

**إصابات المجاري البولية المتسببة عن البكتريا *Alcaligenes spp*
لدى مرضى داء السكر**

زياد ذنون الرسام أديبة يونس شريف

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/9/20 ؛ تاريخ القبول 2005/12/26)

الملخص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص البكتريا *Alcaligenes* من إصابات المجاري البولية، لـ (372) مصاباً بداء السكر من المعتمدين وغير المعتمدين على الأنسولين، بواقع (125) ذكراً و (247) أنثى وبأعمار تراوحت بين (11- 71) عام، كما شملت الدراسة (95) حالة من إصابات المجاري البولية لغير المصابين بالداء كعينة للسيطرة .

شكلت *Alcaligenes* نسبة (4.07%) من مسببات إصابات المجاري البولية لمرضى داء السكر، ولم تعزل من غيرهم، شخصت عزلات البكتريا *Alcaligenes* إلى النوع *A. faecalis*، تحت النوع *A. xylooxidans denitrificans* بنسبة (30%) لكل منهما و تحت النوع *A. xylooxidans* بنسبة (40%). تبينت نسبة عزل هذه المسببات في كل من الذكور والإناث المصابات، وبينت الدراسة ان (50 %) من هذه الاصابات لم تكن مصحوبة بأعراض سريرية، كما لم تتأثر نسبية عزل أفراد الجنس *Alcaligenes* بنوع العلاج المستخدم لداء السكر.

كلمات المفتاح : إصابات المجاري البولية و *Alcaligenes*

Urinary Tract Infections Caused by *Alcaligenes* spp. in Diabetic Patients

Zeyad T. Al-Rassam Adeba Y. Shareef

Department of Biology

College of Science

Mosul University

ABSTRACT

The study includes the isolation and identification of the bacteria *Alcaligenes* from urinary tract infections for (372) insulin and non-insulin dependent patients, (125) of them were males and (247) were females. Their ages ranged between (11-71) year. The study also includes (95) cases of non-diabetic urinary tract infections as control subjects. The bacteria *Alcaligenes* constitutes (4.07 %) of urinary tract infections among the diabetic patients in the study and this genus was not isolated from non-diabetics. The isolates of the bacterium *Alcaligenes* were isolated and identified as *A. faecalis* with a frequency of (30 %), the subspecies *A. xylooxidans denitrificans* at the same percent and *A. xylooxidans xylooxidans* (40 %). These differences in the frequency of isolation was occurred in both sexes . The study also showed that (50 %) of infections with *Alcaligenes* was without clinical syndromes . The study showed that there was no correlation between the treatment of diabetes and the rate of isolation of the three species of bacteria under study .

Key words: Diabetic, UTI, *Alcaligenes*

المقدمة

تتصف بكتريا *Alcaligenes* بكونها خلايا عسوية قصيرة تتواجد في التربة الرطبة و البيئات المائية ، كما عزلت من منتجات الألبان والبيض الفاسد ومن الخضراوات الطازجة (Buchanan and Gibbon, 1974). لم يأخذ أفراد هذا الجنس نصيبهم من الاهتمام إلا في مطلع التسعينات من القرن المنصرم بعد أن ثبتت مسؤولية هذه البكتريا عن إحداث إصابة المجاري البولية الباثية لمرضى التثبيط المناعي الراقدين في المستشفيات (Thomas and Kelly, 1993) . كما عزلت من إصابات الأذن الوسطى (Bizet and Bizet, 1997) وقرحة ملتزمة العين والتقرحات الجلدية وخاصة قرحة القدم للمرضى المصابين بداء السكر فضلاً عن عزلها من الدم وسائل النخاع الشوكي وأغشية الدماغ (Holt et al., 1994) . بالرغم من إن امراضية بكتريا *Alcaligenes* مازالت غير مدروسة بشكل موسع، إلا أن سبل انتقالها داخل ردهات المستشفيات عن طريق المحاليل الطبية الملوثة وأيدي الكادر الطبي باتت معروفة (Legrand and Anaissie, 1992) .

يضم هذا الجنس ستة أنواع :

A. eutrophus ، *A. faecalis*، *A. latus* ، *A. paradoxus* ، *A. plechaudii*، *A. xylooxidans* subsp. *denitrificans* ، *A. xylooxidans* subsp. *Xylooxidans*

أهمها سريريا :

1 . النوع (*A . f*) *Alcaligenes faecalis*

يعتبر من الأنواع المهمة لكونه أقدم أنواعها ولعدم امتلاك أفرادها خصائص مميزة فقد وضع تحت عوائل مختلفة، وقد ازدادت أهميته الطبية بعد عزله من عينات الإدرار والدم و إفرازات الجهاز التنفسي و من التهاب شغاف القلب والصفاق وإصابات المجاري البولية وسوائل غسل الكلية و قرحة ملتئمة العين والتقرحات الجلدية للمرضى المصابين بداء السكر (Thomas and Kelly, 1993; Foley et al., 1961) . (Kron vall et al., 1999 ; Ignatova et al., 1998 ; Bizet and Bizet, 1997; .

2. النوع *Alcaligenes xylooxidans*

يضم هذا النوع اثنين من تحت الأنواع هما :

أ- *Alcaligenes xylooxidans xylooxidans* (*A .x.x*)

تتميز أفرادها بقدرتها على أكسدة كل من الزيلوز والكلوكوز واستخدامها كمصدر للكربون وإنتاج الحامض على وسط O/F (Wilson and Reeves et al., 1986; Kiredjian et al .. 1986) . (Forbes et al., 1998; Baron and Finegold, 1990 ;

ب- *Alcaligenes xylooxidans denitrificans* (*A .x.d*)

تتصف أفرادها بعدم قدرتها على أكسدة أو استخدام كل من الزيلوز والكلوكوز كمصدر للكربون. (Bizet et al .. 1993; Baron and Finegold, 1990) .

وقد تم إجراء هذه الدراسة لإيجاد نسبة عزل أفراد الجنس *Alcaligenes* من التهابات المجاري البولية للمرضى المصابين بداء السكر و غير المصابين به .

المواد وطرائق العمل

العينات :

جمعت عينات الإدرار من (372) مريضاً مصاباً بداء السكر ، بأعمار تراوحت بين (11-71) عاماً، (125) ذكراً و (247) أنثى ومن المرضى المراجعين للعيادات الاستشارية في كل من مستشفى السلام، ابن سينا ومركز الوفاء لأبحاث وعلاج داء السكر في مدينة الموصل ، للفترة ما بين تموز 2002 وأذار 2003 ، كما أخذت عينات سيطرة عشوائية من كلا الجنسين شملت (95) حالة ، منهم (59) مصاباً بالتهابات المجاري البولية فقط (14) ذكراً و (45) من الإناث والعيينات الـ (36) الباقية لأشخاص

أصحاء منهم (18) ذكراً و (18) أنثى، وقد روعي للتأكد من عدم استخدام المرضى للمضادات الحيوية خلال فترة (48) ساعة التي سبقت جمع العينات .

جمع عينات الإدرار :

جمع الإدرار الوسطي Clean-catch midstream في حاويتين معقمتين بعد غسل الأعضاء الخارجية للجهاز البولي (Vandepitte et al., 1991). استخدمت إحدى الحاويتين لإجراء فحص الإدرار العام (GUE) General Urine Examination، أما الثانية فقد تم تلقيحها على وسط أكار الدم Blood Agar ووسط أكار الماكونكي MacConkey's Agar وحضنت بدرجة حرارة (37) °م لمدة (24) ساعة تحت الظروف الهوائية، عزلت المستعمرات النقية للبكتريا النامية ولقحت على وسط الأكار المغذي المائل Nutrient Agar Slant، وحفظت بدرجة حرارة (4) °م لحين استخدامها في إجراء الفحوصات التشخيصية .

تشخيص عزلات البكتريا *Alcaligenes* :

شخصت عزلات البكتريا *Alcaligenes* اعتماداً على الاختبارات الشكلية والكيموجيوية والمطابق لما ورد في أنظمة التشخيص المعتمدة (Buchanan and Holt et al., 1994 ; Bizet et al., 1993 ; Gibbon, 1974; Koneman et al., 1997; Bizet and Bizet, 1997). كما تم التأكد من دقة التشخيص باستخدام نظام API 20 NE المعتمد من قبل وزارة الصحة العراقية ، حيث اختبرت العزلات في مختبر الصحة العامة في الموصل ، وللتأكد من دقة التشخيص أهملت العزلات التي لم تتطابق مع نتائج تشخيص المختبر المركزي في بغداد.

النتائج والمناقشة

1. الصفات المزرعية :

أعطت عزلات جنس *Alcaligenes* بعد (48) ساعة من نموها على وسط اكار الماكونكي بدرجة (37)°م مستعمرات شاحبة اللون غير مخمرة لسكر اللاكتوز، دائرية ذات أقطار تتراوح ما بين (2-3) ملم محدبة ملساء ذات بريق زجاجي وقوام مخاطي عند لمسها بحلقة التلقيح، وانبعثت منها رائحة تشابه رائحة الفاكهة المتخمرة، كما أظهرت بعض عزلاتها تحللاً للدم من نوع α- عند زرعها على وسط اكار دم الأغنام .

2 . الفحص المجهرى :

تميزت خلايا هذا الجنس بكونها عصوية قصيرة الى بيضوية مفردة سالبة لصبغة كرام متحركة وغير مكونة للمحفظة .

3. الاختبارات الكيموحيوية :

اتصفت افراد هذا الجنس بكونها موجبة لفحص الاوكسيدز وهذا دلالة على امتلاكهم لانزيم السايبتوكروم او كسيدز المسوؤل عن نقل الالكترونات من الجزء الواهب المتمثل بالبكتريا الى العامل المختزل الممثل بالكاشف، كما امتلكت القدرة على انتاج انزيم الكتاليز الذي يحفز تحرير غاز O₂ من تحلل مركب بابر وكسيد الهيدروجين السام. كما استطاعت افراد هذا الجنس النمو على وسط السترات الذي يمثل قدرتهم على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون والطاقة واستخدام املاح الامونيوم كمصدر للنيتروجين، كما اظهر اختبار الحركة على وسط SIM قدرة بكتريا *Alcaligenes* على الحركة والذي استدل عليه بانتشار النمو بعيدا عن خط التلقيح.

وقد جاءت جميع هذه النتائج متفقة مع ما ذكره (Singleton, 1997) وبينت النتائج عدم قدرتها على انتاج الاندول من الحامض الاميني التريبتوفان وعدم قدرتها على تخمير سكر الكلوكوز في اختبار المثل الاحمر، كذلك كانت سالبة لاختبار فوكس بروسكور دلالة على عدم امتلاكها انزيمات مسار ايض سكر الكلوكوز وانتاج Butanidiol، ولم تتمكن هذه البكتريا من انتاج غاز كيريتيد الهيدروجين الذي يشير الى عدم قدرتها على اختزال مركبات الكبريت الموجودة في الاحماض الامينية، كما افادت النتائج المبينة في الجدول (1) الى عدم قدرة افراد الجنس *Alcaligenes* على انتاج كل من الانزيم الحال لليوربا والحال للجيلاتين والحامض النووي المنقوص الاوكسجين، والتي تعد من عوامل الضراوة المهمة التي تساعد في الغزو واحداث الاصابة، كما فشلت في تخمير سكر الارابينوز والرايفينوز والتريبالوز والسوربيتول والمانيتول والسكروز واللاكتوز.

واعطت مستعمرات صغيرة الحجم عند تنميتها على وسط السالمونيلا-شايفيلا الصلب وهذا يدل على تحملها لصبغة Brilliant Green، وتباينت النتائج حسب النوع لكل من اختبار الاكسدة والتخمير (O/F) لسكر الزيلوز والكلوكوز واختزال النترات الى نترت واختبار النمو على وسط المرق المغذي الحاوي على تركيز (6.5%) من ملح الطعام والنمو في درجة حرارة (4)°م و (44)°م، الجدول (2) (Bizet and Bizet, 1997). تميزت عزلات تحت النوع *A. xylosoxidans xylosoxidans* بقدرتها على اكسدة كل من سكر الكلوكوز والزيلوز على وسط O/F، و اظهرت عزلات تحت انواع *A. xylosoxidans denitrificans* و *A. xylosoxidans xylosoxidans* مقدرتها على اختزال النترات الى نترت للحصول على الطاقة.

و تمكنت من النمو على الوسط السائل الحاوي على تركيز (6.5%) ملح، استطاعت عزلات النوع *A. faecalis* النمو عند درجة حرارة (4)°م، في حين فشلت عزلات تحت انواع *A. xylosoxidans denitrificans* و *A. xylosoxidans xylosoxidans* من النمو فيها، وتمكنت عزلات تحت النوع *A. xylosoxidans xylosoxidans* من النمو في درجة حرارة (44)°م التي لم تستطع بقية العزلات النمو عندها وهذا يشير الى امتلاكها لنظم أنزيمية مختلفة، وقد انفردت عزلات النوع *A.*

faecalis دون غيرها بقبليتها على إحداث التحلل الجزئي للدم على وسط اكار دم الأغنام، وقد جاءت هذه النتائج مطابقة لنتائج (Bizet and Bizet, 1997; Bizet et al., 1993).

الجدول 1: الاختبارات الأساسية لعزل افراد جنس البكتريا *Alcaligenes*

نتيجة الاختبار	اسم الاختبار
+	الكثايز
+	الأكسيدز
+	الحركة
-	الاندول
-	المثيل الأحمر
-	الفوكس بروسكور
+	السترات
-	انتاج غاز H ₂ S على وسط T S I
-	انتاج الانزيم الحال للوريا
-	انتاج الانزيم الحال للجلائين
-	انتاج الانزيم الحال للحامض النووي منقوص الأوكسجين
+ مستعمرات شاحبة اللون	النمو على وسط اكار الماكونكي
نمو ضعيف	النمو على وسط سالمونيلا شايفلا الصلب
-	تخمير سكر الأربينوز
-	تخمير سكر الرافينوز
-	تخمير سكر التريبهالوز
-	تخمير سكر السوربيتول
-	تخمير سكر المانيتول
-	تخمير سكر السكروز
-	تخمير سكر اللاكتوز
-	تخمير سكر الكلوكوز

+ النتيجة الموجبة للاختبار ، - النتيجة السالبة للاختبار

الجدول 2: الاختبارات المعتمدة في تشخيص أنواع جنس البكتيريا *Alcaligenes*

A.x.x	A.x.d	A.f	اسم الاختبار
+	-	-	اختبار أكسدة سكر الكلوكوز على وسط O/F
+	-	-	اختبار أكسدة سكر الزايلوز على وسط O/F
+	+	-	اختبار اختزال النترات إلى نترت
+	+	-	اختبار النمو على الوسط الحاوي على النترات في الظروف اللاهوائية
+	+	-	النمو على الوسط الزراعي السائل الحاوي 6,5% ملح الطعام
-	-	+	النمو في درجة حرارة 4 م°
+	-	-	النمو في درجة حرارة 41 م°
-	-	+	القابلية على تحليل الدم من النوع - في الوسط الصلب الحاوي على دم الأغنام

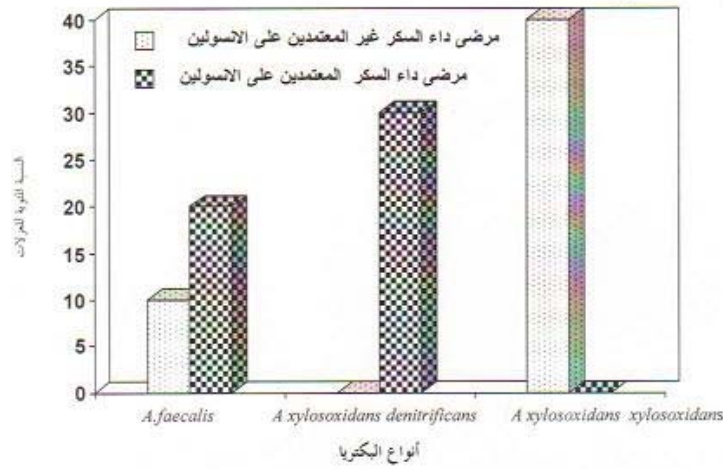
= *Alcaligenes xylosoxidans denitrificans* = (A.x.d) ، *Alcaligenes faecalis* = (A.f) ، *Alcaligenes xylosoxidans xylosoxidans* (A.x.x) ، + النتيجة الموجبة للاختبار ، - النتيجة السالبة للاختبار

شكلت بكتيريا *Alcaligenes* نسبة 4.07% من المجموع الكلي لمسببات إصابات المجاري البولية لمرضى داء السكر و لم تعزل من إصابات المجاري البولية لغير المصابين بداء السكر، إذ تعد هذه البكتيريا من الجراثيم الانتهازية التي تصيب المثبتين مناعياً وكبار السن (Dunne and Maisch, 1994)؛ (Legrand and Anassie, 1992). كما عزلت من صالات المستشفيات بنسبة 1.4% وعُدت احد المسببات للإصابات الثانوية التي تحدث بعد العمليات الجراحية أو الحروق و قد ثبت انتقالها عن طريق ايدي الكادر الطبي وموظفي الخدمة داخل ردهات المستشفيات (الراوي، 1999؛ القوطجي، 2001؛ الداوودي، 2002).

توزعت عزلات الجنس *Alcaligenes* على النواع *A. faecalis* بنسبة 30%، تحت النوع *A. xylosoxidans xylosoxidans* بنسبة 40% و تحت النوع *A. xylosoxidans denitrificans* بنسبة 30% وكانت نسبة عزلها تبعاً لجنس المريض كالاتي، عزلت تحت الانواع *A. xylosoxidans denitrificans* و *A. xylosoxidans xylosoxidans* بنسبة 30% لكل منها من الاناث المصابات، بينما لم يعزل تحت النوع الاول من الذكور وعزل تحت النوع الثاني بنسبة 10% من الذكور، اما النوع *A. faecalis* فقد عزل بنسبة 20% من الاناث و بنسبة 10% من الذكور، وهذا يشير الى ان 80% من عزلات البكتيريا *Alcaligenes* قد تم عزلها من الاناث المصابات بداء السكر، الأمر الذي يفسر على ان

الإناث هن أكثر عرضة للإصابة بالتهابات المجاري البولية من الذكور وبنسبة قد تصل الى مايقرب من خمسة أضعاف ما يسجل لدى الذكور وهذا يعزى الى الاختلافات الفسلجية والتشريحية للجهاز البولي لدى الإناث (Hansson et al., 1997) .

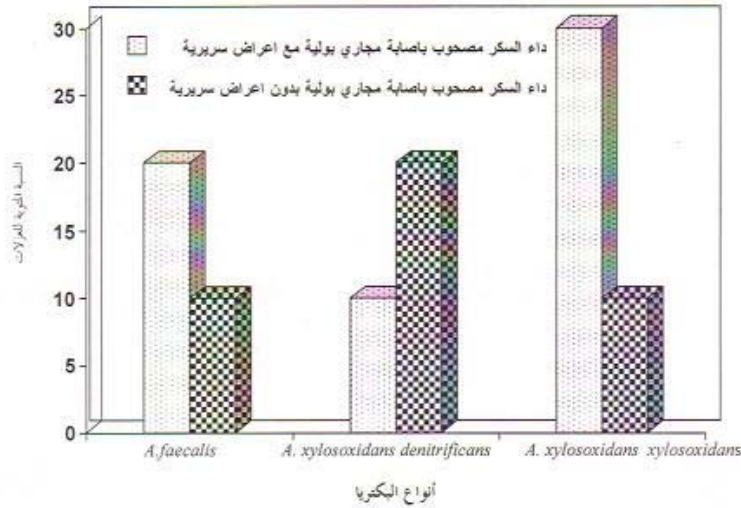
بين الشكل (1) النسبة المئوية لعزلات بكتريا *Alcaligenes* تبعاً لنوع العلاج المستخدم في السيطرة على داء السكر ، اذ عزل النوع *A. faecalis* بنسبة 20% من المرضى المعتمدين على الأنسولين وعزل تحت النوع *A. xylosoxidans denitrificans* بنسبة 30% منهم، بينما عزل تحت النوع *A. xylosoxidans xylosoxidans* بنسبة 40% من غير المعتمدين على الأنسولين، مما يشير إلى أن 50% من العزلات التابعة للجنس *Alcaligenes* تم عزلها من المصابين بداء السكر المعتمدين وغير المعتمدين على الأنسولين، وهذه النتيجة تشير الى عدم وجود تأثير لنوع علاج داء السكر المستخدم في نسبة عزل افراد هذا الجنس.



الشكل 1 : النسب المئوية لتوزيع أنواع جنس *Alcaligenes* المعزولة اعتماداً على نوع علاج داء السكر المستخدم

يوضح الشكل (2) النسبة المئوية للإصابة بأنواع الجنس *Alcaligenes* المصحوبة وغير المصحوبة بالاعراض السريرية، حيث ان 20% من الاصابات بتحت النوع *A. xylosoxidans denitrificans* و 10% لكل من النوع *A. faecalis* و تحت النوع *A. xylosoxidans xylosoxidans* لم تكن مصحوبة باعراض سريرية، مما يشير الى ان نسبة 40% من الاصابات لم تكن مصحوبة باعراض، مما يحتم اجراء فحص الادرار العام للمرضى المصابين بداء السكر بشكل دوري حتى عند غياب الاعراض

السريرية لإصابات المجاري البولية وذلك لتدارك الإصابة بوقت مبكر ، إذ تميل تراكيز الكلوكوز المرتفعة في مصل و قدم عمر الإصابة بداء السكر الى جعل اصابات المجاري البولية لدى مرضى داء السكر تبدو في الغالب بدون اعراض سريرية وهي ناتجة عن الخلل العصبي الحاصل في الاعصاب المحيطة التي تفقد المريض الشعور باعراض الإصابة (Ronald and Londwig, 2001 ; Solomon, 2002) .



الشكل 2 : النسب المئوية لتوزيع أنواع جنس *Alcaligenes* المعزولة حسب حالة الإصابة إن كانت مصحوبة أو غير مصحوبة بأعراض سريرية

المصادر العربية

الداؤودي، عامرة علي، 2002. دراسة تشخيصية وفلسجية على جرثومة *Serratia marcescens* المعزولة من اخماج الجروح للمرضى الراقدين في الردهات الجراحية ، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق .

الراوي، ندى فاضل، 1999. دراسة تشخيصية وفلسجية لعدد من الاجناس التابعة لمجموعة الجراثيم العسوية السالبة لصبغة كرام غير المخمرة . اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

القوطجي، حنان سامي، 2001. عزل وتشخيص البكتريا الملوثة لصالوات العمليات ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية والمطهرات الكيماوية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق .

المصادر الأجنبية

- Baron, E.J. and Finegold, S.M., 1990. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 8th ed., C. V. Mosby Company, USA, pp. 203-255; pp.386-402.
- Bizet, J. and Bizet, C., 1997. Strain of *Alcaligenes faecalis* from clinical material. J. Infect. 35, pp.167-169.
- Bizet, C., Picard, B., Kiredjian, M. and Goulet, P., 1993. Distinctive electrophoretic pattern of esterase produced by *Alcaligenes species*. Institute pasteur/ Elsevier, Paris Res. Microbiol. 144, pp 221-227.
- Buchanan, R.E. and Gibbon, N.E., 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed., The Williams and Wilkins, PP. 373-375, 218p. .
- Dunne, W.M. and Maisch, S., 1994. Epidemiological Investigation of infections due to *Alcaligenes species* in children and patients with cystic Fibrosis: use of Repetitive-Element- Sequence polymerase chain reaction. J. Clin. Infect. Dis., 20: pp.836-841.
- Foley, J.F., Gravelle, C.R., Englehard, W.E. and Chin, T.D.Y., 1961. Achromobacter septicemia: fatalities in prematures. I. Clinical and epidemiological study. Am, J. Dis. Child, 101: pp.279-288. Cited by Dunne, W.M. and Maisch, S., 1994.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S., 1998. Diagnostic microbiology. 10th ed, mosby, inc. missouri USA. pp.351-352, pp.475-487.
- Hansson, S.; Martinell, J. ; Stokland, K. and Jodal, U. 1997. The natural history of bacteriuria in childhood. Infect. Dis. Clin. Worth. Am. 11: pp. 499-512.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S. T., 1994. Bergeys manual of determinative bacteriology. 9th ed., Williams and Wilkins Comp., USA, Baltimor. pp.71-75, pp.125- 126.
- Ignatova, Z., Stoeva, S., Galunsky, B., Hornle, C., Nurk, A., Piotraschke, E., Voelter, W. and Kasche, V., 1998. Proteolytic processing of penicillin amidase from *Alcaligenes faecalis* cloned in *E. coli* yields several active forms. Biotech. Letter, 20 (10): pp.977-982.
- Kiredjian, M., Holmes, B., Kersters, K., Guilvout, I. and Deley, J., 1986. *Alcaligenes piechaudii* a new species from human clinical specimens and the environment. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: pp.282-287.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Srechenberger, P.C. and Winn, W.C., 1997. Color atlas and text book of diagnostic microbiology. 5th ed, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, USA, pp.171-220.
- Kron Vall, G., Hanson, H.S., Stedinyk, L.V., Tornqvist, E. and Falsen, E., 1999. Septic arthritis caused by a gram -negative bacterium representing a new species related to the Bordetella-Alcaligenes complex. APMLS. 108: pp.187-194.
- Legrand, C. and Anaissie, E., 1992. Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in patients with cancer. Clin. Infect. Dis. 14: pp.479-484.
- Singleton, P., 1997. Bacteria. 4th ed, John wiley and sons Ltd., New York. 369 p.
- Solomon, L.P., 2002. Utiis prevention and treatment. Diabetes Forecast, 55 (8) : pp.3-28.
- Thomas, M.D. and Kelly, L.D., 1993. *Alcaligenes faecalis* corneal ulcer in a patient with cicatricial pemphigoid. Am. J. Ophthal. 115 (2) : pp.225-256.
- Vandepitte, L., Engbac, K., Piot, P. and Heuch, C., 1991. Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology (WHO) -Genuva. pp.21-38; 82-95.
- Wilson, R.M. and Reeves, W.G., 1986. Neutrophil phagocytosis and killing in insullin-dependent diabetes. Clin. Exp. Immunol. 63(2). pp. 478-484.