



جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

**التشخيص الجزيئي لجراثيم الإشريكية القولونية
المعزولة من حليب النعاج المرضعة وحملاتها والبيئة
المحيطة بها في بعض مناطق محافظة نينوى**

أيمن هاني طه سليمان

رسالة ماجستير

الطب البيطري / الصحة العامة البيطرية

بإشراف

الاستاذ الدكتور

ضياء محمد طاهر جوهر

التشخيص الجزيئي لجراثيم الإشيريكيا القولونية المعزولة من حليب
النعاج المرضعة وحملاتها والبيئة المحيطة بها في بعض مناطق
محافظة نينوى

رسالة تقدم بها

أيمن هاني طه سليمان

الى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير
في اختصاص الطب البيطري / صحة عامة بيطرية

بإشراف

الاستاذ الدكتور

ضياء محمد طاهر جوهر



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قُلْ لَوْ كَانَ الْبَحْرُ مِدَادًا لِكَلِمَاتِ رَبِّي لَنَفِدَ الْبَحْرُ قَبْلَ أَنْ
تَنْفَدَ كَلِمَاتُ رَبِّي وَلَوْ جِئْنَا بِمِثْلِهِ مَدَدًا ﴿١٠٩﴾ قُلْ إِنَّمَا أَنَا بَشَرٌ
مِثْلُكُمْ يُوحَى إِلَيَّ أَنَّمَا إِلَهُكُمُ اللَّهُ وَاحِدٌ فَمَنْ كَانَ يَرْجُوا لِقَاءَ
رَبِّهِ فَلْيَعْمَلْ عَمَلًا صَالِحًا وَلَا يُشْرِكْ بِعِبَادَةِ رَبِّهِ أَحَدًا ﴿١١٠﴾

الله الصادق العظيم

سُورَةُ الْكَهْفِ ، الْآيَات (109 - 110)



إقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافي في جامعة الموصل، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في الصحة العامة البيطرية.

التوقيع :

الاسم : أ.د. ضياء محمد طاهر جوهر

التاريخ : / / 2022

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بان هذه الرسالة الموسومة بـ (التشخيص الجزيئي لجراثيم الإشيريكيا القولونية المعزولة من حليب النعاج المرضعة وحملاتها والبيئة المحيطة بها في بعض مناطق محافظة نينوى) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية، وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الإسلوب وصحة التعبير.

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. أحمد يحيى علي

التاريخ : / / 2022

إقرار رئيس فرع الصحة العامة البيطرية

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

التوقيع :

الاسم : أ.د. ضياء محمد طاهر جوهر

التاريخ : / / 2022

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 : أ.د. رعد عبدالغني بشير

التاريخ : / / 2022

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة، إطلعنا على هذه الرسالة وناقشنا الطالب أيمن هاني طه سليمان في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 31 / 8 / 2022 ، وإنه جدير لنيل شهادة الماجستير في إختصاص الصحة العامة البيطرية.

التوقيع

أ.د. زيد خلف خضر

عضو لجنة المناقشة

التوقيع

أ.م.د. عمر هاشم شيت

عضو لجنة المناقشة

التوقيع

أ.د. رعد عبدالغني بشير

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع

أ.د. ضياء محمد طاهر

عضو لجنة المناقشة (المشرف)

قرار مجلس الكلية

إجتمع مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل لجلسته المنعقدة بتاريخ / / 2022م وقرر منحه شهادة الماجستير في إختصاص الصحة العامة البيطرية.

مقرر مجلس الكلية

أ.د. رعد عبدالغني بشير

عميد الكلية

أ.د. ظافر محمد عزيز

شكر وتقدير

الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ وَالصَّلَاةُ وَالسَّلَامُ عَلَى أَشْرَفِ الْأَنْبِيَاءِ وَالْمُرْسَلِينَ سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ وَعَلَى آلِهِ وَصَحْبِهِ
وَمَنْ تَبِعَهُمْ بِإِحْسَانٍ إِلَى يَوْمِ الدِّينِ، وَبَعْدَ ..

فَأَيُّ شُكْرٍ لِلَّهِ تَعَالَى عَلَى فَضْلِهِ إِنْ أُتِيَ لِي إِجْزَارُ هَذَا الْعَمَلِ، فَلَهُ الْحَمْدُ أَوَّلًا وَآخِرًا.
وَكَذَلِكَ أُنْقَدِمُ بِالشُّكْرِ وَالثَّنَاءِ إِلَى رِئَاسَةِ جَامِعَةِ الْمَوْصِلِ وَعِمَادَةِ كُتَيْبَةِ الطِّبِّ الْبَيْطَرِيِّ فِي جَامِعَةِ الْمَوْصِلِ
وَذَلِكَ لِمَنْحِي الْإِجَازَةَ الدِّرَاسِيَّةَ لِإِكْمَالِ دِرَاسَتِي.

ثُمَّ أَشْكُرُ أَوْلِيَّكَ الْأَخْيَارَ الَّذِينَ مَدَّوْا لِي يَدَ الْمُسَاعَدَةِ، خِلَالَ هَذِهِ الْمُدَّةِ، وَفِي مُقَدِّمَتِهِمْ مُشْرِفِي وَرَأْسِ فَرْعِ
الصِّحَّةِ الْعَامَّةِ الْبَيْطَرِيَّةِ أ.د. ضِيَاءَ مُحَمَّدٍ طَاهِرٍ جَوْهَرِ الَّذِي لَمْ يَدَّخِرْ جُهْدًا فِي مُسَاعَدَتِي.
كَمَا أُنْقَدِمُ بِالشُّكْرِ إِلَى أَسَاتِذَةِ فَرْعِ الصِّحَّةِ الْعَامَّةِ الْبَيْطَرِيَّةِ جَمِيعًا لِمَا قَدَّمُوهُ مِن مُسَاعَدَةٍ وَتَوْجِيهَاتٍ.

الباحث

الإهداء

إلى أبي العَطُوف.... قُدوتِي، وَمَثَلِي الأَعلى فِي الحَيَاة؛ فَهُوَ مَنْ عَلَّمَنِي كَيْفَ أُعِيشُ بِكَرَامَةٍ وَسُموخ.
إلى أُمِّي الحُنُونَة..... لا أَجِدُ كَلِمَاتٍ يُمكنُ أَنْ تَمْنَحَهَا حَقَّهَا، فَهِيَ مَلْحَمَةُ الحُبِّ وَفَرَحَةُ العُمُرِ، وَمِثَالُ
التَّقَانِي وَالعَطَاءِ.
إلى إِخْوَتِي.... سَنَدِي وَعَضُدِي وَمُشَاطِرِي أَفْرَاجِي وَأَحْزَانِي.
إلى زَوْجَتِي.... أَسْمَى رُموزِ الإِخْلَاصِ وَالوَفَاءِ وَرَفِيقَةِ الدَّرْبِ.
إلى أولادِي..... أَفْلاذُ الأَكْبَادِ.
إلى جَمِيعِ الأَخْلَاءِ؛ أَهْدِي إِلَيْكُمْ جُهْدِي المُتَوَاضِعَ هَذَا.

الباحث

الخلاصة

أُجريت الدراسة خلال المدة من 2022/2/26 ولغاية 2022/4/26، أذ جمعت 400 عينة من خمسة مناطق مختلفة تمثل بعض مراكز وتجمعات الأغنام في محافظة نينوى شملت الكصر والسلامية والدرناج وكوكجلي والعباسية ولحقول بأنظمة تربية مختلفة (المفتوحة وشبه المغلقة والمغلقة). إذ جُمعت 50 عينة لكل من الحليب والبراز والأعلاف الجافة والحشائش الخضراء من الحقول والماء والأرضية و 50 مُسحة لكل من أفواه الحملان الرضيعة وأيدي العاملين، ووضعت في حاوية مبردة ونقلت إلى مختبرات الصحة العامة البيطرية في كلية الطب البيطري في جامعة الموصل للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية. إذ أجريت عليها الفحوصات الجرثومية التقليدية من العزل والتصبيغ والاختبارات الكيميائية الحيوية، كما أُجريت عليها الاختبارات الجزيئية باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) بالإعتماد على جين *uidA*، فضلاً عن التحري الجزيئي لجينات سموم الشيكات *Stx1* و *Stx2*، وإجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية واختبار إنتاج الغشاء الحيوي للعزلات الجرثومية من العينات المختلفة.

أوضحت نتائج الدراسة ان 253 عينة من مجموع العينات المختلفة الكلية البالغة 400 عينة أي بنسبة 63.3% كانت موجبة للعزل لجرثومة الإشيريكية القولونية، وكانت نتائج طريقة PCR مُطابقة مع نتائج الطرائق التقليدية للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية. إذ بلغت نسب عزل جراثيم الإشيريكية القولونية من عينات الحليب والبراز ومسحات الفم للحملان والأعلاف الجافة والحشائش الخضراء والماء والأرضية وأيدي العاملين من المناطق المختلفة، 36% و 100% و 54% و 48% و 82% و 46% و 98% و 42% على التوالي. وأظهرت نتائج الفحص الجزيئي للعزلات الجرثومية للإشيريكية القولونية ظهور حُزَم على هلام الأكاروز والتي تعود لجين *uidA* وبوزن جزيئي 623 زوج قاعدي. كما وأظهرت نتائج التحري الجزيئي عن جينات سموم الشيكات *Stx1* و *Stx2* أن جميع عزلات جراثيم الإشيريكية القولونية من العينات المختلفة لحقول الأغنام والبيئة المحيطة بها تمتلك وبصورة متفاوتة الجينات الخاصة بسموم الشيكات 1 و 2 وبوزن جزيئي 347 و 589 زوج قاعدي على التوالي.

وبينت نتائج فحص الحساسية للمضادات الحيوية وجود تفاوت في مقاومة وحساسية العزلات الجرثومية للإشيريكية القولونية، إذ بلغت النسب المئوية لمقاومة العزلات للسيفالوثين والإريثروميسين والأموكسيسيلين، 100% و 88% و 77% على التوالي، في حين كانت مقاومة العزلات الجرثومية للتيتراسايكلين والستربتوميسين والترايميثوبريم بنسبة 54% و 46% و 33% على التوالي، بينما بلغت نسبة حساسية العزلات الجرثومية للإشيريكية القولونية للجنتاميسين والسيفترياكسون والسيبروفلوكساسين

والسيفيكسيم والترايميثوبريم والكلوررامفينيكول 94% و 85% و 81% و 75% و 67% و 65% على التوالي.

وأظهرت نتائج إنتاج الأغشية الحيوية أن 32 عزلة جرثومية من بين 48 عزلة أي بنسبة 66.7% كانت مُنتجة للغشاء الحيوي، أعلاها في البراز والحليب بنسبة 83.3% تليها الأرضية والماء ومسحات أيادي العاملين والمسحات الفمية للحملان بنسبة 66.7% ثم الأعلاف الجافة والحشائش الخضراء بنسبة 50%. تَوَزَعَت العزلات المنتجة للغشاء الحيوي بين 22 عزلة قوية الإنتاج و 10 عزلة متوسطة الإنتاج أي بنسبة 45.8% و 20.8% على التوالي، كما أشارت النتائج إلى وجود ترابط بين نسب المقاومة المرتفعة للمضادات الحيوية وإنتاج الأغشية الحيوية القوية والمتوسطة في عزلات جراثيم الإشيريكية القولونية.

ثبت المحتويات

الصفحة	الموضوع
ج - و	ثبت المحتويات
ز - ح	ثبت الجداول
ط - ي	ثبت الأشكال
ي	ثبت الملاحق
4-1	الفصل الأول : المقدمة
19-5	الفصل الثاني : إستعراض المراجع
5	1-2: الإشيريكية القولونية <i>Escherichia coli</i>
6	2-2: الصفات العامة لجراثيم الإشيريكية القولونية
6	3-2: تصنيف جراثيم الإشيريكية القولونية <i>Taxonomy of E.coli</i>
8	4-2: الصِّفَات المظهرية والخصائص الكيميائية الحيويّة لجراثيم إشيريكية القولونية
8	5-2: عوامل الفوعة لجرثومة الإشيريكية القولونية Virulence Factors
8	2-1-5: مُستَضدّ المِحْفظة Capsular Antigen K (kps)
9	2-5-2: الشَّعِيرَات Pili
9	3-5-2: الحَمَائِل من النوع الأول Type 1 Fimbriae
10	4-5-2: السُّمُوم (الذيفانات) Toxins
10	1-4-5-2: الالف-هيمولايسين α -hemolysin (HlyA)
10	2-4-5-2: عامل التتخر السام للخلايا Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1)
11	5-5-2: حَامِلَات الحَدِيد Siderophores
11	6-2: جراثيم الإشيريكية القولونية المُنتِجَة للبيبتاكتاميز -Beta-Lactamase- Producing <i>E.coli</i>
12	7-2: تشكيل الغشاء الحيوي Biofilm Formation
13	8-2: الأهمية الصحية لجراثيم الإشيريكية القولونية

13	1-8-2: الأهمية الصحية لجراثيم الإشيريكية القولونية في الماء
13	2-8-2: الأهمية الصحية لجراثيم الإشيريكية القولونية في الأعلاف
14	3-8-2: الأهمية الصحية لجراثيم الإشيريكية القولونية في الأغنام
15	4-8-2: تلوث الحليب بجراثيم الإشيريكية القولونية
15	5-8-2: جراثيم الإشيريكية القولونية في الإنسان
16	9-2: مقاومة جراثيم الإشيريكية القولونية للمضادات الحيوية <i>E.coli</i> Antibiotics Resistance
17	10-2: طرائق تشخيص جراثيم الإشيريكية القولونية
17	1-10-2: الطرائق الجرثومية التقليدية
17	2-10-2: إختبار فايتك 2 Vitek2 test
17	3-10-2: الطرائق الجزيئية (تفاعل البلمرة المتسلسل) Polymerase Chain Reaction (PCR)
18	11-2: فحص الحساسية لجرثومة الإشيريكية القولونية
18	12-2: فحص القابلية على إنتاج الاغشية الحيوية Biofilm production assay
19	13-2: العلاقة بين مقاومة المضادات الحيوية وإنتاج الأغشية الحيوية
38-20	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل
20	1-3: المواد
20	1-1-3: الأجهزة والمعدات
21	2-1-3: المواد الكيميائية
22	3-1-3: الأوساط الزرعية والكيميائية الحيوية
23	4-1-3: المحاليل الخاصة لإستخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين وتفاعل البلمرة المتسلسل PCR
24	2-3: طرائق العمل Methods
24	1-2-3: جمع العينات Sampling
25	2-2-3: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of Culture Media

25	Eosin Methylene Blue وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق (EMB) Agar
25	MacConkey Agar وسط الماكونكي
25	Brilliance™ <i>E.coli</i> للانتخابي للإشريكية القولونية Coliform Selective Agar
25	Muller Hinton Agar وسط مولر هينتون
26	Congo Red Agar (CRA) وسط الكونغو الأحمر
26	Simmons Citrate Agar وسط سترات سايمون
26	Triple Sugar Iron (TSI) وسط إختبار ثلاثي السكر والحديد Agar
26	Peptone Water مرق ماء البيتون
27	Nutrient Broth with Glycerin المرق المغذي مع الجليسيرين
27	Gram's Stain (صبغة كرام) الصبغات
27	مُعاملة العينات والعزل الجرثومي
27	1-4-2-3: عينات الحليب
27	2-4-2-3: عينات البراز
28	3-4-2-3: عينات الأرضية
28	4-4-2-3: عينات الأعلاف الجافة
28	5-4-2-3: عينات الحشائش الخضراء
29	6-4-2-3: عينات الماء
29	7-4-2-3: مسحات ايدي العاملين
29	8-4-2-3: مسحات الفم للحملان الرضيعة
30	5-2-3: توصيف الجرثومة Bacterial characterization
30	1-5-2-3: الخصائص المظهرية Phenotypic characterization
30	2-5-2-3: الخصائص المجهرية Microscopic characterization
30	6-2-3: الإختبارات الكيميائية الحيوية Biochemical tests
30	1-6-2-3: إختبار الإندول Indole test

30	Methyl red test إختبار المثليل الأحمر 2-6-2-3
30	Voges-Proskauer test إختبار فوكس بروسكاور 3-6-2-3
31	Citrate Utilization test إختبار استهلاك السترات 4-6-2-3
31	Triple Sugar Iron إختبار النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد (TSI) Agar 5-6-2-3
31	Oxidase test إختبار الأوكسيديز 6-6-2-3
31	Catalase test إختبار الكتاليز 7-6-2-3
31	Vitek2 system 2 إستخدم نظام فايترك 2 7-2-3
32	الكشف الجزيئي عن جراثيم الإشيريكية القولونية 8-2-3
32	1-8-2-3: إستخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين (DNA) لجراثيم الإشيريكية القولونية
33	2-8-2-3: الكشف الجزيئي عن جراثيم الإشيريكية القولونية بالإعتماد على جين <i>uidA</i>
35	3-8-2-3: الكشف الجزيئي عن جينات سُوم الشيكا لجراثيم الإشيريكية القولونية
36	4-8-2-3: تحضير محلول 10X TBE Buffer Stock
36	5-8-2-3: الترحيل الكهربائي بالهلام Gel electrophoresis
37	9-2-3: إختبار فحص الحساسية للمُضادَات الحيويَّة Antibiotics sensitivity test
38	10-2-3: إختبار إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production test
57-39	الفصل الرابع : النتائج
65-58	الفصل الخامس : المناقشة
67-66	الفصل السادس : الإستنتاجات والتوصيات
66	1-6 : الإستنتاجات
67	2-6 : التوصيات
92-68	المصادر
68	المصادر الإنكليزية
94-93	الملاحق

ثبت الجداول

رقم الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
20	الأجهزة والمعدات المستخدمة في الدراسة	1-3
21	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2-3
22	الأوساط الزرعية والكيميائية الحيوية المستخدمة في الدراسة	3-3
23	المحاليل الخاصة لإستخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين وتفاعل البلمرة المتسلسل PCR	4-3
33	بادئات جين <i>uidA</i> المستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل لجرثومة الإشيريكية القولونية	5-3
34	يوضح مكونات خليط انبوبة تفاعل البلمرة المتسلسل	6-3
34	يوضح برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بجين <i>uidA</i>	7-3
35	بادئات جينات <i>Stx1</i> و <i>Stx2</i> المستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل لجرثومة الإشيريكية القولونية	8-3
35	برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بجينات <i>Stx1</i> و <i>Stx2</i>	9-3
36	يوضح مكونات 10X TBE Buffer	10-3
38	يُبين أنواع وتركيز المضادات الحيوية المستخدمة في إختيار الحساسية لجراثيم الإشيريكية القولونية	11-3
39	يُوضح العينات الموجبة والنسب المئوية الكلية لجراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من العينات المختلفة	1-4
40	تحديد جين <i>uidA</i> في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الحليب	2-4
40	تحديد جين <i>uidA</i> في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات براز الأغنام	3-4
41	تحديد جين <i>uidA</i> في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من مسحات فم الحملان الرضيعة	4-4
41	تحديد جين <i>uidA</i> في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الأعلاف الجافة	5-4

42	تحديد جين <i>uidA</i> في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الحشائش الخضراء	6-4
42	تحديد جين <i>uidA</i> في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الماء	7-4
43	تحديد جين <i>uidA</i> في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الأرضية	8-4
43	تحديد جين <i>uidA</i> في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من مسحات أيادي العاملين	9-4
49	نتائج التفاعلات الكيميائية الحيويّة لجراثيم الإشيريكية القولونية	10-4
52	عدد العيّنات الكُليّة والعيّنات الموجبة والنسبة المئوية لجينات <i>Stx1</i> و <i>Stx2</i> الخاصة بجرثومة الإشيريكية القولونية من العزلات في العيّنات المختلفة	11-4
53	نتائج فحص المقاومة والحساسية للمضادّات الحيويّة لجراثيم الإشيريكية القولونية	12-4
54	النسب المئوية لمقاومة جراثيم الإشيريكية القولونية للمضادّات الحيويّة للعيّنات المختلفة	13-4
55	يُوضّح العدد والنسب المئوية للعزلات المنتجة للغشاء الحيوي	14-4
56	يوضح أنماط إنتاج الغشاء الحيوي لجراثيم الإشيريكية القولونية	15-4
57	العلاقة مابين المقاومة للمضادّات الحيويّة وقابلية إنتاج الأغشية الحيويّة	16-4

ثبت الأشكال

رقم الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
24	مناطق الدِّراسة في محافظة نينوى	1-3
44	نمو جراثيم الإشيريكية القولونية على وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق	1-4
44	نمو جراثيم الإشيريكية القولونية على وسط اكار الماكونكي	2-4
45	نمو جراثيم الإشيريكية القولونية على وسط الاكار المتألق	3-4
45	صورة مجهرية لجراثيم الإشيريكية القولونية (100X)	4-4
46	إختبار الإندول المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية	5-4
46	إختبار المثيل الأحمر المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية	6-4
47	إختبار فوكس-بروسكاور المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية	7-4
47	إختبار إستهلاك السترات المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية	8-4
48	إختبار ثلاثي السكر والحديد المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية	9-4
48	إختبار الأوكسيديز المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية	10-4
48	إختبار الكتاليز المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية	11-4
49	البطاقة الخاصّة بإختبار فايترك 2	12-4
49	نموذج نتيجة إختبار فايترك 2	13-4
50	الشكل 14-4 : ناتج إختبار تفاعل البلمرة المتسلسل لجين <i>uidA</i> بالوزن الجزيئي 623 زوج قاعدي. N: السيطرة السلبية، M: الدليل الحجمي (100 زوج قاعدي)، P: السيطرة الموجبة، 5,4,3,2,1: العينات الموجبة لعزلات الإشيريكية القولونية	14-4
51	الشكل 15-4 : ناتج إختبار تفاعل البلمرة المتسلسل يحدد الوزن الجزيئي لجين <i>Stx1</i> بالوزن الجزيئي 347 زوج قاعدي. N: السيطرة	15-4

	السلبية، M: الدليل الحجمي (100 زوج قاعدي)، P: السيطرة الموجبة، 1,2,3,4,5: العينات الموجبة لعزلات الإشيريكييا القولونية	
51	الشكل 4-16 : ناتج إختبار تفاعل البلمرة المتسلسل يحدد الوزن الجزيئي لجين وجين <i>Stx2</i> بالوزن الجزيئي 589 زوج قاعدي. N: السيطرة السلبية، M: الدليل الحجمي (100 زوج قاعدي)، P: السيطرة الموجبة، 1,2,3,4,5: العينات الموجبة لعزلات الإشيريكييا القولونية	16-4
53	الشكل 4-17 : إختبار الحساسية للمضادات الحيويّة لجراثيم الإشيريكييا القولونية على وسط مولر-هنتون	17-4
54	الشكل 4-18 : نمو جراثيم الإشيريكييا القولونية على وسط الكنغو الأحمر (A) غير المنتجة للغشاء الحيوي (B) المنتجة للغشاء الحيوي	18-4

ثبت الملاحق

رقم الصفحة	عنوان الملحق	رقم الملحق
93	إختبارات نظام فاينتك	1-2
94	مقاسات أقطار تثبيط المضادات الحيويّة لجراثيم الإشيريكييا القولونية	1-3
94	يُوضّح النسب المئوية الكليّة لجراثيم الإشيريكييا القولونية المعزولة من العينات المختلفة	1-4

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

تُحظى تربية الأغنام في العراق بأهمية كبيرة كونها مصدراً مهماً لإنتاج الألبان واللحوم والصوف والجلود، إذ تشكل إحدى الركائز الإقتصادية الأساسية للثروة الحيوانية فضلاً عن استخدام فضلاتها في صناعة الأسمدة، وتنتشر تربية الأغنام في العراق في مناطق واسعة وبنسبة عالية في محافظة نينوى إذ يُقدّر عددها حوالي (4825696) وفق إحصائيات قسم الثروة الحيوانية في دائرة زراعة نينوى (حسب آخر إحصائية لوزارة الزراعة العراقية لعام 2020)، ويعتمد غالبيتها على الرعي في المراعي الطبيعية مما يُضيف ميزة أخرى لها وهي انخفاض كُلف تربيتها، الأمر الذي يسهم في زيادة أعدادها وتعميم إنتاجها، وبالمقابل فإنها تتعرض إلى أمراض عديدة تؤدي إلى خسائر إقتصادية كبيرة (Anon, 2010,) (Mohammed, 2021).

تواجه تربية الأغنام مشاكل عديدة منها الأمراض الجرثومية التي تسببها جراثيم الإشيريكيا القولونية (*E. coli*) والتي تنتشر في جميع أنحاء العالم وتتسبب في خسائر إقتصادية كبيرة في تربية الحيوانات وكذلك تسبب مشاكل للصحة العامة، فهي من أهم أنواع الجراثيم التي تُصيب الإنسان والحيوان على حدٍ سواء، وتمتلك جراثيم الإشيريكيا القولونية القدرة على إنتاج سُوم الشيكات التي تسبب التسمم الغذائي للإنسان (Nataro and Kaper, 1998).

تعد جراثيم الإشيريكيا القولونية أحد أهم أفراد العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* السالبة لصبغة كرام والمتعايشة Commensals في أمعاء الإنسان والحيوان، ولكنها وتحت ظروف معينة مثل تغير نوع العليقة أو حدوث الإصابات الطفيلية أو إعطاء المضادات الحيوية يمكن أن تتحول هذه الجراثيم المتعايشة إلى جراثيم إنتهازية Opportunistic pathogens تُسبب أمراضاً معوية مثل إتهاب الأمعاء الحاد Acute enteritis وإتهاب القولون النزفي Hemorrhagic colitis أو خارجها مثل الإنتان الدموي Septicemia (Polse et al., 2016, Madec et al., 2017). وتُقسم جراثيم الإشيريكيا القولونية وفقاً لعوامل الضراوة التي تمتلكها والتي تتمثل بإنتاج المحفظة Capsule synthesis والمواد اللاصقة Adhesins وإنتاج السُموم Toxins production وما إلى ذلك، إلى جراثيم الإشيريكيا القولونية

المُمرضة المِعْوِيَّة (*Intestinal pathogenic E.coli (IPEC)*) وجراثيم الإشيريكية القولونية المُسَبِّبَة للأَمْرَاضِ خارجِ الأَمْعَاءِ (*ExPEC*) (*Habouria et al., 2019*).

وُصِّفَتْ جراثيم الإشيريكية القولونية المُسَبِّبَة للأمراض المِعْوِيَّة (*IPEC*) إلى : جراثيم الإشيريكية القولونية المُمرضة المِعْوِيَّة (*Enteropathogenic E.coli (EPEC)*) وجراثيم الإشيريكية القولونية المِعْوِيَّة التَّجْمُعيَّة (*Enteraggative E.coli (EAEC)*) وجراثيم الإشيريكية القولونية المِعْوِيَّة الغَازِيَّة (*Enteroinvassive E.coli (EIEC)*) وجراثيم الإشيريكية القولونية المِعْوِيَّة الذِّيفَانِيَّة (*Enterotoxigenic E.coli (ETEC)*) وجراثيم الإشيريكية القولونية المِعْوِيَّة النَّزْفِيَّة (*Enterohemorrhagic E.coli (EHEC)*) وهي مُنْتَشِرَة على نِطاقٍ واسعٍ وتُحْدِثُ في أَمَاكِنٍ مُتَعَدِّدَة وفي أَنْوَاعٍ مُخْتَلَفَة من نُظُمِ تَرْبِيَةِ الحَيَوَانَاتِ (*Malberg Tetzschner et al., 2020*). تُسَبِّبُ العَدْوَى بِالأَنْوَاعِ المِعْوِيَّة المُمرضة (*IPEC*) إلتِهَابَاتٍ مِعْوِيَّةٍ وَحُدُوثِ الإِسْهَالِ، وفي بَعْضِ الحَالَاتِ الشَّدِيدَة تُؤَدِي إلى نُفُوقِ الحَيَوَانَاتِ (*Malberg Tetzschner et al., 2020*)، في حين تُسَبِّبُ الأنواع المُمرضة خَارِجَ الأَمْعَاءِ (*ExPEC*) إلتِهَابَاتِ المَسَالِكِ البُولِيَّةِ وإلتِهَابِ السَّحَايَا عِنْدَ الأَطْفَالِ (*Russo and Johnson, 2003*). تُسَبِّبُ جراثيم الإشيريكية القولونية أَشْكَالاً عَدِيدَة من الأَمْرَاضِ فِي الأَغْنَامِ ، بِمَا فِي ذَلِكَ: مَرَضُ القَمِّ المَائِي فِي الحِمْلَانِ (*Watery mouth disease*) (*Collins and Carson, 2022*) وإلتِهَابِ السُّرَّةِ وَالمَفَاصِلِ (*Navel and joint ill*) (*Swinson, 2021*) والإِسْهَالِ المَائِي (*Scour*) (*Hassan et al., 2013*) وَتَسْمُمِ الدَّمِ (*Septicemia*) (*Kjelstrup et al., 2017*) وإلتِهَابِ السَّحَايَا (*Meningitis*) (*Konradt et al., 2017*). وَتُعَدُّ جراثيم الإشيريكية القولونية من النَمَطِ المَصْلِي O157: H7 مَسْؤُولَة عَنِ العَدِيدِ مِنَ الأَمْرَاضِ الَّتِي تُصِيبُ الإِنْسَانَ وَتَكُونُ سَبَباً فِي حُدُوثِ حَالَاتِ الإِسْهَالِ الشَّدِيدِ المَصْحُوبِ أحياناً بِالدَّمِ وَحُدُوثِ المَغْصِ المِعْوِي (*Gonzalez et al., 2022*).

أُعْتِمِدَتْ إستراتيجيات السَّيْطْرَةِ والقَضَاءِ على جراثيم الإشيريكية القولونية فِي السَّنَوَاتِ المَاضِيَّةِ على إِسْتِخْدَامِ المُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ، وَلَكِنْ بِسَبَبِ إِسْتِخْدَامِ تِلْكَ المُضَادَّاتِ بِشَكْلِ سَيِّئٍ وَعَشْوَائِيٍّ وَخَاطِئٍ، الأَمْرُ الَّذِي أَسْهَمَ فِي النِّهَايَةِ إِلَى زِيَادَةِ المُقَاوِمَةِ الجُرْثُومِيَّةِ لِلْمُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ وَالَّتِي تَتَجَلَّى فِي عَدَمِ الإِسْتِجَابَةِ لِلعِلَاجِ، إِذْ شَكَّلَتْ عِبْئاً على الإِسْتِثْمَارِ الإِقْتِصَادِي فِي هَذَا المَجَالِ (*Founou et al., 2016*) وَعَلَيْهِ فَقَدْ أَصْبَحَتْ المُقَاوِمَةُ الجُرْثُومِيَّةِ المُتَزَايِدَةُ لِلْمُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ وَبأنواعِها المُخْتَلَفَة تُمَثِّلُ مُشْكِلة صِحِّيَّة ذاتِ إِنْتِشَارٍ عَالِمِيٍّ، الأَمْرُ الَّذِي أَدَّى إِلَى إِنْخِفَاضِ فَعَالِيَّةِ العَدِيدِ مِنَ المُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ الشَّائِعَةِ الإِسْتِخْدَامِ فِي المَجَالِ البَيْطَرِي وَالبَشَرِي على حَدِّ سَوَاءٍ (*Alag and Aziz, 2020, Palmeira and Ferreira, 2020, Yousif and Jwher, 2021*). وَمِنْ نَاحِيَةِ أُخْرَى، يُؤَدِي الإِسْتِخْدَامُ المُسْتَمِرُّ وَالمُتَكَرِّرُ

للمضادات الحيويّة في الحيوانات إلى تقوية الإنتقائيّة وظهور سلالات جديدة مقاومة للمضادات الحيويّة ، ومن ثمّ إنتقالها إلى الإنسان (Bolick *et al.*, 2013). وأشار الباحثون إلى أنّ جراثيم الإشيريكييا القولونية الممرضة المتواجدة في الأغنام هي المَخرن الرئيسي لجينات المقاومة للمضادات الحيويّة وإنتشارها من الحيوانات إلى الإنسان من خلال السلسلة الغذائيّة عن طريق تناول اللحوم والحليب، وتقدّر الحكومة البريطانيّة بأنّه في عام 2050 سيَتجاوز عدد الوفيات بسبب عدوى مقاومة المضادات الحيويّة العشرة مليون كل عام (de Kraker *et al.*, 2016). وفي أوربا يموت حوالي 25000 شخصاً من جرّاء الإصابة بالجراثيم المقاومة للمضادات الحيويّة ، لذا فإنّ أكبر التّهديدات التي تُواجه الإنسان في الوقت الحالي هو إحتمال ظهور وإنتشار الجراثيم المقاومة للمضادات الحيويّة عالمياً (Nadeem *et al.*, 2020). إنّ إكتساب صفة المقاومة للمضادات الحيويّة من قبل جراثيم الإشيريكييا القولونية ولاسيّما التي تحمّل صفة إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز واسعة الطيف والذي يُشكّل تهديداً مُباشراً للإنسان والحيوان على حدّ سواء وذلك لما قد تُضيفه صفة المقاومة الواسعة من ميزات إضافية تُساعد الجراثيم في تجاوز المضادات الحيويّة المُستخدمة عادةً في العلاج (Olsen *et al.*, 2014, Ahmed, 2021). فضلاً عن ما تمثّلُه جراثيم الإشيريكييا القولونية من خواص تُمكنها من العيش في بيئة ملاصقة كإمتلاكها للحمائل أو الشعيرات Fimbriae أو Pilli التي تُساعدُها على الإلتصاق على أنسجة المضيف وتمنحها القدرة على إنتاج الأغشية الحيويّة Biofilm والتي تُعطي نفاذية إختيارية للجراثيم وتوفّر لها الحماية من المضادات الحيويّة والإنزيمات الحائلة والتحقّي من الأجسام المُضادة للمضيف، إذ تُعتبر عامل مقوّض ويُهدد القدرة على علاج الأمراض (Frydendahl, 2002, Quinn *et al.*, 2011, Messele, 2016).

وقد أظهرت العديد من الدّراسات الحديثة إلى وجود علاقة ما بين المقاومة للمضادات الحيويّة والقابلية على إنتاج الأغشية الحيويّة لجراثيم الإشيريكييا القولونية وغيرها من الجراثيم المعوية المُسبّبة للأمراض (Behzadi *et al.*, 2020a). وتعدّ آلية إنتاج الأغشية الحيويّة التي تمثّلُها أو تُطوّرُها وتنتشرُها على نطاق واسع بعض الكائنات الحيّة الدّقيقة ومنها الإشيريكييا القولونية عامل مقوّض تُهدد القدرة على علاج الأمراض (De la Fuente-Núñez *et al.*, 2013).

أهداف الدِّراسة :

محافظة نينوى هي إحدى محافظات العراق الرّئيسة لتربية الأغنام. ومع ذلك، وفي السّنوات الأخيرة، تَسببتْ جراثيم الإشيريكيا القولونية في حُدُوث العديد من الأشكال المَرَضِيَّة للأغنام، لذلك فإنَّ الكشف عن مَدَى إنتِشار الإشيريكيا القولونية مُهم للوقاية من الأمراض التي تُسببها في محافظة نينوى، لذلك هدفتْ هذه الدِّراسة إلى:

1. عزل وتشخيص جراثيم الإشيريكيا القولونية من الأغنام وبيئتها باستخدام الطرائق التقليدية.
2. تأكيد جراثيم الإشيريكيا القولونية المعزولة من الأغنام وبيئتها المُحيطة من خلال الكشف عن جين ال- *uidA* من جرثومة الإشيريكيا القولونية باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المُتسلسل.
3. الكشف عن جراثيم الإشيريكيا القولونية المُنتجة لسُوم الشيكا من خلال تحديد جينات *Stx1* و *Stx2* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المُتسلسل.
4. إجراء فحص الحساسية والمقاومة للمضادات الحيويَّة لجراثيم الإشيريكيا القولونية
5. الكشف عن قابلية جراثيم الإشيريكيا القولونية على إنتاج الاغشية الحيويَّة.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Review of Literatures

1-2: جراثيم الإشيريكية القولونية *Escherichia coli* :

تنتمي جراثيم الإشيريكية القولونية الى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* والتي تضم مجموعة كبيرة ومتنوعة من الجراثيم التي تنتشر بشكل واسع في الطبيعة، إذ تتواجد في التربة والمياه وعلى النباتات، وتتواجد في أمعاء الإنسان والحيوان بصورة طبيعية (Pitout, 2012, Abbas et al., 2019). وتضم هذه العائلة حوالي 43 جنساً و 180 نوعاً، نصفها ذات أهمية من الناحية البيطرية وتُسمى بالممرضات الرئيسية major pathogens مثل *Salmonella spp.* و *Yersinia spp.* والممرضات الإنتهازية opportunistic pathogens مثل *Escherichia coli* و *Klebsiella spp.* و *Proteus spp.* و *Enterobacter spp.*، إذ تتميز بأنها عصيات سالبة لصبغة كرام Gram negative rods، هوائية Aerobic او لاهوائية إختيارية Facultative Anaerobic غير مُكوّنة للأبواغ، تمتلك عوامل ضراوة مختلفة كالمُتوسم Toxins والانزيمات Enzymes، كما تُخبر مجموعة واسعة من السُكريّات فضلاً عن قابلية بعض أجناسها على تخمير سكر اللاكتوز Lactose الذي يُستخدم عادة للتفريق بين تلك الأجناس. إنّ جراثيم العائلة المعوية تكون عادة سالبة لإختبار الأوكسيداز Oxidase وموجبة لإختبار الكتاليز Catalase ومُعظمها تتحرك بواسطة الأسواط Flagella، ودرجة الحرارة المُثلى لنموها 37°م (Quinn et al., 2011).

تعدّ جراثيم الإشيريكية القولونية من أهم أفراد العائلة المعويّة، وهي جزء من النبيت الجرثومي الطبيعي Normal Flora في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان (Riedel et al., 2019). وتعدّ من الممرضات الإنتهازية إذا ما توفّرت لها الظروف المناسبة، إذ تُسبب أمراضاً مختلفة منها الإسهال في الإنسان والحيوانات فتُسمى Diarrheagenic *E. coli* (DEC) فضلاً عن العديد من الأمراض كالتهاب السحايا Meningitis وتجرثم الدّم Bacteremia وإصابات الجهاز البولي التناسلي والتهابات الجروح Wound infections كما تُسبب داء الفُولونيّات Colibacillosis والإنتان الدّمّوي الفُولوني Colisepticemia، وعزلت من حالات إلتهاب الضرع عند الأبقار والأغنام

والماعز Coliform Mastitis وحالات إنتهاب السُرّة عند أفراخ الدجاج والديك الرومي (Quinn *et al.*, 2011, Laurent *et al.*, 2018).

2-2: الصفات العامة لجراثيم الإشيريكية القولونية :

تمتلك السلالات الممرضة لجراثيم الإشيريكية القولونية العديد من عوامل الضراوة Virulence factors التي تمثل سبباً رئيساً لقدرتها على إحداث الأمراض في المصانيف، تعود هذه الضراوة لإمتلاك الجراثيم للعديد من العوامل التي يوجد بعضها ضمن التركيب الخلوي والبعض الآخر يفرز خارج الخلية مثل الإنزيمات والسّموم المختلفة، إذ تسهم هذه العوامل في جعلها أكثر حدة في إحداث الخمج، ومن هذه العوامل إمتلاكها للتراكيب السطحية مثل السّموم الداخلية Endotoxins والتي تُكوّن مُتعدد السكريات الدهني Lipopolysaccharide (LPS) التي تحتوي على المُستضد الجسمي Somatic Antigen O، وإبعضها القابلية على إنتاج المحفظة Capsule ومُتعدد السكريات الذي يحتوي على المُستضد المحفظي Capsular Antigen K وأيضاً تمتلك تراكيب سطحية أخرى هي الأسواط Flagella التي تُستعمل كوسيلة للحركة في الأنواع المُتحركة وكذلك تحتوي على المُستضد السوطي Flagellar Antigen H وإمتلاكها حاملات الحديد Siderophores، وعامل التَنخّر السّام للخلايا Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF) وأيضاً تمتلك الشّعيرات Pilli التي تُساعد على الإلتصاق على أنسجة المُضيف والأسطح، والغلاف الخارجي الذي يُعطي نفاذية إختيارية للجراثيم كما يحميها من المُضادات الحيوية والإنزيمات الحائلة (Frydendahl, 2002, Quinn *et al.*, 2011, Messele, 2016).

فضلاً عن إمتلاكها لإنزيم البيتالاكتاميز الذي يُمثل جزءاً مهماً من عوامل الإمرضية لديها ويشمل البنسلينيز Penicillinase والسيفالوسبورينيز Cephalosporinase الذي يمنح الجراثيم صفة المقاومة للمضادات الحيوية من عائلة البيتالاكتام β -lactam، إذ يقوم هذا الإنزيم بالتحلل المائي لحلقة البيتالاكتام وجعل جزيئاتها غير فعالة حيوياً (Dahms *et al.*, 2015, Kuenzli, 2016, Meini *et al.*, 2019). ومن الجدير بالذكر أنّ الإشيريكية القولونية التي تتعرض إلى مدى واسع من المُضادات الحيوية في المُعالجة الطبية ولاسيما سلالاتها الممرضة، قد تُصبح قادرة على نقل الجينات من وإلى الجراثيم الأخرى مما يزيد من مقاومتها لطيف واسع من المُضادات الحيوية (Garcia and Munoz Bellido, 2007).

3-2: تصنيف جراثيم الإشيريكية القولونية *E.coli* Taxonomy :

شخصت جراثيم الإشيريكية القولونية لأول مرة من قبل العالم الألماني ثيودور اشريش Theodore Escherich في عام 1885 خلال دراسته عن الجراثيم الطبيعية في الأمعاء في براز الأطفال

الرُّضَع كجراثيم مُتعايشة تَسْتَوِطِن الأمعاء مُباشرةً بعد الولادة وأُطْلِقَ عليها في ذلك الوقت *Bacterium coli*، وفي عام 1945 وَجَدَ العالم براي Bray أنَّ سُلالة جراثيم الإشيريكيا القولونية كانت السَّبب الرئيس لإسهال الأطفال الرُّضَع في إنكلترا وأُطْلِقَ عليها (Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Bray,) (1945, Frydendahl, 2002)

يكون جنس الإشيريكيا *Escherichia* قَرِيب الصِّلة من أجناس العائلة المعوية الأخرى ولاسيما جنس الشايكيلا *Shigella*، ويضمُّ هذا الجنس خمسة أنواع (*E.vulneris*, *E.fergsonii*, *E.hermannii*, *E.blattae*, *E.coli*) تَخْتَلِفُ فيما بينها بِبعض التفاعلات الكيميائية الحيويَّة، وتعدُّ جراثيم الإشيريكيا القولونية الأكثر أهميةً وشيوعاً في إمراضية الإنسان (Olowe et al., 2017).

وبحسب مُصنَّف برجي Bergey's manual، صُنِفَت الإشيريكيا القولونية ضمن العائلة المعوية (Garrity et al., 2005).

Domain : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order : Enterobacterales

Family : *Enterobacteriaceae*

Genus : *Escherichia*

Species : *Coli*

ويُمكن تصنيف جراثيم الإشيريكيا القولونية سريريّاً إلى 3 أنواع :

1. الإشيريكيا القولونية المُتعايشة *E.coli* Commensals
2. الإشيريكيا القولونية المعويَّة المُمرضة (Intestinal Pathogenic *E.coli* (IPEC)
 - الإشيريكيا القولونية المعويَّة النَّزفية (Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC)
 - الإشيريكيا القولونية المعويَّة المُمرضة (Enteropathogenic *E.coli* (EPEC)
 - الإشيريكيا القولونية المعويَّة الدِّيفانِيَّة (Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC)
 - الإشيريكيا القولونية المعويَّة الغَازِيَّة (Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)
 - الإشيريكيا القولونية المعويَّة التَّجمعيَّة (Enteroggregative *E.coli* (EAEC)
3. الإشيريكيا القولونية المُمرضة خارج الأمعاء (Extraintestinal pathogenic *E.coli* (ExPEC)

وتشمل العزلات المسؤولة عن إصابات المسالك البولية Uropathogenic *E. coli* (UPEC) وتجرتُم الدم Sepsis-associated *E. coli* (SEPEC) والتهاب السحايا Meningitis associated *E. coli* (MNEC) (Kaper et al., 2004, Brooks et al., 2007, Bajaj et al., 2016).

2-4: الصفات المظهرية والخصائص الكيميائية الحيوية لجراثيم الإشيريكية القولونية :

تعدُّ جراثيم الإشيريكية القولونية النوع الأكثر شيوعاً وأهمية من جنس الفولونيات وتتصف بأنها عُصيات سالبة لصبغة كرام، مُحركَة بواسطة الأوساط المحيطية Peritrichous flagella التي تُحيط بكامل الجسم، وتكون مُستعمراتها ملساء ناعمة ومُحدبة قليلاً ذات قطر 1-3 ملم، غير مُخاطية أو مُخاطية عند إمتلاكها لتركييب المحفظة Capsule، تكون هذه الجراثيم هوائية أو لاهوائية إختيارية، غير مُكونة للأبواغ ذات نمو سريع في الأوساط الرزعية، مخمرة لسُكر اللاكتوز وتنتج مُستعمرات ذات لون وردي على وسط أكار الماكونكي MacConkey agar، كما وتنتج مُستعمرات ذات بريق معدني عند تنميتها على وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق Eosin Methylene Blue (EMB) agar، وتنمو في أس هيدروجيني pH يتراوح بين (4.4-9) ودرجة الحرارة المثلى لنموها هي 37°م (Jawetz et al., 2016, Wanger et al., 2017). تمتلك جراثيم الإشيريكية القولونية صفات كيموحيوية مميزة، إذ تكون سالبة لإختبار الأوكسيديز Oxidase والسترات Citrate وفوكس بروسكاور Voges Proskauer والليباز Lipase واليوريز Urease كما أنها غير مُحللة للجيلاتين gelatin وغير مُنتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H₂S في وسط ثلاثي السُكر والحديد Triple Sugar iron (TSI) agar، كما أنها تكون موجبة لإختبار الكتاليز Catalase والمثيل الأحمر Methyl red والإندول Indole الذي يُعدُّ الإختبار الأفضل الذي يُميّزها عن بقية أفراد العائلة المعوية (Quinn et al., 2011, Hemraj et al., 2013).

2-5: عوامل الفوعة لجراثيم الإشيريكية القولونية Virulence Factors :

2-5-1: مُستضد المحفظة (kps) Capsular Antigen K :

تتميز السلالات المُختلفة لجراثيم الإشيريكية القولونية بالتباين الكبير في السُكريات المُتعددة على سطح الخلية (Whitfield et al., 1994)؛ وتعدُّ السُكريات السطحية الأولية الخاصة بالنمط المصلي مُحددات فوعة مهمة؛ وتشمل هذه مُستضدات مُتعدد السُكريات الدهنية (LPS) ومُستضدات المحفظة (K)، حيثُ تنتج الأنماط المصلية المُختلفة لـ (O) و (K) من التباين في تكوين السُكريات وخصوصية الإرتباط في السُكريات وإستبدالها بمُخلفات غير كربوهيدراتية، وهناك 167 مجموعة مصلية مُختلفة من (O) وأكثر من 80 مستضد متعدد السُكريات من (K) في جراثيم الإشيريكية القولونية، وقد تمَّ تحديد الهياكل الأولية

للعديد من هذه المُستَضدات (Whitfield and Roberts, 1999). إنَّ الجينات المُحدَّدة في مُستَضدات المِحْفظة في الجراثيم المُمرضة للمسالك البولية تُعد مسؤولة عن تجميع السُكريات خارج الخلية الجرثومية (المِحفظات)، وتُمكن الجراثيم من مُقاومة الخلايا المناعية للمُضيف من خلال الإبقاء على هذه الجراثيم في البيئات المُعادية Hostile environments، فإن هذه المِحفظات تؤدي وظيفة حاسمة في بقاء الجراثيم في هذه البيئات المُعادية (Park et al., 2009). وقد يَمنع المُستضد المِحفظي الجرثومي (K) الذي يُغطي سطح الخلية من الالتصاق بالخلايا الظهارية، وقد أشار الباحث Sáez-López وجماعته (2017) إلى إرتباط سلالات جراثيم الإشيريكية القولونية المُعبرة عن مستضد K1 بتطور حالات تَعَفُن الدَّم عند حديثي الولادة Neonatal sepsis. وأوضح الباحث Sarowska وجماعته (2019) إرتباط إنتاج مُستضدات المِحْفظة بمجموعة مُستضدات المِحْفضة kps14 المسؤولة عن تشكيل مِحْفظة K1، حيث يقوم الجين *kps MTII* بترميز البروتينات المطلوبة لإنتقال البوليمر من موقع التوليف الخاص به إلى سطح الخلية بوجود جين *neuC*.

2-5-2: الشُعيرات Pili :

الشُعيرات عبارة عن عُضيات Organelles سطحية مُتَبَتَّة على الغشاء الخارجي لجراثيم الإشيريكية القولونية وتُوجد بشكل شائع في عُزلات المسالك البولية، تُساعد الجراثيم على الالتصاق بالخلايا المُضيفة وهي مُهمة في الخطوة الأولى من الإستعمار وضرورية لتكوين الأغشية الحيوية (Anderson et al., 2003). وتلعبُ الشُعيرات دوراً في الفوعة كوسيط للإرتباط على السطح الظهاري في الإنسان، والتي تُظهر توجهاً ملحوظاً لأنواع مُختلفة من الخلايا الظهارية، والتي يَتِمُّ تحديدها من خلال توافر مُستقبِلاتها المُحددة على سطح الخلية المُضيفة (Ryan and Ray, 2004). مُعظم جراثيم الإشيريكية القولونية تُعدُّ من النوع الأول من الشُعيرات Type I Pili أو من الشُعيرات الشائعة Common Pili، يَرتبُط النوع 1 ببقايا D-mannose الموجودة بشكل شائع على أسطح الخلايا الظهارية، ومن ثمَّ يَتوسط الإرتباط بمجموعة مُتنوعة من أنواع الخلايا (Neeser et al., 1986). يلعب النوع الأول من الشُعيرات دوراً في تطور أمراض الجهاز الهضمي، وكذلك العديد من جراثيم الإشيريكية القولونية المعوية (Forero et al., 2006).

2-5-3: الخَمَائِل من النوع الأول Type 1 Fimbriae :

الخَمَائِل عبارة عن زوائد خيطية غير سوطية على السطح الخارجي للجراثيم يُمكن ملاحظتها تحت المِجهر الإلكتروني، وتُصنَّف إلى خمسة أنواع إعتدالاً على الترابط ونشاط التراص، ويُعتَقَدُ أنَّ لها دور

في عملية التراص لكريات الدم الحمراء والإلتصاق، وأظهرت العديد من الدراسات وجود علاقة بين ضراوة الجراثيم وقابليتها على الإلتصاق ولاسيما في الأنواع المسببة للعدوى في الطبقة المخاطية (Antão *et al.*, 2009).

2-5-4: السموم (الذيفانات) : Toxins

تلعب العديد من البروتينات أو المواد السامة التي تفرزها جراثيم سلالات الإشيريكية القولونية المسببة للأمراض دوراً مهماً كعوامل ضراوة. ومع ذلك، فإن السموم لديها القدرة على تغيير تسلسل إشارات الخلية المضيفة وتعديل الإستجابة الإلتهايبية، إذ أظهرت العديد من الدراسات المختبرية قدرة السموم على تحفيز موت الخلايا المضيفة وتحرير العناصر الغذائية الضرورية (Agarwal *et al.*, 2012)، وتم تحديد العديد من السموم الأخرى، بما في ذلك Hemolysin A (HlyA) وعامل التثخر 1 السام للخلايا (CNF1) وسموم النقل التلقائي المفرز Autotransporter toxin (SAT) Secreted والساييتوليسين أ Cytolysin A والذيفان المشفر بالبلازميد Plasmid-encoded toxin (PET) وسموم النقل التلقائي التفريغي Vacuolating autotransporter toxin (VAT) وسموم الشيكا (*Stx1*) و (*Stx2*) والأرجينين سكسينيل ترانسفيراز Arginine Succinyltransferase (AST) وغيرها من السموم (Soltani *et al.*, 2018).

2-5-4-1: الالفا-هيمولايسين (α -hemolysin (HlyA)

وهو عبارة عن بروتين دهني ينتمي إلى عائلة السموم (RTX) Repeats in Toxin (Bhakdi *et al.*, 1986)، يؤدي إلى موت الخلية المبرمج Apoptosis من خلال إصابة أغشية الخلايا وتحرير أكسيد النيتريك الذي يسبب تكوين المسامات في أغشية جذران الخلايا (Chen *et al.*, 2003)، بالإضافة إلى تحليل كريات الدم الحمراء (Russo *et al.*, 2005).

2-5-4-2: عامل التثخر السام للخلايا (CNF1) Cytotoxic Necrotizing Factor 1

من العوامل الرئيسية للفوعة الجرثومية هي إنتاج السموم البروتينية والتي تمثل إحدى الإستراتيجيات الرئيسية للتفاعل مع خلايا الأجسام المضيفة للثدييات، وتعمل بإليات متنوعة ومعقدة من خلال التلاعب بوظائف الخلايا للمضيف بطريقة يمكن أن تضمن بقاء وانتشار الجراثيم، (Fabri *et al.*, 2008). يعد CNF1 عامل جرثومي رئيسي يسهم في تغلغل جراثيم الإشيريكية القولونية للحاجز الدموي الدماغى، وهو عبارة عن بروتين سايتوبلازمي تنتجها جراثيم الإشيريكية القولونية، وهو

نتاج تَطَوَّر طَوِيل الأَمَد، ويُمكن أن يَسْتَهْدِف عَمَلِيَّات مُهَمَّة في الكائنات الحية مثل مكونات آليَّة تَخْلِيْق البروتين وبلمرة الأكتين ومسارات نقل الإشارات وكذلك الإستجابة المناعية والإلتهابية (Alaubydi and Jawad, 2018).

2-5-5: حَامِلَات الحَدِيد Siderophores :

تُعَدُّ حَامِلَات الحَدِيد أحدى العوامل الرئيسية التي تُسَاعِد في البقاء والإستعمار في ظل بيئة الإجهاد (Sarowska et al., 2019)، وبالتالي، فإنَّ إنتاج حَامِلَات الحَدِيد هي أحدى عوامل الفوعة الأولية للإشريكية القولونية المُمرضة والتي تُسَاعِد في إنشائها مما يُؤدِّي إلى علامات سريرية مُختلفة تتراوح من الإسهال الذاتي Self-Limiting Diarrhea إلى إسهال الأطفال الجيني Fetal Childhood Diarrhea، وعدوى المسالك البولية Urinary Tract Infection (UTI)، ومُتلازمة إنحلال الدم اليوريمي Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) وإلتهاب القولون النزفي Hemorrhagic Colitis (HC)، وإلتهاب السحايا الوليدي Neonatal Meningitis، وتجرثم الدم، وما إلى ذلك (Vila et al., 2016, Shah et al., 2018). تمَّ توصيف جميع عزلات الإشريكية القولونية كيميائياً للكشف عن النوعين الأكثر شيوعاً من حَامِلَات الحَدِيد بإستخدام المقاسات الكيميائية الموصوفة بواسطة Csaky للكشف عن حَامِلَات الحَدِيد من نوع الهيدروكسامات hydroxamate siderophore و Arnov للكشف عن حَامِلَات الحَدِيد من نوع الكاتيكولات catecholate siderophore (Maheshwari et al., 2019).

2-6: جراثيم الإشريكية القولونية المُنتجة للبيتالاكتاميز Beta-Lactamase-Producing E.coli :

إنَّ الظهور والزيادة السريعة في إنتشار الجراثيم المُنتجة للطيف المُمتد للبيتالاكتاميز (ESBLs) والتي تُقاوم مُختلف الأدوية في جميع أنحاء العالم، شكَّلت عبئاً علاجياً يُؤدِّي إلى إرتفاع مُعدلات الإصابة بالأمراض وإرتفاع مُعدل الوفيات وزيادة تكاليف الرعاية الصحية (Schwaber and Carmeli, 2007).

وقد إزدادت مُقاومة الجراثيم المعوية للمضادات الحيوية وخصوصاً الجيل الثالث والرابع للسيفالوسبورينات من خلال إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز ذات الطيف الممتد (ESBLs) منذ العقد الأول من القرن الحادي والعشرين، الأمر الذي حدَّ من الخيارات العلاجية ضدَّ هذه الأمراض (Poirel et al., 2018)، وقد تمَّ الإبلاغ عن إنتشار جراثيم الإشريكية القولونية التي تمتلك تهديداً خطيراً على الصحة العامة على نطاق واسع في الإنسان والحيوانات (Giufre et al., 2021, Cardozo et al., 2021).

ومنذ عام 2000 سُجِلَتْ زيادة في مُقاومة السيفالوسبورينات في جراثيم الإشيريكية القولونية المُنتِجة لإنزيمات الطيف المُمتد للبيتالاكتاميز (ESBLs)، إذ سُجِلَتْ هذه المُقاومة في 10-12% من الجراثيم التي تمَّ عزلها من مجرى الدَّم في الإنسان في المملكة المُتحدة (Committee, 2015). كما سُجِلَتْ العديد من جراثيم الإشيريكية القولونية المُنتِجة للبيتالاكتاميز على نطاق واسع في مياه الصَّرف الصحي والحيوانات الأليفة واللحوم والحيوانات المُنتِجة للغذاء، ولكنَّ مدى إنتقال العدوى بين هذه الأوساط والإنسان لازال قيد الدراسة ودور السلسلة الغذائية قيد المناقشة، وأشارت دراسة إلى إنتقال عدوى جراثيم الإشيريكية القولونية المُنتِجة للبيتالاكتاميز بين الإنسان بإكتشاف واحد مُقابل 17 إكتشافاً لإنتقال العدوى المُنتقلة خلال السلسلة الغذائية (Lazarus et al., 2015).

7-2: تشكيل الغشاء الحيوي Biofilm Formation :

تتكون الأغشية الحيوية من كائنات دقيقة مرتبطة بالأسطح ومغلقة في مصفوفة بوليمرية تحتوي على السكريات والبروتينات والأحماض النووية، تُكَلِّف المشاكل المرتبطة بالأغشية الحيويَّة الولايات المتحدة مليارات الدولارات كل عام في خسائر الطاقة وتلف المعدات وتلوث المنتج والعدوى، وتُسبب في أكثر من 80% من الأمراض الالتهابية والمُعدية المزمنة التي تسببها الجراثيم، بما في ذلك إتهاب الأذن الوسطى والفُرحة المُعدة والتهابات المسالك البولية والتهابات الرئة في مرضى التَّليُّف الكيسي (Sauer et al., 2007).

تفرز الجراثيم الموجودة في الأغشية الحيويَّة مجموعة مُتنوعة من المواد الوقائية تُسمى المواد البوليمرية خارج الخلية Extracellular Polymeric Substances (EPS) التي تُعزز كفاءة بقائها على قيد الحياة، وتمَّ العثور على الأغشية الحيوية في جراثيم الإشيريكية القولونية لتُكون العامل المُسبب الرئيسي للعديد من الإلتهابات المعوية، وتكون وسيلة للتواصل مع بعضها من خلال إشارات كيميائية تجعل الخلايا مُقاومة للمُضادات الحيويَّة (Mittal et al., 2015, Sharma et al., 2016). إنَّ آلية تطوُّر الأغشية الحيويَّة تتمُّ من خلال خمسة مراحل، وتشمل الإرتباط الأولي القابل للإنعكاس والتحوُّل من الإرتباط القابل للإنعكاس إلى الإرتباط غير القابل للإنعكاس والإنشاء المُبكر لهيكل الأغشية الحيوية وإنتاج الغشاء الحيوي النَّاضج للتركيب الثلاثي الأسطح من المُستعمرات الدَّقيقة وأخيراً تنشُّت الخلايا من الأغشية الحيويَّة للعودة إلى حالة العوَّالق (planktonic state) (Van Houdt and Michiels, 2005). أنَّ الخُطوات المُبكرة في تكوين الأغشية الحيوية تتطلَّب تخليق ملاحق Appendages سطحية جُثرومية مُختلفة بما في ذلك الأسواط Flagella التي تُسمَح بالإرتباط القابل للإنعكاس (Prüß et al., 2006).

2-8: الأهمية الصحية لجراثيم الإشيريكيا القولونية :

2-8-1: الأهمية الصحية لجراثيم الإشيريكيا القولونية في الماء :

يُعدُّ الماء مادةً أساسية للحياة ولهُ دورٌ في صِحَّة الإنسان والحيوان، ويُعدُّ وسيلةً مهمَّة لنقل العوالم الممرضة ولاسيَّما في البلدان النامية (Saravanan *et al.*, 2011). وتوصي وكالة حماية البيئة الأمريكية United States Environmental Protection Agency (US EPA) باعتبار جراثيم الإشيريكيا القولونية كمؤشر حي لفحص أنظمة المياه وتُعدها معياراً حساساً للتلوث البرازي (Rice *et al.*, 2012). وفُدرت الإندلاعات المَرَضِيَّة النَّاتِجَة من تلوث المياه بجراثيم الإشيريكيا القولونية بـ 7.6 مليون حالة مَرَضِيَّة سنوياً و1200 وفاة (Morris and Levin, 1995). وفي عام 1993 سُجِّلَتْ 403000 حالة إصابة و104 وفاة من جرَّاء النقص في مُعالِجَة المياه (Morris *et al.*, 1998). تمَّ الإبلاغ عن عزل جراثيم الإشيريكيا القولونية من الماء في عام 1989، ويُعتَقَدُ أنَّ تلوث إمدادات المياه بجراثيم الإشيريكيا القولونية ينشأ من الفضلات البرازية من الخزانات الحيوانية الرئيسية (الأبقار والأغنام والإنسان) (Mcgowan *et al.*, 1989). وأثبتت الدراسات التي قام بها عدد من الباحثين أنَّ جراثيم الإشيريكيا القولونية O157:H7 هي إحدى مُسببات الأمراض المَحْمُولَة بالماء، إذ تمَّ عزلها خلال الإندلاعات المَرَضِيَّة في ولاية ميسوري الأمريكية (Swerdlow *et al.*, 1992)، وأكَّدتها العديد من الدراسات في ولاية وايمنك (Olsen *et al.*, 2002) وفي ولاية نيويورك (Bopp *et al.*, 2003) من خلال الدراسات التي أُجريت على المياه الجوفية أنَّ النقص الحاصل في مُعالِجَة المياه والتوزيع تُؤدي إلى الإصابة بالتهابات حادَّة للجهاز الهضمي للإنسان والحيوان (Kuusi *et al.*, 2004). ويلعب الماء المُلوَّث دوراً مهمّاً في حُدوث الإندلاعات المَرَضِيَّة ولاسيَّما بعد تناول الحيوان للأعلاف المُركزة التي تُزيد من حاجة الحيوان للماء (Gerba and Smith, 2005).

2-8-2: الأهمية الصحية لجراثيم الإشيريكيا القولونية في الأعلاف :

تُعدُّ الأعلاف المُلوثة من أهم المصاير الرئيسة للإصابة بجرثومة الإشيريكيا القولونية (Werber *et al.*, 2007)، إذ تلعب الحيوانات دور الخازن الرئيسي لجراثيم الإشيريكيا القولونية ولاسيَّما النمط المصلي O157:H7 (Bonardi *et al.*, 2015)، ويحدث تلوث الأعلاف (الحشائش الخضراء والأعلاف المركزة) عن طريق البراز الحاوي على الجراثيم الممرضة ويكون مُعدَّل طرح جراثيم الإشيريكيا القولونية *E.coli* O157:H7 عبر البراز ما بين 10^2 - 10^5 وحدة تكوين المُستعمرة/غرام (Slutsker *et al.*, 1998).

2-8-3: الأهمية الصحية لجراثيم الإشيريكيا القولونية في الأغنام :

ازدادت عدوى جراثيم الإشيريكيا القولونية (*E.coli* O175:H7 (VTEC) المُسببة للتسمم في الحيوانات والإنسان منذ أن تمَّ تحديدها لأول مرة كسبب لأمراض الجهاز الهضمي في عام 1983 (Riley, 1983). وتعدُّ المُجترات الخازن الرئيسي لهذا الكائن الحي ولاسيما الأغنام والأبقار، إذ تحملها بدون أعراض سريرية وتلقاها مع البراز (Chapman *et al.*, 1997).

وقد تمَّ تحديد العديد من الحالات المرضية بجراثيم الإشيريكيا القولونية وكان مصدرها من خلال تعقبها إلى الأغنام والأبقار (Strachan *et al.*, 2001, Licence *et al.*, 2001) والماعز (Bielaszewska *et al.*, 1997). وفي الآونة الأخيرة، أكتشفت مسارات أخرى لإنتقال جراثيم الإشيريكيا القولونية من غير المنقولة بالغذاء بسبب الإتصال البشري المباشر مع الحيوانات أو برازها (Keen *et al.*, 2003)، وهذا الإتجاه يؤكد أهمية القياس الكمي والنوعي لإنتشار هذا الكائن الحي في الحيوانات وبيئتها، وتسبب الإصابة بنوع الإشيريكيا القولونية المُمرضة المعوية (IPEC) إلتهاب الأمعاء والإسهال وتصل في بعض الحالات الشديدة إلى نفوق الحيوانات (Malberg Tetzschner *et al.*, 2020). كما تسبب جراثيم الإشيريكيا القولونية العديد من المشاكل في الجملان الصغيرة بما في ذلك مرض الفم المائي وأمراض السرة والمفاصل والإسهال المائي وإلتهاب السحايا وتسمم الدم، إذ تُصاب هذه الجملان بالعدوى خلال الساعات الأولى من حياتها عندما تبتلع أعداداً كبيرة من جراثيم الإشيريكيا القولونية من صوف النعجة أثناء بحثها عن الضرع، أو إذا كانت فرشتها مُتسخة، وتنتقل الجراثيم إلى الأمعاء (Maynou *et al.*, 2017). إن التناول المُبكر لللبأ بكميات كافية هو أفضل حماية ضدَّ العدوى مع الإهتمام بعلاجات السرة والنظافة البيئية (Ogden *et al.*, 2005)

من أهم مصادر التلوث بالجراثيم المُمرضة التي تُسبب حالات إلتهاب الضرع في المُجترات هي (الضرع والجلد والأضلاف والرحم وآلة الحلب والحلابيين والفرشة والماء المُلوَّث أو عن طريق الحشرات المُلوثة بجراثيم الإشيريكيا القولونية وعدم توازن العليقة ولاسيما كمية البروتين التي يتناولها الحيوان وضربة الشمس والجروح والتشققات في الحلمات والضرع وأخطاء آلية تعود لعملية الحلب) (Levison *et al.*, 2016). وتلعب الفرشة دوراً مهماً في إنتشار الجراثيم المُمرضة بين الحيوانات بسبب إحتكاكها المُباشر والمُستمر بحلمات الضرع، إذ أن بعض الجراثيم تنمو بسرعة وبأعداد هائلة خلال 24 ساعة في الفرشة، ويعتمد عدد الجراثيم على مستوى رطوبة الفرشة ودرجة الحرارة والتخميرات بها، ويختلف ذلك بين فصل الشتاء والصيف، لذلك نجد أن الحيوانات التي تُربى داخل الحضائر المُغلقة أكثر عُرضة للإصابة

بالجراثيم الممرضة بالمقارنة مع الإصابات المنخفضة في فصل الصيف الحار وذلك لأن الفرشة تكون جافة وعملية التهوية بصورة مستمرة، لذلك نجد أن العدد الجرثومي منخفضاً (Maynou *et al.*, 2017).

2-8-4: تلوث الحليب بجراثيم الإشيريكيا القولونية :

يعد الحليب ومُنْتَجَاتِهِ مَصْدَرًا مُهِمًا لِإِحْتَوَائِهِ عَلَى الْعُنْصُرِ الْغِذَائِيَّةِ الْحَيَوِيَّةِ لِلإِنْسَانِ (Hemme and Otte, 2010, Fusco and Quero, 2014)، إذ التكوين الفريد والخصائص المميزة التي تجعل من الحليب وسطاً جيداً للنمو الجرثومي وذلك لإحتوائه على نسب عالية من البروتينات والكاربوهيدرات والدهون والمعادن والفيتامينات المهمة فضلاً عن درجة الحموضة الملائمة 6.7 مع توفر درجات الحرارة والرطوبة الملائمة للنشاط الجرثومي (Claeys *et al.*, 2013). والجراثيم الممرضة المحمولة عبر الحليب تشكل تهديداً كبيراً على صحة الإنسان، إذ تشكل ما يقارب 90% من الأمراض المرتبطة بمنتجات الحليب (Marth and Steele, 2001). وجراثيم الإشيريكيا القولونية نوع O157:H7 واحدة من الأنماط الممرضة المرتبطة بإستهلاك الحليب الخام (Claeys *et al.*, 2013)، والحالة الإحيائية الدقيقة للحليب تتأثر بعدة عوامل منها (الحالة الصحية للحيوان والنظافة العامة للحقل وضعف التحكم بدرجة حرارة الحقل) (Assessment, 2009).

2-8-5: جراثيم الإشيريكيا القولونية في الإنسان :

تعد جراثيم الإشيريكيا القولونية المنتجة لسُوم الشيكَا (STEC) سبباً مُهِمًا للأمراض التي تنتقل عن طريق الغذاء إلى الإنسان ويمكن أن تؤدي العدوى إلى مجموعة واسعة من الأعراض بدءاً من المغص البطني Abdominal Cramps والإسهال النزفي Hemorrhagic Diarrhea إلى الحالات الشديدة بما في ذلك مُتلازمة إنجلال الدم اليوريمي (HUS) وأمراض الكلى في المرحلة النهائية End-Stage Renal Disease ومن ثم الموت، أن النوع ExPEC مسؤولة عن بعض الحالات المرضية التي تُسبب التهابات المجاري البولية والتهاب السحايا عند الأطفال (Russo and Johnson, 2003). وقدرت منظمة الصحة العالمية في تقريرها عن العبء العالمي للأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية، أنه في عام 2010، تسببت STEC التي تنتقل عن طريق الأغذية إلى أكثر من 1,2 مليون حالة تسمم و 128 حالة وفاة (WHO, 2015).

9-2: مقاومة جراثيم الإشيريكية القولونية للمضادات الحيوية *E.coli* Antibiotics Resistance :

المضادات الحيوية عبارة عن نواتج أيضية ثانوية طبيعية أو مصنعة، تُنتج من قبل الأحياء المجهرية ولها القدرة على تثبيط الأحياء المجهرية الأخرى دون التأثير في خلايا جسم المضيف، يمتلك بعضها طيفاً محدوداً Narrow Spectrum Antibiotics أي تكون مُحَدَّدة بنوع مُعين او مجموعة مُحَدَّدة من الأحياء المجهرية، والبعض الآخر يمتلك طيفاً واسعاً Broad Spectrum Antibiotics أي تعمل على مختلف مجاميع الأحياء المجهرية، البعض منها يكون ذا تأثير قاتل Bactericidal والبعض الآخر يكون ذا تأثير مُثبِّط Bacteriostatic، تمَّ إكتشافها أولاً من قِبَل العالم Alexander Fleming في عام 1928م بعد إكتشافه لعقار البنسلين Penicillin بالصدفة، لكنَّ هذا العقار بقي حتى قام العالمان Ernst Chain و Howard Flory بإستخلاصه، وفي عام 1941م إنتشر بشكل واسع (Ali et al., 2018). تُعدُّ صفة المقاومة للمضادات الحيوية التي تمتلكها الجراثيم إحدى أهم المشاكل الصحية والإقتصادية في العالم، الأمر الذي دَفَع الباحثين إلى النَّحْرِي عن مضادات جديدة للتغلب على السلالات الجرثومية المقاومة، إذ تُؤدِّي الإصابة بالجراثيم المقاومة إلى طول مُدة العلاج وزيادة حُطورة الإصابة، وهناك عدة أنماط من المقاومة للمضادات الحيوية منها Multi-Drug Resistant (MDR) و Extensively Drug Resistant (XDR) و Pan-Drug Resistant (PDR) ، المقاومة من نوع (MDR) تعني أنَّ الجراثيم تكون مُقاومة على الأقل لواحد من بين ثلاثة مضادات حيوية، والمقاومة من نوع (XDR) تعني أنَّ الجراثيم مُقاومة لأثنين أو كل المضادات الحيوية المأخوذة، أما المقاومة من نوع (PDR) فتعني أنَّ الجراثيم تكون مُقاومة لجميع المضادات الحيوية (Basak et al., 2016)، صفة المقاومة هذه تكون إما فِطْرِيَّة Innate أو مُكْتَسَبَة Acquired، تَكْتَسِبُهَا إما عن طريق الطَّفَرَات في الجينات (طفرات كروموسومية) Chromosomal Mutations، أو تَكْتَسِبُهَا عن طريق إنتقال المادَّة الوراثية من جُرثومة إلى أخرى بعدة طرائق، إما عن طريق الإقْتِرَان الجُرثومي Conjugation ويَتِمُّ فيه إنتقال المادة الوراثية بين خلية وأخرى مُباشرة مثل البلازميدات Plasmids والجينات القَافِزة Transposons، أو عن طريق التَحَوُّل Transformation ويَتِمُّ فيه أخذ الجينات الجُرثومية المُتَحَرِّرة من الجراثيم المَيِّتة، أو عن طريق الحَتِّ Transduction ويَتِمُّ فيه إنتقال المعلومات الوراثية بين الخلايا الجُرثومية بوساطة العائيات Bacteriophages (Laird, 2016)، وقد أدَّت الطفرات إلى زيادة مُقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية فكانت سابقاً مُقاومة لما يُقارب الـ 70% من التتراسايكلين Tetracycline والستربتومايسين Streptomycin والسلفيزوكسازول Sulfisoxazole لكن بعد حُصُول الطفرات وإنتقال بلازميدات المقاومة لها أصبَحَتْ مُقاومة أيضاً للأمبيسلين Ampicillin والكنامايسين Kanamycin والتيكارسيلين Ticarcillin (Shariff, 2013, Afzal, 2017)، وتُظهِر الجراثيم عدداً من آليات المقاومة للمضادات الحيوية بعد إنتقال جينات المقاومة إليها.

10-2: طرائق تشخيص جراثيم الإشيريكية القولونية :**1-10-2: الطرائق الجرثومية التقليدية:**

يُعدُّ الفحص الجرثومي للعينات المختلفة والذي يتضمّن التّمنية على الأوساط الزّرعية الإنتخابية وإستخدام الصبغات والإختبارات الكيميائية الحيويّة المعيار الذهبي لتشخيص جراثيم الإشيريكية القولونية في المُجترات الصغيرة، ومع ذلك تتطلب هذه الطرائق بعض الوقت للحصول على النتائج النهائية فضلاً عن عَدَم إمكانية إجرائها في الحقل (Fragkou *et al.*, 2014).

2-10-2: إختبار فايتهك 2 Vitek2 test :

يُعدُّ هذا النظام من الأنظمة التشخيصية الحديثة، وهو جهاز يُستخدم في تشخيص العزلات الجرثومية على مُستوى النوع، وبإمكانه كذلك تحديد حساسية الجراثيم للمضادّات الحيويّة ، ويعمل بوجود بطاقات خاصّه تحوي على 64 حُفرة صغيرة، كل حُفرة مُخصصة لإختبار معين (الملحق 1-2)، وهو جهاز كبير الحجم مُزوّد بحُجرتين الأولى تُعرف بحُفرة الملاء، إذ يُجرى فيها ملء حُفرة البطاقة بالعالق الجرثومي، والثانية هي حُفرة التّحصين والتي يُحصن فيها النموذج إلى اليوم الثاني لتقرأ بعد ذلك النتيجة (Pincus, 2006).

3-10-2: الطرائق الجزيئية (تفاعل البلمرة المتسلسل) (PCR) Polymerase Chain Reaction

هي عملية تضاعف المادّة الوراثية كمّاً ونوعاً ملايين المرّات بالطرائق الإنزيمية وخارج الجسم الحيّ *In vitro* بزمن قصير جداً. ولإجراء العملية يلزم توفّر إنزيم البلمرة *Taq polymerase* والبادئات *Primers* ومنقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات *dNTP* وقالب الحامض النّووي المُستخلص *DNA* *template* وجهاز المُبلّر الحراري *Thermocycler* (Ravi *et al.*, 2014). إذ تُستعمل بشكل واسع في تشخيص الكائنات الحيّة ومنها الأحياء المجهرية، إذ تُسهّل تشخيص الجراثيم التي يُمكن تَميئُها بالطرائق الزّرعية التقليديّة والتي تكون صعبة التشخيص بالطرائق التقليديّة، وتُستعمل أيضاً بشكل كبير في التّعرف على التّنوع الجرثومي في البيئة، فتُستعمل تقنية تفاعل البلمرة المُتسلسل لتصنيف الجراثيم إلى أجناس وأيضاً تُستعمل لتصنيف الجراثيم إلى أنواع مُتعدّدة تعود للجنس نفسه (Jenkins *et al.*, 2012, Khalaf and Al-Khafaji, 2014).

11-2: فحص الحساسية لجرثومة الإشريكية القولونية :

تقوم كل من مختبرات الجراثيم البشرية والبيطرية وبشكل مستمر ودوري بإنشاء ملفات تعريفية لحساسية وقابلية المسببات المرضية لرصد الاتجاهات في تطوير المقاومة والإبلاغ عنها بشكل دوري من أجل أن يتمكن الأطباء من إختيار وإستخدام العلاج الأفضل للقضاء على المسببات المرضية (Cambrea, 2014)، والكثير من هذه الحالات تستند إلى بيانات المراقبة والفحص والتحري عن إكتساب الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية، وغالباً ما تستند هذه البيانات إلى إختبارات تعريف الحساسية المعتمدة على فحص الإنتشار في الأطباق (Caprioli et al., 2000) Disk Diffusion Tests.

وهناك نوعان من الفحوصات المختبرية الرئيسة لفحص مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية، الأولى عن طريق الإنتشار في الأطباق، وفي هذه الطريقة يتم التفسير بالإعتماد على قطر منطقة التثبيط التي تظهر حول القرص المشبع بالمضاد الحيوي وتكون النتيجة إما حساس أو متوسط الحساسية أو مقاوم، وهذه الطريقة غير مكلفة نسبياً وسهلة الإستخدام وشائعة في علم الجراثيم، فضلاً عن سماحها بإختيار العديد من المركبات المضادة للجراثيم أو المضادات الحيوية في نفس الوقت (Klement et al., 2005)، والطريقة الثانية هي طريقة الإنتشار في الاكار أو المرق، وتسمح هذه الطريقة بتحديد الحد الأدنى من التركيز المثبّط (Minimum Inhibitory Concentration (MIC) لكائن حي معين لمضاد جرثومي معين، ويعد العلماء هذه الطريقة كمعيار ذهبي لإختيار الحساسية (Lamy et al., 2004, Klement et al., 2005).

12-2 : فحص القابلية على انتاج الاغشية الحيوية Biofilm production assay :

الأغشية الحيوية عبارة عن مواد خارجية لزجة تُسبب إلتصاق الكائنات الحية الدقيقة بأسطح الخلايا المضيفة أو الأسطح غير الحية مثل الأجهزة الطبية التي تُسبب مقاومة مضادات الجراثيم، نظراً لمحتوياتها الجزيئية مثل (Environmental DNA (eDNA والإنزيمات الخارجية β -lactamase والسّموم وما إلى ذلك (Myckatyn et al., 2016).

كشفت الدراسات الكيميائية والفيزيائية أنّ الجراثيم الموجودة في هذه الأغشية الحيوية تختلف إختلافاً كبيراً عن نظيراتها حرة المعيشة free-living bacteria، تُشكل الخلايا داخل الأغشية الحيوية هياكل ثلاثية الأبعاد معقدة تتكون من مستعمرات دقيقة مغلقة بالسكريات الخارجية (Costerton, 1995). هناك عدّة طرائق معتمدة للكشف عن قابلية الجراثيم لإنتاج الاغشية الحيوية وتتضمن: طريقة الصفيحة العيارية (TCPM) Tissue Culture Plate method (Fusco et al., 2017) وطريقة الأنبوب (Tube method) (Christensen et al., 1982) وطريقة اكار الكنغو الأحمر Congo Red Agar

Modified (Freeman *et al.*, 1989) method (CRA) وطريقة اكار الكنغو الأحمر المحوّرة (Mariana *et al.*, 2009) Congo Red Agar method (MCRA).

2-13: العلاقة بين مقاومة المضادات الحيوية وإنتاج الأغشية الحيوية :

من أهم التحديات المرتبطة بعلاج الحالات المرضية ظهور وانتشار سلالات جرثومية مقاومة للمضادات الحيوية المتعدّدة (MDR)، وذلك بسبب عدد كبير من آليات المقاومة المختلفة التي تحد من البدائل العلاجية (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018)، وفي هذا الصدد فقد تمّ تسجيل مستويات عالية من المقاومة للمضادات الحيوية في الجراثيم السالبة لصبغة كرام في المناطق التي لم يتمّ فيها فرض قيود على استخدامها (Garau, 2006)، ومن ما يُفاقم آليات المقاومة هذه أيضاً هو إنتاج الأغشية الحيوية، وهو تحدّ ذاته يُعدّ مصدر قلقٍ رئيسي آخر يُسهم في الفشل العلاجي (Jamal *et al.*, 2018). تسمّح الأغشية الحيوية للجراثيم بالتعلّق بالعديد من البيئات غير الحية والحيوية، وتوفّر لها الحماية من الظروف البيئية القاسية والعوامل الضارة، مثل المضادات الحيوية (Wu *et al.*, 2015)، وتبقى مشكلة القضاء على مسببات المرضية المنتجة والمتضمنة في الأغشية الحيوية في الجسم الحي مصدر قلق كبير، إذ لا توجد أدوية محدّدة للقضاء على هذه الجراثيم التي تمتلك مقاومة لأنواع معينة من المضادات الحيوية وتتواجد داخل الغشاء الحيوي، ولاسيما في الحالات المرضية (Verderosa *et al.*, 2019).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

1-3: المواد

1-1-3: الأجهزة والمعدات

الجدول 1-3 : الأجهزة والمعدات المستخدمة في الدراسة

الشركة (المنشأ)	الأجهزة والمعدات	ت
Hirayama (Japan)	Autoclave	1 مؤصدة
ADAM (USA)	Electronic Balance	2 ميزان الكتروني حساس
Memmert (Germany)	Incubator	3 حاضنة
4 Lab Tech (Denmark)	Laminar Air Flow(Hood)	4 كابينة الزرع الجرثومي
Local market	Clean Bench	5 كابينة تحضير مزيج تفاعل البلورة
VESTEL (Turkey)	Refrigerator	6 ثلاجة (4م)
Profilo (Turkey)	Deep Freezer	7 مجمدة عمودية (-20م)
ARCTIKO (Germany)	Deep Freezer	8 مجمدة عمودية (-86م)
Elektro.Mag (Turkey)	Water Distiller	9 جهاز التقطير
RLABINCO (Germany)	Magnetic stirrer	10 محرض مغناطيسي
Hanna (India)	pH Meter	11 جهاز قياس الاس الهيدروجيني
Memmert (Germany)	Water Bath	12 حمام مائي
KRUSS (Germany)	Microscope	13 مجهر ضوئي
Nüve (Turkey)	Centrifuge	14 جهاز طرد مركزي
Eppendorf (Germany)	Microcentrifuge	15 جهاز طرد مركزي دقيق
Biometra (Germany)	Thermocycler	16 المُبلِّم الحراري
Biometra (Germany)	Gel electrophoresis	17 جهاز الترحيل الكهربائي
Biometra (Germany)	UV Transilluminator	18 جهاز قراءة الهلام
DRAGON LAB(Germany)	Vortex	19 المازج
BOMANN (Turkey)	Microwave	20 مايكرويف

Himedia (India)	Standard Wire Loop	ناقلة الزرع	21
OEM(China)	Disposable Loop	ناقلة زرع بلاستيكية	22
Gilson (French)	Microliter Pipettes	ماصات دقيقة	23
OEM (China)	Disposable Petri Dishes	اطباق بتري	24
Biozek (Netherlands)	Sterilized Cotton Swabs	مسحات قطنية معقمة	25
OEM (China)	Tips	رؤوس الماصات (أحجام مختلفة)	26
OEM (China)	Microscopic Slides	شرائح زجاجية	27
Citoglass (China)	Glass Test Tubes	أنابيب اختبار زجاجية	28
OEM (China)	Plastic Test Tubes	أنابيب اختبار بلاستيكية	29
OEM (China)	Disposable Syringes	حقن طبية	30
Geneaid (Taiwan)	PCR Tubes 0.2ml	أنابيب تفاعل البلمرة المتسلسل	31
Geneaid (Taiwan)	Eppendorf Tubes 1.5 ml	أنابيب إيندروف	32
OEM (China)	Sterile Cotton	قطن معقم	33
Citoglass (China)	Conical Flask	دورق مخروطي (أحجام مختلفة)	34
Citoglass (China)	Beaker	دورق زجاجي	35
Citoglass (China)	Graduated Cylinder	إسطوانة مدرجة	36
Citoglass (China)	Watch Glass	زجاجة ساعة	37
OEM (China)	Filter Paper	ورق ترشيح	38
Citoglass (China)	Funnels	اقماع زجاجية	39

2-1-3: المواد الكيميائية

الجدول 2-3 : المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة

الشركة (المنشأ)	المواد الكيميائية	التسلسل	
NPL (India)	Hydrogen Peroxide	بيروكسيد الهيدروجين	1
Chem-Lab (Belgium)	Ethanol	كحول ايثيلي (70%)	2
BDH (England)	Absolut Ethanol	كحول ايثيلي مطلق (99,5%)	3
Dlchem (China)	Paraffin Wax	شمع البارافين	4
Sunway (China)	Glucose	كلوكوز	5
BDH (England)	Glycerol	كليسيرول	6
Carlroth (Germany)	Tris-(hydroxymethyl)Aminomethane	ترس-(هيدروكسي مثيل) أمينو ميثان	7
Merck (Germany)	Boric Acid	حامض البوريك	8
Merck (Germany)	EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)		9

Promega, USA	Agarose	الأكاروز	10
Bioneer (Korea)	Deionized Sterile D.W	ماء منزوع الأيونات	11
BioBasic(Canada)	Ethidium Bromide	إيثيديوم برومايد	12
Bioanalyse (Turkey)	Oxidase Strips	شرائط اختبار الأوكسيديز	13
ThermoFisher (UK)	Kovac's Reagent	كاشف كوفاكس	14
ThermoFisher (UK)	α -Naphthol	محلول الفا-نفثول	15
BBL (UK)	Potassium Hydroxide	هيدروكسيد البوتاسيوم	16
Atom scientific (UK)	Gram Stain	صبغة كرام	17
Glentham (UK)	Methyl Red Indicator	كاشف المثيل الأحمر	18
Carloth (Germany)	Cedar Oil	زيت العدسات	19
CotexChem (China)	K_2HPO_4	فوسفات ثنائي البوتاسيوم	20
Bioanalyse (Turkey)	Antibiotics Sensitivity Discs	أقراص المضادات الحيوية	21

3-1-3: الأوساط الزرعية والكيميائية الحيوية

الجدول 3-3 : الأوساط الزرعية والكيميائية الحيوية المستخدمة في الدراسة

الشركة (المنشأ)	الأوساط الزرعية والكيميائية الحيوية	ت
Himedia (India)	Eosin Methylene Blue (EMB) Agar	1
Oxoid (England)	MacConky Agar	2
Oxoid (England)	Brilliance E. coli/ Coliform Agar	3
Himedia (India)	Congo Red Stain	4
NEOGEN (USA)	Brain Heart Infusion Broth	5
Merck (Germany)	Agar Agar	6
LABM™ (UK)	Peptone Water	7
Himedia (India)	Nutrient Broth	8
Oxoid (England)	Triple Sugar Iron (TSI) Agar	9
Himedia (India)	Simmons Citrate Agar	10
Oxoid (England)	Muller-Hinton Agar	11

4-1-3: المحاليل الخاصة لإستخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين وتفاعل البلمرة المتسلسل PCR :

الجدول 4-3 : المحاليل الخاصة لإستخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين وتفاعل البلمرة المتسلسل المُستخدمة في الدراسة

ت	العدة	المكونات	الشركة (المنشأ)
1	الدليل الحجمي (100-1000) زوج قاعدة	Ladder	Promega (USA)
2	صبغة التحميل	Loading Dye	BioBasic (Canada)
3	عدة إستخلاص الحامض النووي presto™ mini gDNA bacteria kit	- GT Buffer 30 ml - GB Buffer 40 ml - W1 Buffer 45 ml - Wash Buffer 100 ml with Ethanol - Elution Buffer 30 ml - Proteinase K 1.1 with deionized sterile Distilled Water - GD Columns 100 pcs - 2ml Collection Tubes 200 pcs	Geneaid (Taiwan)
4	عدة مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل Master Mix	- Taq DNA Polymerase - Reaction Buffer (pH 8.5) - dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) - MgCl2 Stabilizer and Tracking Dye (Loading Dye) Nuclease-Free Water	Promega (USA)

2-3: طرائق العمل Methods :

1-2-3: جمع العينات Sampling :

جُمِعَتْ 400 عينة من خمس مناطق مُختلفة وبصورة عشوائية تمثل بعض مراكز وتجمعات الأغنام في محافظة نينوى شملت الكسر والسَّلامية والدرناج وكوكجلي والعبَّاسية (الشكل 1-3) (كان نظام التربية في مناطق الكسر والسَّلامية من النوع المفتوح وكوكجلي والعبَّاسية بالنظام شبه المفتوح ولقريَّة الدرنج بالنظام المغلق) خلال المُدَّة من 2022/2/26 ولغاية 2022/4/26، تُوَزَّعَتْ العينات بين 50 عَيَّةة لكل من الحليب والبراز للأغنام المُرضِعة والأعلاف الجافة والحشائش الخضراء من الحُقُول والماء والأرضية و 50 مُسحَّة لكل من أفواه الحملان الرُّضِيعَة وأيدي العاملين، جُمِعَتْ عَيَّات الحليب والبراز والأعلاف الجافة والحشائش الخضراء والأرضية والماء في غُلب بلاستيكية مُعقَّمة وأُغْلِقَتْ بإحكام في حين وُضِعَتْ عَيَّات المُسحات في أنابيب إختبار تحتوي على مرق ماء البيتون وُوضِعَتْ في حاوية مُبرَّدة ونُقِلَتْ إلى مُختبرات الصحة العامة البيطرية في كلية الطب البيطري / جامعة الموصل لإجراء الإختبارات الجرثومية عليها.



شكل 1-3: مناطق الدِّراسة في محافظة نينوى

2-2-3: تحضير الأوساط الزَّرعية : Preparation of Culture Media**1-2-2-3: وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق Eosin Methylene Blue (EMB) Agar**

وُزِنَ 28 غراماً من الوسط ووضع في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقطر حسب تعليمات الشركة المُصنِّعة ثُمَّ عُقِّمَ بجهاز التعقيم (المؤسدة) بدرجة حرارة 121°م وضغط 1.5 جو لِمُدَّة 15 دقيقة. بعدها ترك الوسط ليبرد بدرجة حرارة 45-50°م، ثم صُبَّ الوسط بعد ذلك في أطباق بتري البلاستيكية والمعقمة، بعدها حُفِظَتْ الأطباق في الثلاجة بدرجة 4°م لحين الإستخدام.

2-2-2-3: وسط الماكونكي MacConkey Agar

وُزِنَ 51.5 غراماً من الوسط ووضع في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقطر حسب تعليمات الشركة المُصنِّعة ثُمَّ عُقِّمَ بجهاز التَّعْطِيم (المؤسدة) بدرجة حرارة 121°م وضغط 1.5 جو لِمُدَّة 15 دقيقة. بعدها تُرِكَ الوسط ليبرد بِدَرَجَة حرارة 45-50°م، ثُمَّ صُبَّ الوسط بعد ذلك في أطباق بتري البلاستيكية والمُعَقَّمَة، بعدها حُفِظَتْ الأطباق في الثَّلَاجَة بدرجة 4°م لحين الإستخدام.

3-2-2-3: وسط المتألق الإنتخابي للإشريكية القولونية Brilliance™ E.coli Coliform Selective Agar

وُزِنَ 28 غراماً من الوسط ووضع في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقطر حسب تعليمات الشركة المُصنِّعة ثُمَّ عُقِّمَ بجهاز التعقيم (المؤسدة) بدرجة حرارة 121°م وضغط 1.5 جو لِمُدَّة 15 دقيقة. بعدها تُرِكَ الوسط ليبرد بدرجة حرارة 45-50°م، ثُمَّ صُبَّ الوسط بعد ذلك في أطباق بتري البلاستيكية والمُعَقَّمَة، بعدها حُفِظَتْ الأطباق في الثلاجة بدرجة 4°م لحين الإستخدام.

4-2-2-3: وسط مولر هينتون Muller Hinton Agar

وُزِنَ 38 غراماً من الوسط ووضع في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقطر حسب تعليمات الشركة المُصنِّعة ثُمَّ عُقِّمَ بجهاز التعقيم (المؤسدة) بدرجة حرارة 121°م وضغط 1.5 جو لِمُدَّة 15 دقيقة. بعدها تُرِكَ الوسط ليبرد بدرجة حرارة 45-50°م، ثم صُبَّ الوسط بعد ذلك في أطباق بتري البلاستيكية والمُعَقَّمَة، بعدها حُفِظَتْ الأطباق في الثلاجة بدرجة 4°م لحين الإستخدام.

3-2-2-5: وسط الكونغو الأحمر (CRA) Congo Red Agar :

حُضِرَ الوسط حسب الخُطوات الآتية (Freeman *et al.*, 1989):

1. المَحْلُول (أ) : وُزِنَ 37 غراماً من مَرَق تَسْرِيْب الدماغ والقلب (BHIB) مع 50 غراماً من السُكْرُوز مع 20 غراماً من الأكار آكار ووضعوا في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقَطَّر.
2. المَحْلُول (ب) : وُزِنَتْ 8 غرامات من صبغة الكونغو الحمراء وَوُضِعَتْ في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقَطَّر حسب تعليمات الشَّرْكَة المُصَنِّعة .
3. عَقِّمَ المَحْلُولان بجهاز التَّعْطِيم (المؤسدة) بدرجة حرارة 121°م وضغَط 1.5 جو لِمُدَّة 15 دقيقة.
4. أُضِيفَ المَحْلُول (ب) إلى المَحْلُول (أ) ومُزَجاً جيداً، بعدها تُرِكَ الوسط لِيَبْرُدَ بدرجة حرارة 45-50°م ، ثُمَّ صُبَّ الوسط بعد ذلك في أطباق بتري البلاستيكية والمُعَقَّمة، بعدها حُفِظَتْ الأطباق في الثلاجة بدرجة 4°م لحين الإِسْتِخْدَام.

3-2-2-6: وسط سترات سايمون Simmons Citrate Agar :

وُزِنَ 25 غراماً من الوسط ووضع في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقَطَّر حسب تعليمات الشَّرْكَة المُصَنِّعة وَوُزِعَ في أنابيب إختبار بلاستيكية مُقاومة للحرارة بسعة 2 مل لكل انبوبة، ثُمَّ عَقِّمَ بالمؤسدة وتُرِكَ الوسط بصورة مائِلة لِيَبْرُدَ وَحُفِظَ بالثلاجة لحين الإِسْتِخْدَام.

3-2-2-7: وسط إختبار ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron (TSI) Agar :

وُزِنَ 65 غراماً من الوسط ووضع في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقَطَّر حسب تعليمات الشَّرْكَة المُصَنِّعة وَوُزِعَ في أنابيب إختبار بلاستيكية مُقاومة للحرارة سعة 3 مل لكل انبوبة، ثُمَّ عَقِّمَ بالمؤسدة وتُرِكَ الوسط بصورة مائِلة لِيَبْرُدَ وَحُفِظَ بالثلاجة لحين الإِسْتِخْدَام.

3-2-2-8: مَرَق ماء الببتون Peptone Water :

وُزِنَ 15 غراماً من الوسط ووضع في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المُقَطَّر حسب تعليمات الشَّرْكَة المُصَنِّعة وَوُزِعَ في أنابيب إختبار بلاستيكية مُقاومة للحرارة سعة 3 مل لكل انبوبة،

تُثَمَّ عَقْمَ بالمؤصدة وحُفِظَ بالثلاجة لحين الإستعمال، وأُسْتَعْمِلَ في جَمع العينات وفي الإختبارات الكيميائية الحَيَوِيَّة.

9-2-2-3: المَرَقَ المُغْذِي مع الجليسيرين *Nutrient Broth with Glycerin* :

وُزِنَ 25 غراماً من الوسط ووضع في دورق زجاجي وأُكْمِلَ الحجم إلى 750 مل بالماء المُقَطَّر وأُضِيفَ إليه 250 مل من الجليسيرين ومُزَجَّ جيداً حسب تعليمات الشَّرْكَة المُصنِّعة وُوزِعَ في أنابيب إيبندروف بلاستيكية مُقاومة للحرارة سعة 1 مل لكل انبوبة، تُثَمَّ عَقْمَ بالمؤصدة وحُفِظَ بالثلاجة لحين الإستعمال، وأُسْتَعْمِلَ لِنَشِيطِ العُزلات وتَجْدِيدِها (الجِفظ المُجمَّدة طَوِيل الأمد للمزارع الجُرثومية) ونَقَلها إلى وسط آخر.

3-2-3: الصبغات (صبغة كرام) *Gram's Stain* :

أُسْتُخْدِمَت صبغة كرام المُصنِّعة من شركة Atom Scientific, UK لملاحظة الوان وأشكال وترتيب الخلايا الجُرثومية وتفاعلها مع الصبغة (موجبة أو سالبة) (Levison *et al.*, 2016).

4-2-3: مُعاملة العينات والعزل الجُرثومي:

1-4-2-3: عينات الحليب :

رُجِبَت العُلبَة الحاوية على عَيِّنَة الحليب بهدوء وأُخِذَت عُرْوَة واحدة بالنَّاقِلة الجُرثومية (Loop) من الحليب ونُشِرَت على وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق وحُضِنَ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة، وبعد الحُضن لوحِظَت المُستعمَرات الجُرثومية النامية، بعد ذلك تَمَّ أخذ وتنقية مُستعمَرات جراثيم الإشيريكي القولونية التي تتميز بظاهرة البريق المعدني وأُهْمِلَت باقي الجراثيم وحُوِّلَت إلى أطباق أخرى من وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق ووسط الماكونكي ووسط المُتألق الإِنْتِخابي الخَاص بجراثيم الإشيريكي القولونية، وحُضِنَت بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة (McFarland *et al.*, 2000).

2-4-2-3: عينات البراز :

رُجِبَت العُلبَة الحاوية على عَيِّنَة البراز بهدوء بعد إضافة مَرَق ماء البيبتون إليها وأُخِذَت عُرْوَة واحدة بالنَّاقِلة الجُرثومية من المحلول ونُشِرَت على وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق وحُضِنَ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة، وبعد الحُضن لوحِظَت المُستعمَرات الجُرثومية النامية، بعد ذلك تَمَّ أخذ وتنقية مُستعمَرات جراثيم الإشيريكي القولونية التي تتميز بظاهرة البريق المعدني وأُهْمِلَت باقي الجراثيم وحُوِّلَت

إلى أطباق أخرى من وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق ووسط الماكونكي ووسط المُتَأَلَقِ الْإِنْتِخَابِي الْخَاصِ بِجراثيم الإِشِيرِيكِيَا الْقَوْلُونِيَّةِ، وَخُضِنَتْ بِدَرَجَةِ حَرَارَةِ 37 م° لِمُدَّةِ 24 سَاعَةٍ (Persson *et al.*, 2007).

3-4-2-3: عينات الأرضية :

رُجِنَتْ الْعَلْبَةُ الْحَاوِيَّةُ عَلَى عَيِّنَةِ الْأَرْضِيَّةِ بِهَدْوٍ بَعْدَ إِضَافَةِ مَرَقِ مَاءِ الْبِيْبِتُونِ إِلَيْهَا وَأُخِذَتْ عُرْوَةٌ وَاحِدَةٌ بِالنَّاقِلَةِ الْجُرْثُومِيَّةِ مِنَ الْمَحْلُولِ وَنُشِرَتْ عَلَى وَسْطِ الْإِيُوسِيْنِ وَالْمَثِيلِيْنِ الْأَزْرَقِ وَخُضِنَ بِدَرَجَةِ حَرَارَةِ 37 م° لِمُدَّةِ 24 سَاعَةٍ، وَبَعْدَ الْحَضْنِ لَوْحِظَتْ الْمُسْتَعْمَرَاتُ الْجُرْثُومِيَّةُ النَّامِيَّةُ، بَعْدَ ذَلِكَ تَمَّ اخْذُ وَتَنْقِيَةُ مُسْتَعْمَرَاتِ جِرَاثِيمِ الْإِشِيرِيكِيَا الْقَوْلُونِيَّةِ الَّتِي تَتَمَيَّزُ بِظَاهِرَةِ الْبَرِيْقِ الْمَعْدِنِيِّ وَأَهْمِلَتْ بَاقِي الْجِرَاثِيمِ وَحُوِّلَتْ إِلَى أَطْبَاقٍ أُخْرَى مِنْ وَسْطِ الْإِيُوسِيْنِ وَالْمَثِيلِيْنِ الْأَزْرَقِ وَوَسْطِ الْمَاكُونِكِيِّ وَوَسْطِ الْمُتَأَلَقِ الْإِنْتِخَابِيِّ الْخَاصِ بِجِرَاثِيمِ الْإِشِيرِيكِيَا الْقَوْلُونِيَّةِ، وَخُضِنَتْ بِدَرَجَةِ حَرَارَةِ 37 م° لِمُدَّةِ 24 سَاعَةٍ (Astorga *et al.*, 2019).

3-4-2-3: عينات الأعلاف الجافة :

رُجِنَتْ الْعَلْبَةُ الْحَاوِيَّةُ عَلَى عَيِّنَةِ الْأَعْلَافِ مِنْ مَعَالِفِ الْأَغْنَامِ الْجَافَةِ بِهَدْوٍ بَعْدَ إِضَافَةِ مَرَقِ مَاءِ الْبِيْبِتُونِ إِلَيْهَا وَأُخِذَتْ عُرْوَةٌ وَاحِدَةٌ بِالنَّاقِلَةِ الْجُرْثُومِيَّةِ مِنَ الْمَحْلُولِ وَنُشِرَتْ عَلَى وَسْطِ الْإِيُوسِيْنِ وَالْمَثِيلِيْنِ الْأَزْرَقِ وَخُضِنَ بِدَرَجَةِ حَرَارَةِ 37 م° لِمُدَّةِ 24 سَاعَةٍ، وَبَعْدَ الْحَضْنِ لَوْحِظَتْ الْمُسْتَعْمَرَاتُ الْجُرْثُومِيَّةُ النَّامِيَّةُ، بَعْدَ ذَلِكَ تَمَّ اخْذُ وَتَنْقِيَةُ مُسْتَعْمَرَاتِ جِرَاثِيمِ الْإِشِيرِيكِيَا الْقَوْلُونِيَّةِ الَّتِي تَتَمَيَّزُ بِظَاهِرَةِ الْبَرِيْقِ الْمَعْدِنِيِّ وَأَهْمِلَتْ بَاقِي الْجِرَاثِيمِ وَحُوِّلَتْ إِلَى أَطْبَاقٍ أُخْرَى مِنْ وَسْطِ الْإِيُوسِيْنِ وَالْمَثِيلِيْنِ الْأَزْرَقِ وَوَسْطِ الْمَاكُونِكِيِّ وَوَسْطِ الْمُتَأَلَقِ الْإِنْتِخَابِيِّ الْخَاصِ بِجِرَاثِيمِ الْإِشِيرِيكِيَا الْقَوْلُونِيَّةِ، وَخُضِنَتْ بِدَرَجَةِ حَرَارَةِ 37 م° لِمُدَّةِ 24 سَاعَةٍ (Nemser *et al.*, 2014).

3-4-2-3: عينات الحشائش الخضراء :

رُجِنَتْ الْعَلْبَةُ الْحَاوِيَّةُ عَلَى عَيِّنَةِ الْحَشَائِشِ الْخَضْرَاءِ بِهَدْوٍ بَعْدَ إِضَافَةِ مَرَقِ مَاءِ الْبِيْبِتُونِ إِلَيْهَا وَأُخِذَتْ عُرْوَةٌ وَاحِدَةٌ بِالنَّاقِلَةِ الْجُرْثُومِيَّةِ مِنَ الْمَحْلُولِ وَنُشِرَتْ عَلَى وَسْطِ الْإِيُوسِيْنِ وَالْمَثِيلِيْنِ الْأَزْرَقِ وَخُضِنَ بِدَرَجَةِ حَرَارَةِ 37 م° لِمُدَّةِ 24 سَاعَةٍ، وَبَعْدَ الْحَضْنِ لَوْحِظَتْ الْمُسْتَعْمَرَاتُ الْجُرْثُومِيَّةُ النَّامِيَّةُ، بَعْدَ ذَلِكَ تَمَّ اخْذُ وَتَنْقِيَةُ مُسْتَعْمَرَاتِ جِرَاثِيمِ الْإِشِيرِيكِيَا الْقَوْلُونِيَّةِ الَّتِي تَتَمَيَّزُ بِظَاهِرَةِ الْبَرِيْقِ الْمَعْدِنِيِّ وَأَهْمِلَتْ بَاقِي الْجِرَاثِيمِ وَحُوِّلَتْ إِلَى أَطْبَاقٍ أُخْرَى مِنْ وَسْطِ الْإِيُوسِيْنِ وَالْمَثِيلِيْنِ الْأَزْرَقِ وَوَسْطِ الْمَاكُونِكِيِّ وَوَسْطِ الْمُتَأَلَقِ الْإِنْتِخَابِيِّ

الخاص بجراثيم الإشيريكيا القولونية، وحُصِنَتْ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة (Ogden *et al.*, 2001).

3-2-4-6: عينات الماء :

رُجِنَتْ العُلبَة الحاوية على عَيِّنَة الماء بهدوء وأُخِذَتْ نَقْلَة عُرْوَة بالنَّاقِلَة الجُرثومية من المحلول ونُشِرَتْ على وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق وحُصِنَ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة، وبعد الحضانة لوحِظَتْ المُستعمَرات الجرثومية النامية، بعد ذلك تَمَّ أخذ وتنقية مُستعمَرات جراثيم الإشيريكيا القولونية التي تتميز بظاهرة البريق المعدني وأهملت باقي الجراثيم وحُوِّلَتْ إلى أطباق أخرى من وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق ووسط الماكونكي ووسط المُتألق الإنتخابي الخاص بجراثيم الإشيريكيا القولونية، وحُصِنَتْ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة (Pope *et al.*, 2003).

3-2-4-7: مسحات ايدي العاملين :

رُجِنَتْ الأنابيب الحاوية على المُسحات المأخوذة من أيدي العاملين بعد بهدوء وأُخِذَتْ عُرْوَة واحدة بالنَّاقِلَة الجُرثومية من المحلول ونُشِرَتْ على وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق وحُصِنَ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة، وبعد الحضانة لوحِظَتْ المُستعمَرات الجرثومية النامية، بعد ذلك تَمَّ أخذ وتنقية مُستعمَرات جراثيم الإشيريكيا القولونية التي تتميز بظاهرة البريق المعدني وأهملت باقي الجراثيم وحُوِّلَتْ إلى أطباق أخرى من وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق ووسط الماكونكي ووسط المُتألق الإنتخابي الخاص بجراثيم الإشيريكيا القولونية، وحُصِنَتْ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة (Sebsibe and Asfaw, 2020).

3-2-4-8: مسحات الفم للحملان الرضيعة :

رُجِنَتْ الأنابيب الحاوية على المُسحات المأخوذة من أفواه الحملان الرضيعة بهدوء وأُخِذَتْ عُرْوَة واحدة بالنَّاقِلَة الجُرثومية من المحلول ونُشِرَتْ على وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق وحُصِنَ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة، وبعد الحضانة لوحِظَتْ المستعمَرات الجرثومية النامية، بعد ذلك تَمَّ أخذ وتنقية مُستعمَرات جراثيم الإشيريكيا القولونية التي تتميز بظاهرة البريق المعدني وأهملت باقي الجراثيم وحُوِّلَتْ إلى أطباق أخرى من وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق ووسط الماكونكي ووسط المُتألق الإنتخابي الخاص بجراثيم الإشيريكيا القولونية، وحُصِنَتْ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة (Sebsibe and Asfaw, 2020).

5-2-3: توصيف الجرثومة Bacterial characterization :

شُخِّصَتِ المُسْتَعْمَرَاتُ الجرثومية إِعْتِمَاداً عَلَى مَا يَأْتِي:

1-5-2-3: الخصائص المظهرية Phenotypic characterization :

دُرِسَتْ الصِّفَاتُ المَظْهَرِيَّةُ لِلْمُسْتَعْمَرَاتِ النَّامِيَةِ عَلَى وَسْطِ الإِيوسِينِ وَالمِثْلِينِ الأزرقِ وَوَسْطِ الماكونكي وَوَسْطِ المَنَاقِلِ، وَلَوْحِطَّتْ أَشْكَالُهَا وَأَلْوَانُهَا وَقَوَامُهَا، وَتَخَمَّرَ سُكَّرُ المَلَكَتُوزِ عَلَى وَسْطِ الماكونكي.

2-5-2-3: الخصائص المجهرية Microscopic characterization :

فُحِّصَتِ العَيِّنَاتُ بِأَخْذِ مُسْحَةٍ مِنَ المُسْتَعْمَرَاتِ الجرثومية النَّامِيَةِ عَلَى الأوساطِ الزرعِيَّةِ وَتَثْبِيئِهَا وَصِبْغِهَا بِصِبْغَةِ كرامٍ لِمَلاحِظَةِ أَشْكَالِ وَتَرْتِيبِ الخَلايا الجرثومية وَتفاعِليها مَعَ الصِبْغَةِ.

6-2-3: الإختبارات الكيميائية الحيويّة Biochemical tests :**1-6-2-3: إختبار الإندول Indole test :**

أُجْرِيَ الإِخْتِبَارُ بِتَلْقِيحِ أنابيبِ تحوي على 3 مل من مرق ماء البيبتون Peptone water بالمُسْتَعْمَرَاتِ النَّقِيَّةِ المُرَادِ إِخْتِبَارِهَا، وَحُضِنَتْ بِدَرَجَةِ حرارة 37 م° لِمُدَّةِ 24 ساعة، ثُمَّ أُصِيفَتْ 3-6 قطرات من كاشف Kovac's Reagent. تَكُونُ حلقة حمراء أرجوانية أعلى المرق يَدُلُّ عَلَى إيجابية الإِخْتِبَارِ (Borkar, 2017).

2-6-2-3: إختبار المثيل الأحمر Methyl Red test :

أُفْحِثَ الأنابيبِ الحاوية على مرق ماء البيبتون والكلوكوز وفوسفات ثنائي البوتاسيوم بالمُسْتَعْمَرَاتِ النَّقِيَّةِ المُرَادِ إِخْتِبَارِهَا، حُضِنَتْ الأنابيبِ بِدَرَجَةِ حرارة 37 م° لِمُدَّةِ 24 ساعة، ثُمَّ أُصِيفَتْ 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر. إِنَّ ظَهْوَ اللونِ الأحمرِ يُعَدُّ دَلِيلًا عَلَى النَتِيجَةِ موجبة، أَمَّا بقاء اللونِ الأصفر فيعني عدم قُدرة الجراثيم على إنتاج الحامض بكمية كافية لخفض الدالة الحامضية إلى 4.5 (McDevitt, 2009).

3-6-2-3: إختبار فوكس بروسكاور Voges-Proskauer test :

أُفْحِثَ الأنابيبِ الحاوية على وسط ماء البيبتون بالمُسْتَعْمَرَاتِ النَّقِيَّةِ المُرَادِ إِخْتِبَارِهَا، حُضِنَتْ الأنابيبِ بِدَرَجَةِ حرارة 37 م° لِمُدَّةِ 24 ساعة، أُصِيفَتْ 4 قطرات من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم

وقطرتين من محلول ألفا - نفثول الى الأنابيب، رُجَّتْ الأنابيب لِمُدَّة 10 ثواني ، ظُهور اللون الأصفر البني دليل على سلبية الإختبار (Borkar, 2017).

4-6-2-3: إختبار استهلاك السترات Citrate Utilization test :

أُفِحَّت موائِل من الوسط بعزلات نقيّة من الجراثيم ، وُحِضِنَتْ الانابيب في درجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة ، إنَّ بقاء لون الوسط أخضر دلالة على عدم قدرة الجراثيم على إستهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون (MacFaddin, 2000) .

5-6-2-3: إختبار النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron (TSI) Agar :

أُفِحَّت موائِل من الوسط بعزلات نقيّة من الجراثيم، وُحِضِنَتْ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة، إنَّ تَغْيِير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر وتكوين غاز CO₂ أسفل الوسط الذي يدفع الوسط للأعلى يَدُلُّ على إيجابية الإختبار (MacFaddin, 2000).

6-6-2-3: إختبار الأوكسيديز Oxidase test :

إِسْتَعْمِلْتِ شَرَائِطَ إختبار جاهزة، نُقِلَت المُستعمرات النقيّة المُراد إختبارها إلى الشريط. إنَّ تَغْيِير لون الشريط إلى اللون الارجواني الغامق خلال ثواني يُعدُّ دليلاً على إنتاج الإنزيم وإيجابية الإختبار وعدم تَغْيِير اللون دليل على سلبية الإختبار (Brown and Smith, 2014).

7-6-2-3: إختبار الكتاليز Catalase test :

أُجْرِيَ الإختبار بِوَضْع قَطْرَة من محلول بيروكسيد الهيدروجين على شريحة زُجاجية نظيفة، ثُمَّ نُقِلَت إليها مُستعمرات نقيّة بواسطة حَلَقَة الزَّرْع، ظُهور الفُفَاعَات الغازية خلال ثوان يَدُلُّ على إنتاج الإنزيم وإيجابية الإختبار (Brown and Smith, 2014).

7-2-3: إستخدام نظام فايتهك 2 Vitek2 system :

أُجْرِيَ الإختبار في مُخْتَبَر الدكتور رضوان الجماس في حي البريد في مدينة الموصل وحسب تعليمات شركة bioMérieux, Inc المُصنِّعة للجهاز وكما يأتي:

1. عُلِقَت المُستعمرات النقيّة للجُرثومة في 3 مل من المَحلول المِلحي الخاص بالجهاز (0,45%).

2. تمّ تصفير جهاز قياس العُكُورَة باستخدام أنبوب حاوي على المَحلول المِلحي فقط ثمّ عُيرتْ إِمْتِصَاصِيَة العالق الجُرثومي للحُصُول على إِمْتِصَاصِيَة تتراوح بين (0,5-0,63).
3. وُضِعَتْ الأنبوبة في الحامل وُوضِعَتْ البطاقة المُخَصَّصَة للتشخيص إلى جانبها بحيث عُمرتْ المَاصَّة الشَّعْرِيَة الخَارِجَة من البطاقة في أنبوبة العالق الجُرثومي.
4. شُغِلَ البرنامج الخاص بنظام الجهاز والمُحَمَّل على الحاسب المُرتبُط بالجهاز، ثمّ أُدخِلتْ البيانات الخَاصَّة بالعينة : رقم البطاقة + الرمز الرقمي لكل بطاقة + رقم العينة.
5. بعدها تُوبِعَتْ التعليمات التي أصدرها الجهاز.
6. ظَهَرَتْ نتائج التشخيص بعد 24 ساعة، وُقِرَتْ على شاشة الحاسوب وثَمَّتْ طِبَاعَتُهَا على الورق.

8-2-3: الكشف الجزيئي عن جراثيم الإشيريكيا القولونية :

1-8-2-3: إستخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين (DNA) لجراثيم الإشيريكيا القولونية :

تمّ الإعتماد على عُدَّة التَحْلِيل المُجَهَّزَة من قِبَل شركة Geneaid في إستخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين لجراثيم الإشيريكيا القولونية وكما يأتي :

1. أُخِذَتْ 6-8 مُسْتَعْمَرَاتْ من الجراثيم المُنَمَّاة والمُنَقَّاة على الوسط المتألق بالنَّاقِلَة وُوضِعَتْ في أنابيب إندروف 1,5 مل يحوي كل منها على 250 مايكروليتر من محلول TE، وُخْصِنَتْ الأنابيب بدرجة حرارة 65 م° لِمُدَّة 24 ساعة.
2. أُضِيفَ إليها 180 مايكروليتر من محول GT Buffer ومُزِجَتْ بإستعمال المازج .
3. أُضِيفَ إليها 20 مايكروليتر من إنزيم Proteinase K بتركيز 1.1 ملغم/مل ومُزِجَتْ بإستعمال المازج.
4. خُصِنَتْ الأنابيب بدرجة حرارة 60 م° لِمُدَّة 10 دقائق وقُلبَ الأنبوب كُلُّ 3 دقائق خلال مُدَّة التَحْضِيْن.
5. أُضِيفَ إليها 200 مايكروليتر من المحلول المنظم GB Buffer ومُزِجَتْ بإستعمال المازج وُخْصِنَتْ عند 70 م° لِمُدَّة 10 دقائق.
6. أُضِيفَ إليها 200 مايكروليتر من الإيثانول المطلق ومُزِجَتْ مُباشرةً بإستعمال المازج.
7. نُفِلَ المَزِيج إلى أنابيب الجَمْع Collection tubes المُتَبَّبَتْ عليها أعمدة تَفْرِيج الغاز Gas Discharge Column وُوضِعَتْ في جهاز الطرد المركزي Centrifuge وعُمِلَ طرد

- مركزي بسرعة 14000 دورة بالدقيقة لِمُدَّة دقيقتان، ثُمَّ رُمِيتْ أنابيب الجمع مع الرّاشح، ووضِعَتْ أعمدة تفريغ الغاز في أنابيب جمع جديدة .
8. أُضِيفَ إليها 400 مايكروليتر من مَحلول الغَسَلِ الأول W1 Buffer وَوَضِعَتْ في جهاز الطَّرْدِ المركزي وَعَمَلَ طرد مركزي بسرعة 14000 دورة بالدقيقة لِمُدَّة دقيقة، ثُمَّ تُخْلِصَ من الرّاشح وَأَعِيدَتْ أعمدة تفريغ الغاز إلى أنابيب جمع.
9. أُضِيفَ إليها 600 مايكروليتر من مَحلول الغسل الثاني Wash Buffer with Ethanol وإِجْرَاء طرد مركزي عليها بسرعة 14000 دورة بالدقيقة لِمُدَّة دقيقة.
10. نُقِلَتْ أعمدة تفريغ الغاز إلى أنابيب إيندروف 1,5 مل جديدة وَمُعَقَّمَةٌ وَأُضِيفَ إليها 100 مايكروليتر من مَحلول الإذابة TE Buffer، ثُمَّ تُرَكَّتْ لِمُدَّة 3 دقائق للسماح لمحلول الإذابة بالإمتصاص بصورة كاملة، بعدها وَضِعَتْ في جهاز الطرد المركزي وإِجْرَاء طرد مركزي بسرعة 14000 دورة بالدقيقة لِمُدَّة دقيقة لِشُطْفِ الحامض النووي المُسْتَخْلَصِ Extracted DNA.
11. رُقِمَتْ الأنابيب وَكُتِبَتْ عليها مَعْلُومَات العينات وَخُفِضَتْ بدرجة حرارة -20م° لحين الإستعمال.

3-8-2-2: الكشف الجزيئي عن جراثيم الإشيريكية القولونية بالإعتماد على جين *uidA* :

تَمَّ الكَشْفُ عن العُزَلَات الجُرثومية عن طريق تَطْخِيم جين *uidA* في الحامض النووي المُسْتَخْلَصِ للجراثيم كما مَوْضَحَ في الجدول (3-5)، إذ تَمَّ خَلْط الحامض النووي المُسْتَخْلَصِ للجراثيم مع البادئات الخاصّة بالجين و الـ Master mix كما مَوْضَحَ في الجدول (3-6).

الجدول 3-5: بادئات جين *uidA* المُستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل لجراثومة الإشيريكية القولونية

الجين	البادئ	التسلسل	حجم الحزمة (زوج قاعدي)	المصدر
<i>uidA</i>	F	5' CCAAAAGCCAGACAGAGT 3'	623	(Moyo et al., 2007)
	R	5' GCACAGCACZTCAAAGAG 3'		

جدول 3-6 : يوضح مُكوّنات خليط انبوبة تفاعل البلمرة المتسلسل

التركيز	الحجم (µL)	المكونات	ت
-	12.5	المزيج الرئيسي	1
10 Pmol	1	البادئ (F)	2
10 Pmol	1	البادئ (R)	3
-	5.5	ماء خالي من النوكلييز	4
100-25 ng	5	الحامض النووي المُستخلص	5
	25	الحجم الكلي	

بعدها تمّ إدخال إنابيب التفاعل في جهاز المُبلّم الحراري Thermocycler لإجراء التفاعل التضاعفي وباستعمال البرنامج الخاص للتفاعل وكما موضح في الجدول (3-7):

الجدول 3-7 : يوضح برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بجين *uidA*

عدد الدورات No. of cycles	الوقت Time (min.)	درجة الحرارة Temp. °c	الخطوات Steps
1	5	95	مرحلة المسخ الاولي Initial denaturation
35	1	94	مرحلة المسخ Denaturation
	1	57	مرحلة ارتباط البادئات Annealing
	1	72	مرحلة إطالة البادئات Extension
1	5	72	مرحلة إطالة الدنا النهائية Final extension
		4	درجة الحرارة النهائية Hold

3-8-2-3: الكشف الجزيئي عن جينات سُمووم الشيكيا لجراثيم الإشيريكية القولونية :

تمَّ الكَشَف عن جينات سُمووم الشيكيا *Stx1* و *Stx2* عن طريق تَظْخِيم المنطقة في الحَامِض النَّوَوِي المُسْتَخْلَص للجراثيم كما مَوْضَح في الجدول (8-3). وتمَّ خلط الحامض النووي المُسْتَخْلَص للجراثيم مع البادئات والـ Master mix كما في جين *uidA*، (الجدول 6-3).

الجدول 8-3 : بادئات جينات *Stx1* و *Stx2* المُستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل لجراثومة

الإشيريكية القولونية

المصدر	حجم الحزمة (زوج قاعدي)	التسلسل	البادئ	الجين
(Fujioka <i>et al.</i> , 2013)	347	5' AGTTAATGTGGTGGCGAAGG 3'	F	<i>Stx1</i>
		5' CACCAGACAATGTAACCGC 3'	R	
(Fujioka <i>et al.</i> , 2013)	589	5' TTCGGTATCCTATTCCCGG 3'	F	<i>Stx2</i>
		5' CGTCATCGTATACACAGGAG 3'	R	

بعدها تمَّ إدخال أنابيب التفاعل في جهاز المُبَلِّم الحراري Thermocycler لإجراء التفاعل التضاعفي وباستعمال البرنامج الخاص للتفاعل وكما مَوْضَح في الجدول (9-3).

الجدول 9-3 : برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بجينات *Stx1* و *Stx2*

عدد الدورات No. of cycles	الوقت Time (min.)	درجة الحرارة Temp. °c	الخطوات Steps
1	5	95	مرحلة المسخ الاولي Initial denaturation
35	1	94	مرحلة المسخ Denaturation
	1	55	مرحلة ارتباط البادئات Annealing
	1	72	مرحلة إطالة البادئات Extension
1	5	72	مرحلة إطالة الدنا النهائية Final extension
		4	درجة الحرارة النهائية Hold

4-8-2-3: تحضير محلول 10X TBE Buffer Stock :

يكون سائل صافٍ عديم اللون يتكوّن من المواد الآتية (الجدول 10-3):

الجدول 10-3 : يوضح مكونات 10X TBE Buffer

الوزن / الحجم	المكونات	ت
108 g	Tris base (tris-hydroxymethyl-aminomethane)	1
55.5	Boric acid	2
7.5 g	EDTA	3
Add to 1000 ml	Double-distilled H ₂ O	4

خُفِّفَ محلول 10X TBE Buffer Stock بنسبة 10:1 للخُصُولِ على محلول 1X TBE Buffer وأُسْتَعْمِلَ لِتَحْضِيرِ هُلام الأكاروز وفي حوض الترحيل الكهربائي (Electrophoresis tank).

5-8-2-3: الترحيل الكهربائي بالهلام Gel electrophoresis :

التَّرحيل الكهربائي بواسطة هُلام الأكاروز من أهم الخطوات لإكمال الترحيل الكهربائي وتمَّ كما يأتي (Sambrook and Rusell, 2001) :

1. أُذِيبَ 2 غرام من الأكاروز في 100 مل من محلول 1X TBE buffer الدارئ ثمَّ مُزَجَ جيداً وَوُضِعَ في المايكرويف لِمُدَّةِ دقيقتان حتى يُصْبِحَ رائق، ثُمَّ نُقِلَ 25 مل من محلول الهُلام إلى دُورق زُجاجي صغير يحوي على مغناطيس صغير.
2. أُضِيفَ 2 مايكروليتر من الإيثيديوم برومايد إلى محلول الهُلام المُحَضَّر ومُزَجَ بِإِسْتِخْدَامِ المَازَجِ المغناطيسي، ثُمَّ صُبَّ الهُلام في قالب التَّرحيل Tray الخاص بجهاز التَّرحيل والمُنْتَبِثَ عليه المشط Comb في المَوْضِعِ الصَّحِيحِ وَتُرِكَ لِمُدَّةِ 20-30 دقيقة لحين التَّصَلُّبِ، وبعد ذلك أُزِيلَ المشط وَنُقِلَ إلى حَوْضِ جِهَازِ التَّرحيلِ الذي يحوي على محلول 1X TBE buffer الذي تمَّ إِسْتِخْدَامُهُ في تَحْضِيرِ هُلام الأكاروز.
3. حُقِنَ 2 مايكروليتر من صبغة القياس DNA Ladder 100pb في الحُفْرَةَ الثَّانِيَةَ (التي صُمِّمَتْ لِتَحْدِيدِ الوَزنِ الجُزيئيِّ للحمّاض النَّوويِّ من 100-1000 زوج قاعدي)، ولكل صبغة قياس نقطه

- أساس والتي تُمثّل 100 و500 و1000 زوج قاعدي، وتكون هذه النقطة مُضيئة جداً لتسهيل عملية القراءة في حين تُركت الحفرة الأولى للسيطرة السالبة والحفرة الثالثة للسيطرة الموجبة.
4. حُقِنَ 4-6 مايكروليتر من ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل للغلزلات في الحُفَر المُتَبَقِيَّة.
5. شُغِلَ جهاز التَّرحيل بطاقة 60 فولت لِمُدَّة 60 دقيقة، وبعدها نُقِلَ الهلام الى جهاز UV transilluminator لِمُشاهدة حُرْم الحامض النووي المُرحَّلَة عبر الأشعة فوق البنفسجية.

9-2-3: إختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics sensitivity test:

أجرى إختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية لـ 48 عُرْزَة نَقِيَّة تَمَّ الحُصُول عليها، وفُجِصَتْ الحساسية لـ 12 نوعاً من المضادات الحيوية كما مُبَيَّن في الجدول (12)، وقد أُسْتُخِذَتْ طريقة كيربي وباور Kirby-Bauer method المُحَوَّرَة والمُعَمَّدَة من مُنظمة الصحة العالمية لِمَعْرِفَة حساسية أو مُقاومة الغلزلات الجرثومية للمضادات الحيوية (Baur et al., 1966) وذلك بنقل جزء من المُسْتَعْمَرَات النَوِيَّة في وسط الإدامة وَزَّر عِها على وسط المتألق بواسطة الناقل، وبعد ذلك حُصِنَتْ الأوساط لِمُدَّة 24 ساعة في درجة حرارة 37 م°، نُقِلَتْ 5-6 مُسْتَعْمَرَات نَقِيَّة لجرثومة الإشيريكية القولونية من وسط المتألق بإستخدام النَّاقِلَة، وَزَّر عَتْ في أنابيب إختبار تحوي على 5 مل من المَرَق المُغذي، ثُمَّ حُصِنَتْ لِمُدَّة 4 ساعات بدرجة حرارة 37 م°، وبعد ذلك أُجريت الخُطوات الآتية:

1. غُمِرَتْ مُسْحَة قطنية مُعَمَّمة بالمَرَق المُغذي المَزْرُوع وأزِيلَ الفائض من المَرَق بِضَغْط المُسْحَة القطنية على الجدار الداخلي لإنبوبة الإختبار ثُمَّ نُشِرَتْ على وسط أكار مولر هنتون بثلاثة إتجاهات مُتعاكسة (نُشِرَتْ كل عِيَّة على طبقتين) لَتُكوِّن طبقة رَقِيقة مُتجانسة من الزرع الجرثومي على جميع أجزاء سطح الوسط الزرعي.
2. تُرْكَّت أوساط المولر هينتون لِمُدَّة خمس دقائق حتى تَجِف.
3. ثُمَّ إسْتُخِذِمَ ملقط مُعَمَّم بالكحول والذهب، اذ وُضِعَتْ أقراص المضادات الحيوية على الطبقتين (6 أقراص لكل طبق) وكان توزيعها على أماكن مُنتظمة تسمح بقياس قُطر التَّنْبِيْط للنمو الجرثومي حول قُرص المُضاد الحيوي، وتلافي سقوطها ثُمَّ تَنْبِيْطها بواسطة الملقط وذلك بالضَغْط الخفيف عليها.
4. تُرْكَّت الأطباق لِمُدَّة 15 دقيقة حتى تَجِف ثُمَّ حُصِنَتْ بدرجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة بظروف هوائية.
5. قُرِنَتْ النتائج وذلك بقياس قُطر التَّنْبِيْط للنمو الجرثومي ومن ضمنها قُطر قرص المُضاد الحيوي بوحدة المليمتر بواسطة مسطرة بلاستيكية شَفَافَة ومُقارنتها مع قياسات الشركة المُجهزة لهذه

الأقراص (الملحق 3-1)، إذ أمكن التعرف على العزلات الحساسة والمتوسطة الحساسية والمقاومة لهذه المضادات الحيوية.

الجدول 3-11 : يبين أنواع وتراكيز المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية لجراثيم الإشريكية القولونية

ت	المضادات الحيوية	الإختصار	التركيز (µg)
1	إريثروميسين	E	10
2	سيبروفلوكساسين	CIP	10
3	سيفيكسيم	CFM	5
4	كلورامفينيكول	C	10
5	سيفالوثين	KF	30
6	نتراسايكلين	TE	10
7	تريميثوبريم	TMP	10
8	نتروفوراننتوين	F	100
9	جنتاميسين	CN	10
10	سيفترياكسون	CRO	10
11	أموكسيسيلين	AX	10
12	ستربتومايسين	S	5

3-2-10: اختبار إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production test :

أجري الاختبار بأخذ عينة من العزلات نقيّة من جراثيم الإشريكية القولونية وزُرعت على أكار الكونغو الأحمر (CRA) وحُضِنَت الأطباق في درجة حرارة 37 م° لِمُدَّة 24 ساعة، ثمّ تُصنّف العزلات إلى ثلاث فئات (قوية ومتوسطة وغير منتجة للغشاء الحيوي)، إذ تظهر المُستعمَرات قوية الإنتاج على وسط الكونغو الأحمر باللون الأسود وتظهر المُستعمَرات متوسطة الإنتاج باللون الوردي وبمركز أسود تُعطي مظهر عين الثور، وتظهر المُستعمَرات غير المنتجة باللون الوردي، وتتناسب شدّة اللون طردياً مع كمية إنتاج الأغشية الحيوية بعد زراعة العزلات وحُضِنها لِمُدَّة 24 ساعة (Freeman *et al.*, 1989). كما تمّت دراسة العلاقة ما بين المُقاومة للمضادات الحيويّة والقابلية على إنتاج الغشاء الحيوي لعزلات الإشريكية القولونية، إذ تمّ الرّبط بين عزلات العينات المختلفة من حيث مُقاومتها للمضادات الحيويّة وقابليتها على إنتاج الأغشية الحيويّة.

الفصل الرابع

النتائج

Results

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عدد العزلات الجرثومية للإشريكية القولونية المعزولة من 400 عينة من العينات المختلفة والتي تم جمعها من قطعان الأغنام والحملان والبيئة المحيطة بهما ومن مناطق الدراسة المختلفة كانت 253 عزلة أي بنسبة 63.3%، شُخصت بالطرائق التقليدية للعزل على وسط اكار الإيوسين والمثيلين الأزرق و اكار الماكونكي ووسط اكار المتألق الخاص بجراثيم الإشيريكية القولونية وصبغة كرام والإختبارات الكيميائية الحيوية وإختبار فايتك2، وأكثت بالطريقة الجزيئية (تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل) لجين *uidA* الخاص بجراثيم الإشيريكية القولونية. وكشفت نتائج الدراسة الحالية أن النسب المئوية لجراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من الحليب والبراز ومسحات فم الحملان والأعلاف الجافة والحشائش الخضراء والماء والأرضية مسحات أيادي العاملين هي 36% (50/18)، 100% (50/50)، 54% (50/27)، 48% (50/24)، 82% (50/41)، 46% (50/23)، 98% (50/49)، 42% (50/21) على التوالي وكما هو موضح في الجدول (1-4) والملحق (1-4).

الجدول 1-4 : يوضح العينات الموجبة والنسب المئوية الكلية لجراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من العينات المختلفة

نوع العينة	عدد العينات الكلي	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية %
الحليب	50	18	36 %
البراز	50	50	100 %
مسحات فم الحملان	50	27	54 %
الأعلاف الجافة	50	24	48 %
الحشائش الخضراء	50	41	82 %
الماء	50	23	46 %
الأرضية	50	49	98 %
مسحات أيادي العاملين	50	21	42 %
المجموع	400	253	63.3 %

وَبَيَّنَتْ النتائج أيضاً أنَّ أعلى نسبة عزل لجراثيم للإشريكية القولونية من عيّنات حليب النعاج المُرضعة ومن مناطق الدِراسة المُختلفة، كانت في منطقتي السّلامية والدرناج بنسبة 12%، وأقل نسبة عزل لمناطق الكصر والعباسية وكوكجلي وبنسبة 4%، وكما هو مُوضَّح بالجدول رقم (2-4).

الجدول 2-4 : تحديد جين *uidA* في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الحليب

الموجبة لجين <i>uidA</i>		عدد العينات الكلي	المنطقة
النسبة المئوية %	عدد العينات		
4 %	2	10	الكصر
12 %	6	10	السلامية
12 %	6	10	الدرناج
4 %	2	10	كوكجلي
4 %	2	10	العباسية
36 %	18	50	المجموع الكلي

وأظهرت النتائج أيضاً أنَّ أعلى نسبة عزل لجرثومة الإشيريكية القولونية من عيّنات البراز وبنسبة 20% ولكافة مناطق الدِراسة، وكما هو مُوضَّح بالجدول رقم (3-4).

الجدول 3-4: تحديد جين *uidA* في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات براز الأغنام

الموجبة لجين <i>uidA</i>		عدد العينات الكلي	المنطقة
النسبة المئوية %	عدد العينات		
20 %	10	10	الكصر
20 %	10	10	السلامية
20 %	10	10	الدرناج
20 %	10	10	كوكجلي
20 %	10	10	العباسية
100 %	50	50	المجموع الكلي

وأوضحت النتائج أيضاً أنّ أعلى نسبة عزل لجرثومة الإشيريكية القولونية من عينات المسحات الفمية للحملان الرضيعة من مناطق الدراسة المختلفة، كانت في منطقة العباسية وبنسبة 16%، وأقل نسبة عزل في منطقة السلامة بنسبة 6%، وكما هو موضح بالجدول رقم (4-4).

الجدول 4-4 : تحديد جين *uidA* في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من مسحات فم الحملان الرضيعة

الموجبة لجين <i>uidA</i>		عدد العينات الكلي	المنطقة
النسبة المئوية %	عدد العينات		
12 %	6	10	الكصر
6 %	3	10	السلامية
8 %	4	10	الدرناج
12 %	6	10	كوكجلي
16 %	8	10	العباسية
54 %	27	50	المجموع الكلي

وكانت أعلى نسبة عزل لجرثومة الإشيريكية القولونية من عينات الاعلاف الجافة المأخوذة من مناطق الدراسة المختلفة، في منطقة الدرناج بنسبة 12%، وأقل نسبة عزل من مناطق السلامة وكوكجلي وبنسبة 8% وكما هو موضح في الجدول (4-5).

الجدول 5-4 : تحديد جين *uidA* في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الأعلاف الجافة

الموجبة لجين <i>uidA</i>		عدد العينات الكلي	المنطقة
النسبة المئوية %	عدد العينات		
10 %	5	10	الكصر
8 %	4	10	السلامية
12 %	6	10	الدرناج
8 %	4	10	كوكجلي
10 %	5	10	العباسية
48 %	24	50	المجموع الكلي

وسُجِلت أعلى نسبة عزل لجرثومة الإشيريكية القولونية من عينات الحشائش الخضراء لمناطق الدراسة المختلفة في منطقة كوكجلي وبنسبة 20%، وأقل نسبة عزل كانت في منطقة الدرنج بنسبة 14%، وكما هو موضح في الجدول (6-4).

الجدول 6-4 : تحديد جين *uidA* في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الحشائش الخضراء

الموجبة لجين <i>uidA</i>		عدد العينات الكلي	المنطقة
النسبة المئوية %	عدد العينات		
16 %	8	10	الكصر
16 %	8	10	السلامية
14 %	7	10	الدرنج
20 %	10	10	كوكجلي
16 %	8	10	العباسية
82 %	41	50	المجموع الكلي

وبَيَّنَّت النتائج أيضاً أنَّ أعلى نسبة عزل لجرثومة الإشيريكية القولونية من عينات الماء المأخوذة من مصادر الشرب للأغنام من مناطق الدراسة المختلفة، كانت في منطقة العباسية بنسبة 14%، وأقل نسبة في منطقة الكصر وبنسبة 4% وكما هو موضح في الجدول (7-4).

الجدول 7-4: تحديد جين *uidA* في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الماء

الموجبة لجين <i>uidA</i>		عدد العينات الكلي	المنطقة
النسبة المئوية %	عدد العينات		
4 %	2	10	الكصر
6 %	3	10	السلامية
10 %	5	10	الدرنج
12 %	6	10	كوكجلي
14 %	7	10	العباسية
46 %	23	50	المجموع الكلي

وكشفت النتائج أيضاً عن وجود نسب عالية لعزل جرثومة الإشيريكية القولونية من عينات الأراضية المأخوذة من حضائر الأغنام، بلغت 20% في مناطق السلامة والدرناج وكوكجلي والعباسية، وأقل نسبة عزل في منطقة الكصر بنسبة 18%، وكما هو موضح في الجدول (4-8).

الجدول 4-8 : تحديد جين *uidA* في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من عينات الأراضية

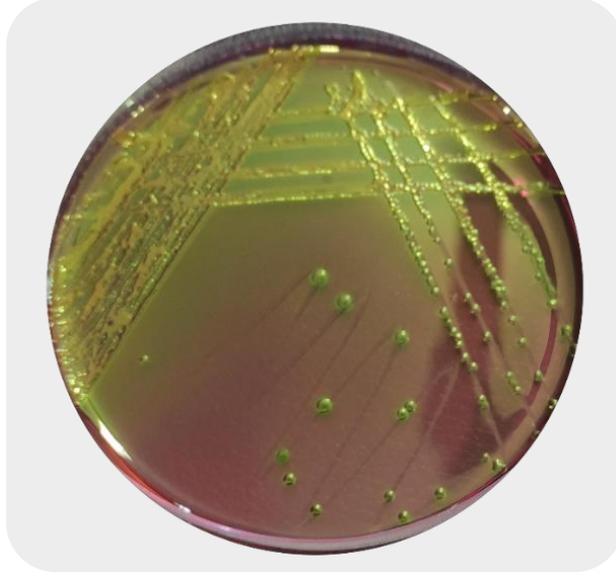
الموجبة لجين <i>uidA</i>		عدد العينات الكلي	المنطقة
النسبة المئوية %	عدد العينات		
18 %	9	10	الكصر
20 %	10	10	السلامية
20 %	10	10	الدرناج
20 %	10	10	كوكجلي
20 %	10	10	العباسية
98 %	49	50	المجموع الكلي

وسجلت أعلى نسبة عزل لجرثومة الإشيريكية القولونية من مسحات أيادي العاملين في منطقة الكصر بنسبة 12%، وأقل نسبة عزل في منطقة العباسية بنسبة 4%، وكما هو موضح بالجدول رقم (4-9).

الجدول 4-9 : تحديد جين *uidA* في جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من مسحات أيادي العاملين

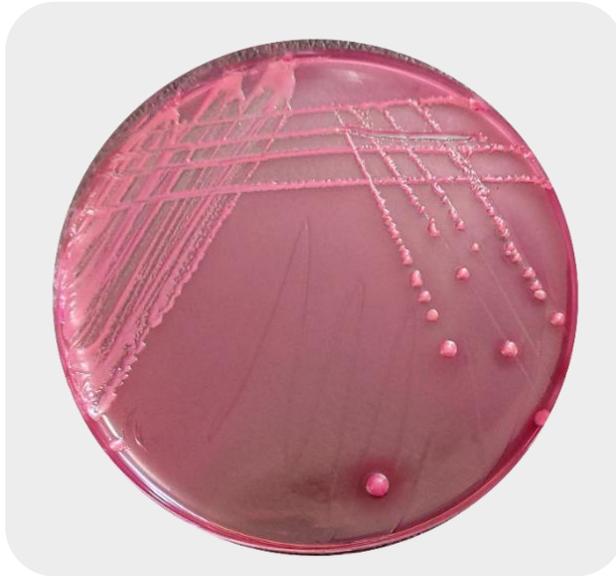
الموجبة لجين <i>uidA</i>		عدد العينات الكلي	المنطقة
النسبة المئوية %	عدد العينات		
12 %	6	10	الكصر
8 %	4	10	السلامية
10 %	5	10	الدرناج
8 %	4	10	كوكجلي
4 %	2	10	العباسية
42 %	21	50	المجموع الكلي

وظَهَرَتِ المُستَعْمَراتُ الجرثومية للإشيريكية القولونية على وسط أكار الإيوسين والمثيلين الأزرق بلون أخضر بَرَّاق يُعرف بظاهرة البريق المعدني الأخضر (Green Metallic Sheen) وذلك لإحتواء الوَسط على صبغات الإيوسين والمثيلين الأزرق التي تترسب في الوسط الحامضي بعد إرتباطها مع بعض فنُعطي هذا اللون واللمعان الأخضر مما يدلُّ على أنَّ الجرثومة أنتجت الحوامض العضوية نتيجة لتخميرها سُكريات اللاكتوز والسكروز، وكما هو موضح في الشكل (1-4).



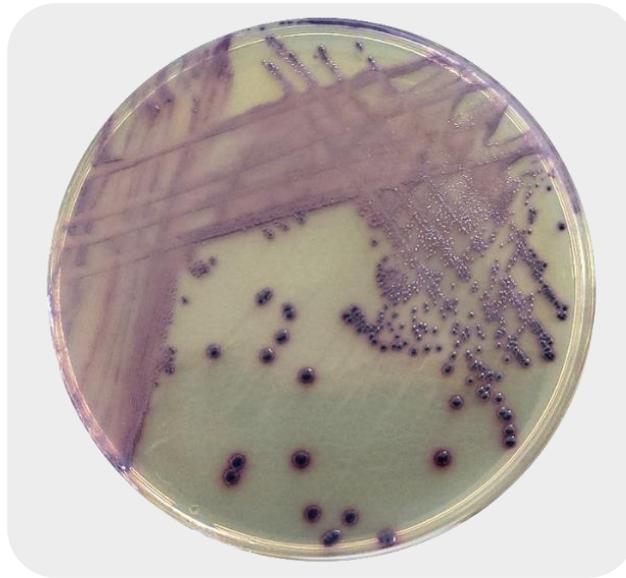
الشكل 1-4 : نمو جراثيم الإشيريكية القولونية على وسط الإيوسين والمثيلين الأزرق

وظَهَرَتِ المُستَعْمَراتُ الجرثومية للإشيريكية القولونية باللون الوردي على وسط أكار الماكونكي وتغيير الأس الهيدروجيني للوسط من المُتعادِل إلى الحامضي من خلال قُدرة الجرثومة على تخمير سُكر اللاكتوز، وكما هو موضح في الشكل (2-4).



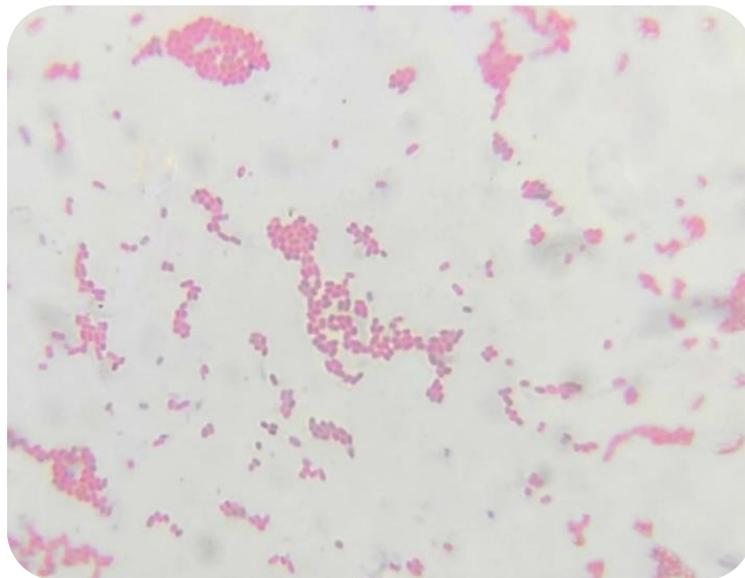
الشكل 2-4 : نمو جراثيم الإشيريكية القولونية على وسط اكار الماكونكي

في حين ظَهَرَتْ مُسْتَعْمَرَات جراثيم الإشيريكية القولونية على وسط الأكار المتألق لجراثيم الفُولُونِيَّات والإشيريكية القولونية بلون بنفسجي، وكما هو مُوضَّح في الشكل (3-4).



الشكل 3-4 : نمو جراثيم الإشيريكية القولونية على وسط الأكار المتألق

مجهرياً، ظَهَرَتْ جراثيم الإشيريكية القولونية بشكل عُصَيَّات تَتَرْتَّبُ بِأَشْكَالٍ مُنْفَرِدَةٍ أو في أزواج تَتَصَبَّغُ باللون الوردي إلى الأحمر عند صبغها بصبغة الكرام وكما مُبَيَّن في الشكل (4-4).



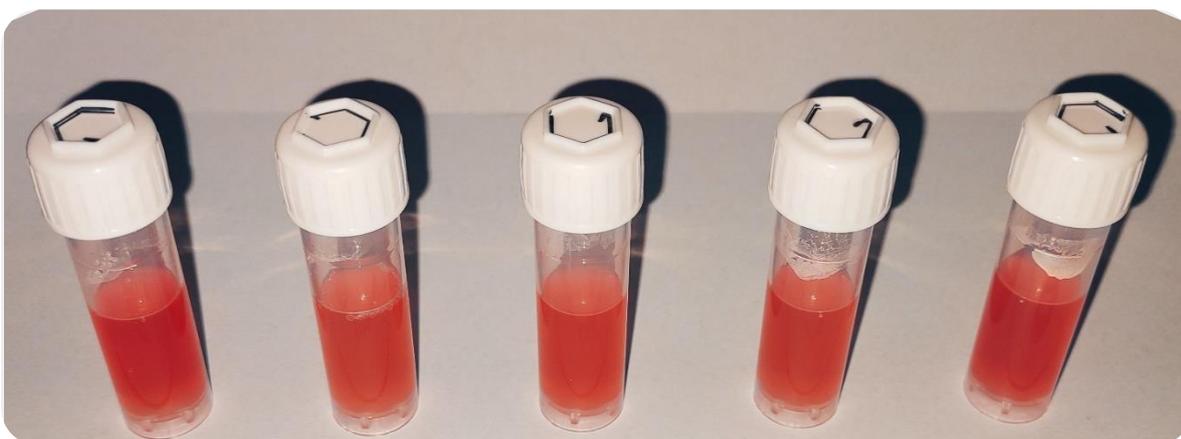
الشكل 4-4 : صورة مجهرية لجراثيم الإشيريكية القولونية (100X)

وأعطت الإختبارات الكيميائية الحيوية لجميع عزلات جراثيم الإشيريكية القولونية المُستحصَل عليها من الزرع الجرثومي لعينات الدراسة نتائج إيجابية لإختبار الإندول من خلال ظهور الحلقة الحمراء الأرجوانية الدالة على قدرتها على تحليل الحامض الأميني التربتوفان وإنتاج الإندول كما موضح في الشكل (4-5) والجدول (4-10).



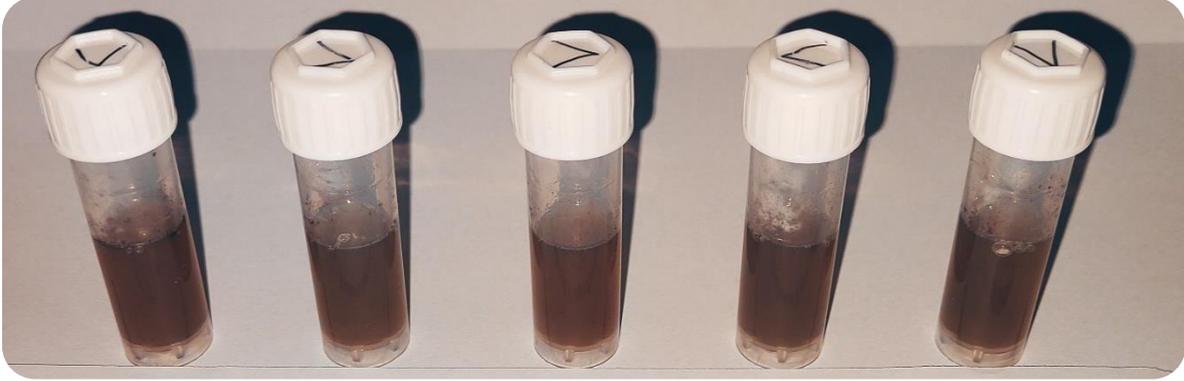
الشكل 4-5 : إختبار الإندول المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية

وكانت النتائج موجبة أيضاً لإختبار الميثيل الأحمر من جراء إنتاج الحامض الناتج من إستهلاك وتخمير سكر الكلوكوز وبالتالي تغيير الاس الهيدروجيني pH للوسط، والذي يؤدي بدوره إلى تغيّر لونه إلى الأحمر كما موضح في الشكل (4-6) والجدول (4-10).



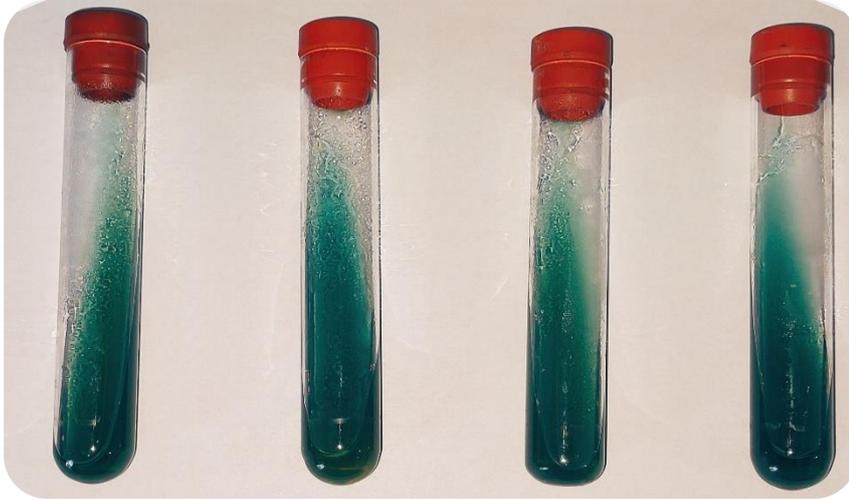
الشكل 4-6 : إختبار الميثيل الأحمر المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية

وكانت نتائج إختبار فوكس-بروسكاور سلبية وذلك بعدم ظهور اللون الأحمر، وظهور اللون الأصفر المائل للبيني للوسط السائل بسبب عدم تحويل الجراثيم سكر الكلوكوز إلى الأسيتون مما يؤدي إلى عدم تفاعل الكاشفين VP₁ (α -Naphthol) و VP₂ (Potassium hydroxide) مع الأسيتون كما موضح في الشكل (4-7) والجدول (4-10).



الشكل 4-7 : إختبار فوكس-بروسكاور المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية

وكانت نتائج العزلات سلبية لإختبار إستهلاك السترات، وذلك بَعْدَم تَغْيِير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق بسبب عَدَم إستهلاك الجراثيم للسترات كَمَصْدَر وحيد للكربون لِعَدَم إِمْتلاكها إنزيم Citrate Permease و عَدَم إنتاج حامض الستريك الذي يُغْيِر درجة الاس الهيدروجيني pH كما مُوضَّح في الشكل (8-4) والجدول (10-4).



الشكل 4-8 : إختبار إستهلاك السترات المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية

وأعطت العزلات الجرثومية نتيجة موجبة على وسط ثلاثي السكر والحديد وذلك بِتَحْوِيل لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر (لِكُل من القَمَّة والقَعْر) مِمَّا يَدُلُّ على قُدْرَة الجراثيم على تَخْمِير سكر الكلوكوز واللاكتوز والسكروز مع تَكُون غاز ثنائي أوكسيد الكربون CO₂ الذي يعمل على دَفْع الوسط للأعلى كما مُوضَّح في الشكل (9-4) والجدول (10-4).



الشكل 4-9 : إختبار ثلاثي السكر والحديد المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية

وكأنت نتيجة إختبار الأوكسيديز سالبة وذلك بعدم تغيير لون شريط الإختبار المُشبعة بكاشف الأوكسيديز إلى اللون البنفسجي، وكما موضح في الشكل (4-10) والجدول (4-10).



الشكل 4-10 : إختبار الأوكسيديز المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية

وظهرت نتائج إختبار الكتاليز موجبة، بظهور فقاعات نتيجة لفُدرة الجراثيم على إنتاج إنزيم الكتاليز الذي يُحلل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) إلى أُوكسجين (O_2) وماء (H_2O) كما موضح في الشكل (4-11) والجدول (4-10).



الشكل 4-11 : إختبار الكتاليز المستخدم للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية

جدول 4-10 : نتائج التفاعلات الكيميائية الحيوية لجراثيم الإشيريكيا القولونية

النتيجة	الإختبار
+	الإندول
+	المثيل الأحمر
-	فوكس بروسكاور
-	سترات سايمون
+	ثلاثي السكر والحديد
-	الأوكسيديز
+	الكتاليز

وأشارت نتائج إختبار فايتك2 Vitek2 للغلزلات الجرثومية إلى إحتمالية 99% للإشيريكيا القولونية، كما مبيّن في الشكل (4-12) والشكل (4-13).

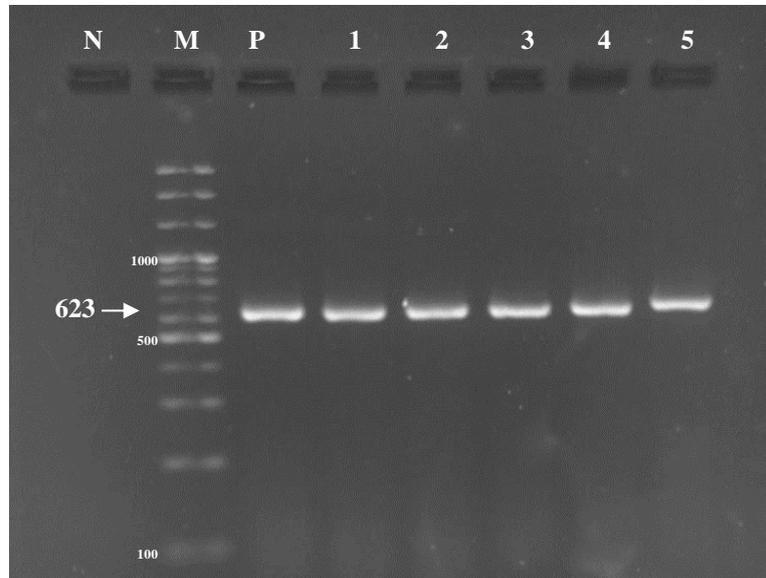


الشكل 4-12 : البطاقة الخاصّة بإختبار فايتك 2

Identification Information		Analysis Time:	3.83 hours	Status:	Final												
Selected Organism		99% Probability	<u>Escherichia coli</u>														
ID Analysis Messages		Bionumber:	0405610454504611														
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	-			

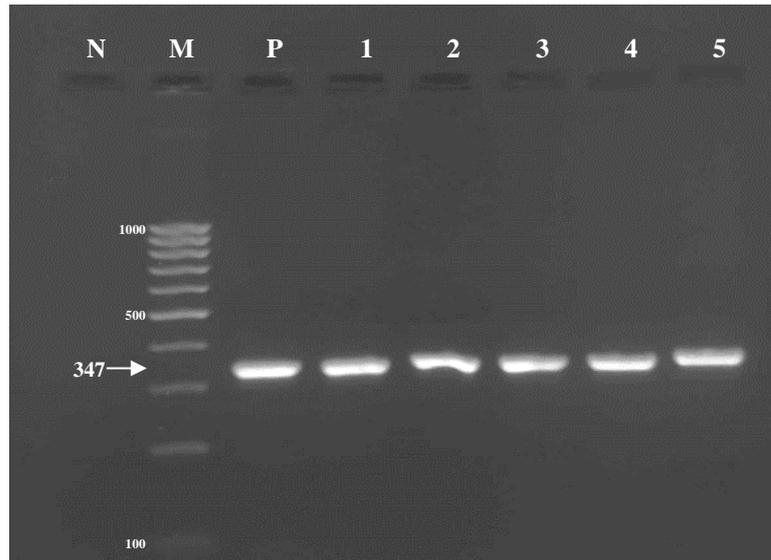
الشكل 4-13 : نموذج نتيجة إختبار فايتك 2

وأُثبتت نتائج الدِّراسة الحالية أنَّ جَمِيع العُزلات الجرثومية للإشيريكية القولونية من العَيِّنات المُختلفة لحُقُول الأَغنَام والبيئَة المُحيطة والتي كانت موجبة للعزل والإختبارات الكيميائية الحيويَّة إمتلاكها لجين *uidA* ذو الوزن الجزيئي 623 زوج قاعدي بعد ترحيل نواتج التَّضخيم على هُلام الأكاروز، كما هو مُوضَّح في الشكل (4-14).

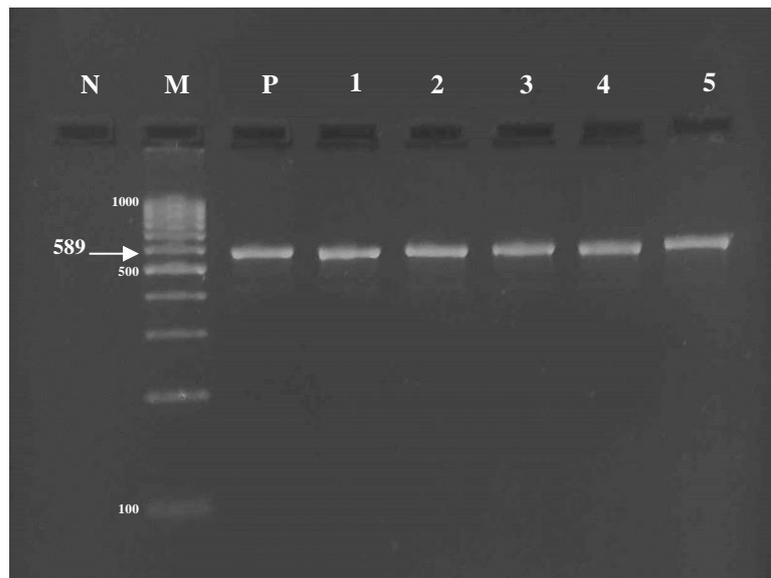


الشكل 4-14 : ناتج إختبار تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *uidA* بالوزن الجزيئي 623 زوج قاعدي.
 N: السيطرة السلبية، M: الدليل الحجمي (100 زوج قاعدي)، P: السيطرة الموجبة، 5,4,3,2,1:
 العينات الموجبة لعزلات الإشيريكية القولونية

وأظهرت نتائج الدِّراسة الحالية أنَّ جَمِيع جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من العَيِّنات المُختلفة لحُقُول الأَغنَام والبيئَة المُحيطة بها تَمْتَلِكُ وبصورة مُتَّفَاوِة الجينات الخاصَّة بِسُموم الشبكا *Stx1* و *Stx2* ذات الأوزان الجزيئية 347 زوج قاعدي و 589 زوج قاعدي على التَّوالي بعد ترحيل نواتج التَّضخيم على هُلام الأكاروز كما هو مُوضَّح في الشكل (4-15) والشكل (4-16)



الشكل 4-15 : ناتج إختبار تفاعل البلمرة المتسلسل يحدد الوزن الجزيئي لجين *Stx1* بالوزن الجزيئي 347 زوج قاعدي. N: السيطرة السلبية، M: الدليل الحجمي (100 زوج قاعدي)، P: السيطرة الموجبة، 1,2,3,4,5: العينات الموجبة لعزلات الإشيريكية القولونية



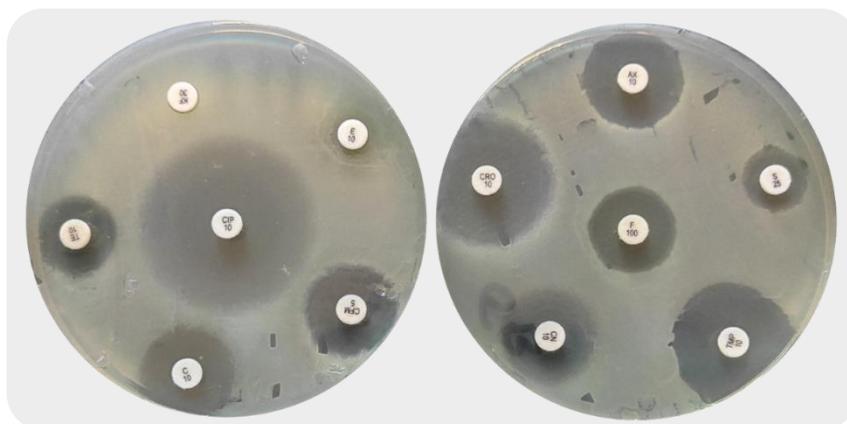
الشكل 4-16 : ناتج إختبار تفاعل البلمرة المتسلسل يحدد الوزن الجزيئي لجين *Stx2* بالوزن الجزيئي 589 زوج قاعدي. N: السيطرة السلبية، M: الدليل الحجمي (100 زوج قاعدي)، P: السيطرة الموجبة، 1,2,3,4,5: العينات الموجبة لعزلات الإشيريكية القولونية

ويُشير الجدول رقم (4-11) إلى عدد العزلات الجرثومية للإشريكية القولونية المنتجة للسموم من خلال إمتلاكها لجينات *Stx1* و *Stx2*، حيث تُشير النتائج إلى وجود تفاوت في إمتلاك العزلات لكلا الجينين أو لأحدهما، فقد كانت أعلى نسبة للتي تمتلك كلا الجينين من عزلات الحليب وبنسبة 100% تليها البراز ومُسحات الفم للحملان بنسبة 83,3% وأقلها عزلات عيّنات الماء بنسبة 16,6% مع إمتلاك جميعها لجين *Stx1* والبعض الآخر لجين *Stx2*.

الجدول 4-11: عدد العيّنات الكليّة والعيّنات الموجبة والنسبة المئوية لجينات *Stx1* و *Stx2* الخاصة بجرثومة الإشريكية القولونية من العزلات في العيّنات المختلفة

نوع العينة	عدد العينات	عدد <i>Stx1</i> و <i>Stx2</i> (%)
الحليب	6	6 (100%)
البراز	6	5 (83.3%)
مسحات فم الحملان	6	5 (83.3%)
الأعلاف الجافة	6	3 (50%)
الحشائش الخضراء	6	2 (33.3%)
الماء	6	1 (16.6%)
الأرضية	6	2 (33.3%)
أيادي العاملين	6	3 (50%)
المجموع الكلي	48	27 (56.3%)

وأظهرت نتائج فحص الحساسية للمضادّات الحيويّة وجود تفاوت في مقاومة وحساسية العزلات الجرثومية للإشريكية القولونية، وكما موضح في الشكل (4-17).



الشكل 4-17 : إختبار الحساسية للمضادات الحيويّة لجراثيم الإشيريكية القولونية على وسط مولر-هنتون

إذ كانت النسبة المئوية لمقاومة العزلات للسيفالوثين والإريثرومايسين والأموكسيسيلين، 100% و 88% و 77% على التوالي في حين كانت مقاومة العزلات للنترايسايكلين والستربتومايسين والتراميثوبريم 54% و 46% و 33% على التوالي، فضلاً عن حساسية العزلات الجرثومية للإشيريكية القولونية للجنتاميسين والسيفترياكسون والسيبروفلوكساسين والسيفيكسيم والتراميثوبريم والكلورامفينيكول ونسب 94% و 85% و 81% و 75% و 67% و 65% على التوالي وكما موضح في الجدول (4-12) .

الجدول 4-12 : نتائج فحص المقاومة والحساسية للمضادات الحيويّة لجراثيم الإشيريكية القولونية

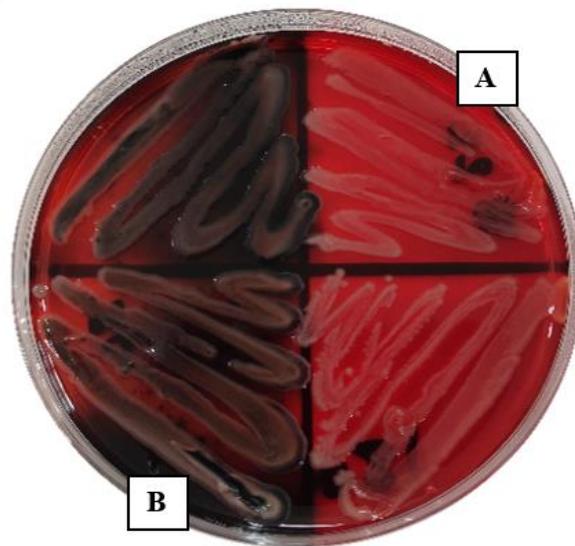
النسبة المئوية %			المختصر	المضاد الحيوي
مقاومة (R)	متوسطة الحساسية (I)	حساسة (S)		
88	12	0	E	إريثروميسين
15	4	81	CIP	سيبروفلوكساسين
15	10	75	CFM	سيفيكسيم
31	4	65	C	كلورامفينيكول
100	0	0	KF	سيفالوثين
54	46	0	TE	نتراسايكلين
33	0	67	TMP	تراميثوبريم
0	56	44	F	نتروفورانتوين
6	0	94	CN	جنتاميسين
15	0	85	CRO	سيفترياكسون
77	13	10	AX	أموكسيسيلين
46	16	38	S	ستربتومايسين

وأوضحت الدراسة وجود تفاوت بين عزلات جرثومة الإشيريكية القولونية المعزولة من العينات المختلفة من ناحية مقاومتها للمضادات الحيوية و كما هو موضح في الجدول (4-13).

الجدول 4-13: النسب المئوية لمقاومة جراثيم الإشيريكية القولونية للمضادات الحيوية للعينات المختلفة

المضادات الحيوية %												العينات
S	AX	CRO	CN	F	TMP	TE	KF	C	CFM	CIP	E	
65	85	0	0	0	35	100	100	35	0	0	100	الحليب
50	50	15	15	0	50	50	100	35	15	35	50	البراز
50	100	35	0	0	35	35	100	0	35	0	100	مسحات فم الحملان
35	50	0	0	0	15	15	100	15	0	15	65	الأعلاف الجافة
100	65	15	0	0	50	85	100	100	15	0	100	الحشائش الخضراء
15	100	15	0	0	35	50	100	35	15	0	100	الماء
15	65	0	0	0	15	65	100	15	0	35	85	الإرضية
35	100	35	35	0	35	35	100	35	35	35	100	أيادي العاملين

وتفاوتت العزلات الجرثومية للإشيريكية القولونية في قابليتها على إنتاج الأغشية الحيوية من خلال تغيير لون وسط الكنغو الأحمر (CRA) من اللون الأحمر إلى اللون الأسود الدال على إنتاج الأغشية الحيوية على عكس العزلات غير المنتجة للغشاء الحيوي والتي ظهرت باللون الأحمر أو الوردي الزاهي كما موضح في الشكل (4-18).



الشكل 4-18: نمو جراثيم الإشيريكية القولونية على وسط الكنغو الأحمر (A) غير المنتجة للغشاء الحيوي (B) المنتجة للغشاء الحيوي

وأظهرت النتائج أن 32 عُرلة جرثومية من بين 48 عُرلة أي بنسبة 66.7% كانت مُنتجة للغشاء الحيوي، أعلاها في البراز والحليب بنسبة 83.3% تليها الأرضية والماء ومُسحات أيدي العاملين والمُسحات الفمية الحملان بنسبة 66.7% ثمّ الأعلاف الجافة والحشائش الخضراء بنسبة 50% وكما مُوضَّح في الجدول (4-14).

الجدول 4-14 : يوضح العدد والنسب المئوية للعزلات المنتجة للغشاء الحيوي

نوع العينة	عدد العينات	العزلات المنتجة للغشاء الحيوي	
		النسبة المئوية %	عدد
الحليب	6	83.3 %	5
البراز	6	83.3 %	5
المسحات الفمية للحملان	6	66.7 %	4
الاعلاف الجافة	6	50 %	3
الحشائش الخضراء	6	50 %	3
الماء	6	66.7 %	4
الأرضية	6	66.7 %	4
مسحات أيدي العاملين	6	66.7 %	4
المجموع	48	66.7 %	32

وأوضحت نتائج إختبار إنتاج الأغشية الحيويّة لعزلات الإشيريكييا القولونية أنّ 32 عُرلة من أصل 48 عُرلة أي بنسبة 66.7% كانت مُنتجة للأغشية الحيويّة ، تَوَزَعَتْ بين 22 عُرلة ذات إنتاج قَوي و10 عزلات مُتوسطة الإنتاج و16 عُرلة غير مُنتجة للغشاء الحيوي أي بنسبة 45.8% و 20.8% و33.3% على التوالي، وكانت أعلى نسبة لإنتاج الأغشية الحيويّة بين العزلات ذات الإنتاج القوي من عَيّنات البراز والحليب بنسبة 83.3%، وأقلها من عزلات العَيّنات من الأرضية والأعلاف والماء ومُسحات أيدي العاملين والأعشاب الخضراء ومُسحات الفم للحملان بنسبة 33.3%، في حين بلغت أعلى نسب للعزلات ذات الإنتاج المُتوسط للغشاء الحيوي من عَيّنات مُسحات أفواه الحملان ومُسحات أيدي العاملين والماء والأرضية بنسبة 33.3% ، وأقلها في عَيّنات الأعلاف والحشائش الخضراء بنسبة 16.7% وكما هو مُوضَّح بالجدول (4-15).

الجدول 4-15 : يوضح أنماط إنتاج الغشاء الحيوي لجراثيم الإشيريكية القولونية

نمط إنتاج الغشاء الحيوي						عدد العينات	نوع العينة
غير منتجة		إنتاج متوسط		إنتاج قوي			
%	عدد	%	عدد	%	عدد		
16.7	1	0	0	83.3	5	6	الحليب
16.7	1	0	0	83.3	5	6	البراز
33.3	2	33.3	2	33.3	2	6	المسحات الفمية الحملان
50	3	16.7	1	33.3	2	6	الأعلاف الجافة
50	3	16.7	1	33.3	2	6	الحشائش الخضراء
33.3	2	33.3	2	33.3	2	6	الماء
33.3	2	33.3	2	33.3	2	6	الأرضية
33.3	2	33.3	2	33.3	2	6	مسحات أيادي العاملين
33.3	16	20.8	10	45.8	22	48	المجموع

ويُوضّح الجدول (4-16) العلاقة ما بين المقاومة للمضادات الحيويّة وقابلية إنتاج الأغشية الحيويّة لعزلات الإشيريكية القولونية، حيث كانت أغلب العزلات الجرثومية للإشيريكية القولونية المقاومة للمضادات الحيويّة كالأموكسيسيلين (AX) والسيفالوثين (KF) والسيفيكسيم (CFM) كانت مُنتجة للغشاء الحيوي من النمط القوي، في حين كانت العزلات المقاومة للسفترياكسون (CRO) والإريثرومايسين (E) والجينتاميسين (CN) والستريبتومايسين (S) مُنتجة للغشاء الحيوي بنمط مُتوسط، وفي المقابل كانت العزلات المقاومة للسيبروفلوكساسين (CIP) والكلورامفينيكول (C) والتيتراسايكلين (TE) والتراميثوبريم (TMP) غير مُنتجة للغشاء الحيوي وكانت كل العزلات الحساسة للنتروفورانتوين (F) غير منتجة للغشاء الحيوي.

تمّ إكتشاف مُعدل مُرتفع من المقاومة للمضادات الحيويّة في العزلات المُنتجة للأغشية الحيوية القوية والمُتوسطة بإستثناء سيبروفلوكساسين والكلورامفينيكول والتترايسايكلين والتراميثوبريم والنتروفورانتوين وكما هو مُوضّح بالجدول (4-16).

الجدول 4-16 : العلاقة ما بين المقاومة للمُضادَات الحَيَوِيَّة وقابلية إنتاج الأَغْشِيَّة الحَيَوِيَّة

إنتاج الغشاء الحيوي		المقاومة للمُضادَات الحَيَوِيَّة		
المنتجة عدد (%)	نمط إنتاج الغشاء الحيوي	المقاومة للمُضادَات الحَيَوِيَّة عدد (%)		المضاد الحيوي
22 (45.8%)	قوية الإنتاج	37 (77%)		AX
		48 (100%)		KF
		7 (15%)		CFM
10 (20.8%)	متوسط الإنتاج	7 (15%)		CRO
		42 (88%)		E
		3 (6%)		CN
		22 (46%)		S
16 (33.3%)	غير منتجة	7 (15%)		CIP
		15 (31%)		C
		26 (54%)		TE
		16 (33%)		TMP
		0 (0%)		F

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

تُعدُّ الأغنام والأبقار المُستودع الرئيسي لجراثيم الإشيريكية القولونية وتنتقلُ منهما إلى الحيوانات الأخرى والأنسان، وتُمثّل الإصابة بجراثيم الإشيريكية القولونية تحدياً كبيراً ولاسيماً للأشخاص الذين يعيشون بالقرب من الأغنام، لِعَدَمِ إمتلاكهم أيّة معرفة بإمراضية جراثيم الإشيريكية القولونية وطرائق إنتقالها (Shabana et al., 2013).

تُوفّر العديد من الإختبارات التقليدية فرصة للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية، لكنّها لازالت تُشكّل تحدياً عند تشخيصها الدقيق في العينات المختلفة، لذلك فإنّ تقنية تفاعل البلمرة المُتسلسل (PCR) تمثلك القدرة على التغلب على العديد من مشاكل الطرائق التقليدية. في هذه الدّراسة إستُخدمت تقنية تفاعل البلمرة المُتسلسل بالإعتماد على مجموعة من البادئات المُشتقة من تسلسل جين *uidA* للكشف عن جراثيم الإشيريكية القولونية، وحتى تلك التي لا يُمكن إكتشاف نشاط β -d-glucuronidase بالإجراء التقليدي، يُمكن إكتشافها بهذه الطريقة بناءً على جين *uidA* (Horakova et al., 2008).

أكثر الحالات المرضية شيوعاً هي الإصابة بالإسهال والذي يُعدُّ بحّد ذاته مشكلة كبيرة نتيجة ما يُسببه من خسائر إقتصادية كبيرة لأنه قد يؤدي إلى إرتفاع مُعدّل الوفيات أو فقدان الوزن أو حتى النُمو المُتأخر في الحيوانات المختلفة وحتى في الإنسان وهو ناتج عن مجموعة من العوامل الخطرة (Bastauerous et al., 2001, Gwyther et al., 2012)، إذ تتّمكن جراثيم الإشيريكية القولونية من البقاء والتكثيف في المُضيف وبيئته من خلال إمتلاكها لعوامل الفوعة المسؤولة عن ذلك (Gouali and Weill, 2013)، وهنا تجدر الإشارة إلى الأغذية التي تلعب دوراً كبيراً في نقل الأمراض، وهي من القضايا المُهمّة التي تُؤثر على الصّحة العامّة ولاسيماً في البلدان النامية وتحتديداً العراق، إذ تمّ ربط الإصابات البشريّة بجراثيم الإشيريكية القولونية إلى حد كبير بالمواد الغذائية التي يتّيمّ الحُصول عليها من مصادير حيوانية (Jo et al., 2004).

أظهرت نتائج هذه الدّراسة أنّ أعلى نسبة عزل لجراثيم الإشيريكية القولونية كانت من عينات البراز بنسبة 100% تليها عينات الأرضية بنسبة 98% وعينات الحشائش الخضراء بنسبة 82%،

ومسحات الفم للحملان بنسبة 54%، وعيّنات الأعلاف الجافة بنسبة 48%، وعيّنات الماء بنسبة 46%، وأيادي العاملين بنسبة 42%، وعيّنات الحليب بنسبة 36%، إذ يُلاحظ أنّ هناك تَفَاوُتاً واضحاً في نسب العزل ما بين العيّنات المُخْتَلَفَة ولاسيّما ما بين عيّنات البراز والأرضية مُقارَنةً مع عيّنات الحشائش الخضراء وعيّنات المسحات الفموية للحملان وعيّنات الأعلاف الجافة والماء وأيادي العاملين وبنسبة أقل في الحليب.

كانت نتائج دراستنا لعزل جراثيم الإشيريكيا القولونية من عيّنات الحليب أعلى من نتائج الدّراسة في اليونان وبنسبة بلغت 1% (Dontorou et al., 2003)، ودراسة أخرى في اليونان أيضاً وبنسبة 0.84% (Solomakos et al., 2009)، وفي نيجيريا بنسبة 22.8% (Ivbade et al., 2014)، وفي ليبيا بنسبة 25% (Garbaj et al., 2016)، وفي اثيوبيا بنسبة 12% (Bedasa et al., 2018). يُمكن أن تُعزى النتيجة الكُبرى في هذه الدّراسة إلى الاختلافات في نوع نُظْم التّربية للثروة الحيوانية في البلدان الأخرى والموقع الجغرافي ومُستوى الإحتياجات والإجراءات الصحيّة. وفي الوقت نفسه، كانت النتائج الحالية للعزل من عيّنات حليب الأغنام أكثر بالمُقارنة مع الدّراسة التي أُجريت في العراق وبنسبة بلغت 57.3% (Abbas et al., 2012)، ويُعزى هذا التّفَاوُت في نسب العزل إلى تَكَرّر التلوث بالإشيريكيا القولونية والاختلافات في حَجْم العيّنة ونُظْم تربية الأغنام وتَقْنِيّات الحلب والموقع والإجراءات الصحيّة المُطبّقة في مُختلف مناطق الدّراسة، ونتيجة لذلك فإنّ وجود جراثيم الإشيريكيا القولونية لا يُشير بالضرورة إلى تلوث مُباشر للحليب بالبراز، ولكنّه مُؤشّر على قِلّة النظافة والممارسات غير النّظيفة أثناء الحلب الأمر الذي يُشكّل خطراً مُحتملاً على المُستهلكين (Meshref, 2013). وهذا الاختلاف في مُعدّلات التلوث في تلك البلدان يعود إلى الأسباب نفسها كالممارسات الصحيّة والاختلافات الجغرافية والموقع (Chapman, 2000) والاختلافات في طريقتي أخذ العيّنات (Steele et al., 1997) والاختلافات في الإتجاهات الموسميّة والاختلافات في حساسية عُزلات الإشيريكيا القولونية (Bennett et al., 1996, Blackburn and McCarthy, 2000, Orden et al., 2003).

وكانت نتائج الدّراسة الحالية لعزل جراثيم الإشيريكيا القولونية من عيّنات البراز أعلى أيضاً من نتائج الدّراسات في الدنمارك وبنسبة بلغت 66.6% (Beutin et al., 1993) وفي المملكة المتحدة بنسبة 2.2% (Chapman, 2000)، وفي إسبانيا بنسبة 5% (Blanco et al., 2003)، في حين أشارت دِراسة أخرى في النرويج إلى نسبة إنتشار 87.6% (Urdahl et al., 2003)، إذ تُؤكّد كل هذه النتائج على أهمية الأغنام كخزان للإشيريكيا القولونية.

وتقَرَّب نتائج دراستنا في عزل جراثيم الإشيريكيا القولونية من عينات الأرضيّة كالدّراسة التي أُجريت في تشيلي، إذ أشارت إلى عزل لجراثيم الإشيريكيا القولونية من عينات الأرضيّة وبنسبة

95% (Astorga et al., 2019)، وتعمل التربة من خلال عواملها الحيويّة وغير الحيويّة على قتل وتثبيط العوامل المُمرضة، ففي الحالات التي تكون فيها الأرضيّة صلبة وجافة تعمل على تثبيط الجراثيم وتمنعها من التأثيرات المرصية في أقصى إمكاناتها، وكذلك التفاعلات المُعدّدة في البيئة والتي تعمل على قتل الأحياء المجهرية (Rotenberg et al., 2005, Baysal et al., 2008)، وقد أشارت دراسات في الولايات المتحدة أنّ لبيئة الحقل تأثيرات كبيرة على إنتشار جراثيم الإشيريكية القولونية داخل المزرعة وخارجها (Hogan et al., 1999, Lung et al., 2001)، وقد اقترحت العديد من الخطط والإستراتيجيات للحد من مخاطر إنتشار جراثيم الإشيريكية القولونية وغيرها من المُسببات المرصية داخل الحقل من خلال تغيير تركيبة الفرشة وتعديل النظام الغذائي ومعالجة النفايات بالتخمير، إذ ذكر الباحثون أنّ عملية التسميد يُمكن أن تُقلل من أعداد المُسببات المرصية فضلاً عن إستخدام فراش الرمل المُعاد تدويره يُمكن أن يُقلل من إنتشار الجراثيم المُمرضة في حقول الحيوانات المنتجة للحليب ومن ثمّ تقليل الخطر من إنتشارها بشكل واسع ووصولها إلى الأغذية، حيث تميل حقول تربية الأغنام وخصوصاً المُعلقة إلى الإحتفاظ بمستوى مُرتفع من جراثيم الإشيريكية القولونية بمرور الوقت والذي تمّ تفسيره على أنّه مُؤثر على عوامل إدارة الحقل ودور الفرشة على الإبقاء والإحتفاظ بالجراثيم (Smith et al., 2001)، إذ سُجّلت العديد من الحالات المرصية ومنها حالات إتهاب الضرع من جرّاء تلوث الفرشة، وهذا ما أثبتته الباحثين حيث أظهرت إنتشار واسع لجراثيم الإشيريكية القولونية في نشارة الخشب المُستخدمة كفرشة من جرّاء تلوثها ببراز الحيوانات، لذلك فإنّ العمليات الإداريّة الحقلية المُستمرّة تعمل على التقليل من إنتشار الجراثيم في الحقول (Hancock et al., 1997, Msolo et al., 2016).

تُظهر النتائج التي توصلنا إليها إلى المدى الكبير في تلوث مياه الشرب للحيوانات ولاسيما في العينات التي جُمعت من الحقول المغلقة، إذ يُزيد هذا المستوى من التلوث من احتمال حدوث خسائر كبيرة من جرّاء الإندلاعات المرصية التي تُحدثها جراثيم الإشيريكية القولونية في الحيوانات، إذ أشارت دراسة أُجريت في نيوزيلاندا إلى تلوث لعينات الماء بجراثيم الإشيريكية القولونية وبنسبة بلغت 65.9% (Cookson et al., 2006)، وتُشير هذه النتائج إلى أنّ جزءاً مهماً من أي إستراتيجية للحد من التلوث بأنواعه ومن ضمنه جراثيم الإشيريكية القولونية يحتاج إلى التوجّه إلى الرعي المُفتوح وكذلك الإدارة الجيدة للتخلص من المُخلفات الحيوانية في أراضي حظائر الحيوانات (Holvoet et al., 2015). ويُشير وجود جراثيم الإشيريكية القولونية في المياه إلى وجود خطر على صحة الحيوانات والإنسان، لأنّ التلوث البرازي يُزيد من خطر توطن جراثيم الإشيريكية القولونية المُسببة للأمراض المعويّة وغيرها من الأمراض من خلال تلويثها للمياه السطحيّة ومياه الأنهار ومن ثمّ إمدادات الرّي ومياه الشرب (Kay et al., 1999)، والعامل الرئيسي المُؤثر على التلوث المُحتمل للمياه بواسطة جراثيم الإشيريكية القولونية يأتي من كمية

براز الحيوانات ومن الطين في الأرضية الرطبة، وقد أثبت الباحثون أن كمية ما يُطرح من جراثيم الإشيريكية القولونية من كل حيوان عن طريق البراز الطري وفي الأرضية الرطبة تكون أكبر بالمقارنة مع الأرضية الجافة بسبب فرصة موت الجراثيم نتيجة الظروف غير المؤاتية (Mawdsley *et al.*, 1995).

وفيما يخص مسحات أيدي العاملين، فقد كانت نسب العزل التي توصلنا إليها أعلى من نسب العزل لجراثيم الإشيريكية القولونية في الدراسة التي أجريت على مناطق مختلفة في اثيوبيا بنسبة 11% من مسحات أيادي الحلابين في مزارع الألبان (Msolo *et al.*, 2016)، وقد تم تحديد العديد من الحالات المرضية بجراثيم الإشيريكية القولونية من خلال تعقبها إذ كان مصدرها الأغنام والأبقار (Strachan *et al.*, 2001, Licence *et al.*, 2001) والماعر (Bielaszewska *et al.*, 1997).

وبالنسبة لنتائج عينات الأعلاف، فقد كانت نتائج دراستنا أعلى بكثير من نتائج دراسات أخرى، كالدراسة التي أجريت في المملكة المتحدة، إذ اشارت إلى عزل لجراثيم الإشيريكية القولونية وبنسبة 6.6% في الأعلاف الجافة (Hutchison *et al.*, 2006)، وتُعزى هذه النتيجة إلى سوء تخزين الأعلاف وخبزها في أماكن قريبة من حوائط الحيوانات وتعرضها لدرجات الحرارة العالية والجفاف والحشرات والاحتفاظ بها لفترات طويلة قبل استخدامها.

وأشارت دراسة في المملكة المتحدة إلى نسبة تلوث للحشائش الخضراء وبنسبة 72% (Hutchison *et al.*, 2006)، وتقرب هذه النتيجة من نتائج دراستنا لعزل جراثيم الإشيريكية القولونية من عينات الحشائش الخضراء، تُعزى هذه النتيجة إلى تلوث حشائش المراعي ببراز الحيوانات وإلى الحشرات ومياه الري لهذه المناطق (Ijabadeniyi *et al.*, 2011).

وفي الأونة الأخيرة، اكتشفت مسارات أخرى لإنقال جراثيم الإشيريكية القولونية من غير المنقولة بالغذاء بسبب الإتصال البشري المباشر مع الحيوانات أو برازها (Keen *et al.*, 2003)، وهذا الإتجاه يؤكد أهمية القياس الكمي والنوعي لانتشار هذا الكائن الحي في الحيوانات وبيئتها.

وبالإتفاق مع نتائجنا والتي تم تحديد أنماط وراثية من جينات *stx1* و *stx2* لعزلات جراثيم الإشيريكية القولونية المعزولة من المصادر المختلفة والتي شملت الدراسة (Kudva *et al.*, 1996, Rubini *et al.*, 1999, Dontorou *et al.*, 2003)، وبالإتفاق مع ما توصلنا إليه بإملاك العزلات الجرثومية لجين *stx1* بنسبة 100%، فقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن النمط الجيني السائد لإنتاج السموم هو *stx1* (Brett *et al.*, 2003)، إذ يُعد هذا الجين من أهم عوامل الضرورة لإنتاج السموم المرتبطة بحدوث العديد من الحالات المرضية كالإسهالات و حدوث متلازمة إنحلال الدم اليوريمي، وقد

أشارت دراسات عديدة إلى ارتباط إنتاج سُوم الـ *stx1* و *stx2* بإنتاج الهيمولايسين إرتباطاً وثيقاً بمُعظم الإشيريكية القولونية من النوع STEC المَعزولة من الأبقار والأغنام والماعز (Bielaszewska et al., 1997)، في حين أشارت دراسة أخرى في استراليا أنّ هناك نسبة إنتشار أعلى لـ *Stx2* من الـ *Stx1* بنسبة 100% و 95% على التوالي (Ramachandran et al., 2001)، إذ يُعدُّ هذا الجين من أهم عَوامل الضَّرَاوة لإنتاج السُّوم المرتبطة في تلف الأنسجة.

يُعدُّ ظُهور وإنتشار مُسببات الأمراض المُقاومة للمُضادّات الحيويّة من التّهدّيات الرئيسيّة للصحة العامّة، ويُمكن لمُسببات الأمراض المُقاومة ولأسيما المعويّة أن تتحمّل الجرعات المُميّنة من المُضادّات الحيويّة ذات التراكيب الكيميائية وآليات العمل المُختلفة (Gajdacs, 2019). تُظهر المعويّات مثل جراثيم الإشيريكية القولونية آليات مُهمّة لتجنّب الجرعات المُميّنة من المُضادّات الحيويّة مثل إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز وتغيير الهدف وإنخفاض الإمتصاص والإفراط في التّعبير عن بروتينات التدفّق. لا يُمكن أن يتطابق مُعدّل إكتشاف الأدوية وتطوُّرها في القرن الحادي والعشرين مع التّغيير المُستمر والصّار في إتجاهات مُقاومة المُضادّات الحيويّة (Medina and Pieper, 2016). وتعمل مُسببات الأمراض المرتبطة بالتهاب المسالك البولية على تغيير ميزاتها بشكل مُتزايد خاصّة بسبب التّطبيب الدّائي والإفراط في استخدام الأدوية وإساءة استخدامها (Kaur et al., 2014). ومع تفتّشي إساءة استخدام المُضادّات الحيويّة، هناك إرتفاع في السلالات الأحدث والأكثر مُقاومة للعوامل المُسببة لإلتهاب المسالك البولية، يُمكن للعدوى الجرثومية المُقاومة للمُضادّات الحيويّة أن تُحد من العلاج الفعّال مما يجعل الإلتهابات الجرثومية صعبة العلاج بما في ذلك إلتهاب المسالك البولية في البلدان مُنخفضة الدّخل، هُنالك ضعف في الوصول إلى الرّعاية الصحيّة وإرتفاع التّكلفة العلاجية مما يحد من استخدام الأدوية الجديده واسعة الطيف (Akram et al., 2007).

أظهرت نتائج إختبار الحساسيّة للمُضادّات الحيويّة وجود بعض المُقاومة لجراثيم الإشيريكية القولونية لأنواع عديدة من المُضادّات الحيويّة كالسيفالوثين (KF) والإريثرومايسين (E) والأموكسيسيلين (AX) وبنسبة 100% و 88% و 77% على التوالي وبنسبة أقل للتتراسايكلين (TE) والستربتومايسين (S) وبنسبة 54% و 46% على التوالي، وكانت حسّاسة لِكُل من الجنتاميسين (CN) وسيفترياكسون (CRO) والسيبروفلوكساسين (CIP) والسيفيكسيم (CFM) بنسبة 94% و 85% و 81% و 75% على التوالي وبنسبة أقل لِكُل من كلورامفينيكول (C) والتريميثوبريم (TMP) وبنسبة 65% و 67% على التوالي والنتروفورانتوين (F) والتتراسايكلين (TE) بنسبة 56% و 46% على التوالي، وتقرّب نتائج الدّراسة من نتائج دّراسات سابقة لنسب الحساسيّة للمُضادّات الحيويّة السيبروفلوكساسين 70.4% والتريميثوبريم 59.3%، في حين كانت نتيجة الحساسيّة للجنتاميسين أقل من دّراستنا وبنسبة 55.6%، من ناحية أخرى،

المقاومة للأموكسيسيلين والإريثرومايسين بنسبة 83.3% لكل منهما، ولالستربتومايسين والكلورامفينيكول وبنسبة 50% و40% على التوالي (Reuben and Owuna, 2013, Alam et al., 2017)، وكانت النتائج أيضاً متقاربة مع دراسة سابقة من ناحية المقاومة للمضاد الحيوي التريميثوبريم وبنسبة 27.3% وللسفترياكسون والسيبروفلوكساسين بنسبة 0% لكل منهما (Disassa et al., 2017, Bedasa et al., 2018). ويعود سبب المقاومة إلى الاستخدام العشوائي وغير المدروس للمضادات الحيوية، وبحسب ما ذكره الباحثون في إظهار الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية عن طريق آليات متعددة وهي الانتخاب (Selection) والتكيف (Adaptation) والطفرة (Mutation) (Garrod et al., 1981).

إن الآليات الرئيسية للمقاومة للمضادات الحيوية تعتمد على الحد من امتصاص الأدوية وتغيير هدف الدواء وتعطيله وإيقاف تدفقه النشط، إذ تكون هذه الآليات إما موجودة فعلاً في بعض الكائنات الدقيقة أو مكتسبة من الكائنات الحية الدقيقة الأخرى، وهنالك من ذهب إلى أنه نوع من التكيف الجرثومي مع الظروف المحيطة لأن هنالك اعتقاد بأن وجود الأجسام المضادة باستمرار هو ما يحافظ على المقاومة، فعندما يظهر جيل مقاوم لجراثيم معينة فإنها تعمل على الحفاظ على هذه السمة والتي تندرج ضمن وسائل التكيف مع الظروف البيئية غير المواتية، أو قد تخضع إلى حدوث طفرات إنتقائية اعتماداً على الضغط الذي تتعرض له والذي يحدد السلوك الذي ستتبعه لإظهار المقاومة أو عن طريق الجراثيم النافعة التي تمتلك جينات مقاومة، حيث يحدث الانتقال العرضي لهذه الجينات أو الطفرات والتي تؤثر على نفاذية الغشاء الخلوي أو ما يُسمى آلية التدفق (Bedasa et al., 2018).

إن استخدام المضادات الحيوية كالسيفالوثين والإريثرومايسين والأموكسيسيلين والتتراساكيلين والستربتومايسين بشكل متكرر لعلاج العديد من الإصابات المرضية أدى إلى زيادة المقاومة الجرثومية لهذه العوامل بين عزلات جراثيم الإشريكية القولونية، والإختلافات في الجرعة وطريقة تناول والإستخدام المستمر والعشوائي للمضادات الحيوية للمعالجة وإضافات الأعلاف في مناطق الدراسة المختلفة، فضلاً عن مستوى الوعي والموقع الجغرافي، كان سبباً في التطور السريع لمقاومة المضادات الحيوية المتعددة والذي سيؤدي إلى تحديد كفاءة العلاجات والقدرة على إدارة الأمراض المعدية في كل من الحيوانات والإنسان، والنتيجة الرئيسية للدراسة الحالية هي أن نسبة كبيرة من العينات قيد الدراسة ملوثة بجراثيم الإشريكية القولونية (Wu et al., 2021).

يُعد استخدام وسط اكار الكونغو الأحمر (CRA) للكشف عن إنتاج الأغشية الحيوية لعزلات الإشريكية القولونية كونها لا تخمر السكريات الأخرى والتي قد تكون ضرورية لإطلاق نواتج أيضية

مُعَيَّنَةٌ تَتَّحِدُ مَعَ صِبْغَةِ الكونغو الحمراء (Congo Red stain) لإضفاء اللون الأسود على المُسْتَعْمَرَاتِ مِمَّا يُشِيرُ إِلَى إنتاج الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ (Mathur *et al.*, 2006, Yaratha *et al.*, 2017).

يُعَدُّ إنتاج الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ مَرَحَلَةً مُهِمَّةً فِي العَدِيدِ مِنَ الحَالَاتِ المَرَضِيَّةِ، لَيْسَ فَقَطْ مِنْ وَجْهَةِ نَظَرِ آلِيَّةِ، وَلَكِنَّهُ قَدْ يَسْمَحُ أَيْضاً بِمُقَاوَمَةِ إِضَافِيَّةٍ تَخْتَلِفُ فِي جَوَانِبٍ أُخْرَى مِنْ مُقَاوَمَةِ المُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ المُتَعَدِّدَةِ (Giaouris *et al.*, 2014, Etefia, 2021)

مِنْ بَيْنِ 48 عَزْلَةً مِنْ جراثيم الإِشِيرِيكِيَا القَوْلُونِيَّةِ، كَانَتْ 32 عَزْلَةً مُنْتِجَةً لِلأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ بِمَعْدَلِ 66.7%، مِنْهَا 22 عَزْلَةً بِنِسْبَةِ 45.8% عَالِيَةِ الإِنْتِاجِ وَ 10 عَزَلَاتٍ بِنِسْبَةِ 20.8% ضَعِيفَةِ الإِنْتِاجِ لِلأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ وَهَذِهِ النَتَائِجُ قَرِيبَةٌ مِمَّنْ نَتَائِجُ الدِّرَاسَاتِ السَّابِقَةِ، (Beloin and Ghigo, 2005, Anandkumar *et al.*, 2021).

مِنْ بَيْنِ عَزَلَاتِ جراثيم الإِشِيرِيكِيَا القَوْلُونِيَّةِ، تَمَّ إِكْتِشَافُ مُعْدَلِ مُرْتَفِعٍ مِنَ المُقَاوَمَةِ الجِراثِمِيَّةِ مَعَ إِنتِاجِ الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ القَوِيَّةِ وَالمُتَوَسِّطَةِ، تَمَّ العُثُورُ عَلَى عِلَاقَةٍ بَيْنَ إِنتِاجِ الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ وَالمُقَاوَمَةِ لِلْمُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ السِيفَالُوثِينِ وَالأَمُوكْسِيسِيلِينِ وَالسِيفِيكْسِيمِ وَالسِيفِتْرِيَاكْسُونِ وَالإِيرِثْرُومِيسِينِ وَالجِنْتَامِيسِينِ وَالسْتِرِبْتُومَايسِينِ بِإِسْتِثْنَاءِ السِيبِرُوفُلُوكْسَاسِينِ وَالكُلُورَامْفِينِيكُولِ وَالتِتْرَاسايكَلِينِ وَالتِّرِيمِثُوبرِيمِ وَالنْتروْفُورَانْتُونِ، وَكَانَتْ هَذِهِ النَتَائِجُ مُتَّفِقَةً مَعَ نَتَائِجِ Ramírez-Castillo وَجَمَاعَتِهِ (2018) إِذْ رَبطَ بَيْنَ الكَائِنَاتِ الحَيَّةِ الدَّقِيقَةِ المُنتِجَةِ لِلأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ وَبَيْنَ مُقَاوَمَةِ العَدِيدِ مِنَ المُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ، وَتَزْدَادُ مُقَاوَمَةُ تِلْكَ المُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ إِلَى 1000 مَرَّةً، لِذَلِكَ قَدْ يَتَطَلَّبُ قَتْلُ الجراثيمِ دَاخِلِ الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ إِعْطَاءَ تَرَكَيزِ عَالِيَةٍ لِلوُصُولِ إِلَى التَّرْكَيزِ الفَعَّالِ الَّذِي يُقَاوِمُ آلِيَّاتِ تَحَلُّلِ المُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ وَالوُصُولِ إِلَى الجراثيمِ وَقَتْلِهَا أَوْ تَعْطِيلِهَا (Behzadi *et al.*, 2020b, Karahutová *et al.*, 2021). وَهنا تَلْعَبُ العَدِيدُ مِنَ المَلاحِقِ السَّطْحِيَّةِ لِلإِشِيرِيكِيَا القَوْلُونِيَّةِ، مِثْلَ الأَسْوَاطِ وَالمُسْتَضَدِّ Ag43 43 وَالأَلْيَافِ المَلْتَوِيَّةِ وَأَلْيَافِ النُّوعِ الأَوَّلِ وَشُعَيْرَاتِ الإِقْتِرَانِ دَوْرًا فِي تَكْوِينِ الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ (Sherlock *et al.*, 2006, Jin and Marshall, 2020). وَيَلْعَبُ التَّحَلُّلُ الدَّائِي وَإِطْلَاقُ الحَامِضِ النُّوَوِيِّ للجراثيمِ أَيْضاً دَوْرًا مُهِمًّا فِي الإِرْتِبَاطِ الأَوَّلِيِّ وَتَشْكِيلِ الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ مِنْ قَبْلِ العَدِيدِ مِنَ الكَائِنَاتِ الحَيَّةِ الدَّقِيقَةِ (Costerton, 1995, Nakao *et al.*, 2012).

نَظَرًا لِأَنَّ إِنتِاجِ الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ هُوَ سِلُوكٌ تَعَاوُنِيٌّ مُتَبَادِلُ المَنْفَعَةِ بَيْنَ الكَائِنَاتِ الحَيَّةِ الدَّقِيقَةِ لِتَعْزِيزِ بَقَائِهَا عَلَى قَيْدِ الحَيَاةِ، فَلا يُوجَدُ إِسْتِيعَادٌ أَنَّهُ سَيَكُونُ هُنَاكَ إِنتِقَالٌ لِلجِينَاتِ بَيْنَ الكَائِنَاتِ الحَيَّةِ الدَّقِيقَةِ لِتَطْوِيرِ مُقَاوَمَةِ المُضَادَّاتِ الحَيَوِيَّةِ وَإِنْتِاجِ الأَغْشِيَّةِ الحَيَوِيَّةِ، وَهَذَا يُسَلِّطُ الضَّوءَ عَلَى العِلَاقَةِ الكَبِيرَةِ وَالمُوثِقَةِ بَيْنَ الأَلْيَتِينِ (Niederdorfer *et al.*, 2017, Karahutová *et al.*, 2021)، وَقَدْ يُفَسَّرُ هَذَا التَّبَادُلُ التَّطَوُّرِيُّ

إتجاهات المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة في نفس أنواع الجراثيم التي تُنتج والتي لا تُنتج الأغشية الحيوية، مما يعني أننا نجدُ عزلات مقاومة ومنتجة للأغشية الحيوية وعزلات أخرى منتجة للأغشية الحيوية غير مقاومة للمضادات الحيوية والعكس صحيح أو ليس لديهم كلاهما (Nadell and Bassler, 2011)، وهذا ما أظهرته دراستنا لمقاومة الأريثروميسين مع إنتاج مُتوسيط للغشاء الحيوي.

الفصل السادس

الإستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

1-6 : الإستنتاجات Conclusions :

1. عزل جراثيم الإشيريكية القولونية من حليب النعاج المرضعة وجمالها الرضية والبيئة المحيطة بهم.
2. تلعب عناصر البيئة المحيطة دوراً كبيراً في إنتقال جراثيم الإشيريكية القولونية والإبقاء على مستوى مرتفع في حقول تربية الأغنام وينسب عالية.
3. تشخيص جراثيم الإشيريكية القولونية باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل بالإعتماد على جين *uidA* يُعد من الطرائق الدقيقة.
4. تحديد جينات *Stx1* و *Stx2* المنتجة للسموم في عزلات جراثيم الإشيريكية القولونية.
5. أظهرت عزلات جراثيم الإشيريكية القولونية مقاومة متفاوتة لبعض المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة.
6. أغلب عزلات الإشيريكية القولونية كانت منتجة للغشاء الحيوي.
7. وجود علاقة بين مقاومة بعض المضادات الحيوية وإنتاج الأغشية الحيوية لبعض عزلات الإشيريكية القولونية.

2-6 : التوصيات Recommendations :

1. إجراء دراسة أخرى مُشابهة على أنواع أخرى من الجراثيم.
2. إجراء فحص الحساسية للتأكيد على الإستخدام الصحيح والمُنهَج للمُضادّات الحيويّة لعلاج الحالات المرَضِيّة.
3. العمل على تطوير إستراتيجيات مُناسبة فيما يتعلّق ببروتوكولات الوقاية والعلاج والسيطرة.
4. توعية المُربّين بأهميّة إجراءات النظافة في الحقل والتي تشمل الأعلاف والمساكن والأرضيات والمياه.
5. توعية المُربّين إلى تغيير مناطق رعي الأغنام بين الحين والآخر وعدم الإعتماد على مرعى واحد.
6. العمل على زيادة مُستوى الوعي لدى المُربّين بأهمية استخدام النُظْم والطرائق الحديثة في التربيّة من إيواء وإجراءات إدارية والتأكيد على أهميّة إتباع الإجراءات الصحيّة والإدارية في نُظْم تربيّة الأغنام إذ يُعدُّ أسلوب التربيّة غير المُتبع للإجراءات الصحيّة والإداريّة مصدرًا للعدوى.

المصادر

References

المصادر الإنكليزية

- Abbas, B., Khudor, M. and Abid Smeasem, O. 2012. Detection of verotoxigenic *E. coli* O157: H7 in raw milk using duplex PCR in Basrah city-Iraq. *MRVSA*, 1, 25-33.
- Abbas, G., Khan, I. and Mohsin, M. 2019. High rates of CTX-M group-1 extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* from pets and their owners in Faisalabad, Pakistan. *Infection and Drug Resistance*, 12, 571.
- Afzal, M. 2017. Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* and *klebsiella* species in pakistan: a brief overview. *J Microb Biochem Technol*, 9, 277-279.
- Agarwal, J., Srivastava, S. and Singh, M. 2012. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian journal of medical microbiology*, 30, 141-149.
- Ahmed, I. M. 2021. Detection of CTX-M gene in extended spectrum β -lactamases producing *Enterobacteriaceae* isolated from bovine milk. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35, 397-402.
- Akram, M., Shahid, M. and Khan, A. U. 2007. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 6, 1-7.
- Alag, R. N. and Aziz, Z. D. 2020. Detection of ESBLsCTX-M Gene of *E.coli* Isolated from Clinical Cases in Maysan Province. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 14(1).

- Alam, M .K.-U., Akther, S., Sarwar, N., Morshed, S. and Debnath, G. K. 2017. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 isolated from raw milk marketed in Chittagong, Bangladesh. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(3), 214-220.
- Alaubydi, M. A., Almasaudi, H.F., and Jawad, S. 2018. Detection of *cnf1* gene in the local human uropathogenic *E.coli* isolate and study some immunological and histopathological effects in vivo. *Iraqi journal of biotechnology*, 17(1), pp.27-36.
- Ali, J., Rafiq, Q. A. and Ratcliffe, E. 2018. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future science OA*, 4, FSO290.
- Anandkumar, H., Nigudgi A, Hajare V and S, B. 2021. Evaluation of cell surface hydrophobicity and biofilm formation as pathogenic determinants among ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian Journal of Microbiology Research*, 8, 263–267.
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J. and Hultgren, S. J. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*, 301, 105-107.
- Anon 2010. LIVESTOCK: Sheep and Goats At Risk. *Africa Research Bulletin: Economic, Financial and Technical Series*, 47, 10.
- Antão, E.-M., Wieler, L. H. and Ewers, C. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut pathogens*, 1, 1-12.
- Assessment, R. 2009. Microbiological Risk Assessment of Raw Cow Milk.
- Astorga, F., Navarrete-Talloni, M. J., Miró, M. P., Bravo, V., Toro, M., Blondel, C. J. and Hervé-Claude, L. P. 2019. Antimicrobial resistance in *E.coli* isolated from dairy calves and bedding material. *Heliyon*, 5, e02773.
- Bajaj, P., Singh, N. and Viridi, J. 2016. *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Front Microbiol.* 2016; 7: 417.

- Basak, S., Singh, P. and Rajurkar, M. 2016. Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: a study. *Journal of pathogens*, 2016.
- Bastauerous, A., Thabet, A. E.-R., Abdel Hafeez, M., Sayed, A. and Arafa, M. 2001. Studies on diarrhoea in lambs in assiut governorate 1-isolation and identification of causative bacterial and parasitic agents. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 46, 98-108.
- Baur, A., Kirby, W., Sherris, J. C., Turck and Turch, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J clin pathol*, 45, 493-4.96
- Baysal, F., Benitez, M.-S., Kleinhenz, M. D., Miller, S. A. and Gardener, B. B. M. 2008. Field management effects on damping-off and early season vigor of crops in a transitional organic cropping system. *Phytopathology*, 98, 562-570.
- Bedasa, S., Shiferaw ,D., Abraha, A. and Moges, T. 2018. Occurrence and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* O157:H7 from food of animal origin in Bishoftu town, Central Ethiopia. *International Journal of Food Contamination*, 5, 1-8.
- Behzadi, P., Urbán, E .and Gajdács, M. 2020a. Association between biofilm-production and antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): an in vitro study. *Diseases*, 8, 17.
- Behzadi, P., Zsoldiné Urbán, E. and Gajdács, M. 2020b. Association between Biofilm-Production and Antibiotic Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): an in vitro study. *Diseases*, 8(2), 17.
- Beloin, C. and Ghigo, J.M. 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in microbiology*, 13, 16-19.
- Bennett, A., Macphee, S. and Betts, R. 1996. The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of immunomagnetic separation and immunoassay procedures. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 237-243.

- Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S. and Scheutz, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of clinical microbiology*, 31, 2483-2488.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. and Holland, I. 1986. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infection and immunity*, 52, 63-69.
- Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Minaříková, H., Jikova, E., Karmali, M., Laubova, J., Preston, M., Khakhria, R. and Karch, H. 1997. Human *Escherichia coli* O157 [ratio] H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiology and Infection*, 119, 299-305.
- Blackburn, C. D. W. and Mccarthy, J. 2000. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157 :H7 in foods. *International journal of food microbiology*, 55, 285-290.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I., Alonso, M. P., Coira, A., Rodriguez, A. and Rey, J. 2003. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157: H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental biology and medicine*, 228, 345-351.
- Bolick, D. T., Roche, J. K., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., Nataro, J. P. and Guerrant, R. L. 2013. Enteroaggregative *Escherichia coli* strain in a novel weaned mouse model: exacerbation by malnutrition, biofilm as a virulence factor and treatment by nitazoxanide. *Journal of medical microbiology*, 62, 896.
- Bonardi, S., Alpigiani, I., Tozzoli, R., Vismarra, A., Zecca, V., Greppi, C., Bacci, C., Bruini, I. and Brindani, F. 2015. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157, O26 and O111 in cattle faeces and hides in Italy. *Veterinary record open*, 2, e000061.

- Bopp, D. J., Sauders, B. D., Waring, A. L., Ackelsberg, J., Dumas, N., Braun-Howland, E., Dziewulski, D., Wallace, B. J., Kelly, M. and Halse, T. 2003. Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *Journal of clinical microbiology*, 41, 174-180.
- Borkar, S. 2017. Biochemical Tests Used in Identification of Bacteria. *Laboratory Techniques in Plant Bacteriology*. CRC Press.
- Bray, J. 1945. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 57, 239-247.
- Brett, K. N., Ramachandran, V., Hornitzky, M. A., Bettelheim, K. A., Walker, M. J. and Djordjevic, S. P. 2003. stx 1c is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 926-936.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J., Morse, S., Mietzner, T. and Jawetz, M. 2007. Adelberg's medical microbiology. *Sultan Qaboos Univ. Med. J*, 7, 273.
- Brown, A. and Smith, H. 2014. *Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology, Short Version*, McGraw-Hill Education.
- Cambrea, S. C. 2014. Antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated in a pediatric population from South Eastern Romania. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, 9, 157-162.
- Caprioli, A., Busani, L., Martel, J. L. and Helmuth, R. 2000. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 295-301.

- Cardozo, M. V., Liakopoulos, A., Brouwer, M., Kant, A., Pizauro, L. J. L., Borzi, M. M., Mevius, D. and De Ávila, F. A. 2021. Occurrence and molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales recovered from chicken, chicken meat, and human infections in Sao Paulo State, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, p.901.
- Chapman, P. 2000. Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield, UK. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 51S-60S.
- Chapman, P., Siddons, C., Malo, A. C. and Harkin, M. 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection*, 119, 245-250.
- Chen, M., Jahnukainen, T., Bao, W., Daré, E., Ceccatelli, S. and Celsi, G. 2003. Uropathogenic *Escherichia coli* toxins induce caspase-independent apoptosis in renal proximal tubular cells via ERK signaling. *American journal of nephrology*, 23, 140-151.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. and Beachey, E. H. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and immunity*, 37, 318-326.
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H. and Thiange, P. 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food control*, 31, 251-262.
- Collins, R. and Carson, A. 2022. Watery mouth disease in lambs. *Veterinary Record*, 190, 28-29.
- Committee, E. W. 2015. Public Health England. English Surveillance Programme for Antimicrobial Utilisation and Resistance (ESPAUR) 2010 to 2014. Report 2015.

- Cookson, A., Taylor, S. and Attwood, G. 2006. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 54, 28-33.
- Costerton, J. W. 1995. Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15, 137-140.
- Dahms, C., Hübner, N.O., Kossow, A., Mellmann, A., Dittmann, K. and Kramer, A. 2015. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PloS one*, 10, e0143326.
- De Kraker, M. E., Stewardson, A. J. and Harbarth, S. 2016. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS medicine*, 13, e1002184.
- De La Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L. and Hancock, R. E. 2013. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current opinion in microbiology*, 16, 580-589.
- Disassa, N., Sibhat, B., Mengistu, S., Muktar, Y. and Belina, D. 2017. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *E.coli* O157: H7 isolated from traditionally marketed raw cow milk in and around Asosa town, western Ethiopia. *Veterinary medicine international*, 2017.
- Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A. and Levidiotou, S. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods in Greece. *International journal of food microbiology*, 82, 273-279.
- Etefia, E. 2021. Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli*.
- Fabbri, A., Travaglione, S., Falzano, L. and Fiorentini, C. 2008. Bacterial protein toxins: current and potential clinical use. *Current medicinal chemistry*, 15, 1116-1125.

- Forero, M., Yakovenko, O., Sokurenko, E. V., Thomas, W. E. and Vogel, V. 2006. Uncoiling mechanics of *Escherichia coli* type I fimbriae are optimized for catch bonds. *PLoS biology*, 4, e298.
- Founou, L. L., Founou, R. C. and Essack, S. Y. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Frontiers in microbiology*, 7, 1881.
- Fragkou, I., Boscos, C. and Fthenakis, G. 2014. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*, 118, 86-92.
- Freeman, D., Falkiner, F. and Keane, C. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42, 872-874.
- Frydendahl, K. 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Veterinary microbiology*, 85, 169-182.
- Fujioka, M., Otomo, Y. and Ahsan, C. R. 2013. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*, 92, 289-292.
- Fusco, A., Coretti, L., Savio, V., Buommino, E., Lembo, F. and Donnarumma, G. 2017. Biofilm formation and immunomodulatory activity of *Proteus mirabilis* clinically isolated strains. *International journal of molecular sciences*, 18, 414.
- Fusco, V. and Quero, G. M. 2014. Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid-based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 493-537.
- Gajdács, M. 2019. The concept of an ideal antibiotic: implications for drug design. *Molecules*, 24, 892.

- Garau, J. 2006. Impact of antibiotic restrictions: the ethical perspective. *Clinical microbiology and infection*, 12, 16-24.
- Garbaj, A. M., Awad, E. M., Azwai, S. M., Abolghait, S. K., Naas, H. T., Moawad, A. A., Gammoudi, F. T., Barbieri, I. and Eldaghayes, I. M. 2016. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in milk and dairy products from Libya: Isolation and molecular identification by partial sequencing of 16S rDNA. *Veterinary world*, 9, 1184.
- Garcia, M. and Munoz Bellido, J. 2007. Garcia Rodriguez JA Spanish Cooperative Group for the Study of Antimicrobial Susceptibility of Community U. *in vitro susceptibility of community-acquired urinary tract pathogens to commonly used antimicrobial agents in Spain: a comparative multicenter study, (2002–2004) J Chemother*, 19, 263-270.
- Garrity, B., Don J, Krieg, N. R., Staley, J. T. and Gm 2005. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, Springer.
- Garrod, L., Lambert, H., O'grady, F. and Waterworth, P. 1981. Antibiotic and chemotherapy, 5th edn Churchill Livingstone. *Edinburgh London New York*, 72-77.
- Gerba, C. P. and Smith, J. E. 2005. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *Journal of environmental quality*, 34, 42-48.
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S. and Nychas, G.J. 2014. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat science*, 97, 298-309.
- Giufre, M., Mazzolini, E., Cerquetti, M., Brusaferrò, S., Accogli, M., Agnoletti, F., Agodi, A., Alborali, G. L., Arghittu, M. and Auxilia, F. 2021. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal

- infections in humans and from food-producing animals in Italy: a 'One Health' study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58, 106433.
- Gonzalez, J., Cadona, J. S., Zotta, C. M., Lavayén, S., Vidal, R., Padola, N. L., Sanso, A. M. and Bustamante, A. V. 2022. Genetic features of verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 isolated from clinical cases of Argentina and Chile. *Microbes and Infection*, 24, 104883.
- Gouali, M. and Weill, F.-X. 2013. Les *Escherichia coli* entérohémorragiques: des entérobactéries d'actualité. *La presse Médicale*, 42, 68-75.
- Gwyther, C. L., Jones, D. L., Golyshin, P. N., Edwards-Jones, G. and Williams, A.P. 2012. Fate of pathogens in a simulated bioreduction system for livestock carcasses. *Waste Management*, 32, 933-938.
- Habouria, H., Pokharel, P., Maris, S., Garénaux, A., Bessaiah, H., Houle, S., Veyrier, F. J., Guyomard-Rabenirina, S., Talarmin, A. and Dozois, C. M. 2019. Three new serine-protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney. *Virulence*, 10, 568-587.
- Hancock, D., Besser, T., Rice, D., Herriott, D. and Tarr, P. 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiology and Infection*, 118, 193-195.
- Hassan, N., Sheikh, G., Malik, H., Shaheen, M. and Willayat, M. 2013. Hemato-biochemical and therapeutic studies on *Escherichia coli* associated with concurrent enteric infection in lambs. *Veterinary World*, 6, 870.
- Hemme, T. and Otte, J. 2010. *Status and prospects for smallholder milk production: A global perspective*, FAO, Roma (Italia).
- Hemraj, V., Diksha, S. and Avneet, G. 2013. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare J Life Sci*, 1, 1-7.
- Hogan, J., Bogacz, V., Thompson, L., Romig, S., Schoenberger, P., Weiss, W. and Smith, K. 1999. Bacterial counts associated with sawdust and recycled

- manure bedding treated with commercial conditioners. *Journal of dairy science*, 82, 1690-1695.
- Holvoet, K., Sampers, I., Seynaeve, M., Jacxsens, L. and Uyttendaele, M. 2015. Agricultural and management practices and bacterial contamination in greenhouse versus open field lettuce production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 32-63.
- Horakova, K., Mlejnkova, H. and Mlejnek, P. 2008. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, β -d-glucuronidase, and β -d-galactosidase. *Journal of applied microbiology*, 105, 970-976.
- Hutchison, M., Thomas, D., Walters, L. and Avery, S. M. 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, faecal coliforms and coliphage in animal feeds. *Letters in applied microbiology*, 43, 205-210.
- Ijabadeniyi, O. A., Debusho, L. K., Vanderlinde, M. and Buys, E. M. 2011. Irrigation water as a potential preharvest source of bacterial contamination of vegetables. *Journal of Food Safety*, 31, 452-461.
- Ivbade, A., Ojo, O. E. and Dipeolu, M. A. 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in milk and milk products in Ogun State, Nigeria. *Vet. Ital*, 50, 185-191.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M. and Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the chinese medical association*, 81, 7-11.
- Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. 2016. *Review of medical microbiology*.
- Jenkins, C., Ling, C. L., Ciesielczuk, H. L., Lockwood, J., Hopkins, S., Mchugh, T. D., Gillespie, S. H. and Kibbler, C. C. 2012. Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *Journal of medical microbiology*, 61, 483-488.

- Jin, X. and Marshall, J. S. 2020. Mechanics of biofilms formed of bacteria with fimbriae appendages. *PLoS One*, 15, e0243280.
- Jo, M.-Y., Kim, J.-H., Lim, J.-H., Kang, M.-Y., Koh, H.-B., Park, Y.-H., Yoon, D.-Y., Chae, J.-S., Eo, S.-K. and Lee, J. H. 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *International journal of food microbiology*, 95, 41-49.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2, 123-140.
- Karahutová, L., Mandelík, R. and Bujňáková, D. 2021. Antibiotic Resistant and Biofilm-Associated *Escherichia coli* Isolates from Diarrheic and Healthy Dogs. *Microorganisms*, 9, 1334.
- Kaur, N., Sharma, S., Malhotra, S., Madan, P. and Hans, C. 2014. Urinary tract infection: aetiology and antimicrobial resistance pattern in infants from a tertiary care hospital in northern India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8, DC01.
- Kay, D., Wyer, M., Crowther, J., O'neill, J., Jackson, G., Fleisher, J. and Fewtrell, L. 1999. Changing standards and catchment sources of faecal indicators in nearshore bathing waters. *Water quality processes and policy*, 47-64.
- Keen, J., Wittum, T., Dunn, J., Bono, J. and Fontenot, M. 2003. Occurrence of STEC O157, O111, and O26 in livestock at agricultural fairs in the United States. Proc. 5th Int. Symp. on Shiga Toxin-Producing,.
- Khalaf, T. T. and Al-Khafaji, Z. M. 2014. Prevalence of oxalobacter formigenes among the iraqi population. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS)*, 3, 165-177.
- Kjelstrup, C. K., Barber, A. E., Norton, J. P., Mulvey, M. A. and L'abée-Lund, T. M. 2017. *Escherichia coli* O78 isolated from septicemic lambs shows high pathogenicity in a zebrafish model. *Veterinary research*, 48, 1-8.

- Klement, E., Chaffer, M., Leitner, G., Shwimmer, A., Friedman, S., Saran, A. and Shpigel, N. 2005. Assessment of accuracy of disk diffusion tests for the determination of antimicrobial susceptibility of common bovine mastitis pathogens: a novel approach. *Microbial Drug Resistance*, 11, 342-350.
- Konradt, G., Bassuino, D. M., Prates, K. S., Bianchi, M. V., Snel, G. G., Sonne, L., Driemeier, D. and Pavarini, S. P. 2017. Doenças infecciosas supurativas do sistema nervoso central de ruminantes domésticos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 820-828.
- Kudva, I. T., Hatfield, P. G. and Hovde, C. J. 1996. *Escherichia coli* O157: H7 in microbial flora of sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 431-433.
- Kuenzli, E. 2016. Antibiotic resistance and international travel: Causes and consequences. *Travel medicine and infectious disease*, 14, 595-598.
- Kuusi, M., Klemets, P., Miettinen, I., Laaksonen, I., Sarkkinen, H., Hänninen, M.-L., Rautelin, H., Kela, E. and Nuorti, J. 2004. An outbreak of gastroenteritis from a non-chlorinated community water supply. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 58, 273-277.
- Laird, E. D. 2016. *Characterization of antibiotic resistance profiles of surface water bacteria in an urbanizing watershed* (Doctoral dissertation).
- Lamy, B., Carret, G., Flandrois, J. P. and Delignette-Muller, M. L. 2004. How does susceptibility prevalence impact on the performance of disk diffusion susceptibility testing? *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 49, 131-139.
- Laurent, P., Jean-Yves, M., Agnese, L., Anne-Kathrin, S., Nicolas, K. and Patrice, N. 2018. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.*, 6, 289-316.
- Lazarus, B., Paterson, D. L., Mollinger, J. L. and Rogers, B. A. 2015. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clinical Infectious Diseases*, 60, 439-452.

- Levison, L., Miller-Cushon, E., Tucker, A., Bergeron, R., Leslie, K., Barkema, H. and Devries, T. 2016. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*, 99, 1341-1350.
- Licence, K., Oates, K., Synge, B. and Reid, T. 2001. An outbreak of *E.coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiology and Infection*, 126, 135-138.
- Lung, A., Lin, C.-M., Kim, J., Marshall, M., Nordstedt, R., Thompson, N. and Wei, C. 2001. Destruction of *Escherichia coli* O157: H7 and Salmonella enteritidis in cow manure composting. *Journal of food protection*, 64, 1309-1314.
- Macfaddin, J. 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria, 2000. *The Willims and Wilkinson Baltimore*. [Google Scholar].
- Madec, J.-Y., Haenni, M., Nordmann, P. and Poirel, L. 2017. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC-and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? *Clinical microbiology and infection*, 23, 826-833.
- Maheshwari, R., Bhutani, N. and Suneja, P. 2019. Screening and characterization of siderophore producing endophytic bacteria from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum* plants. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7-4.
- Malberg Tetzschner, A. M., Johnson, J. R., Johnston, B. D., Lund, O. and Scheutz, F. 2020. In silico genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. *Journal of clinical microbiology*, 58, e01269-01220.
- Mariana, N., Salman, S., Neela, V. and Zamberi, S. 2009. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillinresistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 330-338.
- Marth, E. H. and Steele, J. 2001. *Applied dairy microbiology*, CRC Press.

- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D., Fatma, T. and Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*, 24, 25-29.
- Mawdsley, J. L., Bardgett, R. D., Merry, R. J., Pain, B. F. and Theodorou, M. K. 1995. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Applied soil ecology*, 2, 1-15.
- Maynou, G., Bach, A. and Terré, M. 2017. Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* isolated from fecal and nasal swabs. *Journal of dairy science*, 100, 2682-2694.
- Mcdevitt, S. 2009. Methyl red and voges-proskauer test protocols. *American Society for Microbiology*, 8.
- Mcfarland, M., Holcombe, D., Redelman, D., Garner, D., Allen, J., Surian, M. and King, D. 2000. Quantification of subclinical mastitis using flow cytometry in sheep. *Proceedings-American Society of Animal Science Western Section*,. 380-383.
- Mcgowan, K., Wickersham, E. and Strockbine, N. 1989. *Escherichia coli* 0157: H7 from water. *the Lancet*, 333, 967-968.
- Medina, E. and Pieper, D. H. 2016. Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. *How to overcome the antibiotic crisis*, 3-33.
- Meini, S., Tascini, C., Cei, M., Sozio, E. and Rossolini, G. M. 2019. AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection*, 47, 363-375.
- Meshref, A. M .S. 2013. Bacteriological quality and safety of raw cow's milk and fresh cream. *Slovenian Veterinary Research*, 50, 21-30.
- Messele, Y.E., 2016. Characterization of drug resistance patterns of *E.coli* isolated from milk collected from small scale dairy farms reared in holeta

- and burayu and meat from addis ababa abattoirs enterprise and alema farm slaughter slab MVSc (Doctoral dissertation, thesis, Addis Ababa University College of Veterinary Medicine and Agriculture. Bishoftu, Ethiopia [Dissertation] pp: 37-51).
- Mittal, S., Sharma, M. and Chaudhary, U. 2015. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens and global health*, 109, 26-29.
- Mohammed, Z. A. 2021. A study of pathological abnormalities of genitalia in ewes in Duhok, Iraq. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 35(3), 421-427.
- Morris, R. D. and Levin, R. 1995. Estimating the incidence of waterborne infectious disease related to drinking water in the United States. *IAHS Publications-Series of Proceedings and Reports-Intern Assoc Hydrological Sciences*, 233, 75-88.
- Morris, R. D., Naumova, E. N. and Griffiths, J .K. 1998. Did Milwaukee experience waterborne cryptosporidiosis before the large documented outbreak in 1993? *Epidemiology*, 264-270.
- Moyo, S. J., Maselle, S. Y., Matee, M. I., Langeland, N. and Mylvaganam, H. 2007. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC infectious diseases*, 7, 1-7.
- Msolo, L., Igbinosa, E. O. and Okoh, A. I. 2016. Prevalence and antibiogram profiles of *Escherichia coli* O157: H7 isolates recovered from three selected dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6, 990-995.
- Myckatyn, T. M., Cohen, J. and Chole, R. A. 2016. Clarification of the definition of a “biofilm”. *Plastic and reconstructive surgery*, 137, 237e-238e.
- Nadeem, S. F., Gohar, U. F., Tahir, S. F., Mukhtar, H., Pornpukdeewattana, S., Nukthamna, P., Moula Ali, A. M., Bavisetty, S. C. B. and Massa, S. 2020. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 46, 578-599.

- Nadell, C. D. and Bassler, B. L. 2011. A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 14181-14185.
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S. N. and Uhlin, B. E. 2012. Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PloS one*, 7, e51241.
- Nataro, J. P. and Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11, 142-201.
- Neeser, J.-R., Koellreutter, B. and Wuersch, P. 1986. Oligomannoside-type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation of potent inhibitors from plant glycoproteins. *Infection and immunity*, 52, 428-436.
- Nemser, S. M., Doran, T., Grabenstein, M., McConnell, T., Mcgrath, T., Pamboukian, R., Smith, A. C., Achen, M., Danzeisen, G. and Kim, S. 2014. Investigation of *Listeria*, *Salmonella*, and toxigenic *Escherichia coli* in various pet foods. *Foodborne pathogens and disease* 11(9), pp.706-709.
- Niederdorfer, R., Besemer, K., Battin, T. J. and Peter, H. 2017. Ecological strategies and metabolic trade-offs of complex environmental biofilms. *npj Biofilms and Microbiomes*, 3, 1-6.
- Ogden, I. D., Fenlon, D. R., Vinten, A. J. and Lewis, D. 2001. The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *International journal of food microbiology*, 66, 111-117.
- Ogden, I. D., Macrae, M. and Strachan, N. J. C. 2005. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in sheep faeces at pasture in Scotland. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 646-651.
- Olowe, B., Oluyeye, J., Famurewa, O., Ogunniran, A. and Adelegan, O. 2017. Molecular identification of *Escherichia coli* and new emerging enteropathogen, *Escherichia fergusonii*, from drinking water sources in Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria. *J. Microbiol. Res*, 7, 45-54.

- Olsen, R. H., Bisgaard, M., Löhren, U., Robineau, B. and Christensen, H. 2014. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. *Avian Pathology*, 43, 199-208.
- Olsen, S. J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., Mckee, G., Fox, K., Bibb, W. and Mead, P. 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerging infectious diseases*, 8(4), 370.
- Orden, J., Ruiz-Santa-Quiteria, J., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Cid, D., González, E., Blanco, J. and De La Fuente, R. 2003. Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiology and Infection*, 130, 313-321.
- Palmeira, J. D. and Ferreira, H. M. N. 2020. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in cattle production—a threat around the world. *Heliyon*, 6, e03206.
- Park, H.K., Jung, Y. J., Chae, H. C., Shin, Y. J., Woo, S. Y., Park, H. S. and Lee, S. J. 2009. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (kps, usp and ireA) and enteroaggregative genes (aggR and aap) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 43, 51-57.
- Persson, S., Olsen, K., Scheutz, F., Krogfelt, K. and Gerner-Smidt, P. 2007. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clinical microbiology and infection*, 13, 516-524.
- Pincus, D. H. 2006. Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 1-32.

- Pitout, J. 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, 3, 9.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A.K., Kieffer, N., Nordmann, P. and Schwarz, S. 2018. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 6-4.
- Polse, R. F., Yousif, S. Y. and Assaf, M. S. 2016. Prevalence and molecular characterization of extended spectrum beta-Lactamases-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated in Zakho, Iraq. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 6, 163-167.
- Pope, M. L., Bussen, M., Feige, M. A., Shadix, L., Gonder, S., Rodgers, C., Chambers, Y., Pulz, J., Miller, K. and Connell, K. 2003. Assessment of the effects of holding time and temperature on *Escherichia coli* densities in surface water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6201-6207.
- Prüß, B. M., Besemann, C., Denton, A. and Wolfe, A. J. 2006. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 188, 3731-3739.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S. and Fitzpatrick, E. 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*, John Wiley and Sons.
- Ramachandran, V., Hornitzky, M. A., Bettelheim, K. A., Walker, M. J. and Djordjevic, S. P. 2001. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1932-1937.
- Ramírez-Castillo, F. Y., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Márquez-Díaz, F., Harel, J. and Guerrero-Barrera, A. L. 2018. An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 17, 1-13.

- Ravi, I., Baunthiyal, M. and Saxena ,J. 2014. *Advances in biotechnology*, Springer.
- Reuben, R. and Owuna, G. 2013. Antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* O157: H7 from Nigerian fermented milk samples in Nasarawa State, Nigeria. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 2, 38-44.
- Rice, E., Baird, R., Eaton, A. and Lenore, S. 2012. Standard methods: For the examination water and wastewater, 22nd edn. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation. ISSN.
- Riedel, S ,Morse, S. A., Mietzner, T. A. and Miller, S. 2019. *Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 28 E*, McGraw Hill Professional.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T. and Blake, P.A., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England journal of medicine*, 308(12), pp.681-685.
- Rotenberg, D., Cooperband, L. and Stone, A. 2005. Dynamic relationships between soil properties and foliar disease as affected by annual additions of organic amendment to a sandy-soil vegetable production system. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1343-1357.
- Rubini, S., Cardeti, G., Amity, S., Manna, G., Onorati, R., Caprioli, A. and Morabito, S. 1999. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in sheep milk. *The Veterinary Record*, 144(2), 56.
- Russo, T. A., Davidson, B. A ,Genagon, S. A., Warholic, N. M., Macdonald, U., Pawlicki, P. D., Beanan, J. M., Olson, R., Holm, B. A. and Knight Iii, P. R. 2005. *E.coli* virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289, L207-L216.

- Russo, T. A. and Johnson, J. R. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and infection*, 5, 449-456.
- Ryan, K. and Ray, C. 2004. Sherris Medical Microbiology McGraw Hill. Pp112.
- Sáez-López, E., Bosch, J., Salvia, M. D., Fernández-Orth, D., Cepas, V., Ferrer-Navarro, M., Figueras-Aloy, J., Vila, J. and Soto, S. M. 2017. Outbreak caused by *Escherichia coli* O18: K1: H7 sequence type 95 in a neonatal intensive care unit in Barcelona, Spain. *The Pediatric infectious disease journal*, 36, 1079-1086.
- Sambrook, J. and Rusell, D. 2001. Molecular Cloning :A Laboratory Manual 3rd Ed Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York.
- Saravanan, V., Mollinga, P. P. and Bogardi, J. J. 2011. Global change, wastewater and health in fast growing economies. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 3(6), 461-466.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G. and Choroszy-Krol, I. 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*, 11, 1-16.
- Sauer, K., Rickard, A. H. and Davies, D. G. 2007. Biofilms and biocomplexity. *Microbe-American Society for Microbiology*, 2, 347.
- Schwaber, M. J. and Carmeli, Y. 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 913-920.
- Sebsibe, M. A. and Asfaw, E. T. 2020. Occurrence of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157: H7 in meat and swab samples of various contact surfaces at abattoir and butcher shops in Jimma town, Southwest district of Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3853.

- Shabana, I., Zaraket, H. and Suzuki, H. 2013. Molecular studies on diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from humans and animals in Egypt. *Veterinary microbiology*, 167, 532-539.
- Shah, M. K., Aziz, S. A., Zakaria, Z., Lin, L. C., & Goni, M. D. 2018. A Review on Pathogenic *Escherichia coli* in Malaysia. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 6(2).
- Shariff, A. S., M. S.; Yadav, T. And Radhakrishna 2013. The antibiotic susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli*, with special reference to the fluoroquinolones. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(6), 1027.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S. and Gabrani, R. 2016. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology*, 121, 309-319.
- Sherlock, O., Dobrindt, U., Jensen, J. B., Munk Vejborg, R. and Klemm, P. 2006. Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *Journal of bacteriology*, 188, 1798-1807.
- Slutsker, L., Ries, A. A., Maloney, K., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M. and Group, E. C. O. H. S. 1998. A nationwide case-control study of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the United States. *Journal of Infectious Diseases*, 177, 962-966.
- Smith, D., Blackford, M., Younts, S., Moxley, R., Gray, J., Hungerford, L., Milton, T. and Klopfenstein, T. 2001. Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *Journal of Food Protection*, 64, 1899-1903.
- Solomakos, N., Govaris, A., Angelidis, A. S., Pournaras, S., Burriel, A. R., Kritas, S. K. and Papageorgiou, D. K. 2009. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food microbiology*, 26, 865-871.

- Soltani, S., Emamie, A. D., Dastranj, M., Farahani, A., Davoodabadi, A. and Mohajeri, P. 2018. Role of toxins of uropathogenic *Escherichia coli* in development of urinary tract infection. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 21(1).
- Steele, M. L., McNab, W. B., Poppe, C., Griffiths, M. W., Chen, S., Degrandis, S. A., Fruhner, L. C., Larkin, C. A., Lynch, J. A. and Odumeru, J. A. 1997. Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. *Journal of Food Protection*, 60, 1341-1346.
- Strachan, N. J., Fenlon, D. R. and Ogden, I. D. 2001. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiology Letters*, 203, 69-73.
- Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell Jr, H.D., Geldreich, E., Payne, B.J., Meyer Jr, A., Wells, J.G. and Greene, K.D., 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157: H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of internal medicine*, 117(10), pp.812-819.
- Swinson, V. 2021. An update on joint ill in sheep. *Veterinary Record*, 188, 24-26.
- Urdahl, A., Beutin, L., Skjerve, E., Zimmermann, S. and Wasteson, Y. 2003. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 92-101.
- Van Houdt, R. and Michiels, C. W. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology*, 156, 626-633.
- Verderosa, A. D., Totsika, M. and Fairfull-Smith, K. E. 2019. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Frontiers in chemistry*, 824.
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C., Naas, T., Carattoli, A. and Martínez-Medina, M. 2016.

- Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS microbiology reviews*, 40, 437-463.
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A. and Actor, J. K. 2017. Microbiology and molecular diagnosis in pathology: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice.
- Werber, D., Behnke, S. C., Fruth, A., Merle, R., Menzler, S., Glaser, S., Kreienbrock, L., Prager, R., Tschäpe, H. and Roggentin, P. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany—different risk factors for different age groups. *American journal of epidemiology*, 165, 425-434.
- Whitfield, C., Keenleyside, W. and Clarke, B. 1994. Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in *Escherichia coli*.
- Whitfield, C. and Roberts, I. S. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 31, 1307-1319.
- Who 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015, World Health Organization.
- Wu, D., Ding, Y., Yao, K., Gao, W. and Wang, Y. 2021. Antimicrobial resistance analysis of clinical *Escherichia coli* isolates in neonatal ward. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 670470.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N. and Song, Z.-J. 2015. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*, 7, 1-7.
- Yaratha, G., Perloff, S. and Changala, K. 2017. Lactose vs non-lactose fermenting *E.coli*: epidemiology, clinical outcomes, and resistance. Open forum infectious diseases,. Oxford University Press US, S589-S590.

- Yousif, S. A. and Jwher, D. M. T. 2021. Detection of multiple presence of antibiotic residues in slaughtered sheep at Duhok abattoir, Iraq. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35, 49-55.

الملاحق

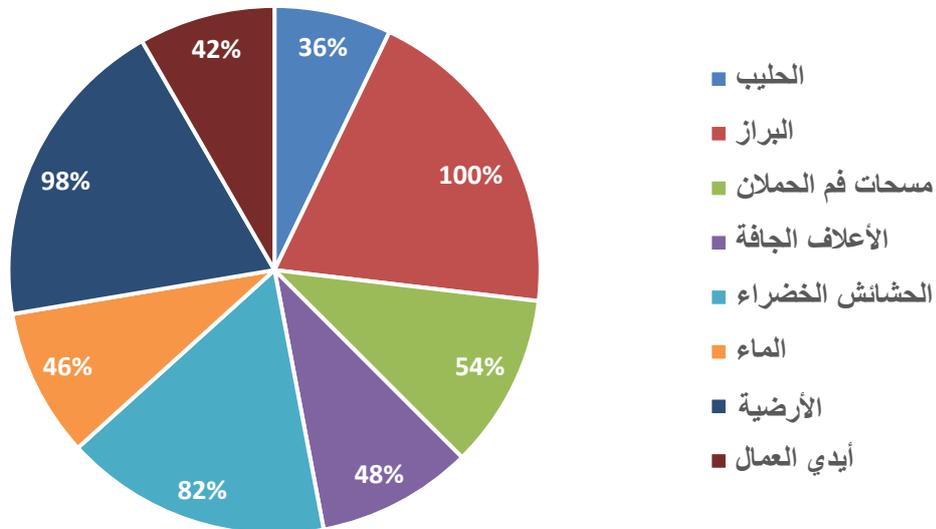
Appendices

الملحق 1-2 : إختبارات نظام فايتك 2

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0.3 mg
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0.3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
10	H2S PRODUCTION	H2S	0.0024 mg
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408 mg
12	Glutaryl Arylamidase pNA	AGLTp	0.0324 mg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0.3 mg
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0.0228 mg
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	OFF	0.45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0.036 mg
18	D-MALTOSE	dMAL	0.3 mg
19	D-MANNITOL	dMAN	0.1875 mg
20	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
21	BETA-XYLOSIDASE	BXYL	0.0324 mg
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	BAlap	0.0174 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
26	LIPASE	LIP	0.0192 mg
27	PALATINOSE	PLE	0.3 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
33	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0.3 mg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0.3 mg
35	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
36	CITRATE (SODIUM)	CIT	0.054 mg
37	MALONATE	MNT	0.15 mg
39	5-KETO-D-GLUCONATE	5KG	0.3 mg
40	L-LACTATE alkalisation	ILATk	0.15 mg
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
42	SUCCINATE alkalisation	SUCT	0.15 mg
43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0.0306 mg
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
45	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
46	Glycine ARYLAMIDASE	GlyA	0.012 mg
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	ODC	0.3 mg
48	LYSINE DECARBOXYLASE	LDC	0.15 mg
52	DECARBOXYLASE BASE	ODEC	N/A
53	L-HISTIDINE assimilation	IHISa	0.087 mg
56	COUMARATE	CMT	0.126 mg
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0.0378 mg
58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	O129R	0.0105 mg
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	GGAA	0.0576 mg
61	L-MALATE assimilation	IMLTa	0.042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0.03 mg
64	L-LACTATE assimilation	ILATa	0.186 mg

الملحق 3-1 : مَقَاسَات أَقْطَار تَنْبِيْط المُضَادَّات الحَيَوِيَّة لِجراثيم الإِشِيرِيكِيَا القَوْلُونِيَّة

مُقَاوِم (ملم)	مُتَوَسِّط الحَسَّاسِيَّة (ملم)	حَسَّاس (ملم)	المُضَاد الحَيَوِي
13	17-14	18	ارِيثروميسين
15	20-16	21	سيبروفلوكساسين
15	18-16	19	سيفيكسيم
12	17-13	18	كلورامفينيكول
14	17-15	18	سيفالوثين
14	18-15	19	تتراسايكلين
10	15-11	16	تريميثوبريم
13	17-14	18	نتروفورانتوين
12	15-13	16	جنتاميسين
19	22-20	23	سيفترياكسون
13	16-14	17	أموكسيسيلين
11	14-12	15	ستربتومايسين



الملحق 4-1 : يُوضِّحُ النِسْب المئويَّة الكُلِّيَّة لِجراثيم الإِشِيرِيكِيَا القَوْلُونِيَّة المعزولة من العَيِّنَات المُخْتَلِفَة

Abstract

The study was conducted during the period from 26/2/2022 to 26/4/2022, where 400 samples were collected from five different regions representing some sheep-breeding and gathering centers in Nineveh governorate, including Al-Kasr, Al-Salamiya, Al-Dernaj, Gogjali and Al-Abbasiya, and for fields with different breeding systems (open, semi-closed and closed). Fifty samples were collected for each of milk, feces, dry feed, green grasses from the fields, water, and the floor, and 50 swabs for each of the mouths of suckling lambs and the worker's hands. They were placed in an ice container and transferred to the veterinary public health laboratories at the college of veterinary medicine in the university of Mosul for detection of *Escherichia coli*. Traditional bacteriological tests were performed on them, such as isolation, staining, and biochemical tests. Molecular assays were also carried out using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique based on the *uidA* gene, as well as the molecular detection of the shiga toxins genes *Stx1* and *Stx2*, with performing an antibiotics sensitivity test and a biofilm production test for bacterial isolates from different samples.

The results of the study showed that 253 samples out of the total of 400 different samples, i.e., 63.3%, were positive for *E.coli* by the classical methods and confirmed by the molecular method. The percentages of isolating *E.coli* from milk samples, feces, lambs mouth swabs, dry feed, green grasses, water, the floor and the workers' hands from different regions were 36%, 100%, 54%, 48%, 82%, 46%, 98%, and 42% respectively. The results of the molecular assay of the bacterial isolates of *E.coli* showed that bands appeared on the agarose gel, which belongs to the *uidA* gene and has a molecular weight of 623 pb. The results of molecular detection of the shiga toxin genes *Stx1* and *Stx2* showed that all isolates of *E.coli* from different samples of sheep fields and the surrounding environment possess, in varying degrees, the specific genes of *Stx1* and *Stx2* with a molecular weight of 347 bp and 589 bp respectively.

The results of the antibiotics sensitivity test revealed a difference in the resistance and sensitivity of *E.coli* isolates, where the percentage of resistance of isolates to Cephalothin, Erythromycin, and Amoxicillin were 100%, 88%, and 77% respectively, while the resistance of bacterial isolates to Tetracycline, Streptomycin, and Trimethoprim were 54%, 46%, and 33% respectively, while the percentage of sensitivity of *E.coli* bacterial isolates to Gentamicin,

Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Cefixime, Trimethoprim and Chloramphenicol were 94%, 85%, 81%, 75%, 67%, and 65% respectively.

The results of biofilms production showed that 32 bacterial isolates out of 48 isolates, i.e., 66%, were biofilm producers, the highest in feces and milk at a rate of 83.33%, followed by floor, water, workers' hands swabs, and lambs' mouth swabs by 66.66%, then dry feed and green grasses by 50%. The biofilm-producing isolates were distributed among 22 highly producer isolates and 10 medium- producer isolates, i.e., 45.8% and 20.8% respectively. The results also indicated that there was a correlation between the high rates of resistance to antibiotics and the production of strong and medium biofilms in *E.coli* isolates.

**Molecular Detection of *Escherichia coli* isolated
from the milk of lactating ewes, their lambs, and the
surrounding environment in some regions of
Nineveh province**

A Thesis Submitted

by

Ayman Hani Taha Sulaiman

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 Medicine / Veterinary Public Health

Supervised by

Prof. Dr. Daa Mohammad Taher Jwher

University of Mosul
College of Veterinary Medicine



**Molecular detection of *Escherichia coli* isolated from
the milk of lactating ewes, their lambs, and the
surrounding environment in some regions of
Nineveh province**

Ayman Hani Taha Sulaiman

M.Sc. / Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Public Health

Supervised by

Prof. Dr. Diao Mohammad Taher Jwher

