المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد 23، عدد إضافي 2، 2009 (385-391)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

عزل وتشخيص المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط والكشف عن عوامل الضراوة من حالات التهاب الضرع في الأبقار

ابتهال نوفل محمود و جورجيت نيسان شمعون

فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط من عينات الحليب التي جمعت من 141 بقرة (27 بقرة مصابة بالتهاب الضرع السريري و114 بقرة مصابة بالتهاب الضرع تحت السريري) من مناطق مختلفة في مدينة الموصل للمدة بين تشرين الأول 2004 ولغاية آيار 2005، والتي كشف عنها بإستخدام اختباري كاليفورنيا ووايت ساید. تم عزل 33 (23.40 %) عزلة عائدة لجراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط توزعت على 10 أنواع تمثلت بـ *Staph. haemolyticus* 7 (21.21%) و *S. intermedius* 6 (18.18%) و *S. chromogenes* 5 (15.15%) و *S. xylosus* 4 (12.12%) و *S. epidermidis* 3 (9.10%) و *S. hominis* و*S. hyicus* و *S. saprophyticus* 2 (6.06%) لكل منهم و *S. arlettae* و *S. sciuri* 1 (3.03%) لكل منهما. شُخصت أنواع هذه الجراثيم باستخدام العديد من الاختبارات الأولية والكيموحيوية واختبارات معززة للتشخيص. تعتبر هذه الدراسة الأولى من حيث عزل جراثيم *S. intermedius* التي هي إحدى جراثيم المكورات العنقودية المنتجة لخميرة التجلط، وجراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط: *S. hominis* و *S. arlettae* و *S. sciuri* من حالات التهاب ضرع الأبقار، و اظهرت الدراسة ان هذه الجراثيم قادرة على انتاج خميرتي الكاتاليز Catalase و البيتـا – لاكتمييز *β*-lactamase بنسبة (100%)، ولها القدرة على انتاج خميرة الدينيز DNase بنسبة (93.94%)، وانتاج المادة اللزجة Slime بنسبة (84.85%)، بينما تباينت نسب إنتاج هذه الجراثيم للخمائر الأخرى بين (3.03%) لخميرة الاوكسيديز Oxidase الى (63.64%) لخميرة الحال الدموي المؤازر.

Isolation and identification of coagulase–negative staphylococci and detection of virulent factors in bovine mastitis

E. N. Mahmmoud and G. N. Shamoon

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

This study deals with the isolation and the identification of Coagulase – Negative Staphylococci from milk samples of 141 cows (27 cows suffering of clinical and 114 cows suffering of sub clinical mastitis) from different areas in Mosul city, from October 2004 to May 2005, which is detected by California and White side tests. 33(%23.40) isolates of CNS were obtained, which belonging to 10 species which were: *Staph. haemolyticus* 7 (21.21%), *S. intermedius* 6 (18.18%), *S. chromogenes* 5 (15.15%) , *S. xylosus* 4 (12.12%), *S. epidermidis* 3 (9.10%), *S. hominis*, *S. hyicus* and *S. saprophyticus* 2 (6.06%), *S. arlettae* and *S. sciuri* 1 (3.03%). Types of CNS were diagnosed by numbers of laboratory, biochemical and another diagnostic enhancer tests. This study is regarded as first in isolated *S. intermedius* bacteria, which are one of the Coagulase - Positive Staphylococci (CPS) and isolated CNS bacteria which are they: *S. hominis* , *S. arlettae* and *S. sciuri* from bovine mastitis. This study indicate that (100%) of this bacteria produce Catalase and *β*-lactamase, (93.94%) produce DNase and (84.85%) produce Slime, while varying production ratio to another enzyme between (3.03%) of Oxidase to (63.64%) of the Synergistic hemolysis.

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

المقدمة

يشمل مصطلح المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط Coagulase – Negative Staphylococci (CNS) كل الأنواع الجرثومية التابعة لجنس المكورات العنقودية Staphylococci عدا النوع (*Staphylococcus aureus*) (1). تُكوّن جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط نسبة كبيرة من النبيت الطبيعي ((Normal flora للجلد و الأغشية المخاطية في الإنسان و الحيوان (2)، ويعد وجود خميرة التجلط (Coagulase) معياراً مهماً في تحديد ضراوة (Virulence) المكورات العنقودية، مما جعل وجود هذه الجراثيم في المزارع الجرثومية يعد تلوثا (3)، تعزل هذه الجراثيم بصورة مستمرة من عينات حليب الأبقار، ولوجودها على جلد الحلمات فبإمكانها أن تستوطن قناة هذه الحلمات وتسبب التهاب الضرع (2). إن إصابة الضرع بوساطة هذه الجراثيم يرافقها التهاب خفيف للغدد اللبنية مع ارتفاع للخلايا البيض في الحليب دون وجود أية علامة سريرية للالتهاب، ولكن أحيانا تستطيع أن تتسبب بحالات التهاب ضرع سريري (4). تصاب الأبقار الصغيرة العمر التي تلد لأول مرة أكثر من غيرها بهذه الجراثيم، إذ تتراوح نسبة الإصابة بها (20 – 50%)، وإصابة مثل هذه الأبقار بعمر مبكر يعمل على منع تطور النسيج المفرز للحليب حتى وإذا كان التهاب الضرع خفيفاً، وبالتالي يعمل على التقليل من إنتاج الحليب مقارنة بالأرباع الطبيعية، لذلك فان التهاب الضرع في هذه الأبقار يكون مهماً من الناحية الاقتصادية، وصحة الغدد اللبنية لهذه الأبقار تؤثر على إنتاج ونوعية الحليب في المستقبل (6,5). وجد إن بعض سلالات جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط والمعزولة من حالات التهاب الضرع تمتلك خمائر وذيفانات مثل خميرة التجلط و الدينيز و الليسثنيز واللايبيز و الحال الدموي المؤازر و الفوسفتيز والبيتا – لاكتمييز و الليكوسيدين (Leucocidin) و الفايبرينولايسين (Fibrinolysin) (9-7)، كما لوحظ إن بعض هذه الجراثيم لها القدرة على إنتاج ذيفان دلتا، الذي يعد ذا فعالية حيوية كبيرة، و أوضح (10) أن هذا الذيفان يكشف عنه باستخدام فحص الحال الدموي المؤازر، كما إنها تستطيع أن تنتج المواد اللزجة والمحفظة Capsule التي لها علاقة بالعملية الأمراضية (11). ذكر بعض الباحثين إن جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط من خلال إنتاجها العديد من الذيفانات بإمكانها أن تحطم أو تلتصق على مكونات الأنسجة اللبنية الطبيعية، لكن دور هذه الذيفانات وأهميتها لم يجد الاهتمام الذي وجدته المواد المنتجة من قبل *S.aureus* (8)، ونظرا لقلة الدراسات المحلية حول هذه الجراثيم المعزولة من حليب الأبقار المصابة بالتهاب الضرع، إذ أن أغلب هذه الدراسات تشير إلى إنها سالبة لخميرة التجلط أو أنه يطلق عليها بمجموعها *Staph. epidermidis*، ارتأينا إجراء هذه الدراسة لتحقيق الأهداف الآتية:عزل وتشخيص جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط من حليب الأبقار المصابة بالتهاب الضرع السريري وتحت السريري لمعرفة نسبة تواجدها في عينات حليب الابقار والكشف عن بعض عوامل ضراوتها.

المواد وطرائق العمل

تم جمع 141 عينة حليب منها 27 عينة من بقرة مصابة بالتهاب الضرع السريري و 114 عينة من بقرة مصابة بالتهاب الضرع تحت السريري، تراوحت أعمارها بين سنتين الى خمس سنوات، وللمدة بين تشرين الأول 2004 ولغاية أيار2005، وروعيت النظافة في جمع العينات. بعد التخلص من الدفعات الأولى للحليب وضع مقدار 10-25 مل من الحليب في قناني معقمة، بعدها نقلت العينات إلى المختبر في حاوية مبردة، وأجريت في البدء عليها اختبارات الكشف عن التهاب الضرع وهي: اختبار كاليفورنيا لالتهاب الضرع (California mastitis test) أجري الاختبار بمزج حجوم متساوية من الحليب المراد فحصه مع كاشف كاليفورنيا، بعد المزج الجيد في الطبق بتحريكه حركة دائرية خفيفة لمدة 10 ثوان، قرئت النتائج وسجلت الدرجات التفاعلية (12)، واختبار وايت ساید - (White Side test) إذ أجري هذا الاختبار بمزج قطرتين من محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز(4%) مع خمس قطرات من عينة الحليب المراد فحصها بوساطة قضيب زجاجي أو عصا بلاستيكية على سطح شريحة زجاجية ملساء ومعتمة. فرش المزيج على مساحة 4 سم^3 وبعد 20- 25 ثانية من نشر المزيج على المساحة الدائرية المحددة، تمت قراءة وتسجيل النتائج حسب درجات التفاعل (12)، بعد التأكد من الإصابة بالتهاب الضرع تحت السريري، تم تلقيحها على وسط آكار الدم، حضنت الأطباق بدرجة (37)°م لمدة 24 ساعة وبعد الحضانة قرئت النتائج ولوحظت المستعمرات الجرثومية النامية (13). أخذت الجراثيم التي كانت سائدة في كل عينة حليب و نقيت، بعدها لُقِحت على وسط آكار الملح وسكر المانيتول، وبعد انتهاء فترة الحضانة تمت ملاحظة وتسجيل لون المستعمرات وشكلها وحجمها، وعملت منها مسحة جرثومية لملاحظة الشكل والحجم والتفاعل الصباغي للجراثيم الذي يكون على شكل مكورات تشبه عناقيد العنب. أخذت المستعمرات النامية على وسط آكار الملح وسكر المانيتول ولُقِحَتْ على وسط آكار نقيع القلب والمخ، وعليها تمّ إجراء الاختبارات الكيموحيوية (13,1) وهي: اختبارات الكاتاليز والاوكسيديز والتجلط بنوعيه، فضلا عن الأختبارات التشخيصية وهي: اختبار التخمر التأكسدي و اختبار تخمر السكريات و اختبار اختزال النترات و اختبار الفوكس بروسكاور، اما الأختبارات المعززة فشملت على اختبار انتاج الحمض من الكليسيرول واختبار النمو في تراكيز ملحية عالية واختباري تحلل الأسكولين و انتاج الصبغات (14,1). اما طرائق الكشف عن عوامل الضراوة في جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط فشملت على:

اختبار إنتاج خميرة الدينيز

أستُخْدِمَ وسط الدينيز مضافاً إليه صبغة التوليدين الزرقاء بنسبة (0.005%). لُقِحَ الوسط بطريقة التنقيط، وبعد انتظار 24 ساعة من التلقيح والتحضين بدرجة (37)°م، لوحظ تغير اللون حول وتحت المستعمرات من اللون الأزرق إلى اللون الوردي المحمر، وهذا يشير إلى تحلل الـ DNA (13).

اختبار الكشف عن خميرتي الليستنيز واللاييبز

يسمى هذا النوع من الاختبارات بالاختبارات المركبة(Combined test) إذ يتم التحري في الوقت نفسه عن خميرتي الليستنيز واللاييبز. أستُخدِمَ وسط اكار مح البيض للكشف عنهما الذي لُقِحَ بمستعمرات فتية وحضن بدرجة (37)°م ولمدة 48 ساعة. المستعمرات المنتجة لخميرة الليستينز تحاط بمناطق صافية وبراقة، وللكشف عن خميرة اللاييبز، غمر الوسط المُلَقح بكاشف كبريتات النحاس المشبعة لمدة 20 دقيقة، ثم تم التخلص من المحلول الفائض، وجففت الأطباق بوضعها في الحاضنة لفترة قصيرة. إتخاذ المستعمرات اللون الأزرق المخضر في مناطق تحلل الدهن، دلالة على إنتاج خميرة اللاييبز (15,1).

اختبار إنتاج خميرة الحال الدموي المؤازر

يكشف هذا الاختبار عن التحلل من نوع دلتا (Dalta hemolysin)، اختبرت قابلية العزلات الجرثومية على إنتاج خميرة التحلل المؤازر، بتلقيح جرثومة *S. intermedius* المنتجة لـ Beta – lysin(محللة للدم نوع β) بخط مستقيم يمر بالمركز على وسط آكار دم الأغنام. بعد ذلك لُقِحَتْ العزلات المراد اختبارها عمودياً على الخط المركزي للتلقيح الأول، وبدون أن تلامسها. حضنت الأطباق هوائياً بدرجة (37)°م لمدة 24 ساعة النتائج الموجبة سجلت بملاحظة منطقة من التحلل الكامل حول العزلات المختبرة داخل منطقة من التحلل غير الكامل الذي سببه الـ Beta – lysin العائد لـ *S. intermedius* (10,7).

اختبار إنتاج خميرة البيتا – لاكتمييز

اتبعت طريقة (16) في التحري عن وجود هذه الخميرة في الجراثيم المعزولة. وضعت ورقة ترشيح في طبق بتري معقم، بعدها استحلب مقدار 0.02 من مسحوق البنسلين G بإضافة بضع قطرات من الماء المقطر المعقم في مركز الورقة، وإلى هذا المستحلب نقل جزء من مستعمرة فتية يراد اختبارها ومزجت معه. ترك المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق، ليتم حدوث التفاعل الخميري، بعد ذلك أضيفت 3-5 قطرات من محلول كرام أيودين. بعد مرور 5 دقائق من وضع المحلول، قرئت النتائج. ظهور بقعة بيضاء محاطة بمناطق بُنية مصفرة في موقع مزج مستحلب البنسلين مع المستعمرة دليل على إيجابية الفحص وإنتاج الخميرة.

اختبار إنتاج المادة اللزجة

كشف عن إنتاج المواد اللزجة باستخدام طريقة (17) إذ نميت الجراثيم المعزولة في وسط مرق الصويا تربتون، وحضنت بدرجة (37)°م لمدة 24 ساعة، استخرجت القناني وسكبت محتوياتها، وأضيف إليها بضع قطرات من صبغة السفرانين. جففت القناني بوضعها بشكل مقلوب على ورق ترشيح، للتخلص من الصبغة الزائدة. سجلت النتائج الموجبة بملاحظة النمو الملتصق بشكل مواد لزجة على الجدران الداخلية للقناني واصطباغها باللون الأحمر، كما تم استخدام قناني سيطرة حاوية على الوسط الزرعي فقط.

اختبار التحري عن المحفظة

أخذت 2-3 مستعمرات من الجراثيم المعزولة ووضعت في 1 مل من الماء المقطر المعقم، ثم صبغت بطريقة الصبغة السالبة المحورة وذلك بأخذ قطرة من المعلق المُحضَّر على الشريحة، ومزجت مع قطرة من الحبر الهندي، نشر المزيج وتركت الشريحة لتجف. علقت المسحة بصبغة المثيل البنفسجي وبتركيز(1%) لمدة دقيقة واحدة. فحصت مجهرياً للكشف عن وجود المحفظة في الجراثيم المعزولة (18) .

النتائج

تم الحصول على 33 (23.40%) عزلة جرثومية من جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط من 141 عينة حليب منها 6 (22.22%) عزلات من عينات حليب ابقار مصابة بالتهاب الضرع السريري و27 (23.68%) عزلة من حالات الاصابة تحت السريرية. شخصت العزلات الجرثومية اعتمادا على الاختبارات الكيموحيوية ووضعت العزلات المتشابهة في صفاتها في مجاميع، فتوزعت الى (10) انواع وهي: *Staph. haemolyticus*،*S.intermedius*، *S.chromogenes*، *S.xylosus*، *S.epidermidis*، *S. hominis*، *S. hyicus*، *S. saprophyticus*، *S. arlettae* و *S. sciuri*. تعتبر هذه الدراسة الأولى من حيث عزل النوع *S. intermedius* بنسبة (18.18%)، كذلك عزلت الانواع الجرثومية *S. hominis* بنسبة (6.06%) والانواع *S. arlettae* و *S. sciuri* بنسبة (3.03%) لكليهما، لاول مرة ايضا، الجداول (1-3).

الجدول (1) أنواع ونسب جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط المعزولة من حالات التهاب الضرع في الأبقار.

ت	نوع الجرثومة	العدد	النسبة المئوية
1.	*Staphylococcus haemolyticus*	7	21.21

.2	*S. intermedius*	6	18.18
.3	*S. chromogenes*	5	15.15
.4	*S. xylosus*	4	12.12
.5	*S. epidermidis*	3	9.10
.6	*S. hominis*	2	6.06
.7	*S. hyicus*	2	6.06
.8	*S. saprophyticus*	2	6.06
.9	*S. arlettae*	1	3.03
.10	*S. sciuri*	1	3.03
	المجموع	33	% 100

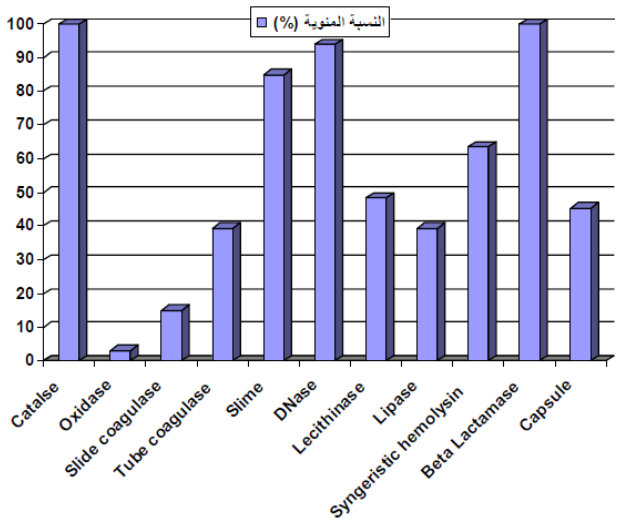
أظهرت نتائج الاختبارات الخاصة والتي أجريت على العزلات الجرثومية قيد الدراسة وجود بعض عوامل الضراوة والتي تستطيع ان تنتجها جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط، اذ سجلت نسبة (100%) لإنتاج خميرتي الكاتاليز والبيتا - لاكتيميز من قبل هذه الجراثيم، كذلك سجلت نسبة (93.94%) لإنتاج خميرة الدينيز، ونسبة (84.85%) لإنتاج المادة اللزجة، بينما تباينت نسب إنتاج الخمائر الأخرى بين (3.03%) لإنتاج خميرة الاوكسيديز الى (63.64%) لإنتاج خميرة الحال الدموي المؤازر، اما بالنسبة لإنتاج المحفظة فالدراسة الحالية اشارت الى ان هناك (45.45%) من عزلات هذه الجراثيم قادرة على إنتاجها، والشكل (1) يوضح ذلك.

الجدول (2) الاختبارات الأولية المستخدمة للكشف عن جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط المعزولة من حالات التهاب الضرع في الابقار.

ت	رقم العزلة	نوع الجرثومة	الكاتاليز	الاوكسيديز	المقيد	خميرة التجلط الحر بعد 4 ساعات	خميرة التجلط الحر بعد24 ساعة
1	3		+	-	-	-	-
2	17		+	-	-	-	+
3	43		+	-	-	-	-
4	73	*S.hameolyticus*	+	-	-	-	+
5	90		+	-	-	-	-
6	95		+	-	-	-	-
7	117		+	-	+	-	-
8	2		+	-	+	-	-
9	130		+	-	+	-	+
10	131	*S.intermedius*	+	-	+	-	+
11	134		+	-	-	+	+
12	137		+	-	+	-	+
13	141		+	-	+	+	+
14	7		+	-	-	-	+
15	23		+	-	-	-	+
16	35	*S.chromogenes*	+	-	-	-	+
17	44		+	-	-	-	-
18	135		+	-	-	-	-
19	41		+	-	-	-	-
20	49	*S.xylosus*	+	-	-	-	+
21	84		+	-	-	-	-
22	140		+	-	-	-	-
23	21		+	-	-	-	-
24	138	*S.epidermidis*	+	-	-	-	-
25	139		+	-	-	-	-
26	55	*S.hominis*	+	-	-	-	-
27	81		+	-	-	-	-
28	72	*S.hyicus*	+	-	-	+	+
29	133		+	-	-	+	+
30	1	*S.saprophyticus*	+	-	-	-	-
31	89		+	-	-	-	-
32	97	*S.arlettae*	+	-	-	-	-
33	67	*S.sciuri*	+	+	-	-	-

الجدول (3) الاختبارات المعززة المستخدمة لتشخيص جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط المعزولة من حالات التهاب الضرع في الابقار.

ت	رقم العزلة	نوع الجرثومة	NaCl agar 10 %	NaCl agar 15 %	Esculin hydrolysis	Pigment production	Acid from glycerol
1	3		-	+	+	+	+
2	17		+	+	+	+	+
3	43		+	+	+	+	+
4	73	*S.haemolyticus*	+	-	-	-	+
5	90		-	-	+	-	+
6	95		+	+	-	+	+
7	117		+	+	+	+	+
8	2		+	+	-	-	+
9	130		+	+	-	+	+
10	131	*S.intermedius*	+	-	-	-	+
11	134		+	-	-	-	+
12	137		+	+	-	+	+
13	141		+	-	-	+	+
14	7		+	+	-	+	+
15	23		+	+	+	+	+
16	35	*S.chromogenes*	+	+	+	+	+
17	44		+	+	+	+	+
18	135		+	+	-	-	+
19	41		+	+	+	+	+
20	49	*S.xylosus*	+	+	+	+	+
21	84		+	-	+	+	+
22	140		+	-	+	+	+
23	21		+	-	-	-	+
24	138	*S.epidermidis*	-	-	-	-	+
25	139		+	-	-	-	+
26	55	*S.hominis*	+	+	-	+	+
27	81		+	+	-	+	+
28	72	*S.hyicus*	+	+	+	-	+
29	133		+	-	+	-	+
30	1	*S.saprophyticus*	+	+	-	+	+
31	89		-	-	+	+	+
32	97	*S.arlettae*	+	+	+	+	+
33	67	*S.sciuri*	-	-	+	+	+



الشكل (1): النسب المئوية لعوامل الضراوة المنتجة من قبل جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط المعزولة من ابقار مصابة بالتهاب الضرع.

المناقشة

اظهرت نتائج الدراسة الى عزل 33 (23.40%) عزلة لجراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط من عينات حليب ابقار مصابة بالتهاب الضرع. أشار (19) إلى عزل هذه الجراثيم بنسبة (2.34%) من حالات التهاب الضرع السريري، وهي أقل بكثير من النسبة المسجلة حالياً (22.22%)، أما في حالة التهاب الضرع تحت السريري فقد عزل 25 عزلة، توزعت على فترات الرضاعة الخمسة أكثرها كانت بنسبة (3.9%) في فترة الرضاعة الثانية، وأقلها في فترة الرضاعة الرابعة، إذ لم يعزل أي من هذه الجراثيم في هذه الفترة، وهذا يؤكد أن بمرور الوقت على عملية الولادة والرضاعة تتناقص الإصابة بهذه الجراثيم (4)، توصلت الباحثة (20) إلى عزل 8 عزلات من جراثيم *Staph. epidermidis* من مجموع الجراثيم المسببة لالتهاب الضرع بنسبة (12.90%) وهذه النسبة أقل من النسبة المسجلة في هذه الدراسة اذ عزلت بنسبة (9.10%). إن السبب في قلة الإشارة لهذه الجراثيم في البحوث، ربما قد يعود الى عدم اهتمام الباحثين بعزلات المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط التي تظهر لديهم، إذ كانت تعد تلوثاً حتى ولو ظهرت بحالة نقية، ولا تسجل على إنها السبب في إحداث مرض التهاب الضرع، أو يكون السبب في تشخيص بعض العزلات سهوا على إنها جراثيم *S. aureus*، وخاصة إن جراثيم *S. intermedius* وبعض عترات *S. hyicus* تكون ايضا موجبة باختبار التجلط على الشريحة (14)، وان نتائجهم اقتصرت على هذا الفحص للتفريق بين العزلات

المرضية وغير المرضية من المكورات العنقودية ولا يجرى اختبار التجلط في الأنبوب أو الاختبارات التشخيصية الأخرى والاختبارات المعززة الأخرى التي استخدمت في هذه الدراسة، كذلك فإن بعض عزلات هذه الجراثيم تكون موجبة لتخمر سكر المانيتول، الفحص الآخر الذي يعتمد عليه في التفريق بين *S. aureus* و المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط، إذ اكتشف (8) إن جراثيم *S. hyicus* و *S. chromogenes* و *S. haemolyticus* و *S. hominis* و *S. warneri* و *S. simulans* موجبة باختبار تخمر سكري التريهالوز والمانيتول باستخدام مرق تريهالوز–مانيتول. وبهاتين الخاصيتين، تخمر سكر المانيتول وإنتاج خميرة التجلط فإنه يحصل التباس في تشخيص المكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط على إنها *S. aureus*، هذا إذا أضفنا إلى ذلك قابلية هذه الجراثيم على إنتاج الصبغات (14)، أو ربما قد يعود السبب في إرتفاع نسبة الإصابة بجراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط بهذه الدراسة الى كون الأبقار التي أجريت عليها الدراسة تتراوح أعمارها بين سنتين إلى خمس سنوات، إذ ذكرت الدراسات التي أجريت على أبقار صغيرة العمر أو التي تلد لأول مرة، ارتفاع نسبة الإصابة بهذه الجراثيم، فأطلق على هذا المرض مرض الأبقار صغيرة العمر (6).

أظهرت نتائج الدراسة إن أكثر العزلات من جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط كانت للنوع *S. haemolyticus* بنسبة (21.21%)، ويعزى ذلك إلى تزايد الإصابة بهذه الجرثومة لما تمتلكه من عوامل ضراوة وخاصة خميرتي الحال الدموي والحال الدموي المؤازر، وأقلها لجرثومتي *S. arlettae* و *S. sciuri* بنسبة (3.03%) لكل منهما. تتفق هذه الدراسة في نتائجها مع دراسات أخرى في عزل أنواع جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط المختلفة لكنها تتباين في النسب، وذلك تبعاً لاختلاف المنطقة وموقع القطيع وعدد العينات المأخوذة (3).

بينت نتائج اختبارات عوامل الضراوة التي تم الكشف عنها في الأنواع المعزولة لجراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط لأول مرة في هذه الدراسة أن هناك تبايناً واضحاً في امتلاك هذه الجراثيم لعوامل الضراوة، اذ أظهرت الدراسة إن هذه الجراثيم باستطاعتها أن تنتج خميرة الكاتاليز بنسبة (100%) (21)، لكن ليس باستطاعتها أن تنتج خميرة الأوكسيديز إلا بنسبة (3.03%)، وهذه النسبة عائدة للنوع *S. sciuri*، إذ يحتوي على سايتوكرومات a و b فضلا عن نوعين من سايتوكروم c (13)، كانت نسبة إنتاج خميرة التجلط بطريقة الشريحة الزجاجية (15.15%) وبطريقة الأنبوب الزجاجي بنسبة (39.39%)، اذ ان جرثومتي *S. intermedius* و *S. hyicus* بامكانها ان تنتج هذه الخميرة (14). دراستنا الحالية أشارت إلى أن معظم جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط المعزولة بإمكانها أن تنتج خميرة الدينيز بنسبة (93.94%)، وهذا ما وجده كل من (23,22). كانت نسبة إنتاج خميرة اللايبيز بهذه الدراسة (39.39%)، وهذا مشابه لما توصل إليه (24) اذ اشار الى ان هذه الجراثيم تنتج هذه الخميرة ولو بكميات قليلة. بالنسبة لخميرة الحال الدموي المؤازر، سجلت الدراسة الحالية نسبة إنتاجها (63.64%) وهذا مقارب لما سجله (7). سجل (25) نسبة (34.1%) لإنتاج خميرة البيتا – لاكتمييز تنتجها جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط المعزولة من أبقار مصابة بالتهاب الضرع، وهي اقل مما تم الحصول عليه بهذه الدراسة إذ سجلت نسبة (100%) لإنتاج هذه الخميرة.

كشفت الدراسة الحالية عن وجود خمائر أخرى مثل الليسثنيز ومتعدد السكريد المحفظي Capsular polysaccharide والمادة اللزجة تنتجها هذه الجراثيم، وهذا ماأثبته (26,9)، وبالاعتماد على نتائج الدراسة الحالية والتي بينت امتلاك بعض السلالات لخمائر الدينيز و البيتا-لاكتمييز والمادة اللزجة ومتعدد السكريد المحفظي وبنسب عالية يمكن اعتبار هذه المجموعة من الجراثيم ممرضة، وهذا ما اكدته دراسات عديدة والتي اشارت الى ان هذه المواد مجتمعة لها دوراً في العملية الإمراضية في هذه الجراثيم (27,10).

المصادر

1. Collee JG, Marmion BP, Fraser AC, Simmons A. Mackie and McCartney Practical medical microbiology. 14th ed. New York: Churchill Livingstone; 1996.p.245–258.
2. Carter GR, Cole JRJr. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and microbiology. 5th ed. London: Acadimic Press Inc Harcourt Brace Jovanovich Publishers; 1990.p.201–207.
3. Thorberg B-M. Coagulase – Negative Staphylococci in bovine sub clinical mastitis. [master's thesis]. Uppsala, Swedish University; 2008. 10, 23p.
4. Taponen S. Bovine mastitis caused by Coagulase – Negative Staphylococci. [master's thesis]. Finland, Helsinki University; 2008. 12–15p.
5. Myllys V, Rautala H. Characterization of clinical mastitis in primiparous heifers. J Dairy Sci. 1995;78:538–545.
6. Radostits OM, Gay GC, Blood DC, Hinchiliff KW. Mastitis in: Veterinary Medicine, A text Book of the Diseases of the , Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9th ed. Mastitis. London: W.B. Saunders Company Ltd; 2000.p.603–630.
7. Hebert GA, Crowder CG, Hancock GA, Jarvis WR, Thornsberry C. Characteristics and Coagulase – Negative Staphylococci that help differentiate these species and other members of the family Micrococcaceae. J Clin Microbiol. 1988;26(10):1939–1949.
8. Watts JL, Naidu AS, Wadstrom T. Collagen binding, Elastase production and slime production associated with Coagulase – Negative Staphylococci isolated from bovine intramammary infections. J Clin Microbiol. 1990;28(3):580–583.
9. Zhang S, Maddox CW. Cytotoxic activity of Coagulase – Negative Staphylococci in bovine mastitis. Infect Immun. 2000;68(3):1102–1108.
10. Hebert GA, Hancock GA. Synergistic hemolysis exhibited by species of Staphylococci. J Clin Microbiol. 1985;22(3):409–415.
11. Donhlan RM, Costerton B. Biofilms survival mechanisms of clinically revenant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15(2): 167–193.
12. Coles EH. Veterinary clinical pathology. London: W.B. Saunders Company; 1986.p.428–438.

13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schrechenberge RC, Winn WS. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Published; 1997.
14. Capurro A. Diagnostic and epidemiological studies of Staphylococci in bovine mastitis. [doctoral thesis]. Uppsala, Swedish University; 2009.14–20p.
15. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 3rd ed. Iowa. U.S.A: WMC. Brown Communication In; 1996.
16. Lee WS, Komarmy L. Hocometric spot test for detection of Beta – Lactamase in *Hemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 1981;13(1): 224–225.
17. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime – producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. Infect Immun. 1982;37(1):318–326.
18. Bottone EJ, Patel L, Patel P, Robin T. Mucoid encapsulated *Enterococcus faecalis* an emerging morphotype isolated from patients with Urinary tract infections. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;31: 429–430.
19. زورة، خزعل ثجيل. دراسة بعض الجوانب السريرية و البكتريولوجية لمرض التهاب الضرع في الأبقار (رسالة ماجستير). بغداد: جامعة بغداد، 1979.
20. الجوالي، الهام عبد الغني قاسم. العلاقة بين الجراثيم المسببة لالتهاب الرحم والتهاب الضرع في الأبقار (رسالة ماجستير).الموصل: جامعة الموصل، 1996.
21. Carter GR, Wise DJ. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. 6th ed. Iowa, U. S. A: the Blackwell Publishing Company; 2004.p.193–197.
22. Maddux RL, Koehne G. Identification of *Staphylococcus hyicus* with the API Staph. Strip. J Clin Microbiol. 1982;15(6):984–986.
23. Citak S. Slime productions and DNase activity of Staphylococci isolated from raw milk. J Food Safety. 2003;23(4):219–222.
24. Molnar C, Heressy Z, Rozgonyi F, Gemmell CG. Pathogenicity and virulence factors of Coagulase – Negative Staphylococci in relation to adherence, hydrophobicity and toxin production in vitro. J Clin Pathol. 1994;47:743–748.
25. Myllys V, Asplund K, Brofeldt E, Hirrela – Koski V, Honkanen – Bazaski T ,Junttila J, Kulkas L, Myllykangas O, Niskanen M, Saloniemi H, Sandholm M, Saranpaa T. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995. Change in prevalence and antimicrobiol resistance. Acta Vet Scan. 1998;39:119–126.
26. Watts JL, Owens W. Synergistic hemolysis associated with Coagulase – Negative Staphylococci isolated from bovine mammary glands. J Clin Microbiol. 1987;25(11):2037–2039.
27. Gemmell CG. Coagulase – Negative Staphylococci. J Med Microbiol. 1986;22:282–295.