المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٠، العدد ١، ٢٠٠٦ (٣٩-٤٧)

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، موصل، العراق

(الاستلام ٢٢ أيار ٢٠٠٥؛ القبول ٤ 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 (53%) 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 %) و4 (26.6 %) عزلة، على التوالي 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 *STAPHYL OCOCCUS AUREUS* CAPSULES PRODUCER ISOLATED FROM BOVINE AND BUFFALOES 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 were 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, respectively. An increase in the number of capsules and slim producing strains was observed following growing of these bacteria in culture media containing glucose and milk. The experimentally performed histo-pathological study, revealed presence of capsules in lung sections stained with Hematoxylin–Eosin as a halo areas appeared around the bacterial cells. In addition to a strong positive reaction with periodic acid shiffs.

المقدمـــة

عرفت جراثيم المكورات العنقودية المرضية بكونها مسبة للعديد من الإمراض للإنسان والحيوان و منذ أكثر من مئة عام اعتبرت هذه الجراثيم من المسببات الشائعة لالتهاب الضرع الحاد وتحت الحاد على الرغم من وجود مسببات مرضية عديدة. إذ يسبب المرض خسائر اقتصادية فادحة في صناعة الألبان (1 ،2) وتعزي قدرة الجراثيم على إحداث المرض إلى امتلاكها العديد من اللاواصق المرتبطة بالسطح والإنزيمات والذيفانات الخارجية والمحافظ المتعددة السكرية Capsular polysaccharide التي تساعد هذه الجراثيم في الالتصاق بالأغشية الخلوية للخلايا الحقيقية النواة ومقاومة الابسنة والبلعمة Opsonophagocytosisوتحليل الخلية الحقيقية النواة وتحفز على إنتاج سلسلة الوسائط المناعية للمضيف (4, 3). وجد إن 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 إن معظم سلالات هذه الجراثيم تنتج طبقة خفيفة تختلف في التركيب المناعي والمستضدي عن التي في مكونات الجدار الخلوي التي تعرف بـ Micro capsule، إذ لوحظ إن هذه الطبقة تتكون من سكريات متعددة مؤلفة مـــن 2 – actamido – 2 deoxy – D – Mannuronic acid ومرتبطة مـع 2 –actamido – 2- deoxy focuse، كما وجد تكون مواد متعدد السكريد خارجية في بعض سلالات جراثيـــم *Staph. aureus* استجابة لبعض الظروف البيئية الخاصة، تدعى هذه المواد ب Slim أو طبقة المواد اللزجة وتتكون هذه الطبقة من hexose و hexosamin و Prolein و phosphorus وتختلف هذه الطبقة كيماويا" ومناعيا" عن السكريات المتعددة للمحافـظ (2).

ولأهمية هذه المحافظ في أمراضية جراثيم المكورات العنقودية المرضية أجريت هذه الدراسـة للتحـري عـن السـلالات المنتجـة للمحـافظ و Slim والمعزولـة مـن حـالات التهـاب ضـرع الأبقـار والجـاموس ألـسريري وتـأثير إضـافة الكلوكـوز والحليـب علـى إنتـاج هـذه المكونات فضلا" على التأكد من وجودها تجريبيا" من خـلال إحداث الخمج التجريبـي فـي الجرذان.

المواد وطرائق العمـل

تم جمع 40 عينة حليب من الأبقار و 15 أخرى من الجاموس، مصابة ظاهريا" بالتهاب الضرع. وتم جمع عينات الحليب في قناني معقمة ثم لقحت نماذج من الحليب على أطباق وسط أكار الدم (Blood agar) والمجهزة من شركة (Oxoid). حضنت الأطباق بدرجة 37 °م ولمدة 24 ساعة في ظروف هوائية، تم التعرف إلى شكل الجرثومة مجهريا باستخدام صبغة كرام بعد دراسة صفاتها المز رعية ثم اختبرت المستعمرات المشكوك بها ونقلت على وسط أكار سكر المانتول والملح (Oxoid Mannitol Salt agar) وحضنت بالظروف النموذجية لنمو الجرثومة ثم آجري اختباري (Catalase) و (Coagulase) للمستعمرات المخمرة لسكر المانتول بعد تنميتها على وسط أكار نقيع القلب والمخ (Oxoid Brain heart infusion agar) (6). تم نلقيح المستعمرات الموجبة لاختبار (Coagulase) على وسط (Columbia agar) والحاوي على 2% كلوريد الصوديوم ثم أخذت 2–3 مستعمرة من تلك النامية و تم وضعها في 1 مل من الماء المقطر العقيم وتم صبغها بطريقة الصبغة السالبة المحورة وذلك بأخذ قطرة من المعلق المحضر على الشريحة ومزجها مع قطرة من الحبر الهندي بعدها تم نشر المزيج وتركت الشريحة لتجف. علقت المسحة بصبغة المثيل البنفسجي وبتركيز1% لمدة دقيقة واحدة ثم فحصت الشرائح

مجهريا للتحري عن وجود المحافظ في السلالات المعزولة وتم تصويرها فوتوغرافيا" (7). كما أجرئ اختبار إنتاج المادة اللزجة (Slime) للسلالات السالبة إذ تم تنمية السلالات هذه في قناني حاوية على وسط (Trypticase Soya broth) وحضنت بدرجة 37 °م ولمدة 24 ساعة. بعدها وضعت قطرات من السفر أنين 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 الأحمر (8). كما تم التحري عن إنتاج المحافظ و (Slime) بالطريقة المذكورة أعلاه بعد تلقيح السلالات المعزولة في وسط (Brain heart infusion broth) والحاوي على 1% لكل من الحليب والكلوكوز لدراسة تأثيرها على إنتاج المحافظ و Slime (9).

استخدمت خمسة من ذكور الجرذان وبوزن 190 – 200غم وبعمر 8 أسابيع إذ تم حقنها ب 0.5 مل من 2 x 10^7 Cfu / مل لعزلة الجراثيم المنتجة للمحفظة في التجويف ألخلبي (10). وبعد مرور سبعة أيام من الحقن تم قتل الجرذان لإجراء الصفة التشريحية وأخذت نماذج من نسيج الرئة حيث غمرت في محلول الفورمالين الدارئ المتعادل 10 % لغرض تحضير شرائح نسجية وبسمك 4 – 6 ما يكرون ثم صبغت بصبغة هيماتوكسلين – ايوسين وصبغة حمض البريوديك شيف Periodic (acid (11) shiff's (PAS فحصت مجهريا ثم صورت فوتوغرافيا".

النتائـــج

تم الحصول على 23 و 8 عزلات عائدة لجراثيم *Staph. aureus* وبنسبة 57.5% و 53 % من حالات ألتهاب ضرع الأبقار والجاموس ألسريري، على التوالي والمبينة في الجدول (1) . كما يوضح الجدول (2) إن 6 عزلات من الجراثيم المعزولة من حالات التهاب الضرع ألسريري في الأبقار كانت منتجة للمحافظ، في حين كانت 9 عزلات منتجة Slim ، كما إن 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 إضافة الكلوكوز والحليب للوسط ألزرعي المستخدم في تنمية هذه الجراثيم. تظهر الصورة (1) وجود المحفظة في الجراثيم المعزولة المنتجة للمحافظ وبطريقة الصبغة السالبة المحورة إذ 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 بلون احمر (صبغة السفر أنين) هذا دلالة على تكون Slim وتبين المقاطع النسجية وجود المحافظ في بعض السلالات المعزولة من خلال التفاعل الموجب لصبغة PAS إذ تظهر بلون وردي كما في ألصورة (3). كما إن الصورة (4) توضح وجود المحافظ بشكل مجاميع حول خلايا هذه الجراثيم والمصبوغة بصبغة H & E.

جدول 1: عدد ونسب عزلات *Staph. aureus* المعزولة من حالات التهاب ضرع الأبقار والجاموس ألسريري.

مصدر العينة	عدد العينات	عدد ونسب العزلات
التهاب ضرع الأبقار	40	23 (57.5%)
التهاب ضرع الجاموس	15	8 (53 %)

جدول 2: عدد ونسب *Staph. aureus* العزلات المنتجة للمحافظ Slim.

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

جدول 3: يبين تأثير الحليب والكلوكوز على إنتاج المحافظ Slime.

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

صـورة 1: توضـح المحفظـة فـي جـراثيم *Staph. aureus* المعزولـة الـصبغة الـسالبة المحورة.

صورة 2: توضح Slim في جراثيم *Staph. aureus* المعزولة الصبغة سفرأنين.

صورة3 : صورة فوتوغرافية نسجية لمقطع من رئة جردي مخمج بجرثومة *Staph. aureus* توضح التفاعل الموجب لصبغة PAS.

صورة 4: صورة فوتوغرافية نسجية لمقطع من رئة جردي مخمج بجرثومة *Staph. aureus* يوضح تموضع الجرثومة بهيئة مجاميع فضلا عن وجود المحافظ الصبغة H & E.

المناقشة

ازداد الاهتمام بدراسة المحافظ الخارج خلوية في الجراثيم لدورها في العملية المراضية للإنسان والحيوان إذ إن احتواء بعض جراثيم المكورات العنقودية الممرضة على المحافظ يعزز من ضراوة الجرثومة ومقاومة البلعمة كما تساهم أيضا في التصاق هذه الجراثيم بخلايا المضيف (10). لوحظ إن السلالات الحاوية على المحافظ والمعزولة من حالات التهاب الضرع في الأبقار تعود إلى مجموعة مختلفة عن السلالات المعزولة من الحالات المرضية للإنسان إذ تكون التراكيب السطحية والمستضدات مخفية بواسطة هذه المحافظ (1) صنفت السلالات السريرية المعزولة من الإنسان والحاوية على المحافظ إلى 11 نمط مصلي استنادا" إلى التنميط المناعي لمتعدد السكريد المكون لهذه المحافظ إذ لوحظ إن 70 %–80 % من هذه السلالات تعود إلى النمطين 5 و 8 (12) كما لوحظ وجود

علاقة بين هذين النمطين وعوامل الضراوة كإحداث Toxic shock syndrome، سجل تواجد النمطين في السلالات المعزولة من مصادر حيوانية (10).

تم الحصول في هذه الدراسة على 23 (9.2 %) و 8 (1.2 %) عزلة تابعة لجراثيم المكورات العنقودية المرضية من حالات التهاب الضرع ألسريري من الأبقار والجاموس على التوالي. وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسات محلية وعالمية عديدة بينت بان هذه الجراثيم هي أكثر المسببات الجرثومية لالتهاب ضرع الأبقار والجاموس (2-16) كما أظهرت نتائج الفحص ألمجهري للجراثيم المعزولة وجود المحافظ إذ ظهرت بشكل هالة بيضاء تحيط بخلايا الموجبة لصبغة كرام إذ تعد صبغة الحبر الهندي ومظهر المستعمرات المخاطي على الأوساط الزرعية من طرق التشخيص المعروفة للمحافظ والمبينة في الجدول 2 والصورة 2 وهذا يوافق ما أشار إليه (17) في بعض من سلالات جراثيم المكورات العنقودية تكون محافظ حقيقية.

أظهرت النتائج إن استخدام الحليب والكلوكوز أدى إلى زيادة في إنتاج المحافظ والمواد اللزجة، إذ بينت النتائج ظهور المحافظ في 8 و3 عزلات أخرى من التهاب ضرع الأبقار 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 يتفق مع دراسات أخرى العديد من الباحثين، إذ بينت (3 ,18) بأن استخدام بعض الأوساط الزرعية الحاوية على المصل والكلوكوز والحليب أو إضافة بعض المواد للوسط ألزرعي الخاص بجراثيم المكورات العنقودية يؤدي إلى زيادة إنتاج مواد Slim في هذه الجراثيم استجابة لوجود هذه المواد في الوسط، كما أكد (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 الأبقار عند تنميتها في الحليب الخام الغني بالمواد المغذية الأساسية أو في الأوساط الحاوية على السكريات يعزز من إنتاجها لمواد خارج خلوية أي إن إنتاج هذه الطبقة يتأثر بالعوامل البيئية وبظروف النمو، أن زيادة تركيز الكلوكوز في الوسط ألزرعي يؤدي إلى زيادة إنتاج Slim من قبل هذه الجراثيم، وجد إن العديد من السلالات تكون مواد سكرية خارجية لا تندمج مع جدار الخلية إذ تكونها فقط في ظروف معينة مثل وجود الكلوكوز (17) إذا يعتقد إن الجين المنتج لهذه المواد يحث بوجود مصادر ايضية في الوسط كما تزداد الإصابة بالمرض عندما تكون سلالات هذه الجراثيم مخاطية أو منتجة لـ Slim (19). وان قدرة هذه الجراثيم لاستيطان الغدد اللبنية تزداد عندما تكون الإصابة بواسطة السلالات المخاطية أو المنتجة لSlime أكثر من السلالات غير المخاطية (17) كما أظهرت النتائج إن السلالات التي تم تنميتها في الوسط الخالي من الكلوكوز والحليب أنتجت Slim بعد إضافة الكلوكوز إلى الوسط ومن الجدير بالذكر أنه عند العزل الأولي لهذه الجراثيم تكون بعض السلالات منتجة للمحافظ ولكن بعد الزرع المتكرر في المختبر تفقد هذه السلالات خاصية إنتاج المحافظ (20). لذا من الممكن الاستفادة من خاصية إضافة مواد محفزة إلى الأوساط الزرعية لإنتاج المحافظ.

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

إن نتائج الفحص النسيجي التي أظهرتها مقاطع نسيج الرئة المخمجة بالجرثومة والمصبوغة بصبغة هيماتوكسلين ايوسين تبين وجود المحفظة فضلا عن التفاعل الموجب الذي أبدته مع تقنية PAS وهذا يشير إلى قابلية هذه المحافظ على حماية الجرثومة من

دفاعات المضيف وهذا ما ذكرته بعض الدراسات التجريبية حيث أشارت إلى إن المحافظ لها دور في العملية الامراضية إذ تزيد من ضراوة الجراثيم ومقاومتها للبلعمة في الفئران وبالتالي بقاء الجرثومة واستمرارها في المجرى الدموي للمضيف المصاب كما وجد بان هذه المحافظ تؤدي إلى تكوين الخراجات في هذه الحيوانات (9, 22، 23) وان الأضداد الناتجة عن الخمج بالمحافظ لها القابلية على حماية المضيف من أفات مرضية متمثلة بالتهاب شغاف القلب والتجرثم الدموي وإصابات الكبد والطحال والتي تؤدي إلى الموت (23).

المصادر

1. Boerlin P, Kuhnert P, Hussy D, 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, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clinc Microb Rev 2004; 17: 218–234.
4. Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein B1, Modoff G. Mechanism of microbial disease. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins 1999: 135.
5. Captain GG, Costerction S. Morphological examination of the glycocalyces of *Staphylococcus aureus* strains. Infect lmmune 1982; 36: 759–767.
6. Silva WP, Destro MT, Laudgraf, 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, Robin T. Mucoid encapsulated *Entrococcus faecalis* an emerging morphologic isolated from patients with urinary tract infections. Diagn Microbiol Infec Dis 1998; 31: 429–430.
8. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. 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, Moutanaro 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, 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, Wallington EA. Carton's histological technique. 5th ed. Oxford: University Press 1980.
12. Koneman MD, Alten MD, Juada, Hreckeu Bergen Ms, Winn Jr. Atlas textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. 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 AR. Studies on Mastitis in buffaloes. M Sc Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad 1982.
16. Kupar MP, Singh RP. 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, 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 CN, Tome A, Ubeda CM, Trotond P, Monzon M, Perris C, Amorena B, Lassa I, Renades JR. Role of biofilm associated protein Bap in the Pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 2004; 72: 2177–2185.
21. Norcross NL, 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, Lee C. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina. J Clin Microbiol 2000; 38: 846–850.