جامعة حماه – كلية الصيدلة

السنة الثالثة

المحاضرة الثالثة

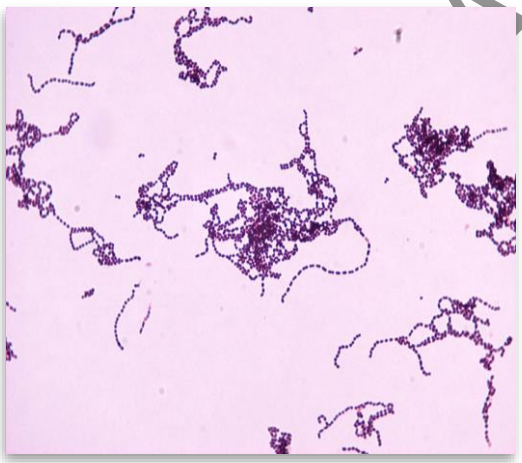
المكورات العقدية

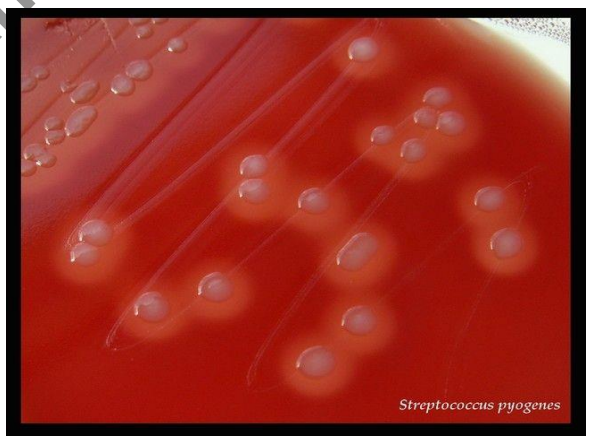
مقدمة

المكورات العقدية واسعة الانتشار توجد في الهواء والتربة وفي الفجوات الطبيعية للإنسان والحيوان، وعلى الجلد. يشكل بعضها جزءاً من الزمرة الجرثومية الطبيعية للإنسان وبعضها الآخر يكون مسؤولاً عن أمراض خطيرة تصيب الإنسان والحيوان. بالإضافة إلى أنها سبب للعديد من الأمراض الإنتانية، كالخراجات Abscesses وحمى النفاس، ذات الرئة Pneumonia، التهاب الجلد، التهاب اللوزتين Tonsillitis، التهاب نقي العظام، خمج الدم Fatal Septicemia، داء الحمى القرمزية، داء الرثية المفصلية الحاد، التهاب الكلية. التهاب السحايا Meningitis، التهاب شغاف القلب Endocarditis، التهاب البلعوم Pharyngitis، داء الحمرة Erysipelas، التهاب كبيبات الكلية Glomerulonephritis. ومن هذه المكورات ذات الأهمية الطبية ندرس:

- **المكورات العقدية المقيحة *Streptococcus pyogenes*:** وتعتبر من أكثر العقديات إمراضية وتبدو مستعمراتها بشكل نقطة محاطة بهالة شفافة تماماً وهذا الانحلال يدعى بالنمط β بيتا

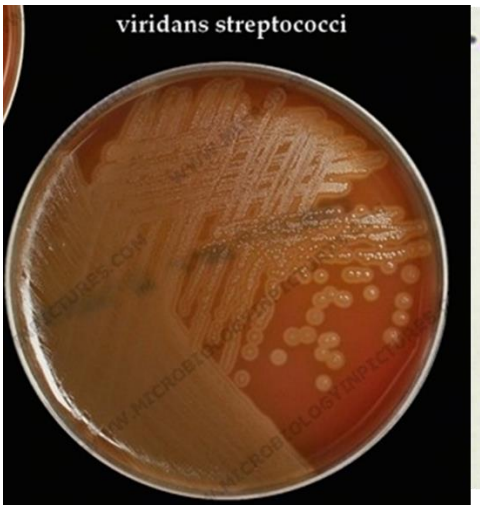
Alhamed Alduhi

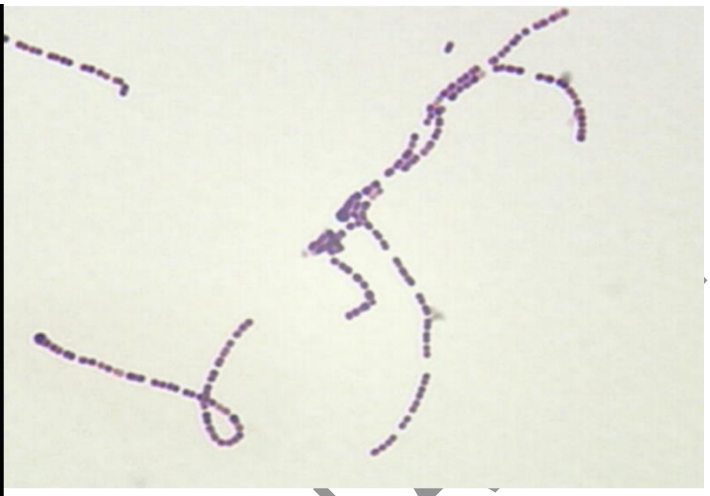




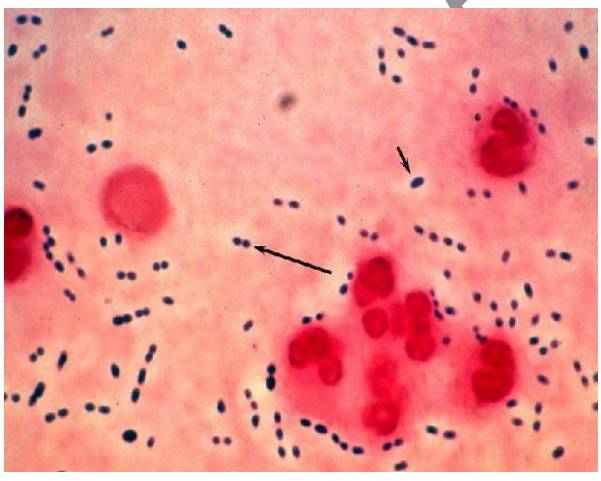
Streptococcus pyogenes

• **المكورات العقدية المخضرة *Streptococcus viridians*:** وتعد مسؤولة عن نخر الأسنان بشكل رئيسي. هذه الجراثيم تحول الهيموغلوبين إلى ميتاهيموغلوبين وتكون مستعمراتها محاطة بهالة خضراء مميزة ذات انحلال جزئي يدعى بالانحلال ألفا



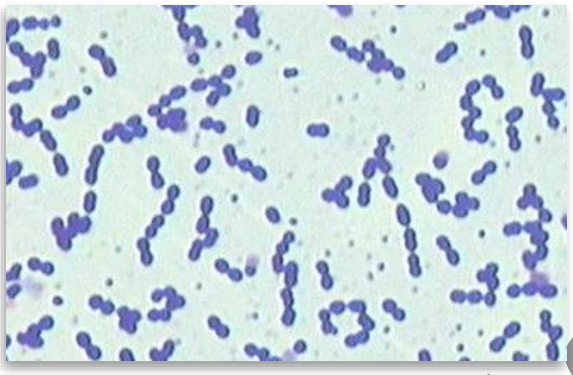


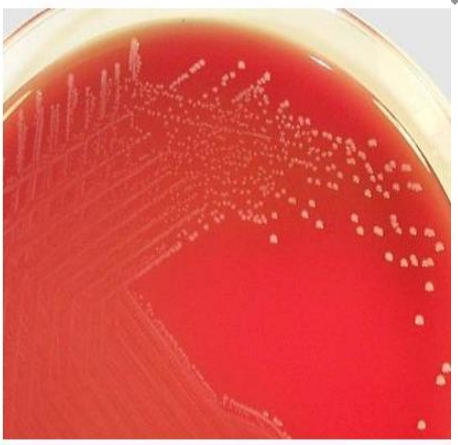
• **المكورات العقدية الرئوية *Streptococcus pneumoniae*:** هي عامل ذات الرئة الفصية، والتهاب القصبات، والتهاب الصفاق، وذات الجنب، والتهاب السحايا، والتهاب المفاصل، والتهاب الشغاف، وخمج الدم. تنمو مستعمراتها على وسط الآغار بالدم وتكون محاطة بهالة خضراء مميزة، ذات انحلال جزئي يدعى بالانحلال ألفا



Alhamed

•**المكورات العقدية البرازية *Streptococcus faecalis*:** توجد في أمعاء الإنسان والحيوان وتطرح مع البراز وتبقى حية في الوسط الخارجي (الماء والتربة) ووجودها دليل على تلوث البيئة بالبراز. تعد من الجراثيم الانتهازية ويمكن أن تسبب أخماجاً بولية والتهاب شغاف القلب البطيء والتهاب السحايا. هذه العقدية لا تحل الدم ونسميها ذات نمط انحلال غاما ولكن في أحيان نادرة يمكن للعقدية البرازية أن تحل الدم سواء انحلال aالفا أو β بيتا ولذلك لابد من دراسة الخواص الكيميائية الحيوية والزرعية لهذه المكورات لتفريقها عن بعضها





عوامل الفوعة الجرثومية Virulence Factors:

- M-Protein: يحمي الجرثوم من البلعمة من قبل الجهاز المناعي.
- الستربتوكيناز Streptokinase: يحل الفيبرين المتشكل في اطار الرد المناعي للجسم.
- الستربتوليزين Streptolysin O و Streptolysin S تقوم بحل الكريات الحمراء والبيضاء وغيرها من الخلايا.
- ذيفان مولِد للحمامى erythrogenic toxin تسبب الظواهر الجلدية و المخاطية التي تترافق مع الـScarlet Fever

1- أخذ العينات المرضية:

تؤخذ مسحة جرثومية من المناطق المتقيحة كالبلعوم واللوزتين وخصوصاً أنها من المستوطنات الطبيعية في البلعوم، ومخاطية اللثة ومن الحفرة السنية بعد قلع السن، من اللعاب

Dr.Hiba Alhar

Saliva، والجلد Skin، كذلك تؤخذ مسحة جرثومية من المهبل Vagina وعنق الرحم ومن الجروح أو بأخذ نموذج من القيح، الدم، البول، السائل الدماغي الشوكي، القولون Colon، المستقيم Rectum.

2- التشخيص المخبري

2-1- الفحص المباشر للعينة المرضية:

تتم دراسة القيح بالعين المجردة، فالقيح الناتج عن الإصابة بالمكورات العقدية يكون مائعاً مصلي القوام وقليل التماسك. ثم تفحص عينة غير ملونة (بالحالة العبيطة) فنشاهد وجود عدد كبير من الكريات البيضاء كثيرة النوى المتقيحة وبعض البقايا الخلوية كما نلاحظ وجود المكورات متجمعة على شكل سلاسل مختلفة الأطوال غير متحركة. بعد التلوين بطريقة غرام نلاحظ وجود مكورات موجبة الغرام قطرها 0.5-1 مكرون متجمعة بشكل سلاسل (مكونة من عدد من المكورات يتراوح بين 5-8 مكورات)، وأحياناً بشكل مزدوج داخل وخارج الخلايا ذات شكل يشبه لهب الشمعة، وهذه المكورات غالباً ما تكون محاطة بهالة شفافة هي المحفظة وهذه حالة المكورات العقدية الرئوية.

2-2- عزل المكورات العنقودية من العينة المرضية

تزرع العينات المرضية في أوساط غنية بالمواد الغذائية وخاصة الآغار بالدم. ويعتبر دم الحصان هو المفضل أو دم الخروف أو الأرنب حيث تسكب هذه الأوساط في أطباق بتري. تنمو العقدية المقيحة والمكورات العقدية الرئوية في الأوساط الغنية، بينما تستطيع بعض أنواع العقديات المخضرة وأيضاً البرازية النمو في أوساط زرع جرثومية عادية.

يتم تلقيح أطباق من الآغار بالدم بواسطة ماسحات قطنية معقمة مأخوذة من العينات المرضية بطريقة التخطيط والوخز من أجل تحديد نمط الانحلال الدموي للجراثيم الموجودة في منطقة البلعوم Pharynx. ولكن يفضل العديد من المختصين بعلم الجراثيم قبل البدء بتلقيح الأطباق وضع الماسحات في أنابيب تحتوي على وسط مغذ غني سائل من نمط TSB (Trypticase Soy Broth) أو وسط أكثر انتقائية وهو TSBCV (Trypticase Soy Broth with Crystal Violet) تحضن هذه الأوساط عادةً على درجة حرارة 37 مئوية ولمدة 24ساعة. تعتبر هذه الخطوة مهمة

Dr.Hiba Alhamed Alduini

جداً وخصوصاً في حال كانت أعداد الجراثيم في العينة المأخوذة قليلة جداً. وهذه الخطوة يمكن تجاوزها في بعض الحالات الخاصة.

تشكل المكورات العقدية مستعمرات صغيرة يتراوح قطرها ما بين 0.5–1 ملم، شفافة، لماعة سطحها أملس ناعم وقوامها أقرب للمخاطي لاحتوائها على المحفظة. بعدئذ يتم انتقاء بعض المستعمرات المعزولة بشكل جيد من أجل عمل مزارع نقية لدراسة الخصائص الفيزيولوجية والكيميائية الحيوية لهذه الجراثيم.

2–3– التفريق بين أنواع المكورات العقدية

يعتمد التفريق بين أنواع المكورات العقدية بالتعرف على خصائصها الزرعية والكيميائية الحيوية ومن المفضل في البداية التأكد من نقاوة المزرعة الجرثومية النامية وذلك بإجراء صبغة غرام.

◙ **إجراء اختبار الكاتلاز**: المكورات العقدية سالبة الكاتلاز على عكس المكورات العنقودية التي تُعد موجبة الكاتلاز.

إن زرع المكورات العقدية في الآغار بالدم يسمح لنا بدراسة قدرتها الحالة للدم:

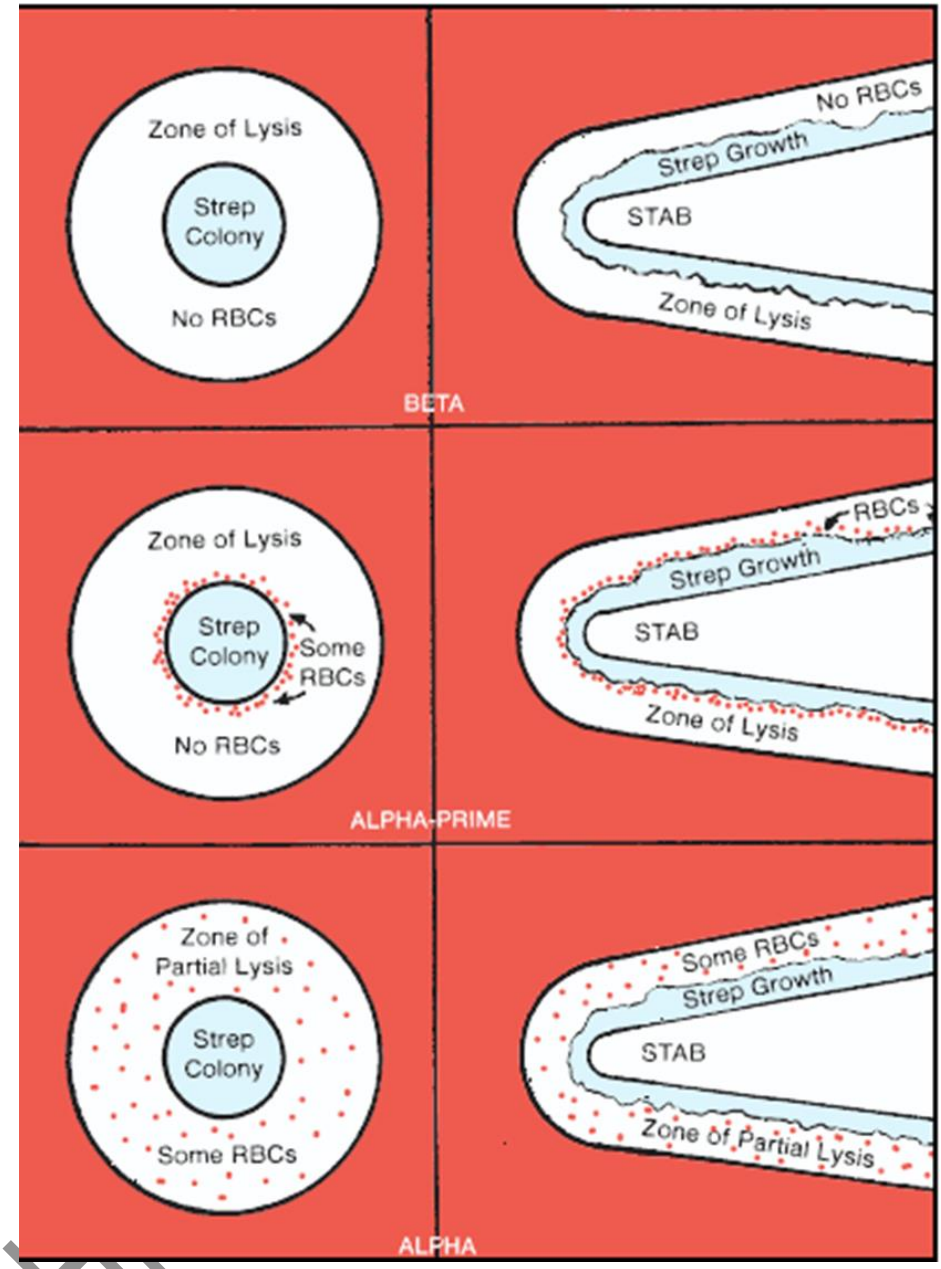
* **العقدية المقيحة *St. pyogenes*** تحلل الدم (تخرب الكريات الحمراء بصورة كاملة وتحرر الهيموغلوبين) وتبدو مستعمراتها بشكل نقطة محاطة بهالة شفافة تماماً وهذا الانحلال يدعى بالنمط β بيتا

* **العقدية المخضرة *St. viridans*** : هذه الجراثيم تحول الهيموغلوبين إلى ميتاهيموغلوبين وتكون مستعمراتها محاطة بهالة خضراء مميزة ذات انحلال جزئي يدعى بالانحلال α الفا.

* **العقدية البرازية *St .fecalis*** : هذه العقدية لا تحل الدم ونسميها γ غاما ولكن في أحيان نادرة يمكن للعقدية البرازية أن تحل الدم سواء انحلال α الفا أو β بيتا ولذلك لابد من دراسة الخواص الكيميائية الحيوية والزرعية لهذه المكورات لتفريقها عن بعضها.

• **المكورات العقدية الرئوية *Streptococcus pneumonia***: تنمو مستعمراتها على وسط الآغار بالدم وتكون محاطة بهالة خضراء مميزة، ذات انحلال جزئي يدعى بالانحلال ألفا.

Dr Hiba Alhamed Alduhni



Dr.H

◙ **اختبار تحمل الملح 6.5 NaCl%:** فقط المكورات العقدية البرازية يمكن أن تنمو في الأوساط الحاوية على 6.5 NaCl%، بينما لا تبدي الجراثيم من غير مجموعة العقديات البرازية أي نمو على هذه الأوساط، ولذلك يعد هذا الاختبار صفة تشخيصية ممتازة للتفريق ما بين جراثيم العقديات البرازية والعقديات غير البرازية. أما إذا كانت النتيجة سلبية بعد 24 ساعة من الحضن فتحضن الأوساط مرة ثانية لمدة 48–72 ساعة

الاختبارات الكيميائية الحيوية للتفريق بين مجموعات المكورات العقدية.

مجموعات المكورات العقدية	نمط انحلال الدم	التحسس للباستراسين	تفاعل CAMP	إماهة الهيبورات	التحسس لـ SXT	إماهة الاسكولين	تحمل الملح NaCl 6.5%	التحسس للأيتوشين	التحلل بالصفراء
المجموعة A *S.pyogenes*	β	+	–	–	R	–	–	–	–
المجموعة B *S.agalactiae*	β	–	+	+	R	–	±	–	–
المجموعة C *S.equi* *S.equisimilis* *S.zooepidemicus*	β	–	–	–	S	–	–	–	–
المجموعة D (Enterococci) *S.faecalis* *S.faecium* etc.	α β none	–	–	–	R	+	+	–	–
المجموعة D (nonenterococci) *S.bovis* etc.	α none	–	–	–	R/S	+	–	–	–
Viridans *S.mitis* *S.salivarius* *S.mutans* etc.	α none	–	–	–	S	–	–	–	–
Pneumococci *S.pneumoniae*	α	±	–	–		–	–	+	+

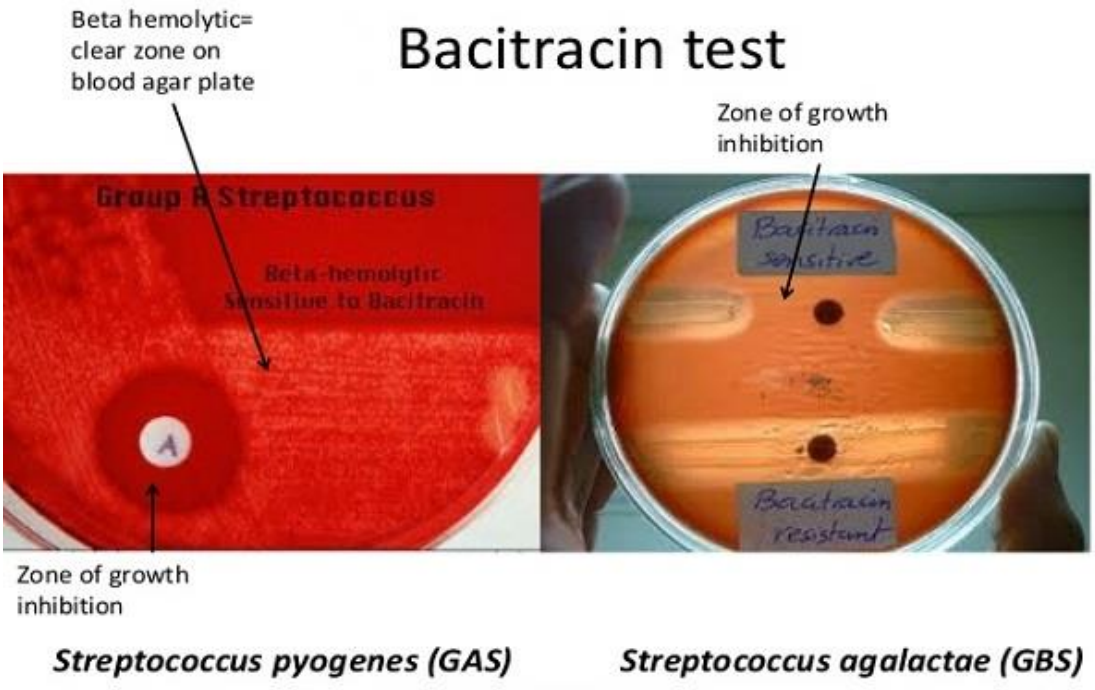
Dr.Hiba Alhamed Alduihi

◙ **زرع الجرثوم في وسط قلوي pH =9.6** : إن كان هناك نمو في هذه الأوساط فالجرثوم هو من المكورات العقدية البرازية.

◙ **اختبار النمو في درجة 45 مئوية:** إن المكورات العقدية البرازية وحدها فقط يمكن أن تنمو بدرجة 45 مئوية وتقاوم الدرجة 60 مئوية وتبقى حية، ويمكنها أن تنمو ثانية لو زرعت بعد وضعها مدة نصف ساعة بدرجة 60 مئوية.

◙ **التحسس للصاد الباسيتراسين Bacitracin Susceptibility:** وهو اختبار خاص لتمييز المكورات العقدية الحالة للدم نموذج β بيتا وخاصة المكورات العقدية المقيحة *S.pyogenes* التي تتحسس تجاه هذه المادة، أما بقية المكورات العقدية فهي مقاومة للباسيتراسين ولا تتأثر فيه .

ولاجراء هذا الاختبار، تزرع المكورات العقدية على وسط الآغار بالدم بطريقة الفرش في طبق بتري ثم يوضع على سطح المزرعة قرص نشاف مشرب بمادة الباسيتراسين، وتحضن في درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة . ففي حال تشكل هالة عدم نمو حول قرص الباسيتراسين فهذا يدل على أن هذا الجرثوم هو من المكورات العقدية المقيحة *S.pyogenes*



◙ **اختبار التحسس تجاه الـ SXT:** تحتوي الأقراص المستعملة في هذا الاختبار على 1.25 ملغ من التريميتوبريم Trimethoprime و 27.75 ملغ من السلفاميتاكسازول Sulfamethaxazole.

ويهدف هذا الاختبار إلى التمييز بين جراثيم المجموعة A والمجموعة B من باقي الجراثيم الحالة للدم من نمط β. حيث تتميز كلا المجموعتين A و B بمقاومتهما للمركب التآزري SXT. وفي حال أظهرت بعض الجراثيم العقدية الحالة للدم من نمط بيتا مقاومة للصاد الحيوي الباسيتراسين وحساسية تجاه الصاد الحيوي SXT فيمكن تصنيفها على أنها ليست من المجموعتين A و B وإنما هي من المجموعة الثالثة Group C والتي أفرادها عبارة عن جراثيم حالات للدم من نمط β.

ملاحظة: (في بعض الحالات تبدي جراثيم المكورات العقدية *Streptococcus* من المجموعة A حساسية للصاد الحيوي SXT وبالتالي لابد من وجود بعض الاستثناءات لهذه الاختبارات، ولهذا السبب أطلق على هذه الطريقة من التعرف على جراثيم المكورات العقدية بطريقة التعرف الاحتمالي للعينات المدروسة.

◙ **اختبار إماهة الهيبورات Hippurate Hydrolysis:** يسمح هذا الاختبار بالتفريق بين المكورات العقدية من المجموعة B عن غيرها من المكورات العقدية الحالة للدم من النمط بيتا. من الملاحظ أن اختبار إماهة مادة الهيبورات Hippurate إيجابي لدى جراثيم النوع *S. agalactiae*. وللقيام بهذا الاختبار نقوم بما يلي:

- تؤخذ مستعمرة جرثومية وتوضع في أنبوب يحتوي على محلول هيبورات الصوديوم 1% ثم يحضن الأنبوب في درجة 37 مئوية مدة 2 ساعة.
- يضاف 2 مل من كاشف النينهدرين .
- اخلط جيداً وانتظر مدة 10–15 دقيقة .

إن ظهور لون بنفسجي يعني أن الجرثوم أماه هيبورات الصوديوم أي التفاعل ايجابي، وفي حال عدم تغير اللون يعني أن التفاعل سلبي. إن المكورات العقدية من المجموعة B تعطي تفاعلاً إيجابياً، كذلك بعض السلالات النادرة من المكورات العقدية المعوية (البرازية) Enterococci.

ويمكن أن يجرى الاختبار كما يلي:

- ثقل المزرعة الجرثومية النامية على الوسط Sodium Hippurate Broth لمدة من 3 – 5 دقائق.
- خذ 0.2 مل من السائل الطافي Supernatant و 0.8 مل من كاشف كلوريد الحديد وضعهما في أنبوب اختبار وأمزجهما بشكل جيد.

Dr.Hiba Alhamed Alduihi

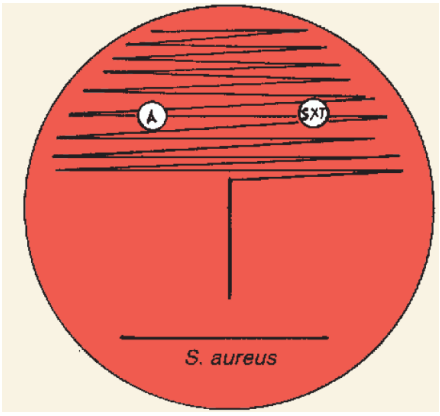
- ابحث عن تشكل راسب ثقيل فإذا تشكل واستمر لمدة 10 دقائق أو أكثر فالإختبار موجب. أما في حال إظهار النوع لإيجابية ضعيفة احضن هذه المزرعة لمدة 24 ساعة إضافية وكرر نفس الاختبار

◙ تفاعل CAMP

يجرى هذا الاختبار كما يلي:

- يحضر طبق بتري حاوٍ على الآغار بالدم Blood Agar.
- تزرع سلالة من جراثيم *St. aureus* على شكل خط على سطح الآغار بالدم في طبق بتري.
- تزرع سلالة المكورات العقدية المراد اختبارها بشكل خط عامودي على خط زراعة جراثيم *St. aureus* وبمسافة فاصلة حوالي 1سم .
- تحضن علبة البتري في درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة.

في حال أنتج النوع المدروس هالة انحلال دموي على شكل رأس السهم في المنطقة الفاصلة ما بين جراثيم المكورات العنقودية الذهبية وجراثيم المكورات العقدية بشكل متعامد فالنوع المدروس هو من نوع *Streptococcus agalactiae* حيث تسمى هذه الظاهرة بـ تفاعل CAMP. المشكلة الوحيدة في هذا الاختبار هو أنه إذا تم حضين هذا الطبق في ظروف لا هوائية فإن النوع *S. Pyogenes* يبدي إيجابية لاختبار CAMP



◙ **اختبار إماهة الـ Bile Esculin Broth:** هو أفضل اختبار كيميائي حيوي للتعرف على جراثيم المكورات العقدية التابعة للمجموعة D، حيث أن كلا جراثيم الـ Enterococcal و Nonenterococcal المشكلين للمجموعة D Group قادرين على إماهة الآغار من النوع Bile Esculin Broth، محولين لون الآغار إلى اللون الأسود. عموماً الإيجابية في اختبار B.E. Slant Agar يدلنا على وجود جراثيم المكورات العقدية من المجموعة D ولكن التمييز بين المجموعة D وغيرها من المجموعات، فيتم على أساس اختبار تحمل NaCl.

فقط المكورات العقدية البرازية تخمر عملياً الاسكولين المستخرج من كستناء الهند وتلون الآغار باللون الأسود نتيجة لتحرر إحدى الوظائف الفينولية التي تسوّد بوجود أملاح الحديد الموجود في الوسط

◙ **اختبار التحسس تجاه الأبتوشين Optochin Test:**

والذي يستخدم للتفريق بين جراثيم *S. viridans* الحالة للدم من نمط ألفا عن جراثيم *S. pneumoniae* الحساسة لهذه الأقراص.

تزرع المكورات العقدية على سطح وسط آغار بالدم وبطريقة الفرش نحصل على طبقة من الجراثيم على سطح طبق البتري ثم نضع على سطح المزرعة قرصاً من ورق النشاف المشرب بمادة الابتوشين Ethyl Hydrocupreine ثم تحضن العلبة بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة فالمكورات الرئوية لا تنمو بجوار القرص لأن هذه المادة تثبط نمو هذه المكورات وتبدو حول القرص هالة شفافة من عدم النمو، أما المكورات العقدية فإنها تنمو بجوار القرص لأنها مقاومة لهذه المادة وهذا يسمح بالتفريق بين المكورات الرئوية والمكورات العقدية.

◙ **اختبار الانحلال في الصفراء :**

إن المكورات العقدية لا تنحل في الصفراء بينما المكورات الرئوية تنحل. ولإجراء هذا الاختبار نأخذ أنبوبي اختبار ونضع في الأول 1 مل من مزروع المكورات العقدية بالمرق المغذي والحديث التحضير وفي الثاني 1 مل من مزروع المكورات الرئوية ثم نضيف لكل واحد منهما 0.2 مل من صفراء الأرنب أو البقر ونتركهما بضع دقائق في حرارة المخبر، ونلاحظ أن الأنبوب الأول بقي على حاله دون أن يتغير فهذا يعني أن المكورات العقدية لم تنحل في الصفراء. أما الأنبوب الثاني فقد أصبح رائقاً شفافاً نتيجة لانحلال جرثوم المكورات الرئوية *S. pneumoniae* .

Dr.Hiba Ahamed Alduihi

◙ **التشخيص المصلي للمكورات الرئوية:**

ويتم اعتماداً على تفاعل انتفاخ المحفظة باستخدام مصول ضدية تحوي أضداداً خاصة بالمستضدات المحفظية، ويمكن بوساطة هذه المصول الضدية تحديد النمط مباشرة وحتى في العينات المرضية (سائل الحبن، والسائل الدماغي الشوكي، والقشع). ويتم ذلك بأخذ قطرة من مزروع المكورات الرئوية في وسط سائل غني أو من العينات المرضية وتوضع على شريحة زجاجية نظيفة ويوضع فوقها قطرة من المصل الممنع المضاد للمكورات الرئوية وتمزج جيداً ثم تفحص بالمجهر (تكبير 40 أو 60) فنلاحظ ارتصاص هذه المكورات على بعضها. وإذا تم تلوين المحضر السابق بأزرق الميثيلين 1% وفحص بالعدسة الغاطسة فإننا نلاحظ انتفاخ المحفظة وهذا ما يدعى باختبار نيوفليد Neufled لإظهار المحفظة.

والجدول يبين أهم الصفات التي تميز المكورات العقدية الرئوية عن المكورات العقدية الأخرى.

الصفات التي تميز المكورات العقدية الرئوية عن المكورات العقدية الأخرى.

◙

المكورات	نمط انحلال الدم	اختبار تحمل الحرارة 60	حادثة نيوفليد	اختمار السكاكر		حيوانات التجربة الحساسة	الحساسية للبنسلين
				اينولين	اسكولين		
العقدية المقيحة	β	−	−	−	−	**الأرنب**	+
العقدية المخضرة	α	±	−	−	−	−	±
العقدية البرازية	γ (β− α)	+	−	−	+	−	−
العقدية الرئوية	α	−	+	+	−	**الفأر**	+

زرق حيوانات التجربة :

الحيوان المفضل هو الفأرة البيضاء التي تعد حساسة جداً تجاه المكورات الرئوية الممرضة ذات المحفظة. يحقن مزروع هذه المكورات في الصفاق فإن الفأرة ستموت خلال 24–48 ساعة

Dr.Hiba Alhamed Alduhi

بإنتان الدم. وعند عمل محضر من دم هذه الفأرة نلاحظ بأنه مليء بالمكورات الرئوية الممرضة ذات المحفظة بينما لا تتأثر الفأرة بالمكورات العقدية أو بالمكورات الرئوية عديمة المحفظة وغير الممرضة وتبقى حية.

وبعد تشخيص المكورات الرئوية يجري اختبار حساسيتها للصادات الحيوية فهي حساسة للسلفاميدات والبنسلين والكلورامفينيكول والتتراسكلينات.

Dr.Hiba Alhamed Alduihi