وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعـــــــة كـربلاء

كليـــة العلـــــوم

دراسة بعض العوامل في انتاج الكواكيوليز Coagulase من المكورات العنقودية Staphylococci المعزولة محليا

رسالة مقدمـــة إلـــــى

مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

براك ثامر شبيب السالمي

بكالوريوس علوم حياة – الجامعة المستنصرية

2003

بأشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة

ذكرى عدنان جواد المسلماوي

ذي الحجة 1436هـ

تشرين الاول 2014 م

[رَبِّ أَوزِعنِي أَن أَشكُرَ نِعمَتَكَ الَّتِي أَنعمتَ عَلَيَّ وَعَلَى وَالِدَيَّ وَأَن أَعمَلَ صَالِحاً تَرضَه]

النمل : 19

صَدَقَ اللهُ أَلعَلِيُ العَظِيمْ

الإهداء

إلــــــى من علمتني النجـــاح والصبر

إلــــــى من أفتقدها في مواجهة الصعاب .. أمـــي الغــالية

إلــــــى النور الذي ينير لي درب النجاح

إلــــــى سبب وجودي فـــي الحيــــاة .. والــدي الحبيب

إلــــــى من كانوا يضيئون لـــي الطريق

ويساندونـــــــي ويتنازلـون عن حقوقهم

لإرضائـــــي والعيش فـــــي هنـــــاء .. إخوتـــــــي

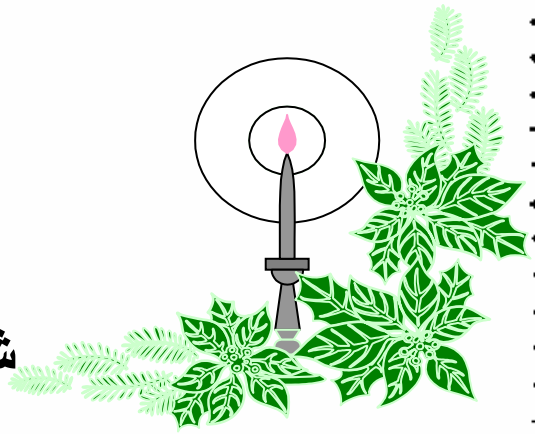
إلـــــى من تحمل أعبائي وكان عوناً لي .. زوجـــــــي

إلــــــى كل من أضاء بعلمه عقل غيره

أو هدى بالجواب الصحيح حيرة سائليه أســاتذتــي الكـــرام

أهدي هذا الجهد

أطياف



شكر وتقديـر

شكراً لله على وافر نعمائه وحمداً له على ما من بفضله ويسر برحمته ونور هدايته لنبصر طريق الهدى والعلم والأيمان. الحمد لله الذي جعل الحمد شكراً لنعمائه، ومعاذاً من بلائه، وسبيلاً إلى جنانه، والصلاة والسلام على رسوله نبي الرحمة وإمام الأئمة وسراج الأمة وعلى أهل بيته مصابيح الظلم وملاذ الأمم ومنار الدين الواضحة.

يطيب لي وأنا أنهي كتابة رسالتي هذه أن أقدم شكري إلى عمادة كلية العلوم – جامعة كربلاء ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي. كما أتوجه بخالص شكري وامتناني وعميق إحترامي وتقديري إلى مشرفتي الفاضلة الدكتورة ذكرى عدنان جواد لاقتراحها مشروع البحث وما أبدته من حسن المتابعة والدعم المستمر والتوجيهات القيمة طيلة فترة البحث وكتابة الرسالة جزاها الله الجزاء الأوفى.

كذلك أقدم عرفاني وتقديري إلى أساتذتي الكرام لتعاونهم معي بما قدموه لي من نصائحهم وعطائهم المعنوي وأخص بالذكر الأستاذ الدكتور عبد عون الغانمي لمساعدته لي في إجراء التحليل الأحصائي.

كما أتقدم بآيات الشكر والأمتنان إلى العاملين كافة في مستشفى الحسين (ع) العام ومختبر الصحة المركزي في محافظة كربلاء المقدسة والى المرضى المتطوعين كافة لتعاونهم معي في الحصول على العينات مع تمنياتي للجميع بدوام الصحة والموفقية.وكذلك شكري الخاص إلى زملائي ممن رافقوا مسيرتي وتعاونوا معي في تذليل مصاعب بحوثنا معاً . وبمزيد من العرفان والجميل أتقدم لكل إنسان قدم لي يد العون والمساعدة العلمية ولكل من ساعدني بكلمة أو فعل استمددت منهما الإرادة والصبر والاحتمال والقوة ، أتمنى أن يمن الله على الجميع بالموفقية.

أطياف

إقرار الأستاذ المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء/كلية العلوم وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع :

الاســـم : د. ذكرى عدنان المسلماوي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

التأريخ :

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاها المقدمة من قبل المشرف ، أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاســـم :

المرتبة العلمية :

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

التأريخ :

إقرار المقوم العلمي

أقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ (دراسة العوامل المؤثرة في إنتاج الهيمولايسين من العزلات البكتيرية الأكثر شيوعاً في إحداث خمج الجروح) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجــة الماجستير في علوم الحياة تقويماً علمياً.

التوقيع :

الاســم :

المرتبة العلمية :

التأريخ :

إقرار المقوم اللغوي

أقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ (دراسة بعض العوامل المؤثرة في إنتاج الهيمولايسين لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الجروح) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة إذ تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة قدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب و صحة التعبير .

التوقيع :

الاســم :

المرتبة العلمية :

التأريخ :

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة بأننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة المقدمة من قبل الطالب (**براك ثامر شبيب السالمي**) ، وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها ، وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ 11/ 2 / 2015 ووجدناها مستوفية لمتطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة بتقدير (**امتيـــــاز**).

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : محمد شمخي جبر

المرتبة العلمية :استاذ

التاريخ : / / 201

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : موسى نعمة مزهر

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / / 201

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم: جاسم محمد مصطفى

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

التاريخ : / / 201

عضواً ومشرفاً

التوقيع :

الاسم : ذكرى عدنان جواد

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / / 201

مصادقة عمادة كلية للعلوم

التوقيع :

الاسم : أحمد محمود عبد اللطيف

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 201

ال

باقـــة ورد

إلى من غرس في نفسي حب العلم والتعلم.. نور عيني ومثلي الأعلى.. أستاذي الأول

أبي ......

إلى من آنارت لي الطريق بدعائها

أمي ....

إلى الروح الطاهرة التي ازكت بعطرها تنير ليا الدرب

عمي00000

الى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئه إلى رياحين حياتي

00000 إخواني و أخواتي

الى من تحملت اعبائي وكانت عونا لي

00000 زوجتي

إلى كل من احبني وتمنى لي الخير

اهدي ثمر ة جهدي المتواضع

براك

براك ثامر

شكـــر و تقديـــر

بسم الله الذي لا أرجو إلا فضله ولا أخشى إلا عدله ولا اعتمد إلا قوله ولا اتمسك إلا بحبله , والصلاة والسلام على سيد الأنام نبينا المصطفى الأمين وعلى آلـه الغر الميامين الطيبين الطاهرين المنتجبين ..

الحمد لله أولاً وآخراً لتيسيره لي الصعوبات لإنجاز هذا العمل ولما أنعم به علي من نعم كثيرة وأمدني بالصبر الجميل طيلة مدة البحث والدراسة.

وأنا أضع اللمسات الأخيرة لإتمام هذا البحث لا يسعني إلا أن أتقدم بفائق شكري وامتناني واصدق اعتزازي إلى مشرفتي الأستاذة الدكتورة ذكرى عدنان جواد لاقتراحها موضوع البحث وإشرافها عليه وتقديمها النصائح العلمية القيمة طيلة فترة البحث والكتابة.

أتقدم بجزيل شكري وتقديري واحترامي إلى عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي والشكر موصولا الى أساتذتي الكرام ومنتسبي القسم كافة.

ومن دواعي الوفاء ان أوجه شكري وتقديري الى مختبر الصحة العامة إدارة ومنتسبين واخص بالذكر الست الفاضلة (أم محمد) لتقديمها كل ما في وسعها من مساعدة خاصة في ما يتعلق بعزل وتشخيص البكتريا ، جعل الله ذلك في ميزان حسناتها0

وأتقدم بالشكر الجزيل إلى قسم شؤون داخلية كربلاء المقدسة ضباطا ومنتسبين وأخص بالذكر كل من العقيد حيدر جاسم لإتاحته الفرصة بإكمال دراستي ومساعدتي في هذا المجال قدر المستطاع فجزاه الله خير الجزاء واشكر كذلك المقدم أسام رحيم بيرغ والنقيب حيدر محمد جواد لمد يد العون لي فمن الله لهم التوفيق والسداد0

يسعدني ويشرفني أن أقدم جزيل شكري وعرفاني إلى أخي وصديقي وعوني الأستاذ باسم محمد عبد البديري لمساعدته بكل ما يستطيع بغية اكمال دراستي فله مني فائق الشكر والإمتنان والشكر موصولاً إلي أخي الأستاذ صلاح هاشم لكرمه الفائق في تحقيق أهدافي ومساعدتي في هذا المجال0أتقدم بالشكر والامتنان للأخوة كل من حيدر خضير وماهر عبد السادة و سمير غني لمساعدتهم المشكورة في إتمام هذا البحث0

وأتقدم بجزيل الشكر والامتنان لطلبة الدراسات العليا مع دعواتي لهم بالتوفيق والنجاح .

ختاماً امتناني وعميق عرفاني لعائلتي التي ساندتني ووقفت الى جانبي وتحملت معي الكثير .

براك

الخلاصـــــــة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جراثيم المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci) من عينات سريرية بلغت (102) عينة من مستشفيات مدينة كربلاء المقدسة (مستشفى الحسين(ع) العام ومستشفى كربلاء للأطفال) وشملت المسحات الأنفية Nasal swabs ، المسحات الأذنية Ear swabs ، المسحات الجلدية Skin swabs ،مسحات الحروق Burn swabs ، مسحات الجروح Wound swabs ، مسحات صالات العمليات Operation swabs وعينات الإدرار Urine sample كذلك العينات الغذائية والتي أعتمد جمعها من الباعة المتجولين المفتقدين لعنصر النظافة والتي بلغت (35) عينة وشملت عينات الأجبان Cheese sample ، عينات الألبان Dairy sample ، عينات اللحوم Meat sample وعينات البوظة Ice cream sample للفترة بين (15 نيسان- 15 تموز2014)0

شخصت العزلات وفق الإختبارات المظهرية والبايوكيميائية وبعد تشخيص المستعمرات النامية وجد أن البكتريا الموجبة لملون غرام شكلت نسبة (69.98%) للعينات السريرية و(57.89%) للعينات الغذائية من مجموع العزلات التي أعطت نمو على الأوساط الزرعية وشكلت بكتريا المكورات العنقودية Staphylococci نسبة (45.09%) و(45.45%) للعينات السريرية والغذائية على التوالي من مجموع العزلات الموجبة لملون غرام ، و شكلت المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci) نسبة (39.13%) من مجموع بكتريا المكورات العنقودية Staphylococci المستحصل عليها أثناء العزل والتشخيص للعينات السريرية كما ظهرت نسبة (60.86%) للمكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci) من مجموع بكتريا المكورات العنقودية Staphylococci في العينات الغذائية وتم تشخيص نوعين من المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) وهما *S. aureus* و*S. hyicus* بالإعتماد على إختبار انزيم مخثر البلازما بنوعيه Slide and Tube Coagulase Test وكذلك بالإعتماد على الفحوصات البايوكيميائية الأخرى ونظام أشرطة الابي Api staph0

تم إختبار حساسية المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) للمضادات الحيوية لتحديد المضاد الأكثر فعالية ضد هذه البكتريا كذلك تم تحديد المضادات التي تقاومها البكتريا ووجد أن المضاد الأكثر فعالية على بكتريا *S.aureus* هو مضاد Azithromycin أما بكتريا *S.hyicus* فكان مضاد Erythromycin هو الأكثر فعالية تجاه هذه البكتريا كما أبدت

بكتريا *S.aureus* مقاومةً واضحةً لمضاد Erythromycin وكذلك مضاد Ciprofloxacin أما بكتريا *S.hyicus* فأبدت مقاومة واضحة لمضاد Streptomycin وكذلك لمضاد Gentamycin0

تم دراسة الظروف المختلفة لإنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) لكلا النوعين المدروسين ولوحظ أن هنالك تشابهاً كبيراً في تلك الظروف ما عدا بعض الإختلافات0أشارت النتائج أن وسط Chemical defined medium أدى إلى زيادة في إنتاج الانزيم في كلا النوعين قيد الدراسة ولوحظ أن درجة الحرارة الملائمة في إنتاج الانزيم هي نفسها لكلا النوعين وهي درجة حرارة (37) م ولوحظ أن الأس الهيدروجيني الذي أدى إلى زيادة إنتاج الانزيم كان متماثلاً لكلا النوعين وهو (7.5) ، توافقا كلا النوعين في إنتاجيتهما للأنزيم بفترة الحضن (24hrs.) وتوافقت النتائج من حيث الإنتاج الجيد للأنزيم في كلا النوعين عند استخدام حاضنة هزازة بسرعة (100) هزة0

أما الإختلاف الذي لوحظ في إنتاجية الانزيم هو أن بكتريا *S. aureus* تقوم بإنتاج كميات عالية من الانزيم باستخدام بلازما الارانب والإنسان كما لوحظ أن بلازما الأرانب والخراف هما المناسبين في إنتاج الانزيم في بكتريا *S. hyicus* كما لوحظ ان تركيز البلازما 1/5 هو الملائم في انتاج الانزيم لبكتريا *S. aureus* خلافاً لما لوحظ أن تركيز 1/8 من البلازما هو الملائم في إنتاج الانزيم في بكتريا *S. hyicus* أما بالنسبة لإستخدام أملاح الأيونات فلوحظ أن استخدام أملاح أيونات المغنيسيوم $MgCl_2$ يؤدي إلى إنتاج عالي للأنزيم في بكتريا *S. aureus* أما بالنسبة لبكتريا *S. hyicus* فلوحظ أن أملاح أيونات البوتاسيوم KCl أدت الى زيادة الإنتاج ولوحظ أيضاً أن أيونات أملاح الصوديوم لها تأثير سلبي في قلة الإنتاج لكلا النوعين 0

-

قائمة المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة	III - II
	قائمة المحتويات	III-XI
	قائمة الاشكال	XI
	قائمة الجداول	XII
	قائمة المختصرات	XIII- XIV
الفصل الأول- المقدمة		
	المقدمة	1
الفصل الثاني - استعراض المراجع		
1-2	نبذة تاريخية عن المكورات العنقودية Historical overview of Staphylococci	3
2-2	جنس المكورات العنقودية *Staphylococcus*	5
1-2-2	البكتريا السالبة لانزيم مختر البلازما CNS	7
2-2-2	البكتريا الموجبة لانزيم مختر البلازما CPS	8
1-2-2-2	*Staphylococcus hyicus*	10
3-2	الإمراضية Pathogenicity	11
4-2	عوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية Virulence factors of Staphylococci	14
1-4-2	عوامل الالتصاق Adherence factors (Adhesion)	14
1-1-4-2	بروتينات السطحية الخلوية Cellular surface protein	14
2-1-4-2	بروتين أ Protein A	15
3-1-4-2	الاهدابPilli	15

-

2-4-2	المحفظة Capsule	16
3-4-2	حامض التيكويك Teichoic acid	16
4-4-2	البروتينات الخارجية Exoproteins	17
1-4-4 -2	السموم Toxins	17
1-1-4-4-2	السـم القاتل لخلايا الدم البيض بانتون فلانتين Panton valentin leukocidin PVL	17
2-1-4-4-2	متلازمة الصـدمة السـمية نوع (1) (Toxic shock syndrom toxin – 1, TSST)	18
3-1-4-4-2	السموم المعوية العنقودية Staphylococcal enterotoxin	19
4-1-4-4-2	السموم حالة الدم Hemolysins	19
5-1-4-4-2	السموم المقشرة Exofoliative Toxins	20
2- 4-4-2	الانزيمات الخارج خلوية Extracellular enzymes	21
1- 2- 4-4-2	الكاتليز Catalase	21
2- 2- 4-4-2	انزيمات حالة البروتين Proteases	22
3- 2- 4-4-2	انزيمات حالة الاحماض النووية سNuclease	22
4- 2- 4-4-2	انزيم الهيالوروندیزHyaluronidase	23
5- 2- 4-4-2	انزيم اللاييز Lipases	23
6- 2- 4-4-2	انزيم محرك العنقوديات Staphylokinase	24
7- 2- 4-4-2	انزيم مخثر البلازما Coagulase	25
الفصل الثالث – المواد وطرق العمل		
1-3	المواد Materials	30
1-1-3	الأجهزة والأدوات Instruments and Equipments	30
2-1-3	المواد الكيمياوية والبايولوجية المستخدمة Chemical & Biological Material Used	32
3-1-3	الأوساط الزرعية الجاهزة Ready Culture Media	35

-

4-1-3	الأوساط الزرعية التحضيرية Prepared Culture Media	36
5-1-3	أوساط العزل والاستنبات Isolation &Growth Media	37
1-5-1-3	وسط أگار المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar	37
2-5-1-3	وسط أگار بيرد – باركر Baird-Parker Agar	37
3-5 -1-3	وسط أگار شليفر- كرامر SK Agar	38
4-5 -1-3	وسط P Agar	39
5-5 -1-3	الوسط المعرف كيميائياً Chemically defined medium (CDM)	39
6-5 -1-3	وسط أگار الدم الأساس Blood Agar Base	40
7-5 -1-3	وسط الأگار المغذي Nutrient agar	40
8-5 -1-3	وسط المرق المغذي Nutrient broth	40
9-5 -1-3	وسط مرق خلاصة الخميرةYeast extract broth	40
10-5 -1-3	وسط ماء الببتون Pepton water	40
11-5 -1-3	وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion broth	41
12-5 -1-3	وسط أگار نقيع القلب والدماغ Brain Heart infusion agar	41
13-5-1-3	وسط مرق النترات Nitrate Broth	41
14-5 -1-3	وسط أگار اليوريا Urea agar medium	41
15-5 -1-3	وسط الـثايوكلايكوليت Thioglycolate Medium	41
16-5 -1-3	وسط سيمون ستريت Simmons's Citrate Agar	42
17-5 -1-3	وسط الكلوكوز الفوسفاتيِ Glucose Phosphate medium	42
18-5 -1-3	وسط مرق تربتك صويا Trypton soys broth	42
19-5 -1-3	وسط الحركة Motility medium	42
20-5 -1-3	وسط تخمر السكريات Sugar fermentation medium	43

21-5 -1-3	وسط أگار مولر هنتون Muller hinton agar	43
6-1-3	أوســـاط حفظ وإدامة العزلات الجرثومية Isolates bacteria conservation media	43
1-6-1-3	الحفظ القصير الأمد Short-term conservation	43
2- 6-1-3	الحفظ المتوسط الأمد Medium-term conservation	43
3 -6-1-3	الحفظ طويل الأمد Long-term conservation	44
7-1-3	الكواشف والمحاليل Indicators and Reagents	44
1-7-1-3	الكواشف Indicators	44
1-1-7-1-3	محاليل ملون گرام Gram Stain Solutions	44
1-1-7-1-3أ	صبغة البنفسج البلوري Crystal Violet	44
1-1-7-1-3ب	صبغة السفرانين Safranin	44
1-1-7-1-3ج	مثبت الأيودين Mordant Iodine	44
1-1-7-1-3د	محلول القصرDecolorize	44
2-1-7-1-3	كاشف باريت Barrit’s Indicator	45
3-1-7-1-3	كاشف كوفاكس Kovac’s Reagent	45
4-1-7-1-3	كاشف الكاتاليزCatalase reagent	45
5-1-7-1-3	كاشف أنزيم السايتوكروم أوكسيديزCytochrome Oxidase Indicator	45
6-1-7-1-3	كاشف المثيل الأحمرMethyl red reagent	45
7-1-7-1-3	أشرطة نظام الأبيِ Analytical Profile Index (Api system)	45
2-7-1-3	المحاليل Solutions	46
1-2-7-1-3	محلول اليوريا Urea solution	46
2-2-7-1-3	محلول الملح الفسلجي Normal saline	46
3-2-7-1-3	محلول دارئ الفوسفات الفسلجي Phosphate buffered Saline	46

-

4-2-7-1-3	محلول مكفر لاندMcFarland solution	46
3-7-1-3	الدوارئ المستعملة في دراسة تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني المؤثرة في إفراز أنزيم مخثر البلازما Coagulase من قبل المكورات العنقودية Staphylococci	47
1- 3 -7-1-3	دارئ الفوسفات Phosphate buffer ذو الرقم الهيدروجيني (4)	47
2- 3 -7-1-3	دارئ الفوسفات والسترات (Citro – phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (4.5)	47
3-3 -7-1-3	دارئ الخلات (Acetate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (5)	47
4- 3 -7-1-3	المحلول الدارئ (Buffer solution) ذو الرقم الهيدروجيني (5.5)	47
5- 3 -7-1-3	دارئ الخلات (Acetate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (6)	48
6- 3 -7-1-3	دارئ الفوسفات والسترات (Citro-phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (6.5)	48
7- 3 -7-1-3	دارئ الفوسفات (Phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني(7)	48
8- 3 -7-1-3	دارئ الفوسفات (Phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (7.5)	48
9-3-7-1-3	دارئ البورات (Borate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (8)	48
10- 3 -7-1-3	دارئ خلات الترس (Tris acetate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (8.5)	49
11-3 -7-1-3	دارئ البورات (Borate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني(9)	49
8-1-3	البلازما المستخدمة في إختبار تخثر الدم Coagulase Test	49
1-8-1-3	بلازما الإنسان Human Plasma	49
2-8-1-3	بلازما الأرانب Rabbit Plasma	49
3-8-1-3	بلازما الأغنام Sheep Plasma	49
4-8-1-3	بلازما الأبقارCow Plasma	50
2-3	طرائق العمل Working Methods	50
1-2-3	جمع العيناتSpecimens Collection	50
1-1-2-3	العينات السريرية Clinical samples	50

-

2-1-2-3	العينات الغذائية Foods samples	50
2-2-3	التشخيص Identification	51
1-2-2-3	الصفات المزرعية Culture characteristics	51
2-2-2-3	الفحص المجهري Microscopic Examination	51
3-2-2-3	الفحوصات البايوكيميائيةBiochemical Test	51
1-3-2-2-3	فحص إنتاج إنزيم الكاتاليز Catalase Test	51
2-3-2-2-3	إختبار فعالية انزيم السا يتوكروم اوكسيديز Cytochrome Oxidase Test	52
3-3-2-2-3	إختبار فوكس بروسكر Voges – Proskauer test	52
4-3-2-2-3	إختبار استهلاك السترات Citrate utilization test	52
5-3-2-2-3	فحص إنتاج إنزيم محلل الدم Hemolysin Test	52
6-3-2-2-3	إختبار الحركة Motility Test	53
7-3-2-2-3	إختبار تحلل اليوريا Urea hydrolysis test	53
8-3-2-2-3	إختبار السكريات Sugers Test	53
9-3-2-2-3	الكشف عن إنتاج مخثر البلازما Coagulase Test	53
1- 9-3-2-2-3	الطرق النوعية Qualtitative Method	53
1-1- 9-3-2-2-3	إختبار الانبوب Tube Coagulase Test	53
2-1- 9-3-2-2-3	اختبار الشريحة Slide Coagulase Test	54
2- 9-3-2-2-3	الطرق الكمية Quantitative Method	54
1-2- 9-3-2-2-3	إختبار صب الاطباق Pour – Plate Test	54
2-2- 9-3-2-2-3	إختبار الانتشار في الشريحة Diffusion slide assay	54
4-2-2-3	تشخيص بكتريا *Staphylococcus* بإستخدام API Staph System	55
1-4-2-2-3	مكونات عدة التشخيص بنظام API للمكورات العنقودية	55

-

2- 4-2-2-3	آلية استخدام اشرطة Api Staph	55
1-2- 4-2-2-3	كاشف إختبار الفوكس بروسكر Voges – Proskaure test reagent	56
2-2- 4-2-2-3	كاشف إختبار اختزال النترات Nitrate Reduction test reagent	56
3-2- 4-2-2-3	كاشف إختبار إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase test reagent	56
3-2-3	إختبار حساسية المكورات العنقودية للمضادات الحياتية Antibiotic Susceptibility Test	56
4-2-3	تحديد العوامل المثلى في إنتاج أنزيم مخثر البلازما (Coagulase) من قبل المكورات العنقودية Staphylococci	58
1-4-2-3	الوسط الغذائي Culture medium	58
2-4-2-3	درجة حرارة الحضن Incubation temperature	59
3-4-2-3	الأس الهيدروجيني pH	59
4-4-2-3	زمن الحضانة Incubation time	59
5-4-2-3	نوع الحضانة Incubation kind	59
6-4-2-3	عدد الهزات Shaking number	60
7-4-2-3	نوع البلازما Plasma kind	60
8-4-2-3	تركيز البلازما Plasma concentration	60
9-4-2-3	تأثير إضافة بعض ايونات املاح المعادن Minerals salts ions addition effect	61
5-2-3	التصميم والتحليل الإحصائي	61
الفصل الربع – النتائج والمناقشة		
1-4	العزل Isolation	62
1-1-4	العينات السريرية Clinical sample	62

-

2-1-4	العينات الغذائية Food sample	66
2-4	التشخيص Diagnosis	70
1-2-4	الصفات المجهرية Microscopic Characteristics	70
2-2-4	الصفات الزرعية Cultural Characteristics	70
1-2-2-4	وسط أگار الدم Blood agar base	71
2-2-2-4	وسط أگار المانيتول الملحي Mannitol salt agar	71
3-2-2-4	وسط أگارالبي P agar	71
4-2-2-4	وسط أگار بيرد باركر Baird-Parker agar	72
5-2-2-4	وسط أگار شليفر- كرامر SK Agar	72
3-2-4	الصفات البايوكيميائية Biochemical Characteristics	75
4-2-4	Api staph test	78
3-4	حساسية المكورات العنقودية للمضادات الحيوية	79
4-4	تأثير الظروف المختلفة لإنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من قبل المكورات العنقودية (Staphylococci)	83
1-4-4	تأثير نوع الوسط الغذائي في إنتاج مخثر البلازما Coagulase)	83
2-4-4	تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم مخثر البلازما (Coagulase)	85
3-4-4	تأثير الأس الهيدروجيني في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase)	88
4-4-4	تأثير نوع الحضـــن وعدد الهزات في جهاز الهزار في فعالية انزيم مخثر البلازما (Coagulase)	90
5-4-4	تأثير فترات حضن مختلفة في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase)	92
6-4-4	تأثير نوع البلازما في فعالية انزيم مخثر البلازما (Coagulase)	94
7-4-4	تأثير تركيز البلازما في فعالية انزيم مخثر البلازما (Coagulase)	97
8-4-4	تحديد تأثير أيونات المعادن في فعالية انزيم مخثر البلازما (Coagulase)	98

-

الإستنتاجات والتوصيات		
	الإستنتاجات	102
	التوصيات	103
	المصادر	104
	الملحق (1)	136

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1-2	ارتباط الثرومبين Thrombin مع انزيم مختثر البلازما Staphylocoagulase	27
1-4	نسبة العينات السريرية التي أعطت نمو على الوسط الزرعي	64
2-4	نسبة العينات البكتيرية الموجبة لملون گرام G^+ من العينات السريرية	64
3-4	نسبة المكورات العنقودية في العينات السريرية	65
4-4	نسبة المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مختثر البلازما CPS في العينات السريرية	65
5-4	نسبة العينات الغذائية التي أعطت نمو على الوسط الزرعي	68
6-4	نسبة العينات البكتيرية الموجبة لملون گرام G^+ من العينات الغذائية	68
7-4	نسبة المكورات العنقودية في العينات الغذائية	69
4 -8	نسبة المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مختثر البلازما CPS في العينات الغذائية	69
9-4	نمو المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* على وسط Blood agar	72
10-4	نمو المكورات العنقودية Staphylococci على وسط S.K agar	73
11-4	نمو المكورات العنقودية Staphylococci على وسط P agar	73
12-4	اختبار مختثر البلازما Tube test للمكورات العنقودية Staphylococci	75
13-4	اختبار مختثر البلازما (Slid test) للمكورات العنقودية(Staphylococci)	76
14-4	احتبار الانتشار في الشريحة (Diffusion slide assay) للمكورات العنقودية	76
15-4	الاختبارات التشخيصية التأكيدية لجرثومة *S. aureus* باستعمال نظام Api-Staph	79
16-4	الاختبارات التشخيصية التأكيدية لجرثومة *S. hyicus* باستعمال نظام Api-Staph	80
17-4	اختبار الحساسية للمكورات العنقودية *Staphylococci*	84

-

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنـــــــــوان	الصفحة
1-2	إمراضية بكتريا المكورات العنقودية Staohylococci	13
1-3	المضادات الحياتية المستعملة لاختبار حساسية المكورات العنقودية	57
1- 4	أنواع واعداد العينات السريرية المستخدمة في الدراسة	62
2-4	أنواع واعداد العينات الغذائية المستخدمة في الدراسة	66
3-4	إختلاف أشـكال المسـتعمرات لبكتريا *S.aureus* وبكتريا *S.hyicus* على أوسـاط زرعية مختلفة	74
4-4	نتائـج الإختبـارات الكيوحيويـة والفسـلجيـة المستخدمـة فـي تشخيـص بكتريا *S.aureus* و *S. hyicus*	77
5-4	مقاومة عزلات المكورات العنقودية Staphylococci للمضادات الحيوية	82
6-4	تـأثير نوع الوسـط الغـذائي في إنتـاج مخثر البلازمـا (Coagulase) من عزلات بكتريـا المكورات العنقودية Staphylococci	85
7-4	تـأثير درجـة الحرارة في إنتـاج انزيم مخثر البلازمـا (Coagulase) من عزلات بكتريـا المكورات العنقودية Staphylococci	87
8-4	تـأثير الأس الهيدروجيني في إنتـاج انزيم مخثر البلازمـا (Coagulase) من عزلات بكتريـا المكورات العنقودية Staphylococci	90
9-4	تـأثير نوع الحض وعدد الهزات في إنتـاج انزيم مخثر البلازمـا (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية Staphylococci	92
10-4	تأثير فترات حضـن مختلفة في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية Staphylococci	94
11-4	تـأثير نوع البلازمـا في فعاليـة انزيم مخثر البلازمـا (Coagulase) من المكورات العنقوديـة Staphylococci	96
12-4	تـأثير تركيز البلازمـا في فعاليـة انزيم مخثر البلازمـا (Coagulase) من عزلات بكتريـا المكورات العنقودية Staphylococci	98
13-4	تأثير تركيز ايونـات المعادن في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية Staphylococci	101

-

قائمة المختصرات

المختصر	الإسم الكامل
Api	Analytical Profile Index
α -naphthol	Alpha- naphthol
BHI	Brain Heart Infusion
B.P agar	Baird-Parker Agar
β- hemolysis	Beta- hemolysis
CDM	Chemicaly defined medium
CDS	Central for Disease Control Preventation
CPS	Coagulase Positive Staphylococci
CNS	Coagulase Negative Staphylococci
C.R.D	Completely Randomized Design
Clf B	clumping factor B
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
CO2	Carbon dioxide
DNA	Deoxy ribonucleic acid
(ETs)	Exfoliative toxins
FAME	Fatty acid metabolizing enzyme
hr	hour
HNP	Human Neutrophile Protein
IsdA	Iron regulated surface determinant protein A
KDa	Kilo Dalton
LTA	LipoTeichoic Acid
min	minutes
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
ml	Millilitrees
µg/ml	Microgram per milliliter
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive
µl	Micro litre
µg	Micro gram
MHA	Mueller-Hinton Agar
MSSA	Methicillin Sensitive *S.aureus*
MSA	Mannitol Salt Agar

-

PBS	Phosphate Buffer Saline
PFT	Pore forming toxin
PVL	Panton valentine leukocidin
NETs	Neutrophil extracellular traps
NCCLS	Standard National Committee for Clinical Laboratory
S.aureus	*Staphylococcus aureus*
S. hyicus	*Staphylococcus hyicus*
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B
SEC	Staphylococcal Enterotoxin C
SEE	Staphylococcal Enterotoxin E
SED	Staphylococcal Enterotoxin D
SEG	Staphylococcal Enterotoxin G
SK agar	Schleifer and Krämer agar
spp	Species
TA	Teichoic Acid
TNF	Tumor necrosis factor
TSST-1	Toxic shock syndrome toxin-1
TSB	Trypticase Soya Broth
VP	Voges Proskauer
Wall TA	Wall teichoic acid

الفصـــل الأول

المقدمـة

Introduction

تعد بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci) من أهم الممرضات الشائعة التي تصيب الإنسان إذ تستوطن حوالي 20% من السكان وفي أماكن مختلفة من الجسم تشمل الجلد ، القناة التنفسية العليا والقناة المعدية وتسبب مشاكل صحية كبيرة ومتزايدة في كل أنحاء العالم حيث تشكل إمراضية المكورات العنقودية أكثر من 80% من الأمراض القيحية (Suppurative disease) المسجلة في المراكز الطبية كذلك تسببها بالعديد من الأخماج المرتبطة بالمستشفيات (Nosocomial infection) خاصة في وحدات العناية المركزة ووحدات الحروق (Shittu *et al*., 2012) وتعد بكتريا *S.aureus* أكثر الأنواع التابعة لجنس المكورات العنقودية أهمية من الناحية السريرية نظراً لما تسببه من إصابات قيحية سواء أكانت سطحية أو عميقة وتسبب مدى واسع من الأخماج ومنها الأخماج الجهازية وهي أخماج تسبب حالات مهددة للحياة (Life threating) مثل التهاب شغاف القلب (Endocarditis) والتهاب نخاع العظم (Osteomyelitis) وذات الرئة (Pneumonia) وخراج الدماغ (Brain abscesses) وذات السحايا (Meningitis) وتجرثم الدم (Bacteremia) عند توفر الظروف الملائمة لها مثل وجود إنخفاض في آليات الدفاع المناعية للجسم ، إصابة الجلد كالحروق والجروح ، والإصابة بكائنات مرضية أخرى كالفايروسات أو وجود أمراض مزمنة كالسرطانات (Mahfouz *et al*.,2010)

وتعد بكتريا *S.hyicus* ذات أهمية من الناحية السريرية والناحية الاقتصادية نظراً لما تسببه من أخماج كإلتهاب البشرة العرقي (Exudative epidermitis) في الخنازير والذي يسمى Greasy disease كما تم عزل البكتريا من الأبقار المصابة بالتهاب الثدي Mastitis من لحومها وألبانها وتم عزلها من الخيول ومن الدجاج ومن أسطح البيض والعديد من الماشية وتم عزل هذه البكتريا أيضاً من التجويف الفمي للإنسان (Human oral cavity) وكذلك من حالات التعفن (Sepsis) وفي الأشخاص المعتلين مناعياً (Park *et al*.,2013) 0

وتعود أسباب مشاركة المكورات العنقودية في العديد من الأخماج إلى امتلاكها عدداً من عوامل الضراوة التي تمكنها من اختراق حواجز الجسم الطبيعية وقوى الدفاع المناعية والإنتشار الى أنسجة

الجسم الأخرى متمثلة بعوامل الإلتصاق (Adherence factor) مثل بروتينات سطحية خلوية (Cellular surface protein) وتقوم المكورات العنقودية بإنتاج مجموعة من البروتينات الخارجية كالسم القاتل لخلايا الدم البيض (Leukocidin) والسم القاتل لخلايا الدم البيض بانتون فلانتين (Panton Valentin Leukocidin , PVL) (Sangvik *et al.*,2012) فضلاً عن إفرازها للأنزيمات كأنزيم مخثر البلازما (Coagulase) والذي يعتبر مقياساً مهماً في المختبرات المايكربايولوجية لتشخيص بكتريا *S.aureus* ويظهر طبيعة بايوكيميائية وفسلجية فريدة والتي تمكن البكتريا من تكوين Pseudocapsule والذي يحفز الإمراضية وتكوين الخراجات (Abscess) والتعفن (Sepsis) والتهاب الشغاف القلبي (Endocarditis) الذي لوحظ في الحيوانات المختبرية (Said,2010) واعتماداً على إفراز هذا الانزيم تم تقسيم المكورات العنقودية الى المكورات العنقودية المنتجة لهذا الانزيم (Coagulase Positive Staphylococci) والمكورات العنقودية غير المنتجة لهذا الانزيم (Coagulase Negative Staphylococci) حيث جاءت هذه الدراسة لتحقيق الأهداف التالية :-

1- عزل وتشخيص المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci) من مصادر سريرية وغذائية مختلفة0
2- دراسة مقاومة العزلات الجرثومية الموجبة لأنزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci) للمضادات الحيوية0
3- دراسة الظروف المختلفة لإنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من قبل المكورات العنقودية الموجبة للأنزيم (Coagulase Positive Staphylococci)0

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Review of Literature

1-2 نبذة تاريخية عن المكورات العنقودية Historical overview of Staphylococci

تعد المكورات العنقودية Staphylococci من أكثر الجراثيم انتشاراً في الطبيعة إذ توجد على الجلد (Skin) ، الأغشية المخاطية (Mucous membrane) والقناة التنفسية العليا (Upper Respiratory Tract) وكذلك في الهواء، التربة ومياه البحار وكذلك توجد في المنتجات الحيوانية كاللحوم والحليب والأجبان ، إذ تشكل هذه الجراثيم جزءاً من الفلورا الطبيعية وهذه الجراثيم مقاومة لمختلف الظروف البيئية (Vasconceloes & Cunha ,2010) 0

عرفت المكورات العنقودية Staphylococci عام 1883 من قبل العالم Ogston وهي من مجموعة المكيرات (Micrococci) المسببة للخمج والتقيح (Infection & Suppuration) وكان هو الأول في تمييز نوعين من المكورات التقيحية (Pyogenic cocci) إحداهما تترتب في مجاميع أو تكتلات تسمى Staphylococci والأخرى تترتب بشكل سلاسل وتسمى Billroths Streptococci (Götz *et al*., 2006) ، وفي عام 1884 قام العالم Rosenbach بوصف هذه البكتريا حسب لون المستعمرات حيث إفترض تسمية معينة وهي *Staphylococcu aureus* للبكتريا التي تكون مستعمراتها صفراء ذهبية اللون وكذلك سمى تلك التي تكون مستعمراتها بيضاء *Staphylococcus albus* وهذا الأخير يسمى *Staphylococcus epidermidis* 0وفي عام 1886 فصل الجنس *Staphylococcus*عن الجنس *Micrococcus* من قبل العالم Flugge حيث تم فصلهما بالإعتماد على الإختلاف في فعالية تسييل الجيلاتين (Gelatin Liquification) كذلك العلاقة بالمضيف حيث أن *Staphylococcus* تسيل الجيلاتين وتكون إما ممرضة (Pathogenic) أو طفيلية (Parasite) أو كلاهما ، أما *Micrococcus* تكون متغايرة في إسالة الجيلاتين وتكون رمية (Saprophyte) 0 (Siegrist,2014)

كذلك عام 1955 قام العالم Evausel بفصل الجنس *Staphylococcus* عن الجنس *Micrococcus* بالإعتماد على علاقتها بالأوكسجين حيث أن المكورات اللاهوائية الإختيارية (Facultative anaerobic cocci) وضعت في جنس المكورات العنقودية (Staphylococci) والإجبارية الهوائية (Obligate aerobic) وضعت في جنس المكيرات (Micrococci) 0 (Götz *et al*., 2006)

في عام 1960 كان هناك فصل واضح بين الجنسين بالإعتماد على مكونات قواعد DNA حيث أن Staphylococci تحتوي على نسبة (33-40) % من DNA G+C في حين أن جنس Micrococci يحتوي على نسبة (70) % من DNA G+C (Prax *et al*., 2013) 0

قام العلماء Baird-Parker عام 1963 بتصميم طريقة للتمييز بين الجنسين *Staphylococcus* و *Micrococcus* بإستخدام الإختبارات الفسلجية والبايوكيميائية (Physiological & biochemical tests) كإنتاج الحامض من الكلوكوز تحت الظروف اللاهوائية كما هو الحال في جنس *Staphylococcus* خلافاً لما هو في جنس *Micrococcus* (Taponen & Pyorala , 2009) 0 لحد عام 1970 الجنس Staphylococci يتكون من ثلاثة أنواع *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus saprophyticus* و *Staphylococcus epidermidis* ولكن إعتماداً على الصفات الوراثية (Genetic characteristic) وكذلك التصنيف الكيميائي (Chemotaxonomy) ظهرت هنالك أنواع جديدة (Zecconi *et al*.,2006) 0

عام 1975 قدم Kloos–Schleifer مخططاً بسيطاً لتعريف هذا الجنس والذي أعتمد على 13 فحص تشخيصي مثل فعالية انزيم مخثر البلازما (Coagulase activity) ، التحلل (Hemolysis) ، إختزال النترات (Nitrate reduction) وتخمر السكريات مثل (Maltose , Ribose , Xylose , Fructose) 0(Spergser *et al*.,2003)

قسم جنس المكورات Staphylococci حديثاً على قسمين رئيسين هما المكورات العنقودية غيرالمنتجة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Negative Staphylococci) والمكورات العنقودية المنتجة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci) إعتماداً على إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase enzyme) والذي يسبب تجلط بلازما الدم إلى خثرة (Clot)0

إن المكـورات العنقوديـة الموجبـة لأنـزيم مختـر البلازمـا (Coagulase) تضـم سـتة أنـواع وباقي الأنواع هي مكورات عنقوديـــة سـالبة لأنـزيم مختـر البلازمــــا مثـل *S. saprophyticus* ، *S. haemolyticus, S.Iugdunensis* أما حالياً فإن جنس المكـورات العنقوديـة Staphylococci يحتوي على47 نوع (Species) و24 تحت نوع (Sub species) مثلما جاء في قائمة بدائية النواة في (2012) وفقاً لما ذكر(Jaradat *et al*.,2013) 0

المفتاح التصنيفـــي لجنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* كما ورد في (William *et al*., 2009)

Domain	Bacteria
Kingdom	Eubacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Coccus
Order	Bacillales
Family	Staphylococcaceae
Genus	*Staphylococcus*

2-2 جنس المكورات العنقودية *Staphylococcus*

المكـــــورات العنقوديـــــة *Staphylococcus* هــــي جــــراثيم تتميــــز بشـــــكلها الكـروي (Spherical) المنتظـم ويتـراوح قطـرها بـين µm (0.5-1.5) ، موجبـة لملـون گـرام (Gram Positive) تنقسم خلاياها إلى أكثر من مستوى لتعطي أشكالاً ثنائيـة أو رباعيـة أو قد تكـون على هيئـة تجمعـات عنقوديـة غيـر منتظمـة (Irreqular grape – like cluster) ومـن هنـا جـاءت تسميتها بـالمكورات العنقوديـة 0 وهـي غيـر متحركـة (Non-motile) ، غيـر مكونــــــة للسـبورات (Non-sporulating) وغيرمكونــــــة للكبسولـــــــة (Non - capsulated) عدا بعض الأنـــواع (Plata *et al*.,2009) وهي نشطة أيضياً ولها القدرة على النمو على أوسـاط زرعيـة متنوعـة مسـتغلة الكاربوهيـدرات والأحمـاض الأمينيـة كمصـدر للكـاربون والطاقـة وعنـد مـدى حـراري واسـع يتراوح بـين (10-40) درجـة مئويـة ورقـم هيـدروجيني يتـراوح بـين (9.4 – 4.8) وتنمـو فـي أوسـاط تحتوي على 010% Nacl

مستعمراتها دائرية (Circularity) ، محدبة (Convex) ومعتمة (Opaque) قطرها mm (2-3) لها ألوان مختلفة صفراء ذهبية (Yellow gold) أو بيضاء (White) أو ذات تحبب كريمي أو طبقة لامعة سوداء (Shiny black) مع سطح أبيض دقيق ومحاطة بهالة شفافة (أبويونس وأخرون،2012) 0وتكون هذه البكتريا لاهوائية إختيارية (Facultative anaerobic) موجبة لفحص الكتاليز (Catalase-positive) وسالبة لفحص الأوكسيديز (Oxidase-negative) وتتميز بكون تغذيتها كيميائية عضوية (Chemoorgaotrophs) ولها أيض تخميري (Fermentative) أيضاً وتقوم بعض أنواع المكورات العنقودية بإفراز انزيم مخثر البلازما (Coagulase) والذي يقوم بتحويل مولد الليفين (Fibrinogen) إلى خثرة الليفين (Fibrin) وتصنف المكورات الى العنقودية تبعاً لإنتاج هذا الانزيم إلى المكورات العنقودية المنتجة لانزيم مخثر البلازما (CPS) والمكورات العنقودية الغير منتجة لهذا الانزيم (CNS) 0(Adnan *et al*.,2014)

المكورات العنقودية جراثيم واسعة الإنتشار في الطبيعة إذ توجد عموماً على الجلد والأغشية المخاطية حيث أن كثافة المكورات العنقودية تصل إلى $cell / cm^2$ ($10^3 – 10^6$) في المناطق الرطبة مثل مناطق الأبط (Axillae areas) والفتحات الأنفية (Anterior nares) وكذلك تنخفض في المناطق الجافة كالجلد (Skin) لتصل إلى $cell / cm^2$ ($10^1 – 10^3$) وعزلت الجراثيم من المنتجات الحيوانية كاللحوم والحليب والأجبان ومصادرأخرى كالتربة والرمال ومياه البحار والهواء0 هذه البكتريا مقاومة لمختلف الظروف البيئية حيث بإمكانها تحمل الحرارة (Heat) ، الجفاف (Dryness) والتجفيف (Dehydration) حيث تنمو جيداً في الضغط الأزموزي العالي (Higher Osmotic pressure) والرطوبة القليلة (Low moisture) وهذا يفسرنموها في الإفرازات الأنفية في العديد من الأصحاء (Adnan *et al*.,2014)0

إن تكوين الصبغة (Pigmentation) للمستعمرات النامية على الأوساط الزرعية يظهر بعد (24) ساعة عندما تنمو بدرجة حرارة الغرفة (25-20) درجة مئوية أو نموها في وسط إغنائي (Enrichment media) حيث أن سبب تكون هذه الصبغات هو مادة الستافيلوزانثين Staphyloxanthin وتعمل كعوامل ضراوة بفعل عملها المضاد للأكسدة والذي يساعد المايكروب لتجنب القتل بواسطة أنواع جذورالأوكسجين الفعالة («ROS» Reactive oxygen species) الموجودة ضمن مكونات الجهاز المناعي للمضيف (Desouky *et al* .,2014)0

2-2 -1 المكورات العنقودية السالبة لانزيم مختثر البلازما (Coagulase Negative Staphylococci)

يشمل المكورات العنقودية السالبة لانزيم مختثر البلازما غالبية الأنواع التابعة لهذ الجنس حيث تعتبر جزءاً من الفلورا الطبيعية (Normal flora) الموجودة على الجلد والاغشية المخاطية وعادة لا تسبب أمراض وتكون هذه الأحياء تعايشية (Commensals) أو رمية (Saprophytic) ولكن في حالة تدمر الجلد بواسطة الجرح (Trauma) أوالأبر(Needle) يمكن لهذه الأحياء أن تدخل الأجهزة الداخلية للمضيف (Kloos & Bannerman ,1994) 0

وصفت هذه البكتريا عام 1884 من قبل العالم Rosenbach وسميت *Staphylococcus albus* واعتبرت غير ضارية وفي عام 1958 نشر أول تقريرعن إمراضية البكتريا ووصفت بأنها مرضية0 في عام 1970 قسمت إلى نوعين أحدهما Novobiocin resistant staphylococci مثل بكتريا *S.xylosus* والآخر Novobiocin susceptible staphylococci مثل بكتريا *S.hominis* 0 (Hirotaki *et al.*,2011)

سجل 15 نوع من هذه البكتريا عام 1985 ولكن العدد بدأ بالتزايد وخاصة الأنواع التي تصيب الحيوانات والتي أكتشفت في السنوات الأخيرة وحالياً هنالك أكثرمن 40 نوع من هذه البكتريا علماً إن الأختلاف بين أنواع هذه البكتريا يعتمد على الشكل المظهري والخصائص البايوكيميائية 0(Thorberg *et al.*,2009)

إن سبب قلة الاشارة لهذه البكتريا في البحوث ربما يعود إلى عدم اهتمام الباحثين لعزلات المكورات العنقودية غير المنتجة لأنزيم مختثر البلازما (CNS) إذ كانت تعد ملوثة للعينات ولو ظهرت في الأوساط الزرعية بصورة نقية ولا تسجل على أنها السبب في إحداث المرض وعلى الرغم من أن هذه الجراثيم تفتقر إلى عوامل الضراوة الكاملة الموجودة في المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مختثر البلازما (CPS) مثل *S.aureus* لكن بعض الأنواع لديها عوامل التصاق (Adherence factor) مثل Fibrinogen binding protein (FBP) وأيضا تقوم بإفراز بعض السموم مثل Staphylococcal – Enterotoxin C (SEC) وأيضاً تمتلك بعض هذه الأنواع انزيمات أو سموم مثل Licithinase ، Lipase ، Hemolysin و Fibrinolysin كما أنها تستطيع أن تنتج بعض المواد اللزجة وتنتج المحفظة (Capsule) التي لها علاقة وثيقة بالأمراضية 0 (Al-Jumaily *et al.*,2014)

2-2 -2 المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci)

تعد البكتريا الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) أكثر ضراوة من البكتريا السالبة لانزيم مخثر البلازما (CNS) وذلك لقدرة خلاياها على تغطية أجسامها أو تجمعاتها بالفايبرين (Fibrin) والذي يحميها من الإلتهام الخلوي (Phagocytosis) حيث أن هذه البكتريا تنتج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) بنوعيه المرتبط (Bound) والحر (Free) وهو خلافاً لما موجود في البكتريا السالبة لانزيم مخثر البلازما (CNS)0

وفي محاولة للعزل في خطوة واحدة فقد أستخدم وسط Mannitol salt agar (MSA) في عام 1945 للعزل الإنتقائي للمكورات العنقودية المرضية في المختبرات إذ أن النمو وتكوين المستعمرات الصفراء نتيجة للمحتوي العالي من الملح وتخمير المانتول تعتبر دلائل إفتراضية في تشخيص البكتريا الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) ومنها المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) عن البكتريا السالبة لانزيم مخثر البلازما (CNS) مع أن هنالك بعض البحوث تشير بأن بعض انواع (CNS) يمكن أن تنمو مستعمراتها على هذا الوسط 0 (Petit *et al*.,1997) & (Dezfulian e*t al*.,2011)

إن البكتريا الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) تعرف بالمكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) إذ تعد هذه البكتريا النوع الوحيد الذي أكتشف سابقاً من جنس المكورات العنقودية ذات الأهمية السريرية والتي تكون موجبة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase) ومع ذلك فإن هنالك سلالات نادرة من هذا النوع تكون سالبة لهذا الانزيم ، لذا فقد حضيت هذه الجرثومة بإهتمام الباحثين في جميع أنحاء العالم لأهميتها المرضية للإنسان وإنتشارها الواسع في الطبيعة (Anstead *et al*., 2014) ، حيث تعتبر من الممرضات المهمة والتي تكون مسؤولة عن 80% من الأخماج القيحية (Pyogenic infection) والمسبب الثاني في الخمج داخل المستشفيات (Nosocomial infection) وذلك لمقاومتها العديد من المضادات الحيوية علماً أن هنالك ستة أنواع أخرى تكون أيضاً موجبة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase) وهي (*S.delphini* , *S.intermedius* , *S.pseudintermedius* , *S.lutrae* , *S.schleiferi supsp. Coagulans* , *S.hyicus*) (Baele *et al*.,2001)0

على الرغم من أن المكـورات العنقوديـة الذهبيـة *Staphylococcus aureus* تشكل جزءاً من الفلورا الطبيعية (Normal flora) المتواجدة في أجزاء مختلفة من الجسم مثل الجلد والمجاري التنفسية إلا أنهـا تعتبـر مـن أكثـر الأنـواع التابعـة لجـنس المكـورات العنقوديـة أهميـة نظـراً لمـا تسـببه مـن مدى واسع من الإصابات (Infection) نتيجة لعوامل الضراوة المختلفة التي تنتجها كالإصـابات الجهازيـة مثل التهاب الشغاف القلبي (Endocarditis) وكذلك تسبب إصـابات قيحيـة مختلفـة سـواء كانـت سـطحية أوعميقة فضلاً عن الإلتهابات المعوية الحادة (Pelisser *et al.*,2009)0

فـي عـام 2007 توصـلت البحـوث التـي أجريـت فـي مركـز الوقايـة والسـيطرة فـي الولايات المتحدة («CDC» Center for Disease Control & Prevention) إن هـذه الجـراثيم هـي المسـبب الرئيسـي للإصـابات القاتلـة أو الخطيـرة فـي الولايـات المتحـدة (U.S) وتعتبـر أيضاً هـذه الجراثيم أحـد مسببات التسمم الغذائـي الحـاد (Acute food poisoning) وذلـك لإنتاجهـا السم الثابت حرارياً (Heat stable enterotoxin) حيث تقوم بإنتاج خمسة أنـوع مـن هـذه السـم المعـوي وهي SEA, SEB, SEC, SED & SEF والتي تكون مسؤولة عن 95% من التسـمم الغـذائي بواسـطة هذه البكتريا (Shall & McBryde ,2014) 0

تعد جرثومة *S.aureus* ذات تحمل عالٍ للظروف البيئية المختلفة إذ بإمكانها البقاء في الهواء لفتـرة أيام إلى أسابيع ، كما أنها تستطيع البقاء حية فـي القيح الجـاف وتتحمـل الحـرارة العاليـة والتـي تصـل الـى 60 م° لمدة 30 دقيقة ، إلا أنها تموت عند زيادة الوقت إلى 60 دقيقة (Vidya *et al.*,2005)0

تتصـف مسـتعمرات هـذه الجـراثيم الناميـة علـى الأوسـاط الصـلبة بكونهـا دائريـة بقطـر mm (1-4) ، معتمة (Opaque) ، ملساء (Smooth) ومرتفعة قليلاً ، وهي ذات لـون أصـفر ذهبـي (Golden yellow) لتكوينهـا الصبغـة الذهبيـةعند حضـنها فـي درجـة حـرارة 37 م لمـدة (24–48) سـاعة وتكـون الصـبغة أكثـر وضـوحاً عنـد تـرك النمـو البكتيـري فـي درجة حرارة الغرفة ولمدة (24–28) ساعة ولكنها لا تكـون هـذه الصـبغة فـي الظـروف اللاهوائيـة أوعنـد النمو فـي الأوساط السائلـة (Monte *et al.*,2014) ولجراثيم العنقوديات الذهبية القدرة علـى النمـو فـي مـدى حـراري واسـع يتـراوح بـين (60-37) م° ، غيـر أن درجـة الحـرارة المثلـى لهـا هـي 37 م وأنها تنمو في مدى واسع من الأس الهيدروجيني يتراوح بين (9.4 – 4.8) ويعتبرالأس الهيـدروجيني 7.5 هو الأمثل لنموها0

Staphylococcus hyicus 1-2-2-2

وهي جزء من الفلورا التعايشية (Commensal flora) الموجودة على الجلد والأغشية المخاطية لبعض الحيوانات حيث في بداية إكتشافها وصفت كـ *Micrococcus hyicus* ولكن عام 1965 نقلت إلى جنس المكورات العنقودية Staphylococci كتحت نوع (Supspecies) وأخيراً عام 1978 وضعت كنوع جديد ومستقل سميت *S.hyicus* من قبل Devriese (Yogananth *et al.*,2014)0

تعد بكتريا *S.hyicus* المسبب الرئيس لألتهاب البشرة (Exudative epidermitis) في الخنازير والذي يسمى Greasy disease كما تم عزل البكتريا من الأبقار المصابة بإلتهاب الثدي (Mastitis) من لحومها وألبانها وتم عزلها أيضاً من الخيول والدجاج ومن أسطح البيض والعديد من الماشية لذا يمكن ان تسبب هذه البكتريا عدداً من الأمراض المهمة إقتصادياً وذلك لإصابتها العديد من الحيوانات حيث تسبب التهاب الجلد في الابقار الخيول والخنازير والقطط كداء القوباء (Imptigo) وتسبب أيضاً التهاب المفاصل (Arthritis) والتهاب الرحم (Metritis) لهذه الحيوانات (Aarestrup & Jensen, 2002)0

كذلك عزلت هذه البكتريا من التجويف الفمي للإنسان (Human oral cavity) وكذلك من حالات التعفن (Sepsis) في الأشخاص المعتلين (Immunocompromised) وتم عزلها من إلتهاب النسيج الخلوي (Cellulitis) ومن إصابات الجروح في الأنسان بعد تعرضه للعض من بعض الحيوانات (Park *et al.*,2013)0

تظهر هذه البكتريا عدداً من عوامل الضراوة كالـ Protein A ، Lipase وEnterotoxin والذي يشابه ذلك الذي يفرز من قبل *S.aureus* وتفرز هذه البكتريا Exofoliation – inducing exotoxin والذي يعمل كمقصات (Scissors) يسبب فقدان التصاق الخلايا مع بعضها في الطبقة المتقرنة (Keratinocyte cell – cell adhesion) ومنه ExhA , ExhB , ExhC & ExhD (Victor *et al.*,2013) 0

تقوم هذه البكتريا بإنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) لذا فإن هذه البكتريا تشبه بكتريا المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) في إفرازها لهذا الانزيم وتشبه المكورات العنقودية السالبة لانزيم مخثر البلازما (CNS) بمستعمراتها البيضاء غيرالمخمرة للمانيتول على وسط Mannitol salt agar وغير المحللة للدم (Nonheamolytic) على وسط Blood agar والغير محببة أيضاً (Casanova *et al.*, 2011)0

3-2 الإمراضية (Pathogencity)

تعد المكورات العنقودية (Staphylococci) من الممرضات المهمة المسؤولة عن العديد من الأمراض في الأنسان حيث تسبب هذه البكتريا طيف واسع من الإصابات من البسيط والشديد إلى القاتل ، حيث تتمكن هذه البكتريا في إحداث الضررللمضيف من خلال آليات معينة كالإلتصاق بأنسجة المضيف والتضاعف والإنتشار بصورة كبيرة في أنسجة المضيف محدثة الضرر فيه أو تجنب الأنظمة الدفاعية للمضيف وإفراز مواد إلى خارج الخلية البكتيرية وكذلك فإن خطورة الإصابة ببكتريا المكورات العنقودية تكمن في صعوبة إيجاد العلاج المناسب لها بسبب مقاومتها المتعددة لأغلب المضادات الحيوية ، حيث أن بعض المكورات العنقودية تستعمر بعض مناطق الجسم مثل الأبط (Axillaries) ، البلعوم (Pharynx) وسطح الجلد المتضرر في حالات الجروح والحروق وكذلك بإمكانها أن تلوث ملابس الفريق الطبي وأدوات المعالجة والجراحة حيث أن هنالك بعض الصفات تساهم في إمراضية البكتريا كنموها تحت الضغط الأزموزي العالي والرطوبة القليلة (Weidenmaier,2004)0

تشكل أمراض المكورات العنقودية أكثر من 80% من الأمراض القيحية المسجلة في المراكز الطبية إذ تسبب بكتريا المكورات العنقودية العديد من الأمراض للإنسان في المستشفيات0فمنذ أن أصبحت سلالاتها ذات مقاومة مرتفعه لعدة مجاميع من المضادات الحيوية أصبح هنالك تزايد في معدل الإمراضية والوفيات في كل أنحاء العالم وذلك يعود لقدرتها على إحداث إصابات إنتهازية (Opportunistic infections) خطرة وقاتلة عند المرضى الراقدين وخصوصاً في وحدات العناية المركزة 0إذ تحدث هذه البكتريا الأمراض في المرضى الراقدين في المستشفيات الذين يعانون ضعفاً في ميكانيكيات دفاعات الجسم الطبيعية حيث أزدادت في السنوات الأخيرة وبشكل مثير الأخماج المرتبطة بالمستشفيات والتي تسببها المكورات العنقودية المقاومة للمضادات الحيوية حيث أن هنالك سلالات تظهر مقاومة لأكثر من 20 مركب مضاد للجراثيم ومن ضمنها المطهرات (Antiseptic) (Sulieman & Allaahmed ,2012) 0

تعود إمراضية المكورات العنقودية لإمتلاكها العديد من عوامل الضراوة (Bien *et al* ,2012) والتي تشمل :-

1- Surface protein والذي يحفز إستعمار خلايا المضيف0

2- Invasin والذي يحفزإنتشار البكتريا في خلايا المضيف0

3- Surface factor والذي يثبط عملية البلعمة للبكتريا0

4- Membrane – damaging toxin والذي يقوم بحل غشاء كريات الدم البيضاء0

5- Exotoxin والذي يدمر خلايا المضيف0

تسبب بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci) العديد من الأمراض وخاصة الأخماج المكتسبة في المستشفيات (Hospital – acquried infection) والتي تتضمن تجرثم الدم (Bacterimia) وإصابات الأماكن الجراحية (Surgical site infection) إذ تسبب مدى واسع من الأمراض كالإلتهابات السطحية (Superficial infections) مثل البثرات الجلدية (Skin pustules) ،القرحة (Boil) ، الجمرة (Carbuncle) ، داء القوباء المعدي (Impetigo) ، إلتهاب ملتحمة العين (Conjunctivitis) فضلاً عن أخماج جروح العمليات (Surgical infections) وأخماج الحروق (Burn infections) وإلتهاب اللوزتين (Tonsillitis) والبلعوم (Pharyngitis) والحنجرة (Laryngitis) وإلتهاب الأوعية اللمفية (Lymphangitis) (Proctor *et al*.,2006) 0

كذلك تسبب هذه البكتريا التسمم الغذائي وعلى الرغم من أن التسمم بهذه البكتريا يكون قليل إلا أنه قد يسبب الوفاة في الأطفال وكذلك المرضى المعتلين مناعيا (Immunocompromised) وأيضاً قد تصيب هذه البكتريا الحيوانات وتسبب لها أمراض خطيرة مثل أمراض المفاصل القيحية (Suppurative disease Atthritis) ، والتهاب الضرع (Mastitis) والتهاب المجاري البولية (Urinary tract infection) إذ تعد من الأمراض المهمة إقتصادياً حيث تؤثر على القدرة الانتاجية للثروة الحيوانية حيث نلاحظ في الولايات المتحدة أنها أدت في عام 1982 إلى خسارة مادية قدرت بـ 1.5 مليون دولار (Lessa *et al*.,2012) والجدول (1-1) يضم بعض أنواع الأمراض التي تسببها هذه البكتريا 0

جدول (2-1) إمراضية المكورات العنقودية Staphylococci

ت	النوع البكتري	الإصابـــــــة
-1	*S.aureus*	إصابة الجلد والأنسجة الرخوة Skin & soft tissue infections ، إصابات الجروح Wound infections ، الجمرة Carbuncles ، إلتهاب الظفر Paronychia، الدمامل Furuncles ، داء القوباء المعدي Impetigo ، إلتهاب النسيج الخلوي Cellulitis ، إلتهاب الشغاف القلبي Endocarditis ، إلتهاب الجهاز العصبي Central nervous system، خراجات الدماغ Brain abscess، السحايا Meningitis ، ذات الرئة Pneumonia إلتهاب الأذن الوسطى Otitis media ، التهاب العظمOsteomyelitis ، التهاب الاربطة Joints infection و التسمم الغذائي Food poisoning0 .
-2	*S.epidermids*	إلتهاب المثانة Cystitis ، إلتهاب الشغاف القلبي Endocarditis ، السحايا Osteomyelitis، إلتهاب العظام Osteomyelitis وإلتهاب المناطق الجراحية Surgical site infections 0
-3	*S.saprophyticus*	إلتهاب الجهاز البوليUrinary tract infections
-4	*S.lugdunensis*	إلتهاب الأربطة Joints infection ، إلتهاب الشغاف القلبي Endocarditis ، التعفن Sepsis ، إلتهاب العظام Osteomyelitis وإلتهاب المناطق الجراحية Surgical site infections
-5	*S.haemolyticus*	التعفن في المواليد الجدد ,Sepsis in neonates الإنسداد الرئوي Neonate pulmonary embolism
-6	*S.warneri*	إلتهاب الشغاف القلبي Endocarditis ، إلتهاب الجهاز العصبي Central nervous system والسحايا Osteomyelitis
-7	*S.hominis*	إلتهاب الشغاف القلبي Endocarditis ، إلتهاب العضلة Pyomyositis إلتهاب المفصل الحرقفي Sacroliitis والإعتلال الفقاري Spondylodiscitis
-8	*S.intermedius*	إلتهاب الشغاف القلبي Endocarditis وخراجات الدماغ Brain abscess
-9	*S.capitis*	إلتهاب الشغاف القلبيEndocarditis والتعفنsepsis
-10	*S.pettenkoferi*	إلتهاب العظم Osteomyelitis

4-2 عوامل الضراوة في بكتريا المكورات العنقودية (Virulence factors of Staphylococci)

عوامل الضراوة (Virulance factor) هي جزيئات متواجدة أو تفرز من قبل البكتريا تلعب أدواراً مهمة ومتعددة في الإصابة والإمراضية كإستيطان وإستعمار خلايا المضيف والإلتصاق إلى الخلايا وغزوالجهاز المناعي للمضيف وكذلك تثبيط الإستجابة المناعية للمضيف إذ أن هنالك عدد من عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا المكورات العنقودية والتي تؤدي دوراً مهماً في إمراضيتها (Jekle *et al.*,2013) وهذه العوامل هي :-

1-4-2 عوامل الألتصاقِ Adherence factors (Adhesion)

تبدأ عملية إستيطان (Colonization) خلايا المضيف بإلتصاق البكتريا على سطح تلك الخلايا بواسطة العديد من العوامل حيث أن هذه العوامل توفر المغذيات (Nutrients) المتطلبة لبقاء البكتريا مثل الحديد (Iron) وكذلك حماية البكتريا ضد الجهاز المناعي للمضيف والتي تشمل :-

1-1-4-2 البروتينات السطحية الخلوية (Cellular Surface Proteins)

ويطلق عليها المكونات السطحية المايكروبية المميزة لجزيئات قالب الإلتصاق (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (MSCRAMMs) ، إن عامل التكتل B (Clumping factor B «CIfB») والمحدد السطحي البروتيني المنظم للحديد (Iron regulated surface determinant protein A «IsdA») والبروتين السطحي (SasG) المتواجدين على سطح الخلية البكتيرية يحفزان الإلتصاق بالخلايا الطلائية ومن ثم إستعمارها من قبل الخلايا البكتيرية وإن كلا العاملين (CIfB) و(IsdA) يرتبطان بالبروتينات المتواجدة في الغلاف (Envelope) للخلايا الطلائية المخاطية (O'Brien *et al.*,2002) 0 إذ أن عامل التكتل B (Cell clumping) يحفز أيضاً تجمع الصفائح الدموية (Platelet aggregation) ويدعم الإرتباط بالخلايا الطلائية الحرشفية (Squamous epithelial cells) والخلايا التقرنية (Keratinocytes) إضافة لذلك هنالك بعض البروتينات كالبروتين الخلوي الخارجي (140 kD Extra – cellular protein) وبروتين الـ Autolysin الذي وصف عام (2006) والمسؤول أيضاً عن عملية الإلتصاق في مختلف السطوح (Hussain *et al.*,1997) .

2-1-4-2 بروتين أ (Protein A)

هو بروتين سطحي مضاد لعملية البلعمة (Antiphagocytic protein) وزنه الجزيئي (40) KDa ويكون 80% منه مطموراً تساهمياً في طبقة الببتيدوگلايكان للجدار الخلوي للخلية البكتيرية و10% منه في سايتوبلازم البكتيريا يعرف بمشاركته بإمراضية بكتريا *S. aureus* بالتداخل مع الإستجابة المناعية (Immune responses) ويلعب دور مهم في الألتصاق (Adhesion) ببروتينات المضيف ويخوض أول خطوة في الإصابة وتحفيز الألتهاب (Inflammation) (Foster,2005)0

تم توضيح دور هذا البروتين في الإمراضية من قبل الباحث Dasseh عام 1965 إذ يقوم هذا البروتين بتنشيط تجمع الصفائح الدموية (Platelet aggregation) ويقوم أيضاً بالإرتباط مع Complement protein (C3) وكذلك يرتبط مع عامل التنخر الورمي- ألفا (Tumor necrosis factor (TNF) - α) ويقوم أيضا بتثبيط عملية الإلتهام الخلوي (Phagocytosis) وكذلك إختزال الإشارات الإلتهابية المستبقة من قبل عاما التنخر الورمي- الفا (Baum *et al.*,2009)0

2-1-4-3 الأهداب (Pili)

هي تراكيب بروتينية تتواجد على أسطح العديد من البكتريا إذ يتركب الهدب من ثلاث وحيدات بروتينية وهي PiLA ، PiLB و PiLC وتعتبر الوحيدة البروتينية PiLB المكون الأساس لهذا التركيب في حين أن الوحيدة البروتينية PiLA تكون ذات أهمية كونها تتوسط عملية الإلتصاق أما الوحيدة البروتينية PiLC فتعتبر بروتيناً مساعداً يشارك في تركيب العمود الفقري لهذه الأهداب (Konto *et al.*,2009)0

وصفت الأهداب عام 1968 من قبل Yanagawa في البكتريا الموجبة لصبغة گرام حيث تم وصف نوعين من الأهداب أحدهما Pili والتي تكون مرنة وعصوية والأخرى هي Fimbriae والتي تكون أطول من Pili ومن وظائفها أنها تساعد البكتريا على إستيطان النسيج وسطوح أخرى وتجعلها أكثر مقاومة لدفاعات المضيف (Hendrickx *et al.*,2008)0

2-4-2 المحفظة (Capsule)

إن تكوين المحفظة من قبل بعض أنواع المكورات العنقودية (Staphylococci) وصف لأول مرة من قبل العالم Gilbert عام 1931 حيث أن اكثر من 90% من المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* تكون عديد السكريات المحفظي (Capsular polysaccharide) والتي تكون مسؤولة عن حماية البكتريا من الخلايا متعددة أشكال النوى (Polymorphonuclear cell) وكذلك تثبط فعالية خلايا وحيدة النواة (Mononuclear cell) (Masoudhaghkhah,2003)0

إن التجارب التي أجريت على نماذج حيوانية كشفت أن محفظة بكتريا المكورات العنقودية لها أهمية في الإمراضية إذ أنها تحفز ضراوة المكورات العنقودية بواسطة عرقلتها لعملية البلعمة (Phagocytosis) نتيجة بقاء البكتريا في مجرى دم المضيف كما لوحظ أن المحفظة تحفز الإستعمار والبقاء للبكتريا على السطوح المخاطية (Nanra *et al.*,2013) 0

2-4-3 أحماض التيكويك (Teichoic acids)

هي بولمرات أيونية سالبة موجودة في البكتريا الموجبة لملون كرام أكتشفت في الخمسينات من القرن الماضي من قبل James Baddily (Percy & Gründling,2014) والذي أفترض أن لها دور مهم في الحفاظ على غلاف البكتريا الموجبة لصبغة گرام حيث أن الشحنة العالية في سطح الخلية البكتيرية الموجبة لملون گرام ناتجة عن كمية الفوسفات الكبيرة في طبقة Teichoic acid وهنالك نوعين من هذه الطبقة الاولى هي Lipoteichoic acid (LTA) والتي تكون مطمورة في غشاء الخلية وتتمدد الى طبقة الببتيدوگلايكان Peptidoglycan layer وتحتوي على Glycerol phosphate والنوع الثاني هي Wall teichoic acid (Wall TA) والتي ترتبط تساهمياً إلى طبقة الببتيدوگلايكان وتحتوي على Ribitol phoaphat أو Glycerol phosphate 0 ومن وظائف هذه الطبقة هي الحفاظ على تركيب وسلامة وشكل الخلية البكتيرية وتسهم في عديد من الفعاليات الحيوية كمقاومة الظروف البئية ومقاومة الانزيمات الحالة وتساهم أيضاً في إنقسام الخلية والتشكل (Morphogensis) (Weidenmaier *et al.*,2004)0

2-4-4 البروتينات الخارجية (Exoproteins)

إن بعض أنواع المكورات العنقودية تفرز مجموعة من البروتينات متضمنة السموم الخارجية (Exotoxins) والانزيمات (Enzymes) مثل انزيم النيوكلييز(Nuclease) وانزيم البروتييز(Protease) وانزيم اللاييز(Lipase) وانزيم مخثر البلازما (Coagulase) وغيرها من الانزيمات الأخرى ولابد من الإشارة إلى أن الوظيفة الرئيسة لهذه البروتينات هي تحويل النسيج الموضعي للمضيف إلى مادة غذائية تستفيد منها الخلية البكتيرية لغرض النمو 0(Dinges *et al.*,2000)

ومن السموم الخارجية التي تنتجها هذه البكتريا والتي تمتلك فعالية تحليلية خلوية هي هيمولايسين- الفا (Alpha – hemolysin) وهيمولايسين – بيتا (Beta–hemolysin) وهيمولايسين – گاما (Gama–hemolysin) والسم القاتل لخلايا الدم البيض (Leukocidin) والسم القاتل لخلايا الدم البيض بانتون فلانتين (Panton Valentin Leukocidin PVL) وسم متلازمة الصدمة السمية (Toxic Shock Syndrom Toxin – 1‹TSST – 1›) والسموم المعوية (Staphylococcal enterotoxins SEA- SEB- SEC- SED –SEF) 0(Sani *et al.*,2014)

2- 4-4-1 السموم (Toxins)

يمكن أن تقسم تلك السموم إلى مجموعتين حسب قابليتها على تحليل الخلايا أولهما هي السموم الخلوية (Cytotoxic) والتي تكون قادرة على إحداث ضرر مباشرة في الغلاف الخارجي للخلية المضيف والثانية السموم التي لها خاصية المستضد الفوقي (Superantigenic toxins) والتي ليس لديها قابلية على إحداث الضرر المباشر للخلية المضيف ولكن يمكن أن تحدث الضرر من خلال تنشيط الخلايا التائية (T-cells) وبالتالي تنشيط فعالية الخلايا المناعية كالخلايا الوحيدة (Monocytes) والبلاعم الكبيرة (Macrophage) ومن هذه السموم ما يأتي :-

2-4-4-1-1 السم القاتل لخلايا الدم البيض بانتون فلانتين (Panton Valentine Leukocidin PVL)

ينتج هذا السم من قبل نسبة قليلة جداً من المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* اذ أن حوالي (2-3) % منها منتجة لهذا السم 0وصف هذا السم لأول مرة عام 1849 من قبل Van de Velde

أما عام 1932 أقترح كل من Panton & Valentine دور هذا السـم في إمراضية المكـورات العنقوديـة (Staphylococci) (Haddad & Moineau , 2013). إذ يتكـون من بـروتينين يفرزان بصورة منفـردة لكن يعملان سوية ويطلق عليهما LuKF – PV و LuKS – PV والتي تتجمع مع بعضها في غشاء خلايا دفاعات المضيف كالخلايا الوحيدة (Monocyte) والبلاعم الكبيرة (Macrophage) مما يـؤدي إلـى تكـوين الثقـوب وتغيير النفاذيـة لتلـك الخلايـا وبـذلك تـتحطم الخلايا ويعد هذا السم عامل ضراوة مهم في الامراض التنخريـة (Necrotizing disease) (Bocchini *et al*.,2006) ، لذا نجد إنتشاره واسعاً بين العزلات البكتيريـة المعزولـة من هذه الإصابات التنخرية حيث يعمل على تحلل الخلايا أحادية النواة (Mononuclear) والخلايا متعددة أشكال النوى (Polymorphnuclear) ووجد أن هذا السم نادراً ما يكون مسؤول عن بعض الإصابات مثل إلتهاب العظام (Osteomyelitis) وإلتهاب شغاف القلب الداخلي (Endocarditis) 0

2-1-4-4-2 سم متلازمة الصدمة السمية نوع (1) (Toxic Shock Syndrom Toxin , TSST– 1)

إن هـذا الـذيفان TSST–1 هـو عبـارة عـن سلسـلة متعـددة الببتيـد مفـردة (Single chain polypeptide) وزنـه الجزيئـي KDa (22) تقريباً 0 وصف من قبل James Todd عام 1978 وتمتلك هذه السموم خصائص إضافة إلى قدرتها على إحداث السمية فهي لها خاصية المستضد الفوقي (Superantigenicity) كذلك تعمل على تحفيز الخلايا اللمفية التائية (T- lymphocyte) ، إذ أن هذا الذيفان يتفاعل مباشرة مع المناطق الثابتة للصنف الثاني (class II) لجزيئـة مستضد التوافـق النسيجي (Major histocompatibility complex «MHC«) والموجودة فقط في الخلايا المقدمـة للمستضدات (Antigen – Presenting Cells) وكذلك الخلايا اللمفيـة البائية (B- cell lymphocyte) وبذلك ينشط عـدد كبير من الخلايا التائيـة (T- cell) والنتيجة هي إنتاج كمية هائلة من الحركيات الخلوية (Cytokines) والتي تشمل عامل التنخر الورمي الفـا و بيتا (Tumor Necrosis Factor alpha & beta ‹TNF› –) مسببـة فـي النهايـة موت الخلية (Bien *et al*.,2011) 0

2-4-4-1-3 السموم المعوية العنقودية (Staphylococcal Enterotoxin)

عبارة عن بروتينات أحادية السلسلة واطئة الأوزان الجزيئية إذ تبلغ حوال KDa (34–27) ثابتة بالحرارة في درجة حرارة 100م لمدة 30 دقيقة وكذلك تكون مقاومة للانزيمات المعدية المحللة للبروتين (Proteolytic Gastric Enzyme) مثل Chemotrypsin ، Trypsin و Rennin وتعد هذه السموم من عوامل الضراوة البارزة والمنتجة من قبل المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* والتي تسبب متلازمة التسمم الغذائي المتقطعة (Sporadic food poisoning syndrom) أو حالات التفشي الوبائية غذائية الأصل (Foodborne outbreaks) ، كما تسبب أمراض الحساسية وامراض المناعة الذاتية (Allergic & autoimmune diseases) كما أكد الباحث Bergdoll عام 1990 قدرة بكتريا *S.hyicus* على إنتاج هذه السموم المعوية (Balaban & Rasooly,2000) 0

إن وظيفة هذه السموم لا تقتصر على أنها سموم معوية فعالة لكنها تعد أيضاً كأنتيجينات فوقية (Superantigens) والتي تحفزالتكاثر غير المحدود للخلايا التائية (T-cell) وتقسم هذه السموم إلى عدة أنواع متغايرة مستضدياً وهي SEA , SEB , SAC , SED , SEE , SEIR & SEH (Pelisser *et al*.,2009)0

2-4-4-1-4 السموم حالة الدم (Hemolysins)

هي سموم مكونة للثقب («PFT» Pore Forming Toxin) تمثل المجموعة الأهم من بين السموم التي تفرزها المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* إذ تعمل هذه السموم على تحطيم كريات الدم الحمراء وتحرير الهيموغلوبين وإن تكوين المسام أو الثقوب على أغشية الخلية المضيف الخاضعة للسم يؤدي إلى فقدان سلامة الغشاء (Membrane integrity) بتكون الثقوب (Ratner *et al* ., 2006) وتتميز هذه المجموعة بأنها متنوعة ومتعددة منها حال الدم ألفا (Alpha hemolysin) ويعد السم البكتيري الخارجي الأول الذي عرف من بين السموم الحالة للدم المكونة للثقب (Pore forming toxin) وهو متعدد ببتيدي وزنه الجزيئي KDa (33.2) يقوم هذا السم بتعطيل العضلات الملساء (Smooth muscle) في الاوعية الدموية (Czajkowsky *et al*.,1998) وهو سام للعديد من الخلايا مثل الخلايا الكبدية (Hepatocyte)، الصفيحات الدموية (Platelet) ، كريات الدم الحمراء (Erythrocyte)

وحال الدم بيتا (Beta-hemolysin) ويسمى أيضا Sphingomyelinase C وهو بروتين غير ثابت حراري (Heat– labile protein) وزنه الجزيئي KDa (35) وهو متخصص للـ Sphingomyelin وكذلك Lysophosphatidylcholin وسام للعديد من الخلايا مثل خلايا الدم الحمراء (Erythrocyte)، خلايا الدم البيضاء (Leukocyte) البلاعم الكبيرة (Macrophage) ومولدات الألياف (Fibroblast) ويعتمد في عمله على أيونات المغنيسيوم (Brosnahan *et al* ., 2009) وحال الدم كاما (Gama hemolysin) تنتجه أغلب سلالات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* وأنه يعمل على الخلايا البلعمية الكبيرة (Macrophage) والخلايا العدلة (Neutrophile) فضلاً لما ذكر يمتلك القابلية على تحلل العديد من كريات الدم الحمراء للبائن لكن التحلل الناتج من هذا السم على وسط غراء الدم يكون غير مميز بسبب التأثير المثبط لمادة الأگارعلى فعالية السم (Prevost *et al* ., 1995) وحال الدم دلتا (Delta hemolysin) وهو بروتين متعدد الببتيد يتكون من26 حامض أميني وزنه الجزيئي KDa (3.000) ينتج من قبل بعض سلالات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* وكذلك من بعض المكورات العنقودية الأخرى يمتلك طيف واسع (Wide spectrum) من الفعالية التحليلية (Cytolytic activity) ويتميز بقدرته على تحطيم الغشاء الخلوي لخلايا اللبائن (Cheung *et al*.,2012) وحال الدم أبسلون (Epsilon toxin) وهو سم فعال ينتج من قبل العزلات البكتيرية السالبة لإختبار انزيم مخثر البلازما (CNS) يسبب هذا السم حالة Enterotoxemia للحيوانات كالأغنام والماعز وبنسبة ضئيلة للأبقار والميزة الرئيسية لهذ السم هو إنتاج الوذمة (Edema) كما يسبب الورم السريع لخلايا الكلية (Petit *et al*.,1997)**0**

5-1-4-4-2 السموم المقشرة (Exofoliative Toxins)

هي عبارة عن بروتينات ذات وزن جزيئي KDa (26.000) وصفت عام 1978 من قبل الباحث Rittershain تفرزمن قبل بعض أنواع المكورات العنقودية مثل *S.aureus* وهي أحد أنواع السموم الفوق مستضدية الحرارية (Pyrogenic Toxins Superantigen‹PTAg›) تمتلك هذا السموم فعالية جلدية (Edematous activity) وفعالية تقسيمية (Mitogenic activity) تجاه الخلايا اللمفية التائية (T–lymphocyte) وتقسم الى أربعة انواع ETA ، ETB ، ETC ، ETD وهي العامل المسبب لمتلازمة الجلد المقشر العنقودي (Staphylococcal Scalded Skin Syndrom‹SSSS›) 0 (James *et al*.,2000)

كذلك تم ملاحظة إنتاج هذه السموم من قبل ضروب معينة من النوع *S.hyicus* والتي تسبب تقشر الطبقة السطحية الجلدية للخنازير (Exdative Epidermitis‹ET›) وهنالك دراسات تشير إلى أن هذا السم متشابه ويمتلك نفس الوظيفة الفسلجية والمرضية في كلا النوعين *S.aureus* و*S.hyicus* 0(Fudaba *et al*.,2005)

2-4-4 -2 الانزيمات الخارج خلوية (Extracellular enzymes)

إن غالبية سلالات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية لها القابلية على إنتاج العديد من الانزيمات الخارج خلوية مثل الـ- Lipase ، Hayluronidase ، Deoxyribonuclease و Staphylokinase و Coagulase 0

2-4-4 -2 -1 الكاتليز (Catalase)

هو انزيم يشترك في مقاومة الإجهاد التأكسدي ويشفر له بواسطة الجين (*kat A*) إذ يقوم بتحويل بيروكسيد الهيدروجين (Hydrogen peroxide) المتكون خلال الأيض الخلوي إلى ماء وأوكسجين جزيئي حيث لوحظ عمل هذ الانزيم عام 1811 من قبل Louis Jacques عندما لاحظ أن بيروكسيد الهايدروجين (Hydrogen peroxide) يتكسر بواسطة مادة غير معروفة أما عام 1911 فان العالم Oscar Loew هو أول من أعطى اسم Catalase لهذا الانزيم (Wakabayashi & Cheng,2012) 0

انزيم الكتاليز عامل ضراوة مهم في العديد من الممرضات البكتيرية وبسبب فعاليته فإنه يحمي الممرضات البكتيرية من أنواع الاوكسجين الفعالة («ROS» Reactive Oxygen Species) المتكونة بواسط الخلايا حقيقية النواة أو المتواجدة في بيئة البكتريا مثل بيروكسيد الهيدروجين (Hydrogen peroxide) والجذور الحرة الهيدروكسيلية (Hydroxyle radicals) (Cabisco *et al*.,2000) 0إن دور انزيم الكتاليز كعامل ضراوة بقي غير واضح بينما لاحظ بعض الباحثين بأن هنالك علاقة بين فعالية الانزيم والضراوة ولكن باحثين أخرين ذكروا بأنه لا يوجد هنالك أي دليل على ذلك0

2-4-4 -2- 2 انزيمات حالة البروتين (Proteases)

تنتج بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* أنواع مختلفة من انزيمات حالة البروتين ومنها انزيمات Metalo protease ، serine protease و Cystein protease (Bose *et al.*,2014) حيث أن العديد من الدراسات أقترحت أن هذه الانزيمات تعد عوامل ضراوة مهمة وأن حوالي (21%) من سلالات هذه البكتريا تعطى مناطق تحلل بروتيني (Proteolysis) على وسط غراء الكازئين (Casein agar) أما النسبة الباقية فتعطي نتيجة سالبة0

إن الدراسات التي اجريت في الزجاج (*in vitro*) أشارت إلى أن انزيمات البروتييز المنتجة من قبل هذه البكتريا بإمكانها أن تشارك في إنتشار وتوزيع الإصابة بواسطة تحطيم عدد من بروتينات المضيف المهمة مثل بروتينات الخلايا العدلة في الانسان (Human neutrophile protein «HNPs») ، بروتينات الصفائح الدموية المضادة للمايكروبات (Animicrobial platelet protein) ، الكلوبيولين المناعي (Immunoglobulin) والبروتينات المتممة (Complement protein) وكذلك لها دور في عمليات الإصابة مثل تحوير تصنيع Kinin و Chemokine ، وأشارت البحوث الأخيرة إلى أن هذه الانزيمات تؤدي دوراً في تحول المكورات العنقودية الذهبية من نمط لاصق (Adhesive) إلى نمط ظاهري غازي (Invasive phenotype) (Rice *et al* ., 2001). كما وتم ملاحظة إنتاج هذه البروتينات من قبل النوع *S.hyicus* والتي أشارت البحوث إلى تداخلها في ميكانيكية دفاعات المضيف ومكونات الخلايا الاخرى وتحطيم البروتينات الكبيرة إلى جزيئات أصغر تستفيد منها الخلية البكترية في عملية الأيض الخلوي لها (Kumari.,2014)0

2-4-4 -2- 3 انزيمات حالة الاحماض النووية (Nucleases)

بروتين كروي صغير يتألف من 149 حامض اميني ووزن جزيئي KDa (16.8) وذو PH مثالي بين 10.3 - 8.6 يتطلب لعمله Ca^{2++} بتركيز 0.1M لعمله وعلى الرغم من أن إنتاج هذا الانزيم من قبل المكورات العنقودية قد أكتشف منذ فترة طويلة إلا أن دور هذا الانزيم في إمراضية البكتريا غيرمفهوم نوعاً ما إلا أنه كان معروفاً مشاركة هذا الانزيم في تحطيم أنسجة المضيف إلى متطلبات غذائية لنمو البكتريا وكذلك يقوم بتحطيم شبكات كريات الدم البيض العدله خارج الخلية (Neutrophil extracellular traps ‹NETs›) (Evelien *et al.*,2010) 0

عرف مؤخــــراً مشاركة هذا الانـزيم فـــي تكوين الغشـــاء الحيوي (Biofilm formation) كمـــا عـرف مساهمتـه فـــي توزيـع ونشر ذلك الغشـــاء (Biofilm dispersal) والإنتقـــال أو الحركـــة التعاقبيـــة (Subsequent promotion) للإنتشار الجرثومي (Mann *et al*., 2009)0

2-4-4 -2 -4 انزيم الهيالورونديز (Hyaluronidase)

هوانزيم مسؤول عن تحطيم حامض الهيالورونيك (Hyaluronic acid) والذي هو مكون أساس للرابط خارج الخلوي (Extracellular matrix) من الأنسجـــة إذ يوجد في كلا البكتريا الموجبة والسالبة لملون گرام وفي عدد من الحالات يساهم هذا الانزيم في إمراضية البكتريا وذلك من خلال إجتياحه للأنسجة أو توفير مصدر الكاربون والطاقة للخلايا البكتيرية ، ويطلق على هذا الانزيم عامل الإنتشار (Spreading factor) اذ أن بعد تحطيمـه للرابط الخارج الخلـوي يسهل إنتشار البكتريا إلى المناطق المحيطة (Abdelhak, 2009) 0

إن دورهـذا الانـزيم فـي إمراضـية بكتريـا المكـورات العنقوديـة الذهبيـة قـد اقتـرح مـن قبـل الباحث Makris وجماعته حيث يقوم هذا الانزيم بتقليل اللزوجة في الإنسجة والتي تنتج عنها زيادة نفاذية الإنسجة الساندة وبذلك يزداد إنتشار هذه السموم إلى الأنسجة كما تم ملاحظة إنتاج هذا الانزيم من قبل النوع *S.hyicus* والذي يلعب دوراً مهماً في إحداث الإصابة في الطبقة المخاطية في جلد بعض الحيوانات (Makris *et al*.,2004)0

2-4-4 -2 -5 انزيم اللايبيز (Lipases)

هـــــو انـــــزيم يعـــــرف بـــــالانزيم المــــــأيض للاحمـــــاض الدهنيـــــة (Fatty - acids metabolizing enzyme «FAME») ينتـج من قبل المكـــورات العنقوديـــة ولـه تأثيرسلبي فـي وظـائف المناعـة للمضـيف حيـث أن كـل سـلالات المكـورات العنقوديـة الذهبيـة *S.aureus* وأكثر من 30% من أنواع المكورات العنقودية الأخرى تنتج هذا الانزيم والذي يقوم بتحليل الدهون كوظيفة أساسية لضمان بقاء البكتريا فـــي المناطق الدهنيـــة (Sebaceous area) من الجسم (Masoudhaghkhah,2003)0

إن فعالية هذا الانزيم في المكورات العنقودية لوحظت عام 1901 حيث أن هنالك سلالات من المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* تفرز نوعين من هذا الانزيم أحدهما هو Glycerol ester hydrolase (Geh) والآخر Lipase (Lip) وكلاهما متطلبان لتحليل الدهون وتحطيم المادة الغذائية لصالح البكتريا (Rollof *et al*., 1988) 0

إن دور هذا الانزيم في الإمراضية غير مفهوم ولكن لوحظ في أغلب الحالات أن إنتاج هذا الانزيم من قبل المكورات العنقودية يكون مرتبط بالإمراضية كمساهمته في تحديد الإصابة (Localization) للمكورات العنقودية (Tembhurkar *et al*.,2012) اذ أثبتت الدراسة أن بكتريا *S. aureus* والتي عزلت من إصابات الجروح العميقة تنتج كميات كبيرة من هذا الانزيم مقارنة مع تلك البكتريا التي عزلت من المناطق السطحية الأمرالذي أكد على أن فعالية هذا الانزيم مهمة في التغذية والإنتشار ولوحظ أيضاً أن هنالك علاقة بين فعالية هذاالانزيم وإمراضية البكتريا وذلك عن طريق التحري عن وجود الأضداد (Anti–lipase IgG) في المرضى المصابين بالمكورات العنقودية الذهبية والتي تؤيد الدور المرضي لهذا الانزيم (Ryding,1992)0

2-4-4 -2- 6 انزيم محرك العنقوديات (Staphylokinase)

ويسمى أيضا Fibrinolysin وهو بروتين وزنه الجزيئي KDa (15.5) يتألف من سلسلة بروتينية أحادية الأحماض الأمينية (136) حامض أميني ينتج من قبل سلالات معينة من المكورات العنقودية الذهبية ويعتبرعامل حال للخثرة (Thrombolytic agent) وهو ينتمي إلى Fibrin - specific plasminogen activator وله دور مهم في إزالة الخثرة (Anti-clotting function) وهو يساعد في تحويل مولد البلازمين (Plasminogen) إلى بلازمين (Plasmin) (Devi.,2012) ويتداخل هذا الانزيم مع دفاعات المناعة الذاتية للجسم 0(Innate immunity defence)

إن هذا الانزيم هو بروتين خارجي (Extracellular protein) يصنع خلال الطورالأسي المتأخر (Late exponential phase) و يساعد بكتريا المكورات العنقودية في كسر الخراجات (Abscess) في شبكة الفايبرين وبذلك تمكن البكتريا بأن تدخل إلى النسيج بعمق (Szakiel *et al*.,2007) 0

2-4-4 -2 -7 انزيم مخثر البلازما (Coagulase)

تعد بكتريا المكورات العنقودية (Staohylococci) الوحيدة في إنتاجها لهذا الانزيم لذا نجد أن هذا الانزيم حظي بكثير من الاهتمام إذ ذكر Loebs (1903) أن هنالك سلالات من المكـــورات العنقوديـة تقوم بتخثير البلازما وذكر العالم Much عام 1908 أن تخثر بلازما الانسان يحدث بواسطة مواد معينة تفرز من قبل المكورات العنقودية وتسمى Staphylococagulase ، أما في عام 1932 أقترح الباحثين كل من Peters & Champan ، Beren أن إختبار مخثر البلازما مهم في تشخيص البكتريا المرضية (Chandrakanth *et al.*,2010)0

إن إنتاج انزيم مخثر البلازما يعتبر مقياساً مهماً في مختبرات الأحياء المجهرية لتشخيص بكتريا *S.aureus* وعلى الرغم من أن سلالات قليلة من المكورات العنقودية الذهبية لا تنتج كميات ملحوظة من هذا الانزيم لكن السلالات كلها يبدو أنها تمتلك جين مخثر البلازما (Coagulase gene ، *Coa*) علماً أن هنالك ستة أنواع أخرى من المكورات العنقودية تقوم بإنتاج هذا الانزيم وهي كل من *S.intermedius* , *S.schleiferi* , *S.hyicus S.delphini* , *S.lutrae* & *S.pseudointermedius* (Hanaa *et al.,*2014)0

وبالإعتماد على إنتاج انزيم مخثرالبلازما من قبل المكورات العنقوديـة تم تقسيمها كما ورد سابقاً إلى المكورات العنقودية المنتجة للانزيم (Coagulase Positive Staphylococci) والمكورات العنقوديـة غير المنتجـة للانزيم (Coagulase Negative Staphylococci) غير أن هنالك سلالات من CNS ربما تخثر بلازما الأرانب (Rabbit plasma) كنتيجة لإنتاج انزيم البروتييز الفعال (Very active protease) ولذا يسمى انزيم مخثر البلازما الكاذب (Psudocoagulase) (Vandenesch *et al.*,1994)0

انزيم مخثر البلازما (Coagulase) هو بروتين خارجي (Extracellular protein) متعدد الببتيد يتكون من 690 حامض أميني وزنه الجزيئ KDa (60-70) يحتوي على أحماض أمينية متغايرة (Rajbhandari ,2011) يتكون هذا الانزيم من ثلاث مناطق الأولى هي منطقة النهاية الأمينية (N- terminous) وتحتوي على مناطق إرتباط البروثرومبين (Prothrombin binding site) والثانية هي منطقة المركز (Central region) وتكون محفوظة بشكل كبير0

والمنطقة الثالثة هي منطقة النهاية الكاربوكسيلية (C-terminous) وتتالف من 27 حامض أميني حيثأن هنالك 75% من التشابه بتسلسل الأحماض الامينية لانزيم مخثر البلازما وتسلسلات ستة أخرى من البروتين قد وضحت من قبل المركز العام للمعلومات البايوتكنولوجية National Center for Biotechnology Information (NCBI) 0(Carson *et al*.,2009)

إن انزيم مخثر البلازما (Coagulase) هو شكل أولي (Prototype) لمجموعة من البروتينات والتي تسمى Zymogen Activator & Adhesion Protein (ZAAPs) كذلك لوحظ أن البعض لايعتبر انزيم مخثر البلازما (Coagulase) انزيماً بل يعتبره Bifunctional Receptin وهي البروتينات المايكروبية ذات الألفة لبروتينات اللبائن او قد يسمى Extracellular matrix binding protein (ECMBPs) وهي التي تمنح البروتينات السطحية للبكتريا القدرة على الإلتصاق مع بعض مكونات Extracellular matrix (ECM) للمضيف (Bjerketorp ,2004)0

إن آلية عمل انزيم مخثر البلازما والتي وضحت من قبل العالم Waltson عام 1935 هي أن هذا الانزيم يتفاعل مباشرة مع مولد الليفين (Fibrinogen) لتكوين خثرة الفايبرين (Fibrin) أو الليفين0

Coagulase + Fibrinogen ⟶ Fibrin

في عام 1962 الباحثان Smith & Hale فقد لاحظا وجود عوامل موجودة في البلازما والأنسجة حيث أن هذه العوامل تسمى منشطات (Activator) وسميت أيضاً Coagulase reacting factor (CRF) والتي تختلف عن مكونات الدم وتكون مسؤولة عن التخثر الفسيولوجي والذي يقوم به المضيف كجزء من الدفاعات ضد الإصابة 0

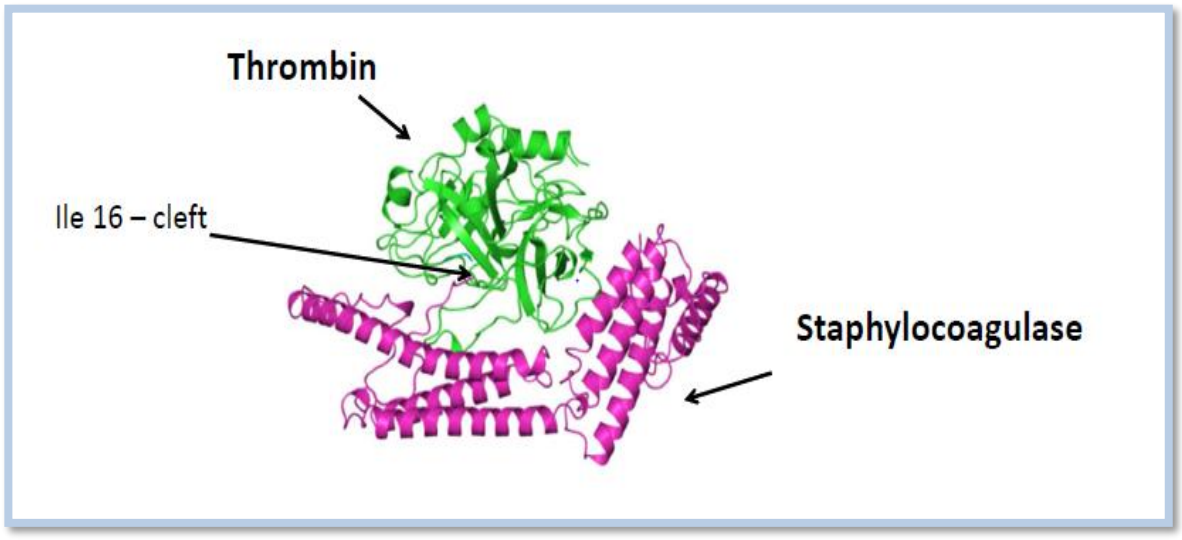
Coagulase + CRF ⟶ Coagulase - CRF

Coagulase - CRF + Fibrinogen ⟶ Fibrin

إن آلية التنشيط الفسيولوجي الطبيعي للـ Zymogen prothrombin تتم بواسطة كسر انزيمي (Enzymtic cleavage) إلى Thrombin وبعدها يقوم Thrombin بكسر مولد الليفين (Fibrinogen) الى Fibrinopeptide وخثرة الفايبرين (Fibrin clot) (Hookey *et al*.,1999)

خلافاً لما لوحظ في انزيم مخثر البلازما Coagulase حيث لا يقوم بكسر البروثرومبين (Prothrombin) إلى ثرومبين (Thrombin) وبدلاً عن ذلك يعمل كعامل مساعد (Cofactor) حيث يحث التغير الشكلي للبروثرومبين (Conformational change of prothrombin) والذي ينتج عنه المعقد Staphylothrombin والذي يحول مولد الليفين (Fibrinogen) إلى الليفين (Fibrin) إذ أن انزيم مخثر البلازما (Coagulase) يحتوي على (NH_2-terminal D1 – D2 domain) والتي تكون مسؤولة عن الإرتباط والتنشيط الشكلي للبروثرومبين (Binding & conformational activating) من خلال Non – proteolytic activation pathway أي نتيجة لتغير التركيب الثلاثي للبروثرمبين (Tertiary structure of Prothrombin) حيث أن NH2-terminal لانزيم مخثر البلازما سوف تحشرفي NH2-terminal binding pocket للبروثومبين Prothrombin ليكون جسرا ملحياً (Critical salt bridge) الأمر الذي يؤدي إلى تكوين المعقد النشط مع البروثومبين Staphylothrombin (Sc-ProT) 0

كذلك يحتوي انزيم مخثر البلازما (Coagulase) على منطقة النهاية الكاربوكسيلية (COOH – terminal region) والتي تكون قادرة على الإلتصاق بمولد الليفين (Fibrinogen) (Goh *et al.*,2008) والشكل (1-1) يوضح إرتباط الثرومبين (Thrombin) مع انزيم مخثر البلازما (Staphylocoagulase)0



الشكل (2-1) إرتباط الثرومبين Thrombin مع انزيم مخثر البلازما Staphylocoagulase (Davis, 2011)

إن ارتبـــاط المعقد («Sc-ProT» Staphylothrombin) مـع مولـد الليفين (Fibrinogen) مباشـــرة ســـوف يـــؤدي إلـــى كســـره إلـــى الليفـــين (Fibrin) وتحـــت هـــذه الظـــروف ســـوف تكون بكتريا المكـــورات العنقوديـــة إثنـان مـن الأليـاف أحـدهما Inner pseudocapsule والأخـرى Outer microcolony associated meshwork وعلـــى الـرغم مـن ذلـك فـإن طريقـة عمـل هـذا الانـزيم بقيـت مجـرد إفتراضـيات (Hypothetical) اذ أن عـدداً مـن النظريـات سـجلت لطبيعـة عملـه 0 (Vanassche *et al.*,2010)

عـــام 1954 وجـــد العـــالم Duthie أن انـــزيم مخثـــر البلازمـــا يكـــون علـــى نـــوعين أحـدهما انـزيم مخثـر البلازمـا المـرتبط (Bound coagulase) ويطلـق عليـه Clumping factor الـذي يكـــون ثابـت حراريـــاً (Heat stable) ومرتبـــط بجـدار الخليـــة ولا يحتـــاج إلـــى Coagulase reacting factor (CRF) لعمله ويبدو أنه يرتبط مـع سلسـلة ألفـا وبيتـا لمولـد الليفين (Fibrinogen) في البلازما ويحوله إلى ليفين (fibrin) وقد وصف نوع واحد منه والذي يقوم بتخثير بلازما خنازيرغينيا ويمكن تحديد هذا الانزيم من خلال فحص Slide test أما النوع الآخر يطلـق عليـه انزيـــم مخثر البلازما الحـر (Free coagulase) والذي يكـون حســاس للحـرارة (Heat labile) ويفـــــرز مـــــن قبـــــل البكتريـــــا إلـــــى الوســـــط دون إرتباطـــــه بجـــــدار الخليـــــة ويحتاج الى Coagulase reacting factor (CRF) لعمله وقد وصفت ثمانية أنمـاط مستضـدية منـه وهي A , B , C , D , E , F , G & H ولا يخثـر بلازمـا خنازيرغينيـا (Ozen *et al.*,2011)0

إن القدرة على إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من قبل المكورات العنقودية يعتبر مؤشر بالغ الأهمية في الإمراضية (Pathogencity) والتي أثبتت بواسطة ظهور الخثرة فـي بلازمـا الإنسـان بعد عدة ساعات من الحضن حيث أن إرتباط هذا الانـزيم بالإمراضـية لـوحظ مـن قبـل العـالم Daranji عام 1925 والذي أقترح وجود دورين فـي الإصـابة لانـزيم مخثـر البلازمـا (Coagulase) أحـدهما ان يشارك الانزيم في بداية الإصـابة أو أنـه يحمـي منـاطق الخمـج المتكونـة مـن قبـل المكـورات العنقوديـة (Staphylococci)0 أمـا كـل مـن Remmel ، Kamp و Lebovits اقترحـوا أن لانـزيم مخثـر البلازما (Coagulase) دوراً في تحوير إستجابة المضيف (Response Modification) 0

كما أن تفاعل هذا الانزيم مع Reacting factor يؤدي الى إستيطان الإصابة وهكذا فإن هذا الانزيم يزيد من ضراوة البكتريا بواسطة حمايتها ضد عمل Normal serum bacteriocidin وكذلك ضد عملية الإلتهام الخلوي (Phagocytosis) (Tiwari *et al*.,2008) 0

أوضح الباحثون العلاقة بين الضراوة وبين انزيم مختثر البلازما (Coagulase) حيث عندما تم حقن البكتريا السالبة للانزيم (Coagulase Negative Staphylococci) مع انزيم مختثر البلازما النقي في مجرى دم الفئران أدى ذلك الى موت الفئران خلال 20 دقيقة (Matar,2014)0

إن تكوين طبقة من الليفين (Fibrin) بواسطة هذا الانزيم من قبل المكورات العنقودية (Staphylococci) يؤدي إلى حالة بايوكيميائية وفسلجية فريدة والتي تمكن البكتريا من تكوين Pseudocapsule والذي يحفز الإمراضية وتكوين الخراجات (Abscess) والأنتان (Sepsis) وإلتهاب الشغاف القلبي (Endocarditis) الذي لوحظ في الحيوانات المختبرية (Schwarzkopf & Karch ,1994)0

ويعد انزيم مختثر البلازما (Coagulase) من السموم الخلوية (Cytotoxin) والتي تسبب تكوين الثقوب وتحث التغيرات ما قبل الالتهاب (Proinflammatory change) في خلايا اللبائن (Mammalian cells) ويسهل إنتشارالإصابة إلى أنسجة أخرى (Dinges *et al*.,2000) كما يساهم في عرقلة تقدم كريات الدم البيضاء (Leucocyte) إلى المناطق المصابة بواسطة إنتاج خثرة في الشعيرات المحيطة كما يعتبر هذا الانزيم من عوامل تلازن النطف (Spermagglution) ويؤثر أيضاً على حركة النطف (Gharib *et al*., 2013) ويؤدي انزيم مختثر البلازما (Coagulase) دوراً في تطور Blood – born staphyloccocal pneumonia ويحث إلتهاب الضرع في الأبقار (Mastitis) (Weidenmaier *et al*.,2004)0

وأثبت العالم Sawai مشاركة انزيم مختثر البلازما (Coagulase) في الخمج الرئوي (Pulmonary infection) وأيضاً أوضح أن تكوين الخثرة ذات أهمية في عمليات الفسلجة المرضية بإلتهاب العظم كما أن انزيم مختثر البلازما يمكن أن يستخدم كلقاح (Vaccine) يسهل على الأجسام المضادة حماية الجسم من إصابات بكتريا المكورات العنقودية (Sasaki *et al*., 2010) 0

الفصل الثالث

المواد وطرق العمل

Materials & Method

1-3 المـــــواد (Materials)

1-1-3 الأجهـــزة والأدوات Instrument & Equipment

استخدمت الأجهزة والأدوات الآتية :-

ت	إسم الجهـاز أو الأداة	الشركة المصنعة
1	أنابيب اختبار بلاستيكية Plane tubes	AFMA-Dispo (China)
2	أنابيب اختبار زجاجية Test tube	Pyrex (Italian)
3	أطباق بتري بلاستيكية Petri Dishes	Sterilin (England)
4	أوراق ترشيح Filter paper	Ahlstrom (Germany)
5	بارافلم Parafilm	Can (U.S.A)
6	ثاقب فليني Cork Porer	Janetzki (Germany)
7	ثلاجة Refrigerator	Concord (France)
8	جهازتقطير Distiller	GLF (Germany)
9	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Hettich (Germany)
10	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني PH-meter	Mauritius (Germany)
11	جفنه خزفية Morter	Shandon (England)
12	حاضنة Incubator	Termaks (Stockholm)
13	حاضنة هزازة Shaker incubator	Labtech (Korea)

14	Water bath حمام مائي	Julabo (Germany)
15	Disposable Syringe محاقن طبية نبيذه	Meheco (China)
16	Micropipette ماصه دقيقة	Hunan (Germany)
17	Slides شرائح زجاجية	Meheco (China)
18	Loop عروة ناقلة	Shandon (England)
19	Electric oven فرن كهربائي	Memmert (Germany)
20	Cloves كفوف	Tanedial (China)
21	Autoclave مؤصدة	YX-280B (China)
22	Light microscope مجهر ضوئي	Motic (Germany)
23	Sensitive balance ميزان حساس	Sartorius (Germany)
24	Millipore Filter مرشحات غشائية	GMBH,W. (Germany)
25	Benzen Burner مصباح بنزن	Shandon (England)
26	Sterile cotton swabs مسحات قطنية معقمة	(China)
27	Vortex مازج	Rome (Italy)
28	Vacuum pump مضخة تفريغ	(Japan)
29	Anaerobic jar الوعاء اللاهوائي	Oxoid (English)
30	Hot plate with magnetic stirrer هيتر مع محرك مغناطيسي	Gallen Kamp (England)
31	Laminar flow cabinet حجرة تلقيح	Jeio – Tech (Korea)

2-1-3 المواد الكيميائية والبايولوجية المستخدمة Chemical&Biological Material Used

استخدمت المــواد الكيميائية والبايولوجيــة الآتية :-

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة
1	اليوريا Urea	BDH (England)
2	البنفسج البلوري Crystal violet	BDH (England)
3	الأيودين Iodine	BDH (England)
4	أزايد الصوديوم Sodium azide	BDH (England)
5	السكريات	
	سكروز Sucrose	Himedia (India)
	تريهالوز Trehalose	Himedia (India)
	رايبوز Ribose	Himedia (India)
	الكلوكوز Glucose	Samara (Iraq)
	لاكتوز Lactose	Himedia (India)
	مالتوز Maltose	Himedia (India)
6	ببتون Peptone	BDH (England
7	باودرخلاصة الخميرة Yeast extract powder	Himedia (India)
8	بايروفيت الصوديوم Sodium pyruvate	BDH (England)
9	بيركسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide	Fluka (Switzerland)
10	بنزوات الصوديوم Sodium benzoiate (Na3C6H5O7)	Fluka (Switzerland)
11	بوتاسيوم داي هيدروجين أورثوفوسفيت Potassium dihydrogen orthophosphate	Himedia (India)

12	بورات الصوديوم الرباعية Sodium tetra borate	Himedia (India)
13	تولورايت البوتاسيوم Potassium tellurite	ThomasBaker (India)
14	حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid	Fluka(Switzerland)
15	حامض الكبريتيك Sulphuric acid (H_2SO_4)	BDH (England)
16	حامض الأوكزاليك Oxalic acid	BDH (England)
17	حامض الأورثوفوسفوريك Orthophosphoric acid	BDH (England)
18	حامض البوريك Boric acid	BDH (England)
19	حامض الستريك Citric acid	BDH (England)
20	خلات الصوديوم Sodium acetate	Ajax (Australia)
21	خلات الأمونيوم Ammonium acetate	Ajax (Australia)
	خلاصة لحم البقر Beef extract	Himedia (India)
22	داي صوديوم هيدروجين أورثوفوسفيت Disodium hydrogen orthophosphate	BDH (England)
23	زيت السدر Seder oil	BDH (England)
24	سفرانين Safranin stain	BDH (England)
25	سيانيد البوتاسيوم Potassium cyanide (KCN)	BDH (England
26	شمع البارافين Paraffin wax	Fluka(Switzerland)
27	فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروحين (Na_2HPO_4) Disodium hydrogen phosphat	BDH (England)
28	فوسفات الصوديوم ثنائيــة الهيدروجين (NaH_2PO_4) Sodium hydrogen phosphate	BDH (England)
29	فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين (K_2HPO_4) hydrogen phosphate phosphate	BDH (England)
30	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروحين (KH_2PO_4) dihydrogen Potassium phosphate	BDH (England)
31	قاعدة الترس Tris base	BBL (USA)

32	كحول أثيلي Ethanol 70%	Ajax(Australia)
33	كلوريد الصوديوم Sodium chloride (NaCl)	Thomas Baker (India)
34	كاشف إختبار الأوكسيديز N,N,N,NTetramethyle- ρ -phenylene diaminedihydrochloride	Fluka (Switzerlad)
35	كاشف الكوفاكز Kovac's reagent	BDH (England)
36	كاشف الألفا نفثول α-naphtol reagent	BDH (England)
37	كاشف أحمر الفينول Phenol red reagent	BDH (England)
38	كلوريد الباريوم Barium chloride ($BaCl_2.7H_2O$)	BDH (England)
39	كلوريد الكالسيوم Calicum chloride (CaCL)	BDH (England)
40	كلوريد المغنيسيوم Magnicum chloride (MgCL)	BDH (England)
41	كلوريد البوتاسيوم Potassium chloride (KCL)	BDH (England)
42	هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxide (KOH)	BDH (England)
43	كبريتات الأمونيوم Amonium sulphate $(NH\ 4)_2SO_4$	BDH (England)
44	كبريتات المغنسيوم Magnisium sulphate ($MgSO_4$)	BDH (England)
45	گلايسين Glycine	BDH (England)
46	كلوروفورم Chloroform	BDH (England)
47	يوديد البوتاسيوم Iodid	Fluka(Switzerland)
48	نترات البوتاسيوم Potassium nitrate	BDH(England)

3-1-3 الأوسـاط الزرعية الجاهزة (Ready Culture Media)

حضـرت جميـع الأوسـاط الجـاهزة وفقـاً لتعليمـات الشـركة المجهـزة ، وبعـد التحضـير ضـبط الأس الهيـدروجيني (pH) وعقمـت بالمؤصـدة (Autoclave) بدرجـة حـرارة (121) م وضغط 15 باوند / انج^2 لمدة (15) دقيقة وهذه الأوساط هي الآتية :-

ت	إسم الوسط		المنشأ
-1	وسط أگار نقيع القلب والدماغ	Brain Heart Infusion Agar	Himedia
-2	وسط مرق نقيع القلب والدماغ	Brain Heart Infusion Broth	Himedia
-3	وسط أگار سيمون ستريت	Simmons citrate agar	Oxoid
-4	وسط أگار المانيتول الملحي	Mannitol Salt Agar	Himedia
-5	وسط أگار المولر هنتون	Mueller Hinton Agar	Himedia
-6	وسط أساس أگار اليوريا	Urea Agar base	Himedia
-7	وسط أساس أگار الدم	Blood Agar base	Oxoid
-8	وسط الأگار المغذي	Nutrient Agar	Himedia
-9	وسط المرق المغذي	Nutrient Broth	Himedia
-10	وسط الثايوكلايكوليت	Thioglycolate medium	Oxoid
-11	وسط مرق تربتك صويا	Tryptic Soy Broth	Himedia
-12	وسط مرق خلاصة الخميرة	Yeast extract broth	Oxoid
-13	وسط ماء التربتون	Trypton water	Himedia

3-1- 4 الأوساط الزرعية التحضيرية (Prepared Culture Media)

وشملت هذه الأوســـاط ما يأتي :-

ت	إسم الوسط	
-1	الوسط المعرف كيميائيا	Chemicaly defined medium (CDM)
-2	وسط الكلوكوز الفوسفاتي	Glucose phosphate medium
-3	وسط تخمر السكريات	Sugar fermentation medium
-4	وسط أگار شليفر- كرامر	Schleifer and Krämer agar(SKagar)
-5	وسط أگار بيرد – باركر	Baird-Parker Agar
-6	وسط الحركة	Motility medium
-7	وسط مرق النيتريت	Nitrate broth
-8	وسط أگار البي	P agar

3-1-5 أوساط العزل والإستنبات (Isolation &Growth Media)

حيث تم إستخدام الأوساط أعلاه في الفقرتين (3-1-3) و (3-1-4) وذلك لعزل بكتريا المكورات العنقودية Staphylococci وإنمائها كذلك أستخدمت في الفحوصات البايوكيميائية (Biochemical test) وتشمل ما يأتي :-

3-1-5-1 وسط أگار المانيتول الملحي (Mannitol Salt Agar)

حضر هذا الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وعقم بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم صب الوسط المحضرفي أطباق بتري معقمة ، حيث يعتبر هذا الوسط إنتقائي (Selective) لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* 0

3-1-5-2 وسط أگار بيرد – باركر (Baird-Parker Agar)

حضر هذا الوسط وفقاً لما جاء في (Vanderzant *et al.*,1992) من المواد الآتية :-

تربتون	Tryptone	10غم
خلاصة لحم البقر	Beef extract	5غم
خلاصة الخميرة	Yeast extract	1غم
گلايسين	Glycin	12 غم
كلوريد الليثيوم	Lithium chloride	5 غم
أگار أگار	Agar agar	20غم
مستحلب صفار البيض	Egg Yolk Emulsion	50مل

أذيبت تلك المواد في (950) مل من الماء المقطرماعدا مستحلب صفار البيض ، ثم سخن حتى الغليان مع التحريك المستمر لغرض إذابته ، تم نقله إلى المؤصدة (Autoclave) لغرض تعقيمه بعدها تم تبريده في حمام مائي عند درجة حرارة (50) م ثم أضيف إليه (50) مل من مستحلب صفار البيض (Egg Yolk Emulsion) الحاوي على 10 مل من (1% Potassium tellurite) تم مزجهم بلطف وصب الوسط تحت ظروف معقمة في أطباق بتري حيث يعتبرهذا الوسط إنتقائي (Selective) للمكورات العنقودية في الأغذية 0

3-1-5- 3 وسط أگار شليفر- كرامر (SK Agar)

حضر هذا الوسط وفقاً لماء جاء في (Götz *et al.*,2006) من المواد الآتية :-

ببتون	Peptone	10غم
خلاصة لحم البقر	Beef extract	15غم
خلاصة الخميرة	Yeast extract	3غم
جليسيرول	Glycerol	10غم
الليثيوم كلوريد	Lithium chloride	2غم
بايروفيت الصوديوم	Sodium pyruvate	10غم
گلايسين	Glycine	0.5 غم
سيانيد البوتاسيوم	KCN	2.25 غم
فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين	$NaH_2PO_4.H_2O$	0.6 غم
فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين	$NaH_2PO_4.2H_2O$	0.5 غم
أگار أگار	Agar agar	13غم
أزايد الصوديوم	Sodium azide	10مل

أذيبت تلك المواد في حجم قليل من الماء المقطر ما عدا أزايد الصوديوم (Sodium azide) ثم سخن حتى الغليان مع تحريكه بإستمرار لغرض إذابته ثم أكمل الحجم إلى (1) لتر, وعقم بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (45) م ثم أضيف إليه (10) مل من محلول (Sodium azide) المعقم بواسطة مرشح غشائي (µm 0.45 Millipore Filter) تم مزجهم بلطف ثم تم صب الوسط تحت ظروف معقمة في أطباق بتري حيث يعتبر هذا الوسط أيضاً إنتقائي (Selective) للمكورات العنقودية في الأغذية 0

3-1-5- 4 وسط (P Agar)

حضر هذا الوسط وفقاً لما جاء في (Götz *et al.*,2006) من المواد الآتية :-

ببتون	Peptone	10غم
خلاصة الخميرة	Yeast extract	5غم
كلوريد الصوديوم	Sodium chloride	5غم
كلوكوز	Glucose	1غم
أگار أگار	Agar agar	15غم

أذيبت تلك المواد في حجم قليل من الماء المقطر، ثم سخن حتى الغليان مع تحريكه بإستمرار لغرض إذابته ثم أكمل الحجم إلى (1) لتر, وعقم بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م ثم تم صبه تحت ظروف معقمة في أطباق بتري ، أستخدم هذا الوسط لعزل المكورات العنقودية من العينات السريرية 0

3-1-5- 5 الوسط المعرف كيميائياً («Chemically defined medium «CDM)

تم إستخدام هذا الوسط لغرض إجراء إختبارمخثر البلازما (Coagulase test) وحضرهذا الوسط وفقاً لما جاء في (Snyder & Koch ,1966) من المواد الآتية :-

فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين	$NaH_2PO_4.H_2O$	2.3 غم
فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين	$NaH_2PO_4.2H_2O$	0.78 غم
كبريتات الأمونيوم	$(NH_4)_2SO_4$	1غم
كبريتات المغنسيوم	$MgSO_4$	0.1 غم
بنزوات الصوديوم	$Na_2C_6H_5O_7$	0.6 غم

أذيبت تلك المواد في حجم قليل من الماء المقطر، ثم أكمل الحجم إلى (500) مللتر, وعقم بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم توزيعه في أنابيب زجاجية معقمة بواقع (5) مل للأنبوبة الواحدة تم إستخدامه بإختبار تأثيرنوع الوسط الزرعي في إنتاج انزيم مخثرالبلازما (Coagulase)0

3-1-5- 6 وسط أگار الدم (Blood Agar)

حضر أگارالدم الأساس وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وعقم بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م ثم أضيف إليه الدم البشري بمقدار(5%) حيث خلط مع الوسط جيداً بعدها صب الوسط في أطباق بتري معقمة وترك ليتصلب ، أستعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على حل خلايا الدم 0

3-1-5- 7 وسط الأگارالمغذي (Nutrient agar)

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم صبه في الأطباق المعقمة بحيث تم إستخدامه كوسط عام لإنماء العزلات الجرثومية0

3-1-5- 8 وسط المرق المغذي (Nutrient broth)

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم توزيعه في أنابيب زجاجية معقمة بواقع (5) مل للأنبوبة الواحدة كوسط عام لإنماء وحفظ العزلات الجرثومية إضافة لإستخدامه بإختبار تأثير نوع الوسط الزرعي في إنتاج انزيم مخثرالبلازما (Coagulase)0

3-1-5- 9 وسط مرق خلاصة الخميرة (Yeast extract broth)

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم توزيعه في أنابيب زجاجية معقمة بواقع (5) مل للأنبوبة الواحدة كوسط عام لإنماء العزلات الجرثومية إضافةً لإستخدامه بإختبار تأثير نوع الوسط الزرعي في إنتاج انزيم مخثرالبلازما (Coagulase) 0

3-1-5- 10 وسط ماء الببتون (Pepton water)

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم توزيعه في أنابيب زجاجية معقمة بواقع (5) مل للأنبوبة الواحدة كوسط عام لإنماء العزلات الجرثومية إضافةً لإستخدامه بإختبار تأثير نوع الوسط الزرعي في إنتاج انزيم مخثرالبلازما (Coagulase)0

3-1-5- 11 وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth)

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم توزيعه في أنابيب زجاجية معقمة بواقع (5) مل للأنبوبة الواحدة أستخدم هذا الوسط لإجراء إختبارمخثرالبلازما (Coagulase Test) إضافةً لإستخدامه بإختبار تأثير نوع الوسط الزرعي في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) وكذلك أستخدم كوسط إغنائي0

3-1-5- 12 وسط أگار نقيع القلب والدماغ (Brain Heart infusion agar)

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم صبه في أطباق بتري معقمة وتم إستعماله كوسط عام لإنماء العزلات الجرثومية وكذلك كوسط إغنائي0

3-1-5- 13 وسط مرق النترات (Nitrate Broth)

أستخدم هذا الوسط لتحديد قدرة العزلات البكتيرية لإختزال النترات (NO_3) إلى نتريت (NO_2) وتم تحضيره بإضافة (10) غم من الببتون (Peptone) و (10) غم من نترات البوتاسيوم (Potassium nitrate ، KNO_3) إلى أقل حجم من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى (1) لتر من الماء المقطر بعدها تم ضبط الأس الهيدروجيني ووزع الوسط في أنابيب اختبار بمقدار(5) مل لكل أنبوبة وعقمت بالمؤصدة (Autoclave)0

3-1-5- 14 وسط أگاراليوريا (Urea agar medium)

حضر هذا الوسط بإضافة (10) مل من 40% من محلول اليوريا المعقم بالترشيح بواسطة أغشية الترشيح الدقيقة (0.25µm Millipore Filter) إلى (90) مل من وسط Urea agar base المعقم بالمؤصدة (Autoclave) والمبرد إلى درجة حرارة (50) م بعد ضبط الأس الهيدروجيني الى (7.1) 0أستعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج انزيم اليوريز (Urease) الذي يحلل اليوريا إلى أمونيا وثاني اوكسيد الكاربون (MacFaddin,1985)0

3-1-5- 15 وسط الثايوكلايكوليت (Thioglycolate Medium)

حضر هذا الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وعقم بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م وصب في أنابيب وبعدها لقح بالبكتريا ثم نقلت الأنابيب إلى الوعاء اللاهوائي (Anaerobic jar) أستخدام الوسط للكشف عن وجود البكتريا اللاهوائية0

3-1-5- 16 وسط أگار سيمون ستريت (Simmons's Citrate Agar)

حضر هذا الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ووزع في أنابيب زجاجية بواقع (5) مل للأنبوبة الواحدة ، عقمت الأنابيب بالمؤصدة (Autoclave) وتركت لتبرد بصورة مائلة (Slant) أستعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على أستخدام السترات كمصدروحيد للكاربون (MacFaddin,2000)0

3-1-5- 17 وسط الكلوكوز الفوسفاتيِ (Glucose Phosphate medium)

حضر هذا الوسط وفق طريقة (Zhang *et al*.,2012) وكما يأتي :-

ببتون Peptone 1غم

كلوكوز Glucose 5غم

فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين K2HPO4 45 غم

حيث أذيبت المحتويات أعلاه في كمية قليلة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (1) لتر ووزع الوسط في أنابيب إختباربمقدار(5) مل للأنبوبة الواحدة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) أستخدم هذا الوسط في إختبارفوكس بروسكور(Voges – Proskauer test) 0

3-1-5- 18 وسط مرق تربتك صويا (Trypton soys broth)

حضروفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم توزيعه في أنابيب زجاجية معقمة بواقع (5) مل للأنبوبة الواحدة أستخدم كوسط عام لإنماء البكتيريا إضافةً لإستخدامه بإختبار تأثيرنوع الوسط الزرعي في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) (MacFaddin,2000)0

3-1-5- 19 وسط الحركة (Motility medium)

حضر هذا الوسط بإضافة (4) غم من مسحوق (Agar-Agar) بنسبة (0.4%)الى (20) غم من وسط المرق المغذي (Nutrient broth) وأذيبت المحتويات في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى (1) لترمن الماء المقطر ووزع الوسط في أنابيب إختبار زجاجية نظيفة بواقع (5) مل لكل أنبوبة عقمت بعدها بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليتصلب بشكل عمودي ، أستخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة (Murray *et al*., 1995)0

3-1-5- 20 وسط تخمر السكريات (Sugar fermentation medium)

حضر هذا الوسط بإضافة (10) غم من الببتون (Peptone) و(5) غم من كلوريد الصوديوم (NaCL) في كمية من الماء المقطروأكمل الحجم الى (1) لتر وأضيف اليه (0.002) من كاشف الفينول الاحمر(Phenol red reagent) بتركيز (2%) وعدل الأس الهيدروجيني إلى (7.2)0 وزع الوسط في أنابيب زجاجية بواقع (4) مل للأنبوبة الواحدة وعقمت هذه الأنابيب بالمؤصدة (Autoclave) وبردت ثم أضيف اليها (1) مل من المحاليل السكرية (كل على إنفراد) المعقمة بالترشيح بواسطة مرشحات غشائية (0.45) µm والتي حضرت بإضافة (0.5) غم من السكر المراد إختباره إلى (10) مل من الماء المقطر (MacFaddin,2000)0

3-1-5-21 وسط أگار مولر هنتون (Muller hinton agar)

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد إلى درجة حرارة (50) م بعدها تم صبه في أطباق بتري معقمة ، أستعمل هذا الوسط لغرض إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية (Murray *et al*., 1995) 0

3-1-6 أوساط حفظ وإدامة العزلات الجرثومية

3-1-6-1 الحفظ القصير الأمد (Short-term conservation)

نميت العزلات البكتيرية على وسط الأگارالمغذي المائل (Slant) بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة ثم أحكم غلق الأنابيب بوساطة Parafilm لمنع التلوث, وحفظت في الثلاجة على أن يتم إعادة الزرع كل (3-4) أسابيع (Harley & Prescott, 1996)0

3-1-6-2 الحفظ المتوسط الأمد (Medium-term conservation)

نميت العزلات على وسط الأگارالمغذي المائل (Slant) بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة , ثم حفظت بدرجة حرارة (4) م ، وأستمرت عملية الإدامة للعزلات بشكل دوري كل أربعة أشهر وذلك بتنشيطها على وسط Trypticase soya broth, وتمت إعادة تنميتهاعلى وسط زرعي مائل جديد لضمان بقائها (Collee *et al*., 1996)0

3-6-1-3 الحفظ طويل الأمد (Long-term conservation)

حضر وسط الحفظ بإضافة (3-2) مل من الكليسيرول إلى (85) مل من وسط مرق نقبع القلب والدماغ (B.H.I.B) ووزع في قناني صغيرة ذات غطاء محكم عقم بالمؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد في درجة حرارة الغرفة لقح الوسط بمستعمرات نقية من الجراثيم المراد حفظها بإستخدام عروة ناقل الجراثيم (Loop) المعقم وحفظت في درجة حرارة (- 20) م (Croft,1999) 0

3-1- 7 الكواشف والمحاليل (Indicators & Reagents)

3-1-7-1- 1 الكواشف Indicators

3-1-7-1-1 محاليل ملون گرام (Gram Stain Solutions)

تم تحضيرمحاليل الصبغة وفقا لـ (Talib , 1996) وكما يلي :

أ- صبغة البنفسج البلوري (Crystal Violet)

حضرت بإذابة (1) غم من مسحوق الصبغة في حجم من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الماء المقطر، تم ترشيح المحلول مرتين بورق الترشيح (Whatman) وحفظت في قنينة زجاجية نظيفة ومعقمة 0

ب - صبغة السفرانين (Safranin)

حضرت بإذابة (0.5) غم من مسحوق الصبغة في حجم معين من الكحول الاثيلي ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الكحول الاثيلي (95%) وتم ترشيحه أيضاً بورق الترشيح (Whattman) وحفظت في قنينة زجاجية نظيفة ومعقمة 0

جـ - مثبت الايودين (Mordant Iodine)

حضر بمزج (1) غم من حبيبات الأيودين مع (2) غم من يوديد البوتاسيوم (KI) بواسطة جفنة خزفية (Morter) ، تم مزجهم جيداً وأذيب الخليط في (20) مل من الماء المقطر بعدها تم إكمال الحجم إلى (100) مل بالماء المقطر 0

د- محلول القصر (Decolorize)

تم إستعمال الكحول الاثيلي بتركيز (75%) لإزالة الصبغة 0

2-1-7-1-3 كاشف باريت (Barrit's Indicator)

حضر هذا الكاشف وفقاً لماء جاء في (Macfaddin, 2000) من محلولين :-

1- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH 40%)0 والذي تم تحضيره بإذابة (40) مل من هيدروكسيد البوتاسيوم في حجم معين من الماء المقطر ثم تم إكمال الحجم إلى (100) مل من الماء المقطر0

2- محلول الألفا نفثول (α – naphtol)0 حيث تم إذابة (0.05) غم من الألفا نفثول في حجم معين من الكحول الأثيلي المطلق ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الكحول الأثيلي المطلق 0

3-1-7-1-3 كاشف كوفاكس (Kovac's Reagent)

تم إستعمال هذا الكاشف من شركة (Himedia) للتحري عن جذور الأندول 0

4-1-7-1-3 كاشف الكاتاليز (Catalase reagent)

أستعملت مادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز (3%) للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الكاتاليز وتم حفظه في قنينة زجاجية معتمة وبعيدة عن الضوء (MacFaddin,2000) 0

5-1-7-1-3 كاشف أنزيم السايتوكروم اوكسيديز (Cytochrome Oxidase Indicator)

حضر هذا الكاشف بإذابة (1) غم من مادة مثيل بارافنيلين ثنائي أمين ثنائي هيدروكلورايد (N,N,N,N Tetramethyl – ρ –phenylene diaminedihydrochloride) في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الماء المقطر أيضاً وتم حفظه في قنينة زجاجية معتمة (Tang & Stratton,2006) 0

6-1-7-1-3 كاشف المثيل الأحمر (Methyl red reagent)

حضر بإذابة (0.1) غم من مسحوق المثيل الأحمر في (30) مل من الكحول الأثيلي بتركيز (95%) ، بعدها أكمل الحجم إلى (50) مل بالماء المقطر(Balows *et al.*,1991)0

7-1-7-1-3 أشرطة نظام الأبيِ « Api» (Analytical Profile Index system)

تم إستخدام أشرطة نظام الأبي لبكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* والكواشف الخاصة بها المجهزة من الشركة الفرنسية Bio Merieux 0

3-1-7-2 المحاليل (Solutions)

3-1-7-2-1 محلول اليوريا (Urea solution)

تم تحضيره بإذابة (20) غم من مسحوق اليوريا (Urea powder) في حجم من الماء المقطر ثم أكمل إلى (100) مل من الماء المقطر أيضاً ليكون تركيزه النهائي (20%) ثم عقم المحلول بإستخدام مرشحات غشائية بقطر (0.45µm)0

3-1-7-2-2 محلول الملح الفسلجي (Normal saline)

حضر بإذابة (8.5) غم من كلوريد الصوديوم (NaCl) في حجم قليل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (1) لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة (Autoclave)0

3-1-7-2-3 محلول دارئ الفوسفات الفسلجي (Phosphate Buffered Saline‹‹PBS››)

حضر بإذابة (8) غم من كلوريد الصوديوم (NaCL) و (0.2) من كلوريد البوتاسيوم (KCL) و(1.4) غم من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين (Na_2HPO_4) و(0.25) من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) في حجم قليل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى (1) لتر من الماء المقطر أيضاً0 تم ضبط الأس الهيدروجيني إلى (7.2) وتم تعقيمه بالمؤصدة (Autoclave) وحفظ في درجة حرارة (4) م لحين الإستعمال استعمل هذا المحلول لتعليق وغسل الخلايا الجرثومية (Allen et al; 1977) 0

3-1-7-2-4 محلول مكفرلاند (McFarland solution)

حضر هذا المحلول وفقاً لما جاء في (Bollela *et al.*,1999) ويتكون من محلولين :-

- **محلول A:**

حضر بإذابة (1.175) غم من مسحوق كلوريد الباريوم ($BaCL_2.7H_2O$) في حجم معين من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الماء المقطر0

- **محلول B:**

وهو محلول (1%) من حامض الكبريتيك H_2SO_4 0

حضرت أنبوبة مكفرلاند ذات الرقم (0.5) وذلك بإضافة 0.05 مل من محلول (A) إلى 9.95 مل من المحلول (B) في أنبوبة نظيفة وجافة ، أستخدم لمقارنته مع عكورة العوالق البكتيرية 0

3-1-7- 3 الدوارئ المستعملة في دراسة تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني المؤثرة في إنتاج أنزيم مخثر البلازما (Coagulase) من قبل المكورات العنقودية Staphylococci

حضرت الدوارئ وفقاً لما جاء في (Colowick & Kaplan, 1955) ، وهذه الدوارئ ذات رقم هيدروجيني (4 ، 4.5 ، 5 ، 6 ، 6.5 ، 7 ، 7.5 ، 8 ، 9) 0

3-1-7- 3 -1 دارئ الفوسفات (Phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (4)

حضر بإذابة (6.8) غم من البوتاسيوم داي – هيدروجين أورثوفوسفيت (Potassium dihydrogen orthophosphate) في (700) مل الماء المقطر مع (10% حجم / حجم) من محلول حامض الأورثوفوسفوريك (Orthophosphoric acid) وأكمل حجم المحلول إلى (1) لتر بإضافة الماء المقطر0

3-1-7- 3 -2 دارئ الفوسفات والسترات (Citro-phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (4.5)

حضر (30) ملليترمن (0.2) مولاري داي – صوديوم هيدروجين أورثوفوسفيت (Disodium hydrogen orthophosphate) وتمت إضافة (6) مل من (0.1) مولاري حامض الستريك Citric acid ليكون الحجم النهائي (36) مل0

3-1-7- 3 - 3 دارئ الخلات (Acetate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (5)

حضر بإذابة (13.6) غم من خلات الصوديوم (Sodium acetate) مع (6) مل من حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) في كمية من الماء المقطر ثم أكمل حجم المحلول إلى (1) لتر بإضافة الماء المقطر إليه0

3-1-7- 3 -4 المحلول الدارئ (Buffer solution) ذو الرقم الهيدروجيني (5.5)

حضر بإذابة (54.4) غ م من خلات الصوديوم (Sodium acetate) في (50) مل من الماء المقطرمع التسخين إلى درجة حرارة (35) م إذا تطلب الأمر ، بعدها ترك المحلول ليبرد ثم أضيفت له (10) مل من حامض الخليك (Acetic acid) وببطء مع الرج ، ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الماء المقطر0

3-1-7- 3 - 5 دارئ الخلات (Acetate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (6)

حضر بإذابة (100) غم من خلات الأمونيوم (Ammonium acetate) في (300) مل من الماء المقطر وأضيف اليه (4.1) مل من حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) ثم أكمل الحجم إلى (500) مل بإضافة الماء المقطر0

3-1-7- 3- 6 دارئ الفوسفات والسترات (Citro-phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (6.5)

حضر هذا المحلول بمزج (29) مل من (0.1) مولاري حامض الستريك (Citric acid) مع (71) مل (0.2) مولاري داي– صوديوم هيدروجين أورثوفوسفيت (Disodium hydrogen orthophosphate) حيث أصبح حجم المحلول النهائي (100) مل 0

3-1-7- 3 - 7 دارئ الفوسفات (Phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني(7)

حضر هذا المحلول بمزج (1.361) غم من البوتاسيوم داي– هيدروجين أورثوفوسفيت (Potassium dihydrogen orthophosphate) في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى (100) مل بالماء المقطر أيضاً ، بعدها يتم إضافة (3.5 % وزن/ حجم) محلول داي – صوديوم هيدروجين أورثوفوسفيت (Disodium hydrogen orthophosphate) 0

3-1-7- 3 - 8 دارئ الفوسفات (Phosphate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (7.5)

حضر هذا المحلول بمزج (27.22) غم من البوتاسيوم داي– هيدروجين أورثوفوسفيت (Potassium dihydrogen orthophosphate) في (930) مل من الماء المقطر بعدها يتم إضافة (30% وزن/ حجم) من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (Potassium hydroxide) ثم أكمل حجم إلى (1) لتر بالماء المقطر0

3-1-7- 3 - 9 دارئ البورات (Borate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (8)

حضر هذا المحلول بإذابة (0.7456) غم من كلوريد البوتاسيوم (Potassium chloride) و(0.6179) غم من حامض البوريك (Boric acid) في حجم معين من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (1) لتر من الماء المقطر0

3-1-7- 3 -10 دارئ خلات الترس (Tris acetate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (8.5)

حضر هذا المحلول بإذابة (0.294) غم من كلوريد الكالسيوم (Calicium chloride) و(12.11) غم من قاعدة الترس (Tris base) في كمية كافية من الماء المقطر ثم أكمل حجم المحلول إلى (1) لتر بإضافة الماء المقطر0

3-1-7- 3 - 11 دارئ البورات (Borate buffer) ذو الرقم الهيدروجيني (9)

يتكون هذا الدارئ من محلولين :-

- **محلول (أ) :** حضر بإذابة (6.18) غم من حامض البوريك (Boric acid) و(0.1) مولاري من كلوريد البوتاسيوم (Potassium chloride) ليكون حجم المحلول النهائي (1) لتر0
- **محلول (ب) :** (0.1) مولاري من هيدروكسيد الصوديوم (Sodium hydroxide) 0

تم مزج (1) لتر من محلول أ مع (420) مل من محلول ب0

3-1-8 البلازما المستخدمة في اختبار تخثر الدم (Coagulase Test)

1- بلازما الإنسان (Human Plasma)

تم الحصول عليها من مصرف الدم في محافظة كربلاء المقدسة إما بشكل بلازما أو بشكل دم ، حيث حصل على البلازما من الدم بالنبذ المركزي بسرعة (3000 دورة / دقيقة) لمدة (20) دقيقة وتم فصل البلازما بواسطة سرنجة معقمة 0

2- بلازما الأرانب (Rabbit Plasma)

أستخدمت الدماء من الأرانب النيوزيلندية البيضاء إذ تم الحصول على الدم بواسطة طعنة القلب (Heart puncture) وجمع الدم بواسطة أنابيب حاوية على مادة مانعة للتخثر ، ثم تم النبذ المركزي بسرعة (3000 دورة / دقيقة) لمدة (20) دقيقة وتم الحصول على البلازما 0

3- بلازما الأغنام (Sheep Plasma)

تم الحصول على الدم من مذبح مدينة كربلاء المقدسة حيث جمع الدم من الوريد الوداجي Jugular vein مباشرة بعد الذبح بواسطة قناني تحتوي مادة مانعة التخثر وفي المختبر تم فصل البلازما بواسطة النبذ المركزي بسرعة (3000 دورة / دقيقة) لمدة (20) دقيقة 0

4- بلازما الأبقار (Cow Plasma)

تم الحصول على الدم من مذبح مدينة كربلاء المقدسة أيضاً حيث جمع الدم من الوريد الوداجي بعد الذبح مباشرة بواسطة قناني تحتوي مادة مانعة التخثر وفي المختبر تم فصل البلازما بواسطة النبذ المركزي بسرعة (3000 دورة / دقيقة) لمدة (20) دقيقة0

2-3 طرائق العمل (Working Methods)

1-2-3 جمع العينات (Specimens Collection)

1-1-2-3 العينات السريرية (Clinical samples)

تم الحصول على العينات السريرية لجميع الأعمار ولكلا الجنسين وقد تم ذلك للفترة من (15 نيسان إلى 15 تموز ، 2013) من مستشفى الحسين (ع) العام في كربلاء المقدسة ومستشفى كربلاء للاطفال حيث تم أخذ العينات بإستعمال مسحات قطنية معقمة (Disposal Cotton Swabs) محفوظة داخل أنابيب بلاستيكية محتوية على وسط Brain Heart Infusion Broth (B.H.I.B) والذي أستخدم كوسط ناقل ، وكذلك بواسطة Sterile container بالنسبة للإدرار(Urine) حيث تم نقلها إلى مختبر الدراسات العليا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم ووضعت في الحاضنة بدرجة (37) م لفترة (2-4) ساعة شملت العينات السريرية مسحات أنفية (Nasal swabs) ، مسحات الأذن (Ear swabs) ، مسحات الجلد (Normel skin swabs) ، مسحات الحروق (Burn swabs) ، مسحات الجروح (Wound swabs) ، عينات الإدرار (Urine swabs) ومسحات صالة العمليات والتي تشمل (الأرضيات ، جدران ، الأجهزة ، المعدات وملابس العاملين)0

2-1-2-3 العينات الغذائية (Foods samples)

شملت العينات محلية الصنع كل من الأجبان (Cheese) ، الألبان (Dairy) ، البوظة (Ice cream) وأعتمد جمعها من الباعة المتجولين كما شملت العينات الغذائية على عينات اللحوم (Meat) من القصابين في الاسواق المحلية وتم جمع كافة العينات الغذائية في أنابيب إختبار نظيفة ومعقمة 0

2-2-3 التشخيص (Identification)

تم إنتخاب المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية الخاصة بالعزل والاستنبات وفق الفقرة (3-1-5) بعدها تم إجراء عدداً من الفحوصات التشخيصية لجميع العزلات إعتماداً على طريقة (Dubey & Maheshwari., 2009) و (Macfaddin, 2000) لتشخيص المكورات العنقودية كذلك تم إستعمال نظام API System الخاص ببكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* لتشخيص الأنواع التابعة لهذا الجنس 0

1-2-2-3 الصفات المزرعية (Culture characteristics)

شخصت العينات أولياً بملاحظة الصفات المزرعية للمستعمرات النامية من ناحية شكل المستعمرة (Shape) ، حجمها (Size) ، ارتفاعها (Raised) ، حافاتها (Edge) ، لونها (colour) وتأثيرها في الوسط مثل تحلل الدم وتخمر المانتول ، وتم تنقيتها وذلك بإعادة زرعها على وسط الأگارالمغذي (Nutrient agar) ثم حضنت بدرجة حرارة (37) م ولمدة (24) ساعة 0

2-2-2-3 الفحص المجهري (Microscopic Examination)

أجري الفحص المجهري لمعرفة إستجابة العزلة البكتيرية لملون گرام (Gram stain) حيث تم أخذ جزء من مستعمرة نامية على وسط الأگارالمغذي (Nutrient agar) بواسطة عروة ناقل (Loop) ثم عمل منها مسحة بكتيرية (Bacterial smear) على شريحة زجاجية نظيفة وتم تصبغيها بملون گرام ثم تم فحصها بالمجهر الضوئي (Light microscope) بإستعمال العدسة الزيتية وتم ملاحظة شكل ولون الخلايا البكتيرية 0

3-2-2-3 الفحوصات البايوكيميائية (Biochemical Test)

1-3-2-2-3 فحص إنتاج إنزيم الكاتاليز (Catalase Test)

أجري هذا الأختبار بنقل جزء من المستعمرة النقية إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة ثم أضيف إليها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز (3%) والمحضر وفق الفقرة (3--1-7-1-4) وأستدل على النتيجة الموجبة بظهور فقاعات هوائية على سطح الشريحة

الزجاجيـة دلالـةً علـى قـدرة الجـراثيم علـى إفـراز إنـزيم الكاتـاليز الـذي يحطـم محـلول بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) إلى (H_2O و O_2) (MacFaddin ,2000) 0

2-3-2-2-3 إختبار فعالية إنزيم السا يتوكروم أوكسيديز (CytochromeOxidase Test)

تـم ترطيـب ورقـة الترشـيح بقطـرات مـن محلـول الكـاشف والمحضـر وفـق الفقرة (3-1-7-1-5) ثم نقلت المستعمرة البكتيرية النامية على وسط الأگارالمغذي وبعمر(24) ساعة بواسـطة أعـواد خشـبية معقمـة ومزجـت جيـداً مـع الكاشـف إن ظهوراللـون البنفسـجي خلال (10-20) ثانية يعد نتيجة موجبة (Atlas *et al* ., 1995)0

3-2-2-2-3 -3 إختبار فوكس بروسكر (Voges – Proskauer Test)

تـم تلقـيح وسـط مـاء البتـون والفوسـفيت والكلوكـوز (Glucose phosphate peptone water) والمحضروفق الفقرة (3-1-5-17) بالعزلـة البكتيريـة وحضنت بدرجـة حـرارة (37) م ولمدة (24 -48) ساعة بعدها يـتم إضافـة (0.6) مـل من كاشف ألفانفثول و (0.2) مل من محلـول هيدروكسيد البوتاسيوم لكل أنبوبـة والمحضـرين وفـق الفقرة (3-1-7-1-2) مـع الـرج ، إن ظهـوراللـون الـوردي بعد (15) دقيقـة يعد نتيجـة موجبـة للإختبار (Balows *et al*.,1991)0

3-2-2-2-3 -4 إختبار إستهلاك السترات (Citrate utilization Test)

تـم تلقيـح وسـط أگار سيمون ستريت (Simmon's citrate agar) والمحضـروفق الفقـرة (3-1-3-3-16) بالعزلـة البكتيريـة ، ثـم حضـنت بدرجـة حـرارة (37) م لمـدة (24) سـاعة ، إن تحـول لـون الوسـط الأخضـر إلـى الأزرق يـدل علـى إيجابيـة التفاعـل (Macfaddin, 2000)0

3-2-2-2-3 -5 فحص إنتاج إنزيم محلل الدم (Hemolysin Test)

تـم إسـتنبات العـزلات البكتيريـة قيـد الفحـص علـى وسـط أگار الـدم (Blood agar) والمحضـر وفـق الفقـرة (3-1-5-6) بطريقـة التخطـيط وحضـنت الأطبـاق بدرجـة حـرارة (37) م لمـدة (24) سـاعة ، تمـت ملاحظـة وجـود التحلـل فـي الأطبـاق وكـذلك شـكله ونوعـه وضعت بعدها الأطباق بدرجـة حرارة (4) م لمدة (24) ساعة لإستكمـال تشخيص نـوع التحلل (Mathai *et al*.,2003) 0

6-3-2-2-3 إختبار الحركة (Motility Test)

لقح وسط الحركة (Motility medium) والمحضر وفق الفقرة (3-1-5-19) بمستعمرات العزلة البكتيرية بطريقة الطعن بإستعمال الإبرة ، بعدها حضنت الأنابيب بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة ، إن ظهور ضبابية حول منطقة الطعن يدل على قابلية البكتيريا على الحركة (Murray *et al*.,2003)0

7-3-2-2-3 إختبار تحلل اليوريا (Urea hydrolysis Test)

لقح وسط أگارالييوريا (Urea agar) والمحضر وفق الفقرة (3-1-5-14) بالعزلة البكتيرية بطريقة الطعن ثم حضنت بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة ، إن تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي يعد نتيجة موجبة تدل على قابلية البكتيريا على إنتاج إنزيم محلل اليوريا (Murray *et al*.,2003)0

8-3-2-2-3 إختبار السكريات (Sugers Test)

لقحت أوساط تخمر السكريات الحاوية على السكريات المراد إختبارها والمحضرة وفق الفقرة (3-1-5-20) بمزروع بكتيري بعمر(18-24) ساعة وحضنت بدرجة حرارة (37) م لمدة (7) ايام مع متابعة تغيرات اللون يومياً ، إن تغير لون الوسط من الأحمر الى الأصفر دلالة على إيجابية الإختبار (Mahon *et al*.,2011)0

9 -3-2-2-3 الكشف عن إنتاج مخثر البلازما (Coagulase Test)

1-9 -3-2-2-3 الطرق النوعية (Qualtitative Method)

1- إختبار الانبوب (Tube Coagulase Test)

تم التحري عن إنزيم مخثر البلازما الحر(Free Coagulase) باستخدام إختبارالأنبوب (Tube test) حيث تم إضافة (0.8) مل من بلازما الدم إلى (0.2) مل من وسط Brain heart infusion broth والملقح بالعزلات البكتيرية النامية بعمر (18- 24) ساعة في أنابيب صغيرة وحضنت بدرجة حرارة (37) م لمدة (4) ساعات تم خلالها مراقبة حدوث التخثر الذي يدل على إيجابية الفحص في حين تركت الأنابيب التي لم يظهر فيها التخثر في درجة حرارة الغرفة إلى اليوم التالي (Holt *et al*., 1994)0

2- اختبار الشريحة (Slide Coagulase Test)

أجريت هذه الطريقة للتحري عن إنزيم مخثر البلازما المرتبط (Clumping Factor) وذلك بإستخدام شريحة زجاجية وضع عليها قطرة من بلازما الأرانب ثم أضيف اليها مستعمرات فتية من بكتريا المكـــــورات العنقوديـــــة بعمر (18-24) ساعة في وسط Brain heart infusion agar ومزجت جيداً ، إن ظهور التكتل خلال (5-10) ثانية دلالة على إيجابية الإختباركذلك تم إستخدام شريحة زجاجية أخرى ووضع عليها قطرة من العالق البكتيري مع المحلول الفسلجي والتي تمثل السيطرة السالبة (Baron *et al* ., 1994) 0

3-2-2-3- 9-2 الطرق الكمية (Quantitative Method)

1- إختبار صب الاطباق (Pour – Plate Test)

أتبعت طريقة (Parisi *et al*.,1973) للتحري عن انزيم مخثرالبلازما (Coagulase) في المكورات العنقودية المنتجة لأنزيم مخثر البلازما (CPS) حيث تم إستخدام وسط Brain Heart Infusion Agar المضاف اليه البلازما بتركيز (15%- 12 حجم / حجم) بعدها صب الوسط في أطباق بتري المعقمة وتركه حتى يتصلب حيث تم تلقيح الأوساط بالعزلات البكتيرية قيد الدراســة بطريقة التخطيط ، بعدها حضن بدرجـــة حـرارة (37) م ولمدة (24) ساعة إن ظهورهالات كثيفة حول المستعمرات دلالة على إيجابية الإختبار بعدها تم قياس قطر الهالات المتكونة0

2- إختبار الإنتشار في الشريحة (Diffusion slide assay)

أتبعت طريقـــة (Kohl & Johnson,1980) وهي طريقة أخرى للكشف عن انزيم مخثرالبلازما (Coagulase) المفرز من قبل المكورات العنقودية (CPS) حيث إستخدم وسط Brain Heart Infusion Agar المضاف إليه البلازما بتركيز (15%- 12 حجم / حجم) صب الوسط على شرائح زجاجية نظيفة بعد لصق جانبي كل شريحة بلاصق شفاف ، ثم تم عمل حفر بالثاقب الفليني في الوسط بمعدل حفرتين لكل شريحة بعدها ملئت الحفر بالراشح البكتيري الذي تم الحصول عليه بعملية النبذ المركزي (2000) rpm لمدة (5) دقائق للمزارع الفتية بعمر (18-24) ساعة والمنماة على وسط Brain heart infusion broth 0 إن ظهور هالات حول الحفر دلالة على إيجابية الإختبار وتم بعدها قياس قطر الهالات المتكونة0

4-2-2-3 تشخيص بكتريا *Staphylococcus* باستخدام (API Staph System)

لغرض تشخيص عزلات بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* على مستوى النوع فقد تم الإستعانة بالعدة التشخيصية لتشخيص الأنواع العائدة إلى هذا الجنس حيث أن (API Staph Kit) تتكون من (20 microtube) يحتوي كل منها على (Dehydrated substrate) ، بعد التلقيح بالعالق البكتيري وبعد فترة الحضن بدرجة حرارة (37) م˚ لمدة (24) ساعة نلاحظ أن الفعاليات الايضية للبكتريا (Bacterial Metabolism) تحدث تغير في اللون في حفر الشريط والذي إما أن يكون تلقائي (Spontaneous) أو يظهر بواسطة إضافة كواشف 0

1-4-2-2-3 مكونات عدة التشخيص بنظام API للمكورات العنقودية 0

1 - وسط بكتريا المكورات العنقودية (Ampoules of Staph medium)0

2 - إشرطة الإختبارات التشخيصية (API Staph strips) 0

3- صندوق الحضن (Incubation box) 0

4- قطارة الزيت المعدني (Mineral oil dropper) 0

5 - الكواشف الكيميائية (Chemical reagents)0

4-2-2-3 -2 آليـة استخدام اشرطة (Api Staph)

وتتلخص آليـة استخدام شريط (Api Staph) وحسب ما ورد في تعليمات الشركة المجهزة :-

1- تم فتح حافظة الشريط الحاوية على العديد من الحفر ورطبت بإضافة (5) مل من الماء المقطر إلى تلك الحفر0

2- حضر العالق البكتيري وذلك بنقل (5) مستعمرات منفردة من وسط أگار المانتول الملحي ومزجت بصورة جيدة بإضافتها إلى (5) مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم ثم رجت جيداً حتى أصبح المحلول عكراً0

3- تم بواسطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة تلقيح الشريط وذلك بملء الجزء السفلي Tube بالعالق البكتيري ولجعل الظروف لاهوائية ملء الجزء السفلى فقط لكل من الأنابيب ADH ، URE في حين ملء الجزء العلوي بزيت البارافين السائل والمعقم 0

4- تم إغلاق الحافظة بعد وضع الشريط بداخلها وحضنت بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة بعد الحضن سجلت النتائج للأنابيب ولكن بعد إضافة الكواشف التالية :-

1- كاشف إختبار الفوكس بروسكر (Voges – Proskaure test reagent)

أضيفت قطرة من كاشف VP1 ثم قطرة من كاشف VP2 إلى أنبوبة VP مع الإنتظار لمدة (10) دقائق تقريباً0

2- كاشف إختبار اختزال النترات (Nitrate Reduction test reagent)

أضيفت قطرة من كاشف NIT1 ثم قطرة من كاشف NIT2 إلى أنبوبة NIT مع الإنتظار لمدة (10) دقائق تقريباً0

3- كاشف إختبار إنزيم الفوسفاتيز القاعدي (Alkaline phosphatase test reagent)

أضيفت قطرة من كاشف Zyma ثم قطرة من كاشف Zymb إلى أنبوبة PAL مع الإنتظار لمدة (10) دقائق تقريباً0

سجلت النتائج حسب تعليمات الشركة المجهزة وصولاً إلى رقم مكون من سبعة أرقام ، وبعد ذلك تم البحث في الدليل المرفق لنظام (API Staph) والذي يعطى إسم العزلة المشخصة0

3-2-3 إختبار حساسية المكورات العنقودية للمضادات الحيوية (Antibiotic Susceptibility Test)

تم إتباع طريقة باور وجماعته (Bauer *et al.*,1966) في إختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية ، حيث تم نقل (3) مستعمرات من العزلة البكتيرية الفتية النامية على وسط صلب بواسطة عروة الناقل (Loop) إلى وسط Trypton soys broth المحضر وفق الفقرة (3-1-5-18) والموضوع في أنابيب زجاجية بواقع (4) مل للأنبوب الواحد وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة (37) م لمدة (2-5) ساعة أو لحين ظهورالعكورة عدل تركيز الخلايا الجرثومية في الوسط بإستخدام أنبوبة مكفرلاند ذات القياس (0.5) المحضر وفق الفقرة (3-1-7-2-3) ، بعد ذلك تم زرع العالق الجرثومي على وسط Muller hinton agar والمحضر وفق الفقرة (3-1-5-21) بطريقة التخطيط بإستخدام مسحة قطنية (Cotton swab) مبللة بالعالق الجرثومي لغرض نشر البكتريا على سطح الأگار والحصول على نمو متجانس بعدها تركت الأطباق (5) دقائق وضعت بعدها أقراص المضادات الحيوية

(6 اقـراص للطبـق الواحـد) بإسـتخدام ملقـط معقـم حضـنت الأطبـاق بدرجـة حـرارة (37) م لمـدة (18) ساعة ، قرأت النتائج بقياس أقطار التثبيط حول أقراص المضادات الحيويـة بإسـتخدام المسـطرة بالمقارنة مع الجـدول رقـم (3-1) والـذي درجـت فيـه المعـدلات القياسـية لأقطـار التثبـيط للمضـادات الحيوية0

جدول (3-1) المضادات الحيوية المستعملة لإختبار حساسية المكورات العنقودية ، تراكيزها ، أقطار التثبيط القياسية والشركـــــة المجهـــزة لكل منها National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS,2011)

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز ملغم / قرص	اقطار التثبيط بالمليمتر			الشركة المصنعة
			مقاومة	متوسطة	حساسة	
Amikacin	Ak	30	≤14	16-15	≥17	Oxoid
Ampicillin	Am	10	≤ 28	-	≥ 29	Oxoid
Azithromycin	AZI	15	≤13	17-14	≥18	Oxoid
Ceftazidime	CAZ	30	≤ 14	17-15	≥ 18	Oxoid
Chloramphenicol	C	30	≤12	17-13	≥18	Oxoid
Ciprofloxacin	CIP	5	≤15	22-15	≥21	Oxoid
Erythromycin	E	50	≤13	22-14	≥18	Oxoid
Gentamycin	GM	10	≤12	14-13	≥15	Oxoid
Clindamycin	CD	15	≤15	20- 16	≥21	Oxoid
Methicillin	ME	5 µg	≤ 9	10-13	≥ 14	Oxoid
Streptomycin	S	30	≥ 11	14-12	≤ 15	Oxoid
Tetracyclin	TE	30	≤14	18-15	≥19	Oxoid

4-2-3 تحديد العوامل المؤثرة في إنتاج وفعالية أنزيم مخثر البلازما (Coagulase) من قبل المكورات العنقودية

تم دراسة عدداً من العوامل المؤثرة في إنتاج أنزيم مخثر البلازما (Coagulase)

3-2- 4-1 الوسط الغذائي (Culture medium)

تم إستخدام الأوساط الزرعية المبينة في الجدول أدناه كل من :-

ت	اسم الوسط	
-1	الوسط المصنع كيميائيا	Chemical defined medium (CDM)
-2	وسط نقيع القلب والدماغ	Brain Heart Infusion Broth
-3	وسط التربتك صويا	Tryptic Soy Broth
-4	وسط خلاصة الخميرة	Yeast extract broth
-5	وسط المرق المغذي	Nutrient Broth
-6	وسط ماء الببتون	Peptone water

تم تلقيح هذه الأوساط الزرعية بالعزلات البكتيرية الموجبة لأنزيم مخثر البلازما (CPS) وحضنها بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة وأجريت الإختبارات النوعية والكمية لأنزيم مخثر البلازما والموصوفة وفق الفقرة (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهالات الكثيفة المتكونة لدينا ومقارنتها لكل من الأوساط الزرعية0

3-2-4-2 درجة حرارة الحضن (Incubation temperature)

تم تلقيح الوسط الزرعي الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم بالعزلة البكتيرية الموجبة لأنزيم مختثر البلازما (CPS) وحضنها لمدة (24) ساعة بدرجات حرارية مختلفة (25-30-37-40) م وأجريت الإختبارات النوعية والكمية لأنزيم مختثر البلازما والموصوفة وفق الفقرة (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهالات الكثيفة المتكونة لدينا ومقارنتها لكل من الدرجات الحرارية المختلفة 0

3-2-4-3 الأس الهيدروجيني (pH)

تم تلقيح الوسط الزرعي الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم بالعزلة البكتيرية الموجبة لأنزيم مختثرالبلازما (CPS) وحضنها بدرجة الحرارة التي أعطت أعلى إنتاجية للانزيم بعد إستخدام عدداً من المحاليل الدارئة المختلفة والموضحة في الفقرة (3-1-7-3) وأجريت الإختبارات النوعية والكمية لأنزيم مختثر البلازما والموصوفة وفق الفقرة (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهالات الكثيفة المتكونة لدينا ومقارنتها لكل المحاليل الدارئة المختلفة 0

3-2-4-4 زمن الحضانة (Incubation time)

تم تلقيح الوسط الزرعي الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم بالعزلة البكتيرية الموجبة لأنزيم مختثر البلازما (CPS) وضبط الأس الهيدروجيني (pH) الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم وحضنها بدرجة الحرارة التي أعطت أعلى إنتاجية للانزيم بفترات حضانة مختلفة (4-18-24-48) ساعة وأجريت الإختبارات النوعية والكمية لأنزيم مختثر البلازما والموصوفة وفق الفقرات (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهالات الكثيفة المتكونة لدينا ومقارنتها لكل من فترات الحضانة المختلفة 0

3-2-4-5 نوع الحضانة (Incubation kind)

تم تلقيح الوسط الزرعي الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم بالعزلة البكتيرية الموجبة لأنزيم مختثر البلازما (CPS) وضبط الأس الهيدروجيني (pH) الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم وحضنها (بدرجة الحرارة وفترة الحضانة) التي أعطت أعلى إنتاجية للانزيم وإستخدام نوعين من الحضن (الحاضنة الثابتة والحاضنة الهزازة) وأجريت الإختبارات النوعية والكمية لأنزيم مختثر البلازما والموصوفة وفق الفقرة (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهالات الكثيفة المتكونة لدينا ومقارنتها لكل من النوعين من الحضن0

6-4-2-3 عدد الهزات (Shaking number)

تم تلقيح الوسط الزرعي الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم بالعزلة البكتيرية الموجبة لأنزيم مختر البلازما (CPS) وضبط الأس الهيدروجيني (pH) الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم وحضنها (بدرجة الحرارة وفترة الحضانة وحاضنة هزازة) التي أعطت أعلى إنتاجية للانزيم ثم تم إستخدام عدد هزات مختلفة (100-150-200) هزة وأجريت الإختبارات النوعية والكمية لأنزيم مختر البلازما والموصوفة وفق الفقرة (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهالات الكثيفة المتكونة لدينا ومقارنتها لكل من عدد من الهزات المستخدمة 0

7-4-2-3 نوع البلازما (Plasma kind)

تم تلقيح الوسط الزرعي الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم بعد إضافة أنواع مختلفة من البلازما إليه (كل على إنفراد) والتي ذكرت في الفقرة (3-1-8) بالعزلة البكتيرية الموجبة لانزيم مختر البلازما (CPS) وضبط الأس الهيدروجيني (pH) الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم وحضنها (بدرجة الحرارة وفترة الحضانة وحاضنة هزازة بعدد هزات معينة) التي أعطت كلها أعلى إنتاجية للانزيم وأجريت الإختبارات النوعية والكمية لأنزيم مختر البلازما والموصوفة وفق الفقرة (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهالات المتكونة لدينا ومقارنتها لكل من أنوع البلازما المستخدمة0

8-4-2-3 تركيز البلازما (Plasma concentration)

تم تلقيح الوسط الزرعي الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم بعد إضافة تراكيزمختلفة (كل على إنفراد) من نوع البلازما الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم إليه بالعزلة البكتيرية الموجبة لانزيم مختر البلازما (CPS) وضبط الأس الهيدروجيني (pH) الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم وحضنها (بدرجة الحرارة وفترة الحضانة وحاضنة هزازة بعدد هزات معينة) التي أعطت أعلى إنتاجية للانزيم أيضاً وأجريت الإختبارات النوعية والكمية لأنزيم مختر البلازما والموصوفة وفق الفقرة (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهالات المتكونة لدينا ومقارنتها لكل تركيز من البلازما المستخدمة0

9-4-2-3 تـأثير إضافـة ايونـات امـلاح المعـادن (Salts ions addition effect Minerals)

تم دراســـــة تأثيرإضافـــة عدداً من أيونات أملاح المعادن في إنتاج أنزيم مخثر البلازما (Coagulase) مـن قبـل المكـورات العنقوديـة واتبعـت طريقـة (عبـد الحميـد واخـرون،2013) حيث حضر المحلول الخـزين لكـل مـن أيونـات امـلاح المعـادن (ملـح كلوريـد الصـوديوم Nacl ، ملح كلوريد المغنيسيوم $Mgcl_2$ ، ملح كلوريـد البوتاسـيوم Kcl و ملـح كلوريـد الكالسـيوم $Cacl_2$) بتركيز (20) ملي مولارلكل منهـا ثـم حضـر منـه التركيـز (10) ملـى مـولار والـذي يضـاف إلـى الوسط الزرعى الذي أعطـــى أعلى إنتاجية للانزيم (كل على إنفراد) بعـدها لقـح الوسـط الزرعـى بعـــد إضـــافة تركيـــز معـــين مـــن نـــوع البلازمـــا الـــذي أعطـــى أعلـــى إنتاجيـــة للانـــزيم بالعزلة البكتيرية الموجبـــة لانزيم مخثر البلازما (CPS) وضبط الأس الهيدروجيني(pH) الذي أعطى أعلى إنتاجية للانزيم (بدرجة الحرارة وفترة الحضانة وحاضنة هزازة بعـدد هـزات معينـة) التي أعطت كلها أعلى انتاجية للانزيم وأجريت الإختبارات النوعيـة والكميـة لأنـزيم مخثرالبلازمـا والموصوفة وفق الفقرة (3-2-2-3-9) حيث تم قياس قطر الهـالات المتكونـة لـدينا ومقارنتهـا لكـل تركيز من أملاح أيونات المعادن المستخدمة0

5-2-3 التصميم والتحليل الاحصائي

أتبع فـي تصميم التجربة التصميم العشوائي التام (Completely Randomized Design) ‹‹C.R.D›› وبمكررين0 وأستعمل إختبـــــار L.S.D علـــــى مستوى احتمال 0.05 لمقارنة المتـوسـطـات بيـن المعـامـلات (الراوي و عبد العزيز ، 1980) 0

.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة
Result & Discussion

1-4 العزل (Isolation)

1-1-4 العينات السريرية (Clinical sample)

تم جمع (102) عينة سريرية لجميع الأعمار ولكلا الجنسين من مستشفى الحسين (ع) العام في مدينة كربلاء المقدسة ومستقى كربلاء للاطفال من شهر 15 نيسان لغاية 15 تموز2013 وكما هو موضح في الجدول (4-1) أدناه0

جدول رقم (4-1) أنواع وأعداد العينات السريرية المستخدمة في الدراسة

نوع العينة	عدد العينات السريرية
مسحات الأنف Nasal swabs	23
مسحات الأذن Ear swabs	22
مسحات الجلد Skin swabs	21
مسحات الحروق Burn swabs	14
مسحات الجروح Wound swabs	8
مسحات صالات العمليات Operation swabs	8
عينات الإدرار Urine samples	6
المجموع الكلي للعينات Total samples	102

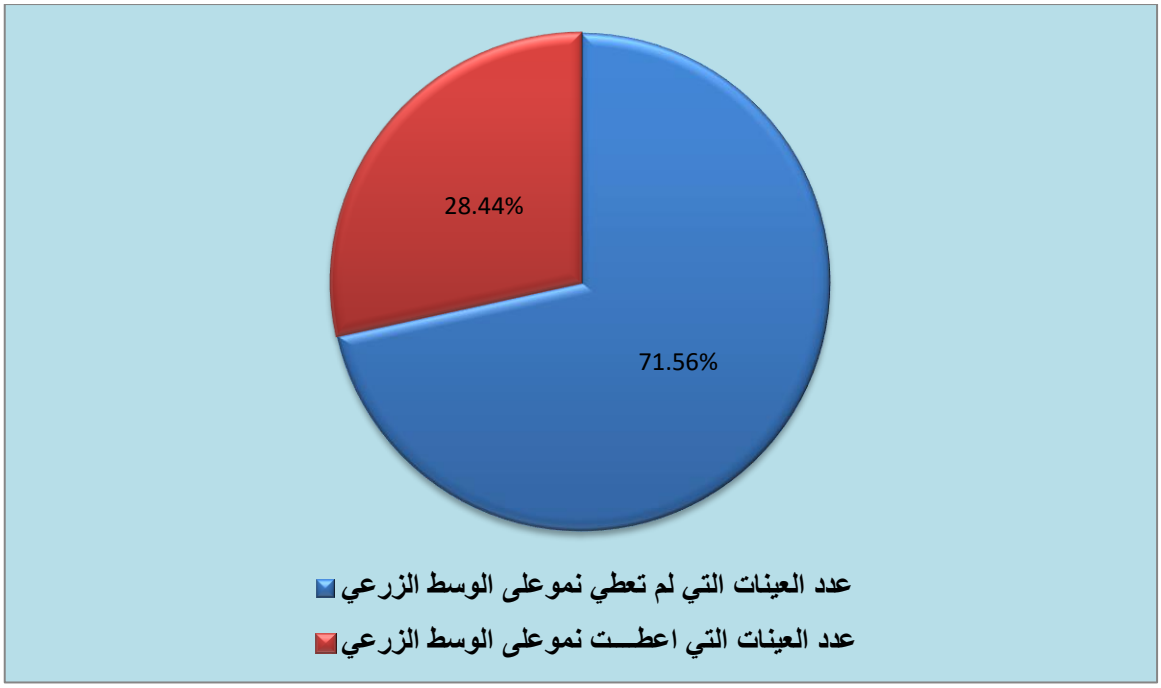
لوحظ من خلال الزرع المختبري للعينات السريرية والموضح غي الشكل (4-1) أن عدد العينات التي أعطت نتيجة موجبة للزرع المختبري (73) عينة شكلت نسبة (71.56%) بينما كان عدد العينات التي أعطت نتيجة سالبة للزرع المختبري (29) عينة شكلت نسبة (28.44%) وهذه النتائج تتوافق تقريباً مع ما ذكره (Daniel *et al.*, 2013) . إذ وجد أن نسبة العينات السريرية التي أعطت نمواً كان (70%)0

في حين أن الشكل (4-2) يوضح أن عدد العزلات البكتيرية الموجبة لملون گرام (G+ v) كانت (51) عزلة من المجموع الكلي للعزلات التي أعطت نمواً على الأوساط الزرعية شكلت نسبة (69.86%) أما عدد العزلات البكتيرية السالبة لملون گرام G-ve كانت (22) عزلة من المجموع الكلي للعزلات التي أعطت نمواً على الأوساط الزرعية شكلت نسبة (30.14%)0 هذا وقد أشار الباحث (Sarkar *et al.,*2014) إلى أن نسبة البكتريا الموجبة لملون گرام G+ ve كانت (66.0%) من بين العزلات السريرية التي تم جمعها وهذا يقارب نوعاً ما نتائج الدراسة الحالية 0

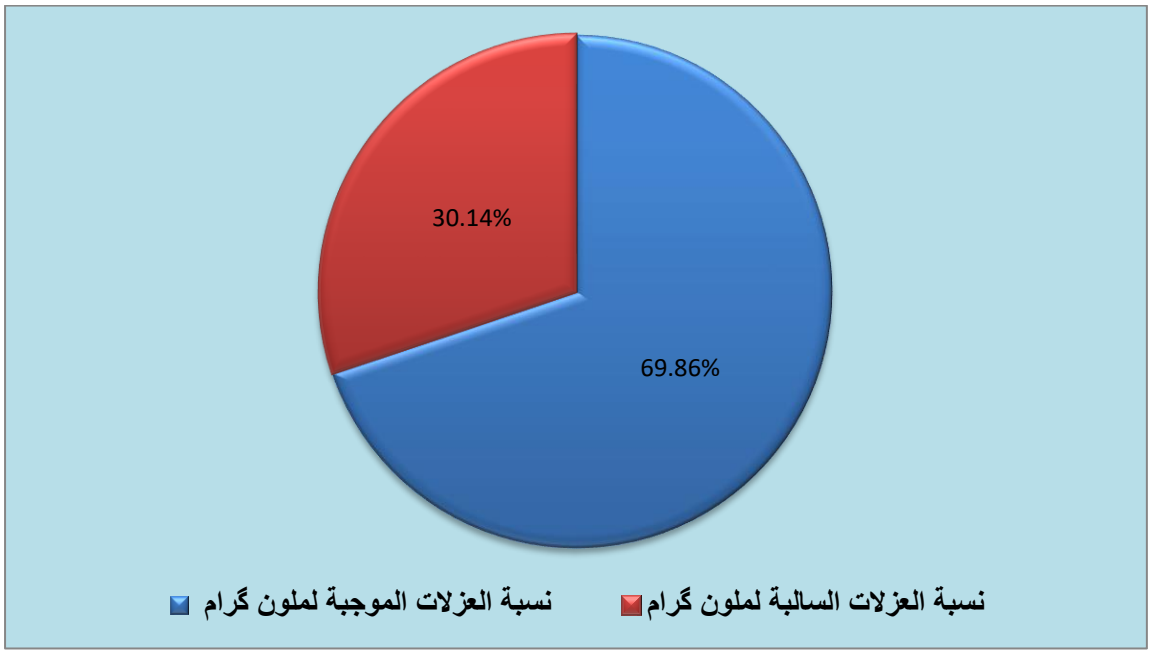
يبن الشكل رقم (4-3) أن عدد عزلات المكورات العنقودية (Staphylococci) التي تم الحصول عليها من جميع العينات السريرية هي (23) عزلة تشكل نسبة (45.09%)0 فقد ذكر (Taneja *et al.*,2013) إن نسبة المكورات العنقودية التي تم الحصول عليها من عينات سريرية (45.0%) من أصل (215) عينة ، كذلك أشار الباحث (شقيفة ،2005) أن عدد المكورات العنقودية التي تم الحصول عليها من أصل (100) عينة هي (47) عزلة والتي تظهر التقارب في النتائج المستحصل عليها0

وعند النظر في الشكل رقم (4-4) فإن عدد عزلات المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) التي تم الحصول عليها من جميع عزلات المكورات العنقودية هي (14) عزلة تشكل نسبة (60.86%) في حين كان عدد عزلات المكورات العنقودية السالبة لأنزيم مخثرالبلازما (CNS) التي تم الحصول عليها من جميع عزلات المكورات العنقودية (Staphylococci) هي (9) عزلات وتشكل نسبة (39.13%) وعند المقارنة مع نتائج الباحث (Nwoire *et al.*,2013) والذي أستحصل على (57) عزلة من المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مخثر البلازما (CPS) تشكل نسبة (39.5%) من بين (144) عزلة من المكورات العنقودية (Staphylococci) والتي تظهر التقارب مع نتائج الدراسة الحالية0

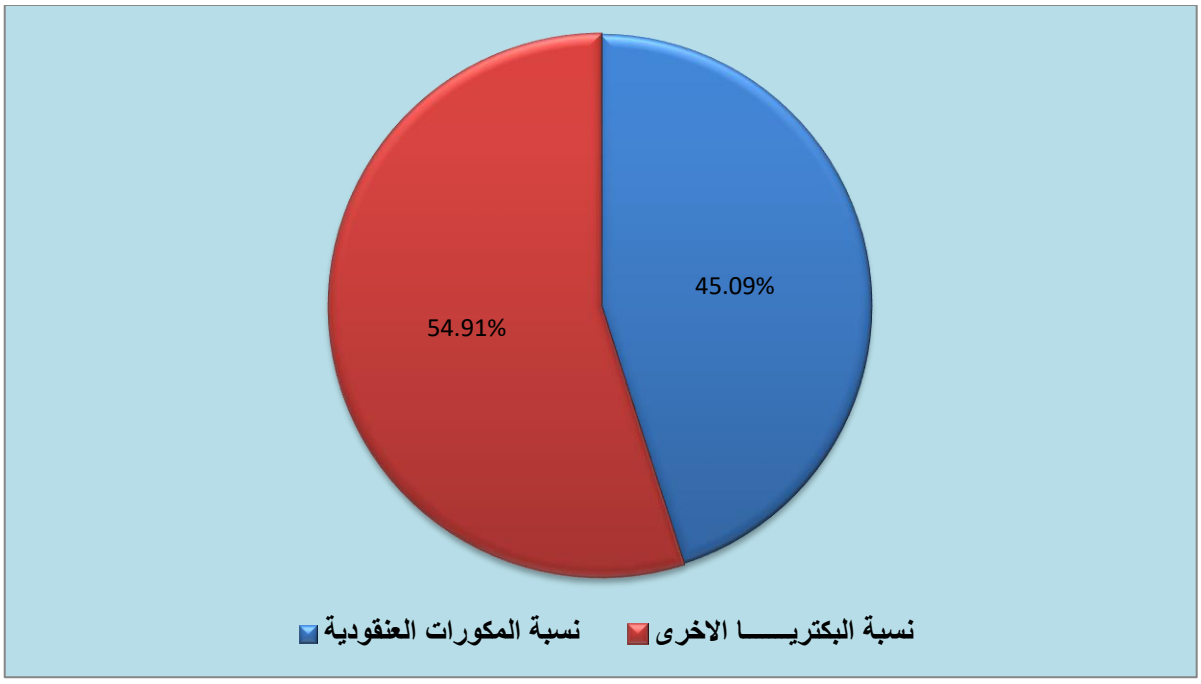
إن إختلاف النسب المئوية التي تم الحصول عليها توافق أو تختلف مع دراسات سابقة أخرى ويعود التوافق والإختلاف إلى جملة من الأسباب يقع في مقدمتها إختلاف الطرق والوسائل التي تم أخذ العينات بها ، إضافة إلى الثقافة الصحية التي تختلف من شخص إلى آخر وكذلك يعود إلى مواقع أخذ المسحات وعددها أو إلى مستوى نظافة بيئة المستشفى والأدوات المستخدمة ، أدت أكملها الى التباين الملحوظ في النسب المئوية0



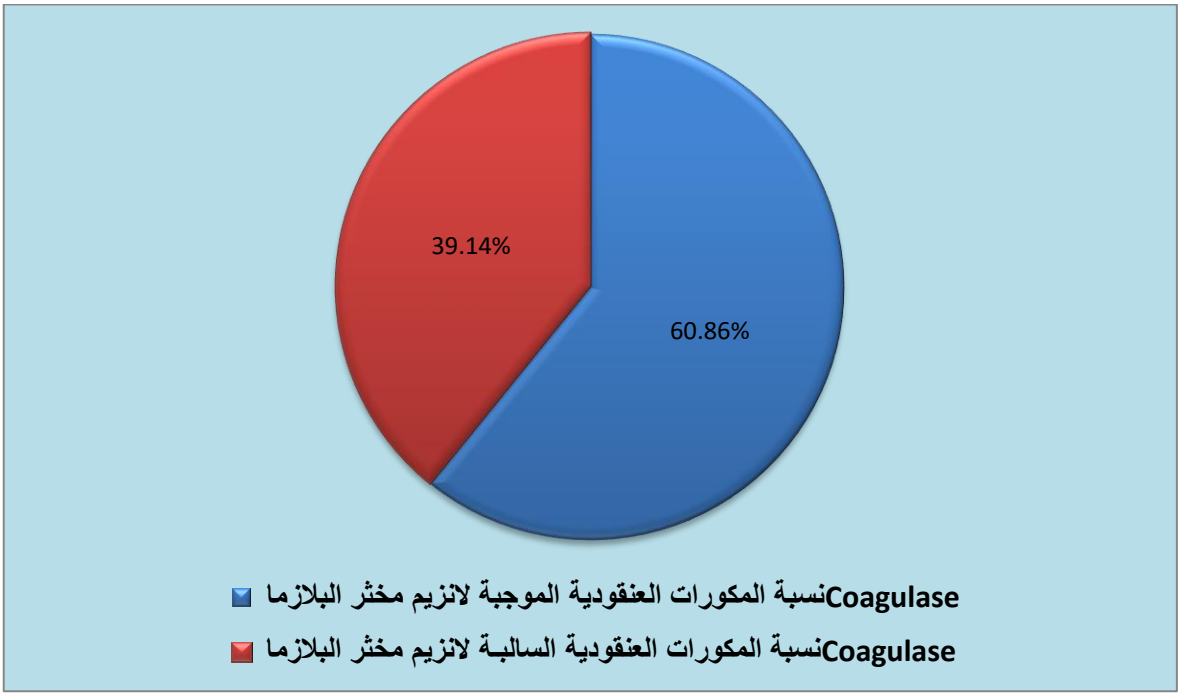
شكل رقم (4-1) النسبة المئوية للعينات السريرية التي أعطت نمو على الوسط الزرعي



شكل رقم (4-2) النسبة المئوية للعزلات البكتيرية الموجبة لملون گرام G+ve من العينات السريرية



شكل رقم (4-3) النسبة المئوية للمكورات العنقودية في العينات السريرية



شكل رقم (4-4) النسبة المئوية للمكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مختر البلازما (CPS) في العينات السريرية

2-1-4 العينات الغذائية (Food sample)

جمعت خلال فترة الدراسة (35) عينة غذائية للفترة من 15 نيسان لغاية 15 تموز2013 وأعتمد جمع العينات من الباعـــة المتجولين في مركز مدينة كربلاء المقدسة وكما هو موضح في الجدول (5-4) أدناه 0

جدول رقم (4-2) أنواع وأعداد العينات الغذائية المستخدمة في الدراسة

نوع العينة		عدد العينات الغذائية
عينات الأجبان	Cheese samples	12
عينات الألبان	Dairy samples	12
عينات اللحوم	Meat samples	6
عينات البوظة	Ice cream samples	5
المجموع الكلي للعينات	Total samples	35

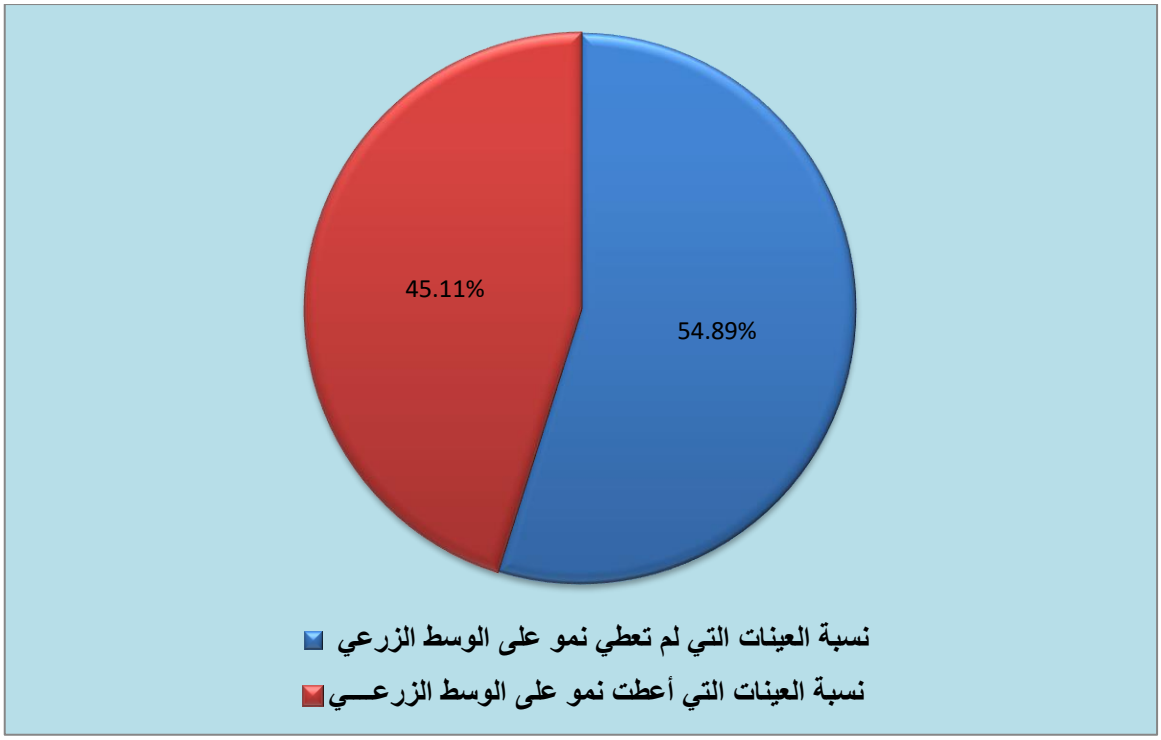
يوضح الشكل رقم (4-5) أن عدد العينات التي أعطت نتيجة موجبة للزرع المختبري (19) عينة شكلت حوالي نسبة (54.28%) في حين كان عدد العينات التي أعطت نتيجة سالبة للزرع المختبري (16) عينـــة شـــكلت حـــوالي نســـبة (45.72%) وهـــذه النتـــائج تتوافـــق تقريبـــاً مع (El-Gedawy, 2014)0

بينما يبين الشكل رقم (4-6) أن عدد العزلات البكتيريـــة الموجبـة لملون گرام (G+ve) كانت (11) عزلة من المجموع الكلي للعزلات التي أعطت نمواً على الأوساط الزرعية والبالغة (19) عينة شكلت نسبـــة (57.89%) أما عـــدد العزلات البكتيريـــة السالبـــة لملـــون گرام (G-ve) كـانت (8) عزلات من المجموع الكلـــي للعزلات التي أعطت نمواً على الأوساط الزرعية شكلت نسبة (42.10%)0 هذا وقد أشار الباحثان (lee & Selminen ,1995) إلى أن عدد البكتريا الموجبة لملون گرام (G+ve) كانت (172) عزلة شكلت نسبة (57.33%) من بين العينات الغذائية مختلفة المصادر والبالغة (300) عينة التي تم جمعها وهذا يقارب نوعاً ما الى نتائج الدراسة الحالية0

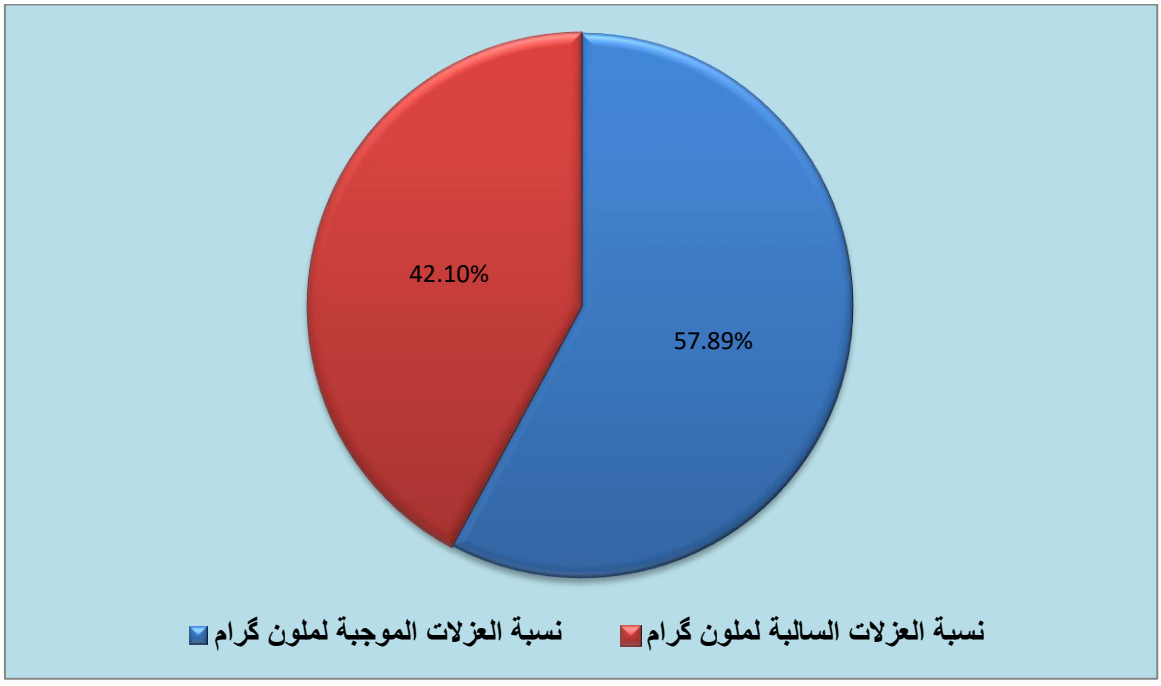
يبين الشكل رقم (4-7) أن عدد عزلات المكورات العنقودية التي تم الحصول عليها من العينات الغذائية هي (5) عزلات تشكل نسبة (45.45%) من عدد العزلات البكتيرية الموجبة لملون گرام (G+ve) والبالغة (11) عزلة فقد أشار (Özpin *et al*.,2013) إلى أن نسبة المكورات العنقودية التي تم الحصول عليها من عينات غذائية (45.0%) من أصل (20) عينة ، كذلك أشار الباحث (El-Jakee *et al* .,2013) أن عدد المكورات العنقودية التي تم الحصول عليها من أصل (100)عينة هي (47) وهذا يقارب نوعاً ما إلى نتائج الدراسة الحالية

وحين النظر في الشكل (4-8) فإن عدد عزلات المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مختزالبلازما (CPS) التي تم الحصول عليها من جميع عزلات المكورات العنقودية هي (3) عزلات من أصل (5) عزلات تشكل نسبة (60%) في حين كان عدد عزلات المكورات العنقودية السالبة لأنزيم مختزر البلازما (CNS) التي تم الحصول عليها من جميع عزلات المكورات العنقودية (Staphylococci) هي (2) عزلة تشكل نسبة (40%) وهذا يقارب تقريباً ما وصل إليه الباحثان (Abd El-Hamid & Bendary, 2013) واللذان إستحصلا على (18) عزلة من المكورات العنقودية الموجة لأنزيم مختز البلازما (CNS) شكلت نسبة (39.13%) من بين (46) عزلة من المكورات العنقودية 0

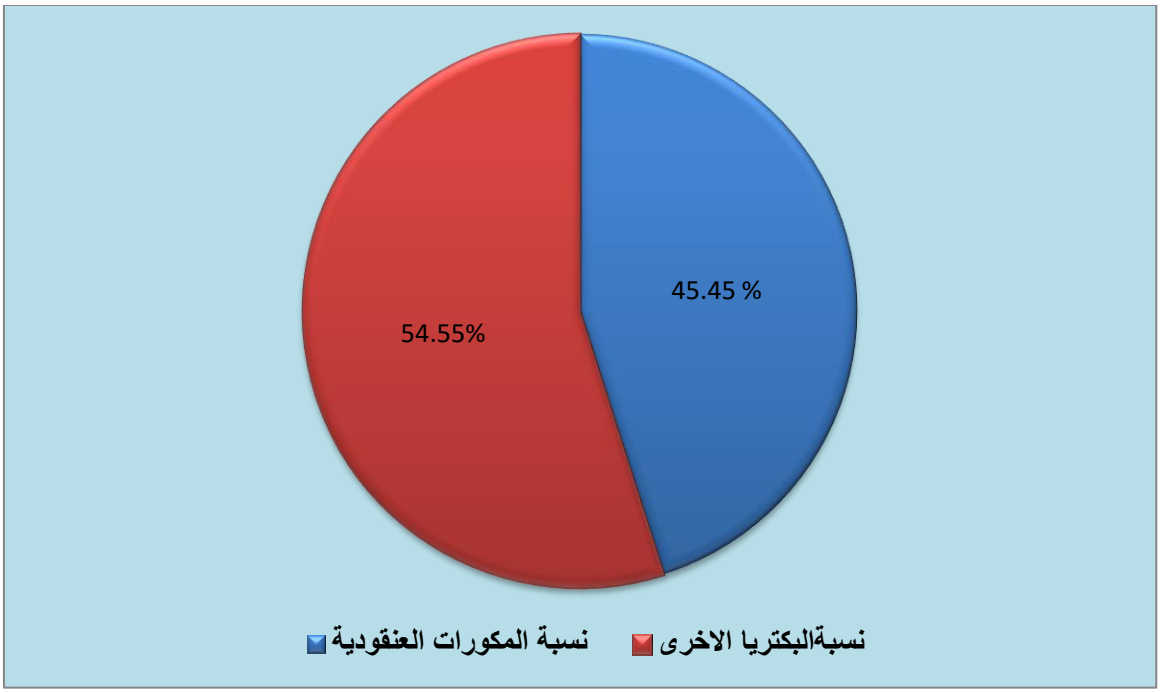
إن إختلاف النسب المئوية التي تم الحصول عليها توافق أو تختلف مع دراسات سابقة أخرى ويعود التوافق والإختلاف إلى جملة من الأسباب يقع في مقدمتها إختلاف الطرق والوسائل التي تم أخذ العينات بها ، وكذلك يعود إلى مواقع أخذ المسحات وعددها ، اضافة الى كيفية التعامل مع العينات الغذائية من قبل الباعة المتجولين كظروف الخزن التي تستخدم من قبلهم وكذلك ربما يعود إلى فصل السنة أدت أكملها الى التباين الملحوظ في النسب المئوية (Guss,2011)0



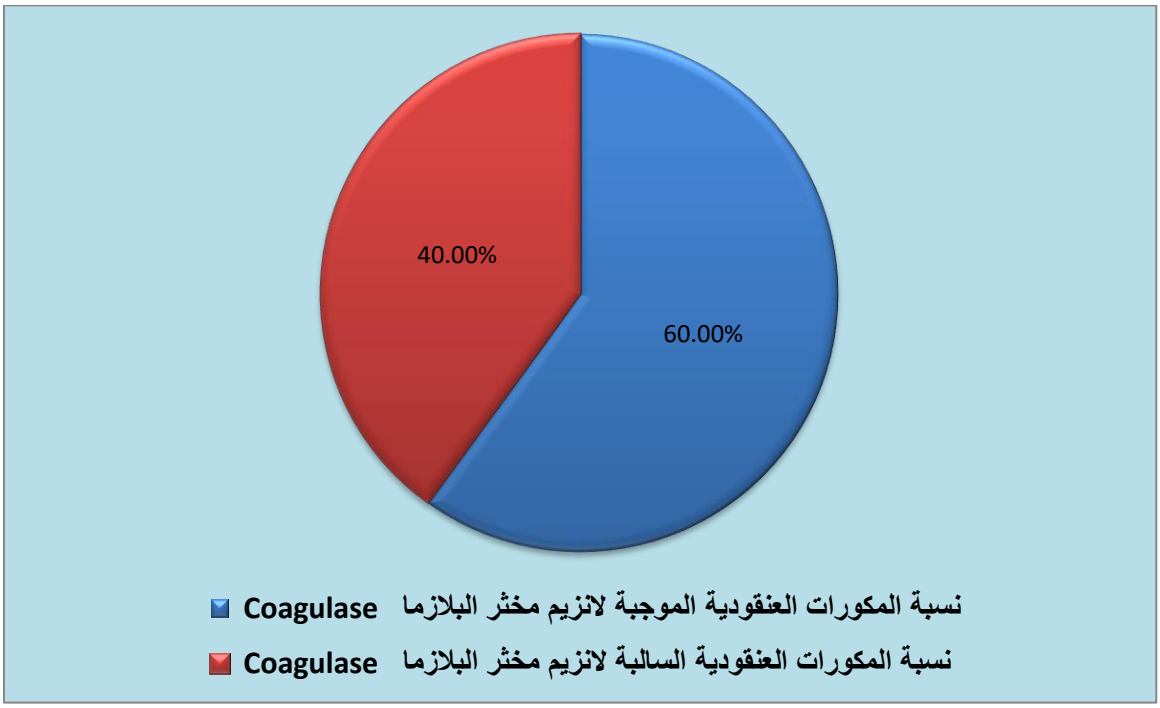
الشكل رقم (4-5) النسبة المئوية للعينات الغذائية التي أعطت نمو على الوسط الزرعي



الشكل رقم (4-6) النسبة المئوية للعزلات البكتيرية الموجبة لملون گرام G+ve من العينات الغذائية



الشكل رقم (4-7) النسبة المئوية للمكورات العنقودية في العينات الغذائية



الشكل رقم (4-8) النسبة المئوية للمكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مخثر البلازما CPS في العينات الغذائية

2-4 التشخيص (Diagnosis)

تم تشخيص العزلات البكتيرية المعزولة من كافة العينات الغذائية والسريرية وفقاً إلى (William *et al*., 2009) ، (Dubey & Maheshwari., 2009) و (Macfaddin , 2000) وأيضاً كانت النتائج التي تم الإستحصال عليها للإختبارات الشكلية والكيموحياتية والتي أجريت على العزلات الجرثومية المعزولة مطابقة لما ورد في أنظمة التشخيص المعتمدة (Koneman *et al*., 1997)، (Levinson & Jawetz, 2000) و (Brooks *et al*., 2001)0

شخصت العزلات البكتيرية التابعة لجنس *Staphylococcus* مبدئياً إعتماداً على صفاتها المظهرية عند تنميتها على الأگارالمغذي (Nutrient agar) حيث ظهرت بكتريا المكورات العنقودية من خلال تنميتها على هذا الوسط أنها مستعمرات دائرية ملساء كبيرة نسبياً (Large circular) ومرتفعة قليلاً (Low raised) وذات لون أبيض معتم ، ثم أصبح لونها اصفراً شاحباً عند تنميتها فترة أطول وهذا يوافق ما ذكره (السعدي واخرون ،2014)0

1-2-4 الصفات المجهرية (Microscopic Characteristics)

ظهرت بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci) من خلال الفحص المجهري للشرائح الملونة بملون گرام بإستخدام المجهر الضوئي الإعتيادي بإستعمال العدسة الزيتية 0 حيث تم ملاحظة شكل الخلايا، إنتظامها ، طريقة تجمعها ، وتفاعلها مع ملون گرام ووجد بأنها خلايا موجبة لملون گرام ذات شكل كروي (Spherical cells) بقطر(1) mm تقريباً متجمعة بشكل عناقيد العنب (Cluster of grapes) وتكون بأشكال مفردة كروية (Single cocci) أو أزواج (Pair)أو رباعية (Tetrad) وهذا ما ذكره (Matar .,2014) 0

2-2-4 الصفات الزرعية (Cultural Characteristics)

تم إستخدام العديد من الأوساط الزرعية الإغنائية والتفريقية لغرض ملاحظة نمو المكورات العنقودية ونذكر منها ما يأتي : -

4-2-2-1 وسط أگار الدم (Blood agar)

ظهرت بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* من خلال تنميتها على هذا الوسط أنها مستعمرات دائرية كبيرة نسبياً (Large circular) ، مرتفعة قليلاً (Low raised) ، صفراء إلى ذهبية (Yellow – Golden) تحيطها منطقة شفافة ضيقة على وسط أگارالدم نتيجة لتحليلها الكامل للدم من نوع بيتا (β) أما عزلة *S.hyicus* فظهرت بشكل مستعمرات صغيرة بيضاء (White small) ، معتمة (Opaque) ، ناعمة (Smooth) ولا تحاط بمنطقة شفافة دلالة على عدم قدرتها لتحليل الدم (Benson, 2001) 0

4-2-2-2 وسط أگارالمانيتول الملحي (Mannitol salt agar)

إن وسط أگارالمانيتول الملحي هو وسط تفريقي وإختياري بسبب إحتوائه على نسبة عالية من الأملاح (10% - 7.5%) والتي بالإمكان تحملها من قبل جنس المكورات العنقودية (*Staphylococcus*) كذلك يحتوي الوسط على سكر المانيتول وكاشف أحمر المثيل حيث إن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* ظهرت مستعمراتها صفراء بقطر (2-3) mm قادرة على تخمير سكر المانيتول وإنتاج منتجات حامضية يعزى إليها السبب في تحويل لون الوسط من الأحمر الى الأصفر في حين ظهرت مستعمرات *S.hyicus* بيضاء اللون بقطر (1-2) mm غير قادرة على تخمير سكر المانيتول وكذلك لا تحول لون الوسط إلى الأصفر 0 (Leboffe & Pierce , 2010)

4-2-2-3 وسط P agar

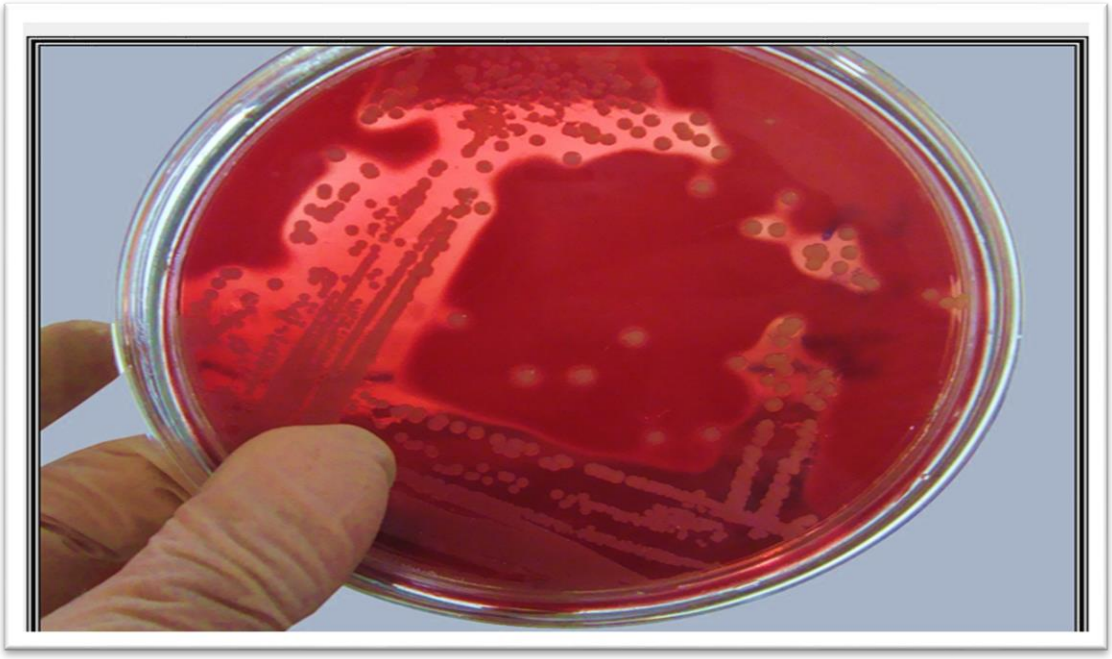
حيث ظهرت بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* عند تنميتها على هذا الوسط أنها مستعمرات دائرية (Circular) ، قليلة التحدب (Low convex) ، لماعة (Glistening) معتمة (Opaque) وغير محببة (Non pigmented) بقطر (3.5 – 4.5) mm وهذا يتوافق لما ذكره (Foster *et al* .,1997) فيما لم تبدي *S. hyicus* أي نمو على هذا الوسط0

4-2-2-4 وسط أگار بيرد باركر(Baird-Parker agar)

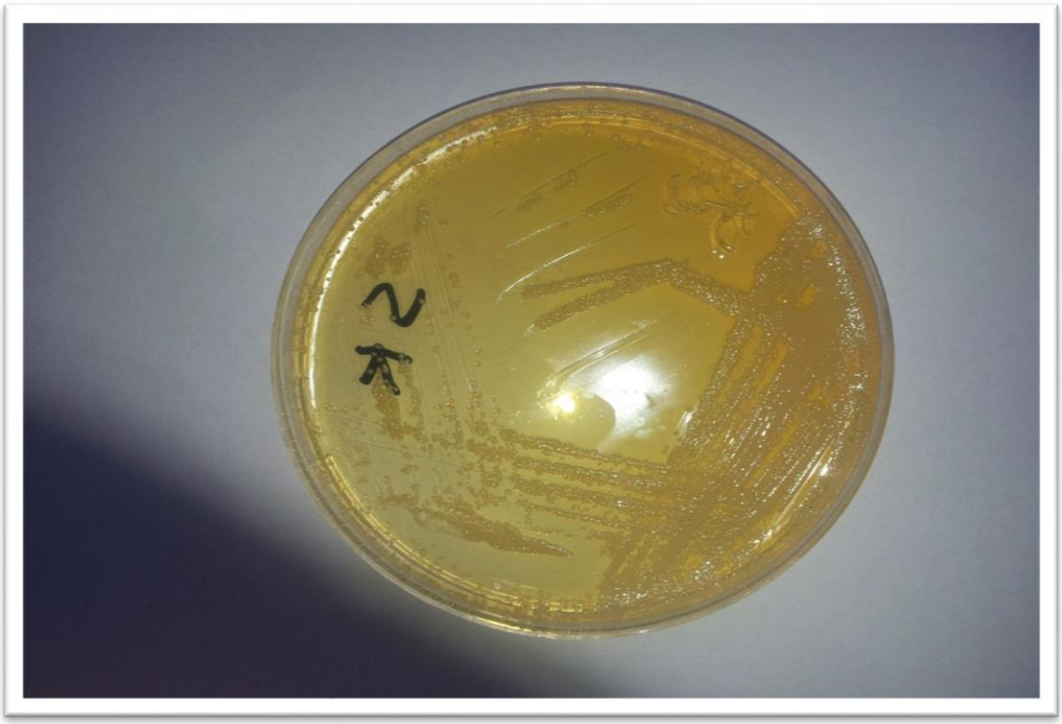
إن هذا الوسط هو إنتقائي وتفريقي لعزل المكورات العنقودية Staphylococci من النماذج الغذائية حيث امتازات عزلات *S. aureus* بأنها مستعمرات رصاصية إلى سوداء غامقة براقة محدبة (Dark grey-black shiny convex) بقطر(1-1.5) mm خلال (18) ساعة من النمو وأكثرمن (3) mm خلال (24) ساعة مع إحاطتها بمناطق صافية أما بعض المستعمرات فأعطت لوناً أسود والأخرى أعطت ألواناً بنية (Brown) وكلها غير براقة تعود الى *S.hyicus* وتأتي هذه النتائج مطابقة لما ذكره (O'Brien *et al*., 2009) 0

4-2-2-5 وسط أگار شليفر- كرامر (SK Agar)

يعتبر وسط إنتقائي وتفريقي لعزل المكورات العنقودية Staphylococci من النماذج الغذائية حيث إمتازت عزلات *S. aureus* وعزلة *S.hyicus* بأنها مستعمرات دائرية (Circular) صغيرة ذات لون أصفرغامق (Dark yellow) محدبة لماعة بقطر (2.5 - 2) mm وتأتي هذه النتائج مطابقه لما ذكره (Weimer,2007)0



الشكل (4-9) نمو المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* على وسط Blood agar



الشكل (4-10) نمو المكورات العنقودية Staphylococci على وسط SK agar

الشكل (4-11) نمو المكورات العنقودية Staphylococci على وسط P agar

جدول (4-3) إختلاف أشكال المستعمرات لبكتريا *S.aureus* وبكتريا *S.hyicus* على أوساط زرعية مختلفة

إسم الوسط	*S.aureus*	*S.hyicus*
وسط أگار الدم الاساس (Blood agar base)	مستعمرات دائرية كبيرة نسبياً (Large circular)، مرتفعة قليلا (Low raised)، صفراء إلى ذهبية (Yellow– Golden) تحيطها منطقة شفافة ضيقة على وسط أگار الدم نتيجة لتحليلها الكامل للدم من نوع بيتا (β) 0	مستعمرات صغيرة بيضاء (White small) ، معتمة (Opaque) و ناعمة (Smooth) لا تحاط بمنطقة شفافة دلالة على عدم قدرتها لتحليل الدم0
وسط أگارالمانيتول الملحي (Mannitol salt agar)	مستعمراتها صفراء بقطر (2-3) mm	مستعمراتها بيضاء اللون بقطر (1-2) mm

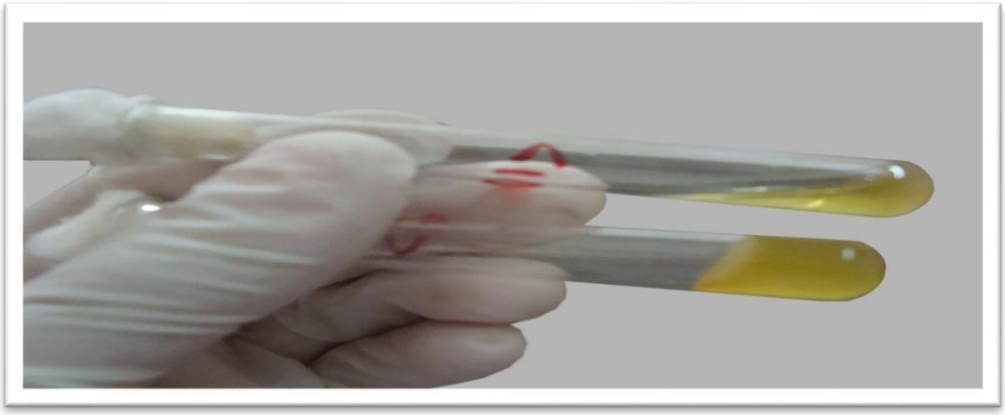
وسط P agar	مستعمرات دائرية (Circular) ، قليلة التحدب (Low convex) ، لماعة (glistening) ، معتمة (Opaque) وغير محببة (Non pigmented) بقطر(3.5 – 4.5) mm **0**	لا تبدي *S. hyicus* أي نموعلى هذا الوسط0
وسط أگار بيرد باركر Baird-Parker agar	مستعمرات رصاصية إلى سوداء غامقة براقة محدبة (Dark grey - black shiny) بقطر (1-1.5) mm خلال (18) ساعة من النمو وأكثر من (3) mm خلال (24) ساعة0	أعطت لون بني (Brown) غير براق**0**
وسط أگارشليفر- كرامر (SK Agar)	مستعمرات دائرية (Circular) صغيرة ذات لون إصفر غامق(Dark yellow) محدبة لماعة بقطر(2-2.5) mm **0**	مستعمرات دائرية (Circular) صغيرة ذات لون أصفر غامق (Dark yellow) محدبة لماعة بقطر(2-2.5) mm **0**

3-2-4 الصفات البايوكيميائية (Biochemical Characteristics)

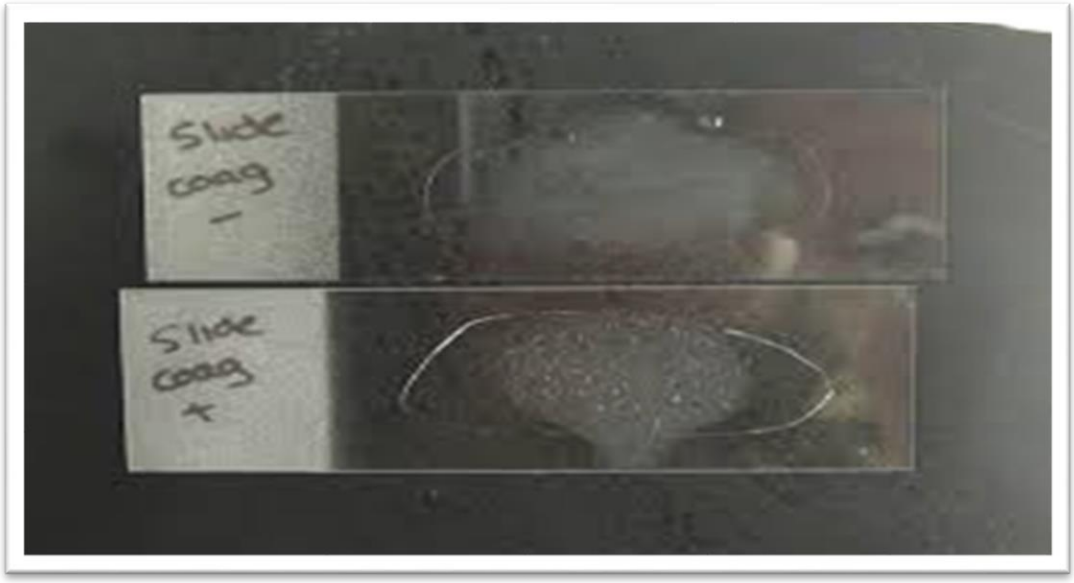
تم إخضاع العزلات البكتيرية قيد الدراسة إلى إختبارات بايوكيميائية عدة فظهرت كافة العزلات موجبة لفحص الكتاليز (Catalase test) والذي يميز جنس المكورات العنقودية (Staphylococci) عن المسبحيات (Streptococci) كما أجري فحص الأوكسيديز (Oxidase test) والتي ظهرت فيه جميع العزلات أنها سالبة ويستخدم هذا الفحص للتمييز الأولي بين جنس المكورات العنقودية Staphylococci عن جنس الـ Micrococci .

بعد تشخيص العزلات على مستوى الجنس تم تميزها على مستوى النوع ، وذلك بالإعتماد على فحص انزيم مخثر البلازما (Coagulase) بطريقة الانابيب (Tube coagulase test) وطريقة الشريحة (Slide coagulase test) حيث أبدت جميع العزلات التي أعطت

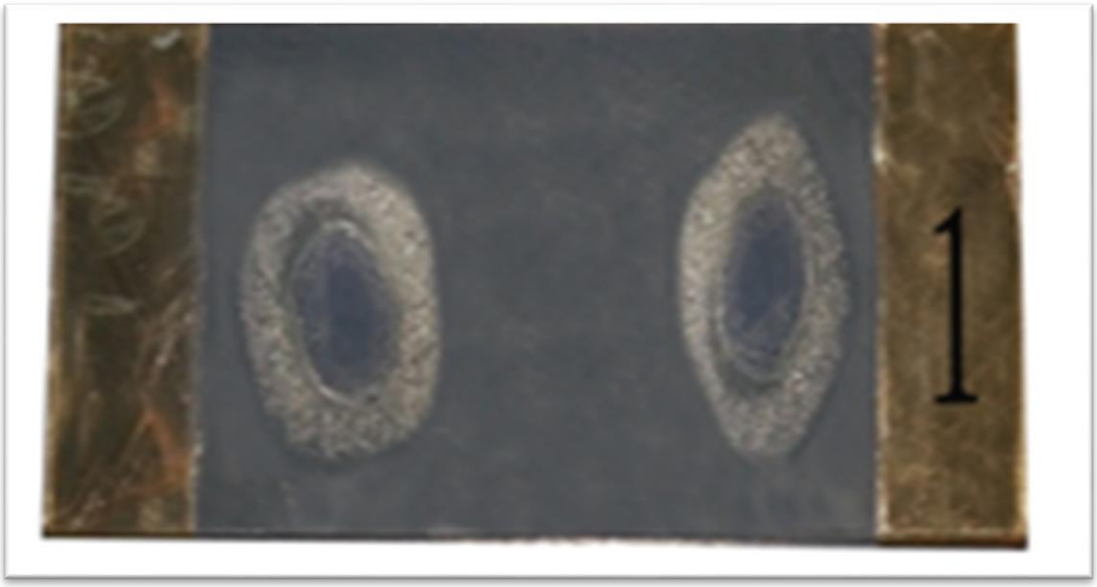
مستعمرات صفـــراء علـى وسط الـ Mannitol salt agar فحصـاً موجبـاً لكـلا الإختبـارين فيمـا أعطت المستعمرات البيضـاء النامية علـى نفس الوسط نتيجـة سلبية للإختبـارين عدا عزلـة واحـدة هي A10 والتـــي ظهرت مستعمراتها بيضـاء علـــى وسط الـ Mannitol salt agar أعطـت فحصـاً موجبـاً لإختبـار الانبوبـة (Tube coagulase test) ونتيجـــة سالبـــة لإختبـار الشـريحة (Slide coagulase test) وحيث أن فحص إنتـاج الانـزيم المخثـر للبلازمـا قـد يظهـر نتـائج كاذبـة أحياناً بسبب نوع وطبيعة البلازما المستعملة ومدة الحضـن ودرجـة التخثـر ، فضـلاً عـن إمكانيـــة إنتـــاج هذا الانزيم من نوع بكتيري آخـر(Vandenesch *et al.*,1994) الأمـر الـذي دعانـا إلـى إخضـاع العـزلات البكتيريـة قيـد الدراسـة إلـى إختبـارات بايوكيميائيـة أخـرى وكمـا هـو موضـح في الجدولين (4-4) و(4-5)0



الشكل(4-12) إختبار مخثر البلازما (Tube test) للمكورات العنقودية (Staphylococci)



الشكل(4-13) إختبار مخثر البلازما (Slide test) للمكورات العنقودية (Staphylococci)



الشكل (4-14) إختبار الإنتشار في الشريحة (Diffusion slide assay) للمكورات العنقودية (Staphylococci)

جدول (4-4) نتائج إختبارات الكيوحيوية والفسلجية المستخدمة في تشخيصبكتريا *S.aureus* و*S. hyicus*

الإختبارات الكيموحيوية	*S.aureus*	*S. hyicus*
صبغة گرام	+	+
فحص الأوكسيديز	-	-
فحص الكاتالايز	+	+
إنتاج الهيمولايسين	تحلل كامل	-
إختبارفوكس بروسكور	+	-
تحليل اليوريا	V	-
قابلية الحركة	-	-
إستهلاك السترات	+	+
إختبار مخثر البلازما بالأنبوب	+	+
إختبار مخثر البلازما بالشريحة	+	-
تخميرسكرالكلوكوز	+	+
تخميرسكرالسكروز	+	+
تخميرسكرالمالتوز	+	-
تخميرسكرالاكتوز	+	+
تخميرسكرالمانيتول	+	-
تخميرسكرالرافينوز	-	-

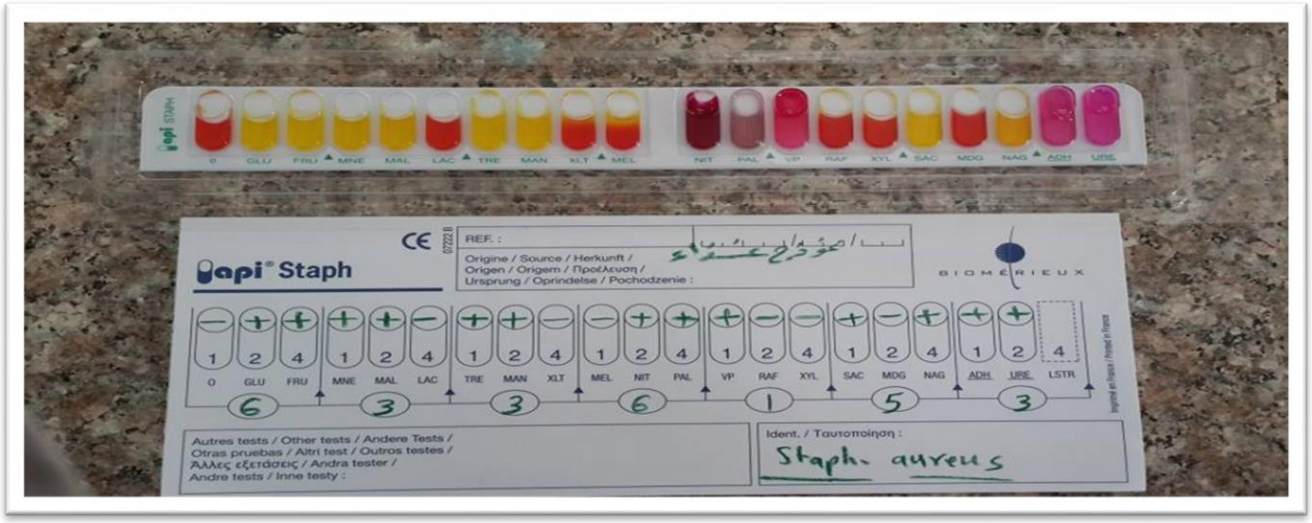
(+) نتيجة موجبة (-) نتيجة سالبة (V) نتيجة متغايرة

4-2-4 -Api staph test

تم إستعمال نظام Api staph لتأكيد النتائج البايوكيميائية للعزلات التي تم الحصول عليها اذ تميز هذا النظام بسهولة التحضير والأداء حيث أن النتائج التي تم التوصل اليها كانت مطابقة لتلك التي تم الحصول عليها في الإختبارات الكيوحيوية إذ أعطت العزلات تفاعلات مختلفة مع الفحوصات العشرين التي يشتمل عليها هذا النظام والتي حولت إلى أرقام مطابقة لنتيجة تلك التفاعلات ، فسرت تلك الأرقام بعد ذلك من خلال الرجوع إلى Analytical profile index المجهز من النظام المذكور 0 (Atlase, 1995)

إن إستعمال هذا النظام في التشخيص أصبح مهماً في مختبرات البكتريولوجي كونه يعتبر فحصاً دقيقاً وسريعاً وشاملاً لجميع الإختبارات المهمة في التشخيص وتلافياً للخطأ والخلط الحاصل في الطرق الإعتيادية0

CONTR	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-



شكل (4-15) الإختبارات التشخيصية التأكيدية باستعمال نظام Api-Staph system لجرثومة *S.aureus*

CONTR	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-

شكل (4-16) الإختبارات التشخيصية التأكيدية باستعمال نظام Api-Staph system لجرثومة *S. hyicus*

3-4 حساسية المكورات العنقودية للمضادات الحيوية Staphylococci Sensitivity for Antibiotic

تتزايد المقاومة بين سلالات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* في كثير من أنحاء العالم وقد يعود ذلك إلى الإستخدام الواسع للمضادات الحيوية في الوقاية والعلاج من الأمراض وكذلك بسبب الإستعمال العشوائي لها إضافةً لإمتلاك البكتريا وإكتسابها لعوامل وراثية تحمل صفة المقاومة للمضادات الحيوية وكذلك لشدة وتنوع الإمراضية التي تسببها هذه البكتريا 0(Diekema *et al* .,2004)

وفي هذه الدراسة تم إختبار حساسية العزلات المنتخبة لـ (12) مضاد حيوي بإستخدام طريقة الإنتشار القياسي للمضادات الحيوية وكما موضح في الفقرة (3-2-3) في المواد وطرائق العمل حيث أبدت بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* قيد الدراسة مقاومة لبعض المضادات الحيوية ويوضح الجدول (4-6) إرتفاع النسبة المئوية للبكتريا المقاومة لمضاد Erythromycin حيث بلغت 88.88% وإن هذا مقارب لما ذكره (Devapriya *et al.*,2013) والذي إستحصل على نسبة 88.00% من العزلات مقاومة لهذا المضاد وتعزى مقاومة البكتريا لمضاد Erythromycin إلى وجود نسخ متعددة من البلازميد الحامل للجين المسؤول عن المقاومة والذي يسيطر على إنتاج انزيمات محللة للمضاد مثل انزيم (Erythromycin esterase) (Murray,1998) 0هذا وقد اشار الباحث (Coombs *et al.*,2011) إلى أن عزلاته من المكورات العنقودية الذهبية أبدت مقاومة لمضاد Ciprofloxacin بنسبة 80% وهذا مقارب لما توصلنا إليه حيث بلغت نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد حوالى 77.77% 0 حيث أن مضادات Fluoroquinolone الذي ينتمي إليها هذا المضاد تمتاز بفعاليتها ضد انزيمات Gyrase و Topoisomerase والتي توقف عملية تضاعف الحامض النووي (DNA replication) وكذلك عملية الإستنساخ (Reygaert, 2013) حيث أن حدوث طفرات نقطية كروموسومية (Point mutations Chromosomal) في الجينات *gyrA* , *grlA* والجين *norA* ، إذ يشفر الجين الاول والثاني الأنزيمان DNA Topoisomerase و DNA gyrase اللذان يمثلان الهدف الأساسي للمضادات الحيوية من مجموعة الـ Fluoroquinolones ويعد هذان الانزيمان ضروريان لتضاعف DNA الخلايا البكتيرية في حين يشفرالجين *norA* للبروتين NorA المسؤول عن آلية الضخ (Efflux pump) لهذه المجموعة من المضادات إلى خارج الخلايا البكتيرية 0(Noguchi *et al.*,2002)

كما أبدت عزلة بكتريا *S.hyicus* مقاومة لبعض المضادات الحيوية كالمقاومة الواضحة جداً ضد مضادات Streptomycin ، Gentamycin ، Tetracycline وChloramphenicol وهذا يتفق مع (Pyzik & Marek.,2011) 0

كما أن أعلى حساسية لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* تم الحصول عليها كانت لمضاد Azithromycin حيث كانت النسبة 88.88% من عزلات المكورات العنقودية الذهبية حساسة لهذا المضاد وهو ما ذكره (Wertheim *et al* .,2005) حيث أن هذا المضاد هو من

مضادات Macrolide والذي يظهر تأثير ما بعد المضاد (Post antibiotic effect) حيث يمنع إعادة نمو البكتريا بعد فترة قصيرة من التعرض لهذا المضاد حيث أنه يثبط تصنيع البروتين من خلال إرتباطه مع 50s subunit لرايبوسومات البكتريا ، كما أظهرت العزلات البكتيرية حساسية عالياً تجاه مضاد Gentamycin حيث وصلت نسبة العزلات الحساسة الى 77.77% وهذا مقارب لما توصل إليه (Swarooprani *et al.*,2014) حيث كانت حوالى 72.4% من عزلاته حساسة لهذا المضاد حيث أن حساسية البكتريا للكلايكوسيدات الامينية (Aminoglycosides) تعتمد على نظام نقل المضاد الحيوي المتطلب للأوكسجين (Oxygen requiring drug transport system) لذا نجد أن هذه المضادات تكون فعالة ضد الميكروبات الهوائية لكنها غير فعالة ضد الميكروبات اللاهوائية الإجبارية بسبب فقدانها لهذا النظام (Williams & Wilkins,2009). كما أبدت عزلة بكتريا *S.hyicus* حساسية واضحة وملحوظة لمضاد الامبيسيلين Ampicillin حيث تظهر البنسيلينات تأثيراً واضحاً ضد الميكروبات بواسطة تثبيط طبقة الببتيدوگلايگان (Peptidoglycan layer) وهي إحدى مكونات الجدار الخلوي والذي يمنح الجدار الصلابة (Rigidity) ونتيجة لهذا التثبيط تفقد البكتريا صلابتها ولاحقاً إلى تحلل الخلية البكتيرية كما وأبدت عزلة *S.hyicus* حساسية واضحة لمضاد Erythromycin وكذلك لمضاد Clindamycin وهذا يتفق لما ذكره (Lyall *et al.*,2013) 0

إن نتائج هذه الدراسة أوضحت أن عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة تمتلك مقاومة متعددة للمضادات الحيوية ، هذا ما جعلها إحدى مسببات الأخماج الحاصلة في المستشفيات وكذلك إمتلاكها العديد من عوامل الضراوة والمتمثلة بإنتاج الذيفانات والانزيمات وغيرها من عوامل الضراوة الأخرى (Liu *et al.*, 2005)0

إن الإختلاف في مستوى الحساسية (Sensitivity) لمختلف المضادات الحيوية يعود لعدة أسباب منها تقليل نفاذية الجدار الخلوي (cell wall permeability) أو إنتاج Biofilm والذي يساعد البكتريا كثيراً في التغلب على فعل المضادات والتقليل من إنتشارها (Cheung *et al.*, 2012)0

جدول رقم (4-5) مقاومة عزلات المكورات العنقودية Staphylococci للمضادات الحيوية

المضـــــادات الحيويـــــة												العزلات البكتيرية
CAZ	**M**	**AMP**	**TE**	**ST**	**CD**	**GM**	**C**	**E**	**CIP**	**AZI**	**AK**	
S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	**A1**
S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	**A2**
R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	**A3**
S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	**A4**
S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	**A5**
S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	**A6**
R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	**A7**
R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	**A8**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**A9**
S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	**A10**

R (Resistant) S (Sensitive)

- AK (Amikacin) **- C (Chloramphenicol)**

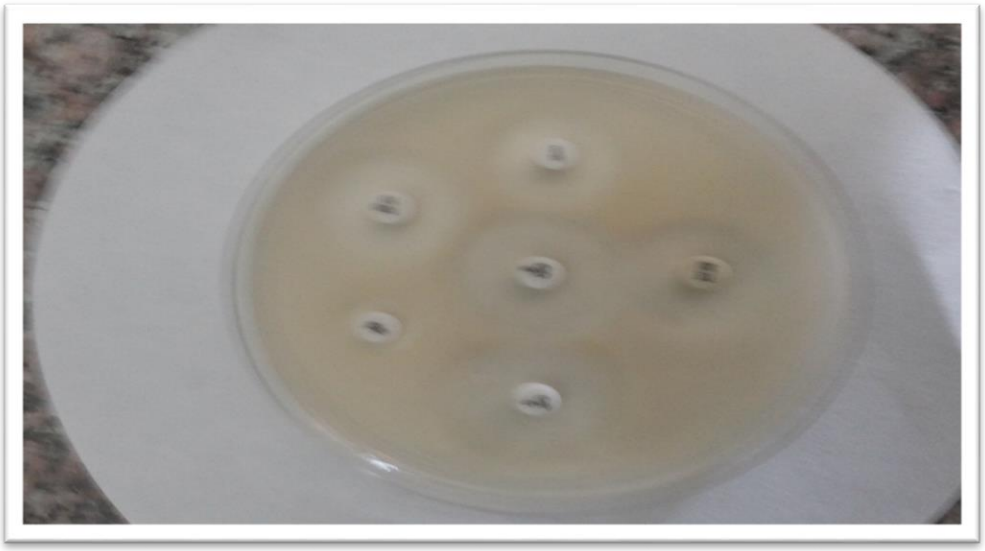
- AZI (Azithromycin) **- E (Erythromycin)**

- GM (Gentamycin) **- CAZ (Ceftazidime)**

- AMP (Ampicillin) **- M (Methicillin)**

- CD (Clindamycin) **- ST (Streptomycin)**

- CIP (Ciprofloxacin) **- TE (Teteacycline)**



الشكل (4-17) إختبار الحساسية للمكورات العنقودية Staphylococci

4-4 تأثير الظـــروف المختلفـــة فـــي إنتاج وفعاليـــة انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من قبل المكـــــورات العنقوديـــة (Staphylococci)

4-4-1 تأثير نوع الوسط الغذائي في إنتاج مخثر البلازما (Coagulase)0

أستخدمت في هذه الدراسة عدة أوساط زرعية لإنتـاج انـزيم مخثـر البلازمـا (Coagulase) مـن العـزلات البكتيريـة ، حيـث يتبـين مـن الجـدول رقـم (4-8) أن عـزلات بكتريـا *S.aureus* أعطـت أعلـى إنتاجيـة للانـزيم علـى وسـط (Chemical defined medium ‹CDM›) لوحظـت مـن خـلال أقطـار الهـالات الكثيفـة علـى الأوسـاط الزرعيـة والتـي بلغـت (4.167 ، 4.333 ، 4.167 ، 4.833 ، 4.000 ، 4.500 ، 4.667 ، 4.667 ، 4.500) ملـم للعزلات (A1 ، A2 ، A4 ، A3 ، A5 ، A6 ، A7 ، A8 ، A9) علـى التـوالي كمـا لـوحظ إنخفـاض إنتاجيـة الانـزيم علـى الأوسـاط الأخـرى مقارنـة مـع الوسط (CDM) حيث بلغت اقطـار الهـالات المتكونـة علـى وسط Nutrient broth

(2.167، 2.167 ، 1.667 ، 1.833 ، 1.333، 2.000 ، 1.667 ، 1.500 ، 1.167) ملم كما أعطت عزلة بكتريا *S. hyicus* أعلى إنتاجية لها على الوسط (CDM) مقارنة مع بقية الأوساط حيث بلغ قطر الهالة المتكونة (2.500) ملم كما لوحظ انخفاض انتاجيتها من الانزيم على بقية الأوساط الأخرى حيث بلغ أقل إنتاج لها على الوسطين Peptone btoth و Trypton soys broth بقياس قطر الهالة المتكونة والبالغة (1.667) ملم لكل منهما بينما إنعدم تماماً إنتاجها للانزيم على وسط Nutrient broth وتتفق النتائج مع ما ذكره (Turutoglu *et al.*,2005) إلى أن هذا النوع من المكورات العنقودية يقوم بإنتاج كمية قليلة من انزيم مخثر البلازما (Coagulase) مقارنة مع المكورات العنقودية الذهبية 0*S. aureus*

وتبين نتائج التحليل الاحصائي أن وسط الـ Chemical defined medium أظهر فرقا معنوياً في إنتاجية الانزيم بمقارنته مع بقية الأوساط الاخرى وعند مستوى احتمالية (0.05) ولكلا النوعين من البكتريا *S.aureus* و*S. hyicus* يليه وسط Brain heart infusion agar والذي أظهر تفوقاً معنوياً وعند مستوى احتمالية (0.05) على بقية الأوساط الأخرى 0

إن التغاير في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) يعود إلى تباين هذه الأوساط في المحتوى الكاربوني والنيتروجيني وعوامل النمو الأخرى اذ لوحظ أن أعلى إنتاجية كانت لوسط Chemical defined medium حيث يساعد هذا الوسط في الكثير من الفعاليات البايولوجية للبكتريا ويساعد في أن تسلك البكتريا مسارات أيض ثانوية (Metabolism pathway) كإنتاج الانزيمات وذلك لعدم توافر المواد الإغنائية في الوسط (Summers & Biggers,2003) ، أما وسط Brain heart infusion agar فيوصف بأنه وسط غني بالمغذيات ملائم لإنماء عدد كبير من الإحياء المجهرية وحيث أن تصنيع الانزيم يكون مرتبط بقوة بنمو الخلية فلذلك نلاحظ الإنتاجية الجيدة للأنزيم (Cherif *et al.*,2011) 0

إن إنخفاض إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) في الأوساط الزرعية الأخرى يمكن أن يعزى إلى طبيعة مكونات الوسط الزرعي وإلى نوعية المصادر النيتروجينية التي تحفز إنتاج الانزيم ولكون المصادرالنيتروجينية المعقدة تكون مصدراً للأحماض الامينية الحرة والببتيدات الصغيرة وبتراكيز مختلفة تبعاً لدرجة تعقيد المصدر النيتروجيني كما تؤثر تراكيز الأحماض الأمينية في إنتاج الانزيم

فـــــالتراكيز العاليـــــة أوالواطئـــــة لهـــــذه الأحمـــــاض قـــــد تحفـــــز إنتاجيـــــة جيدة للإنزيم (سعود واخرون، 2009)0

جاءت الدراسة الحالية مقاربة نوعاً ما لما ذكـراه (Sulieman & Allaahmed.,2012) والذان يؤكدان إستخـــدام وسـط Chemical defined medium لدراســة إنتـــاج الانزيمـــات وخاصــة انزيم مختثر البلازما (Coagulase) 0

جدول (4-6): تأثير نـــوع الوســـط الغذائـــي فـــي إنتـــاج مختثر البلازمـــا (Coagulase) من عزلات بكتريا المكـــورات العنقودية (Staphylococci)0

العـــزلات البكتيريـــة	قطر الهالات المتكونة على مختلف الأوساط الزرعية (بالملم)					
	C.D.M	Brain heart infusion broth	Trypton soys broth	Pepton broth	Yeast extract broth	Nutrient broth
A1	4.167	3.667	3.667	3.667	2.167	2.167
A2	4.333	3.500	3.000	3.167	2.333	2.167
A3	4.167	3.667	3.333	2.333	2.167	1.667
A4	**4.833	4.167	3.167	2.500	2.167	1.833
A5	4.000	3.167	3.000	2.667	1.667	1.333
A6	4.500	3.833	2.167	3.167	2.167	2.000
A7	4.667	3.167	2.833	2.167	1.500	1.667
A8	4.667	3.000	2.167	2.167	1.500	1.500
A9	4.500	3.167	2.333	1.833	1.500	◊1.167
A10	*2.500	2.000	◊1.167	◊1.167	◊1.000	¤0.000
المعدل	4.233	3.333	2.733	2.533	1.817	1.550

L.S.D (0.05) للوسط الغذائي = 0.23 ◊ الإنتاجية القليلة من الانزيم

* فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05) ¤ إنعدام إنتاج الانزيم

4-4-2 تأثير درجة الحرارة في إنتاج انزيم مختثر البلازما (Coagulase)0

درس تأثيردرجة الحرارة في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من العزلات البكتيرية قيد الدراسة بإستخدام درجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25 ، 30 ، 37 ، 40) م° ويتضح من الجدول (4-9) أن أعلى إنتاجية من خلال قياس معدل قطر الهالات بلغت (5.167 ، 4.500 ، 5.000 ، 5.667 ، 5.167 ، 5.333 ، 5.000 ، 5.167 ، 4.833) ملم لعزلات *S.aureus* (A1 ، A2 ، A3 ، A4 ، A5 ، A6 ، A7 ، A8 ، A9) على التوالي عند درجة حرارة 37 م مقارنة مع بقية الدرجات الحرارية الأخرى والي أبدت إنخفاضاً ملحوظاً في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) حيث بلغت معدل قطر الهالات عند درجة حرارة 25 م (2.333 ، 2.333 ، 2.333 ، 2.167 ، 2.000 ، 2.167 ، 1.167 ، 2.167 ، 1.500) ملم لعزلات *S.aureus* (A1 ، A2 ، A3 ، A4 ، A5 ، A6 ، A7 ، A8 ، A9) على التوالي كما سجلت أعلى إنتاجية لعزلة *S. hyicus* والتي بلغت 3.167 ملم عند درجة حرارة 37 م مقارنة مع درجات الحرارة (30 ، 40) م والتي أبدت إنتاجا أقل مقارنة مع درجة حرارة 37 م كما لوحظ إنعدام إنتاجية الانزيم عند درجة حرارة 25 م الأمر الذي يوضح أن درجة الحرارة 37 م كانت أفضل من بقية الدرجات الحرارية لإنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) مقارنة مع الدرجات الحرارية الأخرى والتي أبدت انخفاضاً واضحاً في إنتاجية الانزيم 0

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي أن لدرجة الحرارة (37) م فرقاً معنوياً واضحاً عند مستوى احتمالية (0.05) على بقية الدرجات الحرارية المستخدمة ولكلا النوعين من البكتريا *S.aureus* و *S. hyicus* .

إن لدرجة الحرارة تأثير مهم في إنتاج الانزيم من الإحياء المجهرية عن طريق تأثيرها في ذائبية الأوكسجين في الوسط الزرعي وزيادة الطاقة الحركية للجزيئات وسرعة التفاعلات الانزيمية وينعكس ذلك سلباً أو إيجاباً في إنتاجية الانزيم ، حيث يعود سبب الزيادة في سرعة التفاعلات الانزيمية بإرتفاع درجة الحرارة إلى زيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم وجزيئات المادة الأساس بفعل الطاقة الحركية للجزيئات ونتيجة لذلك يزداد عدد الجزيئات المتصادمة وهذا يؤدي الى زيادة في طاقة تنشيطها وبالتالي زيادة فعالية الانزيم أما إنخفاض إنتاجية الانزيم في درجات الحرارة العالية خلافاً لدرجة الحرارة المثلى قد يكون ناجما عن تغير التركيب الطبيعي للأنزيم مع احتمال حصول مسخ للأنزيم (Denaturation) مما يسبب تغير في الموقع الفعال للأنزيم وفقدان الفعالية (محيسن واخرون, 2008) كما أن إنخفاض درجة الحرارة لها تأثير كبيرعلى بكتريا المكورات

العنقودية (Staphylococci) حيث لوحظ ان البكتريا تقلل من سيولة الغشاء إستجابة لإنخفاض درجة الحرارة وهذ يؤدي إلى إنخفاض آلية النقل الفعال وإفراز البروتين ويقلل من ترجمة mRNA ويقلل من وظائف الرايبوسومات وهذا يؤدي إلى قلة إفراز الانزيمات (Alreshidi *et al.*,2013) 0

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج (Sturm *et al.*,2008) والذي أوضح إستخدام درجة حرارة 37 م في إنتاجية انزيم مخثر البلازما (Coagulase) لبكتريا *S.aureus* وتتفق نوعاً ما مع ما ذكره (Kerremans *et al.*,2008) والذي أستخدم درجة حرارة 35 م لإنتاج الانزيم في بكتريا *S. hyicus* وأكد إن إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) فيه قليل جدا مقارنة *S.aureus* 0

جدول (4-7): تأثير درجة الحرارة في انتاج انزيم Coagulase من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة على مختلف الدرجات الحرارية (بالملم)			
	25 م°	30 م°	37 م°	40 م°
A1	2.333	3.000	5.167	3.667
A2	2.333	3.333	4.500	3.833
A3	2.333	3.333	5.000	3.833
A4	2.167	3.500	**5.667	3.833
A5	2.000	2.500	5.167	3.000
A6	2.167	3.500	*5.333	4.000
A7	◊1.167	3.167	5.000	3.667
A8	2.167	3.167	5.167	3.667
A9	◊1.500	2.500	4.833	3.000
A10	¤0.000	◊1.167	*3.167	◊1.667
المعدل	1.867	2.917	4.900	3.417

L.S.D (0.05) للدرجة الحرارة = 0.161 ◊ الإنتاجية القليلة من الانزيم

* فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05) ¤ إنعدام إنتاج الانزيم

3-4-4 تأثير الأس الهيدروجيني في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase)

درس تأثيرالرقم الهيدروجيني على إنتاج انزيم مخثرالبلازما (Coagulase) عند قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4 ، 4.5 ، 5 ، 5.5 ، 6 ، 6.5 ، 7 ، 7.5 ، 8 ، 8.5 ، 9) ويبين الجدول رقم (4-10) أن الرقم الهيدروجيني (7.5) أعطى أكبر قطر للهالات على الوسط الزرعي لعزلات بكتريا *S.aureus* بلغت (6.167 ، 6.50 ، 6.333 ، 6.667 ، 6.167 ، 5.833 ، 7.167 ، 7.50 ،6.167) ملم للعزلات (A1، A2، A3 A4، A5، ،A6، A7، A8، A9) على التوالي مقارنة مع بقية الأرقام الهيدروجينية والتي أبدت إنخفاضاً بإنتاج الانزيم حيث لوحظ أقطارالهالات على الوسط الزرعي لعزلات بكتريا *S.aureus* عند الرقم الهيدروجيني (4) (1.333 ، 2.167 ، 1.833 ، 1.667 ، 2.167 ، 1.333 ، 2.333 ، 1.833 ، 1.667) ملم للعزلات (A1، A2، A3 A4، A5، ،A6، A7، A8، A9) على التوالي كما لوحظ أن عزلة A10 *S. hyicus* كانت الأوطأ في إنتاجيتها للأنزيم مقارنة مع بقية العزلات وعلى كافة الأرقام الهيدروجينية حيث بلغ أعلى إنتاج لها بقياس قطر الهالة المتكونة (3.667) ملم عند الاس الهيدروجيني 7.5 في حين لوحظ أقل انتاجية لها بقياس قطر الهالات المتكونة والبالغة (1.000 ، 1.500 ، 1.500) ملم عند الارقام الهيدروجينية (5.5 ، 6 ، 8.5) على التوالي كذلك لم يلاحظ لها أي إنتاجية عند الأرقام الهيدروجينية (4 ، 4.5 ، 5 ، 9) 0

و أظهرت نتائج التحليل الاحصائي أن للرقم الهيدروجيني (7.5) فرقاً معنوياً مؤثراً على إنتاجية انزيم مخثر البلازما على بقية الأرقام الهيدروجينية الأخرى ولكلا النوعين من البكتريا *S.aureus* و *S. hyicus* 0

تشير النتائج المذكورة أعلاه إمكانية إنتاج الانزيم في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني وذلك لنمو بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci) في أس هيدروجيني يتراوح بين (4-9.8)

(Delbes *et al*.,2006) وأشارت النتائج أيضاً أن الرقم الهيدروجيني (7.5) أعطى أعلى انتاجية للانزيم في كلا النوعين *S.aureus* و*S. hyicus*0

مما يدل أن نمو الكائن الحي المجهري وإنتاجيته للأنزيم يكون عند رقم هيدروجيني متعادل إلى قاعدي حيث يؤثر الرقم الهيدروجيني في إنتاج الانزيمات بسبب دوره في ذائبية المواد الغذائية في الوسط وتأثيره في الحالة الأيونية للمادة الأساس وجاهزيتها للكائن المجهري فضلاً عن تأثيره في ثبات الأنزيمات المنتجة وتأثيره في نمو البكتريا وإنتاجها للأنزيمات (Sharma &Gupta , 2001) كذلك يؤثرالأس الهيدروجيني بقوة في العديد من العمليات الانزيمية وأيضاً يقوم بنقل المكونات عبر الغلاف الخلوي والذي يدعم نمو الخلية وإنتاج مواد معينة 0

كذلك يؤثر الرقم الهيدروجيني على الفعاليات الأيضية للخلايا من خلال تأثيره على تأين المواد وكذلك نضوح الغشاء الخلوي والذي له تأثير على المجاميع الحرة والقابلة للتأين للأنزيمات وهذا التأثير ينعكس على فعالية الانزيمات في ملامسة التفاعلات الحيوية التي تقوم بها لذلك فإن الأسباب التي تؤدي إلى نقصان إنتاجية الانزيم عند رقم هيدروجيني أقل او أكثر من القيمة المثلى هي تكوين صورة أيونية للأنزيم أو للركيزة أو الإثنان سويةً غير ملائمة للتفاعل الانزيمي 0 (Singh & Parmar.,2011)

تتفق نتائج الدراسة الحالية نوعاً ما مع نتائج (Wilcoxs *et al*.,1996) والذي أوضح إستخدام الأس الهيدروجيني 7.2 في إنتاجية انزيم مخثر البلازما (Coagulase) كما أكد (Kristlová *et al*.,2012) في دراسة أجراها على بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci) بأن الأس الهيدروجيني من 6.0 إلى 7.0 هو الأمثل لنمو المكورات العنقودية (Staphylococci) وإفرازالانزيمات0

جدول (4-8): تأثير الأس الهيدروجيني في إنتاج انزيم Coagulase من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة على مختلف الأرقام الهيدروجينية (بالملم)										
	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9
A1	◊1.333	2.333	2.667	3.167	3.667	4.333	5.333	6.167	4.500	3.167	1.833
A2	2.167	2.667	3.167	3.500	4.167	4.833	5.500	6.500	4.833	3.333	2.333
A3	1.833	2.667	3.167	3.667	4.333	4.833	5.167	6.333	4.633	2.833	◊1.833
A4	1.667	2.167	2.667	3.167	4.167	4.833	5.500	6.667	5.667	3.167	2.167
A5	2.167	2.167	2.500	3.000	3.333	4.333	4.833	6.167	4.333	3.333	2.167
A6	◊1.333	1.833	2.167	2.833	3.500	4.333	5.167	5.833	4.500	3.667	3.167
A7	2.333	2.167	3.167	3.833	4.000	4.500	5.167	7.167	5.333	3.167	2.667
A8	1.833	2.333	2.833	3.333	3.667	3.833	5.167	*7.500	5.667	4.333	3.333
A9	1.667	2.167	2.667	3.333	3.667	4.500	4.833	6.167	5.167	4.500	2.500
A10	¤0.000	¤0.000	¤0.000	◊1.000	◊1.500	2.500	3.167	*3.667	2.500	◊1.500	¤0.000
المعدل	1.633	2.050	2.500	3.083	3.600	4.283	4.983	6.217	4.713	3.300	2.200

L.S.D (0.05) للرقم الهيدروجيني = 0.1 ◊ الإنتاجية القليلة من الانزيم

* فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05) ¤ إنعدام إنتاج الانزيم

4-4-4 تأثيرنوع الحضن وعدد الهزات في جهاز الهزاز في إنتـاج انـزيم مخثـر البلازمـا (Coagulase)

إن إنتاج انزيم مخثر البلازما في ظروف حاضنة هزازة ذات عدد هزات معينة يكون أفضل من إنتاجه في ظروف الحاضنة الثابتة إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن إنتـاج انـزيم مخثـر البلازمـا بإسـتخدام الحاضنة الثابتة يكون أقل مما هو عليه بإستخدام الحاضنة الهزازة0

لـوحظ مـن خـلال الجـدول (4-11) ان أعلـى إنتاجيـة للأنـزيم قـد سـجلت عنـد إسـتخدام حاضـنة هـزازة عـدد هزاتهـا (100) هـزة إذ بلغـت اقطـار الهـالات علـى الوسـط الزرعـي (7.833 ، 7.333، 7.500 ، 8.167 ، 7.333 ، 7.667 ، 7.333 ، 8.333 ، 7.333) ملـم لبكتريـا *S. aureus* للعـزلات (A1 ، A2 ، A3 ، A4 ، A5 ، A6 ، A7 ، A8 ، A9) علـى التوالي فيما لوحظ أن قطر للهالات لبكتريا *S. aureus* علـــى الوسط بإستخدام الحاضـنة الثابتـة (6.166 ، 5.166 ، 6.000 ، 5.833 ، 5.166 ، 4.833 ، 6.00 ، 6.166 ، 5.500) ملـم للعـزلات (A1، A2، A3 A4، A5، A6، A7، A8، A9) علـى التـوالي والـذي يظهـر إرتفـاع معدل قطر الهالات بإستخدام الحاضنة الهزازة مقارنة مع الحاضنة الثابتة فيمـا لـوحظ أيضـاً إنخفـاض قطر الهالات عند إزدياد عدد الهزات عـن (100) هـزة وذلـك بإسـتخدام حاضـنة هـزازة عـدد هزاتهـا (150) و(200) هزة حيث سجل أعلى قطر للهالات هو (4.333 ، 3.000) ملم عنـد حاضـنة هـزازة سرعتها (150 ،200) على التوالي0 إن استخدام الحاضنة الهزازة يعتبر أفضل من إستخدام الحاضـنة الثابتـة وأن عـدد هـزات قـدرها (100) هـزة تعتبـر عـدد الهـزات المثلـى لإنتـاج انـزيم مخثـر البلازما (Coagulase) وتنطبق هذه النتائج من حيث زيادة الإنتاج وقلته وبأقطار مختلفة للهالات فـي الظروف أعلاه على بكتريا *S hyicus* ويمكن تفسير إزدياد إنتاجية الانزيم بواسطة الحاضنة الهزازة عما هوعليه في الحاضنة الثابتة إلى أن المكورات العنقودية (Staphylococci) هـي كائنـات هوائيـة حيث تتوفر نسبة أكبـر مـن الهـواء بإسـتخدام الحاضـنة الهـزازة كـذلك نفسـرإنخفاض إنتاجيـة الانـزيم بإستخدام عدد هزات قدرها (150 ،200)على التوالي إلى أن زيادة الـرج يمكـن أن تـؤدي إلـى دنتـرة الانزيم (Denaturation) وبالتالي تغيير في تركيبه (Nigam *et al.*,2012)0

أظهرت نتائج التحليـل الإحصـائي أن لعـدد الهـزات (100) فرقـاً معنويـاً علـى إنتاجيـة الانـزيم وعنـد مستوى إحتمالية (0.05) لكلا النوعين من البكتريا *S.aureus* و*S.hyicus 0*

إن استخدام حاضـنة هـزازة يجـانس مـن مكونـات الوسـط الزرعـي مـع بعضـها ومـع الهـواء والكـائن المجهري حيث يكون الأخير بشكل عالق في الوسط الزرعي مما يساعد على إنجاز الفعاليات الأيضـية بصورة أفضل ، كما إن إستخدام الحاضنة الهزازة يزيد من ذوبان الأوكسجين في الوسـط الزرعـي أي أنها توفر ظروفاً جيدة للتهوية وبالتالي توفير النمو الجيـد حيـث أن النمـو والأيـض للأحيـاء المجهريـة الهوائية يعتمد على كمية الاوكسـجين المتـوفرة حيـث أنـه فـي حالـة عـدم تـوفر الأوكسـجين ستضـطر

البكتريا إلى النمو اللاهوائي وتقوم بإنتاج كميات مختلفة من المواد الأيضية كالكحول وغاز CO_2 ومنتجات حامضية (Maier & Büchs,2001) 0

جاءت هذه النتائج موافقة نوعاً ما لما أشار اليه الباحث (Naja *et al.*,2005) والذي أكد أن إستخدام ظروف هزازة تؤدي إلى إنتاج عالي للأنزيم كما تتفق النتائج مع (Gonc *et al.*,2003) والذي أوضح ضرورة إستخدام الحاضنة الهزازة في نمو بكتريا *S. hyicus* وإنتاج الانزيم 0

جدول (4-9): تأثير نوع الحض وعدد الهزات في انتاج انزيم (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة على الحاضنة الثابتة والهزازة (بالملم)			
	الحاضنة الثابتة	الحاضنة الهزازة		
		100هزة	150 هزة	200 هزة
A1	6.166	7.833	3.667	2.167
A2	5.166	7.333	3.500	2.167
A3	6.000	7.500	3.500	2.333
A4	5.833	*8.167	3.667	3.000
A5	5.166	7.333	3.667	◊2.167
A6	4.833	7.667	3.167	◊2.167
A7	6.000	7.333	3.167	2.333
A8	6.166	*8.333	4.333	2.167
A9	5.500	7.333	3.500	◊2.167
A10	3.833	*4.500	2.333	◊1.167
المعدل	6.129	7.333	3.450	2.263

L.S.D (0.05) للهزات = 0.170 * فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05)

◊ الإنتاجية القليلة من الانزيم

5-4-4 تأثير فترات حضن مختلفة في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase)

يبين الجدول رقم (4-12) أن هنالك إنتاجية لأنزيم مخثر البلازما بعد فترة حضانة قدرها (4hrs.) حيث بلغت معدل أقطار الهالات للعزلات كلها (3.200) ملم كما لوحظ إزدياد إنتاجية الانزيم عند فترة حضانة (18hrs.) حيث بلغت معدل أقطار الهالات لكل العزلات (7.483) ملم والتي تشير إلى إنتاجية عالية أيضا للانزيم ، كذلك لوحظ في فترة الحضانة (24hrs) أعلى إنتاجية للأنزيم حيث بلغت أقطار الهالات على الوسط الزرعي لعزلات بكتريا *S.aureus* (9.167 ، 8.333 ، 8.167 ، 8.833 ، 8.833 ، 9.000 ، 8.333 ، 9.333 ، 9.333) ملم للعزلات (A1، A2، A3 A4، A5، A6، A7، A8، A9) على التوالي كما لوحظ انخفاض إنتاجية للأنزيم بفترة حضانة (48 hrs.) حيث بلغت اقطار الهالات على الوسط الزرعي (6.167 ، 5.667 ، 5.500 ، 5.833 ، 6.333 ، 5.333 ، 5.667 ، 6.167 ، 5.500) ملم لعزلات بكتريا *S.aureus* (A1، A2، A3 A4، A5، A6، A7، A8، A9) على التوالي كما لوحظ أن فترة الحضانة (24hrs) أعطت أعلى انتاجية للانزيم لبكتريا *S.hyicus* حيث بلغ قطر الهالة (4.667) ملم كما لوحظ انخفاضاً واضحاً لإنتاج انزيم مخثرالبلازما لبكتريا *S.hyicus* عند فترة حضانة قدرها (48 hrs.) حيث بلغ قطر الهالة (2.167) ملم على الوسط الزرعي0

يتضح من النتائج أعلاه أن فترة الحضانة (24hrs.) تعتبرهي فترة الحضن المثلى في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) لكلا النوعين *S. aureus* و *S. hyicus* حيث أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن لفترة الحضانة (24hrs.) فرقاً معنوياً عند مستوى إحتمالية (0.05) والذي يبدو واضحاً في أقطار الهالات نتيجة لعمل انزيم مخثر البلازما 0

إن إنتاج انزيم مخثر البلازما يبدا بعد (4hrs.) أو قبلها إلا أن كمية الانزيم المتكونة تكون قليلة وقد يعود السبب إلى ان البكتريا تكون في طورالتطبع والطور اللوغارتيمي خلال هذه الفترة وفي هذه الأطوار تقوم بإستهلاك المواد الغذائية وبناء خلاياها ، بعدها إنتاجية الانزيم تزداد بالتدريج وصولاً إلى الإنتاج الأمثل في فترة الحضانة المثلى أما الإنخفاض في إنتاجية انزيم مخثر البلازما يمكن أن يعزى للتأثيرات السلبية المحتملة للنواتج الأيضية المتكونة مع إستمرار نمو البكتريا وقد يحدث هضم ذاتي للأنزيم وحيث أن فترة الحضن ترتبط مباشرة مع إنتاجية الانزيم وبعض الفعاليات الايضية لذا فإن إطالة فترة الحضن تؤدي إلى نفاذ المواد الغذائية والذي يؤثر على فسلجه البكتريا وإنتاج الانزيمات (Rathnan *et al.*,2012) وهذا ما لوحظ في انتاج الانزيم عند استخدام درجة حضن (48 hrs.)0

تناسقت الدراسة الحالية مع (Schulz *et al.*,2004) والذي ذكر أن فترة الحضن المثلى لبكتريا *S. aureus* (24 hrs.) وتتفق أيضاً مع (Feldsine , 2002) والذي أكد أن فترة الحضانة المثلى لبكتريا *S. hyicus* وإنتاج الانزيمات هي (24 hrs.) 0

جدول (4-10): تأثير فترات حضن مختلفة في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة في فترات حضن مختلفة (بالملم)			
	4 hrs.	18 hrs.	24 hrs.	48 hrs.
A1	4.167	8.167	9.167	6.167
A2	3.333	7.667	8.333	5.667
A3	3.167	7.667	8.167	5.500
A4	2.833	8.167	8.833	5.833
A5	3.667	7.833	8.833	6.333
A6	2.667	8.167	9.000	◊5.333
A7	3.833	7.333	8.333	5.667
A8	3.333	8.167	*9.333	6.167
A9	◊2.667	8.167	*9.333	◊5.500
A10	2.333	3.500	*4.667	◊2.167
المعدل	3.200	7.483	8.400	5.433

L.S.D (0.05)للمدة الحضن = 0.162 * فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05)

◊ الإنتاجية القليلة من الانزيم

6-4-4 تأثير نوع البلازما في فعالية انزيم مخثر البلازما (Coagulase)

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) يعتمد على نوع البلازما المستخدمة حيث أن إختبار مخثر البلازما يعتمد بشكل رئيسي على نوعية البلازما المستخدمة في الإختبار لذا نلاحظ من الجدول رقم (4-13) أن أعلى فعالية للأنزيم لوحظت عند إستخدام بلازما الأرانب حيث بلغت اقطار الهالات لبكتريا *S. aureus* على الوسط الزرعي (9.333 ، 8.667 ، 8.333 ، 8.333 ، 9.167 ، 9.333 ، 8.333 ، 9.333 ، 8.500) ملم للعزلات (A1، A2، A3 A4، A5، ،A6، A7، A8، A9) على التوالي كذلك لوحظت فعالية وإنتاجية جيدة للأنزيم لبكتريا *S. aureus* عند استخدام بلازما الانسان حيث بلغت اقطار الهالات (6.333 ، 6.333 ، 5.833 ، 6.833 ، 6.500 ، 5.667 ، 4.833 ، 6.333 ، 6.333) ملم على الوسط الزرعي للعزلات (A1، A2، A3 A4، A5، ،A6، A7، A8، A9) على التوالي فيما لوحظ إنخفاضاً واضحاً في قطر الهالات المتكونة لبكتريا *S. aureus* نتيجة لعمل انزيم مخثر البلازما عند إستخدام بلازما الأبقار حيث بلغ أعلى قطر للهالات المتكونة (4.333) ملم كما سجل أعلى قطر الهالات المتكونة اثناء إستخدام بلازما الأغنام (3.667) ملم لبكتريا *S. aureus* والتي تشير إلى إنخفاض واضح وملحوظ في الفعالية والإنتاجية لكلا النوعين الأخيرين من البلازما فيما لوحظ أن قطر الهالة المتكونة على الوسط الزرعي في بكتريا *S. hyicus* على بلازما الارانب (4.833) ملم ، أيضاً بلغ قطر الهالات في إنتاج انزيم مخثر البلازما لبكتريا *S. hyicus* (1.167 ، 4.500 ، 4.833) ملم لبلازما الأنسان والأبقار والخراف على التوالي نستنتج مما ذكر أعلاه أن افضل أنواع البلازما المستخدمة في إنتاج انزيم مخثر البلازما لبكتريا *S.aureus* هو بلازما الأرانب مقارنة مع بقية أنواع البلازما المستخدمة حيث يعتبر هذا النوع من البلازما هو المناسب لإنتاج الانزيم (Croft ., 1999) 0

كما نستنتج أن بلازما الأرانب والخراف هما المناسبان في إنتاج انزيم مخثر البلازما في بكتريا *S. hyicus* كذلك لا تقوم هذه البكتريا بإنتاج انزيم مخثر البلازما أو تقوم بإنتاج كمية قليلة جداً من الانزيم عند إستخدام بلازما الانسان ويتفق هذا الاستنتاج لما ذكراه (Dickson & Marples,2014) وان البلازما الأمثل لعملها هو كما ذكر (Bendahou *et al.*,2008) هو بلازما الخنازير ونظراً لعدم توافره لم نستطع إجراء الإختبار عليه 0

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي أن لبلازما الأرانب فرقاً معنوياً واضحاً على أقطار الهالات المتكونة في بكتريا *S. aureus* وعند مستوى احتمالية (0.05) كما لوحظ تفوق بلازما الأرانب والخراف معنويا وعند مستوى احتمالية (0.05) لبكتريا *S. hyicus* على بلازما الانسان والابقار0

إن إنزيم مخثر البلازما Coagulase يحتاج في عمله الى مكونات البلازما CRF (Coagulase –reacting factor) والذي يكون معقد معها (CRF- Coagulase) حيث لوحظ ان بلازما الأرانب يحتوي على عدد كبير من CRF مقارنة مع بقية الأنواع من البلازما والتي تحتوي على عدد أقل من CRF يليه بلازما الإنسان في إحتوائه على CRF والذي يستخدم بكثرة في إختبار مخثر البلازما (Coagulase) وذلك لان بلازما الأرانب غير متوفر محلياً وكذلك لغلاء ثمنه ونلجأ للحصول عليه بواسطة سحب الدم من الأرانب وإجراءعملية الطرد المركزي (Centrifugation) للإستحصال على البلازما رغم أن إستخدام بلازما الانسان قد يعطي نتائج خاطئة لإحتوائه على Anti- staphylococcal antibody وقد يحتوي على إصابات فايروسيه قد تتداخل مع التفاعل مثل (HIV/AIDS , Hepatitis B & C) (Kateete *et al.*,2010) وتتفق النتائج التي تم الحصول عليها لما ذكره (Makwana *et al.*,2012) 0

جدول (4-11): تأثير نوع البلازما في فعالية انزيم (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة على أنواع مختلفة من البلازما (بالملم)			
	بلازما الأرانب	بلازما الإنسان	بلازما الأبقار	بلازما الخراف
A1	**9.333	6.333	3.667	3.167
A2	8.667	6.333	2.833	◊2.167
A3	8.333	5.833	2.833	◊2.167
A4	8.333	6.833	3.667	3.167
A5	*9.167	6.500	4.333	3.667
A6	**9.333	5.667	2.667	2.167
A7	8.333	4.833	◊2.167	2.333

A8	**9.333	6.333	2.833	◊2.167
A9	8.500	6.333	2.333	◊2.167
A10	*4.833	◊1.167	4.500	*4.833
المعدل	*8.467	5.617	3.183	◊2.86

L.S.D (0.05) للبلازما = 0.183 * فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05)

◊ الإنتاجية القليلة من الانزيم

7-4-4 تأثير تراكيز مختلفة من البلازما في فعالية انزيم مختر البلازما (Coagulase)

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن فعالية انزيم مختر البلازما في بكتريا *S aureus* عند إستخدام تركيز مخفف من البلازما 1/5 يكون أعلى مما هو عليه عند إستخدام بلازما غيرمخففة أوأي تراكيز أخرى حيث نلاحظ من الجدول (4-14) أن أقطار الهالات على الوسط الزرعي عند استخدام تركيز 1/5 (10.667 ، 9.833 ، 9.833 ، 10.333 ، 10.833 ، 11.333 ، 10.167 ، 10.833 ، 10.167) ملم للعزلات (A1، A2، A3 A4، A5، A6، A7، A8، A9) على التوالي فيما أظهرت البلازما غير المخففة أعلى قطر للهالات بلغ (4.500) ملم وكذلك أظهرت التراكيز كل من 1/2 و 1/8 أعلى قطر للهالات بلغ (9.500،2.833) ملم على التوالي الأمر الذي يوضح تفوق التركيز 1/5 على البلازما غير المخففة وكذلك التراكيز الأخرى في فعالية انزيم مختر البلازما (Coagulase) 0

وقد لوحظ أن أعلى تركيز للأنزيم قد تم الإستحصال عليه في بكتريا *S.hyicus* كان عند تركيز 1/8 للبلازما حيث بلغ قطر الهالة (6.667) ملم فيما لوحظ إنخفاض فعالية انزيم مختر البلازما عند إستخدام البلازما غير المخففة وكذلك البلازما بتركيز 1/2 و1/5 حيث بلغت أقطار الهالات (2.167، 4.667، 5.833) ملم على التوالي الأمر الذي يظهر تفوق التركيز 1/8 على التراكيز الأخرى في فعالية وانتاج الانزيم خلافاً لما لوحظ في بكتريا *S.aureus* 0

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي أن لتركيز 1/5 فرقا معنويا واضحا على أقطار الهالات المتكونة وعند مستوى إحتمالية (0.05) مقارنة مع بقية التراكيز الأخرى في بكتريا *S. aureus* فيما أظهرت نتائج التحليل الاحصائي نفسها تفوق تركيز 1/8 معنويا على بقية التراكيز الأخرى في فعالية الانزيم في بكتريا *S.hyicus* وعند مستوى احتمالية (0.05)0

إن تركيز المادة الأساس يعتبر من العوامل المهمة والتي تؤثر في فعالية الانزيم لذلك نلاحظ التغاير في فعالية الانزيم بإستخدام تراكيز مختلفة من البلازما فالتركيز العالي من المادة الأساس يؤدي الى إنتاجية واطئة للأنزيم والنواتج وكذلك التركيز الواطئ من المادة الأساس يفشل في إنتاج كميات مناسبة من الانزيم وذلك لأن العديد من جزيئات الانزيم تبقى بدون مادة أساس فلذلك نلاحظ الإنتاج الواطئ من الانزيم (Sharma *et al.*,2012) . إن استخدام تراكيز واطئة من المادة الأساس تجعل المواقع الفعالة للإنزيم غير مشبعة بالمادة الأساس لكن عند زيادة تركيز المادة الأساس لحد معين تصبح المواقع الفعالة للأنزيم مشبعة بالمادة الأساس وبهذا نصل الى السرعة القصوى للتفاعل اما بعد تلك التراكيز فإن سرعة التفاعل لا تعتمد على تركيز المادة الأساس (الهلالي و طه، 2013) تتفق النتائج التي تم الوصول اليها لما ذكره كل من (Sabbadini *et al.*,2012) والذي وجد ان استخدام تركيز 1/5 من البلازما هو الأمثل في إختبار انزيم مختر البلازما لبكتريا *S.aureus* ويوافق لما ذكراه (D'Allaire & Friendship,2010) أن تركيز 1/8 هو الأمثل في إنتاج الانزيم في بكتريا *S.hyicus* 0

جدول (4-12): تأثير تركيز البلازما في فعالية انزيم مختر البلازما (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة على تراكيز مختلفة من البلازما (بالملم)			
	بلازما غيرمخففة	1/2	1/5	1/8
A1	4.167	9.167	*10.667	2.833
A2	3.333	8.500	9.833	2.500
A3	4.500	8.333	9.833	2.167
A4	3.333	8.667	10.333	2.333
A5	3.667	9.000	10.833	2.833
A6	3.667	9.500	**11.333	2.167
A7	3.167	8.333	10.167	◊2.167
A8	3.333	9.333	10.833	2.667
A9	3.833	8.667	10.167	2.667
A10	◊2.167	4.667	5.833	*6.667
المعدل	3.617	8.417	9.983	2.900

L.S.D (0.05) لتركيز البلازما = 0.150 * فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05)

◊ الإنتاجية القليلة من الانزيم

8-4-4 تحديد تأثير ايونات المعادن في فعالية وانتاجية انزيم مخثر البلازما (Coagulase)

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن هنالك تغايراً في فعالية انزيم مخثر البلازما(Coagulase) عند إستخدام تركيز معين من أملاح أيونات فلزية مختلفة مثل كلوريد الصوديوم NaCl ، كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ ، كلوريد البوتاسيوم KCl وكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ لبكتريا *S. aureus* فقد لوحظ أن هنالك زيادة في فعالية وإنتاج انزيم مخثرالبلازما (Coagulase) بزيادة أقطار الهالات المتكونة على الوسط الزرعي عند إستخدام أملاح كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ حيث نلاحظ من الجدول (4-15) أن أقطار الهالات المتكونة (12.00،12.333، 12.333 ، 12.167 ، 12.333 ، 12.667 ، 12.500 ، 11.667 ، 12.333) ملم على الوسط الزرعي للعزلات (A1، A2، A3 A4، A5، A6، A7، A8، A9) على التوالي فيما لوحظ إنخفاض واضح في إنتاجية الانزيم عند إستخدام كلوريد الصوديوم NaCl بلغت اقطار الهالات على الوسط الزرعي (8.167 ، 8.833 ، 8.167 ، 7.500 ، 8.167 ، 8.500 ، 8.500 ، 7.500 ، 7.333) ملم للعزلات (A1، A2، A3، A4، A5، A6، A7، A8، A9) فيما لم تسجل أي زيادة او نقصان في إنتاجية الانزيم عند إستخدام كلوريد البوتاسيوم KCl وكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ حيث بلغت أعلى قطر للهالات المتكونة (10.833 ، 11.167)) ملم لكلوريد البوتاسيوم KCl وكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ على التوالي فيما لوحظ إزدياد إنتاج انزيم مخثر البلازما في بكتريا *S. hyicus* عند إستخدام أملاح كلوريد البوتاسيوم KCl حيث بلغ قطر الهالة المتكونة (8.000) ملم فيما لوحظ إنخفاض فعالية الانزيم عند استخدام كلوريد الصوديوم NaCl حيث بلغ قطر الهالة المتكونة (3.665) ملم فيما لم تسجل أي زيادة أو نقصان في إنتاجية الانزيم عند استخدام كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ وكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ وتختلف هذه النتائج مع ما استحصل عليه من نتائج في بكتريا *S. aureus* 0

تم الإستنتاج من النتائج أعلاه أن كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ يساعد في إنتاج الانزيم عند إستخدامه مع بكتريا *S.aureus* فيما أظهرت النتائج في البكتريا نفسها أن أملاح كلوريد البوتاسيوم KCl وأملاح كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ ليس لها دور يذكر في إنتاج الانزيم أما ما لوحظ في بكتريا *S.hyicus* أن أملاح كلوريد البوتاسيوم KCl تزيد من إنتاجية الانزيم فيما لم يلاحظ أي دور لأملاح كلوريد المغنيسيوم $Mgcl_2$ وأملاح كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ في إنتاج الانزيم فيما أظهرت أملاح

كلوريد الصوديوم NaCl دورسلبي في إنتاج الانزيم لكلا العزلتين من البكتريا *S.aureus* و*S.hyicus* حيث ظهر إنخفاض واضح في إنتاج انزيم مختر البلازما Coagulase 0

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي تفوق أملاح كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ معنويا على بقية أملاح الأيونات المستخدمة في بكتريا *S.aureus* وعند مستوى احتمالية (0.05) وكذلك أظهرت أملاح البوتاسيوم KCl تفوقا معنويا وعند مستوى احتمالية (0.05) في انتاج الانزيم في بكتريا *S. hyicus* على بقية أملاح الأيونات المستخدمة0

إن وجود أيونات المعادن في الوسط الزرعي يؤثر بقوة في الفعالية الأيضية للأحياء المجهرية حيث يعمل كعامل مساعد (Co-factor) في كثير من التفاعلات الأنزيمية وتعتبر منظمة لإنتاج الانزيمات ويتغاير تأثير هذه المعادن في الفعاليات الايضية للأحياء المجهرية حيث أن بعضها يزيد من الفعالية الانزيمية وبعضها يقلل منها وبعضها ليس له تأثير ملحوظ على الفعالية الانزيمية وتعتمد هنا على نوع الكائن المجهري (Priyadarshini *et al*., 2012) 0 إن إنخفاض الإنتاجية بواسطة أملاح الصوديوم NaCl يمكن أن يعزى إلى تأثير الأيونات الفلزية في تركيب الانزيم إذ تتفاعل الأيونات الموجبة مع المجاميع الحرة في الموقع الفعال للأنزيم مما ينتج عنه فقدان الانزيم لنشاطه وتختلف الآلية التي تعمل بها هذه الأيونات المثبطة لعمل الانزيم فالأيون يمكن أن يغيرالاتجاه الفراغي للبروتين لكي يسمح بالإرتباط الصحيح بين المادة الأساس والانزيم (عبدالحميد واخرون, 2013) أو قد يعود السبب إلى تداخل الأيون مع مجاميع السلاسل المشحونة للأحماض الأمينية للأنزيم والذي يعود تأثيره على التركيب الكلي للأنزيم (Adak & Banerjee.,2013) 0

ويعود كذلك زيادة فعالية الانزيم بواسطة كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ إلى دور هذه الأيونات في تنشيط عمل الانزيم في أن هذه الفلزات تؤثر في الانزيم والمادة الأساس بطريقة تجعلها أكثر ألفة للإرتباط بالمادة الأساس وتكوين معقد الانزيم – المادة الأساس وتتفق نتائجنا مع (Faixova & Faix.,2002) والذي يكشف أن أيون المغنيسيوم Mg عامل مساعد في العديد من الفعاليات الحيوية المرتبطة بالكربوهيدرات والدهون وكذلك أيض الخلية والذي يشارك في العديد من فعاليات الخلية البكتيرية كإنتاج الانزيمات وتتفق النتائج لما ذكره (Alariya *et al*.,2013) إن كلوريد البوتاسيوم KCl مصدر الكلوريد الملائم لأغلب الأنواع البكتيرية ويؤدي إلى نمو جيد للأحياء المجهرية وإنتاج جيد للأنزيمات 0

جدول (4-13): تأثير تركيز أيونات المعادن في إنتاج انزيم (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة عند تركيز معين لأيونات المعادن (بالملم)			
	NaCl	$MgCl_2$	KCl	$CaCl_2$
A1	8.167	12.000	10.500	10.167
A2	8.833	*12.333	9.833	10.500
A3	8.167	*12.333	9.000	9.500
A4	7.500	12.167	10.167	10.333
A5	8.167	12.333	10.500	11.167
A6	8.500	**12.667	10.833	11.000
A7	8.500	12.500	10.500	10.167
A8	◊7.500	11.667	10.500	10.833
A9	7.333	12.333	10.167	10.333
A10	◊3.665	6.500	*8.000	6.667
المعدل	7.633	11.683	10.000	10.067

L.S.D (0.05) =0.135 * فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05)

◊ الإنتاجية القليلة من الانزيم

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

نستنتج من الدراسة ما يأتي :

1- إتضح مـــن خلال الدراسة الحالية كثرة إنتشار بكتريا المكورات العنقودية فـــــي مستشفيات محافظة كربلاء المقدسة وكذلك في العينات الغذائية عند الباعة المتجولين0

2- أظــهرت نتــائج الــدراسة أن المضاد الحيوي الأزثرومايسين هو الأكثر فعاليـــــــــة تجاه عزلات بكتريـــا المكورات العنقوديـــــة الذهبيـــة *S. aureus* وكذلك عزلة بكتريا *S.hyicus*0

3- لم يوجـد هنـالـك أي فرق في إنتـاج انزيم مخثر البلازمـا (Coagulase) في كلا النوعين *S.aureus* و*S.hyicus* في الظروف الفيزيائية المختلفة كدرجة الحرارة وطول فترة الحضـن ونوع الحضن وكذلك الرقم الهيدروجيني 0

4- تم التوصل مـــــن خلال نتـــــائج الدراسة الحالية ان بلازما الأرانب والإنسان كانا مناسبين لإنتاج انزيم مخثر البلازما لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* في حين أن بلازما الأرانب والخراف هما المناسبين لإنتاج الانزيم من قبل عزلة بكتريا *S.hyicus*0

5- تم التوصل مـــــن خلال نتـــــائج الدراسة الحالية ان تركيز1/5 من البلازما في الأوساط الزرعيـة يؤدي إلى زيـادة إنتـاج انزيم مخثر البلازمـا لبكتريـا المكورات العنقوديـة الـذهبيـة *S. aureus* في حين أن اسـتخدام تركيز 1/8 من البلازما في الأوسـاط الزرعية يؤدي إلى زيادة إنتاج انزيم مخثر البلازما لعزلة بكتريا *S.hyicus*0

6- تم التوصل إلـــــى أن استخدام أملاح ايونات المغنيسيوم $MgCl_2$ في الأوساط الزرعية يؤدي إلى زيادة إنتاج انزيم مخثر البلازما لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* في حين أن استخدام أملاح أيونات البوتاسيوم KCl في الأوساط الزرعية يؤدي إلى زيادة إنتاج انزيم مخثر البلازما لعزلة بكتريا *S.hyicus*0

التوصيات

1- التأكيد على العزلات الموجبة لانزيم مختثر البلازما(CPS) على أنها ليست بالضرورة أن تكـون كلها *S. aureus*. وإنما يعود بعضها لأنواع أخرى للمكورات العنقودية مثل *S.hyicus*0

2- التعمق فـــي دراسة انزيم مختثر البلازما ودوره في إحداث الإصابـــــــــــة والإمراضيــة0

3- إجراء دراســـة جزيئية في هذا المجال لمعرفة التغيير الجيني الحاصل بوجود عوامل مختلفــة0

المصادر
Reference

المصادر العربية :

♦ **أبو يونس** ، عهد و أبو غرة ، صياح و سليق ، سمير0**(2012)** 0عزل بكتيريا *S.aureus* من المثلجات اللبنية وتشخيصها بالإعتماد على تقنيتي PCR و API 0 مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 0 المجلد (28)- العدد (1) الصفحات : 289-300 0

♦ **الراوي** ، خاشع محمود وعبد العزيز، محمد خلف الله 0(**1980**)0 تصميم وتحليل التجارب الزراعية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل ، العراق0

♦ **السعدي** ، عادل عبيد حسوني و فاضل ، عباس كرار وسعدي ، رياض جمهوريه0 (**2014**) استخلاص وتنقية البروتين المرتبط بالفايبرونكتين من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية0 مجلة جامعة بابل. العلوم الصرفة والتطبيقية. العدد(4)- المجلد (22)0

♦ **الهلالي** ، لؤي عبد وطه ، مصعب عسكر(**2013**) 0 فصل ودراسة إنزيم اللاكتوبيروكسيديز من حليب الإبل والجاموس المحلي0 مجلة علوم الرافدين، المجلد (24) - العدد (6) ص:112

♦ **سعود** ، أسماء محمد وعزيز، غازي منعم والخفاجي ، زهرة محمود 0(**2009**) 0تحديد الظروف المثلى لإنتاج البورتيز من بكتريا AG10 *Staphylococcus aureus* المعزولة محليا. المجلة العراقية للتقانات الحديثة 0المجلد (8) العدد (1) الصفحة :10 - 26 0

♦ **عبد الحميد** ، علياء معن و خضير، محمد خليفة و فرمان ، مينا صباح . (**2013**) .إنتاج وتنقية إنزيم اللايبيزLipase من العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas cepacia* ودراسة بعض الظروف المؤثرة في فعاليته0 مجلة ديالى للعلوم الزراعية المجلد (5) العدد (2) الصفحة :436-450

♦ **محيسن** ، ابتسام كريم ويحيى ، اياد نافع والاعرجي، سند باقر0 0(2008) 0توصيف انزيم Lipoxygenase المستخلص والمنقى من بذور الفول السوداني، مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية المجلد (24)- العدد الثاني 0

♦ **شقيفة** ، علاء الدين0 (**2005**) . دراسة التلوث بالمكورات العنقودية في العيادات السنية الجراحية مجلة جامعة دمشق للعلوم الصحية 0 المجلد (21) 0 العدد الثاني0

المصادر
Reference

المصادر الإنكليزية :

♦**Aarestrup** , F. M. & Jensen l. B. **(2002)**: Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. Vet. Microbiol. 89: 83-94

♦**Abdelhak** , D**. (2009)**. Alternative method for genetic transformation of *Pasteurella multocida* X73 using a hyaluronidase-producing *Staphylococcus aureus* strain. J Microbiol Methods.78(1):2

♦**Abd El-Hamid** , M. & Bendary , M. **(2013)**. Association between agr alleles and toxin gene profiles of *S. aureus* isolates from human and animal sources in Egypt .International Journal of Advanced Research 1(8):133-144

♦ **Adak ,** S. S. & Banerjee , R. R**. (2013)**. Biochemical Characterisation of a Newly Isolated Low Molecular Weight Lipase from Rhizopus oryzae NRRL 3562. 2 (2):(1-7)

♦**Adnan** , K. ; Sudeshna , S. ; Ghosh , b. & Bolesa , R. **(2014)**. Triclosan Promotes *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. Journal of Pathogens Research 5 (2):1-4.

♦**Alariya** , S. S. ; Sethi , S. ; Gupta , S. & Gupta , B. L. **(2013)**. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. Archives of Applied Science Research , 5 (1):15-24 .

المصادر
Reference

♦**Al-Jumaily** , E. F. ; Saeed , N. M. , & Khanaka , H. H. **(2014)**. Study the biological characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin . World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 3 (6): 13-30.

♦**Allen** , J. W ; Schuler , C. F. ; Mendes , R. W. & Latt , S. A**. (1977)**. Asimplified technique for in vivo analysis of sisterchromatid exchange using 5bromodeoxy uridine tablets , Cytogentics, 18:231-237

♦**Alreshidi** , M. M. ; Dunstan , R. H. ; Onyango , L. A. & Roberts , T. K. **(2013)**. Staphylococcal phenomics: metabolomics and proteomic responses to environmental stressors. Journal of Pathogens. Research 7: 123–129.

♦**Anstead** , G. M. ; Cadena , J. ; & Javeri , H. (**2014**). Treatment of infections due to resistant *Staphylococcus aureus*. Methods Mol. Biol. 1085: 259–309.

♦**Atlase** , R. M. ; Brown , A. E. & Parks , L. C. **(1995)**. Laboratory Manual Experimental Microbiology. Mosby-Comp:119-121

♦**Baele** , M. ; Storms , V. ; Haesebrouck , F. ; Devriese , L. A. , Gillis ; M. ; Verschraegen , G. ; De Baere , T. & Vaneechoutte , M. **(2001)**. Application and evaluation of the interlaboratory reproducibility of tRNA intergenic length polymorphism analysis (tDNA PCR) for identification of *Streptococcus* species. J Clin Microbiol 39:1436–1442.

♦**Balaban** , N. and Rasooly, A**.(2000)**. Staphylococcal enterotoxins.. Int. J. Food Microbiol. 61: 1–10.

المصادر
Reference

♦**Balows** , A. ; Hausler , W.J. ; Herrmann , K.L. ; Isenberg , H.D. & Shadomy , H.J. **(1991)**. Manual of clinical microbiology. 5th ed. Washington, DC: ASM:233-234

♦**Baron** , E. J. ; Pelerson , L. R. ; & Finegold , S. M. **(1994)**. Enterobacteriaceae.In : Baiely and Scott's Dagnostic Microbiology,(9th ed.) , Mosby –year book Inc ,USA:163-139

♦**Bauer** , A. W. ; Kirby , W. M. ; Sherris , J. C. & Turck, M. **(1966)**. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 36 (3): 493-496.

♦**Baum** , C. ; Loffler , B. ; Westh , H. ; Boye , K. ; Peters , G. ; Neumann , C. & Kahl , B. C. (**2009**). Nonspa- typeable clinical *Staphylococcus aureus* strains are naturally occurring protein A mutants. J Clin Microbiol 47: 3624-3629.

♦**Bendahou** , A. ; Lebbadi , M. ; Ennanei , L. ; Essadqui , F.& Abidm M. **(2008)** . Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. *J Infect Developing Countries*; 2(3):218-225.

♦**Benson** , J. H. **(2001)**. Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology. 8th ed. McGraw-Hill Higher Education. New York.

♦**Bien** , J. ; Sokolova , O. & Bozko , P. **(2011)**. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. Journal of Pathogens. Research , 39 :579-588.

♦**Bjerketorp** , J**. (2004)**. Novel Adhesive Proteins of Pathogenic Staphylococci and Their Interaction with Host Proteins Doctorate thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala .

♦**Bocchini** , C. E . ; Hulten , K. G. ; Mason , E. O. ; Gonzalez , B. E. ; Hammerman , W.A. & Kaplan, S. L. **(2006)**. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis in children Pediatrics , 117(2):433-440.

♦**Bollela** , V. R. ; Sato , D. N. & Fonseca , B. A. L**.(1999)**. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using Mycobacterium tuberculosis as a research tool. Brazilian Journal of Medical and Biological Research , 32: 1073-1076.

♦**Bose** , J. L. ; Daly , S. M. ; Hall , P. R. ; Kenneth W. & Baylesa , K. W**. (2014)**. Identification of the *Staphylococcus aureus* vfrAB Operon, a Novel Virulence Factor Regulatory Locus. 82 (5) : 1813–1822.

♦**Brooks** , G. F. ; Butel , J. S. ; Morse , S. A**.** ; Jawetz , E. ; Melnik , J. L. & Adelberg's **(2001)**. Medical Microbiology . 22nd ed. Medical East ed , Appleton Large.:229-231.

♦**Brosnahan** , A. J. ; Mantz , M. J.; Squier , C. A. ; Peterson , M. L. & Schlievert , P. M. **(2009)**. Cytolysins augment superantigen penetration of stratified mucosa. J. Immun. 182 (4) 2364–2373.

♦**Cabisco** , E. ; Tamarit , J. & Rom , J.**(2000)**. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species, Int. Microbiol. 3:3–8.

♦**Carson** , J. ; Lui , L. H. ; Rennick , L. & J. Fuller , J**. (2009)**. Interpretation of MRSA Select screening agar at 24 hours of incubation. J. Clin. Microbiol. 47:566–568

♦**Casanova** , C. ; Iselin , L. ; Steiger , N. V. ; Droz , S. & Parham , P**.(2011)**. *Staphylococcus hyicus* Bacteremia in a Farmer. Journal Of Clinical Microbiology, Dec 49 (1): 4377–4378

♦**Chandrakanth** , K. ; Gavimath , C. C. ; Kangralkar , V. A. ; Morabad , U. ; Virupakshaiah , D. B. M. **(2010)**. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* Coagulase gene. J Adv Bioinfo App Res; 1: 31-36.

♦**Cherif** , S. ; Mnif , S. ; Hadrich , F. ; Abdelkafi , S. & Sayadi , S**. (2011)**. Strategy for improving extracellular lipolytic activities by a novel thermotolerant *Staphylococcus sp*. Strain. Cherif et al. Lipids in Health and Disease , 10:209.

♦**Cheung** , G. Y. ; Duong , A. C. & Otto , M. **(2012)** Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. Microbes Infect. 14: 380–386.

♦**Colowick** ,S. P. & Kaplan , N.O**. (1955)**.Preparation of buffers for use in enzyme studies: Methods in enzymology.Part.1, Academic press, New York. p:138-145

♦**Collee ,** G. ; Fraser , A.G. ; Marmion , B.P. ; & Simmons , A. **(1996)** Mackie and Mc Cartney Practical Medical Microbiology (14^{th} ed.) Churchill Livingstone.New York , P: 245 - 251.

♦**Coombs** , G. W. ; Nimmo , G. R. ; Pearson , N. C. ; Collignon , P. J. ; Jan , M**. (2011)**. Australian Group on Antimicrobial Resistances Hospital- onset *staphylococcus aureus* surveillance prograae annual report. 37(3) :210-218 .

♦**Croft , (1999)**.Identification,Purity and clinical significance of coagulase negative *staphylococcus* species isolated from, clinical blood culture.(M.Sc thesis) .University of Utah.

♦**Czajkowsky** , D. M. ; Sheng , S. & Shao , Z. (1998). Staphylococcal alpha-Hemolysin Can Form Hexamers in Phospholipid Bilayers. J. Mol. Biol. 276: 325-330 .

♦**D'Allaire** , S & Friendship , R. (**2010**). Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress Vancouver, Vancouver, Canada.

♦**Daniel** , S. J. C. ; Gowthami , E & Sowmiya , S. **(2013)**. Isolation and identification of bacterial pathogens from wounds of diabetic patients. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 2(11): 72-77.

♦**Davis** , E. M. **(2011)**. Characterization of fibrinogen-binding surface protein B and staphylocoagulase in human blood fibrinolysis and coagulation. Master Thesis. Nashville, Tennessee.

♦**Delbes** , C. ; Alomar , J. & Chouguim , N. **(2006)** . *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked , semihard cheese from cows' milk. J. food protect. 69: 2161-2167.

♦**Desouky** , S. E. & El-Gamal , M. S. **(2014)**. Determination of Some Virulence Factors in *Staphylococcus spp*. Isolated from Clinical Samples of Different Egyptian Patients. World Applied Sciences Journal 32 (4): 731-740 .

♦**Devapriya** , F. ; Ramesh , R. ; Khan , A. K. & Shanmugam, J. **(2013)**. β-lactamase production of *Staphylococcus aureus*: a comparison study of different iodometric methods. Gulf medical journal ,2(1):16- 21.

♦**Devi** , C. S. ; Sinha , D. D. ; SHARMA , V. & Mohanasrinivasan , V. M. **(2012)**. Screening for Staphylokinase producing *staphylococcus spp*. from different environmental samples asian journal of pharmaceutical and clinical research 5 (4) :125-128.

المصادر
Reference

♦**Dezfulian** , A. ; Aslani , M. M. ; Oskoui , M. ; Farrokh , P. ; Azimirad , M. ; Dabiri , H. ; Salehian , M. ; & Zali , M.R. (**2011**). Identification and characterization of a high vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *VanA* gene cluster isolated from diabetic foot ulcer. *Iran J. Basic Med. Sci.* 15(2) , pp:803-806.

♦**Dickson** , J. & Marples , R. R. **(2014)**. Coagulase production by strains of *Staphylococcus aureus* of differing resistance characters: a comparison of two traditional methods with a latex agglutination system detecting both clumping factor and protein A. J Clin Pathol;39:371-375

♦**Diekema** , D. J. ; Muller , B. & Vaughn , T. E. **(2004)**. Antimicrobial resistance trends and out break frequency in United State Hospital. Clinical Infection Diseases 38: 78 – 85 .

♦**Dinges** , M. M. , Orwin , P. M. & Schlievert , P. M. **(2000)**. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews. 13: 16-34

♦**Dubey** , R. C. & Maheshwari , D. K. **(2009)**. A textbook of Microbiology. 1st ed. S. Chand and Company LTD. New Delh.

♦**El-Gedawy** , A. A. , Ahmed , H. A. & Awadallah , M. A. I. **(2014)**. Occurrence and molecular characterization of some zoonotic bacteria in bovine milk, milking equipments and humans in dairy farms, Sharkia, Egypt. International Food Research Journal 21(5): 1813-1823 .

♦**EI-Jakee** , J. ; Marouf , S. A. ; Ata , N. S. ; Abdel-Rahman , E. H. ; El-Moez , S. A. ; Samy , A. A. & E. El-Sayed , W. **(2013)** Rapid Method for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins in Food. Global Veterinaria 11 (3): 335-341.

♦**Evelien** , T. M. B. ; Alexander , R. H. ; Nina , M. H. ; Monestier , M. ; Nizet , V. & Blickwede , M. **(2010)**. Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. J .Innate Immun. 2(6): 576–586.

♦**Faixova** , Z. & Faix , S. **(2002)**. Influence of Metal Ions on Ruminal Enzyme Activities. ACTA VET. BRNO 2002, 71: 451–4550.

♦**Feldsine** , P. **(2002)**. AOAC international method committee guidelines for validation of gualitative and guantitative food microbiological official method of analysis,J AOAC Int 85:1187 – 1200

♦**Foster** , G. ; Ross , H. M. ; Hutson , R. A. & Collins , M. D. **(1997)**. *Staphylococcus lutrae sp*. nov., a New Coagulase-Positive Species Isolated from Otters. Internationjaolu Rnaolf SystemaTbica Cteriology, p. 724-726 .

♦**Foster** , T. J. **(2005)**. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol 3: 948-958.

♦**Fudaba** ,Y. ; Nishifuji , K. ; Andresen , L. ; Yamaguchi , T. ; Komatsuzawa , H. ; Amagai , M. & Sugai , M. **(2005)**.*Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins selectively digest porcine desmoglein 1. Microbial Pathogenesis 39: 171–176.

♦**Gharib** , A. A. ; Attia , A. & Bendary , M. M. **(2013)**. Detection of the Coa Gene in *Staphylococcus aureus* from Different Sources by Polymerase Chain Reaction. International Journal of Microbiological Research 4 (1): 37-42.

♦**Goh** , S. K. , Byrne , J. L. , Zhang & Chow , A. W. **(2008)**.Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms," Journal of Clinical Microbiology., 30:1642-1645.

♦**Gonc** , A. ; Rodrigues , A. ; Pina-Vaz , C. ; Oliveira , S. & Tavares , C. Ch. **(2003)**. Expression of Plasma Coagulase among Pathogenic *Candida* Species. Journal Of Clinical Microbiology. 41(12) : 5792–5793.

♦**Götz** , f. ; Bannerman , t. & Schleifer , k. **(2006)**. The genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. prokaryotes ,4:5–750

♦**Guss** , A. M. (**2011**). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. 5:20–9.

♦**Haddad** , L. E. & Moineau , S. **(2013)**. Characterization of a Novel Panton-Valentine Leukocidin (PVL)- Encoding Staphylococcal Phage and Its Naturally PVL-Lacking Variant. Applied and Environmental Microbiology. 79 (8) : 2828–2832.

المصادر
Reference

♦**Hanaa ,** A. E. & Darwishm , S. F. **(2014)**. Evaluation of Phenotypic Methods versus Molecular Methods for Differentiation of Coagulase Positive Staphylococci causing Bovine Mastitis with a Special Reference to atypical *Staphylococcus aureus*. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci , 3(5): 543-558.

♦**Harley** , J. P. & Prescott , Z. M. **(1996)**. Laboratory exercises in Microbiology. 3rd ed. WEBMC Gram-Hill, New York.

♦**Hendrickx** , A. P. A. ; Bonten , M. J. M. ; Luit , M . (**2008**).Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired Enterococcus faecium isolate. Microbiology 154:3212-3223.

♦**Hirotaki** , S. ; Sasaki , T. ; Kuwahara , K. & Hiramatsu , K. **(2011)**. Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. J Clin Microbiol 49(36):27-31.

♦**Holt** , J. G. ; Krieg , N. R. ; Sneath , P. H. ; Staley , J. T. & William , S.T. **(1994)**. Broad of trustees of Berg's manual of determinative bacteriology .9th ed. ,Williams and Wilkins publication .Baltimor .pp:42-43.

♦**Hookey** , V. Edwards , B. D. & Richardson , J. **(1999)**. PCR-RFLP analysis of the coagulase gene of *Staphylococcus aureu*s: application to the differentiation of epidemic and sporadic methicillin-resistant strains, Journal of Hospital Infection 42, pp. 205-12.

♦**Hussain** , M. h. ; Van , E. C. ; Perdreau , R. F. & Peters , G. (**1997**). A 140 – Kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *staphylococcus* epidermids strain on surfaces.Infection and Immunity.65.519-524.

♦**James ,** V. ; Gregory , M. ; Gregory , A. ; Douglas , H. & Patrick , M. **(2000)**. Mutational Analysis of the Superantigen Staphylococcal Exfoliative Toxin A (ETA) J Immunol 164:2207-22130

♦**Jaradat** , Z. ; Al Aboudi , A. ; Shatnawi , M. & Ababneh , Q. **(2013)**. *Staphylococcus aureus* isolates from camels differ in coagulase production - genotype and methicillin. Journal of Microbiology, Biotechnology and food sciences. 2 (6) 2455-2461.

♦**Jekle** , A. ; Yoon , J. ; Zuck , M. ; Najafi , R. ; Wang , L. ; Shiau , T.; Francavilla , C. ; Rani , S. A. ; Eitzinger , C. ; Nagl ,M. ; Anderson , M. ; Debabova , D. **(2013)**. NVC-422 Inactivates *Staphylococcus aureus* Toxins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57(2): 924–929.

♦**Kampen** , M. D. ; Simons , J. W. F. A. ; Dekker , N. ; Egmond , M. R. & Verheij , H. M. **(1998)**. The phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation Chem. Phys. Lipids, 93: 39–450

♦**Kateete** , D. P. ; Kimani ,C. ; Katabazi , F. A. ; Okeng , A. ; Okee , M. S. ; Nanteza , A. ; Joloba , M. L. & Najjuka , F. **(2010)**. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 9:23:(1-7)

♦**Kerremans** , J. ; Goessens , W. H. F. & Verbrugh , H. A. **(2008)**. Rapid Identification of *Staphyloccocus aureus* in Positive -Testing Blood Cultures by Slidex Staph Plus Agglutination Test. Journal Of Clinical Microbiology.

♦**Kloos** , W. E. & Schleifer , K. H. **(1975)**. Isolation & characterization of staphylococci from human skin; description of four new species: *Staphylococcus warneri , Staphylococcus capitis Staphylococcus hominis & Staphylococcus simulans*. Int. J. Bacteriol. 25: 62-79.

♦**Kloos** , W. & Bannerman , T. L. **(1994)**.Updated on clinical significans of Coagulase Negative Microbiology Review-7:117-140.

♦**Kobayashi** , S. D. & DeLeo , F. R. **(2013)**. *Staphylococcus aureus* Protein A Promotes Immune Suppression. mbio.asm.org. Volume 4 Issue 5. : 94-96.

♦**Kohl** , J. D. & Johnson , M. G.**(1980)**. Quantitative,radial diffusion slide assay for Staphylocoagulase. Applied and Environmental Microbiology .p:339-341.

♦**Koneman** , E. W. ; Allen , S. D. ; Janda , W. M.; Schreckenberg , P. C. & Winn , W. C. **(1997)**. Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., J. B. Lippincott Company, Philadelphia. New York.

♦**Konto** ,Y. ; Mairey, E. ; Mallet , A.Duménil , G. & Caliot , E. **(2009)** . Dual Role for Pilus in Adherence to Epithelial Cells and Biofilm Formation in *Streptococcus agalactiae*. PLoS Pathog 5(5) .

♦**Kristlová** , J. ; ková , P. & Vytřasová , J. **(2012)**. Influence of pH and temperature on the production of staphylococcal enterotoxin H. African Journal of Microbiology Research 6(11): 2598-2602

♦**Kumari** , k. **(2014**). Extracellular Protease Enzyme Production using *Micrococcus luteus*-4 , *Staphylococcus hyicus* , *Micrococcus luteus*-1 , *Pasteurella pneumotrop* and *Micrococcus sp*. isolated From Water Reservoirs. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 3(5): 772-784.

♦**Kusuma ,** C. M. & Kokai , J. F. **(2005)**. Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of *Staphylococcus auerus* .J. Antimicrob.Agents Chemother., 49 (8) : 3256 – 3262

المصادر
Reference

♦**Leboffe** , M. J. & Pierce , B. E. **(2010)**. Microbiology: Laboratory Theory and Application. 3d ed. Morton Publishing Company. Englewood, CO.

♦**Lee** , Y. K. & Selminen , S. **(1995**). The coming age of probiotics. Trends Food Sci. Technol. 6:241–245.

♦**Lessa** , F. C. ; Cohen , J. ; Dumyati , G. ; Farley, M. M. ; Winston , L. ; Kast , K. ; Holzbauer , S. ; Meek , J. ; Beldavs , S. ; McDonald , L. C.& Fridkin , S. K. **(2012)**. Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America, Society for Healthcare Epidemiology, Pediatric Infectious Disease Society, and HIV Medical Association; San Diego.

♦**Levinson** , W. & Jawetz , E. **(2000)**. Medical Microbiology & Immunology. Examination & Board Review. 6th ed., McGraw-Hill, International Editions. Health Professions Series.

♦**Liu** , G. Y. ; Essex , A. ; Buchanan , J. T. ; Datta ,V. ; Hoffman , H. M. ; Bastian , J. F. & Nizet ,V. **(2005)**. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through it's antioxidant activity.J.Exp.Med. 202 (2): 209 - 215.

♦**Lyall** , K. D. S. ; Gupta ,V. & Chhina , D. **(2013)**. Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences , 18(2):112- 115.

♦**MacFaddin** , J. F. **(2000).** Biochemical Tests for Identification of Medial Bacteria. 3rd ed., Lippincott Williams and Wikins,a walters Kluwer Com., London. pp:484-485.

♦**MacFaddin** , J. F. (**1985**). Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, Md.

♦**Mahon** , C. R. ; Lehman, D. C. & Manuselis , G. **(2011)**. Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. Philadelphia: W. B Saunders Co.

♦**Mahfouz** , A. A. ; Al-Azraqi , T. A. ; Abbag , F. I . ; Al-Gamal , M. N. & Seef , S. t. **(2010)** Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit in south-western Saudi Arabia. East Mediterr Health J 16: 40-44.

♦**Maier** , U. & Büchs , J. **(2001)**. Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*., Vol. 7.

♦**Makris** , G. ; Wright , J. D. ; Ingham , E. & Holland , K. T. **(2004)**. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus*: a virulence factor. Microbiol. 150, 6, 2005–2013.

♦**Makwana** , G. E. ; Gadhavi , H. & Sinha , M. **(2012)**. Comparision Of Tube Coagulase Test With Mannitol Fermentation Test For Diagnosis Of *Staphylococcus Aureus*. Njirm; Vol. 3(4).

♦**Mamza ,** A. , Godwin , O. ; Gideon, D. & Mshelia , S. **(2010)**. Antibiotic susceptibility patterns of beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from chickens in Maiduguri (Arid zone), Nigeria. Veterinarski Arhiv 80 (2), 283-297

♦**Mann** , E. E. ; Rice , K. C. ; Boles , B. R. ; Endres , J. L. ; Ranjit , D. ; Chandramohan , L. ; Tsang , L. H. ; Smeltzer , M. S. ; Horswill , A. R. & Bayles , K. W. **(2009)**. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. PLoS One. 4: 5822.

♦**Masoudhaghkhah** , D. V. M. **(2003)**. Study of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*. Doctorate thesis. Shiraz University.

♦**Matar** , S. **(2014)**. Characterization of *Staphylococcus* Small Colony Variant and their Pathogenic Role in Biomaterial Related Infectoin with Special Reference to *Staphylococcus epidermidis*.:187-192

♦**Mathai** , J. ; Sindhu , P. N. ; Sulochana , P. V. & Sathyabhama , S. **(2003)**. Haemolysin test for characterization of immune ABO antibodies. Indian J. Med Res 118 : 125-128.

♦**Monte** , J. ; Abreu , A. C. ; Borges , A. ; Simões, L. Ch & Simões , M. **(2014)**. Antimicrobial Activity of Selected Phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and Their Biofilms. Pathogens, 3: 473-498.

♦**Murray, B. E. (1998)**. Diversity among multidrugs resistance Enterococci .Emerg.Infect.Dis., 4 (1) : 37 - 47.

♦**Murray**, P. R. ; Baron , M. A. Pfaller , F. C. & Yolken , R. H. **(1995)**. Manual of clinical microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.:445-457

المصادر
Reference

♦**Murray**, P. R. ; Baron , M. A. Pfaller , F. C. & Yolken , R. H. **(2003)**. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press: Washington, DC.332-339

♦**Naja** , G. M. ; Mustin , C & Volesky, B. **(2005)**. A high resolution ; a new approach to studying binding site of microbial biosorbent . Water Research , 39 :579-588

♦**Nanra** , J. S. ; Buitrago , S. M. ; Crawford , S. ; Fink ,J. N. S. ; Hawkins , J. ; Scully , I. L. ; Mcneil , L. k. ; Amézaga , J. M. ; Cooper , D. ; Jansen , K. U. & Anderson , A. S. **(2013)**. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. Human Vaccines & Immunotherapeutics 9:3, 480–487.

♦ **Nigam** , V. K. ; Khandelwal , A. K. ; Agarwal , Mohan , A. M. K. & Vidyarthi , A. S. **(2012)**. Production of a Thermostable Nitrilase in a Lab Scale Stirred Tank Bioreactor. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology.. 4(3):122-127

♦**Noguchi** , N. ; Tamura , M. ; Narui , K. ; Wakasuugi , K. & Sasatsu , M. **(2002)**. Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones. J. Biol. Pharm. Bull., 25(9): 1129 – 1132.

♦**Nwoire** , A. ; Madubuko , E. F. ; Eze , U. A. ; Wilberforce , R. O. ; Azi , S. O. ; Ibiam , G. A. ; Egwu , I. H. ; Okereke , E. C. & Obi , I. A. **(2013)**. Incidence of *staphylococcus aureus* in clinical specimens in Federal Teaching Hospital, Abakaliki, Ebonyi State. Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences. 1(3) : 043-046.

♦**O'Brien** , M. ; Hunt , K. ; McSweeney , S. & Jordan , K. **(2009)**. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. Food Microbiol. 26: 910-914.

♦**O'Brien** , L. M. ; Walsh , E. J. ; Massey , R. C. ; Peacock , S. J. & Foster , T. J. **(2002)** *Staphylococcus aureus* clumping factor B(CIfB) promotes adherence to human type 1 cytokeratin 10: implication for nasal colonization. Cell Microbial.4(11):759- 770.

♦**Ozen** , N. S. ; Ogunc , D. ; Mutlu , D. , Ongut ; G. ; Baysan , B. O. & Gunseren , F. **(2011)** .Comparison of four methods for rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from BACTEC 9240 blood culture system. Indian J Med Microbiol ; 29:42-6.

♦**Özpin** , N. ; Semith , K. & Gümüssoy , K. S. (**2013**). Phenotypic and Genotypic Determination of Antibiotic Resistant and Biofilm *Staphylococcus aureus* Isolated in Erzincan Tulum Cheese. Kafkas Univ Vet Fac Derg. 19(3):517 – 521.

♦**Parisi** , J. T. ; Baldwin , J. N. & Sottile , M. **(1973)** . Pour – Plate method for the detection of coagulase – Production by *Staphylococcus aureus*. Applied Microbiology, p:558- 561

♦**Park** , J. ; Friendship , R. ; Weese , J. S. ; Poljak , Z. & Dewey, C. E. (**2013**). An investigation of resistance to β-lactam antimicrobials among staphylococci isolated from pigs with exudative epidermitis.. BMC Veterinary Research, 9:211.

♦**Pelisser** , M. R. ; Klein , C. S. ; Ascoli , K. R. ; Zotti ,T. R. & Maisonnave , A. C. **(2009)**. Ocurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex pcr detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. Brazilian journal of microbiology 40:145-148.

♦**Percy**, M. G. & Gründling , A. (**2014**). Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. Annu. Rev. Microbiol 68:81–100 .

♦**Petit** , L. ; Gibert , M. ; Gillet , D. ; Winter , C. ; Boquet , P. & Popoff , M. R. **(1997)**. *Clostridium perfringgens* Epsilon Toxin Induces a Rapid Change of Cell Membrane Permeability Ions and Forms Channels in Artificial Lipid Bilayer.J.Bacteriol.179:6480-6487 .

♦**Plata** , K. ; Rosato , A. E. & Wegrzyn , G. **(2009)**. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochimica Polonica 56 (4): 597-612.

♦**Prax** , M. ; Lee , C.Y. & Bertram , R. **(2013)** . An update on the molecular genetics toolbox for Staphylococci. Microbiology, 159: 421–435.

♦**Prevost** , G. ; Couppie , P. ; Prevost , P. ; Gayet , S. ; Petiau , P. ; Cribier , B. ; Monteil , H. & Piemont , Y. **(1995)**. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. J Med. Microbiol. 42:237–245.

♦**Priyadarshini** , S. R. B. ; Mugeraya , G. & Sandhyavali , M. S. (**2012**). effect of media constituents on microbial enzyme activity. international journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences. ijpcbs, 2(3), 236-241

♦**Proctor** , R. A. ; Eiff C. ; Kahl , B. C. ; Becke r, K. , Mcnamara , P. ; Herrmann , M. & Peters , G**. (2006)**.Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol 4: 295–305.

♦**Pyzik** , E. & Marek , A. (**2011**). Characterization of bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the eggs of Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Polish Journal of Veterinary Sciences. 15(4): 767-772

♦**Rajbhandari** , R. (**2011**). Studies on the role of the putative phosphorylation consensus sequence YXNX in the tandem repeat domains of the of the *Staphylococcus aureus* Mu50 Extracellular Adherence Protein (Eap). Thesis University of Saarland.

♦**Rathnan** , R. K. ; Gopal , S. ; Thomas , M. ; Antony , S .; Thomas , C. & Mechoor , A. **(2012)** . Effective utilization of an aquatic weed Salvinia Molesta as a substarte for the production of Cellulase Enzyme –Eradication through utilization. International Journal Of Environmental Sciences. 3(1): 36-43.

♦**Ratner** , A. J. ; Hippe , K. R. ; Aguilar , J. L. ; Bender , M. H. ; Nelson , A. L. & Weiser , J. N. **(2006)**. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. J. Biol. Chem. 281, 18, 12994–12998.

♦**Resch** , M. ; Nagel , V. & Hertel, C. **(2008)**. Antibiotic resistance of coagulase-negatives staphylococci associated with food and used in starter cultures. Int. J. Food Microbiol., 127: 99-104.

♦**Reygaert** , W. C. **(2013)**. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education ,297- 305.

♦**Rezaee** , A. ; Khonsari , A. M. & Pirayeh , S. N**.(2006)**. Effect of Sub-inhibitory Concentrations of Gentamicin the β-lactamase Production of Uropathogenic *Escherichia Coli*. Research Journal of Medicine and Medical Sciences, 1(2): 63-67.

♦**Rice** , K. ; Huesca , M. ; Vaz , D. & McGavin , M. J. (**2001**). Variance in fibronectin binding and fnb locus polymorphisms in *Staphylococcus aureus*: identification of antigenic variation in a fibronectin binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of methicillin-resistant *S. aureus*. Infect. Immun. 69:3791-3799.

♦**Rollof** , J. ; Braconier , J. H. ; Soderstrom , C. & Nilsson , P. **(1988)**. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 7: 505-510.

♦**Ryding** , U. ; Renneberg , J. ; Rollof , J. & Christensson , B. **(1992)**. Antibody response to *Staphylococcus aureus* whole cell, lipase and Staphylolysin in patients with *S. aureus* infections". FEMS Microbial. Immunol. Vol.4 p.105

♦**Sangvik** , M. ; Olsen , R. S. ; Olsen , K. ; Simonsen , G. S. Furberg , A. S. & Sollid , J. U. **(2012)**. Age- and gender-; associated *Staphylococcus aureus spp*. types found among nasal carriers in a general population: the Tromso Staph and Skin study. J Clin Microbiol 49: 4213–4218

♦**Said** , M. B. S. M. **(2010)**. Sequences analysis and secondary structure prediction of Coagulase enzyme in *Staphylococcus aureus*. Master Thesis, University Technology Mara.

♦ **Schulz** , A. R. ; Smith , K. L. ; Wolter , M. ; Hogan , J. S. & Love , B. C. **(2004)**. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. Vet. Microbiol. 102 ,33-42.

♦**Shittu** , A. ; Oyedara , O. ; Abegunrin , F. ; Okon , K. & Raji , A. **(2012)** Characterization of methicillin-susceptible and –resistance staphylococci in the clinical setting: a multicentre study in Nigeria. BioMed Central Infectious Diseases 12: 1-10.

♦**Sabbadini** , P. S. ; Silva , M. R. N. ; Adelino , T. N. ; Santos , C. S. D. ; Pereira , G. A. ; Nagao , P. E. ; Dias , A. A. S. ; Guaraldi , A. L. & Júnior , R. H. **(2012)**. Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 105(5): 706-711.

♦**Sani** , N. A. M. ; Sapri , H. F. ; Neoh , H. & Hussin , S**. (2014)**. First report on the molecular epidemiology of Malaysian *Staphylococcus epidermidis* isolated from a University Teaching Hospital. BMC Research Notes, 7:597.

♦**Sarkar** , S. S. ; Sengupta , M. ; Saha , P. & Sengupta , M. (**2014**). In-vitro activity of Cefotaxime in the Era of Antimicrobial Resistance. International Journal of Scientific and Research Publications, Volume 4, Issue 3.

♦**Sasaki** , T. ; Tsubakishita , S. ; Tanaka , Y. ; Sakusabe , A. ; Ohtsuka , M. ; Hirotaki , A. ; Kwakami , T. ; Fukata , T. & Hiramatsu , K. **(2010)**. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. Journal of Clinical Microbiology.;48:765-769.

♦**Schwarzkopf** , A. & Karch , H. **(1994)** Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker," Journal of Clinical Microbiology, vol 32, no. 10, pp: 2407–2412.

♦**Shall** & McBryde , E**. (2014)**. The role of *Staphylococcus aureus* carriage in the pathogenesis of bloodstream infection. Marshall and McBryde BMC Research Notes, 7:428.

♦**Sharma** , S. & Gupta , M. N. **(2001)**. Alginate as a macroaffinity ligand and an additive for enhanced activity and thermostability of lipases. Biotechnol .Appl. Biochem. 33(3): 161-165 .

♦**Sharma** , N. ; Burgohain , P. ; Kaushal , R. & Tandon , D. **(2012)** . Use of microwave pretreated Cedrus deodara wood residue as a substrate for enhanced production of cellulase free xylanase from *Geotrichum sp.* F3 isolated from rural compost. J. Microbiol. Biotech. Res., , 2 (4): 621-631.

♦**Siegrist** , J. **(2014)**. The Role of *Staphylococcus aureus***.** Microbiology Focus , 6 (1) : 1-8.

♦**Singh** , P. & Parmar , N. **(2011)** .Isolation and characterization of tow novel poylhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria. African Journal of Biotechnology 10(24):4907-4919.

♦**Snyder** , I. S. & Koch ,N. A. **(1966)**. *Staphylococcus* isolated from the eggs of Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Polish Journal of Veterinary Sciences 15(4): 767-772 .

♦**Spergser** , J. ; Wieser , M. ; Täubel , M. ; Mora , R. A. ; Rosengarten , R ; Busse , H.J. **(2003)**. *Staphylococcus nepalensis sp nov*., isolated from goats of the Himalayan region. Int J Syst Evol Microbiol 53: 2007-2011

♦**Sturm** , P. D. J. ; Kwa1 , D. ; Vos , F. J. ; Bartels , C. J. M. & Schulin , T. **(2008)**. Performance of two tube coagulase methods for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood cultures and their impact on antimicrobial management. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 14, 495–513.

♦**Sulieman** , H. M. A. & Allaahmed , A. A. A. **(2012)**. Effect of Antimicrobial Properties of Pepper Fruits on on Some Spoilage Organism of Sudanese Wet Salted Fermented Fish(Fassiekh) Product .World' s V *et*. J. 2(1):05.10.

♦**Summers** , M. C. & Biggers , J. D. **(2003)**. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. Human Reproduction Update, 9 (6) : 557-582.

♦**Swarooprani ,** N. B. ; Kardesai , S. G. & Metgud , S. C. **(2014)**. Aerobic Bacteriological Study of Chronic Suppurative Otitis-Media with Reference to MRSA and ESBL. SMU Medical Journal, 1 (1):120-1280

♦**Szakiel** , M. ; Sadowska , B. & Barbara , B. (**2007**). Staphylokinase Production by Clinical *Staphylococcus aureus* Strains .Polish Journal of Microbiology, 56 (2):97-102**.**

♦**Talib ,** V. H. **(1996)**.Basic Fundamental Techniques P:107-116.In:A Handbook of Medical Laboratory Technology,1st Ed.,WHO India0

♦**Taneja** , N. ; Chari , P. S. ; Singh , M. ; Singh , G. ; Biswal , M. & Meera Sharma , M. **(2013)**. Evolution of bacterial flora in burn wounds: key role of environmental disinfection in control of infection Int. J. Burn Trauma;3(2):102-107.

♦**Tang** ,Y. & Stratton , C. W. **(2006)**.Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Springer Science Business Media , LLC. Printed in the United States of America .

♦**Taponen** , S. & Pyorala , S**. (2009)**. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-not so different from *Staphylococcus aureus*, Vet. Microbial. 134:29-36.

♦**Tembhurkar** , V. R. ; Dama , L. B. ; Attarde , N. P. & Zope , P. S. **(2012)**. Production and characterization of extracellular lipases of *staphylococcus sp*. isolated from oil contaminated soil. vol. 1 no. 1.

♦**Thorberg** , B. M. ; Tham , M. L. ; Emanuelson , U. & Waller , K. P . **(2009)**. Bovine subclinical mastitis caused by different types. American Dairy Science Association, J. Dairy Sci. 92 :4962–4970.

♦**Tiwari** , H. K. ; Sapkota , A. ; Gaur , J. P. ; Mathuria , A. & Sen , M. R. **(2008)** .Molecular typing of clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Northern India using coagulase gene PCR-RFLP Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 39(3): 467–473.

♦**Tobin** , P. J. ; Mani , N. & Jayaswal , R. K. **(1994)**.Effect of physiological condition on autolysis of *staphylococcus aureus* strain. Antonie van Leeuwenhoek 56:71-78 .

♦**Turutoglu** , H. ; Tasci , F. & Ercelik , S. **(2005)**. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by tube Coagulase test. bull vet inst pulawy 49: 419-422.

♦**Vanassche** , T. ; Verhaegen , J. ; Peetermans , W. E. ; Hoylaerts , M. F. & Verhamme , P. (**2010**). Dabigatran inhibits *Staphylococcus aureus* coagulase activity. J Clin Microbial; 48: 4248–4250.

♦**Vanderzant** , C. & Splittstoesser , D. F. **(1992)**. Compendium of methods for the microbiological examination of food., 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

♦**Vandenesch** , F. ; Lebeau , C. ; Bes , M. ; Mcdevitt , D. ; Greenland , T. ; Novickj , P. R. & Etienne , J. (**1994**). Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in voIves both transcriptional and -post-transcriptional defects. J. Med. Microbial. Vol. 40, 344-349.

♦**Vasconceloes** , N. G . & Cunha , M. R. S. (**2010**). Staphylococcal enterotoxin: Molecular aspect and detection method, 2(3): 29-42.

♦**Victor**, I. ; Akwuobu , C. A. ; Akinleye , O. A. & Tyagher , J. A. **(2013)**. Management of exudative epidermitis (greasy pig disease) in 4 week old piglets. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health. 5(7:180-185.

♦**Vidya** , K. C. ; Mallya , P. S. & Rao , P. S. **(2005)**. Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentration of antibiotic. Indian Journal of Medical Microbiology , 23(2):102-105.

♦**Wakabayashi** , J. Y. I. & Cheng , D. W. **(2012)**.PerR-Mediated Oxidative Stress Response in *Staphylococcus aureus* .Jundishapur J Microbiol. 5(3):443-44.

♦**Weidenmaier** , C. ; Kokai , J. F. & Kristian , S. A. **(2004)**. Role of teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factoring nosocomial infections. *Nat. Med*. 10: 243-245.

♦**Weimer**, B. C.(**2007**) Woodhe Publishing In Food Science Technology and Nutrition (Improving the flavor of cheese).Cambridge CB216AH.England .

♦**Wertheim** , H. F. ; Melles , D. C. ; Vos , M. C. ; van Leeuwen , W. ; van Belkum , A. ; Verbrugh , H. A. & Nouwen , J. L. **(2005)**. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet. Infect. Dis. 5:751-762.

♦**Wilcox** , M. H. ; Walker , C. ; Wlnstanleyt , T. G. & Limb , D. I. **(1996)**. True identity of control *Staphylococcus aureus* strains and their performance in the tube coagulase test. J. Med. Microbiol.44:496-499 .

♦**Williams** , L. & Wilkins. **(2009)**. Review of Pharmacology.4th ed. USA.

♦**William** , B. W. ; Paul , D. V. ; George , M. G. ; Dorothy , J. ; Noel , R. K. ; Wolfgang , L. ; Fred , A. R. & Karl , S. (**2009**). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition Com.:392- 433.

♦**Yogananth** , N. ; Sophiya , S. ; Prabakaran , L. N. & Chanthru , A. **(2014)**. Isolation, antibiotic sensitivity and molecular characterization of Multi Drug Resistance *Staphylococcus aureus* using Polymerase Chain. 21:57-83

♦**Zecconi** , A. L. ; Cesaris , E. ; Liandris , V. ; Dapra , A. & Piccinini , R. (**2006**). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. Microbial. Path. 40:177-183 .

♦**Zhang** , L. ; Chen , S. ; Xie , H. ; Yuting Tian , Y. & Kaihui , K. **(2012)** . Efficient acetoin production by optimization of medium components and oxygen supply control using a newly isolated Paenibacillus polymyxa CS10. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 87 (11): 1551–1557.

ملحق (1) الإختبارات الكيموحيوية بإستخدام نظام Api Staph

الإختبار	المادة الأساس	النتيجة السالبة	النتيجة الموجبة
GLU	D-glucose	أحمر	أصفر
FRU	D-fructose	أحمر	أصفر
MNE	D-mannose	أحمر	أصفر
MAL	Maltose	أحمر	أصفر
LAC	Lactose	أحمر	أصفر
TRE	D-trehalose	أحمر	أصفر
MAN	D-mannitol	أحمر	أصفر
XLT	Xylitole	أحمر	أصفر
MEL	D-melibiose	أحمر	أصفر
NIT	Potassium nitrate	أحمر	أصفر
PAL	B-nephthyl-acid phosphate	عديم اللون- وردي فاتح	أحمر
VP	Sodium pyruvate	أصفر	بنفسجي
RAF	Raffinose	عديم اللون	بنفسجي- وردي
XYL	Xylose	أحمر	أصفر
SAC	Sucrose	أحمر	أصفر
MDG	α-methyl glucoside	أحمر	أصفر
NAG	N-acetyl glucose amine	أحمر	أصفر
ADH	Arginine dihydrolase	أصفر	برتقالي- أحمر
URE	Urease	أصفر	أحمر- بنفسجي

SUMMARY

The study include isolate and diagnosis the Coagulase Positive Staphylococci from clinical samples reached (102) sample of Hospitals Holy City of Kerbala (General Al Hussein Hospital and Kerbala Children Hospital) included Nasal swabs , Ear swabs , skin swabs , Burn swabs , Wound swabs ,Operation swabs and Urine sample ,as well as food samples and adopted collected from hawkers have not component cleanliness , which amounted to (35) sample ,which included food samples such as cheese , Dairy sample , samples of meat and ice cream sample for the period between (15 April and 30 Jule , 2014) .

Diagnosis of isolates was done according to tests of morphological and biochemical and after a diagnosis of colonies growth found that the bacteria positive for gram-stain formed ratio (٪69.98) for clinical samples and (٪57.89) for samples of food from the total isolates that gave the growth on culture media. And formed Staphylococci bacteria percentage (٪45.09) and (٪45.45) of clinical and food samples respectively, of the total isolates were positive for gram-stain. It also formed a Coagulase Positive Staphylococci ratio (٪39.13) of the total bacteria staphylococci acquired during isolation and diagnosis of clinical samples emerged as the percentage (٪60.0) of Coagulase positive staphylococci of total bacteria staphylococci in food samples. Also been diagnosed tow species of CPS (*S. aureus* and *S. hyicus*) depending on the both types of Slide and Tube Coagulase Test as well as relying on other biochemical tests and Api staph system .

Also been tested the sensitivity of CPS toward antibiotic to determine the most effective antibiotic toward these bacteria and found that the Azithromycin antibiotic was the most effective antibiotic toward *S.aureus* in contrast of *S.hyicus* that found the Erythromycin antibiotic was the most effective antibiotic toward it. As shown bacteria *S.aureus* resistant clear to Erythromycin antibiotic as well as Ciprofloxacin antibiotic , as for the *S.hyicus* bacteria show obvious resistance to streptomycin antibiotic as well as for Gentamycin antibiotic. Been studying the different condition for the production of Coagulase enzyme for both species , it was noted that is a great similarity in those circumstances except for some difference , the results indicate that the chemical defined medium led to an increase in the production of the enzyme in both types under study , it was noted that the degree of appropriate temperature in the production of the enzyme is the same for both types, a temperature (37) C° it was noted that the pH, which led to increased production of the enzyme was identical for

both types, a (7.5) and agreed both species in the good production of the enzyme in incubation time (24 hrs.) , it also coincided result in good production of the enzyme in both species when using shaking incubator (100 rpm).

The difference observed in the productivity of the enzyme was that the bacteria *S. aureus* produce high amounts of the enzyme using rabbits and humans plasma and was also examined that rabbits and sheep plasma were suitable in the production of the enzyme in bacteria *S. hyicus* It was also observed that the plasma concentration of 1/5 is appropriate in enzyme production of bacteria *S. aureus*, contrary to what was observed that 1/8 of the plasma concentration is appropriate in the production of the enzyme in bacteria *S. hyicus* As for the use of ion salts was observed that the use of magnesium ions salts ($MgCl_2$) leads to high production of the enzyme in bacteria *S. aureus* As for the bacteria *S. hyicus* was showed that potassium ions (KCl) salts having high production also observed that sodium salts ions have a negative impact on the lack of production of both types.

Ministry of Higher Education &

Scientific Research

University of Kerbala

College of Science

Study of Some Factors Affecting Coagulase Production by Local Isolates of Staphylococci

A Thesis

Submitted to the College of Sciences University of Kerbala in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of Master of science in Biology

By

Barrak Th. Shebeeb ALsalmi

B.SC.ALMustansiria University

Supervised by

Assist.Pro.Dr.

Thikra Adnan Jawad

October 2014 AD

Thi-Alheja 1435 H