مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد الحادي والعشرون - المجلد الرابع - علوم الحياة - آيار 2023 م
doi.org/10.52866/esj.2021.04.21.14

عزل وتشخيص بكتريا السالمونيلا غير التيفوئيدية من الانسان ودراسة حساسيتها للمضادات الحياتية

حارث رباح أحمد ، خالد محمود حمادي
الجامعة العراقية / كلية التربية - قسم علوم الحياة

مستخلص :

شملت هذه الدراسة جمع (100) عينة براز من مرضى مصابين (أطفال وبالغين) تراوحت أعمارهم بين 4 اشهر الى50 سنة يعانون من اسهال حاد ودموي من مستشفيات مختلفة من صلاح الدين والانبار وديالى ، زرعت العينات على أوساط انتقائية واغنائية وتفريقية لغرض عزل بكتيريا السالمونيلا غير التيفوئيدية ، حيث شخصت العزلات تبعا لصفاتها الزرعية المظهرية والفحوصات الكيموحيوية والفحص بجهاز (VITEK-2) اظهرت النتائج وجود (10) عزلات تابعة لجنس السالمونيلا اثبت عائدية (5) عزلات منها لبكتريا (*S.Typhimurium*) و عزلتين لكل من بكتريا (*S.Entritidis*) و (*S.newport*) وعزلة واحدة من (*S.mbandaka*) بعد ذلك تم اجراء فحص الحساسية لـ (10) من المضادات الحياتية للعينات المعزولة اذ أظهرت بكتريا (*S.Typhimurium*) حساسية عالية و بنسبة (100٪) لكل من (Ci-profloxacin) و (Chloramphenicol) اما مضاد (Rifampicin) فقد اظهر مقاومة و بنسبة (92.40٪) اما المضادات (Cephalothin) و (Cotrioxazole) و (Ampicillin) فكانت نسبة المقاومة (84.70) في حين كانت اقل نسبيا للمضاد (Amoxicillin) و (Cotrimoxazole) و (Neomycin) بنسب (76٪ ، 69٪ ، 53٪) بالتتابع.

الكلمات المفتاحية : عزل ، السالمونيلا غير التيفوئيدية ، المضادات الحياتية .

Isolation and identification of non-typhoidal salmonella bacteria from humans and study of their sensitivity to antibiotics

Harth Rabah Ahmed ، Khalid Mahmood Hammadi

Department of biology - College of Education – Al- Iraqia University

Abstract :

This study included the collection of (100) stool samples from infected patients (children and adults) ranging in age from 4 months to 50 years suffering from acute and bloody diarrhea from different hospitals in Salah al-Din, Anbar and Diyala. where the isolates were diagnosed according to their morphological characteristics, biochemical tests and examination with VITEK-2. The results showed (10) of these isolates was *Salmonella Sp*. It was proven that (5) isolates were (*S.Typhimurium*) bacteria, two isolates of each (*S.Enteriditis*) and (*S.Newport*) and one isolate from (*S.mbandaka*), where a sensitivity test was conducted for (10) antibiotics for the isolated samples, where the bacteria (*S.Typhimurium*) showed high sensitivity (100 %) to each the antibiotic (Ciprofloxacin) and (Chloramphenicol) while the (Rifampicin)(showed resistance (92.40), while the others (Cephalothin) and (Cotrioxazole) and (Ampicillin) showed a percentage of (84.70), while it was relatively lower for the (Amoxicillin) and (Cotrimoxazole) and (Neomycin) in proportions (76, 69, 53) sequentially .

Key words: Isolation, Non-typhoidal salmonella, Antibiotics .

1 - المقدمة

يعتبر داء السالمونيلات من الامراض ذات المنشأ الحيواني و تنتقل عن طريق الغذاء في جميع مناطق العالم حيث تعتبر (*S. typhimurium*) كواحد من أكثر الانواع شيوعا والتي تسبب الأمراض المنقولة عن طريق الأغذية لدى البشر والحيوانات. [1].

تصنف (Salmonella enterica subspp) إلى أكثر من 2500 انواع مختلفة مع مضائف مختلفة بما في ذلك الإنسان والحيوانات مثل الماشية والأغنام [2]، منها (*Salmonella Typhimurium*) و(*Salmonella Enteritidis*) هما النوعان المعزولان الأكثر تكرارا من الامراض المنقولة بالغذاء في العالم والذي يسبب التهاب المعدة والأمعاء لدى الإنسان [3]. تشخيص السالمونيلا من عينات البراز مهم وضروري للكشف عن حاملات هذا العامل المرض خاصة بين متناولي الأغذية، الذين قد يتسببون في انتشار الكائنات الحية الدقيقة [4] تشمل إجراءات عزل السالمونيلا زراعة عينة البراز، خاصة من عينة الإسهال. تتحكم البرامج في السالمونيلا وتتحقق منها باستخدام تقنية مختبرية محددة وحساسة لعزلها وكشفها وتنميطها. على الرغم من أن طرق التشخيص المثالية للسالمونيلا سهلة وقابلة للتكرار وغير مكلفة ومحددة وحساسة، إلا أنه لا توجد تقنية واحدة تلبي جميع هذه المعايير [6]. لذلك، فإن التقنية السريعة أمر حيوي لتحديد مسببات أمراض السالمونيلا من العينات السريرية [5].

استعملت المضادات الحياتية في علاج هذا المرض وقد أعطت نتائج جيدة في علاجه والسيطرة عليه والحد من انتشاره بشكل وبائي، لكن سوء استعمال هذه المضادات وبشكل عشوائي وغير مدروس ودون أجراء فحص الحساسية للمضادات الحياتية ، أدى إلى ظهور العديد من السلالات البكتيرية المقاومة لواحد او اكثر من المضادات المهمة من الناحية العلاجية ، وأصبحت هذه المقاومة بمثابة مشكلة خطيرة من الناحيتين الصحية والاقتصادية [7,8].

2 - المواد وطرق العمل

ثانياً : طرق العمل

– **العزل والزرع** : جمعت (100) عينة براز من مرضى أطفال وبالغين تتراوح أعمارهم من 4 اشهر الى 50 سنة يعانون من اسهال حاد مائي ودموي من مستشفيات مختلفة من صلاح الدين وديالى والانبار، وللفترة الممتدة من 2021/ 10/ 2 الى 4/ 15 / 2022 أُخذت هذه العينات مباشرة الى المختبر وزرعت مباشرة عند الحصول عليها من المرضى، حيث تم إضافة (1)غرام من البراز الى الانابيب الحاوية على (10) مل من وسط (Sel-enite Broth) وتم مزجها جيدا ثم حضنت هذه الانابيب بدرجة حرارة (37) م ولمدة (24) ساعة ، وبعدها اخذت عينة من النمو الناتج بواسطة الناقل (Loop) وتم زراعتها على أوساط انتقائية منها وسط MacConkey Agar و XLD Agar و S.S Agar وحضت هذه الأوساط لمدة (24) ساعة وبدرجة حرارة (37) م .

– **تشخيص البكتريا المعزولة** : تم تشخيص البكتريا المعزولة اعتماداً على صفاتها الزراعية والاختبارات الكيموحيوية وهي كالآتي :

–**الصفات الزرعية** : بعد انتهاء فترة الحضن تم اختبار واحدة او اكثر من المستعمرات النامية على وسط (XLD) وغير المخمرة لسكر اللاكتوز والزيلوز مع الاخذ بنظر الاعتبار الصفات الاتية للمستعمرات المأخوذة من كل وسط فعلى وسط الماكونكي تكون دائرية، ملساء الحافة، صفراء باهتة شفافة [9]. وعلى وسط (XLD) المستعمرات تكون

دائرية ملساء الحافة، حمراء اللون ويكون في مركز المستعمرة اسودا في حالة انتاج H_2S .

- **الفحوصات الكيموحيوية:** تم اجراء العديد من الفحوصات الكيموحيوية حسب ما أشار اليه [10]. وهي oxidase test و catalase test و Indol و قدرتها على الحركة وقابلية البكتريا على استغلال الستريت كمصدر وحيد للكاربون واختبار تخمر السكريات (TSI) وإنتاج H_2S.

3- **التشخيص بجهاز الفايتك (VITEK-2):** تتم عملية التشخيص بهذا الجهاز بالاعتماد على التعليمات للشركة المصنعة كالآتي :

زرعت عينات البراز المراد تشخيصها على وسط الماكونكي وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة وبعد ظهور النمو البكتيري على الوسط المذكور تم اخذ مستعمرة من كل عينة بواسطة الناقل ومزجت مع المحلول الملحي الفسلجي في الانبوب المجهز من قبل الشركة المصنعة ثم تم قياس العالق للعزلات المراد تشخيصها بواسطة جهاز العكورة الخاص بجهاز VITEK_2 (Densi ChekTM) اذ يجب ان تكون عكورة العالق ما بين 0.50 – 0.63 بعد ذلك تم وضع الانابيب في المكان المخصص لها بعد ان تم وضع كاسيت الفحص الخاص (Card) وتم نقل الانابيب والكاسيتات الى الجهاز اذ وضعت أولا في حقل الحشو (Filler) الذي يقوم تلقائياً بملء الكاسيت بالعالق البكتيري وبعد الانتهاء من هذه العملية يعطى الجهاز ايعاز انتهاء ومن ثم يتم نقل الحامل الى الحقل الثاني القارئ (Reader) الذي يقوم أولا بقطع الأشرطة وإعطاء الايعاز عبء (Burden) بشكل إشارة رقمية اذ يتم الاحتفاظ بالاشرطة داخل الجهاز اما الحامل الحاوي على الانابيب فيتم إخراجه من الجهاز ومن ثم أُدخلت معلومات العينات في جهاز الحاسوب المرفق والتي تشمل (نوع العينة ، الجنس ، العمر ، الاسم ، الرمز ورقم العينة) ومن ثم تُركت العينات لمدة 4- 6 ساعات لإعطاء نتيجة التشخيص .

- **التحري عن مقاومة *Salmonella Typhimuri-um* للمضادات الحيوية :**

تم اختبار عزلات بكتريا ***Salmonella Ty-phimurium*** لتسعة مضادات حيوية من مجاميع مختلفة بطريقة انتشار القرص (Disc diffusion method) وفق ما جاء في [12] حيث نقلت 3 – 5 مستعمرات من العزلة النامية في وسط الماكونكي وبعمر 18 – 24 ساعة إلى انبوبة الاختبار الحاوية على 3 مل من المحلول الملحي الفسلجي، وتم ضبط كثافة العالق البكتيري مع انبوب 0.5 من مقياس العكورة ماكفرلاند الذي يعطي عدداً قدره حوالي ($1 – 1.5 \times 10^8$) خلية/ مل، ثم غُمست المسحة القطنية Cotton swab في العالق البكتيري المحظر ومن ثم تم تدويرها وضغطها على الجدار الداخلي للأنبوبة لتقليل كمية اللقاح، بعد ذلك لقح طبق آكار مولر-هنتون بطريقة التخطيط بواسطة Swab على سطح الوسط بمختلف الاتجاهات للحصول على نمو متجانس، وتركت الاطباق حوالي 10 دقائق بحرارة المختبر لكي تجف. بعد ذلك وضعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط الملقح باستعمال ملقط معقم وضغطت بلطف لتثبيتها جيدا مع سطح الوسط وبمسافة لا تقل عن 20 ملم بين مركز قرص واخر ثم حضنت الاطباق الحاوية على أقراص المضادات الحيوية بدرجة حرارة 37 م^0 لمدة 18 – 24 ساعة ثم تمت قراءة النتيجة من خلال قياس منطقة التثبيط Inhibition Zoon بواسطة المسطرة بالمليلتر وتم مقارنتها مع القيم القياسية [13].

تم اختيار مجموعة مضادات من مختلف المجاميع وهي Amoxicillin و Chloramphenicol و Cipro-floxacin و Rifampicin و Cephalothin و Cotriox-azole و, Neomycin Ampicillin .

3 - النتائج

1- **الصفات المظهرية والزرعية** : شخصت العزلات البكتيرية للسالمونيلا اعتمادا على صفاتها المظهرية والزراعية اذ زرعت على وسط اختياري انتقائي حيث ظهرت مستعمرات مختلفة من البكتريا على (S.S Agar) حيث كانت المستعمرات مستديرة وصغيرة وعديمة اللون مع مركز اسود صغير اشبه بالدبوس في الوسط بينما كانت مستعمرات البكتريا على وسط (XLD Agar) ذات لون شاحب وسلس مع مركز كبير من اللون الأسود على الوسط مما يدل على ان البكتريا منتجة (H_2S) ، اذ تمكنت هذه البكتريا من النمو ايضا على وسط الماكونكي اجار الذي يعد وسطاً تفريقياً لكونه ينمي البكتريا السالبة لصبغة كرام وفي نفس الوقت يعد وسطا تفريقياً بين البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز من غيرها اذ يعد مصدر كاربوني مهما لها ، ونميت أيضا على وسط المغذيات وقد تميزت مستعمرات بكتريا (*S. Typhimurium*) على وسط اجار المغذيات (Nu-trient Agar) ناعمة وصغيرة وذات لون شاحب وظهور بقع سوداء على الوسط بينما على وسط الماكونكي اجار (Maconkey Agar) انتجت البكتريا مستعمرات ناعمة وعديمة اللون ومحدبة .

2- **الفحوصات الكيموحيوية**: بعد اجراء العديد من الفحوصات الكيموحيوية لغرض التأكد من جنس البكتريا المستخدمة للدراسة ظهرت النتائج لعزلات السالمونيلا أن جميع السلالات كانت سلبية في اختبار أوكسيديز (Oxidase)، وموجب في الكاتليز (Catalase) بينما في اختبار اليوريز (Urase) سالب ولا يحدث تخمر في اللاكتوز حيث تغير لون الوسط من اللون الأصفر الى اللون الوردي وهذا متفق مع ما ذكره [14]، وأعطى اختبار الإندول (Indol) نتيجة سالبة، ولكن TSI اعطى مؤشر إيجابي وإنتاج H2S .

3- **التشخيص بجهاز الفايتك (VITEK-2):** بإستعمال جهاز الفايتك تم التشخيص النهائي للعزلات البكتيرية لغرض التأكد من عائديتها الى جنس السالمونيلا غير التيفوئيدية اذ يوفر هذا الجهاز 64 فحصاً من الفحوصات الكيموحيوية، اذ تمت عملية التشخيص في مختبر دجلة ، حيث اثبت عائدية (5) عزلات لبكتريا (*S.Typhimurium*) وعزلتين من بكتريا (*S.Entritidis*) وعزلتين أيضا من بكتريا (*S.newport*) وعزلة من (*S.mbanda-ka*) وتمت دراستنا الحالية لبكتريا السالمونيلا غير التيفوئيدية الأكثر شيوعاً وهي بكتريا (*S.Typh-imurium*) .

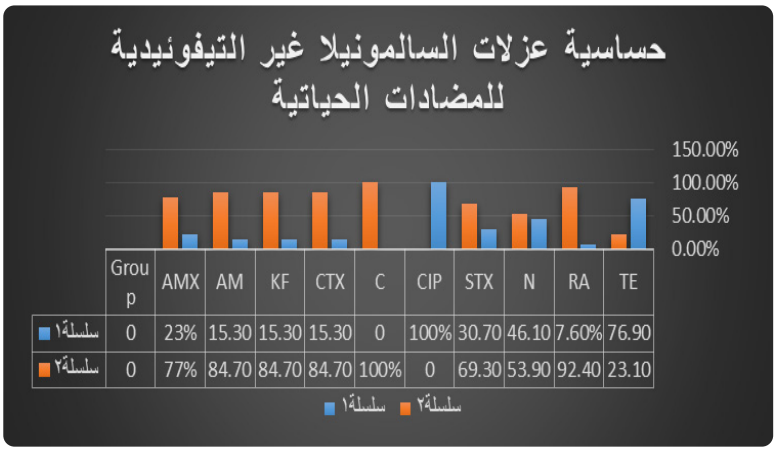
4- **العزل** : بينت نتائج العزل البكتيري لعينات البراز التي جمعت من الانسان (100 عينه) وبعد عملية زرع هذه العينات على الاوساط الزرعية المختلفة أظهرت (5) عينات أي بمعدل (5٪) عن وجود بكتريا السالمونيلا غير التيفوئيدية (*S. Typhimurium*) (NTS) في البشر وبأعمار مختلفة من الذكور والاناث ومن مناطق مختلفة. النتيجة في دراستنا تتفق مع [11]. في دراسة أجريت في مستشفى الحسين في محافظة محافظة ذي قار على 170 عينات البرازية تم جمعها من الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين الجنسين (5 – 12) سنوات من الجنسين والنتائج عزل 19 عزل من Salmonella SPP بما في ذلك 8 عزلات أي بمعدل (7,8٪) من *S. Typhimurium* .

5- **حساسية السالمونيلا (*S.Typhimurium*) للمضادات الحياتية** : ان عزلات بكتريا السالمونيلا كانت حساسة بنسبة (100 ٪) للمضاد الحياتي (Ci-profloxacin) في حين كانت جميع العزلات مقاومة

للمضاد (Chloramphenicol) بنسبة (100٪) في حين اختلفت العزلات فيما بينها بين المقاومة والحساسية للمضادات الحياتية حيث ان 10 عزلات من مجموع (13) عزلة عائدة لجنس بكتريا السالمونيلا (Salmonella) كانت حساسة للمضاد (Tetracycline) بنسبة (76.9٪) و (6) عزلات كانت حساسة للمضادين (Neomycin) و Nalidixic acid ولكن ايضاً هناك (4) عزلات حساسة للمضاد (Cotrimoxazole) وبنسبة (30.7٪) وكذلك (3) عزلات حساسة للمضاد الحياتي (Amoxicillin) بنسبة (23٪) وكانت هناك عزلتان حساسة للمضادين الحيويين (Ampicillin)و(Cephalothin, Cephotaxime) وبنسبة (15.3٪) .

وقد جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع ما أشار عليه [15]. الى وجود نسبة مقاومة عالية للمضاد الحيوي (Ampicillin)، وقد بلغت نسبة المقاومة له (36٪) حيث لوحظ ارتفاع نسبة المقاومة لهذا المضاد من 22٪ الى 49.5٪ وان نسبة (41٪) من عزلات هذه البكتريا كانت مقاومة لمضاد (Tetracycline) وبنسبة (5٪) كانت مقاومة للمضاد (Chloramphenicol) في حين عزلتان فقط كانت مقاومة للمضاد (Gentamycin). وكذلك اتفقت هذه الدراسة مع الباحث [16]. الذي أشار الى ان اغلب أنواع السالمونيلا المعزولة من حالات الاسهال كانت مقاومة للمضادات الحيوية (Ampicillin) و (Chloramphenicol) و (Cephotaxime).

أظهرت الدراسة ان زيادة مقاومة عزلات السالمونيلا (Salmonella) للعديد من المضادات الحيوية المهمة من الناحية العلاجية، ويعزى الى ان الاستعمال الخاطئ والعشوائي لهذه المضادات دون اجراء اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية اذ انه بمجرد اكتشاف مضاد حيوي سرعان ما تتجه الانظار من اجل استعمال هذا المضاد بشكل واسع وخاطئ مما يؤدي ذلك الى ظهور العديد من العزلات المقاومة له وبهذا فهو يشكل مشكلة خطيرة من الناحية الصحية والاقتصادية اذ ينتج عنها انتشار المقاومة المتعددة للعديد من المضادات الحيوية المهمة من الناحية العلاجية فضلا عن تطوير البكتريا للعديد من الاليات المقاومة لهذه المضادات مثل تغير موقع الهدف لعمل المضاد وزيادة انتاج انزيمات البيتالاكتاميز مما يؤدي الى ظهور أنواع جديدة منها، أو تغير حاجز النفاذية لذلك تجنبا لحدوث مثل هذه الظاهرة، فيجب توعية المرضى وارشادهم للالتزام بالتعليمات وكذلك ضرورة اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية لمعرفة المضاد الحيوي الملائم قبل إعطاء المريض [16,17].



Group	AMX	AM	KF	CTX	C	CIP	STX	N	RA	TE
سلسلة١ 0	23%	15.30	15.30	15.30	0	100%	30.70	46.10	7.60%	76.90
سلسلة٢ 0	77%	84.70	84.70	84.70	100%	0	69.30	53.90	92.40	23.10

المصادر

1-Herrero-Fresno, A. and Olsen, J. (2018). Salmonella Typhimurium metabolism affects virulence in the host - A mini-review. Food Microbiology, 71:98-110.

2-Graziani, C; Busani, L; Dionisi, AM; Lucarelli, C; Owczarek, S; Ricci, A; Mancin, M; Caprioli, A and Luzzi, I. (2008). Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar typhimurium from human and animal sources in italy. Vet. Microbial, (128): 414-418.

3-Velge, P.; Cloeckaert, A. and Barrow, P.(2005). Emergence of Salmonella epidemics: The problems related to Salmonella Enteritidis and multiple antibiotic resistances in other major serotypes. Vet. Res. (36):267–288.

4-Pathmanathan, S.G.; Cardona-Castro, N.; Sánchez-Jiménez ,M.M.; Correa- Ocho ,M.M.A.; Puthucheary, S.D.and Thong ,K.L. (2003). Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene ; J. Med. Microbiol., 52 (9): 773-776.

5-Zahraei, T.; Salehi, M.; Mahzounieh, and E. Khaksar. (2010). Detection of Salmonella serovars in zoo and pet reptiles, rabbits, and rodents in Iran by culture and PCR methods. Comp. Clin. Pathol. (19):199–202.

6-CDC, (2011) National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Summary. 7-Forward, K.R.; and Rainnie, B.J. (1997). Use of selenite enrichment broth the detection of Salmonella from human stool: A report of one year experience at aprovinial public health laboratory. Diagn. Microbiol. Infected Dis.,29:215-217.

8-Hoque,B.A. (2003) diarrheal disease Hand washing practices and challengenin Bangladesh Int.J.Environ. Health.REs.13 :81-87.

9-Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M. ATenover, F.C.; and Yolken, R.H. (1999). Mannual of Clinical Microbiology. 7th ed. ASM press. Washington. D.C .

10-Forbes,B.A.;Sahm, D.F.;and Weissfeld,A.S.(1998).Bailey and Scotts Diagnosis Microbiology ,10 th ed. Mosby, Inc, St. Louis.

11-Yousif, A. A. R.and Harab, A. A. H. (2011). Isolation And Serotyping Of Salmonella Species In Diarrheal Children ,5: (1): 149-155 **12-Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. and Truck, M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 43:493-496.

13-**NCCLS. (2000**). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 7th ed. NCCLS document M2-A7. NCCLS, Wayne, Pa.

14-Collee, J.G. ; Frasel, A.G. ; Marimon, B.P. and Simmons, A. (1996). ‘’Mackie and Cartney Practical Medical Microbiology’’. 14th ed.

15-Samaj s, S.; Pils, H.; and Braun, V. (1997). Colicin U, a novel colincin
produced by Shigella boydii. J.Bacteriol., 179(15): 4919-4928 .

16-Anil M, Helvaci M, Ozkalay N, Toprak E, Anil AB, Dilek M, Agus NIndian Pediatr. (2009) Salmonella typhimurium outbreak in a neonatal unit in Turkey. .Jun;76(6):629-33.

17-Daved,L;Heymann,M.D;(2004) Control of Communicable Diseases Eighteen edition Printed and bouned in the united statesofAmeric.