى امتلاك العنقوديات الذهبية للمحفظة خلال مرحلة الاصابة ، وان هذه العزلات اما ان تفقد هذه القابلية عند اعادة استنباتها على الاوساط الاصطناعية ، او انها تحتفظ بقابليتها الوراثية على تكوين المحفظة ولاتظهرها على هذه الاوساط (Iveler,1965; Yoshida et al., 1969; Yoshida and Takeuchi,1970 ; Yoshida et al.,1970; Yoshida and Naito,1972 ,Yoshida et al. , 1979)

١-٤- التحفّظ الكاذب Pseudocapsulation

لقد تطرق سال وجماعته (Sall et al.,1961) الى الظاهرة التي تظهرها بعض العنقوديات الذهبية تحت ظروف خاصة من التنمية ، حيث تمكن هؤلاء الباحثون من ملاحظة مادة تشبه المحفظة محيطة بالخلايا الجرثومية النامية في الوسط الزرعي الحاوي على خلاصة الخميرة والتربتون والهلام واللاكتوز والمانيتول والغراء والمحضنة بدرجة حرارة ٣٧م لاقل من ٦ ساعات ، وذلك بعد تصبيغها بالحبر الهندي الرطب سواء بالمسحة الرطبة او الجافة .

لقد اشار هؤلاء الباحثون الى ان تكوّن هذا التركيب ناتج عن البناء للمادة الخارج خلوية والتي يصعب انتشارها بالوسط الزرعي تحت مثل هذه الظروف وان تكون هذه المادة الملاصقة للخلايا معتمد على وجود اللاكتوز والهلام والتربتون وخلاصة الخميرة في وسط التنمية ، كما ان تعويض اي منها بآخر ينتج عنه فشل العزلة ذاتها في اظهار هذه الحالة (Wiley,1972) .

ولقد كشف التقدير الكمي لانظيم مختر البلازما وانظيم محلل الجلاتين لهذه العزلات عن وجود الاول بقيم عالية ، وقد اشار سال (Sall ,1962) الى ان السبب في ذلك يعود الى الكميات العالية من الهلام في الوسط والتي تعيق هذا الانظيم من الانتشار والتحرر من سطح الخلايا ، وان هذا التأثير يزداد مع وجود الانظيم الثاني بقيم ضئيلة وتمثل هذه الظاهرة فعالية العنقوديات الذهبية تحت ظروف خاصة جداً من التنمية في الزجاج ومن غير المؤكد حصول مثل هذه الظروف في الحي ، وعليه فمن الممكن الاستنتاج بان هذه الظاهرة وان حصلت في الحي فانها اقل اهمية من حالة التحفظ الحقيقي في امراضية هذه الجراثيم (Sall et al. , 1961) وانها يمكن ان تكون ظاهرة مختبرية ليس لها علاقة مع الظروف البيئية في الحي (Wiley , 1972) .

١-٥- استخلاص متعدد سكريد المحفظة

على الرغم من وجود العديد من البحوث المتعلقة بوجود المحفظة في العنقوديات الذهبية حتى عام ١٩٦١ ، لكن لم يكن الكثير منها يتناول توصيف هذه المحفظة او متعدد سكريدها .

يعد ويلي (Wiley ,1961) اول من قام بعزل مادة المحفظة من عزلة الجروح ، وكان للمادة المستخلصة القابلية على اظهار استجابة مناعية ووقاية منفعلة (Passive protection) ضد الاصابة بخلايا عزلة الجروح المحفظة في الاختبار المنفذ في بيوض الفراخ الحاوية على الاجنة . وان امتصاص الفصول المضادة مع كميات مايكروغرامية من هذه المادة المستخلصة ادى الى تقليل خصائص الوقاية المنفعلة للمصل المضاد النوعي ، وهذا يدعم فكرة كون المادة المستخلصة هي مادة محفظة (Wiley , 1972) .

كما قام ويلي ووناكوت (Wiley and Wonnacott , 1962) بوصف طريقة لاستخلاص مادة المحفظة من العزلة نفسها (عزلة الجروح) بعد تنميتها في مرق احماض الكازامينو والكليسيرول (Casamino acids – glycerol broth) الموصوف من قبل ويلي (Wiley , 1961) . وبعد جمع الراشح وبالاعتماد على تقنية هيدلبيرگر وجماعته (Heidelberger et al. , 1936) والتخلص من البروتينات والترسيب النهائي بالكحول الاثيلي تم الحصول على مادة بيضاء اللون تم عدّها مادة محفظة منقاة جزئياً . ان اهم خواص هذا الجزء المحفظي هو قابليته على امتصاص الاضداد المسؤولة عن تفاعل المحفظة النوعي في المصل المضاد النوعي ، حيث كان ل٦٠ مايكروغراماً من هذه المادة القابلية على اختزال تفاعل المحفظة النوعي.

لقد فسر كوهن ومورس (Cohen and Morse,1959) سبب بقاء خلايا عزلة سمث حية داخل الخلايا البيضاء متعددة اشكال النوى للارنب الى امتلاكها مستضدات سطحية كتلك التي للعقديات الرئوية ، حيث تمكنا عن عزل مادة مثبطة للبلعمة من مرشحات مزارع هذه العزلة . هذا وقام مورس (Morse,1962) في دراسة اكثر تفصيلاً بدراسة الخصائص الكيمياوية للمستضد المعزول هذا والذي اطلق عليه مستضد سطح العنقوديات (Staphylococcal surface antigen)(SSA) ، حيث اشار الى قابلية هذا المستضد على اعطاء تفاعل الترسيب في الهلام مع الاضداد الناظرة وبتركيز ٥ر٠ مايكروغرام من المستضد/ملليتر.

ان فقدان الصل المضاد لعزلة سمث قابليته على احداث تلازن الخلايا المحفظة الناظرة بعد امتصاصه مع المستضد النوعي المعزول يعطي الدليل على كون المستضد المستخلص عبارة عن مكون سطحي لعزلة سمث المحفظة . وكان هذا المستضد منعاً فعالاً ضد الاصابة واختبار التحدي النفذ في الفئران عند حقنها بعالق عزلة سمث المعلّقة في ميوسين الخنزير المعدي .

كما نجح ماڤيراكس وويلي (Maverakis and Wiley ,1970) بتنقية مستضد محفظة عزلة الجروح مبتدئين بمتعدد سكريد المحفظة المنقى جزئياً [Partialy Purified Capsular Material (PPCM)] حيث اظهرت المادة المنقاة بالكروموتوگرافيا والمعرضة للهجرة المناعية فعالية اكثر بمقدار ١٣ مرة من متعدد السكريد المنقى جزئياً ، المستعمل كمادة بدء .

هذا ونتيجة لكثرة تكرار ووجود النوع المحفظي الثامن والخامس ضمن العزلات السريرية للعنقوديات الذهبية ، فقد قام فورنير وجماعته (Fournier et al.,1984) بعزل وتنقية مستضد النوع المحفظي الثامن باستعمال كروموتوگرافيا التبادل الايوني والترشيح في الهلام .

كما تمكن لي وجماعته (Lee et al.,1987) باستعمال طريقة الهضم الانظيمي والترسيب بالكحول الاثيلي وكروموتوگرافيا التبادل الايوني من عزل وتنقية مستضد محفظة العزلة SA1 (Mucoid SA1) ، وتبين ان المستضد المعزول منع جيد في كل من الارانب والفئران .

وعلى الرغم من أن شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1989) لم يستعملوا الكروموتوگرافيا او الترشيح بالهلام الا انهم تمكنوا بعد الهضم بانظيمي محلل الدنا ومحلل الرنا والترسيب بالكحول الاثيلي من استخلاص مادة محفظة العزلة MC31 وكان ل٣٠٠ مايكروغرام من هذه المادة فعالية كاملة في حماية الفئران المحقونة ضد التحدي القاتل مع الكائنات الناظرة والمخالفة (Homologous and Heterologous organisms)

١-٦- التركيب والمكونات الكيمياوية لمتعدد سكريد المحفظة

لقد كشف التحليل الكيمياوي لمادة المحفظة التي قام ويلي (Wiley ,1961) بعزلها من عزلة الجروح عن وجود اربعة احماض امينية وگلوكوز اميني . وشخصت الاحماض الامينية فكانت لايسين وگلايسين وألانين وحامض الگلوتاميك فضلاً عن وجود حامض الفوسفوريك والگليسرول والفوسفات ومركبات أخرى غير مشخصة حاوية على الفوسفات .

كما قام هاسكل وهانسيان (Haskell and Hanessian, 1963 , 1964) بالتحري الموسع عن الخصائص الكيمياوية لمستضد عزلة سث العزول من قبل فيشر وجماعته (Fisher et al. , 1963) والمسمى بمستضد متعدد سكريد السطح [Surface polysaccharide antigen (SPA)]. ويشترك هذا المستضد بصفات عديدة مع ذلك الموصوف من قبل مورس (Morse,1960,1962) حيث بين التشخيص الكيمياوي احتواءه على (2-amino -2-deoxy- D-glucouronic acid) و [2(CN-acetyl alanyl)-amino]-2-deoxy galacturnic acid] والمثبت حالياً على انه النمط المحفظي الاول (Arbeit et al.,1984) .

وفي دراسة اكثر تفصيلاً حول عزلة الجروح قام كاراكاوا وكان (Karakawa and Kann,1975) بتحديد التركيب الكيمياوي لمستضد هذه العزلة حيث ظهر احتواءه على (Amino mannuronic acid) و (fucosamine) . وعلى الرغم من ان هذا المستضد مشابه في تركيبه للمستضد T المعزول من قبل يو وبارك (Wu and Park,1971) والمتكون من (N-acetyl-D-mannosaminuronic acid) و(N-acetyl-D-fucosamine) الا انهما مختلفان مناعياً كما يظهر ذلك من تفاعل الترسيب المناعي . وقد تم تسجيل متعدد سكريد عزلة الجروح على كونه النمط المحفظي الثاني (Arbeit et al.,1984) .

هذا وحدد ليو وهاش (Liau and Hash,1974,1977) التركيب الاساس لمتعدد سكريد العزلة (M) وتبين انه عبارة عن سكر سداسي مكون من (N-acetyl-D-aminogalacturonic acid) و (N-acetyl-D-Fucosamine) و (Taurin) وبنسب مولارية ٤:٢:١ على التوالي .

كما قام كاراكاوا ويونج (Karakawa and young,1979) بدراسة المستضد السطحي التابع لعزلة عنقوديات ذهبية معزولة من حالة اصابة بالتهاب العظام (Osteomyelitis) فتبين انه عبارة عن متعدد سكريد حامضي مكون من الگالكتوز وحامض الگلوكويورون وان الاخير يمثل السيادة المناعية (Immunodominant) الرئيسة في هذا البوليمر .

في حين حدد فورنير وجماعته (Fournier et al.,1984) التركيب الكيمياوي للنمط المحفظي الثامن على انه عبارة عن (O-acetyl-groups-N-N-acetyl fucosamine) و (N-acetyl-galactosaminuronic acid) المشابه لل Aminouronic acid في حين كان متعدد سكريد العزلة (SA1) المخاطية الشخص من قبل لي وجماعته (Lee et al. , 1987) عبارة عن [2-acetamido-2-acet amido-2-deoxy- galacturonic acid (4-0 linked)] و (Taurine) و [(2-deoxy-α-fucose (3-0 linked كما ان الخصائص الكيمياوية والمناعية لمحفظة هذه العزلة كانت مشابهة لمحفظة العزلة (M)(Lee et al. ,1987) .

١-٧ -الصفات البايولوجية للعزلات المحفظة

والى جانب الصفات البايولوجية المعروفة للعنقوديات الذهبية فان لوجود المحفظة علاقة وثيقة مع العديد من الخواص الاضافية للعزلات الحاوية عليها ومنها :-

١-٧-١- ضعف او فقدان قابلية التنميط العاثي

الى جانب اهمية مكونات جدار الخلية البكتيرية في عملية البلعمة للكائنات الحاوية عليها فأنها تعمل ايضاً كمستقبلات للعاثيات الجرثومية حيث يسهم كل من حامض التايكويك والبپتيدوكلايكان في تهيئة موقع استقبال لهذه العاثيات (Coyette and Ghuysen,1968;Chatterjee,1969) .

ان حساسية الجراثيم للاصابة بالعاثيات تعتمد على امكانية الاخيرة للالتصاق بالمستقبلات النوعية لها على سطح الخلية (Lindberg,1973).وعلى الرغم من تحديد نمط العزلات بالعاثي لبعض العزلات المحفظة (Wiely,1961,Wiley and Maverakis,1974) الا ان هناك العديد من البحوث التي تشير الى فقدان هذه العزلات للقابلية على التنميط العاثي(Yoshida and Takeuchi,1970;Yoshida et al. , 1977 Smith et al.,1977) ولقد اتضح فيما بعد ان العزلات المحفظة تربط العاثي بكفاءة اقل من

نظائرها غير المحفّظة . ومن هذا يتضح ان المحفظة تعمل كحاجز يبعد العاثي من التداخل مع مستقبلاته . وان هذا الامتزاز غير الكفوء للعاثيات على العزلات المحفّظة يفسر ضعف التنميط العاثي لمثل هذه العزلات (Wilkinson and Holmes,1979) .

١-٧-٢- امراضية العزلات المحفظة

لقد لاحظ كل من گلبرت (Gilbert, 1931) وهنركسن (Henriksen , 1948) زيادة في نسبة وفيات خنازير غينيا عند حقنها بالصفاق بالعزلات المحفّظة التي قاموا بعزلها .

هذا ويعد هنت وموسس (Hunt and Moses,1958) اول من جلب الاهتمام لخصائص عزلة سمث على اساس وجود النوعين المختلفين مظهرياً في وسط غراء الصل الطري وقد اظهرت المتغايرة المنتشرة قابلية عالية على النمو والتضاعف في صفاق الفأر مسببة موتها بعد ١٢ ساعة من الحقن ،

في حين اظهرت المتغايرات التراصة قابلية قليلة للتضاعف . وقد تم التسليم بان الفرق في الفوعة بين هذه المتغايرات ناجمة عن وجود المحفظة في مستنبتات المتغايرة المنتشرة (Fisher,1960; Morse,1960,1962;Koenig and Melly,1965) .

كما اشار كوينك وميلي (Koenig and Melly , 1965) الى ان سبب الفوعة العالية للعزلات السالبة لعامل التكتل التي درسها ألامي وكيلي (Alami and Kelly , 1960) تعود الى امتلاكها مستضدات سطحية مقاومة لعملية البلعمة تغلف المستضدات التي تتفاعل في اختبار عامل التكتل وتجعل الكائن سالباً لهذا الاختبار .

كما تم التعرف الى ان الفوعة العالية لعزلة سمث ومن ثم عزلة K-93 والعزلة Welwood تعود الى كونها عزلات محفّظة (Koenig et al.,1962;Maverakis and Wiley,1969) .

ولقد اكدت نتائج ويلي (Wiley,1968) ومن ثم لي وجماعته (Lee et al.,1987) وجود علاقة طردية بين حجم المحفظة وفوعة العزلات الحاوية عليها ، حيث اظهرت عزلات ويلي الاكثر فوعة زيادة في انتاجها لمادة المحفظة بمقدار عشرة اضعاف العزلات الاقل حجماً للمحفظة والاقل امراضية .

وقد كان للعزلة(Mucoid SA1) ذات المحفظة الاكبر مقدار جرعة نصف قاتلة اقل بحوالي ٣٠٠٠ مرة من العزلة(JL24)ذات المحفظة الدقيقة او العزلة(JL25)غير المحفّظة .

كما اشار يوشيدا واكستدت (Yoshida and Ekstedet,1968a,b) الى ان العزلات النامية على وسط العنقوديات رقم ١١٠ والتي اظهرت كميات متزايدة من المادة المخاطية الخارج خلوية كانت اكثر فوعة من الكائنات النامية على وسط نقيع القلب والدماغ ، كما اوضحا بان اللقاحات الحية المحضرة من هذه العزلات الحية كانت فعالة في تحفيز المقاومة للتحدي القاتل بوساطة عزلة سمث المنتشرة اكثر من اللقاحات المقتولة وقد عزا هذان الباحثان ذلك الى ان الكائنات الحية تمتلك خصائص في داخل النظام الحي مشابهة لتلك التي لعزلة سمث المنتشرة هي مستضدات المحفظة التي تحفز المقاومة . وعليه يمكن الاستنتاج بان العزلات المحفّظة ذات فوعة اكثر من تلك الفاقدة لها وان تنمية هذه العزلات بمثل هذه الطريقة لزيادة مخاطيتها ربما يسهم في زيادة فوعتها (Wiley,1972) .

١-٧-٣ مقاومة البلعمة المطهية

لقد حدد رايت ودوغلاس (Wright and Doglas,1903) الدور المهم الذي تلعبه عوامل المصل في تحريك بلعمة العنقوديات وعرّف الطاهي (Opsonin) بأنه عوامل في المصل تقوم بتهيئة الجراثيم من أجل أن تجعلها جاهزة لعملية البلعمة . لقد اشار عدد من الباحثين الى مقاومة العزلات المحفظة لعملية البلعمة ، تلك الظاهرة التي تعود للحاجة الى بعض متطلبات الطهاية (Opsonic requirements) لهذه العزلات (Rogers and Melly,1962;Melly et al.,1974;Horwitz,1982).وقد حاول بيترسون وجماعته (Peterson et al. , 1978) تحديد طبيعة تداخل هذه العزلات مع عملية البلعمة فاشار الى ان وجود المحفظة يتداخل مع عملية الطهاية لكل من السلك التقليدي والبديل للمتمم حيث تغلف المحفظة الجزء C3b المستقر على جدار الخلية في حالة عدم وجود المحفظة وان هذا التداخل يكون اعظم في العزلة(M)منه في متغايرة سمث المنتشرة بسبب حجم المحفظة الكبير للعزلة(M). وهذا يؤيد ما توصل اليه يوشيدا وتاكيوشي مسبقاً (Yoshida and Takeushi,1970) .

هذا وقد قام ولكنسون وهولمز (Wilkinsin and Holmes,1979) بتفسير تداخل المحفظة في عملية مقاومة البلعمة وذلك من خلال منع عملية الطهاية نتيجة تغليفها (Masking) لجزيئات الببتيدوكلايكان وعلى العكس فان مادة الببتيدوكلايكان المعزولة من العزلة (M) المحفظة كانت كفؤة في الطهاية بوساطة مصول الانسان الاعتيادية وتمت بلعمتها من قبل الخلايا البيضاء المتعددة الانوية بشكل طبيعي .

١-٨- التنميط المصلي للمحفظة Serological Capsular typing

قبل ملاحظات يوشيدا (Yoshida,1971,1972) الذي ميز اربعة انواع محفظية بوساطة تقنية غراء الصل الطري كانت تعد سلالات العنقوديات الذهبية موحدة مصلياً . لقد لاحظ يوشيدا ومنكيشي (Yoshida and Menigishi,1976) خصوصية في مصول الارانب المضادة للمحفظة تعود الى النمط المحفظي في التحري عن المحفظة وانتاجها حتى في السلالات غير المحفّظة .

لقد تم مسبقاً تصنيف العنقوديات الذهبية بالاعتماد على تفاعلات التلازن وخصائص النمو في وسط غراء الصل الطري (Cowan, 1939; Hobbs, 1948; Oeding, 1960; Haukenes, 1962 ; Cohen and Smith , 1964 ; Yoshida, 1971) الا أن المعرفة غير الكافية للتراكيب والدور الامراضي للمكونات المشولة في هذه التفاعلات فضلاً عن التعقيدات في تحضير المصول المنمطة تعد من المحددات لمثل هذه الطرائق ، وعليه فقد قام كاراكاوا وفان (Karakawa and Vann, 1982) بوضع طريقة للتصنيف معتمدة على متعدد السكريد على اساس وجود ثمانية انماط من المستضدات المحفظية .

كما قام الباحثون انفسهم في بحث لاحق (Karakawa et al., 1985) بوصف طريقة تحضير المصول المنمطة (Typing sera) وقد اشارت معظم الدراسات المعتمدة على التحري واستقصاء الانواع المحفظية الى وجود النوع الثامن والخامس بنسبة ٧٠٪ من مجموع انواع محافظ هذه البكتريا ، وان النمط الاول والثاني نادراً بين العزلات السريرية (Arbiet et al.,1984;Nells et al.,1985) .

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

٢- المواد وطرائق العمل

٢-١ المواد

٢-١-١ الاجهزة

اسم الجهاز		اسم الشركة
١- موصدة	Autoclave	Daikyo
٢- حاضنة	Incubator	Kotterman
٣- حاضنة هزازة	Shaker incubator	Gallenkamp
٤- منبذة مبردة	Cooling centrifuge	Beckman
٥- مجهر ضوئي	Light microscope	Olympus
٦- مازج	Vortex	Griffin
٧- محرك مغناطيسي	Magnetic stirrer	Corning
٨- منبذة	Centrifuge	Janetz
٩- مقياس الاس الهيدروجيني	PH meter	Griffin
١٠- جهاز التبذبات فوق الصوتية	Sonicator	DAWE
١١- حمام مائي	Water bath	Memmert
١٢- مجفد	Freeze dryer	Karl kolb
١٣- جهاز المطياف الضوئي	Spectrophotometer	LKB
١٤- ميزان حساس	Sensitive balance	Mettler
١٥- ميزان	Balance	Sartorious
١٦- فرن كهربائي	Oven	Hirayama

٢-١-٢- الاوساط الزرعية

حضرت جميع الاوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقمت بالاوصدة بدرجة حرارة ١٢١م وتحت ضغط ١٥ باوند/أنج ولمدة ١٥ دقيقة عدا وسط تخمر الكلوكوز ووسط العنقوديات رقم ١١٠ المحور اللذين عقما لمدة ١٠ دقائق . الاوساط الزرعية هي :-

١- مرق تربتون الصويا	Tryptone soya broth	(Oxoid)
٢- الغراء المغذي	Nutrient agar	(Oxoid)
٣- غراء نقيع القلب والدماغ	Brain Heart infusion agar	(Oxoid)
٤- غراء المانيتول الملحي	Mannitol salt agar	(Merck)
٥- المرق المغذي	Nutrient broth	(Merck)
٦- غراء مولرهنتون	Mueller Hinton agar	(Merck)
٧- وسط غراء محلل الدنا	DNase agar	(BBL)
٨- غراء الدم	Blood agar	(Oxoid)

حضر الوسط الاساس وعقم بالاوصدة ثم ترك ليبرد الى درجة ٥٠م ثم اضيف الدم البشري .

٩- مرق تربتون مستخلص الخميرة الحاوي على الكلوكوز لاختبار انتاج الاسيتوين Tryptone Yeast extract glucose broth

حضر الوسط على وفق طريقة كروكشانك وجماعته (Cruickshank et al.,1975) وكالاتي :-

- تربتون	Tryptone	١ غم	(Maknur)
- خلاصة اللحم	Meat extract	٣ر٠ غم	(Merck)
- خلاصة الخميرة	Yeast extract	ار٠ غم	(Maknur)
- الكلوكوز	Glucose	٢ غم	(B.D.H)

اذيبت هذه المحتويات في ١٠٠ ملليتر من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني الى ٢ر٧ ووزعت بمقدار ٥ ملليتر في كل انبوبة .

١٠- وسط غراء المصل الطري Serum soft agar

حضر على وفق طريقة فنكلستين وسلكين (Finkelstein and Sulkin,1958) وكالآتي :-

- تربتون	Tryptone	اغم	(Maknur)

- خلاصة الخميرة	Yeast extract	٥ر٠غم	(Maknur)
- كلوكوز	Glucose	٥ر٠غم	(B.D.H)
- فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين	K2HPO4	٥ر٠غم	(B.D.H)
- اغار اغار	Agar agar	١٥ر٠غم	(Oxoid)

اذيبت هذه المحتويات في ١٠٠٠ملليتر ماء مقطر وعقمت ثم بردت لدرجة ٥٠م واضيف اليها مصل الانسان المعقم بنسبة ١٪ .

١١- وسط العنقوديات الذهبية رقم ١١٠ المحور Modified Staphylococcus 110 medium

حضر هذا الوسط بالاعتماد على طريقة يوشيدا واكستدت (Yoshida and Ekstedt ,1968a) وكالآتي :-

- خلاصة الخميرة	Yeast extract	٥ر٢غم	(Maknur)
- ببتون	Peptone	١٠غم	(Oxoid)

اذيبت هذه المكونات ب٥٠ ملليتر من محلول ٣٪ كلوريد الصوديوم وتم ديلزتها مقابل ٩٥٠ملليتراً من محلول ٣٪ كلوريد الصوديوم ولمدة ٤٨ساعة بدرجة حرارة ٤م مع التحريك المستمر بالمحرك المغناطيسي ، ومن ثم اضيف للمحلول الديلز المواد الآتية :-

- مانيتول	Mannitol	١٠غم	(Oxoid)
- لاكتوز	Lactose	٢غم	(Oxoid)
- فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين	K2HPO4	٥غم	(B.D.H)

استخدم الوسط السائل ، واضيف ٥ر١ غم من الغراء لكل ١٠٠ ملليتر لتحضير الوسط الصلب . عدل الاس الهيدروجيني الى ٢ر٧ ثم عقم بالموصدة بدرجة ١٢١م .

١٢- وسط تخمر الكلوكوز Glucose Fermentation medium

حضر حسب تعليمات الشركة المحضرة (Oxoid) باذابة ١٠ غم من الببتون و٥غم من ملح الصوديوم في ١٠٠٠ملليتر من الماء المقطر ثم اضيف اليها ٥٪ من كاشف احمر الفينول ٢ر٠٪ وضبط الاس الهيدروجيني الى ٢ر٧ ثم اضيف الكلوكوز بنسبة ١٪

٢-١-٣- المحاليل الكيمياوية والكواشف

١- ملون غرام Gram staim ويحوي على :-

- صبغة البلور البنفسجي	Crystal violet	(Fluka)
- صبغة الايودين	Iodine	(BDH)
- الاسيتون	Acetone	(BDH)
- الايثانول	Ethanol	(BDH)
- صبغة السفرانين	Safranin	(Fluka)

٢- كاشف انزيم الكتالاز Catalase

محلول ٣٪ بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) (Oxoid)

٣- كاشف انزيم الاوكسيداز Oxidase

محلول ١٪ رباعي مثل بارافنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلوريد - N,N,N,N -Tetramethyl p-phenylene-Diamine Dihydrochloride

٤- كاشف اختبار الاسيتوين

أ- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ٤٠٪ (اذيب ٤٠غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في ١٠٠ملليتر من الماء المقطر) .

ب- محلول الفا نفثول ٥٪ (اذيب ٥غم من الفا نفثول في ١٠٠ملليتر من الكحول الاثيلي المطلق) .

٥- المحلول الملحي الفسيولوجي Physiological saline

حضر باذابة ٨٥ر٠ غم كلوريد الصوديوم في ١٠٠ ملليتر من الماء المقطر .

٦- انابيب مكفارلند (Finegold and Baron,1986)

أ- كلوريد الباريوم $BaCl_2$

ب- حامض الكبريتيك المركز H_2So_4

٧- صبغة المحفظة السالبة Negative Capsular stain

أستعملت صبغة الحبر الهندي في تصبيغ العينات .

٨- مساعد فروند الكامل Complete Freund's adjuvant (Oxoid)

٩- بلازما دم الانسان

تم الحصول عليها من مصرف الدم في مدينة صدام الطبية .

٢-١-٤- أقراص المضادات الحيوية Antibiotic discs (Oxoid)

استخدمت الاقراص المنفردة (Unidisc) وبتراكيز معينة كما هو مثبت في الجدول (١) وتم استعمال خمسة أقراص من المضادات الحيوية في كل طبق .

٢-١-٥- محاليل ومواد استخلاص متعدد سكريد المحفظة

- انظيم محلل الرنا RNase (Sigma)
- انظيم محلل الدنا DNase (Sigma)
- الكلوروفورم Chloroform (Oxoid)
- داريء الفوسفات الفسيولوجي Phosphale buffer saline

المحضر بمولارية ٠,٠٦ وأس هيدروجيني (٧) .

- خلات الصوديوم Sodium acetate (Maknur)
- الكحول الاثيلي بتركيز ٩٥٪ Ethanol (Fluka)
- الايثر Ether (Fluka)

٢-١-٦- محاليل ومواد الانتشار المناعي الثنائي في الهلام

- اغاروز Agarose (LKB)
- ازايد الصوديوم NaN3 (B.D.H)
- داريء الفوسفات الفسيولوجي Phosphate buffer saline (BBL)

(بأس هيدروجيني ٥,٩) .

- المصل المضاد لمتعدد سكريد المحفظة Capsular polysaccharide antiserum
- متعدد سكريد المحفظة Capsular poysaccharide المستخلص من العزلتين (١١) و(٢٩) .
- الخلايا المحفظة المقتولة بالحرارة Heat Killed encapsulated cell

٢-١-٧- مواد اختبار التلازن النموي السالب

١- عالق كريات الدم الحمراء للخروف بتركيز ٥٪

٢- مصل الارنب المضاد لمتعدد سكريد المحفظة المستخلص

٣- المصل المضاد للخلايا المحفّظة المقتولة بالحرارة

٤- داريء الفوسفات الفسيولوجي

٥- محلول السيفر (Alsever's Solution) المحضر على وفق طريقة بويدن (Boyden,1951) والمكون من :-

- دكستروز Dextrose	٢ر٠٥غم	(Oxiod)
- سترات الصوديوم Sodium citrate	٠ر٨غم	(Fluka)
- كلوريد الصوديوم Sodium chloride	٤٢ر مغم	(B.D.H)
- حامض الليمون Citric acid	٥٤ر٠غم	(Fluka)

اذيبت هذه المحتويات في ١٠٠ملليتر من الماء المقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى ٦ر٢ ورشح المحلول بوساطة مرشح دقيق (Millipore filter) قطر ثقوية ٢٢ر٠ مايكروميتر .

٦- حامض التانيك Tannic acid

٧- أطباق المعايرة الدقيقة Microtitration trays

٢-١-٨- محاليل ومواد التلازن المباشر

- المصل المضاد لمتعدد السكريد
- لقاح الخلايا الجرثومية للعزلة (١١) المحفظة
- انظيم التربسين (Sigma)
- الكلوروفورم (Oxoid)

٢-١-٩- الحيوانات المختبرية

استخدمت ثماني ارانب محلية بيضاء اللون بعمر ٢-٣ أشهر وبأوزان ٥ر١-٢ كيلوغرام تم تقسيمها الى مجاميع (ارنبان من كل مجموعة) ، كما تم استخدام الفئران البيضاء بوزن ٢٠غرام (±٢غرام) حيث تم توزيعها الى مجاميع وبواقع خمسة فئران في كل مجموعة .

٢-١-١٠ -العزلات الجرثومية

١- استخدمت ٧٠ عزلة عنقوديات ذهبية سريرية محلية معزولة ومشخصة من قبل الربيعي،شروق ريس (١٩٩٤) محفوظة على وسط الغراء الغذي والتي تم عزلها من اماكن مختلفة من الجسم ، وقد اعيد تشخيص هذه العزلات للتأكد من كونها عنقوديات ذهبية وذلك لغرض المقارنة مع العزلات الفتية المعزولة في هذه الدراسة لاحتوائها المحفظة .

٢- الذرية القياسية الحساسة للمضادات الحيوية S. aureus ATCC25923 كسيطرة نوعية لقياس فعالية اقراص المضادات الحيوية .

٢-٢- طرائق العمل

٢-٢-١- جمع وتشخيص العينات

٢-٢-١-١- جمع العينات

تم جمع (٢٥٨) عزلة عنقوديات في اماكن مختلفة من الجسم ، كالانف والاذن والبلعوم وتقرحات الجروح والعمليات والمهبل والاحليل ومستنبتات الدم والادرار والسائل المخي الشوكي والمنوي والالتهابات المختلفة لمرضى باعمار مختلفة ومن كلا الجنسين وقد تم ذلك في المدة بين تشرين الثاني ١٩٩٣ وشباط ١٩٩٤ ومن الاماكن الاتية :-

١- المختبرات التعليمية	مدينة صدام الطبية
٢- مستشفى بغداد	مدينة صدام الطبية
٣- مستشفى الشهيد عدنان خيرالله	مدينة صدام الطبية
٤- مستشفى عام بعقوبة	بعقوبة
٥- مختبر الصحة العام	بعقوبة
٦- مستشفى صدام للولادة والاطفال	بعقوبة
٧- مستشفى اليرموك التعليمي	بغداد

حيث تم نقل هذه العزلات الى المختبر بوساطة مائل الغراء المغذي وزرعها على اطباق الوسط الاختياري غراء المانيتول الملحي لعزل العنقوديات وحضّنت بظروف هوائية بدرجة حرارة ٣٧م ولمدة ٢٤-٤٨ ساعة ثم اختيرت العزلات المخمرة والتي ظهرت بلون اصفر على هذا الوسط .

٢-٢-١-٢- تشخيص عينات العنقوديات الذهبية

شخصت العنقوديات الذهبية بالاعتماد على سنيث وجماعته (Sneath et al.,1986) وبالطرائق المستخدمة من قبل كروكشانك وجماعته (Cruickshank et al.,1975) وكالاتي :-

١- ملون غرام

صبغت جميع العزلات بملون غرام لملاحظة شكل ولون وتجمع الخلايا .

٢- انتاج انظيم الكتالاز

تم اضافة قطرة من بيروكسيد الهيدروجين على شريحة زجاجية نظيفة الى النمو الجرثومي بعمر ١٨-٢٤ ساعة حيث دل ظهور الفقاعات على قابلية العزلة على انتاج انظيم الكتالاز .

٣- انتاج انظيم الاوكسيداز

تمت اضافة ٢-٤ قطرات من كاشف رباعي فنيلين ثنائي أمين ثنائي هيدروكلوريد الى مسحة من الجراثيم المأخوذة من وسط الغراء المغذي بعمر ١٨ ساعة على ورقة ترشيح . إن تكون اللون البنفسجي خلال عشر دقائق يعد دليلاً موجباً للكشف .

٤- انتاج انظيم مخثر البلازما الحر Free coagulase test

اتبعت طريقة تريغان وبوليام (Treagan and Pulliam,1982)حيث اضيف ١ر٠ ملليتر من العالق الجرثومي بعمر ٢٤ ساعة في انبوبة اختبار تحوي ٥ر٠ ملليتر من البلازما غير المخففة وحُضنت الانابيب بدرجة حرارة ٣٧م وتمت مراقبة حدوث التخثر كل نصف ساعة لمدة ٤ ساعات .

ان وجود اي اثر للتخثر يدل على ايجابية الاختبار . في حين استمر حضن الانابيب التي لم تعطي نتيجة لمدة ٦-٢٤ ساعة قبل اعتبار النتيجة النهائية سالبة ، لقد قورنت النتائج مع انبوبة السيطرة الحاوية على المحلول الفسيولوجي والعالق الجرثومي .

٥- فحص انتاج اختبار الاسيتوين Acetoin production test

استخدم هذا الاختبار لتمييز العنقوديات الذهبية وبقية العنقوديات الاخرى المنتجة لانظيم مخثر البلازما ، ويعتمد على انتاج الاسيتوين من بايروفات الصوديوم كنتيجة نهائية لأيض الكلوكوز ، والذي اجري بتلقيح وسط مرق تربتون كلوكوز مستخلص الخميرة وحضن المزروع الجرثومي بدرجة ٣٠ م لمدة ١٤ يوماً . وتمت اضافة ١ ملليتر من محلول ٤٠٪ هيدروكسيد البوتاسيوم و٣ملليتر من محلول الفانفثول وتم رجه بصورة جيدة لمدة لاتقل عن ثلاثين ثانية ، يتم الفحص بعد ١-٢ ساعة بدرجة حرارة الغرفة ، ان تكون اللون الوردي يدل على ايجابية الفحص .

٦- اختبار تخمر الكلوكوز لاهوائياً Anaerobic glucose fermentation

استخدم هذا الفحص لتمييز العنقوديات Staphylococcus عن الكيرات Micrococcus ، حيث تم تلقيح الانابيب الحاوية على وسط الكلوكوز بالعزلات تحت الفحص وغطيت بطبقة من زيت البرافين السائل المعقم بارتفاع ٢سم ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة ٣٧م ولمدة ٥أيام . ان تحول لون الوسط الى الاصفر دلالة على وجود العنقوديات في حين يدل عدم تغير لون الوسط على ان الخلايا تعود الى جنس الكيرات .

٧- فحص انتاج انظيم حال الدم Hemolysin production

زرعت جميع العزلات قيد الفحص على وسط غراء الدم بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة ولوحظ بعد ذلك وجود التحلل ونوعه في كل طبق .

٨- انتاج انظيم محلل الدنا DNase production test

تم تخطيط العزلات على وسط غراء محلل الدنا الحاوية على ازرق التولودين وحضنت بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ١٨-٢٤ ساعة . ان تكون الهالة الوردية حول المستعمرات النامية دليل على ايجابية الاختبار .

٢-٢-٢- تشخيص العنقوديات الذهبية المحفّظة

شخصت العزلات المحفّظة بالاعتماد على سكوت (Scott , 1969) وشومارا وجماعتها (Chomarat et al. , 1985) وكالآتي :-

٢-٢-٢-١ -التصبيغ بالحبر الهندي

تم وضع قطرة من الصبغة على شريحة زجاجية نظيفة وجافة ونقل بوساطة الناقل جزء كثيف من المزروع البكتري بعمر ١٨-٢٤ ساعة والنامي على وسط نقيع القلب والدماغ ثم مزجت الصبغة مع المزروع جيداً ثم وضع غطاء الشريحة وضغط برفق بين ورقتي ترشيح براحة اليد لفرش الخلايا وبشكل متجانس واستبعاد التكتلات ، وفحصت الشريحة تحت العدسة الزيتية . ان وجود هالة شفافة محيطة بالخلية البكتيرية يعد دليلاً على وجود المحفظة .

٢-٢-٢-٢ -أختبار عامل التكتل Clumping factor test

- طريقة الشريحة الزجاجية Slide test

اتبعت طريقة بارون وفاينغولد (Baron and Finegold ,1990) للتحري عن عامل التكتل باضافة قطرة من المحلول الملحي الفسيولوجي على شريحة زجاجية نظيفة ومزج معه جزء من النمو الجرثومي بعمر ١٨ ساعة بوساطة عروة الناقل ، وبعد حصول مستحلب للمزروع اضيف اليه بلازما دم الانسان الطبيعي وبعد تحريك الشريحة بلطف فحصت قرب مصدر ضوئي . ان حدوث التخثر الواضح بالمقارنة مع السيطرة المكونة من المحلول الملحي الفسيولوجي والنمو الجرثومي بالمقارنة دلالة على ايجابية الاختبار .

٢-٢-٢-٣- أختبار النمو في وسط غراء المصل الطري Growth in Serum Soft Agar(SSA) test

اتبعت طريقة فنكلستين وسلكين (Finklstein and Sulkin,1958) في هذا الاختبار وكالآتي :-

حضر المزروع الجرثومي للعزلات قيد الفحص بتنميتها في وسط مرق نقيع القلب والدماغ بعمر ١٨ ساعة ، ثم خفف المزروع الاصلي لكل عزلة الى التخفيف السادس (10^{-6}) : بعدها تم اخذ ٥٠ مايكروليتراً من هذا التخفيف ولقحت به الانابيب التي سبق تعقيمها على وفق رقم العزلة المراد فحصها ، تم عل مكررات (انبوبتين) لكل عزلة اضيف للمجموعة الاولى ١٠ ملليتر من الوسط المحضر سابقاً وبأس هيدروجيني ٧٫٢ مضافاً اليه المصل الطبيعي (١٪) وفي المجموعة الثانية اضيف الوسط السابق نفسه المحضر بأس هيدروجيني ٨٫٤ .

ثم اضيف امليلتر من الغراء المحضر بنسبة ٢٪ لكل انبوبة لتجنب تكون الطبقة المائية المشجعة لحصول النمو الجرثومي فيها ، وحضنت الانابيب بعدها بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ١٨-٢٤ ساعة ولوحظ نوع النمو فيها وعدت العزلات التي اظهرت مستعمرات متراصة (Compact colony) في كلا المجموعتين على انها عزلات غير محفّظة في حين عّدت العزلات محفظة اذا مااظهرت شكلاً منتشراً في كلا المجموعتين ، اما العزلات التي اظهرت شكلاً منتشراً في المجموعة الاولى وتحولت الى التراص في الثانية فقد تم عدها عزلات منتشرة كاذبة (Pseudodiffuse) لتمييزها عن السلالات المنتشرة الحقيقية .

٢-٢-٣ - أختبار حساسية العزلات المحفّظة للمضادات الحيوية

استخدمت طريقة باور وجماعته (Bauer et al.,1966) لاختبار حساسية العنقوديات الذهبية المكونة للمحفظة باستعمال اقراص المضادات الحيوية القياسية والمبينة في الجدول (١) والمثبتة من قبل National Committee for Clinical Laboratory Standards(NNCLS) (Reeves et al.,1978) . حيث تم تحضير العالق الجرثومي بأخذ (٤-٥) مستعمرات نقية ونقلها باستعمال الناقل الى وسط مرق تربتون الصويا (٤-٥) مليتر وحضنها بدرجة حرارة ٣٧م لمدة (٢-٥) ساعات لحين ظهور العكورة وعدل التركيز باستخدام عالق قياسي (انبوبة مكفارلند ٥ر٠) . وبعد الحصول على المزروع المناسب تم زرعه على غراء مولار هنتون باستعمال مسحة قطنية مغمسة في العالق الجرثومي وبثلاثة اتجاهات للحصول على نمو متجانس ، وبعدها ترك الطبق لمدة ١٥ دقيقة ثم اضيفت اقراص المضادات الحيوية بوساطة ملقط معقم وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ١٨ ساعة . قرأت النتائج بقياس اقطار مناطق التثبيط حول كل قرص وقورنت بالمعدلات القياسية لقطر منطقة التثبيط للمضادات الحيوية (الجدول -١-) .

استخدمت النزية القياسية المعروفة الحساسية Staphylococcus aureus25923كسيطرة نوعية لقياس فعالية اقراص المضادات الحيوية

الجدول (١) : انواع وتراكيز واقطار التثبيط القياسية للمضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية لعزلات العنقوديات الذهبية المحفظة .

** المضاد الحيوي	الرمز	تركيز المضاد مايكرو-غرام/قرص	* قطر منطقة التثبيط القياسية بالملمترات		
			حساسة	متوسطة	مقاومة
ستربتومايسين Streptomycin	S	١٠	١٥ أو اكثر	١٤-١٣	١١ أو اقل
سلفوميثوكزازول Sulfomethoxazol	RL	٢٥	١٦ أو اكثر	١٥-١١	١٠ أو اقل
اموكسيسيلين Amoxycillin	AML	٢٥	١٤ أو اكثر	١٣-١٢	١١ أو اقل
سيفالوردين Cephaloridin	CR	٣٠	١٨ أو اكثر	١٧-١٥	١٤ أو اقل
سيفالكسين Cephalexine	CL	٣٠	١٨ أو اكثر	١٧-١٥	١٤ أو اقل
دي اوكسي سايكلين Deoxycycline	DO	٣٠	١٦ أو اكثر	١٥-١٣	١٢ أو اقل
ارثرومايسين Erythromycin	E	١٥	١٨ أو اكثر	١٧-١٤	١٣ أو اقل
حامض الفيوسدك Fusidic acid	FD	١٠	٢٠ أو اكثر	-	١٩ أو اقل
تتراسايكلين Tetracycline	TE	٣٠	١٩ أو اكثر	١٨-١٥	١٤ أو اقل
بنسلين-جي- Penicillin G	P	١٠	٢٩ أو اكثر	-	٢٨ أو اقل

* أقطار التثبيط القياسية عن [National comittee of clinical laboratory standard (Neels, 1988)].

** جميع اقراص المضادات الحيوية اعلاه من انتاج شركة (Oxoid) البريطانية.

٢-٢-٤- استخلاص متعدد سكريد المحفظة

Extraction of capsular polysaccharide

تم الاستخلاص بالاعتماد على طريقة شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1989) وكالآتي :-

استخدمت العزلتان (١١و٢٩) لاستخلاص متعدد سكريد المحفظة حيث نميت على مرق العنقوديات رقم ١١٠ المحور لمدة ١٨ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧ م كلا على انفراد . اعيد استنبات العزلة على وسط غراء العنقوديات رقم ١١٠ المحور وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ١٨-٢٤ ساعة ، تم حصاد النزروع وتعريضه للنبذبات فوق الصوتية فوق الصوتية بجهاز النبذبات فوق الصوتية (DAWE) بمقدار ١٠كيلو دورة ولمدة خمس دقائق . نبذ الطافي بعدها باستعمال المنبذة المبردة وبسرعة ٩٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة للتخلص من الخلايا . اخذ بعدها الطافي وعومل بالانظيم المحلل للدنا بمقدار ١٠ مايكروغرام /ملليتر والانظيم المحلل للرنا بمقدار ٥٠ مايكروغرام /ملليتر ، وضع بعدها الراشح في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ٣٠ دقيقة ، اضيف الكلورفوم للطافي ووضع بدرجة حرارة ٤م لمدة ١٨ ساعة مع استمرار التحريك بالمحرك المغناطيسي .

اخذت الطبقة المائية العليا وتم ديلزتها مقابل داريء الفوسفات الفسيولوجي المحضر بأس هيدروجيني ٧ر٢ لمدة ١٨ ساعة وبدرجة حرارة ٤م .

اضيفت خلات الصوديوم للجزء المديلز وبتركيز نهائي ١٪ اعقبها اضافة الكحول الاثيلي بتركيز ٩٥٪ وبواقع خمسة حجوم كحول الى واحد من المحلول وترك الخليط لكي يستقر ويترسب بدرجة حرارة ٤م . حيث تم جمع الراسب في اليوم التالي بوساطة المنبذة المبردة وبسرعة ٩٠٠٠ دورة /دقيقة وعومل بالايثر لازالة الدهون . ثم اعيد تعليقه بالماء المقطر المعقم قبل التجفيد . (مخطط -١-)

مخطط -١- مراحل استخلاص متعدد سكريد محفظة العنقوديات الذهبية للعزلة (٢٩) *

تلقيح وسط مرق العنقوديات رقم ١١٠ المحور بخلايا العزلة (٢٩) ثم الحضن بدرجة ٣٧م لمدة ١٨ساعة

↓

اعادة زرع الخلايا النامية على وسط غراء العنقوديات رقم ١١٠ المحور مع الحضن بدرجة ٣٧ م لمدة ١٨-٢٤ساعة

↓

حصاد النزروع الجرثومي بوساطة المحلول الملحي الفسيولوجي وتعريضه للذبذبات فوق الصوتية بمقدار ١٠ كيلو دورة ولمدة خمس دقائق .

↓

نبذ مركزي للعالق بسرعة ٩٠٠٠ دورة بالدقيقة لمدة ٢٠ دقيقة للتخلص من الخلايا

↓

معاملة الطافي بانظيم محلل الدنا (١٠مايكروغرام /ملليتر) و انظيم محلل الرنا (٥٠مايكروغرام/ملليتر)

↓

حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ٣٠ دقيقة

↓

اضافة الكلوروفورم للطافي وتركه بدرجة حرارة ٤م لمدة ١٨ ساعة مع التحريك المستمر بالمحرك المغناطيسي .

↓

اخذت الطبقة المائية العليا و تم ديلزتها مقابل داريء الفوسفات الفسيولوجي (أس هيدروجيني ٢ر٧) بدرجة حرارة ٤م لمدة ١٨ساعة

↓

اضافة خلات الصوديوم للجزء الديلز وبتركيز ١٪ ثم اضافة الكحول الاثيلي بتركيز ٩٥٪ وبواقع خمسة حجوم كحول الى ١ من المحلول

↓

ترك الخليط لكي يستقر ويترسب بدرجة ٤م

↓

جمع الراسب بالمنبذة المبردة بسرعة ٩٠٠٠ دورة /دقيقة

↓

معاملة الراسب بالايثر للتخلص من الدهون

↓

ترسيب بالمنبذة المبردة بسرعة ٩٠٠٠ دورة /دقيقة

↓

تعليق الراسب بالماء المقطر المعقم

↓

تجفيد (متعدد السكريد المستخلص)

* - اتبعت نفس الطريقة والخطوات لاستخلاص متعدد سكريد العزلة (١١) .

٢-٢-٥- تحضير المصل المضاد Preparation of antiserum

٢-٢-٥-١- المصل المضاد للخلايا المحفّظة الكاملة

اولا: تحضير اللقاح

تم اعتماد طريقة شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1989) في تحضير اللقاح من الخلايا المحفظة للعزلة (١١) وكالاتي :-

نميت خلايا العزلة قيد الاختبار في مرق نقيع القلب والدماغ لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧م ، ثم رسبت الخلايا باستعمال المنبذة المبردة وبسرعة ٦٠٠٠ دورة /دقيقة .

غسلت بعدها مرتين بالمحلول الفسيولوجي وعلقت بالمحلول نفسه للوصول الى كثافة بصرية تساوي (١) على طول موجي ٤٨٠ نانوميتر . حيث يكون عدد الخلايا في هذا المحلول ١ x١٠^٨ خلية/ملليتر . تم بعدها وضع العالق في حمام مائي بدرجة حرارة ٧٠م ولمدة ساعة واحدة لقتل الخلايا ، ومن اجل التأكد من القتل التام لجميع الخلايا وتعقيم المحلول تم زرع ٠,١ ملليتر من هذا العالق على وسط الغراء المغذي وحضن بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ١٨-٢٤ ساعة .

ثانياً : الحقن

تم حقن ارنبين بلقاح خلايا العزلة (١١) المقتولة بالحرارة وكالاتي :-

الاسبوع	الجرعة	ايام الحقن
١	٠,٥ ملليتر/ارنب	الاول والثاني والثالث
٢	١ ملليتر/ارنب	الاول والثاني والثالث
٣	١ ملليتر/ارنب	الاول والثاني والثالث
٤	١ ملليتر/ارنب	الاول والثاني والثالث
٥	١ ملليتر/ارنب	الاول والثاني والثالث
٦	١* ملليتر/ارنب	الاول والثاني والثالث

* جرعة منشطة لزيادة الاستجابة المناعية

ثالثاً : سحب الدم

تم سحب الدم من الحيوانات الممنعة في الاسبوع الثاني والرابع وبعد مرور سبعة ايام من آخر موعد للحقن بوساطة طعنة القلب . وترك بدرجة حرارة ٢٤م لمدة ٢٤ ساعة للحصول على المصل الممنع، تم سحب المصل عن الخثرة بوساطة ماصة باستور ووضع في انابيب معقمة وحفظ بدرجة حرارة -٢٠م لحين الاستعمال . اعيد سحب الدم في الاسبوع السابع والتاسع للتأكد من ثبوت عيارية الاضداد النوعية .

٢-٢-٥-٢ - تحضير المصل المضاد لمتعدد السكريد المستخلص

حضر المصل المضاد في الارانب والفئران وكما يأتي :-

٢-٢-٥-٢-١- تحضير المصل المضاد في الارانب

استخدمت طريقة لي وجماعته (Lee et al.,1987) في الحقن وكالاتي :-

اولاً : تحضير المستضد للحقن

اذيب ١٠ ملغرام من المستضد المستخلص في ١٠ ملليتر من المحلول الفسيولوجي المعقم للحصول على تركيز ١ ملغرام /ملليتر .

ثانياً : الحقن

تم حقن الحيوانات (٢) أرنب حسب جدول التنميع وكالآتي :-

الاسبوع	الجرعة	مكان الحقن
١	٠,٥ ملليتر (٠,٥ ملغرام من المستضد المستخلص + ٠,٥ ملليتر من مساعد فروند الكامل) في اليوم الاول	تحت الجلد
	٠,٥ ملليتر من العالق في اليوم الثاني	داخل الوريد
٢	٠,٥ ملليتر يوميا ولمدة خمسة ايام متتالية	داخل الوريد
٣	٠,٥ ملليتر يوميا ولمدة خمسة ايام متتالية	داخل الوريد
٤	١ ملليتر يوميا ولمدة خمسة ايام متتالية	داخل الوريد
٥	١ ملليتر يوميا ولمدة خمسة ايام متتالية	داخل الوريد
٦	*١ ملليتر يوميا ولمدة خمسة ايام متتالية	داخل الوريد

* جرعة منشطة لزيادة الاستجابة المناعية

حقنت مجموعة اخرى من الارانب بالعدد نفسه وبالمحلول الملحي الفسيولوجي كسيطرة وبجدول التنميع المذكور نفسه .

ثالثاً :- سحب الدم

تم السحب كما في الفقرة (٢-٢-٥-١-ثالثاً) .

٢-٢-٥-٢-٢- الحقن في الفئران

ولتحديد جرعة التنبيع المثلى ومقدار الاستجابة المناعية في الفئران لتعدد السكريد المستخلص ، تم حقن سبعة مجاميع (خمسة فئران في كل مجموعة)داخل الصفاق وبالجرع الآتية :-

ار٠ ، ٥ر٠ ، ١ ، ١٠ ، ٢٥ ، ٥٠ ، ١٠٠ مايكروغرام /فأرة وكان الحقن في الايام صفر ، ٥ ، ١٠ ، تم سحب الدم قبل كل حقنة وبعد مرور خمسة أيام من آخر موعد للحقن بواسطة الوريد الذنبي (Lee et al. , 1987) كما تم حقن المجموعة السابعة بالمحلول الملحي الفسيولوجي كسيطرة .

٢-٢-٦- الكشف عن الاضداد النوعية للمحفظة

٢-٢-٦-١- الطريقة النوعية Qualitative method

اجريت الطريقة اعتماداً على اختبار اوختر لوني للانتشار المناعي الثنائي في الهلام Oucht erlony double immunodiffusion ingel.

حضر الوسط اعتماداً على كروكشانك وجماعته (Cruickshank et al.,1975) وكالآتي :-

اذيب ٥ر١ غم من الاغاروز في ١٠٠ ملليتر من داريء الفوسفات الفسيولوجي مضافاً اليه ار٠ غم من ازايد الصوديوم كمادة حافظة . اضيف الوسط المحضر اعلاه الى الاطباق الخاصة بالاختبار بمقدار ٥ ملليتر لكل طبق وبعد تصلبه تم عمل حفرة وسطية وخمس حفر محيطية بقطر ٥ ملم .

اضيف ١٠ مايكروليتر من الصل المضاد لتعدد سكريد العزلة (١١) في الحفرة الوسطية ، وفي الحفر المحيطية اضيف المقدار نفسه من المستضد المحضر بتركيز ٥٠ مايكروغرام /ملليتر من الداريء الفسيولوجي و المستضد المحضر بتركيز ١٠٠ مايكروغرام/ملليتر و مستضد الخلايا المقتولة بالحرارة و داريء الفوسفات الفسيولوجي كسيطرة وكلاً على انفراد .

في طبق آخر تمت اضافة الصل الطبيعي كسيطرة في الحفرة الوسطية بدل الصل المضاد لتعدد السكريد .

اتبعت الطريقة نفسها في الكشف عن الاضداد النوعية في الصول المضادة لتعدد سكريد العزلة (٢٩) الحساسة للمضادات الحيوية والصل المضاد للخلايا المحفظة ، والصول المضادة لتعدد السكريد المحضرة في الفئران .

٢-٢-٦-٢- الطريقة الكمية Quantitation method

٢-٢-٦-٢-١- طريقة التلازن الدموي السالب Passive haemagglutination test

اتبعت طريقة كروكشانك وجماعته (Cruickshank et al.,1975) وكالآتي :-

٢-٢-٦-٢-١-١- تحضير عالق كريات الدم الحمراء المحسسة بالمستضد

اولاً- تم استعمال كريات الدم الحمراء للخروف التي تم الحصول عليها عن طريق سحب الدم من الوريد العنقي بوساطة حقنة طبية سعة ٢٠-٥٠ ملليتر ، ثم اضيف اليها محلول السيفر (Alsever's Solution) بنسبة (١ : ١) مع المزج بلطف، ترك بعدها بدرجة ٤م ، حيث يكون صالحاً للاستعمال لمدة ثلاثة اسابيع (Boyden,1951) .

ثانياً- غسل وتعليق كريات الدم الحمراء .

فصلت خلايا الدم الحمراء عن البلازما بالنبذة وبسرعة ١٥٠٠ دورة /دقيقة ولمدة ٥ دقائق ، تم سحب الرائق بماصة باستور واعيد تعليق الخلايا بالداريء الفسيولوجي وكررت عملية الغسل ثلاث مرات .

ثالثاً- تم تعليق الخلايا بالداريء الفسيولوجي بتركيز نهائي ٥ر٠٪ في انبوبتين منفصلتين .

رابعاً- معاملة الخلايا بحامض التنيك .

من محلول مركز بنسبة ١٪ تم تحضير محلول الحامض آنياً في الداريء الفسيولوجي (بأس هيدروجيني ٢ر٧) بتركيز ١ : ٢٠٠٠٠ .

اضيف ١٠ ملليتر من الكريات المحضرة في الفقرة (٢-٢-٦-٢-١-١- رابعاً) الى حجم مساوي من محلول الحامض المذكور آنفاً ووضع الخليط في حمام مائي بدرجة ٣٧م لمدة ١٥ دقيقة مع التحريك الهادئ المستمر لتجنب ترسب الخلايا وضمان تعرض سطوحها للحامض .

نبذ الخليط لمدة ٥ دقائق وبسرعة ١٥٠٠ دورة /دقيقة . تم التخلص من الراشح واعيد تعليق الخلايا في كلا الانبوبتين ب ١٠ ملليتر من الداريء الفسيولوجي وكررت عملية النبذ للحصول على الخلايا فقط . تركت احدى الانبوبتين كمصدر للخلايا غير المحسسة لاستعمالها لاحقاً في امتصاص المصول قيد الاختبار ، واستعمالها في السيطرة ، واعيد تعليق الخلايا في الانبوبة الثانية الى تركيز (٥ر٠ ٪) .

٢-٢-٦-٢-١-٢- تعيين كمية المستضد المثلى باستعمال المصل المضاد الموجب لمتعدد السكريد

أولاً -تحسيس خلايا الدم الحمراء Sensitization of erythrocytes

حضر المستضد بتراكيز مختلفة في الداريء الفسيولوجي (اس هيدروجيني ٢ر٧) وكالاتي :-١، ٥ر١٢، ٢٥، ٥٠، ١٠٠، ١٥٠ مايكروغرام /ملليتر . في انابيب مختلفة اضيف ١٠ ملليتر من معلق الخلايا المحضر سابقاً في الفقرة (٢-٢-٦-٢-١-١) الى حجم مساوٍ من تراكيز المستضد مع التحريك الهادئ والستر لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٢٠م لضمان تعرض سطوح الخلايا للمستضد . رسبت الخلايا بعدها بسرعة ١٥٠٠ دورة /دقيقة ولمدة ٥ دقائق ، تم بعدها غسل الخلايا ثلاث مرات بالداريء المضاف اليه مصل الارنب الطبيعي بتركيز ١٪ (سبق وان عرض هذا المصل للامتصاص مع المستضد المحضر وابطال التمم) ، ونبذت الانابيب بنفس السرعة والوقت اعلاه . اعيد تعليق الخلايا بالداريء المضاف اليه المصل الطبيعي بنسبة ١٪ الى التركيز ٥ر٠٪ .

ثانياً - ابطال عمل التمم وامتصاص النماذج .

وضع ١ر٠ ملليتر من كل نموذج مصل في انابيب نبذ مركزي (كلاً على انفراد) وابطل عمل التمم بوضعها في حمام مائي بدرجة حرارة ٥٦م لمدة ٣٠ دقيقة واضيف بعدها ٩ر٠ ملليتر من معلق كريات دم الخراف غير المحسسة لكل انبوبة وتركت النماذج بدرجة حرارة ٢٠م لمدة ١٥ دقيقة لازالة احتمال وجود الاجسام المضادة لسطوح هذه الخلايا Anti-Sheep red cell agglutinin التي قد تؤثر على نتيجة التفاعل (Fisher,1952) .

نبذت الانابيب بعدها بسرعة ١٥٠٠ دورة /دقيقة لمدة ٥ دقائق وفصل المصل لاستعماله في الفحص لاحقاً .

ثالثاً :- المعايرة Titration

تمت المعايرة باستخدام اطباق المعايرة الدقيقة ، حيث اضيف ٠٥ر٠ ملليتر من الخلايا المحسسة بالمستضد مع ٠٥ر٠ ملليتر من المصل المضاد المعامل(بالفقرة ٢-٢-٦-٢-١-٢ ثانياً)٠استعملت تراكيز مختلفة من المصل المضاد لمتعدد السكريد وكالاتي :- ١ : ١٠ ، ١ : ٢٠ ، ١ : ٤٠ ، ١ : ٨٠ ، ١ : ١٦٠ ، ١ : ٣٢٠ ، ١ : ٦٤٠ ، ١ : ١٢٨٠ ، وفيما يخص مجموعة السيطرة فقد استخدمت ثلاثة احتمالات كسيطرة سالبة :-

أ- أضافة ٠٫٥ مليتر من معلق الخلايا غير المحسسة الى ٠٫٥ مليتر من المصل المضاد النوعي بالتخفيف الاول .

ب- أضافة ٠٫٥ مليتر من معلق الخلايا غير المحسسة الى ٠٫٥ مليتر من داريء الفوسفات الفسيولوجي .

ج - أضافة ٠٫٥ مليتر من معلق الخلايا المحسسة الى ٠٫٥ مليتر من داريء الفوسفات الفسيولوجي .

تمت القراءة الاولية بعد ساعتين بدرجة حرارة المختبر (٢٠ م) ثم تركت لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٤ م وقرأت النتائج بعدها باستعمال مرآة مقعرة (Butler ,1963; Weir,1973)

ان تركيز المستضد الامثل هو ذلك التركيز الذي يعطي تفاعلاً موجباً مع اعلى تخفيف للمصل المضاد الموجب . حيث تم اعتماد تركيز ٢٥ . مايكروغرام /مليتر واستخدم في الخطوات اللاحقة للتقدير .

٢-٢-٦-٢-١-٣- معايرة نماذج المصول المضادة لمستخلص متعدد السكريد

اولاً - ابطال عمل التتمم وامتصاص المصول :-

اتبعت الطريقة المذكورة في الفقرة (٢-٢-٦-٢-١-٢ ثانياً) .

ثانياً - المعايرة

اضيف ١٫٠ مليتر من المصل المحضر في الفقرة (٢-٢-٢-٦-١-٣ أولاً) الى ٩٫٠ مليتر من عالق الخلايا غير المحسسة وترك الخليط بدرجة حرارة ٢٠ م لمدة ١٥ دقيقة ثم نبذ بسرعة ١٥٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٥ دقائق وذلك للتخلص من الخلايا والحصول على المصل الذي اصبح بعد هذه العملية مخففاً بنسبة ١ : ١٠ ومن هذا التخفيف تم تحضير تخافيف عشرية مضاعفة للمصول وكالاتي :- ١ : ١٠ ، ١ : ٢٠ ، ١ : ٤٠ ، ١ : ٨٠ ، ١ : ١٦٠ ، ١ : ٣٢٠ ، ١ : ٦٤٠ ، ١ : ١٢٨٠ باستعمال الداريء الفسيولوجي . تمت اضافة ٠٫٥ مليتر من كل تخفيف من هذه التخافيف الى ٠٫٥ مليتر من الخلايا المحسسة بالكمية المثلى للمستضد (٢٥ مايكروغراماً) في اطباق المعايرة الدقيقة وقرأت النتائج بعد ساعتين بدرجة حرارة ٢٠ م ، واعيدت القراءة بعد ١٦-١٨ ساعة بعد حضنها لهذه المدة في درجة حرارة ٤ م .

دونت النتائج على شكل عيارية والتي تمثل مقلوب اعلى تخفيف للمصل الذي يعطي نتيجة موجبة واضحة .

٢-٢-٦-٢-٢ التلازن المباشر Direct agglutination

قـدرت الاضداد في المصل الضاد للخلايا المحفظة على وفق طريقة فورنير وجماعته (Fournier et al. , 1984) باستخدام هذا الاختبار وكالاتي :-

اولاً - امتصاص المصل الضاد مع المتغايرات غير المحفظة .

نميت الخلايا غير المحفظة بعد اعادة استنباتها (٢٢) مرة في ١ لتر من مرق تربتون الصويا لمدة ١٨ ساعة وتم وضع المزروع في حمام مائي بدرجة حرارة ٧٠ م لمدة ساعة واحدة لقتل الخلايا ومن ثم رسبت هذه الخلايا وغسلت ثلاث مرات بعدها اعيد تعليقها ب ١٠٠ ملليتر في داريء الفوسفات الفسيولوجي وعوملت الخلايا بعد ذلك بانظيم التربسين (١ ملغم /ملليتر من عالق الخلايا) واضيف بعد ذلك قطرات من الكلوروفورم وتركت ١٨ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ م ، اعيد غسل الخلايا ثلاث مرات مع داريء الفوسفات الفسيولوجي ثم اضيف المصل الضاد الى الخلايا المرصوصة (Packed cells) بواقع ٢ : ١ . وبعد الحضن بدرجة حرارة ٤م لمدة ١٨ ساعة تم نبذ العالق بسرعة ٣٠٠٠دورة/دقيقة حيث تم جمع المصل المتص بعد ذلك .

ثانياً - اختبار التلازن المباشر :

- خفف المصل الضاد المتص في الفقرة (٢-٢-٦-٢-٢ أولاً) تخافيف عشرية مضاعفة باستعمال داريء الفوسفات الفسيولوجي وبحجم ٢٥ر٠ ملليتر . اضيف لكل تخفيف من هذه التخافيف حجم مساوٍ من العالق الجرثومي في انابيب شعرية . لوحظ التلازن الحاصل بعد ترك الانابيب ٤ ساعات بدرجة حرارة ٣٧ م ومن ثم ١٦-٢٠ ساعة بدرجة ٤م .

٢-٢-٧- تأثير المصل المضاد على تحول شكل المستعمرات النامية في وسط غراء المصل الطري Effect of antiserum on colonial morphology in Serum Soft agar

اجري الاختبار على وفق طريقة يوشيدا (Yoshida,971) حيث تم تحضير ١٠٠ ملليتر من وسط غراء المصل الطري بالطريقة المذكورة سابقاً (الفقرة ٢-١-٢) في ثلاث دورات منفصلة ، اضيف لاحدها المصل الضاد الموجب النوعي وللاخرى المصل الضاد المتص وللثالث المصل الضاد اللانوعي ، اضيف هذا الوسط الى الانابيب الملقحة ب٥٠ مايكروليتراً من التخفيف السادس لمزروع بعمر ١٨ ساعة للعزلة (١١) المناظرة . وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ١٨-٢٤ ساعة ، لوحظ بعدها شكل المستعمرات النامية في كلا الوسطين . وللسيطرة تم استعمال الوسط نفسه مضافا اليه المصل الطبيعي غير المنع .

٢-٢-٨ -امتصاص المصول المضادة مع متعدد السكريد المستخلص

Absorption of antiserum with extracted polysaccharide

استعملت طريقة شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1989) في امتصاص المصول المضادة الوجبة مع المستضد النوعي مع اجراء بعض التحوير في كمية المستضد وكالاتي :-

في انابيب شعرية مختلفة تمت اضافة ١ ملليتر من المصل المضاد لكل منها ، واضيف بعد ذلك الكميات الآتية من متعدد السكريد المستخلص كلاً على انفراد :

٥ر٠ ، ١ ، ٥ر٢ ، ٥ ، ١٠ ملغرام .

حضنت الانابيب بعد ذلك لمدة ساعتين بدرجة حرارة ٣٧ م ثم تركت بدرجة حرارة ٤م لمدة ١٨ ساعة ، ازيل الراسب بالمنبذة ٣٠٠٠دورة /دقيقه وحفظ العالق السائل بدرجة حرارة -٢٠ م لحين الاستعمال .

اعيد اجراء اختبار اوختر لوني للانتشار المناعي الثنائي في الهلام واختبار التلازن الدموي المباشر باستعمال الخلايا المحفظة المقتولة بالحرارة مع المصل المضاد المتص .

الفصل الثالث

النتائج

٣-١ جمع العينات وتشخيصها

تم الحصول على ٢٥٤ عزلة سريرية من العنقوديات الذهبية من مرضى باعمار واجناس مختلفة ومن مختلف الاماكن (الجدول ٢) وتم تشخيصها اعتماداً على مصنف بيركي (Sneath et at.,1986).

اظهر الفحص المجهري لجميع هذه العزلات كونها مكورات عنقودية ايجابية لملون غرام ، وقد تمكنت جميعها من النمو وتخمير سكر المانيتول على وسط غراء المانيتول الملحي وهو الوسط الاختياري لعزل العنقوديات ، كما كانت جميعها ايجابية لفحص الكتالاز والاسيتوين ومنتجة لانظيم مخثر البلازما الحر ومنتجة للانظيم حال الدنا والانظيم حال الدم من النوع بيتا و مخمرة لسكر الكلوكوز لاهوائياً وسالبة لفحص الاوكسيداز .

٣-٢- التحري عن العزلات المحفظة

تم وبالاعتماد على خصائص النمو في وسط غراء المصل الطري الحصول على ١٠٢ عزلة عنقوديات ذهبية من اصل ٢٥٤ لها القابلية على النمو بشكل منتشر في هذا الوسط وبأس هيدروجيني ٢ر٧ و ٨ر٤ في حين اظهرت ٨ عزلات منها قابلية على النمو بشكل منتشر في هذا الوسط بأس هيدروجيني (٢ر٧) لكنها تحولت الى الشكل التراص عند تنميتها في ذات الوسط وبأس هيدروجيني ٨ر٤ ، والتي تمثل عزلات منتشرة كاذبة (Pseudodiffuse isolates) وقد تم استبعاد مثل هذه العزلات عن العزلات المنتشرة المحفظة الحقيقية (Encapsulated isolates) ، وكان ل١٤٤ عزلة من مجموع ٢٥٤ القابلية على النمو وبشكل متراص في هذا الوسط وبكلتا دالتي الحموضة . النمو المختلف للعزلات موضح بالصورة رقم (١) .

وعندما اختبرت قابلية هذه العزلات على تكوين عامل التكتل ، كانت جميعها سالبة لهذا الاختبار ، في حين اظهرت الخلايا تحت المجهر الضوئي هالة شفافة واضحة ومميزة بين الخلفية والخلايا المصطبغة باللون الاسود عند تصبيغها بالحبر الهندي بطريقة التحميل الرطب ، (الصورة ٢) .

وقد كانت جميع هذه العزلات منتجة لانظيم محلل الدم من النوع بيتا عند تنميتها على الوسط الخاص بهذا الاختبار ، ويتضح ذلك من ظهور الهالة الشفافة حول المستعمرات النامية على وسط الغراء المغذي الحاوي على دم الانسان ، كما كان لكل العزلات القابلية على انتاج انظيم محلل الدنا على الوسط الخاص بهذا الاختبار .

الجدول (٢)
عدد ومصادر عزلات العنقوديات الذهبية

مصدر العينات	عزلات العنقوديات الذهبية		
	العدد الكلي	العنقوديات الذهبية المحفظة	
		العدد	النسبة المئوية (٪)
الحنجرة والبلعوم	٥٤	١٩	٣٥,١٨
الاذن	٣٦	١٥	٤١,٦٦
الانف	١٣	٦	٤٦,١٥
الادرار	١٥	٣	٢٠,٠٠
الدم	٣	١	٣٣,٣٣
السائل النخاعي الشوكي	١٤	٥	٣٥,٧١
الدمامل والتقرحات	١٤	٦	٤٢,٨٥
السائل المنوي	١٠	٣	٣٠,٠٠
المهبل	١٢	٥	٤١,٦٦
الحروق	١٥	٥	٣٣,٣٣
اخماج الجروح والعمليات	٦٨	٣٦	٥٢,٩٤
المجموع	٢٥٤	١٠٤	٤٠,٩٤

- تم الكشف عن وجود المحفظة بثلاث طرائق (التصبيغ بالحبر الهندي ، النمو المنتشر في غراء المصل الطري ، سالبية التفاعل لعامل التكتل) .

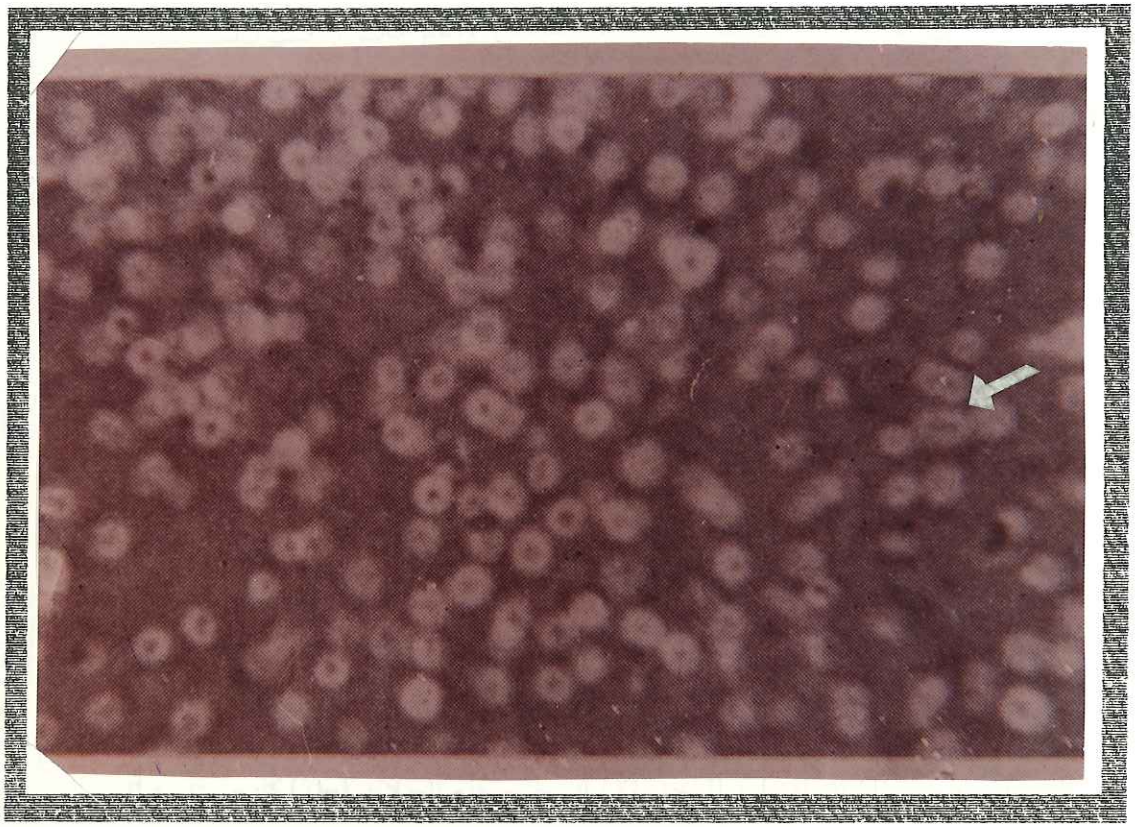
الصورة (١) :

طبيعة نمو ثلاث عزلات عنقودية ذهبية في وسط غراء الصل الطري ذو الاس الهيدروجيني ٧ر٢ و ٨ر٤ :

أ- عزلة غير محفظة

ب- عزلة منتشرة كاذبة

ج- عزلة محفظة حقيقية .



الصورة (٢) :

الخلايا الجرثومية لعنقوديات ذهبية بعمر ١٨ ساعة ، مصبغة بالحبر الهندي بطريقة التحضير الرطب (مكبرة ٣٠٠٠ مرة) .

⟵ خليتين جرثوميتين تقتسمان المحفظة نفسها .

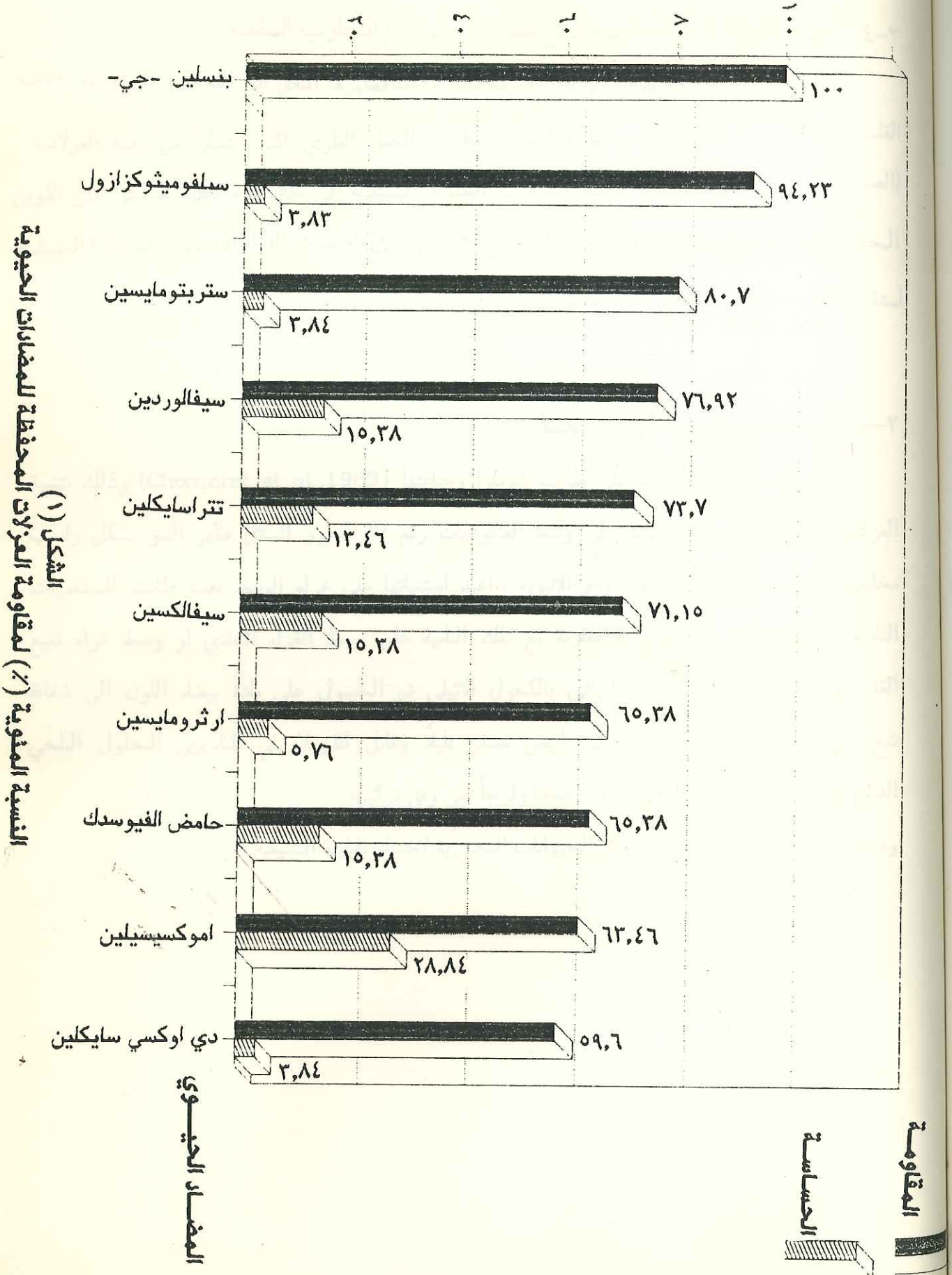
ويتبين من ملاحظة الجدول (٢) انّ نسبة العزلات المحفظة كانت ٩٤ر٤٠٪ وانّ اعلى نسبة من هذه العزلات كانت ضمن عزلات الجروح والعمليات ، ويليها الانف ثم الدمامل والتقرحات ، حيث كانت النسب ٩٤ر٥١٪ ، ١٥ر٤٦٪ ٨٥ر٤٢٪ على التوالي ، في حين ان اقل النسب تم الحصول عليها من عينات الادرار وكانت ٢٠٪ في حين كانت نسب المحفظة في العزلات المحفوظة والمعاد استنباتها لعدد من المرات على الغراء المغذي (٤٢ر٢١٪) . الملحق (١)

٣-٣- اختبار مقاومة العزلات المحفظة للمضادات الحيوية

اظهرت العنقوديات الذهبية المحفظة حساسية مختلفة لعشرة مضادات حيوية متوافرة ،محلياً والمثبتة في الجدول رقم (١) .

حيث تم الحصول على ٢٤ عزلة من اصل ١٠٤ (٠٧ر٢٣٪) مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستعملة . الشكل (-١-) . في حين اظهرت ٦عزلات منها (٧٦ر٥٪) مقاومة لتسعة من مجموع عشرة مضادات ، في الوقت الذي فيه ١٤ عزلة منها (٤٦ر١٣٪) مقاومة لثمانية مضادات حيوية .

يتبين من ملاحظة الشكل (١) و الملحق (٢) ان جميع هذه العزلات (١٠٠٪) كانت مقاومة للبنسلين -جي - ، وان ٣٣ر٩٤٪ منها مقاومة للسلفوميثوكزازول ويليها الستربتومايسين بنسبة مقاومة (٧ر٨٠٪) في حين كانت مقاومتها متساوية لكل من الارثرومايسين وحامض الفيوسدك (٣٨ر٦٥٪لكل منها) . وان اعلى حساسية لهذه المضادات كانت (٢٤ر٢٨٪) مع المضاد الحيوي الاموكسيلين ، كما كانت حساسية هذه العزلات متساوية لكل من السفالوردين والسيفالكسين وحامض الفيوسدك (٣٨ر١٥) لكل منها .



الشكل (١)
النسبة المئوية (٪) لمقاومة العزلات المحفظة للمضادات الحيوية

٣-٤- اختيار العزلة المنتخبة لاستخلاص متعدد السكريد والتجارب المناعية

اختيرت العزلة المحفظة رقم (١١) للاستخلاص وذلك لمظهرها السائل الى المخاطي على وسط خلاصة القلب والدماغ . كما كانت مستعمراتها النامية في وسط غراء العصل الطري اكثر انتشاراً من بقية العزلات (الصورة ٣) فضلاً عن مقاومتها لجميع الضادات الحيوية المستعملة الى جانب احتفاظها بقابليتها على تكوين المحفظة لعدد من مرات اعادة الاستنبات (اكثر من ٢٠ مرة) . كما اختيرت العزلة المحفظة رقم (٢٩) الحساسة لستة مضادات حيوية من مجموع عشرة مضادات .

٣-٥ - استخلاص متعدد سكريد المحفظة

تم الاستخلاص بالاعتماد على طريقة شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1989) وذلك بتنمية العزلتين (١١، ٢٩) كل على انفراد على وسط العنقوديات رقم ١١٠ المحور السائل فظهر النمو بشكل راسب مخاطي الشكل يصعب تفريقه عند رج الانبوبة ، اعيد استنباتها على غراء الوسط نفسه فكانت المستعمرات النامية مخاطية وذات لزوجة عالية مقارنة مع تلك النامية على وسط الغراء المغذي او وسط غراء نقيع القلب والدماغ ، وبعد الترسيب النهائي بالكحول الاثيلي تم الحصول على مادة بيضاء اللون الى شفافة نتج عن تجفيدها مسحوق ابيض الى ابيض مصفر قليلاً وقابل للذوبان في الماء وفي المحلول الملحي الفسيولوجي ، وان المحلول المائي له كان صافياً ولزجاً على وفق تركيزه .

وقد استعملت هذه المادة لاحقاً في حقن الحيوانات المختبرية لاختبار قابليته التمنيعية .

ب- أ-

الصورة (٣) :

طبيعة نمو العزلة (١١) في وسط غراء المصل الطري

أ- اس هيدروجيني ٧ر٢

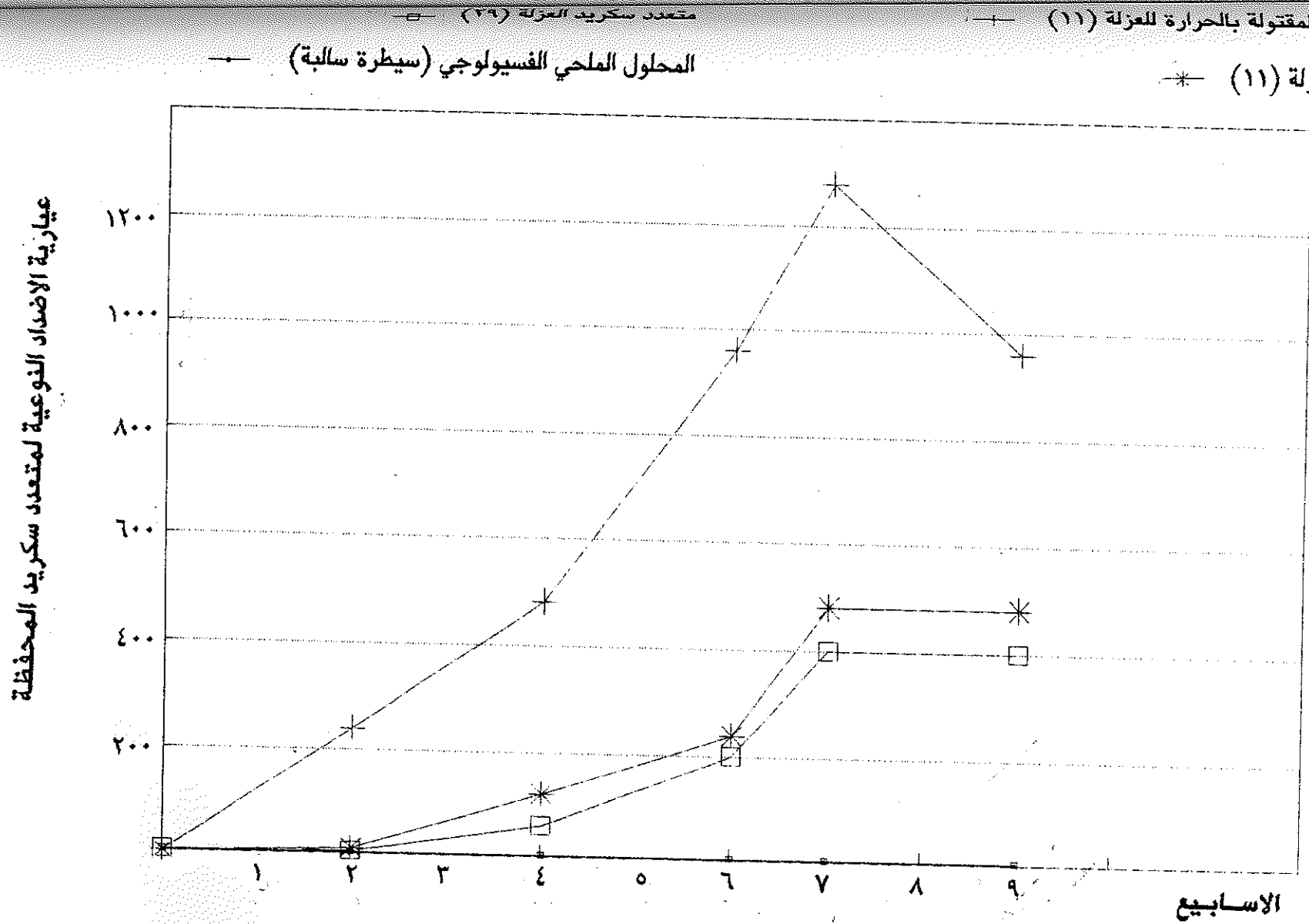
ب- اس هيدروجيني ٨ر٤

٣-٦- تحضير المصل المضاد للخلايا المحفظة ومتعدد سكريد المحفظة

يتبين من ملاحظة الشكل (٢) والملحق (٣) بدء الاستجابة المناعية في الاسبوع الثاني من حقن الارانب بالخلايا المحفظة حيث كانت عيارية الاضداد ٢٤٠ في حين كانت اقل بكثير في حالة متعدد السكريد المستخلص(١٠). كما نلاحظ تزايد الاستجابة المناعية في كلتا الحالتين باستمرار الحقن وبشكل واضح وبعد انتهاء مدة الحقن (خمسة اسابيع) وسحب الدم في الاسبوع السادس امكن الحصول على عيارية عالية في حالة الخلايا (٩٦٠) في حين كانت (٢٤٠) في حالة متعدد السكريد . وعند اعطاء الجرعة المنشطة في نهاية الاسبوع السادس تضاعفت عيارية الاضداد النوعية لتعدد السكريد المستخلص لتصل الى ٤٨٠ . في حين كانت الزيادة اقل ضد الخلايا المحفظة حيث اصبحت ١٢٨٠ ، كما نلاحظ في الشكل المذكور ثبوت هذه العيارية حتى الاسبوع التاسع في حالة متعدد السكريد في حين انخفضت بنسبة ضئيلة في حالة الخلايا المحفظة . لم يلاحظ فرق واضح في مدى الاستجابة لتعدد سكريد العزلة الحساسة للضادات الحيوية عن متعدد سكريد العزلة المقاومة لها حيث كانت ٤٠٠ في الحالة الاولى في نهاية الاسبوع السابع وبقيت كذلك حتى نهاية الاسبوع التاسع كما لم يلاحظ اية استجابة مناعية واضحة في الحيوانات المحقونة بالمحلول الملحي الفسيولوجي المستعمل كسيطرة .

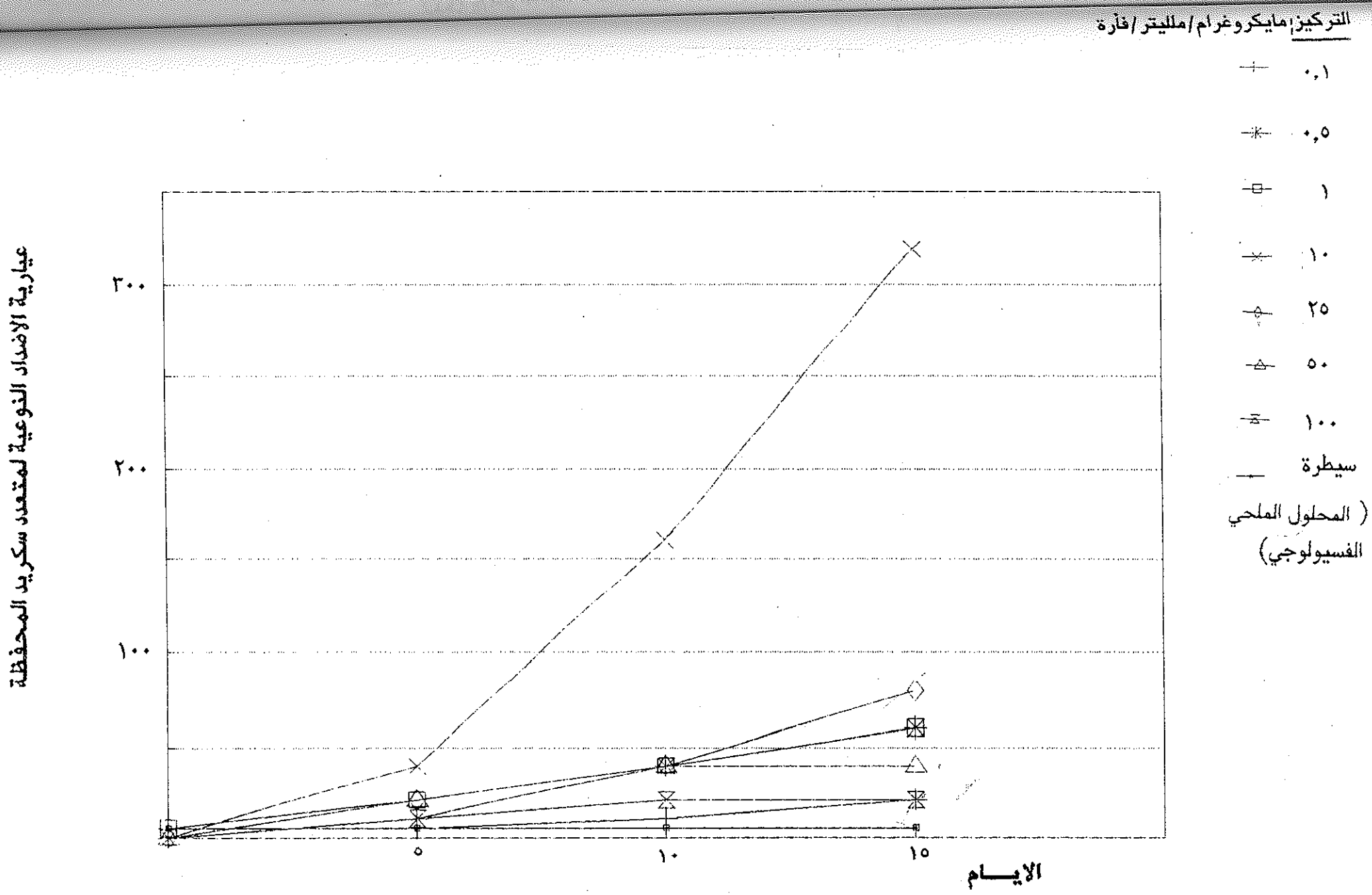
ولغرض دراسة قابلية الستضد التنيعية في الفئران ولتحديد التركيز الامثل للتنيع فقد قمنا بحقن مجاميع من الفئران بتراكيز معينة من الستضد لمدة ١٥ يوماً ، حيث يتبين من ملاحظة الشكل (٣) والملحق رقم (٤) ان افضل جرعة للتنيع كانت ١٠ مايكروغرام /ملليتر للفأرة الواحدة حيث اعطيت عيارية ٣٢٠ في حين لم تلاحظ استجابة مناعية واضحة مع التركيزات ١٠٠ مايكروغرام /فأرة او عند حقن المحلول الملحي الفسيولوجي كسيطرة .

كما ان زيادة الجرعة او نقصانها عن ١٠ مايكروغرام /ملليتر / فأرة اظهر استجابة مناعية اقل ، حيث كانت ٦٠ في حالة التركيزين ٠٫٥ و ١ مايكروغرام /ملليتر/فأرة و٨٠ و٤٠ لكل تركيز من التركيزين ٢٥، ٥٠ مايكروغرام/ملليتر/فأرة .



الشكل (٢)

الاستجابة المناعية في الارانب ضد متعدد سكريد المحفظة والخلايا المحفظة المقتولة بالحرارة للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية ومتعدد سكريد العزلة (٢٩) الحساسة للمضادات الحيوية



الشكل (٣)

الاستجابة المناعية في الفئران ضد متعدد سكريد المحفظة للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية

٣-٧ - اختبار الانتشار المناعي الثنائي في الهلام

لقد اظهر متعدد سكريد المحفظة المستخلص من العزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية خط ترسيب مفرداً واضحاً مع المصل المضاد النوعي مع الخلايا المحفّظة للعزلة نفسها .

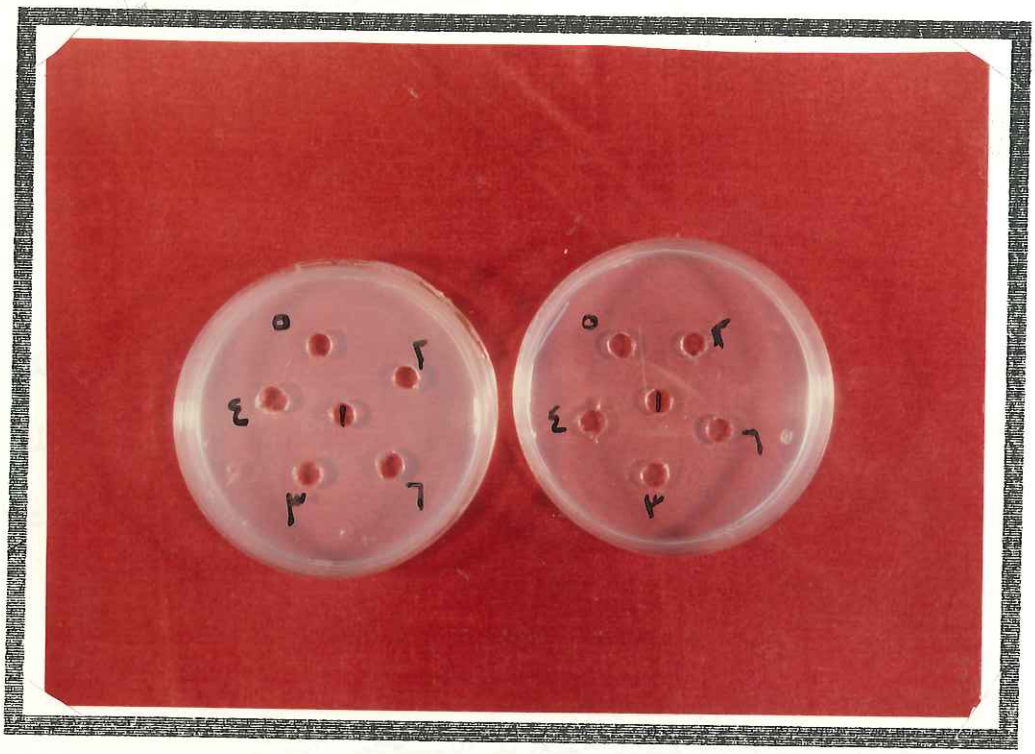
في حين لم يلاحظ اية خطوط ترسيب مع المستضد المعزول من العزلة (٢٩) الحساسة للمضادات الحيوية مع المصل النوعي لمستضد العزلة (١١) كذلك الحال مع المحلول الملحي الفسيولوجي المستعمل كسيطرة سالبة .

يظهر من ملاحظة الصورة (٤) ان المستضد المعزول من العزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية المحضر بتركيز ٥٠ مايكروغرام /ملليتر من المحلول الفسيولوجي قد ترسب وبشكل خط واضح مع المصل المضاد (غير المخفف) في حين لم يتكون اي خط ترسيب باستعمال التركيز ١٠٠ مايكروغرام /ملليتر .

كذلك الحال وبالتراكيز نفسها مع المصل المضاد النوعي المحضر ضد العزلة (٢٩) الحساسة للمضادات الحيوية عند اختباره مع المستضد الخاص به . وفي طبق السيطرة الذي استعمل فيه المصل الطبيعي غير المنع لم تلاحظ اي خطوط واضحة بين هذا المصل ومتعدد سكريد العزلتين اعلاه مع الخلايا المحفظة لهاتين العزلتين .

-أ-

-ب-



الصورة (٤) :

تفاعل الانتشار المناعي الثنائي للمصل المضاد لمتعدد سكريد العزلة (١١) .

أ- المصل غير المتص

ب- المصل المضاد لمتعدد السكريد بعد امتصاصه مع المستضد النوعي

الحفرة رقم :

١- المصل المضاد

٢- متعدد السكريد المحضر بتركيز ٥٠مايكروغرام /ملليتر

٣- خلايا العزلة (١١) المقتولة بالحرارة (١ x ١٠^{٨} خلية /ملليتر)

٤- خلايا العزلة (٢٩) المقتولة بالحرارة (١ x ١٠^{٨} خلية /ملليتر)

٥- متعدد سكريد العزلة (١١) المحضر بتركيز ١٠٠ مايكروغرام/ملليتر

٦- داريء الفوسفات الفسيولوجي

٣-٨ - تأثير المصل المضاد النوعي على تحول شكل المستعمرات النامية في وسط غراء المصل الطري

يتوضح من الصورة (٥) تأثير اضافة المصل المضاد النوعي الى وسط غراء المصل الطري بدلاً عن المصل الطبيعي . حيث يظهر واضحاً تحول المستعمرات للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية من الشكل المنتشر الى المتراص باستعمال المصل المضاد النوعي في حين احتفظت العزلة نفسها بقابليتها على النمو بشكل منتشر في الوسط ذاته عند اضافة المصل الطبيعي بدل المصل المضاد . وباستعمال المضاد اللانوعي المحضر ضد العزلة (٢٩) الحساسة للمضادات الحيوية .

كما لم يلاحظ اي تأثير للمصل المضاد لتعدد سكريد العزلة (١١) المقاومة للمضادات على شكل مستعمرات العزلة (٢٩) الحساسة لها عند اضافته لغراء المصل الطري شأنه شأن المصل الطبيعي . كذلك الحال مع المصل المضاد لتعدد سكريد العزلة (٢٩) . حيث لم يكن تأثيره واضح على شكل نمو مستعمرات العزلة (١١) النامية في الوسط نفسه . في حين كان التأثير واضحاً على مستعمرات العزلة (٢٩) .

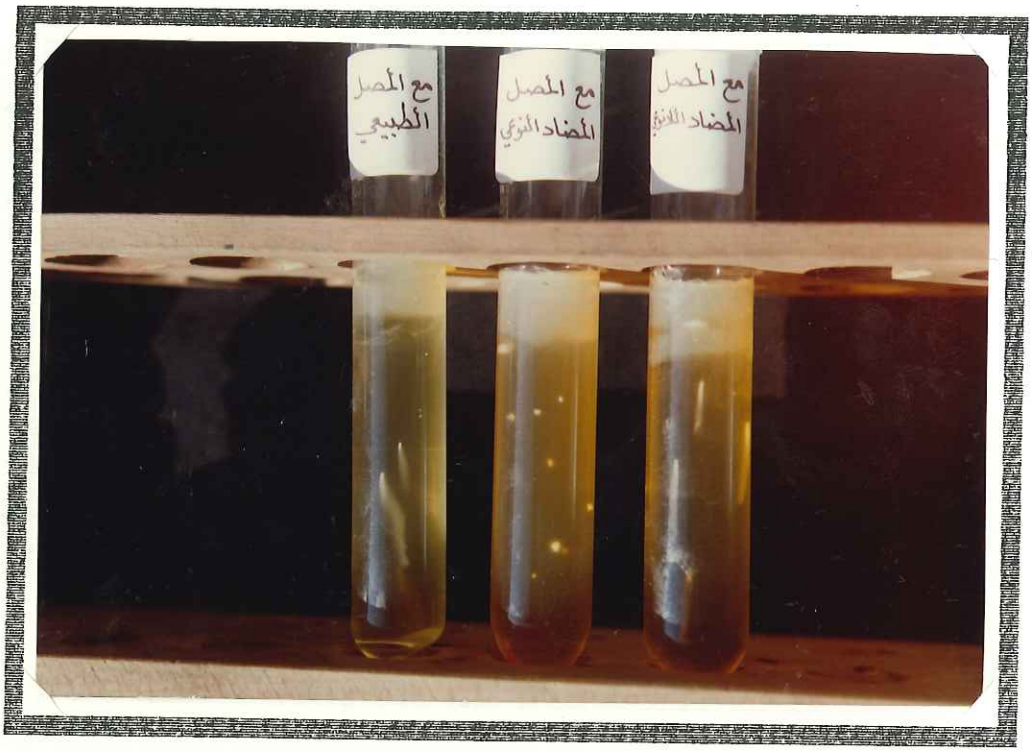
٣-٩- امتصاص المصول المضادة مع متعدد السكريد المستخلص النوعي

لقد تبين من نتيجة اضافة متعدد السكريد الى المصل المضاد النوعي للخلايا المحفظة وبعد التخلص من الراسب بالنبذ المركزي ، فقدان هذا المصل المضاد الموجب في اختبار التلازن المباشر لقابليته على تلازن الخلايا وبشكل واضح مع تركيز ٢ر٥ ملغرام/ملليتر . ويتبين من ملاحظة الجدول (٣) عدم وجود فرق بين المصل الطبيعي غير المنع وبين المصل الممتص مع المستضد الخاص به . في حين احتفظ المصل المضاد غير الممتص بقابليته على التلازن بالخلايا المناظرة وبعيارية عالية ، كما احتفظ هذا المصل بقابليته على التلازن عند اضافة المستضد بتركيز ٥ر٠ و١٠ ملغرام /ملليتر .

كما لم نلاحظ اية خطوط ترسيب واضحة في الهلام عند اعادة اجراء هذا الاختبار للمصل المضاد المعرض للامتصاص مع متعدد السكريد الخاص به ، توضح الصورة (٤) عدم وجود فعالية مصلية للمصل الممتص مع المستضد بتركيز ٥٠ و ١٠٠ مايكروغرام/ملليتر كذلك الحال مع الخلايا المحفظة للعزلة ذاتها .

كما لم يظهر هذا المصل اي تأثير على شكل المستعمرات للعزلة المناظرة النامية في وسط غراء المصل الطري المضاف اليه هذا المصل شأنه في ذلك شأن المصل الطبيعي غير المنع .

-أ- -ب- -ج-



الصورة (٥) :

تأثير المصل المضاد على تحول خلايا العزلة (١١) النامية في وسط غراء المصل الطري .

أ- مع المصل الطبيعي

ب- مع المصل المضاد النوعي

ج- مع المصل المضاد اللانوعي

الجدول (٣)
فحص تلازن العزلة المحفظة (١١) مع المصل المضاد النوعي الممتص وغير الممتص مع متعدد السكريد الخاص به

نـــــوع المصـــــل	مقلوب اعلى تخفيف للمصل					
	٤٠	٨٠	١٦٠	٣٢٠	٦٤٠	١٢٨٠
مصـل الارنـب الطبيـعي	-	-	-	-	-	-
مصل الارنب المضاد النوعي الممتص للعزلة ١١ المقاومة للمضادات الحيوية	-	-	-	-	-	-
مصل الارنب المضاد النوعي الممتص للعزلة ١١ المقاومة للمضادات الحيوية (غير الممتص)	++	++	++	+	+	+

- عدم وجود تلازن
+ وجود تلازن ضعيف
++ وجود تلازن واضح وقوي

الفصل الرابع

المناقشة

-٤-

٤- المناقشة

٤-١- جمع العينات وتشخيصها

جمعت ٢٥٤ عزلة من العنقوديات الذهبية من الستشفيات والمختبرات المذكورة آنفاً ومن اماكن واصابات مختلفة وتم تشخيصها اعتماداً على الصفات الفسلجية والكيمياحيوية .

ونتيجة لكثرة تكرار ووجود الجراثيم السرضة واهمية التركيب الكيمياوي لسطح الخلية الخارجي في الفوعة للعديد من هذه الجراثيم ، وحيث تمت الاشارة في العديد من النشريات السابقة الى وجود المحفظة في العديد من السلالات الغازية (Invasive strains) من العنقوديات الذهبية ، فأن طرائق تشخيص هذه الجراثيم يعد غاية في الاهمية (Karakawa et al.,1985) .

استخدمت تقنية نمو العزلات في وسط غراء الصل الطري بشكل موسع من اجل تشخيص العزلات المحفظة للعنقوديات الذهبية وعلى الرغم من ان ويت (Witte , 1957) ويوشيدا ومنگيشي (Yosida and Minigishi , 1976) قد لاحظوا خصائص بايولوجية اضافية مهمة في تشخيص هذه العزلات ، مثل فقدان القابلية على التنميط العاثي والصلي ، فضلاً عن السالبية لعامل التكتل ، الا ان اوبدبيك ونوركروس (Opdebeek and Norcross,1983) ونوركروس واوبدبيك (Norcross and opdebeek 1983), قاما مؤخراً بتمييز هذه العزلات اعتماداً على خصائص النمو المنتشر وسطغراء الصل الطري المحور عن وسط العنقوديات رقم ١١٠ . وعلى العموم يكون نمو العزلات غير المحفظة متراصاً في وسط غراء الصل الطري وهذا يعود لامتلاكها المادة المسؤولة عن تفاعل تكون المستعمرة المضغوطة (Compact Colony Forming Active Substance [CCFAS]) والتي هي عبارة عن متعدد سكريد مقترن مستقرة في الاس الهيدروجيني القاعدي (Yoshida et al. , 1977) التي لها القابلية على امتصاص عوامل تفاعل الصل (Serum reacting factor) والتي هي الفايبرينوجين ونكوصه (Fibrinogen and it's degradation) مؤدية بذلك الى تكون الخثرة وتراص المستعمرة حيث تم عدّها

المادة الثالثة المسؤولة عن تخثر الدم الى جانب انظيم مخثر البلازما وعامل التكتل (Yosida et al. 1980) ، وعلى العكس فان العزلات المحفظة تظهر بشكل منتشر يشبه الفارزة في هذا الوسط نتيجة لوجود المحفظة التي تغلف (CCFAS) وتبطل عملها مؤدية بذلك الى انتشار وتفكك المستعمرة النامية نتيجة لطراوة الوسط .

ان ظهور بعض العزلات التراصة ذات الذيل في جزئها النهائي يعد من المشاكل الاساسية لاسيما وان لمعظمها القابلية على التحول الى الشكل التراص في الوسط المذكور نفسه المحضر بأس هيدروجيني قاعدي (٨ر٤) وهذا ما لاحظته شومارا وجماعتها (Chomarat et al. , 1985) فضلاً عن ملاحظات يوشيدا وجماعته (Yoshida et al.,1969) السابقة عن تحول بعض العزلات التراصة الى المنتشرة عند تنميتها في الوسط المحضر بأس هيدروجيني حامضي (٦ر٤) ، وعليه فأن اجراء اختبار النمو في غراء الصل الطري وبأس الهيدروجين التعادل والقاعدي ضروري للتأكد من ان النمو المنتشر يعود لوجود المحفظة الحقيقية وليس بسبب تمسخ (Denaturation) مادة (CCFAS) التي تتأثر بالوسط الحامضي او الحامضي الضعيف . وعليه فقد تم استبعاد هذه العزلات التي اطلقت على مثلها شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1985) اسم العزلات المنتشرة الكاذبة (Pseudodiffuse isolates) تجنباً لسؤ الترجمة او التفسير فيما يتعلق بعلاقتها بالمحفظة ، لاسيما وان صور المجهر الالكتروني للعزلة MC31 المنتشرة الكاذبة التي درست من قبل هؤلاء الباحثين قد اكدت خلوها من المحفظة .

ان سالبية العزلات المحفظة لعامل التكتل يعود الى وجود المحفظة التي تغلف وتعيق فعل هذا العامل لاسيما وان غسل الخلايا الجرثومية ولاكثر من مرة يؤدي احياناً الى تحولها الى عزلات موجبة لهذا التفاعل(Yoshida and Ekstedt , 1968a) ، وعليه تؤيد نتائجنا استنتاجات شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1985) من ان طريقة النمو المنتشر في وسط غراء الصل الطري القاعدي قد تكون كافية في تشخيص مثل هذه العزلات على الرغم من ان عدم القابلية على التنميط العاثي والصلي قد تلاحظ بشكل واسع بين هذه العزلات ، كما ان استعمال الطرائق المجهرية في التشخيص اعتماداً على التصبيغ السالب بالحبر الهندي قد اظهر وبشكل لايقبل الشك وجود المحفظة من خلال الهالة الشفافة غير المصبوغة حول الخلايا والخلفية المصطبغة .

٤-٢- وجود المحفظة في عزلات العنقوديات الذهبية السريرية

بالاعتماد على مقاييس التحفظ (Encapsulation) المذكورة سابقاً تمكنا من الحصول على ١٠ عزلة محفظة من مجموع ٢٥٤ عزلة عنقوديات ذهبية (٤٠٩٤٪). حيث تماثل هذه النسبة ماتوصل اليه دزيارسكي (Dziaraski,1981) من ان المحفظة توجد في ٥-٤٥٪ من العزلات الفتية للعنقوديات الذهبية .

وان اعلى النسب للعزلات المحفّظة كان ضمن عزلات اخماج الجروح والعمليات وذلك لدور المحفّظة اكثر من بقية العوامل الاخرى في مقاومة البلعمة كرد فعل الجسم ضد غزو هذه الجراثيم ، (Bartell et al. 1962) حيث تبتلع الخلايا غير المحفّظة وتبقى تلك الحاوية على المحفظة او التي لـها القابلية على تكوينها اضافة لاهمية المحفظة كعامل مساعد في التصاق الجرثومة الى انسجة المضيف ومن ثم الاستيطان والتكاثر .

وعلى الرغم من ان روجرز (Rogers ,1966) قد توصل الى نسبة اقل بكثير (٠٫٤٪) الا انه لم يشر الى كـونه عـزلاته هذه كانت فتية اومعاداً استنباتها او الى عـدد مرات اعادة الاستنبات . لذا جاءت نتائجنا لتؤكد ما اشار اليه يوشيدا وجماعته (Yoshida et al.,1977) من ان النسبة العالية التي حصل عليها (٤٫٢٪) مقارنة مع روجرز تعود الى العزلات الفتية التي لم يعاد استنباتها لاسيما وان بعض العزلات ، التي قمنا بتشخيصها والتأكد من كونها عزلات محفظة فقدت المحفظة بعد اعادة استنباتها لعدد من المرات ، مختلف حسب قابلية هذه العزلات ، كما ان نسبة وجود المحفظة في العزلات المحفوظة التي تم الحصول عليها من الربيعي (١٩٩٣) المعاد استنباتها لمرات عديدة لغرض حفظها قد اظهرت نسبة وجود محفظة اقل حيث كانت (٢١٫٤٢٪) .

لقد اشار ايفلر (Iveler,1965) الى ان بعض العنقوديات الذهبية قد تمتلك محفظة خلال دورة الاصابة ولكن اما انه تفقدها خلال اعادة استنباتها على الاوساط الاصطناعية او انها تحتفظ بقابليتها على تكون المحفظة ولاتظهرها بشكل واضح على هذه الاوساط ، كما اشار دزيارسكي (Dziarski,1981) الى ان لكل العنقوديات الذهبية القابلية الوراثية (Genetic ability) لتكوين المحفظة وان تكوينها ظاهرياً يعتمد على ظروف التنمية ومرحلة الاصابة .

لقد حصل سمبولنسكي وجماعته (Sompolinisky et al.,1985) على ان (٩٠٪) من العـزلات المحفظة بين العزلات الفتية للعنقوديات الذهبية بالاعتماد على طريقة التنميط المصلي المحفظي (Capsular serotyping) مـع الحصـول المضـادة القيـاسية لتعدد سكريد العزلات الاحدى عشرة الاولية المحفظة على الرغم من ان هذه قد لاتكون ذات محفظة كبيرة وواضحة (Chomarat et al.,1989) . كما توصل اوبدبيك ونوركروس (Opdebeek and Norcross,1983) الى نسبة مقاربة (٩٣٪)

بالاعتماد على خصائص النمو في غراء الصل الطري لوسط العنقوديات رقم ١١٠ المحور ذي الاس الهيدروجيني المتعادل على الرغم من ان تحديد وجود المحفظة بمثل هذه الطريقة قد تشتمل على العزلات ذات النمو المنتشر الكاذب التي هي في الاصل غير محفظة .

كما ان الاختلاف في نسب العزلات المحفّظة يعود الى الطريقة المتبعة في التشخيص والاوساط الزرعية المستخدمة .

ان اشارة يوشيدا وجماعته (Yoshida et al.,1969) الى ان للعنقوديات الذهبية دورة حياتية داخل الجسم متمثلة بالشكل غير المحفظ الى المحفظ مروراً بالمحفظ الكاذب ، وكذلك اشارته ان محفظة بعض العزلات تكون غير ثابتة (Labile) فضلاً عن سرعة نمو المتغايرات المتراصة (Compact Variants) مقارنة مع نظاهرها المنتشرة ربما بشكل عائقاً في عزل هذه المتغايرات .

ان هذه التقارير المتناقصة تشير الى ان غالبية العنقوديات الذهبية لاتنتج محفظة كبيرة بل ان البعض منها ينتج مايعرف بالمحفظة الدقيقة (Microcapsule) التي تحوي كمية قليلة من مادة المحفظة .

حيث اكدت دراسة قام بها لي وجماعته (Lee et al.,1987) بالاعتماد على الطرق المصلية ان ٧٦-٩٠٪ من العنقوديات الذهبية تنتج محفظة دقيقة ، كما ان عزلات العنقوديات الذهبية الشبيهة بعزلة MC31 ذات النمو المنتشر الكاذب قد تكون منتشرة في البيئة الطبيعية ، كما ان الاصابة بمثل هذه العزلات يكون شائعاً (Chomarat et al.,1989) .

٤-٣- أستخلاص متعدد سكريد المحفظة

ان من اهم اسباب التحري عن وجود المحفظة في الكائنات المجهرية هو لتوضيح دورها في امراضية الكائنات التي تمتلكها . وعلى مدى هذا الافتراض فأن الكشف عن وجودها يمكن الباحثين من عزل المستضد المحفظي ، لغرض دراسة الصفات الكيمياوية والمصلية والمناعية .

ولعل من دواعي الدقة في محاولة عزل مستضد المحفظة قدرة هذا المستضد على امتصاص عينة المصل المضاد النوعي القادر على اعطاء تفاعل المحفظة النوعي وان يكون له القدرة على تقليل هذا التفاعل . واعتماداً على هذا الاختبار يمكن التأكيد على نجاح عملية عزل مستضد المحفظة (Wiley,1972) .

تم عزل مستضد المحفظة اعتماداً على طريقة شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1989) وذلك لسهولتها وتوافر المواد المستعملة فيها .

نميت العزلات المستخدمة في الاستخلاص في وسط العنقوديات رقم ١١٠ المحور وذلك من اجل تحفيزها على انتاج مادة محفظة اكبر في هذا الوسط الحاوي على اللاكتوز والمانيتول وكلوريد الصوديوم والشابه في تركيبه لوسط العنقوديات ١١٠ (Yoshida and Ekstedt ,1968a)

أظهرت العزلات النامية في هذا الوسط مخاطية عالية مقارنة مع تلك النماة على وسط الغراء الغذي او وسط غراء نقيع القلب والدماغ . وهذا يماثل ماتوصل اليه يوشيدا وأكستدت (Yoshida and Ekstedt ,1968a) وشومارا وجماعتها (Chomarat et al. , 1989) ، وتجدر الاشارة الى ان هذه الحالة مشابهة لحالة التحفظ الكاذبة الموصوفة من قبل سال وجماعته (Sall et al.,1961) عدا كون الوسط لا يحوي الهلام وان كلوريد الصوديوم اساسي بنسبة ٣٪ .

كان الناتج النهائي بعد التجفيد عبارة عن مسحوق ابيض مصفر قليلاً وقد اشار العديد من الباحثين مسبقاً الى اختلاف الظروف المثلى لظهور انتفاخ واضح للمحفظة عند اجراء تفاعل المحفظة النوعي للعزلات المحفظة مع الصول المضادة النوعية والى كون غالبية الجراثيم لاتظهر انتفاخاً محسوساً للمحفظة ، فضلاً عن عدم تمكن هؤلاء الباحثين من الحصول على ايجابية لهذا التفاعل مع العزلات التي قاموا بدراستها (Tomcsik,1956 ; Morse, 1962 ; Fournier et al.,1984) لذا لم يتم اعتماد هذا التفاعل في تحديد موقع المستضد المعزول ، عليه وللتأكد من موقع المستضد المعزول وتحديد علاقته بالمحفظة ، كونه يمثل بالفعل مستضد سطح العنقوديات المحفظة وليس اي مكون آخر من مكونات سطح الخلية الجرثومية فقد قمنا بدراسة تفاعل التلازن المباشر للخلايا المحفظة مع الصول المضادة النوعية بعد امتصاص هذا الصول مع المستضد المعزول من العزلة الناظرة . ان فقدان هذه الصول لقابليتها على ملازنة الخلايا شأنها في ذلك شأن الصل الطبيعي غير المنع لدليل واضح على موقع هذا المستضد ، حيث تطابق هذه النتائج ماتوصل اليه مورس مسبقاً (Morse,1962) بدراسته لمستضد سطح العنقوديات (SSA) المعزول من عزلة سمث المحفّظة .

٤-٤- الخواص المناعية والمصلية لمتعدد السكريد

لقد قام عدد من الباحثين (Kayhty et al.,1983 ; Wilkinson,1983 ; Cryz et al.,1984) بدراسة متعدد سكريد المحفظة للعديد من الجراثيم لمعرفة دورها في الامراضية وامكانية استعمالها كلقاحات مرشحة .

لقد أظهرت الارانب المحقونة بالمستضد المعزول استجابة مناعية واضحة وصلت الى ٤٨٠ بعد اعطاء الجرعة المنشطة في حالة متعدد سكريد العزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية والى ٤٠٠ في حالة متعدد سكريد العزلة (٢٩) الحساسة لهذه المضادات على الرغم من ان هذه العيارية تعد جيدة الا ان استعمال الخلايا المحفظة كاملة الحقن بعد قتلها كان افضل في تحفيز الاستجابة المناعية وهذا يتفق مع العديد من

الدراسات السابقة ; Ekstedt ,1963 a; b; Lee et al.,1988 ; (Fisher,1960 Chomarat et al.,1989) حيث كانت هذه الحالة (١٢٨٠) .

ظهر في دراستنا الناتجة عن حقن متعدد السكريد المعزول من العزلة (١١) عيارية واطئة (٤٨٠) بالمقارنة مع ماتوصل اليه لي وجماعته (Lee et al. , 1987) التي كانت ١٨٠٠ في المصل المضاد لمتعدد سكريد العزلة (SAI Mucoid) باستعمال طريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالخميرة غير المباشرة (Indirect enzyme liked immunosorbent assay) الاكثر حساسية مقارنة مع طريقة التلازن الدموي السالب ، كما ان استخدام الكروموتوكرافيا والتبادل الايوني لزيادة التنقية للمستضد المستخلص من قبل هؤلاء اسهم بشكل واضح في زيادة الاضداد النوعية ، لاسيما ان المادة الخام التي عمل عليها ويلي ووناكوت (Wiley and Wonnacott ,1962) اعطت عيارية مقدارها ١٦:١ بعد شهرين من الحقن الى جانب اتباعهم طريقة تفاعل المحفظة النوعي الاقل حساسية في معايرة المصول المضادة .

ومن نتائج ماتوصلنا اليه نبين ان متعدد السكريد ممنع جيد في الارانب وللتحري عن مدى الاستجابة المناعية لمتعدد السكريد المعزول في الفئران وتحديد جرعة التمنيع المثلى في الفئران فقد تم حقن مجاميع منها بجرع مختلفة من المستضد المعزول فكان المستضد ممنعاً جيداً وبتركيز ١٠ مايكروغرام /ملليتر لكل فأرة حيث اعطى اعلى عيارية وقدرها ٣٢٠ . وان زيادة الجرعة الى ١٥٠ و ١٠٠ ملغرام /ملليتر للفأرة الواحدة لم تظهر استجابة واضحة . ان هذه الجرعة كانت اعلى ماتوصل اليه مورس (Morse , 1962) . باستعمال مستضد سطح العنقوديات [Staphylococcal Surface antigen (SSA1)] حيث كان ار٠-١ مايكروغرام /فأرة كافية لحماية هذه الفئران ضد التحدي القاتل (Lethal challenge) بالكائنات المناظرة . وان زيادة الجرعة اونقصانها اظهر استجابة مناعية اقل .

في حين اشارت شومارا وجماعتها (Chomarat et al.,1989) الى ان ٣٠٠ مايكروغرام /ملليتر من المستضد المعزول من العزلة (MC31) كانت كافية لتوفير الحماية للفئران المحقونة بالكائنات المناظرة .

ومن الجدير بالذكر ان هذا التفاوت في مقدار الاستجابة المناعية في الحيوانات المختبرية ربما يعود الى اختلاف التركيب الكيمياوي لمتعدد سكريد العزلات المحفظة التي قام هؤلاء الباحثون بدراستها وان العزلة التي درست من قبلنا ربما تعود الى نمط محفظي مختلف ، حيث اشار كاراكاوا وجماعته

(Karakawa et al.,1985) بالاعتماد على التنميط المصلي المحفظي (Capsular serotyping) الى وجود احد عشر نمطاً محفظياً مختلفاً في سيادتها المناعية (Immuno-dominant) لاسيما ان المصل المضاد لتعدد السكريد المستخلص من العزلة المحفظة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية لم يظهر خطوط ترسيب مع مستضد العزلة المحفظة (٢٩) الحساسة لهذه المضادات في اختبار الترسيب المناعي في الهلام . في حين كان للمصل المضاد نفسه القابلية على الانتشار والترسيب مع المستضد النوعي له وهذا ما يتفق مع العديد من الدراسات السابقة (Morse ,1962 ; Lee et al.,1987)

٤-٥- تأثير المصل المضاد على تحول شكل المستعمرات النامية في وسط غراء المصل الطري

لغرض التوسع في دراسة خصوصية المصل المضاد المحضر فقد قمنا بدراسة تأثير المصل المضاد على تحول شكل الخلايا النامية في هذا الوسط ، وتأثير امتصاص هذه الصول المضادة الموجبة مع المستضد النوعي لها ادت اضافة المصل المضاد غير الممتص للوسط الى تحول شكل مستعمرات العزلة الناظرة من المنتشر ه الى التراصة . وهذه النتائج تتفق مع ماذكره مورس (Morse , 1962) ويوشيدا (Yoshida , 1971) . ان التأثير الناتج يعود الى التفاعل الحاصل بين المستضد والضد النوعي له (Eda and Iwata , 1968).

حيث ان وجود اضداد المحفظة في المصل المضاد ادت الى معادلة فعل المحفظة المغلفة للمادة المسؤولة عن تفاعل تراص المستعمرة [Compact Colony Forming Active Substance (CCFAS)] التي تعمل على الفايبرينوجين ونكوصه لتكوين الخثرة ومن ثم المستعمرة التراصة (Compact colony) ، لاسيما وان امتصاص هذه الصول مع متعدد السكريد الخاص به ادى الى فقدان هذه الصول لتأثيرها على شكل النمو في هذا الوسط شأنها في ذلك شأن المصل الطبيعي غير المنع وهذا يؤيد ماذكره يوشيدا واكستدت (Yoshida and Ekstedt ,1968b) حول فقدان الصول المضادة بعد امتصاصها مع المستضدات الخاصة بها لخاصية الوقاية المنفعلة المقدمة من قبل هذه الصول . كما اشار يوشيدا واكسدت (Yoshida and Ekstedt,1968b) ونوركروس (Norcross , 1977) الى ان المقاومة التي يمكن نقلها انفعالياً (Passively) في الحيوانات المختبرية تعود الى وجود المقبلات (Opsonins) الموجودة في الكلوبيولينات المناعية IgG1, IgG2 ، على الرغم من ان يوشيدا وجماعته

(Yoshida et al.,1979) ويوشيدا واشيمان (Yoshida and Ichiman, 1984) قد اشاروا الى اهمية الكلوبيولينات المناعية نوع IgM اكثر من IgG كعوامل مقاومة العنقوديات الذهبية في الانسان والحيوانات المختبرية .

٤-٦- حساسية العزلات المحفظة للمضادات الحيوية

استخدمت عشرة انواع من المضادات الحيوية المستخدمة محلياً لاختبار تأثيرها على العنقوديات الذهبية الفتية المنتجة للحفظة . لقد بينت النتائج ان معظم العزلات اظهرت مقاومة لضادين او اكثر وان ٢٣٫٠٧٪ منها كانت مقاومة لجميع المضادات المستعملة . لقد اشار تاونسيند وجماعته (Townsend et al.,1984) الى ان بعض عزلات العنقوديات الذهبية تكون مقاومة ل ٢٠ مضاداً حيوياً .

وكما كانت مقاومة الجراثيم المعزولة ١٠٠٪ للبنسلين -جي-وهذا يتفق مع العديد من الدراسات السابقة (١٩٩٣ ، دواف ; Ang et al.,1985 ; Ma et al.,1983 ; Barber , 1961) ، كما تم تسجيل مقاومة العنقوديات الذهبية للشيلين بعد مدة قليلة من بدء استعماله .

وان مقاومة العنقوديات الذهبية للبنسلينات شبه المصنعة مثل الاوكزاسيلين والشيلين اصبح من المشاكل السريرية والوبائية (Haley et al. , 1982 ; Boyce et al. , 1983) .

وتعود بعض مقاومة العنقوديات الذهبية للبنسلين الى امتلاكها لانظيم البنسليناز في حين يمتلك البعض الآخر مقاومة طبيعية للبنسلينات والسيفالوسبورينات (Sabath , 1982) .

كما ان الجراثيم المعزولة كانت مقاومة للتتراسايكلين بنسبة (٧٣٫٠٧٪) وربما تعود قابلية هذه العزلات على مقاومة هذا الضاد الحيوي لقابلية متعدد السكريد على اختزال النفاذية الخلوية لهذا الضاد (Franklin , 1977, William ,1983) .

لقد اصبح من الشائع عزل مثل هذه الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية نتيجة الاستعمال الواسع والخاطئ لعدد كبير من المضادات الحيوية ، حيث اشار العديد من الباحثين الى العلاقة الواضحة بين الاستخدام الواسع للمضادات الحيوية في المستشفيات وانتشار السلالات المقاومة لها (Davis and Masten,1974 ; Meyer et al. ,1976 ; Ma et al.,1983) .

لقد اشار فورنير وجماعته (Fournier et al.,1987) الى وجود العلاقة بين النمط المحفظي والمقاومة لبعض المضادات الحيوية ، وان ٤٨٪ من العزلات المحفظة ذات النمط المحفظي الخامس كانت مقاومة للاوكزاسيلين في حين كانت العزلات ذات النمط الثامن اقل مقاومة لهذا الضاد (٥٪) فقط .

كما اشار الى انتشار هذين النمطين بين العزلات السريرية حيث يشكلان اكثر من (٧٠٪) من مجموع الانماط المحفظية السائدة (Arbiet et al. , 1984 ; Nelles et al. , 1985) وهو بهذا يؤشر الى ان التنميط المحفظي للعزلات السريرية قد يسهل اختيار الخط الاولي للعلاج بالمضادات الحيوية .

كما ان المقاومة العالية للمضادات الحيوية في العزلات المحفظة تبين اهمية اجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية قبل اتخاذ العلاج فضلاً عن اهمية هذا الاختبار في تحديد مصدر الاصابة ، على الرغم من وجود طرائق اخرى مكملة مثل التنميط العاثي والمصلي .

كما اشار الى انتشار هذين النمطين بين العزلات السريرية حيث يشكلان اكثر من (٧٠٪) من مجموع الانماط المحفظية السائدة (Arbiet et al. , 1984 ; Nelles et al. , 1985) وهو بهذا يؤشر الى ان التنميط المحفظي للعزلات السريرية قد يسهل اختيار الخط الاولي للعلاج بالمضادات الحيوية .

كما ان المقاومة العالية للمضادات الحيوية في العزلات المحفظة تبين اهمية اجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية قبل اتخاذ العلاج فضلاً عن اهمية هذا الاختبار في تحديد مصدر الاصابة ، على الرغم من وجود طرائق اخرى مكملة مثل التنميط العاثي والمصلي .

الاستنتاجات

١- توجد المحفظة في (١٥٪٤٠٪) من عزلات العنقوديات الذهبية الفتية وبنسب اقل (٤٢ر٢١٪) في العزلات المحفوظة المعاد استنباتها لمرات عديدة وذلك اعتماداً على الطرائق المستخدمة في الدراسة .

٢- تفقد العزلات المحفّظة قابليتها على الاحتفاظ بالمحفظة خلال اعادة الاستنبات على الاوساط الزرعية وبشكل متفاوت .

٣- وجود اكثر من نمط محفظي ضمن العزلات السريرية المحلية .

٤- اظهرت هذه العزلات مقاومة عالية للمضادات الحيوية حيث كانت جميعها (١٠٠٪) مقاومة للبنسلين -جي- وان ٠٧ر٢٣٪ منها كانت مقاومة لعشرة مضادات حيوية . كما ان ٧٦ر٥٪ منها كانت مقاومة لتسعة من مجموع عشرة مضادات حيوية مستعملة .

٥- اثبت متعدد السكريد المستخلص فاعليته في تحضير الاجسام المضادة ضد العزلات المحفّظة في حين ان استعمال الخلايا المحفظة في تمنيع الحيوانات المختبرية كان افضل في تحفيز الاستجابة المناعية لتكوين اضداد متعدد السكريد .

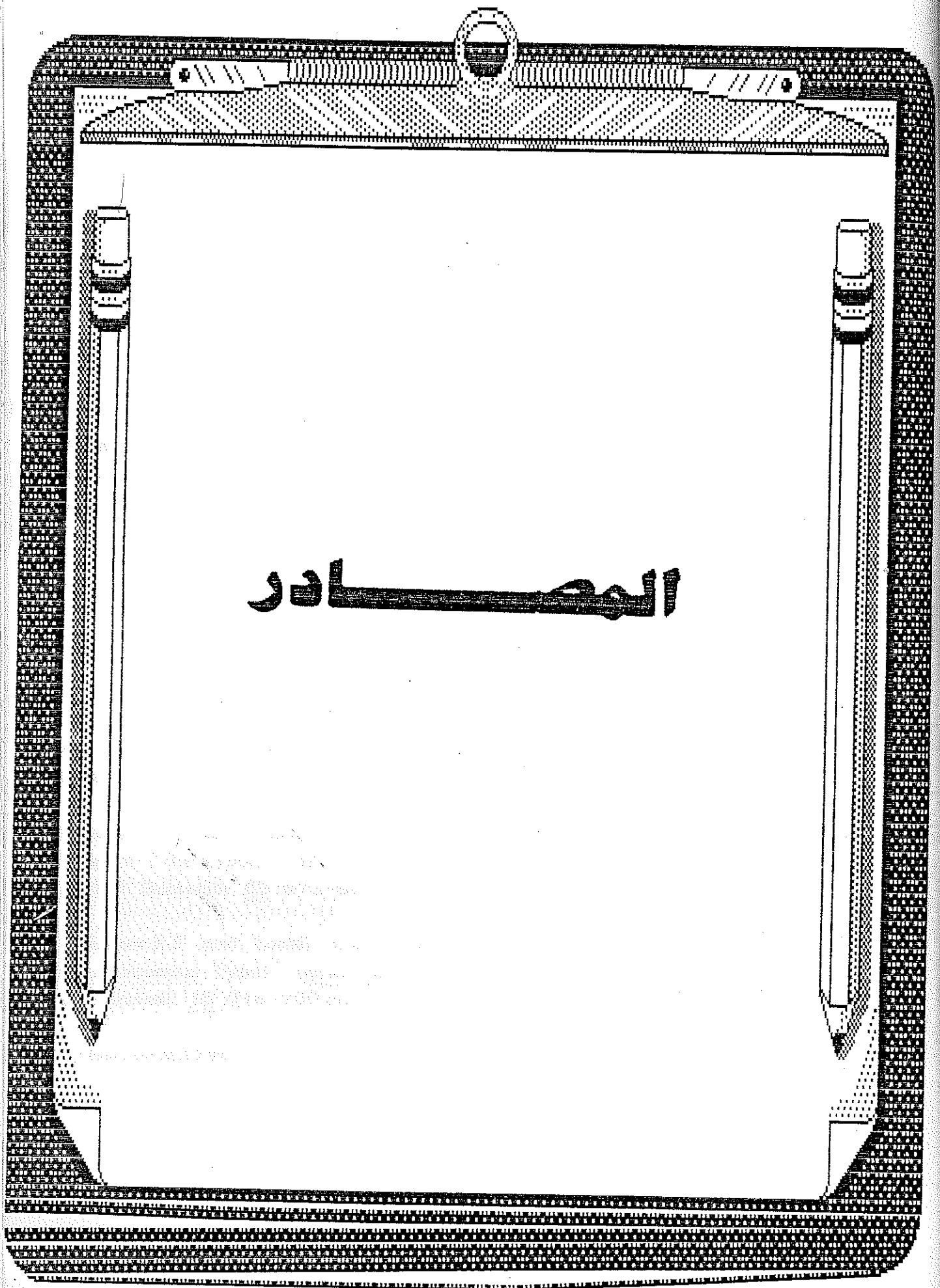
التوصيات

١- بالنظر للمقاومة العالية التي اظهرتها العنقوديات الذهبية المحفّظة للمضادات الحيوية المستخدمة فاننا نوصي بضرورة اجراء فحص حساسية العنقوديات الذهبية للمضادات الحيوية قبل اعطاء العلاج .

٢- ان تشخيص العزلات السريرية المحفّظة ومتعدد سكريد المحفظة للعنقوديات الذهبية يمكن ان يعطي بعداً جديداً في دراسة امراضية هذه الجراثيم ويهيئ الفرصة لافكار جديدة في منع هذه الاصابات .

٣- بالاعتماد على قابلية متعدد السكريد على تحفيز تكون الاجسام المضادة بالامكان التوسع في دراسة تأثير هذه الاضداد في الحماية من اصابات العنقوديات الذهبية على الرغم من ان التنميط المحفظي قد لايكون كافياً لدراسة الوبائية الا انه وبالاقتران مع التنميط العاثي قد يعطي دليلاً كافياً على مصدر الاصابة .

٥- دراسة الانواع المحفظية السائدة بين العزلات السريرية ومعرفة تراكيبها الكيمياوية وعلاقتها بامراضية هذه العزلات ، وعلى الرغم من ان التطبيقات الوبائية للاضداد وحيدة النسيلة قد تكون محددة الا ان هذه الاضداد قد تكون اداة مناسبة للتشخيص في العيادات السريرية ، على سبيل المثال في التشخيص السريع للاصابة العميقة بوساطة التحري المباشر عن متعدد سكريد المحفظة في السوائل الجسمية .



المصـــــادر

References

* Alami,S.Y. and Kelly,F.C.(1959) .Demonstartion of staphylococcal clumping factor and free coagulase in soft agar media .J. Bacteriol. 78;539-543.

* Alami,S.Y. and Kelly,F.C.(1960). Infleunce of coagulase and route of injection on staphylococcal virulence. proc. soc. Exptl. Biol. Med. 105:589-591 .

* Albus, A.; Fournier,J.M; Wolz,C., Boutonnier,A.; Rank,M.; Hoiby,N., Hochkeppel,H. and Doring ,G.(1988). Staphylococcus areus capsular types and antibody response to lung infection in patients with cystic fibrosis.J. Clin.Microbiol.26:2505-2509 .

* Aly,R.; Shinefield,H.R.; Litz,C.and Miabach.H.I.(1980). Role of teichoic acid in the binding of staphylococcus aureus in man.J.infect.Dis. 141:463-465 .

* Ang,O.;Isirkan,M. and Gurener,Z.(1985). Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens in Istanbul.In:The staphylococci (Jeljaszewicz.,J.,ed.). zbl.Bakt.(suppl.14). Gustav Fisher,velarg stuttgard ,New York,pp.483-486 .

* Arbeit ,R.D.; Karakawa,W.W.; Vann,W.F., and Robbins,J.B.(1984). predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinicat isolates of staphylococcus aureus. Diagn.Microbiol. Infect. Dis. 2:85-91

* Baehr G., and Kantor.J.(1912). Cbl.Bakt. Abt.I, orig., Ixil,120 Cited by: Duguid , J.P.(1951). The demonstratin of bacterial capsules and Slime.J. pathol. Bacteriol. 63 :673-685 .

* Baker,R.F and Loosli, C.J.G.(1966). The Ultrastructure of encapsulated penmococcus Type1 befave and after exposuve to type specific antibody . lab . Invest. 15 :716-730 cited by. Wiley, 1972 .

* Barber,M.(1961). Hospital infection Yesterday and today .J.clin.path . 14:2-9 .

* Baron,E.J. and Finegold, S.M.(1990). Hospital epidemiology . In:Baily and Scotts . diagnostic microbiology . 8th ed. The C.V.Mosby Co., U.S.A., pp.36-45.

* Bartell,P.E.; Orr, T.E.; Geffen,A. and loria, P. (1962). Experimental infection of mice with Staphylococcus aureus :evidence against alphatoxin and the large size of the bacterial population as determinants of lethality. J.infect.Dis. 118 :481-490 .

* Bauer,A.W.; Kirby M.M.; Sheeris ,J.C. and Turck,M. (1966). Antibiotic Susceptibility testing by astandarized single disc method.Am.J.Clin.Path 45 :493-496 .

* Boyce, J.M.; White ,R.L. and Spruill, E.Y.(1983). Impact of methicill-inresistant Staphylococcus aureus on the incidence of nosocomial Staphyloccal infections .J.Infect.Dis. 148 :760-768.

* Boyden,S.V.(1951). The Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by antiprotein sera.J.Exptl.Med. 93 :107-120.

* Butler,W.T. (1963). Haemgglutiuation studies with formalinized erythrocytes. Effect of Bis-diazobenzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen.J. Immunol. 96 :663-671 .

* Chatterjee,A.N.(1969). Use of bacteriophage resistant mutants of study the nature of the bacteriophage recoptor site of Staphylococcus aureus .J.Bacteriol. 98 :519-527 .

* Chomarat,M.; Ichiman,Y. and .Yoshida,K.(1985). pseudsdiffuse -type growth of a Staphylococcus aureus strain in serum soft agar. J. Clin, Microbiol. 22 :132-133 .

*Chomarat ,M.; Ichiman, Y. and Yoshida ,K.(1989). protection of mice by apseudodiffuse strain of Staphylococcus aureus possessing polyvalent capsular type antigen .Med.Microbiol. 28 :129-136 .

* Clark.H.F. and Shepard,C.C.(1963). Adialysis technique for preparing flourescent antibody. virology, 20 : 642-644.

* Cohen,J.(1986), Medical microbiology. 2nd edd.p:360. Addison-Wesley, Inc. (California),U.S.A

* Cohen, Z.A. and Morse,S.I(1959). Interaction between rabbit polymar-phonuclear leucocytes and Staphylococci.J.Exptl. Med.110 419-443.

* Cohen,J.O. and Smith,P.B.(1964). Serological typing of Staphylococcus aureus. II TYping by slide agglutination and comparison with phage typing.J.Bacteriol. 88 :1364-1371 .

* Cowan, S.T.(1939). Classification of Staphylococci by slide agglutination .J.Pathol. Bacteriol. 48 :169-173 .

* Coyette , J. and Ghuysen, J.M.(1968). Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus, strain copenhagen IX.Teichoic acid and phage adsorption. Biochemistry., 7 :2385-2389 .

* Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P. and Swain, R.H.A. (1975). Medical microbiology. Vol.2,12th.edd. Churchil Livigstone, Edinburgh, London, NewYork .

* Cryz,S.J.; Furer,E. and Germanier, R. (1984). Experimeutal Klebsiella pneumoniae-burn wound sepsis role of capsular polysaccharide. Infect. Immun. 43 :440-441.

* Davis ,T.J. and Masten,J.M.(1974). Prevalence and characteristics of Klebsiella species :Relation to association with ahospital environment .J. Infect.Dis., 130 :402-405 .

* Duguid ,J.P. (1951). The demonstration of bacterial capsules and Slime.J. pathol.Bacteriol. 63 :673-685 .

* Duthie,E.S. (1954). Evidence for two froms of Staphlococcal coagu lase .J. Gen. Microbiol. 10 : 427-438 .

* Dziarski , (1981).Effectof Staphylococcal cell wall product on immunity .In Friedman, et al. (ed.) .pp:95-134. Immuno, modulation by Bacteria and their product ,plenum,New York .

* Eda,T. and Iwata, K. (1968). Studies on unique staphlococcal strains exhibiting high virulence for mice by intraperitoneal inoculation .5. Serological properties .Jap.J.Bacteriol. 23 :692-699 .

* Ekstedt, R.D.(1963a). Studies on immunity to Staphylococcal infection in mice .I.Effect of dosage, viability and internal between immunization and challenge on resistance to infection following injection of whole cell vaccines .J. infect Dis. 112 :143-151 .

* Ekstedt, R.D.(1963b). Studies on immunity to Staphylococcal infection in mice II.Effect of immunization with fractions of Staphyloccus aureus prepared by physical and chemical methods.J. infect.Dis. 112 :152-157 .

* Finegold.S.M. and Baron, E.J.(1986). Methods for testing antimicrobial effectiveness in:Baily and Scotts diagnostic microbiology. 7th. ed.The C.V. Mosby Co. Westline Industrial Drive,st,Louis,Missuri,U.S.A .

* Finkelstein ,R.A. and Sulkin ,S.E.(1958). characteristics of coagulase positive and coaulase negative Staphylococci in serum soft agar .J.Bacteriol. 75 :339-344 .

* Fisher, S.(1952). The estimation in vitro of small amounts of diphtheria antitoxin by means of a haemagglutination technique .J. Hyg. (london) 50 :445-456 .

* Fisher,S. (1960). A heat stable protective Staphylococcal antigen . Austratian .J.Exptl.Biol. Med.Sci. 38 :479-485 .

* Fisher ,M.W; Delvin ,H.B. and Erlandson, A.L. (1963). Anew Staphylococcal antigen :its preparation and immunizing activity against experimental infections .Nature, 199 :1074-175 .

* Foster ,W.D. (1963). The role of alpha-haemolysin pathogenicity of Staphylococcus aureus .J. Bacteriol. 86 :535-540 .

* Fournier ,J.M.; Bouret,A.;Boutonnier, A.; Audurier ,A.; Goldstein, F.; Pierre, .J. Bure,A.; Lebrun, L. and Hockeppel ,H.K. (1987). Predominance of capsular polysaccharide type 5 among oxacillin-resistant Staphylococcus aureus. J. clin.Microbiol., 25; 1932-1933 .

* Fournier,J.M.; Vann, W.F. and Karakawa, W.W.(1984). Purification and characterization of Staphylococcus aureus type 8 Capsular polysaccharide . Infect. Immun. 45 :87-93 .

* Franklin, T.J.C.(1977). Bacterial resistance to antibiotics . In: pharmaceutical microbiology. (Hugo,W.B. and Russell ,A.D.,eds.)PP.137-154. Blackwell scientific publications, Oxford, London, Edinburg, Melborne,

* Gilbert, I.(1931). Dissociation in an encapsulated Staphylococcus .J. Bacteriol.21 :157-160 .

* Haley ,R.W.; Hightower ,A.W.; Khqbbaz,R.F.; Thornsberty, C.; Morton ,W.J.; Allen ,J.R. and Hughes ,J.M.(1982). The emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in united states hospitals .possible role of the house-staff-patient tranfer circuit Ann.Inter.Med. 97 :297-308 .

* Hamm, A. (1907). Ibid., Abt.I, orig., xlii,287. cited by Duguid ,J.P. (1951). The demonstration of bacterial capsules and Slime .J.path. Bacterid. 63 673-684.

* Haskell,T.H. and Hanessian ,S.(1963). 2-Amino-2-deoxy-L-glucouronic acid, the main constituent of S.P.A. (Staphylococcal polysaccharide antigen) Nature. 199 :1075-1076 .

* Haskell,T.H. and Hanessian,S. (1964). The Purification and charact-erization of a new immunizing polysaccharide prepared from Staphylococcus aureus. Biochem.Biophys.Acta, 83 :35-41 .

* Haukenes,G. (1962). Serologicul typing of Staphylococcus aureus .Acta Pathol. Microbiol. 56 :106-107 .

* Heidelberger ,M.F.; Kendell,F.E. and scherp,H.W(1936). The specific polsaccharide of types 1,II and III Pnenmococcus .Areversion of methods and data.J. Exptl.Med. 64 :559-572 .

* Henriksen ,S.D. (1948). Some unusual mucoid organism-Acta. pathol. Microbiol.Scand. 25 :485-490 cited by . Scott, A.C. (1969). Acapsulated Staphylococcus aureus. J.Med. Microbiol. 2 . 253-262 .

* Hobbs, B.C. (1948). Astudy of the serological type differentiation of Staphylococcus pyogenes .J. Hyg. 46 :222-238 .

* Horwitz,M.A.(1982). Phagocytosis of microorganisms. Rev. infect. Dis. 4:104-123 .
cited by :
Lee,J.C.,F.Michon, N.E.Perez,C.A. Hopkins and Pier,G.B. (1987). chemical characterization and Immunogenicity chemical characteri_ zation and Immunogenicity of capsuler polysaccharide isolated from mucoid Staphylococcus aureus. 55 : 2191-2197 .

* Hunt, G.A. and Moses, A.J. (1958). Acute infection of mice with Smith Strain of Staphylococcus aureus. Science., 128 :1574-1575 .

* Iveler,D. (1965). Comparative metabolism of virulent and avirulent Staphylococci. Ann.N.Y. Acad. Sci. 128 :62-80 .

* Kaplan,M.H. and Tenenbaum ,M.J. (1982). Staphylococcus aureus : cellular biology and clinical application.Am.J.Med., 72 :248-258 .

* Karakawa, W.W, Fournier,J.M.; Vann, W.F.; Arbiet , R.; schneerson, R.S. ; and Robbins , J.B. (1985). Method for serological typing of the capsular polysaccharides of Staphylococcus aureus .J.clin.Microbiol. 22:445-447

* Karakawa W.W., and Kann ,J.A. (1975). Immunochemistry of an acide antigen isolated from a staphylococcus aureus .J.Immunol., 310 :315-320

* Karakawa ,W.W. and Vann,W.F. (1982). capsular polysacchavides of Staphylococcus aureus .p.285-293.In: Neinstein and B.N. Fields (ed.),Seminars in infectious diseases . Thieme Stratton, New York .

* Karakawa ,W.W. and Young ,D.A. (1979). Immunochemical study of diverse surface antigens of a Staphylococcus aureus isolate from an osteomyelitis patient and their role in vitro phagocytosis .J. clin Microbiol. 9 :399-408 .

* Kayhty, H.; Peltola, H.; Karanko, V. and Makela ,P.H.(1983). The protective level of serum antibody to the capsular polysaccharide of Haemophilus infleunzae type b.J., infect. Dis. 147 : 1100-1109 .

* Koenig,M.G., and Melly, M.A. (1965). The imporatance of surface antigens in Staphylococcal virulence .Ann.N.Y.Acad. Sci.128 : 231-248.

* Koenig, M.G., Melly, M.A. and Rogers, D.E. (1962). Factor relating to the virulence of Staphylococci II.observation on four mouse-pathogenic strain.J. Exp.Med. 116 : 589-589 .

* Lee,J.C.; Michon F.; Perez, N.E.; Hopkins, C.A.; Pier G.B.; (1987). Chemical charecterization and immunogenicity of capsular polysaccharide isolated from mucoid Staphylococcus aureus .Infect Immun. 55 : 2191-2197 .

* Lee ,C.J.; Norma, F.P.; Hopkins, C.A. and Pier, G.B. (1988). Purified capsular polysaccharide-induced immunity to Staphylococcus aureus infection .J. Infect. Dis. 157 :723-730 .

* Liau ,D.F. and Hash ,J.H. (1974). Surface polysaccharide from Staphylococcus aureus M that contains taurine, D.aminogalacturonic acid and D-fucosamine, J.Bacteriol. 119 :913-922 .

* Liau ,D.F. and Hash, J.H.(1977) Structural analysis ofthe surface polysaccharides of Staphylococcus aureus .J.Bacteriol. 131 :194

*Lindberg, A.A.(1973). Bacteriophage receptors.Annu. Rev.Microbiol. 27 205-241.

* Lyons,C.(1937). Antibacterial immunity to Staphylococcus pyogenes . Brit .J. Exptl. Pathol. 18 :411-422 .

* Ma, M.Y.; Goldstein,E.J.; Fiedman, M.H.; Anddeson, M.S. and Mulligan, M.A. (1983). Resistance of gram-negative bacilli as related to hospital use of antimicrobial agents. Antimicrob.Agents chemothy 24 :347-352 .

* Maverakis, N.H. and Wiley,B.B.(1969).Evidence for amultiplicity of capsulartypes among S. aureus strains.J.Bacteriol. 99 :472-479 .

* Maverakis, N.H. and Wiley,B.B.(1979). cited by Wiley, B.B.(1972). capsules and pseudocapsules of Staphylococcus aureus. In:The staphylococci, cohen,J.O.(ED.) PP:41-63-John Wiley and sons, In C.N.Y.

* Mccarty, M.; Taylor,H.E. and Avery ,O.T.(1946). Biochemical studies of environmental factors essential in transformation of pneumococcal types.Cold Spring Harbor Symosia Quant. Biol., 11 :177-183 .

* Melly, M.A.; Duke, L.J.; Liau,D.F. and Hash, J.H.(1974). Biological properties of encapsulated Staphylococcus aureus. Infect. Immunol. 105: 389-395 .

* Meyer,R.D.; Halter ,J. and Lewis, R.P. (1976). Gentamycin-resistant Pseudomonas aroginosa and Serratia marscescens in general hospital. Lancet, 7 :580-583 .

* Morse, S.(1960). Isolation of Phagocytosis inhibiting substance from culture filtrates of an encapsuled Staphylococcus aureus.J. Exptl.Med., 115 :295-311 .

* Morse ,S.(1962). Isolation and Properties of a surface antigen of Staphylococcus aureus .J.Exptl.Med. 115 : 295-311 .

* Mudd,S.(1965). Capsulation ,Pseudocapsulation , and the somatic antigens of the surface antigen of Staphylococcus aureus. Ann.N.Y.Acad. Sci. 128: 45-56 .

* Mudd,S., and Decourcy ,S.J.Jr. (1965). Interaction of viscid material of Staphylococcus aureus with specific immune serum.J. Bacteriol. 89:874-879 .

* Nells,M.J.; Niswander,A; Karakawa ,W.W., and Vann, W.F. and Arbeit ,R.D.(1985). Reactivity of type-specifc mouoclonal antibodies with Staphylococcus aureus Clinical isolates and purified capsular polysaccharide. Infect. Immun. 49 :14-18.

* Norcross, N.L.(1977). Immune response of the mammary gland and role immunization in mastitis control .J.Am. Vet.Med.Assoc. 170 :1228-1231 .

* Norcross, N.L. and Opdebeeck,J.P.(1983). Encapsulution of Staphylo-coccus aureus isolated from bovine milk. Vet. Microbiol. 8 :397 - 404 .

* Oeding,P.(1960). Antigenic proerties of Staphylococcus aureus. Bacteriol.Rev. 24: 374-396 .

* Opdebeeck , J.P. and Norcross, N.L.(1983). Frequency and immunologic cross-rectivity of encapsulated Staphylococcus aureus in bovine milk in New York. Am.J. Vet.Res. 44 :986-988 .

* Peterson ,P.K.; Wilkinson, B.J.; Kim,Y.; Quie, P.G.(1978). Infleunce of encapsulation on Staphylococcal opsonization and Phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 19 :943-949 .

* Pike, R.M.(1946). A study of group A Streptococcui from healthy carriers with particular attention to mucoid polysaccharide production.J. infect.Dis., 79 :148-156 .

* Price,K.M. and Kneeland ,Y.Jr.(1954) . Further studies of the phenomen of capsular swelling of Micrococcus pyoyenes var. aureus in the presence of immune serum.J. Bacteriol. 71 :229-230 .

* Rasmussen,J.G.(1975). Toxic epidermal necrolysis : Areview of 75 cases in children Arch.Dermatol.111 :1135-1139 .

* Reeves,D.S., Philips, I.; Williams, J.D. and Wise ,R.(1978). Laboratory methods , in antimicrobial chemotherapy. PP: 8-28. first edd،Edinburgh London and New York.

* Robbins, J.B., Schneerson, R.; Egan W.B. : Vann, W.F. and Liu, D.T. (1980). virulence properties of bacterial capsular polysaccharides: unaswered questions. P.115-132-In Smith ,H.; Skehel,J.J. and Turner, M.J. (ed.), The molecular basis of microbial pathogenicity. Dahlen Konferenzen. velarg chemie International , weinheim, Fedral Republic of Germany .
cited by:
HocHkpeel H.K., D.G. Braun, W.Vischer ,A. Imm, S.Sutter, U.Staeubl, R. Guggenheim, E.L.Kaplan, A.Boutonnier and J.M. Fournier. (1987). serotyping and electron Microscopy studies of Staphylococcus aureus clinical Isolates polysaccharide type 5 and 8.J.clin.Microbiol. 25 526-530 .

* Rogers,D.E.(1966). Experimental observations on Staphylococcal disease Symposium on Staphylococci and Staphylococcal disease. pantowowe Wyadawnictwo Naukowe Warzewa, P.279-296. cited by
Yoshida, K.; Smith,M.R. and Naito,Y.(1970). Biological and immunological properties of encapsulated strains of Staphylococcus aureus from human sources. Infect. Immuni 2 :528-532 .

* Rogers, D.E. and Melly ,M.A. (1962). observation on the immunology of pathogenic staphylocci. Yale.J.Biol.Med., 34 :560-581 .

* Sabath,C.D.(1982). Mechanism of resistance to Beta-lactom antibiotics in strains of Staphylococcus aureus. Ann.Intern. Med. 47 :339-334 .

* Sall,T.(1962). Interrelationship of extracellular enzymes and pseudo-capsulation in astrain of Staphylococcus aureus .J. Bacteriol. 83:1238-1243 .

* Sall,T.; Mudd,S. and Taubler,J.(1961). concerning the surfaces of cells of Staphylococcus. Pyogenes. 1. A pseudocapsulation phenomenon under certain conditions .J.Exptl.Med.113 :693-700 .

* Scott, A.C.(1969). A capsulated Staphylococcus aureus. J.Med. Micro-biol. , 2 :253-261 .

* Sheagren,J.N.(1984). Staphylococcus aureus : The persistent pathgen . N.Engl.J.Med. 310 :1368-1373 .

* Smith,R.M.; Parisi,J.T : Vidal,L. and Baldwin, J.H.(1977). Nature of the genetic determinant controling encapsulation in Staphylococcus aureus. Smith.Infect.Immun. 17 :231-234 .

* Sneath , P.A.; Mair,N.S., Sharpe,M.E. and Holt,J.C.(1986). Bergey's Manual of systematic Bacteriology.Williams and Wilkins.U.S.A. PP:1013-1035 .

* Sompolinsky.,D.,Samra, Z.; Karakawa, W.W., Vann,R.S. and Malik; Z. (1985). Encapsulation and capsular types in isolates of Staphyloccus aureus from different sources and relationship to phage types.J.clin. Microbiol.22 :828-834 .

* Spink,W.(1939).Attempts to demonstrate of surface antigen of staphylococci and Specific phagocytosis ,proc.Soc.Exptt. Biol. Med. 40 : 549-552 .
cited by:
Duguid, J.P.(1951). The demonstration of bacterial capsule and Slime.J.Pathol. Bacteriol. 63 :673-685 .

* Tomcsik,T.(1956).Bacterial capsules and their relation to the cell wall in Spooner E.T.C. Spooner and stoker B.A.D. (eds.), PP: 41-67 Bacterial Anatomy, Cambride university press.London .

* Townsend, D.E.; Ashdown, N.; Greed, L.C. and Grubb, W.B.(1984). Transposition of plasmids resistance to cationic agents .J.Antimicrob. chemother. 14 :115-124 .

* Treagan L. and Pulliam,L.(1982). Medical microbiolog laboratory procedures, W.B. Saunders co.

* Ward,H.K. and Rudd,G.V.(1938). Studies on hemolytic streptococci from human sources. I.The cultural charcteristics of potentially virulent strains. Austral.J. Expt l. Biol. Med.Sci. 16 : 181-192 .

* Weir,D.M.(1973). Hand book of Experimental immunology 2nd edd. . Black well scientific publications, London .

* Wiley ,B.B.(1959). The demonstration of passive protection against an encapsulated strain of Staphylococcus aureus in embryonated hen's eggs. Bacteriol. proc. 59 : 61-62 .

* Wiley ,B.B.(1961). Anew virulence test for Staphylococcus aureus and its application to encapsulated strains. Can.J.Microbiol. 7 :933-943 .

* Wiley,B.B.(1963).The incidence of encapsulated staphylococci and anticapsular antibodies in normal humans. Can.J.Microbiol. 9 :27-32 .

* Wiley,B.B(1968). Capsule size,cougulase production and egg virulence among certain strains of Staphylococcus aureus .J.microbiol., 14:685-689.

* Wiley, B.B. (1972) . Capsules and pseudocapsules of Staphylococcus aureus .In: The staphylococci., Cohen, J.O.(Ed.) PP: 41 - 63. John Wiley and Sons, Inc.N.Y.

* Wiley,B.B. and Maverakis,N.H.(1968). Virulent and avirulent encapsulated variants of Staphylococcus aureus .J. Bacteriol. 95 : 990-1002 .

* Wiley,B.B. and Maverakis ,N.H.(1974). Capsule production and virulence among strains of Staphylococcus aureus. Ann. N.Y. Acad. Sci., 236 : 221-232 .

* Wiley,B.B.and Wonnacott,.J.C.(1962). Isolation and partial chemical characterization of acapsular material from Staphylococcus aureus .J. Bacteriol. 83 :1169-1176 .

* Wilkinson,B.J.(1983). Staphylococcal Capsules and Slime.In: Easmon CSF,Adlamc, (eds.) Staphylococci and Staphylococcal infection: Vol.2. New york Acaelemicpress, PP :481-523 .

* Wilkinson,B.J. and Holmes,K.M. (1979). Staphylococcus aureus cell surface: Capsule as abarrier to bacteriophage Adsorption. Infect. Immun., 23 :549-552 .

* Williams,J.D.(1983). Antibacterial substances used in the treatment of infections. In: Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity. 7th ed., Vol. 1 , Edward Arnold, PP. 97-144.

* Witte,W.(1957). Kapselbildung bei Staphylococcus aureus als ursache furdie Neu trypisierubarkeit , durch phagen. Zentralblatt fur Bakteriologie, parasit 1. Abteilnng original Reihe A 233 ,447-451 .
cited by :
Yoshida ,K.; Takahash,M.; Ohtomo, T.; Minigishr , Y.; Ichiman, Y. and Haga, K.(1979). A pplication of fluorescent antibodies for Detecting capsular substancesoin Staphylococcus aureus . J.App-Bacteriol . 46 : 147-152 .

* Wright, A.E. and Doglas, S.R. (1903). An experimental investigation on the role of blood fluids in connection with Phagocytosis. Proc.R.Soc. London. 72 : 357-370 .
cited by :
Peterson, P.K.; Wilkinson, B.J.; Kim,Y.; Schmeling ,D. and Quie, P.C.(1978). Infleunce of Encapsulation On Staphylococcal opsonization and phagocytis by human polymorphonuclear teukocytes. Infect. Immun. , 19 :943-949 .

* Wu,T.C.M and Park,J.T. (1971). Chemical characterzation of anew surface antigenic polysaccharide from amutant of Staphylococcus aureus .J.Bacteriol. 108 : 874-884 .

* Yoshida ,K.(1971). Demonstration of serologically capsular types among strins of Staphylococcus aureus by the serum soft agar technique. 3:535-539 .

* Yoshida ,K.(1972). Isolation of an aditional capsular-type strain of Staphylococcus aureus by the serum soft agar technique., Infect. Immun. 5 : 833-834 .

* Yoshida ,K.(1973). Compact colony-forming activity and the effect of PH on Compact-type growth of Staphylococcus aureus strains in serum soft agar. Am.J. clin. Pathol. 59 :412-416 .

* Yoshida ,K. and Ekstedt, .D.(1968a). Relation of mucoid growth of Staphylococcus aureus to clumping factor reaction, morphology in serum soft agar, and virulence.J.Bacteriol. 96 :902-908 .

* Yoshida, K. and Ekstedt, R.D.(1968b). Antibody response to Staphylococcus aureus in rabbits: sequence of immunoglobulin synthesis and its correlation with passive protection in mice .J. Bacteriol. 96:1540-1545 .

* Yoshida,K. and Ichiman,Y.(1984). Successive extraction of specific protective immunoglobulins from pooled human sera.J. clin. Microbiol. 20 :461-464 .

* Yoshida, K.; Ichiman, Y.; Narikawa, S., Takahashi, M.; Kono, E. and San Clemente, C.L. (1979). Passive protection by human serum in mice infected with encapslated Staphylococcus aureus .J.Med. Microbiol. 12 : 277-282 .

* Yoshida ,K. and Minegishi, Y. (1976). Capsular substance production in unencapsulated starins of Staphylococcus aureus. In Staphylococal disease.(Jeliaszewicz, J.ed.) PP : 359-375 .Stuhgrat, New.York. Gustav Fischer velarg.

* Yoshida, K. and Naito,Y.(1972). comparison of capsular types of Staphylococcus aureus Strains .Infect. Immun. 5 :143-144.

* Yoshida ,K.; Nakamura, A.; Ohtomo, T. and Iwami, S.(1974). Detection of capsular antigen production in unencapsulated strains of Staphylococcus aureus .Infect. Immun. 9 : 620-623 .

* Yoshida ,K.; Ohtomo, T. and Minigish,Y. (1977). Mechanism of compact colony formation by strains of Staphylococcus aureus in serum soft agar.J.Gen. Microbiol. 98 :67-75 .

* Yoshida, K.; Smith, M.R. and Naito,K. (1970). Biological and immunological properties of encapsulated strains of Staphylococcus aureus from human sources. Infect . Immun. 2 :528-532 .

* Yoshida, K.; Takahashi, M.; Haga, K.; Kone, E.; Kushiro, H. and Ito, S.(1980). Comparison of three bloodclotting substances in Staphylococcus aureus strains.J.clin. Microbiol. 11 : 293-294 .

* Yoshida,K.; Takahashi, M. and Takeuchi, Y.(1969). Psuedo compact type growth and conversion of growth types of strains of Staphylococcus aureus invitro and in vivo .J. Bacteriol. 100 :162-166 .

* Yoshida,K.; Takahashi M.;Ohtomo, T.; Minigishi, Y.; Ichiman,Y.;Haga, K.; Kone, E. and Sanclement, C.L.(1979). Application of flourescent antibody for detecting capsular substance in Staphylococcus aureus .J. App. Bacteriol. 46 :147-152 .

* Yoshida,K. and Takeuchi ,Y.(1970). comparison of compact and diffuse variants of the strains of Staphylococcus aureus . Infect. Immun. 2 : 523-527 .

المصادر العربية

- البعلبكي ، منير (١٩٨٦) . المورد ، قاموس انكليزي - عربي ، الطبعة العشرون ، دار العلم للملايين ، بيروت .

- الربيعي ، شروق ، ريس .(١٩٩٣) . بروتين A من العنقوديات الذهبية وعلاقته ببعض صفاتها الفسلجية - اطروحة ماجستير - كلية - العلوم - جامعة بغداد .

- دواف ، محسن ، هند . (١٩٨٣) . تأثيرات المطهرات الكيمياوية على الجراثيم اللوثة في صالات العمليات الجراحية - اطروحة ماجستير- كلية العلوم - جامعة بغداد .

- مجلس وزراء الصحة العرب - اتحاد الاطباء العرب ، منظمة الصحة العالمية ، المنظمة العربية للتربية والثقافة والعلوم (١٩٨٣) . المعجم الطبي الموحد . قاموس انكليزي ، عربي ، فرنسي ، الطبعة الثالثة ، سويسرا .

الملاحق

الملحق (١)
عدد ومصادر عزلات العنقوديات الذهبية المحفوظة

مصدر العينات	* عزلات العنقوديات الذهبية		
	العدد الكلي	** العنقوديات الذهبية المحفظة	
		العدد	النسبة المئوية (٪)
الانف	٦	صفر	صفر
الاذن	٩	١	١١,١١
البلعوم	١٩	٥	٢٦,٣١
الجروح	٨	١	٢٥
قرح في الجلد	٧	١	١٤,٢٨
الادرار	٤	١	٢٥
المهبل	١٧	٥	٢٩,٤١
المجموع	٧٠	١٥	٢١,٤٢

* تم عزل وتشخيص العزلات من قبل الربيعي ، شروق ريس (١٩٩٤)،محفوظة على وسط الغراء المغذي ، وقد اعيد تشخيصها في هذه الدراسة للتأكد من كونها عنقوديات ذهبية .

** تم الكشف عن وجود المحفظة بثلاث طرائق (التصبيغ بالحبر الهندي ، النمو المنتشر في غراء المصل الطري ، سالبية التفاعل لعامل التكتل) .

الملحق (٢)
النسبة المئوية لمقاومة العزلات المحفظة للمضادات الحيوية

المضاد الحيوي	(أ)	(ب)	(ج)	(د)	(هـ)	(و)	(ك)	(ل)	(ي)	(ن)
التركيز مايكروغرام/قرص	١٠	٢٥	٢٥	٣٠	٣٠	٣٠	٣٠	١٠	٣٠	١٠
المقاومة	٨٠,٧٠	٩٤,٢٣	٦٣,٤٦	٧٦,٩٢	٧١,١٥	٥٩,٦	٦٥,٣٨	٦٥,٣٨	٧٣,٠٧	١٠٠
متوسطة الحساسية	١٥,٣٨	١,٩٢	٧,٦٩	٧,١٩	١٣,٤٦	٣٦,٥٣	٢٨,٨٤	١٩,٢٣	١٣,٤٦	صفر
الحساسة	٣,٨٤	٣,٨٣	٢٨,٨٤	١٥,٣٨	١٥,٣٨	٣,٨٤	٥,٧٦	١٥,٣٨	١٣,٤٦	صفر

(أ) ستربتومايسين (ب) سيلفوميثوكزازول (ج) اموكسيسيلين (د) سيفالوردين (هـ) سيفالكسين (و) دي اوكسي سايكلين (ك) ارثرومايسين (ل) حامض الفيوسدك
(ي) تتراسايكلين (ن) بنسلين -جي-

الملحق (٣)

الاستجابة المناعية في الارانب ضد متعدد سكريد المحفظة والخلايا المحفظة المقتولة بالحرارة .
العزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية ومتعدد سكريد العزلة (٢٩) الحساسة للمضادات الحيوية

الاسابيع	السيطرة			الخلايا المحفظة للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية			متعدد السكريد للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية			متعدد السكريد للعزلة (٢٩) الحساسة للمضادات الحيوية		
	الارنب الاول	الارنب الثاني	المعدل	الارنب الاول	الارنب الثاني	المعدل	الارنب الاول	الارنب الثاني	المعدل	الارنب الاول	الارنب الثاني	المعدل
صفر	صفر	٥	٢,٥	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	٥	صفر	٢,٥
٢	صفر	٥	٢,٥	٣٢٠	١٦٠	٢٤٠	صفر	٢٠	١٠	١٠	صفر	٥
٤	صفر	٥	٢,٥	٦٤٠	٣٢	٤٨٠	١٦٠	٨٠	١٢٠	٨٠	٤٠	٦٠
٦	صفر	٥	٢,٥	١٢٨٠	٦٤٠	٩٦٠	٣٢٠	١٦٠	٢٤٠	٣٢٠	٨٠	٢٠٠
٧	صفر	٥	٢,٥	١٢٨٠	١٢٨٠	١٢٨٠	٦٤٠	٣٢٠	٤٨٠	٤٨٠	٣٢٠	٤٠٠
٩	صفر	٥	٢,٥	١٢٨٠	٦٤٠	٩٦٠	٦٤٠	٣٢٠	٤٨٠	٤٨٠	٣٢٠	٤٠٠

الملحق (٤)
الاستجابة المناعية في الفئران ضد متعدد سكريد المحفظة للعزلة (١١) المقاومة للمضادات الحيوية

التركيز مايكروغرام/ملليتر							دارىء الفوسفات الفسيولوجي	اليوم
١٠٠	٥٠	٢٥	١٠	١	٠,٥	٠,١		
العيارية								
صفر	صفر	صفر	صفر	٥	صفر	٥	٥	صفر
١٠	٢٠	٢٠	٤٠	٢٠	١٠	٥	٥	٥
٢٠	٤٠	٤٠	١٦٠	٤٠	٤٠	١٠	٥	١٠
٢٠	٤٠	٨٠	٣٢٠	٦٠	٦٠	٢٠	٥	١٥

The presence of the specific antibody for the polysaccharide in the prepared antisera was detected by the folowing methods :

1- The double immunodiffusion test ingel .

2- The passive haemagglutination test of the extracted polysaccharide antisera ; and direct agglutination in the case of the whole encapsulated organisms antisera .

3- The transformation in the shape of the colonies grown on the soft agar containing the antiserum .

4- Absorption of the antisera with it's homologous antigen .

The antisera showed a serological specificity in the double immuno-diffusion in gel method with the homologous extracted antigen, while no precipitation appeared when using the polysoccharide extracted from the heterologous encapsulated isolates . The same results appeared when the transformed shapeof the colonies grown on the soft agar containing the prepared antiserum were used .

Summary

This study includes the investigation for the presence of capsule in Staphylococcus aureus isolates and the study of the sensitivity of these isolates to the locally used antibiotics and the extraction of the capsular polysaccharide to investigate it's immunogenic capability in the laboratory animals .

Two hundred fifty four Staphylococcus aureus specimens were isolated and identified according to Bergey's manual from a total of 258 Staphylococcal clinical isolates, collected from different sites of The body : [Nose ,Ear, pharynx, Wounds , Operations , Skin ulcers , Vaginal swabs , Ureter , Urine , Burns , Blood cultures , Cerebrospinal fluid] .

The presence of capsule in these isolates were investigated by using three tests :

1- The diffused growth in serum soft agar with neutral PH(7.2) and alkaline PH(8.4) .

2- Negative reactivity for clumping factor .

3- Negative staining by india ink , wet preparation .

According to these three tests 102 capsule producing isolates were detected from a total of 254 fresh Staphylococcus aureus isolates (40.15%) , while the preserved isolates that re-cultured for many times on synthetic culture media showed much more less capsule formation (20.42%) .

Results of the antibiotic sensitivity test of the isolates showed adifferent resistance . All isolates were resistant to penicillin$_G$ (100%) with different ratio of resistance to Sulphamethoxazole (94.23%) and Streptomycine (80.7%) . The higest sensitivity of these isolates for antibiotics was for Amoxacillin (28.84%) .

Depending on the enzymetic digestion and the final precipitation by ethanol , the capsular polysaccharide was extracted from two encapsulated isolates , one of them was resistant to all the antibiotics used in this study (isolate 11), the other one was sensitive to six of these antibiotics (isolate 29) .

The ability of the extracted polysaccharide and the heat-killed encapsulated organisms to immunize the lab. animal were examind .

The result revealed that the extracted antigen was agood immunogen for rabbits and mice while the heat killed encapsulated organisms were more active in the induction of the immunogenic response by forming a specific antibody for the capsular polysaccharide .

SEROLOGICAL STUDY OF LOCAL ISOLATES OF ENCAPSULATED STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND THEIR SENSITVITY TO ANTIBIOTICS

ATHESIS SUBMITTED TO THE COLLEGE OF SCIENCE UNIVERSITY OF BAGHDAD IN PARTIAL FULFILMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY (MICROBIOLOGY)

BY
MAJIDA MAHMOOD HASSAN

MAR . 1995

SEROLOGICAL STUDY OF LOCAL ISOLATES OF ENCAPSULATED STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND THEIR SENSITVITY TO ANTIBIOTICS

A THESIS
SUBMITTED TO THE COLLEGE OF SCIENCE
UNIVERSITY OF BAGHDAD
IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY
(MICROBIOLOGY)

BY
MAJIDA MAHMOOD HASSAN

MARCH 1995