عزل وتشخيص بكتريا *Cambylobacter jejuni* من حالات الإسهال في الأطفال.

لمى جاسم حمود وتوت — أزهار عمران لطيف — فريال جميل عبد

كلية طب الأسنان/ جامعة بابل — كلية العلوم / جامعة بابل — كلية العلوم / جامعة بابل

الخلاصة:-

جمعت 125 عينة براز من أطفال مصابين بالإسهال تتراوح أعمارهم بين (1 - 5) سنوات من مستشفى بابل للولادة والأطفال للمدة بين تشرين الثاني 2009 ولغاية آيار 2010. تم الحصول على 12 عزلة بكتيرية لبكتريا *C.jejuni* أي بنسبة 40% باستعمال طريقتين للعزل، الأولى باستخدام الوسط الانتقائي (وسط سكيرو) والثانية باستخدام ورق الترشيح ذي القطر (0.45µm).أجريت الفحوصات الكيموحيوية والفسيولوجية واختبار الحساسية للمضادات الحيوية وكانت النتائج متماثلة لـــ 12 عزلة بكتيرية، حيث كانت جميعها حساسة لحامض النالدكسيك ومقاومة للسيفالوثين بنسبة 100%.تم التحري عن الضد الموضعي المتخصص في عينات البراز باستخدام التلازن بالأنابيب للكلوبيولينات المناعية المفصولة من براز المرضى لـ 55عينة . بينت نتائج الاختبار أن 30 عينة كانت موجبة أي بنسبة 54.5%.تم التأكد من العزلات البكتيرية بإجراء الفحص المصلي باستخدام العدة التشخيصية للكلوبيولينات المناعية والبكتريا وكان اختبار تلازن اللاتكس موجباً لتلك العينات.

المقدمة:-

ان بكتريا *Campylobacter jejuni* هي عصيات منحنية تمتلك سوطين على قطبي الخلية، وهي خلايا صغيرة جدا يبلغ عرضها حوالي (0.2 - 0.5) مايكرون وطولها حوالي (0.5 - 5) مايكرون، عندما تلتصق خليتان مع بعضهما قد تكون بشكل حرف (S) أو تكون شكل يشبه أجنحة طائر النورس (gull – winged)، تظهر الخلايا في المستعمرات القديمة كروية أو دائرية الشكل، البكتريا غير مكونة للأبواغ، سالبة لصبغة كرام، تغذيتها كيمياوية عضوية، لا تخمر الكربوهيدرات ولا تؤكسدها وتعتمد تغذيتها على عملية التنفس ولا تنتج حوامض أو مواد متعادلة لأيضها (25).من الصعب الكشف عن البكتريا في العمل التقليدي لقلة فعاليتها الكيموحيوية، حيث تحتاج البكتريا إلى كميات قليلة من الأوكسجين (Microearophilic) وكمية كبيرة من ثاني أوكسيد الكربون مقارنة بالبكتريا الهوائية لغرض البقاء، يمكن توفير هذه الظروف بوساطة حاضنة لا هوائية تسيطر على الظروف التي تحتاجها البكتريا حيث تنظم هذه الحاضنة الهواء الذي يدور داخلها ليتكون من (5 - 10)% ثاني أوكسيد الكربون و(5 - 10)% أوكسجين والباقي نيتروجين بالإضافة إلى تنظيم درجة الحرارة على 42مْ (34).

بالرغم من أن البكتريا غير محللة للدم فإن البحوث الحديثة أشارت إلى أنها تسبب نوعين من التحلل احدهما ألفا والآخر بيتا على وسط أكار الدم ولاسيما النوع (17) (*Campylobacter jejuni*).

صنفت بكتريا *C.jejuni* مع الجنس *H.pylori* في بداية تصنيفها ثم فصلت عنها كجنس مستقل بالاعتماد على خصائص تركيبية وكيميائية حيوية كوجود الأسواط وأغلفتها ومحتوى الحامض الدهني والإنتاج لإنزيم اليوريز (Urease) وصفات أخرى فصلت عن جنس *Helicobacter* (10).

تسبب بكتريا *Campylobacter jejun*i الاسهال بنسبة 10-18% (33).

عرفت مقاومة البكتريا بسلالاتها المختلفة للمضادات الحيوية المختلفة منذ زمن بعيد، وقد أظهرت بكتريا *Campylobacter* هذه المقاومة أيضاً ، تعتبر بكتريا *Campylobacter* بطبيعتها مقاومة للبنسلينات

والسيفالوسبورينات ما عدا المضادات واسعة الطيف (32) . وتحفز البكتريا كذلك كلاً من الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية(23).وهدف الدراسة الحالية هو عزل وتشخيص بكتريا *Campylobacter jejeni* بكتريولوجيا ومصليا من حالات الاسهال وذلك لقلة الدراسات لهذه البكتريا في محافظة بابل .

المواد وطرائق العمل:

أولاً: العينات

أ: المرضى Patients:

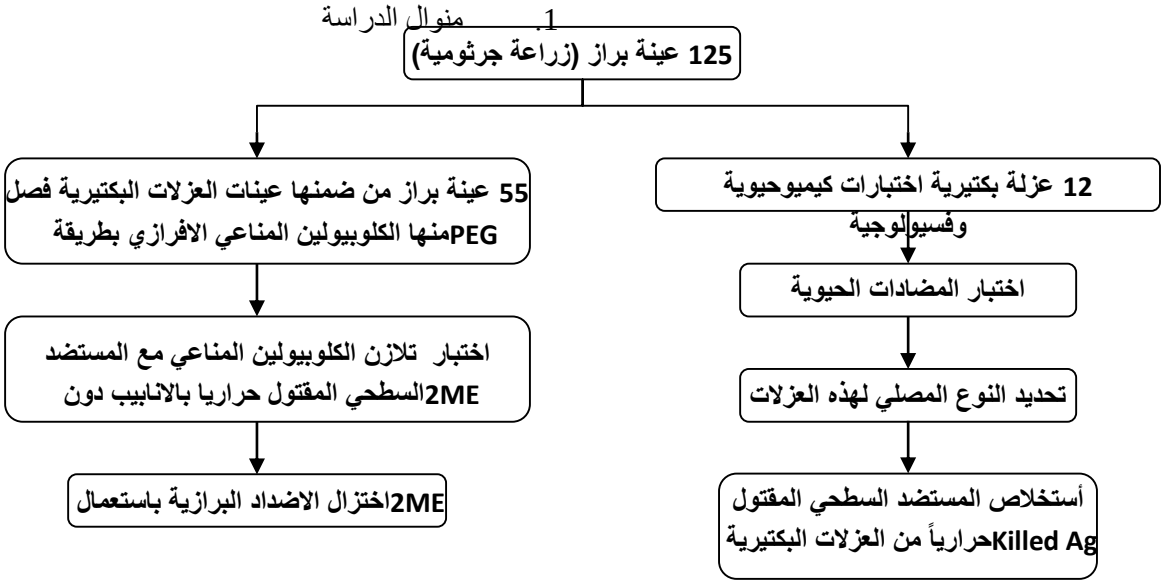
شملت الدراسة 125 عينة براز لأطفال تتراوح أعمارهم بين (1 - 5) سنوات في مستشفى الولادة والأطفال في محافظة بابل للمدة بين تشرين الثاني 2009 ولغاية آيار 2010.

ب: السيطرة Control:

عينات براز من اشخاص غير مصابين بالاسهال.

ثانياَ:الفحوصات البكتريولوجية

- طرق زرع العينات



شكل (1) مخطط منوال الدراسة

2.طرائق زرع العينات Cultural Methods:

تم تلقيح وسط أكار كولومبيا الحاوي على المضادات الحيوية Skirrow Selective) Supplement III) شركة (Himedia) ودم الإنسان بواسطة المسحة القطنية من الوسط الناقل للعينة بتخطيطها على الوسط الانتقائي وحضنت الأطباق في ظروف مقلة للأوكسجين Microearophilic حيث يوفر الـO2 بنسبة 5%، CO2 بنسبة (5 - 10%)، N2 بنسبة 85% في حاوية لا هوائية Candle Jar بدرجة حرارة 42مْ لمدة (24 – 96) ساعة.

استخدمت طريقة اخرى لعزل بكتريا الـــ *Campylobacter jejuni* من البراز وهي عمل عالق من عينة البراز بماء الملح الطبيعي ثم سحب جزء من هذا العالق بوساطة حاقنة ويحقن بقوة خلال ورق ترشيح قطرة 0.45µm السائل المرشح المار خلال ورقة الترشيح يحتوي على بكتريا *Campylobacter jejuni* يلقح به على وسط العزل الصلب (Columbia Blood Base Agar، (11).

أُجريت طريقة الزرع الثانوي للبكتريا على اوساط غير انتقائية مثل (Blood agar) وChoclate agar)) حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37مْ في ظروف مقلة للاوكسجين لمدة (24 - 96) ساعة (3).

3.طرائق التشخيص الاعتيادية:

تم تشخيص النمو البكتيري وفق ما جاء في (28) من خلال:

أ. دراسة الخصائص المظهرية المزرعية للمستعمرات النامية لكل عينة.
ب. الفحوصات المجهرية وتفاعلات صبغة كرام.
ج. التفاعلات الكيموحيوية لكل عينة.
د. تحديد النوع المصلي.

ه. اختبار الحساسية لحامض النالدكسيك والسيفالوثين.
و. فحص الحركة.

- **الشكل الخارجي:**

تم تحضير مسحات مباشرة من المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية وصبغها بصبغة كرام.

- الخصائص المزرعية:

تم دراسة النمو مظهريا على الأوساط الصلبة و الأطباق التي لا يوجد فيها نموٌ في اليوم الثالث من التحضين تمت حضانتها مرة أخرى مدة يومين قبل أن تعد سالبة الزرع.

المستعمرات المسطحة الرمادية الرطبة نصف الشفافة تشخص كمستعمرات لبكتريا *Campylobacter jejuni* مبدئيا.

- تحديد النوع المصلي لبكتريا *Campylobacter jejuni*:

تم اختبار العزلات مصلياً باستخدام اختبار التلازن على الشريحة (Slide Agglutination Test) مع المصل الضدي لبكتريا *Campylobacter jejuni* (Hi *Campylobacter* Latex Test Kit) المجهز من قبل شركة (Himedia Laboratories Prt. Ltd.) وذلك بمزج قطرة من عالق البكتريا المحضر في مرق البروسيلا مع قطرة من المصل الضدي على سطح شريحة نظيفة مع مراعاة إجراء اختبار السيطرة بمزج قطرة من مرق البروسيلا غير المزروع مع قطرة من المصل الضدي، تقرأ النتيجة بظهور التلازن خلال (دقيقة – دقيقتين).

- **اختبار الحساسية للمضادات الحيوية:**

نقل 0.1 مل من العالق الميكروبي بعد مقارنته بأنبوب ماكفرلاند القياسي 0.5 وزرع على وسط مولر هنتون الصلب (Muller – Hinton Agar) المجهز بـ 5% دم الحصان تركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة (10-15) دقيقة وزعت أقراص المضادات الحيوية والتي شملت (حامض النالديكسيك بتركيز 50µm والسيفالوثين بتركيز 50µm) بملقط معقم Forceps على الوسط الصلب وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 48 ساعة تحت ظروف قليلة التهوية قرئت النتيجة بعد انتهاء فترة التحضين بظهور هالات التثبيط للمضادات التي تحسست لها البكتريا ولم تظهر هالات التثبيط للمضادات التي تكون البكتريا مقاومة لها (19).

ثالثاً: الفحوصات المناعية:

1.تحضير المستضد السطحي للبكتريا سالبة الكرام المقتول حرارياً Heat killed Bacterial Ag:
استخدمت طريقة (43) مع إجراء بعض التحويرات.

2.فصل الكلوبيولينات المناعية الإفرازية من البراز بوساطة (PEG) Separation Method for Secretory Ig From Feaces by Polyethylene Glycolاتبعت طريقة(2)

3.التلازن بالأنابيب Tube Agglutination Test:
استخدم هذا الاختبار للتحري عن وجود خاصية ضدية للكلوبيونات المناعية الإفرازية لمستضدات البكتريا او عدم وجودها وتحديد العيار (16).

أ. التلازن بالأنابيب للكلوبيولينات المناعية الإفرازية (الأضداد البرازية)Tube Agglutination Test :

استعملت طريقة (40)

ب. اختزال الأضداد البرازية (Reduction of S-Ig):

في الوقت نفسه الذي تم فيه اختبار الأنابيب تم استخدام ثمانية أنابيب أخر للأضداد البرازية وإجراء الخطوات نفسها في اختبار الأنابيب ولكن استبدل المحلول الملحي الفورماليني بالمحلول المختزل ثاني مركبتو ايثانول (0.05 مولاري) والمخفف بالمحلول الملحي.

النتائج والمناقشة :-

تم الحصول على 12 عينة موجبة لبكتريا *Campylobacter jejuni* وتم اختيار 55 عينة من مجموع 125 من العينات للدراسة المصلية الشكل (2). أظهرت 30 عينة منها إيجابية للفحص المصلي و25 منها سالبة للفحص المصلي. أظهر الزرع الجرثومي للعينات الموجبة للفحص المصلي 12 منها موجبة و18 سالبة للزراعة الجرثومية (شكل 2) قسمت عينات البراز الموجبة للفحص المصلي على أساس القوام دموي أو مخاطي. وأظهرت النتيجة 20% منها ذات قوام دموي و 80% ذات قوام مخاطي .

تناولت الدراسة عزل وتشخيص بكتريا *Campylobacter jejuni* و بعض الجوانب المناعية لالتهاب الأمعاء ، ففي هذه الدراسة كان ا براز الأطفال المصابين بالإسهال تتراوح أعمارهم بين (1 – 5) سنوات وهذا يتوافق مع البيانات في دول الخليج لعربي كالكويت والسعودية والبحرين بالنسبة لعمر الأطفال الذين عزلت منهم البكتريا فقد كانت أكثر الحالات للأعمار دون أربع سنوات (5).

ومن خلال اعتماد الصبغ بصبغة كرام(جدول 2) وجد أن نسبة البكتريا الموجبة الكرام كانت 43.2% وهذا يعود لوجود مسببات بكتيرية أخرى موجبة الصبغة مثل *Staphylococcus* و*Streptococcus* أما نسبة البكتريا السالبة لصبغة كرام دون بكتريا *Campylobacter* فقد كانت 47.2% وهذا يعود إلى وجود بكتريا قد تكون ملوثة للبراز أو فلورا طبيعية وشملت هذه الأنواع *Pseudomonas* و*Enterobacter* هذا التلوث يعزى إلى استعمال الدم في طبق الزرع حيث انه يوفر المغذيات ويسمح لنمو أنواع بكتيرية أخرى وبالتالي فمن الصعب الحصول على مستعمرات نقية للبكتريا وهذا يتفق مع (6). أما نسبة بكتريا *Campylobacter* فكانت 9.6%، فمن خلال التصبيغ بصبغة كرام ظهرت عصيات منحنية وسالبة لصبغة كرام اعتبرت مبدئيا بكتريا *Campylobacter*. إذ تعد طريقة التصبيغ بصبغة كرام صعبة لتمييز بكتريا *Campylobacter* واقل حساسية (21).

كانت نتائج الزرع الأولي ايجابية أي تم الحصول على البكتريا وسلبية أي الحصول على انواع بكتيرية اخرى غير بكتريا *Campylobacter* وذلك بعد جلب عينات البراز بالوسط الناقل نقيع القلب – الدماغ الحاوي على المضادات الحيوية (Skirrow selective supplement III) كوسط أغنائي حيث إن هذا الوسط ينعش البكتريا ويقلل من تحطيم الخلايا الجرثومية نتيجة التعرض للحرارة أو الجفاف أو التجميد أو التعرض لجذور الأوكسجين، كما انه يساعد على الحصول على مستعمرات مفردة وفي تشخيص الأنواع (22). إن تحضين العينة بالوسط الإغنائي الناقل لمدة أربع ساعات بدرجة حرارة 37مْ في ظروف قلة الأوكسجين قبل زراعتها على الوسط الانتقائي الصلب يقلل من نمو الملوثات (20). يمكن وصف المستعمرات التي كانت تظهر بعد الزرع على الوسط الانتقائي الصلب (Columbia blood base agar) الحاوي على المضادات الحيوية المذكورة سابقا بعد التحضين بدرجة حرارة 42مْ لمدة 48 ساعة في ظروف قلة الأوكسجين على أنها مستعمرات كبيرة ومخاطية ولزجة وذات لون رمادي وقطرات تشبه قطرات الماء وصغيرة وهذا يتفق مع (1).وقد كانت نتائج العزل للبكتريا باستخدام أوراق الترشيح ذات القطر (0.45µm) بعد جلب العينات بماء الملح الطبيعي واستعمال ظروف التحضين السابقة على الوسط الصلب (Columbia blood base) agar غير الحاوي على المضادات الحيوية كانت نتائجها مماثلة للعزل السابق حيث ظهرت مستعمرات كبيرة ومخاطية ولزجة وذات لون رمادي وتشبه قطرات الماء وتعد طريقة الترشيح من الطرائق الجيدة إذ إن هذه الطريقة يمكن من خلالها عزل كل أنواع بكتريا *Campylobacter*، بالإضافة إلى انه ليس جميع خلايا *Campylobacter* لها القابلية على المرور خلال فتحات أوراق الترشيح وحساسيتها تكون محدودة إلى 10 Unit / g من البراز (26). ويؤيد بعض الباحثين استعمال طريقة الترشيح على الوسط الانتقائي وغير الانتقائي كونه يعزز من نمو بكتريا *Campylobacter* المتحملة للحرارة (19).

أما نتائج الزرع الثانوي للبكتريا على وسط غير انتقائي مثل (Blood agar وChoclate (agarوبظروف تحضين بدرجة 37مْ لمدة 48 ساعة في ظروف قلة الأوكسجين نتائج مماثلة للزرع الأولي حيث كانت المستعمرات ذات لون رمادي وكبيرة ومخاطية ولزجة وهذا يتوافق مع (39).

إن استعمال الدم بحجم 5 - 7% (حجم/حجم) ليخمد سمية مركبات الأوكسجين مثل بيروكسيد الهيدروجين عندما يتعرض الوسط للضوء (9). أما قدرة البكتريا على تحلل الدم على وسط أكار الدم حيث لوحظ في عملية الاستنبات المتكرر، حيث إن زيادة تركيز الدم في الوسط يؤدي إلى زيادة كثافة النمو وتميل المستعمرات عندها إلى اللزوجة والمخاطية مع لون وردي وهذا يتوافق مع دراسة (1).

ومن ناحية الوصف المجهري ظهرت أشكال مختلفة خلال الفحص باختلاف المسببات المشاركة للإسهال، الأشكال التي كانت تظهر عصيات منحنية على شكل حرف S أو حلزونية أو بشكل أجنحة الطير وسالبة لصبغة كرام تشخص بكتريا *Campylobacter jejuni*.

تكون المستعمرات في المزارع القديمة كروية الشكل مثل المزارع بعمر 72 ساعة لنفاذ المواد الغذائية أو تعرض الخلايا إلى نسبة عالية من الأوكسجين يؤدي إلى تغير النمو في الخلية، كما يعد تغاير أشكال الخلايا في بكتريا *Campylobacter* من الصفات الظاهرية المميزة لها(36).

عند وضع الأطباق الحاوية على النمو في درجة حرارة 4مْ لأكثر من يومين ستتحول الخلايا من الشكل الحلزوني إلى الشكل الكروي وترجع الخلايا إلى شكلها الحلزوني بصعوبة بعد إضافة منشطات النمو والدم البشري بنسبة 5% (30).

من المعروف أن هذه البكتريا تمتاز بقلة فعاليتها الكيموحيوية و على الرغم من ذلك تستخدم بعض الفحوصات لتأكيدها (42; 6).أظهرت الاختبارات الكيموحيوية جدول (3) أن جميع العزلات موجبة لفحص الأوكسديز أما الكتاليز فإن جميع أنواع بكتريا *Campylobacter* موجبة لهذا الاختبار ماعدا *C.jejuni* sub.*dolyei* فهي سالبة لهذا الفحص ويمكن تمييزها من خلال حساسيتها للـ cephalothine الذي يستعمل في الوسط الانتقائي لعزلها (45). من الصفات التشخيصية المهمة لبكتريا *C.jejuni* هو قابليتها على تحلل الهيبيوريت وهذا يميزها عن النوع *C.coli*، أما اختبار اليوريز فقد أعطت البكتريا نتيجة سالبة وهذا ما يميزها عن بكتريا *Helicobacter pylori* حيث إنها موجبة له، وفي اختبار اختزال النترات الى نتريت كانت موجبة للفحص وفي اختبار تكوين جذر الاندول كانت موجبة ايضا، اما اختبار تكوين غاز H_2S في وسط (Trible Sugar Iron) فهي سالبة ولاتنتج الغاز (45).

بالنسبة إلى تخمر البكتريا للكربوهيدرات فإنها لا تخمر الكربوهيدرات(44).

النمو بدرجات حرارية 37مْ و 42مْ صفة تشخيصية مهمة بين أنواع بكتريا *Campylobacter* وأنواع بكتيرية أخرى (27) وفي النمو على وسط أكار الماكونكي فالبكتريا لا تنمو عليه أما النوعان *C.coli* و*C.lari* فكلاهما ينمو على وسط أكار الماكونكي (44).

وفيما يخص فحص الحركة فالبكتريا متحركة وحركتها تشبه السدادات الفلينية (Corkscrew-like motility) وهي صفة تشخيصية ثانية بعد الشكل الحلزوني للبكتريا والذي يميزها عن المعويات الأخر (34). أما بالنسبة لاختبار الحساسية للمضادات الحيوية فقد أظهرت جميع العزلات مقاومتها للمضاد الحيوي السيفالوثين وحساسيتها لحامض النالدكسيك بنسبة 40% وهذا يتفق مع (1 ,6). عندما تتأكد الإصابة ببكتريا *Campylobacter jejuni* فان أول اختيار للعلاج هو المضاد الحيوي الأرثرومايسين ولأن مقاومة البكتريا لهذا المضاد متعلقة بالكروموسومات وبسبب تغير الموقع الهدف في 23S) (rRNA للرايبوسوم ، كما انه سهل الامتصاص، فاقد للسمية و كفاءته عالية هذه الصفات جعلته المضاد الحيوي المناسب لبكتريا *Campylobacter jejuni* (14). (جدول 4)اختبار الحساسية الدوائية للبكتريا اظهرت مقاومة عزلات *C.jejuni* للمضاد الحيوي السيفالوثين (الذي يعود للسيفالوسبورينات والتي هي اكبر عائلة للمضادات الحيوية والأكثر تنوعا) وهذه مشكلة إذ إن معظمها توصف للمرضى في المستشفى (36). أما صفة الحساسية لحامض النالدكسيك فهي تشخيصية لبكتريا *Campylobacter* ولكن في الوقت الحالي ظهرت بعض التعقيدات و ذلك بسبب التداخل الذي يحدث في ازدياد المقاومة لهذا المضاد الحيوي بالنسبة لسلالات البكتريا، وأظهرت عزلات الدراسة الحالية جميعها حساسية لحامض النالدكسيك وهذا يتوافق مع (42).

الدراسة المناعية :

تم التحري عن عيار الضد المتخصص للكلوبيولينات المناعية المستخلصة من عينات البراز وذلك بإجراء اختبار التلازن بالأنابيب باستخدام المستضد السطحي المقتول بتركيز 10 وحدات دولية مع العامل المختزل 2-مركبتو ايثانول (2ME) وبدونه حيث تعمل هذه المادة على كسر الأواصر بين وحدات الكلوبيولين المناعي عند الموقع (S-S)، لم يؤثر استخدام هذه المادة كثيرا مما يعني إن الأضداد الإفرازية مقاومة لفعلها (24). لم يحدث العامل المختزل اختزالاً للعيار الضدي وقد أظهرت 30 عينة من مجموع 55 عينة اجري لها التلازن عيارات عالية. أن العيارات العالية لـــ30 عينة كانت موجبة للفحص باستخدام العدة التشخيصية للفحص المصلي (47). بلغت 64,32,16 حيث كان العيار 16 الأكثر عددا في الحالات حيث ظهر في 15 حالة والعيار 32 ظهر في 4 حالات والعيار 64 ظهر في 11 حالة والعيار 4 ظهر في 10 حالات والعيار 2 ظهر في 8 حالات والعيار 1 ظهر في 7 حالات(جدول 5)

وفي التحري عن الضد المتخصص باستخدام العدة التشخيصية للفحص المصلي فقد أظهرت نتائج الاختبار المصلي لعالق البكتريا المحضر في مرق البروسيلا باستخدام اختبار التلازن على الشريحة مع المصل الضدي للبكتريا (HiCampylobacter Latex Test Kit)المجهز من قبل شركة (Himedia Laboratories Pvt. Ltd) ايجابية الاختبار للبكتريا المزروعة.كما استخدمت العدة التشخيصية للتحري عن الضد المتخصص للكلوبيولين المناعي لبكتريا *Campylobacter jejuni* وكانت النتيجة موجبة للعينات

. دراسات في أفريقيا توصلت الى عزل أنواع بكتريا *Campylobacter* من أطفال غير مصابين بالإسهال (براز اعتيادي) بعمر اقل من شهر هذا دليل على دور الأجسام المضادة في الحماية المكتسبة من أمهاتهم (18). وبين (8,7) في دراسة على الأطفال أن أصناف الكلوبيولينات التي تستجيب لبكتريا .*Campylobacter* spp متنوعة باختلاف العمر لكن ثلاثة أنواع فقط ترتفع خطيا منذ الولادة ولعمر 5 سنوات ثم ينخفض مستوى IgM بينما يبقى مستوى IgG مستقراً، حيث إن نسيج الدم يحتوي فقط على صنف الكلوبيولين المضاد IgG لأنواع بكتريا *Campylobacter* (8) وهذا مماثل للأجسام المضادة المتكونة ضد المستضد السوطي للبكتريا منذ الولادة وحتى عمر ثلاثة أشهر حيث يحتوي الدم بصورة رئيسة على الكلوبيولينIgG (29).

إن طبيعة توزيع البكتريا في الطبقة الظهارية الداخلية والتهاب الطبقة المخاطية للأمعاء ليست صفة مميزة لبكتريا *C.jejuni* (38) بقدر تكوين أجسام مضادة متخصصة (41). وعلاقته بأمراض المناعة الذاتية فقد اقترح أن بكتريا *C.jejuni* بالرغم من أنها نادرا ما تخترق الطبقة الظهارية فهي كفوءة في تحفيز الاستجابة المناعية المتخصصة(4). تلعب الطبقة الظهارية للأمعاء دورا مهماً في تنسيق الارتباط بين الاستجابة المناعية المتخصصة وغير المتخصصة وذلك بتكوين الجاذبات الكيمياوية المعروفة، هذه الطبقة لا تكون حاجزاً فيزيائياً حاسماً بين الجسم والتجويف المعوي بل تشترك كذلك بفعالية بقاء المناعة المتخصصة وغير المتخصصة مكونة الدفاع الأول ضد الممرضات المعوية للطبقة المخاطية، تحتوي هذه الطبقة كذلك على الجزء الإفرازي Secretory Component من IgA ويمنع تحطيمه من قبل الإنزيمات (13)، وكذلك من التحطيم بوساطة (2ME) (12). من الطرائق التشخيصية الشائعة في تشخيص الأمراض هي الطرائق المصلية بوصفها طرائق سريعة وبسيطة وتتناسب مع وضع المريض الصحي حيث يكون بأمس الحاجة إلى التشخيص السريع لإنقاذ حياته، يستعمل فحص اللاتكس السريع Rapid Latex Agglutination بصورة رئيسة لتأكيد تشخيص الممرضات المعوية المتحملة للحرارة كبكتريا *Campylobacter* وقد أظهرت نتائج الفحص جدول (5) نتيجة موجبة لـ30 عينة براز وبنسبة 54.4% ، كانت 12 عينة منها فقط موجبة للزرع البكتيري وذلك لان البكتريا تمتاز بصعوبة الحصول عليها بالزرع الروتيني نتيجة لوجود الفلورا الطبيعية، لكنها أعطت نتيجة موجبة لفحص اللاتكس عند التحري عن الضد الموضعي المتخصص إذ إن الدراسات حول التخصص الضدي شخص عدداً من مستضدات بكتريا *Campylobacter* خلال الإصابة بها حيث أشارت الكثير من الدراسات إلى أهمية عوامل الضراوة الموجودة على سطح الخلية وهي ممنعة. ويعد المستضد السوطي من اكبر المستضدات المناعية السائدة لبكتريا *Campylobacter* (31) .

وهناك عدد آخر من المستضدات البروتينية تتضمن بروتينات الجدار الخارجي يمكن تشخيصه وهو مُمَّنع يمكن استخدامه في التحري عن الأضداد المتخصصة لبكتريا *C.jejuni* في المواد الإفرازية (45). وقد وجد أن 50% من الاستجابة المناعية ممكن أن تعزى الى الاصابة المؤكدة ببكتريا في حين ان معايير الأجسام المضادة في حالات غير مؤكدة (*15*).

المصادر:

1- التميمي، إيمان عامر حسين علي (2007). دراسة العلاقة الاستضدادية بين عديد السكريد الشحمي لبكتريا *Campylobacter jejuni* و *Helicobacter pylori* باستخدام اختبار التلازن الدموي المنفعل والتلازن المباشر . كلية العلوم / جامعة بغداد. رسالة ماجستير.

2- السعدي، محمد عبد الكاظم (1998) . فصل الكلوبيولينات المناعية الإفرازية للأمعاء. كلية العلوم / جامعة بابل. رسالة ماجستير.

3- Albert, M. J.; Haridas, S. and Adler, B. (2008). Major outer membrane proteins from many *Campylobacter* species cross - react with cholera toxin. Clin. Vac. Immunol. P: 859 - 862.

4-Allos, B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clin. Infect. Dis. 32(8): 1210 – 1206.

5- Al-Mahmeed, A.; Senok, A.C.; Ismaeel, A.Y.; Bindayna, K.M.; Tabbara, K.S. and Botta, G.A. (2006). Clinical relevance of virulence genes in *Campylobacter jejuni* isolates in Bahrain. J. Med. Microbiol. 55: 839 - 843.

6- Al-Sibahee, S. M. A. (2010). Pathological Effects of The Cytotoxin Extracted from Alocally Isolated *Campylobacter jejuni*. Ph.D, thesis. Baghdad University. Iraq.

7- Blaser, M. J.; Black, R. E.; Duncan, D. J. and Amer, J. (1985). *Campylobacter jejuni* - specific serum antibodies are elevated in healthy Bangladeshi children. J. Clin. Microbiol. 21: 164 - 167.

8- Blaser, M. J.; Taylor, D. N. and Echeverria, P. (1986). Immune response to *Campylobacter jejuni* in a rural community in Thailand. J. Infect. Dis. 153: 249 - 254.

9- Bolton, F. J.; Mutchinson, D. N. and Coltes, D. (1984). Blood - free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. J. Clin. Microbiol. 19 (2): 169 - 171.

10- Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morase, S.A.(2004). Jawetz, Melnick and Adeberg's Medical Microbiology. 32rd ed. Lange Medical books. McGraw-Hill Companies. USA.

11- Dekeyser, P.; Goussuins - Deirain, M.; Butzler, J. – P. and Stemon, J. (1972). Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. J. infect. Dis. 125: 390 – 393.

12- Doan, T., Melvold, R., Viselllli, S. and Waltenbaugh, G. (2008). Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology. Wotters Kluwer/ Lippincott Williams and Wilkins.

13- Eales, L. J. (2003). Immunology for Life Scientists. 2nd ed. p. cm University of surrey, Guildford, UK.p:47-48.

14- Engberg, J.; Neimann, J.; Nielson, E. and Fussing, V. (2004). Quinolone - resistant *Campylobacter* infection in Denmark. Emerg. Infect. Dis. 10: 1056 - 1063.

15- Figueroa, G.; Galeno, H.; Troncoso, M.; Toldo, S. and Soto, V. (1989). Prospective study of *Campylobacter jejuni* infection in Chilean infants evaluated by culture and serology. J. Clin. Microbiol. P: 1040-1044.

16- Garvey, J. S.; Cremer, N. E. and Sussdrof, D. H. (1977). Methods in Immunology 3th ed. Addison - Wesley Publishing company INC, Reading. 21: 53 - 267.

17- Gaudreau, C. and Gilbert, H. (2003). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* subspecies. *Jejuni* strains isolated from humans in 1998 to 2001 in Montreal, Canada. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2027 -2029.

18- Georges, C.; M. C.; Beraud, C. A. M.; Gouandjika, I. and Georges, A. J. (1987). Porspective study of enteric *Campylobacter* infections in children from birth to 6 months in the Central African Republic. J. Clin. Microbiol. 25: 836 - 839.

19- Gillespie, S. H. and Hawkey, P. M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John Wiley and Sons, Ltd. P: 485-493.

20- Goossens, H. and Butzler, J. -P. (1992). Isolation and identification of *Campylobacter* spp. In: *Campylobacter jejuni* current status and future trends (ends Nachamikin, I., Blaser, M. J., Tompkins, L. S.). Ch II. American Society for Microbiology, Washington DC.

21- Ho, D. D.; Ault, M. J.; Mark, J.; Ault, Mary, A. A. and Glen, H. M. (1982). *Campylobacter* enteritis: early diagnosis with Gram's stain. Arch. Intern. Med. 142: 1858 - 860.

22- Humphrey, C. D.; Montag, D. M. and Pittman, F. E. (1985). Experimental infection of hamsters with *Campylobacter jejuni*. J. Infect. Dis. 151: 485 -493.

23- Janssen, R.; Krogfelt, K. A.; Cawthraw, S. A.; Pelt, W. V.; Wagenaar, J. A. and Owen, R. J. (2008). Host - Pathogen interaction in *Campylobacter* infection: the host perspective. American Society for Microbiology. P: 505 - 518.

24- Kwapinski, J. B. (1972). Methodology of Immunochemical and Immunological Research. Wiley - interscience, NewYork 267 - 316.

25- Law, B. and Alcamo, I. E. (2004). Deadly Diseases and Epidemics Campylobacteriosis. Chelsea House Publishers.

26- Lawson, A. J.; On, S. L. W.; Logan, J. M. J. and Stanley, J. (2001). Isolation and characterization of anew species, *Campylobacter hominis* sp. nov. from the human gastrointestinal tract. International Journal of Systematic Evolutionary Biology, 51: 651 - 660.

27- Lior, H. (1984). New extending biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, C. coli, C. larids. J. Clin. Micro. 20: 636 - 640.

28- MacFaddin, J. E. (2000). Individual biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams Wilkins, London.p:57 – 424.

29- Martin, P. M. V.; Mathiot, J.; Ipero, J.; Kirimat, M.; Georges, A. J. and Courbot, M. (1989). Immune response to *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in a Cohort of children from birth to 2 years of age. Infect. and Immunol. P: 2542 - 2546.

30- Mohammad, H. F. (2002). *Campylobacter jejuni* gastroenteritis in children in Basrah. Ph. D, thesis. College of Medicine. University of Basrah. Iraq.

31- Nachamkin, I. and Yang, X. H. (1992). Local immune responses to *Campylobacter jejuni* flagllin in acut *Campylobacter* Gastrointestinal infection. J. Clin. Microbiol. 30: 509 - 511.

32- Nachamkin, I.; Engberg, J. and Aarestrup, F. M. (2000). Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species.In: *Campylobacter*, 2nd edn (eds I. Nachamkin, M. J. Blaser), ASM Press, Washington, DC.p:45- 66.

33- Naghipour, M. and Nakagomi, O. (2008). Issues with redusing the rotavirus - assotiated mortality by vaccination in developing countries. Vaccine, 26: 3236 -3241.

34- Ng. L. K; Sherburne, R.; Tylor, D. E. and Stiles, M. E. (1985). Morphological form and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. J. Bact. 164 (1): 338 - 343.

35- Parker, J. N. and Parker, P. M. (2004). *Campylobacter*: A Medical Dictionary, Bibliography, and Annotated Research Guide to Internet References. ICON Health Publications.

36- Penner, J. L. (1988). The genus *Campylobacter*: a decade of progress. Clinical Microbiology Reviews, 1: 157 - 172.

37- Pober, C.G. (1998). Cepfalosporin: update. Pediatr. rev. 19: 118-127.

38- Russell, R. G.; O'Donnoghue, M.; Black, Jr. D. C.; Zulty, J. and DeTolla, L. J. (1993). Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimently challenged infant Macoca Mulatta. J. Infect. Dis. 168: 210 - 215.

39- Scott, D. R.; Weeks, D.; Postius, S.; Melchers, K. and Sachs, G. (1998). The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 114:58 - 70.

40- Shnawa, I. M. S. and Al-Saadi, M. A., (2002). Gut mucosal immunoglobulin separation practical characterization and utility as infection probe. Iraq. J. of microb. 13 (3).

41-Skirrow, M. B. and Blaser, M. J. (2000). Clinical aspects o *Campylobacter* infection, In Nachamkin, I. and Blaser, M. J. Ed., *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Prees, Washington, DC.p:69-88.

42- Svanborg - Eden, C.; Kulhary, R. and Martid, S. (1985). Urinary immunoglobulin in healthy individuals and children with acute pyelonephritis. Scand. J. Immunol. 21: 305 - 313.

43- Vandamme, P. (2000). Taxanomy of family Campylobacteraceae. In: *Campylobacter*, 2nd edn (eds I. Nachamkin, M. J. Blaser), ASM Press, Washington, DC.p:3 - 26.

44- Vandepitte, J. and Verhaegen, J. (2003). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. Second edition, WHO, Switzerland, p: 42 - 43.

45- Winn, J. R.; Stephen, A.; William, J.; Felmer, K.; Gray, P.; Paul, S. and Gail, W. (2006). Konema`s color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Washington, p: 393 - 405.

46- Wu, S. L.; Pacheco, N. D.; Oprandy, J. J. and Rollwangen, F. M. (1991). Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* antigens with mucosal and systemic antibodies. American Society for Microbiogy. P: 2555 – 2559.

47- Yang, J. R.; Wu, H.S; Chiang, C. S. and Mu, J. J. (2008). Pediatric Campylobacteriosis in northern Taiwan from 2003 to 2005. BMC Infect. Dis. 8(5): 1471 - 2334.

جدول (1) الوصف المظهري لعينات البراز الموجبة للفحص المصلي.

نوع البراز	العدد	%
دموي Bloody	6	% 20
مخاطي Mucoid	24	% 80
المجموع	30	% 100

جدول (2) النسبة المئوية لأنواع العزلات البكتيرية.

أنواع العزلات البكتيرية.	العدد	%
عدد البكتريا الموجبة لصبغة كرام	54	43.2
عدد البكتريا السالبة لصبغة كرام	59	47.2
عدد بكتريا *Campylobacter jejuni*	12	9.6
المجموع	125	100

جدول(3) الاختبارات التشخيصية التاكيدية لبكتريا *Campylobacter jejuni*.

الاختبار	النتيجة
النمو في الظروف الهوائية	+
النمو بدرجة 37مْ	+
اختبار الاوكسديز	+
اختبار الكتاليز	+
اختبار اليوريز	-
تحلل الهيبيوريت	+
اختزال النترات	+
تكون الأندول	+
تكوين غاز H_2S في وسط TSI	-
النمو على وسط أكار الماكونكي	-
فحص الحركة	+

جدول(4) الحساسية الدوائية لبكتريا *Campylobacter jejuni* للمضادات الحيوية.

المضاد الحيوي	الاستجابة	عدد العزلات	%
NalidixicAcid (30µg)	S	12	100
Cephalothine (30µg)	R	12	100

جدول (5) عيارات الضد المتخصص بالمسبب *Campylobacter jejuni* .

العيار بدون 2ME	عدد الحالات	العيار مع 2ME	عدد الحالات
64	11	64	11
32	4	32	4
16	15	16	15
4	10	4	10
2	8	2	8
1	7	1	7
المجموع	55	المجموع	55

جدول (6) النسبة المئوية للفحص المصلي والجرثومي لعينات الدراسة.

مجموع العينات	125	النسبة المئوية
العينات التي اجري لها الفحص المصلي	55	%80
العينات التي أعطت نتيجة موجبة للفحص المصلي	30	%54.5
العينات الموجبة للزرع الجرثومي من أصل 30عينة	12	%40

Isolation and identification of *Campylobacter jejuni* from diarrhea of children.

Lumma J. H. Witwt Babylon University

Azhar – AL- Thahab Babylon University College of dentistry

Frial G.Abd College of science

Abstract:

One handred twenty five stool samples were collected from children with diarrheal disease in age between (1-5) years old who attending the Babylon hospital for maternity and children from the period November 2009 to May 2010. *C.jejuni* was isolated from 12 diarrheal samples with percentage 40% using two methods. First the using selective media (Skirrow's Media) and second by using filter paper with pore size (0.45µm). Biochemical, physiological and antibiotics sensitivity tests were conducted for 12 bacterial isolates. All of these isolates were sensitive to nalidixic acid and resistance to cephalothine in percentage 100%. Local specific antibodies was detected using tube agglutination test for globulins isolated from stool samples which was positive for 30 samples with percentage 54.5%. Rapid latex agglutination test was positive also for these samples.