دراسة جرثومية وجزيئية لالتهاب الأمعاء النخري عند الدجاج

د. مأمون الأمير * د. سامر إبراهيم **

(الإيداع: 4 آيار 2020، القبول: 5 تشرين الأول 2020)

الملخص:

هدفت هذه الدراسة للتقصي عن جراثيم المطثية الحاطمة عند طيور دجاج تعاني من التهاب الأمعاء النخري وأخرى سليمة وذلك من خلال عزل وتحديد المطثية الحاطمة والكشف عن وجود مورثات الذيفان ألفا في العزولات ودراسة الواقع الحقلي للقطعان المدروسة.

أظهرت نتائج عزل وتنقية الجراثيم وجود المطثية الحاطمة في 17.47% من العينات المدروسة، وقد أظهرت نتائج تفاعل البوليمراز المتسلسل PCR وجود مورث الذيفان ألفا عند جميع العزولات المأخوذة من الطيور السليمة والمصابة بالمرض، وقد كانت الديوك أكثر إصابة بالتهاب الأمعاء النخري من الفرخات وكذلك دجاج اللحم بالنسبة للأمات.

وإن عدم وجود دراسات عن المطثية الحاطمة عند الدجاج في سوريا يتطلب المزيد من الأبحاث في المستقبل للتقليل من الخسائر الاقتصادية في قطاع الدواجن.

الكلمات مفتاحية: المطثية الحاطمة، التهاب الأمعاء النخري، الذيفان ألفا.

* طالب دراسات عليا- دكتوراه في قسم الأحياء الدقيقة - كلية الطب البيطري بجامعة حماة-سورية.

** استاذ دكتور التشخيص المخبري - كلية الطب البيطري بجامعة حماة- سورية.

Bacteriological and Molecular Study of Necrotic Enteritis in the Chickens

Dr. Mamon AL AMIR* Dr. Samer Ebrahim**

(Received:4 May 2020, Accepted: 29 September 2020)

Abstract:

This study has investigated Clostridium perfringens infection for birds suffering from necrotic enteritis as well as healthy birds through isolating and identifying Clostridium perfringens beside discovering the existence of alpha toxin gene in isolates and studying the disease field condition.

The results showed that Clostridium perfringens are existing in %17.47 of the samples. The PCR results showed the existence of alpha toxin gene in all the isolates that were collected from both infected and healthy birds. Male birds are more exposed to infection when compared to female ones as of necrotic enteritis.

Having no specific studies on Clostridium perfringens on birds in Syria requires more dedicated researches in next future in order to minimize the economic losses in poultry industry.

Keywords: Clostridium perfringens, necrotic enteritis, alpha toxin.

***PHD student, Microbiology Department, Veterinary Faculty- Hama University**

**** Professor of Laboratory Diagnosis, Microbiology Department, Veterinary Faculty- Hama University**

1- المقدمة Introduction :

تتواجد معظم أنواع المطثيات كجراثيم رمية غير ممرضة في الطبيعة عند الحيوانات والنباتات decaying vegetation ولكن يوجد ما يزيد على 25 نوعاً منها تعتبر من مسببات الأمراض الثانوية minor pathogens في حين أنه يوجد 13 نوعاً آخر تعتبر من مسببات الأمراض الرئيسة major pathogens وهذه الأخيرة تنتج بشكل إجمالي حوالي 59 نوع من الذيفانات الجرثومية المختلفة (Johansson et al.,2005)

وإن أكثر أنواع المطثيات المولدة للذيفان شهرة هي المطثية الوشيقية *C. botulinum* ، *المطثية الكزازية C.tetani* ، المطثية الحاطمة *C. perfringens* ، المطثية العسيرة *C. difficile* ، المطثة الشوفوية *C. chauvoei* (Hatheway, 1990; Schiavo & Montecucco, 1997).

وإن جنس المطثية يعتبر أكثر جنس جرثومي مولد للذيفان حيث تسبب المطثية الحاطمة (Clostridium Perfringens) العديد من الأمراض عند الإنسان والحيوانات الأهلية والبرية، وتعد المطثية الحاطمة المسبب الرئيس لالتهاب الأمعاء النخري عند الطيور الداجنة (Johansson et al.,2005) والذي يعتبر من أهم الأمراض التي تصيب قطعان دجاج اللحم وقطعان الحبش، وقد ازدادات خطورة المطثية الحاطمة على صحة الدواجن في الاتحاد الأوربي من خلال حدوث التهاب الأمعاء النخري بشكليه الحاد وتحت الحاد نتيجة لإلغاء استخدام المضادات الحيوية كمحفزات للنمو ومجموعة الأيونوفور كمضادات كوكسيديا (Johansson et al.,2004)

المطثية الحاطمة هي جراثيم إيجابية الغرام عصوية الشكل تشكل أبواغ بيضاوية قرب نهاية والتي تختلف عن معظم أنواع المطثيات في أن العصيات كبيرة نسبياً (0.6-2.4 x 1.3-9.0 µm) وغير متحركة (Cato et al., 1986)

تشكل المطثية الحاطمة مستعمرات مستديرة ملساء لامعة تحيط بها منطقة كاملة التحلل الدموي وذلك لقدرتها على انتاج الذيفان ثيتا theta-toxin ومنطقة خارجية غير كاملة التحلل والناتجة عن تأثير الذيفان ألفا alpha-toxin (Quinn *et al.*, 1994). وتصنف المطثية الحاطمة بأنها جراثيم لاهوائية أو دقية الهواء تنمو بوجود نسبة ضئيلة من الأكسجين (Quinn *et al.*, 1994) وتنمو هذه الجراثيم بدرجة حرارة تتراوح بين 12-50 مْ ، ويكون النمو بطيئ جداً عندما تنخفض درجة الحرارة دون 20مْ .(Adams & Moss, 1995) في حين أنها تنمو تحت الظروف المثالية (43-47)مْ بسرعة فائقة مع زمن تضاعف generation time يقدر بـ 8-10 دقائق ويصاحب هذا النمو انتاج وفير للغاز (Bryant & Stevens, 1997)، يتطلب نمو الجراثيم 13 حمض أميني أساسي وتنمو الجراثيم بدرجة PH تتراوح بين (5-8) ويجب أن تكون درجة النشاط المائي substrate water activity (0.93-0.97) ويمكن أن تعيش المطثية في ظروف قاسية وذلك بفضل التمايز من خلايا إنباتية vegetative cells إلى أبواغ ذات مقاومة عالية (Novak & Juneja,2002) إن الأبواغ الجرثومية هي أكثر أنواع الخلايا الحية المعروفة مقاومةً للحرارة والجفاف والحموض والعديد من المطهرات الكيميائية. تصنف أنواع المطثية الحاطمة C. perfringens إلى خمس أنماط رئيسية (A, B,C, D and E) وذلك حسب قدرتها على إنتاج أربعة ذيفانات رئيسة (alpha, beta, epsilon, iota) (Songer, 1996).

في عام 1941 وجد (MacFarlane & Knight, 1941) أن الذيفان ألفا يمتلك الخواص الأنزيمية للفوسفوليباز C (phospholipase C) وقد اعتبر حينها أن الذيفان ألفا هو الذيفان الرئيس القاتل للمطثية الحاطمة. وهو ذيفان متعدد الوظائف وينتج بكميات متفاوتة من عزولات المطثية الحاطمة حيث يسبب حلمهة (تميه) الدهون الفوسفاتية في غشاء الخلايا المختلفة مما يؤدي لانحلال الخلية أو حدوث أشكال سمية أخرى(Songer, 1997b; Titball, 1993).

تقع الجينات التي ترمز للذيفان ألفا والذيفان بيتا على الصبغي، وتقع العديد من الجينات التي ترمز للذيفانات أخرى تقع على البلازميدات الكبيرة large plasmids وقد استُخدم PCR بشكل واسع للكشف عن جينات الذيفان ألفا (cpa) (Clostridium perfringens alpha toxin gene) وذلك بسبب حساسيته العالية high sensivity (Brynestad & Granum, 1999)

2- هدفت هذ الدراسة إلى:

1- عزل وتحديد هوية جراثيم المطثية الحاطمة من الحالات المشتبه بإصابتها بالتهاب الأمعاء النخري في قطعان الدجاج ومن الأعورين لطيور سليمة.

2- الكشف عن وجود الجين المرمز للذيفان ألفا في العزولات المأخوذة من الطيور السليمة ومن الطيور المشتبه بإصابتها باستخدام PCR.

3- دراسة العوامل المؤثرة على الإصابة بالمرض حقلياً.

3- المواد وطرائق البحث Material & Methods

- المواد Material:

1- العينات: Samples

تم جمع العينات من مصدرين

المصدر الأول للعينات: من قطعان دجاج تظهر عليها أعراض الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري فقد تم جمع (166) عينة موزعة على الشكل التالي (143) عينة من طيور دجاج اللحم، (23) عينة من طيور أمات دجاج اللحم، كانت هذه الطيور إما نافقة حديثاً أو قد ذُبحت بعد الفحص وبعد تسجيل المشاهدات العيانية، كانت العينات على شكل مسحات من الغشاء المخاطي للجزء الأوسط من الأمعاء

المصدر الثاني للعينات: من قطعان دجاج اللحم لا تظهر عليها أعراض الإصابة وذلك بعمر 45 يوم فقد بلغ مجموع عدد العينات الكلي (80) عينة موزعة على 4 قطعان، جمعت العينات من محتويات الأعورين بعد الذبح.

والجدول (1) يوضح أعداد القطعان التي جمعت منها العينات والعدد الكلي للطيور في القطعان.

الجدول رقم(1): أعداد العينات وعدد القطعان وعدد الطيور في هذه القطعان

مصدر العينات	نوع القطيع	عدد العينات	عدد المزارع	عدد الطيور الكلي في القطعان
قطعان مصابة	دجاج اللحم	143	25	228092
	أمات دجاج اللحم	23	7	86279
قطعان سليمة	دجاج اللحم	80	4	31200

وقد حُرِص على جمع العينات بعد النفوق أو بعد الذبح بشكل سريع لتجنب غزو الجراثيم المعوية الهوائية المخيرة الأخرى (Quinn et al.,2004).

2- الأوساط الزرعية المستخدمة في العزل الجرثومي:

استخدمت الأوساط الزرعية التالية في مراحل العزل الجرثومي:

1- وسط الثيوغليكولات Thioglycolate medium:

استخدم لإكثار الجراثيم التي تحتاج إلى مواد تغذوية معقدة وخاصة الجراثيم اللاهوائية كونه وسط مختزل للأوكسجين، يمكن أن يستخدم لتنمية المطثية الحاطمة ولحفظ مستعمرات نقية بعد العزل (Quinn et al.,2004) وقد تم تحضير الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Himedia-India)

2- مرق نقيع المخ والقلب Brain Heart Infusion:

وسط سائل غني يستعمل في إنماء وإكثار الجراثيم التي تحتاج إلى مواد تغذوية معقدة وقد تم تحضير الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Himedia-India)

3- وسط SPS: (Sulphite Polymyxin Sulfadiazine)

أبتكر هذا الوسط من قبل العالم أنجيلوتي Angelotti في عام 1962م يمكن أن يضاف إلى هذا الوسط صفار البيض للكشف عن قابلية تحليل اللستين حيث تظهر مناطق شفافة حول المستعمرات النامية إذا كانت محللة للستين (Angelotti et al.,1962) وقد تم تحضير الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Himedia-India)

4- وسط أغار المطثيات Clostridial agar:

يستخدم هذا الوسط لعزل المطثيات الممرضة من النبيت المختلط الموجود في الأمعاء وذلك لاحتواء وسط الزرع على سلفات النيوميسين Neomycin Sulphite وأزيد الصوديوم Sodium Azide وقد تم تحضير الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Himedia-India).

5- وسط الآجار المدمم: Blood Agar

يعتبر الآجار المدمم المحضر بشكل طازج وسط مناسب للعزل الأولي للمطثية الحاطمة، تم تحضير الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Himedia-India) بإضافة 5 % من دم الأغنام منزوع الفبرين إلى وسط أساس الآجار المدمم. يعد هذا الوسط من المنابت المغنية والتفريقية أيضا يستخدم من أجل تنشيط العزولات وكذلك للكشف عن مقدرة الجراثيم على تحليل كريات الدم الحمراء.

- **طرائق العمل:**

1- أخذ العينات:

أخذت العينات بواسطة ماسحة قطنية من الغشاء المخاطي للجزء الأوسط من الأمعاء للطيور المصابة بالتهاب الأمعاء النخري أو من الأعورين للطيور السليمة وتم إرسالها للمخبر بحافظة مبردة مع الثلج.

وتم أخذ قطعة من الأمعاء حفظت بالفورمالين 10% لدراسة التغيرات النسيجية في الأمعاء.

2- الفحص المجهري المباشر:

أخذت مسحات مباشرة من الأنسجة المصابة في الأمعاء وصبغت بصبغة غرام للكشف عن عصيات إيجابية الغرام كبيرة الحجم والتي تميل لعدم التلون عند التبوغ.

اعتُبِر وجود أعداد كبيرة من عصيات إيجابية الغرام ثخينة في لطخة مباشرة من مخاطية الأمعاء الدقيقة دليل افتراضي على الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري (Quinn et al.,2004).

3- عزل وتنقية وتحديد هوية الجرثوم :

زرعت كل عينة على **وسط مرق الثيوغليكولات** لإكثار جراثيم المطثية الحاطمة حيث تم تسخين وسط الثيوغليكولات على الدرجة 85م لمدة 10 دقائق لطرد الأكسجين المنحل absorbed oxygen وبُرد بسرعة حتى الدرجة 37م ثم زرعت العينات و حُضن على الدرجة 37م لمدة 24-48 ساعة بعد ذلك أخذت مسحة من الوسط وصبغت بصبغة غرام للكشف عن وجود جراثيم المطثية الحاطمة ، وبعد الإكثار على وسط الثيوغليكولات أجري الزرع على وسط **الآجار المدمى** و على **وسط SPS** وعلى وسط **Clostridial agar** وقد تم دراسة الصفات المزرعية لجراثيم المطثية الحاطمة ومن ثم أخذت المستعمرات النقية مزروعة حديثاً و أجري لها اختبارات الكيميا حيوية لتأكيد التشخيص ومن ثم تم حفظت المستعمرات النقية من المطثية الحاطمة على **وسط الثيوغليكولات** في الدرجة -80م لإجراء مزيد من الاختبارات اللاحقة.

تم تحضين الأوساط المزروعة على الدرجة 37م لمدة 24-48 ساعة في ظروف لاهوائية وعلى العموم إن معظم المطثيات لاهوائية صارمة باستثناء المطثية الحاطمة فإنها محتملة للهواء نسبياً relatively aerotolerant ويفضل أن تنمى جميعها في ظروف لاهوائية صارمة مع جو يحتوي 2-10% CO_2 حيث أن ذلك يعزز نموها (Quinn et al.,2004) شكل رقم(1).

الشكل رقم (1): توضح التحضين في ظروف لاهوائية

4- الاختبارات الكيمياحيوية المستخدمة لتمييز المطثية الحاطمة

بعد الزرع على المنابت الصلبة التمييزية ودراسة الخواص المزرعية والشكلية أجريت اختبارات الكيميا حيوية على العزولات لتأكيد الإصابة وهي:

1- اختبار تحلل اللستين (Quinn et al., 2004)

أجري هذا الاختبار بإضافة صفار البيض بنسبة 5% إلى أحد منابت المطثية الحاطمة وقد أضيف صفار البيض في هذه الدراسة لوسط SPS وذلك للكشف عن قدرة العزولات على تحليل اللستين حيث تعتبر النتيجة إيجابية عند ظهور عتامة أو منطقة صافية حول المستعمرات (تغير في البريق حول المستعمرات) اعتمادا على الوسط المستخدم.

2- اختبار الليباز(Quinn et al., 2004)

تستخدم المنابت المضاف إليها مح البيض (صفار البيض)، حيث تظهر المستعمرات التي تملك إنزيم الليباز والقادرة على تحليل الشحوم بشكل طبقة لؤلؤية pearly layer أو قزحية Iridescent يمكن أن تغطي المستعمرات وفي بعض الحالات يمكن أن تمتد إلى الآجار المحيط.

3- اختبار تحلل الجيلاتين (Cruickshank et al., 1975)

يتألف من 12 % مادة الجلاتين مع الماء المقطر ويكون الوسط صلب عند الدرجة 4 وحتى 25°م ، ويستخدم لكشف الجراثيم المفرزة لأنزيم الجيلاتيناز وذلك بقدرتها على تحليل الجلاتين حيث يتحول الوسط الصلب إلى الشكل المائع بعد الزرع والتحضين بدرجة حرارة الغرفة

4- اختبار الاندول:Indole Reaction (Koneman et al., 1988)

ويتكون من وسط الماء الببتوني 1 % ويستخدم للكشف عن إنتاج غاز الاندول حيث يتشكل حلقة حمراء على سطح الوسط عند إضافة كاشف كوفاك. إذا كانت الجرثومة لها المقدرة على تفكيك الحمض الاميني التربتوفان وإطلاق الغازو إن جراثيم المطثية الحاطمة سلبية الاندول.

5- وسط الحليب منزوع الدسم:Skim Milk media (Koneman et al., 1988)

حُضر بإذابة الحليب منزوع الدسم 5-10 غرام / 100 مليلتر ماء يضاف إليها 2.5 مل من كاشف حبيبات اللتموس المحضر سابقا. استُخدم للكشف عن الجراثيم المحللة لسكر اللاكتوز والتي تؤدي بالتالي لانخفاض حموضة الوسط مما يسبب تجلط بروتين الكازئين أسفل الأنبوبة وبما أن جراثيم المطثية الحاطمة منتجة للغاز فإنه سوف تؤدي إلى تكوين فجوات في هذه الخثرة المتكونة مع انتشار جزء من الخثرة على جوانب الأنبوبة مكونة ما يسمى بالتخمر العاصف Stormy Fermentation.

6- اختبار تخمر السكاكر :(Koneman et al., 1988)

إن المطثية الحاطمة قادرة على تخمير سكاكر (الجلوكوز، اللاكتوز، السكروز، المالتوز) وقد تم تجهيز ماء الببتون الحاوي على 1% من السكر المختبر و وكاشف أندريد كمشعر PH وقد تم إضافة زيت البارافين على سطح المنبت من أجل النمو اللاهوائي.

7- اختبار ماءات البوتاسيوم KOH 3%

استخدمت للتفريق بين الجراثيم إيجابية وسلبية الغرام عند عدم ظهور نتائج واضحة بصبغة غرام، حيث انه عند مزج مستعمرات الجراثيم سلبية الغرام مع هذا المحلول يتكون مزيج حليبي مخاطي القوام بينما الجراثيم إيجابية الغرام لا تعطي هذا القوام. (Quinn et al., 2004).

تم دراسة الخواص البيوكيميائية للمستعمرات المشتبهة وعند تأكيد نوع الجراثيم حفظت العزولات بدرجة (-20مْ) لحين إجراء الاختبارات اللاحقة.

5- الصبغات المستخدمة:

استخدمت صبغة غرام لدراسة الأفلام المحضرة ودراسة الخواص الشكلية للجراثيم (Quinn et al., 2004).

6- دراسة التغيرات النسيجية المرضية:

أخذت عينات من الجزء الأوسط للأمعاء للطيور التي تظهر عليها أعراض الإصابة، وتم تثبيتها في الفورمالين المتعادل 10%، وتم تحضير الشرائح النسيجية، وصُبِغَت بصبغة الهيماتوكسيلين والأيوزين بطريقة (luna, 1968) وتم دراستها تحت المجهر

7- اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل للكشف عن جين الذيفان ألفا: (Baums *et al.*,2004)

تم استخلاص DNA من جراثيم المطثية الحاطمة المعزولة من الطيور وذلك باستخدام عتيدة منتجة من شركة (QIAmp (blood, body fluids, tissues وهي عتيدة متعددة الاستعمالات تستعمل لاستخلاص الدنا من الخلايا الجرثومية أو

خلايا الدم أو الخلايا النسيجية. أجري الاستخلاص طبقا لتعليمات الشركة المنتجة ثم حفظت المستخلصات على الدرجة – 20 لحين إجراء تفاعل PCR (Park et al.,2015).

أجري تفاعل PCR للمستخلصات بهدف الكشف عن مورثات الذيفان ألفا في عزولات المطثية الحاطمة وذلك باستخدام زوج من المرئسات الخاصة بجين الذيفان ألفا , 5-AGTCTACGCTTGGGATGGAA-3) (5- TTTCCTGGGTTGTCCATTTC-3 من أجل الكشف عن أنطقة دنا (DNA Band) ذات حجم 900 قاعدة آزوتية تدل على وجود جين الذيفان ألفا (cpa) وذلك مقارنةً مع معلم الوزن الجزيئي (100 bp DNA Ladder,PeqLab).

تم تحضير مزيج التفاعل في مكان نظيف ومعزول وباستعمال ماصات ورؤوس ماصات معقمة، وقد وضعت جميع المواد اللازمة للاختبار في أنبوب ابندورف معقم سعة 1.5مل موضوع فوق الثلج وتم توزيع 40 ميكرولتر من المزيج في أنابيب خاصة باختبار (Polymerase chain reaction) (PCR) سعة 200 µl وقد وشمل مزيج تفاعل PCR لكل عينة على المواد التالية:

المرئس الصاعد	1.00 µl	Alpha primer F(10 pmole/ µl)
المرئس الهابط	1.00 µl	Alpha primer R(10 pmole/µl)
مزيج التفاعل	25.00 µl	Ready Mix
ماء مقطر معقم خالٍ من الدناز	13.00 µl	Distilled water (Dnase free)
مجموع المزيج	40 µl	total

بعد توزيع مزيج التفاعل في كل أنبوب من أنابيب الاختبار أضيف 10 µl من قالب الدنا المستخلص سابقاً من عزولات المطثية الحاطمة إلى كل أنبوب على حده ليصبح الحجم الكلي للمزيج 50 µl.

نقلت الأنابيب المحتوية على مزيج التفاعل إلى جهاز المدور الحراري Thermocycler (Techne TC512) وتم تشغيل الجهاز بعد إعداد البرنامج الخاص بالاختبار للكشف عن الذيفان ألفا كما هو موضح في الجدول رقم(2).

الجدول رقم(2): برنامج تضخيم الدنا بوجود مرئسات خاصة بالكشف عن الذيفان ألفا

المرحلة	درجة الحرارة	المدة	عدد الدورات
مرحلة التمسخ الأولي Intial Denaturation	94مْ	5 دقائق	1
مرحلة التمسخ Denaturation step	94مْ	40 ثانية	35
مرحلة ارتباط المشرعات Primer-annealing step	52مْ	40 ثانية	
مرحلة الاستطالة وتضخيم الدنا DNA extension step	72مْ	30 ثانية	
مرحلة الاستطالة النهائية Final DNA extention	72مْ	2 دقيقة	1

بعد إتمام تفاعل البوليمراز المتسلسل، خضعت نواتج التفاعل للرحلان الكهربائي في هلامة الآجاروز، وبعد انتهاء الرحلان أخرج قالب الآجاروز بعناية مع اتخاذ كافة إجراءات السلامة ونُقِل إلى جهاز الإظهار بالأشعة فوق البنفسجية (UVipro platinum) المزود بكاميرا فيديو ومرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية وموصولة بجهاز كمبيوتر و طابعة حرارية حيث (ترتبط صبغة بروميد الاثيديوم بسلاسل الدنا وعندما تتعرض للأشعة فوق البنفسجية تصدر لمعانا).

3- النتائج:

تم فحص الطيور المصابة بالتهاب الأمعاء النخري والبالغ عددها (143) طائر من دجاج اللحم و (23) طائر أمات حيث أجري تشخيص أولي للمرض من خلال سير المرض وتسجيل الأعراض والصفات التشريحية ثم أخذت عينات من أمعاء الطيور وأجريت مسحات مباشرة للكشف عن وجود عصيات إيجابية الغرام بأعداد كبيرة في وسط الأمعاء وأجريت دراسة جرثومية لعزل المطثية الحاطمة وبعد العزل تم التحري عن وجود جين الذيفان ألفا في العزولات وكما أجري فحص نسيجي للعينات لتسجيل التغيرات المشاهدة.

أما العينات التي جمعت من طيور دجاج تسمين سليمة بعمر 45 يوم والبالغ عددها (80) عينة فقد تم التحري عن وجود جراثيم المطثية الحاطمة في الأمعاء(الأعورين) وإجراء الزرع الجرثومي وإثبات نوع العزولات بتطبيق اختبارات الكيميا حيوية اللازمة ومن ثم أجريت دراسة جزيئية بالكشف عن جين الذيفان ألفا.

أ- التشخيص الحقلي لمرض التهاب الأمعاء النخري عند الطيور من خلال الأعراض والصفات التشريحية:

ظهر على الطيور المصابة بالتهاب الأمعاء النخري أنها قليلة الحركة وتميل للخمول وكانت الفرشة شديدة الرطوبة شكل (2)، ولوحظ انتفاش الريش وتراجع استهلاك العلف وانخفاض الوزن وتراجع معامل التحويل وإسهال دائم أدى لحدوث تجفاف شكل (3)، وقد وجد الزرق مختلط بالغازات في معظم الحالات شكل (4) أو مختلط بالمخاط شكل (5) وفي بعض الحالات وجد علف غير مهضوم ولوحظ في الإصابات الشديدة تدلي الرأس والأجنحة شكل رقم (6) وقد تراوحت مدة الإصابة في معظم الحالات (3-7) أيام.

أما التغيرات التشريحية فقد لوحظ تغير في سماكة جدار الأمعاء حسب مراحل الإصابة ففي المراحل الأولى للإصابة شوهد زيادة في سماكة جدار الأمعاء وفي المراحل المتقدمة للإصابة بدت كل من العفج والصائم واللفائفي رقيقة الجدران وممتلئة بالغاز شكل رقم (7) وتظهر محتويات الأمعاء من الخارج وقد ترافقت بعض الحالات بتغيرات على الكبد بشكل بؤر وعقيدات تحت المحفظة وفي النسيج الحشوي إضافة لتغيرات في الكلية والأعورين وفي الحالات الشديدة كان النخر منتشر في الأمعاء الدقيقة ومغطى بغشاء كاذب أصفر شكل (8).

ولوحظ ترافق التهاب الأمعاء النخري مع بعض الإصابات مثل الإصابة بديدان اسكاريس الدجاج شكل رقم (9) أو الإصابة بداء الايميريا وهذا الأخير كان الأكثر ملازمة لالتهاب الأمعاء النخري.

الشكل رقم (2): فرشة شديدة الرطوبة نتيجة الإسهال

الشكل رقم (3): طائر يعاني من إسهال شديد نتيجة الإصابة

الشكل رقم (4): توضح زرق مختلط بالغازات

الشكل رقم (5): زرق مختلط بمخاط

الشكل رقم (8): تشكل غشاء دفتيري في حالة متقدمة

الشكل رقم (9): التهاب أمعاء نخري مترافق مع الإصابة بديدان الاسكاريس

الشكل رقم (6): تدلي الرأس والأجنحة

الشكل رقم (7) محتويات الأمعاء مختلطة بالغازات

نتائج الدراسة الجرثومية :

أظهرت نتائج الزرع الجرثومي للعينات وجود Clostridium perfringens في (17.47%) من عدد العينات الكلي.

وقد أظهرت المسحة المباشرة من مخاطية الأمعاء للعينات التي أخذت من طيور مصابة بالتهاب الأمعاء النخري وجود أعداد كبيرة من عصيات إيجابية الغرام كبيرة الحجم.

وقد أظهر النمو الجرثومي للـ Clostridium perfringens على وسط Blood agar مستعمرات ذات تحلل دموي مزدوج النطاق Double zone of haemolysis منطقة داخلية كاملة التحلل الدموي (تحلل بيتا Beta haemolytic) بفعل Theta toxin ومنطقة خارجية ذات تحلل دموي جزئي (تحلل ألفا Alpha haemolytic) بفعل Alpha toxin الشكل رقم (10) في حين أن الزرع على منابت SPS و TSC أظهر مستعمرات كبيرة، ملساء Smooth، ذات مركز أسود متناسقة regular، محدبة convex، معتمة قليلاً slightly opaque، ذات سطح محزز بشكل شعاعي flat radially striated ، و حدود رقيقة transparent border، ويمكن أن تكون المستعمرة ذات سطح خشن كورق العنب rough flat vine leaf colony ، مع ملاحظة أن اللون الأسود للمستعمرات قد اختفى عند تجاوز فترة 24 ساعة من الزرع حتى و إن حفظت المنابت في درجة حرارة البراد وتعتبر هذه النتيجة مهمة للباحثين في Clostridium Perfringens حيث يجب قراءة النتائج خلال 24 ساعة من الزرع على وسط TSC,SPS ويمكن أن تعاد القراءة بعد 48 ساعة من الزرع.

وقد أظهرت المسحات المأخوذة من هذه المستعمرات وجود عصيات إيجابية الغرام مفردة كبيرة تشبه أحياناً عربات القطار large boxcar أو سلاسل الخيزران bamboo chains ذات أبواغ بيضاوية قرب طرفية لا تسبب انثقاب الخلية الأم لا تصبغ بصبغة غرام الشكل رقم (11).

أظهرت اختبارات الكيمياحيوية على مستعمرات حديثة تبين أنها سلبية الكاتلاز والأوكسيداز وخمرت سكاكر (الجلوكوز، مالتوز ، لاكتوز، سكروز) شكل رقم (12) وقامت بتمييع الجلاتين و أحدثت التخثر العاصف في الحليب وقامت بتحليل الليستين.

وقد كانت نتائج الزرع الجرثومي من حيث الخواص الشكلية والمزرعية والاختبارات الكيميا حيوية متماثلة لعزولات Clostridium perfringens لكل من العينات المأخوذة من طيور مصابة و العزولات التي تم الحصول عليها من طيور سليمة

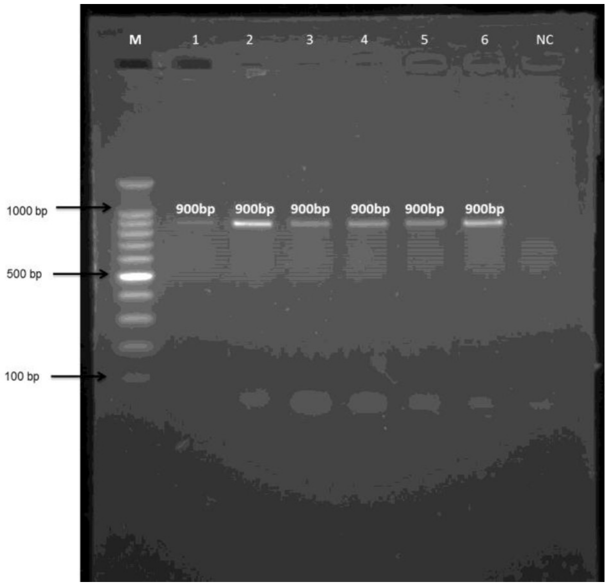
الشكل رقم (10): توضح التحلل الدموي للمستعمرات وسط آجار مدمى

الشكل رقم (11): توضح جراثيم المطثية الحاطمة – صبغة غرام- تكبير×100

الشكل رقم (12): توضح تخمير السكاكر

ب- نتائج الكشف عن الذيفان ألفا باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل:

بينت النتائج أن جميع العزلات المأخوذة من الطيور السليمة وجميع العزلات المأخوذة من طيور مصابة كانت إيجابية لجين الذيفان ألفا (900bp) شكل (15).



الشكل رقم (15) نتائج اختبار PCR للكشف عن وجود جين الذيفان ألفا في العزولات: يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزيئي، يشير العمود NC إلى الشاهد السلبي، العينات(4-1) عزولات مطثية حاطمة من طيور مصابة بالتهاب الأمعاء النخري، العينات (5,6) عزولات مطثية حاطمة من طيور سليمة.

ت- نتائج الدراسة النسيجية:

أظهرت الدراسة النسيجية لأمعاء الطيور المصابة بالتهاب الأمعاء النخري إصابة العديد من الزغابات المعوية بالنخر، مما أدى إلى توسفها وتساقط أجزاء منها ضمن لمعة الأمعاء، ارتشاح الفبرين والخلايا الالتهابية خاصةً اللمفاويات والبلاعم

بشـــكل كثيف بين الزغابات المعوية، إضـــافة إلى حدوث فرط تنســـج في الغدد الخبيئة المولدة للزغابات المعوية شـــكل (14,13).

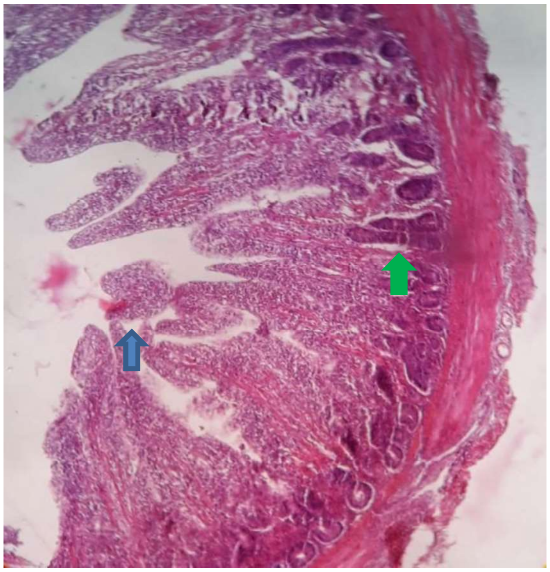
ث- دراسة تأثير الجنس على الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري

تم دراســة تأثير جنس الطائر في نسـبة حدوث الإصـابة بالتهاب الأمعاء النخري عند طيور أمات دجاج اللحم وقد أظهرت النتائج أن الذكور (الديوك) كانت أكثر إصابة بالمرض من الإناث (الفرخات) الجدول رقم (3)

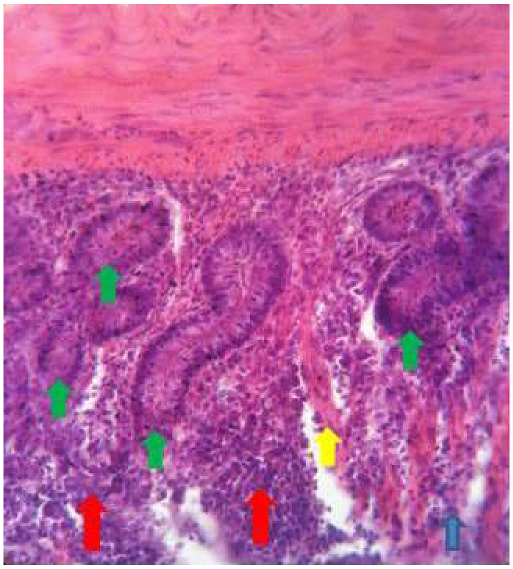
الجدول رقم (3): تأثير جنس الطائر على نسبة حدوث الإصابة بالمرض

تأثير الجنس على الإصابة			
	الجنس	عدد العينات	التوزيع التكراري %
الجنس	ديوك	19	82.61 [a]
	فرخات	4	17.39 [b]
	المجموع	23	100.00

a , b , c , d تدل على وجود فروقات معنوية في حال اختلافها ضـــمن نفس العمود عند المقارنة بين النســـب المئوية للمجموعات المدروسـة وذلك باسـتخدام اختبار مربع كاي Chi Squire Test في البرنامج الإحصـائي SPSS 20 حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P<0.05$



الشكل رقم 13: يوضح انسلاخ الزغابات المعوية، وفرط تنسج الغدد الخبيئة - X100



الشكل رقم 14: يوضح انسلاخ الزغابات المعوية، وفرط تنسج الغدد الخبيئة ، النضح الفبريني ، ارتشاح الخلايا الالتهابية - X400

ج- دراسة تأثير نوع الطيور على الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري

تم دراسـة تأثير نوع الطيور في نسـبة حدوث الإصـابة بالمرض عند طيور أمات دجاج اللحم وطيور دجاج اللحم وقد بينت النتائج أن دجاج اللحم كان أكثر عرضة للإصابة بالتهاب الأمعاء النخري مقارنة بأمات دجاج اللحم الجدول رقم(4).

الجدول رقم (4): تأثير نوع الطيور في نسبة حدوث الإصابة بالمرض

تأثير نوع الطيور على الإصابة			
	النوع	عدد العينات	التوزيع التكراري %
النوع	دجاج اللحم	143	86.14 [a]
	أمات دجاج اللحم	23	13.86 [b]
	المجموع	166	100.00

a , b , c , d تدل على وجود فروقات معنوية في حال اختلافها ضمن نفس العمود عند المقارنة بين النسب المئوية للمجموعات المدروسة وذلك باستخدام اختبار مربع كاي Chi Squire Test في البرنامج الإحصائي SPSS 20 حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية P<0.05

4-المناقشة:

يعتبر التهاب الأمعاء النخري من الأمراض التي تسبب خسائر اقتصادية فادحة في قطاع الدواجن وقد قامت هذه الدراسة بتشخيص أولي للمرض من خلال الأعراض والصفات التشريحية الظاهرة على الطيور المريضة وقد توافقت الأعراض السريرية المشاهدة في هذه الدراسة والتي تضمنت خمول الطيور المصابة وانتفاش الريش وكما أنها تكره الحركة مع ما ذكر في العديد من الدراسات السابقة (Ficken&Wages.,1997;Van Immerseel et al.,2004) وكذلك فقدان الشهية (Ficken& Wages.,1997) و إسهال مؤدياً لتجفاف (Van Immerseel et al.,2004)

وكما تركزت التغيرات التشريحية العيانية المشاهدة في الجزء الأوسط من الأمعاء تحديداً في الصائم واللفائفي وهذا ما توافق مع (Van Immerseel et al.,2004) ولكن في بعض الحالات امتدت التغيرات لتصل إلى العفج والأعور (Ficken& Wages.,1997;Van Immerseel et al.,2004) وقد كانت الأمعاء الدقيقة منتفخة سهلة التفتت (Kaldhusdal& Hofshagen.,1992; Van Immerseel et al.,2004) و توضع غشاء دفتيري كاذب على الغشاء المخاطي (Ficken& Wages.,1997)

إن الصفات التشريحية العيانية لا تعتبر وسيلة كافية لتشخيص المرض فقد تتشابه هذه الآفات مع التهاب الأمعاء التقرحي المتسبب بـ C.colinum والكوكسيديا (long et al.,1974; porter.,1998) ولذلك يوصى بتأكيد التشخيص من خلال الزرع الجرثومي و إجراء الفحص النسيجي للأنسجة المصابة

وقد أخذت مسحات مباشرة من الأنسجة المصابة في الأمعاء وصبغت بصبغة غرام فقداعتُبِر وجود أعداد كبيرة من عصيات إيجابية الغرام ثخينة في لطخة مباشرة من مخاطية الأمعاء الدقيقة دليل افتراضي على الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري (Quinn et al.,2004) إلا أنه لا تعتبر هذه الخطوة وحدها كافية لإثبات وجود المرض ولا بد من القيام بإجراءات العزل والزرع الجرثومي واختبارات الكيمياحيوية والكشف عن الذيفانات المسببة للمرض(Quinn et al.,2004).

أما نتائج الزرع الجرثومي للعينات فقد أظهرت وجود Clostridium perfringens في (17.47%) من عدد العينات الكلي، وهذه النسبة أقل من المعدل المسجل في دراسات أوربية أو مقارنة بالعديد من البلدان الأخرى (Awad et al.,1977; Craven et al.,2001; Engstrom et al.,2003; Latinovic.,1983; Tschirdewahn et al.,1991) و إن انخفاض هذه النسبة قد يعود لاستخدام المضادات الحيوية في سوريا كمحسنات نمو و كذلك استخدام مضادات الكوكسيديا بشكل دائم في أعلاف دجاج اللحم ومن المعلوم أن تلف الغشاء المخاطي للأمعاء وزيادة محتوى البروتين وسط الأمعاء الناتجين عن الإصابة بالكوكسيديا يعتبر من أكثر العوامل المهيئة لحدوث التهاب الأمعاء النخري (Williams,

1999b; Anonymous, 2000)، و إن من الجوانب الإيجابية لاستخدام المضادات الحيوية كمحفزات نمو مع الأعلاف هو السيطرة على الكثير من الأمراض المعوية ولكن بالمقابل تؤدي للقضاء على الفلورا المتعايشة في الأمعاء وتؤدي لزيادة مقاومة الجراثيم للصادات الحيوية إضافةً للثمالات الدوائية التي تصل للإنسان مع اللحوم المستهلكة في سوريا يومياً. في حين أن بلدان الاتحاد الأوربي منعت الاستخدام الدائم للمضادات الحيوية مع العلف ولكن بالمقابل هذا أدى لظهور أمراض كانت قد تمت السيطرة عليها بشكل جيد كالتهاب الأمعاء النخري وأدت لخسائر فادحة في الإنتاج (Engstrom et al.,2003).

وقد بينت النتائج اختبار PCR للكشف عن جين الذيفان ألفا أن جميع العزلات المأخوذة من الطيور السليمة وجميع العزلات المأخوذة من طيور مصابة كانت إيجابية لجين الذيفان ألفا (900bp) و إن وجود الذيفان ألفا في جميع العزولات للطيور السليمة والمصابة قد يشير إلى أن هذا الذيفان لا يعتبر وحده الذيفان المسؤول عن حدوث النخر في الطيور وإنما لا بد من وجود عوامل ضراوة أخرى لدى الجرثوم تشارك في حدوث النخر والإصابة وهذا ما أشارت له بعض الأبحاث (Keyburn et al.,2008)

وقد وجد في هذه الدراسة أنه يفضل استخدام PCR لتشخيص Clostridium perfringens وذلك لسهولة إجراء الاختبار مقارنة بطرق التشخيص الكلاسيكية والتي تعتبر باهظة الثمن وتستغرق وقتاً طويلاً كما أن هذه التقنية تعطي فرصة لتنميط عزولات لا يمكن تنميطها باستخدام اختبار تعادل الذيفان المجرى على فئران التجارب حيث أن اختبار تعادل الذيفان قد يعطي نتائج غير حقيقية في العينات الطازجة (Kalender.,2005)

وقد تم دراسة تأثير جنس الطائر في نسبة حدوث الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري عند طيور أمات دجاج اللحم وقد أظهرت النتائج أن الذكور (الديوك) كانت أكثر إصابة بالمرض من الإناث (الفرخات) وذلك قد يعود إلى أن علف الديوك يحتوي على نسبة عالية من الألياف (الشعير والنخالة) مقارنة بعليقة الفرخات وقد وجد في بعض الحالات أن الشعير لم يجرش بشكل جيد نتيجة صغر حجم الحبة وكبر حجم فتحة غربال العلف أثناء الجرش وهذا ما توافق مع بعض الدراسات التي أشارت إلى أن وجود الشعير في العليقة يهيئ للإصابة بالتهاب الأمعاء النخري لاحتواء الشعير على سكريات معقدة غير نشوية ذوابة في الماء water soluble non-starch polysaccharides) (NSPs) (Annett et al., 2002; (Dahiya et al., 2006; Kalshusdal and Hofshagen, 1992; McDevitt et al., 2006 حيث أن الأنزيمات الموجودة في الجهاز الهضمي عند الطيور غير قادرة على هضم (NSPs) وبعض أنواع النشاء الموجودة في الحبوب وهذه تعمل كركائز substrates للفلورا الموجودة في الأمعاء وتوفر فرصة لهذه الكائنات للتكاثر بما في ذلك الجراثيم المسببة للأمراض وهذه السكريات أيضاً تؤدي لزيادة لزوجة محتويات الأمعاء وازدياد وقت العبور وهذا يؤدي لزيادة تكاثر clostridium perfringes مما يجعل الطيور مهيأة للإصابة بالتهاب الأمعاء النخري بشكل أكبر وهذا ما أشارت إليه بعض الدراسات (Annett et al., 2002).

وقد تم دراسة تأثير نوع الطيور في نسبة حدوث الإصابة بالمرض عند طيور أمات دجاج اللحم وطيور دجاج اللحم وقد بينت النتائج أن دجاج اللحم كان أكثر عرضة للإصابة بالتهاب الأمعاء النخري مقارنة بأمات دجاج اللحم وهذا ما توافق مع (Osman et al.,2012) وربما يعود ذلك لكثافة تربية دجاج اللحم مقارنة بالأمات كما أن طول فترة تربية أمات دجاج اللحم قد تسمح بتكوين فلورا معوية تكون أفضل كماً نوعاً مما هو عند دجاج اللحم وهذا يقلل من إمكانية الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري.

إضافةً إلى أن تحصين أمات دجاج اللحم بلقاح الكوكسيديا يقلل من إمكانية الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري حيث تعتبر الإصابة بالايميريا مفتاح الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري (Parek et al.,2015) كما أن انخفاض نسبة الإصابة عند

الأمات قد يعود أيضاً للتشدد في برامج الأمن الحيوي عند الأمات مقارنة بدجاج اللحم الذي تعتبر فيه برامج الأمن الحيوي ضعيفة أو حتى معدومة في بعض المزارع.

5-الاستنتاجات والتوصيات:

1. وجد أن الديوك أكثر إصابة بالتهاب الأمعاء النخري مقارنة بالفرخات.
2. يصاب دجاج اللحم بالتهاب الأمعاء النخري بنسبة أكثر من الأمات.
3. إن التشدد في تطبيق إجراءات الأمن الحيوي والتحصين ضد الكوكسيديا قد يخفف من تعرض القطيع للإصابة بالتهاب الأمعاء النخري.
4. يوصى باستخدام اختبار PCR لتشخيص المطثية الحاطمة لسهولة هذا الاختبار وقلة التكاليف مقارنة بطرق التشخيص الكلاسيكية.
5. إن وجود الذيفان ألفا عند جميع العزولات للطيور السليمة والطيور المصابة بالتهاب الأمعاء النخري قد يحفز البحث عن عوامل ضراوة أخرى قد تكون مشاركة لهذا الذيفان في حدوث النخر أو أنها قد تنفي دور هذا الذيفان في إحداث النخر وهذا يتطلب المزيد من الأبحاث والدراسات.
6. إن استخدام المضادات الحيوية كمحفزات نمو رغم أنه قد يقلل من الإصابات المعوية إلا أنه من جانب آخر يقود إلى خسارة الفلورا المتعايشة في الأمعاء.

6- المراجع References:

1. Adams, M.R. & Moss, M.O. 1995. Bacterial Agents of Foodborne Illness. The Royal Society of Chemistry. Guildford. 364 pp.
2. ANGELOTTI, R., HALL, H.E., FOTER, M.J., a. LEWIS, K.M. 1962: Quantitation of Clostridium perfringens in Foods. – Appl. Microbiol., 10; 193-199 .
3. Annett CB, Viste JR, Chirino-Trejo M, Classen HL, Middleton DM, Simko E. Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of Clostridium perfringens type A. Avian Pathol 2002;31:598e601.
4. Anonymous. (2003). Watering system is the key to healthy poultry flocks. Poultry International, 42: 36–38.
5. Awad, F.I., Bassicunni, A.A., Gadalla, M.S., Elsisi, M.A., Hussein A.Z.: Studies of poultry anaerobes in Egypt. 1. An attempt to isolate anaerobic bacteria from the intestinal. tract of normal and dead chickens. 2. The effect of alpha and beta toxins of Clostridium perfringens Type A and C introduced by different routes. 3. The effect of ration on chickens infected with Clostridium perfringens type C. Egypt J. Vet. Sci., 1977; 13: 1-22.
6. Baums C. G., Schotte U., Amtsberg G. & Goethe R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of Clostridium perfringens isolates. Vet. Microbiol. 20:11-16.
7. Bryant, A.E. & Stevens, L.S. 1997. The Pathogenesis of Gas Gangrene. Academic Press. San Diego. 186-187 pp.

8. Brynestad, S. & Granum, P.E. 1999. Evidence that Tn5565, which includes the enterotoxin gene in Clostridium perfringens, can have a circular form which may be a transposition intermediate. FEMS Microbiology Letters 170, 281-6.
9. Craven, S.E., Stern, N.J., Barley, J.S., Cox, N.A.: Incidence of Clostridium perfringens in broiler chickens and their environment during production and processing. Avian Dis., 2001; 45: 887-896.
10. Cato, E.P., George, W.L. & Finegold, S.M. 1986. Genus Clostridium Prazmowski 1880, 23AL. In Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 1179-1182. pp.
11. Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P.; and Swain, R.H. A.(1975). Medical Microbiology.Vol.2, The Practice of Medical Microbiology.12th ed., Churchill livingstone, Edinburgh, London.
12. Dahiya JP, Wilkie DC, Van Kessel AG, Drew MD. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. Anim Feed Sci Technol 2006;129:60e88
13. Engstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Baverud,V., Gunnarsson, A.: Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry. Vet. Microbiol.,2003; 9: 225-235.
14. Ficken, M.D., and D. Wages. 1997. Necrotic enteritis. In: Diseases of Poultry, 10th ed. Y.M. Saif, H.J. Barnes, C.W. Beard, and L.R. McDonald, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. 261-264
15. Hatheway, C.L. 1990. Toxigenic clostridia. Clinical Microbiology Reviews 3, 66-98
16. Johansson, A., Engström, B.E., Frey, J., Johansson, K-E. & Båverud, V. 2005. Survival of Clostridium perfringens during simulated transport and stability of some plasmid-borne toxin genes under aerobic conditions. Acta Veterinaria Scandinavica, 46(4), 241-247.
17. Johansson, A., Greko, C., Engström, B.E., & Karlsson, M. 2004 Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of Clostridium perfringens from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. Veterinary Microbiology 99, 251-257.
18. Kalender H, Ertas¸ HB. Isolation of Clostridium perfringens from chickens and cetection of alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). Tr J Vet Anim Sci 2005;29(3):847e51.

19. Kalshusdal M, Hofshagen M. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. Poult Sci 1992;71:1145e53.
20. - Keyburn A. L. Boyce J. D. Vaz P. Bannam T. L. Ford M. E. Parker D. Rubbo A. D. Rood J. I. Moore R. J. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by Clostridium perfringens. PLoS Pathog. 4:e26
21. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Dowell, V.R.; Janda, W.M.; Som- mers, H. M. and Winn, W.C. (1988). Color Atlas of Diagnostic Microbiology. 3rd ed., Lippincott Company
22. Latinovic, V.: Study of characteristics of Clostridium perfringens strains isolated from broilers with enteritis. Veterinaria Yugoslavia, 1983; 32: 267-275.
23. Long, J.R., J.R. Pettit, and D.A. Barnum. 1974. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis.Canadian Journal of Comparative Medicine 38: 467-474.
24. Luna, L.G., Editor. 1968. Manual ofHistologic Staining Methods of the Armed Forces Institute ofPathology. 3d ed. McGraw-Hill, New York. 258p.
25. MacFarlane, M.G. & Knight, B.C.J.G. 1941. The biochemistry of bacterial toxins.I. Lecithinase activity of Cl. welchii toxins. Biochemical Journal 35, 884 -902.
26. McDevitt RM, Brooker JD, Acamovic T, Sparks NHC. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. Worlds Poult Sci J 2006;62:221e47.
27. Novak, J.S. & Juneja, V.K. 2002. Clostridium perfringens: hazards in new generation foods. Innovative Food Science & Emerging Technologies 3,127-132.
28. Osman KM, Soliman YA, Amin ZMS, Aly MAK.Prevalence of Clostridium perfringens type A isolates in commercial broiler chickens and parent broiler breeder hens in Egypt Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 2012; 31:931-941.
29. Park JY, Kim S, Oh JY, Kim HR, Jang I, Lee HS , Kwon YK. Characterization of Clostridium perfringens isolates obtained from 2010 to 2012 from chickens with necrotic enteritis in Korea. Poultry Science. 2015; 94:1158-1164.
30. Porter, R.E. 1998. Bacterial enteritides of poultry. Poult Sci.77:1159-1165.
31. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. & Carter, G.R. 1994. Clostridium species. In Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing. London. 191-208.pp.
32. Quinn,P.J., Carter,M.E., Markey,B.and Carter,G.R., (2004): Clinical Veterinary Microbiology.Mosby,Elsevier Limited, London, pp.118-126

33. - Schiavo, G. & Montecucco, C. 1997. The structure and mode of action of botulinum and tetanus toxins. In The Clostridia - molecular biology and pathogenesis. Edited by J.I. Rood, B.A. McClane, G. Songer & R.W. Titball. Academic Press. San Diego.
34. Songer, J.G. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clinical Microbiology Reviews 9, 216-34.
35. Songer, J.G. 1997b. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends in Microbiology 5, 156-61.
36. Titball, R.W. 1993. Bacterial phospholipases C. Microbiological Reviews 57, 347-66.
37. Tschirdewahn, B., Notermans, S., Wernars, K., Untermann, F:. The presence of enterotoxigenic Clostridium perfringens strains in faeces of various animals. Int. J. Food Microbiol., 1991; 14: 175-178.
38. Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2004. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. Avian Pathol. 33:537–549.
39. Williams, RB. (1999b). Anticoccidial vaccines: the story so far. World Poultry, Special Supplement Coccidiosis, 3: 23–25.