عزل أربعة أنواع من الجراثيم المسببة للتلف الكلوي في دجاج اللحم

حارث محمد ألحيالي حيدر طعمة الكعبي سعاد عبد الكريم
فرع الأمراض والدواجن – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

الخلاصة

بلغ عدد حالات الخمج الكلوي المستعملة في هذه الدراسة 80 حالة من الدجاج المرسل إلى مراكز تشخيص الدواجن وتم عزل اربعة انواع من الجراثيم وهي *Proteus , mirabilis, E.coli* , *Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aerogenoza*

اذ استعملت العدة التشخيصية api20E و كانت نسب العزل 5 , 17.5 , 22.5 و 55 % لكل منها على التوالي في حين لم تعزل أي بكتريا من كليتي الدجاج السليم ولتأكيد كون الاشريكيا كانت سببا للتلف الكلوي . استعمل 40 فرخا بعمر ثلاثة أسابيع قسمت عشوائيا وبالتساوي إلى مجموعتين حقنت الأولى بجرعة 0.5 مل من عالق البكتريا الحاوي 2×10^7 CFU بالوريد الو داجي أما الثانية فحقنت بجرعة 0.5 مل ماء مقطر وعدت مجموعة سيطرة. أظهرت نتائج حقن الاشريكيا القولونية المحقونة بأنها شديدة حيث أدت إلى هلاك 70% من الأفراخ المحقونة و ظهرت تغيرات مرضية عيانية في الكليتين. تمثلت باحتقانهما وتضخمهما وعند دراسة المقاطع النسيجية للكليتين في الافراخ المحقونة لوحظ وجود الالتهاب الكلوي الخلالي الحاد. وشكلت عزل انواع البكتيريا من كليتي الدجاج سبق علمي مهم في حالات الخمج الكلوي في الدجاج ونوصي باجراء خمج تجريبي للجراثيم الاخرى التي تم عزلها في هذه الدراسة وهي*Proteus mirabilis, Pseudomonas aerogenoza , Klebsialla pneumonia* لمعرفة التغيرات العيانية والنسيجية .

Isolation of four types of bacteria that cause kidney damage in broiler chickens.

Harith M. Al-Hiyali , Haidar T. Al-Kabbi and Suad Abdulkarim.
Department of Pathology and Poultry Diseases
College of Veterinary Medicine, University of Baghdad.

Summary

This study was conducted on 80 cases of damaged kidneys received by poultry disease diagnostic centers in Baghdad. Four microorganisms were isolated *E.coli* , *Proteus milabilis* , *Pseudomonas aregenosa* and *Klebsiella pneumonia* and formed 55, 22.5 , 17.5 ,and 5% of the infection respectively . While no any kind of bacteria were isolated from kidneys of healthy chicks. To be sure the *E. coli* could be a cause of kidney damage. An experimental infection with *E.coli*

was carried out on 40 chicks, three weeks old, and randomly divided into two groups. Chicks of the first group was inoculated intravenously with 0.5 ml of field isolated *E. coli* suspension containing $2x10^7$ colony forming unit (CFU), while the second group was inoculated with 0.5 ml distilled water and considered as control group. The results revealed that chicks inoculated with *E.coli* showed 70% mortality rate with severely congested swollen kidneys with acute interstitial nephritis. However, this study gave information on kidney damage widely spread at this time; therefore, it could be recommended for other studies to be hold in the future on the other causative agents of each case.

المقدمة

تعد الكليتين من الأعضاء التي تؤدي دورا مهما متميزا في توازن الماء والهواء وتخليص الجسم من الفضلات النايتروجينية الناتجة من تمثيل البروتين (1و2) ومن الممكن أن يتعرض الجهاز البولي في الدجاج خلال فترة التربية إلى خمج وحالات مرضية لأسباب قد تكون إدارية مثل البرد أو إلى إصابات جرثومية او فايروسية (3و4). وتشكل الاشريكيا القولونية نسبة كبيرة قد تصل إلى حوالي أكثر من 50% من خمج الجهاز البولي فضلا عن العصيات الأخرى السالبة لصبغة كرام من اجناس مختلفة مثل, *Enterobacter*، *Proteus* وتعد جرثومة Psedomonas وهي من المسببات المرضية للقناة البولية في الإنسان (5 و6 و7) تم عزل الاشريكيا القولونية من العجول المصابة حقليا بمتلازمة نخر الكليتين الخلالي و أظهرت آفات مرضية عيانية تمثلت بوجود عقيدات دقيقة صفراء إلى بيضاء اللون على سطح الكليتين وتمثلت التغيرات النسيجية بوجود نخر وضمور في نسيج الكبيبات الكلوية وارتشاح خلايا العدلات و البلعمية و اللمفية (8).وفي دراسة قام بها (3) حيث عزل ثلاثة انواع من الجراثيم من خمج كلوي حقلي وهي *Staph aurous E coli, Actinomyces phylogenies* , وتم إحداث خمج تجريبي في فروج اللحم واحدث تضخما واحتقانا في الكليتين مع بقع نزفية وتوسع الحالبين. أما التغيرات النسيجية فكانت أبرزها التهاب النسيج ألخلالي. كثرت في الآونة الأخيرة حدوث حالات التلف الكلوي في الدجاج لذا تهدف هذه الدراسة إلى تسليط الضوء للتعرف على المسببات البكتيرية التي تؤدي إلى حدوث التغيرات وآفات مرضية في كليتي الدجاج من خلال عزل جرثومي من الاخماج الحقلية وإجراء الاخماج البكتيرية التجريبية لمعرفة التغيرات النسيجية الناجمة عن البكتيريا المعزولة والمحقونة.

المواد وطرائق العمل

أولا جمع النماذج: تم جمع 80 عينة من كليتي الدجاج المخمجة حقليا والمشخص سريريا بانها التهاب كلوي لغرض العزل البكتيري. جمعت النماذج من الحالات الواردة للمختبر المركزي التابع للشركة العامة للبيطرة والمختبرات الأهلية وذلك خلال الفترة الممتدة من آب 2000 ولغاية آب 2001. أخذت النماذج بمعدل كلية واحدة او اثنين لكل حالة نموذجية تؤخذ بعد ذبح الدجاج المريض ومعاينة الآفات الواضحة عليه بعد تشخيصها

ثانيا العزل البكتيري: تم اخذ العينات برفع الاجزاء الثلاثة للكلية الواحدة برفق كي لا تتهتك بواسطة مقص مدبب. وتعقم بالكحول 70% لمدة 0.5 –1 دقيقة بعدها تمرر على النار ليحترق الكحول إلى أن ينطفي لضمان عدم حدوث التلوث (الخطيب, اتصال شخصي) ثم نعمل قطعا مستعرضا للكلية بمقص معقم بعد أن يتم الزرع من الجزء المقطوع على وسط أكار الدم و أكار الماكونكي و أكار المغذي. وعمل تخفيف للزرع بواسطة سلك الزرع البكتيري(Loop) ثم يترك من 24Hr-48 بدرجة حرارة 37ºم. (9) . ثم تنقية الزرع بعزل كل نوع من المستعمرات في طبق أكار الدم ويحضن 18–24 ساعة بدرجة 37ºم للحصول على نوع واحد من النمو البكتيري. و أخذت مسحة وصبغت بصبغة كرام وتم اجراء الفحوصات الكيموحيوية (10) وتم التشخيص النهائي باستعمال عدة التشخيص البكتيري api20E والتي جهزت من مختبرات التحليلات المرضية التابعة لمستشفى اليرموك التعليمي في بغداد(شكل 1).

ثالثا التقطيع النسجي: أخذت عينات من كليتي الدجاج المخمج حقليا بقياس1 سم اشتملت على القشرة واللب وثبتت في محلول الفورمالين المتعادل 10% لمدة 48–72 ساعة ومررت وقطعت وصبغت بالهيماتوكسلين والايوزين حسب طريقة (11) .

الإصابة التجريبية باشريكيا القولون المعزولة من حالة مخمجة حقليا :

1. **تحضير جرع الحقن:** نقلت الجرثومة من أكار نقيع الدماغ والقلب إلى أكار الماكوني وحضنت من 18–24 ساعة بدرجة 37ºم ثم نقلت إلى المرق المغذي وحقنت لمدة 18–24 ساعة بدرجة حرارة 37ºم واجرى العد الجرثومي بطريقة (12) .
2. **حقن أفراخ التجربة:** تم استعمال 40 فرخا بعمر ثلاث أسابيع قسمت عشوائيا إلى مجموعتين بواقع 20 فرخة لكل مجموعة. حقنت المجموعة الأولى باشريكيا القولون بجرعة 0.5 مل عن طريق الوريد الوداجي تحوي 2×10^7 وحدة مكونة للمستعمرة البكتيرية والمجموعة الثانية حقنت بماء مقطر وعدت مجموعة سيطرة. لوحظت العلامات السريرية على الأفراخ لمدة 7أيام بعد الحقن ثم أجريت الصفة التشريحية على الأفراخ الهالكة والتي بقيت حية بعد 7 أيام لملاحظة الآفات العيانية وتم تقدير الامراضية بالاعتماد على طريقة (13).

3. تقدير أمراضية جرثومة الاشريكيا القولونية: تم تقدير امراضية الجرثومة في الأفراخ المحقونة بالاعتماد على طريقة(13) .وكما يلي:

1- جرثومة شديدة الأمراضية: تعطي هلاكات وأفات شديدة تتضمن التهاب الأكياس الهوائية، التهاب التامور، التهاب محفظة وتنكس الكبد في أكثر من 50% من الأفراخ المحقونة.
2- جرثومة متوسطة الأمراضية: تعطى هلاكات وافات عيانية في أقل من 50% من الأفراخ المحقونة.
3- جرثومة ضعيفة الأمراضية: لا تعطى هلاكات وأحيانا تعطى أفات عيانية(التهاب الأكياس الهوائية).

النتائج

نتائج العزل البكتيري من كليتي دجاج مخمج حقليا:

تم عزل أربع أنواع بكتيرية من80 عينة مصاب حقليا لحالات مرضية مختلفة وقد تم تشخيصها باستعمال أوساط الزرع البكتيري وبعض الفحوصات المختبرية الكيموحيوية في التشخيص الأولي وتم التأكد من التشخيص باستعمال عدة التشخيص البكتيري api20E الموضحة في الصورة (1) واعتمدت كتشخيص نهائي.

ولم يلاحظ وجود أي نمو بكتيري في العينات المأخوذة من حالات حقلية غير مخمجة . يوضح جدول (1) الأنواع البكتيرية المعزولة ونسبها المئوية في حين يوضح جدول(2) نتائج الاختبارات والفحوصات المستعملة في التشخيص الأولي أما جدول(3) فيوضح نتائج الكيموحيوية المستعملة بالعدة التشخيصية api20E للأنواع البكتيرية الأربعة المعزولة والمعتمدة في التشخيص.

نتائج الخمج التجريبي باشريكيا القولون:

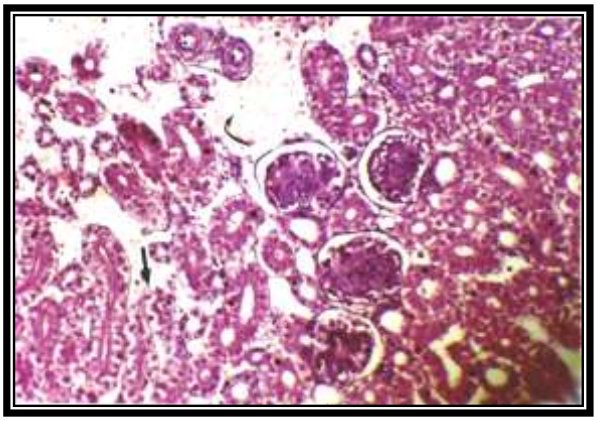
بعد حقن الأفراخ في الوريد الو داجي باشريكيا القولون لوحظ خمول الأفراخ وعدم تناول العلف و نفوش الريش وإسهال مائي يحوي مواد مخاطية بيضاء اللون وهلاك خمسة أفراخ خلال 24 ساعة بعد الحقن وثمانية أفراخ خلال 48–72 ساعة بعد الحقن. حيث بلغ عدد الأفراخ الهالكة 70%. عند إجراء الصفة التشريحية على الأفراخ التي هلكت خلال 24 ساعة بعد الحقن لوحظ احتقان الكبد والأمعاء مع وجود تضبيب على تامور القلب أما الكليتان فقد كانتا متضخمتين ومحتقنتين مع وجود بقع نزفية فضلا عن وضوح التفصص كما موضح في (شكل 2).

أظهرت المقاطع النسجية المأخوذة من الأفراخ خلال 72–48 ساعة حدوث تنكس فجوي شديد في بطانة النبيبات مع نخر البعض الأخر الذي أدى إلى فقدان جزئي في متن الكليتين موضح في (شكل3). وقد وضح الفحص النسجي زيادة خلوية اللمة الشعرية للكبيبات الكلوية مع تكاثر الخلايا البطانية

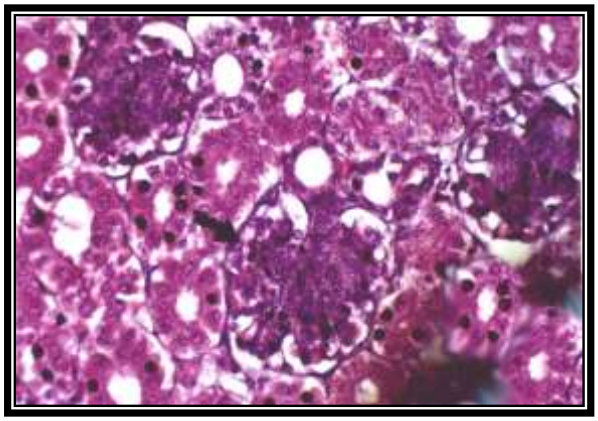
والميزنكيمية لتلك اللمة فضلا عن احتقان الأوعية الشعرية الكبيبية كما موضح في (شكل 4). في حين بينت المقاطع النسجية المأخوذة من ألأفراخ الهالكة بعد 72ساعة من الحقن تغيرات وعائية تمثلت بتضخم الأوعية الدموية مع حدوث أرتشاح خلوي في النبيبات الكلوية المتنخرة التي ظهرت على هيئة كتلة صلدة أخذت اللون الأزرق عند صبغها بصبغةH&E.

شكل (1)يوضح العدة التشخيصية api20Eالمستعملة في التشخيص النهائي.

شكل (2)تضخم واحتقان الكلية مع وضوح الفصيصات نتيجة الخمج التجريبي بالاشريكيا القولونية بعد 48 ساعة.



شكل (3)مقطع نسجي في كلية أحد الأفراخ المحقونة تجريبيا بالاشريكيا القولونية يلاحظ فيه تنكس فجوي شديد مع نخر وتورم غيمي في ظهارة النبيبات (سهم كبير) مع نزف(سهم صغير)، 48 ساعة من الحقن H&E×20.



شكل (4) مقطع نسجي في كلية أحد الأفراخ المحقونة بالاشريكيا القولونية، يلاحظ زيادة خلوية اللمة مع أحتقان الأوعية الشعرية في الكبيبة،(48ساعة). H&E×40.

جدول (1) يبين أنواع البكتيريا المعزولة من كليتي دجاج مخمج حقليا و نسبها المئوية.

أنواع البكتيريا	عدد العزلات	النسبة المئوية

اشريكيا القولون *E. coli*	44	% 55
المتقلبات *Proteus mirabilis*	18	% 22.5
زوائف هوائية *Pseudomonas aerogenosa*	14	% 17.5
ذات الرئة *Klebsiella pneumonia*	4	% 5

جدول(2) يبين نتائج الاختبارات المستعملة للتشخيص الأولي للبكتيريا المعزولة من كليتي دجاج مخمج حقليا.

البكتيريا الاختيار	*E. COLI*	*PROTEUS*	*PSEUDOMONAS*	*KLEBSIELLA*
صبغة كرام	-	-	-	-
الحركة	(+)	+	+	-
فحص الأندول	+	-	-	-
أنتاج H_2S	-	+	-	-
فنيل النين	-	+	-	-
استهلاك السترات	-	+	+	+
فحوصات أخرى	تعطي لون أخضر معدني على أكار EMB	رائحتها مميزة حركتها نشطة جدا.	رائحتها مميزة تشبه التفاح المتعفن تحلل RBC نوع بيتا.	محاطة بمحفظة باستعمال الحبر الهندي.

– = فحص سالب.

+ = فحص موجب.

(+) = فحص متغاير، 70% موجب.

المناقشة

أظهرت نتائج الدراسة عزل أربعة أنواع من الجراثيم وهي *E.coli, Pseudomonas aerogenosa,, Proutes mirabilis, Klebsilla pneumonia,* وبنسبة 55% و 22.5% و 17.5% و 5% لكل منها على التوالي والمعزولة من كليتي دجاج مخمج حقليا والتي أظهرت أفات واضحة. واتفقت هذه النتيجة مع الباحثين (3) في عزل جرثومة *E. coli* من خمج كلوي حقلي في الدجاج مع ظهور علامات وآفات مرضية عيانية مشابهة لما ذكر في هذه الدراسة. أن ارتفاع نسبة عزل الاشريكيا القولونية والتي بلغت 55% مقارنة بالعزلات الثلاثة الأخرى يؤكد أهمية هذه الجرثومة في أحداث اخماج كلوية في الدجاج واتفقت هذه النتيجة مع ما وصلت أليه عدد من الباحثين الذين أشاروا إلى ارتفاع نسبة الإصابة بالاشريكيا القولونية في كليتي الحيوانات الأخرى.(14 و 8) ، وكذلك في إصابات الجهاز البولي في الانسان (5) . ولعل السبب في ذلك يعود إلى كونها جزء من النبيتات الطبيعة للأمعاء intestinal flora ولهذا فهي موجودة بيسر لغزو القناة البولية عند إعاقة آلياتها الدفاعية الطبيعية (5) .

وتم في هذه الدراسة عزل ثلاثة أنواع أخرى هي: *K. pneumonia, Pseudomonas aerogenosa, P.mirabilis* والتي لم يتوصل إلى عزلها سابقا من كليتي الدجاج من قبل الباحثين (3) وهذا يؤكد أهمية الدراسة في معرفة عزلات جديدة لم يتم عزلها من كليتي الدجاج علما أن العزلات الثلاثة المذكورة أعلاه قد عزلت أيضا من اخماج كلوية من حيوانات الأبقار والجاموس والكلاب. (14 و15) .

اقتصرت الدراسة على اختيار الاشريكيا القولونية لإجراء خمج تجريبي في الأفراخ تمثلت العلامات السريرية لأفراخ المحقونة بالجرثومة في الوريد الوداجي بخمول الأفراخ وعدم تناول العلف والإسهال المائي وهلاك الأفراخ بنسبة 70% واتفقت هذه النتيجة مع (13) في تقدير شدة الأمراضية للاشريكيا القولونية إذ تعد هذه الجرثومة شديدة الأمراضية واتفقت هذه النتيجة مع ما توصلت أليه الباحثة (16) في دراسة استعمل فيها لقاح زيتي مبطل لأمهات فروج اللحم لتحصين أفراخها ضد العصاء القولوني colibacilosis أما التغيرات المرضية العيانية تضمنت احتقان وتضخم الكليتين مع وجود بقع نزفيه على قشرة الكليتين واتفقت هذه النتيجة مع ما توصل أليه الباحثين (3) ومن الملاحظ في هذه الدراسة الحالية زيادة الآفات المرضية العيانية وتركزها في الكليتين أكثر من الأعضاء الأخرى و لعل السبب في ذلك يعود إلى كونها عترة معزولة سابقا من اخماج كلوية وهذا يجعلها ذات ألفة جيدة للتكاثر في النسيج الكلوي في حين لا تسبب هذا التأثير العتر الغير المعزولة من الأمعاء. (17) وقد يعود السبب في ذلك إلى امتلاك هذه العتر إلى عوامل ضراوة تختلف من تلك العتر المعزولة من البراز. ومن

هذه العوامل القدرة على الالتصاق بالخلايا الطلائية للجهاز البولي وطبيعة متعدد السكريات الطلائية للمستضد (O. Ag) ، (6) وما يؤكد هذا الرأي وجود نمط مظهري phynotype في الاشريكيا أكثر تكرارا في العزلات الجرثومية المعزولة من حالات التهاب الجهاز البولي في الإنسان (7) .

References

1. David, L. G. and Erik, S.(2000). Renal and external regulation of body fluid composition. In: Sturk's Avian physiology. Edited by Whittw, G, C., 5th ed. Academic Press.
2. Swenson, M. J.(1970). Duck physiology of domestic animals. 8th ed. Cornell University press (Ithaca & London).
3. Sokker, S. M., Mohammad, M. A. and Atwia, M. (1998). Experimental induction of renal lesion in chickens, Berl. Munch. Tierarztl Wochenschr. 111: 161-163.
4. Fraizer, K.,Howes, R. L. Reece, A. W., Kdd and Cavangh, D.(1990). Isolation of non- cytopathic viruses implicated in the aetiology of nephritis and baby chick nephropathy and serologically related to avian nephritis virus. Avian Path. 19: 139-160
5. الرجب، وفاء جاسم و القزاز، حسن محمد(1984). علم الاحياء المجهرية. الجزء الثاني ، مطبعة جامعة الموصل ، ص 748
6. Shrinkhand, S. N., Chande, C. A. and Pathak, A. A. (2000). Virulence factors in uropathogenic E. coli, Indian. J. Path. Microbial 49: 321-395.(Abst).
7. Johnson, M., Mobley, R. J. and Warren, K. (1991). Virulence determination of uropathogenic E. coli and Proteus mirabilis. Kindney International, 46: 129-136.
8. Al- Sultan, I. I; Youkhana, S.O. and Ismail, H. K. (1998). Interstitial Renal necrosis syndrome of calves. The Iraqi J. vet. Med. 22; 35-42.
9. Harrigan, W.F. and McCone, M.E. (1979). Laboratory methods in food and diary microbiology. 4th ed. Academic press, London.
10. Edwards, R. P. and Ewing, W. H. (1972). Identification of enterobacteriaceae. 3rd. Ed. Pug. Burgess publishing company.
11. Luna, H.T. and Lee, G. (1968). Manual of Histological Staining Methods of the armed forces. Institute of Pathology 3rd ed. Pilackiston division McGraw Hill Book Co. New York Toronto, London and sudney.
12. Miles, A. A. and Misra, S. S. (1938). The estimation of the bactericidal power of food. L. Hyg. 38: 732-749. Cited Cowan, S. T. (1997). Manual for identification of medical bacteria. 2nd ed. London, New York, Melbourn.

13. Rosenberger L. K., fries P. A., cloud, S. S. and Wilson, R. A. (1985). In vitro and In vivo characterization of Avian Escherichia coli II. Factors Associated with pathogenisity. Avian Dis. 29: 1094- 1107.

14. فرج، عبود حسن(1980). دراسة بعض الجوانب المرضية لأمراض الكلية ومسبباتها في الأبقار والجاموس، رسالة ماجستير مقدمة إلى كلية الطب البيطري- جامعة بغداد.

15. Quinn, P. J., Carter M. E., Markey, B. K. and Carter, C. (1997). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby London

16. الموسوي، منى تركي(1997). استخدام لقاح زيتي مبطل لأمهات فروج اللحم لتحصين أفراخها ضد العصاء القولوني. أطروحة دكتوراه مقدمة إلى كلية الطب البيطري- جامعة بغداد.

17. Harry, L., Roberts, J. A. and Landeraud, L. (1994). Frequency of E. coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor in unrinary tract infection. Am. J. kidney Dis. 13: 273-287.