*التحري عن جينات *fimA* و *fimC* في بكتريا *Salmonella typhimurium* المعزولة من مصادر مختلفة

تاريخ الاستلام 2016/8/29 تاريخ القبول 2016/10/9

عباس ميار حزام ميثم غالي يوسف

كلية العلوم – جامعة القادسية

abbas7m16@yahoo.com Maitham722003@yahoo.com

الخلاصة

جمعت 500 عينة مختلفة لغرض التحري عن بكتريا *Salmonella typhimurium* اذ شملت 140 عينة براز من الأطفال من الذكور والإناث الراقدين والمراجعين إلى مستشفى النسائية والأطفال التعليمي الذين يعانون من الإسهال ،90 عينه من فضلات الحمام، 142 عينه من الكبد المعلب و128 عينه من اللحوم المعلبة المفحوصة في مختبر الصحة العام في الديوانية ومختبر الصحة المركزي في بغداد، اظهرت نتائج الاختبارات الزرعية والعدة التشخيصية API 20E عائديه 54عزلة لبكتريا *Salmonella typhimurium* وبنسبة 10.8%، كما اظهرت الفحوصات المصلية احادية التكافؤ عائديه 50 عزلة للنمط المصلي *S.typhimurium* وبنسبة 92.6 % بالإضافة الى عزلتين تعودان الى *Salmonella entritidis* وعزلتين الى *Salmonella muenchen*. استعملت ايضا تقنية التفاعل انزيم البلمرة PCR للكشف عن وجود جين (*fimA*) وجين (*fimC*) المشفر للأهداب الخاص ببكتريا *S. typhimurium* ، اظهرت نتائج تقنية الـ PCR ان 50 عزلة تمتلك جين *fimA* وبنسبه 92.6% ، كما تبين من خلال الكشف عن جين *fimC* أن50 (92.6%) عزله تعود الى النمط المصلي *S.typhimurium*.

الكلمات المفتاحية : *Salmonella typhimurium* ، *fimA* ، *fimC* , تقنية التفاعل انزيم البلمرة PCR

* بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

المقدمة

تعد بكتريا *Salmonellae typhimurium* من اهم الانواع التابعة لجنس الـ *Salmonellae* spp ، وهي عصيات سالبة لصبغه كرام والعائدة للعائلة المعوية (17) ، لاهوائية اختيارية Facultative anaerobic غير مكونة للأبواغ Nonspores forming ، وغير مكونة للمحفظة Noncapsulated ، عادة متحركة تحوي اسواطا محيطة ثلاثية التقسيم Peritrichous flagella وتحدد الاسواط Flagella نوع النمط المصلي serovar type وهي ضرورية لتكوين المستعمرات colonization في نسيج المضيف (11) إذ أنها ممرضه لمدى واسع من المضائف و تسبب داء salmonellosis الذي يعد مصدر قلق على الصحة العامة ومهم في جميع أنحاء العالم ويكون واحدا من الأسباب الرئيسية لالتهاب المعدة والأمعاء وتجرثم الدم في الانسان (13). أن معظم الاصابات ناتجة عن شرب المياه الملوثة وتناول الأطعمة الجاهزة ، اذ تنتقل هذه البكتريا للإنسان من خلال تناول اللحوم والمنتجات الحيوانية الملوثة بالفضلات (11) . شخصت عزلات السالمونيلا spp *Salmonellae* بالطرق المظهرية والكيموحيوية والتنميط المصلي ألا أن في العقدين الماضيين استخدمت طرق بديلة لتحديد الضرب المصلي من خلال الكشف عن DNA الخاص بها (19)، الطرق القديمة للكشف عن هذه البكتريا والتي تعتمد على الزرع باستخدام الاوساط الزرعية التفريقية والانتقائية والفحوصات الكيموحيوية والاختبارات المصلية تحتاج الى وقت طويل لذلك لابد من استخدام طريقه سريعة وضرورية لتشخيص الانماط المصلية للسالمونيلا من العينات المختلفة (9) . في السنوات الأخيرة كان هناك توجه نحو التقنيات الجزيئية للكشف عن السالمونيلا *Salmonellae* التي استندت بدرجة أكثر على الخصائص الوراثية الثابتة مما على الملامح المظهرية (10). أصبحت تقنية PCR البديل بالتشخيص في علم الأحياء المجهرية نظرا للدقة والسرعة بالتشخيص (18).

في العراق ، كان هناك العديد من الدراسات التي أجريت لعزل وتشخيص السالمونيلا والتي تقوم على التقنيات المختبرية الروتينية مثل دراسة(8،7،4،3،2،1) فيما التقنية الجزيئية PCR استخدمت بدراسة (5) الذي كشف عن جين *fimA* من *S.typhimurium* المعزولة من الأطفال والماشية في محافظة الديوانية والنجف ودراسة (15) الذي استخدم جينات *fimA* و *fimC* لتشخيص *S.typhimurium* المعزولة من الاطفال الرضع في محافظة الديوانية . استهدفت الدراسة الحالية عزل وتشخيص بكتريا *S.typhimurium* من مصادر مختلفة، والتحري عن الجينات *fimA* و *fimC* كتشخيص تأكيدي لبكتريا *S.typhimurium* باستخدام تقنيه PCR.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 500 عينة مختلفة من (براز الاطفال، اللحوم، فضلات الحمام) من مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الولادة والاطفال ومختبر الصحة العام في الديوانية ومختبر الصحة العامة المركزي في بغداد خلال الفترة من تشرين الاول 2015- الى أذار 2016 ، اذ جمعت عينات البراز بإضافة 1 غرام من البراز الى 5 مل من selenite broth اما عينات اللحوم والاغذية فقد جمعت بإضافة 25 غرام من كل عينة الى 225 مل من وسط ماء الببتون . ثم نقلت جميع العينات الى مختبر

الاحياء المجهرية في كلية العلوم – جامعة القادسية و حضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ثم نقل 1مل من كل عينة الى 10 مل من وسط Tetrathionate broth وحضن الوسط بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة وبعد فتره الحضانة عزلت وشخصت بكتريا *S.typhimurium* (16) .

العزل والتشخيص

شخصت العينات من خلال زراعتها على الوسط الانتخابي Xylose–lysine deoxycholate بطريقة التخطيط Streaking وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة (12،16). ثم استخدمت عدة API 20E كتشخيص تأكيدي لبكتريا *S. tyiphimrium* اذ تحوي هذه العدة على 20 حفرة Well خاصة بالفحوصات الكيموحيوية التأكيدية بعد ذلك استخدم الاختبار المصلي أحادي التكافؤ monovalent وبالاعتماد على تعليمات الشركة المجهزة لغرض تشخيص الأنماط المصلية العائدة لجنس السالمونيلا

إستخلاص الحمض النووي البكتيري

استخلص الدنا (DNA) الجينومي لبكتريا *S.typhimurium* قيد الدراسة حسب ما جاء في تعليمات الشركة المصنعة لعدة استخلاص الدنا الجينومي (Geneaid,USA) , وتم قياس تركيز ونقاوة عينات الدنا بواسطة جهاز قياس الكثافة الضوئي Nanodrop spectrophotometer .

تقنية تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction (PCR)

تم أجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة المتسلسل للتحري عن جينات *fimA* و *fimC* الخاصة بتشخيص جرثومة *S. typhimurium*.

تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة (Bioneer, Korea) وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول (1). البادئات المستخدمة تم تجهيزها من قبل الشركة ,Bioneer Korea (الجدول 2), وبعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة تم غلق الانابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 5 ثواني. نقلت الانابيب لجهاز المبلمر الحراري الحلقي Therma cycler لإجراء عمليات التضخيم وتمت برمجة الدورات الحرارية لجينات *fimA* و *fimC*(الجدول 3).

3- الترحيل الكهربائي

تم الكشف عن نواتج التضخيم بترحيل العينات كهربائياً على هلام الاكاروز بتركيز (1.5%) لمدة ساعة بفرق جهد مقداره (100) فولت, قدرت الأحجام الجزيئية للحزم المتكونة عن نواتج التضخيم بالمقارنة مع الحزم ذات الأوزان الجزيئية المعلومة للدليل الحجمي (100bp DNA Ladder) والمجهز من شركة (Bioneer, Korea) بعد فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية (U.V Light).

جدول (1): مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

الحجم	مكونات مزيج تفاعل انزيم البلمرة	
5µL	القالب DNA template	
1.5µL	Forward P.	البادئات Primers
1.5µL	Reverse P.	
12µL	ماء الـ بي سي أر PCR water	
20µL	المجموع Total	

جدول (2): بادئات الدنا DNA primer

المصدر	حجم التضخيم	تتابع البادئ		البادئ
صمم في هذه الدراسة	508bp	GCGAGTCTGA TGTTTGTCGC	F	*fimA*
		TAAAGGTGGC GTCGGCATTA	R	
صمم في هذه الدراسة	307bp	AGCGAGCCCA AAAGTGAAA	F	*fimC*
		ATCTTGAGAT GGTTGCCAC	R	

F: Forword R: Reverse

جدول (3): حالات الدورات الحرارية لفحص الـ PCR

الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
المسخ الأولي	95C	5min.	1
المسخ	95C	30sec.	30
الارتباط	(58.3°C)[1] (54.6°)[2]	30sec.	
الاستطالة	72C	1min.	
الاستطالة النهائية	72C	5min.	1

1-*fimA* gene: 58.3°C, 2- *fimC* 54.6°C

النتائج والمناقشة

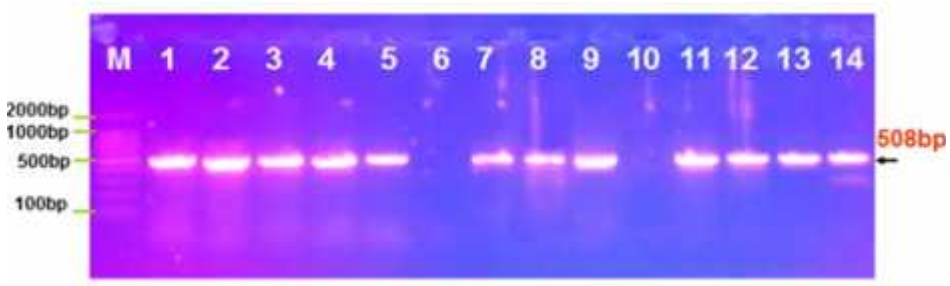
أظهرت نتائج الزرع لـ 500 عينة مختلفة والتي شملت 140 عينة براز من الاطفال الذين يعانون من الاسهال من مختلف الاعمار ولكلى الجنسين ، و142 عينة من الكبد المعلب بمختلف انواعة، و128 عينة من اللحوم المعلبة الحمراء والبيضاء ، و90 عينة من فضلات الحمام بمختلف الاعمار ولكلى الجنسين خلال المدة من شهر تشرين الاول 2015 ولغاية شهرآذار 2016 على وسط Xylose–lysine deoxycholate وجود (54) عزلة تابعة لبكتريا *S. Typhimurium* وبنسبة10.8% من المجموع الكلي للعينات, أذ اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان اعلى نسبة عزل كانت في فضلات الحمام وبنسبة 17(18.88%) تليها الكبد المعلب بنسبة 10.56% ، واقل نسبة في براز الاطفال الرضع وبنسبة 10 (7.14%) والجدول (4) يوضح الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا *S. Typhimurium* حسب مصدر جمع العينات .

جدول (4): الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا *S. Typhimurium* بحسب مصدر جمع العينات.

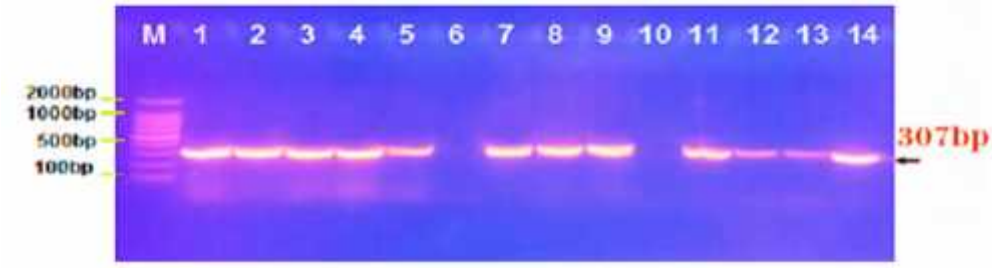
المصدر	العدد الكلي للعينات	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية %
براز الأطفال	140	10	7.14
الكبد المعلب	142	15	10.56
اللحوم المعلبة	128	12	9.38
فضلات الحمام	90	17	18.88
المجموع	500	54	%10.8

وقد أشار (5) ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت 10% في دراسة اجراها في مدينة الديوانية وهذه النتيجة تتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، اما في دراسة (3) فقد عزلت هذه البكتريا بنسبة 14.47% وهذة النتيجه مقاربة لنتائج دراستنا, فيما كانت لدى (14) بنسبة 28.16%, وقد عزلها (6) بنسبة 48% % وهذه النتائج لاتتفق مع نتائج الدراسه الحالية .

ويمكن أن يعزى سبب اختلاف نسب العزل إلى عدة أسباب منها: اختلاف الموسم الذي جُمعت فيه العينات وعددها ومصدرها واختلاف عدد المستشفيات المشمولة في الدراسة ، اذ تم عزل عدد قليل من *S. typhimurium* بالمقارنة مع السنين السابقة وهذا قد يرجع الى تحسن الوضع الاقتصادي باستخدام الماء الصافي مما يؤدي الى تقليل شرب المياه الملوثة بالإضافة الى استخدام المضادات الحياتية عند الاشخاص الذين يعانون من حالات الاسهال(15). ثم شخصت جميع العزلات النامية على وسطXLD agar بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية باستخدام العدة التشخيصية API20E ، **كما** أظهرت نتائج الاختبار المصلي أحادي التكافؤ monovalent antisera الذي تم إجراؤه في مختبر الصحة المركزي في بغداد عائدية 50 عزلة لبكتريا *S. Typhimurium* وبنسبة.92.6% . كما اكدت عزلات *S. typhimurium* بأستخدام تقنية الـ (PCR) وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1) وجود الحزمة التشخيصية للجين *fimA* ذو الوزن الجزيئي(508) زوج قاعدة في 50 عزلة من العزلات البالغ عددها (54)عزلة والتي أعطت نتيجة موجبة عند نموها على وسط أكَارXylose–lysine deoxycholate , كماتم استعمال تقنية الـ PCR للتحري عن جين*fimC* ذو الوزن الجزيئي(307) زوج قاعدة فقد أظهرت (50) عزلة بكترية لـ *S. typhimurium* تمتلك هذا الجين وبنسبة 92.6 % كما في الشكل (2) ، أي أن تقنية الـ (PCR) كانت حساسة 92.6 % في تشخيص عزلات البكتريا قيد الدراسة وهذه النتيجة متفقة مع (15) **بأن تقنية** (PCR) **حساسة في** التشخيص البكتيري وبنسبة 89.5%.



شكل (1) : نواتج تضخيم جين *fimA* الخاص بتشخيص بكتريا *S. Typhimurium* باستعمال تقنية الـ Monoplex PCR والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز بتركيز (1.5%) ، اذ يمثلM:Marker ladder ، والعزلات من رقم (1-5 ،7-9 ، 11-14) بكتريا *S. Typhimurium* الموجبة للفحص بناتج طوله 508 زوج قاعدي باستخدام تيار80 امبير و100فولت لمدة ساعة واحدة.



شكل (2) : الترحيل الكهربائي لهلام الاگاروز المستخدم بتركيز1.5 غم والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *fimC* الخاص بتشخيص بكتيريا *S. Typhimurium*, اذ يمثل M:Marker ladder 2000-100bp والعزلات من رقم (1-5 ،7-9 ، 11-14) بكتريا *S. Typhimurium* الموجبة للفحص بناتج طوله 307 زوج قاعدي باستخدام تيار80 امبير و100فولت لمدة ساعة واحدة.

المصادر

1. **Abu-Al maali, H. M. M. (2004). Study of important causative of aerobic bacterial diarrhea in children in Karblaa and their sensitivity to some antibiotics. M.Sc. Thesis, College of Science, Al-Anbar University.**
2. **Al – Abaddi, H. F. H. (2005). Comparison between modified method with delayed secondary enrichment of Salmonella isolated from poultry products .M. Sc. Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad.**

3. Al – Janabi, J. K. (2001). Characteristics of salmonellae isolated from children with diarrhea in Al-Diwaniya city. M.Sc. Thesis, College of Education, Al – Qadisiya University.
4. Al – Janabi, J. K. (2006). Microbiological study of some causative agents of diarrhea in children under five year of age in Al – Diwaniya city. Ph.D. Thesis. College of Education, Al – Qadisiya University.
5. Al – Karawiy, H. A. M. (2008). Isolation and identification of Salomonella typhimurium and detection of gene encoded type -1- fimbria by using polymerase chain reaction. M.Sc. Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Basrah.
6. Al- Haiyderi, A . A.S .(2013). The Prevalence of Salmonella spp. In Imported Beef and Chicken Meats in local Markets of Al- Diwaniyia City. College of Veterinary, Al-Qadisiya University.
7. Al- Molla, M. A. (2005). Detection of Salmonella carrier in cows in Basrah. M.Sc. Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Basrah , Iraq.
8. Al-Rawi, Z. S. H. (2003). Diagnostic study of Salmonella typhimurium in patients and Cattle. M.Sc. Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad.
9. Alvarez, J.; Sota, M.; Vivanco, A. B.; Perales, I.; Cisterna, R.Rementeria, A. and Garaizar, J. (2004). Development of a Multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of Salmonella in human clinical samples. J. Clin. Microbiol. 42(4):1734–1738.
10. Arrach, N.; Porwollik, S.; Cheng, P.; Cho, A.; Long, F.; Choi, S. and McClelland, M. (2008). Salmonella serovar identification using PCR-based detection of gene presence and absence. J. Clin . Microbiol. 46(8): 2581–2589.
11. Coburn B.; Grassl G.A. and Finlay B.B. (2007).Salmonella, the host and disease: a brief review. Immunol. Cell Biol.85:112–118.
12. Forbes , B. A. ; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic Microbiology 12th ed. Bailey and Scotts'. Mosby Elsevier. China., pp: 93-247.
13. Franklin K.; Lingohr E. J.; Yoshida C.; Anjum M.; Bodrossy L.; Clark C. G.; Kropinski A. M. and Karmali M. A.(2011). Rapid Genoserotyping Tool for Classification of Salmonella Serovars. J. Clin. Microbiol.49 (8): 2954–2960.
14. Ibrahim,H.S.(2007).Bacteriological studies on Pathogens in Egyptian Pigeon.serology Unit .Animale Health Reserch Institiute,Dokki,Giza,Egypt.
15. Jawad, A. A . (2010). Detection of fim A, rfbj (B) and fimC Genes of Salmonella Isolates Using Singleplex

and Multiplex Polymerase Chain Reaction. M.Sc. Thesis. College of Medicine , Al-Qadisiya University.

16. MacFaddin , J.E. (2004). Biochemical tests for identification of medical MedicalBacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
17. Pang, S. (2012). Bacterial genomics and its applications in molecular epidemiology of Salmonella enterica serovar Typhimurium Ph.D. Thesis. School of biotechnology and biomolecular sciences .The University of New South Wales. Australia.
18. Pickup, R. W.; Rhodes, G. and Hermon-Taylor, J. (2003). Monitoring bacterial pathogens in the environment: advantages of a multilayered approach. Curr. Opin. Biotechnol. 14: 319–325.
19. Wattiau P.; Boland, C. and Bertrand S. (2011). Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. J. Appl. Environ. Microbiol. 77(22):7877-7885.

*Detection of *fim*A & *fim*C genes of *Salmonella Typhimurium* isolated from different sources

Receved : 29/8/2016 Accepted :9/10/2016

Abbas mayar hazam **Maitham Ghaly Yousif**

Collage of science- Al-Qadisiya university

abbas7m16@yahoo.com Maitham722003@yahoo.com

Abstract

The collection of 500 different sample for the purpose of investigating the bacterium *Salmonella typhimurium* as included 140 stool specimens from children, male and female who admitted to the Teaching Hospital of Maternity and Pediatrics, in Al-Diwaniya ,90 a sample of stool pigeons ,142 a sample of the liver freezer and 128 sample of frozen meat examined in the laboratory of public health in Diwaniya, a laboratory of the Central Health in Baghdad.. The results of culturing on selective media, in addition to API 20 E system revealed that the rate of *Salmonella* isolates was (54/500)10.8% . results of serotyping *Salmonella* isolates by using monovalent antisera revealed that 50 out of 54 isolates (92.6 %) belong to *S .typhimurium*. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *fimA* gene encoding for biosynthesis of fimbriae A of *S. typhimurium* and *fimC* gene encoding for fimbriae C of *S. typhimurium*, PCR technique revealed that 50 (%92.6) isolates of *S. typhimurium.* were contain *fimA* and *fimC* gene.

Key words: *Salmonella typhimurium*, fimA , fimC , Polymerase chain reaction

Microbiology Classification QR 75- 99.5

* The research is a part of M.sc. thesis in the case of first researcher.