المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ١٩، العدد ٢، ٢٠٠٥ (١٩٣-٢٠١)

التحري عن جراثيم المكورات العنقودية المرضية المنتجة للمحافظ والمعزولة من حالات التهاب ضرع الابقار والجامـوس

جورجيت نيسان شمعون

فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل
(الأستلام ٤ كانون الأول ٢٠٠٥؛ القبول ٢ تشرين الأول ٢٠٠٥)

الخلاصـة

تم في هذه الدراسة التقصي عن سلالات جراثيم المكورات العنقودية المرضية المنتجة للمحافظ والمعزولة من حالات التهاب ضرع الابقار والجاموس اذ تم عزل 23 (57.5 %) و 8 (٥٣%) عزلة تابعة لهذه الجراثيم من حالات التهاب ضرع الابقار والجاموس وكانت) 6 (26 %و 2 (13.3 %) عزلة منتجة للمحافظ على التوالي وان 9 (1 .39 %) و %) 4 (26.6 عزلة كانت منتجة لمادة Slim فضلا عن زيادة عدد السلالات المنتجة للمحافظ و Slim بعد تنمية السلالات في الوسط الحاوي على الكلوكوز والحليب ، كما أظهرت نتائج الدراسة التجريبية في الجرذان وجود المحافظ في المقاطع النسجية المحضرة من الرئة والمصبوغة بصبغة هيماتوكسلين أيوسين H & E على هيئة هالة حول الخلايا الجرثومية كما اعطت تفاعلا موجبا مع تقنية حمض البريودك شيف Periodic acid shiffs .

DETECTION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CAPSULES PRODUCER ISOLATED FROM BOVINE & BUFFALOE MASTITIS

G N Shamoon

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

ABSTRACT

This study was done for the detection of capsulated *Staphylococcus aureus* strains which isolated from bovine & buffaloes Mastitis . 23 (57.5 %) & 8 (53 %) strains of these bacteria were isolated , 6 (26 %) & 2 (13.3 %) were capsule producing strains, and that 9 (39.1 %) & 4 (26.6 %) were slime producing strains, as well as an increase in number of capsules and slim producing strains were observed following growing of these bacteria in culture media containing glucose, milk. The experimentally histo- pathological study revealed presence of capsules in lung sections stained with Hematoxylin – Eosin as a halo area which appears around the bacterial cells . In edittion to a strong positive reaction with periodic acid shiffs.

المقدمـــة

عرفت جراثيم المكورات العنقودية المرضية بكونها مسبة للعديد من الامراض للانسان والحيوان منذ اكثر من 100 عام اذ اعتبرت هذه الجراثيم من المسببات الشائعة لالتهاب الضرع الحاد وتحت الحاد على الرغم من وجود مسببات مرضية عديدة اذ يسبب المرض خسائر اقتصادية فادحة في صناعة الالبان (1 , 2) وتعزي قدرة الجراثيم على

احداث المرض الى امتلاكها العديد من اللاواصق المرتبطة بالسطح والانزيمات والذيفانات الخارجية والمحافظ المتعددة السكرية Capsular polysaccharide التي تساعد هذه الجراثيم في الالتصاق بالاغشية الخلوية للخلايا الحقيقية النواة و مقاومة الابسنة والبلعمة Opsonophagocytosis وتحليل الخلية الحقيقية النواة وتحفز على انتاج سلسلة الوسائط المناعية للمضيف (3 , 4). وجد ان سلالات قليلة في هذه الجراثيم تنتج محافظ حقيقية والتي تكون بشكل طبقة خارجية تحيط بالجدار الخلوي وبسمك 200 نانوميتر من الممكن رؤيتها بالمجهر الضوئي وباستخدام طريقة الصبغة السالبة (5) في حين بينت دراسات المجهر الالكتروني ان معظم سلالات هذه الجراثيم تنتج طبقة خفيفة تختلف في التركيب المناعي والمستضدي عن التي في مكونات الجدار الخلوي التي تعرف ب Micro capsule ، اذ لوحظ ان هذه الطبقة تتكون من سكريات متعددة مؤلفة مـــن 2 – actamido – 2 – deoxy – D – Mannuronic acid ومرتبطة مـــــع 2 –actamido – 2- deoxy focuse – 2 ، كما وجد تكون مواد متعدد السكريد خارجية في بعض سلالات جراثيـــم *Staph . aureus* استجابة لبعض الظروف البيئية الخاصة ، تدعى هذه المواد ب Slim او طبقة المواد اللزجة وتتكون هذه الطبقة من hexose و hexosamin و Prolein و phosphorus وتختلف هذه الطبقة كيماويا" ومناعيا" عن السكريات المتعددة للمحافـظ (2).

ولاهمية هذه المحافظ في امراضية جراثيم المكورات العنقودية المرضية اجريت هذه الدراسة للتحري عن السلالات المنتجة للمحافظ و Slim والمعزولة من حالات التهاب ضرع الابقار والجاموس السريري وتأثير اضافة الكلوكوز والحليب على انتاج هذه المكونات فضلا" على التأكد من وجودها تجريبيا" من خلال احداث الخمج التجريبي في الجرذان.

طرائق العمـل

تم جمع (40) عينة حليب من الابقار و (١٥) أخرى من الجاموس، مصابة ظاهريا" بالتهاب الضرع. وتم جمع عينات الحليب في قناني معقمة ثم لقحت نماذج من الحليب على أطباق وسط اكار الدم Blood agar والمجهز من شركة Oxoid. حضنت الاطباق بدرجة 37 م ه ولمدة 24 ساعة في ظروف هوائية ، تم التعرف الى شكل الجرثومة مجهريا باستخدام صبغة كرام بعد دراسة صفاتها المز رعية ثم اختبرت المستعمرات المشكوك بها ونقلت على وسط اكار سكر المانتول والملح Mannitol Salt agar (Oxoid) وحضنت بالظروف النموذجية لنمو الجرثومة ثم آجري اختباري Catalase و Coagulase للمستعمرات المخمرة لسكر المانتول بعد تنميتها على وسط اكار نقيع القلب والمخ oxoid Brain heart infusion agar (6) لقحت المستعمرات الموجبة لاختبار Coagulase على وسط Columbia agar والحاوي على 2 % كلوريد الصوديوم ثم اخذت 2 – 3 مستعمرة من المستعمرات النامية ووضعت في 1 مل من الماء المقطر المعقم ثم صبغت بطريقة الصبغة السالبة المحورة وذلك بأخذ قطرة من المعلق المحضر على الشريحة ومزجت مع قطرة من الحبر الهندي ثم نشر المزيج وتركت الشريحة لتجف علقت المسحة بصبغة المثيل البنفسجي وبتركيز 1 % لمدة دقيقة واحدة ثم فحصت الشرائح مجهريا للتحري عن وجود المحافظ في السلالات المعزولة وتم تصويرها فوتوغرافيا" (7) ، كما أجرئ اختبار انتاج المادة اللزجة Slime للسلالات السالبة اذ تم تنمية السلالات هذه في قناني حاوية على وسط Trypticase soya broth وحضنت بدرجة 37م ه ولمدة 24

ساعة بعد التحضين وضعت قطرات من السفرأنين بعد تفريغ محتويات القناني ووضعت بشكل مقلوب للتخلص من آثار الصيغة الزائدة ثم سجلت النتائج بملاحظة النمو الملتصق بشكل مواد لزجة ملتصقة على الجدران الداخلية للقناني واصطباغها باللون الاحمر (8)، كما تم التحري عن انتاج المحافظ و Slime بالطريقة المذكورة اعلاه بعد تلقيح السلالات المعزولة في وسط Brain heart infusion broth والحاوي على 1 % لكل من الحليب والكلوكوز ولدراسة تأثيرها على انتاج المحافـــظ و Slime (9) .

استخدمت خمسة من ذكور الجرذان وبوزن 190 – 200 غم وبعمر (8) أسابيع اذ تم حقنها ب 0.5مل من 2×10^7 Cfu / مل لعزلة منتجة للمحفظة في التجويف الخلبي Intra (10) Peritoneal (I.P) وبعد مرور سبعة أيام من الحقن ثم قتل الجرذان لاجراء الصفة التشريحية واخذت نماذج من نسيج الرئة حيث غمرت في محلول الفورمالين الدارئ المتعادل 10 % لغرض تحضير شرائح نسجية وبسمك 4 – 6 مايكرون ثم صبغت بصبغة هيماتوكسلين – ايوسين وصبغة حمض البريوديك شيف Periodic acid shiff's (PAS) (11) فحصت مجهريا ثم صورت فوتوغرافيا".

النتائـــج

تم الحصول على 23 و 8 عزلات عائدة لجراثيم *Staph . aureus* وبنسبة %) (57.5 و (53 %) من التهاب ضرع الابقار والجاموس السريري على التوالي والمبينة في الجدول 1 ، كما يوضح الجدول ٢ ان 6 عزلات من الجراثيم المعزولة من حالات التهاب الضرع السريري في الابقار كانت منتجة للمحافظ في حين كانت 9 عزلات منتجةللـ Slim ، و ان 2 و 4 عزلات كانت منتجة للمحافظ و Slim من الجراثيم المعزولة من حالات التهاب ضرع الجاموس ، أما الجدول 3 يبين زيادة في عدد السلالات المنتجة للمحافظ و Slim بعد اضافة الكلوكوز والحليب للوسط الزرعي المستخدم في تنمية هذه الجراثيم . تظهر الصورة 1 وجود المحفظة في الجراثيم المعزولة المنتجة للمحافظ وبطريقة الصبغة السالبة المحورة اذ تظهر المحافظ بهيئة هالة حول الخلايا التي تأخذ لون صبغة المثيل البنفسجي ، وتوضح الصورة 2 وجود النمو الملتصق بشكل خيوط لزجة ملتصقة على الجدران الداخلية للقناني الحاوية على الوسط المزروع بهذه الجراثيم وتظهر هذه المادة بلـون احمر (صبغة السفرأنين) هذا دلالة على تكون Slim وتبين المقاطع النسجية وجود المحافظ في بعض السلالات المعزولة من خلال التفاعل الموجب لصبغة PAS اذ تظهر بلـــون وردي صورة 3 كما ان الصورة 4 توضح وجود المحافظ بشكل مجاميع حول خلايا هذه الجراثيم والمصبوغة بصبغة H & E .

جدول (1) عدد ونسب عزلات Slap , aureus المعزولة من التهاب ضرع الأبقار والجاموس السريري

مصدر العينة	عدد العينات	عدد ونسب العزلات
التهـــاب ضـــرع الابقار	40	23 (٥٧.5 %)
التهـــاب ضـــرع الجاموس	15	8 (% 53)

جدول (2) عدد ونسب العزلات المنتجة للمحافظ Slim

مصدر العينة	عدد ونسبة العزلات المنتجة للمحافظ		عدد ونسبة العزلات المنتجة Slim	
التهاب ضرع الابقار	6	% 26	9	% 39.1
التهاب ضرع الجاموس	2	% 13.3	4	% 26.6

جدول (3) يبين تأثير الحليب والكلوكوز على انتاج المحافظ Slime

مصدر العينة	عدد ونسبة العزلات المنتجة للمحافظ بعد اضافة الكلوكوز والحليب	عدد ونسبة العزلات المنتجة Slim بعد اضافة الكلوكوز والحليب
التهاب ضرع الابقار	8 (34.7 %)	11 (47.8 %)
التهاب ضرع الجاموس	3 (20 %)	5 (33.3 %)

صورة (1) توضح المحفظة في جراثيم Staph . aureus المعزولة الصبغة السالبة المحورة .

صورة (2) توضح Slim في جراثيم Staph . aureus المعزولة الصبغة سفرأنين .

صورة (٣) صورة فوتوغرافية نسجية لمقطع من رئة جردي مخمج بجرثومة Staph . aureus توضح التفاعل الموجب لصبغة PAS .

صورة (٤) صورة فوتوغرافية نسجية لمقطع من رئة جردي مخمج بجرثومة Staph . aureus يوضح تموضع الجرثومة بهيئة مجاميع فضلا عن وجود المحافظ الصبغة H & E.

المناقشــة

ازداد الاهتمـام بدراسـة المحـافظ الخـارج خلويـة فـي الجـراثيم لـدورها فـي العمليـة الامراضية للانسان والحيوان اذ ان احتواء بعض جراثيم المكورات العنقودية الممرضـة علـى المحـافظ يعـزز مـن ضـراوة الجرثومـة ومقاومـة البلعمـة كمـا تـساهم ايضـا فـي التـصاق هـذه الجـراثيم بخلايـا المضيف (10) . لـوحظ ان السلالات الحاوية علـى المحـافظ والمعزولـة مـن حـالات التهـاب الـضرع فـي الابقـار تعـود الـى مجموعـة مختلفـة عـن الـسلالات المعزولـة مـن الحـالات المرضـية للانـسان اذ تكـون التراكيـب الـسطحية والمستـضدات مخفيـة بواسـطة هـذه المحافظ (1) صنفت السلالات السريرية المعزولة من الانسان والحاوية علـى المحـافظ الـى 11 نمط مصلي استنادا" الى التنميط المناعي لمتعدد السكريد المكون لهذه المحافظ اذ لوحظ ان % 70 – 80 من هذه السلالات تعود الى النمطيـــن 5 و8 (12) كما لـوحظ وجـود علاقـة بـين هذين النمطين وعوامل الضراوة كاحداث Toxic shock syndrome ، سجل تواجد النمطين في السلالات المعزولة من مصادر حيوانية (10).

تـم الحـصول فـي هذه الدراسـة علـى 23 (9.2 %) و 8 (1.2 %) عزلـة تابعـة لجـراثيم المكورات العنقودية المرضية من حالات التهاب الضرع السريري من الابقار والجاموس علـى التوالي وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسات محلية وعالمية عديدة والتي بينت بان

هذه الجراثيم هي احدى واكثر المسببات الجرثومية لالتهاب ضرع الابقار والجاموس (16 2 ,13 , 14 , 15) كما أظهرت نتائج الفحص المجهري للجراثيم المعزولة وجود المحافظ اذ ظهرت بشكل هالة بيضاء تحيط بخلايا الموجبة لصبغة كرام اذ تعد صبغة الحبر الهندي ومظهر المستعمرات المخاطي على الاوساط الزرعية من طرق التشخيص المعروفة للمحافظ والمبينة في الجدول 2 والصورة 2 وهذا يوافق ما أشار اليه (17) في بعض من سلالات جراثيم المكورات العنقودية تكون محافظ حقيقية.

أظهرت النتائج ان استخدام الحليب والكلوكوز ادى الى زيادة في انتاج المحافظ والمواد اللزجة ، اذ بينت النتائج ظهور المحافظ في 8 و3 عزلات اخرى من التهاب ضرع الابقار والجاموس بعد تنمية الجراثيم المعزولة في الوسط الحاوي على الحليب والكلوكوز كما توضح النتائج زيادة عدد العزلات المنتجة للمواد اللزجة من في الجدول 3 وهذا يقارب دراسات العديد من الباحثين اذ بينت دراسة (3 , 18) بأن استخدام بعض الاوساط الزرعية الحاوية على المصل والكلوكوز والحليب او اضافة بعض المواد للوسط الزرعي الخاص بجراثيم المكورات العنقودية يؤدي الى زيادة انتاج مواد Slim في هذه الجراثيم استجابة لوجود هذه المواد في الوسط ، كما اكد (18) وجماعته وجود علاقة بين هذه المواد وزيادة مقاومة الجراثيم للبلعمة من خلال تكوين Micro capsule وبالتالي زيادة ضراوة الجرثومة كما توافق الدراسة الحالية دراسة (19 و20) والتي بينت بأن السلالات المعزولة من هذه الجراثيم ومن حالات التهاب ضرع الابقار عند تنميتها في الحليب الخام الغني بالمواد المغذية الاساسية او في الاوساط الحاوية على السكريات يعزز من انتاجها لمواد خارج خلوية أي ان انتاج هذه الطبقة يتأثر بالعوامل البيئية وبظروف النمو ، أن زيادة تركيز الكلوكوز في الوسط الزرعي يؤدي الى زيادة انتاج Slim من قبل هذه الجراثيم ، وجد ان العديد من السلالات تكون مواد سكرية خارجية لا تندمج مع جدار الخلية اذ تكونها فقط في ظروف معينة مثل وجود الكلوكوز (17) اذا يعتقد ان الجين المنتج لهذه المواد يحث بوجود مصادر ايضية في الوسط كما تزداد الاصابة بالمرض عندما تكون سلالات هذه الجراثيم مخاطية او منتجة للـ Slim (19) . وان قدرة هذه الجراثيم لاستيطان الغدد اللبنية تزداد عندما تكون الاصابة بواسطة السلالات المخاطية او المنتجة للSlime اكثر من

السلالات غير المخاطية (17) كما أظهرت النتائج ان السلالات التي تم تنميتها في الوسط الخالي من الكلوكوز والحليب انتجت Slim بعد اضافة الكلوكوز الى الوسط ومن الجدير بالذكر أنه عند العزل الاولي لهذه الجراثيم تكون بعض السلالات منتجة للمحافظ ولكن بعد الزرع المتكرر في المختبر تفقد هذه السلالات خاصية انتاج المحافظ (20). لذا من الممكن الاستفادة من خاصية اضافة مواد محفزة الى الاوساط الزرعية لانتاج المحافظ .

أن الاوساط الزرعية الحاوية على الحليب والكلوكوز تساعد هذه الجراثيم في انتاج محافظ كاذبة Pseudo capsules لها صفات مقاومة البلعمة كما وجد ان هذه الجراثيم تنتج المحافظ على اوساط محورة كاستخدام Staphylococcus Media, 110 والحاوي على المصل (20، 21).

ان نتائج الفحص النسيجي التي أظهرتها مقاطع نسيج الرئة المخمجة بالجرثومة والمصبوغة بصبغة هيماتوكسلين ايوسين تبين وجود المحفظة فضلا عن التفاعل الموجب الذي ابدته مع تقنية PAS وهذا يشير الى قابلية هذه المحافظ على حماية الجرثومة من دفاعات المضيف وهذا ما ذكرته بعض الدراسات التجريبية حيث اشارت الى ان المحافظ لها دور في العملية الامراضية اذ تزيد من ضراوة الجراثيم ومقاومتها للبلعمة في الفئـــران وبالتالي بقاء الجرثومة واستمرارها في المجرى الدموي للمضيف المصاب كما وجد بان هذه المحافظ تؤدي الى تكوين الخراجات في هذه الحيوانات (9 ,22 ، 23)

وان الاضداد الناتجة عن الخمج بالمحافظ لها القابلية على حماية المضيف من افات مرضية متمثلة بالتهاب شغاف القلب والتجرثم الدموي واصابات الكبد والطحال والتي تؤدي الى الموت (23).

المصـادر

1. Boerlin P, Kuhnert P, Hussy D and Schacllibaum M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in case of bovine Mastitis. J Clinical Microbiol. 2003; 41: 767 – 771.
2. Tollersud T *Staphylococcus aureus* Mastitis. Thesis for the degree of: Doctor Med Vet. National Vet Institute. Oslo 2001.
3. Riordan KO and Lee JC . *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides Clin Microb Rev 2004; 17: 218 – 234.
4. Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein B1, and Modoff G. Mechanism of microbial disease 3rd edition. Philadelphia Lippincott William & Wilkins 1999. pp135.
5. Captain GG and Costerction S. Morphological examination of the glycocalyces of *Staphylococcus aureus* strains infect lmmune. 1982; 36: 759 – 767.
6. Silva WP Destro MT Laudgraf M and Franco B. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms – Braz J Microbiol 2000 ; 31 : 1- 6.
7. Bottone Ed Patel P and Robin T. Mucoid encapsulated *Entrococcus faecalis* an emerging morphologic isolated from patients with urinary tract infections Diagn . Microbiol Infec Dis 998; 31 : 429 – 430.
8. Christensen G D Simpson W A Bisno A L Beachey E H. Adherence of slim – producing strains of *Staphylococcus aureus* to smooth surfaces. Infec & Immun 1982; 37: 318 – 326.
9. Baldassarri L Cecchin R Bertuccin L Ammendolin MG Losi F Areola CR, Mou tanaro L, Rosin R Gherardi G, Dicuonzo G, Orefic Gondcreti R. Enterococcus spp produces slim and survives in rat peritoneal macrophages. Med Microbiol Immunol 2001; 190: 113 – 120.
10. Hong RH Sonll P and Albert G. Prevalence of capsular poly saccharide types of *staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk and protection of *Staph. aureus* infection in mice with CP vaccine. J Vet Med 2000;
62: 1331 – 1333.
11. Drury RAB and Wallington EA. Carton's histological technique, 5th edition Oxford university Press, 1980.
12. Koneman MD, Alten MD , Juada , Hreckeu Bergen Ms and Winn Jr . Atlas textbook of diagnostic microbiology, 5th edition. Philadelphia Lippincot 1997.

13- الجوالي ، الهام عبد الغني قاسم . العلاقة بين الجراثيم المسببة لالتهاب الرحم والتهاب الضرع في الابقار. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل 1996.

١٤- زورة، خزعل علي ثجيل. دراسة بعض الجوانب السريرية والبكتريولوجية لمرض التهاب الضرع في الابقار. رسالة ماجستير كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، طب العلاج البيطري 1979.

15. Abdul Wahab A R . Studies on Mastitis in buffaloes . M Sc Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad 1982.
16. Kupar M P and Singh R P. Studies on clinical mastitis in cows, buffaloes and goats in Haryna State . Ind. Vet . J. (1987); 55: 803 – 806.
17. Tollersrud T Kenny JR Reitza and Lec JC. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and of other staphylococci spp from Europe & United States. J Clin Microbiol 2000; 38: 2998 – 2003.
18. Baselga RI , Albizu , Orena AM. *Staphylococcus aureus* capsule and slim as virulence factors in ruminant mastitis .A review. Vet Microbiol 1994; 39: 1950 – 2004.
19. Ammendolia MG , Dirosa R, Montanro L, Arciola C . Baldassarri L. Slim production expression of the slim associated antigen (SAA) by staphylococcal clinical isolates . J Clin Microbiol 1999; 37: 3235 – 3238.
20. Cucarlle C N , Tome A , Ubeda C M , Trotond P , Monzon M , Perris C , Amorena B , Lassa I , Renades J R . Role of biofilm associated protein Bap in the Pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect & Immun 2004; 72: 2177 – 2185.
21. Norcross NL and Opdeebeecke JP. Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. Vet Micro 1983; 8: 347 – 404.
22. Watson DL. Virulence of *Staphylococcus aureus* grown in vitro or in vivo . Res Vet Sci 1982; 32: 311 – 315.
23 Sordelli Do, Buzzola FR, Gomes MI , Steele Moore D, Barge E, Gentilini M, Catalono M, Reitz AJ , Tollersrud T, Deuamiol G, Jeric P and Lee C. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina . J. Clin . Microbiol . 2000 ; 38 : 846 – 850 .