Isolation & Identification Coagulase Positive Staphylococci From Different Clinical & Food sample & Study Some factor Effecting on enzyme Production.

عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية المنتجة لانزيم مخثر البلازما من عينات سريرية وغذائية مختلفة ودراســـة بعض العوامل المؤثرة فـــي انتاجه0

براك ثامر شبيب السالمي / جامعة كربلاء – كلية العلوم – قسم علوم الحياة
ا. م. د. ذكرى عدنان جواد / جامعة كربلاء - كلية العلوم – قسم علوم الحياة
المراسلات الى : ا. م. د. ذكرى عدنان جواد
التخصص الدقيق:- بكتريا مرضية رقم الموبايل:- 07814435945
البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول

الخلاصة:-

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جراثيم المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci,CPS) من عينات سريرية بلغت (102) عينة من مستشفيات مدينة كربلاء المقدسة (مستشفى الحسين(ع) العام ومستشفى كربلاء للأطفال) وشملت المسحات الأنفية ، المسحات الأذنية ، المسحات الجلدية ،مسحات الحروق ، مسحات الجروح ، مسحات صالات العمليات وعينات الإدرار وكذلك العينات الغذائية والتي بلغت (35) عينة وشملت عينات الأجبان ، عينات الألبـــان ، عينات اللحـــوم وعينات البوظـــة للفترة بين (15 نيسان- 15 تموز2014) 0شكلت المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) المتحصل عليها نسبة (39.13% ،60.86%) للعينات السريرية والعينات الغذائية على التوالي وتم تشخيص نوعين من المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) وهما *S. aureus* و*S. hyicus* وتم دراسة الظروف المختلفة لإنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) لكل النوعين المدروسين ولوحظ أن هنالك تشابهاً كبيراً في تلك الظروف ما عدا بعض الاختلافات 0أشارت النتائج أن وسط Chemical defined medium أدى إلى زيادة في إنتاج الانزيم في كلا النوعين قيد الدراســـة ولوحظ أن درجة الحرارة (37) م والأس الهيدروجيني (7.5) وفترة حضن (.24hrs) واستخدام حاضنة هزازة بسرعة (100) هزة أدت كلها إلى زيادة إنتاج الانزيم في كلا النوعين المدروسين0 حيث جاءت هذه الدراسة لتحقيق الأهداف التالية:-

1- عزل وتشخيص المكـــورات العنقوديـــة الموجبـــــة لأنزيم مخثر البلازما CPS من مصادر سريرية وغذائية مختلفة0
2- دراسة الظروف المختلفـــة لإنتاج انزيـــم مخثر البلازما من قبل المكـــورات العنقوديـــة الموجبة للأنزيم CPS0

الكلمات المفتاحية:- انزيم مخثر البلازما،S.*aureus*

Summary:-

The study include isolate and diagnosis the Coagulase Positive Staphylococci bacteria from (120) clinical sample of hospitals holy city of Karbala (General Al Hussein Hospital،Karbala Children Hospital) included Nasal swabs, Ear swabs, skin swabs, Burn swabs, Wound swabs, Operation swabs and Urine sample as well as food samples which included samples of cheese, Dairy Yoghurt sample, samples of meat and ice cream sample for the period (April 15 to Jule 30 , 2014).

CPS formed ratio ((٪39.13 , ٪60.0)) of clinical and food samples respectively, Also been diagnosed tow species of CPS (*S. aureus* and *S. hyicus*) , and 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 t temperature (37) C, pH (7.5), incubation time (24 hrs.) & incubator shaking (100 rpm) which led to increased production of the enzyme for both types.

المقدمة:-

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 العلوية 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 المركز الطبية كذلك تسببها بالعديد من الأخماج المرتبطة بالمستشفيات (Nosocomial infection) خاصة في وحدات العناية المركزة ووحدات الحروق[1] 0المكورات العنقودية *Staphylococcus* هي جراثيم تتميز بشكلها الكروي المنتظم ويتراوح قطرها بين µm (0.5-1.5) ، موجبة لملون گرام تنقسم خلاياها إلى أكثر من مستوى لتعطي أشكالاً ثنائية أو رباعية أو قد تكون على هيئة تجمعات عنقودية غير منتظمة 0 وهي غير متحركة ، غير مكونة للسبورات وغير مكونة للكبسولة عدا بعض الأنواع وتنمو في أوساط تحتوي على Nacl 010%مستعمراتها دائرية ، محدبة ومعتمة قطرها mm (2-3) لها ألوان مختلفة صفراء ذهبية أو بيضاء ذات تحبب كريمي أو طبقة لامعة سوداء مع سطح أبيض دقيق ومحاط بهالة شفافة [2]0 قسم جنس المكورات Staphylococci حديثاً على قسمين رئيسين هما المكورات العنقودية غير المنتجة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Negative Staphylococci ,CNS) والمكورات العنقودية المنتجة لانزيم مخثر البلازما (Coagulase Positive Staphylococci ، CPS) إعتماداً على إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase enzyme) والذي يسبب تجلط بلازما الدم الى خثرة (Clot) 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 المختبرية0

المواد وطرائق العمل :

عزل المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS)0

تم الحصول على العينات السريرية لجميع الأعمار من مستشفى الحسين (ع) العام في كربلاء المقدسة 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 ، كذلك تم الحصول على العينات الغذائية من الباعة المتجولين إذ تم جمعها في أنابيب إختبار نظيفة ومعقمة وتم استخدام بعض الأوساط الزرعية لعزل المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما وكذلك لغرض التشخيص وإجراء الاختبارات البايوكيميائية كالأوساط الزرعية الجاهزة مثل وسط Mannitol Salt Agar ووسط Brain Heart Infusion broth ووسط Urea Agar base والاوساط الزرعية التحضيرية كالوسط المعرف كيميائيا (CDM) ووسط Schleifer and Krämer agar ووسط Baird-Parker Agar 0

تشخيص المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS)0

تم انتخاب المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية بعدها تم إجراء عدداً من الفحوصات التشخيصية لجميع العزلات إعتماداً على طريقة[4] لتشخيص المكورات العنقودية كذلك تم إستعمال نظام API System الخاص ببكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* لتشخيص الأنواع التابعة لهذا الجنس حيث شخصت العينات أولياً بملاحظة الصفات المزرعية للمستعمرات النامية من ناحية شكل المستعمرة ، حجمها ، ارتفاعها ، حافاتها ، لونها وتأثيرها في الوسط مثل تحلل الدم وتخمر المانتول وأجري كذلك الفحص المجهري لمعرفة إستجابة العزلة البكتيرية لملون گرام0

الفحوصات البايوكيميائية (Biochemical Test)0

تم إجراء عدداً من الفحوصات البايوكيميائية والموضحة في الجدول أدناه:

جدول رقم (1) أنواع الإختبارات البايوكيميائية التي تم إجراءها على بكتريا المكورات العنقودية

ت	الإختبارات الكيموحيوية
-1	صبغة گرام
-2	فحص الأوكسيديز
-3	فحص الكاتالايز
-4	إنتاج الهيمولايسين
-5	إختبارفوكس بروسكور
-6	تحليل اليوريا
-7	قابلية الحركة
-8	إستهلاك السترات
-9	تخمر السكريات
-10	إختبار مخثر البلازما بالأنبوب
-11	إختبار مخثر البلازما بالشريحة

الكشف عن إنتاج مخثر البلازما (Coagulase Test)
أولاً:- الطرق النوعية (Qualtitative Method)

1- إختبار الانبوب (Tube Coagulase Test)

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[3]**0**

2- اختبار الشريحة (Slide Coagulase Test)

تم إستخدام شريحة زجاجية وضع عليها قطرة من بلازما الأرانب ثم أضيف اليها مستعمرات فتية من بكتريا المكورات العنقودية بعمر (18-24) ساعة في وسط Brain heart infusion agar ومزجت جيداً ، إن ظهور التكتل خلال (5-10) ثانية دلالة على إيجابية الإختبار كذلك تم إستخدام شريحة زجاجية أخرى ووضع عليها قطرة من العالق البكتيري مع المحلول الفسلجي والتي تمثل السيطرة السالبة [5] 0

ثانيا:- الطرق الكمية (Quantitative Method)

1- اختبار صب الاطباق (Pour – Plate Test)

تم إستخدام وسط Brain Heart Infusion Agar المضاف اليه البلازما بتركيز (15%- 12 حجم / حجم) بعدها تم صب الوسط في أطباق بتري المعقمة وتركه حتى يتصلب حيث تم تلقيح الأوساط بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة بطريقة التخطيط بعدها تم الحضن بدرجة حرارة (37) م ولمدة (24) ساعة إن ظهور هالات كثيفة حول المستعمرات دلالة على إيجابية الإختبار بعدها تم قياس قطر الهالات المتكونة [6] 0

2-- إختبار الإنتشار في الشريحة (Diffusion slide assay)

تم إستخدام وسط Brain Heart Infusion Agar المضاف إليه البلازما بتركيز (15%- 12 حجم / حجم) ثم تم 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 تم ملئ 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 المتكونة [7] 0

تحديد العوامل المؤثرة في انتاج وفعالية (Coagulase) من قبل المكورات العنقودية:-

تم دراسة عددا من العوامل المؤثرة في انتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من قبل المكورات العنقودية وقد اشتملت هذه العوامل على:-

1- الوسط الزرعي
2- درجة الحرارة والحضن
3- الاس الهيدروجيني
4- نوع الحضن وعدد الهزات
5- نوع البلازما

النتائج والمناقشة :

العـــزل

إن عدد عزلات المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما (CPS) التي تم الحصول عليها من العينات السريرية من جميع عزلات المكورات العنقودية هي (14) عزلة وعند المقارنة مع نتائج الباحث [8] والذي أستحصل على (87) عزلة من المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مخثر البلازما (CPS) من بين (144) عزلة من المكورات العنقودية (Staphylococci) والتي تظهر التقارب مع نتائج الدراسة الحالية وكذلك فان عدد عزلات المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مخثر البلازما(CPS) التي تم الحصول عليها من العينات الغذائية من جميع عزلات المكورات العنقودية هي (3) عزلات من أصل (5) عزلات تشكل نسبة (60%) وهذا يقارب تقريباً ما وصل إليه الباحثان [9] واللذان إستحصلا على (26) عزلة من المكورات العنقودية الموجبة لأنزيم مخثر البلازما (CNS) من بين (46) عزلة من المكورات العنقودية من العينات الغذائية 0 إن إختلاف النسب المئوية التي تم الإستحصال عليها توافق أو تختلف مع دراسات سابقة أخرى ويعود التوافق والاختلاف إلى جملة من الأسباب يقع في مقدمتها اختلاف 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 البيئة التي اخذت منها العينة والأدوات المستخدمة**0**

التشخيص

تم تشخيص العزلات البكتيرية المعزولة من كافة العينات الغذائية والسريرية وفقاً إلى [4] و ظهرت بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci) خلايا موجبة لملون گرام ذات شكل كروي (Spherical cells) بقطر(1) µm تقريباً متجمعة بشكل عناقيد العنب (Cluster of grapes) وتكون بأشكال مفردة كروية (Single cocci) أو أزواج (Pair) أو رباعية 0 (Tetrad)

الصفات البايوكيميائية (Biochemical Characteristics)

تم إخضاع العزلات البكتيرية قيد الدراسة إلى إختبارات بايوكيميائية عدة فظهرت كافة العزلات موجبة لفحص الكتاليز (Catalase test) كما أجري فحص الأوكسيديز (Oxidase test) والتي ظهرت فيه جميع العزلات أنها سالبة بعد تشخيص العزلات على مستوى الجنس تم تميزها على مستوى النوع ، وذلك بالإعتماد على فحص انزيم المخثر للبلازما (Coagulase) بطريقة الأنابيب (Tube coagulase test) وطريقة الشريحة (Slide coagulase test) حيث أبدت جميع العزلات التي أعطت مستعمرات صفراء على وسط الـ Mannitol salt agar فحصاً موجباً لكلا الاختبارين فيما أعطت المستعمرات البيضاء النامية على نفس الوسط نتيجة سلبية للاختبارين عدا عزلة واحدة هي A10 والتي ظهرت مستعمراتها بيضاء على وسط الـ Mannitol salt agar أعطت فحصاً موجباً لـ Tube coagulase test ونتيجة سالبة لاختبار الشريحة (Slide coagulase test) ، وحيث أن فحص إنتاج الانزيم المخثر للبلازما قد يظهر نتائج كاذبة أحياناً بسبب نوع وطبيعة البلازما المستعملة ومدة الحضن ودرجة التخثر ، فضلاً عن إمكانية إنتاج هذا الانزيم من نوع بكتيري آخر[10] الأمر الذي دعانا إلى إخضاع العزلات البكتيرية قيد الدراسة إلى الأمر الذي دعانا إلى إخضاع العزلات البكتيرية قيد الدراسة إلى إختبارات بايوكيميائية أخرى وكما هو موضح في الجدول (2) 0

جدول (2) نتائج إختبارات الكيوحيوية والفسلجية المستخدمة في تشخيص بكتريا *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

تأثير الظـــروف المختلفـــة فـــي إنتاج وفعاليـــة (Coagulase) من قبل المكـــورات العنقوديـــة

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

أستخدمت في هذه الدراسة عدة أوساط زرعيه لإنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من العزلات البكتيرية ، حيث يتبين من الجدول رقم (3) أن عزلات بكتريا *S.aureus* أعطت أعلى إنتاجية للانزيم على وسط (Chemical defined medium ‹CDM›) لوحظت من خلال أقطار الهالات الكثيفة على الأوساط الزرعية لعزلات بكتريا S.aureus والموضحة بالرموز (A1 الى A9) كما لوحظ إنخفاض إنتاجية الانزيم على الأوساط الأخرى مقارنة مع الوسط (CDM) وأعطت عزلة بكتريا *S. hyicus* والتي تحمل الرمز A10 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 بينما أنعدم تماماً إنتاجها للانزيم على وسط Nutrient broth وتتفق النتائج مع ما ذكره [11] إلى أن هذا النوع من المكورات العنقودية يقوم بإنتاج كمية قليلة من انزيم مخثر البلازما (Coagulase) مقارنة مع المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*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 [12]0

جدول (3): تأثير نوع الوسط الغذائي في انتاج مخثر البلازما (Coagulase) من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)0

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة على مختلف الأوساط الزرعية (بالملم)					
	Chemical defined medium	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	1.667	1.667	◊1.000	¤0.000
المعدل	4.233	3.333	2.733	2.533	1.817	1.550

* فرق معنوي عند مستوى احتمالية(0.05

◊ الانتاجية القليلة من الانزيم ¤ انعدام انتاج الانزيم

2- تأثير درجة الحرارة في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase)

درس تأثير درجة الحرارة في انتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) من العزلات البكتيرية قيد الدراسة بإستخدام درجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25 ، 30 ،37 ، 40) م حيث يتضح من الجدول (4) أن أعلى إنتاجية من خلال قياس معدل قطر الهالات لعزلات *S.aureus* عند درجة حرارة 37 م مقارنة مع بقية الدرجات الحرارية الأخرى والي أبدت إنخفاضاً ملحوظاً في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) 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 تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج (Sturm *et al.*,2008) والذي أوضح إستخدام درجة حرارة 37 م في إنتاجية انزيم مخثر البلازما (Coagulase) 0

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 سلبا او إيجابا في إنتاجية الانزيم [13] 0

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

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة على مختلف الدرجات الحرارية (بالملم)			
	25 مº	30 مº	37 مº	40 مº
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	3.147

* فرق معنوي عند مستوى احتمالية(0.05)

◊ الانتاجية القليلة من الانزيم ¤ انعدام انتاج الانزيم

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

درس تأثير الرقم الهيدروجيني على إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase) عند قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني ويبين الجدول رقم (5) أن الرقم الهيدروجيني (7.5) أعطى أكبر قطر للهالات على الوسط الزرعي لعزلات بكتريا *S.aureus* مقارنة مع بقية الأرقام الهيدروجينية والتي أبدت انخفاضا بإنتاج الانزيم كما لوحظ أن عزلة *S. hyicus* كانت الأوطأ في إنتاجيتها للأنزيم مقارنة مع بقية العزلات وعلى كافة الأرقام الهيدروجينية حيث بلغ أعلى إنتاج لها بقياس قطر الهالة المتكونة (4.833) ملم عند الأس الهيدروجيني 7.5 في حين لوحظ أقل انتاجية لها بقياس قطر الهالات المتكونة عند الارقام الهيدروجينية (5.5 ، 6 ، 8.5) على التوالي كذلك لم يلاحظ لها أي إنتاجية عند الأرقام الهيدروجينية (4 ، 4.5 ، 5 ، 9) وتتفق النتائج التي تم الاستحصال عليها مع [14]0

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 وانتاجها للأنزيمات[15] 0

جدول (5): تأثير الأس الهيدروجيني في إنتاج انزيم Coagulase من عزلات بكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci)

العزلات البكترية	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	3.417	2.500	3.083	3.600	4.283	4.983	6.217	4.713	3.300	2.200

* فرق معنوي عند مستوى احتمالية(0.05)

◊ الانتاجية القليلة من الانزيم ¤ انعدام انتاج الانزيم

4- تأثير نوع الحضن وعدد الهزات في جهاز الهزاز في إنتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase)

لوحظ من خلال الجدول (6) ان أعلى إنتاجية للأنزيم قد سجلت عند إستخدام حاضنة هزازة عدد هزاتها (100) هزة في كلا النوعين *S.aureus, S.hyicus* من خلال ملاحظة قياس أقطار الهالات على الوسط الزرعي وتتفق النتائج التي استحصل عليها مع [16] ويمكن تفسير ازدياد إنتاجية الانزيم بواسطة الحاضنة الهزازة عما هو عليه في الحاضنة الثابتة إلى أن المكورات العنقودية (Staphylococci) هي كائنات هوائية حيث تتوفر نسبة أكبر من الهواء باستخدام الحاضنة الهزازة كذلك نفسر انخفاض إنتاجية الانزيم باستخدام عدد هزات قدرها (150، 200) على التوالي إلى أن زيادة الرج يمكن أن تؤدي إلى دنترة الانزيم (Denaturation) وبالتالي تغيير في تركيبه [17]0

جدول (6): 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		
		100 هزة	150 هزة	200 هزة
A1	6.166	7.833	3.667	2.167
A2	5.166	7.333	3.500	2.167
A3	6.00	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	6.00	7.333	3.167	2.333
A8	6.166	**8.333	4.333	◊2.167
A9	5.50	7.333	3.500	◊2.167
A10	◊3.833	*4.500	2.333	◊1.167
المعدل	6.1293	7.333	3.450	2.263

* فرق معنوي عند مستوى احتمالية(0.05)

◊ الانتاجية القليلة من الانزيم ¤ انعدام انتاج الانزيم

5- تأثير نوع البلازما في فعالية انزيم مختثر البلازما (Coagulase)

نلاحظ من الجدول رقم (7) أن أعلى فعالية للأنزيم لوحظت عند إستخدام بلازما الأرانب في بكتريا *S. aureus* من خلال قياس قطر الهالات المتكونة على الوسط الزرعي كما لوحظ أن أعلى فعالية للأنزيم عند إستخدام بلازما الأرانب وبلازما الخراف من خلال قياس قطر الهالات المتكونة في بكتريا *S.hyicus* ويتفق هذا النتائج لما ذكراه [18] 0

ان إنزيم مختثر البلازما Coagulase يحتاج في عمله الى مكونات البلازما (Coagulase –reacting factor، CRF) 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 احتوائه على CRF [19]

جدول (7): تأثير نوع البلازما في فعالية انزيم (Coagulase) من المكورات العنقودية(Staphylococci)

العزلات البكتيرية	قطر الهالات المتكونة على أنواع مختلفة من البلازما (بالملم)			
	بلازما الارانب	بلازما الانسان	بلازما الابقار	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

* فرق معنوي عند مستوى احتمالية(0.05)

◊ الانتاجية القليلة من الانزيم ¤ انعدام انتاج الانزيم

الاستنتاجات

نستنتج من الدراسة ما يأتي :

1- لا يوجد هنالك أي فرق في إنتاج انزيم مختثر البلازما (Coagulase) في كلا النوعين *S.aureus* و*S.hyicus* في الظروف الفيزيائية المختلفة كدرجة الحرارة وطول فترة الحضن ونوع الحضن وكذلك الرقم الهيدروجيني 0

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

التوصيات

1- التعمق في دراسة انزيم مختثر البلازما ودوره في إحداث الإصابـــــــــــــة والإمراضيــة0

References :

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

[2]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.

[3]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.

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

[5]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.

[6]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.

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

[8]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.

[9]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.

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

[11]Turutoglu , H. ; Tasci , F. & Ercelik , S. **(2005)**. detection of *Staphylococcus aureus* in milk by tube coagulase test. bull vet inst pulawy 49: 419-422.

[12]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.

[13]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.

[14]Delbes , C.; Alomar, J. and 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

[15]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.

[16]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

[17] 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. Vol. 4, No. 3.

[18]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.

[19]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.p(1-7)