المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ٢، ٢٠٠٩ (٢٨٥-٢٩٢)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

التغيرات في مكونات حليب النعاج العواسية بعد الخمج التجريبي بجراثيم المكورات العنقودية الذهبية

عارف قاسم حسن الحبيطي و افتخار خالد محمد علي

فرع الصحة العامة البيطرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

استهدفت الدراسة إلى معرفة التغيرات الحاصلة في مكونات حليب ستة نعاج عواسية عند حقن ضرعها بجراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*. تم إيجاد العلاقة بين أعداد الخلايا الجسمية والعد الجرثومي الكلي في عينات الحليب المفحوصة لكل من الأغنام السليمة والمصابة، و شملت أيضاً التغيرات الحاصلة في شقوق بروتينات الشرش قبل وبعد إحداث الخمج التجريبي. جمعت ٢٤٠ عينة حليب سليمة ومصابة من كلا نصفي الضرع للنعاج ولمدة ١٠ أيام قبل وبعد الخمج. حقنت جراثيم المكورات العنقودية الذهبية بجرعة ١٥٠ وحدة مكونة للمستعمرة في النصف الأيسر من ضرع النعاج قيد التجربة بعد التأكد من سلامة ضرعها من التهاب الضرع ألسريري وتحت ألسريري، وجمعت عينات الحليب قبل إحداث الخمج بـ ١٠ أيام وبعدها من كلا نصفي الضرع (الأيمن والأيسر) لتحديد أعداد الخلايا الجسمية (بطريقة الحساب ألمجهري المباشر) والعد الجرثومي الكلي (باستخدام طريقة الأطباق القياسية). أوضحت النتائج أن العينات التي تم جمعها من نصف الضرع الأيسرالمخمج لاضرع النعاج أن هناك زيادة معنوية في العد الجرثومي الكلي، وكذلك لعدد الخلايا الجسمية، وأن هناك ارتباطاً معنوياً موجباً بينهما. أما نتائج تحليل شقوق بروتينات الشرش فقد بينت النتائج أن هناك انخفاض معنوي في كل من الالفا و البيتالاكتوكلوبيولين وزيادة معنوية في البومين مصل الدم والكلوبيولينات المناعية والبروتييز ببتون في عينات حليب النصف الأيسر من الضرع مقارنة مع ما هي عليه في النصف الأيمن السليم. وان مكونات الحليب المأخوذة منه قد عانت من التغيرات نفسها في مكونات الحليب في النصف الأيسر فضلاً عن التغير في العد الجرثومي الكلي وعدد الخلايا الجسمية وكانت الفروقات معنوية.

Changes in milk constituents of Awassi ewes after experimental infection with *Staphylococcus aureus*

A. K. Al –Hubaety and I. K. Al –Radhwany

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

The aim of this study was to examine the changes in milk constituents of Awassi ewes due to experimental infection with *Staphylococcus aureus* which was isolated from milk sample of clinically infected ewe with mastitis. We examined the relationship between somatic cell count (SCC) and total bacterial count (TBC) in normal and infected milk and to detect the changes in fractions of whey proteins before and after infection. A total of 240 samples of normal and infected milk from both left and right halves of udder of 6 Awassi sheep before and after infection were collected from tested healthy ewes. Milk samples were collected through 10 days before and after infection. Inoculum with *Staph. aureus* was done with effective dose (150 colony forming unit). Ten days later, samples were taken for 10 successive days to estimate TBC, SCC and milk constituents. The results showed that the samples collected from the left infected half of ewe udder, there was a significant increase in TBC, which followed by a significant increase in SCC. There was a significantly positive relationship between the TBC and SCC. The right half of udder after experimental infection of bacteria also showed the same significant results such as those in the left mastitic half due to transmission of the infection between the two halves, after inoculation of the left half.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

تمثل الأغنام أحد المصادر الرئيسية للثروة الحيوانية في العراق، إذ يبلغ تعدادها في العراق ٦,٧٧٢,٠٠٠ مليون رأس (١). يبلغ معدل إنتاج النعجة العواسية وفي العراق هو ٦٥١,٥٧ غم حليب / يوم خلال الموسم وهذا يشير الى الكميات الكبيرة التي تنتجها من الحليب والاهتمام الواجب إعطاؤه لصحة الضرع ونوعية الحليب (٢).

يعد إنتاج الحليب من الأغراض المهمة لتربية النعاج وذلك لنوعيته الجيدة واحتواءه على العدد المسموح به من الخلايا الجسمية Somatic cells، إذ يبلغ العدد الطبيعي للخلايا الجسمية في الأغنام ١٨٦, ٠ × ١٠ ٦ خلية / مل، وفي المعز ١١٨ , ١٠×٠ ٦ خلية / مل وفي الأبقار ٠,٦٠ × ١٠ ٦ (٣)، إذ أن للخلايا الجسمية الموجودة في الحليب علاقة بالحالة الصحية للضرع، حيث تزداد أعدادها في حالة الإصابة بمرض التهاب الضرع مما قد يؤدي إلى خسارة النعجة واستبعادها من القطيع، كما أن ارتفاع عدد الخلايا الجسمية في الحليب كونه يقلل من جودة الحليب الخام ونوعيته له تأثير اقتصادي سلبي على المنتج (٤).

تعد الجراثيم المسبب الرئيسي لمرض التهاب الضرع حيث عزلت أنواع مختلفة منها من النعاج المصابة وكانت نسبتها ١, ٨٧ ٪ وشملت *Staphylococci spp.* و*Streptococci spp.* و *Bacilius spp.*، مثلت جراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* نسبة ٤١,٨ ٪ من هذه النسبة (٥). تتجلى شدة أمراضية المكورات العنقودية الذهبية وإحداثها التهاب الضرع وذلك لقابليتها على الالتصاق بالمكونات المحيطة بالخلية وغزوها لخلايا الضرع لوجود البروتينات السطحية فيها (٦).

ونظرا لأهمية مرض التهاب الضرع في إحداثه أضرار على الصحة العامة فضلا على الخسائر الاقتصادية التي يسببها إذ تشير بعض التقارير إلى أن الخسائر قد تصل إلى ١٨٠ دولارا أمريكياً في السنة على كل حيوان مصاب (٧)، ارتأينا إجراء هذه الدراسة لإيجاد معامل الارتباط بين أعداد الخلايا الجسمية والعد البكتيري الكلي نتيجة الإصابة التجريبية بالتهاب الضرع وكذلك إمكانية التنبؤ بعدد الخلايا الجسمية من خلال العد الجرثومي الكلي وبصورة تقريبية قبل وبعد إحداث الإصابة بالتهاب الضرع (معادلات خط الانحدار). ومعرفة تأثيرالخمج، بمرض التهاب الضرع في نسب مكونات بروتينات الشرش المفصولة بطريقة الترشيح الهلامي بواسطة استخدام الـ Sephadx G -100 لعينات حليب النعاج المصابة تجريبياً بجراثيم المكورات العنقودية الذهبية.

المواد وطرائق العمل

استخدمت ست نعاج من السلالة العواسية حيث كانت سليمة سريريا (لم تظهر عليها علامات التهاب الضرع) فضلاً عن إجراء فحصWhite Side Test للتأكد من خلوها من الخمج تحت ألسريري بالتهاب الضرع) وكانت بعمر ٣ سنوات وفي الولادة الثانية وبأوزان تراوحت بين ٢٥ - ٣٥ كغم، تم بعد حلب النعاج بصورة كاملة أخذ عينات حليب بمقدار ١٠ مل من الحليب الكلي ولكلا نصفي الضرع وعلى مدى عشرة أيام قبل إحداث الخمج بجرثومة المكورات العنقودية الذهبية وبعدها لإجراء الفحوصات عليها.

جمعت عينات الحليب بطريقة معقمة حيث تم مسح الحلمة بشكل كامل بالكحول الأثيلي ٧٠ ٪ ووضعت قنينة جمع الحليب المعقمة بشكل أفقي وتم استبعاد القطرات الأولى من الحليب ثم اجري الحلب بصورة كاملة ونقلت القناني إلى المختبر لإجراء الفحوصات عليها (٨).

تم الحصول على جرثومة المكورات العنقودية بعزلها من نعجة مصابة طبيعيا بالتهاب الضرع الحادالسريري من حيث ملاحظة الصفات السريريةالظاهرة عليها حيث تورم الضرع وقلة الشهية وارتفاع درجة حرارة الجسم والضرع وأيضا كون الحليب غير طبيعي، اذ تم جمع عينات الحليب من هذه النعاج المصابة طبيعياً بالتهاب الضرع الحاد ألسريري أثناء فحصها في المستشفى البيطري بطريقة معقمة وأحضرت إلى المختبر لإجراء العزل الجرثومي.

لقحت العينات على وسط أكار الدمBlood agar حيث اخذ مقدار ملئ لوب من الحليب بالناقلة الجرثومية المعقمة، ونشرت بالتخطيط على وسط أكار الدم وحضنت الأطباق بدرجة ٣٧° م ولمدة ٢٤ ساعة، وبعد الحضانة قرئ النتائج ولوحظت المستعمرات الجرثومية النامية (٩-١٢).

تم التعرف إلى شكل الجرثومة باستخدام صبغة كرام و بعد دراسة صفاتها المز رعية اختبرت المستعمرات المشكوك بها ونقلت إلى الوسط التفريقي الخاص بجراثيم المكورات العنقودية وهو وسط أكار سكر المانيتول والملح Manitol Salt Agar وحضنت بالظروف النموذجية لنمو الجرثومة بدرجة ٣٧ °م ولمدة ٢٤ ساعة، ثم أجريت الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص جراثيم المكورات العنقودية على المستعمرات المخمرة لسكر المانيتول (١٣). وكانت نتائج الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بتشخيص جرثومة المكورات العنقودية الذهبية.

بعد الحصول على مستعمرات لجرثومة المكورات العنقودية الذهبية زُرعت على موائل من الاكار المغذي Nutrient Agar Slant وحفظت بدرجة حرارة ٤° م في الثلاجة لحين استخدامها في إحداث الخمج التجريبي بالتهاب الضرع.

الجدول (١) نتائج الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بتمييز المكورات العنقودية الذهبية.

الاختبارات الكيموحيوية	النتيجة
اختبار الكاتاليز	+
اختبار النمو على وسط المانيتول	+
اختبار إنزيم التجلط	+
اختبار DNAase	+
تحلل الدم	تحلل كامل
المثيل الأحمر	+
فوكس بروس كور	+
اختبار إنزيم اليورينز	d
اختبار الجيلاتينيز	+
اختبار الاوكسديز	-

(+): موجبة للفحص، (-): سالبة للفحص، (d): متغايرة الاختبار.

تم تحديد الجرعة الممرضة التي تسبب التهاب الضرع بـ ١٥٠ وحدة مكونة للمستعمرة CFU من جراثيم المكورات العنقودية الذهبية من قبل (١٤) وهي الجرعة التي استخدمت في إحداث الخمج بالتهاب الضرع في هذه الدراسة.

تم نقل ٢- ٣ مستعمرات جرثومية بواسطة ناقلة جرثومية معقمة الى ٩ مل من المرق المغذي Nutrient broth، ثم حضنت في ٣٧ °م لمدة ٢٤ساعة، بعدها تم عمل عشرة تخافيف للمرق المغذي المزروع. ثم زُرع من كل تخفيف لمعرفة العد الجرثومي الموجود فيه بالزرع على وسط الاكار المغذي Nutrient agar، حيث نقل من كل تخفيف مقدار ١مل و ٠,١ مل وزرعت كل على طبق منفرد بطريقة الصب في الطبق، حضنت الأطباق بعد ترقيمها في الحاضنة بدرجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ساعة ثم قرئت النتائج، وتم عد المستعمرات الجرثومية لكل الأطباق وحسبت الوحدات المكونة للمستعمرة (CFU) لكل تخفيف باستخدام المعادلة الآتية:

$$\text{الوحدة المكونة للمستعمرة /غم} = \frac{\text{العد الكلي للمستعمرات} \times \text{١/ التخفيف}}{\text{حجم الغرسة}}$$

بعدها حدد التخفيف الذي يحتوي على الجرعة الممرضة وكان التخفيف السابع.

وضعت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي وتم التخلص من الرشح وغسل الراسب مرتين بالماء المقطر المعقم (١٥).

بعد تحديد الجرعة الممرضة والتي هي ١٥٠ وحدة مكونة للمستعمرة تم حقن ١ مل من المعلق الجرثومي الأخير بواسطة أنبوب خاص Gavage needle في نصف الضرع الأيسر لكل من النعاج الستة المستخدمة في التجربة، ثم حقن ١ مل من الماء المقطر المعقم في نصف الضرع الأيمن لكل النعاج وتم الحقن بعد حلب الضرع وتفريغه من الحليب بصورة كاملة (١٥).

جمعت عينات الحليب من كلا (جهتي) نصفي الضرع السليم والمخمج بعد مرور ٢٤ ساعة من الحقن، وبعد ظهور العلامات السريرية للإصابة في نصف الضرع الأيسر (الذي حقن بالمعلق الجرثومي)، وإجري الفحص الجرثومي له للتأكد بان جرثومة المكورات العنقودية الذهبية هي المسبب للإصابة بالتهاب الضرع حيث تم عزلها بوصفها نوعاً سائداً من عينة الحليب.

الفحوصات المختبرية

أخضعت جميع العينات الماخوذة من النصف المصاب وغير المصاب (السليمة والمصابة) لكلا النصفين لمجموعة من الفحوصات وكما يأتي:

عد الخلايا الجسمية

حسبت أعداد الخلايا الجسمية لكل العينات السليمة، وبعد إحداث الخمج بطريقة العد ألمجهري الكلي المباشر لخلايا الدم البيض Direct Microscopic Total Leukocytic Count التي أشار إليها (١٢) في حساب عدد خلايا الدم البيض في الحليب حيث حُسِب عدد الخلايا الجسمية في خمسة عشر حقلاً مجهرياً بشكل عشوائي، وضُرب معدل عدد الخلايا بالعامل ألمجهري للحصول على العدد التقريبي للخلايا الجسمية في ١ سم٣ من الحليب وكما في المعادلة الآتية:

$$\text{عدد الخلايا الجسمية في ١ سم}^3 \text{ حليب} = \frac{\text{مجموع الخلايا الجسمية في ١٥ حقلا مجهريا}}{١٥} \times \text{العامل ألمجهري}$$

حيث كان العامل ألمجهري (معامل التكبير للمجهر Microscopic Factor) في هذه الدراسة ٣٠٠,٠٠٠.

العد الجرثومي الكلي في عينات الحليب

بعد جمع عينات الحليب في قناني زجاجية معقمة وذات غطاء محكم،تم قياس الحمل الجرثومي لكل عينة بعد عمل عدة تخافيف للعينة باستخدام المرق المغذي (Nutrient broth)وتم القياس باستخدام طريقة(Standard plate count)، بعدها تم تحديد العد الجرثومي لكل عينة بالزرع بطريقة الصب في الطبق ولكل تخفيف تم زرع طبقين١ مل و٠,١ مل من التخفيف. حضنت الأطباق بدرجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ساعة وبعدها تم قراءة النتائج في الأطباق التي احتوت على ٣٠- ٣٠٠ مستعمرة جرثومية لتستخدم في تحديد الحمل الجرثومي لكل عينة.

الترشيح الهلامي

وصف هذه الطريقة (١٦) واستخدمت فيها مادة السيفاديكس Sephadex G- 100، تم تعبئة هذه المادة في عمود الفصل Column (٢,٥ × ٦٥ سم) واستخدم ٠,١ مولاري من محلول دارئ الفوسفات Phosphate Buffer Saline ذي أس هيدروجيني ٧ والذي يحتوي ٠,٣ مولارية كلوريد الصوديوم NaCl، تم الفصل بدرجة حرارة الغرفة، وبعد إضافة ٢ مل من عينة الشرش تم جمع ٥ مل لكل قطفة ولخمسين قطفة

لكل عينة بمعدل انسياب ١ – ١,٥ مل / دقيقة، قرئت درجة الامتصاصية لكل قطفة بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجي ٢٨٠ نانو ميتر.

تم تمثيل قراءات المطياف الضوئي بشكل منحني لكل من عينات الحليب السليمة و المصابة لتمثل حزم البروتين، وتم حساب المساحة تحت المنحني لكل حزمة من حزم البروتين باستخدام الصيغة الآتية (١٧):

ارتفاع المنحني × عرض نصف قاعدة المنحني

التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج إحصائيا باستخدام اختبار التباين One way analysis of variance حسب متطلبات التجربة وأخضعت لاختبار معنوية المتوسطات بواسطة اختبار (Least Significant DifferenceLSD)، وكان مستوى المعنوية ولكافة الاختبارات عند مستوى احتمال (أ < ٠,٠٥)، وكذلك تم استخدام معادلات الانحدار egression equation للتنبؤ بعدد الخلايا الجسمية من خلال العد الجرثومي الكلي فضلاً عن استخدام معادلة معامل الارتباط البسيطSimple correlation coefficient لإيجاد العلاقة بينهما (١٨) و(١٩).

النتائج والمناقشة

العد الجرثومي الكلي

أوضحت نتائج العد الجرثومي الكلي / مل٣ من عينات الحليب المأخوذة من نصفي الضرع للنعاج قبل الخمج بجراثيم المكورات العنقودية الذهبية (جدول ٢) أن العد الكلي في النصف الأيمن في مدة الأيام العشرة قبل الخمج قد تراوح مابين ٠,١٦ × ١٠ ° ±١٦و٠ إلى٢,٨٣ × ١٠° ±٣٠و٠ وبمعدل ٠,٧٣ × ١٠ ° ±٠٨٩و٠، والذي لم يختلف فيه معنويا خلال المدة نفسها عن العد الجرثومي الكلي لعينات الحليب المأخوذة من النصف الأيسر للنعاج قبل الخمج حيث تراوحت ما بين ٠,٥ × ١٠ °±٣٤و٠ إلى ١,٣٣ × ١٠ °±٢١و٠ وبمعدل ٠,٩١ × ١٠° ±٠٨٨و٠، أما بعد إحداث الخمج في نصف الضرع الأيسر لنفس النعاج بجراثيم المكورات العنقودية الذهبية بجرعة ١٥٠ وحدة مكونة للمستعمرة / ملم ٣ فقد ازداد العد الجرثومي الكلي معنويا (أ < ٠,٠٥ ومنذ اليوم الأول بعد الخمج ولمدة عشرة أيام بعد الخمج (فترة الدراسة) بالمقارنة هذه الأعداد مع اعدادها قبل الخمج حيث تراوحت الأعداد بين ٣٢٣٣,٣٣ × ١٠ ° ±٥١ و٤٢٢إلى ٥٢٥٠,٣٣ × ١٠ °±٠٠و٣٨٥ وبمعدل ٤١٩٦,٨٦ × ١٠ °±٣٦و١٩٧، وقد أثرت إصابة النصف الأيسر من الضرع بجراثيم المكورات العنقودية الذهبية في العد الكلي للجراثيم في النصف الأيمن منه عند مقارنة أعداد هذه الجراثيم مع ادادا قبل الخمج وكان هذا الاختلاف معنويا (أ < ٠,٠٥) حيث تراوحت الأعداد بين ١,٥٠ × ١٠ °±٥٠و٠ إلى ٦,٠٠ × ١٠ °±٣٦و٠ وبمعدل ٣,٥١ × ١٠ ° ±٥٣و٠.

وعلى الرغم من زيادة العدد الكلي للجراثيم في النصف الأيمن بعد إصابة النصف الأيسر فإنّ العد الكلي للجراثيم في النصف الأيسر للضرع المصاب بقي أعلى وبشكل معنوي (أ < ٠,٠٥) عن الزيادة الحاصلة في أعداد الجراثيم للنصف الأيمن من الضرع.

إن حقن جراثيم المكورات العنقودية في ضرع النعاج أدى إلى الخمج بالتهاب الضرع نتيجة لالتصاق هذه الجراثيم على بطانة الضرع وذلك لقابليتها على الالتصاق بالمكونات المحيطة للخلية وغزوها لخلايا الضرع لوجود البروتينات السطحية فيها (Surface protein)، وامتلاكها لإنزيمات (Leukocidin , Kinases , Hyaluronidase) مما يبقيها في الضرع ومنع بلعمتها على الرغم من توارد الخلايا الجسمية (خلايا الدم البيض) إلى الضرع جراء الالتهاب الناجم بسبب وجود حبيبات الدهن في الحليب فضلاً عن امتلاك الجرثومة العوامل التي تمنع بلعمتها مثل (Capsule , Protein A)، علاوة على حمل هذه الجراثيم للصفات الكيموحيوية التي تساعد في إبقاء هذه الجراثيم حية داخل البلاعم وهي (Caratenoids , Catalase production) وعوامل مناعية أخرى مثل (Protein A , Coagulase , Clotting factor) وان هذا الالتصاق وعدم البلعمة ينشأ بعده انقسام لهذه الجراثيم ثم انتشارها بقنوات الحليب فضلاً عن امتلاك هذه الجراثيم للسموم المحطمة لجدران خلايا المضيف مثل (Hemolysins, Leukotoxin, Leukocidin) وتلك التي تفاقم الالتهاب مثل (SEA-G, TSST, ET) وتعد جرثومة المكورات العنقودية الذهبية كأحد أهم مسببات التهاب الضرع في الحيوانات الحلوبة ومنها النعاج، فالضرع المخمج بهذه الجراثيم يعد مستودعاً مهماً لانتشارها بين قطعان الحيوانات الحلوب (٢٠) و(٢١).

عد الخلايا الجسمية

اظهرت نتائج الدراسة التغييرات الحاصلة في اعداد الخلايا الجسمية في عينات الحليب المجموع من نصفي الضرع (الايسر والايمن) بعد احداث الخمج التجريبي في حين لم تتجاوز أعداد الخلايا الجسمية في كلا نصفي الضرع الأيمن والأيسر لمدة ما قبل الخمج عن ٥ × ١٠ ° ± خلية / ملم ٣ وتراوحت أعدادها في النصف الأيمن مابين ٢,٠٥ × ١٠ ° و ٣,٧٨ × ١٠° وبمعدل ٢,٨٧ × ١٠ °، وبأعداد متقاربة في النصف الأيسر التي بلغت أعدادها في عينات الحليب ما بين ٢,٠٧ × ١٠ ° و ٣,٣٣ × ١٠ ° وبمعدل ٢,٦٥ × ١٠ ° خلية / ملم ٣ وعليه فلم يسجل اختلاف معنوي بين أعداد الخلايا الجسمية لكلا النصفين قبل الخمج.

الجدول (٢) العلاقة بين عدد الخلايا الجسمية والعد الجرثومي الكلي للنعاج قبل الخمج التجريبي بجراثيم *Staph. aureus* وبعده.

القياسات	قبل الإصابة		بعد الإصابة	
	النصف الأيمن	النصف الأيسر	النصف الأيمن	النصف الأيسر
α	٢,٣١٩	١,٥٩٤	١٦,١٢٢	١٣,٤٧٤
β	٠,٥٧٩	١,٣٣٢	١,٠٠٢	٠,٠٠٤
ر	٠,٦٦٠	٠,٨٧٠	٠,٩٠٣	٠,٨٨٠
أ	أ<٠,٠٠١	أ<٠,٠٠١	أ<٠,٠٠١	أ<٠,٠٠١
معادلة خط الانحدار	γ = ٢,٣١٩ + ٠,٥٧٩ χ	γ = ١,٥٩٤ + ١,٣٣٢ χ	γ = ١٦,١٢٢ + ١,٠٠٢ χ	γ = ١٣,٤٧٤ + ٠,٠٠٤ χ

α: نقطة تقاطع المحور الرأسي. β: ميل خط الانحدار. ر: معامل الارتباط. أ: مستوى المعنوية < ٠,٠٠١. γ: عدد الخلايا الجسمية (خلية × ١٠ ⁵ / ملم³). χ: العد الجرثومي الكلي (خلية × ١٠ ⁵ / ملم³).

أما بعد إحداث الخمج في النصف الأيسر للضرع فان أعداد الخلايا الجسمية في عينات الحليب المأخوذة منها قد ارتفع بشكل معنوي (أ < ٠,٠٥) عند مقارنة أعدادها مع مثيلاتها في نفس النصف من الضرع قبل الخمج ومنذ اليوم الأول بعد الخمج لتتراوح مابين ٢٦,٤٣ × ١٠ ⁵ و ٣٤,٨٣ × ١٠ ⁵ خلية / ملم ٣ وبمعدل ٣٣,٢٥ × ١٠ ⁵ خلية / ملم ٣.

وقد أثرت الزيادة في أعداد الخلايا الجسمية بعد إحداث الخمج في النصف الأيسر في زيادة في أعدادها لعينات الحليب المأخوذة من النصف الأيمن، لتصبح أعداد الخلايا الجسمية في النصف الأيمن بعد الخمج ما بين تلك ما قبل الخمج في كلا النصفين وأعدادها في النصف الأيسر بعد الخمج وتراوحت ما بين ١٧,٧٣ × ١٠ ⁵ إلى ٢٣,٦٤ × ١٠ ⁵ خلية / ملم ٣ وبمعدل ١٨,٩٤ × ١٠ ⁵ وبهذا اختلفت معنويا (أ < ٠,٠٥) عن مثيلاتها في النصف الأيمن قبل إحداث الخمج. ولم يكن تأثير النصف الأيمن بعد إصابة النصف الأيسر ليؤثر على أعداد الخلايا الجسمية كتلك الزيادة في أعدادها في النصف الأيسر وعليه فقد بقيت الأعداد في النصف الأيسر أعلى وبشكل معنوي (أ < ٠,٠٥) عن تلك في النصف الأيمن بعد الخمج. إن حدوث التهاب الضرع في النعاج عند تلوثه بالمكورات العنقودية الذهبية الموجبة لاختبار الكاتاليز تبعه ظهور علامات الالتهاب الحاد والسريري، مما أدى إلى انجذاب خلايا الدم البيض إلى مكان وجود هذه الجراثيم في الضرع وإلى زيادة أعداد الخلايا الجسمية بعد اليوم الأول من الخمج جراء تحفز الجهاز المناعي ونضوج خلايا الدم البيض الدفاعية من الدم الى الضرع تودي الى زيادة أعدادها في الحليب (٢٢،٢٣). وان بعض هذه الخلايا عبارة عن خلايا الدم البيض متعددة النواة (٢٤،٢٥) (الجدول ٣).

معامل الارتباط بين عدد الخلايا الجسمية و العد الجرثومي الكلي قبل و بعد الخمج بالتهاب الضرع

أظهر التحليل الإحصائي أن معامل الارتباط بين عدد الخلايا الجسمية و العد الجرثومي الكلي قبل الخمج بالتهاب الضرع وبعدها كان موجبا أي انه عندما تزداد أعداد البكتريا يصاحبه زيادة طردية في أعداد الخلايا الجسمية وكان معامل الارتباط ذو معنوية عالية(أ < ٠,٠٠١).ويمكن التنبؤ بعدد الخلايا الجسمية من خلال تعويض العد الجرثومي الكلي في معادلات خط الانحدار لنصفي الضرع قبل وبعد الخمج **(**الجدول ٤). كما قد ذكر (٢٦و٢٧) انه في حالة التهاب الضرع وعندما يحوي الحليب مستوى عالياً من الخلايا الجسمية فان هناك انخفاضاً ملحوظاً في الالفا والبيتالاكتوكلوبيولين،وهذا ناتج عن ضعف وظيفتي التصنيع والإفراز التي تقوم بها الخلايا ونتيجة تسرب أو هروب البروتينات من الحليب إلى السوائل خارج الخلايا خلال المعبر بين الخلايا الذي يتضاعف خلال التهاب الضرع وهذا جاء متوافقا مع نتائج دراستنا.

الترشيح الهلامي Gel-Filtration

يتبين من الجدول (٥) تأثير الخمج بمرض التهاب الضرع في نسب مكونات بروتينات الشرش المفصولة بطريقة الترشيح الهلامي بواسطة استخدام الـ Sephadex G – 100 لعينات حليب النصف الأيسر من الضرع المصاب تجريبيا بجرثومة المكورات العنقودية الذهبية والمختارة بصورة عشوائية لثلاثة نعاج (١، ٢، ٣) مقارنة بمكونات بروتينات الشرش في الحليب الطبيعي للنصف الأيسر من الضرع قبل الخمج و لنفس الحيوانات. ومن الجدول نفسه يتضح أن نسبة البيتاكلوبيولين في عينات الحليب السليمة للحيوانات (١، ٢، ٣) كانت ٢٧,٥٤ و ٢٨,٠٥ و ٢٧,٧٢ ٪ على التوالي، وأصبحت نسب هذه الشقوق في الحليب المصاب لنفس الحيوانات ٢٤,٧٨ و ٢٥,٤٤ و ٢٥ ,١٦ ٪ على التوالي، ومن هذه النتائج يتضح أن نسبة البيتالاكتوكلوبيولين انخفضت عند الخمج بمرض التهاب الضرع ولجميع الحيوانات المفحوصة. وتبين كذلك أن نسبة الالفالاكتوكلوبيولين كانت مرتفعة في عينات حليب الحيوانات السليمة فقد كانت النسبة ٢٠,٤٥ و ٢١,٤٢ و ٢٠,٩٧ ٪ في الحيوانات الثلاثة على التوالي، وأصبحت هذه النسب بعد الخمج بمرض التهاب الضرع ١٤,٢٥ و ١٥,٠٤ و ١٥,٥٧ ٪ و لنفس الحيوانات على التوالي.

الجدول (٣) التغيرات في العد الجرثومي الكلي في ملم³ من حليب النعاج قبل الخمج التجريبي بجراثيم *Staph. aureus* وبعده.

قبل الخمج	بعد الخمج

الأيام	النصف الأيمن المعدل ± الخطأ القياسي	النصف الأيسر المعدل ± الخطأ القياسي	النصف الأيمن المعدل ± الخطأ القياسي	النصف الأيسر المعدل ± الخطأ القياسي
١	١٠° ± ٠,٢٠ × ١,٢٠ أ	١٠° ± ٠,٢٠ × ١,٢٠ أ	١٠° ± ٠,٥٤ × ٠٠,٣ ب	١٠° ± ٣٨٥,٠٠ × ٥٢٥٠,٣٣ ج
٢	١٠° ± ٠,٢٢ × ٠,٥٠ أ	١٠° ± ٠,٢١ × ٠,٦٦ أ	١٠° ± ٠,٥٠ × ١,٥٠ ب	١٠° ± ١٩٤,٢٤ × ٥٠٦١,٦٦ ج
٣	١٠° ± ٠,١٦ × ٠,١٦ أ	١٠° ± ٠,٢٥ × ١,٠٠ أ	١٠° ± ٠,٩٥ × ١,٥٠ ب	١٠° ± ٣٨٥,٠٠ × ٤٦٦٦,٦٦ ج
٤	١٠° ± ٠,٢١ × ٠,٦٦ أ	١٠° ± ٠,٥١ × ١,٠٠ أ	١٠° ± ٠,٣٠ × ١,٨٣ ب	١٠° ± ٤٤١,١٠ × ٤٠٥٣,٣٣ ج
٥	١٠° ± ٠,٢١ × ٠,٦٦ أ	١٠° ± ٠,٣٤ × ٠,٥٠ أ	١٠° ± ٠,٥٠ × ٢,٦٦ ب	١٠° ± ٤٩٥,٠٠٩ × ٤٠٧١,٦٦ ج
٦	١٠° ± ٠,٣٠ × ٢,٨٣ أ	١٠° ± ٠,٢٢ × ٠,٥٠ أ	١٠° ± ٠,٦٧ × ٣,٥٠ ب	١٠° ± ٤٢٢,٥١ × ٣٢٣٣,٣٣ ج
٧	١٠° ± ٠,٢١ × ٠,٦٦ أ	١٠° ± ٠,٠٠ × ١,٠٠ أ	١٠° ± ٠,٦١ × ٤,٣٣ ب	١٠° ± ٢٣٢,٠٣ × ٤٧٩٥,٠٠ ج
٨	١٠° ± ٠,٢٥ × ١,٠٠ أ	١٠° ± ٠,٣٦ × ١,٠٠ أ	١٠° ± ٠,٨٣ × ٥,١٦ ب	١٠° ± ٢١٥,٢٦ × ٣٧٤٦,٦٦ ج
٩	١٠° ± ٠,١٦ × ٠,٨٣ أ	١٠° ± ٠,٢١ × ١,٣٣ أ	١٠° ± ٠,٣٦ × ٦,٠٠ ب	١٠° ± ٢٨٤,٨٣ × ٣٨٨٣,٣٣ ج
١٠	١٠° ± ٠,١٦ × ٠,٨٣ أ	١٠° ± ٠,٣٦ × ١,٠٠ أ	١٠° ± ٠,٦١ × ٥,٦٦ ب	١٠° ± ٣٣٢,٠٠ × ٤٢٠٦,٦٦ ج
	١٠° ± ٠,٠٠٨٩ × ٠,٧٣ أ	١٠° ± ٠,٠٠٨٨ × ٠,٩١ أ	١٠° ± ٠,٥٣ × ٣,٥١ ب	١٠° ± ١٩٧,٣٦ × ٤١٩٦,٨٦ ج

الأحرف المختلفة أفقياً تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمال (أ < ٠,٠٥).

ولوحظ كذلك أن نسبة البومين مصل الدم كان في الحيوانات المصابة بالمرض ١٠,٨٧ و ٩,٢٣ و ١٠,١٥ ٪ للحيوانات الثلاثة على التوالي، في حين كانت هذه النسبة قبل الخمج بالمرض ٥,٨٧ و ٥,٤٧ و ٦,٢١ ٪ لنفس الحيوانات على التوالي ويتبين من هذا أن نسبة البومين مصل الدم ارتفعت بعد الخمج بالمرض. ولوحظ كذلك أن نسبة الكلوبيولينات المناعية في الحليب السليم المأخوذ من الحيوانات الثلاثة على التوالي ٣,٤٢ و ٣,٣٣ و ٣,٤٠ ٪، وعند الخمج بمرض التهاب الضرع ارتفعت نسبة الكلوبيولينات المناعية لتصبح ٤٥,١١ و ٥٠,٢١ و ٤٥,٤٧ ٪ على التوالي وهذه النتيجة تبين أن هناك ارتفاعاً في نسبة الكلوبيولينات المناعية نتيجة حدوث الخمج بمرض التهاب الضرع والجدول نفسه يوضح حدوث ارتفاع في نسبة البروتيوز ببتون في الحليب المصاب فقد كانت النسبة قبل الخمج للحليب السليم ٢,٤١ و ٢,٣٢ ٢,٣٤٪ على التوالي وارتفعت النسبة لتصبح ٥,٠٢ و ٤,١٢ و ١١,٠٠ ٪ بعد الخمج بالمرض للحيوانات الثلاثة على التوالي. وقد ظهر وجود خمسة منحنيات في جميع العينات المفحوصة وهذه الشقوق هي البيتالاكتوكلوبيولين

الجدول (٤) التغيرات في عدد الخلايا الجسمية في ملم^3 من حليب النعاج قبل الخمج التجريبي بجراثيم *Staph. aureus* وبعده.

الأيام	قبل الخمج		بعد الخمج	
	النصف الأيمن المعدل ± الخطأ القياسي	النصف الأيسر المعدل ± الخطأ القياسي	النصف الأيمن المعدل ± الخطأ القياسي	النصف الأيسر المعدل ± الخطأ القياسي
١	٠,١٧ ± ١٠°× ٣,٥٦ أ	٠,٠٠٥٨ ± ١٠° × ٣,٢٨ أ	٠,٣٨ ± ١٠°× ١٨,٨٦ ب	٢,٦٠ ± ١٠°× ٣٤,٨٣ ج
٢	٠,١٢ ± ١٠°× ٢,٧٥ أ	٠,٠٠٦٥ ± ١٠°× ٢,٤٦ أ	١,١٩ ± ١٠°× ١٧,٧٦ ب	١,٦٣ ± ١٠°× ٣١,١٣ ج

٣	٢,١٤×°١٠ ± ٠,١٨ أ	٢,٩٣×°١٠ ± ٠,١٢ أ	١٧,٧٣×°١٠ ± ٠,٨٣ ب	٢٩,٣٦×°١٠ ± ١,٨٥ ج
٤	٣,٠٢×°١٠ ± ٠,٢٠ أ	٢,٩٨×°١٠ ± ٠,١١ أ	١٨,١٠×°١٠ ± ٠,٥٧ ب	٢٧,٢٣×°١٠ ± ٢,٣٥ ج
٥	٢,٩٠×°١٠ ± ٠,٢١ أ	٢,٠٧×°١٠ ± ٠,٢٢ أ	١٨,٧١×°١٠± ١,٤٨ ب	٢٧,٩٨×°١٠ ± ١,٥٤ ج
٦	٣,٧٨×°١٠ ± ٠,٢٣ أ	٢,٥٣×°١٠ ± ٠,٢٢ أ	١٩,١٦×°١٠ ± ٠,٧٤ ب	٢٦,٤٣×°١٠ ± ١,٢٦ ج
٧	٢,٧٤×°١٠ ± ٠,١٥ أ	٣,٠٢×°١٠ ± ٠,٢٧ أ	٢٠,٩٣×°١٠ ± ٠,٨٢ ب	٢٩,٥٣×°١٠ ± ٢,٣٣ ج
٨	٣,٥٥×°١٠ ± ٠,١٦ أ	٣,١٥×°١٠ ± ٠,١٣ أ	٢١,٧٦×°١٠ ± ١,٨٨ ب	٢٦,٦٣×°١٠ ± ١,٥٧ ج
٩	٢,٠٥×°١٠ ± ٠,٢١ أ	٣,٣٣×°١٠ ± ٠,١٥ أ	٢٣,٤٦×°١٠ ± ٠,٩٠ ب	٢٦,٩٤×°١٠±٢,٣٩ ج
١٠	٢,١٠×°١٠ ± ٠,٢١ أ	٢,٤٩×°١٠ ± ٠,١٧ أ	١٩,٩٦×°١٠ ± ١,٠٣ ب	٣٠,١٤×°١٠ ± ١,٨٨ ج
	٢,٨٧×°١٠ ±٠,١٨ أ	٢,٦٥×°١٠ ± ٠,١٥ أ	١٨,٩٤×°١٠ ± ٠,٢٠ ب	٣٣,٢٥×°١٠ ±٠,٥٨ ج

الأحرف المختلفة أفقياً تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمال (أ < ٠,٠٥).

الجدول (٥) تأثير الخمج بالتهاب الضرع في مكونات بروتينات الشرش المفصولة بطريقة الترشيح الهلامي.

مكونات بروتين الشرش	متوسط نسبة الشقوق للحليب السليم)النصف الأيسر)			متوسط نسبة الشقوق للحليب المصاب (النصف الأيسر)		
	الحيوانات			الحيوانات		
	١	٢	٣	١	٢	٣
البيتالاكتوكلوبيولين	٢٧,٥٤	٢٨,٠٥	٢٧,٧٢	٢٤,٨٧	٢٥,٤٤	٢٥,١٦
الالفالاكتوكلوبيولين	٢٠,٤٥	٢١,٤٢	٢٠,٩٧	١٤,٢٥	١٥,٠٤	١٥,٥٧
البومين مصل الدم	٥,٨٧	٥,٤٧	٦,٢١	١٠,٨٧	٩,٢٣	١٠,١٥
الكلوبيولينات المناعية	٣,٤٢	٣,٣٣	٣,٤٠	٤٥,١١	٥٠,٢١	٤٥,٤٧
البروتيوز ببتون	٢,٤١	٢,٣٢	٢,٣٤	٥,٠٢	٤,١٢	١١,٠٠

والالفالاكتوكلوبيولين والبومين مصل الدم و الكلوبيولينات المناعية والبروتيوز ببتون، وقد عرفت هذه الشقوق اعتمادا على البروتينات النقية المفصولة تحت نفس الظروف. إن الانخفاض في نسبة الشقين البيتالاكتوكلوبيولين والالفالاكتوكلوبيولين في الحليب المخمج وارتفاع نسبة الشقوق البومين مصل الدم والكلوبيولينات المناعية والبروتيوز ببتون فيه قد يعود إلى تغير نسب هذه الشقوق في الدم كنتيجة للخمج بمرض التهاب الضرع والسبب أن لبيتالاكتوكلوبيولين والالفالاكتوكلوبيولين يخلقان داخل الضرع بينما مصل الدم والكلوبيولينات المناعية والبروتيوز ببتون يتم نقلهم إلى الغدة عن طريق الدم مباشرةً مما يزيد نسبة الأخيرة في الغدة اللبنية (٢٨) وان هذه النتائج كانت متفقة مع (٢٨و٢٩).

المصادر

١. المنظمة العربية للتنمية الزراعية. الكتاب السنوي للإحصائيات الزراعية العربية، ١٩٩٨ المجلد ٨ ديسمبر، الخرطوم، السودان.
٢. الحبيطي، عارف قاسم حسن. العلاقة بين الشكل التكويني للضرع بإنتاج الحليب وبعض مكوناته في الأغنام العواسية (أطروحة دكتوراه) الموصل:جامعة الموصل. كلية الزراعة والغابات، ٢٠٠٥.
3. Dulin A M, Paap M J and Wergin W P. Differentiation and numeration of somatic cell in goat milk. J Food Prot. 1982;45:435 - 441.
4. Pirisi A, Piredda G, Corona M, Pes M, Pintus S and Ledda A. Influence of somatic cell count on ewes milk composition, cheese yield and cheese quality 2001;Istituto Zootecnicoe Caseario Perla Sardegna 07040.Olmedo,Italy.

5. Al-Jammas M A. Mycotic mastitis among ewes in Mosul. Iraqi J Vet Sci. 2003;17 (1):55 – 60.
6. Mullarky I K, Su C, Frieze N, Park Y H and Sordillo L M. *Staphylococcus aureus* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. Infect Immun. 2001;69 (1):45 – 51.
7. Dhakal I P, Thapa B B. Economic impact of clinical mastitis in buffaloes. Buffalo J. 2001;18 (2):225 – 234 .
8. Trevor J P, Richard K R. Advanced dairy science and technology. Blackwell publishing.2008; pp294.
9. Capurro A, Concha C, Nilsson L and östensson K. Identification of coagulase - positive Staphylococci isolated from bovine milk. Acta Vet Scand.. 1999;40:315 – 321.
10. Chaffer M, Lettner G, Winkler M., Glickman A, Krihfucks O and Saran S. Coagulase negative Staphylococci and mammary gland infections. J Vet Med. 1999;46:707 – 712.
11. Coles E H. Veterinary clinical pathology. W. B. Saunders Co., London. 1980; pp. 438.
12. Coles E H. Veterinary clinical pathology.;4th ed. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto. 1986..
13. Silva W P, Destro M T and Franco B.Biochemical characteristics of typical and a typical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. Braz J Microbial. 2000;31:.1- 6.
14. Middlton J R., Luby C D, Viera L, Tyler J W and Casteel S. communication:Influence of *Staphylococcus aureu* Short intramammary infection on serum copper, zinc, and iron. J Dairy Sci. 2004;87:976 – 979.
15. Tollersrud T, Kampen A H and Kenny K. *Staphylococcus aureus* enterotoxin D is secreted in milk and stimulates specific antibody responses in cows in the course of experimental intramammary infection. Am. Society Microbiol. 2006;74 (6:3507 – 3512.
16. Davis D T.The quantitative partition of the albumin fraction of milk serum proteins by gel chromatography. J Dairy Res. 1974;41:217 – 228.
17. Randolph H E, Erwin R E and Richter R L.. Influence of mastitis on properties of milk. J Dairy Sci. 1974;57:15 – 18.
18. Petrie A and Watson P. Statistics for Veterinary and Animal Sciences. Blackwell Science, Oxford, 1999; pp140..
19. Bruning J L,Kintz B L.Computation and handbook of statistics. Scott, Foresman and Co. Glenview, Illinois.1977; pp143.
20. Roberson J R., Fox L K, Hancock D D, Gay J M and Besser T E. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci. 1994;77 3354.
21. Ghaleb A, Abusafih D, Aref R and Abo Omar J. Prevalence of microorganisms associated with intramammary infection in cows and small ruminants in the north of Palestine.
22. Ranucci S E, Morgante M. Sanitary control of sheep udder:total and differential cell controls in milk.In 'Somatic Cells and Milk of Small Ruminants.(Ed.R.Rubino.)19 – 13.(EAAP Publication:Wagheningen.) (cited by Bencini and Pulina 1997). J Islam. Univ. Gaza. 2005;13 (1):165 - 173.
23. Harmon R. Mastitis and milk quality.In ' Milk and Professional:London. 1995;(cited by Bencini and Pulina 1997)
24. Paape M J, Guidry A.J, Jain N C and Miller RH. Leucocytic defense mechanisms in the udder. Flemish Vet J. 1991;62:95 - 105.
25. Nickerson S C. Immunological aspects of mammary involution. J Dairy Sci. 1989;72:1665 - 1678.
26. Auldist M J, Hubble I B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. Austral. J Dairy Technol. 1998;53:28-36.
27. Petrovski K R. Milk composition changes during mastitis. 2006;(http:// www.milk production.com /Library/Articles.
28. Ali M M. Studies on the detailed composition and properties of some constituents of buffalo's milk.1989;Ph.D.Thesis, Ain Shams University, Ain Shams, Egypt.
29. Stephen J, Ganguli N C. Heat induced changes in buffaloes milk serum proteins as revealed by gel filteration and electrophoresis. Indian J Dairy Sci. 1977;30:78 – 81.