الجمهورية العربية السورية

جامعة حماة

كلية الطب البيطري

قسم الأحياء الدقيقة

عزل جراثيم الليستيرية من الحليب والجبن في محافظة دير الزور

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في العلوم الطبية البيطرية اختصاص

الأحياء الدقيقة

إعداد طالب الدراسات العليا

مصطفى خالد الخضر

إشراف

الأستاذ الدكتور ناجح هبره

1445 هـ - 2023 م

❊ شـــهادة ❊

أشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث قام به المرشح الطالب مصطفى خالد الخضر تحت إشراف الدكتور ناجح هبره الأستاذ في قسم الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري في جامعة حماة وأي رجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع موثق في النص .

المرشـــــح　　المشـــرف العلمـــي

مصطفى خالد الخضر　　أ.د ناجح هبره

حرر في / /

❊ *Certificate* ❊

It is hereby certified that the work described in this thesis is the result of the author, s own investigation Dr. Mustafa Khaled Al khuder under the supervision of the professor Dr.Najh Habra in the department of Microbiology at the faculty of veterinary medicine , ALHama University .And any reference to other researcher work has been acknowledged in the paragraphs .

Date / /

Candidate　　Supervisors

Mustafa Khaled Al khuder　　Prof.. Dr. Najh Habra

الجمهورية العربية السورية
جامعة حماة
كلية الطب البيطري

Syrian Arab Republic
Hama Universit
Faculty of Veterinary.-Medicine

هاتف: ٢٤٦٠١٨٠ ـ ٢٤٦٠١٨١ ٠٠٩٦٣٣٣ ـ فاكس: ٠٠٩٦٣٣٢٥١٠٥١٤ ـ بريد الكتروني: vet-med@net.sy

الرقم :
التاريخ :
التصنيف :
الموضوع :

قرار لجنة الحكم والمناقشة

استناداً إلى قرار مجلس الشؤون العلمية بجامعة حماه رقم (٤٨٦) المتخذ بالجلسة رقم (٢٣) للعام الدراسي ٢٠٢٢ – ٢٠٢٣ المنعقدة بتاريخ /١٤/ محرم ١٤٤٥ هـ والموافق ١ / ٨/ ٢٠٢٣ القاضي بتشكيل لجنة الحكم والمناقشة لرسالة الماجستير للطالب **مصطفى الخضر** بعنوان :

" **عزل جراثيم الليستيرية من الحليب والجبن في محافظة دير الزور** "

وبعد عرض الرسالة وسردها ومناقشتها ،اجتمعت لجنة الحكم والمناقشة بتاريخ ٢٢/ ٨/ ٢٠٢٣ وبعد المداولة قررت اللجنة ترشيح طالب الدراسات العليا **مصطفى الخضر** لنيل درجة الماجستير في العلوم الطبية البيطرية اختصاص (الأحياء الدقيقة) بتقدير عام (جيد جداً) وبدرجة (٧٦.٠٢).

وتوصي اللجنة بصرف تكاليف طباعة الأطروحة على نفقة الجامعة نظراً للجهد الذي بذله الطالب والتكاليف التي تكبدها إضافة إلى تناوله موضوعاً حساساً من الناحية الاقتصادية في القطر.

أعضاء اللجنة :

أ.د. عبد الكريم قلب اللوز
اختصاص أمراض سارية
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

التوقيع

أ.د. ناجح هبيرة
اختصاص تحليل وتشخيص مخبري
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

د.أشرف الصالح
اختصاص علم الجراثيم العام
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

الجمهورية العربية السورية جامعة حماة كلية الطب البيطري		Syrian Arab Republic Hama Universit Faculty of Veterinary.-Medicine

هاتف: ٢٥١٠١٨٠ - ٢٥١٠١٨١ - ٠٠٩٦٣٣٣ فاكس: ٠٠٩٦٣٣٣٢٥١٠٥١٤ - بريد الكتروني: vet-med@net.sy

الرقم :　　　　التصنيف :

التاريخ :　　　　الموضوع :

الأستاذ الدكتور عميد كلية الطب البيطري

بعد الاطلاع على الأطروحة المعدلة من رسالة الماجستير المقدمة من قبل المرشح لنيل درجة الماجستير في العلوم الطبية البيطرية طالب الدراسات العليا مصطفى الخضر في قسم الأحياء الدقيقة اختصاص (الأحياء الدقيقة) بعنوان:

" عزل جراثيم الليسترية من الحليب والجبن في محافظة دير الزور "

نفيدكم بأن الأطروحة بشكلها الحالي قد استوفت التعديلات التي أشارت لها لجنة الحكم والمناقشة التي عقدت يوم الثلاثاء بتاريخ ٢٢/ ٨/ ٢٠٢٣ لمناقشة الرسالة، ونعتبر أن الرسالة بهذه الصورة جاهزة للطباعة بشكلها النهائي.

يرجى التكرم بالاطلاع

/ / ٢٠٢٣م

عضو	عضو	رئيس اللجنة
د. أشرف الصالح	أ.د. ناجح هبرة	أ.د. عبد الكريم قلب اللوز

رئيس قسم الأحياء الدقيقة

الأستاذ الدكتور عبد الكريم الخالد

مصدق عميد الكلية

الأستاذ الدكتور عبد الكريم قلب اللوز

تصريح

أصرح بأن هذا البحث والذي هو بعنوان (عزل جراثيم الليستيرية من الحليب والجبن في محافظة دير الزور) لم يسبق أن قبل للحصول على أية شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى .

المرشح التاريخ

مصطفى خالد الخضر / /

DECLARATION

It is hereby declared that this work (Isolation of Listeria from milk and cheese،s in the Governorate of Der-Alzoor) has not been accepted already for any degree , nor is being submitted concurrently for any other degree.

Date

/ /

Candidate
Mustafa Khaled Al khuder

بِسْمِ اللّٰه الرَّحْمنِ الرَّحيم

﴿وَقُل اعْمَلُواْ فَسَيَرَى اللّٰهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمنُون وَسَتُرَدُّونَ إِلَى عَالِمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُم بِمَا كُنتُمْ تَعْملُونّ﴾ التوبة 105

صدق اللّٰه العظيم

فهرس المحتويات

الموضوع	الصفحة
المقدمة	13
أهداف البحث	17
اهمية البحث	17
الدراسة المرجعية	18
داء الليسترية	19
خطورة المرض	19
العامل المسبب	21
الخواص الشكلية لجراثيم الليسترية	22
الخواص المزرعية لجراثيم الليسترية	22
الخواص الكيميا حيوية لجراثيم الليسترية	23
الأعراض التي تسببها جراثيم الليسترية	23
انتشار داء الليسترية	23
وبائية داء الليسترية	27
مصدر ومخزن الخمج لداء الليسترية	27
طرق انتقال مرض الليسترية	27
الامراضية الخاصة بجراثيم الليسترية	28
المواد وطرائق العمل	29
المواد المستخدمة في الزرع والعزل الجرثومي والاختبارات البيوكيمائية	30
الأجهزة اللازمة للبحث	31
طرائق البحث	31
طريقة جمع العينات	31
الزرع الجرثومي	32
دراسة الخواص الشكلية	32
اختبار تحلل الدم	33
اختبار الحركة	33
اختبار الكاتلاز	33
اختبار أوكسيداز	33
اختبار أحمر الميثيل	34
اختبار فوكس بروسكاور	34
اختبار كامب	34
اختبار الأندول	35

اختبار تخمير السكريات	35
اختبار حساسية العزولات للمضادات الحيوية	35
النتائج	37
صور لجراثيم الليستيرية	39
نتائج عزل جراثيم الليستيرية من الحليب	40-41
نتائج عزل جراثيم الليستيرية من الأجبان	42-43
نتائج الاختبارات الكيميا حيوية	44
نتائج اختبار الحساسية	45
المناقشة	46
الاستنتاجات و التوصيات	49
الملخص العربي	52
الملخص الأجنبي	53
المراجع	54

فهرس الجداول

الرقم	عنوان الجدول	الصفحة
1	جدول يمثل العينات المدروسة	30
2	نتائج عزل جراثيم الليستيرية على العينات المدروسة	38
3	نتيجة عزل جراثيم الليستيرية من حليب الأبقار	40
4	نتيجة عزل جراثيم الليستيرية من حليب الأغنام	41
5	نتيجة عزل جراثيم الليستيرية من أجبان الأغنام	42
6	نتيجة عزل جراثيم الليستيرية من أجبان الأبقار	43
7	نتيجة الاختبارات الجرثومية والكيمياحيوية لجراثيم الليستيرية	44
8	نتيجة اختبار الحساسية	45

فهرس المخططات

الرقم	عنوان المخطط	الصفحة
1	مخطط يمثل جراثيم الليستيرية في حليب الأبقار	40
2	مخطط يمثل جراثيم الليستيرية في حليب الأغنام	41
3	مخطط يمثل جراثيم الليستيرية في أجبان الأغنام	42
4	مخطط يمثل جراثيم الليستيرية في أجبان الأبقار	43

فهرس الصور

الرقم	العنوان	الصفحة
1	نمو جراثيم الليستيرية على منبت بالاكام	39
2	نمو جراثيم الليستيرية على منبت أوكسفورد	39
3	جراثيم الليستيرية بعد عملية التنقية على منبت أوكسفورد	39
4	تخمير السكاكر لجراثيم الليستيرية	39

فهرس الاختصارات

الاسم العربي	الاسم الانكليزي	الاختصار
أحمر الميثيل	Methyl Red	MR
فوكس بروسكاور	Voges–proskauer	VP
الاندول	Indol	IN
التحلل الدموي	Hemolysin	HLY
الحركة	Motility	MOT
الكاتلاز	Catalase	CAT
الأوكسيداز	Oxidase	OXID

بسم الله الرحمن الرحيم

الإهداء:

* إلى من سجدت له الجباه وخنعت له رقاب الجبابرة خوفاً وتضرعاً وطمعاً بعفوه وكرمه

إلى من فاضت له العيون بعبرتها . . . إلى من خشعت له القلوب

إلى من وعد عباده وبشر الصابرين على صبرهم بفرج قريب سبحان الله الكريم

إلى من تاقت له الأرواح واشتاقت له النفوس لتقف بين يديه الرحمن الرحيم

إلى خالق الكون رب السموات والأرض ورب العرش العظيم **الله جل جلاله**

* إلى سيد البشرية وخير البرية . . . إلى مهدي البشرية الذي بعث بالحق رحمة للعالمين

سيدنا وحبيبنا وشفيعنا سيدنا **محمد صلى الله عليه وعلى آله وصحبه وسلم**

*إلى النور الذي أبصر به وسندي في الحياة . . .إلى من ينبض قلبي بوجودها

إلى من علمتني معنى الصبر والعطاء . . .إلى من كانت لي بمثابة كل شيء

إلى من اعتبرها أعز ما في الوجود . . . إلى الشمعة التي تحترق لتضيئ من حولها

إلى من قاسمتني حياتي بحلوها ومرها . . . إلى من وقفت بجانبي وساندتني بكل مواقف الحياة

إلى الدوحة العظيمة . . . إلى من كانت لها كل الفضل . . . إلى من وهبتني الكثير الكثير ولم أهبها إلا القليل . . . إلى من أكن لها كل الاحترام والتقدير التي لولا تحفيزها لما وصلت إلى النجاح

إلى والدتي الغالية المعلمة الفاضلة **كفاء جنيد** أطال الله بعمرها

*إلى من غاب عن ناظري واشتاقت له روحي . . . إلى من تعلمت منه معنى الشجاعة

إلى من كان له الفضل علي . . . إلى من حرمتني الدنيا كلمة أبي

إلى من تراأى لي طيفه من بعيد وتمنيت أن يكون موجود بيننا لأزف له خبر نجاحي

ولكن موعدي معك في جنان الخلد . . . **إلى روح والدي المرحوم خالد الخضر**

*إلى من أكن لهم الاحترام والتقدير . . .إخوتي **محمد الخضر، المهندسة رولى الخضر**

إلى الزهور التي عطرت جو أسرتنا . . .إلى ضحكة الحياة وبهجتها

إلى أمل المستقبل **حنين، مصطفى، لين**

مصطفى

شكر وتقدير

أقدم جزيل الشكر والعرفان بالجميل إلى مشرفي وأستاذي وقدوتي في العلم

الأستاذ الدكتور ناجح هبره للتوجيه الدائم وعلى نصائحه القيمة .

شكر وتقدير

إلى رئيس جامعة حماه **أ . د . عبد الرزاق سالم**

وإلى **أ . د . سامر إبراهيم** نائب رئيس جامعة حماه

وإلى كلية الطب البيطري وجميع العاملين فيها وأخص بالذكر

أ . د . عبد الكريم قلب اللوز عميد كلية الطب البيطري

والسادة الوكلاء **أ . د . موفق جنيد ، د . مرهف لحلح**

وإلى **د . أشرف الصالح**

وإلى **أ . د . عبد الكريم الخالد** رئيس قسم الأحياء الدقيقة

والله ولي التوفيق

مصطفى خالد الخضر

المقدمة والأهداف

Introduction

&

Objectives

1- المقدمة Introduction:

قال الله تعالى:

((وإنّ لكم في الأنعام لعبرة نسقيكم مما في بطونها ولكم فيها منافع كثيرة ومنها تأكلون)).

((وإنّ لكم في الأنعام لعبرة نسـقيكم مما في بطونه من بين فرث ودم لبناً خالصـاً سـائغاً للشاربين)).

إن نعم' الله تعالى على الإنسان نعم'' كثيرة لا تعد ولا تحصى ومن نعمه علينا عز وجل أنه سبحانه وتعالى جل جلاله قد سخر لنا الأنعام لنستفيد من حليبها ولحمها وصوفها وغيرها من هذه الفوائد العظيمة سبحان الله وبحمده سبحان الله العظيم.

وأيّ مادة غذائية سواء أكانت الحليب، الأجبان أو اللحوم تعد عرضة للتلوث البكتيري حيث تستطيع العديد من الجراثيم أن تغزو هذه المادة الغذائية مسببة أمراضاً خطيرة جسيمة ملحقة بالكائن الحيّ ومن بين هذه الجراثيم جراثيم الليستيرية التي تعد من أخطر الجراثيم لما تسببه من أمراض فتاكة سواء أكانت عند الإنسان أو الحيوان.

ينتشر مرض الليستيرية بكثرة في الطبيعة مصيباً الإنسان وأنواعً عديدة من الحيوانات بما فيها الأسماك والطيور، وتشكل بعض الحيوانات القارضة المصابة بالمرض إصابة خفية مصدراً هاماً للعدوى حيث يمكنها أن تحدث وبائية كبيرة للمرض في الحيوانات الأهلية، ويعتبر المرض من الأمراض المعدية التي تصيب الجهاز العصبي المركزي، وكذلك تحدث تسممات دموية في الحيوانات الحديثة الولادة خاصة، إضافة إلى التهابات الرحم وإجهاضات والتهاب الضرع المزمن (الرفاعي والعمر، 2007).

الليستيرية وحيدة النواة جراثيم ايجابية الغرام، هوائية لاهوائية مخيرة تتواجد في أماكن متعددة وتعتبر من المسببات المرضية الهامة للعديد من الحيوانات (Jones, 1988; Chasseignaux *et al*., 2001).

كما يمكن أن تنتشر هذه الجراثيم في الطبيعة والبيئة المحيطة كالتربة والماء والنباتات (البني وزملاوء، 2016).

وتحدث العدوى عن طريق (الاحتكاك، الأوســاخ ، الأطعمة الملوثة) ولا تنتقل العدوى من إنسـان إلى آخر حيث يصـاب الإنسـان بهذه العصـيات محدثة التهابات السـحايا والمخ وكذلك إجهاض النساء الحوامل (الرفاعي والعمر،2007).

جهاز الإحسـاس البصـري مثل الرنين المصـلي السـطحي (SPR) Surface Plasmon resonance يعطي الكشـف الفوري عن الممرضـات المنقولة بالغذاء أو الجزيئات الحيوية، لان في هذا النظام يمكن ملاحظة ارتباط المستضد والضد خلال ثواني من اضافة العينة أما مستوى الارتباط الاعظمي يحدث خلال 15 دقيقة (Fatamico *et al*., 1998; Rich & Myszka :2000 ; Sonezaki *et a.,l* 2000 ; Koabova *et al*., 2001).

طرق الكشـف عن الليسـترية والتي تسـتخدم طريقة إكثار العينة و اسـتخدام أوسـاط زرع انتقائية وتحديد النمط الظاهري للجرثومة اســتبدلت الآن بالنظم التشــخيصــية المناســبة والســريعة والمعتمدة على المظاهر الوراثية فيما يخص بالمســابر الحامضــية النووية الصحيحة أو بالمستضدات الجرثومية المميزة المشاركة بالمرض مثل Listeriolysin O (LLO) phosphatidylinositol specific phospholipase C (PI-PLC) or the 60-kDa comprising p60 protein . وعلى أية حال فان الطرق المعتمدة في تحضير العينة على أســاس الحمض النووي لاتزال مشـكلة غير محلولة بينما الطرق المناعية تعتبر هي الأكثر دقة ومتانة بهذا المجال إلا أن التجارب المعتمدة في أســاســها على الأجســام لمضـادة (الاضـداد) هي محدودة كثيراً بسـبب قلة الاضـداد الحسـاسـة والنوعية ومن الممكن الاسـتفادة منها في كشـف أنواع الليسـترية، ولكي يتم التغلب على هذه العقبة في التجارب المناعية لكشـف الليستـرية تم الاستفادة من الاضـداد المطورة حديثاً والتي أظهرت إفادة في كشـف الليستـرية (الليستـرية وحيدة النواة) ضـد المستضـد p60 kD وهو بروتين خارج خلوي تنتجه كل أنواع الليسـترية ويعتبر مكون أسـاسـي لتضـاعف الخلية (Köhler *et al*., 1990; Datta *et al*., 1993; Makino *et al*., 1995; Gholizadeh *et al*., 1996; Bhunia, 1997; Bubert *et al*; 1999.;).

إن الطرق والاختبارات السريعة والدقيقة المخصصة للكشف عن الليستيرية وحيدة النواة يجب أن تكون مطبقة وإلى حد كبير في مصانع المواد الغذائية وتحت إشراف أخصائيين، حيث إن طرق الكشف تتطلب عملية إغناء وعزل للجرثومة ثم إجراء الاختبارات الكيمياحيوية للتعرف على نوع الليستيرية المتواجدة حيث يوجد في الأسواق حالياً كيتات تجارية مناسبة وسريعة في كشف أنواع الليستيرية (Swaminathan & Feng , 1994).

الليستيرية هي جراثيم صغيرة على هيئة عصيات مكورة ايجابية الغرام، ايجابية لاختبار الكاتالاز وسلبية لاختبار الأوكسيداز، متحركة، هوائية لاهوائية مخيرة، تنمو بدرجات حرارة ما بين 4- 45 م° و درجة حموضة ما بين pH (5.5- 9.6) أما نوع الليستيرية ايفانوفي L. ivanovii والليستيرية اينكوا L. inouca فهي من أقل الأنواع الممرضة للحيوانات، تتواجد وبشكل واسع في البيئة وفي النباتات أو الأعشاب وفي مياه المجاري المتحركة يوجد ست أنواع من جنس الليستيرية وتعتبر الليستيرية وحيدة النواة من أهم وأكثر الأنواع الممرضة وتصيب العديد من الحيوانات والإنسان (Murray *et al.*, 1926).

تتواجد جراثيم الليستيرية في أماكن متعددة بالطبيعة وبشكل طبيعي في ملوثات المواد الغذائية ومنتجاتها مثل الحليب و اللحم والخضروات والمأكولات البحرية .... وتعتبر عامل مسبب لداء الليستيرية وهو مرض خطير ومميت للأشخاص المسنين وحديثي الولادة ومضطربي المناعة ، وبدراسات علم الأوبئة يعد داء الليستيرية من الأمراض المنقولة بالغذاء حيث سجلت حالات تفشي للمرض في أمريكا الشمالية وأوربا وسجلت نسبة الوفيات تقريباً 20% ولكن قد تزداد نسبة خطورة المرض وتصل إلى نسبة 75% عند النساء الحوامل، ومعظم الوفيات كانت تعزى الى الليستيرية وحيدة النواة والتي اعتبرت من المسببات الخطيرة على الصحة العامة بسبب قدرتها على النمو والتكاثر بدرجات حرارة منخفضة4 م° ومقاومتها للإجهاد التناضحي وبقائها حية من إجراءات معالجات الحفظ (Rocourt & Berch, 1996; Cox *et al*., 1989; Bell & Kyriakides, 2005).

تتميز الأنواع الممرضة لجراثيم الليستيرية (الليستيرية وحيدة النواة، الليستيرية ايفانوفي) بقدرتها على خرق حواجز الخلايا الظهارية والبطانية للعائل المصاب متضمناً الأوعية

الدموية للدماغ والحاجز المشـــيمي للجنين، كما ولها القدرة على الغزو والتكاثر في الخلايا البالعة وغير البالعة حيث ترتبط جراثيم الليسـترية بالخلايا حقيقة النواة بواسـطة نوعين من البروتينـات وهم InlA , InlB ، وهـذه البروتينـات تتواجـد على ســـطح الجرثومـة مع مســـتقبلات نوعية على أغشـــية الخلايا الهدف (Vazquez-.; Cossort *et al*., 2003 .(Boland *et al*., 2001

2- أهداف الدراسة Objective:

الهدف من البحث:

نظراً لخطورة جراثيم الليستـرية وما تسـببه من أمراض خطيرة للإنســان والحيوان ونظراً لكثرة مادة الحليب ومنتجاته من الأجبان في محافظة دير الزور لقد تم إجراء هذه الدراســة من أجل الوقوف على تقييم الليسترية وإيجاد المضـاد الجرثومي المناسب لها لحماية الإنسان أولاً ثم الحيوان والحد من خطورتها ومنع انتشارها وذلك من خلال:

1- عزل جراثيم الليسترية من عينات من الحليب الأبقار والأغنام في محافظة دير الزور

2- عزل جراثيم الليسترية من عينات من الأجبان الأبقار والأغنام في محافظة دير الزور

3- اختبار حساسية هذه العزولات اتجاه بعض المضادات الحيوية

أهمية البحث:

نظراً لقلة الأبحاث حول هذه الجراثيم في القطر العربي السـوري تم إجراء هذه الدراسـة في محـافظـة دبر الزور على عينـات الحليـب والأجبـان الأبقـار والأغنـام ونظراً لأهميـة الحليـب والأجبان كغذاء أسـاسـي للإنسـان في القطر العربي السوري وفي محافظة دير الزور خاصة والتي تتركز فيها أعداد كبيرة من القطعان، ونظراً لانتشـار الإصـابة بداء الليسـترية في هذه القطعان بالإضافة إلى قلة الدراسات عن داء الليستـرية في محافظة دير الزور.

الدراسة المرجعية
Literature Review

2- الدراسة المرجعية Literature Review:

2-1- داء الليستيرية Liserosis:

داء الليستيرية مرض تسببه عصيات الليستيرية وحيدة النواة وهو من أقل وأهم الأمراض المنقولة بالغذاء، ومازال هذا المرض يسبب القلق للأطباء لما يسببه من نسبة وفيات عالية والتي قد تصل إلى 20% (Mead *et al*., 1999).

تسبب عصيات الليستيرية أخماج عديدة للإنسان والحيوان محدثة نسبة وفيات عالية وخصوصاً في الأشخاص كبار السن والمرافقة لحالات مناعية مضطربة وضعيفة (Bennion *et al*., 2001; Suarez *et al*., 2008; Kruszyna *et al*., 2008).

أكثر أخماج داء الليستيرية تكون مكتسبة عن طريق الغذاء وهذا ما أكدته منظمة الصحة بأنه يصيب الاشخاص المتقدمين بالسن وحدثي الولادة بسبب تناول الاغذية الملوثة مسبباً لأمراض متعددة مثل التهاب السحايا، تجرثم الدم، التهاب الأمعاء والقولون (Radice *et al*., 2006; Mead *et al*., 2006; Graham *et al*., 2002; Winter *et al*., 2009).

2-2- خطورة داء الليستيرية Liserosis:

القلق الرئيسي من الإصابة بداء الليستيرية كون عصيات الليستيرية وحيدة النواة مقاومة وبشكل طبيعي للعديد من المضادات الحيوية المطبقة تجريبياً في علاج داء الليستيرية مثل الجيل الثالث والرابع للمضاد الحيوي سيفالوسبيرين. ولهذا تكون الإصابة بداء الليستيرية لكبار السن واتباع العلاج الخاطئ تنذر بسوء الإصابة حيث يكون التكهن السريري سيئ (Troxler *et al*., 2000; Vicente *et al*., 1990. Stepanovic *et al*., 2004).

تتواجد جراثيم الليستيرية في كل مكان وتعتبر من ملوثات المنتجات الغذائية وهي تتضمن ست أنواع ولكن فقط الليستيرية وحيدة النواة هي الممرضة والمسببة لداء الليستيرية عند الإنسان والحيوانات، وقد تزايد هذا المرض في السنوات العشرون الأخيرة نتيجة لتناول المواد الغذائية ومنتجاتها الملوثة وبالتالي اعتبر داء الليستيرية من أحد أهم الأمراض المنقولة بالغذاء (Farber & Peterkin, 1991).

عزلت جراثيم الليستـــرية من أماكن متعددة منها التربة ومن الماء والنباتات ومن البراز واللحم والمأكولات البحرية والخضـروات الفاسـدة ومن الحليب الفاسـد ومنتجاته كما عزلت من الإنســان والحيوانات الحاملة لجراثيم الليســترية وبدون ظهور أعراض ســريريه عليهم (Jones, 1986).

حتمية الوجود المطلق لجراثيم الليسترية وسهولة دخولها في بيئات تحضير الطعام وشركات تصـــنيع الأغذية ومقدرتها أيضـــاً على النمو والتكاثر بدرجة التبريد كلها عوامل تزيد من خطر تلوث الأغذية وبالتالي الإصـابة بأخماج الليسـترية والمتمثلة بأعراض سـريريه تشـير إلى التهاب الســحايا، التهاب الســحايا والدماغ، التســمم الدموي إجهاض قبل ميعاد الولادة ،الالتهاب المعوي المعدي إن السـمة المميزة لأنواع الليسـترية الممرضــة وهي قدرتها على خرق حواجز الخلايا الظهارية والطلائية للعائل المصـــاب متضـــمناً الدم والدماغ والحاجز المشــيمي للجنين، لأن الليســترية وحيدة النواة والليســترية ايفانوفي لهم القدرة على الغزو والتكاثر في الخلايا البالعة وغير البالعة (Vazquez- Boland *et al*., 2001).

ويفسر وجود جراثيم Listeria في الحليب الخام المستخدم في تصنيع الأجبان البيضاء إلى وجود الجراثيم التابعة لجنسListeria في عمليات تصـنيع الجبن بالإضـافة إلى عدم إتباع الطرائق الصـحيحة للقضـاء عليها خلال عمليات التصـنيع (FSIS, 2000)، أوعن طريق تلوث المواد الأولية المسـتخدمة في عمليات التصـنيع (OIE, 2000)، كما يحدث التلوث بعد عملية البسترة عند استخدام مواد التغليف (Hui *et al*., 1994).

نســبة حدوث داء الليســترية عادة ما تكون منخفضــة وبمعدل 2- 15 حالة لكل مليون في الســنة. إلا إن معدل الوفيات تكون عالية وقد تصــل إلى ما بين 20- 30 % وخاصــة في الأشخاص الذي يتطور داء الليسترية لديهم مثل المرأة الحامل والإنسان المضطرب المناعة، وهذا مما يجعل من جرثومة الليسـترية وحيدة النواة شـديدة الخطورة بالإنسـان Farber & Peterkin , 1991; Mead *et al*., 1999).

وتم الإبلاغ عن حالات إصـــابة بداء الليســـترية عند الإنســـان في جمهورية التشـــيك حيث تضـــاعف عدد الإصـــابات من 9 حالات في عام 1993 إلى 20 حالة وأكثر خلال الفترة الممتدة 2000 - 2002 (Epidat, 2003) بالمقارنة مع بقية الإصـــابات الأخرى وهذا المرض تحت المراقبة الدقيقة وذلك بســـبب خطورة هذه الجراثيم ومعدلات الوفيات مرتفعة تصل إلى 30% وأكثر لدى الأشخاص المهيئين للمرض وفقاً لتقرير منظمة الصحة العالمية (Cox, 1989).

الطريقة الأكثر شـــيوعا لانتقال العدوى هي اســـتهلاك الأطعمة الملوثة بجراثيم الليســـترية (Vasavada, 1988).

ومن الضـروري أن أحد المتطلبات الصحية للمواد الخام والأغذية ذات الأصل الحيواني هي عدم وجود مسـببات الأمراض للكائنات الحية الدقيقة ، بما في ذلك L. monocytogenes (CZ, 1999).

2-3- العامل المسبب:

الليســـترية هي جراثيم صـــغيرة عل هيئة عصـــيات مكورة ايجابية لغرام، ايجابية لاختبار الكاتالاز وســـلبية لاختبار الأوكســـيداز، متحركة – هوائية لاهوائية مخيرة – تنمو بدرجات حرارة ما بين 4- 45 م° ودرجة حموضـة ما بين pH (5.5- 9.6) ويعتبر نوع الليستريـة ايفـانوفي L. ivanovii والليســـتريـة اينكوا L. inouca من أقل الأنواع الممرضـــة للحيوانات، تتواجد وبشـكل موسـع في البيئة وفي النباتات أو الأعشـاب وفي مياه المجاري المتحركة يوجد ست أنواع من جنس الليستريـة وتعتبر الليستريـة وحيدة النواة من أهم وأكثر الأنواع الممرضة وتصيب العديد من الحيوانات والإنسان (Murry *et al*., 1926).

الليستريـة تتضمن ست أنواع مختلفة هي:

1 - الليستريـة وحيدة والنواة L. monocytogenes

2- الليستريـة ايفانوفي L. ivanovii

3- الليستريةسيلا جري L . seeligeri

4- الليستريةولشيميري L.welshimeri

5- الليستريةاينكوا L. innocua

6 - اللستريةكري L. grayi

ولكن تعد فقط الليســتريةوحيدة النواة، والليســتريةايفانوفي هما الممرضــات للإنســان والحيوانات حيث تسبب الليستريةوحيدة النواة أخماج متعددة للإنسـان والحيوانات في حين إن الليســتريةايفانوفي تكون مرفقة للأمراض التي تصـيب الحيوانات). وان داء الليســتريةعند الإنســان غالباً ما يكون من الأمراض المنقولة بالغذاء وبنســبة 99% نتيجة لتناول المنتجات الغذائية الملوثة (Mead *et al*., 1999).

الخواص الشكلية و التلوينية :

هي عصــيات إيجابية الغرام غير متبوغة ولا تظهر محفظة وتنتظم وحيدة أو في ثنائيات أو على شكل سلاسل قصيرة ،تنمو على البيئات الصلبة وبدرجة حرارة الغرفة تعطي عصيات خيطيـة متحركـة وتزداد حركتهـا في البيئـات السـائلـة بـدرجـة 25مئويـة، أمـا في المزارع الطازجة فتنتظم على شكل مكورات وتتوضع هذه العصيات داخل الخلية الحيوانية المصابة أو خارجها (الرفاعي والعمر،2007).

الخواص المزرعية :

هي جراثيم هوائيـة لاهوائيـة مخيرة تنمو على البيئـات العـاديـة ويزاد نموهـا على المنـابـت الغنية مثل المنابت المضاف إليها خلاصة الكبد أو المصل أو الدم.

على الآغار الدموي: تنمو عصـيات الليسـتريةخلال يوم أو يومين على شـكل مسـتعمرات صــغيرة قطر الواحدة (2) مم شــفافة لامعة بيضــاء تتحول رويداً رويداً إلى مســتعمرات محاطة بمنطقة تحلل دموي كامل ضيقة.

على بيئة أغار التيلوريت بالتربتوس: تنمو معطية مسـتعمرات ناعمة لونها أسـود وأطرافها خضراء (الرفاعي والعمر،2007).

الخواص الكيمياحيوية:

تعد هذه العصـــيات نشـــيطة بتفاعلاتها التخمرية فهي تخمر (ســـكر الجلوكوز، المالتوز واللاكتوز) دون إنطلاق غـازات ولا تخمر المـانيتول ولا تطلق الأنـدول ولا غـاز H2S، وتفكك الأســكولين بشــكل ســريع، ايجابية الكاتالاز وهي تفرز ذيفاناً محللاً للدم (الرفاعي والعمر،2007).

2-4- الأعراض التي تسببها جراثيم الليستيرية:

1- عند الإنسان:

الاصـابة عند الحوامل وحديثي الولادة تشـكل حوالي نصـف مجموع الإصـابات بالليسـترية وتحدث عادة بعد الأسبوع العشرين من الحمل، معظم الإصابات لا عرضية وسليمة الإنذار بالنسـبة للأم، قد تحدث بعض التظاهرات الهضـمية (إسـهال مائي، حرارة، آلام بطنية) أو التنفسية (شكل النزلة الوافدة)، ونادراً ما تصاب بإنتان دم أو التهاب سحايا.

وداء الليســـترية خلال مرحلة الحمل يمكن أن يكون عدوى داخل الرحم، ويتظاهر إما على شـكل بدء باكرearly onset يؤدي إلى إنتان داخل الرحم وموت الحمل قبل أو بعد الولادة، أو على شكل بدء متأخر late onset يسبب التهاب سحايا بين الولادة والأسبوع الثالث من الحياة، أما الإصـابة عند الكهول يمكن أن تتظاهر على شكل التهاب سـحايا ودماغ أو تجرثم دم خاصة عند مضعفي المناعة كخمج انتهازي (البني وزملاؤه، 2016).

2- عند الحيوان:

تصـيب هذه الجراثيم الجهاز العصـبي المركزي وكذلك تحدث تسـممات دموية في الحيوانات حديثة الولادة خاصـة، إضـافة إلى التهابات الرحم والاجهاض وعند الأغنام يحدث ما يسـمى بمرض الدوران.

2-5- انتشار داء الليستيرية Liserosis:

وفي دراسة أجريت في التشيك عن تلوث الأطعمة للكشف عن جراثيم الليستيرية عام 1998 حيـث أن هـذه الجراثيم الخطيرة تم العثور عليهـا في الأطعمـة ذات أصـــل حيواني

(1998,Karpiskova)، حيث تعتبر منتجات الألبان (الجبن) الملوثة بجراثيم الليستـــرية كمواد غذائية خطرة (Marth & Ryser, 1990).

على الرغم من ذلك حيث يعتبر داء الليســـتريـة من الأمراض المنقولـة بـالغذاء إذ يمكن أن تنتقل هذه الجراثيم عن طريق استهلاك اللحوم الملوثة ومنتجاتها (Jay,1996).

ولقد ارتبطت معظم حالات الإصـــابة بمرض Listeriosis في العالم بتناول الحليب الخام حيث تم تسجيل مجموعة من الاصابات في ألمانيا عام 1981 (شحاته، 1981)، وفي العام نفسه ظهرت في كندا 85 إصابة أدت إلى الوفاة (Gava & others, 1996).

في عام 2002 تم التأكد من وجود عزولتين نقيتين من جراثيم L. monocytogenes من عينات الحليب التي تم اختبارها والتي بلغ عددها111 عينة حليب بنســـبة (1.8٪) في الجمهورية التشيكية (Schlegelova *et al*., 2002).

في حين أظهر الباحثين (Jensen *et al*., 1996) نتيجة مماثلة خلال الفترة الممتدة بين 1972- 1994 حيث تبين وجود جراثيم L. monocytogenes بنسبة 1.2٪ من قطيعاً وفي بداية التسعينيات بلغت نسبة تلوث الأجبان الناعمة بجراثيم الليسترية 6% في السويد (Loncarvic *et al.,* 1995)، أما في نهاية التسعينيات أثبتت الدراسات بأن نسبة التلوث في الأجبان المصـنعة من حليب غير مبسـتر 4.8% في فرنسـا (Rudol & Scherer, 2001).

في حين أظهرت دراســـة أجراها (Marth & Ryser ,1990) للكشـــف عن جراثيم الليسترية وحيدة النواة L. monocytogenes في الحليب المبستر ومنتجات الألبان.

كما بلغت نســـبة تلوث الحليب البقري الخام بجراثيم تابعة لجنس Listeria في اســـبانيا عام1998 بنسبة 36 %في حليب الأبقار ، و بنسبة 2.6 %في حليب الماعز (Rodriguez *et al*., 2001).

مشـكلة أخرى هي حقيقة أن جراثيم الليسـترية تصـبح مقاومة إلى واحد أو أكثر من الأدوية المضادة للميكروبات تحت ضغط استخدام مضادات الميكروبات (Teuber , 1999).

وفي عام 1985 تم الإبلاغ للمرة الأولى في الولايات المتحدة الأمريكية عن حالات الإصابة بمرض Listeriosis وذلـك نتيجـة تنـاول الجبن الطري المكســيكي (Ryser & Marth,1991)، أما في سـويسـرا بلغت إجمالي حالات الإصـابة عام 1987المرتبطة بتناول الأجبان المنضجة بنسبة 50% (FDA , 2002)

وعلاوة على ذلك، تم إثبات انتقال المقاومة بين الأنواع البكتيرية الأخرى وهكذا الانتقال من L. monocytogenes إلى المكورات العنقودية المذهبة (Lemaitre *et al*., 1998).

وقد تم اعتبار القشدة مع المنتجات اللبنية من المواد الغذائية التي تساعد على انتشار مرض Listeriosis وخاصة في ألمانيا نتيجة تناول الأجبان غير المطبوخة (CDC, 2002).

وفي تقرير ذكره مجموعة من الأطباء والطب الوقائي في أحد مستشفيات ريو دي جينرو (البرازيل) ان معظم مرضى داء الليستريةهم من المسنون والذين يعانون من نقص واضطراب المناعة، وإن بعض المرضى تطورت الإصابة لديهم إلى مجرى الدم وكانت العترة المسببة للإصابة من النمط المصلي 1/2b، ومرضى آخرون كان عندهم التهاب البريتون والنمط المصلي المسبب 3b و1/2b كما أشاروا إلى أن مطبخ المشفى هو مصدر محتمل للعدوى (Martins *et al*., 2010).

كما ظهرت إصـابات في بريطانيا عام 1988وذلك بسـبب اسـتخدام الأجبان المصـنعة من حليب الماعز غير معامل حرارياً، وتم الربط مع 60 %من حالات الإصـابة المنتشـرة في فرنسا عام 1992نتيجة تناول الأجبان الطرية الناعمة مما أدى إلى منع النسـاء الحوامل من التغذية على الأجبان الناعمة في أوروبا (شحاتة ،1997).

ذكر مجموعـة من البـاحثين بـأنـه قد حـدث تفشـــي ل 40 حـالـة نتيجـة لتنـاول النقانق المقلية وسببت حدوث أربع وفيات. وفي عام 2001 سجل نفس الباحث 101 حالة لداء الليستريةأنفاً كما أشـار الباحث نفسـه عام 2002 تفشـي لداء الليسـترية في كارولاينا الشـمالية نتيجة لتناول جبنه طرية محضـرة بالطريقة المكسيكية من حليب خام ملوث أدى إلى حدوث خمس

ولادات لأجنة ميتة (ثلاثة منهم كانوا غير ناضجي التكوين، واثنان كانا مصابين بالمرض)، كون النمط المصلي المرتبط بهذه الإصابات المذكورة لداء الليستريه هو 4b (CDC, 1998).

كما تم عزل جراثيم الليستريه في الولايات المتحدة الأمريكية من المثلجات اللبنية والتي أدت إلى ظهور حالات عديدة من الأجنة الميتة نتيجة إصابتها بجراثيم الليستريه وحيدة النواة L. monocytogenes وذلك بسبب تناول الأمهات للمثلجات اللبنية خلال فترة الحمل، كما أثبتت دراسات عديدة في العالم منها عام 2000 والتي أثبتت عن وجود إصابات عديدة ناتجة عن تناول المثلجات اللبنية في مناطق مختلفة من أوروبا وأمريكا اللاتينية (Windrantz & Arias, 2000) ولكن جميع هذه الدراسات لم تنجح في إثبات المثلجات اللبنية مصدراً للتلوث (Ryser & Marth, 1991).

ولقد أثبتت الدراسات بأن جراثيم الليستريه وحيدة النواة جراثيم ممرضة للانسان وتعتبر من أهم الممرضات المنقولة بالغذاء. ولكن لم يذكر بأن الانسان أصيب بداء الليستريه (الليستريه وحيدة النواة) نتيجة تناول البيض أو منتجاته على الرغم من عزلها من براز وقناة البيض للدجاج ولكن بدون ان تظهر عليها أعراض المرض. ولكي يثبتوا وجود الليستريه وحيدة النواة في البيض ومنتجاته. جمعت 144 عينة ومن 30 مركز لتخزين البيض حيث وجود 25 عزولة لليستريا وحيدة النواة في البيض المأخوذ عشوائياً والمخزن على الدرجة 2 مْ لمدة يومين و 4 عزولات من البيض المعقم والمخزن على الدرجة 2م° لمدة يومين وكانت أكثر العزولات في الصيف والشتاء عنها في الخريف (Rivoal *et al*., 2010) .

وأجريت مجموعة من الدراسات للتأكد من وجود جراثيم الليستريه في منتجات الألبان في شبه الجزيرة الكورية خلال الفترة الممتدة 1993-1997 (Baek *et al*., 2000) حيث بلغت نسبة تلوث الحليب الخام 4,5% ولم تلاحظ في الحليب المبستر،أما في الولايات المتحدة الأمريكية خلال الفترة الممتدة 1998-2000 بلغت نسبة تلوث الحليب الخام الملوث بأحد الأنواع التابعة لجنس اللستريه بنسبة% 21.6 (Hassan *et al*., 2000).

2-6- وبائية داء الليستريةLiserosis:

جراثيم الليستـرية جراثيم واسـعة الانتشـار في الطبيعة ظهرت خلال العقد الماضـي كأحد الإمراض الهامـة المحمولـة بـالغذاء، وتعتبر المنتجـات الغذائيـة مثل منتجـات الألبان واللحم والخضـروات لها الدور الأكبر في انتشـار وتفشـي داء الليسـترية ولهذا كانت الحاجة توجب اتخاذ الإجراءات الصـحية اللازمة من أجل السـيطرة على الغذاء الملوث بجراثيم الليسـترية وحيدة النواة (Riedo *et al*., 1994; Van Renterghem *et al*., 1991 ; Hiroshi; *et al*., 1996; Rocourt & Cossart, 1997).

2-7- مصدر ومخزن الخمج بالنسبة للإنسان:

1- ينتشـر العامل المسـبب بشـكل واسـع في الحيوانات والإنسـان والبيئة، فقد عزلت هذه الجراثيم من مختلف أنواع الحيوانـات والطيور والتربة والنباتات والمراعي والمياه ومجاري المياه. حيث إن الأبقار والأغنام وكثير من أنواع الحيوانات المصـابة تنشـر العامل المسـبب عن طريق برازها ،كما عزل من أعداد كبيرة من الأصـحاء، كما عزل من النسـاء الحوامل بنسبة (20-30%) كما أنه يوجد فيي القناة التناسلية للنساء، وبذلك فإن الأم المصابة تعتبر مصدراً لخمج الجنين والطفل الوليد.

2- يعتبر الحليب الملوث ببراز الأبقار المصـابة مصـدراً للعدوى، إضـافة إلى الخضـروات التي تتلوث بهذا البراز، كما تعتبر لحوم الحيوانات الملوثة مصدراً للخمج.

3- تعتبر الحيوانات بكافة أنواعها والإنسـان المصـاب أو الحامل للمرض والبيئة (التربة) والنباتات والخضروات والأتربة مخزناً للخمج.

2-8- طرق انتقال المرض إلى الإنسان :

1 – عن طريق استنشاق الأتربة الملوثة.

2- عن طريق اسـتهلاك لحوم الحيوانات والطيور الملوثة إما نيئة أو غير مطبوخة بشـكل جيد واستهلاك الخضروات الملوثة التي تستهلك نيئة.

3- وعلى الأغلب تتلوث القناة التناسـلية للأم عن طريق برازها، بينما يصـاب الجنين عن طريق الدم والمشيمة.

4- قد ينتقل المرض بين المرأة وزوجها عن طريق الجماع، فقد تم عزل الجراثيم من السائل المنوي لرجل كانت إمراته مصـابة باالليسـترية في القناة التناسـلية مما يوحي بالاعتقاد بأن المرض قد ينتقل عن طريق الجنس.

5- قد يحصـل المرض بين المواليد الحديثة في قسـم الأطفال في المسـتشـفيات أو في غرف المواليد الحديثة.

6- قد تلعب بعض العوامل في ظهور المرض عند الإنسـان مثل الإجهاض أو الترافق مع مرض آخر أو المعـالجـة التي تؤدي إلى تخفيض المنـاعـة، ومن العوامـل المهيئـة الأخرى الهبوط في الجهاز المناعي الذي قد يحصـل لدى كبار السـن وأيضـاً التغيرات في الغدد الصماء خلال الحمل، والنقص في النظام المناعي عند المستوى المشيمي .

2-9- الإمراضية:

تدخل هذه الجراثيم الجسم عن طريق الجهاز الهضمي عند تناول طعام ملوث بها كالأجبان، اللحوم والنباتات. تملك الليسـترية بروتين سـطحي في جدارها الخلوي يدعى انترنالين Internalin يتفاعل مع مستقبل على الخلايا الظهارية هو E-cadherin محرضـاً عملية البلعمة إلى داخل الخلايا الظهارية. بعد عملية البلعمة يصـبح الجرثوم محاطاً داخل اليبلوع Phagosome حيت يحرض ال PH المنخفضـة الجرثوم على إنتـاج الليسـتيروليزين O Listeiolysin وهو الأنزيم الذي يحل غشـاء اليبلوع مما يسـمح للجرثوم بالهرب إلى هيولى الخلايـا الظهـاريـة، حيث يتكـاثر الجرثوم ويولـد بلمرة الأكتين الـذي يـدفع الخلايـا الجرثومية إلى الغشاء الخلوي محدثاً نتوءات فيه تدعى أرجل كاذبة خيطية Filopods.

هذه الأرجل الكـاذبـة تبتلعهـا الخلايـا الظهـارية المجاورة والبلاعم والخلايا الكبدية ثم تتحرر الليسترية وتبدأ دورة ثانية من جديد. بذلك تنتقل الليسترية من خلية لأخرى دون أن تتعرض للأضداد والمتممة وكثيرات النوى. المناعة ضد الليسترية هي مناعة خلوية بالدرجة الأولى حيث إن الإنتـان داخـل خلوي ويترافق بشـكل ملحوظ مع حـالات نقص المنـاعـة الخلويـة والإيدز AIDS واللمفوما ونقل الأعضاء (البني وزملاؤه، 2016).

المواد وطرائق العمل

Material and Methods

3- مواد وطرائق البحث:

3-1- مواد البحث:

3-1-1- العينات:

تم جمع 120 عينة (60 عينة من الحليب و60 عينة من الأجبان) من محافظة دير الزور مصدرها الأبقار والأغنام من نيسان وحتى أيلول 2021.

الجدول رقم (1): عدد ونوع العينات المدروسة

العينات	حليب		أجبان		المجموع
عدد العينات	أبقار	أغنام	أبقار	أغنام	
	30	30	30	30	
العدد الكلي	60		60		**120**

3-1-2- المواد المستخدمة في الزرع والعزل الجرثومي والاختبارات البيوكيمائية:

1- الأوساط المزرعية المستخدمة لعزل جراثيم الليستيرية:

منبت بالاكام – منبت اوكسفورد من انتاج شركة Hi Media حيث تعد هذه الأوساط خاصة لنمو جراثيم الليستيرية. تم تحضير هذه الأوساط وذلك حسب تعليمات الشركة المصنعة وبعد وتعقيمها في الموصدة و إضافة المعزز الخاص لكل وسط بعد تبريده للدرجة 50 م ، ومن ثم صب الأوساط في أطباق بتري معقمة وحفظت بالبراد لحين الاستخدام.

2- الأوساط والمواد المستخدمة في اختبار التحلل الدموي:

الأجار الدموي من انتاج شركة Hi Media – دم أغنام منزوع الفيبرين 5%.

وتم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة، وتم إضافة 5% دم أغنام منزوع الفيبرين وذلك بعد التعقيم والتبريد لدرجة حرارة 50 مْ، وبعدها تم صب الوسط الناتج في أطباق بتري معقمة، واستخدم هذا الوسط من أجل الكشف عن مقدرة الجرثوم على تحليل كريات الدم الحمراء.

3- الأوساط والمواد المستخدمة في الاختبارات البيوكيميائية:

- مرق منقوع القلب والدماغ من أجل اختبار الحركة من انتاج شـــركة Hi Media تم استخدام هذا الوسط من أجل اختبار حركة الجرثوم.

- السكاكر المستخدمة (لاكتوز – الجلوكوز – المالتوز)

- ماء ببتون - ماء أوكسجيني - بارافين- ماء مقطر

- كاشف أوكسداز – بيروكسيد الهيدروجين

كاشف أندريد، كاشف كوفالك، كاشف أحمر الميثيل، كاشف باريت

4- الأوساط والمواد المستخدمة في اختبار الحساسية:

مرق مغذي – وسط موللر هينتون – أقراص مضادات حيوية من أجل اختبار الحساسية من انتاج شركة Hi Media.

5- الأجهزة اللازمة للبحث:

حضانة كهربائية - براد ومجمدة - محم مائي - اوتوكلاف - مثفلة - رجاج - مجهر ضوئي

- أنابيب بلاستيكية سعة 10 مل ذات غطاء معقمة لجمع عينات الحليب والأجبان – كحول

- قطن - حافظة ثلجية - قطع ثلج.

2-3- طرائق البحث:

1-2-3- طريقة جمع العينات وتحضيرها للزرع الجرثومي:

تم جمع 120من العينات مل (5-10) 60 عينة من الحليب (30عينة حليب أبقار+ 30 عينة حليب أغنام) و60 عينة من الأجبان (30عينة جبن أبقار + 30 عينة جبن أغنام) خلال الفترة 1\4\2021-1\10\ 2021 .

تم جمع العينات بشكل عشوائي من أماكن مختلفة خاصة لبيع الحليب و منتجاته في محافظة دير الزور حيث تم أخذ 10 مل من خزان الحليب بعد مجانسته ووضعت في أنابيب بلاستيكية معقمة مغلقة سعة (20) مل و أخذ قطعة من الجبن بوزن 200 غ ووضعت في عبوة معقمة من أجل الكشف عن جراثيم الليستيرية ، إذ نقلت العينات تحت ظروف التبريد إلى مخبر الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري بجامعة حماة لإجراء التجارب المخبرية عليها.

أولاً: تحضير العينات قبل البدء بالزرع الجرثومي:

تم إكثار العينات على البارد وذلك بوضع العينات في البراد ولمدة 24-48 ساعة من أجل تثبيط الجراثيم المرافقة وبقاء جراثيم الليستريـة كونها جراثيم محبة للبرودة على عكس الجراثيم الأخرى.

ثانياً :الزرع الجرثومي لعينات الحليب لعزل جراثيم الليستريـة:

1- تم زراعة كل العينات كل واحدة على حدة على وسط بالاكام بعد إضافة المعزز الخاص وحضنت على الدرجة 32 مْ لمدة 24-48 ساعة، كل المستعمرات سوداء اللون على أطباق البتري لوسط بالاكام تم نقلها بغرض العزل.

2- نقلت المستعمرات التي نمت على وسط بالاكام إلى وسط أكسفورد بعد إضافة المعزز الخاص له وحضنت على الدرجة 32 مْ ولمدة 24-48 ساعة.

ثالثاً : تنقية جراثيم الليستريـة:

تم اختبار مستعمرات نموذجية معزولة ومفردة والتي نمت على وسط أكسفورد ونقلت أيضاً إلى وسط أكسفورد مرة أخرة وذلك من أجل تنقية جراثيم الليستريـة.

بالنسبة لعينات الأجبان زرعت في المرق المغذي بعد استحلابها بطريقة الستوماخ ومن ثم تم اتباع الخطوات السابقة بالزرع على منبت بالاكام ووسط أكسفورد والتي تم شرحها سابقاً في زراعة عينات الحليب بغرض عزل وتنقية هذه المستعمرات.

ومن المستعمرات النموذجية والخاصة بمواصفات مستعمرات الليستريـة أجريت عليها الاختبارات الكيمياحيوية واختبار الحركة.

دراسة الخواص الشكلية:

تم دراسة الخواص الشكلية والتلوينية للجراثيم النامية وذلك بتحضير لطاخة جرثومية من المستعمرات النامية على منبت أكسفورد وتم صبغها بطريقة غرام حيث تظهر جراثيم الليستريـة على شكل عصيات مكورة بنفسجية اللون.

- اختبار التحلل الدموي Hemolysin Test:

تم أخذ مستعمرة نموذجية من الأوساط المزرعية الاختيارية وزرعت على وسط الأغار الدموي المحضر مسبقاً وتم التحضين على الدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة وتم دراسة خواص النمو وشكل المستعمرات حيث تكون جراثيم الليستيرية محلله للدم تحلل كامل

- اختبار الحركة Motility TEST:

تم أخذ مستعمرات قياسية من سطح الأوساط المزرعية الانتقائية ثم زراعتها على وسط مرق نقيع القلب والدماغ وتم تحضينها على الدرجة (22-25)م لمدة (2-4) ساعات ثم نقل قطرة إلى الشريحة زجاجية خاصة تحتوي في وسطها على تقعر (اختبار القطرة المعلقة) وبعدها تفحص الحركة بملاحظة الحركة المتقلبة لليستيرية المستوحدة.

- اختبارالكاتلاز Catalase Test:

تم إضافة قطرات من محلول بيروكسيد الهيدروجين على شريحة زجاجية تحتوي على مستعمرات طازجة مأخوذة من منبت أوكسفورد أخذت بواسطة لوب الزرع وظهور فقاعات غازية هذا يدل على نتيجة موجبة للكاتالاز.

- اختبار أوكسيداز Oxidase Test :

تم وضع قطرة (2-3) من محلول كاشف الأوكسيداز على ورقة ترشيح معقمة موضوعة داخل طبق بتري معقم ثم أخذ مستعمرات من النمو الجرثومي بواسطة قضيب زجاجي ومررت على ورقة الترشيح المبللة بالكاشف وظهور اللون الأرجواني الغامق خلال (5-10) ثانية تكون نتيجة ايجابية للأوكسيداز.

- طريقة تحضير وسط كلارك- لويس لإجراء الاختبارات(MR ، VP):

نحضر(7 غ) ببتون، (5غ) غلوكوز، (5 غ) ثنائي فوسفات البوتاسيوم، ليتر ماء مقطر. تحل هذه الكميات في الماء المقطر ثم تعبأ في أنابيب (4 مل /أنبوب)ثم تعقم بالموصدة مدة 15 دقيقة على الدرجة 121 م وضغط 1.5 بار.

- اختبار أحمر الميثيل Methyl Red Test:

نأخذ بواسطة لوب الزرع مستعمرات من وسط أوكسفورد وتزرع في 5 مل من وسط كلارك - لويس على الدرجة 30 مْ لمدة 24-48 ساعة، وبعدها تضاف عدة قطرات من مشعر أحمر الميثيل في الحالة الإيجابية تلون البيئة باللون الأحمر وهذا يعد دليلاً على أن الوسط أصبح حمضياً نتيجة لتفكك وتخمر الغلوكوز، اما في الحالة السلبية: بقاء الوسط قلوياً وبلون أصفر.

- اختبار فوكس بروسكاور Voges-proskauer TEST:

حيث يتم استخدام وسط كلارك- لويس، حيث يزرع الجرثوم في 2-3 مل من هذا الوسط على الدرجة 37 مْ لمدة 48 ساعة ثم يضاف له مشعر باريت والذي يتألف من:

1- محلول ألفا نفتول (6%) في الكحول الإيتلي المطلق.

2- محلول ماءات البوتاسيوم بتركيز(40%) .

ثم يضـــاف إلى كل 3 مل من البيئة 1مل من المحلول الأول،و4 مل من المحلول الثاني ثم يحرك الأنبوب الحاوي على البيئة جيداً ،ويترك لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة في الحالة الإيجابية تلون الوسط باللون الأحمر الأيوزيني والذي يظهر بعد مرور ما يقارب 5-10 دقائق.

- اختبار كامب CAMP Test:

يعـد هـذا الاختبـار مـن الاختبـارات التأكيديـة التـي تكشـف عـن وجود جراثيم الليستيرية وهـو يعتمـد علـى إظهـار خاصـية التحلـل الـدموي ونـوع هـذا التحلل.

طريقـة العمـل: يؤخـذ طبـق آجـار مـدمى بـدم الأغنام وتـزرع علـى امتـداد قطـر الطبـق (في منتصف الطبق) مستعمرات من المكورات العنقودية الذهبية المحللة للدم تحليلاً ً غيـر كامـل، تـزرع جراثيم المراد اختبارها من أعلى وأسفل خط نمو جراثيم العنقودية الذهبية، تحضـن بدرجـة37 مْ لمدة 24ساعة

ففـي الحالـة الإيجابيـة ظهور خط نمو جراثيم الليستيرية من أعلى وأسفل خط نمو جراثيم العنقودية الذهبية.

- اختبار الأندول Indol Test:

تم زرع الجرثوم في مرق ماء الببتون عند الدرجة37 مْ لمدة 24-48 ساعة وبعدها أضيف 0.5 مل من كاشف كوفاك ففي النتيجة السلبية لم تتشكل حلقة حمراء ظهور حلقة صفراء بلون الكاشف على السطح.

- اختبار تخمرالسكريات: Carbohydrate Fermentation Test

طريقة تحضير وسط تخمر السكريات:

يتكون وسط تخمر السكريات من ببتون 10غ نكاشف أندريد 2،0% مل، ماء مقطر 1000 مل ويعقم الوسط في الأتوكلاف في درجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة.

طريقة تحضير محلول السكريات 10%:

يتكون وسط محلول السكريات تركيز 10% من السكريات 10 غ، ماء مقطر 90 مل وبعد تمام الذوبان تعقم بالفلترة والسكريات المستخدمة في التفاعل (اللاكتوز- الجلوكوز- المالتوز)

ويضاف محلول السكريات 10% بحجم مل = 1000ميكروليتر بوسط تخمر السكريات بحجم (9مل) بحيث يصبح تركيز الوسط النهائي (1%) ويتم توزيع المزيج في أنابيب معقمة بحيث يحتوي كل أنبوب 2،5 مل.

طريقة العمل:

يزرع من المنابت الجرثومية حتى أعمق نقطة في الانبوب الحاوي على وسط تخمر السكريات(1%) ،ثم تحضن الأنابيب على الدرجة 32مْ لمدة 24- ساعة حيث تكون النتيجة ايجابية إذا تغير لون الأنبوب بحيث يصبح بلون زهري أو زهري خفيف وتكون النتيجة سلبية إذا لم يتغير لون الوسط.

وجراثيم الليستيرية ايجابية للسكاكر (اللاكتوز- الجلوكوز- المالتوز).

- اختبار حساسية العزولات للمضادات الحيوية:

اجري اختبار الحساسية للعزولات التي تم الحصول عليها اتجاه7 أنواع من المضادات الحيوية وهي: لينكومايسين، أموكسلين، سولفاسوميدين، ستربتومايسين، كلوكساسلين،

سبيكينومايسين، كولستين على وسط آغار مولر هينتون وتم اختيار هذه المضادات الحيوية من بين المضادات الأكثر استخداماً والمتوفرة تجارياً.

تم إجراء الاختبار بزرع 1-3 مستعمرة جرثومية حديثة النمو في محلول ملحي معقم ومزجها حتى التجانس بغية الحصول على معلق جرثومي متجانس ذو عكاره توافق 0.5 على مقياس ماك-فرلاند Mcfarland. تم زرع 100 µL من المعلق الجرثومي على سطح وسط اغار مولر هينتون بطريقة الإكثار باستخدام ماسحة قطنية، ترك الطبق المزروع لمدة 10 دقائق ليجف ثم وزعت أقراص المضادات الحيوية على سطح الطبق باستخدام ملقط معقم وبجانب اللهب، حضنت الأطباق على الدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة، تم قراءة النتيجة من خلال قياس قطر مناطق منع النمو للجراثيم حول أقراص المضادات الحيوية ومقارنتها بالجداول القياسية حسب توصيات الشركة المصنعة.

قسمت نتيجة تحسس العزولات للمضادات الحيوية الى ثلاث فئات وهي:

إما حساسة Sensitive (S)

أو متوسط الحساسية Intermediate (I)

أو مقاومة Resistance (R).

النتائج

Results

4- النتائج:

أظهرت نتائج الزرع والعزل الجرثومي للعينات المدروسة ومن خلال دراسة الخواص الشكلية والتلوينية وبعد إجراء الاختبارات الكيمياحيوية عن التوصل إلى تحديد هوية 10 عزولات من جراثيم الليستيرية (4) عزولات من الحليب (3عزولات من جراثيم الليستيرية من حليب الأبقار و عزولة واحدة من حليب الأغنام) وبنسبة 10% ، 3.33 % على التوالي كما في الجدول رقم (2).

أما بالنسبة للأجبان فقد تم التوصل إلى تحديد هوية 6 عزولات من جراثيم الليستيرية (4 عزولات من جبن الأغنام، 2 عزولة من جبن الأبقار) وبنسبة 13.33% ،6.66% على التوالي كما في الجداول (2).

الجدول رقم (2): نسبة عزل الليستيرية من عينات الحليب والأجبان.

العينات	حليب		أجبان	
	أبقار	أغنام	أبقار	أغنام
عدد العينات الإيجابية	3	1	2	4
عدد العينات السلبية	27	29	28	26
العدد الكلي	30	30	30	30
نسبة العزل	10 %	3.33%	6.66%	13.33%

- تحديد هوية عزولات الليستيرية:

أظهرت كل العزولات نفس شكل المستعمرات المميزة لجراثيم الليستيرية على منبت بالاكام وأوكسفورد وعند دراسة خواصها الشكلية والتلوينية كانت على شكل عصيات مكورات بنفسجية اللون ايجابية الغرام كما هو مبين في الصور (1-4).

الصورة رقم (1): نمو جراثيم الليستيرية على منبت بالاكام

الصورة رقم (2): نمو جراثيم الليستيرية على منبت أوكسفورد

الصورة رقم (3): جراثيم الليستيرية بعد عملية التنقية على منبت أوكسفورد

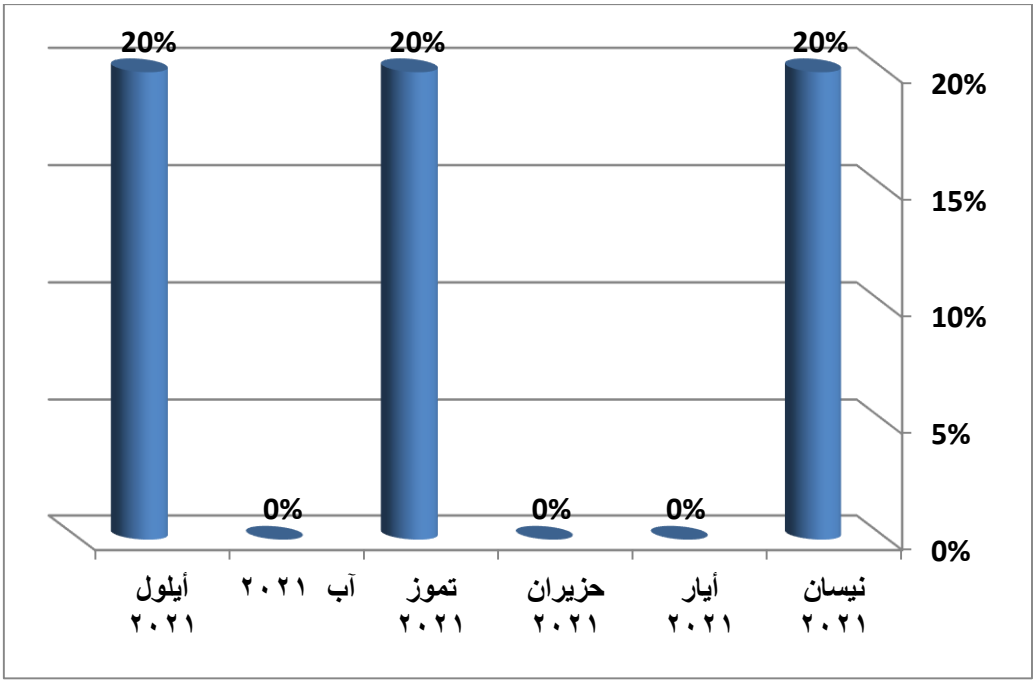
الصورة رقم (4): تخمير السكاكر لجراثيم الليستيرية

وقد كانت كافة العزولات إيجابية للكاتلاز وسلبية للأوكسيداز ومحللة للدم ومتحركة ونشطة على الدرجة 25 -28مْ. وهذا موضــح في الجداول (3، 4، 5، 6 و 7) والمخططات (1، 2، 3 و 4)

الجدول رقم (3): نتائج عزل جراثيم الليستيرية في حليب الأبقار حسب أشهر الدراسة.

أشهر الدراسة	عدد العينات	العينات الإيجابية	العينات السالبة	نسبة التلوث%
نيسان 2021	5	1	4	20^{a}
أيار 2021	5	0	5	0^{b}
حزيران 2021	5	0	5	0^{b}
تموز 2021	5	1	4	20^{a}
أب 2021	5	0	5	0^{b}
أيلول 2021	5	1	4	20^{a}
المجموع	30	3	27	10

تدل الأحرف a ، b ، c على وجود فروقات معنوية في حال اختلافها ضـــمن نفس العمود وذلك عند المقارنة بين نســـب التلوث المئوية باســـتخدام اختبار كاي مربع Chi Square Test في البرنامج الإحصائي SPSS 20 حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند $P<0.05$.

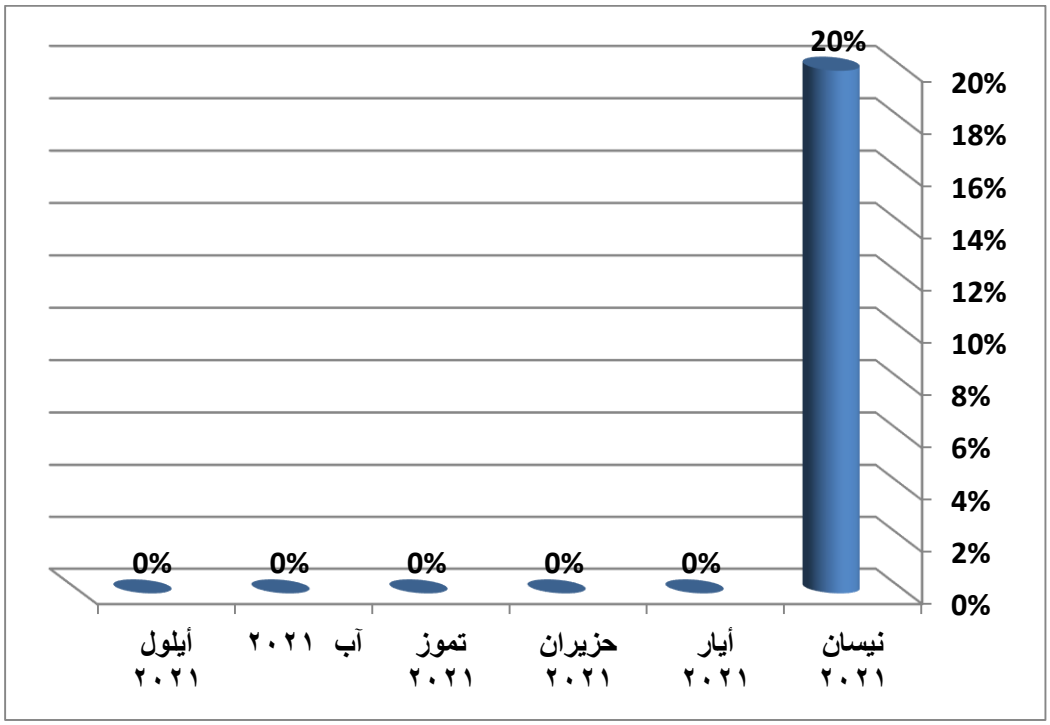


المخطط رقم (1): نتائج عزل جراثيم الليستيرية في حليب الأبقار حسب أشهر الدراسة.

الجدول رقم (4): نتائج عزل جراثيم الليستيرية في حليب الأغنام حسب أشهر الدراسة.

أشهر الدراسة	عدد العينات	العينات الإيجابية	العينات السالبة	نسبة التلوث%
نيسان 2021	5	1	4	20^{a}
أيار 2021	5	0	5	0^{b}
حزيران 2021	5	0	5	0^{b}
تموز 2021	5	0	5	0^{b}
أب 2021	5	0	5	0^{b}
أيلول 2021	5	0	5	0^{b}
المجموع	30	1	29	3.33

تدل الأحرف a ، b ، c على وجود فروقات معنوية في حال اختلافها ضـــمن نفس العمود وذلك عند المقارنة بين نســـب التلوث المئوية باســـتخدام اختبار كاي مربع Chi Square Test في البرنامج الإحصائي SPSS 20 حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند P<0.05

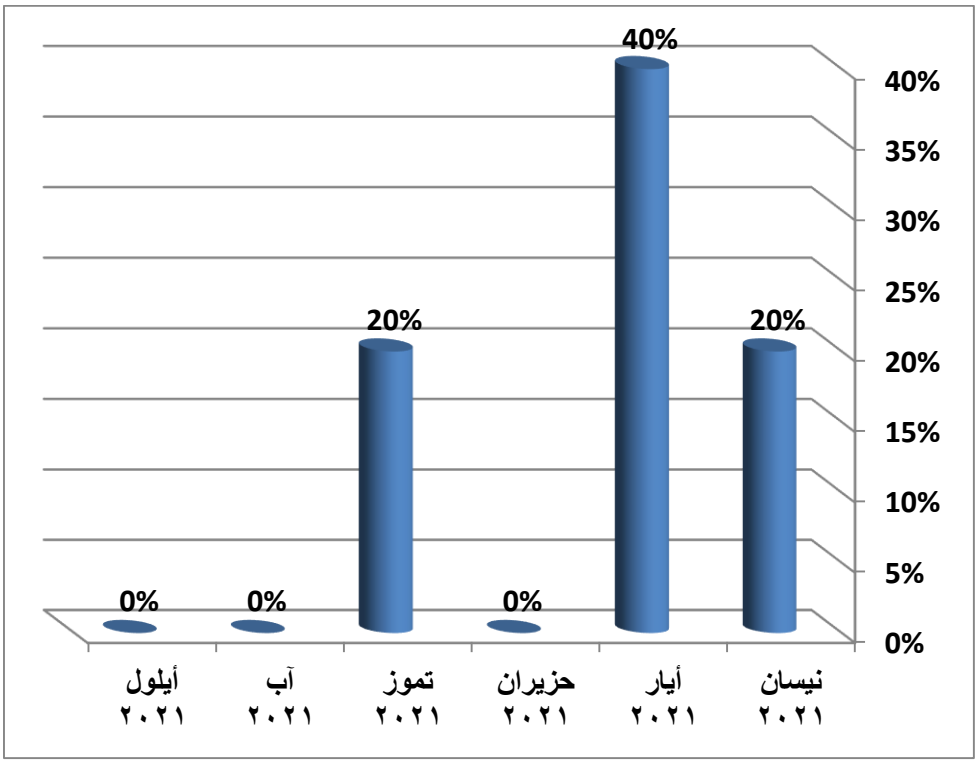


المخطط رقم (2): نتائج عزل جراثيم الليستيرية في حليب الأغنام حسب أشهر الدراسة.

الجدول رقم (5): نتائج عزل جراثيم الليستيرية في أجبان الأغنام حسب أشهر الدراسة.

أشهر الدراسة	عدد العينات	العينات الإيجابية	العينات السالبة	نسبة التلوث%
نيسان 2021	5	1	4	20^{a}
أيار 2021	5	2	3	40^{b}
حزيران 2021	5	0	5	0^{c}
تموز 2021	5	1	4	20^{a}
أب 2021	5	0	5	0^{c}
أيلول 2021	5	0	5	0^{c}
المجموع	30	4	26	13.33

تدل الأحرف a ، b ، c على وجود فروقات معنوية في حال اختلافها ضـــمن نفس العمود وذلك عند المقارنة بين نســـب التلوث المئوية باســـتخدام اختبار كاي مربع Chi Square Test في البرنامج الإحصائي SPSS 20 حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند P<0.05

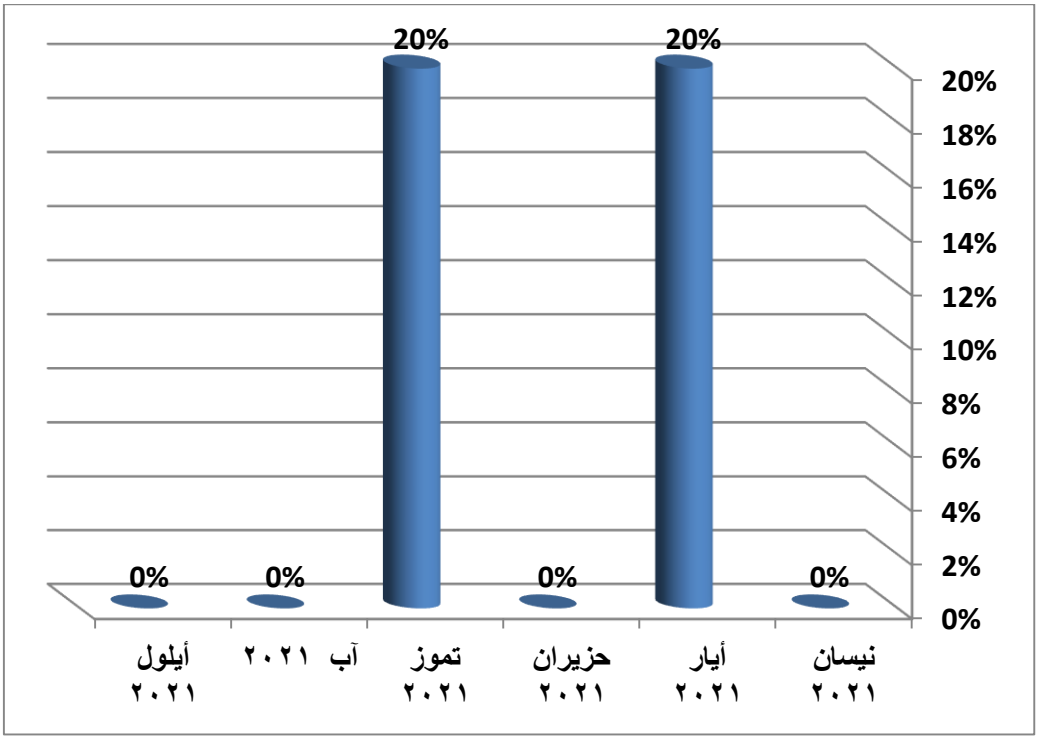


المخطط رقم (3): نتائج عزل جراثيم الليستيرية في أجبان الأغنام حسب أشهر الدراسة.

الجدول رقم (6): نتائج عزل جراثيم الليستيرية في أجبان الأبقار حسب أشهر الدراسة.

أشهر الدراسة	عدد العينات	العينات الإيجابية	العينات السالبة	نسبة التلوث%
نيسان 2021	5	0	5	0^a
أيار 2021	5	1	4	20^b
حزيران 2021	5	0	5	0^a
تموز 2021	5	1	4	20^b
أب 2021	5	0	5	0^a
أيلول 2021	5	0	5	0^a
المجموع	30	2	28	6.66

تدل الأحرف a ، b ، c على وجود فروقات معنوية في حال اختلافها ضـــمن نفس العمود وذلك عند المقارنة بين نســـب التلوث المئوية باســـتخدام اختبار كاي مربع Chi Square Test في البرنامج الإحصائي SPSS 20 حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند P<0.05.



المخطط رقم (4) : نتائج عزل جراثيم الليستيرية في أجبان الأبقار حسب أشهر الدراسة.

الجدول رقم (7): نتائج الاختبارات البيوكيميائية المطبقة على عزولات جراثيم الليستيرية.

العزولات	عدد العزولات	الحركة	تحلل الدم	كاتلاز	أوكسيداز	تخمير السكاكر			MR	VP	كامب	الأندول
						م	غ	لا				
عزولات حليب الأبقار	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	+	_
	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	_	_
	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	_	_
عزولات حليب الأغنام	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	+	_
عزولات جبن الأبقار	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	_	_
	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	_	_
عزولات جبن الأغنام	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	+	_
	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	+	_
	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	_	_
	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	+	_
	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	+	_
	1	+	+	+	_	+	+	+	+	+	_	_

حيث: م: مالتوز، غ: غلوكوز، لا: لاكتوز

MR : أحمر الميثيل ، VP: فوكس بروسكاور

نتيجة اختبار الحساسية للمضادات الحيوية:

لقد أعطت جميع العزولات (10 عزولات) التي تم تحديد هويتها حساسية متوسطة للمضاد الحيوي (البنسلين) وبنسبة 50 %، في حين أظهرت نتائج هذه الدراسة أن كل عزولات جراثيم الليستيرية التي تم الكشف عنها كانت مقاومة بنسبة 100% للمضادات الحيوية التي تم استخدامها في هذه الدراسة (لينكومايسين، أموكسلين، سولفاسوميدين، ستربتومايسين، كلوكساسلين، سبيكينومايسين، كولستين) كما هو موضح في الجدول (8).

الجدول رقم (8): نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على عزولات جراثيم الليستيرية.

المضادات الحيوية	الحساسية	المقاومة
لينكومايسين	-	100%
بنسلين	50%	-
أموكسلين	-	100%
سولفاسوميدين	-	100%
ستربتومايسين	-	100%
كلوكساسلين	-	100%
سبيكينومايسين	-	100%
كولستين	-	100%

المناقشة

DISCUSSION

5- المناقشة:

إن الغاية من هذه الدراسة هو عزل وتحديد هوية جراثيم الليسترية من الحليب والأجبان في محافظة دير الزور، حيث تعد جراثيم الليسترية من الجراثيم الخطيرة لما تسببه من أمراض خطيرة للإنسان والحيوان .

لقد تم استخدام Oxford Listeria Selective Agar لاحتواء هذا الوسط على مواد تثبط نمو الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة غرام الأخرى لاحتواه على Lithiumchloride التي تكبح نمو العديد من الجراثيم الموجبة الأخرى وكذلك لاحتواه على Criflavine الذي يثبط نمو الجراثيم الموجبة و Cefotetan و Fosfomycin الذي يثبط نمو المكورات العقدية والعنقودية والعائلة المعوية.

وقد تم الحصول على (10) عزولات من جراثيم الليسترية حيث ظهرت المستعمرات سوداء اللون وعند القيام بإجراء صباغة العزولات الجرثومية باستخدام صبغة غرام Gram Stain وفحصها بالمجهر الضوئي على العدسة الزيتية حيث ظهرت الجراثيم موجبة لصبغة غرام على شكل عصيات صغيرة وكبيرة تشبه الأحرف الصينية مع أشكال كروية وعصوية كروية وتترتب بشكل ميز بهيئة الأحرف Y,V وذلك بسبب وجود البروتين السطحي Act-A حيث يعمل على الالتصاق بالخلية الثانية من جهة القطب المحتوي على البروتينAct-A بسبب التجاذب المغناطيسي أو قد يعود إلى اختلاف الشحنات الكهربائية في الخلايا الجنسية الذكرية والأنثوية والتي تكون متعاكسة في ترتيب شحناتها السطحية وبالتالي تنجذب النهايات إلى بعضها البعض.

أما بالنسبة إلى نتائج الزرع على وسط الأجار الدموي حيث تبين أنها محللة للدم ولها القدرة على إنتاج مناطق تحلل دموي من نوع β وذلك ناتج عن تأثير عامل تحلل الدم الموجود في جراثيم الليستريةListerolysin O،وأظهرت جميع عزولات جراثيم الليسترية نتيجة موجبة لاختبار الكاتلاز وسلبية لاختبار الأوكسيداز.

وكانت نسبة عزل جراثيم الليسترية في بحثنا هذا من حليب الأبقار كما هو موضح في الجدول (2) والتي بلغت (10%) تعد هذه النسبة أكثر مما توصلوا إليه (1996 , Jensen) الذي سجل بنسبة (1.2 %).

أما بالنسبة لنتيجة عزل جراثيم الليستيرية في حليب الأغنام في هذه الدراسة بلغت بنسبة (3.33%) وهذه النتيجة أقل من النتائج التي توصلوا إليها (Muraoka *et al.*,2003) حيث سجلوا بنسبة (4.9%) في حليب الأغنام بينما كانت نتيجة بحثنا متقاربة إلى ما توصلوا إليه (Gaya *et al*., 1998) والتي بلغت (3.62%).

وبالنسبة لنتيجة عزل جراثيم الليستيرية في الأجبان تم الحصول على 6 عزولات من الأجبان (4 عزولات من الجبن الأغنام، 2 عزولة من الجبن الأبقار) وبنسبة 13.33%، 6.66% على التوالي وهي أكثر مما توصلوا إليه (Rudol and Scherer, 2001) الذين سجلوا نسبة بلغت 4.8%.

أما بالنسبة لاختبار الحساسية للمضادات الحيوية أعطت جميع العزولات من جراثيم الليستيرية حساسية للصاد الحيوي (البنسيلين). ومن جهة أخرى كانت جميع العزولات مقاومة بنسبة 100% للمضادات الحيوية:

(لينكومايسين، أموكسلين، سولفاسوميدين، ستربتومايسين، كلوكساسلين، سبيكينومايسين، كولستين).

ولقد أكد الباحث (EL-Sherbini *et al.*,1998) بأن المضادات الحيوية تثبط جراثيم الليستيرية مثل المضاد الحيوي الأمبسلين، والأريثرومايسين، والسلفاميثوكسازول).

وأن جراثيم الليستيرية حساسة لكل من (البنسلين، والكلورامفينكول، والترايمثبريم، والأريثرومايسين، والجنتامايسين، والريفامبسين، والتتراسكلين) ومقاومة للسيفالوسبورينات.

الاستنتاجات والتوصيات

CONCLUSIONS

&

RECOMMENDATION

6- الاستنتاجات والتوصيات:

6-1- الاستنتاجات :

خلصت هذه الدراسة إلى ما يلي:

1- الكشف عن وجود جراثيم الليستيرية و تحديد هويتها في عينات الحليب والأجبان في محافظة دير الزور.

2- إن كل العزولات التي تم التوصل إليها من عينات الحليب والأجبان المأخوذة من محلات البيع في محافظة دير الزور كانت مقاومة للمضادات الحيوية مما يشكل صعوبة في القضاء على هذه الجراثيم عند الحيوانات المصابة حيث أن هذه الجراثيم تطرح عن طريق الحليب ولها القدرة على الانتقال عن طريق الغذاء.

3- إن هذه الجراثيم متحركة ولها القدرة على العيش في الأوساط الغذائية ويمكنها الانتقال عن طريق تلوث الأيادي العاملة أو الأدوات أو الجو المحيط إلى الألبان والأجبان.

6-2-التوصيات:

1- تطبيق الشروط الصحية للأغذية لمنع انتشار الأمراض والحد من وقوع حالات تسمم غذائي أو التهاب سحايا عند الأطفال أو حدوث حالات إجهاض عند النساء الحوامل.

2- غليّ الحليب والأجبان جيداً وذلك لضمان قتل المحتوى الجرثومي وخاصة تلك التي تسبب الأمراض والتسمم الغذائي.

3- تطبيق الشروط التربية الصحيحة في مزارع الأبقار والأغنام لمنع حدوث انتشار العدوى بجراثيم الليستيرية في المزارع.

4- مراقبة دورية للأسواق المحلية خاصة محلات الحليب الألبان والأجبان وإجراء فحص عينات بشكل دوري للتأكد من سلامة هذه المنتجات وخلوها من الجراثيم وخاصة جراثيم الليستيرية.

5- إجراء المزيد من الأبحاث بهدف معرفة المضادات الحيوية الفعالة في علاج الإصابة بالليستيرية ودراسة قدرة هذه الجراثيم على تطوير مقاومة اتجاه المضادات الحيوي.

الملخص

ABSTRACT

7-1- الملخص العربي:

هدفت هذه الدراسة إلى عزل جراثيم الليستـرية من الحليب والأجبان في محافظة دير الزور حيث تم جمع 120 عينة 60 عينة من الحليب (30 عينة من الأبقار، 30 عينة من الأغنام) و60 عينة من الأجبان (30 عينة من الأبقار، 30 عينة من الأغنام) بشكل عشوائي من أماكن مختلفة مخصصة لبيع الحليب والجبن في محافظة دير الزور، خضعت هه العينات لإجراءات الزرع الجرثومي بغرض عزل وتحديد هوية جراثيم الليستـرية،

أظهرت نتائج الزرع والعزل الجرثومي والاختبارات الكيمياحيوية عن تحديد هوية 10 عزولات من جراثيم الليستـرية، 4 عزولات من الحليب (3عزولات من حليب الأبقار، 1عزولة من حليب الأغنام) وبنسبة 10% و 3.33 % على التوالي.

و 6 عزولات من الأجبان (4 عزولات من أجبان الأغنام و2 عزولة من أجبان الأبقار) وبنسبة 13.33% و 6.66% على التوالي.

كما أعطت هذه العزولات حساسية متوسطة للمضاد الحيوي البنسلين وكانت مقاومة لكل من اللينكومايسين، الأموكسلين، السولفاسوميدين، الستربتومايسن، السبيكينومايسن، الكولستين.

إن الكشف عن جراثيم الليستـرية في الحليب والأجبان يشكل خطر على الصحة العامة ويتطلب المزيد من البحث في هذا المجال

الكلمات المفتاحية: الليستـرية، الحليب، الجبن، الأغنام، الأبقار.

7-2- Abstract

This study aimed to isolate Listeria bacteria from milk and cheese in Deir ez-Zor Governorate, where 120 samples were collected, 60 samples from milk (30 samples from cows, 30 samples from sheep) and 60 samples from cheese (30 samples from cows, 30 samples from sheep). Randomly from different places designated for selling milk and cheese in Deir ez-Zor Governorate, these samples were subjected to bacterial culture procedures for the purpose of isolating and identifying Listeria bacteria.

The results of culture, bacterial isolation, and biochemical tests showed the identification of 10 isolates of Listeria bacteria, 4 isolates from milk (3 isolates from cow's milk, 1 isolate from sheep's milk), with a percentage of 10% and 3.33%, respectively.

And 6 isolates from cheese (4 isolates from sheep cheeses and 2 isolates from cow cheeses), with a percentage of 13.33% and 6.66%, respectively.

These isolates also gave medium sensitivity to the antibiotic penicillin and were resistant to Lincomycin, Cloxacillin ,Amoxicillin,Sulfasomidne, Streptomycin, Specinomycin, Cholastin.

Detection of Listeria bacteria in milk and cheese poses a threat to public health and requires further research in this area .

Key words: Listeria; Milk ; Cheeses ;Cheep ; Cow:

المراجع

REFERENCES

8-المراجع العربية والأجنبية:

8-1-المراجع العربية:

1. الرفاعي والعمر(2007): علم الأحياء الدقيقة الخاصة ،منشورات جامعة البعث.
2. البني وزملاؤه، (2016): الجراثيم والفيروسات الطبية منشورات جامعة دمشق.
3. شحاتة، عبده (1997): الأمراض الناتجة عن الغذاء المكتبة الأكاديمية – القاهرة (127- 132).

8-2- المراجع الأجنبية:

1-Anonymous.(2008): Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 8,evision3,2006; US Department of Agriculture; Accessed:1Janury 2008. Vailableat : http://www.fsis.usda.gov/Science/ Microbiological_Lab_Guidebook

2-Baek,S.Y;Lin,S.y.;Lee,D.;Min,K.H.;Kin, C.(2000): "Incidence and Characterization of Listeria monocytogenes from domestic and importedfoods in Korea" J. Food Prot. 63(2):186-189.

3-Bell,C.and Kyriakides ,A .(2005): Listeria, APractical Approachto the Organism and its Control in Foods, 2nd Ed. Blackwell Pub., London

4-Bennion, JR.;Sorvillo,F;Wise, ME; Krishna, S. and Mascola, L. (**2008):** Decreasing listeriosis mortality in the United States, 1990-2005. Clin Infect Dis;47:867-74.

5-Bhunia, A.K. (1997): Antibodies to Listeria monocytogenes. Crit.Rev. Microbiol. 23, 77–107.

6-Bubert,A.;Hein,I.;Rauch,M.;Lehner,A.;Yoon,B.;Goebel, W.andWagner, M. (1999): Detection and identification of Listeria spp.by a single reaction based on multiplex PCR. Appl. Environ.Microbiol. 65, 4688– 4692.

7-Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2001): "Epidemiologic Notes and Reports Update Listeriosis and Pasteurizedmilk"www.cdc.gov /mmwr/preview /mmwr .html

8-Center for Disease Control and Prevention(CDC). (2002): Multistate outbreak of Listeriosis. MMWR 49 (50),1129– 1130

9-Center for Disease Control CDC, (2006). Preliminary Food Net data on the incidence of infection with pathogen stransmitted commonly throughfood10 states, 2006. 56:336-9.

10-Chasseignaux,E.;Toquin,MT.;Ragimbeau,C.;Salvat,G.; Colin ,P.and Ermel ,G.(2001): Molecular epidemiology of Listeria monocytogenesisolates collected from the environment , raw meat and raw products in two poultryand pork-processing plants. J Appl Microbiol;91: -99.

11-Cossart,P.;Pizarro-Cerda, J.andLecuit,M.(2003): Invasion of mammalian cells by Listeria monocytogenes functionalimicry tosubvert cellular functions. Trends Cell Biol. 13, 23–31.

12-Cowan and Steels. (1974): Manual for the identification of medical bacteria. Second edition revised by S.T.Cowan, Cambridge university pres. Cutis; 63,25-7

13-Cox , L.J. (1989): Aperspective on listeriosis. FoodTechnol.,43, 52–59.

14-Cox, L.J.; Kleiss,T.; Cordier, J.L.; Cordellana,C.; Konkel, P. ; Pedrazzini,C.; Beumer, R. and Siebenga, A.(1989): Listeria spp. in food processing, non-food and domestic environments. Food Microbiology 6, 49–61.

15-Datta, A.R.; Moore,M.A.; Wentz,B.A. and Lane, J.(1993): Identification and enumeration of Listeria monocytogenes by non radioactive DNA probe colony hybridization.Appl.Environ.Microbiol. 59144– 149

16-EL-Sherbini , M . ;AL-Agili,S. and Garbaj , A .(1998): Isolation of Listeria from farm milk and abortion cases of women .Estern MediterraneanHealth,WHO.4:589-592

17-Epidat.(2003): Occurrence of selected notifiable infectionsin the Czech Republic during 1999 to 2001 The Bulletinof Centre of Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health Prague (in Czech)

18-Farber ,J .M . and Peterkin ,P. I .(1991): Listeria monocytogenes , a foodborne pathogen. Microbiol. Rev. 55, 476– 511.

19-Food and Drug Administration (FDA).(2002) : "Chapter 10:Listeriamonocutogenes"www.cfsamfda.gov/ ebam/bam-10.html.

20-Food Safety and Inspection Service(FSIS).(2000) : "Action lanforAddressing Listeria *monocytogenes "* *www.fsis.usda.gov*

21-Fratamico,P.M.;Strobaugh,T.P.;Medina,M.B.andGehring, A.G.(1998): Detection of Escherichia coli O157:H7 using a surfaceplasmon resonance biosensor. Biotechnol. Tech. 12, 571– 576.

22-Gava,P.; Saralegui,C.;Medina, M. (1996): "Occurrence of Listeria monocytogenes and other Listeria ssp in raw caprine milk. "departamento de tecnologia de alimentos. 79: (1936 – 1941). **23-Gaya , P.; J. Sanchez . ;, M, Medina & M, Nuñez.(1998):** Incidence of Listeria monocytogenes and other Listeria species in raw milk produced in Spain. Food Micr.

24-Gholizadeh ,Y.; Poyart, C. ; Juvin, M. ; Beretti , J., Croize, J.,Berche ,P .andGaillard,J.(1996): Serodiagnosis of listeriosis basedupon detection of antibodies against recombinant truncatedforms of listeriolysin O. J. Clin. Microbiol. 34, 1391– 1395.

25-Graham, JC .;Lanser , S .; Bignardi, G.;Pedler,S.; Hollyoak ,V.;J, Hosp. (2002): Infect Hospitalacquired listeriosis51:136-.www.ajicjournal.org Vol. 38 No. 9

26-Hassan,L.;Mohammed,H.O.;McDomough,P.L.; Gonzalez ,R .N.(2000):"Acrosssectional Study on the Prevalaence of Listeria monocytogenes and Salmonella in New – York Dairy Herds" J. Dairy Sci. 83(11):2441-2447.

27-Hiroshi,U.;Keiichi,Y .;Takanori ,A. ;Yasukazu,M.; Hiroyuki ,T.;Takashi,I.;Chiharu,M.(1996): The prevalence of Listeria monocytogenes in the environment of dairy farms. Microbiol .Immunol. 40, 121–124.

28-Hui, Y. H.;Gorhan, J. E.R.; Murrell, K. D.; Cliver ,D.(1994): "Foodborne disease handbook–diseases caused by bacteria" vol. (1), Marcel dekker. Inc. New-York .

29-Jay, J.M. (1996): Foodborne listeriosis, 478–499. In: Jay J. M.(ed.): odern Food Microbiology. Chapman & Hall,New York. 661 pp

30-Jensen, N .E.;Aarestrup, F.M .; J. Jensen and H.C .Wegener. (1996): Listeria monocytogenes in bovine mastitis. Possible implication for human health. International Journal of Food Microbiology, 32, 209–216.

31-Jones,D.(1988): The place of Listeria among gram-positive bacteria. Infection S8-85.

32-Karpiskovamn , R . (1998) : Study of the occurrence of listeriae in food stuffs in 1998 (in Czech). The Bulletin of Centrefor the Hygiene of Food Chains in Brno, 7, 8–9 .

33-Katell, Rivoal.; Stéphane, Quéguiner.; Evelyne, Boscher.; Stéphanie , Bougeard.; Gwennola, Ermel.; Gilles, Salvat.; Michel, Federighi.; Florence Jugiau, Jocelyne Protais.(2010): Detection of Listeria monocytogenes in raw and pasteurized liquid whole eggs and characterization by PFGE. International Journal of Food Microbiology 138 (2010) 56–62

34-Ko¨hler, S .; Leimeister-Wa¨chter , M .; Chakraborty , T.; Lottspeich ,F.andGoebel,W.(1990): Thegenecoding for protein p60 of Listeria monocytogenes and its use as a specific probe for Listeria monocytogenes. Infect. Immun. 58, 1943– 1950.

35-Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda W.M.; Schreck enberger , P.C. and Winn, W.C (1997). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Lippincott–Raven publisher, Philadelphia, USA. pp. 664-668, 1330.

36-Koubova,V.; Brynda, E.; Karasova, L; Skovr ,J.; Homola .,J.; Dostalek , J.; Tobiska , P. and Rosicky , J.(2001): Detection of food borne pathogens using surface plasmonresonance biosensors. Sens.Actuators, B, Chem. 74, 100– 105.

37-Kruszyna T. ;Walsh, M.; Peltekian, K.; Molinari, M. (2008) : Earlyinvasive Listeria monocytogenes infection after orthotopic liver trans plantation: casereport and review of the literature. Liver Transpl;14:88-91

38-Lemaitre ,J .P.; Echchannaoui, H.; Michaut, G.; Divies, C.; Rousset , A. (1998) : Plasmid – mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. Food Prot., 61,1459–1464

39-Loncarevic,S.;Danielsson,M.L.; Tham, W .(1995): Occurrence of Listeria monytogenes in soft and semis of tcheeseinretailoutlets in Sweden Int. J. Food Micro biology 245-250.

40-Makino,S.;Okada,Y,andMaruyama, T. (1995) A new method fordirect detection of Listeria monocytogenes from foods by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3745– 3747.

41-Marth, E.H and. Ryser, T.E. (1990): Occurence of Listeria in foods milk and dairy foods. 151–164. In Miller A.J. (ed.) Foodborne Listeriosis. Topics in industrial microbiology,Society for industrial Microbiology,A msterdam

42-Martins et al.(2010): Aluster of Listeria monocytogenes infections in hospitalized adults.Copyright 2010 by the Associa-tion for Professionals in Infection Control and Epi- demiol-ogy, Inc. Published by Elsevier Inc. All righte rserved.Am J Infe-ct Control;38:e31-e36

43-Mead , P.S.;Slutsker,L.;Dietz,V.(1999): Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5, 607– 625.

44-Mead, PS. ;Dunne,EF .;Graves,L. ;Wiedmann, M.; Patrick,M. ;HunterS,etal.(2006):Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. Epidemiol Infect134:744-51.

45-Muraoka ,W. ; Gay, C.; Knowles , D. and Borucki , M. (2003) : Prevalence of Listeria monosytogenes Subtypes in Bulk Milk of the Pacific Northwest. Journal of Food Protection , Vol 66 .8 :1413-1419.

46-Murray,E.G.D.;Webb,R.AandAwann,M.B.R(1926): AQdiseas evofrabbitbcharacterised by alarg monnucellearleucocytosis caused byhithrrtoun described bacillus Bacterium onocytogenes . Journal of pathology andBacteriology,29,407-439.

47-Office International Epizooties (OIE). (2000): "Pathogenic micro organismsMilk and Dairy Products the Situation in France and Europe" 16: 452 –471. *www.oie.int*

48-Quinn, P.J.;Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2006). Veterinary Microbiology and microbial disease. Printed and bound in Great Britain byinternational Ltd . Pad stow-Cornwall.

49-Radice, C.; Munoz, V .; Castellares ,C.;Casanova,M . ;Serrano,D.; Carrion R, etal.(2006): Listeria monocytogenes meningitis in two allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Leuk Lymphoma 2006;47:1701-3.

50-Regulation by the Ministry of Health No. 91/1999 Collof Laws to amend the regulation by the Ministry ofHealth No. 294/1997 Coll. of Laws on microbiological requirements for foodstuffs, methods of their controland evaluation (in Czech)

51-Rich,R.L. and Myszka, D.G.(2000): Advancesinsurface plasm on resonance biosensor analysis. Curr. Opin. Biotechnol. 11,54– 61.

52-Riedo,F.X.;Pinner,R.W.;Tosca,M.;Cartter,M.L.; Graves ,L.M.; Reeves,M.W.; Weaver,R.E. ;Plikaytis,B .D.; Broome ,C. V. (1994): Apoint-source food bornelisteriosis tbreak:documented incubation period and possible mild illness.J. Infect. Dis. 170, 693– 696.

53-Rocourt,C.and Berche, P.(1996): The pathogenesis of infection by Listeria monocytogenes. Microbiology SEM 12, 245–258.

54-Rocourt,J.andCossart,P.,(1997): Listeria monocytogenes. In:Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology.ASM Press, Washington, DC, pp. 337–352.

55-Rodriguez , E.; Arques , J.L.; Gaya,P.; Nunez , M.; Medina ,M. (2001):"Control of Listeria monocytogenes Bacteriocins and Monitoring of Bactriocin Producing Lactic acid Bacteria by Hybridzation in Senni Hard Raw Milk Cheese" journal of Dairy Research. 68:131-137.

56-Ryser, T. E.and Marth, E. (1991): "Listeria, Listeriosis and food safety" Marcel dekker Inc. New-York .

57-Ryser,T. E.and Marth, E.(1991): "Listeria, Listeriosis and food safety" Marcel dekker Inc. New- York .

58-Schlegelova, J.; Babak, V.; Klimova, E.; Lukasova, J. ;Navratilova , P. ; Ustackova , A.; Sediva, I. (2002): Prevalence ofand resistance to anti-microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples. VetMed. B., 49, 216–225.

59-Sonezaki, S.; Yagi, S.; Ogawa, E. and Kondo, A.(2000): Analysis of theinteraction between monoclonal antibodies and human hemoglobin (native and cross-linked) using a surface plasmon resonance(SPR) biosensor. J. Immunol. Methods 238, 99– 106.

60-Stepanovic, S.; Lazarevic, M. G. Jesic.; M ,Kos. ;(2004): Meropenem therapy failurein Listeria monocytogenes infection. Eur J Clin Microbiol Infect

61-Suarez, M.M.; Bautista, RM.; Almela, M.; Soriano, A.; Marco, F.; BoschJ, et al (2007): Listeria monocytogenes bacteria analysis of 110 episodes. MedClin (Barc) **;**129:218-21.

62-Swaminathan, B. and Feng, P.(1994): Rapid detection of food-bornepathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 48, 401– 426.

63-Teuber, M. (1999): Spread of antibiotic resistance with food borne pathogens. Cell. Mol. Life Sci., 56, 755–763.

64-Troxler ,R. ;von ,GA. ; Funke, G .;Wiedeman ,B.; Stock ,I **.(2000):** Natural antibiotic susceptibility of Listeria species : L.grayi, L. innocua , L.ivanovii ,L.monocytogenes L.seeligeri,andL.welshimeri strains.Clin Microbiol Infect;6: 525-35.

65-vanRenterghem,B.;Huysman,F.;Rygole,R.;Verstraete ,W. (1991): Detection and prevalence of Listeria monocytogenes in the agricultural ecosystem. J. Appl. Bacteriol. 71, 211 – 217

66-Vasavada,PC. (1988): Pathogenic Bacteria in Milk. A Review. J.Dairy Sci., 71, 2809–2816

67-Vazquez – Boland , J.A.;Dominguez,L.;Fernandez-arayzaba l, J .F. and Suarez,G.(1992): Listeria monocytogenesCAMP reaction .Clin. Microbiol. Rev. 5, 343.

68-Vazquez-Boland , J .A .; Kuhn, M .; Berche ,P.; Chakraborty ,T.; Dominguez – Bernal ,G .; Goebel ,W . ; Gonzalez- Zorn ,B .;Wehland,J.and Kreft,J.(2001): Listeria pathogenesis and molecul Ravlovich, B., 1984. Listeriosis Research Present Situation and Perspective. Akademiai Kiado, Budapest.

69- VazquezBoland, J .A.; Kocks,C.; Dramsi,S.; Ohayon ,H . ; Geoffroy , C.;Mengaud,J.;Cossart,P.(1992): Nucleotide sequence of the lecithinase operon of Listeria monocytogenes and possiblerole of lecithinase in cell-to-cell spread. Infect. Immun. 60,219– 230

70-Vicente,MF.;Perez-Daz,JC.; Baquero ,F., ngeldeP ,M.;Bere nguer , J . (1990) : Penicillin-binding protein 3 of Listeria monocytogenes as theprimary lethaltarget for B-lactams. Antimicrob Agents Chemother;34:539-42.

71-Windrantz, P. and Arias, M. L.(2000) : "Evaluation of the Bacteriological Quality of Ice Cream Sold ot San Jose, Costa Rica" Arch. Latinoem. Nutr. 50 (3) 301-303.

72-Winter,CH.;Brockmann,SO.Sonnentag, SR.; Schaupp,T.; Prager, R.;HH,etal.(2009): Prolonged hospital and community-based listeriosis outbreak caused byready-to-eat scalded sausages. J Hosp Infect;73:121-8