عزل وتشخيص البكتريا المسببة لالتهاب الضرع في الابقار في محافظة كربلاء المقدسة

ميساء صالح مهدي الحمداني كلية العلوم – جامعة كربلاء

علي عبد الكاظم الغانمي كلية الصيدلة –جامعة كربلاء

omranaljelawi@gmail.com

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة تحديد الابقار المصابة بالتهاب الضرع عن الابقار السليمة من خلال فحص ٢٠٠ عينة حليب مأخوذة من ابقار مرباة في مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة وذلك بالاعتماد على فحص كاليفورنيا وفعالية انزيم NAGase وقد اوضحت النتائج خلو ١٢٢ عينة من الاصابة بينما بلغ عدد العينات العائدة لابقار مصابة ٧٨ .

اشتملت هذه الدراسة ايضاً على عزل البكتريا المسببة لالتهاب الضرع وتشخيصها بالطرائق التقليدية والجزيئية وقد تم الحصول على ١٠ عزلات من بكتريا *Staphylococcus aureus* و٥ عزلات من بكتريا Coagulase Negative staphylococcus(CoNS) و٨ عزلات من بكتريا *Escherichia coli* وعزلة واحدة من بكتريا *Streptococcus uberis* .

الكلمات المفتاحية :–التهاب الضرع في الابقار , فحص كايفورنيا , فحص انزيم NAGase , PCR .

Abstract

This study included the identification of diseased cows with mastitis from the healthy cows by testing 200 samples of milk taken from cows in different regions of Sacred Karbalaa province depending on California test and the activity of the enzyme NAGase , the results showed that 122 samples were free of the disease while the number of samples of the diseased cows were 78 .

This study was also included the isolation of the bacteria causing mastitis and diagnosing it with the conventional and molecular methods , 10 isolates were obtained of bacteria *S. aureus* , 5 isolates of CoNS , 8 isolates of bacteria *E.coli* and one isolate of bacteria *Strep. uberis* .

Keywords: cows with mastitis, California test, enzyme test NAGase , PCR

المقدمة

يعد التهاب الضرع (Mastitis) واحداً من أهم الامراض التي تصيب الابقار في العالم , إذ تشير الاحصائيات العالمية المتوفرة الى ان هذا المرض يتسبب في احداث نسبة عالية من الخسائر في صناعة الالبان (Dairy industry) تصل الى ٣٨ % من اجمالي الكلفة الكلية التي تقوم عليها تلك الصناعة . تشتمل تلك الخسائر على انخفاض انتاج الحليب وتردي نوعيته وانخفاض سعره فضلاً عن التكاليف المترتبة على علاج الابقار المصابة بالمضادات الحيوية (Bradley ,2002 ; Berry and Meaney ,2005) .

تميزت بعض انواع البكتريا بكونها مسببات شائعة لهذا المرض ولعل في مقدمتها بكتريا *Staphylococcus aureus* فقد اتفقت معظم الدراسات على انها المسبب الرئيس لالتهاب الضرع في الابقار في جميع انحاء العالم اذ تتمكن هذه البكتريا من اجتياح المضيف بفعل عوامل ضراوتها المختلفة فضلاً عن تاثيرها في جهازه المناعي (Green and Bradley ,2004) . و يجب ان لا يغفل دور بكتريا *Escherichia coli* كونها تمثل ٨٠ % من البكتريا القولونية (Coliform bacteria) التي تشارك كممرضات بيئية في احداث هذا المرض اذ يتصف جدار هذه البكتريا باحتوائه على المركب Lipopolysaccharide (LPS) الذي يمثل عامل الضراوة الرئيس فيها و يكون مسؤولاً عن معظم التفاعلات الفسيولوجية المرضية (Pathophysiological reactions) التي تحدث لضرع البقرة عند اصابتها بهذا النوع من البكتريا (Suojala *et al.* , 2013) . و توزعت ثلاثة انواع من بكتريا *Streptococcus* بين ممرضات معدية واخرى بيئية لضروع الابقار اشتملت هذه الانواع على *Strep. agalactiae* و *Strep. dysgalactiae* و *Strep.*

uberis , فيما صنفت بكتريا المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التجلط (Coagulase Negative Staphylococci,CoNS) كمسببات ثانوية لمرض التهاب الضرع في الابقار (Bogni *et al.* ,٢٠١١) .

تتوفر طرائق عديدة للكشف عن التهاب الضرع و تشخيصه و لعل اهمها اختبار كاليفورنيا و حساب عدد الخلايا الجسمية (Somatic cell count) و تقدير فعالية بعض الانزيمات و التشخيص الميكروبي سواءً بالطرائق التقليدية او الجزيئية و قياس التوصيل الكهربائي للحليب فضلاً عن قياس الرقم الهيدروجيني (Viguier *et al.* , 2009) .

ونظراً لخطورة مرض التهاب الضرع فقد هدفت هذه الدراسة الى تحديد أهم الانواع البكتيرية المسببة لهذا المرض في الابقار المرباة في مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة عن طريق عزل وتشخيص تلك الانواع سواءاً بالطرائق التقليدية او الجزيئية .

المواد وطرائق العمل

تم جمع ٢٠٠ عينة حليب من ابقار مرباة في مناطق متفرقة في محافظة كربلاء المقدسة .اذ تمت عملية جمع العينات حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Ericsson *et al.*, 2009) مع بعض التحوير, اذ يتم غسل ضرع البقرة وتنشيفه بقطعة قماش نظيفة فيما تم رش الحلمات (Teats) برذاذ من الكحول الاثيلي 70 % وعند اجراء عملية الحلب للبقرة تم اهمال الدفعات الاولى من الحليب بينما استخدمت قناني معقمة لجمع الحليب من كل ربع (Quarter) من ارباع البقرة (على انفراد) ونقلت الى المختبر بصورة مبردة في اسرع وقت ممكن .

خضعت العينات الى اختبارات نوعية سريعة للتحري عن اصابة الحيوان بالتهاب الضرع, اشتملت الاختبارات السريعة على :-

١- **اختبار كاليفورنيا California mastitis test (CMT)**

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (2006) Dhakal في اجراء هذا الاختبار.وسجلت النتيجة بحسب الدرجات التفاعلية الموصوفة من قبل (Guha *et al,*2012) وهي سالب (N) وضئيل (T) وموجب +١ وموجب +٢ وموجب +٣ .

٢- **تقدير فعالية انزيم N-acetyl-D-glucosaminidase (NAGase)**

تم تقدير فعالية انزيم NAGase بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (2000)Park *et al.* مع بعض التحوير . اذ تم مقارنة لون المحلول الناتج بلون المحلول الصفري وتم تصنيفه الى الاصناف الاتية: أصفر ضعيف (+) ومتوسط الصفرة (++) وشديد الصفرة (+++) .

عزل البكتريا المسببة لالتهاب الضرع في الابقار

تم زرع العينات الموجبة لفحصي كاليفورنيا والانزيم NAGase على وسطي اكار الدم والماكونكي لغرض عزل البكتريا المسببة لالتهاب الضرع .

تشخيص البكتريا المسببة لالتهاب الضرع

تشخيص بكتريا *Staphylococcus*

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات المكورات العنقودية .*Staphylococcus* spp والتي ظهرت على اكار الدم وتم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية , كما تم تشخيص هذه البكتريا باستخدام عدة التشخيص .Api Staph .

تشخيص بكتريا الـ *Escherichia. coli*

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *E. coli* و تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية , كما تم تشخيص هذه البكتريا باستخدام عدة التشخيص . Api 20E .

تشخيص بكتريا *Streptpcoccus*

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Streptococcus* اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية , كما تم تشخيص هذه البكتريا باستخدام عدة التشخيص . Api Strep.

تشخيص بكتريا *S. aureus* و *E. coli* باستخدام تفاعل الكوثرة التسلسلي

تم استخلاص الـ DNA من عزلات بكتريا *S. aureus* و *E. coli* باستخدام عدة التشخيص المجهزة من شركة Geneaid Biotech Ltd,UK وحسب التعليمات .

تم استخدام البوادئ والموضح صفاتها في الجدول الاتي:-

الجين المستخدم	اسم البادئ	تتابع البادئ 5`ـــ3`	Amplicon size (bp)	المصادر
femA	*FemA-F* *FemA-R*	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	Mehrotra, Wang *et al.* 2000
phoA	*PhoA-F* *PhoA-R*	GTGACAAAAGCCCGGACACCATAAATGCCT TACACTGTCATTACGTTGCGGATTTGGCGT	903	Kong, So *et al.* (1999)

- ***femA* (132 bp) for *Staph.aureus***
- ***phoA* (903 bp) for *E. coli***

اجراء تفاعل البلمرة (PCR Assay):

تم تحضير محلول البادئ بتركيز (10) بيكو مول\مايكرو ليتر . وتم برمجة جهاز الـPCR كما في الجدول الاتي :

الخطوة	العمليــة	
1	دورة واحدة لمدة ٥ دقائق عند درجة حرارة 95 ◦م للمسخ الأولي لـ DNA القالب .	
2	30 دورة تضمنت :	
	A	١ دقيقة عند درجة حرارة 96 ◦م لمسخ لـ DNA القالب .
	B	30 ثانية عند درجة حرارة 52 ◦م لارتباط البوادئ لـ DNA القالب .
	C	1 دقيقة عند درجة حرارة 72 ◦م لاستطالة البوادئ المرتبطة .
3	دورة واحدة لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة 72 ◦م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف .	

النتائج والمناقشة

تحديد عينات الحليب العائدة لأبقار مصابة بالتهاب الضرع

تم الحصول على ٢٠٠ عينة حليب مجموعة من ٦٤ بقرة من مناطق مختلفة في محافظة كربلاء المقدسة , وقد خضعت تلك العينات لبعض الاختبارات النوعية لتمييز العينات العائدة لأبقار مصابة بألتهاب الضرع عن تلك العائدة لابقار سليمة . اشتملت الاختبارات النوعية على اختبار كاليفورنيا وتقدير فعالية انزيم NAGase . وقد اوضحت النتائج خلو ١٢٢ عينة من الاصابة اي بنسبة ٦١ % من مجموع العينات المفحوصة بينما بلغ عدد العينات العائدة لابقار مصابة ٧٨ عينة اي بنسبة ٣٩ % من مجموع العينات .

اختبار كاليفورنيا

وقع الاختيار على هذا الاختبار نظراً لكونه فحصاً سريعاً ورخيصاً فضلاً عن امكانية اجرائه موقعياً ومختبرياً على الرغم من حساسيته الواطئة (Viguier *et al.* , 2009) .

يعتمد مبدأ هذا الاختبار على ان التفاعل الحاصل بين كاشف كاليفورنيا والمادة الوراثية (DNA) للخلايا الجسمية المتواجدة في الحليب يؤدي الى تكوين هلام (gel) يتناسب تركيزه مع عدد الخلايا الجسمية (Brito *et al.* ,1997).

اعتمدت نتائج فحص كاليفورنيا في دراستنا الحالية على شدة الدرجات التفاعلية (T و+١ و +٢ و+٣) ويتضح من الجدول (١) ان نسبة ٢٦.٩ % من مجموع العينات المفحوصة كانت شديدة الاصابة لإعطائها درجة تفاعلية +٣ يليها الدرجات التفاعلية (٢ و ١ وT) والتي بلغت نسبتها المئوية (١٦.٦ و ٢٦.٩ و ٢٩.٤) % , على التوالي .

ان الدرجة التفاعلية +٣ تؤدي الى حصول ترسبات واضحة جداً تحدث مباشرة بعد مزج الكاشف مع الحليب ولزوجة المزيج قوية التكوين بحيث تتكون كتلة من المادة الغروية تتخذ شكلاً محدباً عند تدوير المحراك و تكون اعداد الخلايا الجسمية عند الدرجة التفاعلية +٣ عالياً جداً تصل الى أكثر من ٥٠٠٠.٠٠٠ خلية / مل (Quinn *et al.* ,2004) .

الجدول (١) : نتائج فحص كاليفورنيا لتحديد العينات العائدة لأبقار مصابة بالتهاب الضرع .

الدرجة التفاعلية لفحص كاليفورنيا	النسبة المئوية لعينات الحليب %
T	٢٩.٤
١	٢٦.٩
٢	١٦.٦
٣	٢٦.٩

التقدير النوعي لفعالية انزيم NAGase

يقوم انزيم NAGase بتكسير مادة التفاعل p–Nitrophenyl N–acetyl β–D–glucosaminide وتحرير ناتج التفاعل البارانايتروفينول (P–Nitrophenol) ذو اللون الاصفر. وتكون عملية تقدير فعالية الانزيم نوعية لذا فقد صنفت هذه الفعالية وفق شدة اللون الاصفر المتكون الى ثلاث درجات هي اصفر فاتح ومتوسط الصفرة وشديد الصفرة. ويتضح من النتائج المبينة في الجدول (٢) ان نسبة العينات التي حررت البارانايتروفينول

بلون اصفر فاتح بلغت ٤٦.٩ % تليها العينات التي حررت هذا الناتج بلون متوسط الصفرة بنسبة ٢٧.٢ % فيما بلغت نسبة العينات التي حررت البارانايتروفينول بلون شديد الصفرة ٢١.٧ %.

الجدول (٢) : نتائج التقدير النوعي لفعالية انزيم NAGase لتحديد عينات لحليب العائدة لأبقار مصابة بالتهاب الضرع .

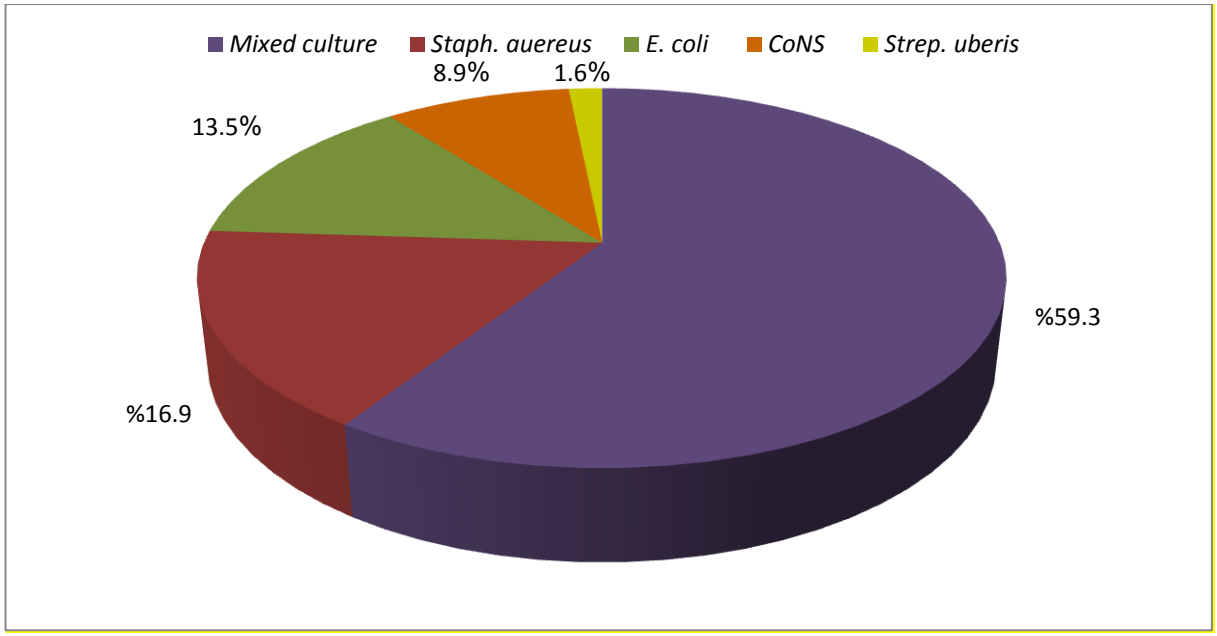
شدة لون P-Nitrophenol	النسبة المئوية لعينات الحليب %
أصفر فاتح	٤٦.٩
متوسط الصفرة	٢٧.٢
شديد الصفرة	٢١.٧

اثبتت العديد من الدراسات زيادة فعالية انزيم NAGase عند حدوث الاصابة بألتهاب الضرع في الحيوانات , كما لوحظ أيضاً ان ازدياد فعالية هذا الانزيم تقترن دائماً بزيادة عدد الخلايا الجسمية (SCC) مما يجعله مؤشراً واضحاً يعكس درجة التهاب الضرع (Mattila *et al.* ,1986 ; Kitchen ,1981) .

عزل وتشخيص البكتريا المسببة لالتهاب الضرع في الابقار

عزل البكتريا المسببة لالتهاب الضرع

تم زرع العينات الموجبة لفحصي كاليفورنيا وانزيم NAGase على وسطي اكار الدم والماكونكي وبينت النتائج ظهور نمو بكتيري في ٥٩ عينة منها أي بنسبة ٧٥.٦ % من مجموع العينات المصابة في حين لم تظهر العينات المتبقية والبالغ عددها ١٩ عينة أي نمو بكتيري أي بنسبة ٢٤.٤ % من مجموع العينات المصابة . واعتمادا على نتائج التشخيص التي سيرد ذكرها لاحقاً , اسفرت عملية العزل عن الحصول على ١٠ عزلات من بكتريا *S.aureus* و٨ عزلات من بكتريا *E.coli* و ٥ عزلات من بكتريا CoNS وعزلة واحدة من بكتريا *Strep. uberis* فضلا عن ظهور انواع بكتيرية اخرى بصورة عزلات مختلطة (Mixed cultures) اشتملت على اجناس *Klebsiella* و *Pseudomonas* و *Bacillus* و *Enterobacter* و *Acenitobacter* الشكل (١)



الشكل(١): أنواع البكتريا المعزولة والمسببة لالتهاب الضرع في الابقار في محافظة كربلاء المقدسة .

ان عدم ظهور نمو في قسم من العينات الموجبة لفحصي كاليفورنيا والانزيم يتفق مع ما اشارت اليه دراسات سابقة من ان ما يقرب من (٢٥- ٤٥) % من مجموع عينات الحليب المزروعة لا تسفر عن اي نمو بكتيري حتى بعد ٤٨ ساعة من الحضن (Makvec and Ruegg , 2003 ; Bradley *et al*. , 2007 ; Koivula *et al*. , 2007) .

من ملاحظة الشكل (١) يتضح ان بكتريا *S. aureus* و *E. coli* و CoNS و *Streptococcus* هي الانواع البكتيرية الرئيسة المسببة لمرض التهاب الضرع في الابقار في محافظة كربلاء المقدسة وتتفق هذه النتائج مع ماوجده Kurjogi and Kaliwal (2011) في دراسة لعزل البكتريا المسببة لالتهاب الضرع في الابقار في منطقة Karanataka في الهند فقد تم عزل بكتريا *S. aureus* و *E. coli* و CoNS و *Streptococcus* بنسب (28.1 و 21.08 و 18.91 و 15.3) % ,على التوالي. وفي دراسة اخرى اجريت في منطقة بني سويف في مصر اتضح ان الانواع البكتيرية المسببة لهذا المرض هي CoNS و *S. aureus* و *E. coli* و *Streptococcus agalactiae* و *Klebsiella pneumonia* و *Strep. Uberis* بنسب (37.8 و25.8 و18.7 و11.8 و 3.6 و2.8) %, على التوالي (Elbably *et al*. , 2013) .

تشخيص البكتريا المسببة لالتهاب الضرع

تشخيص بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus*

الصفات الزرعية والمجهرية (Cultural and Microscopical characteristics):

اسفرت نتائج الزرع الميكروبي على وسط اكار الدم بعد مدة حضن ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مْ عن الحصول على مستعمرات دائرية و محدبة و براقة وذات لون اصفر – ذهبي , كما اوضحت النتائج قابلية هذه المستعمرات على تحلل الدم من نوع الفا وبيتا (β –α) . ولم تتمكن هذه المستعمرات من النمو على اغلب تركيبات وسط الماكونكي . اما مجهرياً فكانت بهيئة مكورات موجبة لصبغة كرام ومتجمعة بهيئة عناقيد

(clusters) مما يدل على ان هذه البكتريا تعود لجنس المكورات العنقودية (Staphylococcus) وهذا يتفق مع ما وصفه (Quinn *et al.*,2004) لذا فقد اسفرت عملية التشخيص عن الحصول على ١٥ عزلة من بكتريا المكورات العنقودية .

تشخيص بكتريا الـ *S. aureus*

تم استخدام وسطي MSA و DNase , فضلا عن الفحوصات الكيموحيوية , لغرض تشخيص بكتريا *S. aureus* عن بقية انواع الـ *Staph.* ضمن الخمس عشرة عزلة المتحصل عليها في هذه الدراسة ,

A- النمو على وسط (Manitol salt agar (MSA

امتازت مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على الوسط MSA بكونها مستعمرات غير شفافة (Opaque) وبراقة (Shiny) وذات لون اصفر ، يستخدم وسط MSA لتمييز بكتريا الـ *S. aureus* عن بقية المكورات الموجبة لصبغة كرام المنتجة للكتاليز . يحتوي هذا الوسط على ٧.٥ % من كلوريد الصوديوم الذي يثبط نمو الكثير من الاحياء المجهرية , اما بكتريا *Staph.* فتتمكن من النمو عليه وتعمل على تخمير سكر المانيتول الموجود فيه مؤدية الى انتاج حامض الذي يتسبب في تحول كاشف الفينول الاحمر من اللون الوردي الى الاصفر (De La Maza *et al. ,1997*) .

B- النمو على وسط DNase :

يحتوي هذا الوسط على الـ DNA وهو يستخدم عادة للتمييز بين بكتريا *S. aureus* و CoNS اذ تتمكن الاولى من النمو عليه من خلال انتاجها لأنزيم DNase , لذا فقد تم تلقيح هذا الوسط بعزلات بكتريا *Staph.* المتحصل عليها في هذه الدراسة وحضنه لمدة ٢٤ ساعة ثم غمر الوسط بحامض الهيدروكلوريك المخفف الذي يعمل على ترسيب الـ DNA . وقد اوضحت النتائج ان مستعمرات (١٠) عزلات منها كانت محاطة بمناطق شفافة (Clear areas) بسبب تحلل الـ DNA بفعل انزيم الـ DNase المنتج منها مما يدل على ان هذه العزلات تعود للنوع *S. aureus* في حين لم يلاحظ وجود مثل هذه المناطق حول مستعمرات العزلات الخمس المتبقية مما يدل على انها تعود لبكتريا CoNS (Hart and Shears, 2004) .

C- الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

عند اجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات بكتريا *Staph.* وجد ان العزلات جميعها منتجة للكاتليز من خلال مقدرتها على تحطيم بيروكسيد الهيدروجين(H_2O_2) وتحويله الى ماء وغاز الأوكسجين اذ اتسمت النتيجة الموجبة بظهور فقاعات غازية .

و عندما خضعت تلك العزلات لأختبار إنتاج انزيم مجلط البلازما (coagulase) فقد اعطت ١٠ عزلات منها اي بنسبة ٦٦.٦٦ % نتيجة موجبة وهي العزلات ذاتها المنتجة لانزيم DNase مما يدل على أن هذه العزلات تعود لبكتريا *S. aureus* وهذا يتفق مع ماوصفه (Quinn *et al.* , 2004) فيما أعطت الخمس عزلات المتبقية منها اي بنسبة 33.33 % عزله نتيجة سالبة لهذا الاختبار وهي العزلات ذاتها غير المنتجة لانزيم DNase مما يدل على انها تصنف ضمن CoNS . ويوضح الجدول (٣) الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S. aureus* .

جدول (٣) : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S. aureus*

ت	الاختبار	النتيجة
1-	صبغة غرام	+
2-	المظهر	خلايا كروية بشكل عناقيد
3-	ظروف النمو	لا هوائية اختيارية
4-	اختبار الكاتليز	+
5-	اختبار الاوكسيديز	-
٦-	اختبار DNase	+
٧-	تخمر المانيتول	+
٨-	اختبار التجلط	+
٩-	الوسط الانتقائي Manitol –Salt Agar	+

+ نتيجة موجبة , - نتيجة سالبة

تشخيص بكتريا *CoNS* :

لقد تم تشخيص بكتريا CoNS من خلال الطرائق الاتية :

أ- أستخدام الطرائق المتبعة في تشخيص بكتريا *S. aureus* :

تم تشخيص عزلات بكتريا *Staph.* الخمس باتباع الطرائق ذاتها المستخدمة في تشخيص النوع *S. aureus* من اختبارات شكلية وكيموحيوية وكانت النتائج مطابقة لبكتريا *S. aureus* ماعدا اختباري DNase و Coagulase اللذين أعطيا نتيجة سالبة مما يدل على ان هذه البكتريا تعود لـ CoNS (الجدول ٣) .

ب- تشخيص CoNS على مستوى النوع :

تم استخدام العدة التشخيصية Api Staph. لغرض تشخيص عزلات CoNS على مستوى النوع وقد تبين من خلال النتائج ان ثلاث منها تعود للنوع *S. xylosus* وواحدة للنوع *S. lentus* فيما تعود الاخيرة للنوع *S. haemolyticus*

تشخيص بكتريا *E. coli* :

الصفات الزرعية والمجهرية (Cultural and Microscopical characteristics):

بعد زرع عينات الحليب على وسط الماكونكي وحضنها بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة تم الحصول على ثمانية عزلات بهيئة مستعمرات دائرية, منفردة وبراقة وذات لون وردي وكانت مخمرة لسكر اللاكتوز, اما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلات البكتيرية الثمانية هي *E. coli* (الجدول ٤).

يعد وسط الماكونكي وسطاً اختيارياً- تفريقياً , فهو اختياري من جهة لأنه يحتوي على صبغة Crystal violet المثبطة لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام كما يحتوي ايضاً على ملح Bile salt المثبط لنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام عدا مجموعة البكتريا المعوية (Enteric Bacteria) ومن جهة اخرى يعد هذا الوسط وسطاً تفريقياً كونه يميز بين الجراثيم المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز . يحتوي هذا الوسط

على اللاكتوز والفينول الاحمر إذ يعد الاخير دليلاً للرقم الهيدروجيني (pH indicator) لذا فان المستعمرات المخمر لسكر اللاكتوز تنتج حامض الذي يعمل بدوره على تغيير لون الدليل الى اللون الاحمر (Quinn *et al* . ,2004 ; Hart and Shears,2004) .

عند استخدام وسط EMB في تنمية العزلات الثمانية التي شخصت على انها بكتريا *E.coli* ظهرت مستعمرات هذه العزلات بهيئة مستعمرات متميزة بالبريق المعدني (Green metallic) وهذا يتفق مع ماوصفه (Quinn *et al* . ,2004).

تميزت مستعمرات بكتريا الـ *E. coli* المنماة على وسط Semisolid بانتشارها حول منطقة الزرع دلالة على قابلية البكتريا على الحركة (Hart and Shears, 2004) .

الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical test)

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول (٤) ان بكتريا *E. coli* قد اعطت النتيجة Acid\ Acid with gas في اختبار الـ TSI , وليس لها القابلية على تحليل اليوريا , وتتمكن من تحليل الحامض الاميني التربتوفان لذا فقد اعطت نتيجة موجبة في فحص الاندول , كما اعطت نتيجة موجبة في فحص المثيل الاحمر بينما كانت النتيجة سالبة في فحص VP , ولم تتمكن هذه البكتريا من استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون وبالتالي اعطت نتيجة سالبة في هذا الاختبار .

الجدول (٤) : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *E. coli*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	–
2	المظهر	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	هوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	–
٦	اختبار الحركة	+
٧	تخمر اللاكتوز	+
٨	الوسط الانتقائي EMB	+ (green metallic)
٩	فحص الاندول	+
١٠	MR	+
١١	VP	–
١٢	Citrate	–
١٣	TSI	A\A with gas
١٤	فحص اليوريا	–

(+): نتيجة موجبة , (–):نتيجة سالبة

تشخيص بكتريا *E. coli* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *E. coli* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E . وقد جاءت نتائج العدة التشخيصية لتؤكد ان البكتريا المعزولة هي *E. coli* .

تشخيص بكتريا *S. uberis* :

الصفات الزرعية والمجهرية (Cultural and Microscopical characteristics):

بعد زرع عينات الحليب على وسط اكار الدم وحضنها بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة وبوجود CO_2 تم الحصول على عزلة واحدة بشكل مستعمرات صغيرة نصف شفافة لها القابلية على تحليل الدم من نوع (α, β وγ) .اما مجهريا فقد ظهرت هذه العزلة بهيئة مكورات موجبة لصبغة كرام متجمعة بشكل ازواج او سلاسل (الجدول ٥).لذا فان التشخيص المقترح لهذه العزلة انها تعود لجنس المكورات السبحية (Streptococcus) (Quinn *et al.* , 2004).

الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical test)

تميزت بكتريا *Streptococcus* المشخصة في الخطوة السابقة بكونها سالبة لفحص الكتاليز وسالبة لفحص الاوكسيديز ولها القابلية على تخمر سكر الكلوكوز (Whiley and Hardi,2009). (الجدول ٥).

الجدول (٥) : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *Streptococcus*

ت	الاختبار	النتيجة
1	صبغة غرام	+
2	المظهر	خلايا كروية بشكل ازواج اوسلاسل
3	ظروف النمو	لاهوائي اختياري
4	اختبار الكاتليز	–
5	اختبار الاوكسيديز	–
٦-	تخمر الكلوكوز	+

تشخيص بكتريا الـ *Streptococcuss* باستخدام العدة التشخيصية .Api Strep .

استخدمت العدة التشخيصية Api Strep في تشخيص بكتريا المكورات السبحية على مستوى النوع .وقد اتضح من النتائج ان التشخيص المقترح لهذه العزلة هو *Strep. uberis* .

تشخيص بكتريا *S. aureus* و *E. coli* بالطرائق الجزيئية

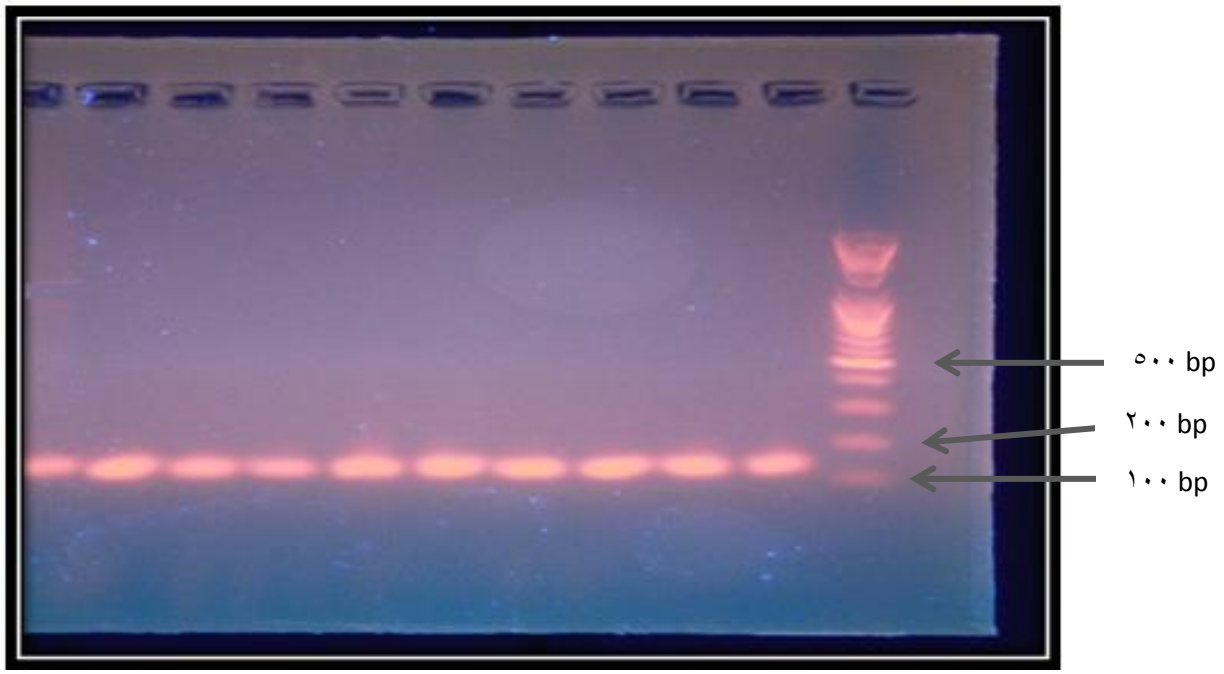
يستخدم تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لأجراء تشخيص سريع للعزلات البكتيرية , يستخدم هذا التفاعل كاختبار تاكيدي بعد تشخيص البكتريا بالطرائق الكيموحيوية . وحالياً يلعب الـ PCR دوراً مهماً في الدراسات السريرية للاحياء المجهرية اذ يمكن بواسطته تشخيص هذه الاحياء وجيناتها (Mehrotra *et al.*,2000; Towner *et al.*,1998 ,Amghalia *et al.*,2009 ; Jonas *et al.*, 2002; Perez-roth *et al.* ,2001) .

استخدمت تقنية الـ PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود جين fem A في بكتريا *S. aureus* وجين pho A في بكتريا *E. coli* .

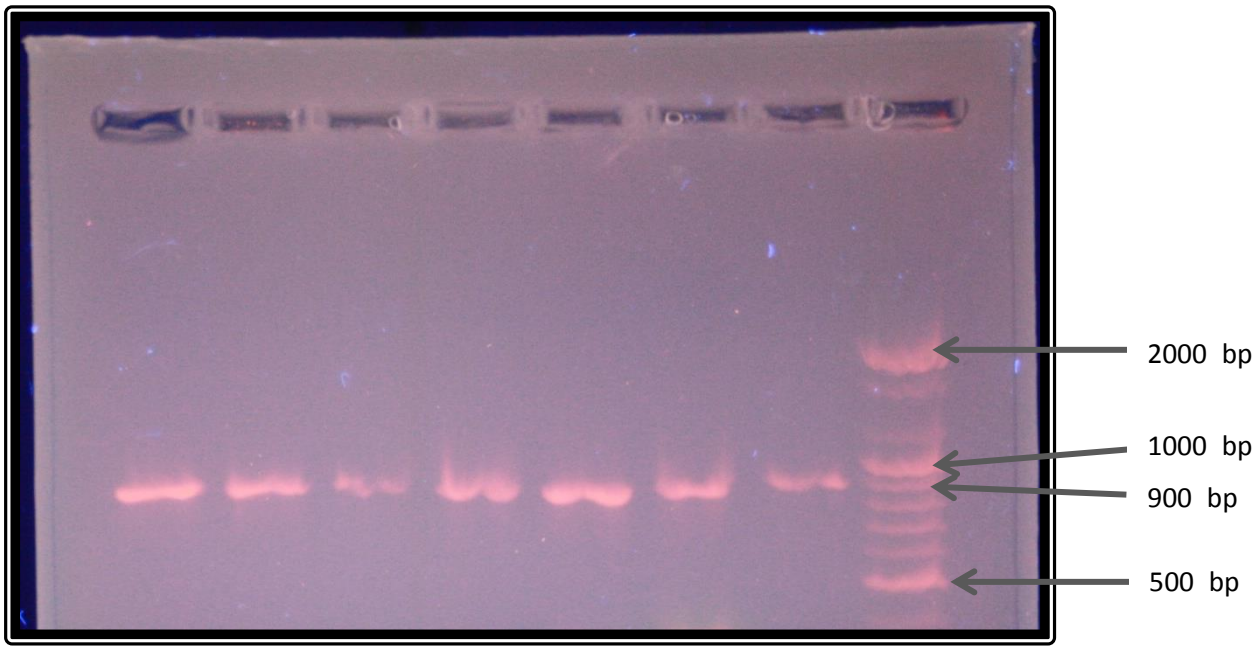
تم استخلاصDNA من نوعي البكتريا قيد الدراسة بطريقتين هما الاستخلاص بطريقة الغليان والاستخلاص باستخدام العدة (Kit) واوضحت النتائج امكانية استخلاصDNA من بكتريا *E. coli* بنجاح باستخدام كلا طريقتي الاستخلاص فيما اقتصرت عملية استخلاص DNA من البكتريا *S. aureus* بطريقة العدة (Kit) . ويمكن تفسير ذلك بان بكتريا *E. coli* تصنف ضمن البكتريا السالبة لصبغة كرام والتي تتميز بكون جدارها الخلوي يمثل طبقة رقيقة لذا يمكن تحليله باستخدام كلا طريقتي الاستخلاص , بينما يتصف جدار بكتريا *S. aureus* باحتوائه على طبقة سميكة من الببتيدوكلايكان لذا لايمكن تحليله بطريقة الغليان .

يوضح الشكل (٢) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي يتبين من خلالها ان البادئ (Primer) الخاص بالجين femA كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه ١٣٢ bp, لذا يمكن استخدام هذا الجين في في تشخيص بكتريا *S. aureus* .

اما الشكل (٣) فيوضح الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي يتبين من خلالها ان البادئ (Primer) الخاص بالجين phoA كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه ٩٠٣ bp , لذا يمكن استخدام هذا الجين في تشخيص بكتريا *E. coli* .



الشكل (٢): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S. aureus* بإستعمال البادئ النوعي لجين *femA* (132bp) , تركيزالهلام (1.5)% ،الفولتية (٨٠) فولت لمدة (٣٠) دقيقة



الشكل(٣): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *E. coli* بإستعمال البادئ النوعي لجين *phoA*(903bp) , تركيزالهلام (1.5)% ،الفولتية (٨٠) فولت لمدة (٣٠) دقيقة

المصادر

Amghalia, E., Nagi, A. A., Shamsudin, M. N., Radu, S., Rosli, R., Neela, V. and Rahim, R. A. (2009). Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolated from Malaysian hospitals. Research Journal of Biological Sciences, 4, 444-448.

Berry,D.P. and Meaney,W.J.(2005).Cow factors affecting the risk of clinical mastitis. Irish Journal of Agricultural and Food Research 44:147-156.

Bogni, C.; Odierno, L.; Raspanti, C.; Giraudo, J., Larriestra, A.; Reinoso, E.; Lasagno, M.; Ferrari, M.; Ducrós, E.; Frigerio, C.; Bettera, S.; Pellegrino, M.; Frola, I.; Dieser, S. and Vissio, C.(2011). War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens.Science against microbial pathogen :communicating current research and technological advances .

Bradley, A. J. (2002).Bovine Mastitis :An Evolving Disease. The Veterinary Jornal ,163,1-13.

Bradley, A.J.; Leach**,** K.A; Breen, J.E. ; Green, L.E. and Green, M.J. (2007). Survey on the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Rec. 160:253-257.

Brito, J.R.F.; Caldeira,G.A.V.; Verneque,R.S. and Brito, M.A.V.P. (1997). Sensibilidade e especificidade do California Mastitis Test como recurso diagnostic damastite subclinical em relacao a contagem de celulas somatica.Pesquis Veterinaria Brasiletra. 17(2):49-53.(Citted from Pradiee *et al*.,2012).

De La Maza,L.M. ; Pezzlo,M.T.; Baron, E.J.(1997).Color Atlas of Diagnostic Microbiology .Mosby-year book,Inc. USA.

Dhakal, I.P. (2006). Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. J.Vet.Med.53:81-86.(citted from Guha, A. *et al*.(2012).

Elbaby, M.A.; Emeash, H.H. and Asmaa, N.M. (2013). Risk Factors Associated with Mastitis Occurrence in Dairy Herds in Benisuef, Egypt. World's Vet. J.3(1):05-10,2013.

Ericsson, U.H. , Lindberg A, Persson WK, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Ost M, Bengtsson B (2009).Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. Vet. Microbial.116:270-282.(citted from Cheng,D. R. *et al*.(2010)) .

Green,M. and Bradley,A. (2004).Clinical form-*Staphylococcus aureus* mastitis in cattle .UK VET-VOLUM 9 No 4 .

Guha, A. ; Guha, R. and Gera ,S.(2012).Comparision of somatic cell count ,California mastitis test ,chloride test and rennet coagulation time with bacterial culture examination to detect subclinical mastitis in riverine buffalo(Bubalus bubalis). African Journal of Microbiology Research Vol. 7(41),pp.5578-5584.

Hart,T and Shears, P.(2004).Color atlas of Medical Microbiology. Second edition.Mosby,an imprint of Elsevier Limited .

Jnas, D., Speck, M., Daschner, F. D. and Grundmann, H**.** (2002). Rapid PCRbased identification of methicillinresistant Staphylococcus aureus from screening swabs. Journal of Clinical Microbiology, 40, 1821-1823.

Kitchen,B.(1981).Review of the progress of dairy science :Bovine mastitis :Milk compositional changes and related diagnostic test,J.Dairy Res.48,167-188 .

Koivula, M.; Mantysaari, E. A. ; Pitkala, A. and Pyorala, S.(2007). Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in anew database for mastitis pathogens in finland .Acta Agric.Scand.A 57:89-96.

Kong, R. Y. C., So, C. L., Law, W. F. and Wu, R. S. S**.** (1999). A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic (ETEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) strains of *Escherichia coli*. Marine Pollution Bulletin 38, 1207-1215.

Kurjogi, M.M. and Kaliwal, B.B. (2011). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated From Bovine Mastitis. Advances in Applied Science Research, 2(6): 229-235.

Makovec, J.A.; and Ruegg,P.L.(2003).Rusults of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001 .J. Dairy Sci. 86:3466-3472 .

Mattila,T. Syvajarvi,J. and Sandholm, M.(1986).Milk antitrypsin, NAGase, plasmin and bacterial replication rate in whey-effects of lactation stage, parity and daily milk yield ,J.Vet. Med. B33 ,462-470 .

Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. Journal of Clinical Microbiology 38, 1032-1035.

Park, S. H. ; Lee, J.-H. and Lee, h. K. (2000). Purification and Characterization of Ethylene induced β-1,3-Glucanase from Soybean [Glycine max(L.)] Leaves . Korean Biochem. J., 25(7):597-603.

Perez-Roth, E., Claverie, F., Villar, J. and Mendez, S**.** (2001). Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicilin and mupirocin resistance. Journal of Clinical Microbiology, 39, 4037-4041.

Quinn, P. J. ;Carter, M. E. ;Markey, B. ;and Carter, G. R. (2004).Clinical Veterinary Microbiology , Elsevier limited.

Suojala, L.; Kaartinen, L.and Pyorala, S.(2013) Treatment for bovine Escherichia coli mastitis – an evidence-based approach. J. vet. harmacol. Therap. doi:10.1111/jvp.12057.

Towner, K.J., Talbot, D.C.S., Curran, R., Webster, C.A. and Humphreys, H. **(**1998). Development and evaluation of a PCRbased immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Medical Microbiology, 47, 607-613.

Viguier, C.; Arora, S.;Gilmartin, N.; Welbeck,K. and O'Kennedy,R.(2009).Mastitis detection :current trends .

Whiley, R.A. and Hardi,J.M (2009):In Bergey`s manual of determinative bacteriology,2thed.;Wilkins:Baltimore MA,USA.