المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ٢، ٢٠٠٩ (٤٤٥-٤٤٨)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

عزل وتشخيص المايكوبلازما من حالات التهاب الضرع عند الأغنام في المنطقة الوسطى من سورية

حميد الرفاعي و سامر إبراهيم

قسم الأحياء الدقيقة، كلية الطب البيطري، جامعة البعث، سوريا

الخلاصة

جمعت ٢٠٠ عينة حليب من نعاج سليمة ظاهريا و ٩٥ عينة من نعاج مصابة بالتهاب الضرع ألسريري من قطعان مختلفة موزعة في المنطقة الوسطى من سورية للفترة المحصورة بين كانون الثاني وحزيران ٢٠٠٨، وأجريت عليها فحوصات العزل والتصنيف الكيموحيوية الخاصة بالمايكوبلازما. حيث أظهرت نتائج العزل الجرثومي أن ١٤عينة من مجموع العينات الكلي كانت موجبة للزرع على الأطباق الخاصة بالمايكوبلازما توزعت على الشكل التالي: ١٢,٦٣٪ للنعاج المصابة بالتهاب الضرع ألسريري، و١٪ للنعاج السليمة ظاهريا، كما أظهرت نتائج الاختبارات الكيموحيوية تشخيص ثلاث عزلات للمايكوبلازما النوع الماعزي *mycoplasma capricolum* و١١ عزلة كانت للمايكوبلازما اكلاكتيا*Mycoplasma agalactiae* .

Isolation and identification of mycoplasma from cases of mastitis in sheep in the middle region of Syria

H. Alrefaie and S. Ibrahim

Department of Veterinary, Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Albaath University, Syria

Abstract

Tow hundred milk samples were collected from healthy appearance ewes and ninety five samples from clinical infected ewes with mastitis from deferent flocks distributed in the middle region of Syria from January to June 2008, isolation and biochemical identification testes of Mycoplasma were applied to all samples. Results showed that fourteen samples were positive (12.63%) for clinical infected ewes and 1% for healthy appearance ewes. Biochemical tests revealed that three isolates positive *to Mycoplasma capricolum* and eleven isolates to *Mycoplasma agalactiae*.

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

المقدمة

يعرف التهاب الضرع على انه التهاب غدة الثدي عند النعاج بغض النظر عن المسبب ويتصف بحدوث تغيرات فيزياوية و كيميائية وجرثومية في الحليب مع وجود اعداد هائلة من مختلف انواع الجراثيم فيه وتغيرات مرضية في نسيج غدة الثدي والتي تسبب تغيرا في صفات ومكونات الحليب الطبيعي من ناحية اللون والقوام والرائحة وعدد الخلايا الالتهابية فيه (١،٢). هناك مسببات عديدة لالتهاب الضرع عند الأغنام كما هو الحال عند الأبقار منها ما يكون جرثوميا، فطريا، خميريا، مايكوبلازميا او حمات راشحة (فيروسيا). تعد المايكوبلازما من أهم العوامل الممرضة عند الأغنام والماعز وبشكل خاص *Mycoplasma agalactiae* والتي تسبب متلازمة جفاف الضرع الساري contagious agalactia syndrom عند الأغنام والماعز (٣)، والمرض أول ما يصيب الغدة اللبنية، ثم المفاصل، والعين وبدرجة أقل القناة التنفسية ويظهر سريريا على شكل التهاب ضرع والتهاب مفاصل، التهاب القرنية والملتحمة والتهاب رئوي (٤) ومع ذلك فإن التغيرات المرضية والسريرية المشابه عند هذه الحيوانات يمكن أن تسببها أنواع المفطورات الأخرى(٤-٦) والمتضمنه المفطورة ميكوئيديس تحت النوع ميكوئيديس

Mycoplasma mycoides subsp. mycoides والمفطورة الماعزية تحت النوع الماعزي Capricolum subsp. capricolum والمفطورة ميكوئيديس تحت النوع الماعزي Mycoplasma mycoides subsp. Capri (٣)، بسبب التاثيرات الحادة والشديدة لهذه الممرضات ودورها في إنخفاض انتاج الحليب وإنقطاعه وزيادة أو ارتفاع تعداد الخلايا الجسمية في الحليب في حال اصابة غدة الثدي، فإن متلازمة جفاف الضرع الساري تعتبر أحد الأسباب الأكثر أهمية لإلتهاب الضرع في المناطق المستوطن فيها المرض(٧). نظرا لما تسببه المايكوبلازما من تأثيرات اقتصادية ومرضية عند الأغنام فقد هدفت الدراسة الى التقصي عن التهاب الضرع المسبب بالمايكوبلازما وعزل وتشخيص هذه المسببات.

المواد وطرائق العمل

العينات

تم جمع ٩٥عينة حليب من نعاج مصابة بالتهاب الضرع السريري و٢٠٠ عينة من نعاج سليمة ظاهريا (جمعت عشوائيا) من مناطق مختلفة من المنطقة الوسطى من سوريا (محافظة حمص وحماه) في الفترة الممتدة من كانون ثاني 2008 حتى حزيران 2008 وتم جمع عينات الحليب بطريقة عقيمة وبأنابيب معقمة بعد ترك الدفعات الاولى للحليب (استبعادها)، اخذ حوالي ١٠-١٥ مل من الحليب , بعدها نقلت العينات الى المختبر في حافظة ثلجية (٩) تم اجراء اختبار كاليفورنيا للعينات المأخوذة من النعاج السليمة ظاهريا لكشف التهاب الضرع و أجريت الاختبارات الجرثومية لجميع العينات السريرية وتحت السريرية.

الأوساط الزرعية

استخدم وسط مرق المايكوبلازما (PPLO broth) والمنتج من قبل شركة Oxoid. ووسط أغار المايكوبلازما (PPLO agar) والمنتج من قبل شركة Oxoid الانكليزية تم تحضير تبعا لتعليمات الشركة وتم التعقيم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ درجة مئوية وتحت ضغط ١٥٠ باوند ولمدة ١٥ دقيقة.

المواد المضافة لوسط المايكوبلازما: تم تحضير محاليل المواد وفقا لـ ((10:تم تحضير الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة واضيفت له مصل دم الحصان من انتاج شركة سيجما تم اضافته للوسط بنسبة ٢٠٪ أي اضيف ٢٠٠ مل مصل لكل لتر من الوسط المحضر، DNA (Himedia)، خلات الثاليوم (سيجما)، خلاصة الخميرة (هايميديا الهندية) حضر محلول من خلاصة الخميرة بنسبة 50% وتم تعقيم المحلول بالفلاتر، الاضافات (supplement) (Himedia) وتحتوي مضادات حيوية، بنسلين G تم تحضيره وفقا لـ (١٠).

تحضيرالوسط الصلب PPLO agar: تم تحضيره وفقا لتعليمات الشركة المنتجة،أضيف للوسط 200مل مصل دم الحصان و100 مل من محلول الخميرة المحضرة حديثا (50%)، 20مل محلول DNA (0.2%)، 20مل خلات الثاليوم(1%)، 2 مل supplement أو 10 مل بنسلين G،ضبط PH الوسط عند 7.6 و 7.8 و تم صب الوسط في أطباق بتري معقمة حوالي 15 مل بكل طبق.

مواد الاختبارات البيوكيميائية

غلوكوز – فينول فثالين دي فوسفات الصوديوم– ارجنين – يوريا.

الكواشف والمواد الكيميائية

كاشف أحمر الفينول- ماءات البوتاسيوم ٣٠٪ - كاشف اختبار كاليفورنيا

الأدوات المخبرية الأخرى

جرة الزرع اللاهوائي – حضانة.

اختبار كاليفورنيا

تم إجراء اختبار كاليفورنيا الحقلي للعينات المأخوذة من النعاج السليمة ظاهريا للكشف عن التهاب الضرع تحت السريري وتم تقييم نتائج الاختبار حسب (٩).

الزرع والعزل

تم الزرع حسب (١١) بأخذ 0.1 من عينة الحليب بعد مجانستها بتحريكها بلطف وفردها على طبق بتري يحوي وسط PPLO agar المحضر مسبقا ومن نفس العينة تم أخذ 0.2 مل من العينة وتلقيحها في الوسط السائل (بأنبوب يحوي 1.8 مل PPLO broth) ومن ثم أخذ 0.2 من الأنبوب المحقون بالعينة (رقم 1) وحقنه في أنبوب آخر (رقم 2) يحوي 1.8 مل PPLO broth وتحضن الأنابيب المزروعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية هوائيا، أما الأطباق المحقونة بالعينة فتوضع في حجرة الزرع اللاهوائي وبوجود الشمعة وبوجود وتغلق حجرة الزرع وتحضن بدرجة حرارة37 °م وتم فحص الانابيب المزروعة بالعينة يوميا لمشاهدة التغير في لون الوسط (تغير لون المشعر) نتيجة تغير PH وفحصت الأطباق بعد 3 أيام تحت مجهر المجهر المجسم بتكبير 35× لمشاهدة الشكل المميز لمستعمرات الميكوبلازما (شكل البيض المقلي).

وتم أخذ 0.1 مل من الأنابيب (1،2) وحقنت على أطباق الوسط الصلب بعد 3 أيام و10 أيام من التحضين للأنابيب.

تم تنقية المايكوبلازما وفقا لـ (٩) حيث تم التنقية من خلال أخذ مستعمرة واحدة بعد تحديدها وتعليمها ومن ثم قطع الجزء المحدد من الآكار المحدد والمحتوي على مستعمرة مفردة بمشرط معقمsterile scalpel ونقل الجزء المقطوع بصورة عقيمة الى أنبوب يحوي 2-3 مل من الوسط السائل PPLO broth وتم تحضين الأنابيب المزروعة بدرجة 37 °م لمدة 48 ساعة أو أكثر وتم فحص الأنابيب بعد 48 ساعة، يمرر الوسط السائل النامية

عليه المايكوبلازما من خلال فلتر (مرشحة ذات قط 0.45 mμ) الى انبوب معقم ويمدد الوسط المزروع بإضافة وسط سائل حديث وطازج بتمديده 10/1 و 100/1 ويؤخذ ملئ لوب الزرع من كل تمديد ويفرد على وسط صلب خاص بالمايكوبلازما وتحضن الاوساط المزروعة بنفس شروط التحضين الخاصة بالمايكوبلازما وتم تكرار هذا الإجراء ثلاث مرات.

طرق إجراء الإختبارات الكيمياء حيوية

أهم الاختبارات المجراه: وتم اجراءها وفقا لـ(١٢) وذلك بعد الحصول على مستعمرات نقية.

تخمير أو استقلاب الغلوكوز

ويتم تحضير الوسط السائل كما سبق شرحه من قبل وضبط PH الوسط عند 7.5 وتم وضع المستعمرة النقية في الأنبوب المحتوي على الوسط المحضر ويترك أنبوب يحوي وسط بدون زرع كشاهد ويتم التحضين ظروف التحضين للوسط السائل المذكورة سابقا ولمدة48 ساعة أو أكثر ويتم فحص الأنابيب كل يومين ولمدة أسبوع وعند تخمير الغلوكوز يتنتج الحمض ويتغير PH نحو الحموضة الانبوب الشاهد دون تغير ويصبح لون الوسط أصفر نظرا لتحول لون المشعر (أحمر الفينول) في الوسط الحمضي الى اللون الأصفر.

فاعلية الفوسفاتيز phosphatase activity

يعتمد هذا الاختبار على تحرر الفينوفثالين من الوسط الزرعي الحاوي ملح الصوديوم لمادة الفينوفثالين ثنائي الفوسفات بعد تحضير الوسط الصلب وإضافة المواد اللازمة للوسط،بعد تبريد الوسط عند الدرجة 50 درجة مئوية و تم إضافة 10 مل من فينول فثالين دي فوسفات الصوديوم (1%) وبعد ذلك ضبط PH الوسط عند 7.8 وتم صب الوسط في أطباق بتري معقمة، حقنت الأوساط الصلبة بقطرات من وسط سائل تم تنمية المستعمرات النقية فيه وحضن لمدة 48ساعة وتم ترك طبق من دون زرع كشاهد. وتم تحضين الأطباق المروعة لمدة 4 ايام ومن ثم اضافة عدة قطرات من هيدروكسيد البوتاسيوم 40% على سطح الاطباق المزروعة، النتيجة الايجابية أعطت لون أحمر بسرعة خلال نصف دقيقة بينما في النتيجة السالبة استغرق تكويين اللون الاحمر وقت أطول من ذلك.

اماءة الأرجنين

نفس طريقة تحضير الوسط لتخمير الغلوكوز أي أن الوسط لايحوي غلوكوز وانما يستبدل الغلوكوز بـ 25 مل أرجنين-L 30% arginine وتم ضبط PH الوسط عند 7 ففي الحالة الايجابية يتغير PH الوسط نحو القلوية بمقدار0.5 يتحول اللون من اللون البرتقالي الى اللون الأحمر العميق.

تحلل اليوريا

نفس طريقة اماءة الأرجنين وهنا لم يتغير اللون لأن المايكوبلازما سالبة لليوريا.

تكوين الغشاء والنقط

تم حقن وسط اغار المايكوبلازما الصلب بقطرات من الوسط السائل المنماه فيه مستعمرات المايكوبلازما النقية ووضعت الأطباق المزروعة في جرة الزرع وبوجود الشمعة وحضنت بدرجة 37 درجة مئوية لمدة اسبوعين وفحصت الأطباق كل 4-3 ايام تحت المجهر Stereoscopic microscope لمشاهدة الغشاء الذي يتكون على سطح الأجار في المنطقة المزروعة بكثافة.

النتائج

تم الحصول على 12 عزلة مايكوبلازما من عينات الحليب المأخوذ من نعاج مصابة بالتهاب الضرع السريري أي ان 12 عينة كانت ايجابية لزرع المايكوبلازما من أصل 95 عينة وبلغت نسبة العزل 12.63 % و2 عزلة من نعاج سليمة ظاهريا (مصابة بالتهاب ضرع تحت سريري) أي عينتين ايجابيتين للزرع الجرثومي من أصل 200 عينة وكانت نسبة العزل1 % , كانت اختبار كايفورنيا لهاتين العينتين ايجابية وأخذت درجة الأختبار الرقم 3 (CMT≥3) شخصت العزلات بالاعتماد على شكل المستعمرة وبناء على الخواص الكيمياحيوية للمايكوبلازما (١).

جدول (١): نتائج الاختبارات الكيمياحيوية لعزلات المايكوبلازما.

نوع العزلة	عدد العزلات	تخمير غلوكوز	اماءة الأرجنين	تحلل اليوريا	فاعلية الفوسفتيز	تشكل الغشاء والنقط
مايكوبلازما ماعزية	3	+	+	-	+	-
مايكوبلازما أجلاكتيا	11	-	-	-	+	+

من الجدول يتضح لدينا أن عدد عزلات المايكوبلازما الأجلكتية هو 11 عزلة وحددت حسب الاختبارات الكيمياحيوية الموضحة بالجدول (١)، بينما كان عدد عزلات المايكوبلازما الماعزية هو 3 عزلات.

المناقشة

من خلال نتائج الدراسة تبين أن العينات الايجابية للزرع وعزل المايكوبلازما كانت مأخوذة من نعاج ظهر لديها التهاب ضرع مترافق مع التهاب مفاصل والتهاب القرنية والملتحمة

وكانت تعاني من عرج شديد نتيجة تورم المفاصل وهذا يتوافق مع ماذكره (٤) أن متلازمة جفاف الضرع الساري تسبب التهاب ضرع والتهاب مفاصل والتهاب القرنية والملتحمة، بينما العينات الأخرى المأخوذة من نعاج مصابة بالتهاب الضرع السريري فقط لم تكن ايجابية لعزل المايكوبلازما، كما أن العينات الايجابية لعزل المايكوبلازما والمأخوذة من نعاج سليمة ظاهريا، أظهرت نتيجة اختبار كاليفورنيا أن تعداد الخلايا الجسمية كان مرتفع بعينات الحليب (CMT≥3) كما أن هذه النعاج كانت تعاني انخفاض حاد بانتاج الحليب وهذا يتوافق مع ماذكره (٧) بأن المايكوبلازما تسبب ارتفاع بتعداد الخلايا الجسمية بالحليب وانخفاض شديد بانتاج الحليب، من نتائج العزل والتمييز تبين لدينا أن عزل المايكوبلازما الأجلكتية كان أعلى وبلغ (12.63 %) وهذا يتوافق مع ماذكره (٣) بان المايكوبلازما الأجلكتية هي المسبب الرئيسي لمتلازمة جفاف الضرع الساري عند الأغنام، كما أن نسبة عزل المايكوبلازما (13%) وخصوصا من الحالات السريرية بهذه الدراسة تتوافق الى حد ما مع ماذكر من قبل (٨) في دراستهم التي أجروها في الاردن لعزل وتشخيص المايكوبلازما من المجترات الصغيرة حيث بلغت نسبة عزل المايكوبلازما من عينات الحليب المأخوذة من نعاج تعاني من أعراض متلازمة جفاف الضرع الساري (13%) حيث تم عزلها من 8 عينات من أصل 62 عينة حليب، كما تم عزل المايكوبلازما الماعزية تحت نوع الماعزي *Capricolum* *capricolum*في هذه الدراسة والذي يؤكد دور هذا النوع من المايكوبلازما في حدوث متلازمة جفاف الضرع الساري وهذا يتوافق مع ماذكره (٤-٦) بأن أنواع أخرى من المايكوبلازما تسبب نفس أعراض متلازمة جفاف الضرع الساري.

المصادر

1. B.Bergonier D, Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G. and Berthelot, X.. Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res.2003;34:689-716.
2. Matthews J. Diseases of the Goat. 2nd ed. Blackwell, Oxford, UK. 1999.
3. Bergonier D, Berthelot X, Poumarat F. Contagious agalactia of small ruminants:current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev Sci Tech. Off. Int Epiz. 1997;16 (3):242-246.
4. Nicholas R. Contagious agalactia:an update. In:Frey J and Sarris K:COST 826 Agriculture and Biotechnology,"Mycoplasmas of Ruminants:Pathoge- nicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics," EUR 16934 Luxembourg. 1996;pp. 848–873.
5. Sarris K. Contagious agalactia. In:Frey J, Sarris K. Mycoplasmas of ruminants:pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Cost 826, EUR 16934, European Commission, European Communities Official Publications Office, Luxembourg. 1996;pp. 12 -15.
6. Bolske G, Wilhemsson E, Twinamasiko E, Johansson K-E. Detection of Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae in goats and sheep in Uganda. IOM Letters. 1994;3:19 – 20.
7. Corrales JC, Sanchez A, Luengo C, Poveda JB, Contreras A. Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank milk somatic cell count in Murciano–Granadina goat herds. J Dairy Sci. 2004;87 (10), 3165–3171.
8. AL Momani W, Halablab MA, Abo- Shehada MN, Miles K, McAuliffe L, Nicholas RAJ. isolation and molecular identification of small ruminant mycoplasma in Jordan.. Small Rumin Res. 2005;65(1-2),106-112.
9. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK and Carter GR. Clinical veterinary microbiology. London, Mosby-year book Europe limited.1999;pp. 322-324.
10. National milk council.laboratory hand book on bovine mastitis.University of California press. USA. 2005;pp.187-188
11. Bisping W and Amtsberg G. Color atlas for diagnosis of bacterial pathogens in animals. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1988;pp.313-317.
12. Carter GR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology 3rd by Charles C T. Publisher Springfield. Illinois.USA.1979;pp.261-264.