# Study The Effect of Some Antibiotics on Some Species of Gram Positive Bacteria Causing Mastitis in Buffaloes in Baghdad Province

# دراسة تأثير بعض المضادات الحياتية على الجراثيم الموجبة لصبغة كرام المسببة لالتهاب الضرع في الجاموس في محافظة بغداد

د.اسعد خلف طلال
مركز بحوث السوق وحماية المستهلك – جامعة بغداد


## الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة جمع 100 عينة حليب عشوائيا من الجاموس في حقول مختلفة من محافظة بغداد(الفضيلية) للمدة من شباط 2009 إلى حزيران 2009 بطريقة معقمة وأجري اختبار وايت سايد Whiteside test على الحليب لمعرفة الإصابات تحت سريريه وتفريقها عن السليمة منها أما الحالات المصابة سريريا فقد سجلت من الحقل من خلال العلامات السريرية ومن صاحب الحقل وكان عدد حالات الإصابة السريرية 10 بينما عدد حالات الإصابة تحت السريرية 12 .

فحصت العينات بعمل زرع جرثومي على أكار الدم ثم شخصت الجراثيم التي تم الحصول عليها اعتمادا على الصفات المظهرية والمجهرية وعلى نتائج الاختبارات التشخيصية الأولية والكيموحيوية والتأكيدية حيث استخدم اختبار الـ Analytic profile index للتأكد من نوع الجراثيم المعزولة.

بينت الدراسة سيادة جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus* على بقية الجراثيم الموجبة لصبغة كرام حيث عزلت من (14) حالة عزله تلتها جراثيم من جنس المكورات السبحية *Streptococcus* التي تمثلت بـ(6) عزلات وبعدها( 2) عزلات من جنس الوتديات *Corynebacterium* عزله واحدة كانت عصيات سالبة لصبغة الكرام.

اجري اختبار حساسية الجراثيم لسبعة من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال في علاج حالات التهاب الضرع في الجاموس والمتمثلة بـ (السيبروفلكساسين Ciprofloxacin , والجنتامايسين Gentamicin , والبنسلين Penicillin , والتتراسايكلين Tetracycline, والكلورامفينيكول Chloramphenicol , والايرثرومايسين Erythromycin والستربتومايسين Streptomycin ) وأظهرت الدراسة أن المضاد الحيوي السيبروفلكساسين Ciprofloxacin كان أكثر المضادات الحياتية التي أدت إلى تثبيط نمو الجراثيم وبنسبة 79.19 % في حين كان المضاد الحيوي الستربتومايسن اقلها تأثيرا على الجراثيم وبنسبة 34.88 % .

## Summary

This study includes collection of 100 random milk samples of buffaloes taken from different farms in Baghdad city from February 2009 to June 2009 by aseptic methods then Whiteside test is done on milk to identify the subclinical cases from the healthy ones while the clinical cases had been registered from farms by the help of clinical signs in addition to owners.

There were (10) clinical cases and (12) subclinical cases. The milk samples were examined in laboratory by making bacteriological cultures on blood agar then the bacteria that found were identified by using morphological and microscopical characteristics depending on results of primary identification, biochemical and verifying tests then API test was used to confirm the type of isolated bacteria.

The current study showed that *Staphylococcus Spp.* was the dominant bacteria upon the remaining Gram positive bacteria. (14) isolates of *Staphylococci* were isolated followed by( 6) isolates of *Streptococci* and then (2) isolates of *Corynebacterium* and (1) Gram negative bacilli.

Antibiotic sensitivity test was done using (7) antibiotics which ordinarily used for treatment of mastitis in buffaloes and these antibiotics were Ciprofloxacin, Gentamicin, Penicillin, Tetracycline, Chloramphenicol, Erythromycin, and Streptomycin this study showed that the ciprofloxacin was the best antibiotics and 79.19 % of tested isolates were sensitive while the streptomycin was the least effective one on bacteria.

## المقدمة

يعد مرض التهاب الضرع Mastitis من أحد أهم الأمراض الشائعة الانتشار في كل أرجاء العالم التي تسبب الخسائر الاقتصادية في الإنتاج الحيواني لما له من دور في خفض إنتاج الحليب، وللمرض مسببات عدة من الأحياء المجهرية Microorganisms حيث أن عدد المسببات لحد ألان يتجاوز 150 مسبباً مرضياً وتشمل هذه المسببات الجراثيم والفطريات والخمائر والأعفان والفيروسات (1) .

أن المسببات المرضية لالتهاب الضرع عديدة وبين مدة وأخرى يُكشف عن مسببات جديدة لم تكن مدرجة ضمن المسببات الرئيسية للمرض. تحتل الجراثيم المرتبة الأولى من المسببات المجهرية لهذا المرض وتعد الجراثيم الموجبة لصبغة كرام هي الأكثر انتشارا وبالذات جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus* وجراثيم المكورات السبحية *Streptococcus* وتأتي بعدها جراثيم الوتديات *Corynebacterium* وبعد ذلك تأتي الجراثيم السالبة لصبغة كرام ومن أشهرها جراثيم *E. coli* وجراثيم الكلبسيلا *Klebsiella* (2). تأتي أهمية مرض التهاب الضرع من كونه يؤدي إلى أضرار على الصحة العامة وخطراً على حياة الإنسان حيث أن وجود أعداد هائلة من الجراثيم في الحليب يؤدي إلى حدوث حالات تسمم غذائي وخصوصا التسمم بجراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* حيث أن الذيفانات المعوية Enterotoxines التي تفرزها هذه الجراثيم هي التي تؤدي إلى حدوث التسمم (3).

يسبب المرض خسائر اقتصادية كبيرة حيث أن التقارير تبين أن الخسائر التي يسببها التهاب الضرع تصل إلى 180 دولاراً أمريكيا في السنة لكل حيوان مصاب (4) كما أن النشرات الحديثة في الولايات المتحدة تشير إلى خسائر سنوية تقدر ب 2 مليار دولار بسبب التهاب الضرع في الأبقار (1) . وتتمثل الخسائر الاقتصادية بقلة إنتاج الحليب أو انعدامه الذي يحصل بسبب الالتهاب كما أن الحليب المنتج يكون ذا قيمة غذائية متدنية وذلك لتغير كثير من القيم الغذائية فيه ومنها انخفاض نسبة البروتينات والدهون واحتوائه على نسبة عالية من خلايا الدم البيض White blood cells فضلا عن أن الخسارة تأتي من التهاب الضرع تحت السريري Subclinical mastitis ، ويضاف إلى هذه الخسائر الكلفة الاقتصادية الناتجة عن علاج المرض وأحيانا يكون العلاج غير فعال وغير مجدٍ وقد تصل الحالة إلى بتر الضرع Mastectomy أو عزل الحيوان المصاب(1). يصاب الجاموس كغيره من الحيوانات بالتهاب الضرع لكنه أكثر مقاومة من حيوانات المزرعة الأخرى ويعد الجاموس من الحيوانات الشائعة والموجودة بنسبة معقولة في العراق ( 5). يعد أنتاج حليب الجاموس ذا أهمية كبيرة حيث أن تقديرات الاتحاد الدولي لإنتاج الحليب International dairy federation (IDF) تشير إلى أن إنتاج حليب الجاموس ازداد بنسبة 48.52% خلال الأعوام 1992-2002 في حين أن إنتاج حليب الأبقار ازداد 8.83% للمدة ذاتها مما يدل على أهمية حليب الجاموس ويقدر الاتحاد الدولي لإنتاج الحليب (IDF) أيضا أن إنتاج حليب الجاموس السنوي حوالي 70.7 مليون طن في حين أن إنتاج حليب الأبقار السنوي 501.5 مليون طن (6).

وبهذا تظهر أهمية حليب الجاموس وفائدته الغذائية حيث انه يشبه حليب الأبقار ويصنع منه العديد من مشتقات الألبان وتظهر أيضا زيادة ملحوظة في إنتاج حليب الجاموس لذلك يعد مرض التهاب الضرع خطراً كبيراً على الإنتاج وعلى الصحة العامة ولاسيما انه تم اكتشاف الكثير من المسببات المرضية التي عزلت مؤخرا من حالات التهاب الضرع حيث أن هذه المسببات كانت سابقا تعد ملوثات طبيعية أو ضمن جراثيم الطبيعية Normal microflora لجسم الحيوان والمشكلة الأخرى التي ظهرت في السنوات الأخيرة ظهور سلالات من الجراثيم مقاومة لكل المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام لذلك وجبت دراسة هذه السلالات ومعرفة مدى حساسيتها للمضادات الحيوية. هدف الدراسة عزل وتشخيص الجراثيم الموجبة لصبغة كرام والمسببة لالتهاب الضرع في الجاموس في محافظة بغداد (منطقة الفضيلية) ،للتعرف على حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية لمعرفة المضاد الحيوي الأكثر فعالية لعلاج حالات التهاب الضرع في الجاموس.

## المواد و طرائق العمل

### المواد

### أولاً- العينات

جمعت 100 عينة حليب من جاموس من حقول جاموس مختلفة في محافظة بغداد (الفضيلية) وعلى مدى عدة أشهر بدأ من شباط 2009 إلى حزيران 2009 بمساعدة ( أصحاب الحيوانات) والمستوصف البيطري في الفضيلية واخذت العينات بطريقة معقمة حيث استخدمت قناني زجاجية معقمة فتحت القناني قرب الضرع وبعد ذلك لأهملت القطرات الاولى من الحليب واخذ حوالي 15-20 مل من الحليب واغلقت القنينة بسرعة ووضعت في حاوية تحتوي على ثلج لتبريد الحليب لحين وصولة الى المختبر وحفظت العينات في الثلاجة Refrigeratorالى اليوم الثاني صباحا حيث يتم اجراء الاختبارات الجرثومية علية (7).

### ثانياً- الأوساط الزرعية Cultural media

استخدمت الأوساط الزرعية الآتية والمنتجة من شركة Oxoid الإنكليزية وقد حضرت حسب تعليمات الشركة.

1. أكار الدم Blood agar
2. أكار الدم و الازايد Azide blood agar

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المنتجة وأضيف إليه 5-7% دم إنسان واستخدم لعزل جراثيم المكورات السبحية *Streptococcus*وتنقيتها.

3. أكار ادرود Edward's agar

استخدم بوصفه وسطا انتخابياً لعزل جراثيم المكورات السبحية *Streptococcus* وحضر حسب تعليمات الشركة المنتجة وأضيف أليه 5-7% دم إنسان.

4. أكار الملح وسكر المانيتول Mannitol salt agar
حضر حسب تعليمات الشركة واستخدم بوصفه وسطا انتخابياً وتفريقيا لعزل جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus*

5. الاكار المغذي Nutrient agar
6. أكار المكورات السبحية الانتخابي Streptococcal selective agar
7. أكار هويل Hoyle medium agar
استخدم هذا الوسط بوصفه وسطا انتخابياً لعزل جراثيم الوتديات *Corynebacterium*.

8. وسط اختبار السكريات Sugars test medium
استخدم لهذا الاختبار وسط مرق الفينول الأحمر Phenol red broth وحضر الوسط حسب تعليمات الشركة وأضيف للوسط السكر المراد اختباره بنسبة 1% كلا على حدة وبعد ذلك عدل الأس الهيدروجيني إلى 7 ووزع الوسط إلى ألانابيب وعقم بالمؤصدة على درجة حرارة 110 م° ولمدة 10 دقائق.

9. وسط اختبار الأكسدة والتخمر Oxidation fermentation test (OF)
10. أكار الدينيز DNase agar.
11. الوسط الملحي High salt medium.
12. أكار مولر هنتن Mueller-Hinton agar استخدم الوسط لدراسة حساسية الجراثيم المعزولة تجاه المضادات الحيوية.

**ثالثاً - الصبغات و الكواشف والمحاليل الكيماوية:**

حضرت اعتمادا على (8) وهي صبغة كرام Gram's stainوصبغة زيل نلسون الصامدة للحامض Zeihl-Neelson's acid faststain،زايول xylole ، كلوريد الصوديوم NaCl 1%، هيدروكسيد الصوديوم NaOH4% ، كحول اثيلي مطلق 96% وكحول اثيلي عادي 70 %، بيروكسيد الهيدروجين 3%، كليسيرول Glycerol ،حامض الهيدروكلوريك HCl 1% ، محلول الملح الفسيولوجي المعقم 0.9 % .

**رابعاً- العدد التشخيصية:**

1. العدة التشخيصية Slidex strepto-kit من أنتاج شركة bioMrieux الفرنسية.
2. العدة التشخيصية Analytic profile index API من أنتاج شركة bioMrieux الفرنسية.

**خامساً - أقراص المضادات الحياتية**، استخدمت أقراص المضادات الحيوية من شركة Bioanalys التركية .

## طرائق العمل

### 1- اختبار وايت سايد Whiteside test

اجري هذا الاختبار للتحري عن التهاب الضرع في عينات الحليب التي أخذت من ضرع غير سليم ومصاب بالتهاب الضرع سواء كان الالتهاب سريريا أو تحت السريري حيث أن هذا الاختبار يكشف عن التهاب الضرع تحت السريري ويعتمد مبدأ عمل اختبار وايت سايد على حصول تفاعل بين كاشف الاختبار وبين البروتين والحامض النووي لخلايا الدم البيض التي توجد في الحليب بسبب حصول الالتهاب لكي يكون خثره وتزداد كمية الخثرة كلما زاد عدد خلايا الدم البيض بالحليب (9). واجري الاختبار بوضع 5 قطرات من الحليب على الشريحة الزجاجية ثم نشرها بواسطة العصا البلاستيكية Stick على مساحة لا تتعدى 2 سم بالقطر ثم إضافة قطرتين من كاشف هيدروكسيد الصوديوم 4% إلى الحليب مزج جيدا وكانت النتائج كالأتي: عدم حصول أي تغير في الحليب يعني أن الحليب سليم وإذا حصل تغير في الحليب مثل التخثر وكون الحليب رائقاً فمعناه أن الحليب مصاب (10). سجلت نتائج العينات التي أعطت نتائج موجبة لاختبار وايت سايد واجري عليها الاختبارات الجرثومية.

### 2 - زرع عينات الحليب Culturing of milk samples

نقلت العينات بعد رج القنينة بهدوء وأخذت نقلة واحدة بالناقلة الجرثومية Bacteriological loop من الحليب ونشرت على أكار الدم وحضنت بدرجة حرارة 37م °لمدة 24 ساعة وبعد الحضن لوحظت المستعمرات الجرثومية النامية حيث تم اخذ وتنقية الجراثيم السائدة التي كان عددها أكثر من 150 مستعمرة في كل عينة وأهملت العينات التي لم تعطِ نتيجة أو كان النمو الجرثومي فيها قليلا جدا. الصفات المزرعية والمجهرية للجراثيم مثل شكل وقوام وحجم المستعمرات ولونها ثم عملت مسحات لهذه المستعمرات وصبغت بصبغة كرام ثم أخذت الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وأهملت السالبة لصبغة كرام منها وتم أجراء تشخيص البكتريا كالآتي :

### أولاً- تشخيص جراثيم المكورات العنقودية Staphylococcus

نقلت المستعمرات النامية على اكارالملح وسكر المانيتول وبعد نمو مستعمرات المكورات العنقودية على وسط المانيتول درست قدرة هذه الجراثيم على تخمير سكر المانيتول وسجلت النتائج وأجريت الاختبارات التشخيصية الأولية وهي:

1. التحلل الدموي Hemolysis.
2. اختبار الكاتاليز Catalase Test .
3. اختبار التجلط Coagulase test .
4. اختبار التأكسد والتخمر Oxidation fermentation test (OF) .
5. اختبار الدنيز DNase test.

6. اختبار تخمر السكريات Sugars fermentation test.
لقحت الأنابيب المحتوية على وسط السكريات بالعزلات وحضنت على درجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة ولوحظت النتائج خلال مدة التحضين حيث أن الجراثيم التي لها القدرة على تخمير السكر تغير اللون الأحمر إلى الأصفر وتكون النتيجة موجبة في حين عدم تغير اللون دليل على عدم قدرة الجرثومة على تخمير هذا السكر.

### ثانياً - تشخيص جراثيم المكورات السبحية *Streptococcus*

نقلت المستعمرات النامية على أكار ادورد واكار الدم واكار الدم والازايد واكار المكورات السبحي الانتخابي وسجلت النتائج ثم أجريت عليها الاختبارات التشخيصية الأولية الآتية :

1. اختبار التحلل الدموي Hemolysis .
2. اختبار الكاتاليز Catalase test.
3. اختبار النمو في تراكيز عالية من الملح High salt test.

اجري الاختبار بتلقيح سلالات جراثيم المكورات السبحية المراد تشخيصها بوسط الملح وحضنت بدرجة حرارة 37 م ° لمدة 24 ساعة وسجلت النتائج حيث أن جراثيم المكورات السبحية لا تنمو في هذا الوسط لعدم قدرتها على تحمل هذا التركيز العالي من الملح (11) .

4. التصنيف حسب مجاميع لانسفيلد Lancefield grouping .

صنفت المكورات السبحية إلى مجاميع لانسفيلد استنادا إلى نوع متعدد السكريد Polysaccharide الموجودة في جدار الجراثيم آذ تم استخدام العدة التشخيصية Slidex Strepto-kit فرنسية المنشأ ومن أنتاج شركة bioMrieux. (11).

### ثالثاً - تشخيص جراثيم الوتديات *Corynebacterium* .

نقلت المستعمرات النامية على أكار هويل Hoyle medium agar وهو وسط انتخابي لجراثيم الوتديات ثم شخصت بالاختبارات الأولية وبعدها باختبار API الموضح أدناه.

### رابعاً - التشخيص التأكيدي للجراثيم المعزولة باستخدام العدة التشخيصية Analytic profile index API

استخدمت العدة التشخيصية APIوهي من أنتاج شركة bioMrieux الفرنسية وهذه العدة عبارة عن شريط بلاستيكي يحتوي على عدة حفر وتحوي كل حفرة المواد الأولية لأحد الاختبارات الكيموحيوية وقد تم اخذ عزلات المكورات العنقودية والسبحية والوتديات بعد أجراء الاختبارات التشخيصية الأولية السابقة الذكر وتم التأكد من كونها عائدة إلى أجناس المكورات العنقودية و المكورات السبحية والوتديات حيث زرعت هذه العزلات على وسط أكار الدم وثم نقلت إلى مستشفى بغداد العام حيث اجري لها هذا الاختبار إذ تم تحضير معلق جرثومي وتم تلقيح الحفر بالمعلق ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ وقرئت النتائج بين 24-28 ساعة حسب Analytic profile index المجهز مع هذا النظام لكل جنس من الأجناس المشخصة ومن خلاله تم التعرف على نوع الجرثومة (12).

### خامساً - اختبار حساسية الجراثيم المعزولة للمضادات الحياتية Antibiotic sensitivity test

اجري اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحياتية لجميع العزلات التي تم الحصول عليها وقد استخدمت طريقة كيربي وباور Kirby-Bauer method المحورة عن منظمة الصحة العالمية (13) لمعرفة حساسية أو مقاومة العزلات الجرثومية للمضاد وقد اجري الاختبار بتلقيح العتر المدروسة في مرق نقيع المخ والقلب لمدة 4 ساعات ثم نشر المعلق الجرثومي على أكار مولر هنتون Mueller-Hinton agar باستخدام المسحات المعقمة Swabs وتركت الأطباق لتجف لمدة 10-15 دقيقة وبد ذلك تم تعليم الأطباق وتقسيمها إلى 7 أقسام على عدد المضادات باستخدام قلم ماجك ثم وضعت أقراص المضادات والمبينة في الجدول (1) في أقسامها المحددة باستخدام ملقط معقم بالكحول والتلهيب وحضنت الأطباق لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 مْ وقرئت النتائج وذلك بقياس قطر تثبيط نمو الجراثيم بالوسط وقورنت مع القطر القياسي وقسمت النتائج إلى ، حساس Sensitive أي أن المضاد الحيوي قادر على تثبيط نمو الجرثومة المعزولة ومقاوم Resistant أي أن المضاد الحيوي غير قادر على تثبيط نمو الجرثومة المعزولة و متوسط Intermediate أي أن قيمة التثبيط تقع بين الحساس والمقاوم.

**الجدول (1) يبين المضادات الحياتية وتراكيزها المستخدمة في الدراسة.**

| | اسم المضاد | التركيز بالمايكوغرام |
|---|---|---|
| 1 | السيبروفلوكساسين Ciprofloxacin (CIP) | 5 µg |
| 2 | الايرثرومايسين Erythromycin (E) | 15 µg |
| 3 | الجنتامايسين Gentamicin (GN) | 10 µg |
| 4 | التيتراسايكلين Tetracycline (TE). | 30 µg |
| 5 | الستربيتومايسين Streptomycin (S). | 10 µg |
| 6 | البنسلين Penicillin (P). | 10 IU |
| 7 | الكلورامفينيكول Chloramphenicol (C). | 30 µg |

## النتائـــج

### أولاً- الإصابة السريرية وتحت السريرية Clinical and subclinical mastitis

بينت النتائج وجود 10 حالة إصابة سريريه من مجموع 100 عينة حليب مأخوذة بطريقة عشوائية من الحيوانات و12 حالة إصابة تحت السريرية والتي شخصت باستخدام اختبار وايت سايد للكشف عن الحليب المأخوذ من حيوانات مصابة بالتهاب الضرع جدول (2) .

**الجدول (2) يبين عدد حالات الإصابة السريرية وتحت السريرية.**

| نوع الإصابة | عدد الحالات المصابة |
|---|---|
| إصابة سريريه clinical | 10 |
| إصابة تحت السريرية subclinical | 12 |
| سليمة | 78 |
| المجموع الكلي | 100 |

### ثانياً- أنواع وأعداد البكتريا المعزولة من حالات التهاب الضرع :

تم الحصول على 22 عزلة من عينات الحليب تابعة لثلاثة أجناس من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام والمشخصة مجهريا وبالاختبارات التشخيصية الأولية والكيموحيوية التأكيدية فضلا عن عزلة واحدة سالبة لصبغة كرام والمبينة في الجدول (3).

**الجدول (3) يوضح أجناس وأعداد الجراثيم المعزولة.**

| ت | أجناس الجراثيم | عدد العزلات |
|---|---|---|
| 1 | المكورات العنقودية *Staphylococcus* | 14 |
| 2 | المكورات السبحية *Streptococcus* | 6 |
| 3 | الوتديات *Corynebacterium* | 2 |
| 4 | جراثيم سالبة الكرام Gram negative | 1 |
| 5 | المجموع | 23 |

تبين من خلال النتائج أن بعض الجراثيم كانت مسؤلة عن التهاب الضرع ألسريري والبعض الأخر كان مسئول عن التهاب الضرع تحت ألسريري وفيما يلي أهم المسببات .

#### 1- جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus*

بعد أجراء الاختبارات التشخيصية الأولية والكيموحيوية التأكيدية على جراثيم هذا الجنس تم الحصول على 14 عزلة من جراثيم المكورات العنقودية التي أعطت نتائج موجبة للنمو في الوسط الانتخابي أكار الملح وسكر المانيتول، وجميع العترات أعطت نتيجة موجبة لاختباري الكاتاليز والتأكسد والتخمر في حين كانت معظم العزلات موجبة لاختبار الدنيز DNase test .

#### 2- جراثيم المكورات السبحية *Streptococcus*

بعد زرع الجراثيم وتنقيتها ونموها على الأوساط الانتخابية الخاصة بجراثيم المكورات السبحية *Streptococcus* وتم عمل الاختبارات التشخيصية الأولية والكيموحيوية والتأكيدية عليها وتم عزل 6 عازلات.

#### 3 - جراثيم الوتديات *Corynebacterium*

بينت النتائج نمو مستعمرات رصاصية سوداء على وسط تليورات البوتاسيوم المستخدم لعزل جراثيم الوتديات كما اظهر الفحص لمجهري جراثيم عصوية متعددة الأشكال موجبة لصبغة كرام وأجريت على العزلات اختبارات أولية للتأكد منها.

### ثالثاً- اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحياتية Antibiotic sensitivity test

اجري اختبار حساسية الجراثيم المعزولة قيد الدراسة للمضادات الحياتية وسجلت حساسية جراثيم المكورات العنقودية وجراثيم المكورات السبحية وجراثيم الوتديات للمضادات الحياتية الجدول (4) يوضح نتائج حساسية ومقاومة الجراثيم المعزولة ونسبها المئوية للمضادات الحيوية المستخدمة.

**الجدول (4) يوضح النسبة المئوية فعالية المضادات الحياتية على جميع عزلات الجراثيم.**

| ت | المضاد وتركيزه بالمايكوغرام | Sensitive | Intermediate | Resist |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Ciprofloxacin (CIP). 5 µg | %74.41 | %11.62 | %13.95 |
| 2 | Gentamicin (GN) 10 µg | %62.79 | % 11.62 | % 25.58 |
| 3 | Penicillin (P) .10 IU | %39.53 | %16.27 | %44.18 |
| 4 | Tetracycline (TE). 30 µg | % 48.83 | % 2.32 | % 48.83 |
| 5 | Chloramphenicol (C). 3µg | %55.81 | %13.95 | %30.23 |
| 6 | Erythromycin (E) 15 µg | % 37.2 | % 27.9 | % 34.88 |
| 7 | Streptomycin (S). 10 µg | % 34.09 | %23.25 | %41.86 |

ويبين الجدول (5) نتائج اختبار الحساسية لكل جنس من أجناس الجراثيم وظهر من خلال النتائج أن المضاد الحيوي السيبروفلوكساسين كان الأكثر قدرة على تثبيط الجراثيم من باقي المضادات الحياتية وقد لوحظ انخفاض في قدرة قسم من المضادات مثل البنسلين والكلورامفنكول والتتراسايكلين والايرثرومايسين في تثبيط الجراثيم ، أما المضاد الحيوي الستربتومايسين فقد كان الأقل تأثيرا على الجراثيم.

جدول (5) يبين النسب المؤية لفعالية كل مضاد حياتي تجاه كل جنس من أجناس الجراثيم

| Corynebacterium | | | Streptococcus | | | Staphylococcus | | | اسم المضاد | ت |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R | I | S | R | I | S | R | I | S | | |
| 0 % | 0 % | 100 % | 16.66 % | 0 % | 83.33 % | 14.28 % | 17.85 % | 67.85 % | Ciprofloxacin (CIP). 5 µg | 1 |
| 0 % | 0 % | 100 % | 16.66 % | 8.33 % | 75 % | 32.14 % | 14.28 % | 53.57 % | Gentamicin (GN) 10 µg | 2 |
| 0 % | 0 % | 100 % | 16.66 % | 25 % | 58.33 % | 60.71 % | 14.28 % | 25 % | Penicillin (P) .10 IU | 3 |
| 0 % | 0 % | 100 % | 16.66 % | 0 % | 83.33 % | 67.85 % | 3.57 % | 28.57 % | Tetracycline (TE). 30 µg | 4 |
| 0 % | 0 % | 100 % | 25 % | 0 % | 75 % | 35.71 % | 21.42 % | 42.85 % | Chloramphenicol (C). 30µg | 5 |
| 0 % | 0 % | 100 % | 25 % | 16.66 % | 58.3 % | 52.85 % | 35.71 % | 21.42 % | Erythromycin (E) 15 µg | 6 |
| 0 % | 0 % | 100 % | 16.66 % | 16.66 % | 66.66 % | 57.14 % | 28.57 % | 14.28 % | Streptomycin (S). 10 µg | 7 |

## المناقشـــــة

أن عدد حالات التهاب الضرع السريرية التي تم الحصول عليها هي أقل من تلك التي سجلها الباحثان العراقيان(14 و15) حيث أشارا إلى أن أعداد حالات الإصابة السريرية كانت مرتفعة ويعود سبب الانخفاض الإصابة بهذا البحث إلى وجود حرص من قبل المربين على معالجة الحالات السريرية التي تظهر عيانيا ولكن كثيراً من الحالات تتحول إلى الإصابة تحت السريرية التي لا يلاحظها المربي وتستمر من غير أن يعلم ويعزى ذلك أيضا إلى وجود مضادات حيوية جديدة وذات كفاءة جيدة في معالجة حالات التهاب الضرع.

وقد تم الحصول على 22 عزلة مختلفة تابعة لأربعة أجناس من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وهي 14 عزلة من جراثيم المكورات العنقودية و6 عزلات من جراثيم المكورات السبحية و 2 عزله من جنس الوتديات و بالإضافة إلى عزلة واحدة سالبة لصبغة كرام وهي مبينة في الجدول (3). وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي بينت سيادة جراثيم المكورات العنقودية على باقي أنواع الجراثيم (16 و17).

### أولا-عزل جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus*

الجراثيم التي أعطت نتيجة موجبة للنمو على أكار الملح وسكر المانيتول سواءً بتخمير سكر المانيتول أو عدمه تم التأكد من كونها من جنس المكورات العنقودية بأجراء اختبارَي الكاتاليز والأكسدة والتخمر كما عملت مسحات مجهريه منها وتم التأكد من شكلها وتفاعلها ألصباغي وكونها موجبة الكرام. واستخدم اختبار الكاتاليز للتأكد من كون هذه الجراثيم من جنس المكورات العنقودية حيث أن المكورات العنقودية تكون موجبة لاختبار الكاتاليز لتفريقها عن جراثيم المكورات السبحية التي تكون سالبة لهذا الاختبار (18) .

أن اختبار الأكسدة والتخمر أستخدم لعزل جراثيم المكورات العنقودية عن المكورات الدقيقة التي هي عبارة عن ملوثات طبيعية موجودة حول الضرع حيث أن جراثيم المكورات العنقودية لها القدرة على تخمير الكلوكوز في ظروف لاهوائية وتكوّن حامضاً يؤدي إلى انخفاض الأس الهيدروجيني pH فيغير لون الكاشف المستخدم في الاختبار أما جراثيم المكورات الدقيقة فليس لها القدرة على تخمير الكلوكوز في الظروف اللاهوائية ومبدأ الاختبار يعتمد على الطريقة التي تستخدمها الجراثيم في تحطيم الكلوكوز فقسم من الجراثيم مثل المكورات الدقيقة يستخدم الأوكسجين لأيض الكلوكوز وتسمى العملية أكسدة Oxidation وهي الجراثيم الهوائية المجبرة Obligate aerobes والقسم الأخر من الجراثيم مثل المكورات العنقودية لا يحتاج الى الأوكسجين لأيض الكلوكوز وتسمى العملية بالتخمر (19).

وبعد ذلك أجري اختبار التجلط لتفريق جراثيم المكورات العنقودية المنتجة لخميرة التجلط عن تلك التي لاتنتجها، حيث إن هذا الأنزيم يسبب تجلط بلازما الدم ويعمل على تكوين غلاف يحيط بالجرثومة ويحميها من دفاعات الجسم مثل البلعمة Phagocytosis وهذا الإنزيم تنتجه جراثيم المكورات العنقودية الممرضة. وهناك نوعان من الأنزيم هما أنزيم التجلط الحر Free coagulase وأنزيم التجلط المقيد Bound coagulase حيث أن الأنزيم الأخير يرتبط بالخلايا وقد اجري الاختبار بطريقتين هما اختبار التجلط على الشريحة واختبار التجلط في الأنابيب حيث تستخدم الطريقة الأولى للكشف عن الإنزيم المرتبط والجراثيم التي تعطي نتيجة سالبة بهذا الاختبار أجري لها اختبار التلازن في الأنابيب أي الطريقة الثانية التي تكشف عن الأنزيم الحر واجري اختبار تلازن في الأنابيب للتأكد من قدرة الجراثيم على أنتاج الأنزيم حيث أن قسما من الجراثيم المنتجة للأنزيم لا يُعطي نتائج موجبة في اختبار التلازن على الشريحة (19).واجرية كذلك اختبار الدنيز DNase test والذي استخدم لمعرفة قدرة الجراثيم على أنتاج خميرة الـ DNase التي تعمل على تحليل الـ DNA وتعد هذه الخميرة من عوامل الضراوة لجراثيم المكورات العنقودية الممرضة وقد كان معظم العزلات التي تم الحصول عليها موجبة لهذا الاختبار مما يدل على كونها ممرضة وتملك هذا العامل من عوامل الضراوة (20) .اختبار تخمر السكريات تم استخدام عدة سكريات لهذا الاختبار والمبدأ الذي اعتمد عليه هذا الاختبار هو كون جراثيم المكورات العنقودية تختلف حسب أنواعها في تخمير السكريات المختلفة حيث إنه لكل نوع من الجراثيم القدرة على تخمير أنواع معينة من السكريات وبالاعتماد على جداول قياسية مثبتة علميا تمت المقارنة بينها وبين النتائج التي تم الحصول عليها في هذا البحث لمعرفة نوع الجراثيم التي عزلت ( 19).

### ثانيا- عزل جراثيم المكورات السبحية *Streptococcus*

بعد زرع الجراثيم وتنقيتها ونموها على الأوساط الانتخابية الخاصة بجراثيم المكورات السبحية وتم عمل الاختبارات التشخيصية الاولية والكيموحيوية والتأكيدية عليها تم عزل 6 عزلات وهي من البكتريا البيئية المتطفلة على أنسجة الضرع وهي تعد من المسببات الرئيسية لالتهاب الضرع في كثير من دول العالم أو قد تأتي بالدرجة الثانية بعد المكورات الذهبية وعلى الرغم أن هذه البكتريا تعد غازية اختيارية للغدة اللبنية ألا أن العديد من البحوث تؤكد أنها ذات ضراوة عالية ولا يمكن السيطرة عليها وذلك لعدم وجود ميكانيكية فعالة أو أمراضية أو وبائية مفهومة لهذه البكتريا . (18).

### ثالثا- عزل جراثيم الوتديات *Corynebacterium*

تم عزل 2 عزله من جراثيم *Corynebacterium* واجري قسم من الاختبارات الأولية على العزلات وقد نمت الجراثيم على وسط تليورات البوتاسيوم حيث أن مادة تليورات البوتاسيوم مادة مثبطة لنمو الجراثيم الأخرى, كما كانت نتائج الاختبارات التي أجريت على العزلات الثلاثة موجبة لاختبار الكاتاليز والتحلل الدموي كما ظهرت عصوية متعددة الأشكال موجبة الكرام في الفحص ألمجهري وبعد ذلك تم تأكيد النتيجة بأجراء اختبار الـ API (19).

### رابعا-التشخيص التأكيدي للجراثيم المعزولة باستخدام العدة التشخيصية Analytic profile index

أستخدم الاختبار التأكيدي API الذي يعد واحداً من الفحوصات التشخيصية الدقيقة لمعرفة نوع الجراثيم التي تم الحصول عليها وفكرة هذا الاختبار تعتمد على أجراء 21 اختباراً كيموحيوياً في شريط واحد وتقرأ النتائج وتقارن مع جداول قياسية لمعرفة نوع الجراثيم المعزولة واجري الاختبار لجميع العزلات للأجناس الثلاثة المكورات العنقودية , المكورات السبحية والوتديات *Corynebacterium* (12) .

### خامسا- اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية Antibiotic sensitivity test

تظهر نتائج اختبار الحساسية اختلافاً عن ما سبق من البحوث وقد لوحظ انخفاض في قدرة قسم من المضادات مثل البنسلين والكلورامفينيكول والتتراسايكلين في تثبيط الجراثيم حيث سجل الباحث(21) وجماعته أن نسبة حساسية جراثيم المكورات العنقودية لهذه المضادات كانت 64.28% ، 78.5% ، 85.7% على التوالي في حين وجد الباحث (22) وجماعته أن نسبة عمل هذه المضادات كانت للبنسلين 50 % وللكلورامفينيكول 81.81 % في حين وضحت الدراسة الحالية أن نسبة التثبيط لهذه المضادات كانت للبنسلين 25% ، وللكلورامفينيكول 42.8 % ، وللتتراسايكلين 28.5 % على التوالي وهذه مقاربة لما وجده (22) وجماعته من انخفاض في قدرة هذه المضادات على تثبيط هذه الجراثيم ويظهر أن هذه الجراثيم لها القدرة على تطوير المقاومة لهذه المضادات.

وفيما يخص حساسية جراثيم المكورات السبحية وجد الباحث (21) وجماعته ان نسبة الحساسية للمضادات الثلاثة البنسلين والكلورامفينيكول والتتراسايكلين كانت 87.5 % ، 100 % ، 100 % على التوالي اما في الدراسة الحالية فقد كانت نسبة حساسية الجراثيم لهذه المضادات هي 58.33 % ، 75 % ، 83.33 % على التوالي في حين أن النسب التي حصل عليها الباحث (22) وجماعته كانت للبنسلين 66.67 % وللكلورامفينيكول 83.33 % وهي نسب مقاربة لما توصلت له الدراسة الحالية في حين لم تتفق النسب مع ماوجده الباحث (21) وجماعته وهذا ايضا يدل على كون الجراثيم قد أصبحت أكثر مقاومة للمضادات الحياتية.

وفي جراثيم الوتديات وجد الباحث (1) وجماعته أن حساسية الجراثيم التي حصل عليها للمضادات البنسلين والكلورامفينيكول والتتراسايكلين كانت 100 % ، 62.5 % ، 25 % في حين أوضحت الدراسة الحالية ان نسبة التثبيط كانت 100 % للمضادات الثلاثة وهذا مخالف لما أوجده الباحث (21) وجماعته ومخالف ايضا لنتائج الباحث (21) وجماعته الذين وجدوا أن نسبة التثبيط للمضادات الكلورامفينيكول والبنسلين والستربتومايسين كانت 66.67 % ، 36.36 % ، 55.55 % على التوالي في حين أن الدراسة الحالية بينت ان نسبة التثبيط كانت 100 % للمضادات الثلاثة.

وجد الباحث (23) ان نسبة حساسية جراثيم المكورات العنقودية للكلورامفينيكول والجنتامايسن كانت 61.9 % ، 85.71 % في الوقت الذي كانت فيه النسب التي وجدت في هذه الدراسة هي 42.85 % ، 53.57 % على التوالي اما الباحث (22) وجماعته فقد وجد ان النسب لهذين المضادين كانت 81.81 % ، 90.91 % وهذه النسب تختلف عن ما وجد في هذا البحث.

وقد بينت نتائج البحث أن المضاد الحيوي السيبروفلوكساسين كان أكثر المضادات التي أدت إلى تثبيط الجراثيم وبنسبة 79.91 % ولم يتم الحصول على دراسة أستخدم فيها هذا المضاد لكونه مضاد حديث الاستعمال في مجال معالجة التهاب الضرع.فيما وجد الباحث (22) وجماعته أن حساسية الجراثيم للمضاد الستريبتومايسين على جراثيم المكورات العنقودية والمكورات السبحية والوتديات كانت 68.18 %، 66.67 %، 55.55% على التوالي أما الدراسة الحالية فقد بينت ان نسبة حساسية هذا المضاد الحيوي على نفس الجراثيم كانت 14.26 % ، 66.66 % ، 100 % على التوالي وهذا الاختلاف يبين قدرة الجراثيم والعزلات على مقاومة هذا المضاد.

## المصادر


**1- Mona,S.Z. and Susan,O.(2008)**. Effect of subclinical mastitis on some biochemical parameters in buffalo , J.Agric. and Environ.sci., 3(2), pp: 200-204.

**2- Tanver, A. M. and Bilal,S.U. (2007)**. Impact of Mastitis Severity on Mineral contents of Buffalo., Pak. J. Agri.Sci., vol.44 (1) .

**3- Varshney,J.P. and Ram,N. (2004).**Clinical Management of Udder Disease of Riverine Buffaloes Homeopathy, vol.93,pp:17-20.

**4- Dhakal I. P. and Thapa B. B. (2001)**. Economic impact of clinical mastitis in buffaloes. Buffalo J. 18(2) : 225-234

**5- Magid S. A. (1996)**. Buffalo population and production in Iraq. National Co- ordinator for Iraq, State board for Agricultural Research, Baghdad

**6- FAO Bulletin of statistics (2002).** Agriculture. 3(1):11-13

**7- Boddie R. L. and Nickerson S. C. (2002).** Reduction of mastitis caused by experimental challenge with Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae by use of quaternary ammonium and halogen mixture teat dip J. Dairy Sci. 85:285-262.

**8- Cruickshank R, Dujuid J. P., Marmoin B P and Swain R H A (1975).** Medical microbiology 12th ed., Vol.2, Churchill Livingstone, Edimblirgh London and New York

**9- Whyte D. S, Orchard R. G., Cross P S, Frietsch T, Claycomb R. W. and Mein G.A. ( 2001)**. An On-Line Somatic Cell Count Sensor. International symposium for automatic milking in Leylstad, the Netherlands, March, 24-26

**10- Coles E. H. (1980).** Veterinar Clinical Pathology.W.B. Saunders Company London pp 428-438

**11- Collee J. G., Marmion B P, Fraser A. G. and Simmons A. (1996)**. Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed., ChurchillLivingstone, New York, pp 263-98.

**12- Isabel C. , and Fabregas ,B. (2007)**. Drug Resistant Coagulase – Negative *Staphylococcus* isolated from milk of Buffaloes , Vol.14(2) , pp: 117- 121 (Abstract).

**13- Vandepitte J., Engback K., Piot P. and Hench C. C. (1991)**. Basic laboratory procedure in clinical bacteriology. World health organization Geneva, Switzerland pp : 31-36.

**14- Abdul Wahab A. R. (1982).** Studies on mastitis in buffaloes. M. Sc. Thesis, college of veterinary medicine, university of Baghdad.

**15- Yass A. A., Kalra D. S. and Khalaf A. M. (1983).** Studies on mastitis in buffaloes in Iraq, prevalence rate and etiology. Tropical Veterinary and Animal Science Research. 1(1):23-28.

**16-Dhakal,S.W.and Koshih,T., (2007).** Epidemiological and Bacteriologic Survey of Buffalos Mastitis in Nepal. Journal Of Vet. Medical Scienece .vol. 69 , pp: 1241-1245.

**17-Apice,L., Fenizia, D. and Capparell,R. (2006).** Detection of antibodies to *Staphylococcus aureus* in water buffaloes. Research In Veterinary Science . ,vol .66 (Abstract) .

**18- Baron E. J. and Finegold S. M. (1990)**. Diagnostic microbiology. Baily and Scotts. 8th ed., C.V. Mosby Company, St. louis, pp :341-342.

**19- Lennette E. H., Albert Balows, William J. Hausler and H. Jean Shadomy (1985)**. Manual of clinical microbiology. 4th ed American societyfor microbiology, Washington, D.C. pp : 143-175.

**20 - Rio,D.J. and Eirro,B.(2005)**. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolution from Buffalo Mastitis . J. Dairy. Sci. vol.,88 (2) ,pp: 3341–3219.

**21 – Sharm, N., Gupta, S.K. (2007)**. Treatment of Clinical Mastitis In Buffaloes , Buffalo Bulletn., vol.26, No.2, pp:56-58 .

**22- Uppal S. K., Singh K. B., Bansal B. K. and Jand S. K. (1998).** Antibiogram of bacteria isolated from clinical and subclinical casesof mastitis in buffaloes. Buffalo J., 2:253-258.

**23- Lashmik,K. and Syama,S.N.(2009)**. Buffalo Mastitis . Risk Factors . vol.28,No.3(abstract).