



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

ماجد محمد محمود
معن عبد الواحد عبد المنعم
باسل رزوق فرج

وحدة بحوث الأمراض 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 والمستخدمة لتلقيح الأبقار والتحري عن مقاومة تلك الجراثيم لبعض المضادات الحيوية فقد جمعت 118 قصبية تلقيح مستوردة جلبت من اسواق بغداد المحلية وبعض العيادات البيطرية للفترة من كانون الأول 2011 لغاية شباط 2012 ونقلت مباشرة الى مختبر وحدة الأمراض المشتركة (كلية الطب البيطري) جامعة بغداد) مجمدة بالتبريد السائل، ثم زرعت محتويات كل قصبية 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 الأخرى والباليولوجية، 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 الإصابة المزدوجة بجرثومتي *B. subtilis* و *S. aureus* معاً في 9 قصبات (7.63%) و *E. coli* و *B. subtilis* معاً في ثلاث قصبات (2.54%)، و اظهرت نتائج فحص الحساسية مقاومة عزلات المكورات العنقودية الذهبية لمعظم المضادات الحيوية فيما أظهرت جراثيم الاشريشيا القولونية *E. coli* و *B. subtilis* استجابة متوسطة ومتباينة وقد كانت جميع العزلات حساسة لمضاد الازيثروميسين *Azithromycin* و الـ Ceftriaxone، اما فيما يخص الفطريات فقد عزل عن (*Penicillium*) 16 عزلة (13.65%) يليه عفن (*Aspergillus*) 7 عزلات (5.93%) ثم عفن (*Alternaria*) 4 عزلات (3.39%) وأخيراً (*Cladosporium*) عزلين فقط (1.69%). يستنتج من هذه الدراسة ضرورة استخدام المضادات الحيوية وخاصة *Azithromycin* للخلص من التلوث واتخاذ الإجراءات الصحية في عملية التلقيح الاصطناعي واستخدام المعقمات والمطهرات للأدوات 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

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).

المكونكي ووسط الاكار المغذي ثم حضنت بعد اجراء الفحوصات المظهرية والمجهرية بصيغة كرام وفحص الحركة ثم اجريت الاختبارات الكيموحيوية وحسب (8). كما اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية 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 للاعفان باخذ جزء من الغزل القطري من حافة النمو بواسطة نقل معقوف النهائية 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 للكثايز 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 المكونكي ناعسة، لماعة، شفافة ومخمرة لسكر اللاكتوز ومنتجة لـ 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 للكثايز وموجبة لاختبار المثيل الاحمر (MR) في حين كانت سالبة لاختبار استهلاك السترات وتفاعل فوكس بروسكاور (VP) والاكسيديز 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 جرثومتى *B. subtilis* و *S. aureus* معاً في 9 قصبات (7.63%) كما سجل وجود جرثومتى *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 والكازين وموجبة لاختبار تميع الجيلاتين ومخمرة للسكريات مثل الكلوكوز والمانيتول والزايلوز والارابينوز وسالبة لاختبار الاندول واختبار انتاج السيدينيز 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 محلة للدم من نوع بيتا على اكار الدم اما على وسط المانيتول الملحي فقد ظهرت المستعمرات دائرية الشكل ناعسة ومحدبة صفراء ذهبية اللون مخمرة للمانيتول محولة

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) وتحتفظ هذه القصبات مجمدة في سائل التبرزين بدرجة حرارة - 196 °م 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 (30 و 31).

عولجت هذه المشكلة (تلاوث القصبات) بإضافة المضادات الحيوية مثل البنسلين مع الستربتوميسين مما أدى إلى تقليل التلوث ، إلا أن معظم البكتيريا اكتسبت مقاومة لهذه المضادات لأنها غير فعالة ضد الكثير من الجراثيم مثل *Corynebacterium* ، *Pseudomonas* ، *Vibrio* ، *Brucella* ، *Mycobacterium* ، *Mycoplasma* ، *Ureaplasma* ، *Hemophilus* وأن معظم هذه الجراثيم قد اكتسبت مقاومة (4) و (5).

ان 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* و *Cryptococcus neoformans* والتي تسبب تغير الدالة الحمضية pH لتلك القصبات ان تكون الملوثات موجودة بكمية في مهبل الإناث قبل التلقيح فتسبب التلوث (6 و 7) .

وفي العراق حيث يستخدم الاطباء البيطريين قصبات التلقيح (بنوعها المستوردة والمحلية) على نطاق واسع في تئاسل الابقار فقد لوحظ في الأونة الاخيرة التوجه

الى القصبات المستوردة وترك القصبات المحلية (لأسباب غير معروفة) الا ان مشكلة الانحاص غير الناجح لا زالت مستمرة كما ان نسب الانتهابات والتلوث على جدي في تلك القطعان، ونظرا لقلّة الدراسات في هذا الجانب فقد صمم هذا البحث لتسليط الضوء على اهم الملوثات الجزيئية والفطرية لقصبات التلقيح المستخدمة ميدانياً معرفة مدى مقاومة تلك الميكروبات للضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل:

جمعت 118 قصبية لتلقيح مستوردة من مصادر مختلفة من بغداد (السوق المحلية وبعض العيادات البيطرية) لفترة من كانون الاول 2011 لغاية شباط 2012 ونقلت مباشرة الى مختبر وحدة الامراض المشتركة / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد باستخدام حاوية خاصة مجهزة بالثلاجات الجافة. زرع كل قصبية في 10 مل في كل من مرق نقيع القلب والدماغ (BHI) (Brain heart infusion) من انتاج شركة Himedia) الهندية وقرق (TSB) (Trypticase (Becton Dickinson) شركة (Soya broth) الامريكية لغرض التحري عن المسميات البكتيرية وكذلك مرق (SDB) (Sabouraud dextrose) (broth) شركة (Himedia) الهندية والمضاد اليه المضاد الحيوي الكلورامفينيكول بنسبة 100 ميكروغرام/مل للتحري عن الفطريات ثم حسنت بدرجة حرارة 37 °م لمدة 48-24 ساعة لكل من مرق (BHI) و (TSB) ولمدة (5-7) ايام بالنسبة لمرق (SDB) بدرجة حرارة (25-21) °م. بعدها زرع على أنفيل جروموي من كل من مرق (BHI) و (TSB) ثلاث انواع من الاساط الزرعية وفي اكل الدم ووسط

lis
قص
عط
الق
) اه

بشدة
أبوا
في
وتفا
والد
للبد
والا
البد
موض
اد
تحت
بشكل
للدم
المعد
ومعد

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 بيتا	تحلل الدم	+	تخمير اللاكتوز	-	التخمير اللاهوائي
متباين	تحلل الـ DNA	-	استهلاك المسترات	+	استهلاك المسترات
+	انتاج الكاتاليز	+	انتاج الكاتاليز	-	انتاج انزيم الليستينيز
+	انتاج الكوكليوليز	+	انتاج الاندول	+	اختزال النترات
+	تخمير المانيتول	-	تفاعل (VP)	+	تفاعل (VP)
+	تخمير السكرور	+	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 الكازين
+	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 التثبيط 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 تبين 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

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

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

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

الأعفان	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	

وقد أظهرت 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 أنوية متعددة حاملة للأبواغ متفرعة ذات لون أخضر. أما عفن *Alternaria* فقد ظهرت مستعمراتها على الأوساط الزرعية مميكة القوام ذات اللون خضراء، أسود 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 أخضر غامق عند اليوم السابع وذات قوام زغبي (Fuzzy). وفي مجال عزل الخمائر، فلم تعزل أي خمائر تذكر في هذه الدراسة من قصبات التلقيح.

المنافسة:

إن القصبات المستخدمة لأغراض التلقيح الاصطناعي في الماشية والمصنعة محلياً هي أقل كفاءة من تلك المستوردة حسب ما يراه معظم الأطباء البيطريين في العراق إلا أن القصبات المستوردة بطبيعتها أو عن طريق الاستخدام الخاطئ قد سببت في الآونة الأخيرة خسائر اقتصادية كبيرة جراء التلوث الذي يسبب الالتهابات الحادة وقلة الخصوبة في الإقار وخاصة إقار الفريزيان والتي تشكل النوعية الجيدة المتواجدة في العراق وقد كشفت نتائج دراستنا وجود بعض الملوثات الجرثومية والفطرية في تلك القصبات والتي قد تعزى إلى طريقة الخزن الخاطئ وغير المطابق للمواصفات العالمية أو طريقة نقلها واستيرادها (براً أو جواً أو بحراً) أو التداول غير الصحي بين العيادات البيطرية وأماكن الشراء وغيرها من الأسباب التي تعزز وصول الملوثات المرضية التي تؤدي إلى قلة خصوبة الإناث، حيث أن وجود الملوثات يقلل

فعالية وحياة الحيامن وبالتالي يقلل من خصوبتها كما أن وجود الملوثات يسبب أضراراً مادية ناجمة عن الالتهابات وتكاليف العلاج الباهضة وغيرها. لقد أجريت العديد من التجارب والبحوث عالمياً لتحري عن وجود الملوثات المختلفة لقصبات التلقيح ولم تخلو تلك القصبات من وجود أنواع مختلفة من الجراثيم، فعلى سبيل المثال في الهند عزلت جراثيم *Moraxella bovis* من قصبات التلقيح الاصطناعي المجمدة في سائل التروحين من 13 قصبية مستخدمة لتلقيح إقار هولشتاين وقد تم تأكيد تلك العزلات باستخدام الزرع الجرثومي وإجراء مسحات مجهرية (سلايدات) لتلك القصبات (11)، كما أشار نفس الباحث إلى إمكانية عزل جراثيم كل من *Escherichia coli* و *Staphylococcus spp* و *Pseudomonas spp* من قصبات التلقيح المخزونة في سائل التروحين عند 196 م° والتي قد تلوث تلك القصبات وخاصة في مرحلة الجمع أو في أي مرحلة من مراحل معالجة الحيامن أو تخفيفها أو تعبئتها في القصبات قبل التخزين. وقد اتفقت نتائج دراستنا مع العديد من الباحثين (12) الذين أشاروا إلى وجود الكثير من الملوثات الجرثومية للقصبات، ففي الهند أجريت محاولة عزل البكتريا من 100 قصبية تلقيح أخذت من مركزي روهرى وكراشي الهندية للتلقيح الاصطناعي وقد تمكنوا من عزل كل من *Acinetobacter*, *Actinobacillus lignieris*, *Citrobacter*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus S. intermedius* و *epidermidis*. 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 أن تسبب الأمراض الخطيرة والخسائر الاقتصادية الكبيرة.

سجلا وجود عزلة فطرية واحدة وقد درسا مقاومة تلك الجراثيم لاربع مضادات حيوية وهي الامبيسلين والارثروميكسين والجنتاميسين والسبكتينوميكسين وقد أوضحنا ان جميع تلك الجراثيم كانت مقاومة للامبيسلين في حين كانت متوسطة الحساسية او حساسة لبقية المضادات.

وفي مجال الملوثات الفطرية لقصبات التلقيح فإن 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 والمحيطة في تلقيح الابقار باستخدام التعقيم والتطهير من قبل الطبيب البيطري المعالج وتنظيف وتعقيم كافة الانوات المستعملة لذلك الغرض كما ننصح بضرورة استخدام المضادات الحيوية وخاصة الازيثروميسين *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 *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Proteus spp.* وهي الاكثر شيوعاً وكذلك وجود بعض الفلورا الطبيعية في مهبل الاناث ولكن بدرجة اقل مثل *Pseudomonas* و *Klebsiella* و *Streptococcus* و *Bacillus* و *Corynebacterium*.

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 الحمضية pH مما يؤثر على الحمض النووي DNA للحيامن ويقلل خصوبتها. ومما يزيد من خطورة تواجد الجراثيم الملوثه 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 spp.* و *Bacillus* من قصبات التلقيح بعد اخراجها من حاوية التتروجين واذابة التجميد عنها وقد درست مقاومة تلك الاجنس للعديد من المضادات الحيوية مثل الجنتاميسين *Gentamycin* والتايولوسين *Tylosin* و النكوسيكين *Linco-spectin* وقد لاحظوا مقاومة تلك الجراثيم للمضادات المذكورة.

وقد اجرى 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 الامبيسلين *Ampicillin*، والارثروميكسين *Erythromycin* والجنتاميسين *Gentamycin* والسبكتينوميكسين *Spectinomycin* والتتراميسكلين *Tetracyclin* وقد بينوا ان جميع العزلات كانت مقاومة لعقار الامبيسلين فيما تبليغت حساسيتها لبقية المضادات، وفي دراسة اخرى اجراها الباحثان (18) في محاولة ايجاد التلوث الجرثومي لقصبات التلقيح الاصطناعي الفرنسية المنشأ فقد لاحظوا 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.; Roya, R.; López-Fernández, C.; Dieza, B.; Carabañob, M.J.; Fernández, 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.; Türütöğlu, H.; Kale, M.; Gülay, M.S. and Pehlivanoğlu, 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.