(19) IQ

جمهورية العراق

وزارة التخطيط

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية

قسم الملكية الصناعية

(12)

براءة اختراع

(11) رقم البراءة : 3724

(21) رقم الطلب : 2009/48

(22) تاريخ تقديم الطلب : 2009/2/22

(30) تاريخ طلب الاسبقية - بلد الاسبقية - رقم طلب الاسبقية :

(51) التصنيف الدولي

C12N15/03

(52) التصنيف العراقي 6

(45) تاريخ منح البراءة : 2013/12/15

(72) اسم المخترع وعنوانه :

1-ا.م.د. احسان عيدان عبد الكريم السيمري/ جامعة البصرة/كلية الطب /فرع الاحياء ال

2- ا.د. كوثر هواز مهدي /جامعة البصرة /كلية العلوم /قسم علوم الحياة

3 -ا.د. خليل اسماعيل الحمدي /جامعة البصرة /كلية الطب /فرع الطب الباطني

4-ا.د. سندس صديق بكر /جامعة البصرة /كلية الطب / فرع الاحياء المجه

(73) اسم صاحب البراءة : الذوات اعلاه

(74) اسم الوكيل :

(54) تسمية الاختراع : استخلاص وتوصيف وامراضية المستضدات الفوقية
العنقودية الذهبية (ستا فلوجين) كمسبب لداء الاكزيما
للانسان .

منحت هذه البراءة استناداً لاحكام المادة 21 من قانون براءات الاختراع والنماذج الصناعية رقم 65 لسنة 1970 المعدل وعلى مسؤولية المخترع .

ا.د. علي الشكري
وزير التخطيط
توقيع المسجل
رئيس الجهاز

مطبعة الجهاز المركزي للإحصاء 2013
printing.press@mop.gov.iq

بسم الله الرحمن الرحيم

عنوان الاختراع

المستضدات الفوقية للمكورات العنقودية الذهبية

(ستا فلوجين) كمسبب لداء الأكزيما الجلدية للإنسان

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUPERANTIGENS (STAPHYLOGEN) INDUCING ATOPIC DERMATITIS/ ECZEMA SYNDROME IN HUMAN.

أسماء المخترعين وعناوينهم

أ.م.د. إحسان عيدان السيمري[1]

أ.د. كوثر هواز مهدي الهواز[2]

أ.م.د. خليل إسماعيل الحمدي [3]

أ .د. سندس صديق بكر[1]

(1) فرع الأحياء المجهرية- كلية الطب- جامعة البصرة.

(2) قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة البصرة

(3) فرع الطب الباطني- كلية الطب- جامعة البصرة.

عنوان الاختراع

المستضدات الفوقية للمكورات العنقودية الذهبية (ستا فلوجين) كمسبب لداء الأكزيما الجلدية للإنسان

STAPHYLOCOCCUS AUREUS **SUPERANTIGENS (STAPHYLOGEN)INDUCING ATOPIC DERMATITIS/ ECZEMA SYNDROME IN HUMAN.**

خلاصة الاختراع

1- تم في الدراسة الحالية استحداث الاكزيمة التأتبية الجلدية Atopic Dermatitis (Eczema) Syndrome في الفئران المختبرية المخمجة تجريبياً بالمستضد الفوقي Superantigen أو السم الخارجي Exotoxin للمكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) ويمكن تسميته (Staphylogenic Protein or Staphylogen) والمعزولة من آفة الاكزيمة التأتبية للإنسان.

2- أظهرت العلامات السريرية والتغييرات النسيجية المرضية لآفة الأكزيما Eczematous Lesion في الفئران المختبرية البيضاء BALB/C تشابها كبيراً مع مثيلاتها سريرياً ونسيجياً لآفة الأكزيما البشرية

3- تمكنت الدراسة من عزل وتنقية وتوصيف هذا المستضد الفوقي(ستا فلوجين) حيث تبين بأنه بروتين نقي يمتلك وزناً جزيئياً يبلغ (47.315)كيلودالتون.

4- تبين ان جسم المكورات العنقودية الذهبية متكون من ثمانية مستضدات بروتينية ظهرت على شكل ثمانية حزم بأجراء الرحلان الكهربائي لهلام الاكريلامايد المتعدد عالي النقاوة(PAGE 7.5%) وتراوحت أوزانها الجزيئية من (13.567- 549.540) كيلودالتون بالمقارنة مع البروتينات القياسية المدروسة.(ومن المؤمل دراسة علاقتها بآفة الاكزيمة البشرية مستقبلاً ان شاء الله).

5- اظهرت نتائج الدراسة الجرثومية لمتلازمة الاكزيمة التأتبية البشرية بان المكورات العنقودية الذهبية هي السائدة في افة الأكزيما بنسبة 60.48 ٪ تلتها بقية الأنواع الجرثومية وان تواجد الجراثيم ذات ارتباط إحصائي معنوي عالي بآفة الاكزيمة التأتبية($P<0.05$) مما يدلل بوضوح ويؤكد على العلاقة الوثيقة بين هذه الجراثيم والإصابة بمتلازمة الاكزيمة التأتبية.

6- استنادا على نتائج الدراسه الحالية وما ذكر في اعلاه تبين بان المستضد الفوقي للمكورات العنقودية الذهبية هو المسؤول عنً او على الأقل مسبباً ثانوياً لحدوث متلازمة التهاب الجلد التأتبي (الأكزيما).

أولا – مقـــدمة وخلفيـــة الاختـــراع

الأكزيما الجلدية أو الأكزيما التأتبية Atopic Eczema والتي تسمى ايضاً التهاب الجلد التأتبي Atopic Dermatitis والتي سميت حديثاً Atopic Dermatitis/ Eczema Syndrome وهي احد الامراض الجلدية المزمنة غير المعدية التي يمكن التعايش معها والتخفيف من مضاعفاتها وهي تصيب الصغار والكبار على حد سواء(1و2).

الاكزيما عباره عن اضطراب جلدي يتميز بالحكة والالتهاب والاحمرار وتكون ألبشره ايضاً ملتهبة وجافة ومتورمة ومكسوة بقشرة او تنضح بالسوائل . وللاكزيما إشكال متعددة ويمكن تصنيفها الى قسمين رئيسيين هي: التهاب الجلد الاكزيمي الخارجي Extrinsic والتهاب داخلي المنشأ Intrinsic او ما يسمى الالتهاب البنيوي (3-6).

أسباب الاكزيما غير معروفة ويحتمل انها ناتجة عن تفاعل عدة عوامل ذاتية وخارجية وقد تلعب الوراثة دوراً كبيراً في الاصابه بها حيث تبدأ معظم حالاتها في مرحلة الطفولة وتنمو بسرعة فائقة عند الثالثة والرابعة من العمر ويستمر بعضها خلال مرحلة البلوغ وتتهيج من وقت لأخر اعتماداً على الحالة النفسية للمريض او العادات الغذائية له بالإضافة الى الظروف البيئية المحيطة به (7-10).

وقد تتسبب الاكزيما الجرثومية من الجراثيم او منتجاتها حيث تختلط الاكزيما بأنتان جرثومي ثانوي او غزو فايروسي للجلد ويصبح الجلد متحسساً لمنتجات الجراثيم او المواد الكيمياوية الموجودة في الافرازات ويمكن ان تسبب المستضدات الجرثومية ارتكاساً سمياً خلوياً في الجلد (11-15).

المستضدات الفوقية Superantigens وهي بروتينات عالية الوزن ألجزيئي تنتج من قبل كائنات مجهرية مختلفة مثل المكورات العنقودية والمسبحية والعصيات والمايكوبلازما والفايروسات مسببة إمراض بشرية مثل التسمم الغذائي والصدمة الإنتانية وداء الصدفة وغيرها(16-18).

بناءً على ما جاء في اعلاة تهدف الدراسة الحالية الى عزل وتنقية وتوصيف المستفد الفوقي للجراثيم الأكثر شيوعا. و محاولة أحداث اكزيما جلدية في الفئران المختبرية المتعرضة لهذا المستفد الفوقي بالاضافة الى مقارنة التأثيرات المرضية السريرية والنسيجية الناتجة في الحيوانات المختبرية مع تلك الموصوفة للإنسان.

ثانيا- مستلـــزمات وطـرائـــق الاختـــــــــراع

1-عـــــزل وتـــشخيـــص الجـراثيـــــم

أخذت مسحات جلدية من آفة الأكزيما ومن الجلد السليم القريب من الآفة للشخص المصاب استخدمت انظمة API- System لتشخيص الأنواع الجرثومية المختلفة بالإضافة الى عـدد من الاختبارات الكيمياحياتية لتأكيد تشخيص المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* (19و20).

2- عزل وتنقية وتوصيف المستضد الفوقي للمكورات العنقودية الذهبية

اعتمدت الطرائق القياسية من المصادر العلمية المشار إليها إزاء كل خطوة مع أجراء بعض التعديلات والتحويرات التي تتلائم مع طبيعة دراستنا وللوصول إلى أفضل النتائج في عزل وتنقية وتوصيف المستضد الفوقي(السم الخارجي Exotoxin) للمكورات العنقودية الذهبية وكما يلي:

1- Primary Screening المسح الأولي (21)

2- الوجود الأولي للمستضد الفوقي Primary Detection Of Superantigen(22)

3- أنتاج السم الفوقي (23و24) ويشمل:

أ- تحديد الفعالية التخثرية

ب- تحديد تركيز البروتين

4- تنقية المستضد الفوقي (السم الخارجي) للمكورات العنقودية الذهبية وتشمل:

أ- الترسيب بأملاح الامونيوم (23).

ب- التنقية بالترشيح الغشائي (الديلزة)(25).

ج- التنقية باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (26).

5- توصيف المستضد الفوقي للمكورات العنقودية الذهبية ويشمل:

أ- الفعالية التحللية (22).

ب- بعض الصفات الحركية (23).

ج- السمية الخلوية (27).

د- الفعالية ضد الجرثومية (28).

هـ- تقييم النقاوة وتحديد الوزن ألجزيئي باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي بهلام الاكريلامايد المتعدد Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE 7.5%)

3- الدراسات داخل الجسم *In vivo* Studies

حقنت الفئران البيضاء BALB/C White Mice بالمستضد الفوقي وقورنت مع فئران السيطرة Control Group (المحقونة بالمحلول الفسيولوجي Normal Saline وغير المتعرضة للمستضد الفوقي).درست التغييرات النسيجية المرضية Histopathological Study لغرض التعرف على التغييرات النسيجية المرضية للآفات Lesion الجلدية ألمستحثه

ثالثا- ادعاءات ونتائج الاختراع

1- الدراسة الجرثومية

يبين الجدول رقم (1) الأنواع الجرثومية المعزولة من آفة الاكزيمة والجلد السليم للأشخاص المصابين بالاكزيمة التأتبية حيث يظهر الجدول بان الـ Staphylococcus Aureus هي الجرثومة السائدة في آفة الاكزيمة ($P<0.05$).

والجدول رقم (2) يبين أنماط العزل للأنواع الجرثومية من كلي آفة الأكزيما والجلد السليم

ومن هذه النتائج السابقة اختيرت جرثومة المكورات العنقودية الذهبية *Staph aureus* والتي يرمز لها من ألان (Sa) لغرض عزل المستضد الفوقي أو السم

2- عزل وتنقية وتوصيف المستضد الفوقي (السم الخارجي) للمكورات العنقودية الذهبية

الجدول (3-10) والإشكال (1و2) توضح خطوات عزل وتنقية وتوصيف المستفد الفوقي للمكورات العنقودية الذهبية. حيث اختيرت العزلة AS1 في كل الدراسات اللاحقة والتي أظهرت فعالية ضد جرثومية عالية ضد الأنواع الجرثومية القياسية المدروسة بالمقارنة مع بقية العزلات جدول (3) وثبات هذه الفعالية في فترات زمنية متعاقبة جدول (4) واختير وسط أغار الكازائين المتحلل (CHA) (كوسط أنماء وإنتاج) لأنه أعطى أفضل كفاءة للعزلة Sa1 لإظهار فعالياتها التخثرية والتحلليه والتثبيطية جدول (5).

ويبين جدول (6) خطوات تنقية المستضد الفوقي للمكورات العنقودية الذهبية من خطوات التنقية القياسية .

ويظهر الشكل (1) المنحنى القياسي للـ L-Tyrosin .

من ناحية أخرى وضمن خطوات توصيف المستضد الفوقي للمكورات العنقودية الذهبية تبين إن PH=7 ودرجة حرارة 37^0م هي الظروف المثلى لإنتاج السم الخارجي جدول (7) وان

التركيز الأدنى للسمية الخلوية لكريات الدم الحمراء للإنسان لهذا المستضد الفوقي بلغت (25مايكروغرام/مل) جدول (8)، وان والتراكيز المثبطة الدنيا والتراكيز القاتلة الدنيا لهذا المستضد الفوقي ضد العزلات الجرثومية القياسية موضحة في جدول (9).

وبأجراء الرحلان الكهربائي لهلام الاكريلامايد المتعدد(PAGE 75%) بالمقارنة مع مجموعة من البروتينات القياسية معروفة الوزن ألجزيئي والمثبتة في جدول رقم (10) والشكل رقم(2) تبين وبشكل أكيد النقاوة العالية للمستضد الفوقي (السم الخارجي) للمكورات العنقودية الذهبية المعزولة من آفة الأكزيما للمرضى المصابين بالاكزيما التأتبية حيث تبين إن هذا المستضد متكون من حزمة منفردة نقية واحدة وبرسم المخطط البياني القياسي بالمقارنة مع البروتينات القياسية تبين ان الوزن ألجزيئي لهذا المستضد الفوقي يبلغ (47.315)كيلودالتون وان جسم المكورات العنقودية الذهبية المنتجة لهذا المستضد الفوقي تتكون من ثمانية مستضدات متباينة الوزن ألجزيئي تتراوح من (13.567- 549.540)كيلودالتون جدول (10) وصورة(1).

3- الدراسات داخل الجسم

الصورة(2-5) تظهر استحثاث آفة الاكزيمة الجلدية التأتبية في الفئران المحقونة بطرق مختلفة بالمستضد الفوقي للمكورات العنقودية الذهبية حيث أظهرت أفات الاكزيمة المستحثة تجريبياً بأنها تحمل مواصفات سريريه مشابهه للعلامات السريرية النموذجية لآفة الاكزيمة للإنسان حيث أنها تكون (قشرية وملتهبة (محمرة)).

تظهر الصور (6و7) الجلد السليم للإنسان وآفة الاكزيمة البشرية حيث تميزت بصفات نسيجية مرضية هامة هي: Spongiosis, Exocytosis and Hyperkeratosis

وتظهر الصور (8-16) التغييرات النسيجية المرضية لآفة الأكزيما للفئران المخمجة تجريبياً بالمستضد الفوقي للمكورات العنقودية الذهبية وأثبتت الصور وجود نفس الصفات النسيجية المرضية لآفة الاكزيمة البشرية المذكورة أعلاه بالإضافة إلى الصفات النسيجية المرضية الثانوية الهامة ذات العلاقة بالاكزيمه التأتبية وهي ارتشاح الخلايا اللمفاوية، التواجد العالي لكريات الدم البيضاء الحمضة في البشرة والأدمة وتكون القيح وموت الخلايا في الأدمة وزيادة سمك طبقة الكيراتين في البشرة Acanthosis (Hyperplasia) وظهور تورم واحمرار التهابي وتحسس في مناطق ألبشره المختلفة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة صورة(17) والتي تظهر الجلد السليم للفئران.

Table (1) : Bacterial species isolated from eczematous lesions and healthy skin of AD patients. (P<0.05)

Bacterial types	No. of cases(%) from Eczematous lesion	No. of cases(%) from healthy skin
Staph.aureus	173(60.48)	50(17.48)
Staph.epidermidis	49(17.13)	164(57.34)
Staph. xylosus	8(2.79)	8(2.79)
Staph. saprophyticus	15(5.24)	30(10.48)
Staph. capitis	8(2.79)	8(2.79)

Staph. hominis	64(22.37)	27(9.44)
Strept.pyogenes	49(17.13)	28(9.79)
Strept. faecalis	66(23.07)	51(17.83)
Strept. Mutans	42(14.68)	27(9.44)
E.coli	73(25.52)	95(33.21)
Enterobacter sp.	16 (5.59)	51(17.83)
Klebsiella sp.	9(3.14)	4(1.39)
Acinetobacter sp.	16(5.59)	10(3.49)
Proteus sp.	17(5.94)	17(5.94)
Ps. Aeruginosa	50(17.48)	16(5.59)
Pr. Acnes	56(19.58)	10(3.49)
Pr. granulosum	58(20.27)	53(18.53)
H. influenzae	61(21.32)	33(11.53)
Bacteroid sp.	52(18.18)	11(3.84)
Corynebacterium sp.	77(26.92)	51(17.83)
No. of isolates	959	744
Average (isolate :case)	(3.35: 1)	(2.6 : 1)
No. of –ve growth culture	16(5.59)	39(13.63)
No. of +ve growth culture	270(94.4)	247(86.36)
Total No. of cases	286	

Table(2) : Modes of isolation of bacterial species from eczematous lesions and healthy skin of AD patients . (P<0.05)

Mode of isolation	No. of cases (%) from eczematous lesions	No. of cases (%) from healthy skin
Single	38(14.07)	31(12.55)
Double	75(44.11)	102(41.29)
Third	22(12.94)	19(7.69)
Fourth	19(11.17)	61(24.69)
Fifth	59(34.7)	17(6.88)
Sixth and over	57(33.52)	17(6.88)
No. of +ve culture (total No. of modes)	270 (94.4)	247(86.36)
No. of -ve culture	16(5.59)	39(13.63)
(total No. of cases)	286	286

Table(3) : Primary screening of *Staph.aureus* strains isolated from eczematous lesions of AD patients against a standard bacterial strains (P<0.05)

Staph.aureus strains	Diameter of inhibition zones (mm)			
	E.coli NCTC 5933	*Staph.aureus* NCTC 6571	*B.subtilis* PCI 219	*K.pneumoniae* ATCC 10031
Sa1	8	6	7.5	10

Sa2	4	2	3.5	5
Sa3	3.5	1	3	2.5
Sa4	1.5	0	2	1.5
Sa5	3	1.5	2.5	3.5

Table(4) : Antibacterial activity of Sa1 against a standard bacterial strains after various incubation periods . (P≥0.05)

Incubation period (hrs)	Diameter of inhibition zones (mm)			
	E.coli NCTC 5933	*Staph.aureus* NCTC 6571	*B.subtilis* PCI 219	*K.pneumoniae* ATCC 10031
24	18	7.5	20	25
48	20	8	23	27.5

Table(5) : primary detection of Sa1 exotoxin on two culture media .

Medium	Inhibition zone (mm)	Growth
CHA	17	+++
SMA	13	+

Table(6) : Results of purification steps of Sa1 exotoxin

Step of purification	Volume (ml)	Clotting activity (unit/ml)	Protein concentration mg/ml	Specific activity unit/mg	Total activity (unit)	Degree of purification	Exotoxin resultant (recovery) (%)
Crud exotoxin solution	500	30	5	6	15000	1	100
Precipitation by $(NH_4)_2SO_4$	200	32.5	4	8.1	6500	1.35	43.33
Dialysis	200	80.5	2.5	32.2	16100	5.366	46.50
Gel infiltration G-100	15	85.5	0.041	2085.3658	1282.5	347.56	3.975

Figure (1) : Standard curve of L-Tyrosin

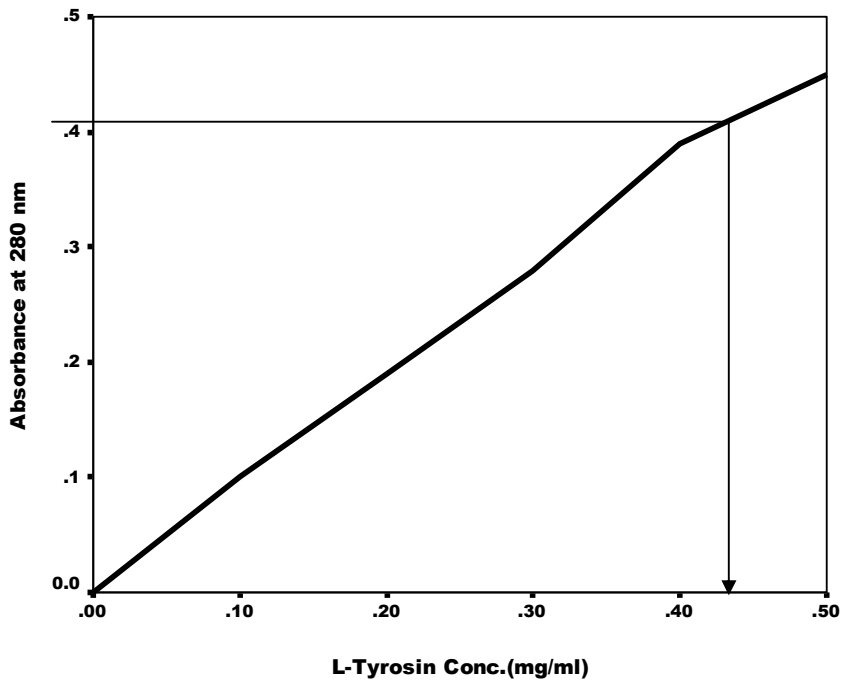


Table (7) : Effects of PH and temperature Sa1 exotoxin activity (P<0.01)

Exotoxin activity according inhibition zones (mm)			
Temperature (^{o}C)	PH		
	4	7	9
30	3	21	10
37	5	24	12
45	0	18	3
60	0	3	0

Table(8) : Cytotoxicity of Sa1 exotoxin against human RBCs .
T : Toxic , NT : Not toxic

Conc. µg/ml	Cytotoxicity against R.B.Cs
0.05	NT
0.5	NT
20	NT
25	NT
35	T
50	T
75	T

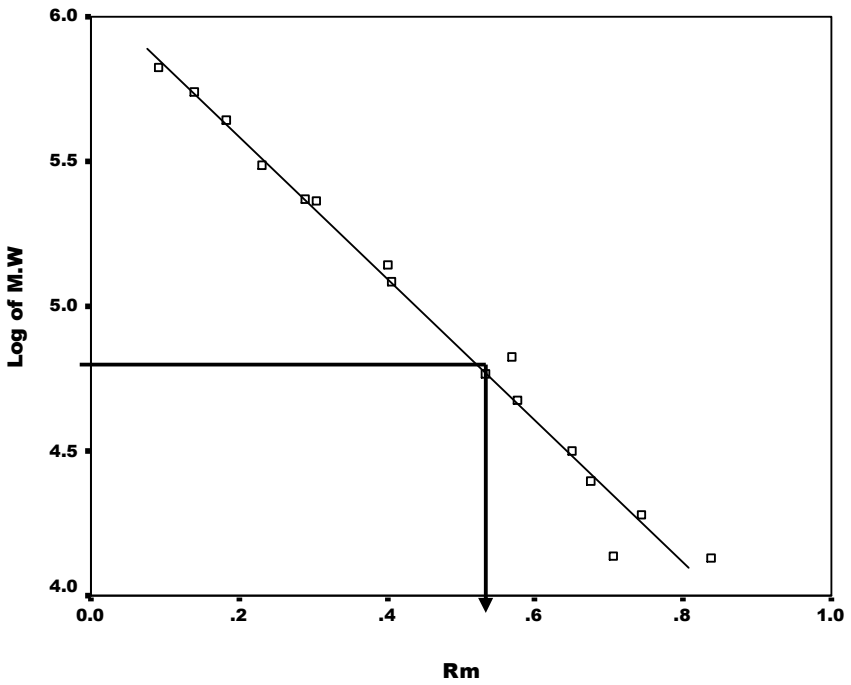
Table(9) : Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of pure Sa1 exotoxin against standard bacterial strains . (P<0.05) .

Technique mode	Exotoxin concentration (µg/ml)			
	Staph.aureus NCTC 657	*E.coli* NCTC 5933	*B.subtilis* PCI 219	*K.pneumoniae* ATCC 10031
MIC	0.35	1.5	3.5	0.85
MBC	1.0	2.5	5.0	1.5

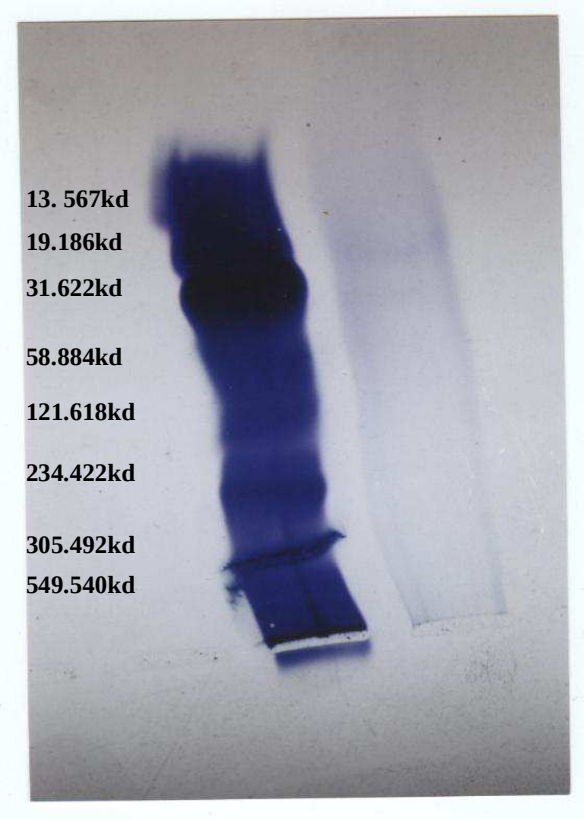
Table (10) : **The relative mobility (Rm) and molecular weight of the standard proteins and various bands of *Staph. aureus* 1 (All antigens) and Sa1 exotoxin by using conventional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (7.5%)**

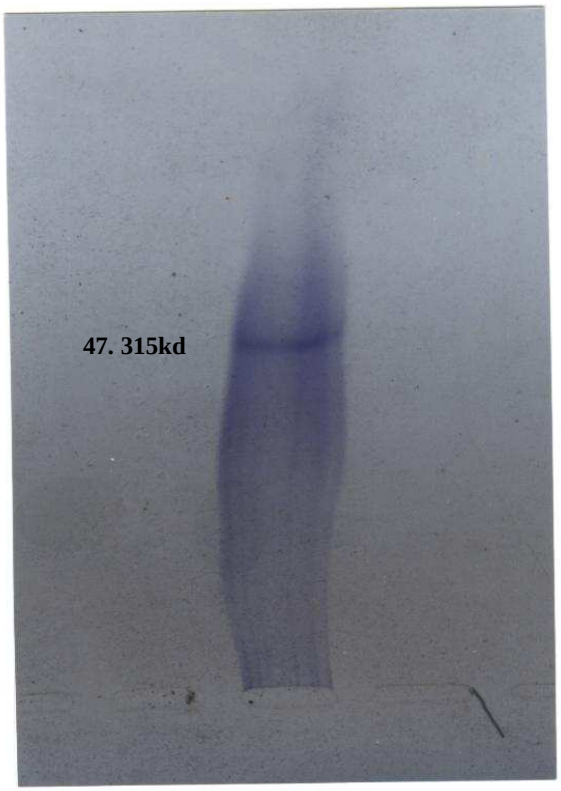
Protein	Rm	Molecular weight (Dalton)
Thyroglobulin	0.092	669,000
Ferritin	0.184	440,000
Catalase	0.304	232,000
Aldolase	0.4	140,000
Albumin	0.569	67,000
Chemotrypsinogen	0.676	25,000
Ribonuclease	0.705	13,700
Staph.aureus 1 (All antigens): Band1	0.139	549,540.8739
Band2	0.232	305,492.1113
Band3	0.290	234,442.8815
Band4	0.406	121,618.6
Band5	0.534	58,884.3655
Band6	0.651	31,622.7766
Band7	0.744	19,186.6874
Band8	0.837	13,567.5053
Staph.aureus 1 exotoxin	0.576	47,315.1259

Fig- 2 - : Calibration curve for estimation of molecular weight of extracted staph. aureus antigens and – in especially- exotoxin. According to comparison with standard proteins by using a conventional polyacrylamide gel electrophoresis PAGE (7.5%).



PICTURE (1) : BANDS FROM GEL ELECTROPHORESIS .
LEFT : *STAPH AUREUS* ALL BODY ANTIGENES .
RIGTH : SINGLE PURE BAND OF *STAPH AUREUS* EXOTOXINE (SUPERANTIGENE)





PICTURE (2): BALB/C MICE, CONTROL .

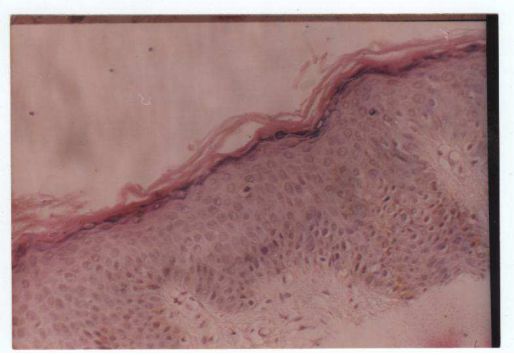
PICTURE (3): SKIN LESION IN 24HRS AFTER INTRADERMAL INJECTION OF EXOTOXIN .

PICTURE (4) : SKIN LESION IN 48HRS AFTER PRICK TEST OF EXOTOXIN (SUPERANTIGENS) .

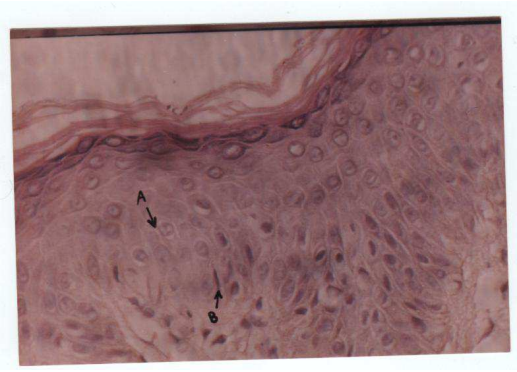
PICTURE (5) : SKIN LESION AS A TYPICALLY PHENOMENA OF AD (SCALY & ERYTHMATOUS) IN 96 HRS AFTER SPOT TEST OF EXOTOXIN .

PICTURE (6) : HUMAN SKIN , CONTROL . 66x

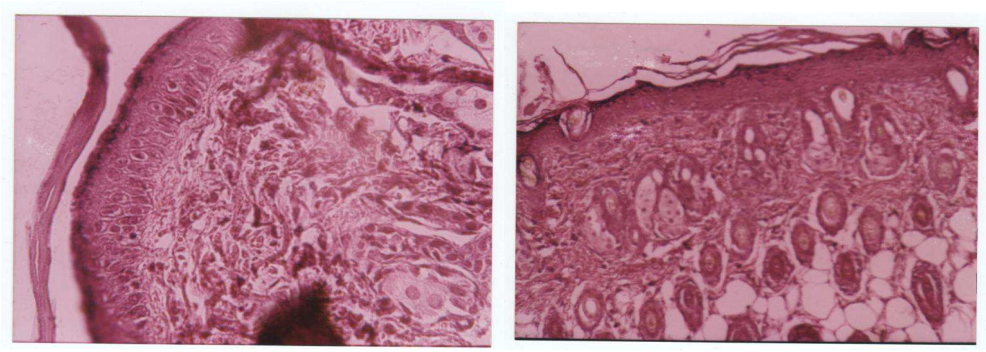
PICTURE (7) : SKIN LESION OF HUMAN AD . A : SPONGIOSIS B : EXOCYTOSIS . ITH HYPERKERATOSIS . 132x



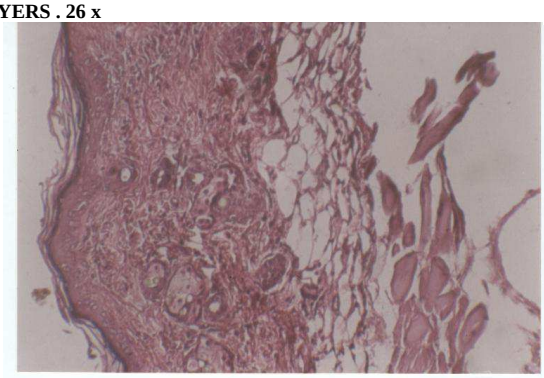
PICTURE (8) : DEGENERATION AND INFLAMMATION OF EPIDERMAL LAYERS . MICE SKIN LESION . 65x



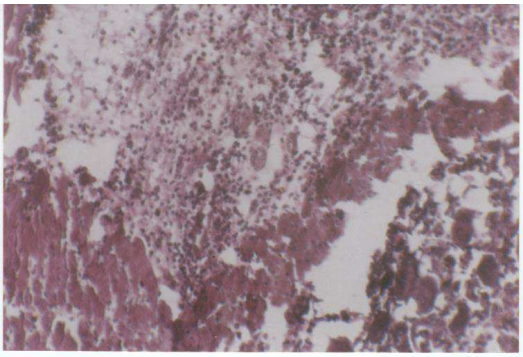
PICTURE (9) : HYPERKERATOSIS , SPONGIOSIS WITH INFILTRATION OF INFLAMMATORY CELLS REACTION WITH INCREASE OF BLOOD VESSELS & NERVE IN DERMIS . 26x



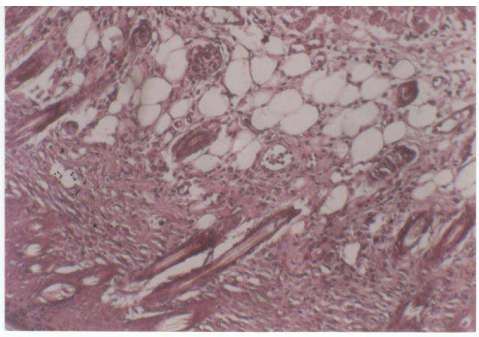
PICTURE (10) : SPONGIOSIS , HYPERKERATOSIS AND MILD INFLAMMATORY CELLS REACTION IN DERMAL LAYERS . 26 x



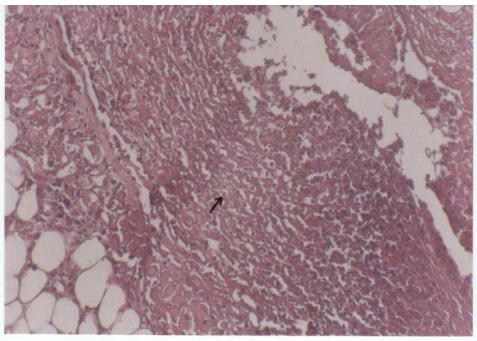
PICTURE (11) : ACUTE INFLAMMATION IN SUBCUTANEOUS LAYER OF SKIN . 65 x



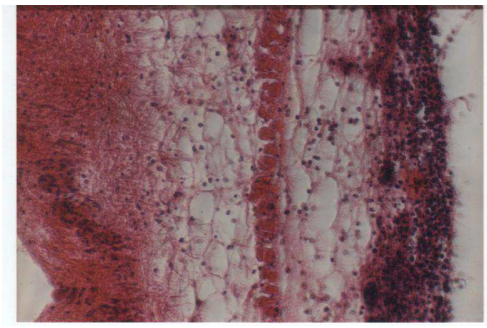
PICTURE (12) : INFILTRATION AND DIAPEDES MOVEMENTOF INFLAMMATORY CELLS FROM BLOOD VESSELS WITH EDEMA IN THE DERMIS & HYPODERMIS . 26x



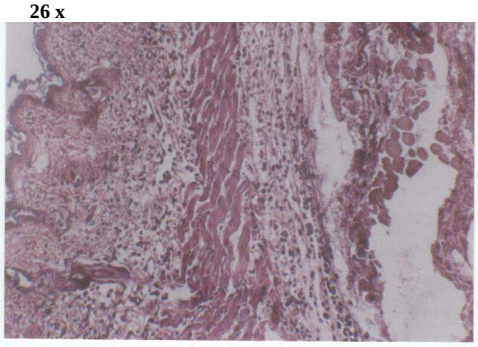
PICTURE (13) : SUB CUTANEOUS ADIPOSE TISSUES NECROSIS WITH INFLAMMATION IN THE DERMIS . 26x



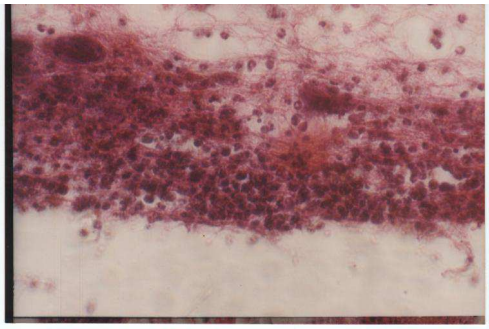
PICTURE (14) : SURFACE ULCERATION , SEVERE INFLAMMATION IN EPIDERMAL & DERMAL LAYERS . 26 x



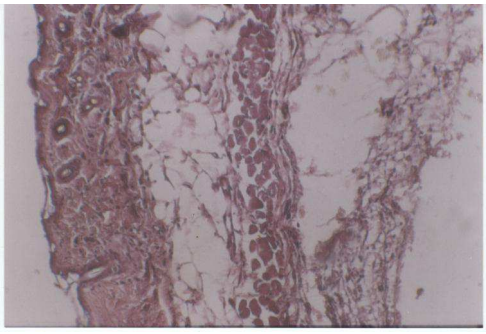
PICTURE (15) : INFLAMMATORY CELLS IN SUBCTANEOUS TISSUES BETWEEN MUSCLE FIBERS . 26 x



PICTURE (16) : INFILTRATION OF INFLAMMATORY CELLS -IN ESPECIALLY – NEUTROPHILES IN DEEP DERMIS LAYER . 132 x



PICTURE (17) : MICE SKIN , CONTROL 26 x



رابعـــا – العنـــاصر الجـــديـــدة المـــراد حمـايتـــها في الاختـــراع

1- أمكن استحثاث آفة الأكزيما في الفئران المختبرية المخمجة تجريبياً بتقنيات مختلفة بالمستضد الفوقي (السم الخارجي) للمكورات العنقودية الذهبية المعزولة من آفة الأكزيما

2- أظهرت العلامات السريرية والتغييرات النسيجية المرضية لآفة الاكزيمة المستحثة في الفئران تشابهاً عالياً مع آفة الاكزيمة البشرية مما يشير إلى نجاح تخميج الفئران بآفة الاكزيمة التأتبية مختبرياً.

3- تبين إن الوزن ألجزيئي للمستضد الفوقي المسبب للاكزيمه التأتبية والمنتج من قبل المكورات العنقودية الذهبية يبلغ (47.315)كيلودالتون وانه عالي النقاوة ومتكون من حزمة واحدة على سطح هلام الاكريلامايد المتعدد.

4- إن المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من آفة الاكزيمة البشرية متكونة من ثمانية مستضدات بروتينية تتراوح أوزانها الجزيئية من (13.567- 549.540) كيلودالتون.

5- إن المكورات العنقودية الذهبية هي الجراثيم السائدة في آفة الاكزيمة التأتبية البشرية وهي احد المسببات الرئيسية لهذا المرض من خلال أنتاج السموم الخارجية (المستضدات الفوقية) و المستضدات الجسمية الأخرى.

سادسا – مصـــادر الأختـــــــراع

1. **AAD (2003).** Eczema/ Atopic dermatitis.http://www.aad.org.
2. **Beltrani ,V.S and Boguneiwics , M .(2003).** Atopic dermatitis .**Dermatol. On line J., 9(2) :1-28.**
3. **Akdis , C.A. and Akdis ,M.(2003).** Immunological difference between intrinsic and extrinsic types of atopic dermatitis**. Clin. Exp. Allergy , 33: 1618-1621.**
4. **Antonie ,R.; Antonio , C., Barbra , F., Schmid ,G.P.(2004).** Microbial colonization and atopic dermatitis. **Allergy Clin.Immunol., 4(5) : 373-378**.
5. **Bachert , C.; Gevaert ,P. and Cauwenberge , P.(2002).** *Staphylococcus aureus* enterotoxins : A key in airway disease?. **Allergy ,57(6) : 480-487.**
6. **Berke , J.R.(1994).** Immuunopthogenesis of atopic eczema. **Tidsskr Nor Laegoforen, 114: 1827 – 1828.**
7. **Cookson, W.O. and Moffatt, M.F.(2002).** The genetics of atopic dermatitis . **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.,2:383-387.**
8. **Correale, C.; WALKER, C.; Murphy , L. and Craig , T.J.(1999).** Atopic dermatitis : A review of diagnosis and treatment. **Am Fam Physician, 60 :1191-1210.**
9. **Daniels ,J. and Haper ,J. (2002).** The epidemiology of atopic dermatitis. **Hosp.Med., 63(11):649-652.**
10. **Breuer , k.; wittmann ,M., Bosche , B. ;Kapp , A. and werfel , T(2000) .** Sever atopic dermatitis is associated with sensitization to staphylococcal enteroxin B (SEB). **Allergy, 55(6) : 551-555.**
11. **Abeck , D., and mempel , M.(1998).** *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implication. **British J. Dermatol., 139:16.**
12. **Breuer ,K.; kapp., A. and Werfel , T.(2001).** Bacterial infections and atopic dermatitis**. Allergy , 56(11) : 1034.**

13. **Breuer , K., Haussler ,S. Kapp, A. and werfel , T. (2002).***Staphylococcus aureus* : Colonizing features and influence of an antibactereial treatment in adult with atopic dermatitis .**British. J. Dermatol. ,147 (1) : (55).**
14. **Brook , I.; Frazier, E-H. and Yeager , J.K.(1996).** Microbiology of infected atopic dermatitis. **Int . dermatol., 35(11): 791-793.**
15. **Geha,R.S.(2001).** Immunologic mechanisms of atopic dermatitis. **http://crisp.cit.nih.gov/crisp.**
16. **Kotzin ,B.L.; Leung, D.Y.M.; Kappler, J.and Marrack, P.(1993).** Superantigens and their potential role in human disease. **Adv. Immunol ., 54: 99-166.**
17. **Hauser ,C.; Prins , C. and Lacour, M.(1996).**The role of infectious agents in atopic dermatitis. in : Leung , D.Y.M. Atopic dermatitis : from pathogonesis to treatment. Springer-Verlag. New york .**PP : 67-112**.
18. **Leung, D.Y.M. (2002).** Role of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. In: Bieber, T. and Leung,D.Y.M. Atopic dermatitis. Marcel Dekker, InC. Newyork. **PP: 401-418.**
19. **Garrity , G.M.(Edit).(2001).** Bergys Manual of Systematic Bacteriology. 2 nd ed. Springer – Verlage , NewYork, **Vol.3,Group -17. http://www.Berbys.org.**
20. **Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Werssfeld , A.S.(1998).** Baily & scott' s Diagnostic Microbiology. 10th ed. Vol. I ,Mosby Co. St Louis**, PP: 68-280, 282-418, 606-618 .**
21. **Schmauder ,H.P.(Edit).(1997).** Methods in Biotechnology. Taylor & Francis ,Ltd. London ,**pp:5-70.**
22. **Taguchi ,S., Suzuk ,M., Kojima ,s., Miiura ,K. I and momose ,H. (1995) .** Streptomyces serine protease (SAM-p20) : Recombinant , production , characterization and interaction with endogenous protease inhibitor .**J. Bacterial ., 177 : 6638-6643.**
23. **Saleh ,A.A.(2000)**. Isolation and identification of acidic protease from dtreptomyces aureofacins T_{252} U_{11}. **M.Sc. Thesis. College of science. University of Basrah.**
24. **AL-Sarraji, E.H.(1996).**Praduction of clotting engyme from Trichoderma hamatum (bamatum (bonordi) Bain and study of propertiey and its use in production of soft Iraqi cheese. **Ph.D. Dissertation . College of Agriculture . Unvesity of Basrah.**
25. **Okino,N.; Tani,M.; Imayama,S. and Ito, M.(1998).** Purification and characterization of a novel ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J . Biol. Chem.., 273(23) : 14368-14373.**

26. **Kalasz, H.(1984).** Gel Chromatography. In : kreses. I.(edit). Methods of protein analysis. Ellis horwood, Ltd.**PP : 271 – 325**.

27. **Nair , M.G., Putanam ,A.R., Mishar, S.K.,etal (1989).** Faerie fungin : A new broad-spectrum antibiotic from *Streptomyces griseus* var. *autotrophicus*. **J Natural Products, 52 : 797-809.**

28. **Donham , M.C.;Tleath , H.E.; Leblance, P.A.; and Sloon , G.L.(1988).** Characteristic of extracellular protein production by *Staph simulans* biovar *staphyloticus* during aerobic and anaerobic growth .**Gen . microb. 134 : 2615-2621.**