جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

المرحلة الرابعة

المادة بكتريا مرضية

أ.م.د. ميادة عبدالله شيحان

المحاضرة الرابعة: البكتريا الصغيرة السالبة لصبغة كرام Small gram negative coccobacilli

البكتريا الصغيرة السالبة لصبغة كرام

١- عصيات البروسيلا *Brucella*

تتصف عصيات حمى مالطا (الحمى المتموجة) بشكلها العصوي الصغير coccobacilli وتمتاز بكونها سالبة لصبغة كرام وغير متحركة non motile وهوائية اجبارية obligate aerobic وتنتج خميرة urease و catalase وبعض الاحيان الـ oxidase . يتطلب نموها صناعيا وجود(5-10%) من CO2 الذي يحفزها على النمو وخاصة النوع *Br. abortus* ويعد الوسط soyabean casein digest agar افضل الاوساط لعزل هذا الجرثوم الذي يعتبر من الجراثيم المتطفلة اجباريا obligate parasites على الانسان والحيوان وتنمو داخل الخلايا intracellulary وتكون متطلباتها للنمو معقدة وبعض سلالاتها تنمو على الاوساط المعروفة الحاوية على الاحماض الامينية ، الفيتامينات، الاملاح والكلوكوز. النماذج الماخوذة حديثا تنمو على وسط Trypticase soya agar بوجود (5-10%) من CO2 وتكوت Brucella حساسة للحرارة والحوامض وتقتل بالبسترة pasteurization ويشمل جنس الـ Brucella خمسة انواع حسب المضيف الحيواني لها وهي:

- الماشية host cattle *Brucella abortus*
- الاغنام والماعز host goat and sheep melitensis *Brucella*
- الخنازيرhost pig *Brucella suis*
- الكلاب canis host dogs *Brucella*
- Brucella ovis host sheep.

تنقل *Brucella* من مضيفها الحيوان الى الانسان وتسبب امراضا مشتركة zoonoses.

الامراضية pathogenicity.

ان المصدر الرئيسي للاصابة بـ *Brucella abortus* هو تناول الحليب والالبان الملوثة بهذه الجرثومة(منتجات حليب غير مبسترة) حيث تصاب القناة الهضمية او تتلوث الاغشية المخاطية بنقيطات droplet حيوان مريض او حامل للمرض او تلوث الجلد نتيجة ملامسة انسجة الحيوان او جثثها وتسبب *Brucella abortus* الاجهاض abortion للابقار المصابة كما تصاب بها الجاموس والخيول والماعز والاغنام والغزلان.

تبدا الاصابة بتلوث الدم وتتدرج الاعراض في حدتها وتختلف باختلاف نوع البكتريا والشخص المصاب وتؤدي اصابة البشر بهذه الجرثومة الى التهاب العقد اللمفاوية الموضعية وهنا ينتقل الجرثوم الى بقية انحاء الجسم ويؤدي الى التهاب البطانة الشبكية مسببة الورم الجيبي الذي يصيب الطحال spleen والعظام والقناة البولية والرئة والانسجة الرخوة ويمكن مشاهدة خلايا البروسيلا داخل الخلايا البلعمية في هذه المرحلة . تكون اعراض حمى مالطا غير واضحة ومختلفة وتتميز بالشعور بالبرد chills والحمى fever والتعرق sweating وفقدان الشهية مقترنة بالضعف العام والاعياء واوجاع العضلات كذلك العظام والمفاصل ، وتكون الاصابة

مصحوبة بارتفاع درجة الحرارة وانخفاضها خاصة في الاسبوع الاول لذلك سميت بالحمى المتموجة وقد تنتهي حالة الاصابة بحمى مالطا الحادة acute brucellosis المزمنة chronic brucellosis وقد يصعب الشخيص والعلاج في المرحلة المزمنة.

التشخيص المختبري Laboratory diagnosis.

١- الزرع Culture تؤخذ نماذج الدم في حالة الشك بالإصابة كما تؤخذ خزعة من العقد اللمفاوية lymph nods او العظم وتزرع على وسط Brucella agar وهو وسط غني ويجب زرع الدم المتكرر في حالة زرع الدم . ومن الاوساط الاخرى التي تنمو البكتريا جيدا عليها هي trypticase soya agar بإضافة او دون اضافة دم الاغنام او وسط Brain heart infusion و Chocolate agar وعلى جميع الاوساط المذكورة يجب ان تحضن بوجود (5-10%) من CO2 وتلاحظ النتيجة خلال ستة اسابيع قبل تحديد ايجابية او سلبية الزرع . وعند ملاحظة (بعد الفحص المجهري للمستعمرات) عصيات دقيقة سالبة لصبغة كرام موجبة للـ catalase , oxidase , urease تشخص على انها *Brucella* species.

٢- الاختبارات السيرولوجية serology tests. مستوى الاجسام المضادة IgM ترتفع خلال الاسبوع الاول من مرحلة الاصابة بالمرض أما الاجسام المضادة IgG فترتفع بعد ثلاثة اسابيع من مرحلة الاصابة الحادة للمرض.تستخدم الاختبارات المصلية لتلافي الوقت الطويل لزرع الدم وكذلك لتلافي الحصول على نتائج سالبة كاذبة False negative وتعتمد على طريقة التلازن المصلي للبروسيلا Brucella agglutination اذ تظهر الاجسام المضادة بعد 7_10 أيام من مرحلة الاصابة.ويعد اختبار coomb's test التلازني افضل طريقة لتلافي الحصول على نتائج سالبة كاذبة قد تسببها الاجسام المضادة العارضية blocking antibodies خاصة اذا كان المريض ملقح ضد الهيضة ، ويجب التاكد من الاختبارات المصلية التي اعطيت نتيجة موجبة بطريقة Mercaple ethanol method الثنائي ويعد التركيز الادنى 1/160 او الاعلى دليلا على وجود المرض ويجب تخفيف دم المصاب الى 1/1280 لتجنب ظهور او الوقوع في ظاهرة Prozone التي تعطي نتيجة سالبة كاذبة بسبب زيادة الاجسام المضادة في دم المصاب الى حد منع التفاعل المصلي بسبب عدم التكافؤ بين المستضدات والاجسام المضادة.

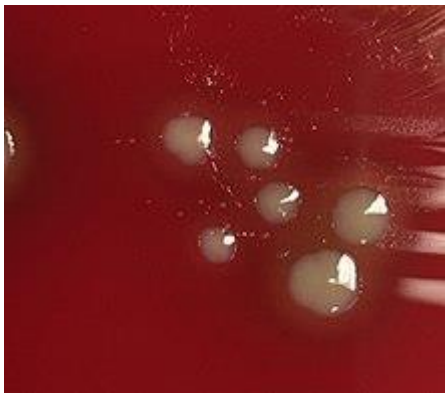
الوبائية Epidemiology:

لقد اكتشف هذا الوباء (حما مالطا) في حوض البحر الابيض المتوسط وعزلت الجراثيم المسببة له من طحال احد المصابين ومن حالات وفيات الجيش البريطاني في جزيرة مالطا ومنه سمي المرض.وتنتشر *Brucella abortus* في كثير من اقطارالعالم ويسبب الاجهاض للابقار وقد ينتقل من حليبها الخام raw milk الى الانسان مسببة حما ماطا اما *Brucella suis* فيصيب الخنازير وينتقل الى آكلي لحومها.لقد ساعد الاختبار التلازني المسمى Milk Ring Tesd(MRT) على الكشف عن الاجسام المضادة للبروسيلا في الحليب ويحدث تلازن

Brucella agglutination حيث يضاف معلق البكتريا المصبوغة الى الحليب فتتلزن ويمكن اختبار المواشي عن طريق اختبار الجلد Skin test.

٢- العصيات محبة الدم *Haemophilus*.

هي عصيات سالبة لصبغة كرام وذات أشكال متعددة pleomorphic حيث يعتمد شكلها على العمر والوسط الزرعي وهي غير متحركة ولاهوائية اختيارية محاطة بغلاف ولاتنمو في الاوساط الزرعية الاساسية البسيطة ولكنها تتطلب عاملي النموX (haemin) و V (Nicotinamide adinine dinucleotide و coenzyme 1 الموجودين في الدم . يمتاز العامل x بمقاومته للحرارة ويوجد في مركب الهيمين haemin الذي تحتاجه البكتريا في تخليق ال catalase و cytochrome اما العامل V فيوجد داخل كريات الدم الحمراء ويتحرر عند تحضير وسط Chcolate الدم المسخن بدرجة حرارة 80-90 مْ. اذا احتوى الوسط الزرعي على العصيات المحبة للدم والعنقوديات فان مستعمرات هذه البكتريا تنمو حول البكتريا العنقودية توابع لها مثل نموها على وسط blood agar حيث تقوم الاخيرة بتحليل الدم وتحرر العوامل التي تحتاجها عصيات *Haemophilus* وتسمى بظاهرة التباع Satellite phenomenon.



من عوامل الضراوة التي تنتجها العصيات المحبة للدم هي المحفظة capsule (antiphagocytic polysaccharide) حيث تقاوم البلعمة وlipid A كجزء من الجدار الخلوي Cell wall يلعب دور مهم في السلالات الفاقدة للمحفظة اضافة الى التي (LOS) Lipooligopolysaccharides تاكون سامة للـ cilli الموجودة في القناة التنفسية كما تنتج IgA protease وهو انزيم يحطم IgA .

من اهم اجناسه *H. influenzae* و *H. parainfluenzae* و *H. haemolyticus* الذي يمتاز بتحلله الكامل للدم و *H. ducreyii* المسبب للامراض الجنسية.

الامراضية pathogenicity.

ان النوع المحب للدم *H. influenza* يعد من البكتريا الطبيعية التي تعيش في الجهاز التنفسي العلوي وخاصة السلالة الغير مغلفة non capsulated وهناك نوعان من الامراض التي تسببها هذه البكتريا وهي مجموعة الامراض الحادة الاولية ذات المصدر الخارجي Acute primary exogenous infection التي تسببها العصيات المغلفة capsulated haemophilus وخاصة النوع المصلي b.اما المجموعة الثانية فهي الامراض المزمنة الثانوية والداخليةchronic secondary endogenus infection التي تصيب الجهاز التنفسي خاصة السلالات الغير مغلفة noncapsulated strain.

تلعب السلالات المحبة للدم المغلفة capsulated haemophilus وخاصة النوع المصلي b دور الممرض الاولي وتسبب حالة التهاب الخيشوم البلعومي nasopharyngitis وتحدث هذه العصيات التهابات اخرى مثل التهاب الحنجرة والمزمار والتهاب القصبات الحاد acute bronchitis وذات الرئة والتهاب الاذن الوسطى والتهاب السحايا. وتشير الدراسات البكتريولوجية الى كثرة عزل السلالات الغير مغلفة من البلغم في حالة التهاب القصبات المزمن chronic bronchitis حيث انها ليست المسبب الاول لحالة التهاب القصبات الحاد بل تكمن اهميتها في دورها الانتهازي والثانوي ومن مميزات التهاب القصبات المزمن بهذه البكتريا وجود البلغم القيحي بدلا عن البلغم المخاطي mucoid sputum ومن المحتمل انها تقوم بدور الممرض الثانوي بعد الالتهابات او الاصابة الفايروسية الاولية primary viral infection.

التشخيص المختبري Laboratory diagnosis.

يؤدي التشخيص المبكر للسحايا meningitides المسبب عن النوع *H. influenza* الى انقاذ حياة المريض وتحضر الشريحة من سائل النخاع الشوكي CSF ثم تصبغ بصبغة كرام ويستخدم المحلول Carbol fuchsin بدلا عن السفرانين للكشف الاولي عن الجرثوم.

كما تساعد الطرق الزرعية البكتريولوجية لسائل النخاع الشوكي وخاصة وسط blood agar و chocolate agar على عزل هذه الجراثيم .كما ان زرع دم المصاب مهم جدا في حالة الاصابة بتسمم الدم septicemia اما في حالة الاصابة بالتهابات القصبات المزمن والتهاب الرئة الارتشافي فيمكن اولا اجراء سحق ومجانسة البلغم وتعمل منه شرائح زجاجية لغرض صبغة كرام كما تحقن به اطباق الدم والجوكليت ويمكن عزل هذا الجرثوم على وسط Levinthal medium الحاوي على خلاصة الدم blood extract وهو افضل الاوساط الزرعية لعزل هذا الجرثوم وتكون المستعمرات مخاطية mucoid ومعتمة ويمكن تمييزها بسهولة ، كما يمكن التاكد من هويتها بزرعها على وسط nutrient agar ثم تلصق الاقراص الحاوية على عاملي النمو X,V والتي سوف تحفز العصيات على النمو حولها .

اما الاختبارات المصلية للنوع *H. influenzae* تعتمد على كون سلالات الجرثوم تحتوي سسته انواع من المستضدات هي من aالى f والنوع b هو الاكثر انتشارا بين الاطفال وخاصة دون سن الخامسة من العمر.وتتلخص هذه الاختبارات بأخذ قطرة من مضاد المصل النوعي specific antisera وتمزج بجزء من المستعمرات وان حدوث التلازن agglutination يدل على ايجابية الاختبار.

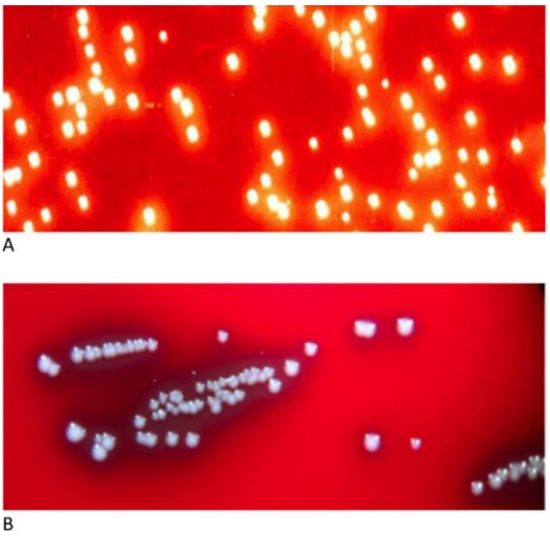
٣- بكتريا السعال الديكي *Bordetella*.

صفاتها characteristics .

سميت بهذا الاسم نسبة الى مكتشفها العالم Bordet .وقد صنفت سابقا ضمن البكتريا المحبة للدم Haemophilus غير انها فصلت عنها بسبب امكانيتهاالاستغناء عن الدم .وهي عبارة عن بكتريا عصوية مكورة coccobacilli سالبة لصبغة كرام وتكون هذه البكتريا مفردة single

او ازواج pairs او سلاسل chains وقد تكون متحركة او غير متحركة وتنمو على وسطها الزرعي الخاص Bordet – Gengu mediumالحاوي على الدم وماء البطاطا وتكون مستعمراتها مرتفعة وناعمة وكاملة الحافة كالقبة ولماعة رصاصية اللون كنصف لؤلؤة كما تمتاز بكونها مشرقة ومحاطة بحزام من التحلل الدموي الغير محدد ولهذه البكتريا فعاليات ايضية تاكسدية عالية ان معظم سلالات هذه البكتريا تحتاج الى عوامل النمو وهي Nicotnic acid, cysteine, methionine.

ان النوع *B. pertussis* هو المسبب لمرض السعال الديكي whooping cough عند الانسان ويمتاز بكونه محاط بما يشبه الغلاف capsule like وهو لاينتفخ عند اضافة المصول النوعية لها .ولقد اظهرت بعض التجارب الامراضية قدرة هذا الجرثوم على اصابة الفئران وتكاثره خاصة في انسجة الجهاز التنفسي والدماغ وللحصول على نمو جيد لهذه البكتريا يجب تحضينها بدرجة حرارة 37مْ مدة يومين الى اربعة ايام ، ويوجد نوعان اخران هما *B. parapertussis*, *B. bronchoseptica* اللذان يختلفان عن النوع *B. pertussis* من حيث حاجتهما البسيطة الى عوامل النمو الواجب توفرها في الوسط الزرعي .



A

B

A – *B. pertussis*

B - *B. parapertusis*

الامراضية pathogenicity.

ان مرض السعال الديكي whooping cough وهو عبارة عن التهاب الاغشية المخاطية التنفسية وتمتد الاصابة من ٤-٨ اسابيع بعد فترة الحضانة التي هي من ٧ الى ١٤ يوم . ويمكن مشاهدة معلقة على الاهداب او الجدران الحرشفية للقصيبات والقصبات والقصبة الهوائية . وتهاجم الاغشية المخاطية وتتوغل داخل النسيج التنفسي مؤدية الى تخريشه ومفرزة كميات كبيرة من المادة المخاطية ويكون المخاط ثخينا وحبليا ropy مما يجعل الاهداب في الخلايا الحرشفية ملتصقة مع بعضها matting فتسبب السعال اللانتيابي paroxymal coughing وتشنج القصبات bronchospasm. كما يعتقد ان سبب السعال المتميز بعدد متتالي من الفترات القصيرة متبوعا بصوت شهيق هو انتاج الذيفات المؤثرة على الاعصاب والتي تسمى neurotoxin وتتطور الاصابة بعد ذلك مؤدية الى تخريش النسيج الرئوي وتحطيمه وقد تؤدي الاصابة بهذا الجرثوم الى انسداد القصيبات ومن ثم انهيار حيوية الرئة المصاحبة بانتفاخات رئوية .وتتعقد حالة السعال الديكي نتيجة الالتهابات الثانوية التي قد تسببها المكورات القيحية pyogenic cocci مما يتسبب عنها الالتهاب القصبي الرئوي bronchopneumonia القاتل احيانا.

التشخيص المختبري Laboratory diagnosis.

يعتمد في التشخيص على الاعراض السريرية للمريض وقد يلجأ الى التشخيص المختبري للتاكد من الحالة المرضية في بعض الاحيان وتتم محاولة عزل البكتريا المسببة للمرض في وسط Bodet-Gengo medium هوائيا . وتحضن الاطباق بدرجة حرارة ٣٧ممدة يومين الى اربعة ايام وتظهر بعد ذلك مستعمرات هذه البكتريا على شكل حبيبات لؤلؤية صغيرة منصفة يقارب قطرها مليمترا واحدا ومحاطة بحزام معدني metallic sheen اما اطباق السعال cough plates فتستخدم بشكل واسع وتكمن اهميتها في كونها البديل عن القشع sputum الذي يصعب الحصول عليه من الاطفال.وتحتوي اطباق السعال على الوسط الزرعي الخاص بهذه البكتريا Bodet-Gengo medium وتوضع مفتوحة على مسافة ٦ انجات من فم الطفل ويحفز الطفل على البكاء ويسعل على الطبق ثم تحضن الاطباق كما ذكر سابقا . وهناك طرق تشخيصية اخرى كالتلازن و fluorescent antibodies المعتمدة في التشخيص المختبري وبها يميز *B. pertussis* المسبب الرئيسي للسعال الديكي عن الانواع الاخرى المسببة لالتهابات الجهاز التنفسي.

الجدول التالي يبين الاختبارات التفريقية الكيميائية والمصلية بين انواع Bordetella

Species	catalase	Urease	Aggutination with phase 1 sera
B. pertussis	-	-	+
B. parapertussis,	+	+	-
B. bronchoseptica	+	+	+