مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) العدد (1) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (36) No. (1) 2014

# دراسة بعض الخصائص الحيوية للجراثيم المعزولة من الغشاء الحيوي (Biofilm) في أنظمة شرب مزارع الدواجن

بشرى العيسى*

(تاريخ الإيداع 28 / 10 / 2013. قبل للنشر في 3 / 2 / 2014)

## □ ملخّص □

تمّ عزل مجموعة جراثيم من مكونات الغشاء الحيوي (biofilm) وتصنيفها في أنظمة الشرب في عدد من مزارع الدجاج البياض ودجاج اللحم(الفروج) انتمّت إلى *Staph. lentus , Staph. aureus , Pseudomnas aeryginosa , Citrobacter freundii , E. coli , Pasteurella Multocida , Salmonella typhimurium,* وحددت جرعة العدوى Infection dose (ID50) وقدر التعداد العام للجراثيم المدروسة في الميليمتر الواحد بوساطة أنابيب العكارة العيارية Macferland Turbidity Standard .

كما أظهرت نتائج دراسة فوعة Virulence العزلات المصنفة في أجنة بيض الدجاج المحضن بعمر 11 يوم لدى حقنها وبكمية 0,25 مل في الأغشية السقائية المشيمائية، نفوق أجنة المجموعات المحقونة بالجراثيم بعد 72 ساعة من الحقن بنسبة 80% وبنسبة 18% في مراحل متأخرة من التحضين وبنسبة 2% عند الفقس.

وفي نتائج دراسة الخصائص الإمراضية Pathogenicity للعزلات المصنفة في أثناء العدوى التجريبية لصيصان فروج لحم بعمر يوم واحد لدى حقنها بالجرعة المعدية عن طريق الفم وعن طريق جوف البطن تراوحت نسبة النفوق الوسطي لصيصان مجموعات التجربة مابين 40% وحتى 100% ووصفت العلامات السريرية المرضية والآفات التشريحية المميّزة الناجمة عن حقن كلّ نوعٍ من الجراثيم المدروسة. كما تمّ عزل العامل الممرض من كبد ونقي عظام الصيصان النافقة على المستنبتات الجرثومية التمّييزية.

**الكلّمات المفتاحية:** الغشاء الحيوي، أحياء الدقيقة، جراثيم، إمراضية، نظام الشرب، دواجن.

* مشرفة على الأعمال– قسم الإنتاج الحيواني – كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) العدد (1) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (36) No. (1) 2014

# A Study of Some Biological Characteristics of Isolated Microorganisms from Biofilm of the Poultry Watering Systems

**Bushra ALissa***

**(Received 28 / 10 / 2013. Accepted 3 / 2 /2014 )**

## □ ABSTRACT □

Some microorganisms which form biofilms in poultry watering systems in poultry farms (broiler flocks, laying hens) were isolated and classified as follows: *Staph. lentus, Staph. aureus Pseudomnas aeryginosa, Citrobacter freundii, Pasteurella Multocida, E.coli, Salmonella typhimurium.*

The infectious dose (ID50) was determined depending on the total count of bacteria, and it was performed by the Macferland Turbidity Standard.

The results of the virulence study of classified isolates in embryos during the eleventh day of incubation showed that when injected with (0,25ml) in the chorioallantoic membrance, all infected experimental embryos died by 80% after 72 hours, 18% in late stages and 2% during hatching.

The results of the study of some pathogenicity characteristics of classified isolates of infected one-day-old chicks showed that the percentage of deaths ranged between 40%-100% during injection with the infectious dose via mouth and via abdomen. The main clinical signs and gross lesion were recorded for each sort of isolated bacteria. The etiologic agent was also isolated from liver and marrow.

**Keywords:** biofilm, Microorganism, Bacteria, pathogenesis, drinking water systems, poultry

***Work Supervisor, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia,**
**Syria**

**مقدمة:**

تعد صناعة الدواجن وإنتاجها إحدى الفروع المهمة للإنتاج الحيواني الذي يقدّم للإنسان مواداً غذائيةً عالية القيمة، كثيرة الطلب، ورفع إنتاجية هذا القطاع ومستوى حماية القطعان في المزارع وخفض الهدر والكلّفة وتحسين نوعية اللحم والبيض هدف جدير بالاهتمّام ويتعلق بدرجة كبيرة بالدراسات والبحوث والتجارب العلمية التي تكشف المشاكلّ وتضع الحلول لها، وتأتي الحالة الصحية في مقدّمة هذه المشاكلّ؛ إذ إن اكتشاف بؤر ومصادر العدوى بالأمراض وتحديد المسببات ودراسة خصائصها واختيار طرائق المعالجة وتدابير السيطرة وإجراءات الوقاية يعود بالفائدة العالية على كلّ من المنتج والمستهلك.

في ظل الرعاية المختلفة والإنتاج المكثف للدواجن الذي يستخدم تقنيات حديثة ومتطورة ويضمّ أعداداً كبيرة من الطيور في مساحة محددة تزداد درجة التلوث بالأحياء الدقيقة في الحظائر على الأدوات والتجهيزات الموجودة فيها من معالف ومناهل وغيرها وبذلك تصبح الفرصة مهيأة لانتشار الأمراض المعدية وإصابة القطعان بها، مما يؤدي إلى انحراف صحة الطيور وخلل الإنتاج وتدني المردود الاقتصادي. ونظراً لأهمية الماء بالنسبة لجسم الطيور في عمليات هضم المواد الغذائية وامتصاصها ونقلها وتخليص الجسم من الفضلات وغيرها (Jafari et al., 2006; Jeff Odle et al., 2008) فإن استهلاك الماء يعد من المؤشرات المبكرة على صحة الطيور وذلك من خلال مقارنة معدل الاستهلاك اليومي للطيور مع الاستهلاك النظامي المتوقع (Defra, 2002) كما أن الماء يشكلّ المكون الأكبر من الدم ويسهم في التفاعلات البيوكيميائية التي يحتاجها الطير للنمو وفي حالات الاجهاد الحراري وارتفاع درجات الحرارة فإن شرب الماء النقي بكميات وافرة يساعد في تنظيم درجة الحرارة الداخلية للطيور (Jafari et al., 2006; Jeff Odle et al., 2008) وبالتالي يشكلّ التلوث الجرثومي لمياه الشرب خلال دورة إنتاج الدواجن أحد المشاكلّ الصحية الخطيرة التي تهدد باستمّرار صناعة الدواجن (Manning et al., 2006).

وما يزيد خطورة الوضع الحاجة المضاعفة للماء مقارنة بالعلف، وكون مصدر الماء الذي يغذي الحظائر واحداً في المزرعة ويوزع على عدد من الحظائر وبالتالي أعداد كبيرة من الطيور ستتأثر حتمّاً به وبمحتوياته من الجراثيم والفيروسات والأوليات والفطريات (Amaral, 2004; Nikolaev & Plakunov. 2007) والتي تزداد أعدادها غالباً في المياه غير المعالجة (Goan et al., 1992; Poppe et al., 1991; Kapperud et al., 1993).

تتحدد مواصفات الماء النوعية من خلال المذاق Taste، الرائحة Odor، اللون Color ، القساوة Hardness، درجة التأين الهدروجيني pH، الحموضة acidity، القلوية alkalinity الناقلية الكهربائية electrical conductivity، الملوحة salinity ، العكارة turbidity، الأيونات anions، الكاتيونات cations والجراثيم. (Cooperative Regional Research; 2005)

وقد أظهرت الاختبارات والفحوص الصحية لمياه شرب الدواجن من قبل البحاثة عبر سنوات عديدة مستوى تلوث عالٍ بالجراثيم الهوائية Aerobic bacteria في أنابيب المياه المغلقة وصل تعدادها لأكثر من مليون خلية جرثومية/مل في حين أن المستوى المقبول لأعداد الجراثيم هو 100 /مل. إذ يساعد توافر الشروط المناسبة من حرارة، مواد مغذية في التصاق الجراثيم على السطوح الداخلية للمشارب وتشكلّ الغشاء الحيوي وما يحتويه من الأحياء الدقيقة بالجرعة الخطرة Harmful organism does. ومنها الاشريكية القولونية القادرة على التضاعف بالتريليون في بضع ساعات في حال توافر الشروط المناسبة (Prakash et al., 2003 ).

إن الجراثيم المعوية تؤثر في طعم الماء ورائحته والحيوانات كالإنسان لا تستسيغ الماء سيء الطعم والرائحة (Jeff Odle et al., 2008) كما تشير الأبحاث إلى أن الجراثيم ضمن الغشاء الحيوي أكثر مقاومة للمطهرات والمضادات الحيوية من الخلايا الحرة لأنه يعمل على الحد من تأثيرها وبالتالي زيادة التكلّفة الاقتصادية عند الوقاية أو المعالجة (Anwar & Costerton, 1990; Korber et al., 1994) ويوضح الجدول(1) المواصفات النوعية بالمستويات المسموح بها في مياه شرب الدواجن (Brian & Casey, 2006).

**الجدول(1): المواصفات النوعية بالمستويات** المسموح بها **في مياه شرب الدواجن**

| Contaminanat, characteristic or Mineral | Maximum Acceptable Levels |
|---|---|
| Bacteria | |
| Total Heterophic Bacterial | 100CFU/100ml |
| *Coliform Bacteria* | 50CFU/100ml |
| PH | 6.0-8.0 |
| Hardness | 110ppm |
| Naturally Occurring Compounds | |
| Calcium | 500 pmm |
| Chloride | 250 pmm |
| Copper | 0.6 pmm |
| Iron | 0.03 pmm |
| Maganese | 125 pmm |
| Nitrate | 0.05 ppm |
| Phosphorus | 0.1pmm |
| Potassium | 500pmm |
| Sodium | 50 pmm |
| Sulfate | 250pmm |

## أهمية البحث وأهدافه:

تأتي الأهمية العملية للبحث من خلال دراسة بعض الخصائص الحيوية للجراثيم المعزولة من الغشاء الحيوي في أنظمة الشرب، وبالتالي المساهمة في التشخيص المبكر، والتنبؤ المستقبلي للأمراض المتوقعة، والعمل على إيجاد الطرق الملائمة للوقاية منها، ومعالجة أمراضها. أيضاً تحديد فوعة العزلات وقدرتها على إحداث المرض، وإظهار العلامات السريرية، والتسبب بالنفوق عند العدوى التجريبية للصيصان عن طريق الفم والحقن في جوف البطن يكشف الخطر الذي تشكلّه بالنسبة لقطعان الطيور والأضرار والخسائر التي تلحقها بمزارع الدواجن.

## طرائق البحث ومواده:

نفذ البحث في مخبر الدواجن في كلّية الزراعة في جامعة تشرين ومخبر الأحياء الدقيقة في هيئة التقانة الحيوية بدمشق خلال الفترة الممتدة (آب 2012 – أيلول 2013). كما نفذت اختبارات العدوى التجريبية على الصيصان في مدجنة خاصة واستخدمت المواد الآتية:

1- **العزلات الجرثومية من الغشاء الحيوي المتشكلّ في أنظمة الشرب:** تمّ مسح 20 مزرعة لتربية الفروج والدجاج البياض، منتشرة في الساحل السوري، قسم من هذه المزارع يتبع نظام مشارب الحلمة والقسم الآخر يتبع نظام المشارب الآلية المعلقة، وتمّ عزل مجموعة من العزلات الجرثومية التي تمّ تصنيفها تبعاً للخصائص الزرعية في المستنبتات العامة والتمّييزية وصبغة غرام والاختبارات البيوكيميائية وتقانة التنميط البكتيري ( API Staph, API 20 E) من الشركة الفرنسية (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) إلى: *freundi, Citrobact, ,Salmonella typhi , Ps. aeryginosa, E. coli , S .aureus , S. lentus* *Pasteurella Multocida*

2- **أجنة دجاج نامية بعمر إحدى عشر يوماً تحضين وبعدد 60:** استخدمت في الاختبارات الحيوية لتحديد ضراوة الخصائص الإمراضية للعزلات الجرثومية المعزولة بالجرعة المعدية ودراستها ، فقد تمّ اختيار بيض التفريخ ذوي أجنة حية متوسط الوزن يتروواح بين /57–65/غ وقشرة نظيفة وحجرة هوائية وحيدة ومتوضعة في الطرف العريض للبيضة وخصص سبع أجنة لكلّ عزلة والبقية كشاهد في كلّ مكرر.

3- **صيصان فروج لحم بعمر يوم واحد: بعدد 96:** استخدمت في الاختبارات الحيوية لدراسة الخصائص الإمراضية للعزلات بالجرعة المعدية، خصص 12 أجنة لكلّ عزلة مع 12 كشاهد في كلّ مكرر.

4- **الاختبارات الحيوية:**

آ- تحديد الجرعة المعدية ID50 Infection dose) للعزلات ودراسة بعض الخصائص الحيوية ( الفوعة، الإمراضية) حسب (Koroven et al.,1989) و تقدير التعداد العام للجراثيم المدروسة في الميليمتر الواحد بوساطة أنابيب العكارة العيارية Macferland Turbidity Standard .

**ب – دراسة فوعة العزلات الجرثومية في أجنة الدجاج النامية:**

تمّت عملية الحقن بالعزلات الجرثومية السابقة الذكر بحسب (Siorin et al.,1986) وبالخطوات الآتية:

تمّ فحص البيض بالفاحص الضوئي لتحديد نقطة في الحجرة الهوائية ونقطة أخرى في منطقة ضعيفة بالأوعية الدموية ثم عقم البيض في النقطتين المحددتين بالكحول اليودي واستخدم مثقب دقيق معقم جداً لإحداث ثقبين في النقطتين المحددتين وباستخدام المحقن قد تمّ إدخال الجرعة في الثقب الجانبي للبيضة في الأغشية السقائية المشيمائية وبعدها أغلقت الثقوب بالشمع، ومتابعة التحضين في المفرخة لكلّ مجموعة بعد تسميتها وترقيمها تبعاً للعزلات الجرثومية. خضعت الأجنة للمراقبة اليومية والفحص بالكاشف الضوئي لمراقبة تطور الأجنة واستبعاد الأجنة النافقة ووضعها في البراد لحين التشريح، استمّرت التجربة حتى انتهاء الفقس.

**جـ- دراسة الخصائص الإمراضية للعزلات الجرثومية في الصيصان:**

بعد تحضير الجرعات المعدية للعزلات الجرثومية المقدرة بـ 250 مليون خلية جرثومية /مل تمّت العدوى التجريبية لصيصان الفروج ولتمييزها بعمر يوم واحد وذلك بحقن جرعة 0,5 مل من كلّ عزلة لـ 6 صيصان عن طريق الفم و 6 صيصان عن طريق الحقن في جوف البطن ولتمّيزها عن الأولى تمّ صبغ رأس الصيصان بالكحول اليودي. ثم

وضعت بشكلّ منفصل عن بعضها في الحظيرة مع تأمين ظروف رعاية أرضية فوق فرشة من نشارة الخشب والتغذية والشرب في معالف ومناهل يدوية، تمّت المراقبة اليومية لصيصان كلّ المجموعات مع الشاهد لمدة 10 أيام، وسجلت النتائج تبعاً للعلامات السريرية والنفوق، استبعدت الصيصان النافقة في أكياس بلاستيك بشكلّ منفرد وتمّ أخذ الصفة التشريحية وحددت التغيرات المرضية في الأعضاء والأحشاء الداخلية. كما أخذت مسحات من الكبد ونقي عظام الصيصان النافقة لعزل المسببات المرضية وقد نفذت الاختبارات الحيوية على مكررين.

## النتائج والمناقشة:

### 1- نتائج دراسة الخصائص السمية للعزلات:

### 1-2- نتائج دراسة فوعة (ضراوة) العزلات:

كشفت تجارب حقن أجنة الدجاج النامية بعمر 11 يوم تحضين بالجرعة المعدية من العزلات المصنفة أن الجراثيم المعزولة من الغشاء الحيوي ذات فوعة عالية وظهر تأثيرها واضحاً في الأجنة؛ إذ سببت نسبة نفوق 100% من أجنة المجموعة المحقونة بـ *Staph. aureus, Staph .Lentus, E.coli, P.aeryginosa, Salmonella typhi* و*Pasteurella Multocid* بعد 72 ساعة من العدوى التجريبية وبنسبة 57.14% في الأجنة المحقونة بـ *Citrobacter freundi* في المراحل اللاحقة من فترة التفريخ والجدول(2) يوضح نتائج حقن الأجنة بالعزلات الجرثومية.

**الجدول (2): نتائج حقن أجنة الدجاج النامية بعمر 11 يوم تحضين بالعزلات الجرثومية**

| العزلات الجرثومية | عدد الأجنة المحقونة | عدد الأجنة النافقة/ساعة بعد الحقن | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 24 ساعة | 48 ساعة | 72 ساعة | في المراحل الأخيرة قبل النقف | الفقس | العدد الكلّي للنفوق | النسبة المئوية للنفوق % |
| *S.aureus* | 7 | 1 | 1 | 5 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| *S. lentus* | 7 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| *E.coli* | 7 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| *Citrobacter freundii* | 7 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 4 | 57.1 |
| *P.aeryginosa* | 7 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| *Salmonella typhi* | 7 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| *Pasteurella Multocida* | 7 | 0 | 1 | 5 | 1 | 0 | 7 | 100 |
| Control | 7 | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | 6 | 14.3 |

كما كشفت عمليات فتح البيض وتشريح الأجنة النافقة تغيّرات مرضية تشريحية مشتركة عند أجنة المجموعات كلّها، تلخصت بـ : وذمة واحتقان في الأغشية، التهابات معوية، كبدية، صفراوية، وفي المراحل الأخيرة من التحضين عدم امتصاص كيس المح وترسب البولات في الحالبين والجدول(3) مع الصور(1،2،3) توضح هذه المعطيات.

**الجدول (3): نتائج تشريح الأجنة النافقة والآفات التشريحية المشاهدة**

| العزلات الجرثومية | الآفة التشريحية |
|---|---|
| *S..aureus* | وذمة واحتقان في الأغشية الجنينية، التهاب كبد، التهابات الأمعاء |
| *S. lentus* | وذمة في الأغشية الجنينية، التهاب الحويصلة الصفراوية ، والتهاب السرة، ترسب البولات في الحالبين |
| *E.coli* | وذمة في الأغشية الجنينية، التهاب الحويصلة الصفراوية |
| *Citrobacter freundii* | احتقان الأغشية الجنينية، ضمور وتأخر تطور الأمعاء، اخضرار كيس المح الذي كانت محتوياته سائلة ومتجبنة ،عدم التئام السرة. |
| *P.aeryginosa* | وذمة واحتقان في الأغشية الجنينية، ترسب البولات في الحالبين |
| *Salmonella typhi* | وذمة في الأغشية الجنينية، نزف في الأعضاء الداخلية |
| *Pasteurella Multocida* | وذمة واحتقان في الأغشية الجنينية، نزف في الأعضاء الداخلية، عدم التئام السرة |

**الصورة(1): وذمة في الأغشية الجنينية للأجنة النافقة بعد48 ساعة**

**الصورة(2): جنين نافق في مراحل متأخرة من التحضين**

الصورة(3): ترسب البولات في الحالبين عند الأجنة النافقة

الصورة(4): عينات من أكباد صيصان نافقة وأفخاذها

## 2-2- نتائج دراسة الخصائص الإمراضية للعزلات الجرثومية

بينت نتائج دراسة الخصائص الإمراضية للعزلات المصنفة عند العدوى التجريبية لصيصان فروج لحم بعمر يوم واحد عند الحقن بالجرعة المعدية ( ID50 ) وبكمية 0,5 مل.

### أ- عند الحقن عن طريق الفم:

يبيّن الجدول(4) عدد الصيصان النافقة في اليوم عند الحقن عن طريق الفم كما يبيّن الجدول(5) النسبة المئوية لعدد الصيصان النافقة في اليوم بعد الحقن والجدول(6) يبيّن نتائج العدوى عند حقن الصيصان عن طريق الفم من حيث فترة الحضانة ومدة النفوق ونسبة النفوق النهائية.

**يبيّن الجدول(4): عدد الصيصان النافقة في اليوم بعد الحقن عن طريق الفم**

| العزلات الجرثومية | عدد الصيصان النافقة/ يوم بعد الحقن | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | الأول | الثاني | الثالث | الرابع | الخامس | السادس | السابع | الثامن | التاسع | العاشر | العدد الكلّي |
| *S. aureus* | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| *S. lentus* | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| *E.coli* | 0 | 0 | 4 | 2 | – | – | – | – | – | – | 6 |
| *Citrobacter freundii* | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| *P.aeryginosa* | 0 | 0 | 1 | 5 | – | _ | – | – | – | – | 6 |
| *Salmonella typhi* | 0 | 1 | 5 | – | – | – | – | – | – | – | 6 |
| *Pasteurella Multocida* | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 | – | – | – | – | 6 |
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |

**الجدول(5): يبيّن النسبة المئوية لعدد الصيصان النافقة في اليوم بعد الحقن عن طريق الفم**

| العزلات الجرثومية | النسبة المئوية لعدد الصيصان النافقة/ يوم بعد الحقن | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | الأول | الثاني | الثالث | الرابع | الخامس | السادس | السابع | الثامن | التاسع | العاشر |
| *S.aureus* | 0 | 0 | 16.6 | 16.6 | 16.6 | 16.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S. lentus* | 0 | 0 | 0 | 0 | 16.6 | 16.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *E.coli* | 0 | 0 | 66.6 | 33.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Citrobacter freundii* | 0 | 0 | 0 | 0 | 16.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *P.aeryginos* | 0 | 0 | 16.6 | 83.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Salmonella typhi* | 0 | 16.6 | 83.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Pasteurella Multocida* | 0 | 0 | 0 | 0 | 16.6 | 83.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**الجدول(6) : نتائج حقن الصيصان عن طريق الفم (فترة الحضانة ومدة النفوق ونسبة النفوق النهائية).**

| العزلات الجرثومية | عدد الصيصان المحقونة | فترة الحضانة /اليوم | مدة النفوق/يوم | عدد الصيصان النافقة | النسبة لمئوية للنفوق |
|---|---|---|---|---|---|
| *S.aureus* | 6 | 2 | 6-3 | 4 | %66.66 |
| *S. lentus* | 6 | 4 | 7-5 | 3 | %50 |
| *E.coli* | 6 | 2 | 4-3 | 6 | %100 |
| *Citrobacter freundi* | 6 | 4 | 5 | 1 | %16.66 |
| *P.aeryginosa* | 6 | 2 | 4-3 | 6 | %100 |
| *Salmonella typhi* | 6 | 1 | 3-2 | 6 | %100 |
| *Pasteurella Multocida* | 6 | 4 | 6-5 | 6 | %100 |

**ب- عند الحقن عن طريق جوف البطن:**

يبيّن الجدول(7) عدد الصيصان النافقة في اليوم عند الحقن عن طريق جوف البطن كما يبيّن الجدول(8) النسبة المئوية لعدد الصيصان النافقة في اليوم بعد الحقن ويبيّن الجدول(9) نتائج العدوى عند حقن الصيصان عن طريق جوف البطن (فترة الحضانة ومدة النفوق ونسبة النفوق النهائية).

**الجدول(7): يبيّن عدد الصيصان النافقة في اليوم بعد الحقن عن طريق الفم**

| العزلات الجرثومية | عدد الصيصان النافقة/ يوم بعد الحقن | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | الأول | الثاني | الثالث | الرابع | الخامس | السادس | السابع | الثامن | التاسع | العاشر | العدد الكلّي |
| *S. aureus* | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| *S. lentus* | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| *E. coli* | 0 | 0 | 3 | 3 | – | – | – | 1 | – | – | 7 |
| *Citrobacter freundi* | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| *P.aeryginosa* | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| *Salmonella typhi* | 0 | 5 | 1 | – | – | – | – | – | – | – | 6 |
| *Pasteurella Multocida* | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 1 | – | – | – | – | 6 |
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |

**–نفوق كامل لصيصان المجموعة     0 لا يوجد نفوق**

**الجدول(8): يبيّن النسبة المئوية لعدد الصيصان النافقة في اليوم بعد الحقن عن طريق جوف البطن**

| | النسبة المئوية لعدد الصيصان النافقة/ يوم بعد الحقن | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| العزلات الجرثومية | الأول | الثاني | الثالث | الرابع | الخامس | السادس | السابع | الثامن | التاسع | العاشر |
| *S.aureus* | 0 | 0 | 33.3 | 16.6 | 16.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S. lentus* | 0 | 0 | 0 | 16.6 | 16.6 | 16.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *E. coli* | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Citrobacter freundii* | 0 | 0 | 0 | 16.6 | 33.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *P.aeryginosa* | 0 | 0 | 33.3 | 33.3 | 16.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Salmonella typhi* | 0 | 83.3 | 16.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Pasteurella Multocida* | 0 | 0 | 0 | 16.6 | 66.6 | 16.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

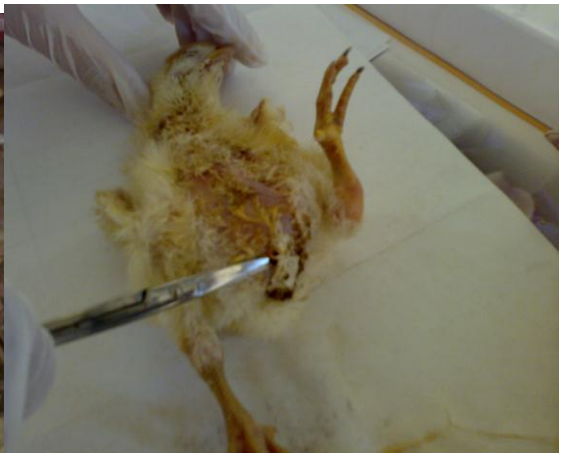
**الجدول(9): نتائج حقن الصيصان في جوف البطن (فترة الحضانة ومدة النفوق ونسبة النفوق النهائية)**

| العزلات الجرثومية | عدد الصيصان المحقونة | فترة الحضانة /اليوم | مدة النفوق/يوم | عدد الصيصان النافقة | % للنفوق |
|---|---|---|---|---|---|
| *S.aureus* | 6 | 3 | 5-3 | 4 | %66 |
| *S.lentus* | 6 | 3 | 6-4 | 3 | %50 |
| *E.coli* | 6 | 2 | 4-3 | 6 | %100 |
| *Citrobacter freundi* | 6 | 3 | 5-4 | 3 | %50 |
| *P.aeryginosa* | 6 | 2 | 5-3 | 5 | %83 |
| *Salmonella typhi* | 6 | 1 | 3-2 | 6 | %100 |
| *Pasteurella Multocida* | 6 | 3 | 6-4 | 6 | %100 |

سجلت العلامات السريرية وشرحت الصيصان لتحديد التغيرات والآفات المرضية في الأعضاء والأحشاء الداخلية والجدول (10) مع الصور(8,7,6,5) يبيّن العلامات السريرية المشاهدة على صيصان التجربة والجدول(11) مع الصور(14,13,12,11,10,9) يوضح الآفات التشريحية للصيصان النافقة.

**الجدول(10): يبيّن العلامات السريرية للصيصان النافقة**

| العزلات الجرثومية | العلامات السريرية |
|---|---|
| *S. aureus* | إسهال، وهن، قلة الحركة، رقود الصيصان |
| *S. lentus* | إسهال، ضعف شهية، انعزال، رقود الصيصان |
| *E.coli* | ضعف عام، إسهال وتجمع مواد لزجة في منطقة المجمع |
| *Citrobacter freundii* | انخفاض استهلاك العلف، إسهال |
| *Ps. aeruginosa* | انخفاض استهلاك العلف، إسهال،ضعف عام |
| *Pasteurella Multocida* | ضعف عام، إسهال لونه أصفر، رقود مع بسط الرأس على الأرض إلى الأمام |
| *Salmonella typhi* | انخفاض شهية، خمول، إسهال مائي مع تعجن منطقة المجمع |



**الصورة(5): إسهال وتجمع مواد لزجة في منطقة المجمع**

**الصورة(6): التواء الرأس إلى الخلف ونفوق**

**الصورة(7): بسط الرأس إلى الأمام على الأرض سببته*Pasteurella Multocida***

**الصورة(8): تظهر صيصان الشاهد وهي بحالة جيدة**

**الجدول(11): يبيّن الآفات التشريحية للصيصان النافقة**

| العزلات الجرثومية | الآفات التشريحية |
|---|---|
| *S.aureus* | احتقان وتضخيم في الكبد والطحال ، التهاب السرة |
| *S. lentus* | التهابات معوية، تضخم في الأعضاء الداخلية ( كبد، طحال) |
| *E.coli* | التهاب السرة، انتفاخ البطن التهابات معوية |
| *Citrobacter freundii* | نزف دموي على القلب، التهاب الأمعاء |
| *P.aeryginosa* | التهاب أمعاء رشحي |
| *Pasteurella Multocida* | تضخمم الكبد، ،نزف دموي على الأغشية الداخلية والمصلية |
| *Salmonella typhi* | تضخم في الكبد والطحال، تلون الكبد بلون أصفر |

الصورة(9): الكبد متضخم وبلون أصفر برونزي
بسبب *Salmonella typhimurium*

الصورة(10): النزف الدموي على الأغشية والمصلية
بسبب *Pasteurella Multocida*

الصورة(11): التهابات معوية بسبب *S. lentus*

الصورة (12): نزف دموي على القلب والكبد بسبب *E.coli*

الصورة(13):التهاب أمعاء رشحي بسبب *Ps. aeruginosa*

الصورة(14): تبين احتقان في المعدة الغدية والأمعاء

**المناقشة:**

أظهرت العزلات المختبرة جميعها تقريباً أنها تمتلك فوعة عالية بالنسبة للأجنة النامية التي أبدت حساسية تجاه هذه العزلات، وقد ذكر الباحث (Siorin et al., 1986) وجود حساسية عالية عند أجنة الدجاج النامية تجاه الليستيريا بعد حقنها في الأغشية السقائية المشيمائية فقد أحدثت في الأجنة المحقونة تنخراً في الكبد والطحال والكلّى والقلب لدى

الأجنة النافقة في مراحل متأخرة من التحضين، وتعد الأنواع الممرضة هي التي تسبب نفوق 75-100% من الأجنة المحقونة. ومن المعطيات الموضحة بالجدول (2) أظهرت الأجنة هذه الحساسية تجاه جميع العزلات ؛ إذ بلغت نسبة نفوق الأجنة بعد 72 ساعة 100% في الأجنة المحقونة بـ *S. lentus*, *S .aureus*, *E.coli*, *P.aeryginosa*, *Pasteurella Pneumoniae Salmonella typhi* و14.28% في الأجنة المحقونة بالـ *Citrobacter freundi* فقد لوحظ أنها كانت أقل ضراوة مقارنة بالعزلات الأخرى على الرغم من تسببها بحدوث خلل في مراحل مختلفة من التطور الجنيني أدى إلى نفوق 42.85% في المراحل المتأخرة من التحضين. على الرغم من ضعف فوعة الستروباكتر إلا أنها أظهرت تأثيرها في تطور الأجنة ونموها ومنعت حدوث فقس الصيصان بشكلّ طبيعي. وبحسب الباحث (Costynico et al., 1989) فإن الخصائص الإمراضية للميكروبات تتحدد بمقدرتها على إحداث النفوق أو إمراض حيوانات التجارب. وحسب (Baydvlato & Bessarbov, 1984) فإن السلمونيلة والإشريكية القولونية وغيرها من العوامل الحيوية الممرضة التي تلوث بيض التفريخ أو تنتقل معه من الأم وهي من المسببات الخطرة لأمراض الأجنة إذ تسبب خللاً في تطور الأجنة ونموها ويذكر الباحثان أن *Salmonella typhi* و *Salmonella Pullorum* تخفضان نسبة الفقس في البيض الموبوء بها بنسبة 25-50% وتؤديان في مراحل التفريخ المختلفة إلى نفوق 70-85% من الأجنة والتي أظهر تشريحها آفات متعددة أهمها اخضرار كيس المح، وسماكة قوام محتوياته، كما يتغير لون الكبد أحياناً. كما يؤدي التلوث بالإشريكية القولونية في بيض التفريخ سواء الداخلي أو الخارجي إلى نفوق الأجنة، وبحسب الباحث نفسه فإن العدوى التجريبية بالإشريكية القولونية لبيض الإوز المخصب في اليوم الأول من التفريخ فقد سبب انخفاض الفقس حتى 59.7% مقابل 86.3% في مجموعة الشاهد. وعموماً يذكر الباحث نفسه أن الجراثيم الأخرى التي تلوث بيض التفريخ وتنفذ إلى محتوياته الداخلية تسبب تغيرات مرضية مختلفة في مكونات البيضة وأغلفة وأعضاء الجنين، إذ لاحظ عند الأجنة النافقة بعمر / 15/ يوم تحضين احتقاناً دموياً على سطح الجلد، ونزفاً في الأغشية المشيميائية، ونقاط تنكرز في الكبد، ونزفاً في الأعضاء الداخلية مع ترسب لأملاح البولة في الحالبين والمجمع. وفي الدراسة الحالية سببت العدوى بالعزلات المختبرة وذمة واحتقان في الأغشية الجنينية، التهاب الحويصلة الصفراوية والتهاب السرة وعدم التئامها وترسب البولات في الحالبين وضمور وتأخر تطور الأمعاء واخضرار كيس المح والذي ظهرت محتوياته سميكة ومتجبنة أحياناً ونزفاً في الأعضاء الداخلية. وبمتابعة تحضين البيض المتبقي حتى انتهاء موعد الفقس كانت نسبة الصيصان الفاقسة 0% في بيض كلّ المجموعات و42.8% في

المجموعات الأجنة المحقونة بـ *Citrobacter freundi* وهذا ما يكشف الدور المحتمّل والخطر لجراثيم الغشاء الحيوي في التسبب بالكثير من الأمراض التي تصيب قطعان الدواجن. في حين بلغت نسبة الفقس 90% عند مجموعة الشاهد بينما كانت 86.3 % بحسب دراسة (Baydvlatov & Bessarbov, 1984).

من معطيات الجدولين(9،6) وصلت نسبة نفوق الصيصان إلى 100% بعد 48 ساعة في حالتي العدوى، ما يشير إلى خطورة *Salmonella typhi* وهذا يتوافق مع نتائج (Mohyla et al., 2007; Kenneth Todar., 2005) الذين ذكروا أن جراثيم السلمونيلة تسبب نفوقاً مرتفعاً عند الطيور الفتية خلال الأيام الأولى من العمر بسبب الحالات التسممية. كما تتوافق أيضاً مع ما يشير إليه (Baydvlatov& Bessarbov, 1984) أن *Salmonella typhi* في الإصابة فوق الحادة تؤدي إلى نفوق الصيصان بدون علامات سريرية واضحة، بينما يلحظ في الحالات الحادة فقدان الشهية والإنهاك واضطراب الحركة وخمول وضعف عام وإسهال وزرق مائل للاخضرار وهذه الأعراض

تتطابق نسبياً مع ما سجل في العدوى التجريبية للدراسة. أما معطيات الآفات التشريحية التي أظهرت تغيرات واضحة في الكبد (تضخم، هشاشة، اصفرار) وما يماثلها تقريباً في الطحال تؤكده أيضاً المصادر السابقة نفسها ويذكر الباحث (Ocedze, 1987) أن نسبة النفوق بسبب *Salmonella typhi* تصل إلى 70%.

أما بالنسبة لصيصان مجموعة الـ *E. coli* فقد بلغت فترة الحضانة يومين وشوهدت بعدها على الصيصان علامات الضعف العام والإسهال تلاه نفوق مرتفع بلغ (100%) وهي تتوافق مع معطيات (Skyberg et al., 2007). ويذكر(Baydvlatov& Bessarbov, 1984) أن عدوى *E. coli* عند الطيور الفتية بعمر /1-20 / يوم غالباً ما تأخذ شكلاً مميتاً ويظهر عند الصيصان المريضة علامات إسهال وفقدان شهية وخمول، في الآفات التشريحية لصيصان نافقة بعمر عدة ساعات حتى / 5-7 / أيام لم نلحظ تغيرات مميزة للحالات المرضية التسممية. كما يعزى تعدد الحالات المرضية للإشريكية القولونية لتعدد الأنماط المصلية الممرضة المسببة لها إذ تؤدي أيضاً إلى نفوق الأجنة في أثناء التفريخ ونفوق الصيصان الفاقسة حديثاً وفي الأسبوع الأول من عمرها بسبب الإنتان الدموي والتهابات السرة التي تسببها(Costynico et al., 1989). بالنسبة لمجموعتي الصيصان المحقونة بالـ *Staphylococcus* من المعطيات الموضحة بالجدولين(9،6) بلغت فترة الحضانة من / 2-4 / أيام، وتفاوتت بحسب النوع وطريقة العدوى، وكذلك نسبة نفوق الصيصان، حيث سببت جراثيم *Staph. aureus* نفوق 66.6% وهي نسبة أكثر ارتفاعاً مقارنةً بالـ *Staph. lentus* التي سببت نفوق 50% لأنها أكثر ضراوة فهي تنتج ذيفانات تحلل كريات الدم، وتسبب إنتانات دموية، ولها يعزى النفوق العالي للصيصان كما يذكر كلّ من (Nawaz et al., 1999)، وذكر الباحث (Costynico et al., 1989)أن الأنواع الممرضة من الـ *Staphylococcus* تسبب نفوق 75-100% من حيوانات التجارب. وتسير العدوى الطبيعية بالمكورات العنقودية بأشكال حادة أو مزمنة، وتتطور في الحالات الحادة التهابات مفاصل الأرجل والأجنحة (Baydvlatov& Bessarbov,1984)، وهذا بعض ما سجل في نتائج العدوى التجريبية للدراسة. وفي المعطيات التشريحية المرضية الموضحة بالجدول(11) شوهدت احتقانات دموية، وتضخم في الكبد والطحال، وهذا يتطابق مع ما ذكره المصدر السابق عن الآفات التشريحية في الحالات الحادة، وبالنسبة لما تشير إليه المراجع عن أمراض البستوريلة عند الطيور (Ocedze, 1987)، فإنها غالباً ناجمة عن الإصابة بأنواعها المختلفة منها *Pasteurella Multocida* عند الدجاج و*P.anatipestier* عند البط و*P.septicaemiae* عند الإوز وفي هذه الدراسة عزل النوع *P.pneumonae* الذي أظهر بالعدوى التجريبية و بكلّتا الطريقتين (الفم أو جوف البطن) أن فترة الحضانة تراوحت من ساعات عدة إلى ما بين /3-4 / أيام وهي بذلك تتوافق مع ما ذكره (Ocedze, 1987)، وتنفق الطيور خلال /5-10/ أيام تظهر خلالها علامات المرض التي سجل قسم منها عند العدوى التجريبية في دراستنا هذه التي تتوافق أيضاً مع (John, 1998; Arun & Krishnappa, 2004)، الذين ذكروا أن جراثيم الباستوريلة متعددة السمية شديدة الفوعة، وتسبب مرض كوليرا الطيور Fowl Cholera الذي يتمّيز بارتفاع نسبة الإصابة والنفوق خاصة في الحالات الحادة، وتتلخص العلامات السريرية الرئيسة بـ: انخفاض الشهية، انخفاض إنتاج البيض، نسبة النفوق عالية، ازرقاق العرف وضيق تنفس، وقد يحدث المرض كنتيجة لتلوث الماء بالزرق. ومن الملاحظ أن الأعراض لم تبدأ بالظهور على الصيصان إلا في اليوم الرابع ؛ إذ نفق صوص واحد من مجموعة الصيصان المحقونة عن طريق جوف البطن، وهذا يفسر بأن فترة حضانة *Pasteurella.pneumonae* تتراوح بين عدة ساعات حتى/ 2- 4 / أيام (John, 1998; Arun & Krishnappa, 2004).

## الاستنتاجات والتوصيات:

– أظهرت الاختبارات الحيوية أن الجراثيم المعزولة بالجرعة المعدية ذات ضراوة وإمراضية عالية للأجنة والصيصان وبالتالي فإن زيادة أو وصول أعداد الأحياء الدقيقة إلى أعداد محددة في الغشاء الحيوي المتشكلّ في أنظمة الشرب يمكن أن يسبب العدوى الطبيعية لقطعان الطيور.

– إن البحث في الوسائل والتدابير التي تعيق تشكلّ الغشاء الحيوي أو تعالج وجوده تعدّ الخط الأول في الأمن الحيوي، ومن أبسط هذه التدابير إيجاد طريقة التنظيف الفعّالة وزيادة فترة المعالجة بالقلويات وزيادة زمن ملامسة المنظف للسطوح الداخلية للأنابيب لتفادي تشكلّ الغشاء الحيوي.

– اختيار التجهيزات وإمدادات وتوصيلات المياه التي لا تؤمن ظروفاً ملائمة لنمو الكائنات الدقيقة، فالعديد من المشاكلّ يمكن تلافيها باختيار تصميم ملائم للتجهيزات والمعدات.

– إجراء تحاليل جرثومية نظامية ودورية لعيّنات الماء المقدّم للطيور.

## المراجع:

1. AMARAL, L.A. *Drinking water as a risk factor to poultry health*. Brazilian Journal of Poultry Science (2004), / v.6 / n.4 / 191-99. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - FCAV/Unesp
2. ANWAR, H. AND COSTERTON, J. W. *Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother.* (1990) 34: 1666-71
3. ARUN.S.J AND KRISHNAPPA, G. *Antigenic Analysis of Outer Membrane Proteins of Biofilm and Free Cells of Pasteurella multocida A:1 in Comparison with Local Isolate* International Journal of Poultry Science (2004) 3 (8): 517-521.
4. BRIAN D. FAIRCHILD AND CASEY W. RITZ *Poultry Drinking Water Primer Extension Poultry Scientists Cooperative Extension Service* College of Agricultural and Environmental Sciences / Georgia & Ft. Valley State University Bulletin (2006).13-16
5. BAYDVLATO, B. B & BESSARBOV, BF, *Poultry disease*. Ezdat urajai. Moscow (1984) P.138-139
6. COSTYNICO,T.C,ESCARTHEIS SKIA ,A.E.T, JETKL SON C.C *Practical of vet retinal medical and immunology* . (Moscow) 1989. ) P.18-23
7. COOPERATIVE REGIONAL RESEARCH PROJECT *Water Quality Issues in Poultry Production and Processing.* October 1, 2000 to September 31, (2005).W-195.
8. DEFRA,D. *Meat Chickens and Breeding Chickens*. Code of recommendation for the welfare of livestock, (2002),P72-75.
9. GOAN,H.C.,BURCHAM, P.H., DENTON,P.H.ANDDRAUGHON,F.A. *Quality of well water on Tennessee poultry farms*. Poultry Science (1992) 71:103
10. JAFARI , R.A. FAZLARA A. and GOVAHI M .*An investigation into salmonella and fecal coliform contamination of drinking water broiler farms in Iran*. International Journal of Poultry Science 5 (5): ISSN (2006) 491-493
11. JEFF ODLE O. *Quality Water is Vital for Poultry Production*. Animal Health Solutions – North America in Wilmington Poultry Times Magazine September (2008) Volume 55, Number19

12. JOHN R.GLISSON *Bacterial Respiratory Diseases of Poultry,* (1998) Poultry Science 77:1139–114
13. KAPPERUD G, SKJERVE E, VIK L, HAUGE K, LYSAKER A, AALMEN I, OSTROFF SM, POTTER M. *Epidemiological investigation of risk factors for Campylobacter colonization in Norwergian broiler flocks*. Epidemiology and Infection, 111(2), (1993) 245-255
14. KENNETH TODAR, *Salmonella and salmonellosis*, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology Journal of Food Protection, Vol. 69, No. 10, 2005 Pages 2352–2356
15. KORBER, D.R., JAMES, G.A., and COSTERTON, J.W. *Evaluation of fleroxacin activity against established Pseudomonas fluorecens biofilms.* Appl. Environ. icrobiol., 60: (1994). 1663-1669
16 .MOHYLA. P, BILGI S. F, OYARZABAL O. A, WARF.C. C AND KEMP .G. K . *Application of Acidified Sodium Chlorite in the Drinking Water to Control Salmonella serotype Typhimurium and Campylobacter jejuni in Commercial Broilers*. Journal of Applied Microbiology Volume 102 (2007) Issue 2 Page 548-554, February.
17. MANNING, L., BAINES, R.N. and CHADD,S.A. *Key performance indicators for food safety in broiler production*. British Food Journal (2006) 108(8): 605-621.
18. NIKOLAEV. YU. A. AND PLAKUNOV. V. K. *Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms***.** Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7, k. 2, Moscow, 1312, Russia Mikrobiologiya, **(**2007) Vol. 76, No. 2, pp. 149–163.
19. NAWAZ,MS KHAN,AA KHAN, SA PAINE,DD POTHULURI,JV CERNIGLIA, CE. *biochemical and molecular characterization of erythromycin-resistant avian Staphylococcus spp. isolated from chickens,* Poultry Science, (1999) Vol 78, Issue 8, 1191-1197.
20. POPPE C, IRWIN RJ, MESSIER S, FINLEY GG, OGGEL J. *The prevalence of Salmonella enteritidis and other Salmonella spp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks*. Epidemiology and Infection, 107, (1991), 201-211.
21. PRAKASH. B. VEEREGOWDA. M and KRISHNAPPA G. *Biofilms: A survival strategy of bacteria.* Current Science, .(2003)Vol. 85, No. 9, 10 November.
22. OCED ZE D.F *Infections animal disease***.** Moscow. (1987) AGROPROM F7DAT.P 11-16.
23. SIORIN U.V, BELOROSOVA R.V, SALOVIEV B.U, FOMIN N.V *Laboratorial Method Of Diagnosis Viral Diseases Of Animal Agroprom Iizdot*, Moscow (1986) P.71-75.
24. SKYBERG, J.A. SIEK, K.E C. DOETKOTT, L.K. NOLAN *Biofilm formation by avian Escherichia coli in relation to media, source and phylogeny*. Journal of Applied Microbiology 102 (2) (2007) , 548–554.
25 **.**SIORIN U.V, BELOROSOVA R.V, SALOVIEV B.U, FOMIN N.V ***Laboratorial*** **.**Method Of Diagnosis Viral Diseases Of Aninal Agroprom Iizdot**,** Moscow, Russia (1986) P.71-75