جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية الطب البيطري

عزل وتمييز جزيئي للرشاشيات فليفاس من الأعلاف المركزة فضلا عن دراسة إمراضيتها في الارانب والحمام وحساسيتها لمستخلصات بعض النباتات

رسالة

مقدمة الى مجلس كلية الطب البيطري ، جامعة ديالى

كجزء من متطلبات الحصول على ماجستير علوم في الأحياء المجهرية البيطرية

من قبل

احمد داود احمد المشهداني

بكالوريوس طب وجراحة بيطرية

اشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة

لمى طه احمد

الأستاذ الدكتور

نزار جبار مصلح الخفاجي

2018 ميلادي

1439 هجري

الخلاصة

اجريت الدراسة الحالية في حقل ومختبرات كلية الطب البيطري ، جامعة ديالى من اليوم الاول من تموز 2016 الى اليوم الثلاثون من نيسان 2017.

جمعت عشرة عينات من العلف المركز المستخدم في تغذية الأبقار ، والدواجن ، والاسماك من مواقع مختلفة من محافظة ديالى (كنعان ، الخالص، بهرز، والمقدادية). عزلت رشاشيات فليفاس *Aspergillus flavus* ومن ثم ميزت بالطرق المختبرية من خلال الفحص العياني .

رشاشيات فليفاس المعزولة عززت بالطرق الجزيئية. استخلص الحالمض النووي الرايبو مزال الاوكسجين (الدي أن أي (DNA) بنجاح من رشاشيات فليفاس باستخدام عدد تجارية Kits ، بعد ذلك تفاعل سلسلة متعددة البلمرة والذي انجز باستخدام برايمرين مختليفين ITs 1، ITs4 ، NS1 ، C18L .

أنجزت الامراضية بتعرض ثلاث مجموعات من كل من الارانب والحمام ، خمس حيوانات في كل مجموعة، أما إلى سم الافلا أو الأبواغ . حيث عرضت حيوانات المجموعة الأولى لسم الافلا عن طريق الفم ، بينما عرضت حيوانات المجموعة الثانية من خلال الحقن داخل الصفاق من السم ، في حين ، عرضت حيوانات المجموعة الثالثة للأبواغ من خلال الاستنشاق.

شملت المعايير الرئيسية المعتمدة، العلامات السريرية والتي تظهر على الحيوانات، وزن الجسم ، زمن التخثر ، وزمن النزف، وفحوصات الدم (العدد الكلي لكريات الدم الحمر ، وتركيز خضاب الدم ، وحجم الخلايا المرصوصة ، والعدد الكلي

والتفريقي لخلايا الدم البيض)، والكيموحيوية (ناقل الأمين الالنين ، وناقل الأمين الاسبرتيت ، ومستوى البليروبين الكلي في مصل الدم) ، فضلا عن التغييرات بعد الموت في الحيوانات الهالكة و المذبوحة والنسيجية التشريحية (الكبد، الكلى ، والقلب).

حددت الفعالية البلعمية باستخدام اختبار اختزال صبغة النايترو بلو تترازوليام.

أنجزت حساسية الجلد على 6 ارانب بيضاء ناضجة بوزن 1 – 1.5 كغم وزن الجسم . شمل العلاج منطقة واحدة على كل حيوان وتركت المنطقة الاخرى كسيطرة وكما يلي : في الحيوان الاول والثاني عرض الجرح الى 0.2 مل من عالق الابواغ ، بينما الحيوان الثالث والرابع عرض الجرح الى 0.2 مل من عالق سم الافلا ، في حين في الحيوان الخامس والسادس عرض الى مستخلص الدهني لسم الافلا بنشر نصف الكمية من المادة الدهنية بقضيب زجاجي في اليوم الاول وكرر نفس الشي في اليوم الثاني وتركت المنطقة الاخرى كسيطرة بدون تعرض. تمت مراقبة الحيوانات لمدة 10 ايام وسجلت التغيرات غير الطبيعية التي ظهرت علة الحيوان او الجلد.

حددت الفعالية المضادة للفطريات للمستخلصين الميثانولي والمائي لكل من لثمار الميليا ازدراج ، وورد اللنتانا كمارا ، وثمار اللنتانا كمارا، وثمار (البمبر) كورديا دايكوتوما ، وبذور الخروع ، ولب الرمان ، وأوراق وأزهار السنا ، باستخدام طريقتي الحفر والاقراص على الاكار، فضلا عن ايجاد تركيز المثبط الادنى ضد رشاشيات فليفاس المعزولة.

كشفت الدراسة ان الفطريات المعزولة من 10 نماذج من العلف كانت رشاشيات فليفاس ، رشاشيات نايكر ، رشاشيات باراسيتيكاس ، فيوزيريوم ، بنسيليوم ، والخميرة.

سلسلة البرايمر الأول لم تظهر اي نتيجة ، بينما كشف الثاني حزمة التضخيم لجميع الرشاشيات المعزولة .

ظهور العلامات السريرية التي ظهرت بعد التعرض عن طريق الفم والتي كانت الاوضح في الحمام مقارنة بالأرانب. تمثلت في الحمام بالعلامات العصبية ، حركات غير مسيطر عليها ، صعوبة التنفس ، انتفاخ القانصة ، الإغماء الذي استمر ل 20 – 30 دقيقة والشلل . بينما اظهرت الارانب علامات معتدلة ، واصوات الالم والانين. التعرض الفمي لسم الافلا كان اكثر اذى وادى الى ظهور علامات اشد. في كلا الحمام والارانب التي عرضت لسم الافلا بالحقن في الصفاق ، كانت العلامات معتدلة ، سجلت عدم السيطرة على الاطراف الامامية والخلفية. لم تظهر علامات على الحيوانات المعرضة من خلال الاستنشاق. وزن الجسم انخفض بشكل غير معنوي. طال زمن التخثر وزمن النزف. هبط العدد الكلي لكريات الدم الحمر ، تركيز خضاب الدم ، وحجم الخلايا المرصوصة . ارتفاع اعداد خلايا الدم البيض ونسبة العدلات ، في حين هبطت نسبة الخلايا اللمفاوية . اظهرت نتائج الفحوصات الكيمو حيوية ارتفاعا في مستويات ناقل الأمين الالنين، والاسبرتيت والبليروبين الكلي في مصل الحيوانات. هلكت ثلاث ارانب من المجموعة الاولى والتي عرضت لسم الافلا عن طريق الفم ، واثنان من المجموعة الثانية التي عرضت لسم الافلا عن طريق الحقن داخل الصفاق فضلا عن طير واحد هلك من المجموعة المعرضة لسم الافلا عن طريق الحقن داخل الصفاق. التغيرات النسيجية المرضية والعيانية الرئيسية ، تمثلت بتورم الكبد ، احتقان القلب ، الكبد ، الكلى ، الرئتين . كما ظهر ارتشاح الخلايا الالتهابية ، تحطم الاسناخ ، تنكس دهني في الكبد.

فـي اختبـار حساسـية الجلـد فـي الارانـب هنـاك زيـادة فـي قطـر ومسـاحة الجـروح، الاحمـرار، التـورم ، الاسـتجابة الالتهابيـة، تغيـر لـون المنطقـة، تـثخن الجلـد، وتغيـر فـي فعاليـة الحيوان كما في عدم فعالية الارانب ، هبوط استهلاك الغذاء، وفقدان الوزن.

مـن خـلال المستخلصـات الميثـانولي والمائيـة ، اظهـرت مستخلصـات الميثـانول افضـل فعاليـة مضـادة للفطـر . مسـتخلص لـب الرمـان لكـل مـن الميثـانولي والمـائي اظهـر الفعاليـة الاعلـى المضـادة للفطـر . طريقـة الحفـر علـى الاكـار اعطـت نتـائج افضـل مقارنـة بطريقة الأقراص.

يمكـن الاسـتنتاج مـن ان رشاشـيات فليفـاس كعفـن عزلـت مـن كـل نمـاذج الاعـلاف المركـزة التـي اعتمـدت فـي الدراسـة وكانـت مـن نـوع مولـد سـم الافـلا. تعـرض الارانـب والحمـام الـى سـم الافـلا او الابـواغ نـتج عنـه تـأثيرات مؤذيـة مـن وجهـة النظـر الفحوصـات الكيمـو حيويـة وفحوصـات الـدم والنسـيجية المرضـية . مستخلصـات الميثـانول اظهـرت تـأثيرات افضـل مقارنتـا بالمستخلصـات المائيـة .مسـتخلص لـب الرمـان كـان لـه تـأثير مثـبط اعلـى . طريقة الانتشار في الحفر اعطت نتائج افضل مقارنتا بطريقة الانتشار في الاقراص.

1.Introduction

Only in the last 30 years, it has become clear, that commonly occurring fungi, growing in foods and feeds may produce toxins, known as mycotoxins. These poisons have caused major epidemics in man and animals during historical times. Aflatoxicosis, which killed 100,000 young turkeys in the UK in 1960 and has caused death and disease in other animals and probably in man as well (Rodricks *et al*., 1977).

Food has always play an extra-ordinarily vital role in the rise or decline of a nation because of its effect on the health of the population. Consumption of unsafe, contaminated diet leads, to food-borne diseases which cause considerable morbidity and mortality (Waghode and Garode, 2013).

In human medicine, the appearance of AIDS and the evolution of immunosuppressive treatments essential for the success of organ transplants, have highlighted the importance of fungal diseases, and efforts have been made to understand these diseases and to develop means for their prevention and control. This has been much slower in Veterinary Medicine; on many occasions the fungal diseases have been relegated to post- mortem discoveries (Emomon's *et al*., 1977 and Jose and Marta, 2008).

Current advances in biotechnology, molecular genetic marker have been employed for rapid identification of different species of fungi (Lieckfeld and Seifert, 2000 and Attanayake *et al.*, 2009). Nevertheless, isolation of intact DNA is critical for a number of molecular analysis such as cDNA production and transcriptional output quantitation (Selma *et al*., 2008).

Advancements towards identifying fungal species are by way of using DNA markers, developing DNA barcodes that are diagnostics of target species, using species-oligonucleotides (Druzhinina *et al*., 2005).

Diseases caused by the genus Aspergillus are named aspergillosis. These includes invasion and damage of tissues in an animal that can be wide

spread and rapidly fatal. For emphasis, aspergillosis is the second most common fungal infection requiring hospitalization (Kone man and Roberts, 1983 and Smith, 1994).

Fungal deteriorations and mycotoxin contamination of various food and feed stuffs are a major problem in the tropics and subtropics, where climatic conditions and storage practices are favorable to mold growth (Salari *et al.,* 2006; Quian *et al.,* 2009 and Shukla *et al.,* 2009). The risk of mycotoxins, particularly aflatoxins contamination is an important food safety concern for grains and other field crops worldwide (Kumar *et al.,* 2007 and Reddy *et al.,* 2009). The Food and Agriculture Organization (FAO) estimated that around 25% of the world's cereals are contaminated by mycotoxins, including aflatoxins (Dowling,1997). Aflatoxin B1 is one of the most common and dangerous mycotoxin produced by *A. flavus* (Manafi and Khosravinia, 2013). Aflatoxins are found in a variety of food commodities such as maize, ground nut, cotton seeds, and other cereals worldwide. It is reported that about 4.5 billion people in developing countries are systematically exposed to uncontrolled amounts of aflatoxins (Shukla *et al.*, 2008).

The use of plant compounds to treat infection is an age- old practice in a large part of the world, especially in developing countries, where there is dependence on traditional medicine for a variety of diseases (Gangoue-Pieboji *et al*., 2006). Medicinal plants would be the best source to obtain a variety of drugs (Santos *et al*., 1995).

Plant extracts have played significant role in the inhibition of pathogens and in the improvement of quality and yield of food (Nwachukwe and Umechurma, 2001). The use of plant extracts with known antimicrobial properties can be of great significance in disease treatments. There is an urgent need to shift towards eco-friendly technologies to reduce the loss.

1.2. Aims of the study

1- Isolation and identification of *Aspergillus flavus* from different types of concentrated feed on dependence of macro and micromorphological examination of colonies. in addition to the molecular identification.

2- Exploring the pathogenicity of Aspergillus toxin (aflatoxin) and spores in local and albino rabbit and pigeons on the dependence of clinical, hematological, biochemical, and histopathologica-l parameters.

3- Study the rabbit skin sensitivity to aflatoxin and fungal spores isolated from feed samples.

4- Determining the sensitivity of isolated *Aspergillus flavus* to methanolic and aqueous extracts of famous medicinal plants by using well and disc agar diffusion methods, in addition to find the Minimum Inhibitory Concentration.