دراسة تاثير حامض التايكويك المستخلص من جدار بكتريا العنقوديات الذهبية المعزولة من حالات التهاب العظم والنقي في امراضيتها

م. علياء معن عبد الحميد
جامعة ديالى/ كلية العلوم _قسم علوم الحياة والاحياء المجهرية

الخلاصة Abstrct

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus aureus* من حالات التهاب العظم والنقي ومن ثم استخلاص حامض التايكويك من جدار بكتريا العنقوديات الذهبية ومحاولة التحري عن اضداد حامض التايكويك في مصل دم المرضى المصابين بالتهاب العظم والنقي.

جمعت 34 عينة (قيح ودم) من المرضى المصابين بالتهاب العظم والنقي الراقدين في مستشفى بعقوبة العام_ دائرة صحة ديالى.

كانت نتائج الزرع البكتيري الهوائي لعينات القيح 22 عينة موجبا و 12 عينة كانت نتيجتها سالبة. وكما اظهرت نتائج الزرع البكتيري و الفحوصات الكيموحيوية وجود 9 عزلات من بكتريا العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus*. تم استخلاص وتنقية جزئية لحامض التايكويك من جدار بكتريا العنقوديات الذهبية باستخدام عملية التكسير الميكانيكي (Mechanical disintegration) بطريقة الرج (Shaking)السريع لتكسير جدار خلية *Staphylococcus aureus* باضافة الحبيبات الزجاجية (Glass beads) والحصول على كمية مناسبة من الخلايا المتكسرة ومن ثم استخلاص وتنقية جزئية للجدار المتكسر اعتمادا على الهظم الانزيمي بوساطة انزيمات محللة (Proteolytic enzyme) فضلا عن استخدام مركب سلفات دودسيل الصوديوم (Sodium dodecyle sulphate)(SDS)لازالة الاغشية السايتوبلازمية.كماتم التحري عن اضداد حامض التايكويك المستخلص من جدار بكتريا *Staphylococcus aureus* في مصل دم المرضى المصابين بالتهاب العظم والنقي اعتمادا على اختبار الانتشار المناعي بالهلام بظهور حزمة ترسيبية واحدة.

المقدمة Introduction

يعد مرض التهاب العظم والنقي (Osteomylitis) من الامراض الخطرة الشائعة في قطرنا والتي من الصعوبة معالجتها لاسيما عند تحول الحالة الى مرض مزمن اذ تؤدي الى حدوث تشوهات العظم وتاخر النمو في العظم المصاب يحدث المرض نتيجة الاصابة بكائنات مختلفة وتعد البكتريا هي المسبب الرئيسي لهذا النوع من الالتهاب في العالم مما تؤدي الى اخماج ينتج منها تحطم العظم ،وتنخر العظم، وبناء عظم جديد (Mohammed,2001;Ahmed,2004).

ويعد الباحثانٍ Smith and Dubos,(1956) اول من قاما بعزل بكتريا *Staphylococcus aureus* من مريض مصاب بالتهاب العظم والنقي (Osteomylitis) عام1930 م فضلا عن ان هذه البكتريا تسبب العديد من الاخماج مثل (Impetigo,Pustules,boils,Carbuncles,Cellulitis,and Wound infection) نتيجة لامتلاكها العديد من عوامل الفوعة التي تزيد من قابليتها على الالتصاق والاستيطان واختراقها مناطق عميقة من الجسم مثل العظام (Baliy and Scotts,1998). وفي السنوات الاخيرة اوضحت الدراسات ان حامض التايكويك يمكن ان يتوسط التصاق البكتريا بالمفاصل الصناعية ويساهم في زيادة حدوث الاخماج المكتسبة من المستشفيات(هادي، 1987;2000 ,Umeda) فضلا عن ان الاجسام المضادة لحامض التايكويك يمكن ان تستخدم في تشخيص اخماج المناطق العميقة التي تسببها *Staphylococcus aureus* مثل حالات التهاب العظم والنقي(Wheat *etal*.,1985;Perouse *etal*.,1988) .

ولاهمية حامض التايكويك في امراضية *Staphylococcus aureus* لكونه عامل التصاق مهم في احداث التهاب العظم والنقي فقد استهدف البحث ما يلي :_

1_عزل بكتريا العنقوديات *الذهبية Staphylococcus aureus*.

2_استخلاص وتنقية جزئية لحامض التايكويك من جدار خلية العنقوديات الذهبية .

3_الكشف عن وجود الاجسام المضادة لحامض التايكويك في مصل دم المرضى المصابين بالتهاب العظم والنقي باستخدام اختبار الانتشار المناعي بالهلام بوصفها طريقة للكشف عن وجود الاصابة .

تعريف التهاب العظم والنقي Osteomylitis

يشير هذاالمصطلح الى الالتهاب الذي يحدث في العظم والناتج من الاصابة بكائنات مختلفة اكثرها حدوثا"البكتريا المكونة للقيح (Pus forming bacteria) ويمكن ان ينتقل هذا الالتهاب من نقي العظم (Bone marrow) الى القشرة (Cortex) ثم الى السمحاق(Periosteum) والانسجة الرقيقة التي تحيط بالعظم (William and Warnar,1998).وتتميز حالات النوع الدموي المنشا من التهاب العظم والنقي التي تتطور عادة خلال ايام قليلة الى عدة اسابيع الى ثلاث مراحل سريرية وهي:_

المرحلة الاولى : تكون بثرة في العظم (Boil in bone)

وتتميز هذه المرحلة بحدوث الم شديد ولكن بدون احمرار او انتفاخ او حرارة تظهر الاعراض بعد 24_48 ساعة

المرحلة الثانية: تجمع القيح في اللب والفراغ تحت السمحاقي (Pus in the medulla and the subperiostealspace)

يحدث في هذه المرحلة تطور للاعراض والعلامات السريرية مثل حصول توعك وحمى والم وصداع وتبدا هذه الاعراض بعد 48 ساعة من الاصابة وتستمر لثلاثة او خمسة ايام

المرحلة الثالثة :تتميز بتكون القيح في الانسجة الرخوة(Pus in the soft tissue)

تظهر اعراض الالتهاب في هذه المرحلة التي تتضمن التورم والاصفرار وتبدا بعد خمسة ايام من الاصابة وقد تستمر الى عشرة ايام او اسبوعين(Mohmmed,2001)الشكل في الملحق رقم (1) يوضح المراحل الثلاث لالتهاب العظم والنقي (Adams,1973).

العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus*

اكتشفت من قبل روزنباج Rosenbach في عام 1889 م وتكون بشكل خلايا كروية منتظمة قطرها(0.5_1.0) مايكروميتر ،تكون مرتبة بصورة فردية اوثنائية اوعلى شكل عناقيد ، تحدث الاصابة بهذه البكتريا عن طريق اخماج الجروح بعد العمليات واخماج الحروق والجروح السطحية اذ تنتقل عن طريق مجرى الدم وتصل الى العظم وتسبب الاصابة(Lowy,1998;James,2000).

تعتمد امراضية *Staphylococcus aureus* في احداث الاصابة عن طريق تكاثرها

وانتشارها السريعين خلال الانسجة اذ لها القابلية في انتاج مدى واسع من الانزيمات والذيفانات (Elizabeth and David,2004) مثل Hyaluronidase وال Staphylokinase اللذان يعملان على تحطيم مادة الارضية للانسجة الرابطة وخثرة الليفين على التوالي (Brock and Modigon,1988) فضلا عن قابليتها على انتاج الكنان السكري المغطي للبروتين والذي يعطيها قابلية الالتصاق بالسطوح الملساء(Baron *etal.*,1994).

احماض التايكويك Teichoic acids

اكتشفت احماض التايكويك منذ عام 1959م بعد اكتشاف النيوكليوتيد بوصفها مكونات للطبقات الخارجية في البكتريا الموجبة لملون غرام وهي لاتصنع في البكتريا السالبة لملون غرام تتراوح نسبةهذه الاحماض بحوالي 50% من الوزن الجاف للجداروحوالي 10% من الوزن الكلي الجاف للخلية (Baddiley,1989).

يوجد حامض التايكويك اما في الجدار اوغشاء الخلية البكتيرية حيث يرتبط بروابط تساهمية مع الببتيدوكلايكان او يرتبط مع الدهون المرابطة للغشاء وعندها يسمى حامض التايكويك الشحمي(LTA)(Lipoteichoic acid) (Elizabeth and David,2004).

لقد اقترح Baddily *etal.*,(1989) ان حامض التايكويك هو عبارة عن بوليمرات(Polymers) تتكون من وحدات سكرية متعددة من(كليسرول او ربيتول)مع مجاميع فوسفاتية ثنائية الاستر.

تكمن اهمية حامض التايكويك في كونها مكونات مستضدية يمكن الاستفادة منها في تصنيف البكتريا الموجبة لملون غرام اذ يمكن استخدامها في التصنيف المصلي (Serological classification) لبكتريا العنقوديات اذ اشير الى وجود عوامل محددة رئيسة تؤثر في فعالية حامض التايكويك بوصفه مستضدا سطحيا ومنها التداخلات الايونية مع مكونات الجدار وتاثيرها في الهيئة والتكوين وعمق نفوذية حامض التايكويك في الجدار(Knox and Wicken,1993) .

عزل حامض التايكويك واستخلاصه Isolation and Extraction of Teichoic acid

استخدمت العديد من الطرائق لعزل واستخلاص حامض التايكويك من قبل الباحثين(Grov and Rude,1989) وذلك بمعاملة الجدار الخام بالفينل هيدرازين

(Phenylhydrazin) اومعاملته بثنائي مثيل هيدرازين(N,N phenylhydrazin) .

اما Daugharty *eta*l.,(1989) فقد قاموا باستخلاص حامض التيكويك باستعمال جهاز الذبذبات فوق الصوتية لتحرير حامض التايكويك الى الوسط الزرعي ومن ثم فصله عن الخلايا بوساطة النبذ المركزي المبرد وترشيحه بجهاز الترشيح المستدق .

اما Weeke *etal.*,(1990) قد قاموا بعزل جدار بكتريا *Staphylococcus aureus* باستعمال انزيم اللايسوزايم عند الاس الهيدروجيني 5 ثم وضع العالق في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 37م.

في حين عوملت البكتريا النامية في وسط مرق تربتك صويا (Tryptic soya broth) بعد غسلها بداريء الفوسفات الملحي واجراء النبذ المركزي المبرد بانزيم اللايسوستافين (Lysostaphin) ووضع العالق في حاضنة هزازة بدرجة 37م (Timothy *etal.*,1991).

اما Umeda,(1987) فقد قام بعزل جدار بكتريا *Staphylococcus aure*us بوساطة التكسير الميكانيكي (Mechanical damage) باستخدام الحبيبات الزجاجية المضافة للعالق البكتيري ومن ثم استخلاص مع حامض ثلاثي كلوروخليك (Trichloro acetic acid)(TCA).

اما Perous *etal.*,(1988) فقد اشاروا الى تكسير جدار البكتريا النامية في وسط مرق تربنك صويا باستعمال الحبيبات الزجاجية والاستخلاص بحامض ثلاثي كلوروخليك والكحول الايثانولي والايثر ومن ثم الترشيح بوساطة المرشحات .

وفي دراسات اخرى (Hughes and Tanner,1992)تم استخلاص حامض التايكويك تحت ظروف قاعدية باستخدام هيدروكيسد الصوديوم (NaoH)(1N) بدرجة حرارة 35م .

الكشف عن الاجسام المضادة النوعية لحامض التايكويك باستخدام تفاعل الترسيب

تعد هذه الطريقة من اكثر الطرائق المستخدمة في الكشف عن قابلية التمنيع لحامض التايكويك وتتاثر الاجسام المضادة في استجابتها للممنعات المختلفة بطريقة الكشف المستخدمة حيث وجد ان الكلوبيولين المناعي ج (IgG antibodies) اكثر استجابة من الكلوبيولين المناعي م (IgM antibodies).

لقد اشارت بعض الدراسات الى استخدام تفاعلات الترسيب في ا لغراء بوساطة الانتشار

المناعي الثنائي (اوكترلوني) للكشف عن خليط من مكونات مستضدية وامكانية توضيح فيما اذا كانت بكتريا مختلفة حاوية على مستضد معين وايضا استخدمت للتمييز بين احماض التايكويك لجدار بكتريا العنقوديات الذهبية الحاملة لوحدات الفا وبيتا اسيتيل كلوكوز امينيل (Alpha and Beta N_acetylglucos aminyl) وامكانية وجود احدهما او كلاهما في سلالة معينة(Larinkari *etal.*,1987)

لقد اشار Martin *etal.*,(1988) الى تكون اجسام مضادة من نوع الكلوبيولين المناعي ج في دم الانسان التي تم الكشف عنها بطريقة الترسيب ضد حامض التيكويك المستخلص من جدار بكتريا العنقوديات الذهبية اذ يتم التفاعل في وسط شبه صلب مثل الاكاروز ويحدث انتشار المستضد والجسم المضاد كلا باتجاه الاخر مكونا خطوطا" ترسيبية.

يمكن فصل حامض التايكويك عن طريق تطبيق تقنية الترحيل الكهربائي في الاكاروز عند الاس الهيدروجيني 7 ويمكن اظهارها باستخدام صبغة التولودين الزرقاء (Knox and Wickin,1993)(Toluidine Blue).

المواد وطرائق العمل

الكواشف المستعملة بالتشخيص:

*كاشف انزيم الكاتالايز

محلول 3%بيروكسيد الهيدروجينH2O2

*كاشف انزيم الاوكسيداز

محلول 1% N,N,N,N, Tetra methyl _P_phenylene_Diamine Dihydrochloride(اذيب 1غم من هذه المادة في 100 مليلتر من الماء المقطر.

المحاليل المستعملة في استخلاص حامض التايكويك:

*محلول انزيم DNase

حضر بتركيز 1ملغم/مليلترمن محلول يتكون من 0.01 مولار من محلول Tris ذي اس هيدروجيني 7.5 للحصول على تركيز 1000 مايكرو غرام/مليلتر من الانزيم.

*محلول انزيم RNase

حضر بتركيز 1ملغم/مليلتر من محلول يتكون من 0.01 مولار من محلولTris ذي

اس هيدروجيني 7.5 مضافا" اليه0.15 مولار كلوريد الصوديوم ثم سخن في حمام مائي عند درجة 100 م لمدة 15 دقيقة للحصول على تركيز 1000 مايكرو غرام /مليلتر من الانزيم.

*دارىء الفوسفات الملحيPhosphate Buffer Saline

ذوالرقم الهيدروجيني 7.4 يتكون هذا الدارىء من محلولين هما:

المحلول الاول:محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين (K2HPO4)(0.01) مولار.

حضر باذابة 2.28 غم من K2HPO4 في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر.

المحلول الثاني:محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين(KH2PO4)(0.01)مولار.

حضر باذابة 1.36 غرام من KH2PO4 في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر.

مزج 500 مليلتر من المحلول الاول مع 500 مليلتر من المحلول الثاني واضيف اليه58.4 غرام من كلوريد الصوديوم ومزج جيدا"وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م لمدة 15 دقيقة.

المواد والمحاليل الخاصة بأختبار الانتشار المناعي الثنائي في الهلام:_

هلام الاغاروز Agarose

صوديوم ازايد NaN3

دارىء الفوسفات الملحي 0.15 مولار ذو الاس الهيدروجيني 7.2

حضر بأذابة 2 غم من الاغاروز و 0.05 غم من ازايد الصوديوم في 100 مليلتر من دارىء الفوسفات الملحي داخل حمام مائي مغلي لمدة 30 دقيقة.

<u>طرائق العمل:</u>

جمعت 34عينة(قيح ودم) من المرضى المصابين بالتهاب العظم والنقي بعد تشخيصها من قبل اطباء اختصاص كسور في العيادة الخارجية لمستشفى بعقوبة العام _ دائرة صحة ديالى.

تم اخذ عينة القيح بوساطةمسحة قطنية معقمةبعد القيام بتعقيم المنطقة وتركها لتجف. وتم تخطيط المسحات القطنية المحملة بالقيح على طبق غراء الدم مباشرة بعد سحبها من المريض وحضنت بدرجة 37م لمدة 18_24 ساعة.تم انتخاب المستعمرات الشفافة المحدبة وتخطيطها

على وسط غراء الدم لحين الحصول على مستعمرات مفردة اعيدت هذه العملية مرتين لضمان نقاوة العزلات.

تم بعد ذلك اجراء الفحوصات المظهرية والكيموحيوية والفسيولوجية الكافية لتشخيص بكتريا *Staphylococcus aureus*

اما عينات الدم فقد تم سحب 5 مليلتر من دم المرضى المصابين الذين شخصوا بالاصابة ،وتركت الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة ،ثم نبذت مركزيا"بسرعة 1500 دورة /دقيقة ولمدة 10 دقائق ،تم فصل المصل وحفظ بانابيب ابندروف بدرجة _20م لحين استعمالها .

الفحوصات الكيموحيوية:

*فحص انتاج انزيم الكاتاليز Catalase test

اضيفت قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين3% على سطح النمو البكتيري على وسط الغراء المغذي ،تتمثل النتيجة الموجبة بتصاعد فقاعات غازية من سطح النمو البكتيري

*فحص انتاج انزيم الاوكسيديز Oxidase test

تم هذا الفحص باخذ جزء من النمو البكتيري ووضع على ورقة ترشيح نظيفة ، ومن ثم اضيفت قطرتان من الكاشف N,N,N,N,Tetra methyle-P-phenylene Diamine Dihydrochloride .ان ظهور اللون البنفسجي المزرق خلال 10 ثوان دليل على ايجابية الفحص.

*فحص انتاج انزيم مخثر البلازما Coagulase test

تم اجراء هذا الاختبار بطريقتين:_

*طريقة الانبوب Tube method

وتستخدم للتحري عن ال Coagulase الحر ،حيث تم خلط 0.1 مليلتر من مزرعة بعمر 18 ساعة مع 0.5 مليلتر من بلازما الدم الانسان ،حضن الخليط بدرجة 37م وتم قراءة النتائج خلال الست ساعات الاولى من الحضن واعتبرت أي درجة من التجلط نتيجة موجبة.

طريقة الشريحة Slide method

وتستخدم للتحري عن الCoagulase المرتبط او عامل التكتلClamping factor .حيث

اخذت شريحتان زجاجيتان وضع على الاولى قطرة من المحلول الفسيولوجي وعلى الثانية قطرة من بلازما دم الانسان ثم اضيف الى كل منها قليل من المزروع البكتيري ومزجت جيدا"بحركة دائرية مستمرة .تتمثل النتيجة الموجبة بظهور تكتل خشن خلال 5_10 ثانية.

*اختبار انتاج انزيم محلل الدم Haemolysis

زرعت العزلات على وسط غراء الدم الحاوي على دم الانسان بنسبة 5% وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة.

*فحص انتاج الانزيم المحلل للدنا

زرعت العزلات على وسط اختبار ال DNase الصلب وحضنت بدرجة 37م لمدة 18 ساعة .اعتبرت العزلات منتجة للانزيم المحلل للدنا في حالة ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات النامية.

*اختبار انتاج الحامض هوائيا"من السكريات

اولا":وسط تخمر السكريات:

تم تحضير مرق البيتون واضيف اليه كاشف Bromocresol blue بتركيز مقداره 0.005%(وزن/حجم) وعقم بالمؤصدة ثم اضيف اليه السكر بعد تعقيمه بالترشيح بنسبة 0.5%(وزن/حجم) ووزع في انابيب اختبار.وتم استخدام السكريات الاتية:مانيتول،سكروز،مالتوز،ماتوز.

ثانيا": طريقة العمل:

لقحت انابيب الاختبار الحاوية على وسط تخمر السكريات بالعزلات البكتيرية ،حضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة .تتمثل النتيجة الموجبة بتغير لون اوساط السكريات من اللون الارجواني الى الاصفر.

<u>الاختبارات الفسيولوجية</u>:

اختبار النمو على غراء الملح والمانيتول:

لقحت اوساط Mannitol salt agar الحاوية على كلوريد الصوديوم بنسبة 10%(وزن/حجم) بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24_48 ساعة .تتمثل النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط من الاحمر الى الاصفر الذهبي وظهور نمو ملحوظ.

التنقية الجزئية لحامض التايكويك:-

تضمنت عزل جدار خلية *Staphylococcus aureus* ومن ثم استخلاص حامض التايكويك من جدار الخلية

اولا": عزل جدار خلية*Staphylococcus aureus*

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Umeda,(1987) وتتلخص بما يلي::-

*-تلقيح لتر واحد من وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain-Heart infusion broth) للعزلة المنشطة مسبقا" على وسط الغراء المغذي (Nutrient agar) بعمر 18 ساعة.

2_تحضن في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة /الدقيقةبدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة

3_نبذ العلق البكتيري بسرعة 8000 دورة /الدقيقة وتم فصل الراسب بعد غسله بمحلول دارىء الفوسفات الملحي (Phosphate buffer saline)(PBS) ثم علق الراسب بمحلول الدارىء نفسه

4_اضيف للعالق كمية متساوية من الحبيبات الزجاجية المعقمة ومزجت محتويات الانبوبة باستخدام المازج الكهربائي (Vortex) بسرعة 500 دورة/ الدقيقة لتكسير الخلايا البكتيرية(ان تغير لون العلق من الابيض العكر الى سائل اصفر شفاف (فقدان العكرة) دليل على انتهاء عملية التكسير .

5_نبذت المحتويات باستخدام منبذة بسرعة 2000 دورة /الدقيقة لمدة 10 دقائق لفصل الرائق عن الحبيبات الزجاجية والخلايا غير المتكسرة.

6_نبذت مرة اخرى بسرعة 10000 دورة /الدقيقة بدرجة 4م لمدة 30 دقيقة لاخذ الراسب (الخلايا المتكسرة)والذي يمثل جدار الخلايا الخام.

ثانيا":استخلاص حامض التايكويك من جدار خلية *Staphylococcus aureus* Umeda,(1987)

1_معاملة الجدار الخام ب2%من سلفات دودوسيل الصوديوم بدرجة 37م لمدة 30 دقيقة (لازالة الغشاء السايتوبلازمي وبعض المكونات الخلوية واغلب البروتينات العالقة بالجدار

2_معاملة الجدار بانزيم التربسين(200 مايكروغرام بالمليلتر من التربسين في دارىء الفوسفات ذي مولارية0.05 مولار)ذي الرقم الهيداوجيني 7.8 عند درجة 37م لمدة 18 ساعة

3_اضافة 5 مايكروغرام بالمليلتر من الانزيمين الدنازDNase والرناز RNase(لازالة الاحماض النووية الدنا والرنا من النموذج)

4_نبذ بسرعة 3000 دورة /الدقيقة وغسل الراسب بدارىء الفوسفات الملحي

5_اضافة 10%من حامض ثلاثي كلوروخليك لمدة 15 دقيقة

6_نبذ بسرعة 3200 دورة/ الدقيقة لمدة 30 دقيقة وبدرجة 4م

7_ يرشح الراشح بمرشحات ذات ثقوب دقيقة (0.2 مايكرون)

8_اضافة الكحول الاثيلي للراشح لمدة 24 ساعة

9_نبذ بسرعة 3000 دورة /الدقيقة لمدة 15 دقيقة

10_تكون راسب ابيض رقيق يمثل حامض التايكويك

الكشف عن الاجسام المضادة لحامض التايكويك

اتبعت طريقة Wheat *etal*.,(1985) في الكشف عن اضداد حامض التايكويك في مصل دم المرضى المصابين بالتهاب العظم والنقي باستخدام اختبار الانتشار المناعي بالهلام (Timothy *etal*.,1991) وعلى النحو الاتي :تم تحضيرهلام الاكاروز وصب في اطباق زجاجية نظيفة وجافة وبعد تصلب الهلام تم عمل حفرة وسطية و4 حفر محيطية بقطر 3مليمترات وبمسافة 5 مليمتر بين الحفر المحيطية والحفر الوسطية باستعمال ثاقب الفلين (Cork borer)

اضيف 20 مايكروليتر من مصل دم المرضي المصابين في الحفرة الوسطية ووضعت نماذج حامض التايكويك المستخلص والمذاب في دارىء الفوسفات الملحي ذي الاس الهيدروجيني 7.2 في الحفر المحيطية وبتراكيز مختلفة(1\16,1\8,1\4,1\2,1) مايكروليتر/غرام، وحضنت الاطباق الزجاجية بدرة 37م داخل صندوق رطب لمدة 48 ساعة وتمت ملاحظة خطوط الترسيب المتكونة.

النتائج والمناقشة

جمعت 32عينةمن(القيح والدم) من المرضى المصابين بالتهاب العظم والنقي ،وكانت نتائج الزرع البكتيري الهوائي 22 عينة كانت نتيجتها موجبة و12 عينة كانت نتيجتها سالبة ، كما اظهرت الفحوصات الكيموحيوية والفسلجية التشخيصية وجود 9 عزلات من بكتريا *Staphylococcus aureus* وهي موجبة لفحص الكاتاليز وسالبة لفحص الاوكسيديز ومنتجة

للانزيم المخثر للبلازما ،ومنتجة للانزيم المحلل للدنا ونمت بشكل مستعمرات ذهبية على وسط غراء الدم والمانيتول.ويوضح الجدول في الملحق رقم (2) نتائج هذه الاختبارات لعزلات بكتريا *Staphylococcus aureus*

عزل حامض التايكويك واستخلاصه من جدار بكتريا *Staphylococcus aureus*

اختلفت عملية الاستخلاص في معظم الدراسات ،الا ان الاستخلاص تحت الظروف الحامضية كان شائعا".اذ اعتمدت طريقة Umeda,(1987) اذ قام بتكسير الخلايا البكتيرية النامية في وسط نقيع القلب والدماغ باستخدام الحبيبات الزجاجية وتم الاستخلاص بأستخدام حامض ثلاثي كلوروخليك وبتركيز 10%لمدة 15 دقيقة واجراء النبذ المركزي المبرد بد رجة حرارة 4م.ان استخدام حامض ثلاثي كلورو خليك بتركيز 20_30% لمدة 15 دقيقة وبدرجة حرارة 90م يؤدي الى فقدان الفعالية المصلية .(Serological activity).

اما فقد Hughes and Tanner,(1992) قاموا بأستخلاص حامض التايكويك تحت ظروف قاعدية بأستخدام هيدروكسيد الصوديوم بدرجة حرارة 35م.الاان هذه الطريقة تكون غير ملائمة لاستخلاص كل انواع حامض التايكويك اذانه في بعض الحالات تؤدي المعاملة بالقاعدة عند استخلاص حامض التايكويك الى تكسير هيكله وفقدان فعاليته المصلية.

الكشف عن الاجسام المضادة لحامض التايكويك بطريقة الانتشار المناعي الثنائي بالهلام

تم التحري عن وجود اضداد حامض التايكويك في مصل دم مرضى التهاب العظم والنقي بأستعمال حامض التايكويك المستخلص من جدار بكتريا *Staphylococcus aureus* بوساطة اختبار الانتشار المناعي بالهلام وذلك بظهور خط ترسيبي بين مصل دم المرضى المخمجين وتراكيز من حامض التايكويك المذابة في دارىء الفوسفات الملحي.

وهذ دليل على تفاعل حامض التايكويك المستخلص من الجدار مع الاضداد النوعية لها في المصل المضاد كما هو موضح في الصورة في الملحق رقم (3).اتفقت النتائج مع Timothy *et al*.,(1991)الذي اشار الى وجود اجسام مضادة لحامض التايكويك المستخلص من جدار بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من مرضى التهاب العظم والنقي والذين لديهم اخماج الجروح العميقة، اذ تم الكشف عنها بوساطة الانتشار المناعي بالهلام بظهور خط ترسيبي واحد.

اما Mackowiak and Smith(1987) فقد اشاروا الى اهمية اختبار الانتشار المناعي بالهلام في التحري الكمي عن اضداض حامض التايكويك المستخلص من جدار بكتريا *Staphylococcus aureus*، اذ اشير الى انتاج الكلوبيولين المناعي ج في مصل دم مرضى التهاب العظم والنقي . واشار Groll and Shah,(1989) ايضا"الى وجود اضداد حامض التايكويك المستخلص من جدار بكتريا في دراستهم ل 26مريضا"من مجموع 30 مصابا"بالتهاب العظم والنقي التي تم التحري عنها باختبار الانتشار المناعي بالهلام.اما Tuazon and Sheagrean,(1991) فقد اشاروا في دراستهم ل28 مريضا"مصابا" بالتهاب العظم والنقي الى اهمية اختبار الانتشار المناعي بالهلام في التشخيص المبكر للاخماج المتسببة بوساطة بكتريا *Staphylococcus aureus*عن طريق كشف التقدير الكمي لاضداد حامض التايكويك.

الاستنتاجات

ان اختبار الانتشار المناعي في الهلام اظهر وجود الاجسام المضادة لحامض التايكويك في مصل دم المرضى المصابين بالتهاب العظم والنقي عند استعمال حامض التايكويك المستخلص ، وهذا ما يجعل هذا الاختبار طريقة سهلة للاستدلال بالاصابة بالتهاب العظم والنقي.

المصادر باللغة العربية:

هادي، اميرة عبد الامير (2000)/ عزل وتوصيف الطبقة اللزجة من جرثومة *Staphylococcus epidermidis* الملتصقة على العدد الطبية المستخدمة في نقل السوائل/كلية العلوم/قسم علوم الحياة/جامعة بغداد.

References

*Adams,J,C.(1973)."Outline of orthopaedics)7th edition pp.68_81.
*Ahmed,B,E.(2004).Osteomylitis.J.emedicine instant Access to the ind of medicine.

*Baddiley,J.(1989).Bacterial cell walls and membranes.Discovery of the teichoic acids.Bioessays.10(6):207_10.(Medline).
*Baron,E.J.,Peterson,R.,Finegold,S.M.(1994).HospitalEpidemiology,conventional and rapid microbiological methods for identification of bacteria and fungi.InBailey and Scotts Diagnostic Microbiolology.Mosby,9th edition,Chap6,25.pp41,42,:97_108.
*Brock,T.D.andmodigan,M.T.(1988).Biologyof microorganism.5thed.Preentice Hall,Inc.,NewJersey.
*Daugharty,H.Martin,R.R. and White,A.(1989).Antibodies against Staphylococcal teichoic acids and type specific antigens in man .J.Immunol.,98:1123_1129.
*Elizabeth,P.and David,B.(2004).Staphylococcus aureus infection.Division of Pediatric infectious Diseases.Atlantic Health System.Chapter:18. *Groll,A.and Shah,P.(1989)Teichoic acid antibody assay in infections of the bones and joints caused by Staphylococcus aureus.Unfallchirurg,92(8):414_8. *Grov,A.and Rude,S.(1989).Immuno chemical examination of phenylhydrazine_treated *Staphylococcus aureus* cell walls.Acta ,Pathol.Microbiol.Scand,71:417
*Hughes,R.C. and Tanner,P.J.(1992).The action of dilute alkali on some bacterial cell

walls.Biochem.Biophys.Commun.,33:22_28.
*James C.(2000).Control of communicable disease manual.7the dition.American Public Health Association.P:460_468.
*.Knox,K.W.and Wicken,A.J.(1993).Immunological properties of teichoic acides .Bacteriological.Reviews,37(2):215_257.
*Larinkari,U.M.Valtonen,M.V.,Sarvas,M. and Voltenen,V.V.(1987).Teichoic acid antibody test :its use in patients with coagulase_positive staphylococcual bacterimia.Arch Intern Med .,137(11):1522_5.
*Lowy,F.D.(1998) *S taphylococcus a ure u s* infections.N Engl J Med,339(8)::520_32.
*Mackowiak,P.A. and S mith ,J.W.(1987).Teichoic acid antibodies in chronic staphylococcual osteomylitis.Ann Intern Med ,89(4):494_6.
*Martin,R.R.,Daugharty,H. and White,A.(1988).Immunoglobulins of specific staphylococcal antibodies.Pediatrics,41:1092_1096.
*Mohammed,H.(2001).Management of acute Haematogenous osteomylitis inchildren.Thesis in orthopaedic surgery collage of medicine ,Al_Mustansirya University.
*Perouse,M.,Boullanger,P.,Flandrois,J.(1988)Study of Staphylococcus aureus teichoic acid immunodominant site by help of synthetic haptens.Zentraibi_Bakteriol_Mikrobiol_Hyg_A.267(3):414_24.
*Smith.J.M.and Dubos,R.J.(1956).The behavior of virulent and avirulent staphylococci in the tissues of normal mice ,J.Exp.Med.,103:87_107.
*Timothy,E.,Burdash,M.,Boehm,M. and West,E.(1991).Evaluation of acommercial counterimmunoelectrophoresis kit for detection of *Staphylococcus aureus* teichoic acid antibodies .J Clin Micro,17(4):567_570.
*Tuazon,C.U. and Sheagrean,J.N.(1991).Teichoic acid antibodies in the diagnosis of serious infections with *Staphylococcus aureus* .Ann Intren Med,84(5):543_6.
*Umeda,A.(1987)Structure of *Staphylococcus aureus* cell wall determined by the freeze substitution method.Nippon Saikingaka,Zasshi,43(6)961_963.
*Weeke,J.,Lahav,M.,Ginsburg,I.and Giesbrecht,P(1990).Cellwall degradation of *Staphyloccus aureus* by lysozyme.Arch Microbiol ,131(2):116_23.
*Wheat,J.,White,C.and Norden,C.(1985)Serological diagnosis of Staphylococcus aureus osteomylitis.JClin Micro,21(5):764_767.
*William,C. and Warner,J.(1998).Osteomylitis.In"Compbells operative orthopedic".Edition by Canal ,T.S.,Vol .1Mosby publication.9th edition.Chap,14,PP.578_600.

Study of extracted teichoich acid from Staphylococcus aureus isolated osteomylitis Patient

Summery

This study deals with the isolation and identification of bacteria *Staphylococcus aureus* that cause osteomylitis ,and the extract teichoic acid from the wallof *Staphylococcus aureus* isolate and tried to identify the antibodies of teichoic acid in serum of patients complaining from osteomylitis.

Thirty four samples of(pus and blood) were collected from hospitalized osteomylitis patient in BaqubaGeneral Hospital-Diyala province.The results of aerobic bacterial culture revealed 22 positive samples and 12 negative samples.The biochemical test revealed 9 isolates of *Staphylococcus aureus* .Extraction and partial purification of teichoic acid from the wall of *Staphylococcus aureus* was determind by using the mechanical disintegration procedure using speed shaking method to disintegrate the cell wall of *Staphylococcus aureus* by adding the glass beads and obtaining an appropriate amount from the disintegrate cells.Extaction and partial purifiacation of disintegrated wall depended on the digestion by proteolytic enzymes

in addition to the use of sodium dodecyle sulphate (SDS)to removethe cytoplasmic membrane .The antibodies aginst cell wall of teichoic acid of *Staphylococcus aureus* were detected in the osteomylitis patient serum using immunodiffusion in gel test through the appearance of one precipitate band against teichoic acid extracted from the cell wall of *Staphylococcus aureus*