جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

التحري عن تلوث عينات حليب الابقار الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في ارياف محافظة كربلاء المقدسة

رسالة مقدمة
إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة ـ جامعة كربلاء وهي جزء
من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل
ندى جاسم محمد الكروي
بكالوريوس تربية علوم حياة / جامعة كربلاء 2000 - 2001
بأشراف
أ.م.د هيام عبد الرضا كريم العواد

1441 هـ 2019 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿نَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مَنْ نَشَاءُ وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ﴾

صَدَقَ اللَّهُ العَلِيُّ العَظِيمُ

سورة يوسف آية (76)

الإهداء

إلهي لايطيب الليل إلا بشكرك... ولايطيب النهار إلا بطاعتك ... ولاتطيب اللحظات إلا بذكرك

ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك ..... ولا تطيب الجنة إلا برؤيتك

الله جل جلاله

إلى من بلَّغ الرسالة .. ونصح الأمة .. إلى نبي الرحمة ونور العالمين..

نبينا الكريم محمد صلى الله عليه واله وسلم

إلى معنى الحب ومعنى الحنان والتفاني ..

إلى من كان حنانهم بلسماً لجراحي ودعاؤهم سر نجاحي إلى أغلى الأحبة

أمي وابي (رحمهم الله)

الى... من هو أغلى علي من نفسي

ومن كان عونا لي في شدتي

زوجي ألغالي

الى من أشد بهم أزري

إخوتي وأخواتي

الى ثمرة فؤادي ونور عيني

اولادي

الى المقاتلين الابطال وارواح الشهداء الابرار

الذين بذلوا دماءهم الطاهرة لننعم بالأمان

الى كل قلب خفق حباً ووفاءً لي ... أهدي ثمرة جهدي وفاءً وعرفاناً بالجميل

ندى

الحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على اشرف الخلق والمرسلين سيدنا محمد وعلى اله الطيبين الطاهرين .

لا يسعني وانا انتهي من اعداد رسالتي هذه الا ان اتقدم بخالص شكري وامتناني الى الأستاذ المساعد الدكتور هيام عبد الرضا العواد لاقتراحها موضوع البحث ولإشرافها المباشر على العمل وكتابة البحث فضلا عن النصائح القيمة و الجهد و الدعم المتواصلين الذين أثمروا بإخراج هذا البحث .

كما أتوجه بخالص الشكر والاحترام إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة و رئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي . وعميق شكري وامتناني الى زميلتي واختي العزيزة دعاء حسين كاظم .

ولا يفوتني إن أتقدم بخالص امتناني إلى مختبر الأحياء المجهرية في مستشفى الإمام الحسين (ع) الطبية ومستشفى الاطفال التعليمي إدارة ومنتسبين لحسن المعاملة والأخلاق.

وأتقدم بجزيل شكري وامتناني إلى الأستاذ عبد الخالق حميد عبد الكريم في مختبر الأحياء المجهرية في مستشفى الإمام الحسين (ع) الطبية لما قدمه لي من مساعدة في إتمام بحثي ، فجزاه الله على ذلك خيراً.

كذلك ابدي اعتزازي لعائلتي على صبرهم ومساعدتهم لي وتحملهم معي عناء هذا الجهد ، والى كل من ذكرني بالدعاء وفاتني ذكرهم و شكرهم متمنية للجميع النجاح والموفقية والله ولي التوفيق.

اقرار المشرف

اشهد ان اعداد هذه الرسالة الموسومة (التحري عن تلوث عينات حليب الابقار الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في ارياف محافظة كربلاء المقدسة) قد جرى تحت اشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان

التوقيع/

الاسم / هيام عبد الرضا كريم

اللقب العلمي/ استاذ مساعد

التاريخ /

توصيات رئيس قسم علوم الحياة

اشارة الى التوصية اعلاه من قبل الاستاذة المشرفة احيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الراي فيها

التوقيع/

الاسم / نصير مرزا حمزة

اللقب العلمي/ استاذ مساعد

التاريخ /

اقرار المقوم اللغوي

اشهد ان هذه الرسالة الموسومة (التحري عن تلوث عينات حليب الابقار الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في ارياف محافظة كربلاء المقدسة) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من اخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك اصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر ما تعلق الامر بسلامة الاسلوب وصحة التعبير .

التوقيع/

الاسم / فائزة ثعبان الموسوي

اللقب العلمي/ مدرس

العنوان / جامعة كربلاء / كلية العلوم الاسلامية

التاريخ /

اقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه نشهد باننا اطلعنا على الرسالة الموسومة (التحري عن تلوث عينات حليب الابقار الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في ارياف محافظة كربلاء المقدسة) المقدمة من الطالبة (ندى جاسم محمد)كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة /علم الحيوان ، وبعد اجراء المناقشة وجدنا انها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير (مستوفي)

رئيس اللجنة

التوقيع/

الاسم / د. زهير محمد علي جدوع

اللقب العلمي/ استاذ

العنوان / جامعة كربلاء / كلية الطب

التاريخ /

عضو اللجنة

التوقيع/

الاسم / د. حيدر علي محمد

اللقب العلمي/ استاذ مساعد

العنوان/جامعة كربلاء / كلية الطب البيطري

التاريخ/

عضو اللجنة

التوقيع

الاسم / د. سهام جاسم محسن

اللقب العلمي/ استاذ مساعد

العنوان / جامعة الكوفة / كلية التربية بنات

التاريخ /

عضوا ومشرفا

التوقيع /

الاسم / د. هيام عبد الرضا كريم

اللقب العلمي /استاذ مساعد

العنوان / جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ/

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع/

الاسم / د. حميدة عيدان سلمان

اللقب العلمي/ استاذ

العنوان / جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ

الخلاصة

جاءت هذه الدراسة لغرض الكشف عن وجود بكتيريا الاشريشيا القولونية في عينات حليب الابقار الخام ودراسة مدى استجابة ومقاومة العزلات المدروسة للمضادات الحياتية والتحري عن تواجد جينات السموم المعوية ST و LT في العينات المعزولة باستعمال تقنية انزيم البلمرة المتسلسل .

جُمعت 125 عينة من حليب الابقار الخام من اربع مناطق ريفية مختلفة في محافظة كربلاء المقدسة ، والتي شملت منطقة الزبيلية ، و الحسينية ، والهندية ، وناحية الحر ، امتدت الدراسة من 15كانون الاول 2018 ولغاية 30اذار 2019 ، وقد تم الحصول على 51 عزلة من بكتريا الاشريشيا القولونية 40.8 % ، وسجل أكبر عدد من العينات الملوثة بالإشريشيا القولونية في منطقة الزبيلية بنسبة 16.8% ، تليها منطقة الحسينية بنسبة 12.8% ، اما منطقة الهندية فكانت نسبة التلوث بالاشريشيا القولونية 6.4 % ، وقد سجل اقل عدد من العينات الملوثة تم الكشف عنها في منطقة الحر بنسبة 4.8 % .

اظهرت الدراسة ان اعلى نسبة تلوث تم عزلها من حليب الابقار الخام كانت في شهر كانون الثاني بنسبة 35.29% ، يليها شهر كانون الاول وبنسبة 25.49 % ، اما شهر شباط فكانت نسبة التلوث ببكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من الحليب 21.56% ، وسجلت اقل نسبة تلوث للحليب الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في شهر اذار 17.64 % ، اذ لاحظنا عدم وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P\geq0.05$.

اختبرت حساسية جميع عزلات الاشريشيا القولونية تجاه 16 نوعاً من المضادات الحياتية وباستخدام جهاز Vitek-2 Compact System ، اظهرت العزلات البكتيرية حساسيتها للمضادات Imepenem وMeropenem و Colistin بنسبة 100% كما اظهرت العزلات البكتيرية حساسيتها للمضاد الحياتي Ciprofloxacin (94.1%) و Piperacillin/Tazobactam (88.2%) و Piperacillin (82.3%) و Trimethoprim/Sulfamethoxazol (80.3%) و Pefloxacin (78.4%) و Gentamicin (76.4 %) و Cefepime (76.4 %) و Minocycline(74.5%) و Amikacin (72.5%) كما اظهرت البكتريا مقاومتها لبعض المضادات الحياتية اذ كانت اعلى نسبة مقاومة هي للمضاد الحياتي Ticarcillin وبنسبة 92.1 % ، يليه المضاد الحياتي

Ticarcillin Clavulanic acid وبنسبة 90.1% ، كما اظهرت العزلات مقاومتها للمضادين الحياتيين Aztreonam و Topramycin وبنسبة 25.4% لكل منهما .

واخيرا تم التحري عن ظهور جينات السموم المعوية *LT,ST* باستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل والكشف عن حجم الجين بواسطة الترحيل الكهربائي و باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية للعزلات البكتيرية البالغ عددها 51 ، اذ كان عدد العزلات الحاملة للجين *ST* بحجم bp 121 هي 7 عزلات وبنسبة 13.7 % وعدد العزلات الحاملة للجين *LT* بحجم bp 360 هي 2 عزلات وبنسبة 3.9 % .

من ذلك نستنتج وجود سلالات ضارية لل *E.coli* (ETEC) في الحليب الخام للأبقار في ارياف محافظة كربلاء المقدسة والتي تشكل خطرا كبيرا على الصحة العامة.

قائمة المحتويات

التسلسل	العنوان	رقم الصفحة
	الخلاصة	أ
	قائمة المحتويات	ج
	قائمة المختصرات	ح
	قائمة الجداول	و
	قائمة الأشكال	ز
الفصل الأول المقدمة وأهداف البحث		
1.1	المقدمة	1
2.1	أهداف البحث	2
الفصل الثاني استعراض المراجع		
1 .2	تعريف وتكوين الحليب	3
2 .2	مصادر التلوث الميكروبي في الحليب	5
3.2	العدوى المنقولة بواسطة الحليب والكائنات الدقيقة المسببة للأمراض	5
4.2	الجودة الميكروبية للحليب الخام	6
5.2	السيطرة على التلوث الميكروبي في الحليب	6
6.2	تأثير المضادات الحيوية على الحيوانات والانسان	7
7. 2	بكتريا الاشريشيا القولونية	8
8.2	تصنيف الاشريشيا القولونية	8
9.2	المحتوى الوراثي لبكتريا الايشريشيا القولونية Genetic Content of *E.coli*	9
10.2	عوامل الفوعة او الضراوة Virulence factors	11
.1.10. 2	أنتاج الذيفان Toxin production	11
.2 .10 .2	عوامل الالتصاق Adhesion factor	11
.3 .10. 2	انتاج الانزيم الحال للبروتين Protease production	12
.4.10. 2	المحفظةCapsule Factor	12
11. 2	إمراضية الايشريشيا القولونية Pathogenesis of *E. coli*	13`
12 . 2	أنواع الايشريشيا القولونية Types of *E. coli*	13
.1.12.2	الاشريشيا القولونية السامة للأمعاء Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)	13
.2. 12. 2	الاشريشيا القولونية النزفيةEnterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)	14
.3. 12.2	الاشريشيا القولونية الغازية للأمعاء Enteroinvasive *E. coli*(EIEC)	14
.4.12.2	الاشريشيا القولونية المرضية المعويةEnteropathogenic *E.coli*	14
.5.12.2	الاشريشيا القولونية ذات الالتصاق المنتشر Diffusely adhering *E. coli*(DAEC)	14
.6.12.2	الاشريشيا القولونية المعوية المتجمعة EnteroaggregativeE. *coli* (EAEC)	15
13.2	المضادات الحياتية Antibiotics	15
14.2	مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية	16

15.2	الذيفانات المعوية للـ *Enterotoxins of E. coli*	18
الفصل الثالث المواد وطرائق العمل		
1.3	الأجهزة والمواد المستعملة	20
.1.1.3	الأجهزة المستعملة	20
.2.1.3	الأوساط الغذائية المستعملة والغرض من استعمالها	22
.3.1.3	المواد الكيميائية المستعملة	22
.4.1.3	عدد الفحص المختبرية المستعملة في الدراسة	23
.5.1.3	البوادئ primers	24
2.3	طرائق العمل Methods	25
.1.2.3	جمع العينات	25
.2.2.3	زرع العينات Sample culturing	25
.3.2.3	الأوساط الزرعية الجاهزة	25
.4.2.3	الكواشف المستعملة	26
.1.4.2.3	كاشف الكاتليزCatalase reagent	26
.2.4.2.3	كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent	26
3.3	عزل العينات وتنقيتها Isolation and purification	26
4.3	تشخيص العزلات البكتيرية	26
.1.4.3	التشخيص المظهريMorphological characteristics	26
.2.4.3	الفحص ألمجهري Microscopic examination	26
.3.4.3	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	30
.1.3.4.3	اختبار إنزيم الكاتاليز Catalase test	30
.2.3.4.3	اختبار إنزيم الاوكسيديز Oxidase test	30
5.3	التشخيص بجهاز VITEK 2 Compact	30
6.3	حفظ العزلات لمدة طويلة في الجليسيرول (Glycerol)	34
7.3	استخلاص الدنا DNA extraction	34
8.3	تقدير مستخلص الحامض النووي Estimation of DNA extracts	35
9.3	تحضير مزيج سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل	36
10.3	الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis	37
11.3	التحليل الإحصائي Statistical Analysis	38
الفصل الرابع النتائج والمناقشة		
1.4	الفحوصات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا الاشريشيا القولونية Morphological and biochemical tests	39
2.4	العزل والتشخيص Isolation and identification	41
3.4	الفحوصات الكيموحيوية باستعمال جهاز VITEK - 2 Compact	44
4.4	حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية Susceptibility of bacterial isolates to antibiotics	45

5.4	التحري عن جينات *LT* و *ST* التابعة لسلالة ETEC	50
الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات		
1.5	الاستنتاجات	53
2.5	التوصيات	54
	المصادر	55

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
3 – 1	الاجهزة المختبرية	20
3 – 2	الادوات المختبرية	21
3 – 3	الاوساط الغذائية	22
3 – 4	المواد الكيمائية والبيولوجية المستعملة	22
3 – 5	العدد المختبرية المستعملة في الدراسة	23
3 – 6	تتابعات البوادئ النوعية لجين *LT* لبكتريا ETEC وحجم الناتج لكل بادئ	24
3 – 7	تتابعات البوادئ النوعية لجين *ST* لبكتريا ETEC وحجم الناتج لكل بادئ	24
3 – 8	المضادات الحياتية المستعملة	32
3 – 9	مكونات مزيج انزيم البلمرة المتسلسل	36
3 –10	خطوات تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل	37
4 – 1	الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتيريا الاشريشيا القولونية	41
4 – 2	عدد العزلات والنسبة المئوية لبكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من الحليب الخام للأبقار حسب اشهر الدراسة	43
4 – 3	النسبة المئوية لبكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من الحليب الخام حسب المناطق	43
4 – 4	نتائج الاختبارات ألكيموحيوية لتشخيص عزلات *E.coli* في جهاز ViTEK-2	44
4 – 5	نتائج اختبار حساسية بكتريا الاشريشيا القولونية للمضادات الحياتية المستعملة في الدراسة	46
4 – 6	التركيز المثبط الادنى MIC	47

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
bp	Base pair
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic acid
E. coli	*Escherichia coli*
EAEC	Enteroaggregative *E. coli*
EHEC	Enterohaemorrhagic *E. coli*
EIEC	Enteroinvasive *E. coli*
EMP	Eosin Methylin Blue
EPEC	Enteropathogenic *E. coli*
ETEC	Entrotoxigenic *E. coli*
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Heat labile toxin
MR-VP	Methyl red Vogaus Proskaure
OMPs	Outer memberane proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
ST	Heat stable toxin
TBE	Tris- Boric acid- EDTA
U.V	Ultra Violet
UPEC	Uropathogenic *E. coli*
UTI	Urinary Tract Infection
WHO	World Health Organization
nm	Nanometer
Chi – square - test	X^2

الخلاصة

جاءت هذه الدراسة لغرض الكشف عن وجود بكتيريا الاشريشيا القولونية في عينات حليب الابقار الخام ودراسة مدى استجابة ومقاومة العزلات المدروسة للمضادات الحياتية والتحري عن تواجد جينات السموم المعوية *ST* و *LT* في العينات المعزولة باستعمال تقنية انزيم البلمرة المتسلسل .

جُمعت 125 عينة من حليب الابقار الخام من اربع مناطق ريفية مختلفة في محافظة كربلاء المقدسة ، والتي شملت منطقة الزبيلية ، و الحسينية ، والهندية ، وناحية الحر ، امتدت الدراسة من 15كانون الاول 2018 ولغاية 30اذار 2019 ، وقد تم الحصول على 51 عزلة من بكتريا الاشريشيا القولونية 40.8 % ، وسجل أكبر عدد من العينات الملوثة بالإشريشيا القولونية في منطقة الزبيلية بنسبة 16.8% ، تليها منطقة الحسينية بنسبة 12.8% ، اما منطقة الهندية فكانت نسبة التلوث بالاشريشيا القولونية 6.4 % ، وقد سجل اقل عدد من العينات الملوثة تم الكشف عنها في منطقة الحر بنسبة 4.8 % .

اظهرت الدراسة ان اعلى نسبة تلوث تم عزلها من حليب الابقار الخام كانت في شهر كانون الثاني بنسبة 35.29% ، يليها شهر كانون الاول وبنسبة 25.49 % ، اما شهر شباط فكانت نسبة التلوث ببكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من الحليب 21.56% ، وسجلت اقل نسبة تلوث للحليب الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في شهر اذار 17.64 % ، اذ لاحظنا عدم وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \geq 0.05$.

اختبرت حساسية جميع عزلات الاشريشيا القولونية تجاه 16 نوعاً من المضادات الحياتية وباستخدام جهاز Vitek-2 Compact System ، اظهرت العزلات البكتيرية حساسيتها للمضادات Imepenem وMeropenem و Colistin بنسبة 100% كما اظهرت العزلات البكتيرية حساسيتها للمضاد الحياتي Ciprofloxacin (94.1%) و Piperacillin/Tazobactam (88.2%) و Piperacillin (82.3%) و Trimethoprim/Sulfamethoxazol (80.3%) و Pefloxacin (78.4%) و Gentamicin (76.4 %) و Cefepime (76.4 %) و Minocycline(74.5%) و Amikacin (72.5%) كما اظهرت البكتريا مقاومتها لبعض المضادات الحياتية اذ كانت اعلى نسبة مقاومة هي للمضاد الحياتي Ticarcillin وبنسبة 92.1 % ، يليه المضاد الحياتي

Ticarcillin Clavulanic acid وبنسبة 90.1% ، كما اظهرت العزلات مقاومتها للمضادين الحياتيين Aztreonam و Topramycin وبنسبة 25.4% لكل منهما .

واخيرا تم التحري عن ظهور جينات السموم المعوية *LT,ST* باستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل والكشف عن حجم الجين بواسطة الترحيل الكهربائي و باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية للعزلات البكتيرية البالغ عددها 51 ، اذ كان عدد العزلات الحاملة للجين *ST* بحجم bp 121 هي 7 عزلات وبنسبة 13.7 % وعدد العزلات الحاملة للجين *LT* بحجم bp 360 هي 2 عزلات وبنسبة 3.9 % .

من ذلك نستنتج وجود سلالات ضارية لل *E.coli* (ETEC) في الحليب الخام للأبقار في ارياف محافظة كربلاء المقدسة والتي تشكل خطرا كبيرا على الصحة العامة.

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

الفصل الأول

المقدمة

1.1 المقدمة Introduction

يعد الحليب عنصراً مهماً من العناصر الغذائية للإنسان والحيوان وهو ايضا من افضل الاوساط الغذائية الملائمة لنمو اغلب الاحياء المجهرية وتكاثرها لاحتوائه على معظم العناصر الغذائية من بروتينات وسكريات وفيتامينات واملاح معدنية ، وان القيمة الغذائية للحليب تمكنه من دعم حياة الجراثيم التي تنتهز الظروف الملائمة لتتكاثر وتسبب تغير في تركيبه الكيميائي (Christidis *et al.*,2016).

يتكون الحليب من 87 % من الماء والجزء المتبقي يشمل الكربوهيدرات والدهون والفيتامينات والبروتينات والاملاح والمعادن النادرة وبكميات متوازنة فضلاً عن احتوائه على كثير من المركبات ذات الفعالية البيولوجية واخرى ذات الفعالية الوظيفية ، كما تشمل مكونات الحليب الاخرى الجلوبيولين المناعي الذي يقوم بحماية المولود من عدد كبير من الامراض (Pandy and Voskuil, 2011).

يجب ان يكون الحليب المستعمل للاستهلاك البشري خاليا من اي كائنات حية مسببة للأمراض (Bertu *et al* ,.2011) لان التلوث الميكروبي في الحليب يسبب العديد من الامراض للإنسان كما يسبب تلف الحليب ايضا ، اذ يمكن للكائنات الدقيقة الوصول الى الحليب ومنتجات الالبان الاخرى ، ومن بين هذه الكائنات هي الاشريشيا القولونية والتي تستعمل في كثير من الاحيان كمؤشر موثوق للتلوث بالبراز(Rehman *et al.*, 2014) .

ان تلوث حليب الماشية يعزى الى عدة اسباب اهمها :- قلة النظافة ، تلوث ادوات الحلب واواني جمع الحليب ، وجود الماشية في حظائر ملوثة وغير نظيفة ، بالإضافة الى ارتفاع مستوى الرطوبة داخل بيوت تربية المواشي ، فضلا عن عدم نظافة ايدي العاملين واصابتهم بالعديد من الامراض الانتقالية ، والتي من اهمها امراض الجهاز الهضمي والتنفسي والتي تنتقل مسبباتها الإمراضية الى حليب المواشي (Solomon *et al.*, 2013) .

تعود بكتريا الاشريشيا القولونية الى عائلة Enterobacteriaceae وهي عصيات مستقيمة سالبة لصبغة كرام ، لا تكون ابواغ ، متحركة بأسواط متعددة وتشكل جزءا من الفلورا المعوية للحيوانات ذوات الدم الحار ، والبشر ، وتستعمر القولون منذ الساعات الاولى من الولادة (Abubakari *et al.*,2015) ، معظم الاشريشيا القولونية غير ممرضة ، ومع ذلك فان بعض السلالات منها لها عوامل الضراوة المكتسبة ، وترتبط مع الامراض المعوية ، او خارج الجهاز الهضمي ، ان من اهم عوامل الضراوة التي تمتلكها والتي تعمل على تعزيز القدرة الدفاعية للبكتيريا ضد المضادات الحياتية هي عوامل الالتصاق وانتاج الذيفان و انتاج انزيم البروتييز والمحفظة (Baliere,2016) ، كما ان جميع سلالات الاشريشيا القولونية المسببة للأمراض قادرة على التضاعف ، وتدخل في الجهاز الهضمي عن طريق تجاوز الدفاعات المناعية للمضيف وتحفز تحطيم الخلايا . (Thomas *et al.*,2017).

تعد بكتريا Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) من اهم البكتريا المسؤولة عن الاسهال ، والتي تنتقل الى الاشخاص عن طريق الماء او الغذاء الملوث ، كالحليب ، ومنتجات الالبان الاخرى ، وتلتصق في جدار الخلايا المخاطية المبطنة للأمعاء (Bagheri *et al.*,2014) ، وقد تحمل معلومات جينية لإنتاج الذيفان المعوية المستقرة بالحرارة Heat - stable toxin (STs) ، والذيفان المعوية المتغيرة بالحرارة Heat - labile toxin (LTs) ، ان هذه الذيفان تشفر من قبل جينات *LT* , *ST* على التوالي (Wani *et al*,.2006) وتعد من عوامل الضراوة الرئيسية اذ تعمل على تقليل قابلية الامعاء على امتصاص الصوديوم ، وتسبب الافراز الشديد للماء وايونات الكلوريد ، وتتسبب في حدوث الاسهال الذي قد يؤدي الى الوفاة (Kolenda *et al.*,2015). ولقلة الدراسات المحلية عن جينات الذيفان المعوية *ST* و *LT* وتواجدها في بكتريا الاشريشيا القولونية الملوثة للحليب والتي تتسبب في حدوث حالات الاسهال الخطيرة جاءت هذه الدراسة والتي تهدف الى التحري عن بكتريا الاشريشيا القولونية الحاملة لجينات الذيفان المعوية *ST* و *LT* والملوثة لعينات الحليب في محافظة كربلاء المقدسة عن طريق المحاور الاتية :-

1 - الكشف عن تواجد بكتريا الاشريشيا القولونية في عينات حليب الابقار الخام.

2 معرفة مقاومة العزلات المدروسة للمضادات الحياتية المستعملة.

3 - التحري عن تواجد جيني الذيفان المعوية *ST* و *LT* لبكتريا (ETEC) بتقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

الفصل الثاني

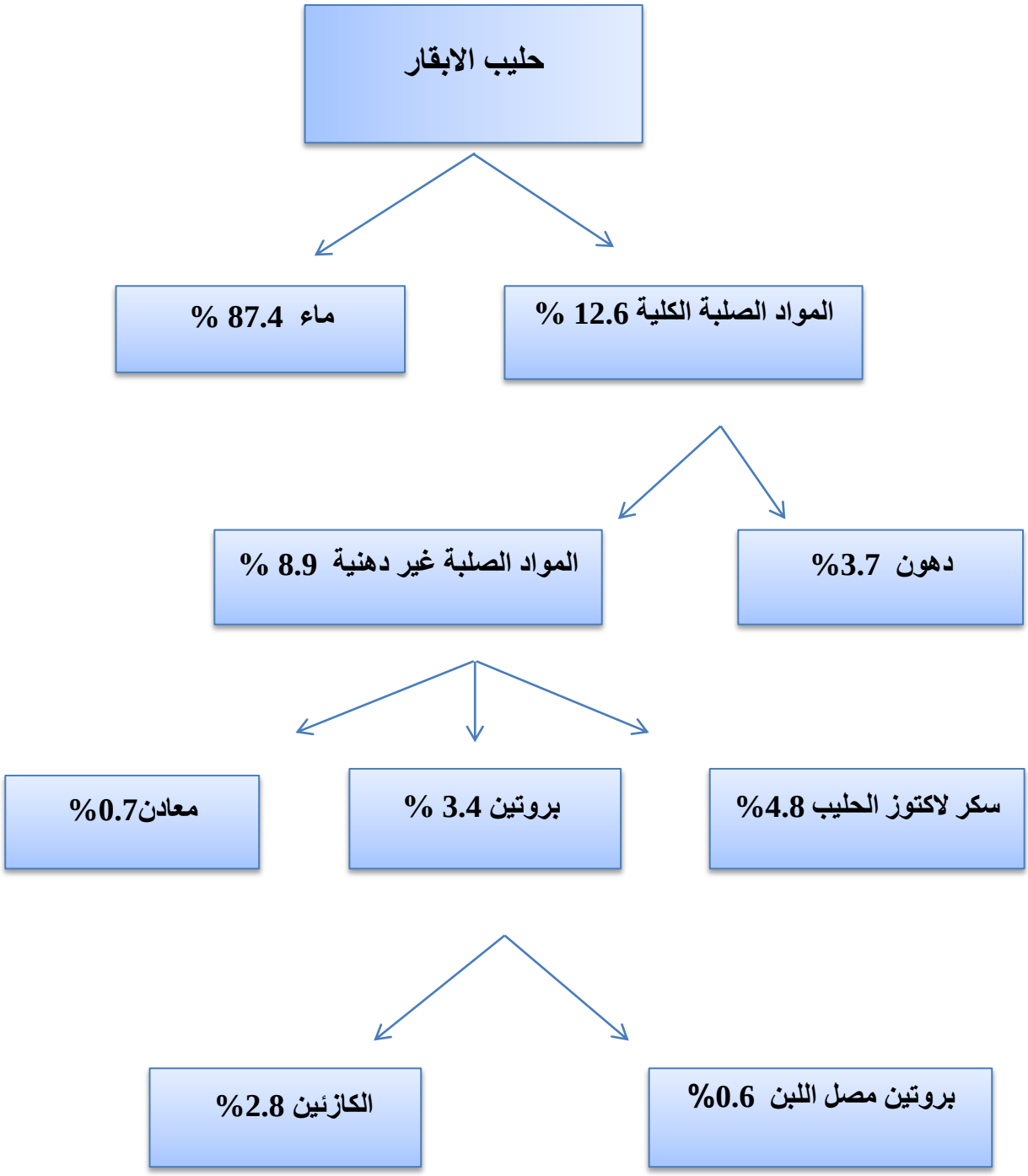
استعراض المراجع

2 . استعراض المراجع Literature Review

2 . 1 تعريف وتكوين الحليب

الحليب هو سائل ابيض مصفر غير شفاف تفرزه الغدد الثدية لجميع الثدييات ، وهو المصدر الرئيس للتغذية والغذاء الوحيد لنسل الثدييات قبل ان يتمكنوا من تناول وهضم انواع اخرى من الطعام ، يحتوي الحليب على شكل متوازن من جميع العناصر الضرورية لبناء جسم الانسان والحيوان والحفاظ عليه (Laba and Udosek, 2013) .

ان التركيب الرئيس للحليب هو الماء والذي يشكل نسبة (78 – 88) % اما الجزء المتبقي فهو عبارة عن مواد صلبة تشمل الكربوهيدرات والدهون والبروتينات والمعادن شكل (2 – 1) وتختلف نسب مكونات الحليب باختلاف الانواع والموسم والاعلاف ومرحلة الرضاعة والصحة والوضع الفسيولوجي للحيوان (Pandey and Voskuil, 2011) وفي بعض الاحيان قد يتغير تركيب الحليب من يوم الى اخر اعتماداً على التغذية والمناخ بالإضافة لذلك يعد الحليب مصدراً ممتازاً للبروتينات والفيتامينات والمعادن عالية الجودة مثل الكالسيوم والفسفور ، لذلك أصبح الحليب ومنتجات الالبان الأخرى جزءا رئيسيا من النظام الغذائي البشري في العديد من البلدان مما دفع الدول لتحسين المنتج ونوعية وكمية الحليب والحد من مستوى التلوث. (Harding, 1999). ان المعالجة الحرارية للحليب قبل الاستهلاك يعد خطوة مهمة لقتل الكائن المسبب للأمراض ، كما انه يضمن القضاء على الكائنات المسببة للتلف ، او يخفض على الاقل من عدد تلك الجراثيم من اجل الحفاظ على الجودة المثلى (IDF, 1994). ويعد الحليب وسط مثالي لنمو العديد من الكائنات الحية لذلك يجب القضاء على مصدر التلوث واتباع النظافة من اجل تحسين جودة الحليب ومنتجاته وزيادة العمر الافتراضي له (Gruetzmacher and Bradley, 1999).



شكل (2 - 1) المكونات الكيميائية الرئيسة في حليب الابقار الخام

(Chandan 1997)

2 . 2 مصادر التلوث الميكروبي في الحليب

الحليب سائل مُعقم خالي من الجراثيم عندما يكون في ضرع الحيوان ولكنه يصبح ملوثا بالبكتريا بشكل رئيسي اثناء وبعد الحلب (Makerere University, 2011).

اشار(1997) Adesiyun *et al.*, الى انه قد تكون المياه المستخدمة في المزارع المصدر الرئيسي لتلوث الحليب ، وقد يؤدي تعرض الحليب لهذه المصادر الى زيادة التلوث الميكروبي والتأثير على جودته ،على الرغم من ان اعادة التلوث قد تحدث احيانا بعد المعالجة ويرجع ذلك اساسا الى الظروف غير الصحية او سوء التعامل مع الحليب اثناء الاستهلاك (Parekh and Subhash, 2008).

ان مستوى جودة الحليب يقل عندما يتعرض لعدد من العوامل الملوثة كإضافة الماء ، والتلوث اثناء وبعد الحلب ، ووجود التهاب الضرع (التهاب الغدد الثدية) (Mdegela *et al.*, 2009).

2 . 3 العدوى المنقولة بوساطة الحليب والكائنات الدقيقة المسببة للأمراض

يمكن لمختلف البكتريا الانتقال الى الحليب ومنتجات الالبان بطرق عديدة وتسبب انواعاً مختلفة من الامراض المنقولة بالحليب وفي بعض الاحيان قد يحمل الحليب ومنتجات الالبان كائنات دقيقة مسببة لأمراض عديدة كما تتسبب في تلف الحليب ايضا مما يجعله غير امن للاستهلاك البشري (Bukuku, 2013) .وتنتقل امراض عديدة للإنسان بواسطة استهلاك الحليب الملوث ، وذلك عبر استهلاك الحليب الملوث (Parekh and Subhash, 2008) ومن الامراض التي تنتقل عن طريق الحليب هي السل البقري ، وداء البروسيلات ، والجمرة الخبيثة ، والسالمونيلا (Sivapalasingams *et al.*, 2004) ومن البكتريا الشائعة التي يتم عزلها من الحليب : *E.coli spp , Staphylococcus spp,Listeria spp, Salmonella spp, Pseudomonas aurogenosa, Compylobacter spp , Mycobacterium spp , ,Proteus spp , Clostridiumspp, Klebsiella spp, Yersinia spp, Streptococcus spp , Leptospira spp,* (Shirima *et al.*, 2003) وان كل هذه

البكتريا مسببة للأمراض ، وتشكل تهديدا خطيرا لصحة الانسان ، وتساهم بنسبة تصل تقريبا الى 90% من جميع الامراض المرتبطة بالألبان ومشتقاته (Donkor *et al.*,2007) ، ولذلك تعد اجراءات الحلب والتنظيف والتعقيم المناسبة للمعدات والبيئات اداة اساسية لضمان جودة الحليب . (Pandey and Voskuil,2011)

4 .2 الجودة الميكروبية للحليب الخام

يحتوي الحليب الخام على عدد قليل جدا من البكتريا عندما يتم حلبه من الضرع السليم (Omore *et al.*, 2005). ويتراوح عدد البكتريا في الحليب الخام 50-1000 خلية / مل ، كما ان حدوث التلوث في الحليب ومشتقاته يزيد من عدد البكتريا الكلية حتى 50000 خلية / مل او قد تصل الى عدة ملايين في المليلتر الواحد (Pandey and Voskuil,2011) .

ان وجود بكتريا القولون لاسيما الاشريشيا القولونية في الحليب الخام هو مؤشر على التلوث الذي ينطوي على ظروف صحية سيئة لان هذه البكتريا هي من اصل برازي ، يحتوي الحليب على نظام مثبط طبيعي او خصائص مبيدة للجراثيم تمنع حدوث زيادة كبيرة في عدد البكتريا خلال اول ساعتين الى ثلاث ساعات (Swai and Schoonman,2011) اذا تم تبريد الحليب الى اربع درجات مئوية في هذه الفترة بعد الحلب ، فانه يحتفظ تقريبا بجودته الاصلية ويبقى امنا للمعالجة والاستهلاك ، كما ان درجة حرارة التخزين والوقت الذي يستغرقه الحلب مهمان ايضا في تحديد جودة الحليب ، ولمنع تكاثر البكتريا بنحو كبير يجب تبريده او تسخينه في اسرع وقت (Pandey and Voskuil, 2011).

2 . 5 السيطرة على التلوث الميكروبي في الحليب

اشار Janetschke (1992) ان عملية حفظ الحليب يتم بعدة طرق والتي اهمها التجفيف و التبريد و التجميد و التسخين مثل بسترة الحليب الخام قبل الاستهلاك ، وقد عرفت عملية البسترة (Pasteurization) على انها عملية معالجة حرارية يتم تطبيقها على المنتج بهدف تجنب الخطر المؤثر على الصحة العامة بسبب الكائنات المجهرية الممرضة المتأثرة ببسترة الحليب ، بوصفها عملية معالجة حرارية تهدف الى تقليل التغيرات الفيزيائية والكيميائية للمنتج (IDF,1994) ، وان من العوامل الرئيسة التي تؤثر في الحفاظ على جودة الحليب المبستر هي شدة المعالجة الحرارية و درجة حرارة التخزين وحدوث التلوث بعد عملية البسترة (IDF, 1986). وقد لقي

عامل حدوث التلوث بعد عملية البسترة الاهتمام لأنه يحد او يقلل من العمر الافتراضي للمنتج في معظم الحالات (IDF, 1993) .

يمكن السيطرة على الكائنات المسببة للأمراض من الحيوانات المرضعة و منع التلوث البكتيري عن طريق الالتزام بالممارسات الصحية العامة ونظافة البيئة ، بنحو عام يمكن تقليل التلوث البكتيري عبر فحص الحليب قبل نقله الى الاسواق ، لذا يمكننا القول ان قلة وعي الاشخاص بالاخماج التي تنتقل عن طريق الحليب في العديد من البلدان النامية واستهلاك الحليب الخام يعرض مربي الماشية والمستهلكين لخطر الاصابة بهذه الكائنات المجهرية الممرضة (Mosalagae *et al.*, 2011).

2 . 6 تأثير المضادات الحياتية في الحيوانات والانسان

المضادات الحياتية مواد عضوية كيمياوية تنتجها احياء مجهرية مختلفة تستعمل للعلاج. ان بعض مربي الاغنام والابقار والابل اصبحوا يخلطون الاعلاف بمضادات حياتية وذلك وقاية لإنتاجهم من النفوق وزيادة في التسمين (Sharma *et al.*, 2011) بالإضافة لذلك فان سوء الاستعمال والتطبيقات غير الصحيحة للمضادات الميكروبية والمضادات الحياتية تتراكم بقاياها بشكل ملحوظ في انسجة الحيوانات . كما تؤدي الاستعمالات العشوائية للمضادات الحياتية الى زيادة احتمالية انتقال البكتريا المقاومة للمضادات الحياتية من الحيوانات الى البشر مؤدية الى العديد من الامراض الخمجية المزمنة لمستعملي الحليب ومنتجي الالبان (Pesavento *et al.*, 2007).

اشار Katakweba *et al.* (2012) الى ان الكثير من الادوية مثل oxytetracycline تستعمل لعلاج وحماية الماشية ضد الامراض المختلفة ، وعندما يتم استعمال هذه الادوية من قبل اشخاص غير محترفين قد يؤدي الى مخلفات مضادة للميكروبات ،كما يمكن العثور على البقايا المضادة للميكروبات مثل المضادات الحيوية ومضادات البكتريا الاخرى في الحليب بعد اعطاءها للحيوانات ، وغالبا ما تكون هذه المخلفات في الحليب ناتجة عن فشل المزارعين في الالتزام بفترات سحب الحليب المحددة بعد استعمال المضادات الحيوية للأبقار المرضعة ، ومستويات الجرعة غير الصحيحة ، وطريقة الإعطاء (Kurwijila *et al.*, 2006) وبما ان الغليان او البسترة لا تدمر بقايا المضادات الحياتية ، فان هذا الخطر الكيميائي قد يشكل خطرا صحيا اكثر خطورة على المدى الطويل على المستهلكين (Syit,2008) ان العوامل المضادّة للميكروبات الشائعة الاستعمال خاصة المضادات الحياتية في مستوى المزرعة هي مجموعات أو

فئات مختلفة والتي تشمل penicillins, tetracyclines , aminoglycosides , macrolides sulphonamides (Bukuku,2013) كما إن وجود مخلفات الأدوية المضادة للميكروبات في الحليب فوق الحدود القصوى المسموح بها وأخذها من قبل الانسان يمكن أن يؤدي إلى تأثيرات صحية غير مرغوب فيها ، مثل حدوث سلالات من البكتيريا المقاومة ، التي لا تستجيب بنحو جيد للعلاجات المستعملة للمضادات الحياتية الشائعة لأمراض الإنسان ، وقد تسبب تلف الأنسجة ، و آثار مسرطنة. فالمعالجة الحرارية للحليب مثل الغلي والبسترة تدمر أو تقضي على الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض ولكن تأثيراتها محدودة أو متغيرة على مخلفات الأدوية (Shitandi, 2004; Kurwijila *et al.*, 2006).

2 . 7 بكتريا الاشريشيا القولونية

عُزلت بكتريا الاشريشيا القولونية لأول مرة من براز طفل سليم سنة 1885 من قبل الطبيب الالماني (Theodor Escherich) واطلق عليها اسم (Bacterium coli commune) نسبة لوجودها في القولون والتصنيف الاولي ل (Ernst Haeckel) سنة 1867 اذ وضع جميع البكتريا ومن ضمنها الاشريشيا القولونية في مملكة المونيرا اعتمادا على الشكل والحركة (Escherich,1885).

تعود بكتريا الاشريشيا القولونية الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae ، وتعد من الاحياء المجهرية التي تستوطن القناة المعوية للإنسان والحيوان ، وتوصف الاشريشيا القولونية بانها جراثيم عصوية سالبة لصبغة غرام متحركة ولا تكون ابواغ ، لها القدرة على تكوين المحفظة (Brook *et al.*, 1998) البعض منها تكون متعايشة غير ضارة للقناة الهضمية والبعض الاخر يكون انتهازيا وممرضا وله عدة سلالات تسبب الامراض داخل وخارج القناة الهضمية (Kaper *et al.*, 2004).

تبدو مستعمرات الاشريشيا القولونية صغيرة ومحدبة قليلا في الاوساط الزرعية و شاحبة على الوسط المغذي العام اما على وسط ماكونكي الصلب فتكون مستعمرات وردية اللون وذلك بسبب قدرة هذه البكتريا على تخمير سكر اللاكتوز (Topley and Willson, 1964) .

2 . 8 تصنيف بكتريا الاشريشيا القولونية

تندرج بكتريا الاشريشيا القولونية مع اربعة انواع اخرى هي :- *E.vulneris* *E.albertii* ,*E.fergusonii* , *E.hermanii* ضمن جنس الاشريشيا ، وينتمي هذا الجنس

للعائلة المعوية والتي تعود الى رتبة Enterobactriales ضمن شعبة Proteobacteria التابعة لمملكة Eubacteria (Garrity *et al.*, 2005) ، وتصنف بكتريا *Escherichia coli* حسب ما اورده (Tchaptchet & Hansen, 2011) وهي مايلي :-

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Camma

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus*: Escherichia*

Species: *coli*

2 . 9 المحتوى الوراثي لبكتريا الاشريشيا القولونية

تتميز بكتريا الاشريشيا القولونية باحتوائها على كروموسوم منفرد مرصوف الى تركيب مدمج يسمى بالنيوكلويد (Nucleoid) وقد تحتوي على بلازميد حلقي ، وعلى جينوم يبلغ حجمه 4600 كيلو زوج قاعدي ويكون ذو تسلسل معلوم بشكل كامل وتحتوي تقريبا 4300 سلسلة تشفير كاملة وحوالي 1800 بروتين معروف فيها ، كما ان 70% من الكروموسوم يتكون من جينات مفردة التشفير Monocistronic و 6 % يتكون من جينات متعددة التشفير Polycistronic وتمتلك 70% من اطارات التشفير المفتوح السلسلة غير المعروف الوظائف ويبلغ طول الكروموسوم في بكتريا الاشريشيا القولونية 1.5µµ ويحتوي على 4000 مورث تقريباً (Reed, 2005).

يقدر المحتوى الوراثي من القواعد النيتروجينية G – C في الجينات المركزية (Core genes) لبكتريا الاشريشيا القولونية من سلالة K- 12 حوالي 50 – 52 %، كما تحتوي على 1100 جين تقع اغلبها ضمن قطع DNA كبيرة ذات احجام مختلفة تتراوح من (4 – 100) كيلو زوج قاعدي (Hacker *et al.*,1997) وهذه الجينات غالبا ما تنتظم سوية في تجمعات

كبيرة تدعى بالجزر الإمراضيه Pathogenicity associated islands (Brooks *et al* .,2007).

تتميز بكتريا الاشريشيا القولونية باحتوائها على بلازميدات Plasmids وهي عبارة عن عناصر وراثية توجد بشكل مستقر خارج الكروموسوم ، ولها القدرة على التضاعف الذاتي والتوارث بثبات بشكل قطع منفصلة عن الكروموسوم ، وتوجد البلازميدات في كائنات بدائية وحقيقية النواة مثل البكتريا والخمائر والفطريات (Boundless,2014). حيث تم التعرف على البلازميدات لأول مرة في البكتريا المعوية قبل اكتشافها في البكتريا الاخرى وتعد البلازميدات من العناصر الوراثية التي يتم استخدامها بكثرة في الهندسة الوراثية (Selimovic *et al*.,2007). تختلف البلازميدات عن الكروموسومات في البكتريا من خلال قدرة بعضها على الانتقال بين الانواع البكتيرية وهذا ما يفسر انتشار بعض الصفات المشفرة بلازميدياً كصفة المقاومة للمضادات الحياتية وغيرها (Schito,2006). على الرغم من ذلك ان بعض جينات المقاومة للمضادات الحياتية تكون محمولة على الكروموسوم البكتيري ،وتكون صغيرة نسبياً وتكون صغيرة نسبيا مقارنة بكروموسوم الخلية(Blake *et al*.,2011). تصنف البلازميدات تبعا لقابليتها على الانتقال الى الخلايا البكتيرية الاخرى الى :البلازميدات الانتقالية Transmissible وهي تحتوي على مجموعه من المورثات الناقلة Transfer geneمثل tra و mob التي تحفز عملية الاقتران (Conjugation) (Nicholl,2008) والبلازميدات غير الانتقالية Non-transmissible فهي لا تحتوي على مورثات الانتقال مثل tra ولذلك فالبكتريا الحاوية على هذه البلازميدات تكون غير قادرة على بدء عملية الاقتران ، وكما تصنف البلازميدات حسب الوظيفة الى خمسة اصناف :-

- بلازميدات الخصوبة Fertility (F) Plasmids هي البلازميدات الحاوية على المورثات tra وتكون لها القابلية على الانتقال وتعبير عن الاهلاب الجنسية Sex Pilli.
- بلازميدات المقاومة Resistance (R) Plasmids هذه البلازميدات تحتوي على مورثات تشفر لمقاومة المضادات الحيوية .
- بلازميدات الضراوة Virulence plasmids تقوم بتحويل البكتريا غير الممرضة الى بكتريا ممرضة ، وتوجد ضمن العائلة المعوية وتترافق مع جينات المقاومة وتشفر لعوامل ضراوة متعددة مثل عوامل الالتصاق او سموم كما في بكتريا الاشريشيا القولونية (Brown,2010).

- بلازميدات الهاضمة Degradative plasmids تقوم بهضم المواد غير الاعتيادية مثل Toluene,Salicylic acid.
- بلازميدات الكولسين Collcin plasmids التي تتضمن جينات تشفر لإنتاج بروتين البكتريوسين الذي يعمل على قتل الخلايا البكتيرية الاخرى (Gerdes et al.,1986).

10. 2 عوامل الفوعة او الضراوة Virulence factors

تمتلك بكتريا الاشريشيا القولونية العديد من عوامل الفوعة والتي لها أثر مهم في الإمراضية ومن اهم عوامل الفوعة او الضراوة هي :-

1.10. 2 أنتاج الذيفان Toxin production

تمتلك بكتريا القولون ذيفاناً داخلية Endotoxin ، والتي تتكون من العديد من السكريدات الشحمية(LPS) Lipopolysaccharides ، وهذه الذيفان تعد احد مكونات جدار الخلية البكتيرية (Mandell *et al.*, 1995) . كما تستطيع ان تفرز ذيفاناً معوية خارجية Exotoxin والتي تكون على نوعين هما الحساس للحرارة Heat labile (LT) ، والثابت للحرارة (Heat stable (ST ، وتمتلك ذيفاناً خارجية اخرى مثل الهيمولايسين Haemolysin ، وعامل التنخر السمي Cytotoxic necrotizing ، وهناك بعض سلالات بكتريا *E. coli* لها القابلية على انتاج ذيفاناً شبيهة بالذيفان التي تنتجها بكتريا *Shigellae dysenteria* ، والتي تتمثل بذيفان Shiga Toxin (Jandu *et al.*, 2009).

2. 10. 2. عوامل الالتصاق Adhesion factor

ان عامل الالتصاق يعد خطوة مهمة من خطوات الاصابة بالإمراضية ويتم ذلك بالتصاق البكتريا بخلايا المضيف (Spano *et al;* 2008) ولقد اشار Kumar *et al.*, (2001) ان بروتينات الغشاء الخارجي لها أثر مهم في حدوث الالتصاق بخلايا المضيف ، كما ان وجود تراكيب خيطية Filamentous structure وسكريدات شحمية Lipopolysaccharide وبروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane proteins (OMPs) تعمل على مساعدة البكتريا على الالتصاق (Rocha-De-Souza *et al.*, 2001) يوجد عاملان اساسيان ولهما أثر مهم في عملية التصاق البكتريا وهما:

A-**المستقبلات Receptor :** وهي عبارة عن سلاسل ببتيدية او كربوهيدرات متخصصة على سطوح الخلايا الحقيقية النواة .

B-**الرابط Ligand :** وهي عبارة عن تراكيب كبيرة تمتد من سطوح الخلايا البكتيرية والتي لها القدرة على ان تتفاعل مع مستقبلات موجودة في خلايا سطح المضيف وتحدث تفاعلا" مشابها" لتفاعلات الضد – المستضد (Prescott *et al.*, 2005).

2 .10. 3. انتاج الانزيم الحال للبروتين Protease production

يعمل هذا الأنزيم على تحلل البروتين و يفرز خارج الخلية ويعد من أهم عوامل الفوعة التي تمتلكها البكتيريا والتي تحفز على الإصابة وتصنف الانزيمات الحالة للبروتينات إلى ثلاثة مجاميع اعتمادا على الأس الهيدروجيني الامثل لفعاليتها وهي القاعدية والحامضية والمتعادلة (Rao *et al.*,1998) كما وتقسم على أساس المجاميع المحضر لها (Catalytic groups) الموجودة في الموقع الفعّال (Active site) وتضم أربع مجاميع هي البروتييزات السيرينية (Serine protease) والبروتييزات الفلزية (Metallo protease) وبروتييزات الاسبارتك (Aspartic protease) بالإضافة الى (Threonin) و بروتييزات السستين (Cystenis protease) وتوجد في كل الكائنات الحية (Jewell; 2000) وتقسم هذه الانزيمات على اساس الكائنات المنتجة لها اذ تنتج هذه الانزيمات من قبل الفطريات والبكتريا والبدائيات (Atlas *et al.*, 1995) .

2 .4.10.المحفظة Capsule Factor

هي مادة خارج خلوية لها دور مهم في حماية البكتريا من البلعمة (Phagocytosis) وبذلك تزيد من قابليتها على حدوث الإمراضية .(Johson and Obryan; 2004) تعد الكبسولة احدى عوامل الفوعة المهمة والتي تتكون من سكريدات متعددة Polysaccharide). Peleg *et al.*, 2005) . وتقع المحفظة في البكتريا السالبة لصبغة غرام الى الخارج من الغشاء الخارجي وتعمل على حماية البكتريا من دفاعات المضيف الغير المتخصصة وخاصة فعل المتمم وعملية البلعمة (Wilson *et al* .,2007|). ولا يمكن ازالة المحفظة بالغسل عندما تكون منتظمة وملتصقة وتسمى بالمحفظة اما اذا كانت غير منتظمة فيمكن ازالتها بسهولة وعندها تسمى بالطبقة اللزجة ، اما Glycocalyx وهي شبكة من متعددة السكريات خارجة من سطح الخلية

ويمكن ان تحيط بها عدة خلايا وفي نفس الوقت تغطي المحفظة والطبقة اللزجة (Prescott *etal.*,1990).

2 . 11 إمراضية الايشريشيا القولونية Pathogenesis of *E. coli*

بعض السلالات الانتهازية في الايشريشيا القولونية تسبب الاصابة في الامعاء والاجزاء الاخرى من الجسم ، والتي تقوم بتعطيل دفاعات المضيف (Clarke,2001)هناك ثلاثة متلازمات سريرية تحدث بسبب الاصابة بسلالات بكتريا الايشريشيا القولونية الممرضة 1- التهاب المسالك البولية (UTI) 2 - امراض الاسهال (Diarrhea) 3 - التهاب السحايا (Jawetz *et al.*, 1998) كما تعد بكتريا *E. coli* مصدرا مهما لإصابة الاطفال بتجرثم الدم Bacteramia وخاصة في الريف (Berkley *et al.*,2005). ولها القابلية على الانتقال من الموقع الطبيعي في جسم الانسان الى مواقع اخرى وتتسبب في حدوث اصابات انتهازية (Opprtunistic infections) (Brooks *et al.*, 2004).

تمتلك بكتريا الاشريشيا القولونية العديد من العوامل التي تتسبب في حدوث الامراضية ومن اهم هذه العوامل احتواء جدار الخلية على المحفظة والتي تتكون من سكريات دهنية متعددة (Lipopolysaccharides) ، وتمتلك جرثومة الاشريشيا القولونية اهلاب او مخامل pili or fimbriae (Virella, 1997) ، كما تحتوي ايضا هذه الجرثومة على اسواط محيطية peritrichous flagellae ، ان هذه التراكيب هي التي تكون مسؤولة عن حدوث الامراضية والاصابة بهذه البكتريا (Todar,2002) .

تعد بكتريا الاشريشيا القولونية من اهم واكثر مسببات الاسهال حدوثا للوفيات من الاطفال في البلدان النامية (Enayat *et al* ,2011) تلتصق هذه الجرثومة في النسيج الطلائي للخلية وربما تطرح سموما خارجية ، عندما تكون الدفاعات للمضيف قليلة وغير كافية تصل هذه الجرثومة الى مجرى الدم وتتسبب في احداث تسمم دموي ، كما تعد جرثومة الاشريشيا القولونية والمكورات المسبحية التي تنتمي للمجموعة B من اهم اسباب حدوث حالات التهاب السحايا عند الاطفال (Al- Gosha'ah.,2005).

2 . 12 أنواع الاشيريشيا القولونية Types of *E. coli*

تصنف الايشريشيا القولونية على اساس صفاتها الوراثية والمظهرية الى ستة انواع (Santona *et al.*, 2013).

2-12-1. الاشيريشيا القولونية السامة للأمعاء Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

تعد العامل الاساسي المسبب للإسهال الذي يحدث للأطفال والعامل المسبب لإسهال المسافرين Traveler's diarrhea ومن اعراض هذا المرض هو حدوث إسهال مائي Watery diarrhea مصحوبا بحمى خفيفة او عدم وجود الحمى (Clavijo *et al.*, 2010) .

2 .12 .2. الايشريشيا القولونية النزفية Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)

لها دور مهم في حدوث الإسهال الدموي للأطفال ، وتعد اكثر انواع الاشريشيا القولونية الممرضة خطورة و لها القابلية على افراز نوع من السموم المعروفة بـ (Verotoxin) وهي تشبه السموم التي تفرزها بكتريا الشيكلا *Shigella* وتسمى Shiga like toxin (Doyle Bettelheim *et al.*, 1996) *et al.*, 1997, .

12.2 .3.الايشريشيا القولونية الغازية للأمعاء Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

تعد من اهم انواع بكتريا الاشريشيا القولونية التي تتسبب في اصابة الانسان بالإسهال الدموي الذي يماثل الزحار الذي تسببه بكتريا *Shigella spp* والذي يتميز بالحمى ، الاسهال دموي مصحوب بمخاط مع مغص في البطن ، والمصدر الأولي لنقل المرض هو الانسان (Feng and Weagant; 2011).

4.12.2. الايشريشيا القولونية المرضية المعوية Enteropathogenic *E.coli*

تعد اشيرشيا القولون المرضية المعوية المسبب الرئيسي للإسهال عند الاطفال الرضع في الدول النامية (Afset *et al.*, 2004) والمسبب للإسهال المتقطع في الدول المتقدمة (Yatsuyanagi *et al.*, 2002).

5.12.2. الايشريشيا القولونية ذات الالتصاق المنتشر Diffusely adhering *E. coli* (DAEC)

تتميز (DAEC) بامتلاكها نمط من الالتصاق المنتشرDiffusely Adherent الذي بواسطته تتمكن البكتريا ان تغطي كل سطح الخلية وبشكل منتظم ويمكن تمييز هذه السلالة من خلال التصاقها بخلايا HEP-2 وحدوث الاسهال المائي عند الاطفال الرضع(Servinn,2005). هذه البكتريا لا تمتلك أي نوع من انواع السموم ولا تستطيع ان تخترق الخلايا الظاهرية (Doyle *et al.*, 1997).

6.12.2. الايشريشيا القولونية المعوية المتجمعة *E. coli* Enteroaggregative (EAEC)

يتسبب هذا النوع في حدوث اسهال مستمر عند الأطفال والرضّع في الكثير من دول العالم ولقد تم عزلها من الأطفال المصابين بالتهابات الأمعاء والمعدة (Adachi *et al.*, 2001).

2 . 13 المضادات الحياتية Antibiotics :

المضادات الحياتية هي نواتج ايضية ثانوية تمتلك فعالية ضد مجموعات مختلفة من الكائنات المجهرية ، وتعرف ايضا بانها مواد عضوية كيمياوية تنتجها احياء مجهرية مختلفة (Prescott) *et al.*,2005 تقسم المضادات الحياتية اعتماداً على الموقع الهدف إلى:

1- مجموعة من المضادات تتدخل في بناء الجدار الخلوي Cell Wall Synthesis

تعمل هذه المضادات مثل Penicillins وglycopeptides وCephalosporins على التداخل مع العمليات الحيوية لبناء الجدار بوساطة تأثيرها على منع تجمع مكونات الجدار الخلوي لخلايا البكتيريا من خلال تحطيمها للبروتين وبذلك تعرقل ارتباطها واشتراكها في تكوين الجدار الخلوي (Stephan &Timothy,2010).

2 - مضادات تعمل على تثبيط بناء البروتين Inhibition of Protein Synthesis مثل tetracyclines , Aminoglycosides, macrolides اذ تعمل Aminoglycosides على الوحدة البنائية 30S ribosomal(Quiros *et al*.,2010).

3 - مضادات تعمل على تثبيط المسار الأيضي Inhibition of a Metabolic Pathway مثل cotrimoxazole هذا المضاد يتكون من trimethoprim/sulfamethoxazole وتكمن كفاءة هذا المخلوط في انه يعمل كل مضاد على مرحلة من مراحل تكوين الحوامض النووية، وهذا يؤدي إلى تأثير قاتل للخلايا البكتيرية (Brook *et al.*, 2007).

4 - مضادات تعمل على التداخل مع تكوين الحوامض النووية Nucleic Acid Synthesis مثل quinolones and rifampin (Hall *et al.*, 2011). .

5- مضادات تعمل خلل في تركيب الغشاء البكتيري Disruption of bacterial membrane structure مثل Polymyxins and Daptomycin اذ أن مجموعة Polymyxins تعمل على تعطيل بناء الفوسفوليبيد الخاص بالخلية (Forbes *et al* ., 2007) .

2 . 14 مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية Antibiotic resistance

كان لإكتشاف المضادات الحياتية اثر كبير في انخفاض معدل الإصابات البكتيرية ، ولكن استعمال نوع معين من المضادات الحيوية وبنحو متكرر يؤدي إلى ظهور سلالات جديدة مقاومة لهذا المضاد . وطبقا لتقارير منظمة الصحة العالمية لعام 1997 فان هناك مشكلة تتمثل بازدياد الإصابات بالمسببات المرضية وعلى شكل أوبئة ، بالإضافة لذلك فان هذه المسببات المرضية تكون مقاومة للعديد من الأدوية ، حتى إن بعض السلالات تقاوم معظم المضادات الشائعة (Rezai *et al.*, 2014).

يوجد نوعان من المقاومة للمضادات الحياتية وهي مقاومة طبيعية resistance Natural وتكون هذه المقاومة ذات اصل وراثي يتم تشفيره بواسطة جينات تكون محمولة على البلازميدات او الكروموسومات ، والنوع الثاني مقاومة مكتسبة Acquired resistance والتي تنتج عن طريق اكتساب البكتريا بلازميدات وتحمل هذه البلازميدات جينات تشفر للمقاومة ، وقد تعزى مقاومة البكتريا الى العناصر القافزة Transposable elements والتي تعمل على تحويل العزلة الحساسة الى عزلة مقاومة (Odumosu *et al.*,2013)

ان الأساس الجزيئي لنشوء المقاومة قد ينتج بسبب التغييرات الدائمة في المحتوى الوراثي وعن طريق آليات مختلفة منها الطفرات، واكتساب جينات مقاومة من عزلات أو سلالات مقاومة ، والتي تنتقل عن طريق الاقتران ، أو عن طـريق نواقل وراثيــة Transposons أوعن طريق التحول Transformation (Normark and Normak,2002) .

ان الاقتران البكتيري هو من أكثر الطرق شيوعاً لانتقال بلازميدات المقاومة وعوامل الضراوة وبنحو سريع ويعتمد على وجود النواقل الوراثية الاقترانية (Conjugative transposons) او البلازميدات الاقترانية (Conjugative plasmids) ومن اهم هذه

البلازميدات بلازميد R (R plasmid) اذ يحصل الاقتران وبتكرار عال بين السلالات التي تعود لنفس النوع أو الأنواع المتقاربة (Dionisio *et al.*, 2002) .

إن تطور ونشوء مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية ما هو إلا نتيجة سوء استعمال هذه المضادات وكثرتها ، وايضا الاستعمال غير السريري لهذه المضادات والذي يلعب دورًا مهما في انتشار المقاومة ، عن طريق السلسلة الغذائية أوعن طريق التلامس المباشر مع الحيوانات التي تحمل البكتريا المقاومة للمضادات الحياتية (Bergogne- Berezin,1997).

ان من اهم آليات مقاومة الاحياء المجهرية للمضادات الحياتية :-

أولاً - إنتاج الأنزيمات المثبطة لمضادات الحياة :

تقوم الاحياء المجهرية بإنتاج انزيمات معينة تحطم العقار مثال على ذلك بكتريا *Staphylococci* والتي تقاوم بنسيلين G تنتج انزيم β-Lactamase والذي يعمل على تحطيم العقار، تفرز البكتريا السالبة لصبغة غرام والمقاومة لمجموعة Aminoglycoside انزيمات تعمل على تثبيط هذه المجموعة وتشمل Phosphorylating enzyme Acetylating enzyme , Adenylating enzyme (Brook *et al* ., 2001) .

ثانيا - تغير في موقع الهدف:

وهو موقع يعمل على ربط المضادات الحيوية في داخل الخلية البكتيرية ، بالإضافة لأنظمة دفق Pumping system وهذه الانظمة تتضمن طرح المضاد الداخل للخلية البكتيرية الى الخارج عن طريق آلية معينة تدعى (آلية الضخ الخارجي) Pump out ويتم ذلك بمساعدة الغشاء الخارجي والفسحة البلازمية والغشاء البلازمي ، ان حدوث طفرة وراثية في موقع الهدف يقلل من الفة المضاد لذلك الهدف وهذا يؤدي الى تحول البكتريا من حساسة الى مقاومة وهذا ما يلاحظ في المقاومة Erythromycin اذ يتم تغيير الهدف وهو الوحدة الرايبوسومية (50S) وتغير في الوحدة الرايبوسومية (30S) والتي تعد موقع الهدف للمجموعة Aminoglycoside (Levinson and Jawetz,2000).

ثالثاً - تغير في حاجز النفاذية:

تمتلك العصيات السالبة لصبغة غرام غشاء يعد حاجزا محبا للماء (Levinson and Jawetz,2000) حدوث تغير في تركيب الغشاء الكيمياوي او حدوث اختزال في عدد ثقوب

الغشاء يودي الى تغير في نفاذيته وهذا يؤدي الى جعل البكتريا مقاومة للمضاد (Jacoby and Sutton,1985) بالإضافة الى ذلك توفر بروتينات Penicillin Binding Proteins (PBPs) ذات الطبيعة الانزيمية والتي توجد في الغشاء السايتوبلازمي اذ تعمل على تخليق الببتيدوكلايكان ولها القابلية على الارتباط بمضادات البيتا لاكتام تساهميا (Pfeifle *et al.*,2000).

رابعاً – تغير المسارات الايضية:

بعض انواع البكتريا تكون مقاومة لعمل المضادات وذلك عبر تغيير في مسارها الكيموحياتي كذلك تقوم بتطوير انزيمات متغيرة تؤدي وظيفة ايضية وتكون اقل تأثرا بالعقار مثلا أنزيم (Dihydrofolic acid reductase) والذي ينتج بواسطة بكتريا مقاومة لمضاد Trimethoprim (Brook *et al.*, 2001).

2 . 15 الذيفانات المعوية للـ *E. coli* Enterotoxins of

أول من أشار إلى أن بكتريا *E. coli* هي السبب في حدوث الإصابة المعوية في الأطفال الرضع والحيوانات الداجنة هما Halls و Smith في1967 ، اذ أوضح العالمان بان الزرع البكتيري وراشحه لهما قابلية على تجميع السوائل في حلقة الأمعاء المربوطة للأمعاء الدقيقة للأرنب ، وأطلقا على الراشح الذي يتسبب في تجمع السوائل في حلقات الأمعاء بالذيفانات او السموم المعوية (Enterotoxins) ، وتنتج هذه الذيفانات من قبل سلالات المجموعة السمية (ETEC) وتكون على نوعين (Hung *et al.*, 2013) .

- **الذيفانات ا لمعوية الثابتة بالحرارة Heat stable Enterotoxin (ST)**

تتصف هذه الذيفانات بثبوتها بالغليان ولمدة 15 دقيقه وتكون قابلة للذوبان في الماء ، وكذلك تتميز بمقاومتها لإنزيمات التحلل البروتيني والحموضة ولكنها تكون حساسة في الوسط القاعدي (Tsuji , 1995) وتتصف هذه الذيفانات بكونها ذات وزن جزئي واطئ (Dorner 1976 *et al.*,) ان هذا الذيفان يتكون من سلسلة من متعدد ببتيد ويتراوح معدل عدد أحماضها بين 17- 53 حامض أميني ويوجد ايضا ست وحدات من الحامض الاميني Cysteine في المنطقة النهائية ، وهناك ثلاث اواصر ثنائية الكبريت تتكون بين الحوامض الستة وتكون ضرورية في

إظهار سمية الجزيئة التي يتكون منها الذيفان (Saeed *et al* .,1984) ويفرز الذيفان في البيئة الخالية من الكلوكوز(Giannella, 1995) يصنف الذيفان المعوي ST إلى نوعين يطلق عليهما (ST-1 , ST-11) أو (STb, STa) اذ يكون ST1 مسببًا رئيساً للإسهال عند البشر أما ST11 فيكون مسبب للإسهال في الخنزير البري (Chart, 2002) . أما آلية عمل الذيفان بعد ان يتم إفرازه في الأمعاء يكون مرتبط بالمستقبل الخلوي الخاص وينتج عن ذلك تنبيه وتحفيز الغشاء المرتبط بإنزيم Guanylate Cyclase مما يؤدي الى تنشيط الإنزيم الذي يعمل على تحويل GTP إلىcGMP ثم تحدث الزيادة في Cyclic Guanosine Monophosphate وان هذه الزيادة تؤثر في تدفق الايونات إلى الأمعاء مما يؤدي الى حدوث تثبيط في الامتصاص لأيونات الصوديوم وزيادة في تدفق الايونات للكلور والماء من زغابات الأمعاء (Schmitt *et al.*, 1999).

- **الذيفانات غير الثابتة بالحرارة Heat Labile Enterotoxin (LT)**

يشابه ذيفان LT سموم الكوليرا Choleratoxin (CT) والذي تنتجه سلالات *Vibrio cholerae* من حيث التركيب والفعالية المستضدية (Feng and Weagant, 2002) تفقد هذه الذيفانات صفاتها عند تعرضها لدرجة حرارة 56 درجة مئوية ولمدة 30 دقيقه (Lewis, 1997) تصنف هذه الذيفانات إلى نوعين LT-1, LT-11 و توجد أنماط ثانوية للـ LT -1 والتي تعتمد على المضيف (الإنسان و الخنازير أو الطيور)، أما أنماط LT- 11 فهي LT-11a, LT-11b ، على الرغم من مستوى التغايرات في التراكيب إلا أن جميع الذيفانات غير الثابتة بالحرارة تتكون من وحدتين ، وحده فرعيه A وتكون ذات وزن جزئي (26000 - 28000) دالتون وخمس وحدات ثانوية B و لها وزن جزئي (11500 -11800) دالتون ، أن ارتباط الجزء A مع الجزء B يكون غير تساهمي (Gill *et al.*,1976).

تعد الوحدة A مسؤولة عن تنشيط أنزيم Adenylate Cyclase في الطبقة الظهارية للقناة الهضمية ، وان هذه الوحدة تكون مرتبطة بخمس وحدات من B ، و بدورها ترتبط بغشاء الخلايا الظهارية للأمعاء عن طريق جزء مستقبل عقدي يدعى Ganglioside GM 1 وبعد ارتباط الوحدات B1 إلى GM 1 تدخل الوحدة A وتعمل على تنشيط انزيم Adenylate Cyclase والذي يقوم بتحويل ATP إلى AMP مما يزيد مستوى Cyclic Adenosine Monophosphateوهذا بدوره يقلل من امتصاص الصوديوم من قمة الزغابات المعوية ويعمل على زيادة إفراز ايونات الكلوريد والكربونات وان هذه بمثابة سداد لامتصاص الماء من الأمعاء

، ويحصل ايضا خروج للماء عن طريق الخلايا المخاطية مما يؤدي الى نقصان الماء والأملاح وحصول حالة الجفاف (Horstman and kuchn,2000).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3 الاجهزة والمواد المستعملة

1.1.3 الاجهزة المستعملة

استعملت الاجهزة المدرجة في القائمة ادناه:

جدول (3 – 1) الاجهزة المختبرية

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
1	ثلاجة Refrigerator	LG (Korea)
2	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	Bio-Rad-Italy
3	جهاز الدورات الحراري Thermo cycler	Bio neer (Korea)
4	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Hettich (Germany)
5	جهاز طرد المركزي عالي السرعة High speed cold centrifuge	Sanyo - UK
6	جهاز تحضير الاوساط الزرعية	France
7	جهاز تشخيص البكتريا Vitek – 2	Biomeriex (France)
8	جهاز تقطير الماء Distiller	Ogawa (Japan)
9	حمام مائي Water bath	Memmert (Germany)
10	فرن كهربائي Oven	Memmert (Germany)
11	كابينة الزرع المجهري laminar flow cabinet (Hood)	mn120 (Korea)
12	كاميرا رقمية Digital camera	Canon (Japan)
13	مازج Vortex	Bio neer (Korea)
14	مجهر ضوئي Microscope	Nikon (Japan)

15	Autoclave مؤصدة	Labtech (Korea)
16	Electrical Sensitive ميزان الكتروني حساس balance	TAFESA (Germany)
17	Shakerهزاز	Biotek (USA)

جدول (3 – 2) الادوات المختبرية

ت	اسم المواد	المنشأ (الشركة المصنعة)
1	Petri dishesاطباق بلاستيكية	AFMA-Jordan
2	Eppendorfs tubs انابيب باندروف	Afco-Dispo (Jorden)
3	Diffferent tubes انابيب بلاستيكية مختلفة	Afco-Dispo (Jorden)
4	filter Paper اوراق ترشيح	Slamed - German
5	Different pipet tips تبات مختلفة الاحجام	Slamed-German
6	Cynical flasks دورق مخروطي	BBL (USA)
7	Slides and Covers شرائح زجاجية واغطية	Meheco (China)
8	Para film شريط شمعي لاصق	BDH(England)
9	Transport ice box صندوق نقل العينات	Slibrand-China
10	Micropipettes ماصات دقيقة	Slamed-German
11	Syringes محاقن طبية مختلفة الاحجام	Meheco (China)
12	Cotton swab مسحات قطنية	AFMA-Jordan
13	Loop ناقل بكتيري	KD SURGICALS-INDIA

2.1.3 الاوساط الغذائية المستعملة والغرض من استعمالها

استعملت الاوساط الزرعية والموضحة في جدول (3 – 3) منشئها والغرض من استعمالها

جدول (3 – 3) الاوساط الغذائية

ت	الوسط	المنشأ	الغرض من استعماله
1	اكار ماكونكي MacConkeyś agar	Oxoid (England)	عزل البكتريا السالبة لصبغة غرام والتفريق بين العزلات المخمرة لسكر اللاكتوز عن غير المخمرة
2	مرق نقيع القلب والدماغ-Brain heart infusion broth	Himedia-India	لحفظ وتنشيط الخلايا
3	وسط أكار ايوسين المثيلين الأزرق Eosin-Methylene blue agar	Oxoid (England)	للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين البريق المعدني المخضر Metalic sheen لل *E.coli*

3.1.3 المواد الكيميائية المستعملة

جدول (3 – 4) المواد الكيمائية والبيولوجية المستعملة

ت	اسم المادة	الشركة (المنشأ)
1	اكاروز جل Agarose gel	Bio Basic (USA)
2	ايثانول مطلق Absolute Ethanol	BDH (England)
3	ايثيديم بروماید Ethidium Bromide	Bio Basic (USA)
4	بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2 Peroxidase)	BDH chemical Ltd

(England)	hydrogen	
BDH(England)	جليسيرولGlycerol	5
BDH(England)	صبغة كرامGram stain	6
BDH(England)	صبغة المثلين الازرقMethylene blue	7
Fluka (Switzerland)	كحول اثيلي Ethanol %96	8
BDH(England)	كحول اثيلي مطلق99 Absolute Ethanol%	9
BDH(England)	محلول فسلجي Normal saline	10
IRAQ	محلول الايودين المعقم Povidone Iodine %10	11
Bioneer (Korea)	ماء خالي من الايونات nuclease Free water	12
Bio Basic (USA)	محلول الترحيل الدارئ TBE-buffer 10X TBE (Tris - Boric acid- EDTA)	13

4.1.3 عدد الفحص المختبرية المستعملة في الدراسة

استعملت في هذه الدراسة كل من العدد المختبرية المبينة في جدول (3 – 5)

جدول (3 – 5) : العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة

ت	عدة الفحص	الشركة المصنعة والمنشأ
1	خليط التفاعل Pre-Mix	Bioneer (Korea)
2	سلم الحامض النووي ذو حجم 100- 1500 قاعدة نتروجينيهDNA Ladders	Bioneer(Korea)
3	عدة استخلاص الحامض النووي DNA- Extraction Kits	FAVORGEN (Taiwan)
4	عدة جهاز فايتك التشخيصية	Biomeriex (France)

5.1.3 البوادئ primers

صممنا هذه البوادئ الخاصة ببكتريا *Escherichia coli* وذلك باستعمال موقع NCBI Gen Bank data base (WWW.NCBI.Com.) وبرنامج تصميم البادئات Primer 3 plus وقد تم تجهيز هذه البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب الجدول (3 – 6) و (3 – 7) .

جدول (3 – 6) تتابعات البوادئ النوعية لجين *LT* لبكتريا ETEC وحجم الناتج لكل بادئ

Primer	Sequence 5´——— 3´		Amplicon
LT – E.coli	F	GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	360bp
	R	CTGCGTTAGGTGGAATACCAT	

جدول (3 – 7) تتابعات البوادئ النوعية لجين *ST* لبكتريا ETEC وحجم الناتج لكل بادئ

Primer	Sequence 5´——— 3´		Amplicon
ST – E.coli	F	TTGCTACAAATGCCTATGCATCT	121 bp
	R	CCAGCAGTACCATCTCTAACC	

2.3 طرائق العمل Methods

1.2.3 جمع العينات

جمعت العينات من ارياف متعددة محافظة كربلاء المقدسة والتي شملت منطقة الزبيلية ، الحسينية ، الهندية و ناحية الحر ، امتدت الدراسة من كانون الاول 2018 لغاية اذار 2019 اذ شملت عينات الدراسة 125 عينة من الحليب الخام للأبقار وباستعمال قناني بلاستيكية معقمة بحجم 50 مل وبعد اخذ العينة وضعت في حاوية فلينية ثم نقلت العينات مباشرة الى المختبر اذ تم تنميتها على اطباق بتري حاوية على الاوساط الزراعية (وسط الماكونكي ، وسط ايوسين مثيلين الازرق) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة (37)° م لمدة 24 ساعة.

2.2.3 زرع العينات Sample culturing

زرعت العينات على الاوساط الزرعية ، وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة (37)° م لمدة 24 ساعة ، وتم تنقيتها على وسط الماكونكي اكار ومن ثم اعادة زراعتها بطريقة التخطيط وذلك باستعمال الناقل المعقم (Loop) وتم حضن كافة الاطباق بدرجة حرارة (37) ° م لمدة 24 ساعة وذلك كي يتم التأكد من نقاوتها والحصول على مستعمرات بكتيرية منفردة ، بعد ذلك تم اجراء عدد من الفحوصات التشخيصية المظهرية والكيموحيوية للبكتريا.

3.2.3 الاوساط الزرعية الجاهزة

تم تحضير الاوساط الزرعية وفقا للتعليمات الموجودة على العبوات للشركات المصنعة ثم عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة (121)° م وتحت ضغط 15 باوند / انج ^{2} ولمدة 15 دقيقة ثم صبت بالأطباق المخصصة لها وبعد الصب تم حضنها في الحاضنة لمدة 24 ساعة من اجل التأكد من عدم حدوث تلوث ، ثم تم حفظها في الثلاجة بدرجة حرارة (4) ° م لحين استعمالها .

4.2.3 الكواشف المستعملة

1.4.2.3 كاشف الكاتليز Catalase reagent

تم استعمال بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وبتركيز3% وذلك من اجل الكشف عن قابلية البكتريا لإنتاج انزيم الكاتليز (Tang &Stratton,2006).

2.3. 2.4 كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

استعمل الكاشف الجاهز من قبل شركة (BioMerieux \ France)

3.3 عزل العينات وتنقيتها Isolation and purification

تم عزل المستعمرات البكتيرية و نقيت المستعمرات الفردية من كل عينة تم زرعها مسبقا على وسط الايوسين مثيلين الازرق وذلك لإجراء الاختبارات التشخيصية .

4.3 تشخيص العزلات البكتيرية

1.4.3 التشخيص المظهري Morphological characteristics :

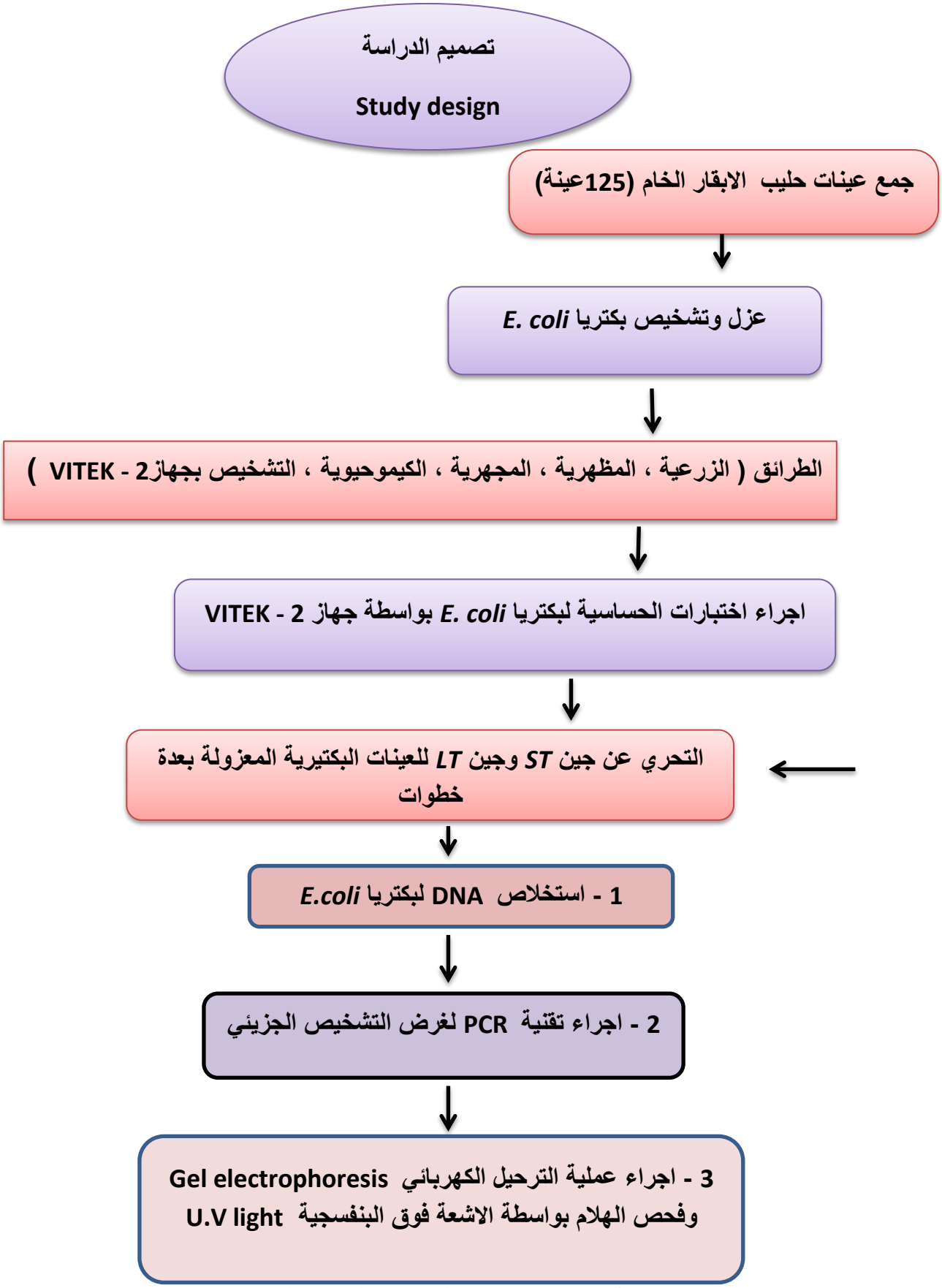
تم تشخيص العزلات البكتيرية وبالاعتماد على ما ورد في (Holt *et al.*,1994). وقد تم تشخيص المستعمرات البكتيرية مبدئيا بالاعتماد على صفاتها المظهرية وقد تضمن التشخيص شكل المستعمرات ، لونها ، قوامها ، رائحتها وايضا حجمها على وسط اكار الماكونكي ووسط اكار ايوسين المثيلين الازرق Eosin Methylene Blue.

2.4.3 الفحص المجهري Microscopic examination

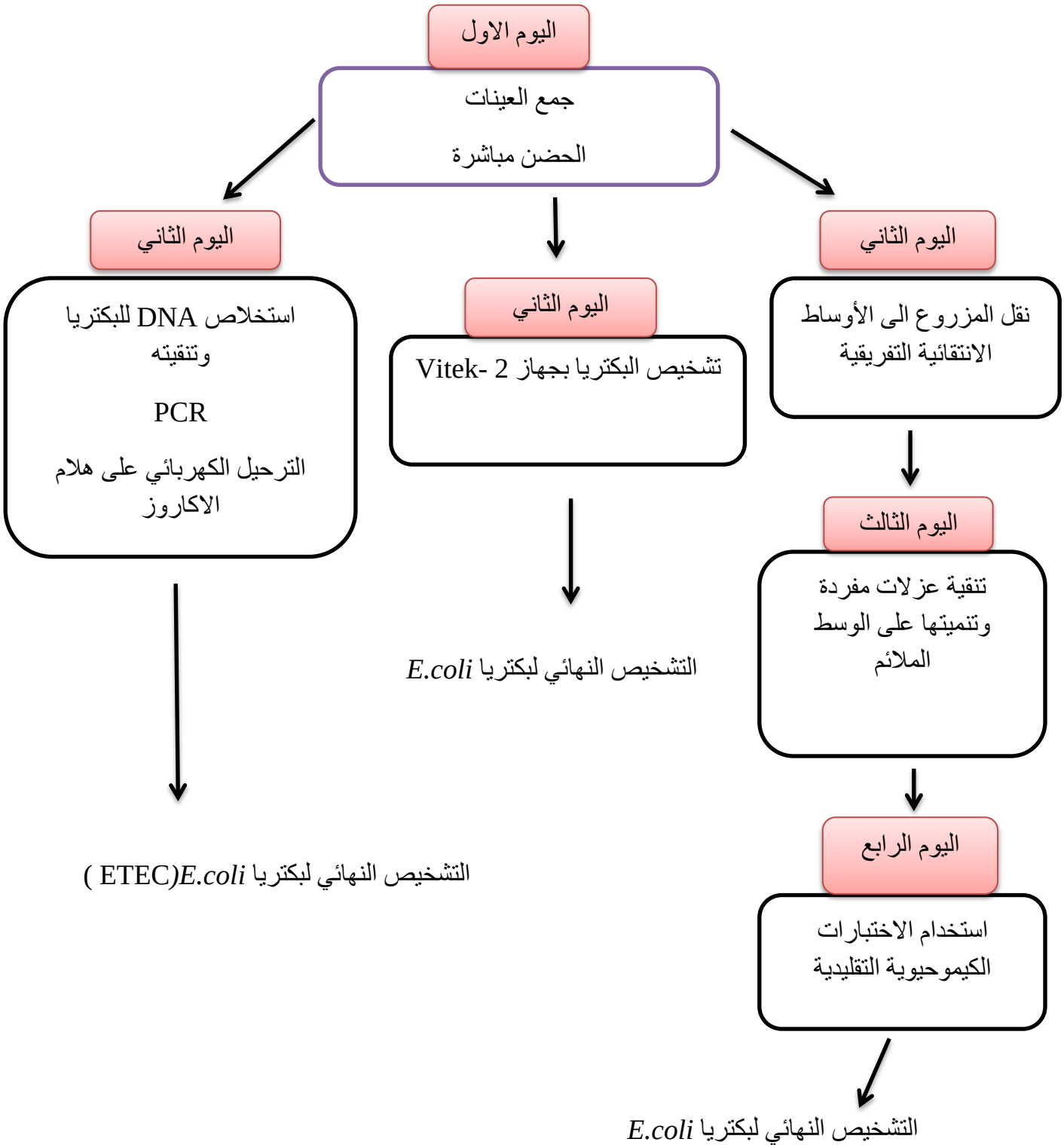
تم استخدام صبغة غرام لتصبيغ الخلايا البكتيرية اذ تتكون هذه الصبغة من :-

- صبغة الكرستال البنفسجية Crystal Violet
- محلول الايودين Iodine Solution
- محلول قصر Decolarizer
- صبغة السفرانين Safranin Pigment

اخضعت عزلات بكتريا *E.coli* الى الفحص المجهري و ذلك باستعمال صبغة كرام وتم فحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي ليتم التعرف على شكل البكتريا وكذلك حجمها وترتيبها و التفاعل مع ملون كرام (Atlas *et al.*, 2010).



شكل (3-1) يوضح المحاور الرئيسة للبح



شكل (3 – 2) يوضح الطرق التشخيصية المستعملة في تشخيص بكتريا الاشريشيا القولونية اعتمادا على التقنيات التقليدية والحديثة

3. 4 .3 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

1.3. 4 .3 اختبار انزيم الكاتاليز Catalase test:

تم استعمال اختبار انزيم الكاتاليز للتحري عن قدرة بكتريا *E.coli* على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يقوم بتحليل بيروكسيد الهيدروجين ويعمل على تحويله الى الماء ونتيجة لذلك يتحرر غاز الاوكسجين على شكل فقاعات هوائية ، تم اخذ جزء من المزروع البكتيري الى شريحة زجاجية نظيفة وتم اضافة قطرات من كاشف بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) باستعمال ماصة باستور عند ظهور فقاعات غاز الاوكسجين يدل ذلك على ايجابية الاختبار(Koneman *et al.*,1992).

2.3. 4 .3 اختبار انزيم الاوكسيديز Oxidase test

تم استعمال اختبار انزيم الاوكسيديز وذلك من اجل الكشف عن قدرة بكتريا *E. coli* لإنتاج انزيم السايتوكروم اوكسيديز (Cytochrome oxidase) ، تم وضع عدة قطرات من كاشف الاوكسيديز على ورقة الترشيح المعقمة والنظيفة باستعمال الاعواد الخشبية المعقمة (Stick) ونقلت المستعمرة البكتيرية بعمر 24 ساعة الى ورقة الترشيح ، وتكون النتيجة موجبة عند ظهور لون بنفسجي في غضون عشر ثواني عند ملامسة البكتريا لكاشف الاوكسيديز على سطح الورقة وهذا دلالة على ايجابية الاختبار (Koneman *et al.*,1992).

5.3 التشخيص بجهاز VITEK - 2 Compact:

استعملت عدة الفحص الخاصة بجهاز VITEK-2 والمجهز من قبل شركة Bio Merieux لعمل اختبارات كيموحيوية لهذه العزلات البكتيرية ، يتضمن عدة الفحص الخاصة بجهاز VITEK- 2 (48) نوع من الاختبارات الكيموحيوية والتي يتم استخدامها في تشخيص البكتريا وتصل درجة دقة التشخيص لهذا الجهاز تقريبا 99 % كما تم تفسير نتائج فحص الحساسية للمضادات الحياتية على اساس المقاوم (R) والحساس (S) والوسطي (I). (Pincus,2011).

1.5.3 المواد المستعملة

- VITEK 2 Cassete
- محلول ملحي فسلجي
- وسط الماكونكي الصلب
- قطعة بلاستيكية من مادة Polystyrene لغرض حمل الانابيب
- VITEK 2 GN Card
- VITEK 2 DENSICHEK
- مازج
- مسحة معقمة
- VITEK 2 DENSICHEK Power Adapter

2.5.3 طريقة العمل

❖ تحضير العالق الجرثومي Suspension Preparation :

زرعت بكتريا *E.coli* التي يراد فحصها على وسط اكار الماكونكي وذلك بطريقة التخطيط ، وقمنا بحضن هذه الاطباق بدرجة حرارة (37) مْ لمدة 24 ساعة ، ثم قمنا بتحضير العالق البكتيري وذلك بإضافة جزء من المزروع البكتيري الى Normal Saline في انبوبة اختبار.

❖ تلقيح البطاقة Inoculation of the card : تم تلقيح البطاقة وحسب الخطوات التالية :

1. تم قياس العكورة للمستعمرة البكتيرية بجهاز VITEK 2 DENSICHEK بحيث يكون القياس للعكورة (0.5 -0.63).

2. تم نقل العالق البكتيري والبطاقة الى حامل الجهاز Cassette تم وضعهما في الاماكن المخصصة لهما ، وبعد ذلك تم ربط العالق البكتيري والبطاقة بوساطة الانبوب الناقل وتم ادخال رمز البطاقة عن طريق الماسح الضوئي .

3. تم وضع الحامل في حجرة تكون خاصة ومفرغة تماما من الهواء Vacum chamber ، اذ ان عملية تفريغ الهواء تعمل على نقل هذه الميكروبات وبوساطة الانبوب الناقل للبطاقة ، بالإضافة الى توزيعها في الحفر التي توجد فيها .

❖ الاغلاق المحكم للبطاقة وحضنها Card Sealing and Incubation:

يقطع الانبوب الناقل وبصوره الية من قبل الجهاز في مدة لا تتجاوز (15) دقيقة ويتم غلق البطاقة اي يتم احكام اغلاق المنفذ للأنبوب الناقل وذلك من اجل منع حدوث اي تسرب ، بعدها تنقل البطاقة الى الحاضنة ويتم حضنها بحرارة (35.5 ± 1.0) درجة مئوية ، و تستوعب الحاضنة (30-60) بطاقة.

❖ نظام التشخيص البصري Optical System:

ان نظام التشخيص البصري في الجهاز يعمل على تسقيط العديد من الحزم الضوئية باتجاه البطاقة وذلك من اجل التعرف على الاطوال الموجية للتفاعلات الحاصلة وترجمتها وذلك عن طريق الترجمة اللونية وكذلك العكورة فضلا عن النواتج الايضية .

❖ نتائج الاختبار وتقنيات التحليل Test Reaction results & Analytical Techniques:

يعمل هذا الجهاز على حساب النتائج وكذلك مقارنتها بالنتائج المخزونة بالجهاز والتي تضم عدد من قياسات الاختبارات ، ولعدد كبير من السلالات البكتيرية النامية تحت ظروف مختلفة

والتي تم عزلها من اماكن مختلفة ، يظهر هذا الجهاز نتائج الاختبارات بشكل + ، − ، (+) ، (−) وتشير النتيجة بين الاقواس ان الاختبار يكون ضعيف .

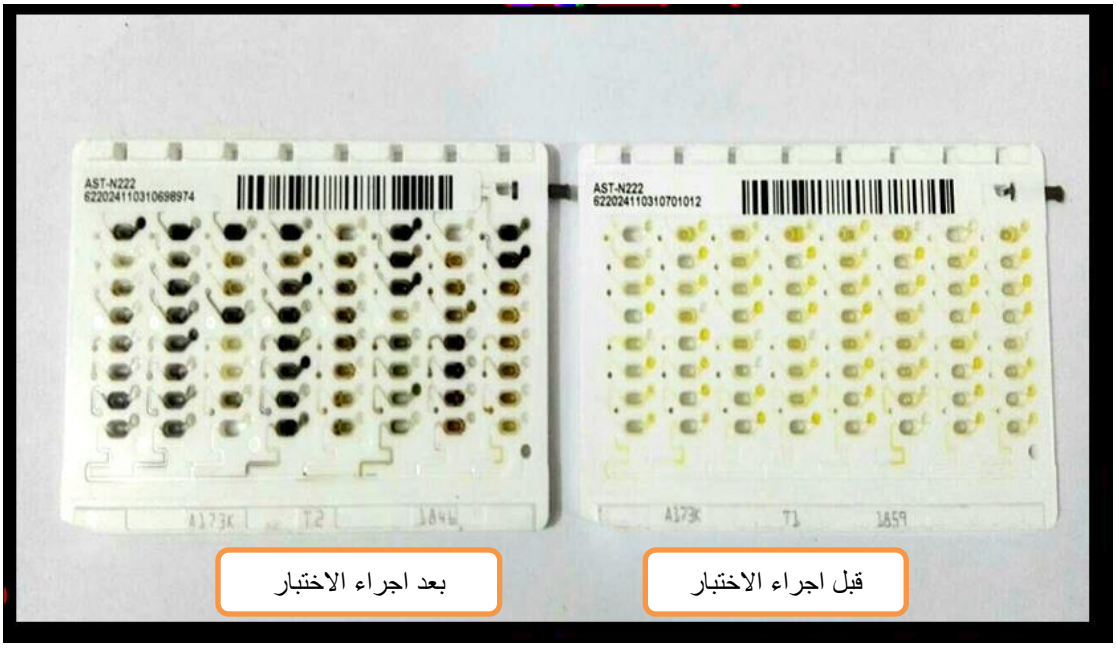
❖ تحديد مستوى تشخيص الجراثيم Identification Level of Bacteria :

يتم تحديد مستوى التشخيص للبكتريا عن طريق خارطة اختبارات ويتم مقارنتها بصفات تصنيفية للجهاز فيعطى للكائن نسبة معينة من الاحتمالية ومستوى الثقة ، فمثلا اذا كانت نسبة الاحتمالية (96-99%) هي عند مستوى الثقة ممتاز (Pincus,2011).

جدول (3 – 8) يوضح المضادات الحياتية المستعملة

اسم المضاد الحيوي Antibiotics	الرمز
Amikacin	AK
Aztreonam	AZT

CEF	Cefepime
CAZ	Ceftazidime
CIP	Ciprofloxacin
GEN	Gentamicin
IPM	Imipenem
MEM	Meropenem
MIN	Minocycline
PIP	Piperacillin
PTZ	Piperacillin - Tazobactam
TIC	Ticarcillin
TCC	Ticarcillin – Clavulanic acid
TOP	Tobramycin
SXT	Trimethoprim/Sulfamethoxazole



شكل (3 – 3) بطاقة فحص الحساسية للمضادات الحيوية والخاصة بجهاز Vitek قبل وبعد اجراء الاختبارات الخاصة لفحص الحساسية

6 .3 حفظ العزلات لمدة طويلة في الجليسيرول (Glycerol):

تم تحضير وسط حفظ البكتريا وذلك بوساطة إضافة 20 مل من الجليسيرول الى 80 مل من وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain-heart infusion broth وتم تعقيم الوسط بالمؤصدة وتحت ضغط (15) باوند \ نج^2 بحرارة (121)° م لمدة (15) دقيقة ثم ترك ليبرد ، وبعد ذلك تم توزيعه في قناني زجاجية ذات غطاء محكم ثم لقحت بمستعمرات بكتيرية نقية من العزلات المراد حفظها بعد حضانة (2 – 3) ساعة ووضعت هذه القناني في الحاضنة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة (37)° م وذلك من اجل ملاحظة العكرة التي تكونت بسبب نمو هذه البكتريا في الوسط الذي قمنا بتحضيره ، ويتم حفظ هذه القناني بدرجة حرارة (20 –)° م مع ملاحظة تجديدها كل ثلاث اشهر (Fugelsang and Edwards,2007).

7 .3 استخلاص الدنا DNA extraction

تم استخلاص DNA من البكتريا المعزولة من الحليب وحسب العدة الخاصة كما في الخطوات التالية ، وحسب التعليمات للشركة المصنعة لها FAVORGEN من منشأ Taiwan :

1- نقل 2 مل من العالق البكتيري المزروع على وسط المرق المغذي والمحضنة 12 ساعة الى انابيب ابندروف وتم وضعه في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة / دقيقة وذلك لغرض تكوين راسب (pellet) وللتخلص من الجزء الطافي .
2- اضيف 200 مايكرو ليتر من Proteinase K إلى أنابيب ابندروف التي كانت حاوية على الراسب ثم يتم مزجها بجهاز المازج Vortex لمدة ثلاث دقائق وحضنت في حرارة الغرفة لمدة (10) دقائق مع قلب هذه الانابيب كل ثلاث دقائق اثناء مدة الحضن وذلك لضمان التحلل الكامل للخلايا في المزيج المتكون .
3- أضيف 200 مايكرو ليتر من دارئ (GB) إلى أنابيب ابندروف و تم مزجها في Vortex لمدة خمس ثواني ثم وضعت الانابيب في الحمام المائي بدرجة حرارة (60) °م لغرض الحضن لمدة (10) دقائق وتقلب الانابيب كل ثلاث دقائق اثناء مدة الحضن .
4- اضيف 200 مايكرو ليتر من كحول الايثانول المطلق Absolute ethanol إلى انابيب ابندروف ثم تم مزجها .

5- تم نقل مكونات الخليط بما فيه الراسب في الخطوة السابقة إلى أنابيب الفلترة (Filter Colum) والتي تم تجهيزها مع العّدة وقد تم وضع أنابيب الفلترة في أنابيب الجمع (Collection tubes) و تم وضعها في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 14000 دورة/ دقيقة و لمدة دقيقتان ، وقد تم التخلص من أنابيب الجمع ومحتوياته و تم وضع أنابيب الفلترة في أنابيب جمع جديدة .

6- اضيف 400 مايكرو ليتر من دارئ W1 buffer والمجهز مع العدة إلى أنابيب الفلترة GD وذلك لغسل الحامض النووي وتم وضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000دورة / دقيقة ولمدة 30 ثانية ثم سكب المحلول المتكون في أسفل أنابيب الجمع .

7- اضيف 600 مايكرو ليتر من(wash buffer) إلى أنابيب الفلترة (GD) ووضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة / دقيقة ولمدة 30 ثانية لغرض الغسل وايضا التخلص من بقايا الدهون وتم القيام بتكرار العملية وذلك بوضع انابيب الفلترة في جهاز الطرد المركزي لمدة ثلاث دقائق وبسرعة 14000 دورة / دقيقة من اجل التخلص من بقايا الدهون.

8- تم اضافة 100 مايكرو ليتر من محلول الإذابة (elution buffer) لأنابيب الفلترة الحاوية على DNA والمرتبطة بمادة السليكا ، ويوضع المحلول في حمام مائي بحرارة(60 °) م ثم نقوم بإضافته الى انابيب الفلترة من اجل فك ارتباط DNA بمادة السليكا والموجودة في انابيب الفلترة .

9- قمنا بوضع أنابيب الجمع أسفل أنابيب الفلترة وذلك لغرض نزول DNA من أنابيب الفلترة إلى انابيب الجمع وذلك عن طريق وضعها في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 10000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحده وذلك لغرض نزول بقايا DNA.

10- تم نقل عينات DNA من أنابيب الجمع إلى أنابيب ابندروف وبواسطة micropipette وتم وضع أنابيب ابندروف التي تحوي على DNA بدرجه حرارة (– 20 °) م لغرض حفظه وعمل PCR من اجل التحري عن الجينات .

8.3 تقدير مستخلص الحامض النووي Estimation of DNA extracts

تم فحص الحامض النووي DNA الذي تم استخراجه من البكتيريا وذلك باستعمال جهاز النانو دروب Nano drop spectrophotometer الذي قيس بواسطته تركيز DNA ب

مايكرو غرام/ مل تم فحص النقاوة للحامض النووي بوساطة قراءة امتصاصية الطول الموجي والذي يتراوح بين 260/280 نانوميتر .

1- بعد تشغيل جهاز Nano drop تم اختيار برنامج لقياس الحامض النووي نوع DNA.
2- تم تصفير الركيزة للمقياس مرتين وذلك عن طريق وضع 2 مايكرو لتر من (ddH_2O) وباستعمال مايكروبايبيت تكون معقمة على سطح ركيزة المقياس وتم اجراء التصفير وبعدها تم تنظيف الركيزة باستعمال ورق نشاف خاص بالجهاز.
3- وضع واحد مايكرو ليتر بالضبط من كل عينة من عينات DNA الذي تم استخلاصه على ركيزة مقياس الجهاز ومن ثم تم الضغط على زر OK لبدء عملية القياس لتركيز DNA بعدها نقوم بتنظيفه مرة ثانية من اجل قياس العينة الاخرى .
4- ايضا حددت نقاوة عينات DNA المستخلصة وذلك بقراءة الامتصاصية بوساطة جهاز Nano drop spectrophotometer وعلى طولين موجيين 260/280 نانوميتر ، ان الحامض النووي DNA الذي تم استخلاصه يعد نقي وذلك عندما تكون نسبة الامتصاصية (1.8).

9.3 تحضير مزيج سلسلة تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل

1- حضر المزيج ولكل عينة وبنفس المكونات وتم استخدام / Accupower PCR Premix Bioneer Com. ، هذا المزيج تم اعداده وفق الشركة المصنعة له وحسب الجدول الاتي:-

جدول (3 – 9) مكونات مزيج انزيم البلمرة المتسلسل

ت	مزيج PCR	الحجم المضاف لخليط التفاعل والتركيز النهائي للبوادئ والدنا القالب
1	الدنا القالب	5 مايكرو ليتر
2	البادئ الامامي	1.5 مايكرو ليتر
3	البادئ الخلفي	1.5مايكرو ليتر
4	البريمكس	5 مايكرو ليتر
5	الماء الخالي من الايونات	12 مايكرو ليتر
الحجم الكامل		25مايكر وليتر

2- مزجت جميع انابيب التفاعل بوساطة جهاز المازج الدوار مدة 5 ثوان.

3- وضعت انابيب التفاعل في جهاز الدورات الحراري PCR Thermo cycler وذلك لإجراء عملية تضخيم DNA (DNA Amplification) وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية لبكتريا الاشريشيا القولونية والمتمثلة بعملية فصل شريط DNA Denaturation وارتباط البوادئ مع الشريط المنفصل Annealing وتطويل سلسلة Extension DNA.

جدول (3 – 10) خطوات تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل

خطوات PCR	درجة الحرارة	عدد الدورات	الوقت
المسخ الاولي	95C°	1	5 دقائق
المسخ	95 C°	30	30 ثانية
التصاق البوادئ	55 C°		30 ثانية
امتداد	72 C°		45 ثانية
امتداد اخير	72 C°	1	5 دقائق

3 . 10 الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis

حُلل ناتج PCR بواسطة هلام اكاروز الترحيل الكهربائي Agarose gel electrophoresis وباتباع الخطوات التالية (Mladin *et al.*,2009) :

1 . تم تحضير 1 % من هلام الأكاروز وذلك باستخدام تركيز X 1من دارئ TBE بإضافة 1 غم من الأكاروز في 100مل (TBE-buffer) (Tris-borate-EDTA) محلول الترحيل و تم وضعه في المايكرويف من اجل اختفاء البلورات.

2 . تم تذويبها في حمام مائي وبحرارة (100)° م مدة ربع ساعة بعد ذلك يتم تركة كي يبرد ويصل لدرجة حرارة (50)° م.

3. تم اضافة 3 مايكرو ليتر من صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide stain لمحلول هلام الأكاروز.

4. ثبت المشط في المكان المخصص وذلك لمعرفة اماكن عينات PCR بعدها تم سكب هلام الأكاروز في قالب الترحيل (Tray) ثم ترك بحرارة الغرفة ولمدة 15 دقيقة وذلك كي يتصلب ثم ازيل المشط بهدوء من قالب الترحيل .

5. اضيف 6 مايكرو ليتر من ناتج PCR لكل حفرة (Well) من حفر المشط بعدها تم اضافة 5 مايكرو ليتر من DNA ladder الدليل الحجمي لناتج PCR وتم وضعه في الحفرة الاولى.

6. بعد اكتمال التحميل تُبت قالب الهلام في حوض الترحيل الكهربائي كي يتم ملؤه بوساطة TBE 1X (Tris-borate-EDTA) وبعدها اغلق غطاء الترحيل ، و تم تشغيل الجهاز ثم مُرر التيار الكهربائي وبقوة 70 فولت و 65 ملي امبير لمدة 60 دقيقة.

7. بعد الانتهاء من عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR بوساطة الأشعة فوق بنفسجية (Transillumator UV).

11.3 التحليل الاحصائي Statistical Analysis

اخضعت نتائج الدراسة الحالية للتحليل الاحصائي باستعمال البرنامج الاحصائي SPSS الاصدار الخامس اذ جرى تطبيق اختبار Chi-square test لهذا الغرض واعتمدت قيمة $P \leq 0.05$ (Levesque,2007) .

الفصل الرابع

النتائج و المناقشة

Results and Discussion

الفصل الرابع

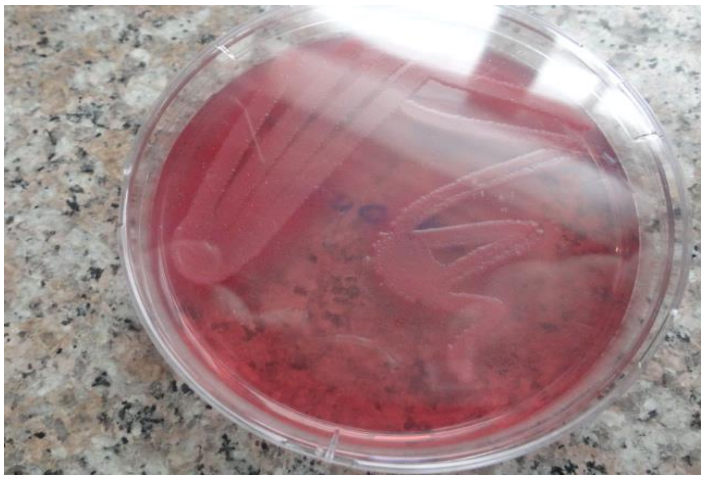
النتائج والمناقشة Results and Discussion

4 . 1 الفحوصات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا الاشريشيا القولونية Morphological and biochemical tests

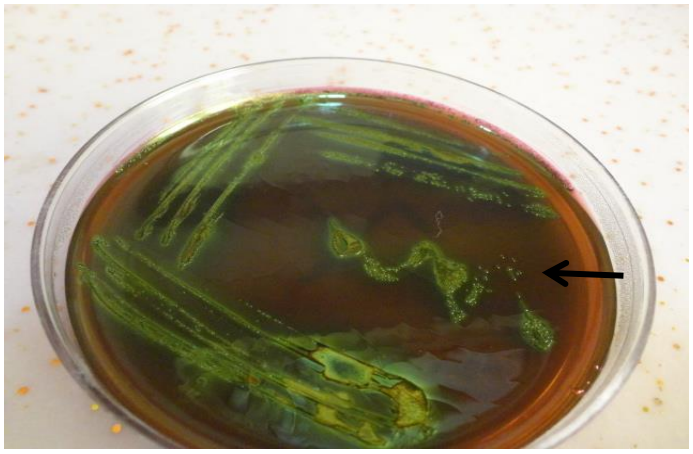
تميزت بكتريا الاشريشيا القولونية التي تم عزلها عن غيرها من المستعمرات البكتيرية بكونها مستعمرات صغيرة او متوسطة الحجم وبدت رطبة على وسط الاكار المغذي وايضا تكون قليلة التحدب ملساء ، اعطت المستعمرات البكتيرية اللون الوردي الفاتح الشفاف على وسط اكار الماكونكي وذلك نتيجة لتخميرها لسكر اللاكتوز وتعد هذه الصفة مهمة جدا" لتشخيص بكتريا الاشريشيا القولونية وتمييزها عن سائر الانواع الاخرى ، اذ يعد وسط اكار الماكونكي وسط اختياري وتفريقي في الوقت نفسه ، يكون وسط اختياري لأنه يحتوي على الصبغة كرستال فيوليت (Crystal violet) التي تعمل على تثبيط نمو البكتريا الموجبة لصبغة غرام وايضا يحتوي على املاح الصفراء (Bile salt) التي تقوم بتثبيط النمو لجميع انواع البكتريا السالبة لصبغة غرام عدا مجموعة البكتريا المعوية ، ويكون اكار الماكونكي وسط تفريقي لأنه يقوم بالتفريق بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز (Hart and Shears,2004:Quinn *et al.*2004) شكل (4 – 1)

واعطت بريق اخضر معدني metallic green sheen على وسط اكار ايوسين المثيلين الازرق (EMB) وفقاً لما وصفه (Quinn *et al.*,2004) شكل (4 – 2) ، ولوحظ عند فحصها بالمجهر الضوئي وتصبيغها بصبغة كرام انها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام (Chees, 2012) شكل (4 – 3) .

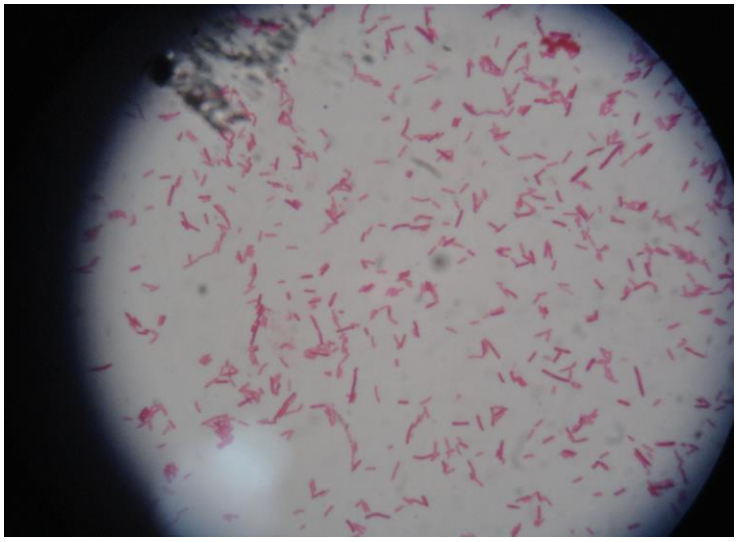
تم اجراء بعض الاختبارات الكيموحيوية في جدول (4 – 1) أعطت بكتريا الاشريشيا القولونية نتيجة ايجابية لإنزيم الكاتليز catalase وذلك عبر اضافة قطرة او قطرتين من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 للمستعمرات البكتيرية ، ان ظهور الفقاعات دلالة على النتيجة الايجابية للبكتريا ، كما اعطت نتيجة سلبية في اختبار الاوكسيديز ، (Hart and Shears,2004) .



شكل (4 – 1) وسط اكار الماكونكي يبين وجود بكتريا الاشريشيا القولونية



شكل (4 – 2) يشير السهم الى وجود مستعمرة بكتريا الاشريشيا القولونية على وسط EMB



شكل (4 – 3) بكتريا الاشريشيا القولونية بصبغة غرام تحت المجهر الضوئي

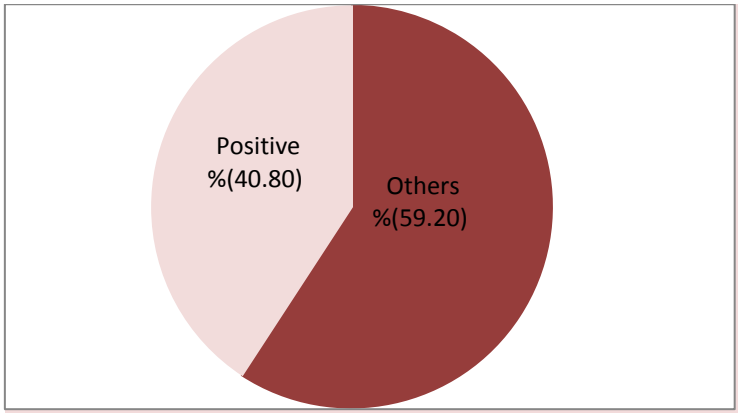
جدول (4 – 1) الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتيريا الاشريشيا القولونية

نوع الاختبار	الاستجابة
شكل الخلايا	عصوي
صبغة غرام	–
اختبار الكاتليز	+
اختبار الاوكسيديز	–
النمو على الماكونكي	+
النمو على وسط EMB	(Metalic green sheen) +

2. 4 العزل والتشخيص Isolation and identification

جُمعت 125 عينة من حليب الأبقار الخام من مختلف ارياف محافظة كربلاء المقدسة ، وامتدت الدراسة من كانون الاول 2018 ولغاية اذار2019 والتي شملت اربع مناطق هي منطقة الزبيلية ، الحسينية ، الهندية و ناحية الحر. تم الحصول على 51 عزلة من بكتريا الاشريشيا القولونية ، فكانت نسبة الاشريشيا القولونية المعزولة من حليب الابقار الخام هي 40.8 % شكل (4 – 4) وتعد هذه النسبة مقاربة للنتائج التي سجلها (Farzan *et al.*,2012) اذ سجل الباحث نسبة 41.5 % من بكتريا الاشريشيا القولونية والتي عزلت من الحليب الخام في ايران ، وفي دراسة اخرى (Soomro *et al.*,2002) سجل الباحث نسبة 57 % من بكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من الحليب الخام في باكستان ، وفي دراسة مشابهة (Ahmed *et al.*,2011). كانت نسبة تلوث الحليب الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في باكستان ايضاً هي 73 % ، بالإضافة الى ذلك كانت نسبة تلوث الحليب الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في تونس 32.5 % (Bali *et al.*,2013) .

ان الاختلاف الملحوظ بين الدراسات يعود إلى الاختلاف في أخذ العينات والأصول الجغرافية المتنوعة للحيوانات و أعداد الحيوانات و تصميم الدراسة و الموسم ويضاف الى ذلك الاختلاف في مستوى الوعي الصحي والثقافي لدى الناس ومدى الالتزام بالشروط الصحية في تربية ورعاية الحيوانات (Godefay and Molla, 2000) .



شكل (4 – 4) نسبة عزل بكتريا الاشريشيا القولونية من الحليب الخام للأبقار

يبين جدول (4 – 2) ان اعلى نسبة تلوث لبكتريا الاشريشيا القولونية والتي تم عزلها من الحليب الخام للأبقار كانت في شهر كانون الثاني بنسبة 35.29 % ، يليها شهر كانون الاول بنسبة 25.49 % ، اما شهر شباط فكانت نسبة التلوث ببكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من الحليب 21.56% ، وسجلت اقل نسبة تلوث للحليب الخام ببكتريا الاشريشيا القولونية في شهر اذار 17.64 % . وبالرغم من وجود تفاوت في النسب المئوية لتواجد بكتريا الاشريشيا القولونية في عينات الحليب باختلاف اشهر السنة الا ان هذا التفاوت لم يكن معنويا بمستوى $P \geq 0.05$.

جدول (4 – 2) عدد العزلات والنسبة المئوية لبكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من الحليب الخام للأبقار حسب اشهر الدراسة

اوقات جمع العينات(شهر)	عدد العينات المعزولة	%	الاشريشيا القولونية	%
كانون الاول	31	%24.8	13	%25.49
كانون الثاني	37	%29.6	18	%35.29
شباط	28	% 22.4	11	% 21.56
اذار	29	% 23.2	9	%17.64
المجموع	125		51	

قيمة مربع كاي = 2.13
درجات الحرية =3
الاختبار غير معنوي عند مستوى احتمالية $P \geq 0.05$

اظهرت الدراسة الحالية في جدول (4 – 3) بانه تم تسجيل أكبر عدد من العينات الملوثة بالإشريشيا القولونية في منطقة الزبيلية بنسبة 16.8 % تليها منطقة الحسينية بنسبة 12.8% ، اما منطقة الهندية كانت نسبة التلوث بالاشريشيا القولونية 6.4 % ، اقل عدد من العينات الملوثة تم الكشف عنها في منطقة الحر بنسبة 4.8 % . اذ لاحظنا عدم وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية $P\geq0.05$ ويعود السبب في ذلك هو ان بكتريا الاشريشيا القولونية هي من اصل برازي اذ تتواجد البكتريا في امعاء الحيوانات وهي تتساقط في البراز ، والتي يمكن أن تكون مصدرًا لتلوث الحليب ، في بعض الاحيان يغطى الضرع بالروث والغبار والاوساخ وفي حالة عدم غسل الضرع والايدي بشكل صحيح قبل الحلب يكون حدوث التلوث امر طبيعي (Swai and Schoonman, 2011).

جدول (4 – 3) النسبة المئوية لبكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من الحليب الخام حسب المناطق

المنطقة	عدد العينات المعزولة	%	الاشريشيا القولونية	%
الزبيلية	51	% 40.8	21	% 16.8
الحسينية	39	% 31.2	16	% 12.8
الهندية	19	% 15.2	8	% 6.4
الحر	16	% 12.8	6	% 4.8
المجموع	125		51	

قيمة مربع كاي = 0.08
درجات الحرية =3
الاختبار غير معنوي عند مستوى احتمالية $P\geq0.05$

ان تلوث حليب الماشية يعزى الى عدة اسباب اهمها قلة النظافة ، تلوث ادوات الحلب واواني جمع الحليب اذ ان اواني الحلب هي ليست مغلقة بشكل صحيح وممكن ان تكون مصدر للتلوث (Swai and Schoonman, 2011) ، وفي بعض الاحيان يستغرق نقل الحليب من القرى الى المدن وقت طويل ولا توجد ترتيبات مناسبة للحفاظ على برودة الحليب ، وفي بعض الاماكن يتم الحلب في الليل ويتم نقل الحليب في الصباح ، وقد يعود الى الخزن لفترات طويلة كل ذلك يعزز نمو الكائنات الحية في الحليب ويمكن أن يكون السبب في ارتفاع معدل انتشار الاشريشيا القولونية في الحليب .كذلك وجود الماشية في حظائر ملوثة وغير نظيفة بالإضافة الى ذلك ارتفاع مستوى الرطوبة في بيوت تربية المواشي فضلا عن عدم نظافة ايدي العاملين واصابتهم بالعديد

من الامراض الانتقالية والتي من اهمها امراض الجهاز الهضمي والتنفسي والتي تعد كمسببات ناقلة للإمراضية عبر حليب المواشي (Solomon *et al.*, 2013) .

3 . 4 الفحوصات الكيموحيوية باستعمال جهاز VITEK 2 Compact

تم اجراء ألفحص التأكيدي للعزلات البكتيرية باستعمال عدة الفحص الخاصة جهاز ViTEK - 2 Compact تحتوي عدة الفحص على 48 نوع من الاختبارات ألكيموحيوية والتي تستعمل في تشخيص البكتريا اذ تصل نسبة دقة ألتشخيص بهذه الطريقة الى 99% (Pincus ,2011) اذ اظهرت النتائج بان كل العزلات والبالغ عددها (51) اعطت نتيجة موجبة تعود لبكتريا الاشريشيا القولونية في هذا الفحص ويوضح الجدول (4 – 4) نتائج الفحص .

جدول (4 – 4) نتائج الاختبارات ألكيموحيوية لتشخيص عزلات *E.coli* في جهاز ViTEK-2

نوع الأختبار	النتيجة	نوع الأختبار	النتيجة	نوع الأختبار	النتيجة
APPA	-	ADO	-	PyrA	-
H2S	-	BNAG	-	AGLTp	-
BGLU	-	Dmal	+	dMAN	+
ProA	-	LIP	-	PLE	-
SAC	+	Dtag	-	dTRE	+
ILATK	-	AGLU	-	SUCT	+
GlyA	-	ODC	+	LDC	+
O129R	+	GGAA	-	IMLTa	-
IARL	-	dGLU	+	dMNE	+
TYrA	+	CIT	-	NAGA	-
IHISa	-	ELLM	-	dCEL	-
GGT	-	URE	-	AGAL	+
BXYL	-	MNT	-	CMT	+
ILATa	-	BGAL	+	OFF	+
BALap	-	dSOR	+	5KG	-
PHOS	-	BGUR	+	Glu	+

+ الاختبار موجب - الاختبار سالب

4 . 4 حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية Susceptibility of bacterial isolates to antibiotics

تم اجراء اختبار الحساسية للعزلات البكتيرية البالغ عددها 51 عزلة بكتيرية باستعمال جهاز VITEK 2 Compact وباستعمال Kit الخاص بالمضادات الحياتية اذ استعملت مضادات حياتية مختلفة التراكيز اتجاه العزلات الجرثومية ، جدول (4 – 5)

يعد جهاز VITEK 2 من افضل الاجهزة للتعرف على انواع الاحياء ألمجهرية بشكل دقيق جدا وفي مدة قصيرة كما يعد من تطوير شركة Biomerieux ألفرنسية ويقوم بتحديد نوع البكتريا وبشكل الي ، كما يتعرف على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام والفيروسات والخميرة بالإضافة لفحص الحساسية للمضادات الحياتية ، ان اهم ما يميز هذا الجهاز انه يستطيع التعرف على الخلايا الحية فقط وباستعمال كارت التعريف ، اذ يتم تحديد مستوى التشخيص للكائن عن طريق خارطة اختباراته وتقارن بالصفات التصنيفية للجهاز فيعطى للكائن نسبة الاحتمالية ومستوى الثقة . اذا كان نسبة الاحتمالية 96-99% فهي تكون عند مستوى ثقة الممتاز ولذلك يكون جهاز VITEK- 2 من اكثر الأجهزة ألمعتمدة حديثا في المختبرات وهو ما اتفق مع دراسة (Mondelli *et al* .,2012) والتي اثبتت بان تقنية جهاز VITEK- 2 تقنية دقيقة وسريعة ، يجب العمل بها في تشخيص الاحياء المجهرية وفي كل المختبرات .

جدول (4 – 5) نتائج اختبار حساسية بكتريا الاشريشيا القولونية للمضادات الحياتية

ت	المضاد الحيوي	المقاوم		الوسطي		الحساس	
		العدد	النسبة%	العدد	النسبة%	العدد	النسبة%
1	Amikacin	10	%19.6	4	%7.8	37	%72.5
2	Aztreonam	13	%25.4	6	%11.7	32	%62.7
3	Cefepime	8	%15.6	4	%7.8	39	%76.4
4	Ciprofioxacin	2	%3.9	1	%1.9	48	%94.1
5	Colistin	0	%0	0	%0	51	%100
6	Gentamicin	9	%17.6	3	%5.8	39	%76.4

%100	51	%0	0	%0	0	Imipenem	7
%100	51	%0	0	%0	0	Meropenem	8
%74.5	38	%13.7	7	%11.7	6	Minocycline	9
%78.4	40	%7.8	4	%13.7	7	Pefloxacin	10
% 88.2	45	% 1.9	1	%9.8	5	Piperacillin/Tazobactam	11
% 82.3	42	% 3.9	2	% 13.7	7	Pipracillin	12
% 5.8	3	% 1.9	1	% 92.1	47	Ticarcillin	13
% 3.9	2	% 5.8	3	% 90.1	46	Ticarcillin /Ciavulanic acid	14
% 70.5	36	% 3.9	2	% 25.4	13	Topramycin	15
% 80.3	41	% 5.8	3	% 13.7	7	Trimethoprim/Sulfamethoxazol	16

جدول (4 – 6) التركيز المثبط الادنى MIC

MIC			اسم المضاد الحيوي Antibiotics
الحساس(S)	الوسطي (I)	المقاومة (R)	
≤16	32	≥64	Amikacin
≤4	8	≥16	Aztreonam
≤ 2	8	≥16	Cefepime
≤ 2	4	≥8	Ceftazidime
≤8	16	≥32	Ciprofloxacin
≤4	8	≥16	Gentamycin
≤1	2	≥4	Imipenem
≤1	2	≥4	Meropenem
≤6	32	≥64	Minocycline

≤16	32 –64	≥128	Piperacillin
≤16/ 4	32/4 -64/4	≥128/4	Piperacillin – Tazobactam
≤8/4	16/8	≥32/16	Ticarcillin
≤16/2	32/2 -64/2	≥128/2	Ticarcillin – Clavulanic acid
≤4	8	≥16	Tobramycin
≤16	32	≥64	Trimethoprim/Sulfamethoxazole

R= Resistant, I=Intermediate and S=Sensitive

(CLSI, 2017)

لوحظ من نتائج هذه الدراسة ارتفاع نسبة مقاومة بكتريا الاشريشيا القولونية لمجموعة مضادات البيتا لاكتام β-lactam اذ كانت مقاومة المضاد الحياتي Ticarcillin بنسبة 92.1 % ، والمضاد الحياتي Ticarcillin Clavulanic acid بنسبة 90.1% كما كانت نسبة المقاومة للمضاد الحياتي Aztreonam هي 25.4% ، اما المضاد الحياتي Cefepime فكانت نسبة المقاومة 15.6% نلاحظ من هذه الدراسة ارتفاع نسبة مقاومة عزلات بكتريا الاشريشيا القولونية اتجاه مضادات المونباكتام والبنسيلينات و السيفالوسبورينات كما يعزى ذلك الى العديد من الاسباب والتي من اهمها قدرة بكتريا *E.coli* على انتاج الانزيمات الحالة لحلقة البيتا لاكتام الواسعة الطيف ESβLs ، تعمل هذه الانزيمات على تحليل حلقة β-lactam (Zurfluh *et al.*, 2015). ان انتاج انزيمات بيتا لاكتاميز (B-lactamases) تعد من اهم اليات مقاومة المضادات الحيوية واصبحت من اهم المشاكل التي تشكل خطراً على القطاع الصحي وبمناطق واسعة من العالم (Chuma *et al.*,2013) .

جاءت هذه الدراسة موافقة مع ما توصلت اليه دراسة في الولايات المتحدة الامريكية (Sarah *et al.*,2006) بارتفاع نسب المقاومة للمضادين الحياتيين Ticarcillin و Ticarcillin / Clavulanic acid اذ بلغت نسبة المقاومة للمضاد الحياتي Ticarcillin 99% والمضاد الحياتي Ticarcillin / Clavulanic acid 99% ايضا.

اظهرت نتائج هذه الدراسة ان نسبة المقاومة للمضاد الحياتي Aztreonam 25.4% وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه (Delveen *et al.*,2016) اذ بلغت نسبة مقاومة المضاد الحياتي Aztreonam 23.8%. وكانت نسبة مقاومة البكتريا للمضاد الحياتي Cefepime 15.6% وهي تتفق مع ما توصلت اليه دراسة في غينيا (Samuel *et al.*,2019) اذ بلغت نسبة مقاومة بكتريا الاشريشيا القولونية للمضاد الحياتي Cefepime حوالي 12.5% في الحليب الخام للأبقار والجمال .

كانت عزلات بكتريا الاشريشيا القولونية حساسة للمضادين Imepenem وMeropenem وبنسبة 100% ويعزى ارتفاع حساسية بكتريا *E.coli* لمضادات الكاربابينيم هو ثبوتها ضد التحلل المائي عن طريق انزيمات البيتا لاكتاميز ، وكذلك بسبب قدرتها على النفاذ عبر الغشاء الخارجي للبكتريا (Hawkey & Munday,2004) وكانت هذه النتائج متفقة مع دراسة اجريت في تايلاند (Woranich *et al.*,2017) اذ بلغت نسبة الحساسية للمضادين Meropenem و Imipenem 100% لكل منهما. كما تتفق الدراسة مع دراسة اجريت في المملكة العربية السعودية (Naiyf *et al.*,2018) اذ بلغت نسبة حساسية البكتريا للمضادين Meropenem و Imipenem 100% لكل منهما في الابقار التي تعاني من التهاب الضرع تحت السريري ، وتتفق ايضا مع دراسة اجريت في الهند (Kunal *et al.*,2018) اذ بلغت نسبة حساسية البكتريا للمضاد Imipenem 100% .

اظهرت النتائج حساسية البكتريا للمضاد الحياتي Ciprofloxacin وبنسبة 94.1 % لامتلاكه طيف واسع من الفعالية ضد بكتريا الاشريشيا القولونية بسبب تأثيره الفعال على تصنيع DNA وكذلك قدرته العالية على اختراق جدار الخلية ونفوذه الى داخل البكتريا (Anvarinejad *et al.*,2011). وجاءت هذه النتائج موافقة مع ما توصلت اليه دراسة في كندا (Angela *et al.*,2011) اذ كانت نسبة الحساسية للمضاد الحياتي Ciprofloxacin 96.2% وجاءت هذه الدراسة مقاربة لما توصلت اليه دراسة في اثيوبيا (Haftay *et al.*,2017) اذ بلغت نسبة الحساسية للمضاد الحياتي Ciprofloxacin 90% .

اظهرت نتائج مقاومة بكتريا الاشريشيا القولونية لمجموعة Aminoglycosides نسبة 19.6 % للمضاد الحياتي Amikacin ونسبة 17.6 % للمضاد الحياتي Gentamycin ونسبة 25.4 % للمضاد Topramycin كما يعزى سبب مقاومة البكتريا لهذه المضادات امتلاكها للإنزيمات التي تشفر لها عن طريق بلازميدات متنقلة تعمل على تحوير المضاد او تعمل على

تغيير موقع الهدف والذي يمثل Subunit-30وحدة رايبوسومية صغيرة (Zorn *et al.*,2005) جاءت هذه النتائج متقاربة مع دراسة اجريت في مصر (Rashid *et al.*,2013) اذ كانت نسبة مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية Amikacin وGentamycin هي 20% و نسبة مقاومة المضاد الحياتي Topramycin 28 %. ولا تتفق هذه الدراسة مع ما توصلت اليه دراسة في بنغلادش (Rahman *et al.*,2017) اذ بلغت نسبة مقاومة المضادات الحياتية Gentamycin ، Amikacin 0 %. وهي لا تتفق ايضا مع ما توصلت اليه دراسة في العراق (Mohammed *et al.*,2016) اذ بلغت نسبة مقاومة المضاد الحياتي Gentamycin 80% ونسبة مقاومة المضاد الحياتي Amikacin 0 %.

نلاحظ ان البعض من المضادات الحياتية المستعملة في الدراسة تمتلك نسبة مقاومة عالية وربما يعود سبب ذلك للاستعمال الواسع للمضادات الحياتية وقلة الوعي الصحي بين الافراد (Syit,2009).

بالإضافة الى ذلك فإن ما يقارب نصف المضادات الحياتية التي تنتج في الدول الصناعية تستعمل لأغراض زراعية وتستعمل في تدعيم الأغذية للحيوانات كالأبقار ، اذ تستعمل لأغراض العلاج أو لتحفيز نمو الحيوان أو للوقاية من الإصابات او لزيادة الإنتاج (Bergogne-Berezin,1997).

4 . 5 التحري عن جينات *LT* و *ST* التابعة لسلالة ETEC

بعد ان اجري تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل لعزلات بكتريا الاشريشيا القولونية لتحديد جينات *ST* المسؤولة عن انتاج سموم Stabile toxins وجينات *LT* المسؤولة عن انتاج سموم Labile toxins المنتجة من عزلات ETEC و باستعمال بادئات نوعية تستهدف جينات *ST* و جينات *LT* من قبل شركة Bioneer الكورية من اجل التحري عن احتواء عزلات بكتريا الاشريشيا القولونية على احد هذين الجينين او كلاهما كونهما من أهم عوامل الفوعة التي تمتلكها بكتريا ETEC (Kaper *et al.*,2004) . أظهرت النتائج بعد ترحيل ناتج التضاعف على هلام الأكاروز و تحت الأشعة فوق البنفسجية ان 7 عزلات بكتيرية من اصل 51 عزلة كانت تحتوي على جين *ST* وبنسبة 13.7 % و 2 عزلات بكتيرية من اصل 51 عزلة تحتوي على جين *LT* وبنسبة 3.9 % شكل (4 – 5) .

تعد *E coli* Enterotoxogenic من اهم سلالات *E coli* المنتجة للذيفان المعوية ST وLT وهي من عوامل الفوعة والتي تكون مسؤولة عن ظهور الأعراض الرئيسية في الإصابات البكتيرية والتي تتسبب في حدوث ما يقارب 280 – 400 مليون حالة اسهال سنويا خصوصا في الاطفال دون سن الخامسة في البلدان النامية بسبب تناول الغذاء والمياه الملوثة (Nicklasson, 2008).

ان هذه السموم تشفر من قبل جينات *ST* , *LT* على التوالي (Wani *et al*,.2006) وتعد من عوامل الضراوة الرئيسية اذ تعمل على تقليل قابلية الامعاء على امتصاص الصوديوم وتسبب الافراز الشديد للماء وايونات الكلوريد وتتسبب في حدوث حالات الاسهال الخطيرة والتي قد تؤدي الى حدوث الوفاة (Kolenda *et al*.,2015).

تقنية PCR من أدق واسرع الطرق للتحري عن الجينات المشفرة للذيفانات المعوية الثابتة ST وغير الثابتة بالحرارة LT (Weagand *et al*.,2000).

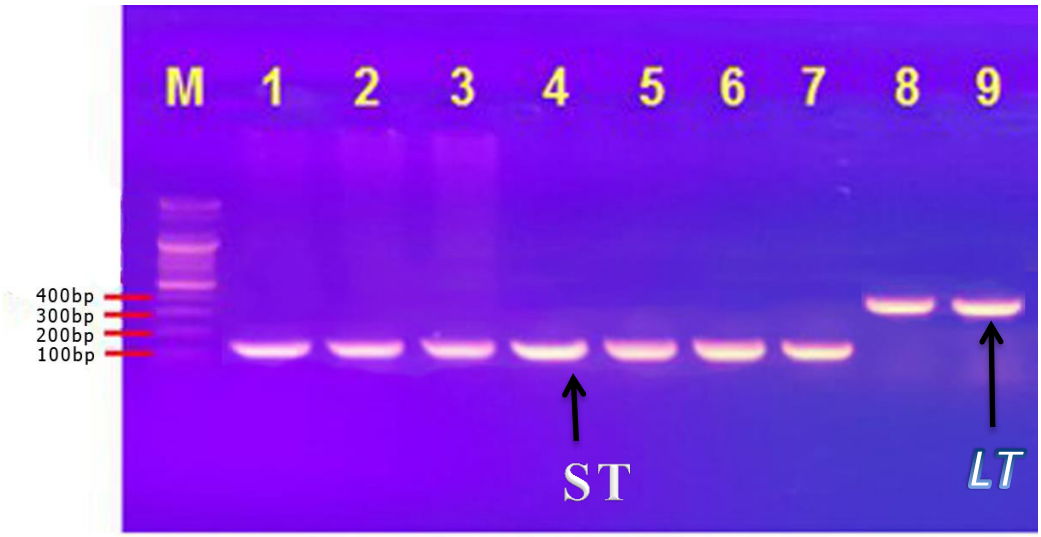
احرزت تقنية PCR المرتبة الاولى في تشخيصها لبكتريا ETEC من ناحية الوقت اذ استغرقت اربع ساعات بعد العزل الاولي المباشر مقارنة بالتشخيص بجهاز Vitek- 2 الذي يستغرق يوماً كاملاً لتشخيص البكتريا بعد العزل الاولي ، اما الزرع البكتيري بالطرق التقليدية أستغرق ما يقارب 4 أيام شكل (3 – 2).

وجاءت نتائج الدراسة الحالية لتؤكد بأن نسب تواجد العزلات البكتيرية ETEC والحاوية على جين *ST* هي نسبة قليلة فضلاً عن نسب تواجد الجين *LT* كانت اقل بكثير في العينات ، وهذا ما اوضحته دراسة قام بها (Bonyadian *et al.*, 2014) اذ وجد بان عدد العزلات الحاملة للجين *ST* كانت 12 من اصل 120 عزلة وبنسبة 10% و 2 من اصل 120 عزلة وبنسبة 2% كانت تحمل الجين *LT* .

كما ان الدراسة التي قام بها (Amin *et al*.,2017) في مصر اوضحت ان عزلة واحدة من مجموع 124عزلة كانت حاوية على جين *ST* وافتقار العزلات الى الجين *LT* .

اما الدراسة التي جاء بها (Jamal *et al* .,2018) والتي اجريت في مصر ايضاً وجد بان عدد العزلات الحاملة جين *ST* 31 عزلة من اصل 34 وبنسبة 91 % وافتقار العزلات الى الجين *LT*.

وفي دراسة اجريت على الاجبان ومشتقات الحليب في البرازيل (Paneto *etal*.,2007) كان عدد العزلات التي تحمل جين *LT* عزلة واحدة فقط من اصل 41 عزلة وبنسبة 2% في حين لم تظهر النتائج عن وجود جين *ST* في العينات المعزولة اذ كانت نسبة وجود الجين *ST* 0 %.



شكل (4 – 5): الترحيل الكهربائي لناتج تضخيم الجينين *LT* و *ST* باستعمال تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل على هلام الأكاروز بتركيز(1%) وفرق جهد 70 فولت / سم^2 ومدة ساعة واحدة. اذ توضح M حجم DNA ladder ، الحفرة (1 – 7) تمثل العينات الموجبة بناتج PCR Product الخاصة بجين *ST* طوله 121bp، الحفرة (8 – 9) تمثل العينات الموجبة بناتج PCR Product *LT* طوله 360 bp .

الفصل الخامس

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions

and

Recommendations

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Consclusions and Recommendation

1. 5 الاستنتاجات Conclusions

1 - ان وجود سلالات ضارية لل *E.coli* (ETEC) في حليب الابقار الخام في ارياف محافظة كربلاء المقدسة يعد خطرا كبيرا على الصحة العامة.

2 - مقاومة عزلات بكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من حليب الابقار الخام للمضاد الحياتي Ticarcillin بنسبة عالية ، وحساسيتها للمضادات Imepenem وMeropene و Colistin وتباينت مقاومتها لباقي المضادات الاخرى.

3- قلة تواجد جيني *ST* و *LT* في عزلات الاشريشيا القولونية في محافظة كربلاء المقدسة.

4- تعد البوادئ المصممة والمستعملة في البحث متخصصة في الكشف عن جينات *LT* و *ST*.

2. 5 التوصيات Recommendation

1- هناك حاجة إلى دراسة لتوصيف جميع السلالات المسببة للأمراض من الاشريشيا القولونية في الحليب والكشف عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الفوعة والمقاومة للمضادات الحياتية عبر التقنيات الجزيئية الأخرى مثل RFLP وReal time PCR.

2 - ينبغي إجراء المزيد من الدراسات للكشف عن جميع مسببات الأمراض الحيوانية المنشأ التي يمكن أن تشكل خطرا محتملا على الصحة العامة عن طريق استهلاك الحليب الملوث غير الاشريشيا القولونية .

3 - من الضروري مراقبة استعمال المضادات الحياتية في تربية الحيوانات والعلاج البشري لتقليل تطور مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية .

4 - دراسة مدى انتشار عزلات بكتريا الاشريشيا القولونية في الحليب خلال عام كامل ومقارنة نسب تواجدها في اشهر السنة .

References

A

Abubakari, A.; Amoah, I.D.; Essiaw-Quayson, G.; Larbi, J.A.; Seidu, R. and Abaidoo, R.C. (2015). "Presence of pathogenic *E. coli* in ready-to-be-eaten salad food from vendors in the Kumasi Metropolis, Ghana , Afr. J. Microbiol. Res., 9 (21): 1440-1445.

Adachi, J. A; Jiang, ZN and Mathewson, J.J. (2001). Entero aggregative *Escherichia coli* as a major etiological agent in traveler's diarrhea in three regions of the world. 5(32):1706-1709.

Afset, J. E and Bevanger, L.; Romundstad, P. and Bergl, K. (2004). Association of atypical entero pathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. J. Med. Microbiol. 53:1137-1144.

Ahmad, N.; Rahman, U.; Ali, L.; Malik, A.P.; Safeer, M. and Ubaidullah, M. (2011). Contamination of raw milk with *Escherichia coli* sold in Peshawar university campus and adjacent area. J. Vet. Med. 3(2): 72-75.

Al-Gosha'ah,F. A. S.(2005). Studying the Effect of Inhibitory Substances produced by *Saccharomyces boulardii* on virulence factor of some enteric bacteria. Degree of Doctorate College of Science Council, Al-Mustansiriyah.

Altalhi, A.D. and Hassan, S.A. (2009). Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. Food Control, 20: 913–917.

Amin, W.F. ;Ahmed, E.H. ; Embarak, M.S. ; Abo-Shama, U.H. ; Thabit,A.G.and S.Y. Ismai**.(2017).**Molecular detection of Enterotoxigenic *E. coli* in raw Milk and Milk Products. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences ,6 (11): 856-864.

Angela,K.;Richard,J.;Reid,s.;Rebecca,J.I.;Scott,A.M.;Virginia,Y.;Kelly,B.and Carl,R.(2011). Antimicrobial Resistance-Fed Vel Meat from Southern Ontario,Canada.Journal of food protection,74(2):1328-1333.

Anvarinejad, M.; Farshad, S.; Alborzi, A.; Ranjbar, R.; Giammanco, G M. and Japoni, A. (2011). Integron and genotype patterns of quinolones-resistant uropathogenic Escherichia coli. African Journal of Microbiology Research, 5(22), 3736-3770 .

Arora, B.(2007). Practical Microbiology .CBS Publishers and Distributors, India .pp.40-49.

Atlas, R, M. (2010). Handbook of microbiological media. CRC; 4th ed. United State of America.

Atlas, R.; Parks, L. and Brown, A. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. 1st ed. Mosby. Co. USA; P: 68-244, 256, 537,539.

B

Bagheri, S.; Mousavi Gargari SL; Rasooli, I.; Nazarian , S.and Alerasol M. (2014). A CssA, CssB and LTB chimeric protein induces protection against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Braz. J. Infect. Dis18(3):308-341.

Bali, O.S.; Lajnef, R.; Felfoul, I.; Attia, H. and Ayadi, M.A. (2013). Detection of *Escherichia coli* in unpasteurized raw milk. International Journal of Agricultural and food Science,3(2):53-55.

Baliére, C. (2016), "Les Escherichia coli potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC", Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 179p, available at (https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01505750/document) accessed June: 20,2017.

Bergogne-Berezin E.(1997). Antibiotic resistance.J.Med.Microiol.46:461

Berkley, J. A.; Lowe, B. S. and Mwang. I. (2005). Bactermia among children admitted to a rural hospital in Keny a. N. Engl. J. Med; 352:39-47.

Bertu, W.J.; Dapar, M.; Gusi, A.M.; Ngulukun, S.S.; Leo, S. and Jwander, L.D. (2010). Prevalence of Brucella antibodies in marketed milk in Jos and environs. African Journal of Food Science 4(2): 062 – 064 .

Bettelheim. Ka. (1996). EHEC-A new problem an old group of organisms. J. Australian Veterinary. 73(1): 20-2.

Blake, K.L.; Randall, C.P. and O'Neill, A.J. (2011). In vitro studies indicate a high resistance potential for the lantibiotic nisin in Staphylococcus aureus and define a genetic basis for nisin resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55(5): 2362-2368.

Bonyadian, M.; Bonyadian, M.; Moshtaghi, H. and Taheri, M.A. (2014). Molecular characterization and Antibiotic resistance of entero toxigenic and entero-aggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. 5(1):29-34.

Boundless.(2014). Type of plasmid and their biological significance.Type of plasmids and their biological significance Boundless microbiology.

Brooks, G. F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology (22nd ed). McGraw- Hill. U.S.A. pp.197-202.

Brook, G. F., Butel, J. S. and Mores S. A. (1998). Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 21st ed. Appleton and Lange, California .

Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Mores, S. A. (2004). Medical microbiology. Jawetz and Menick and Adelbergs (eds). 23rd Appleton and Lange, USA, PP: 250-252.

Brooks, G., Butel, J., Carroll, K. & Morse, S. (2007). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. McGraw-Hill. NewYork. U.S.

Brown,T.A.(2010). Vectors for Gene cloning plasmid and Bacteriophage Gene cloning and DNA Analysis An Introduction. (6th.ed). Wiley-Blackewll.

Bukuku, J.N. (2013). Awareness of health risks as a result of consumption of raw milk in Arusha City and Meru District, Tanzania. Unpublished dissertation for award of MSc. degree at Sokoine University of Agriculture, Morogoro, Tanzania.pp1 – 89.

C

Chandan, R.(1997). Dairy based ingredients. Newer knowledge of dairy foods.

Chart, H.(2002). *Escherichia,*cha 26.In Daud G.W. ;Richard,S. and John,F.P.,Medical Microbiology AGuide to Microbial In fections :pathogenesis, Immunity ,Laboratory Diagnosis and control (16^{th}) ed .

Chess, T.(2012). Microb.18thedition.McGrowHill.United States**.**

Christidis, T.; Pintar ,K.D.; Butler, A.J.; Nesbitt, A.; Thomas, M.K.; Marshall, B. and Pollari, F. (2016). *Campylobacter spp*. Prevalence and Levels in Raw Milk: A Systematic Review and Meta-Analysis. International Journal of Agricultural and Food Science.79(10):1775-178.

Chuma, T.; Miyasako, D.; Dahshan, H.; Takayama, T.; Nakamoto, Y .; Shahada, F. and Okamoto, K. (2013). Chronological change of resistance to β-lactams in Salmonella enterica serovar Infantis isolated from broilers in Japan. Frontiers in microbiology, 4 :113-124.

Clarke SC. 2001. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem Diag Microbiol InfectDis; 41:93-98.

Clavijo, A.P.; Bai, J. and Gomez-Duarte, O.G. (2010). The longus type IV pilus of enterotoxogenic *Escherichia coli* (ETEC) mediates.5:112-123.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institue. (2017) Perfornance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seven Informational Supplement. CLSI Document M 100-7^{th} ed . Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institue.

Collins , C.H.; Lyne , J.M.G. and Falkinhan ,J.O. (2004). Microbiological Methods g^{th} ed .Arnold .London.

D

Delveen, R. I.; Christine, E. R. D. ; Dov, J. S. , Stephen, J. R. and Jon, L. H.(2016). Multidrug resistant, extended spectrum β-

lactamasproducing - (ESBL) *Escherichia coli* isolated from dairy farm. School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Sutton Bonington, Loughborough,Leicestershire, Leicestershine LE12 5RD, UK.

Dionisio, F.; Matic, I. ; Radman, M.; Rodrigues, O. R. and Taddei, F. (2002). Plasmids spread very fast in heterogenous bacterial communities . Genetics . 162:1525-1532.

Donkor, E.S.; Aning, K.G. and Quaye, J. (2007). Bacterial contaminations of informally marketed raw milk in Ghana. Ghana Medical Journal41(2):58–61.

Donnenberg. M. S. and Nataro, J. P. (1995). Methods for studying adhesion of diarrheagenic *Escherichia coli*: methods enzymol. 253:324-36.

Dorner,F.; Jakche, H. and Stocks,W. (**1976**). *Escherichia coli* enterotoxin: purification partial characteriztion and immunological observation.J.Infect.Dis.133:142-156.

Doyle, M. P; Beuchat, L. R. ; and Montiville, I. J. (1997). Food microbiology: fundamentals and frontiers. Asm press Washington D. C. basis for dissemination of arm A. J. Antimicrob Chemother 56:583-585.

E

Enayat , K.;Sohili, F;Salimi,H; Soltan, D. and Mohammad, M .(2011).*Escherichia coli* pathotypes obtained from children with acute diarrhea. Frequency, antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of JJM. 4 (1) 23-28.

F

Farzan, R.; Rahimi, E. and Momtaz, H. (2012). Virulence properties of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Iranian raw milk and dairy products .Slovenian Veterinary Research,49(4):159-66.

Feng, P. and Weagant, S.D.(2002). Diarrheagenic *Escherichia coli* In Bacteriological Analytical Maunal online Chp4.

Feng. P. and Weagant, S. D. (2011). Bacteriological analytical Manual U. S. Food and Drug Administration. J. Vet. Med. 3(2): 71-76.

Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic microbiology. Bailey& Scott1s Diagnostic Microbiology, 11(1),11-14.

Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G. (2007) . Wine microbiology practical applications and procedures . 2nd. ed. Springer . New York .

G

Gamal, Y.; Amal, A. and Reem, G.(2018). Prevalence and virulence determinants of *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk. African Journal of Microbiology Research. 12(9): 225-229.

Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R. and Staley, J. R. (2005). Bergey's Manual of systematic bacteriology, the proteobacteria part: B : the gamma proteobacteria 2nd ed. New York , Springer . 2607-624.

Gerdes, K., Rasmussen, P. B., & Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 83 (10), 3116-3120.

Giannella, R.A.(1995). *Escherichia coli* heat. stable enterotoxins, guanylins and their receptors: what are they and what do they do? J. Lab clin Med. 125: 173081 .

Gill, M.; Evans ,D.J.; and Evans ,D.G.(1976). Mechanism of activation of adenylate Cyclase in vitro by polymyxi n-released-heat Labile enterototoxin of *Escherichia coli.* J. Infect.133: 103-5107.

Godefay, B. and Molla, B. (2000). Bacteriological quality of Raw Milk from Four Dairy Farms and Milk Collection Center and Around Addis Ababa. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 113: 1-3.

Gruetzmacher , I.; Tomas, J. ; Bradly ,F. and Robert , J.R. (1999). Identification and control of processing variables that affect the quality and safety of fluid milk .Journal of Food Protection, 62 (60): 625-631.

Guth D.E.C.(2000). Enterotoxigenic *Escherichia coli.* An over view. Mem lnst Oswaldo Cruz. 95 (1) : 95-99 .

Gyles, C.L. and Barnum, D.A. (1967). *Escherichia coli* in ligated segments of pig intestine.J.Pathol.Bacteriol.94:189-194.

H

Haftay , A . T .; Netsenet, B . G.; Kidane, W.; Hagos, H.; Seyfe, G.; Abrha, B. and Habtamu,T .(2018). Antimicrobial Resistance Profile of *E. coli* Isolated from Raw Cow Milk and Fresh Fruit Juice in Mekelle, Tigray, Ethiopia.7pp.

Hall,M.M.,Finnoff, J. T., & Smith, J. (2011). Musculoskeletal complications of fluoroquinolones: guidelines and precautions for usage in the athletic population. 3(2), 132-142.

Harding, F. (1999). Milk Quality. Firest edition, Chapman and Hall. Food Science Book, pp 102-104.

Hart, H. and Shears, P. (2004). Color atlas of medical microbiology. 2nd ed, an imprint of Elsevier limited .97:133-138.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997) . Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Molecular microbiology, 23(6), 1089-1097.

Hawkey, P. and Munday, C. (2004). Multiple resistance in Gram-negative bacteria. Lippincott Williams and Wilkins. Rev. Med. Microbiol 15(2),51-61.

Holt ,J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; and Williams, S.T.(1994). Bergy, Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed.

Horstman, A.L. and Kuchn, M.J.(2000). Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes Active Head-Labile Enterotoxin via outer membrane vesicles .J. Biol chem. 275 (17): 12489-12496 .

Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Crowley, J. R., Heuser, J., ... & Hultgren, S. J. (2013). Escherichia coli biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure . 4(5): 45-63.

I

International Dairy Federation (1986). Pasteurization. International. Dairy Federation, Bulletin No. 200.

International Dairy Federation (1993). Catalogue of tests for the detection of ppc of milk. Bulletin No. 281.

International Dairy Federation (1994). Pasteurization and Other Heat Treatment Processes in: Recommendation for the hygienic manufacture of Milk and Milk Based Products. Bulletin of the International Dairy Federation N 292/1994. information al supplement M100-S24. 34 (1): 58-172.

J

Jacoby, G.A. and Sutton, L. (1985). β -Lactamases and β-Lactam resistance in *E . coli* Antimicrob. Agents. Chemother, 28(5): 703-705 .

Jamal,Y;Amal,A.and Reem , G.(2018). Prevalence and Virulence determinants of *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk. African Journal of Microbiology Research,12(9):225 – 229.

Jandu, N.; Ho, N. K. L.; Karmali, M. A.; Mascarenhas, M. and Tailor, C. (2009). Entero hemorrhagic *Escherichia coli* O157 expression profiling in response to gene presence of host epithelial. Journal List. 4(3):48-89.

Jewell, S. N. (2000). Purification and characterization of anoval protease from Burkholderia strain 2.2 N. MSc. Thesis Virginia polytechric Institue and State University. Blacksbury. Virginia; P:6,7,11,24,49,52 .

Johnson, J. R. and Obryan, T. T. (2004). Detection of the *Escherichia coli* groups 2 polysccharide capsule synthesis gene Kps M by a rapid and specific PCR based assay. Journal. clin. Microbiol; 42(4): 1773-1776.

K

Kaper, J.B.; Nataro, J.P. and Moble , H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli.* Microbiol. 2: 123-140.

Katakweba, A.A.S. (2014). Prevalence and molecular studies of antimicrobial resistance in bacteria from farm animals, wildlife, pets and humans in Tanzania. Thesis for award of degree of Doctor of Philosophy (PhD) at Sokoine University of Agriculture, Morogoro, Tanzania. pp. 1 – 243 .

King, M. R.; Vimr, R. P.; Steenbregen, S. M.; Spanjaard, L.; Plunkett, G.; Blantner. R. and Vinr, E. R. (2007). *Escherichia coli* K1-specific bacteriophage cus-3 distribution and function in phase-variable capsular polysialic acid O acetylation. J. Bacteriol; 189(17): 6447-6456.

Kolenda, R.; Burdukiewicz, M. and Schierack, P. (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli.* Front Cell Infect. Microbiol.5:23.

Koneman, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnosti**c** Microbiology. (4^{th}) ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia.

Kumar, S. S; Sankarang, K.; Haigh, R.; Williams, P. H. and Balakrishnan, A. (2001). Cytopathic effects of outer-membrane. Preparation of Entero pathogenic *Escherichia coli* and Coexpression of maltoporin with secretory virulence factor, ESPB. J. Med. Microbiol; 50:602-612.

Kunal, B.; Abhiroop, B.; Susmita, P.; Samir, D. ;Siddhartha, N. J. ;Indranil, S.; Devi, P. I. and Abhishek, D. S.(2018). Detection, characterization, and antibiogram of extended-spectrum beta-lactamase

Escherichia coli isolated from bovine milk samples in West Bengal, India, India, Veterinary World, 11(10): 1423-1427 .

Kurwijila, L.R.; Omore, A.; Staal, S. and Mdoe, N.S.Y. (2006). Investigation of the risk of exposure to antimicrobial residues present in marketed milk in Tanzania. Journal of Food Protection 69: 2487 – 2492.

L

Laba, S.A. and Udosek, C.E. (2013). Bacteriological quality of raw cow milk in Ilorin, North Central Nigeria. Nat. Sci. 11(10):73-79.

Levesque, R. (2007) . SPSS Programming and Data Management , (4^{th}) ed. Chicago .522.

Levinson ,W. and Jawetz ,E . (2000) . Medical Microbiology and Immunology examination and board review . Appleton and lange U.S.A.

Richard, S. **Lewis, M.J. (1997)**. *Escherichia* chp.27: In David, GW; and John, F.P.; Medical Microbiology A Guide to Microbial Infection: Pathogenes. Immunity, Laboratory Diagnosis and controls (15^{th}) ed .

M

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

Mandell, G. H.; Bennett, J. E. and Dolin, R. (1995). Mandell, Douglas and Bennetts principles and practice of infections Disease. 4th ed. Churchill Livingstone. Inc. USA; PP: 233-271.

Mdegela, R.H.; Ryoba, R.; Karimuribo, E.D.; Pire, E.J.; Løken, T.; Reksen, O.; Mtengeti E. and Urio, N.A. (2009). Prevalence of clinical and subclinical mastitis and quality of milk in smallholder dairy farms in Tanzania. Journal of the South African Veterinary Association 80(3): 163 – 168 .

Mohammed, M. J .; Hussein, o.; Salwa k. k. and Anaam, M.(2016). Isolation and Identification of toxigenic strains of *E.coli* from local cheese and evaluate their resistance to antibiotics . Kufa Journal For Veterinary Medical Science.7(1).

Mosalagae, D.; Pfukenyi, D.M. and Matope, G. (2011). Milk producer's awareness of milk-borne zoonoses in selected smallholder and commercial dairy farms of Zimbabwe. Tropical Animal Health and Production 43: 733 – 739.

N

Naiyf, S. A .; Jamal M.K.; Shine, K. ;Ahmed, S. A. ; Anwar, H. S .;Sami, A. A .; Taghreed, N. A. ;Mohammad, A. A. and Muhammed, R.S.(2018). Prevalence of *Escherichia coli* strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk. Saudi Journal of Biological Sciences .

Nicklasson, M. (2008). Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in Entero toxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Inst of Biomedicine. Dept of Medical Microbiology and Immunology, PhD thesis.

Normark, B.H. and Normark, S.(2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. J. Intern. Med. 252:91-106 .

O

Odumosu, B. T.; Adeniyi, B. A. and Chandra, R. (2013). Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest, Nigeria. Annals of clinical microbiology and antimicrobials12(1): 29-45.

P

Pandey, G.S. and Voskuil, G.C.S. (2011). Manual on Milk safety, quality and hygiene. Golden Valley agricultural Research Trust, Zambia. 52pp.

Paneto ,B.R.; Schocken -Iturrino,R.P.; C. Macedo,C.; SantoI,E.and Marin ,G.M.(2007). Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 59(2) : 508-512.

Parekh, T.S. and Subhash, R. (2008). Molecular and bacteriological examination of milk from different milk animals with special reference to Coliforms. Current Research in Bacteriology 1(2): 56 – 63.

Patel, J.B.; Cockerill, F.R.; Bradford, P.A.; Eliopoulos, G.M.; Hindler, J.A.; Jenkins, S.G.; Lewis, J.S.; Limbago, B.; Miller, L.A.; Nicolau, D.P.; Powell, M.; Swenson, J.M.; Traczewski, M.M.; Turnidge, J.D.; Weinstein, M.P. and Zimmer, B.L. (2015). Clinical and Laboratory Standard Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Document . M100-S25. CLSI, Wayne, Pa , USA. p1-240 .

Peleg, A.; Shifrin, Y; Ilam, O.; Nadler-Yona C.; Nov, S.; Koby; S.; Baruch, K.; Altuvia, S.; Elgrably -Wess, M.; Abe; C. M.; Knutton, S.; Saper, M. A. and Rosenshine, I. (2005). Identification of and *Escherichia coli* operon required for formation of the O-antigen capsule. J. bacteriology; 187(15): 5259-5266.

Pesavento, G.; Ducci, B.; Comodo, N. and Nostro, A.L. (2007). Antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Escherichia coli* (MRSA). Food Control 18: 196-200 .

Pfeifle , D. ; Janas , E. and Wiedemann , B. (2000). Role of penicillin – binding proteins in the initation of the Ampc –β– lactamase expression . J. Antimicrob . Agent . Chemother . 44:169-172.

Pincus, D. H. (2011) . Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek® 2 System . bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA . 1: 1-32.

Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw-Hill companies. Inc. New York; pp 2719-2725 .

Q

Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B.; and Carter, G. R. (2004). Clinical Veterinary Microbiology, Elsevier limited .

Quiros, Y., Vicente-Vicente, L., Morales, A. I., López-Novoa, J. M., &

López-Hernández, F. J. (2010). An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. Toxicological Sciences, 119(2), 245-256.

R

Rahman, M. A.; Rahman, A. K. M. A.; Islam, M. A. and Alam ,A.A.(2017). Antimicrobial resistance *Escherichia coli* isolated from milk , beef and chicken meat in Bangladesh. Bangl. J. Vet. Med. 15 (2): 141-146.

Rao, M. B.; Tankscale, A. M.; Chatge, M. S. and Desshpande; V. V. (1998). Molecular and Biotechnology aspects of Microbiol Protease. J. Clin. MicrobioL; 62(3): 597-635.

Reed, J. L. (2005) . Model driven analysis of *Escherichia coli* UC San Diego Electronic Thesis and Dissertations . Schoolarship university of California . USA.

Rehman MU, Rashid M, Sheikh JA, Bhat, MA (2014). Molecular *Escherichia coli* isolated from bovines and their handlers in Jammu. India. J. Adv. Vet. Anim. Res. 1(4):177-181.

Rezai, **M.S., Salehifar, E., Rafiei, A., Langaee, T., Rafati, M., Shafahi, K. & Eslami, G. (2014) .** Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in north of iran . Biomed Research International . 23: 4847-4861.

Rocha-De-Souza, C.M.; Colombo, A. V.; Hirata, R.; Mattos-Guoraldi; A. L.; Monterio-Leal, L. H.; previato, J. O; Freitas, A. C. and Andrade, A. F. B. (2001). Identification of a 43-kDa outer-membrane protein . J. Med. MicrobioL; 50:313-319.

Saeed, A.M.; Magnuson, N.S.; Srirangana, N.; Burger, D. and Cosand, W. (1984). Molecular homogeneity of heat-stable enterotoxins

produced by bovine Entero toxigenic *Escherichia coli* .Infect .Immun; 40 (2): 701-707.

Samuel ,M.N.;Joseph, W. M.; Bockline, O. B. and Christian,H.(2019). Prevalence of β-haemolytic multi-drug resistant *E. coli* in cow and camel milk in Kenya. J .of Consumer Protection and Food Safety; 14(1) : 55–61.

Santona, S., Diaz, N., Fiori, P. L., Francisco, M., Sidat, M. Cappuccine-lli, P. & Rappelli, P. (2013) . Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic Escherichia coli isolated in industrialized and devel-oping countries . J. Infect. Dev. Ctries. 7 (3) : 214 - 219 .

Schito, G. (2006). The importance of the development of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Infect. 12(1): 3-8.

Sarah, C. D.; Beth A. S. ; Narasimha, V.H ; Ashish, A. S ; Chitrita, D. and Bhushan M. J.(2006). Molecular Epidemiology of Ceftiofur-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Dairy Calves. Microbiol. 72(6): 3940–3948.

Servin, A.L.(2005). Pathogenesis of Afa /Dr diffusely adhering *E. coli.* Clin. Microbiol. Rev. 18(2):264-292

.

Selimovic, B. M., Babic , T., kocic, B., stojanovic, P., Ristic, L. & Dinic, M. (2007) . Bacterial Plasmid . Acta medica Medianae ; 46 (4):61-62.

Sharma, D.; Sharma, P.K. and Malik, A. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of drug resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk of dairy cattle. International Research Journal of Microbiology 2(11): 466 – 470 .

Schmitt,C.K.; Meysick, K.C. and O'Brien ,A.D. (1999). Bacterial Toxins: Friends or Foes?. Emer. Infect. Dis. Ma r-Apr. 5(2).

Shirima, G.M.; Fitzpatrick, J.; Cleaveland, S.; Kambarage, D.M.; Kazwala, R.R.; Kunda, J. and French, N.P. (2003). Participatory survey on zoonotic diseases affecting livestock keeping communities in

Tanzania. Journal of Animal and Veterinary Advances 2(4): 253 – 258.

Shitandi ,A.(2004). Risk factors and control strategies of antibiotic residues in milk at farm level in Kenya. Thesis for award of degree of Doctor of Philosophy (PhD)at the Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 36pp. ISSN 1401-6249. ISBN 91-576-6477-3.

Sivapalasingams, S., Friedman, C.R., Cohen, L. and Tauxe, R.V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States. Journal of Food Protection 67(10): 2342 – 2353.

Sjöling Å. (2013). Alkaline pH is a signal for optimal production and secretion of the heat labile toxin, LT in Entero toxigenic *Escherichia coli* (ETEC). PLoS One 8: e74069.

Smith HW, Halls S. 1968. The production of oedema disease and diarrhea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. J. Med. Microbiol. 1: 45-59.

Solomon, M.; Mulisa, M.; Yibeltal, M.; Desalegn, G. and Simenew, K. (2013). Bacteriological quality of bovine raw milk at selected dairy farms in DebreZeit town, Ethiopia. Comprehensive J. Food Sci. Technol. Res. 1(1): 1-8.

Soomro, A. H.; Arain, M. A.; Khaskheli, M. and Bhutto, B. (2002). Isolation of *Escherichia coli* from milk and milk products in relation to public health sold under market conditions at Tandojam, Pakistan. Journal of Nutrition, 1: 151-152.

Spano, L. C.; Sadovsky, A. D. L.; Segui, P. N.; Saick, K. W.; Kitagawa, S. M. S.; Pereira, F. E. L.; Fagundes-Neto, U. and Scaletsky, I. C. A. (2008). Age-specific prevalence of diffusely adherent in Brazilin children with acute diarrhea. J. Med. MicrobioL; 57:359-363.

Stephen, H.G., & Timothy, D.M. (2010). Antibiotic Resistance protocols, (2nd ed).Humana press. New York, regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. J.Clin Microbiol., Rew.22:582-610.

Swai, E.S. and Schoonman, L. (2011). Microbial quality and associated health risks of raw milk marketed in the Tanga region of Tanzania. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1(3): 217 – 222 .

Syit, D.A. (2008). Detection and determination of oxytetracycline and penicillin G antibiotic residue levels in Bovine bulk milk from Debrezeit and Nazareth dairy farms in Ethiopia. In: Proceedings of the 1st International Technology, Education and Environment Conference African Society for Scientific Research. (Edited by Human Resource Management Academic Research Society). May, 2008, Adds Ababa, Ethiopia. pp. 325 – 346 .

T

Tang, Y.W. and Stratton,C.W. (2006). Advanced techniques indiagnostic microbiology. Springer Scie. Business media . Spring street . USA.

Tchaptchet, S. and Hansen, J. (2011). The Yin and Yang of hostcommensal mutualism. Gut Microbes.2: 347–352.

Thomas, R.R.; Brooks, H. J. and O'Brien, R. (2017). Prevalence of Shiga toxin- producing and Entero pathogenic *Escherichia coli* marker genes in diarrhoeic stools in a New Zealand catchment area. J. Clin. Pathol 70(1):81-84 .

Todar, K.(2002a). Pathogenic *E. coli* . Journal of Becteriology,33: 340-350.

Topley, W., and Wilson, G. (1964). Principles of bacteriology and immunity. Arnold, London Esherich, T. (1985). Die Darmbakterien des Neugeboren and Saugling. Fortsoner. Med. 3:515-522 .

Tsuji , T. (1995). Monomer of the B-subunit of heat Labile enterotoxin from Entero toxigenic *Escherichia coli* has Little ability to bind to GM1 ganglioside Compared to it coligenoid. Micropbiology and Immunology 39: 817-819 .

V

Virella, G. (1997). Microbiology Infections Diseases. Williams and Wilkins company. U.S.A.

W

Wani , S. A.; Nabi, A.; Fayaz, I.; Ahmad, I.; Nishikawa, Y.; Qureshi, K. and Chowdhary, J. (2006). Investigation of diarrhoeic faecal samples for Entero toxigenic, Shiga toxin-producing and typical or atypical Entero pathogenic *Escherichia coli* in Kashmir India. FEMS microbiology letters, 261(2), 238-244 .

Weagand, S. D.; Jinneman, K.C. and wetherington, J.H. (2000). Use of multiplex polymerase chain reaction for ldentification of Entero toxigenic *Escherichia coli.* FDA LIB 4227 (abstract).

Woranich,H. ; Natapol, P.; Sirijan, S. ; Suphang, K.; Shutipen, B.; Nitant,S.; Wanpen,C.; Pisinee,A.and Nitaya,I.(2017). Detection and drug resistance profile of *Escherichia coli* from subclinical mastitis cows and water supply in dairy farms in Saraburi Province, Thailand.

Y

Yatsuyanagi , J. ;Saito, S.; Sato, H.; Miyagima, Y.; Amano, K. L. and Enomoto ,K. (2002). Characterization of Entero pathogenic and Entero aggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. J. clin. MicrobioL. 40(1): 294-297.

Z

Zorn, B.G.; Catalan, A.; Escudero, J.A. and Dominguez, L.(2005). Genetic basis for dissemination of arm A. J. Antimicrob Chemother. 56:583-585.

Zurfluh, K.; Glier, M.; Hächler, H. and Stephan, R. (2015). Replicon typing of plasmids carrying bla CTX-M-15 among Enterobacteriaceae isolated at the environment, livestock and human interface. Science of the Total Environment, 521: 75-78.

Abstract

This study was designed to detect the presence of bacteria *Escherichia coli* in samples of raw cow's milk and examine the response and resistance to antibiotics , and investigation of the presence of intestinal genes *ST* and *LT* in isolated samples using polymerase chain reaction. 125 samples of raw cow's milk where collected from four different rural areas in the holy Kerbala governorate, which included Al- Hussainiya , Al- Zebeliya , Al- Hindiya and Al – Hurr during the period from 15 December 2018 to 30 March 2019 . *E.coli* was detected in 51(% 40.8) of samples . the highest number of samples contaminated with *E.coli* in Al-Zebeliya %16.8 , followed by Al- Hussainiya %12.8 , Al- Hindiya region were contaminated with *E.coli* % 6.8 , the lowest number of samples contaminated disclosed in Al – Hurr % 4.8.

The study revealed that the highest pollution isolates of raw cow's milk were in the month of January by %35.29 , followed by the month of December % 25.49 , In February, the proportion of pollution due to isolated from milk% 21.56 , the smallest proportion of *E.coli* contamination raw cow’s milk in March %17.64.

Study showed that *E.coli* isolated from raw cow’s milk were resistant to Ticarcillin (%92.1) followed by Ticarcillin Clavulanicacid (%90.1) ,Topramycin (%25.4) , Aztreonam (%25.4) and sensitive to Meropenem (%100) , Imepenem (%100) and Colistin (%100), It also sensitive to Ciprofloxacin (%94.1) followed by Pipracillin / Tazobactam (%88.2) Pipracillin (%82.3) , Trimethoprim / Sulfamethoxazole (%80.3) , Pefloxacin (%78.4) , Cefepime (%76.4) , Gentamicin (76.4%) , Minocycline (%74.5) and Amicacin (%72.5).

Finally, it was investigating the emergence of genes *ST* and *LT* by Using a Polymerase chain reaction (PCR) and disclose the size of the gene by Polymerase chain reaction (PCR) and using a source of ultraviolet light for bacterial isolate, The virulence profile of genes revealed that 2/51 (%3.9) isolates of *E. coli* harbored *LT* genes and 7/51 (%13.7) isolates of *E. coli* harbored *ST* genes .

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Kerbala

College of Education for pure sciences

Department of Biology

Detection of contaminated raw cow's milk with *Escherichia coli* in Holy Kerbala Province

A Thesis submitted to the College of Education for pure sciences of Kerbala University as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biology-

By

Nada Jasim Mohammed

B.Sc.Biology / 2000 - 2001

Supervised By

Assist.Prof.Dr

.

Hiyame Abdul Ridha Kareem AL-Awade

2019 A.D. 1441 A.H