المجلة العراقية للبحوث الانسانية والاجتماعية والعلمية
Iraqi Journal of Humanitarian, Social and Scientific Research
Print ISSN 2710-0952 -Electronic ISSN 2790-1254
العدد 9 لسنة 2023
No. 9 – May 2023

التحري المظهري والجزيئي لبعض عوامل الضراوة في بكتريا *Salmonella typhi* المعزولة من المرضى المصابين بالحمى المعوية في مدينة الديوانية

منذر ليلو راضي[1]; أ.م.د. هدف مهدي كاظم[2]
[1] lilomundher@gmail.com : [2] hadaf.mahdi@qu.edu.iq

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل وتشخيص بكتريا *Salmonella typhi* من الأشخاص المصابين بحمى التايفوئيد في مدينة الديوانية للفترة من 14/8/2022 لغاية 14/12/2022 حيث تم جمع 120 عينة توزعت بين الأعمار (50 ≤ - 1) سنة ولعينات ولكلا الجنسين. وكذلك تم الكشف عن العلامات الإمراضية عن طريق التشخيص المظهري والكيموحيوي وتأكيدها بواسطة اختبار Vitek و 16 SrRNA باستخدام تقنية PCR.

أظهرت نتائج العزل خلال فترة الدراسة أن 51 عينة من أصل 120 عزلة كانت موجبة توزعت بنسب 27% منها عائدة لبكتريا *S. typhi* و 16% تابعة لأنواع بكتيرية أخرى، وبينت النتائج أيضاً ان 69 عزلة كانت سالبة للنمو بنسبة 57%. وقد بينت النتائج أيضاً إن نسبة الإصابة في الذكور أعلى من الإناث اذ بلغت النسب للذكور والإناث 65.5% و 34.4% على التوالي، أما بالنسبة للفئات العمرية فأن الفئة العمرية (1-10) سنوات أعطت أعلى نسبة إصابة والتي بلغت 34.37% تلتها الفئة العمرية (41-50≤) سنة بنسبة 28.125% بينما أقل نسبة إصابة سُجلت في الفئة العمرية (21-30) سنة من المصابين بالحمى المعوية. تضمنت هذه الدراسة التحري عن قدرة 32 عزلة من بكتريا *S. typhi* على إنتاج عوامل الضراوة مثل الهيمولايسين والمحفظة وإنتاج البروتييز وتكوين الغشاء الحيوي بطريقتين، إذ أظهرت النتائج أن جميع العزلات مكونة للمحفظة capsule بينما بينت النتائج عدم قدرة جميع العزلات على إنتاج إنزيمي الهيمولايسين والبروتييز. كما أظهرت العزلات تكويناً للغشاء الحيوي biofilm بنسب عالية باستخدام الطريقتين حيث كانت بنسبة 59.37% لطريقة أكار الكونغو الأحمر، بينما كانت بنسبة 81.25% توزعت بين strong و moderate بالنسبة لطريقة لوحة زراعة الأنسجة TCP.

تم إجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية حيث أوضحت الدراسة الحالية إن جميع العزلات كانت مقاومة بنسبة 100% لمضادات الامبسلين Ampicillin (AM) والبنسلين Pincillin (P) التابعة لمجموعة β-lactams ومضاد Cefotaxime (CTX) من مضادات السيفالوسبورينات Cephalosporines. وكانت المقاومة بنسبة 93.7% لمضاد Amoxicillin-clavulanic acid، بينما كانت المقاومة ضعيفة أو معدومة لمجموعة مضادات Carbapenem والتي كانت بنسبة 9.37% لمضاد Imipenem (IPM) ومعدومة لمضاد Meropenem (MEM) أي إن البكتريا حساسة بشكل كامل. وبينت النتائج أيضاً أن المقاومة لبعض مضادات مجموعة Tetracycline كانت قليلة مقارنة بمجموعة Cephalosporine ومجموعة β-lactams ففي المضاد Tetracycline (TE) كانت بنسبة 15.6% ومضاد Doxycycline بنسبة 21.8% ، كما أظهر المضاد Aztreonam (ATM) والذي يعود لمجموعة Monobactams مقاومة عالية بنسبة 96.8%، وكذلك ظهرت مقاومة عالية أيضاً بنسبة 93.7% لمضاد Ciprofloxacin (CIP)، ونسبة 56.1% لمضاد Chloramphinicol (C)، بينما كانت المقاومة قليلة بنسبة 18.7% لمضاد Levofloxacin (LEV). في الدراسة الجزيئية تم إجراء الكشف الجزيئي لبعض جينات عوامل الضراوة (PrgH, PagC,) باستخدام تقنية PCR إذ وجد إن الحامض النووي لجميع العزلات يحتوي على هذه الجينات وبنسبة 100%. وأظهرت نتائج بعض سلالات بكتريا S. typhi المعزولة وجود طفرات وراثية من النوع غير المحافظ في الأحماض الأمينية للجين PrgH للسلالة البكتيرية OQ696845.1 فقد كشف عن وجود طفرة واحدة للحامض الأميني Phenylalanine F والذي حل محله الحامض الأميني Lucene L. و نظراً لأهمية بكتريا السالمونيلا Salmonella typhi وعلاقتها بحدوث الالتهابات في المعدة والأمعاء ومقاومتها للمضادات الحيوية هدفت الدراسة الى عزل وتشخيص بكتريا السالمونيلا التايفية من مرضى الديوانية

إجراء الكشف الجزيئي عن البكتريا باستعمال تقنية PCR. و إجراء الكشف المظهري phenotype عن عوامل الضراوة. الكشف الجيني genotype عن بعض الجينات المشفرة لعوامل الضراوة باستعمال تقنية PCR (prgH, prgC).و إجراء تحليل الشجرة الوراثية وتقنية التحليل التتابعي Sequence technique للأحماض الأمينية لهذه الجينات.و تحديد مدى مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية.

كلمات مفتاحية: التحري المظهري ، الجزيئي ، بكتريا Salmonella typhi ، الحمى المعوية

Phenotypic And Molecular Investigation Of Some Virulence Factors In Salmonella Typhi Isolated From Patients With Enteric Fever In Al-Diwaniyah City.

Monther Lilo Radi 1: lilomundher@gmail.com 1; Asst.Prof .Dr. Hadaf Mahdi Kadem 2 hadaf.mahdi@qu.edu.iq 2

Conclusion

The current study aimed to isolate and diagnose Salmonella typhi bacteria from people with typhoid fever in the city of Diwaniyah for the period from 14/8/2022 to 14/12/2022, where 120 samples were collected distributed between ages (1 - ≤ 50) years and samples for both sexes. Pathological signs were also detected by phenotypic and biochemical diagnosis and confirmed by Vitek and 16 SrRNA test using PCR technique.

The results of isolation during the study period showed that 51 samples out of 120 isolates were positive, 27% of which belonged to S. typhi bacteria and 16% belonged to other bacterial species. The results also showed that 69 isolates were negative for growth by 57%. The results also showed that the infection rate in males is higher than in females, as the percentages for males and females reached 65.5% and 34.4%, respectively. As for the age groups, the age group (1-10) years gave the highest infection rate, which amounted to 34.37%, followed by the age group (41-≤50) years, with a rate of 28.125%, while the lowest incidence rate was recorded in the age group (21-30) years of people with enteric fever. This study included investigating the ability of 32 isolates of S. typhi bacteria to produce virulence factors such as hemolysin, capsula, protease production, and biofilm formation in two ways. The isolates also showed high biofilm formation using the two methods, as it was 59.37% for the Congo red acar method, while it was 81.25% distributed between strong and moderate for the TCP tissue culture plate method.

The antibiotic sensitivity test was conducted, as the current study showed that all isolates were 100% resistant to Ampicillin (AM) and Pincillin (P) of the β-lactams group, and Cefotaxime (CTX) of the Cephalosporines. The resistance was 93.7% for amoxicillin-clavulanic acid, while the resistance was weak or non-existent for the group of Carbapenem antibiotics, which was 9.37% for imipenem (IPM) and non-existent for meropenem (MEM), meaning that the bacteria are fully sensitive. The results also showed that the resistance to some

antibiotics of the Tetracycline group was low compared to the Cephalosporine group and the β-lactams group. In Tetracycline (TE) it was 15.6%, and Doxycycline antibody was 21.8%. Aztreonam (ATM), which belongs to the Monobactams group, showed a high resistance of 96.8%. %, as well as high resistance also appeared by 93.7% to Ciprofloxacin (CIP) and 56.1% to Chloramphinicol (C), while the resistance was low by 18.7% to Levofloxacin (LEV). In the molecular study, molecular detection of some virulence factors genes (PrgH, PagC,) was carried out using PCR technique, as it was found that the DNA of all isolates contains these genes by 100%. The results of some isolated S. typhi strains showed the presence of genetic mutations of the non-conservative type in the amino acids of the PrgH gene of the bacterial strain OQ696845.1. It revealed the presence of one mutation for the amino acid Phenylalanine F, which was replaced by the amino acid Lucene L. Given the importance of Salmonella bacteria Salmonella typhi and its relationship to the occurrence of infections in the stomach and intestines and its resistance to antibiotics. The study aimed to isolate and diagnose Salmonella typhi from patients in Diwaniyah.

Molecular detection of bacteria using PCR technology. And phenotype detection of virulence factors. Detection of the genotype of some genes encoding virulence factors using PCR technique (prgH, prgC). Analysis of the genetic tree and the sequence technique of amino acids for these genes. Determination of antibiotic resistance of bacteria.

Keywords: phenotypic, molecular investigation, Salmonella typhi, enteric fever

المقدمة

بكتريا السالمونيلا *Salmonella* هي عصيات متحركة سالبة لصبغة كرام تصيب وتستعمر الإنسان وتسبب العدوى بأعراض سريرية مختلفة مثل التهاب المعدة والأمعاء والحمى المعوية وتجرثم الدم، إذ تحدث الإصابة بالحمى المعوية بسبب السالمونيلا التايفية *Salmonella typhi* بينما تعرف سلالات السالمونيلا الأخرى بالسالمونيلا غير التايفية non-typhoidal salmonella، تنتمي بكتيريا السالمونيلا إلى عائلة Enterobacteriaceae إذ يقسم التصنيف الحالي هذه البكتريا إلى نوعين رئيسيين هما *Salmonella enterica* و*Salmonella bongori* مع انتظار الموافقة على النوع الثالث *Salmonella subterranean* (Ajmera and Shabbir, 2022). تعد *S. enterica* من الأنواع الرئيسية والتي تنقسم بدورها إلى ستة سلالات فرعية Subspecies (Su and Chiu, 2007). والتي تضم أكثر من 2600 نوع مصلي (Gal-Mor *et al.*, 2014). يصنف جنس السالمونيلا إلى نوعين فقط *Salmonella bongori* والتي تصيب الحيوانات ذات الدم البارد و *S. enterica* القادرة على اصابة كلا النوعين ذات الدم البارد والدافئة (AbdulAziz, 2019; Tindall *et al.*, 2005). تقسم S. enterica إلى ستة أنواع فرعية هي sub species (*S. enterica*, *S. Salamae*, *S. arizonae* IIIa, *S. diarizonae* IIIb, *S. houtenae*, *S. indica*) فإنها *S. bongori* ، أما بالنسبة لبكتريا *S. enterica* V كانت تصنف سابقاً على أنها سالمونيلا معوية تابعة للسلالة لكنها لاحقاً اعتبرت كنوع منفصل (Chattaway *et al.*, 2021) . أن معظم الأنماط المصلية للسالمونيلا لا يمكن تمييزها بالاختبارات البايوكيميائية ما عدا *S. typhi*، إذ أنها تمتلك خصائص بايوكيميائية فريدة تسمح لها بالتميز

عن الأجناس الأخرى من خلال إنتاج كميات ضئيلة فقط من كبريتيد الهيدروجين الذي عادةً ما يتم ملاحظته بشكل وتد هلالي الشكل ذو ترسبات سوداء على السطح العلوي والسفلي في وسط Kligler iron agar (KIA) و وسط Triple sugar iron agar (TSIA) (Aryal, 2022). كما يمكن ملاحظتها من خلال نموها على وسط MacConkey agar ويلاحظ أن هذه البكتريا غير مخمرة للاكتوز تماماً مما يميزها عن العائلة المعوية Enterobacteriacaea (Deng, 2003). جميع سلالات السالمونيلا تقريباً تكون ممرضة تتمكن من غزو الخلايا البشرية والبقاء على قيد الحياة وبذلك أظهرت خاصية بارزة أثناء مهاجمتها للخلايا البشرية غير البلعمية non-phagocytic (Yadav *et al.*, 2020). حيث تحفز و تستغل هذه الخاصية البلعمية phagocytosis من اجل الوصول الى الخلية المضيفة، كما تم العثور على الجينات الكامنة وراء هذه الاستراتيجية البارزة في Salmonella Pathogenicity Island (SPIs) بالإضافة إلى الجينات الموجودة في منطقة الحامض النووي DNA (Grassl & Finlay, 2008). يمكن أن تكتسب بكتريا *S. typhi* مقاومتها للمضادات الحيوية بعدة طرق منها التثبيط الانزيمي enzyme suppression مثل إنتاجها لإنزيمات البيتالاكتام β-lactamase التي تثبط عمل المضاد penicillin G، وكذلك من خلال تغيير موقع الإصابة alteration infection site وتقليل النفاذية reduced permeability بواسطة الأغشية الخلوية وتغيير المسارات الأيضية، وتعتبر أنظمة الدفق generation of efflux pump system احدى آليات المقاومة الرئيسية التي تمكن البكتريا من خلالها إخراج المضادات خارج الخلية وترتبط الكثير من المقاومة للتتراسايكلين والكلورامفينيكول بهذه الآليات التي تزيل هذه المضادات إلى خارج الخلية البكتيرية، في السالمونيلا يتم تشفير هذه المقاومة للتتراسايكلين بـ tet genes (Singh *et al.*, 2010 ; Butaye, 2003). ومع ذلك فان آليات مقاومة المضادات الحيوية يتوسطها عاملين أساسيين هما اكتساب جينات المقاومة عبر البلازميدات والطفرات الكروموسومية (Holt *et al.*, 2008). يساهم التطور المستمر للسالمونيلا على المستويين genetic and genomic في زيادة الإصابة ومقاومة المضادات الحيوية المتعددة، وبالتالي ظهور نمط مظهري جديد مقاوم للأدوية المتعددة وهذه المقاومة تشكل مصدر قلق كبير للصحة العامة (Fàbrega & Vila, 2013). كما أن تكوين السالمونيلا للأغشية الحيوية معقدة وتلعب دورا كبيرا في المقاومة حيث توجد اربع مكونات رئيسية لتكوّن Biofilm هي (Curli, Cellulose, Capsular polysaccharides and Lipopolysaccharides)، حيث تعد ألياف Curli التي يشار لها بإسم الألياف التراكمية الرقيقة جداً (Tafi) أحد المكونات الرئيسية لمصفوفة السالمونيلا Extracallular Polysaccharide Salmonella (EPS) (Corcoran, 2013 ; Al-Quraishi, 2018). وعليه فإن إنتاج *S. typhi* لـ Biofilm قد يمثل عاملاً رئيساً في تعزيز الإصابة و العدوى المستمرة وبالتالي تسبب تلف الأعضاء وقد تسبب السرطان خاصةً في المرارة (Di Domenico *et al.*, 2017). و نظراً لأهمية بكتريا *Salmonella typhi* وعلاقتها بحدوث الالتهابات في المعدة والأمعاء ومقاومتها للمضادات الحيوية هدفت الدراسة الى عزل وتشخيص بكتريا السالمونيلا التايفية من مرضى الديوانية وإجراء الكشف الجزيئي عن البكتريا باستعمال تقنية PCR. و إجراء الكشف المظهري phenotype عن عوامل الضراوة. الكشف الجيني genotype عن بعض الجينات المشفرة لعوامل الضراوة باستعمال تقنية PCR (*prgH, prgC*).و إجراء تحليل الشجرة الوراثية وتقنية التحليل التتابعي Sequence technique للأحماض الأمينية لهذه الجينات.و تحديد مدى مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية.

المواد وطرق العمل

جمع العينة

جُمعت 120 عينة سريرية مختلفة من الراقدين والمراجعين في مستشفى الديوانية العام وبعض المراجعين لأطباء الباطنية في شارع الأطباء ولكلا الجنسين ولمختلف الأعمار، حيث تم تسجيل المعلومات الخاصة بالمريض في استمارة خاصة (ملحق رقم 1) ، وتم جمع العينات للفترة من (8-14) 2022 ولغاية (14-12-2022).

تشخيص العزلات البكتيرية Identification of Bacteria

تم زراعة كل عينة على وسطي Blood agar و MacConkey agar وحُضنت بدرجة حرارة 37 مº لمدة 24-48 ساعة، بعدها تم اخذ مستعمرة واحدة من كل مزرعة موجبة وزرعت على الأوساط الزرعية الانتقائية الخاصة بالسالمونيلا Salmonella Shigella agar و Xylose-Lysine Deoxchoelate agar و Bismoth sulphite وتم حضنها بدرجة حرارة 37 مº لمدة 24-48 ساعة. وتم تشخيص العزلات البكتيرية بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية Morphological and Microscopical characteristic تم تشخيص المستعمرات النامية مبدئياً اعتمادا على الصفات المظهرية والتي تشمل (شكل المستعمرة، حجمها، لونها، حدودها، الارتفاع والملمس) ثم دُرست صفات الخلايا عن طريق فحصها بالمجهر الضوئي بعد صبغها بصبغة كرام (Winn *et al.*, 2005).

الكشف المظهري لعوامل الضراوة Phenotypic detection of virulence factors

1.إنتاج الهيمولايسين Haemolysin production

تم إجراء اختبار إنتاج الهيمولايسين عن طريق تلقيح وسط أكار الدم بالبكتريا وحضنت بدرجة حرارة 37 مº لمدة 24-48 ساعة، في حالة ظهور منطقة انحلال واضحة حول المستعمرات يشير إلى انحلال كامل للدم (β-haemolysis) وفي حالة كون منطقة التحلل غير واضحة وتكون اقرب للون الأخضر يكون الانحلال جزئي (α-haemolysis)، أما في حالة عدم وجود منطقة انحلال أي لا يوجد تغيّر في المنطقة المحيطة بالمستعمرة يكون الاختبار سلبي من نوع (γ-haemolysis) (Baron *et al.*, 1994).

2.الكشف عن المحفظة Capsule detection

أخذت مستعمرة صغيرة من النمو البكتيري لمستعمرة بعمر 24 ساعة بواسطة حلقة الزرع ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وأضيف اليها قطرة صغيرة من صبغة nigrosine (الحبر الهندي india ink preparation) ومزجت ثم وزع المزيج على سطح الشريحة بعد ذلك تركت لتجف في الهواء وفحصت بالعدسة الزيتية، توفر صبغة nigrosine خلفية داكنة ففي حالة وجود كبسولة تظهر بشكل هالة شفافة غير مصبوغة بالحبر حول الخلية البكتيرية (Bottone, 1999).

3.التحري عن إنتاج إنزيم البروتييز Detection of protease production

تم تلقيح البكتريا في وسط TSA (tryptcase soya agar) بعد ذلك حضنت بدرجة 37 مº ولمدة 24-48 ساعة، في حالة كون النتيجة موجبة تتكون منطقة رائقة حول المستعمرات النامية ويعد هذا دليل على قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم protease (Elsner *et al.*, 2000).

4.تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

1. طريقة أكار الكونكو الاحمر Congo Red Agar (CRA) Method

تم وصف هذا الاختبار من قبل Halim *et al.* (2018) والذي يلعب دوراً في الكشف عن إمكانية تكوين الأغشية الحيوية للبكتريا و يستعمل خلاله وسط CRA الذي اعد مسبقاً حيث يتم تلقيحه ببكتريا *S. typhi* وحضنها بدرجة حرارة 37 مº لمدة 48 -24 ساعة حيث تظهر البكتريا المكونة للغشاء الحيوي على شكل مستعمرات سوداء بلورية جافة اذ يعد هذا الشكل دليلاً على تكوين biofilm من قبل البكتريا

2.طريقة لوحة زراعة الأنسجة Tissue culture plate method

استخدمت هذه الطريقة التي تم وصفها أولا بواسطة Christensen *et al.* (1985) والمعدلة من قبل Bose *et al.* (2009) للكشف عن قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي biofilm باتباع الخطوات التالية:

1- تم تلقيح وسط Tryptic Soya Broth TSB المعقم بسلالة بكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 مº لمدة 18 ساعة.

2- خُفف الزرع البكتيري بنسبة 100:1 في وسط TSB و 1% من الكلوكوز glucose بعدها تم نقل 200 µl من العالق المحضر إلى اللوحة التي تحوي 96 حفرة بشكل ثلاث مكررات (3 حفر لكل عينة) ما عدا حفر الكونترول التي تحوي الوسط TSB فقط، وتم حضنها لمدة 24 ساعة بدرجة 37°م.

3- تم التخلص من الراشح وغسل اللوحة ثلاث مرات باستعمال محلول الفوسفات الملحي المنظم لإزالة الخلايا غير الملتصقة. بعدها تم تجفيف اللوحة بدرجة حرارة الغرفة ثم تمت عملية التثبيت بواسطة Sodium acetate 2% وتركت لمدة 10 دقائق لغرض تثبيت الخلايا الملتصقة.

4- تمت إضافة 100 µl من صبغة crystal violate (0.1 %) لكل حفرة وتركت لمدة 10 دقائق ثم غسلت الحفر بالماء المقطر لإزالة الصبغة الزائدة. بعدها تم إضافة 200 µl من الإيثانول بتركيز 95% لمدة 10 دقائق لغسل الصبغة.

5- تم قياس الكثافة الضوئية Optical density (O.D) بجهاز Micro ELISA auto reader عند الطول الموجي 630 nm.

6- تم حساب درجة تكوين الغشاء الحيوي وفق المعادلة التالية:

Biofilm degree = Mean O.D630 of tested bacteria – Mean O.D630 of control

تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation	الالتصاق Adherence	معدل الكثافة الضوئية Mean O.D value
ضعيف او غير منتج	عديم	<0.120
متوسط	متوسط	0.120 – 0.240
قوي	قوي	>0.240

8. اختبار فحص الحساسية للبكتريا Determination of Antibacterial Susceptibility test

تم إجراء اختبار الحساسية في المختبر لعزلات *S. typhi* بطريقة الانتشار لأقراص المضادات الحيوية disc diffusion استعمل خلالها 11 قرصاً مضاداً اعتمدت في ذلك طريقة Kirby وكما جاء في (Hindler, 1998) وفسّرت النتائج وفقاً لما ورد في (CLSI., 2021).

الدراسة الجزيئية Molecular study

. استخلاص الحامض النووي الجيني Extraction of Genomic DNA

استخلص الحامض النووي DNA للبكتريا المدروسة باستعمال Genomic Extraction Kit المجهز من قبل شركة Geneaid الأمريكية وتمت عملية الاستخلاص حسب تعليمات الشركة .

تحضير أزواج البرايمرات Primer pairs preparation

صممت البوادئ المدروسة وبادئ تسلسل الحامض النووي باستعمال التسلسل الجيني الموجود في بنك الجينات وفق المصادر المذكور والموجودة على موقع المعلومات البايولوجية الوطنية NCBI وذلك باستعمال برنامج تصميم البوادئ primer 3 plus وجُهزت تلك البوادئ من قبل شركة IDT الكندية وتم استخدامها وفق تعليمات التصنيع وذلك بإضافة ماء مقطر منزوع الأيونات (dd H2O) إلى الأنبوبة المجففة الحاوية على البوادئ وفق الحجم المثبت على الأنبوبة بعدها خلطت جيدا بجهاز vortex للحصول على محلول ثم تم تخزينها لحين الاستعمال بدرجة حرارة 20 – °م.

الدورات الحرارية لتضخيم الحامض النووي Thermocycler Programmed to DNA Amplified

اجري تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة باستعمال جهاز المضخم الحراري thermocycler حيث تتم برمجة الجهاز حسب الجينات المستهدفة، وتمر هذه التفاعلات بعدة مراحل حسب الجدول المبين أدناه

(جدول1) الدورات الحرارية لتضخيم الحامض النووي

16 SrRNA gene			
Steps	Temp. ºC	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation	95	1 min	35
Annealing	55	1 min	
Extension	72	2 min	
Final extension	72	10 min	1
Steps	Temp. ºC	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation	95	30 sec	35
Annealing	56	30 sec	
Extension	72	45 sec	
Final extension	72	5 min	1
***PrgH* gene**			
Steps	Temp. ºC	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	35
Annealing	58	30 sec	
Extension	72	45 sec	
Final extension	72	5 min	1
***Pag C* gene**			
Steps	Temp. ºC	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	35
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	1 min	
Final extension	72	5 min	1

تسلسل الحامض النووي DNA Sequencing

تم إرسال عينات نواتج التفاعل إلى الشركة الكورية Macrogen لإجراء تفاعل تسلسل الحامض النووي باستعمال جهاز DNA sequencing system وتم استلام النتائج المرسلة عبر تقرير خاص بالشركة.

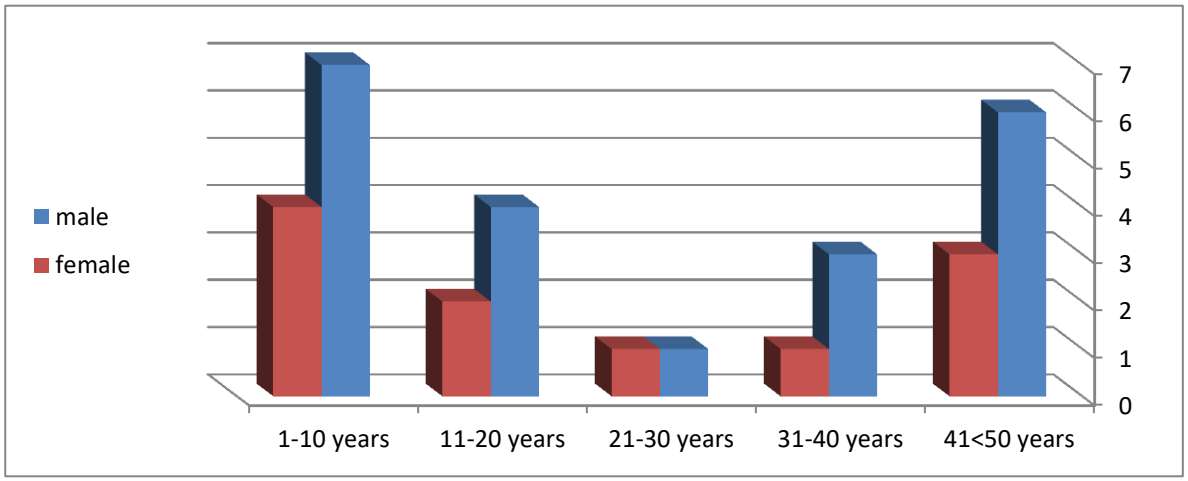
تم إجراء تحليل نتائج الجينات المستهدفة (16 SrRNA, , *PrgH*, *Pag C*) باستعمال برنامج BLAST من المركز الوطني للمعلومات والتقنيات الأحيائية بعد ذلك تم التسجيل العلمي باستعمال NCB-Gen Bank Submission.

الشجرة الوراثية Phylogentic tree

استخدم برنامج Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA) لتحليل الشجرة وتم قياس البعد الوراثي للجينات المستهدفة (16 SrRNA, *PrgH*, *Pag C*)، وبعدها تم رسم الشجرة الوراثية باستخدام طريقة Neighbor-Joining Method.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج جمع 120 عينة لأشخاص يعانون من أعراض الحمى المعوية والذين تتراوح أعمارهم بين (1 - < 50) سنة، أن 51 عينة من أصل 120 عينة كانت موجبة توزعت بين 27% لبكتريا *S. typhi* و 16% لأنواع بكتيرية أخرى، وبينت النتائج أيضا ان 69 عزلة كانت سالبة بدون نمو بنسبة 57 %. وأثبتت نتائج الدراسة الحالية ان هنالك 21 ذكر مصاب ببكتريا *S. typhi* بنسبة 65.6 % و 11 أنثى بنسبة 34.4 %. وقد أشارت النتائج أيضاً ان الفئة العمرية (1 -10) سنه كانت الأكثر إصابة ببكتريا *S. typhi* بنسبة 34.375 %، تلتها الفئة العمرية (41 ≤ 50) سنة بنسبة 28.125 بينما الفئة العمرية (11 – 20) سنة بنسبة 18.75 % والفئة العمرية (31 – 40) سنة بنسبة 12.5 %، بينما أقل نسبة تم تسجيلها بنسبة 6.25 % في الفئة العمرية (21 – 30) (شكل 1).



(شكل 1) أعداد ونسب المصابين بالحمى التايفية موزعة حسب الفئات العمرية والجنس
قيمة مربع كاي = 10.39 ، 0.666 قيمة المعنوية المحسوبة = 0.039 ، 0.955 للفئات العمرية والجنس على
التوالي (توجد اختلافات معنوية عند مستوى دلالة 5%)

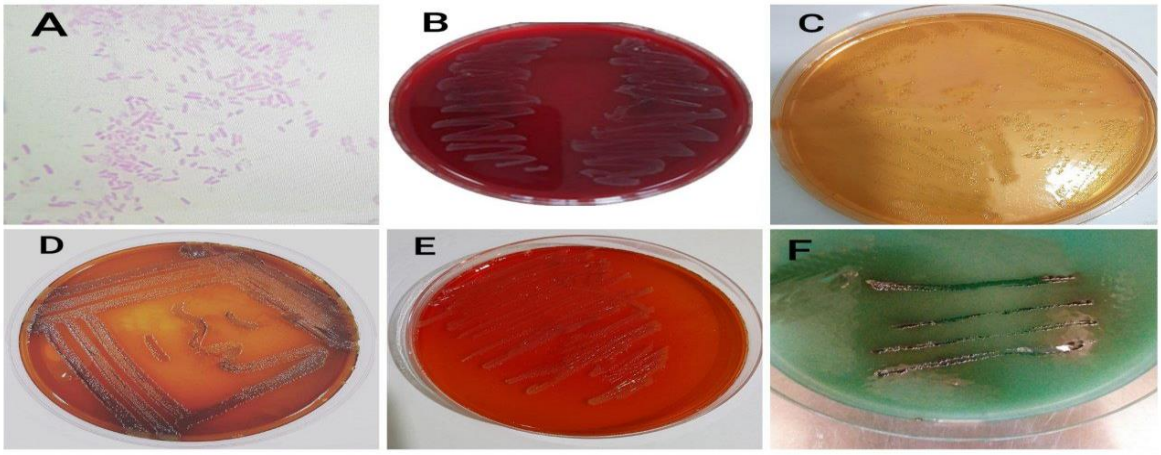
يصيب المرض جميع الأعمار ألا ان معظم حالات الإصابة في الدراسة الحالية كانت في الأطفال الذين تتراوح فئاتهم العمرية بين (1 -10) سنوات والتي قد يود سببها إلى عدم نضج الجهاز المناعي حيث يؤدي ذلك إلى تعرضهم للعدوى أكثر من الفئات العمرية الأخرى، وقد اقترنت هذه النتائج مع دراسة (Saha *et al.*, 2001) التي لاحظت ان الأطفال الذين تزيد أعمارهم عن 5 سنوات هم الفئة العمرية الأكثر عرضة للإصابة. أما الفئة التي تلتها في هذه الدراسة هي (41 ≤ 50) سنة أي في كبار السن والتي قد يعزى سبب الإصابة إلى ضعف الجهاز المناعي.

التشخيص المظهري للسالمونيلا التايفية Morphological identification of *S. typhi*

شُخصت السالمونيلا التايفية *S. typhi* اعتماداً على الخصائص المظهرية، كما تم التعرف عليها مجهرياً إذ ظهرت بشكل عصيات سالبة لصبغة كرام متحركة بواسطة سوط منفرد أو بشكل أزواج، وتم استخدام الأوساط المورفولوجية لعزل البكتريا مثل MacConkey agar و Blood agar للعزل الأولي

و وسط Xylose lysin deoxy cholate (XLD) و وسط Salmonella-Shigella (SS) agar و وسط Bismuth Sulfite agar كأوساط انتقائية أو تفضيلية.

تم تشخيص الصفات المورفولوجية على أوساط الاستزراع بعد حضنها لمدة 24 -18 ساعة و بدرجة حرارة 37 °م. حيث ظهر النمو البكتيري على وسط أكار الدم Blood agar بشكل مستعمرات ناعمة مستديرة محدبة غير محللة بلون أبيض رمادي. بينما على وسط الماكونكي أكار MacConkey agar ظهرت بلون أصفر شاحب (غير مخمرة للاكتوز) بقطر 3-1 ملم. وظهر نمو جيد لمستعمرات البكتيريا على وسطي XLD agar و SS agar حيث ظهرت بشكل دائري صغير ولون وردي ذو حواف سوداء على الوسطين بسبب قدرة البكتريا على إنتاج غاز H_2S، وظهرت أيضاً بشكل مستعمرات خضراء مع مركز أسود على وسط Bismuth Sulfite agar (شكل 2)



(شكل 2) بكتريا *S. typhi* **A**- شكل البكتريا تحت المجهر بقوة ×10 بالعدسة الزيتية **B**- على وسط Blood agar **C**- على وسط MacConkey agar **D**- على وسط S.S agar **E**- على وسط XLD agar **F**- على وسط Bismuth Sulfite agar

3.4. التعرف السريع والمباشر للسالمونيلا التايفية باستخدام جهاز الفايتك
Direct rapid identification of *S. typhi* by Vitek 2 compact

تم استخدام التعرف السريع على العزلات النامية بواسطة جهاز Vitek 2 لتأكيد النتائج الإيجابية التي تم الحصول عليها من الاختبارات السابقة والخصائص المجهرية والزرعية، إذ تم الحصول على 32 عزلة تعود لبكتريا *S. typhi* من مجموع 51 عزلة علماً أن جميع العزلات مأخوذة من أشخاص يعانون أعراض الحمى المعوية.

حساسية بكتريا *S. typhi* للمضادات الحيوية
Susceptibility of *S. typhi* to antibiotics

تم إجراء اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية وفق CLST (2022) و لـ 12 مضاداً حيوياً شائعة الاستعمال ضد بكتريا *S. typhi* بطريقة الانتشار لأقراص المضادات الحيوية Kirby-Bauer Disc على 32 عزلة لبكتريا *S. typhi*، أثبتت نتائج الدراسة إن معدل مقاومة المضادات الميكروبية عالية لكل من مجموعة مضادات البيتالاكتام β-Lactams مثل مضاد الأمبسلين Ampicillin (AM) والبنسلين Pincillin (P) إذ كانت النتيجة 32/32 عزلة اي بنسبة 100%، ومضاد Amoxicillin Clavulanic acid فقد كانت النتائج 32/30 عزلة بنسبة 93.7%، أما بالنسبة لمضادات السيفالوسبورينات Cephalosporin فكانت البكتريا مقاومة لمضاد Cefotaxime (CTX) بنسبة 100% أي 32/32 عزلة.

كما أظهرت النتائج إن مقاومة البكتريا لمجموعة Carbapenem كانت ضعيفة أو معدومة ففي المضاد Imipenem (IPM) كانت العزلات 32/3 بنسبة 9.37% أما في المضاد Meropenem (MEM) فقد كانت المقاومة معدومة أي ان البكتريا حساسة بشكل كامل وكانت العزلات 32/0، وبينت النتائج أيضاً أن المقاومة لبعض مضادات مجموعة Tetracycline كانت قليلة مقارنة بمجموعة السيفالوسبورينات ومجموعة البيتالاكتام فمضاد Tetracycline (TE) فقد كانت العزلات 32/5 وبنسبة 15.6% والمضاد Doxcycline (DO) بنسبة 21.8% وكانت العزلات 32/7. وأظهرت النتائج أن المضاد Aztreonam (ATM) الذي يعود لمجموعة Monobactams ان مقاومة البكتريا كانت عالية 32/31 عزلة أي بنسبة 96.8%، والمقاومة لمضاد Ciprofloxacin (CIP) كانت عالية أيضاً بنسبة 93.7% وكانت العزلات 32/30، أما في المضاد Levofloxacin (LEV) فقد ظهرت المقاومة بنسبة أقل 18.7% وكانت العزلات 32/6، والمضاد Chloramphenicol (C) بنسبة 56.1% والعزلات 32/18 (شكل 3).

نتيجة لمعدلات مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية تعتبر هذه العزلات ذات مقاومة للأدوية المتعددة MDR ويعزى سبب هذه المقاومة نتيجة وجود عامل محمول على البلازميد موجود داخل هذه العزلات أوقد يكون ناتج عن الطفرات التي تحدث بين العزلات البكتيرية وهذه النتائج تتفق مع (Ali, 2015).

أظهرت النتائج إن جميع عزلات بكتريا *S. typhi* أظهرت مقاومة عالية لمضادات Ampicillin و Penicillin ومضاد Amoxicillin-Clavulanic acid والتي تعود إلى المجموعة الأولى من المضادات التي تؤثر على تكوين الجدار الخلوي وقد تعزى مقاومتها لهذه المضادات إلى امتلاكها إنزيمات β-Lactamases أو فشل وصول المضادات الحيوية إلى الهدف Pencillin-binding proteins PBPs (Harwood *et al.*, 2000). أما بالنسبة للسيفالوسبورينات فان معظم عزلات *S. typhi* او جميعها مقاومة لهذه المضادات الحيوية والتي قد تعود إلى ضعف نفاذ هذه المضادات إلى البكتريا او قلة مواقع الارتباط PBPs أو تحطيم المضاد بواسطة إنزيمات β-Lactamases (Brooks, *et al.*, 2007).

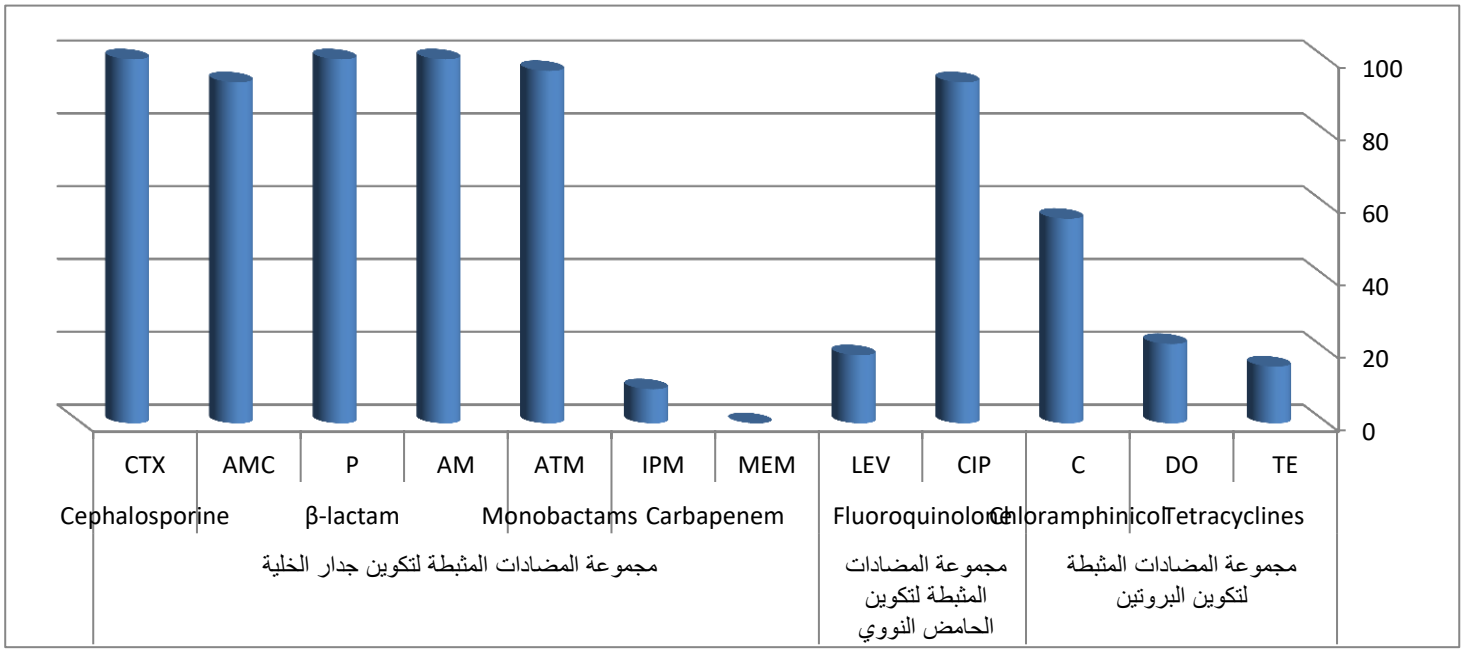
إن β-Lactamases هي تسمية لمجموعة من الإنزيمات التي تنتج حلقة β-Lactam للمضادات الحيوية عن طريق إضافة جزيئة ماء إلى هذه الحلقة وهذه العملية تؤدي إلى تعطيل عمل المضادات الحيوية مثل penicillin وCephalosporin (Abrescia *et al.*, 2012). ففي بكتريا السالمونيلا فان مقاومة مضادات β-Lactam مثل penicillin وCephalosporin تتم بشكل رئيسي بواسطة إنزيمات β-Lactamase التي تعطل عمل هذه المضادات (Micheal *et al.*, 2006). كما ذكرت نتائج دراسة Cortez *et al.* (2022) في البرازيل و Wang *et al.* (2003) في الصين أن 78% من عزلات *S. typhi* كانت مقاومة لمضاد Ampicillin. أما الدراسة التي أجراها Bacci *et al.* (2012) في إيطاليا فقد لاحظ إن 33.3% فقط من سلالات السالمونيلا المعزولة من الدم مقاومة لمضاد Ampicillin.

أظهرت نتائج المجموعة الثالثة لمضادات Carbapenem والتي تعتبر مضادات β-Lactam صناعية تختلف في تركيبها عن البنسلين في استبدال ذرة الكبريت في حلقة thiazolldine للبنسلين بذرة كاربون لذلك كانت مقاومتها لمضاد Imipenem بنسبة 9.37% وتكاد تكون معدومة المقاومة لمضاد Meropenem. إن معظم مقاومة β-Lactam تم منحها بواسطة إنزيمات β-Lactamases التي تشتق حلقة β-Lactam وتمنعها من الارتباط بإنزيمات جدار الخلية لهذا السبب تم تصنيع β-Lactam الجديد لمضاد Carbapenem من خلال تعديل المجموعة الكيميائية حول حلقة β-Lactam والتي تتأثر بإنزيمات β-Lactamases (Giguère, 2013 ; Fadil, 2019). تلعب هذه المضادات دوراً هاماً في العلاجات التجريبية لأنها فعالة ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والتي تمتلك إنزيمات β-Lactamases لكن قد تخضع هذه المضادات مثل Imipenem إلى انقسام بواسطة إنزيم dehydropeptidase الموجود في النبيبات الكلوية والذي بدوره يكون مركب غير نشط يحتمل أن يكون ساماً للكلية (Karen, 2015).

أما مجموعة Monobactams التي تعمل أيضاً على تعطيل تكوين الجدار الخلوي للخلية البكتيرية مثل مضاد Aztreonam فقد أظهرت عزلات *S. typhi* مقاومة عالية لهذا المضاد بنسبة 96.8% كون هذه المضادات تتكون من حلقة β-Lactam فريدة من نوعها ولم يتم دمجها صناعياً وغير سامة لكن هذه المضادات قد تسبب التهاب وريدي أو طفح جلدي، أما التأثيرات المناعية لهُ تكون منخفضة فقد يوفر هذا الدواء بديلاً لعلاج المرضى الذين يعانون من حساسية تجاه Penicillin أو Cephalosporin أو Carbapenem (Karen, 2015). أدت التعديلات على تحسين نشاط هذه المضادات على البكتريا من خلال وصولها إلى موقع الهدف مثل Ampicillin و Amoxicillin-Clavulanat والسيفالوسبورينات مثل Cefoxitin و Cefotaxime و Cefazidime والتي تعد من الجيل الثاني والثالث من السيفالوسبورينات (Giguère, 2013).

كما إن مجموعة Tetracycline التي تعود إلى مجموعة المضادات التي تثبط تكوين البروتين مثل مضادات Tetracycline و Doxycycline فقد أظهرت عزلات *S. typhi* مقاومة قليلة تجاه هذه المضادات وبنسب (15.6% و 21.8%) على التوالي. و أظهرت العزلات مقاومة أقل أيضاً لمضاد Levofloxacin الذي يعود إلى مجموعة المضادات المثبطة لتكوين الحامض النووي وبنسبة 18.75%. أصبحت مسببات الأمراض المقاومة للمضادات الحيوية تشكل تهديداً خطيراً لصحة الإنسان حيث تميزت بكتريا *S. typhi* بالمقاومة للأدوية المتعددة MDR والتي تكون مقاومة لأدوية الخط العلاجي الأول مثل Ampicillin و Cephalosporin و Aminoglycoside والأدوية الشائعة الأخرى المستخدمة كعلاج لمرضى التيفوئيد مما أدى إلى زيادة معدلات الإصابة بهذا المرض خاصةً في الأطفال دون سن الخامسة والذين يعانون من سوء التغذية (Fadil, 2019).

(شكل 3) مقاومة بكتريا *S. typhi* للمضادات الحيوية



قيمة مربع كاي = 260.6 قيمة المعنوية المحسوبة = 0* (توجد اختلافات معنوية عند مستوى دلالة 5%)

5.4. الكشف المظهري عن عوامل الضراوة في بكتريا *S. typhi*

Detection Virulence Factors of *S. typhi*

1.5.4. إنتاج الهيمولايسين Haemolysin production

أظهرت نتائج اختبار عامل الضراوة Haemolysin ان جميع عزلات *S. typhi* لم تنتج الهيمولايسين (جدول 4-5) حيث اتفقت هذه النتائج مع ما توصلت إليه دراسة (Flayyih, 2017).

2.5.4. الكشف عن المحفظة Capsule production

بينت النتائج أن جميع عزلات *S. typhi* كانت موجبة لإنتاج الكبسولة حيث اتفقت هذه النتائج مع دراسة Huda (2021) التي ذكرت إن إنتاج المحفظة يعتبر من عوامل الضراوة المهمة لإمراضيه البكتريا لأن طبقة المحفظة تمثل طبقة ضخمة ليفية تغطي سطح الخلية البكتيرية . تتألف طبقة المحفظة capsule من سكريات متعددة (CPS) عبارة عن بوليمرات قائمة على الكاربوهيدرات يتم تصنيعها على الأسطح البكتيرية (Flemming, 2016). ان Vi antigen هو عامل ضراوة مهم لحدوث الإصابة بالسالمونيلا التايفية حيث يتم تشفيره في الجزر الامراضية للسالمونيلا SPI-7 (Seth-Smith, 2008).

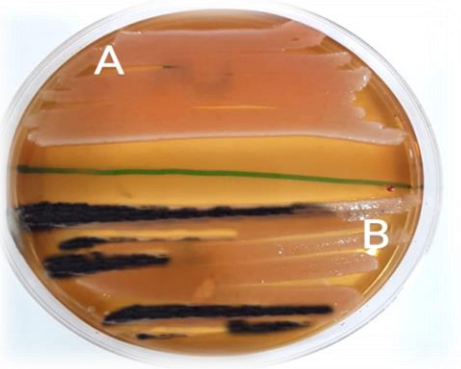
3.5.4. إنتاج البروتييز Protease production

أظهرت النتائج ان جميع عزلات *S. typhi* لم تنتج البروتييز خارج الخلية حيث اتفقت هذه النتيجة مع (Angham, 2015)(جدول 2).

4.5.4. تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

1- طريقة أكار الكونغو الأحمر

تم إخضاع 32 عزلة من *S. typhi* لهذا الاختبار لمعرفة قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي حيث ظهرت 19 عزلة بنسبة 59.37 % بشكل مستعمرات سوداء اللون والتي تمثل نتيجة إيجابية لتكوين الغشاء الحيوي في حين ظهرت المستعمرات الأخرى بلون وردي والذي يعتبر نتيجة سلبية لاختبار تكوين الغشاء الحيوي (شكل 4).



(شكل 4) تكوين الغشاء الحيوي بطريقة أكار الكونغو الأحمر بعد 48 ساعة من الزراعة وحضانة بدرجة 36 مº لعينات *S. typhi* (الجزء A) يمثل بكتريا غير مكونة للغشاء الحيوي و(الجزء B) يمثل بكتريا مكونة للغشاء الحيوي

2- طريقة لوحة زراعة الأنسجة Tissue Culture Plate method

تم اختبار قدرة بكتريا *S. typhi* على تكوين الأغشية الحيوية باستخدام طريقة لوحة زراعة الأنسجة (TCP) وتسمى أيضاً micro titer plate وقد فُسّرت النتائج وفق (Stepanović *et al.*, 2007). تتضمن الأغشية الحيوية لبكتريا *S. typhi* السليلوز وحامض الكولانك و Vi antigen وألياف Curli والبروتينات المرتبطة بالأغشية الحيوية (Gibson *et al.*, 2006 ; Jonas *et al.*, 2007). بينت نتائج تكوين الأغشية الحيوية باستخدام الطريقة المذكورة ان 32/12 من العزلات البكتيرية مكونة بشكل قوي للغشاء الحيوي وبنسبة 37.5%، في حين كان تكوين الغشاء الحيوي متوسط في 14 عزلة من 32 بنسبة 43.75% و 32/6 فقط كانت ضعيفة وغير منتجة للغشاء الحيوي (جدول 2). (جدول 2) نتائج بعض عوامل الضراوة في عزلات بكتريا *S. typhi*

عوامل الضراوة Virulence factor	S. typhi No. 32			
	العزلات الموجبة positive isolates		العزلات السالبة negative isolates	
	No.	(%)	No.	(%)

Haemolysin		**0**	**0**	**32**	**100**
Vi-Capsular		**32**	**100**	**0**	**0**
Protease		**0**	**0**	**32**	**100**
Biofilm formation	**Strong**	**12**	**37.5**	**20**	**62.5**
	Moderate	**14**	**43.75**	**18**	**56.25**
	Weak or non	**6**	**18.75**	**26**	**81.25**
قيمة مربع كاي		**100.87**			
القيمة المعنوية المحسوبة		**0***			

*توجد اختلافات معنوية عند مستوى دلالة 5%

اتفقت هذه النتائج مع دراسة (Farahani *et al.*, 2018) الذين لاحظوا ان (34.5%) من العزلات كانت منتجة قوية للغشاء الحيوي و (59.6%) متوسطة و (5.7%) ضعيفة أو غير مكونة للغشاء الحيوي. واختلفت هذه النتائج مع دراسة (Huda, 2022) التي ذكرت ان (66.6%) من العزلات البكتيرية كانت ضعيفة أو غير مكونة للغشاء الحيوي.

إن قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي يعد عاملاً مهماً لبقائها داخل المضيف، علاوةً على ذلك فان وجود الأغشية الحيوية يؤدي إلى صعوبة في الاستجابات المناعية للمضيف والقضاء على العامل الممرض (Hall-Stoodley & Stoodley , 2009). كما أثبتت العديد من الدراسات عن وجود علاقة بين مقاومة المضادات الحيوية والقدرة على تكوين الأغشية الحيوية للبكتريا (Gilbert *et al.*, 2002). إذ كشفت دراسة Curtin *et al.* (2003) ان الأغشية الحيوية أعاقت وصول المضادات الحيوية للبكتريا كما إن التراكيز المطلوبة للقضاء على البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي أعلى من تلك المطلوبة للسلالات البكتيرية التي لا تنتج الأغشية الحيوية. لذا فان تكوين الأغشية الحيوية له علاقة بسلالات البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية MDR (Chauhan *et al.*, 2016). وعليه تُعزى قدرة بكتريا *S. typhi* على التسبب بالمرض والتأثير المناعي لامتلاكها المحفظة capsule المكونة من متعدد السكريات ومع ذلك تم ملاحظة أن *S. typhi* يمكن أن تتسبب بالمرض أيضاً حتى في حالة عدم وجود المحفظة نظراً لكون الغشاء الحيوي له دور وقائي مشابه للمحفظة لذا يمكن افتراض إن وجوده قد يكون بمثابة درع لهُ دور في بقاء البكتريا لفترة أطول داخل الجسم (Wain *et al.*, 2005 ; Somda *et al.*, 2018).

الدراسة الجزيئية Molecular Study

تم التأكد من احتواء العينات المفحوصة على جين 16S rRNA والتي حجمها حوالي (1500 base pairs) من DNA بدائية النواة الموجود في جميع أنواع البكتريا . أظهرت نتائج ترتيب التسلسلات لجزيئة DNA ل 10 عزلات عراقية من بكتريا *S. typhi* من الجين 16S rRNA والتي قورنت مع المراجع العالمية الأخرى المختارة لنفس الجين 16S rRNA تشابها كبيرا وفق مواقع خاصة لترتيب التسلسلات للقواعد النتروجينية وفقاً لخوارزمية (BLAST n) من NCBI للكشف عن النسبة المئوية للتقارب بين سلالات العزلات والتي تم ترقيمها بين (95 – 100) بين سلالات العزلات العراقية وسلالات عالمية أخرى، وبعد المقارنة تم تسجيلها في بنك الجينات العالمية وأعطيت رقم عالمي لكل عزلة والتي هي (OQ357572، OQ357573، OQ357574، OQ357575، OQ357576، OQ326505، OQ326506، OQ326507، OQ326508، OQ326509). و اعتمد تحليل الشجرة الوراثية للنشوء والتطور على التسلسل الجزيئي للجين 16S rRNA والذي استخدم للكشف عن بكتريا *S. typhi* باستخدام برنامج (MEGA 11.1) وبعدها تم رسمها باستخدام طريقة Neighbor-Joining Method (شكل 5).

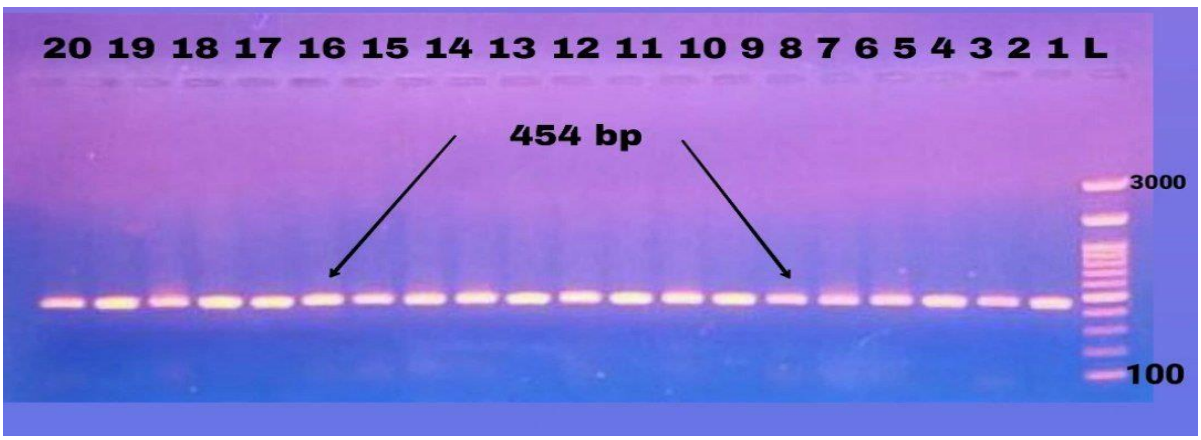
(شكل 5) تحليل الشجرة الوراثية التطورية على أساس جين 16S rRNA المستخدم لأنواع *S. typhi* والتي أظهرت مدى تقارب العزلات المحلية والعزلات العالمية

الكشف الوراثي لعوامل ضراوة *S. typhi*

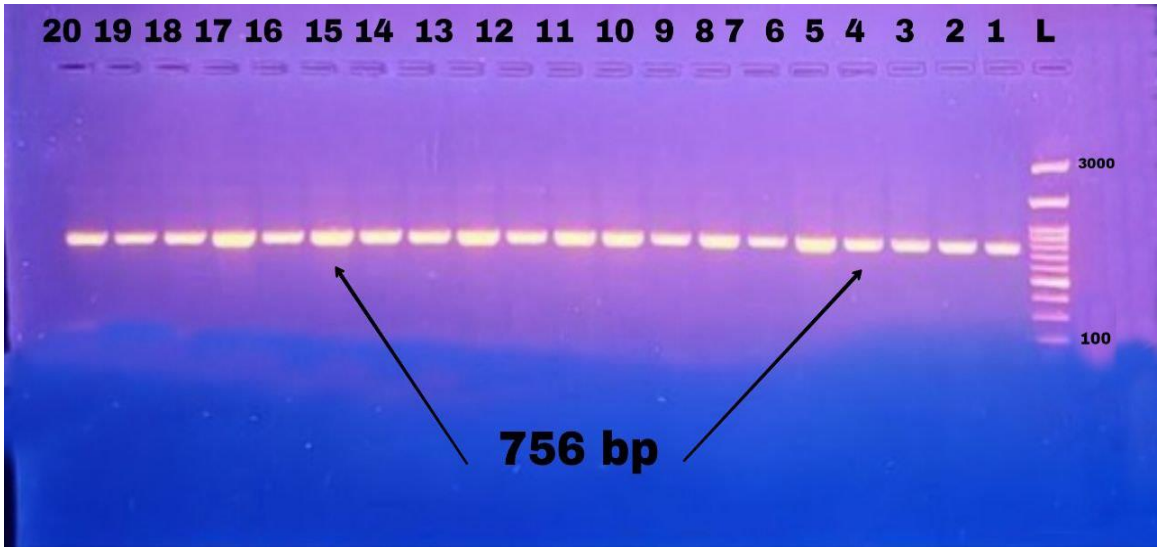
Genotypic Detection of *S. typhi* Virulence Factors

تم إجراء اختبار PCR لبعض جينات عوامل الضراوة لـ 20 عينة من بكتريا *S. typhi* باستخدام البادئات الأمامية و الخلفية للجينات (*PrgH, PagC,*) المتداخلة التي تحمل البلازميد والحامض النووي للعينات المختارة. تم استهداف الجينات **المرتبطة بالجزر الامراضية The genes of Pathogenicity Island** لبكتريا *S. typhi* *PrgH* و *PagC* اللذان يقعان ضمن الجزر الإمراضية PAIs والتي تتضمن مجموعة من الجينات المرتبطة بإمراضية بكتريا *S. typhi* مثل *(InvA, OrgA, PrgH, SpaN, Invd, SipB, SitC, PagC, msgA, SpiA, SopB, IpfC, SifA)* (Marcus *et al.*, 2000). والتي تكون بشكل قطع مميزة من DNA للبكتريا تحتوي على الجينات المرتبطة بعوامل الضراوة، حيث يمكن للقطعة الواحدة ان تشفر لواحد أو أكثر من هذه العوامل والتي من المحتمل ان يتم إدخالها إلى الجينوم عبر النقل الأفقي (Jerod *et al.*, 2006).

بينت نتائج تفاعل PCR في الدراسة الحالية امتلاك العينات المدروسة لجيني *PagC* و *PrgH* بنسبة 100 % لجميع العزلات (شكل 6) و (شكل 7). حيث اتفقت هذه النتائج مع دراسة (Jerod *et al.*, 2006) التي ذكرت امتلاك جميع عينات الدراسة لهذه الجينات والتي تكمن أهميتها في البقاء داخل الخلايا والغزو، كذلك وجد ان الجين *PrgH* مرتبط بتشفير بروتينات حلقات الأغشية الداخلية لأنظمة الإفراز من النوع الثالث (TTSSs). أما في دراسة AL-Quraishi (2018) فقد أشارت إلى تواجد هذه الجينات في العينات المدروسة لكن بنسب أقل 54.2% و 91.4% لجيني *PagC* و *PrgH* على التوالي.



(شكل 6) الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز(1.5%) الملون ببروميد الاثيديوم الناتجة من تفاعل PCR لعزلات S. typhi المضخمة بالبادئات الجينية لجين PagC والناتج منها 454 bp تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 ملي أمبيرو لمدة 60 دقيقة

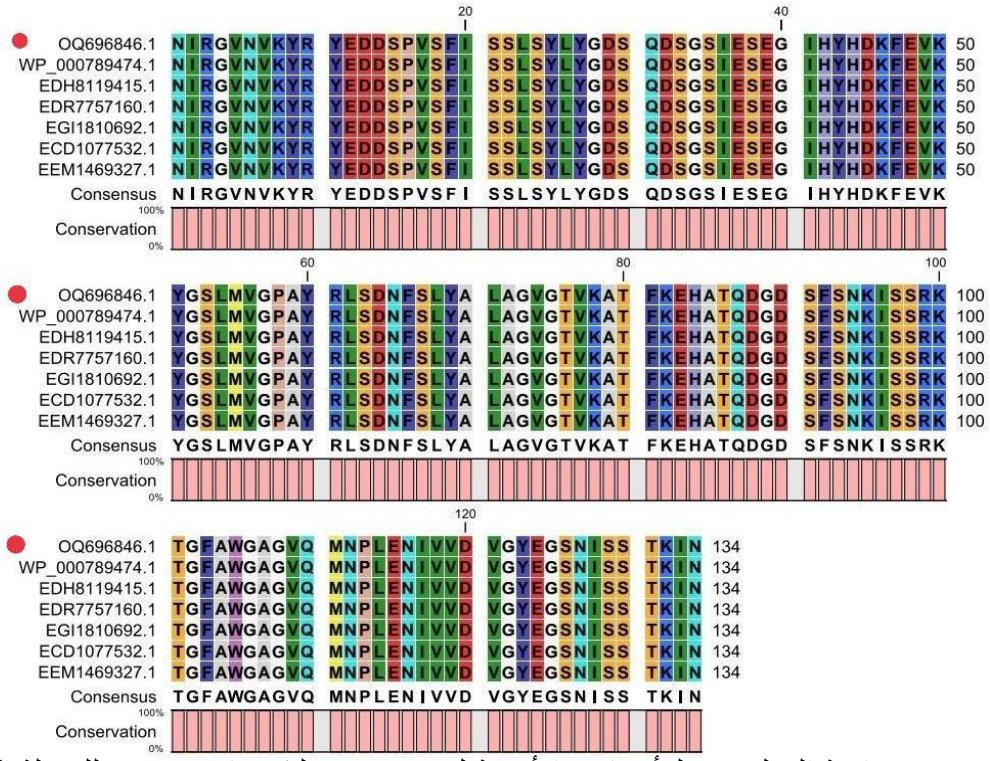


(شكل 7) الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز(1.5%) الملون ببروميد الاثيديوم الناتجة من تفاعل PCR لعزلات *S. typhi* المضخمة بالبادئات الجينية لجين *PrgH* والناتج منها 756 bp تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 ملي أمبير لمدة 60 دقيقة

أظهر تحليل الشجرة الوراثية لجين *PagC* المشفر لبروتينات غشاء الخلية عن وجود تقارباً كبيراً لمجموعة من السلالات العالمية مقارنة بالسلالة المحلية OQ696846.1 وخاصةً السلالة WP000789474.1 للولايات المتحدة الأمريكية والسلالة EDH8119415.1 للمملكة البريطانية وكذلك السلالة الكندية EGI1810692.1 بينما كانت بعيدة التقارب بالنسبة للسلالة EEM1469327.1 والسلالة ECD1077532.1 اللتان تعودان للمملكة البريطانية (شكل 8).

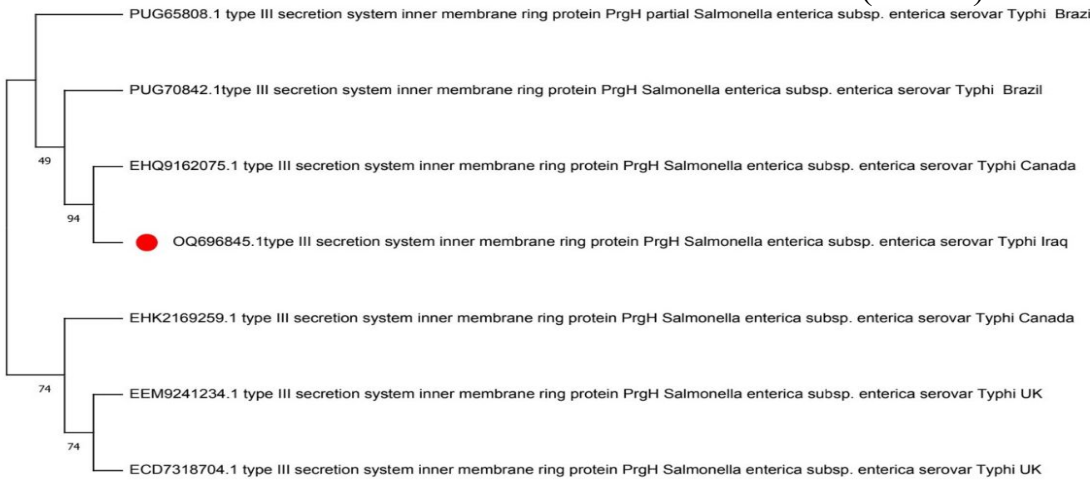
(شكل 8) تحليل الشجرة الوراثية لجين *PagC* لبكتريا *S. typhi* للسلالة OQ696846.1

كما أظهرت نتائج تحليل التسلسل التتابعي لأحماض الأمينية لجين *PagC* للسلالة المحلية OQ696846.1 عن عدم وجود أي طفرة مقارنةً مع مجموعة من السلالات العالمية القريبة والبعيدة والتي تم تحديدها سابقاً للشجرة الوراثية (شكل 9).



(شكل 9) يبين مقارنة التسلسلات للأحماض الأمينية لجين *PagC* لبكتريا *S. typhi* للسلالة البكتيرية OQ696846.1 مع سلالات عالمية أخرى

أما بالنسبة للجين *PrgH* فقد أظهرت نتائج تحليل الشجرة الوراثية للسلالة المحلية OQ696845.1 لهذا الجين تقارباً للعديد من السلالات العالمية منها الكندية EHQ9162075.1 والبرازيلية PUG70842.1 بينما كان التقارب بعيداً عن السلالات البريطانية EEM9241234.1 و ECD7318704.1 (شكل 10).



(شكل 10) تحليل الشجرة الوراثية لجين *PrgH* لبكتريا *S. typhi* للسلالة OQ696845.1

أجري تحليل التسلسل التتابعي للأحماض الأمينية للجين *PrgH* للسلالة المحلية OQ696845.1 حيث كشفت النتائج عن وجود طفرة واحدة للحامض الأميني فنيل الانين F (Phenylalanine) بين التسلسلات

(200-180) ضمن تسلسلات الأحماض الأمينية مقارنة مع التحليل التتابعي للأحماض الأمينية لنفس الجين لكن لسلالات عالمية مختلفة، وقد حلّ محله الحامض الأميني الليوسين L(Lucene)(شكل 11).

References

Abdul Aziz T. A. F. AL Jobouri.,(2019). Molecular Characterization of Some Virulence Genes of *Salmonella enterica* in Babylon province Msc Thesis Baghdad University.

Abrescia, F. Gobbi, A. Angheben, M. Gobbo, Z. Bisoffi C. Poma Hospital, Mantova, Italy (2012). *Salmonella enterica serovar typhi* with CTX-M β-Lactamase ,Germany Emerging Infectious Diseases.

Ajmera, A., & Shabbir, N. (2022). Salmonella. StatPearls. Nassau University Medical Center.

AL-Quraishi, Z. H. O. (2018). Bacteriological And Molecular Study On *Salmonella Typhi* Isolated From Gallbladder Chronic Infections In Alnajaf City A Thesis Submitted To The Council Of College Of Science. *University Of Kufa*.

Ali ,A. J.M. (2015). Identification of *Salmonella typhi* isolated-from patient s with typhoid fever Immunomolecular study. A Thesis submitted to the council of faculty of Science University of Kufa in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctorate of Philosophy of Science in Biology / Microbiology.

Angham, J. (2015). *Identification of Salmonella typhi Isolated from Patient's with Typhoid Fever Immunomolecular Study* University of Kufa].

Aryal, S.2022. Kligler's Iron Agar Test – Procedure, Uses and Interpretation. Online Microbiology Notes – MicrobiologyInfo.com.

Bacci, C., Boni, E., Alpigiani, I., Lanzoni, E., Bonardi, S., & Brindani, F. (2012). Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken meat and chicken and quail carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, *160*(1), 16-23.

Baron E.J., Peterson l.R. and Finegold S.M. (1994). Baily and Scott's. Diagnostic Microbiology. 9th ed. Company. USA.

Bose, S., Khodke, M., Basak, S., & Mallick, S. (2009). Detection of biofilm producing staphylococci: need of the hour. *J Clin Diagn Res*, *3*(6), 1915-1920.

Bottone, E. J. (1999). Encapsulated Enterococcus faecalis: role of encapsulation in persistence in mouse peritoneum in absence of mouse lethality. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *33*(1), 65-68.

Brooks , G. F., Butel J. S., Carroll K.C. and Morse S. A. (2007). Jawetz ,-Melnick & Alderge's Medical microbiology . 24th ed. McGraw Hill . Companies Inc, 161 – 195.

Butaye, P., Cloeckaert, A., & Schwarz, S. (2003). Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents*, *22*(3), 205-210

Chattaway, M. A., Langridge, G. C., & Wain, J. (2021). *Salmonella* nomenclature in the genomic era: a time for change. *Scientific reports*, *11*(1), 7494.

Chauhan, N., Khan, M., & Farooq, U. (2016). Biofilm: An important factor in the prevalence of MDR *Salmonella typhi*. *Int J Biol Pharm Allied Sci*, 2464-2473.

Christensen, G. D., Simpson, W., Younger, J., Baddour, L., Barrett, F., Melton, D., & Beachey, E. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, *22*(6), 996-1006.

CLSI (2022). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20th informational supplement. CLSI, Document M100-S20, CLSI, Wayne, Pa, USA.

Corcoran, M. (2013). *Salmonella enterica-biofilm formation and survival of disinfection treatment on food contact surfaces*.

Cortez, A., de Carvalho, A. d. F., Ikuno, A., Bürger, K., & Vidal-Martins, A. (2022). Resistência antimicrobiana de cepas de Salmonella spp. isoladas de abatedouros de aves. *Arquivos do Instituto Biológico*, *73*, 157-163.

Curtin, J. A., Quint, E., Tsipouri, V., Arkell, R. M., Cattanach, B., Copp, A. J., Henderson, D. J., Spurr, N., Stanier, P., & Fisher, E. M. (2003). Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Current Biology*, *13*(13), 1129-1133.

Deng, W., Liou, S.-R., Plunkett III, G., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Burland, V., Kodoyianni, V., Schwartz, D. C., & Blattner, F. R. (2003). Comparative genomics of Salmonella enterica serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *Journal of Bacteriology*, *185*(7), 2330-2337.

Di Domenico, E. G., Cavallo, I., Pontone, M., Toma, L., & Ensoli, F. (2017). Biofilm producing Salmonella typhi: chronic colonization and development of gallbladder cancer. *International journal of molecular sciences*, *18*(9), 1887.

Elsner, H.-A., Sobottka, I., Mack, D., Laufs, R., Claussen, M., & Wirth, R. (2000). Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *19*, 39-42.

Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica serovar Typhimurium* skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*, *26*(2), 308-341.

Fadil ,H. A. H. (2019). Bacteriological and Immunological Study of Patients with Enteric Fever ,Msc Thesis, Babylon University .

Farahani, R. K., Ehsani, P., Ebrahimi-Rad, M., & Khaledi, A. (2018). Molecular detection, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic

resistance of *Salmonella enterica* serotype enteritidis isolated from poultry and clinical samples. *Jundishapur journal of microbiology*, *11*(10).

Flayyih, I. A. A. (2017). *Molecular characterization of MDR Salmonella sp. Isolate from typhoid patients in Al. Najaf Al. Ashraf province-IRAQ* University of Kufa].

Flemming, H.-C. (2016). EPS—then and now. *Microorganisms*, *4*(4), 41.

Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal Salmonella enterica serovars differ. *Frontiers in microbiology*, *5*, 391.

Gibson, D., White, A., Snyder, S., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M., & Kay, W. (2006). Salmonella produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, *188*(22), 7722-7730.

Giguère, S., Prescott, J. F., & Dowling, P. M. (2013). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. John Wiley & Sons.

Gilbert, C., Rollet-Labelle, E., Caon, A. C., & Naccache, P. H. (2002). Immunoblotting and sequential lysis protocols for the analysis of tyrosine phosphorylation-dependent signaling. *Journal of immunological methods*, *271*(1-2), 185-201.

Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2008). Pathogenesis of enteric Salmonella infections. *Current opinion in gastroenterology*, *24*(1), 22-26.

Halim, R. M. A., Kassem, N. N., & Mahmoud, B. S. (2018). Detection of biofilm producing staphylococci among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, *6*(8), 1335.

Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, *11*(7), 1034-1043.

Harwood, V. J., Whitlock, J., & Withington, V. (2000). Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9), 3698-3704.

Holt, S., Buckley, H., & Whelan, S. (2008). The impact of exposure to domestic violence on children and young people: A review of the literature. *Child abuse & neglect*, *32*(8), 797-810.

Hindler, J. (1998). Antimicrobial Susceptibility Testing in Essential Procedures for Clinical Microbiology. In: ASM Press Washington. DC. USA.

Huda, S. J.(2021). Molecular Detection of Some Outer Membrane Proteins in *Salmonella enterica*. A Thesis Submitted to the Council of College of Biotechnology/ Al-Qasim Green University as a Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master in Biotechnology.

Jerod, A.; Skyberg,A.; Catherine, M.; Logue, B.; Lisa, K. and Nolan AC. (2006). Virulence genotyping of *Salmonella* spp. With multiplex PCR. American association of avian pathologists.AVIAN DISEASES 50:77–81.

Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L. M., & Melefors, Ö. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in Salmonella biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC microbiology*, *7*(1), 1-9.

Karen Whalen (2015) Pharm.D., BCPS Lippincott Illustrated Reviews: Pharmacology Sixth Edition Copyright ©Wolters Kluwer.

Marcus, S. L.; Brumell, J. H.; Pfeifer, C. G. and Finlay, B. B. (2000). Salmonella pathogenicity islands: big virulence in smal packages. Microbes Infect. 2:145-156.

Michael, G. B., Butaye, P., Cloeckaert, A., & Schwarz, S. (2006). Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in Salmonella: an update. *Microbes and Infection*, *8*(7), 1898-1914.

Saha, S. K., Baqui, A. H., Hanif, M., Darmstadt, G. L., Ruhulamin, M., Nagatake, T., Santosham, M., & Black, R. E. (2001). Typhoid fever in Bangladesh: implications for vaccination policy. *The Pediatric infectious disease journal*, *20*(5), 521-524.

Seth-Smith, H. M. (2008). SPI-7: Salmonella's Vi-encoding pathogenicity island. *The journal of infection in developing countries*, *2*(04), 267-271.

Singh, S., Yadav, A. S., Singh, S. M., & Bharti, P. (2010). Prevalence of Salmonella in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance. *Food Research International*, *43*(8), 2027-2030.

Somda, N. S., Savadogo, A., Bonkoungou, J. I. O., Traoré, O., Sambe-Ba, B., Wane, A. A., Traoré, Y., & Gassama-Sow, A. (2018). Molecular detection of virulence and resistance genes in Salmonella enterica serovar Typhi and Paratyphi A, B and C isolated from human diarrhea samples and lettuce in Burkina Faso. *bioRxiv*, 436501.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, *115*(8), 891-899.

Su, L., & Chiu, C. (2007). Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, *30*(3), 210.

Tindall, B., Grimont, P., Garrity, G., & Euzeby, J. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *55*(1), 521-524.

Wain, J., House, D., Zafar, A., Baker, S., Nair, S., Kidgell, C., Bhutta, Z., Dougan, G., & Hasan, R. (2005). Vi antigen expression in *Salmonella enterica serovar Typhi* clinical isolates from Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(3), 1158-1165.

Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F., & Hooper, D. C. (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of

Escherichia coli from Shanghai, China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *47*(7), 2242-2248.

Winn, W. C.; Allen, S. D.; Janda, et.al. (2005). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA. Pp.: 1736.

Yadav, K.; Jassal, M. and Agrawal, A. K. (2020). Typhoid fever: Pathogenesis and disea. *International Journal of Energy Research, 44(2)*