Assiut Vet. Med. J. Vol. 60 No. 142 July 2014

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MYCOPLASMA FROM CASES OF PNEUMONIA IN FEEDLOT LAMBS

M.A. HAMAD and Z.M. AL-JUMAA
Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Musol, Mosul, Iraq
E-Mail: sandyz85@ymail.com

ABSTRACT

Received at: 8/5/2014

Accepted: 21/5/2014

The present study was performed to detect and isolate the Mycoplasma as causative agent of atypical pneumonia in feedlot lambs. Samples (180) were collected from lambs suffering clinically from pneumonia. During the period October 2013 to March 2014. These samples were included nasal swabs (60), tracheal swabs (60) and infected lungs (60). Samples were cultured in the selective media (Mycoplasma Broth Base) and incubated aerobically at 35C° for 4 – 14 days. When turbidity appeared inoculum of each broth was cultured on Mycoplasma Glucose Agar medium and incubated at 35C° for 7 -14 days in candle jar. Primary isolation was demonstrated by color changing of diphasic media, The ability of staining with Dennis stain, reduction of Tetrazolium, red blood cell lysis and fried egg appearance of Mycoplasma colonies was also studied. The results of present study also showed the total rate of Mycoplasma isolation (49.4%) from total samples, and the highest rate of isolation was from Nasal swabs (58%). While, the rate of isolation from Tracheal swabs (55.3%) and from infected lungs (35%).

***Key words**: Mycoplasma, Pneumonia, Feedlot lambs.*

عزل وتشخيص المايكوبلازما من حالات ذات الرئة في حملان التسمين

محمد علي حمد ، زهراء مصطفى الجمعة
E-Mail: sandyz85@ymail.com

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص المايكوبلازما بوصفها كأحد مسببات التهاب الرئة اللا نمطي في حملان التسمين . تم جمع (١٨٠) عينة من حملان كانت تعاني سريريا من علامات ذات الرئة خلال الفترة من تشرين الأول ٢٠١٣ ولغاية آذار ٢٠١٤ وقد شملت هذه العينات (٦٠) مسحة أنفية و (٦٠) مسحة رغامي و (٦٠) عينة رئة مصابة. زرعت العينات في الوسط الانتقائي الخاص بتنمية المايكوبلازما Mycoplasma Broth Base وحضنت هوائيا بدرجة حرارة ٣٥ مْ لمدة ٤- ١٤ يوم. بعد ظهور العكارة أخذت نقلة جرثومية وزرعت على وسط Mycoplasma Agar Base medium ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٥مْ لمدة ٧-١٤ يوم داخل ناقوس الشمعة. وللكشف عن نمو المايكوبلازما على الوسط الصلب الخاص بها وتشخيصها بالاختبارات الشكلية والفحوصات الكيمياحياتية. سجلت النتائج من خلال تغير لون الوسط ثنائي الطور للكشف عن تخمر الكربوهيدرات وقدرة المايكوبلازما على الاصطباغ بصبغة دينيس وقدرتها على اختزال مادة التترازوليم وتحليل كريات الدم الحمراء وملاحظة مظهر البيضة المقلية المميز لمستعمراتها. أظهرت نتائج الدراسة ان النسبة المئوية الكلية لعزل المايكوبلازما من العينات المجموعة بلغت ٤٩.٤% وكانت أعلى نسبة عزل من المسحات الأنفية ٥٨% بينما بلغت نسبة العزل من مسحات الرغامي ٥٥,٣% وعينات الرئات المصابة ٣٥%.

INTRODUCTION
المقدمة

يعد مرض ذات الرئة في الحملان من الأمراض المهمة الواسعة الانتشار في كثير من بلدان العالم ، ويؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة لما يسببه من هلاكات عالية في الحيوانات المصابة ، والانخفاض الكبير في وزن جسم الحيوان المصاب ، وسرعة انتشار المرض بالملامسة بين قطعان الحيوانات مؤدياً بذلك إلى ارتفاع تكاليف التربية والجهد المبذول في الإدارة والتربية والعلاج للسيطرة على هذا المرض. (Nicholas *et al.*, 2008; Kilic *et al.*, 2013). وتعتبر حملان التسمين مصدر مهم لإنتاج البروتين الحيواني حيث تحتل الصدارة بالنسبة للثروة الحيوانية والإنتاج الحيواني في العراق وتكون اكثر حساسية للإصابة بهذا المرض مع نسب إصابة وهلاكات عالية جداً خصوصاً إذا تزامنت مع ظروف التربية غير الجيدة (رحيمة وجماعته،٢٠٠١) تشكل الأمراض التنفسية وذات الرئة من أكثر الأمراض المهمة والتي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة في الضان نتيجة الإصابات والهلاكات العالية ، وقد أشار Healy, (١٩٩٣) إلى ان نسبة الإصابة بالأمراض التنفسية تصل إلى ٦٩% من مجموع الأمراض التي تصاب بها الأغنام وتشكل حالات ذات الرئة نسبة ٧٥% من هذه الأمراض التنفسية. كما أن المسببات المرضية لحالات ذات الرئة متنوعة وعديدة و تشمل اغلب الجراثيم المرضية ، من أهمها المايكوبلازما (Nicholas *et al.*, 2001). وتعد المايكوبلازما من الكائنات الحية الواسعة الانتشار في العالم ، إذ يضم هذا الجنس أكثر من 102 نوع. تصيب هذه الجراثيم الإنسان والحيوان ومنها المجترات وبخاصة الأغنام والأبقار مسببة العديد من الأمراض المعدية ومنها الأمراض التنفسية مثل ذات الرئة (Nicholas and Ayling 2003) إذ تسبب ذات الرئة الخلالي المزمن chronic proliferative interstitial pneumonia ، التهاب ملتحمة العين conjunctivitis والتهاب الضرع mastitis

في الأغنام والماعز. كما انه من الممكن عزلها من الرئة lung، القصبة الهوائية trachea، الأنف nose، الملتحمة conjunctivae للأغنام المصابة (Nicholas and Ayling *et al.*, 2003; Sheehan *et al.*, 2007). إن المايكوبلازما عبارة عن كائنات صغيرة بدائية النواة محاطة بغشاء بلازمي فقط غير قادرة على تخليق الببتيدو كلايكان أو احد لبناتة precursors لذا يكون اصطباغها بصبغة جرام ضعيفا حيث تظهر سالبة الجرام متعددة الأشكال اكبر حجماً من الفيروس واصغر من البكتيريا لافتقارها للجدار الخلوي، ولها القدرة على التضاعف الذاتي self-proliferation. (Quinn *et al.*, 2002). تكون هذه الجراثيم صعبة العزل اذ تحتاج إلى أوساط مغنية والستيرول في النمو لذا يضاف المصل إلى الأوساط الغذائية بوصفه مصدرا للستيرولات، كما أن لها القدرة على تخمير الجلوكوز وإنتاج حامض، وتكون حساسة للحرارة والجفاف ،بينما تنمو جيدا تحت الظروف الهوائية ودرجة حرارة (٣٥-٣٧م°) وتحتاج إلى دالة حامضية قدرها (PH 7.8). ومن أهم الاختبارات المميزة المستعملة في تشخيصها اختبار اختزال التترازوليوم واختبار القدرة على تحلل كريات الدم الحمر واختبار الكاتاليز. (Koenman *et al.*, 1997). نظرا لأهمية المايكوبلازما في إحداث نسبة عالية من حالات ذات الرئة في الحملان ولقلة الدراسات عليها في العراق بشكل عام وخصوصا المايكوبلازما التنفسية المعزولة من الحملان لذا أجريت هذه الدراسة لعزل المايكوبلازما من حالات ذات الرئة في حملان التسمين.

MATERIALS and METHODS
مواد وطرائق العمل

جمع العينات

تم جمع (١٨٠) عينة للفترة من تشرين الأول ٢٠١٣ ولغاية آذار ٢٠١٤ توزعت العينات كالآتي:

١- (٦٠) مسحة أنفية مأخوذة من حملان كانت تعاني من علامات تنفسية.

٢- (٦٠) مسحة رغامي أخذت أيضا من نفس الحملان المصابة، وذلك بإدخال المسحات القطنية إلى داخل التجويف الأنفي وبداية الرغامي وبعدها وضعت المسحات القطنية داخل انابيب زجاجية حاوية على المرق الخاص بتنمية المايكوبلازما.

٣- (٦٠) عينة رئة ظهرت عليها آفات وعلامات الإصابة بذات الرئة، جمعت من مجزرة الموصل ومحلات القصابة في مناطق مختلفة من مدينة الموصل، حيث أخذت العينات من مكان الآفة الظاهرة على الرئات المصابة وزرعت في المرق الخاص ونقلت العينات إلى مختبر البحوث الجرثومية التابع لفرع الأحياء المجهرية في كلية الطب البيطري.

الأوساط الزرعية

وسط ازرق المثيلين – جلوكوز الثنائي الطور Methylen Blue – Glucose Diphasic Medium

وسط ثنائي الطور يستخدم في عزل جرثومة المايكوبلازما وتشخيصها يتكون من طور صلب يعلوه طور سائل في القنينة ذاتها ، تم تحضيره في المختبر (Koneman *et al.*, 1997) وكما يأتي:

١- الطور الصلب Mycoplasma agar

حضر من نقيع المخ والقلب (٥٠ غم) ببتون (١٠ غم) كلوريد الصوديوم (٥ غم) الاجار المصلب (١٤ غم). اذيبت مكونات الوسط في لتر من الماء المقطر . ووزع الوسط في دوارق زجاجية يحتوي كل منها على (٧٠) مل وعقم الوسط بالمؤصدة وبعد تبريده إلى (٥٠ م°) أضيفت إليه المواد الآتية :

أ- مستخلص الخميرة – المصل Yeast extract-serum (٣٠ مل) المعاد تدفئته ، الذي تم تحضيره في المختبر كالآتي :

- تم اذابة ٠.٥ غم من مستخلص الخميرة في ٤٠ مل ماء مقطر وعرض المحلول لدرجة الغليان ثم برد الى درجة حرارة الغرفة ورشح باستخدام ورق الترشيح . ثم ضبطت الدالة الحامضية عند (٨) باستعمال هيدروكسيد الصوديوم (١ عياري) وبالتالي عقمت خلاصة الخميرة بالترشيح .

- ولتحضير محلول الخميرة-المصل، اضيف مصل دم الخيول المعقم بالترشيح الى مستخلص الخميرة بنسبة (٢:١) من المصل – خلاصة الخميرة وحفظ المزيج تحت التجميد بدرجة (٢٠ - م°) .

ب- محلول ازرق المثيلين (٠.١) مل بتركيز ١%، محلول الفينول الاحمر (٠.٥) مل بتركيز ٠.٤%، محلول الكلوكوز (٢) مل بتركيز ٥٠%، محلول خلات الثاليوم (٠.٢٥) مل بتركيز ١٠% و (٣) مل من محلول البنسلين المعقم الحاوي على ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية/ مل.

بعد اضافة المواد المذكورة الى الطور الصلب ضبطت الدالة الحامضية عند (٧.٨) وزع الوسط الصلب في قناني معقمة وبواقع (١) مل لكل قنينة ثم ترك ليتصلب مع المحافظة على ظروف التعقيم.

٢- الطور السائل Mycoplasma broth

حضر من المكونات التالية:

مرق نقيع القلب والمخ (٥٠ غم) ، ببتون (١٠ غم) ، كلوريد الصوديوم (٥ غم) اذيبت المكونات في لتر من الماء المقطر وعقم الوسط بالمؤصدة ومزج (١٤٠) مل من الوسط مع (٦٠) مل من خلاصة الخميرة-المصل المحضر كما ورد في الطور الصلب وأضيفت إليه المحاليل التالية:

محلول ازرق المثلين (٠.٢) مل بتركيز ١%، محلول الفينول الاحمر (١.٠) مل بتركيز ٠.٤%، محلول الكلوكوز (٤.٠) مل بتركيز ٥٠%، محلول خلات الثاليوم (٠.٥) مل بتركيز ١٠% و(٦) مل من محلول البنسلين الحاوي على ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية/ مل. ضبطت الدالة الحامضية للوسط عند (٧.٨) ووزع في قناني الطور الصلب وبواقع (٢) مل لكل قنينة . (Koneman *et al.*, 1997).

وسط Mycoplasma broth base (PPLO broth base)

يعد وسطًا أساسًا لعزل المايكوبلازما وتنميتها من النماذج السريرية بعد اغنائه بالمواد المضافة(المكملات) supplement والتي تم ذكرها في تحضير الوسط ثنائي الطور (MB-GD) حضر الوسط باضافة (٢١.٠) غم من الوسط الى (٧٠٠) مل ماء مقطر وسخن المزيج لحين الذوبان

وعقم بالمؤصدة ثم برد لدرجة حرارة ٤٥ ثم بعد ذلك أضيف له ٢.٨٥ مل من مادة potassium tellurite بتركيز ١% المعقمة بالترشيح. أضيف (٣٠٠) مل من خلاصة الخميرة- المصل المحضرة سابقا إلى وسط PPLO broth base المعقم.

وسط Mycoplasma agar base (PPLO agar base)

حضر بإضافة (٣٦.٠) غم من وسط PPLO agar الى (٧٠٠) مل من الماء المقطر سخن حتى درجة الغليان ثم ضبطت الدالة الحامضية عند ٧.٨ وعقم بالمؤصدة وترك ليبرد ومن ثم اضيفت اليه المكملات المعقم والمحضر كما ذكر آنفا (Koneman *et al.*, 1997).

وسط Mycoplasma Glucose Agar medium

حضر في المختبر باعتماد (Koneman *et al.*, 1997) وكما يأتي:

حضر (٧٠) مل من Mycoplasma agar وأضيف إليه (٣٠) مل من مستخلص الخميرة – المصل مزج جيدا ثم أضيفت إليه المحاليل الآتية مع مراعاة الحفاظ على ظروف التعقيم :-

محلول الكلوكوز (٢) مل بتركيز ٥٠%، محلول خلات الثاليوم (٠.٢٥) مل بتركيز ١٠%،و ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية/ مل محلول البنسلين (٣) مل مع ضبط الدالة الحامضية للوسط عند (٧.٨) ووزع في اطباق بتري معقمة ثم حفظ في الثلاجة إلى حين الاستخدام. (Koneman *et al.*, 1997).

الصبغات والكواشف والمحاليل

صبغة دينيس المحورة Modified Dennis Stain حضرت كما يأتي:

١- تحضير Stock solution من الصبغة تم تحضيره من المواد الآتية:

Methylen blue (2.5)غم , Azure II (1.25) غم , Maltose (10.0) غم , Na2Co3 (0.25) غم , ماء مقطر ١٠٠ مل.

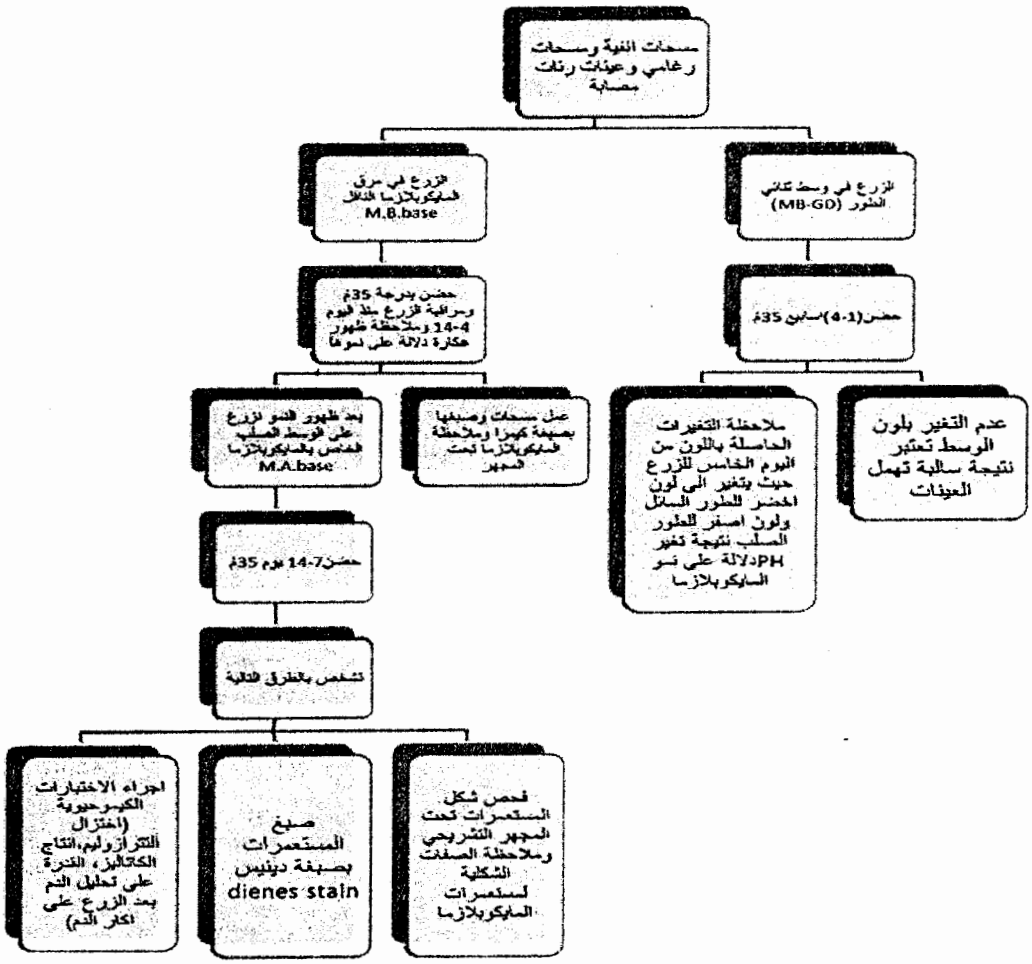
٢- محلول Working solution من الصبغة:

حضر بتخفيف المحلول (١) بالماء المقطر بإضافة ثلاث أحجام من الماء المقطر إلى حجم واحد من المحلول (١) (Koneman *et al.*, 1997).

المواد الاخرى

صبغة كمزا ، دارئ الفوسفات الملحي ، ازرق المثيلين ، محلول الفينول الأحمر ، محلول الجلوكوز ، محلول خلات الثاليوم ، محلول البنسلين محلول 2-(p-iodo phenyl) -3-nitrophenyl -5-phenyl tetrazolium chloride. حضرت كما ورد في (Koneman *et al.*, 1997).

طرائق العمل



١- زرع العينات:
زرعت مسحات الأنف ومسحات الرغامي مباشرة في المرق الخاص بالمايكوبلازما ووضعت بالحاضنة لمدة ٤-١٤ يوم بدرجة حرارة ٣٥ م مع توفير الرطوبة اللازمة.

أخذت قطع من الرئات المصابة من مكان الآفة ووضعت مباشرة بالمرق الخاص بالمايكوبلازما وحضنت كالسابق وبعد ذلك زرعت على وسط Mycoplasma Agar base Medium وحضنت لمدة٧- ١٤ يوم بدرجة حرارة ٣٥ م داخل ناقوس الشمعة.

٢- الاختبارات التشخيصية لجرثومة المايكوبلازما:

١- الاختبارات الشكلية وتشمل:

الشكل المستعمري : Colony morphology
درست الصفات الشكلية وخصائص المستعمرات من خلال نموها على وسط Mycoplasma Agar Medium بعد انتهاء مدة التحضين باستخدام المجهر التشريحي.

الفحص المجهري : microscopic appearance
حضرت مسحات من الأوساط الزرعية الملقحة بالمايكوبلازما وصبغت بصبغة كيمزا وفحصت بالمجهر الضوئي باستخدام العدسة الزيتية لملاحظة أشكال المايكوبلازما .

٢- صبغة دينيس
اعتمدت صبغة دينيس من قبل (Koenman *et al.*, 1997) لصبغ المستعمرات اذ غمر سطح طبق الاكار الحاوي على المستعمرات ب (١) مل من صبغة دينيس Dennis stain working solution وغسلت بالماء المقطر ثم أضيف (١) مل من (٩٥ %) من الكحول الاثيلي للقصر وترك مدة دقيقة واحدة ثم أزيل الكحول الزائد وكررت عملية الغسل بالماء المقطر وفحصت مستعمرات المايكوبلازما من حيث اللون .

٣- الاختبارات الكيمياحياتية:

اختبار اختزال التترازوليم Tetrazolium reduction test
غمر سطح الطبق النامية عليه المستعمرات ب (٢) مل من كاشف التترازوليم وحضن بدرجة (٣٥ م) مدة (٣٠-٦٠ دقيقة) .

اختبار تخمر الكاربوهيدرات
استخدم الوسط (MB-GD medium) الثنائي الطور الحاوي على الجلوكوز وازرق المثيلين والفينول الأحمر لإجراء اختبار تخمر الكاربوهيدرات.

اختبار القدرة على تحليل الدم
أضيف (٥ %) من دم الأغنام إلى وسط Mycoplasma agar base المضاف له المكملات Supplement كما في السابق ثم وزع في أطباق بتري معقمة ولقح بالجراثيم تحت الاختبار وحضنت الأطباق هوائيًا بدرجة (٣٥م) مدة (٥-٧ أيام) .

RESULTS
النتائـــج

١- الشكل المستعمري
تبين من خلال دراسة الصفات الشكلية وخصائص المستعمرات نمو المايكوبلازما على وسط (PPLO agar) إذ ظهرت مستعمرات كروية ذات مركز محاط بهالة بيضاء إلى عديمة اللون شبيهة بالبيض المقلي وكما موضح في الصورة (١).

٢- الفحص المجهرى
تميزت العينات الموجبة لصبغة كيمزا بظهور خلايا المايكوبلازما بلون بنفسجي وظهرت بأشكال مختلفة highly pleomorphic تراوحت بين الكروية والعصوية والخيطية والمتفرعة كما موضح في الصورة (٢) لعدم احتوائها على الجدار الخلوي.

٣- صبغة دينيس
أوضحت نتائج استخدام صبغة دينيس ظهور مستعمرات المايكوبلازما النامية على وسط PPLO agar عديمة اللون وذلك لقدرتها على اختزال ازرق الميثيلين الموجود في تركيبة صبغة دينيس وظهور مستعمرات عديمة اللون كما في الصورة (٣).

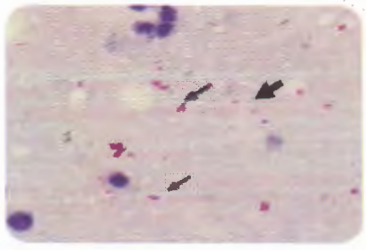
٤- اختبار اختزال التترازوليم
عند إجراء الاختبارات الكيمياحياتية للتاكد من نوع الجرثومة أظهرت نتائج اختبار اختزال التترازوليم المبينة في الصورة (٤) أن مستعمرات المايكوبلازما تحت الاختبار ظهرت باللون الأحمر.

٥- اختبار تخمر الكربوهيدرات
لوحظ قدرة المايكوبلازما على تخمير الكربوهيدرات بتحول الطور الصلب إلى اللون الأصفر والطور السائل إلى اللون الأخضر كما موضح في الصورة (٥).

٦- اختبار القدرة على تحليل كريات الدم الحمر
أظهرت النتائج قدرة المايكوبلازما النامية على اجار الدم على تحلل الدم وظهور مناطق شفافة حول المستعمرات النامية نتيجة لقدرتها على إنتاج بيروكسيد الهيدروجين والذي بدوره يوثر على أغشية الخلايا ويحطمها.

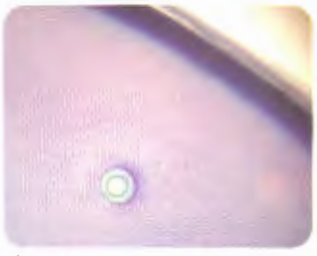
٧- انتاج الكاتاليز
أظهرت المايكوبلازما النامية نتيجة موجبة لهذا الفحص.

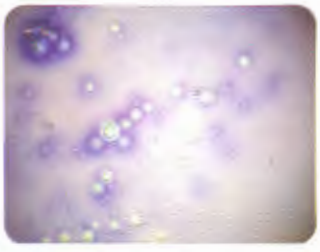
٨- نسب العزل الجرثومي
بينت نتائج الدراسة بعد إجراء جميع الاختبارات التأكيدية أن نسبة عزل المايكوبلازما من مجموع العينات كانت (٤٩.٤%) وقد ظهرت المايكوبلازما بأعلى نسبة عزل في المسحات الأنفية وبنسبة (٥٨%) تلتها مسحات الرغامي والرئات المصابة وبنسبة (٥٥.٣%، ٣٥%) على التوالي.



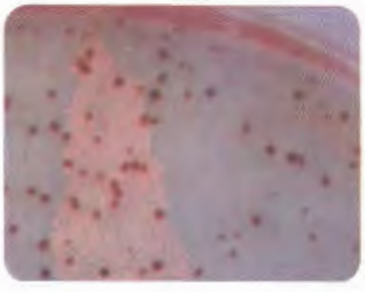
الصورة (١)
المستعمرات المجهرية ذات المظهر المميز (مظهر البيضة المقلية) تحت المجهر التشريحي

الصورة (٢)
مسحة رغامي مباشرة مصبوغة بصبغة كيمزا تتضح فيها النتيجة الموجبة لوجود المايكوبلازما وظاهرة تعدد الأشكال لخلايا المايكوبلازما.





الصورة (٣)
النتيجة الموجبة لاختزال صبغة دينيس وظهور مستعمرات عديمة اللون



الصورة (٤)
اختبار اختزال التترازوليوم وظهور المستعمرات باللون الأحمر

(أ) (ب)

الصورة (٥)
النمو في الوسط ثنائي الطور
ا- النتيجة الموجبة لنمو المايكوبلازما
ب- النتيجة السالبة

جدول ١: أعداد وأنواع ونسب العينات التي تم جمعها خلال فترة الدراسة.

نوع العينة	عدد العينات الكلي	عدد العينات الموجبة	%
مسحات انفية	٦٠	٣٥	٥٨
مسحات رغامي	٦٠	٣٣	٥٥.٣
رئات مصابة	٦٠	٢١	٣٥
المجموع	١٨٠	٨٩	٤٩.٤

DISCUSSION
المناقشة

إن الأمراض التنفسية وذات الرئة من أكثر الأمراض المهمة والتي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة في الضأن نتيجة الإصابات والهلاكات العالية وقد أشارت إحدى الدراسات إلى أن نسبة الإصابة بالأمراض التنفسية تصل إلى (٦٩%) من مجموع الأمراض التي تصاب بها الأغنام وتشكل ذات الرئة نسبة (٧٥%) من هذه الأمراض التنفسية (Healy *et al.*, 1993) ، وتعتبر المايكوبلازما من المسببات الرئيسية للأمراض التنفسية في الحملان (Pitcher and Nicolas 2005).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المستعمرات النامية كانت نموذجية ومطابقة للمستعمرات الخاصة بالمايكوبلازما عند تنميتها على وسط PPLO agar إذ ظهرت بشكل مستعمرات كروية ذات مركز محاط بهالة شفافة شبيهة بمظهر البيضة المقلية Fried egg appearance وهذا مشابه لما مذكور في المراجع العلمية (Koenman *et al.*, 1997; Quinn *et al.*, 2002; Nester *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2005). وأشارت نتائج الفحص المجهري للمسحات المحضرة من الزروع النامية والمصبوغة بصبغة كيمزا ظهور الجرثومة بأشكال متعددة (highly pleomorphic) ويعزى هذا إلى افتقارها إلى الجدار الخلوي مما يجعلها مطاطية وهشة وليس لها شكل ثابت (Nester *et al.*, 2004). بينما ظهرت المايكوبلازما النامية على وسط Modified PPLO agar والمصبوغة بصبغة دينيس مستعمرات عديمة اللون لقدرتها على اختزال ازرق الميثيلين الذي يعد احد مكونات صبغة دينيس وهذا مطابق لما ورد في انظمة التشخيص المعتمدة من قبل (Koenman *et al.*, 1997) . أما نتائج الاختبارات الكيماحياتية للتأكد من نوع الجرثومة اختبر اختزال التترازوليم حيث أن مستعمرات المايكوبلازما ظهرت باللون الأحمر وهذا مطابق لما توصل إليه كل من (النعيمي ؛ ٢٠٠١ ؛ الاغا ؛ ٢٠١٢) ويعود السبب إلى قدرتها على اختزال مركب -2-(P-iodophenyle) 3-nitrophenyle-5-phenyle tetrazolium chloride. العديم اللون إلى مركب غير ذائب يترسب داخل خلاياها ليغير لون المستعمرة إلى اللون الأحمر وهو مركب الفورمازان (Formazan). أما اختبار تخمر الكربوهيدرات باستخدام الوسط ثنائي الطور (Methylen Blue-Glucose Diphasic medium) فقد أدى إلى ظهور الطور الصلب باللون الأصفر أما الطور السائل فكان باللون الأخضر وهذا يتفق مع النتائج التي تم التوصل إليها من قبل كل من (النعيمي ؛ ٢٠٠١ ؛ الاغا ؛٢٠١٢) وذلك لان المايكوبلازما لها القدرة على استهلاك الجلوكوز الموجود في الوسط الغذائي وإنتاج الحامض الذي بدوره يقلل الدالة الحامضية للوسط ويؤدي إلي تحول لون الفينول الأحمر من الأرجواني إلى اللون الأصفر وفي الوقت ذاته يختزل الميثيلين الأزرق من قبل المايكوبلازما ويصبح عديم اللون إذ يلاحظ تغير لون الطور السائل من اللون الأرجواني إلى اللون الأخضر أو الأخضر المصفر فيما يتحول لون الطور الصلب من الارجواني إلى اللون الأصفر أو الأصفر البرتقالي (Koenman *et al.*, 1997). كذلك درست نتائج الاختبارات الكيمياحياتية الأخرى مثل اختبار انزيم الكتاليز حيث كونت مستعمرات المايكوبلازما فقاعات بعد إضافة قطرة من بيروكسيد الهيدروجين 3% (H2O2) إلى جزء من المستعمرة المنقولة على سطح شريحة زجاجية (Atlas *et al.*,1995 ; النعيمي ؛٢٠٠١ ؛ الاغا، ٢٠١٢) إذ يعمل إنزيم الكتاليز على تحويل بيروكسيد الهيدروجين إلى أوكسجين وماء. واستخدمت اختبارات تشخيصية أخرى مثل اختبار تحليل كريات الدم الحمراء والتي تمثلت بظهور مستعمرات محاطة بنطاق رائق من التحلل الدموي دلالة على قدرتها على تحلل الدم تحللا كاملا والذي يعود إلى إنتاجها H2O2 الذي يعمل على تحطيم الأغشية الخلوية (Willey *et al.*, 2008 ؛ الاغا ؛ ٢٠١٢).

وقد أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى عزل (٨٩) عزلة مايكوبلازما من مجموع العينات البالغ عددها (١٨٠) عينة وبنسبة عزل كلية (٤٩.٤%)، وعند دراسة توزيع النسب المئوية لعزل المايكوبلازما حسب نوع العينة فقد سجلت مسحات الأنف أعلى نسبة عزل للمايكوبلازما (٥٨%) تلتها مسحات الرغامي (٥٥.٣%) وعينات الرئات المصابة (٣٥%) وقد يعزى هذا السبب الى دور الحواجز التشريحية واليات الدفاع الطبيعية في تقليل أعداد الجراثيم التي تصل إلى المجرى التنفسي السفلي. حيث كانت نسبة عزل المايكوبلازما من مسحات الأنف مقاربة نسبيا لنتائج الدراسة التي أجراها Ongor , (٢٠١١) للتحري عن وجود المايكوبلازما من ٦٩٢ عينة إفرازات أنفية فقد بلغت نسبة العزل لديه (٤١%) من جموع العينات الكلي (Ongor *et al.*, 2011). في حين لم تتفق هذه النسبة مع ما توصل إليه باحثون في شمال الأردن حيث تم عزل المايكوبلازما من ٧ مسحة أنفية من مجموع ٣١٠ مسحة أنفية تم جمعها من أغنام وحملان كانت تعاني من علامات تنفسية بنسبة عزل (٢.٣%) وقد يعود السبب إلى نوع العينة المأخوذة للزرع أو الظروف المستخدمة في العزل وتاريخ الحالة المرضية (case history) وفترة جمع العينات خلال مدة الدراسة (Momani *et al.*, 2006). حيث يعتبر عزل المايكوبلازما من أصعب المهمات التي يمكن إجرائها في المختبرات التشخيصية وذلك لصعوبة تنميتها على الأوساط المختبرية الاعتيادية واحتياجها إلى ظروف تنمية خاصة والى إضافات معينة لتحسين النمو (Bidhendi *et al.*, 2011). أما عينات الرئات المصابة فقد اتفقت النسب المئوية للعزل التي تم التوصل إليها في دراستنا مع ما توصل إليه باحثون في تركيا (Kilic *et al.*, 2013) حيث تم عزل المايكوبلازما من ٨٠ عينة من مجموع ٢١٦ رئة مصابة تظهر عليها علامات ذات الرئة وكانت النسبة (٣٧%)، في حين كانت نسبة العزل اقل في دراسة مشابهة اجريت على ٢٠٠ رئة أغنام وحملان مصابة بذات الرئة حيث بلغت نسبة العزل لديهم (١٣.٥%) من الحالات (Erkin N., 2004). أما عند مقارنة ما توصلنا إليه مع دراسة أجريت على رئات مصابة جمعت من المجزرة إذ أظهرت نتائجنا انخفاضا ملحوظا في نسبة العزل مع نتائج هذه الدراسة التي بلغت فيها نسبة العزل (٩٠%) (Sheehan *et al.*, 2007) بينما كانت نسبة العزل التي توصلنا إليها (٣٥%) من الرئات المصابة.

إن الدراسة الحالية أثبتت إمكانية عزل جراثيم المايكوبلازما من المسحات الأنفية ومسحات الرغامي وعينات الرئات المصابة وبنسب عالية مما يستوجب الانتباه إلى ارتفاع نسب الإصابة بالمايكوبلازما في الحملان في الزمن الحاضر ، وأيضا يجب مراعاة تقليل عوامل الإجهاد ومحاولة السيطرة على الإصابات المرضية التي قد تهيئ الحملان للإصابة بالأمراض التنفسية بشكل عام والمايكوبلازما بشكل خاص.

شكر وتقدير
يتقدم الباحثان بالشكر والثناء لكلية الطب البيطري، جامعة الموصل لدعمها المادي والمعنوي لانجاز البحث.

REFERENCES
المراجـع

الآغا ، يسرى يحيى قاسم ، (٢٠١٢): "دراسة مصلية وزرعيه لمسببات ذات الرئة اللانمطي لدى الأطفال ". أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم - قسم علوم الحياة، جامعة الموصل.

النعيمي، نجلاء عبد الله (٢٠٠١): "دراسة في تقييم دور مجموعة من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام وجرثومة Mycoplasma pneumonia في الإصابات التنفسية لدى الأطفال الحديثي الولادة في مدينة الموصل". رسالة ماجستير، كلية العلوم – قسم علوم الحياة. جامعة الموصل.

رحيمة ، ماجد شيال ، شمعون، جورجيت نيسان ، قاسم ، الهام عبد الغني (٢٠٠١): المسببات المرضية لذات الرئة في حملان التسمين. المجلة العراقية للعلوم البيطرية ، المجلد١٤ ، العدد ١ ، الموصل ، العراق .

Atlas, R.M.; Brawn, A.E. and Parks, L.C. (1995): Laboratory Manual of Expermental Microbiology (2nd ed.). Mosby-Year Book, Inc. USA.

Bidhendi, M.; Khaki, S. and Langroudi, P.R. (2011): Isolation and identification of Mycoplasma agalactiae by culture and polymerase chain reaction in sheep and goat milk samples in Kordistan Province, Iran. Razi Institute, vol. 66, No. 1.

Erkin, N. (2004): The isolation and identification of Mycoplasma species in sheep and lambs that indicates pneumonia in Samsun rejoin. M.Sc. Thesis, Samsun Veterinary Control and Research Institute.

Healy, A.M.; Monaghan, M.L. and Basset, H.F. (1993): Morbidity and mortality in large irish feedlot, Microbiological and serological finding in lambs with acute respiratory disease. British. Vet. J. 149: 539-560.

Kilic, A.; Kalender, H.; Eroksuz, H.; Muz, A. and Tasdemir, B. (2013): Identification by culture, PCR, and immunohistochemistry of mycoplasmas and their molecular typing in sheep and lamb lungs with pneumonia in Estern Turkey 10: 013-0394.

Koenman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreck enberger, P.C. and Winn, W.C. (1997): Colar atlas and text book of diagnostic Microbiology. (5th ed.) Lippincot-Raven publisher, Philadelphia, USA.

Momani, A.W.; Halab, M.A.; Aboshehada, M.N.; Mieles, K.; McAuliffe, L. and Nicholas, R.A.J. (2006): Isolation and molecular identification of small ruminant Mycoplasma in Jordan, small Ruminant Research. 65: 106-112.

Nester, E.W.; Anderson, D.G.; Jr., CER.; Pearsall, Pearsall, N.M. and Nester, M.T. (2004): Microbiology.(4th ed.)., McGraw-Hill Companies, Inc. USA.

Nicholas, R.A.J.; Ayling, R.D. and McAuliffe, L. (2003): A Text Book of the Mycoplasma Diseases of Ruminants, CABI is a trading name of CAB International, www.cabi.org ., Pp. 132-168.

Nicholas, R.A.J.; Ayling, R.D. and Loria, G.R. (2008): Ovine Mycoplamal infections. Small Ruminant Research, 76, 92-98.

Nicholas, R.A.J.; Wood, E.; Baker, S. and Ayling, R.D. (2001): Mycoplasmas isolated from ruminants in Britain 1995-2000. In: Poveda, J.B., Fernandez, A., Frey, J., and Johansson, K.E. (eds.). Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Moleculargenetics. Vol.5. European Commission, Brussels. pp. 116-120.63.

Ongor, H.; Kalin, and MN Acik, (2011): Detection of Mycoplasma ovipneumoniae from goats with nasal discharge by culture and polymerase chain reaction. Pak. Vet. J., 31(3): 244-248.

Pitcher, D. and Nicholas, R.A.J. (2005): Mycoplasma host specificity: fact or fiction? Vet. J., 170: 300–306.

Prescott, L.M. Harley, J.P. and Klein, D.A. (2005): Microbiology. Avenue of the Americas, New York. (6th ed.) McGraw-Hill.Companies, Inc., USA.

Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2002): Mycoplasmas. In: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st ed., Black Well Publishing. Pp: 189-195.

Sheehan, M.; Casidy, J.P.; Brady, J.; Ball, H.; Doherty, M.L.; Quinn, P.J.; Nicolas, R.A.J. and Markey, B.K. (2007): An Aetiopathological Study of Chronic Bronchopneumonia in lambs in Ireland. The Veterinary Journal, 173, 630-637.

Willey, H.C.; Sherwood, L.M. and Woolverton, C.J. (2008): Microbiology. (7th ed.) McGraw Hill. USA.