

استخدام الذيفان المعوي CPE المستخلص محليا من عزلات جرثومة
Clostridium perfringens في علاج سرطان الثدي

**Using of Locally Produced Enterotoxin CPE from
Clostridium perfringens Isolates in the Treatment of
Breast Cancer**

استخدام الڤيفان المعوي CPE المستخلص محليا من عزلات جرثومة
Clostridium perfringens في علاج سرطان الثدي

**Using of Locally Produced Enterotoxin CPE from
Clostridium perfringens Isolates in the Treatment of
Breast Cancer**

د. أميرة محمود محمد الراوي/استاذ /كلية العلوم/جامعة الموصل.

07708300500 umnashwa@yahoo.com

د. آلاء حسين طه المولى/مدرس /كلية العلوم/جامعة الموصل.

07723062550

2- الموجز

يعد سرطان الثدي الاكثر انتشارا بين النساء في العالم بعد سرطان الجلد فضلا عن انه سببا ثانيا للوفيات بين النساء بعد سرطان الرئة ففي الولايات المتحدة تشير الاحصائيات ان من بين 8 نساء هناك امرأة مصابة بسرطان الثدي خلال فترة حياتها (2%0) وان هذه النسبة في تزايد مستمر حيث اوضحت الدراسات الوبائية ان في عام 2002 شكل سرطان الثدي 2552% من السرطانات التي تصيب النساء حول العالم وارتفعت النسبة حيث سجلت الدراسات اصابة 258 مليون امرأة بسرطان الثدي في الولايات المتحدة في عام 2005 . تختلف انظمة علاجات سرطان الثدي اعتمادا على نوع السرطان ومرحلته والحساسية للهورمونات وعمر المريضة وحالتها الصحية بشكل عام وتعد الجراحة والاشعاع الخيارات الاساسية للعلاج فضلا عن العلاج الكيميائي.

على الرغم من التطور الملحوظ في المعالجة وتطور ادوية حديثة باستمرار الا ان التقدم في نسب شفاء مرضى السرطان تبقى ضعيفة ولهذا السبب تبقى هناك حاجة لاهداف جديدة ومركبات علاجية ذات فعالية عالية . ان احدى الاستراتيجيات الموعودة قد تستهدف علاج امراض السرطان جينيا بضمنها النهج الذي من خلاله يمكن توجيه الجزيئات السمية الغريبة بشكل تخصصي تجاه الخلايا السرطانية.ومن اهم المرشحات الجديرة بجذب الانتباه الذيفانات الجرثومية التي ابدت فعالية في قتل الخلايا السرطانية في الدراسات داخل الجسم الحي وفي الزجاج. لذا اولينا في دراستنا اهتماما بتسليط الضوء على احد انواع الذيفانات للتحري عن فعاليته في هذا المجال

ويشكل اكثر تفصيلا يهدف موضوع الاختراع الى الولوج في دراسة مختبرية للتحري عن تأثير الذيفان المستخلص من جرثومة *Clostridium perfringens* في تثبيط سرطان الثدي المحدث في خلايا الخطوط الخلوية بوصفها خطوة اولى وللمره الاولى محليا للكشف عن فعالية الذيفانات الجرثومية المعزولة من بيناتنا المحلية ولعدم وجود دراسة مسبقة على المستوى المحلي حول الذيفان CPE المحلي المصدر بعد استخلاصه وتنقيته من عزلات الجرثومة المعزولة والمشخصة محليا من المرضى المصابين بالتسمم الغذائي في مدينة الموصل مع الاشارة الى استخدام بعض المتطلبات الضرورية لنموها من امكانيات محلية لعدم توفرها في مختبرات الجامعة ومنها الحافظة المعدنية المحلية بديلا عن الجار اللاهوائي فضلا عن استحداث طريقة جديدة محورة لعزل وتنقية الجرثومة باستخدام طبقتين من الاكار بدلا من طبقة واحدة والتي ابدت كفاءة عالية ،هذا فضلا عن استخدام تقنية **Multiplex PCR ولاول مرة محليا على مستوى القطر في التحري عن الجين المشفر للذيفان المعوي**

Abstract

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide after skin cancer. It is also the second leading cause of cancer death in women after lung cancer. One in eight women in the United States (roughly 12%) will develop breast cancer in her lifetime and this percent is in a continuous increasing . In 2012, it comprised 25.2% of cancers diagnosed in women worldwide and increased as the studies recorded 2.8 million women infected with breast cancer in 2015.

Breast cancer treatment regimens differ widely based on the type of cancer, its stage, its sensitivity to hormones, the patient's age and health, and other factors. Surgery and radiation therapy are mainstays of breast cancer treatment as well as chemotherapy.

Despite of the remarkable development in cancer treatment and new drugs ,but the progress in recovery of cancer still weak so the need to new strategies of therapy and to new drugs remains very important . One of these strategies is the gene therapy by which such strange toxic molecules specifically are directed to the cancer cells ,one of these candidates that attracting attention are the bacterial toxins which revealed high activity in killing of the cancer cells in *in vitro* and *in vivo* studies . Our study paid attention to one of the bacterial toxins to screen on its activity in this respect

In more details the patent subject aims to access to *in vitro* study to screen on the activity of locally isolated *Cl. Perfringens* enterotoxin on the breast cancer cell lines as a first step and **for the first time locally** to detect on the effect of bacterial toxins isolated from our environments as well as there **is no previous local study** on CPE that extracted and purified from bacteria isolated from food poisoning patients in Mosul city beside we use some local requirements because it is not available such as the metal container instead of anaerobic jar as well as creation of a new modified method for growth and purification by using double agar layer instead of single layer which revealed high efficient results ,and we also use Multiplex PCR technique for the **first time in Iraq** to detect on *cpe* gene that encode on CPE toxin .

3- المفصل

أ. المقدمة

وصفت جرثومة *C.perfingens* ممرضاً بارزاً للإنسان والماشية ومسبباً لكل من الأمراض السمية للإنسجة والاعتلالات المعوية والتي تعرف بالتهاب الأمعاء أو التسمم المعوي، إذ يتم إنتاج الذيفان في الأمعاء ومن ثم يمتص إلى الدورة الدموية ليصل إلى الأعضاء محدثاً الضرر فيها كالدمغ ، ان ضراوة هذه الجرثومة اللاهوائية، الموجبة لصبغة كرام والمكونة للسبورات تعود إلى قدرتها على إنتاج على الأقل 07 نوعاً من الذيفانات، وقد أشارت الدراسات إلى ان ما يقارب 5% من عزلات *C.perfingens* تنتج ذيفان يطلق عليه CPE كما ان معظم السلالات الموجبة لإنتاج ذيفان CPE التي وصفت على انها النوع A (*C.perfingens* type A) تكون مسؤولة عن احداث التسمم الغذائي الذي يعد ثاني اهم مسبب للتسمم الغذائي في معظم الدول النامية و يعد ذيفان CPE هو المسؤول عن احداث اعراض التهاب المعدي المعوي في العديد من الامراض المعدية المعوية المنقولة وغير المنقولة عن طريق الغذاء التي تصيب الانسان الناتجة عن الاصابة بجرثومة *C.perfingens* (Kominsky et al., 2004).

ينتج ذيفان CPE اثناء طور تكوين السبورات في الأمعاء والتي تتضمن مشاركة العديد من عوامل سكما المتخصصة بعملية تكوين السبورات، وهو عبارة عن متعدد ببتيد مفرد يحتوي على 309 حامض اميني يحتوي على تتابع اولي فرد من نوعه. ان عمل CPE يبدأ بارتباطه مع Claudin وبشكل خاص Claudin 3 و Claudin 4 اذ على الرغم من تشخيص اكثر من 08 بروتين من بروتينات Claudin الا انه فقط هذين البروتين يتواجدان على الخلايا الحساسة للتحلل الناتج عن ذيفان CEP، يحدث الارتباط بين وحدات الارتباط النهائية الكاربوكسيلية للذيفان مع جزء خاص في العروة الخارج خلوية الثانية لبروتينات Claudin (Black et al., 2015; Mitchell and Koval, 2015).

يتم التعبير عن مستقبلات Claudin 3 و Claudin 4 بشكل كثيف في العديد من سرطانات الانسان مثل سرطان البروستات ، الثدي ، البنكرياس وسرطان المبيض، مما قد يوفر اداة جزيئية مهمة لاستهداف الخلايا السرطانية في الانسان بتقنية متخصصة، اذ وجد انه يحدث تعبير عالي لمستقبلات Claudin 3 و Claudin 4 بنسبة 62% و 26% على التوالي في سرطان الثدي مقارنة مع الخلايا الطبيعية، وبعد سرطان الثدي بانه ثاني اهم مسبب للوفاة من بين انواع الاورام السرطانية الاخرى، وكاستجابة لهذه الامتيازات تم التوجه الى تطوير طرق تعتمد على استخدام ذيفان في تشخيص وعلاج سرطان الثدي (Hashimi et al., 2013; Saeki et al., 2010).

في هذه الدراسة ولأول مرة محليا تم التحري عن الفاعلية الحيوية ضد السرطان تجاه الخطوط الخلوية لسرطان الثدي والمتضمنة كل من MCF-7 و T47D فضلا عن فعاليته تجاه الخلايا الطبيعية كخلايا Periodontal fibroblast وخلايا Vero cell (خط خلايا الكبد).

ب. الفن السابق

يعد العلاج بالاشعاع والجراحة الدعائم الاساسية لعلاج سرطان الثدي بوصفها تستهدف الورم من دون التأثير على الاعضاء الاخرى في الجسم

الجراحة: هناك نوعين من الجراحة الجراحة المستخدمة في علاج سرطان الثدي الاولى يطلق عليها Lumpectomy يتم فيها استئصال الجزء المصاب بالورم من الثدي اما الثانية فيطلق عليها Mastectomy يتم فيها استئصال الثدي بالكامل وفي بعض الحالات تزال الانسجة المحيطة ايضا وقد تشمل العقد اللمفاوية كجزء من الجراحة لسرطان الثدي .

الاشعاع: تستخدم موجات عالية High-Radiation لقتل الخلايا السرطانية وهذا النوع من المعالجة قد يوصف للمرضى الخاضعين للجراحة او في حالة انتشار الورم الى اعضاء اخرى في الجسم .

المعالجة الكيميائية: هناك العديد من العلاجات الكيميائية التي تطورت تدريجيا بمرور الزمن مع تطور التقنيات الدوائية وتعطى للمريض قبل الو بعد العمليات الجراحية لاسئصال الورم وتعطى اما عن طريق الفم او عن طريق الوريد وتمتاز بكفاءتها بوصفها قاتلة للخلايا السرطانية الا انها تؤثر بشكل كبير على الخلايا الطبيعية ايضا لانها تنتقل مع مجرى الدم او اللمف الى اجهزة الجسم الاخرى فضلا عن الاتاثيرات الجانبية التي تحدثها كالاسهال والتقيؤ وفقدان الشعر .

وعموما و على الرغم من التطور الملحوظ في المعالجة وتطور ادوية حديثة باستمرار الا ان التقدم في نسب شفاء مرضى السرطان تبقى ضعيفة ولهذا السبب تبقى هناك حاجة لاهداف جديدة ومركبات علاجية ذات فعالية عالية .ان احدى الاستراتيجيات الموعودة والواعدة قد تستهدف علاج امراض السرطان بايولوجيا باعتماد الجينات بضمنها النهج الذي من خلاله يمكن توجيه الجزيئات السمية الغريبة بشكل تخصصي تجاه الخلايا السرطانية.ومن اهم المرشحات الجديرة بجذب الانتباه هي:

الذيفانات الجرثومية التي ابدت قابلية فعالة في قتل الخلايا السرطانية في العديد من الدراسات داخل الجسم الحي وفي الزجاج وبشكل تخصصي .ومما تجدر الاشارة اليه ان ذيفانات جرثومة Cl.perfringens هي احدى هذه الجزيئات ،وهي من الجراثيم اللاهوائية اجبارا وتحتاج الى ظروف تحضين خاصة يجب استيرادهامثل الجار اللاهوائي وعدة التحضين اللاهوائية، اضافة الى صعوبة الحصول على عزلات نقية منها باستخدام الطرق الروتينية المعروفة لذلك في دراستنا هذه ارتأينا الولوج الى التفكير باسبب الامكانيات المتوفرة محليا مثل الحافظة المعدنية المحلية مع تحويل طريقة التنمية والتلقيح للحصول على عزلات نقية من الجرثومة.

ت. تفاصيل الفكرة

التجربة الاولى : عزل وتشخيص جرثومة *C.perfringens*

العينات: جمعت عينات من خروج المرضى المصابين بالتسمم الغذائي المراجعين لبعض مستشفيات مدينة الموصل. وضعت عينات الخروج في قناني جافة ومعقمة وذات غطاء محكم لحين ايصالها الى المختبر، وقسمت العينات الى جزئين، الاول خاص بالاختبارات البكتريولوجية فيما خصص الجزء الاخر للدراسة الجزيئية حيث وضعت في قناني معقمة ومحكمة الغلق وحفظت في جهاز التجميد السريع عند درجة حرارة -70°م لحين استخدامه.

الايوساط الغذائية: استخدمت لغرض عزل الجرثومة عدد من الاوساط الانتخابية شملت:

• وسط Sulphite Polymyxin Sulfadiazine agar (SPS)

حضر الوسط وفق تعليمات الشركة المجهزة (Himedia) الهندية.

• وسط Tryptose Sulphite Neomycin agar (TSN)

حضر الوسط اعتماداً على ما ذكره (Harmon *et al.*, 1971).

• وسط Tryptose Sulphite Cycloserine agar (TSC)

تم تحضير الوسط الكامل حسب ما ورد في (Atlas, 2010).

الايوساط الخاصة بالاختبارات الكيموحيوية: استخدم وسط اللاكتوز - الجيلاتين (LG) ووسط الحركة - النترات (MN) اعتماداً على ما ورد في (Atlas, 2010).

حضرت كما ورد في تعليمات الشركة المجهزة

الايوساط المستخدمة لتأكيد التشخيص : استخدم كل من

• وسط Rapid Perfringens Medium (RPM)

حضر كما ورد في (Corry *et al.*, 2003).

• وسط Fluorogenic media (Fluorocult TSC agar-TSCF agar)

استخدمت مادة 4-Methylumbelliferyl phosphate لغرض تأكيد التشخيص من خلال التحري عن انزيم Acid phosphatase. حضر الوسط من نفس مكونات الوسط الاساس لـ TSC agar مع اضافة Supplement خاص من شركة (Fluka) مكون من:

550g Sucarose غم / لتر ، 054D-Cycloserine غم / لتر و 050g / لتر من 4-Methylumbelliferyl phosphate disodium salt. حضر الوسط باضافة 555 غم من TSC

supplement الى 50 سم³ من الماء المقطر وعقم المزيج باستخدام مرشح قطر 052 مايكروميتر ثم اضيف المزيج الى 0000 سم³ من الوسط الاساس المعقم بالموعدة والمبرد الى 55 °م.

المواد المستخدمة محليا لتوفير ظروف التحضين اللاهوائي لعزل الجرثومة:

- غاز ثنائي اوكسيد الكاربون CO₂: استخدم غاز CO₂ المعبأ محليا بقنان خاصة.
- غاز النتروجين N₂: استخدم غاز N₂ المعبأ محليا بقنان خاصة.
- نظام توليد الظروف اللاهوائية: استخدم المغلف AnaeroGen المستورد من شركة Oxiod الانكليزية.

• كاشف الريزازورين Resazurin: حضر محلول الكاشف بتركيز 0.0002% (النقار، 2000)

• ثايوكلايكوليت الصوديوم Sodium thioglycolate

• كبريتات الكالسيوم CaSO₄

طرائق العزل:-

بعد جلب العينات الى المختبر تم وزن 0.5-1غم من عينات الخروج وخففت مع 4.5-9 سم³ على التوالي من وسط ماء البيبتون للحصول على التخفيف 10⁻¹ ثم تم مزج العينات.

الزرع على الاوساط الانتخابية

لقت العينات على الاوساط الانتخابية المخصصة للعزل الاولي بثلاث طرائق، اذ قسمت العينات بعد الحصول على التخفيف 10⁻¹ الى ثلاث مجاميع وكما ياتي:-

المجموعة الاولي: اخذ 0سم³ من التخفيف 10⁻¹ للعينة واجري عليه سلسلة من التخفيف العشرية.

المجموعة الثانية: تم معاملة 2 سم³ من التخفيف 10⁻¹ للعينة لمدة 00 دقيقة عند 80°م .

المجموعة الثالثة: تم معاملة 2 سم³ من التخفيف 10⁻¹ بالتسخين لدرجة حرارة 000 °م لمدة 30 دقيقة . وضع 0سم³ من كل تخفيف من المجاميع الثلاث المذكورة اعلاه في اطباق معقمة ثم اضيفت اوساط العزل الاولي الانتخابية المتمثلة بوسط SPS agar و TSN agar ووسط TSC agar المبردة إلى -45-50°م بمقدار 00-05 سم³ ومزجت محتويات الطبق باليد ثم تركت الاطباق لحين التصلب في داخل قناني حاوية على CO₂ أو N₂، وبعد تصلب الوسط تم صب طبقة اضافية من الاوساط الانتخابية المذكورة مسبقا وبمقدار 00 سم³ ثم وضعت الاطباق مرة اخرى في قناني حاوية على CO₂ لحين التصلب. (Roberts and Greenwood, 2003).

التحضير اللاهوائي باستخدام الحافظة المعدنية بديلا عن الجار اللاهوائي:

وضعت الاطباق في داخل حافظة معدنية بسعة 2 لتر (الصورة 0) من الاسواق المحلية محكمة الغلق بهيئة غير مقلوبة وحضنت لاهوائيا عند درجة حرارة 37 م° و 46 م° لمدة 24-48 ساعة، ولغرض توفير الظروف اللاهوائية تم استخدام مغلف Anaerogen المتخصص لاختزال الاوكسجين خلال 30 دقيقة وانتاج CO₂ بمقدار 9-03% وتوفير ظرف لاهوائي، وقد تم التأكد من توفر الظروف اللاهوائية باستخدام كاشف الاكسدة والاختزال المتمثل بكاشف الريزازورين إذ وضع 00 سم³ من الكاشف داخل طبق بتري ثم وضع داخل الحافظة وبمجرد تغير لون الكاشف من اللون الوردي الى عديم اللون فان ذلك يدل على توفر الظروف اللاهوائية داخل الحافظة ولغرض التخلص من الرطوبة المتولدة اثناء التحضير تم تغطية ارضية الجار بطبقة من مادة كبريتات الكالسيوم CaSO₄ المجففة.



الصورة 1): حافظة معدنية محليّة بسعة 2 لتر

استحداث طريقة محورة لتنقية العزلات

قمنا بتحويل الطريقة الروتينية لغرض تنقية عزلات جرثومة *C.perfringens* قيد الدراسة وذلك باعتماد طريقة التلقيح ثنائية الطبقة وذلك بصب طبقة رقيقة من الوسط الزرعي SPS agar وبمقدار 00-05 سم³ وتركه حتى يتصلب تحت الظروف اللاهوائية ومن ثم تخطيط حملة لوب على طبق الاكار ثم قمنا بصب طبقة اضافية وبمقدار 5-00 سم³ من نفس الوسط ويهدوء وحذر ثم حضنت الاطباق بشكل غير مقلوب في الظروف اللاهوائية لمدة 24 ساعة عند 46 م° ثم صورت الاطباق فوتوغرافيا.

التشخيص

بعد نمو الجرثومة على الاوساط الانتخائية SPS agar, TSN agar, TSC agar انتخبت المستعمرات السوداء المشكوك على انها جرثومة *C.perfringens* التي طابقت مواصفاتها ما ذكر في (de Jong, 2003 ; Roberts and Greenwood, 2003) واجريت عليها مجموعة من الاختبارات

المظهرية (صبغة كرام) والاختبارات الكيميوحيوية التي تضمنت اختبار انتاج انزيم الكتاليز واختبارات LGMN (انتاج انزيم الجيلاتينيز، تخمير سكر اللاكتوز، فحص الحركة واختزال النترات) .

تأكيد التشخيص

أ. اختبار التخمر العاصف

انتخبت المستعمرات النقية من الجراثيم التي اعطت نتيجة سالبة لفحص الحركة وقابلية على اختزال النترات وتخمير لسكر اللاكتوز وانتاج الجيلاتينيز فضلا عن المواصفات المظهرية المطابقة لجرثومة *C.perfringens* ولقحت حملة لوب منها على وسط RPM وحضنت هوائيا عند 46 °م لمدة 24 ساعة.

ب. تأكيد التشخيص باستخدام وسط (TSCF agar) Fluorogenic

انتخبت مستعمرات نقية بعد تشخيصها اعتمادا على الشكل المظهري والاختبارات الكيميوحيوية ولقحت على وسط FTG ثم حضنت لاهوائيا عند 37 °م لمدة 24 ساعة .

اخذ لقاح بمقدار 0.1 سم³ من المزرعة السائلة الفتية ووضع في طبق بتري ثم صب وسط TSCF agar بمقدار 05-00 سم³ ثم وضعت الاطباق في حاويات حاوية اما على غاز Co₂، او غاز N₂ لحين التصلب ثم صببت طبقة رقيقة من نفس الوسط مرة ثانية و وضعت ايضا في ظروف لاهوائية لحين التصلب، ثم بعد التصلب حضنت الاطباق لاهوائيا عند درجة حرارة 37 °م لمدة 08-24 ساعة.

فحصت الاطباق بعد التحضين تحت مصباح الاشعة فوق البنفسجية UV من نوع P.W. Allen- A409 انكليزي المنشأ لقراءة النتيجة بدلالة ظهور المستعمرات المنقلورة وصورت فوتوغرافيا.

التجربة الثانية: تشخيص عزلات جرثومة *C.perfringens* المنتجة لذيفان CPE باعتماد

تقنية Multiplex PCR

استخلاص الحامض النووي DNA وتقدير تركيزه ونقاوته

المواد:-

- العزلات: استخدمت عزلات مشخصة من *C.perfringens* لاجراء التنميط الجيني.
- المحاليل والمواد المستخدمة

0-محلول 0 مولار ترس - حامض الهيدروكلوريك (1M Tris-HCl pH 8)

2- محلول 0.25 مولار ترس -حامض الهيدروكلوريك (0.25M Tris-HCl pH 8)

3- محلول 0.5 مولار EDTA (0.5M EDTA pH 8.0)

4-محلول داريء TE (TE buffer pH 8.0)

- 5 - محلول داريء 10 X TE (10 X TE buffer)
- 6- محلول Sodium dodecyl sulfate (SDS) بتركيز 00 %
- 7- محلول 5 مولار بيركلورات الصوديوم (5M Sodium perchlorate)
- 8- محلول انزيم اللايسوزايم بتركيز 000 ملغم /سم³ (Lysozyme 100mg/ml)
- 9- محلول انزيم البروتيناز K بتركيز 20 ملغم /سم³ (Proteinase K 20mg/ml)
- 00- محلول (10 X) TBE المجهد من شركة Promega الأمريكية.
- 00- محلول (1 X) TBE.
- 02- محلول داريء التحميل.
- 03- محلول صبغة الاثديوم برومايد.
- 04- هلام الاكاروز بتركيز 1 %.
- طرائق العمل :-

• استخلاص الحامض النووي DNA من مزارع جرثومة *C.perfringens*

- استخلص الـ DNA لخلايا جرثومة *C.perfringens* اعتمادا على الطريقة التي ذكرها الباحث Garmory وجماعته (2000) باتباع الخطوات التالية :-
- 0- تم تلقيح 000 سم³ من وسط FTG بحملات لقاح من جرثومة *C.perfringens* ثم تم التحضين لمدة 24 ساعة عند 37 °م.
- 2- رسبت الخلايا النامية في الوسط الزرعى باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد من شركة Hittich الماني المنشأ عند 10000 xg ودرجة 4 °م لمدة 00 دقائق.
- 3-- غسلت الخلايا باستخدام 00 سم³ من محلول داريء 10X TE بأس هيدروجيني 7.5 ثم رسبت الخلايا مرة اخرى باستخدام النبذ المركزي المبرد عند 10000 xg لمدة 00 دقائق.
- 4- علق الراسب في 2 سم³ من محلول الداريء TE المستخدم في الخطوة السابقة.
- 5- اضيف 00 مايكروليتر من محلول انزيم الايسوزايم بتركيز 000 ملغم/سم³ وحضن المزيج لمدة ساعة عند 37 °م مع التحريك.
- 6- تم اضافة 200 مايكروليتر من محلول SDS بتركيز 00% وحضن المزيج لمدة 00 دقائق عند 60 °م.

- 7-اضيف 20 مايكروليتر من محلول 0.5 مولار EDTA و5 مايكروليتر من محلول انزيم البروتيناز K بتركيز 20 ملغم/سم³ وحضن المزيج لمدة ساعة عند 37°م.
- 8-اضيف 440 مايكروليتر من محلول 5 مولار بيروكلورات الصوديوم وحضن المزيج لمدة 30 دقيقة عند 65°م.
- 9-بعد الحصول على Cell lysate اضيف 6 سم³ من مزيج الكلوروفورم وكحول الايزواميل بنسبة 24 : 0 مع التحريك لمدة 30 دقيقة.
- 00-اجري نبذ مركزي عند 11000 xg لمدة 05 دقيقة عند 4 °م لفصل المزيج الى ثلاث طبقات اذ تمثل الطبقات من الاعلى الى الاسفل كما يأتي :طبقة الحامض النووي DNA، طبقة البروتين وطبقة الكلوروفورم.
- 00-سحبت الطبقة الشفافة المائية العلوية المتمثلة بطبقة الحامض النووي DNA باستخدام ماصة معقمة وبحذر نقلت الى انبوبة اخرى معقمة.
- 02-رسب الحامض النووي DNA باضافة حجم واحد من كحول الايزوبروبانول المبرد اذ تم ملاحظة الحامض النووي DNA بشكل خيوط بيضاء او كتل عالقة من الخيوط في المزيج، وتم تصويرها فوتوغرافيا.
- 03-نقل الحامض النووي DNA باستخدام انبوبة باستور معقوفة النهاية الى انبوبة اخرى، ثم غسل الحامض النووي DNA باستخدام كحول الايثانول 70% ثم جفف.
- 04-تم اذابة الحامض النووي DNA في 200-0000 مايكروليتر من دارئ TE ذي اس هيدروجيني 8.0، ثم حفظ بالتجميد لحين اجراء الاختبار.

• تقدير تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA

تم تقدير تركيز الحامض النووي DNA بقياس الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي لطيف الاشعة فوق البنفسجية Aquarius الماني المنشأ عند الطول الموجي 260 نانوميتر، اذ تم تخفيف العينات المراد تقدير تركيز الحامض النووي DNA فيها الى 000 مرة باستخدام محلول دارئ TE، وتم ايجاد تركيز الحامض النووي DNA الثنائي السلسلة باستخدام القانون :

$$\text{تركيز DNA (مايكروغرام/مايكروليتر)} = (\text{القراءة عند الطول الموجي } 260 \times \text{معامل التخفيف } 50) / 0000$$

ولغرض قياس النقاوة فقد تم قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر وامكن تقدير قيمة النقاوة من حاصل قسمة قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 260 نانوميتر على قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر .(Cherry, 1962; Barbas et al., 2001).

• الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز للتحري عن الحامض النووي DNA

تم مزج 00 مايكروليتر من الحامض النووي DNA مع 5 مايكروليتر من داريء صبغة التحميل لكل عينة باستخدام ماصة دقيقة ووضع المزيج في حفر هلام الاكاروز الحاوي على صبغة الاثديومبرومايد في جهاز الهجرة الكهربائية، وجهاز تيار كهربائي مقداره 000 فولت لمدة 75 دقيقة وتمت مشاهدة الهلام على جهاز UV transilluminator.

التتميط الجيني لعزلات *C.perfringens* باستخدام Multiplex PCR

استخدمت تقنية تفاعل Multiplex PCR لغرض تنميط العزلات بالاعتماد على الجينات المشفرة للذيفانات الرئيسية الخمس وذلك باستخدام خمسة ازواج من البادئات للتحري عن جينات *cpe*, *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*.

المواد:-

• البادئات

انتخبت 5 ازواج من البادئات اعتمادا على ما ذكره الباحثان Korkeala و Heikinheimo (2005) لغرض التتميط الجيني للعزلات بالاعتماد على جينات الذيفانات، وان تتابع البادئات وتراكيذها المضافة الى خليط التفاعل فضلا عن حجم القطعة المسؤول كل زوج عن تضخيمها وجين الذيفان المراد الكشف عنه موضحة في الجدول (0).

الجدول(1):البادئات المستخدمة في تفاعل Multiplex PCR لتنميط عزلات *C.perfringens*

اسم البادئ	التسلسل	التركيز بالمايكرمولر	حجم قطعة الجين زوج قاعدة	الجين
CPA	F 5-TGCATGAGCTTCAATTAGGT-3 R 5-TTAGTTTTGCAACCTGCTGT- 3	0.5	400	<i>cpa</i>
CPB	F 5-GCGAATATGCTGAATCATCTA-3 R 5-GCAGGAACATTAGTATATCTTC-3	0.36	196	<i>cpb</i>
ETX	F 5-GCGGTGATATCCATCTATTC-3 R 5-CCACTTACTTGTCTACTAAC-3	0.46	655	<i>etx</i>
1A	F 5-ACTACTCTCAGACAAGACAG-3 R 5-CTTTCCTTCTATTACTATACG-3	0.52	446	<i>iA</i>
CPE	F 5-GGAGATGGTTGGATATTAGG-3 R 5-GGACCAGCAGTTGTAGATA-3	0.34	233	<i>cpe</i>

المواد والمحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي

استخدمت المواد والمحاليل نفسها المذكورة في عملية ترحيل الحامض النووي DNA.

طرائق العمل:

• تحضير البادئات Preparation of primers

حضر المحلول الخزين لكل بادئ بتركيز 000 بيكومول/مايكروليتر باضافة الماء المقطر اعتمادا على تركيز كل بادئ وفق تعليمات الشركة المجهزة (BioCorp) الكندية كما مبين في الجدول (2).

الجدول (2): مكونات المحلول الخزين للبادئات

البادئ	حجم الماء المضاف بالميكروليتر	البادئ	حجم الماء المضاف بالميكروليتر
CPA F	920	ETX R	900
CPA R	1.065	IA F	1.190
CPB F	943	IA R	1.010
CPB R	1.132	CPE F	1.285
ETX F	1.190	CPE R	1.011

• خليط التفاعل Reaction mixture

حضر خليط التفاعل عند حجم نهائي 50 ميكروليتر باستخدام KAPA Taq 2X Ready Mix DNA polymerase لانجاز العمل وكما مبين في الجدول (3).

الجدول (3): خليط تفاعل Multiplex PCR لتنميط عزلات *C.perfringens*

المكونات	الحجم
2x Ready Mix with Mg ²⁺	25 ميكروليتر
زوج البادئات CPA F, CPA R	0.25 ميكروليتر لكل بادئ
زوج البادئات CPB F, CPB R	0.18 ميكروليتر لكل بادئ
زوج البادئات ETX F, ETX R	0.23 ميكروليتر لكل بادئ
زوج البادئات IA F, IA R	0.26 ميكروليتر لكل بادئ
زوج البادئات CPE F, CPE R	0.17 ميكروليتر لكل بادئ
القالب Template	00 ميكروليتر
Free nuclease water	اكمل الحجم الى 50 ميكروليتر

• التضخيم Amplification

اضيف 2x Ready Mix DNA polymerase بمقدار 625 مايكروليتر الخاص بـ 25 عينة الى انبوبة ابندروف ذات حجم 1.5سم³ ثم اضيفت البادئات باحجام محضرة لخمس وعشرين عينة الى خليط التفاعل كما يأتي:-

0- زوج البادئات CPA F, CPA R بمقدار 6.25 مايكروليتر

2- زوج البادئات CPB F, CPB R بمقدار 4.5 مايكروليتر

3- زوج البادئات ETX F, ETX R بمقدار 5.75 مايكروليتر

4- زوج البادئات IA F, IA R بمقدار 6.5 مايكروليتر

5- زوج البادئات CPE F, CPE R بمقدار 4525 مايكروليتر

وزع المزيج السابق المكون من 2x Ready Mix DNA polymerase والازواج الخمسة من البادئات الى 25 انبوبة ابندروف الخاصة بكل عينة وفق الترقيم بمقدار 27.18 مايكروليتر ثم اضيف 00 مايكروليتر من القالب المحضر سابقا الى كل انبوية ابندروف من الانابيب الخمسة والعشرين، ثم اكمل الحجم النهائي لمزيج التفاعل الى 50 مايكروليتر باضافة الماء المقطر، واجريت عملية التضخيم باستخدام جهاز Thermal cycler المبرمج على 35 دورة بعد عملية المسخ الاولي عند 94°م لمدة 5 دقائق اذ تضمنت كل دورة مسخ عند 94°م لمدة دقيقة واحدة، و تم الارتباط عند 53°م لمدة دقيقة واحدة والاستطالة عند 72°م لمدة دقيقة واحدة وبعد اتمام الدورات اجريت دورة نهائية عند 72°م لمدة 00 دقائق.

• الترحيل الكهربائي Electrophoresis

تم اجراء الترحيل الكهربائي لتحليل نواتج التضخيم باضافة 20 مايكروليتر من نواتج التضخيم الى حفر هلام الاكاروز الحاوي على صبغة الاثيومبرومايد فيما عدا الحفرة الاولي التي اضيف اليها 6 مايكروليتر من مزيج صبغة التحميل والمؤشر (100-bp) DNA Ladder بنسبة 5:1 والحفرة الثانية التي اضيف اليها محلول السيطرة السالبة ثم ربط مجهز القدرة ومرر تيار كهربائي بقدرة 100 فولت ولمدة 90 دقيقة ثم رفع اللوح الخاص بهلام الاكاروز من حوض الترحيل و فحصت الحزم تحت UV-Transillium، ثم تم تصوير النتائج فوتوغرافيا.

التجربة الثالثة : التحري عن تكوين السبورات وانتاج الذيفان المعوي

Detection of Sporulation and Enterotoxin Production

المواد :-

1- العينات

استخدمت في هذا المحور 8 عزلات من جرثومة *C.perfringens* type A *cpe+* المشخصة مسبقا بالاعتماد على تفاعل Multiplex PCR لغرض التحري عن تكوين السبورات وقابليتها على انتاج الذيفان المعوي باستخدام اختبار تلازن اللاتكس المنفعل العكسي.

2- عدة اختبار تلازن اللاتكس المنفعل العكسي (PET-RPLA)

استخدمت العدة المجهزة من شركة Oxoid الانكليزية المنشأ التي تحتوي على المكونات الاتية:-

-اللاتكس المحسس Sensitized latex

-لاتكس السيطرة Latex control

-السيطرة (الذيفان المعوي Enterotoxin)

-المحلول المخفف Diluent

3 - وسط تكوين السبورات Modified Duncan and Strong medium

حضر الوسط من المكونات الاتية:-

450 غم Yeast extract، 0550 غم Proteose peptone، 450 غم Soluble starch، 050غم

Sodium thioglycolate، 0050 غم $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

حضر الوسط باذابة المكونات اعلاه في 0000سم³ من الماء المقطر ثم وزع الوسط بمقدار

06-08سم³ في قناني ذات غطاء محكم وعقم بالموصدة عند درجة حرارة 020 °م لمدة 05 دقيقة.

4 - صبغة كرام Gram stain

5- صفيحة المعيار الدقيق نوع V Microtiter plate

طريقة العمل:-

• انتاج الذيفان المعوي والتحري عن تكوين السبورات

0-تم تلقيح وسط اللحم المطبوخ بجرثومة *C.perfringens* type A *cpe+* النامية على وسط FTG ثم

حضنت المزارع عند 37°م لمدة 08-20 ساعة .

2-سخنت المزارع عند درجة حرارة 75°م لمدة 20 دقيقة.

3-تم تلقيح 058 سم³ من المزرعة المسخنة المأخوذة من قاع الانابيب في 06-08سم³ من وسط تكوين السبورات ثم حضنت عند 37°م لمدة 24 ساعة.

4-تم تحضير مسحات من المزرعة النامية على وسط تكوين السبورات وصبغت بصبغة كرام للتحري عن تكوين السبورات في العزلات قيد الاختبار.

5-اجري طرد مركزي للمزارع عند 3000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة 4°م ثم فصل الراشح واستخدم في الاختبار.

• التحري عن الذيفان المعوي وتنقيته

0-حضر نموذج السيطرة للذيفان المعوي باضافة 550 سم³ من المحلول المخفف الى الانبوب الخاص به.

2-تم ترقيم Micrtiter plate حيث اعطي كل صفين من الطبق رقم واحد وكل صف يتكون من 8 حفر.

3-اضيف 25 مايكروليتر من المحلول المخفف لكل حفرة من الحفر الثماني لكلا الصفين ماعدا الحفرة الاولى.

4-اضيف 25 مايكروليتر من العينة للحفرة الاولى والثانية من كل صف.

5-اجريت تخافيف مضاعفة ابتداءً من الحفرة الثانية الى الحفرة السابعة مع ترك الحفرة الثامنة.

6-اضيف 25 مايكروليتر من الاتكس المحسس لكل حفرة في الصف الاول.

7-اضيف 25 مايكروليتر منلاتكس السيطرة لكل حفرة في الصف الثاني ومزجت محتويات الطبق باليد بشكل خفيف، وغطي الطبق بواسطة البارافيلم ووضع على ارضية سوداء، ثم وضع طبق بتري فيه ماء بالقرب من صفيحة الاختبار، وتم وضع غطاء صندوقي الشكل فوقهما لمنع حدوث الجفاف وتركت الصفيحة في درجة حرارة الغرفة لمدة 20-24 ساعة.

8-قرات النتائج وسجلت ثم صورت فوتوغرافيا.

9-تم تنقية الذيفان المعوي المستخلص بالاعتماد على (Scott and Duncan,1975)

التجربة الخامسة: التحري عن فعالية التوكسين كمضاد لسرطان الثدي

التجربة الاولى:

المواد:

الخطوط الخلوية Cell Lines:-

استخدمت في هذه الدراسة اربعة خطوط خلوية مختلفة تم الحصول عليها من مختبر البايولوجي

الجزئي في مجمع كلية الطب /الجامعة الاردنية تضمنت :

- 1- Human breast adenocarcinoma cell -lines MCF-7
- 2- T472D
- 3- Periodontal fibroblasts
- 4- Vero cell line

الايوساط والمواد المستخدمة:-

- وسط DMEM/F12 تم الحصول عليه من (Gibco, invitrogen, USA)
- وسط RPMI 1644 تم الحصول عليه من (Gibco, invitrogen, USA)
- مصلى الابقار الجنيني Fetal bovine serum حصل عليه من (Gibco, invitrogen, USA)
- L-glutamine تم الحصول عليه من (Lonza, Belgium)
- Penicillin تم الحصول عليه من (Lonza, Belgium)
- Streptomycin تم الحصول عليه من (Lonza, Belgium)
- Humidified incubator

طريقة العمل:-

تحضير المزارع الخلوية: Cell Culture preparation:

تم زرع الخطوط الخلوية MCF7 و T47D و Fibroblast في وسط DMEM-F12، فيما زرعت خلايا Vero Cells في وسط RPMI 1644 المعزز باضافة 00% مصلى الابقار الجنيني المسخن و 0% من 2 ملي مولر كلوتامين و 50 وحدة عالمية IU من المضاد الحيوي البنسلين و 50 مايكروغرام /سم³ من المضاد الحيوي ستريبتومايسين وحضنت جميع الخلايا في الحاضنة عند 37 م مع وجود 5 % CO₂ مع مراعاة توفير الرطوبة.

التجربة الثانية: قياس السمية الخلوية والفعالية المضادة للتكاثر في الزجاج باستخدام صبغة التريبان الزرقاء

المواد:-

طبق سداسي الحفر، الديقان المعوي المحضر محليا، صبغة التريبان الزرقاء، شريحة العد، مجهر مقلوب

طريقة العمل :

زرعت جميع الخطوط الخلوية في الطبق السداسي الحفر بحيث تكون كثافة الخلايا 00⁶×050 خلية/حفرة لخلايا MCF-7، T47D، وخلايا Vero فيما تكون كثافة خلايا الفايبروبلاست 00⁶×0535 خلية/حفرة ثم عوملت الخلايا بالديقان الذي تم استخلاصه وتنقيته من العزلة المحلية من

الجرثومة بخمسة تراكيز مختلفة (0500، 0550، 0525، 0503، 0506) مايكروغرام /سم³ مع مراعاة اضافة ثلاثة مكررات لكل تركيز ، اما حفرة السيطرة فتحتوي فقط على الوسط دون اضافات . وبعد ساعة من التحضين حسب حيوية الخلايا باستخدام صبغة التريبان الزرقاء وقدرت اعداد الخلايا الميتة والخلايا الحية باستخدام شريحة عد الخلايا وبوساطة المجهر المقلوب .

التجربة الثالثة :

المواد:

- عدة اختبار تكاثر الخلايا ، تم الحصول عليها من (Promega .USA)

- طبق ذو 96 حفرة

- قارئ الامتصاصية Absorbance microplate reader (Sunrise-TECAN, Switzerland)

طريقة العمل :

قياس الفعالية المضادة للتكاثر الخلوي والسمية الخلوية في الزجاج باستخدام طريقة MTT

تم زرع خلايا T47D، MCF-7 وخلايا Vero في الطبق المكون من 96 حفرة بكثافة 005000 خلية/حفرة ثم عوملت الخلايا بالذيفان بواقع 6 تراكيز مختلفة (0500، 055، 0525، 05025، 05062، 0500B02) مايكروغرام /سم³ بحيث اضيف كل تخفيف من الذيفان بثلاثة مكررات، فما استخدم ثلاثة تراكيز مختلفة للذيفان تجاه خلايا فايبروبلاست وبمكررين فقط وهي (0.00، 055، 0525) مايكروغرام/سم³، اما حفر السيطرة فتحتوي على الوسط فقط. وبعد ساعة من التحضين تم حساب حيوية الخلايا بطريقة MTT كما ورد في تعليمات عدة الاختبار وقيست الامتصاصية لجميع الحفر عند 570 نانوميتر مع طرح القيم المقاسة عند 570 نانوميتر بواسطة قارئ الامتصاصية وصورت الخلايا فوتوغرافيا.

التحليل الاحصائي :

تم حساب النسبة المئوية لحيوية للخلايا بالمقارنة مع السيطرة كما في المعادلة الاتية :

$$\% \text{ للخلايا الحية} = \frac{\text{قراءة امتصاصية العينة}}{\text{امتصاصية السيطرة}} \times 100$$

كما تم حساب التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا الحية IC₅₀ الذي يمثل قياس فعالية المادة السامة لتثبيط الفعالية البايولوجية للخلايا بنسبة 50%، باستخدام نظام برمجي خاص.

النتائج: نتائج التجربة الأولى

عزل جرثومة *C.perfringens*:

بينت نتائج زرع عينات الخروج للمرضى المصابين بالتسمم الغذائي على الأوساط الانتخائية الخاصة بعزل وتعداد جرثومة *C.perfringens*، وبعد مدة تحضين 24-48 ساعة في الظروف اللاهوائية عند درجتي حرارة 37°م و 46°م ان العدد الافتراضي لخلايا جرثومة *C.perfringens* يتعدى 10^3 خلية/غرام، أما فيما يخص نتائج الزرع بالاعتماد على الطرائق المستخدمة للعزل الأولى فكانت نتائج زرع المجموعة الأولى من العينات المخففة في وسط ماء البيبتون ظهور تعداد عالٍ للمستعمرات السوداء المختزلة للكبريت التابعة لجرثومة *C.perfringens* بينما بينت نتائج زرع التخافيف المعاملة حرارياً عند درجة حرارة 80°م لمدة 00 دقائق ظهور نمو نقي لمستعمرات جرثومة *C.perfringens* الا ان عدد المستعمرات النامية كانت اقل مقارنة مع الطريقة الأولى، ولم يتم الحصول الا على مستعمرة واحدة من جميع العينات المعاملة بدرجة حرارة 000°م لمدة 30 دقيقة.

استخدمت ثلاثة أوساط انتخائية صلبة للعزل الأولى وهي (TSC، SPS، TSN) لغرض عزل وتعداد جرثومة *C.perfringens* اعتماداً على انتخائيتها لاحتوائها على Sulfadiazine, Neomycin و sulphate, Polymyxin B و D-Cycloserine كذلك اعتمد على انتقائيتها في تمييز مستعمرات *C.perfringens* المختزلة للكبريت، وقد أظهرت الأوساط الثلاثة اختلافاً واضحاً في شكل المستعمرات النامية عليها وحجمها.

ظهرت مستعمرات *C.perfringens* على وسط TSC agar سوداء اللون وبأحجام 0-3 ملم ذات حواف محددة ومنظمة و أحياناً تندمج أكثر من مستعمرة فتبدو بشكل مستعمرة واحدة كبيرة توضحها الصورة (2) وتتفق نتائجها مع ما أشار اليه الباحث Corry وجماعته (2003) الى ان المستعمرات السوداء على وسط TSC agar و بأقطار 0-5 ملم تعد مستعمرات لجرثومة *C.perfringens*.

اما عند استخدام وسط SPS agar فقد بدت مستعمرات *C.perfringens* سوداء اللون متباينة بأحجامها بعضها صغير جداً والبعض الآخر متوسط الحجم إلا أنها بشكل عام اصغر من تلك النامية على وسط TSC agar، كما ان حوافها اقل تحديداً ومنتشرة وكما موضحة في الصورة (3) فيما ظهرت مستعمرات *C.perfringens* على وسط TSN agar شبيهة بتلك النامية على وسط SPS agar، كما موضحة في الصورة (4)، ولوحظ اسوداد لحواف الأوساط الثلاثة او انتشار اللون الأسود في الطبق مما يصعب تمييز المستعمرات المنفردة وخاصة عندما يكون تعداد المستعمرات عال جداً ويحدث هذا في الأغلب عند التخافيف 10^0 او 10^{-2} أو أحياناً عند زيادة فترة التحضين عن 24 ساعة الى 48 ساعة وكما موضح في الصورة (5)..



الصورة 3) مستعمرات جثومة *C. perfringens* لختزلة للهب رت غي وسط SPS agar



الصورة 2) مستعمرات جثومة *C. perfringens* لختزلة للهب رت غي وسط TSC agar



الصورة 4) مستعمرات جثومة *C. perfringens* لختزلة للهب رت غي وسط TSN agar



الصورة 5) انتشار لواسب الاسود غي او ساطلا عزل اول لختزلة *C. perfringens*

كفاءة التحضين اللاهوائي باستخدام الحافظة المحلية

استخدمنا في دراستنا حافظة معدنية بسعة 2 لتر تم شراؤها من الاسواق المحلية وبغطاء محكم ذات تصميم شبيه بالجار الاعتيادي بوصفه بديلا عن الجار بحجم 255 لتر لعدم توفره ، وتم اختيار حجم القنينة بالاعتماد على استخدام المغلف الخاص بجار سعة 255 لتر ، وقد اعطى نتائج جيدة في التحضين اللاهوائي وعزل *C. perfringens*.

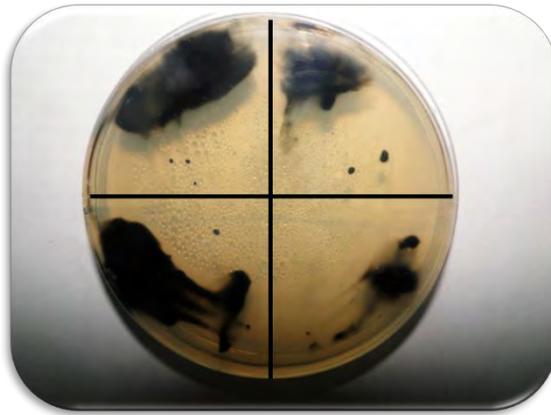
ثالثا: تنقية العزلات بالطريقة المحورة

بينت نتائج تنقية العزلات قيد الدراسة لغرض تمييز المستعمرات السوداء المختزلة للكبريت عن غيرها من الجراثيم الاخرى الموجودة معها كما موضح في الصورة (6) الحصول على مستعمرات منفردة سوداء ونقية لعزلات *C. perfringens*.

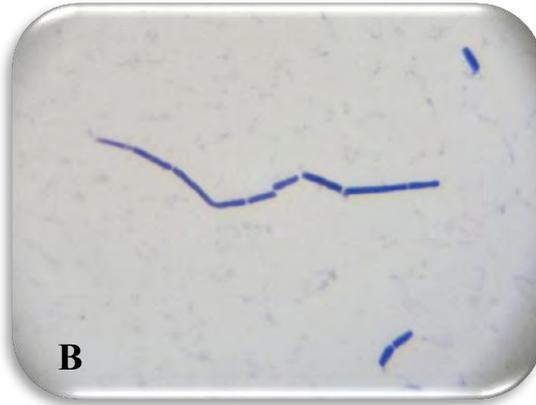
نتائج التشخيص

الفحص المجهرى

بينت نتائج الفحص المجهرى للمسحات المصبوغة بصبغة كرام المحضرة من المستعمرات السوداء المختزلة للكبريت النامية على أوساط العزل الأولي ظهور خلايا جرثومة *C.perfringens* عسوية الشكل موجبة لصبغة كرام، ومتغايرة الحجم وذات نهايات عريضة مستقيمة تشبه المربع تبدو بهيئة خلايا منفردة او ثنائية او قد تترتب بشكل سلسلة قصيرة كما موضح في الصورة (7)، تبين في دراستنا ان بعض العزلات تمتلك شكلا متطاولا ونحيفا ومتغايرة الأصباغ لصبغة كرام وبجوانب ونهايات مستقيمة وكما موضحة في الصورة (8).



الصورة (6) مستعمرات جرثومة *C.perfringens* لثقافة في وسط SPS



الصورة (7): خلايا جرثومة *C.perfringens* عسوية صبوغ صبغ كرام (100X)
A: خلايا منفردة مرتبة بشكل ثنائي
B: خلايا مرتبة في سلسلة قصيرة



الصورة 8): خلايا جرثومة *C. perfringens* مثبتة بأنة الاصبغ غميصغة كرام (100X)

نتائج الاختبارات الكيموحيوية

أظهرت العزلات قيد الدراسة عدم القدرة على إنتاج انزيم الكتاليز بدلالة عدم ظهور فقاعات الأوكسجين عند إضافة كاشف الكتاليز.

وعند اجراء اختبارات LGMN أظهرت نتائج الزرع على وسط MN عدم القدرة على الحركة بدلالة عدم انتشار النمو في الوسط الزرعي حول منطقة التلقيح وكما موضح في الصورة (9) ، فيما أظهرت العزلات القابلة على اختزال النترات بدلالة ظهور اللون الوردي المحمر حول منطقة التلقيح على نفس الوسط عند اضافة كاشف النترات كما في الصورة (00)، وأبدت نتائج زرع العزلات على وسط LG قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز بدلالة تحول لون الوسط من اللون الأحمر الى اللون الأصفر فيما أظهرت القابلية على إنتاج انزيم Gelatinase بدلالة تميح الجيلاتين كما في الصورة (00).

نتائج تأكيد التشخيص

أولاً: نتائج التحري عن ظاهرة التخمر العاصف

بينت نتائج زرع عزلات *C. perfringens* على وسط RPM قابلية هذه العزلات على تكوين ظاهرة التخمر العاصف ،وفي مدة تحضين قصيرة تنحصر بين (5-24 ساعة) تحت الظروف الهوائية والصورة (02) توضح النتيجة الموجبة لظاهرة التخمر العاصف بفعل جرثومة *C. perfringens*، إذ يستدل على حصول التخمر العاصف من خلال تخمير سكر الحليب بدلالة تغير لون وسط Litmus milk وتكوين الخثرة بدلالة التجبن ونتاج كمية كبيرة من الغاز مما يؤدي الى تكسر الخثرة والتصاقها بجدران انبوبة الاختبار.

ثانياً: نتائج التشخيص باستخدام وسط Fluorogenic

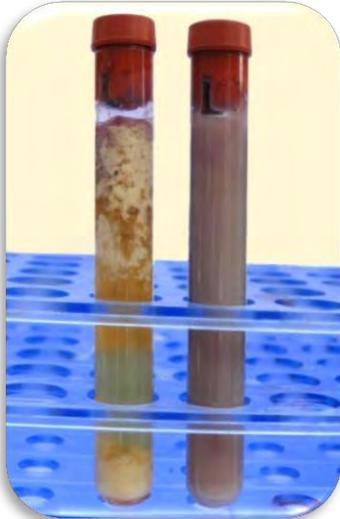
ظهرت مستعمرات عزلات *C. perfringens* على وسط TSCF agar بشكل مستعمرات سوداء مختزلة للكبريت وعند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية ظهرت مستعمرات متفلورة زرقاء غامقة تميل الى اللون الأسود ومحاطة بهالة من التفلور الأزرق الفاتح البراق من الوسط الزرعي كما مبين في الصورة (03).



الصورة (10): أجابآج تبار ايجزال لانترا ت على وسط
MN



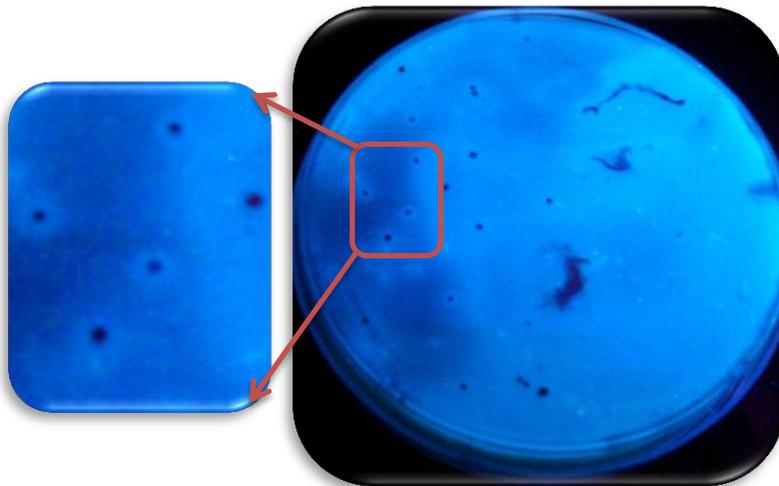
الصورة (9): عدم لقدرة على لحرك قب دلاة عللقت شار
لن مو ح ولمنطقة لتلقح على وسط MN



الصورة (12): ظاهرا قلت خمير لعصفف ووسط
RPM من قبل عزلات جرثومة *C.perfringens*



الصورة (11): أجابآج تبار تآم لآ لآلتين
وتخمير اللاكتوز على وسط LG



الصورة (13): بمثل ووسط عمرات *C.perfringens* لان آمة على وسط TSCF agar من دت عرض هالاشع فوق لآفس آة

نتائج التجربة الثانية: التشخيص الجزيئي لعزلات *C.perfringens* باستخدام تقنية Multiplex PCR

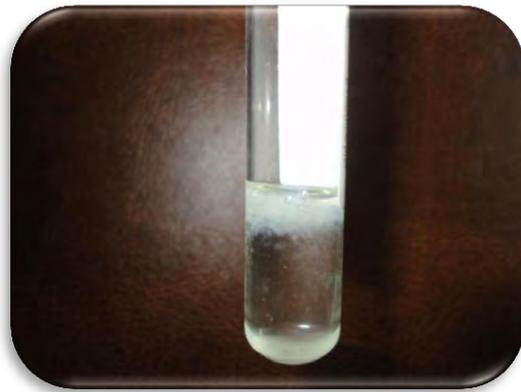
اولاً: نتائج استخلاص الحامض النووي DNA

تم الحصول على الحامض النووي DNA بالاعتماد على الطريقة التي وصفها الباحث Garmory وجماعته (2000) في عزل الحامض النووي DNA لغرض التتميط الجيني لعزلات *C.perfringens* في الكشف عن جينات الذيفانات الرئيسية لها الذي يبدو بشكل كتلة من الخيوط بيضاء اللون كما موضح في الصورتين (04) و(05) ،وتبين ان تركيز الحامض النووي DNA ينحصر بين (3555-5568) مايكروغرام/مايكروليتر وبنقاوة تتحصر بين (056-2.0).

ولغرض الكشف الاولي عن وجود الحامض النووي DNA تم اجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 0% حيث تبين وجود حزم واضحة للحامض النووي DNA المستخلص من العزلات قيد الدراسة ،وبذلك يمكن القول ان الطريقة المستخدمة في استخلاص الحامض النووي كانت كفوءة ومناسبة جدا لغرض الحصول على قالب لاجراء تفاعل Multiplex PCR .



الصورة (15): DNA جثومة *C.perfringens* مفعوع بطلعها لزج اجة



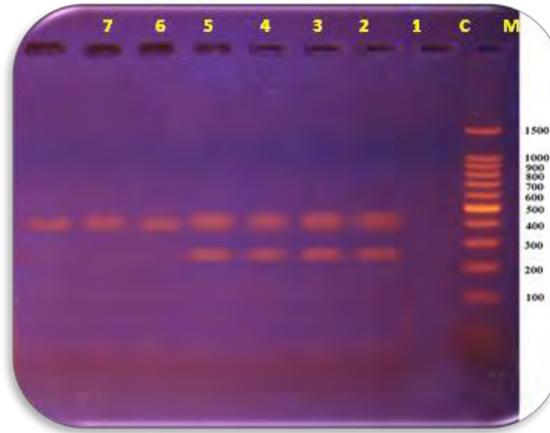
الصورة (14): DNA جثومة *C.perfringens* بشركل كتلة من الخوطبض اللون

ثانياً: التشخيص الجزيئي لعزلات *C.perfringens* باستخدام Multiplex PCR

قرأت نتائج مضاعفة نماذج الحامض النووي DNA خارج الجسم الحي بعد انتهاء التفاعل بترحيل النواتج كهربائياً على هلام الاكاروز كما موضح في الصورة (06) فقد اجري اختبار التتميط على نماذج الحامض النووي DNA المستخلص من مزارع جرثومة *C.perfringens* بالاعتماد على تفاعل Multiplex PCR باستخدام 00 بادئات متخصصة في تفاعل تضاعفي واحد للتحري عن خمسة جينات مشفرة للذيفانات الرئيسية الخمسة وهي جين *cpa* المشفر لذيغان الفا وجين *cpb* المشفر لذيغان بيتا وجين *etx* المشفر لذيغان ايسلون وجين *ia* المشفر لذيغان ايوتا وجين *cpe* المشفر للذيغان المعوي،

وقد أظهرت النتائج وجود حزمة مضيئة لجميع النماذج بوزن جزيئي (400-bp) عند مقارنتها بمؤشر الحامض النووي DNA (100-bp) كما مبين في الصورة (06)، ان ظهور هذه الحزمة في هذا الموقع يدل على الارتباط المتخصص للباديء المستخدم للكشف عن الجين المشفر لذيغان الفا مع التسلسل المكمل له على نموذج الحامض النووي DNA.

تبين من نتائج دراستنا أيضاً ظهور حزمة مضيئة اخرى في 8 من النماذج وبوزن جزيئي (233-bp) عند مقارنتها مع مؤشر الحامض النووي DNA (100-bp) فضلا عن الحزمة (400-bp) مما يدل على الارتباط المتخصص للبادئات المستخدمة في التحري عن جين *cpe* مع التسلسل المكمل لها على نموذج الحامض النووي DNA مما يدل على امتلاك هذه العزلات لكل من الجين *cpe* و *cpa*، من هذه النتائج يتبين ان جميع العزلات تعود الى النمط A بدلالة عدم ظهور الحزم المؤشرة لوجود جينات (*cpb, etx, Ia*)



الصورة (16): نتائج فحص فاعل Multiplex PCR لمرحلة كهيلي أ على هلام الاكاروز 1.5%
 الاعمدة : M : مؤشر الحامض النووي DNA Ladder (100-bp)
 C : لسطرة لسرابة

4-1: عزلات *C.perfringenstype A+cpe*

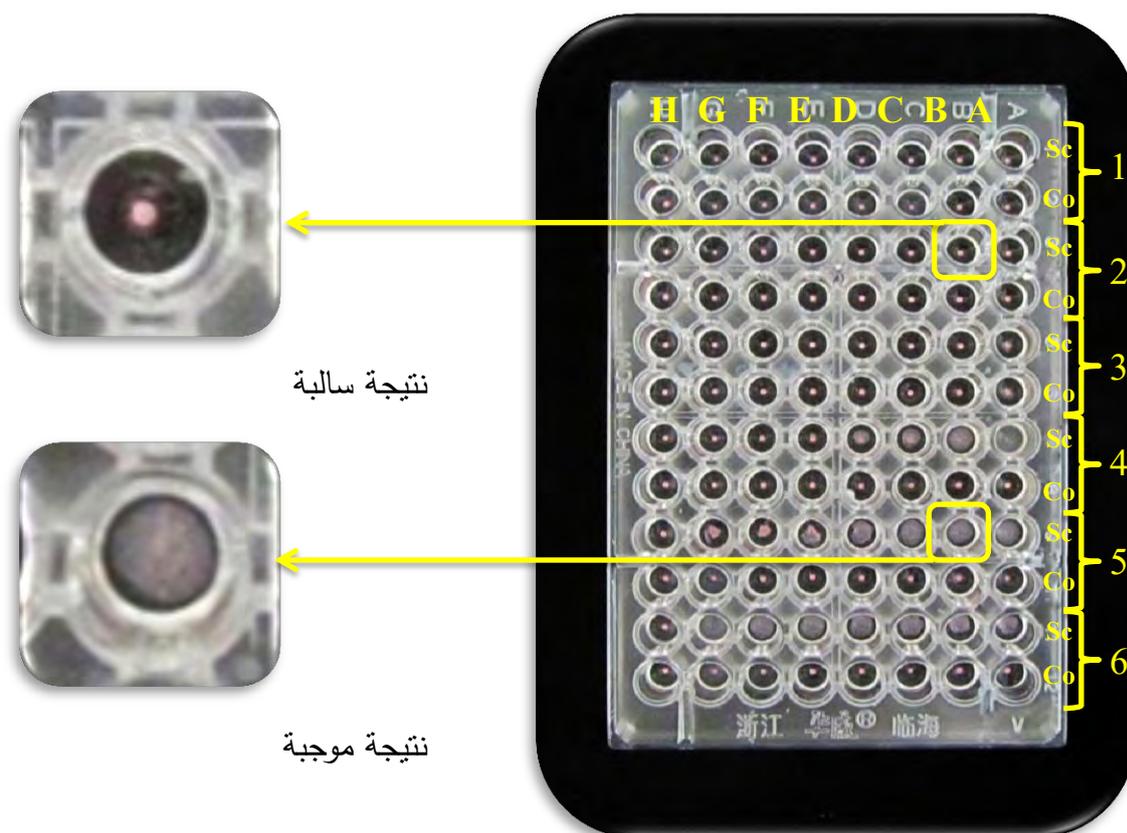
7-5: عزلات *C.perfringenstype A-cpe*

نتائج التجربة الثالثة: لتحري عن تكوين السبورات وإنتاج الذيفان المعوي للنمط A في رشح مزرعة *C.perfringens* باستخدام اختبار تلازن اللاتكس المنفعل العكسي

استخدم اختبار RPLA للتحري عن قابلية عزلات *C.perfringenstype A+cpe* على إنتاج الذيفان المعوي CPE في الزجاج (*in vitro*) بالاعتماد على تنميتها على وسط Modified Duncan and Strong الخاص بإنتاج الذيفان المعوي، وقد تبين ان عزلتين فقط من مجموع 8 عزلات أعطت

نتائج موجبة لانتاج الذيفان وبنسبة 25% عند مقارنتها مع نتائج السيطرة الموجبة والسالبة، كما مبين في الصورة (17).

تبين النتائج ان التلازن للعينة الاولى توقف عند الحفرة الرابعة في التخفيف 8/0 بينما توقف التلازن للعينة الثانية عند التخفيف الاخير وهو 64/0 في الحفرة السابعة وهذا قد يعود إلى الاختلاف في تركيز الذيفان المعوي في رواشح المزارع قيد الدراسة ،كما موضح في الصورة (17)



الصورة (17) تلتوى اختبار تبار تلازن RPLA للتحري عن نتائج قن ان CPE

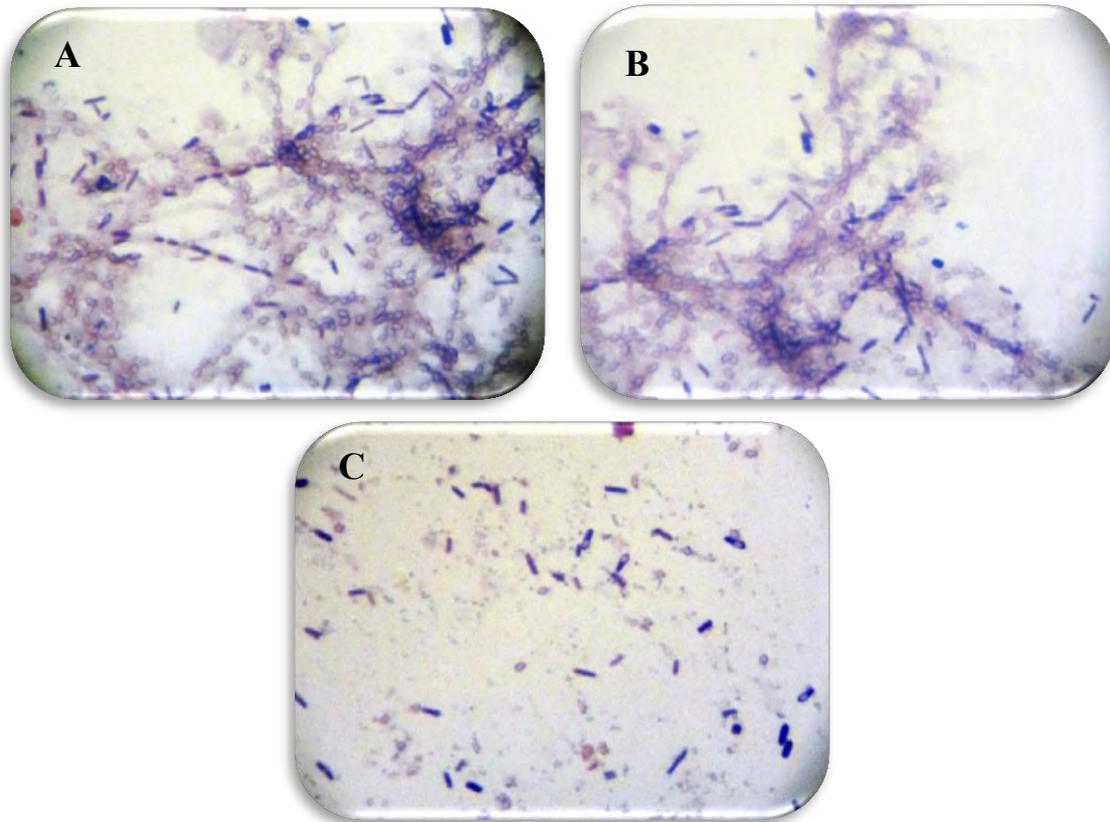
Control latex :Co Sensitised latex: Sc

3-1: نلتوى جسر لابة 4-5 نلتوى ج هج بة 6: عنة لس طرة

A: لعنة من دون تخفف G-B: لك تخفف 64/1-2/1 H: ل تخفف قظ.

أبدت نتائج هذه الدراسة بعد إجراء الفحص المجهرى باستخدام صبغة كرام للمسحات المحضرة من مزارع جرثومة *C.perfringens* type A *cpe*+ Modified في دراستنا وجود للسبورات في المزارع التابعة للعزلتين اللتين انتجتا ذيفان CPE وان وجود هذه السبورات كان بكثافة عالية كما مبين في الصورة (08) التي توضح السبورات والمراحل المختلفة من عملية تكوينها مما يدل على حدوث عملية تكوين السبورات وبكفاءة عالية الا ان العزلات

الأخرى لوحظ فيها تكون السبورات وبكميات قليلة جداً فيما لم يتم ملاحظة السبورات في بعض المسحات، مما يثبت العلاقة بين حدوث تكوين السبورات وإنتاج الذيفان المعوي



الصورة (18):

A: سبورات لعزلة الاثريثوم *C.perfringens*

B: سبورات لعزل قثان قثوم *C.perfringens*

C: صور قثوم سبورات لاثريثوم داخل لخلايا وخارجها

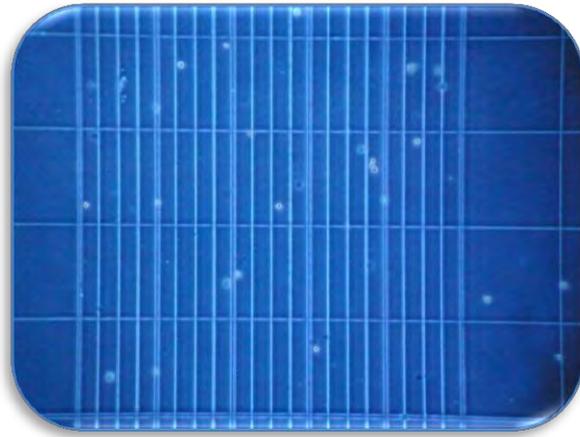
نتائج التجربة الرابعة:

اولاً: قياس السمية الخلوية والفعالية المضادة للتكاثر في الزجاج باستخدام صبغة التريبان الزرقاء
يوضح الجدول (4) نتائج قياس السمية الخلوية والفعالية المضادة للتكاثر للذيفان CPE تجاه
الخطوط الخلوية لسرطان الثدي المتضمنة خلايا MCF-7 و T47D وخلايا الكبد
(خلايا Vero) كسيطرة موجبة وخلايا طبيعية (خلايا Fibroplast) كسيطرة سالبة باستخدام صبغة
التريبان الزرقاء. تبين النتائج ان تعداد الخلايا الحية يقل مع زيادة تركيز ذيفان CPE لكلا الخليين
الخلويين MCF-7 و T47D ، اذ بلغت $00^6 \times 0575$ و $00^6 \times 0535$ خلية على التوالي عند التركيز
0506 مايكروغرام /مل الذي يمثل اقل تركيز وازداد انخفاض عدد الخلايا بزيادة تركيز الذيفان اذ بلغت
اعدادها $00^6 \times 0504$ و $00^6 \times 0503$ خلية على التوالي عند اعلى تركيز 0500 مايكروغرام /مل.

اما بالنسبة لخلايا Fibroblast فقد بينت النتائج انه لم يحدث اي تاثير في اعدادا عند معاملتها بالذيفان وعند جميع التراكيز مقارنة بالسيطرة 0.35×10^6 بينما حدث انخفاض تدريجي في اعداد خلايا Vero اذ بلغت $00^6 \times 059$ خلية عند اقل تركيز للذيفان البالغ 0506 مايكروغرام /مل واستمر الانخفاض وصولا الى $00^6 \times 0525$ عند اعلى تركيز 0500 مايكروغرام /مل كما مبين في الجدول (4) وقد تم تمييز الخلايا الحية عن الخلايا غير الحية بتفاعلها مع صبغة التريبيان الزرقاء اذ بدت الخلايا الحية عديمة اللون فيما اصطبغت الخلايا الميتة باللون الازرق الصورة (09).

الجدول (4): اعداد خلايا الخطوط الخلوية عند معاملتها بالتراكيز المختلفة من ذيفان CPE باستخدام صبغة التريبيان الزرقاء

Cell line	control	Concentration($\mu\text{g/ml}$)				
		0.06	0.13	0.25	0.50	1.00
MCF-7	1.00×10^6	0.75×10^6	0.33×10^6	0.23×10^6	0.10×10^6	0.04×10^6
T47D	1.00×10^6	0.35×10^6	0.24×10^6	0.15×10^6	0.08×10^6	0.03×10^6
Fibroblast	0.35×10^6	0.35×10^6	0.35×10^6	0.35×10^6	0.35×10^6	0.35×10^6
Vero	1.00×10^6	0.9×10^6	0.82×10^6	0.45×10^6	0.30×10^6	0.25×10^6



الصورة (19) (لخلايا الحية) لعدّمة اللون (والخلايا الميتة) لورق اءاللون

ثانيا: قياس السمية الخلوية والفعالية المضادة للتكاثر في الزجاج باستخدام قياس MTT
توضح الجداول (5، 6، 7، 8) نتائج قياس السمية الخلوية والفعالية المضادة لذيفان CPE تجاه الخطوط الخلوية لسرطان الثدي MCF-7 و T47D وخلايا Vero كسيطرة موجبة و خلايا Fibroblast كسيطرة سالبة باستخدام قياس MTT بالاعتماد على الامتصاصية ، تبين نتائج قراءة

الامتصاصية لخلايا MCF7 للمكررات الثلاثة ان هناك زيادة في الامتصاصية كلما قل تركيز الذيفان اذ بلغت 05006 عند اعلى تركيز 0500 مايكروغرام /مل ووصلت الى 05607 عند اقل تركيز البالغ 0500802 مايكروغرام /مل للمكرر الاول ولوحظ التأثير نفسه في المكررين الثاني والثالث الجدول (5). وبملاحظة الجدولين (6 و 7) الذي يوضح نتائج قراءات الامتصاصية لخلايا T47D وخلايا Vero على التوالي وبثلاث مكررات فقد ابدت زيادة في الامتصاصية كلما قل تركيز الذيفان. اما خلايا Fibroblast فيلاحظ ان هناك تأثير طفيف من خلال قراءات الامتصاصية الجدول (8).

وعند حساب النسب المئوية لحيوية الخلايا MCF7 T47D , وخلايا Vero بعد معاملتها بالذيفان باستخدام قياس MTT وبالمقارنة مع السيطرة اظهرت النتائج بشكل عام نقصان ملحوظ في حيوية الخلايا كلما زاد تركيز الذيفان، اذ بلغت النسبة المئوية لخلايا MCF7 92592% عند اقل تركيز للذيفان والبالغ 0500802 مايكروغرام /مل وانخفضت تدريجيا مع زيادة تركيز الذيفان الى ان وصلت 065007% عند اعلى تركيز للذيفان والبالغ 0500 مايكروغرام /مل ولوحظ نفس التأثير لخلايا T47D وخلايا Vero فيما لم تتاثر حيوية خلايا Fibroblast عند معاملتها بالذيفان الجدول (9).

وعند حساب قيم IC_{50} باستخدام قياس MTT تبين انه يساوي 208527 لخلايا MCF-7 فيما بلغ 24553 و 0325 لخلايا T47D وخلايا Vero على التوالي الجدول (00). والصورتان (20 و 20) توضحان خلايا الفايبروبلاست غير المعاملة والمعاملة على التوالي فيما تبين الصور (22، 23، 24، 25) خلايا MCF-7 غير المعاملة بالذيفان والمعاملة بالذيفان بالتراكيز المستخدمة (055، 05025) و(050) مايكروغرام/سم³ على التوالي والتي تظهر بوضوح تاثير الذيفان على تحلل وتفكك الخلايا بعد المعاملة مقارنة بالخلايا غير المعاملة بالذيفان.

الجدول (5): الامتصاصية عند 575 نانوميتر لخلايا MCF-7 المعاملة بذييفان CEP

	Concentration(μ g/ml)					
Control	1.00	0.5	0.25	0.125	0.062	0.00312
0.638	0.106	0.19	0.203	0.382	0.564	0.617
0.577	0.069	0.094	0.191	0.373	0.56	0.5
0.581	0.113	0.088	0.157	0.424	0.51	0.555

الجدول (6): الامتصاصية عند 575 نانوميتر لخلايا T47D المعاملة بذييفان CEP

	Concentration(μ g/ml)					
control	1.00	0.5	0.25	0.125	0.062	0.00312
0.354	0.077	0.085	0.083	0.1	0.113	0.213
0.312	0.071	0.082	0.076	0.083	0.114	0.21
0.309	0.07	0.072	0.07	0.075	0.081	0.222

الجدول (7): الامتصاصية عند 575 نانوميتر لخلايا Vero المعاملة بذيغان CEP

	Concentration($\mu\text{g/ml}$)					
control	1.00	0.5	0.25	0.125	0.062	0.00312
0.364	0.155	0.23	0.29	0.349	0.346	0.44
0.413	0.188	0.238	0.302	0.328	0.348	0.363
0.377	0.165	0.197	0.357	0.379	0.355	0.35

الجدول (8): الامتصاصية عند 575 نانوميتر لخلايا الفايبروبلاست المعاملة بذيغان CEP

	Concentration($\mu\text{g/ml}$)		
control	1.00	0.5	0.25
0.158	0.176	0.184	0.203
0.208	0.201	0.175	0.181

الجدول (9): النسبة المئوية لحيوية الخلايا قيد الدراسة

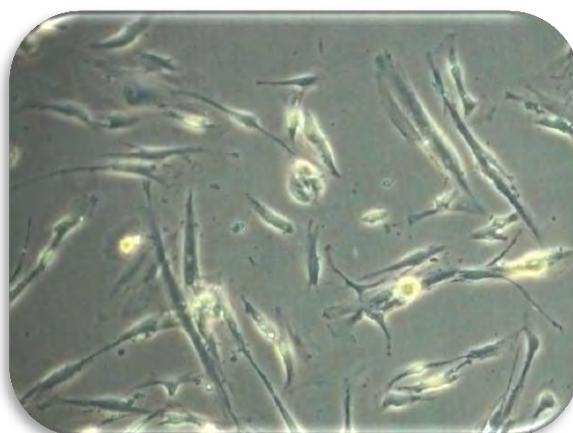
Cell line	Concentration($\mu\text{g/ml}$)					
	1.00	0.5	0.25	0.125	0.062	0.00312
MCF-7	16.007%	20,405%	30.647%	65.831%	91.077%	92.962%
T47D	22.386%	24.531%	23.483%	26.373%	31.557%	66.44%
Vero cell	43.956%	57.689%	82.519%	91.942%	91.159%	100.0%
Fibroblast cell	100% viability					

الجدول (15): التركيب المثبط لنقص عدد الخلايا الحية IC_{50} لخلايا MCF-7، T47D و Vero

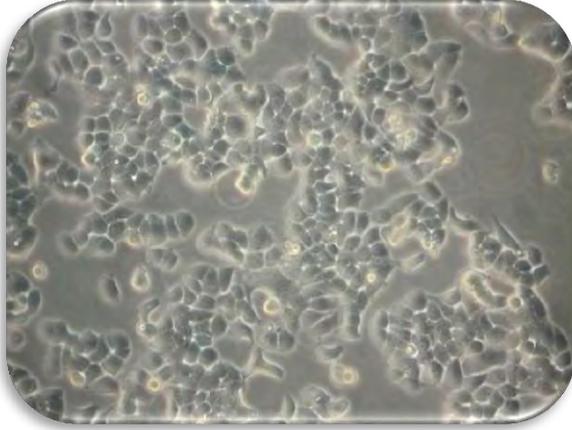
Cell line	Enterotoxin IC_{50}
MCF-7	208.27 \pm 31.13
T47D	24.53 \pm 2.99
Vero cell	1325.73 \pm 171.40



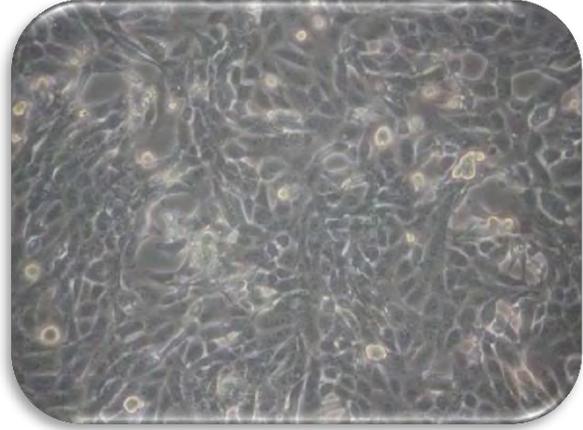
لصورة (21) خلايا فيبروبلاست لمعالم قبتان CPE



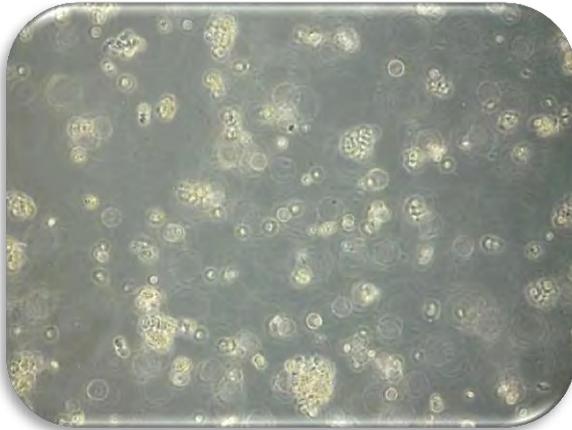
لصورة (20) خلايا فيبروبلاست غير لمعالم قبتان CPE



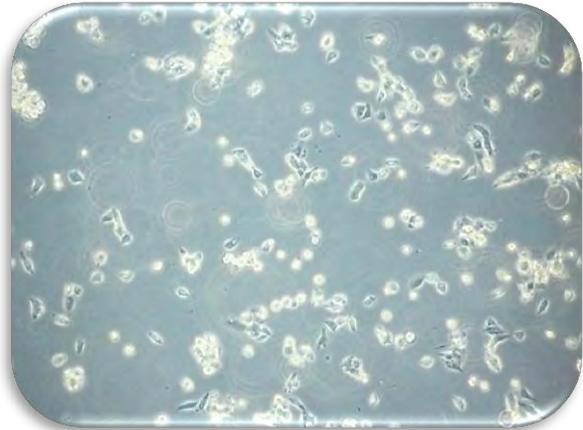
لصورة 23) خلايا MCF-7 مع المقياس 0.125
م الكروغرام/مل من دفان CPE



لصورة 22) خلايا MCF-7 غير المقياس
(سطرة)



لصورة 25) خلايا MCF-7 مع المقياس 1.00
م الكروغرام/مل من دفان CPE



لصورة 24) خلايا MCF-7 مع المقياس 0.5
م الكروغرام/مل من دفان CPE

المناقشة : العزل والتشخيص

اظهرت الاوساط الغذائية الانتقائية نجاحا في عزل جرثومة *C.perfringens* وانفقت نتائجنا مع ما اشار اليه الباحث Corry وجماعته (2003) من ان المستعمرات السوداء على وسط TSC agar وبأقطار 0-5 ملم تعد مستعمرات لجرثومة *C.perfringens* فيما اكد (Zimbro et al., 2009) أن مستعمرات *C.perfringens* تكون سوداء اللون على وسطي SPS agar و TSN agar. ان ظهور اللون الاسود للمستعمرات النامية على الأوساط الثلاثة يعود الى قابلية جرثومة *C.perfringens* على اختزال الكبريت لاحتواء هذه الاوساط على كل من الحديد و Sulphite فقد أشار الباحث Labbé (2001) الى ان هذه الجراثيم تختزل Sulphite الى Sulphide الذي يتفاعل بدوره مع الحديد ليكون راسب كبريتيد الحديد Iron sulfide الأسود والمستعمرات السوداء تعد مبدئياً على انها جرثومة *C.perfringens* كما أكد الباحث Corry وجماعته (2002) بان جراثيم Clostridium تختزل

Sulphite الموجود في الوسط الزراعي الى Sulphide بواسطة انزيم Sulphite reductase ثم يترسب Sulphide بشكل راسب اسود عند وجود املاح الحديد المناسبة.

وعند مقارنة كفاءة الأوساط الثلاثة في دراستنا تبين ان هنالك اختلافا واضحا في كفاءتها، وكذلك في انتخابتها وقد يعود السبب الى اختلاف محتواها من العوامل الانتخابية فقد أظهرت النتائج كفاءة عالية لوسط TSC agar في عزل وتعداد *C.perfringens* فضلا عن انتخابته الجيدة بمنعه لنمو الجراثيم الملوثة الموجودة طبيعيا في العينات ويعود ذلك الى احتوائه على العامل الانتخابي D-Cycloserine ضمن مكوناته وهو مثبت لمدى واسع من الجراثيم ، أكد الباحث (de Jong 2003) على أن D-Cycloserine له القدرة على تثبيط العديد من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وجراثومة *E.coli* وبعض جراثيم *Pseudomonas* و *Chlamydia* فضلا عن مجموعة Group D streptococci.

فيما اظهر وسط SPS agar نفس كفاءة وسط TSC agar في العزل والتعداد مع انتخابية اقل مقارنة بوسط TSC agar، وقد يعود التلوث الى تعرض المضادات الحيوية الموجودة ضمن مكوناته وهي كل من Polymyxin B و Sulfadiazine الى الحرارة اثناء التعقيم بالموصدة الذي يؤدي بدوره إلى فقدان جزء من فعاليتها، اما وسط TSN agar فقد كانت كفاءته قليلة مقارنة مع وسطي TSC agar و agarSPS في عزل جراثومة *C.perfringens* فضلا عن ذلك فقد لوحظ ان نسبة التلوث كانت قليلة جدا على هذا الوسط، وقد تعزى هذه النتيجة الى تأثير المضادات الحيوية الموجودة ضمن مكوناته وهي كل من Polymyxin B و Neomycin في كل من عزلات *C.perfringens* وعزلات الانواع الاخرى من الجراثيم فضلا عن احتفاظ المضادين الحيويين بكامل فعاليتهما الانتخابية لعدم تعرضهما للحرارة، لأنهما يضافان بعد عملية تعقيم الوسط بالموصدة ، ومن ملاحظة النتائج يمكن القول ان وسط TSC agar يعد أفضل وسط انتخابي لعزل وتعداد جراثومة *C.perfringens* مقارنة مع كل من SPS agar و TSN agar وتتفق نتائجنا مع ما استنتجه الباحث de Jong وجماعته (2003) عند دراسته لمقارنة ستة اوساط مختلفة لتعداد جراثومة *C.perfringens* من ان وسط TSC agar يعد الافضل.

استخدم في دراستنا مغلّف Anaerogen لتوفير الظروف اللاهوائية الذي يحتوي على Ascorbic acid الذي يقوم بامتصاص الاوكسجين الى اقل من 0% خلال 30 دقيقة ويوفر غاز CO₂ بنسبة 3-9%، ويعد استخدامه وسيلة سهلة ولا تحتاج لوجود Catalyst والماء كما هو معروف عند استخدام مغلفات Gaspak التقليدية لتوفير الظروف اللاهوائية، وقد استخدمنا في دراستنا حاوية معدنية بسعة 2 لتر وبغطاء محكم ذات تصميم شبيه بالجار الاعتيادي بوصفه بديلا عن الجار بحجم 255 لتر لعدم توفره ، وتم اختيار حجم القنينة بالاعتماد على استخدام المغلف الخاص بجار سعة 255 لتر ، وقد اعطى

نتائج جيدة في التحضين اللاهوائي وعزل *C.perfringens* مقارنة مع استخدام الجار المتوفر ويحجم 3 او 355 لتر الذي لم يعط نتيجة ايجابية في توفير الظروف اللاهوائية المناسبة للعزل بالاعتماد على عدم تحول لون صبغة الريزازورين الى عديم اللون مقارنة مع تغييره عند استخدام الحافظة اللاهوائية المعدنية فضلا عما تقدم فان تفاعل Ascorbic acid الموجود في داخل المغلف مع الأوكسجين يولد حرارة كدليل ايضا على الظرف اللاهوائي إذ بمجرد اخراج المغلف من الحافظة بعد انتهاء مدة التحضين وتعرضه للهواء نلاحظ ارتفاع حرارته مما يدل على احتفاظه ببعض فعاليته في داخل المغلف وفقدان الهواء بشكل كامل داخل الحافظة اللاهوائية.

تميزت الطريقة المعتمدة في تنقية العزلات بسهولة ونجاحها في تمييز مستعمرات *C.perfringens* المختزلة للكبريت السوداء على وسط SPS agar لان التخطيط المباشر على سطح الطبق يفشل في اعطاء اسوداد واضح للمستعمرات مما يصعب عملية التنقية والتمييز بين المستعمرات المختزلة للكبريت عن غيرها التابعة للانواع الاخرى من الجراثيم ، اما بالنسبة لنتائج الفحص المجهرى للمسحات المصبوغة فقد اتفقت مع اشار اليه الباحث حمد (2000) الى ان خلايا جرثومة *C.perfringens* تكون موجبة لصبغة كرام، عصوية الشكل، منفوخة وبنهاية مدورة تتواجد بشكل ازواج او منفردة او احيانا بشكل سلسلة قصيرة. كما جاءت نتائج الاختبارات الكيموحيوية منققة مع ما أشار اليه الباحث Ryzinska-Paier وجماعته (2000) على ان جرثومة *C.perfringens* تكون مستعمرات متميزة على وسط TSC agar وأنها غير متحركة، مختزلة للنترات، مخمرة للاكتوز ومسببة لتميع الجيلاتين.

تعد طريقة LGMN المستخدمة في دراستنا لتشخيص *C.perfringens* بالاعتماد على وسطي LG و MN طريقة مفيدة وسهلة في قدرتها على الكشف عن اختبارين كيموحيويين باستخدام نفس الوسط الزرعي وبذلك يتم توفير الوقت والجهد والتكلفة فضلا عن كونها طريقة متخصصة وحساسة لتشخيص النوع *C.perfringens* عن باقي أنواع جنس *Clostridium*، وقد اقترح من قبل منظمة ISO استخدام وسط TSC لغرض العزل الاولي، ثم يتم التشخيص بالاعتماد على الفحوصات المظهرية الاربع وهي تخمير اللاكتوز وتميع الجيلاتين و فحص الحركة واختزال النترات ،وبذلك اطلق على هذه الطريقة (ISO,2002)ISO-LGMN.

ولتأكيد التشخيص فقد استخدم وسط RPM في دراستنا للتحري عن التخمير العاصف لاحتوائه على Litmus milk اذ يعد وسط مناسب لتقليل احتمالية التلوث مقارنة مع استخدام وسط Litmus milk لوحده لكون وسط RPM وسط انتخابي يحتوي على Neomycin sulphate و Polymyxin B sulphate فضلاً عن درجة حرارة التحضين المرتفعة وهي 46°م كما تعد طريقة التشخيص بالاعتماد على هذا الوسط سهلة لعدم حاجتها لتوفير ظروف لاهوائية لاحتواء الوسط على العديد من العوامل

المختزلة مثل Sodium thioglycolate و L-Cystein وكمية قليلة من الاكار والجيلاتين لإعاقة انتشار الأوكسجين .

وعند استخدام وسط Fluorogenic فان ظهور المستعمرات المتفلورة الزرقاء يعود الى تكون مادة 4-Methylumbelliferon(4-MU) الذاتية التآلق عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية وهذا ما أكد عليه الباحثان Adcock و Saint (2000) من ان جرثومة *C.perfringens* تستطيع تأييض مادة 4-Methylumbelliferylphosphate (MUP) بواسطة انزيم Acid phosphatase لينتج مادة (4-MU) التي تمتلك قابلية على التآلق عند وضعها تحت الاشعة فوق البنفسجية.

التشخيص الجزيئي :

تم الحصول على عينات الحامض النووي DNA بنجاح بالاعتماد على الطريقة المذكورة في طرائق العمل في عزل الحامض النووي DNA ، اذ ان وجود حزم واضحة للحامض النووي DNA المستخلص من العزلات قيد الدراسة على هلام الاكاروز بتركيز 0% بعد الترحيل الكهربائي يدل على ان الطريقة المستخدمة في استخلاص الحامض النووي كانت كفوءة ومناسبة جدا لغرض الحصول على قالب لاجراء تفاعل Multiplex PCR .ومن قراءة نتائج تفاعل سلسلة البلمرة Multiplex PCR تبين ان هذه النتائج تتفق مع ما ذكره الباحثان Heikinheimo و Korkeala (2005) عند استخدامهما للبادئات المتخصصة للجينات الخمسة المشفرة للذيفانات الرئيسية في تفاعل Multiplex PCR من ان ناتج التضخيم في التحري عن جين *cpe* هو ظهور حزمة بوزن جزيئي (233-bp) وناتج التضخيم في التحري عن جين *cpa* ظهور حزمة بوزن جزيئي (400-bp) في عزلات *C.perfringens*. مع غياب الحزم الخاصة بالذيفانات بيتا، ايسلون، وآيوتا اذ ان جرثومة *C.perfringens* يتم تمييزها الى خمسة أنماط اعتماداً على أساس الذيفانات الرئيسية الخمسة فالنمط A ينتج ذيفان الفا فقط ، النمط B ينتج ذيفان الفا وبيتا و ايسلون والنمط C ينتج الذيفانين الفا وبيتا، النمط D ينتج الذيفانين الفا و ايسلون والنمط E ينتج الذيفانين الفا وآيوتا فضلا عن قابلية جميع الأنماط على إنتاج الذيفان المعوي CPE، وتتفق نتائج دراستنا في هذا المحور مع نتائج دراسة الباحث Sparks وجماعته (2000)، فقد أشار إلى ان جميع عزلات *C.perfringens* المعزولة من مرضى التسمم الغذائي ومرضى AAD التي شملتها دراسته تعود الى النمط A بدلالة وجود الجين المشفر لذيفان الفا وغياب الجينات المشفرة لكل من الذيفانات بيتا و ايسلون فيما أشار الباحث Mohamed وجماعته (2000) الى ان النمط A من جرثومة *C.perfringens* هو العامل الجرثومي السائد في العينات المأخوذة من خروج المرضى المصابين بالإسهال في مصر .

يظهر بوضوح في نتائج دراستنا ان عزلات *C.perfringens* type A + *cpe* هي المسبب الرئيس لحالات التسمم الغذائي الثماني التي أعطت عزلاتها نتائج إيجابية لوجود جين *cpe*، لان الإصابة

بالتسمم الغذائي تنتج عن جرثومة *C.perfringens* الحاملة لجين *cpe* وهذا ما اكده الباحث Miyamoto وجماعته (2002) من ان ذيفان CPE هو المسؤول عن العديد من امراض الإنسان المعوية ومنها التسمم الغذائي للنمط A وان انتاج هذا الذيفان يحدث بواسطة سلالات *cpe + type A* . ان استخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة Multiplex PCR في دراستنا لغرض تمييز عزلات *C.perfringens* تعد بديل جيد للطرائق التقليدية المناعية لسهولة إجرائها وتفادي ظهور النتائج السالبة او الموجبة الكاذبة لاعتماد معظم الطرائق التقليدية على التعبير الجيني للجينات المشفرة للذيفانات الرئيسية التي قد تتأثر في الظروف البيئية ، كما ان إجراء التمييز بالتحري عن خمسة جينات وفي تفاعل مستقل بالاعتماد على الطريقة التقليدية في تفاعل سلسلة البلمرة هو مفيد جداً لاختصار الجهد والزمن والتكلفة ، فضلاً عن ذلك فإن تمييز العزلات بالاعتماد على الجينات المشفرة للذيفانات الرئيسية ضروري لفهم طبيعة وبائية إصابات التسمم الغذائي الناجمة عن جرثومة *C.perfringens* مع الأخذ بنظر الاعتبار ان دراستنا هي الأولى في القطر في هذا الاتجاه.

تبين من نتائج دراستنا في التحري عن تكوين السبورات وانتاج الذيفان المعوي للنمط A في راشح مزرعة *C.perfringens* باستخدام اختبار تلازن اللاتكس المنفعل العكسي حدوث عدم تطابق في الطرازين المظهري والجيني لستة من العزلات قيد الدراسة من مجموع 8 عزلات فيما اتفق الطرازان المظهري والجيني لعزلتين من مجموع 8 عزلات حاملة لجين *cpe*، بذلك فقد تفاوتت نتائجنا في التحري عن تكوين السبورات وانتاج الذيفان المعوي للنمط A في راشح مزرعة *C.perfringens* باستخدام اختبار تلازن اللاتكس المنفعل العكسي في الحصول على عزلتين من مجموع 8 عزلات حاملة لجين *cpe* مع نتائج الباحث Augustynowicz وجماعته (2002) التي فيها 26 عزلة من مجموع 42 عزلة تحمل جين *cpe* أعطت نتيجة موجبة بالاعتماد على اختبار PET-RPLA وتوصل الباحث Singh وجماعته (2005) الى ان من بين 05 عزلة حاملة لجين *cpe* هنالك 02 عزلة منها أنتجت ذيفان CPE في الزجاج الا ان نتائج دراستنا لم تتفق مع نتائج دراسة الباحث Miki وجماعته (2008) والباحث Yang وجماعته (2006) اللتين تطابق فيها كل من الطرازين المظهري والجيني لجميع العزلات.

كما تبين من نتائج المسحات المحضرة من مزارع جرثومة *cpe+C.perfringens type A* النامية على وسط Modified Duncan and Strong في دراستنا علاقة بين حدوث تكوين السبورات وإنتاج الذيفان المعوي للعزلتين المنتجتين للذيفان المعوي بما يتفق مع العديد من الدراسات التي بينت انه فقط الخلايا الداخلة في عملية تكوين السبور وليست الخلايا الخضرية تنتج mRNA كما ان السلالات غير المكونة للسبورات لا تنتج الذيفان المعوي (Meliville et al.,1994;Czeczulin et al ,1996)

ان ظهور النتائج السالبة في اختبار PET-RPLA مقارنة مع نتائج Multiplex PCR يدل على كفاءة الطرائق الجزيئية مقارنة مع الطرائق المناعية اذ ان ظهور النتائج السالبة قد يعود الى تكوين ذيفان CPE بكميات قليلة نتيجة عدم تكوين السبورات بكفاءة عالية في العزلات السالبة او لقلة حساسية اختبار PET-RPLA.

ان السلالات الحاملة لجين *cpe* التي أبدت نتائج سالبة عند التحري عن الذيفان قد تكون قادرة على إنتاج CPE في القناة المعوية ومن ثم إحداث التسمم الغذائي ،لذلك فإن الاعتماد على الطرائق الجزيئية لتحديد جين *cpe* تعد افضل الطرائق لتمييز سلالات التسمم الغذائي خصوصاً ان العديد من العوامل الداعمة لعملية تكوين السبورات بشكل كفوء في جرثومة *C.perfringens* غير مفهومة بشكل كامل (Lindström et al., 2011). ان قابلية جرثومة *C.perfringens* على تكوين السبورات ونتاج ذيفان CPE يعتمد على عدة عوامل منها خصائص العزلة ،ونسبة اللقاح، ودرجة حرارة التحضين وعوامل بيئية اخرى (Deguchi et al.,2009).

الذيفان علاج لسرطان الثدي

ان حدوث سرطان الثدي في تزايد مضطرد في الدول النامية والذي يعد سببا في ارتفاع نسبة الوفيات المرتبطة بامراض السرطان حول العالم، وعلى الرغم من التطور الملحوظ في المعالجة الكيميائية والعلاج بالاشعاع وتطور ادوية حديثة باستمرار الا ان التقدم في نسب شفاء مرضى السرطان تبقى ضعيفة ولهذا السبب تبقى هناك حاجة لاهداف جديدة ومركبات علاجية ذات فعالية عالية .ان احدي الاستراتيجيات الموعودة قد تستهدف علاج امراض السرطان جينيا بضمنها النهج الذي من خلاله يمكن توجيه الجزيئات السمية الغريبة بشكل تخصصي تجاه الخلايا السرطانية. ومن اهم المرشحات الجديرة بجذب الانتباه هي الذيفانات الجرثومية التي ابدت قابلية فعالة في قتل الخلايا السرطانية في العديد من الدراسات داخل الجسم الحي وفي الزجاج (Felgner et al., 2016)، لذا تم التركيز في هذه الدراسة **ولأول مرة في القطر** على استخدام الذيفان CPE لعلاج سرطان الثدي ليوفر اداة جديدة في محاربة السرطان بطريقة انتقائية دون احداث اي ضرر للخلايا الطبيعية وفتح اتجاه جديد لامكانية استخدام العلاج المعتمد على جين *cpe* للاستهداف الانتقائي لخلايا سرطان الثدي.

ومن النتائج التي توصلنا اليها في هذه الدراسة نلاحظ ان ذيفان CPE يمتلك سمية خلوية متخصصة تجاه الخطوط الخلوية لسرطان الثدي قيد الدراسة بالمقارنة مع الخلايا الطبيعية التي لم تتأثر وقد يعود السبب في ذلك الى قدرة ذيفان CPE للارتباط مع الخلايا السرطانية عن طريق مستقبلات متخصصة يتم التعبير عنها فقط من قبل الخلايا السرطانية في حين لايمكن التعبير عنها في الخلايا الطبيعية لذا تعد هذه الخاصية ذو اهمية في اعطاء الخصوصية لذيفان CPE بطريقة مشابهة لمسؤوليته

عن احداث التسمم الغذائي بسبب قدرته الى تحليل الخلايا بشكل تخصصي وسريع للخلايا المعبرة عن المستقبلات الخاصة به.

اشارت العديد من الدراسات الى ان مستقبلات ذيفان CPE هي Claudin 3 and 4 وان هذه المستقبلات يتم التعبير عنها بصورة كبيرة على خلايا سرطان الثدي فيما لم يحدث لها تعبير على الخلايا الطبيعية (Kominsky et al., 2004)، فيما اشارت دراسات اخرى الى حدوث تعبير لمستقبلات claudin 3 and 4 في اورام القولون والمستقيم بالمقارنة مع تعبيرها على الخلايا الطلائية الطبيعية هذه الحقائق تقدم هذه المستقبلات كهدف جاذب للمعالجة الانتقائية للعديد من امراض السرطان مثل سرطان القولون وسرطان الثدي.

4- التطبيقات

0. يعد نجاح الذيفان المعوي CEP في علاج سرطان الثدي وبشكل تخصصي دون اي تأثير على الخلايا الطبيعية يمكن اعتماده كعلاج بايولوجي كفوء وآمن.
2. يمكن انتاج الذيفان في plate Pilot (بوصفه ناتج ابيض ثانوي) باستخدام طرق الكلونة (Cloning) اعتمادا على جراثيم اخرى سهرة العزل.
3. يمكن انتاج الذيفان على مستوى صناعي (Industrial scale) بتوفير الظروف الملائمة ومتطلبات الانتاج.
4. امكانية تطبيق نجاح الذيفان كعلاج على مجموعة من المرضى المتطوعين مع الأخذ بنظر الاعتبار المتابعة الصحية لهم .

5- المميزات

0. نجاح الذيفان المعوي CPE المستخلص محليا من عزلات محلية من جرثومة *C. perfingens* في قتل الخلايا السرطانية في الخطوط الخلوية بتخصصية عالية... الدراسة الاولى في العراق.
2. كفاءة وسط Florogenic في تشخيص جرثومة *C. perfingens* بوصفه بديلا اثبت نجاحا ملحوظا مقارنة بالطرائق التقليدية. .
- 3- كفاءة الحافظة المعدنية البديلة للجار في التحضين اللاهوائي للجرثومة
- 4- نجاح تحويل تنقية عزلات الجرثومة باعتماد التقنية بالتخطيط ثنائي الطبقة بديلا عن الطريقة التقليدية. باستخدام طبقة واددة من الاكار.
5. نجاح تقنية Multiplex PCR المستخدمة لأول مرة محليا لغرض التحري عن جين *cpe* المشفر للذيفان المعوي CPE لدقة نتائجه
- 6- اثبتت هذه التقنية كفاءة عالية في التحري عن النمط الجيني لعزلات الجرثومة
- 7- امكن تحقيق الهدفين المذكورين في النقطتين 5 و6 بتفاعل سلسلة بلمرة منفرد مختصرا الوقت والجهد.

6- الادعاءات (عناصر الحماية)

أ. استخدام الذيفان CPE المستخلص محليا من عزلات جرثومة *C. perfringens* في علاج سرطان الثدي.

ب- اشارة الى عنصر الحماية الاول فقد كان تركيز الذيفان الاكثر فاعلية في قتل الخلايا السرطانية للخطوط الخلوية لسرطان الثدي وبتخصصية عالية .

ج. اشارة الى عنصر الحماية الاول فقد اثبتت تقنية Multiplex PCR كفاءة عالية في التحري عن جين *cpe* المشفر للذيفان المعوي وفي التتميط الجيني لعزلات الجرثومة المنتجة للذيفان المعوي CPE وامكن استخدام التقنية للهدفين بتفاعل سلسلة بلمرة منفرد مختصرا الوقت والجهد والكلفة.

د. اشارة الى عنصر الحماية الاول :تم عزل وتنقية الجرثومة بطريقة محورة وذلك عن طريق استخدام طبقتين من الاكار بديلا عن الطبقة الواحدة لزيادة كفاءة العزل والتنقية اضافة الى استبدال الجار اللاهوائي المستورد بحافظة معدنية محلية تم شراؤها من الاسواق المحلية لغرض التحضين اللاهوائي.

7- المصادر:

- حمد، محمد علي (2000)، دراسة جرثومية لاختماج المطثية الحاطمة عند الاغنام في سورية. اطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة البعث.
- النقار، سحر سالم بطرس داؤد (2000)، عزل وتشخيص الاركيا المولدة للميثان ودورها في إنتاج الغاز الحيوي من فضلات الابقار والدجاج. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.
- Adcock, P. W. and Saint, C. P. (2001). Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using chromogenic and fluorogenic substrates, *App. Environ. Microbiol.*, 67(9): 4382-4384.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. 4th ed., Taylor and Francis Group, LLC, New York, USA.
- Augustynowicz, E.; Gzyl, A. and Slusarczyk, J. (2002). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* with a duplex PCR. *J. Med. Microbiol.*, 51(2): 169-172.
- Barbas, C. F.; Burton, D. R.; Scott, J. K. and Silverman, G. I. (2001). Quantitation of DNA and RNA. In: *General Procedures*, Cold Spring Harbor Laboratory Protocols. Barbas, C. F. And Burton, D. R. Cold Spring Harbor, New York
- Black, J. D.; Lopez, S., Cocco, E.; Schwab, C. L.; English, D. P. and Santin, A. D. (2015). *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) and CPE –binding domain (c-CPE) for the detection and treatment of gynecologic cancers. *Toxins*. 7:1116-1125.
- Cherry, J. H. (1962). Nucleic acid determination in storage tissues of higher plants. *J. Plant. Physiol.*, 73:670-678.
- Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996). *Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology*. 14th ed., Churchill Livingstone Inc., USA.

- Corry, J. E. L.; Curtis, G. D. W. and Baird, R. M. (2003). Handbook of Culture Media for Food Microbiology. 3rd ed., Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherland.
- Corry, J. E. L.; Curtis, G. D. W. and Baird, R. M. (2012). Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. 3rd ed., Royal Society of Chemistry, UK.
- Czeczulin, J. R.; Collie, R. E. and McClane, B. A. (1996). Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally *cpe*-negative type A, B, and C isolates of *C. perfringens*. *Infect. Immun.*, 64(8): 3301-3309.
- de Jong, A. E. I. (2003). *Clostridium perfringens*: spores and cells, media and modeling. Ph. D. Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- de Jong, A. E.; Eijhusen, G. P.; Brouwer-Post, E. J.; Grand, M.; Johansson, T.; Kärkkäinen, T.; Marugg, J.; in't Veld, P. H.; Warmerdam, F. H.; Wörner, G.; Zicavo, A.; Rombouts, F. M. and Beumer, R. R. (2003). Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens* from foods. *J. Microbiol. Methods.* , 54(3): 359-366.
- Deguchi A.; Miyamoto, K.; Kuwahara, T.; Miki, Y.; Kaneko, I.; Li, J.; McClane, B. A. and Akimoto, S. (2009). Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One.*, 4(5): e5598.
- Felguer, S.; Kocijancic, D.; Frahm, M. and Weiss, S. (2016). Bacteria in cancer therapy: renaissance of an old concept. *Int. J. Microbiol.* 2016, 6304150.
- Garmory, H. S.; Chanter, N.; French, N. P.; Bueschel, D.; Songer, J. G. and Titball, R. W. (2000). Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.*, 124: 61-67.
- Harmon, S. M.; Kautter, D. A. and Peeler, J. T. (1971). Comparison of media for the enumeration of *C. perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 21(5): 922-927.

- Hashimi, S. M.; Alqurash, N.; Ipe, D. S and Wei, M. O. (2013). Immunotoxin-mediated targeting of claudin-4 inhibits the proliferation of cancer cells. *Inter. J. Onco.* 42:1911-1918.
- Heikinheimo, A. and Korkeala, H. (2005). Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* obtained from Finnish broiler chickens. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40(6): 407-411.
- International Organization of Standardisation (ISO). (2002). Water Quality – Detection and Enumeration of *Clostridium perfringens* – Part 2: Method by Membrane Filtration (ISO/CD 6461-2). Geneva, Switzerland.
- Kominsky, S. T.; Vali, M.; Korz, D.; Gabig, T. G.; Weitzman, S. A.; Argani, P. and Sukumar, S. (2004). *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4.
- Labbé, R. G. (2001). *Clostridium perfringens*. In: Compendium of Methods for the Microbiological examination of food. 4th ed., Downes, F. P. and Ito, K. The American Public Health Association, USA.
- Lindström, M.; Heikinheimo, A.; Lahti, P. and Korkeala, H. (2011). Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiology*, 28: 192-198.
- Melville, S. B.; Labbé, R. and Sonenshein, A. L. (1994). Expression from the *Clostridium perfringens* *cpe* promoter in *C. perfringens* and *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.*, 62(12): 5550-5558.
- Miki, Y.; Miyamoto, K.; Kaneko-Hirano, I.; Fujiuchi, K. and Akimoto, S. (2008). Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(17): 5366-5372.
- Mitchell, L. A. and Koval, M. (2010). Specificity of interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. *Toxins*. 2:1595-1611.

- Miyamoto, K.; Li, J. and McClane, B. A. (2012). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification. *Microbes Environ.* , 27(4): 343-439.
- Mohamed, M. E.; Suelam, I. I. and Saleh, M. A. (2010). The presence of toxin genes of *Clostridium perfringens* isolated from camel and human in Egypt. *Vet. Arhiv.*, 80(3): 383-392.
- Roberts, D. and Greenwood, M. (2003). *Practical Food Microbiology*. 3rd ed., Blackwell Publishing Inc., Massachusetts, USA.
- Ryzinska-Paier, G.; Sommer, R.; Haider, J. M.; Knetsch, S.; Frick, C.; Kirschner, A. K. T. and Farnleitner, A. H. (2011). Acid phosphatase test proves superior to standard phenotypic identification procedure for *Clostridium perfringens* strains isolated from water. *J. Microbiol. Methods*, 87(2): 189-194.
- Sacki, R.; kondoh, M.; Uchida, H. and Yagi, K. (2010). Potency of claudin – targeting as antitumor therapy. *Mol. Cell. Pharmacol.* 2:47-51.
- Singh, R. V.; Bhilegaonkar, K. N. and Agarwal, R. K. (2005). Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. *J. Food Saf.*, 25: 146-156.
- Sparks, S. G.; Garman, R. J.; Sarker, M. R. and McClane, B. A. (2001). Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J. Clin. Microbiol.*, 39 (3): 883-888.
- Yang, C.; Wang, J. -Y. and Shih, D. Y. -C. (2006). The level of fecal carriage and the toxic potential of *Clostridium perfringens* in the feces of a Taiwan subpopulation. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(1): 89-92.
- Zimbro, M. J.; Miller, S. M.; Wilson, G. E. and Johnson, J. A. (2009). *Difco and BBL Manual, Manual of Microbiological Culture Media*. 2nd ed., Becton, Dickinson and Company, USA.