وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية العلوم
قسم علوم حياة

التحري عن الانواع البكتيرية الملوثة للوجبات السريعة في النادي الطلابي لكلية العلوم

بحث مقدم من قبل الطالب

يوسف ابراهيم عبد الزهرة

الى كلية العلوم – قسم علوم الحياة – كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

بأشراف

م.م عباس ميار حزام

٢٠١٨ م - ١٤٣٩ هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

فَتَعَالَى اللَّـهُ الْمَلِكُ الْحَقُّ ۗ وَلَا تَعْجَلْ بِالْقُرْآنِ مِن قَبْلِ أَن يُقْضَىٰ

إِلَيْكَ وَحْيُهُ ۖ وَقُل رَّبِّ زِدْنِي عِلْمًا ﴿١١٤﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة طه:من الايه 114

الاهداء

اهتديت-- فهديت رحيق
الدراسة وشهد
العمر الى امي وابي

شكر وتقدير

شكري وتقديري الى كل من ساعدني في بحثي هذا ،والشكر موصول الى الحشد الشعبي المقدس الذي لولاه لما كان بحثي هذا ،وهذا من فضل ربي

والله ولي التوفيق .

الخلاصةSummary

جمعت عينات الدراسة بواقع ٥٠ عينة من النادي الطلابي لكلية العلوم خلال الفترة من تشرين الاول٢٠١٧ ولغاية شباط٢٠١٨، اذ شملت ١٠ عينات من الفلافل ، ١٠ عينات من الهمبركر، ١٠ عينات من سلطة الخس ، ١٠ عينات من سلطة الطماطه و ١٠ عينات من البيض المسلوق وذلك لغرض التحري عن الانواع البكترية المختلفة الملوثة للوجبات السريعه، حيث تم استخدام الاختبارات المجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية.

اظهرت النتائج ان١٧ عينة غذائية وبنسبة ٣٤% اعطت نتائج موجبة لتلك الاختبارات، حيث شملت العينات الموجبة ١٠عزلات لبكتريا *E.coli* و٦ عزلات لبكتريا*proteussp*وعزلة واحده لبكتريا *staphylococcus.aureus*.

من جهة اخرى بينت النتائج البحث ان اعلى نسبة عزل لبكتريا القولون *E.coli* كانت من الفلافل وبنسبة ٣٥,٩% واقل نسبة عزل كانت من سلطة الخس وبنسبة٢٣,٥%.بينما كانت اعلى نسبة عزل لبكتريا*proteussp*من الهمبركر ٢٣,٥% واقل نسبة عزل من سلطة الطماطة هي١١,٧%. كما بينت النتائج ان تواجد البكتريا*staphylococcus.aureus*في البيض كانت نسبة ٥,٨% .

ومن خلال الدراسة أظهرت النتائج سيادة بكتريا القولون *E.coli* في الوجبات السريعة تليها بكتريا المتقلبات *proteussp* .

الفصل الاول

المقدمة

١_المقدمه:

تتعرض الاغذيه للتلوث بالبكتريا الممرضه وخاصه الوجبات السريعه ، من اهم انواع البكتريا المسببه لتلوث الاغذيه هي افراد العائله المعويه وفي مقدمتها *E.coli* . تمتلك جرثومة *E.coli* تركيبا مستضديا معقدا يتكون من ثلاثه انواع من المستضدات Antigens . بعض مستضداتها مقاومه للحراره Heat_stable like ويدعى المستضد الجسمي Somatis Antigan وهو النوع الاول اما البعض الاخر فيكون حساس للحراره Heat_labil like وهو المستضد المحفظي Capsular وهو النوع الثاني ، اما النوع الثالث فهو المستضد السوطي Flagellar .كما ان اغلب الاخماج و بسب جرثومه *E.coli* تكون ناتجه عن التعرض الى المستضدين الجسمي والمحفظي .بالاضافه الى بكتريا *sp Proteus* والتي تعد من أهم انواع البكتريا المنتشرة في الاغذية (مصطفى ،٢٠١١). تسبب بكتريا *proteus sp* العديد من الإمراض في مقدمتها التهاب المسالك البولية لاسيما في القسم العلوي منها وتؤدي الإصابة احيانا الى حدوث التهاب حويض الكلية (Swierzko *et al.*,2000). تعد بكتريا *proteus sp* المسبب المرضي الثاني بعد بكتيريا *Escherichia coli* في إحداث التهاب القناة البولية وتكثر الإصابة بها في المرضى الراقدين في المستشفيات والمستعملين للقناطر البولية لمدة زمنية طويلة وكذلك الأشخاص الذين يعانون من تشوهات تركيبيه في القناة البولية (Sosa *et al.*, 2006). كما تحتوي الوجبات السريعه على المكورات العنقوديه ومن اهم انواعها بكتريا *S. aureus* الممرضة للإنسان وأكثرها شيوعاً وهي مسؤولة عن مدى واسع من الأمراض مثل الدمامل ، والخراجات المختلفة ، وخراجات الجروح الناتجة عن العمليات الجراحية ، والتهاب الجلد والأنسجة الرخوة ، والتهاب العظام ، والمفاصل ، والتهاب الرئة القصبي ، والتهاب الأجزاء الداخلية للقلب ، والإصابات الناتجة عن الذيفانات مثل متلازمة الصدمة الذيفانية ، ومتلازمة الجلد الحرشفي العنقودي والتسمم الغذائي (Omoe *et al.*, 2002) .

تعود امراضية بكتريا *s.aureus* الى امتلاكها الكثير من عوامل الضراوة مثل انتاجها الذيفانات Toxins والانزيمات Enzymes التي تساعد البكتريا على احداث الاصابة (Brooks *et al.*, 1998) . إذ تمتلك البكتريا القابلية على إنتاج الأنزيمات خارج خلوية مثل الأنزيم المخثر لبلازما الدم الذي يمتلك القدرة على تثبيط عملية البلعمة وأنزيم الستافيلوكاينيز ، والبروتينيز ، واللايبيز التي تسهم في غزو البكتريا للأنسجة ، وانتشار الخمج ، وتعمل على إنتاج ذيفانات محللة للدم نوع ألفا وبيتا وكاما ودلتا ، إلى جانب إنتاجها ذيفانات معوية مسببة تسمماً غذائياً ، كما إنها تمتلك قدرة على إنتاج ذيفانات خارجية تنتج في حالات متلازمة الصدمة الذيفانية ومتلازمة الجلد الحرشفي العنقودي (Ryan and Ray, 2004) . فضلاً عن امتلاكها المحفظة التي تساعد في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة.

الهدف من الدراسة:

نظرا لتعرض الانسان للعديد من التسممات الغذائية فقد كان الهدف من الدراسه هو التحري عن الانواع البكترية الملوثه للوجبات السريعه ، وتحقق الهدف من خلال

١_عزل الانواع البكترية(*E.coli* و*Proteus sp* و*S.aureus)*

٢_تشخيص الانواع البكترية مظهريا وباستخدام الاختبارات الكيموحيويه Biochemical test

الفصل الثاني

استعراض المراجع

٢_استعراض المراجع :

٢_١: الصفات العامه الانواع البكترية الملوثه الاغذيه

٢_١-١:بكتريا *E.coli*

تظهر جرثومه *E.coli* على هيئه عصيات صغيره الحجم (1.3_0.5) مايكروميتر سالبه لصبغه كرام ،توجد بشكل منفرد او بهيئه ازواج ، تنمو في ظروف لاهوائيه اختياريه (Facultative anaerobis) (Madigan et al ,2006) تتحرك بواسطه الاسواط المحيطه (Peritichous flagella) غير مكونه لسبورات (Non_ spore forming)، وقد تمتلك بعض سلالاتها المحفظه (Capsule)(Holt et al,1994) تستطيع النمو في مديات حراريه واسعه تتراوح مابين (٤٥_١٥)م الا ان درجه الحراه المثلى لنموها هي (٣٧م) (Fotador et al ,2005) تظهر مستعمرات جرثومه E.coli المرضيه على وسط ايوسين المثلين الازرق الصلب ذات بريق اخضر معدني (Green metalic cheen) (Brooks et al,2004) كما ان لها القدره على تخمير سكر اللاكتوز ،فتظهر مستعمراتها بلون وردي على وسط الماكونكي الصلب (Mecter et al ,1998) تعطي جرثومه *E.coli* نتيجه موجبه للعديد من الاختبارات الكيمو حيويه مثل اختبار الكاتليز(Catalace test) واختبار الاندول (Indole test) واختبار احمر المثيل (Methel red test) في حين انها تكون سالبه لاختبار الاوكسديز (Oxidase test) واختبار السترات (Sirate test) واختبار الفوكس برسكار (vagesproskar test)، وتمتلك الجرثومه القابليه على اختزال النترات الى نتريت وتحليل الجلاتين بينما لاتمتلك القابليه على انتاج انزيم اليوريز وانتاج كبريتد الهيدروجين H2S (Macfaddin,2000).

2_1_2 :بكتريا*Proteus sp*

توصف هذه البكتريا بأنّها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام، قطرها يتراوح من (0.3 - 1.0) مايكرومتر و طولها (6.0-0.6) مايكرومتر ومتحركة غير مكونة للسبورات (Abbott, 2007). كما ان هذه البكتريا مكونة للكبسولة وتحتوي على مخامل (Fimberiae) وكذلك تحتوي على الاسواط (Flagellae)، سالبة لفحص الأوكسيديز، منتجة لانزيم اليوريز، منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H_2S عند نموها على وسط (kligler iron agar)وموجبة لفحص احمر المثيل (Methyl red) وسالبة لفحص (Vogus Proskaur) وكذلك بأمكانها تكوين (Phenyl Pyruvic acid) عند تنميتها على وسط حاوي على (Phenylalanine) بالاعتماد على انتـــاج انزيم (Phenylalanine deaminase) (Greenwood *et al.*, 2002)) .وتكون موجبة لفحص الكاتليز وأنواع بكتريا المتقلبات تعطي فحصا سالبا للاندول ماعدا النوع *P.vulgaris* ، وتظهر مستعمرات بكتريا المتقلبات بلون اصفر باهت على وسط أكار الماكونكي لعدم تخمرها سكر اللاكتوز غير إنها تخمر كلا من سكر الكلوكوز والسكروز والكالاكتوز (Holt *et al.*, 1994). وتمتاز بكونها هوائية (Abbott,2007;Cooker *et al.*,2000).

٢_١-٣:بكتريا *Staphylococcus aureus*

هي مكورات موجبة لصبغة كرام ، مرتبة بشكل عناقيد غير منتظمة ، تنمو في العديد من الأوساط الزرعية منتجة مستعمرات بصبغات مختلفة تتدرج بين اللون الأبيض ، والأصفر الداكن والذهبي (Ryan and Ray, 2004) ، وتعد المكورات العنقودية موجبة للكتاليز كصفة تفريقية عن جنس *Streptococcus* (MacFaddin, 2000)و تعد بكتريا *S. aureus* من أوسع أنواع المكورات العنقودية أمراضية للإنسان وتتميز بكتريا الـ*S. aureus* عن بقية أنواع المكورات العنقودية بكونها موجبة لإنزيم مخثر بلازما الدم (Coagulase)

(Collee *et al.*, 1996) . وتعرف بكتريا *S.aureus* على إنها خلايا كروية الشكل قطرها ١مايكروميتر تقريباً ، موجبة لصبغة كرام ، غير متحركة (Nonmotil) ، غير مكونة للسبورات (Non sporforming) وعادة مكونة للمحفظة (Capsulated) (Kenneth,2002)وذات مستعمرات كبيرة صفراء على الاوساط الغنية (Rich media) حيث تظهر مستعمراتها دائرية رقيقة ذات سطوح لماعة يصل قطر المستعمرة الواحدة (2-3) مليمتر وتصطبغ بلون ذهبي مصفر،ولها القابلية على تحلل الدم في وسط أكار الدم (Blood agar) ومعيشة هذه البكتريا هوائية او لاهوائية اختياريه

٢-٢: الامراضيه

٢-٢-١:بكتريا *E.coli*

تملك بعض سلالات *E.coli* القابليه على احداث العديد من اخماج الانسان والحيوان(Belanger etal,2011) فهي مسؤوله عن اخماج الجهاز الهضميواخماج المسالك البوليه واخماج اخرى ومنها تعفن الدم والسحايا(Sepsis_meningitis) (Russo and Johnson 2003) وكذلك تسبب عدت امراض من اهمها

١_جرثومة*E.coli*/*المعويه* السميه (Enterotoxigenic E.coli

٢_جرثومة *E.coli* المعويه الممرضه (Enterotoxigenic E.coli)

٣_جرثومه *E.coli* المعويه النزفيه (Enterotoxigenic E.coli)

٤_جرثومه *E.coli* المعويه الغازيه (Enteroinvasive E.coli)

٥_جرثومة *E.Coli* المعويه المتجمعه (Enteroaggregative E.coli

٦_جرثومه *E.coli* المنتشره الملتصقه Diffusely Adherent E.coli

٢_٢_٢ بكتريا *Proteus sp*:

على الرغم من كون هذه البكتريا جزء من النبيت الطبيعي (Normal flora) في القناة المعوية مع باقي انواع البكتريا المعوية للاشخاص الاصحاء لكن من الممكن ان تؤدي الى اصابة الأفراد ضعيفي المناعة في الغالب عندما تنتقل اليهم (Kearns, 2010).ولكونها بكتريا أنتهازية (Opportunistic) لذا فهي تسبب كثيراً من الاصابات عند وجودها في غير موطنها الطبيعي كخمج المسالك البولية (Pellegrino *et al.*,2013)

٢_٢-٣: بكتريا *S. aureus*

تعد جرثومة *S. aureus* من اشد انواع المكورات العنقودية في امراضيتها على الرغم من كونها جزءاً من النبيت الطبيعي (Normal flora) للجلد والانف والبلعوم والقناة الهضمية والتناسلية للانسان (Todar,2002) . وتمتلك ايضاً القدرة على احداث اخماج انتهازية Opportunistic infections تتفاوت بين اخماج الجلد البسيطة نسبيا الى الامراض الجهازية المهددة للحياة (Levinson and Jawetz, 2000) . وبسبب امتلاكها العديد من المستضدات السطحية والانزيمات والذيفانات تستطيع هذه البكتريا اختراق انسجة الجسم بقوة (Zadik *et al.*, 2001) .

من الأمراض التي تسببها هي الأخماج الأولية مثل الدمامل الموضعية (Furuncles) وهي عبارة عن خمج جلدي سطحي يحدث في حويصلات الشعر ، أو في الغدد الشحمية ، أو الغدد العرقية ، وهذا الخمج يؤدي إلى إغلاق قناة الغدة مصحوباً بحكة ، وتنتهي الإصابة عادة بتصريف القيح ، ومن الممكن أن تمتد الحويصلة بين الأنسجة الجلدية المتجاورة وتكون سلسلة من الإصابات التي قد تصل إلى مجرى الدم (Diep *et al.*, 2004) ، كما تنتج *S. aureus* الدمامل المزمنة (Chronic furuncles) نتيجة لتكرار الإصابة وهذه الإصابات عادة تكون مصحوبة بعدة عوامل كأن يكون الشخص مصاباً بداء السكري ، أو مصاباً بأحد أمراض الدم الأخرى ، وغالباً ما تظهر الإصابة ببكتريا *S. aureus* كإصابة ثانوية مصاحبة للإصابة الأولية بالمكورات المسبحية (Ryan and Ray, 2004). ومن الامراض الجلدية الاخرى التي تسببها بكتريا *S. aureus* هي الخراجات Abscesses والتهاب حويصلة الشعر Folliculitis ومرض القوباء المعدي Impetigo Contagiosa والبثور Pimples

. (Johnson *et al.*, 2002 ; Jawetz *et al.*, 1998 ; Collee *et al.*, 1996)

٢-٣: عوامل الظراوة

2-3-1:بكتريا *E.coli*

تمللك البكتريا العديد من عوامل الظراوة اهما :

١_الخمل Fimbriae:تمتاز جرثومة *E.coli* بوجود تراكيب مشابهة الاسواط الا انها اقصر وتنتشر على سطح الخليه الجرثوميه وقد سميت هذا الزوائد بالخمل (Fimbriae)وهي عبارة عن زوائد بروتنيه رفيعه تبرز من سطح الخليه الجرثوميه (Tioba et al ,2008)

٢_الاسواط Flagella تسعى العديد من الجراثيم الى الحركه للحصول على الظروف الملائمه للنمو عن طريق السباحه (Swmimming) وتتدرج الى المواد المغذيه والاوكسجين والضوءاو تتدرج الى الاسفل بعيد عن المواد السامه ،ومن هذه التراكيب التي تستخدمها الجراثيم في السباحه هي الاسواط Flagella وهي عباره عن مواد بروتنيه تمتد من سطح الخليه الجرثوميه وتترتب على شكل خيوط حلزونيه (Blair,1995:Caplan and kara _Lvanov,1993)

٣_المحفظه Capsule :تمتاز العائله المعويه Enterobacteriaceae بقدرتها على تكوين طبقه متعددة السكريات polysaccharide على السطح الخارجي للخلايا تعرف بالمحفظه Capsule (Whitfield and Roberts,19999)

٤_تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation:عندما تلامس الجراثيم خلايا المضيف تلتصق عن طريق الخمل ثم تبدا هذه الجراثيم بالنمو والتوطن منتشره فوق تلك السطوح مكونه مستعمرات صغيره ومتقاربه وسرعان ما تلتحم مع بعضها البعض مكونة الغشاء الحيوي(Neill et al ,1994)

٥_انتاج الذيفانات Toxin broduction: تمتلك السلالات الممرضه للجراثيم السالبه والموجبه لصبغه كرام القدره على انتاج الذيفانات وتختلف هذه الذيفانات بطبيعتها التركيبه والكيمياويه (Lamdraud et al ,2000)

٦_انتاج الانزيمات Emzymes production:تعد الانزيمات من المكونات الحيويه للخلايا وهي محفات عضويه ذات منشأ بايلوجي متكونة من بروتينات بسيطه او متقرنه تحتوي على بعض المجاميع الكيمياويه الاخرى ،تلعب الانزيمات دورا هاما في جميع مراحل عمليات الايض والتفاعلات الكيمياويه المختلفه ،تمتلك الاحياء المجهريه القابليه على انتاج انزيمات معينه ذات اهميه خاصه تدخل في مجالات مختلفة ومنها مجال الصناعات الغذائيه ،كما تعد من عوامل الفوعه التي تزيد من امراضيه الجراثيم المنتجه لها (Chirumamilla etal,2001:Pamdey et al ,1999).

٢-٣-٢: بكتريا *proteus sp*

تمتلك بكتريا *proteus sp* العديد من عوامل الضراوة التي تساهم في أمراضيتها وتثبيتها في أنسجة المضيف (Corker *et al.*,2000). ومن عوامل الضراوة لهذه البكتريا الانزيم الحال للدم (Hemolysin) ، أنزيم اليوريز(urease) ، الأهداب (Fimbria) و الاسواط (Flagella) (Himpsl *et al.*,2008) . كما تتميز هذه البكتريا بظاهرة الانثيال(Swarming) ، أضافة الى قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation (Liaw *et al.*,2004).

٢-٣-٣:بكتريا *S. aureus*

تكمن الاهمية السريرية لبكتريا *S. aureus* في كونها تمتلك العديد من عوامل الضراوة(Virulence factors) التي تعطيها القدرة على النمو والتكاثر وغزو انسجة المضيف وبذلك فهي تساهم بصورة كبيرة في امراضيتها (Zadik *et al.*, 20010) وفيما يلي اهم تلك العوامل :

١_ **المحفظة Capsule :** تمتلك بعض سلالات *S. aureus* محفظة ضمن جدار الخلية ، التي تعمل على تثبيط عملية البلعمة الناتجة عن خلايا الدم البيضاء ذات الأنوية متعددة الأشكال (Bannerman, 2003) و تتكون من عديدة السكريات (Polysaccharide) ، كما ان سلالات المحفظة تعد أكثر ضراوة من السلالات غير المحفظة والسبب في ذلك لامتلاكها المحفظة التي تجعلها مقاومة لعملية البلعمة (Phagocytosis) ،

٢_ **الببتيدوكلايكان Peptidoglycan وحامض التيكويك Teichoic acid :** تمتلك *S. aureus* بعض التراكيب الأنتجينية مثل جدار الخلية البكتيرية الذي بدوره يتكون من الببتايدوكلايكان (Peptidoglycan) المحتوي على سلسلة خطية من الكلايكان المتكون من نوعين من السكريات الأنتيجينية المتعاقبة ، والمتبادلة وهما الأستيل كلوكوزأمين (NAG) N-acetylglucosamine ، والأستيل حامض الميورامك N-acetylmuramic acid (NAM) (Ryan and Ray, 2004) ، وهو مهم في الامراضية لانه يشجع انتاج الانترلوكين (Interleukin-1) الذي يفرز من الخلايا وحيدة النواة (Monocyte) .

٣_ **بروتين protein A**: هو عبارة عن مستضد يقع على سطح الخلية البكتيرية يمثل حوالي 7% من جدار البكتريا، يرتبط تساهمياً مع الطبقة الخارجية لجدار الخلية المكونة من الـ Peptidoglycan (Hiramatsu,1997 ; Albus *et al.*,1988) . لهذا البروتين القدرة على الارتباط بمنطقة Fraction Crystalisable (FC) لجزيئة Imminoglobulin G (IgG) (Wann *et al.*,1999) ينتج بروتين A من قبل اكثر من 95 % من سلالات *S. aureus* ، لوحظ ان هذا البروتين يثبط آلية (Opsonization) ، والبلعمة (Phagocytosis) مختبريا (*In vitro*) حيث يعمل بروتين A قناعاً مناعياً (Immunological disguises)

يحمي البكتريا ويساعدها على البقاء . فبكتريا *S. aureus* التي يعوزها بروتين A تبتلع بسرعة وتمتاز بفوعة ضعيفة . (Gemmell *et al* ., 1991; Patel *et al* ., 1987)

٤ _ **الانـزيم المخثـر للبلازمـا Coagulase**: يفـرَزُ الانـزيم المخثـر للبلازمـا مـن بكتريـا *S. aureus* ويعـد مـن الصـفات التشخيصية المهمة لهذه البكتريا ، والانزيم عبارة عن بروتين قليل الكاربوهيدرات يفرز في الطور اللوغاريتمي من النمو البكتيري (Deepak *et al*., 2000; Collee *et al*., 1996) . الذي يؤدي وجوده إلى تجميع الفايبرونجين الموجود ضمن التركيب الكيمياوي لبلازما الدم ومن ثم ترسيبه على سـطح خـلايا بكتريا الـ *S. aureus* على شكل شبكة من الألياف الدقيقة مكونة بذلك الخثرة ، ومن المميزات المهمة لهذا الإنزيم تكوينـه للأضداد ، إذ يمتلك صفة مستضدية ، والقدرة على تثبيط عملية البلعمة Phagocytosis (Nair *et al*., 2000).

٥ _ **عوامل ضراوة أخرى:** هناك عدد من الانزيمات والذيفانات الاخرى التي تنتجها بكتريا *S. aureus* التي تساهم في زيـادة أمرضـيتها مثـل انـزيم الكتـاليز (Catalase) الـذي يقـوم بتحليـل بيروكسـيد الهيـدروجين الـى اوكسـجين ومـاء (Lowy,1998; Cohen ,1991) وعامل الانتشار (Hyaluronidase) الذي يعمل على تحطيم حامض الهايلرونك في الانسجة الضامة (Murray *et al*., 2009)، والستافيلوكاينيز (Staphylokinase) الذي يحلل الفايبرين المكون للخثرة ، أضافة الى (Proteinase) الذي يحلل البروتينات الخلوية .

الفصل الثالث

المواد وطرق العمل

3. المواد وطرائق العملMaterials and methods

٣-١: المـــواد Materials

٣-١-١: الأجهــزة والأدوات المختبرية والصبغات والمواد الكيميائية

جدول(٣-١) الأجهزة والمعدات المختبرية والصبغات والمواد الكيميائية المستخدمة في البحث

ت	أســـــــم الجـــهـاز	
١	مؤصده	**Autoclave**
٢	ميزان حساس	**Sensitive balance**
٣	كاميرا رقمية	**Digital camera**
٤	مجهر ضوئي	**light microscope**
٥	مسخن حراري	**Hot plate**
٦	حمام مائي	**Water bath**
٧	جهاز تقطير	**Distiller**
٨	منبذة عالية السرعة	**High speed centrifuge**
٩	حاضنة	**Incubator**
١٠	مازج	**Vortex mixer**
١١	كابينة الزرع المجهري	**Laminar flow cabinet**
١٢	ثلاجة	**Refrigerator**
١٣	الناقل الزرعي القياسي	**Standard wire loop (1µ)**
١٤	دورق مخروطي	**Conical flasks**
١٥	اطباق بتري بلاستكية	**Disposable Petri dishes**
١٦	شرائح زجاجيه وغطاء شريحة	**Slides and cover slides**
١٧	أنابيب إختبار	**Test tube**
١٨	كليسيرول	**Glycerol**
١٩	المثيل الأحمر	**Methylred ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)**
٢٠	الاكار	**Agar- Agar**
٢١	كاشف كوفاكس	**Kovac' s reagent**
٢٢	صبغة گرام	**Gram stain**

٣-١-٢: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media

جدول (٣-٢):الأوساط الزرعية المستخدمة في البحث

اسم الوسط الزرعي		الشركة المصنعة (المنشأ)
وسط اكار السترات	Simmons citrate agar	Mastdiagnostic
وسط ماء الببتون	Pepton water	BDH
وسط الايوسين الازرق	Eosin methylene blue	Oxoid
وسط الماكونكي	MacConkey agar	Himedia
وسط كلكلر	**Kligler's iron agar**	Himedia
قاعدة اغار الدم	Blood agar base	Himedia
الوسط المغذي الصلب	Nutrient agar	Himedia
الوسط المغذي السائل	Nutrient broth	Himedia

٣-٢:طرائق العمل procedures

٣-٢-١: طرائق التعقيمmethodes Sterilization

عقمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة، والتركيبية، وأغلب المحاليل المستخدمة التي لاتتأثر بالحرارة بجهاز الموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مº وتحت ضغط ١٥ باوند / انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة، أما الزجاجيات فقد تم تعقيمها بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة ١٦٨ مْ لمدة ساعتين (MacFaddin, 2000).

٣-٢-٢: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

٣-٢-٢-١: وسط اكار الماكونكي MacConkey agar medium

حضرهذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 50 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 م^{o} لمدة 20 دقيقة، استعمل لعزل البكتريا السالبة لصبغة غرام، والتفريق بين العزلات المخمرة لسكر اللاكتوز عن

غير المخمرة له.

٣-٢-٢-٢: وسط الاكار المغذي Nutrient agar medium

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 28 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 م^{o} لمدة 20 دقيقة، استخدم كوسط عام للتنمية وحفظ العزلات.

٣-٢-٢-٣: وسط المرق المغذي Nutient broth medium

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 13 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 م^{o} لمدة 20 دقيقة. واستعمل لتنشيط وادامة العزلات.

٣-٢-٢-٤: وسط ماء الببتون Peptone water

حضر هذا الوسط من اذابة ٢٠غرام ببتون و٥ غرام NaCl و ١٠٠٠ مليليتر ماء مقطر ذوبت المكونات بواسطة الحمام المائي ووزع في انابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة. استخدم للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج حلقة ألا ندول.

٣-٢-٢-٥: وسط سيمون ستريت Simmons citrate agar

حضرهذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 24.2 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر، ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 20 دقيقة، استخدم لاختبار قابلية البكتريا على استهلاك سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكاربون.

و٣-٢-٢-٦: سط الايوسين المثيلن الأزرق Eosin methylene blue

حُضرهذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 36 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2، ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م^{o} لمدة 20 دقيقة. استخدم لتفريق بكتريا *E. coli*عن البكتريا المعوية الأخرى.

٣-٢-٢-٧ وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور M.R.V.P Medium

حضرهذا الوسط بإذابة ٥ غرام ببتون و٥ غرام K_2HPO_4 في ١٠٠٠ مليليتر ماء مقطر ذوبت

المكونات بواسطة الحمام المائي جيداً وعقمت بالموصدة، برد الوسط إلى ٥٠°مْ ثم أضيف أليه ٥٠ مليليتر من محلول ١٠% كلوكوز والذي عقم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة. استخدم الوسط للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الحامض أو الاستيل مثيل كاربون (Macfaddin, 2000).

٣-٢-٢-٨: وسط المانتول الملحيMannitol salt agar

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة .

٣-٢-٢-٩: وسط كلكلر Kligler's iron agar

حُضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، استخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وكذلك قابليتها على تخمير سكريات الكلوكوز واللاكتوز.

٣-٢-٢-١٠: وسط اكار الدم Blood agar

أستعمل وسط اكار الدم المعقم والمحضر بحسب تعليمات الشركة المصنعة ، ثم بُرد الوسط لدرجة (٤٥-٥٠) مْ وأُضيف له (٥%) دم الإنسان صنف AB و من ثم صبه في إطباق بتري معقمة وحُفظ بالثلاجة لحين الاستعمال (Macfaddin,2000) .

٣-٢-٢-١١: وسط اختبار الحركة Motility media

حُضّر هذا الوسط بإذابة ٠,٤% غرام من مسحوق الاكار مع ١٣ غرام من المرق المغذي في ١ لتر، صب في انابيب وعقم بالمؤصدة ، استخدم لاختبار حركة البكتريا (Isenberg & Garcia , 2004).

٣-٢-٣: <u>محاليل الصبغات والكواشف Stains and reagents solutions</u>

٣-٢-٣-١:محاليل صبغة كرام Gram stain solutions

تم الحصول على محاليل الصبغة جاهزة واستعملت هذه المحاليل لدراسة الخصائص المظهرية لخلايا البكتريا المعزولة تحت المجهر.

٣-٢-٣-٢:المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline solution

حضر المحلول بإذابة ٠,٨٥ غرام من Nacl في ٩٠ ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى

١٠٠ ملي لتر، وعقم بالموصدة. استعمل هذا المحلول في أعداد اللقاح البكتيري المباشر (MacFaddin, 2000).

٣-٢-٤:جمع العينات Samples collection

تضمنت الدراسة الحالية جمع ٥٠ عينة من النادي الطلابي لكلية العلوم خلال المدة من تشرين الأول ٢٠١٧ ولغاية شباط ٢٠١٨ شملت العينات المأخوذة من الوجبات السريعة ،حفظت في علب خاصة معقمة ،وبعدها نقلت العينات الى المختبر لغرض زرعها وتشخيصها ، اذ زرعت في اطباق بتري حاوية على وسط الاكار المغذي ووسط الماكونكي ووسط الايوسين- ازرق المثلين الصلب وكذلك على وسط اكار الدم الصلب بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة٣٧ م ولمدة ١٨- ٢٤ساعة لغرض تشخيص البكتريا النامية على الأوساط (MacFaddin, 2004) .

٣-٢-٥:تشخيص البكتريا المعزولة

٣-٢-٥-١: التشخيص المظهري والمجهري

تم دراسة الخصائص المجهرية للبكتريا المعزولة من خلال عمل مسحات مباشرة من الأوساط الزرعية والتي صبغت بواسطة صبغة كرام لدراسة الخصائص المظهريه للأنواع البكتيرية المعزولة. كذلك درست الصفات المظهرية لكل من المستعمرات والخلايا البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة، شملت دراسة المستعمرات البكتيرية من حيث اللون والشكل و القوام والحواف والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية Differential media والانتقائية Selective media، أما الصفات المظهرية للخلايا فقد شملت شكل الخلية البكتيرية، وانتظام الخلايا البكتيرية مع بعضها ، وطبيعة تفاعلها مع صبغة كرام.

٣-٢-٥-٢: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

لغرض إجراء هذه الفحوصات تم استخدام المزروع البكتيري النامي على وسط الاكارالمغذي بعمر ٢٤ ساعة وهذه الفحوصات تشمل:-

٣-٢-٥-٢-١:الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test

تم إجراء الفحص بنقل كمية قليلة من النمو البكتيري النامـــي على الوسط الزرعي بعمر ٢٤ ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من ٣% بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) المحضر في الفقرة، إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

٣-٢-٥-٢-٢:الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test

تم إجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية معقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنياً، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي يدل على النتيجة الموجبة للكشف (Collee *et al*., 1996).

٣-٢-٥-٢-٣:اختبار إنتاج مخثر البلازما Coagulase test

تم التحري عن إنزيم مخثر البلازما بالاعتماد على طريقة أنبوبة الاختبار (Tube Test) ، إذ تم إضافة ٠,٥ ملي لتر من بلازما دم الإنسان غير المخفف إلى أنابيب اختبار حاوية على ٠,٥ ملي لتر من وسط تربتون الصويا السائل الملقحة بالعزلات البكتيرية المراد التحري عنها وحضنت أنابيب الاختبار في حمام مائي في درجة حرارة ٣٧ °م مدة أربع ساعات ، تم خلالها مراقبة تكون الخثرة لكونها دليلاً على ايجابية الفحص ، أما الأنابيب التي لم تظهر استجابة للاختبار تركت في الحاضنة مدة ٢٤ ساعة وفي درجة حرارة ٣٥ °م للتأكد من النتائج (MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٥-٢-٤:اختبار عامل التكتل testClumping factor

تم التحري عن إنزيم مخثر البلازما المرتبط (Bound coagulase) بإتباع طريقة الشريحة الزجاجية (Slide Test) ، إذ وضعت قطرتان من البلازما على جانبي الشريحة الزجاجية وأضيف إلى إحداهما مليء ناقل من وسط تربتون الصويا السائل الملقح بمستعمرة فتية بعمر (١٨-٢٤) ساعة ، بينما أضيف إلى الأخرى قطرة من الماء المقطر لغرض المقارنة (سيطرة سالبة) ، ومزجت المكونات بعناية للحصول على معلق متجانس تعد النتيجة موجبة عند حدوث خثرة مميزة خلال (٥-٢٠) ثانية(MacFaddin, 2000).

٣-٢-٥-٢-٥:اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test

اجري الفحص بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة. ان تحول لون الوسط الاخضر الى الازرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000).

٣-٢-٥-٢-٦: اختبار قابلية الحركة Motility test

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة

٣-٢-٥-٢-٧: الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري حضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة، عندها أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى كل أنبوبة مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 1979).

٣-٢-٥-٢-٨: اختبار احمر المثيل Methyl red test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي M.R.V.P Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة عندها تم اضافة ٥ قطرات من كاشف احمر المثيل مع رج الانبوبة ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة يدل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض (Collee *et al.*, 1996).

٣-٢-٥-٢-٩:اختبار الفوكس بروسكور Voges pros-kauer test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة بعد ذلك تم إضافة ١ ملي ليتر من الكاشف إلى كل أنبوبة مع الرج، ان ظهور اللون الوردي خلال ٢ –٥ دقيقة والذي يصبح كرزي غامق خلال ٣٠ دقيقة مع الرج المتواصل يعبر عن النتيجة الموجبة (Collee *et al.*, 1996).

٣-٢-٥-٢-١٠:اختبار كلكلر – ايرون Kligler-iron test

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الكلكلر الصلب المائل بمستعمرة نقية بطريقة الطعن والتخطيط ثم حضنت بدردجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة .ثم تقرأ المتغيرات اللونية في قعر وقمة الوسط الزرعي كما موضح ادناه.

القعر/السطح المائل	**اللون**
حامضي/قاعدي	اصفر/احمر
حامضي/حامضي	اصفر/اصفر
قاعدي /قاعدي	احمر/احمر
انتاج H_2S	راسب اسود

٣-٢-٦: حفظ العزلات البكتيرية

٣-٢-٦-١:الحفظ قصير الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة ٣٧ مº لمدة ٢٤ ساعة، ثم حفظت في درجة ٤ مº، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات كل شهر، (Forbes *et al.*, 2007).

٣-٢-٦-٢: وسط الحفظ طويل الأمد

حضر هذا الوسط بإضافة ١٥% من الكليسيرول إلى المرق المغذي المحضر بإذابة ١,٥ غرام من الوسط في ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر، وعقم بالمؤصدة، وترك ليبرد في درجة حرارة ٥٦ مْ باستعمال الحمام المائي، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في ٤ مْ لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - ٢٠ مْ (Forbes *et al.*, 2007).

الفصل الرابع

النتائج

٤- النتائج

٤-١.العزل والتشخيص

بينت النتائج ان ١٧ عينة كانت ملوثة بالبكتريا من اصل ٥٠ عزلة ماخوذة من الوجبات السريعة للنادي الطلابي لكلية العلوم وبواقع عزلة واحدة لبكتريا*staphylococcus-aureus* و١٠ عزلات لبكتريا *E-coli* و٦ عزلات لبكتريا *proteus sp*، ثم شخصت عزلات البكتريا من خلال دراسة الخصائص المظهرية والمجهرية ثم اكدت النتائج باختبارات كيموحيوية ما يلي:

٤-١-١: خصائص الزرعية

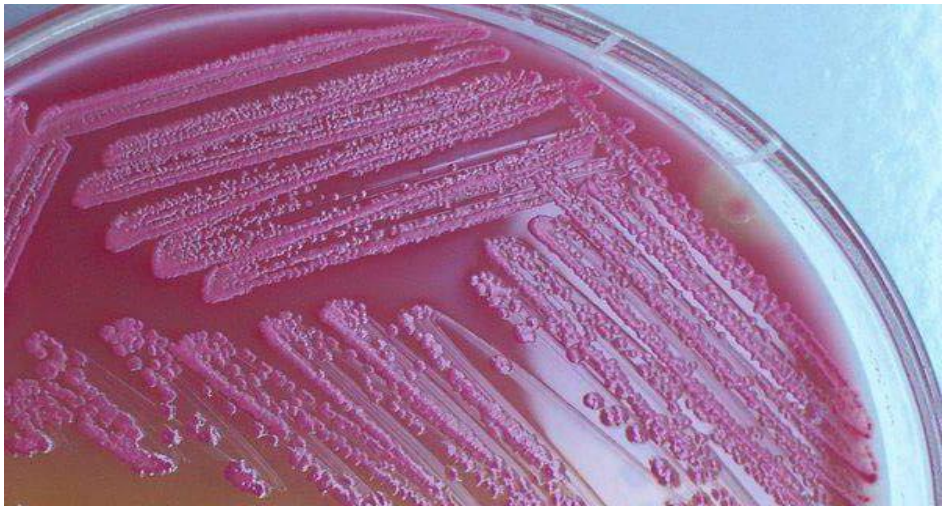
<u>بكتريا*proteus sp*</u>

اظهرت النتائج ان بكتريا المتقلبات تكون ذات مستعمرات شفافة شاحبة على وسط اكار الماكونكي **MacConkey agar**بوصفها غير مخمرة للسكر اللاكتوز وكذلك تمتاز بظاهرة العج (swarming) على اكار الدم Blood agar كما في الشكل (٤-١) ، فضلا عن مستعمراتها التي تشبه رائحة السمك.

شكل (٤-١) يوضح ظاهرة العج على وسط اكار الدم Blood Agar

<u>بكتريا *E-coli*</u>

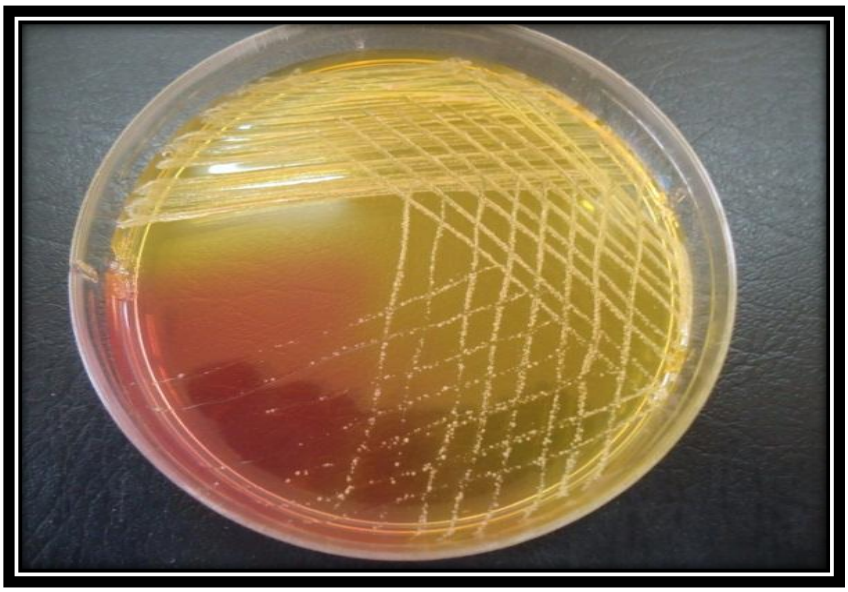
تكون ذات مستعمرات وردية على اكار الماكونكي **MacConkey agar** نتيجة لتخمرها سكر اللاكتوز كما في الشكل (٤-٢) ، كما اظهرت النتائج مستعمرات البكتريا ذات بريق معدني اصفر على وسط ايوسين-ازرق المثلين**Eosin methylene blue**.



الشكل (٤-٢) يمثل مستعمرات بكتريا القولون على وسط اكار الماكونكي **MacConkey agar**.

بكتريا *staphylococcus aureus*

تكون ذات مستعمرات صفراء ذهبية على وسط المانتول الملحي **Mannitol salt agar** نتيجة لتخمرها سكر المانتول كما في الشكل (٤-٣) .



الشكل (٤-٣) يمثل مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على وسط Mannitol Salt Agar.

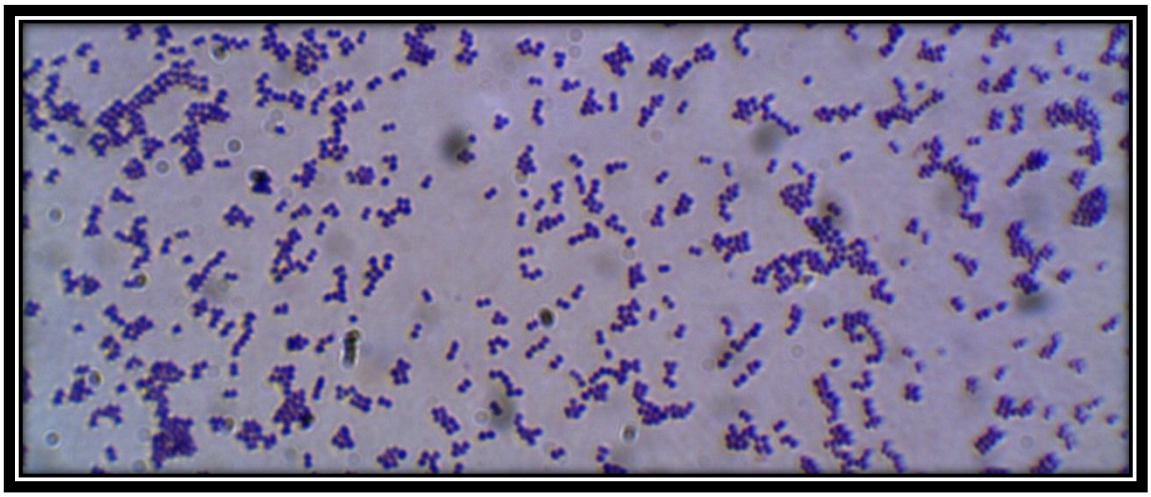
٤-١-٢: الخصائص المجهرية

بكتريا*proteus sp* ،وبكتريا E.coli

تكون بشكل عصيات صغيرة سالبة لصبغة كرام ذات لون وردي غير مكون للسبورات.

بكتريا *staphylococcus aureus*

تكون بشكل مكورات عنقودية تحت المجهر مكون للمحفظةCapsule كما في الشكل (٤-٤).



الشكل (٤-٤) بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* المصبغة بصبغة غرام تحت المجهر .

٤-١-٣: الفوحصات الكيموحيوية

بكتريا*proteus sp*

تكون موجبة لاختبار الكتاليز من خلال تكوين فقاعات هوائيه عند اضافة H_2O_2 لمستعمرة البكتريا الموضوعة على الشريحة الزجاجية وكذلك موجبة لاختبار احمر المثيل من خلال تكوين اللون الاحمر بعد اضافة الكاشف للمزرعة البكتيرية وهذا دليل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج حامض ، وايضا موجبة لاختبار الحركة من خلال انتشار النمو خارج حدود الطعنة ، وكذلك موجبة لاستهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون حيث يتغير اللون الوسط من الاخضر الى الازرق. بينما اعطي جميع العزلات البكتريا فحصا سالبا للاوكسديز والفوكس بروسكور واختبار الاندول تكون النتجية موجبة من خلال تكوين حلقة حمراء نتيجة تحلل الحامض الاميني الترتيوفان وتكون الاندول، كذلك نمت البكتريا على وسط الحديد الثلاثي وانتجت H_2Sوغاز كما في الجدول (٤-١)

بكتريا *E-coli*

موجبة لاختبار الكتاليز، واختبار الحركة ،و اختباراحمر المثيل، وتخمر الكلوكوز واللاكتوز والمانتول ، ولاتخمر السكريات ، وسالبة لفحص لاوكسديز وفوكس بروسكور، وكذلك سالبة لاستهلاك السترات لعدم قابليتها على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون من خلال عدم تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق. وموجبة لاختبار الاندول من خلال تكوين حلقة الاندول الحمراء نتيجة تحلل الترتيوفان وتكون الاندول. وكذلك تنمو على وسط الحديد الثلاثي Triple sugariron ويكون نموها A/A مع انتاج غاز CO_2 كما في الجدول (٤-١)

جدول (٤-١) الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا ***proteus sp*** وبكتريا ***E-coli***

الاختبارات	Proteus	E-coli
الكتاليز	+	—
الاوكسديز	—	—
Vogesproskauer	—	—
الاندول	—	+
احمر المثيل	+	+
استهلاك سترات	+	—
الحركة	+	+
الكلكوز	+	+
اللاكتوز	—	+
مانتول	—	+

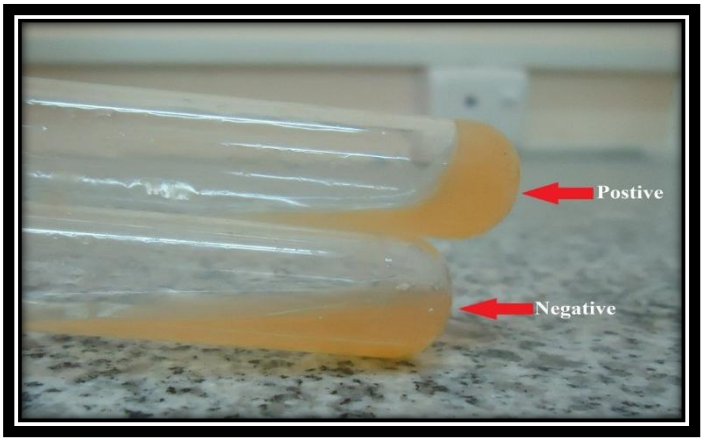
بكتريا *staphylococcus aureus*

اظهرت جميع العزلات فحصا موجبا للكتاليز، وسالبا للاوكسديز، من خلال عدم تكون اللون البنفسجي عند اضافة المستعمرة الى ورقة الترشيح المشبعة بالكاشف الاوكسديز.وكذلك موجبة الاختبارCoagulase كما في الشكل (٤-٤)من خلال تكون خثرة في انابيب الاختبار حاوية على مزرعة بكتريا بعد٤ ساعات من اضافة بلازما الدم غير

المخفف الى الانابيب.وكذلك موجبة الاختبار لعامل التكتل من خلال تكون خثرة للمستعمرة البكتريا الموضوعة على سطح الشريحة الزجاجية بعد اضافة قطرة من بلازما الدم، وايضا موجبة الاختبار فوكس بروسكور من خلال تكون اللون الاحمر بعد اضافة الكاشف وهذا دليل على التحلل الجزئي للسكريات كما في الجدول (٤-٢)

جدول (٤-٢) الاختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا المكورات الذهبية

الاختبارات	staphylococcus-aureus
الكتاليز	+
اوكسديز	—
Coagulase	+
Clumping factore	+
Vogesproskauer	+
تخمر المانتول	+



الشكل (٤-٤) يمثل اختبار Coagulase لبكتريا *staphylococcus aureus*

٤-٢: الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا *S.aureus* و*Proteus sp* و*E.coli* من مصادر مختلفة

شخصت ١٧عزلة (بنسبة عزل٣٤%من مجموع ٥٠ عينة)التي جمعت من الوجبات السريعة للنادي الطلابي لكلية العلوم خلال الفترة من تشرين الاول ٢٠١٧ ولغاية شباط ٢٠١٨ ، شملت ١٠ عينات من الفلافل ، ١٠ عينات من الهمبركر ، ١٠ عينات من سلطة الطماطة ، ١٠ عينات من سلطة الخس و١٠ عينات من البيض المسلوق.

اظهرت نتائج البحث ان اعلى نسبة عزل لبكتريا القالون *E-coli* كانت من الفلافل وبنسبة ٣٥,٩% واقل نسبة عزل كانت من سلطة الخس وبنسبة ٢٣,٥% ، بينما اظهرت النتائج ان اعلى نسبة عزل لبكتريا *proteus sp* كانت من

الهمبركر وبنسبة ٢٣,٥% واقل نسبة في سلطة الطماطة وكانت ١١,٧% بينما كانت بكتريا*S-aureus* المتواجدة في البيض المسلوق بنسبة ٥,٨% كما في الجدول (٤-٣)

جدول (٤-٣) يوضح الاعداد والنسب المئوية لعزل الانواع البكترية من الوجبات السريعة:

مصدر العينات	عـــدد العينـــات الكلي	عـــدد العـــزلات الموجبة	نوع العزلات	النسبة المئوية%
فلافل	١٠	٦	*E.coli*	%٣٥,٩
همبركر	١٠	٤	*proteus sp*	%٢٣,٥
سلطة خس	١٠	٤	*E.coli*	%٢٣,٥
سلطة طماطة	١٠	٢	*proteus sp*	%١١,٧
البيض المسلوق	١٠	١	*S.aureus*	%٥,٨
المجموع	٥٠	١٧	-	%٣٤

الفصل الخامس

المناقشة

٥. المناقشة

٥-١: عزل وتشخيص بكتريا *Proteus sp* و*E.coli* و *S. aureus*

٥-١-١:الخصائص الزرعية والمظهرية

جمعت ٥٠ عينة من الوجبات السريعة في النادي الطلابي لكلية العلوم للفترة من تشرين الأول ٢٠١٧ ولغاية شباط ٢٠١٨ وبعد ان شخصت الأنواع البكتيرية قيد الدراسة تشخيصا اوليا من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية ، أظهرت بكتريا *Proteus sp* بشكل مستعمرات شفافة نقية شاحبة اللون ،متوسطة الحجم ذات حافات ملساء وغير مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط اكار الماكونكي MacConkey Agar، وذات رائحة تشبة رائحة السمك المتعفن، وكذلك اظهرت البكتريا الحركة التموجية Swarrming على وسط اكار الدم Blood Agar التي تعد صفة تشخيصية اولية لهذة البكتريا ، وتظهر هذه الحركة نتيجة امتلاك الخلايا الخضرية على العديد من الاسواط وكما في الشكل (٤-١) وهذه النتيجة تتفق مع ذكره وجماعته Al-Bassam و Al-Kazaz (٢٠١٣).

اما في مايخص بكتريا *E.coli* فظهرت مستعمراتها بلون وردي على وسط اكار الماكونكي MacConkey Agar نتيجة لتخمرها لسكر اللاكتوز متوسطة الحجم ، بينما تكون ذات بريق معدني اخضر على وسط الايوسين الأزرق (MacFaddin ٢٠٠٠) ،

بينما ظهرت مستعمرات بكتريا *S. aureus* على وسط الدم الصلب Blood Agar ناعمة ، مرتفعة قليلاً ، لامعة ، وتتراوح أقطارها بين (1-3) ملي متر ، ومحاطة بهالة تحلل نوع بيتا (β-hemolysis) ، كما ظهرت المستعمرات النامية على وسط المانيتول الملحي الصلب Mannitol Salt Agar باللون الأصفر، والأصفر الشاحب ، والذهبي ، وبلغت أقطارها (1-٢) ملي متر تقريبا ، بالإضافة إلى تغير لون الوسط من الاحمر إلى اللون الأصفر نتيجة لتخمر المانيتول وإنتاج الحامض ، وهذه النتائج كانت متوافقة مع ما ذكره (٢٠٠٠) MacFaddin .

كما اظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا بكتريا *E.coli* و *Proteus* تكون بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام وغير مكونة للسبورات ، اما بكتريا *S. aureus* فتكون خلايا البكتريا المعزولة كروية الشكل عنقودية الترتيب متجمعة بصورة ثنائية او رباعية او على هيأة سلاسل ، وموجبة لصبغة كرام وهذا متفق مع Holt وجماعته (١٩٩٤).

٥-١-٢:الاختبارات الكيموحيوية

- **بكتريا*Proteus sp***

استعملت كفحوصات تكميلية للتشخيص الاولي للبكتريا والغرض منها تأكيد تشخيص جنس البكتريا قيد الدراسة، فقد اوضحت النتائج المبينة في الجدول (٤-١) استجابة جميع العزلات لفحص الكاتليز دلالة على قدرتها على انتاج انزيم الكاتليز اذ كانت النتيجة الموجبة ظهور فقاعات هوائية بصورة مباشرة بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H2O2 ، وكذلك كانت النتيجة موجبة لاختبار استهلاك السترات بوصفة المصدر الوحيد للكاربون اذ لوحظ تغير لون الوسط من الاخضر الى اللون الازرق نتيجة لتغير لون البروموثايمول الى اللون الازرق لزيادة الاس الهيدروجيني وهذه النتيجة كانت مطابقة مع Collee وجماعته (١٩٩٦). وكما اعطت العزلات المشخصة فحصا موجبا لاختبار احمر المثيل وفحصا سالبا لاختيار الفوكس-بروسكاور وذلك لعدم تكوين المركب Acetyl-Methyl Carbinol من التحلل الجزيئي للسكروهذا مطابق مع Collee وجماعته (١٩٩٦). اما بالنسبة لفحص الاندول فكانت النتيجة سالبة للعزلات قيد الدراسة ، اذ تكون النتيجة الموجبة تكوين حلقة حمراء نتيجة تحلل الحامض الاميني (التربتوفان) وتحوله الى الاندول وهذه النتائج مطابقة مع Holtوجماعتة (١٩٩٤) و Colleeوجماعتة (١٩٩٦). كما اظهرت جميع عزلات البكتريا قدرتها على تخمر كل من سكر السكروز والكلوكوز واعطت غازاً وراسباً اسودا على الوسط دلالة على انتاج كبريتيد الهيدروجين H2S وهذ متفق مع Collee وجماعته (١٩٩٦).

- بكتريا***E.coli***

أظهرت النتائج في الجدول (٤-١) فحصا موجبا للكتاليز واختبار الحركة و اختباراحمر المثيل وتخمر الكلوكوز واللاكتوز والمانتول ولاتخمر السكريات ، وفحصا سالبا لاوكسديز وفوكس بروسكور وكذلك سالبة لاستهلاك السترات لعدم قابليتها على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون من خلال عدم تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق. موجبة لاختبار الاندول من خلال تكوين حلقة الاندول الحمراء نتيجة تحلل الترتيوفان وتكون الاندول . وكذلك تنمو على وسط Triple sugar ironاكار الحديد الثلاثي ويكون نموها A/A مع انتاج غاز CO_2وهذه النتائج مطابقة مع Holtوجماعتة (١٩٩٤) و Colleeوجماعتة (١٩٩٦).

- بكتريا***S. aureus***

أظهرتالنتائج في الجدول (٤-٢)استجابة عزلات بكتريا *S. aureus* و بنسبة (١٠٠%) لكل من اختبار الكتاليزواختبارعامل التكتل ومخثر البلازما الحر وتخمر المانيتول، بينما اظهرت جميع العزلات نتيجة سالبة لاختبار الاوكسيديز وكان ذلك متقارباً مع ما ورد في كل من Collee *et al.*, (1996) و(2000) , Macffaddin و Harley and Prescott, (2002) . أبدت جميع العزلات في هذه الدراسة نتيجة موجبة لاختبار فوكس – بروسكاور ويستعمل هذا الاختبار لمعرفة قابلية البكتريا على تحرير نواتج نهائية متعادلة مثل Acetylmethyl-carbinol (AMC) والأسيتون من خلال تخمير الكلوكوز (MacFaddin, 2000).

٥-٢: الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا *Proteus sp* و*E.coli* و *S. aureus*

بينت النتائج الموضحة في الجدول (٤-٣) ان بكتريا القولون حققت نسب تواجد عالية (٣٥,٩%) في الوجبات السريعة مقارنة ببكتريا المتقلبات ***Proteus sp*** . تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل الية كل من AL-Hamadan et al,2007 اذ ذكرو ان البكتريا تأتي في المرتبة الأولى في تلوث الأغذية وجاءت نسبة تواجد بكتريا ***Proteus sp*** (٢٣,٥%) في هذه الدراسة متقاربة مع دراسة Hussien(٢٠١٣) الذي بين في دراستةالتي اجراها في مدينة النجف ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت (٢٦,٣%).اما دراسة Khurana وجماعته (٢٠٠٢) فقد عزلت فيها هذه البكتريا بنسبة (٣٣,٣%)

وكانت هذه النتيجة ايضا متقاربة مع الدراسة الحالية .في حين اظهرت دراسة كاظم وخلف (٢٠١٢) ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت (١١,٨٥%) وهذه النتيجة اقل من الدراسة الحالية . كما وجد Hassan (٢٠٠٨) في دراسة اجراها في مدينة الناصرية ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت (٤٨,٨%). ،قد يرجع سيادة بكتريا القولون وبكتريا المتقلبات في الأغذية الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة أهمها عوامل المسح والارتباط Attachment and effacing factors واهلاب الالتصاق وكذلك امتلاكها الاسواط والمحفظة والبروتينات السطحية التي تمكنها من الحركة والانتقال والعيش في ظروف قاسية .

كما بيّنت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة عزل *S. aureus* من الوجبات السريعة كانت ٥,٨%،وكانت نسبة عزل *S. aureus* في الدراسة الحالية أدنى من نسبة العزل في دراسة الخضيري (2008) التي بلغت (37.5%) وأدنى من نسبة العزل في دراسة زيدان (2007) التي بلغت (50.0%) ، وأعلى من نسبة العزل في دراسة Al-Hassnawi (2012) التي بلغت (10.8%).تعد *S. aureus* أحد أهم الأسباب الرئيسية في إنتاج وتكوين الاخماج بسبب قدرتها الكامنة على الغزو والهجوم تحصل عملية إحداث المرض ومن ثم التسبب في إحداث أخماج في مناطق واسعة من الجسم (Murphy *et al*., 2001) ، وتحدث الأخماج العنقودية عندما تخترق الحواجز المناعية مثل الجلد والحواجز المخاطية أو عند دخول أجسام غريبة ، و قد يكون الشخص المخمج يعاني أصلا من ضعفٍ في أنظمة الجسم المناعية. قد يكون سبب الاختلاف في نسب العزل لهذة البكتريا هو عدد العينات المشمولة في الدراسة ومدة جمع العينات .

الاستنتاجات Conclusions

١ -سيادةبكتريالقولون*E.coli*في الوجبات السريعة تليها بكتريا المتقليات. *proteussp*

٢ -تزايد نسب تلوث الأغذية بالبكتريا المعوية .

التوصيات Recommendations

١. الاهتمام بالنظافة الصحية للنادي الطلابي

٢. توعية العاملين بالنادي الطلابي على النظافه الشخصيه

٣. ضرورةاستعمال طريقةالتخطيط على وسطChromAgar في تشخيص الانواع البكتيرية وذلك لسهولة الأستعمال والسرعة في اعطاء النتائج.

٤. التوسع في دراسة الأنواع البكتيرية من الناحية الوراثية ، واستخدام تقنيات أكثر تطوراً في العزل والتشخيص كتقنية PolymeraseChainReaction (PCR) للتميزبين العزلات المرضية والغيرمرضية كفحوصات توكيديةمن خلال اعتماد بادئ تنوعي اخر يمثل الجينات المشفرة لبعض عوامل الضراوة.

المصادر العربية

مصطفى،ديانا نور الدين. (٢٠١١).تطفير المحتوى الوراثي .مجلة التربية والعلم . **٢٤**(٢)._4

زيـدان ، إسـراء علـي (2007) . دراسـة بكتريولوجيـة ووراثيـة لبكتريـا *Staphylococcus aureus* المعزولـة من عينات سريرية مختلفة ومقاومة لمضاد الفانكومايسين . رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة بغداد .

الخضيري ، ميعاد كاظم علي (٢٠٠٨) . دراسة بكتريولوجية ووراثية للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين المعزولة من مستشفيات مدينة النجف . رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات . جامعة الكوفة .

المصادر الاجنبية

Abbott, S. L. (2007). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, and Other *Enterobacteriaceae*. In:Manual of Clinical Microbiology, Murray, P. R.; *Baron, E. J.; Jorgensen, J.* H.; Landry M. L. and Pfaller, M. A.(eds.) 9th ed. ASM Press. Washington. USA, pp. 698-711

AL-Bassam ,W. W. ; and Al-Kazaz,AK. (2013) . The Isolation and Characterization of *Proteus mirablis* from different Clinical Sample.*Journal of Biotechoology Research center* .**2**(7):26

Albus,A.; Fournier,J.M.; Molz,C.; Bontonnier,A.; Rank,M.; Hoiby, N.;Hochkeppel , H. ;and Doring,G. (1988). *Staphylococcus aureus*

AL-hamadan, A. H. ; Hussien, A. N. and AL-Nashaa, A. A.(2007). Curing of Plasmid Contents of *Proteus* spp. Isolated in from urinary tract in AL-Diwaniyah city.*QMJ*.**3**(1):

Al-hassnawi, H.H. (2012) . Molecular Characterization of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Clinical Cases in Babylon Province . PhD. thesis. College of Medicine.University of Babylon.

Bannerman, T. L. (2003). Staphylococci, micrococci and other catalase-positive cocci that grow aerobically. eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th edn. Washington: American society for microbiol. Press. 384-404

Belanger , L. ; Garenaux, A. ; Harel J.; Boulianne , M.; Nadeau , E.

Blair , D.F. (1995).How bacteria sense and swim. Annual Reviews of

Boynukara, B.; Gulhan, T.; Gurturk, K.; Alisarli, M.; and Ogun, E. (2007). Evolution of slime production by coagulase-negative staphylococci and enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various human clinical specimens. J. Med. Microbiol. **56**: 1296-1300.

Brook ,G ,F.; Butel, J, S.; and Morse,S ,A.(2001).Medical microbiology lange medical brook Mcgraw-hill.tewenty-second edition pp 197-202.

Brooks, G.F., Butel, J.S. & Morse. S.A. (1998). Jawetz, Melinck and Adelberg's Medical Microbiology .21st ed. Appleton and lange, Asimon and Schuster Co., California.

Chirumamilla, R.R.; Muralidhar, R.; Marchant, R.and Nigam,P.(2001). Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol. Cell. Biochem*. 224: 159–168.

Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P.;and Simmon, A. (1996). Mackie and McCarteny Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone Inc; USA

Corker, **C. ; Poore, C. A. ; Li , X. and Mobley , H. L. (2000) .** Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect* ; **2**(12) : 1497-1505.

Deepak, S.; Samant, S. A., and Urhekar, A. D. (2000). study of coagulase positive and negative staphylococci in clinical samples.Indian.

Diep, B. A.; Sensabaugh, G. F.; Somboona, N. S.; Carleton, H. A.; and Perdreau-Remington, F. (2004). Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. J. Clin. Microbiol.**42**: 2080-2084.

Forbes , B. A. ; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic Microbiology 12th ed. Bailey and Scotts'. Mosby Elsevier. China., pp: 93-247.

Fotador, U. ; Zaveloff, P. and Terracio, L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperature . *J. Basic.Microbio*45.5:403-404 .

Gemmell , G . ; R . Tree ; A . Patel ; M . O . Reilly . and T . J . Foster . (1991) . Susceptibility to opsonophagocytosis of protein A , Alpha – haemolysin and Beta – toxin

deficient mutants of *S.aureus* isolated by allele – replacement . Zentbl . Bakteriol . **21** (suppl.) : 273 – 277 .

Harley, J. P. and Prescott, L.M. (2002). Laboratory exercises in microbiology. 5th edition. McGraw Hill companies. New York

Hassan,Talib Falah.(2008). Study of *Proteus mirablis* Infections in AL-Nassiria City.*Journal of Thi-Qar University* **4**(3):9.

Himpsl , S .D. ; Lockatell , C.V.; Hebel , J.R . ; Johnson , D . E . and Mobley , H . L. (2008). Identification of virulence determinants in uropathogenic Proteus mirabilis using signature-tagged mutagenesis. *J. Med .Microbiolo*, **57**: 1068-1078

Hiramatsu,K.(1997). *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility .J.Antimicrob. Agents Chemother. **40**:135-136.

Holt, J. G. ; Kreig , N. R. ; Sneath, P. H.A. ; Stanley, J. T. and Williams , S. T. (eds) (1994) Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th. ed Williams and Wilkins , *USA.* P. 532 – 553.

Humphreys,H. (1997) . Staphylococcus : Skin infection : Osteomylitis Food poisoning , Foreign body infections . Medical Microbiology.5th ed.,Churchil Lidingston .USA.

Jawetz, E. ; J. K. Melnick and E. A. Adelberg (1998). Enterobacteriaceae in medical microbiology review. 12th ed. P : 223 – 224. Apelton and large , Middle eastol Libravie Dublin , Beirut.

Jiang, S., Lin, T., Wang, W., Liu, M., Hsueh, P.and Liaw, S. (2010) .Characterization of UDP-Glucose dehydro-genaseand UDP-Glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis*: Defectiveness in polymyxin B resis-tance, swarming, and virulence. *Antimicrob. Agents and Chemother*, **54**(5): 2000-2009.

Johnson, A. G.; Ziegler, R. J.; Lukasewycz, O. A. and Hawley, L. B. (2002). Board Review Series Microbiology and Immunology. 4thed. Lippincott Williams & Wilkins Awolters Kluwer Company. 88.

Kenneth, T . (2002) . The bacterial flora of Human , University of Wisconsin – Madison . Department of bacteriology

Khurana, S.; Taneja, N. and Sharma, M. (2002). Extended-spectrum beta-lactamase mediated resistance in urinary tract isolates of family enterobacteriaceae. Indian. *J. Med. Res*. Oct.**116**: 145-149

Landraud, L.; Gauthier, M.; Fosse, T.; and Boquet, P. (2000). Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor(CNF1) in nocosomial urinary tract infections. *Lett. Appl. Microbiol*. 30:213–216.

Lawrence,C.; and Nauciel,C.(1998).Production of interleukin -12 by murine macro phage in response to bacterial peptidoglycan .Infect Immun.**66**:4947-4949

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

Lowy,F.D.(1998) . *Staphylococcus aureus* Infections. The N. Engl .J.Med., **339** (8) : 520 - 532.

Macfaddin, J.F. (2000).Biochemical test for bacteria, 3nded.the Williams andWilkins. London. identification of medical Microbiology .8thed .The McGraw-Hill Companies.USA.

Melish,M. E. (1992) . Staphylococcal infection. In Feigin, R. D., and Cherry, J. D., (ed.): Test book of pediatric infections diseases, 3rd. ed. Vol. 2. W. B. Saunders, philadelphia.

Methods . Academic Press. London.. Pp:1-4 .

Microbiology. 49: 489–522.

Munoz, A.; Alvanez, O.; Alonso, B. & Liovo, J. (1999). Lectin tuping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol, **48**: 495-499.

Murphy, G. J.; Pararajasingam, R.; and Nasim, A. (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in vascular surgery patients. Ann. R. Coll. Surg. Engl. **83**: 158-163.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; and Pfaller, M. A. (2009) . John, F. K. Kennedy. Medical microbiology. 6th edition. Mosby Elsevier. U.K

- **Omoe, K.; Ishikawa, M.; Shimoda, Y.; Hu, D. L.; Ueda, S.; and Shinagawa, K.** (2002). Detection of *seg*, *seh*, or *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. J. Clin. Microbiol. **40**: 857-862.

Pamela , R .; DVM .; MPVM . (2001) . Evaluating the effectiveness of Mastitis vaccines . Apractical guide to managing mastitis . University of Wisconis . Madison .

Patel , A .H . ; P . Nowlan . ; E . D . Weavers . and T . Foster . (1987) . Virulance of protein A – deficient and alpha – toxin – deficient mutants of *staphylococcus aureus* isolated by allele replacement . Infect . Immun . **55** : 3103 - 3110.

pathogenic *E. coli*. *FEMS. Immunol Med Microbiol* . 62:1-10.

Pellegrino. R.; Scavone, P.; Umpiérrez, A.; Maskell, D.J.and Zunino, P.(2013). *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *J. Phatho. Dis.*, **2**(67):104-107.

Rochon–Edouard, S.; Pestel–Caron, M.; Lemeland, J. and Caron, F. (2000). In Vitro Synergistic Effects of Double and Triple Combinations of β-Lactams, Vancomycin, and Netilmicin Against Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. Antimicrob. Agents Chemother., **44**:3055-3060.

Roder,B. L. ; Wandall, D. A. ; Moller, N. F. ; Espersen, F. ; Skinhoj, P. and Rosdahl, V. T. (1999). Clinical features of staphylococcus aureus endocarditic. Arch. Intern. Med. **159** : 462-469.

Russo, T.A. and Johnson, J.R.(2003). Medical and economic impactof extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*. 5: 449-456.

Ryan, K. J.; and Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology 4th ed. McGraw-Hill-NewYork

Sosa,V. ; Schlapp,G and Zunino,P.(2006). *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. *Microbiol*. **152:**2149.

Swierzko, A.S.; Kirikae, T.; Kirikae, F.; Hirata, M.; Cedzynsk, M.; Ziolkowski, A.; Hirai, Y.; Kusumoto, S.; Yokochi, T.;and Nakano, M.(2000). Biological Activities of Lipopolysaccharides Of *Proteus* Species & Their Interactions With Polymyxin-B and An 18-Kda Cationic Antimicrobial Protein (cap 18) Derived Peptide. *J.Med.Microbiology*. **49**(2): 127-138.

Tiba , M.R.; Yano, T. and Leite D. S.(2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev. Inst. Med. Trop.Sao. Paulo. 50.5:255–60.

Todar,K. (2002). Staphylococcus. J. Med. Microbiol, 1-9.

Tornos,P. ; Almirante, B. ; Mirabet, S. ; Permanyer, G. ; Pahissa, A. and Soler, J. S. (1999). Infective endocarditis due to *staphylococcus aureus*. Arch. Intern. Med. **159** : 433-475.

Whitfield, C. and Roberts, I. S. (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* 31:1307–1319.

Zadik, P.M.; Davies, S.; Wttittaker, S. and Muson, C. (2001). Evaluation of new selective medium for methicillin-resistance *Staphylococcus aureus.* J. Med. Microbial. **50**:476-479.