

دور بروتين A المستخلص من جدران خلايا بكتريا *Staphylococcus aureus* في امراضيتها

Role of *Staphylococcus aureus* cell wall protein A in the pathogenesis of the bacteria

سمير عبد الامير عبد علي علش

كلية العلوم / جامعة بغداد

Samir Abdul Amir Abid Ali Alash

College of Science/ Baghdad University

المستخلص

أُستخدِم في اجراء هذه الدراسة على 20 عزلة مرضية من بكتريا *Staphylococcus aureus*. أُستخدِم اختبار التلازن الدموي (Haemagglutination test) في التحري عن وجود بروتين A في جميع العزلات. أُختيرت عزلة واحدة تميزت بمحتوى عالٍ من بروتين A لأجل اتمام هذه الدراسة. أُستخلص بروتين A الخام (Crude protein A) على مرحلتين. الاولى باتباع طريقة التعليق بالصوديوم آزيد، والثانية فكانت باتباع طريقة الترسيب بكبريتات الامونيوم. أُدخل مستخلص بروتين A الخام لأجل الوصول الى بروتين منقى عملية التنقية (Purification) على مرحلتين، الاولى استخدمت فيها طريقة كروماتوغرافيا التبادل الايوني (Ion – exchange chromatography) بعمود DEAE – Cellulose. والثانية فقد تضمنت استخدام طريقة كروماتوغرافيا الترشيح بالهلام (Gel – filtration chromatography) بعمود Sepharose CL – 6B. استخدم اختبار الانتشار المناعي الثاني في الهلام للتحري عن احتفاظ بروتين A الخام والمنقى بفعاليته. قدر تركيز مستخلصات بروتين A (الخام و المنقى جزئيا و المنقى) باتباع طريقة برادفورد. تم استخدام الفئران البيض من نوع (Balb C) من اجل الوصول الى التأثيرات المرضية لمستخلص بروتين A المنقى. اظهرت مجموعة فئران البحث المحقونة ببروتين A المنقى على المستوى السريري خمولا عاما بدا واضحا بعد الحقنة السادسة. لم تظهر اية تغيرات مظهرية جلدية في مناطق الحقن كما لم تحدث وفيات. قُتل الفئران وشرحت جميعها، أُستأصلت اعضاء القلب، والطحال، والكبد، والكليتين، والامعاء، والمعدة، واخيرا الرئة. وبالموازنة مع اعضاء فئران السيطرة لوحظ حدوث تضخم كبير في الطحال. كما اظهر الكبد تضخما ملحوظا وهذا سجل في الفئران المحقونة ببروتين A المنقى. لم يسجل حدوث تغيرات على المستوى المظهري في اعضاء القلب، و الامعاء، والمعدة ولكن لوحظ وجود بقع سوداء اللون على السطح الخارجي لنسيج الكبد، والكليتين، وهو ايضا سجل في فئران الدراسة اجمع. ما برز في هذه الدراسة هو حجم التأثير المرضي الذي اصاب عضو الرئة حيث ظهر النسيج يميل الى السواد ببهوت وهو ما كان واضحا في سبعة من فئران الحقن، اما الثلاثة الباقية شوهدت الرئة فيها خلال التشريح وهي مغطاة بعض من اجزائها بالدم. كشف الفحص النسيجي لأعضاء القلب، و الامعاء، والمعدة عدم وجود اية تأثيرات مرضية ناتجة من حقن بروتين A المنقى. اما الطحال فقد شهد حدوث توسع كبير في منطقة اللب الابيض (White Pulp) مع احتقان دموي بارز وانتشار للخلايا المولدة للصفائح الدموية (Megacaryocytes). اما الكبد فقد برز فيه حدوث تلف بسيط (Mild degenerative change) في خلايا الكبد مع ارتشاح خلايا احادية النواة (Monocytes) خصوصا في المنطقة البوابية التي بدت متوسعة نوعا ما. كما لوحظ زيادة في خلايا كبفر (Kupffer cells) في عموم نسيج الكبد. الكليتين شهدتا بروز زيادة في الخلايا المكونة للكبيبة الكلوية (Glomeruli) والتي يطلق عليها (Mesangial cells). عضو الرئة تضمن الفحص النسيجي له تأثيرات عدة تضمنت احتقانات دموية كبيرة (Bloody congestions)، وذمة (Oedema)، ارتشاح خلايا التهابية (infiltration Inflammatory cells)، توسع في الفسح القصبي (Alveolar spaces) مكونا ما يسمى بظاهرة (Emphysema) اي انتفاخ حويصلات الرئة. بدت الرئة للفئران المحقونة جميعا ببروتين A المنقى اكثر الاعضاء التي اظهرت تضررا نسيجيا كبيرا موازنة بالضرر في بقية الاعضاء.

Abstract

This study dealt with 20 diagnosed isolates of *Staphylococcus aureus*. The haemagglutination test was used to investigate the presence of protein (A) in all

S.aureus isolates. One isolate has been chosen as an optimal isolate to accomplish this study, because of its high content of protein (A). Crude protein (A) was The first is "Suspending in sodium azide"; the second extracted by two steps. was precipitation by ammonium sulphate. In order to get a purified protein (A) extract from crude protein A, purification was accomplished by two steps: Ion – exchange chromatography by DEAE – cellulose column was used in the first step, while Gel – filtration chromatography by Sepharose CL – 6B column was used in the second step. Double immunodiffusion in gel was used to investigate (A) with its full function. the preservation of the crude and purified protein Bradford method was used to estimate protein (A) extracts concentration (Crude, Partial purified, Purified). White mice (Balb C) were used to investigate the pathogenic effects of purified protein (A) .The injected mice with purified protein (A) showed general weakness which was very clear after the sixth injection . There were no phenotypic dermal change in the injection area and no dead mice as well. After killing and dissecting of all the mice, the organs of heart, spleen, liver, kidney, intestine, stomach and lung were eradicated. There were a great enlargement in spleen and a little in liver in all injected mice in comparison with the control mice. No phenotypic changes appeared in heart, intestine and stomach, but black spots were shown on the outer surface of kidney and liver tissue which were presented in all the injected mice. The most important results in this study are the great size of pathogenic effects in lung. The tissue seemed faint black with which was obvious in seven mice. The lung of the three others The histological check (some parts) showed during anatomy covered by blood. for heart, intestine and stomach showed no pathogenic effects resulted from protein (A) injection. In the spleen, there was a huge expanding in the white pulp region, with blood congestion while the spreading of megacaryocytes has increased. The liver showed mild degenerative change in liver cells with monocytes infiltration especially in the entrance region which appeared expanded. Also there was an increase in kupffer cells in all liver tissue. Kidney showed increase in mesengial cells which are considered the forming units of oedema, glomeruli. The histological check of lung included bloody congestions, inflammatory cells infiltration and alveolar spaces expanding forming "Emphysema " The lung was the most effected organ that showed tissue injury among other all organs.

المقدمة

تعد بكتريا *Staphylococcus aureus* من الاحياء المجهرية ذات الاهمية الطبية وذلك لقدرتها على انتاج العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من اختراق انسجة الجسم والقدرة على توليد الخمج (Infection) ومقاومة العديد من المضادات الحيوية (Antibiotics) [1] . يعد بروتين A احد اهم المكونات لجدار خلية العنقوديات الذهبية ، وقد اشارت البحوث الى انه يتكون من سلسلة واحدة من متعدد الببتايد (Polypeptide) تنتظم على شكل حقول (Domains) ، وهناك نوعان من بروتين A يتمثل النوع الاول ببروتين A المرتبط بجدار الخلية (Cell – bound protein A) (CPA) . اما النوع الثاني فيتمثل ببروتين A المفرز الى الخارج (Extracellular protein A) (EPA) . تشابه تشابها تركيبيا حقول بروتين A المفرز الى الخارج (EPA) مع الحقول الفعالة لبروتين A المرتبط بالجدار (CPA) [2] .

ان بروتين A بنوعه المرتبط بالجدار والمفرز الى الخارج يمتلكان نشاطات ارتباط متميزة مع IgG . فكل حقل يستطيع الارتباط مع الجزء المتبلور (FC) وكذلك مع جزء الارتباط المستضدي (Fab) لـ IgG . فبالرغم من الحجم الصغير لـ SPA فهو يستطيع ابداء هذه الفعاليات بتلقائية عالية . يتميز بروتين A بكونه احد البروتينات المايكروبية المملوكة لخصائص تركيبية وضعت في مجموعة ما يسمى بالمستضدات الفائقة (Superantigens) . لهذه المستضدات الفائقة تفاعلات عدة مع نسبة عالية من الخلايا للمفاوية لتخلق نوعا خاصا من الاستجابة يطلق عليها بالاستجابة فوق النسيجية (Supraclonal response) [3] .

الكثير مما عرف حول العلاقات الوظيفية لتركيب المستضدات الفائقة لخلايا B جاءت عن طريق التحريات التي اقيمت حديثا على بروتين A التي شُخصت عن طريق المعقدات الصورية البلورية (Crystallographic complex) المتكونة بين بروتين A ، والجزء البشري الخاص بالارتباط مع المستضد (Human fragment of antigen binding) (Fab) [4 ، 5] . ان مجابهة SPA وتفاعله مع خلايا B لوحظ انه يحثها على التضاعف (Proliferation) ، و التنشيط (Activation) ، والهجرة (Migration) ، والحذف فوق النسيجي (Supraclonal deletion) . كما يمتلك SPA تأثيراً في الاستجابة المناعية وعلى تنشيط العامل المتمم [6 ، 7] . كما قد اكتشف ان SPA له ارتباط مع العديد من الامراض كمرض كوازاكي (Kawazaki Disease) (KD) وتفاعل ارثوس (Arthus Reaction) و التهاب المفاصل الخمجي (Septic Arthritis) [8،9] . ومن اهم الاكتشافات الحديثة التي شكلت منعطفا بارزا هو ارتباط SPA مع الاصابة بذات الرئة (Pneumonia) . او هو احد العوامل الرئيس لبكتريا *S. aureus* التي تقود لأحداث الاصابة [10] . بسبب ما جاء من اكتشافات في الكثير من البحوث الحديثة حول SPA التي تركزت في انه احد العوامل المهمة جدا المسؤولة عن التسبب في عدد من الامراض التي تصيب الانسان ، لذا هدفت الدراسة الى :

1. التحري عن دور بروتين A في امراضية بكتريا *S. aureus* وذلك من خلال استخلاصه وتنقيته ومن ثم حقنه في حيوانات التجارب .
2. دراسة التأثيرات المرضية في اعضاء جسم الحيوان المهمة وهي الرئة ، و الامعاء ، و المعدة ، و القلب ، و الكليتين ، و الكبد ، و الطحال .
3. البحث بالدرجة الاساس عن مدى حدوث الاصابة بذات الرئة (Pneumonia) .

المواد وطرائق العمل

1. جمعت وشخصت 20 عزلة ممرضة من بكتريا *Staph aureus* ، تبعتها اجري اختبار التحري عن امتلاكها لبروتين A وانتخبت العزلة الأكثر انتاجاً له ، والتي منها استخلص بروتين A ونقي واجري عليه اختبار التحري عن احتفاظه بفعاليته [11 ، 12] ، ومنه تم الحصول على بروتين A فعال ليصبح جاهزاً لأتمام البحث . اجري العمل بالكامل في مركز بغداد للتقنيات الاحيائية / جامعة النهرين .
2. استخدمت فئران مختبرية بيضاء نوع (Bulb c) بوزن (20 – 25) غم بعمر خمسة اسابيع وبعدد 15 فأرة . قسمت الفئران بمعدل 10 فئران اجري عليها عمليات الحقن (Injection) ببروتين A) المنقى ، الخمسة الباقية شكلت مجموعة السيطرة (Control) .
3. حقنت فئران المجموعة الاولى بمستخلص بروتين A المنقى ذو التركيز 36 مايكروغرام/مليلتر بطريقة الحقن داخل البريتون (Intraperitoneal injection) . حيث بلغت عدد الحقنات سبعة وبمعدل 0.1 مليلتر لكل حقنة بفصل بين حقنة واخرى يوم واحد . أُتبعت الطريقة نفسها في حقن فئران السيطرة ولكن مادة الحقن هنا كانت المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline) .
4. قتلت الفئران جميعها بعد مرور يومين من آخر حقنة ثم شُرحت حيث جُمع اعضاء (القلب ، الكليتين ، الكبد ، الطحال ، الرئة ، الامعاء ، المعدة) . غسلت جيذا بالمحلول الملحي الفسيولوجي ثم نقلت اعضاء كل فأرة الى حاويات صغيرة من محلول مثبت بوين (Bouins fluid) معلمة بشكل جيد [13] .
5. سُجلت ابتداءً التغيرات الحاصلة جميعها مظهرياً ونسجياً لأعضاء الفئران المحقونة بمستخلص بروتين A المنقى وبالموازنة مع اعضاء فئران السيطرة .

النتائج والمناقشة

أظهرت مجموعة فئران البحث المحقونة ببروتين A المنقى على المستوى السريري خمولا عاما ، وهو ما بدا واضحا بعد الحقنة السادسة . لم تظهر اية تغيرات مظهرية جلدية في مناطق الحقن . كما لم تحدث اية وفيات .

اظهر الفحص المظهري لبعض الاعضاء حدوث تضخم كبير للطحال حيث بلغ حجمه الضعف . كما كان التضخم بارزا في عضو الكبد مع بروز بقع سوداء مرئية بالعين المجردة على سطح النسيج الخارجي . برزت هذه البقع ذاتها في الكلى . هذه المظاهر سجلت في فئران البحث اجمع بالمقارنة مع فئران السيطرة . لم يلاحظ حدوث تغيرات مظهرية في أعضاء القلب ، الامعاء ، المعدة . اما عضو الرئة حيث بدا النسيج يميل الى السواد ببهوت وهو ما كان واضحا في سبعة من فئران الحقن . اما الثلاثة الباقية شوهدت الرئة فيها وهي مغطاة بعض اجزائها بالدم .

كشف الفحص النسيجي لأعضاء القلب ، و الامعاء ، والمعدة عدم وجود اية تأثيرات مرضية ناتجة من حقن بروتين A . فقد اظهرت المقاطع المأخوذة من نسيج القلب وضعا طبيعيا لخلايا القلب . كما اظهرت المقاطع المأخوذة من نسيج الامعاء تركيبا طبيعيا للزغابات المعوية . اما المقاطع المأخوذة من نسيج المعدة فقد اظهرت التركيب الطبيعي لطبقات جدار المعدة المتكونة من الطبقة المخاطية .

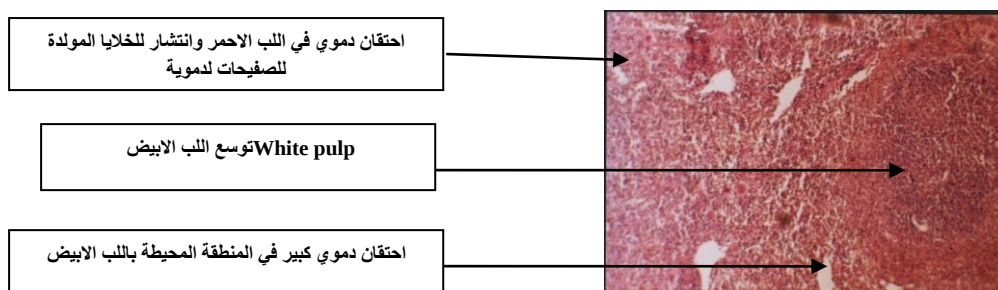
كما وسجل الفحص النسيجي لعضو الطحال حدوث توسع كبير في منطقة اللب الابيض (White pulp) مع احتقان دموي بارز وانتشار للخلايا المولدة للصفائح الدموية (Megacaryocytes) . لقد وجد ان بروتين A يعمل على حدوث تضاعف كبير في الخلايا الطحالية وهو ما يفسر التضخم الحاصل للطحال في الفئران المحقونة جميعها موازنة بفئران السيطرة [9] . يعمل بروتين A على حث خلايا B الناضجة في الخروج من العقد اللمفاوية المحيطة (Peripheral lymphnodes) ومن ثم هجرتها الى الطحال (Spleen) . كذلك يحث على هجرة خلايا B المبطنة (Lining) للمنطقة الخارجية للجيب الحافي (Marginal sinus) الى عقيدات خلايا B – cells follicles [7] . خلال المراحل المتأخرة من بعد اندماج بروتين A مع خلايا B الطحالية هناك عزل كبير لأجسام (B220 apoptotic bodies) في الطحال وفي العقد اللمفاوية المحيطة ، يستدل من ذلك ان بروتين A ينتهي في الموت المبرمج (Apoptosis) لنسبة كبيرة من خلايا B المتأثرة في انحاء الجسم المختلفة [7 ، 14] . ان هذا الاختزال الحاصل في خلايا (Marginal zone- B – lymphocytes) يقود الى نقص كبير في النوع الثاني من الاستجابة الخلوية وهو ما سيقود الى حدوث تفاقم في الاصابات المتواترة [15] الشكلين (1،2) يظهر التأثيرات الحاصلة في عضو الطحال .



طحال فأرة سيطرة

طحال فأرة محقونة ببروتين A

شكل (1) : حالة التضخم في عضو الطحال عن الفئران المحقون ببروتين A موازنة بطحال فأرة سيطرة



شكل (2) : مقطع نسيجي لعضو الطحال عن الفئران المحقونة ببروتين A المنقى بمقدار 0.1 مليلتر (تركيز 36 مايكروغرام/ مليلتر) يظهر مدى التأثير الحاصل (X100)

في الكلية ادى ترسب المعقدات المناعية الناتجة من ارتباط بروتين A مع الكلوبولينات المناعية سواء أكان الارتباط في منطقة Fc ام في منطقة Fab الى زيادة في الخلايا المكونة للكبيبة الكلوية (Glomeruli) التي يطلق عليها (Mesengial cells) ، وتبرز هذه الزيادة من كثافة الانوية في الكبيبة الكلوية . ان هذه المعقدات المناعية ستؤدي الى تنشيط العامل المتمم خلال المسلك التقليدي (Classical pathway) وهو بدوره سيقود

الى تطور التفاعلات الالتهابية في مناطق ترسب المعقدات المناعية لبروتين A وهي منطقة الكبيبة الكلوية . ان نتائج هذا التفاعل الالتهابي يمكن ان يتطور منتجا نوعا من امراض المناعة الذاتية (Autoimmune diseases) مثل التهاب كبيبات الكلية الحادة (Acute glomerulonephritis) [16] . الشكلين (4،3) يظهران التغيرات الحاصلة في الكليتين .

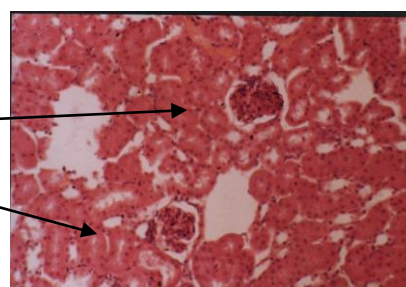


كلية فارة سيطرة

كلية فارة محقونة ببروتين A

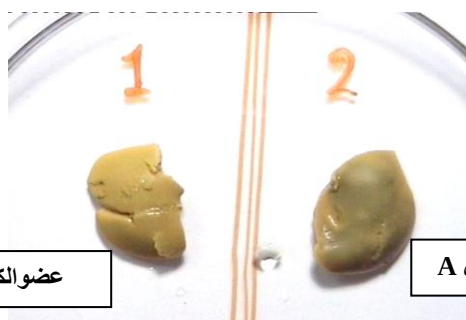
شكل(3): كلى عن الفئران المحقونة ببروتين A موازنة بفئران السيطرة تبرز بوضوح المناطق السوداء في النسيج الكلوي والتضخم العام

زيادة الخلايا المكونة للكبيبة الكلوية
المسماة Mesengial cells



شكل (4): مقطع لنسيج الكلية عن الفئران المحقونة ببروتين A بمقدار 0.1 مليلتر (تركيز 36 مايكروغرام / مليلتر) تبرز زيادة الخلايا المكونة للكبيبة الكلوية Mesengial cells (X100) .

اما عضو الكبد فقد اظهر الفحص النسيجي وجود تلف بسيط (Mild degenerative change) في خلايا الكبد مع ارتشاح خلايا احادية النواة (Monocytes) خصوصا في المنطقة البوابية التي بدت متوسعة نوعا ما . كما لوحظ زيادة في خلايا كبفر (Kupffer cells) في عموم نسيج الكبد . جميع ما بدا هو نتيجة الفعالية الالتهابية للمعقد المناعي SPA – IgG وتنشيطه للمسلك التقليدي للعامل المتمم [6، 16] . الشكلين (5 ، 6) يظهران التغيرات الحاصلة في الكبد .



عضو الكبد لفارة سيطرة

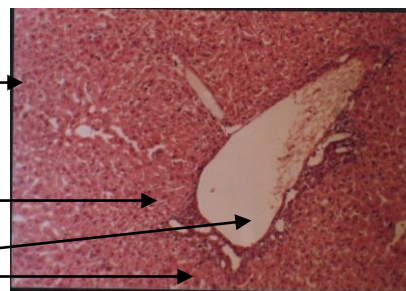
عضو الكبد لفارة محقونة ببروتين A

الشكل (5): عضو الكبد عن الفئران المحقونة ببروتين A بمقدار 0.1 مليلتر (تركيز 36 مايكروغرام / مليلتر) تبرز حالة التضخم والمناطق السوداء في النسيج الكبدي

تلف بسيط في خلايا الكبد مع ارتشاح خلايا احادية النواة وزيادة في خلايا كبفر Kubbfer cells

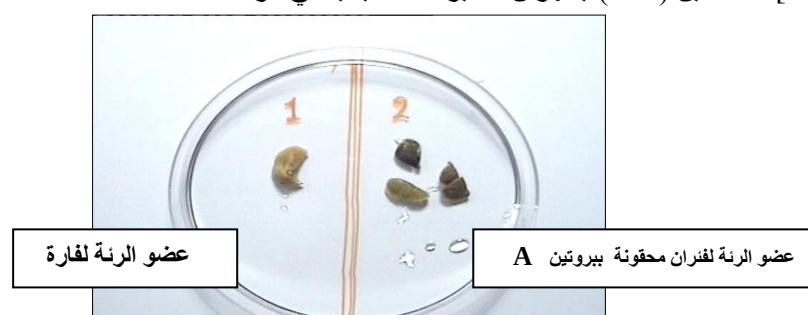
توسع المنطقة البوابية

تلف خلايا المنطقة البوابية مع ارتشاح كثيف لخلايا احادية النواة

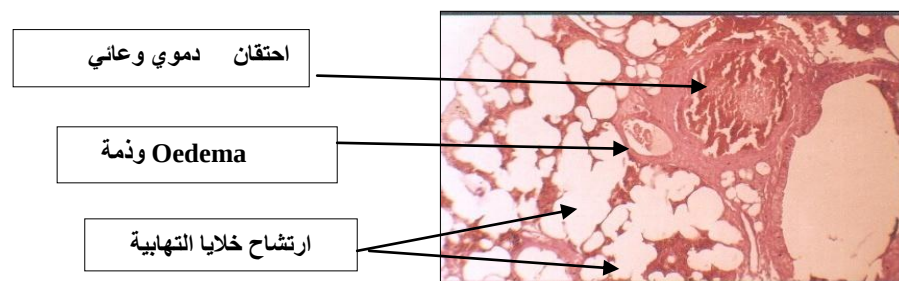


شكل (6): مقطع نسيجي لعضو الكبد عن الفئران المحقونة ببروتين A بمقدار 0.1 مليلتر (تركيز 36 مايكروغرام / مليلتر) يبرز مدى التأثير (X100)

اظهر الفحص النسيجي للرئة ضررا كبيرا ، وهذا يعزى ان بروتين A يعيد انتاج تاثيرات Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF) (الفا) جميعها فهو يحرك (TNFR1) Tumor Necrosis Factor Receptor 1 ويحشده على سطوح الخلايا الطلائية التنفسية في الاعلى . ويحث بروتين A على ذرف TNFR1 الى تجويف الممرات الهوائية الذي يعد الحلقة الكامنة ذاتية التنظيم ، وفيه سيتم التنافس بينه وبين TNFR1 المرتبط بالغشاء على الارتباط مع TNF الفا من اجل التنظيم التنازلي للاستجابة المناعية . كما ويبدأ عملية التنبيه وتحريك الاشارات لمسالك مهمة تدخل في تنشيط MAPKinase P38, JNK1/2 . كما يقود الى تحفيز Transcription factor NF – KB ، انتاج Cytokine و Chemokines وكذلك ارتشاح PMN [17] . ان من اهم الصفات البايولوجية لبروتين A هو قدرته على تخثر الدم وخذش الصفائح الدموية ، لذلك هو يساهم في تطوير الانصمام الخثاري (Thromboembolic) داخل الاوعية . هذا يفسر ظاهرة الاحتقانات الدموية في الاوعية الدموية الرئوية ، كذلك الاحتقانات الدموية داخل الفسح القصبية (Alveolar spaces) . وهو ما يفسر الاحتقانات الدموية الاخرى في بقية الاعضاء . هذا جميعه سيؤدي الى التهاب رئوي شديد يصاحبه ضررا نسيجيا (Tissue damage) معرضا وظيفة الرئة الى الخطر ومن ثم الى حدوث ذات الرئة (Pneumonia) [18 ، 19] . الشكلين (7، 8) يظهران التغيرات النسيجية في الرئة .



شكل (7): عضو الرئة عن الفئران المحقونة ببروتين A بمقدار 0.1 مليلتر (36 مايكروغرام / مليلتر) يبرز الاختلاف الكبير مقارنة بفئران السيطرة



شكل (8): مقطع نسيجي لعضو الرئة عن الفئران المحقونة ببروتين A يظهر التغيرات الكبيرة فيه حسبما مؤشر في الصورة X100

المصادر

1. Henry, F. Chambers. (2009). Pathogenesis of *staphylococcus aureus* infection A manner of expression . J. Infectious Diseases. 199(3): 291 – 293.
2. Marc, G., A. S. Enrico, L. C. Adam, Brian, J. S. Michael, J. T., Jean, B. C. and J. S. Gregg. (2000). Crystal structure of *staphylococcus aureus* protein a domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B – Cell receptors and superantigen activity. J. Immunol. 97: 5399-5404.
3. Starovasnik, M. A., M. P. O'Connell, W. J. Fairbrother, and R. F. Kelley. (1999). Antibody variable region binding by staphylococcal protein A: Thermodynamic analysis and location of the FV binding site on E-domain. Protein. Sci. 8: 1423-1431.
4. Graille, M. et al. (2000). Crystal structure of a *staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis

- for recognition of B – cell receptors and superantigen activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 5399 – 5404.
5. Graille, M. et al. (2001) . Complexed between peptostreptococcus magnus protein L and a human antibody reveals structural convergence in the interaction modes of Fab binding proteins. Structure. 9: 679 – 687.
 6. Mastellos, D., J. C. Papadimitriou, S. Franchini, P. A. Tsonis, and J. D. Lambris. (2001). A novel role of complement: Mice deficient in the fifth component of complement exhibit impaired liver regeneration. Immunol. 166: 2479 – 2486.
 7. Goodyear, C. S. and G. J. Silverman. (2004). Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate – like lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 11392 – 11397.
 8. Ellsabeth, R. W., A. P. Fehringer, Ezepechuk, Y. V., P. M. Schlievert, P. Bina, R. F. Reiser, M. M. Hook, and D. Y. M. Leung. (1999). *Staphylococcus aureus* isolation from patients with Kawasaki disease express high levels of protein A. Infection and Immunity. 67: 4737 – 4743.
 9. Palmqvist, N., T. Foster, A. Tarkowski, and E. Josefsson. (2002). Protein A is a virulence factor in *staphylococcus aureus* arthritis and septic death. Microb. Pathog. 33: 239 – 249.
 10. Gomez, M. et al. (2004). *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNF R1. Nature. Medicine. 10: 842 – 848.
 11. Lind, I. (1974). Protein A production in different strains of *staphylococcus aureus* under varied growth conditions. Acta. Path. Microbiol. Scand. S. B. 78: 673 – 682.
 12. Seki, K., S. Nashihara, and S. Masuda. (1985). A rapid and simple method for the purification of staphylococcal protein A from the culture of extracellularly protein A releasing mutant. Microb. Immun. 29: 559 – 563.
 13. Bancroft, J. D. and A. Stevens. (1990). Theory and practice of histological techniques. (2 nd. Ed.). Churchill living stone. Edenburg. London. 662.
 14. Goodyear, C. S. and G. J. Silverman. (2003). Death by a B cell superantigen: *In vivo* VH – targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a staphylococcal toxin. J. Exp. Med. 197: 1125 – 1139. Elucidation of primary pathways for activation – induced cell death that is induced by a B – cell superantigen.
 15. Viav, M., N. S. Longo, P. E. Lipsky, and M Zouali. (2005). Staphylococcal protein A deletes B–1a and marginal zone B lymphocytes expressing human immunoglobulins: An immune evasion mechanism. J. Immunol. 175: 7719 – 7727
 16. Anderson, A., R. Sporiei, J. Lambris, D. Larosa, and I. Levinson. (2006). Pathogenesis of B – cell superantigen – induced immune complex – mediated inflammation. Infect. Immun. 74: 1196 – 1203.
 17. Gomez, M. et al. (2006). *S.aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. J. Biological Chemistry. 281:20190 – 20196.
 18. Soong, G. et al. (2011). *S.aureus* protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activities .J.Biological Chemistry. 286:35891-35898.
 19. Parker, D. and A. Prince. (2011). Innate immunity in respiratory epithelium. American J.of Respiratory Cell and Cell Molecular Biology. 45:189-201.