

جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية / كلية الطب البيطري



عزل وتشخيص جرثومة *Salmonella typhimurium* والكشف عن الجين المشفّر لتخليق النوع الهدبي الأول باستعمال تقنية تفاعلات سلسلة البلمرة (PCR)

بحث مقدم الى /

■ كلية الطب البيطري / جامعة القادسية
■ وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في الطب البيطري

باشراف الاستاذة

زينه فؤاد صالح الحسناوي

من قبل الطالبتين

بنين عبد الرسول محمد الخالدي

بان عماد جاسم الزبيدي

الخلاصة

تم جمع 50 عينة براز في الفترة من شهر تشرين الثاني عام 2016 ولغاية شهر شباط 2017 من الأبقار باعمر واجناس مختلفة في مزارع ومجازر محافظة الديوانية ...

وقد تم عزل وتشخيص جرثومة السالمونيلا باستخدام طرق الزرع الجرثومي للعينات على اوساط زراعية انتقائية بالإضافة الى استعمال الاختبارات الكيميوحيوية واختبار التلازن باستعمال المصل المضاد متعددة واحادية التكافؤ وكذلك استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البلمرة (PCR) للكشف عن وجود الجين الهدب النوع الاول (Type -1- fimbriae) المشفر للاهداب الخاصة بجرثومة *S.typhimurium* .

اظهرت النتائج ان نسبة عزل جراثيم السالمونيلا spp في عينات براز الحيوان كانت 6% واظهرت النتائج التنميط المصلي لعزلات جرثومة السالمونيلا والتي استخدم فيها المصل المضاد متعدد واحادي التكافؤ ان جميع عزلات السالمونيلا في الابقار من النمط المصلي *S.typhimurium* .

وعند استخدام تقنية PCR للكشف عن الجين المشفر لتأليل (fimbriae) Type-1-(fimbriae) أظهرت جميع عزلات النمط المصلي *S.typhimurium* في الابقار احتواها على هذا الجين وذلك لوجود حزمة واحدة ناتجة من عملية التضخيم للحمض النووي DNA والتي حجمها 289 زوج قاعدي عند ترحيلها على هلام الاكاروز....

كشفت نتائج هذه الدراسة ان تقنية تفاعل سلسلة البلمرة-PCR اظهرت سرعة التشخيص في الكشف عن النمط المصلي لجرثومة السالمونيلا لاسيما المشفرة للجين المسؤول عن تشفير النوع الهدبى الاول المعزولة من الابقار مقارنة بالفحوصات الأخرى الزراعية والكيميوحيوية والمصلية....

الفهرس

الصفحة

المحتويات

الفصل

I

II - VII

VIII - XI

XII - XVII

XVIII - XX

XXI - XXII

XXIII - XXVI

المقدمة

أاستعراض المراجع Literatures Review

المواد وطرق العمل

النتائج

المناقشة

الاستنتاجات

النوصيات

المصادر

الأول

الثاني

الثالث

الرابع

الخامس

١- المقدمة

يعد مرض السالمونيلوس (salmonellosis) من الأمراض المنتشرة في العالم بشكل واسع وتصيب كلاً الإنسان والحيوان وهي من الأمراض المشتركة (Zonosis disease) ويسبب اصابات خطيرة وموت الإنسان وهلاك الحيوان. يكون هذا المرض شائعاً في العجول من عمر أسبوع إلى 10 أسابيع، غالباً ما يحدث في الأبقار الطيور البالغة وأبقار اللحوم ويعد أيضاً من الأمراض ذات التأثير الاقتصادي الخطير (Serious economic) على لحوم الأبقار.

تحدث الإصابة غالباً عن طريق تناول المواد الغذائية أو الأعلاف الملوثة وبالرغم من إن الأبقار تصاب بعدة أنواع من الأنماط المصلية فإن الأنواع المهمة منها والشائعة هي (*S.dublin*) و(*S.typhimurium*). شخصت جرثومة السالمونيلا بعدة طرق منها الزراعة والكيموحيوية والمصلية فضلاً عن وجود دراسات أشارت إلى استعمال تقنية PCR للتحري عن عوامل الضراوة لجرثومة السالمونيلا ومن ضمنها (*S.typhimurium*) و(*S.enteritidis*) والتي شملت جين *fimH* المشفّر لتخليق النوع الهدبي الأول.

أن شدة المرض وعدم توفر العلاج الفعال بشكل جيد فضلاً عن انتشار وباء الإصابة الناتج من تناول الأغذية والمياه الملوثة بهذه الجرثومة كان دافعاً لتركيز الأبحاث حول تحسين كفاءة تشخيص هذه الجرثومة ودراسة أمراضيتها ووبائيتها ، إذ شهدت السنين الأخيرة استعمال عدد كبير من تقنيات التشخيص الجزيئي لتسهيل عملية التحري عن البكتيريا المسببة للإسهال وتعزيز الدراسات الوبائية باعتماد المؤشرات الجزيئية لغرض التعرف على طبيعة العلاقة بين السلالات التي تم الحصول عليها من مصادر مختلفة وتحديد مصدر العدوى.

والهدف من البحث هو الكشف الجزيئي عن الجين *C fim* لجرثومة السالمونيلا *S.typhimurium* باستخدام تقنية PCR وإمكانية الاستفادة منها في الدراسات التشخيصية مقارنة بالفحوصات التقليدية والتحري عن الجينات المشفّرة للهدب النوع الأول والذي يعتبر من عوامل الضراوة في السلالات المعزولة باستعمال تقنية تفاعل سلسلة البلمرة (PCR).

2.1 نبذة تاريخية لجرثومية السالمونيلا والنمط المصلي *S. typhimurium*

ان اول من اكتشف جرثومية السالمونيلا في الانسان هو العالم Eberth عندما عزلها من طحال مريض توفي بحمى غير مشخصة وسميت في بادئ الامر *Eberthela typhosa*, بعد ذلك تمكّن العالم Gaffkey من زرعها والحصول عليها بشكل نقى من انسان مصاب بالتيفوئيد عام 1884 وسميت بعد ذلك بالسالمونيلا نسبة الى العالم الامريكي Salmon عام 1885 الذي يرجع اليه الفضل مع Smith في عزل جرثومية *S.cholerasuiss* من خنزير مصاب بكولييرا الخنازير [1]. تمكّن العالم De-noble لأول مرة من عزل النمط المصلي *S. typhimurium* لأول مرة عندما حدثت ثورة مرضية عام 1888 نتيجة تلوث المواد الغذائية بهذه الجرثومية [2]. يصيب النمط المصلي *S. typhimurium* كل انواع الحيوانات ويعتبر من اهم الاسباب الى حدوث التسمم الغذائي [3]. تتوارد هذه الجرثومية في المياه، التربة، البراز الحيواني، المنتجات الحيوانية مثل منتجات الالبان والبيض واللحوم الطري ويحتفظ الطعام بطعمه ورائحته الطبيعية مما يصعب الشك بتلوثه [4]. بعدها تمكّن Loffer عام 1892 من عزل *S. typhimurium* من جرذان مصابة بمرض يشبه التيفوئيد [5]. استعملت هذه الجرثومية في الدراسات الواسعة حول امراضية الجرثومية والمناعة المترکونة لها في فران التجارب وخلايا الانسان حيث اعتبرت نموذجاً لدراسة التفاعلات التي تحدث بين الجرثومية والسائل [6].

2.2 الصفات الكيموحيوية والزرعية لجرثومه *S. typhimurium*

ينتمي جنس السالمونيلا الى عائلة الجراثيم المعاوية Enterobacteriaceae التي تعيش في القناة المعاوية للانسان والحيوان وهي عصيات سالبة لصبغة كرام هوائية ولا هوائية اختيارية غير مكونة للابواغ (Non-sporing) جميعها متحركة بوساطة اسواط محيطية (Peritricous) باستثناء *S. pullorum* و *S. gallinarum* [7]. غير مخمرة للاكتوز وسالبة لاختبار فوكس بروسكاور تنتج انزيم الكاتلیز ولا تنتج انزيم الاوكسیدیز ومعظم السلالات تنتج كبریتید الهایدروجين (H_2S) ماعدا *S. paratyphi A*. ولا تنتزع الامینات من الفنیل الینین ولا يحصل لها نمو في الاوساط الحاوية على سیانید البوتاسيوم ولا تمیع الجیلاتین وبعض افرادها ممرضة للانسان والحيوان ومتوفرة بصورة واسعة الانتشار في الطبيعة [8]. تستطيع الجرثومه العيش لعدة اشهر في ظروف بيئية جافة ورطبة اذا لم تتعرض الى ضوء الشمس المباشر او درجات الحرارة العالية [9]. للجرثومه القدرة على تخمير سكريات الكلوکوز، الفركتوز، والارابینوز والزایلوز، والتريھالوز فضلاً عن تحرر الغاز، ولا تخمر السکروز والسالسین والادونیتول وتنتج کبریتید الهایدروجين H_2S ولا تنتج الاندول ولا تمیع الجیلاتین وتخزل النترات كما لا تحل اليوریا وتسنهك السترات كمصدر وحيد للكاربون [1]. وتحرر غاز (H_2S) عند زرعها على الوسط السكري الثلاثي الحاوي على الحديد Tripe Sugar iron [10]. تكون مستعمرات *S. typhimurium* على وسط السالمونيلا - الشکیلا أشكالاً ملساء دائيرية ذات حافات متكاملة بقطر (٣-٤) ملم محددة صفراء شاحبة تحتوي على مركز اسود [12].

٢.٣ التصنيف وموقع جرثومة الـ *S. typhimurium*

نظراً لأهمية جرثومة السالمونيلا بصورة عامة وما تسببه من أمراض في الإنسان والحيوان فقد قسمت بشكل عام إلى ثلاثة مجاميع اعتماداً على نوع العائل الذي تكيفت معه [13] ; [14]. فشملت المجاميع التي تكيفت لاصابة الإنسان وهي *S. paratyphi* ، *S. typhi* ، *S. dublin* التي تسبب الحمى التيفوئدية والحمى الباراتيفوئدية والمجاميع المتكيفة لحيوان واحد وهي *S. gallinarum* التي تصيب الابقار و *S. enteritidis* التي تصيب الدواجن. والمجاميع غير المتكيفة لمضيف معين وتشمل الانماط المصلية التي تصيب الإنسان والحيوان وهي *S. typhimurium* . أن تطور الطرق التشخيصية وأمتلاك هذه الجراثيم الصفات الكيموحيوية والمستضدية ساعد في تشخيص الانواع المختلفة من هذا الجنس [15] ; [16]

٢.٤ تصنيف جرثومة السالمونيلا حسب التفاعلات الكيموحيوية

قسم (١٩٧٥) جنس السالمونيلا إلى أربعة جنисات Sub-genus يمكن التمييز بينهما بسلسلة من الاختبارات الكيموحيوية ويشمل:

- * الجنس الأول أكثر من (٢٠٠٠) نمط مصلي خاص بالانسان او المشتركة بين الانسان والحيوان مثل *S. typhi* *S. dublin* *S. typhimurium* .
- * الجنس الثاني *S. daressalam* تضم الانماط المصلية التي تصيب الحيوانات ذوات الدم البارد.
- * الجنس الثالث *S. arizona* تضم الانماط المصلية التي تصيب الدواجن والطيور.
- * الجنس الرابع *S. houtenae* تضم الانماط المصلية النادرة.

وحدثياً قسم جنس السالمونيلا إلى سبعة جنисات وهي موضحة في جدول (1) [11]. أستمر الجدل حول جنس السالمونيلا لعدة سنوات وطبقاً لآخر تسمية Latest nomenclature فقد حدثت عدة تحويرات Modification في تصنيف هذا الجنس [3].

2.5 تصنیف الجرثومة حسب المستضدات

يعتبر العالم White اول من ادخل التركيب المستضدي في نظام تصنیف السالمونيلا حيث استطاع تمیز عدد قليل من السالمونيلا وبفضل العالم Kauffmann أتسع نظام التصنیف وقد اطلق على هذا النظم Kauffmann-White scheme (جدول 2). ويشکل هذا النظم اهمية كبيرة في فهم امراضية ووبائية جرثومة السالمونيلا حيث يحدد النمط المصلی لجرثومة السالمونيلا ومن ضمنها *S. typhimurium* وذلك بالاعتماد على التركيب المستضدي لكل منها [17].

أولاً:- المستضد الجسمی (O- Ag)

هو عبارة عن متعدد السكريد الشحمي (lipopolysaccharide) يقع على الغشاء الخارجي لجدار الخلية ثابت بالحرارة لكونه لا يتاثر بالتسخين في ١٠٠ م لمنة ساعتين ونصف وثبت اتجاه الكحول بالمعاملة القياسية ٩٦٪ ايثانول لمدة ساعتين كما انه لا يتاثر اذا علق بـ (٢٠٠) فورمالین [18]. هنالك اكثر من ٦٧ مجموعة مصلية يرمز لها بحروف ابجديّة لاتينية كبيرة وتنقسم بعض هذه المجاميع الى مجاميغ ثانوية مثل مجموعة E لها اربعة مجاميغ ثانوية E1, E2, E3, E4 ويرمز للمستضدات الجسمية بالارقام العربية وكل مجموعة تتضمن بمستضد رئيسي خاص بها واحد او أكثر لا يوجد في مجاميغ اخرى أي كل نمط يمتلك اثنين او أكثر من المستضدات الجسمية ، والتركيب المستضدي لجرثومة *S. typhimurium* هو [19] ١٢، ١٤، ٥، ١.

ثانياً:- المستضد السوطي (H- Ag)

هي مستضدات بروتینیة تمتاز بكونها غير ثابتة بالحرارة (heat-labile) تتوارد في جراثيم السالمونيلا المتحركة ويكون من بروتين يطلق عليه flagellin (ولهذه المستضدات قابلية تكوين الأضداد المناعية حتى في حالة اسلاخلتها من خلايا الجراثيم، وتنقسم هذه المستضدات الى طورين هما الطور الاول (phase I) والطور الثاني (phase II) وان معظم الانماط المصلية لجرثومة السالمونيلا هي ثنائية الطور [18]

- الطور الاول (phase I) يسمى بالطور النوعي تعلم بحروف صغيرة ابتدأ من a وانتهاء الى z ولكن سبب وجود اكثر من 70 مستضد سووطياً اصبحت هذه التعليمات غير متبعة وتم اضافة ارقام صغيرة جديدة لها مثل z_1, z_2, z_3 والمستضد النوعي لجرثومة *S. typhimurium* هو (i).

• الطور الثاني (phases II) ويسمى بالطور غير النوعي يعلم بواسطة الأرقام العربية، إذ وجد بأن مستضدات الطور الأول نفسها موجودة في الطور الثاني مثل Z,N,E وكما ان العديد من الانماط المصلية تشارك نفس المستضد للطور الثاني وبالتالي سمي هذا الطور بالطور غير المتخصص non specific او طور المجموعة والمستضدان السوطيان الغير نوعيين لجرثومة *S. typhimurium* هي [10]. لذا فإن المستضدات الجسمية تحدد المجاميع بينما المستضدات السوطانية تحدد النمط المصلبي وبالذات الطور الاول المتخصص [20]. ان التطور الحال في الطرائق المتبعة في الكشف عن المستضدات Antigens وتشخيصها مصلياً Serologically ومن ثم تطبيق هذه الطرائق على هذه المجموعة من الجراثيم، فقد وصف عدد كبير من الانماط المصلية ولا زالت ضرورة مصلية جديدة من السالمونيلا توصف باستمرار ونتيجة لذلك فقد تم وصف اكثراً من 2500 من الانماط المصلية المختلفة، ويعود هذا التطبيق مهم من الناحية الوبائية [21]. اذ ان كل واحد من هذه الانماط المصلية يعد مسبباً قوياً للمرض وان اكثراً الانماط المصلية شيوعاً التي تصيب الانسان والحيوان هي (*S. typhimurium*) و [22] (*S. enteritidis*).

2.6 الأمراضية Pathogenesis

لا تختلف داء السالمونيلا في الانسان عن الحيوان ويمكن تقسيمها الى اربع مراحل وهي التموضع، الاختراق، احداث الاسهال واخيراً الانتشار الى الجهاز الشكي البطاني :

أولاً: التموضع Colonization

أن مراحل استعمار الامعاء يبدأ بالالتصاق ببطانة الامعاء والخلايا الطلائية من خلال الحفافات الهدبية لهذه الخلايا (Brush border) بعد اجتيازها حموضة المعدة التي تعد خط الدفاع الاول ضد الاصابات المغوية وافراز الكلوبيولين المناعي IgA ومخاطية الامعاء التي تلعب دوراً "مهماً" في تجنب اختراق الجرثومة للخلايا المغوية

[23]

ثانية: اختراق المخاطية للأمعاء

ان اختراق الحاجز الطلائي يبدأ من خلايا M cell التي تغطي لطخات باير (Peyer's patches) اذ أكدت الدراسات باستخدام المجهر الإلكتروني بأن هذا الاختراق يتبع بتحطم خلايا M cells للطخات باير .**[24]** حيث اعتبر **[25]** ان الخطوة الأساسية في امراضية جرثومة *S. typhimurium* هي القدرة على اختراق الحاجز المخاطية للأمعاء. تحدث عملية الاختراق عند اتصال *S. typhimurium* مع خلايا المضييف وبفعل غزو الجرثومة يتاثر الغشاء البلازمي للخلية المضييف ويأخذ مظهراً مشابهاً لقطرة من السائل عندما تقع على سطح صلب يسمى هذا التأثير الغشاء البلازمي المجد (Plasma membrane ruffling) كنتيجة من نتائج تمزيق هيكلية خلايا المضييف (Cytoskeleton host cells)

.**[26]**

ثالثاً: تحفيز افراز السوائل (ميكانيكية الاسهال)

تدخل البكتيريا بعد اجتيازها الطبقة المخاطية للأمعاء وخلايا Mcells التي تغطي لطخات باير اللفافية إلى الأنسجة المفاوية تحت المخاطية والأنسجة المفاوية الأخرى والبلعوميات وتبدأ باطلاق الديفان المعيوي enterotoxin **[27]**. ومع ذلك فإن هذا الغزو من جراثيم السالمونيلا يؤدي إلى حدوث الاسهال وذلك بوجود الديفان المعيوي التي تنتج جرثومة السالمونيلا اذ انه يعمل مع البروستوكلاندين المفرز من الخلايا البطانية والتي تعمل على تنشيط إنزيم الأدينيل سايكليز Adenyl cyclase ويزداد تركيزه وهذا يؤدي بدوره إلى زيادة تركيز النيوكوتايد الحلقي الخلوي (Cyclic Adenosine monophosphate) والذي يعمل على إعادة امتصاص الماء والسوائل من الدم وتجمعها في جوف الأمعاء مما يؤدي إلى زيادة قطر تجويف الأمعاء وتحفيز نهاية الأعصاب فيها ثم زيادة الحركة المتحولة ثم حدوث الاسهال المائي **[28]**. (شكل ١).