

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

\*ميساء صالح مهدي الحمداني /جامعة كربلاء /كلية الصيدلة

أ.م.د. علي عبد الكاظم الغانمي /جامعة كربلاء/كلية العلوم

المراسلات الى : أ.م.د. علي عبد الكاظم الغانمي

\* البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول

### الخلاصة :

تضمنت هذه الدراسة تحديد الابقار المصابة بالتهاب الضرع عن الابقار السليمة من خلال فحص 200 عينة حليب مأخوذة من ابقار مرعاة في مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة وذلك بالاعتماد على فحص كالفورنيا وفعالية انزيم NAGase وقد اوضحت النتائج خلو 122 عينة من الاصابة بينما بلغ عدد العينات العائدة لابقار مصابة 78 .

اشتملت هذه الدراسة ايضاً على عزل البكتريا المسببة لالتهاب الضرع وتشخيصها بالطرائق التقليدية والجزئية وقد تم الحصول على 10 عزلات من بكتريا *Staphylococcus aureus* و5 عزلات من بكتريا Coagulase Negative staphylococcus(CoNS) و8 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* .

## 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 38 % من اجمالي الكلفة الكلية التي تقوم عليها تلك الصناعة . تشمل 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 تأثيرها في جهازه المناعي (Green and Bradley ,2004) . و يجب ان لا يغفل دور بكتريا *Escherichia coli* كونها تمثل 80 % من البكتريا القولونية (Coliform bacteria) التي تشارك كمرضات 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 لضرع 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. ,2011) .

تتوفر طرائق عديدة للكشف عن التهاب الضرع و تشخيصه و لعل اهمها اختبار كالفورنيا 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 (Viguiet 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 سواءً بالطرائق التقليدية او الجزيئية .

## المواد وطرائق العمل

تم جمع 200 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) برداذ من الكحول الايثيلي % 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 :-

### 1- اختبار كاليفورنيا (California mastitis test (CMT)

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Dhakal (2006) في اجراء هذا الاختبار. وسجلت النتيجة بحسب الدرجات التفاعلية الموصوفة من قبل (Guha *et al.*, 2012) وهي سالب (N) وضئيل (T) وموجب +1 وموجب +2 وموجب +3 .

### 2- تقدير فعالية انزيم N-acetyl-D-glucosaminidase (NAGase)

تم تقدير فعالية انزيم NAGase بحسب الطريقة الموصوفة من قبل Park *et al.* (2000) 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* وتم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية , كما تم تشخيص هذه البكتريا باستخدام عدة التشخيص Api 20E .

## تشخيص بكتريا *Streptococcus*

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 الكوثرية التسلسلي

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

تم استخدام البوادئ والموضح صفاتها في الجدول الاتي:-

المصادر	Amplicon size (bp)	تتابع البادئ 5`—3`	اسم البادئ	الجين المستخدم
Mehrotra, Wang ) et al. 2000	132	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	FemA-F FemA-R	femA
Kong, So et al. ) (1999)	903	GTGACAAAAGCCCGACACCATAAATGCCT TACACTGTCATTACGTTGCGGATTTGGCGT	PhoA-F PhoA-R	phoA

❖ **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 الـ

PCR كما في الجدول الاتي :

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 95 °م للمسخ الأولي لـ DNA القالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A 1 دقيقة عند درجة حرارة 96 °م لمسح لـ DNA القالب .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 52 °م لارتباط البودئ لـ DNA القالب .
C 1 دقيقة عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .	
3	دورة واحدة لمدة 10 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 200 عينة حليب مجموعة من 64 بقرة من مناطق مختلفة في محافظة كربلاء المقدسة , وقد خضعت تلك العينات لبعض الاختبارات النوعية لتمييز العينات العائدة لأبقار مصابة بالتهاب الضرع عن تلك العائدة لأبقار سليمة . اشتملت الاختبارات النوعية على اختبار كاليفورنيا وتقدير فعالية انزيم NAGase . وقد اوضحت النتائج خلو 122 عينة من الاصابة اي بنسبة 61 % من مجموع العينات المفحوصة بينما بلغ عدد العينات العائدة لأبقار مصابة 78 عينة اي بنسبة 39 % 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 (Viguer *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 1+ و 2+ و 3+ ) ويتضح من الجدول ( 1 ) ان نسبة 26.9 % من مجموع العينات المفحوصة كانت شديدة الاصابة لإعطائها درجة تفاعلية 3+ يليها الدرجات التفاعلية ( 2 و 1 و T ) والتي بلغت نسبتها المئوية ( 16.6 و 26.9 و 29.4 ) % , على التوالي .

ان الدرجة التفاعلية 3+ 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 المحرك

و تكون اعداد الخلايا الجسمية عند الدرجة التفاعلية +3 عالياً جداً تصل الى أكثر من 5000.000 خلية / مل (Quinn *et al.*, 2004).

الجدول ( 1 ) : نتائج فحص كاليفورنيا لتحديد العينات العائدة لأبقار مصابة بالتهاب الضرع .

النسبة المئوية لعينات الحليب %	الدرجة التفاعلية لفحص كاليفورنيا
29.4	T
26.9	1
16.6	2
26.9	3

#### التقدير النوعي لفعالية انزيم NAGase

يقوم انزيم NAGase بتكسير مادة التفاعل p-Nitrophenyl N-acetyl  $\beta$ -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 ( 2 ) ان نسبة العينات التي حررت البارانايتروفينول بلون اصفر فاتح بلغت 46.9 % تليها العينات التي حررت هذا الناتج بلون متوسط الصفرة بنسبة 27.2 % فيما بلغت نسبة العينات التي حررت البارانايتروفينول بلون شديد الصفرة 21.7 % .

الجدول ( 2 ) : نتائج التقدير النوعي لفعالية انزيم NAGase لتحديد عينات لحليب العائدة لأبقار مصابة بالتهاب الضرع .

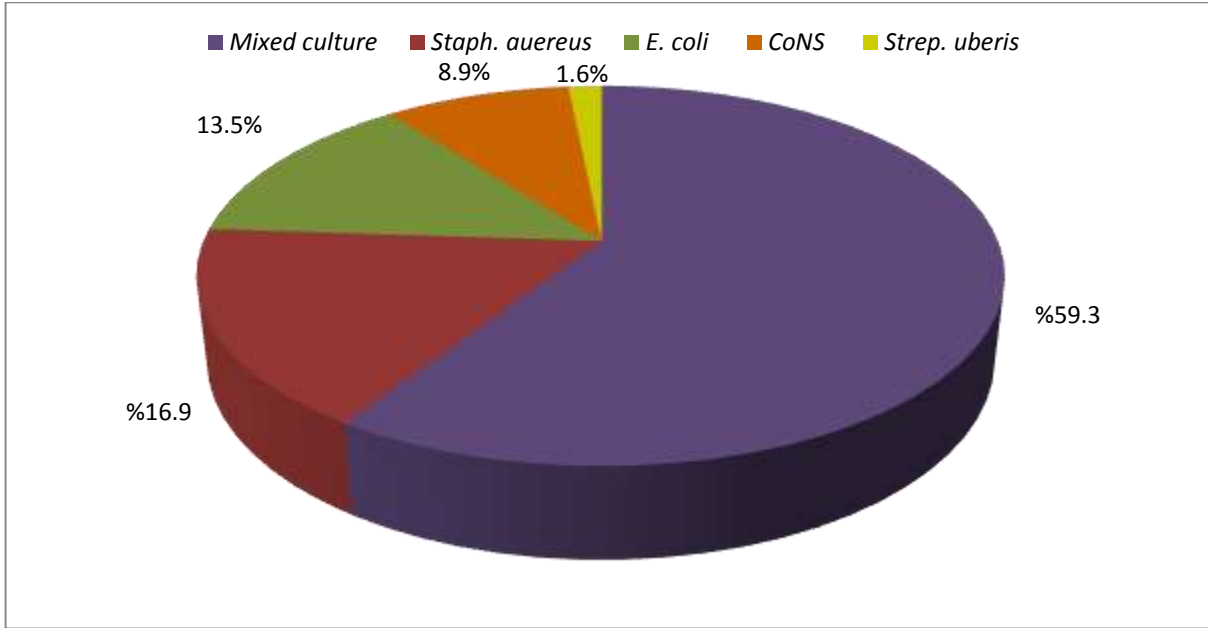
النسبة المئوية لعينات الحليب %	شدة لون P-Nitrophenol
46.9	أصفر فاتح
27.2	متوسط الصفرة
21.7	شديد الصفرة

اثبتت العديد من الدراسات زيادة فعالية انزيم NAGase عند حدوث الاصابة بالتهاب 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 (Kitchen ,1981 ; Mattila *et al.* ,1986) .

### 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 59 عينة منها أي بنسبة 75.6 % من مجموع العينات المصابة في حين لم تظهر العينات المتبقية والبالغ عددها 19 عينة أي نمو بكتيري أي بنسبة 24.4 % من مجموع العينات المصابة . واعتماداً على نتائج التشخيص التي سيرد ذكرها لاحقاً , اسفرت عملية العزل عن الحصول على 10 عزلات من بكتريا *S.aureus* و 8 عزلات من بكتريا *E.coli* و 5 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 ( 1 )



الشكل ( 1 ) : 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 (25- 45 ) % من مجموع عينات الحليب المزروعة لا تسفر عن اي

نمو بكتيري حتى بعد 48 ساعة من الحضانة ( Bradley *et al.* , 2007 ; Makvec and Ruegg , 2003 ; Koivula *et al.* , 2007 ).

من ملاحظة الشكل (1) يتضح ان بكتريا *S. aureus* و *E. coli* و CoNS و *Streptococcus* هي الانواع البكتيرية الرئيسية المسببة لمرض التهاب الضرع في الابقار في محافظة كربلاء المقدسة وتتفق هذه النتائج مع ما وجدته 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 *Streptococcus agalactiae* و *E. coli* و *Klebsiella pneumoniae* و *Strep. Uberis* بنسب (37.8 و 25.8 و 18.7 و 11.8 و 3.6 و 2.8) % , 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 حضانة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° عن الحصول على مستعمرات دائرية و محدبة و براقية وذات لون اصفر - ذهبي , كما اوضحت النتائج قابلية هذه المستعمرات على تحلل الدم من نوع الفا وبيتا ( $\beta - \alpha$ ) . ولم تتمكن هذه المستعمرات من النمو على اغلب تركيبات وسط الماكونكي . اما مجهرياً فكانت بهيئة مكورات موجبة لصبغة كرام و متجمعة 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 15 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 ( MSA ) Manitol salt agar

امتازت مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على الوسط MSA بكونها مستعمرات غير شفافة (Opaque) و براقية (Shiny) وذات لون اصفر , يستخدم وسط MSA لتمييز بكتريا الـ *S. aureus* عن بقية المكورات الموجبة لصبغة كرام المنتجة للكثايز . يحتوي هذا الوسط على 7.5 % من كلوريد الصوديوم الذي يشبط 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 لانزيم DNase , لذا فقد تم تلقيح هذا الوسط بعزلات بكتريا *Staph.* المتحصل عليها في هذه الدراسة وحضنه لمدة 24 ساعة ثم غمر الوسط بحامض الهيدروكلوريك المخفف الذي يعمل على ترسيب الـ DNA . وقد اوضحت النتائج ان مستعمرات (10) 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 10 عزلات منها اي بنسبة 66.66% نتيجة موجبة وهي العزلات ذاتها المنتجة لانزيم DNase مما يدل على أن هذه العزلات تعود لبكتريا *S. aureus* وهذا يتفق مع ما وصفه (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 ( 3 ) الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S. aureus* .

جدول (3) : 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	-
-6	اختبار DNase	+
-7	تخمير المانيتول	+
-8	اختبار التجلط	+

+	الوسط الانتقائي Manitol -Salt Agar	-9
---	--	----

+ نتيجة موجبة , - نتيجة سالبة

### تشخيص بكتريا *CoNS* :

لقد تم تشخيص بكتريا *CoNS* من خلال الطرائق الآتية :

أ- استخدام 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 3) .

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 37 م لمدة 24 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 4) .

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 شخّصت 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 ( 4 ) 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 (4) : 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	-
6	اختبار الحركة	+
7	تخمير اللاكتوز	+
8	الوسط الانتقائي EMB	+ (green metallic )
9	فحص الاندول	+
10	MR	+
11	VP	-
12	Citrate	-
13	TSI	A\A with gas
14	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 والمجهريّة (Cultural and Microscopical characteristics):

بعد زرع عينات الحليب على وسط اكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة وبوجود CO<sub>2</sub> تم الحصول على عزلة واحدة بشكل مستعمرات صغيرة نصف شفافة لها القابلية على تحليل الدم من نوع (α, β, γ) . اما مجهريا فقد ظهرت هذه العزلة بهيئة مكورات موجبة لصبغة كرام متجمعة بشكل ازواج او سلاسل ( الجدول 5) .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 الكاتاليز وسالبة لفحص الاوكسيديز ولها القابلية على تخمر سكر الكلوكوز (Whiley and Hardi,2009). (الجدول 5) .

الجدول ( 5 ) : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *Streptococcus*

ت	الاختبار	النتيجة
1	صبغة غرام	+
2	المظهر	خلايا كروية بشكل ازواج او سلاسل
3	ظروف النمو	لا هوائي اختياري
4	اختبار الكاتاليز	-
5	اختبار الاوكسيديز	-
-6	تخمر الكلوكوز	+

### تشخيص بكتريا الـ *Streptococcus* 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

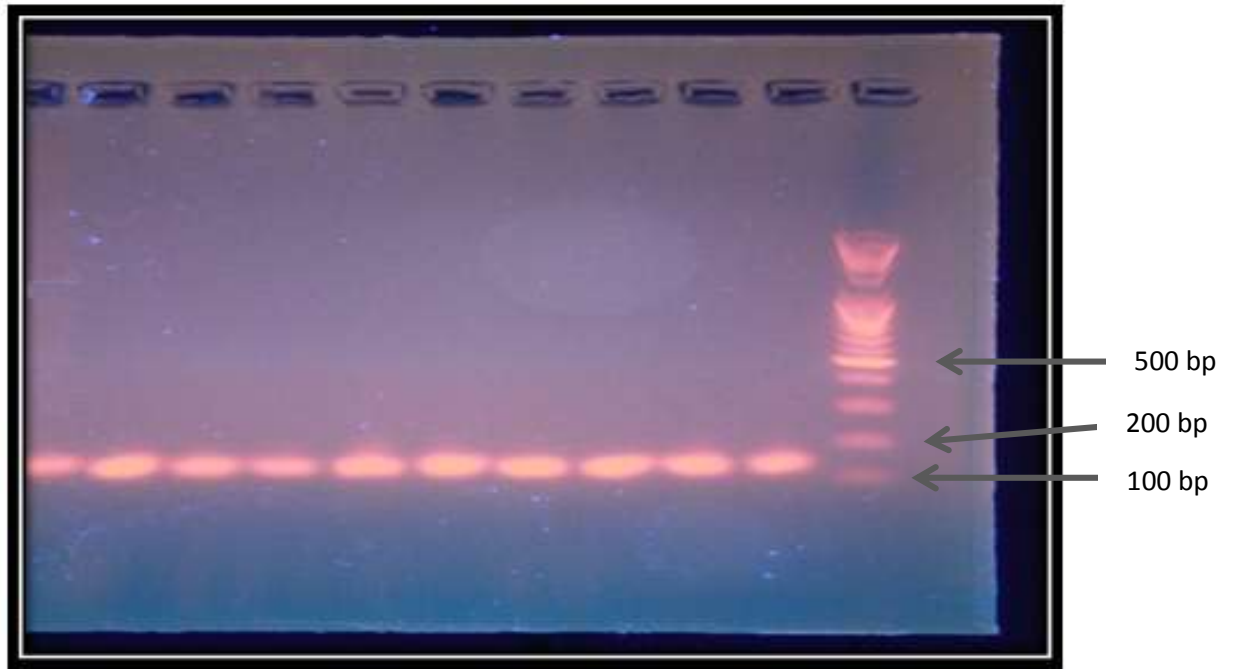
يستخدم تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لأجراء تشخيص سريع للعزلات البكتيرية , يستخدم هذا التفاعل كاختبار تايدي بعد تشخيص البكتريا بالطرائق الكيموحيوية . وحالياً يلعب الـ PCR دوراً مهماً في الدراسات السريرية للاحياء المجهرية اذ يمكن بواسطته تشخيص هذه الاحياء وجيناتها ( Mehrotra et al.,2000 ; Perez-roth et al.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

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

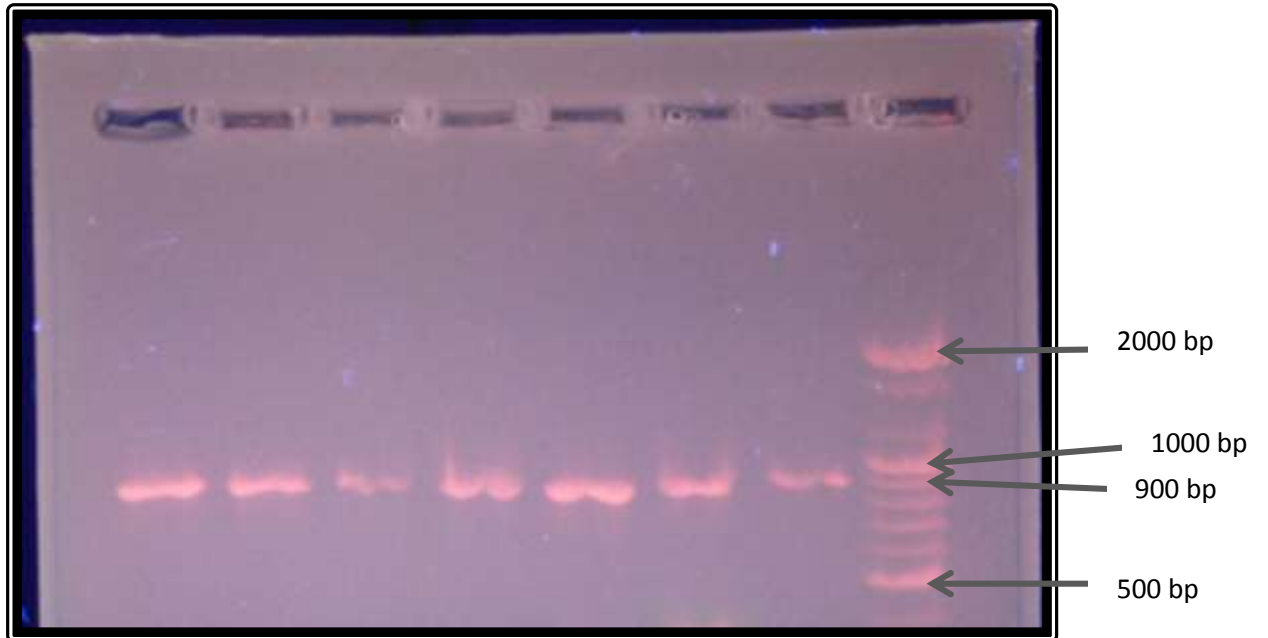
تم استخلاص DNA من نوعي البكتريا قيد الدراسة بطريقتين هما الاستخلاص بطريقة الغليان والاستخلاص باستخدام العدة ( Kit ) واوضحت النتائج امكانية استخلاص DNA من بكتريا *E. coli* بنجاح باستخدام كلا طريقتي الاستخلاص فيما اقتصرت عملية استخلاص DNA من البكتريا *S. aureus* بطريقة العدة ( Kit ) . ويمكن تفسير ذلك بان 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 ( 2 ) 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 132 bp , لذا يمكن استخدام هذا الجين في تشخيص بكتريا *S. aureus* .

اما الشكل ( 3 ) 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 903 bp , لذا يمكن استخدام هذا الجين في تشخيص بكتريا *E. coli* .



الشكل (2): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا *S. aureus* بإستعمال البادئ النوعي لجين *femA* (132bp) , تركيز الهلام (1.5%) ، الفولتية (80) فولت لمدة (30) دقيقة



الشكل(3): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا *E. coli* بإستعمال البادئ النوعي لجين *phoA* (903bp) , تركيز الهلام (1.5%) ، الفولتية (80) فولت لمدة (30) دقيقة

- 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.; Giraud, 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 Journal* ,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 Brasileira*. 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.
- Dhokal, 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. Microbiol.*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 .
- Jonas, 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).** Results 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  $\beta$ -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.armacol. 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.

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

**Wiley, R.A. and Hardy, J.M (2009):** In Bergey's manual of determinative bacteriology, 2<sup>th</sup> ed.; Wilkins: Baltimore MA, USA.