



التحري عن الملوثات البكتيرية والفطرية لقصبات التلقيح الاصطناعي المستوردة والمستخدم لتلقيح الأبقار

ماجد محمد محمود
معنر عبد الواحد عبد المنعم
باسل رزوق فرج

وحدة بحوث الامراض المشتركة، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد
E-Mail: alani.majid@gmail.com

الخلاصة:

هدف البحث الحالي التحري عن تواجد الملوثات الجرثومية والفطرية في قصبات التلقيح الاصطناعي المستوردة والمستخدم لتلقيح الأبقار والتحري عن مقاومة تلك الجراثيم لبعض المضادات الحيوية فقد جمعت 118 قصبه تلقيح مستوردة جلبت من اسواق بغداد المحلية وبعض العيادات البيطرية للفترة من كانون الاول 2011 لغاية شباط 2012 ونقلت مباشرة الى مختبر وحدة الامراض المشتركة (كلية الطب البيطري | جامعة بغداد) مجمدة بالنيتروجين السائل، ثم زرعت محتويات كل قصبه في 10 مل في كل من مرق نقيع القلب والدماغ للتحري عن المسببات البكتيرية وكذلك مرق (Sabouraud dextrose broth) للتحري عن الفطريات مع استخدام الفحوصات الروتينية الاخرى والبايولوجية، كما اجري فحص الحساسية لأحد عشر (11) مضاداً حيوياً، وقد بينت النتائج عزل جراثيم *Bacillus subtilis* بواقع 34 عزلة (28.81%) تليها جراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* 27 عزلة (22.88%) وجراثيم الاشريشيا القولونية *E. coli* والتي بلغت 13 عزلة (11.07%)، كما سجلت الاصابة المزدوجة بجرثومتى *B. subtilis* و *S. aureus* معاً في 9 قصبات (7.63%) و *B. subtilis* و *E. coli* معاً في ثلاث قصبات (2.54%)، و اظهرت نتائج فحص الحساسية مقاومة عزلات المكورات العنقودية الذهبية لمعظم المضادات الحيوية فيما اظهرت جراثيم الايشيريشيا القولونية *E. coli* و *B. subtilis* استجابة متوسطة ومتباينة وقد كانت جميع العزلات حساسة لعقار Azithromycin و الـ Ceftriaxone. اما فيما يخص الفطريات فقد عزل عفن (*Penicillium*) 16 عزلة (13.65%) يليه عفن (*Aspergillus*) 7 عزلات (5.93%) ثم عفن (*Alternaria*) 4 عزلات (3.39%) وأخيراً (*Cladosporium*) عزلتين فقط (1.69%). يستنتج من هذه الدراسة ضرورة استخدام المضادات الحيوية وخاصة Azithromycin للتخلص من التلوث واتخاذ الاجراءات الصحية في عملية التلقيح الاصطناعي واستخدام المعقمات والمطهرات للادوات المستعملة لتجنب الاضرار الصحية الناجمة عن ذلك.

الكلمات المفتاحية: قصبات التلقيح الاصطناعي المستوردة ، الملوثات الجرثومية والفطرية.

Detection of Bacterial and Fungal Contaminants of the Imported Semen Straws Used for Cows

Majid Mohammed Mahmood Moutaz Abdul Wahid Abdul-AL-Mounam
Basil Razook Faraj

Unit of Zoonotic Diseases, College of Veterinary Medicine, Baghdad University

Abstract:

The study was conducted to detect the presence of bacterial and fungal contamination in imported semen straws used for Artificial Insemination (AI) in cows and antibiotic sensitivity test for those isolates. For this purpose, a total of 118 imported semen straws from local

markets in Baghdad and some veterinarian clinics from December 2011 to February 2012 transported directly to the laboratories of Unit of Zoonotic Diseases (College of Veterinary Medicine / Baghdad University) frozen in liquid nitrogen (-196°C), the cultured on brain and heart broth and Sabouraud dextrose broth with routine biochemical tests, as well as antibiotic sensitivity test was done using 11 antibiotics. The results revealed isolation of *Bacillus subtilis* 34 isolates (28.81%), *Staphylococcus aureus* 27 (22.88%), and *E. coli* 13 (11.07%), also mixed infection was registered *B. subtilis* + *S. aureus* found in 9 straws (7.63%) and *B. subtilis* + *E. coli* in 3 straws (2.54%). The results of antibiotic sensitivity showed resistant strains of *S. aureus* against most antibiotics used, while *B. subtilis* and *E. coli* showed intermediate sensitivity to many antibiotics. In general, all isolates were sensitive to Azithromycin and Ceftriaxone. Fungal isolation showed *Penicillium* 16 isolates (13.65%), *Aspergillus* 7 isolates (5.93%), *Alternaria* 4 (3.39%), and *Cladosporium* only 2 isolates (1.69%). It could be concluded that there was a need to use a dose of Azithromycin to get rid of contamination and using of hygienic precautions in artificial insemination and using of disinfectants for sterilization of instruments and tools to avoid contamination.

Keywords : imported semen straws , bacterial and fungal contamination.

المقدمة:

استخدم مربوا الحيوانات تقنية التلقيح الاصطناعي منذ ثلاثينيات القرن الماضي ولحد الآن ولاسيما في مجال تكاثر الماشية حيث يجمع السائل المنوي من الذكور (ذات مواصفات قياسية خاصة) ثم يخفف ويوضع داخل قصبات تسمى "قصبات التلقيح الاصطناعي" (Semen Straws) وتحفظ هذه القصبات مجمدة في سائل النيتروجين بدرجة حرارة -196°C في أوعية خاصة مغلقة بإحكام ، ولا تخلو هذه العملية في أي مرحلة من المراحل من التعرض للتلوث الجرثومي والذي بدوره ينتقل مع القصبات من بلد إلى آخر (1 و 2 و 3).

عولجت هذه المشكلة (تلوث القصبات) بإضافة المضادات الحيوية مثل البنسلين مع الستربتومايسين مما أدى إلى تقليل التلوث ، إلا أن معظم الباحثين اكتفوا عدم كفاية هذين المضادين لأنهما غير فعالين ضد الكثير من الجراثيم مثل *Corynebacterium* , *Pseudomonas* , *Vibrio* , *Brucella* , *Mycobacterium* , *Mycoplasma* , *Ureaplasma* , *Hemophilus* وان معظم هذه الجراثيم قد اكتسبت مقاومة (4) و (5).

إن الملوثات التي تصيب قصبات التلقيح لا تقتصر على البكتيريا فقط بل هناك مسببات فطرية وفيروسية وأوالي وغيرها ، فعلى سبيل المثال قد تتلوث القصبات بفطريات المبيضات *Candida* أو *Cryptococcus neoformans* والتي تسبب تغير الدالة الحامضية pH لتلك القصبات أو قد تكون الملوثات موجودة طبيعياً في مهبل الأبقار قبل التلقيح فتسبب التلوث (6 و 7) .

وفي العراق حيث يستخدم الأطباء البيطريين قصبات التلقيح (بنوعها المستوردة والمحلية) على نطاق واسع في تناسل الأبقار فقد لوحظ في الآونة الأخيرة التوجه

إلى القصبات المستوردة وترك القصبات المحلية (لأسباب غير معروفة) إلا أن مشكلة الإخصاب غير الناجح لا زالت مستمرة كما أن نسب الالتهابات والتلوث عالي جداً في تلك القطعان ، ونظراً لقلة الدراسات في هذا الجانب فقد صمم هذا البحث لتسليط الضوء على أهم الملوثات الجرثومية والفطرية لقصبات التلقيح المستخدمة ميدانياً ومعرفة مدى مقاومة تلك الميكروبات للمضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل:

جمعت 118 قصبية تلقيح مستوردة من مصادر مختلفة من بغداد (السوق المحلية وبعض العيادات البيطرية) للفترة من كانون الأول 2011 لغاية شباط 2012 ونقلت مباشرة إلى مختبر وحدة الأمراض المشتركة / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد باستخدام حاوية خاصة مجهزة بالنيتروجين السائل. زرعت كل قصبية في 10 مل في كل من مرق نقيع القلب والدماغ (BHI) (Brain heart infusion) من إنتاج شركة (Himedia) الهندية ومرق (TSB) (Trypticase Soya broth) شركة (Becton Dickinson) الأمريكية لغرض التحري عن المسببات البكتيرية وكذلك مرق (SDB) (Sabouraud dextrose broth) شركة (Himedia) الهندية والمضاف إليه المضاد الحيوي الكلورامفينيكول بنسبة 100 مايكروغرام/مل للتحري عن الفطريات ثم حضنت بدرجة حرارة 37°C لمدة 24-48 ساعة لكل من مرق (BHI و TSB) ولمدة (5-7) أيام بالنسبة لمرق (SDB) بدرجة حرارة $25-21^{\circ}\text{C}$. بعدها زرع حجم ناقل جرثومي من كل من مرق BHI و TSB على ثلاث أنواع من الأوساط الزرعوية وهي أكار الدم ووسط

مزجت بقطرة ماء واستخدمت صبغة Lactophenol cotton blue وفحصت تحت المجهر (10).

النتائج:

أظهرت النتائج عزل جراثيم العصيات *Bacillus subtilis* بكثرة من قصبات التلقيح الاصطناعي المستوردة بواقع 34 عزلة موجبة (28.81%) تليها جراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والتي بلغت 27 عزلة موجبة (22.88%) وبدرجة أقل جراثيم الإشريشيا القولونية *E. coli* والتي بلغت 13 عزلة (11.07%) (جدول رقم 1).

المكوني ووسط الاكار المغذي ثم حضنت بعد اجراء الفحوصات المظهرية والمجهريه بصبغة كرام وفحص الحركة ثم اجريت الاختبارات الكيموحيوية وحسب (8). كما اجري فحص الحساسية للمضادات الحياتية لبعض الجراثيم المعزولة من خلال قياس قطر هالة التثبيط على اطباق ملر هنتون (Mueller Henton) وحسب طريقة (Bauer Kirby) باستخدام مسطرة مدرجة ثم سجلت النتائج (9).

وقد اجري الفحص المجهرى للاجزاء المزهرة للاعنان باخذ جزء من الغزل الفطري من حافة النمو بواسطة ناقل معقوف النهاية ووضعه على شريحة زجاجية ثم

جدول رقم (1) يبين النسب المئوية للجراثيم المعزولة من قصبات التلقيح.

الجراثيم	عدد العزلات الموجبة	النسبة المئوية (%)
<i>B. subtilis</i>	34	28.81%
<i>S. aureus</i>	27	22.88%
<i>E. coli</i>	13	11.07%
المجموع	74 عزلة	

لون الاكار الى اللون الاصفر المنتشر على جميع انحاء الاكار وموجبة لفحص انزيم التجلط coagulase بنوعيه (اختبار الشريحة واختبار الانبوبة) الا انها تباينت في انتاج انزيم الدنا DNase موجبة للكتاليز وتخمر المانيتول والسكروز وكانت متباينة في اختبار تميع الجيلاتين ومنتجة لليوريز والفوسفاتيز ومخمرة لكل من سكر الزايلوز وال تريهالوز ومتباينة في اختبار انتاج اليوريز كما هو ملخص في الجدول رقم (2).

أظهرت النتائج اشكال المستعمرات لجراثيم *E. coli* على الاوساط الزرعية حيث ظهرت على وسط المكوني ناعمة، لماعة، شفافة ومخمرة لسكر اللاكتوز ومنتجة لون وردي على الطبق، في حين ظهرت المستعمرات على الوسط الانتقائي ايوزين مثيلين الازرق (EMB) خضراء اللون ذات بريق معدني، وقد كانت العزلات موجبة لفحص الحركة ومخمرة لسكر اللاكتوز والكلوكوز ومنتجة للكتاليز وموجبة لاختبار المثيل الاحمر (MR) في حين كانت سالبة لاختبار استهلاك السترات وتفاعل فوكس بروسكاور (VP) والاكسيدز وغير منتجة لانزيم اليوريز ولا تميع الجيلاتين اما فيما يخص فحص Triple Sugar (TSI) Iron فقد كانت النتيجة (حامضي \ حامضي ، منتجة للغاز CO₂ وغير منتجة للغاز H₂S).

كما اظهرت بعض القصبات وجود اكثر من جرثومة (اصابة مشتركة) من الجراثيم المعزولة في نفس القصبه، فقد اوضحت النتائج احتواء بعض القصبات على جرثومتي *B. subtilis* و *S. aureus* معاً في 9 قصبات (7.63%) كما سجل وجود جرثومتي *B. subtilis* و *E. coli* معاً في ثلاث قصبات (2.54%).

ظهرت جراثيم *B. subtilis* تحت المجهر الضوئي بشكل عصيات كبيرة ذات نهايات عريضة محتوية على ابواغ كروية مركزية او شبه مركزية الموقع وكما مبين في الجدول رقم (2).

وقد كانت العزلات موجبة لفحص اختزال السترات وتفاعل فوكس بروسكاور (VP) ومحللة للنشا والكابزين وموجبة لاختبار تميع الجيلاتين ومخمرة للسكريات مثل الكلوكوز والمانيتول والزايلوز والارابينوز وسالبة لاختبار الاندول واختبار انتاج الليسيثينز والتخمر اللاهوائي وتحلل التايروسين وكما موضح في الجدول رقم (2).

اما جراثيم المكورات العنقودية الذهبية فقد ظهرت تحت المجهر الضوئي بشكل ثنائيات او رباعيات او بشكل عناقيد العنب موجبة لصبغة كرام وقد كانت محللة للدم من نوع بيتا على اكار الدم اما على وسط المانيتول الملحي فقد ظهرت المستعمرات دائرية الشكل ناعمة ومحدبة صفراء ذهبية اللون مخمرة للمانيتول محولة

جدول رقم (2) الاختبارات الكيموحيوية لجراثيم *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *E. coli* المعزولة.

<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
النتيجة	الاختبارات	النتيجة	الاختبارات	النتيجة	الاختبارات
محللة نوع بيثا	تحلل الدم	+	تخمير اللاكتوز	-	التخمير اللاهوائي
متباين	تحلل الدنا DNA	-	استهلاك السترات	+	استهلاك السترات
+	انتاج الكتاليز	+	انتاج الكتاليز	-	انتاج انزيم الليثينيز
+	انتاج الكواكيوليز	+	انتاج الاندول	+	اختزال النترات
+	تخمير المانيتول	-	تفاعل (VP)	+	تفاعل (VP)
+	تخمير السكروز	+	تفاعل MR	-	انتاج الاندول
متباين	تميع الجيلاتين	-	انتاج الاوكسيديز	+	تحلل النشا
+	انتاج اليوريز	-	انتاج اليوريز	متباين	انتاج اليوريز
+	الفوسفاتيز	-	تميع الجيلاتين	+	تميع الجيلاتين
+	تخمير الزايلوز	+	الحركة	+	تحلل الكايزين
+	تخمير التريهالوز	+	تخمير الكلوكوز	-	تحلل التايروسين
		A/A	TSI		تخمير الكلوكوز
		+	(CO ₂)	+	والمانيتول
		-	(H ₂ S)		والزايلوز والارابينوز

المذكورة (الجدول رقم 3). وقد تبين ان جميع العزلات اعلاه كانت حساسة لعقار Azithromycin و الـ Ceftriaxone الا ان نطاق التنشيط كان اوسع بالنسبة للعقار الاول قياساً بالثاني مما يدل على كفاءة هذا المضاد وضرورة استخدامه في هذه الحالة.

اظهرت نتائج فحص الحساسية للعزلات المذكورة مقاومة المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* لمعظم المضادات الحيوية فيما ابدت جراثيم الايشيريشيا القولونية *E. coli* استجابة متوسطة لبعض تلك المضادات وكانت حساسة للبعض الاخر في حين تباينت استجابة العصيات *B. subtilis* لتلك المضادات

جدول رقم (3) نتائج فحص الحساسية لجراثيم *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *E. coli* المعزولة.

<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	التركيز (µg)	الرمز	المضاد الحيوي
R	R	R	30	AMC	Amoxicillin
R	R	R	10	Am	Ampicillin
S	S	S	15	AZM	Azithromycin
R	I	I	10	B	Bacitracin
S	S	S	30	CRO	Ceftriaxone
R	R	R	30	CL	Cephalexin
R	S	R	15	E	Erythromycin
R	S	I	10	GM	Gentamicin
I	S	I	23.75	SXT	Sulfamethoxazole
R	S	R	30	TE	Tetracyclin
R	S	I	5	TMP	Trimethoprim

S = حساسة ، I = متوسطة الحساسية ، R = مقاومة

عفن (*Alternaria*) 4 عزلات (3.39%) وأخيراً وبدرجة اقل عفن (*Cladosporium*) عزلتين فقط (1.69%)، كما هو مبين في الجدول رقم (4).

أما فيما يخص الفطريات المعزولة من قصبات التلقيح فقد عزلت 4 أجناس من الأعفان على وسط الفطريات (SDA) وقد عزل عفن (*Penicillium*) بواقع 16 عزلة (13.65%) وكان السائد بين الفطريات يليه عفن (*Aspergillus*) 7 عزلات (5.93%) ثم

جدول رقم (4) يبين النسب المئوية للأعفان المعزولة من قصبات التلقيح.

الاغفان	عدد العزلات الموجبة	النسبة المئوية (%)
<i>Penicillium</i>	16	13.65%
<i>Aspergillus</i>	7	5.93%
<i>Alternaria</i>	4	3.39%
<i>Cladosporium</i>	2	1.69%
المجموع	29 عزلة	

فعالية وحيوية الحيامن وبالتالي يقلل من خصوبتها كما ان وجود الملوثات يسبب أضراراً ماديةً ناجمة عن الالتهابات وتكاليف العلاج الباهضة وغيرها. لقد أجريت العديد من التجارب والبحوث عالمياً للتحري عن وجود الملوثات المختلفة لقصبات التلقيح ولم تخلو تلك القصبات من وجود انواع مختلفة من الجراثيم ، فعلى سبيل المثال في الهند عزلت جراثيم *Moraxella bovis* من قصبات التلقيح الاصطناعي المجمدة في سائل النتروجين من 13 قصبية مستخدمة لتلقيح ابقار هولشتاين وقد تم تأكيد تلك العزلات باستخدام الزرع الجرثومي واجراء مسحات مجهرية (سلايدات) لتلك القصبات (11)، كما اشار نفس الباحث الى امكانية عزل جراثيم كل من *Escherichia coli* و *Staphylococcus spp* و *Pseudomonas spp* من قصبات التلقيح المخزونة في سائل النتروجين عند - 196 °م والتي قد تلوث تلك القصبات وخاصة في مرحلة الجمع او في أي مرحلة من مراحل معاملة الحيامن او تخفيفها او تعبئتها في القصبات قبل التخزين.

وقد اتفقت نتائج دراستنا مع العديد من الباحثين (12) الذين اشاروا الى وجود الكثير من الملوثات الجرثومية للقصبات ، ففي الهند اجريت محاولة عزل البكتريا من 100 قصبية تلقيح اخذت من مركزي روهرى وكراتشي الهندية للتلقيح الاصطناعي وقد تمكنا من عزل كل من *Acinetobacter*, *Actinobacillus lignieris*, *Citrobacter*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* و *S. intermedius*.

في حين استطاع الباحث (2) من عزل جراثيم *Brucella* و *Leptospira* باستخدام تقنية تفاعل انزيم سلسلة البلمرة PCR من حيامن الثيران مما يدل على احتواء الحيامن على المزيد من الملوثات والتي من الممكن ان تسبب الامراض الخطيرة والخسائر الاقتصادية الكبيرة.

وقد اظهرت نتائج عزل الفطريات جنس الـ *Penicillium* حيث ظهر الغزل الفطري على شكل شبكة كثيفة التفرع متعددة الأنوية مجزئه عديمة اللون تظهر بشكل فروع مقسمة وذات انوية متعددة حاملة للأبواغ متفرعة ذات لون اخضر. اما عفن *Alternaria* فقد ظهرت مستعمراتها على الأوساط الزرعية سمكية القوام ذات ألوان خضراء ، اسود وورصائية، وقد ظهرت الأبواغ هراوية الشكل، ذات سلاسل مفردة طويلة. في حين ظهر عفن الـ *Cladosporium* بشكل مستعمرات خضراء زيتونية إلى بنية أو سوداء اللون وتكون سبورات غامقة الصبغة على شكل سلاسل مفردة أو متفرعة. وأخيراً ظهر عفن الـ *Aspergillus* بشكل مستعمرات بيضاء في اليوم الثالث ثم اخضر غامق عند اليوم السابع وذات قوام زغبي (Fuzzy) . وفي مجال عزل الخمائر، فلم تعزل أي خمائر تذكر في هذه الدراسة من قصبات التلقيح.

المناقشة:

ان القصبات المستخدمة لاجراض التلقيح الاصطناعي في الماشية والمصنعة محلياً هي اقل كفاءة من تلك المستوردة حسب ما يراه معظم الاطباء البيطريين في العراق الا ان القصبات المستوردة بطبيعتها او عن طريق الاستخدام الخاطئ قد سببت في الاونة الاخيرة خسائر اقتصادية كبيرة جراء التلوث الذي يسبب الالتهابات الحادة وقلة الخصوبة في الابقار وخاصة ابقار الفريزيان والتي تشكل النوعية الجيدة المتواجدة في العراق وقد كشفت نتائج دراستنا وجود بعض الملوثات الجرثومية والفطرية في تلك القصبات والتي قد تعزى الى طريقة الخزن الخاطئ وغير المطابق للمواصفات العالمية او طريقة نقلها واستيرادها (براً او جواً او بحراً) او التداول غير الصحي بين العيادات البيطرية وأماكن الشراء وغيرها من الاسباب التي تعزز وصول الملوثات المرضية التي تؤدي الى قلة خصوبة الاناث ، حيث ان وجود الملوثات يقلل

سجلا وجود عزلة فطرية واحدة وقد درسا مقاومة تلك الجراثيم لأربع مضادات حيوية وهي الامبسلين والارثرومايسين والجنتاميسين والسبكتينومايسين وقد أوضحنا ان جميع تلك الجراثيم كانت مقاومة للامبسلين في حين كانت متوسطة الحساسية او حساسة لباقي المضادات.

وفي مجال الملوثات الفطرية لقصبات التلقيح فان البحوث تشير الى قلة تواجد الفطريات فعلى سبيل المثال وجدت الباحثة (19) في دراسة لها على سموم فطرية تابعة لجنس *Fusarium* ونسبة قليلة جداً حوالي 2% وهذا اقل مما توصلنا اليه في دراستنا ، اما الدراسة التي اجراها الباحثون (20) فقد تمكنوا من عزل الكثير من الملوثات البكتيرية لقصبات التلقيح المستخدمة للجاموس الا انهم لم يعزلوا أي مسبب فطري.

يستنتج من دراستنا الحالية ضرورة فحص قصبات التلقيح من حيث احتوائها على الملوثات بكافة انواعها والتأكيد على ضرورة اتباع الطرق الصحية والصحيحة في تلقيح الابقار باستخدام التعقيم والتطهير من قبل الطبيب البيطري المعالج وتنظيف وتعقيم كافة الابوات المستعملة لذلك الغرض كما ننصح بضرورة استخدام المضادات الحيوية وخاصة الازيثرومايسين *Azithromycin* الذي اثبت كفاءته ضد الجراثيم بعد اجراء التلقيح وعدم الاكتفاء بالمضادات المضافة من قبل الشركة المصنعة لتلك القصبات لضمان الحصول على اداء جيد ومستوى خصوبة عالي وخالي من التلوث.

المصادر:

- 1) Labouriau, R.; Christensen, P. and Borchersen, S. (2004). Considerations on the sample design of an experiment on semen dilution for artificial insemination in cattle. Biometry Research Unit , Internal Report Danish Institute of Agricultural Sciences , Research Centre Foulum. Pp: 1-24.
- 2) Vinodh, R.; Dhinakar Raj, G.; Govindarajan R. and Thiagarajan, V. (2008). Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. Trop. Anim. Hlth. Prod., 40(5): 323-329.
- 3) López-Gatius, F. (2012). Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. Theriogenol., 77(6):1029–1041.

تشير بعض البحوث الى ان طريقة تلوث القصبات قد لا تكون داخلية المنشأ أي ان القصبات نظيفة ولكن وجود الفلورا الطبيعية في فرج الاناث هي التي تنتقل الى داخل الرحم (13) و(14) و(7) ومن تلك الملوثات الرئيسية الموجودة طبيعياً في مهبل الابقار *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Proteus spp.* وهي الاكثر شيوعاً وكذلك وجود بعض الفلورا الطبيعية في مهبل الاناث ولكن بدرجة اقل مثل *Streptococcus* و *Klebsiella* و *Pseudomonas* و *Corynebacterium* و *Bacillus*.

ان وجود الجراثيم المختلفة يؤثر سلباً كما ذكرنا على حيوية النطف وبالتالي على الخصوبة بشكل عام وقد اتفق هذا المفهوم مع ما اكده (5) في اسبانيا حيث اشاروا الى ان وجود الجراثيم يؤدي الى اعاقه حركة النطف كما يغير الدالة الحامضية pH مما يؤثر على الحمض النووي DNA للحيامن ويقلل خصوبتها. ومما يزيد من خطورة تواجد الجراثيم الملوثة للقصبات هو حدوث الالتهابات الحادة مما يزيد من تواجد الخلايا الالتهابية وخاصة العدلات والتي تزيد من اعاقه حركة الحيامن وبالتالي تقلل من الكفاءة التناسلية وقد اتفق هذا المضمون مع ما وجدته (15) حيث لاحظوا ارتفاع معدل الخلايا البيضاء وعلاقته بحالات التهاب الضرع في الابقار وكلها تسبب خسائر اقتصادية كبيرة جداً.

اما فيما يتعلق بمقاومة الجراثيم المعزولة من القصبات للمضادات الحيوية فقد اظهرت دراسة في باكستان للباحث (16) عزل جراثيم كل من *Staphylococcus* و *Micrococcus* و *E. coli* و *Pseudomonas* و *Proteus* و *Bacillus spp.* من قصبات التلقيح بعد اخراجها من حاوية التتروجين واذابة التجميد عنها وقد درست مقاومة تلك الاجناس للعديد من المضادات الحيوية مثل الجنتاميسين *Gentamycin* والتايلوسين *Tylosin* و اللنكوسبكتين *Linco-spectin* وقد لاحظوا مقاومة تلك الجراثيم للمضادات المذكورة.

وقد أجرى الباحثون (17) دراسة لعزل الملوثات الجرثومية من قصبات التلقيح الفرنسية المنشأ وقد وجدوا نسبة عزل 25% لمختلف الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام والتي تتماشى مع ما توصلنا اليه في دراستنا كما درسوا مقاومة تلك العزلات لعدة مضادات حيوية مثل الامبسلين *Ampicillin*، والارثرومايسين *Erythromycin* والجنتاميسين *Gentamycin* والسبكتينومايسين *Spectinomycin* والتتراسايكلين *Tetracyclin* وقد بينوا ان جميع العزلات كانت مقاومة لعقار الامبسلين فيما تبينت حساسيتها لبقية المضادات، وفي دراسة اخرى اجراها الباحثان (18) في محاولة ايجاد التلوث الجرثومي لقصبات التلقيح الاصطناعي الفرنسية المنشأ فقد لاحظا وجود نسبة 36.6% من الملوثات البكتيرية وهذا مقارب ويتفق مع ما وجدناه في دراستنا الحالية كما

- (2008). Isolation of *Moraxella bovis* from frozen bovine semen and determination of microbial load. *Ind. J. Microbiol.* 48: 405-407.
- 12) Abro, S.H., R.Wagan, M.T. Tunio, A.A. Kamboh and M. Munir, (2009). Biochemical activities of bacterial species isolated from the frozen semen of cattle. *J. Agric. Soc. Sci.*, 5: 109-113.
- 13) Dohmen, M.J.; Huszenicza, G.Y.; Fodor, M.; Kulcsar, M., Vamos, M., Porkolab, L., Szilagy, N., Lohuis, J.A. (1986). Bacteriology and fertility in healthy postpartum cows and cows with acute endometritis. *Proceedings XIX. World Buiatrics Congress, Edinburgh*, Pp: 238-240.
- 14) IAEA (2007). International Atomic Energy Agency. Improving the Reproductive Management of Dairy Cattle Subjected to Artificial Insemination. Publication prepared under the framework of an RCA project with the technical of the Joint FAO/IAEA. Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Pp: 49-53.
- 15) Lavon, Y.; Ezra, E.; Leitner, G. and Wolfenson D. (2011). Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94 (9): 4538-4545.
- 16) Hasan, S.; Andrabi, S.M.; Muneer, R.; Anzar, M. and Ahmad, N. (2001). Effects of a new antibiotic combination on post-thaw motion characteristics and membrane integrity of buffalo and shaiwal bull spermatozoa and on the bacteriological quality of their semen. *Pak. Vet. J.*, 21(1): 6-12.
- 17) Patel, H.V., Patel, R. K. and Chauhan, J. B. (2011) Biochemical properties of
- 4) Shin, S.J.; Lein, D.H.; Patten, V.H. and Ruhnke, H.L. (1988). A new antibiotic combination for frozen bovine semen. Control of *Mycoplasmas*, *Ureaplasmas*, *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* and *Hemophilus somnus*. *Theriogenol.*, 29: 577-592.
- 5) González-Marína, C.; Royá, R.; López-Fernández, C.; Dieza, B.; Carabañob, M.J.; Fernándezc, J.L.; M.E. Kjellandd, J.F. Morenod, and J. Gosálveza, (2011). Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 123(3-4) : 139-148.
- 6) Kher, H.N. and P.M. Dholakia, 1985. Prevalence of fungi in bovine semen. *Indian J. Anim. Reprod.*, 6: 100-101.
- 7) Ata A.; Türütöđlu, H.; Kale, M.; Gülay, M.S. and Pehlivanođlu, F. (2010). Microbial Flora of Normal and Abnormal Cervical Mucous Discharge Associated with Reproductive Performance of Cows and Heifers in Estrus. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23(8):1007-1012.
- 8) Barrow, G.I. and Feltham, R.K. (2003). "Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria". 3rd Ed. Cambridge University Press. London, Pp: 86-90.
- 9) Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2006). "Veterinary Microbiology and Microbial Diseases Textbook". Printed and bound in Great Britain by International Ltd. Mosby, London, Padstow-Cornwall. Pp: 118-126.
- 10) Dismukes, W.E.; Pappas, P.G. and Sobel, J.D. (2003). "Clinical Mycology". Oxford University Press, Inc. Printed in the United States of America. Part 1 Pp: 3-12.
- 11) Gandhi, A.; Sharma, M.; Dhar, P.; Katoch, V.; Thakur, A. and Kumar, R.

19) Alm-Packalén, K. (2009). Semen quality and fertility after artificial insemination in dairy cattle and pigs. Academic Dissertation , University of Helsinki , Finland.

20) Panchal, S.P.; Pathak, V. and Patel, R.K. (2012). Estimation of microbial load and their biochemical properties in frozen semen of Murrah buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). Wayamba J. Anim. Sci., Number 1344830870.

microbial load in frozen semen of cattle. Wayamba J. Anim. Sci., 578: 117-121.

18) Patel, D.Y. and Patel, R.K. (2012). Estimation of Biochemical Activities of Microbial Load Isolated from the Frozen Semen of HF and HF Crossbred Cattle Bulls. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 6(3): 328-33.