



التوصيف المظهري و الجزيئي لبكتريا *Salmonella Typhimurium* المعزولة من اسهال الأطفال
في محافظة القادسية
نور سليم هاتف¹ ، أحلام علي صخي²
^{1,2} جامعة القادسية/كلية التربية/قسم علوم الحياة/ احياء مجهرية
الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى التوصيف المظهري و الجزيئي عن بكتريا السالمونيلا تيفيموريم المعزولة من الأطفال اللذين يعانون من الاسهال مستشفيات محافظة القادسية، إذ تم جمع 200 عينة اسهال من الأطفال تتراوح أعمارهم 1-5 سنوات من كلا الجنسين، إذ تم تشخيص بكتريا اعتماداً على التشخيص المظهري و الكيميوحيوي و تم تأكيدها باستعمال جهاز الـVITEK-2 و تقنية الـPCR، بالإضافة الى الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا السالمونيلا تيفيموريم. أظهرت نتائج العزل و التشخيص البكتيري وجود 14 عزلة عائدة لبكتريا السالمونيلا تيفيموريم، شخّصت هذه العزلات مختبرياً على أوساط مختلفة منها وسط الـChrome agar و وسط الـSS agar و وسط الـXLD و وسط الـBismuth agar و وسط الـMacConkey agar و وسط الـNutrient agar و بعدها شخّصت مجهرياً و اجراء اختبارات الكيميوحيوية ثم تم اثبات العزلات باستعمال جهاز الـVITEK-2 بعدها اكدت العزلات على انها بكتريا من خلال استعمال الجين التشخيصي *16S rRNA* بتقنية الـPCR.

أثبتت هذه الدراسة امتلاك بكتريا السالمونيلا تيفيموريم قدرة عالية على احداث الامراض من خلال ما تمتلكه من عوامل ضراوة مختلفة و ما أكدته هذه الدراسة، إذ أظهرت النتائج ان 14 عزلة من بكتريا *S. Typhimurium* لها القدرة بنسبة 100% على انتاج عوامل ضراوة مختلفة منها انتاج انزيمات الـHemolysin و الـProtease و الـLipase بالإضافة الى قدرتها على الالتصاق على الاسطح الخلوية الظهارية.

الكلمات المفتاحية: السالمونيلا تيفيموريم: الاسهال: عوامل الضراوة: PCR: جين *16S rRNA*.

Phenotypic and Molecular characterization for *Salmonella Typhimurium* isolated from children's diarrhea in Al-Qadisiyah Province.

Abstract

The current study aimed at the phenotypic and molecular characterization of *Salmonella Typhimurium* bacteria isolated from children infected with diarrhea in hospitals in Al-Qadisiyah province, where 200 diarrhea samples were collected from children aged 1-5 years of both sexes, as bacteria were diagnosed phenotypic and by biochemical tests and were confirmed using VITEK-2 and PCR technologies. In addition to the phenotypic detection of some of the virulence factors possessed by *Salmonella Typhimurium* bacteria.

The results of isolation and bacterial diagnosis showed the presence of 14 isolates belonging to *Salmonella Typhimurium* bacteria, these isolates were diagnosed in the laboratory on different media, including Chrome agar media, SS agar media, XLD medium, Bismuth agar medium, MacConkey agar media, and Nutrient agar medium, and then they were diagnosed microscopically and biochemical tests were conducted. The isolates were proven using the VITEK-2 device, after which the isolates were confirmed as *Salmonella Typhimurium* bacteria using the diagnostic gene *16S rRNA* using PCR technology.

This study proved that *Salmonella Typhimurium* bacteria have a high ability to cause diseases through their various virulence factors and what was confirmed



by this study, and the results showed that 14 isolates of bacteria have with 100% ability to produce different virulence factors, including the production of Hemolysin, Protease, and Lipase enzymes, in addition to their ability to adhere to the surfaces of epithelial cells.

Keywords: *S. Typhimurium*; Diarrhea; Virulence factors; PCR; 16S rRNA gene.

Introduction

المقدمة

تعد العائلة المعوية Enterobacteriaceae احد اكبر العوائل البكتيرية إذ تضم اكثر من 30 جنساً و 120 نوعاً لكن 95 % من السلالات البكتيرية المهمة سريريا تقع ضمن 10% اجناس واقل من 25 نوعاً فقط، تعد هذه العائلة الأكبر والأكثر تنوعاً ضمن مجموعة البكتيريا السالبة لصبغة كرام التي لها أهمية سريرية، إذ تسبب حوالي 80 % من الإصابات المرضية للإنسان والتي تشمل اخماج المسالك البولية و الاخماج الرئوية و الإسهال و خمج السحايا و تعفن الدم، وتعد الاجناس البكتيرية التالية *Salmonella* و *Shigella* و *Yersinia* و *Escherichia* و *Proteus* و *Enterobacter* و *Klebsiella* و *Citrobacter* من اكثر الانواع البكتيرية شيوعاً من الناحية السريرية كمسببات للأمراض (Gorras et al., 2021).

أصبحت العائلة المعوية من أهم العوائل البكتيرية المرتبطة بتلوث الأغذية و بشكل خاص اللحوم و الألبان، و تمثل أفراد هذه العائلة دليلاً على جودة الصحة للأغذية ولعمليات الإنتاج وتعد الاجناس المعوية *Salmonella* و *Escherichia* و *Proteus* و *Klebsiella* و *Citrobacter* من أكثر الملوثات البكتيرية لمنتجات اللحوم في جميع أنحاء العالم وكذلك أكثر الأنواع انتشاراً في جميع حالات التسمم الغذائي المرتبطة بمنتجات اللحوم (Mladenović et al., 2021). تشير تقارير منظمة الصحة العالمية إلى أن حوالي 600 مليون شخص من سكان العالم يصابون بالأمراض المنقولة بالغذاء سنوياً، وأن 420,000 حالة وفاة سنوياً تحدث بسبب هذه الأمراض وبالأخص المتسببة بالبكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية و ان هناك حاجة ملحة للسيطرة والوقاية من تفشي أمراض التسمم الغذائي المرتبطة بمنتجات اللحوم بسبب الزيادة الكبيرة في ارتفاع معدلاتها (Lee and Yoon, 2021) إن إمراضية البكتيريا المعوية تعتمد بشكل أساسي على وجود عوامل ضراوة متعددة كقابليتها على الالتصاق و امتلاكها مستضدات سطحية و مستضدات الكبسولة و السموم الداخلية و قابليتها على تحليل الدم و انتاجها الاغشية الحيوية بالإضافة الى انتاجها انزيمات الضراوة المختلفة (Legba et al., 2020).

السالمونيلا هي مشكلة صحية رئيسية في جميع أنحاء العالم تسبب داء السالمونيلا غير التيفوئيدية (NTS) وداء السالمونيلا التيفوئيدية. تصيب هاتان الفئتان من داء السالمونيلا ملايين الحالات سنوياً مع خسائر اقتصادية كبيرة وحتى مهددة للحياة (Manoj et al., 2015). تعد بكتيريا السالمونيلا من بين الأسباب الأكثر شيوعاً للأمراض التي تنقلها الأغذية لدى البشر والحيوانات (Takele et al., 2018). تسبب السالمونيلا غير التيفوئيدية (NTS) الأمراض المنقولة بالغذاء كعدوى معوية تعتبر المشكلة الطبية الثانية بعد عدوى الجهاز التنفسي، تنتمي هذه العدوى إلى *Salmonella enterica* التي تسبب التهاب المعدة والأمعاء الحاد وأمراض الإسهال المعوي في الحيوانات والبشر (Raffatellu et al., 2008).

مرض الإسهال هو أحد الأخطار التي تهدد صحة الإنسان ويمكن أن يتسبب في خسائر اقتصادية كبيرة من حيث كلفة العلاج والنفقات الأخرى (WHO, 2017). تحدث عدوى الـ *S. Typhimurium* عن طريق الفم والغشاء المخاطي الجهازى، مما يتسبب في التهاب المعدة والأمعاء لدى البشر، فترة الحضانة: 8-48 ساعة؛ مدة الإصابة بالإسهال 3-7 أيام و 72 ساعة. للحمى التي تقتصر على الجهاز الهضمي مباشرة مصحوبة بإسهال مصحوب بارتفاع الدرجة الحرارة تصل الى 39م و الإسهال والغثيان والقيء وتشنجات البطن بعد (12-72) ساعة من التعرض، مصحوبة أيضاً ببراز رخو ودموي؛ (Adzitey et al., 2019). بمجرد عبوره البيئة المعادية للمعدة، يتم امتصاصه بواسطة الخلايا الظهارية المعوية ويتم إطلاقه في النسيج الضام الأساسي حيث يبدأ في التكاثر مما يشير إلى أن عدوى *S. Typhimurium* تتطور إلى تجرثم الدم ومضاعفات تمتد إلى ما بعد الأمعاء، مثل عدوى المسالك البولية (UTI) والتهاب



السحايا والتهاب الشغاف والالتهاب الرئوي (Arii et al., 2002). لذلك هدفت الدراسة الحالية التحري المظهري و الجزيئي عن بكتريا *S. Typhimurium* في اسهال الأطفال في محافظة القادسية، بالإضافة الى الكشف المظهري عن عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا.

Methodology

المواد و طرق العمل

Collect of diarrhea samples

جمع عينات الاسهال

جمعت 200 عينة من اسهال الاطفال المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال ومستشفى عفك والمستشفيات الاهلية والمختبرات الاهلية في محافظة القادسية ومن مختلف الاجناس وبأعمار مختلفة تراوحت بين 1-5 سنة ولمدة ثلاثة اشهر من 2022/11/10 الى 2023/2/15 تم جمع عينات الاسهال في حاويات بلاستيكية نظيفة ومعقمة وجافة ومادة للترسب، ثم نقلت بصندوق مبرد و بشكل سريع للمختبر لزراعتها.

Phenotyping characterization

التوصيف المظهري

أجري التشخيص الزرعي للعوائل بكتريا السالمونيلا تيفيموريم المعزولة من اسهال الاطفال بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية من شكل ولون وقوام و نوع التخمر على وسط الماكونكي، و الأوساط الانتقائية و التفرقية مثل وسط السالمونيلا – شيكلا SSA و وسط XLD و شخصت ايضاً بزراعتها على الوسط CHROM agar و وسط Bismuth agar، وحضنت الاوساط بدرجة 37م لمدة 24 ساعة، ثم اخذت مستعمرة او اكثر من المستعمرات النامية التي تعطي الصفات المميزة لبكتريا السالمونيلا تيفيموريم، ثم اجريت عليها بقية الاختبارات الكيميوحيوية التأكيذية كما أجري الفحص المجهرى للعوائل من خلال صبغها بصبغة كرام وفحصها تحت المجهر الضوئي لملاحظة شكل و ترتيب و لون الخلايا (Procop et al., 2018).

الكشف المظهري عن بعض أنواع عوامل الضراوة لبكتريا *S. Typhimurium*

Phenotypic detection of some virulence factors for *S. Typhimurium*

تم التحري عن عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا السالمونيلا تيفيموريم مظهرياً وفق ما جاء في Faiz (2021).

1- الكشف عن انتاج انزيم المحلل للدم Detection of hemolysin enzyme production

تم التحري عن قابلية بكتريا السالمونيلا تيفيموريم على إنتاج إنزيم الهيمولايسن، من خلال زراعتها على وسط الدم الأساس بطريقة التخطيط ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، إذ يعد ظهور هالة شفافة محيطية بالمستعمرات البكتيرية على إنتاج البكتريا الهيمولايسن من النوع بيتا، اما مشاهدة منطقة خضراء محيطية بالمستعمرات البكتيرية هذا يدل على إنتاج البكتريا انزيم الهيمولايسن من النوع الفا، اما عدم ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية هذا يدل على إنتاج البكتريا انزيم الهيمولايسن من النوع كاما.

2- الكشف عن انتاج انزيم البروتيز Detection of protease enzyme production

تم زرع عزلات بكتريا السالمونيلا تيفيموريم على وسط الحليب الصلب بطريقة التخطيط بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، بعد ذلك يعد مشاهدة مناطق شفافة رائقة حول المستعمرات البكتيرية هذا يدل على إيجابية الكشف.

Detection of lipase enzyme

3- الكشف عن انتاج انزيم المحلل للدهون production

زرعت العزلات النقية من بكتريا السالمونيلا تيفيموريم على وسط Tributyrin الصلب، بعدها حضنت الاطباق بحاضنة هوائية بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، بعد ذلك يتم فحص الاطباق لمشاهدة المناطق الشفافة من عدمها.



Detection of bacterial

4- الكشف عن قابلية بكتريا على الالتصاق adhesion

مزج 0.5 مل من العالق البكتيري مع 0.5 مل من عالق الخلايا الطلانية في انبوبة معقمة و حضن في حاضنة هزازة بسرعة 40 دورة / دقيقة في درجة 37 م لمدة ساعة واحدة ثم عرض المزيج الى النبذ المركزي وبسرعة 1000 دورة / دقيقة 5 دقائق، أهمل الرائق وعلق الراسب بمحلول الفوسفات المنظم (PBS) للتخلص من الخلايا غير الملتصقة. وأخذت قطرة من الخلايا المعلقة وفرشت على شريحة زجاجية نظيفة، جففت وثبتت باللهب وصبغت بصبغة البلورات البنفسجية وفحصت بالمجهر الضوئي لمشاهدة الخلايا الملتصقة

Molecular characterization

التوصيف الجزيئي

Polymers Chain Reaction (PCR) technical

تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة وذلك لإجراء التشخيص التأكدي لعزلات بكتريا السالمونيلا تيفيموريم *S. Typhimurium* وكما يأتي يتكون تفاعل من عدة خطوات:

Genetics extraction

استخلاص المادة الوراثية

استخلص الحامض النووي منقوص الاوكسجين لبكتريا السالمونيلا تيفيموريم باستعمال عدة الاستخلاص (Genomic Extraction Kit)، المجهزة من قبل شركة (Geneaid)، الامريكية، وتمت عملية الاستخلاص وفق ما ورد من تعليمات الشركة المجهزة، بعد ذلك تم قياس نقاوة وتركيز الـ DNA باستعمال جهاز القطرة النانوية عند الطول الموجي (260/280nm).

Primer

البادئ

تم استخدام بادئ خاص بجين *16S rRNA* التشخيصي الخاص ببكتريا السالمونيلا تيفيموريم وذلك باستعمال موقع NCBI – Genbank وبرنامج تصميم البادئات primer3plus وتم تجهيز هذا البادئ عن طريق شركة Bioneer في كوريا كما في الجدول (1)

جدول (1) البادئ المستعمل في الدراسة

Primer	Sequence	Product Size
16S rRNA	*F 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3	1500bp
	R 5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3	

R: Revers البادئ العكسي

F: Forword البادئ الأمامي

PCR

تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل

master mix

تم تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة الـ Bioneer الكورية وبحسب تعليمات الشركة كما في الجدول ادناه:

جدول (2): مكونات مزيج تفاعل انزيم البلمرة Monoplex PCR master mix وحجومها

المادة	الكمية (μl)
PCR master mix	12.5
DNA template	5
Forward Primer 10pmol	1.5
Reverse Primer 10pmol	1.5



PCR water	4.5
Total	25

Thermocycler PCR

برمجة جهاز الدورات الحرارية Program

استعمل جهاز الـ Thermocycler PCR لغرض اجراء تفاعل لبلمرة المتسلسل وتمت برمجة الجهاز كما في الجدول (3)

جدول (3) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل لتضخيم الجين *16S rRNA*

PCR step	Temperature (C°)	Time	Repeat
Initial Denaturation	95	5min	1
Denaturation	95	1 min	35 Cycles
Annealing	55	1 min	
Extension	72	2 min	
Final extension	72	5min	1
Hold	4	Forever	—

Agarose Gel Electrophoresis

الترحيل الكهربائي الهلامي

- حضر هلام الاكاروز وفق طريقة Lee وجماعته (2012) وكالاتي :
- حضر الاكاروز بتركيز 1.5 % لترحيل عينات الـ DNA وذلك باستعمال دوارق زجاجية مقاومة للحرارة Erlenmeyer flask ثم اضيف المحلول المنظم (TBE buffer) بتركيز (1X) الى هلام الاكاروز ومزج جيداً وذلك من خلال تدوير الدورق.
- نوب هلام الاكاروز مع المحلول المنظم بالتسخين في الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة لمدة 30 دقيقة بعدها يخرج الدورق من الصفيحة ثم يهز حتى تمزج محتوياته جيداً وتكرر هذه العملية لحين نوبان الاكاروز بشكل كامل .
- ترك الهلام الاكاروز ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ثم اضيفت صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) الى المزيج ليصبح التركيز النهائي في هلام الاكاروز 0.5 مايكروكروم / مليلتر.
- صب الهلام في القالب (Tray)، وذلك بعد غلق حافتي القالب ووضع المشط (Comb)، المكون للحفر في حافة القالب ثم يترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة بعد التصلب يتم ازالة المشط وتفتح فتحتا القالب ويوضع الهلام في حوض الترحيل الكهربائي.
- اضيفت صبغة التحميل الى عينات الـ DNA وذلك بواقع اضافة جزء واحد من هذه الصبغة الى كل خمسة اجزاء من الـ DNA، اذ تعمل هذه الصبغة على جعل حزم DNA مرئية كما تثقل الـ DNA في حفر الهلام .
- استعمل سلم القياس (DNA Ladder) بحجم (100-2000) زوج قاعدي وذلك لغرض قياس حجم الـ DNA المضخم .
- اضيف محلول (TBE buffer) بتركيز X1 الى هلام الاكاروز وبعد ذلك يتم غلق غطاء الترحيل الكهربائي ثم توصل اقطاب حوض الترحيل بمجهز الطاقة بعدها يشغل جهاز الترحيل باستعمال تيار 100 فولت و 80 امبير لمدة ساعة كاملة.
- بعد انتهاء عملية الترحيل يتم فحص هلام الاكاروز الذي يحتوي على ناتج الـ PCR وذلك باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية (U.V Light Source) لتحديد حزم الوراثة وقياس الاوزان الجزيئية عند مقارنتها بالقيم القياسية للدنا القياسي (DNA Marker).



Results and discussion

النتائج و المناقشة

بينت نتائج الدراسة الحالية أن (200) طفل مصاب بالإسهال اللذين تتراوح أعمارهم بين (1-5) سنة في محافظة القادسية، وقد يكون السبب هو التعرض المفرط لمصادر الطعام الملوثة والمشروبات والمراحيض الملوثة (Rajbhandari *et al.*, 2020) وكذلك بسبب الظروف غير الصحية للأطفال ونقص المناعة، وارتفاع نفاذية الغشاء المخاطي، وسوء الامتصاص (Afzalpurkar *et al.*, 1992) و أظهرت الدراسة ان الذكور اعلى نسبة إصابة بمعدل (60%) ونسبة عينات الإناث (40%)، قد يكون السبب هو العادات الاجتماعية المختلفة المعمول بها والتي تسمح للذكور بمزيد من الحرية في البقاء خارج المنزل وتناول الطعام من الباعة الجوالين، وبالتالي يصبحون أكثر عرضة للإصابة. هناك فرضية بيولوجية تفترض أنه قد تكون هناك اختلافات فيزيولوجية مرضية بين الفتيات والفتيان فيما يتعلق بالإسهال الحاد، مما يجعل الأطفال أكثر عرضة للإصابة (Siziya *et al.*, 2013). تقترح النظريات البيئية فرضيات مختلفة حسب الجنس. على سبيل المثال، قد يُسمح للأطفال الأكبر سناً بمزيد من الحرية في التجول في المنزل أو الذهاب للعمل مع والديهم، مما يعرضهم بشكل غير متناسب لمسببات الأمراض المعدية (Anteneh *et al.*, 2017). كانت الإصابة أكثر في المناطق الريفية في محافظة القادسية وقد تكون بعض حالات العوق والتعب ونقص الوزن من بين المخاطر الرئيسية للإصابة بالإسهال لدى الأطفال دون سن الخامسة.

العزل و التشخيص المظهري لبكتريا السالمونيلا تيفيموريم

Isolation and Identification of Phenotype for *S. Typhimurium*

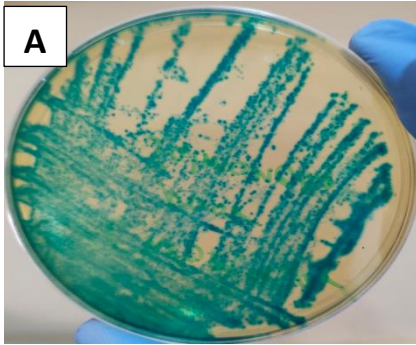
تم عزل و تشخيص 14 عزلات بنسبة 7% من بكتريا السالمونيلا تيفيموريم من اصل 200 عينة اسهال جمعت من أطفال دون سن الخامسة من العمر، تم تشخيصها مظهرياً اعتماداً على الصفات المظهرية و الزراعية من خلال زراعتها على الأوساط الزراعية التشخيصية و التفريقية، تميزت بكتريا *S. Typhimurium* بإنتاجها مستعمرات كبيرة خضراء اللون على الوسط التشخيصي Chrome agar كما ظاهر في الشكل (A 1)، و انتجت بكتريا *S. Typhimurium* عند زراعتها على وسط SS agar مستعمرات صغيرة ومستديرة عديمة اللون ذات مركز اسود اللون صغير اشبه برأس الدبوس كما في الشكل (B 1)، كما أعطت عند زراعتها على وسط XLD الصلب مستعمرات صغيرة شاحبة ملساء ذات مركز اسود اللون كبير و ذلك بسبب قدرتها على إنتاج غاز (H_2S)، كما واضح في الشكل (C 1)، و أظهرت مستعمرات سوداء اللون على وسط Bismuth agar كما في الشكل (D 1)، كما تمكنت بكتريا *S. Typhimurium* من النمو على وسط MacConkey agar و أظهرت مستعمرات صغيرة شاحبة محدبة غير مخمرة لسكر اللاكتوز كما واضح في الشكل (E 1)، بالإضافة الى ذلك تمت زراعتها على وسط Nutrient agar أظهرت مستعمرات صغيرة ناعمة ذات لون شاحب مع ظهور بقع سوداء اللون. كما شخصت بكتريا *S. Typhimurium* مجهرياً إذ أظهر بشكل عصيات منفردة سالبة لصبغة كرام تحت المجهر الضوئي، كما شخصت بكتريا السالمونيلا تيفيموريم باستعمال اختبار الكيميوحيوية فأظهرت النتائج اجابيتها لاختبارات الـ Catalase و الـ Citrate و الـ Methyl Red و الـ Motility و سالبة للاختبارات الـ Indole و الـ Voges Proskauer و الـ Urease و الـ Oxidase، و أعطت نتيجة إيجابية للاختبار TSI و انتاجها غاز (H_2S). كما في الجدول ادناه

الجدول (4): يوضح الاختبارات الكيميوحيوية لبكتريا السالمونيلا تيفيموريم.

N	Biochemical test Result	<i>S. Typhimurium</i>
1	Catalase test	+
2	Oxidase test	-
3	Urea test	-
4	Motility test	+
5	Indole test	-

6	Methyl Red test	+
7	Voges Proskauer test	-
8	Citrate utilization test	+
9	TSI test	K/A , with H ₂ S, With gas or Without

+: إيجابية النتيجة، -: سالبة النتيجة، K: الوسط قاعدي، A: الوسط حامضي.
جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع نتائج دراسة Yousif and Harb (2011). إذ عزل 5 عزلات بنسبة 7.8% من اسهال الأطفال في محافظة ذي قار. و كما كانت دراستنا متقاربة مع ما توصل اليه AL-zubaidy (2019)، إذ عزل 5 عزلات من بكتريا السالمونيلا تيفيموريم بنسبة 5% من اسهال الأطفال في محافظات الانبار و ديالى و صلاح الدين، لكن اختلفت مع دراسة Zaman و جماعته (2021)، اللذين عزلوا بكتريا بنسبة 12.7% من اسهال الأطفال في مدينة كركوك.
بكتريا السالمونيلا باعتبارها أحد العوامل البيولوجية المسيطرة على لأمراض المنقولة عن طريق الأغذية، تشكل خطراً على صحة الإنسان 1. وفقاً لبيانات منظمة الصحة العالمية (WHO) في عام 2021، كان هناك 58 حادثة تتعلق بسلامة الأغذية سببتها السالمونيلا في 86 من الدول العالم 2. يحتل معدل الإصابة بالسالمونيلا تيفيموريم *S. Typhimurium* المرتبة الأولى بين عدوى السالمونيلا ويمكن أن يسبب *S.*



Typhimurium عدوى المستشفيات والتسمم

الغذائي السريع مع معدل وفيات مرتفع. يعد التشخيص الدقيق والكشف عن بكتريا *S. Typhimurium* أمراً مهماً للوقاية المبكرة من عدوى الأمراض المنقولة بالأغذية وتفشيها والتشخيص والسيطرة عليها. 3. لذلك، فإن تقنية الكشف عن *S. Typhimurium* هي نقطة بحث مهمة في الصحة العامة. تشمل طرق الكشف التقليدية عن *S. Typhimurium* اعتماداً على الخصائص الزرعية التي تمتلكها على الأوساط الزرعية أو باستعمال جهاز الـ ELISA، أو استعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

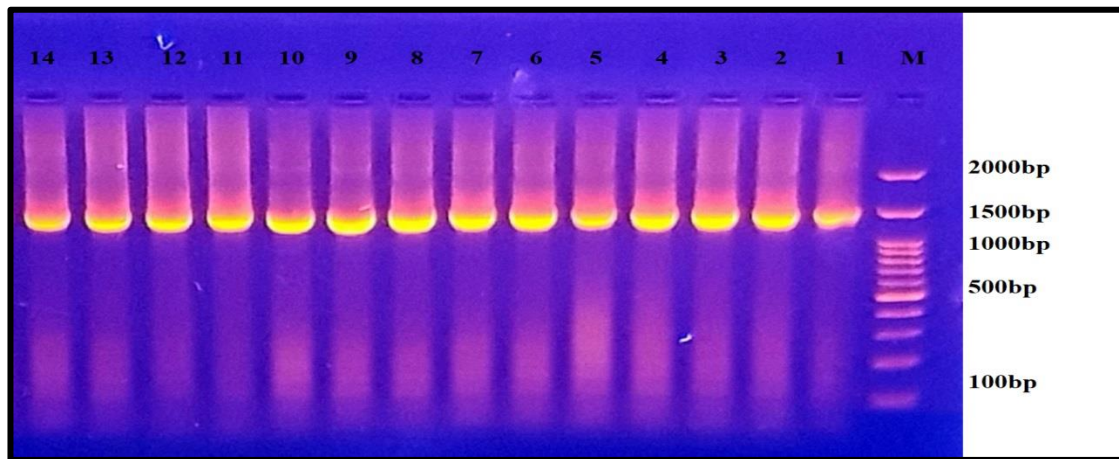
الشكل 1: التوصيف المظهري لبكتريا على الأوساط الزرعية A- وسط Chrome agar و B-وسط SS agar و C – وسط XLD و D- وسط Bismuth agar و E – وسط MacConkey agar

التوصيف الجزيئي لبكتريا السالمونيلا تيفيموريم

Molecular characterization for *S. Typhimurium*

اجري التشخيص الجزيئي للعزلات قيد الدراسة من خلال استعمال تقنية الـ PCR بالاعتماد على الجين التشخيصي الـ *16S rRNA* لامتياز هذا الجين بالثبات وعدم التغير لفترة زمنية طويلة في النوع البكتيري، إذ اظهرت النتائج ان الجين التشخيصي الخاص ببكتريا الـ *S. Typhimurium* موجود في جميع العزلات وبنسبة 100%، لوحظ ظهور حزم وراثية لجميع العزلات المرحلة بمستوى واحد فهذا يدل على ارتباط البادئ بالتسلسل المتم له في شريط الـ DNA البكتيري، ثم قدرت الاوزان الجزيئية للحزم الوراثية الناتجة بالاعتماد على حزم قياسية معلومة الاوزان الجزيئية الواضحة في المسار (M) بحجم متدرج (100-200bp) إذ اظهرت النتائج تماثل واضح للوزن الجزيئي للحزم الناتجة التي كانت (1500bp) مع الوزن الجزيئي للجين التشخيصي *16s rRNA*.

فجاءت نتائج التشخيص الجزيئي مطابقة لنتائج التشخيص المظهري و التشخيص باستعمال جهاز الفايترك- 2 إذ بينت النتائج ان 7 عزلات تعود لبكتريا *S. Typhimurium* من خلال امتلاك كل عزمة حزم وراثية بحجم 1500 زوج قاعدي كما في الشكل (2)، و أن سبب ظهور الحزم الوراثية هو أن تسلسل بادئ هذا الجين الخاص ببكتريا *S. Typhimurium* قد وجد التسلسل المماثل له ضمن التركيب الوراثية لذلك نجح في الارتباط، و يعد ظهور الحزم الوراثية دليل على الخصوصية العالية و التنوع الكبير لجين التشخيصي *16s rRNA*.



الشكل (2): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين الـ *16S rRNA* (1500 زوج قاعدي) لعزلات بكتريا الـ *S. Typhimurium* على هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 وتيار 80 امبير ولمدة ساعة واحدة، العمود M يمثل DNA ladder بحجم (100bp-2000bp).

يعد التشخيص الجزيئي باستعمال تقنية التفاعل البلمرة المتسلسل للعزلات البكتيرية السريرية من ضمنها النمط المصلي *S. Typhimurium* احد التقنيات المهمة في أبحاث التشخيص السريرية نظراً للدقة في التشخيص السريع مقارنة بطرق التشخيص الأخرى مثل التشخيص المظهري و الكيميوحيوي إلى جانب أنها تساعد في تقليل المتطلبات للزراعة. بالإضافة على ذلك، يمكننا الحفاظ على المادة الوراثية لفترة طويلة (Riegman et al., 2019).

التشخيص السريع والمباشر عن بكتريا السالمونيلا تيفيموريم

Direct rapid identification of *S. Typhimurium* by VITEK- 2 compact

تم استعمال جهاز الفايترك في التشخيص السريع عن بكتريا *S. Typhimurium* هو تأكيد لنتائج التشخيص المظهري السابقة جاءت النتائج مؤكدة و مطابقة لنتائج الاختبارات المظهرية من خلال تشخيص 14 عزلات تابعة لبكتريا *S. Typhimurium* كما في الشكل (3).

Patient Name: 2		Patient ID: 2															
Location		Physician:															
Lab ID: 95		Isolate Number: 1															
Organism Quantity:																	
Selected Organism: Salmonella ser.Typhimurium																	
Source: Diarrhea		Collected:															
Comments:																	
Identification Information		Analysis Time: 3.93 hours	Status: Final														
Selected Organism		98% Probability	Salmonella ser.Typhimurium														
ID Analysis Messages		Bionumber:	0015610465026200														
Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	+	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	+
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

الشكل (3): يوضح نتائج تشخيص بكتريا *S. Typhimurium* بجهاز الفايترك-2

الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا السالمونيلا تيفيموريم

Phenotype detection of some virulences factors for *S. Typhimurium*

1- الكشف عن انتاج انزيم المحلل للدم production

اظهرت هذه الدراسة قابلية بكتريا بنسبة 100% قدرتها على انتاج انزيم الهيمولايسن من نوع بيتا- هيمولايسين من خلال ما احدثه من حالة شفافة محيطية بمستعمرات البكتريا كما في الشكل (A 4). يعد انزيم الـ Hemolysin احد عوامل الضراوة المهمة التي تمتلكها بكتريا السالمونيلا التيفيموريم الذي يعمل على تحليل كريات الدم الحمراء للحصول على مغذيات ضرورية مهمة لنموها مما يسبب تأثيراً سلبياً على المضيف (Mare et al., 2017).

2- الكشف عن انتاج انزيم البروتيز Detection of protease enzyme production

أبدت جميع عزلات بكتريا السالمونيلا تيفيموريم قيد الدراسة قابليتها على انتاج انزيم البروتيز من خلال ما انتجته من حالة شفافة رائقة محيطية بالمستعمرات كما في الشكل (B 4)، إذ أظهرت دراسة (Freire) و اخرون عام (2020)، أن من اهم مسببات العدوى و انتشار البكتريا المعوية في الجسم هو نتاجها انزيم الـ Protease الذي يمكن أن يتسبب في تلف الانسجة و تحطيم جزيئات نظام المتمم و تثبيط دوره المناعي.

3- الكشف عن انتاج انزيم المحلل للدهون production

اثبتت الدراسة الحالية قدرة عزلات بكتريا التيفيموريم بعد زراعتها على وسط Tributyrin على انتاج انزيم الـ Lipase من خلال ملاحظة تكون حالة شفافة محيطية بالمستعمرات و هذا دليل على قدرة البكتريا

على تحليل الدهون و تحطيم الانسجة. يعد انتاج هذا الانزيم من اهم علامات الامراض التي تمتلكها البكتريا الذي يعمل على تحطيم الخلايا الدهنية و تحرير المغذيات و يعمل هو على استعمار البكتيري في الغدد و الخلايا الدهنية بالجسم (Hinkel and Wargo, 2020).

4- الكشف عن قابلية بكتريا على الالتصاق

Detection of the ability of bacterial on adhesion

أظهرت هذه الدراسة قدرة جميع عزلات بكتريا على الالتصاق *S. Typhimurium* على الخلايا الطلائية اتفقت مع دراسة Yin وجماعته (2022) تساهم العديد من عوامل الضراوة المسببة للأمراض في بقاء هذه البكتريا في المضيف، بما في ذلك الخمل البكتيري والسموم المعوية وجزر الامراضية، وما إلى ذلك. تضع السالمونيلا استراتيجيات مختلفة للالتصاق بالأنسجة المضيفة من خلال التعبير عن عدد هائل من الخماثل، والتي تلعب دوراً مهماً في الالتصاق من البكتريا إلى الخلايا الظهارية وفي استعمار الغشاء المخاطي المعوي الدقيق (Yin et al., 2022).

الشكل (4): يوضح عوامل الضراوة A – الهيمولايسن و B- البروتيز في بكتريا السالمونيلا تيفيموريم.



References



المصادر

- Adzitey, F., Agbolosu, A., & Udoka, U. J. (2019). Antibacterial effect of Aloe Vera gel extract on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from the gastrointestinal tract of Guinea fowls. *World's Veterinary Journal*, 9(3), 166-173.
- Afzalpurkar, R. G., Schiller, L. R., Little, K. H., Santangelo, W. C., & Fordtran, J. S. (1992). The self-limited nature of chronic idiopathic diarrhea. *New England Journal of Medicine*, 327(26), 1849-1852.
- AL-zubaidy, G. A. (2019). *Isolation and Molecular Detection of Salmonella Typhimurium from Human and Ruminants Fecal Sample with Histopathological Study of Some Internal Organ* (Doctoral dissertation, Msc. Thesis, Vet. Med. College/University of Baghdad).
- Anteneh, Z. A., Andargie, K., & Tarekegn, M. (2017). Prevalence and determinants of acute diarrhea among children younger than five years old in Jabithennan District, Northwest Ethiopia, 2014. *BMC public health*, 17(1), 1-8.



- Arii, J., Tanabe, Y., Miyake, M., Mukai, T., Matsuzaki, M., Niinomi, N., ... & Noda, M. (2002). Clinical and pathologic characteristics of nontyphoidal salmonella encephalopathy. *Neurology*, 58(11), 1641-1645.
- Faiz, S., Nasreen, Z., Sha, A., & Naz, S. (2020). 18. Isolation, screening and characterization of lipase from bacterial isolates and its application in detergents and oily waste water degradation. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 10(1), 209-224.
- Freire, C. A., Santos, A. C. M., Pignatari, A. C., Silva, R. M., & Elias, W. P. (2020). Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) are largely distributed among *Escherichia coli* isolated from the bloodstream. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 447-454.
- Gorrasi, S., Pasqualetti, M., Franzetti, A., Gonzalez-Martinez, A., Gonzalez-Lopez, J., Muñoz-Palazon, B., & Fenice, M. (2021). Persistence of Enterobacteriaceae drawn into a marine saltern (Saline di Tarquinia, Italy) from the adjacent coastal zone. *Water*, 13(11), 1443.
- Hinkel, L. A., & Wargo, M. J. (2020). Participation of Bacterial Lipases, Sphingomyelinases, and Phospholipases in Gram-Negative Bacterial Pathogenesis. *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, 181-203.
- Lee, S. V., & Bahaman, A. R. (2012). Discriminatory power of agarose gel electrophoresis in DNA fragments analysis. *Gel Electrophoresis-Principles and Basics*, 41-56.
- Lee, S. Y., Chen, F., & Lee, T. Y. (2021). Tryptamine-functionalized magnetic nanoparticles for highly sensitive detection of *Salmonella typhimurium*. *Analyst*, 146(8), 2559-2566.
- Legba, B., Dougnon, V., Chabi, Y., Gbaguidi, C., Aniambossou, A., Deguenon, E., ... & Baba-Moussa, L. (2020). Evaluation of in-vivo anti-*Salmonella* activity of *Uvaria chamae*, *Lantana camara* and *Phyllanthus amarus* used in Benin, West Africa. *BMC veterinary research*, 16(1), 1-18.
- Manoj, J., & Singh, M. K. (2015). SinghYP (2015). The role of poultry in food borne salmonellosis and its public health importance. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(9), 485-490.
- Mare, A., Man, A., Toma, F., Ciurea, C. N., Coșeriu, R. L., Vintilă, C., & Maier, A. C. (2020). Hemolysin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under 2 years old with diarrheal disease. *Pathogens*, 9(12), 1022.
- Mladenović, K. G., Grujović, M. Ž., Kiš, M., Furmeg, S., Tkalec, V. J., Stefanović, O. D., & Kocić-Tanackov, S. D. (2021). Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-13.



- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2018). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 29-60.
- Raffatellu, M., Santos, R. L., Verhoeven, D. E., George, M. D., Wilson, R. P., Winter, S. E., ... & Bäumlér, A. J. (2008). Simian immunodeficiency virus–induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nature medicine*, 14(4), 421-428.
- Riegman, P. H. J., Becker, K. F., Zatloukal, K., Pazzagli, M., Schröder, U., & Oelmüller, U. (2019). How standardization of the pre-analytical phase of both research and diagnostic biomaterials can increase reproducibility of biomedical research and diagnostics. *New biotechnology*, 53, 35-40.
- Rajbhandari, P., Brown, A., Patel, V., Mandelia, Y., & El-Hallak, M. (2020). Prolonged Fever, Diarrhea, Abdominal Pain, and Joint Pain in a 9-Year-Old
- Siziya, S., Muula, A. S., & Rudatsikira, E. (2013). Correlates of diarrhoea among children below the age of 5 years in Sudan. *African health sciences*, 13(2), 376-383.
- Takele, S., Woldemichael, K., Gashaw, M., Tassew, H., Yohannes, M., & Abdissa, A. (2018). Prevalence and drug susceptibility pattern of *Salmonella* isolates from apparently healthy slaughter cattle and personnel working at the Jimma municipal abattoir, south-West Ethiopia. *Tropical diseases, travel medicine and vaccines*, 4, 1-7.
- WHO, O. (2017). One health. World Health Organization, 736.
- Yin, L., Dai, Y., Chen, H., He, X., Ouyang, P., Huang, X., Sun, X., Ai, Y., Lai, S., Zhu, L., & Xu, Z. (2022). Cinnamaldehyde Resist *Salmonella Typhimurium* Adhesion by Inhibiting Type I Fimbriae. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(22), 7753. <https://doi.org/10.3390/molecules27227753>.
- Zaman, N. A., & Mohammed, P. L. (2021). Detection of *Salmonella*, *Shigella* and *Candida* spp. in stool from diarrheal children and evaluation the heating effect on *Salmonella* phage in Kirkuk city. *Tikrit Journal of Pure Science*, 26(4), 6-11.