جامعة حماه – كلية الصيدلة **المحاضرة الثانية**

السنة الثالثة **تشخيص وعزل المكورات العنقودية الممرضة**

تتواجد هذه الجراثيم بكثرة في الطبيعة (الماء، الهواء، التربة) وغالباً ما تعيش على **الجلد** كجراثيم مؤاكلة Normal Inhabitants وفي الفجوات الطبيعية للإنسان والحيوان وتتركز هذه الجراثيم في الأغشية الأنفية Nasal Membranes وفي جريبات الأشعار Hair Follicles كما توجد في الأمعاء وفي منطقة الشرج Perineum حتى عند الأشخاص الأصحاء.

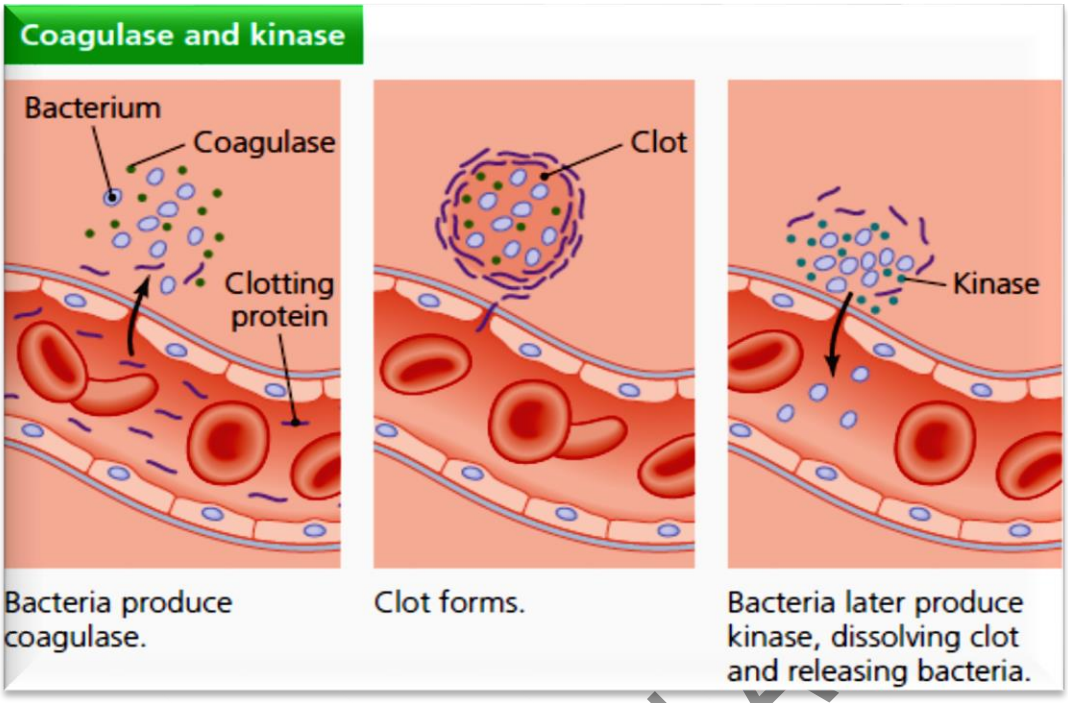
و تعتبر مسؤولة عن أمراض كثيرة منها الدمامل Boils or Carbuncles والخراجات Abscesses وخمج الدم المميت Fatal Septicemiaوتستقر أحياناً في العظام فتسبب إنتان العظام والنقي Osteomyelitis، كما تسبب أحياناً بعض التسممات الغذائية وتشير الحقائق بأن 90% من العاملين في المشافي Hospital personnel هم حاملون لجراثيم المكورات العنقودية وهذا ما يخلق مشكلة صحية حقيقية وخصوصاً كون أغلب سلالات هذه الجراثيم هي مقاومة البنسلينات.

الأنزيمات والسموم التي تفرزها المكورات العنقودية الذهبية

1– إنزيم المخثراز Coagulase Enzayme:

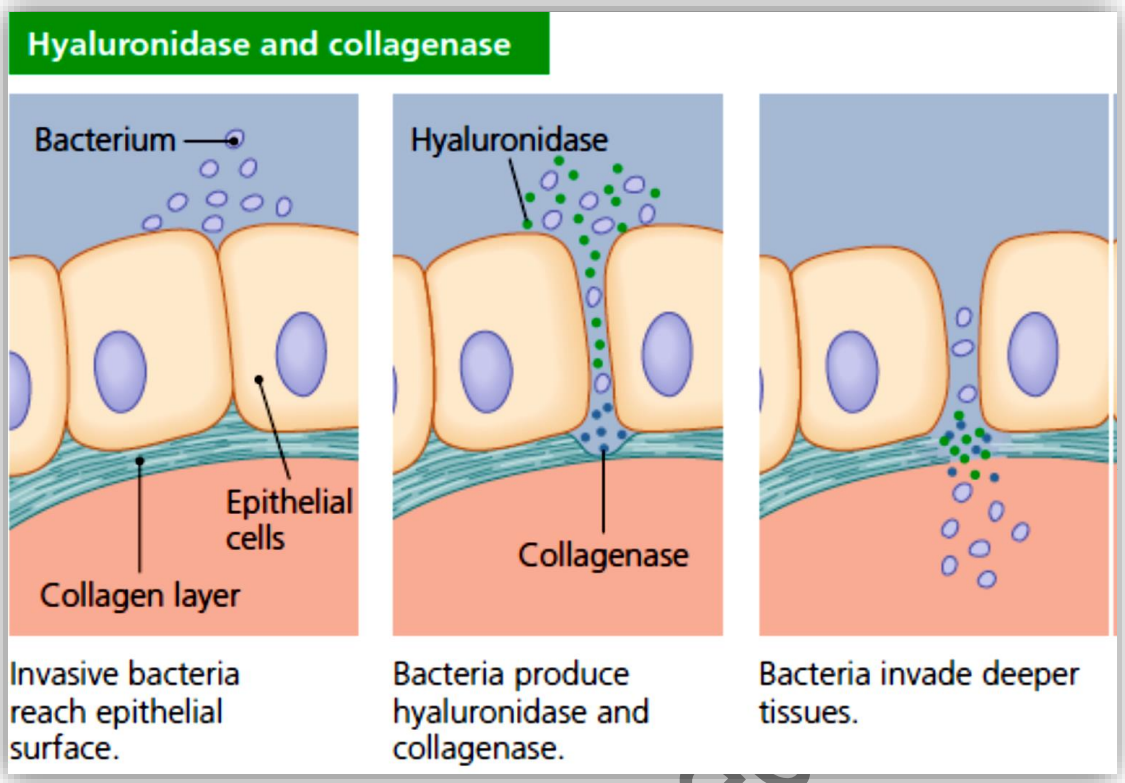
إنزيم يُخثر بلازما الدم للإنسان والأرنب وهذه الصفة من أهم الصفات التي تفرق بين المكورات العنقودية الممرضة وغير الممرضة ولهذا تعرف المكورات العنقودية الذهبية الممرضة بالمكورات العنقودية المفرزة للمخثراز coagulase positive *staphylococci*، أما المكورات غير المفرزة لهذا الإنزيم فتعرف بالمكورات العنقودية سالبة المخثراز يعمل على تخثر بروتينات الدم الأمر الذي من شأنه أن يوفر ملجئ أو مخبئ للجراثيم بداخل الخثرة أو الجُلْطَة لذا تكمن أهمية أنزيم المخثراز في أنه يغلف المكورات بالليفين Fibrin مانعاً بذلك الخلايا البالعة من التهامها

Dr.Hiba Abdul Aduni



- **2–إنزيم الستافيلوكاينيز Staphylokinase**: وهو إنزيم يُفكك الخثرات المتكونة من الفيبرين Fibrinolysin.
- **3–إنزيم الهيالورونيديز Hyaluronidase**: وهو إنزيم يُفكك حمض الهيالورينيك المكون الأساسي للأنسجة الضامة مما يسهل من عملية انتشار المكورات بالأنسجة.

Dr.Hiba Alhamed



Dr.Hiba Alhamed

- **4–إنزيم حال للحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين *Deoxyribonuclease***: وهو إنزيم يميه الحمض النووي مؤدياً إلى أضرار بالأنسجة المختلفة.
- **5– إنزيمات أخرى تفرزها المكورات العنقودية الذهبية**: إنزيم الفوسفاتيز وإنزيم هاضم للدهون *lipase* ثم إنزيم Penicillinase الذي يخرب الصاد الحيوي البنسيلين فيبطل مفعوله ولهذا لا يمكن الاستفادة منه كعلاج للسلالات المفرزة للأنزيم.
- **6–بروتين Protein A**:
- يوجد في جدار الخلية ويتحد بصورة غير نوعية مع جزء Fc المستقبل من الأجسام المضادة مانعاً بذلك وظيفة الأجسام المضادة في التخلص من الجراثيم مانعاً عملية البلعمة.
- **7–الذيفان المعوي Enterotoxin**: وهو من السموم الخارجية، ذو طبيعة بروتينية، مقاوم للحرارة وإنزيمات الجهاز الهضمي. يسبب الإنسمام المعوي تسمماً غذائياً يظهر على هيئة إسهال شديد وقيء، وُيفرز من قبل عدد كبير من المكورات العنقودية الذهبية في الطعام الملوث بها كالحلويات والمعجنات ومشتقات الألبان والمايونيز واللحوم الملوثة. وهناك . حتى الآن . سبعة أنواع مصلية لهذا الذيفان.
- **8–حالات للكريات البيضاء leucocidine**: وهي تحطم الخلايا البالعة والملتهمة وتلعب دوراً في تثبيط عملية البلعمة.

- **9– الذيفان المقشر لطبقة الجلد Epidermolytic toxin or Exfoliatin toxin**: ذيفان خارجي يتكون من مواد بروتينية ويسبب تقشر الطبقة الخارجية للجلد في الأطفال حديثي الولادة، ونادراً في البالغين المصابين بنقص في المناعة وهناك نوعان من هذا الذيفان، AوB
- الذيفان (ETA & ETB): الذي يعمل على فصل طبقة البشرة الخارجية عند مستوى الطبقة الجلدية الحبيبية *stratum granulosum* . وقد وصف الباحث رايتر Ritter هذه الحالة في عام 1878 م لمجموعة من الأطفال حديثي الولادة ولهذا يعرف المرض بمرض رايتر *Ritter's disease* حيث يظهر على هيئة احمرار بالجلد وطفح يشمل الجسم كله خلال يومين إلى ثلاثة أيام ثم تظهر فقاقيع تتجعد وتتقشر يبدأ بعدها انفصال البشرة الخارجية تاركة منطقة عارية من الجلد المحمر، ولهذا يطلق عليه الآن مرض الجلد المقشر أو المحروق الناتج عن المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcal Scalded Skin SSSS Syndrome*).
- **10–حالات الدم *Haemolysins***: وهناك أربعة أنواع من هذه الحالات، ألفا وبيتا غاما ودلتا، وهي محللة للكريات الحمراء والصفائح الدموية وسامة لبعض خلايا الأنسجة المزروعة، كما يحلل ذيفان ألفا الكريات الملتهمة الكبيرة.
- **11–الذيفان المسبب لأعراض الصدمة السمية Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST)**: وهو مادة بروتينية رافعة لدرجة حرارة الجسم. وقد وجد أن 90 % من المكورات العنقودية الذهبية التي عُزلت من مهبل نساء خلال الدورة الشهرية ومن مناطق أخرى أيضاً يفرزون هذا السم (TSST). ويتصف هذا المرض بارتفاع في درجة الحرارة وطفح جلدي وانخفاض في ضغط الدم وإسهال وفشل كلوي وتشوش عقلي وإصابة العديد من الأعضاء. كما قد تصاب سيدات بنفس المرض بعد العمليات القيصرية أو الولادة الطبيعية.

تصنيف المكورات العنقودية:

جراثيم المكورات العنقودية هي عبارة عن جراثيم ذات شكل كروي، موجبة الغرام، تواجد في تجمعات على شكل عناقيد العنب. وبالإعتماد على تصنيف العالم بيرجي Bergey's Manual of Systematic Bacteriology فإنها تتبع فصيلة *Micrococcaceae* والتي تضم أربعة أجناس هي:

I. *Micrococcus*
II. *Stomatococcus*
III. *Planococcus*
IV. *Staphylococcus*

Dr. Hiba Ahamed Alduini

ومن أشهر أنواع جنس الـ *Staphylococcus* هي:

S. aureus	*S. Epidermidis*
S. Saprophyticus	*S. haemolyticus.*
S. Simulans.	*S. Chromogenes.*

أكثر تلك الأنواع أهميةً هو المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* الذي يمكن تميزه من باقي الأنواع السابقة بأنه إيجابي المختراز Coagulase وهو الشكل الأكثر إمراضية من باقي الأنواع الاخرى.

وجراثيم المكورات العنقودية الذهبية هي عبارة عن مكورات يتراوح قطرها ما بين 0.8–1 ميكرون، إيجابية الغرام، غير متحركة، متجمعة بشكل عناقيد، وفي بعض الأحيان تشاهد هذه المكورات داخل الكريات البيضاء نتيجة لفعل البلعمة، وهي جراثيم متحملة للملوحة Salt Tolerant .

2- العينات المرضية

تؤخذ العينات المرضية من القيح، القشع، الدم، السائل الدماغي الشوكي، مسحة جرثومية من الأنف أو البلعوم أو الجروح أو الجلد أو ملتحمة العين أو مخاطية المهبل، أو السائل المنوي، البول ، البراز، المنتجات الغذائية.

3- التشخيص المخبري

أ- الفحص المباشر للعينة المرضية: تتم دراسة العينة بالعين المجردة وتسجل كل خواصها ثم تفحص منها عينة غير ملونة (بالحالة العبيطة) وعينة أخرى تلون بطريقة غرام، حيث نشاهد فيها مكورات موجبة الغرام غير متحركة، متجمعة بشكل مزدوج أو رباعي أو بشكل عناقيد، وفي بعض الأحيان تشاهد هذه المكورات داخل الكريات البيضاء بحسب نوع العينة المفحوصة.

بـ – زرع العينة المرضية: يتم تكثير جراثيم المكورات العنقودية في أنابيب تحوي على وسط زرعي سائل مناسب مثل Nutrient Broth أو مصل فيزيولوجي يحوي على 10% من NaCl. تحضن هذه الأنابيب لمدة 4 – 24 ساعة على درجة حرارة مناسبة ثم تزرع على الأوساط المغذية للتعرف عليها، حيث تحضن أطباق بتري المزروعة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة.

Dr. Hiba Ahmed Aldijihi

أو تزرع العينة المرضية مباشرة في الآغار المغذي، والآغار بالدم، وعلى الوسطين الانتقائيين لعزل جراثيم المكورات العنقودية الذهبية وهما:

● **وسط شابمان Chapman** الحاوي على 7.5% من كلوريد الصوديوم والذي يعمل على تثبيط جميع أنواع المكورات باستثناء المكورات الذهبية ويحتوي على مشعر أحمر الفينول، وفي حال تخمر سكر المانيتول فإن المشعر سوف يتغير لونه من الأحمر إلى الأصفر.

●**وسط بيرد باركر Baird Parker Agar** الذي تنموعليه فقط جراثيم المكورات العنقودية الذهبية ويحتوي على صفار البيض Egg Yolk ومادة تيلوريت البوتاسيوم. فالمستعمرات النامية عليه والتي يتشكل حولها هالة انحلال هي مستعمرات المكورات العنقودية الذهبية

جـ- فحص المستعمرات: تكون المستعمرات مدورة الشكل، منتفخة، عاتمة بقطر 1- 3 مم، بيضاء في بادئ الأمر لا تلبث بعد 24-36 ساعة أن تتلون بألوان مختلفة حسب نوع المكورات العنقودية، إما بلون أصفر (مكورات عنقودية صفراء)، أو أبيض (مكورات عنقودية بيضاء) أو ذهبي (مكورات عنقودية ذهبية).

وفي الاختبارات الهادفة إلى عزل المكورات الذهبية الممرضة يتم إجراء ما يلي:

♦ **صبغة غرام:** تظهر الجراثيم على شكل مكورات عنقودية إيجابية الغرام.

♦ **اختبار إفراز أنزيم ألفا الحال لكريات الدم الحمراء:** والمتمثل بالانحلال من نمط بيتا β-Hemolytic حيث تظهر حول المستعمرات النامية على أطباق الآغار بالدم Blood Agar هالات شفافة.

♦ **تخمر سكر المانيتول:** تنمو المكورات العنقودية الذهبية على وسط Chapman شابمان وتخمر المانيتول وتحول لون الوسط من أحمر إلى أصفر.

♦ **تخثر مصـــورة الأرنب، أو الكشـــف عن الجراثيم إيجابية المخثراز:** تفرز المكورات العنقودية الممرضة أنزيم المخثراز الذي يخثر مصورة الأرنب بوجود الأوكسالات.

تكمن أهمية أنزيم المخثراز في أنه يغلف المكورات بالليفين مانعاً بذلك الخلايا البالعة من التهامها. وهناك نوعان من هذا الإنزيم هما:

Dr.Hiba Alhamed Aldurini

أ- **المختزاز المقيد Bound coagulase:** يوجد على جدار الخلية الخارجي في معظم أنواع المكورات العنقودية الذهبية ويتفاعل مع مولد الليفين مسببا تجمع المكورات العنقودية ويتم اجراء هذا الاختبار باستخدام الشريحة المجهرية slide coagulase test.

ب- **المختزاز الحر Free coagulase:** يفرز أثناء نمو الجراثيم خاصة خلال الطور اللوغاريتمي ويسبب تخثر المصورة ويتم اجراء هذا الاختبار باستخدام طريقة الأنابيب Tube coagulase test، حيث نضع في أنبوب صغير 0.5 مل من المصورة ونضيف لها 0.5 مل من مزروع المكورات العنقودية في المرق المغذي ثم نضع الأنبوب في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة وتتم مراقبة الأنبوب أثناء فترة الحضن كل ساعة على الأقل فالمكورات العنقودية الممرضة تخثر المصورة بمدة تتراوح بين نصف إلى 24 ساعة وبالتالي تصبح المصورة المخثرة عبارة عن كتلة هلامية متصلبة .

بينما تتميز باقي أنواع المكورات العنقودية الشهيرة بعدم قدرتها على إفراز أنزيم ألفا الحال للدم وبالتالي عدم قدرتها على تشكيل انحلالات من نمط β- Hemolytic وكذلك عدم قدرتها على تخثر مصل الأرنب، وبالتالي هي جراثيم سلبية المختزاز.

♦ **اختبار الـ DNase** : إن معظم المكورات إيجابية المختزاز قادرة على إماهة الـ DNA ويجرى هذا الاختبار بتلقيح المكورات على وسط خاص يدعى DNase Test Agar والتحضين لمدة من 18-24 ساعة، ومن ثم يلاحظ تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأصفر وتدريجاته .

♦ **الأصبغة Pigments:** تعتبر المكورات العنقودية الذهبية بصورة عامة ممرضة أما المكورات العنقودية البيضاء والصفراء فتعتبر غير ممرضة، ولقد تبين أنه لاعلاقة للأصبغة بالقدرة الممرضة فيمكن أن تتحول المكورات العنقودية البيضاء إلى ذهبية وتصبح ممرضة.

♦ **البحث عن أنزيم الفوسفاتاز Phosphatase**: عادة لا تصنع المكورات العنقودية غير الممرضة أنزيم الفوسفتاز وإنما فقط المكورات العنقودية الممرضة. إن أنزيم الفوسفاتاز يحلل ويفكك فوسفورات الفينول فتالئين المضافة إلى الوسط الزرعي، ويتم الاختبار بأن يزرع الجرثوم في أنابيب تحوي على المرق المغذي المضاف إليه 0.01 % من فوسفورات الفينول فتالئين ثم تحضن هذه الأنابيب بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة، بعد ذلك يضاف إليها عدة قطرات من محلول 10% من هيدروكسيد الصوديوم لكل 2 مل من المزروع ففي حال وجود الفينول فتالئين فإن المزروع يتلون خلال 1-2 دقيقة باللون الأحمر.

Dr.Hiba Ahamed Aldjni

♦ **تخثر الحليب:** إن صفة تخثر الحليب وتمييع الجيلاتين من قبل المكورات العنقودية الممرضة يمكن أخذها بعين الاعتبار في حال المكورات العنقودية المسؤولة عن التسممات الغذائية.

♦ **تمييع الجيلاتين:** تزرع الجراثيم بطريقة الوخز في وسط يحوي الجيلاتين وتترك الأنابيب مدة 24 ساعة في درجة حرارة المخبر تنمو المستعمرات على طول خط الوخز وبعد 2-10 أيام نلاحظ تميع الجيلاتين بشكل سائل عكر أو أصفر وذلك بسبب وجود أنزيم الجيلاتيناز فنقول إن هذه الجراثيم موجبة الجيلاتيناز. وبصورة عامة المكورات العنقودية الممرضة تميع الجيلاتين بسرعة لكن المكورات العنقودية البيضاء يمكن أن تميع الجيلاتين لكن ببطء، أما المكورات الدقيقة فلا تميعه.

ويجب إجراء اختبار تحسس الصادات على المكورات العنقودية المعزولة، والسبب أن هذه الجراثيم تبدي مقاومة للكثير من الصادات. وبشكل عام فإن كلاً من البنسلين، والاريترومايسين والتتراسكلين والأمبيسيلين تؤثر في العنقودية الذهبية.

Dr.Hiba Alhamed Aljuihi