تضخيم كل من المورثات *tyv* و*prt* و*invA* لتحديد النمط المصلي التيفي ونظير التيفي لعزلات سلمونيلا معزولة من عينات غذائية

ميرنا برصوم[1] و ابتسام حمد[2] و بسام البلعة[3]

[1] قسم علم الحياة النباتية ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية
[2] قسم العلوم البيئية ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية
[3] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية ــ هيئة الطاقة الذرية السورية ــ سورية

تاريخ الإيداع 2011/07/13
قبل للنشر في 2011/10/17

الملخّص

الحمّى التيفية والنظيرة التيفية مرضان يسببان العديد من الوفيات سنوياً، يعدُّ العامل الممرض المسبب لهما هو النّمط المصلي التيفي *Salmonella typhi* والنّمط المصلي نظير التيفي *Salmonella paratyph* على التوالي. لا بدّ من تمييز هذين النمطين المصليين الممرضين عن غيرهما من الأنماط المصلية الأقل إمراضية للإنسان، طُبّقت في هذا العمل إحدى تقانات البيولوجيا الجزيئية في تحديد هذين النمطين المصليين لعزلات تمّ الحصول عليها من عينات غذائية. فقد جُمعت 65 عينة غذائية تتضمن عينات لحم دجاج وحليب وجبنة من ريف دمشق. زرعت هذه العينات على أوساط تفريقية لتحديد العينات الحاوية على جراثيم السلمونيلا، ودرست الخصائص الحيوية الكيميائية والمورفولوجية لهذه الجراثيم، ومن ثمّ حُدّد النمط المصلي التيفي والنظير التيفي باستخدام التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR باستخدام ثلاثة أزواج من المرئسات صُمّمت لتضخيم ثلاث مورثات وهي *tyv* و*prt* و*invA*. تمّ في النهاية الحصول على 47 عزلة من السلمونيلا (72.3% من إجمالي العينات)، تتضمن 16 عزلة من السلمونيلا التيفية (34.04% من إجمالي عزلات السلمونيلا) و13 عزلة من السلمونيلا نظيرة التيفية (27.65% من إجمالي عزلات السلمونيلا) و18 عزلة تنتمي إلى أحد الأنماط المصلية الأخرى من السلمونيلا (38.29% من إجمالي عزلات السلمونيلا).

الكلمات المفتاحية: السلمونيلا التيفية، السلمونيلا نظيرة التيفية، وسط ليزين آيرون آغار، وسط سلمونيلا آغار، التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز.

Amplification of *invA*, *prt* and *tyv* genes to determine *serovar Typhi* and *serovar Paratyphi* for *Salmonella*.spp isolates isolated from food samples

M. Barsoum[(1)]; I. Hamad[(2)] and B. Al Balaa[(3)]

[(1)] Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria
[(2)] Department of Ecology , Faculty of Sciences, Damascus University, Syria
[(3)] Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Syria.

Received 13/07/2011
Accepted 17/10/2011

ABSTRACT

Typhoid and paratyphoid fever are two diseases responsible for the death of many people annually. The responsible pathogens for these diseases are *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi* respectively. We should differentiate between these two human pathogenetic serovars and the other serovars which are less pathogenic for human, therefore we apply one of the molecular biology techniques to determine these two serovars in isolates obtained from food samples. 65 food samples including milk, cheese and eggs samples were collected from Damascus suburb. These samples were cultured on differential media to detect the samples which contain *salmonella*.spp, then morphological and biochemical characterizes were studied, after that *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi* were determined by Multiplex PCR using three primer pairs which were designed to amplify *tyv*, *prt* and *invA* genes. Finally 47 *Salmoenella* spp. isolated were obtained (72.3% of the samples), contained: 16 *Salmonella typhi* isolates (34.04% of the *Salmonella* spp. isolates), 13 *Salmonella paratyphi* isolates (27.65% of the *Salmonella* spp. isolates), 18 *Salmonella* spp. isolates which belong to the other *Salmonella* serovars (38.29% of the *Salmonella* spp. isolates).

Key words: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, Lysine Iron Agar, *Salmonella* Agar, Multiplex PCR.

المقدمة

تصل كثير من العوامل الممرضة إلى الإنسان عن طريق الأطعمة والمشروبات الملوثة ومن أمثلتها جراثيم الـ *Escherichia coli* المسؤولة عن بعض الإسهالات الحادة، والتسمم الوشيقي الذي تسببه جراثيم الـ *Clostridium botulinum*، ومرض السلمونيلات الذي تسببه بعض الأنماط المصلية التابعة لنوع السلمونيلا المعوية *Salmonella enterica* (1)، فالسلمونيلا تلوّث الدّجاج واللّحوم والبيض والحليب والماء والأجبان والخضروات وحتى مياه الشرب. يلاحظ وجود تخصص لبعض الأنماط المصلية التابعة لجنس السلمونيلا بالنسبة إلى المضيف، فالنمط المصلي *Salmonella typhimurium* يصيب كلاً من الإنسان والحيوان ويسبب خسائر اقتصادية كبيرة في مجال المنتجات المرتبطة بالدجاج على وجه الخصوص، في حين يصيب النمط المصلي *Salmonella typhi* الإنسان فقط مسبباً له مرض الحمّى التيفية (2). تتجلى أعراض الحمى التيفية بظهور مفاجئ لحمّى مستمرة مع ألم شديد في الرأس وفقدان شهية وتشنّج بالمعدة وغثيان فضلاً عن إمساك وإسهال (3). يصل هذا العامل الممرض إلى الإنسان عن طريق الفم، ويمكن أن يصل من إنسان حامل للمرض (الحملة الأصحاء) ولكن لا تظهر عليه الأعراض (2 –5 % من الأشخاص الحاملين لها لا تظهر عليهم الأعراض، ولكن يمكن أن ينقلوا المرض إلى غيرهم نتيجة استخدام أدواتهم). كما سجلت حالات كثيرة لوصوله إلى المخبريين الذين يتعاملون مع هذه الجراثيم وحالات أخرى من وصوله إلى الإنسان عن طريق الحيوانات الحاملة لجراثيم أو منتجاتها. يعدُّ وجود 000 100 خلية جرثومية كمية كافية للإصابة، وعند وصولها إلى الإنسان تبقى بمدة حضانة 12 – 36 ساعة، وتتكاثر في الأمعاء خلال 1 - 3 أسابيع، ثمّ تنتشر إلى الكبد والمرارة والطحال ويصبح الإنتان منتشراً ويؤدي إلى تشويش الجهاز المناعي بسبب الذيفانات التي تفرزها (4). أمّا بالنسبة إلى الحمى نظيرة التيفية التي يسببها النمط المصلي *Salmonella paratyphi* فإنها تنتقل بطرائق مشابهة للحمى التيفية، وتتجلى أعراضها بأعراض مشابهة لأعراض الحمى التيفية ولكن بشكل أقل ضرراً (5).

أطلق على جراثيم السلمونيلا هذا الاسم نسبة إلى العالم دانيال سلمون عام 1885، وهي جراثيم معوية عصوية الشكل سالبة الغرام غير متبوغة وقطرها 0.7– 1.5 ميكرومتر وطولها 2- 5 ميكرومترات وهي متحركة بسياط محيطية peritrichous، كيميائية التغذية العضوية chemoorganotrophs، لاهوائية اختيارياً facultative anaerobic، معظم أنواعها تنتج كبريت الهيدروجين، ولا تنتج الاندول، وتخمّر الغلوكوز، ولا تنتج اليوريا، وتستخدم السيترات كمصدر للكربون (6). تنتمي إلى Gamma proteobacteria الذي يقع ضمن شعبة Proteobacteria وهي من رتبة المعويات Enterobacteriales وفصيلة المعويات Enterobacteriaceae، يحتوي جنس السلمونيلا

على نوعين هما *S. enterica* و*S. bongori*، ويحتوي النوع *S. enterica* على ستة تحت أنواع (7). النمطان المصليان *S.enterica serotype paratyphi* و *S.enterica serotype typhi* يقعان ضمنها.

تناولت كثير من البحوث محاولات لتحديد وجود السلمونيلا في العينات الغذائية باستخدام الطرائق التقليدية التي تعتمد على الأوساط التفريقية والخصائص الحيوية الكيميائية (19)، ولكنها تحتاج إلى مدة زمنية طويلة، فضلاً عن أنّ النتائج ليست دقيقة دائماً مما يحتم ضرورة اللجوء إلى تقانات البيولوجيا الجزيئية لتحديد النمط المصلي لجراثيم السلمونيلا الموجودة (8، 20). وقد تناولت بحوث عديدة هذا الموضوع بتضخيم مورثة واحدة مميزة عند جنس السلمونيلا ومن ثم تضخيم مورثة مميزة عند النمط المصلي لتحديده، وتطبيق أكثر من تفاعل سلسلي للبوليميراز (9، 20)، ولكننا باستخدام التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR فنحن نضخم أكثر من مورثة بالوقت نفسه ومن ثم سيكون هناك اختصار للوقت والمال (10).

هدف هذا العمل إلى جمع عينات غذائية وزراعتها على وسط ليزين آيرون آغار ووسط سلمونيلا آغار اللذين يتميزان بأنهما يغنيان عن كثير من التفاعلات الحيوية الكيميائية التي نحتاج إليها للتقصي عن جراثيم السلمونيلا ومن ثم عُزلت جراثيم السلمونيلا (11، 15). وحُدّدت صفاتها المورفولوجية والحيوية الكيميائية، وفي النهاية حُدّد النمطان المصليان: السلمونيلا التيفية *Salmonella typhi* والسلمونيلا نظيرة التيفية *Salmonella paratyphi* بطريقة سريعة، وذلك باستخدام التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR (10، 12، 13، 14) لتحديد أيهما أكثر فعالية في تحديد الأنماط المصلية.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات

جُمعت عينات غذائية مختلفة تضمنت 23 عينة من الحليب من بائعين متجولين، و11 عينة من الجبنة غير معلبة، و31 عينة من لحم الدجاج نيئ من مناطق مختلفة في ريف دمشق. وبهذا فقد بلغ مجموع العينات 65 عينة.

عزل السلمونيلا

الزراعة على أوساط تفريقية وتحديد الصفات الحيوية الكيميائية والمورفولوجية

زُرعت هذه العينات (65 عينة) في البداية على وسط ليزين آيرون آغار Lysine Iron Agar (BBL^{TM}) الذي يتميز بأنه وسط تفريقي Differential Medium لجراثيم الأمعائيات (15). وقد زُرعت العينات أيضاً على وسط سلمونيلا آغار *Salmonella* Agar

(Biokar) الذي يتميّز بأنه وسط تفريقي للسلمونيلا (11). كانت الزراعة على هذين الوسطين ذات أهمية كبيرة في اختصار كثير من التفاعلات الحيوية الكيميائية التي تجرى عادة لتحديد جراثيم السلمونيلا (اختبار تخمر اللاكتوز، والإندول، واليورياز، وإطلاق غاز كبريت الهيدروجين ونزع الكربوكسيل). أُجري اختبار الكاتالاز الذي يميّز الجراثيم الهوائية الإجبارية والهوائية اللاهوائية الاختيارية موجبة الكاتالاز عن الجراثيم اللاهوائية سالبة الكاتالاز، بوضع قطرة من الماء الأوكسجيني على شريحة زجاجية ومن ثمّ وضع جزء من المستعمرة الجرثومية، يعدُّ الاختبار موجباً في حال ظهور فقاعات وسلبياً في حال عدم ظهورها. وأجري اختبار الأوكسيداز الذي يفرق جراثيم الأمعائيات Enterobacteriaceae سالبة الأوكسيداز عن غيرها من العصيات سالبة الغرام موجبة الأوكسيداز، حيث تنمى المستعمرة الجرثومية مدة 24 ساعة على وسط صلب ومن ثمّ توضع على المستعمرة قطرة من 1% ألفانفتول في الغول الإيتيلي Alpha nephtol/ethanol وفوقها قطرة من 1% حماضات باراأمينودي ميتيل أنيلين Para amino dimethyle aniline (16)، ومن ثمّ تُلوَّن بلون أزرق في حال كانت الجراثيم موجبة الأوكسيداز. أُجري أيضاً تلوين غرام للمستعمرات جميعها التي أعطت نتيجة إيجابية على الأوساط التفريقية لدراسة خصائصها المورفولوجية ومشاهدتها بالعدسة الغاطسة بالمجهر الضوئي (Olympus DP70). أمّا بالنسبة إلى دراسة الحركة فكانت بطريقة القطرة المعلقة، وشُوهدت بالمجهر الضوئي أيضاً (Olympus DP70).

تحديد النمط المصلي

التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز

صُمِّمتْ ثلاثة أزواج نوعية من المرئسات بالاعتماد على التسلسل النيكليوتيدي للمورثات المأخوذ من البنك المورثي للسلمونيلا. الزوج الأول مسؤول عن تضخيم مورثة الـ *inv A* (الجدول 1)، هذه المورثة خاصة بجنس السلمونيلا .*Salmonella* spp وغير موجودة عند أي جنس آخر. وهي ترمز بروتيناً أساسياً من مكونات آلة الحقن التي تستخدمها جراثيم السلمونيلا في حقن العوامل الممرضة عند استخدامها النمط الإفرازي الثالث المميّز لها Type three secration system فضلاً عن أنّ له دوراً في اجتياح السلمونيلا للخلايا الظهارية في أثناء الإصابة. أما الزوج الثاني فهو مسؤول عن تضخيم مورثة الـ *prt* (الجدول 1)، التي ترمز الأنزيم المسؤول عن صنع سكر الباراتوز (paratose synthase)، وقد كان يطلق على هذه المورثة سابقاً *rfbS*، وهذه المورثة موجودة عند كل من النمط المصلي *Salmonella typhi* والنمط المصلي *Salmonella paratyphi* وغير موجودة عند أي نمط مصلي آخر من جنس السلمونيلا. ولكي يتم التفريق بين النمطين المصليين السابقين استُخدم الزوج الثالث من المرئسات المسؤول عن تضخيم مورثة مميّزة في جينوم جراثيم السلمونيلا التيفية، وهي المورثة *tyv* (الجدول 1)، وهذه المورثة ترمز الأنزيم المسؤول عن

صنع سكر التيفيلوز (CDP tyvelose-2-epimerase)، وناتج تضخيم هذه المورثة يظهر فقط في حال كانت العزلة هي جراثيم السلمونيلا التيفية *Salmonella typhi* (10).

الجدول (1) المرئسات الست المستخدمة في التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز PCR.

المرئسة	التسلسل النيكليوتيدي للمرئسة	الطول
***Inv A* F**	GTA TTG TTG ATT AAT GAG ATC CG	23
***Inv A* R**	ATA TTA CGC ACG GAA ACA CGT T	22
***Prt* F**	CTT GCT ATG GAA GAC ATA ACG AAC C	25
***Prt* R**	CGT CTC CAT CAA AAG CTC CAT AGA	24
***Tyv* F**	GAG GAA GGG AAA TGA AGC TTT T	22
***Tyv* R**	TAG CAA ACT GTC TCC CAC CAT AC	23

حُضّر مزيج التفاعل للعينة الواحدة كما يأتي: 2.5 ميكرولتر من الواقي (Buffer 10 X) الحاوي على 100 ميلي مولر Tris – HCl (pH 8.3)، 1 ميكرولتر $MgSO_4$ (1 ميلي مولر)، 0.5 ميكرولتر dNTPs (0.2 ميلي مولر)، و0.2 ميكرولتر من أنزيم البوليميراز، 1 ميكرولتر من كل من المرئسات الـ 6 السابقة (25 بيكومولاً/ ميكرولتر) وأخيراً أُكمل حجم المزيج إلى 20 ميكرولتراً بإضافة 9.3 ميكرولتر من الماء المقطر والمعقم.

حُضّرت أيضاً العزلات لإجراء التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR، حيث زرعت هذه العزلات في أنابيب سعة 50 مل تحتوي على 3 مل من الوسط الجرثومي السائل (LB) وحضنت بالدرجة 37 ْم مدة 24 ساعة، ومن ثمّ أُخذ 10 ميكرولتر من كل مزرعة جرثومية في أنبوب إيندورف Eppendorf، ووضعت في حمام مائي يغلي مدة عشر دقائق بهدف تفجير الخلايا، ومن ثم خروج المادة النووية DNA من الخلايا وتحضير التركيز 50X.

ثمّ إضافة 5 ميكرولتر من التركيز 50X لكل من العينات السابقة إلى مزيج التفاعل السابق (20 ميكرولتراً) فالحجم النهائي للتفاعل هو 25 ميكرولتراً. هذا فضلاً عن استخدام كل من الماء وجراثيم البروسيلا الضأنية *Brucella melitensis* 16M المأخوذة من مخبر الميكروبيولوجيا والمناعيات في قسم التقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية كشاهدين سلبيين.

وبعد الانتهاء من تحضير مزيج التفاعل أُخضع المزيج إلى المراحل الآتية: التمسخ الأولي Initial Denaturation في الدرجة 95°م مدة 5 دقائق، يتبع ذلك بتكرار دورة مؤلفة من ثلاث مراحل أساسية 35 مرة وهذه المراحل هي: 1- التمسخ Denaturation في الدرجة 94°م مدة دقيقة. 2- الالتحام Annealing بالدرجة 60°م مدة دقيقة. 3- الاستطالة Extension بالدرجة 72°م مدة دقيقة، ينتهي التفاعل بدورة أخيرة في

الدرجة 72°م مدة 10 دقائق. تم بعدها ترحيل ناتج التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR على هلامة الأغاروز 1.5% فضلاً عن ترحيل واسم الدنا المعياري (GeneRuler™ 100 bp - fermentase). في النهاية حُفظت العينات التي حُدّد نمطها المصلي في الدرجة - 60°م لكي نحافظ عليها من التلوث أكبر مدة ممكنة.

النتائج والمناقشة

من خلال الزراعة على وسط ليزين آيرون آغار تبيّن أنّه من بين 65 عينة التي جُمعت كان هناك 55 عينة (24 عينة من الدجاج، 23 عينة من الحليب، 8 عينات من الجبنة) أي 84.6% من إجمالي العينات تحتوي جراثيم السلمونيلا *Salmonella* spp.، فقد كانت المستعمرات الإيجابية شفافة، مع مركز عاتم أو من دونه، ويبقى الوسط محافظاً على لونه البنفسجي، وكان هذا متوافقاً مع الشكل النموذجي لمستعمرات السلمونيلا على هذا الوسط، كما وُصّفت سنة 2002 من قبل Forbes وSahm، فهذا الوسط يحتوي على مشعر للحموضة وهو البروموكريزول Bromocresol الذي يعطي لوناً أصفرَ في الوسط الحمضي في حين يعطي في الوسط المعتدل والقلوي اللون البنفسجي كمؤشر على قدرة المستعمرة على نزع زمرة الكربوكسيل من الحمض الأميني ليزين lysine ومن ثمَّ قلونة الوسط،، ويحتوي أيضاً على سترات الحديد التي تمكننا من تمييز الجراثيم التي تطلق غاز كبريت الهيدروجين H_2S من خلال المراكز العاتمة للمستعمرات (15) (الشكل 1).

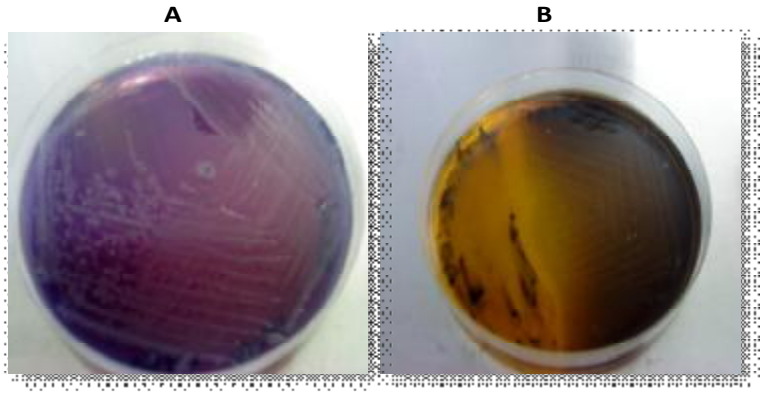
أمّا بالنسبة إلى الزراعة على وسط سلمونيلا آغار فتبيّن أنّه من بين 65 عينة التي جُمعت كان هناك 47 عينة (21 عينة من الدجاج، 18 عينة من الحليب، 8 عينات من الجبنة) أي 72.3% من إجمالي العينات تحتوي جراثيم السلمونيلا *Salmonella* spp.، فقد كانت المستعمرات الإيجابية شفافة، مع مركز عاتم أو من دونه، أمّا بالنسبة إلى الوسط فقد تحول إلى اللون الأصفر حول المستعمرات، وكان ذلك متوافقاً مع الشكل النموذجي لمستعمرات السلمونيلا على هذا الوسط، كما وُصّفت أول مرة سنة 1978 من قبل Hoffmann وÖnöz، وأيضاً تمّ تأكيد ذلك من قبل منظمة تحديد المواصفات القياسية ISO سنة 2004. فهذا الوسط يحتوي على الأملاح الصفراوية Bile salts والأخضر اللماع Brilliant green اللذين يثبطان نمو الجراثيم موجبة الغرام، وسترات الحديد تمكن من تمييز الجراثيم التي تطلق غاز كبريت الهيدروجين من خلال المراكز العاتمة للمستعمرات، ويمكن من خلال مؤشر الحموضة الموجود في الوسط تمييز جراثيم السلمونيلا غير المخمرة للاكتوز من خلال لون المستعمرات الأصفر الشفاف ولون الوسط الأصفر حول المستعمرات (11) (الشكل 1).

مما سبق يلاحظ بأنّه لا حاجة لاختبار كل من إطلاق غاز كبريت الهيدروجين، واختبار تخمر اللاكتوز، واختبار إفراز أنزيم الديكربوكسيلاز. أمّا بالنسبة إلى اختبار

اليورياز الذي يميّز الـ *Salmonella* سالبة اليورياز عن الـ *Proteus* والـ *Klebsiella* موجبة اليورياز، فمن الممكن أن يُستغْنى عنه بتمييز كل من مستعمرات الـ *Proteus* التي تبدو على وسط سلمونيلا آغار بلون الصدأ، ومستعمرات الـ *Klebsiella* التي تبدو بشكل مستعمرات رمادية مزرقة مع ترسبات زرقاء مائلة للبنفسجي على المحيط. كما يمكن الاستغناء عن اختبار الإندول الذي يميز الـ *Salmonella* عن الـ *Proteus* والـ *E.coli*، الـ *Proteus* تُميّز كما سبق، أمّا الـ *E.coli* فإنها تظهر بشكل مستعمرات بنفسجية مع هالة زرقاء (11، 15).

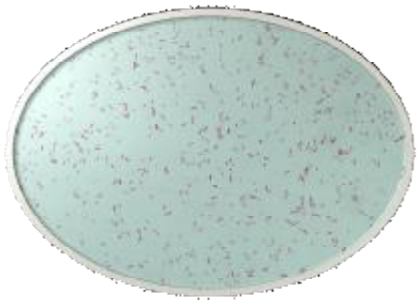
ولكن كان هناك 8 عينات (12.3% من إجمالي العينات) أعطت نتيجة إيجابية على وسط ليزين آيرون آغار ونتيجة سلبية على سلمونيلا آغار، متضمنة 3 عينات من الدجاج و5 عينات من الحليب (الجدول 2).

أجريت الاختبارات اللاحقة على العزلات جميعها (55 عزلة متضمنة العزلات الثماني التي كانت سلبية على وسط سلمونيلا آغار)، كانت جميعها موجبة الكاتالاز وسالبة الأوكسيداز، مما يؤكد أنّ العزلات جميعها تنتمي إلى فصيلة الأمعائيات. وقد كانت نتيجة صبغة غرام للعزلات جميعها هي عصيات سالبة غرام، متفاوتة في الطول (الشكل 2). أمّا بالنسبة إلى دراسة الحركة بواسطة القطرة المعلقة فقد تبيّن أن العزلات جميعها تتحرك بشكل دائري لوجود سياط محيطية. وذلك متوافق مع ماجاء في دليل بيرجي Bergey's "manual of determinative bacteriology" عن تحديد جراثيم السلمونيلا منذ عام 1923 الذي لم يتغيّر في الإصدارات الجديدة منه (1957 و1974 و1994 و2000) (الجدول 2).



الشكل (1) شكل المستعمرات على الأوساط التفريقية.

A:إحدى عزلات السلمونيلا على وسط ليزين آيرون آغار B:إحدى عزلات السلمونيلا على وسط سلمونيلا آغار.



الشكل (2) تلوين غرام لإحدى عزلات السلمونيلا، وهي عصيات سالبة الغرام.

أظهر التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR العزلات التي تنتمي إلى النمط المصلي *Salmonella typhi*؛ وذلك من خلال العصابات الثلاث التي أظهرها ناتج الترحيل على هلامة الأغاروز، وهي بالأوزان الجزيئية الآتية: عصابة طولها 615 زوجاً نكليوتيدياً ((615 base pair (bp) وهي ناتج تضخيم المورثة *tyv*، وعصابة بطول 259 زوجاً نكليوتيدياً ((259 base pair (bp) ناتج تضخيم المورثة *prt*، فضلاً عن العصابة التي طولها 373 زوجاً نكليوتيدياً ((373 base pair (bp) وهو ناتج تضخيم المورثة *inv*. وحُدّد أيضاً النمط المصلي *Salmonella paratyphi*، وذلك من خلال العصابتين اللتين أظهرهما ناتج الترحيل على هلامة الأغاروز لكل من المورثتين *prt* و*inv*. وذلك بالمقارنة مع Karami الذي قام بإجراء هذا التفاعل سنة 2007 وأكد أنّ هذه النتائج تحدد بشكل دقيق الأنماط المصلية السابقة (10). أمّا في حال كانت عزلة السلمونيلا خلافاً لهذين النمطين فقد أُشير إلى أنها تنتمي إلى أحد الأنماط المصلية *Salmonella* spp. وذلك من خلال العصابة الوحيدة التي شُوهدت عند الترحيل على هلامة الأغاروز للمورثة *inv*. وهذا يتوافق مع العصابة الوحيدة المميّزة للجنس التي ظهرت عندما استخدم Gallegos سنة 2009 مرئسات لتضخيم هذه المورثة المميّزة لجنس السلمونيلا (الشكل 3).

تبيّن أنّه من بين 65 عينة التي جُمعت كان هناك 47 عينة (21 عينة من الدجاج أي 67.74% من إجمالي عينات الدجاج، 18 عينة من الحليب أي 78.26% من إجمالي عينات الحليب، 8 عينات من الجبنة أي 72.72% من إجمالي عينات الجبنة) أي 72.3% من إجمالي العينات تحتوي جراثيم السلمونيلا *Salmonella* spp. (الجدول 2). وقد كانت هذه النتيجة متوافقة مع النتيجة على وسط سلمونيلا آغار، ومتخالفة مع النتيجة على وسط ليزين آيرون آغار (الجدول 3)، فوسط ليزين آيرون آغار يحتاج إلى تفاعلات حيوية كيميائية إضافية لكي تُشخص جراثيم السلمونيلا عن طريقه لأنّه لا يمكننا من تمييز كل من جراثيم الـ *E.coli* والـ *Klebsiella* والـ *Proteus* عن جراثيم السلمونيلا كما في وسط سلمونيلا آغار، ومن ثمّ لا بدَّ من إجراء كل من اختبار اليورياز والإندول فضلاً عمّا تمّ إجراءه. وذلك بالمقارنة بين ما يحدده هذا الوسط ودليل بيرجي Bergey's manual

of determinative bacteriology عن تحديد جراثيم السلمونيلا. وقد توصل Gallegos سنة 2009 إلى نتائج مشابهة فيما يتعلق بالنتائج الإيجابية باستخدام الأوساط التفريقية والسلبية باستخدام التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR (18، 21)، ممّا يؤكد ضرورة اللجوء إلى تقانات البيولوجيا الجزيئية.

الجدول (2) أعداد العينات الحاوية على عزلات السلمونيلا ونسبها المئوية في كل اختبار.

مصدر العينات	عدد العينات	العدد الإيجابي على وسط LIA	العدد الإيجابي على وسط SA	العدد الإيجابي باستخدام الـ multi PCR
الدجاج	31	24 (%77.41)	21 (%67.74)	21 (%67.74)
الحليب	23	23 (%100)	18 (%78.26)	18 (%78.26)
الجبنة	11	8 (%72.72)	8 (%72.72)	8 (%72.72)
المجموع	65	55 (%84.6)	47 (%72.3)	47 (%72.3)

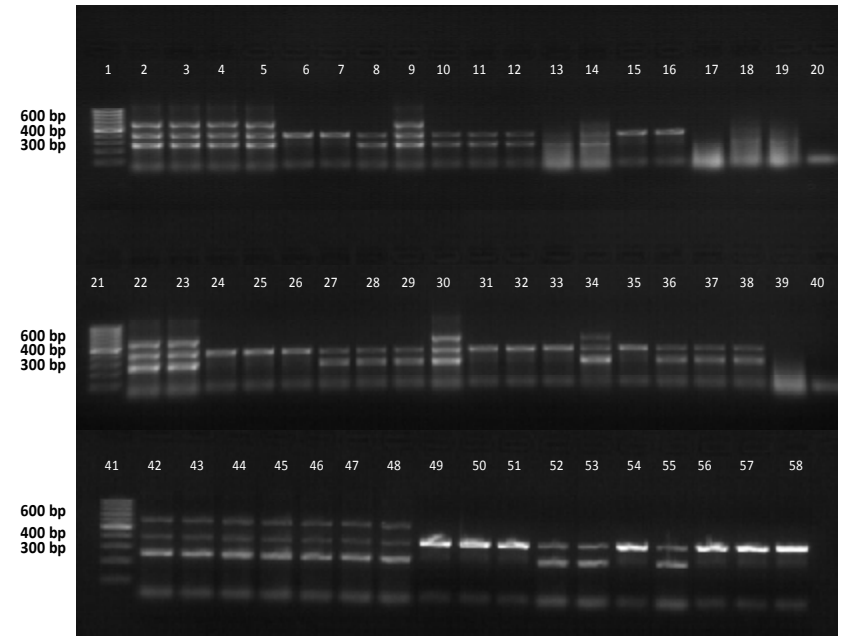
الجدول (3) أعداد العينات ونتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية والمورفولوجية والتفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR.

عدد العينات		وسط LIA	وسط SA	اختبار الأوكسيداز	اختبار الكاتالاز	تلوين غرام	دراسة حركة	multi PCR		
								invA	*prt*	*tyv*
دجاج	9	+	+	-	+	Gr -	+	+	+	+
	1	+	+	-	+	Gr -	+	+	+	-
	11	+	+	-	+	Gr -	+	+	-	-
	3	+	-	-	+	Gr -	+	-	-	-
	7	-	-	x	x	x	x	-	-	-
حليب	6	+	+	-	+	Gr -	+	+	+	+
	8	+	+	-	+	Gr -	+	+	+	-
	4	+	+	-	+	Gr -	+	+	-	-
	5	+	-	-	+	Gr -	+	-	-	-
جبنة	1	+	+	-	+	Gr -	+	+	+	+
	4	+	+	-	+	Gr -	+	+	+	-
	3	+	+	-	+	Gr -	+	+	-	-
	3	-	-	x	x	x	x	-	-	-

ملاحظة: x يعني أنّ الاختبار لم يُجْرَ، + يعني أنّ نتيجة الاختبار موجبة، - يعني أنّ نتيجة الاختبار سالبة، –Gr يعني أنّ الجراثيم سالبة غرام.

يلاحظ توزع جراثيم السلمونيلا بشكل متجانس في العينات فالنسب المئوية للجراثيم متشابهة مع فروق قليلة. أمّا بالنسبة إلى الأنماط المصلية التي حُدّدت باستخدام التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR فقد كانت على النحو الآتي: 16 عزلة من السلمونيلا التيفية أي 34.04% من إجمالي عزلات السلمونيلا (9 عزلات من عينات الدجاج أي 56.25% من إجمالي عزلات السلمونيلا التيفية، 6 عزلات من عينات الحليب أي 37% من إجمالي عزلات السلمونيلا التيفية، عزلة واحدة من الجبنة أي 6.25% من إجمالي عزلات السلمونيلا التيفية). و13 عزلة من السلمونيلا نظيرة التيفية أي 27.65% من إجمالي

عزلات السلمونيلا (عزلة واحدة من عينات الدجاج أي 7.69% من إجمالي عزلات السلمونيلا نظيرة التيفية، 8 عزلات من الحليب أي 61.5% من إجمالي عزلات السلمونيلا نظيرة التيفية، 4 عزلات من الجبنة أي 30.76% من إجمالي عزلات السلمونيلا نظيرة التيفية) و18 عزلة من جنس السلمونيلا الذي لم يُحدّد نمطه المصلي، أي 38.29% من إجمالي عزلات السلمونيلا (11 عزلة من عينات الدجاج أي 61.11% من إجمالي عزلات السلمونيلا التي لم يُحدّد نمطها المصلي، 4 عزلات من الحليب أي 22.22% من إجمالي عزلات السلمونيلا التي لم يُحدّد نمطها المصلي، 3 عزلات من الجبنة أي 16.66% من إجمالي عزلات السلمونيلا التي لم يُحدّد نمطها المصلي). (الجدول 4).



الشكل (5) الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1.5% لناتج التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR لعزلات السلمونيلا: المسار 1، 21، 41: تمثل واسم الدنا المعياري (GeneRuler™ 100 bp). المسار 4,3,2، 5، 9، 22، 23، 30، 34، 42، 43، 44، 45، 46، 47، 48: تمثل عزلات السلمونيلا التيفية: نلاحظ وجود ثلاث عصابات يقارب أطوالها (615 bp، 373 bp، 259 bp). المسار 8، 10، 11، 12، 27، 28، 29، 36، 37، 38، 52، 53، 55: تمثل عزلات السلمونيلا نظيرة التيفية: نلاحظ وجود عصابتين يقارب أطوالها (373bp، 259bp). المسار 6، 7، 15، 16، 24، 25، 26، 31، 32، 33، 49، 50، 51، 54، 56، 57، 58 تمثل عزلات السلمونيلا التي لم تحدد بأنها تيفية ولا نظيرة التيفية: نلاحظ وجود عصابة واحدة بما يقارب (373 bp). المسار 20، 40: الشاهد السلبي (الماء H_2O وجراثيم البروسيلا الضأنية *Brucella melitensis* 16M على التوالي).

الجدول (4) نتيجة التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR للأنماط المصلية المعزولة وأعدادها ونسبها المئوية في كل من عينات الدجاج والحليب والجبنة.

النمط المصلي	الجبنة	النسبة المئوية	الحليب	النسبة المئوية	الدجاج	النسبة المئوية
Salmonella typhi	1	%6.25	6	%37	9	%56.25
Salmonella paratyphi	4	%30.76	8	%61.5	1	%7.69
***Salmonella* spp.**	3	%16.66	4	%22.22	11	%61.11

يلاحظ أنّ النسبة الكبرى للنمط المصلي *Salmonella typhi* في عينات الدجاج، في حين النسبة الكبرى للنمط المصلي *Salmonella paratyphi* في عينات الحليب، أمّا بالنسبة إلى الأنماط المصلية الأخرى فقد كانت النسبة الكبرى لها في عينات الدجاج. إنّ النمطين المصليين التيفي ونظير التيفي يصيبان الإنسان بالتحديد، ويلاحظ انتشارهما في المنتجات الحيوانية التي تعدُّ إحدى الطرق لانتقال هذه الجراثيم إلى الإنسان، ومن ثمّ لابدّ من اتخاذ الإجراءات اللازمة لمنع وصول هذه الجراثيم إلى الإنسان.

الاستنتاجات

1- عُزلت جراثيم السلمونيلا التيفية من عينات غذائية، وزُرعت على أوساط تفريقية نستطيع من خلالها الاستغناء عن كثير من الاختبارات الحيوية الكيميائية، ومن ثم اختصار كثير من الوقت. وملاحظة أنّ وسط سلمونيلا آغار agar *Salmonella* من الأوساط الدقيقة في عزل السلمونيلا .*Salmonella* spp.

2- حُدّدت الأنماط المصلية بطريقة التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز، وهذه الطريقة تختصر كثيراً من الوقت، كما أنّ تحديد النمط المصلي التيفي في هذه الطريقة يتم من خلال وجود ناتج تضخيم كل من المورثتين tyv وprt، ومن ثم لا يمكن أن يعطي نتيجة إيجابية أو سلبية كاذبة، فقد أكدت العديد من البحوث أنّ استخدام التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR المعتمد على تضخيم مورثة واحدة لتحديد النمط المصلي للسلمونيلا التيفية يعطي في كثير من الحالات نتائج غير صحيحة (17).

التوصيات

1- لابدَّ من إجراء دراسات مستقبلية لاستخدام التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز PCR multi لتحديد وجود السلمونيلا في العينات الغذائية والمرضية مباشرة عوضاً عن عزل الجراثيم وتحديد نمطها المصلي بدءاً من عينات نقية كما جرى في هذا العمل. فضلاً عن استخدام هذه الطريقة في تقدير التعداد الجرثومي بالعينات.

2- السعي لتقليل زمن برنامج التفاعل السلسلي المتعدد للبوليميراز multi PCR المستخدم بهدف الوصول إلى طريقة تشخيصية سريعة للكشف عن وجود هذه الأنماط المصلية الممرضة من السلمونيلا في العينات مباشرة.

REFERENCES المراجع

1- **Colby, DS. 1985. A Synopsis, Lange Medical Publications, California, cancer, 55: 2799-803.**

2- **Keusch, GT., 2002. Salmonellosis is responsible for large numbers of infections in both humans and animals, J Med Microbiol, 52: 773-80.**

3- **Parry, CM., Hien, TT., Dougan, G., White, N., and Farrar, JJ., Typhoid fever, 2002. N Engl J Med, 347(22):1770-82.**

4- **Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, RP., Tükel, C., Akçelik, M., and Bäumler, AJ., 2006. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis, Infect Immun, 74(1):19-27.**

5- **Levine, M., Tacket, C., Sztein, M., 2003. Host-*Salmonella* interaction: human trials, Microbes Infect, (14-15):1271-9.**

6- **Zubay, G., 1989. Macmillan Publishing Company, Biochemistry – 2nd Edition, Mol Cell Biochem, 90: 27-35.**

7- **Tindall, B., Grimont, P., Garrity, G., Euzeby JP, 2005, Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*, Int J Syst Evol Microbiol, 55: 521-4.**

8- **Rall, V., Rall, R., Aragon, L., Silva, M., 2005. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry, Brazilian Journal of Microbiology, 36:147-150.**

9- **Salehi, TZ., Mahzounieh, M., Saeedzadeh, A., 2005. Detection of invA gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method, Int. J. Poult. Sci, 4: 557-559.**

10- **Karami, A., Ranjbar, R., Ahmadi, Z., and Safiri, Z., 2007. Rapid Detection of Different Serovares of *Salmonella entrica* by Multiplex PCR, Iranian J Publ Health, 36:38-42.**

11- **Önöz, E., and Hoffmann, K., 1978. Erfahrungen mit einem neuen Nährboden für die *Salmonella* – Diagnostik, Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig, 240: 16-21.**

12- **Aabo, S., Rasmussen, O., Roseen, L., Sorensen, P., Olsen, J., 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction, MoI Cell Probes, 7:71-8.**

13- **Parkhill, J., Dougan, G., James, KD., Thomson, N R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, KL., Bentley, SD., Holden, MTG., Sebaihia, M., Baker, Basham, SD., Brooks ,K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, RM., Dowd, L., White N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, TT., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, TS., Leather, S., Moule, S., Ó'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., and Barrell, BG., 2001. The complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica serovar Typhi* CT18 provides insight into the evolution of host restriction and antibiotic resistance, Nature, 413:848–53.**

14- **McClelland, M., Sanderson, KE., Clifton, SW., et al., 2004. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid, Nat Genet, 36:1268–74.**

15- **Forbes, B., Sahm. D., Weisfeld, A., 2002. Baily and Scotts microbiology, 12th ed. Mosby, inc., St.louis., 12: 798-813.**

16- **Andrews, W., 1992. Manual of food quality control microbiological analysis FAO food and nutrition paper Rev.1 Rom, 14: 1-338.**

17- **Tindall, BJ., Grimont, PAD., Garrity, GM., Euzeby JP., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol, 55: 521-24.**

18- **Gallegos, M., Morales-Loredo, A., Álvarez-Ojeda, G., Osuna-García, JA., Martínez, IO., Morales-Ramos, LH., Fratamico, P., 2009. PCR detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. From fresh beef and cantaloups, journal of food science Vol. 74: 1-5.**

19- **Wilfred Ruban, S., Thiyageeswaran, M., and Sharadha, R., 2010. Isolation and identification of *Salmonella*.spp from retail chicken meat by polymerase chain reaction, international journal of microbiological research 1, 3: 103-109.**

20- **Wattiau, P., Van Hessche, M., Schlicker, C., Vander Veken, H., and Imberechts, H., 2008. Comparison of classical serotyping and PremiTest assay for routine identification of common *Salmonella enteric serovars*, J. Clin. Microbiol, 46 (12), 4037–4040.**

21- **Kanki, M., Sakata, J., Taguchi, M., Kumeda, Y., Ishibashi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Yamasaki, W., Inoue, K., and Miyyahara, M., 2009. Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. Food Microbiol., 26 (1), 1–3.**