

عزل جراثيم السل Mycobacterium من حليب الأبقار المصابة بالتهاب الضرع والأبقار السليمة

عفاف عبد الرحمن يوسف العزي* ، ميسون صباح عباس* ومولود عباس علي الغريباوي**
 *كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد
 **وزارة الزراعة

الخلاصة

تم جمع 100 عينة حليب من الأبقار الحلوب من أماكن مختلفة من منطقة أبو غريب في مدينة بغداد، 80 عينة من حالات مرضية تعاني من التهاب الضرع تحت الحاد أو المزمن و20 عينة جمعت من حالات سليمة لم تظهر أعراضاً ضد مرضية على الضرع. واستخدمت الطرق الروتينية بالزرع على الوسط الزرع الخاص والمسحة المباشرة قبل وبعد الزرع.

أظهرت النتائج نسبة العزل الكلية لجراثيم السل 15% ونسبة عزل 10% من الحالات المرضية المصابة بالتهاب الضرع، أما نسبة العزل من الحالات السليمة فقد بلغت 5%. وكان عدد العينات التي أعطت نتيجة موجبة لبكتريا السل البقرية (Mycobacterium bovis) 11 عينة وبنسبة 11% حسب نتائج الاختبارات الكيميوحيوية.

Isolation of mycobacterium from milk of mastitic cows and normal cows

A. A. Y Al-Ezzi*, M. S. Abas* and M. A. A. Al-Grabawii**
 *Veterinary Medicine College\ University of Baghdad
 **Ministry of Agriculture

Abstract

One hundred milk samples were collected from different area of abu-grab in Baghdad, eighty samples from infected cases suffering from subacute and chronic mastitis, and twenty samples were collected from healthy cases didn't show any clinical signs. conventional methods were used by culture on selective media and direct smears before and after cultures.

The results revealed tuberculosis isolates at a percent 15%, and the isolation rate of 10% from infected cases and isolation rate from healthy cases 5%. The number of samples which give positive result to Mycobacterium bovis bacteria was 11 samples in a percent of 11% according to the results of biochemical tests.

المقدمة

يعتبر الحليب مصدراً مهماً من مصادر البروتين والمواد الغذائية المفيدة لجسم الإنسان حيث لا يمكن الاستغناء عنه سواء للصغار أو الكبار، ولكنه ممكن ان يكون سبباً من أسباب إصابته بالأمراض الخطيرة مثل مرض السل وذلك عن طريق شرب الحليب الغير مبستر (1، 2).

في الدول المتقدمة انخفضت نسبة الإصابة بجراثيم السل كنتيجة لفحص الحيوانات المستمر باختبار السلين وبستر الحليب والتخلص من الحيوانات المصابة بالمرض (3)، في البرازيل عزل Leite (4) عصيات السل البقرية

والأنواع الأخرى من عصيات السل من عينات حليب الأبقار وسجل نسبة إصابة 68%. أما (5) فقد سجل ثلاث حالات موجبة لجراثيم السل بالمسحة المباشرة من مجموع 68 عينة حليب أبقار من منطقة الفضيائية وسبع حالات بالزرع الجرثومي. وتمكن Salaisel (6) من عزل جرثومة السل من الحليب من محطات تربية الأبقار حيث جمع 37 عينة حليب عزل منها 20 عذلة.

وأكد العديد من الباحثين ان المجترات تعتبر الخازن الرئيسي لعصيات السل والذي تنقله إلى الإنسان عن طريق مباشر أو عن طريق الحليب واللحوم (7، 8، 9، 10، 11).

ان جراثيم السل عبارة عن عصيات رفيعة مختلفة الأطوال تكون تفرعات خيطية تنقسم بسهولة إلى عصيات وتكون هذه التفرعات الخيطية مشابهة للخيطوط الفطرية ولهذا يعود السبب في تسمية الجرثومة مايكوبكتريم، وهي جراثيم غير متحركة يتميز جدارها بكثرة الدهون وحامض مايكولك وهي مقاومة للحامض (Acid fast) والنمو البطيء هو احد مواصفاتها وعند نموها على الأوساط الزرعية الصلبة تكون مستعمرات مختلفة من ملساء إلى خشنة ذات مظهر شمعي شفاف إلى معتمة (12).

يعتبر العراق من البلدان الموبوءة بمرض السل في منطقة الشرق الأوسط حيث سجل المرض نسبة إصابة بجميع أشكاله 56 لكل 100000 شخص وحسب ما ذكر من قبل منظمة الصحة العالمية WHO لعام 2008 (13).

ان الهدف من الدراسة الحالية هو الكشف عن جراثيم السل الموجودة في حليب الأبقار والتعرف على النسبة المثوية لجراثيم السل البقرية.

المواد وطرق العمل

اجري البحث في وحدة الأمراض المشتركة/ كلية الطب البيطري. جمعت عينات الحليب من مناطق مختلفة من منطقة أبو غريب ومن حقل كلية الطب البيطري ومن حالات مصابة بالتهاب الضرع (80 بقرة) ومن حالات سليمة ظاهريا (20 بقرة). جمعت العينات (50 مل) من الأرباع الأربعة لكل بقرة في أنابيب معقمة ونقلت إلى المختبر مبردة، ثم مزجت كميات متساوية من الحليب مع هيدروكسيد الصوديوم 4% المعقم للتخلص من التلوث، وترك المزيج لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة ولمدة 20 دقيقة للتخلص من الطافي أما الراسب فتمت معادلته بإضافة حامض الهيدروكلوريك 8%، ثم أذيب في 2 مل من المحلول الفسلجي المعقم ثم تم التعامل معه بالشكل التالي وحسب طريقة (14).

1. الفحص المجهرى المباشر قبل الزرع وذلك بعد نشر كمية من الحليب على سلايد نظيف وبمساحة تتراوح ما بين 1.5×1.5 ملم مربع وصبغت بصبغة زيل نلسون للفحص المجهرى.
2. الزرع البكتيري: تم الزرع على الوسط الزرعى الخاص بجراثيم السل وهو stone brinks media وحقنت الأوساط في درجة حرارة 37 م° ولمدة 4-8 أسبوع لملاحظة المستعمرات الجرثومية من خلال شكلها وطبيعية نموها ولونها.
3. بعد ظهور النمو الجرثومي تم إجراء الفحص المجهرى المباشر من المستعمرات.
4. أجريت الاختبارات الكيميوحيوية وأهمها اختبار النياسين واختبار اختزال النترات واختبار الكاتاليز واختبار النمو على (Lj Slant) مع بايروفيت الصوديوم.

النتائج

1. نتائج الفحص المجهرى قبل الزرع: بلغت نسبة الإصابة بعد إجراء الفحص المجهرى المباشر قبل الزرع (27%) حيث أعطت 27 عينة من مجموع 100 عينة المفحوصة نتائج ايجابية لعصيات السل وأعطت 73 عينة المتبقية نتيجة سالبة لجميع الاختبارات كما موضحة بالجدول (1).
2. نتائج الزرع الجرثومي والاختبارات الكيميوحيوية: بلغ عدد العينات الموجبة للزرع الجرثومي 10 من الـ 80 عينة المأخوذة من الحالات المصابة بالتهاب ضرع بنسبة 10%، وبلغ عدد العينات الموجبة والمأخوذة من الحالات السليمة 5 عينات وبنسبة 5% كما موضحة في جدول (2).
ان النتائج الموجبة أظهرت تنموا لمستعمرات السل بعد زرعها على الميديا الخاصة حيث ظهرت المستعمرات صغيرة، ناعمة بيضاء ومرتفعة.
3. شخصت 11 عزلة من 15 عزلة على أنها جراثيم السل البقرية وذلك كنتيجة لسليبيتها لثلاث الاختبارات الكيميوحيوية وهي اختبار النياسين واختبار اختزال النترات واختبار الكاتليز وايجابيتها لاختبار النمو على (Lj Slant) مع بايروفيت الصوديوم (جدول 3).
3. الفحص المجهرى بعد الزرع ان العينات الموجبة للزرع أظهرت كذلك ايجابيتها عند إجراء الفحص المجهرى بعد الزرع على المستعمرات الظاهرة وذلك بظهور عصيات السل الحمراء النحيفة وذات أطوال مختلفة على خلفية زرقاء.

ويوضح جدول (4) العينات الموجبة للفحص المجهرى الأولي والبالغ عددها 27 وكذلك يوضح النتائج الموجبة لجراثيم السل بعد الزرع (15) وأعداد العينات الموجبة للفحص المجهرى بعد الزرع (15) والاختبارات البايوكيميائية والتي تم فيها تثبيت جراثيم السل البقرية والبالغ عددها (11).
أظهرت الحالات العشرة من الـ 80 بقرة مصابة علامات التهاب ضرع مزمن والتي تميزت بأعراض شديدة تمثلت بكمبر حجم الضرع وصلابته وظهور الورم على شكل درنات وتقصصات. أما بالنسبة للحليب فقد أظهر تغيرات فيزيائية منها تغيرات في اللون ووجود بعض الخثر في الحليب، أما الحالات الخمسة الأخرى والتي أظهرت ايجابية للزرع فكانت من الحالات السليمة والتي لم تظهر أعراض على الضرع بصورة واضحة.

جدول (1) يوضح نتائج الفحص المجهرى قبل الزرع

الاختبار	العدد الكلي للعينات	العينات الموجبة	العينات السالبة
الفحص المجهرى قبل الزرع	100	27	73
النسبة المئوية		27 %	73 %

جدول (2) يوضح عدد العينات الكلي والنسب المئوية للإصابة بجراثيم السل

عدد العينات	الزرع الجرثومي للعينات من حالات مرضية (80)	الزرع الجرثومي للعينات من الحالات السليمة (20)
	العينات الموجبة	العينات السالبة
100	10	15
النسبة المئوية	10%	5%

جدول (3) نتائج الاختبارات الكيميوحيوية للعزلات البكتيرية

النتيجة	الاختبارات الكيميوحيوية
-	إنتاج النياسين
-	اختبار اختزال النترات
-	اختبار الكاتليز
+	واختبار النمو على (Lj Slant) مع بايروفيت الصوديوم

جدول (5) يوضح العينات الموجبة للزرع الجرثومي والفحص المجهرى قبل الزرع وبعده والفحوصات الكيميوحيوية

تسلسل	طبيعة الحالة	الفحص المجهرى قبل الزرع	الزرع الجرثومي	الفحص المجهرى بعد الزرع	الفحوصات الكيميوحيوية (بكتريا السل البقرية)
1	التهاب ضرع	+	+	+	+
2	التهاب ضرع	+	+	+	+
3	التهاب ضرع	+	+	+	+
4	التهاب ضرع	+	-	-	-
5	التهاب ضرع	+	+	+	+
6	التهاب ضرع	+	+	+	+
7	التهاب ضرع	-	+	+	+
8	التهاب ضرع	+	+	+	+
9	التهاب ضرع	+	+	+	+
10	التهاب ضرع	+	+	+	+
11	التهاب ضرع	+	+	+	+
12	التهاب ضرع	+	-	-	-
13	التهاب ضرع	+	-	-	-
14	التهاب ضرع	+	-	-	-
15	التهاب ضرع	+	-	-	-
16	التهاب ضرع	+	-	-	-
17	التهاب ضرع	+	-	-	-
18	التهاب ضرع	+	-	-	-
19	التهاب ضرع	+	-	-	-
20	سليمة	+	-	-	-
21	سليمة	+	-	-	-
22	سليمة	+	-	-	-
23	سليمة	+	+	+	+
24	سليمة	+	+	+	+
25	سليمة	+	+	+	-
26	سليمة	+	+	+	+
27	سليمة	+	+	+	+
المجموع		27	15	15	11

المناقشة

أوضحت النتائج ظهور جراثيم السل في عينات الحليب المأخوذة من الأبقار المصابة بالتهاب الضرع بنسبة 10% ومن الأبقار السليمة 5% وشكلت النسبة المئوية الكلية للإصابة 15%، وكانت نسبة جراثيم السل البقرية (*Mycobacterium bovis*) قد شكلت نسبة 11%، ان هذه النسبة العالية لها أهمية كبيرة تأتي بالدرجة الأولى من خلال نقل هذه الجراثيم من الحيوانات الحلوية إلى الإنسان وهذا ما أكدته الدراسات التي تعطي أهمية كبيرة لمرض السل لكونه مرض مشترك بين الإنسان والحيوان (8، 9) الذي ينتقل عن طريق شرب الحليب الغير مبستر والأهمية الأخرى تأتي من لضرارة العالية لجراثيم السل (15)، وقد عزل (16) جراثيم السل البقري من عينات

الحليب بنسبة 16% وقد اعتمد الباحث على الفحص المجهرى المباشر والعزل الجرثومي في تشخيص جرثومة السل وكانت هذه النسبة مقارنة لنسبة العزل في دراستنا الحالية.

ان الفحص المجهرى قبل الزرع تعتبر الخطوة الأولى للتشخيص ولكن النتائج أظهرت نسبة أعلى مما عليه في الزرع البكتري ومن الممكن تفسير ذلك على ان عدد البكتريا المتواجدة في عينة الحليب قليلة جدا بحيث ظهرت في هذا الفحص فقط وقد فقدت أثناء الزرع البكتري، فقد أظهرت 27 عينة ايجابية له وبنسبة (27%) أما الزرع الجرثومي على الوسط الخاص فقد اظهر كفاءة عالية بحيث تطابقت نتائجه مع الفحص المجهرى بعد الزرع ولم تتطابق نتائجنا لهذا الفحص مع نتائج (5) والذي وجد ان نسبة العزل بطريقة الفحص المجهرى قبل الزرع كانت 4.4% حيث كانت اقل من نسبة العزل البكتيري وقد فسرها على أنها طريقة غير دقيقة للكشف عن المرض. أما (17) فكانت نتائجه مطابقة لنتائج بحثنا حيث عزل جرثومة السل من 11 عينة حليب مأخوذة من حالات مصابة بالتهاب الضرع من مجموع 98 بعد زرعها على الستون برنك وعند إجراء الفحص المباشر للحليب لاحظ وجود جراثيم السل فيها.

في دراستنا الحالية أظهرت الحالات المرضية بالتهاب ضرع تحت الحاد أو المزمن وقلة في الحليب وضعف في الجسم نسبة إصابة (10%) وقد تطابق بحثنا مع دراسة (18) والذين سجلوا أهمية التهاب الضرع المتسبب بجراثيم السل السريعة النمو (*Rapidly growing Mycobacterium species*) وبنسبة (9.7%) في خلال فحص 300 نموذج حليب في حالات التهاب ضرع تمثلت بالالتهاب تحت الحاد وبدون علامات جهازية مما أدى في بعض الحالات إلى انقطاع الحليب، أما الباحث (19) فقد أكد على أهمية مرض السل من الناحية الصحية والاقتصادية وأهمية الفحوصات الكاملة على الحليب للتأكد من التشخيص حيث درس نسبة الإصابة بمرض السل في مصر باستخدام الاليزا واختبار السلين وكذلك أكد على الزرع الجرثومي من عينات الحليب حيث أظهرت نتائجه نسبة (4.35%) من 23 خلال فحص حيوان مصاب بالسل واعتبر وجوده هذه النسبة مصدر كبير لانتقال المرض من الحيوان إلى الإنسان، ان هذه النسبة كانت اقل من النسبة التي ظهرت في دراستنا وذلك لان الباحث قد فحص جراثيم السل البقرية فقط أما في دراستنا فقد تم تسجيل جنس جراثيم السل المسببة للمرض سواء *Typical mycobacterium* or a *typical mycobacterium*.

وقد لاحظنا في دراستنا الحالية وجود خمس عينات مصابة بجراثيم السل من العينات السليمة والغير مصابة بالتهاب الضرع وهذا يعزى لكون بعض الأبقار قد تكون مصابة بالتهاب الضرع تحت السريري والذي يشكل خطر أكبر على صحة الإنسان وكذلك قد يؤدي إلى انتشار المرض بين الأبقار. وقد تطابقت دراستنا مع دراسة (7) الذي عزل جراثيم السل البقرية بنسبة (15%) وجراثيم السل تيويركلوسز بنسبة (28.5%) من الحليب وأكد على أهمية الإصابة تحت السريرية وعلى أهمية استخدام الطرق المتقدمة مثل تقنية البلمرة المتسلسل للتشخيص وللكشف عن الحالات المصابة إصابة تحت السريرية.

الكثير من الدراسات أشارت إلى أهمية الإصابة بمرض السل وانتقاله إلى الإنسان من خلال شرب الحليب الغير المبستر أو استخدام الحليب النئ مباشرة أو من خلال إنتاج القشطة أو الجبن وخاصة بين مربي الأبقار (5)، (16، 19، 20).

المصادر

1. Primm, T. P.; Lucero, C. & Falkinham III, J. O. (2004) Health impacts of environmental Mycobacteria. *Clinic Microbiol. Rev.*, 17:98-106.
2. Sweeney, R. W.; Whitlock, R. H.; Rosenberger, A. E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected symptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 166-171.
3. Caffrey, J. P. (1994). Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. *Vet. Microbiol.*, 40: 1-4.
4. Leite, C. Q. F.; Anno, I. S.; Leite, S. R. A.; Roxo, E.; Morloc, G. P. K. & Cooksey, R. C. (2003). Isolation and identification of mycobacteria from livestock

- specimens and milk obtained in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol. 98 No. 3 Rio de Janeiro Apr.
5. Al-Saqur, I. M.; Al-Thwani, A. N. & Al-Attar, I. M. (2009). Detection of *Mycobacteria spp* in cows milk using conventional methods and PCR. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Vol. 23, Supplement II, 2009 (259-262) Proceedings of the 5th Scientific Conference, College of Veterinary Medicine University of Mosul.
 6. Salaisel, S. S. S. (2003). An epidemiological study of bovine tuberculosis in some cattle stations in Iraq. Ph. D. thesis in internal and preventive medicine– College of Vet. Medicine.
 7. Srivastava, K.; Chauhan, D. S.; Gupta, P.; Singh, H. B.; Sharma, V. D.; Yadav, V. S.; Sreekumaran, T. S. S.; Dharamdheeran, J. S.; Nigam, P.; Prasad, H. K. & Katoch, V. M. (2008). Isolation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from cattle of some farms in north India– Possible relevance in human health. Indian J. Med. Res., 128: 26-31.
 8. Berrada, J. & Barajas-Rojas, J. A. (1995). Controle of bovine tuberculosis in developing countries pp 159-166. In:- Mycobacterium Bovis infection in animals and human, Is ted, Iowa stat university press, Ames.
 9. Biet, F.; Boschioli, M. L.; Thorel, M. F. & Guilloteau, L. A. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intercellulare* complex (MAC). Vet. Res., 36: 411-436.
 10. Cosivi, O.; Grange, J. M.; Daborn, C. J.; Raviglione, M. C.; Fujikura, T.; Coousins, D.; Robinson, R. A.; Huchzermeyer, H. F.; De Kaantor, I. & Meslin, F. X. (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg. Infect. Dis., 4:59-70.
 11. O Reilly, L. M. & Daborn, C. J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection s in animals and man: a review. Tuberc. Lung dis., (Suppl.) 1: 1-46.
 12. Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. & Carter, G. R. (2004). Clinical Veterinary microbiology. 6th ed., Mosby an imp. Wolf, London.
 13. WHO/IUATLD. (2008). Global project on anti- tuberculosis drug resistance surveillance. Anti- tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. Geneva, World Health Organization.
 14. Chalmers, C. H. (1955). Bacteria in relation to milk supply. 4th ed., W. & J. Makay & Co. Ltd; Chaltham. Cited by Kustandi, J. D. (1984). M.Sc. Thesis, University of Baghdad.
 15. Dean, G.; Rhodes, S. G.; Coad, M.; Whelan, A. O.; Cockle, P. J.; Clifford, D. J.; Hewinson, R. G. & Vordermeier, H. M. (2005). Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. Infect. Immuno., 73:6467-6471.
 16. Chandra, V. J. H. A.; Morita, Y.; Dhakal, M.; Beshunu, B.; Sato, T.; Nagal, A.; Kato, M.; Kozawa, K.; Yamamoto, S. & Kimura, H. (2007). Isolation of *Mycobacterium Spp* from milking Buffaloes and cattle in Nepal. J. Vet. Med. Sci., 69 (8): 819-825.
 17. Kustandi, J. D. (1984). Isolation and Identification of Mycobacterium from cattle in and around Baghdad. M.Sc. Thesis, College of Vet. Medicine- University of Baghdad.
 18. Schultz, W. D.; Stoud, B. H. & Brasso, W. B. (1985). Dairy problem with mastitis caused by a rapidly growing *Mycobacterium Spp*. Am. J. Vet. Res. Jan., 46(1): 42-7.
 19. Hassanain, N. A.; Hassanain, M. A.; Soliman, Y. A.; Ghazy, A. A. & Ghazyi, Y. A. (2009). Bovine tuberculosis in a dairy cattle farm as a threat to public health. African J. of Microbiol. Res., 3 (8): 446-450.
 20. Appuswamy, S.; Batish, V. K.; Prakash, O. R. & Rangunathan, B. (1980). Prevalence of *Mycobacteria* in raw milk sampled in Karnal. India. J. Food Prot., 43:778-788.