جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية/ كلية التربية

قسم علوم الحياة

التحري عن العنقوديات السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم والمنتجة للغشاء الحيوي

(Coagulase – negative staphylococci)

بحث مقدم إلى

رئاسة قسم علوم الحياة/ كلية التربية/جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

من قبل الطالب

مصطفى نزار نظيم

بإشراف الدكتورة

أ. د. أزهار نوري الموسوي

١٤٤٠ هـ

٢٠١٩ م

وَإِن يَمْسَسْكَ اللَّهُ بِضُرٍّ فَلَا كَاشِفَ لَهُ إِلَّا هُوَ ۖ وَإِن يُرِدْكَ بِخَيْرٍ فَلَا رَادَّ لِفَضْلِهِ ۚ يُصِيبُ بِهِ مَن يَشَاءُ مِنْ عِبَادِهِ ۚ وَهُوَ الْغَفُورُ الرَّحِيمُ(١٠٧)

سورة يونس ١٠٧

صدق الله العلي العظيم

الإهداء

إلى نور الهدى وبيريق الحق ومصدر النعمة ونـبي الرحمة .... محمد واله الكرام (ص)

والى أستاذتي ومشرفتي وأختي العزيـزة الـدكتورة أزهـار نـوري الموسـوي عرفـاً واعتـزازاً واحترامـاً لجنابها الكريم

إلى مـن فـتح أمـامي أفـاق المسـتقبل .... والـدي العزيزين

إلى رمز الإخاء والصدق ..... إخوتي وأخواني

إقرار المشرف

اشهد أن مشروع البحث " **التحري عن العنقوديات السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم والمنتجة للغشاء الحيوي** " اجري تحت أشراف أ. د أزهار نوري في قسم علوم الحياة – كلية التربية جامعة القادسية وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

التوقيع:

الاسم : أ.د. أزهار نوري الموسوي

اللقب العلمي :

التاريخ : / ٢٠١٩/٤

الخلاصة..... Summary

تم الحصول على عزلات الدراسة والبالغ عددها 10 عزلات من مختبر الدارسات العليا كلية التربية والتي تعود الى بكتريا المكورات العنقودية السالبة لفحص الكواكيوليز . تم التأكد من عائديه هذه العزلات بعد أجراء فحص الكواكيوليز والتي ظهرت جميع هذه العزلات سالبيتها لهذا الفحص .

اجري اختبار انتتاج الغشاء البلازمي لهذه المجموعة من البكتريا باستخدام طريقة صيغة الكونفو أظهرت 7 عزلات (70%) قدرتها على إنتاج الغشاء الحيوي والذي يلعب دوراً مهما في انتشار مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحيوية .

المقدمة..... Introduction

تعد العنقوديات السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم staphylococci(CONS)

(Coagulase– Negative) من الفلور الطبيعة للجلد والأغشية المخاطية للإنسان وبعض اللبائن والطيور (Asangi *et al*,2011) وتعتبر من البكتريا الانتهازية التي تظهر قدرتها المرضية عند المرضي الذين يعانون من الضعف المناعي (patients Immunocompromised) وحالات الأمراض المزمنة والمرضى الراقدين لمدد طويلة في المستشفى (jean–Baptiste *et al* , 2011) إذ تدخل مجرى الدم وتسبب إصابات في جهاز الدوران سيما في الحالات المصاحبة لاستخدام بعض العدد الطبية كأنابيب القسطرة ومن فروع الدم للمرضى في المستشفيات

(AL. Mazroea ,2009) .

وتعد من اهم الأنواع البكتيرية المسبب للاخماج المكتسبة من المستشفيات (Nosocomial In Factions) اذا تمتاز بقدرتها على نمو في مديات حرارية من 15– 43^{o} وتحملها الملحي Nacl 15% ومقاومة للتراكيز المنبسطة الدنيا لبعض المطهرات الشائعة فضلا عن مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية . تنتج بعض أنواعها سموم معوية خارجية مسببة التسمم الغذائي .

أن اغلب اليات المقاومة في المكوران العنقودية تستقر لها بلازميدان مما يوفر فرصة لانتقال هذه المقاومة إلى الأنواع والأجناس أخرى (Ternes *et al* .; 2013)

إن قدرة هذه الأنواع على التعايش داخل المستشفيات مكنتها من اكتساب المقاومة للعديد من المضادات الحيوية وصلت 100% لمركبات B-lactam و 80% للمثيسلين وهي نسب تفوق أحيانا مقاومة النوع S. *aureus*

(Jacques *et at* .; 2000)

هناك تقارير عديدة تشير إلى قدرة النوع S. *epidermidis* على إصابة عضلة القلب (Endocarditis)، . وحدات الخمج في العديد من الحالات المصاحبة لاستخدام العدد الطبية العلاجية وخاصة أنابيب القسطرة وقدرة هذا النوع على أحداث التهابات الحروق والأذن والسبيل البولي (Duah,2010) .

تكمن خطورة العنقودية في قدرتها على التعايش مع أنواع البكتيرية الأخرى ونقل مقاومة المقاومة البلازميدية اليها من يفرز دورها الوبائي داخل المستشفيات

(Aires *et al* ,2000)

الامراضية..... (pathogenicity)

صنف 14 نوع من البكتريا العنقوديات CONS ذات علاقة بالأسنان فهي قادرة على إصابة أجهزة الجسم المختلفة ابتداء من الجلد حتى القلب والنخاع الشوكي ، وذلك لامتلاكها للعديد من عوامل الضراوة ومقاومتها العالية والمتعددة للمضادات الحيوية والمطهرات فضلا عن القدرة على التحمل الملحي (Turkyilmaz and kaya,2016) أن الأعراض التي تسببها CONS عادة تتكون مخفيه وغير نوعية والمراحل السريرية للإصابة تكون في الطور تحت الحاد أو المزمنة بدون أعراض واضحة . (Bannerman ,2003:) تنشط CONS في حالات الضعف المناعي والأمراض المزمنة خاصة عند الراقدين في المستشفى ويرتفع مستوى أمراضها عندما تتوفر لها وسيلة لدخول الجسم إذ تعد من الجراثيم الممرضة الانتهازية

(Bannerman2003) ان لها القدرة على خمج الجهاز التنفسي والبولي والتناسلي الأنثوي وخمج عقله القلبي والعظم والعيون والثدي والإذن الوسطى والجروح والحروق والمشاركة في التهابات أخرى (Al.Ghraiy,2007)

المواد وطرائق العمل

١-**العزلات قيد الدراسة** : تم الحصول على عزلات الدراسة من مختبر الدارسات العليا في قسم علوم الحياة – كلية التربية وتم التأكد من العزلات بأجراء فحص أنزيم التخثر .

فحص أنزيم التخثر .....Coagula Test

هو فحص تفريقي بين أنواع المكورات العنقودية وتم بطريقة الشريحة (Slide coagulase) وذلك بعمل معلق بكتري من مستعمرات بكترية مع قطرة من الماء المقطر المعقم أو ما يعادل (0.05) على شريحة زجاجية حين اخذ بعض الاعتبار مجانسة العالق ثم أضيف للعالق 0,5 من بلازما دم الأرنب ومزج جيدا فكانت النتيجة موجبة عند تكتل العالق خلال 10 ثواني بعدها كانت النتيجة سالبة وقورنت مع عينة السيطرة السالبة المتمثلة بالعالق البكتريا مع الماء المقطر .

٢- التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm

درست قدرة البكتريا على إنتاج المادة المخاطية باستخدام دسوا كار الكونفو الأحمر congo–RedAgar Medinm (CRA)

لقحت العزلات البكتريا قيد الدراسة على وسط CRA و CRA المحور بواقع ثلاثة مكورات لكل عزلة بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة ثم تراكم الأطباق لمدة ٤٨ ساعة بدرجة حرارة الغرفة بعد انتهاء التحقين ثم تحديد النمو المظهري لإنتاج المادة المخاطية وقسمت العزلات إلى

١-**عزلات منتجة للمادة المخاطية بغزارة** Strong positive تظهر بشكل مستعمره سوداء أو رمادية مائلة إلى الأسود ذات تالف بلوريا

٢- عزلات منتجة ضعيفة weakch moderate **للمادة المخاطية**

تكون مستعمرات بنية ذات سوداء في مركز المستعمرة

٣- عزلات غير منتجة للمادة المخاطية Negative

تظهر بشكل مستعمرات حمراء أو وردية مع تحول لون الوسط إلى الأسود (Khan et al ,2011)

النتائج والمناقشة..... Results and discussion

تم التأكد من العزلات التي حصلنا عليها من مختبر الدارسات العليا في قسم علوم الحياة – كلية التربية والبالغ عددها ١٠ عزلات بأجراء اختبار أنزيم تخثر البلازما للتأكد من أن جميع العزلات كانت نتيجة سالبة لهذا الفحص باستخدام صبغة احمر الكونفو .

اجري اختبار التحري عن إنتاج عزلات بكتريا المكورات العنقودية السالبة لفحص أنزيم تخثر البلازما لإنتاج الغشاء الحيوي إذ ظهرت العزلات إيجابية لهذا الفحص وبنسبة ٧٠%

اذا تبين أن ٧ عزلات كانت منتجة للغشاء الحيوي .

جدول (١) قابلية عزلات بكتريا المكورات السالبة لفحص الكواجيوليز على إنتاج الغشاء الحيوي

العزلات	إنتاج الغشاء الحيوي
S. saprophyticus	+
S. saprophyticus	–
S. saprophyticus	–
S. saprophyticus	+
S. saprophyticus	+
S. saprophyticus	+
S . xyloses	+
S . xyloses	–
S . xyloses	+
S . xyloses	+

منتجة = +

غير منتجة = –

شكل (١) : عزلة منتجة الغشاء الحيوي

أشارت التقارير إلى ارتفاع نسب CONS في اخماج الدم

(Maria *et al,*2002) وبينت الدارسات إلى امتلاك بعض أنواعها لعامل التصاق والمكون من مصدر السكريات يمكنها من الالتصاق على العدد الطبية البلاستكية وخاصة أنابيب القسطرة وتشكل غشاء حيوي مخاطي يعرف (Biofilm) يعمل على حماية البكتريا من دفاعات المضيف ويمنع وصول المضاد الحيوي للبكتريا (Holger *et al* ,2004) يتواجد الغشاء الحيوي في كل مكان على الصخور والأحجار في الأنهار أو مجاريها كما هو الحال في تواجده على الأنسجة الحية كمينا الأسنان وفي الممر المعدي – المعوي والمجرى البولي ، وقناة الأذن الوسطى حيث انه يتواجد بالقرب من أنواع الكائنات المجهرية التي تملك اليات تمكنها من الالتصاق

(Bendouah *et at*., 2006) يعد الغشاء الحيوي مكون مهم في السلسلة الغذائية لانهار ومجاريها تتغذى عليه اللافقريات على أوراق النباتات حين يتميز بكونه خليط من الأحياء المجهرية مع مواد مغذية لهذه الأحياء إضافة إلى المواد البوليميرية خارج الخلايا التي تنتجها تلك الأحياء وهي مواد فعالة لا تتمكن هذه الأحياء من إنتاج هذه المواد عندما تكون منفردة وتلك المواد جعلتها من الصعوبة القضاء عليها من قبل مضادات الحياة والمنظفات والجهاز الخليوي (Xavier *et. al* 2004) ولا تقوم تلك الكائنات المجهرية بتكوين الأغشية الحيوية ألا بعد التصاقها بسطوح داخلية أو بيئة للأوساط التي تتواجد عليها ، حيث تكون استراتيجية تكون الغشاء بنشوء المستعمرات

الأولى على السطح والتي تسببها وصول خلايا أخرى من خلال تجهيز مواقع التصاق متنوعة وتبدا ببناء الأرضية التي يتماسك عندها الغشاء الحيوي حين أن المستعمرات الأولى يتم التصاقها بالسطوح في البداية بمساعدة قوى فاندر فالس (vender Waals forces) وغالبا ما تكون هذه الأحياء المجهرية (المستعمرات الأولى التي تليها) من نوع واحد أو من عدة أنواع من الكائنات المجهرية التي قد تكون بكتريا أو ابتدائيات أو فطريات (fungi) أو طحالب (Alge) (Lappin – Scoot, 2003) وتكون هذه الأحياء مغمورة في النواتج التي تكونها في ذلك الوسط المتواجد عليه وهذه النواتج هي عبارة عن سكريات متعددة ومواد بوليمرية . (Xavier *et al* 2004) كما يتواجد ضمن مواد الغشاء الحيوي جزئيات معدنية ودقائق طينية حسب البيئة التي يكون فيها الغشاء الحيوي (Donlan and Costerton ,2002)ومن امثله الأغشية الحيوية تلك المتواجدة في أنظمة المياه الباردة وهذه الأغشية الحيوية تعمل كناقل مختزل للحرارة في هذه الأنظمة وأيضا هناك اغشيه حيوية في المحيط الصناعي (Fund strialenviri mint) (Lappen – Scot ,2003 , ,2000) يمتاز الغشاء الحيوي بدرجة عالية في التنسيق بحيث يبدو بهيئة تجمعات أحادية النوع أو متعددة الأنواع البكترية فهو قد يتكون من طبقة واحدة مستمرة أو من عدة طبقات وله تركيب ثلاثي الأبعاد أو قد تتخذ أشكالا يقترب بعضها من شكل العرهون (chemielewski and frank,2003) أن مراحل تكون طبقات الغشاء الحيوي

على مينا الأسنان لا تحدث ألا بمساعدة مجموعة من العوامل منها خصائص السطوح الذي يتكون عليها الغشاء الحيوي إضافة إلى خصائص الوسط وخصائص الخلية البكترية . من اجل استمرارية نمو الكائنات المكونة للغشاء الحيوي يتوفر ممرات مائية يتم بواسطتها السيطرة على التبادل الغذائي داخل الغشاء الحيوي وهذا الترتيب بدوره يولد فراغات بينيه بين المستعمرات البكتيرية التي تكونها (Lawrence, *et al* 1991.) ولكي تعمل هذه الكائنات المجهرية على تكوين الغشاء الحيوي لابد من توفر ظروف بيئية مناسبة تتمثل بوجود سطح صلب نصف مغمور ومواد غذائية كافية وتركيز عالي للماء .(Espinosa– Urgle ,2003)

References..... **المصادر**

1-Aires , D.S.Santos , ML. and Lancaster , H.D .(2000) .Epidemiological , study of Staphylococcal colonization and cross- infection in two west African hospital .Microbe .Drug . Resist .6:133-141.

2-AL – Marzroea, A.H (2009). Incidence and Chilnical Significance of Coagulase Negative Staphylococi in Blood . journal of Taibah University Medical sciences 4: 137-147

3-AL- Ghrairy , Z.A.(2007) . Comparative Study on some-pathological aspects between staphylococcus xylosus and Staphylococcus saprophyticus M.SC. Thesis. University of Baghdad. College of science: 5-14.

4-Asangi , S.Y;Mariraj , J ; stathyanarayan , M.S, Nagabhushan , and Rashmi , A .(2011) , Speciation of clinically significant patterns in a tertiary care hospital .i nt J.Biol .Med .Res,2(3) :735-739.

5- Bannerman, T.L. (2003) Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A. and Yolken, R.H., Eds., Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition, American Society for Microbiology, Washington DC, 384-404.

6- Bendough, Z,Barbeau , J,Hamad, W.and Dressier, M (2006) . Biofilm formation by staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa is associated with and an unfavorable evolution surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis "Otolaryngology " had and neck surgery :134(6)

7- Chmielowski , R.A .and Frank, J.F (2003) . Biofilm formation and control in food processing facilities .J. CRFSFS .2.22-32.

8- Donavan , R.M .and Casterton , J.W (2002) . Biofilm : microbial life on surface .Emerging infectious diseases .8(9) :881-890.

9- Duah , M (2010) , Daotomycin for methicillin –resistant Staphylococcus epidermidisa native –valve – valve endocarditis : a case report . Amal's of Clinical Microbiology and Antimicrobials , 9:9 .

10- Espinosa – Urge , M .(2003) . Resident parking only : rhammolipids maintain fluid channels in biofilms . J.bacterial .185(3) :699-700

11- Holger , R;Mathios , k . and Dietrich , M.(2004) .Detection of virulence - associated genes not useful for discrimination between and commensal staphylococcus epidermidis strains from a bone marrow transplant unit .J. Clin .Micro .42:5614-5619.

12- Jacquse ; Anne M . and Nevin , E .(2000) Phenotypic and molecular typing of nosocomial methicillin –

resistant staphylococcus aureus strain susuepitble to gentamicin isolated in France from 1995 to 1997. ASFM38:185-190.

13- Kareachalisos GN; Zhon , Y; Gadina , M; Lipsky , p.and Sigel , R,(2006) .Splenic abscess due to staphylococcus lentus a rare entity Scand .J. Infect .Dis 38:708-710.

14- Khan , F . Shukla . I . Rizvi . M; Mansoor , T ; Sharma , S.C. (2011) . Detection of formation in staphylococcus aureus . Does it have a role in treatment of MRSA infections ? Trends in Med . Res . Academic J .6 (2) ,116-123.

15- Lappin – Soctt , Hilary .(2003) .Mricrobial Biofilms .Cambridge : University .

16- Lawrence korber , D.R,Hoyle , B.D , Casterton , J.W. and Coldwell , D.E (1991) .Optical sectioning of microbial biofilms . J. bacterial .173(20) :6558-6567.

17- Maria , M; Couto , I . and Sandra of . F. (2002) . Molecular characterization of methicillin resistant staphylococcus epidermidis clones .ASFM .clin. microbial 40:430-438.

18- Turk Yilmaz, S. and kaya , O.(2006) .Determination of some Virulence Factors ib staphylococcus spp. Isolated from Various Clinical Samples . Turk J Vet Anim Sci , 30:127-132.

19- Xavier , J.B, Picioreaun, C. Vanloosdrech , M.C.M (2004) . Assessment of three –dimensional biofilm models through direct comparison with con focal microscopy imaging . water scitchnol .49:11-12.