جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

العزل والتشخيص التقليدي والجزيئي لجراثيم الزوائف من اللحوم وقياس حساسيتها للمضادات الحيوية في مدينة الموصل

إبراهيم محمد طاهر جوهر

رسالة ماجستير

الطب البيطري / الصحة العامة البيطرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة

منتهى غازي حسن

١٤٤٤ هـ

٢٠٢٢م

جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

العزل والتشخيص التقليدي والجزيئي لجراثيم الزوائف من اللحوم وقياس حساسيتها للمضادات الحيوية في مدينة الموصل

إبراهيم محمد طاهر جوهر

رسالة ماجستير

الطب البيطري / الصحة العامة البيطرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة

منتهى غازي حسن

١٤٤٤ هـ

٢٠٢٢ م

العزل والتشخيص التقليدي والجزيئي لجراثيم الزوائف من اللحوم وقياس حساسيتها للمضادات الحيوية في مدينة الموصل

رسالة تقدم بها

إبراهيم محمد طاهر جوهر

إلى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في اختصاص الطب البيطري / صحة عامة بيطرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة

منتهى غازي حسن

١٤٤٤ هـ **٢٠٢٢ م**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قُلْ لَوْ كَانَ الْبَحْرُ مِدَادًا لِكَلِمَاتِ رَبِّي لَنَفِدَ الْبَحْرُ قَبْلَ أَنْ تَنْفَدَ كَلِمَاتُ رَبِّي وَلَوْ جِئْنَا بِمِثْلِهِ مَدَدًا ۝ قُلْ إِنَّمَا أَنَا بَشَرٌ مِثْلُكُمْ يُوحَى إِلَيَّ أَنَّمَا إِلَهُكُمْ إِلَهٌ وَاحِدٌ فَمَنْ كَانَ يَرْجُوا لِقَاءَ رَبِّهِ فَلْيَعْمَلْ عَمَلًا صَالِحًا وَلَا يُشْرِكْ بِعِبَادَةِ رَبِّهِ أَحَدًا ۝

سورة الكهف، الآيات (١١٠/١٠٩)

إقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة جرى تحت اشرافي في جامعة الموصل ، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في الصحة العامة البيطرية.

التوقيع :

الاسم : **ا. د. منتهى غازي حسن**

التاريخ : / /

إقرار المقوم اللغوي

اشهد ان هذه الرسالة الموسومة (**العزل والتشخيص التقليدي والجزيئي لجراثيم الزوائف من اللحوم وقياس حساسيتها للمضادات الحيوية في مدينة الموصل**) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية ، وبذلك اصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع :

الاسم : **ا. م .د. فارس ياسين محمد**

التاريخ : / /

إقرار رئيس فرع الصحة العامة البيطرية

بناءً على التوصيتين المقدمتين من قبل المشرف والمقوم اللغوي ، أُرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع :

الاسم : **ا. د. ضياء محمد طاهر جوهر**

التاريخ : / /

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقوم اللغوي ورئيس فرع الصحة العامة البيطرية ، أُرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع :

الاسم : **ا. د. رعد عبد الغني بشير**

التاريخ : / /

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة ، اطلعنا على هذه الرسالة وناقشنا الطالب **ابراهيم محمد طاهر جوهر** في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتأريخ / / 2022 ، وإنه جدير لنيل شهادة الماجستير في اختصاص الصحة العامة البيطرية.

عضو لجنة المناقشة
ا. د. سعد ثابت جاسم

عضو لجنة المناقشة
ا.م .د عامر يحيى حميد

رئيس لجنة المناقشة
ا. د. عقيل محمد شريف

عضو لجنة المناقشة (المشرف)
ا . د. منتهى غازي حسن

قرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل بجلسته ..... المنعقدة بتأريخ / / 2022 وقرر منحه شهادة الماجستير في اختصاص الصحة العامة البيطرية بتقدير..... .

مقرر مجلس الكلية
أ.د . رعد عبد الغني بشير

عميد الكلية
أ.د. ظافر محمد عزيز

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين **سيدنا محمَّد** وعلى آلة وصحبه ومن تبعهم بإحسان إلى يوم الدين، وبعد ..

فإني أشكر الله تعالى على تيسيره إنجاز هذا العمل البحثي ، فله الحمد أولاً وآخرًا.

وأشكر **عمادة كلية الطب البيطري** والسيد **رئيس فرع الصحة العامة** لجهودهم في دعم طلبة الدراسات العليا واتقدم بخالص الشكر والامتنان إلى أستاذتي المشرفة على الرسالة (**أ. د.منتهى غازي حسن**) التي لم تدَّخر جهدًا في توجيهي لا كمال متطلبات البحث .

كما أتقدم بالشكر والتقدير إلى اساتذة فرع الصحة العامة البيطرية جميعا لما قدموه من تسهيلات طيلة مدة البحث وأوجه امتناني لزملائي طلبة الدراسات العليا على نصحهم وتوجيهاتهم

واقدم اعتزازي وشكري الجزيل الى **عائلتي واهلي** لدورهم الكبير في دعمي ماديا ومعنويا في اثناء مسيرة البحث

إبراهيم

الإهداء

إلى أبي وامي .... قدوتي، ومثلي الأعلى في الحياة.

إلى إخوتي واخواتي .... سندي وعضدي في الحياة.

إلى زوجتي.... أسمى رموز الإخلاص والوفاء.

إلى الأستاذة المشرفة .... لما بذلته من جهد خلال مدة الدراسة

إبراهيم

الخلاصة

عرفت الزوائف بإنها أحد انواع الجراثيم المحبة للنمو بدرجات الحرارة المنخفضة وتميزت بكونها من الكائنات الحية المجهرية المسببة لفساد اللحوم اثناء حفظها ؛ لذا هدفت الدراسة الحالية إلى التحري على تواجد جراثيم الزوائف في اللحوم المعروضة في اسواق مدينة الموصل تم جمع (150) عينة لحم من لجوم الأبقار والأغنام والدواجن بواقع (50) عينة لكل نوع للمدة من تشرين الثاني 2021 ولغاية أذار 2022 ، وشخصت هذه الجراثيم مظهرياً وجينياً ، أظهرت النتائج إن (53) عينة من اللحوم بأنواعها كافة موجبة لتواجد الزوائف وبنسبة 35.33% موزعة على (23) عينة من لحوم الأبقار وبنسبة 46% و (19) عينة من لحوم الدواجن وبنسبة 38% واختلفت معنوياً عن لحوم الأغنام التي أعطت 11عينة موجبة وبنسبة 22% .من بين هذه العزلات الموجبة كانت 21 عزلة منها موجبة لتواجد الزوائف الزنجارية في اللحوم وبنسبة 39.62% بالاعتماد على وجود جين *rpoB* بينما 7 عزلات منها بنسبه 13.21% موجبة لتواجد جراثيم الزائفة المتألقة بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية، اعتمد جين *CarA* للكشف عن وجود أنواع أخرى من الزوائف والمسببة لفساد اللحوم وكانت نسبة 91.6% من العزلات موجبة لوجود هذا الجين ،كان العد الكلي للزوائف في لحوم الأبقار والأغنام ($1.47*10^4$) و ($1.92*10^4$) وحدة تكوين المستعمرة \غرام على التوالي ، بينما أظهر العد الكلي للزوائف في لحوم الدواجن ($21.3*10^4$) وحدة تكوين المستعمرة \غرام . كما وتم الكشف عن ضراوة عزلات الزوائف الزنجارية والمعزولة من اللحوم بالاعتماد على بعض جينات الضراوة متمثلة بكل من *ToxA, oprL, PlcH,-ExoS* واستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل إذ سجل الجين *PlcH* أعلى نسبة تواجد بينما سجل الجين *oprL* أقل نسبة تواجد في حين لم تظهر العزلات أي نتيجة موجبة لتواجد جينات *ExoS* .

أثبتت الدراسة الحالية أن عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم في مدينة الموصل تمتلك مقاومة عالية للمضاد الحيوي Amoxicillin /Clavulanic acid وحساسية عالية لكل من المضادات الحيوية Tobramycin وLevofloxacin و Ciprofloxacin و Gentamycin كما بينت الدراسة أن اللحوم المعروضة في أسواق مدينة الموصل تفتقر إلى تطبيق الضوابط الصحية من حيث طرائق حفظ اللحوم في محلات البيع بدرجات حرارة مناسبة ومن حيث نظافة الأسطح المستخدمة في تداول وإعداد هذه اللحوم ومنتجاتها وعرضها للمستهلك الأمر الذي يجعل من اللحوم الملوثة بهذه الجراثيم مصدراً خطراً على صحة المستهلكين لهذه اللحوم ومن ثم على المجتمع .

ثبت المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
الخلاصة	أ
ثبت المحتويات	و
ثبت المختصرات	ك
ثبت الجداول	م
ثبت الأشكال	ن
الفصل الأول : المقدمة Introduction	2-1
الفصل الثاني : استعراض المراجع Literature Review	3
2-1 : تصنيف الزوائف Classification of *Pseudomonas spp.*	3
2-2:الصفات العامة للزوائف General characteristic of *Pseudomonas*	4
2-3 : تواجد جراثيم الزوائف في اللحوم *Pseudomonas* in Meat	5
2-4: امراضية جراثيم الزوائف Pathogenesis of *Pseudomonas*	7
2-5:الانتانات والاصابات Infections	8
2-6: وبائية جراثيم الزوائف Epidemiology of *Pseudomonas*	8
2-7: تشخيص جراثيم الزوائف Diagnosis of *Pseudomonas* spp	9
2-7-1: الطرق التقليدية Routine Methods	9
2-7-2: الطرق الجزيئية Molecular Methods	10
2-8:عوامل الضراوة للزوائف Virulence factors of *Pseudomonas*	11
2-8-1: الصبغة Pigment	11
2-8-2: السوط Flagellum	12
2-8-3: الاهداب Pilli	12
2-8-4: الخمل Fimberia	12
2-8-5:الغشاء الحيوي Biofilm	12
2-8-6: حاملات الحديد Siderophore	13
2-8-7:الالجينات Alginate	13

2-8-8: أنظمة الافراز Secretion Systems	14
2-8-9:الذيفانات Toxins	14
2-8-9-1: انزيم Carbamoyl Phosphate Synthase	15
2-8-9-2: الذيفان الخارجي Exotoxin A	15
2-8-9-3:الغشاء الخارجي Outer Membrane	16
2-8-9-4:الهيمولايسين Hemolysin	16
2-8-9-5: الذيفان الخارجي Exotoxin S	16
2-9:مقاومة بكتريا الزوائف للمضادات الحيوية *Pseudomonas* Resistance to Antibiotics	17
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل Materials and Methods	21
3-1:المواد Materials	21
3-1-1: الأجهزة المختبرية Laboratory Equipments	21
3-1-2: الأوساط الزرعية Cultural Media	23
3-1-3:المواد الكيميائية والكواشف Chemicals and Reagents	24
3-1-4: العدد المختبرية التجارية Commercial Laboratory kits	25
3-1-5: البادئات Primers	25
3-1-6:-المضادات الحيوية Antibiotics	27
3-2: طرائق العمل Methods	28
3-2-1: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of Culture Media	28
3-2-1-1: وسط ماء الببتون Peptone water	28
3-2-1-2: اكار السترمايد Cetrimide Agar	28
3-2-1-3- وسط اكار King- A Medium	28
3-2-1-4- وسط اكار King- B Medium	28
3-2-1-5: الوسط المغذي Nutrient Agar	29
3-2-1-6: مرق نقيع القلب والدماغ مع الكليسيرول Brain Heart Infusion Broth with glycerol	29

3-2-1-7: مولر- هنتون اكار Muller- Hinton Agar	29
3-2-2 تحضير الكواشف والاختبارات الكيموحيوية	29
3-2-2-1:وسط اختبار انتاج الاندول Indole Production Test	29
3-2-2-2: كاشف المثيل الاحمر Methyl Red Reagent	29
3-2-2-3: كاشف اختبار فوكس بروسكور Voges-Proskauer Reagent	30
3-2-2-4: وسط سيمون ستريت Simmon's Citrate Medium	30
3-2-2-5: اختبار وسط ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron Agar	30
3-2-2-6: كاشف اختبار الاوكسيديز Oxidase Test Reagent	30
3-2-2-7: كاشف اختبار الكتاليز Catalase Test Reagent	30
3-2-2-8: معيار مكفارلاند McFarland	31
3-3: جمع العينات Sampling	31
3-4: العد الكلي والعزل الجرثومي Total Count and Bacterial Isolation	31
3-4-1: العد الكلي للزوائف Total count of *Pseudomonas*	31
3-4-2:تنقية العزلاتPurification of Isolates	32
3-5: توصيف الجرثومة Identification Of Bacteria	32
3-5-1: الخصائص المظهرية Morphological Characteristics	32
3-5-2: الخصائص المجهرية Microscopic Characteristics	32
3-6 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests	32
3-6-1: اختبار انتاج الاندول. Indole-production Test	32
3-6-2:اختبار المثيل الاحمر. Methyl Red Test	33
3-6-3: اختبار فوكس – بروسكور. Voges-proskauer Test	33
3-6-4: اختبار استهلاك السترات Citrate utilization Test	33
3-6-5: اختبار ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron Test	33
3-6-6: اختبار انزيم الكتاليز Catalase Test	34
3-6-7: اختبار الاوكسيديز Oxidase test	34
3-7 :التشخيص باستخدام جهاز الفايتك Vitek-2 compact	34

3-8:حفظ العزلات الجرثومية Preservation of Bacterial Isolates	35
3-9: التشخيص الجزيئي لجراثيم الزوائف Molecular detection of *Pseudomonas spp*	35
3-9-1:استخلاص الحامض النووي DNA Extraction	35
3-9-2: تحضير مزيج التفاعلMaster Mix Preparation	36
3-9-3:برمجة جهاز المدوار الحراري Thermocycler	37
3-9-4:الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروزElectrophoresis Agarose gel	38
3-10: اختبار حساسية المضادات الحيوية Antibiotic Sensitivity Test	38
3-10-1: طريقة تحضير العالق البكتيري ومقارنته مع McFarland Standard	38
3-10-2: تحديد النمط المظهري للمقاومة للمضادات الحيوية	39
3-11: التحليل الاحصائي Statistical Analysis	39
الفصل الرابع : النتائج Results	40
4-1:عزل الزوائف Isolation of *Pseudomonas*	40
4-2: العد الكلي للزوائف في اللحوم Total Count of *Pseudomonas* in Meat	42
4-3: الصفات الحسية Sensory traits	43
4-4: التشخيص المظهري والمجهري Phenotypic and Microscopic Diagnosis	44
4-4-1: النمو على وسط King A و King B	45
4-4-2: الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests	47
4-4-2-1: التشخيص التأكيدي لجراثيم الزوائف المتألقة باستخدام جهاز الفايتك	47
4-5: التشخيص الجزيئي للكشف عن انواع الزوائف Molecular diagnosis to detect *Pseudomonas* spp	49
4-5-1:التشخيص الجزيئي باستخدام جين *16srRNA*	49
4-5-2: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *rpoB*	50
4-5-3: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *CarA*	51
4-6: التشخيص الجزيئي للكشف عن بعض عوامل الضراوة Molecular Identification of some Virulence factors	52

4-6-1: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *ToxA*	53
4-6-2:التشخيص الجزيئي باستخدام جين *oprL*	54
4-6-3: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *plcH*	55
4-6-4: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *ExoS*	56
4-7: مقاومة عزلات الزوائف الزنجارية لبعض المضادات الحيوية Resistance of *Pseudomonas* to Antibiotics	56
الفصل الخامس : المناقشة Discussion	59
5-1: عزل وتمييز الزوائف Isolation and Discrimination of *Pseudomonas*	59
5-2: التوصيف الجزيئي Molecular Characterization	61
5-3: المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات الزوائف من اللحوم Antibiotic Resistance of *Pseudomonas* isolated from meat	64
الفصل السادس : الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations	66
6-1: الاستنتاجات Conclusions	66
6-2: التوصيات Recommendations	67
المصادر References	95-68
Abstract	a ,b

ثبت المختصرات

المختصرات	المصطلحات
16SrRNA	Each bacterium contains 5~10 copies of 16SrRNA, which makes the detection sensitivity highly(A ribosomal RNA necessary for synthesis of all prokaryotic proteins)
µm	Micrometer
BPW	Buffer peptone water
BSI	Blood stream infection
CAP	Community acquired pneumonia
CarA	Carbamoyl phosphate synthase subunitA
Cfu	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DNA	Deoxyribonucleic acid
EF2	Extension factor 2
ESBLS	Extended spectrum beta-lactamase
ExoS	Exoenzyme S
fliC	Flagellin -subunit protein which polymerizes to form the filaments of bacterial flagella
GN Card	Gram negative card
gyrB	DNA gyrase subunit B
HAP	Hospital –acquired pneumonia
IL	Interleukin
Las A	Elastase A
Las B	Elastase B
LPS	Lipopolysaccharide

MDR	Multi-drug resistance
Ml	Milliliter
Mm	Millimeter
OprL	Outer-membrane lipoprotein
PCR	Polymerase Chain Reaction
plcH	Hemolytic phospholipase C
PW	Peptone water
QS	Quorum sensing
RecA	DNA recombination/repair protein RecA
rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
RpoD	RNA polymerase sigma factor RpoD
RT -PCR	Real time- polymerase chain reaction
SSO_s	Specific Spoilage Organisms
TAVI	Trans catheter Aortic valve implantation
toxA	Exotoxin A
TSI	Triple Sugar Iron
UTI	Urinary tract infection
UV	Ultra violet light
VOCs	Volatile organic compounds
VP	Voges-Proskauer reagent
WHO	World health organization

ثبت الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1-3	الأجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة الحالية	21
2-3	الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة	23
3-3	المواد الكيميائية والكواشف المستخدمة في الدراسة الحالية	24
4-3	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة الحالية	25
5-3	البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسلPCR	26
6-3	المضادات الحيوية المعتمدة لدراسة أنماط حساسية عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم	27
7-3	مكونات المزيج الرئيس لتفاعل البلمرة المتسلسل	37
8-3	خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل	37
1-4	إعداد ونسب جراثيم الزوائف المعزولة من عينات اللحوم المختلفة في مدينة الموصل بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية	40
2-4	أنواع الزوائف المعزولة من اللحوم المختلفة في مدينة الموصل	41
3-4	إعداد ونسب جراثيم الزوائف الزنجارية المعزولة من عينات اللحوم المختلفة في مدينة الموصل بالاعتماد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل	41
4-4	إعداد ونسب جراثيم الزوائف المتألقة المعزولة من عينات اللحوم المختلفة في مدينة الموصل بالاعتماد على نتائج جهاز الفايتك Vitek	42
5-4	العد الكلي لجراثيم الزوائف في انواع اللحوم المختلفة في مدينة الموصل	42
6-4	قيمة الأس الهيدروجيني لعينات اللحوم المختلفة	43
7-4	الصفات الحسية لعينات لحوم الابقار والاغنام والدواجن في مدينة الموصل	44
8-4	عدد العزلات والنسب المئوية لمقاومة جراثيم الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم للمضادات الحيوية	57

ثبت الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1-2	عوامل الضراوة لجراثيم الزوائف	17
2-2	آلية عمل المضادات الحيوية على الخلية الجرثومية	19
1-4	قيم الأس الهيدروجيني لعينات اللحوم المختلفة في الدراسة	43
2-4	أ : نمو مستعمرات الزوائف الزنجارية على وسط اكار السترمايد ب: توهج مستعمرات الزوائف الزنجارية عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية	45
3-4	نمو مستعمرات جراثيم الزوائف على وسط King A	46
4-4	نمو مستعمرات جراثيم الزوائف على وسط king B	46
5-4	نتائج تشخص الزوائف المتألقة باستخدام الفايتك	48
6-4	الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladderحجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-12 تمثل عينات موجبة 1351 زوج قاعدي ،المسار 13 يمثل السيطرة السالبة	49
7-4	الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladderحجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-12 تمثل عينات موجبة 750 زوج قاعدي ،المسار 13 يمثل السيطرة السالبة	50
8-4	الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف .المسار M يمثل المؤشر DNA ladderحجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-11 تمثل عينات موجبة 700 زوج قاعدي ،المسار 12 يمثل السيطرة السالبة	51
9-4	النسب الكلية لتواجد بعض جينات الضراوة للزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم	52
10-4	نسب تواجد بعض جينات الضراوة للزوائف الزنجارية المعزولة من انواع اللحوم المختلفة	52
11-4	الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladderحجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-5 تمثل عينات موجبة 396 زوج قاعدي ،المسار 6 يمثل السيطرة السالبة	53

12-4	الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladderحجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-5 تمثل عينات موجبة 504 زوج قاعدي ،المسار 6 يمثل السيطرة السالبة	54
13-4	الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladderحجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-4 تمثل عينات موجبة 307 زوج قاعدي ،المسار 5 يمثل السيطرة السالبة	55
14-4	حساسية ومقاومة جراثيم الزوائف الزنجارية لبعض المضادات الحيوية على وسط Muller-Hinton Agar	56
15-4	توزيع عدد العزلات ونسبها حسب المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية	58
16-4	توزيع عدد العزلات ونسبها حسب المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية تبعاً لنوع اللحوم	58

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

تعد اللحوم مصدراً غذائياً غنياً بالبروتين الحيواني يلبي حاجة المستهلك؛ لقيمته الغذائية العالية الأمر الذي يتطلب الحفاظ على اللحوم من الفساد لحين وصولها إلى المستهلك (Heinz and Hautzinger,2007) ،إذ إن (3.5) بليون كغم من اللحوم تهدر سنوياً؛ بسبب سوء الحفظ والتخزين سواء عند الباعة أو المستهلكين ،وإن 5% من خسائر اللحوم يمكن أن تغطي الحاجة اليومية لما يقارب (320) الف شخص حول العالم (Cerveny *et al* .,2009)،و تعددت أسباب فساد اللحوم فمنها فيزيائية وكيميائية وميكروبية واعتماداً على ظروف عمر الحيوان ونوعه عند الجزر وظروف التربية؛ إذ تتمكن بعض الأحياء المجهرية من التكاثر في اللحوم ؛ لكونها وسطًا مناسبًا لنمو العديد من المسببات المرضية التي يمكن أن تلوث اللحوم أثناء الذبح والتجهيز مسببة تغيرات في قيمة الآس الهيدروجيني للحوم وكذلك تكوين الطبقة الهلامية وفقدان المظهر الطبيعي للحم(Rouger *et al* .,2017;Dave *et al* .,2011; Miller ,2002) ويمكن وفي ظل الممارسات الصحية الجيدة أثناء الذبح والتخزين التقليل من خطورة فساد اللحوم التي تحدث العديد من التغيرات (Rouger *et al* .,2017; Williams *et al* .,2007; Ercolini *et al* .,2009) تميزت الزوائف بكونها أكثر الأنواع شيوعًا في اللحوم المبردة المخزنة في ظروف هوائية مسببة خسارة المنتج وتتمثل أكثر الأنواع تواجداً في اللحوم *P.aeruginosa ,P. fluorescens ,P. Putida,P fragi* (Wickramasinghe *et al*.,2019; Rawat *et al* .,2015) ويعد الاجهاد الناجم عن مراحل قبل وبعد الذبح أحد عوامل فساد اللحوم نتيجة زيادة فعالية الأحياء المجهرية المسببة للفساد من خلال قابلياتها على إنتاج انزيمات تؤثر على البروتينات والكربوهيدرات الموجودة في اللحوم الأمر الذي يجعل علامات الفساد ظاهرة للعيان مسببة ظهور الروائح الكريهة وتغير لون اللحم ،فضلاً عن تكون الطبقة الهلامية وتحرر النواتج الايضية غير المرغوبة ومنها المركبات العضوية الطيارة كالكحوليات والألدهيدات والكيتونات والاحماض الدهنية في اللحوم المبردة وانتاج كميات وفيرة من اسيتات المثيل والاثيل مؤدية إلى عدم تقبل المستهلكين لهذه اللحوم ، وتستخدم الزوائف الكلوكوز كركيزة للطاقة ، وعندما يتم استنفاد الكلوكوز تلجأ إلى استخدام معظم الأحماض الأمينية (Saewan *et al*., 2021; Papadopoulou *et al*., 2020). تتوفر

اللحوم عادةً في الأسواق بشكل ذبيحة كاملة أو مقطعة أو منتجات مصنعة من اللحوم (Ristic,1994; Risvik ,1994). اذ تتجلى مظاهر فساد اللحوم بنمو الأحياء المجهرية الدقيقة وتراكم نواتج عملياتها الاستقلابية التي تظهر على شكل ألوان وروائح غير مرغوبة، فضلاً عن تغيير ملمس السطح (Del Rio and Panizo,2007). اعتمدت حديثاً الطرائق البيولوجية الجزيئية للكشف عن الأحياء المجهرية المسببة لفساد اللحوم على نطاق واسع ، ويعد الكشف الجزيئي عن أنواع الزوائف في اللحوم أمرًا حيويًا لتوفير استراتيجيات مناسبة للسيطرة على اللحوم وسلامتها الغذائية من الأحياء المجهرية المسببة للفساد لإطالة مدة الحفظ ووصولها آمنة إلى المستهلك (Fletcher *et al* .,2018). يستخدم الجين 16SrRNA للكشف عن وجود الزوائف (Stellato *et al* .,2017)، فضلاً عن اعتماد جين *rpoB* لتشخيص وجود الزائفة الزنجارية في اللحوم (Benie *et al* .,2017). تشارك الزائفة الزنجارية في العديد من أنواع العدوى التي لا تستجيب للعلاج وتهدد الحياة ؛ نظراً لمقاومتها العالية للأدوية المتعددة من المضادات الحيوية من خلال نفاذية الأغشية (Aloush *et al* .,2006) ، وإنتاج الإنزيمات المعطلة للمضادات الحيوية مع انتشار جينات مقاومة لمضادات الميكروبات عبر السلسلة الغذائية ، وتشكل خطرًا على الصحة العامة (Henwood *et al* .,2001).

أهداف الدراسة Aims of study:

1- التقييم الصحي للحوم المعروضة في اسواق مدينة الموصل ومدى تلوثها بجراثيم الزوائف المسببة للفساد .
2- اعتماد تقنيات تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction) في توثيق تشخيص جراثيم الزوائف المعزولة من اللحوم .
3- الكشف عن بعض عوامل الضراوة لجراثيم الزوائف المعزولة من اللحوم متمثلة بقابليتها على انتاج بعض الذيفانات.
4- التحري عن مقاومة الزائفة الزنجارية المعزولة من اللحوم لبعض انواع للمضادات الحيوية .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

1-2 : تصنيف الزوائف .Classification of *Pseudomonas* spp

صنفت الزوائف ضمن عائلة *Pseudomonodaceae* التي تعد من العوائل الجرثومية الكبيرة، وتتميز أفراد هذه العائلة بكونها حرة المعيشة بأغلب البيئات وتتواجد باعداد كبيرة في المياه العذبة والبيئة المالحة والتربة فضلاً عن كونها إحدى المسببات المرضية في الإنسان والحيوان (juan *et al*.,2017; Virella,1997; Zumft,1997; Gunsalus,1996) . وصفت هذه الجراثيم في 1894 إذ أطلق العالم ميغولا اسم جنس *Pseudomonas* على هذه البكتيريا إذ تتكون التسمية من مقطعين *Pseudo* في الاغريقية تعني كاذبة و *Monas* تعني وحدة؛ لذا فإن المصطلح يعني (وحدة كاذبة) ، في حين سميت جراثيم الزائفة الزنجارية لأول مرة من قبل العالم Schroeter في عام 1872 إذ قام بعزل الجرثومة من جروح قيحية، وتبعه العالم الفرنسي Gessard الذي عزل الزائفة الزنجارية من جروح جلدية وميزها بإنتاجها قيح أخضر مزرق (Gessard,1984) وهذا يفسر سبب تسميتها لأول مرة بعصيات القيح الأزرق Bacillus pyocyaneus إذ تشير Bacillus إلى الشكل العصوي للجرثومة في حين pyo إلى pusالقيح أما cyaneusإلى الصبغة الزرقاء التي تنتجها هذه الجراثيم ثم تغيرت تسميتها إلى *P .aeruginosa* ويعد جنس الزائفة الزنجارية من الأجناس الشائعة والأكثر انتشاراً في البيئة (Brooks *et al* .,2010). تضم هذه العائلة حوالي عشرة أجناس وينتمي لها ما يقارب (180) نوعا وتتميز جميعها بقابليتها الأمراضية للإنسان وتأثيرها على الصحة العامة (Brunner *et al* .,2005 ;Rehm *et al* .,2008) وبالاعتماد على تسلسل الحامض النووي 16srRNA في التصنيف (Tripathi *et al* .,2013) فإن هذه المجموعة من الجراثيم صنفت كما يلي :

Kingdom : Bacteria

Phylum :*Proteobacteria*

Class : *Gamma Proteobacteria*

Order : *Pseudomonadales*

Family : *Pseudomonadacae*

Genus : *Pseudomonas*

2-2:الصفات العامة للزوائف General Characteristic of *Pseudomonas*

تميزت الزوائف بكونها عصوية مستقيمة سالبة لصبغة كرام متحركة بواسطة سوط قطبي وغير مكونة للأبواغ يتراوح طولها بين (1.5-3) مايكرومتر وقطرها (0.5-0.8) مايكرومتر (Todar,2012), ،تنمو جراثيم الزوائف بمديات حرارية واسعة تتراوح ما بين (4_42)مْ والنمو الأمثل لهذه الجراثيم ولاسيما الزائفة الزنجارية يكون بدرجة حرارة 37±2 مْ ، وتوجد على نطاق واسع في الهواء والتربة الماء والغذاء (Crone *et al* .,2020 ;Benie *et al* .,2017;Gillespie and Hawkey,2006 ;Aravindhan *et al* .,2014) ، يكون تواجد هذه الجراثيم على شكل عصيات منفردة أو متجمعة على شكل سلاسل قصيرة ، وتعد هوائية وبعض أنواعها لها القدرة على النمو في ظروف لا هوائية ؛لأنها تتمكن من الحصول على النترات كمستقبلات نهائية للإلكترونات بدلاً عن الأوكسجين (Paul,2018)، لا تستطيع النمو في الأوساط الحامضية ولكن النمو الأمثل لها يكون عند قيمة pH ما بين7-9 وتتميز بعض أنواع الزوائف بقدرتها على انتاج الصبغات مثل صبغة البيوسيانين pyocyanin ذات اللون الازرق المخضر إذ يستخدم وسط King A للكشف عن قابلية هذه الجراثيم على انتاج الصبغة وكذلك تنتج أنواع منها صبغة البايوفردين pyoverdinذات لون أصفر مخضر إذ تظهر هذه الصبغة تألقا عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية وتعد صبغة البايوفردين من المركبات العديدة ذات الفعالية المضادة للبكتريا إذ قام العالم king عام 1954 بتطوير وسط يظهر قابلية بعض أنواع الزوائف على انتاج صبغة البايوفردين وسمي بوسط King B لتأكيد هذه العزلات بإضافة مواد تساعد على انتاج البايوفردين وتمنع انتاج البايوسيانين ومنها ثنائي فوسفات البوتاسيوم التي تعمل على زيادة تركيز الفسفور في الوسط ويسهم مع الببتون بإنتاج صبغة البايوفردين (Jawetz *et al* .,2001;Holt *et al*.,1998)،فضلاً عن انتاجها لصبغات اخرى كالبيوروبين الحمراء pyorubin وصبغة البايوميلانين السوداء pyomelanin (Carrol *et al* .,2016) مع انتاج رائحة مميزة تشبه رائحة العنب أو اللوز المرلقابليتها على تحرير مادة ثنائي امينواسيتوفينون ذات الرائحة

المميزة (Vindeirinho *et al*.,2020;Al-Araji and Ali,2012) ، تعد الزوائف احد المسببات المرضية الانتهازية ولا تحتاج إلى متطلبات غذائية كبيرة وتستهلك الكربون كمصدر للطاقة وتسبب الأمراضية للأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة إذ تسبب الزوائف ولاسيما الزائفة الزنجارية عدوى الجلد والانسجة الرخوة تحت الجلد والتهاب الأذن الوسطى والتهاب السحايا وعدوى الجهاز التنفسي وكذلك الالتهابات الرئوية الحادة فضلاً عن التهاب المسالك البولية ؛إذ تشكل خطورة عالية جداً عند الاشخاص الذين يعانون من التليف الكيسي الهوائي بالرغم من استخدام المضادات الحيوية كطريقة علاج أولية إلا إنها ممكن أن تسبب الوفاة (Hilliam *et al* 2020; Quinn *et al*., 2011; Sadikot *et al* .,2005) .

3-2 : تواجد جراثيم الزوائف في اللحوم ***Pseudomonas* in Meat**

تعد اللحوم مصدراً غذائياً مهماً غنياً بالبروتينات والفيتامينات والحديد والعناصر المعدنية وبطبيعة مكوناتها أصبحت اللحوم بيئة جيدة لنمو انواع مختلفة من الأحياء المجهرية (Doulgeraki *et al*.; 2012;Ercolini ,2010), و تتعرض اللحوم إلى التلوث بالعديد من الكائنات الحية المجهرية ابتداء من الحقل ومرورا بنقل الحيوانات إلى المجازر واتمام عملية الفحص قبل الذبح وأيضا من خلال إجراءات الذبح وتجهيز الذبائح وقد تكون مصدر هذه الأحياء المجهرية من الحيوانات نفسها كفضلات الحيوانات البرازية أو من الحيوانات المصابة الملامسة لها والحاملة للمسبب المرضي أو عن طريق العاملين في المجزرة أو الأدوات والأسطح الملوثة التي تجعل هذه الأنواع من الأحياء المجهرية تنتشر على سطح ذبائح الحيوانات ومنتجاتها من اللحوم الطازجة ومن أشهر هذه الأنواع *Pseudomonas* و *Staphylococuus* و *Micrococcus*و *Moraxella* و*Brochothrix* و *Enterobacteriaceae* و *Flavobacterium* (Pennacchia *et al* .,2011 ;Nychas *et al* .,2008; Skandamis and Nychas 2005; jay *et al* ., 2003; Gram *et al*., 2002) ، ولتجنب نمو الأحياء المجهرية على اللحوم ومنتجاتها وجب حفظ اللحوم باتباع بعض الطرائق المعتمدة في حفظها كالتبريد والتجميد والتغليف تحت ظروف هوائية معينة والمعاملة بالمواد الحافظة والتجفيف والتعليب وغيرها ؛لإطالة مدة الخزن والحفاظ على سلامة اللحوم وضمان وصولها إلى المستهلك آمنة وغير فاسدة (Nychas *et al* .,2008; Skandamis and Nychas.,2005)، إذ تتمثل ظاهرة الفساد بمجموعة من العمليات التي تحدث باللحوم بفعل الانزيمات وبفعل الأحياء المجهرية ولا نلبث أن تتوقف فعل الانزيمات بعد انخفاض الآس الهيدروجيني للحوم بعد الذبح ووصوله إلى أقل من 5 بينما يستمر نمو ونشاط الأحياء المجهرية الملوثة للحوم مسببة فسادها(Ercolini *et al* .,2010)، تعد الزوائف المحبة للبرودة من الكائنات المتخصصة المسببة للفساد Specific Spoilage

Organism(SSO) في اللحوم والدواجن والأسماك. وتعد الأكثر شيوعاً في اللحوم على الرغم من وجود أنواع أخرى، وتسبب الزوائف الفساد في اللحوم؛ لكونه من المصادر الغذائية الغنية بالبروتين فضلاً عن احتوائها على نسبة من الرطوبة ، فبعد استنفاذ الكلايكوجين من اللحم تتمكن الزوائف من التغلغل إلى داخل اللحم وتعمل على تفكيك البروتينات مسببة الفساد وينجم الفساد عن تحلل لأحماض الآمينية في اللحوم ولاسيما الأسماك وتسهم درجة الحرارة وكمية الحديد الموجودة في اللحوم ومنتجاتها بإنتاج lipase وpeptidase من قبل الزوائف(Machado *et al* .,2017;Woods *et al* .,2001)، وأشارت البحوث التي اجريت على لحوم الأبقار والدواجن لمقارنة نمو الزوائف مع جراثيم العصيات اللبنية *Lactobacillus* إن الزوائف تتغلغل إلى داخل اللحم بفعل الانزيمات المحللة للبروتين مقارنة بالعصيات اللبنية وبالأخص *p.fargi* و*P.putida* مقارنة بالأنواع *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus plantarum* (Wickramasinghe *et al* ., 2019) . تزداد أهمية الزوائف في الأغذية المبردة؛ لكونها من الجراثيم المحبة لدرجات حرارة التبريد وبالأخص *P. lundensis ; P. flouresence P .fragi ; P. putida* التي تسبب الطعم المر والتعفن والتزنخ والتميع ،فضلاً عن تكوين الطبقة الهلامية والمخاطية على سطح منتجات اللحوم المبردة ومع استمرار التغيرات في الصفات الحسية للحوم بفعل النواتج الايضية للجراثيم تصبح هذه اللحوم غير مقبولة وغير مستساغة من قبل المستهلك (Koutsoumanis *et al* 2006) ،ازدادت أهمية الكشف عن جراثيم الزوائف في اللحوم بعد تطور الأوساط الزرعية الانتخابية الخاصة بعزلها مثل وسط اكار الستريمايد والحاوي على مواد مثبطة لنمو بقية انواع الجراثيم مثل Cephaloridine و Fucidin، تعتمد درجة الفساد في اللحوم على مستوى الآس الهيدروجيني والاوكسجين ودرجة الحرارة التي تشترك جميعها في تحديد درجة الفساد المسببة من قبل الزوائف إذ إن درجة حرارة الخزن هي عامل مهم مؤثر على نمو الزوائف في اللحوم ولاسيما في ظروف التبريد؛ لكونها من الأحياء المجهرية المحبة للبرودة (Mataragas *et al* .,2006) وتظهر رائحة اللحم الفاسد عندما يصل اعداد الزوائف إلى 10^7-10^8 cfu/g ويمكن تميزها عن طريق المكونات النيتروجينية التي تنتج مركبات طيارة كالالديهايدات والكيتونات والاسترات المسؤولة عن انتاج الروائح الكريهة عند الفساد الذي يقلل من مدة حفظ اللحوم ويخفض من جودتها (Gracy and Chiche .,2011;Yagoub ,2009) ؛ لذا فإن تقييم الصفات الحسية للحوم من حيث اللون والرائحة والملمس يعد مؤشراً؛ لوجود حالات الفساد في اللحم فضلاً عن درجة الآس الهيدروجيني التي ترتفع بوجود ظاهرة الفساد في اللحوم إلى ما يقارب 6.4 ، يختلف نمو أنواع الزوائف باختلاف انواع اللحوم ومكوناتها إذ تكون كل من *P.fragi* و*P, fluorescence* أكثر الأنواع سيادة في لحوم الدواجن المبردة بينما تكون *P.lundensis* أكثر شيوعاً في اللحوم الحمراء والأسماك على الرغم من

امكانية تواجد الأنواع الأخرى ولكن بنسبة قليلة نوعاً ما (Tryfinopoulou *et al* .,2002) ،إذ تظهر مستعمراتها باللون الأخضر؛لقابليتها على انتاج صبغة البايوسيانين ،عزلت الزوائف في مجازر الدواجن من ذبائح الدجاج وكذلك من لحوم الدجاج المعروضة في الأسواق (Chen .,2020) كما أجرى الباحثين دراسات عدة لبيان العد الكلي للزوائف في اللحوم المختلفة، منها دراسة اجريت في إيرلندا على ذبائح الأبقار قبل التبريد وبعد مرور 96 ساعة بعد التبريد إذ كان العد الكلي للزوائف قبل التبريد 1.14 $\log_{10}$ cfu/cm^2 وبعد مرور 48 ساعة بالتبريد انخفض العد الكلي للزوائف إلى 0.11 $\log_{10}$ cfu/cm^2 بعدها ازداد العد الكلي للزوائف ليصل إلى 1.86$\log_{10}$ cfu/cm^2 خلال 96 ساعة (Reid *et al* .,2015) كما تراوح العد الكلي للزوائف في ذبائح الأبقار الرومانية إلى (1.04-5.84) $\log_{10}$ cfu/cm^2 (Dan *et al* .,2003)، وأظهر العد الكلي للزوائف في ذبائح الأغنام الهندية خلال مراحل الجزر المختلفة مثل إزالة الجلد والاحشاء والغسل 3.11 و 3.09 و3.08 $\log_{10}$ cfu/cm^2 على التوالي (Bhandare *et al* ., 2007).

4-2: امراضية جراثيم الزوائف Pathogenesis of *Pseudomonas*

تعد الزوائف الزنجارية من أهم الممرضات؛ لامتلاكها مقاومة جرثومية عالية للمضادات الحيوية وظهور سلالات لها القدرة على إحداث الامراضية ولاسيما الانتانات (Gonzalez *et al* .,2016) **وتعزى** أمراضية الزوائف الزنجارية بقابليتها على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm وانتاج عوامل الضراوة وكذلك عوامل الاغشية الخلوية المتمثلة بمتعدد السكريد الدهني والاسواط وعوامل الالتصاق كالأهداب أما عوامل الضراوة الأخرى فتتمثل بالذيفانات الخارجية مثل Exotoxin S و Exoprotases وProtease $_{IV}$ و Phospholipase C وExoenzyme (Bricha *et al* .,2009) ، وتقترن عوامل الضراوة المرتبطة بالأغشية مع الاصابات المزمنة بينما تقترن عوامل الضراوة الخارجية مع الاصابات الحادة (Nikbin *et al* .,2012). وتسهم الأهداب بدور كبير في عمليات التصاق الجراثيم مع اسطح الخلايا الطلائية للمضيف مما له الأثر المهم في تكوين الغشاء الحيوي ويزيد من تلف الانسجة (Asikyan *et al* .,2008) وهناك العديد من أنظمة الافراز تلعب دوراً كبيراً في زيادة ضراوة الزوائف واخطر الانظمة نظام الافراز الثالث؛ لكون الذيفان يفرز مباشرة داخل خلية المضيف مثل EXO TOXIN-S-T-U-Y (Filloux ,2010; Davinic,2008) وتسهم الانزيمات الخارجية في زيادة امراضية الزوائف مثل Phospholipase و Elastasesو Gelatenase وكذلك الذيفان الخارجي Exotoxin A والمشفر بالجين *ToxA* بتثبيط البروتينات لتأثيره على عامل الاستطالة الثاني ADP-riposyltransferase مسبباً تحطم الخلية وتلف النسيج، أما الانزيم الخارجي S والمشفر بالجين *ExoS* يسهم في عملية الالتصاق بالخلايا الظهارية ويسبب

الموت المبرمج Apoptosis إذ لا تتأثر الزوائف بفعل الكريات البيضاء ويتم السيطرة على هذه العوامل بنظام نقل الاشارات بين الخلايا ويطلق عليها بظاهرة الاستشعار Quorum sensing . Wolska . and Szweda,2009.

5-2:الانتانات والاصابات Infections

تعد الزوائف من أهم الجراثيم المسببة لالتهاب الجهاز التنفسي وإحداث التهاب الرئة وبنسبة 14% من مجمل الامراض الرئوية إذ تسبب العديد من الأمراض في الجهاز التنفسي، ومنها الانتان الرئوي الانسدادي المزمن Chronic Obstructive Pneumonia Disease (COPD) (Rojo-Molinero *et al*.,2016) ، أما الالتهاب الرئوي المكتسب (HAP) يعد من الأمراض الشائعة الانتشار إذ يرتبط بمعدل وفيات عالية ويعد ثاني مسبب للعدوى الرئوية (Awad *et al*., 2014) وتتسبب الزوائف بالإصابة بهذا النوع بمعدل 15 – 20 % من الاصابات(Rangel *et al* .,2014). وعادةً ما يحدث التهاب ذات الرئة عند الاشخاص المصابين بأمراض نقص المناعة إذ تصل الإصابة بجراثيم الزوائف عبر الدم إلى الرئتين ويمكن أن تكون الزوائف أحد مسببات انتان الأذن بنسبة تصل إلى 50 % (Glikson *et al* .,2017) وانتان العين نتيجة استخدام العدسات الملوثة Jebur *et al* .,2015; Rossolini and Mantengoli,2005 ،فضلاً عن انتانات القناة البولية إذ تصل نسبة الإصابة بجراثيم الزوائف 7% ولاسيما بعد العمليات الجراحية والقسطرة البولية لقابلية هذه الجراثيم على تكوين الغشاء الحيوي على اسطح الأدوات والمعدات الجراحية(Sarabhai *et al* 2016).

6-2: وبائية جراثيم الزوائف Epidemiology of *Pseudomonas*

تتواجد الزوائف الزنجارية بشكل واسع في بيئات مختلفة منها البيئة المائية كما عزلت من مياه الصرف الصحي الملوثة ومن مياه الينابيع الحارة الملوثة بالمشتقات النفطية (Wongsa ,*et al* .,2004;Mllah *et al*; .,2012) وكذلك عزلت من الترب الزراعية والملوثة ؛لقدرتها على استخدام الكاربون كمصدر للطاقة ،فضلاً عن امتلاكها مقاومة التراكيز العالية من المعادن الثقيلة مثل الكادميوم والكوبالت والزنك (Pitonodo -Silva *et al* .,2016; AL –Saleh and Akhbar ,2015) ،تنتشر الزوائف في محيط بيئة الحيوانات ويمكنها أن تتسبب في العديد من الأمراض إذ يمكن أن تسبب الإصابة ببعض الحالات المرضية في الدجاج ونفوقها ، مثل الأمراض التنفسية التي يرافقها ضيق في التنفس واحتقانات الاعضاء الداخلية وغشاء التامور مسببة خسائر اقتصادية كبيرة في الدواجن نتيجة الهلاكات

العالية وموت الأجنة المبكر، كما يمكن أن تسبب الخراجات القيحية في الماشية (Shukla and Mishra.2015; Hossain *et al* .,2013; Walker *et al* .,2002) ،و يمكن أيضاً أن تسبب انتانات في الأذن الخارجية عند الكلاب (De martino *et al* .,2016) تكون الطيور بكافة اعمارها حساسة للإصابة بالزوائف الزنجارية ولاسيما الطيور صغيرة العمر ويمكن أن تكون عدوى الإصابة بالزوائف الزنجارية في الطيور ميكانيكياً عن طريق الجروح والخدوش في الجلد أو ناجمة عن استعمال أدوات ملوثة اثناء التلقيح وتسهم الحالة المناعية للطائر في زيادة حساسية اصابة الدواجن بهذه الجراثيم فقد عزلت الزوائف الزنجارية من حقول الدواجن بنسبة 12% من الدجاج السليم وبنسبة 30% من الدجاج المريض (Satish and Priti,2015) وعزلت بنسبة 8.75% من عينات لحوم الدواجن (Farghaly *et al* .,2017) ومن الأجنة النافقة في القشرة بنسبة 52 % وعزلت من المفاقس بنسبة 8 % (Eraky *et al* .,2020) وبسبب قابلية التكيف العالية للزوائف مع البيئات المختلفة تمكنت هذه الجراثيم من التواجد في الأغذية مسببة فساد الغذاء ولاسيما الأغذية ذات المنشأ الحيواني الجاهزة للاستهلاك كاللحم والحليب ومنتجات الألبان لقابليتها العالية على انتاج انزيم Protease (Caldera *et al* .,2016).

2-7: تشخيص جراثيم الزوائف Diagnosis of *Pseudomonas* spp

يعتمد في تشخيص جراثيم الزوائف على طرائق عدة تتضمن الطرائق التقليدية المعروفة بالاعتماد على التشخيص المظهري والفحوصات الكيموحيوية، فضلاً عن الطرائق الجزيئية الحديثة ومنها تقنيات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR و تقنية الوقت الحقيقي R T –PCR (Eusebio,2013) .

2-7-1: الطرق التقليدية Routine Methods

وهي من الطرق المعتمدة في عزل الزوائف وتشخيصها بالاعتماد على النمو الميكروبي و الخصائص المظهرية و الزرعية للزوائف من إذ شكل ومظهرو قوام المستعمرات الجرثومية وقابليتها على انتاج رائحة مميزة ،فضلاً عن قابلية بعض العزلات على تحلل الدم وبيان نوع التحلل وكذلك قابليتها على انتاج الصبغات ، فالبعض من السلالات لها القابلية على إنتاج صبغة مزرقة وهي البيوسيانين التي تنتشر في الاكار وبعضها تمتلك قابلية انتاج صبغة متألقة كالبيوفردين إذ تظهر لوناً مخضراً في الاكار , وتنتج بعض العزلات صبغة حمراء pyorubin والبعض الأخر صبغة سوداءpyomelanin (Tador, 2012) Carrol *et al* .,2016. تظهر عزلات الزوائف ثلاثة أنواع من اشكال المستعمرات الجرثومية منها صغيرة خشنة إذا كان مصدرها من التربة والماء في حين العزلات السريرية غالباً ما تكون مستعمرات

ناعمة وحواف مسطحة (Min and Xuefeng, 2015) ،يعد وسط اكار الستروماید وسط انتخابيا لهذه الجراثيم (Bhatia and Ichhpujani, 2008)؛ ونظراً لقلة احتياج الزوائف إلى المواد الغذائية فأنها تمتلك قابلية التكيف مع الظروف المختلفة التي لا تستطيع بقية الأحياء المجهرية التعايش معها (Alice) 2012,،ومع ذلك فإن هذه الطرائق في تشخيص الزوائف تواجه بعض الصعوبات في التشخيص الدقيق بسبب تغيرات النمط المظهري وعدم بيان الخصائص الوراثية المطلوبة للتحقق من الأنماط الممرضة لجراثيم الزوائف (Eusebio *et al* .,2013 ;Ferroni *et al* .,2002)

2-7-2: الطرق الجزيئية Molecular Methods

تتمثل الطرائق الجزيئية بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وهي تقنية تعتمد على مضاعفة DNA في المختبر واكتشفها العالم Kary Mullis سنة 1938 وحازت على جائزة نوبل عام 1993 وتعد من التقنيات الدقيقة والسريعة؛ لكونها تعتمد في التشخيص على وجود الحامض النووي منقوص الأوكسجين بكل نوع من أنواع الجراثيم التي يصعب التعرف عليها بالطرائق التقليدية (Yamamoto ,2002).ويستعمل الجين 16SrRNA في تشخيص وجود الزوائف من المصادر المختلفة؛ لتميزها عن باقي الأجناس البكتيرية الأخرى(Hussien *et al* .,2012) واعتمد الكثير من الباحثين الجين *rpoB* في تشخيص الزوائف الزنجارية (Benie *et al* .,2017) ومن ايجابيات هذه الطرائق في التشخيص التعرف على تتبع العزلات الوبائية الممرضة لهذه الجراثيم ،فضلاً عن تقليل الوقت والجهد والكلفة اللازمة للتشخيص المعتمد في الطرائق التقليدية مع دقة النتائج، فضلاً عن إمكانية حفظ الحامض النووي الخاص بالجرثومة في درجات حرارة مناسبة(Basu *et al*.,2015; Blance, 2004; Leal-Klevezas *et al*.,2000)، فضلاً عن اعتماد هذه التقنية في التعرف على وجود جينات الضراوة التي تمتلكها الزوائف (Benie *et al* .2017;Ercolini *et al* ., 2007).ومع ذلك فإن هذه التقنية لا تخلو من بعض السلبيات أثناء عزل DNA وحفظة (Wassenegger,2001) ، تعتمد هذه التقنية على مبدأ مضاعفة قطع من الحامض النووي ملايين المرات بواسطة البوادئ المتخصصة وبفعل الانزيمات في مدة زمنية سريعة إذ يظهر DNA المتضاعف بشكل حزم ترحل على جل الاكاروز وبوجود الصبغة يتم التعرف على وجود الجراثيم ، تتضمن هذه التقنية مراحل عديدة تبدأ بتجهيز خليط التفاعل الحاوي على الحامض النووي مع البوادئ المتخصصة وبوجود انزيم taq-polymerase مع الماء المقطر المتاين والخالي من الاحماض النووية يليها مسخ الحامض النووي لفصل شريطي DNA في درجة حرارة 95 مْ لتكسير الأواصر الهيدروجينية بين الشريطين، بعد ذلك يبرد الخليط التفاعل ليرتبط مع البوادئ في المنطقة المراد تضخيمها في سلسلة قالب الDNA وهذه

البوادئ إما تكون عامة (Universal) أو بوادئ خاصة (Specific) ويحدث الارتباط بدرجة حرارة بين 55مْ – 65 مْ لبناء الأواصر الهيدروجينية يعقبها مرحلة استطالة البادئات DNA Extension بدرجة حرارة 72مْ -75مْ (Witter. and Farrar,2011).

2-8:عوامل الضراوة للزوائف Virulence factor of *Pseudomonas*

إن اهم ما يميز جراثيم الزوائف هو قابليتها الأمراضية الانتهازية التي تعود إلى امتلاكها عدد كبير من عوامل الضراوة والمشفرة بجينات متموضعة تحت سيطرة منظومة ظاهرة الاستشعار Quorum sensing إذ تهاجم خلايا المضيف بمجموعة من العوامل، و لكل عامل تأثير على بروتينات و مستقبلات خاصة به تعمل على تعطيل الأليات الدفاعية في جسم المضيف إذ تقاوم عمليات البلعمة (Stones and Krachler,2015;Cohen *et al*.,2015; Okuda *et al* .,2010). وللزوائف عوامل ضراوة عديدة تتمثل بالصبغة والأسواط والأهداب والغشاء الحيوي والا لجينات وحاملات الحديد .

2-8-1: الصبغة Pigment

تتميز الزوائف بإنتاجها مجموعة من الصبغات مثل اللون الأصفر أو الأخضر والأحمر والبني و أنواع أخرى من الصبغات تضم الكلورافين و الهيدروفينازين ولكن تعد الصبغة الزرقاء البيوسيانين الصبغة المهمة ؛لدورها في الأمراضية ولاسيما أمراض الرئة؛ لكونها تحمي الزوائف من تأثير أهداب الخلايا الطلائية المتواجدة في الجهاز التنفسي إذ تمنع تأثير الانترلوكين2 (IL-2) مؤدية إلى نقص الكلوبولينات المناعية المفرزة ، ومن ثم يؤدي لافراز الانترلوكين8 (IL-8) , مسبباً سمية الخلايا العدلة إذ يمكن لهذه الصبغة أن تخترق الخلية من خلال غشائها؛ نتيجةً لانخفاض وزنها الجزيئي و قدرتها على توليد الأوكسجين ومن ثم تحدث ضرراً كبيراً في خلايا الانسان(Pastells *et al*., 2016;Hall *et al*.,2016;Prabhu *et al*.,2014;Fuse *et al*.,2013). وأشارت العديد من الدراسات إلى تباين الزوائف بإنتاج الصبغات من إذ كميتها بحسب مكان الإصابة ،فمثلاً اصابات الأذن بلغت كمية الصبغات 7.8 µm وفي اصابات الجروح 8.1 µm (Hall *et al*.,2016) وتمتاز بعض الصبغات بصفة المضادات الحيوية؛ لكونها مضادة لنمو العديد من الأحياء المجهرية كالجراثيم و الفطريات و الطحالب (Prabhu *et al*.,2014). .

2-8-2: السوط Flagellum

تحتوي الزوائف على سوط قطبي وحيد يتكون من بروتين Flagellin ؛ مما يجعلها أكثر ضراوة من بقية أنواع الجراثيم التي لا تمتلك الاسواط (Korpi *et al*.,2016)، إذ تسهم الأسواط في حركة وانجذاب الكائن المجهري من المصدر الغذائي ، بالاضافة الى دوره في الالتصاق بالمستقبلات في خلايا المضيف (Tingpej, 2008).

3-8-2: الاهداب Pilli

في مطلع القرن العشرين عرفت الشعيرات الخاصة بجراثيم الزوائف بكونها زوائد سطحية مرنة تسهم في حركة الجراثيم ، وفي التصاق الخلايا الجرثومية على سطح الخلايا الظهارية الموجودة على سطح المضيف إذ تتكون هذه الشعيرات من بروتين معقد يسمى Pilin على الغشاء الداخلي و الخارجي مروراً بالمحيط السايتوبلازمي إذ تنجم الحركة عن طريق تقلص و امتداد الوحدات البروتينية التي ترتبط بدورها مع الوحدات الموجودة داخل الخلية (McCallum *et al*.,2016)، بينما الزوائف التي لا تمتلك هذه الاهداب ؛ نتيجة لحدوث الطفرات تكون أقل ضراوة من بقية الأنواع وذلك لتحديد قدرتها على الانتشار (Korpi *et al*.,2016). كما في الشكل (2-1)

4-8-2: الخمل Fimberia

الخمل أحد عوامل الأمراضية لجراثيم الزوائف، وظيفته تكوين مستعمرات على أسطح أنسجة المضيف و تكوين الغشاء الحيوي، وبذلك يسهم الخمل في الالتصاق و الحركة ويسيطر عليه جينات خاصة لها دور في ضراوة الخمل (Mikkelsen *et al*.,2011; Kulasekara *et al*.,2005).كما في الشكل (2-1)

5-8-2:الغشاء الحيوي Biofilm

يمثل الغشاء الحيوي تجمعاً من مستعمرات الزوائف المرتبطة مع بعضها على الأسطح بمساعدة عدد من السكريات والاحماض النووية والبروتينات ، إذ إن عملية تكوين الغشاء تكون استجابة لعوامل عدة تتمثل بانخفاض الآس الهيدروجيني و نقص المواد المغذية مما يؤمن بقاء المستعمرات الجرثومية حية ويعد وجود الغشاء الحيوي صفة مهمة لاستمرار وبقاء الإصابة بالزوائف (Sharma *et al* .,2014)، إن امتلاك الزوائف الغشاء يجعلها أكثر مقاومة للظروف المحيطة مقارنة مع باقي انواع الجراثيم إذ يتشكل هذا الغشاء

اعتماداً على قابلية الزوائف على الالتصاق على الأسطح وبمساعدة الاهداب و الخمل يليها تجمعاً للخلايا الجرثومية على شكل مستعمرات، وتبدأ بالارتباط مع بعضها وتنضج و تشكل الغشاء الحيوي إذ يأخذ شكلاً مميزاً يجعله قادراً على مقاومة المضادات الحيوية و مقاومة عمليات البلعمة (Sharma *et al*.,2014). ، تعد مادة Rhamnolipids من النواتج الايضية الثانوية التي تفرز خارج الخلية ولها خصائص فعالة تنتجها الزوائف الزنجارية و تسهم في ثبات الغشاء الحيوي، لأنها مقاومة للحرارة العالية و الملوحة و درجات الحموضة وتقاوم نقص المواد الغذائية وحالات الاجهاد مما يجعل وجودها ضرورياً في الحفاظ على التصاق المستعمرات الجرثومية ببعضها البعض ويتم السيطرة على انتاج هذه المادة في الزوائف من خلال ظاهرة الاستشعار الضرورية لاستمرار الاغشية الحيوية (Slonezewski and Foster, 2014;Davey *et al* 2003)., إذ إن التراكيز القليلة منها تسهم في زيادة الجذب للخلايا تمهيدا لبداية عملية الالتصاق على الأسطح وإن التراكيز العالية منها في الوسط المحيط يمنع التصاق الخلايا في حين أن في مرحلة التكاثر تكون هذه المادة أكثر فعالية للحفاظ على بقاء الاغشية الحيوية وفي المراحل المتأخرة من تطور الغشاء الحيوي تحفز هذه المادة حركة الخلايا (Nickzad and Dézie,2014).

2-8-6: حاملات الحديد Siderophore

حاملات الحديد هي مركبات عضوية ذات وزن جزيئي منخفض تفرزها البكتريا للحصول على الحديد الضروري لنمو الجراثيم وزيادة ضراوتها خاصة المنتجة للبيوفردين إذ تستعمل هذه الصبغة كحاملات حديد من قبل الزوائف الزنجارية لالتهام الحديد من بروتينات المضيف وهي تعمل كمؤشر تنبؤي لإنتاج عاملين مهمين من عوامل الضراوة Exotoxin A وEndoprotenase (prpl) وكذلك أنواع الزوائف المتألقة المنتجة للبيوفردين تعد من جراثيم حاملات الحديد الرئيسية (Lamont *et al*.,2002).

2-8-7:الالجينات Alginate

تلعب الالجينات دوراً مهماً في ضراوة جراثيم الزوائف من خلال تكوين الغشاء الحيوي المخاطي ،إذ تكون الالجينات عبارة عن سكريات خارجية متعدد تساعد الجراثيم في إحداث العديد من الامراض كالتهاب الرئتين المزمن نتيجة لإفراز الزوائف لهذه الالجينات ومن ثم تحولها إلى المظهر المخاطي الذي يساعد على نمو مستعمرات صغيرة ،يحدث افراز هذه الالجينات نتيجة استخدام المضادات الحيوية وهذه الالجينات تلعب دوراً كبيراً في حماية جراثيم الزوائف من الخلايا الدفاعية و الخلايا البلعمية الاخرى Qiu ; Rowe, 2013 (Tan *et al*.,2014 *et al*.,2008).

2-8-8: أنظمة الإفراز Secretion systems

أنظمة الإفراز هي أنظمة ذات بنية بروتينية عالية التخصص وتعد أهم عوامل الضراوة التي تمتلكها الزوائف والتي تمكن الجراثيم من تكوين مستعمرات على خلايا أنسجة المضيف مسبباً تلف النسيج عبر إفراز الذيفانات في بيئة المضيف من خلال هذه الأنظمة إلى خارج الخلية الجرثومية (Costa *et al*.,2015 ;Thomas *et al*.,2014). هناك ستة أنظمة من أنظمة الإفراز يتواجد النظام الثاني والخامس على الغشاء الخارجي في حين تتواجد باقي الأنظمة على الغشاء الداخلي والخارجي (Xu and Liu ,2014; Bleves *et al*.,2010)، تكون آلية عمل هذه الأنظمة على نوعين آلية افراز بخطوة واحدة يتم فيها إفراز البروتينات بشكل مباشر إلى الوسط الخارجي من دون المرور في البلازما والآلية الثانية هي الإفراز بالخطوتين تتمثل بمرور البروتينات المفرزة إلى البلازما المحيطية لمدة وجيزة ثم تطرح إلى الوسط الخارجي وبمساعدة قنوات موجودة في الغشاء الخارجي للبروتين متخصصة لنقل البروتينات عبر طبقة اللبيدات إلى الوسط المحيط(Costa *et al*.,2015)، تمتلك الزائفة الزنجارية نظام الإفراز الثاني ويتمثل بنوعين النوع الأول تفرز من خلاله ما يقارب 12 بروتين مثل Exotoxin A -Las A-LasB تحت سيطرة ظاهرة الاستشعار التي تؤثر بشكل جدي في أمراضية الزوائف ،والنوع الثاني يعمل على إفراز انزيم الفوسفاتيز القاعدي عند انخفاض تركيز الفوسفات (Cadorate *et al* .,2014)كما تعد الزائفة الزنجارية من الجراثيم القادرة على تكوين مستعمرات في بيئات متعددة؛ لامتلاكها الحركة بمساعدة السوط والاهداب اللذان يوفران حركة منتظمة بين الخلايا الجرثومية يطلق عليها الحركة الرعاشية twichig motility تساعدها على تكوين الغشاء الحيوي (Anyan *et al* .,2014).

2-8-9:الذيفانات Toxins

تمتاز جراثيم الزوائف بإمراضيتها الانتهازية ، الذي يعتمد على انتاجها للعديد من عوامل الضراوة المرتبطة بالخلية وخارجها ،إذ تلعب عوامل الفوعة دوراً مهماً في الأمراضية فضلاً عن دورها بمساعدة جراثيم الزوائف بالبقاء مدة أطول على الأنسجة (Ben HajKhalifa *et al* .,2011).

2-8-9-1: انزيم Carbamoyl Phosphate Synthase

يعد جين *CarA* (Carbamoyl Phosphate Synthase sub unit A) أحد الجينات المهمة لفعالية انزيم (Glutamine amino transferase) الضروري لإزالة مجموعة الأمونيا من الحامض الأميني الكلوتامين أثناء تصنيع البيور ينات والبرميدينات، وهذا الأنزيم بدورة يعد المادة الأساس لتكوين النيكلوتيدات الارجنين والبيرميدين بمسار متبادل إذ تمتلك الزوائف الزنجارية تعبير عن جين *CarA* تحت سيطرة البرميدينات والحامض الاميني الارجنين وهذا يعطي دلالة على أن جين *CarA* يعطي تعبيره بدلالة الارجنين واليوراسيل(Zhang *et al* ., 2010; Nojiri *et al* ., 2001)، يتكون هذا الجين من وحدتين subunit ،أحدهما صغيرة يتم تشفيرها بالجين *CarA* الذي يمتلك طفرات عديدة للحصول على الارجنين الضروري للنمو الأمثل والأخرى كبيرة يتم تشفيرها بالجين *CarB* ،والمسؤول عن حدوث الطفرات التي تعزز من قابلية الأحياء المجهرية على غزو أنسجة المضيف، علماً أنها لا تمتلك قابلية التكاثر داخل جسم الكائن الحي ، يوجد منطقتين تحفيز لهذا الجين promotion region ، المحفز الأول العلوي هو محفز للبرميدين والمحفز الثاني السفلي للارجنين ويكون تحت سيطرة الارجنين وأيضاً يؤثر على عوامل أخرى التي تعد مهمة لنمو ومعيشة الكائنات الحية اثناء الإصابة (Butcher *et al* .,2016)، أشارت بعض البحوث إلى ارتباط هذا الجين بضراوة بعض الانواع البكتيرية الممرضة مثل عصيات السل والليستيريا والزوائف والاشريكيا القولونية وغيرها (Hilario *et al* .,2004).

2-8-9-2: الذيفان الخارجي Exotoxin A

هو أحد البروتينات ذات السمية العالية شديدة الضراوة ويفرز هذا النوع السام (*ToxA*) من خلال إنزيم خارج الخلية (Exotoxin A) إذ يعمل لوحده أو بالتآزر مع انزيمات أخرى محللة تسبب موت ونخر حاد في خلايا الإنسان المضيف (Wolska and Szweda,2009). تكمن خطورته في تثبط تصنيع البروتين في خلايا المضيف من خلال نقل ADP-ribosyl transferase لجزء ADP-ribosyl إلى عامل استطالة EF2 (Extension Factor 2)وبذلك يمنع استطالة البروتين على الرايبوسوم (Kipnis *et al* 2006).، ولهذا الذيفان دورٌ في غزو الانسجة ،ولاسيما حالات التليف الكيسي وتكون السلالات غير المنتجة للذيفان الخارجي ذات ضراوة أقل مقارنة بالسلالات المنتجة له (Davinic *et al* .,2009).

2-8-9-3:الغشاء الخارجي Outer Membrane

تؤدي الاغشية الخارجية لخلايا جراثيم الزوائف دوراً مهماً في افراز(Outer-membrane lipoprotein) *OprL* إذ يؤدي هذا الجين أدواراً مهمة في تفاعل البكتريا مع البيئة ،فضلا عن مساعدته في مقاومة الجرثومة للمضادات الحيوية بالتأثير على أنظمة التدفق ومن ثم تؤثر على نفاذية الخلايا (Khattab *et al* ., 2015).

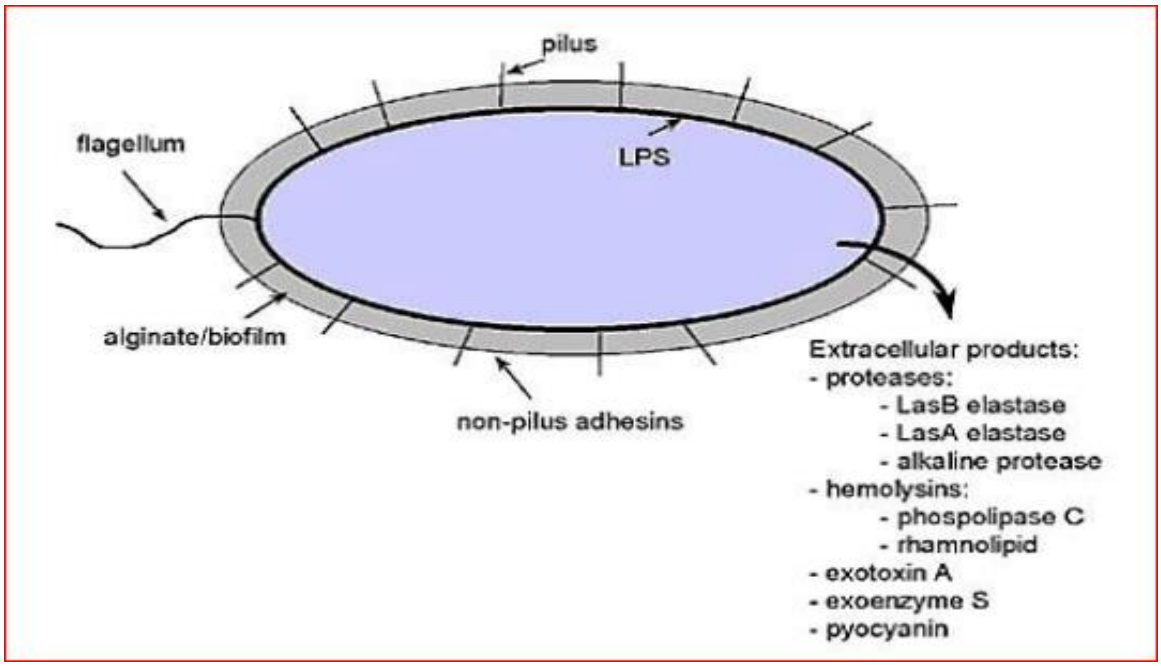
2-8-9-4:الهيمولايسين Hemolysin

وهو يعد أحد عوامل الضراوة التي تنتجها جراثيم الزوائف ويكون على نوعين النوع الأول Phospholipase C إذ تفرز الزوائف الزنجارية ثلاثة أنواع من Phospholipase c الأول يمتلك قابلية التحلل *plcH* والثاني لا يمتلك قابلية التحللplcN والأخير له دورٌ مهمٌ في تحفيز الحركة الرعاشية والجذب الكيميائي *plcB* ، يفرز *PlcH* عند وجود نقص الفوسفات من خلال نظام الإفراز الثاني ،ويعتمد وجود هذا الجين في الزوائف الزنجارية كمؤشر على ضراوة هذا النوع من الزوائف وخطورته الإمراضية (Fadhil *et al* .,2016) ،أما النوع الثاني Rhamnolipids يؤدي إلى تثبيط الحركة الهدبية للخلايا الطلائية في الإصابات التنفسية (Roger and Ibrahim ,2012)، تمتلك الزوائف الزنجارية هذا الجين الذي يشفر انزيم Phospholipase H المحلل وبشكل خاص على Phosphatidylcholine وSphingomyline ويلعب دوراً في إمراضية هذه الجراثيم وضراوتها ويثبط الخلايا العدلة مسبباً حدوث الإصابات الرئوية .

2-8-9-5: الذيفان الخارجي Exotoxin S

يتم إفراز عوامل الضراوة الخارجية للسموم الخارجية من خلال آلية الإفراز من النوع الثاني ، والتي تستخدم جهازًا يشبه pilus لإفراز البروتينات في البيئة خارج الخلية ، بما في ذلك Lipase وPhospholipase و Alkaline phosphatase وProtease. أشارت التجارب على الحيوانات إلى الدور المهم لهذه العوامل في إحداث العدوى، يحتوي هذا النوع على بروتين منشط (N –terminal GTP) و (C-terminal ADP ribosylation) مشفر بواسطة جين *exoS* يثبط البلعمة عن طريق تعطيل الهيكل الخلوي للأكتين والالتصاقات ،فضلاً عن عمليات نقل الاشارة ، إذ يعد هذا السم من السموم الرئيسة في

عمليات الغزو البكتيري وعمليات الانتشار للبكتيريا أثناء العدوى ، إذ يفرز في مرحلة ثابتة من النمو في ظل التغيرات البيئية مثل نفاذ الكالسيوم او عند الاتصال بالخلية المضيفة (Wolska and Szweda,2009).



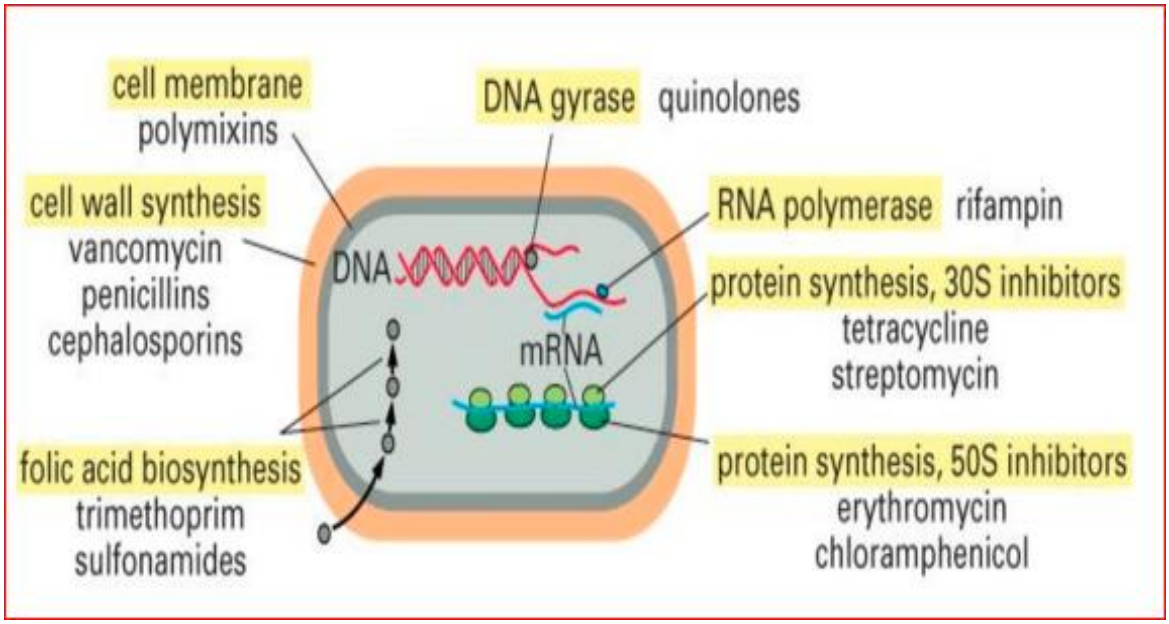
الشكل (2-1) عوامل الضراوة لجراثيم الزوائف (Delden and lglewsk,1998)

2-9:مقاومة بكتريا الزوائف للمضادات الحيوية *Pseudomonas* resistance to antibiotics

اكتشفت المضادات الحيوية من قبل العالم (الكسندر فليمنك)عام 1929 ولعبت دوراً مميزاً في تقليل خطر الإصابة بالعديد من الأمراض فضلا عن إلى تقليل نسبة الوفيات ، تتميز المضادات بامتلاكها للعديد من الاليات المختلفة في منع وتقليل النمو الجرثومي(Mahmoud *et al* .,2013)

إن مفهوم جودة اللحوم هو مفهوم واسع يتأثر بالمتغيرات الداخلية والخارجية المتعلقة بالحيوانات ، ويعتمد تقييم جودة اللحوم على المستهلكين اعتماداً على بعض الصفات الحسية الجيدة للحوم ، ولتجنب الخسائر الاقتصادية توجب على منتجي اللحوم تلبية متطلبات حاجة المستهلك من إذ المواصفات النوعية والحسية وبشرط ضمان بقاء اللحوم ومنتجاتها آمنة من الناحية الميكروبيولوجيه خلال مدة الخزن

(Mills *etal*.,2014) ،ويحدث الفساد في اللحوم بفعل عوامل عديدة منها الاكسدة والتحلل الأنزيمي والنمو الميكروبي متأثرا بالعوامل الإدارية المتعلقة بظروف التربية ونوع وعمر الحيوان مدة الذبح وغيرها وتتغير قيمة الآس الهيدروجيني للحوم مع حدوث حالات الفساد الميكروبي بفعل جراثيم الزوائف مؤدية إلى فقدان اللون الطبيعي للحوم وظهور علامات الفساد من الروائح غير المقبولة ، وظهور الطبقة المخاطية الهلامية (Dave and Ghaly 2011; Miller 2002) , تمتلك الزوائف أهمية كبيرة في اللحوم والحليب لفعاليتها العالية في إنتاج الانزيمات المحللة للبروتينات والدهون، فضلاً عن تكوين الغشاء الحيوي الذي يؤثر على نوعية اللحوم (Abd El-Ghany 2021 ; Rawat , 2015) ومن بين أنواع الزوائف المهمة في اللحوم هي الزوائف الزنجارية التي تعد من الممرضات الانتهازية المقترنة بحدوث حالات الفساد في اللحوم وتقلل من مدة صلاحية اللحوم للاستهلاك كما أنها تعد من الممرضات التي لا تستجيب للعلاج بالعديد من المضادات الحيوية من خلال قلة نفاذية الاغشية الخلوية الخارجية وإنتاج الانزيمات المثبطة لفعل المضادات الحيوية ،ومضخات التدفقات التي تطرح المضاد الحيوي خارج الخلية منتجة جينات ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية وجميع هذه الميكانيكيات تشكل خطراً مهدداً لصحة الإنسان والمستهلك (Aloush *etal*.,2006 ; Cosgrove and Carmeli,2003 ; Hancock and speert,2000)، ويحدث ذلك إما بسبب طفرة بالكروموسوم أو عن طريق البلازميد باكتسابها جين مقاوم أوعن طريق جين قافز Transposone وكذلك عن طريق الغشاء الخارجي للخلية الذي يقلل ويمنع عبور هذه المضادات الحيوية إلى الخلية عن طريق القنوات البروتينية الموجودة فيه فضلاً عن أن نفاذية الغشاء في جراثيم الزوائف أقل من بقية الجراثيم بحدود (10-100)مرة ،وبذلك يتيح لها المقاومة للمضادات الحيوية (Odumosu *et al* .,2013; Boussoualim *et al* .,2014) ،وفي الوقت الحاضر أصبحت مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية من المشاكل الشائعة والحرجة في كل انحاء العالم (Idrees,2012). وكما موضح في الشكل (2-2).



الشكل (2-2)الية عمل المضادات الحيوية على الخلية الجرثومية (Islam,2008)

صنفت المضادات الحيوية إلى مجاميع عدة على ضوء فعاليتها ضد جراثيم الزوائف ومنها مجموعة B-lactam مثل Penicillin's والسيفالوسبورينات مثل (Cefotaxime and Ceftazidime) ومجموعة Monobactams مثل (Aztreonam) ومجموعة Carbapenems مثل (Meropenem) ومجموعة Aminoglycoside مثل(Gentamicin and Tobramycin) ومجموعة Quinolones التي تضم (Ciprofloxacin and Levofloxacin) (Black,2012). تعد مجموعة B-lactam من المجاميع المهمة والشائع استخدامها إذ تعمل على تثبيط الجدار الخلوي للبكتريا من خلال ارتباطه بمواقع خاصة تسمى (Penicillin Binding Protein) وتثبيط انزيم Trans peptidase المهم في تكوين جسور ببتيدية ضمن جدار الخلية (Zervosen *et al.*,2012; Konaklieva,2014)، تؤثر مجموعة Aminoglycoside تأثيراً واسع الطيف للجراثيم السالبة والموجبة لصبغة الكرام إذ تعمل على تثبيط تصنيع البروتين من خلال الارتباط 30s ويكون قاتل للخلية الجرثومية (Hermann,2007).في حين مجموعة Quinolones تثبط الخلية الجرثومية من خلال تثبيط تخليق الحامض النووي (DNA) عن طريق تثبيط انزيم DNA gyrase في الجراثيم السالبة لصبغة الكرام (Fabrega *et al.*,2009). تنتج الجراثيم السالبة لصبغة الكرام انزيمات خاصة تسمى انزيمات B-lactamase ومن هذه الجراثيم هي الزوائف إذ تكون هذه الانزيمات محمولة على الكروموسوم وتعمل على حماية الخلية الجرثومية من تأثير المضادات الحيوية ومنها مضادات B-lactam، وتتميز بوجود نوعين من هذه الانزيمات منها المنتظم

والذي يفرز بشكل طبيعي بدون الحاجة إلى محفز والنوع الثاني الذي يحتاج إلى محفز وهذا النوع يفرز بكميات كبيرة وهناك نوع ثاني من انزيمات B-lactamase تكون محمولة على البلازميد، وهذه أكثر شيوعاً من النوع الأول؛ وذلك لقدرتها على الانتقال من خلية جرثومية إلى خلية جرثومية أخرى ؛ولهذا فان الانتشار الواسع لاستخدام المضادات الحيوية أدى إلى ظهور المقاومة البلازميدية للمضادات الحياتية (Mohamudha *et al*.,2012).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Material and Methods

3-1:المواد Materials

3-1-1: الاجهزة المختبرية Laboratory Equipments

تم استعمال العديد من الاجهزة والمواد المختبرية في الدراسة الحالية وكما مدرج في الجدول (3-1)

جدول (3-1) الأجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة الحالية

ت	اسم الجهاز	المصطلح	الشركة المصنعة	المنشأ
1	المجهر الضوئي	Microscope	Olympus CX21	Japan
2	جهاز الطرد المركزي	Bench centrifuge	Labew	China
3	ثلاجة	Refrigerator	Beko	Turkey
4	جهاز الطرد المركزي	Eppendrof microcenterfuge	Wisd	Germany
5	ميزان الكتروني حساس	Sensitive electric balance	Want	China
6	جهاز تقطير	Water distiller	H20 labs	China
7	حمام مائي	Water bath	Germany	Taiwan
8	حاضنة	Incubator	Memmert	Germany
9	مؤصدة	Autoclave	Suglod	China
10	جهاز مسخن حراري دوار	Hote plate stirrer	Worner lab	China
11	جهاز الفايتك	Vitek-2 compact	Bio Merieux	France
12	فرن المايكروويف	Microwave oven	LG	Korea
13	جهاز مزج العينات	Vortex shaker	Thermo	USA
14	جهاز المدوار الحراري	Thermocycler	Biorad	USA
15	جهاز الترحيل الكهربائي	Gel electrophoreses	Biorad	USA

		system		
USA	Biorad	Gel doc EZ gel documentation system	جهاز تصوير هلامه الاكاروز	16
China	Dragon	Micropipettes	ماصات دقيقة وبأحجام مختلفة	17
Indian	Himedia	Bacteriological loop	ناقل جرثومي	18
China	Shengguang	Disposable syringe	حقن طبية نابذة	19
China	Citotest	Disposable petry dish	اطباق بتري نابذة	20
China	Citotest	1.5 ml Eppendrof tubes	انابيب ابندروف	21
China	Citotest	Conical flask	دورق زجاجي مخروطي	22
China	Citotest	PCR tube 0.2 ml	أنابيب ابندروف	23
China	Citotest	Rack	حامل انابيب متنوع الاحجام	24
China	Citotest	Tips different sizes	رؤوس ماصات	25
China	Citoglass	Microscopic slides	شرائح زجاجية	26
China	Citotest	Test tubes	أنابيب اختبار	27
Germany	Macherey-Nagle	pH test paper	شرائح قياس الاس الهيدروجيني	28
China	Citotest	Surgical scissor	مشرط جراحي	29
Turkey	Global laboratory medical	Plastic container	حاويات بلاستيكية معقمة لجمع العينات قياس 50 مل	30
Denmark	Radiometer	pH –meter	جهاز قياس الحموضة	31

2-1-3: الأوساط الزرعية Cultural Media

استخدمت عدد من الأوساط الزرعية والمجهزة من شركات مختلفة لغرض عزل جراثيم الزوائف من اللحوم وكما موضح في الجدول (3-2).

جدول (3-2): الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة

ت	الوسط الزرعي		الشركة المصنعة	المنشأ
1	وسط اكار السترمايد	Certimide agar	Neogen	USA
2	وسط الاكار المغذي	Nutrient agar	Neogen	USA
3	وسط King –A	King –A medium	Himedia	Indian
4	وسط King –B	King –B medium	Himedia	Indian
5	مرق نقيع القلب والدماغ	Brain-Heart infusion Broth	Himedia	Indian
6	وسط ماء الببتون	Peptone water	Neogen	USA
7	وسط اكار مولر-هنتون	Muller-Hintone agar	Himedia	Indian
8	وسط استهلاك السترات	Simmon’s citrate agar	Himedia	Indian
9	وسط اكار الحديد ثلاثي السكر	Triple Sugar Iron Agar (TSI)	Himedia	Indian

3-1-3:المواد الكيميائية والكواشف Chemicals and Reagents

استخدمت العديد من المواد الكيميائية والكواشف المختلفة في الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول (3-3).

جدول (3-3) المواد الكيميائية والكواشف المستخدمة في الدراسة الحالية

ت	المادة	المصطلح	الشركة المصنعة	المنشأ
1	الكحول الاثيلي	Ethanol(70%)	Chem-lab	Belgium
2	كحول الايثانول	Ethanol(100%)	Chem-lab	Belgium
3	كليسيرول	Glycerol	Scharlau	Spain
4	اكاروز	Agarose	Promega	USA
5	محلول تي بي اي الدارىء	Tris Borate EDTA	Promega	USA
6	صبغة الجل الاحمر	GEL RED Stain	Genet Bio	Korea
7	كلوريد الباريوم المائي	Barium chloride	Scharlau	Spain
8	حامض الكبريتيك المركز	Sulfuric acid	Scharlau	Spain
9	كحول ايزوبروبانول	Isopropanol(100%)	Chem-lab	Belgium
10	بيروكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide H2o2%		
11	صبغة المثيل الأحمر	Methyl- Red	BDH	England
12	كاشف الاوكسيديز	Oxidase Reagent	BDH	England
13	كاشف الاندول	Kovac's Indole Reagent	Himedia	India
14	صبغة كرام	Gram stain	Atom scientific	UK

3-1-4: العدد المختبرية التجارية Commercial Laboratory Kits

استخدمت العدد المختبرية المختلفة في الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول(3-4).

جدول (3-4)العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة الحالية

ت	المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
1	بطاقة تشخيص الجراثيم VITEK-2GN Card لصبغة كرام (جهاز الفايتك)	Bio merieux	France
2	عدة DNA BacteriaDNA preparation kit استخلاص الحامض النووي	Gena bioscience	Germany
3	محلول مزيج التفاعل الرئيسي 2x Master mix	Gene Bio	Korea
4	ماء خاص بتفاعل البلمرة المتسلسل PCR grade water	Gene Bio	Korea
5	الدليل الحجمي DNA ladder (100 bp)	Add Bio	Korea

3-1-5: البادئات Primers:

استخدمت البادئات المدرجة بالتفصيل في الجدول (3-5) والمصنعة من قبل شركة (Macrogen korea,) لغرض توثيق تشخيص جراثيم الزوائف المعزولة من اللحوم المختلفة ، فضلاً عن بعض جينات الضراوة التي تلعب دوراً مهماً في إمراضية هذه الجراثيم.

جدول (3-5) البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسلPCR

ت	اسم البادئ	تسلسل البادئات Sequence 5”—3”	Tm مْ	حجم الناتج Bp	الجين المستهدف	المصدر
1	16s-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	1351	*16srRNA*	(Franzetti and Scarpellini,2007)
2	16s-R	CTACGGCTACCTTGTTACGA				
3	*rpoB-F*	CAGTTCATGGACCAGAACAACCCG	58	750	*ropB Gene*	(Franzetti and Scarpellini,2007)
4	*rpoB-R*	ACGCTGGTTGATGCAGGTGTTC				
5	*CarA-F*	TTCAACACCGCCATGACCGG	55	700	*CarA Gene*	(Hilario *et al* .,2004)
6	*CarA-R*	TGATGRCCSAGGCAGATRCC				
7	*ExoS-F*	GCGAGGTCAGCAGAGTATCG	60	118	*ExoS Gene*	(Ajayi *et al* ., 2003)
8	*ExoS-R*	TTCGGCGTCACTGTGGATGC				
9	*Oprl-F*	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC	55	504	*oprL Gene*	(Mokhtari and Amini,2019)
10	*Oprl-R*	CTTCTTCAGCTCGACGCGACG				
11	*ToxA-F*	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC	55	396	*ToxA Gene*	(matar *et al*.,2002)
12	*ToxA-R*	CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT				
13	*PlcH-F*	GAA GCC ATG GGC TAC TTC AA	60	307	*plcH Gene*	(Strateva ,2008)
14	*plcH-R*	AGA GTG ACG AGG AGC GGTAG				

6-1-3:-المضادات الحيوية Antibiotics:

اختبرت حساسية عزلات الزوائف باستخدام ثمانية أنواع من المضادات الحيوية وبتراكيز مختلفة والمجهزة من قبل شركة (Bioanalyse) التركية وكما مبين في الجدول (3-6).

جدول (3-6) المضادات الحيوية المعتمدة لدراسة أنماط حساسية عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم

التسلسل	المضاد الحيوي	الرمز	تركيز المضاد الحيوي µg	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	Levofloxacin	LEV	5	Bioanalyse (Turkey)
2	Ciprofloxacin	CIP	10	
3	Amoxicillin / Clavulanic acid	AMC	30	
4	Piperacillin	PRL	100	
5	Aztreonam	ATM	30	
6	Meropenem	MEM	10	
7	Tobramycin	TOB	10	
8	Gentamicin	CN	10	
	Zone inhibition diameter according to CLSI (2020)			

2-3: طرائق العمل Methods

1-2-3: تحضير الأوساط الزرعيةPreparation of Culture Media

1-1-2-3: وسط ماء البيبتون Peptone Water

حضر بإذابة (15) غم من البيبتون في 1000 مل من الماء المقطر ومزج جيداً بالتسخين وضبط الآس الهيدروجيني عند 7.4 ، وبعدها عقم بالمؤصدة عن درجة الحرارة 121ºم لمدة 15 دقيقة Collee *et al*.,1996).

2-1-2-3: اكار السترمايد Cetrimide Agar

تم تحضير الوسط بإذابة (45.3)غم من سترمايد اكار في 1000 مل من الماء المقطر ومن ثم إضافة 10 مل من الكليسرول ،وبعد التسخين ومزج الخليط عقم الوسط بالمؤصدة في درجة الحرارة (121ºم) لمدة 15 دقيقة وبعدها ترك الوسط ليبرد بدرجة45ºم (Forbes *et al*.,2007).

3-1-2-3- وسط اكار King- A Medium

حضر الوسط بإذابة(20) غم من البيبتون ,(1.4) غم من كلوريد المغنيسيوم ,(10) غم كبريتات البوتاسيوم ,(15) غم من الاكار في لتر من الماء المقطر ثم أضيف اليه (10) مل من الكليسرول ورج المزيج وسخن ومن ثم ضبط الآس الهيدروجيني عند 7.2 وعقم بالمؤصدة .

4-1-2-3- وسط اكار King- B Medium

حضر الوسط بإذابة(20)غم من البيبتون ,(1.5) غم من ثنائي فوسفات البوتاسيوم , (1.5)غم من كبريتات المغنيسيوم و(15) غم من الاكار في 1000 مل من الماء المقطر ثم اضيف 10 مل من الكليسرول ومزج بالتسخين وبعدها عقم بالمؤصدة بعد ضبط الآس الهيدروجيني عند 7.2 (Blondel-Hill *et al*.,2007; Collee *et al* .,1996).

3-2-1-5: الوسط المغذي Nutrient Agar

حضر بإذابة (28)غم من الوسط في 1000مل من الماء المقطر وسخن مع الرج المستمر لحين الغليان لمدة دقيقة واحدة حتى يتجانس كلياً ثم عقم بالمؤصدة عند درجة حرارة 121ºم لمدة 15 دقيقة ثم ترك ليبرد بدرجة 45 ºم .

3-2-1-6: مرق نقيع القلب والدماغ مع الكليسيرول

Brain Heart Infusion Broth with glycerol

اعتمد هذا الوسط لتنشيط العزلات وتجديدها ، وتبعاً لتعليمات الشركه المصنعة (NEOGEN) حضر مرق نقيع القلب والدماغ بإذابة 3 غم من الوسط في 80 مل من الماء المقطر ثم أضيف له (20) مل من الكليسيرول؛ ليصبح التركيز النهائي للكليسيرول 20% ثم عقم الوسط بالمؤصدة وترك ليبرد ومن ثم وزع على انابيب ابندروف معقمة وحفظ في التجميد بدرجة (-20 ºم) لحين الاستعمال .

3-2-1-7: مولر- هنتون اكار Muller- Hinton Agar Medium

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك بإذابة (23) غرام في 1000 مل من الماء المقطر، ومزج جيداً وبعدها عقم بالمؤصدة وبعد تبريده إلى درجة حرارة 45 مْ ثم سكب بأطباق بتري المعقمة وحفظت الأطباق في الثلاجة للكشف عن حساسية البكتريا للمضادات الحيوية .

3-2-2 تحضير الكواشف والاختبارات الكيموحيوية:

3-2-2-1:وسط اختبار انتاج الاندول Indole Production Test

حضر هذا الوسط بإذابة (23) غم من ماءالببتون في (1000) مل من الماء المقطر، ثم وزع المحلول في أنابيب اختبار زجاجية معقمة بعد ضبط الآس الهيدروجيني ليكون متعادلاً و عقم بالمؤصدة ؛ (Koneman *et al.*, 1997).

3-2-2-2: كاشف المثيل الاحمر Methyl red Reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة (0.1)غم من دليل المثيل الأحمر في 300 مل من الكحول الاثيلي95%، ثم أكمل الحجم إلى 500 مل بالماء المقطر،(Tadesse and Alem,2006).

3-2-2-3: كاشف اختبار فوكس بروسكور Voges-Proskauer reagent

ويتألف من :

أ- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium Hydroxide Solution

حضر هذا المحلول بإذابة(40)غم من الهيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 100 مل من الماء المقطر وبتركيز المحلول 40%.

ب- محلول الفا – نفثول α - Naphthol

حضر هذا المحلول بإذابة (5)غم الفا- نفثول في 100 مل من الكحول الاثيلي المطلق بتركيز 5% (Brooks *etal.*,2010).

4-2-2-3: وسط سيمون ستريت Simmon's Citrate Medium

حضر المحلول بإذابة (23)غم من الوسط الزرعي في 1000 مل من الماء المقطر، وضبط الآس الهيدروجيني عند 6.7 وعقم بالمؤصدة ،(Collee *et al* .,1996).

5-2-2-3: اختبار وسط ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron Agar (TSI)

حضر بإذابة (37)غم منه في 1000مل من الماء، ثم عقم بالمؤصدة ووزع في انابيب اختبار زجاجية سعة 5 مل لكل انبوبة و ترك الوسط بصورة مائلة ليبرد و حفظ بالثلاجة لحين الاستعمال ،استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية الجراثيم على تخمير السكريات وتحرير غاز كبريتيد الهيدروجين. (Brooks *et al.*,2010)

6-2-2-3: كاشف اختبار الاوكسيديز Oxidase Test Reagent

حضرالكاشف بإذابة(1)غم من مادة Tetramethyl-p-Phenylene Diamine Dihydrochloride في 100 مل من الماء المقطر المعقم للكشف عن قابلية الجراثيم الزوائف على انتاج الاوكسيديز (Tadesse and Alem,2006) .

7-2-2-3: كاشف اختبار الكتاليز Catalase Test Reagent

استعمل محلول بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide وبتركيز (3%) للكشف عن قابلية جراثيم الزوائف على انتاج انزيم الكتاليز(Tadesse and Alem,2006).

3-2-2-8: معيار مكفارلاند McFarland

تم تحضير محلول مكفارلاند على النحو الآتي

المحلول (أ)

تم تحضير بإذابة 1.175 غم من كلوريد الباريوم المائي .Bacl2.H2o2 ومن ثم اذابة في 100 مل من الماء المقطر المعقم.

المحلول (ب)

تم إضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز $H2SO_4$ إلى 99 مل ماء مقطر، بعد ذلك تم إضافة 0.5 مل من محلول (A) إلى 99.5 مل من محلول (B) للحصول على عكارة بتركيز (1.5×10^8) خلية لكل مل ، ثم خلطة جيدًا في زجاجة زجاجية غير شفافة ومختومة ، لمنع التبخر وحفظت في مكان مظلم حتى الاستخدام.(Vandepitte *et al* .,2003).

3-3: جمع العينات Sampling

جمعت (150) عينة من لحوم الأبقار والأغنام والدواجن المعروضة في الاسواق المحلية لمدينة الموصل بواقع (50) عينة لكل نوع من اللحوم للمدة من تشرين الثاني 2021 ولغاية اذار2022 ومن مناطق مختلفة من مدينة الموصل وتم فحص الصفات الحسية كاللون والرائحة والأس الهيدروجيني ونقلها بصورة مبردة باستخدام Sterile Ice Box إلى المختبر المركزي في فرع الصحة العامة البيطرية في كلية الطب البيطري - جامعة الموصل لأجراء الفحوصات البكتريولوجية عليها.

3-4: العد الكلي والعزل الجرثومي Total count and Bacterial Isolation

3-4-1: العد الكلي للزوائف Total Count of *Pseudomonas*

اعتمدت طريقة التخافيف العشارية بالاعتماد على (Quinn *et al* .,1999) بوزن 25 غرام من اللحم، وأضيف لها 225 مل من محلول (Buffer peptone water) (Bpw) وبعد مجانسة العينات بجهاز مزج العينات Vortex shaker لمدة 90 ثانية ثم نقل 1 مل من التخفيف الأول إلى أنابيب الحاوية على 9 مل من ماء البيبتون لاستكمال التخافيف ، وبعدها نقل 0.1 مل من كل تخفيف إلى أطباق بتري المعقمة والحاوية على وسط اكار السترمايد باعتماد طريقة النشر وحضنت الاطباق بدرجة حرارة (37 مْ) لمدة (48) ساعة ، وقرئت النتائج من خلال عدد المستعمرات النامية في الأطباق التي تحتوي على (30-300) مستعمرة و احتساب اعداد الزوائف (Chen *et al* .,2003).

3-4-2:تنقية العزلات Purification of Isolates

أخذت المستعمرات النامية على وسط اكار السترمايد وتمت تنقيتها على كل من الاوساط الأتية وسط (Cetrimide ، King -A ، King –B) للتعرف على بعض الخصائص المظهرية والمجهرية لجراثيم الزوائف المعزولة من اللحوم (Forbes *et al.*,2007).

3-5: توصيف الجرثومة Identification of Bacteria

شخصت المستعمرات الجرثومية اعتمادا على ما يأتي:

3-5-1: الخصائص المظهرية Morphological Characteristics

اعتمدت الخصائص المظهرية للمستعمرات النامية على الأوساط الزرعية الانتخابية المذكورة أعلاه لتميز بعض انواع الزوائف من خلال التعرف على صفات المستعمرات النامية كالشكل واللون وحجم المستعمرات(Brooks *et al.*, 2015).

3-5-2: الخصائص المجهرية Microscopic Characteristics

صبغت المستعمرات النامية على الوسط الزرعي الانتخابي بصبغة كرام لتأكيد تشخيص الزوائف بمزج مستعمرة نامية على وسط اكار السترمايد وعلى الشريحة الزجاجية مع قطرة من الماء المعقم ونشرها بشكل جيد على الشريحة ومن ثم جففت الشريحة بمسافة معينة عن اللهب وثبتت العينة بتمريرها سريعاً على اللهب، وبعد ذلك اضيفت صبغه كرستال البنفسجية وبعد دقيقة غسلت الشريحة بالماء ووضع محلول الايودين لمدة دقيقة وبعدها الكحول الاثيلي (10-15) ثانية وغسلت بالماء ومن ثم إضافة الصبغة السفرانين لدقيقة وبعدها غسلت الشريحة وجففت وفحصت تحت المجهر بعدسة التكبير الزيتية 100χ (Brooks *et al.*, 2015).

3-6 الاختبارات الكيموحيويةBiochemical tests

3-6-1: اختبار انتاج الاندول. Indole-Production Test

اجري الاختبار للكشف عن قابلية الزوائف على تحليل الحامض الاميني التربتوفان إلى الاندول و ثنائي أوكسيد الكاربون والأمونيا بفعل انزيم trytophynase بتلقيح وسط ماء الببتون بجزء من مستعمرة فتية للزوائف وحضنها لمدة (24-48)ساعة وبعدها اضيف 0.5 مل من كاشف كوفاك (kovac`s reagent) المصنع من قبل شركة (Himedia) واعتمدت النتيجة الايجابية للاختبار على ظهور حلقة حمراء أعلى المحلول(Borkar, 2017).

3-6-2:اختبار المثيل الاحمر. Methyl Red Test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قابلية جراثيم الزوائف على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج الحامض العضوي الذي يعمل على خفض الآس الهيدروجيني إلى اقل من 4.5. إذ لقحت الأنابيب الحاوية على وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفيت بالعزلات النقية المراد اختبارها، بعدها حضنت هذه الأنابيب في درجة حرارة 37 م° لمدة (24-48) ساعة ، ثم أضيف خمس قطرات من كاشف المثيل الأحمر، واعتمدت ظهور اللون الأحمر كدليلاً على ايجابية الاختبار، في حين أن عدم تغير اللون يدل على عدم قابلية الزوائف على انتاج الاحماض بكمية كافية لخفض الدالة الحامضية للمحلول إلى 4.5 (Prescott *et al* ., 2005).

3-6-3: اختبار فوكس – بروسكور. Voges-proskauer test (VP)

تم إجراء هذا الاختبار للكشف عن قابلية الزوائف على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج مركب Acetyl Methyl carbinol (Butanediol) أو الناتج المختزل 3،2- butylene glycol ,إذ لقحت الانابيب الحاوية على وسط ماء الكلوكوز والببتون والفوسفيت بالمستعمرات النقية المراد اختبارها، حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 °م لمدة (24-48) ساعة، أضيف كاشف كوبلت Coblet's reagent المكون من كاشفA وكاشف B , اذ أضيفت 6 قطرات من الكاشف A و2 قطرة من الكاشف B إلى الأنابيب، ورجت الأنابيب لمدة 30-60 ثانية لغرض التهوية وتركت في الحاضنة لمدة (15-20) دقيقة، واعتمد ظهور اللون الأحمر دليلاً على النتيجة الموجبة لهذا الاختبار (Songer and Post, 2005).

3-6-4: اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

اجري الاختبار للتعرف على مدى قدرة الزوائف على استهلاك السترات مصدراً وحيداً للكربون والطاقة واملاح الامونيوم مصدراً للنتروجين، لقح وسط اكار السايمون ستريت Simmon's citrate agar ، و حضنت هذه الأنابيب في درجة حرارة (37°م) لمدة (24-48) ساعة، ويعد تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دلالة على قدرة جراثيم الزوائف على استهلاك السترات كمصدر للطاقة (McFaddin, 2000).

3-6-5: اختبار ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron Test

يحتوي الوسط على ثلاثة أنواع من سكريات وهي (D- كلوكوز، لاكتوز، سكروز)ويستخدم للكشف عن قابلية جراثيم الزوائف على تخمير السكريات و تحويل لون الوسط من اللون الأحمر إلى اللون الأصفر

عند تخمر اللاكتوز أو السكروز أو تغير لون القعر في الوسط فقط دلالة على تخمر سكر الكلوكوز، ويستدل على انتاج الغاز بتكون الفقاعات أو تشقق الوسط ، يستعمل أيضاً للكشف عن قابلية الزوائف على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين من خلال ظهور الراسب الاسود. لقحت موائل هذا الوسط TSI بعزلات نقية من جراثيم الزوائف وحضنت بدرجة حرارة (37°م) لمدة 24 ساعة، وان عدم تغير لون الوسط يدل على عدم قابلية الزوائف على تخمير السكريات (McFaddin, 2000).

3-6-6: اختبار انزيم الكتاليز Catalase Test.

اعتمد هذا الاختبار للكشف على قدرة جراثيم الزوائف على تحطيم المركب السام بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وتحرير الاوكسجين والماء، اجري هذا الاختبار بنقل جزء من المستعمرة النقية بواسطة حلقة الزرع إلى شريحة زجاجية نظيفة؛ وأضيف إليها قطرة من مركب بيروكسيد الهيدروجين ، ويستدل على ايجابية الاختبار بظهور الفقاعات الغازية خلال ثوان دلالة على انتاج انزيم الكتاليز (Brown and Smith, 2017).

3-6-7: اختبار الاوكسيديز Oxidase Test .

اعتمد هذا الاختبار للتعرف على قابلية جراثيم الزوائف على إنتاج انزيم الاوكسيديز الذي يعمل على نقل الالكترونات من الجزء الواهب داخل الزوائف إلى العامل المختزل الممثل بالكاشف Tetramethyl-P-Phenylene Diamine Dihydrochloride. إذ اضيف الكاشف إلى ورقة ترشيح لدرجة التشبع، بعد ذلك نقل جزء من المستعمرة الفتية إلى ورقة الترشيح، واعتمد تغير لون ورقة الترشيح إلى اللون الارجواني الغامق خلال (10-30) ثانية دليلاً على إنتاج الانزيم (Brown and Smith, 2017).

3-7 :التشخيص باستخدام جهاز الفايتك Vitek-2 compact

استخدم جهاز الفايتك لتاكيد تشخيص بعض عزلات الزوائف من خلال كارت خاص بالجراثيم سالبة الكرام GN ID Card والمتضمن 48 فحص من الفحوصات الكيموحيوية التفريقية للجراثيم السالبة لصبغة كرام وحسب تعليمات الشركة المصنعة(Pincus,2011).

تم تنقية العزلات المراد تشخيصها على وسط اكار السترمايد وحضنت بدرجة 37 مº لمدة 24 ساعة للحصول على مستعمرات نقية ومن ثم أخذت (1) مستعمرة ووضعت في انبوب يحتوي 2 مل من محلول كلوريد الصوديوم تركيزه 0.45 % وتم معايرة كثافة الجراثيم باستخدام جهاز McFarland Densichek plus للحصول على تركيز 0.5 وبعدها وضعت الأنابيب والبطاقة في حامل خاص بالجهاز

إذ يكون مفرغ من الهواء vacuum chamber لتساعد على نقل الجراثيم إلى البطاقة بواسطة الأنبوب الناقل فضلاً عن توزيعها على الحفر في الكارت الخاص بتشخيص الجراثيم السالبة GN ID Card وبعدها ادخل رمزالبطاقه بواسطة الماسح الضوئي لتسجيل البيانات اللازمة للعينات لغرض القراءة وسجلت نتائجها ،يعمل جهاز الفايتك على قطع الانبوب ذاتياً خلال15 دقيقة ويتم ختم البطاقة بأحكام لمنع تسرب الجراثيم وبعدها نقلت البطاقة إلى الحاضنة بدرجة(35.5 ̊c ± 1)، بعمل جهاز الفايتك بنظام التشخيص البصري إذ يعمل على إرسال حزم ضوئية إلى البطاقة للتعرف على الأطوال الموجية ويتم تفسيرها من خلال التغيرات اللونية والعكورة وكذلك من خلال النواتج الايضية (AL Hasan,2012; Pincus,2011).

8-3:حفظ العزلات الجرثومية Preservation of Bacterial Isolates

استخدم مرق نقيع القلب والدماغ brain heart infusion broth مع الكليسيرول بتركيز 20% لحفظ العزلات الجرثومية ،وذلك لضمان الحفاظ على حيويتها ونشاطها. إذ اخذت عدة مستعمرات حديثة النمو وتم مزجها بشكل جيد مع وسط نقيع القلب والدماغ مع الكليسيرول وحفظت بدرجة حرارة (-20مْ) (LaBauve and Wargo, 2012).

9-3: التشخيص الجزيئي لجراثيم الزوائف Molecular Detection of *Pseudomonas spp*

اعتمدت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي Conventional PCR لتأكيد تشخيص عزلات جراثيم الزوائف من اللحوم والمشخصة بالطرائق المظهرية عن طريق استخدام البادئات المتخصصة بالجين(16SrRNA / *Car*A / *rop*B) للزوائف ،في حين استخدمت بادئات الجينات / *Tox*A *opr*L / *Exo*S) plcH) للتحري عن ضراوة هذه الجراثيم .

1-9-3:استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

تم استخلاص الحامض النووي DNA لبكتريا *Pseudomonas spp* باستخدام العدة الخاصة باستخلاص الحامض النووي Bacterial DNA preparation kit وكما يلي:

1. نقلت مستعمرات حديثة النمو على وسط اكار السترمايد إلى انابيب ابندروف Eppendrof tube حجم 1.5مل حاوية على 300 مايكرو لتر من محلول cell lysis solution

2. أضيف 1.5 مايكرو لتر من محلول RNase إلى العينة ومزجت جيداً مع التقليب عدة مرات للتخلص من الحامض النووي RNA وحضنت بدرجة حرارة 37 مº ولمدة 30 دقيقة بعدها برد في الثلج لمدة 60 ثانية .
3. أضيف 100 مايكرو لتر من محلول ترسيب البروتين protein precipitation solution ثم مزجت العينة بجهاز مزج العينات وبسرعة عالية ولمدة 30 ثانية.
4. وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 15000 x*g* دورة ولمدة 5 دقائق.
5. تم نقل الراشح supernatant إلى أنبوب ابندروف معقم أخر حجم 1.5 مل يحتوي على 300 مايكرو لتر من الكحول ايزوبروبانول المطلق absolute Isopropanol، ومزجت العينة جيداً ولمدة (60) ثانية .
6. وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة لمدة دقيقة إذ ظهر الحامض النووي على شكل راسب أبيض.
7. تم التخلص من الراشح ووضع أنبوب ابندروف على ورق مناديل نظيفة ليجف لمدة دقيقة .
8. أضيف 500 مايكرو لتر من محلول الغسل washing buffer مع التقليب مرات عدة لغسل الحامض النووي ثم وضعت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 15000 دورة لمدة دقيقة.
9. بعدها تم سكب الايثانول بعناية وتركت هذه الأنابيب لتجف بدرجة حرارة الغرفة ولمدة 15 دقيقة.
10. بعدها أضيف(100) مايكرو ليتر من محلول ترطيب الحامض النووي DNA hydration solution إلى الحامض النووي الجاف في انبوبة ابندروف وحضن بالحمام المائي بدرجة حرارة(65 °م) ولمدة (60) دقيقة.
11. تم حفظ الحامض النووي DNA المستخلص بالتجميد بدرجة حرارة -20 °م مئوية لحين الاستعمال .

3-9-2: تحضير مزيج التفاعل Master Mix Preparation

حضر هذا المزيج الرئيس Master Mix لجميع تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام عدة (Genet Bio, Korea) ، وذلك بقياس الاحجام اللازمة لمكونات التفاعل لكل عينة كما موضح في الجدول (3-7). إذ استخدم لكل تفاعل زوج من البادئات المتخصصة التي تمثل جين معين من الجينات المراد الكشف عنها، إذ تم مزج المواد المضافة بشكل جيد ووزعت بحجم 18 مايكرو ليتر على الانابيب صغيرة بحجم 0.2 مل خاصة لا جراء تفاعل البلمرة المتسلسل، بعد ذلك أضيف DNA والمستخلص من العينات بحجم 2

مايكرو ليتر وبشكل منفصل في الأنبوب الخاص بكل عينة إذ يصبح الحجم الكلي في كل أنبوبة 20 مايكرو ليتر.

الجدول(3-7): مكونات المزيج الرئيسي لتفاعل البلمرة المتسلسل

المادة		الحجم
محلول المزيج الرئيس	X Master Mix2	10 مايكرو لتر
البادئ الامامي	Forward primer 10 pmol/µl	1 مايكرو لتر
البادئ الراجع	Reverse primer 10 pmol/µl	1 مايكرو لتر
قالب الحامض النووي	DNA template	2 مايكرو لتر
ماء مقطر خال من انزيمات	PCR grade water	6 مايكرو لتر
الحجم النهائي		20 مايكرو لتر

3-9-3:برمجة جهاز المدوار الحراري Thermocycler

وضعت أنابيب PCR بعد تهيئتها في جهاز Thermocycler T 100 ^{TM} Thermal Cycler, (Bio-Rad, USA) وباتباع البرنامج الخاص بتفاعل البلمرة المتسلسل وكما موضح في الجدول (3-8) وضعت في الثلاجة بدرجة الحرارة (4-8 °م) لحين إجراء الترحيل الكهربائي للكشف عن نواتج عملية التضخيم للحامض النووي (Geyer and Hanson, 2013; kuhnert *et al*.,1996) .

الجدول(3-8): خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل

الخطوة		درجة الحرارة °م	المدة المطلوبة	عدد الدورات
المسخ الأولي	Primary denaturation	94	10 دقائق	1
المسخ	Denaturation	94	45 ثانية	X 35
ارتباط البادئ	Annealing	*	45 ثانية	
استطالة البادئات	Extension	72	1 دقيقة	
الاستطالة النهائية	Final extension	72	10 دقائق	1
التبريد	Cooling	4	∞	-

(*) استخدمت درجة الحرارة الخاصة لكل برايمر وحسب ما ذكر بالجدول (3-5)

4-9-3:الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروزElectrophoresis Agarose gel

حضر هلام الاكاروز بتركيز(1.5 %) بإذابة (1.5) غم من مسحوق الاكاروز في 100 مل من دارئ (Tris-Borate EDTA buffer TBE) بقوة X1 باستعمال دورق زجاجي سعته 250 مل، بعدها رج الدورق للتأكد من تجانس المحلول بالدارئ ، ثم وضع هذا الدورق بالمايكروويف Microwave oven لمدة (1.5) دقيقة حتى الغليان بعدها ترك ليبرد، وقبل التصلب تمت إضافة 3 مايكرو لتر من صبغة Gel Red ومزج المحلول جيداً، ومن ثم صب في قالب casting tray الخاص بجهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis الذي يحتوي على المشط ، وترك الهلام ليتصلب لمدة 15-20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة بعدها سحب المشط من الاكار المتصلب بعناية تاركاً حفراً فارغة وجاهزة، بعدها وضع هلام الاكاروز في حوض الترحيل واضيف 700 مل من دارئ TBE حتى انغمر هلام الاكاروز بالكامل، ووضع 7 مايكرو لتر من نواتج عملية تضخيم الحامض النووي PCR products والناتجة من التفاعل في هذه الحفر المحددة ، أما المؤشر(DNA ladder 100 bp) ، فقد تم وضع 4 مايكرو لتر منه في الحفرة الأولى الموجودة في هلام الاكاروز وربط بعدها مجهز الفولتية power supply بمقدار (80) فولت و (300) ملي أمبير لمدة ساعة واحدة ، بعد إتمام عملية الترحيل استخرج الهلام ووضع في جهاز خاص بالتصوير Gel (Doc EZ Gel Documentation System, BioRad, USA) للكشف عن نواتج التضخيم وبعدها تم حفظ صور النتائج .

10-3: اختبار حساسية المضادات الحيوية Antibiotic sensitivity test

1-10-3: طريقة تحضير العالق البكتيري ومقارنته مع McFarland standard

لتحضير المعلق البكتيري تم نقل مستعمرة من العزلات الجرثومية إلى أنبوب 5 مل من 0.85% normal saline بأنابيب معقمة وضبطت العكارة إلى 0.5 مكفارلاند ($1.5\chi10^8$)CFU ،يتكون محلول مكفارلاند القياسي (1٪ من كلوريد الباريوم و 1٪محلول حامض الكبريتيك) تم بعدها خلط كلوريد الباريوم وحمض الكبريتيك، وبعدها تم وضع الخليط الناتج في أنابيب مغلقة بأحكام ومن ثم الاحتفاظ بالأنابيب التي تحتوي على محلول McFarland القياسي بدرجة حرارة الغرفة (25 مْ) حتى الاستخدام و رجت قبل كل استخدام لمنع ترسب المحلول والالتصاق بالحواف وبعد ذلك تمت مقارنة العكارة بصريًا بمقارنة العكارة البكتيرية مع أنابيب محلول مكفارلاند القياسية (Morello *et al* .,2006).

3-10-2: تحديد النمط المظهري للمقاومة للمضادات الحيوية

تم اتباع طريقة Kirby-Bauer method (طريقة انتشار القرص) لاختبار حساسية المضادات الحيوية لعزلات الزوائف في هذه الدراسة إذ لقحت الأطباق المحضرة من اكار المولر-هنتون بواسطة مسحة مغمورة بالمعلق الجرثومي بعد ضغطها للتخلص من السوائل الزائدة إذ مسح سطح الأطباق بهذه المسحة بزاوية 60 وتدويرها ثلاث مرات وبعدها ترك الطبق ليجف لمدة دقيقة عند درجة حرارة الغرفة و نقلت الاقراص بواسطة ملقط معقم ووزعت على سطح الاكار وضغطت برفق بواسطة ملقط وحضنت بعد ذلك عند درجة حرارة 37مْ لمدة 18 -24 ساعة ،ليتم بعد ها قراءة النتائج بالاعتماد على قطر التثبيط ،فسرت النتائج الفحص على أنها إما مقاومة أو متوسطة أو حساسة للمضادات الحيوية ، وبعد تمت مقارنة النتيجة بجداول قياسية(CLSI,2020; Morello *et al* .,2006).

3-11: التحليل الاحصائي Statistical analysis

تم إجراء التحليل الاحصائي للبيانات باستخدام اختبار chi-sequare test واختبار t-test واختبار ANOVA وذلك للتعرف على الفروقات المعنوية عند مستوى المعنوية p-value <0.05 ، وذلك باستخدام برنامج IBM\SPSS\Statistics\version22, USA .

الفصل الرابع

النتائج

Results

4-1:عزل الزوائف Isolation of *Pseudomonas*

في هذه الدراسة تم الكشف عن وجود جراثيم الزوائف في 150 عينة من اللحوم المعروضة في اسواق مدينة الموصل شملت لحوم الأبقار والأغنام والدواجن بواقع (50) عينة لكل منها وأظهرت النتائج إن (53)عينة من اللحوم كانت موجبة لعزل جراثيم الزوائف بنسبة 35.33 % ،إذ كانت أعلى نسبة عزل لجراثيم الزوائف في لحوم الأبقار بنسبة 46% تبعها لحوم الدواجن بنسبة عزل 38% فيما كانت نسبة عزل الزوائف أقل في لحوم الأغنام وبنسبة 22% علما إن الفروقات في نسبة العزل لجراثيم الزوائف كانت معنوية لكل من لحوم الأبقار والدواجن مقارنة مع لحوم الأغنام وكما موضح في الجدول (4-1) .

الجدول (4-1) أعداد ونسب جراثيم الزوائف المعزولة من عينات اللحوم المختلفة في مدينة الموصل بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية

نوع عينات اللحوم	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة للزوائف	النسبة المئوية للعينات الموجبة	عدد العينات السالبة للزوائف	النسبة المئوية للعينات السالبة
الأبقار	50	23	(23/50)46 **a**	27	(27/50)54
الأغنام	50	11	(11/50) 22 **b**	39	(39/50)78
الدواجن	50	19	(19/50) 38 **a**	31	(31/50)62
المجموع	150	53	(53/150) 35.33	97	(97/150) 64.66

الحروف تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى ($P<0.05$)

توزعت جراثيم الزوائف المعزولة من اللحوم إلى 21 عزلة تعود إلى الزائفة الزنجارية وبنسبة 39.62% و7 عزلات تعود إلى الزائفة المتألقة وبنسبة 13.21% بينما كانت 25 عزلة منها تعود لأنواع أخرى ضمن الزوائف وبنسبة 47.17% كما في الجدول (4-2) .

جدول (4-2) أنواع الزوائف المعزولة من اللحوم المختلفة في مدينة الموصل

الزائفة الزنجارية P.aeruginosa		***الزائفة المتألقة P.flouresence***		**انواع اخرى من الزوائف**	
العدد	***%***	***العدد***	***%***	***العدد***	***%***
21	39.62	7	13.21	25	47.17

بالاعتماد على التشخيص الجزيئي باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل أوضحت النتائج تواجد جراثيم الزوائف الزنجارية في 21 عينة من اللحوم بنسبة 14% وكانت أعلى نسبة لتواجد الزوائف الزنجارية في لحوم الدواجن وبنسبة 22% تلتها لحوم الأبقار بنسبة 14% بينما كانت أدنى نسبة عزل للزوائف الزنجارية في لحوم الأغنام وبنسبة 6% علما إن الفروقات في نسبة عزل الزوائف الزنجارية كانت معنوية لكل من لحوم الأبقار والدواجن مقارنة مع لحوم الاغنام كما في الجدول (4-3).

الجدول (4-3) أعداد ونسب جراثيم الزوائف الزنجارية المعزولة من عينات اللحوم المختلفة في مدينة الموصل بالاعتماد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل

نوع اللحوم	**عدد العينات المفحوصة**	**عدد العينات الموجبة للزوائف الزنجارية**	**النسبة المئوية للعزل**
الأبقار	50	7	(7/50)14 **a**
الأغنام	50	3	(3/50) 6 **b**
الدواجن	50	11	(11/50) 22 **a**
المجموع	150	21	(21/150) 14

الحروف تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى ($P<0.05$)

وبالاعتماد على نتائج التشخيص باستخدام جهاز الفايتك أعطت 7 عينات و بنسبة 13.21% نتيجة موجبة لتواجد جراثيم الزوائف المتألقة *P.flouresence* إذ توزعت بنسبة 11.32% في لحوم الأبقار و1.9% من لحوم الدواجن بينما لم يعزل هذا النوع من لحوم الأغنام وكما في الجدول (4-4) .

الجدول (4-4): أعداد ونسب جراثيم الزوائف المتألقة المعزولة من عينات اللحوم المختلفة في مدينة الموصل بالاعتماد على نتائج التشخيص بجهاز الفايتك Vitek -2

نوع اللحوم	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة للزوائف المتألقة	النسبة المئوية للعزل
الأبقار	50	6	(6/50)11.32 **a**
الأغنام	50	0	(0/50) 0 **b**
الدواجن	50	1	(1/50) 1.9 **b**
المجموع	150	7	(7/150) 4.66

الحروف تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى ($P<0.05$)

4-2: العد الكلي للزوائف في اللحوم Total Count of *Pseudomonas* spp.in Meat

بعد إجراء العد الكلي لتواجد الزوائف في عينات اللحوم المفحوصة في هذه الدراسة ظهر إن العد الكلي للزوائف $1.92*10^4$ و $1.47*10^4$ وحدة تكوين المستعمرة لكل غرام في لحوم الأغنام والأبقار على التوالي في حين كان أعداد الزوائف في لحوم الدواجن $21.3*10^4$ وحدة تكوين المستعمرة لكل غرام كما في الجدول (4-5).

جدول(4-5): العد الكلي لجراثيم الزوائف في انواع اللحوم المختلفة في مدينة الموصل

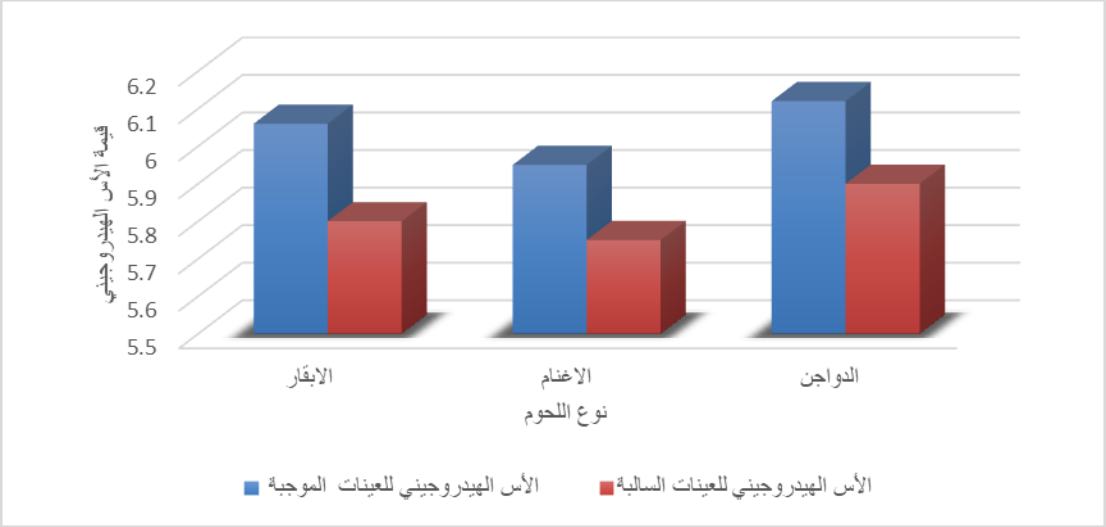
نوع عينات اللحوم	العدد الكلي لجراثيم الزوائف **CFU/g**
الأبقار	$1.47*10^4$
الأغنام	$1.92*10^4$
الدواجن	$21.3*10^4$

3-4: الصفات الحسية Sensory Traits

تضمنت الدراسة أيضاً التعرف على بعض الصفات الحسية للحوم المفحوصة من حيث اللون والرائحة وتكون الطبقة الهلامية التي تعد مؤشراً لوجود علامات الفساد في هذ اللحوم، فضلاً عن معرفة درجة الآس الهيدروجيني لكونه عامل مهم في تقييم نوعية اللحوم، وأظهرت الدراسة إن معدل الآس الهيدروجيني في اللحوم تراوحت بين (5.84 و 5.95 و6.11) لكل من لحوم الأبقار والأغنام والدواجن على التوالي كما في الجدول (4-6).

الجدول (4-6): قيمة الآس الهيدروجيني لعينات اللحوم المختلفة في الدراسة الحالية

نوع اللحم	pH
الأبقار	5.84± 0.066
الأغنام	5.95 ± 0.093
الدواجن	6.11 ± 0.083



الشكل (4-1) قيمة الآس الهيدروجيني لعينات اللحوم المختلفة في الدراسة

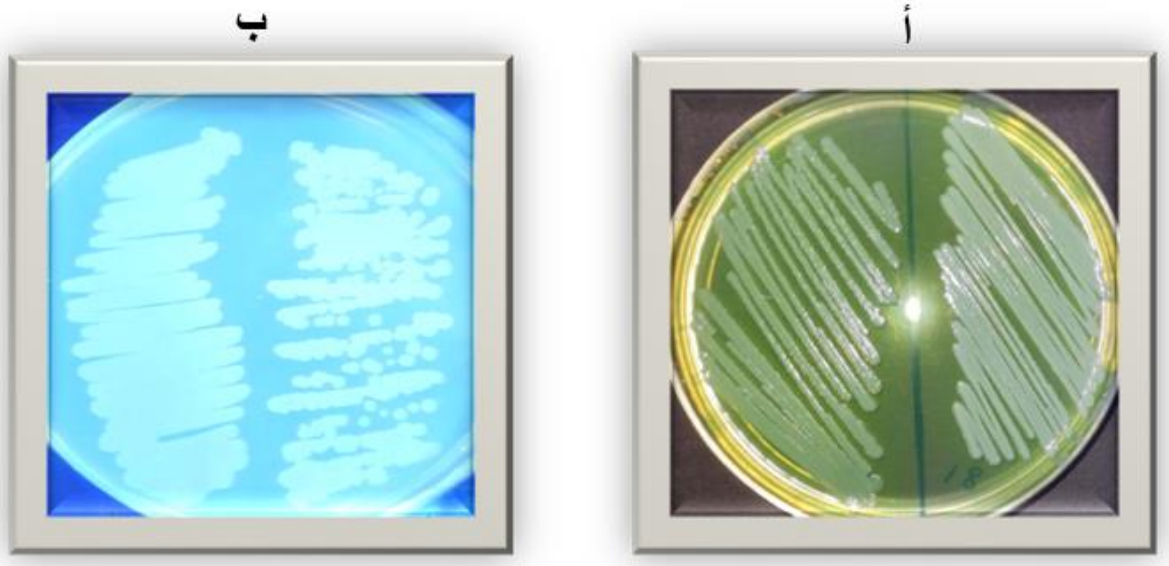
تباينت الوان اللحوم المفحوصة والموجبة لتواجد الزوائف الزنجارية بين اللون الشاحب واللون البني الداكن واللون المخضر وكانت أغلب العينات ذات لون شاحب وبنسبة 56.5% في لحوم الأبقار و 81.8% في لحوم الأغنام و84.2% في لحوم الدواجن ،علماً هناك ثلاث عينات فقط من لحوم الأبقار ذات لون مخضر وبنسبة 13.3% ،وكانت 17.4 % و9 %و11% من لحوم الأبقار والأغنام والدواجن بالتتابع ذات رائحة غير مقبولة ،وتزامنت هذه الصفات مع وجود الطبقة الهلامية على سطح اللحوم الموجبة لتواجد الزوائف الزنجارية وبنسبة 21.7% و9% و21% لكل من لحوم الأبقار والأغنام والدواجن على التوالي دلالة على ظهور علامات الفساد على هذه اللحوم الذي قد يعزى إلى نمو جراثيم الزوائف فيها؛ بسبب عدم توفر الضوابط الصحية في حفظ هذه اللحوم كما في الجدول (4-7).

جدول (4-7): الصفات الحسية لعينات لحوم الأبقار والأغنام والدواجن في مدينة الموصل

نوع عينات اللحوم	الصفات الحسية						
	اللون %			الرائحة %		الطبقة الهلامية %	
	الشاحب	الداكن	المخضر	مقبولة	غير مقبولة	موجبة	سالبة
الأبقار	(56.5)13	(30.4)7	(13.3)3	(82.6)19	(17.4)4	(21.7)5	(78.3)18
الأغنام	(81.8)9	(18.1)2	0	(91)10	(9)1	(9)1	(91)10
الدواجن	(84.2)16	(15.7)3	0	(89)17	(11)2	(21)4	(79)15

4-4: التشخيص المظهري والمجهري Phenotypic and Microscopic Diagnosis

أظهرت نتائج التشخيص المظهري للزوائف على وسط اكار السترمايد الانتخابي لهذه الجراثيم والحاوي على 0.03% من مادة السترمايد التي تثبط نمو بقية أنواع الجراثيم باستثناء الزوائف ، فظهرت مستعمرات الزوائف ذات لون أصفر مخضر لماعة ملساء محببة قليلاً وعند تعريضها إلى الأشعة فوق البنفسجية أظهرت المستعمرات لون أزرق كما في الشكل (4-2).



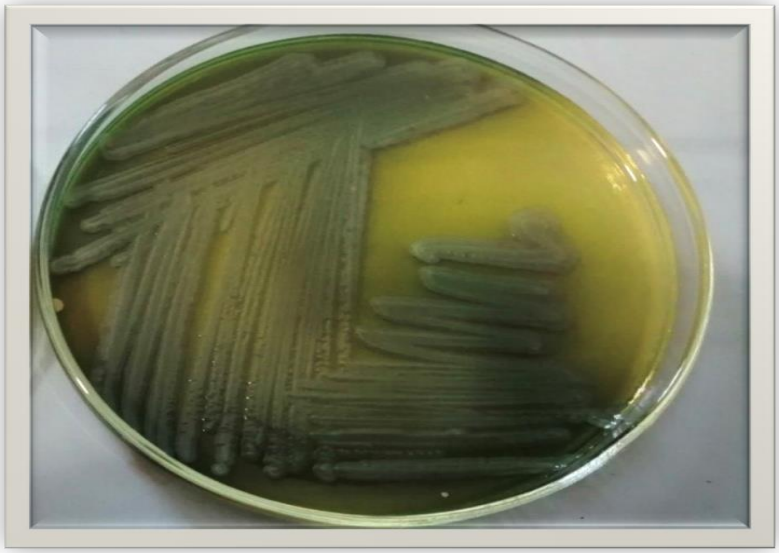
الشكل (4-2)

أ : نمو مستعمرات الزوائف الزنجارية على وسط اكار السترمايد

ب: توهج مستعمرات الزوائف الزنجارية عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية

4-4-1: النمو على وسط King A و King B

النمو على وسط King A ظهرت مستعمرات جراثيم الزوائف على هذا الوسط بلون مائل إلى الأخضرار مع ظهور حافات منتشرة حول خط النمو دلالة على قدرة هذه المستعمرات على انتاج صبغة البيوسيانين؛ لاحتوائه على املاح البوتاسيوم والمغنيسيوم بتراكيز تدعم انتاج البيوسيانين و يثبط انتاج البيوفردين كما في الشكل(4-3)، بينما أظهرت مستعمرات عزلات الزوائف النامية على وسط King B بإنها مستعمرات مسطحة ذات حافات ملساء وبلون أصفر لقابلية هذه الجراثيم على إنتاج صبغة البيوفردين؛ لاحتوائه على تراكيز مناسبة من الفوسفات التي تدعم انتاج الصبغة كما في الشكل (4-4) . تبين من الفحص المجهري لمستعمرات الزوائف المعزولة من اللحوم بعد اجراء عملية الصبغ بصبغة غرام ظهور عصيات سالبة الكرام تحت المجهر الضوئي.



الشكل (4-3) نمو مستعمرات جراثيم الزوائف على وسط King A وتظهر مستعمرات منتجة لصبغة البايوسيانين محدبة ذات لون أخضر وحافات منتشرة حول خط النمو

الشكل (4-4): نمو مستعمرات جراثيم الزوائف المنتجة لصبغة البايوفيردين على وسط king B وتظهر مستعمرات مسطحة حافاتها ملساء ذات لون أصفر لماع

4-4-2: الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests

تم إجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات الزوائف وكانت جميعها موجبة لاختبار الكتاليز الذي يشير إلى قدرة الزوائف على تحليل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء و غاز الأوكسجين (Orlandi *et al.*,2018) ،وكذلك ظهرت النتائج أن عزلات الزوائف موجبة لاختبار الاوكسيديز من خلال تحول اللون إلى اللون الأرجواني عند إضافة الكاشف لامتلاك البكتريا انزيم Cytochrom oxidase كمستقبل للهيدروجين وعند اجراء اختبارات IMVIC كانت جراثيم سالبة لاختبار الاندول؛ لعدم قدرة الجراثيم على تحليل الحامض الاميني تروبتوفان ، سالبة لاختبار المثيل الأحمر لعدم قابليتها على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج الحامض ، وايضاً أعطى اختبار فوكس بروسكاور (VP) نتيجة سالبة ؛ بسبب عدم تحول الكلوكوز إلى الأستيل مثيل كاربونيل ، في حين أظهرت21عزلة من الزوائف نتيجة موجبة لاختبار السترات من خلال تغير لون الوسط إلى اللون الأزرق دلالة على قابلية هذه الجراثيم على استخدام السترات كمصدر للكاربون، وعند اختبار قابلية عزلات الزوائف على النمو بدرجة حرارة 42 مْ و4 مْ تفاوتت قابلية عزلات الزوائف على النمو في درجات الحرارة المختلفة.

4-4-2-1: التشخيص التأكيدي لجراثيم الزوائف المتألقة باستخدام جهاز الفايتك

تم إجراء الفحص التأكيدي لهذه العزلات ، إذ اظهرت نتائج التشخيص لجراثيم الزوائف بجهاز الفايتك Vitek-2 compact GN تطابق 99% من نتائج العزل على أنها جراثيم الزوائف المتألقة مع نتائج العزل و التشخيص باستخدام الأوساط الزرعية الانتخابية التفريقية الخاصة بالزوائف .

Patient Name: 292/16-30/11/2021, .
Isolate: 292-1 (Approved)

Ibrahim Taher

Card Type: GN Bar Code: 2411602103141435 Testing Instrument: 00000EBB7CE5 (2504)
Setup Technologist: Laboratory Supervisor(LabSuper)

Bionumber: 4001011000000000
Organism Quantity: **Selected Organism: Pseudomonas fluorescens**

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2411602103	Expires: Apr 16, 2022 13:00 CDT
	Completed: Aug 12, 2020 00:56 CDT	Status: Final	Analysis Time: 5.80 hours
Organism Origin	VITEK 2		
Selected Organism	99% Probability Pseudomonas fluorescens Bionumber: 4001011000000000		Confidence: Excellent identification

Biochemical Details

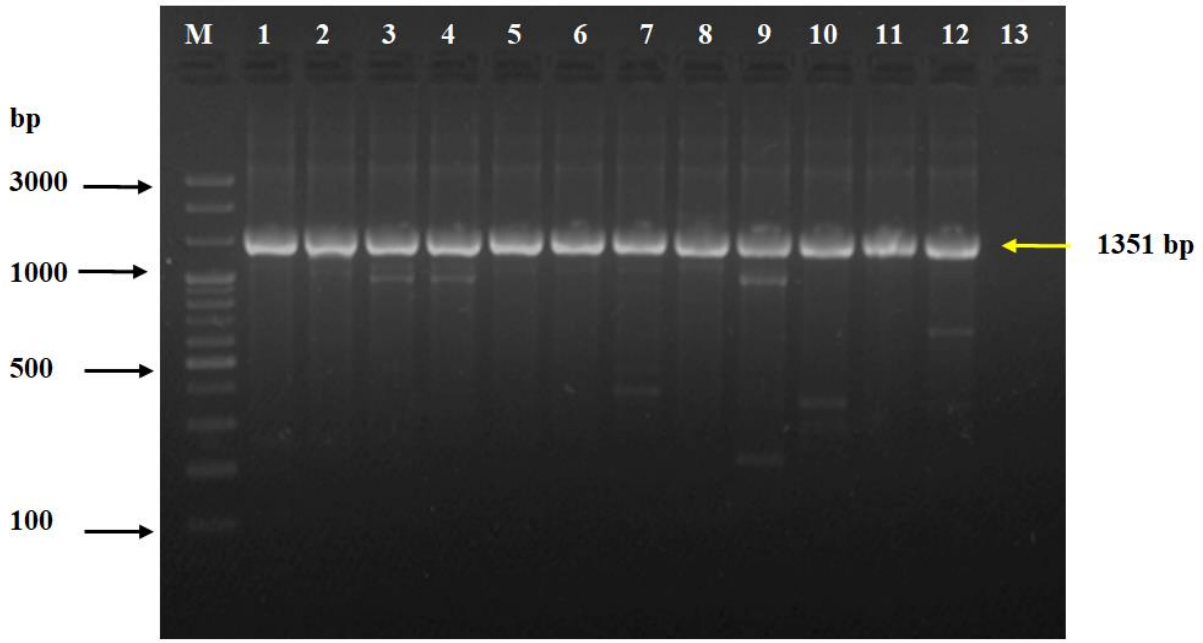
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

الشكل (4-5) نتائج تشخيص الزوائف المتألقة باستخدام الفايتك

5-4: التشخيص الجزيئي للكشف عن الزوائف Molecular Detection of *Pseudomonas*

1-5-4:التشخيص الجزيئي باستخدام جين *16srRNA*

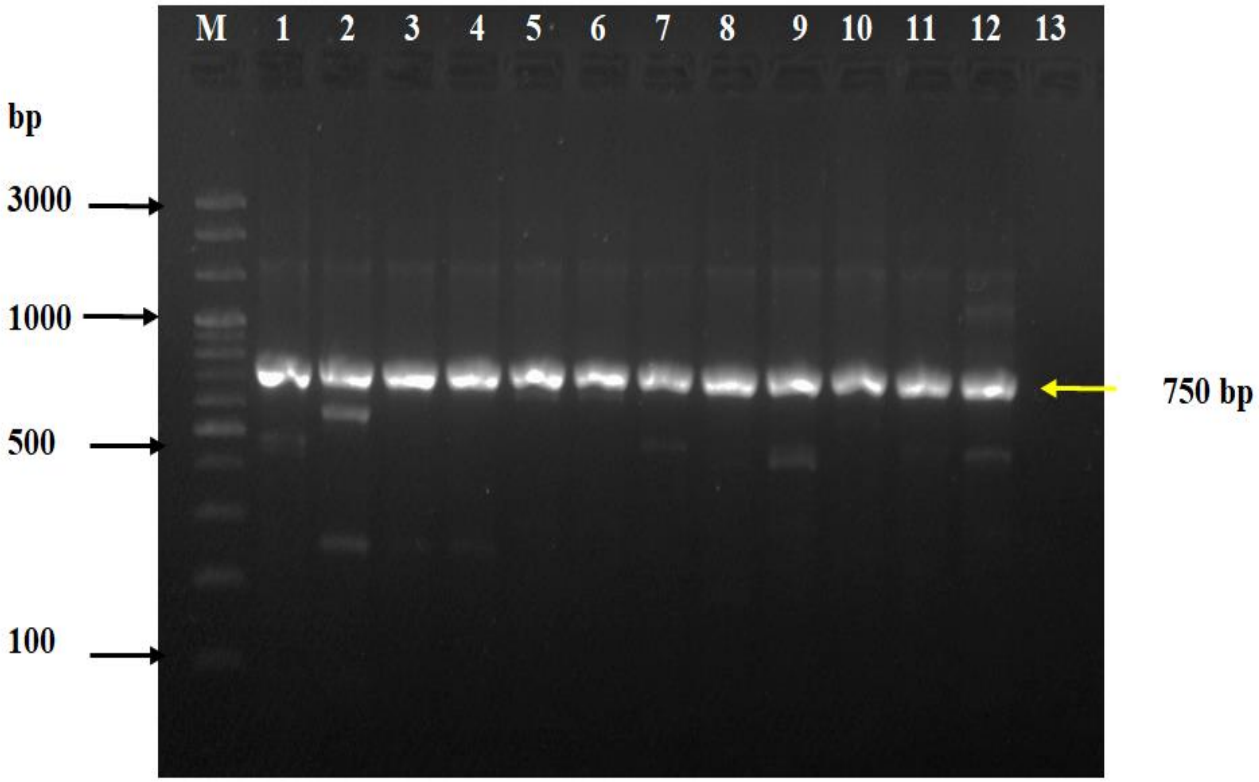
أظهرت نتائج الكشف عن وجود جين *16srRNA* في عزلات الزوائف المعزولة من اللحوم إن جميع العزلات تمتلك هذا الجين وبنسبة (100 %) باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل إذ أعطت البادئات حزم بوزن جزيئي (1351) زوج قاعدي وكما موضح في الشكل (4-6).



الشكل (4-6):الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف المسار M يمثل المؤشر DNA ladder حجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-12 تمثل عينات موجبة 1351 زوج قاعدي ،المسار 13 يمثل السيطرة السالبة

2-5-4: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *rpoB*

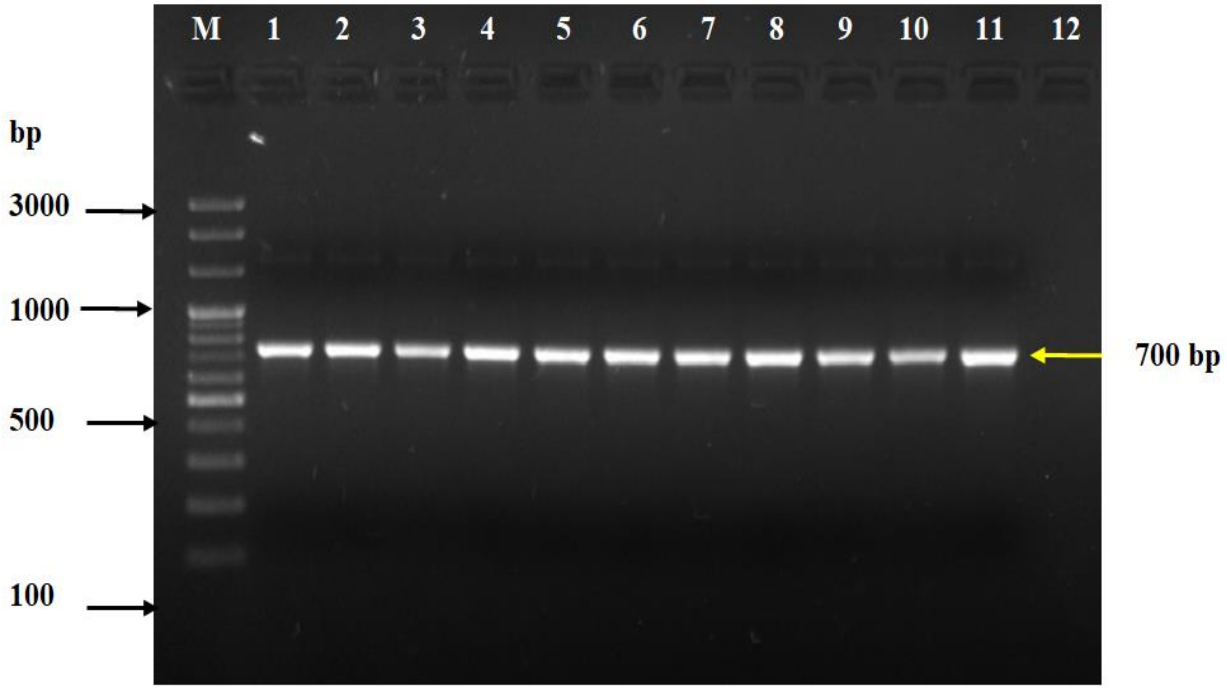
أظهرت نتائج الكشف عن وجود جين *rpoB* في عزلات الزوائف المعزولة من اللحوم إن 39.62% من هذه العزلات تمتلك هذا الجين باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل إذ أعطت البادئات حزمه بوزن جزيئي (750) زوج قاعدي وكما موضح في الشكل (4-7).



الشكل (4-7):الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladder حجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-12 تمثل عينات موجبة 750 زوج قاعدي ،المسار 13 يمثل السيطرة السالبة

3-5-4: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *CarA*

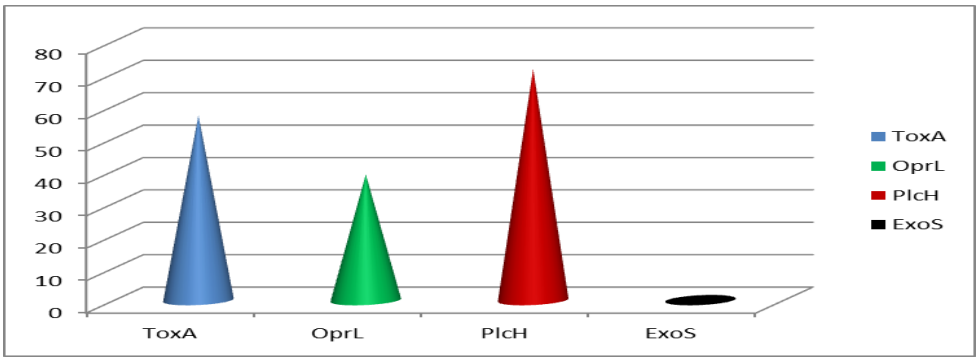
أظهرت نتائج الكشف عن وجود جين *CarA* في عزلات الزوائف المعزولة من اللحوم إن (91.6 %) من هذه العزلات تمتلك جين *CarA* عند استخدام البادئات الخاصة بهذا الجين الذي يشفر انزيم (Carbamoyl phosphate synthase) في بعض انواع الزوائف باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل إذ أعطت البادئات حزمه بوزن جزيئي (700) زوج قاعدي في عزلات الزوائف الموجبة بامتلاكها هذا الجين وكما موضح في الشكل(4-8) .



الشكل (4-8):الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف .المسار M يمثل المؤشر DNA ladder حجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-11 تمثل عينات موجبة 700 زوج قاعدي ،المسار 12 يمثل السيطرة السالبة

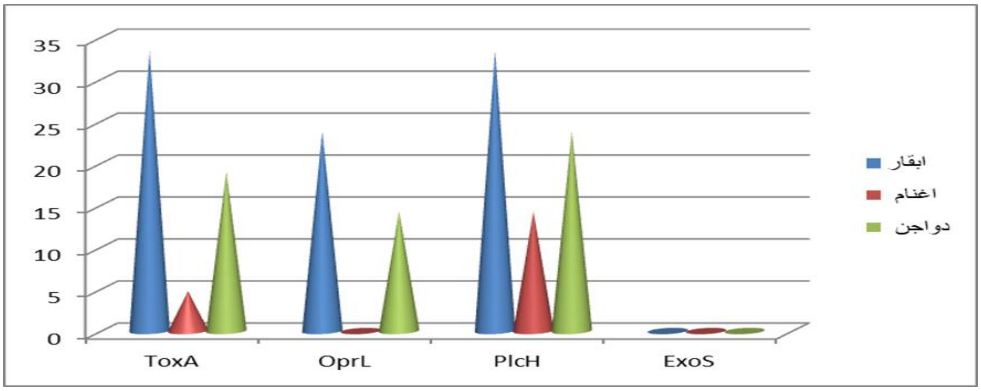
6-4: التشخيص الجزيئي للكشف عن عوامل الضراوة Molecular Identification of Virulence factors

للتعرف على ضراوة عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم في الدراسة الحالية بالاعتماد على بعض هذه الجينات التي شملت جينات *ToxA* و*oprL* و*PlcH* و*ExoS* تبين أن 57.14% من هذه العزلات نتيجة موجبة بامتلاكها جين *ToxA* بينما كانت 38.09% من عزلات الزوائف الزنجارية موجبة لجين *oprL* و71.42% موجبة لتواجد جين *PlcH* وكانت جميع عزلات الزوائف الزنجارية سالبة لامتلاكها جين *ExoS* كما في الشكل (4-9) .



الشكل(4-9) :النسب الكلية لتواجد بعض جينات الضراوة للزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم.

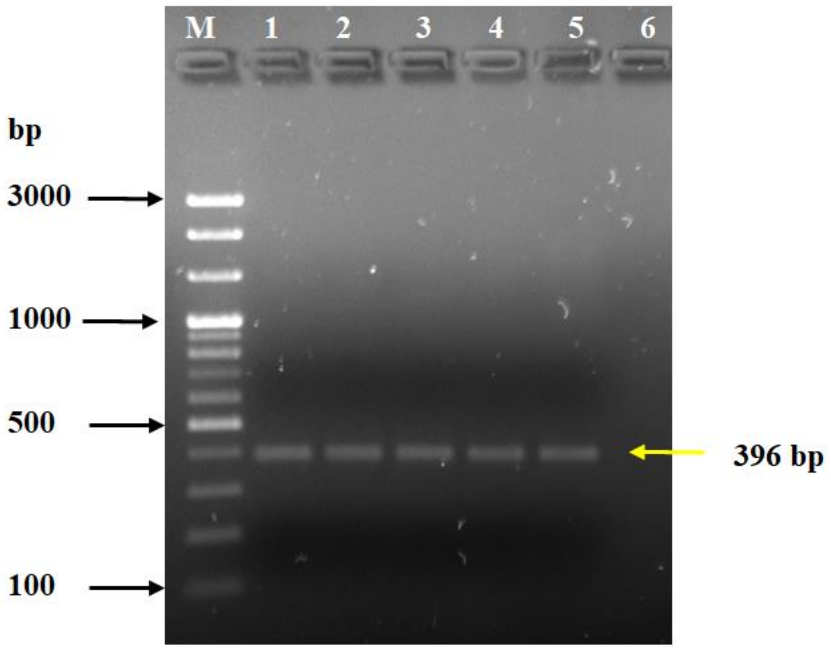
اختلف نسب تواجد الجينات في اللحوم المختلفة حيث كانت النسب في الابقار لجين *PlcH* و*ToxA* 33.33% بينما كانت اقل في جين *OprL* وبنسبة 23.80% بينما كانت اعلى نسبة لجين *plcH* في الاغنام 14.28% واقل نسبة لجين *ToxA* بنسبة 4.76% في حين كانت النسب في الدواجن لجين *PlcH* اعلى وبنسبة 23.80 واقل نسبة كانت لجين *OprL* 14.28%



الشكل(4-10): نسب تواجد بعض جينات الضراوة للزوائف الزنجارية المعزولة من أنواع اللحوم المختلفة

1-6-4: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *ToxA*

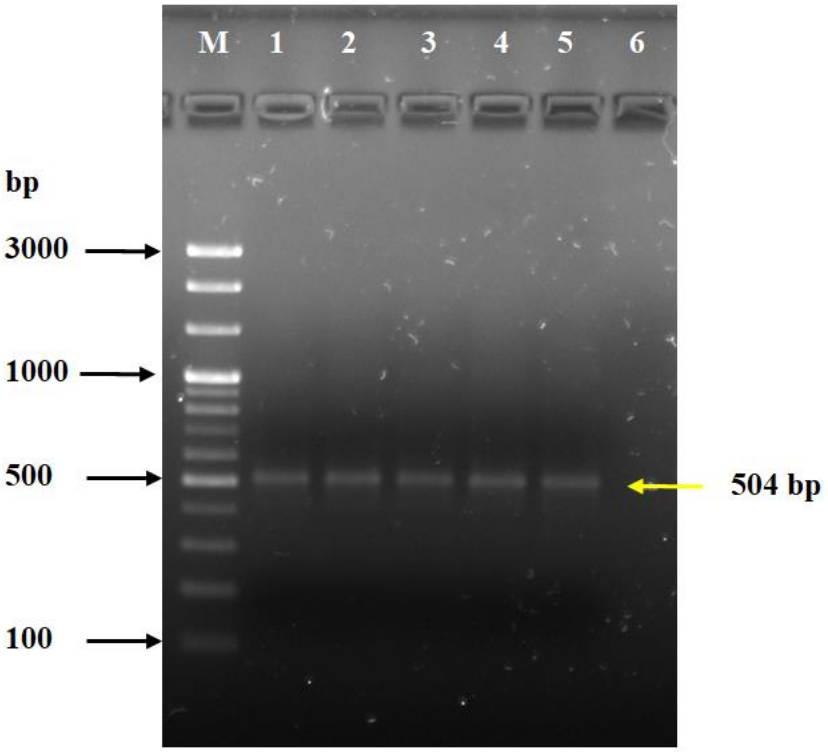
أظهرت نتائج الكشف عن وجود جين *ToxA* في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم أن (57.14 %) من هذه العزلات تمتلك هذا الجين إذ أعطت البادئات حزمه بوزن جزيئي (396) زوج قاعدي في عزلات الزوائف الموجبة بامتلاكها هذا الجين وكما موضح في الشكل (4-11) .



الشكل (4-11): الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladder حجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-5 تمثل عينات موجبة 396 زوج قاعدي ،المسار 6 يمثل السيطرة السالبة

4-6-2:التشخيص الجزيئي باستخدام جين *oprL*

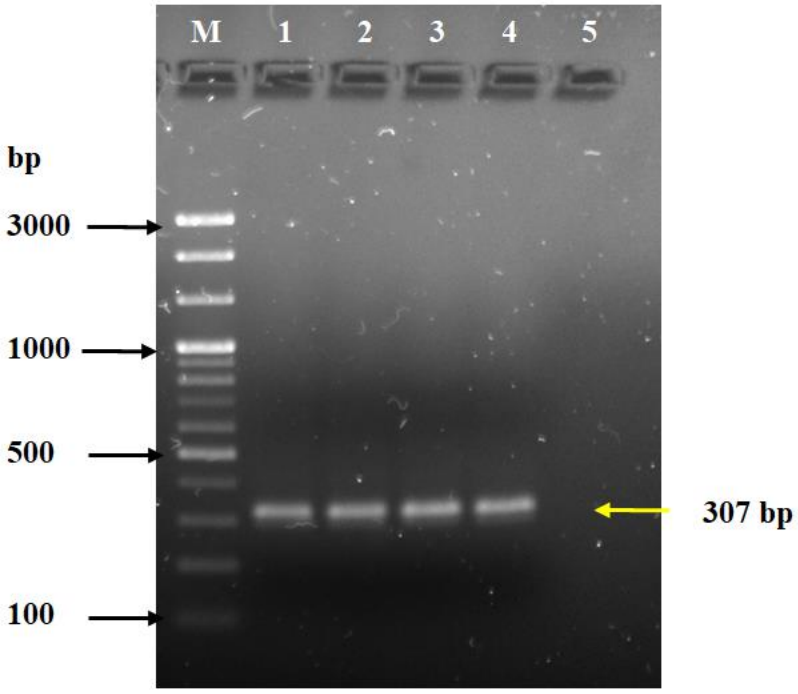
أظهرت نتائج الكشف عن وجود جين *oprL* في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم أن (38.09 %) من هذه العزلات تمتلك هذا الجين إذ أعطت البادئات حزمه بوزن جزيئي (504) زوج قاعدي في عزلات الزوائف الموجبة بامتلاكها هذا الجين وكما موضح في الشكل (4-12).



الشكل (4-12):الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladder حجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-5 تمثل عينات موجبة 504 زوج قاعدي ،المسار 6 يمثل السيطرة السالبة.

3-6-4: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *plcH*

أظهرت نتائج الكشف عن وجود جين *plcH* في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم أن (71.42 %) من هذه العزلات تمتلك هذا الجين إذ أعطت البادئات حزمه بوزن جزيئي (307) زوج قاعدي في عزلات الزوائف الموجبة بامتلاكها هذا الجين وكما موضح في الشكل (4-13).



الشكل (4-13): الترحيل الكهربائي لهلامه الاكاروز للحامض النووي DNA المستخلص من عزلات الزوائف الزنجارية .المسار M يمثل المؤشر DNA ladder حجم المسار 100 زوج قاعدي ، المسارات من 1-4 تمثل عينات موجبة 307 زوج قاعدي ،المسار 5 يمثل السيطرة السالبة

4-6-4: التشخيص الجزيئي باستخدام جين *ExoS*

أظهرت نتائج الكشف عن وجود جين*ExoS* في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم أن جميع العزلات لا تمتلك هذا الجين إذ لم تظهر البادئات أي حزم بوزن جزيئي (118) زوج قاعدي.

4-7: مقاومة عزلات الزوائف الزنجارية لبعض المضادات الحيوية Resistance of *Pseudomonas* to Antibiotics

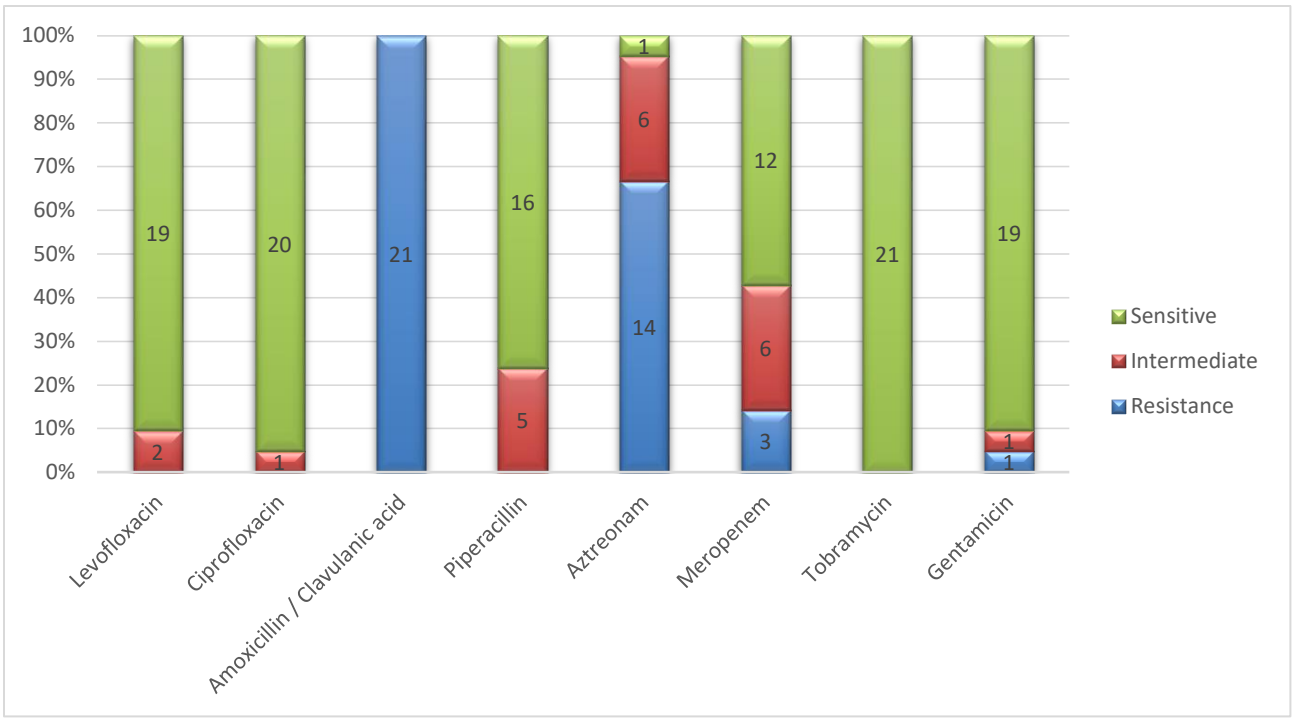
من خلال الكشف عن مقاومة عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم في أسواق مدينة الموصل تبين أن هناك تبايناً واضحاً في مقاومة عزلات الزوائف الزنجارية لبعض أنواع المضادات الحيوية المعتمدة في الدراسة وكما في الشكل (4-14) إذ كانت جميع العزلات مقاومة للمضاد الحيوي Amoxicillin / Clavulanic acid وبنسبة 100% بينما اختلفت عزلات جراثيم الزوائف فيما بينها تجاه المضادات الحيوية المستخدمة فكانت حساسة بنسبة عالية تصل إلى 90-95 % تجاه كلا من (Ciprofloxacin and levofloxacin) العائدين لمجموعة fluoroquinolones وكذلك تجاه (Tobramycin and Gentamycin) العائد لمجموعة Aminoglycosides ،في حين كانت نسب الحساسية تصل إلى 76 % فضلاً عن إلى حساسية العزلات المتوسطة للمضاد الحيوي Piperacillin ونسب أقل من الحساسية تصل إلى 57% ومتوسطة الحساسية للمضاد الحيوي Aztreonam وكما موضح في الجدول (4-8).

الشكل (4-14) :حساسية ومقاومة جراثيم الزوائف الزنجارية لبعض المضادات الحيوية على وسط Muller-Hinton Agar

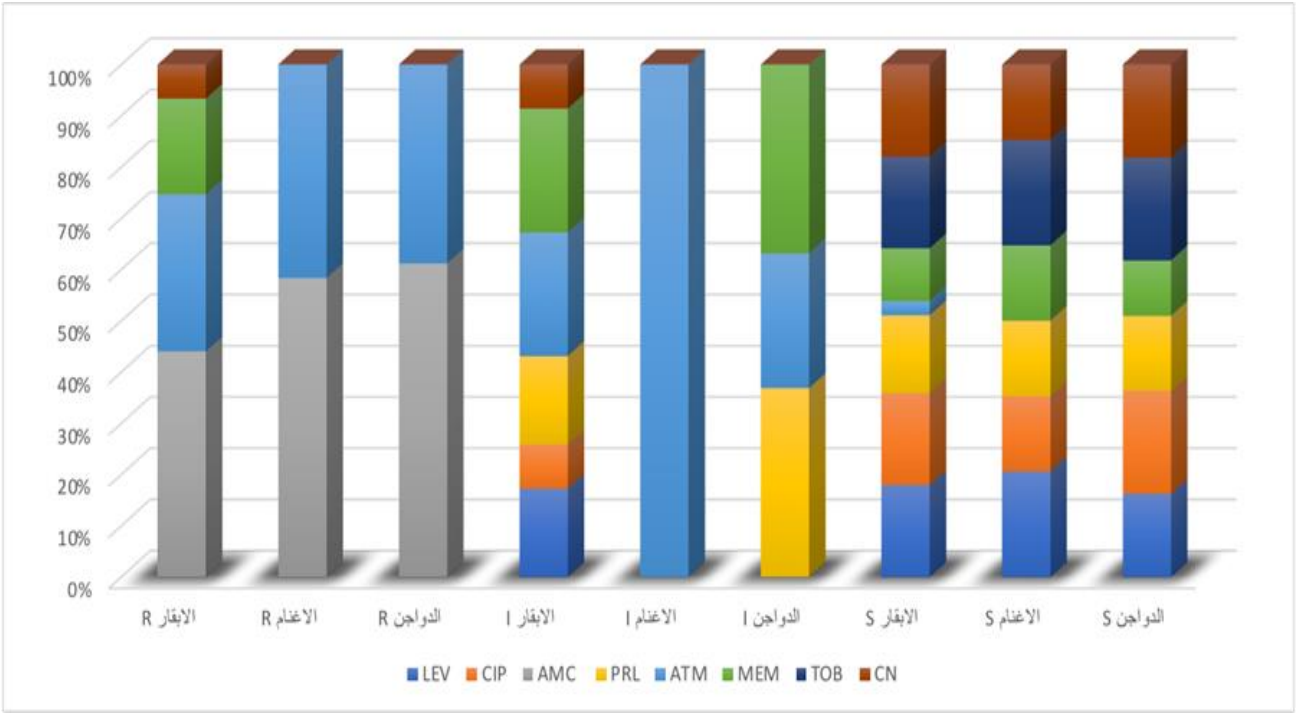
جدول (4-8): عدد العزلات والنسب المئوية لمقاومة جراثيم الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم لبعض المضادات الحيوية

ت	الصنف	المضاد الحيوي	الرمز	المقاومة R		المتوسطة I		الحساسة S	
				عدد	%	عدد	%	عدد	%
1	Fluoroquinolones	Levofloxacin	Lev 5	0	0	2	10	19	90
2	Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	CIP 10	0	0	1	5	20	95
3	B-lactam	Amoxicillin / Clavulanic acid	AMC 30	21	100	0	0	0	0
4	Penicillin's	Piperacillin	PRL 100	0	0	5	24	16	76
5	Monobactams	Aztreonam	ATM 30	14	66	6	29	1	5
6	Carbapenems	Meropenem	MEM 10	3	14	6	29	12	57
7	Aminoglycosides	Tobramycin	TOB 10	0	0	0	0	21	100
8	Aminoglycosides	Gentamicin	CN 10	1	5	1	5	19	90

بالاعتماد على CLSI(2020) (Sensitive:S , Intermediate:I , Resistant:R)



شكل (4-15) :توزيع عدد العزلات ونسبها حسب المقاومة والحساسية لبعض المضادات الحيوية



شكل (4-16): توزيع عدد العزلات ونسبها حسب المقاومة والحساسية لبعض المضادات الحيوية تبعاً لنوع اللحوم

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

5-1: عزل وتمييز الزوائف *Pseudomonas* Isolation and Discrimination of

عرفت الزوائف بكونها احياء مجهرية سائدة في اللحوم المحفوظة بدرجات حرارة التبريد في الظروف الهوائية، لقدرة هذه الجراثيم على استهلاك الكلوكوز والاحماض الأمينية كمصدر أساس للطاقة (Wickramasinghe *et al* .,2019; Franzetti *et al*., 2007).من نتائج الدراسة الحالية تبين أن هناك تواجداً لأنواع الزوائف في اللحوم المعروضة في أسواق مدينة الموصل وبنسبة 35.33% وبضمن هذه النسبة كانت أعلى نسبة عزل للزوائف في لحوم الأبقار والدواجن وبنسبة 46% و 38% على التوالي وتقاربت هذه النسبة مع نسبة عزل الزوائف من اللحوم في القاهرة (Elbayoumi *et al*.,2021) بينما كانت ادنى من نسبة عزل الزوائف من لحوم الدواجن في أسواق مدينة أسيوط (Abd El-Aziz *et al*.,2015) ، ولم تتفق هذه النسبة مع نسبة تواجد الزوائف في لحوم الدواجن في شرق النرويج Heir *et al*.,2021) وبالاعتمادعلى التشخيص الجزيئي باستخدام جين *rpoB* كانت نسبة عزل الزائفة الزنجارية من اللحوم في عينات الدراسة بنسبة 22% في لحوم الدواجن وهي نسبة مقاربة لتواجد الزوائف الزنجارية في اللحوم المفرومة في أسواق مدينة بغداد (Qasim,2019) وأعلى من نسبة عزل الزوائف الزنجارية من اللحوم في مدينة سامسونج (Sırıken *et al*.2019) وقد يعزى ارتفاع نسبة تواجد الزوائف في لحوم الدواجن إلى تلوث البيض والمفاقس مما يسبب خسائر اقتصادية كبيرة (Bakheet *et al*., 2017 ; Liang *et al*.,2012) . كما أظهرت الدراسة أن نسبة عزل الزوائف من لحوم الأغنام وبنسبة 22 % وهي دلالة على وجود تلوث إذ تمتاز لحوم الأغنام بسرعة تلوثها اثناء عمليات الجزر ونزع الصوف (Hauge *et al*.,2011) ، تعد اللحوم وطبيعة مكوناتها وسطاً ملائماً لنمو الكثير من الأحياء المجهرية لمدد طويلة خلال سلسلة إنتاج اللحوم وتداولها وتصنيع منتجاتها وتوزيعها وخزنها ؛لذا تعد اللحوم مصدراً للعديد من الامراض التي منشأها الغذاء والمرتبطة بانتشار الأوبئة (Hassanien, 2004) وتشير نسبة تواجد الزوائف في اللحوم في مدينة الموصل إلى أن اللحوم المعروضة للمستهلك غير مطابقة للضوابط الصحية مما يجعلها غير صالحة للاستهلاك ، ولاسيما وإن بعض أنواع الزوائف قد تكون ذات امراضية عالية وتشكل خطراً

على حياة المستهلك (Akan and Gürbüz,2016) لذلك يجب تركيز الجهود من قبل الأطباء البيطريين لغرض إنتاج لحوم بجودة عالية ليس فقط في مراحل الجزر واعداد اللحوم بل أيضاً في الحفاظ على نظافة الأسطح التي يتم بها تجهيز اللحوم .(Mouafo *et al.*,2020) ، وقد يفسر زيادة نسبة عزل الزوائف في اللحوم إلى أن هذه الجراثيم تمتلك انزيم protease بحيث تكون قادرة على تحليل البروتينات والاعتماد على الاحماض الأمينية الناتجة كمصدر طاقة للنمو اذ تتمكن من منافسة بقية أنواع الأحياء المجهرية التي يمكن ان تتواجد في اللحوم مثل الجراثيم المعوية (Wickramasinghe *et al.*,2019 ; Belak *et al* .,2011) وتتفاوت نسبة انتشار أنواع الزوائف في اللحوم على حسب طبيعة عمليات الايض مثل (*P. fragi* على *P. lundensis* و *P. fluorescens*) (Drosinos,1994)؛ نظراً لتطور التقنيات المعتمدة في تشخيص الأحياء المجهرية الممرضة التي منشأها الأغذية بشكل عام واللحوم بشكل خاص وبضمنها تقنيات التشخيص الجزيئي لهذه الكائنات المجهرية ، نجد أن الكشف عن نسبة تواجد الزوائف في اللحوم باعتماد هذه التقنيات قد اسهم إلى حد كبير إلى التعرف على مدى انتشار الزوائف في اللحوم للوقوف على ظروف انتاج وتصنيع وحفظ اللحوم بطرق امنة لمدد طويلة حفاظاً على صحة المستهلك ولتقليل الخسائر الاقتصادية الناجمة عن فساد اللحوم الذي تسببه الزوائف ومن علامات الفساد المتمثلة بتغير في اللون الطبيعي للحم وبالروائح غير المرغوبة، فضلاً عن تكون الطبقة الهلامية عند تطور مراحل الفساد خاصة وتحديدا عندما تصل أعداد الزوائف إلى ما يقارب 10^7–10^8 وحدة تكوين مستعمرة /سم^2 Amagliani *et al.*, 2012; Nychas *et* .(Tang *et al.*,2017; *al.*, 2008)

ومن دراستنا الحالية تراوحت أعداد جراثيم الزوائف بين 10^4 *1.47 , 10^4x1.92 Cfu/g في لحوم الأبقار والأغنام على التوالي اعقبها $21.3*10^4$ cfu/g في لحوم الدواجن وأشار الباحثين إلى أعداد الزوائف في لحوم الدجاج في مصر كانت $3.51 *10^3$ Cfu/cm^2 (Hassan *et al* .,2020) وأعداد الزوائف في صدور الدجاج $1.43*10^5$ وحدة تكوين مستعمرة /سم^2 (Abd EL-Magied *et al* .,2009) وكذلك 11.5×10^3 Cfu/cm^2 في صدور الدجاج (Eid *et al.*,2014)ويعود السبب في ذلك إلى إهمال توفير الشروط الصحية خلال عمليات انتاج وتصنيع اللحوم ، فضلاً عن أن العد الأولي للزوائف في اللحوم يلعب دوراً مهماً في مدة خزن اللحوم بدرجات حرارة التبريد (Hassan *et al.*,2020; Wang *et al.*,2017) وفي دراسة لذبائح الأبقار قبل التبريد كان العد الكلي للزوائف في اللحوم 1.14 $\log_{10}$ Cfu/cm^2 وبعد مرور 48 ساعة انخفض العد الكلي للزوائف إلى 0.11 $\log_{10}$ CFU/cm^2 ثم وصل العد الكلي للزوائف إلى 1.86 $\log_{10}$ CFU/cm^2 بعد 96 ساعة من الخزن(Reid *et al.*, 2015) وتراوحت

أعداد الزوائف الكلية إلى5.48 -1.04 log_{10} Cfu/cm^2 في ذبائح الأبقار الرومانية (Dan *et al.*, 2003). وبالرغم من ندرة البحوث حول أعداد الزوائف في لحوم الدواجن سجل الباحث Holder *et al.*, (1997) ان العد الكلي للزوائف في لحوم الدواجن 3.96 log_{10} Cfu/cm_2 ،يمكن التنبؤ بمستوى العد الكلي للزوائف ليصل إلى 10^7وحدة تكوين مستعمرة /سم٢ بعد مرور يومين ونصف في لحوم الأبقار ويوم ونصف في لحوم الدواجن عند الحفظ في ظروف هوائية اعتماداً على مستوى التلوث الأولي ودرجة حرارة الحفظ ، وانخفضت أعداد الزوائف في لحوم الأغنام بالمقارنة مع العد الكلي للزوائف في لحوم الابقار والدواجن ورجح الباحثين السبب في ذلك إلى عوامل عدة منها درجات حرارة الحفظ والظروف الهوائية وكذلك درجة الآس الهيدروجيني إذ يصل اقصى قيمة لدرجة الآس الهيدروجيني في الأغنام إلى ما يقارب 5.6–5.7 مقارنة بالأبقار 5.5 ومن المعروف أن قيمة الأس الهيدروجيني للحوم تتناسب طرديا مع نمو أعداد الجراثيم في اللحوم وبالتالي سرعة فسادها إلا أن ارتفاع المحتوى الدهني لهذا النوع من اللحوم يمكن أن يشكل عائقاً لسرعة نمو الزوائف وتكاثرها ولاسيما عند حفظها بطريقة التعبئة تحت التفريغ vacuum packaging ومن ثم يقلل اعدادها ويؤخر الفساد الميكروبي في لحوم الأغنام (Rodrigues *et al.*,2020) .

إن التباين في مستوى العد الكلي للزوائف في أنواع اللحوم المختلفة يرتبط بعوامل عديدة، منها نوع الحيوان والموسم ومدى تطبيق الشروط الصحية من نظافة وتعقيم في مراحل الجزر وبالإمكان الاعتماد على معيار العد الكلي للزوائف لتقييم صلاحية اللحوم للاستهلاك؛ لكون فساد اللحوم يشكل خطرا على حياةً المستهلك؛ لأن بعض أنواع الزوائف تعد ممرضة وتسبب الإصابات في الدم والتهاب المسالك البولية ومضاعفات أخرى (Golemi-Kotra ,2008) .

2-5: التوصيف الجزيئي Molecular Characterization

على الرغم من ندرة البيانات المتعلقة بالجين *CarA* والتسلسل الجيني والذي اعتمدت بعض البحوث على جين *CarA* ؛لكونه من الجينات المهمة التي تدعم تشخيص أنواع الزوائف الشائع تواجدها في الأغذية ومنها *P. fragi* و *P. putida* و*P. lundensis* (Hilario *et al* .,2004) إذ يلعب جين *CarA* دورا مهما في ضراوة بعض الأنواع الجرثومية *E coli* و *Xanthomonas citri* و *Pseudomonas syringae*واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع الباحثين(Ercolini *et al* .,2007) الذين أشاروا إلى امكانية اعتماد *CarA* في تشخيص أنواع الزوائف والتي مصدرها لحوم الأبقار والدواجن ويعد هذا الجين ذو كفاءة عالية في حدوث الفساد أثناء فترة خزن اللحوم ، وتشير الكثير من البحوث إلى الارتباط الوثيق بين

أمراضية البكتريا والعمليات الايضية الخاصة بهذا الجين ،أعتمد هذا الجين في الدراسة الحالية لتوثيق تشخيص أنواع من الزوائف التي مصدرها الغذاء ؛لكون أن جين 16srRNA يفتقر إلى تحديد أنواع الزوائف المتعددة بصورة محددة ودقيقة (Anzai *et al* .,2000) لذا يتوجه الباحثين إلى اعتماد جينات أخرى كبدائل لتشخيص انواع الزوائف منها جينات CarA وrecA وgyrB وfliC وrpoD (Ercolini *et al* .,2007; Bellingham *et al* .,2001; Yamamoto *et al* .,2000)؛ لذلك فإن هذا الجين يعتمد في تشخيص أنواع الزوائف التي يمكن أن تتواجد في الاغذية وبالأخص اللحوم الفاسدة ،وبالاعتماد بشكل مباشر على المستعمرات النامية على الوسط الانتخابي وتسهم جينات *ToxA* الموجودة في عزلات الزوائف كعامل ضراوة مهم في الإصابات التنفسية في حقول الدواجن (Tartor and naenaeey 2016)،إذ كانت نسبة تواجد هذا الجين في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم بنسبة 57.14% ولم تتفق هذه النتيجة مع نسبة تواجد هذا الجين في عزلات الزوائف الزنجارية من اجنة الدواجن (Shahat *et al*.,2019)،بينما لم تتواجد هذه الجينات في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم المجمدة(Khalafallah *et al*.,2020)، يعد جين *oprL* أحد عوامل ضراوة lipoprotein في جراثيم الزوائف كمؤشر لتشخيص أنواع الزوائف الزنجارية إذ كانت نسبة تواجد هذه الجينات في الدراسة الحالية 38.09% وهي غير مطابقة لنسبة تواجد جينات *oprL* من عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من عينات حليب الأبقار ونسبة 100 % (Mokhtari,2019)، ونسبة تواجد هذه الجينات 100 % لعزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من دجاج اللحم (Shahat *et al*.,2019) ،كانت نسبة تواجد جينات *PlcH* في الدراسة الحالية 71.42% وهي نسبة مقاربة إلى نسبة تواجد هذا الجين 72.1% في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من لحوم الأبقار(Benie ,2017) ، مما يدل على انه عامل مهم من عوامل الضراوة لتحديد امراضية الزوائف الزنجارية وقدرتها على إحداث الاصابات و ولها القدرة على افراز الانزيمات الخارجية المحللة وعلى امتلاكها انزيم PLC Phospholipase C) (Barker *et al* .,2004). وذكر باحثين آخرين إن النسبة العالية لتواجد جين *PlcH* تشير إلى قابلية هذه الجراثيم على أنتاج Metallo-B lactamase ويسهم وبشكل جدي في خطورة المنتجات الحيوانية في نقل هذه الممرضات وإحداث الاصابات الخطيرة والأمراض المشتركة ((Fallah *et al* ., 2013;Sheikh *et al* ., 2014)،ان تشخيص عوامل الضراوة و Metallo-B lactamase في عزلات الزوائف الزنجارية يمكن أن يمنع حدوث الطفرات الجينية ويقلل خطورة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لهذه للزوائف (Benie,2017)

أن جين *ExoS* هو المسؤول عن تلف الأنسجة في الأصابات الرئوية والمضاعفات المرافقة لها (Mitov,2010)،واظهرت الدراسة الحالية عدم وجود جينات *ExoS* في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم واتفقت هذه النتيجة مع عدم امتلاك عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من عينات حليب الأبقار إلى جين *ExoS* (Mokhtari,2019)، في حين كانت نسبة تواجد هذه الجينات 96.7% في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من لحوم الأبقار وبنسبة 71.42% لعزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من أجنة الدواجن ودجاج اللحم(Shahat *et al*.,2019).

نستخلص من مجمل هذه النتائج إن جينات عوامل الضراوة لها دور مهم في تواجد الزوائف الزنجارية ونموها على الاسطح وامتلاك بعضها القابلية على غزو الأنسجة بمساعدة الأسواط والاهداب ومتعدد السكريدات واحداث الامراضية لأ نها تعد كعوامل مهيئة للالتصاق في الانسجة فضلاً على ان جراثيم الزوائف الزنجارية لها القدرة على انتاج الذيفانات والانزيمات والتي تسبب تلف وتمزق الحواجز الدفاعية مسببة تهتك أغشية الخلايا بالرغم من مناعة المضيف(Benie *et al* .,2017)،كما وإن قابلية الزوائف على انتاج انزيم Protease يؤدي دوراً مهماً في أمراضية الزوائف المعزولة من المنتجات الحيوانية الذي يعمل على شطر Elastin وCollagen وزيادة انتاج Interlokin-8 (IL-8) ويقلل من الاستجابة المناعية عن طريق شطر البروتينات بمساعدة مستقبلات Protease ويسهم Elastases-B في تثبيط بقية أنواع البروتينات مثل IgA-IgG وبذلك يعيق إصلاح الخلايا الطلائية (Khattab *et al* .,2015).إن تواجد جينات *ExoS* و *plcH* هي الأكثر شيوعاً كعوامل ضراوة للزوائف الزنجارية التي مصدرها الاغذية (Benie *et al* .,2017) ،فضلاً عن أن التنوع الجيني بين عزلات جراثيم الزوائف من المصادر الحيوانية يعد ذو أهمية معنوية في تحديد ضراوة هذه الجراثيم لكونها تختلف حسب مصدر العزلة الجرثومية سواء كانت مصدرها الأنسان أو الحيوان أو البيئة وترتبط بحساسية هذه المضائف البيئية لتواجد هذه الانواع المختلفة من الجراثيم (Mokhtari,2019)، وتمتلك جراثيم الزوائف الزنجارية بلازميدات المقاومة للمضادات الحياتية Integrin وTransposon التي تنتقل إلى الأنواع الاخرى، وان غياب بعض جينات الضراوة في بعض العزلات قد يكون ناجماً عن الإصابة بهذه الجراثيم يعقبها انخفاضا في ضراوة هذه الجينات التي يمكن أن تزيد من قدرة هذه الجراثيم على البقاء في المضيف (Lee *et al* .,2015) يمكن الاعتماد على جينات الضراوة للزوائف الزنجارية للكشف عن قابلية هذه الجراثيم الامراضية على تكوين المخاط Biofilm وبذلك تسهم في دعم التشخيص المبكر لتواجد هذه الجراثيم في الانسان أو الحيوان واختيار العلاج الأمثل لتقليل الاصابة (Płókarz *et al* .,2022).كما ويمكن للزوائف الزنجارية ان تحدث الآفات

المرضية بمواقع مختلفة ؛وذلك لتأثيرها التثبيطي على انتاج السايتوكينات التي تقلل من قابلية المضيف على المقاومة ،لذا فان احتمالية قابلية انتقال عزلات الزوائف عالية الضراوة من الدواجن إلى الإنسان تشكل خطراً على الصحة العامة (Weber *et al* .,2016; Hassan *et al* .,2020).

3-5: المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات الزوائف الزنجارية من اللحوم Antibiotic Resistance of *P.aeruginosa* Isolated from Meat

تشكل المقاومة للمضادات الحيوية تحدياً كبيراً في سلامة الأغذية وصحة المستهلك ، فمن نتائج الدراسة تباينت مقاومة وحساسية عزلات الزوائف من اللحوم لبعض أنواع المضادات الحيوية المستخدمة بالدراسة وكانت جميع العزلات مقاومة للمضاد الحيوي Amoxicillin وبنسبة 100٪ تلاها Aztreonam بنسبة 66٪ وأتفقت هذه النتائج مع مقاومة الزوائف إلى بيتا لاكتام (Elbehiry *et al* .,2021) وانخفضت مقاومة العزلات للمضاد الحيوي Meropenem إلى 14٪ ، وعلى النقيض من ذلك كانت جميع العزلات حساسة للمضاد الحيوي Tobramycin وبنسبة 100٪ وكذلك Levofloxacin بنسبة 90٪ و Gentamycin 90٪ ثم Piperacillin 76% و 57٪ Meropenem واتفقت هذه النتائج مع (Khalafallah *et al* .,2020)لعزلات الزوائف من اللحوم المجمدة ، وأيَد هذه النتائج (Heir *et al*) 2021., الذي أشار إلى امتلاك جراثيم الزوائف المعزولة من لحوم الدواجن في الأسواق إلى مقاومة عالية للمضادات الحيوية وامتلاكها جينات المقاومة الحيوية مثل (B-Lactamase و Ampiclox) إذ تسهم المجازر وحقول الدواجن في نشوء مقاومة للمضادات الحيوية لجراثيم الزوائف لاحتواء الفرشة على اعداد ضئيلة من جراثيم الزوائف الزنجارية مع بقايا المضادات الحيوية، التي تلعب دوراً مهماً في انتشار الاصابة بهذه الجراثيم في البيئة (Farghaly *et al* .,2017; Luo *et al*.,2020) ، واستخلصت نتائج الدراسة إن 29% من عزلات الزوائف تمتلك مقاومة متوسطة إلى المضاد الحيوي Meropenem ويعود هذا التباين إلى الاستخدام المفرط للمضادات الحيوية في الأنسان والحيوان وكذلك سوء استخدام المضادات الحيوية في حقول الحيوانات أما كعلاج او كمحفزات للنمو ؛الأمر الذي يمكن هذه الجراثيم من امتلاك جينات مقاومة تنتقل بين الحيوان والإنسان (Murphy *et al* .,2017) كذلك اتفقت نتائج حساسية عزلات الزوائف الزنجارية للمضادات Tobramycin وLevofloxacin وCiprofloxacin وGentamycin مع حساسية عترات الزوائف المعزولة من حقول الدواجن (Kousar *et al*.,2021) ،والذي اعزى ذلك إلى زيادة مقاومة عزلات الزوائف للبيتا لاكتام ESBL(Extended spectrum beta-lactamase) وأوصى بضرورة توفير الضوابط الصحية للتعامل مع حقول الدواجن ومخلفاتها للتقليل من انتشار الزوائف في بيئة

الدواجن؛ بهدف تقليل الحاجة إلى استخدام المضادات الحيوية، وجاءت نتائج دراستنا مطابقة لنتائج دراسة الباحث (Gales *et al* .,2001) الذي أشار إلى إن Ciprofloxacin يعد عقاراً فعالاً ضد الزوائف، ذكر العديد من الباحثين ان الزوائف تمتلك مقاومة عالية للمضادات الحيوية من خلال العديد من الميكانيكيات وصنفت إلى مجموعتين المجموعة الأولى أطلق عليها ميكانيكية المقاومة الداخلية للمضادات الحيوية وميكانيكية المقاومة المكتسبة للمضادات الحيوية ، واعتمادا على أمراضية الزوائف فإن ميكانيكية المقاومة الداخلية للمضادات الحيوية تشمل تقليل نفاذية الغشاء الخارجي وميكانيكية الضخ الخارجي للمضادات الحيوية خارج السايتوبلازم (De Oliveira *et al*. 2013; LavillaLerma *et al*., 2014) ، ؛ بينما الميكانيكية المكتسبة للمقاومة للمضادات الحيوية فتشمل انتاج انزيمات المعطلة للمضادات الحيوية مع انتشار جينات مقاومة لمضادات الميكروبات عبر السلسلة الغذائية والتي تشكل خطرا على الصحة العامة وإنتاج البيتا لاكتام Metallo β-Lactamases وتكون هذه المقاومة المكتسبة إما من خلال الطفرات عن طريق الجينات المشفرة أو عن طريق البلازميد او transposon (Henwood *et al*. 2001) فضلاً عن تواجد الجراثيم الممرضة كمضائف خازنة لهذه المقاومة مثل الزوائف التي تنتشر بشكل واسع وتتحمل البقاء حية في الظروف البيئية لمدة طويلة الامر الذي يسهم وبدرجة كبيرة إلى نشوء هذه المقاومة للمضادات الحيوية.(Pachori *et al*. 2019) ان جينات المقاومة للمضادات الحيوية تتواجد على البلازميدات ؛لذا فإن انتشار المقاومة للمضادات الحيوية للزوائف المعزولة من المصادر المختلفة إلى الأنسان او إلى البيئة يعد دليلاً على انتقال هذه الجينات بصورة أفقية كمسلك رئيس (Von Wintersdorff *et al*., 2016) ،على ضوء ذلك فإن الدراسات المستقبلية يجب أن تهدف إلى التعرف على التقنيات التي تحد من هذه التناقضات في المقاومة للمضادات الحيوية لأنواع الزوائف ؛ لكونها توثر وبشكل سلبي على صحة المستهلك للحوم الملوثة (Elbehiry *et al*.,2021).

وأن دلت هذه النتائج على شيء فإنما تدل على أن مقاومة الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية يضيف عبئا على تحديد اختيار المضاد الحيوي المناسب ؛ لذا يوصى بضرورة التعامل الجيد مع المنتجات الحيوانية وطبخ اللحوم جيداً بدرجة حرارة مناسبة ،فضلاً عن الحد من استخدام العشوائي لهذه المضادات في الحقل الحيواني.

الفصل السادس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

6-1: الاستنتاجات Conclusions

1- عزلت جراثيم الزوائف الزنجارية من اللحوم في مدينة الموصل وبنسبة 39.62 % وجراثيم الزوائف المتآلقة بنسبة 13.21 %في حين كانت نسبة 47.17 %من الزوائف تعود لأنواع أخرى .

2- تم ولأول مرة اعتماد جين *rpoB* في تشخيص الزوائف الزنجارية وجين *CarA* للكشف عن وجود أدلة الفساد في اللحوم .

3- شخصت ضراوة بعض عترات الزوائف الزنجارية المعزولة من اللحوم بامتلاكها لبعض جينات الضراوة ومنها *ToxA* و*oprL* و *PlcH* وبنسبة 57.14% و 38.09 %و71.42 % على التوالي وعدم امتلاكها للجين *ExoS* دلالة على أمراضية هذه الجراثيم وخطورتها على صحة المستهلك .

4- تميزت جميع عزلات الزوائف الزنجارية بمقاومة عالية تجاه المضاد الحيوي Amoxicillin /Clavulanic acids و Aztreonam وامتلكت حساسية عالية لكل من المضادات الحيوية Tobramycin وLevofloxacin وCiprofloxacin وGentamycin .

2-6: التوصيات Recommendations

1-التقليل من نسب انتشار الزوائف في بيئة الحيوانات بتطبيق الضوابط الصحية من حيث النظافة والتعقيم بتقليل تلوث اللحوم بالزوائف؛ لكونها من الجراثيم التي تتحمل العيش لمدة طويلة في البيئات المختلفة .

2 - اعتماد الطرق الصحية المثلى لحفظ اللحوم في الأسواق ومحلات القصابة مثل التغليف لمنع فسادها وضمان وصول لحوم آمنة إلى المستهلك .

3-دراسة جينات الضراوة الأخرى التي تمتلكها الزوائف الزنجارية مع تحديد تسلسلات الحمض النووي للكشف عن الطفرات الوراثية لهذه الجينات.

4-اجراء دراسات مقبلة لعزل أنواع أخرى من الزوائف من اللحوم ومنتجاتها في مدينة الموصل وباعتماد طرق التشخيص الجزيئي وتحديد القرابة بين العزلات .

5- يمكن الاعتماد على جين *CarA* لتشخيص وجود ادلة الفساد الغذائي ولاسيما الزوائف للكشف عن سلامة اللحوم وصلاحيتها للاستهلاك البشري .

6- ضرورة الحد من الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية لكونها تشكل خطراً كبيراً لنشوء مقاومة عالية للمضادات الحيوية ،والتحري عن الجينات المسؤولة عن مقاومة الزوائف للمضادات الحيوية .

المصادر

Abd El-Ghany WA. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* infection of avian origin: Zoonosis and one health implications. Vet World.;2155–9. DOI: 10.14202/vetworld.2155-2159

Abd EL-Magied-Walaa, K.A., Hassan, M.A., Shaltout, F.A., Lamada- Hanan, M., (2009). Occurrence of psychrotrophic pathogens in chicken meat products. M. V. Sci. (Meat hygiene) Thesis, Fac. Vet. Med., Benha University.

Ajayi, T., Allmond, L. R., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. P. (2003). Singlenucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. J Clin Microbiol 41, 3526– 3531.

Akan, İ. M., and Gürbüz, Ü. (2016). Isolation and identification of *Pseudomonas* species in meat and meat product and cold storage depots. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 32(4), 268-277 .

Al-Araji, M. K., and Ali, S.(2012). 2-Aminoacetophenone As A Virulent Factor For *Pseudomonas aeruginosa* Causing Sever Burn And Wound Infections In Iraq. Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science (25) 3

Al-Hasan,R.(2012). Astudy of carbapenem resistance in Acinetobacter bumanii isolates from Kuwait.Phd.Thesis.University of Edinburgh.

Alice S. Prince. (2012). In Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fourth Edition).

Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. (2006). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother.;50(1):43-48. DOI: 10.1128/AAC.50.1.43-48.2006.

AL-Saleh, E., & Akbar, A. (2015) .Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in Kuwait soil. Chemosphere, 120, 100-107.

Amagliani G, Parlani ML, Brandi G, Sebastianelli G, Stocchi V, Schiavano GF. (2012) .Molecular detection of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational water. Int J Environ Health Res.;22(1):60-70. doi: 10.1080/09603123.2011.588325.

Anyan, M. E., Amiri, A., Harvey, C. W., Tierra, G., Morales-Soto, N., Driscoll, C. M., ... & Shrout, J. D. (2014). Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa* . Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(50), 18013-18018.

Aravindhan, R.; Naveen, n; Anand , G.; Raghava rao, J. and Unni nair, B. (2014). kinetics of biodegradation of phenol and a polyphenolic compound by a mixed culture containing *pseudomonas aeruginosa* and bacillus subtilis. Applied Ecology and Environmental Research.12(3): 615-25.

Asikyan ML, Kus JV, Burrows LL: (2008). Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 190, 7022–7034

Awad, S. S., Rodriguez, A. H., Chuang, Y. C., Marjanek, Z., Pareigis, A. J., Reis, G., and Engelhardt, M. (2014) .A phase 3 randomized doubleblind comparison of ceftobiprole medocaril versus ceftazidime plus linezolid for the treatment of hospital-acquired pneumonia. Clinical Infectious Diseases, 59(1), 51-61.

Baker.R. C.,Hahn.P.W. And Robbins.K. R.(1988). Fundamentals Of New Food Product Development . Eisevier . U.S.A.

Bakheet AA, Ali NM, Habaty SHA, Nasef SA. (2017). Detection of Disinfectant resistant aerobic bacteria in unhatched chicken eggs. Benha Veterinary Medical Journal. 2; 32 (2): 248- 259.

Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML: (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. Mol Microbiol 53, 1089–1098

Basu, S., Bose, C., Ojha, N., Das, N., Das, J., Pal, M., & Khurana, S. (2015). Evolution of bacterial and fungal growth media. Bioinformation, 11(4), 182–184.

Belak, A., Kov´acs, M., Hermann, Z., Holczman, ´A., M´arta, D., Stojakovi˘c, S., Bajcsi, N., Mar´az, A.,(2011). Molecular analysis of poultry meat spoiling microbiota and heterogeneity of their proteolytic and lipolytic enzyme activities. Acta Aliment. 40, 3–22

Bellingham, N. F., J. A. W. Morgan, J. R. Saunders, and C. Winstanley. (2001). Flagellin gene sequence variation in the genus *Pseudomonas.* Syst. Appl. Microbiol. 24:157–165.

Benie CK, Dadié A, Guessennd N, N'gbesso-Kouadio NA, Kouame NZ, N'golo DC, Aka S, Dako E, Dje KM and Dosso M. (2017). Characterization of virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish. European Journal of Microbiology and Immunology. Mar;7(1):55-64.

Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. (2011) . Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations [Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation]. Ann Biol Clin (Paris).;Jul-Aug;69(4):393-403. French. doi: 10.1684/abc.2011.0589.

Bhandare SG, Sherikar AT, Paturkar AM, Waskar VS and Zende RJ, (2007). A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. Food Control, 18, 854–858.

Bhatia Rajesh, Ichhpujani R.L. . (2008). Essentials of Medical Microbiology. 4 th Edition, Publisher: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. New Delhi, India. ISBN: 9788184481549

Black, L.J. (2012) . Microbiology principles and explorations . 8th ed . John Wiley Sons. Inc. United States of America .

Blance D. (2004). The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. Infect Genet Evol., 4: 193-197.

Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa* : A wealth of pathogenic weapons. International Journal of Medical Microbiology, 300(8), 534-543.

Blondel-Hill, E., Henry, E. A. and Speert, D. P. (2007*). Pseudomonas*. In Manual of Clinical Microbiology, 9th edn, pp. 734–748. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Borkar, S.G. (2017). Biochemical Tests Used in Identification of Bacteria. Laboratory Techniques in Plant Bacteriology, pp.93–108. doi.org/10.1201/9781315206882-17.

Boussoualim, N. ; Trabsa, H. ; Krache, I. ; Arrar, L. ; Khennouf, S. and Baghiani, A. (2014) . Anti-bacterial and β-lactamase inhibitory effects of Anchusa azurea and Globularia alypum extracts . Res. J. Phar. Bio. Che. Sci. 5(1): 742-749 .

Bricha S, Ounine K, Oulkheir S, Haloui N, Attarassi B: (2009). Virulence factors and epidemiology related to *Pseudomonas aeruginosa*. Tunis J Infect Dis 2, 7–14

Brooks, G., Carroll, K., Butel, J ‹8Morse, S. and Mietzner, T. (2015). Jawetz, Melnick, Adelberg Medical Microbiology: Placebo doo8.

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., and Mietzner, T.A. (2010). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology, 25th ed. McGraw-Hill, New York, PP:121:136.

Brown, A. E., and Smith, H.R. (2017). Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. 8th ed. Th McGraw-Hill Companies. USA.

Brunner, S., Fengler, K., Morgante, M., Tingey, S. and Rafalski, A. (2005) .Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. Plant Cell, 17, 343–360.

Butcher, B.G., Chakravarthy, S., D'Amico, K. (2016). Disruption of the carA gene in *Pseudomonas syringae* results in reduced fitness and alters motility. BMC Microbiol 16, 194 https://doi.org/10.1186/s12866-016-0819-z

Cadoret, F., Ball, G., Douzi, B., & Voulhoux, R. (2014). Txc, a new type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA7, is regulated by the TtsS/TtsR two-component system and directs specific secretion of the CbpE chitin-binding protein. Journal of bacteriology, 196(13), 2376-2386

Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., and Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. Food Microbiology, 54, 142-153.

Carroll,K.C.;Morse,S.A.;Mietzner,T.;Miller,S.(2016).Pseudomonads and Acinetobacter.In:Jawetz,Melinick and Adelbergs Medical Microbiology , 27th . ed. A lange medical book.

Cerveny, J., Meyer J.D and Hall, P.A. (2009). Microbiological Spoilage Of Meat And Poultry Products In: Compendium Of The Microbiological Spoilage, Of

Foods And Beverages. Foodmicrobiology And Food Safety, W.H. Sperber And M.P.Doyle

Chen, C.Y., Nace, G.W.,and Irwin, P.L.(2003). A 6 χ 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes, and Escherichia coli. J. Microbiol. Methods 55 (2), 475e479. doi: 10.1016/s0167-7012(03)00194-5.

Chen, S.H., Fegan, N., Kocharunchitt, C., Bowman, J.P. and Duffy, L.L. (2020). Changes of the bacterial community diversity on chicken carcasses through an Australian poultry processing line. Food Microbiol., 86: 103350.

Clinical and laboratory standards institute .CLSI. (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cohen, T. S., Parker, D., and Prince, A.(2015). *Pseudomonas aeruginosa* Host Immune Evasion. In *Pseudomonas* Springer Netherlands. (pp. 3- 23).

Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmino, B. P., and Simons, A. (1996). Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology. The Churchill Livingstone. Inc. USA.

Cosgrove SE, Carmeli Y. (2003) .The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. Clin Infect Dis.;36(11):1433-1437. DOI: 10.1086/375081.

Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gramnegative bacteria: structural and mechanistic insights. Nature Reviews Microbiology,13(6), 343-359.

Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A. M., Malone, M., Nicolaisen, M. H., (2020). The Environmental Occurrence of. *Pseudomonas. Aeruginosa*. Apmis. 128 (3), 220–231. doi: 10.1111/apm.13010

Dan SD, Rotaru O, Rapuntean G, Mihaiu M and Zegrean G,(2003). The dynamic of psychrotrophic microflora in beefduring slaughtering process. Bulletin of USAMV-CN Veterinary Medicine, 60, 67–71.

Dave, D , Ghaly, A. E. (2011).Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review. American Journal of Agricultural and Biological Sciences; 6(4), 486-510. https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.486.510

Davey, M.E., Caiazza, N.C. and O'Toole, G.A. (2003) .Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 185, 1027–1036.

Davinic, M. ; Carty, N.L. ; Colmer-Hamood, J.A. ; Francisco, M.S. and Hamood, A.N. (2009) . Role of Vfr in regulation exotoxin A production by *Pseudomonas aeruginosa* . J. Microbiology . 155: 2265-2273 .

Davinic, M. (2008). The role of Vfr and adenylate cyclase in regulating exotoxin a production by Pseudomonas aeruginosa (Doctoral dissertation, Texas Tech University).

De Martino, L., Nocera, F. P., Mallardo, K., Nizza, S., Masturzo, E., Fiorito, F& Catalanotti, P. (2016) .An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(5), 384-389.

De Oliveira KM, dos S Júlio PD, Grisolia AB. (2013). Antimicrobial susceptibility profile of Pseudomonas spp. isolated from a swine slaughterhouse in Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Rev Argent Microbiol. Jan-Mar;45(1):57-60.

Del Rio, E. And M. Panizo-Moran. (2007). Effect Of Various Chemical Decontamination Treatments On Natural Microflora And Sensory Characteristics Of Poultry. Intern. J. Food Microbio. 115: 286-280.

Delden, C.V. and Iglewski, B.H. (1998) . Cell-to-Cell signaling Pseudomonas aeruginosa infections . J. synopsis . 4: 1-4 .

Doulgeraki AI, Ercolini D, Villani F, Nychas G-JE. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. International J Food Microbiol. 157(2):130–141. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.05.020

Drosinos, EH, Board RG. (1994) .Metabolic activities of pseudomonads in batch cultures in extract of minced lamb. J.Appl. Bacteriol.;(77):613–620.DOI:10.1111/j.1365-2672.1994.tb02809.x.

Eid, A.M., Eltalawy, M.F., Zahran, S.E. and Khedre, A. Z. (2014). Bacteriological and chemical evaluation of some heat treated chicken products. Benha Vet. Medical J. 27(2): 437:443.

Elbayoumi, Z., Zahran, R. and Shawish, R., (2021). Prevalence and PCR Screening of *Pseudomonas* Isolated from Some Meat Products in Egypt. Journal of Current Veterinary Research, 3(2), pp.130-136.

Elbehiry A, Marzouk E, Moussa I, Abalkhail A, Ibrahim M, Hamada M, (2021).*Pseudomonas* Species Prevalence, Protein Analysis, and Antibiotic Resistance: An Evolving Public Health Challenge. Research Square Platform LLC.; 30; DOI: 10.21203/rs.3.rs-1067810/v1

Eraky, R , Abd El-ghany, W, Soliman, K. (2020) .Studies on *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Hatcheries and Chicken. J Hel.; 71(1), 1953-1962. DOI: 10.12681/jhvms.22937

Ercolini D, Russo F, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. (2007). Simultaneous Detection of Pseudomonas fragi, P. lundensis, and P. putida from Meat by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the carA Gene. Appl Environ Microbiol.;73(7):2354–9. DOI: 10.1128/aem.02603-06

Ercolini D, Russo F, Nasi A, Ferranti P, Villani F. (2009). Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro

and in Beef. Appl Environmental Microbiol.;75(7):1990–2001. DOI: 10.1128/aem.02762-08

Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., Mauriello, G., Villani, F., (2010). Different molecular types of *Pseudomonas* fragi have the same overall behaviour as meat spoilers. Int. J. Food Microbiol. 142, 120–131.

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., Villani, F.(2006).Changes In The Spoilage Related Microbiota Of Beef During Refrigerated Storage Under Different Packaging Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 72, 4663e4671.

Eusebio, N. , Pinheiro, T. , Amorim, A . A . , Gamboa, F . ; Saraiva, L and Gusmao, L. (2013) . A practical single nucleotide polymorphism multiplex assay for genotyping of Pseudomonas aeruginosa . PLOSone. 8(6): 1-8 .

Fabrega, A. ; Madurga, S. ; Giralt, E. and Vila, J. (2009) . Mechanism of action of and resistance to quinolones . J. Soc. App. Mic. Bla. 2(1): 40-61.

Fadhil L, Al-Marzoqi AH, Zahraa MA, Shalan AA. (2016). Molecular and phenotypic study of virulence genes in a pathogenic strain *of Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical origins by PCR: profiles of genes and toxins. Res J Pharm, Biol Chem Sci7, 590–598

Fallah F, Borhan RS, Hashemi A. (2013). Detection of bla(IMP) and bla(VIM) metallo-β-lactamases genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains. Int J Burns Trauma. Apr 18;3(2):122-4.

Farghaly, E.M., Roshdy, H., Bakheet, A.A., Abd El-Hafez, S.A. and Badr, H. (2017) Advanced studies on *Pseudomonas aeruginosa* infection in chicken. Anim. Health Res. J., 5(4): 207-217

Ferroni ,A.; Sermet,G. I.; Abachin, E.; Quesne, G.; Lenoir , G and Berche, P.(2002).Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of

nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cysticfibrosis center. J.Clin. Microb.40:3793–7.

Filloμx, A., (2010) Secretion signal and protein targeting in bacteria: a biological pμzzle. Joμrnal of bacteriology ‹192(15) ‹3847-3849.

Fletcher B, Mullane K, Platts P, Todd E, Power A, Roberts J, Chapman J, Cozzolino D, Chandra S. (2018). Advances in meat spoilage detection: A short focus on rapid methods and technologies.Journal of Food.;16(1):1037-1044. DOI: 10.1080/19476337.2018.1525432

Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2007). Diagnostic Microbiology, 12th ed., Mobsy Elsevier, Houston, Texas, p (63, 218,222,229,232,234,246.

Franzetti L, Scarpellini M.(2007). Characterization of Pseudomonas spp isolated from foods. Ann Microbiol.; 57: 39-47.

Fuse, K., Fujimura, S., Kikuchi, T., Gomi, K., Iida, Y., Nukiwa, T., and Watanabe, A. (2013) Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* . Journal of Infection and Chemotherapy,19(1), 82-88.

Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Renee R and Ramphal R.(2001) Characterization of ps. aeruginosa occurrence rate, antimicrobial susceptibility pattern and molecular typing in the global sentry antimicrobial surveillance program. Clinic Infect Dis.; 32:S146-55. DOI: 10.2147/idr.s324055

Gessard, C. (1984). Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. Rev. Infect. Dis. 6(3): 775–6.

Geyer, C. N. and Hanson, N. D. (2013). Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. Diagnostic microbiology and infectious disease, 77(2), 113-117.

Gillespie, S. H. and hawkey, P. M. (2006). Principles and practice of clinical bacteriology, Second Edition, John Wiley & Sons Ltd, Southern Gate, Chichester, England.

Golemi-Kotra, D., (2008). *Pseudomonas* Infections. *14*, 2627–2645. https://doi.org/10.3762/bjoc.14.241

Gonzalez, M. R., Fleuchot, B., Lauciello, L., Jafari, P., Applegate, L. A., Raffoul, W., and Perron, K. (2016) Effect of Human Burn Wound Exudate on *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. mSphere, 1(2), e00111-15.

Gracy J, Chiche L. (2011).Structure and modeling of knottins, a promising molecular scaffold for drug discovery. Current pharmaceutical design. Dec 1;17(38):4337-50.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., and Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology, 78(1), 79–97. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7

Gunsalus, I. C.(1996). Pseudomonas: A Century Of Biodiversity.In: T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas, And S.Silver (Eds.) Molecular Biology Of Pseudomonads. ASM Press. Washington, DC. 8–21.

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., and Grant, G. D. 2016- Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* . Toxins, 8(8), 236.

Hassan WH, Ibrahim AMK, Shany SAS,and Salam HSH. (2020) Virulence and resistance determinants in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from pericarditis in diseased broiler chickens in Egypt. J Adv Vet Anim Res. Aug 5;7(3):452-463. doi: 10.5455/javar.2020.g441. PMID: 33005671; PMCID: PMC7521822.

Hassanien.F, A. (2004). Bacterial Hazards Associated with Consumption of Some Meat Products. Benha, Vet.Med.J., 15: 41-54.

Hauge SJ, Nafstad O, Skjerve E, Rotterud OJ and Nesbakken T.(2011) Effects of shearing and fleece cleanliness on microbiological contamination of lamb carcasses. Int J food microbiol.;150:178–183. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.038

Health Organization. 2nd ed. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, WHO, Geneva. 167PP.

Heinz, G., And P. Hautzinger (2007). Meat Processing Technology. For Small-To Medium Scale Producers. Food And Agriculture Organization Of The United Nations Regional Office For Asia And The Pacific. Retrived On 1st June 2010, From Ftp://Ftp.Fao.Org/Docrep/Fao/010/Ai407e/Ai407e00.Pdf.

Heir E, Moen B, Åsli AW, Sunde M ,and Langsrud S.(2021).Antibiotic Resistance and Phylogeny of *Pseudomonas* spp. Isolated over Three Decades from Chicken Meat in the Norwegian Food Chain. Microorganisms. MDPI AG;;9(2):207. DOI: 10.3390/microorganisms9020207

Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M. (2001) Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. J. Antimicrob. Chemother.; 47:789 –799. http://dx.doi.org/10 .1093/jac/47.6.789

Hermann, T. (2007) . Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches . Cell. Mol. Life Sci. 64: 1841-1852 .

Hilario E, Buckley TR, Young JM. (2004)Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of atp D, car A, rec A and 16S rDNA. Antonie Van Leeuwenhoek. Jul;86(1):51-64. doi: 10.1023/B:ANTO.0000024910.57117.16. PMID: 15103237.

Hilliam, Y., Kaye, S., and Winstanley, C. (2020). *Pseudomonas Aeruginosa* and Microbial Keratitis. J. Med. Microbiol. 69 (1), 3–13. doi: 10.1099/jmm.0.001110

Holder JS, Corry JEL and Hinton MH, (1997). Microbial status of chicken portions and portioning equipment. BritishPoultry Science, 38, 505–511.

Holt, T.J., Rees, E.I., Hawkins, S.J., and Reed, R. (1998): Biogenic Reefs: An Overview Of Dynamic And Sensitivity Characteristics For Conservation Management Of Marine Sacs. Scottish Association Of Marine Sciences (UK Marine Sacs Project), Oban

Hossain MG, Saha S, Rahman MM, Singha JK, Mamun AA.(2013). Isolation, identification and antibiogram study of *Pseudomonas aeruginosa* from cattle in Bangladesh. J. Vet. Adv.;3(7):180-5.

Hussien, I.A. ; Habeb, K.A. and Jassim, K.A. (2012). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wounds isolates by PCR using exotoxin A-specific primers . Iraqi J. Biotech. 11(2): 282-291 .

Idrees, E.K.M. (2012) . Comparison between different phenotypic and genotypic methods for detection of metallo β –lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* that has multidrug resistance th antibiotics . College of Science . Abdel aziz University .

Islam, S. (2008) . Chromosomal antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Neisseria gonorrhoeae . Stockholm University . Sweden .

Jawetz, M; Adelberg, E.A.; Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Medical Microbiology. 22nd. ed) McGraw-Hill Company, New York.

Jay, J. M., J. P. Vilai, And M. E. Hughes(2003): Profile And Activity Of The Bacterial Biota Of Ground Beef Held From Freshness To Spoilage At 5–7°C. Int.J. Food Microbiol. 81:105– 111.

Jebur, K. S., Al-Hamadani, A. H., & Jebur, M. S. 2015- Evaluation of Genetic Study and Bacterial Culture for Diagnosis of Pseudomonal Eye Infections. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 4(3), 348-356.

Juan C., Peña C., Oliver A. (2017). Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Infect Dis 215: S44– S51. doi:10.1093/infdis/jiw299.

Khalafallah BM, El-Tawab A, Awad A, Nada S, and Elkhayat ME.Phenotypic and genotypic characterization of *pseudomonas* species isolated from frozen meat. Benha Vet Med J. 2020; 39 (2): 47-51. DOI: 10.21608/bvmj.2020.46777.1285.

Khattab MA, Nour MS, and ElSheshtawy NM: (2015)Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes among different isolates. J Microb Biochem Technol 7, 274–277.

Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect.(2006); Feb;36(2):78-91. doi:10.1016/j.medmal.2005.10.007

Konaklieva, M.I. (2014) . Molecular targets of β-lactam based antimicrobials : beyond the usual suspects . J. Antibiotics . 3: 128-142 .

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Screckenberger, P. C. and Winn, W. C. (1997). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 5th ed, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, USA, pp. 171 – 220.

Korpi, F., Hashemi, F. B., Irajian, G., Fatemi, M. J., Laghaei, P., and Behrouz, B. (2016) Flagellin and pilin immunization against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* protects mice in the burn wound sepsis model. Immunology letters, 176, 8-17.

Kousar S, Rehman N, Javed A, Hussain A, Naeem M, Masood S, Ali HA, Manzoor A, Khan AA, Akrem A, Iqbal F, Zulfiqar A, Jamshaid MB, Waqas

M, Waseem A, Saeed MQ. (2021). Intensive Poultry Farming Practices Influence Antibiotic Resistance Profiles in *Pseudomonas aeruginosa* Inhabiting Nearby Soils. Infect Drug Resist. ;14:4511-4516. DOI: 10.2147/IDR.S324055.

Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., and Nychas, G. J. (2006). Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. Applied and Environmental Microbiology, 72(1), 124–134. https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.124-134.

Kuhnert, P., Capaul, S. E., Nicolet, J., and Frey, J. (1996). Phylogenetic positions of Clostridium chauvoei and Clostridium septicum based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 46 1174–1176.

Kulasekara, H. D., Ventre, I., Kulasekara, B. R., Lazdunski, A., Filloux, A., and Lory, S. (2005) A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. Molecular microbiology, 55(2), 368-380.

Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. (2002)Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences,99(10), 7072-7077.

Lavilla Lerma L, Benomar N, Casado Muñoz M del C, Gálvez A, Abriouel H. (2014)Antibiotic Multiresistance Analysis of Mesophilic and Psychrotrophic Pseudomonas spp: Isolated from Goat and Lamb Slaughterhouse Surfaces throughout the Meat Production Process. Björkroth J, editor. Appl Environ Microbiol.;80(21):6792–806. DOI: 10.1128/aem.01998-14

Leal-Klevezas, D. S., Martínez-Vázquez, I. O., Cuevas-Hernández, B., & Martínez-Soriano, J. P. (2000). Antifreeze solution improves DNA recovery

by preserving the integrity of pathogen-infected blood and other tissues. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 7(6), 945–946.

Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme LG, Ausubel FM (2006) Genomic analysis reveals that Pseudomonas aeruginosa virulence is combinatorial. Genome Biol 7: R90.1- R90.8. doi: 10.1186/gb-2006-7-10-r90.

Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum-sensing network in Pseudomonas aeruginosa. Protein & cell, 6(1): 26–41.

Liang R, Yu X, Wang R, Luo X, Mao Y, Zhu L. .(2012) Bacterial Diversity and Spoilage-Related Microbiota Associated with Freshly Prepared Chicken Products under Aerobic Conditions at 4°C. J Food ProtecJun 1;75(6):1057–62. DOI: 10.4315/0362-028x.jfp-11-439

Luo, Q., Wang, Y. and Xiao, Y. (2020) Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (MCR) gene in bacteria common to animals and humans. Biosaf. Health, 2(2): 71-78.

MacFaddin, G.F. (2000). Biochemical test for identification medical bacteria. 3ed. William and Wilkins, USA.

Machado, S. G., Bagliniere, F., Marchand, S., Van, Coillie E., Vanetti, M. C. ` D., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. Frontiers in Microbiology, 8, 302. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00302

Mahmoud, A.B. ; Zahran, W.A. ; Hindawi, G.R. ; Labib, A.Z. and Galal, R. (2013) . Prevalence of multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* in patients with nosocomial infections at a university hospital in egypt, with special reference to typing methods . J. Virol. Microl. 2: 1-13 .

Matar GM, Ramlawi F, Hijazi N, Khneisser I, and Abdelnoor AM. (2002) Transcription levels of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a gene and severity of symptoms in patients with otitis externa. Curr Microbiol. Nov;45(5):350-4. doi: 10.1007/s00284-002-3703-z.https://doi.org/10.1007/s00284-002-3703-z.

Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I., (2006). Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. J. Food Sci. 71, 157-167.

McCallum, M., Tammam, S., Little, D. J., Robinson, H., Koo, J., Shah, M., and Howell, P. L.(2016) PilN binding modulates the structure and binding partners of the Pseudomonas aeruginosa Type IVa Pilus protein PilM. Journal of Biological Chemistry, 291(21), 11003-11015.

Mikkelsen, H., Sivaneson, M., & Filloux, A. (2011) Key two- component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* . Environmental microbiology, 13(7), 1666- 1681.

Miller RK. (2002) Factors affecting the quality of raw meat, In: Meat processing Improving quality. Joseph, K., K. John and D. Ledward (Eds.), CRC Press, FL, USA,: 26-63. DOI: 10.1201/9781439823163.pt1

Mills, John, Andrea Donnison, Gale Brightwell. (2014); Factors Affecting Microbial Spoilage and Shelf-Life of Chilled Vacuum-Packed Lamb Transported to Distant Markets: A Review. Meat Science 98, no.1:71–80. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.05.002.

Min Wu, Xuefeng Li,(2015) Molecular Medical Microbiology (Second Edition),.

Mitlku, M.; Ali, S. and kibru, G. (2014). Antimicrobial Drug Resistance and Disinfectants Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from

Clinical and Environmental Samples in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. AJBLS. 2(2): 40-5.

Mitov I, Tanya S, Boyka M: (2010). Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Braz J Microbiol 41, 588–595

Mllah , A., Dµrrani R., Ali G & Ahmed S. (2012) .Prevalence of antimicrobial resistant *Pseµdomonas aerµginosa* in fresh water spring contaminated with domestic sewage. J. Biol. Food Sci. Res22-19 (2)1

Mohamudha, P.R. ; Harish, B.N. and Parija, S.C. (2012) . Molecular description of plasmid mediated AmpC β-lactamase among nosocomial isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from six different hospitals in india . Indian J. Med. Res. 135: 114-119 .

Mokhtari A, Amini K. (2019) .Genotyping of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains As A Multidrug Resistant (MDR) Bacterium And Evaluating The Prevalence of Esbls and Some Virulence Factors Encoding Genes By PFGE and ERIC-PCR Methods. Iran J Pharm Res. Summer;18(3):1580-1594. doi: 10.22037/ijpr.2019.1100762. PMID: 32641965; PMCID: PMC6934953.

Morello, J. A.; Mizer, H. E. and Granato, P. A. (2006). Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care.18th ed. McGraw Hill. Boston.

Mouafo, H. T., Baomog, A., Adjele, J. J., Sokamte, A. T., Mbawala, A., Ndjouenkeu, R. (2020): Microbial Profile of Fresh Beef Sold in the Markets of Ngaoundéré, Cameroon, and Antiadhesive Activity of a Biosurfactant against Selected Bacterial Pathogens. Journal of Food Quality,.

Murphy D, Ricci A, Auce Z . Ema and Efsa(2017)joint scientific opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry

in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). EFSA J.;15:1. DOI: 10.2903/j. efsa.2017.4666

Nichols, D. P., Caceres, S., Caverly, L., Fratelli, C., Kim, S. H., Malcolm, K., ... & Moskowitz, S. 2013- Effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. Journal of Surgical Research, 183(2), 767-776.

Nickzad A, Déziel É. (2014) The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development–an approach for control?. Letters in applied microbiology. May;58(5):447-53.

Nikbin V, Aslani M, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour G: (2012)Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. Iranian J Microbiol 4, 118–123 .

Nojiri H, Sekiguchi H, Maeda K, Urata M, Nakai S, Yoshida T, Habe H, Omori T. (2001)Genetic characterization and evolutionary implications of a car gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. J Bacteriol. 2001 Jun;183(12):3663-79. doi: 10.1128/JB.183.12.3663-3679.

Nychas GJE, Skandamis PN, Tassou CC and Koutsoumanis KP, (2008). Meat spoilage during distribution. Meat Science, 78, 77–89.

Odumosu, B.T. ; Adeniyi, B.A. and Chandra, R. (2013) . Analysis of interons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from southwest nigeria . Ann. Cli. Mic. Ant. 12(29): 1-12 .

Okuda, J. ; Hayashi, N. ; Okamoto, M. ; Sawada, S. ; Minagawa, S. ; Yano, Y. and Gotoh, N. (2010) . Translocation of Pseudomonas aeruginosa from the intestinal tract is mediated by the binding of Exo S to an Na , K-ATPase regulator , FXYD3 . Infection Immunity . 78(11): 4511-4522 .

Orlandi, V. T., Martegani, E., & Bolognese, F. (2018). Catalase A is involved in the response to photooxidative stress in Pseudomonas aeruginosa. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 22: 233–240.

Pachori P, Gothalwal R, Gandhi P. (2019).Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Genes Dis. Apr 17;6(2):109-119. doi: 10.1016/j.gendis.2019.04.001.

Papadopoulou OS, Iliopoulos V, Mallouchos A, Panagou EZ, Chorianopoulos N, Tassou CC. (2020) Spoilage Potential of *Pseudomonas* (P. fragi, P. putida) and LAB (Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus sakei) Strains and Their Volatilome Profile during Storage of Sterile Pork Meat Using GC/MS and Data Analytics. Foods.;9(5):633-636. DOI:10.3390/foods9050633

Pastells, C., Pascual, N., Sanchez-Baeza, F., and Marco, M. P. (2016) .Immunochemical Determination of Pyocyanin and 1- Hydroxyphenazine as Potential Biomarkers of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Analytical chemistry, 88(3), 1631-1638.

Paul J. P. (2018). Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases .(5^{th} Ed.) 10.1016/B978-0-323-40181-4.00155-9.

Pennacchia, C., Ercolini, D., & Villani, F. (2011). SpoilageRelated Microbiota Associated With Chilled Beef Stored In Air Or Vacuum Pack. Food Microbiology, 28, 84–93.

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

Pitondo-Silva, A., Gonçalves, G. B., and Stehling, E. G. (2016) .Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. APMIS. Acta Pathologica Microbiologica Immuniglobica Scandinavica

Płókarz, D.; Czopowicz, M.; Bierowiec, K.; and Rypuła, K.(2022).Virulence Genes as Markers for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation in Dogs and Cats. Animals , 12, 422. https://doi.org/10.3390/ani12040422

Prabhu, M. S., Walawalkar, Y. D., and Furtado, I. (2014) .Purification and molecular and biological characterisation of the 1- hydroxyphenazine, produced by an environmental strain of *Pseudomonas aeruginosa* . World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30(12), 3091-3099.

Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2005). Microbiology, 6th ed. McGraw Hill International edition, New York.

Qasim. (2019). Molecular detection of *pseudomonas aeruginosa* isolated from minced meat and studies the pyocyanin effectiveness on pathogenic bacteria The Iraqi Journal of Agricultural Sciences.. 50. 1199-1207. 10.36103/ijas.v50i4.764.

Qiu, D., Eisinger, V. M., Head, N. E., Pier, G. B., and Hongwei, D. Y. (2008). ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* . Microbiology, 154(7), 2119-2130.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Patrick ESF. (2011).Veterinary Microbiology and Microbial Disease . John Willy & Son Ltd, UK..

Quinn, P. J.; Carter, M.E.; Markey, B. And Carter, G. R (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, 3rd. ed. PP : 95-102.

Rangel, S. M., Logan, L. K., & Hauser, A. R. (2014). The ADPribosyltransferase domain of the effector protein ExoS inhibits phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. MBio, 5(3), e01080-14.

Rawat, S,. (2015).Food spoilage: Microorganisms and their prevention. Asian J Plant Sci Res.; 5(4): 47-56.

Rehm, B. H. A.(2008). *Pseudomonas* Model Organism, Pathogen, Cell Factory. Wiley-Vch, Weinheim. 1.

Reid R, Lindqvist R, Fanning S, Whyte P, Kerry J and Bolton D, (2015). The microbiology of beef chilling: do the observations fit the predictions?, Poster 189, Abstract book page 111, poster presented at the EFSA Expo conference 'Shaping the future of food safety together', Milan, Italy, 14–16 October

Ristic, M.(1994).Carcass Value And Meat Quality In Poultry. Fleisch,74:384

Risvik, E (1994). Sensory Properties And Preferences. Meat Sience, 36: 67-77.

Rodrigues G, Coelho-Fernandes S, Faria AS, Lorenzo JM, Gonzales-Barron U, Cadavez V.(2020). Microbial Deterioration of Portuguese Lamb Meat as Affected by Its Intrinsic Properties. The 1st International Electronic Conference on Food Science and Functional Foods. MDPI. 2020; Nov 10; DOI: 10.3390/foods_-07753

Roger, M. and Ibrahim, B. (2012) . Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants . J. Academic . 34(9): p1597 .

Rojo-Molinero, E., Macià, M. D., Rubio, R., Moyà, B., Cabot, G., López-Causapé, C., and Oliver, A. (2016) .Sequential Treatment of Biofilms with Aztreonam and Tobramycin Is a Novel Strategy for Combating *Pseudomonas aeruginosa* Chronic Respiratory Infections. Antimicrobial agents and chemotherapy, 60(5), 2912-2922.

Rossolini GM, Mantengoli E(2005).Treatment And Control Of Severe Infections Caused By Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin .Microbiol. Infect. 11 Suppl 4:17–32.

Rouger A, Tresse O, Zagorec M. (2017). Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. Microorganisms. MDPI AG;5(3):48-50. DOI: 10.3390/microorganisms5030050

Rowe, W. (2013). The Role of Alginate in the Inhibition of Macrophage Phagocytosis of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* . A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., and Prince, A. S. (2005). PathogenHost Interactions in *Pseudomonas Aeruginosa* Pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 171 (11), 1209–1223. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO

Saewan SA, , Z.Kh. Khidhir Zkh, Al-Bayati MH. (2021) .The impact of storage duration and conditions on the formation of biogenic amines and microbial content in poultry meat. Iraqi Journal of Veterinary Sciences;35(1):183-188. DOI: 10.33899/ijvs.2020.126584.1346.

Sarabhai, S., Kaur, A., Capalash, N., & Sharma, P. (2016). Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* : Mechanism and Regulation of Virulence. InPseudomonas: Molecular and Applied Biology Springer International Publishing. (pp. 231-256).

Satish, S. and Priti, M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* infection in broiler chicks in Jabalpur. Int. J. Ext. Res., 6: 37-39.

Schwager , S. A .M.(2012).The Use of Non–Mammalian Infection Models to Study the Pathogenicity of Members of the Genus Burkholderia and *Pseudomonas aeruginosa*. PhD Thesis, University of Zurich, Germany. P: 15.

Shahat H, Mohamed H, Abd Al-Azeem M, Nasef S. (2019). Molecular Detection of Some Virulence Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Chicken Embryos and Broilers with regard to Disinfectant Resistance. SVU-International J Vet Sci. ;2(2):52–70. DOI: 10.21608/svu.2019.12365.1011

Sharma, G. ; Rao, S. ; Bansal, A. ; Dang, S. ; Gupta, S. and Gabrani, R. (2014) . *Pseudomonas aeruginosa* biofilm : potential therapeutic targets . J. Biologicals . 42(1): 1-7.

Sheikh A, Rostami S, Jolodar A, Tabatabaiefar MA, Khorvash F, Saki A, Shoja S, Sheikhi R. (2014). Detection of Metallo-Beta Lactamases Among Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Jundishapur J Microbiol. 2014 Nov;7(11):e12289. doi: 10.5812/jjm.12289

Shukla S and Mishra, P.(2015). *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Broiler Chicks in Jabalpur. International J Ext Res.; 6:37-39.

Sırıken B, İnat G, Başkan C. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Detection methods from ground beef and chicken meat samples. 4thInternational Symposium on Innovative Approaches in Health and Sports Sciences.;4(9):136-140

Skandamis, P. and G.-J. E. Nychas. (2005). Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP), p. 461-493. In J. Sofos (ed.), Improving safety of fresh meat. Woodhead Publishers, Cambridge, United Kingdom.

Slonczewski, J.L. and Foster, J.W. (2014). Microbiology an evolvlng science. 2nd ed. . Norton and company . Alabama . pp 1100

Songer, J.P., Post, K.W. (2005). Bacterial and Funal Agent of Animal disease. Elsevier Saunder. Shome BR, Mitra AS, Bhuwana M, Krithiga N, Velu D.

Stellato G, Utter DR , Voorhis A, De Angelis M, Eren AM, and Ercolini D. (2017).A Few *Pseudomonas* Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment. Front Microbiol.;8(2)312- 315. DOI:10.3389/fmicb.2017.00264

Stones, D.H. and Krachler, A. (2015) . Fatal attraction: how bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them . Int. J. Mol. Sci. 16: 2626-2640 .

Strateva T. (2008). Microbiological and molecular–genetic investigations on resistance mechanisms and virulence factors in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Sofia, Bulgaria;. 210.

Streeter K, Katouli M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. Infect Epidemiol Med 2, 25–32

Tadesse, A. and Alem, M. (2006) . Medical Bacteriology . EPHTI . Gondar University .

Tan, J., Rouse, S. L., Li, D., Pye, V. E., Vogeley, L., Brinth, A. R, and Caffrey, M. (2014). A conformational landscape for alginate secretion across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* . Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 70(8), 2054-2068.

Tang Y, Ali Z, Zou J, Jin G, Zhu J, Yang J, Dai J. (2017). Detection methods for *Pseudomonas aeruginosa*: history and future perspective. RSC advances.;7(82):51789-800.

Tartor YH, El-Naenaeey EY. (2016). RT-PCR detection of exotoxin genes expression in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) ;62(1):56–62The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier. 1-8.

Thomas, S., Holland, I. B., and Schmitt, L. (2014) .The type 1 secretion pathway—the hemolysin system and beyond. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1843(8), 1629-1641.

Tingpej,P, (2008). Clonal strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis Infection, Genetics and Evolution, thesis sµbmitted to Institµte of Clinical Microbiology

Todar, K. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*. Todar's Online textbook of Bacteriology. University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology.

Tripathi, P. ; Banerjee, G. ; Gupta, M.K. ; Saxena, S. and Ramteke, P.W. (2013) . Assessment of phylogenetic affiliation using 16S rRNA gene sequence analysis for *Pseudomonas aeruginosa* in patients of lower respiratory tract infection . J. Indian . 138: 557-559 .

Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., & Nychas, G.-J. E. (2002). Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. Applied and Environmental Microbiology, 68(1), 65–72. https://doi.org/10.1128/aem.68.1.65-72.2002

Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck, C.C. (2003). Bacteriological Investigations. In: World

Vindeirinho, J.M., Soares, H.M. & Soares, E.V. (2020). Modulation of Siderophore Production by *Pseudomonas fluorescens* Through the Manipulation of the Culture Medium Composition. Appl Biochem Biotechnol. PMID: 32500426 DOI: 10.1007/s12010-020-03349-z.

Virella, G (1997).Gram-Negative Rods III Opportunistic And Zoonotic Bacteria In Microbiology And Infectious Diseases By Virella, G 3rded. Williams And Wikins, U.S.A. P:160.

Von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolffs PF. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Front Microbiol. Feb 19;7:173. doi: 10.3389/fmicb.2016.00173. PMID: 26925045; PMCID: PMC4759269.

Walker, S.E., Sander, J.E., Cline, J.L. and Helton, J.S. (2002). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with mortality in broiler chicks. Avian Dis., 46(4): 1045-1050

Wang, G., Wang, H., Han, Y,. (2017). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. Food Microbiol 63:139-46.

Wassenegger, M. (2001). Advantages and disadvantages of using PCR techniques to characterize transgenic plants.Mol Biotechnol 17, 73–82. https://doi.org/10.1385/MB:17:1:73

Weber A, Zimmermann C, Mausberg AK, Dehmel T, Kieseier BC, Hartung HP,. (2016) .*Pseudomonas aeruginosa* and its bacterial components influence the cytokine response in thymocytes and splenocytes. Infect Immun. ;84(5):1413–23. https://doi.org/10.1128/IAI.00905-15.

Wickramasinghe NN, Ravensdale J, Coorey R, Chandry SP, Dykes GA. (2019). The Predominance of Psychrotrophic *Pseudomonads* on Aerobically Stored Chilled Red Meat. Compr Rev Food Sci Food Saf.;18(5):1622–35. DOI: 10.1111/1541-4337.12483.

Williams P. (2007). Nutritional composition of red meat. Nutr Diet. 64:S113–S119. doi: 10.1111/j.1747-0080.2007.00197.x.

Witter, C.T. and Farrar, J.S. (2011). Magic in solution: an introduction and brief history of PCR., P1-12. In kennedy S, Oswald N (ed), PCR Troubleshooting and Optmization: The Essential Guide. Caister Academic Pres, Norfolk, UK

Wolska ‹K.. ‹and Szweda‹, P., (2009). Genetic featµres of clinical *Pseµdomonas aerµginosa* strains. Pol Microbiol ‹58(3) ‹255-60.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., and Okuyama, H. (2004). Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and Serratia marcescens possessing high efficiency to degrade

gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. Current microbiology, 49(6), 415-422.

Woods, R. G., Burger, M., Beven, C. A., & Beacham, I. R. (2001). The aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: A molecular analysis of metalloprotease and lipase production. Microbiology, 147(2), 345–354. https://doi.org/10.1099/00221287-147-2-345

World Health Organization . (2019) .The Journal of Global Antimicrobial Resistance meets the World Health Organization (WHO). J. Glob. Antimicrob. Resist.:18:305–308. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.07.022

Xu, L., & Liu, Y. (2014). Protein secretion systems in bacterial pathogens.Frontiers in Biology, 9(6), 437-447.

Yagoub, S. O., (2009). Isolation of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state. J. Bact. Res., 1: 085-088.

Yamamoto, S., H. Kasai, D. L. Arnold, R. W. Jackson, A. Viavian, and S. Harayama. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes. Microbiology 146:2385–2394.

Yamamoto, Y. (2002) . PCR in diagnosis of infection : detection of bacteria in cerebrospinal fluids . Clini. Lab. Imm. 9(3): 508-14 .

Zervosen, A. ; Sauvage, E. ; Frere, J. ;Charlier, P. and Luxen, A. (2012) . Development of new drugs for an old target – the penicillin binding prpteins . J. Molecules . 17: 12478-12505 .

Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J., Ahn, D.U (2010).Improving Functional Value Of Meat Products. Meat Sci. 86 (1), 15-31.

Zumft, W. G(1997).Cell Biology And Molecular Basis Of Denitrification. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 61:533–616.

و

Abstract

Pseudomonas was characterized by being one of the microorganisms that cause meat spoilage, it's one of the opportunistic pathogens that infected most of the tissues due to their virulence factors resulted to high economic loss , so the current study aimed to identify the presence of *Pseudomonas* species in the meat displayed in the markets of Mosul city, where (150) meat samples were collected from the meat of beef, mutton and poultry, (50) samples for each type for the period from November 2021 until March 2022. Diagnosis of these group of bacteria were done phenotypically and genetically. The results revealed that(53) samples of meat were positive for the presence of *Pseudomonas*, with a rate of 35.33%, distributed to(23) samples of beef, with a rate of 46%, and (19) samples of poultry meat with a rate of 38%, and it differed significantly from mutton meat, which exhibits(11) positive samples with a rate of 22%, (21) isolates belonging to *Pseudomonas aeruginosa* with a percentage of 39.62% depending on the presence of the *rpoB gene* using polymerase chain reactions, while 7 isolates with a rate of 13.21% were positive for the presence of *Pseudomonas fluorescence* based on biochemical tests using Vitek . The *CarA gene* was adopted to detect the presence of other types of *Pseudomonas* that cause meat spoilage, and 91.6% of the isolates were positive for the presence of this gene. The total count of *Pseudomonas* in beef and mutton were ($1.47 * 10^4$) and ($1.92 *10^4$) cfu/g respectively, while the total count of *Pseudomonads* in poultry meat was ($21.3 * 10^4$) cfu/g. The virulence of *P. aeruginosa* isolates were detected depending to some virulence genes represented by *ToxA-oprL-PlcH-ExoS* and using polymerase chain reaction where the *PlcH gene* recorded the highest rate , compared to the lower percentage of *oprL gene* while the isolates revealed no positive result for the presence of the *ExoS genes*.

b

The antimicrobial resistance profile of *P. aeruginosa* isolates from meat in Mosul city showed a high resistance to Amoxicillin/Clavulanic acid and high sensitivity to Tobramycin, Levofloxacin, Ciprofloxacin and Gentamycin. which reflect that the meat impact consumer health .

Isolation ,Conventional and Molecular Identification of *Pseudomonas* From Meat and their Sensitivity to Antibiotics in Mosul City

A Thesis Submitted
By

Ibrahim Mohammed Taher jawhar

To
The Council of the College of Veterinary Medicine
University of Mosul
In
Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of master of Science
In
Veterinary Public Health / Veterinary Medicine

Supervised by
Professor
Dr. Muntaha Ghazi Hasan

2022A.D. **1444A.H.**

University of Mosul
College of Veterinary Medicine

Isolation ,Conventional and Molecular Identification of *Pseudomonas* From Meat and their Sensitivity to Antibiotics in Mosul City

Ibrahim Mohammed Taher jawhar

M.Sc./Thesis

Veterinary Medicine/ Veterinary Public Health

Supervised by

Professor
Dr. Muntaha Ghazi Hasan

2022A.D. **1444A.H.**