عزل جراثيم المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) من الحليب الخام للابقار في محافظة صلاح الدين وتقييم حساسيتها تجاه المضادات الحياتية المختلفة

نهاد عبد الحسين جعفر[1]و سهى ماهر عبد[2]ومثنى علي سلطان[1]

1-كلية الطب البيطري- جامعة تكريت 2 -كلية العلوم- جامعة تكريت- تكريت-العراق

الخلاصة

اجريت الدراسة لعزل جراثيم المكورات العنقودية الذهبية ***Staphylococcus aureus*** من حليب الابقار المتواجدة في مناطق مختلفة من اقضية ونواحي محافظة صلاح الدين . تم جمع(109) عينة حليب خام للفترة مابين (تشرين الاول 2010 الى ايار 2011) واظهرت الدراسة ان عدد عزلات *S. aureus* كانت (14) من اصل (60) اي بنسبة (23.33٪). اما بالنسبة لنتائج اختبار الحساسية للعزلات فقد اظهرت اختلافا في تحسس العزلات ومقاومتها تجاه المضادات الحياتية وبنسب مختلفة تجاه الانواع المستخدمة في الدراسة والتي شملت (6)انواع من المضادات الحياتية وهي Clavulanic acid/amoxicillin, Cefoxetine ,Ciprofloxacin ,Erythromycin, Ampicillin, Methecillin. بينت النتائج ان نسب التحسس لكل من(illin ,Cefoxetine, Clavulanic acid/amoxycillin Methec) بلغت (50٪) وكانت (79٪) من العزلات حساسية تجاه المضاد (Ertythroycin) اما مضاد (Ampicillin) كان فعالا تجاه (57٪) من العزلات, بينما كان اكفأ المضادات هو (Ciprfloxacin) وقد اثبت فعاليته ضد العزلات حيث ان جميع العزلات كانت حساسة لهذا المضاد وبلغت (100٪).

Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw milk of cows at Salah Al -Din province and evaluation of their susceptibility to antibiotics

Nihad,A.J.[1], Suha, M.A.[2] and Muthanna.A.S.[1]

1-College of Veterinary Medicine University of Tikrit 2- College of Science, University of Tikrit, Tikrit-Iraq

Summary

The study was designed for isolation of *Staphylococcus aureus* from raw milk of cows at different regions of salah al-din province. A total number of 109 samples were collected form October (2010) to May (2011). The result of study showed that the number of isolates were (14) from (60) positive samples (23.33%). Antibiotic susceptibility test showed different results for susceptibility according to types of antibiotics that used in this study which include the followings: Amoxycillin, Ampicillin, Cefoxetine, Methcillin, Ciprofloxacin, Clavulinic acid and Erythromycin. The results showed that 50% of the isolates were susceptible for Methecillin, Cefoxetine, and Clavulanic acid-Amoxycillin), While Erythromycin was active against (79%) of the isolates, and Ampicillin was active against (57%), on the other hand, all isolates were susceptible to Ciprofloxacin which considered the most effective antibiotic against the bacteria in this study (100%).

المقدمة

يعتبر الحليب احد اهم الاغذية المهمة بالنسبة للانسان حيث يحتوي الحليب على عناصر غذائية مختلفة بالنسبة للانسان وتعتبر هذه العناصر الغذائية بنفس الوقت وسط مهم لنمو الجراثيم(*1*) وتعتبر جرثومة المكورات العنقودية احد اهم الجراثيم المرضية التي تنتقل عن طريق تناول الحليب الخام والتي سجلت في دول مختلفة من العالم (2,3). في قطعان ابقار الحليب عادة ما تتواجد هذه الجراثيم في حالات التهاب الضرع البقري المختلفة الاشكال وخاصة التهاب الضرع تحت السريري والتي تؤدي بالنهاية الى تلوث الحليب الخام. تعتبر حلمات الضرع بالاضافة الى ايدي الحلابين واماكن الحلب اماكن لتواجد جرثومة المكورات العنقودية الذهبية وبالتالي امكانية تسببها لامراض التسمم الغذائي بصورة كبيرة وبالتالي فان هذه الجرثومة تسبب خسائر اقتصادية عالية في قطعان حيوانات المزرعة بشكل عام والابقار بشكل خاص وهذه الخسائر تتمثل في نقصان انتاج الحليب ,حجب الحليب المصاب,تكلفة المختبرات والعلاجات ونبذ الابقار المصابة(4). ان جرثومة المكورات العنقودية الذهبية تعد من اهم المسببات لالتهاب الضرع قي الابقار في العالم وذلك لما تمتلكه هذه الجرثومة من عوامل الضراوة وصفة المقاومة للمضادات الحياتية (5). غالبية الخسارة الناتجة عن هذا المرض تكون من الاصابة بالنوع

تحت السريري والذي يمكن الكشف عنه فقط عند استعمال الاختبارات التشخيصية.حيث ان كل حالة واحدة من التهاب الضرع السريري تقابلها(15-40) حالة من التهاب الضرع تحت السريري(6).

ان جرثومة المكورات العنقودية الذهبية لديها مقاومة لمعظم انواع المضادات الحياتية بانواعها المختلفة والسبب يرجع الى سوء استعمال هذه المضادات وامتلاك الجرثومة للبلازميدات التي تحمل صفة المقاومة للمضادات الحياتية (7). تهدف الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص المكورات العنقودية من الحليب الخام للابقار في محافظة صلاح الدين واختبار حساسيتها تجاه المضادات الحياتية .

المواد وطرائق العمل

تم جمع 109 عينة حليب خام من قطعان الابقار المتواجدة في مناطق مختلفة من اقضية ونواحي محافظة صلاح الدين وشملت (البوهيازع, العلم, مكيشيفة, الطرابله, البو عجيل, بيجي) وخلال الفترة مابين شهر كانون الاول 2010 الى ايار 2011.وتم جمع عينات الحليب وبواقع 15-20 مل في قناني معقمة وتحت ظروف معقمة, وتم نقل العينات إلى المختبر وذلك لزرعها واجراء الفحوصات اللازمة لها.

تم تشخيص عزلات المكورات العنقودية الذهبية وذلك اعتمادا على مواصفات المستعمرات والفحوصات الكيموحيوية المبينة حسب الطرق التقليدي (8) حيث تم زرع العينات على وسط Mannitol salt agar وتم اجراء الفحوصات الكيميائية للعزلات التي تنمو على وسط المانيتول وتخمرها. تم اجراء الفحوصات التالية لغرض تاكيد تشخيص الجرثومة ومعرفه عوامل الضراوة الخاصة بها, وهذه الفحوصات شملت: Coagulase (tube and slide Method), lecithinase, DNase, lipase, skim milk test, gelatinase, Urease,.

اجرية فحص الحساسية اعتمادا على طريقة كيربي باور(9), حيث تم نقل حملة لوب من مزارع عزلات الجرثومة الى وسط المرق المغذي (10 مل) وحضن بدرجة 37 درجة مئوية لمدة 18 ساعة. ومن بعدها تم تخفيف المعلق الجرثومي بواسطة محلول رنكر وبنسبة 1:1000 ليصبح التركيز 105- 106.

تم زرع المعلق الجرثومي المخفف على سطح وسط اكار مولر هنتون, وتركت لمدة 10 دقائق لكي تركد الجراثيم .وتم ازالة المعلق المتبقي بواسطة ماصة معقمة , وتركت الاطباق لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة لكي تجف.وبعدها تم اضافة اقراص المضادات الحياتية المبينة في الجدول (1) وذلك باستخدام ملقط معقم.وبعد الحضن بدرجة 37 درجة مئوية لمدة 18 ساعة ثم تم قياس قطر التثبيط وقورنت مع الاقطار التثبيطية القياسية لكل مضاد حياتي باستعمال طريقة كيربي باور (9).

جدول رقم(1) يبين اسماء المضادات الحياتية مع تركيز كل منها والمنشأ

اسم المضاد	الرمز	التركيز(مايكروغرام)	المنشأ
Methecillin	**ME**	**10**	**Bioanalyse company-turkey**
Erythromycin	**E**	**10**	**Bioanalyse company-turkey**
Ciprofloxacin	**CIP**	**10**	**Bioanalyse company-turkey**
Ampicillin	**AM**	**25**	**Bioanalyse company-turkey**
Cefoxetine	**FOX**	**30**	**Bioanalyse company-turkey**
Clavulanic acid/amoxicillin	**AMC**	**10/20**	**Bioanalyse company-turkey**

النتائج

اظهرت الدراسة الحالية بان عدد العينات التي ظهرت فيها نمو كانت 60 عينة من اصل 109وكانت 14 عزلة من هذه العزلات عائدة لجرثومة *S. aureus* اي بنسبة 23.33%. اما بالنسبة للانزيمات وعوامل الضراوة فقد اظهرت السلالات المعزولة تباينا في انتاجها لهذه الانزيمات وكما مبين في الجدول رقم(2).

جدول رقم (2) يبين الاختبارات الكيموحيوية مع عدد العزلات الموجبة والسالبة

اسم الاختبار	عدد العزلات الموجبة	عدد العزلات السالبة
Coagulase test(tube method)	14	0
Coagulase test(Slide Method)	14	0
Lecithinase	8	6
DNase	9	5
Lipase	6	8
Skim milk test	11	3
Gelatinase	8	6
Urease	9	5
Mannitol fermentation	14	0

نتائج فحص الحساسية :

أظهرت السلالات المعزولة اختلافا في استجابتها للمضادات الحياتية المستعملة والتي بلغت (6) انواع من المضادات حيث كانت السلالات لديها حساسية تجاه مضاد CIP والذي بينت الدراسة بانه اكثر المضادات الحياتية كفاءة ضد العزلات حيث ان جميع العزلات كانت حساسة لهذا المضاد كما بينت النتائج بان 79% من العزلات كانت حساسة تجاه Erythroycin بينما كانت 50% من العزلات مقاومة لكل من Methicillin, Cefoxetin, Clavulinic acid/Amoxicillin (جدول رقم 3).

جدول (3) يبين عدد عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمضادات الحياتية .

نوع المضاد الحياتي	عدد العزلات الحساسة (%)	عدد العزلات المقاومة (%)
CIP	100	0
AMC	50	50
E	79	21
FOX	50	50
ME	50	50
AM	57	43

المناقشة

اظهرت الدراسة الحالية بان جرثومة *S. aureus* كانت موجودة في 14 عينة من مجموع (60) عينة موجبة من مجموع العينات وبنسبة (23.33 %).وهذه النسبة كانت مقاربة لما توصل اليه باحثون اخرون حيث ذكر الباحث عاشور في دراسته التي اجراها في ديالى –العراق ان نسبة عزل الجرثومة كانت (23.07) (10) , كما سجلت نسب مقاربة (33%) في محافظتي الكوت وبغداد (11) , وفي فنلندا كانت نسبة العزل لهذه الجرثومة هي (25.12%) (12) , وهذه النتائج بينت بان جرثومة المكورات العنقودية الذهبية تلعب دورا بارزا في تلوث الحليب الخام حيث انها تعتبر مسبب رئيسي لحالات التهاب الضرع في الابقار وخاصة النوع تحت السريري وهذه النتائج متفقة مع ماذكره Robello (13) بان جراثيم المكورات العنقودية على العموم وجراثيم المكورات العنقودية الذهبية بشكل خاص هي المسبب الرئيسي لحالات التهاب الضرع في الابقار لاسيما النوع تحت السريري وذلك لعدة اسباب منها صعوبة السيطرة على الاصابة بجرثومة *S.aureus* وذلك لامكانية انتشارها بين حيوانات القطيع بصورة سريعة وضعف استجابتها للعلاج بالمضادات الحياتية مقارنة ببقية الجراثيم التي تسبب التهاب الضرع (14,15) .

بينت الدراسة بان جميع العزلات كانت حساسة تجاه Ciprofloxacin وهذا يتفق مع ماذكره الباحث التشيكي (*16*) اذ وجد بان 93% من عزلات هذه الجرثومة كانت حساسة تجاه هذا المضاد, كما وجد في دراسة اخرى بان عزلات الجرثومة المعزولة من حليب الابقار كانت حساسة 100% للمضاد CIP (17) ,لكن بالمقابل وجد بان 50% من العزلات كانت مقاومة لكل من AMC, FOX, ME بينما وجد الباحث التشيكي (*16*) بان اقل من 10% من العزلات كانت مقاومة لكل من FOX, AMC وهذا الاختلاف قد يرجع الى كثرة وسوء استخدام الادوية من قبل مربي الحيوانات.

المصادر

1. Moroni, P.; Pisoni, G.;Vimercati, C.; Rinaldi, M.; Castiglioni, B.; Cremonesi P.and Boettcher, P. (2005).Characterization of Staphylococcus aureus isolation from chronically infected dairy goats. J Dairy Sci., 88:3500 – 3509.

2. Ash, M. (1997). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: Hocking, A.D.; Arnold, G.; Jenson, I.; Newton, K.; Sutherland, P. ed. Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. North Sydney, Aust. Institute Food Sci. Technol. Inc. pp. 313-312.
3. Bergdoll, M.S. (1989). *Staphylococcus aureus* In: Doyle MP(ed) Food borne Bacterial Pathogens, Marcel Dekper, Inc: New York. pp. 463-523.
4. Helena,F.;Luciano,B.;Antonio,N.F.;Luciano,M.F.;Carlos,A.F.O(2010). Occurrence of Staphylococcus aureus in raw milk produced in dairy farms in Sau Paulo state, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology .41: 376-380
5. Green, M. and Bradley, A. (2004). Clinical Form-Staphylococcus aureus mastitis in cattle. UK Vet., 9(4): 1-9.
6. Chilgunde, S. (2005). "Review on Bovine Mastitis". Article, 22: 26-19.
7. Jafar, N. A.; Al-Jebouri, M. M. (1998). Effect of heat-shock and Helium/Neon gas laser on disinfectant-resistant Staphylococcus aureus isolated from wounds. MSc thesis.
8. Cowan, S. T., Steel K. J.(1965) Manual for identification of medical bacteria. London: Cambridge University Press. 1965.
9. Bauer, A. W; Kirbey W M, Sheris J Sm Turk M. Antibiotic susceptibility testing by standard single disc method(1966). Am J Clin Path 45: 493-496.
10. Ashoor, F A.(2010) Isolation of Staohylococcus aureus that causing bovine mastitis in some Diyala province areas and preparation of some its antigen. Baghdad university/ College of Veterinary medicine, M. Sc thesis. Baghdad, 2010.
11. Yass, A.A.; Yousif, A.A. and AL-Gairbawi, M.A. (1992). A study on incidence of clinical mastitis in dairy cows. Iraqi J. Vet. Med., 16: 12-21.
12. Pitkala, A.; Haveri, M.; Pyorala, S.; Myllys, V. and Honkanen-Buszalski, T. (2004). Bovine Mastitis in Finland 2001-Prevalance, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. J. Dairy Sci., 87: 2433-2441.
13. Rabello, R.F.; Souza, C.R.; Duarte, R.S.; Lopes, R.M.; Teixeira, L.M. and Castro, A.C. (2005). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from Recovered from Bovine Mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. J. Dairy Sci., 88: 3211-3219.
14. Kapur, V.; Sischo, W.M.; Greer, R.S.; Whittam, T.S. and Musser, J.M. (1995) Molecular Population Genetic Analysis of Staphylococcus aureus Recovered from Cows. J. Clin. Microbiol., 33(2): 376–380.
15. Ebling, T.L.; Fox, L.K.; Bayles, K.W.; Bohach, G.A.; Byrne, K.M.; Davis, W.C.; Ferens, W.A. and Hillers, J.K. (2001). Bovine Mammary Immune Response to an Experimental Intramammary Infection with a *Staphylococcus aureus* Strain Containing a Gene for Staphylococcal Enterotoxin C1. J. Dairy Sci., 84: 2044–2050.
16. Vyletelova M, O. Hanus, R. Karpiskova, Z. Sastkova. (2011). Occurrence and antimicrobial sensitivity in staphylococci isolated from goat, sheep and cow's milk. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2011, LIX, No. 3, pp. 209–214.
17. Hyang, M,N.; Ae,L.L.,Suk,C.J.; Mal,N.K.;Guem,C.J.;Sung,H.W.;Suk,K.L. (2011) Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Korea. Foodborne Pathogens And Disease:8;(2): 231-238.