جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

انتشار ومقاومة مضادات الميكروبات والتوصيف الجزيئي للايشريكيا القولونية في المزارع السمكية والأسواق المحلية في مدينة الموصل

نور عبد الجبار يونس الطائي

رسالة ماجستير

الصحة العامة البيطرية

بإشراف

الاستاذ الدكتور

رعد عبدالغني بشير السنجري

1444 هـ

2023 م

انتشار ومقاومة مضادات الميكروبات والتوصيف الجزيئي للايشريكيا القولونية في المزارع السمكية والأسواق المحلية في مدينة الموصل

رسالة تقدمت بها

نور عبد الجبار يونس الطائي

الى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في اختصاص الصحة العامة بيطرية

بإشراف

الاستاذ الدكتور

رعد عبدالغني بشير السنجري

1444 هـ **2023 م**

اللَّهُ نُورُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ مَثَلُ نُورِهِ كَمِشْكَاةٍ فِيهَا مِصْبَاحٌ الْمِصْبَاحُ فِي زُجَاجَةٍ الزُّجَاجَةُ كَأَنَّهَا كَوْكَبٌ دُرِّيٌّ يُوقَدُ مِنْ شَجَرَةٍ مُبَارَكَةٍ زَيْتُونَةٍ لَا شَرْقِيَّةٍ وَلَا غَرْبِيَّةٍ يَكَادُ زَيْتُهَا يُضِيءُ وَلَوْ لَمْ تَمْسَسْهُ نَارٌ نُورٌ عَلَى نُورٍ يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ مَنْ يَشَاءُ وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَالَ لِلنَّاسِ وَاللَّهُ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ

سُورَة النور الآية (35)

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. رعد عبدالغني بشير**

التاريخ : / / 2022

إقرار المقوم اللغوي

اشهد بان هذه الرسالة الموسومه (انتشار ومقاومة مضادات الميكروبات والتوصيف الجزيئي للاشيريكيا القولونية في المزارع السمكية والأسواق المحلية في مدينة الموصل) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية، وبذلك اصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الإسلوب وصحة التعبير.

التوقيع :

الاسم **: أ.م.د.أحمد يحيى علي**

التاريخ : / / 2022

إقرار رئيس فرع الصحة العامة البيطرية

بناءاً 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

بناء 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 الناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة، إطلعنا على هذه الرسالة وناقشنا الطالبة نور عبد الجبار يونس في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتأريخ / / 2022 ، وإنها جديرة لنيل شهادة الماجستير في إختصاص الصحة العامة البيطرية.

التوقيع	**التوقيع**
أ.د.	
عضو لجنة المناقشة	**عضو لجنة المناقشة**

التوقيع	**التوقيع**
أ.د. فاطمة عبودي علي	**أ.د. رعد عبدالغني بشير**
رئيس لجنة المناقشة	**عضو لجنة المناقشة (المشرف)**

قرار مجلس الكلية

إجتمع مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل بجلسته ..... المنعقدة بتأريخ / / 2022 وقرر منحها درجة الماجستير في إختصاص الصحة العامة البيطرية.

مقرر مجلس الكلية	**عميد الكلية**
أ.د. رعد عبدالغني بشير	**أ.د. ظافر محمد عزيز**

الشكر والتقدير

بعد الحمد والثناء لله سبحانه وتعالى الذي يسر لي امري ووفقني في انهاء هذه الرسالة بمشيئته عز وجل والصلاة والسلام على رسوله الكريم محمد (صلى الله عليه وسلم).لا يسعني وأنا أنهي هذه الرسالة إلا أن أتقدم بجزيل الشكر والتقدير الى رئاسة جامعة الموصل و عمادة كلية الطب البيطري في جامعة الموصل كما وأتقدم بجزيل الشكر وخالص التقدير إلى أستاذي الفاضل المشرف الدكتور رعد عبد الغني بشيرالسنجري الذي لم يدخر جهداً في إبداء توجيهاته العلمية القيمة وملاحظاته السديدة طيلة مدة الاشراف وكان له الأثر الكبير في إخراج هذه الرسالة على هذا النحو واتمنى له دوام الصحة والعافية والتوفيق ويشرفني كذلك ان اتقدم بجزيل الشكر والتقدير الى رئاسة فرع الصحة العامة البيطرية لتقديم جميع التسهيلات لإكمال هذه الرسالة ولا يفوتني إلا أن أتقدم بالشكر الى منتسبي الفرع من اساتذة وموظفين كافة متمنيه لهم دوام الموفقية والنجاح كما وأتقدم بالشكر الموصول ايضا الى زملائي طلبة الدراسات العليا . إلى أغلى مافي هذه الدنيا والدي ووالدتي وأخوتي أهدي ثمرة جهدي المتواضع لهم وختأما أقدم شكري وتقديري إلى كل من مد يد العون وأسهم ولو بجزء يسير في اتمام رسالتي وقد فاتني ذكر أسمه فله مني جزيل الشكر والامتنان.

الباحثة

نور

الخلاصة

تسبب جراثيم الايشريكيا القولونية العديد من الأمراض التي تنتقل عن طريق الغذاء الى المستهلك ولاسيما التسمم الغذائي بسبب تلوث المنتجات الغذائية ومن ضمنها الأسماك والاغذية البحرية . هدفت الدراسة إلى عزل جرثومة الايشيريكيا القولونية من الأسماك المتوفرة في الأسواق المحلية والمزارع السمكية في مدينة الموصل وتوصيفها بالطرائق الحديثة . تم جمع عينات الأسماك والبالغ عددها 153عينة للمدة من 2021/11/1 الى 2022/1/30 منها 75 عينة سمك من مزارع الأسماك و 78 عينة سمك من الأسواق المحلية في مدينة الموصل . تم وضع العينات في حاويات مبردة ونقلت العينات الى مختبر فرع الصحة العامة البيطرية /كلية الطب البيطري /جامعة الموصل وأجريت عليها الفحوصات التقليدية والاختبارات الكيموحيوية التاكيدية وكذلك إجراء الاختبارات الجزيئية باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) وذلك للكشف عن الجين الخاص بجرثومة الايشريكيا القولونية *uidA* فضلاً عن الكشف عن عوامل الفوعة الخاصة بالجرثومة والمسؤولة عن انتاج سموم الشيغا وحدوث التسمم الغذائي وتشمل كل من جين *Stx1* و *Stx2* كما وتم تحديد مصدر التلوث اعتماداً على تحليل بصمة تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية (ERIC-PCR). ايضاً تم اجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لمعرفة حساسية الجرثومة للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة .

أوضحت نتائج الدراسة أن عدد العينات التي أعطت نتيجة موجبة لجراثيم الايشريكيا القولونية في أسماك الأسواق المحلية كانت 28 عينة وبنسبة 35.9 %، أما عدد الأسماك التي أعطت نتيجة موجبة لجراثيم الايشريكيا القولونية في أسماك المزارع هي 18 عينة موجبة وبنسبة 24%. أما عدد العزلات التي أظهرت نتيجة موجبة لجراثيم الايشريكيا القولونية ذات النمط المصلي O157:H7 بالعزل التقليدي من عينات أسماك الأسواق المحلية فكانت 11 عزلة وبنسبة 39.2% في حين كانت العزلات من أسماك المزارع هي 7 عزلة وبنسبة 38.9%. وتم اجراء التوصيف الجزيئي للجرثومة باستخدام تقنية ال PCR أذ أظهرت نتائج الدراسة ان جميع عزلات جراثيم الايشريكيا القولونية والتي تم عزلها من عينات الأسماك سواءً من الأسواق المحلية او من المزارع السمكية كانت موجبة وتمتلك الجين الخاص بها *uidA* ذو الوزن الجزيئي 623 زوجاً قاعدياً .

بالاضافة الى ذلك أظهرت نتائج دراسة التحري عن وجود جينات الفوعة الخاصة بالجرثومة والمسؤولة عن انتاج السموم وباستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل والبادئات الخاصة بها حيث أن عدد العزلات لجراثيم الأيشريكيا القولونية المعزولة من عينات أسماك المزارع كانت 16 عزلة تمتلك جين *Stx1* وبنسبة 88.9 % في حين أن العزلات من عينات أسماك الأسواق المحلية البالغ عددها 25 عزلة كانت تمتلك جين*Stx1* وبنسبة 89.3%، وبوزن جزيئي 347 زوج قاعدي كذلك أظهرت نتائج دراستنا أن جرثومة

الأيشريكيا القولونية المعزولة من عينات أسماك المزارع وعددها 13 عزلة وبنسبة 72.2 % كانت *تمتلك* جين *Stx2* أما بالنسبة لعزلات عينات أسماك الأسواق المحلية وعددها 24 عزلة وبنسبة 85.7% كانت تمتلك جين *Stx2* ذو الوزن الجزيئي 589 زوج قاعدي .

وتم ايجاد مصدر التلوث بالاعتماد على تحليل بصمة تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية ERIC-PCR في كل عزلة، فقد أظهرت النتائج أن هناك تشابه بين العزلات وكان يتراوح بين 51-100%. وتم تقسيم عترات إلى 7 أنماط جينية بناءً على حد التشابه بنسبة 90% (من 1 إلى 7) ، أذ كانت العترات الأكثر انتشاراً ضمن النمط الجيني 1. كان النمط الجيني 1 بواقع 4 عترات. بعد ذلك تم تجميع سلالتين ضمن الأنماط الجينية وهي 3 و 5. في حين ان الانماط الجغرافية الجينية 2 و 4 و 6 و 7 تشتمل على عترة واحدة فقط . وفيما يتعلق بالاختلافات الوراثية في الموقع ، كان هناك تشتت نسيلي عالٍ لأكثر العترات الايشريكيا القولونية المعزولة 12/10 وبنسبة 83.3% في مواقع جغرافية مختلفة كما يتضح ذلك من تجميع العترات المختلفة جينيا من موقع جغرافي مختلف لنفس النمط الجيني وأيضاً تجميع العترات المختلفة جينيا من نفس الموقع الجغرافي إلى أنماط جينية مختلفة.

وأوضحت النتائج وجود تفاوت في مقاومة وحساسية الجرثومة للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة أذ كانت أعلى نسبة حساسية جراثيم الايشريكيا القولونية للمضاد الحيوي سايبروفلوكساسين وترايمثبريم وجنتأمايسين وبنسبة 96% ،94% ,86% على التوالي، في حين كانت أعلى مقاومة لجراثيم الايشريكيا القولونية للمضاد الحيوي سيفالوفين وتتراسيكلين والاموكسلين وبنسبة 100%، 64% ،62% على التوالي.

ثبت المحتويات

الموضوع	الصفحة
ثبت المحتويات	ج
ثبت الجداول	هـ
ثبت الأشكال	ز
الفصل الأول : المقدمة	**1-2**
الفصل الثاني : إستعراض المراجع	**3-25**
2-1: الثَروَة السَمَكيّة في العراق	3
2-1-1 : مُقتَرحات للنهوضِ بقطاع الثَروة السَمَكية	4
2-1-2 : أهمية الثروة السمكية: The importance of fisher	5
2-2 : أهمية تربية الأسماك	5
2-3 : أهمية المزارع السمكية	6
2-4 : تلوث الأسماك Fish contamination	7
2-5 : فساد الأسماك Fish spoilage	10
2-6: التسمم الغذائي Food Poisoning	10
2-7 : عائلة الجراثيم المعوية Enterobacteriaceae	11
2-8 : تصنيف الايشريكيا القولونية Classification of *E.coli*	12
2-9 : أنواع الايشريكيا القولونية	13
2-10 : عوامل الضراوة للايشريكيا القولونية Virulence factors	15
2-10-1 : ذيفانات الشيغا Shiga toxins (*Stxs*)	15
2-10-2: بلازميد الضراوة plasmid PO157	16
2-10-3: الهيمولايسين Hemolysin	17
2-10-4: الخمل Fimbria or Pili	17
2-10-5: المستضد المحفظي Capsular antigen K(KPS)	17
2-11 : المضادات الحيوية	17
2-11-1: آلية عمل المضادات الحيوية	18
2-11-2: مقاومة الايشريكيا القولونية للمضادات الحيوية	19
2-12 : طرائق تشخيص جراثيم الايشريكيا القولونية *E.coli*	22
2-12-1 : الطرائق التقليدية	22
2-12-2 : الطرائق الجزيئية	22
2-12-2-1 : تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)	23

2-2-12-2: تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)	24
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل	**26-43**
1-3 : المواد Materials	26
1-1-3 : الأجهزة والمعدات المستخدمة Equipment and Apparatus	26
2-1-3 : الأوساط الزرعية والكيموحيوية المستخدمة: Cultural media and biochemical media	28
3-1-3 : المواد الكيميائية والكواشف Chemicals and Reagents	28
4-1-3 : العدد المختبرية الجاهزة	30
2-3 : طرائق العمل Methods	31
1-2-3 : جمع العينات	31
3-3: الكشف عن الأيشريكيا القولونية	32
1-3-3 : الطرائق التقليدية	32
1-1-3-3 : وسط الايوسين مثيلين الازرق Eosin-methylene blue agar (EMB)	32
2-1-3-3 : وسط الماكونكي MacConkey agar	32
3-1-3-3 : وسط المتألق لجراثيم القولون والاشريكيا القولونية Brilliance *E. coli* / coliform medium	33
4-1-3-3 : وسط الكروم اكار الخاص ببكتريا الايشريشيا القولونية O157:H7 Chrome agar *E.coli* O157:H7	33
5-1-3-3 : وسط مولر هنتون Mueller Hinton agar	33
6-1-3-3 : مرق الماكونكي MacConkey broth	33
7-1-3-3 : المرق المغذي Nutrient broth	34
8-1-3-3 : ماء الببتون peptone water	34
9-1-3-3 : اختبار الأندول Indole test	34
10-1-3-3 : إختبار المثيل الأحمر Methyl red	34
11-1-3-3 : إختبار الفوكس بروسكاور Voges Proskauer test	35
12-1-3-3 : إختبار استهلاك السترات Citrate utilization test	35
13-1-3-3 : إختبار وسط ثلاثي سكر الحديد Triple sugar iron agar (TSI)	36
14-1-3-3 : إختبار الأوكسيديز Oxidase test	36
15-1-3-3 : إختبار الكاتليز Catalase test	36
2-3-3 : الطرائق البيولوجية الجزيئية Molecular Biology methods	37
1-2-3-3 : إستخلاص الحامض النووي DNA Extraction	37

3-3-2-2 : البادئات Primers	38
3-3-2-3 : تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR master mix reaction	38
3-3-2-4 : الترحيل الكهربائي بالهلام لتفاعل البلمرة المتسلسل: PCR Product Analysis (Agarose Gel Electrophoresis)	40
3-3-3 : تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction	42
3-4 : اختبار مقاومة المضادات الحيوية	43
الفصل الرابع : النتائج	**45-57**
الفصل الخامس : المناقشة	**58-62**
الفصل السادس : الإستنتاجات والتوصيات	**63-64**
6-1 : إستنتاجات	63
6-2 : التوصيات	64
المصادر	**65-88**
المصادر الإنكليزية	65

ثبت الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1-3	الأجهزة والمعدات المستخدمة في الدراسة	26
2-3	الأوساط الزرعية والكيموحيوية المستخدمة	28
3-3	المواد الكيميائية الكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة	28
4-3	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة	30
5-3	يوضح انواع المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية لجراثيم الايشريكيا القولونية	31
6-3	يوضح البادئات وتسلسلها وحجم قطع الدنا المتضاعفة	38
7-3	مكونات مزيج التفاعل PCR Master Mix Reaction	39
8-3	يوضح خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *uidA*	39
9-3	يوضح خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل لجينات سموم *Stx1* و *Stx2*	40
10-3	يوضح خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *rfb*	40
1-4	يوضح عدد ونسب العزلات لجرثومة الايشيريكيا القولونية من عينات الأسواق المحلية	45
2-4	يوضح عدد ونسب العزلات لجرثومة الايشيريكيا القولونية من عينات مزارع الأسماك	46
3-4	يوضح عدد ونسب العينات الموجبة لـ *E.coli* O157:H7	46
4-4	يبين نتائج المقاومة والحساسية لجراثيم الايشريكيا القولونية للمضادات الحياتية المستخدمة	52
5-4	عدد العينات الموجبة لجينات سموم *Stx1* و *Stx2* وrfb في جميع مناطق الدراسة	55

ثبت الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1-4	نمو جراثيم الأيشريكيا القولونية على وسط الايوسين المثيلين الازرق EMB	47
2-4	نمو جراثيم الأيشريكيا القولونية على وسط الماكونكي MacConkey	47
3-4	نمو جراثيم الأيشريكيا القولونية على وسط Brilliance *E. coli*/confirm medium	48
4-4	نمو جراثيم الأشريكيا القولونية على وسط Chrome *E. coli* O157:H7 agar	48
5-4	يوضح إختبار الأندول المستخدم للكشف عن جراثيم الأشريكيا القولونية	49
6-4	إختبار المثيل الأحمر المستخدم للكشف عن جراثيم الأشريكيا القولونية	49
7-4	إختبار الفوكس بروسكاور المستخدم للكشف عن جراثيم الاشريكيا القولونية	50
8-4	إختبار إستهلاك السترات المستخدم للكشف عن جراثيم الأيشريكيا القولونية	50
9-4	إختبار ثلاثي سكر الحديد المستخدم للكشف عن جراثيم الأيشريكيا القولونية	51
10-4	إختبار الكاتاليز المستخدم للكشف عن جراثيم الأيشريكيا القولونية	51
11-4	يوضح اختبار الحساسية للمضادات الحياتية على وسط مولر هنتون	52
12-4	يبين نتائج المقاومة والحساسية لجراثيم الإشيريكيا القولونية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة	53
13-4	يوضح اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للايشريكيا القولونية لجين *uidA* ذات الوزن الجزيئي 623 زوج قاعدي، المسار1: السيطرة الموجبة، المسار 2 : الدليل الحجمي، المسارات 3، 4، 5، 6، 7 : العينات الموجبة، المسار 8 : السيطرة السالبة	53

14-4	يوضح اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للايشريكيا القولونية لعامل الفوعة *Stx1* ذات الوزن الجزيئي 347 زوج قاعدي، المسار1: السيطرة الموجبة، المسار 2 : الدليل، المسار 3 : السيطرة السالبة، المسار 4، 5، 6، 7,8 : العينات الموجبة	54
15-4	يوضح اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للايشريكيا القولونية لعامل الفوعة *Stx2* ذات الوزن الجزيئي 589 زوج قاعدي، المسار1: السيطرة الموجبة، المسار 2 : الدليل الحجمي، المسار 3 : السيطرة السالبة، المسار 4، 5، 6، 7,8 : العينات الموجبة	55
16-4	شجرة النشوء بتقنية ال (ERIC-PCR) يُظهر نمط العلاقة ل 12 عترة من بكتريا الايشريكيا القولونية المعزولة من أسماك المزارع والأسواق المحلية في مدينة الموصل	57

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

ازداد استهلاك الإنسان للأحياء المائية بشكل عام والأسماك بشكل خاص وذلك لاحتواءها على البروتينات عالية القيمة الغذائية والأحماض الدهنية العديدة غير المشبعة والفيتامينات ولاسيما فيتامين ب12، فيتامين أ، الزنك، اليود، الحديد، السيلينيوم، والاميغا 3. كما تحوي ايضا على نسبةٍ عاليةٍ من فيتامين د، ولاسيما الأسماك الدهنيّة كالسلمون أذ يُساعد هذا الفيتامين على التقليل من خطر الإصابة بالأمراض، ويعزز كذلك من صحّة العظام. (Mohanty, 2015).

تعد سلامة الاحياء البحرية ولاسيما الأسماك واحدة من أهم قضايا الصحة العامة المرتبطة مباشرة بالزراعة و إنتاج الغذاء الصحي كما هو الحال مع أنواع الأغذية الأخرى (Bridiere *et al.*, 2015)، ولهذا فان الأسماك تلعب دوراً رئيسياً كغذاء في توفير المغذيات للعديد من الحيوانات وكذلك البشر اذ تسهم الأسماك بحوالي (60%) من الإمداد العالمي للبروتين ويستمد (60%) من العالم النامي أكثر من (30%) من البروتين الحيواني من الأسماك إذ يعد توفير منتجات أسماك صحية ضرورياً من وجهة نظر سلامة الأغذية وذلك للمحافظة على صحة المستهلك لأن صحة المستهلك من سلامة كامل الغذاء المتناول (Lilly *et al.*, 2017). وبصرف النظر عن كون الأسماك مصدرًا للغذاء فهي تعمل أيضًا على وقاية البشر من مجموعة متنوعة من الأمراض المنتشرة في العالم حيث ان استهلاك الأسماك بشكل يومي له دور أيضًا في الوقاية من أمراض القلب التي تصيب الانسان (Abraha *et al.*, 2018).

تعد الأسماك سواءً التي يتم صيدها من مناطق انتشارها الطبيعي أو تلك المستزرعة في مزارع تربية الأسماك من المنتجات الغذائية الأكثر أهمية في تغذية الإنسان بالمقارنة مع مصادر البروتين الأخرى، فإن العناصر الغذائية الكبيرة المتوفرة في الأسماك تجعلها أفضل مصدر للبروتين الحيواني مقارنة مع اللحوم فضلاً عن ارتفاع أسعار اللحوم الحمراء وهذا ما يكسبها سمعة جيدة كمنتجات غذائية صحية مفيدة لصحة المستهلك (Bener *et al.*, 2009).

تحوي الأحياء البحرية ولاسيما الأسماك على العديد من مسببات الأمراض التي تنقلها الى الانسان وقد زادت هذه الأمراض المرتبطة باستهلاك الأسماك والأحياء البحرية ولاسيما الملوثة بالمسببات الجرثومية عندما يتم انتاجها في ظل ظروف صحية غير جيدة ولهذا فان تلوث الأسماك يتسبب

بمخاطر كثيرة على صحة المستهلكين (Kim *et al.*, 2017)، نتيجة تلوث البيئة المائية للأسماك بمياه الصرف الصحي للمنازل والفضلات السامة للمصانع فيؤدي الى تلوث الأسماك بالمعادن الصناعية الناتجة من مخلفات المصانع التي تلقي بها في المياه الجارية (Guérin *et al.*, 2011; Lokollo and Mailoa, 2020)، فضلاً عن التلوث الجرثومي الناتج عن ملامسة الاسطح للأغذية الذي يعد عاملاً رئيسياً في حدوث العديد من الأمراض المنقولة بالغذاء ويُعتقد أن لها تأثيرًا مهم على الصحة العامة أذ تنتج حوالي 60٪ من العدوى التي تنقلها الأغذية عن طريق انتقال الاحياء المجهرية من أسطح المعدات إلى الأطعمة المصنعة اثناء التعامل مع الأسماك خلال صيدها وتنظيفها وأزالة احشاءها التي تلوث لحوم الأسماك وكذلك اثناء تخزينها ولاسيما استخدام الثلج المجروش في حفظ الأسماك لحين وصولها الى الأسواق اذ يحوي على اعداد كبيرة من الجرثومة المسببة للأمراض مما يشكل خطراً محتملاً على الصحة العامة من خلال استهلاك المنتجات السمكية والأغذية البحرية الملوثة والذي يؤدي الى حدوث التسمم الغذائي للمستهلكين (Adebayo-Tayo *et al.*,2012; Prakasan *et al.*, 2018).

إن من اهم الملوثات الجرثومية هي جراثيم الايشريكيا القولونية والتي تستخدم بشكل عام كأحد المؤشرات لحدوث تلوث وفساد الأسماك أذ اشارت العديد من الدراسات عن وجود جراثيم الايشيريكيا القولونية في الأسماك الطازجة ومنتجاتها الجاهزة للأكل في أسواق البيع (Khan *et al.*, 2013)، وتتميز هذه الجراثيم بإنتاجها للسموم ولاسيما ذيفان الشيغا والذي يؤدي الى حدوث التسمم الغذائي للمستهلك نتيجة تناول الأسماك الملوثة بالجراثيم أو سمومها (Kim *et al.*, 2020).

أهدَاف الدِّرَاسَة :

1. دراسة عزل وتشخيص جراثيم الايشريكيا القولونية في الأسماك المتوفرة في المزارع السمكية والأسواق المحلية.
2. دراسة جزيئية لبعض الانماط المصلية وعوامل الضراوة المعزولة للايشريكيا القولونية .
3. تحديد الانواع المعزولة من جراثيم الايشريكيا القولونية ومقاومتها للمضادات الحياتية.
4. استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التكراري بين الجينات للجراثيم المعوية لتحديد مصدر التلوث للاسماك Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR).

الفصل الثاني

إستعراض المراجع

Literature Review

2-1: الثَروَة السَمَكيّة في العراق:

تُعدّ الثروَة السَمَكية في العراق واحدَة مِن أبرَزِ القَطّاعات الحيوية ضمن قَطّاع الثروة الحَيَوانية وذلك لكَونها ترتَبط وبشَكلٍ مُباشر بالنِظام الغذائي العراقي وتَوفير المَصدر البروتيني المهم والضَروري للإنسان (UNFAO; 2013). كَما هو مَعلوم أنَّ العراق مُصَنَّفٌ من الدول المُتميّزَة باحتِوائِه على مَوارد مائية كبيرة ومُتنوعة المَصادر والطبيعة، أذ تَبلغ مَساحَة المُسَطَّحات المائية المُتوفّرَة في العراق بالظروف الاعتيادية نَحو أربعة مَلايينَ دونماً، وتَشمل هذه المَساحَة (المُسطّحات المائيّة) كالأنهار وروافِدها والخَزانات والبُحيرات والمُستنقَعات الجنوبية (الأهوار قبل تَجفيف مَواضعها) (Ewart, 2013) .ويَجدر القَول الى أن الاهتمام بالثَروة السَمكية مِن شَأنه أن يسهم في تَحسين الاقتصاد العراقي، ولاسيما حينما لوحظ أنّ في العِقدَينِ من السَنوات الماضية، بدأ العراق في استيراد الأسماك بكَميات كبيرة من الخارج، وهو يعد أمراً خطيرًا جداً، إذ أن الثروة السَمكية العراقية، كانت سابقاً تكفي لِسَد حاجَة الأسواق المحلية، بل وتَصدير كميات كَبيرَة، فائِضَة عَن الحاجَة،الى الخارج (Ahmed *et al*., 2018). وكما هو مَعلوم أن العراق يَمتَلك أنواعاً مُتَميّزة مِنَ الأسماك، من أبرزها الشَبّوط والزبيدي والكطّان والبني والكارب وغيرها. تعرّضَت الثروة السَمكية الى أضرار بالغة قرّبتها من الانقراض شَأنها شَأن بَقيّة قطاعات الثروَة الحَيوانية، مِن دَواجِن وحيوانات المزرعة المنتجة (كالأبقارِ والأغنام والماعز والجاموس والإبل) وكما هي الحال مع القطاعات الاقتصادية الأخرى. هناك عدة أسباب أبرزها الحروب، وغياب الاهتمام الحكومي، فضلاً عن شحّة المياه، والصَيد العَشوائي الجائِر ولاسيما في مَواسم تَكاثرها. هذا الواقع حَرَمَ العراق مَصدَراً هأما مِن مَصادر الدَخل القَومي (Grafton *et al*., 2015) ، إذ تسهم الثروة السَمَكية بنسبة لا يُستَهان بها من الناتج المَحلي، مما جَعلَها اليوم بأمَس الحاجَة إلى إعادة تقييم ودَعم مِن أجل عَودَتها لسَد الحاجَة المحلية للاستهلاك البَشري ورَفد الاقتصاد الوطني جَنباً الى جَنب مَع بقية القطاعات الاقتصادي (Grafton *et al*., 2015) . لقد أدّى عَدم الاستِقرار وغِياب التَنظيمات المؤسساتية لإدارة قَطّاع الثَروة السَمكية الى جَعل واقع البَحث العِلمي وتَنفيذ الدراسات المُتعلقة بالثروة السَمكية تَفتَقد الى

وجود الفِكرَة المُوَحّدَة والنُقطة المُحَدّدة المَعالِم التي يُمَكّنها تَوجيهِ العاملينَ نَحو الهَدف الرئيس لهذه البحوث وهو زيادَة الإنتاج السَمكي وتَطوير عَمليات الاستِزراع السَمكي , Belton and Thilsted) (2014. إن غياب الخطة المَركزية، أو شُبه المركزية، أدّى إلى تَشَتت جهود المُؤسسات العِلمية والعاملين بها، مع العلم أنّ المُؤسَسات العراقية والجامِعات ومَراكز البَحث العلمي تَحوي في مَلاكاتها الدائمة على العَديد مِن المُتَخَصصين في كافة مَجالات قَطّاع البيئة المائية والسَمكية. ومن أهم المَشاكل والمُعوقات التي تواجِه قَطاع الثَروة السَمَكية في العراق هي قلّة المَوارد المائية ولاسيما بَعد استثمار دول الجُوار لكميّات كبيرة جداً من مِياه نَهرَي دِجلَة والفُرات ورَوافدهما، الأمر الذي انعَكَسَ سلباً على الثروة السَمكية في العراق (Bogard, 2017). الصَيد الجائِر والعَشوائي الذي يقوم به العَديد من الصَيّادين، ولاسيما خِلال مَواسم تَكاثر الأسماك، أدى الى فقدان العراق نسبة كبيرة من هذه الثروة الاقتصادية المُهمّة. انتشار الإساءة الكَبيرة للثروَة السَمَكية الهامَّة وذلك من خلال محاوَلات بَعض الصَيّادين في استخدام وسائلَ صَيد غير تَقليدية ومَرفوضَة تُؤثّر سَلباً على العَملية التَنمَويّة والاقتصادية للأسماك المحلية، ومِنها استخدام المُبيدات والمُتفجرات والصَعق الكهربائي وغيرها من الطرائق المَمنوعَة دَولياً (*et al.*, 2016 Thilsted). استمرار القَطّاع الخاص باستثمار خَيرات المُسَطّحات المائية بالطرائق غَير القانونية وغَير الاقتصادية وبدون رقابة أو سَيطَرَة للدَولة مِمّا انعَكَسَ على انخفاض إنتاجية هذه المُسطحات بشَكل مَلحوظ جداً. ضُعف التَسويق الصَحيح للمُنتَج المَحلي وغياب الدعم، مُقابل الاستيراد غَير المُسَيطَر عَليه أدى الى مُنافسة سِعريّة غَير مُنصِفَة. إهمال الاستفادة القصوى من الثروة السَمَكية البَحرية في المياه الساحليّة الإقليمية أذ تَتَّصل هذه المياه اتصالاً مباشراً مع مياه شَط العَرَب وتدخل أنواع عَديدة من الأسماك البحرية، بسبب ظاهرة المَد والجَزر، مُهاجِرَةً لأغراض التغذية والتكاثر وضمور واختفاء أسطول الصَيد البحري العراقي (Ibrahim *et al.*, 2020).

2-1-1 : المقومات الرئيسية للنهوضِ بقطاع الثَروة السَمَكية:

ضَرورة العَمل على إعادَة التقييم الواقعي لقطّاع الثروَة السَمكية والاهتمام بها، ورَسم خارطة طَريق جَديدة من أجل رَفع مُستواها الإنتاجي. الاستفادة مِنَ المياه المُتوفّرة بطرائق مَدروسَة للوصول الى زيادَة تَكاثرها وتَنويع مَصادرها. ويُعَدّ العَمل على دراسة واقع الموارد المائية حاليا والتوقعات المُستقبلية لها مَدخلاً أساسياً لتقييم واقع الثروة السَمكية المُتواجدة في هذه المياه Mouritsen and Styrbaek) (2018, مَع التَوقعات المُستقبلية لها نَتيجة ارتباطها ارتباطا بيئياً مع بيئة الموارد المائية. تَشجيع القَطاعات المَصرَفية في التَنمية عن طَريق التَوسّع في المَشاريع وتَحسين تَكنولوجيا ونُظُم الإنتاج وتقديم القروض المُيَسَّرة للمشاريع الفَرديّة أو الصَغيرة والتي تشكل نسبَة مَلحوظة في قَطاع الأسماك Capita) . and Alonso-Calleja, 2013) العَمل على إنشاءِ وتَفعيلِ التَنظيمات المؤسَساتية للإدارات الرَسميّة

المُشرفة على إدارة وتَنمية الثروَة السَمكية باعتبارها الأساس الرَسمي للاستفادة العلمية للثروة السَمكية كَونها ثروَة اقتصادية مُهمة لها الدور المُؤثّر في السلّة الغذائية لِلمواطن العراقي. العَمل على التَثقيف في إنشاء مَفاقِسَ وحاضِنات لإنتاجِ يَرقات وإصبَعيآت الأسماك بمُختلف انواعها. تقديم قروض مُيسّرة لتنفيذ مَشاريع تَطوير أحواض الأسماك وأقفاص تَربيتها (Froehlich *et al.*,2017). العمل على دراسة إمكانية إنشاء مَشاريعَ كُبرى لتَربيَة وتنمية الأسماك البَحرية في الخِلجان والقنوات المُتَفَرّعَة منها في مناطق جَنوب البَصرة ذات التأثّر بظاهِرة المَد والجَزر للمياه. إعادة إنشاء اسطول الصَيد البَحري الوَطني العراقي مِن أجلِ ممارَسَة حق العراق بالصَيد البَحري في مياه الخَليج العَربي (Yukgehnaish *et al.*, 2020) .

2-1-2 : اهمية الثروة السمكية The importance of fisher

يعد علم الأسماك Ichthyology ذو اهمية كبيرة للإنسان وذلك لعدة اسباب اهمها علاقة الأسماك بالبيئة فضلا عن الاعتماد على الأسماك كمصدر للحوم (Crumlish, 2015) أذ تعد الأسماك عنصراً اساسيا ومهماً في السلسلة الغذائية وذلك لاحتوائه على البروتين المعروف عادة بسهولة هضمه ويعد ايضا من اللحوم البيضاء أذ ينصح الاطباء عادة بتناول الأسماك ولا سيما الاشخاص الذين يعانون من نقص في الدهون والبروتين وضعف البنية للإنسان فضلا عن فقر الدم (Al-Shiblawi, 2014).

تمتد أهمية الثروة السمكية في العراق عبر التاريخ الى حوالي 4000 سنة حينما قام السومريون بوضع أقدم قانون للصيد في ذلك الوقت ويعتمد انتاج الأسماك في العراق بشكل اساسي على الصيد النهري غالبا وذلك لأنه لم يكن هناك اهتمأما كبيرا بإنشاء المزارع السمكية لتطوير قطاع تربية الأسماك في العراق أذ تم الاعتماد في تربية الاحياء المائية في العراق على توافر كل من المواقع الملائمة والتربة والمياه(Jawad, 2012). وعلى الرغم من تواجد الموارد المائية في العراق بما فيها الانهار والبحيرات فقد اقتصر انتاج الأسماك من المزارع السمكية في المياه العذبة على تربية الأسماك في الأحواض ولاسيما أسماك الكارب وحسب إحصائيات انتاج الأسماك في العراق الناتج من تربية الأسماك في المياه العذبة في عام 2007 كان حوالي 16000 طن (Rombough, 2007).

2-2 : اهمية تربية الأسماك :

تلعب الأسماك دورا مهما في اقتصاد البلد اذ يمثل صيد الأسماك مصدرا للغذاء الصحي لمعظم العوائل الفقيرة ولاسيما في المناطق الساحلية (FAO, 2010). فضلا عن ان الأسماك تسهم في زيادة الدخل الناتج من الصيد وتسويقها ولاسيما في قارة افريقيا فضلا عن ان الصيد يوفر العديد من فرص

العمل لحوالي 8-9 مليون نسمة. أذ يعمل حوالي 43 مليون فرد في انحاء العالم في مجال صيد الأسماك وتربية الأسماك والتي بدورها تدعم حوالي ما يقارب اكثر من 170 مليون شخصاً من عوائل ذوي الدخل المحدود (FAO , 2002).

تم انتاج ما يقارب حوالي 143,7 مليون طن من الأسماك من مصائد الأسماك وتربية الأسماك في المزارع السمكية في عام 2006 أذ تمثلت ب 81,9 مليون طن من صيد الأسماك و10 مليون طن من مصائد المسطحات المائية الطبيعية و 31,6 مليون طن من تربية الأسماك في المزارع السمكية (FAO, 2009)، وحسب إحصائيات مديرية الزراعة في محافظة نينوى /قسم الثروة الحيوانية كانت أعداد الأسماك للأعوام من 2017-2022 تراوحت بين 35000 طن سنويا في عام 2017 الى 27000 طن في عام 2022 ، أذ يتم تربية الأسماك الكفية لمدة 6 اشهر وبعدها يتم تسويقها أما الأسماك الاصبعية فيتم تربيتها لمدة 8 اشهر وبعدها يتم تسويقها وتتركز وجود المزارع السمكية في محافظة نينوى في قضاء الحمدانية ومركز الموصل في منطقة حاوي الجوسق (مديرية الزراعة في محافظة نينوى/قسم الثروة الحيوانية).

3-2 : أهمية المزارع السمكية:

نظرا للقيمة الغذائية العالية فضلا عن زيادة الوعي بأهمية الأسماك ومنتجاتها الامر الذي أدى الى فتح افاق جديدة لتداول الأسماك والمنتجات البحرية حول العالم (Martini and Lindberg, 2013) أذ يمثل الاستزراع السمكي في الوقت الحالي ما يقارب حوالي (50%) من حجم الانتاج العالمي للأسماك ومن المتوقع ان يحدث ارتفاع في سقف انتاج الأسماك مستقبلا وذلك لكي يلبي المتطلبات وزيادة مستوى الاستهلاك للأسماك . لقد أسهم انتاج الأسماك في 200 دولة بنسبة 10% من اجمالي الصادرات الزراعية وحوالي 1% من تجارة السلع العالمية في عام 2012 (Ayoola, 2010).

تعد تربية الأسماك في الأقفاص من أفضل الإنجازات التي حققتها التقنيات الحديثة في تربية الأحياء المائية خلال العقدين الماضيين ، أذ تؤدي إلى إنتاجية إيجابية وذلك للحصول على أسماك صحية وسريعة النمو باستخدام نظام بيئي مناسب لمياه الاستزراع المائي ، فضلاً عن كونها وسيلة جيدة ومناسبة لإنتاج الأسماك في المناطق التي يصعب استخدام طرائق الاستزراع السمكي التقليدية (Saleh, 2010)

ونتيجة لتوفر نظام المزارع السمكية في الأقفاص وفوائده لهذا اصبح هذا النظام واسع الانتشار في جميع أنحاء أوروبا وآسيا وأفريقيا وأمريكا وأصبح نظأما مفضلًا على أنظمة الاستزراع الأخرى وكذلك يتم انتاج الأسماك والتي تعد كمصدر رخيص للبروتين الحيواني (Gopakumar, 2009). ونتيجة لزيادة الاقبال على استهلاك البروتين الحيواني المتواجد في الأسماك فقد ازدادت تربية الأسماك في السنوات

الماضية والحالية وقد تم مناقشة ودراسة هذا النظام على نطاق واسع في العديد من الدراسات المختلفة من حيث سلامة الغذاء (Kaper *et al.*, 2004).

4-2 تلوث الأسماك : Fish bacterial contamination

تعد الأسماك من المواد الغذائية المعرضة للجرثومة الممرضة والمسببة للأمراض فضلا عن ذلك فإن الوضع الحالي لمبيعات الأسماك في الأسواق لازالت لا تقوم بتطبيق مبادئ الصحة والسلامة والنظافة والتي تؤدي الى تلوث الأسماك بأنواع مختلفة من الجراثيم المسببة للأمراض مما تؤدي الى انخفاض جودة الأسماك بسرعة كبيرة (Haile and Getahun, 2018). وبهذا فان تعرض الأسماك لا نواع الجراثيم الممرضة يشكل خطرا محتملا على الصحة العامة وذلك من خلال استهلاك المنتجات السمكية الملوثة والذي يؤدي الى حدوث التسمم الغذائي للمستهلكين أذ يحدث نقل التلوث الميكروبي المتواجد على الأسطح البيئية إلى المواد الغذائية بشكل مباشرة من خلال ملامسة السطح أو عن طريق الناقلات مثل الأفراد أو الآفات أو نظام التنظيف (Mizan *et al.*, 2015).

تشكل بعض الاحياء المجهرية خطراً محتملاً على الصحة العامة للمستهلك أذ تعد الأمراض الجرثومية هي المسؤولة عن النفوق الشديد الذي يحدث في كل من الأسماك النهرية وأسماك المزرعة ، كذلك تعد من المسببات الرئيسية لحدوث الأمراض المنقولة عن طريق الطعام food borne disease وذلك من خلال تعرض الأسماك الى أنواع بكتيرية ممرضة لكل من الأسماك والبشر على حد سواءً وقد يكون مصدر العدوى هو الأسماك المحفوظة أيضًا (Abowei and Briyani; 2011).

تعد الأمراض المنقولة بالغذاء من أكثر الأمراض انتشارا في العالم المعاصر وتسبب العديد من المشاكل الصحية للمستهلك ولهذا يجب أن تكون هناك حاجة ملحة للتأكد من صلاحية الطعام للمستهلك ولضمان جودة المنتجات الغذائية التي يتم تسويقها بصرف النظرعن مسببات الأمراض من الكائنات الحية الدقيقة وقد تم التعرف على العديد من مسببات الأمراض التي ظهرت في الآونة الأخيرة، بما في ذلك جراثيم الإشريكيا القولونية المسببة للأمراض المعوية والتسمم الغذائي(Buchanan *et al.*,2017) . أذ تعد هذه الجرثومة هي السبب الرئيسي لحدوث التسمم الغذائي ولاسيما في الأسماك الملوثة بها بسبب انتاجها للسموم الجرثومية وبذلك فإنها تعد من مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق الغذاء بما فيها الاسماك والتي تشكل عامل خطر على الصحة العامة في البلدان المتقدمة والنامية بسبب انتشارها في جميع أنحاء العالم (Huss *et al.*, 2003). تعد جراثيم الإشريكيا القولونية والجرثومة القولونية الأخرى من مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء المهمة أذ تم الإبلاغ عن بعض أهم مصادر التلوث لهذه المجموعات من الكائنات الحية الدقيقة سواءً المناطق ذات النظافة غير الجيدة، والمياه الملوثة، ومنتجات

اللحوم، ومنتجات الحبوب والخضروات (Erkmen *et al.*,2013). ومن المعروف أن العدد الكلي لجراثيم القولونية والإيشريكيا القولونية هو مؤشر على الظروف الصحية غير الجيدة وعلى حدوث التلوث البرازي في الغذاء والماء ومع ذلك ، فإن الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية هي قضية عالمية ويجب اتباع نهج مشترك من قبل جميع البلدان والمنظمات الدولية ذات الصلة بهذا المؤشر شرطًا أساسيًا للكشف عن الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية والسيطرة عليها والتي تشكل تهديدًا لصحة الإنسان (Seydi, 2017). وعلى الرغم من علم الاحياء المعقد وعلم الأوبئة والتحليلات ، فإن معظم الأمراض التي تنقلها الأغذية يمكن الوقاية منها من خلال الأهتمام بالصحة العامة وكذلك تعامل المستهلكون ومنتجو الأغذية وفقًا للمبادئ المتعلقة بأساليب الصحة السلامة المقبولة دوليًا لضمان وصول منتج صحي وخال من الأمراض الى المستهلك (Poole *et al.*, 2007).

يعد سلامة الغذاء (Food Safety) ضمان لسلامة المستهلك وذلك من خلال حماية المنتجات من المخاطر البيولوجية والفيزيائية والكيميائية طوال العملية الإنتاجية بدءًا من المزرعة إلى المعالجة والتخزين والتوزيع والتحضير والطهي . وفي العديد من البلدان حول العالم بدأ الناس في الحصول على منظور أكثر وعياً بشأن الغذاء والبيئة أذ يميل المستهلكون إلى تفضيل الأطعمة التي تكون الأكثر طبيعية والأقل معالجة والصديقة للبيئة والصحية والمنتجة بأمان (Onurlubas and Gürler, 2016).

تحاول برامج سلامة الأغذية Food Safety Programs تحديد العديد من القواعد التوجيهية وذلك لإنتاج منتجات غذائية لا تسبب مشاكل صحية للمستهلك. ومع ذلك ، يجب دائمًا تحديد المخاطر و تقييمها لمساعدة الشركات على إدارة تلك المخاطر المحتملة تطبيق إجراءات الصحة العامة (Bugarel *et al.*, 2010) كما يجب تكريس دور المؤسسات الصحة العامة وصناعة الأغذية والمستهلكين لمنع الأطعمة من حدوث التلوث. أما في حالات تفشي الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية ، فيعد الرصد المستمر أمرًا حيويًا وذلك للكشف عن اندلاعات الأمراض في الأطعمة والمناطق ومسببات الأمراض المرتبطة بها. أما بالنسبة لمعلومات النمط الجيني والأنواع الفرعية التي تم الحصول عليها من العترات الملوثة للغذاء لتتبع مصدر التلوث وتوصيف العترات ومقارنتها (Bintsis,2017) .

وجود جراثيم الامعائيات *Enterobacteriaceae* في أحواض تربية الأسماك يؤدي إلى مخاطر صحية خطيرة. على الرغم من أن هذه الكائنات الدقيقة في معظم الحالات هي تعد من الكائنات الحية الدقيقة الطبيعية للأسماك، إلا أنها يمكن أن تسبب بعض الأمراض عند المستهلكين، مثل عدوى المسالك البولية وكذلك تسبب الجرثومة المعوية العديد من الأمراض الشائعة والتي تنتقل عن طريق المياه الى الأسماك وقد تكون موجودة في أنسجة الأسماك فضلا عن الاستخدام العشوائي للمضادات

الحيوية أدى إلى ظهور عترات مقاومة وهو وضع خطير للغاية بالنسبة للمستهلكين بسبب انتقال الجرثومة الممرضة الى الانسان عن طريق تناول الأسماك الملوثة بالجرثومة .من أهم هذه الجرثومة هي الايشريكيا القولونية التي تستوطن بشكل عام في أمعاء الإنسان والحيوان والذي يعد وجودها كمؤشر على تلوث المياه والبيئة المحيطة بها (Fatma *et al.*, 2012; Costa , 2013; Gastalho *et al.*, 2014).

بالاضافة الى ذلك تعد الأسماك من الاطعمة السريعة التعرض للفساد نتيجة التلوث بالجراثيم ولاسيما الإيشريكيا القولونية والتي تؤدي الى حدوث الأمراض التي تسبب الوفيات والخسائر الاقتصادية فضلا عن تأثيرها على الصحة العامة من خلال حدوث التسمم الغذائي للمستهلكين أذ أشارت العديد من الدراسات إلى حدوث تلوث بجرثومة الإشريكيا القولونية في المنتجات البحرية الصالحة للأكل في بلدان مختلفة عن طريق البيئات المائية الملوثة وكذلك أثناء تداول الأسماك وأثناء عملية الإنتاج أذ لا توجد هذه الكائنات الحية الدقيقة بشكل طبيعي في الأسماك ومع ذلك تنتقل للأسماك (Ayulo *et al.*, 1994; Burrus *et al.*, 2017).

تعد معظم عترات الإيشريكيا القولونية أنماطا مصلية غير مسببة للأمراض وفي الوقت نفسة تعد الإيشريكيا القولونية انتهازية وقد تسبب مرضًا في الجهاز الهضمي و الجهاز البولي و الجهاز العصبي المركزي ولحد الان تم التعرف على أكثر من 400 نمطا مصليا serotype من الإيشريكيا القولونية ومن بينها 200 نمط مصلي منتج للسموم أذ ان وجود الإشريكيا القولونية في الغذاء بما في ذلك الأسماك والاغذية البحرية والماء يعد مؤشرا على حدوث التلوث البرازي (Fadel *et al.*, 2017; Cardozo *et al.*, 2018).

كذلك فان وجود الأنماط المصلية من جرثومة الإيشريكيا القولونية المسببة للأمراض ولاسيما ذات النمط المصلي (O157:H7) في عينات الأسماك يسبب تهديدًا كبيرًا للصحة العامة والمستهلكين (Kumar *et al.*,2001).

ان العلاج بمضادات الاحياء المجهرية يعد اداة مهمة للحد من الوفيات والاصابات المرتبطة بعدوى الإيشريكيا القولونية في الأسماك ولكنها ليست الحل الامثل وذلك بسبب مقاومة الجرثومة المكتسبة للمضادات الحيوية والتي تؤدي إلى خيارات علاجية صعبة لعلاج العدوى الجرثومية (Sakr *et.al.*,2015).

5-2 : فساد الأسماك : Fish spoilage

تعد ظاهرة فساد ألاغذية من الظواهر الطبيعية والتي تحدث نتيجة تأثير الانزيمات الموجودة في الاغذية فضلا عن الانزيمات التي تفرزها الاحياء الدقيقة التي تكون موجودة على سطح الاغذية ومن هذه الاغذية التي لها قابلية سريعة لحدوث الفساد هي الأسماك ولهذا يجب المحافظة عليها بشكل جيد بعد الصيد وذلك لضمان وصول منتج صحي وسليم الى المستهلك (FDA, 2012). وتعد الأسماك واحدة من اكثر المنتجات الغذائية القابلة للتلف أذ يمكن أن تنخفض جودتها بسرعة أثناء التعامل مع المنتج و النقل والتخزين الامر الذي يقلل من مدة صلاحية المنتج Shelf life (Sallam, 2007).

يحدث فساد الأسماك عادة نتيجة التغيرات التي تطرأ عليها وبذلك تصبح غير مقبولة من قبل المستهلك من الناحية الصحية ومن هذه التغيرات تغير اللون والشكل والطعم والرائحة كذلك يؤدي سوء التعامل مع الأسماك وذلك من خلال عرض الأسماك على الأرض أو في درجات حرارة مرتفعة ولاسيما في فصل الصيف وعدم استخدام الثلج كعامل من عوامل المحافظة على الأسماك لمدة طويلة إلى حدوث فساد الأسماك (FAO, 2010) . إذ يبدأ فساد الأسماك بالظهور خلال ساعة أو ساعتين من عرض الأسماك في ظل ظروف التلوث كما ان عملية تنظيف الأسماك وتفريغ احشاءها وتقطيعها بأدوات غير نظيفة على أسطح غير مهيأة وكذلك غسل الأسماك بالمياه الملوثة كلها تعدعوامل تؤثرعلى تلوث الأسماك ومن ثم حدوث فساد الأسماك كذلك سوء التعامل المنزلي مع الأسماك وفي المنشآت الغذائية وطرائق الحفظ غير السليمة يؤدي الى حدوث فساد سريع للأسماك بسبب المحتوى الغذائي للأسماك (HPA)(Health Protection Agency ,2009) .

6-2 : التسمم الغذائي : Food Poisoning

التسمم الغذائي هو عبارة عن مصطلح يضم العديد من الأمراض الناتجة عن تناول المواد الغذائية التي تكون ملوثة بالجراثيم أو سمومها وتعد موادا ضارة بالإنسان أذ ان حدوث حالات التسمم الغذائي يعتمد على مجموعة محددة من العوامل منها :

1. تناول المواد الغذائية التي تحوي على الجراثيم المسببة للتسمم الغذائي أو ذيفاناتها.
2. أن يكون الغذاء وسطا مناسبا" لتكاثر الجراثيم بأذ أن مستويات الحمل الجرثومي أو السموم التي تنتجها الجراثيم في المواد الغذائية تكون كافية لإحداث التسمم الغذائي.
3. تنتج الجراثيم السموم بنفسها أومن خلال عوامل الفوعة الأخرى والتي تسبب العديد من علأمات حدوث التسمم الغذائي والتي تكون لها القدرة على البقاء على قيد الحياة في داخل الغذاء خلال عمليات التصنيع والتوزيع والتخزين والتحضير للمواد الغذائية.

4. الانسان هو الأكثر تعرض للإصابة بالتسمم الغذائي من الأغذية التي تحتوي عادة على مستويات عالية من الجراثيم أو سمومها الخطيرة. أذ يتميز التسمم الغذائي الجرثومي بحدوث أعراض التهاب المعدة والأمعاء الحاد نتيجة لابتلاع الجراثيم الموجودة في الغذاء او سمومها. (Quinn *et al.*,2004).

يوجد هناك نوعان من التسمم الغذائي والذي يكون له صلة باستهلاك المواد الغذائية الملوثة:

1. التسمم بالذيفانات (Foodborne Intoxication): وهو التسمم الذي يكون ناجم عن استهلاك الأغذية بعد إفراز السموم فيها من قبل الجراثيم المنتجة للسموم ومن هذه الأنواع من الجراثيم *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Clostridium perfringens,* وتكون قادرة على إنتاج ذيفان ثابت مقاوم للحرارة. (Ray,2005).
2. العدوى المنقولة بالغذاء (Foodborne Infection) : وهي العدوى التي تحدث نتيجة تضاعف الجراثيم في المواد الغذائية او تضاعفها في الامعاء او بفعل الجرثومة نفسها منتجة بذلك الذيفان المعوي enterotoxin وان من أهم الجراثيم المسببة لهذه النوع من التسمم الغذائي هي (Salmonella ، *E. coli* ،listeria) (Prescott *el al.*, 2005).

7-2 : عائلة الجراثيم المعوية : *Enterobacteriaceae*

تعد جراثيم هذه العائلة من أكثر أنواع المجاميع الجرثومية أهمية وانتشارا وهي عبارة عن عصيات تكون سالبة لصبغة الكرام تستوطن هذه الجراثيم في امعاء كل من الانسان والحيوان وتكون ذات انتشار واسع في الطبيعة ولاسيما في التربة والمياه وتضم العديد من الأجناس أهمها *Salmonella spp., Escherichia coli* & *Yersinia spp* وتعد هذه اجناس ممرضة *Klebsiella spp.* *Proteus* spp. & *Enterobacter spp.* فتعد ممرضة انتهازية. تم تقسيم هذه العائلة على أساس قدرة الجراثيم على تخمير سكر اللاكتوز وتشمل كل من جراثيم (*Klebsiella, Escherichia* and *Enterobacter)* ، وبكتريا ليس لها القدرة على تخمير سكر اللاكتوز وتشمل كل من جراثيم (*Salmonella ,Proteus, Shigella, Yersinia*) (Berendonk *et al.*, 2015).

تعد عائلة الجراثيم المعوية من أكثر الكائنات الحية المتعايشة انتشارًا في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوانات ذوات الدم الحار فضلاً عن كونها واحدة من أهم مسببات الأمراض البشرية والحيوانية .من أهم أنواع الجراثيم المعوية هي الايشريكيا القولونية وهي عبارة عن جرثومة سالبة الكرام

توجد في الجهاز الهضمي للحيوانات وهذه الجراثيم لها القدرة على البقاء خارج الكائن الحي للمضيف لمدة طويلة (Shepon.*et al.*,2016) وهي انتهازية وقد تم تحديد العديد من العترات التي تسبب امراضا خطيرة للمستهلك أذ انها تنتشر بسهولة في النظم البيئية المختلفة من خلال السلسلة الغذائية والمياه ومن أهم الخصائص المميزة لها هي قدرتها على النمو في الظروف الهوائية واللاهوائية وهذه تجعلها أكثر الكائنات الحية الدقيقة استخدأما في مجال تقنية الحمض النووي (Bilinski *et al.*,2012).

8-2 : تصنيف الايشريكيا القولونية: Classification of *E.coli*

جراثيم الإيشريكيا القولونية *E.Coli* ليست من الكائنات الحية الطبيعية لميكروبات الأسماك ومع ذلك، يمكن عزلها من أمعاء الأسماك نظرًا لوجودها في البيئات المائية الملوثة. تنتج جراثيم الايشريكيا القولونية ذيفان الشيغا (*Stx*) وهو عامل الفوعة الرئيسي أذ يوجد هناك نوعان من ذيفان الشيغا ، (*Stx1* و *Stx2*) اذ أن وجود المجموعة المصلية من الايشريكيا القولونية O157:H7 المسببة للأمراض في عينات الأسماك يمثل تهديدا كبيرا للصحة العامة ويمكن ان تكون الأسماك بمثابة وسيلة لنقل هذه الجراثيم الى المستهلكين أذ يحدث تلوث الأسماك بهذه الجراثيم نتيجة لتلوث البيئة المائية للأسماك (Guzmán *et al.*,2004).

جراثيم الإيشريكيا القولونية هي سالبة الكرام ولاهوائية اختيارية عصوية الشكل تترتب بشكل ازواج او منفردة تتحرك بواسطة الاسواط الموجودة على غشاء الخلية غير مكونة للأبواغ وتكون هوائية او لاهوائية اختيارية وتكون مخمرة لسكر اللاكتوز ودرجة الحرارة المثلى لنموها هي 37 درجة مئوية. تكون موجبة لاختبار الاندول واختبار المثيل الاحمر وسالبة لاختبار السترات واختبار الاوكسديز وموجبة لاختبار الكاتاليز ولاتنتج غاز كبريتيد الهيدروجين عند نموها على وسط السكر الثلاثي والحديد وتتواجد عادة في امعاء الحيوانات ذوات الدم الحار(Tille ,2014).

معظم عترات الإيشريكيا القولونية غير ضارة ، لكن بعضها ، مثل النمط المصلي O157:H7، يمكن أن يسبب تسممًا غذائيًا خطيرًا للإنسان بسبب انتاج الجراثيم للسموم ولا يقتصر وجود الإيشريكيا القولونية دائمًا على الأمعاء ، بل انها ايضا لها القدرة على البقاء على قيد الحياة لأوقات وجيزة خارج الجسم ويعد هذا مؤشرًا مثاليًا للتلوث البرازي وهي مصنفة الآن كجزء من عائلة *Enterobacteriaeae* (Kashef*et al.*,2010 ; ; Feng *et al.*,2002).

وتصنف الايشريكيا القولونية اعتمادا على (Engelkirk and Duben-Engelkirk,2015)

Kingdom : Prokaryotae

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Enterobacteriales

Family : *Enterobacteriaceae*

Genus : *Escherichia*

Species : *coli*

2-9 : أنواع جراثيم الايشريكيا القولونية:

توجد هناك العديد من الانواع الفرعية من الإشريكيا القولونية و العديد منها غير ضار بالبشر وبعضها يمكن أن تسبب أمراضًا معوية (Meng *et al.*, 2013)، وتعد الايشريكيا القولونية كائن حي دقيق مع عدد من العزلات المسببة للأمراض ولاسيما الالتهابات المعوية أذ يمكن تصنيف عزلات الايشريكيا القولونية الممرضة إلى أنواع مختلفة لأن كل نوع منها يسبب مرضاً معينا (Köhler and Dobrindt, 2011) ، وتشمل هذه الانواع ما يلي:

1. الإشريكيا القولونية المعوية Enterotoxogenic *E. coli* (ETEC) : يوجد هذا النوع عادةً في المجتمعات التي ليس لديها تدابير كافية للصرف الصحي في المناطق التي لديها موارد صرف صحي محدودة ويعد هذا النوع الفرعي الأكثر شيوعًا والمسؤول عن إسهال المسافر والجفاف عند الأطفال الرضع.
2. الإشريكيا القولونية النزفية المعوية Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) :يعد هذا النوع الأكثر شيوعًا من الإشريكية القولونية التي تسبب التسمم الغذائي لدى الانسان حدثت حالات تفشي سابقة لـ EHEC من الأشخاص الذين تناولوا الفاكهة والخضروات الملوثة وكذلك لحوم البقر غير المطبوخة جيدًا.
3. الإشريكيا القولونية المسببة للأمراض المعوية Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) : يعد هذا النوع هو الأول الذي حدده الأطباء على أنه يسبب الاسهال المائي و يمكن أن ينتقل أيضًا من

شخص لآخر. بشكل أكثر شيوعا ويحدث، EPEC عن طريق استهلاك منتجات الخضروات غير الصحية.

4. الإشريكيا القولونية المعوية التكتلية اوالتراكمي Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) : حدد الباحثون مؤخرًا EAEC بوصفه سببًا شائعًا لحدوث الاسهال في المناطق التي لديها وفرة في موارد الصرف الصحي.
5. الإشريكيا القولونية المعوية الغازية Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) : يعد هذا النوع أقل شيوعًا من الأنواع الأخرى ، على الرغم من أن الأبحاث الحديثة تشير إلى أن هذا قد يكون بسبب نقص التشخيص. وله صلة وثيقة بالشيغيلا ، وهي جراثيم تسبب اضطرابات الجهاز الهضمي.
6. الإشريكيا القولونية الملتصقة المنتشرة Diffusely adhesive *E. coli* (DAEC): يغطي هذا النوع الفرعي من الإشريكية القولونية سطح الخلايا، مما يميزها عن الأنواع الأخرى. في حين أنه يمكن أن يسبب الإسهال لدى الانسان ، ولاسيما الأطفال الصغار,Anderson and Tarr) (2018.

أما فيما يخص الانماط المصلية لجراثيم الإيشريكيا القولونية فهناك العديد من هذه الانماط وخصوصا ذات النمط المصلي (O157: H7) فهي واحدة من مجموعة الإيشريكيا القولونية المسببة للأمراض (المعروفة باسم الإشريكيا القولونية المعوية النزفية أو EHEC التي تستوطن الجهاز الهضمي وتسبب حالة تعرف باسم التهاب القولون النزفي Hemorrhagic Colitis(HC) أو الإسهال الدموي. تعد الإيشريكيا القولونية (O157: H7) أيضًا من انواع الجراثيم المنتجة للسموم ولاسيما سموم الشيغا (STEC) أذ تتميز بان لها القدرة على إنتاج ذيفان الشيغا من النوع 1 (*Stx1*) ، أو ذيفان الشيغا من النوع 2 (*Stx2*) ، أو كلتا النوعين من السموم معا. إن قدرة STEC بشكل عام والإيشريكيا القولونية O157: H7 على وجه الخصوص لإنتاج السموم تجعلها مصدر قلق خاص لانها تسبب التسمم الغذائي للإنسان(Rangel *et al*, 2005).ان الإشريكيا القولونية ذات النمط المصلي O157: H7 تكون مسؤولة عن العديد من الاصابات المعدية في جميع أنحاء العالم أذ ترتبط العدوى بتناول الطعام والمياه الملوثة ، فهي مسؤولة عن ما يقدر بنحو 73،480 حالة مرضية، و 2،168 حالة دخول إلى المستشفى ، و 61 حالة وفاة سنويًا في مختلف انحاء العالم أذ ترتبط غالبية حالات تفشي الإشريكيا القولونية O157: H7 في العالم بانتقالها عن طريق الغذاء والذي يعمل كمصدر للعدوى في حالات تفشي الإشريكيا القولونية O157: H7 فقد تم وصف العديد من الطرائق التي يتم النقل فيها للإشريكيا القولونية O157: H7 عن طريق الغذاء بما في ذلك اللحم البقري والأسماك والحليب ومشتقاته وكذلك من خلال الاتصال بالحيوانات أو بيئتها أذ يكون انتقالها عن طريق الاغذية المختلفة سهل جدا وكذلك أيضًا من خلال قدرة

الجراثيم الممرضة على النمو على مدى واسع من درجات الحرارة والبقاء على قيد الحياة في ظروف التجميد وفضلا عن انتقال العدوى من الطعام أو الشراب الملوث ، فقد تم الإبلاغ أيضًا عن انتقال العدوى من شخص إلى آخر وكذلك عن طريق الماء (Bai and Xiong, 2018 ; Moxley *et al.*, 2009; Fox *et al.*, 2009).

الايشريكيا القولونية هي جراثيم لها مكانة خاصة في عالم الاحياء المجهرية لأنه من الممكن أن تسبب التهابات خطيرة في البشر والحيوانات وتمثل أيضًا جزء كبير من الكائنات الحية الدقيقة الأصلية لمضيفين مختلفين.ان مصدر القلق الرئيسي هو احتمال انتقال عدوى الايشريكيا القولونية الفتاكة أو المقاومة بين الحيوانات والبشر من خلال العديد من المسارات اهمها التلامس المباشر والاتصال بإفرازات الحيوانات أو عبر السلسلة الغذائية (Fry *et al.*, 2018). كذلك تمثل الايشريكيا القولونية أيضًا خزانًا رئيسيًا من الجينات المقاومة للمضادات الحيوية أذ أظهرت عزلات الايشريكيا القولونية ذات المصدر الحيواني مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة (Kaper *et al.*, 2004) ، وتسبب الايشريكيا القولونية العديد من الأمراض للحيوان والتي تكون ناتجة من عزلات الايشريكيا القولونية الناشئة من البيئة المحيطة بالحيوان ومن ثم فإنها تسبب العديد من الخسائر الاقتصادية للثروة الحيوانية. تختلف الايشريكيا القولونية المسببة للأمراض عن غير المسببة للأمراض باختلاف السمات المرتبطة بعوامل الفوعة. (Johnson and Russo, 2005)

10-2 : عوامل الضراوة للايشريكيا القولونية : Virulence factors

تمتلك الايشريكيا القولونية *E Coli* العديد من الجينات والتي تكون مسؤولة عن حدوث الضراوة ولهذا السبب تعد هذه الجرثومة ممرضة وتسبب التسمم الغذائي. ان من أهم عوامل الضراوة للايشريكيا القولونية *E. coli* هي الذيفانات ولاسيما ذيفان الشيغا *Stx1 and Stx2* وبلازميد plasmid p O157 فضلا عن انزيم الهيمولايسين Hemolysin (Kim *et al.*, 2016) .

1-10-2 : ذيفانات الشيغا: Shiga toxins *(Stxs)*

يعد ذيفان الشيغا *Stx* من أهم عوامل الضراوة التي تمتلكها الايشريكيا القولونية *E. coli* ويسمى هذا الذيفان باسم الشيغا لأنه تركيبا ووظيفيا يكون مشابه لذيفان جراثيم الشيكيلا Shigella. الا ان الاختلاف يكون في حامض اميني واحد كما يطلق علية ايضا Cytotoxins و Verotoxin. (Kaper and O'Brien, 2014) قديما كان يطلق عليها مصطلح الذيفانات الشبيهه بالشيغا (Shiga like toxins) الى أن تم التأكد من انهما نفس ذيفان الشيغا. (Scheutz *et al.*, 2012) يعد ذيفان الشيغا سام

جدا للخلايا أذ يلعب دورا مهما في إحداث مرض القولون النزفي HC ومتلازمة حال الدم اليوريمي (Mohawk and O'Brien, 2011). يتم التعرف على الإيشريكيا القولونية المنتجة لذيفان شايغا (STEC) بوصفها كمجموعة مهمة من مسببات الأمراض الجرثومية المعوية أذ هناك ما لا يقل عن 100 نمط مصلي من الإشريكيا القولونية القادرة على إنتاج سموم الشيغا (Nataro and Kaper 1998). تنتج STEC المسببة للأمراض البشرية واحدة أو أكثر من سموم الشيغا (*Stx*)، والتي تتكون عادة من مجموعتين محددتين الاولى *Stx1* أذ (تتكون من انواع فرعية ثلاثة (*Stx1a* و *Stx1c* و *Stx1d*) و الثانية *Stx2* تتكون من سبعة انواع فرعية (*Stx2a* و *Stx2b* و *Stx2c* و *Stx2d* و *Stx2e* و *Stx2f* و *Stx2g*) من بين هذه المتغيرات ، ترتبط (*Stx2a* و *Stx2c* و *Stx2d*) بمرض شديد ويرتبط (*Stx2b* و *Stx2e*) بأعراض سريرية تكون خفيفة او بدون اعراض (Karch et al., 2005). إن إنتاج ذيفان الشيغا (*Stx*) هو سمة الضراوة الرئيسية التي تُنسب الى جراثيم الإيشريكيا القولونية ذات النمط المصلي O157: H7 (Stephan and Hoelzle, 2000). ومع ذلك فإن من بين هذه الأنماط المصلية هي الإيشريكيا القولونية O157: H7 وتعد الأكثر شهرة لكل من علماء الأحياء الدقيقة وعامة الناس أما عن كيفية انتاج الجرثومة للسموم فانه بمجرد أن تلتصق الجرثومة بالغشاء المخاطي للأمعاء فإنها تنمو وتفرز مجموعة من المنتجات خارج الخلية بما في ذلك السموم الخلوية القوية المعروفة باسم سموم الشيغا. هناك نوعان رئيسيان متميزان من السموم (*Stx1* و *Stx2*) أذ تم التعرف على هذا الكائن الحي لأول مرة في عام 1982 بعد اندلاع التهاب القولون النزفي (HC) في الولايات المتحدة (Riley *et al.*, 1983).لقد تم توثيق الانلاعات المرضية االتي تنقلها الاغذية المرتبطة بجرثومة الايشيريكيا القولونية المفرزة لسموم الشايكا في جميع أنحاء العالم. على الرغم من coli O157: H7 حاليًا هو النمط المصلي الأكثر شيوعًا في أجزاء كثيرة من العالم (Armstrong *et al.*, 1996) ، وتعتبر الأنماط المصلية O5 و O26 و O91 و O111 و O113 متساوية في الأهمية في التسبب في التهاب القولون النزفي (Bettelheim, 1996) .فقد تم الإبلاغ عن حدوث الإصابة بجرثومة الايشيريكيا القولونية المفرزة لسموم الشايكا في عدد من المنتجات الغذائية مثل لحم البقر ولحم الخنزير ولحم الضأن والدواجن (Samadpour *et al.*, 1994) . علاوة على ذلك ، تم استخدام جينات rfb التي تشفر مستضد (O) للكشف عن النمط المصلي O157 (Desmarchelier *et al.*,1998) .

2-10-2 بلازميد الضراوة: Plasmid PO157

تمتلك جراثيم الايشريكيا القولونية عوامل ضراوة أخرى فضلا عن عوامل الضراوة الشيغا ولاسيما ذات النمط المصلي O157:H7 مايسمى ب بلازميد الضراوة PO157 وهو عبارة عن جزيئات من الحامض النووي DNA والتي يكون لها القدرة على التضاعف عدة مرات داخل الخلية

الجرثومية وتأتي أهمية هذه البلازميدات في كونها لها القدرة على انتاج انزيمات وسموم بروتينية تعمل على حدوث الأمراض. (Klümper *et al* .,2015)

2-10-3 الهيمولايسين Hemolysin

هو عبارة عن انزيم كما انه يعد احد عوامل الضراوة لجرثومة الايشريكيا القولونية وهو بطبيعته بروتين ويكون سام أذ يعمل على تحليل للخلايا من خلال عمل ثقوب في جدار الخلية الهدف ويوجد ثلاثة انواع من هذا الانزيم وهي الالفا والبيتا والكأما ويعد نوع الف هو الأكثر شيوعا (Coura *et al.*, 2019).

2-10-4 الخمل Fimbria or Pili :

توصف على انها شعيرات دقيقة ويمكن رؤيتها وذلك باستخدام المجهر الألكتروني،أذ يختلف تركيبها البروتيني عن تركيب البروتين للاسواط ويتم التحكم بانتاجها بلازميدات الأشريكيا القولونية (Thakur *et al*., 2013).

2-10- 5 المستضد المحفظي Capsular Antigen K(KPS)

يتواجد هذا المستضد المحفظي عندالايشريكيا القولونية ذات المحفظة الرقيقة أذ يتكون هذا المستضد من السكريات المتعددة أذ يمنع حدوث عملية البلعمة لجراثيم الأشريكيا القولونية وهذا يؤدي الى زيادة قدرة المستضد على إحداث التهابات في أعضاء الجسم المختلفة وتكون الخثر داخل الاوعية الدموية (Harvey *et al*.,2013).

2-11 : المضادات الحيوية: Antibiotics

يمكن تعريف المضاد الحيوي عبارة عن مادة أو مركب ينتج من الاحياء المجهرية أذ تمتلك هذه المضادات القدرة على تثبيط تلك الأحياء دون ان يكون لها تأثير في خلايا جسم المضيف، والبعض الاخر يكون ذا تأثير قاتل للاحياء المجهرية ويمتلك بعض من هذه المضادات الحيوية طيفاً محدوداً Narrow Spectrum Antibiotic والبعض الاخر يمتلك طيفا واسعا Broad Spectrum Antibiotic كما انها تعمل على مجاميع مختلفة من الاحياء المجهري (World Fish, 2016). لقد أحدث اكتشاف العوامل المضادة للميكروبات في منتصف القرن العشرين الى ثورة في إدارة وعلاج الالتهابات الجرثومية بأذ أصبحت العدوى التي كان من الممكن أن تكون قاتلة في العادة قابلة للشفاء. ومنذ ذلك الحين أنقذت العوامل المضادة للميكروبات أرواح الملايين من الناس ومع ذلك ، فإن هذه المكاسب تتعرض الآن لخطر

شديد وذلك بسبب الظهور والانتشار السريع للجرثومة المقاومة لمضادات الاحياء المجهرية (O'Neill,2016).

تم اكتشاف حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية لأول مرة من قبل العالم الكسندر في عام 1928م بعد اكتشافه لعقار البنسلين Penicillin بالصدفة وقد قام العالمان Howard Flory و Ernst Chain باستخلاصه. وأنتشر بشكل أوسع عام 1941 م أذ يوجد هناك عدة أنماط من المقاومة للمضادات الحيوية منها MDR (multi drug resistant) و XDR(extensively drug resistant) و PDR (pan drug resistant). ان المقاومة من نوع MDR تعني أن البكتريا مقاومة على الأقل لواحد من بين 3 انواع من المضادات الحياتية أما بالنسبة للمقاومة من نوع XDR تعني أن البكتريا مقاومة لاثنين أو لجميع انواع المضادات الحيوية المتواجدة والمقاومة من نوع PDR تعني أن البكتريا مقاومة لجميع المضادات الحيوية المتوفرة (Basak *et al.*, 2016).

2-11-1 :الية عمل المضادات الحيوية:

يمكن تقسيم المضادات الحيوية الى مجاميع وذلك بالاعتماد على الية عملها أذ تضم المجموعة الاولى عدد من المضادات الحيوية والتي يكون عملها هو تثبيط تكون جدار الخلية (Inhibition of cell wall synthesis) وهذا يحدث من خلال التداخل مع عدد من الانزيمات التي تقوم بربط الببتيدوكليكان peptidoglycan cross linking. (Giguère , 2013) .

المجموعة الثانية تضم المضادات التي تثبيط تصنيع البروتين أذ انها وبشكل انتقائي تمنع تخليق البروتين للجرثومة ولكنها في الوقت نفسه لا تؤثر على البروتين الموجود في النوا ة (Kapoor et al; 2017).

أما المجموعة الثالثة فتضم انواع المضادات التي تتداخل مع عملية تصنيع الحامض النووي للخلية. أذ انها تتداخل في عملية استنساخ الحامض النووي Interference with nucleic acid synthesis وذلك من خلال ايقاف أو اعاقة عمل انزيم يسمى DNA gyrase (Capita and Alonso-Calleja ,2013).

أما المجموعة الرابعة فتضم المضادات التي تقوم بالتأثير على وظيفة وعمل الغشاء الخلوي cell membrance function أذ ان هذه المجموعة تعتمد في عملها على الاختلاف في محتوى الغشاء من الدهون أذ يؤدي هذا الى تحطيم الغشاء الخارجي للجراثيم سالبة الكرام وبالتالي يؤدي الى خروج كل من البروتينات والقواعد النتروجينية للخارج ومن ثم حدوث انفجار للخلية وموتها (Brooks *et al*;2013) .

أما المجموعة الخامسة فتضم المضادات التي تعمل على اعاقة المسار الأيضي anti-metabolic pathway من خلال تثبيط انزيم(dihydrofolate-reductase)الضروري في تصنيع حامض الفوليك (Manage, 2018).

2-11-2: مقاومة الايشريكيا القولونية للمضادات الحيوية

ان مقاومة الاحياء المجهرية ولاسيما عائلة الجراثيم المعوية واهمها جراثيم القولون (الايشريكيا القولونية) اصبح يشكل مصدر قلق كبير على نطاق واسع ولهذا ينصح الأطباء البيطريين باستمرار استخدام مضادات الاحياء المجهرية بحكمة والتأكيد على الحاجة الى ضرورة النظر الى جميع الخيارات الوقائية والعلاجية مع مراعاة معرفة انواع الجراثيم المقاومة لمضادات الاحياء المجهرية ومعرفة تلك المضادات (Suojala *et al.*, 2013).

تعد عائلة السيفالوسبورينات واسعة الطيف ذات أهمية كبيرة في الطب البشري ولكن غير مصرح باستخدامها في الطب البيطري ولاسيما في الدواجن فضلا عن الإجراءات الوطنية المتخذة في الغالب وذلك لتقييد استخدام مضادات الاحياء المجهرية ذات الأهمية الكبيرة في الحيوانات أذ ان استخدام مضادات الاحياء المجهرية كمحفزات للنمو تم حظرها في الحيوانات في اوروبا منذ عام 2006 لكنها لاتزال شائعة الاستخدام في اغلب الدول . ان مقاومة جرثومة الأمعاء للمضادات الحيوية أصبحت تعد من المؤشرات الرئيسية لحدوث العديد من الأمراض التي تسببها جرثومة الامعاء ولتقدير عبء مقاومة مضادات الاحياء المجهرية من قبل الجرثومة في الحيوانات ومن ثم تأثيرها على الصحة العامة (Michael *et al.*, 2015) . في حين عائلة البيتا لاكتأمازفهي انزيمات تنتج بواسطة بعض الجرثومة أو الجراثيم سلبيات غرام وإيجابيات غرام وهي المسؤولة عن مقاومة الجرثومة المنتجة لهذه الانزيمات لعدد واسع من المضادات الحيوية المتعلقة بالبيتا لاكتام، والتي منها البنسلين. وتوجد مجموعات وصنوف عديدة من هذه الأنزيمات التي تقاوم المضاد الحيوي . هناك العديد من الجينات في الايشريكيا القولونية من أصل بشري وحيواني تمنح مقاومة بيتا لاكتام أذ تكون منتشرة على نطاق واسع في الايشريكيا القولونية والتي يمكن أن تثبط نشاط البنسلين والأمينوبنسلين (Guenther *et al.*, 2017) .

تستخدم مضادات الاحياء المجهرية في الطب البيطري والطب البشري وقد يؤدي الاستخدام المكثف لهذه المضادات الحيوية في الحيوانات إلى تعزيز من تثبيت الجينات المقاومة لمضادات الاحياء المجهرية في الجرثومة والتي قد تكون حيوانية المصدر أو القدرة على نقل هذه الجينات إلى مسببات الأمراض في الانسان والحيوان أو إلى جرثومة الأمعاء في الانسان عن طريق الاتصال المباشر أو الغذاء أو البيئة وملاحظة تأثيرها على صحة الحيوان ويتم ذلك من خلال الكشف عن مجموعة الجينات

المقاومة لمضادات الحيوية (Butaye *et al*; 2015) . كذلك تلوث الفضلات البرازية الناتجة من الحيوانات المياه الجوفية والجداول والمسارات المائية الأخرى مما يسهم في انتشار العديد من انواع الجرثومة التي تحمل جينات مقاومة مضادات الاحياء المجهرية (World Health Organization2017) ايضا تسهم النفايات البشرية الناتجة من المنازل والمستشفيات في تلويث الأنهار والمجاري المائية بالجرثومة المقاومة لمضادات الاحياء المجهرية في الواقع ثبت أن مياه الصرف الصحي المعالجة ومياه البحيرة تحتوي على جينات لبكتيرية مقاومة لمضادات الاحياء المجهرية (Anonymous, 2015).

إن طرائق انتقال جينات الجرثومة المقاومة للمضادات الحياتية بين حيوانات المزرعة والبشر تجعل من الصعب إثبات ما إذا كان مستودع جينات مقاومة مضادات الاحياء المجهرية في الحيوانات يشكل خطرًا على صحة الحيوان أو الإنسان ومع ذلك ، فإن بعض الجرثومة المقاومة لمضادات الاحياء المجهرية تكون حيوانية المصدر (FAO,2016) ، وتعد التربة ومياه الري مصادر تلوث للخضروات والفواكه ، أذ تم الكشف عن الجرثومة المقاومة لمضادات الاحياء المجهرية أيضًا بين المزارع و قد تنتشر الجرثومة المقاومة عن طريق الحيوانات الحاملة المصابة أو الحيوانات المصاحبة أو ناقلات الحياة البرية (FDA,2015).

يؤدي الاستخدام المفرط لمضادات الاحياء المجهرية في الطب البيطري الى ظهور الجرثومة المقاومة لمضادات الاحياء المجهرية ، بما في ذلك الجرثومة المسببة للأمراض الحيوانية ، ومسببات الأمراض البشرية والجرثومة المتعايشة مع الحيوانات. والجرثومة المسببة لتلف المنتجات الغذائية (Costa and Loureiro,2013) والتقارير الواردة من الهيئة الأوروبية لسلامة الأغذية (EFSA) (European Food Safety Authority) والمركز الأوروبي للوقاية من الأمراض ومكافحتها (European Centre for Disease Prevention and Control) (ECDC) التي ترصد مقاومة مضادات الاحياء المجهرية في الحيوانات والتي تكون بتزايد مشيرة الى تأثيرها على صحة المستهلك (Yazdankhah *et al* ., 2014) ومقاومة مضادات الاحياء المجهرية Antimicrobial Resistance (AMR) تعد مشكلة صحية كبيرة منتشرة في جميع أنحاء العالم. وبحسب تقرير مراجعة مقاومة مضادات الاحياء المجهرية أن ما لا يقل عن (700000) حالة وفاة سنوية ناجمة عن العدوى بالعترات الجرثومية المقاومة للأدوية ، وتشير الأرقام أن (50000) شخصاً تقريبا يموتون كل عام بسبب العدوى المقاومة للمضادات الحيوية في أوروبا والولايات المتحدة وحدهما . وقد أدى الاستخدام غير المناسب للمضادات الحيوية في علاج الحيوانات وكذلك في الممارسة الطبية إلى زيادة خطر الإصابة بعدوى غير قابلة للعلاج بسبب حرية تنقل الأشخاص والبضائع بين البلدان وكذلك النقل الدولي المكثف

للماشية أذ أصبحت مشكلة مقاومة مضادات الاحياء المجهرية بطبيعتها مشكلة عالمية ، علاوة على ذلك ، فإن ظهور مقاومة الاحياء المجهرية للأدوية يتزامن مع الانخفاض في اكتشاف عوامل جديدة مضادة للميكروبات (Woolhouse *et al.*, 2015).

ان استخدام المضادات الحيوية تلعب دورًا رئيسيًا في علاج الالتهابات الجرثومية في الطب البشري والبيطري . في الواقع ، تم اعتبار مقاومة مضادات الاحياء المجهرية (AMR) القضية الأساسية للصحة العامة باعتبار أن صحة الإنسان مرتبطة بصحة الحيوان والبيئة التي يعيش بها (Robinson *et al.*,2016) ، فقد وجد بان استخدامها يؤثر على الجرثومة المتعايشة في الحيوانات وكذلك تؤثر على التربة المعالجة بالسماد الحاوية على الجرثومة التي تحمل جينات مقاومة لمضادات الاحياء المجهرية والتي ستعد مستودعا طبيعيا للجرثومة المقاومة لمضادات الحيوية (Thanner *et al* ., 2016) .

وضعت منظمة الصحة العالمية وعلى غرار المنظمة العالمية لصحة الحيوان (المسماة أيضًا المنظمة العالمية للصحة الحيوانية) World Organization for Animal Health قائمة بالمضادات الحيوية للميكروبات ذات الأهمية البيطرية أذ كانت معايير تصنيف مضادات الاحياء المجهرية مختلفةعن الطب البشري . واستندت معايير المنظمة العالمية لصحة الحيوان إلى استبيان أعده فريق متخصص والذي تم إرساله إلى مندوبي المنظمة الدولية للصحة الحيوانية من جميع البلدان الأعضاء والمنظمات الدولية التي وقعت اتفاقية تعاون مع المنظمة العالمية للصحة الحيوانية (Fernandes and Cook., 2013) بأذ استند المعيار الاول إلى معدل الاستجابة وتم استيفاء هذا المعيار عندما حددت غالبية المستجيبين (أكثر من 50٪) في حين استند المعيار الثاني إلى علاج كل مرض حيواني خطير وتوافر عوامل بديلة مضادة للميكروبات: "تم استيفاء هذا المعيار عندما تم تحديد المركبات ضمن الفئة على أنها ضرورية ضد عدوى معينة وكان هناك نقص في البدائل العلاجية الكافية" وتعد منظمة الصحة العالمية ان مضادات الاحياء المجهرية التي تفي بكلا المعيارين "مهمة للغاية" في الطب البيطري ومضادات الاحياء المجهرية التي تفي بأحد المعايير تعد مهمة للغاية" ، ومضادات الاحياء المجهرية التي لا تفي بأي من المعيارين تعد "مهمة" (Argudín and Butaye, 2016). وتشير التقديرات إلى أن معظم المضادات الحيوية المستخدمة حاليًا للعدوى البشرية والحيوانية الشائعة ستكون عديمة الفائدة في غضون خمس إلى عشر سنوات قادمة، مما يعيد عقارب الساعة إلى الوراء إلى عصر ما قبل المضادات الحيوية (Rosa and Corcione, 2015).

تم الكشف عن مقاومة مضادات الاحياء المجهرية في الإشريكيا القولونية في جميع أنحاء العالم أذ ان حدوث زيادة معدلات المقاومة للايشريكيا القولونية سببت مصدر قلق متزايد في كل من البلدان

المتقدمة والنامية. أذ ان ارتفاع المقاومة الجرثومية للمضادات الحيوية يعقد من علاج العدوى. وبشكل عام، يتم علاج ما يصل إلى 95٪ من الحالات التي تظهر عليها أعراض حادة دون إجراء تحقيق جرثومي أذ تم إجراء عدد من الدراسات حول انتشار وأنماط مقاومة مضادات الحيوية للإشريكيا القولونية من مصادر مختلفة (Yismaw *et al.*, 2010).

تمتلك معظم انواع الجراثيم مقاومة ضد المضادات الحيوية أذ يستخدم اختبار الحساسية وذلك لقياس مقاومة هذه الجراثيم للمضاد الحيوي ويستخدم هذا الاختبار عادة للمساعدة في العثور على المضاد الحيوي الأكثر فعالية لقتل أو تثبيط الانواع المختلفة من البكتريا الممرضة (Ali *et al.*, 2018). ويتم عادة تحديد حساسية عزلات الإشريكيا القولونية بمضادات الاحياء المجهرية وفقًا للجنة المضادات الحيوية التابعة للجمعية الفرنسية لعلم الأحياء الدقيقة / اللجنة الأوروبية لاختبار الحساسية لمضادات الاحياء المجهرية وذلك باستخدام طريقة الانتشار القرصي على وسط مولر هنتون وهو وسط خاص باختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحياتية (Société Française , 2015).

12-2 : طرائق تشخيص جراثيم الايشريكيا القولونية: Detection Methods of *E. coli*

يوجد هناك العديد من الطرائق التشخيصية لجراثيم الأيشريكيا القولونية أهمها هي استخدام الاوساط الزرعية الخاصه بالجراثيم مثل وسط الأيوسين مثيلين الأزرق EMB ووسط اكار الماكونكي (Mooljuntee *et al.*, 2010) ومن الطرائق الحديثة المستخدمة في تشخيص جراثيم الأيشريكيا القولونية هي استخدام طريقة تفاعل البلمرة المتسلسلPCR (Polymerase Chain Reaction) إذ يعتمد عليه في تشخيص جراثيم الأيشريكيا القولونية وذلك عبر الكشف عن الجين الخاص بالجرثومة وهو جين ال*uidA* أذ تعد طريقة PCR من أسرع وأدق الطرائق في تشخيص البكتريا واكثرها حساسية في تشخيص الجراثيم الممرضة.وكذلك يتم إجراء إختبار الحساسية للمضادات الحيوية كأحد طرائق التشخيص للجرثومة إذ تتميز جراثيم الأيشريكيا القولونية بصفة المقأومة المتعددة للمضادات الحيوية (Multi drug resistance) (MDR) (Laird, 2016).

1-12-2 : الطرائق التقليدية: Classical Methods

تشمل طرائق العزل الجرثومي بواسطة استخدام الاوساط الانتخابية والانتقائية للجرثومة كما يتم ايضا عمل الفحوصات الكيموحيوية لتأكيد الجرثومة أذ يمكن أن نعد العزل الجرثومي دائما هو المقياس

الذهبي وذلك" للكشف عن جرثومة الايشريكيا القولونية إذ أنها تعطي للباحثين الفرصة لاختبار حساسية الجرثومة للمضادات الحيوية وعمل الفحوصات المناعية مثل فحص الاليزا (Shah, 2019) .

2-12-2 : الطرائق البيولوجية Molecular Biology methods :

من الطرائق الحديثة المستخدمة حاليا في تشخيص جراثيم الأيشريكيا القولونية هي استخدام طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) أذ يمكن أن نعدها من الطرائق المفيدة جدا في تشخيص الجراثيم بشكل ادق من طرائق زرع الجراثيم والتي عادة تستغرق من (3-5) أيام للكشف عن جراثيم الايشريكيا القولونية كما أن تفاعل البلمرة المتسلسل PCR يسمح بإجراء الكشف السريع عن الجرثومة خلال 24 ساعة اذ تعد هذه الطريقة مفيدة جدا ولاسيما في الابحاث الوبائية عندما يكون الكشف عن العوامل المسببة للأمراض يحتاج الى مدة طويلة للتشخيص (Greenwood, 2012).

2-12 -2- 1 :تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction technique:

تم اكتشاف تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR سنة 1983 بواسطة (كاري موليس) وحصل على براءة اختراع في عام 1985 اذ تعد هذه التقنية من اهم الطرائق الحديثة في التشخيص أذ تستخدم في مجالات متعددة في الوقت الحالي ولاسيما في الكشف عن مسببات الأمراض سواءً كانت مسببات فطرية اوالجرثومية اوالفايروسية (Karim, 2019). ومن مميزات هذه التقنية هي الدقة والسرعة في التشخيص وتعتمد على انزيم (*Taq* polymerase) والبادئات ودرجات الحرارة من أجل تكرار تسلسل الحامض النووي DNA خارج الجسم في المختبرات (Parsons *et al.*, 2016). كذلك تستخدم هذه الطريقة بشكل واسع في علم الأحياء الجزيئي إذ تعمل هذه التقنية على توليد سريع لمليارات النسخ من عينة الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA مما يمكن العلماء من أخذ عينة صغيرة جدا من DNA وتضخيمها الى كمية كبيرة تكفي ليتم دراستها بشكل مفصل أذ تعتمد قوة PCR على حقيقة هي ان كمية DNA المصفوفة ليست من الناحية النظرية عاملا مقيدا لذلك يمكننا تضخيم النوكليوتيدات من كميات متناهية الصغر من مستخلص الحامض النووي (Manage *et al.*, 2019)، هناك العديد من انواع تطبيقات PCR أذ تعد تقنية أساسية في الوقت الحالي ولاسيما في البيولوجيا الخلوية والجزيئية أذ يسمح في غضون ساعات قليلة ، "بالاستنساخ اللاخلوي" لجزء من الحمض النووي من خلال نظام آلي ، والذي يستغرق عادة عدة أيام باستخدام التقنيات القياسية للاستنساخ الجزيئي. و من ناحية أخرى ، يستخدم PCR على نطاق واسع لأغراض التشخيص وذلك للكشف عن وجود تسلسل DNA محدد لهذا الكائن أو في السائل أذ يتم استخدامه أيضًا لعمل بصمات جينية ، سواءً كان ذلك تحديدًا جينيًا لشخص في

سياق تحقيق قضائي، أو تحديد أصناف حيوانية أو نباتية أو جرثومية لاختبار جودة الطعام أو التشخيص أو اختيار الأصناف. لا يزال تفاعل البوليميراز المتسلسل ضروريًا جدا وذلك لإجراء التسلسل أو الطفرات الموجهة أذ يوجد هناك العديد من انواع PCR مثل (real-time PCR ، Competitive PCR Optimization, 2017) (PCR,). في الوقت الحاضر تستند التطورات الثورية للبحوث البيولوجية الجزيئية على تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) التي توفر المنتجات المناسبة والمحددة خاصة في مجال التوصيف والحفاظ على التنوع الجيني. هناك عدة تطبيقات ممكنة في تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل منها إنشاء تسلسل كامل لجينوم أهم عترات الماشية و تطوير تقنية تقيس تعدد الأشكال المتناثرة في المواقع في جميع أنحاء الجينوم (Korbie and Mattick, 2008).

2-12- 2 -2 : تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)

تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية وتعرف أيضًا باسم الوحدات المتكررة بين الجينات في البداية سجلت في جراثيم الإشريكيا القولونية والسالمونيلا التايفيميوريوم النوع المصلي المعوي. لكن الان هذه التسلسلات موصوفة في معظم الأنواع الجرثومية مثل العائلة المعوية وكذلك في جراثيم الكوليرا (Hulton *et al*., 1991 Sharples *et al*.,1990) تتكون الإشريكية القولونية من مجموعة كبيرة من العترات ذات التنوع الكبير في مادتها الوراثية أذ تسبب بعض العترات أمراضًا خطيرة ، مثل التهابات المسالك البولية (Touchon *et al*., 2009) .

يتم اكتشاف متواليات متناظرة غير مكتملة بشكل عام داخل المناطق المكتوبة بالاقتران مع الإجماع بين الجينات. علاوة على ذلك ، هناك أعداد مختلفة من نسخ تسلسل إيريك بين الأنواع الجرثومية. (Wilson and sharp, 2006) ومن المثير للاهتمام ، أن هناك تنوعًا كبيرًا في أعداد النسخ بين عترات مختلفة من الإشريكية القولونية. يثير هذا التنوع عمليات التطور بين العترات الجرثومية داخل نوع معين مثل الإشريكية القولونية (Soltani *et al*., 2012) . إن هذه التقنية عبارة عن تنميط جيني بسيطة وحادة وفعالة من حيث التكلفة للتمييز بين أنواع مختلفة من العترات. في الواقع ، يتم التعرف على عناصردقيقة قابلة للتحويل العكسي متنقلة Miniature Inverted Transposable Elements (MITE) بالاشتراك مع الحمض النووي DNA كجزيئات مع ERICs . لا يتم تمييز الاختلافات الجينية الكبيرة في جميع الاختبارات الميكروبيولوجية والكيميائية الحيوية التقليدية. ولهذا وبدلاً من التشخيص التقليدي والاختبارات الاخرى قد يكون تطبيق التقنيات الحديثة والمتقدمة ، مثل

أدوات التشخيص الجزيئي والبصمات الجزيئية خيارًا مناسبًا في التحقيقات الوبائية الجزيئية (Momtaz *et al* ., 2013 ; Meacham *et al.*, 2003) تم الكشف عن ملامح الحمض النووي بوضوح من خلال أنماط بصمات محددة. يظهر ERIC-PCR نهج جيد للطباعة الجزيئية لعترات الإشريكية القولونية المعزولة من مصادر حيوانية مختلفة . يوصى باستخدام ERIC-PCR لتحديد العترات المختلفة المتعلقة بالأنواع الجرثومية بوصفها أداة بسيطة ويمكن معالجة نتائج ERIC-PCR بواسطة أنواع مختلفة من البرامج ، مثل GelClust لتوليد مخططات شجرية مفيدة كمنهجية لا تقدر بثمن فيما يتعلق بتصنيف مجموعة متنوعة من العترات الجرثومية مثل جراثيم الاشريكيا القولونية (Ranjbar *et al.*, 2013).

ومن خلال ظهورهذه التقنيات الوراثية الجزيئية وتطبيقاتها في مجال البيئة الميكروبية تم اكتشاف نسبة صغيرة فقط من التنوع الميكروبي الطبيعي مع ذلك قد تُلقي المعلومات التفصيلية عن الوراثة الجزيئية للكائنات الدقيقة التي لم تكن مميزة من قبل مزيدًا من الضوء على تطور وظائف جرثومة نوع معين داخل موطنها الخاص أو في بيئة غريبة ويمكن استخدام هذه التقنية البيولوجية لتقييم التباين النسيلي للكثير من العزلات الجرثومية ومن ضمنها الإشريكيا القولونية (Dalla-Costa *et al* ., 1998 ; Chansiripornchai *et al.*, 2001).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

1-3 : المواد Materials

1-1-3 : الأجهزة والمعدات المستخدمة Equipments and Apparatus

الجدول 3-1 : الأجهزة والمعدات المستخدمة في الدراسة

ت	الأجهزة والمعدات	الشركة المنتجة
1	المؤصدة Autoclave	Hirayama (Japan)
2	ميزان الكتروني حساس Electronic balance	ADAM
3	حاضنة Incubator	Memmert (Germany)
4	كابينة الزرع الجرثومي Laminar air flow(hood)	4 Lab Tech (Denmark)
5	كابينة تحضير مزيج تفاعل البلمرة Clean bench	Local market
6	ثلاجة (5°م) Refrigerator	VESTEL (Turkey)
7	مجمدة عمودية (-20°م) Deep freezer	Profilo (Turkey)
8	مجمدة عمودية (-86°م) Deep freeze	ARCTIKO (Germany)
9	جهاز التقطير Distillation apparatus	Elektro.Mag (Turkey)
10	محرض مغناطيسي Magnetic stirrer	Rlabinco (Germany)
11	جهاز قياس الاس الهيدروجيني pH meter	Hanna (India)
12	حمام مائي Water bath	Memmert (Germany)
13	مجهر ضوئي Microscope	KRUSS (Germany)
14	جهازطرد مركزي Centrifuge	Nüve (Turkey)

15	جهاز طرد مركزي دقيق Microcentrifuge	Eppendorf (Germany)
16	جهاز البلمرة الحراري Thermocycler	Biometra (Germany)
17	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis	Biometra (Germany)
18	جهاز قراءة الجل UV transilluminator	Biometra (Germany)
19	خلاط منضدي Vortex	DRAGON LAB (Germany)
20	مايكرويف Micr wave	BOMANN (Turkey)
21	ناقلة الزرع Standard wire loop	Himedia (India)
22	ناقلة الزرع بلاستيكية Disposable loop	OEM(China)
23	ماصات دقيقة Microliter pipettes	Gilson (French)
24	اطباق بتري Petri dishes	OEM (China)
25	مسحات قطنية معقمة Sterilized cotton swab	Biozek (Netherlands)
26	رؤوس الماصات (أحجام مختلفة) Tips	OEM (China)
27	شرائح زجاجية Microscopic Slides	OEM (China)
28	أنابيب اختبار زجاجية Glass plastic	Citoglass (China)
29	أنابيب اختبار بلاستيكية Test tubes	OEM (China)
30	حقن طبية Disposable syringe	OEM (China)
31	أنابيب تفاعل سلسلة البلمرة PCR Tubes 0.2ml	Geneaid
32	أنابيب ابندروف Eppendorf tubes 1.5 ml	Geneaid
33	قطن معقم Sterile cotton	OEM (China)
34	دورق مخروطي (أحجام مختلفة) Conical flask	Citoglass (China)
35	كأس زجاجي (بيكر) Beaker	Citoglass (China)
36	الاسطوانة المدرج Graduated cylinder	Citoglass (China)
37	زجاجة ساعة Watch glass	Citoglass (China)
38	ورق الترشيح Filter paper	OEM (China)
39	اقماع زجاجية Funnels	Citoglass (China)

3-1-2 : الأوساط الزرعية والكيموحيوية المستخدمة:

Cultural media and biochemical media

الجدول 3-2 : الأوساط الزرعية والكيموحيوية المستخدمة في الدراسة

ت	الأوساط الزرعية والكيموحيوية	الشركة (المنشأ)
1	وسط الكروم Chromogenic *E. coli* O157:H7 agar	Himedia (India)
2	وسط أكار الماكونكي MacConkey agar	Oxoid (England)
3	وسط أكار الايوسين مثلين الأزرق Eosin Methylene Blue Agar (EMB)	Himedia (India)
4	وسط المتألق لجراثيم القولون Brilliance *E. coli*/ coliform agar والاشريكيا القولونية	Oxoid (England)
5	ماء الببتون Peptone water	LABM™
6	وسط المرق المغذي Nutrient broth	Himedia (India)
7	وسط ثلاثي سكر الحديد Triple Sugar Iron agar (TSI)	Oxoid (England)
8	وسط سترات سايمون Simmon citrate agar	Himedia (India)
9	وسط اكار مولر-هنتون Muller-Hinton Agar	Oxoid (England)

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

الجدول 3-3 : المواد الكيميائية الكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة

ت	اسم المادة	المنشأ والشركة
1	كاشف كوفاكس Kovac's reagent	Arcomexa / Jordan
2	بيروكسيد الهيدروجين3% Hydrogen Peroxide	Local marker
3	كلوريد الصوديوم Sodium chlorid	BDH / England
4	كحول اثيلي70% Ethanol	BDH / England
5	البيبتون Pepton	USA
6	المثيل الأحمر Methyl red	BDH / England
7	كلوكوز Glucose	India

8	كحول الايثانول Ethanol 96%	Arcomexa / Jordan
9	حامض البوريك Boric acid	UK
10	هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium Hydroxide	India
11	كاشف الاوكسيديز Oxidase	Turkey
12	Tris borate EDTA TBE solution 10x محلول الترحيل	Bio basic / Canada
13	هلام الاكاروز Gel agarose	BDH / England
14	ماء منزوع الايون Deionized sterile (D.W.)	Promega / USA
15	صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide	Promega / USA
16	الدليل الحجمي Ladder (100bp)	Promega / USA
17	خليط تفاعل البلمرة Master mix	Promega / USA
18	عدة استخلاص الحامض النووي الجرثومي DNA Extraction Kit	Geneaid / USA
19	عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction kit	Eurofins / Germany
20	مجموعة المضادات الحيوية Antibiotics	Oxoid / England

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

الجدول 3-4 : العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة

ت	Type of kit نوع العدة	Description and components الوصف	الشركة (المنشأ)
1	DNA Extraction kit العدة المستخدمة في استخلاص الحامض النووي	- 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 Distal Water - GD Columns 100 pcs - 2ml Collection Tubes 100 pcs	Geneaid (USA)
2	الدليل الحجمي (100-1000) زوج قاعدة	Ladder	Promega (USA)
3	Go Tag® Green Master Mix عدة مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل	- DNA Polymerase - dNTP (dATP, dCTP,dGTP,dTTP) - Reaction Buffer, With MgCl2, KCl2 30mM - Tris-HCl (pH 9.0) 10mM - Stabilizer and Tracking Dye (Loading Dye)	Promega (USA)

الجدول 3-5 : انواع المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية لجراثيم الايشريكيا القولونية

ت	المضاد الحيوي	الرمز	التركيزملغم/وحدة دولية
1	Tetracycline	TE	10
2	Gentamycin	GEN	10
3	Cephalothin	CEF	30
4	Erythromycin	E	10
5	Ciprofloxacin	CIP	10
6	Trimethoprim	TMP	10
7	Ceftriaxone	CRO	10
8	Amoxicillin	AMX	10
9	Streptomycin	S	5
10	Nitrofurantion	NFN	100
11	Cefixime	CFM	5
12	Chloramphenicol	C	10

3-2 : طرائق العمل Methods

3-2-1 : جمع العينات

تم جمع عينات الأسماك والبالغ عددها 153 عينة منها 75 عينة سمك من مزارع تربية الأسماك والتي شملت أحواض منطقة حاوي الكنيسة وناحية وانه وقضاء الحمدانية و 78 عينة سمك من الأسواق المحلية في مدينة الموصل والتي شملت منطقة الميدان والبلديات وأسواق النبي يونس للمدة الممتدة من 1 تشرين الثاني 2021 الى 30 كانون الثاني 2022. تم اخذ المسحات من جلد عينات الأسماك بواسطة مسحات معقمة وتم وضعها في أنابيب تحوي على محلول ماء الببتون وتم نقل العينات باستخدام صندوق مبرد cool box مباشرة الى مختبرات فرع الصحة العامة البيطرية /كلية الطب البيطري /جامعة الموصل واجريت عليها الفحوصات التقليدية وحضنت على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 18- 24 ساعة كإغناء اولي ثم اخذ ا مل من ماء الببتون ونقل الى أنابيب اختبار تحوي 9 مل من مرق الماكونكي

كإغناء انتقائي وحضنت على درجة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة ومن هذا الوسط الانتقائي زرعت على الاوساط الصلبة الانتقائية والخاصة بجراثيم الايشريكيا القولونية.

3-3: الكشف عن الأيشريكيا القولونية: *E.Coli* Detection of

تم عادة الكشف عن الأيشريكيا القولونية وذلك بالاعتماد على:

1. الطرائق التقليدية Classical methods
2. طرائق البيولوجيا الجزيئية Molecular biological methods

3-3-1 : الطرائق التقليدية

تعتمد هذه الطريقة على استخدام الأوساط الانتخابية والانتقائية واختبارات الكيموحيوية (Biochemical test) وذلك لعزل وتشخيص جراثيم الأيشريكيا القولونية من عينات الأسماك التي تم جمعها من الأسواق المحلية والمزارع السمكية المتوفرة في مدينة الموصل أذ حضرت جميع الاوساط الزرعية المذكورة حسب تعليمات الشركة المصنعة لها واجرى تعقيم جميع الأوساط الزرعية المستعملة بواسطة جهاز المؤصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند ثم حضنت هذه الاوساط بعد زراعتها بالحاضنة بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة (Greenwood, 2012).

أما أهم الاوساط الزرعية المستخدمة فتم تحضيرها كالاتي :

3-3-1-1 : وسط الايوسين مثيلين الازرق Eosin-methylene blue agar (EMB)

تم تحضير هذا الوسط وذلك بالاعتماد على التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة إذ تم إذابة 37.5 غم من وسط الأيوسين مثيلين الأزرق EMB في 1 لتر من الماء المقطر ومن ثم تسخينه الى أن يذوب الوسط بالكامل وبعدها يوضع الوسط في جهاز المؤصدة (Autoclave) لغرض تعقيمه و بعد انتهاء الجهاز من التعقيم، يتم صب الوسط على أطباق بتري ويترك الوسط الى حين أن يبرد ويتصلب ومن ثم يتم استخدمه كوسط انتخابي لعزل جرثومة الأيشريكيا القولونية (Macfaddin, 2000).

3-3-1-2 : وسط الماكونكي MacConkey agar

تم تحضير هذا الوسط بالإعتماد على التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة وذلك بإذابة 51.5 غم في 1 لتر ماء مقطر ومن ثم تسخينه الى حين إذابة الوسط وبعد ذلك تم تعقيمه بوضع الوسط داخل جهاز

المؤصدة (Autoclave) و بعد التعقيم، يتم سكب الوسط في أطباق بتري وترك تلك االاطباق كي تبرد وتتصلب ومن ثم يتم استخدمه كوسط للكشف عن جراثيم الأيشريكيا القولونية (Macfaddin, 2000).

3-1-3-3 : وسط المتألق لجراثيم القولون والاشريكيا القولونية

Brilliance *E. coli* / coliform medium

تم الاعتماد على التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة في تحضير هذا الوسط، إذ تم إذابة 55.8 غم من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر، ومن ثم تسخينه وتعقيمه باستخدام جهاز المؤصدة (Autoclave) وتم توزيع الوسط على أطباق بتري المعقمة وترك تلك الاطباق كي تبرد ويتصلب الوسط، وبعدها يتم استخدمه كوسط للكشف عن جرثومة الأيشريكيا القولونية (Macfaddin, 2000).

3-1-3-4 : وسط الكروم اكار الخاص ببكتريا الايشريكيا القولونية O157:H7

Chrome agar *E. coli* O157:H7

تم استخدام وسط الكروم اكار O157:H7 الانتقائي وذلك لعزل وتشخيص جرثومة *E.coli* O157:H7 أذ يتم تحضير الوسط وذلك بإذابة 28.85غم في لتر واحد من الماء المقطر ومن ثم تسخينه وتعقيمه باستخدام جهاز المؤصدة (Autoclave) وتم توزيع الوسط على أطباق بتري المعقمة وترك تلك الاطباق كي تبرد ويتصلب الوسط، وبعدها يتم استخدمه كوسط للكشف عن جرثومة الأيشريكيا القولونية ذات النمط المصلي O157:H7 (Macfaddin, 2000)

3-1-3-5 : وسط مولر هنتون Mueller Hinton agar

تم تحضير الوسط وذلك بإذابة 38 غم في 1 لتر ماء مقطر وثم تسخينه وتعقيمه بالمؤصدة (Autoclave)، وبعدها وزع على أطباق بتري وترك ليبرد ويتصلب واستخدم كوسط في اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية (Macfaddin, 2000).

3-1-3-6 : مرق الماكونكي MacConkey broth

تم تحضير هذا المرق بالاعتماد على التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة وذلك بإذابة 35 غم في 1 لتر ماء مقطر ومن ثم تسخينه الى حين إذابة المرق وبعد ذلك يتم سكب المرق في أنابيب زجاجية وبعدها يتم وضع الأنابيب داخل جهاز المؤصدة (Autoclave) ويستخدم كمرق مغذي للجرثومة (Macfaddin, 2000).

3-3-1-7 : المرق المغذي Nutrient broth

تم تحضير هذا المرق بالاعتماد على التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة وذلك بإذابة 25 غم في 1 لتر ماء مقطر ومن ثم تسخينه الى حين إذابة المرق وبعد ذلك يتم سكب المرق في أنابيب زجاجية وبعدها يتم وضع الأنابيب داخل جهاز المؤصدة (Autoclave) ويستخدم كمرق مغذي وحافظ للجرثومة (Macfaddin, 2000).

3-3-1-8 : ماء الببتون peptone water

تم تحضير هذا المرق بالاعتماد على التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة وذلك بإذابة 15 غم في 1 لتر ماء مقطر ومن ثم تسخينه الى حين إذابة المرق وبعد ذلك يتم سكب المرق في أنابيب زجاجية وبعدها يتم وضع الأنابيب داخل جهاز المؤصدة (Autoclave) (Macfaddin, 2000)..

3-3-1-9 : اختبار الأندول Indole test

يعد إختبار الأندول احد مجموعة اختبارات (IMVIC) والتي تعد من إختبارات الكيمياء الحيوية والتي عادة تستخدم للكشف عن جراثيم الأيشريكيا القولونية والتي تشمل اختبارات ال (Methyl red Indole, Voges Proskauer, Citrate utilization), أذ يتم تحضير الوسط وذلك بإذابة 15 غم من وسط ماء الببتون peptone water في 1 لتر من الماء المقطر ثم يتم توزيع المحلول في أنابيب إختبار مقاومة لدرجات الحرارة العالية. وبعد ذلك يتم تعقيم الأنابيب بالمؤصدة . بعد اكتمال التعقيم يتم نقل بعض المستعمرات الجرثومية الى وسط ماء الببتون وبعدها توضع جميع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وبعدها يتم إجراء الإختبار بإضافة عدة قطرات من كاشف كوفاكس (Arcomexa / Jorden) الى الأنابيب وبعدها يتم قراءة النتيجة إذ تكون النتيجة موجبة وذلك من خلال تكون حلقة حمراء اللون أعلى السطح بعد اضافة عدة قطرات من كاشف كوفاكس الى محلول ماء الببتون المحضن نتيجة لقدرة الجراثيم على تحليل الحامض الأميني التربتوفان (tryptophan) وإنتاج الاندول (Tille, 2014) .

3-3-1-10 : إختبار المثيل الأحمر Methyl red

تم تحضير كاشف المثيل الأحمر وذلك بإذابة 0.1 غم من المثيل الأحمر في 300 مل من الكحول المثيلي بتركيز 95 %، ومن ثم اكمل الحجم الى 500 مل بإضافة 200 مل من الماء المقطر وأصبح الكاشف جاهز اً للتحري عن قابلية جرثومة الأيشريكيا القولونية على تخمر سكر الكلوكوز (Macfaddin, 2000) تم اجراء الاختبار بنقل عدد من المستعمرات الجرثومية الى الأنابيب المعقمة

والتي تحوي على ماء الببتون أذ حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وبعد ذلك تمت إضافة 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر الى الوسط. وإن النتيجة الايجابية لهذا الإختبار تظهر من خلال تحول لون الوسط الى اللون الاحمر دلالة على انتاج الحامض من قبل الجرثومة مؤدية الى هبوط الاس الهيدروجيني الى اقل من pH 4.4 (Tille, 2014) .

11-1-3-3 : إختبار الفوكس بروسكاور Voges Proskauer test

تم تحضير كاشف فوكس بروسكاور كما يلي:

1. محلول الفانفثول5% : حيت تم التحضير وذلك بإذابة 5 غم من الفانفثول في 100 مل من الكحول الأثيلي بتركي 95%.
2. محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KoH %40: أذ تم تحضير هذا المحلول بإذابة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر .

تم اجراء الاختبار وذلك بنقل عدد من المستعمرات الجرثومية الى الأنابيب المعقمة والتي تحوي على ماء الببتون أذ حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، وبعد ذلك أضيف 1 مل من الكاشف الى كل أنبونة مع التحريك الهادئ ثم ترك ساكنا لمدة 10 -15 دقيقة أذ اعطى هذا الاختبار نتيجة سالبة بعد اضافة الكاشف وذلك ببقاء الوسط اصفر اللون وعدم تحوله الى اللون الاحمر (Macfaddin, 2000).

12-1-3-3 : إختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

تم تحضير وسط السترات وذلك بإذابة 25 غم من Simmons Citrate agar في 1 لتر من الماء المقطر، ثم تسخين المزيج وبعد ذلك يتم سكب الوسط داخل أنابيب الإختبار بمقدار 5 مل وتعقم الأنابيب باستخدام جهاز المؤصدة، وبعد التعقيم يتم وضع الأنابيب بشكل مائلة لكي تبرد ومن ثم يتم إجراء الإختبار وذلك بنقل عدد من مستعمرات جرثومة الأشريكيا القولونية النقية الى الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي وبعدها تحضن الأنابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24. وتكون النتيجة موجبة وذلك بتغير لون الوسط من اللون الاخضر الى الأزرق دلالة على استهلاك الجرثومة للسترات على انه المصدر الوحيد للكاربون فضلا عن انتاج الامونيا نتيجة لوجود مركبات الامونيا في الوسط اما النتيجة السالبة فتكون ببقاء لون الوسط اخضر (Tille, 2014).

13-1-3-3 : إختبار وسط ثلاثي سكر الحديد Triple Sugar Iron agar (TSI)

تم تحضير وسط triple sugar iron agar بحسب التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة وذلك بإذابة 37 غم من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر ثم اذابته وتسخينه ومن ثم يتم توزيع الوسط على أنابيب الاختبار المعقمة 5 مل لكل أنبونة ومن ثم تعقمه باستخدام جهاز المؤصدة، وبعد إجراء عملية التعقيم يترك الوسط بشكل مائلة الى ان يبرد الوسط أذ استخدم الوسط وذلك للكشف عن تخمر السكريات وإنتاج الغازات وتحرير غاز كبريتيد الهيدروجين. تم إجراء الاختبار وذلك بنقل عدد من مستعمرات الجرثومة النقية الى أنابيب الاختبار بطريقة الطعن وتكون نتيجة الإختبار الموجبة بتغير لون الوسط بالكامل الى الأصفر الغامق دليل على قدرة الجرثومة على تخمر سكر الكلوكوز واللاكتوز والسكروز مع ظهور فقاعات غازية كدلالة على تكون غاز ثاني أوكسيد الكربون في حين النتيجة السالبة للاختبار ظهور ترسبات سوداء اللون دلالة على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين (Tille, 2014).

14-1-3-3 : إختبار الأوكسيديز Oxidase test

يتم إجراء هذا الإختبار وذلك من خلال نقل جزء من المستعمرة الى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الاوكسيديز الجاهز وذلك باستعمال عود خشبي معقم، وتكون نتيجة الإختبار سالبة بعدم تغير ورقة الترشيح الى اللون البنفسجي خلال 10 ثواني من بدء الإختبار أما النتيجة الموجبة هو تغير ورقة الترشيح الى اللون البنفسجي (Brown and Smith, 2017).

15-1-3-3 : إختبار الكاتليز Catalase test

تم تحضيره باستخدام بيروكسيد الهيدروجين وبتركيز 3 % أذ يستخدم في الكشف عن قدرة العزلات الجرثومية على إنتاج إنزيم الكاتليز (Macfaddin, 2000). وتم إجراء الإختبار بنقل جزء من المستعمرات من جرثومة الأيشريكيا القولونية الى شريحة زجاجية نظيفة بواسطة عود خشبي معقم ثم أضيفت اليه قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين ويتم مزج المستعمرات مع الكاشف الى حين ظهور النتيجة الموجبة وذلك بتكوين فقاعات هوائية خلال 10 ثواني من إجراء الإختبار (Brown and Smith, 2017).

2-3-3 : الطرائق البيولوجية الجزيئية Molecular Biology methods

يوجد هنالك العديد من الطرائق البيولوجية الجزيئية التي تستخدم للكشف عن الجراثيم وخصائصها الجزيئية وذلك بالاعتماد على الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA ومن اهم الطرائق المستخدمة في الوقت الحالي بشكل واسع هي طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR والتي تستخدم للتشخيص التأكيدي لعزلات الجراثيم وخصائصها الجزيئية التي شخصت بالعزل الجرثومي والاختبارات الكيموحيوية بالطرائق التقليدية لعزل جرثومة الايشريكيا القولونية.

1-2-3-3 : إستخلاص الحامض النووي DNA

يتم استخلاص الحامض النووي الخاص بجرثومة الأيشريكيا القولونية ذات النمط المصلي *E. coli* O157:H7 والسالبة لصبغة الكرام وذلك باستخدام العدة المختبرية الخاصة باستخلاص الحامض النووي لجرثومة الأيشريكيا القولونية المعزولة.

تم الاعتماد على التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة لعدة لاستخلاص الحامض النووي (Presto™ Mini g DNA Bacteria Kit Geneaid USA) وكما في الخطوات الاتية:

1. تم نقل 250 µl من TE Buffer الى أنبونة أبندروف سعة 1.5 مل.
2. تم نقل (5-8) مستعمرات من جرثومة الأيشريكيا القولونية الى أنبونة أبندروف الذي يحتوي على TE Buffer وبعدها وضعت في الحمام المائي بدرجة حرارة 60-70 °م لمدة ليلة كاملة (overnight) وذلك لتحليل الغشاء الخلوي وتحرير محتويات الخلية الجرثومية.
3. تم اضافة 180µl من GT Buffer مع خلط المكونات باستخدام جهاز vortex mixer لمدة 15 ثانية بعدها يتم اضافة 25µl من انزيم proteinase k الى انبوبة ابندروف وذلك لتحلل جميع البروتينات الموجودة في الخلية ومحور الحامض النووي مع عمل مزج المكونات باستخدام جهاز الخلاط .
4. بعدها توضع الأنابيب في الحمام المائي لمدة 30 دقيقة بعدها يتم اضافة 200µl من GB Buffer وعمل خلط المكونات بالخلاط لمدة 10 دقائق .
5. تم إضافة 200 µl من الايثانول المطلق بتركيز 99 % الى أنبونة أبندروف، بعد ذلك يتم خلط المكونات باستخدام جهاز vortex الغرض منه هو لجذب الحامض النووي وترسيبه ، ثم بعدها يتم نقل جميع المكونات الى أنبونة GD Column.
6. تم وضع أنابيب GD Column في جهاز الطرد المركزي (nuve / Turkey) الخاص بأنابيب أبندروف ويتم إجراء عملية الطرد بسرعة 14000 ولمدة 2 دقيقة

7. تهمل جميع السوائل التي تجمعت في نهاية الأنابيب في قنينة خاصة لجمع السوائل (الراسب) مع اهمال القنينة ووضع قنينة جديدة لبدء مرحلة الغسل washing.
8. تبدأ مرحلة الغسل من خلال إضافة 200 µl من W1 الى أنبونة GD Column ومن ثم توضع في جهاز الطرد المركزي ,ويتم إجراء عملية الطرد بسرعة 14000 ولمدة دقيقة واحدة تكرر نفس العملية من خلال اضافة 600 µl من W2 الى أنبونة GD Column ومن ثم توضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة.
9. تم بعدها نقل أنابيب GD Column الى أنابيب أبندروف جديدة لتبدأ مرحلة جمع الDNA .
10. تم اضافة 50 µl من TE Buffer ومن ثم توضع في جهاز الطرد المركزي، تم إجراء الطرد بسرعة 14000 لمدة دقيقة واحدة .
11. تكرر الخطوة الأخيرة مرة ثانية ومن ثم يتم كتابة جميع المعلومات على أنابيب أبندروف وتحفظ بدرجة حرارة (-20° م)الى حين استخدام ال DNA.

3-3-2-2 : البادئات Primers

الجدول 3-6 : يوضح البادئات وتسلسلها وحجم قطع الدنا المتضاعفة

Gene	Primer	Sequence (5- 3)	Amplicon Size [bp]	Reference
uidA	uidA-1	5-CCAAAAGCCAGACAGAGT-3	623	Moyo et al ., 2007
	uidA-2	5-GCACAGCACZTCAAAGAG-3		
Stx1	Stx1-1	5-AGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3	347	Fujioka et al .,2013
	Stx1-2	5-CACCAGACAATGTAACCGC-3		
Stx2	Stx2-1	5- TTCGGTATCCTATTCCCGG-3	592	Fujioka et al .,2013
	Stx2-2	5- CGTCATCGTATACACAGGAG-3		
Rfb	rfb-1	5-CGGACATCCATGTGATATGG-3	259	Paton et al ., 1998
	rfb-2	5-TTGCCTATGTACAGCTAATCC-3		

3-3-2-3 : تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR master mix reaction

يتم إذابة جميع مكونات الكواشف الموجودة في عدة مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل والتي تـــم حفظها في الثلاجة لحين الاستخدام بعد ذلك تم رج هذا المزيج جيدا بواسطة اليد قبل بدأ العمل إذ تـــم استخدام عدة مزيج مجهزة من قبل شركة امريكية أذ تتم عملية المزج وفقا لتعليمات الشركة المصنعة

(GoTaq® Green Master Mix from Promega USA)، لعدة المزج وكما هو موضح في الجدول (3-7):

الجدول 3-7 : مكونات مزيج التفاعل PCR Master Mix Reaction لجين *uidA*، *Stx1, Stx2*

مكونات المزيج Components	الحجم Volume
Master Mix مزيج تفاعل الأساس	12.5 µl
F. primer الأمامي	1 µl
R. primer العكسي	1 µl
PCR water ماء تفاعل البلمرة المتسلسل	5.5 µl
DNA template القالب	5 µl
Total volume الحجم الكل	25 µl

بعد تجهيز أنابيب (PCR tube) والتي تحوي على خليط التضخيم يتم نقلها ووضعها في جهاز Thermocycler (Bio – Rad, USA) واستخدام البرنامج الخاص بتفاعل البلمرة المتسلسل وبعدها يتم رفع الأنابيب من الجهاز ووضعها في الثلاجة (4-8م°) لحين اجراء الترحيل الكهربائي للكشف عن نواتج عملية تضخيم الحامض النووي وكما موضح في الجدول (3-8).

الجدول 3-8 : يوضح خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *uidA*

الخطوات	درجة الحرارة °C	الوقت	عدد الدورات
المسخ الأولي Primary denaturation	95	5 min.	1
المسخ Denaturation	94	1 min.	35
ارتباط البادئ Annealing	57	1 min.	
استطالة البادئات Extension	72	1 min.	
الاستطالة النهائية Final Extension	72	5 min.	1

الجدول 3-9 : يوضح خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل لجينات سموم *Stx1* و *Stx2*

الخطوات	درجة الحرارة °C	الوقت	عدد الدورات
المسخ الأولي Primary denaturation	95	5 min.	1
المسخ Denaturation	94	1 min.	35
ارتباط البادئ Annealing	55	1 min.	
استطالة البادئات Extension	72	1 min.	
الاستطالة النهائية Final Extension	72	5 min.	1

الجدول 3-10 : يوضح خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *rfb*

الخطوات	درجة الحرارة °C	الوقت	عدد الدورات
المسخ الأولي Primary denaturation	94	5 min.	1
المسخ Denaturation	94	1 min.	35
ارتباط البادئ Annealing	50	1 min.	
استطالة البادئات Extension	72	1 min.	
الاستطالة النهائية Final Extension	72	5 min.	1

3-3-2-4 : الترحيل الكهربائي بالهلام لتفاعل البلمرة المتسلسل:

Agarose Gel Electrophoresis for PCR Product:

ان من أهم الخطوات لإكمال اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل هو تحليل نتائج PCR عن طريق الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الأكاروز Gel electrophoresis وحسب الخطوات الأتية :

1. تم إذابة 2 % من الأكاروز في 100 مل من محلول 1x TBE buffer ثم يوضع في المايكروويف لمدة 2 دقيقة حتى تختفي جميع البلورات و يصبح رائق .
2. تم إضافة 2 µl من بروميد إيثيديوم Ethidium Bromide الى 27 مل من محلول الجل الذي تم تحضيره أذ يتم تسخين الجل مع بروميد ايثيديوم بواسطة محرك مغناطيسي ساخن (magnetic stirre) ثم يتم صب الجل في الوعاء الخاص لجهاز الترحيل ويثبت المشط في الموضع الصحيح ويترك الجل حوالي 30 دقيقة لحين التصلب وبعد ذلك يتم ازالة المشط وينقل الجل الى جهاز الترحيل الذي يحوي على محلول 1x TBE Buffer الذي تم استخدامه في إعداد جل الأكاروز.
3. تم حقن 2 µl من صبغة القياس DNA Ladder 100 pb في اول حفرة عادة من جهة اليمين او من جهة اليسار وتستخدم هذه الصبغة عادة من اجل تسهيل عملية القراءة ل ناتج PCR product أذ يتم إضافة 8 µl من الناتج الذي يحتوي على الحامض النووي لكل حفره من الحفر الموجودة في جل الترحيل بأذ يكون الجل مغمورا فيه.
4. تم تشغيل جهاز الترحيل بطاقة 100 فولت لمدة 30 دقيقة او طاقة 60 فولت لمدة 60 دقيقة وبعدها ينقل الجل الى جهاز Transilluminater لمشاهدة حزم الحامض النووي المرحلة عن طريق الأشعة فوق البنفسجية U.V light أذ يتم التصوير عن طريق الكاميرا.

مكونات 10X TBE buffer :

108 g of tris base [tris (hydroxymethyl) aminomethane]

55 g of boric acid

7.5 g of EDTA, disodium salt

Deionized water

حيث تم تخفيف تركيز TBE buffer من 10x الى 1x وذلك عن طريق اضافة 450 مل من الماء المقطر الى 50 مل من 10x .TBE buffer

3-3-3 : تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction

استخدمت 12 عزلة في هذه الدراسة للتحقق من ارتباطها باسلافها الاصلية وتنوعها الوراثي باستخدام بصمة تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية (ERIC-PCR) تم استخدام هذه العزلات والمشخصة والمعزولة سابقاً من أسماك الكارب في محافظة نينوى. تم التعرف على العزلات وتشخيصها على أنها الإشريكية القولونية بالطرائق المظهرية فضلاً عن الطرائق والفحوصات البيوكيموحيوية وكذلك تم تاكيدها بالطرائق الجزيئية من خلال تضخيم الجينات المستهدفة المحددة في هذه الدراسة وهي الجينات المنتجة للسموم المعوية الشايكا واحد واثنان (*Stx1* and *Stx2*) تم إخضاع جميع العزلات لتقنية ERIC-PCR لتحديد عترات مماثلة وتمييز العترات المختلفة باستخدام بادئات (ERIC1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3 ' و ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG-3 ') والتي وصفها(Versalovic *et a.*,1991)أذ تم إجراء هذه التقنية المعتمدة على تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم إجمالي قدره 25 ميكرولتر ، يتكون كل تفاعل من 1 ميكرولتر لكل بادى بتركيز (10 بيكومول) ، و 12 ميكرولتر من مزيج التفاعل الجاهز من شركة (Tawan ، Genedirex) ، و 2 ميكرولتر من عينة الحمض النووي المستخلص من عزلات جراثيم الايشيريكيا القولونية وبتركيز (30-100 نانوغرام / ميكرولتر) ويكمل الحجم بالماء المعقم غير المتاين والخالي من النيوكليواز وبمقدار (9 ميكرولتر) المجهز من شركة (Qiagen، Germany) الى حجم 25 ميكروليتر (Taha , 2021). تم إجراء تفاعل تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام نظام (GeneAmp Applied Biosystem 9700 ، USA).

وفقًا لبرنامج PCR المستخدم من قبل (Bakhshi *et al.*,2018) وكالاتي ، المسخ الأولي لمدة 5 دقائق عند 94 درجة مئوية ، بعد ذلك 35 دورة من متكررة لكل دورة منها مسخ على درجة 94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة ودرجة حرارة ارتباط البادى على 54 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة ، ومرحلة الاستطالة على درجة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق. وهناك دورة تم تمديد لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية . تم تحميل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل المُضخّمة في هلام الاكاروز agarose بنسبة 2٪ والمحضر مسبقا من محلول 1 X Tris- acetate-EDTA (TAE) والملون بصبغة الاحمر الامن Red safe المجهزة من شركة (GeNetBio ، korea).

تم استخدام الدليل الحجمي DNA 100-bp والمجهز من شركة (Tawan, Genedirex) كمعيار للحجم الجزيئي للحزم الناتجة ثم بعد ذلك تم وضع هلام الاكاروز على جهاز المجهز للأشعة فوق البنفسجية UV- trans illuminator لاخذ الشكل لاجل تحليل البيانات فقد تم أولاً تسجيل شكل تحتوي على 12 حفرةً تمثل جميع عزلات الإشريكية القولونية المنتجة لسموم الشايكا يدويًا بواسطة كامرة رقمية للتاكد من وجود أو عدم وجود حزم ال DNA المتضاعف في هلام تم الحصول عليها من تقنية ال ERIC-PCR ثم تم تحليلها أخيرًا باستخدام برنامج إصدار (GelJ software version 2.0) لانشاء مخطط شجيري اعتمادا على (Heras *et al*.,2015). تم إجراء تجميع العزلات بناءً على طريقة مجموعة الأزواج غير الموزونة مع تحليل المتوسط الحسابي (UPGMA) ومعامل تشابه ابتفاوت قدره حوالي 1%. تم تجميع العزلات ذات معامل التشابه التي تساوي أو تزيد عن 90٪ على أنها نفس التركيب الوراثي (Taha, 2021) وتم تجميع العترات وفقًا لاختلافاتهم الجينية مع مصدر العزل نفسه والمختلف بالموقع الجغرافي.

4-3 : اختبار مقاومة المضادات الحيوية:

تم إجراء إختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية وذلك بالإعتماد على طريقة (Bauer *et al.*, 1966) ، وتم ذلك بنقل جزء من المستعمرات النقية من وسط الكروم اكار بواسطة الناقلة الجرثومية (عروة حاملة الجراثيم) اذ يتم نقل حوالي 5-6 مستعمرات جرثومية وزراعتها في أنابيب تحوي على 5 مل من ماء الببتون ومن ثم يتم التحضين لمدة 5 ساعات بدرجة حرارة 37 م ومن بعد ذلك يتم اجراء الخطوات الأتية:

1. تم غمر مسحة قطنية معقمة بماء الببتون المزروع والمحضن، ويتم إزالة الفائض من ماء الببتون وذلك بضغط المسحة القطنية على الجدار الداخلي لأنبونة الإختبار ثم يتم نشرها على وسط مولر هنتون بثلاثة اتجاهات متعاكسة وذلك لتكوين طبقة رقيقة متجانسة من الزرع الجرثومي على جميع أجزاء سطح الوسط الزرعي.
2. تترك أوساط المولر هنتون لمدة 5 دقائق حتى تجف.
3. تم استخدام ملقط معقم بالكحول واللهب لكي يتم وضع أقراص المضادات الحيوية على طبقين من وسط مولر هنتون بأذ يكون توزيعها على أماكن منتظمة تسمح بقياس قطر النمو الجرثومي حول قرص المضاد الحيوي ولتلافي سقوطها يتم تثبيتها بواسطة الملقط وذلك بالضغط الخفيف عليها.
4. تم ترك الأطباق لمدة 15 دقيقة لكي تجف ثم تحضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة.

5. تم قراءة النتائج وذلك بقياس قطر النمو الجرثومي حول قرص المضاد الحيوي المستخدم بواسطة مسطرة بلاستيكية شفافة ومقارنتها مع قياسات الشركة المجهزة لهذه الأقراص اذ أمكن التعرف على عزلات الجراثيم الحساسة والمتوسط الحساسية والمقاومة لهذه المضادات الحياتية.

الفصل الرابع

النتائج

Results

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان عدد جراثيم الايشريكيا القولونية المعزولة من عينات الأسماك والبالغ عددها (153) عينة سمك منها (78)عينة سمك من الأسواق المحلية والتي شملت منطقة الميدان والبلديات وأسواق النبي يونس في مدينة الموصل كانت28 عينة موجبة وبنسبة 35.9 % أما عدد العينات التي أظهرت نتيجة سالبة لجراثيم الايشريكيا القولونية فكانت 50عينة وبنسبة 64.1% كما في الجدول(4-1) .أما عينات السمك الذي جمع من مزارع الأسماك والبالغ عددها (75) والتي شملت أحواض منطقة حاوي الكنيسة وناحية وانة وقضاء الحمدانية كانت 18 عينة موجبة وبنسبة 24% و 57 عينة سالبة وبنسبة 76% كما في الجدول(4-2) أما عدد العينات التي أظهرت نتيجة موجبة لجراثيم الايشريكيا القولونية ذات النمط المصلي O157:H7 من عينات أسماك المزارع فكانت 7 عينة بنسبة 38.9% أما عينات أسماك الأسواق المحلية فكانت 11 عينة وبنسبة 39.2% كما في الجدول (4-3) .

الجدول 4-1 : يوضح عدد ونسب العزلات لجرثومة الايشيريكيا القولونية من عينات الأسواق المحلية

المنطقة	عدد العينات المفحوصة	العينات الموجبة	نسبتها %
أسواق الميدان	28	17	60.71
أسواق البلديات	25	6	24
أسواق النبي يونس	25	5	20
المجموع الكلي	78	28	35.9

الجدول 4-2 : يوضح عدد ونسب العزلات لجرثومة الايشيريكيا القولونية من عينات مزارع الأسماك

المنطقة	عدد العينات المفحوصة	العينات الموجبة	نسبتها %
حاوي الكنيسة	25	4	16
ناحية وانة	25	6	24
قضاء الحمدانية	25	8	32
المجموع الكلي	75	18	24

الجدول 4-3 : يوضح عدد ونسب العينات الموجبة لـ *E. coli* O157:H7

المنطقة	العينات المفحوصة	العينات الموجبة (%)	العينات الموجبة O157:H7
حاوي الكنيسة	25	4 (16%)	1 (25%)
ناحية وانة	25	6 (24%)	2 (33.3%)
قضاء الحمدانية	25	8 (32%)	4 (50%)
المجموع الكلي	75	18 (24%)	7 (38.9%)
أسواق الميدان	28	17 (60.7%)	7 (41.2%)
أسواق البلديات	25	6 (24%)	3 (50%)
أسواق النبي يونس	25	5(20%)	1 (20%)
المجموع الكلي	78	28 (35.9%)	11 (39.2%)

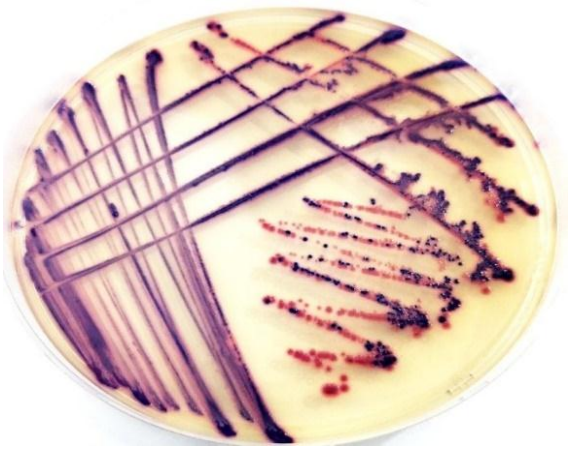
وظهرت مستعمرات الإيشريكيا القولونية ذات أشكالًا وألوانًا عند نموها على الاوساط الانتقائية التي تم استخدامها في هذه الدراسة وان من أهم هذه الوسائط هو وسط الايوسين الميثيلين الأزرق((EMB)، والذي يعد وسطا جيدا لعزل جراثيم الايشريكيا القولونية أذ لوحظ ان نمو هذه الجراثيم على هذا الوسط تكون ذات لون اخضر مع بريق معدني، تسمى هذه الظاهرة المعان معدني وهي سمة مميزة لجراثيم للإيشريكيا القولونية عند نموها على هذا الوسط الانتقائي وكما موضح في الشكل (1-4).

الشكل (4-1) : نمو جراثيم الأيشريكيا القولونية على وسط EMB

في حين لوحظ ان نمو جراثيم الايشريكيا القولونية على وسط الماكونكي MacConkey كانت بشكل مستعمرات ذو لون وردي أذ يعد وسط الماكونكي من الاوساط المستخدمة لعزل جراثيم الايشريكيا القولونية والكشف عن الجراثيم المعوية *Enterobacteriaceae* وكما هو موضح في الشكل (4-2).

الشكل (4-2) : نمو جراثيم الأيشريكيا القولونية على وسط الماكونكي MacConkey

وتم ايضا استخدام اكار المتالق Brilliance *E. coli* /coliform agar وذلك للكشف عن جراثيم الايشريكيا القولونية أذ كان لون المستعمرات لجراثيم الايشريكيا القولونية بننفسجي غامق بينما جراثيم coliform كانت ذات لون احمر فاتح كما هو موضح في الشكل (4-3).

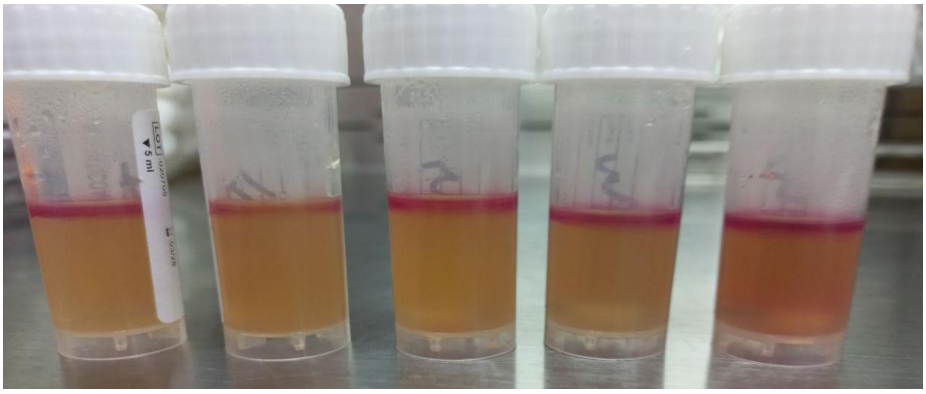


الشكل(4-3): نمو جراثيم الأيشريكيا القولونية على وسط Brilliance *E. coli*/confirm medium

وتم ايضا استخدام وسط Chrome *E. coli* O157:H7 agar ويعد هذا الوسط خاص لتمييز جرثومة الايشريكيا القولونية ذات النمط المصلي O157:H7 أذ ظهرت مستعمرات هذه الجرثومة بلون بنفسجي أما مستعمرات الانماط المصلية الاخرى لجرثومة الايشريكيا القولونية فقد ظهرت بلون ازرق مخضر أذ يعد هذا الوسط مهم جدا في تشخيص هذا النمط المصلي من جراثيم الايشريكيا القولونية كما هو موضح في االشكل (4-4).

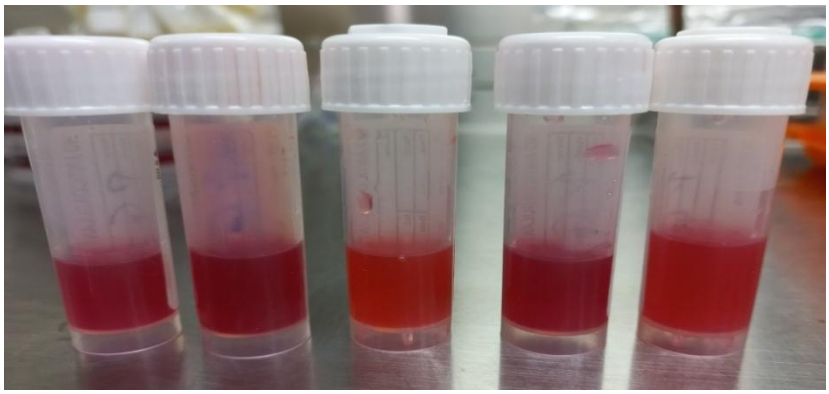
الشكل (4-4) : نمو جراثيم الأشريكيا القولونية على وسط الكروم Chrome *E. coli* O157:H7 agar

ان نتائج اختبارات الكيموحيوية لجميع العزلات اكدت على انها جراثيم الايشريكيا القولونية ومن اهم هذه الاختبارات التي تم اجراؤها هو اختبار الاندول أذ أظهرت جراثيم ال *E. coli* نتيجة موجبة لهذا الاختبار وذلك من خلال تكون حلقة حمراء اللون أعلى السطح بعد اضافة عدة قطرات من كاشف كوفاك الى محلول ماء الببتون المحضن أذ ان ظهور هذه النتيجة دلالة على قدرة الجرثومة على تحليل الحامض الاميني الموجود وهو التربتوفان وإنتاج الاندول كما هو موضح في الشكل (4-5).



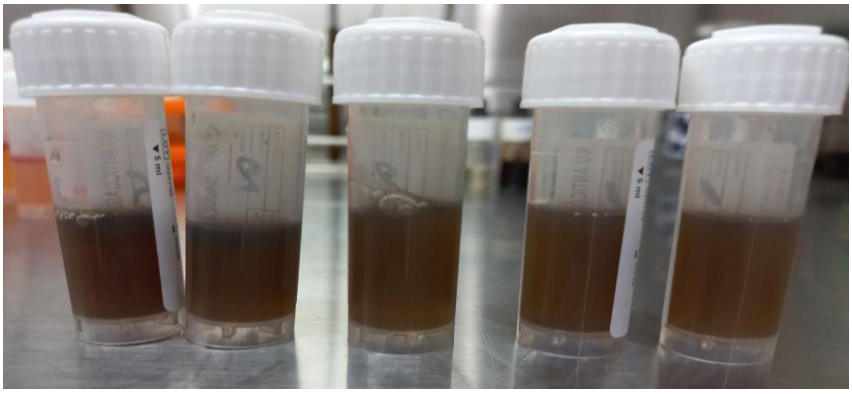
الشكل (4-5) : يوضح إختبار الأندول المستخدم للكشف عن جراثيم الأشريكيا القولونية

في حين أظهرت جراثيم ال *E. coli* نتيجة موجبة عند اجراء اختبار المثيل الاحمر وذلك من خلال تحول لون الوسط الى اللون الاحمر بعد اضافة قطرات من كاشف المثيل الاحمر وذلك من خلال تخمر واستهلاك سكر الكلوكوز وبالتالي انتاج الحامض والذي يؤدي الى حدوث تغير الاس الهيدروجيني pH للوسطومن ثم يؤدي الى تغير لون الوسط الى اللون الأحمر كما في الشكل (4-6).



الشكل (4-6) : إختبار المثيل الأحمر المستخدم للكشف عن جراثيم الأشريكيا القولونية

أظهرت كذلك جراثيم ال *E. coli* نتيجة سالبة عند اجراء اختبار فوكس بروسكاور وذلك بعد اضافة الكاشف و بقاء الوسط اصفر اللون وعدم تحول لون الوسط الى اللون الاحمر كما في الشكل (4-7).



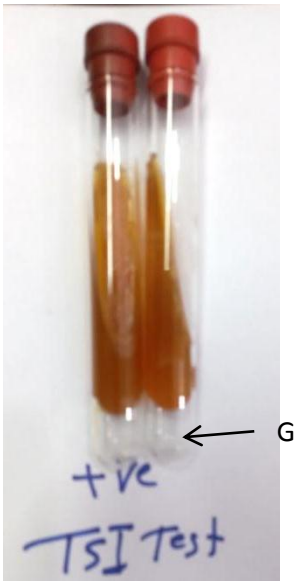
الشكل(4-7) : إختبار الفوكس بروسكاور المستخدم للكشف عن جراثيم الاشريكيا القولونية

وكانت نتائج العزلات سلبية لاختبار استهلاك السترات أذ أظهرت جراثيم ال *E. coli* نتيجة سالبة لهذا الاختبار بعد زراعة المستعمرات على وسط خاص يسمى وسط Simmons Citrate agar وذلك ببقاء لون الوسط اخضر وعدم تغير لون الوسط الى اللون الازرق وذلك لعدم استعمال البكتريا للسترات كمصدر وحيد للكاربون كما هو في الشكل (4-8).

الشكل(4-8) : إختبار إستهلاك السترات المستخدم للكشف عن جراثيم الأيشريكيا القولونية

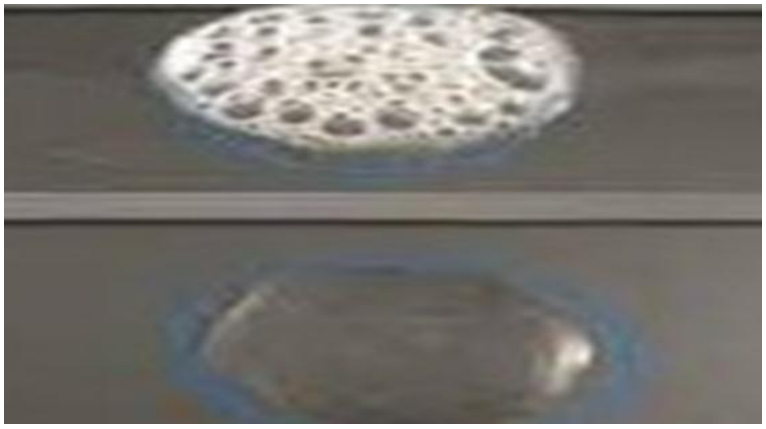
وأظهرت نتيجة اختبار تخمر السكريات وانتاج الغاز على أن جراثيم الأيشريكيا القولونية التي تنمو على وسط ثلاثي سكر حديد (Triple Sugar Iron agar) تعطي نتيجة موجبة وذلك من خلال تغير لون الوسط الى اللون الأصفر الغامق وهذا يعطي دلالة على ان الجراثيم لها القدرة على تخمر السكريات ولاسيما سكر اللاكتوز والسكروز والكلوكوز مع ظهور فقاعات غازية تتكون في اسفل

الأنبوبة والذي يؤدي الى اندفاع الوسط الى الأعلى و هذا الغاز هو غاز ثنائي أوكسيد الكاربون كما هو في الشكل (4-9).



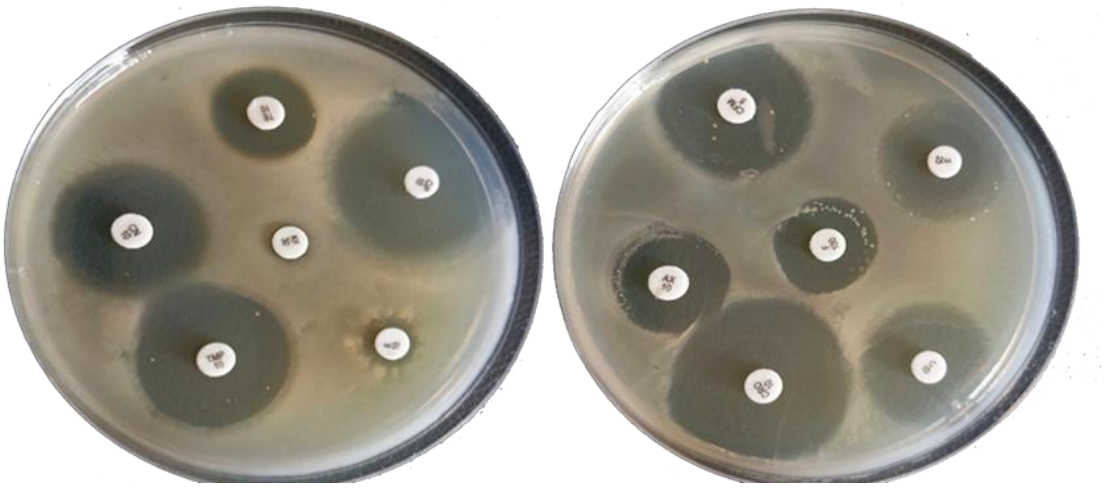
الشكل(4-9) : إختبار ثلاثي سكر الحديد المستخدم للكشف عن جراثيم الأيشريكيا القولونية

كذلك تم اجراء اختبار الكاتاليز أذ أظهرت ال *E. coli* نتيجة موجبة وذلك من خلال تكون فقاعات بعد اضافة الكاشف الى المستعمرات الجرثومية الموجودة على الشريحة الزجاجية في حين أظهرت الجرثومة نتيجة سالبة عند اجراء اختبار الاوكسديز كما في الشكل (4-10).



الشكل (4-10) :ا. إختبار الكاتاليزوالاوكسيديز المستخدم للكشف عن جراثيم الأيشريكيا القولونية

وتمت زراعة العينات التي أعطت نتيجة موجبة على وسط مولر هنتون الخاص باختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحياتية وبعدها تم وضع اقراص المضادات الحياتية على الاطباق المزروعة كما موضح في الشكل (4-11) .

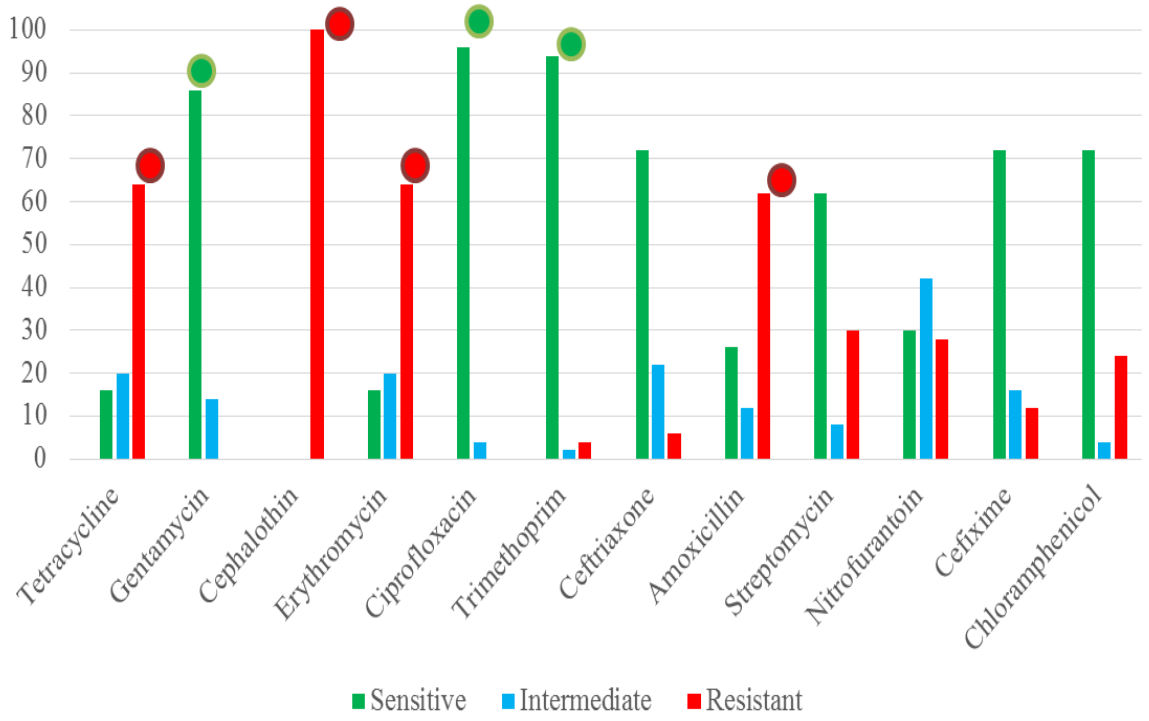


الشكل (4-11): يوضح اختبار الحساسية للمضادات الحياتية على وسط مولر هنتون

فقد أظهرت دراستنا عن وجود اختلاف واضح في مقاومة جراثيم الأيشريكيا القولونية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة أذ كانت أعلى نسبة حساسية جراثيم الايشريكيا القولونية للمضاد الحيوي سايبروفلوكساسين وترايمثبريم وجنتأمايسين 96%، 94% ،86% على التوالي، في حين كانت أعلى نسبة مقاومة جراثيم الايشريكيا القولونية للمضاد الحيوي سيفالوفين وتتراسيكلين والاموكسلين 100% و 64% و 62% على التوالي وكما هو موضح في الجدول رقم (4-4) والشكل (4-11) .

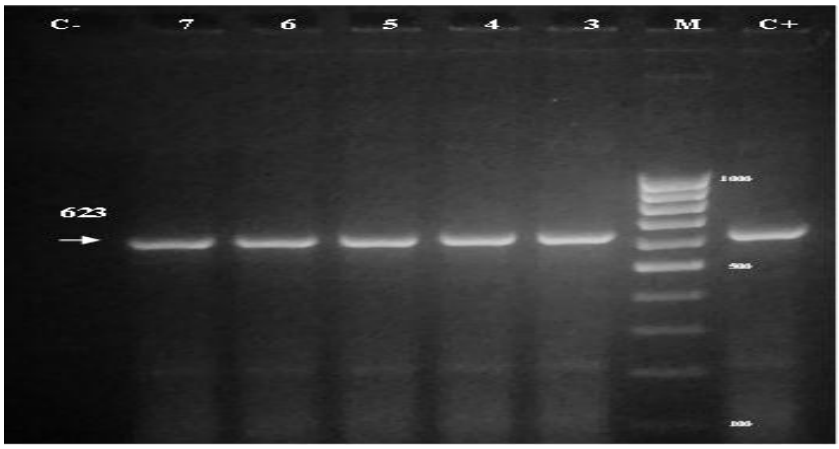
الجدول 4-4 : يبين نتائج المقاومة والحساسية لجراثيم الايشريكيا القولونية للمضادات الحياتية المستخدمة

Resistant %	Intermediate%	Sensitive %	Antibiotics (mg/IU)
64	20	16	Tetracycline
0	14	86	Gentamycin
100	0	0	Cephalothin
64	20	16	Erythromycin
0	4	96	Ciprofloxacin
4	2	94	Trimethoprim
6	22	72	Ceftriaxone
62	12	26	Amoxicillin
30	8	62	Streptomycin
28	42	30	Nitrofurantoin
12	16	72	Cefixime
24	4	72	Chloramphenicol



الشكل (4-12): يبين استجابة جراثيم الإشيريكيا القولونية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

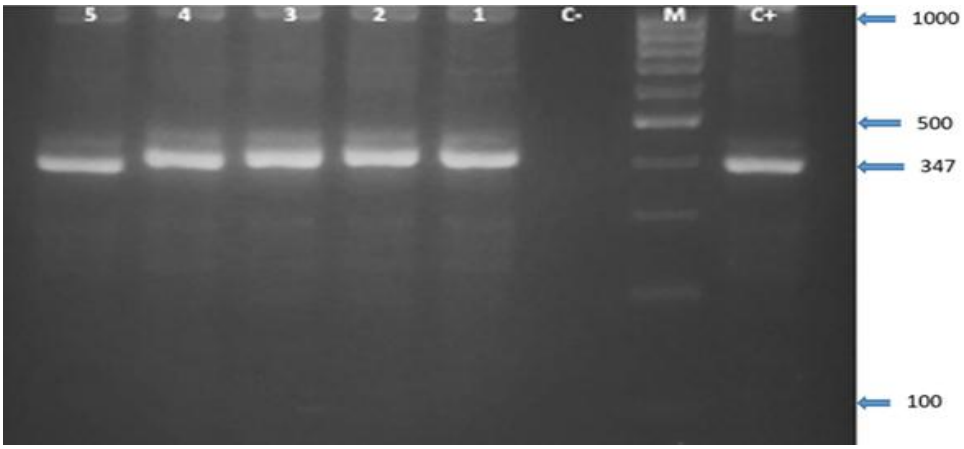
أما فيما يخص نتائج الطرائق البيولوجية الجزيئية فقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية التي تم التوصل اليها أن جميع عزلات جراثيم الأيشريكيا القولونية المعزولة من عينات الأسماك سواءً اكانت أسماك المزارع او أسماك الأسواق المحلية والتي أعطت نتيجة موجبة تمتلك جين *uidA* ذو الوزن الجزيئي 623 زوج قاعدي وكما موضح في الجدول (4-5) و الشكل (4- 13) .



الشكل(4-13) : يوضح اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للايشريكيا القولونية لجين *uidA* ذات الوزن الجزيئي 623 زوج قاعدي، المسار 1 : السيطرة الموجبة، المسار 2 : الدليل الحجمي، المسارات 3، 4، 5، 6، 7 : العينات الموجبة، المسار 8 : السيطرة السالبة

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية التي تم التوصل اليها أن عزلات جراثيم الأيشريكيا القولونية المعزولة من عينات أسماك المزارع 18 عزلة كان منها 16 عزلة تمتلك جين *stx1* وبنسبة 88.9% ذات الوزن الجزيئي 347 زوج قاعدي في حين ان عزلات جراثيم الايشريكيا القولونية المعزولة من عينات أسماك الأسواق المحلية التي كانت 28 عزلة منها 25 عزلة تمتلك جين *stx1* وبنسبة 89.3%، أذ تم الكشف عن هذا الجين *Stx1* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل والبادئات الخاصة بهذا الجين كما في الجدول (4-5) والشكل (4-14) .

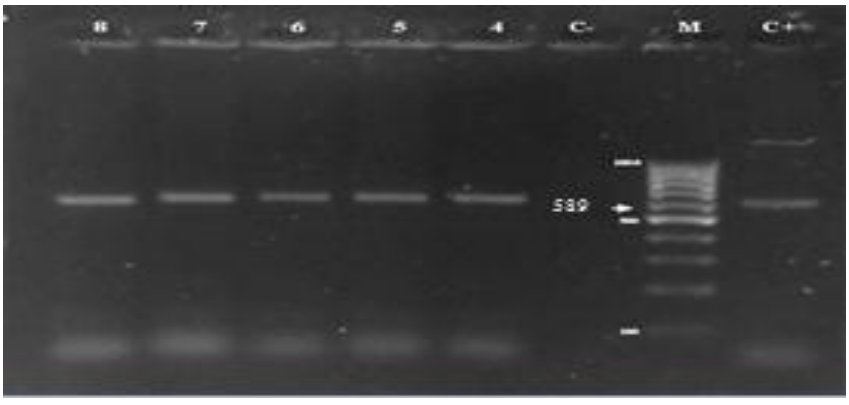
وأظهرت نتائج الدراسة الحالية التي تم التوصل اليها عن وجود 18 عزلة من جرثومة الأيشريكيا القولونية المعزولة من عينات أسماك المزارع منها 13 عزلة تمتلك جين stx2 ذات الوزن الجزيئي 589 زوج قاعدي وبنسبة72.2 % أما بالنسبة لعينات أسماك الأسواق المحلية فكانت عدد العزلات 28 عزلة منها 24 عزلة تمتلك جين stx2 ذات الوزن الجزيئي 589 زوج قاعدي وبنسبة 85,7% أذ تم الكشف عنه باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل والبادئات الخاصة به وكما موضح في الجدول (4-5) والشكل (4-15). بينما في هذه الدراسة لم نكتشف الجين *rfb* سواء في عينات مزرعة الأسماك أو العينات التي تم جمعها من أسواق الأسماك المحلية باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل والبادئات الخاصة به.



الشكل (4-14) : يوضح اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للايشريكيا القولونية لعامل الفوعة *Stx1* ذات الوزن الجزيئي 347 زوج قاعدي، المسار 1 : السيطرة الموجبة، المسار 2 : الدليل، المسار 3 : السيطرة السالبة، المسار 1، 2، 3، 5,4 : العينات الموجبة

الجدول 4-5 : عدد العينات الموجبة لجينات سموم *Stx1* و *Stx2* و*rfb* في جميع مناطق الدراسة

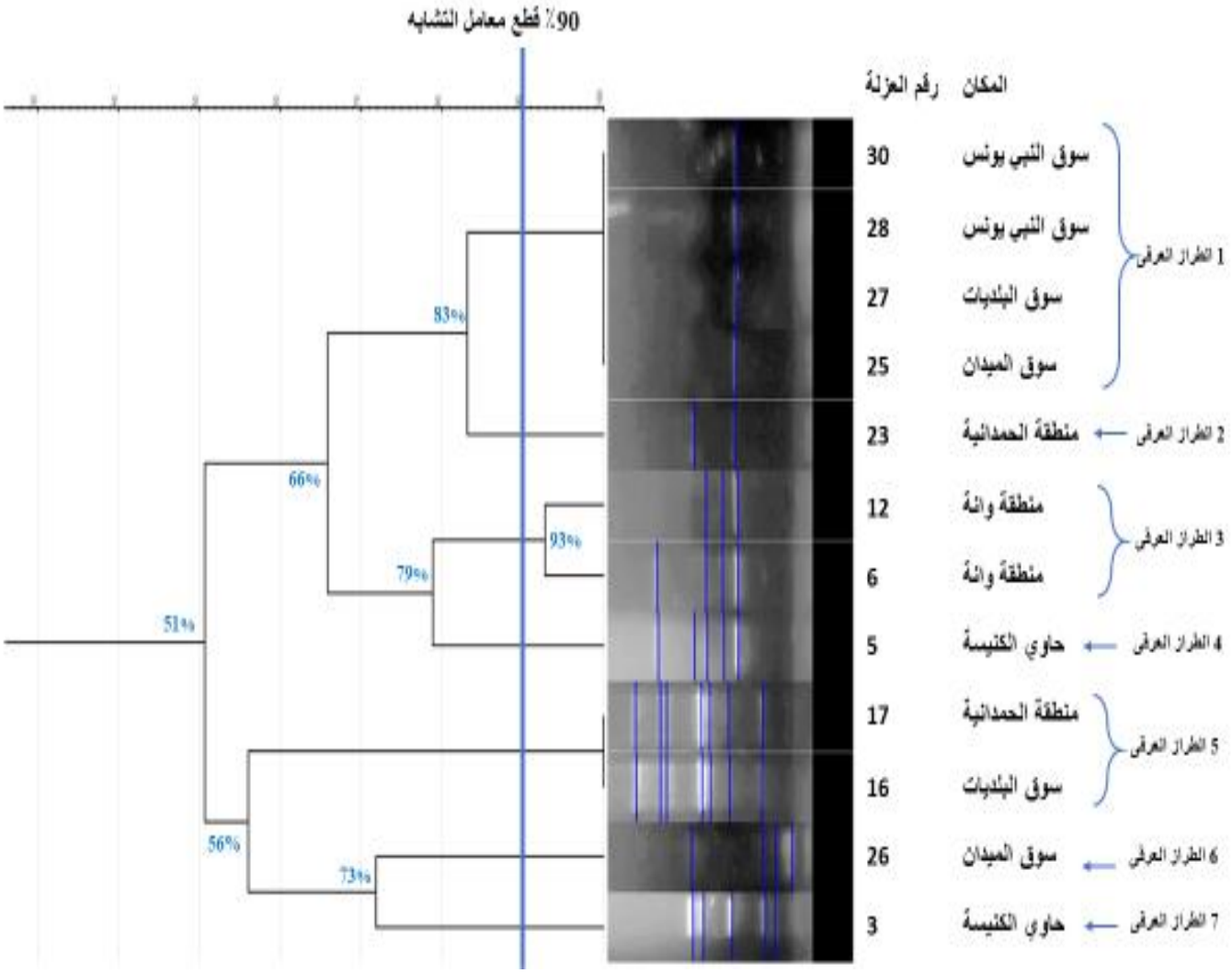
المنطقة	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة للايشريكيا القولونية	عدد العينات الموجبة لجين *Stx1*	عدد العينات الموجبة لجين *Stx2*	عدد العينات الموجبة لجين *rfb*
حاوي الكنيسة	25	4	3	2	-
ناحية وانة	25	6	5	4	-
قضاء الحمدانية	25	8	8	7	-
المجموع الكلي	75	18 (%24)	16 (% 88.9)	13 (% 72.2)	0
أسواق الميدان	28	17	15	13	-
أسواق البلديات	25	6	6	6	-
أسواق النبي يونس	25	5	4	5	-
المجموع الكلي	78	28 (%35.9)	25 (% 89.3)	24 (% 85.7)	0



الشكل(4-15) : يوضح اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للايشريكيا القولونية لعامل الفوعة *Stx2* ذات الوزن الجزيئي 589 زوج قاعدي، المسار 1 : السيطرة الموجبة، المسار 2 : الدليل الحجمي، المسار 3 : السيطرة السالبة، المسار 4، 5، 6، 8,7 : العينات الموجبة

أما نتائج تحليل بصمة تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية فبناءً على عدد وحجم تباينات تسلسل الحزم الناتجة واعتمادًا على تحليل بصمة تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية ERIC-PCR في كل عزلة ، أظهرت النتائج أن تشابهه العزلات كان يتراوح بين 51 - 100 %. تم تقسيم العترات إلى 7 أنماط جينية بناءً على حد التشابه بنسبة 90% (من 1 إلى 7) ، أذ كان العتر الأكثر انتشارًا ضمن النمط الجيني 1تضم 4 عترات. بعد ذلك تم تجميع عترتين ضمن الأنماط الجينية وهي 3 و 5. على النقيض من ذلك ، فقد كان النمط الوراثي 2 و 4 و 6 و 7 يشتمل على عترة واحدة فقط

فيما يتعلق بالاختلافات الوراثية في الموقع الجغرافي كان هناك تشتت نسيلي عال لأكثر عترات الايشريكيا القولونية المعزولة 12/10 وبنسبة 83.3 % في مواقع جغرافية مختلفة كما يتضح ذلك من تجميع العترات المختلفة جينيا من موقع جغرافي مختلف لنفس النمط الجيني وأيضًا تجميع العترات المختلفة جينيا من نفس الموقع الجغرافي إلى أنماط وراثية مختلفة. على سبيل المثال، التجميع في النمط الجيني 1 لكل من العترات رقم 30 و 28 و 27 و 25 من سوق النبي يونس و سوق النبي يونس وسوق البلديات وسوق الميدان على التوالي. علاوة على ذلك ، التكتل أو التجميع في النمط الجيني 5 لكل من العترة رقم 17 (من منطقة الحمدانية) و 16 (من سوق البلديات). فضلا عن ذلك ، فإن العترة رقم 23 (من منطقة الحمدانية) متجمعة في النمط الجيني 2 ، العترة رقم 5 (من منطقة كنيسة حاوي) في النمط الجيني 5 ، العترة رقم 26 (من سوق الميدان) في النمط الجيني 6 وأخيراً العترة رقم 3 (من منطقة حاوي) منطقة الكنيسة) في النمط الجيني 7 ، و في المقابل تم تجميع عترتين فقط معزولتين من نفس الموقع الجغرافي في النمط الجيني الفردي (العترة رقم 12 و 6 من منطقة وانه الفرعية ضمن النمط الجيني 3 (الشكل 4-16).



الشكل (4-16) شجرة النشوء بتقنية ERIC-PCR يُظهر نمط العلاقة لـ 12 عترة من بكتريا الايشريكيا القولونية المعزولة من أسماك المزارع والأسواق المحلية في مدينة الموصل.

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

تعد الثروة السمكية واحدة من أهم المصادر الطبيعية التي استغلها الإنسان منذ القدم عن طريق الصيد. فقد تطورت مهنة صيد الأسماك على مر الأزمان تطوراً كبيراً بتطورمعدات الصيد اعتمادا على مناطق الصيد المختلفة . وتعد الثروة السمكية إحدى مكونات البيئة البحرية والتي تشمل عددا كبيراً من مجموعات الحيوانات المائية المختلفة فضلا عن اعداد كبيرةً من الأنواع في كل مجموعة. وتمتاز البيئة البحرية كما في البيئات الأخرى بوجود نوع من التوازن بين كل مكونات البيئة (Gupta *et al*., 2013) . غالباً ما يرتبط الحديث عن البيئة البحرية بالحديث عن الثروة السمكية، والعكس صحيح. ويمكن أن نفسر ذلك بأهمية الثروة السمكية كواحدة من أهم المكونات الحية للبيئة البحرية أذ تعد من أكثر المجموعات الحيوانية فهي تشمل الأسماك والقشريات (Ariño *et al*., 2013). أصبحت الأسماك البحرية تشكل مكونًا غذائيًا مهمًا لقسم كبير من سكان العالم فضلا عن انها تعد مصدرا مهما للبروتين وعناصر أخرى ضرورية للحفاظ على صحة الجسم نتيجة لسهولة قابلية الهضم كما وانها ذات قيمة غذائية عالية ، وتكمن اهميتها ليس فقط من الناحية الغذائية ولكن أيضًا كعنصر من عناصر التجارة الدولية لعدد من البلدان ومع ذلك فيمكن ان تعدها كناقلات للعديد من المخاطر الصحية والميكروبية على صحة الانسان بسبب استهلاك الأسماك ومنتجاتها الملوثة لكون الأسماك أكثر عرضة لمجموعة متنوعة من مسببات التلوث الجرثومية التي تؤدي الى حدوث التسمم الغذائي ; Faber *et al*., 2010) (Petronillah *et al*., 2015 ; ELsaidy *et al*., 2013) . وبصرف النظر عن كون الأسماك مادة غذائية أساسية قد تشكل بعض الاحياء المجهرية الملوثة لها خطراً محتملاً على الصحة العامة للمستهلك ولهذا فأنها تشكل مصدر قلق رئيسي من وجهة نظر إدارة أنظمة الاستزراع السمكي أذ تعد الأمراض الجرثومية المسؤولة عن النفوق الشديد في كل من الأسماك البرية وأسماك المزارع (Croci and Suffredini, 2003)، ونتيجة لذلك فان جودة الأطعمة البحرية تعتمد على جودة البيئة المائية التي تعيش بها الأسماك أذ يؤدي تلوث الأسماك الى تقليل القيمة الغذائية لها نتيجة لحدوث التحلل فضلا عن حدوث حالات التسمم الغذائي عند حدوث تلوث الأسماك بالجراثيم الممرضة (Ghaly *et al*., 2010) . ولهذا فان تلوث المياه بالبراز يشكل خطرا على الصحة العامة أذ يؤدي إلى حدوث خسائر اقتصادية وتدهور بيئي من خلال تلوث المياه بالصرف الصحي للمسالخ والتصريف غير المنضبط للمواد البرازية

وفضلات الحياة البرية قد تلوث المياه السطحية والجوفية (Abowei and Briyai, 2011) واحدة من هذه الملوثات الجرثومية هو النوع الجرثومي *Escherichia coli* المصاحب للعدوى عن طريق تناول المنتجات الصالحة للأكل من أصل بحري حيث يرتبط حدوث هذه الجرثومة في الغذاء ارتباطًا مباشرًا بالتلوث البرازي (Gerokomou *et al.*, 2011) .ويمثل وجود الإيشريكيا القولونية في المأكولات البحرية والأسماك خطرًا على المستهلكين لاحتمال تواجد عترات من الجرثومة المسببة للأمراض ومع ذلك فإن وجود الإيشريكيا القولونية غير المسببة للأمراض في الأسماك يعد منبه أيضًا للصحة العامة ، أذ تعد التعرف على وجود هذه الجرثومة كمؤشر على التلوث البرازي (Murugan *et al.*, 2011 ; Fatma *et al.*, 2012) ففي حالات الأغذية المصنعة يجب اتخاذ التدابير لضمان السلامة الغذاءية خلال العملية برمتها. فضلا عن ذلك ، لا ينصح بتناول المأكولات البحرية النيئة أو غير المطهية جيدًا أذ تعد الإيشريكيا القولونية واحدة من الجرثومة المسببة لحدوث تلوث الأسماك سواءً اكانت أسماك مياه عذبة أو أسماك المزارع أذ تؤدي الى حدوث حالات التسمم الغذائي للإنسان عند تناول الأسماك الملوثة (Yagoub, 2009).

تم اجراء هذه الدراسة لمعرفة نسبة حدوث تلوث الإيشريكيا القولونية في عينات الأسماك التي تم الحصول عليها من مزارع الأسماك المختلفة وأسواق البيع المحلية المتواجدة في مدينة الموصل فقد أجريت عليها الاختبارات للكشف عن الجرثومة بالطرائق التقليدية والطرائق الجزيئية وكذلك البحثً عن وجود جينات الفوعة بواسطة اجراء تفاعل البلمرة المتسلسل ال PCR كما تم إجراء اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة انتشار القرص وتم تحديد شجرة النشوء بتقنية (ERIC_ PCR) وكذلك تم الكشف عن وجود مجموعة مصلية *E. coli* O157:H7 المسببة للأمراض في عينات الأسماك والذي يشكل تهديدًا كبيرًا للصحة العامة ويمكن أن تكون الأسماك بمثابة وسيلة لنقل هذا النمط المصلي إلى المستهلكين (Santos and Vieira ,2013) .

أظهرت النتائج وجود نسبة عالية من جرثومة الايشيريكيا القولونية في الأسماك التي تم الحصول عليها من الأسواق المحلية أذ تتميز بوجود نسبة عالية من التلوث بسبب مياه الصرف الصحي للمصانع والمجازر وهذا يتفق مع (Austin and Austin, 1999) الذي أفاد بأن معظم الكائنات الحية الدقيقة في أنسجة وجلد الأسماك يعتقد أنها ناتجة عن تلوث البيئة المائية التي تعيش بها الأسماك. كانت نتاءجنا أعلى من النتائج التي تم الحصول عليها من قبل الباحث(El - sheriff et al.,2014) والتي كانت 22-25% . و كانت هذه النتيجة مقاربة للنتائج التي توصل اليها (Azza *et al.*,2012) وهي 17.5٪ و 25.8٪ . (Ishii and Sadowsky,2008) .

وقد يعزى سبب حدوث تلوث اسماك المزارع السمكية بجرثومة الايشريكيا القولونية يرجع الى عدة اسباب اهمها هو عدم استخدام الممارسات الصحية (Good Hygienic Practices) في المزارع والتي تشمل نظافة العاملين وفترات تبديل الماء ونظافة الماء المستخدم بالاضافة الى انشاء المزارع السمكية بالقرب من اماكن تربية الماشية او الطيور والدواجن ومن الممكن ان تكون الاعلاف المستخدمة مصدر للتلوث(Dutta *et al*., 2010)

اما سبب تلوث اسماك الاسواق المحلية فقد يرجع الى عدم اتباع ممارسات السلامة الغذائية (Food Safety Practices) والتي تكون متمثلة بنظافة ايدي العمال من خلال لبس القفازات وتخزين الاسماك بالتبريد حيث يمكن اعتبار العاملين بمثابة نواقل للتلوث بين الانسان والاسماك بالاضافة الى ان نقل الاسماك من المزارع الى الاسواق يمكن ان يكون مصدر للتلوث (Soliman *et al*., 2010) .

تعد الإيشريكية القولونية المنتجة لسموم الشيغا (STEC) من مسببات الأمراض المهمة ذات الأهمية العالمية وتكون STEC مسؤولة عن العديد من الأمراض التي تنقلها الأغذية في جميع أنحاء العالم ، كما أن وجودها في الغذاء يشكل خطراً محتملاً على الصحة ويمكن ربط وجود STEC بعوامل الفوعة للجرثومة والتي تسبب التسمم الغذائي (Hussein *et al*., 2019). فعند عند اجراء اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل في دراستنا للكشف عن عوامل الفوعة لجرثومة الايشريكية القولونية والتي تكون مسؤولة عن الأمراضية والتي تشمل جينات (*Stx1*) (*Stx2*) أذ أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان عدد العينات التي أعطت نتيجة موجبة لجين *(Stx1)* من أسماك المزارع كانت (16) عينة وبنسبة 88.9% أما جين (*Stx2*) فكانت عدد العينات (13) عينة وبنسبة 72.2% . أما عدد العينات التي أعطت نتيجة موجبة لجين *(stx1)* من أسماك الأسواق المحلية كانت (25) عينة وبنسبة 89.3% أما جين (*Stx2*) فكانت عدد العينات(24) عينة وبنسبة 85.7% أذ كانت هذه النسبة أعلى من النسبة التي توصل اليها الباحث Pradhan وجماعته (2016) في بحثه والتي اجراها على 18 عينة سمك أذ احتوت 8 عينات على *Stx1* وبنسبة 44% و14 عينة على *Stx2* وبنسبة 77%. ونستنتج من هذا أنه يمكن اكتشاف STEC في الأسماك نتيجة لإدخال الأسماك في نظام تربية الأحياء المائية الملوثة بسموم جرثومة الايشريكيا القولونية (Cardozo *et al*., 2018) وقد يُعزى تقلب درجات الحرارة ونضوب المغذيات إلى انتشار STEC في البيئات البحرية (Vogeleer *et al*., 2014)، وهذه النسب لا يستهان بها لكون الإيشريكيا القولونية المنتجة لسموم الشيغا (STEC) تعد جرثومة تسبب الإسهال الدموي لدى الأشخاص المصابين وفي حالات نادرة يمكن أن تسبب مرض الكلى المعروف باسم متلازمة انحلال الدم الانحلالي (Sujatha *et al*.,2011) .

في دراستنا لم نتمكن من اكتشاف جينات rfb التي تستخدم في ترميز مستضد O للكشف عن النمط المصلي O157 ، وتتفق هذه النتائج مع دراسة أخرى عندما لا يكتشفون هذا الجين في دراستهم (kumar *et al.*,2001) . وعند اجراء اختبار الحساسية لمعرفة حساسية الجرثومة للمضادات الحياتية المستخدمة في الدراسة أذ أظهرت نتائج الدراسة بوجود تفاوت في حساسية الجرثومة للمضادات الحياتية المستخدمة اذ بينت دراستنا الى ان أعلى نسبة حساسية الجرثومة للمضاد الحيوي كانت ل سبروفلوكساسين ،ترايمثبريم ،وجنتأمايسين وبنسبة 96% و 94% و 86% على التوالي كما وأظهرت نتائج الدراسة بوجود اختلاف في مقاومة الجرثومة للمضادات الحياتية المستخدمة اذ بينت دراستنا الى ان أعلى نسبة مقاومة الجرثومة كانت للمضاد الحيوي ل سيفالوفين ،تتراسيكلين ،والاموكسلين وبنسبة 100% و 64% و 62% على التوالي وهذه النتيجة مقاربة للنتيجة التي حصل عليها (*et al.*, 2000 Lambie). أذ كانت حساسة للمضاد الحيوي السبروفلوكساسين وبنسبة 92% تليها ترايمثبريم 90%. ولكنها مقاومة للمضاد الحيوي سيفالوفين وبنسبة 90% و تتراسيكلين 60% وقد تم الإبلاغ و التأكيد على أن الأسماك التجارية والمأكولات البحرية قد تشكل مستودعات للجرثومة متعددة المقاومة للمضادات الحيوية . في حين لم تتفق نتائجنا مع نتائج دراسة الباحث (Ryu et al.,2012) أذ وجد مقاومة التتراسيكلين (30.7%) ، الستربتومايسين (12.8%) ، السيفالوفين (11.7%) ، الأمبيسيلين (6.7%) في عترات الإشريكية القولونية من الأسماك و المأكولات البحرية التي تم جمعها من الأسواق المحلية . كما ان الاستخدام الخاطىء والعشوائي للمضادات الحيوية يمكن ان يكون سببا لحدوث مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية بالأضافة الى عدم اتباع الارشادات الصحية الصحيحة لمنع حدوث الامراض للحيوانات والاسماك (poirel *et al.*, 2017).

فيما يخص تحليل بصمة تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية فقد أظهرت نتائج الدراسة وجود تشتت نسيلي مرتفع (مستوى عالٍ من عدم التجانس الوراثي) بين معظم العترات من مواقع جغرافية مختلفة. هذا التباين هو مؤشر على أن هناك العديد من العترات من الإشريكية القولونية المنتشرة في مواقع جغرافية مختلفة داخل مدينة الموصل، والتي يمكن أن تأتي من مناطق جغرافية مختلفة (مصادر وأنظمة بيئية متعددة). وليس فقط الأسماك او الاغذية البحرية وانما يمكن أن يعزى ذلك إلى حيوانات اخرى او منتجات غذائية من خلال استيراد الحيوانات من مناطق مختلفة او استيراد منتجات غذائية (التي يتم تصنيعها من لحوم حيوانات من مصادر مختلفة) ومن مواقع مختلفة (بما في ذلك الحيوانات المحلية والمستوردة من المقاطعات المجاورة) (Guimarães *et al.*, 2011).

وذكر(Sellyei et al.,2010) أن دخول الحيوانات من مواقع مختلفة ربما يكون قد دعم في نشر عدد كبير من الأنماط الجينية الجرثومية وربما يكون هناك سبب آخر وراء هذا التنوع وهو أن هناك فرصة ضئيلة لتوزيع هذه الجرثومة بين هذه المصادر للموقع الجغرافية .

بشكل عام ، يتم إنشاء التنوع الجيني الجرثومي عن طريق الطفرات النقطية أو إدخال أو حذف متواليات معينة للحامض النووي منقوص الاوكسجين والتي سوف تؤدي إلى اختلافات في العترات بين المجتمعات الميكروبية ويمكن أن يحدث هذا بعد المرور عبر العديد من المظائف أو النظم البيئية (Jerome *et al.*, 2011)، وهذا تفسير جيد عن سبب وجود مثل هذا التنوع الجيني بين عترات الإشريكية القولونية المعزولة في هذه الدراسة.

من ناحية أخرى ، لم يكن هناك سوى عزلتين من نفس الموقع الجغرافي تم تجميعهما في النمط الجيني الفردي (العترة رقم 12 و 6 من منطقة وانه الفرعية ضمن النمط الجيني 3)، مما يشير إلى وجود مصدر تلوث واحد فقط في هذه العترات (Zhang *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2017) وبالمثل ، وجد(Keesing et al.,2010) أن الحفاظ على النظم البيئية السليمة والتنوع البيولوجي المستوطن المرتبط بها قد يقلل من حدوث انتقال الجرثومة ومن ثم يؤدي إلى تقليل التبادلات الجرثومية بين المواقع المختلفة، وهذا الفقدان في التنوع البيولوجي يمكن ان يكون له تأثير كبيرعلى انتشار الأمراض الجرثومية بين المظائف. في حين علاقة العترات مع الموقع الجغرافي فلاحظنا ان هناك علاقة بين اسماك المزارع في منطقة الحمدانية مع اسماك اسواق البلديات فيمكن ان يكون مصدر الاسماك هو مزارع الحمدانية (Eze *et al.*, 2011).

الفصل السادس

الإستنتاجات والتوصيات

Conclusion and Recommendation

1-6 : الإستنتاجات Conclusion :

1. أسماك الأسواق المحلية وأسماك المزارع السمكية في مدينة الموصل تحتوي على نسبة لايستهان بها من جراثيم الايشريكيا القولونية ويرجع السبب الى تلوث البيئة المائية التي تعيش فيها الأسماك وذلك من خلال رمي المخلفات الحيوانية ومياه المجاري ومياه الصرف للمجازر والمستشفيات.
2. استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل والتي تعد من الطرائق الدقيقة والسريعة لتشخيص جراثيم الايشريكيا القولونية وذلك بالاعتماد على الجين الخاص بها وهو جين *uidA*.
3. تم تشخيص الجينات الخاصة بعوامل الفوعة لجراثيم الايشريكيا القولونية المنتجة للسموم وتشمل جين (*Stx1/Stx2*) في أسماك المزارع السمكية والأسواق المحلية .
4. كانت نسبة الحصول على جراثيم الايشريكيا القولونية ذات النمط المصلي O157:H7 من عينات أسماك الأسواق المحلية أعلى من أسماك المزارع السمكية في مدينة الموصل.
5. اعتمادًا على تحليل بصمة تفاعل البلمرة المتسلسل التكرارى بين الجينات للجراثيم المعوية ERIC-PCR في كل عزلة ، كان هناك تشابهه بالعزلات وتراوح بين 51-100%. وتم تقسيم العترات إلى 7 أنماط جينية بناءً على حد التشابه بنسبة 90% (من 1 إلى 7) .
6. كان هناك تشتت نسيلي مرتفع لأكثر عترات الايشريكيا القولونية المعزولة 12/10 وبنسبة 83.3 % في مواقع جغرافية مختلفة كما يتضح ذلك من تجميع العترات المختلفة جينيا من موقع جغرافي مختلف لنفس النمط الجيني وأيضًا تجميع العترات المختلفة جينيا من نفس الموقع الجغرافي إلى أنماط وراثية مختلفة.

2-6 : التوصيات Recommendation

1. اجراء دراسات مشابهة على أنواع أخرى من الجراثيم التي تصيب الأسماك وتنتقل الى المستهلك عن طريق تلوث الأسماك بها ومن ثم تؤدي الى حدوث ما يسمى بالأمراض المنقولة بالغذاء Foodborn disease .
2. التأكيد على الاستخدام الصحيح وغير العشوائي للمضادات الحيوية مع مراعاة التعرف على انواع الجراثيم المقاومة لهذه المضادات الحيوية.
3. العمل على تطبيق برامج سلامة الاغذية واجراءات الصحة العامة في مؤسسات صناعة الاغذية وذلك لضمان انتاج غذاء صحي خالي من مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق الغذاء للمستهلك لأن سلامة المستهلك من سلامة الغذاء.
4. توعية العاملين في المجازر والمستشفيات والمصانع بعدم رمي مخلفات المجازر و مياه الصرف الصحي والفضلات السامة للمصانع الى مياه الانهار وذلك لمنع تلوث البيئة المائية للأسماك والتي بدورها تؤدي الى تلوث الأسماك بالمعادن الصناعية الناتجة من مخلفات المصانع التي يلقى بها في المياه الجارية .
5. توعية بائعي الأسماك الى استخدام معايير النظافة اثناء التعامل مع لحوم الأسماك من خلال تنظيف الأسماك وتخزينها لحين وصولها ألى الأسواق ومنها الى المستهلك .
6. تعقيم المعدات المستخدمة في صيد وتنظيف وازالة احشاء لحوم الأسماك وذلك لمنع حدوث تلوث لحوم الأسماك مما يقلل من حدوث خطر على الصحة العامة للمستهلك وحدوث التسمم الغذائي للمستهلكين .
7. التأكيد على اتباع الاجراءات الصحية والادارة الجيدة المتبعة في نظم تربية الأسماك في المزارع السمكية لتقليل حدوث التلوث وانتاج أسماك صحية .

المصادر

References

Abowei, J., Briyai, O. (2011). A review of some bacteria diseases in Africa culture fisheries. Asian Journal of Medical Sciences, 3, 206-217.

Abraha, B. H. Admassu, A. Mahmud, N. Tsighe, X.W. Shui, and Y. Fang. (2018). Effect of processing methods on nutritional and physico-chemical composition of fish: a review", MOJ Food Processing & Technology, 6(4), 376–382.

Adebayo-Tayo AC, Odu NN, Michael MU, Okonko IO (2012). Multi-drug resistant (MDR) organisms isolated from sea-foods in Uyo, South-Southern Nigeria. Nature and Sci, 10, 61-70.

Ahmed, N., Ward, JD., Thompson, S., Saint, CP., Diana, JS. (2018). Blue-green water nexus in aquaculture for resilience to climate change. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture, 26, 139–154.

Ali, J; Rafq, Q. A. and Ratcliffe, E. (2018). Antimicrobial Resistance Mechanisms and Potential Synthetic Treatments. Future Sci, 4(4),1-6 .

Al-Shiblawi, S. A. (2014). The Fish farming in Kerbala province. Ahl Al-Bait Jurnal, 1(20).

Anderson, N.W, Tarr, P.I .(2018). Multiplex Nucleic Acid Amplification Testing to Diagnose Gut Infections: Challenges, Opportunities, and Result Interpretation. Gastroenterol Clin North Am, 47(4), 793-812. .

Anonymous,(2015) OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. World Organisation for Animal Health (OIE).

Argudín, M.A.; Butaye, P.(2016). Dissemination of metal resistance genes among animal methicillin-resistant coagulase-negative *staphylococci*. Res. Vet. Sci., 105, 192–194.

Ariño, A., Beltrán, J.A., Herrera, A., Roncalés, P. (2013): Fish and seafood: Nutritional Value-Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition), 254-261.

Armstrong, G.L., Hollingsworth, J. and Morris, J.G. (1996) Emergingfood borne pathogens:Escherichia coliO157:H7 as a model of entryof new pathogen into the food supply of the developed world.Epidemiological Reviews18, 29-50.

Austin ,B., Austin ,D. A., (1999). Bacterial fish pathogens, in Disease of Farmed and Wild Fish. Springer-Praxis, Chichester , p. 155.

Ayoola, A. A. (2010). Replacement of fishmeal with alternative source of proteins in aquaculture diets . MSC. Thesis, Submitted to the North Carolina State University Graduate School, Raleigh, North Carolina, United States, 129.

Ayulo, A.,M., Machado R.A., Scussel V.M. (1994) Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. Int. J. Food Microbiol, 24, 171–178.

Azza, H.,M., Hassan., Noor- El Deen, A.E.,Galal, H.M., Sohad, M., Dorgham, B. M.A., Hakim, A.S. (2012).Further Characterization of *Enterobacteriaceae* isolated from cultured freshwater fish in Kafr El Shiek Governorate: Clinical, biochemical and histopathological study with emphasis on treatment trials. Global Vet.9 (5), 617-662.

Bai, X., & Xiong, Y.(2018). Escherichia coli O157: H7. In Food Safety (pp. 111-140). Apple Academic Press.

Bakhshi B, Afshari N, Fallah F. (2018). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) analysis as reliable evidence for suspected *Shigella* spp. outbreaks. Brazilian J Microbiol, 49(3), 529-533.

Basak, S.; Singh, P. and Rajurkar, M. (2016). Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. Journal of Pathogens . 1-5.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, I. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., 45, 493-496.

Belton B. & Thilsted S.H. (2014). Fisheries in transition: food and nutrition security implications for the global South. Global Food Sec., 3 (1), 59–66.

Bener, A.; Al-Ali, M. and Hoffmann, G. F. (2009). Vitamin D Deficiency in Healthy Children in a Sunny Country: Associated Factors. International Journal of Food Sciences, 60, S5, 60-70.

Berendonk, T. U. , Manaia, C. M. , Merlin, C. , Fatta Kassinos, D. , Cytryn, E. , Walsh, F. , Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. Nature Reviews Microbiology, 13, 310–317. 10.1038/nrmicro34.

Bettelheim, K.A. (1996) *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* areview.International Journal of Food Hygiene7, 5-9.

Bilinski P., Kapka-Skrzypczak L., Posobkiewicz M., Bondaryk M., Holownia P., Wojtyla A (2012). Public health hazards in Poland posed by foodstuffs contaminated with *E. coli* O104:H4 bacterium from the recent European outbreak. Ann. Agric. Environ. Med., 19, 3–10.

Bintsis T.(2017) Foodborne pathogens. AIMS Microbiology.;3(3):529-563.

Bogard J.R. (2017). The contribution of fish to nutrition and food security: informing the evidence base for agricultural policy in Bangladesh. PhD thesis, University of Queensland, Brisbane, Australia.

Bridier, A., Sanchez-Vizuete, P., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naitali, M. and Briandet, R. (2015) Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. Food Microbiol, 45, 167-178.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's .(2013). Medical Microbiology. 26th ed. New York; Chicago: McGraw Hill Education.

Brown, A. E. and Smith, H. R. (2017). Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology. 14th ed. McGraw-Hill Higher Education. New York. 438pp.

Buchanan R.L., Gorris L.G.M., Hayman M.M., Jackson T.C. & Whitinge R.C. (2017). A review of Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control, 75, 1–13.

Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. (2010). Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. Int J Food Microbiol, 142, 318-29.

Burrus, R. G., Hogsette, J. A., Kaufman, P. E., Maruniak, J. E., Simonne, A. H., & Mai, V. (2017). Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 from house flies (Diptera: Muscidae) and dairy samples in North Central Florida. Journal of Medical Entomology, 54(3), 733–741.

Butaye, P.; Argudín, M.A.; Threlfall, J. Introduction to antimicrobial-resistant foodborne pathogens. (2015). In Antimicrobial Resistance and Food Safety:

Methods and Techniques, 1st ed.; Chen, C.Y., Yan, X., Jackson, C.R., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1–18.

Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: A challenge for the food industry. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53(1), 11– 48.

Cardozo, M. V., Borges, C. A., Beraldo, L. G., Maluta, R. P., Pollo, A. S., Borzi, M. M., & ´Avila, F. A. D. (2018). Shigatoxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in fish for human consumption. Brazilian Journal of Microbiology, 49(4), 936–941.

Chansiripornchai N, Ramasoota P, Sasipreyajan J,Svenson SB.(2001) Differentiation of avian *Escherichia coli* (APEC) isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Vet Microbiol, 80, 75-83.

Costa R. A.(2013). *Escherichia coli* in seafood: A brief overview. Advances Bioscience, Biotechnology, 4(03), 450.

Coura, F. M., Diniz, S. D. A., Silva, M. X., Oliveira, C. H. S. D., Mussi, J. M. S., Oliveira, C. S. F. D., & Heinemann, M. B. (2019). Virulence factors and phylotyping of *Escherichia coli* isolated from non-diarrheic and diarrheic water buffalo calves. Ciência Rural, 49(5).

Croci, L. and Suffredini, E. (2003). Rischio microbiolo- gico associato al consumo di prodotti ittici. Annali dell' Istituto Superiore di Sanità, 39, 35-45.

Crumlish, M. (2015). Aquaculture and food security', Marine Oils (From Sea to Pharmaceuticals), pp. 71–82.

Dalla-Costa LM, Irino K, Rodrigues J, Rivera ING,Trabulsi LR.(1998). Characterisation of diarrheagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. J Med Microbiol, 47, 227-234.

Desmarchelier, P.M., Bilge, S.S., Fegan, N., Mills, L., Vary, J.C. Jrand Tarr, P.I. (1998) A PCR speci Æc for Escherichia coliO157 based on the rfb locus encoding O157 lipopolysaccharide. . Journal of Clinical Microbiology36, 1801-1804.

Dutta, C., Saha, D., Panigrahi, A. K. and Sengupta, C. (2010). The occurrence of Escherichia coli in fish samples isolated from different ponds of Nadia District, West Bengal, India. Internet Journal of Food Safety, Vol.12, 2010, p.181-186.

Elsaidy, N., Abouelenien, F., Kirrella, G.A.K.,(2015). Impact of using raw or fermented manure as fish feed on microbial quality of water and fish. Egypt. J. Aqua. Res, 41, 93–100.

Elsherief, M. F., Mousa, M.M.,Abd El-Galil, H., El-Bahy, E.F.,(2014). *Enterobacteriaceae* associated with farm fish and retailed ones. Alex. J. Vet. Sci., 42, 99-104.

Engelkirk, P. and Duben-Engelkirk, J. (2015). Burtons Microbiology for the Health Sciences. 10th ed., Philadelphia, New York, 40-140.

Erkmen O. In: Erkmen O, editor. (2013) Microbiology of Food. 3rd ed. Ankara: Efil Press, 550 p.

Ewart JW. (2013). Shellfish Aquaculture in Delaware's Inland Bays: Status, Opportunities, and Constraints.In Delaware Sea Grant Program, p 43.

EZE, E. I., ECHEZONA, B. C. and UZODINMA, E. C. (2011). Isolation and identification of pathogenic bacteria associated with frozen mackerel fish

(Scomberscombrus) in a humid tropical environment. African Journal of Agricultural Research, 6(7), 1918-1922.

Faber, T.A., Hernot, D.C., Parsons, C.M., Swanson, K.S., Smiley, S., Bechtel, P.J. and Fahey Jr., G.C.(2010). Pro-tein digestibility evaluations of meat and fish substrates using laboratory, avian, and ileal cannulated dog assays. Journal of Animal Science, 88, 1421-1432.

Fadel, H. M., Afifi, R., & Al-Qabili, D. M. (2017). Characterization and zoonotic impact of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in some wild bird species. Veterinary World, 10 (9), 1118.

FAO, (Food and Agriculture Organization of the United Nation). (2010). Quality and changes in fresh fish. FAO Fisheries and Agriculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome, Italy, 72-169.

FAO. Drivers, (2016) . Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production.

Fatma, A.G.,El-Gohary, A.H., El-Bably, M.A., and Mohamed, A.A.,(2012). In-vitro antibiotic sensitivity of isolated strains of *Salmonella* and *E. coli* from poultry farms. 7th Int., Sci. Conf., Mansoura. 28-30.

FDA (U.S. Food and Drug Administration). (2012). Fresh and Frozen Seafood, Selecting and Serving it Safely. 14-18.

FDA. (2015) Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food Producing Animals.. Available online..

Feng P, Weagant S, Grant M.(2002) “Enumeration of Escherichia coli and the Coliform bacteria”, Bacteriological Analytical Manual, (8t ed.), FAD/Center for Food Safety & Applied Nutrition.

Fernandes P.G. & Cook R.M. (2013). Reversal of fish stock decline in the northeast Atlantic. Curr. Biol., 23 (15), 1432–1437.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2002). The State of world fisheries and aquaculture. Rome, Italy.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2009). Report of the global conferrnce on small –scale fisheries . Thailand, 13-17 October 2008. Rome: 190.

Food and Agriculture Organization (FAO).(2010). The State of world fisheries and aquaculture 2010. Word review of fisheries and aquaculture (part1).

Fox, J. T. D. U. Thomson, J. S. Drouillard et al., (2009) "Efficacy of *Escherichia coli* O157:H7 siderophore receptor/porin proteins-based vaccine in feedlot cattle naturally shedding *E. coli* O157," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 6, no. 7, pp. 893–899.

Froehlich H.E., Gentry R.R., Rust M.B., Grimm D. & Halpern B.S. (2017). Public perceptions of aquaculture: evaluating spatiotemporal patterns of sentiment around the world. PLoS ONE, 12 (1), e0169281.

Fry J.P., Mailloux N.A., Love D.C., Milli M.C. & Cao L. (2018). Corrigendum: Feed conversion efficiency in aquaculture: do we measure it correctly? Environ. Res. Lett., 13 (7), 079502.

Fujioka M, Otomo Y. Ahsan CR (2013).A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. J Microbial Methods., 92(3), 289-92.

Gastalho S, Silva GJ, Ramos F.(2014). Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública. Acta Farm Port., 3(1),29–45.

Gerokomou, V., Voidarou, C., Vatopoulos, A., Velonakis, E., Rozos, G., Alexopoulos, A., Plessas, S., Stavropoulou, E., Bezirtzoglou, E., Demertzis, P.G. and Akrida-De- mertzi, K. (2011). Physical, chemical and microbiological quality of ice used to cool drinks and foods in Greece and its public health implications. Anaerobe, 17, 351-353.

Ghaly, A.E, Dave, D., Budge, S., Brooks, M.S., (2010). Fish spoilage mechaism and preservation techniques review Am. J. Applied Sci., 7(7), 859-877.

Giguère, S., (2013). Antimicrobial Drug Action and Interaction: An Introduction, in: Giguère, S., Prescott, J.F., Dowling, P.M. (Eds.), Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, pp. 3–10.

Gopakumar, G. (2009). History of cage culture, cage culture operations, advantages and disadvantages of cages and current global status of cage farming. National Training on 'Cage Culture of Seabass' held at CMFRI, Kochi.

Grafton R.Q., Daugbjerg C. & Qureshi M.E. (2015). Towards food security by 2050. Food Security, 7 (2), 179–183

Greenwood, D. (Ed.). (2012). Medical Microbiology, With studentconsul online access, 18: Medical Microbiology. Elsevier Health Sciences.

Guenther S, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Wieler LH, Schaufler K. (2017). Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. J Antimicrob Chemother, 72,1310–1313.

Guérin, T., Chekri, R., Vastel, C., Sirot, V., Volatier, J. L. and Leblanc, J. C. (2011). Determination of 20 trace elements in fish and other seafood from the French market. Food Chemistry. 6: 174–249. NewYork: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 10.1016/j.foodchem.2011.01.061.

Guimarães Ade S, Dorneles EM, Andrade GI, Lage AP, Miyoshi A et al.(2011) Molecular characterization of Corynebacterium pseudotuberculosis isolates using ERIC-PCR. Vet Microbiol 153(3-4), 299-30.

Gupta, B., Ghatak, S., Gill, J.P.S. (2013). Incidence and virulence properties of *E. coli* isolated from fresh fish and ready-to-eat fish products. Vet. World 6(1), 5-9.

Guzmán M.C., Bistoni M.A., Tamagnini L.M. (2004). Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. *Water Res*., 38, 2368–2374.

Haile A B and Getahun T K. (2018). Isolation and identification *of Escherichia coli* and Edwardsiella tarda from fish harvested for human consumption from Zeway Lake, Ethiopia. African Journal of Microbiology Research, 12(20), 476-80.

Harvey, R. ; Cornelissen, C. and Fisher, B. (2013). Lippincott's illustrated reviews : Microbiology. 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, 111-115.

Health Protection Agency (HPA). (2009). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods. London: HPA.

Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V (2015) GelJ - a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. BMC Bioinfor, 16(1), 1-8.

Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences(1991).a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Mol Microbiol, 825-834.

Huss, H. H., L. Ababouch, and L. Gram. (2003). Assessment and management of seafood safety and quality. FAO Fisheries technical paper 444. FAO, Rome.

Hussein, M.A.; Merwad, A.M.A.; Elabbasy, M.T.; Suelam, I.I.A.; Abdelwahab, A.M.; Taha, M.A. (2019). Prevalence of *enterotoxigenic Staphylococcus aureus* and Shiga toxin producing *Escherichia coli* in fish in Egypt: Quality parameters and public health hazard. Vector-Borne Zoonotic Dis. , 19, 255–264.

Ibrahim, M., Ahmad, F., Yaqub, B., Ramzan, A., Imran, A., Afzaal, M., Akram, Q. (2020). Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture. In M. Z. Hashmi (Ed.) , Antibiotics and antimicrobial resistance genes in the environment (pp. 39– 69). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier.

Ishii, S. and Sadowsky, M.J. (2008). *Escherichia coli* in the environmental: Implications for water quality and human health. Microbes and Environments, 23, 101-108. doi:10.1264/jsme2.23.101.

Jawad, L. A.(2012). History of the Study of the Fish Fauna of Iraq. Water Research and Management, 2(3), 11-20.

Jerome, JP, Bell JA, Plovanich-Jones AE, Barrick JE (2011) Standing genetic variation in contingency loci drives the rapid adaptation of Campylobacter jejuni to a novel host. PLoS One 6(1), 1-11.

Johnson JR, Russo TA.(2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli. Int J Med Microbiol 295, 383–404.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL(2004) . Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol., 2(2), 123–140.

Kaper, J. B., & O'BRIEN, A. D. (2014). Overview and historical perspectives. Microbiology spectrum, 2(2). doi: 10.1128/microbiolspec. EHEC-0028-2014.

Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A., (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology, 33(3), pp. 300-305.

Karch, H., Tarr, P. I., and Bielaszewska, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. Int. J. Med. Microbiol, 295, 405–418.

Karim Kadri. (2019). Polymerase Chain reaction (PCR): Principle and Applications.

Kashef N, Djavid GE, Shahbazi S. (2010). Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran, Iran. J Infect Dev Ctries., 4(4), 202–206.

Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD et al. (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature, 468, 647-652.

Khan, M. U.; Malik, R. N. and Muhammad, S. (2013). Human health risk from heavy metal via food crops consumption with wastewater irrigation practices in Pakistan. Chemosphere, 93, 2230–2238.

Kim, E. J., Chang, H. J., Kwak, S., & Park, J. H.(2016). Virulence factors and stability of coliphages specific to Escherichia coli O157: H7 and to Various E. coli infection. J. Microbiol. Biotechnol, 26(12), 2060-2065.

Kim, H.W., Hong, Y.J., Jo, J.I., Ha, S.D., Kim, S.H., Lee, H.J. and Rhee M.S. (2017). Raw ready-to-eat seafood safety: microbiological quality of the

various seafood species available in fishery, hyper and online markets. Lett. Appl. Microbiol., 64, 27-34.

Kim, J.S., Lee, M.S. and Kim, J.H.(2020). Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10: 273.

Klümper, N., Syring, I., Offermann, A., Shaikhibrahim, Z., Vogel, W., Müller, S. C., & Brägelmann, J. (2015). Differential expression of Mediator complex subunit MED15 in testicular germ cell tumors. Diagnostic pathology, 10(1), 165.

Köhler CD, Dobrindt U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli? Int J Med Microbiol, 301, 642–647.

Korbie, DJ., Mattick JS. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nature Protocols., 3(9), 1452-1456.

Kumar, S. H., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I.(2001). Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. Letters in Applied Microbiology, 33(5), 334–338.

Laird, E. D.(2016). Characterization of Antibiotic Resistance Profiles of Surface Water Bacteria in an Urbanizing Watershed. Msc. Thesis. Texas A and M Universit, 59 PP.

Lambie ,N.,Negleka, M., Brown ,G., and Ryan, J. (2000). study on E.coli infections and antibiotic resistance of isolates in trinida.Bact Dis., 44(1), 155-160.

Lilly, T.T. J.K. Immaculate, and P. Jamila, (2017). Macro and micronutrients of selected marine fishes in Tuticorin", South East coast of India,. Journal homepage.

Lokollo, E., and Mailoa, M N. (2020). Teknik penanganan dan cemaran mikroba pada ikan layang segar di pasar tradisional Kota Ambon. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia., 21(3), 103-11.

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

Manage, D. P., Lauzon, J., Jones, C. M., Ward, P. J., Pilarski, L. M., Pilarski, P. M., & McMullen, L. M.(2019). Detection of pathogenic *Escherichia coli* on potentially contaminated beef carcasses using cassette PCR and conventional PCR. BMC microbiology, 19(1), 175.

Manage, P.M., (2018). Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences, 23(1), pp.13–27.

Martini, R. and C. lindberg (2013). Fishing for Tomorrow: Managing fisheries for sustainable development Organization for Economic Co-operation and Development, (2), 12.

Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF (2003). Evaluation of genotyping large numbers of Escherichia coli isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. J Clin Microbiol., 41(11), 5224–6.

Meng, J., LeJeune, J. T., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In Food Microbiology (pp. 287-309). American Society of Microbiology.

Michael GB, Freitag C, Wendlandt S, Eidam C, Feßler AT, Lopes GV, Kadlec K, Schwarz S. (2015). Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. Future Microbiol, 10, 427–443.

Mizan, F.R., Jahid, I.K. and Ha, S.D.(2015) Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. Food Microbiol., 49, 41-55.

Mohanty, B.P. (2015). Nutritional value of food fish", (September).

Mohawk, K and O'Brien, A. (2011). Mouse Models of *Escherichia coli* O157:H7 Infection and Shiga Toxin Injection. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011: 17.

Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. (2013) Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob., 12(8).

Mooljuntee, S., Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. (2010). Prevalence of the cellular and molecular antimicrobial resistance against *E. coli* isolated from Thai broilers. Thai J. Vet. Med. 40, 311–315.

Mouritsen O.G. & Styrbaek K. (2018). Cephalopod gastronomy – a promise for the future. Front. Commun., 3, 38.

Moxley, R. A. D. R. Smith, M. Luebbe, G. E. Erickson, T. J. Klopfenstein, and D. Rogan,(2009) "*Escherichia coli* O157:H7 vaccine dose-effect in feedlot cattle," Foodborne Pathogens and Disease, vol. 6, no. 7, pp. 879–884.

Moyo S J, Matee MI ,Largeland N, MYLvaganam H. (2007) .Identification of diarrheagenic Escherichia coli isolated from infant and children in Dares Sallaam, Tanzania. BMC inect Dis, 7:92 .

Murugan, S., Jayanthi, P.U., Devi and P.N. John., (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended spectrum β-lactamases producing Escherichia coli in diabetic foot infection. Res. J. Microbiol. 6, 609-617.

Nataro, J.P. & Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews 11, 142 201.

O'Neill, J.(2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance; HM Government and the Wellcome Trust: London, UK,. Available online.

Onurlubaş E, Gürler AZ (2016). The factors affecting level of consumers about food safety. Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University;33(1):132-141.

Parsons, B. D., Zelyas, N., Berenger, B. M., & Chui, L. (2016). Detection, characterization, and typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Frontiers in microbiology, 7, 478..

Paton J.C., Paton A.W. (1998): Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing Escherichia coli infections. Clinical Microbiology Reviews, 11, 450–479.

PCR Optimization: Reaction Conditions and Components. Applied Biosystems. (2017).

Petronillah R, Robert K, John V, Nyoni S(2013). Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria in Edible Fish: A Case Study of Fletcher Dam in Gweru, ZimbabweInt. Journal of Scientific Research India, 2, 269-273.

poirel, L.; jayol, A.; nordmann, P. (2010) . Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clinical Microbiology Washington, 23(1), 35-73.

Poole TL. In: Simjee S, editor. (2007). Foodborne Diseases. 1st ed. Totowa, New Jersey: Humana Press;. 535 p.

Pradhan, S., Pellino, C., Macmaster, K., Coyle, D. and Weiss, A.A. (2016) Shiga toxin mediated neurologic changes in murine model of disease. Front. Cell. Infect. Microbiol. 6, 114.

Prakasan, S., Prabhakar, P., Lekshmi, M., Kumar, S. and Nayak, B. B.(2018). Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring variant Shiga toxin genes from seafood. Vet. World. 11: 379-385.

Prescott L. M., Harley J. P. and Klein D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw-Hill Companies, Inc. New York, 492, 946-949.

Quinn P. J., Carter M. E., MarkeyB. and Carter G. R.(2004). Clinical Veterinary Microbiology. 6th ed. Mosby. London. pp: 42-61, 209, 226-234, 345- 352.

Rangel, J. M. P. H. Sparling, C. Crowe, P. M. Griffin, and D. L. Swerdlow. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002," *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), 603–609.

Ranjbar R, Naghoni A, Yousefi S, Ahmadi A, Jonaidi N, Panahi Y. (2013). The study of genetic relationship among third generation cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* strains by ERIC-PCR. Open Microbiol J, 7, 142.

Ray B. (2005). Fundamental food microbiology, 3rd edition,Boca Raton London, New York, Washington D.C.

Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R. et al. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New England Journal of Medicine 308, 681-685.

Robinson, T.P.; Bu, D.P.; Carrique-Mas, J.; Fèvre, E.M.; Gilbert, M.; Grace, D.; Hay, S.I.; Jiwakanon, J.; Kakkar, M.; Kariuki, S.; et al. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 110, 377–380.

Rombough, P. (2007). The functional ontogeny of the teleost gill: which comes first, gas or ion exchange?. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 148(4), 732-742.

Rosa, De F.G.; Corcione, S.; Pagani, N.; Di Perri, G. (2015). From ESKAPE to ESCAPE, from KPC to CCC. Clin. Infect. Dis., 60, 1289–1290.

Ryu, S.H., Park, S.G., Choi, S.M., Hwang, Y.O., Ham, H.J., Kim, S.U., Lee, Y.K., Kim, M.S., Park, G.Y., Kim, K.S. and Chae, Y.Z. 2012 Antimicrobial resistance and resistance genes in Escherichia coli strains isolated from commercial fish and seafood. International Journal of Food Microbiology, 152, 14-18.

Sakr ,S., kh, Riyad., Salah, M.I. (2015) . Antibiotic Resistancce and Virulance Genes of *E.coli* isolated from fresh Nile Tilapia (Oreochromis Niloticus)in EL-Behera Governorate, Egypt. Alex. J. Vet. Sci. 2016 Jan., 48 (2), 83-90.

Saleh, M.A. (2010). Fish Diseases. General Authority for Fisheries Development, Egypt, Bulletin.

Sallam, K, (2007). Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. Food Chemistry, 2, 592- 600.

Samadpour, M., Ongerth, J.E., Liston, J. et al. (1994) Occurrence ofshiga-like toxin-producingEscherichia coliin retail fresh seafood,beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle,Washington.AppliedandEnvironmentalMicrobiology60,1038

Santos, C.A.M.L. and Vieira, R.H.S.F. (2013). Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 55, 219–228.

Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H.,& Strockbine, N. A. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. Journal of clinical microbiology, 50(9), 2951-2963.

Sellyei B, Bányai K, Bartha D, Hajtós I (2017). Multilocus sequencing of Corynebacterium pseudotuberculosis biotype ovis strains. BioMed Res Intern, 7, 1-7

Seydi, A.(2017). Risk factors and hygiene importance in food safety. Journal of Tourism Gastronomy Studies., 310-321.

Shah, N. J. (2019). Polymerase chain reaction. In Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology, pp. 395-397.

Sharples GJ, Lloyd RG (1990). A novel repeated sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes.Nucleic Acids Res, 6503-6508.

Shepon A., Eshel G., Noor E. & Milo R. (2016). Energy and protein feed-to-food conversion efficiencies in the US and potential food security gains from dietary changes. Environ. Res. Lett., 11 (10), 105002.

Société Française de Microbiologie. (2015). Determination de la sensibilité aux antibiotiques. CASFM/EUCAST, Société Française de Microbiologie Ed, 7-15.

Soliman, M. K., Khalil, R. H., Saad, T. T., El-Gamal M. H. L. and Gebril, A. E. (2010). Isolation and Identification of *E. coli* from Cultured Freshwater Fish. Journal of the Arabian Aquaculture Society, 5(1), 19-34.

Soltani M, Peighambari SM, AskariBadouei M, Sadrzadeh A.(2012). Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). Iran J Vet Med, 6(3), 143-8.

Stephan, R., and Hoelzle, L. E.(2000). Characterization of Shiga toxin type 2 variant B-subunit in Escherichia coli strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP. Lett. Appl. Microbiol. 31, 139–142.

Sujatha, K. P. Senthilkumar, S. Sangeetha, M.D. (2011). Gopalakrishna Isolation of human pathogeneic bacteria in two edible fishes, Priacanthus hamrur and Megalapsis cordyla at Royapuram waters in Chennai Ind. J. Sci. Technol., 4 , 539-541 .

Suojala, L. Kaartinen L, Pyörälä S. (2013). Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis: an evidence-based approach. J Vet Pharmacol Ther, 36, 521–531.

Taha, Z.M (2021) Genetic diversity and clonal relatedness of Aeromonas hydrophila strains isolated from Hemorrhagic septicemia's cases in common Carp (Cyprinus carpio) farms. Iraq J Vet Sci, 35(4), 643-648.

Thakur P, Chawla R, Goel R, Arora R, Sharma RK. (2013). In silico modeling for Identification of promising antimicrobials of Herbal origin against highly 71 virulent pathogenic strains of bacteria like New Delhi Metallo-beta-lactamase-1 Escherichia coli. Int J Innov Appl Stud, 4(3), 582-92.

Thanner, S.; Drissner, D.; Walsh, F. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. mBio, 7.

Thilsted S.H., Thorne-Lyman A., Webb P., Bogard J.R., Subasinghe R., Phillips M.J. & Allison E.H. (2016). Sustaining healthy diets: the role of capture fisheries and aquaculture for improving nutrition in the post-2015 era. Food Policy, 61, 126–131.

Tille, P. (2014). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13th ed. , Mosby: 210-230.

Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. (2009) Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths. PLoS Genet.;5(1) .

United Nations Food and Agriculture Organization. UNFAO.(2013). FOCUS. Fisheries and food security. Sustainable aquaculture development.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. Nucleic Acids Res, 19(24), 6823-6831.

Vogeleer, P.Y.D. Tremblay, A.A. Mafu, M. Jacques, J.(2014) Harel Life on the outside role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing Escherichia coli Front. Microbiol., 5 , p. 317.

Wang L, Nakamura H, Kage-Nakadai E, Hara-Kudo Y, Nishikawa Y.(2017). Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic Escherichia coli isolated from different retail foods. Int J Food Microbiol., 249, 44-52.

Wilson LA, Sharp PM. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. Mol Biol Evol, 23(6),1156-68.

Woolhouse, M.; Ward, M.; van Bunnik, B.; Farrar, J. (2015) Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Philos Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. , 370, 20140083.

World Fish (2016). Why gender equality matters in fisheries and aquaculture. In WorldFish report. WorldFish, Penang, Malaysia.

World Health Organization (WHO). (2017) . Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 5th ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland,; ISBN 978-92-4-151222-0.

Yagoub, S.(2009). Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. From raw fish sold in fish market in Khartoum state. African Journal of. Bacteriology Research 7, 85.

Yazdankhah, S., Rudi, K., Bernhoft, A. (2014) . Zinc and copper in animal feed—Development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. Microb. Ecol. Health Dis,

Yismaw G, Abay S, Asrat D, Yifru S, Kassu A. (2010) . Bacteriological profile and resistant patterns of clinical isolates from pediatric patients, Gondar University Teaching Hospital, Gondar Northwest Ethiopia. Ethiop Med J., 48(4), 293–300.

Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A., & Arockiaraj, J. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: Factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. Reviews in Aquaculture, 12(3), 1903– 1927.

Zhang, S, Wu Q, Zhang J, Lai Z. (2016) Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* in retail ready-to-eat foods in China. Food Control., 68, 236-43.

Abstract

Escherichia coli bacteria cause many diseases transmitted through food to the consumer, especially food poisoning due to contamination of food products including fish and seafood. The aim of this study was to isolate *Escherichia coli* from fish available in local markets and fish farms in the Mosul city using modern methods. One Hundred fifty three fish samples were collected for the period between 1 Nov 2021 to 30 Jan 2022, including 75 fish samples from fish farms and 78 fish samples from local markets. The samples were placed in cool box and transferred to the laboratory of the Department of Veterinary Public Health / College of Veterinary Medicine / University of Mosul . Conventional methods and biochemical tests were performed on them, as well as molecular tests using polymerase chain reaction (PCR) technique to confirme the presence of *UidA* gene in the *Escherichia coli*. In addition the detection of bacteria-specific virulence factors responsible for the production of toxins and that cause food poisoning, including *Stx1* and *Stx2* genes. The source of contamination was determined based on the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) analysis of intestinal bacteria. An antibiotic sensitivity test was also conducted to determine the sensitivity of the bacteria to the antibiotics used in the study.

The results of the study showed that the number of samples that gave a positive result for *E. coli* bacteria in local market was 28 samples 35.9%, while the number of fish that gave a positive result for *E. coli* bacteria in farmed fish was 18 positive samples 24%. As for the number of isolates that showed a positive result for *E. coli* with serotype O157:H7 in the traditional isolate from local market fish samples, it was 11 isolates 39.2%, while the isolates from farmed fish were 7 isolates 38.9%. Molecular characterization of the bacterium was carried out using PCR technique, where the results of the study showed that all isolates of *E. coli* that were isolated from fish samples, whether from local

markets or from fish farms, were positive and possessed, *uidA* gene with a molecular weight of 623 base pairs.

The results of our study investigating the presence of bacteria-specific virulence genes responsible for the production of toxins using the polymerase chain reaction pathogenic *E. coli* was isolated from farmed fish samples 16 isolates possessed the *Stx1* gene at a rate of 88.9%, while the isolates from the local market fish samples were 25 isolates possessed the *Stx1* gene at a rate of 89.3%, with a molecular weight of 347 base pairs. Further more the results of our study showed that 13 *E. coli* isolates from the farmed fish samples were posscssed *Stx2*gene with a percentage of 72.2%, while the 24 isolates of local market fish samples were possessed *Stx2* gene with a rate of 85.7%, molecular weight of 589 base pairs .

The relationship between isolation and deographical location was determined based on the ERIC-PCR fingerprint analysis between the genes in each isolates. The results showed that there are a similarity between the isolates and they ranged between 51-100 %. The strains were divided into 7 genotypes based on the 90% similarity limit (from 1 to 7), with high relationship between strain being the most prevalent within genotype1. Genotype 1 was the largest group containing 4 strain. Two strains were then grouped into genotypes 3 and 5. In contrast, genotype 2, 4, 6 and 7 included only one strain and with respect to genetic differences at the site,tenout of 12 isolate showed diversity. 83.3% diversity geographical locations as evidenced by the collection of genetically different strains from a different geographical location for the same genotype and also the collection of genetically different strains from the same geographical location into different genotypes.

The results showed a varity in the resistance and sensitivity of the *E. coli* to the antibiotics used in the study, where the highest percentage of sensitivity of *E. coli* to the antibiotic Ciprofloxacin, Trimethoprim and Gentamycin were

96%, 94%, 86%, respectively, while the highest percentage of resistance of *E.coli* was to the antibiotic Cephalothin , Tetracycline and Amoxicillin were 100%, 64% and 62%, respectively.

Prevalence, Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Escherichia Coli* in fish farms and local markets in Mosul city

A Thesis Submitted

By

Noor Abdul-Jabbar Younis Al-Taie

To

The council of the College of Veterinary Medicine

University of Mosul

In

Partial of Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science

In

Veterinary Public Health

Supervised by

Professor Dr. Raad Abdulghany Basheer Alsanjary

2023 A.D. **1444 A.H**

University of Mosul

College of Veterinary Medicine

Prevalence, antimicrobial resistance and molecular characterization of *Escherichia coli* in fish farms and local markets in Mosul city

Noor Abdul-Jabbar Younis Al-Taie

M.Sc. Thesis

Veterinary Public Health

Supervised by

Professor

Dr. Raad Abdulghany Basheer Alsanjary

2023 A.D **1444 A.H.**