

عزل وتشخيص بعض الجراثيم المسببة لالتهاب الضرع تحت السريري في الأبقار

باسمة أحمد عبدالله^١، مدركة محمود حسن^٢ و عبد الستار سالم سعدون^٣

^١ قسم علوم الحياة، كلية العلوم، ^٢ فرع الطب الباطني، كلية الطب البيطري، ^٣ قسم الثروة الحيوانية، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الاستلام ١١ شباط ٢٠١٠؛ القبول ٣٠ حزيران ٢٠١٠)

الخلاصة

تم عزل وتشخيص انواع مختلفة من الجراثيم من عينات الحليب التي جمعت من ٢٠ بقرة سليمة ظاهريا ومن مناطق مختلفة في مدينة الموصل، ولفترة ما بين أيار ٢٠٠٧ الى أيار ٢٠٠٨. أجرى اختبار وايت سايد white side test على العينات للكشف عن التهاب الضرع تحت السريري. شخّصت العزلات اعتمادا على الفحوصات الشكلية والكيموحيوية للكشف عن الجراثيم. وظهرت النتائج ان النسبة الكلية لتواجد الجراثيم في الحليب بلغت (٨٠%)، سادت المكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط وكان اكثرها تكرارا افراد النوع Staphylococcus sciuri حيث بلغت نسبة عزلها (٢١.٥%) تلتها المكورات العنقودية الذهبية Staphylococcus aureus ونسبة (١٨.٧%)، ثم السبقيات Streptococcus spp. ونسبة (١٥.٦%) كما اعطت كل من العصيات المكورة والسالبة الكرام G^{-ve} coccobacill. وافراد النوع Arcanobacterium pyogenes النسبة (٩.٣%) واخيرا المكورات الدقيقة Micrococcus بنسبة (٣.١%). كما اظهرت النتائج ان Arcanobacterium pyogenes و Staphylococcus sciuri وبقية انواع CNS حساسية عالية تجاه المضادين الحيويين Chloramphenicol و Ciprofloxacin في حين أعطت مقاومة عالية للمضادين الحيويين Ampicillin و Penicillin G.

Isolation and identification of some bacteria causing subclinical mastitis in cows.

B. A. Abdulla¹, M. M. H. Al-Jammaly² and A.S. Sadoon³

¹Department of Biology, College of Science, ²Department of Internal and Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, Animal Resources Department, College of Agriculture and Forestry. University of Mosul, Mosul, Iraq.

Abstract

Isolation and identification of different type of bacteria from milk samples of 20 clinically healthy cow from different area in Mosul city between the period from May 2007 to May 2008 was carried out. The quality of the milk was screened using white side test. Identification of the isolate was carried out depend on the morphology of colony and biochemical test. The results indicated that total percentage of the infectivity of milk was (80%). The coagulase negative Staphylococci (CNS) was dominant. The more frequent from them was Staphylococcus sciuri which was (21.8%) followed by Staphylococcus aureus (18.7%), Streptococcus spp. (15.6%) then G^{-ve} Coccobacill, Arcanobacterium pyogenes (9.3%) and Micococcus (3.1%). Staphylococcus sciuri and CNS were more sensitive to Chloramphenicol and Ciprofloxacin but resistance to Ampicillin and Penicillin G.

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

المقدمة

جهاز الدوران او دخولها من خلال جلد الضرع والحلمات ومن ثم يتم تكاثرها ونموها مؤدية الى حدوث الالتهاب (٢،١) وتشمل هذه الممرضات الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام، وتعد جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط من

يعد التهاب الضرع من اهم الامراض الذي يصيب الغدد اللبنية للابقار عند غزوها بالممرضات التي تصل أمامن طريق

في الحليب بدون اي ظواهر غير طبيعية على الحليب او الضرع هذا بالاضافة الى الالتهاب المزمن (٩). ونظرا لاهمية هاتين الجرثومتين في احداث هذا المرض خصوصا الجراثيم السالبة لاختبار التجلط والتي اكتشف دورها اخيرا في احداث العديد من الامراض سواء كان للانسان او الحيوان وعلى الرغم من كونها من النبيت الطبيعي حاولت دراستنا ان تلقي الضوء على هذه الجراثيم ومعرفة مدى اهميتها في احداث هذا الالتهاب.

المواد وطرائق العمل

جمعت (٨٠) عينة حليب من ابقار سليمة ظاهريا تراوحت اعمارها ما بين سنتين الى خمس سنوات اتبعت شروط النظافة والتعقيم عند جمع العينات اذ تم التخلص من الدفعات الاولى للحليب ووضع مقدار (١٠-٢٥) مل من الحليب في قناني معقمة بعدها نقلت الى مختبر البحوث في فرع الطب الباطني والوقائي واجريت عليها اختبارات التهاب الضرع (١٠)، وقد اعتمد على اختبار وايت سايد White side test وذلك بمزج قطرتين من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز ٥% مع خمس قطرات من عينة الحليب المراد فحصها على سطح شريحة زجاجية وبعد (٢٠-٢٥) ثانية قرأت ودونت النتائج (١١). لقع وسط اكار الدم بحملة لوب من الحليب ونشرت على وسط اكار الدم، حضنت الاطباق في درجة حرارة ٣٧°م ولمدة ٢٤ ساعة، نقلت المستعمرات المفردة المنتجة على الاوساط الانتخائية كوسط هويل ووسط المانتول ووسط ادور ومن ثم اجريت الاختبارات الشكلية والكيموحيوية والفسلجية على العزلات لغرض تصنيفها وتحديد نوع الجراثيم واخيرا اجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (١٢).

النتائج

اوضحت النتائج ان عدد عينات الحليب المصابة ٦٤ عينة من ٨٠ عينة مأخوذة من ٢٠ حيوان ونسبة (٨٠%) اما عدد العينات غير المصابة بالتهاب الضرع تحت السريري فكان ١٦ عينة من ٨٠ عينة ونسبة (٢٠%) (الجدول ١). وقد اظهرت العزلات الموجبة لصبغة كرام اعلى نسبة توزعت على عدة انواع مختلفة شكلت فيها الخيطيات القبحية Arcanobacterium pyogenes نسبة (٩.٣%) في حين اعطت المكورات العنقودية السالبة لاختبار التجلط اعلى نسبة من بين هذه العزلات (٤٠.٦%) توزعت على عدة اجناس كانت اعلاها جراثيم Staphylococcus sciuri وقد بلغت (٢١.٨%) (الجدول ٢).

الممرضات الثانوية لمرض التهاب الضرع في الابقار مقارنة بالممرضات الرئيسية وتعزل من حليب الابقار لوجودها على جلد الحلمات ولقدرتها على استيطان قناة هذه الحلمات مسببه التهاب بسيط للغدد اللبئية مع زيادة في اعداد الخلايا البيض في الحليب دون وجود اي علامات سريرية للالتهاب (٣)، وتعد افراد النوع Staph.Sciuri من الانواع المهمة اذ تنصف بسعة انتشارها وتعايشها مع بعض الحيوانات مثل الكلاب والقطط والدجاج والابقار والاعنام والخيول، اذ تعد هذه الجرثومة حيوانية المنشأ وعلى الرغم من ذلك فهي تسبب العديد من الامراض للانسان (٤،٥) افرادها موجبة لصبغة كرام تترتب بشكل مفرد او مجاميع غير منتظمة احجامها مختلفة وغير متحركة ولا تكون ابواغ درجة الحرارة المثلى لنموها ٣٧°م وتمتاز بقابليتها على تخمير العديد من الكربوهيدرات فضلا عن اختزال النترت الى نترات مع انتاج خميرة الكاتاليز والاكسيديز والفسفاتيز القاعدي الا انها لا تنتج اليوريز وتتباين في قدرتها على انتاج خميرة DNase و خميرة B. galactoside و B. glucuronidase. تنمو بشكل افضل على وسط اكار الدم الصلب وتتميز مستعمراتها بصغر حجمها مع اعطاء اللون الابيض الكريمي فضلا عن اعطاء بعض عزلاتها قواما لزجا ناتج عن افرازها مادة هلامية لزجة. تتفاوت في قدرتها على تحلل الدم وتفضل وسط كولومبيا المضاف اليه دم الاعنام كوسط انتقائي لتحقيق نمو الجرثومة (٦)، تمتاز هذه الجراثيم بامتلاكها العديد من عوامل الضراوة حيث تتمثل بعدد من الخمائر والذيفانات مثل، Lipase, Leucocidin, Haemolysin, DNase, Protease و Lecthinase مما ساعدها على احداث العديد من المشاكل الصحية في الانسان كالتهاب الجروح والتهاب البريتون، فضلا عن ان الجرثومة تسبب العديد من المشاكل الاقتصادية حيث سجلت العديد من حالات الاصابة المرضية في الحيوانات كالتهاب الضرع في الابقار (٧)، ومن الجراثيم التي لها دور مهم في التهاب الضرع هي Arcanobacterium pyogenes التي تعد جراثيم طبيعية تتواجد في العديد من الحيوانات وتعد انتهائية لحدوث المرض اذ تدخل الجسم وتسبب العديد من الامراض القبحية مثل التهابات الكبد والتهاب الضرع في الابقار والتهاب الرئة والتهاب المفاصل في الخنازير (٨). يأخذ التهاب الضرع في الابقار اشكالا متعددة منها الشكل فوق الحاد الذي يتميز بوجود علامات الورم والحرارة وفقدان الوزن والشهية وقد تتطور الحالة الى تجرثم الدم وبالتالي الى موت الحيوان. اما الشكل الحاد يتميز بكل العلامات الظاهرة للالتهاب بالاضافة الى بعض الاضطرابات الجهازية اما الالتهاب تحت الحاد فهو التهاب خفيف ولا توجد هناك علامات جهازية. اما الالتهاب تحت السريري فلا تظهر اي علامات سريرية على الحيوان لكن هناك دلائل على حدوث الالتهاب مثل ارتفاع الخلايا الجسمية Scc Somatic cell count

الجدول (٢) النسبة المئوية لتواجد المكورات العنقودية السالبة لاختبار التجلط والمسببة لالتهاب الضرع تحت السريري في الابقار في ٨٠ عينة حليب.

النسبة المئوية %	عدد العزلات	الاجناس المعزولة
٥٣.٨٤	١٤	Staph.sciuri
٢٣.١٩	٥	Staph.epidermidies
٣٨.١٥	٤	Staph.saprophyticus
٨٤.٣	١	Staph.hyicus
٨٤.٣	١	Staph.chromoyenes
٨٤.٣	١	Staph.xlosus

كما تم اجراء فحص الحساسية لبعض العزلات المنتخبة تجاه بعض المضادات الحيوية وقد وجد بان معظم هذه السلالات حساسة للمضادين الحيويين Ciprofloxacin و Chloramphenicol ومقاومة للمضادين الحيويين Ampicillin و Penicillin G (الجدول ٤).

الجدول (١) النسب المئوية للجراثيم المعزولة من التهاب الضرع تحت السريري في ٦٤ عينة حليب.

الاجناس المعزولة	عدد العزلات	النسبة المئوية %
Coagulase Negative Staphylococcus	٢٦	٤٠.٦
Staphylococcus aureus	١٢	١٨.٧
Streptococcus spp.	١٠	١٥.٦
Arcanobacterium pyogenes	٦	٩.٣
G ^{ve} Coccobacilli	٦	٩.٣
Micrococcus spp.	٢	٣.١
Candida spp.	٢	٣.١
المجموع	٦٤	

وقد حسبت النسب بالنسبة الى عدد المكورات العنقودية السالبة للاختبار وكانت نتائج الاختبارات الشكلية والكيموحيوية التي اجريت على بعض هذه العزلات مطابقة لما ورد في انظمة التشخيص المعتمد (١٢،١١) (الجدول ٣).

الجدول (٣) الاختبارات الكيموحيوية للاجناس الجرثومية المعزولة من التهاب الضرع تحت السريري في الابقار.

الانواع الجرثومية	catalase	Oxidize	Coagulase	Pigment	Slime	DNase	Urease	Vp	Gelatinase	Nitrate	Glucose	Lactose	Maltose
Arcanobacterium pyogenes	-	-	/	-	-	/	d	/	+	-	+	d	d
Staph.sciuri	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	d
Staph.epidermidies	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	d	+
Staph.saprophyticus	+	-	-	d	d	+	+	d	d	+	+	+	+
Staph.hyicus	+	-	d	-	+	+	d	-	d	+	+	+	-
Staph.chromogenes	+	-	-	d	d	+	+	-	d	+	+	+	d
Staph.xylosus	+	-	d	+	+	+	+	d	+	+	+	d	d
Staph.aures	+	-	+	+	d	+	+	d	+	+	+	+	+

(+) موجبة للاختبار، (-) سالبة للاختبار، (d) متغير.

المناقشة

اظهار اي علامات سريرية وبذلك تكون الدراسة متفقة مع (١٣)، كما اظهرت الدراسة بان اختبار وايت سايد ذو كفاءة عالية في التشخيص وهذا يؤكد ما جاء به (١٠) فضلا عن كونه سهل وسريع وغير مكلف. اظهرت نتائج العزل الجرثومية وجود ٦٢ عزلة جرثومية عائدة الى اجناس مختلفة وقد سادت الجراثيم الموجبة لصبغة كرام على السالبة اذ اعطت الخيطيات نسبة 9.3% وبذلك اتفقت الدراسة مع دراسة كل من (١٥،١٤) على الجاموس في ان الجراثيم الموجبة يكون المسبب الرئيسي لالتهاب الضرع سواء كان في الابقار او الجاموس

لوحظ من خلال هذه الدراسة بان نسبة الإصابة تحت السريرية لالتهاب الضرع في الابقار كانت مرتفعة نوعا ما ويعزى السبب في ذلك الى علاج حالات الإصابة السريرية بالمضادات الحيوية وعدم استمرار العلاج يحول الحالة السريرية الى حالة تحت السريرية وذلك باختفاء علامات الالتهاب او قد يكون السبب هو وجود بعض الانواع الجرثومية المتمثلة بـ CNS لها القدرة على احداث المرض من دون

اذ تتعاون جميعها على تحطيم الخلايا الطلائية والبلعمية وبذلك تحدث الالتهاب وخصوصا في حالة وجودها بكميات كبيرة (٨).

وتعود امراضية هذه الجرثومة الى امتلاكها عدد من الخمائر مثل heamolytic exotoxin, neuraminidase, protease dermonecrotic exotoxin فضلا عن وجود عوامل فوعة أخرى مثل Pyloisin(PLO) و cholesterol-dependent cytolysin (CDC)

الجدول (٤) النسبة المئوية لحساسية ومقاومة بعض العزلات للمضادات الحيوية.

Erythromycin E ₁₀		Ciprofloxacin Cip ₅		Chloramphenicol C ₃₀		Penicillin G P ₁₀		Ampicillin Am ₂₅		العدد	نوع الجرثومة
R	S	R	S	R	S	R	S	R	S		
٤	٨	٣	٣	٢	٤	٢	٤	٣	٣	٦	Arcanobacterium Pyogenes
٦	٦	٣	٩	٤	٨	١٣	٠	١٢	٠	١٢	Staph.aureus
٧	٧	٥	٩	٤	١٠	١٤	٠	١٤	٠	١٤	Staph.sciuri
٣	١	٢	٢	٢	٢	٤	٠	٤	٠	٤	Staph.sapropyticus
٣	٢	٢	٣	٢	٣	٥	٠	٥	٠	٥	Staph.epidermidies

(S) حساس (R) مقاوم Resistance.

جراثيم Staph.sciuri بعدم قدرتها على خميرة البوريز والجلاتينيز اذ لم تتمكن الجرثومة من سحب جزيئة ماء من الحامض الاميني الارجنين وازالة مجموعة الكربوكسيل من الحامض الاميني ornithine وبذلك تكون الدراسة مطابقة مع دراسة (٢٣). وقد اعتمد على اختيار الاوكسيديز للتمييز بين عزلات CNS حيث يعد هذا الاختبار من الاختبارات السهلة اذ يفرق مجموعة جراثيم Staph.sciuri والمنتجة لانزيم سايكوكروم C عن بقية انواع جراثيم CNS السالبة لهذا الاختبار وبذلك تتطابق مع ما ذكره الباحث (٢٢) وكذلك مطابقة لانظمة التشخيص المعتمدة والتي ذكرها (١١) وهذا ما يؤكد بان هذه الجراثيم ممرضة كما اظهرت الدراسة بان Staph.sciuri وبقية انواع CNS ابدت مقاومة عالية للمضادين الحيوي Ampicillin و Penicillin في حين اعطت حساسية عالية تجاه المضادين الحيويين Chloramphenicol و Ciprofloxacin وبذلك اتفقت الدراسة مع دراسة (٢٤) ومخالفة لدراسة (٢٥) اذ تتمثل طرق المقاومة بين الجراثيم بتغيير مكان الجين المقاوم من موقعه على الجينوم الجرثومي الى موقع آخر (٢٦).

الشكر والتقدير

تم دعم البحث من قبل كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.

سادت المكورات العنقودية بنوعها السالبة لاختبار التجلط والموجبة له على غيرها من الاجناس في احداث المرض وبذلك تكون الدراسة قد اتفقت مع دراسة كل من (١٦، ١٧) لكنها لا تتفق مع (١٨) في ان الجراثيم المعوية هي المسبب الرئيس لحالات التهاب الصرع تحت السريري وبنسبة (٣٤.٢%) وهذه النسبة اكثر من النسبة التي سجلت حاليا (١٨.٧%) وقد يعود الاختلاف في هذه النسبة الى الاختلاف ما بين منطقة وأخرى من حيث المناخ والجراثيم المتواجدة في البيئة المحيطة ويعود سبب سيادة المكورات العنقودية على غيرها لما تملكه من عوامل ضراوة بالاضافة الى قابليتها على انتاج السموم التي تعمل على تحطيم الغشاء المبطن للحلمة والغدد اللبينية واحداث الالتهاب (٢٠، ١٩). واطهرت نسبة عزل جراثيم CNS (٤٠.٦%) وهي نسبة مقارنة لما توصل اليها (١٦) واكثر مما سجله (٢١) الا انها اقل مما سجله (١٨) وكانت اكثر هذه العزلات تكراراً هي Staph.sciuri اذ كانت نسبتها (٨.٢١%) وبذلك تكون الدراسة غير متفقة مع دراسة كل من (٢١، ١٧).

اجري اختبار التجلط لتمييز انواع Staph.aureus عن بقية الانواع التابعة لهذا الجنس واطهرت النتائج من خلال الجدول ٣ عدم قدرة جراثيم CNS من ضمنها جراثيم Staph.sciuri على انتاج هذا الانزيم وبذلك اتفقت الدراسة مع دراسة (٢٢). كما لوحظ بان بعض الاجناس من CNS تمتلك عدد من عوامل الضراوة المتمثلة بقابليتها على انتاج بعض الخمائر المتمثلة بخميرة البوريز والجلاتينيز والحال الدموي، في حين اظهرت

- In:world Buffalo congress, 5., coserta anais Caserta;1997-b. pp.635-638.
15. Langoni H, Domingues PF, Molero Filho JR, Baldini S. Etiologia sensibilidade bacteriana da mastite subclinical em bufalos (Bubalus bubalis) ARS veterinaria-2001;17(3):213-217.
 16. Shitandi A, Anakolo G, Galgalo T, Mwangi M. Prevalence of bovine mastitis among small holder dairy herds in kenga. Ls Vet Med Associ J. 2004;59(12):100-112.
 ١٧. ابتهاج نوفل محمود. دراسة جراثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط (CNS) Coagulase-Negative staphylococcus في حالات التهاب الضرع تحت السريري في الإبقار. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.
 18. Kudinha T, Simango CI. Prevalence of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis in zimbabwe. J S Afr Vet Assoc. 2002;73(2):62-65.
 19. Jones GF, Ward GG. Cause, occurrence and clinical signs of mastitis and anorexia in cows in awiscon in study. JAVMA. 1989;8:1108-1113.
 ٢٠. زوره، خزعل ثجيل. دراسة بعض الجوانب السريرية والبكتريولوجية لمرض التهاب الضرع في الإبقار. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، ١٩٧٩.
 21. Waage S, Mork T, Poros A, Aasland D, Hunshamar A, Odegaard, SA. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. J Dairy Sci. 1999;82:712-714.
 22. Sitta A, Lin J, Morrison D, kolawole D. Isolation and molecular characterization of multiresistant staphylococcus sciuri and staphylococcus hemolyticus associated with skin and soft tissue infections. J Med Microbiol.2004;53:51-55.
 23. Costa EO, Benites NR, Guerra JL, Melville PA. Antimicrobial suscepability of staphylococcus spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. J Vet Med B. 2000;47:22-103.
 ٢٤. القس، عمار يوسف مكرم: عزل وتشخيص الجراثيم الموجبة لصبغة كرام المسببة لالتهاب الضرع في الجاموس في محافظة نينوى اطروحة ماجستير كلية الطب البيطري. جامعة الموصل ٢٠٠٥.
 25. Uppal SK, Singh KB, Bansal BK. Antibioqram of bacteria isolation from clinical and subclinical cases of mastitis in buffaloes. Buffalo J. 1998;2:253-258.
 26. Teuber M. Veterinary uses and antibiotic resistance. Microb. 2001;4:493-499.
 1. Blood DC, Radostitis OM. Veterinary medicine:Textbook of the disease of cattle, sheep, pig, goats and horses. 7th ed, London, Baillere & Tindall;1989.p: 40-41.
 2. Heringstad B, Chang YM, Granoia D. Genetic association between animals susceptibility to clinical mastitis and protein yield in Norwegian dairy cattle. J of dairy Sci. 2005;88:104-1514.
 3. Gentilini E, Denamid G, Betancor A, Reuelto M, Fermepin MR, Detorres RA. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. J Dairy Sci.2002;85:1913-1917.
 4. Igimi SJ, Atobe Y, Tohya Y, Inoue E, Takahashi E, Konishi S. Characterization of the most frequently encountered staphylococcus SPP. In Cats Vet Microbiol. 1994;39:255-260.
 5. Daki I, Morisson D, Vukovi D, Savi B, Shittu A. Isolation and molecular characterization of staphylococcus sciuri in the hospital enviroment. J Clin Microbial. 2005;43(6):2782-2785.
 6. Stepanovic S, Daki T, Morrison D, Haus T. Identification and Characterization of clinical isolation of members of the staphylococcus sciuri groups. J Clin Microbial. 2005;43(2):956-958.
 7. Pengov T. The role of Coagulase negative staphylococcus SPP and Associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. J Dairy Sci.2001;84:572-574.
 8. Stefani T, Rudnick B, Helen Jost Stephen J. Billington Transcriptional regulation of pyolysin production in the animal pathogen, Arcanobacterim pyogenes Available online at www.sciencedirect.com. Vet Microbi. 2008;132:96-104.
 9. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical veterinary Microbiology. Mosby, Elsevier Limited, London;2004. P.118-126.
 10. Coles EH. Veterinary clinical pathology, 3rd edition, W.B. Saunder company, Philadelphia;1980. pp: 438-354.
 11. Collee J, Marmion BP, Fraser AC, Simmons A. Mackie Mccartney practical medical microbiology 14th ed., Churchill Livingstone, New York;1996. pp: 245-258.
 12. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic microbiology, 5th ed. Lippincott-Raben publishers Philadelphia;1997. pp.132-134.
 13. Pyorala S. New strategies to prevent mastitis. Repod Dom Anim. 2002;37:211-216.
 14. Costa EO, Garino JRF, Watanabe ET, Ribeiro AR, Vezon P, Baruselli PS, Paske A. Study of mastitis among ten dairy buffaloes herds (Bubalus bubalis) in the vale do Ribeira, sao Paulo, Brazil.