التحري عن مورثات الذيفانات ألفا و netB في المطثية الحاطمة المسببة لالتهاب الأمعاء النخري عند الدجاج

د. مأمون الأمير * د. سامر إبراهيم **

(الإيداع: 13 آيلول 2020 ، القبول: 11 تشرين الثاني 2020)

الملخص:

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتنقية جراثيم المطثية الحاطمة من قطعان الدجاج والتحري عن وجود مورثات الذيفان ألفا والذيفان NetB باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل حيث تعتبر هذه الذيفانات من أهم عوامل الضراوة للمطثية الحاطمة عند الدجاج.

أظهرت نتائج العزل الجرثومي للمطثية الحاطمة في القطعان التي تظهر عليها أعراض الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري أن نسبة العزل بلغت 24.47% عند قطعان دجاج اللحم و17.41% عند قطعان الأمات، في حين أظهرت نتائج العزل الجرثومي للعينات الواردة من الطيور السليمة وجود المطثية الحاطمة في 5% من عدد العينات الكلي. وبينت نتائج تفاعل البوليمراز المتسلسل وجود مورث الذيفان ألفا عند جميع الذراري المعزولة من الطيور السليمة والمصابة بالمرض أما مورث الذيفان NetB فقد وجد بنسبة 11.62% في الذراري المعزولة من الطيور التي تعاني من التهاب الأمعاء النخري فقط ولم يتم الكشف عن مورثة netB في الذراري المعزولة من الطيور السليمة.

أثبتت هذه الدراسة وجود مورث الذيفان NetB في الذراري المعزولة من قطعان الدجاج التي تعاني من التهاب الأمعاء النخري في سوريا وهو من عوامل الضراوة المهمة للمطثية الحاطمة.

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

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

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

The Detection of Alpha and Net B Toxin Genes in Clostridium Perfringens Causing Necrotic Enteritis in Chicken

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

(Received: 13 September 2020, Accepted: 11 November 2020)

Abstract:

This study aimed to isolate and purify Clostridium perfringens from chicken flocks in order to detect the existence of Alpha and Net B toxin gens by PCR. These toxins are considered as the most important virulent factors of Clostridium perfringens in chickens. The results of the isolation of Clostridium perfringens in necrotic enteritis infected flocks showed that the isolation percentage was % 24.47 in broiler flocks and it was % 17.41 in breeder flocks. While it also showed that the isolation percentage in healthy flocks was % 5. The result of the PCR test showed the existence of Alpha toxin gens in all the isolates that were received from infected and healthy birds. Whereas, Net B toxin gene was existed only in the isolates that were received from infected birds with the percentage of %11.62. On other hand, the netB gen was never existed in the isolates that were received from healthy birds .

This study has proved that the NetB toxin gene exists in the isolates that were received from infected flocks by necrotic enteritis in Syria. The NetB toxin is considered as the most important violent factors of Clostridium perfringens.

Keywords: Clostridium perfringens, necrotic enteritis, alpha toxin, NetB toxin

*PHD, Microbiology Department, Veterinary Faculty- Hama University

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

1- المقدمــة Introduction :

تتواجد معظم أنواع المطثيات كجراثيم رمية في الطبيعة غير ممرضـــة عند الحيوانات والنباتات decaying vegetation ولكن يوجد ما يزيد على 25 نوع منها تعد من مسببات الأمراض الثانوية minor pathogens في حين أنه يوجد 13 نوع آخر تعد من مســببات الأمراض الرئيســة major pathogens، وهذه الأخيرة تنتج بشــكل إجمالي حوالي 59 نوع من الذيفانات الجرثومية المختلفة وإن جنس المطثية يعتبر أكثر جنس جرثومي مولد للذيفان (Johansson et al.,2005)

إن أكثر أنواع المطثيات المولدة للذيفان شـــهرة هي المطثية الوشـــيقية *C. botulinum* ، *المطثية الكزازية C.tetani* ، المطثية الحاطمة *C. perfringens* ، المطثية العســـيرة *C. difficile* ، المطثســـة الشـــوفوية *C. chauvoei* (Hatheway, 1990; Schiavo & Montecucco, 1997).

يعد جنس المطثية أكثر جنس جرثومي مولد للذيفان حيث تسـبب المطثية الحاطمة (Clostridium Perfringens) العديد من الأمراض عند الإنســـان والحيوانات الأهلية والبرية، وتعد المطثية الحاطمة المســـبب الرئيس لالتهاب الأمعاء النخري (Necrotic Enteritis) (NE) عند الطيور الداجنة (Johansson et al.,2005) يعد (NE) من أهم الأمراض التي تصـيب قطعان دجاج اللحم وقطعان الحبش، وقد ازدادات خطورة المطثية الحاطمة على صـحة الدواجن في الاتحاد الأوربي من خلال حدوث التهاب الأمعاء النخري بشـكليه الحاد وتحت الحاد نتيجة لإلغاء اسـتخدام المضـادات الحيوية كمحفزات للنمو ومجموعة الأيونوفور كمضادات كوكسيديا (Johansson et al.,2004)

تتصـف المطثية الحاطمة بأنها جراثيم إيجابية الغرام عصـوية الشـكل لاهوائية أو دقية الهواء تنمو بوجود نسـبة ضـئيلة من الأكسـجين (Quinn *et al.*, 1994) تشـكل أبواغ بيضـاوية كبيرة نسـبياً (0.6-2.4 x 1.3-9.0 µm) متبوغة وغير متحركة (Cato et al., 1986) تشـكل مسـتعمرات مسـتديرة ملسـاء 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). 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 بســرعة فائقة مع زمن تضــاعف generation time يقدر بـــــ 8-10 دقائق ويصــاحب هذا النمو انتاج وفير للغاز . (Bryant & Stevens, 1997)

وجد في عام 1941 (MacFarlane & Knight, 1941) أن الذيفان ألفا يمتلك الخواص الأنزيمية للفوســفوليباز C (phospholipase C) وقد اعتبر حينها أن الذيفان ألفا هو الذيفان الرئيس القاتل كونـه ذيفان متعدد الوظـائف 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)

اكتشف في عام 2008 ذيفان جديد عند المطثية الحاطمة المعزولة من حالات التهاب الأمعاء النخري سمي هذا الذيفان بـ (NetB) (Necrotic Enteritis Toxin B-like) وقد وجد مكتشف هذا الذيفان الجديد بأنه الذيفان الرئيس المسؤول عن حدوث الإمراضية في التهاب الأمعاء النخري و أن وجود الذيفان ألفا في ذراري المطثية الحاطمة قد يكون غير ملزم لحدوث الإمراضية في التهاب الأمعاء النخري عند الدجاج (keyburn et al.,2008).

ونظراً لعدم وجود أي دراسة في سورية تقوم بالكشف عن عوامل الإمراضية في المطثية الحاطمة المسببة لالتهاب الأمعاء النخري عند الدجاج فقد

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 الجينات المرمزة للذيفان ألفا والذيفان الجديد NetB في الذراري المعزولة من الطيور المصابة بالتهاب الأمعاء النخري ومن الأعورين للطيور السليمة باستخدام PCR.

3- المواد وطرائق البحث Material & Methods:

- المواد Material:

- العينات: Samples

تم الحصول على (309) عينات موزعة على الشكل التالي: (143) عينة من طيور دجاج اللحم مشتبه بإصابتها بالتهاب الأمعاء النخري ، و(86) عينة من طيور أمات دجاج اللحم أيضاً مصابة بالمرض و (80) عينة من طيور دجاج لحم سليمة لا تظهر عليها أعراض الإصابة بالتهاب الأمعاء النخري، والجدول (1) يوضح أعداد العينات و 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	86	7	86279
قطعان سليمة	دجاج اللحم	80	4	31200
المجموع		309	36	345571

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

- **الأوساط الزرعية المستخدمة في العزل الجرثومي:**

استخدمت الأوساط الزرعية التالية في مراحل العزل الجرثومي:

1- وسط الثيوغليكولات Thioglycolate medium:

استخدم هذا المرق لإكثار المطثية الحاطمة ولحفظ الذراري بعد العزل كونه وسط مختزل للأوكسجين (Quinn et al.,2004) وقد حضر هذا الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Himedia-India).

2- **وسط SPS: (Sulphite – Polymyxin – Sulfadiazine)**

استخدم هذا الوسط لعزل وتنقية جراثيم المطثية الحاطمة كونه من الأوساط الانتقائية والتمييزية حيث تظهر مستعمرات المطثية الحاطمة بشكل مستعمرات سوداء. وقد أضيف إلى هذا الوسط صفار البيض للكشف عن قدرة العزولات على تحليل اللستين حيث تظهر مناطق شفافة حول المستعمرات النامية نتيجية تحلل للستين (Angelotti et al.,1962) وقد حضر هذا الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Himedia-India).

3- وسط الآجار المدمم: Blood Agar

تم تحضير هذا الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Himedia-India) بإضافة 5 % من دم الأغنام منزوع الفبرين إلى وسط أساس الآجار المدمم حيث استخدم هذا الوسط 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 (مكان الآفات) للطيور المصابة بالتهاب الأمعاء النخري أو من الأعورين للطيور السليمة وتم نقلها للمخبر بحافظة مبردة مع الثلج.

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- العزل الجرثومي:

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، ثم أخذت مسحة من الوسط وصبغت بصبغة غرام للكشف عن وجود جراثيم المطثية الحاطمة ، ثم أجري الزرع على وسط الآجار المدمى و على وسط SPS وقد تم دراسة الصفات المزرعية لجراثيم المطثية الحاطمة ومن ثم أخذت المستعمرات النقية مزروعة حديثاً و أجري لها اختبارات الكيميا حيوية لتأكيد اهوية المطثية الحاطمة، و حفظت المستعمرات النقية للمطثية الحاطمة على وسط الثيوغليكولات في الدرجة -20م لإجراء مزيد من الاختبارات اللاحقة. تم التحضين الأوساط المزروعة على الدرجة 37م لمدة 24-48 ساعة في ظروف لاهوائية (Quinn et al.,2004).

4- الاختبارات الكيمياحيوية المستخدمة لتمييز المطثية الحاطمة

أجريت اختبارات الكيميا حيوية على العزولات لتأكيد هوية المطثية الحاطمة:

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

أجري الاختبار بإضافة مستحلب عقيم من صفار البيض (إنتاج شركة Himedia) بنسبة 5% إلى وسط 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)

استخدم وسط SPS المضاف إليه (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)

اســتخدم هذا الاختبار لكشــف الجراثيم المفرزة لأنزيم الجيلاتيناز وذلك بقدرتها على تحليل الجلاتين حيث يتحول الوســط الصلب إلى الشكل المائع بعد الزرع والتحضين بدرجة حرارة الغرفة

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

استخدم هذا الاختبار للكشف عن إنتاج غاز الاندول حيث يتشكل حلقة حمراء على سطح الوسط عند إضافة كاشف كوفاك و إن جراثيم المطثية الحاطمة سلبية الاندول.

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

حُضــر بإذابة الحليب منزوع الدســم 5-10 غرام / 100 مليلتر ماء يضــاف إليها 2.5 مل من كاشــف حبيبات اللتموس المحضـر سـابقا. استُخدم للكشـف عن الجراثيم المحللة لسكر اللاكتوز والتي تؤدي بالتالي لانخفاض حموضـة الوسـط مما يســبب تجلط بروتين الكازئين أســفل الأنبوبة وبما أن جراثيم المطثية الحاطمة منتجة للغاز فإنه ســوف تؤدي إلى تكوين فجوات في هذه الخثرة المتكونة مع انتشـــار جزء من الخثرة على جوانب الأنبوبة مكونة ما يســـمى بالتخمر العاصـــف Stormy Fermentation.

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

استخدم ماء اللبتون (المضاف له السكر) للكشف عن قدرة العزولات في تخمير السكاكر و إن المطثية الحاطمة قادرة على تخمير سكاكر (الجلوكوز، اللاكتوز، السكروز، المالتوز).

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

5- اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل:

أ- استخلاص قالب الدنا:

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).

ب- إجراء تفاعل البوليمراز المتسلسل للكشف عن مورثات الذيفانات:

أجري تفاعل PCR للمستخلصات بهدف الكشف عن مورث الذيفان ألفا و مورث الذيفان NetB في عزولات المطثية الحاطمة وذلك باستخدام زوج من المرئسات الخاصة بجين الذيفان ألفا وزوج من المرئسات الخاصة بجين الذيفان NetB الجدول (3) لتضخيم منطقة من شريط الدنا (DNA Band) ذات حجم 900 قاعدة آزوتية تدل على وجود جين الذيفان ألفا (cpa) وذات حجم 383 قاعدة آزوتية تدل على وجود جين الذيفان NetB .

الجدول رقم (3): مرئسات جين الذيفان ألفا (cpa) وجين الذيفان NetB (netB) وطول الشدف الناتج

Toxin gene	Primer	Sequence 5′-3′	Length of amplification product (bp)
netB	AKP78	GCTGGTGCTGGAATAAATGC	383
	AKP79	TCGCCATTGAGTAGTTTCCC	
cpa	CPA5L	AGTCTACGCTTGGGATGGAA	900
	CPA5R	TTTCCTGGGTTGTCCATTTC	

تم إجراء تفاعل PCR بإضـــافة 10 ميكرولتر من قالب DNA المســتخلص ســابقاً إلى 40 ميكرولتر من مزيج التفاعل والموضـح في الجدول (4) وقد تم تحضـير مزيج التفاعل في مكان نظيف ومعزول وباستعمال ماصـات ورؤوس ماصـات معقمة، موضوع فوق الثلج:

الجدول رقم (4): يوضح مزيج تفاعل PCR

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(×2)
ماء مقطر معقم خالٍ من الدناز	13.00 µl	Distilled water (Dnase free)
قالب الدنا	10 µl	DNA Template
المجموع	**50 µl**	**total**

وضـــعت الأنابيب المحتوية على مزيج التفاعل في جهاز المدور الحراري Thermocycler (Techne TC512) وتم تشـغيل الجهاز بعد إعداد البرنامج الخاص بالاختبار للكشـف عن الذيفان ألفا الجدول رقم (3) والبرنامج الخاص بالاختبار للكشف عن الذيفان NetB وفقاً لـ (Keyburn et al.,2008) الجدول رقم (4).

الجدول رقم (3): 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

الجدول (4) برنامج تضخيم الدنا بوجود مرئسات خاصة بالكشف عن الذيفان NetB (Keyburn et al.,2008)

المرحلة	درجة الحرارة	المدة	عدد الدورات
مرحلة التمسخ الأولي Intial Denaturation	94مْ	2 دقيقة	1
مرحلة التمسخ Denaturation step	94مْ	30 ثانية	35
مرحلة ارتباط المشرعات Primer-annealing step	55مْ	30 ثانية	
مرحلة الاستطالة وتضخيم الدنا DNA extension step	72مْ	1 دقيقة	
مرحلة الاستطالة النهائية Final DNA extention	72مْ	12 دقيقة	1

بعد إتمام تفاعل البوليمراز المتسلسل، تم فحص نواتج التفاعل للكشف عن النواتج النوعية وذلك باستعمال تقنية الرحلان الكهربائي في هلامة الآجاروز (تركيز1.5%)، وبعد انتهاء الرحلان الذي أجري بفرق كمون قدره 100 فولت لمدة 30 دقيقة تقريباً 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)

فحصت الصور من أجل الكشف عن أنطقة دنا (DNA Band) ذات حجم 900 قاعدة آزوتية تدل على وجود جين الذيفان ألفا (cpa) وذات حجم 383 قاعدة آزوتية تدل على وجود جين الذيفان NetB وذلك مقارنةً مع معلم الوزن الجزيئي (100 bp DNA Ladder,PeqLab).

4- النتائج:

فحصت الطيور المشتبه بإصابتها بالتهاب الأمعاء النخري والبالغ عددها (143) طائر من دجاج اللحم و (86) طائر و أكدت الإصابة أولياً من خلال سير المرض وتسجيل الأعراض والصفات التشريحية ثم أخذت عينات من أمعاء الطيور وأجريت دراسة جرثومية لعزل المطثية الحاطمة وبعد العزل أجريت دراسة جزيئية للكشف عن جين الذيفان ألفا وجين الذيفان NetB ومقارنة النتائج.

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

أ- عزل وتنقية المطثية الحاطمة من القطعان المصابة بالتهاب الأمعاء النخري ومن القطعان السليمة:

أظهرت نتائج العزل الجرثومي للمطثية الحاطمة من القطعان التي تظهر عليها أعراض الإصابة بالمرض لكل من دجاج اللحم والأمات أن نسبة العزل بلغت 21.83% (229/50) حيث عزلت المطثية الحاطمة عند قطعان دجاج اللحم بنسبة 24.47% (143/35) في حين بلغت نسبة العزل عند قطعان الأمات 17.41% (86/15) الجدول رقم (5) يوضح نتائج العزل من القطعان المصابة بالمرض.

الجدول رقم (5): نتائج عزل المطثية الحاطمة من القطعان التي تظهر عليها أعراض الإصابة بالمرض

نوع القطيع	عدد العينات المختبرة	العينات الإيجابية للعزل	
		العدد	النسبة%
دجاج لحم	143	35	%24.47
أمات دجاج اللحم	86	15	%17.41
المجموع	229	50	%21.83

في حين أظهرت نتائج العزل الزرع الجرثومي للعينات المأخوذة من القطعان السليمة وجود Clostridium perfringens في 4 عينات (5%) من عدد العينات الكلي (80/4) الجدول رقم (6) يوضح نسبة عزل المطثية الحاطمة عند القطعان السليمة.

الجدول رقم (6): نتائج عزل المطثية الحاطمة من القطعان السليمة

نوع القطيع	عدد العينات المختبرة	العينات الإيجابية للعزل	
		العدد	النسبة%
دجاج لحم	80	4	%5

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

بينت نتائج الكشف عن وجود جين الذيفان ألفا باستخدام تفاعل PCR أن جميع العزولات المأخوذة من الطيور السليمة وجميع العزولات المأخوذة من الطيور المصابة كانت إيجابية لجين الذيفان ألفا (900bp) شكل (6).

ت- نتائج الكشف عن جين الذيفان NetB باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل:

أظهرت نتائج الكشف عن وجود الذيفان جين الذيفان NetB باستخدام تفاعل PCR وجود جين netB (384bp) في11.62% من مجموع العزولات الواردة من طيور مصابة (5 عزولات من 43) شكل (7) حيث بلغت نسبة وجود netB في عزولات دجاج اللحم 11.42% (35/4) ونسبة وجود netB في عزولات أمات دجاج اللحم 12.5% (8/1) والجدول (6) يوضح نتائج ونسب تواجد جين netB في العزولات الواردة من القطعان المصابة بالتهاب الأمعاء النخري.

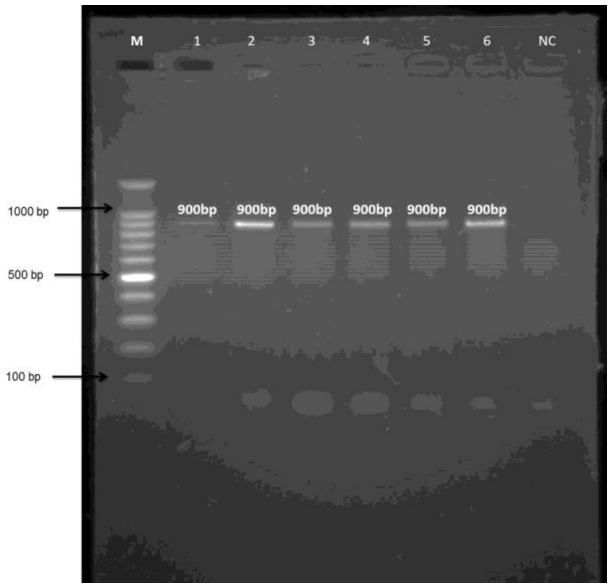
الجدول رقم (6): نتائج ونسب تواجد جين netB في عزولات المطثية الحاطمة الواردة من طيور مصابة

مصدر العينات	نوع القطيع	عدد العزولات	عدد العينات إيجابية netB	نسبة وجود netB
قطعان مصابة	دجاج اللحم	35	4	%11.42
	أمات دجاج اللحم	8	1	%12.5
المجموع		43	5	%11.62

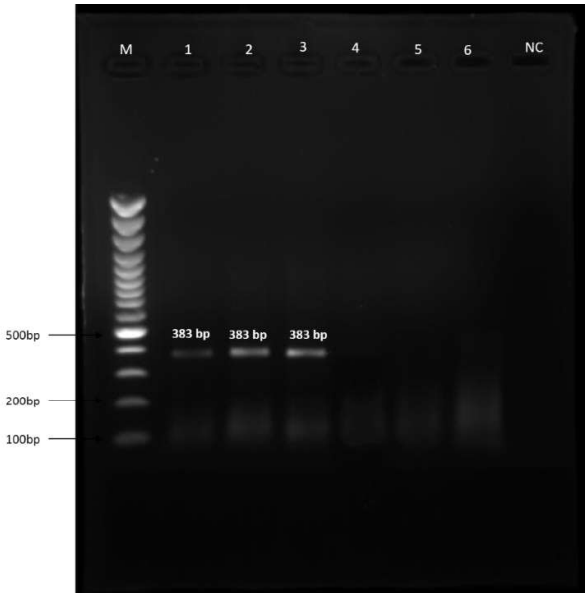
في حين لم يتم الكشف عن جين الذيفان NetB في أي من العزولات الواردة من طيور دجاج اللحم السليمة والجدول (7) يوضح نتائج ونسب تواجد جين netB في العزولات الواردة من قطعان سليمة.

الجدول رقم (7): نتائج ونسب تواجد جين netB في عزولات المطثية الحاطمة الواردة من طيور سليمة

مصدر العينات	نوع القطيع	عدد العزولات	عدد العينات إيجابية netB	نسبة وجود netB
قطعان سليمة	دجاج اللحم	4	0	%0



الشكل رقم (6): 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



الشكل رقم (7): نتائج اختبار PCR للكشف عن وجود جين الذيفان NetB في العزولات: يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزيئي، يشير العمود NC إلى الشاهد السلبي، العينات(3-1) عزولات مطثية حاطمة من طيور مصابة بالتهاب الأمعاء النخري إيجابية NetB، العينات (6-4) عزولات مطثية حاطمة من طيور مصابة بالتهاب الأمعاء النخري سلبية NetB.

5- 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 ومن ثم أخذت عينات من الآفات في الأمعاء وأجري الزرع الجرثومي لعزل وتحديد هوية المطثية الحاطمة المسببة للمرض.

أظهرت نتائج العزل الجرثومي من القطعان التي تظهر عليها أعراض الإصابة بالمرض أن نسبة عزل المطثية الحاطمة عند قطعان دجاج اللحم قد بلغت 24.47% في حين بلغت نسبة العزل عند قطعان الأمات 17.41% بينما بلغت نسبة عزل المطثية الحاطمة في دراسة أخرى أجريت في مصر عام (2014) 56% عند دجاج اللحم و 46.7% عند البياض (Abd-El All & Maysa.,2014) في حين بلغت نسبة العزل في دراسة أخرى أجريت في الهند 26.31% (Dar et al.,2007) في حين بلغت نسبة العزل في دراسة أجريت في التشيك في عام 2005 (14.2%) وفي عام 2006 ارتفعت النسبة إلى 21.1% و إن ارتفاع النسبة في هذه الدراسة الأخيرة يعود وفقاً لما ذكره الباحث (Svobodová et

al.,2007) إلى الإلغاء التدريجي للمضـــادات الحيوية المســـتخدمة كمحفزات نمو Grow promoting antibiotics (GPA) في عام 2006 وقد تجلى منع استخدام المضادات الحيوية في جمهورية التشيك في تدهور سلامة الأمعاء و زيادة نسبة انتشار الأمراض وهذا أثر على كفاءة الإنتاج الإجمالية (Cviková et al. 2006; Svobodová et al.,2007) وقد لوحظ في هذه الدراســـة أن نســـبة العزل للمطثية الحاطمة كانت أعلى عند دجاج اللحم مقارنة بالأمات وهذا قد يعود للتشدد في برامج الأمن الحيوي لدى الأمات مقارنة بمزارع الفروج إضافة إلى أن تحصين الأمات ضد الكوكسيديا قد يخفف من احتمال الإصـابة بالتهاب الأمعاء النخري على اعتبار أن الإصـابة بالكوكسـيديا تعتبر مفتاح الإصـابة بالتهاب الأمعاء النخري (Al-Sheikhly& Al-Saieg.,1980)

في حين أظهرت نتائج العزل الزرع الجرثومي للعينات المأخوذة من القطعان السـليمة وجود Clostridium perfringens في 5% من الطيور السليمة التي أخذت منها العينات، وهذه النسبة أقل من المعدل المسجل في دراسات أوربية أو مقارنة بـالعـديـد من البلـدان 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 يعزى لاستخدام المضادات الحيوية في سوريا كمحسنات نمو و كذلك استخدام مضـادات الكوكسـيديا بشكل دائم في أعلاف دجاج اللحم فمن المعلوم أن تلف الغشـاء المخاطي للأمعاء وزيادة محتوى البروتين في الأمعاء و الناتجين عن الإصـابة بالكوكسـيديا يعد من أكثر العوامل المهيئة لحدوث التهاب الأمعاء النخري (Al-Sheikhly&Al-Saieg.,1980; Baba et al 1997)، و إن من الجوانب الإيجابية لاسـتخدام المضـادات الحيوية كمحفزات نمو مع الأعلاف هو السـيطرة على الكثير من الأمراض المعوية ولكن بالمقابل تؤدي للقضـاء على الفلورا المتعايشـة في الأمعاء وتؤدي لزيادة مقاومة الجراثيم للصـادات الحيوية إضـافةً للثملات الدوائية التي تصـل للإنسـان مع اللحوم المسـتهلكة في سـوريا يومياً. في حين أن بلدان الاتحاد الأوربي منعت الاسـتخدام الدائم للمضـــادات الحيوية مع العلف ولكن بالمقابل هذا أدى لظهور أمراض كانت قد تمت الســـيطرة عليها بشـــكل جيد كالتهاب الأمعاء النخري وأدت لخسائر فادحة في الإنتاج.

هذا التفاوت في معدلات تواجد المطثية الحاطمة بين القطعان حول العالم قد يعزى إلى عدة عوامل منها اختلاف الظروف البيئية بين مناطق الدراسـة واختلاف مواسـم الدراسـة، وطبيعة التغذية واختلافها من دولة إلى أخرى ومن منطقة إلى أخرى (كاسـتخدام طحين اللحم أو اسـتخدام المضـادات الحيوية ومضـادات الكوكسـيديا كمحسـنات نمو)، والتحصـينات والوقاية باللقاحات، ومدى الوعي الصحي والتثقيفي لدى المربين.

بينت نتائج الكشف عن وجود جين الذيفان ألفا عند العزولات باستخدام PCR أن جميع العزولات المأخوذة من الطيور السليمة وجميع العزولات المأخوذة من الطيور المصابة كانت إيجابية لجين الذيفان ألفا (bp900) وإن 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 أظهرت نتائج الكشـــف عن وجود جين الذيفان NetB باســـتخدام تفاعل PCR وجود جين netB في11.62% من مجموع العزولات الواردة من الطيور بالتهاب الأمعاء النخري وهذه النســـبة تتوافق مع النســـب الواردة في بعض الأبحاث وتتخـالف مع أخرى حيـث وجـد Cooper & Songer أن نســـبـة العزولات إيجـابيـة netB (8%) (Cooper & Songer.,2010) في حين وجد آخرون أن نسبة العزولات إيجابية netB (60%) (Abildgaard et al., 2010)

وبالتالي قد لا يكون إنتاج netB شرطاً ملزماً لتحريض NE عند الدجاج ومع ذلك لم تحتوي ولا عزولة من العزولات الواردة من طيور سليمة على جين netB

إن وجود الجين netB ، في حد ذاته غير كاف للتنبؤ عن ضـــراوة C. perfringens ، وينبغي أن تركز الدراســـات المستقبلية على الأنماط الظاهرية البكتيرية bacterial phenotypes و الآليات التنظيمية regulatory mechanisms المشـاركة في التعبير عن NetB ، وربما أيضًـا وجود الذيفانات الأخرى ، وآثارها على ضـراوة عترات C.perfringens الفردية individual C.perfringens strains .

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 باســـتخدام اختبار تعادل الذيفان المجرى على فئران التجارب حيث أن اختبار تعادل الذيفان قد يعطي نتائج غير حقيقية في العينات الطازجة (Kalender.,2005).

6- الاستنتاجات والتوصيات:

1- ارتفاع نسب العزل للمطثية الحاطمة في مزارع دجاج اللحم مقارنة بمزارع الأمات.

2- أظهرت النتائج الانتشـار المحدود للمطثية الحاطمة ولالتهاب الأمعاء النخري في سـوريا مقارنة بدول الاتحاد الأوربي التي حدت من استخدام المضادات الحيوية.

3- إن وجود الذيفان ألفا عند جميع العزولات للطيور السـليمة والطيور المصـابة بالتهاب الأمعاء النخري قد يحفز البحث عن عوامل ضـراوة أخرى قد تكون مشـاركة لهذا الذيفان في حدوث النخر أو أنها قد تنفي دور هذا الذيفان في إحداث النخر وهذا يتطلب المزيد من الأبحاث والدراسات.

4- إن وجود الذيفان NetB في العزولات الواردة من الطيور المصـابة بالتهاب الأمعاء النخري وعدم تواجده في العزولات الواردة من الطيور السليمة قد يدعم الفرضـيات التي تؤكد دور هذا الذيفان المكتشف حديثاً في إحداث الإمراضـية في التهاب الأمعار النخري

5- المراجع References:

1. Abd-El All, AM & Maysa, A 2014. Toxin genotyping of Clostridium perfringens isolated from broiler and layer farms and their workers in Egypt Rev. Revue Méd. Vét., 165, 9-10, 272-279
2. Abildgaard, L., Sondergaard, T.E., Engberg, R.M., Schramm, A. & Hojberg, O. (2010). In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative Clostridium perfringens originating from healthy and diseased broiler chickens. Veterinary Microbiology, 144, 231– 235
3. Adams, M.R. & Moss, M.O. 1995. Bacterial Agents of Foodborne Illness. The Royal Society of Chemistry. Guildford. 364 pp.
4. Al-Sheikhly, F., Al-Saieg, A. 1980: Role of coccidia in occurrence of necrotic enteritis of chickens. Avian Dis; 24: 324-333.
5. ANGELOTTI, R., HALL, H.E., FOTER, M.J., a. LEWIS, K.M. 1962: Quantitation of Clostridium perfringens in Foods. – Appl. Microbiol., 10; 193-199 .

6. Awad, F.I., Bassicunni, A.A., Gadalla, M.S., Elsisi, M.A., Hussein A.Z. 1977: 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; 13: 1-22.
7. Baba, E., Ikemeto, T., Fukata, T., Sasai, K., Arakawa, A.. McDonald, L.R. 1997: Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with Clostridium perfringens and Eimeria necatrix. Vet. Microbiol; 54: 301-308.
8. Bryant, A.E. & Stevens, L.S. 1997. The Pathogenesis of Gas Gangrene. Academic Press. San Diego. 186-187 pp.
9. 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.
10. Cooper K.K., Songer J.G. 2010; Virulence of Clostridium perfringens in an experimental model of poultry necrotic enteritis. Vet. Microbiol., 142 , pp. 323-328
11. Craven, S.E., Stern, N.J., Barley, J.S., Cox, N.A. 2001: Incidence of Clostridium perfringens in broiler chickens and their environment during production and processing. Avian Dis; 45: 887-896.
12. 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.
13. Cviková I, Papp IH 2006: Vyřazení antibiotických růstových stimulátorů, dopad na zdraví a užitkovost brojlerů. Veterinářství 10: 642-644
14. Dar P, Wani S, Wani A, Hussain I, Maqbool R, Ganaie M, Kashoo Z and S Qureshi 2007: Isolation, identification and molecular characterization of Clostridium perfringens from poultry in Kashmir valley, India. Journal of Entomology and Zoology Studies 2017; 5(5): 409-414
15. Engstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Baverud,V., Gunnarsson, A. 2003: Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry. Vet. Microbiol; 9: 225-235
16. Hatheway, C.L. 1990. Toxigenic clostridia. Clinical Microbiology Reviews 3, 66-98
17. 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.

18. 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.
19. Kalender H, Ertas¸ HB. 2005; Isolation of Clostridium perfringens from chickens and cetection of alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). Tr J Vet Anim Sci;29(3):847e51.
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. 1983: Study of characteristics of Clostridium perfringens strains isolated from broilers with enteritis. Veterinaria Yugoslavia; 32: 267-275.
23. 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.
24. Park JY, Kim S, Oh JY, Kim HR, Jang I, Lee HS, Kwon YK. 2015; Characterization of Clostridium perfringens isolates obtained from 2010 to 2012 from chickens with necrotic enteritis in Korea. Poultry Science; 94:1158-1164.
25. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. & Carter, G.R. 1994. Clostridium species. In Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing. London. 191-208.pp.
26. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R., 2004: Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, Elsevier Limited, London, pp.118-126
27. – 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.
28. Songer, J.G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends in Microbiology 5, 156-61.
29. Svobodová ,I, Steinhauserová, I, Nebola. M. 2007: Incidence of Clostridium perfringens in Broiler Chicken in the Czech Republic. Acta Vet. Brno, 76: S25-S30.
30. Titball, R.W. 1993. Bacterial phospholipases C. Microbiological Reviews 57, 347-66.
31. Tschirdewahn, B., Notermans, S., Wernars, K., Untermann, F. 1991: The presence of enterotoxigenic Clostridium perfringens strains in faeces of various animals. Int. J. Food Microbiol.; 14: 175-178.