٣-مواد البحث وطرائقه:

٣-١ مواقع الدراسة

شملت الدراسة ثلاثة أحواض ترابية لمزارع تختص بتسمين الكارب العادي، وهي مزارع عين الطاقة التي تقع في قرية عين الطاقة التابعة لمنطقة السقيلبية على بعد ٦٠كم من مدينة حماة، ومزرعة كازو التي تقع على بعد ٢ كم شمال غرب مدينة حماة، ومزرعة كريميش التي تقع على بعد ١٢ كم جنوب شرق مدينة حماة.

شكل (٢): مزارع الدراسة

١.موقع مزارع كازو السمكية **٢ مزارع عين الطاقة.**

٣.موقع مزارع كريميش **٤.موقع مزارع عين الطاقة.**

و يوضح الجدول (٢) البيانات الخاصة بمزارع الدراسة، وتتضمن: المساحة الإجمالية، وعدد الأحواض، ونوعها، ومصدر المياه، وأنواع الأسماك المستزرعة والشكل رقم (٢) تظهر جانباً من مزرعة عين الطاقة، ومواقع المزارع المدروسة.

الجدول (٢) البيانات الخاصة بمزارع الدراسة

اسم المزرعة	المساحة الاجمالية	عدد الاحواض	نوع الاحواض	مصدر المياه	الأسماك المستزرعة
مزرعة عين الطاقة	٤٣ دنم	٨	ترابية	مياه جوفيه	الكارب والمشط
مزرعة كريميش	٢ دنم	٣	ترابية	نهر العاصي	الكارب و السلور و المشط
مزرعة كازو	٢ دنم	٢	ترابية	نهر العاصي ومياه جوفيه	الكارب والسلور

٣- ٢ جمع العينات:

شكل (٣) : طريقة جمع العينات باستخدام شبكة صيد جارفة

تم جمع ٢١٤ سمكة من أسماك الكارب العادي ***Cyprinus carpio*** **L.** ، ظهرت عليها قرحات جلدية بأحجام وأشكال مختلفة، وترافقت أحياناً مع أعراض خارجية أخرى كانتفاخ البطن، وجحوظ العينين، وقد جُمعت في المدة ما بين شهري آذار وأيلول /٢٠١٢م، باستخدام شبكة صيد جارفة مزودة بحبلين (دالي، ١٩٩٩)، ووضعت الأسماك في كل مرة بأكياس نايلون كبيرة الحجم، إذ ملئ ثلث الكيس بماء الحوض، وحقن الكيس بغاز الأوكسجين لضمان

شكل (٤): استقبال الأسماك في المخبر

وصول الأسماك حية إلى مخبر الأسماك في كلية الطب البيطري بجامعة حماة- وذلك اعتماداً على طريقة (Apha,1998)، إذ تم اختيارها بواقع ٣٥ و ١١٧ و٦٢ سمكة، فكانت نسبة العينات المدروسة من كل مزرعة ١٦,٤% و٥٤,٦%و ٢٩% من مزارع كازو، ومزارع كريميش، ومزارع عين الطاقة على التوالي، وأمكن مشاهدة أسماك عدة مصابة بأكثر من نمط من القرحات في آن واحد، يدل تدرج نمط القرحة هذا على تطور الحالة المرضية عند الأسماك المصابة، والجدول رقم (٣) والمخطط البياني رقم (١) يبين توزع الأسماك المجموعة بحسب المزارع المدروسة.

جدول رقم (٣): توزع الأسماك بحسب المزارع المدروسة.

المزارع	الأسماك المصابة	%
كازو	٣٥	١٦,٤
كريميش	١١٧	٥٤,٦
عين الطاقة	٦٢	٢٩
الكلي	٢١٤	١٠٠

٣- ٣ - دراسة القرحات:

بعد وصول الأسماك للمختبر، وضعت مع الماء الذي نقلت فيه ضمن أحواض زجاجية، والشكل (٤) يبين استقبال العينات في المخبر، وقد تم ملء ما تبقى من الحوض بماء الصنبور، وأخذت كل سمكة مصابة بالتقرح على حدة، وقتلت بتخريب الدماغ، أو بالضرب على الرأس مباشرة وفقاً لـ (James & Alan ,1991)، وتم تصنيف القرحات الموجودة على السمكة إلى ٣ أنماط وفق ما اعتمده الباحثان (Elliott & Shotts, 1980) على النحو الآتي:

- القرحة الأولية: صغيرة الحجم، وبيضاء اللون، ومع تقدم الحالة تحاط القرحة بمنطقة نازفة، والشكل (٥) يوضح ذلك.

- القرحة المتوسطة : تتميز بنزف، وتتكرز في منطقة الأدمة، والشكل (٦) يوضح ذلك.
- القرحة العميقة: تتميز بتوسع القرحة وتعمقها، وظهور النسيج العضلي وتنخره. والشكل (٧) يوضح ذلك.

وتترافق القرحات أحياناً، لاسيما في المراحل المتقدمة من المرض بأعراض خارجية أخرى كانتفاخ البطن، وجحوظ العينين، والشكل (٨) ظهر هذه الأعراض.

وقسمت الأسماك المصابة بحسب القرحات إلى سبع مجموعات هي: الأولية – الثانوية – العميقة – (الأولية + الثانوية) – (الأولية + العميقة) – (الأولية + الثانوية + العميقة)– (الثانوية + العميقة) ، وهذا ما ساعد في تحديد درجة الإصابة، ومن ثم تحديد مراحل المرض المختلفة.

شكل ٥ : القرحة الأولية

شكل ٦ : القرحة المتوسطة

شكل ٧: القرحة العميقة

شكل ٨: جحوظ العينين وانتفاخ البطن

٣- ٤- درجة الإصابة بالمرض:

تم قياس تطور درجة الإصابة بحسب تدرج نمط القرحة الظاهرة على الأسماك المصابة، إذ لايتوقف تطور القرحة عند نمط القرحة الأولية فقط، وإنما يمكن أن تتطور إلى قرحة متوسطة ومن ثم عميقة، وفي كثير من الأحيان يمكن ملاحظة أكثر من نمط من القرحات على السمكة الواحدة شكل (٩). وعدّت المرحلة المرضية التي وصلت لها الأسماك مقابلة لنمط القرحة الأكثر تطوراً ، وعدّت الأسماك المصابة بالقرحات الأولية فقط هي أسماك في المرحلة الابتدائية من المرض، بينما تعدّ الأسماك التي ظهرت عليها القرحات المتوسطة مع/ أو بدون القرحات الأولية قد دخلت في **المرحلة الثانوية** من المرض، وأخيراً عدّت الأسماك الي تظهر عليها القرحات العميقة بأنها دخلت **المرحلة المتقدمة** للمرض، بغض النظر عن وجود أنماط أخرى للقرحات

شكل (٩) : الأنماط المختلفة للقرحات
١.الأولية ٢. المتوسطة ٣. العميقة

٣-٥ - الزرع والعزل الجرثومي:

٣-٥-١ الأدوات والأوساط والصبغات المستخدمة في الزرع والعزل الجرثومي:

تم إجراء عملية الزرع والعزل الجرثومي في مخبر الدراسات العليا والبحوث العلمية في كلية الطب البيطري بجامعة حماة، إذ تم استخدام ماسحات قطنية معقمة موضوعة في أنابيب سعة

١٥ مل (Citswab.China)، لأخذ مسحات عقيمة من مكان القرحات – كحول إيتيلي ٧٠% – قطن – أطباق بتري قطر ٨ سم . أنابيب زجاجية معقمة – وغيرها من الأدوات الضرورية لعملية الزرع الجرثومي.

كما تم استعمال عدد من الأوساط الجرثومية السائلة والصلبة الخاصة بعملية العزل والزرع الجرثومي، وتم تحضيرها وفقاً لتوصيات الشركة المنتجة، وهي :

- صبغة غرام Gram's stains استخدمت عتيدة مجهزة من قبل شركة HiMedia الهندية لتحديد الصفات الشكليائية واللونية للعزولات، إذ إن العزولات إيجابية الغرام تتصبغ باللون البنفسجي، والعزولات سلبية الغرام تتصبغ باللون الوردي.
- مرق تريبتون الصويا Tryptone Soya Broth (TSB) (M011) من شركة HiMedia الهندية من أجل الإكثار قبل عملية الزرع على المنابت الصلبة.
- وسط قاعدة آغار مستنبت الدم Blood Agar Base (M073) من شركة HiMedia الهندية استخدم هذا الوسط بهدف الكشف عن خصيصة التحلل الدموي، والإكثار العام أيضاً.
- وسط آغار تربتون الصويا (TSA)، وقد استخدم هذا الوسط بهدف الإكثار العام من شركة (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Maryl &, USA)، وإعادة تنقية المستعمرات، والكشف عن خصيصة إنتاج الصباغ البني المنتشر لبعض عزولات الإيروموناس.
- وسط قاعدة عزل الإيروموناس Aeromonas Isolation Medium Base (M884) من شركة HiMedia الهندية، وهو وسط تمييزي وانتقائي لجراثيم الإيروموناس عن الجراثيم المعوية وجراثيم الزوائف.

- وسط آغار الفرنكلوزس (الدمل) Furunculosis Agar (M432-500G) من شركة HiMedia الهندية، وهو وسط انتقائي لجراثيم الإيروموناس سالمونيسيدا.
- الأوساط اللازمة لإجراء بعض الاختبارات الكيمياحيوية مثل: اختبار الأكسيداز، اختبار الكاتلاز.
- اختبار الأكسدة والتخمير OF Basal Medium (M395) من شركة HiMedia الهندية، واستُخدم هذا الوسط بهدف معرفة قدرة العزولات الجرثومية لأكسدة سكر الغلوكوز أو تخميره.
- مجموعة تشخيصية من الاختبارات الكيمياحيوية – Biochemical Identification (BIKB002) من إنتاج شركة HiMedia المخصصة للكشف على العصيات السلبية الغرام والتي تحتوي على اثني عشر اختباراً منها سبعة اختبارات كيميائية، وخمسة لتخمير السكاكر، وهي الأندول والسترات واللايسين دي كابوكسيلاز، والأورنيثين دي كاربوكسيلاز واليورياز، واختبار تحليل فينيل آلأنين (TDA)، واختبار إرجاع النترات، وتخمير سكر الغلوكوز، والأدونيتول، واللاكتوز، والأرابينوز، والسوربيتول.
- وسط فوجس بروسكاور المعدل Voges Proskauer Medium Modified (M070F)، وقد استخدم هذا الوسط من أجل إجراء اختبار فوجس بروسكاور Foges-proskauer test للتمييز بين العزولات كأحد الاختبارات الكيميا حيوية.

الشكل (١٠) : أهم الادوات والاوساط والصبغات المستخدمة في الزرع والعزل الجرثومي

- وسط الحركة Sulphide Indole Motility (SIM) لشركة HiMedia Medium المضاف له (Tirphenyltetrazolium chloride) بمعدل ٠,٠٥غ لكل ١٠٠٠ مل من الوسط المحضر، وذلك لإعطاء اللون الزهري مكان نمو الجراثيم، إذ استخدم هذا الوسط لتحديد اختبار الحركة، والكشف عن الأندول، و إطلاق غاز كبريت الهدروجين H_2S وفقاً لـ (Cowan & Steel, 1974).
- وسط أغار موللر– هنتون Mueller Hinton Agar (M173) استخدم هذا الوسط في اختبار تحسس العزولات الجرثومية للمضادات الحيوية.

٣- ٥ - ٢ الكشف عن جراثيم جنس الإيرموناس من القرحات الجلدية :

وضع مخطط عمل (الشكل ٢٢) للكشف عن مسبب مرض التهاب الجلد الأحمر عند الكارب العادي بناء على دراسات لطرائق مرجعية عدة خاصة بعزل جراثيم جنس الإيرموناس، وتصنيفها (Austin & Austin, 2007). وقد تضمن هذا المخطط خطوات عدة تم الدمج خلالها بين العزل والزرع الجرثومي، والاختبارات الكيمياحيوية، والزرع على بعض المنابت التميزية والانتقائية لجراثيم الإيروموناس، واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR باستخدام

مشرعات عامة للكشف عن جراثيم جنس الإيروموناس، وصولاً إلى تحديد الأنواع الجرثومية لهذا الجنس، والمسببة لهذا المرض بالاختبارات الكيمياحيوية المتممة وفق النقاط الآتية:

٣-٥-٢-١عملية إكثار الجراثيم:

تم الزرع من القرحات الجلدية في مخبر البحوث العلمية والدراسات العليا في كلية الطب البيطري، وذلك بإدخال عروة زرع جرثومي، أو ماسحة قطنية معقمة في المنطقة المصابة في القرحة الأولية، بينما تم الزرع من القرحات المتوسطة والعميقة بإدخال عروة الزرع الجرثومي أو الماسحة القطنية بين الأدمة والأنسجة العضلية المصابة عند حافة القرحة. ثم وضعت هذه المسحات في أنابيب اختبار معقمة تحوي كمية كافية من مرق تريبتون الصويا TSB، وحضنت على الدرجة ٢٥ مئوية لمدة ٢٤ ساعة بهدف الإكثار العام للجراثيم (Quinn *et al.*,1999; Lee *et al.*, 2002 a,b ; Austin and Austin, 2007).

٣-٥-٢-٢ الزرع على وسط تريبتون الصويا TSA:

تم نقل ٢٥ ميكروليتر من مرق تريبتون الصويا TSB المزروع على طبق يحوي آغار الصويا TSA المضاف له دم منزوع الفبرين بنسبة ٥ %، والمضاف له الأمبيسيلين ١٠ /ميكروغرام/مل من الوسط (كعامل انتقائي) (Richardson *et al.,* 1982)، وتم نشر العينة على الطبق وحضنت الأطباق المزروعة على الدرجة ٢٥ درجة مئوية، وتم فحص الأطباق يومياً لمراقبة نمو المستعمرات، ولمدة ٣ أيام.

٣-٥-٢-٣ الخواص المزرعية :

تم توصيف المستعمرات من حيث شكلها (دائرية– محدبة – مسطحة– مخاطية – داكنة – لماعة – ناعمة)، وحجمها (صغيرة – متوسطة – كبيرة)، وتحللها للدم (محللة للدم نمط ألفا أو بيتا).

٣-٥-٢-٤ الخواص الشكليائية والتلوينية بصبغة غرام:

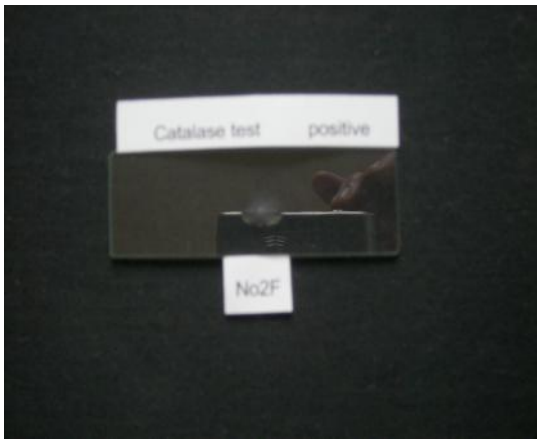
تم أخذ مسحة جرثومية برأس عروة الزرع من كل مستعمرة على شريحة زجاجية، ومزجها بقطرة ماء مقطر ومعقم، وصباغتها بصبغة غرام لمعرفة الخواص الشكليائية والتلوينية للمستعمرات، إذ تم اتباع خطوات العمل التي توصي بها الشركة المصنعة للصبغة. وتم فحص جميع الشرائح باستخدام العدسة الغاطسة، وتكون جراثيم الإيروموناس عصيات سلبية الغرام.

٣-٥-٢-٥ تنقية العزولات:

أخذت عينة من المستعمرات التي كانت مشكلة من جراثيم سلبية الغرام وعصوية الشكل، وتم إعادة زرعها على وسط تريبتون الصويا TSA، إذ تم زرع أكثر من مستعمرة على الطبق نفسه، وتحضينها على الدرجة ٢٥ م° لمدة ٤٨ – ٧٢ ساعة، وذلك بهدف تنقية المستعمرات (Cowan and steel, 1974).

٣-٥-٢-٦ اختبار الكاتلاز: Catalase Test

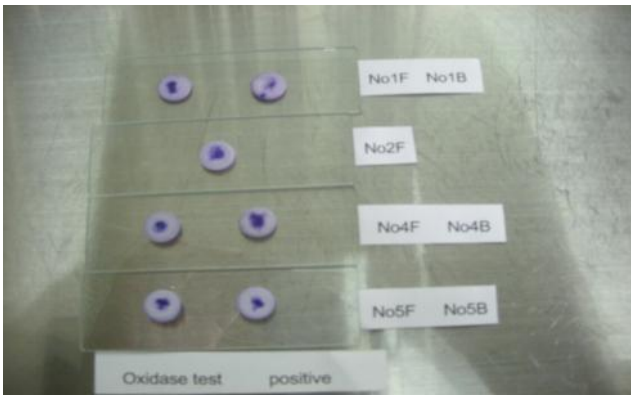
تم أخذ عينة من المستعمرات النامية على وسط تريبتون الصويا TSA ، وإجراء اختبار الكاتالاز (Quinn *et al.*,1999) إذ وضع جزء من المستعمرة الجرثومية على شريحة زجاجية معقمة، وتم وضع قطرة من الماء الأوكسجيني H_2O_2 (٣ %) بجانبها، ومزجها مع بعضها بوساطة عروة الزرع، وتكون النتيجة إيجابية عند ظهور فقاعات أو فوران خلال ثوان عدة من المزج، ومن ثم تكون هذه الجراثيم إيجابية لاختبار الكاتالاز الشكل (١١).



الشكل (١١):الحالة الإيجابية لاختبار الكاتلاز

٣-٥-٢-٧ اختبار الأوكسيداز: Oxidase Test

تم إجراء اختبار الأوكسيداز للعينات الإيجابية لاختبار الكاتالاز، وللكشف عن وجود أنزيم السيتوكروم أوكسيداز في الخلية الجرثومية (Quinn *et al.,*1999) . تم ذلك بوضع نقطة من الماء المعقم والمقطر على قرص الاختبار الحاوي على ١ % من مادة (تيتراميثيل – ب – فنيل داي أمين دي هايدروكلورايد) Tetramethyl–p–phenylenediamie dihydrochloride، ثم تم نقل جزء من المستعمرة المراد فحصها بوساطة عروة زرع معقمة ونشرها فوق نقطة الماء على القرص. يوضح الشكل (١٢) ظهور اللون الأزرق القاتم في حال النتيجة الإيجابية.



الشكل (١٢) : بعض العينات الإيجابية لاختبار الأوكسيداز

٣-٥-٢-٨- اختبار الأكسدة والتخمير: (OF) Oxidation & Fermentation Test

أجري هذا الاختبار على العزولات الإيجابية لاختبار الأوكسيداز والكاتالاز، للكشف عن خصيصة أكسدة سكر الغلوكوز أو تخمره (Quinn *et al.,*1999)، إذ تم تحضير الوسط وفقاً لإرشادات الشركة المصنعة، وتم الزرع في أنبوبين بطريقة الوخز بوساطة عروة زرع معقمة، وتمت إضافة ١ مل من زيت البارافين السائل المعقم لأحد الأنبوبين، وتم التحضين على الدرجة ٢٥ مْ وتم قراءة النتيجة على النحو الآتي:

العامل	الأنبوب المفتوح	الأنبوب المغلق
الأكسدة	أصفر	أخضر
التخمير	أصفر	أصفر
سلبية	أخضر	أخضر

إذ إن الجراثيم من جنس الإيروموناس هي جراثيم مخمرة لسكر الغلوكوز. الشكل(١٣).

الشكل (١٣): نتائج اختبار الأكسدة والتخمير (OF)

٣-٥-٢-٩ اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR باستخدام مشرعات عامة لجنس الإيروموناس:

٣-٥-٢-٩-١ استخلاص وتحضير مرصاف DNA:

تم استخلاص الحمض النووي الدنا DNA من العزولات بالطريقة المعتمدة من قبل (Wang *et al.*, 1997)، إذ تم إعادة زرع العزولات النقية لجراثيم الإيروموناس المشتبهة في مرق الصويا (TSB)، والتحضين في حمام مائي بدرجة ٣٠ درجة مئوية لمدة ليلة كاملة، مع تحريك ثابت للوسط (١٥٠ دورة/دقيقة)، بعد ذلك تم أخذ ½ مل من السائل الطافي للوسط

الشكل (١٤) : استخلاص وتحضير مرصاف DNA

السائل المزروع بجراثيم الإيروموناس المشتبهة، ووضع في أنبوب أبِندروف سعة ١،٥ مل الشكل(١٤)، وتم استخدام جهاز التثقيل بسرعة /٩٠٠٠ g / لمدة ١٠ دقائق، استبعد الطافي، وغسل الراسب ثلاث مرات بإضافة ½ مل من محلول الدارئة الفوسفاتية (BPS=7,2) العقيمة.

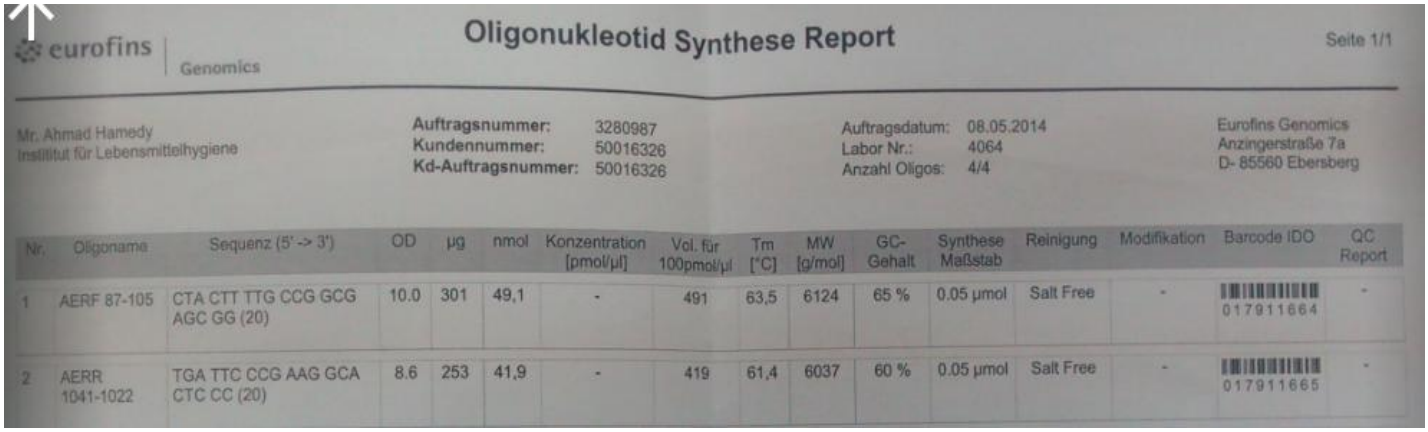
– تم تحضير معلق الراسب بإضافة ½ مل من محلول (HImedia) TRITON X100 وحضّن المزيج مدة ٥ دقائق في حمام مائي درجة حرارته (١٠٠) درجة مئوية، ثم نقل المزيج بسرعة ووضع في مجمدة درجة حرارتها (٢٠–) درجة مئوية لمدة (٥) دقائق.

٣-٥-٢-٩ -٢ اجراء اختبار البوليميراز المتسلسل PCR:

٣-٥-٢-٩ -٢-١المواد المستخدمة في اختبار PCR:

استخدم زوج من مشرعات عامة بجنس الإيروموناس، والمصممة من قبل (Lee *et al.*, 2002 a,b) إذ إن تسلسل المشرع

الصاعد: AERF 87–105 $5'$ CTA CTT TTG CCG GCG AGC GG $3'$
الهابط: AERR 1041–1022 $5'$ TGA TTC CCG AAG GCA CTC CC$3'$



eurofins Genomics

Oligonukleotid Synthese Report

Seite 1/1

Mr. Ahmad Hamedy
Institut für Lebensmittelhygiene

Auftragsnummer: 3280987
Kundennummer: 50016326
Kd-Auftragsnummer: 50016326

Auftragsdatum: 08.05.2014
Labor Nr.: 4064
Anzahl Oligos: 4/4

Eurofins Genomics
Anzingerstraße 7a
D- 85560 Ebersberg

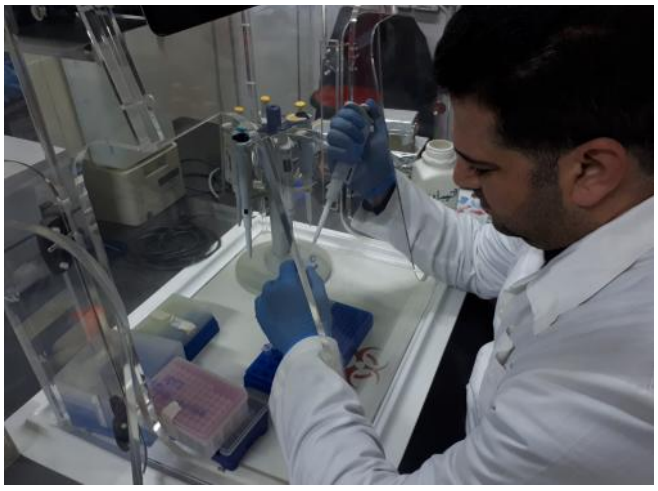
Nr.	Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	OD	µg	nmol	Konzentration [pmol/µl]	Vol. für 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Gehalt	Synthese Maßstab	Reinigung	Modifikation	Barcode IDO	QC Report
1	AERF 87-105	CTA CTT TTG CCG GCG AGC GG (20)	10.0	301	49,1	-	491	63,5	6124	65 %	0.05 µmol	Salt Free	-	017911664	-
2	AERR 1041-1022	TGA TTC CCG AAG GCA CTC CC (20)	8.6	253	41,9	-	419	61,4	6037	60 %	0.05 µmol	Salt Free	-	017911665	-

الشكل (١٥) : المشرعات العامة لجنس الإيروموناس من شركة Eurofins

والمصممة من المنطقة المورثية للإيروموناس Aeromonas 16S rDNA gene، وتم الحصول على المشرعات من شركة (Eurofins MWG Operon, Germany) ــ مزيج PCR core kit (Qiagen,Germany) ــ صبغة الإيثيديوم بروميد Ethidium Bromide، دارئة التحميل 6X Loading Buffer (Takara.Jaban)، معلم الوزن الجزيئي 100 pb DNA (PEQ lab,NO 3404A).

٣-٥-٢-٩-٢-٢ تحضير مزيج التفاعل لاختبار PCR:

حضر المزيج لكل عينة وفقاً لـ (Lee *et al.,* 2002 a,b)، وباستخدام العتيدة المحضرة من شركة (Qiagen, Germany)، وذلك في مكان نظيف ومعزول، وباستعمال ماصات ذات رؤوس معقمة مزودة بفلتر، ووضعت جميع المواد اللازمة للاختبار في أنبوب إبندورف معقم سعة (١,٥) مل فوق الثلج، وتم تكوين (٤٥) ميكرو ليتراً من المزيج في أنابيب خاصة باختبار PCR سعة ٢٠٠ µl، وذلك على النحو الآتي:



الشكل (١٦): تحضير مزيج التفاعل

ماء نقي معقم خال من الدنا H_2O Ultra-pure	33.75 µl
دارئة الاختبار 10 × PCR Buffer	5.00 µl
قواعد آزوتية dNTP(l0 mM)	1.00 µl
المشرع الصاعد F Primer (20 pmole/µl)	0.5 µl
المشرع الهابط R Primer (20 pmole/µl)	0.5 µl
أنزيم البلمرة Taq polymerase (5 U/µl)	0.25 µl

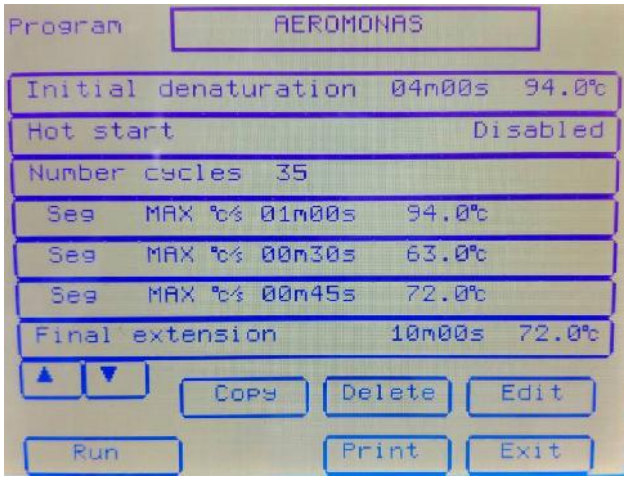
مصل دم بقري	Bovine serum albumin	2 µl
كلوريد الماغنيسيوم	$Mgcl_2$ (50 mM)	2 µl
مرصاف أو قالب الدنا	Template DNA	5.00 µl*
المجموع	Total =	50 µl

وتم المزج باستخدام جهاز طرد مركزي منخفضة السرعة.

*تم إضافته من كل عينة إلى كل أنبوب على حدة

٣-٥-٢-٩-٢-٣ مرحلة التضخيم :

وضعت الأنابيب المحتوية على مزيج التفاعل في المدور الحراري Thermocycler (TechNE TC- 512)، وتم تشغيل الجهاز بعد إعداد البرنامج الخاص بجراثيم جنس الإيروموناس الجدول (٤)، والشكل (٧) وفقاً لطريقة (Lee *et al.*,2002a) .



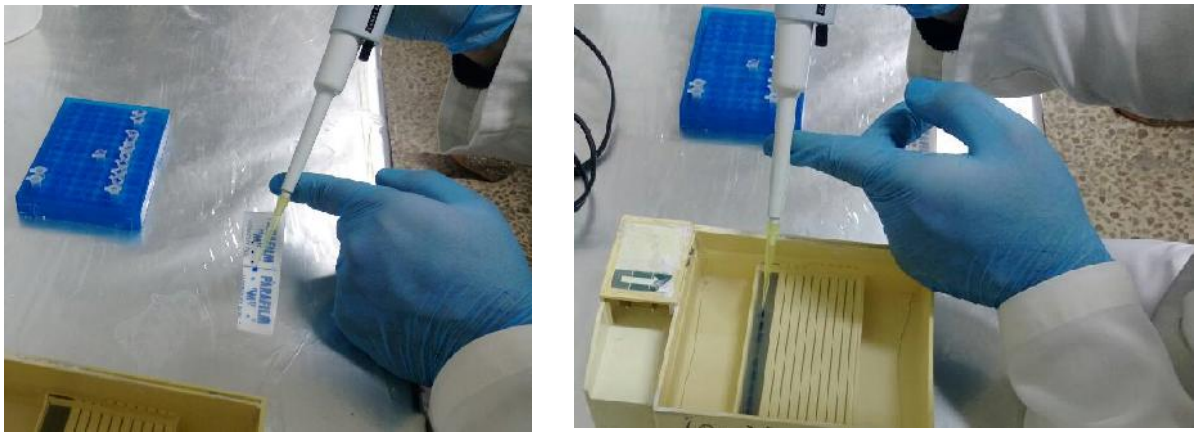
الشكل (١٧):
البرنامج الخاص بجراثيم الإيروموناس على المدور الحراري

الجدول (٤) : **البرنامج الخاص بجراثيم الإيروموناس على المدور الحراري**

المرحلة	درجة الحرارة	المدة	عدد الدورات
Initial Denaturation مرحلة انفصال سلسلتي الدنا (التمسخ الأولي)	٩٤ مْ	٤ دقيقة	١
Denaturation مرحلة انفصال سلسلتي الدنا(التمسخ)	٩٤ مْ	١ دقيقة	٣٥ دورة
Annealing مرحلة ارتباط المشرعات	٦٣ مْ	٣٠ ثانية	
Extension DNA مرحلة الاستطالة	٧٢ مْ	٤٥ ثانية	
Final-Extension مرحلة الاستطالة النهائية	٧٢ مْ	١٠دقائق	١ دورة

٣-٥-٢-٩-٢-٤ مرحلة الكشف عن نواتج التفاعل:

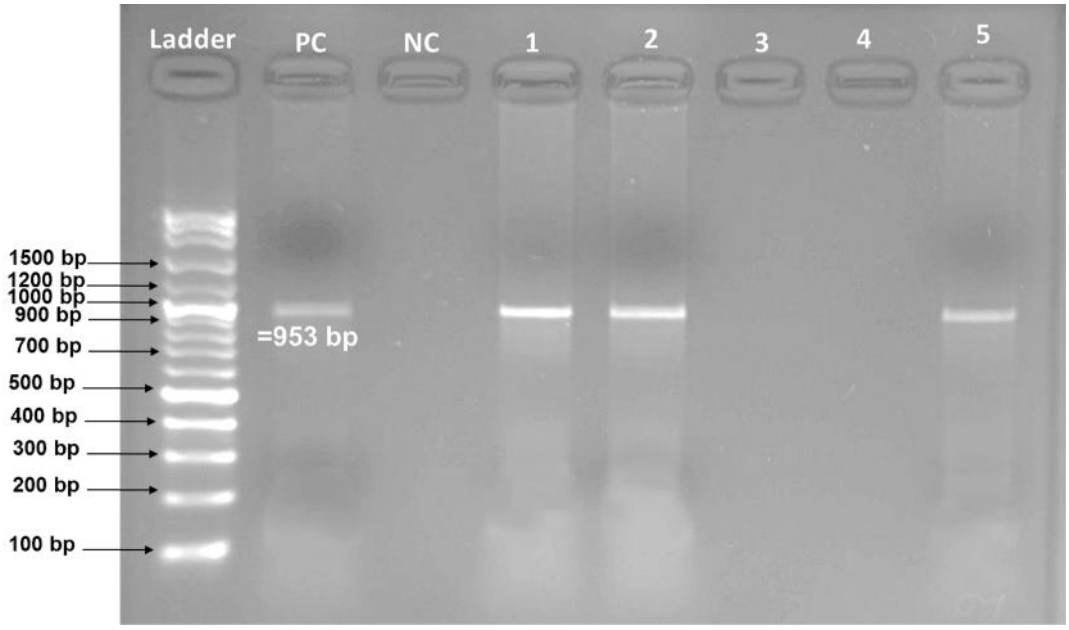
تم تحضير هلامة الآغاروز خلال مدة تضخيم الدنا بإذابة (١,٥) غ من الآغاروز (Peq Lab, Germany) في(١٠٠) مل من دارئة (Tris borate EDTA) TBE × ١ (من إنتاج شركة تاكارا اليابانية) في حوجلة زجاجية، ثم وضع الحوجلة المحتوية على المزيج في فرن كهربائي ذي أمواج قصيرة Microwave لمدة ٢ دقيقة مع تجنب الغليان، ثم تبريد المزيج بمحم مائي عند الدرجة (٥٦ مْ)، بعد ذلك تمت إضافة (١٠) ميكرولتراً من صبغة بروميد الإثيديوم



الشكل (١٨): تحضير وحقن نواتج التضخيم في حفر قالب الآغاروز.

(تركيز ١ ملغ/مل)، ثم سكب الآغاروز ضمن قالب الرحلان بثخانة (٣-٥) مم، بعد وضع الأمشاط الخاصة بالقالب، وتم تركه يبرد في درجة حرارة الغرفة، وبعد تمام تصلب الآغاروز، سحبت الأمشاط بعناية، ونقل القالب إلى جهاز الرحلان الكهربائي المحتوي على دارئة (Tris Borate EDTA) TBE × ١ مع صبغة الإثيديوم بروميد (1 ميكروغرام صبغة/ ١٠ مل دارئة)، بعد ذلك حقن (١٠) ميكرولتر من كل عينة مختبرة في حفر القالب، كما حقن (١٠) ميكرولتراً من معلم الوزن الجزئي في الحفرة الأولى من قالب الآغاروز، كذلك حقنت الكمية نفسها من الشاهد الإيجابي والشاهد السلبي مع كل قالب آغاروز، الشكل (١٩). وتمت برمجة

جهاز الرحلان بتحديد الزمن والجهد الكهربائي على ١٠٠ فولت، ولمدة ٦٠ دقيقة، وبعد مضي المدة المحددة للرحلان الكهربائي تم إيقاف الجهاز، وأخرج قالب الآغاروز بعناية، مع اتخاذ إجراءات السلامة كافة، ونقلت هلامة الآغاروز إلى نظام التظهير بالأشعة فوق البنفسجية (UVipro Platinum) المزود بكاميرة فيديو ومرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية ومرتبطة بجهاز حاسوب وطابعة حرارية، وفحصت الصور من أجل الكشف عن وجود أنطقة دنا (DNA Band) إذ عدّت العينات التي أعطت أنطقة دنا ذات حجم ٩٥٣ bp قاعدة آزوتية إيجابية لجنس الإيروموناس، وذلك بمقارنتها مع معلم الوزن الجزيئي (Lee *et al.*,2002a).



الشكل (١٩):بعض نتائج تطبيق تقنية PCR على العينات السريرية :

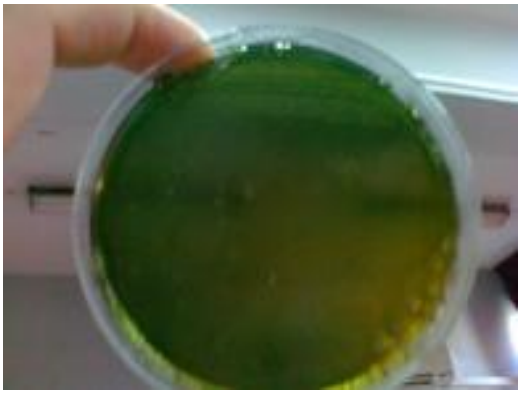
يشير العمود Ladder إلى معلم الأوزان الجزيئية ، ويشير العمود PC إلى الشاهد الإيجابي bp(953)، والعمود NC شاهد سلبي ، والأعمدة ١ و ٢ و ٥ عينات إيجابية (جنس الإيروموناس: حجم أنطقة الدنا bp(953))، والأعمدة ٣ و ٤ عينات سلبية.

٣-٥-٢-١٠ الزرع على المنابت التمييزية والانتقائية

٣-٥-٢-١٠ -١- الزرع على وسط قاعدة عزل الإيروموناس:

(M884) Aeromonas Isolation Medium Base:

يعدّ هذا الوسط من الأوساط التمييزية والانتقائية، إذ تنمو عليه جراثيم الإيروموناس، ولا تنمو عليه الجراثيم المعوية، إضافة إلى كونه يميز جراثيم الإيروموناس هيدروفيلا، والتي تنمو على شكل مستعمرات خضراء عاتمة المركز بنسبة أكثرمن ٥٠% من العزولات، بينما تنمو جراثيم الزوائف على شكل مستعمرات شفافة رمادية مزرقة. الشكل (٢٠).



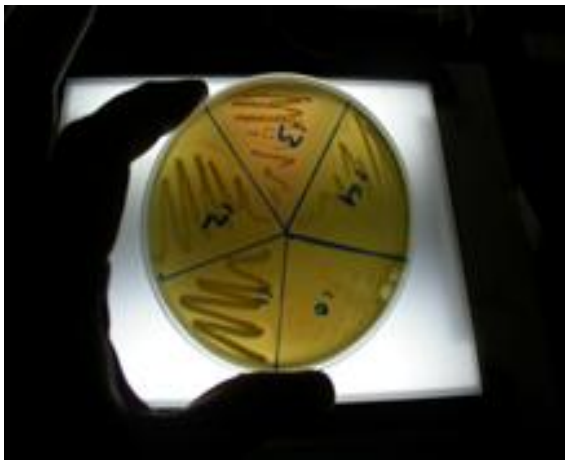
مستعمرات الإيروموناس هيدروفيلا

الزرع بطريقة التخطيط على المنبت

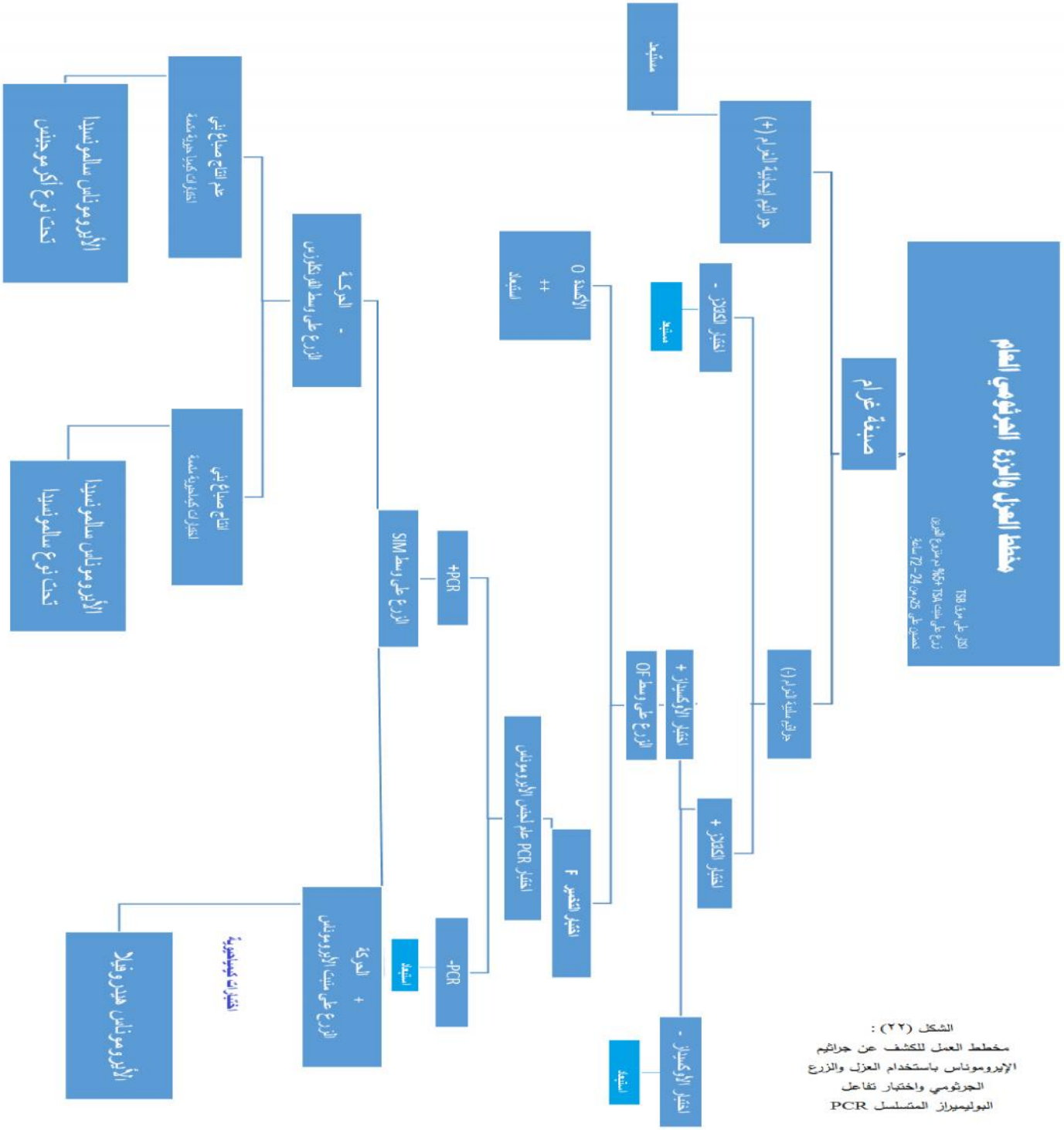
الشكل (٢٠): الزرع وسط قاعدة عزل الإيروموناس Aeromonas Isolation Medium Base

٣-٥-٢-١٠ -٢ الزرع على وسط آجار الفرنكلوزس (M432) Furunculosis Agar:

هو وسط انتقائي لجراثيم الإيروموناس سالمونيسيدا، إذ تنمو عليه بشكل مستعمرات تنتج صباغاً بنياً محمراً ومنتشراً، إذ إن أكثر من ٥٠% من العزولات تنتج هذا الصباغ والذي يعدّ أحد الصفات التمييزية المهمة لجراثيم الإيروموناس سالمونيسيدا الشكل (٢١).



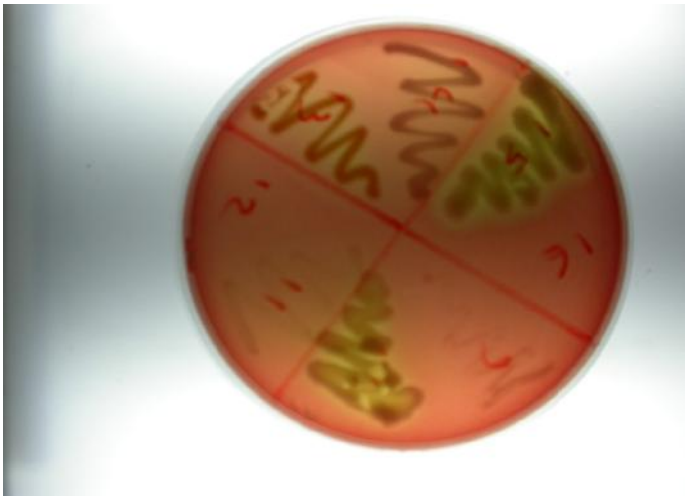
الشكل (٢١): إنتاج الصباغ البني لأحد العزولات



الشكل (٢٢) :
مخطط العمل للكشف عن جراثيم الإيروموناس باستخدام العزل والزرع الجرثومي واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR

٣-٥-٢-١٠-٣- الزرع على وسط قاعدة الآغار المدمى Blood Agar Base

تـم الـزرع علـى هـذا المنبـت بهـدف دراسـة خصيصـة التحلـل الـدموي للمسـتعمرات الناميـة (Austin & Austin, 2007)، وقد حضر المنبت وفقـا لإرشـادات الشـركة المصـنعة، وتمـت إضـافة دم غنم منزوع الفبرين لـه بنسبة ٥%، الشكل (٢٣) يبين نمط التحلـل بتـا لـبعض عـزولات الدراسة.



الشكل (٢٣): التحلل الدموي نمط بتا لبعض عزولات الدراسة

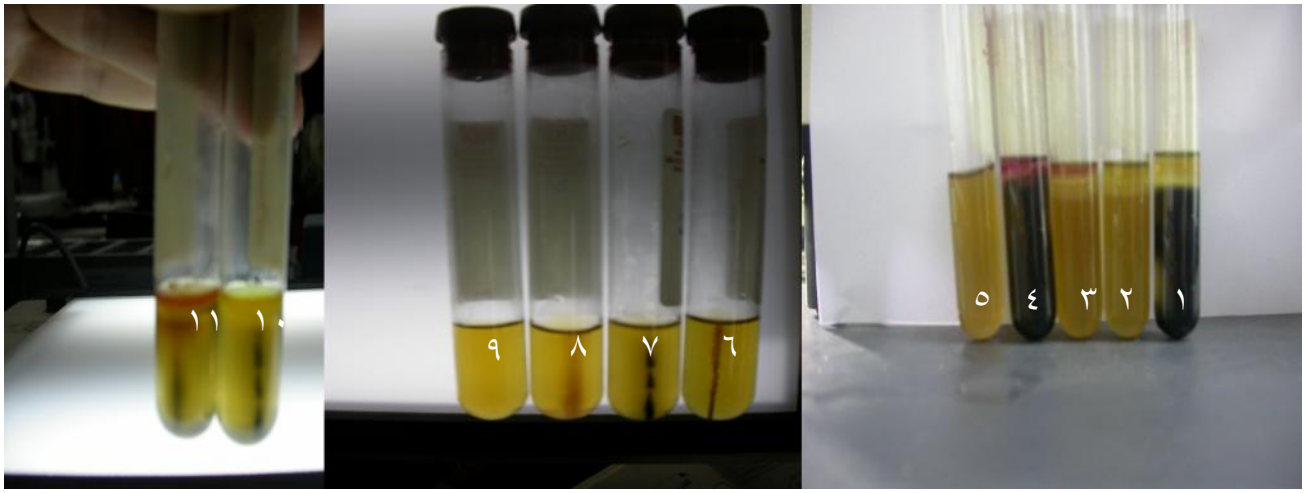
٣-٥-٢-١١ الاختبارات الكيميا حيوية المتممة لأنواع الإيروموناس المعزولة:

٣-٥-٢-١١ – ١ الزرع على منبت SIM للكشف عن الحركة والأندول وإطلاق غاز كبريت الهدروجين

تم زرع العينات الإيجابية لاختبار PCR على هذا المنبت، والمضاف له مادة TTS بمعدل ٠,٠٥غ لكل(١٠٠٠) مل من الوسط المحضر، وذلك لإعطاء اللون الزهري مكان نمو الجراثيم بحسب (Quinn *et al.*,1999)، وقد استخدم هذا المنبت لتحديد اختبار الحركة، والكشف عن الأندول، و إطلاق غاز كبريت الهدروجين H_2S، إذ تم تحضيره وفقاً لإرشادات الشركة المصنعة، وتم توزيع ٣ مل من الوسط على أنابيب اختبار معقمة سعة ١٠ مل، وتركه في غرفة الزرع المعقمة حتى يتصلب، ثم تم وخز المنبت بلوب زرع مستقيم بدون عروة عليه جزء من المستعمرة المراد فحصها بشكل عمودي، وتم التحضين لمدة ٢٤ ساعة على الدرجة ٢٥ مْ . بعد التحضين تمت اضافة أربع نقاط من كاشف كوفاك للأنبوب، وعند ظهور حلقة حمراء على سطح الأنبوب تكون النتيجة إيجابية للأندول، وتم الحكم على النتائج وفق الجدول رقم (٥):

الجدول رقم (٥) : حكم الزرع على وسط SIM.

الاختبار	النتيجة	الوصف
الحركة	متحرك	نمو منتشر داخل الأنبوب مع احمرار مكان النمو
	غير متحرك	نمو على خط الزرع فقط
اختبار الأندول	النتيجة الإيجابية	حلقة حمراء على السطح
	النتيجة السلبية	عدم ظهور حلقة
إطلاق غاز كبريت	النتيجة الإيجابية	لون اسود منتشر ضمن الانبوب **أو** على خط الزرع فقط
الهدروجين	النتيجة السلبية	عدم ظهور لون أسود بالأنبوب



الشكل (٢٤): **نتائج الزرع على وسط الـ SIM**

وترتيب الأنابيب من اليمين إلى اليسار عبر المقاطع الثلاثة

رقم الأنبوب	الحركة	H_2S	الأندول	رقم الأنبوب	الحركة	H_2S	الأندول
١	+	+	–	٦	–	–	–
٢	–	–	–	٧	_	+	–
٣	–	–	+	٨	+	–	–
٤	+	+	+	١٠	_	+	–
٥–٩		قبل الزرع		١١	_	+	+

٣-٥-٢-١١ – ٢ اختبار فوجس بروسكاور : Foges-proskauer Test

الشكل (٢٥): **اختبار فوجس بروسكاور**

يحضر الوسط بإضافة ١٧ غرام من وسط فوجس بروسكاور بحسب إرشادات الشركة المصنعة، ثم يعقم بالموصدة، وبعدها يوزع على أنابيب معقمة (٣ مل في كل أنبوب)، ثم تحضن الجراثيم في الوسط ضمن درجة حرارة ٢٥ مئوية لمدة ٢٤ ساعة، وبعد ذلك:

١- يضاف نقطة من محلول الكرياتين.

٢- يضاف ٠،٥مل من مزيج (جزء من ماءات البوتاسيوم KOH 40% مع ثلاثة أجزاء من محلول ألفانفتول أمين ٥%).

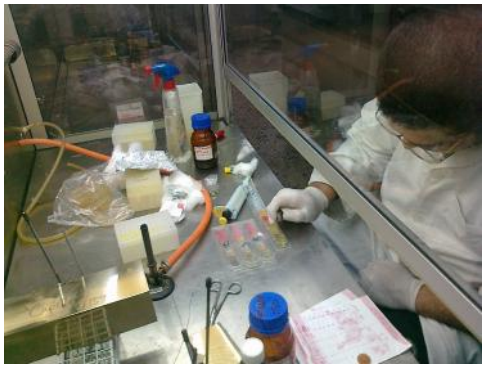
٣- يحرك الوسط و يترك لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة، فإذا تشكل اللون الأحمر تكون النتيجة إيجابية(Quinn *et al.*,1999)، الشكل (٢٥).

٣-٥-٢-١١-٣ المجموعة التشخيصية للعصيات سلبية الغرام:

Biochemical Identification KB002:

وهذه المجموعة BIKB002 من إنتاج شركة HiMedia المخصصة لتفريق العصيات السلبية الغرام، وقد تم زرع العزولات من جراثيم الإيروموناس على المساطر باتباع توصيات الشركة المصنعة، ومن ثم الحكم على النتائج من خلال التغير اللوني الذي طرأ على هذه المسطر بعد عملية التحضين لمدة ٢٤ ساعة على الدرجة ٢٥ مئوية، وإضافة الكواشف الخاصة بكل اختبار، بعد مطابقتها بالنشرة المرفقة للنتائج، والشكل (٢٦) يوضح ذلك.

مساطر المجموعة قبل الزرع



إضافة الكواشف الخاصة بعد الزرع

الشكل (٢٦) : المجموعة التشخيصية BIKB002 **للعصيات سلبية الغرام**

٣-٦- اختبار الحساسية للصادات: Antibiotic Sensitivity Test

أُجري اختبار الحساسية باستخدام وسط أغار موللر- هنتون وبطريقة الانتشار، بعد تحضير معلق من كل عزلة جرثومية، ثم أخذ من المعلق ٠،١مل ووزع على الوسط بشكل منتظم، ووضعت أقراص المضادات الحيوية، و حضنت الأطباق لمدة ٢٤ ساعة في االدرجة٢٥مئوية ، ثم تم قياس مناطق تثبيط النمو للجراثيم، وقورنت بالمعدلات القياسية حسب توصيات الشركة المنتجة للأقراص، والجدول رقم (٦) يوضح الفعالية القياسية للصادات المستخدمة في الدراسة حسب أقطار منع النمو بالمليمتر حسب شركة Bioanalyse .

وأجري اختبار حساسية العزولات الجرثومية للمضادات الحيوية باستخدام أقراص الانتشار المشبعة بالمضاد الحيوي التتراسيكلين Te ٣٠ ميكروغرام/القرص، والجنتامايسين Gn ١٠ ميكروغرام/القرص، والدوكسي سايكلين Doc ٣٠ ميكروغرام/القرص، والأمبيسلين Am ١٠ ميكروغرام/القرص، والسيفالكسين Clx ٣٠ ميكروغرام/القرص، والفلورفينيكول Fl ٣٠ ميكروغرام /القرص والانروفلوكساسين Enr ١٠ ميكروغرام /القرص والسيبروفلوكساسين CIP ٥

الجدول (٦): تراكيز أقراص المضادات الحيوية وبيانات تقييم الحساسية الخاصة بها

نوع المضاد الحيوي	تركيز المضاد الحيوي ميكروغرام/قرص	قطر منع النمو(ملم)		
		حساس	متوسط الحساسية	مقاوم
التتراسيكلين Te	٣٠	≥١٨	١٧ ~١٤	≤١٣
الجنتامايسين GN	١٠	≥٢١	٢٠ ~١٢	≤١١
دوكسي سايكيلن Doc	٣٠	≥١٨	١٧ ~١٤	≤١٣
الكوليستين Col	١٠	≥١١	١٠	≤٩
أمبيسلين Am	١٠	≥١٥	١٤	≤١٣
سيفالكسين CLX	٣٠	≥١٦	١٥ ~١١	≤١٠
النتروفوران F	٠,٣	≥١٥	١٠ ~ ١٤	≤٩
فلورفينيكول FL	٣٠	≥١٨	١٧ ~١٣	≤١٢
أنروفلوكساسين Eno	١٠	≥٢٤	٢٣ ~١٤	≤١٣
سيبروفلوكساسين CIP	٥	≥٢٦	٢٥ ~١٧	≤١٦
أريثرومايسين E	١٥	≥٢٣	٢٢ ~١٤	≤١٣
فلوماكوين FLM	٣٠	≥١٥	١٤ ~١٠	≤١١
نيومايسين N	٣٠	≥١٤	١٣ ~٩	≤٨
سلفاديازين + ثريميثوبريم Sxt	٢٥	≥١٦	١٥ ~١١	≤١٠

وذلك بحسب شركة Bioanalyse.

ميكروغرام /القرص، والأريثرومايسين ١٥ ميكروغرام /القرص، و الفلوماكوين Flm ٣٠ ميكروغرام /القرص، والنيومايسين N ٣٠ ميكروغرام /القرص، والنتروفوران F ٠,٣ ميكروغرام /القرص، والكوليستين Col ١٠ ميكروغرام /القرص، و السلفاديازين + ثريميثوبرم Sxt ٢٥ ميكروغرام /القرص من شركة Bioanalyse ، وكان التقييم للحساسية على ثلاثة مستويات: حساسة، ومتوسطة الحساسية ومقاومة بناء على قطر مناطق منع النمو التي لوحظت، وقد أجريت لكل نوع جرثومي تم عزله من جراثيم الإيروموناس وفقاً لدليل شركة Bioanalyse.

٣-٧ معالجة مرض التهاب الجلد الأحمر:

٣-٧-١ أحواض التربية :

الشكل (٢٧): تحضير مستلزمات المعالجة التجريبية.

تم تخصيص خمسة أحواض زجاجية من شركة (Nisso) اليابانية بسعة ١٠٠ لتير في مخبر تربية وأمراض الأسماك في كلية الطب البيطري لإجراء معالجة تجريبية لأسماك الكارب المصابة بمرض التهاب الجلد الأحمر ، وتم ضبط المؤشرات البيئية اللاحيوية لتكون(٢٣± ٢) درجة مئوية درجة حرارة الماء، ودرجة باهاء pH (٧,٥–٨) ودرجة انحلال أوكسجين DO عند(٧ ±١) ملغ / ليتر، وقد تمت المراقبة بشكل يومي لدرجة الحرارة وقياس درجة الباهاء pH بجهاز قياس من شركة TAO اليابانية (Mohamad *and* Abasali, 2010) ، وقد صممت جداول ورقية لتسجيل هذه البيانات دورياً ولمرتين في اليوم الواحد.

٣-٧-٢- الأسماك المختبرة :

تم اختيار ٥٠ سمكة بمتوسط وزن (٥٠٠±١٠٠غ) مصابة بالتهاب الجلد الأحمر من منطقة كازو، وقد نقلت إلى المخبر في كلية الطب البيطري في أكياس نايلون مملوءة بماء المزرعة مضاف إليها الأوكسجين، وقد قسمت إلى قسمين:

الشكل (٢٨): أحواض تربية الأسماك التجريبية

القسم الأول مكون من (٢٥) سمكة مصابة بالمرحلة الابتدائية للمرض، وكانت القرحات على الأسماك قرحات أولية فقط وقد وزعت على خمسة أحواض بواقع ٥ أسماك في الحوض، والقسم الثاني مكون من ٢٥ سمكة مصابة بمرض التهاب الجلد الأحمر بمراحل ثانوية ومتقدمة من المرض، وعليها كل أنواع القرحات الأولية والثانوية والعميقة، وبكثافة قرحات متشابهة تقريباً، وقد وزعت على الأحواض الخمسة ذاتها بواقع ٥ أسماك للحوض الواحد، وبذلك احتوت الأحواض التجريبية الخمسة على(١٠) أسماك، منها ٥ أسماك مصابة بالمرحلة الأولى للمرض بواقع ٥ أسماك للحوض، ومضاف لها ٥ أسماك مصابة بالمراحل الثانوية والمتقدمة للمرض.

تركت الأسماك لمدة ٥ أيام في الأحواض للتكييف بتطبيق ظروف متماثلة على كل الأحواض، وتقديم الخلطة العلفية العلاجية الاختبارية.

٣-٧-٣- تحضير العلف المقدم وإضافة المادة الدوائية:

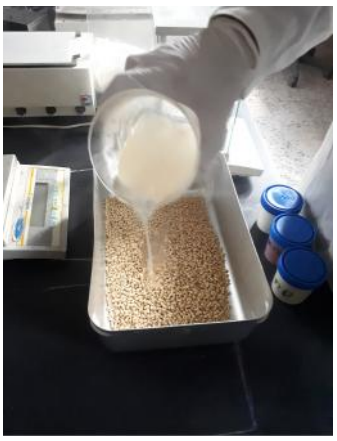
قدم لأسماك المجموعات علف مصنع من علف تجاري مناسب، وأضيف لهذا العلف مادة الجيلاتين التي تخلط معه، حيث يمكن أن تضاف ضمنها المادة العلاجية المراد تجربتها قبل تقسية الجيلاتين بالتبريد، ومن ثم قدم لأسماك التجربة خلال فترة التجربة كلها علف مصنع مكون من علف تجاري مضاف له الجيلاتين، وهو العلف نفسه الذي قدم في مرحلة التعويد، ويختلف من مجموعة إلى أخرى بالإضافات التي أضيفت إلى هذا الجيلاتين.

خطوات تحضير العلف المصنع:

١. تمت حل ٣٠ غ من مادة الجيلاتين غير المنكه في ٥٠٠ مل ماء يغلي.
٢. تمت إضافة ٣٠٠ غرام من العلف التجاري إلى ١٥٠مل ماء مع التحريك حتى الحصول على معلق ناعم، وذلك عند درجة الغرفة.

الشكل (٢٩):
تحضير الجل المضاف إلى الخلطات التجريبية

٣. صب محلول الجيلاتين الساخن على المعلق الغذائي مع التحريك.
٤. تمت إضافة المواد الدوائية المراد تجربتها مع انخفاض درجة حرارة المزيج إلى درجة حرارة الغرفة.
٥. تم تحضير سطح بلاستيكي مبطن بطبقة من الألومنيوم، وتم صب الجيلاتين عليها



الشكل (٣٠):
إضافة الجيل الحاوي على المواد التجريبية إلى المواد العلفية

بثخانة ٣ سم، ووضع الصحن في البراد لتقسية الجيلاتين

٦. تم أخذ الكمية المناسبة للاستهلاك من البراد، وتمت تجزئته إلى مكعبات صغيرة بأبعاد ٢ × ٢ × ٢ ملم تقريباً.

وأعدت جداول لتقييم المعالجة، ومعرفة تأثير المعالجة في الحالة الصحية للسمكة.

٣ -٧ – ٤ - المجموعات التجريبية:

قسمت الأسماك المختبرة إلى ٥ مجموعات، وفق ما يلي:

٣-٧-٤-١المجموعة الأولى:

تعدّ الشاهد أسماك تمت تغذيتها على علف عادي، أضيف له جيلاتين لايحوي إضافات دوائية أو علاجية مساعدة، ويعدّ هو المادة الحاملة للمادة الدوائية في المجموعات الأخرى.

الشكل (٣١): مستلزمات تحضير الخلطات العلاجية التجريبية

٣-٧-٤-٢- المجموعة الثانية:

تمت تغذية الأسماك على العلف العادي، وأضيف له جيلاتين حاوٍ على الفلورفينكول، ومقدّم بجرعة ٣٠ملغ / كغ وزن حي، وتم تقديم المضاد الحيوي بطريقة إضافة الجيلاتين.

٣-٧-٤-٣- المجموعة الثالثة:

تمت تغذية الأسماك على العلف العادي، وأضيف له جيلاتين حاوي فيتامين A بمقدار ٠,٥غ / كغ علف وأوكسيد الزنك بمقدار ٢٥٠ملغ / كغ علف بحسب (Wang *and* wang, 2015)، وتم تقديم المواد المضافة بطريقة إضافة الجيلاتين.

الشكل (٣٢) : تقدير وتقديم العلف العلاجي إلى المجموعات التجريبية.

٣-٧-٤-٤- المجموعة الرابعة:

تمت تغذية الأسماك على العلف العادي، وأضيف له جيلاتين حاوي على الفلورفينكول، وتم تقديم المضاد الحيوي بطريقة إضافة الجيلاتين، وأجري مغطس برمنغنات للأسماك بتركيز ١٠ملغ / ليتر لمدة نصف ساعة.

٣-٧-٤-٥- المجموعة الخامسة:

تمت تغذية الأسماك على العلف العادي، وأضيف له جيلاتين حاوٍ على الفلورفينكول، وفيتامين A ٠,٥غ / كغ علف، وأوكسيد الزنك بتركيز ٢٥٠ملغ / كغ علف، وأجري مغطس برمنغنات البوتاسيوم للأسماك.

وقدم العلف بنسبة 1% من وزن الجسم الحي للأسماك والحاوي على نسبة بروتين 22%، ومن ثم تم تطبيق المضاد الحيوي (الفلورفينكول) على المجموعات ٢ و ٤ و ٥ بجرعة ٢٠ملغ /كغ وزن حي، مع معالجات مساعدة أخرى تمثلت بإضافة فيتامين A بواقع ٠,٥غ / كغ علف جاهز وأوكسيد الزنك ZnO بواقع ٢٥٠ملغ / كغ علف لكل من المجموعات ٣ و ٥، واستخدمت

مغاطس برمنغنات البوتاسيوم بتركيز ١٠ ملغ /ليتر لمدة ٣٠دقيقة كإجراء مساعد للمجموعات ٤ و٥، وبقيت المجموعة ١ بدون أية معالجات كشاهد.

٣-٧-٥- تقييم المعالجة:

قيمت المعالجة قبل بدء التجربة وبعد انتهائها خلال ١٠ أيام، من خلال تقييم حالة القرحات، ومن ثم تم احتساب عدد القرحات الموجودة على كل الأسماك في الحوض قبل المعالجة (بعد مرحلة التعويد)، وكذلك بعد المعالجة، وكل قرحة دخلت في مرحلة الشفاء لم يتم احتسابها في الأسماك الشافية، وتلاحظ القرحات الشافية على شكل ندبات بلون أسود رمادي. وكثيراً ما يؤدي التقلص الشديد لكولاجين نسيج الندبات إلى حدوث تشوهات شديدة، والتي تقلل من القيمة الاقتصادية لهذه الأسماك (Fijan, 1972)، وبذلك فقد قيس مدى الشفاء المتحقق بانخفاض عدد القرحات بدخولها في مرحلة الشفاء الظاهر عند فحص الأسماك، وعلامات الاندمال، وحسبت النسبة المئوية لانخفاض عدد القرحات في كل مجموعة (Fijan, 1972).

٣- ٨ - الدراسة الإحصائية :

استخدم اختبار T (Independent sample T test) لدراسة وجود فروق معنوية لمستويي دلالة ٥% و ١% بين متوسطات عدد القرحات في المجموعات الاختبارية قبل المعالجة وبعدها، وقد استخدم البرنامج الإحصائي (الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية) (SPSS, 2008) لمقارنة النتائج إحصائياً، وتحليلها.