جامعـــة الموصـــل
كلية العلوم

عزل وتشخيص جراثيم *Leptospira* من حالات مرضية مختلفة في مدينة الموصل

رسالة تقدمت بها

الأء حسين طه ايوب المولى

الى مجلس كلية العلوم / جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

بإشراف

الدكتورة أميرة محمود محمد طعمة الراوي
أستاذ مساعد

ربيع الاول 1428 هـ **آذار 2007 م**

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جراثيم جنس ***Leptospira*** من العينات السريرية المتمثلة بالادرار وسائل النخاع الشوكي والدم من المرضى الذين يعانون من اعراض الحمى والآم الرأس والالام العضلية واليرقان والفشل الكلوي والاعراض التنفسية واعراض التهاب السحايا للمدة ما بين شهر حزيران لعام 2005 لغاية شهر نيسان لعام 2006 ، اذ تم تشخيص هذه الجراثيم في عينات الادرار بنسبة قدرها 4.5% وفي عينات سائل النخاع الشوكي بنسبة 2.3% اعتماداً على الصفات المظهرية والزرعية ومتطلبات النمو الخاصة بها فضلا عن بعض الاختبارات التشخيصية . تم تمييز النمو الحلقي لهذه الجراثيم على الاوساط الزرعية شبه الصلبة المستخدمة في العزل الاولي فضلا عن تمييز شكلها المظهري باستخدام صبغة كرام وصبغة كرام المحورة وصبغة فونتانا كما فحصت بالمجهر المتألق بعد صبغها بالاكردين البرتقالي . ولغرض تأكييد التشخيص تم اختبار قدرة عزلات الجراثيم على النمو على وسط Tryptose blood agar فلم تتمكن من النمو عليه في حين اظهرت القدرة على النمو على وسط Trypticase soy broth بوجود المصل بينما لم تستطع النمو عند عدم وجوده واظهرت جراثيم ***Leptospira*** نتائج موجبة لكل من اختبار انتاج انزيمي الكتاليز والاوكسيديز .

وللحصول على اوساط زرعية كفوءة وسهلة التحضير اجري تحوير الوسط الزرعي الخاص بالعزل الاولي لجراثيم ***Leptospira*** وهو وسط فليتشر شبه الصلب اذ تم تحضير ثلاثة اوساط محورة هي وسط فليتشر المحور A و B و C . أختبرت كفاءة اربعة مصول في وسط فليتشر المحور A في تنمية هذه الجراثيم وهي مصل الابقار والاغنام والخيول والانسان مقارنة بمصل الارنب في وسط فليتشر غير المحور وقد أظهر وسط فليتشر المحور A الحاوي على مصل الابقار قدرة في التنمية مكافئة لمصل الارنب من حيث المدة الزمنية للنمو ، وبالنسبة لوسط فليتشر المحور B فقد استخدم حليب البقر الكامل الدسم بدلا من مصل الارنب وأظهر الوسط كفاءة عالية في التنمية بمدة تحضين اربعة ايام مقارنة بالمدة الزمنية اللازمة لتنمية جراثيم ***Leptospira*** على وسط فليتشر الحاوي على مصل الارنب البالغة 7 ايام و 14–20 يوم في العزل الاولي لها ، اما وسط فليتشر المحور C الحاوي على البيض فلم تبدي الجراثيم قدرة على

النمـــــو علـــــى هـــــذا الوســـــط رغـــــم ابقـــــاء مـــــدة التحضـــــين 30 يوماً .

كما شملت الدراسة اجراء بعض الاختبارات الفسلجية المتضمنة اختبار تحديد مدى الاس الهيدروجيني الملائم لنمو جراثيم ***Leptospira*** عند ثبوت درجة الحرارة عند 30°م واختبار تحديد مدى درجات الحرارة الملائمة لنموها عند ثبوت الاس الهيدروجيني عند 7.2 وقد بنيت النتائج عدم قدرة هذه الجراثيم على النمو عند الاس الهيدروجيني الحامضي 6.2 والاس الهيدروجيني القاعدي 8.8 وقدرتها على النمو بكثافة عالية عند الاس الهيدروجيني 7.2 فيما أبدت قابلية على النمو بكثافة مختلفة عند درجات الاس الهيدروجيني 6.8 و 7.8 و 8.2 .

فضلا عن ذلك لم تبدِ الجراثيم قدرة على النمو عند درجتي حرارة 10°م و 45°م وتمكنت من النمو بكثافة عالية عند درجة حرارة 30°م وتفاوتت كثافة نموها عند 20°م و37°م .

وبهدف تسهيل عزل وتشخيص جراثيم جنس ***Leptospira*** تم اقتراح مفتاح تشخيصي خاص بالاعتماد على الاختبارات المظهرية ومتطلبات نمو هذه الجراثم فضلا عن بعض الصفات الفسلجية .

University of Mosul
College of Science

Leptospira from Different Clinical cases in Mosul City

A Thesis Submitted

By

Alaa Hussein T. A. Al-Mola

To

The Council of the College of Science

University of Mosul

In partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science

In

Biology/Microbiology

Supervised by

Dr. Amera Mahmood M. T. Al-Rawi

Assistant Professor

2007 A.D. **1427 A.H.**

Summary

The study included the isolation and identification of ***Leptospira*** from clinical specimens (urine, CSF and blood), collected from patients suffering from fever, headache, myalgia, jaundice, renal failure and meningitis during the period June 2005 – April 2006. The isolates were identified depending on morphological and culture characteristics, growth requirements and some diagnostic tests. The isolation percentage of ***Leptospira*** from urine and CSF were 4.5% and 2.3% respectively. The ***Leptospira's*** ring of growth was detected on semisolid media used for its primary isolation in addition to its morphology by gram stain, modified gram stain and fontana stain as well as testing by fluorescence microscope after staining with acridine orange.

To support the diagnosis, the ability of isolates to grow on tryptose blood agar was tested, since the bacterium couldn't grow on this medium while it could grow on trypticase soy broth with serum and it couldn't grow without serum. All isolates revealed positive results for catalase and oxidase enzymes production.

In order to get the most efficient and simple culture media, fletcher semisolid medium, which is generally used in the primary isolation of ***Leptospira*** was modified into three different types: A, B and C, in the first (modified fletcher A), four sera types (bovine, sheep, horse and human) were used to enhance the growth of this bacterium compared with the original medium which contains only rabbit serum. The efficiency of modified fletcher A containing bovine serum was found to be equal to that of rabbit serum containing medium with regards to the incubation period. In modified fletcher B medium, full cream bovine milk was used instead of rabbit serum, it was found to be more efficient than the original rabbit serum containing fletcher medium with an incubation

period of 4-days in comparison with 7- days for growth on the original fletcher medium and 14-20 days for the primary isolation of ***Leptospira***.

No growth was noticed upon using modified fletcher medium containing egg (modified fletcher C) with prolong incubation period up to (30-days).

Some physiological tests was also carried out including determination of PH range and temperature for growth of ***Leptospira***, the results indicated that the optimum PH is 7.2 and no growth was obtained at PH 6.2 and 8.8 and the optimum temperature for growth was 30 °C, while no growth occurred at 10°C and 45°C.

To aid the isolation and identification of ***Leptospira,*** an identification key is suggested depending on morphological and physiological characteristics and growth requirements of this bacterium.