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

عباس ميار حزام و *ميثم غالي يوسف

قسم علوم الحياة - كلية العلوم – جامعة القادسية

E. mail matham.yousif@qu.edu.iq   maitham722003@yahoo.com

الخلاصة

تم جمع 500 عينة مختلفة لغرض التحري عن بكتريا *Salmonella typhimurium* اذ شملت 140 عينه 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 والكيموحيوية 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% من خلال ظهور حزمة واحدة ناتجة من عملية التضخيم للـ DNA وكان حجمها 508 زوج قاعدي على هلام الاكاروز ، كما تبين من خلال الكشف عن جين *fimC* أن50 (92.6%) عزله تعود الى النمط المصلي *S.typhimurium* لاحتوائها على هذا الجين وذلك بظهور حزمة واحدة ناتجة من عملية التضخيم الـDNA بحجم 307 زوج قاعدي عند ترحيلها على هلام الاكاروز.

تم التحري عن الطفرة النقطية مظهريا من خلال تنمية البكتريا على وسط قليل الكلوكوز Glucose –minimal salt agar إذ اظهرت النتائج ان هنالك 4 من اصل 50 عزلة تمتلك طفرة نقطية للهستدين ، بالإضافة الى ذلك تم التحري عن جين *hisG* في البكتريا قيد الدراسة باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction وأظهرت النتائج ان3 عزلات فقط من اصل 50 وبنسبة 6% ، لا تمتلك جين *hisG*. من خلال نتائج الدراسة الحالية نستنتج بان اللحوم المعلبة تحتوي على نسبة مؤثرة معنويا من هذه البكتريا والتي قد تكون مصدر لنشر اصابات هذه البكتريا , كما ان عزل وتشخيص البكتريا التي بها طفرات نقطية يمكن ان يستخدم كنظام بكتيري لتشخيص المواد المسرطنة في دراسات مستقبلية.

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

* بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

المقدمة

تعد بكتريا *S.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 nonsporesforming ، وغير مكونة للمحفظة Noncapsulated ، عادة متحركة تحوي اسواطا محيطة ثلاثية التقسيم Peritrichous flagella ، تحدد الاسواط Flagella نوع النمط المصلي serovar type وهي ضرورية لتكوين المستعمرات colonization في نسيج المضيف (11) وتعتبر ممرضه لمدى واسع من المضائف و تسبب داء salmonellosis الذي يعتبر قلق على الصحة العامة ومهم في جميع أنحاء العالم الذي يعتبراحد الأسباب الرئيسية لالتهاب المعدة والأمعاء وتجرثم الدم في الانسان (13). ومعظم الاصابات ناتجة عن شرب المياه الملوثة وتناول الأطعمة الجاهزة ، اذ تنتقل بكتريا *S.typhimurium* للإنسان من خلال تناول اللحوم والمنتجات الحيوانية الملوثة بالفضلات (11) . شخصت عزلات السالمونيلا *Salmonellae spp* بالطرق المظهرية والكيموحيوية والتنميط المصلي لكن في العقدين الماضيين استخدمت طرق بديلة لتحديد الضرب المصلي من خلال الكشف عن DNA الخاص بها (19)، طرق الكشف عن السالمونيلا التي 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 (27,23,9) . في السنوات الأخيرة كان هناك توجه نحو التقنيات الجزيئية للكشف عن السالمونيلا *Salmonellae* التي استندت بدرجة أكثر على الخصائص الوراثية الثابتة أقل على الملامح المظهرية (10).

أصبحت تقنية PCR البديل بالتشخيص في علم الأحياء المجهرية نظرا للدقة والسرعة بالتشخيص (18). تمتلك بكتريا *S. typhimurium*ذاتية التغذية Prototrophs جميع المسارات الايضية لتخليق الاحماض الأمينية ومنها الهستدين Histidineحيث ان كل حامض اميني يمتلك مساراً تصنيعيا خاصاً به (20) ، في المسار الأيضي لتصنيع الهستدين يتم هدم مصدر الغذاء لتكوين نواتج وسطيه تشارك في عمليه التصنيع الحيوي للحامض الاميني الهستدين ، اذ تهدم تلك النواتج الوسطية بواسطه انزيمات مختلفة كل انزيم عبارة عن بروتين يشفر بواسطة جين معين ومن ثمَّ فأن حدوث أي طفرة في الجينات المشفرة للأنزيمات سوف يمنع تصنيع الهستدين (22,25) .

اما بكتريا *S. typhimurium* ذات الطفرة النقطية تمتلك جميع المسارات الايضية لتصنيع الأحماض الأمينية باستثناء مسار تصنيع الهستدين ومن ثمَّ فلا تستطيع تصنيعة مما يجعل البكتريا غير قادره على النمو إلا بوجود الهستدين من مصدر خارجي بسبب حدوث طفرة في الجين (*hisG*) الذي يشفر واحد من الانزيمات التي تشارك في المسارات الأيضية لتصنيع الحامض الاميني الهستدين ،هذه الطفرة تمنع ترجمة وظيفة الانزيم ومن ثمَّ فأن الخلايا البكتيرية لا تستطيع اكمال تحول النواتج الوسطية لعمليه الهدم الى الهستدين، لذلك فأن السلالات الطافره تحتاج الهستدين لنموها من مصدر خارجي مما يجعلها ملائمة للكشف عن أنواع مختلفة من المواد المطفرة (19)

في العراق ، وهناك العديد من الدراسات التي أجريت على عزل وتشخيص السالمونيلا والتي تقوم على التقنيات المختبرية الروتينية مثل دراسة(8,7,6,4,3,2,1) بينما 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* من الاطفال الرضع في محافظة الديوانية . استهدفت الدراسة الحالية ما يأتي: عزل وتشخيص بكتريا *S.typhimurium* من مصادر مختلفة، والتحري عن الجينات *fimA* و *fimC* كتشخيص تأكيدي لبكتريا *S.typhimurium* باستخدام تقنيه PCR. وكذلك للتحري عن البكتريا التي بها طفرات نقطية

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

تضمنت الدراسة الحالية جمع 500 عينة مختلفة 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 ، وشملت براز الأطفال الذين يعانون من الاسهال من كلا الجنسين وفضلات الحمام اذ جمعت العينات 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(16) .

العزل والتشخيص

تم تشخيص العينات من خلال زراعتها على الوسط الانتخابي Xylose–lysine deoxycholate بطريقة التخطيط Streaking ثم حضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة حيث ظهرت بكتريا *S.typhimurium* بشكل مستعمرات دائريه حمراء ذات مركز اسود وذلك بسبب انتاجها لغاز H2S ، وكذلك اظهرت نتائج سلبية لفحص الاندول وفحص فوكس بروسكاور وموجبه لاختبار احمر المثيل واختبار استهلاك السترات (12،16) .

التحليل الوراثي للسلالات البكتيرية

بعد عزل بكتريا *S. typhimurium* يجب التأكد من سلامتها وراثيا لأختبار الطفرات من خلال وجود point mutation ، التحليل الوراثي يتضمن الخطوات الآتية :

الاعتماد على الهستدين Histidine dependence

لقح وسط Glucose –minimal salts agar الذي يحتوي على نسبة ضئيلة من محلول البيوتين (160 مايكرو ليتر) بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة وثم حضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ، بعد ذلك تفحص الاطباق فاذا لم يلاحظ نمواً فإنَّ البكتريا تعتمد على الهستدين (19).

الاعتماد على البيوتين Biotin dependence

لقح وسط Glucose –minimal salts agar الذي يحتوي على نسبة ضئيلة من محلول الهستدين (160مايكرو ليتر) بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة ثم حضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ، اذا لم يلاحظ نموا فإنَّ البكتريا تعتمد على البيوتين (19).

الاعتماد على الهستدين و البيوتين Biotin and histidin dependent

لقح وسط Glucose –minimal salts agar الذي يحتوي على نسبة ضئيلة من محلول الهستدين – البيوتين (160مايكرو ليتر) بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة وثم حضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ، ملاحظة النمو يدل على ان البكتريا تعتمد على الهستدين و البيوتين (19).

تقنية تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction (PCR)

تم أجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة المتسلسل لتحري عن جينات *fimA* و *fimC* الخاصة بتشخيص جرثومة وكذلك التحري عن جين *hisG* (13) للتأكد من وجود الطفرات النقطية Point mutation في بكتريا *S. typhmurium* وبحسب طريقة (12) وكما يأتي :

استخلاص الحمض النووي البكتيري

تم استخلاص 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 حيث إن أفضل نقاوة للدنا تكون ما بين (1.8-1.6), وأفضل تركيز للدنا ما بين (5-50) نانو غرام/مايكرو لتر.

تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

تم تحضير 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 (الجدول 3).

الترحيل الكهربائي

تم الكشف عن نواتج التضخيم بترحيل العينات كهربائياً على هلام الاكاروز بتركيز (1.5%) لمدة ساعة بفرق جهد مقداره (100) فولت, وتم تقدير 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

Volume	PCR master mix	
5µL	DNA template	
1.5µL	Forward P.	Primers
1.5µL	Reverse P.	
12µL	PCR water ماء الـ بي سي أر	
20µL	Total المجموع	

جدول (2): بادئات الدنا DNA primer

حجم التضخيم	تتابع البادئ		البادئ
508bp	GCGAGTCTGATGTTTGTCGC	F	*fimA*
	TAAAGGTGGCGTCGGCATTA	R	
307bp	AGCGAGCCCAAAAGTGAAA	F	*fimC*
	ATCTTGAGATGGTTGCCAC	R	

F: Forword R: Reverse

جدول (3) : الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية PCR

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	30sec.
Annealing		(59.3°C)[1] (58.3°C)[2] (54.6°)[3]	30sec
Extension		72C	1min
Final extension	1	72C	5min
Hold	-	4C	Forever

1- HisG gene: 59.3°C, 2- FimA gene: 58.3°C, 3- FimC 54.6°C

التحليل الاحصائي Statistical Analysis

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي لمعرفة الفروق المعنوية بين معدلات النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية وللمجاميع كافة وقد حددت الفروق المعنوية عند مستوى احتمالية 5% وتم آستخدام كل من اختبار تحليل التباين الاحادي One Way ANOVA واختبار تحليل التباين الثنائي two way ANOVA واختبار t-test كما تمَّ أختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات بآستخدام أختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) (24).

النتائج والمناقشة

تم في الدراسة الحالية جمع 500 عينة مختلفة والتي شملت 140 عينة براز من الاطفال الذين يعانون من الاسهال من مختلف الاعمار ولكلى الجنسين ، و 142 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 . ثم زرعت على وسط Xylose–lysine deoxycholate لغرض التحري عن بكتريا *S. Typhimurium* ، وتم الحصول على (54) عزلة 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 يمثل الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا *S. Typhimurium* حسب مصدر جمع العينات .

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

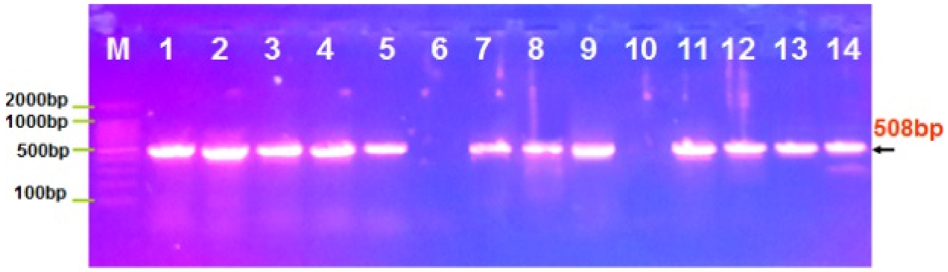
المصدر	العدد الكلي للعينات	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية %
براز الأطفال	140	10	7.14
الكبد المعلب	142	15	10.56
اللحوم المعلبة	128	12	9.38
فضلات الحمام	90	17	18.88
المجموع	500	54	%10.8

P value ≤ 0.05

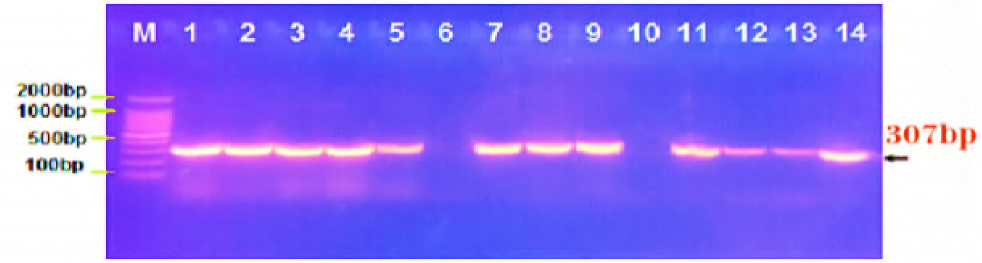
وقد أشار (5) ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت 10% في دراسة اجراها في مدينة الديوانية، اما في دراسة (3) فقد عزلت هذه البكتريا بنسبة 14.47%, فيما كانت لدى (14) بنسبة 28.16%, وقد عزلها (6) بنسبة 48% %

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.

تم في الدراسة الحالية تأكيد تشخيص عزلات *S. typhimurium* بواسطة 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 أكار Xylose–lysine deoxycholate, كماتم استعمال تقنية الــ 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 بكتـريا *S. Typhimurium* باستـعمال تـقنيـة الـ Monoplex PCR والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز بتركيز (1.5%) ، اذ يمثلM:Marker ladder ، والعزلات من رقم (1-5 ،7-9 ، 11-14) بكتيريا *S. Typhimurium* الموجبة للفحص بناتج طوله 508 bp . باستخدام تيار80 امبير و100فولت لمدة ساعة واحدة.



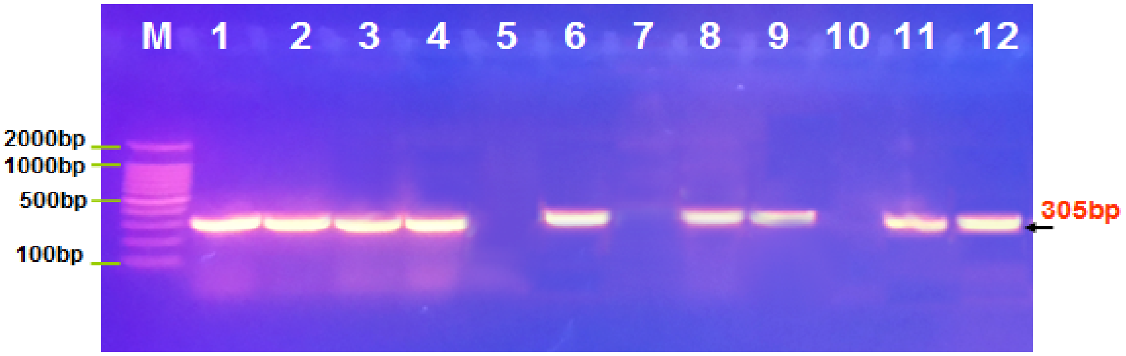
شكل (2) : الترحيل الكهربائي لهلام الاگاروز المستخدم بتركيز1.5 غم والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *fimC* الخاص بتشخيص بكتيريا *S. Typhimurium*, اذ يمثل M:Marker ladder 2000-100bp والعزلات من رقم (1-5 ،7-9 ، 11-14) بكتيريا *S. Typhimurium* الموجبة للفحص بناتج طوله 307 bp باستخدام تيار80 امبير و100فولت لمدة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

التحري المظهري عن الطفرة النقطية.

تم التحري عن الطفرات النقطية point mutationفي جميع عزلات *S. typhimurium* من خلال تنمية البكتريا على وسط قليل الكلوكوز– Glucose minimal salt agar الذي يحتوي على نسبة ضئيلة من محلول (الهستدين – البيوتين) ، أظهرت النتائج ان هنالك 8% (4 من أصل 50عزلة) من بكتريا *S. typhimurium* تحتوي على طفرة نقطية في جين *hisG* من خلال نموها على الوسط المذكور ومقارنتها مع اختبار السيطرة (الوسط خالٍ من محلول الهستدين – البيوتين).

التحري الجيني

استخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المفرد MonoplexPCR في التحري عن جين *hisG* المسؤول عن تصنيع الهستدين في عزلات *S. typhimurium* ، اظهرت النتائج ان هنالك 6% (3 من اصل 50 عزلة) لبكتريا *S. typhimurium* كانت لا تمتلك جين *hisG*. كما في الشكل 3.



شكل (3) : الترحيل الكهربائي لهلام الاگاروز (1.5 %) الذي يحتوي على نتائج فحص PCR لجين *hisG* المسؤول عن تصنيع الهستدين في بكتريا *S. typhimurium* اذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp . العزلات رقم (5،7،10) بكتريا *S. typhimurium* لا تمتلك جين *hisG* اما العزلات من رقم (1-4 ،6 ، 8-9، 11-12) بكتريا*S. typhimurium* التي تمتلك جين *hisG* بناتج طوله 305 زوج قاعدي باستخدام تيار 80 امبير وفرق جهد 100فولت لمدة ساعة واحدة.

اذ ان بكتريا التي تمتلك طفرات نقطية في اول جين (*hisG*) من مشغل الهستدين مما يجعل البكتريا غير قادرة على تخليقه وتحتاجه من مصدر خارجي وهذا يتفق ما ذكر في دراسات سابقة كما في دراسة(21,28,15,14,26,19) الذين أشاروا إلى ان بكتريا *S. typhimurium* المعوزة غذائيا للهستدين لاتستطيع النمو على وسط GM agar الخالي من الهستدين مالم يتم إضافته من مصدر خارجي .يتكون مشغل الهستدين في بكتريا *S. typhimurium* من مجموعة من الجينات أهمها جين *hisG* الذي يشفر إلى الانزيمات التي تشارك في تخليق الحامض الاميني الهستدين ، وحدوث أي طفرة في هذا الجين تمنع عملية التخليق (18) .

ان نتائج هذه الدراسة قد تفتح الباب لاجراء المزيد من الدراسات المستقبلية لتحديد التتابع الجيني الكامل لـ Point mutation مما يجعل استخدام هذه البكتريا كنظام دقيق للكشف عن المواد المسرطنة في الاغذية محليا.

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- Molla, M. A. (2005). Detection of Salmonella carrier in cows in Basrah. M.Sc. Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Basrah , Iraq.
7. 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.
8. 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.
9. Coburn B.; Grassl G.A. and Finlay B.B. (2007).Salmonella, the host and disease: a brief review. Immunol. Cell Biol.85:112–118.
10. Forbes , B. A. ; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic Microbiology 12th ed. Bailey and Scotts'. Mosby Elsevier. China., pp: 93-247.
11. 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.
12. Gallegos-Robles, M. ; Loredo, A. ; Ojeda, G. ; Vega, A. ; Chew, Y. ; Velarde, S. and Fratamico, P. (2008).Identification of Salmonella serovars Isolated from Cantaloupe and Chile Pepper

Production Systems in Mexico by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. J. Food Protect , 71 (11): 2217-2222.

13. Goodson-Gregg, N. and De Stasio, E.A . (2009). Reinventing the Ames Test as a Quantitative Lab that Connects Classical and Molecular Genetics. Genetics, 181: 21-30.
14. Hariri, M. ; Jalali A. ; Farajzadeh, A. and Khajeamiri, E. (2010). Assessing Mutagenicity of the drug mdmam (Ecstasy) available in Iran using Amea test . Natural Pharmaceutical Products, 5(1): 44-49.
15. Hojatia, Z. and Dehghanianb, F. (2014). Evaluation of Mutagenic Potentials of Some Food Additives by Ames Test. Food Biosciences and Technology, 4 (2): 73-81.
16. 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.
17. MacFaddin , J.E. (2004). Biochemical tests for identification of medical MedicalBacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
18. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res, 113: 173-215.
19. Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay . Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455(1): 29-60.
20. Nikoloff, N. ; Larramendy, M.L. and Soloneski, S. (2014). Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells after flurochloridone herbicide exposure. Food and Chemical Toxicology, 65: 233-241.
21. Omoruyi, I.M. (2015). Mutagenic and oestrogenic activity of commercially processed food items and water samples :A comparison between finland and Nigeria. M.Sc. Thesis. College of Veterinary Medicine , University of Helsinki.
22. 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.
23. 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.

24. Schielfer,W.C. (1980).Statistics for the biological sciences.2nd ed.Addison .Wesley publComp,California,London.

25. Takiya, T.; Horie, Y. ;Futo, S. ; Matsumoto, Y. ; Kawai, K. and Suzuki, T .(2003). Rapid test," Mutation Research , 113 - 173.

26. Tejs , S. (2008). The Ames test: a methodological short review. Environmental Biotechnology, 4 (1) : 7-14.

27. 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.

28. Zou , Y.(2014). Impact of different preparations on the mutagenicity of meat products during digestion as evaluated by the AMES-test. M.Sc. Thesis. College of Bioscience Engineering , University of Gent.

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

Abbas mayar hazam & *Maitham Ghaly Yousif

Biology Department, Collage of Science, University Al-Qadisiyah

E. mail matham.yousif@qu.edu.iq 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, biochemical and 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. then diagnose the *Salmonella typhimurium* point mutation through culturing on Glucose -minimal salt agar , the results showed a 4(8%) of 50 isolates were had point mutation in *hisG* gene of the histidine synthesis. Polymerase chain reaction technique also using to detect the presence of *hisG*, the results showed that 3(6%) of the 50 isolates do not have *hisG*, these results revealed that candid foods contain significant percentage of this bacteria which may be cause source for infection. Also the diagnosis of the point mutation in this bacteria can be used as local system for mutagenic agent detection in future studies.

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

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