****

**Republic of Iraq**

**Ministry of Higher Education and Scientific Research**

**University of Baghdad**

**College of Veterinary Medicine**

**Experimental study of secondary copper deficiency on immune response against *Klebsiella pneumoniae* infection in sheep**

A thesis

Submitted to the Council of the College of Veterinary Medicine / University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy of Science in Veterinary Medicine / Internal and Preventive Medicine

By

**Nawras Kadhum Mahdee Al-Nakeeb**

Supervised by

**Assist. Prof. Dr. Abdul Munaf Hamza Judi**

2015 A.D. 1436 A.H.

**Abstract**

The study aimed to investigate the role of copper deficiency in increasing susceptibility to bacterial infection with pneumonia .Fifteen Awassi male sheep were used in this experimental study during a period extending from 20/1/2014 to 29/6/2014 which included (45) days at the beginning of the study for adaptating and receiving a complete vaccination and treatment program with balanced diet containing (5.2)mg/day of copper in addition to green food along the period of experiment to ensure the good healthy state of the sheep.

The animals were divided randomly into three groups (each group containing 5 animals). One of these group was drenched with a mixture of ammonium Molybdate (100)mg and (1)g of Sodium Sulphate in (100) ml of water daily for inducing of secondary Cu deficiency. The parameters measured in the study included an estimation of serum Cu level, complete blood picture covering red blood cells (RBC), hemoglobin (HB), packed cell volume (PCV), total white blood cells (tWBC) granulocytes (GRN%) lymphocyte (LYM%)and monocytes (MON%) on the zero day and these test were repeated every two weeks.

At the time of inducing secondary Cu deficiency, the study also included the collection of (80) pneumonic sheep lungs from the slaughterhouse in AL-Diwaniya city for bacterial isolation and identification by making gram stain then diagnosing by VITEK-2 technique. *Klebsiella pneumoniae* was used for induction of pneumonia.

The infected dose of bacteria were determined by using (50) mice divided into 6 groups (each group consisting of 8 mice) injected intratracheally with *Kl. pneumonaie* suspension including (104, 105, 106, 107, 108 and 109 CFU/ml) with (0.1)ml of bacterial suspension (2)mice leaved as control. The infected dose at concentration (105 CFU/ml) in dose (0.1)ml was selected according to the appearance and severity of clinical signs in mice.

The induction of pneumonia was served to Cu deficient sheep and the other group (infected group) with dose (3ml) of bacteria suspension in concentration (105 CFU/ml) intratracheally while the third group was left as the control group with daily observation to record the clinical signs of pneumonia.

The clinical signs of secondary Cu deficiency which appeared in Cu deficient group included the emaciation of all the (5) animals, loss of wool, bleaching around the eye in one animal, change in the color and increase in respiratory and pulse rate.

Copper level decreased gradually to reach (0.58±0.03ppm) which is regarded subnormal level with statistical significant decrease after 10 weeks of the beginning of oral drenching as compared with the other two groups. Blood parameters which included (RBC, HB, PCV, MCV, MCH and MCHC) did not record any statistical significant differences along all the experimental period at (P≤0.05) in the secondary Cu deficient group as compared with other two groups .

Total WBC in the period of induction of Cu deficiency recorded variation in the values with the presence of statistical significant gradual decrease in the Cu deficient group as compared with other two groups with non-significant differences in GRN%, MON% and LYM% at that period at (P≤0.05).

The clinical finding of pneumonia in groups (Cu deficient and infected) showed nasal discharge which began as serous and changed to mucopurulent ,intermittent cough(which appeared firstly at Cu deficient animals).

Physical examination revealed mild fever in both 2 groups with abnormal respiratory sounds on auscultation. There was statistical increase in respiratory and pulse rates as compared with the control group at (P≤0.05).

Postmortem examination of 2 animals (one animal from each group) revealed increased subcutaneous adipose tissue and fat tissue and less muscles mass of Cu deficient group as compared with other animal. Lung of Cu deficient animals showed paleness, yellow colored with frothy fluid and hard solid consistency with gray hepatization while the lung of the other animal of infected group showed sever congestion .

Histopathological lesion of Cu deficient animal revealed hyperplasia of epithelial cells lining the bronchus and showed as papillary or finger –like projection with desquamation within lumen of bronchus ,also there was emphysema with infiltration of inflammatory cells (mainly macrophages ) with proliferation of fibrous connective tissue (hepatization). The changes in liver included congestion in the central vein and inflammatory cells aggregation (mainly macrophages) dilatation of sinusoid, proliferation of kupffer cells and necrosis of hepatocyte (the nuclei showed karyolitic). The histopathological lesion of lung of the other animal included infiltration of inflammatory cells in the interstitial tissue, pulmonary emphysema and hyperplasia of epithelium and in the liver showed congestion of central vein infiltration of inflammatory cells, hyperplasia of bile duct epithelium and dilatation of the sinusoids.

Total WBC in the copper deficient group recorded statistical significant increase in its numbers through the infection period as compared with the control group with the presence of statistical significant differences between (Cu deficient and infected ) groups. GRN% showed statistical significant increase in values reaching(9.12 ± 0.81) during the period of pneumonia as compared with the control group, (MON%) also showed statistical significant increase in values (more values in the infected significantly than Cu deficient) and (LYM%) revealed statistical significant decrease in Cu deficient group at (P ≤ 0.05).

The phagocytosis test of neutrophils was statistically decreased in Cu deficient group as compared with the other 2 groups.

The passive heamaglutination test (PHAT) showed statistical significant increment in antibodies titers during infection in group B than in group A and control group.

**جمهورية العراق**

**وزارة التعليم العالي والبحث العلمي**

**جامعة بغداد**

**كلية الطب البيطري**

**دراسة تجريبية عن تأثير نقص النحاس الثانوي على الاستجابة المناعية ضد الاصابة بجرثومة (*Klebsiella pneumoniae*) في الاغنام**

**اطروحة**

**تقدم بها إلى مجلس كلية الطب البيطري / جامعة بغداد جزءا˝ من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الطب البيطري/ في علم الطب الباطني والوقائي البيطري**

**الباحثة**

**نورس كاظم مهدي النقيب**

**بإشراف**

**الأستاذ المساعد الدكتور**

**عبد المناف حمزة جودي**

**جامعة بغداد/ كلية الطب البيطري**

**1436 ﻫ 2015 ﻢ**

**الخلاصة**

استهدفت الدراسة البحث عن دور النحاس في شدة الإصابة بذات الرئة الجرثومية في الأغنام العواسية. استخدمت (15) ذكر من الأغنام العواسية في هذي التجربة التي امتدت خلال الفترة من 20\1\2014 إلى 29\6\2014 وقد تضمنت مرحلة الإعداد والتهيئة التي امتدت لمدة(45) يوم عن بداية التجربة وقد شملت برنامج تلقيحي وعلاجي كامل كما غذيت على عليقه غذائية متوازنة احتوت على (5,2) ملغم/يوم من النحاس إضافة إلى الأعلاف الخضراء طيلة فترة التجربة لضمان الحالة الصحية الجيدة للحيوانات.

قسمت الحيوانات عشوائيا إلى ثلاثة مجاميع (كل مجموعة احتوت على 5 حيوانات) وجرعت واحدة من هذه المجاميع بواسطة معلق من موليبدات الامونيا(100)ملغم مع (1)غم من كبريتات الصوديوم مذابة في (100)مل من الماء يوميا لغرض استحداث نقص النحاس الثانوي. تم قياس مستوى النحاس في مصل الدم والصورة الدموية الكاملة والتي شملت العدد الكلي لكريات الدم الحمراء, كمية الهيموكلوبين, حجم الخلايا المضغوطة. العدد الكلي لكريات الدم البيضاء, نسبة الخلايا الحبيبية, نسبة الخلايا اللمفية ونسبة الخلايا وحيدة النواة قبل المعاملة وبعد المعاملة بصورة دورية كل أسبوعين.

وقد اجري المسح التشريحي ل(80) رئة مصابة في مجزرة الديوانية لعزل الكلبسيلا في نفس ذلك الوقت من إحداث نقص النحاس الثانوي من خلال الزرع على أكار الدم والتمييز بواسطة عمل صبغه غرام وبعدها التشخيص حسب تقنية الفايتك. استخدمت (*Klebsiella pneumoniae*) لغرض استحداث ذات الرئة و استخدمت لتحديد الجرعة المرضية (50) فأر قسمت إلى ستة مجاميع كل مجموعه تضمنت (8) فأر بينما تركت اثنان كحيوانات سيطرة. حقنت هذه المجاميع داخل ألرغامي بخليط جرثومة (*Klebsiella pneumoniae*) بتخافيف (108,107,106,105,104و109CFU/ml) بجرعة (0.1)مل, اظهر تركيز (105 CFU/ml) اعراض العلامات السريرية في الفئران.

استحدث مرض ذات الرئة في مجموعتين من الأغنام( الأغنام التي تعاني من نقص النحاس ومجموعه أخرى سميت بالمجموعة المصابة) بواسطة حقن (3) مل من معلق الجرثومة داخل ألرغامي وبتركيز(105 CFU/ml) بينما تركت المجموعة الثالثة كمجموعه سيطرة مع المراقبة اليومية لغرض تسجيل العلامات السريرية الظاهرة.

ظهرت العلامات السريرية لنقص النحاس الثانوي في مجموعه النقص والتي تضمنت الهزال لكل حيوانات المجموعة, فقدان وسهوله أزاله الصوف وتغيير لونه, تفتيح اللون حول العين في واحد من الحيوانات وزيادة في معدلات النبض والتنفس مع قلة مستوى النحاس بشكل تدريجي ليصل (0,58±0.03) جزء من المليون والذي يعتبر تحت المستوى الطبيعي مع قلة معنوية إحصائيا عند(p≤0.05) بعد 10 اسابيع من البدء بالتجريع الفموي بالمقارنة مع السيطرة. كما ان الفحوصات الدموية (RBC, HB, PCV, MCV, MCH & MCHC) لم تسجل فرقا معنويا إحصائيا طيلة فترة التجربة في مجموعه نقص النحاس بالمقارنة مع مجمعة السيطرة عند(p≤0.05). سجلت العدد الكلي في كريات الدم البيضاء تنوعا في مجموعه النقص مع وجود قله تدريجية معنوية إحصائيا في مجموعه النقص مقارنة مع السيطرة ولم تسجل فروقات معنوية احصائيه في نسب الخلايا الحبيبية, اللمفيه ووحيدة النواة عند (p≤0.05). ظهرت علامات الإصابة التجريبية بذات الرئة في مجموعتي النقص والمصابة بوجود ارتشاحات انفيه مصليه ثم تحولت إلى مخاطي قيحي, سعال متقطع والذي ظهر أولا في حيوانات نقص النحاس. كما اظهر الفحص ألسريري وجود حمى خفيفة في كلا المجموعتين مع وجود أصوات تنفسيه غير طبيعيه عند التسمع, كان هنالك أيضا زيادة معنوية إحصائيا في معدلات النبض والتنفس مقارنه مع مجموعه السيطرة مع وجود فروقات معنوية إحصائيا بين مجموعتي النقص والمصابة عند(p≤0.05).

أشار الفحص التشريحي لاثنين من الحيوانات المصابة (واحد من كل مجموعه) وجود زيادة في الأنسجة الدهنية تحت الجلد وحجم اقل للعضلات في مجموعه النقص مقارنه مع الحيوان الآخر. ظهر الفحص العياني لرئة حيوان النقص شحوب واصفرار مع سوائل رغوية وملمس صلب مع تكبد رمادي بينما رئة الحيوان الآخر من المجموعة المصابة أظهرت احتقان شديد. أشارت التغييرات النسيجية المرضية لحيوان النقص إلى وجود تضخم للخلايا الطلائية المبطنة للقصبة مع وجود بروزات حليمية أو شبيهه بالإصبع مع تقشر في داخل حيز القصبة, مع وجود النفاخ مع ترشح للخلايا الالتهابية (البلعمية بصورة رئيسية) مع تكاثر للنسيج الليفي الضام (التكبد). أما التغييرات في الكبد فقد تضمنت احتقان في الوريد المركزي وتجمع للخلايا الالتهابية, توسع في الجيبانيات وتكاثر لخلايا كوبفر مع تنخر للخلايا الكبدية(تحلل لنواة الخلية). أما التغييرات النسيجية المرضية للحيوان الآخر في الرئة شملت ترشح للخلايا الالتهابية في النسيج ألخلالي, نفاخ رئوي وتضخم في الخلايا الطلائية. في الكبد كان هنالك احتقان في الوريد المركزي, ترشح للخلايا الالتهابية, تضخم الطبقة الطلائية في قناة الصفراء وتوسع في الجيبانيات.

سجل العدد الكلي لكريات الدم البيضاء زيادة معنوية إحصائيا بين مجموعة النقص والمجموعة المصابة, كما أظهرت نسبة الخلايا الحبيبية زيادة معنوية إحصائيا وصلت إلى(8,88±0,86) خلال فترة الإصابة بذات الرئة مقارنة مع السيطرة, أما نسبة وحيدة النواة فقد سجلت أيضا زيادة إحصائيا معنوية(كانت القيم أعلى في المجمعة المصابة من مجموعة النقص) وأشارت نسبة الخلايا اللمفية إلى وجود قلة معنوية إحصائيا في حيوانات مجموعة النقص عند(p≤0.05). كانت هنالك قلة معنوية إحصائيا في فحص البلعمة للعدلات في مجموعة النقص مقارنه مع باقي المجموعتين. اظهر فحص التلازن ألدمي المفعل زيادة معنوية إحصائيا في معايير الأجسام المناعية خلال الإصابة في المجموعه الثانيه من مجموعتي نقص النحاس والسيطرة.