



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى – كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Campylobacter spp* المعزولة محلياً

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

الاحياء المجهرية

من قبل الطالبة

نور منعم فاضل الشمري

بإشراف

أ. د. عدنان نعمة عبد الرضا

2017 م

1438 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَإِنْ لَكُمْ فِي الْأَنْعَامِ لَعِبْرَةٌ نُسْقِيكُمْ مِمَّا فِي
بُطُونِهِ مِنْ بَيْنِ فَرْثٍ وَدَمٍ لَبَّأً خَالِصًا سَائِغًا لِلشَّارِبِينَ﴾

صدق الله العظيم

(سورة النحل - الآية 65 - 66)

إقرار المشرف

أشهد أن أعداد هذه الرسالة الموسومة (دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Campylobacter spp* المعزولة محلياً) التي قدمتها طالبة ماجستير (نور منعم فاضل الشمري) . قد جرى تحت اشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية .

التوقيع:

المشرف : أ.د.عدنان نعمة عبد الرضا

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

التاريخ : / / 2017 م

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

أ. م . د. عمار احمد سلطان

رئيس لجنة الدراسات العليا – رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2017 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Campylobacter* spp المعزولة محليا) التي قدمتها طالبة الماجستير (نور منعم فاضل الشمري) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم : أ.م.د. هادي رحمن رشيد

اللقب العلمي : أستاذ مساعد دكتور

التاريخ : / / 2017م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Campylobacter spp* المعزولة محلياً) التي قدمتها طالبة ماجستير (نور منعم فاضل الشمري) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع :

الاسم : م.د. زينب محمد صالح

اللقب العلمي : مدرس دكتور

التاريخ : / / 2017م

إقرار لجنة المناقشة على رسالة

نشهد ونؤيد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل شهادة ماجستير علوم الحياة – الاحياء المجهرية .

لذا نوصي بقبول الرسالة

عضو اللجنة

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع :

التوقيع :

الاسم : أ.د. حميد مجيد جاسم

الاسم : أ.د. عباس عبود فرحان

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

التاريخ : / / 2017 م

التاريخ : / / 2017 م

عضو اللجنة (المشرف)

عضو اللجنة

التوقيع :

التوقيع :

الاسم : أ.د. عدنان نعمة عبد الرضا

الاسم : أ.د. ناظم غزال نعمان

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

التاريخ : / / 2017 م

التاريخ : / / 2017 م

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع:

الاسم : أ.م. د. غالب أدریس عطية

اللقب العلمي: أستاذ مساعد دكتور

التاريخ : / / 2017 م

الاهداء ...

- الى سيد الخلق ... نبينا محمد ﷺ .
- الى شهداء العراق على طول الزمن ...
- الى من أحمل اسمه بكل فخر ... والدي العزيز .
- الى ينبوع الصبر والأمل .. التي تتحملني دائماً بين يديها دعاء متصل الى.. السماء .. والدتي الغالية .
- الى من تذوقت معهم أجمل اللحظات و علموني علم الحياة .. أخواتي .
- الى من مهد الطريق أمامي للوصول الى العلم والمعرفة أساتذتي الأفاضل.
- الى كل من مد يد المساعدة لي ...
- أهدي ثمرة جهدي المتواضع .

نور منعم

شكر وتقدير

الهي لا يطيب النهار إلا بطاعتك .. ولا يطيب الليل ألا بشكرك .. ولا تطيب اللحظات إلا بذكرك .. ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك .. الله جل جلالك .. أشكرك وأحمدك حمداً كثيراً . وآخر دعونا ان الحمد لله رب العالمين والصلاة على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين. لا بد لي وأنا اشرف على انتهاء رسالتي أن اتقدم بأسمى آيات الشكر والامتنان والتقدير والمحبة لأصحاب المعروف ، فأني أتقدم بالشكر الجزيل لكل من ساهم في انجاح هذه الرسالة وأخص بالذكر استاذي ومشرفي الفاضل الدكتور عدنان نعمة عبد الرضا على قبوله الاشراف ، ومتابعته لعملتي منذ خطواته الاولى وعلى ما منحني اياه من نصح وإرشاد ساهم في اخراج هذا العمل بهذه الصورة . كما أتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالأستاذ المساعد (الدكتور غالب ادريس عطية) ، ورئاسة قسم علوم الحياة ومننسيه، لما قدموه لي من العون والمساعدة طيلة فترة الدراسة . وأتقدم بخالص الشكر الى من قدم لي المساعدات، والتسهيلات ،والافكار، والمعلومات، وأخص بالذكر كلاً من (الدكتور زياد السدرة) و(ادريس صالح جليل) . كذلك أتقدم بالشكر إلى كل من قدم لي العون والمساعدة زملائي طلبة الدراسات العليا وجميع المنتسبين في مختبر الأحياء المجهرية داعيةً من الله لهم بدوام النجاح والموفقية. واشكر جزيل الشكر منتسبي المختبرات في مستشفى البتول التعليمي للولادة والأطفال لتعاونهم معي خلال فترة جمع العينات وفقهم الله لكل خير . واقدم شكري وامتناني الى من غمروني بفيض محبتهم ، ودوام دعائهم فكانوا لي خير عونٍ وسندٍ لاكمال دراستي عائلتي .

ألتمس عذراً ممن فاتتني أن أشكرهم ..

وفق الله الجميع لما فيه خير الدنيا والآخرة ..

نور

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة في مختبر الدراسات العليا في كلية التربية للعلوم الصرفة ، إذ جمعت (123) عينة من مصادر متنوعة والتي شملت (30) عينة من الحليب الخام ،(30)عينة من الجبن الأبيض المحلي ،(30)عينة من القشطة المحلية " قيرم العرب " ، من الأسواق المحلية في قضاء بعقوبة للفترة من (1-11-2015 ولغاية 28-2-2016) ، و(33) عينة من براز أطفال مصابين بالإسهال (مائي - مخاطي - دموي) تتراوح أعمارهم بين (3 اشهر - 5 سنوات) من مستشفى البتول للولادة و الأطفال، إذ أظهرت النتائج أنّ (33) عينة ، وبنسبة (26.82%) نمواً سالباً للزرع البكتيري ، و(90) عينة بنسبة (73.17%) نمواً موجباً للزرع البكتيري . درست الخصائص المظهرية والصفات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية ، وقد اشارت نتائج التشخيص الى أنّ (65) عينة منها، وبنسبة (52.84%) من المجموع الكلي للعزلات كانت تعود لجنس بكتريا *Campylobacter* ، أذ وصلت نسبة البكتريا المعزولة من الحليب الخام (15)عينة ، وبنسبة (50%) ومن الجبن المحلي (7) عينات وبنسبة (23.33%) بينما من القشطة المحلية (8)عينات وبنسبة (26.66%). كانت نسبة البكتريا المعزولة من عينات البراز ذي القوام الدموي(3) عينة وبنسبة (9.90%)، أما من عينات القوام المخاطي (10) عينة وبنسبة (30.30%)، ومن عينات ذات القوام المائي (20)عينة وبنسبة (60.60%) . وقد تم تشخيص البكتريا من خلال الفحص المجهرى الذي اظهر سالبيتها وايجابيتها لصبغة كرام، كانت نسبة البكتريا السالبة لصبغة كرام (90.90%) بينما كانت نسبة البكتريا الموجبة لصبغة كرام (9.90%) .

تم إجراء الفحوصات الكيموحيوية والفسولوجية أذ كانت العزلات موجبة لفحص الاوكسيديز - الكاتاليز - اختبار اليوريز - تحلل الهيبوريت - إختبار النمو على درجات حرارة (37 ْم و 42 ْم) وكذلك تحملها للملوحة بتركيز (1.5% و 3.5%) وكانت العزلات حساسة للمضاد الحيوي Nalidixic acid ومقاومة للمضاد الحيوي Cephalothin .

تم استخلاص الدنا الكلي للعزلات البكتيرية لبكتريا *Campylobacter* (12) عزلة باستعمال عدة استخلاص (Mini DNA Bacteria Kit) المجهز من قبل شركة Bioneer أذ كانت نقاوة الدنا المستخلص تتراوح ما بين (2 - 1.8) لجميع العينات المختارة . اجري تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR (Polymerase Chain Reaction ،من خلال استعمال عدة البوادئ المتخصصة التي تستهدف التسلسل النوعي لجين *Cadf* ذي الوزن الجزيئي 400 زوج قاعدي . ورحلت نواتج التضاعف على هلام الأكاروز بتركيز 1% ولوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع المسارات في الهلام بالمستوى نفسه بالنسبة للجين . بينت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وباستعمال بادئ متخصص لهذا الجين أنّ من بين (12) عزلة كانت (7) عزلات تحتوي على هذا الجين ونسبة (58,33%) وبنفس الوزن الجزيئي 400 زوج قاعدي ، في حين كانت العزلات المتبقية (5) لا تحتوي على هذا الجين ونسبة (41.66%).

المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
IV	المحتويات	
X	المختصرات	
XI	قائمة الأشكال	
XI	قائمة الصور	
XII	قائمة الجداول	
1	الفصل الأول -المقدمة	الفصل الأول
4	الفصل الثاني - استعراض المراجع	الفصل الثاني
4	نبذة تاريخية عن بكتريا <i>Campylobacter</i>	1-2
5	الصفات العامة لبكتريا <i>Campylobacter</i>	2-2
6	تصنيف بكتريا <i>Campylobacter</i>	3-2
8	أنواع بكتريا <i>Campylobacter</i>	4-2
8	الأنواع التي تصيب الإنسان	5-2
8	<i>C.jejuni subsp jejuni</i>	1
9	<i>C.coli</i>	2
9	<i>C.jejuni subsp. Doylei .</i>	3
10	<i>C.lari</i>	4
10	<i>C.helveticus</i>	5
11	<i>C.upsaliensis</i>	6
11	<i>C.jejuni</i>	7
11	<i>C. hyointestinalis</i>	8
12	إمراضية بكتريا <i>Campylobacter</i>	6-2
12	مصادر الوبائية Source of Epidemiology	7-2
13	الاعراض السريرية والعلاج	8-2

14	العلاقة بين الإسهال والاصابات عند الأطفال	9-2
15	عوامل الضراوة لبكتريا <i>Campylobacter</i>	10-2
15	Invasiveness القدرة على الغزو والاجتياح	1
16	Motility and adherence الحركة والالتصاق	2
17	Toxins production أنتاج السموم	3
19	Virulence plasmids بلازميدات الضراوة	4
19	Outer Membrane Protein بروتين الغشاء الخارجي	5
20	الحليب الخام ومنتجاته	11-2
20	الحليب الخام	1
21	الجبنة الابيض الطري المحلي والقشطة المحلية (قيرم العرب)	2
23	مصادر التلوث المحتملة ومصادرها التي يمكن أن تصل إلى الحليب كمادة خام للتصنيع وبالتالي كمادة غذائية مصنعة يجعله ضار بالصحة	12-2
23	الحيوان	1
24	البيئة والماء	2
24	الذباب والحشرات والمبيدات في الحليب	3
25	الأدوية البيطرية ومضادات الحيوية التي يعالج بها الحيوان	4
26	المواد الحافظة في الحليب الخام ومنتجاته	5
26	الفورمالين	أ
26	مادة فوق اكسيد الهيدروجين (H_2O_2) السامة	ب
26	نترات الصوديوم او البوتاسيوم	ت
27	النوعية الميكروبية للحليب الخام	13 -2
28	المحتوى الوراثي لبكتريا <i>Campylobacter</i>	14-2
28	التحري عن الجين <i>cadf</i> في البكتيريا <i>Campylobacter jejuni</i> بتقنية PCR	15-2

30	الفصل الثالث - المواد وطرائق العمل	الفصل الثالث
30	المواد	1-3
30	الأجهزة والمعدات	1-1-3
32	المواد الكيميائية والمحاليل	2-1-3
33	الأوساط الزرعية	4-1-3
33	وسط الدم الاساس Blood Agar Base	1
33	آكار الماكونكي Mac Conky Agar	2
34	وسط سكيرو (كولمبيا الأساس) Skirrow Selective Supplement III	3
34	أكار الدم المسخن Choclate Agar	4
34	وسط بريستون Campylobacter Selective Supplement (Preson)	5
35	مرق البروسيل Brucella Broth	6
35	وسط ثلاثي السكر- الحديد Triple Sugar Iron	7
35	وسط الحركة Motility Medium	8
35	وسط اختبار تحلل الهيبوريت Hippurate Hydrolysis Test Medium	9
35	وسط مولر - هينتون Muller Hinton Agar	10
35	وسط نقيع المخ-القلب Brian Heart Infusion agar	11
36	طرائق العمل	2-3
36	المحاليل والصبغات والكواشف البكتريولوجية	1-2-3
36	المحاليل Solutions	2-2-3
36	محلول الملحي الفسيولوجي Physiological Saline Solution	1
37	محلول اليوريا Urea Solution	2
37	محلول هيبوريت الصوديوم Sodium hippurate	3
37	محلول الننهدين Non- hydrin solution	4
37	محلول صبغة كرام Gram stain	5
37	محلول هيدروكسيد الصوديوم NAOH	6
38	حفظ وإدامة العزلات البكتيرية	3-2-3

38	تحضير المحاليل الخزينة الخاصة بالإختبارات الوراثية	4-2-3
39	المحاليل المستعملة في عزل الدنا البكتيري DNA- Bacteria Solutions	5-2-3
40	الإنزيمات المستعملة	6-2-3
40	المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis solutions	7-2-3
41	المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR	8-2-3
42	الصبغات Stains	9-2-3
42	صبغة كرام Gram's Stain	1
42	الكواشف Reagents	10-2-3
42	كاشف الكاتاليز Catalase Reagent	1
42	كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent	2
42	طرائق التعقيم	5-3
43	طرائق العمل	2-3
43	جمع العينات Collection of Samples	11-2-3
44	زرع العينات Samples Culture	12-2-3
46	تشخيص البكتريا Diagnosis of Bacteria	4-3
46	الفحوصات الكيميائية الحيوية Biochemical Tests	5-3
46	إختبار تحلل الهيبوريت Hippurate hydrolysis test	1
47	إختبار تكوين غاز كبريتيد الهيدروجين H2S على وسط TSI	2
47	إختبار النمو في درجات الحرارة (37 - 42 ٬)	3
47	إختبار تحمل الملوحة	4
47	إختبار الكاتاليز Catalase Test	5
47	إختبار الاوكسيديز Oxidase Test	6
48	إختبار الحركة Motility Test	7
48	إختبار تحلل اليوريا Urease hydrolysis test .	8
48	إختبار الكشف عن النمو على وسط الماكونكي Growth on Macconkey .	9
48	إختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية Antibiotics	10

	Susceptibility TEST.	
49	أستخلاص الدنا البكتيري Bacterial DNA extraction .	6-3
50	الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis .	7-3
51	قياس تركيز الدنا ونقاوته.	8-3
51	تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) .	9-3
53	الفصل الرابع – النتائج والمناقشة	الفصل الرابع
53	عزل وتشخيص بكتريا <i>Campylobacter</i> من مصادر متنوعة .	1-4
55	عدد العينات الموجبة والسالبة ونسبها في عينات الحليب الخام ومنتجاته	1-1-4
55	عزل وتشخيص انواع بكتريا <i>Campylobacter</i> من الاسهال عند الاطفال	3-1-4
57	الفحص الجرثومي	2-4
57	الوصف المزرعي والمجهري لبكتريا <i>Campylobacter</i>	1-2-4
58	الوصف المزرعي للنمو على طبق الزرع الثانوي.	2-2-4
58	الإختبارات التشخيصية لبكتريا ال <i>Campylobacter</i> .	3-4
63	التحري عن جين الضراوة <i>Cadf</i> باستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل P.C.R .	4-4
66	الاستنتاجات	الفصل الخامس
67	التوصيات	الفصل السادس
68	المصادر	

Abbreviationsالمختصرات

المختصر	المصطلح
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
Bp	Base pair
<i>C.jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Cadf</i>	<i>Campylobacter</i> adherence factor
CT	<i>Cholera</i> Toxin
CTLT	<i>Cholera</i> Toxin like Toxin
CDT	Cytolethal Distending Toxin
dH ₂ O	Deionized water
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DNA	Deoxynuclic acid
EDTA	Ethylene di-amine tetra acetic acid
GBS	Guillain- Barre Syndrom
LPS	Lipopolysaccharide
OMP	Outer Membrane Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
sIgA	Secretory Immunoglobulin A
TSI	Triple Sugar Iron
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA
Tris-OH	Tris-(hydroxymethyl) methylamine

قائمة الأشكال

الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
17	يوضح آلية غزو واجتياح بكتريا <i>Campylobacter</i>	1-2
18	يوضح فعالية السم <i>cytolethal distending toxin</i>	2-2

قائمة الصور

الصفحة	عنوان الصورة	رقم الصورة
65	الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل البلمرة PCR للكشف عن الجين <i>cadF</i> على هلام الأكاروز بتركيز (1%) وفرق جهد 100 فولت مدة قدرها 45 دقيقة	4-4

قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
30	الأجهزة والمعدات المستخدمة في الدراسة	1-1-3
32	المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة في الدراسة	2-1-3
33	العدة المختبرية Laboratory Kit	3-1-3
35	الانزيمات المستعملة	5-1-3
36	مواد متفرقة المستخدمة	6-1-3
39	مكونات عدة استخلاص الدنا البكتيريا	5-2-3
41	تتابعات وتراكيز البوادئ وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ	8-2-3
51	تفاعل البلمرة المتسلسل P.C.R	9-3
52	البرنامج الحراري لتضخيم جين <i>CadF</i> بتقنية P.C.R	10-3

53	يوضح العينات الموجبة والسالبة النمو في الزرع البكتيري المعزولة من مصادر متنوعة	1-4
54	النسبة المئوية للعزلات البكتريا معزولة من عينات الحليب الخام ومنتجاته	1-1-4
55	اعداد ونسب عزلات بكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والمعزولة من حليب الخام ومنتجاته	2-1-4
56	النسب المئوية للعزلات مئوية للعزلات الموجبة لعينات البراز لبكتريا <i>Campylobacter</i>	3-1-4
56	النسب مئوية لانواع العزلات البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام	4-1-4
62	الاختبارات التشخيصية لانواع بكتريا <i>Campylobacter</i>	3-4

المقدمة

Introduction

Chapter one الفصل الأول

المقدمة Introduction:

يعد الحليب الخام من الأغذية معقدة التركيب إذ يحتوي على كل ما يحتاجه جسم الإنسان من مكونات غذائية ضرورية لبنائه، وبنسبٍ متوازنة، يحتوي الحليب على البروتين (كازين - لاكتوالبومين - لاكتوجلوبولين)، وسكر الحليب (اللاكتوز) ودهن الحليب فضلاً عن الفيتامينات، والأملاح، والمعادن النادرة وذلك بكميات متوازنة في صورة سائل سهل الهضم مقبول الطعم والرائحة، يعد الحليب ومنتجاته وسطاً مناسباً لنمو ونشاط الأحياء الدقيقة، وذلك نظراً لطبيعة تكوين الحليب في احتوائه على نسبة عالية من الماء، وكذلك وجود سكر الحليب (اللاكتوز) القابل للتخمر، ووجود البروتينات، والأملاح، والفيتامينات، والدهون فضلاً عن الأس الهيدروجيني المائل للاعتدال (PH6.6) لذلك فإن كل هذه العوامل تساعد، وتجعل من الحليب وسطاً ملائماً لنمو، وتكاثر الأحياء الدقيقة (فضل، 2007).

يعد الحليب مادة خام للكثير من المنتجات اللبنية (كالحليب المبستر، والجبن، والزبدة...) إذ تعتمد نوعية هذه المنتجات بالدرجة الأولى على نوعية الحليب الخام المستخدم في تصنيعها (Whitney, 2006). الجبن الأبيض الطري يقصد به هو المنتج المصنع بواسطة تخثر بروتين الكازين وتحدث حالات التلوث في الجبن عن طريق التخزين والتصنيع غير الجيد، يتعرض الحليب لمجموعة من المخاطر الكيميائية، والبيولوجية التي تؤدي إلى تلوثه في أثناء إنتاجه في معامل الألبان وفي المزرعة وفي أثناء المعالجة والتعبئة، تعتبر الأدوية البيطرية والمبيدات من المكونات الكيميائية التي تصل إلى الحيوان عن طريق النظام البيئي، ويمكن أن تنتقل إلى الحليب بوصفها أثراً متبقياً، يرتبط إنتاج الحليب بالعوامل البيئية التي تعتمد بشكل كبير على نشاطات الإنسان، ولما لهذه الملوثات من أضرار على الصحة، سواءً للإنسان أو لحيوان المزرعة، لذا يجب على المنتجين وضع خطط وبرامج للسيطرة على الملوثات الكيميائية في الحليب، ومنتجات الألبان ابتداءً من المزرعة وصولاً إلى المنتج النهائي (التل وآخرون، 2015).

تعود بكتريا *Campylobacter* إلى عائلة *Campylobacteriaceae* الذي يضم أنواعاً عديدة، قسم منها يكون ممرض، والقسم الآخر يكون غير ممرض. وهي عبارة عن عصيات سالبة لصبغة غرام، أشتق أسمها من كلمة اغريقية والتي تعني عصيات منحنية

انحناءاً حلزونياً ، وهي خلايا صغيرة جداً حيث يتراوح طولها حوالي (0,5 - 5) مايكروميتر ويتراوح عرضها حوالي (0,2 - 0,8) مايكروميتر . تظهر هذه الخلايا على شكل حرف (S) وذلك عندما ترتبط خليتان مع بعضهما مكونة سلسلة قصيرة تظهر هذه الخلايا في المستعمرات القديمة كروية أو دائرية الشكل . أو تكون بشكل يشبه جناح طائر النورس (Gull _ Winged). هي غير مكونة للأبواغ تكون حركة هذه البكتريا بواسطة سوط قطبي مفرد يقع في أحد قطبي الخلية البكتيرية ، أو قد تمتلك البكتريا سوطين على قطبي الخلية كل واحد يقع في احد قطبي الخلية البكتيرية . يتراوح طول السوط (2-3) مرات بقدر طول الخلية البكتيرية . كل الأنواع التابعة الى هذا الجنس تكون موجبة لفحص الاوكسيداز Oxidase أما فحص الكتاليز Catalase فبعضها يكون ايجابي لهذا الفحص والبعض الاخر يكون سلبي لهذا الفحص . هذه البكتريا تحتاج الى كميات قليلة من الأوكسجين (Microaerophilic)، وكميات كبيرة من ثاني اوكسيد الكربون مقارنة بالبكتريا الهوائية لغرض بقائها .وتكون تغذيتها كيميائية عضوية ولا تخمر الكربوهيدرات حيث تعتمد تغذيتها على عملية التنفس ولا تنتج حوامض او مواد متعادلة لأيضها (Law و Alcamo , 2004) .

كما أنها تكون حساسة للمضاد الحيوي Nalidixic acid ، ومقاومة للمضاد Cephalothin تعد بعض الأنواع العائدة لجنس *Campylobacter* هي إحدى أهم المسببات الشائعة لإلتهاب الأمعاء الجرثومي . إذ تم تمييز النوع البكتيري *C. jejuni* الممرض والأكثر تكراراً من بين مسببات الإسهال عند الانسان وفي الاقطار النامية والمتطورة (Saenz وآخرون , 2000) يعد مرض الإسهال ومضاعفاته هو سبب كبير لوفاة الأطفال خصوصاً في الدول النامية ، إذ يعد السبب الثانوي ، والأكثر شيوعاً لوفاة الأطفال دون سن الخامسة من العمر في العالم (Forsberg وآخرون , 2007) . وتعزى مسببات الإسهال الى وجود أنواع مختلفة من المسببات المرضية التي تختلف في الدول النامية ، والمتطورة فقد تكون هذه المسببات فايروسية أو بكتيرية ، أو طفيلية ، أو إصابات أخرى مختلطة بين هذه الأنواع (Elliott , 2007). أن جنس *Campylobacter* يضم انواعاً عديدة وهي (*C. jejuni* و *C. coli* و *C. lari* و *C. fetus* و *C. hyointestinalis*).تعد الأنواع من الممرضات التي يكون مصدرها الغذاء الملوث مسببة الإسهال ، كذلك تسبب إصابات أخرى خارج معوية وأمراض ثانوية (Nachmkin , 2008).

أهم أعراض الإصابة بهذه البكتريا هو الإسهال المائي Watery diarrhea ، أو الدموي Bloody diarrhea ، مغص معوي والغثيان وفي الحالات الحادة تؤدي الى متلازمة

(Guillain- Barre Syndrom (GBS) والتهاب المفاصل Eptic Arthritis (Hughes و Cornblath , 2005). تتجه الدراسات المستقبلية نحو مقارنة نوعية الجين باستخدام طريقة (RFLP- PCR) و (ALFP) بالطرائق المصلية القياسية والترحيل الكهربائي هي الطريقة المعتادة في المختبرات الصحة العامة (Hawkey و Gillespie , 2006). قد أشارت العديد من الدراسات السابقة الى استخدام التضخيم للكشف عن هذه البكتريا على عينات البراز وذلك عن طريق استخدام جينات المستهدفة التي تتضمن (جين *ceuE* – جين *16S rRNA* - جين *gly A* - جين *23 S rRNA* و جين *cadF*) حيث تنتج هذا البكتريا الكثير من عوامل الضراوة مثل بروتينات الغشاء الخارجي والسموم الداخلية وغيرها من عوامل التي تعمل على زيادة أمراضية البكتريا (Ghosh Roumi وآخرون , 2014) .

نظرا لاهمية بكتريا *Campylobacter* لذا فان هذه الدراسة تهدف الى :

- 1- عزل وتشخيص أنواع بكتريا *Campylobacter* المسببة للإسهال (*C.jejuni* – *C. lari* – *C.coli* – *C. hyointestinalis*) من الحليب الخام ومنتجاته.
- 2- دراسة الصفات التشخيصية للبكتريا وتأثير بعض الصفات الفيزيائية مثل درجة الحرارة وتركيز كلوريد الصوديوم وغيرها من العوامل البيئية التي تؤثر على صفات البكتريا.
- 3- التحري عن جين الضراوة *cadF* المسبب للإسهال من بكتريا *Campylobacter jejuni* باستخدام تقنية PCR .

استعراض المراجع

Literature Review

Chapter Two الفصل الثاني

Literatures Review استعراض المراجع

2- 1: نبذة تاريخية عن بكتريا *Campylobacter* :

في السنين الأخيرة أهتمت الجهات المختصة (WHO) بجنس *Campylobacter* وأنواعه التي تعد مسببات مهمة لإلتهاب الأمعاء Enteritis ، وكذلك إلتهاب المعدة Gastritis ، وأمراض أخرى مثل إلتهاب السحايا، والمفاصل ، وكذلك بعض الأمراض العصبية (Van Vliet وKetley, 2001)، إذ ذكر العالم (Bultzer) في عام 1984 أن الباحثين (Mcfadyean and Stockman) أشارا الى وجود هذه الجرثومة ، إذ كان أول اكتشاف لهذه البكتريا في عام 1909 ، وهي ذات أشكال متعددة و كانت تسمى سابقاً ب(*Vibrio fetus*)، وذلك لتكرار وجودها في حالات الإجهاض Abortion المتوطن في الاغنام . بكتريا *Campylobacter* هي عبارة عن عصيات صغيرة جداً، سالبة لصبغة غرام ، تشبه الضمات تظهر هذه البكتريا على شكل يشبه جناح طائر النورس أو تظهر بشكل حرف (S) وذلك عندما تكون أزواجاً (Nachamkin , 2003). تتباين درجات حرارة النمو للأشكال العائدة لجنس *Campylobacter* فبعض أنواعها تنمو بدرجة (42م°) والتي تسمى بالمجموعة المحبة للحرارة العالية Thermophilic والتي تضم (*C. jejuni - C. lari-C.coli*) هناك نوع آخر ينمو بدرجة حرارة (25م°) مثل (*C. fetus*) (Levin , 2007).

تتميز هذه البكتريا بأحداثها أمراضاً تكون ذات أعراض واضحة لمضائفها الحيوانية الخازنة لها كالأغنام ،والابقار، والدجاج ، والتي لا تتكاثر في الأغذية، كما يحصل مع بكتريا سالمونيلا والعنقوديات (Mandell وآخرون, 2000). حيث صنف بكتريا *C.jejuni* مع جنس *Helicobacter* في بداية تصنيفها، ثم فصلت عنها كجنس مستقل ، وذلك بالاعتماد على

الخصائص كيميائية الحيوية والتركيبية مثل وجود الأسواط، وأغلفتها، والانتاج لأنزيم اليوريز. Urease ومحتوى الحامض الدهني، وصفات أخرى فصلت عن جنس (*Helicobacter Brooks* وآخرون، 2004).

2- 2: الصفات العامة لبكتريا *Campylobacter* :

يعد مصطلح (*Campylo*) عبارة عن مصطلح لاتيني مشتق من كلمة اغريقية (*Kampylos*) والتي تعني "bacillus" التي تعني "rod like"، أن خلايا بكتريا *Campylobacter* تكون صغيرة جداً يبلغ طولها حوالي (0.5-5) مايكروميتر، وعرضها حوالي (0.2-0.8) مايكروميتر ، تظهر هذه الخلايا في المستعمرات القديمة كروية أو دائرية الشكل Coccoid bodies. وذلك بسبب تحلل الغلاف الخلوي cell envelope عند عدم توفر الظروف الملائمة لنموها (*Humphrey* وآخرون، 2007). هذه البكتريا هي عبارة عن عصيات حلزونية لاهوائية ، تمتلك سوطين على قطبي الخلية والأسواط هي عبارة عن زوائد تشبه الشعرة تستعملها البكتريا لدفع نفسها. ويعود سبب هذا الخلط بين كون هذه البكتريا حلزونية الشكل، وإملاكها الأسواط يعطي لصفاتها حركة تشبه السدادات الفلينية (Cork – screw) وهذه الحركات عالية إذ تندفع كالسهم للأعلى، وللأسفل ومن جانبٍ لآخر عند فحصها تحت المجهر الالكتروني . تكون هذه البكتريا بشكل حرف (S) وذلك عندما ترتبط خليتان مع بعضهما أو قد تكون بشكل يشبه جناح طائر النورس (Gull- winged). البكتريا سالبة لصبغة غرام غير مكونة للأبواغ تكون تغذيتها كيميائية عضوية. تكون سالبة لفحص احمر الميثيل (Methyle red) موجبة لفحص الأوكسيداز oxidase . لا تمتلك القدرة على انتاج الأنزيم المحلل للدهون Lipase وتكون قليلة التهوية حيث تحتاج الى الاوكسجين (3-15%). تظهر مستعمرات هذه البكتريا بأشكال متعددة

منها الرمادية والمسطحة ، و ناعمة ، و مخاطية لزجة ، و خشنة (van Putten وآخرون ، 2009) .

تكون هذه البكتريا غير محللة للدم إلا أنّ بعض البحوث الحديثة أشارت الى أنها تسبب نوعين من التحلل أحدهما الفا ، والآخر بيتا على وسط اكار الدم Blood agar ولا سيما النوع *Campylobacter jejuni* (Gilbert وGaudreu, 2003). من الصعب الكشف عن هذه البكتريا في العمل التقليدي، وذلك لقلة فعاليتها الكيموحيوية . إذ تحتاج هذه البكتريا الى كميات كبيرة من ثاني اوكسيد الكربون ، وكمية قليلة من الاوكسجين (Microaerphilic) مقارنة بالبكتريا الهوائية وذلك لغرض بقائها . ويمكن توفير هذه الظروف وذلك بواسطة استخدام حاضنة لاهوائية والتي تسيطر على الظروف التي تحتاجها هذه البكتريا تقوم هذه الحاضنة بتنظيم الهواء الذي يدور داخلها ليتكون (10%) من ثاني اوكسيد الكربون و (5%) من الأوكسجين والباقي نتروجين اضافة الى تنظيم درجة الحرارة على (42 م°) (Parker وParker, 2004).

2-3: تصنيف بكتريا *Campylobacter*:

يعد وصف الأنواع التابعة لبكتريا *Campylobacter* من الامور الصعبة ، وذلك لأنّ الاختبارات التي تميز الأنواع لا زالت قليلة. كذلك التفاوت في الظروف المثلى للنمو فقد وجد هذا التفاوت حتى بين النواعيات (Sub species) للنوع الواحد وفي فحوصات التحمل للملوحة واختلافها في الحساسية للمضادات الحيوية كحامض النالدكسك والسيفالوثين . إذ وضعت الأنواع التابعة لجنس *Campylobacter* في جنس الضمات (*Vibrio*) سابقاً، وضمن عائلة *Vibrionaceae* التي تشمل الضمات المحبة للهواء القليل (*Microaerophilic vibrio*) وذلك بسبب التشابه في شكلها مع الضمات (Parkhill وآخرون ، 2000) .

أنَّ هذا الجنس يضم العديد من الأنواع لكن أهمية هذه الأنواع تكمن من الناحية المرضية ولا سيما النوع *Campylobacter jejuni* سمي هذا النوع بهذا الاسم نسبة الى العزلة الأولى من أول جزء من القناة المعوية وهو الصائم (jejunum) والتي عزلت تجريبياً في عام 1931 من قبل العالم (Gones) إذ تسبب هذه البكتيريا الإسهال الدموي للإنسان وأمراض ولادية وكذلك إلتهابات معوية ومعدية خطيرة (Gloria وآخرون , 2000) تعود هذه البكتيريا الى الصنف (Protobacteria) والذي يتألف من ثلاثة عوائل كبيرة وهي :

1- *Campylobacteraceae*.

2 - *Nautitiaceae* .

3 - *Helicobacteraceae*.

وتتضمن هذه العوائل عدد كبير من الأجناس والأنواع منها الممرضة التي تشمل *C.jejuni* و *H.pylori* (Marshall وآخرون , 2001) فضلاً عن الأنواع الأخرى التي تكون حرة المعيشة ، ولاتعد ممرضة كما في *Sulfuspirillum* spp (Vandamme , 2000). يكون التشخيص المصلي مفيداً، وذلك عندما تقتزن بالطرائق الوراثية مثل الترحيل الكهربائي Pulsed Field Gel Electrophoresis ، وتحديد نوع السوط بواسطة (RFLP- PCR - *fla*) ، أما بالنسبة للطرائق الوراثية فأنها تكون متطورة وقادرة على تحديد نوع السلالات التي لا يمكن تحديدها بالطرائق المظهرية ، لأنَّ الطرائق الوراثية تعتمد على الفوارق بعدد الكروموسومات الثابت مقارنة مع الطرائق المظهرية التي تعتمد على الصفات المستضدية والتي لا يكون تعبيرها ثابتاً (Newell وآخرون , 2000).

هناك تقنيات أخرى للتمييز بين سلالات التي تتضمن (بلازميد الفوعة - الترحيل الكهربائي - للأنزيمات متعددة المواقع - تحليل بروتينات الغشاء الخارجي - تحديد نوع الرايبوسومات -

نوعية التعاقب المتعدد المواقع (Multilocus Sequence Typing) والتي افترضت قديماً أنها مفيدة جداً لتوزيع المجتمع البكتيري ذو التركيب الضعيف مثل بكتريا *Campylobacter* (Dingle وآخرون، 2002).

2-4: أنواع بكتريا *Campylobacter*:

تقسم عائلة (*Campylobacteraceae*) الى ثلاث مجموعات وذلك اعتماداً على الصفات المظهرية :

المجموعة الأولى :- هذه المجموعة تضم أربعة أنواع معروفة بالنسبة للعاملين في مجال الطب البيطري، وذلك بسبب تكرار حدوثها كمرضات ومتعايشات مع دواب الفلاحين بالرغم من أن بعض الأنواع لوحظت بأنها ممرضة للإنسان تتضمن هذه المجموعة بكتريا .

(*C. hyointestinalis* - الجنس *C. sputorum* - الجنس *C. mucosalis* . والجنس *C. fetus*) (وتوت، 2010).

المجموعة الثانية :- وهي من الممرضات للإنسان التي تشمل (*C. showae* - *C. gracilis* و *C. concisus* - *C. rectus* و *C. curvas*) . فضلاً عن أن هناك نوعان جديان إنضما الى هذه المجماميع ، وذلك طبقاً لتشابهها مع أنواع أخرى لبكتريا *Campylobacter* وهما :

(*C. lanienae* sp. nov. و *C. hominus* sp. nov.) (Gillespie و Hawkey , 2006).

المجموعة الثالثة :- تعد هذه المجموعة من أهم المجموعات، والمتعلقة بصحة الانسان تتكون هذه المجموعة من خمسة أنواع من الممرضات المعوية المحتملة للحرارة إذ تتضمن هذه المجموعة: جنس (*C. jejuni*) والجناس *C. coli* و *C. lari* و *C. upsaliensis* و *C. helveticus* (وتوت ، 2010) .

2-5 : الأنواع التي تصيب الإنسان :

1- *C.jejuni subsp jejuni* :

تعد السبب الرئيسي لإلتهاب الأمعاء في الإنسان التي تسبب الإسهال للماشية. كذلك تسبب هذه البكتيريا الإجهاض للأغنام . وقد تم عزلها من الكلاب ، والقطط ، والطيور ، والقردة المصابة بالإسهال . تنتقل هذه البكتيريا للإنسان من القردة ، والكلاب، وقد سجلت حالات متفرقة وذلك بانتقال عدد قليل ، ومحدد من الافراد المتعلقة بنفس العائلة (Nachamkin وآخرون ، 2008) يمكن التفريق بين (*C.jejuni subsp. Jejuni* و *C. coli*) وذلك من خلال اختبار تحلل الهيبورييت إذ أنّ جنس (*C.coli*) يكون سالب لهذا الاختبار .

توجد بعض الصعوبات التي يمكن ملاحظتها عند بعض سلالات التابعة (*C.jejuni*) التي تكون غير قادرة على تحلل الهيبورييت. أنّ الأمراض بكتيريا *Campylobacter* تكون حيوانية المنشأ، أن التميز بين أنواع بكتيريا (*C.jejuni*) يتم من خلال الطرق الوراثية والمظهرية (Wassenaar و Newell, 2000). إذ يمكن التمييز بين النوعين (*C.jejuni subsp.* و *C.jejuni subsp. doylei*) وذلك عن طريق اجراء بعض الاختبارات منها النمو في درجة حرارة (42م°)، واختزال النترات ، وأنّ بكتيريا (*C.jejuni subsp.doylei*) لا ينمو بدرجة حرارة (42م°) (Garrity , 2005).

2. *C.coli* :

أكدت العديد من التقارير أنّ الإصابة بهذا النوع يكون مصدرها الحيوانات المنزلية، والطيور، وهذا يدل على أنّ هذه الحيوانات تُعد وسيلة رئيسية لنقل الإصابة الى الإنسان . وتكون العزلات التابعة لهذا النوع مقاومة للسيفالوثين وحساسة للمضاد الحيوي لحامض النالديكسك Nalidixic acid يعد هذا النوع من الممرضات المعوية في الإنسان ، لكن توажدها يكون أقل من)

C.jejuni subsp. *Jejuni* والتي تعد من الطرق الجزيئية الضرورية للتفريق بين الأنواع (Gillespie و Hawkey , 2006).

3. *C.jejuni* subsp. *doylei* :

تنمو بدرجة حرارة (35-37 م°) ولا تنمو بدرجة حرارة (42 م°) . (20%) منها لا ينتج الكتاليز، كذلك فأنها لا تختزل النترات الى نترت ، وعزلت من عينات البراز لمرضى مصابين بالإسهال . تنتج مستعمرات غير محللة للدم بعد فترة حضانة من (5-6) أيام، وبدرجة حرارة (37 م°)، أن عدم نموها بدرجة حرارة (42 م°) يجعلها تشبه جنس (*Helicobacter fennellia*) رائجتها تشبه رائحة القاصر، تكون حساسة للمضاد حيوي حامض النالدكسك والسيفالوثين لذلك لا يمكن عزلها بالطرق التقليدية التي تعزل بها بكتريا (*C.jejuni* subsp. *Jejuni*) (Gillespie و Hawkey , 2006).

4. *C.lari* :

عزلت لأول مرة من طيور النورس ، وهي محبة لدرجات الحرارة العالية ،مقاومة لحامض النالدكسك ، كذلك عزلت من القروود ،والكلاب ،والاغنام ،وأنواع أخرى من الطيور، إذ كانت سابقاً تسمى (NARTC) Nalidixic acid resistant thermophilic وذلك حتى عام 1983، يسبب هذا النوع إلتهاب الأمعاء في الانسان ،لكن بصورة نادرة ،ويكون قادر على إنتاج أنزيم اليوريز، ويحلل الأندول استيت وهذا يميزها عن الأنواع الأخرى المحبة للحرارة . إذ تشير البحوث الى تكوين السموم المعوية بواسطة هذا النوع من البكتريا (Albert وآخرون, 2008) .

:C.helveticus.5

يُعد هذا النوع من أقدم الممرضات المعوية المحتملة للحرارة ،التي أكتشفت عن طريق دراسات للتحري عن (*C.upsaliensis*) في الكلاب ،والقطط المصابة بالتهاب الأمعاء. إذ يكون هذا النوع مستعمرات تكون مسطحة، وناعمة ذات لون أزرق مخضر ومظهر مائي، منتشر على وسط اكار الدم . كذلك يتميز هذا النوع بعدم قدرته على إنتاج الكتاليز. حوالي نصف بكتريا *Campylobacter* المعزولة من القطط المصابة ،وغير مصابة هي من هذا النوع أن (2%) من البكتريا المعزولة من الكلاب تعود الى هذا النوع . ينمو هذا النوع من البكتريا في أغلب الأوساط وبدرجة حرارة (37م°) (Albert وآخرون , 2008).

:C.upsaliensis.6

هذا النوع عزل أثناء عزل بكتريا *Campylobacter* التي تنتقل من الكلاب الى الانسان، يمتاز هذا النوع بانه حساس لمدى واسع من المضادات الحيوية أكثر من بقية الأنواع المحتملة للحرارة يختلف هذا النوع عن بقية الأنواع المحبة للحرارة بأنها سالبة أو ضعيفة لإنتاج انزيم الكتاليز كذلك تكون غير قادرة على تحلل الهيبيوريت ، ولا توجد بحوث حول إنتاج السموم المعوية بواسطة (*C.upsaliensis* و *C.fetus*) (Taylor وآخرون , 1989).

: C.jejuni.7

يُعد هذا النوع من الممرضات المعوية الرئيسية في الانسان ،وتعود نسبة عالية من حالات الإسهال بهذا الجنس (95-98%) يفضل هذا النوع النمو في درجات حرارة العالية لذلك يعد مع النوع (*C.coli*) من مجموعة *Campylobacter* المحبة للحرارة العالية التي تفضل النمو في درجة حرارة (42-43م°) يمكن تميز هذا النوع عن النوع (*C. coli*) وبقية الأنواع الأخرى وذلك بايجابيته لفحص الهيبيوريت Hippurate Hydrolysis (Skirrow , 2006)

8. *C. hyointestinalis* :

شُخص هذا النوع لأول مرة في عام 1983 في الخنازير ، إذ بينت إحدى الدراسات أن الإسهال الناجم عن الإصابة بهذا النوع من البكتيريا يمكن أن يتوقف بعد تناول المضاد الحيوي الاثرومايسين ، يمتاز هذا النوع بقدرته على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S في وسط TSI (Salama وآخرون ، 1992)، كذلك يكون هذا النوع حساسة للمضاد السيفالوثين Cephalothine ومقاومة للحامض النالدكسيك اسد Nalidixic Acid وتعد هذه صفة تفرقية يتميز بها النوع *C. hyointestinalis* والتي تميزه عن بقية الأنواع الأخرى ،(جمعة ، 2000).

2-6: إمرضيه بكتريا *Campylobacter*:

تعد بكتريا *Campylobacter* هي جزء من الفلورا الطبيعية في أمعاء الطيور، ولا يعد الانسان خازناً للإصابة لذلك تعد الدواجن هي المصدر الرئيسي للإصابة (Samuel وآخرون ، 2004). إذ تنتقل البكتيريا الى الانسان ، وذلك عن طريق تناول اللحوم الملوثة، والحليب غير المبستر أو شرب المياه غير معاملة (Sopwith وآخرون ، 2003)، والتي تسبب إتهاب المعدة ، والأمعاء (Gastroenteritis) بشكل واسع والذي يفوق الحالات المرتبطة ببكتريا *Salmonella* وبكتريا (*Shigella*) ، بكتريا (*C. jejuni*) شخصت على أنها من الأسباب المهمة للإصابة التي تحدث في الانسان ، فقد تصل نسبتها الى (89-93%) أما بكتريا *C. lari*) فتسبب فقط (0.1-0.2%) بينما بكتريا (*C. coli*) تكون نسبة الإصابة بها (7-10 %) (Healing وآخرون ، 1992). أن الأمراض التي تحدث في الانسان تكون بسبب هذه الأنواع الثلاثة المحتملة للحرارة والتي تختلف من الإسهال المتوسط الأمد لمدة يومين الى الإسهال الحاد الذي قد يستمر الى اسبوع أو أكثر . إذ تكون طبيعة الإسهال أما مائياً، أو دمويًا،

قد يحصل التقيؤ في حالات قليلة، وقد يكون مصحوباً بالألم قد تؤدي الى الشك بالتهاب الزائدة الدودية . أن بعض أنواع بكتريا *Campylobacter* تكون مرتبطة بتطور متلازمة- (Guillain Barré) والتي هي السبب الرئيس لحالات الشلل العصبي العضلي (Gillespie و , 2006 Hawkey).

2-7: مصادر الوبائية Source of Epidemiology

يُعد جنس *Campylobacter* واحداً من الأجناس الشائعة التي توجد بصورة طبيعية في أمعاء الكثير من الحيوانات، كالدجاج والمواشي ، وهذا يؤدي الى تلوث منتجات هذه الحيوانات من الحليب ، واللحوم (Horrocks وآخرون , 2009) لذلك فإنّ الطعام يعد الواسطة الرئيسية للإصابة، كاللحوم غير المطبوخة بصورة جيدة إذ تحدث الإصابة نتيجة تناول الأغذية الملوثة بالجرثومة كتناول الحليب غير المبستر الملوثة (Taboada وآخرون , 2013)، وايضاً نتيجة تناول الدجاج الملوث بالجراثيم، تنتقل هذه البكتريا عن طريق رمي مخلفات المجاري في المياه مما يجعلها مصدراً للإصابة خاصة في حالة استخدامها لأغراض الغسل والشرب كذلك تنتقل عن طريق ملامسة الحيوانات المريضة خاصة القطط، والكلاب، فقد سجلت العديد من الأوبئة الناتجة عن شرب المياه الملوثة غير مكلورة او مكلورة ، ولكن بصورة غير صحيحة والتي تحتوي على بكتريا *Campylobacter* (WHO , 2004) يعد تلوث المياه والحليب سبباً في حدوث إنتشار وبائي للمرض وكذلك لوحظ أنّ المرض ينتشر في جميع أنحاء العالم. وتعد الطيور، والاعنام والابقار، خازناً طبيعياً لبكتريا (*C. jejuni*) وهذه البكتريا تصيب الفئات العمرية جميعها ومن كلا الجنسين ، وبأعراض مرضية واضحة (Horrocks وآخرون , 2009).

2- 8: الأعراض السريرية والعلاج :

تتضمن الأعراض الإسهال الذي يستمر من (2-5) أيام تشمل الحالات المبكرة من المرض الآلام البطنية والحمى وألصداع . إذ يصبح البراز سائلاً كريه الرائحة، ثم يصبح مائياً، وقد يظهر الدم في البراز في اليوم الثاني أو الثالث من الإصابة ويصاحب هذه الأعراض ل(80%) من المرضى إرتفاع في درجة الحرارة . وقد تحصل اختلاجات حرارية (شمة) عند الأطفال الذين يتعرضون الى إرتفاع في درجة حرارة أجسامهم، وذلك نتيجة الإصابة ببكتريا *C. jejuni*. كذلك تسبب الإصابة بهذه البكتريا أعراضاً مشابهة لمرض أغشية السحايا ومرض التايفوئيد، بينت الدراسات المتعلقة أعمار المرضى أنّ الإصابة قد تظهر في الأطفال دون سن الخامسة من العمر وفي أقطار أخرى دون السنة (Silva وآخرون , 2011).

في الحالات الناجمة عن الإصابة بهذه البكتريا إذ يتطلب العلاج تعويض السوائل المفقودة نتيجة الإسهال أما عند الحاجة للعلاج، باستخدام المضادات الحياتية فيكون الاثرومايسين هو الافضل أذ تعود مقاومة بكتريا (*C.coli* و *C.jejuni*) للاريثرومايسين إلى وجود طفرة في جينات (23SrRNA) والذي يقلل من قابلية المضاد على الارتباط بالرايبوسوم (Trieber و Taylor , 1999). وعدم وجود أضرار سمية له فضلاً عن وصوله الى مستويات عالية في الأنسجة إذ يساعد العلاج بالاثرومايسين على إزالة بكتريا *C.jejuni* من البراز خلال يومين . في حين أنّ التتراسايكلين يحذر إستعماله للأطفال وذلك بسبب ترسبه في العظام والاسنان وتعرض الطفل الى مضاعفات تتضمن التقيؤ والإسهال والحساسية أما الادوية البديلة هي الجنتامايسين والكلورامفينكول كما يمكن استعمال الكلندامايسين كعلاج مؤثر إذ لوحظ وجود مقاومة مشتركة (Cross – resistance) لهذا المضاد مع الاثرومايسين (Aarestrup و 2001) Engberg, تعود مقاومة بكتريا (*C.coli* و *C.jejuni*) للاريثرومايسين إلى وجود طفرة في

جينات (23SrRNA) والذي يقلل من قابلية المضاد على الارتباط بالرايبوسوم (Trieber وTaylor , 1999).

2-9: العلاقة بين الإسهال والاصابات عند الأطفال :

يُعد الإسهال سبباً رئيسياً لوفاة الاطفال في الدول النامية، وخصوصاً دون سن الخامسة من العمر (Forsberg وآخرون , 2007)، إذ تزداد أعراض المرض عندما يستمر أكثر من (7) أيام وقد يكون الإسهال مزمناً عندما يستمر أكثر من (14) يوم (Guarino وآخرون , 2008). وأن حدوث المرض يختلف بين الدول النامية والمتقدمة . ففي الدول النامية نجد (50-60%) من الحالات يكون بسبب بكتيرية الاصل، وأن (25%) سببه بكتريا *E.coli*، (10-18%) سببه بكتريا (*C.jejuni*) كذلك تسبب (*Salmonella spp.*, *Shigellaspp*)، حوالي (15%) . أما الفايروسات فأنها تسبب حوالي (3%) من الإسهال إذ يسبب فايروس (Rotavirus) حوالي (15-25%) من المرض وقد تكون أغلب الاسباب غير مشخصة أو مختلفة في بعض الدول (Naghipour و Nakagomi , 2008).

أما في الدول المتقدمة إذ أن (70%) من الإسهال سببه فايروسي، إذ يشكل فايروس (Rotavirus) حوالي (40%) ، وحوالي (10-20%) يكون سببه بكتيري. وأكثر من (10%) يكون سببه طفيلي (Elliott , 2007) ، الإسهال هو إفراغ متكرر لمحتويات الأمعاء مع حدوث تغير في قوام البراز ويتحول من الشكل الطبيعي الى سائل او اللين مع زيادة المحتوى المائي (Surawicz و Ochoa , 2006) ، يقسم الإسهال اعتماداً على طبيعة البراز الذي يتضمن الإسهال المائي (Watery diarrhea) ، والإسهال الدموي (BloodY diarrhea)، ينتج الإسهال المائي من غزو الأحياء المجهرية غير مختربة لنسيج الأمعاء الدقيقة مثل (*Vibrio cholera* و *Escherichia coli*). التي تعمل على افراز السموم المعوية مؤدية

الى تحفيز الخلايا المخاطية على افراز السوائل ، أما الإسهال الدموي فانه يحدث نتيجة الإصابة بالأحياء المجهرية المختزقة للطبقة المخاطية للأمعاء والتي تشمل بكتريا (*Campylobacter* spp - *Salmonella* spp و *Shigella* spp) يتميز هذا النوع من البراز باحتوائه على الدم والمخاط (Brooks وآخرون , 2007). تشير الدراسات في المكسيك أنّ الأطفال المعتمدين على الرضاعة الطبيعية هم أقل عرضة للإصابة بأنواع بكتريا *Campylobacter* بسبب الدور الذي يلعبه الكلوبولين الافرازي (sIgA) في حليب الام ضد الإصابة إذ يقلل من حالات الإسهال التي تسببها هذه البكتريا في الاطفال . كذلك وجدت دراسات أخرى أجريت على أشخاص ذوي النقص المناعي لديهم إصابات متكررة بالبكتريا تم إعطاؤهم الكلوبولينات الإفرازية (sIgA) عن طريق الفم أدت إلى التخلص من هذه البكتريا (Hammarstrom وآخرون , 1993).

2-10: عوامل الضراوة لبكتريا *Campylobacter* :

1. القدرة على الغزو والاجتياح Invasiveness:

لهذه البكتريا القدرة على غزو واجتياح المضيف وذلك نتيجة وجود بروتينات في جدار الخلية البكتيرية والطبقة S (slime layer) ، إذ أنها تشابه تركيب محفظة الجرثومة *Nisseria meningitides* وجرثومة القححية *Streptococcus pneumonia* كما أنّ لمتعدد السكريد الشحمي الذي تحتوي عليه هذه البكتريا له دوراً في زيادة الضراوة وإحداث المرض (Brooks وآخرون , 2004)

2. الحركة والالتصاق Motility and adherence:

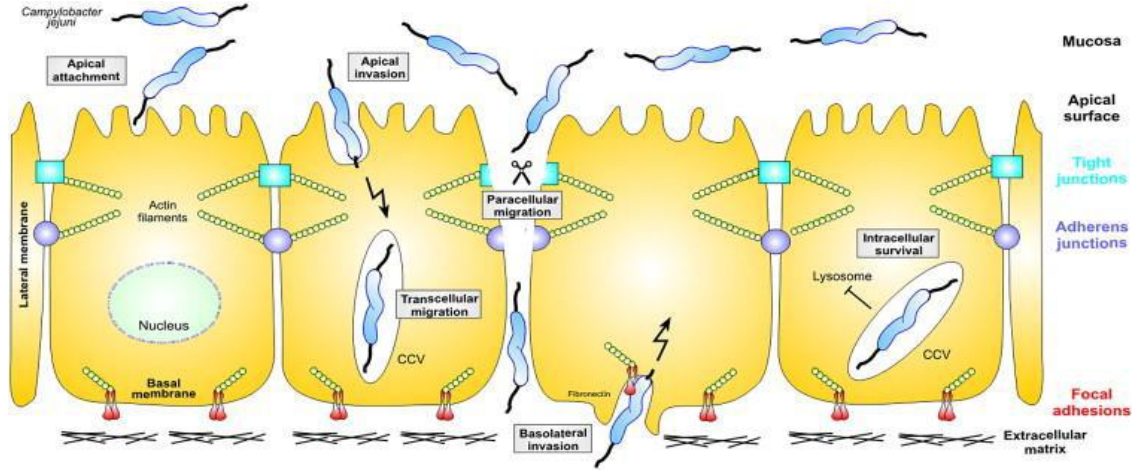
أنّ وجود السوط القطبي يعطي لهذه البكتريا القدرة على الحركة السريعة المشابهة لإنطلاق السهم ، وبالتالي فإنّ اختراق الطبقة المخاطية في بطانة الأمعاء، والمعدة من ثم الالتصاق والإستيطان

فضلاً عن إمتلاك الخلية البكتيرية بروتينات خاصة في جدرانها الخارجية التي تمكنها من الالتصاق بسطح الأمعاء مثل بروتين الغشاء الخارجي ،وبروتين الصدمة الحرارية وبروتينات أخرى (Larson وآخرون , 2008). أنّ وجود البكتريا بأعداد كبيرة في المخاط Mucus يعني أنّ الالتصاق على الخلايا الظهارية على عكس بكتريا (*Salmonella* و *E.coli*) أنّ التصاق يتم بواسطة زوائد مثل الشعيرة (Hofreuter و Backertand , 2013). إذ ترتبط إثنين من بروتينات الغشاء الخارجي هي (*cadf* , *F1Pa*) لبكتريا (*C.jejuni*) تحديداً مع Fibronectin(Fn) . أظهرت الدراسات السابقة أنّ بكتريا *C.jejuni* تمتلك بروتين يسمى *cadf* الموجود في الجدار الخارجي لخلاياها الذي يساعد على الالتصاق بخلايا الأمعاء مما يعزز الإجتياح لجسم المضيف (Larson وآخرون , 2008)، كذلك بينت البحوث أن هذه البروتينات ليست مهمة فقط في وصول البكتريا الى خلايا ظهارية للأمعاء بل مدى سميتها ، إذ أنّ السكريات الموجودة في حليب الأم يمكن أنّ تثبط ارتباط بكتريا *Campylobacter* بالطبقة المخاطية للأمعاء ، وبالتالي توقف الإسهال (Morrrw وآخرون , 2004) .

يعتمد حدوث الإصابة ببكتريا *Campylobacter* أولاً على قدرتها على البقاء في الوسط الحامضي للمعدة ،ومن ثم إنتشارها في الأمعاء الدقيقة، والغليظة، وبالتالي وصولها إلى الخلايا المبطنة للأمعاء والتصاقها ثم مهاجمتها للجسم، أنّ حركة البكتريا التي تنطلق كالسهم المقترن بالأسواط وشكلها الحلزوني يسمح لها أنّ تخترق الطبقة المخاطية اللزجة للوصول إلى الخلايا الظهارية ،ثم الالتصاق والغزو، أنّ فهم آلية الالتصاق والإجتياح لا زالت غير واضحة بشكل تام ،إذ أنّ دخول البكتريا إلى الخلايا الظهارية ،والخلايا البلعمية التي تزيل الأجسام الغريبة عملية،

معقدة وتتضمن عدداً من الإنزيمات والبروتينات التي تفرزها البكتيريا (Alcamo و Law,

2004).

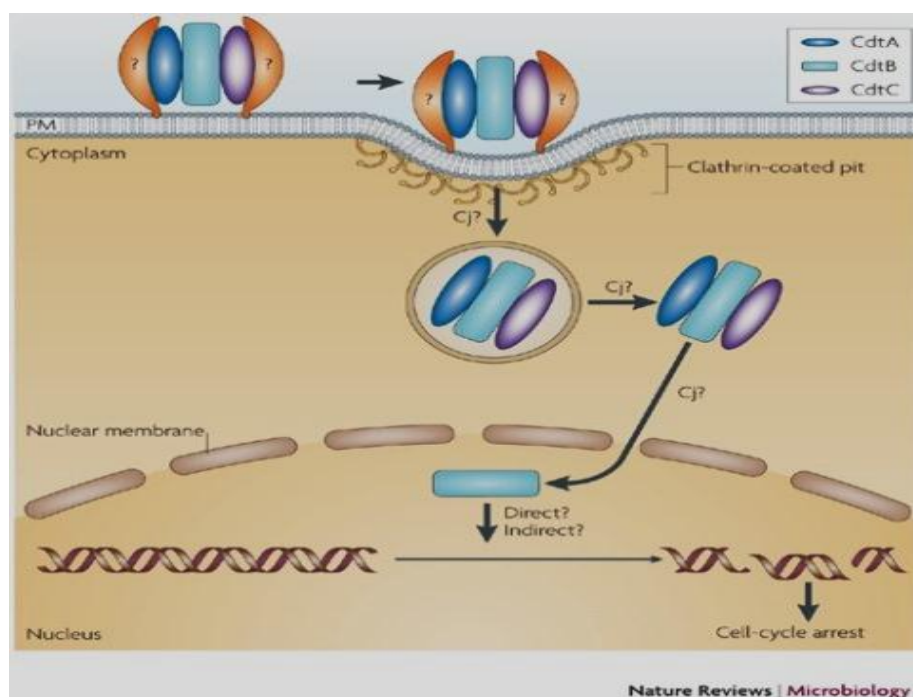


شكل (2-2) يوضح آلية غزو واجتياح بكتريا *Campylobacter* (Backert و
(2013 , Hofreuter

3. أنتاج السموم Toxins production:

أظهرت الدراسات قابلية بكتريا (*C.jejuni*) على إفراز ذيفانات معوية ، ومواد حالة للخلايا وذيفانات داخلية لها دور مهم في الضراوة ، وإحداث المرض إذ تنتج تلك الجراثيم ذيفانات معوية ثابتة الحرارة (Heat Stable Enterotoxin) وأخرى تكون غير ثابتة بالحرارة (Heat Labile Enterotoxin)، إذ تم التعرف على النوع الأول كذيفان مفرز من هذه البكتيريا ، كذلك تم تشخيص بروتين الذيفان الخلوي Cytotoxin Protein غير ثابت حرارياً ، والمفرز من قبل البكتيريا والذي يقوم بقتل خلايا الهدف (Lee وآخرون , 2000) تفرز البكتيريا أيضاً ذيفان يسمى (CDT) Cytolethal Distending Toxin الذي يحفز القتل الخلوي المبرمج للخلايا للمفاوية ، والخلايا الأحادية النواة (Kalischuk وآخرون , 2007).

أظهرت أحد البحوث أنّ بكتريا *C.jejuni* لا تنتج الذيفان المشابه لذيّفان الكوليرا *Cholera* *Toxin like Toxin* والذي تفرزه البكتريا *Vibrio Cholera*، لكن التفاعل التصالبي بين بروتين الغشاء الخارجي (ProA) مع الأضداد لذيّفان الكوليرا (CT) يمكن أنّ يقود إلى الاعتقاد الخاطئ بأنّ *C.jejuni* تنتج (CTLT) الوظيفي (Albert وآخرون, 2007). كذلك بينت أحد البحوث أنّ إفراز أحد هذه السموم هو Cytolethal Distending Toxin (CDT) متعلق بالحوصلات الموجودة في الغشاء الخارجي للبكتريا إذ تفرز جميع وحدات هذا السم المتكون من (CDTa – CDTb – CDTc) إلى البيئة المحيطة المتضمنة أنسجة المضيف المصاب (Lindmark وآخرون, 2009).



شكل (2-3) يوضح فعالية السم cytolethal distending toxin (Young وآخرون, 2007).

4. بلازميدات الضراوة Virulence plasmids :

وجد الباحث (Bacon وجماعته ،2000) أنّ هناك بلازميد أطلق عليه بلازميد الفوعة الذي يوجد في السلالات ذات الأمراض والفوعة العالية ، يُعد هذا البلازميد مهم جداً لما له من أهمية في الالتصاق والإجتياح للخلايا الظهارية المعوية للسلالات الحاوية عليه إذ تسبب للمضيف إصابة ممرضة كذلك لوحظ أنّ عدم حصول الإصابة بشكل شديد ، وحاد عند تطهير السلالات الحاوية على هذا البلازميد (Bacon وآخرون , 2000 Dobryan ; وآخرون , 2005).

5. بروتين الغشاء الخارجي Outer Membrane Protein (OMP):

إنّ الغشاء الخارجي للبكتيريا سالبة لصبغة كرام الممرضة يلعب دوراً هاماً جداً في علاقة الطفيلي بالمضيف ، إذ بينت العديد من الدراسات أنّ بروتينات الغشاء الخارجي للبكتيريا الممرضة للجهاز الهضمي في إلتصاق البكتيريا مع خلايا المضيف كذلك دوره في حجز الحديد (Larson وآخرون , 2008) لهذه البروتينات أهمية في إنتاج ذيفانات الداخلية ، وذلك لإحتوائه على متعدد السكريد الشحمي (LPS) ، أنّ الغشاء الخارجي للممرضات المعوية الأخرى أُعير اهتماماً قليلاً ، إذ لوحظ قديماً أنّ بكتيريا *C.jejuni* والأنواع الأخرى المتحملة الحرارة تمثل ممرضات سامة للإنسان والتي تسبب إلتهاب الأمعاء الحاد ، والذي يقترن بتجرثم الدم Bacteremia ، أشارت البحوث الأخرى بتداخلها مع الاصابات الجهازية مثل إلتهاب السحايا Meningitis (وتوت ، 2010) .

يتميز الغشاء الخارجي لبكتيريا *C.jejuni* بانه ذو وزن جزيئي يتراوح ب (41,000 - 45,000 KDS) الذي يتكون من حزمة بروتينية كبيرة منفردة ، يمتد هذا البروتين من خلال الغشاء على سطح الخلية البكتيرية فضلاً عن ارتباطه مع الببتيدوكلايكان الموجود في السطح الداخلي للغشاء الخارجي ، أنّ هذه البروتينات لها القدرة على التغيّر بالحرارة كذلك تساعد في الآلفة

للماء (Goulhen وآخرون , 2004). يحتوي الغشاء الخارجي على قنوات تلعب دوراً مهماً في تغذية الممرض ، تكون هذه القنوات ذات أقطار واسعة التي تسمح بمرور الجزيئات الكبيرة مثل الببتيدات ،وقواعد النيوكليوتيدات الصغيرة الى التجويف البلازمي ، أن بروتينات الغشاء الخارجي لها دور في التكوين المستضدي للممرض وهذا يختلف من سلالة لأخرى (Goulhen وآخرون , 2004)، كذلك يحتوي الغشاء الخارجي على بروتينات أخرى تكون ذات أوزان جزيئية واطئة تتحرر هذه البروتينات من الغشاء البلازمي بقوة ،وذلك عندما تتعرض لسطح الخلية والتي لها دوراً في إنتاج الذايفانات الداخلية وتزيد من إمراضية البكتريا (Lindmark وآخرون , 2009).

2-11: الحليب الخام ومنتجاته :

1- الحليب الخام : احتلت الألبان موقع الصدارة بين المواد الغذائية نظراً لإحتوائها على جميع العناصر اللازمة للجسم ،و بمعدلات تتلأم مع إحتياجاته مما أعطاهها صفة الإكتمال الغذائي ليعتمد عليه الانسان، لأنّ الحليب يتكون من العناصر أو التراكيب الكيميائية المتنوعة كالبروتينات -الكربوهيدرات -الدهون -الأملاح المعدنية والفيتامينات فضلاً عن الماء، وهي التي ميزت الحليب بتنوع قيمته الغذائية (النمر ،2003). تعد التغذية السليمة ضرورية للمحافظة على صحة الانسان أنّ مصادر تلوث بالبكتريا الممرضة عديدة تبدأ بالتربة والمياه ، ثم الحيوانات والحشرات ، وتنتهي بالإنسان نفسه، مروراً بتصنيع الغذاء، وحفظه، وتوزيعه، لذلك كان لإتباع الشروط الصحية عند التعامل مع الغذاء دوراً كبيراً في المحافظة على صحة المادة الغذائية ، وسلامتها من الأمراض ، وحالات التسمم الغذائي، ومن ثم المحافظة على الصحة العامة للإنسان (ابو يونس وآخرون ،2005) . يحتوي الحليب الناتج من مصادر حيوانية مختلفة على نفس المكونات، ولكن بنسبٍ متغيرة ومتفاوتة يظهر الحليب بشكل سائل متجانس

التركيب لكنه في الواقع مخلوط معقد التركيب يضم مجموعة كبيرة من المركبات الكيميائية .
ويعد الحليب من الأغذية ذات الكثافة العالية لوجود أكثر من (10) مركبات يزودها بشكل طبيعي منها البوتاسيوم وفيتامين (A) ومجموعة فيتامين (B) بما في ذلك الرايبوفلافين وفيتامين (B12) وفي الحليب خمسة مغذيات أساسية لبناء العظام والحفاظ عليها وهي الكالسيوم ، والمغنسيوم ، والفسفور ، والفلوريد ، وللحليب تركيبه فريدة من البروتينات مع قيمة بيولوجية عالية البروتين الرئيسي في حليب البقر هو الكازين يمثل (80%) من بروتينات الحليب الكلية ، وبقية بروتينات ماء الجبنة التي تسمى (بروتينات الشرش Whey proteins) وهي-Beta (Lactalbumin – Lactoglobulin) تمثل (20%) . الدهون في منتجات الحليب تحتوي على الأحماض الدهنية المشبعة (62%) وغير المشبعة (4%) . المصدر الرئيسي للكربوهيدرات في الحليب هو اللاكتوز الذي يعرف بأسم سكر الحليب، حليب البقر يحتوي بنسبة (4.5%) مقارنة بحليب الأم الذي يحتوي على (7%) أيضاً يحتوي الحليب على الكوليسترول ولكن كمية الكوليسترول فيه منخفضة (Everett, 2007) .

2- الجبن الأبيض الطري المحلي والقشطة المحلية (قير العرب):

تُعد القشطة، والجبن من أكثر الأغذية التي تلاقي طلباً في مدن العراق كافة أنّ إنتاج القشطة المحلية، والجبن الأبيض الطري ، يتم أساساً من مربي الحيوانات ، أو من قبل المعامل الأهلية الصغيرة وتباع مباشرةً الى المستهلكين ، لذا من المتوقع عدم تطبيق الشروط الصحية الضرورية عند الإنتاج ، والتعرض الى شتى مصادر التلوث ، إبتداءً من تسويقها ، وتخزينها وعرضها على المستهلك وذلك لأنّ هذه المنتجات تمتاز بسرعة تلفها كونها وسط جيد لنمو الجراثيم مما يجعلها وسيلة لنقل عدداً من الأمراض ومسبباً رئيسياً لعدد من حالات التسمم الغذائي (خضير ، 2001) أنّ صناعة الجبن تتطلب عملية نظافة ،وعناية فائقة بالأجهزة والالواني، والاجواء

المحيطة بالعملية التصنيعية، أن طريقة التصنيع المتبعة لها تأثيراً كبيراً على عدد الأحياء الدقيقة ونوعها و الموجودة في الجبن، فإذا صُنِعَ الجبن من حليب خام فإنَّ أيَّ من البكتيريا المرضية الموجودة في الحليب قد تبقى حية . وقد ثبت إنتشار بعض الأمراض بسبب إستهلاك أجبان ملوثة (شحاته، 1997) .

أما القشطة فهي ذلك الجزء من الحليب الغني بالدهون ، وتسمى محلية (قير العرب) التي تمتاز بإحتوائها على طاقة حرارية عالية بسبب محتواها من الدهون فضلاً عن مكونات الحليب الأخرى كالبروتين ،والسكر ، والاملاح المعدنية ، والفيتامينات . تمتاز القشطة بسرعة تلفها ، وكونها وسط جيد لنمو الجراثيم مما يشكل مصدراً مهماً للتسمم الغذائي ، ونقل الأمراض (ساجت ، 2010) .

يُعد الجبن وسطاً غذائياً مثالياً لنمو العديد من الأحياء المجهرية ، وذلك لإحتوائه على العديد من المركبات الكربوهيدراتية والنيتروجينية فضلاً عن توفر الكثير من الفيتامينات ، والمعادن المختلفة التي تجعله بيئة صالحة للأحياء المجهرية والتي تلعب دوراً مهماً في إحداث التغيرات الحيوية ، والكيميائية التي تحدد قيمة الغذائية ، ونوعية الجبن ، وصلاحيته للإستهلاك البشري والتي تؤدي أحياناً الى العديد من حالات التسمم الغذائي للمستهلكين ،وتلف وفساد المنتج (السعدي ، 2003) . تحتوي القشطة المحلية والأجبان الطرية المحلية على خلايا خضرية لأنواع متعددة من الأحياء المجهرية ، وسبورات البكتريا اللاهوائية ، والهوائية ، وعلى خمائر وأعفان بأعداد كبيرة وذلك نتيجة تلوث الحليب أثناء إنتاجه وتصنيعه وقد أكد (السامرائي ، 1984) أن الحليب المنتج من بقرة سليمة تحت أفضل الظروف يحتوي على عدد أقل من الأحياء المجهرية ، إلا أنه يصبح عرضه للتلوث لغاية وصول المستهلك سواء بشكله الخام أو بهيئة أحد منتجاته من عدة مصادر مثل جسم الحيوان والضرع. وبين (ساجت ، 2010) في دراسة قام بها للتعرف على

بعض الملوثات الميكروبية للجبن الأبيض الطري المحلي والقشطة المحلية (قيمر العرب) إذ أظهرت نتائج البحث إرتفاع محتوى الجبن الطري ، والقشطة المحلية من الأحياء المجهرية التي شملت العديد من مسببات المرضية للإنسان ، ومسببات التسمم الغذائي هي *E.coli* و *Salmonella* وغيرها .

2-12: مصادر التلوث المحتملة ومصادرها التي يمكن أن تصل إلى الحليب كمادة

خام للتصنيع وبالتالي كمادة غذائية مصنعة يجعله ضار بالصحة:

الغذاء هو عبارة عن خليط من المواد الغذائية التي يتناولها الإنسان في طعامه، وهذه المواد تمد الجسم بالطاقة، وبمستلزمات النمو والبناء ،ومقاومة الأمراض والوقاية . والغذاء بحكم طبيعته معرّض للتلوث بالكيماويات المختلفة مثل المعادن، والمبيدات الحشرية ، والمركبات السامة الأخرى والميكروبات من بكتيريا وفطريات ، وطفيليات وفايروسات وغيرها مما يؤدي الى الإصابة بالتسمم الغذائي والأمراض المختلفة ، وكذلك التلوث الاشعاعي الناجم عن التسرب الاشعاعي من محطات الطاقة أو التجارب النووية ، أو زيادة الجرعة الاشعاعية التي تتعرض لها بعض الأغذية في أماكن التعبئة ، والتصنيع الغذائي بقصد الحفظ والتعقيم فضلاً عن تعرض أعلاف الحيوانات المختلفة لها والتي بدورها تنتقل الى الإنسان (الجزار ، 2000) وفيما يلي سوف نتطرق إلى مصادر التلوث في الحليب الخام ومنتجاته وهي :

1-الحيوان :

يكون الحيوان حاملاً لبعض مسببات المرضية على الرغم من انه بصحة جيدة ، لذلك فإنه يعد مصدراً للتلوث وذلك عن طريق تلوث الحيوان الطوب من المجاميع الميكروبية الموجودة داخل الضرع وتلك الموجودة خارجه (على الجلد) وتزداد في حالة اذا كان حيوان مريض . فقد يصاحب الحليب الناتج عن حيوان مصاب بالتهاب الضرع دم وأعداداً هائلة من خلايا الدم

البيضاء والميكروبات المسببة للأمراض ، وأهم تلك الأمراض التي تنتشر عن طريق الحيوان الحلوب هي السل والحمى والتي تفرز ميكروباتها المسببة لهذه الأمراض في الحليب الناتج عنها ،وتتشابه أعراض المرض في الإنسان ، والحيوان وعادةً ما يكون المرض حاداً في الأطفال الضعفاء، وجميع هذه الأمراض يمكن أن تصيب الإنسان عن طريق تناول الحليب ومنتجاته ،كما أن الهواء والروث والأتربة تعد من المصادر الملوثة للحليب لذا يجب العناية بصحة الحيوان ونظافته ونظافة مكانه . كذلك يعد الحلابين مصدراً لتلوث الحليب ، ونقل ميكروبات حمى الضرع من حيوان لآخر، كذلك قد يكون الحلاب مصاب بأمراض تنتقل الى الحيوان السليم ،ومنه الى الحليب ومن ثم الى المستهلك (احمد والفونس ، 2003) .

2- البيئة والماء:

تعد البيئة من مصادر التلوث الحليب بأنواع عديدة من الأحياء الدقيقة في حال عدم إتباع الشروط الصحية فيها ، كذلك يعد الماء غير صحي ، أو الوارد من مصادر ملوثة من المصادر المهمة لتلوث الحليب بمسببات الأمراض الناجمة عن إستهلاك الحليب ومنتجاته ، وخاصة تلك الناشئة عن أنواع عائلة البكتيريا المعوية التي تعد متطفلة داخل أمعاء الإنسان والحيوان ، والتي تنتقل مع مياه الصرف الصحي إلى المياه المستخدمة في إنتاج الحليب (فضل ، 2007) .

3- الذباب والحشرات والمبيدات في الحليب:

يحمل الذباب الميكروبات المختلفة على أرجله وأجنحته من إفرازات الحيوان ، وجروح إلتهاب الضرع وغيرها ثم يلوث الحليب وأدوات إنتاج الحليب ، والمياه وكذلك تعمل بعض الحشرات مثل الصراصير على نقل مسببات الأمراض الى أدوات ، وأوعية الحليب إذ تلعب الكائنات الحية الدقيقة في تلوث الحليب الخام ومنتجاته ، أو المجفف ومنتجاتها مسببة الكثير من العدوى والتسممات الغذائية للمستهلكين وفي كل يوم يتم الكشف عن ملوث من هذه الملوثات في الحليب

ومنتجاته. تبين للباحثين ان المصدر الاساسي لبقايا المبيدات المتواجدة في الحليب هو الطعام النباتي او الأعلاف الملوثة التي تتغذى عليها الحيوانات فالنباتات التي ترش بالمبيد أنها تمتص جزءاً منه وتخزنه في انسجتها ويعقب ذلك أن ينتقل المبيد الى جسم الحيوان الذي يتغذى على النبات الملوث وتخزن بقايا المبيدات في أنسجة الحيوان الدهنية . كذلك فإنّ عملية رش الحيوانات نفسها بالمبيدات بغرض مقاومة طفيليات معينة على جلدها والتي تعد أحد مصادر التي تؤدي الى انتقال بقايا المبيدات الى جسم الحيوان يتبعه إنتاج حليب يحتوي على آثار هذه المبيد وأنّ هذه المتبقيات السامة تنتقل في النهاية الى الإنسان حيث تخزن في أنسجتهم الدهنية او تتسرب بعد ذلك الى حليب الأمهات ومن ثم الى الأطفال (الفيشاوي ، 2011) .

4- الأدوية البيطرية ومضادات الحيوية التي يعالج بها الحيوان :

المضادات الحيوية هي عبارة عن مركبات عضوية ذات أوزان جزيئية واطئة تنتج من قبل الأحياء الدقيقة كمركبات ثانوية لها القدرة على تثبيط نمو ،أو قتل البكتيريا والأحياء الدقيقة الأخرى خلال آلية عمل المضاد الحيوي بمنع التخليق الحيوي للبروتينات والأحماض النووية في البكتيريا، كما أنها لا تؤثر في رائحة ونكهة ولون الحليب ومنتجاته، تعد منتجات الحليب هي مصدر آخر غير مباشر لوصول مضادات حيوية الى الإنسان فضلاً عن الأضرار الصحية والأضرار التصنيعية التي تؤدي الى فشل في إنتاج منتجات الحليب مثل الجبن واللبن وغيرها وذلك لتأثيرها على بكتيريا حامض اللاكتيك اللازمة لتصنيع هذه المنتجات (Kangethe و آخرون , 2005). أكدت الدراسات والبحوث الحديثة أنّ بقايا الأدوية البيطرية التي تعطى للحيوانات والعديد من الكيماويات التي تضاف الى أعلافها لا تجعل حليبها غير مرغوب من قبل المستهلك فقط بل تجعله مصدراً لخطر كبير على صحته. وعليه أكدت الأبحاث أنّ العديد من المضادات الحيوية تعد من أهم ملوثات الحليب ، وأنّ أيّ حليب ناتج من حيوانات عولجت

بمضادات حيوية يعد غير صالح للإستهلاك طوال فترة العلاج ، وأنَّ إستمرار تسويق الحليب الناتج عن حيوانات تعالج بالأدوية البيطرية ومضادات حيوية يعرض صحة الإنسان وخاصة الأطفال لخطر دائم(Plumb , 2005).

5- المواد الحافظة في الحليب ومنتجاته :

لم يكتف الإنسان بكل ملوثات الغذاء والماء ، والهواء والدواء ،والتي تسلل الى ضرع الحيوانات وحليبها والى الحليب الخام ومنتجاته ، بل راح يضيف الى الحليب الناتج نفسه مركبات كيميائية (مواد حافظة) ريثما ينقل الى المستهلكين أو الى المصانع والمعامل الخاصة في حالة عدم اتباعهم للشروط الصحية كون الحليب بيئة خصبة لنمو وتكاثر الأحياء المجهرية (فضل، 2007) ومن هذه المواد هي :

أ -**الفورمالين** : وهي عبارة عن مادة أخرى يضيفها المنتجون الى الحليب ،وذلك لضمان بقاءه على صورته الطبيعية لحين وصوله الى معامل أو مصانع الألبان ،أو الى المستهلكين ،والصناع انفسهم يضيفون مادة فورمالين الى الحليب عند تصنيعهم للأجبان الطرية بغية حفظها زمناً أطول ،وبذلك فهم يتحكمون في الميكروبات المنتجة للغازات وكذلك يكسب بها الجبن الطري نعومة وطراوة . وقد أكد الباحثين أنَّ السمية باقية في الأجبان حتى وأنَّ كانت نسبة إضافة الفورمالين الى الحليب قليلة جداً (Ahmed و Abdellatif , 2013) .

ب- **مادة فوق اكسيد الهيدروجين (H_2O_2) السامة** : ثبت أنَّ لهذه المادة تأثيراً سيئاً على التركيب الكيميائي للحليب ،وخاصة الفيتامينات . كذلك فأنها تؤدي الى إتلاف بعض خصائص الأحماض الأمينية المكونة لبروتينات الحليب ، لذلك يشترط إضافة هذه المادة الى الحليب بتركيز (0.04 %)(Salah وآخرون , 2013).

ت- نترات الصوديوم او البوتاسيوم : تستخدم هذه المواد بتركيز (0,1 - 0,02 %) الى الحليب المعد لصناعة بعض أنواع الجبن الجافة وذلك لوقف نمو ونشاط البكتريا المنتجة للغازات وعلى الرغم من أنّ مادة النترات هي مادة غير سامة إلا أنّ خطورتها تعود الى تحولها من خلال تفاعلات انزيمية او النشاط الميكروبي الى مادة النتريت السامة وهذه تفاعلات تحدث عادة بدون تحكم فقد تتم في الغذاء نفسه أو قد تحدث في أمعاء البالغين ،وفي معدة واثنى عشر الأطفال الرضع (النسر وناهد محمد ، 2012).

2-13:النوعية الميكروبية للحليب الخام :

إنّ تامين نوعية عالية للحليب الخام تعد مسألة صعبة والتي تعتمد على عدة عوامل منها طريقة الحلابة المستخدمة يدوية ، آلية وطرائق نقل الحليب الى أماكن التصنيع ، وعملية تبريد الحليب بعد الحلابة مباشرةً (Whitney , 2006) أنّ نوعية الحليب الخام سواء كانت ميكروبية أو فيزيائية أو كيميائية لها دورٌ كبيرٌ في تحديد نوعية المنتجات المصنعة منه فالحمولة الميكروبية المرتفعة تخفض من مدة حفظ الأجبان المطبوخة (Boughtfower و Leushner , 2002) أنّ استخدام الحليب الخام المرتفع الحملولة الميكروبية في التصنيع أرتبط بوجود مخاطر ، وانتشار الأمراض (Hatchet , 2002) . تسمح النوعية الميكروبية الجيدة للحليب الخام بإطالة مدة حفظ الحليب المبستر (Dougla وآخرون , 2000) في حين تسبب النوعية الميكروبية السيئة في اطالة مدة تجبن الحليب ،وانخفاض المردودية (Santos وآخرون , 2003) . وتسعى الدول المتقدمة في مراقبة النوعية الميكروبية للحليب وذلك لما لها من أهمية عن طريق تحديث التجهيزات المختبرية المعدة لإستلام الحليب الخام لإنجاز الاختبارات بشكلٍ سريعٍ ودقيقٍ وبأقل التكاليف (Anderton , 2007) كذلك إخضاع المزارع الى رقابة دورية، والسعي في نشر

النظام الحديث في الحلابة ، والنقل المبرد للحصول على حليب ذي نوعية جيدة (Fromm و Boor , 2004) .

2-14: المحتوى الوراثي لبكتريا *Campylobacter* :

كروموسوم بكتريا *campylobacter* يحتوي على كوانين وسائتوسين تقريباً (30% - 35%) وحجم الجينوم يتراوح ما بين (16.000-17.000 kb) مليون زوجاً قاعدياً ، تعد هذه النسبة صغيرة بالمقارنة مع المسببات المعوية الأخرى مثل بكتريا (*E.coli*) التي يصل حجم الجينوم الى (45,00 kb) إذ تتراوح نسبة كوانين وسائتوسين الى (50%) وعوامل كروموسومية تختلف باختلاف أعدادها، وأوزانها من نمط مصلي لآخر. أنّ صغر حجم الجينوم ينعكس في احتياجات البكتريا للنمو على الأوساط الاغنائية والقدرة على تخمر الكربوهيدرات وتحلل المواد المعقدة ، كما أنّ العديد من الجينات المشفرة بعضها تكون بلازميدية المنشأ والبعض الآخر تكون كروموسومية المنشأ. وأنّ غالبية هذه البلازميدات هي بلازميدات إقترانية Conjugative Plasmids . بينت العديد من الدراسات أنّ عدد الجينات المشفرة من أنواع بكتريا *Campylobacter* تكون منخفضة مقارنة مع العديد من مسببات الأمراض المعوية الأخرى (Ketley , 1995) .

2-15: التحري عن الجين *cadf* في البكتيريا *Campylobacter jejuni*

بتقنية PCR:

تُعد تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) أحد أهم التطورات العملية في الهندسة الوراثية ، وقد حصل مخترعه كيري ميلس kary mullis على جائزة نوبل سنة 1992، تستخدم هذه التقنية في تضخيم أي تسلسل قصير من الـ DNA ، مثلاً

جين أو قطعة جين ، ذلك لمرات عديدة باستخدام أنزيم DNA polymerase، وتعد هذه التقنية ذات قيمة عالية في مجال تعريف الجينات و التلاعب بها ، إذ يتطلب البروتوكول القياسي لهذه الطريقة شريط قالب DNA الذي يحتوي على التتابع المطلوب تضخيمه والمتكوّن من عشرات أو عشرات الآلاف من النيوكليوتيدات ، و زوج من البودائ primers اللذان يرتبطان بأحد أطراف تسلسل جزيئة الدنا المراد تضخيمها ، وبوجود أنزيم Taq DNA Polymerase الثابت حرارياً فضلاً عن محلول دارئ يُمثّل وسطاً لإجراء أو حدوث التفاعل الذي يحتوي على القواعد النيتروجينية الأربع dNTPs (Nicholl , 2008) . تتم هذه العملية بثلاث خطوات: الأولى تتضمن مسخ (Denaturation) لشريط القالب أي فك شريطيه للسماح للبودائ بالارتباط مع التتابع المكمل لها على شريط القالب ، أما الخطوة الثانية فتضم ارتباط (Annealing) البودائ مع شريطي القالب ، والثالثة التي يطلق عليها بخطوة الإستطالة (Extension) والتي يبدأ من خلالها إنزيم البلمرة بإضافة القواعد النيتروجينية لشريط البادئ من النهاية (OH-3) الحرة (Russell وSambrook, 2001).

يتم الكشف عن نواتج التفاعل باستخدام أكثر من طريقة ، أهمها و أكثرها إستعمالاً هي الترحيل الهلامي Gel electrophoresis على هلام الاكاروز تستخدم للكشف عن القطع المستهدفة ، ومعرفة حجمها بالمقارنة مع قطع DNA معروفة الحجم و الوزن DNA ladder ، و تكون عملية الكشف والاظهار بإستعمال صبغات أو مواد مثل بروميد الاثيديوم Ethidium bromide الذي يعطي تألّفاً عند تعريضه للضوء فوق البنفسجي Ultra violet light (الخفاجي وابو المعالي ، 2013) . تمكنت تقنية PCR من إعطاء نتائج ذات دقة عالية وحساسية نوعية إذ تعد من أحد أهم التقنيات التشخيصية التي يتم من خلالها إختصار العديد من الإختبارات التقليدية ، منها الكشف عن جينات التي تضم جين CadF.

المواد وطرائق
العمل

Materials and Methods

Chapter Three الفصل الثالث

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1-3 : المواد :

1-3-1: الأجهزة والمعدات :

أستخدمت في هذه الدراسة كل من الأجهزة والمعدات المدرجة في الجدول (1-3-1)
جدول(1-3-1) الأجهزة والمعدات المستخدمة في الدراسة.

المصنعة الشركة	اسم الجهاز (Apparatus Name)	ت
Company and Origin		
Human Lab (Korea)	Autoclave	1 مؤصدة
Shndon (England)	Benzen Burnner	2 مصباح بنزن
Hettich (Germany)	Centrifuge	3 جهاز الطرد المركزي
Memmert (GERMANY)	Incubator Anaerobic	4 حاضنة لا هوائية
Nikon (japan)	Compound Light Microscope	5 مجهر ضوئي مركب
Lab tech (Korea)	Distillater	6 جهاز ماء منزوع الايونات
Helena (USA)	Gel Electrophoresis	7 جهاز ترحيل كهربائي
Herolab (Germany)	Gel documentation	8 جهاز تصور الهلام
Brand (Germany)	Beaker	9 كؤوس زجاجية
Brand (Germany)	Cylinder	10 اسطوانات مدرجة
Brand (Germany)	Tube	11 أنابيب اختبار زجاجية
Brand (Germany)	Flask	12 دوارق بإحجام مختلفة
Memmert (GERMANY)	Incubator	13 حاضنة
China	Laptop	14 حاسبة
Loop Rhndon	Loop	15 عروة ناقلة

(England)		
Biomeriex (France)	Micro centrifuge	جهاز طرد مركزي دقيق 16
Bioner (Korea)	Micro Tubes	انابيب دقيقة 17
(USA)	Millipore filter (0.45 µm)	أوراق ترشيح 18
USA	Multigene optimeax cyclor PCR	جهاز البلمرة 19
Memmert(Germany)	Oven	فرن كهربائي 20
Walk Lab (Malaysia)	PH-Meter	جهاز قياس الأس الهيدروجيني 21
Brand (Germany)	pipettes	ماصات زجاجية مختلفة الأحجام 22
AFMA	Plastic Tubes	انابيب بلاستيكية معقمة 23
AFMA (Jordan)	Plastic Petridish	أطباق بتري بلاستيكي 24
Qean (Egypt)	Refrigerator	ثلاجة 25
Sartorius (Germany)	Sensitive Balance	ميزان حساس 26
Shiv Dial Sud & Sons Ambala Cantt. (INDIA)	Slides and Covers	شرائح زجاجية وأغطية 27
Shimadzu (Japan)	الضوئي مطياف جهاز Spectrophotometer	28
Meheco-China.	Syringes	محاقن مختلفة الأحجام 29
Bioneer (Korea)	Tips	30
(ATACO-Brand)	Transprot Cotton Swab	مسحات قطنية ناقلة 31
Memmert (GERMANY)	UV.cabinate	كابينة الأشعة فوق البنفسجية 32
Lab.Tech (Korea)	Vortex Mixer	مازج 33
Memmert (Germany)	Water Bath	حمام مائي 34
Lab tech (Korea)	Water Distillator	جهاز تقطير الماء 35

3-1-2: المواد الكيميائية والمحاليل :

أستخدمت في هذه الدراسة كل من المواد الكيميائية والمحاليل المدرجة في جدول (2-1-3)

جدول (2-1-3) المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة .

ت	المحاليل والمواد الكيميائية	المنشأ
1	كحول ايثانول المطلق Absolute ethanol alcohol	B.D.H
2	اسيتون Aceton	BDH
3	الأكاروز Agarose	USA
4	خلاصة اللحم Beef extract (powder)	Oxoid (England)
5	كلوريد الكالسيوم Calcium chloride	Oxoid
6	فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم Disodium hydrogen phosphate	Oxoid
7	أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك EDTA	B.D.H
8	صبغة برومايد الإثيديوم Ethidium Bromide	Sigma (USA)
9	كليسروول Glycerol	B.D.H
10	بيروكسيد الهيدروجين Hyderogen peroxide	Oxoid (England)
11	كلوريد الصوديوم NaCl	Sdfcl
12	هيدروكسيد الصوديوم NaOH	B.D.H (England)
13	ماء الببتون Pepton Water	Difco(USA)
14	كلوريد الصوديوم Sodium chloride	B.D.H(England)
15	ثايوكلايكولات الصوديوم Sodium thioglycollate	Oxoid
16	نشأ Starch	B.D.H
17	كبريتات الصوديوم Sodium sulfate	Oxoid
18	هيبيوريت الصوديوم Sodium hippurate powder	B.D.H(England)

19	بايروفات الصوديوم	Sodium Pyruvate	Oxoid (England)
20	ثنائي كبريتات الصوديوم Metabisulite	Sodium	Oxoid
21	ثنائي هيدروكلوريد رباعي المثل - بارار- فينيل ثنائي الامين Tetramethyl -p - phenylenediamine - dihydrochloride	B.D.H	
22	ترس الحامضي	Tris – HCL	B.D.H
23	ترس القاعدي	Tris – basie	B.D.H
24	زايلول		Merck (Germany)
25	محلول صبغة كرام		GCC

(3-1-3) : أستخدمت في هذه الدراسة الأداة التشخيصية kits المبينة في

جدول(3-1-3)

ت	الأداة المختبرية	الشركة المصنعة (منشأ)
1	غدة Master Mix PCR وتحتوي المحاليل الكافية لإجراء 100 تفاعل كل تفاعل بحجم (20) مايكرو ليدر.	Bioneer (Korea)

4-1-3 : الأوساط الزرعية :

حُضِرَت هذه الأوساط وفق ما ورد في (Steel و Cawan ، 2004) وعلى حسب تعليمات

الشركة المنتجة.

1- وسط الدم الاساس Blood Agar Base: حضر هذا الوسط بإضافة (5%) من

الدم إلى وسط أكار الدم الأساس المعقم بالظروف الاعتيادية والمبرد إلى 45م يستخدم هذا

الوسط لغرض العزل التفريقي لبكتريا الـ *Campylobacter*، المنتج من قبل شركة (Oxoid ENGLAND).

2- **آكار الماكونكي Mac Conky Agar** : حضر بإضافة 51.5 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر استخدم لتنمية بعض انواع بكتريا *Campylobacter* ومعرفة قابلية البكتريا على تخمر سكر اللاكتوز المنتج من قبل شركة (Rashmi INDIA).

3- **Skirrow's Media Columbia Blood Agar Base + Skirrow Selective Supplement III** وسط سكيرو (كولمبيا الأساس) + إضافة سكيرو الانتقائية : وسط (Columbia Blood Base Agar) الحاوي على مضادات الحيوية (Skirrow Selective Supplement III) متكونة من :

1- Polymyxin B(1.25IU)

2 -Vancomycin(5.0 mg)

3 - Trimethoprim (2.50mg)

ودم الانسان بنسبة (5%) ومنشطات النمو هي Sodium metabisulfate(0.5gm)- Sodium pyruvate (0.5gm)- Sodium sulfate (0.5gm). حضر هذا الوسط بإذابة (39غم) من وسط Columbia في لتر من الماء المقطر يعقم بالمؤصدة ويبرد بدرجة (50م°) ثم يضاف له دم الإنسان و(عبوة واحدة) من Skirrow Selective Supplement III يمزج ويصب في أطباق معقمة يستخدم هذا الوسط لغرض العزل الانتقائي لبكتريا الـ *Campylobacter* المنتج من قبل شركة (Oxoid ENGLAND).

4- **أكار الدم المسخن Chocolate Agar** : حضر هذا الوسط بإضافة 5% من الدم إلى أكار الدم الأساس المعقم ثم سخن الوسط إلى أن أصبح غامق اللون (بني غامق) ثم برد الوسط إلى 45 – 50 م° استخدم لغرض الزرع الثانوي للبكتريا المنتج من قبل شركة (Oxoid ENGLAND).

5- **وسط بريستون Campylobacter Selective Supplement (Preston)** : Preston Campylobacter Blood – Free Medium الحاوي على مضادات

الحيوية المتكونة من :

- 1- Polymyxin B (1.25IU)
- 2- Rifampicin (5.0mg)
- 3- Trimethoprim (2.50mg)
- 4- Cycloeximide (50.0mg)

Sodium metabisulfate(0.5gm)- ودم الانسان بنسبة (5%) ومنشطات النمو هي Sodium pyruvate (0.5gm)- Sodium sulfate (0.5gm) حضر هذا الوسط من اذابة 18.5 غم في 475 مل من المقطر ويعقم بالؤصدة ثم يبرد الوسط الى (50م°) وتمزج جيدا وتصب في اطباق معقمة استخدم هذا الوسط لغرض العزل الانتقائي لبكتريا *Camplobacter* المنتج من قبل الشركة (Oxoid ENGLAND) .

6- مرق البروسيلا **Brucella Broth** : حضر هذا الوسط بإضافة 14.5 غم من الوسط في 500 مل من الماء المقطر يستخدم لحفظ البكتريا لمدة طويلة بالتجميد بعد إضافة الكليسيرول بنسبة 20% المنتج من قبل شركة (Himedia) .

7- وسط ثلاثي السكر-الحديد **Triple Sugar Iron** : يحضر الوسط بإضافة 0.06 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر استخدم في الكشف عن قدرة البكتريا على تخمير السكريات وإنتاج غاز H_2S المنتج من قبل (Oxoid) .

8- وسط الحركة **Motility Medium** : يحضر باذابة 3.8 غم من مرق البروسيلا في 100 مل من الماء المقطر وأضيف له 0.4 غم من agar بعد التعقيم تصب في أنابيب وترك فترة ليبرد ليصبح شبه صلب استخدم في الكشف عن قابلية البكتريا على الحركة المنتج من قبل شركة Himedia

9- وسط اختبار تحلل الهيبوريت **Hippurate Hydrolysis Test Medium** : يتكون هذا الوسط من محلول هيبورات الصوديوم 1% في الماء المقطر والمعقم ووزعت بأنابيب معقمة بحجم 0.4 مل باستخدام اوراق الترشيح وخزن عند درجة حرارة - 20م° إلى حين الاستعمال ولمدة لا تتجاوز الأسبوع استخدم في الكشف عن قابلية البكتريا على تحلل الهيبوريت المنتج من قبل شركة (BHD ENGLAND) .

10 - وسط مولر – هينتون **Muller Hinton Agar** : حضر باذابة 38 غم من الوسط في 1000 مل من الماء المقطر استخدم لتنمية البكتريا المعزولة لغرض اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحياتية المنتج من قبل شركة (Oxoid) .

11- وسط نقيع المخ-القلب **Brian Heart Infusion agar** : حضر هذا الوسط من اذابة 52 غم في لتر من الماء المقطر استخدم هذا الوسط لحفظ العزلات بعد اضافة الكليسرول بنسبة 20% (15- 20 مل) المنتج من قبل شركة (Himedia) .

3-1-5: أستخدمت في هذه الدراسة الأنزيمات المبينة في الجدول (3-1-5).

ت	الانزيمات	الشركة المصنعة
1	أنزيم Proteinase K	Bioneer – Korea
2	أنزيم Lysozyme	Bioneer – Korea

3-1-6: أستخدمت في هذه الدراسة مواد متفرقة المدرجة في جدول(3-1-6).

(6).

ت	المادة	المصدر
1	Polymyxin B	(Jordan)
2	Rifampicin	معمل ادوية سامراء
3	Trimethoprim	معمل ادوية سامراء
4	Vancomycin	معمل ادوية سامراء
5	دم الانسان Human Blood	مصرف الدم – مستشفى بعقوبة العام التعليمي

3- 2: طرائق العمل :

3-2-1: المحاليل والصبغات والكواشف البكتريولوجية:

حضرت المحاليل والصبغات والكواشف وذلك بالإعتماد على المصادر المتبعة في الدراسة. عقت هذه المواد التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز (Autoclave) عند درجة حرارة (121م°) ولمدة (15دقيقة) تحت ضغط (15باوند/ انج²). بينما عقت المواد الأخرى التي تتعرض للتلف عند درجات الحرارة المرتفعة وذلك باستخدام اوراق ترشيح Millipore filter بقطر (0.45) مايكرومتر ، أما المواد الزجاجية عقت بالفرن عند درجة حرارة (180م°) ولمدة ساعتين .

3-2-2 : المحاليل Solutions :

1- محلول الملحي الفسيولوجي Physiological Saline Solution :

يحضر من إذابة 0.85غم من مادة كلوريد الصوديوم (Nacl) شركة (BDH) في(900 مل) وأكمال الحجم الى لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة (Autoclave) ، إستخدم في التخافيف وتحضير العوالق البكتيرية (Forbes وآخرون , 2002).

2- محلول اليوريا Urea Solution :

حضر بإذابة (40غم) من اليوريا بكمية قياسية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى (100 مل) ويعقم بالترشيح وذلك باستخدام أغشية ترشيح دقيقة لحين الإستعمال (MacFaddin , 2000) .

3- محلول هيبورييت الصوديوم Sodium hippurate :

يحضر هذا المحلول بنسبة (1%) في الماء المقطر المعقم ثم يوزع بحجم مقداره (0.4 مل) في أنابيب معقمة ثم يحفظ بدرجة حرارة (-20م) لحين الإستعمال .

4- محلول النهدرين Non- hydrin solution :

يحضر بنسبة (3.5 %) في خليط من الاسيتون والبيوتانول المحضر بنسبة 1:1 (5 مل من الاسيتون و5 مل من البيوتانول) ويحفظ في الظلام بدرجة حرارة الغرفة .

5- محلول صبغة كرام Gram stain :

أستعملت الصبغات الجاهزة والمجهزة من قبل شركة (Himedia \ India) وذلك لتصبغ البكتريا وتصنيفها الى سالبة وموجبة .

6- محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH:

حضر هذا المحلول من إذابة (16غم) من NaOH في (100مل) من الماء المقطر، يستخدم هذا المحلول لغرض ضبط الاس الهيدروجيني (pH) .

3-2-3: حفظ وإدامة العزلات البكتيرية :

• **وسط مرق البروسيل Brucella Broth :** لقحت أنابيب حاوية على (8 مل)

من وسط البروسيل بالعزلات المشخصة وحضنت في حاضنة لاهوائية بدرجة حرارة

(37م) لمدة (48 ساعة) أضيف بعد ذلك 2 مل (15-20%) من الكليسيول المعقم

وحفظت بالتجميد (Albert وآخرون , 2008).

• **وسط نقيع الدماغ - القلب Brian Heart Infusion agar :** لقحت

الأنابيب الحاوية على وسط نقيع الدماغ - القلب مع إضافات النمو (كبريتات الحديد -

ثنائي كبريتات الصوديوم - بايروفات الصوديوم (بالعزلات المشخصة وحضنت في حاضنة لاهوائية بدرجة حرارة (37°) لمدة (48 ساعة) ثم يضاف 2مل (20%) من الكليسيروول المعقم وتحفظ بالتجميد .

3-2-4: تحضير المحاليل الخزينة الخاصة بالإختبارات الوراثية :

تم تحضير المحاليل الخزينة كافة وفق ما جاء في (Russel و Sambrook , 2001

; Stephenson , 2003) كالآتي :-

• دارئ ترس - حامض الهيدروكلوريك Tris – HCl :

تم تحضير هذا المحلول بتركيز (2مولاري) بإذابة (31.52غم) من الترس الحامضي في (80 مل) من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني pH إلى (7.5) بإستخدام حامض HCl المركز و أكمل الحجم إلى (100مل) وعُقم بالمؤصدة .

• محلول أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك EDTA :

تم تحضير هذا المحلول بتركيز (0.5 مولاري) بإذابة (93.06غم) من مادة EDTA في (400 مل) من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني pH إلى (8) بإستخدام NaOH (10 عياري) و أكمل الحجم إلى (500 مل) من الماء المقطر وعُقم بالمؤصدة.

3-2-5 : المحاليل المستعملة في عزل الدنا البكتيري DNA- Extraction

:Solutions

تم أستعمال عدة أستخلاص الـ DNA المجهزة من شركة Bionner لأستخلاص الدنا البكتيري، DNA جدول (3-2-5) يوضح محتويات عدة الاستخلاص.

أستخدمت في هذه الدراسة جدول مكونات عدة استخلاص الدنا البكتيريا المبينة في جدول (3-5-2).

Kit Components	
1	Pellet cells solutions : - • Gram + Buffer (30) ml .
2	Lyse cells solutions : - • Lysozyme (110) m.g • Proteinase K (1.1) m.g + 1.1 ml (ddH2O) . • GB Buffer (30) ml
3	DNA Binding : - • Absolute ethanol alcohol (25) ml . • GD Columns (100)
4	Wash • W 1 Buffer (45) ml . • Wash Buffer (25) ml .
5	Elution • Elution Buffer (30) ml .

3-2-6: الإنزيمات المستعملة :

- إنزيم **Proteinase K** : حضر بإذابة 11 ملغم في (1.1 مل) من الماء مقطر منزوع الاستقطاب dH2O .

- إنزيم **Lysozyme** : حضر بإذابة 110 ملغم في (30 مل) من Gram Buffer ومزج جيداً وبعدها يحفظ بدرجة (4 °C) ولمدة اسبوعين (للعينة الوحدة يحضر من أذابة 4 مليغرام في 200 مايكرو ليتر من Gram Buffer).

2-3- 7 : المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis solutions

حضرت المحاليل الخاصة بالترحيل الكهربائي وفق ما جاء في (Sambrook و ، 2001 (Russel).

● محلول (TBE) Tris- Boric acid – EDTA :

10x حضر هذا المحلول من (0.089 مولار) من Tris-OH ، (0.089 مولار) من حامض البوريك و 0.002 مولار من Na₂-EDTA في (800 مليلتر) من الماء المقطر ، وضبط pH إلى (8) وأكمل الحجم إلى 1000 مليلتر ، وعقم بالمؤصدة ، وحفظ في (4 ° م) لحين الإستعمال.

● دارئ التحميل Loading buffer :

حضر من (50%) TBE ، 30% كليسيرول ، 0.25% صبغة بروموفينول الازرق ، 20% ماء مقطر.

● محلول خزين بروميد الإثيديوم Ethidium Bromide Stock Solution :

حُضر من إذابة (0.05 غم) من صبغة بروميد الإثيديوم في (9 مل) من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (10 مل) بالماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم ١ مل.

8-2-3 :المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR:

● محلول PCR pre mix Master,

المحضر مسبقاً والمجهز من قبل شركة (Bioneer (Korea ملحق رقم (3) والذي يتكون من:

Taq DNA polymerase 2.5 U/ml

dNTPS 250 Mm

Tris – HCl 10 mM

KCL 30 Mm

MgCl₂ 1.5 mM

● محاليل البوادي : Primers Solutions

أختيرت البوادي المتخصصة والمستهدفة لجين (*Cad F*) وفقا لما جاء في (Ghosh

Rouni وآخرون , 2014) ، والتأكد من البكتريا التي تعود الى جنس *Campylobacter*

، كما موضح في جدول (3-2-8) . تم تحضير المحاليل الخزينة بحسب تعليمات شركة

Bioneer المُجهزة لها بإستعمال dH₂O للحصول على تركيز 10pmol/μL ملحق رقم(1)

جدول (3- 2- 8) يبين تتابعات وتراكيز البوادي وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ حسب ما ورد في (GhoshRouni وآخرون, 2014) .

ت	البادئ	تتابع البادئ 3' 5' →	عدد القواعد bp	حجم الناتج bp
1	<i>cadF</i> - F	5-TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG - 3	20	400
2	<i>cadF</i> - R	5-CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC -3	20	

تم تحضير محلول كل بادئ ، وبشكل منفصل بتركيز (10 بيكومول ١ مايكروليتر) ، وذلك

بأخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل بادئ وإضافته إلى 90 مايكروليتر من dH₂O

ومُزجه جيداً وحُفظه في الثلج لحين الإستعمال في حين حُفظت المحاليل الخزينة للبوادي في

درجة (20-) مع مُراعاة مزج المحلول بعد إخراجهِ من الثَّلج بِإستعمال المازج لِمُجانسته قبل الإستعمال.

3-2-9: الصبغات Stains :

1- صبغة كرام Gram's Stain :

حضرت هذه الصبغة وفق ما جاء في (Cawan و Steel , 2004).

3-2-10: الكواشف Reagents:

حضرت كواشف الاختبارات الكيميائية الحيوية للتعرف على العزول البكتيرية وفق ما جاء في)

(Cawan و Steel , 2004) كما يلي :

1- كاشف الكاتاليز Catalase Reagent :

يحضر من مادة بيروكسيد الهيدروجين (Hydrogen Peroxide) بنسبة (3%) من الماء المقطر يستخدم في الكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز (Cawan و Steel , 2004).

2- كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent :

يحضر أنيا عند الإستخدام وذلك بإذابة (1غم) من مادة Tetramethyl -p - phenylenediamine - dihydrochloride في (90 مل) من الماء المقطر، ثم يكمل الحجم الى (100مل)، يستخدم هذا الكاشف لمعرفة قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم الاوكسيديز (Cawan و Steel , 2004).

3-3 : طرائق التعقيم :

عُقمت الأوساط والمحاليل جميعها بجهاز المؤصدة (Autoclave) عند درجة حرارة (121م°) وتحت ضغط (15باوند/انج²) لمدة (15دقيقة) بعد ضبط الاس الهيدروجيني (PH) لهذه الأوساط والمحاليل وذلك بإضافة هيدروكسيد الصوديوم أو حامض الهيدروكلوريك أما الزجاجيات

فعقمت جميعها بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة (180م°) لمدة ساعتين في حين عقمت المواد الكيميائية الخاصة بإضافات النمو بالترشيح باستخدام مرشحات تستخدم لمرة واحدة ذات قطر (0.45) مايكرومتر (Steel و Cawan , 2004).

2-3: طرائق العمل:

11-2-3: جمع العينات : Collection of Samples

1- تم جمع (123) عينة من مصادر متنوعة التي اشتملت على (30) عينة من الحليب الخام ، و(30) من الجبن الأبيض المحلي ، و(30) عينة من القشطة المحلية " قير العرب " و(33) عينة من براز أطفال مصابين بالإسهال (20) عينة إسهال مائي - (10) عينة إسهال مخاطي و(3) عينة إسهال دموي . تضمنت الدراسة التي اشتملت على (30) عينة من الحليب الخام ، (30) عينة من الجبن الأبيض الطري المحلي و(30) عينة من القشطة المحلية " قير العرب " ووضعت في أنابيب معقمة من الأسواق المحلية في قضاء بعقوبة للفترة من (1-11-2015 لغاية 28-2-2016) ثم نقلت العينات مباشرة الى مختبر الدراسات العليا في الكلية ومن ثم إعداد العينات لإجراء الفحوصات المختبرية اللازمة .

2- تم جمع (33) عينة براز من الأطفال المصابين بإسهال مائي أو دموي أو مخاطي بإستعمال مسحات قطنية ناقلية ووضعها في أنابيب معقمة حاوية على محلول الملحي الفسيولوجي ، وتتراوح أعمارهم من (3 اشهر - 5 سنوات) من مستشفى البتول التعليمي للولادة والأطفال في محافظة ديالى للفترة من (1-2-2016 لغاية 18-5-2016) ثم اعداد استمارة خاصة لجمع المعلومات المتعلقة بالمريض من حيث(العمر - الجنس - تاريخ اخذ العينة) ملحق رقم (4 و 5) ، ثم نقلت العينات مباشرة الى مختبر الدراسات العليا في الكلية بإستعمال حاوية صغيرة تحتوي على قطع من الثلج للحفاظ على درجة حرارة العينات ، وذلك لغرض

إجراء الفحوصات والزرع والتشخيص على عينات الدراسة . وتم الحصول على عزلات تعود الى جنس *Campylobacter* ، أن العينات البرازية التي تم تنميتها في ظروف تهوية كانت نسبة الأوكسجين عالية وهذه النسبة لا تتوفر متطلبات النمو لهذه البكتريا وكذلك عدم توفر Gas Generating Kit .

12-2-3 : زرع العينات Samples Culture :

1- تم أخذ (1مل) من الحليب الخام وضعت العينة في إنبوبة معقمة حاوية على (9 مل) من المحلول الفسيولوجي لكي تتجانس محتوياتها ويحصل توزيع متجانس للخلايا البكتيرية بإستعمال جهاز الخلط Vortex Mixer ثم ينقل من الإنبوبة سابقة بمقدار (1مل) بواسطة الماصة الى إنبوبة معقمة حاوية على (9 مل) من المحلول الفسيولوجي وتستمر في عمل التخفيفات الى مدى (10^3) اي تخفيف ثالث . ثم نأخذ من كل تخفيف بمقدار (0.5 مل) وتزرع في الأطباق المحتوية على وسط (Preston *Campylobacter* Blood- Free Selective) medium ووسط (Skirrow Selesctive Supplement III) المحضر في المختبر . ثم تترك الأطباق عند درجة حرارة الغرفة لمدة (5 دقائق) وحضنت الأطباق في ظروف مقلة للأوكسجين Microearophilic في حاضنة لاهوائية بدرجة حرارة (37 م°) ولمدة من (24-48) ساعة . ومن ثم يتم فحص الأطباق بعد فترة التحضين لكي يتم وصف المستعمرات . ثم يتم تنقية البكتريا عن طريق عزل المستعمرات المختلفة بتخطيطها على أطباق جديدة وتحضن لمدة (24-48) ساعة . وتفحص البكتريا بعدها بتصبغها بصبغة كرام والتأكد من نقاء المزرعة .

2- تم تحضير مستحلب الجبن والقشطة المحلية حيث اذ تم وزن (1غم) من العينة ونقلت بعد تقطيعها بإستعمال أداة الجفنة المعقمة (في الفرن لمدة ساعتين) الى أنبوبة معقمة حاوية على

(10مل) من محلول التخفيف (سترات الصوديوم بتركيز 2%) . ثم يمزج المحلول جيدا باستعمال جهاز الخلط الكهربائي Vortex Mixer لمدة (5 دقائق) وبسرعة عالية ثم يترك المحلول لمدة (15 دقيقة) لكي تستعيد الأحياء المجهرية حيويتها مع الإستمرار بالتحريك البطيء لضمان عملية تجانس المحلول . وأخذت كمية من المحلول المستحلب بواسطة المسحة القطنية الناقلة او الناقل Loop ثم تلقح الأوساط الزرعية المستخدمة هي *Preston Campylobacter* medium (Blood- Free Selective) ووسط (Skirrow Selesctive Supplement III) وحضنت الأطباق في ظروف مقلة للأوكسجين Microearophilic في حاضنة لاهوائية بدرجة حرارة (37°) ولمدة من (24-48) ساعة . ومن ثم تم فحص الأطباق بعد فترة التحضين لكي يتم وصف المستعمرات . ثم تم تنقية البكتريا عن طريق عزل المستعمرات المختلفة بتخطيطها على أطباق جديدة وتحضن لمدة (24-48) ساعة . وتفحص البكتريا بعدها بتصبغها بصبغة كرام والتأكد من نقاء المزرعة .

3- أخذت مسحات من عينة البراز ووضعت في المحلول الملحي الفسيولوجي ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي (3000 دورة في الدقيقة) لمدة (30 دقيقة) ثم أخذ من الطافي بواسطة مسحات قطنية ناقلة ولقح بها وسط اكار كولومبيا الحاوي على المضادات الحيوية ودم الإنسان ومنتشطات النمو . (Skirrow Selesctive Supplement III) المحضر في المختبر وذلك بخطيبتها على الوسط . وحضنت الأطباق في ظروف قلة الأوكسجين Microearophilic في حاضنة لاهوائية بدرجة حرارة (42°) ولمدة من (24-48) ساعة . ومن ثم فحصت الأطباق بعد فترة التحضين ووصفت المستعمرات . ثم تم تنقية البكتريا عن طريق عزل المستعمرات المختلفة بتخطيطها على أطباق جديدة وتحضن لمدة (24-48) ساعة . وتفحص البكتريا بعدها بتصبغها بصبغة كرام والتأكد من نقاء المزرعة .

4- أُجريت طريقة الزرع الثانوي للبكتريا على أوساط غير إنتقائية مثل (Blood agar و Choclate agar و Mac Conky Agar) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (37م°) في ظروف مقلة للأوكسجين لمدة (24-48) ساعة (Albert وآخرون , 2008).

4-3 : تشخيص البكتريا Diagnosis of Bacteria :

شُخصت العزلات المستحصل عليها وفق ما ورد في (Cawan و Steel , 2004) من حيث الخصائص المظهرية والمجهريّة Morphological Characteristics .

1- دراسة الخصائص المظهرية المزرعية للمستعمرات النامية لكل عينة والتي تضمنت (لونها وخواصها ورائحتها)

2- الفحوصات المجهريّة وتفاعلات صبغة كرام وذلك للتعرف على شكل البكتريا.

2- الخصائص المزرعية تم دراسة النمو مظهرها على الأوساط الصلبة إذ أنّ الأطباق التي لا يوجد فيها نمو في اليوم الثاني من التحضين يتم زرعها وحضنها مرة أخرى لمدة يومين .

5-3 : الفحوصات الكيميائية الحيوية Biochemical Tests :

نفذت عدد من الاختبارات الكيميائية الحيوية لغرض تشخيص البكتريا النامية على الأوساط الغذائية بعد (24-48) ساعة وهي المدة اللازمة لنموها وفق ما جاء في (Cawan و Steel , 2004) والاختبارات هي:

1- اختبار تحلل الهيبوريت Hippurate hydrolysis test :

ينقل جزء من المستعمرات البكتيرية النامية لمدة (24 ساعة) على وسط اكار كولومبيا الحاوي على مضادات الحيوية ودم الإنسان ومنشطات النمو بواسطة الناقل Loop الى أنبوب من محلول هيبورات الصوديوم المحضر (1%) بعد تذويبه ويخلط المزيج جيداً ويحضن في حاضنة

لاهوائية لمدة ساعتين بدرجة حرارة (37م°) ثم يضاف حجم مقداره 0.2 مل (3-4 قطرات) من محلول النهدرين بعد انتهاء مدة الحضانة ومن ثم يعاد الى الحاضنة نفسها وبدرجة حرارة نفسها. ثم فحصت الأنابيب بعد مرور (10دقائق)، إذ تظهر إيجابية الفحص عن طريق تكون لون بنفسجي غامق وعدم ظهور اللون يدل على سلبية الفحص .

2- اختبار تكوين غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S على وسط TSI :

لُفحت الأنابيب الحاوية على وسط ثلاثي السكريات الحاوي على الحديد (TSI) بالمستعمرات النامية لمدة (24ساعة) وحضنت بدرجة حرارة (37م°) في حاضنة لاهوائية لمدة (48 ساعة) ، تظهر إيجابية الفحص عن طريق تكوّن راسب أسود في الوسط .

3- اختبار النمو في درجات الحرارة (37م° و 42م°) :

لُفحت أطباق بترية حاوية على وسط اكار الكولومبيا الحاوي على دم الانسان ومضادات الحيوية ومنتشطات النمو في حاضنة لاهوائية ، حضنت المجموعة الأولى في درجة حرارة (37م°) والمجموعة الثانية في درجة (42م°) وقرات النتيجة بعد (48) ساعة من مدة الحضانة .

4- اختبار تحمل الملوحة بتركيز (1.5% و 3.5%) :

إستخدم وسط نقيع الدماغ – القلب الحاوي على كلوريد الصوديوم بنسبتي (1.5%) و (3.5%) ثم قرأت النتيجة بعد مرور (24) ساعة من الحضانة وبدرجة حرارة (42م°).

5- اختبار الكاتاليز Catalase Test :

نقل جزء من المستعمرات النامية بواسطة الناقل Loop الى شريحة زجاجية نظيفة حاوية على قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بنسبة (3%) . ظهرت إيجابية الاختبار عن طريق تكوّن فقاعات هوائية خلال ثوانٍ .

6- اختبار الاوكسيديز Oxidase Test :

تم الفحص وذلك بنقل (3) مستعمرات بكتيرية النامية لمدة (24 ساعة) بإستخدام أعواد الخشب المعقمة الى ورقة ترشيح ثم أضيف قطرة من كاشف الاوكسيديز . أنّ ظهور اللون البنفسجي بعد عشر ثوان هو دليل على إيجابية الاختبار .

7- اختبار الحركة Motility Test :

لقت الانابيب الحاوية على وسط اختبار الحركة بطريقة الطعن على ان تكون مسافة الطعن على ما يقارب (3سم) مع مراعاة عدم دخول الطعن الى قعر انبوبة الاختبار ثم حضنت الانابيب في الحاضنة لمدة (24ساعة) بدرجة حرارة (37م°) . ظهور تضبيب حول منطقة الطعن يعد نتيجة موجبة لهذا الاختبار وهذا يدل على ان البكتريا لها قابلية على الحركة .

8- اختبار تحلل اليوريا Urease hydrolysis test :

لُقت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي المائل (Urea agar) بالمستعمرات البكتيرية وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة (37م°) لمدة (48) ساعة . أنّ تغير لون الوسط من الأصفر الى الوردي دليل على إيجابية الاختبار . أستخدم هذا الاختبار لمعرفة إحتواء البكتريا على أنزيم (Urease) .

9- اختبار الكشف عن النمو على وسط الماكونكي Growth on Macconkey :

اجري هذا الاختبار لمعرفة قدرة البكتريا على تخمر سكر اللاكتوز حيث خطط وسط اكل الماكونكي Macconkey agar بالزرع البكتيري وحضن الاطباق في درجة حرارة (37م°) لمدة (24) ساعة . بعد تلون الوسط باللون الوردي دليلا على ايجابية الاختبار .

10- اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية Antibiotics :Susceptibility TEST

أُلقح وسط (مولر - هينتون) Muller Hinton agar بواسطة مسحة قطنية ناقلية لعمل تجانس بكتيري على الوسط ثم وضعت أقراص المضادين بكمية مقدارها (30مايكروغرام / قرص) ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37م °) في ظروف غازية مناسبة وقرأت النتيجة بعد مرور (24ساعة) من مدة الحضانة وذلك بملاحظة المنطقة المحيطة بالقرص .

6-3 : أستخلاص الدنا البكتيري Bacterial DNA extraction :

تم عزل الدنا البكتيري بأستعمال عدة الأستخلاص (Mini DNA Bacteria kit) المجهزة من شركة Bionner وبأتباع الخطوات الآتية :-

1- نقل 1مل من العزلات البكتيرية المنماه بعمر 24 ساعة الى أنابيب أبندورف Eppendorf 1.5مل

2- نبذت الأنابيب مركزياً لمدة دقيقة بسرعة 14000 دوره / دقيقة ، بعدها أهمل الطافي .

3- أضيف 200 مايكروليتر من دارىء GT الى أنابيب أبندورف ومزجها جيداً بواسطة المازج Vortex

4- أضيف 20 مايكروليتر من أنزيم Proteinase K المحضر وفق فقرة (3-2-1-4) الى الأنابيب ثم مزجاً بواسطة المازج Vortex جيداً، ثم وضعت داخل حمام مائي Water bath مده عشر دقائق وبدرجة حرارة 60م ° و قلب الأنابيب ثلاث مرات كل ثلاثة دقائق في أثناء فترة الحضانة .

5-أضيف 200 مايكروليتر من دارىء GB الى الأنابيب ثم مزجاً بواسطة المازج Vortex جيداً لمدة عشر ثوان ثم وضعت داخل حمام مائي Water bath لمدة عشر دقائق وبدرجة حرارة 70م ° و قلبت الأنابيب ثلاث مرات كل ثلاث دقائق في أثناء فترة الحضانة .

- 6-أضيف 200 مايكروليتر من الأيثانول المطلق البارد Absolute ethanol الى الأنبيب ثم خلط المزيج برفق عن طريق قلب الأنبيب لترسيب الدنا .
- 7- تم وضع عامود GD Column في انبوبة الجمع Collection tube سعة 2 مل ونقل له جميع الخليط.
- 8- نبذت الأنبيب مركزياً لمدة دقيقتين بسرعة 14000دورة / دقيقة بعدها نقل المحتويات الى أنبوبة جمع جديدة .
- 9-أضيفت 400 مايكروليتر من دارئ W1 الى عمود GD.
- 10- نبذت الأنبيب مركزياً بسرعة 14000 دورة / دقيقة لمدة 30ثانية ثم وضع عمود GD في أنبوبة الجمع.
- 11- أضيف 600 مايكروليتر من دارئ Wash buffer الى عمود GD.
- 12- أجري النبذ المركزي لمدة دقيقة 14000 دورة / دقيقة .
- 13- أعيد النبذ المركزي لمدة ثلاث دقائق بسرعة 14000 دوره / لمدة دقيقة لتجفيف العمود.
- 14- نقل العمود GD الى أنبوبة ابندروف نظيفة 1.5 مل .
- 15-أضيف 50 مايكوليتر من دارئ Elution المسخن بدرجة 70°م مسبقاً الى الأنبيب وتركت الأنبيب لمدة خمس دقائق ،ثم طردت مركزياً لمدة نصف دقيقة بسرعة 14000 دورة / دقيقة وبذلك يتم الحصول على الدنا .

7-3 : الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis :

أجري الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص وفق لما جاء في (Sambrook و Russell , 2001) بإستعمال المحاليل المحضرة وفق الفقرة (3-2-1-5) وكالاتي :

حُضر هلام الأكاروز بتركيز 1 % باذابة (1 غم) من الأكاروز في (100 مل) من محلول 10 x TBE بعد تخفيفه 10 مرات للحصول على 1x TBE، سُخن الأكاروز إلى

درجة الغليان وترك ليبرد إلى درجة حرارة (45°م)، ثم أضيفت إليه صبغة بروميد الإثديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام / مل بإستعمال المحلول الخزين المحضر لهذه الصبغة بعدها مُزج الأكاروز جيدا . تم إعداد صفيحة لإسناد الأكاروز Tray بإحاطة حافاتها بشريط لاصق وبشكل جيد ، ثم تُثبت المشط Comb لتكوين الحفر Wells المُعدة لتحميل العينات ثم صُبَّ الأكاروز بشكل هادئ ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، رُفِع المشط بهدوء ونُزِع الشريط اللاصق . بعدها نُقِل الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل الحاوي على حجم مناسب يغطي الهلام من 1x TBE ثم حُمِلت العينات المُعدة للترحيل (5 مايكروليتر) من قالب الدنا وخطها بعدها مع (3 مايكروليتر) من دارئ التحميل 6x بإستعمال ماصة دقيقة Micropipette . بعدها تم إجراء عملية الترحيل الكهربائي بفرق جهد مقداره 100 فولت اسم لمدة (45 دقيقة) حتى وصول العينات إلى ما قبل نهاية الهلام ، بعد الإنتهاء من عملية الترحيل نُقِل القالب لفحص الهلام بتعريضه إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator عند طول موجي 320 نانوميتر .

3-8 : قياس تركيز الدنا ونقاوته :

قيس تركيز الدنا من خلال تخفيف العينة بإضافة (495 µL) من الماء المقطر إلى (5 µL) من دنا العينة وقراءة إمتصاص العينة للأشعة فوق البنفسجية بجهاز Spectrophotometer الذي يستعمل لقياس الكثافة الضوئية (O.D) عند الطولين الموجيين 260 ، 280 نانوميتر وتطبيق القانون الآتي :

تركيز الدنا (mg/ml) = مقدار الإمتصاصية عند الطول الموجي 260 لم واحد من العينة x مقلوب التخفيف 50x ، أما النقاوة = الإمتصاصية عند الطول الموجي 260 /

الإمتصاصية عند الطول الموجي 280 ، هذه النسبة هي إحدى المؤشرات الدالة على كفاءة الاستخلاص ومدى تلوث الحامض النووي بالبروتين (Maniatisl وآخرون , 1982).

9-3 : تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) :

تم الكشف عن الجين *Cad F* باستخدام تقنية PCR وبأتباع الخطوات الآتية :

1- حضر خليط التفاعل الرئيس Master Mix وذلك بإضافة المكونات الآتية في أنبوبة معقمة كما في الجدول أدناه :

جدول (3- 9) مكونات خليط التفاعل الرئيسي Master Mix

Final Concentration	Volume For 1 Tube	Materials	Concentration Manufacturer
.....	6 µL		D.W
1x	5 µL		Accupower® PCR Premix
10 pmol	2 µL		Primer – F (10 pmol)
10 pmol	2 µL		Primer – R (10 pmol)
15µL			Total reaction Volume

مزجت هذه المكونات بواسطة ماصة زجاجية دقيقة Micro Pipette وذلك بسحبها عدة مرات ثم وضعت في جهاز النبذ لمدة 10 ثوان .

2- وزع الخليط على 8 أنابيب معقمة حجمها 0.5 مل ومعلمة بحسب العينات المراد دراستها وبواقع 15 µL من الخليط لكل أنبوبة. وبالخطوات الآتية :

3- اضيف (5 µL) من قالب الدنا لكل عينة في الأنبوبة المخصصة لها ، ووزع الـ Master Mix على الأنابيب قبل نقل الـ DNA لتجنب التلوث.

4- أستعمل جهاز الطرد المركزي لمدة (15 ثانية) لجمع القطرات الملتصقة بجدار أنبوبة الطرد المركزي وإنزالها إلى أسفل الأنبوبة للحفاظ على الحجم النهائي لخليط التفاعل والبالغ 20 µL.

2-10 : الظروف المثلى لتضخيم جين *CadF*:

تم إجراء خطوات التضاعف للتحري عن البكتيريا *Campylobacter* على مستوى الجنس وللتحري عن جين *Cad F* بحسب ما جاء في (GhoshRoumi وآخرون, 2014) ومع إجراء بعض التحويلات ثم تمت برمجة جهاز PCR ، كما موضح في جدول (3-10) .

الجدول (3-10) البرنامج الحراري لتضخيم جين *CadF* بتقنية P.C.R

Type of primers	PCR Conditions Temperature / Minute								
	Denaturation				Annealing		DNA-extension		Expected size of products (bp)
	One cycle		36 cycles						
	°C	Min	°C	Min	°C	Min	°C	Min	
<i>CadF</i>	94	4min	94	1min	47	1min	72	5min	400

* نُقِلَ بعد ذلك (10) مايكروليتر من ناتج التضاعف للترحيل الكهربائي.

* حُفِظَ المتبقي من نواتج التضاعف في درجة (- 20 °) م.

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

4 – 1: عزل وتشخيص بكتريا *Campylobacter* من مصادر متنوعة :

بلغ العدد الاجمالي للعينات (123) عينة ، بينت النتائج أن (90) عينة كانت ذات نمو موجب للزرع البكتيري ونسبة (73.17%) في حين أن (33) عينة كانت سالبة النمو للزرع البكتيري التي جمعت من مصادر متنوعة شملت عينات الحليب الخام ومنتجاته وعينات الاسهال، وتبين أن (65) عينة من المجموع الكلي للعينات ونسبة (52.84%) تعود الى جنس بكتريا *Campylobacter* ، كما موضح في الجدول (1-4) .

جدول (1-4): العينات الموجبة والسالبة النمو البكتيري المعزولة من مصادر متنوعة .

ت	انواع العينات البكتيرية	عدد العينات	(%)
1	العينات سالبة النمو في الزرع البكتيري	33	26.82
2	العينات موجبة النمو في الزرع البكتيري	90	73.17
	المجموع	123	100

4-1-1 عدد العينات الموجبة والسالبة ونسبها في عينات الحليب الخام

ومنتجاته :

أعطت العزلات نتيجة موجبة لنمو جراثيم بكتريا *Campylobacter* في الحليب ومنتجاته ، التي تم تنميتها في ظروف لاهوائية وبدرجة حرارة (37م °) إذ شكلت نسبة تلوث الحليب الخام ببكتريا *Campylobacter* (50%) أما نسبة تلوث القشطة المحلية كانت (26.66%) في حين كانت نسبة تلوث الجبن الأبيض المحلي (23.33%) . وهذا يفسر وجود البكتريا على أساس استعمال

الحليب الخام الملوث بأعداد كبيرة من البكتيريا والتي قد يكون انها إنتقلت اليه من بقرة مصابة أو حاملة للبكتيريا أو من العاملين في إنتاج الحليب، كذلك أنّ إنعدام المعاملات الحرارية تضمن وصول هذه البكتيريا الى الحليب الخام وهذا يتفق مع (ساجت 2010) كما موضح في جدول (4-1-1).

جدول (4-1-1): النسبة المئوية للعزلات البكتيريا المعزولة من عينات الحليب ومنتجاته

ت	نوع العينة	عدد العينات	عدد العينات الموجبة للفحص	(%)
1-	الحليب الخام	30	15	50
2-	الجبن الطري المحلي	30	7	23.33
3-	القشطة المحلية	30	8	26.66
	المجموع	90	30	100

بينت الدراسة بإستعمال صبغة كرام وجود عدد من العزلات البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام، حيث كانت نسبة البكتيريا الموجبة لصبغة كرام في الحليب الخام (10%) بينما كانت نسبة البكتيريا الموجبة لصبغة كرام في الجبن المحلي (6.66%) ، و نسبة لبكتيريا الموجبة لصبغة كرام في القشطة المحلية (6.66%) ،حيث كان مجموع العزلات السالبة لصبغة كرام (76.66%) بينما كان مجموع العزلات الموجبة لصبغة كرام (23.32%) وهذا يدل على أنّ البكتيريا السالبة لصبغة كرام هي الأكثر شيوعاً في الحليب ومنتجاته، كما أنّ تلوث منتجات الألبان بما فيها القشطة المحلية والجبن المحلي التي قد تحدث بعد عملية البسترة التي تكون فيها درجة الحرارة اقل من (60 م °) يعود السبب في ذلك الى رداءة نوعية الحليب الخام المستعمل . أنّ استخدام درجات الحرارة المنخفضة يؤدي الى زيادة نسبة الأحياء المجهرية في الحليب المعد للتصنيع ، لأن الحرارة المنخفضة لن تقضي على الاحياء الممرضة الموجودة في الحليب ، والتي تحتاج الى درجات

حرارة مقدارها (72م °) ولمدة (15) ثانية على الأقل وهذا يتفق مع (Chapman , 2001) ،
لقد اوضح الباحثان (Giesendorf و Goossens عام 1995) دور الغذاء والحيوانات في
إصابة هذه البكتريا للإنسان إذ أن تناول الأغذية الملوثة خاصة الحليب غير المبستر وشرب المياه
الملوثة ممكن أن تؤدي الى إصابة بهذه البكتريا كما موضح في الجدول (4-1-2) .

جدول (4-1-2): يوضح اعداد ونسب عزلات البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والمغزولة من الحليب الخام ومنتجاته.

ت	انواع العزلات	عزلات سالبة الصبغة كرام (%)	عزلات الموجبة لصبغة كرام (%)
1	الحليب الخام	12	40
2	الجبنة الابيض المحلي	5	16.66
3	القشطة المحلية	6	20
	المجموع الكلي للعزلات الموجبة الفحص في حليب خام ومنتجاته	30	

4-1-3: عزل وتشخيص انواع بكتريا *Campylobacter* من الاسهال عند الاطفال :

بينت الدراسة أنّ نسبة (9.09%) من عينات البراز كانت ذات القوام الدموي يعود سببه الى
تكاثر البكتريا داخل الطبقة الداخلية للأمعاء وإفرازها سموم خلوية والتي تؤدي الى إلتهاب دموي
، و بنسبة (30.30%) كانت ذات قوام مخاطي يعود سببه الى وجود المخاط Mucus أو
القيح ، وبنسبة (60.60%) كانت ذات قوام مائي يعود سببه الى إلتهاب فيروسي أو بكتيري أو
حساسية أو عدم تحمل نوع من الاطعمة مثل مشتقات الألبان، وهذا يعود الى وجود أنواع بكتيرية
أخرى أو طفيليات مثل *Entamoeba histolytica* (Cyst and trophozoit) هذا يتفق

مع (وتوت ، 2010 ; Al-Sibahee , 2010) كما موضح في جدول (4-1-3)

جدول (3-1-4) النسبة المئوية للعزلات الموجبة لعينات البراز لبكتيريا

Campylobacter

ت	نوع البراز	عدد العينات	(%)
1-	دموي Bloody	3	9.09
2-	مخاطي Mucoïd	10	30.30
3-	مائي Watery	20	60.60
4-	المجموع	33	100

وقد أظهرت الدراسة بإستعمال صبغة كرام وجود عدد من العزلات البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام، كانت نسبة البكتريا السالبة لصبغة كرام (90.90%) وذلك بسبب وجود بكتريا قد تكون ملوثة للبراز أو فلورا الطبيعية. في حين كانت نسبة البكتريا الموجبة لصبغة كرام (9.09%) ، أنّ هذا التلوث يكون سببه إستعمال الدم الدم بحجم (5-7%) (حجم / حجم) وذلك لكي يخمد من سمية مركبات الأوكسجين مثل بيروكسيد الهيدروجين عندما يتعرض الوسط للضوء في طبق الزرع حيث يوفر الدم المغذيات وكذلك يسمح لنمو أنواع بكتيرية أخرى ، وبالتالي فمن الصعب الحصول على مستعمرات نقية للبكتريا ، ومن المجموع الكلي للعينات

كانت نسبة بكتريا *Campylobacter*

(52.84 %) من خلال التصبيغ بصبغة كرام حيث ظهرت عصيات منحنية وسالبة لصبغة

كرام والتي تعود الى جنس بكتريا *Campylobacter* وهذا يتفق مع (وتوت ، 2010 ; Al-

Sibahee , 2010 , Coker وآخرون , 2002) ، كما موضح في جدول (4-1-4) .

جدول (4-1-4) النسب المئوية لأنواع العزلات البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام

ت	أنواع العزلات البكتيرية	عدد العينات	%
1	عدد البكتريا السالبة لصبغة كرام	30	90.90%
2	عدد البكتريا الموجبة لصبغة كرام	3	9.09%
3	المجموع	33	100%

وفي دراستنا تم جمع المعلومات المتعلقة بالمرضى من حيث العمر والجنس والموقع الذي أخذت منه العينة ملحق رقم (4 و 5)، تبين أنّ الإعتماد على الرضاعة المختلطة تشكل النسبة العالية من نوع التغذية، وهذا يفسر حدوث الإسهال وذلك بسبب احتمالية التلوث عند تحضير الرضاعة الصناعية كما أنّ مستوى الوعي والثقافي للأم والبيئة يقومان بدور مهم في زيادة نسبة الإصابة بالإسهال وهذا يتفق مع (الطائي والرواي، 2005). قد تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص أنواع بكتريا *Campylobacter* من براز الأطفال المصابين بالإسهال تتراوح أعمارهم بين (3 اشهر – 5 سنوات) وهذا يتوافق مع بيانات في دول الخليج العربي كالسعودية والكويت والبحرين بالنسبة لعمر الأطفال الذين عزلت منهم البكتريا فقد كانت أكثر الحالات للأعمار دون سن (4 سنوات) (Al-Mohmee وآخرون , 2006 ; وتوت ، 2010).

2-4 الفحص الجرثومي للعينات :

1-2-4 الوصف المزرعي والمجهري للبكتريا *Campylobacter* :

أظهرت نتائج نمو المستعمرات على الاوساط الانتقائية خلال (24-48) ساعة من التحضين وبدرجة حرارة (37م) وصغيرة ومشابهة لقطرات الماء مع حافات غير منتظمة ومخاطية ولزجة ذات لون رمادي وصغيرة مشابهة لقطرات الماء وهذا يتفق مع (التميمي، 2007) . ثم حضرت

مسحات من المستعمرات التابعة لجنس *Campylobacter* بإستعمال صبغة كرام و اظهرت نتائج الفحص المجهرى ان خلايا بكتريا كانت على شكل عصيات سالبة لصبغة كرام Gram negative bacteria ، شكل حرف (S) عندما تلتصق خليتان مع بعضهما ، مستعمرات مسطحة ورطبة ومخاطية صغيرة تشبه قطرات الماء ، والتي تعود الى أنواع بكتريا *Campylobacter* . وقد اظهرت نتائج الفحص المجهرى لخلايا البكتريا المعزولة كانت عصوية قصيرة ، وحلزونية ، كروية مفردة ، وثنائية وسلاسل أو تجمعات أو على شكل حرف (S) عندما تلتصق خليتان مع بعضهما أو بشكل يشبه أجنحة الطير ، سالبة لصبغة كرام أما قدرة البكتريا على تحلل الدم فقد كانت البكتريا محللة للدم في وسط (Preston *Campylobacter* Blood – Free Medium) بالنسبة لعينات الحليب الخام ومنتجاته وقد أشارت البحوث الحديثة الى إنها تسبب نوعين من التحلل أحدهما ألفا والآخر بيتا ولاسيما النوع (*C. jejuni*) أما بالنسبة لعينات الإسهال فقد كانت البكتريا غير محللة للدم هذا يتفق مع (وتوت ، 2010 ; التميمي ، 2007 ; Gandrea و Gilbert ، 2003)

تصبح هذه العصيات كروية الشكل Coccoid في المستعمرات القديمة (وتوت ، 2010) ، يحدث هذا التغيير نتيجة نفاذ المواد الغذائية أو بسبب تعرضها الى نسبة عالية من الأوكسجين والذي يؤدي الى تغيير في الغلاف الخلوي Cell envelope يعد الشكل الحلزوني لجنس *Campylobacter* أكثر صفة مميزة تفرقها عن بقية جراثيم المعوية هذا يتفق مع (الطائي والراوي ، 2005) .

4-2-2 الوصف المزرعي للنمو على طبق الزرع الثانوي :

بينت نتائج الزرع الثانوي على الأوساط غير إنتقائية (Blood agar – Macconkey agar – Chocolate agar) في ظروف تحضين وبدرجة حرارة (37م°) لمدة (24- 48) ساعة وكانت

نتائج مشابهة لنتائج الزرع الأولي على الأوساط الانتقائية إذ كانت المستعمرات صغيرة مشابهة لقطرات الماء ومخاطية ولزجة (وتوت ، 2010) ، ظهرت المستعمرات النامية على وسط الماكونكي اكار دائرية الشكل ذات حافات غير منتظمة هذا يتفق مع (الطائي والراوي ، 2004) .

3-4 : الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Campylobacter* :

تم التحري عن الخصائص التشخيصية ، والكيميائية الحيوية للعزلات النقية لأنواع بكتريا *Campylobacter* اعتماداً على ما ورد في (Steel و Cawon ، 2004) من المعروف أن البكتريا *Campylobacter* تمتاز بقلة فعاليتها الكيموحيوية وعلى الرغم من ذلك أستخدمت الفحوصات لتأكيداها (وتوت ، 2010 ، Al- Sibahee ; 2010) . كما موضح في جدول (3-4)

1-3-4 اختبار النمو في درجات الحرارة (37°م و 42°م) :

أظهرت النتائج قابلية المستعمرات لبكتريا *Campylobacter* بالزرع الأولي على تحمل درجة الحرارة (42°م) وتحمل درجة الحرارة (37°م) في الزرع الأولي والثانوي وفي ظروف مثل قلة الأوكسجين ولمدة (24-48) ساعة وللأوساط الانتقائية وغير الانتقائية ، قد أظهرت نتائج الزرع الأولي على وسط اكار الدم Blood agar في ظروف هوائية وبدرجة حرارة (37°م) ولمدة (48) ساعة نتائج سالبة . يعد اختبار النمو بدرجات الحرارة (37°م و 42°م) صفة تشخيصية مهمة بين أنواع بكتريا *Campylobacter* (Levin , 2007) .

2-3-4 اختبار الكاتاليز Catalase Test :

ظهرت نتيجة اختبار الكاتاليز لعزلات البكتريا موجبة لهذا الاختبار وذلك من خلال تكون فقاعات هوائية خلال (30) ثانية بعد إضافة الزرع البكتيري الى 3% حجم / حجم من مادة بيروكسيد الهيدروجين على الشريحة الزجاجية . أن جميع أنواع بكتريا *Campylobacter* موجبة لهذا

الإختبار ما عدا *C.jejuni Sub – dolyei* فهي سالبة لهذا الإختبار كذلك يمكن تمييزها من خلال حساسيتها للمضاد Cephalothine الذي يستعمل الوسط الإنتقائي لعزلها هذا يتفق مع (Winn وآخرون , 2006)

3-4-3 إختبار الاوكسيديز Oxidase Test :

كانت نتائج إختبار الاوكسيديز لهذه لبكتريا موجبة وذلك عن طريق تغير لون الكاشف الى الأزرق الغامق خلال عدة ثوانٍ . بينت نتائج الإختبارات كما في الجدول (4-5) أن جميع العزلات تكون موجبة لإختبار الاوكسيديز (Winn وآخرون , 2006) .

4-3-4 إختبار تحلل اليوريز Ureas Hydrolysis Test :

ظهرت نتيجة إختبار تحلل اليوريز للبكتريا موجبة عن طريق تحول لون الوسط من الأصفر الى الوردي هذا يدل على قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز المحلل لليوريا. أعطت البكتريا نتيجة موجبة لهذا الإختبار عن طريق تغير لون الوسط من الأصفر الى الوردي هذا يدل على قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز وهذا لا يتفق مع (وتوت، 2010 ; الطائي والراوي ، 2004).

3-4-5 إختبار تحلل الهيببوريث الصوديوم Hippurate Hydrolysis Test :

ظهرت نتائج إختبار تحلل هيببوريث الصوديوم موجبة عن طريق تغير لون الكاشف Nin hydrin Solution الى البنفسجي الغامق بعد (4) ساعات من التحضين بدرجة حرارة (37م°) هذا يدل على قدرة البكتريا على تحلل الهيببوريث الصوديوم، ويعد هذا من الإختبارات المهمة في التفريق بين الأنواع العائدة لجنس *Camplyobacter* خاصة التمييز بين النوعين (*C.jejuni*) والنوع (*C.coli*) يكون النوع (*C.jejuni*) موجب لهذا الإختبار في حين يكون النوع (*C.coli*) سالب لهذا الإختبار (Epps وآخرون , 2013) .

6-3-4 اختبار تكون غاز H₂S على وسط TSI :

في هذا الاختبار كانت جميع العزلات سالبة لهذا الاختبار وذلك بعدم تغير لون الوسط وعدم تكون راسب أسود ، وهذا يدل على عدم قدرة البكتريا على تخمر الكربوهيدرات وعدم قدرتها على إنتاج غاز (H₂S) ، يعد هذا الاختبار من الصفات التشخيصية لجنس *Campylobacter* ماعدا عزلة واحدة أعطت نتيجة موجبة لهذا الاختبار عن طريق تغيير لون الوسط وتكون راسب أسود في الأنابيب ، إذ تشير الدراسات أنَّ النوع (*C.hyointestinalis*) هو النوع الوحيد الذي يكون موجب لهذا الاختبار (Gebhart وآخرون ، 1985 ؛ Winn وآخرون ، 2006) .

7-3-4 اختبار الحركة Motility Test :

أظهرت النتائج التي أجريت في مرق البروسيلا المضاف له اكار - اكار بعد فترة حضانة (24-48) ساعة وبدرجة حرارة (37°م) في ظروف قلة الأوكسجين وكانت نتيجة الاختبار موجبة تكون البكتريا متحركة لامتلاكها سوط قطبيا من جهة واحدة أو من جهتي الخلية ، وحركتها سريعة تشبه السدادات الفلينية Cork Screw -like motility وهي صفة تشخيصية ثانية بعد الشكل الحلزوني للبكتريا ال *Campylobacter* والذي يميزها عن المعويات الأخرى (*Nachamkin* ، 2003) .

8-3-4 اختبار تحمل الملوحة بتركيز (1.5% و 3.5%) :

بينت نتائج الاختبار أنَّ العزلات تستطيع النمو على الوسط الحاوي على ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز (1.5%) وتركيز (3.5%) . وتشير المصادر التصنيفية الى عدم نمو النوع (*C. jejuni*) في تركيز (3.5%) من كلوريد الصوديوم ، لذلك تعد هذه العزلات الموجبة لهذا الاختبار تعود الى النوعين (*C.coli* و *C.lari*) ، وقد أشارت مصادر الى عدم قدرة النوع (*C.jejuni*)

(على النمو بتركيز (3.5%) حيث انها تكون حساسة للملوحة (Skirrow و , 1980 Benjamin).

3-4- 9 اختبار النمو على وسط الماكونكي اكار Growth on Macconkey

Test أظهرت نتائج الاختبار أنّ العزلات تستطيع النمو على وسط اكار الماكونكي وعدم تغيير لون الوسط يدل هذا على عدم قدرة البكتريا على تخمر سكر اللاكتوز ، ظهرت المستعمرات على هذا الوسط دائرية الشكل ذات حافات غير منتظمة. بينت نتائج اختبار النمو على وسط اكار الماكونكي ان البكتريا لا تنمو عليه ما عدا النوعان (*C.coli* – *C.lari*) كلاهما ينموان على وسط اكار الماكونكي وهذا يتفق مع (Winn وآخرون , 2006 ; الطائي والراوي ، 2004) .

3-4- 10 اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics Susceptibility Test:

أظهرت نتائج الاختبار حساسية العزلات مقاومة واضحة للمضاد السفالوثين Cephalothine بينما كانت العزلات البكتيرية حساسة لحامض النالدكسيك اسيد Nalidixic Acid ، وهذه الصفة يتميز بها النوعان (*C.coli* و *C.jejuni*) (Gillespie و Hawkey , 2006). في حين أنّ عزلات أخرى أعطت نتيجة معاكسة فقد كانت حساسة للمضاد السيفالوثين Cephalothine ومقاومة للحامض النالدكسيك Nalidixic Acid وتعتبر هذه صفة تفريقية يتميز بيها هذا النوع (*C.hyointestinalis*) والتي تميزه عن الأنواع الأخرى ، (جمعة ، 2000). أما اختبار الحساسية فقد ظهرت العزلات مقاومتها للمضاد السيفالوثين وحساسيتها لحامض النالدكسيك اسد وهذا يتفق مع

(وتوت، 2010 ; Al-Sibahee , 2010 ; التميمي ، 2007) ، أنّ صفة الحساسية لحامض

النالدكسيك هي صفة تشخيصية لبكتريا *Campylobacter* ولكن في الوقت الحاضر ظهرت

بعض التعقيدات بسبب التداخل الذي يحدث في ازدياد المقاومة لهذا المضاد الحيوي بالنسبة لسلالات البكتريا وظهرت عزلات الدراسة الحالية جميعها حساسة لحامض النالدكسيك وهذا يتفق مع (Vandamm , 2000) .

جدول (3-4) يوضح الاختبارات التشخيصية لأنواع بكتريا *Campyobacter*

ت	Characteristic الاختبارات	<i>C.jejuni</i>	<i>C.Sub sp doylie</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C. hyointestinalis</i>
1	Growth at (37°C)	+	+	+	+	+
2	Growth at (42°C)	+	+	+	+	+
3	Nacl at (1.5% - (3.5%)	-	-	+	+	-
4	H ₂ S- TSI	-	-	-	-	+
5	Catalase	+	-	+	+	+
6	Oxidase	+	+	+	+	+
7	Growth Macconkey agar	-	-	+	+	-
8	Hippurate hydrolysis	+	+	-	-	-
9	Ureas agar	+	+	+	+	+
10	Resistance to Naladixic Acid	S	S	S	R	R
11	Resistance to Cephalothine	R	S	R	R	R

موجب (+) Positive: سالب (-) Negative :

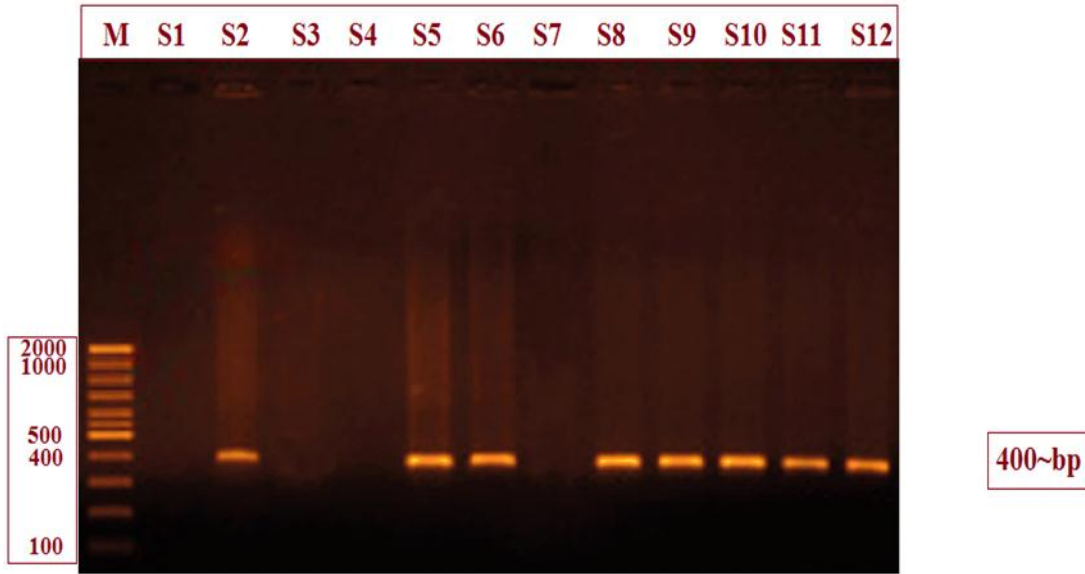
حساسة (S) Sensitive : مقاومة (R) Resistant :

4-4 : التحري عن جين الضراوة *cadf* باستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل P.C.R :

أُختبرت 12 عينة من بكتريا *Campylobacter* التي تحمل التسلسلات (5-10-12-17-20-24-26-26-10-32-18) ، أذ أُختبرت العينات التي نمت على الأوساط الانتقائية (Preston and Skirrow Selective) ، كانت نسبة العينات موجبة (58.33%) في حين كانت نسبة العينات السالبة لهذا الفحص (41.66%) ، إذ أُختبرت هذه العينات للكشف عن قابلية البكتريا لإنتاج العديد من عوامل الضراوة من خلال ذلك أُختبرت العينات للكشف من وجود الجينات ومنها جين الضراوة *cadf* ، وذلك باستخدام تقنية (PCR) وبالإعتماد على البودئ (Primers) المتخصصة بجين *cadF* والمجهزة من قبل شركة (Bioneer \ Korea) على وفق التسلسل المصمم من قبل (Ghosh Roumi وآخرون , 2014) ، وقد تم برمجة جهاز (PCR) كما هو موضح في جدول (10) . وتم إستعمال الدنا القالب (DNA template) المستخلص بواسطة

(Mini DNA Bacteria kit) المجهز من قبل شركة Bioneer ، وتم الكشف عن نواتج استخلاص الدنا البكتيري باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لبعض العينات ، واستخدم جهاز مقياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer إذ كانت نقاوة العينات تتراوح ما بين (1.8-2) . رحل ناتج تفاعل البلمرة التسلسل الخاص بالجين *cadf* على هلام الاكاروز بتركيز (1%) لمدة (45 دقيقة) بفرق جهد قدره (100 فولت) ، إذ لوحظ ظهور حزمة واحدة من جميع الحفر نفسه وذلك بعد تعريض الهلام الى الاشعة فوق بنفسجية كما في الصورة (4-5) . هذا يدل على أنّ ارتباط البادئ مع التسلسل المكمل له على شريط القالب عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder المجهز من قبل شركة (Bioneer \

(Korea ، لوحظ أنّ احجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع هو (400 bp) لجين *cadf* ، وذلك عند مقارنته مع النتائج التي توصل اليها (Ghosh Roumi وآخرون ، 2014) بينت الدراسة الحالية أنّ (5) عينات من بكتريا *campylobacter* كانت سالبة للفحص بنسبة (41.66%)، في حين كانت (7) عينات موجبة للفحص والتي تحتوي على جين الضراوة *cadf* ، أنّ جين *cadf* هو جين ضراوة الذي يوجد على الغشاء الخارجي للبكتريا يساعد هذا الجين على عملية التصاق واجتياح البكتريا مع خلايا المضيف وبالتالي زيادة إمراضية البكتريا والذي يسبب حدوث الإسهال عند الأطفال وهذه يتفق مع (Ghosh Roumi وآخرون ، 2014). أنّ جين *cadf* الموجود في بكتريا *C.jejuni* يكون مشابه لجين (*ompA*) الموجود في بكتريا *E.coli* الذي يعمل عن طريق تكوين قنوات في بروتين الغشاء الخارجي للبكتريا، تكون هذه القنوات ذات أقطار واسعة والتي تسمح بمرور الجزيئات الكبيرة مثل الببتيدات وقواعد النيوكليوتيدات الصغيرة الى التجويف البلازمي حيث يتميز الغشاء الخارجي لبكتريا (*C.jejuni*) (بأنه ذو وزن جزيئي يتراوح بين (45.000 KDS - 41.000) الذي يتكون من حزمة بروتينية كبيرة منفردة ، يمتد هذا البروتين من خلال الغشاء على سطح الخلية البكتيرية فضلا عن ارتباطه مع الببتيدوكلايكان الموجود في السطح الداخلي للغشاء الخارجي هذا يتفق مع (Mamelli وآخرون ، 2006 ; Goulhen وآخرون ، 2004).



صورة (4-4) : الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الأكاروز للتحري عن الجين *cadF* على هلام الأكاروز المتضاعف باستخدام تقنية PCR لبكتريا *Campylobacter* ، بتركيز 1% وفرق جهد 100 فولت .

- المسار رقم (1) : Marker 100-2000bp
المسار رقم (2) : عزلة (5) من حليب الخام تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (3) : عزلة (10) من الجبن الأبيض الطري لا تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (4) : عزلة (12) من الإسهال المائي تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (5) : عزلة (17) من الإسهال الدموي تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (6) : عزلة (20) من القشطة المحلية لا تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (7) : عزلة (24) من الجبن الأبيض لا تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (8) : عزلة (26) من القشطة المحلية تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (9) : عزلة (26) من الحليب الخام لا تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (10) : عزلة (10) من الإسهال المائي تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (11) : عزلة (32) من الإسهال الدموي تحتوي على جين *cadF*
المسار رقم (12) : عزلة (18) من الإسهال المخاطي تحتوي على جين *cadF*

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

and

Recommendations

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

أولاً: الاستنتاجات :Conclusions

من خلال الدراسة الحالية تم التوصل الى الاستنتاجات التالية:

- 1- تسبب أنواع بكتريا *Campylobacter* الإسهال الدموي أو المخاطي أو المائي .
- 2- .إحكام الرقابة على مزارع الألبان المحلية ومتابعة الشؤون الصحية الخاصة بالمزارع والأبقار وصحة العمال والأجهزة والأدوات المستخدمة في إنتاج وتداول الحليب للحصول على حليب خال ل تماما من الملوثات الكيميائية الضارة و الميكروبات الممرضة ووضع مواصفات خاصة بذلك اولعناية التامة بالتحاليل الميكروبيولوجية والتحاليل الكيميائية التي تساعد في الكشف على الحالة الصحية للحليب الخام ومنتجات الألبان المختلفة والكشف عن حالات الغش التجاري.
- 3- أظهرت النتائج أن أعلى نسبة عزل لبكتريا *Campylobacter* كانت من عينات الحليب و من عينات الإسهال المائي بنسبة .
- 4- امتلاك عزلات بكتريا *Campylobacter* جين الضراوة *cadF* المسؤول عن حدوث الإسهال عند الأطفال.
- 5- تطبيق الشروط الصحية في مخازن منتجات الألبان ومراقبة درجات حرارة الخزن التي يجب أن تحفظ عندها هذه المنتجات حتى وصولها إلى المستهلك.

ثانياً: التوصيات Recommendations :

1- أجراء دراسة جزيئية للتحري عن جينات أخرى مسؤولة عن الضراوة لبكتريا

Campylobacter باستخدام تقنية الـ PCR.

2- دراسة التفاعل التصالبي لمستضدات بروتين الغشاء السطحي لهذه البكتريا مع مستضدات

بروتين الغشاء السطحي لأنواع بكتيرية أخرى قريبة منها والمسببة للإسهال.

3- اجراء دراسة لعزل وتشخيص بكتريا *C.jejuni* من المرضى الذين يعانون من التهاب

المعدة والامعاء والتهاب المفاصل .

المصادر

References

المصادر References:

1. المصادر العربية:

- ابو يونس ، عهد ، سمير سليق وصياح ابو غرة (2005) . التحري عن وجود بكتريا *Listeria* في الحليب الخام السوري وبعض منتجاته . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ، المجلد (21) . العدد (1) : الصفات 477-487 .
- التميمي ، إيمان عامر حسين علي (2007). دراسة العلاقة الاستضدادية بين عديد السكريد الشحمي لبكتريا *Campylobacter jejuni* و *Helicobacter pylori* باستخدام اختبار التلازن الدموي المنفعل والتلازن المباشر . كلية العلوم / جامعة بغداد. رسالة ماجستير.
- التل ، جهاد و احمد هداى وانور الحاج علي (2015). تعيين مستوى الافلاتوكسين M1 في الحليب الخام والجبن الابيض المباع في اسواق دمشق بوسطة الكروموتوغرافيا السائلة عالية الاداء . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ، المجلد (31) . العدد(1) : الصفحات 207-220 .
- الجزار ، فتحي السيد (2000) . التلوث البكتيري للغذاء . مجلة اسبوط للدراسات البيئية ، العدد التاسع عشر .
- الخفاجي ، زهرة محمود ، أبو المعالي ، حسن محمود (2013). تفاعلات الكوثرية
جامعة بغداد. 298 ص.
- السامرائي ، عبد الوهاب مهدي ومحمود عبد العمر (1984) صحة الالبان، مطبعة الموصل
- السعدي ، امل طالب عطية (2003). تأثير مستخلصات بعض النباتات الطبية على الاحياء المجهرية المعزولة من الجبن في مدينة بغداد ، رسالة ماجستير- كلية التربية -جامعة القادسية .
- الطائي ، غادة عبد الرزاق و اميرة محمود الراوي (2005) . عزل وتشخيص جرثومة *Campylobacter jejuni* من حالات الاسهال عند الاطفال في مدينة

الموصل . مجلة علوم الرافدين ، المجلد (16) ، العدد (8) ، خاص بعلوم الحياة ، ص 90-99.

- **الفيشاوي ، فوزي عبد القادر (2011).** وأدرك السم بالبلبن .مجلة أسيوط للدراسات البيئية العدد الخامس والثلاثون . جامعة أسيوط . ص 1-13 .
- **النسر ، نيفين عبد الغنى وناهد محمد وهبه (2012) .** مكسبات الطعم والالوان الصناعية التي تضاف للاغذية . مجلة اسيوط للدراسات البيئية ، العدد السادس والثلاثون .
- **النمر ، طارق مراد (2003) .** الالبان النظرية والتطبيق ، مكتبة بستان المعرفة لطبع ونشر وتوزيع الكتب ، جامعة الاسكندرية ، مصر .
- **ثابت احمد ، عبد الراضى و ألفونس فخري بسطاووس (2003) .** ألبان ما لها وما عليها وأثر البيئة في تلوثها ، مجلة أسيوط للدراسات البيئية ، العدد الرابع والعشرون يناير . ص 105-122 .
- **جمعة ، وسن صالح الدين (2000) .** عزل وتشخيص بكتريا *Campylobacter coli* من الاطفال المصابين بالاسهال ودراسة عيوشيتها في الماء تحت ظروف المختلفة ، كلية العلوم ،جامعة بغداد ، رسالة ماجستير .
- **خضير، كريم سهاد (2001) .** عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا المسؤولة عن نكهة جبن الارياف العراق واستخدامها كبدائنات ، رسالة ماجستير كلية الزراعة جامعة بغداد .
- **ساجت ، حياة غيث (2010) .** دراسة التلوث الميكروبي لمنتجات الالبان (الجبن الطري المحلي والقشدة المحلية) في اسواق مدينة بغداد ، مجلة علوم المستنصرية ، المجلد (21) ، العدد (3).
- **شحاته ، عبده السيد.(1997).** تكنولوجيا الجبن – الأسس العلمية. الطبعة الأولى، مطابع المكتب المصري الحديث، المكتبة الأكاديمية. مصر.
- **فضل ، جلال احمد(2007) .** مخاطر منتجات الالبان الملوثة والمواد الخام غير مطابقة للمواصفات ، جامعة صنعاء ، كلية الزراعة . Bull. Environ. Res. . Vol. 10 No. 2, October. AUCES

- وتوت ، لمى جاسم محمود (2010) . دراسة بكتريولوجية ومناعية لبكتريا *Campylobacter jejuni* المسببة للالتهاب الامعاء في الاطفال . كلية العلوم ، جامعة بغداد . رسالة ماجستير .

2. المصادر الأجنبية :

- **AARESTRUP** FM, Engberg J (2001). Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Vet Res.; 32(3-4): 311–321.
- **Albert** , M. J.; Haridas, S. and Adler, B. (2008). Major outer membrane proteins from many *Campylobacter* species cross - react with cholera toxin. Clin. Vac. Immunol. P: 859 - 862.
- **Albert**, M. J.; Haridas, S.; Steer, D.; Dhaunsi, G .S.; Smith, A. I. and Adler, B. (2007). Identification of *Campylobacter jejuni* protein that cross-reacts with cholera toxin. Infect. Immun. P:3070 - 3073.
- **Al-Mahmeed** , A.; Senok, A.C.; Ismaeel, A.Y.; Bindayna, K.M.; Tabbara, K.S. and Botta, G.A. (2006). Clinical relevance of virulence genes in *Campylobacter jejuni* isolates in Bahrain. J. Med. Microbiol. 55: 839 - 843.
- **Al-Sibahee** , S. M. A. (2010). Pathological Effects of The Cytotoxi Extracted from Alocally Isolated *Campylobacter jejuni*. Ph.D, thesis. Baghdad University. Iraq.
- **Anderton** , H.J. 2007 “Dairy processors need some immediate certainty about supply” [www. Infoneurs .co. nz](http://www.infoneurs.co.nz) .
- **Bacon**, D. J.; Aim, R. A.; Burr, D. H.; Kopecko, D.E. (2000). "Involvement of plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81 – 176. Infect. Immune. 68: 4384 – 4390.

- **BACKERT S, Hofreuter D .(2013).** Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. J Microbiol Meth.; 95(1): 8-23.
- **Brooks , G. F.; Butel, J. S. and Morase, S.A.(2004).** Jawetz, Melnick and Adeberg's Medical Microbiology. 32rd ed. Lange Medical books. McGraw-Hill Companies. USA.
- **Brooks , G.F.;Bulel,J.S.;and Morse,S.A.(2007)** Medical microbiology (24th edition). Lange Medical Books / MC Graw-Hill.
- **Chapman , K. W., H. T. Lawless and K. J. Boor. 2001.** Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultra-pasteurized milk. J. Dairy Sci. 84:12-20.
- **Coker , A. O.; Isokpehi, R. D. and Thomas, B. N. (2002).** Human *Campylobacteriosis* in developing countries. Emerg. Infect. Dis. 8: 237 - 244.
- **Cowan , S.T and Steel,K.J. (2004).** Edited and rev. by Barrow, G.I., and Feltham, R.K.A., Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd edition. Dock House, The water front, Cape Town 8001, South Africa .
- **Dingle, K. E., Colles, F. M., et al. (2002).** Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clons: a basis for Epidemiologic investigation. Emerg. Infect. Dis. 8: 949 - 955.
- **Dobryan, M.; Tracz, M. K.; Jasmine, A.; Amera, G.; Kinga, K. and Dian, E. T. (2005).** "Pvir and bloody diarrhoe in *Campylobacter Jejuni* enteritis" 11:143 -150.
- **Douglas, S. A., M. J. Gray, A. D. Crandall and K. J. Boor. 2000.**

Characterization of chocolate milk spoilage patterns. J. Food Prot. 63:516-521

- **Elliot** , E. J. (2007). Acute gastroenteritis in children. BMJ; 334: 35 – 40.

- **EPPS SVR**, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC and Nisbet DJ.(2013). Foodborne *Campylobacter*, Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. Int J Environ. Res. Public Health. 10(12), 6292-6304.

- **Everett**, David warren , 2007 . The chemistry of milk processing. California Polytechnic State University, San Luis Obispo, Department of Animal Science , Science teacher .(1707-1778).

- **Forbes**, B.A. ; Sahm , D.F. and Wessifeld , A.S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . U.S.A., 1:509pp .

- **Forsberg** , B. C.; Patzold M. G. and Cooke, M. (2007). Diarrhoea case management in low – and middle – income countries – an unfinished agenda. Bulletin of WHO, 85(1):265-270.

- **Fromm** , H.I. and Boor K.J. 2004 “characterization of pasteurized fluid milk shelf – life attributes” J. food Sci 69: 207- 214.

- **Garrity** , G. M. (Editor - in - Chief) (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. Springer - Verlag, New York, USA .

- **Gaudreau** , C. and Gilbert, H. (2003). Antimicrobial resistance of

Campylobacter jejuni subspecies. *Jejuni* strains isolated from humans in 1998 to 2001 in Montreal, Canada. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2027 -2029.

- **Gebhart** ,C.J; Edmond, P.; Ward , G.E ; Krutz, H.J.and Berner,D.J.(1985). *Campylobacter hyointestinalis* .Anew species of *Campylobacter* found in the intestine of pigs and other animals .J.Clin.Microbiol .21 : 715-720.
- **Ghosh**, R.; Beena,U.; Prabhav,A.; Anita,C.; Arun,K.J. and A.P.Dubey.(2014) . Acomparative study of conventional and molecular techniques in diagnosis of campylobacter gastroenteritis in children. Annals of Clinical . Laboratory Science ,vol.44, no.1.
- **Gillespie**, S. H. and Hawkey, P. M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John Wiley and Sons, Ltd. P: 485-493.
- **Gloria** , P.; James, R., and Thomas, G. (2000). *Campylobacter* Infection In: Nelson Text Book of Pediatrics. Behrman Kleigman RM (EDS). 16th. Edition. WB Saunders, Philadelphia,p: 855 - 857.
- **Goossens** , H. and Giesendorf, A.J., 1995. Investigation of an outbreak of *Campylobacter* in day care. Dis., Vol.172, pp.1298-1305.
- **Goulhen**, F.; DE, E.; Pages, J. M. and Bolla, J. M.(2004).Functional refolding of the *Campylobacter jejuni* MOMP porin by groel from the same species. Biochem. J. 378: 851 - 856.
- **Guarino**, A.; Albano, F.; Ashkenaz, S. and Cooke, M. (2008). European society for paediatric gastroenterology, hepatology and nutrition / European Society for paediatric infections diseases

evidence - based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. JPGN 48: 81 - 122.

- **Hammarstrom**, V.; Smith, C. I. and Hammarstrom, L. (1993). Oral immunoglobulin treatment in *Campylobacter jejuni* enteritis. Lancet 341: 1036.
- **Hatchett** , W. 2002 “Action needed by Department of Health to avert public health ‘tragedy’ of Crohn’s” www.ehn-online.com/cgi-bin/news/news1.
- **Healing**, T. D.; Greenwood, M. H. and Pearson, A. D. (1992). *Campylobacter* and enteritis. Rev. Med. Microbiol. 3: 159 - 167.
- **Horrocks**, S.M.; Anderson, R.C.; Nisbet, D.J.; Ricke, S.C.(2009) Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, 15, 18–25.
- **Hughes**, R. A. and Cornblath, D. R. (2005). Guillain - Barre Syndrom. Lancet 366: 1653 - 1666.
- **HUMPHREY T**, O'Brien S, Madsen M.(2007) *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol. 15; 117(3):237-57.
- **Kabir Ahmed** and Niar Abdellatif. 2013. Quality Control of Milk in the Dairy Industry. World Journal of Dairy & Food Sciences 8 (1): 18-26.
- **Kalischuk**, L. D.; Inglis, G. L. and Buret, A. G. (2007). Strain – dependent induction of epithelial cell oncosis by *Campylobacter Jejuni* is correlated with invasion ability and is independent of cytolethal distending toxin. J. Med. Microbiol. 135: 2952 - 2963.

- **Kangethe** , E.K.; Abog, G.O.; Kamja, L. W.; Omore, A.O.; MC Derott, J.J. (2005).Investigation of the risk of consuming marketed milk with antimicrobial residues inkenya. *Foo control* , **16** , 349-355 .
- **Ketley** , J.M.(1995) Virulence of *Campylobacter* species: a molecular genetic approach . Department of Genetics , University of Leicester , J. Med. Microbiol. Vol. 42. 312-327.
- Larson**, C.L.; Christensen, J.E.; Pacheco, S.A.; Minnich, S.A.; Konkel, M.E.(2008). *Campylobacter jejuni* secretes protein via flagellar type III secretion system that contribute to host cell invasion and gastroenteritis. In *Campylobacter*, 3rd ed.; Nachamkin, I., Szymanski, C., Blaser, M., Eds.; American Society for Microbiology (ASM) Press: Washington DC, USA, pp. 315–318.
- **Law** , B. and Alcamo, I. E. (2004). Deadly Diseases and Epidemics*Campylobacteriosis*. Chelsea House Publishers.
- Lee**, A.; Logan, S. M. and Trust, T. J. (2000). Demonstration of a flagellar antigen shared by adiverse group of spiral - shaped bacterial that colonize intestinal mucus. *Infect. Immun.* 55: 825 - 831.
- **Leuschner** , R. and Boughtflower M., 2002 “Laboratory scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium,Enteritidis, and Dublin.” *J. Food Protect.*, 65:508-514.
- **LEVIN RE.**(2007). *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnol.* 21(4): 271–347.

- **Lindmark**, B.; Rømpikuntal, P. K.; Vaitkevicius, K.; Song, T.; Mizunoe, Y.; Uhlin, B. E.; Guerry, P. and Wai, S. N. (2009). Outer membrane vesical - mediated release of (CDT) from *Campylobacter jejuni*. BMC Microbiology 1471 - 2180.
- **MacFaddin** , J. E. (2000). Individual biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams Wilkins, London.p:57 - 424.
- **Mamelli** L, Pages JM, Konkel ME, Bolla JM (2006) Expression and purification of native and truncated forms of CadF, an outer membrane protein of *Campylobacter*. *Int J Biol Macromol* **39**: 135-140.
- **Mandell**, G. L.; Bennett, J. E. and Dolin, R. (2000). Principle Practice of Infections Disease. 5th. Editions. Churchill Living Stone.p: 2276 - 2283.
- **Maniatis** , T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) . Molecular cloning : A laboratory Manual . Cold spring Harbor Laboratory . New York, 458pp.
- **Marshall** , S. M.; Melito, P. L.; Woodward, D. L. *et al.*(2001). Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of the 16SrRNA gene. J. Clin. Microbiol. 37: 4158-4160.
- **Morrow**, A. L.; Ruiz, P. G. M.; Altaye, M.; Jiang, X.; Guerrero, M. L.; Meinen - Derr, J. K.; Farkas, T.; Chaturvedi, P.; Pickering, L. K. and Newburg, D. S. (2004). Human milk oligosaccharides are associated with protection against in breast - fed infants. *Pediatr*. 145: 297 - 303.
- **Nachamkin** , I.; Szymanski, M.C.; Blaser, J.M.(2008). *Campylobacter*, 3rd ed.; ASM Press: Washington DC, USA.

- **Nachamkin, I.**(2003). *Campylobacter and Archobacter*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed.; Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.A., Eds.; American Society for Microbiology (ASM) Press: Washington DC., USA, pp. 902–914.
- **Naghipour , M.** and Nakagomi, O. (2008). Issues with reducing rotavirus - associated mortality by vaccination in developing countries. *Vaccine*, 26: 3236 -3241.
- **Newell, D. G.;** Frost, J. A.; Duim, B. *et al.* (2000). New developments in the subtyping of *Campylobacter* species. In: *Campylobacter*, 2nd edn (eds Nachamkin, I. and Blaser, M. J.). ASM press, Washington, DC. P: 27- 44.
- **Nicholl , D.S.T .** (2008) . An introduction to genetic engineering . Third edition .Cambridge University press, 509pp.
- **Parker, J. N.** and Parker, P. M. (2004). *Campylobacter: A Medical Dictionary, Bibliography, and Annotated Research Guide to Internet References*. ICON Health Publications.
- **Parkhill, J.;** Wren, B.W.; Mungall, K.; Ketley, J.M.; Churcher, C.; Basham, D.; Chillingworth, T.; Davies, R.M.; Feltwell, T.; Holroyd, S.; Jagels, K.; Karlyshev, A.V.; Moule, S.; Pallen, M.J.; Penn, C.W.; Quail, M.A.; Rajandream, M.A.; Rutherford, K.M.; van Vliet, A.H.; Whitehead, S.; Barrell, B.G.(2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403, 665–668.
- **Plumb, D.C.** (2005). "Veterinary drug handbook". 5th edn., Black well publishing professional, Ames, USA, pp. 826-862.
- **Saenz , Y.,** Zarazaga, M., Lantero, M., Gastanares, M.J., Baquero, F . and Torres, C., 2000. Antibiotic resistance in *Campylobacter*

strains isolated from animals, foods and humans in Spain, pp.1997-1998.

- **Salah**, F. A. A. E., Esmat, I. A. and Mohamed, A. B. 2013. Heavy metals residues and trace elements in milk powder marketed in Dakahlia Governorate. International Food Research Journal 20(4): 1807-1812.
- **Salama** , S.M; Tabor ,H.; Richter , M.and Taylor,D.E.(1992) .Pulsed – Field gell electrophoresis for epidemiologic studies of *Campylobacter hyointestinalis* isolates . J . Clin . Microbiol . 30 (8) ; 1982-1984.
- **Santos MV**, Ma Y, Barbano DM. 2003 “Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage” J Dairy Sci 86:2491-2503
- **Samuel** , M. C. D. J.; Vugia, S.; Shallow, R.; Marcus, S.; Segler, T.; meGivern, H.; Kassenorg, K.; Reilly, M.; Kennedy, F.; Angulo, F. and Tauxe, R. V. (2004). Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United State and declining trend in incidence, Food Net 1996 - 1999. Clin. Infect. Dis. 38(Suppl. 3): 165 - 174.
- **Silva**, J.; Leite, D.; Fernandez, M.; Mena, C.; Gibbs, P.A.; Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review. *Front. Microbiol.* 2, 1–12.
- **Skirrow** , M. B. and Benjamin, J. (1980). 1001 *Campylobacters*; cultural characteristics of intestinal . *Campylobacter* from man and animals. J.Ityg. Camb . 85: 427 – 432.

- **Skirrow**, M.B. John McFadyean.(2006) and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1213–1217.
- **Sopwith**, W., Ashton, M., Frost, J. A.; Taylor, D.E.; and Keelan, M. (2003). Enhanced surveillance of *Campylobacter* infection in the North West of England 1997 - 1999. *J. Infect.* 64: 35 - 45.
- **Stephenson**, F.H. (2003). Calculations for Molecular Biology and Biotechnolog : A Guide to Mathematics in the Laboratory. 1st edition . Elsevier USA. CH-2,18-34.
- **Surawicz**, Ch.M. and Ochoa, B. (2006) Diarrheal diseases. The American college of gastroenterology.
- **Sambrook**, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York, USA. 5.2-5.14,8.2.
- **TABOADA** EN, Clark CG, Sproston EL, Carrillo CD.(2013). Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *J Microbiol Methods.* 95(1): 24-31.
- **Trieber**, C. A. and Taylor, D. E. (1999). Erythromycin resistance in *Campylobacter* p. 3. In: Proceedings of the 10th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, Baltimore, MD.
- **Taylor**, D. E.; Hiratsuka, K. and Mueller, L. (1989). Isolation of group and characterization of catalase-weak strains of *Campylobacter* species, including *Campylobacter upsaliensis*’ from humans with gastroinritis. *J. Clin. Microbiol.* 72: 2042 - 2045.
- **Vandamme** , P. (2000). Taxonomy of family Campylobacteraceae. In: *Campylobacter*, 2nd edn (eds I. Nachamkin, M. J. Blaser), ASM Press, Washington, DC. p:3 - 26.

- **van Putten**, J.P.M.; van Alphen, L.B.; Wosten, M.M.S.; de Zoete, M.R.(2009). Molecular mechanisms of *Campylobacter* infection. *Curr. Topics Microbiol. Immunol*337, 197–229.
- **VAN VLIET AHM**, Ketley JM.(2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J Appl Microbiol* (30):45–56.
- **Wassenaar** , T. M. and Newell, D. G. (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Envirom. Microbiol.* 66: 1 – 9.
- **WHO**. Global burden of disease (GBD) 2002 estimates, in: the World Health Reports 2003 and 2004.
- **Winn** , J. R.; Stephen, A.; William, J.; Felmer, K.; Gray, P.; Paul, S. and Gail, W. (2006). Konema`s color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Washington, p: 393 - 405.
- **Whitney**, H. 2006 “raw milk quality testing” [www.nr.gov.nl.ca / agric](http://www.nr.gov.nl.ca/agric).
- **Yang** , J. R.; Wu, H.S; Chiang, C. S. and Mu, J. J. (2008).PediatricCampylobacteriosis in northern Taiwan from 2003 to 2005. *BMC Infect. Dis.* 8(5): 1471 - 2334.
- **Young KT**, Davis LM, DiRita VJ.(2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 5(9): 665-679.

الملاحق

Appendix

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseoro,
Daedeok-gu, Daejeon, 306-220,
South Korea
Tel: (Korea) 1588-9788
(International) +82-42-930-8521
Fax: +82-42-930-8700
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: 1-877-264-4300
Fax: 1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.us.com

Bioneer Trade(Shanghai) Co., Ltd
403 Room, Building 888, no. 887,
Zuchongzhi Road, Zhangjiang High Tech Park,
PuDong New District, Shanghai 201203, China
Tel: +86-21-5080-0969
Fax: +86-21-5080-1620
E-mail: salescn@bioneer.com

Seoul Office
2nd fl. Sansu B/D, #66, Gangnam-daero
30-gil, Seocho-gu, Seoul, 137-130,
South Korea
Tel: +82-2-598-1094
Fax: +82-2-598-1096

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusaib bridge Co. (21-1-2016)

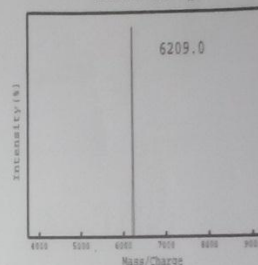
Order No.: 10011255

IDRES F

TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.6 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	25.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6210.0 g/mole
Tm	38.7 C	Volume for	95.6 ul
		100 pmoles/ul	

MALDI-TOF QC

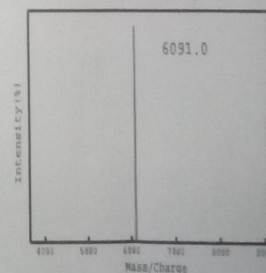


IDRES R

CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.8 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	30.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6092.9 g/mole
Tm	37.7 C	Volume for	98.3 ul
		100 pmoles/ul	

MALDI-TOF QC



ملحق (1) أنواع البوادى المستعملة في الدراسة

Headquarters

49-3 Munpyeong-dong,
Daejeon 306-220,
South Korea
Tel : +82-42-930-8777
Fax : +82-42-930-8688
E-mail : sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.

1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: 1-877-264-4300
Fax: 1-510-865-0350
E-mail : orderusa@bioneer.com

Seoul Office

Sansu Building 2nd floor,
6, Yangjae-dong, Seocho-gu, Seoul
137-130, South Korea
Tel : +82-2-598-1094
Fax : +82-2-598-1096

Order

Korea Market only: 1588-9788
E-mail: order@bioneer.co.kr
Website: www.bioneer.com

[Cat. No.]
D-1030

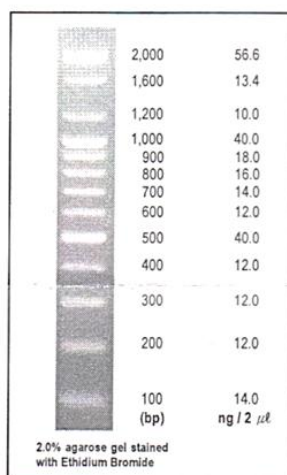
[Lot No.]
1103K

[Volume]
250 μ l

[Concentration]
135 ng/ μ l

• **Description** : 100 bp DNA Ladder is specially designed for determining the size of double strand DNA from 100 to 2,000 base pairs. The DNA Ladder consists of 13 double strand DNA fragments ranging in sizes from 100 to 1,000 bp in 100 bp increments, and additional fragments of 1,200, 1,600, 2,000 bp. The 500, 1,000 and 2,000 bp bands are two to three times brighter for easy identification

• **Application** : Size confirmation of DNA fragments.



• **Features**

- ready-to-use
- Recommended Loading :
1.5 - 2.0 μ l/5 mm lane width
- Typical Loading Number of Lanes :
125 - 166 (5 mm lane width)
- Range (bp) : 100 - 2,000
- Number of Bands: 13

• **Storage Buffer**

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA
- 2.5% Ficoll
- 0.005% Bromophenol Blue
- 0.005% Xylene Cyanol

• **Storage Condition**

This product is shipped on dry ice and should be stored at -20°C until use.

• **Quality control assay** : Agarose gel analysis shows that 13 bands are clearly distinguishable. The 500 bp, 1,000 bp and 2,000 bp band must be more intense than any other band.

• **Note**

- The DNA ladder can be applied directly onto an agarose gel.
- Do not heat before loading.
- Repeated freezing and thawing should be avoided.

• **Ordering Information**

[Related BIONEER DNA Molecular Weight Marker Products]

Note

For research use only. Not for Use in diagnostic or therapeutic procedures.

Bioneer shall not in any event be liable for incidental or special damage of any kind resulting from any use except on application(s).

Cat. No.	Products	Cat. No.	Products
D-1010	10bp DNA Ladder, 100 μ l	D-1060	Lambda DNA / EcoR I Markers, 100 μ g
D-1020	25/100 bp Mixed DNA Ladder, 250 μ l	D-1070	Lambda DNA / EcoR I+Hind III Markers, 100 μ g
D-1030	100 bp DNA Ladder, 250 μ l	D-2510	Lambda DNA, 250 μ g
D-1035	100 bp Plus DNA Ladder, 500 μ l	D-1030-1	AccuLadder 100bp 320 μ l x 2
D-1040	1 Kb DNA Ladder, 500 μ l	D-1040-1	AccuLadder 1Kb 500 μ l x 2
D-1050	Lambda DNA / Hind III Markers, 100 μ g		

Bioneer Corporation
8-11, Munpyeongseoro
Daedeok-gu, Daejeon 306-220
South Korea
Tel: (Korea) 1588-9788
(International) +82-42-930-8777
Fax: +82-42-930-8600
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: order.usa@bioneer.com

Bioneer Trade(Shanghai) Co., Ltd
403 Room, Building 88, no. 887
Zuchongzhi Road, Zhangjiang High Tech Park
PuDong New District, Shanghai 201203 China
Tel: +86-21-5080-0969
Fax: +86-21-5080-1620
E-mail: salescn@bioneer.com

Seoul Office
2nd fl. Sansu B/D, #66, Gangnam-daero
30-gil, Seocho-gu, Seoul 137-130
South Korea
Tel: +82-2-598-1094
Fax: +82-2-598-1096

Order
Domestic only: 1588-9788
E-mail: order@bioneer.co.kr
URL: www.bioneer.com

AccuPower® PCR PreMix is a new, powerful, and ready-to-use PCR reagent optimized for more accurate PCR amplifications.

Advantages

Speed

Substantial reduction in PCR setup time.

Stability

AccuPower® PCR PreMix is the powerful technology for convenient and easy to perform DNA amplification. It contains DNA polymerase, dNTPs, a tracking dye and reaction buffer in a premixed format, freeze-dried into a pellet. The patented chemical stabilizer of this product enables to maintain the activity of pre mixture for over a month even when stored at room temperature (25°C), over 2 years in the freezer.

Reproducibility and Yield

Batch manufacturing under strict ISO 9001 quality control conditions guarantees reproducibility. Minimal handling during reaction set up provides improved accuracy.

Simplicity

Each product line contains an application specific enzyme in an easy to re-suspended, lyophilized premix of dNTPs, reaction buffer, a tracking dye, and a stabilizer. The premix is ready to use, thus offering virtually no reaction set up time.

Contents

Component	Reaction size	20 µl reaction	50 µl reaction
Top DNA polymerase		1 U	2.5 U
Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		250 µM	250 µM
Tris-HCl (pH 9.0)		10 mM	10 mM
KCl		30 mM	30 mM
MgCl ₂		1.5 mM	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye			

Experimental Protocol

- Add template DNA and primers to AccuPower® PCR tube.

Concentration of template DNA and primer

	20 µl reaction	50 µl reaction
Template DNA	5 - 50 ng	10 - 100 ng
Primer	5 - 10 pmole	10 - 20 pmole

- Add distilled water to AccuPower® PCR tubes to a total volume of 20 µl or 50 µl.
- Dissolve the lyophilized blue pellet by vortexing, and briefly spin down.
- Add mineral oil. (This step is unnecessary when using a thermal cycler with top heating.)
- Perform PCR of samples.
- Load samples on agarose gel without adding a loading-dye mixture, and perform electrophoresis.

Notice to Purchaser

This enzyme is specifically optimized for increasing base incorporation rate by inactivating 5'→3' exonuclease activity. Therefore, this is not recommended to use for Real Time PCR using Taqman® probe.

Trademark

AccuPower® is a trademark of Bioneer Corporation.

Ordering Information

Tube type	Reaction	Cat.No.	Description
0.2ml Tube	20 ul	K-2012	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2016	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
	50 ul	K-2013	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2017	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
0.5ml Tube	50 ul	K-2011	0.5 ml thin-wall tubes with attached cap / 100 tubes
96-well	10 ul	K-2260-1	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-2	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-3	thin-wall 96-well semi-skirted plate
	20 ul	K-2260-4	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-5	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-6	thin-wall 96-well semi-skirted plate
384-well	5 ul	K-2080-1	thin-wall 384-well full-skirted plate
	10 ul	K-2080-2	thin-wall 384-well full-skirted plate
	20 ul	K-2080-3	thin-wall 384-well full-skirted plate
Master Mix		K-2018	1 ml of 2 X Master mix solution
		K-2018-1	10 ml of 2 X Master mix solution

A complete product list appears on our web site at www.bioneer.com.

Blazing the Biotechnology Trail

ملحق (3) دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي لـ PCR

ملحق رقم (4)

استمارة معلومات عن المريض

- رقم العينة :
- تاريخ اخذ العينة :
- اسم المريض :
- الجنس :
- تاريخ الاصابة :
- العلاجات المستخدمة :
- هل يعاني من امراض اخرى :
- هل يعاني من الاعراض الاتية :
- اسهال (مائي - مخاطي - دموي) :
- ألم البطن :
- الحمى :
- صداع :
- غثيان وتقيؤ :

ملحق رقم (5)

ت	الجنس	العمر	التاريخ	نوع العينة	العينات التي تحتوي على جين <i>Cadf</i> باستخدام تقنية PCR	الاستنتاجات البكتيري
1	M	3 اشهر	2016-2-1	اسهال مخاطي	-	+
2	M	1 سنة	2016-2-9	اسهال مخاطي	-	+
3	M	3 اشهر	2016-2-14	اسهال مائي	-	+
4	F	1 سنة	2016-2-18	=	-	+
5	F	1 شهر	2016-2-21	=	+	+
6	M	5 سنوات	2016-2-25	=	-	+
7	M	7 اشهر	2016-2-29	=	-	+
8	M	1 سنة	2016-3-2	=	-	+
9	M	6 اشهر	2016-3-5	=	-	+
10	M	6 اشهر	2016-3-6	اسهال دموي	+	+
11	F	1 سنة	2016-3-8	اسهال مائي	-	+
12	M	1 سنة	2016-3-11	=	+	+
13	M	2 سنة	2016-3-13	=	-	+
14	M	3 اشهر	2016-3-14	=	-	+
15	M	2 شهر	2016-3-17	=	-	+
16	M	2 سنة	2016-3-21	=	-	+
17	M	5 شهر	2016-3-25	اسهال دموي	+	+
18	F	2 سنة	2016-3-28	اسهال مخاطي	+	+
19	F	9 لشهر	2016-3-30	=	-	+
20	M	3 سنة	2016-4-4	=	-	+
21	M	2 سنة	=	=	-	+
22	F	1 سنة	=	=	-	+
23	M	1 سنة	=	=	-	+
24	F	10 اشهر	2016-4-10	=	-	+
25	M	1 سنة	=	=	-	+
26	F	2 سنة	=	اسهال مائي	-	+
27	M	3 سنة	2016-4-19	=	-	+
28	F	4 شهر	2016-4-25	=	-	+
29	F	3 سنة	=	=	-	+
30	F	6شهر	2016-5-4	=	-	+
31	M	4 سنة	2016-5-10	=	-	+
32	M	2سنة	2016-5-14	اسهال دموي	+	+
33	F	1سنة	2016-5-18	اسهال مائي	-	+

Male : M ●
Female : F ●

● + : نتيجة موجبة
● - : نتيجة سالبة

Summary

The study is conducted in the Graduate Studies Lab. In the College of Pure Sciences. The researcher compiled (123) samples from various sources comprising of (30) raw milk samples, (30) local white cheese samples, (30) local cream samples compiled from local markets in Baqubah city during the period of time from (1/11/2015 to 28/2/2016), and (33) samples of feces from children with diarrhea (watery, mucoid, bloody) of ages between (3 months to 5 years) in Al-Batoul Teaching Hospital for Maternity and Children.

Results of the study exposed that (33) samples, with a ratio of (26.82%), showed negative growth to bacterial plantation, and (90) samples, with a rate of (73.17%) mirrored positive growth to bacterial plantation. Moreover, studied phenotypic characteristics and attributes biochemical bacterial isolates, it has indicated diagnostic results to be (65) isolation of them, and by (65) samples with a ratio of (52.84%) were *Campylobacter* bacteria as the ratio of isolated bacteria from raw milk reached up to (15) samples with a rate of (50%), (7) samples from local white cheese with a rate of (23.33%) and (8) samples from local cream in a ratio of (26.66%). the ratios of isolated bacteria from feces samples were; (3) samples of bloody sustenance (9.90%), (10) samples of mucoid sustenance (30.30%) and (20) watery samples (60.60%). The bacteria were also diagnosed by means of micrography which showed its negativity and positivity towards Gram stain; (90,90%) were negative to Gram stain, while (9.90%) were positive to Gram stain.

Biochemical and physiological examinations were executed and isolates were oxidase-positive, catalase, urease test, Hippurate hydrolysis test, and growth test within (37 c-42 c) temperatures as well as their

tolerance of salinity with concentrations between (1.5 %-3.5%). Isolates were sensitive to Nalidixic acid and resistant to Cephalothin.

Moreover, total DNA extraction process of the *Campylobacter* bacterial samples was executed via delineating extraction kit (Mini DNA Bacteria Kit) which is equipped by Pioneer Co. the extracted DNA purity ranged between (2-1.8) regarding all selected samples. Next to that, the polymerase chain reaction (PCR) was done with positive growth bacteria on selective media (Skirrow-Preston) and non-selective media (Blood agar, Chocolate agar, Macconkey agar) via the delineation of the specialized primers kit which target the quantitative sequence of cadF gene with a molecular weight of 400 base pairs. The doubling outputs were deported on the Agoaros gel with a concentration of 1%. One package was observed to appear in all tracks in the gel at the same level regarding the gene. The results of the PCR with a use of specialized primer for this gene showed that from (12) samples, (7) of them contained this gene with a rate of (58.33%) and at the same molecular weight of 400 base pairs, while the other (5) samples did not contain this gene with a rate of (41.66%).



**Ministry of Higher Education and Scientific
Research**

University of Diyala

College of Education for Pure Sciences

**Bacteriological and genetic study of the bacteria
Campylobacter spp locally isolated**

A Thesis

**Submitted to the Council of College of Education for Pure
Sciences**

University of Diyala

in Partial Fulfillment of the Requirements of

M.Sc. in Biology/ Microbiology

By

Noor Monim Fadhil Alshammari

Supervised by

Prof.

Adnan Neama Abdurridha (PhD)