مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الهندسية المجلد (٧) العدد(٣) ٢٠٢٣
Tartous University Journal for Research and Scientific Studies - engineering Sciences Series Vol. (7) No. (3) 2023

عزل وتوصيف البكتريا المسببة للالتهابات المعوية النخرية (المطثيات الحاطمة) *Clostridium perfringens* عند دجاج اللحم

أ.د. توفيق دلّا*
أ.د. فهيم عبد العزيز**
حسن يوسف حسين **

(تاريخ الإيداع ٢٠٢٣/٢/١٣ . قُبِل للنشر في ٢٠٢٣/٤/٦)

□ ملخّص□

تعتبر هذه الدراسة جزءا من بحث يهدف الى بيان تأثير مستخلصات نبات الطيون*Inula viscosa (L)* على البكتريا المسببة للالتهابات المعوية النزفية (المطثيات الحاطمة) *Clostridium perfringens* وبعض البكتريا الأخرى عند الدواجن.

تمت هذه الدراسة في مخابر كلية الزراعة بجامعة تشرين ومخابر كلية الطب البيطري في جامعة حماه. حيث تم جمع العينات من مداجن خاصة بدجاج اللحم في منطقة صافيتا تعتمد على نظام التربية الأرضية، في شهر تشرين الثاني من العام ٢٠٢١.

بلغ عدد العينات المختبرة (٦٠) عينة من (١٥) مدجنة خاصة بتربية دجاج اللحم، حيث أخذت العينات المدروسة من الطيور المشتبهة بالإصابة ببكتريا المطثيات الحاطمة *C.perfringens*.

تم اجراء الفحوصات السريرة وتميزت الطيور المصابة بالخمول وقلة الحركة والإسهالات المختلطة بالغازات وكذلك وجود علف غير مهضوم، وتدلي الجناحين والرأس، انتفاخ الريش، تمت ملاحظة الصفات التشريحية من خلال تغير في سماكة جدار الأمعاء في الحالات المتطورة للإصابة،وظهور محتويات الأمعاء وظهور الغشاء الدفتيري في مناطق من الأمعاء إضافة للحالات الالتهابية.

أظهرت نتائج الصفات المجهرية بأن البكتريا إيجابية غرام، عصيات كبيرة الحجم نسبيا ولها لون ازرق ، وكما بينت الاختبارات البيوكيميائية بأنها سلبية (−) لاختبارات الكاتالاز والاكسيداز وإيجابية (+) عند اختبارات السكريات.

الكلمات المفتاحية : المطثيات الحاطمة – الاعراض السريرية – الصفات التشريحية – الاختبارات البيوكيميائية

---

* أستاذ ،قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة ،جامعة تشرين .
** أستاذ، قسم الطب المخبري ،كلية الطب البشري جامعة طرطوس .
*** طالب دراسات عليا (دكتوراه)، قسم الإنتاج الحيواني كلية الزراعة جامعة تشرين .

مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الهندسية المجلد (٧) العدد(٣) ٢٠٢٣
Tartous University Journal for Research and Scientific Studies - engineering Sciences Series Vol. (7) No. (3) 2023

Isolation and characterization of the bacteria that cause necrotic intestinal infections (Clostridium perfringens) in broiler chickens

Dr. Tawfik Dalla*
Dr.Fahim abd al aziz**
Hasan Y Hoseen* * *

(Received 13/2/2023 . Accepted 6/4/2023)

□ ABSTRACT

This study is part of a research aiming to demonstrate the effect of extracts of chamomile plants on the bacteria that cause hemorrhagic defective infections (*Clostridium perfringens*) and some other bacteria in poultry.

This study was carried out in the laboratories of the Faculty of Agriculture, Tishreen University, and the laboratories of the Faculty of Veterinary Medicine, Hama University. The samples were collected from poultry farms in the Safita region, which depend on the ground-rearing system, in November of the year 2021.

The number of tested samples was (60) samples from (15) domesticated poultry farms. The studied samples were taken from birds suspected of being infected with *C. perfringens.*

Clinical examinations were carried out, and the affected birds were characterized by lethargy, lack of movement, and diarrhea mixed with gases, as well as the presence of undigested feed, drooping wings and head, and swelling of the feathers. From the intestine in addition to inflammatory conditions.

The results of the microscopic traits showed that the bacteria are gram-positive, with relatively large bacilli and have a blue color. Biochemical tests showed that they were negative (-) for the catalase and oxidase tests, and positive (+) for the sugars tests.

Keywords: Clostridium perfringens -clinical symptoms natomical characteristics-biochemical tests

* Professor, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University.
** Professor, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Human Medicine, Tartous University.
*** Postgraduate Student (PhD), Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University.

المقدمة introduction:

ازداد الطلب على المنتجات الحيوانية للدواجن من اللحم والبيض وذلك بسبب توفرها ورخص أسعارها، مقارنة بالمنتجات الحيوانية الأخرى، حيث كان الإنتاج الكبير من هذه المنتجات بسبب الاستثمار الاقتصادي الضخم لها (Chapman *et al.*, 2003)

ترافق التطور الكبير في صناعة الدواجن بتطور برامج التحسين الوراثي الأمر الذي انعكس سلباً على مناعة الطيور وخفض مقاومتها للأمراض مما دفع المنتجين للاستخدام المفرط للأدوية والعقاقير الطبية لتفادي حدوث الأمراض وخفض نسبة النفوق، حيث انه بمساحات صغيرة يمكننا انتاج كميات كبيرة من اللحم والبيض من الدواجن مما شجع المستثمرين في مجال صناعة الدواجن الى تحسين السلالات والحصول على اوزان كبيرة من دجاج اللحم خلال فترة قصيرة من الزمن وهذا بدوره كان له الأثر السلبي في تعريض الطائر للعديد من الامراض المعوية والتنفسية الخطرة.

وكان من أخطر الأمراض التي تهدد الجهاز الهضمي هي الأمراض المسببة للالتهابات المعوية النخرية (Necrotic Enteritis) لما لها تأثيرات سلبية على معدل الاستهلاك العلفي وبالتالي على معدل النمو والإنتاج Van (Immerseel *et al*., 2004)

وتم التأكيد على ان المرض الذي يسبب الالتهابات المعوية والنزفية هو مرض معوي يصيب الدواجن لأول مرة عام١٩٦١ في إنكلترا (Parish, 1961).

يتجلى مرض التهاب الأمعاء النخري عند الدواجن بشكليه الحاد وتحت الحاد (Songer,1996) حيث ان الشكل الحاد من المرض يسبب النفوق بنسبة عالية عند الدواجن وخسارة اقتصادية كبيرة في حين الشكل تحت الحاد يسبب مشاكل صحية عند الدواجن يتجلى بمشاكل مرضية وانخفاض الإنتاج Lovaland and (Kaldhusdal,2001).

وتعد بكتريا المطثية الحاطمة *Clostredium Perfringens* من المسببات الرئيسية للالتهابات المعوية النخرية عند الدواجن.

لذلك كان لهذه الدراسة أهمية كبيرة في عزل وتوصيف المسبب المرضي للالتهاب المعوي النخري عند الدواجن وهي المطثيات الحاطمة (C. Perfringens) وذلك في سبيل إيجاد صادات حيوية لها في دراسات لاحقة.

أهمية واهداف البحث:

تكمن أهمية البحث في مدى خطورة المطثية الخاطمة وتأثيرها الصحي والاقتصادي على الدواجن. ومن هنا هدف البحث الى عزل جراثيم المطثيات الحاطمة والتي بدورها تسبب الالتهابات المعوية النخرية والنزفية عند الدواجن وتوصيف العزلات من خلال الخواص الشكلية والمزرعية واجراء الاختبارات البيوكيميائية، والتأكيد على تواجد هذه الإصابة في مداجن منطقة صافيتا بريف طرطوس.

الدراسات المرجعية :

تنتمي المطثيات الحاطمة لجنس المطثية (*Clostridium genus)* حيث يضم هذا الجنس عصيات إيجابية غرام ،متبوغة، لاهوائية، تتواجد في العديد من البيئات (Johansson,2006)

ينتمي جنس المطثيات Genus Clostridium الى:

Phylum :Firmicutes Class: Clostridia

Order : Clostridales Family: Clostridiaceae

(Johansson, 2006)

تتواجد معظم أنواع المطثيات كجراثيم رميّة في الطبيعة غير ممرضة decaying vegetation وكذلك يوجد ما يزيد عن ٢٥ نوعا منها يعتبر من الممرضات الصغرى Minor pathogens في حين يوجد ١٣ نوعا يعتبر من الممرضات الرئيسية major pathogens ومنها *C.perfringens* (Johansson,2006)

تسبب المطثيات العديد من الأمراض عند أنواع الحيوانات المختلفة والبشر ومن أنواع المطثيات المنتجة للسموم (زيفان) يوجد ٥ أنواع هي الأكثر شهرة:(المطثيةالعسيرة C.difficile –المطثية شوفياي C.chauvoei – المطثية الوشيقية C.botulinium –المطثية الكزازية C.tetani –المطثية الحاطمة C.perfringens).

ومن الصفات الرئيسية للمطثيات الحاطمة C.perfringens انها جراثيم إيجابية غرام لاهوائية عصوية الشكل والعصيات كبيرة الحجم نسبيا mμ (٩.٠-١.٣×٢.٤-٠.٦) وهي جراثيم غير متحركة (Cato *et al*.,1986)

وتشكل المطثيات الحاطمة على المنابت الزرعية مستعمرات ملساء مستديرة ولامعة Quinn *et al*., (2004).(Quinn *et al*., 1994)

تنمو المطثيات الحاطمة بدرجة حرارة تتراوح بين ١٢-٥٠ مْ ويكون نموها ضعيفا عند انخفاض الحرارة الى ما دون ال ٢٠مْ (Adams *et al*., Moss 1995)

تحتاج المطثية الحاطمة الى/١٣/ حمض اميني ودرجة pH بين (٥-٨) و يمكن ان تعيش في ظروف قاسية وذلك بسبب قدرتها على التبوغ أي لديها قدرة عالية على مقاومة الحرارة والجفاف والحموضة والعديد من المطهرات الكيميائية(Novak *et al*., 2002)

تصنف المطثية الحاطمة إلى خمس أنماط رئيسية (A-B-C-D-E) وذلك حسب قدرتها على انتاج أربعة زيفانات رئيسية (Alpha-Beta-Epsilon-Iota)

(Hofshagen&Stenwig,1992; Long & Truscott,1976; Songer, 1996, Yoo *et al*., 1997)

ويعد النمط A هو المسبب للإلتهاب الأمعاء النخرية

Lovland and Kaldhusdal., 2001; Porter,1998;Ficken and wages ,1997;Thompson *et* (*al*.,2006)

ومن أهم الأمراض التي تسببها المطثيات الحاطمة (C. Perfringens) عند الدواجن هي الالتهابات المعوية النخرية Necrotic Enteritis (Catherine,2013)، ويعتبر هذا المرض من أخطر الامراض الذي يصيب الطيور الفتية لما له من آثار سلبية على صحة الطيور وبالتالي على الإنتاج الاقتصادي حيث تكون الخسارة بالالتهاب المعوي النخري من خلال تراجع النمو والنفوق وتقدر الخسارة في صناعة الدواجن نتيجة الإصابة بـ NE ب ٢ بليون دولار سنويا في العالم (Mc.Reynolds *et* al., 2004)، وبحسب دراسات أخرى فإن المطثيات الحاطمة يمكن ان

تصيب الانسان من خلال ذيفانات معوية Enterotoxins أثناء التبوغ والتي يمكن ان تسبب الأمراض المنقولة بالغذاء عند الإنسان Foodborne Disease (Kenneth and Glenn,2013).

والأمراض التي تسببها المطثية الحاطمة عند البشر هي الإسهالات أو قد تُحدث التهاب الأمعاء النخري وذلك بحسب نمط المطيثة التي تصيب (Van Immerseel *et al*., 2004)، ويعرف هذا المرض أيضا باسم التهاب الأمعاء المطثي Clostridial Enteritis وتذيفن الدم معوي المنشأ Enterotoxemia (Kenneth and Glenn, 2013).

مواد وطرق البحث

أولا : أدوات البحث:

أدوات تشريح (مقص–مشرط...) – ماسحات قطنية – أكياس خاصة لجمع العينات – مجهر ضوئي –شرائح مجهرية –زيت الأرز– حافظة ثلجية لنقل العينات الى المخبر – اطباق بتري ٩ سم – كفوف خاصة – حاضنة – كحول ايتلي ٧٠ %– اوتوغلاف– غرفة عزل–Loops – موقد لهب.

ثانيا : المواد المستخدمة في الاختبارات البيو كيميائية الخاصة بجراثيم المطثيات الحاطمة :

١– كاشف كوفاك: المستخدم في اختبار الاندول(Koneman *et al*., 1988):

٢– ماء الببتون: يستخدم في تخمر السكريات (Koneman *et al* ., 1988):

٣– كاشف اندريد: المستخدم في اختيار تخمر السكريات (Koneman *et al* ., 1988):

٤– وسط الحليب منزوع الدسم: للكشف عن التخمر العاصف للحليب (Koneman *et al* ., 1988):

٥– السكريات (المالتوز – السكروز – الغلوكوز– اللاكتوز) للكشف عن تحمر السكر (Koneman *et al* ., 1988):

٦– ماء اكسجيني ٣% الازم لإختبار الكاتالاز(Koneman *et al*., 1988):

٧– صفار البيض: المستخدم في اختبار اليباز(Quinn *et al*., 2004).

٨– أقراص ورقية مشبعة بمادة الفانافتول داي ميثيل ب–فينيلين الأمين وتستخدم في اختبار الاوكسيداز (Koneman *et al*., 1988).

٩– زيت البارافين: لجعل الوسط لاهوائيا.

١٠– ماءات البوتاسيوم ٣% لتمييز الجراثيم الإيجابية عن السلبية في حال عدم وضوح صبغة غرام اليباز (Quinn *et al*., 2004).

١١– وسط الجيلاتين: يستحدم لاختبار اماهة الجلاتين (Cruikshank *et al*., 1975)

١٢– صبغة غرام Gram stain: وهي كيت جاهز يحوي على الكريستال البنفسجي –كحول (الايثانول)– الأيودين– السفراني (Quinn *et al*., 2004).

١٣–الأوساط الزرعية المستخدمة: أ– الآغار الدموي(Blood agar)

ب–وسط آجار تريبتوز سولفيت سيكلورسين Tryptose Sulphite Cycloserine(TSC Agar)

طرق جمع العينات:

تم الحصول على العينات باستخدام ماسحة قطنية من الجزء الأوسط للأمعاء (الاثني عشر والصائم) للطيور المصابة بالتهابات الأمعاء النخرية، حيث اخذت العينات بعد الذبح بشكل سريع لتجنب وصول الجراثيم المعوية الهوائية (Quinn *et al*., 2004)

و–بعد اخذ العينات نقلت بوساطة حافظة ثلجية الى مخبر خاص بالتحاليل المخبرية في حماة من اجل عزل المطثية الحاطمة المسببة للمرض في حال وجودها.

وتم بعدها تحضير شرائح مجهرية بأخذ عينات من مخاطية الأمعاء للطيور المشتبه باصابتها وتم صبغها بصبغة غرام ، وباستخدام المجهر الضوئي تبين وجود اعداد كبيرة من العصيات إيجابية غرام وبحجم (٠.٨–١.٣×٠.٧–٢.٣) وهذا يشبه بالاصابة بالمطثيات الحاطمة Hafez and Jodas,1997 ; Quinn *et al*., (2004).

تم تحضير مواد واضافتها لأوساط المطثية الحاطمة وهي:

١– **الدم:** تم الحصول عليه من الأغنام السليمة بعد نزع الفبرين باستخدام كرات زجاجية معقمة وتمت اضافته الى منبت الأغار الدموي

٢– **صفار البيض:** تم استخدام مادة صفار البيض المحضر تجاريا وتمت اضافته بشكل جيد للمنبت عند حرارة (٤٥ مْ) وفقا لتعليمات الشركة المنتجة حيث تمت إضافة ٢٥ مل صفار بيض الى ٤٧٥ مل من منابت المطثيات الحاطمة.

اجراء الاختبارات البيوكيميائية:

١- **اختبار الاكسيداز Oxidase Test:** هذا الاختبار يستخدم لمعرفة الجراثيم التي تحوي انزيم الاكسيداز حيث تم استخدام أقراص ورقية خاصة مشبعة بمادة (ألفا نافتول داي مثيل ب – فينيلين ثنائي الأمين) حيث تتلون الأقراص الورقية بلون ارجواني بعد مرور حوالي ١٠ ثانية في حال كانت النتيجة إيجابية. وتتم الاختبار عن طريق اكسدة الجرثومة للمواد الكاشفة وتنتج (Indophenol Blue) حيث الصبغة تختزل الى اللون الارجواني العميق وان الجراثيم الحاطمة سلبية الاختبار أي سلبية الاوكسيداز (–) (Koneman *et al*., 1988).

٢- **اختبار تخمر السكريات:** تم تحضير ماء الببتون واضيف له ٠.٥% وفقا لتعليمات الشركة التجارية لكل من السكاكر المختبرة (المالتوز – السكروز – الغلوكوز– اللاكتوز) واستخدم الكاشف الخاص للاختبارات السكاكر وهو كاشف اندريد Andrade Reagent وتم إضافة زيت البارافين المخبري الى سطح انابيب الاختبار من اجل تأمين وسط لاهوائي ، وعند إضافة العينة المشبهة فإن الكاشف العديم اللون في الوسط المتعادل يتحول الى لون وردي بانخفاض الـ PH وتكون نتيجة الاختبار إيجابية (+) (Koneman *et al* ., 1988).

٣- **اختبار الكاتالاز Catalase Test:**

تم اخذ عينة من مستعمرة بكتيرية ووضعها على شريحة زجاجية ووضع عليها قطرة من الماء الاكسجيني ٣% حيث يعتمد هذا الاختبار على امتلاك الجراثيم على انزيم الكاتالاز والذي بدوره يسبب تشكل فقاعات غازية

حيث ان جراثيم المطثيات الحاطمة لاتملك هذا الانزيم وبالتالي لم تظهر فقاعات اثناء الاختبار وهذا يدل على سلبية الاختبار (–) (Koneman *et al*., 1988).

٤- **اختبار تحلل اللستين Lecithinase Test:** تم استخدام هذا الاختبار بإضافة صفار البيض الى المنبت لمعرفة قدرة الجراثيم على تحليل اللستين حيث تكون نتيجة الاختبار اعتمادا على الهالة

المتشكلة حول المستعمرات فإن كانت عاتمة دل على امتلاك الجراثيم للانزيم وان كانت منطقة صافية شفافة كانت نتيجة الاختبار سلبيا.

(Quinn *et al*., 2004).

٥- **اختبار حلمهة الجيلاتين Gelatin Hydrolysis Test:** ان الجيلاتين يتميز بأنه سائل في درجة حرارة الغرفة ويتجمد عند درجات الحراة المنخفضة فإن استطاع الجرثوم تحليل الجيلاتين فإن البيئة تبقى سائلة حتى ولو وضعت في حمام ثلجي حيث يتحلل الجيلاتين لتنتج عن تحلله احماض امينية. وان تحلل الجيلاتين يدل على انها جراثيم المطثيات الحاطمة (Cruikshank *et al*., 1975).

٦- **اختبار تحلل الليباز Lipase Test:** تكون جراثيم المطثيات الحاطمة سلبية في اختبار الليباز(Quinn *et al*., 2004).

٧- **اختبار الاندول Indol Reaction:** يتم استخدام كاشف كوفاك للكشف عن غاز الإندول، حيث تقوم الجراثيم بتكسير الحمض الاميني للتربتوفان Treptophane الموجود في ماء الببتون بواسطة انزيم Treptophanase واطلاق غاز الاندول.

حيث يتم تحضين الجراثيم المشبه بها بماء الببتون لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧ مْ ثم يضاف لكل أنبوب ٠.٥ مل من كاشف كوفاك. ففي حال تشكلت حلقة حمراء تكون النتيجة إيجابية للإندول(+) وفي حال تشكل حلقة صفراء تكون الجراثيم سلبية للاختبار حيث ان المطثية الحاطمة هي سلبية للإندول(−) (Koneman *et al* ., 1988).

٨- **اختبار التخمر العاصف في وسط حليب منزوع الدسم Stormy fermentation Skim Milk:** تم اجراء الاختبار عن طريق اذابة الحليب خالي الدسم ٧ غ /١٠٠ مليلتر ماء يضاف اليها ٢.٥ مل من كاشف عباد الشمس ،حيث هذا الوسط يستخدم للكشف عن جراثيم المطثية الحاطمة المحللة لسكر اللاكتوز وتسبب بدورها تخثر بروتين الكازئين لانخفاض الحموضة وذلك اسفل أنبوب الاختبار وبما ان المطثيات الحاطمة تنتج غاز فإنه سوف يحدث فجوات في الخثرة مع انتشار جزء من الخثرة على جوانب انبوبة الاختبار وهذا ما يسمى بالتخمر العاصفStormy fermentation (Koneman *et al* ., 1988):.

ماءات البوتاسيوم ٣%:تستخدم للتفريق بين موجبة وسالبة غرام حيث عند مزج مستعمرات جرثومية سالبة غرام مع ماءات البوتاسيوم ٣% يتكون مزيج من ذو قوام مطاطي والذي بدوره لا يظهر عند مزج جراثيم موجبة الغرام مع ماءات البوتاسيوم (Quinn *et al*., 2004).

<u>العينات :</u> جمعت (٦٠) عينة من طيور دجاج تنتمي لدجاج اللحم من (١٥) مدجنة من منطقة صافيتا تستخدم نظام التربية الأرضية وذلك خلال شهري تشرين الثاني لعام ٢٠٢١ وكان هدف الدراسة هو عزل وتوصيف بكتريا المطثية الحاطمة لإجراء اختبارات حساسية لمستخلصات متنوعة لأوراق نبات الطيون*(L) Inula viscosa* بمرحلة لاحقة .

حيث تم اخذ العينات من الطيور التي تظهر عليها اعراض الإصابة السريرية بالالتهابات المعوية النخرية الشديدة مثل (قلة الحركة – الخمول– انخفاض الوزن– قلة استهلاك العلف– اسهالات شديدة – زرق مختلط بالغاز او بالمخاط – تدلي الرأس والاجنحة– نسبة النفوق تتراوح بين /١٥–٢٤/%).

وبعد ذلك تمت عملية التشريح وملاحظة العلامات التشريحية لأمعاء الطيور المشتبهة بالاصابة بالاتهابات المعوية النخرية فكانت العلامات التشريحية تتركز في منتصف الأمعاء، انتفاخ الأمعاء، زيادة في سماكة جدار الأمعاء، ظهور محتويات الأمعاء، وجود اعلاف غير مهضومة نتيجة سوء الهضم بسبب الإصابة، تلف الزغابات المعوية، التهاب الاقنية الصفراوية، تغيرات في الكلية، وجود غشاء دفتيري على السطح المخاطي للأمعاء.

أخذت مسحات بواسطة ماسحات قطنية من بطانة الأمعاء في الأماكن الأشد إصابة ومن ثم وضعت في أكياس خاصة ونقلت بواسطة حافظات ثلجية إلى مخابر خاصة بالتحاليل البكتيرية.

الخواص الشكلية لمستعمرات المطثيات الحاطمة:

بعد الزرع على الآغار الدموي وجود مستعمرات ذات تحلل دموي مزدوج النطاق. منطقة داخلية كاملة التحلل (تحلل بيتا) وذلك بسبب Theta toxin ومنطقة خارجية واسعة ذات تحلل جزئي (تحلل الفا) وذلك بسبب Alpha Toxin ثم تم اخذ مسحة من المستعمرة المشتبهة وصبغت بصبغة غرام

ثم نقلت المستعمرة المشتبه بها الى منبت (TSC)وبعد التحضين ٢٤ –٤٨ ساعة ظهرت المستعمرة على الشكل التالي: كبيرة الحجم – متناسقة – ملساء – محدبة – عاتمة.

تم تحضير لطاخات للفحص المجهري من المستعمرات المشتبهة والمعزولة على الوسط المغذي باستخدام قطرة ماء وصبغت بعد ذلك بصبغة غرام وبعدها تم الفحص باستخدام المجهر الضوئي بالعدسة الغاطسة وباستخدام وسط مناسب من زيت الأرز ومقارنة النتائج مع الأوصاف الشكلية للمطثية الحاطمة.

(Quinn *et al*., 2004; John *et al*., 1994)

تمت دراسة الخواص البيوكيميائية للمستعمرات المشتبهة بانها المطثيات الحاطمة وعند تأكيد نوع الجراثيم تم حفظ العزلات بدرجة حرارة –٢٠ مْ لحين اجراء اختبارات الحساسية.

النتائج والمناقشة

أولاً: الأعراض السريرة:

شملت الأعراض السريرية صفات واضحة ومنها الخمول وقلة الحركة وانتفاخ الريش وتدلي الرأس والأجنحة وهذا ينطبق مع العديد من الدراسات ومنها (Porter , 1998 ; Van Immerseel *et al*., 2004).

والاسهالات الشديدة المؤدية لتجفاف وهذا ينسجم مع الدراسة (Long *et al*., 1974)، كما لوحظ انخفاض في استهلاك العلف ونقص بالوزن وهذا يتفق مع (Brennan *et al*., 2003; Helmboldt *et al.,* 1971)

ثانياً: الصفات التشريحية :

تركزت التغيرات التشريجية للإصابة المرضية في الجزء الأوسط من الأمعاء وهذا يتوافق مع العديد من الدراسات ومنها (Bernier *et al* ., 1974 ; Van Immerseel *et al* .,2004)، وكما لوحظ اثناء المعاينة التشريحية بأن الأمعاء الدقيقة منتفخة وهذا يتوافق مع(Van Immerseel *et al* .,2004)

وكما لوحظ توضع غشاء دفتيري على الغشاء المخاطي (Ficken *et al.,* 1997)، ورغم تواجد هذه الصفات التشريحية التي تدل على الإصابة بالمطثية الحاطمة إلا أنها وبحسب العديد من الدراسات السابقة تتشابه مع الأعراض التشريحية لأمراض أخرى مثل المطثية القولونية والكوكسيديا (Porter,1998 ; Long *et al*., 1974) ولذلك كان لابد من الزرع الجرثومي واجراء الاختبارات الكيميا حيوية واستخدام طريقة الصبغ للتأكيد على بكتريا المطثيات الحاطمة.

ثالثاً:الخصائص المزرعية للمطثية المعزولة:

أخذت العينات المحفوظة وتمت تنميتها على الآغار الدموي فكانت لشكل المستعمرة المشتبهة: حيث أظهرت المستعمرات البكتيرية الناتجة بعد الزرع والتحضين مستعمرات دائرية الشكل لونها رمادي مصفر وسطحها لامع وهذا يتوافق مع العديد من الدراسات السابقة (El-Jakee *et al*., 2010;Cravan *et al*.,2001;Cravan, 2000;Bergy, 2009)

كما وأظهرت المستعمرات البكتيرية اللون الأسود وهذا يعود بدوره اختزال المطثية الحاطمة للسولفيت وتحويلة لسولفيد والذي يتحول الى الحديد معطيا هذا اللون للمستعمرات وهذا يتوافق مع دراسة (Araujo *et al*., 2001)

اخذت مسحة وزرعت بطريقة التخطيط الرباعي للتخفيف ثم اخذت مسحة بواسطة ابرة الزرع، وبعد ذلك تمت عملية الصبغ بطريقة صبغة غرام وأظهرت تحت المجهر الضوئي الخصائص التلوينية التالية:

اظهرت الدراسة بأن المستعمرات الجرثومية تحت المجهر الضوئي كانت على شكل عصيات مستقيمة وإيجابية الغرام وغير متحركة وهذا يتوافق مع العديد من الدراسات (Quinn *et al*., 2004 ; John *et al*., 1994)

أجريت بعد ذلك الاختبارات البيوكيميائية للعينات المأخوذة وفق الاختبارات المدروسة فكانت نتائج الإختبار على الشكل التالي:

جدول(١) يوضح الاختبارات البيوكيميائية للمطثيات الحاطمة

نوع الاختبار	اختبار الاكسيداز	التخثر العاصف للحليب	تخمر السكريات				اختبار الكاتالاز	اختبار الليباز	حلمهة الجلاتين
			مالتوز	سكروز	لاكتوز	غلوكوز			
النتيجة	–	+	+	+	+	+	–	–	+

حيث كانت الاختبارات سلبية عند اختبار الكاتالاز والاكسيداز وإيجابية عند اختبارات السكريات وهذا بدوره يتوافق مع العديد من الدراسات ومنها (Quinn *et al*., 2004).

النتيجة النهائية: ١- بعد الدراسات التشريحية والشكلية واللونية واجراء الاختبارات البيوكيمائية تبين لنا ان البكتريا المدروسة هي المطثيات الحاطمة *Clostridium perfringens* وهي المسببة للالتهابات المعوية عند الدواجن. وهذا كان ضمن بحث أولي لإجراء اختبارات حساسية لمستخلص نباتي طبي على هذه البكتريا لمعرفة مدى مقاومتها للصادات الحيوية التي يحتويها.

٢- اثبتت الدراسة وجود التهابات معوية نخرية عند قطعان دجاج اللحم في منطقة صافيتا في محافظة طرطوس وأثبتت تواجد الإصابة بالمطثيات الحاطمة (*C.Perifrings*) وقد بينت دراسات مشابهة أخرى تواجد المرض في عدة دول ومنها استراليا (Nairn *et al*., 1967) فرنسا (Casewell *et al*., 2003) والأردن (Gharaibeh *et al*., 2010) ومصر (Abd – El All *et al*., 2014) والعديد من البلدان الأخرى.

الاستنتاجات و التوصيات :

الاستنتاجات:

١- تعد المطثيات الحاطمة من المسببات المرضية للالتهابات المعوية النخرية عند الدواجن.

٢- تعتبر طريقة العزل الجرثومي واجراء الاختبارات البيوكيميائية هي الأفضل لتحديد نوع هذه الجراثيم نظرا لتشابه الصفات التشريحية والعلامات السريرية مع امراض أخرى مثل الكوكسيديا.

التوصيات :

١- نظرا لخطورة البكتريا المدروسة يوصى بالقيام بدراسات لاحقة لايجاد صادات حيوية طبيعية لمستخلصات نباتية قد تؤثر على انتشار هذه البكتريا وتحد من تاثيراتها السلبية .

٢- اجراء دراسات وابحاث للكشف عن المسببات الأساسية لهذه البكتريا.

٣- اجراء درسات لامكانية إصابة الدجاج البياض بهذه البكتريا ومدى خطورتها على الإنتاج.

٤- اجراء دراسات دقيقة لتقدير الخسارة في حال تم المعالجة للبكتريا الممرضة بعد ظهور العلامات السريرية ومقارنتها بدراسات أخرى تمت فيها إعطاء الصادات الحيوية كعلاج وقائي قبل ظهور الاعراض.

٥-التشدد في تطبيق إجراءات الامن الحيوي من إعطاء اللقاحات المناسبة مما يقلل من نسبة الإصابة بها مما ينعكس إيجابا على الإنتاج.

المراجع :

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-Adams, M.R. & Moss, M.O., 1995. Bacterial Agents of Foodborne Illness. The Royal Society of Chemistry. Guildford. 364 pp.

3-Araujo. M., Sueiro, R.A., Gómez, M.J. and Garrido, M.L., 2001. Enumeration of Clostridium perfringens spores in ground water samples: comparison of six culture media. J. Microbiol. Methods. 57: 175–180.

4-Brennan, J., Skinner J., Barnum D.A., and Wilson J., 2003. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. Poult Sci. 82:360–363.

5-Bernier, G., J.B. Phaneuf, and R. Filion., 1974. Necrotic enteritis in broilers. I. Clinoco-pathological aspect. Can J Comp Med. 38:280– 285.

6-Bergey DH., 2009 Clostridium. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, the firmicutes vol 3, 2nd edn. Williams & Wilkins, USA, p 738b.

7-Champan, H.D., Z.B. Johnson, and J.L McFarland., 2003.Improvements in the performance of commercial broilers in the USA: analysis for the years 1997 to 2001. Poult Sci. 82:50–53.

8-Catherine M. Logue., 2013. clostridial diseases. In: Diseases of Poultry. 13th ed. David E. Swayne, John R. Glisson, Larry R. McDougald, Lisa K. Nolan, David L.Suarez, and Venugopal Nair

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-Craven SE, Stern NJ, Bailey JS, Cox NA.2001. Incidence of Clostridium perfringens in broiler chickens and their environment during production and processing. Avian Diseases.,; 45:887-896.

11-Craven S.E., 2000. Colonization of the intestinal tract by Clostridium perfringens and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. Poult Sci. 79:843–849.

12-Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I., 2003. The European ban on growthpromoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. J Antimicrob Chemother ;52:159-61.

13-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.

14-El-Jakee J, Nagwa AS, Bakry MA, Sohier MS, Samy AA, Khairy EA., 2010. Implementation of a rapid procedure for distinguishing enterotoxigenic Clostridium perfringens. Journal of American Science; 6:499-508.

15-Ficken MD and Wages DP., 1997. Necrotic enteritis. In Diseases of Poultry. 10th Ed, Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR and Saif YM, eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, pp: 261- 264.

16-Gharaibeh S, Al Rifai R, Al-Majali., 2010. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens from broiler chickens . Anaerobe Volume (16), P 586-589.

17- Hafez HM and Jodas S., 1997. Nekrotisierende Enteritis In: Putenkrankheiten, Hafez HM and Jodas S ,eds. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart Germany, pp: 80-84.

18-Helmboldt, C.F., and Bryant. E.S., 1971. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. Avian Dis. 15:775–780

19-Hofshagen, M. & Stenwig, H., 1992. Toxin production by Clostridium perfringens isolated from broiler chickens and capercaillies (Tetrao urogallus) with and without necrotizing enteritis. Avian Diseases 36, 837-43.

20-Johansson ,A.,2006. Clostridium perfringens the causal agent of necrotic enteritis in poultry Doctor's dissertation. ISSN 1652-6880, ISBN 91-576-7083-8.

21-John, G.H.; Noel, R.K.; Peter, H.S.; James, T.S.; Stanley, T. W., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 4th ed. Li-ppinncott Williams & wilkins. Philadelphia, London. Pp. 196 – 283.

22-Kenneth O and Glenn S., 2013 Necrotic Enteritis. In: Diseases of Poultry. 13th ed. David E. Swayne ,John R. Glisson, Larry R. McDougald, Lisa K. Nolan, David L.Suarez, and Venugopal Nair Pages 949-953.

23-Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Dowell, V.R.; Janda, W.M.; Sommers, H. M. and Winn, W.C., 1988. Color Atlas of Diagnostic Microbiology. 3rd ed., Lippincott Company.

24-Long, J.R., and Truscott R.B., 1976. Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Reproduction of the disease. Can J Comp Med.40:53–59.

25-Lovland, A. & Kaldhusdal, M., 2001. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of Clostridium perfringens-associated hepatitis. Avian Diseases 30, 73-81.

26-McReynolds JL, Byrd JA, Anderson RC, Moore RW, Edrington TS, Genovese KJ,, 2004. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. Poult Sci;83:1948-52.

27-Nairn.M.E., Bamford. V.W., 1967. Necrotic enteritis of broiler chickens in western Australia Aust Vet J, 43 , pp. 49-54.

28-Novak, J.S. & Juneja, V.K., 2002. Clostridium perfringens: hazards in new generation foods. Innovative Food Science & Emerging Technologies 3, 127-132.

29- Parish, W.E., 1961c. Necrotic enteritis in the fowl (Gallus gallus domesticus). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of Clostridium welchii. Journal of Comparative Pathology 71, 377-93

poultry Doctor's dissertation. ISSN 1652-6880, ISBN 91-576-7083-8.

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. 165. Randall, C.J., 1991. Diseases and Disorders of the Domestic Fowl.

33-Songer, J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clinical Microbiology Reviews 9, 216-34.

34-Thompson, D.R., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R. & Prescott, J.F., 2006. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. Veterinary Microbiology 113, 25-34.

35- Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F, Ducatelle R., 2004. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. Avian Pathol;33:537-49.

36-Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y. & Park, Y.H., 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 35, 228-32.