تاثير اصابة دجاج البيض تجريبيا بجرثومة *Listeria monocytogenes* في بعض مكونات الدم

ميثاق غالب الربيعي ، فارس عبد علي العبيدي

كلية الطب البيطري / جامعة بغداد

الخلاصة

هدف البحث دراسة جرعة اثر إصابة دجاج البيض تجريبيا بجرثومة *Listeria monocytogenes* عن طريق الفم في بعض الصفات الدموية . وزعت 45 دجاجة بياضة على ثلاث معاملات وكل معاملة الى ثلاث مكررات (15 طير / 3مكررات) حيث شملت T_1 : مجموعة سيطرة سالبة وخالية من الاصابة ، اما المعاملتين T2 و T3 فقد اصيب الدجاج فيهما بالجرثومة الضارية فمويا وبالجرعتين $1x10^5$ و $1x10^{10}$ خلية / مل / دجاجة على التوالي . اشارت نتائج الفحوصات الدموية الى تفوق دجاج T1 على T2 وT3 معنويا في تركيز P.C.V. والهيموكلوبين وأعداد خلايا الدم الحمر بعد 6 أيام من الأصابة التجريبية لتختفي هذه الفروق بعد 35 يوم ، في حين ظهرت الفروق المعنوية في اعداد خلايا الدم البيض بعد 9 ايام من الأصابة التجريبية ولم تتغير قيم تركيز البروتين الكلي الا بعد 21 يوما من الأصابة لتنتهي بعد 42 يوم من الأصابة مع عدم ظهور فروق معنوية أحصائيا في تركيز حامض اليوريك.

EFFECT OF EXPERIMENTALLY INFECTION LAYERS WITH *LISTERIA MONOCYTOGENES* ON SOME BLOOD FEATURES

Methaq G. Al-Rubaiey , Faris A. Al-Obaidi and

College of Veterinary Medicine/ University of Baghdad

Abstract

The object of this study was to determine the effect of experimentally infection dose of layers orally on some blood components. A total of 45 layer were distributed into three groups and each group to three replicates (15 layer per replicate) cosnsisted of T1 (control group free of infection) , T2 and T3 were orally experimentally infected by $1x10^5$ and $1x10^{10}$ (CFU \ ml \ hen of *L. monocytogenes* .

The results of blood tests showed that T1 layer predominant in P.C.V. , Hb , and R.B.Cs. after 6 days of experimentally infection and this differences disappeared after 35 days , when as the differences in W.B.C.s appeared after 9 days and total protein concentration after 21 days and disappeared after 42 days of experimentally infection with no statistically differences in uric acid concentration .

المقدمة

يسبب مرض اللستريوسز (Listeriosis) في الدجاج خسائر اقتصادية من غير أن يصاحبها ظهور علامات سريريه مميزة لذلك من الصعوبة تشخيص المرض في الدجاج وعند إصابة الجهاز العصبي يسبب الهلاك المبكر للأفراخ ، وأن الحالات المسجلة للمرض منخفضة نسبيا ومن أهم الآفات المرضية الملاحظة هي وجود مناطق تنخر في القلب ، الكبد ، الطحال ،الكلى ، إضافة إلى التهاب الأكياس الهوائية واحتقان الأوعية الدموية للقلب (1) .

تعد منتجات الدواجن من البيض واللحوم المصنعة من الاغذية الحاملة لجرثومة *L.monocytogenes* وخاصة تلك المخزونة بالتبريد والتجميد وقد عزلت هذه الجرثومة من هذه المنتجات ومن العديد من أنواع اللحوم المصنعة كما تعد هذه الجراثيم من المشاكل المهمة في مجال الصناعات الغذائية لما تسببه من حالات التسمم الغذائي (2) حيث أن هذه الجراثيم واسعة الانتشار في الطبيعة ولها القدرة على العيش والتكاثر في مدى واسع من درجات الحرارة و تحت أس هيدروجيني وضغط أوزموزي متباينان (3 و 4) ، ونظرا لقلة الدراسات حول إصابة دجاج البيض بجراثيم *L. monocytogenes* لذا يهدف هذا البحث إلى معرفة تأثير جرعة الإصابة التجريبية بجرثومة *L. monocytogenes* الفم في بعض الصفات الدموية.

المواد وطرق العمل

اجري البحث في بيت الحيوان في كلية الطب البيطري / جامعة بغداد باستخدام 45 دجاجة بياضة بعمر 50 اسبوع وتم الحصول عليها من احد الحقول المحلية في مدينة بغداد / أبو غريب ، بعد وصول الدجاج تم توزيعها على المعاملات المختلفة بصورة عشوائية داخل قاعة مخصصة لتربية الدجاج تحوي على 15 قن متساوية الأبعاد 1 X 1 متر وجهزت بالمناهل والمعالف بحيث خصص لكل قن منهل ومعلف واحد . تم تغذية الدجاج على عليقة دجاج بياض تجارية تجهز 20 % بروتين وطاقة ممثلة 2900 كيلوسعرة لكل كيلوغرام علف ، وكان العلف يقدم بصورة حرة أمام الدجاج .

الجرثومة المستخدمة :

تم الحصول على عترة جرثومة *L. monocytogenes* من وحدة الامراض المشتركة/ كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد.

تحضير جرعة الاصابة التجريبية لجرثومة *L.monocytogenes* :

لغرض تحضير جرعة الأصابة لهذه الجرثومة فقد زرع مليئ عروة الناقل في 100 ملل من وسط مرق اللستيريا المغذي Enrichment Listeria Broth, Modified (ELBM) وحضنت بدرجة 37 م ° لمدة 48 ساعة , أجريت سلسلة من تخافيف عشرية لمحتويات الوسط وذلك بأخذ 1 ملل من الوسط وأضافته الى محلول 9 ملل محلول .P.B.S ليعطي التخفيف الأول 10^{-1} ثم أستمرت سلسلة التخافيف الى التخيف العاشر بعد ذلك تم زرع من كل تخفيف بنقل 0.1 ملل من كل تخفيف ونشرت على سطح طبق (Trypticase (TSA Soy Agar ونشرت على سطح الاطباق بواسطة الناشر (Spreader) وبصورة جيدة بحيث شمل كل سطح الطبق ثم حضنت الاطباق بدرجة 37 ° م لمدة 24 ساعة ، بعدها تم عد المستعمرات في الطبق الذي يحتوي على (30−300) مستعمرة وحسب التخفيف على اساسها مع مراعاة زرع طبقين لكل تخفيف ثم استخراج المعدل وحسب طريقة Surface Viable Count by Spreading Method (5) .

اصابة الدجاج :

تم أعطاء الدجاج الجراثيم بطريقة التجريع الفموي (Orally) ، وبكمية 1 مل من الجرعتين 10^5 و10^{10} خلية / 1 مل للمعاملتين الثانية والثالثة على التوالي بعد حسابها مسبقاً يوم التجريع.

عينات الدم :

سحبت عينات دم قبل قتل الدجاج من القلب مباشرة من ثلاث دجاجات من كل مجموعة حيث سحب بحدود 5 مل من الدم ثم قسم إلى قسمين القسم الأول مع مضاد تخثر لأجل إجراء الفحوصات الخلوية ، والثاني بدون مانع تخثروضع في الثلاجة في درجة حرارة 4 م ? لمدة 24 ساعة ، وبعد أن فصلت الخثرة عن جدار الانبوب بوساطة عيدان خشبية(Sticks) ، فصل المصل منه باستخدام جهازالمنبذة (Centrifuge) مدة 15 دقيقة 1000 دورة / دقيقة ، بعدها حفظ المصل(Serum) في قناني بلاستيكية صغيرة (Microfuge tube) لحين إجراء الفحوصات ، حيث اعتمدت الطريقة التي أشار إليها Varley *e.al.*,(6) لتقدير تركيز الهيموغلوبين وقدر عدد الخلايا الدم الحمر والبيض وفقاً للطريقة التي أشار إليها Natt and Herrick(7) وحسبت نسبة الخلايا المتغايرة إلى الخلايا اللمفية بعد تحُضير مسحات من الدم على شرائح زجاجية وبعد جفاف الدم (حوالي 10 دقائق) صبغ ت الشرائح بمزيج من صبغتي Wright-Giemsa وفقاً لطريقة Shen and Patterson,(8) ، وعدت باستعمال المجهرالضوئي ، وعلى قوة تكبير 100x بوضع قطرة زيت على الشريحة وحسب طريقة (9) . تم قياس تركيز البروتين الكلي وتركيز حامض البوليك في مصل الدم عن طريق استعمال عدة (Kit) مجهزة من قبل شركة (Biomaghreb) اذ تم الحصول عليها من السوق المحلية واستناداً الى الطريقة التي اشار اليها Henry *et.al.*,(10) .

التحليل الأحصائي :

حللت البيانات وفق التحليل العشوائي الكامل (Complete Randomized Design)، وقورنت المتوسطات على وفق إختبار دنكن متعدد المديات (Duncan's multiple range test) وبإستخدام التحليل الأحصائي الجاهز SAS (11) .

النتائج

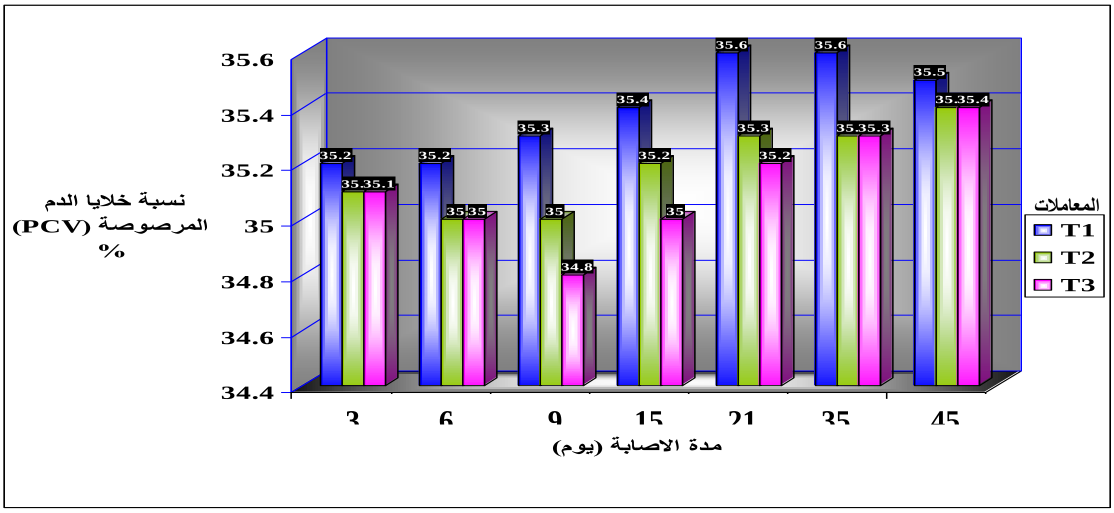
حجم خلايا الدم المرصوصة:

يتضح من الشكل (1) عدم وجود فروق معنوية في تركيز P.C.V. دم دجاج المعاملات الثلاثة بعد 3 أيام من الأصابة التجريبية بجرثومة اللستريا ، إلا أن فروقا معنوية ظهرت في هذه الصفة بعد 6 أيام من الأصابة التجريبية مسببة أنخفاض قيمتها الى 35.0 % لمعاملتي T2 وT3 مقارنة بنسبة 35.2 % لمعاملة السيطرة T1 ، ومع الوصول الى 9 أيام من الأصابة التجريبية ظهرت فروق معنوية ما بين المعاملات الثلاثة , إذ سجل دجاج معاملة السيطرة أعلى نسبة وقد بلغت 35.3 % تلتها معاملة الأصابة بجرعة 10^5 إذ سجلت 35.0 % لتنخفض الى 34.8 % في الدجاج المصاب تجريبيا بجرعة 10^{10} ، وأستمر هذا الحال بعد 15 و21 يوما من الأصابة التجريبية إذ تفوق دجاج معاملة السيطرة على معاملتي الأصابة T2 وT3 التي لم تظهر بينها فروق معنوية لتختفي هذه الفروق بعد 42 يوما من الأصابة التجريبية وقد بلغت قيم P.C.V. 35.5 و 35.4 و 35.4 % للمعاملات الثلاثة على التوالي .

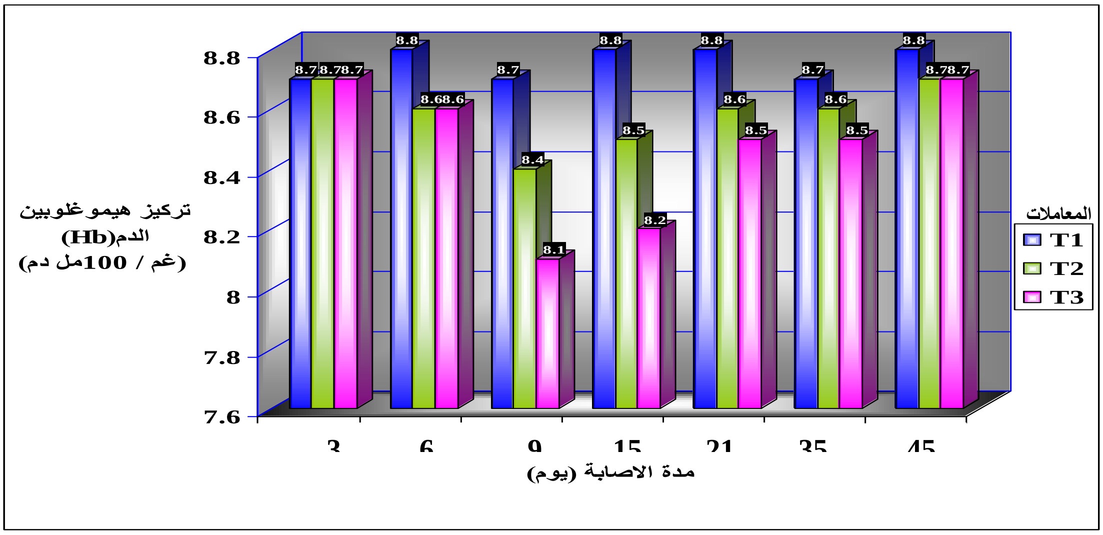
هيموكلوبين الدم :

نلاحظ من الشكل (2) عدم وجود فروق معنوية في تركيز هيموكلوبين الدم للمعاملات الثلاثة بعد 3 أيام من الأصابة التجريبية للمعاملتين T2 وT3 وقد بلغ التركيز في كل منهما 8.7 غم هيموكلوبين/100 مل دم

، إلا أن فروقآ معنوية قد ظهرت في هذه الصفة ما بين المعاملة T1 إذ سجلت 8.8 غم هيموكلوبين/100 مل دم وبين المعاملتين T2 وT3 إذسجلتا 8.6 غم هيموكلوبين/ 100 مل دم لكل منهما بعد الأصابة التجريبية بجرثومة اللستريا بعد 6 أيام ، وعند



الشكل (1) تأثير جرثومة اللستريا *Listeria monocytogenes* على حجم خلايا الدم المرصوصة (PCV) % في دم الدجاج البياض المصاب تجريبياً



الشكل (2) تأثير جرثومة اللستريا *Listeria monocytogenes* على تركيز هيموغلوبين الدم (Hb) (غم / 100 مل دم) في دم الدجاج البياض المصاب تجريبياً

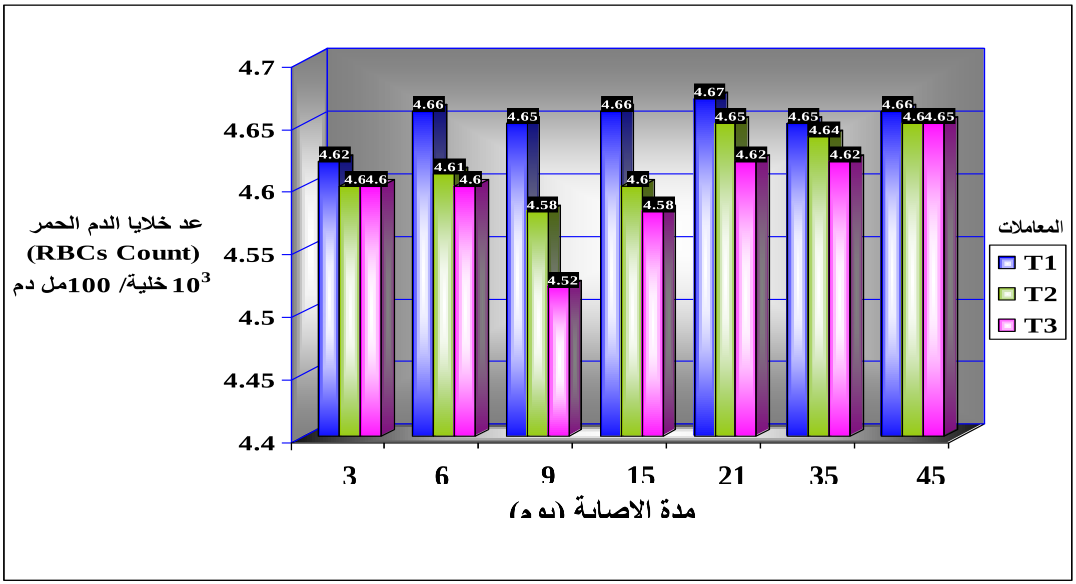
الوصول الى 9 أيام ظهرت فروق معنوية ما بين المعاملات الثلاثة إذ سجلت 8.7 و 8.4 و 8.1 غم هيموكلوبين/100 مل دم للمعاملات الثلاثة على التوالي وبفارق معنوي (P?0.05) وكان الأنخفاض يزداد مع زيادة جرعة الأصابة باللستريا , وبعد مرور 21 يوم من الأصابة التجريبية عادت الفروق لتختفي بين المعاملتين T2 وT3 إلا أن المعاملةT1 كانت متفوقة معنوياَ عليهما (P?0.05) . وبدأت الفروقات بالأختفاء تدريجياَ بين المعاملات الثلاثة عند الوصول الى 42 يوماً بعد الأصابة حيث لم تظهر فروق معنوية .

عدد خلايا الدم الحمر R B C:

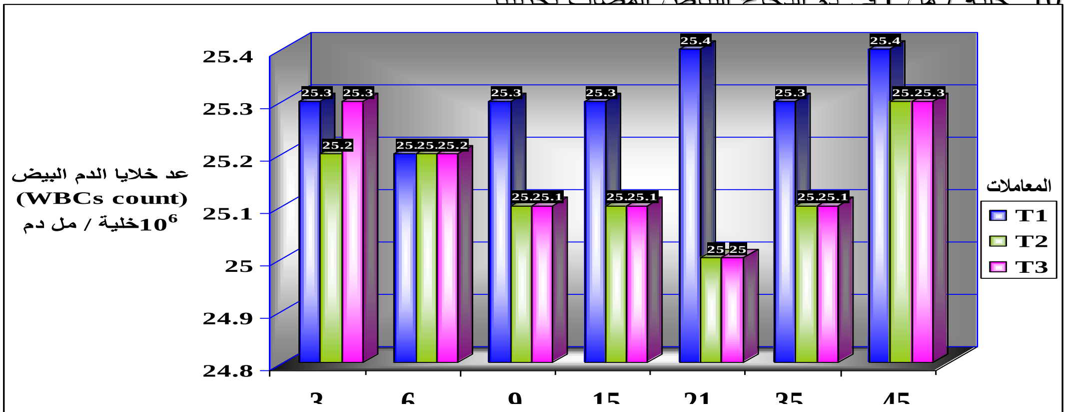
يتضح من الشكل (3) أن قيم أعداد خلايا الدم الحمر كانت متوافقة في نتائجها مع قيم .P.C.V و Hb حيث لم تظهر فروق معنوية في أعداد هذه الخلايا ما بين المعاملات الثلاثة بعد 3 أيام من الأصابة التجريبية للمعاملتين T2 وT3 بجرثومة اللستريا بالرغم من وجود أرتفاع حسابي بسيط لصالح T1 وبدءت الفروق المعنوية تظهر بعد 6 أيام حيث سجلت معاملة T1 أعلى القيم (4.66) مليون خلية /مل دم وبفارق معنوي (P?0.05) عن معاملتي T2 و T3 إذ سجلتا (4.61) و (4.60) مليون خلية /مل دم وعلى التوالي . وأستمر تفوق المعاملة T1 على T2 وT3 بعد 9 و15 و21 يوما من الأصابة التجريبية وكانت أقل القيم قد سجلتها معاملة الأصابة التجريبية بالجرعة العالية لتبدء الفروق المعنوية بين المعاملات الثلاثة بالأنخفاض المعنوي والتلاشي التدريجي وصولا الى عمر35 و 42 يوما من الأصابة التجريبية باللستريا.

أعداد خلايا الدم البيض :

نتائج فحص عد خلايا الدم البيض موضحة بالشكل (4) حيث لم تظهر فروق معنوية في قيم هذه الصفة ما بين المعاملات الثلاثة بعد 3 و6 يوم من الأصابة التجريبية باللستريا إلا أن الفروق المعنوية ظهرت بعد 9 ايام من الأصابة إذ تفوقت معنويا (P?0.05) معاملة السيطرة (T1) مسجلة 25.3 الف خلية دم بيضاء / مل دم على معاملتي الأصابة التجريبية T2 وT3 إذ سجلتا 25.1 الف خلية دم بيضاء /مل دم في كل منهما وبدون فرق معنوي وأستمرت نتائج هذه الصفة على نفس الحال أي بتفوق معاملة السيطرة على معاملتي الأصابة التجريبية بالجرعتين القليلة والعالية بعد 15 و21 و35 يوم من الأصابة التجريبية لتختفي الفروق بين المعاملات الثلاثة عند الوصول الى 42 يوما حيث سجلت المعاملات الثلاثة 25.4 و25.3 و25.3 الف خلية دم بيضاء / مل دم على التوالي وبدون فروق معنوية



الشكل (3) تأثير جرثومة اللستريا *Listeria monocytogenes* على عدد خلايا الدم الحمر (RBC) Count (10^3 خلية / مل) في دم الدجاج البياض المصاب تجريبياً



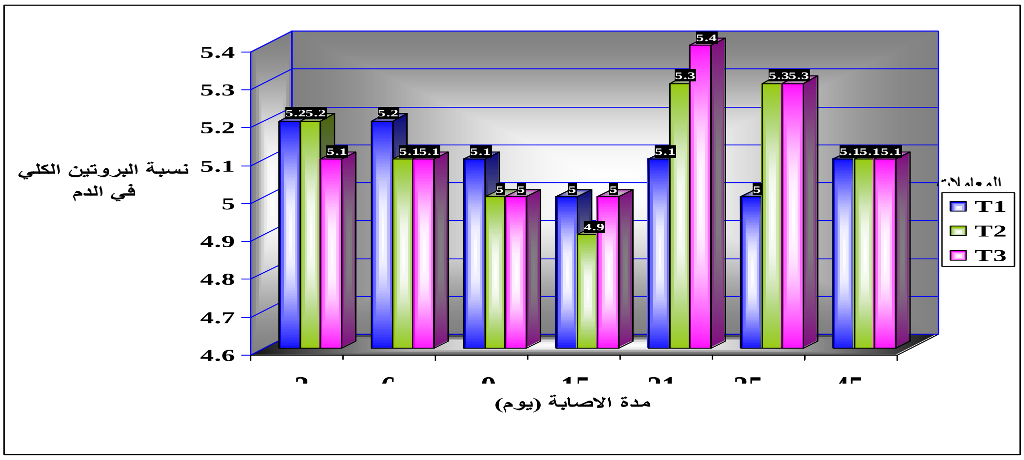
الشكل (4) تأثير جرثومة اللستريا *Listeria monocytogenes* على عدد خلايا الدم البيض (WBC) Count (10^6 خلية / مل) في دم الدجاج البياض المصاب تجريبياً

البروتين الكلي :

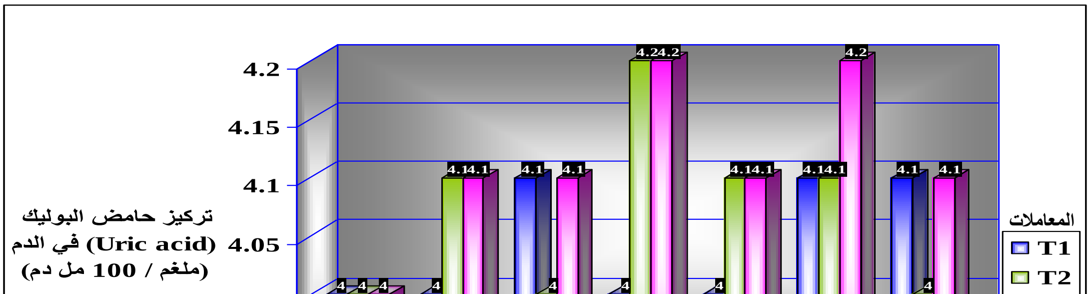
يتضح من الشكل (5) أن تركيز البروتين الكلي كان يتراوح بين 5.1 – 5.2 ملغم بروتين /100 مل مصل دم حيث لم تظهر فروق معنوية بين معاملة السيطرة وبين معاملتي الأصابة التجريبية باللستريا . ولم يتغير الحال في قيم هذه الصفة بعد مرور 6 و 9 و15 يوما من الأصابة التجريبية للمعاملتين T2 وT3 ، إلا أن تركيز البروتين الكلي لمصل دم دجاج معاملتي الأصابة باللستريا T2 وT3 قد بلغ 5.3 و 5.4 ملغم بروتين /100 مل مصل دم وبتفوق معنوي (P?0.05) على المعاملة T1 التي سجلت 5.1 ملغم بروتين /100 مل مصل دم . وأستمر الحال بتفوق المعاملتين T2 وT3 على المعاملة T1 أيضا بعد 35 يوما من الأصابة إلا أن الفروق المعنوية بين المعاملات الثلاثة في تركيز هذه الصفة أنتهت بعد 42 يوم من إحداث الأصابة التجريبية .

تركيز حامض اليوريك :

يتضح من الشكل (6) عدم ظهور فروق معنوية أحصائيا في تركيز حامض اليوريك في مصل دم دجاج معاملة السيطرة T1 ومعاملتي الإصابة التجريبية T2 وT3 على الرغم من حدوث زيادة حسابية في قيم تركيز هذه الصفة بعد 15و21 يوما من الأصابة التجريبية للمعاملتين T2 وT3 .



الشكل (5) جرثومة اللستريا *Listeria monocytogenes* على مستوى البروتين الكلي (Total Protein) (gm /100 ml) في دم الدجاج البياض المصاب تجريبياً



الشكل (6) تأثير جرثومة اللستريا *Listeria monocytogenes* على مستوى حامض البوليك (Uric acid) (mg/ 100 ml) في دم الدجاج البياض المصاب تجريبياً

المناقشة

تعد صفة عد خلايا الدم الحمر من الصفات الدموية المهمة للتعبير عن مقدار التوازن الفسلجي للدم ، إذ يلاحظ انخفاض قيمتها لدجاج المعاملتين T2 و T_3 ، حيث ان الانخفاض الحاصل نتيجة الاصابة التجريبية بالجرعة العالية التي تعد من عوامل الاجهاد المرضي التي تسهم في خفض اعدادها (12 و13) ، وان معـدل خلايـا الدم المرصوصة كان متناسباً طردياً مع أعـداد الكريـات الحـمر لكل معاملة ، مع ملاحظة وجود ارتبـاط وثيـق بين تركـيز الهيموغلوبين واعـداد خلايا الدم الحمر حيث ان انخفـاض اعـداد الكريـات الحمر سـوف ينعكس في خفض الهيموغلوبين والعكس صـحيح (13) ، ويلاحظ انخفـاض اعـداد الخلايا البيض لدجاج المعاملتين T2 و T_3 عند الاصابة بجرثومة اللستريا وقـد يعود ذلك الى ان جرثومة اللستريا تتواجد داخل الخلايـا المناعية وتختفي في مواقع محددة من الجسم (14) ، وان انتشـار الجرثومة عبر مجرى الدم او اللمف ضمن خلايا المضيف كالخلايا البلعمية دون المرور بمرحلة خارج الخلية مما يحصل ارتشاح شديد لخلايا الدم وخاصة اللمفية والبلعمية الى النسيج ثم خفض مستوى الخلايا البيض في الدم المحيطي (15 و 16) ، توافقت نتائج قيم البروتين الكلي مع انخفاض الاجهاد الناتج من الاصابة التجريبية وفي نفس الوقت مؤشر لتحسن المناعة (17).

المصادر

1. Schlech WF (2000). Food borne Listeriosis . Clin Infec Dis. 31: 770-775.
2. Berrange ME North JK Smith DPand Lyon GE (2000). Incidence of *L. monocytogenes* on pre-scald and post – cill chicken carcasses .J Appl. Poult Rese

3. Liu D (2008) . Handbook of *Listeria monocytogenes* . CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW USA.
4. Farber JM and Peterkin PI (1991). *Listeria monocytogenes* , a foodborne pathogen. Microbiol. Rev. 55: 476-511.
5. Miles AA Misra SS and Irwin JO (1938). The estimation of bactericidal power of blood. J Hyg. 38: 732-749.
6. Varley H Gowenlock AH and Bell M (1980). Practical Clinical Biochemistry . 5th ed. William Heinemann Medical Books Ltd. London .
7. Natt MP and Herrick CA (1952).A new blood diluent for counting the erythrocytes and Leukocytes of the chicken Poultry Sci. 31:735-738.
8. Shen PF and Patterson LT (1983).A simplified wright's stain technique for routine Avian blood smear staining,Poult Sci. 62:923-924.
9. Burton RR and CW Guion (1968) . The differential Leucocyte blood count : its precision and individuality in the chiken . Poultry sci.47:1945-1949.
10. Henry RJ Sobel C and Kim J (1982). Determination of uric acid . In Fundamentals of Clinical Chemistry NW Tietz ed. WB Saunders Company. London.
11. SAS,Institue,(2001).SA/TAT user's Guide version G. 4th ed SAS Institue Gary NC.
12. Campbell TW(1988). Avian haematology and cytology 1st edition Ames IA.Iowa state Uni press .
13. Sturkie PD(1986).Avian physiology 4th ed springer – Verlag .NewYork .Berlin Heidelberg.Tokyo .
14. Dramsi S Kocks C Forestier C and Cossart P (1993) . Internalin-mediated invasion of epithelial cells *by Listeria monocytogenes* is regulated by thebacterial growth state, tempreture and the plieotropic activator. Prfa. Mol. Microbiol. 9: 930-941.
15. Hof H Nichterlein T and Kretschmar M (1997). Management of Listeriosis . Clin. Microbiol. Rev. 10: 345-357.
16. Schwarzkoph A (1996). *Listeria monocytogenes_* : aspects of pathogenicity. Pathol. Biol. Paris. 44 : 769-774.
17. Gross WB and Siegel HS (1983). Evaluation of heterophile/ Lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens .Avian Dis .;27 :972 -979.