المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ٢، ٢٠٠٩ (٥٢١-٥٢٥)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

تأثير بعض المضادات الحيوية على جراثيم الإشريكية القولونية المعزولة من أفراخ فروج اللحم من بعض المناطق في سورية

تميم محمد سعد الساعاتي، محمد علي العمادي و ناجح هبرة

قسم امراض الحيوان، كلية الطب البيطري، جامعة البعث، سوريا

الخلاصة

جمعت مائة عزلة من جراثيم الاشريكية القولونية من حالات مرضية مشكوك اصابتها بجراثيم E-coli من دجاج اللحم في مختلف المناطق من سورية. خضعت العزلات لاختبار تسعة عشر مضاد حيوي باستخدام وسط مولر-هنتون. اظهرت نتائج الدراسة ان اكثر العزلات كانت حساسة لكل من الارثرومايسين واللينكومايسين والكنامايسين والكوليستين ومقاومة لكل من الامبيسيلين والسيفاليكسين والتتراسيكلينات.

Effect of some antibiotics on *Escherichia coli* isolates from broiler chicks in some regions of Syria

T. M. S. Al-Saati, M. A. Al-Emadi and N. Habra

Department of Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, Al-Bath University, Syria

Abstract

One hundred *Escherichia coli* isolates collected from pathological cases suspected to be E-coli infection in broiler chicks through Syria. The isolates were subjected to nineteen different antibiotics using Muller Hinton Agar. Results revealed that most isolates were sensitive to Erythromycin, Lincomycin, Kanamycin, Colistin; and resistant for Ampicillin, Cephalexine, Tetracycline.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

عزلت جراثيم الإشريكية القولونية (*Escherichia Coli*) لأول مرة من براز أمعاء الأطفال من قبل العالم Theodor Escherich عام 1885 (1) وسميت بهذا الاسم نسبة للعالم الذي اكتشفها والذي كان يعتقد أنها غير ممرضة، بعد ذلك عزلت من حالات مرضية كثيرة عند الدواجن فهي تسبب العديد من الأمراض التي تصيبها (2) ومن أهمها: الإنتانمية القولونية أو التسمم الدموي القولوني Colisepticemia، والتهاب الأمعاء Enteritis، ومتلازمة تورم الرأس Swallowne Head Syndrome (SHS)، و التهاب ملتحمة العين Panophthalmitis والمرض الحبيبي القولوني Coligranuloma أو مرض هيجرز Hjaress disease، والتهاب المفاصل Arthritis، و التهاب التامور Pericarditis، والتهاب البوق وقناة البيض Salpengitis (3)، والتهاب الصفاق Peritonitis، التهاب السرةOmphalitis ، والتهاب كيس المح Yolk sac infection والتهاب الهلل Cellulites التهاب الرئة و الجنبة Pleuropenumonia (4)، والتهاب الأكياس الهوائية Air saculitisالذي يشكل احد ركائز الإصابة بالمرض المعقد المزمن Chronic Respiratory Disease (CRD) بالمشاركة مع جراثيم المايكوبلازما كون هذه الجراثيم انتهازية ومتعايشة مع جسم الطائر لكنها ما تلبث أن تتحول إلى ممرضة في حال التعرض إلى عدوى ثانوية ناتجة عن عوامل إمراضية (جرثومية أو فيروسية أو طفيلية أو فطرية)، أو عوامل الإجهاد أخرى داخلية او خارجية. وصنفت جراثيم الإشريكية القولونية ضمن عائلة الجراثيم المعوية Enterobacteriaceae وهي تابعة لجنس الإشريكية Escherichia نوع الإشريكية القولونية *Escherichia*

Coli. ويشار عادة بالمصطلح (APEC) إلى العترات الممرضة الطيرية Avian Pathogenic Escherichia Coli، ونظرا للخسائر الاقتصادية الفادحة التي تسببها جراثيم الإشريكية القولونية (5) وصعوبة السيطرة عليها (6) بسبب الاستخدام العشوائي والمكثف للمضادات الحيوية نجد انه لابد من تحديد أنواع المضادات الحيوية ذات التأثير الفعال على عصيات الإشريكية القولونية من أجل السيطرة على هذا المرض من خلال وضع حد للاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية.

المواد و طرائق البحث

العزولات

تم جمع مئة عينة من ٣٩ مزرعة من مزارع تربية دجاج اللحم المنتشرة في مختلف المناطق السورية وخاصة المنطقة الوسطى و الشمالية، وبأعمار مختلفة وخاصة في الأسابيع الأولى و الأخيرة من التربية أي الأسبوع الأول والثاني و الأسبوع الخامس والسادس بالإضافة إلى بعض العينات في الأسابيع المتوسطة من العمر، وذلك من الأعضاء المشتبه إصابتها الناتجة عن الإصابة بجراثيم الإشريكية القولونية والتي شملت كبد، قلب، كيس التامور، الأمعاء، الصفاق، السرة، كيس المح، المفاصل، الأكياس الهوائية، رئتين، ارتشاحات الأنف و القصبات و العين وتحت الجلد و من السوائل الإستسقائية في البطن.

حيث تم اخذ العينات بطريقة المسحة المباشرة باستخدام الماسحات القطنية المعقمة ووضعها مباشرة في المرق المغذي Nutrient Broth ثم نقلها في حافظات مبردة لفترة لا تتجاوز ست ساعات وبعد وصولها إلى المختبر يتم تحضينها في الدرجة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة من أجل إكثار الجراثيم ريثما تتم إجراءات العزل والتصنيف.

الكشف عن العزلات بطريقة إختبار انتربلوري

تم إجراء صبغة غرام Gram's stain لكل من النموات الجرثومية السابقة واستبعاد الإيجابية منها. ثم اجري اختبار الأوكسيداز على العينات السلبية الغرام منها وتم استبعاد العينات الإيجابية أيضا وذلك حسب توصيات الشركة المصنعة فهو مخصص للكشف عن عائلة الجراثيم المعوية Enterobacteriaceae (7) والجراثيم السالبة الغرام والسالبة الأوكسيداز.وللتأكيد تمت تنمية المستعمرات على احد الأوساط التمييزية مثل وسط الماكونكي Mac Conkey Agar (MAC) حيث تتشكل مستعمرات وردية اللون بسبب تخميرها لسكر واللاكتوز، أو وسط (EMB) الإيوزين و أزرق المثلين حيث تعطي ظاهرة البريق المعدني Metallic Sheenعند نموها على هذا الوسط (8).

ومن ثم استخدمت مساطر الإنتربلوري وهي عبارة عن مساطر لعزل وتصنيف الجراثيم، مصنعة من قبل شركة LIOFILCHEM الإيطالية. والتي تم الاعتماد عليها في الحصول على العزولات المستخدمة في البحث، وهي عبارة عن مسطرة مقسمة إلى أثني عشر حجرة مفرغة من الهواء يمر من خلالها لوب معدني محدد بثلمة تسمح هذه الحجرات الحاوية على المنابت اللازمة للاختبارات بإجراء خمسة عشر اختبارا بيوكيميائيا كما هو موضح في الجدول رقم (١). بعد ذلك يتم تسجيل النتيجة على الجدول الخاص بتحديد العدد الرمزي الدال على نوع العزولة كما هو موضح في الجدول رقم (٢).

مثال: العدد (75340) يدل على النتيجة الإيجابية لجراثيم الإشريكية القولونية (9)، واي نتيجة مخالفة لهذا الرقم في المثال السابق تستبعد لانتمائها إلى أنواع وأجناس مختلفة عن الجراثيم موضوع البحث وتحتاج إلى مساطر أخرى نوعية خاصة للكشف عنها.

طريقة استعمال اختبار الإنتربلوري

يتم أخذ واحدة من المستعمرات المفردة بطرف العروة البارزة من أطراف الأنبوب المحددة بدون أن تغرز بالوسط، تسحب العروة عبر الشريط (المسطرة) ببطء وبحركة دائرية عبر الأوساط الزرعية المتسلسلة، تعاد العروة مرة أخرى يستبعد منها الجزء المحدد بالثلمة وذلك للمحافظة على الظروف اللاهوائية اللازمة لتفاعل إطلاق الغاز. ثم تحضن الأنابيب في الدرجة ٣٧ لمدة ٢٤. حيث تم الحصول على ٤٢ عزلة نقية من جراثيم الإشريكية القولونية من مجموع العينات التي تم اختبارها وتشخيصها كما ورد سابقا.

اختبار الحساسية

تم اعتمادا طريقة Kirby-Bauer في إجراء الحساسية للعزلات النقية على وسط مولر هينتون Muller-Hinton من انتاج شركة (High media) الهندية والمحضر بإذابة ٣٥ غرام في ليتر ماء مقطر بشكل جيد ويعقم بالصاد الموصد autoclave بدرجة حرارة ١٢١م / وبضغط ١٥ باوند / أنش ولمدة ١٥ دقيقة حسب (10)، وذلك حيث أخذ ٠,١ سم ٣ من المعلق الجرثومي ونشر على سطح الوسط باستخدام ناشرة زجاجية معقمة ثم ترك الوسط الزرعي ليجف لمدة ٥ دقائق ثم وزعت أقراص الحساسية المنتجة من قبل شركة High media الهندية بشكل منتظم على الأطباق بواسطة ملقط معقم ثم حضنت بالدرجة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم تم قياس قطر التثبيط. والجدول رقم (٣) يوضح أنواع و تركيز ورموز هذه الأقراص وقطر منطقة التثبيط مقاسا بالمليمترDiameter mm والذي يمكن من خلاله تقسيم العزلات المدروسة إلى ثلاث مجموعات.

جدول (١): يوضح الإختبارات البيوكيميائية الموجودة في كل حجرة من حجرات المسطرة من اليسار إلى اليمين و النتائج الإيجابية والسلبية لجرثومة الإشريكية القولونية باستخدام هذا اختبار بالإعتماد على التغيرات اللونية الحاصلة جراء هذه التفاعلات الخاصة بهذه الجرثومة.

Sector	Biochemical eactions	Positive Reaction	Negative Reaction
Glucose / Gas	Glucose fermentation and gas production in anaerobiosis	Yellow Lifted wax	Red Overlaying wax
Lysine	Lysine decarboxylation	Violet	Yellow
Ornithine	Ornithine decarboxylation	Violet	Yellow
H2S / Indol	Hydrogen sulpide production and indole test	Black-brown Pink- red	Beige Colourless
Adonitol	Adonitol Fermentation	Yellow	Red
Lactose	Lactose Fermentation	Yellow	Red
Arabinose	Arabinose Fermentation	Yellow	Red
Sorbitol	Sorbitol Fermentation	Yellow	Red
VP	Acetoin production (Voges – proskaure)	Red	Colourless
Dulcitol / PA	Dulcitol Fermentation phenylalanine deamination	Yellow Dark brown	Green Green
Urea	Urea hydrolysis	Purple	Beige
Citrate	Citrate utilization	Blue	Green

جدول رقم (٢) يبين العدد الرمزي لعترات الإشريكية القولونية E-coli الإيجابية لاختبار الإنتربلوري.

	Group1			Group2			Group3			Group4			Group5		
Test	Glu	Gas	lys	Orn	H2S	Ind	Ado	Lac	Ara	Sor	Vp	Dul	PA	Ure	Cit
Positive code	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Results	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Total		7			5			3			4			0	

الرقم (٠) يدل على النتيجة السلبية لأي اختبار من كل مجموعة، الرقم (١) يدل على النتيجة الإيجابية للاختبار الثالث من كل مجموعة، الرقم (٢) يدل على النتيجة الإيجابية للاختبار الثاني من كل مجموعة، الرقم (٤) يدل على النتيجة الإيجابية للاختبار الأول من كل مجموعة، نحصل على الرقم النهائي للقيم الإيجابية في كل مجموعة بوضع الناتج حسب تسلسل المجموعات ويقارن بالجدول المقدم من قبل الشركة لمعرفة نوع الجراثيم النامية في المسطرة أو الأنبوب.

النتائج

أظهرت ٨٠٪ من العزلات حساسية عالية تجاه كل من اللينكومايسين بنسبة ٩٢٪، و الإريثرومايسن والكوليستين بنسبة ٧٨٪، و بنسبة ٧٩٪ للكانامايسين مع الأخذ بعين الإعتبار أن نسبة ٢٠٪ تراوحت بين مقاومة ومتوسطة الحساسية لهذه المضادات كما نلاحظ أن بعض العزلات كانت حساسة لكل من النيومايسين و الستربتومايسين بنسبة ٦٠ % و للنورفلوكسا سين بنسبة ٦٧ % أي ان ٦٥٪ من العزلات كانت حساسة بشكل أقل لكل من النيومايسين و الستربتومايسين و للنورفلوكساسين وتراوحت النسبة الباقية بين ومقاومة و متوسطة الحساسية.

كانت نسبة ٧٣٪ من العزلات متوسطة الحساسية بالنسبة لكل من المضادات الحيوية التالية السيبروفلوكساسين ٨٣٪ و والتوبرامايسين ٧٦٪ و الجنتاميسين ٦٩٪ ومجموعة النيتروفيران ٨٠٪ و الكلورامفينيكول ٥٩٪.أيضا تراوحت نسبة ٢٧٪ بين مقاومة وحساسة لمضادات المذكورة.

أظهرت العزلات الجرثومية مقاومة عالية تجاه المضادات الحيوية التالية الأمبيسيلين بنسبة ٩٣٪ و السيفاليكسين بنسبة ٨٣ % و التتراسيكلينات بنسبة ٨٨٪ بالدرجة الأولى أي أن ٨٧٪ من العزلات كانت مقاومة للأمبيسيلين و السيفاليكسين و التتراسيكلينات رغم ان بعض العزولات أظهرت حساسية جيدة وبعضها الآخر متوسطة بنسبة بلغت ١٣٪. بينما اظهرت العزلات الجرثومية مقاومة متوسطة النسبة لكل من ثم حمض النالديكسيك بنسبة ٦٩٪ و السلفا الثلاثية بنسبة ٦٦٪ و التريموبريم بنسبة ٦٦٪، هذا يعني أن نسبة العزلات الحساسة او المتوسطة الحساسية لهذه الأخيرة كانت ٣٣٪ (جدول ٤).

الجدول رقم (٣) يوضح أنواع و تركيز ورموز أقراص الحساسية وقطر منطقة التثبيط مقاسا بالمليمتر.

Antimicrobial Agent	Symbol	Disc content	Resistant Mm	Intermediate Mm	Sensitive Mm
Ampicillin	AM	10 mcg	11	12-14	15
Cephalexine	CFX	30 mcg	14	15-17	18
Chloramphenicol	C	30 mcg	12	13-17	18
Ciprofloxacin	CIP	5 mcg	12	13-15	16
Erythromycin	E	15 mcg	13	14-22	23
Gentamicin	G	10 mcg	12	13-14	15
Neomycin	N	30 mcg	12	13-16	17
Nitrofurantion	NF	300mcg	14	15-16	17
Naledixic acid	NA	30 mcg	13	14-18	19
OxyTetracycline	O	1 mcg	10	11-12	13
Tobramycin	TB	10 mcg	12	13-14	15
Trimethoprim	T R	5 mcg	10	11-15	16
Streptomycin	S	10mcg	11	12-14	15
Norfloxacin	Nx	10 mcg	12	13-16	17
Lincomycin	L	2 mcg	9	10-14	15
Kanamycin	K	30 mcg	13	14-17	18
Colistin	Cl	10 mcg	8	9-10	11
Doxycycline	Do	30 mcg	12	13-15	16
Triple Sulphas	S3	300mcg	12	13-16	17

جدول رقم (٤) يوضح النسبة المئوية لتأثير المضادات الحيوية على العزلات الجرثومية المدروسة.

المضاد الحيوي	العزلات المقاومة	العزلات متوسطة الحساسية	العزلات الحساسة
Ampicilline	٪٩٣	٪٧	٪٠
Cephalexine	٪٨٣	٪٨	٪٩
Chloramphenicol	٪٥	٪٥٩	٪٣٦
Ciprofloxacin	٪٥	٪٨٣	٪١٢
Erythromycin	٪٢٠	٪٢	٪٧٨
Gentamicin	٪١٠	٪٦٩	٪٢١
Neomycin	٪١٠	٪٣٠	٪٦٠
Nitrofurantion	٪١٣	٪٨٠	٪٧
Naledixic acid	٪٦٩	٪٢١	٪١٠
OxyTetracycline	٪٨٨	٪٧	٪٥
Tobramycin	٪٤	٪٧٦	٪٢٠
Trimethoprim	٪٦٤	٪٣٢	٪٤
Streptomycin	٪١٠	٪٣٠	٪٦٠
Norfloxacin	٪٣	٪٣٠	٪٦٧
Lincomycin	٪٥	٪٢	٪٩٣
Kanamycin	٪٤	٪١٣	٪٧٩
Colistin	٪٥	٪١٣	٪٧٨
Triple Sulphas	٪٦٦	٪٢١	٪١٣

المناقشة

ظهرت الحساسية العالية لكل من اللينكومايسن والإريثرومايسن لكونهما من المضادات الحيوية الحديثة والقليلة الإستخدام نظرا لارتفاع كلفة تطبيقها في برامج الوقاية ومكافحة الأمراض. كما كذلك أظهرت جراثيم الإشريكية القولونية حساسية تجاه الكلورامفينيكول بدرجة أقل من بقية المضادات وهذا يتفق مع الباحث (11) حيث يعد الكلورامفينيكول من المضادات الموقفة لنمو الجراثيم بتدخلها مع عمليات بناء البروتين (13،12)، وكان من الواضح مقاومة الجراثيم للأمبيسيلين وبنسبة أقل للسيفاليكسين بسبب قدرة جراثيم الإشريكية القولونية على إفراز أنزيم ال Penicillinsae أو لاكتساب البلازميد صفة المقاومة نتيجة الطفرات الناتجة عن الانقسام و الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية (14)، وظهرت المقاومة أيضا ضد النالديكسيك أسيد والتتراسيكلين وذلك بسبب استخدامهما المتكرر في العلف بجرعات وقائية مما يؤدي إلى ظهور المقاومة ضدهما (15).

المصادر

1. Kenneth T. University of Wisconsin Madison Department of Bacteriol. 2005.
2. Cheville NF, Arp LH. Comparative pathologic findings of Esherichia coli infection in birds. J A V M A. 1978; 173: P.P. 584-587.
3. Rosenberger Jk, Faries PA, Cloud SS, Wilson RA. In Vitro and In Vivo characterizaition of Avian Escherichia coli II.Factor Associated with Pathogenicity. Avian disease. Vol. 29 /(4). 1985; pp.1094 –1106.
4. Montgomery RD, Boyel RD, Lenarduzzi TA, Jones LS. Consequences to chicks Hatched From Esherichia coli inoculated Embryos. Avian Diseases. 1998;43:553-563.
5. Samantha J, Horne M, Giddings W, Jessica O, Herbert SM, Lisak N. Avian Dis. 2000;44:23-33.

6. Gross WB. Colibacillosis In: Disease Of Poultry 8th Edition.(Hofstad MS, Calnek BW, Barnes HJ, Ried WM. lowa University Press.1984; pp. 270-277.
7. Brenner DJ, Farmer J, Hickmann FW, Asbury MA, Steigerwalt AG. *Taxonomic and Nomenclature changes in Enterobacteriaceae*; Washington , DC: U. S. Dept. Of Health, Education and Welfare, Public Health Service , National Center for Disease Control. 1977.
8. Brook GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick and Adelbergs, Medical Microbiology 22nd. Ed. Lage Medical Books McGraw- Hill Newyork- Chicago. Sanfrancisco. 2001.
9. Enterpluri-Test 2005 Archivio liofilchem, Marzo.liofilchem bacteriology products
10. Macfaddin JF. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria Waverly. Press Inc. 1979
11. Ibrahim AA, Shehata MA. Some Observation 0n coli septicemia of laying chickens. Assiut vet Med J. 1985;4(27):235-240.
12. Cloud SS, Rosenberger JK, Fries PA, Wilson RA, Oder EM. In Vitro and In Vivo characterization of Avian Escherichia coli I. Serotypes, metabolic Activity, and Antibiotic sensitivity. Avian disease. 1985;29(4):1084–1093.
13. Sambyal DS, Dhingra PN, Baxi kk. A survey and Escherichia coli in poultry Farms and their drug sensitivity. Indian J poult Sic. 1981;16:159–160
14. Jawetz E, Mel nick Jl, Adelberg EA. Enteric Gram- negative Micro Organisms in: Review of Medical Microbiology 12th Ed. lange–Medical– publications Canada.1976; pp.203-208.