----- مجلة علوم الرافدين، المجلد17، العدد9، خاص بعلوم الحياة، ص 1-8، 2006-----

تعيين الانماط المصلية وتضخيم محتوى DNA البلازميدي لجرثومة *Salmonella* المعزولة من مصادر مختلفة

خالد دحام احمد **زيد علي عزيز**

قسم علوم الحياة

كلية التربية

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2003/2/1 ؛ تاريخ القبول 2003/9/15)

الملخص

جمعت 23 عزلة من جنس السالمونيلا من مستشفى السلام العام في الموصل، ومن مصادر مختلفة هي الدم، الادرار، البراز والاطعمة. فحصت العزلات مجهرياً وشخصت باستخدام الاختبارات الكيموحيوية والمصلية. درست خاصية التضخيم لعدد نسخ المحتوى البلازميدي لهذه العزلات الجرثومية بوجود الكلورامفينيكول بتركيز (150 مايكروغرام/مل) حيث أبدت ثلاث عزلات منها تضخيماً حقيقياً من خلال زيادة معدل تركيز DNA البلازميدي حوالي 3-13 ضعف، بينما أبدت عزلة واحدة فقط تضخيماً حقيقياً في المحتوى البلازميدي لها بوجود مضاد الحيوي السبكتينومايسين ، ولم تتمكن أية عزلة من النمو في الوسط الغذائي الحاوي على التتراسايكلين بتركيز (150 مايكروغرام/مل) .

Determination of Serotype and Amplification of the Plasmid DNA Content for the Bacteria *Salmonella* Isolated from Various Sources

Khalid D. Ahmed **Zaid A. Aziz**

Department of Biology
College of Education
Mosul University

ABSTRACT

Twenty three bacterial isolates of the genus *Salmonella* had been collected from General Al-Salam Hospital in Mosul, and from different sources are blood, urine, stool and food. They were microscopally examined and diagnosed using biochemical and serological tests.

The ability of plasmid DNA content to amplify its copy number in the bacterial isolates was studied in the presence of chloramephenicol at concentration 150 µg/ml. Three isolates among others showed real amplification where the concentration of the DNA content increased in the range of 3-13 folds. While only one isolate showed real

amplification in its plasmid DNA content in the presence of spectinomycin, and no growth of any isolate in the nutrient media containing tetracyclin at concentration (150 µg/ml), was observed.

المقدمة

يعد جنس السالمونيلا من اكبر الاجناس العائدة إلى العائلة المعوية من حيث عدد الانواع التابعة لهذا الجنس، كما ان تصنيفها معقد جداً نتيجة التعرف المستمر على انماط مصلية جديدة تقع تحت هذا الجنس، وجرثومة السالمونيلا هي جرثومة عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام وهي مخمرة لسكر الكلوكوز ولا تخمر اللاكتوز والسكروز وغير مكونة للسبورات. تحوي السالمونيلا على مستضدات مختلفة واهمها المستضد الجسمي (O-antigen) وهو عبارة عن متعدد السكريات الدهني والمستضد السوطي (H-antigen) وهو مكون من بروتين، كما تحوي الجرثومة *S.typhi* مستضد اخر هو مستضد الفوعة (Vi-antigen) وهو عبارة عن متعدد السكريات الحامضي (Brooks et al 2001; Indar et al, 2001). ان العديد من الجراثيم المرضية تحمل عناقيد كبيرة من المورثات الامراضية التي تؤدي وظيفة امراضية وان هذه المورثات توجد في انواع السالمونيلا وهي ضرورية للشكل الضاري ويسمى موقع هذه المورثات بالجزيرة الامراضية للسالمونيلا (Hensel, 2000).

ان فكرة التضخيم هي زيادة عدد نسخ البلازميد، حيث ان بعض البلازميدات المتعددة النسخ (التي لها عدد نسخ أكثر من 20 نسخة) يمكنها الاستفادة من خاصية التضاعف بغياب تخليق البروتين، وهذا هو الاختلاف مع كرموسوم الخلية (الذي لا يمكنه التضاعف تحت هذه الظروف)، اذ أمكن استخدام هذه الخاصية بإضافة مثبط للبروتين (Brown, 1995). يمكن إضافة مضاد الكلورامفينيكول إلى مزرعة جرثومية عند الطور اللوغارتمي من اجل زيادة نسخ البلازميد حيث يتوقف تضاعف الكروموسوم بسبب توقف تصنيع البروتينات الخاصة بمرحلة البدء Initiation stage في تضاعف DNA الكروموسومي بينما يستمر تضاعف البلازميد والذي يؤدي في النهاية إلى زيادة عدد النسخ بعد عدة ساعات إلى أكثر من 1000 نسخة في الخلية الواحدة (Broda, 1979 ; Freifelder, 1987).

ان البلازميد المثالي لهذه العملية هو R-plasmid، إذ ان قطعتي DNA الرئيسيتين لهذا البلازميد وهما العامل الناقل للمقاومة Resistance transfer factor (RTF) والمحددة r (r-determinant) اللتان تشفران لخاصيتي الانتقال والمقاومة لها القابلية على التضاعف الذاتي، وعادة تكون هاتان الجزيئتان منفصلتين فتكون RTF بحالة مشددة لذا فهي متواجدة بعدد قليل من النسخ بينما المحددة -r تكون تحت سيطرة مسترخية لذا فان لها القابلية على زيادة عدد نسخها إلى عدد كبير تحت الظروف الاختبارية، باستخدام الكلورامفينيكول في هذه العملية تكون زيادة عدد نسخ المحددة -r واضحة جداً (Clowes, 1972; Hashimoto and Rownd 1975). في حين نسبة RTF لا تتغير حيث ان جزيئات المحددة r خلال هذه

العملية تكون بترتيب ترادفي وزيادتها تتضمن تطويل لهذه التراكيب الترادفية من خلال عمليــات إعــادة التوليف Recombination Processes (Mohamed, 1999).

المواد وطرائق العمل

استخدمت الأوساط الغذائية المجهزة من قبل شركتي Mereck و Oxoid وكانت مضادات الحيوية مجهزة من قبل الشركة العامة للادوية في سامراء، أما الأنزيمات المستخدمة فكان أنزيم اللايسوزايم قد تم الحصول عليه من قسم التقنيات الاحيائية/ كلية العلوم في جامعة بغداد، في حين جهزت أنــزيم RNase من شركة Fluka.

تم الحصول على العزلات والبالغ عددها (23) عزلة من جرثومة *Salmonella*. مــن مصـــادر مختلفة شملت نماذج الادرار، البراز، الدم، والاطعمة من مستشفى السلام العام في الموصل وكلية الطــب البيطري في جامعة الموصل.

تشخيص العزلات الجرثومية

شخصت العزلات الجرثومية بصورة أولية بملاحظة قابلية اصطياغها بصبغة كرام، وتشـــخيص أشكال الخلايا والمستعمرات المنفردة وصفاتها على الأوساط المختلفة، كذلك تم استخدام نظام API 20 E والمجهز من شركة Biomerieux والذي يعد نظام تشخيصي للبكتريا المعوية وأنواع البكتريا العصـــوية السالبة لصبغة كرام. اضف إلى ذلك تم فحص كافة العزلات الجرثومية مصليا بطريقة الــتلازن وذلــك باستخدام مصول متعددة التكافؤ (Polyvalent sera OandH) اذ ان ظهور حالة التلازن الحبيبي هو دليل على التفاعل الموجب (Cruickshank et al.,1975). نميت العزلات المراد تشخيصها على وسط Kligler Iron Agar ثم ارسلت العزلات المزروعة على موائل هذا الوسط إلى معهد الســالمونيلا فــي مركــز الصحة العامة في بغداد لاتمام عملية التشخيص لجرثومة السالمونيلا.

مقاومة مضادات الحيوية

اختبرت مقاومة عزلات السالمونيلا الجرثومية للمضادات المستخدمة لغرض تحديــد العــزلات المقاومة من جرثومة السالمونيلا حسب طريقة (Grant and Pittard,1974) وباستخدام طريقة التخطيط على الاطباق الحاوية المضادات.

تضخيم عدد نسخ DNA البلازميدي من العزلات الجرثومية

اتبعت طريقة (Norgard et al.,1979)، لاجل تحديد قدرة DNA البلازميــدي الموجــود فــي عزلات السالمونيلا على تضخيم عدد نسخه، وذلك بعد انتخاب العزلات الجرثومية المقاومـــة للتراكيــز

العالية لمضاد الحيوي الكلورامفينيكول، السبكتينومايسين والتيتراسايكلين التي أضيفت إلى وسط الاكـــار المغذي بتركيز 150 مايكروغرام/مل.

عزل DNA البلازميدي وتقدير تركيزه

عزل DNA البلازميدي من العزلات الجرثومية ثم حسب تركيزه حسب الطريقة التي استخدمها (Birnboim and Doly,1979).

النتائج والمناقشة

تشخيص العزلات الجرثومية

شخصت العزلات الجرثومية مختبرياً وشملت نماذج مرضية مختلفة المصـــادر وهـــي الـــدم (4 عينات)، الإدرار (4 عينات)، الأطعمة (عينتان) والبراز (13 عينة). بينت الاختبارات الكيميوحيوية نتائج تتطابق مع صفات جرثومة السالمونيلا، حيث كانت نتائج التشخيص في اختبار نظـــام API 20 E هـــي *Salmonella spp.* بنسبة 99%.

أمّا تشخيص الأنماط المصلية فقد تم من قبل معهد السالمونيلا في بغداد بعد إرسال نمـــاذج مـــن العزلات إلى المعهد، ويبين الجدول (1) الأنماط المصلية والصيغة المستضدية لهذه الانماط.

الجدول 1: الصيغ المستضدية للأنماط المصلية المشخصة من جرثومة *Salmonella* حسب مـــا وردت من معهد السالمونيلا.

النمط المصلي	المجموعة المصلية	الصيغة المستضدية	عدد السلالات	ارقام السلالات	مصدر العزلة
S. typhi	D	9, 12, [vi] d	2	8, 10	الادرار، الاطعمة
Salmonella senftenberg	E4	1, 3, 19 g, [s], t	2	1, 2	الدم
S. anatum	E1	3, 10 [15] [15, 34]e, h 1, 6	4	3, 7, 9, 23	الدم، الادرار، الاطعمة، البراز
S.typhimurium	B	1, 4, [5], 12 I1, 2	14	5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22	الادرار، البراز
S. emek	C2-C3	8, 20 g, m, s	1	4	الدم

دراسة قابلية محتوى DNA البلازميدي على تضخيم عدد نسخه في عزلات جرثومة *Salmonella* قيد الدراسة

درست صفة تضخيم عدد نسخ DNA البلازميدي في العزلات، وذلك بعد انتخاب العزلات المقاومة للتراكيز العالية من مضادات الحيوية المستخدمة في هذا الاختبار وهي الكلورامفينيول والسبكتينومايسين والتيتراسايكلين بتركيز (150 مايكروغرام/مل) المضافة إلى للمزرعة الجرثومية عند الطور اللوغاريتمي وعند كثافة ضوئية قدرها (0.4) لهذه العزلات كما وضحها Norgard واخرين (1979) وكانت النتائج كما هو موضح في الجدول (2).

الجدول 2: تأثير إضافة الكلورامفينيكول أو السبكتينومايسين (150 مايكروغرام/مل) إلى الطور اللوغاريتمي للمزارع الجرثومية النامية لعزلات *Salmonella*.

رقم السلالة	مصدر العزلة	المضاد المستخدم	قبل إضافة المضاد الحيوي		بعد إضافة المضاد الحيوي (150 µg/ml) والتحضين لمدة 24 ساعة	
			مقدار كثافة الضوئية للمزرعة الجرثومية (590 nm)	متوسط تركيز DNA البلازميدي µg/ml	مقدار كثافة الضوئية للمزرعة الجرثومية	متوسط تركيز DNA البلازميدي
8	الإدرار	Cm	0.400	5.083	0.410	41.500
10	الأطعمة	Sp	0.390	8.016	0.475	24.25
16	البراز	Cm	0.399	6.633	0.420	106.16
17	البراز	Cm	0.405	7.550	0.450	28.55

بعد اختبار مقاومة العزلات الجرثومية للسالمونيلا لمضاد الحيوي الكلورامفينيكول وبتركيز نهائي قدره (10 مايكروغرام/مل) تبين ان هناك ست عزلات مقاومة لهذا المضاد، وكانت ثلاثة منها فقط مقاومة للتراكيز العالية التي يمكن استخدامها في هذا الاختبار ومن ملاحظة الجدول (2) نرى ان هناك ظاهرة التضخيم في عدد نسخ البلازميدات العائدة لهذه العزلات المذكورة واضحة بوجود الكلورامفينيكول، ففي سلالة *S. typhi* الرقم (8) التي مصدرها الادرار كان متوسط التركيز DNA البلازميدي بعد اضافة مضاد حيوي اكبر بثمان اضعاف تقريبا من متوسط تركيز DNA البلازميدي قبل اضافة المضاد، أمّا في السلالة رقم (16) المعزولة من البراز فان حاصل الزيادة في متوسط تركيز البلازميد فيها واضح بشكل كبير حيث يصل إلى اكثر من عشرة اضعاف تركيز البلازميد قبل اضافة المضاد، في حين كان متوسط تركيز البلازميد في السلالة رقم (17) المعزولة ايضا من البراز بعد اضافة المضاد اكبر باربعة اضعاف من متوسط تركيزه قبل اضافة مضاد الكلورامفينيكول.

من جهة اخرى نلاحظ بان السلالة رقم (10) ومصدرها الاطعمة هي الوحيدة المقاومة للتراكيز العالية للمضاد الحيوي السبكتينومايسين من بين خمسة عشر عزلة مقاومة للتراكيز النهائية وتبين ان لها

القابلية لتضخيم عدد نسخ البلازميد فيها فكان متوسط تركيز DNA البلازميدي بعد اضافة المضاد اكبر بثلاثة اضعاف مما كان عليه قبل اضافة المضاد.

فضلا على ذلك فقد تم ملاحظة قراءات كثافة الضوئية للمزارع الجرثومية عند طـول مـوجي قدره 590 نانوميتر بعد انتهاء فترة الحضن للمزرعة الجرثومية الحاوية على مضاد الحيـوي المناسـب بتركيز (150 مايكروغرام/مل) للتاكد من حدوث ظاهرة التضخيم الحقيقي فـي المحتـوى البلازميـدي لعزلات السالمونيلا المنتخبة، حيث انه لم تحدث زيادة كبيرة في قـراءة الكثافـة الـضوئية للمزرعـة الجرثومية والتي تدل على توقف تضاعف الكروموسوم نتيجة اضـافة مـضاد الحيـوي بتركيـز (150 مايكروغرام/مل) الذي يؤدي إلى تثبيط تصنيع البروتينات الخاصة بمرحلة البدء فـي تـضاعف DNA الكروموسومي، أمّا اذا كانت هناك زيادة في الكثافة الضوئية للمزرعة الجرثومية بعد التحضين فانه مـن الطبيعي حدوث ارتفاع في تركيز البلازميد وذلك نتيجة زيادة في عدد الخلايا للمزرعة، ومن ذلك يتبـين حدوث تضخيم حقيقي في عدد نسخ DNA البلازميدي للخلية الواحدة.

ان الزيادة الطردية في تركيز DNA البلازميدي داخل الخلية الواحدة ربما يعود الـى اسـتخدام انزيمات التضاعف الخلوية لجزيئات البلازميد الجديدة كقالب في عملية التـضاعف حيـث تكـون هـذه الانزيمات موجودة بوفرة في الخلية نتيجة توقف تضاعف الكرموسوم، ومن الممكن ان تعزى هذه الزيادة في التركيز DNA البلازميدي الى زيادة التكرارات الترادفية للمحددة r بالاضافة الى وجود نظام اعـادة اتحاد فعال في هذه العزلات الجرثومية (Clewell, 1972 ; Azad et al.,1992).

عند اجراء اختبار التضخيم على جرثومة *P. mirabilis* باستخدام مضاد الكلورامفينيكول حيـث وجدت زيادة فعالية انزيم chloramphenicol acetyl transferase والتي تعود الى زيـادة التكـرارات الترادفية للمحددة -r فـي R-plasmid والتـي تحمـل المورثـات المقاومـة لمـضاد الكلورامفينيكـول والسبكتينومايسين، في حين ان عدد نسخ الـ RTF لم يتغير (Franklin and Rownd,1972) .

تبين النتائج التي تم الحصول عليها ان التضخيم لوحظ في العينات المعزولة من الادرار والبراز بوجود الكلورامفينيكول اما التضخيم بوجود السبكتينومايسين فقد لوحظ فقط في العزلة التـي مـصدرها الاطعمة، كما ان قابلية جرثومة السالمونيلا للتضخيم تشابه نوعا ما ولكن بكفاءة اعلى قابلية جرثومة *E. coli* لتضخيم عدد نسخ بلازميدها والمعزولة أيضاً من مصادر مختلفـة (Mohamed, 1999) وقابليـة جرثومة *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من حالات مرضية مختلفة لتضخيم عدد نسخ البلازميـد فيها (Hasan, 2000) والتي قد تكون صفة تشترك فيها العائلة التي تضم هذه الجراثيم وهي عائلة البكتريا المعوية، فضلا على ذلك فان مثل هذه العزلات من جرثومة السالمونيلا ذات التضخيم الحقيقي لمحتواهـا البلازميدي يقودنا إلى امكانية استخدام بلازميداتها كنواقل في تقنيات الهندسة الوراثية والتي تسمح بزيادة عدد المورث المرغوب فيه بعد ارتباطها بهذه البلازميدات.

اخيراً لم تكن هناك عزلات جرثومية من جنس السالمونيلا المدروسة ذات مقاومة للتراكيز العالية لمضاد الحيوي التيتراسايكلين بذلك تعذر استخدام هذا المضاد كمضخم لعدد نسخ البلازميدات فـــي هـــذه العزلات الجرثومية.

المصادر الاجنبية

Ahmed, K. D., 1989. The positive control of *ilv* C expression in *E. coli* K12. Ph. D. Thesis Univ. Durham, England.

Atlas, R. M.; Brown, A. E. and Parks, L. C., 1995. Laboratory Manual Experimental Microbiology. Mosby-Year book, Inc.

Azad, A. K.; Coote, J. G. and Prton, R. ,1992. Distinct plasmid profiles of *Pasteurella haemolytica* serotypes and the characterization and amplification in *E. coli* of ampicillin resistance plasmids encoding RoB-1 β-lactamase. J. Gene. Microbiol., 138: pp.1185-1190.

Birnboim, H. C. and Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7: pp.1513-1524.

Broda, P., 1979. Plasmids. W. H. Freeman Company.

Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A., 2001. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 22nd ed., Appleton and lang.

Brown, T. A. ,1995. Gene cloning an Introduction. 3rd ed. Champan and Hall, London.

Clewell, D. B., 1972. Nature of Col E1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. J. Bacteriol., 110: pp.667-676.

Clowes, R., 1972. Molecular structure of bacterial plasmids. J. Bacteriol. Rev., 36: pp.361 – 366.

Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B. P. and Swain, R. H., 1975. Medical Microbiology, The practice of medical microbiology. Longman Group Ltd., New York.

Franklin, T. J. and Rownd, R., 1972. R- factor mediated resistance to tetracycline in *Proteus mirabilis.* J. Bacteriol., 115: pp.235-242.

Freifelder, D., 1983. Molecular Biology, A comprehensive introduction to prokaryotes and eukaryotes. Science books International, Van Nostrand Reinhold Company.

Freifelder, D., 1987[a]. Microbial Genetic. Jones and Barelett Pub. Boston Inc. USA.

Hasan, A. H., 2000. Molecular genetic study of *Klebsiella pneumoniae* isolated from various human infections. M. Sc. Thesis, Univ. Mosul, Iraq.

Hashimoto, H. and Rownd, R., 1975. Transition of the R factor NR1 in *Proteus mirabilis* level of drug resistance in non transitioned and transitioned cell. J. Bacteriol., 123: pp.56-60.

Hensel, M., 2000. *Salmonella* pathogenicity Island 2. Mol. Microbiol., 36: pp.1015–1023.

Indar, H. L.; Daniales, N.; Prabhakar P.; Brown C.; Baccus, T. G.; Comissiong, E. and Hispedales J., 2001. Emergence of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in the Caribbean, case–control study in Trinidad and Tobago, West Indies. Clinical Inf. Dis., 32: pp.890– 896.

Mohamed, B. G., 1999. Genetic study of *E. coli* isolated from various human infection. M. Sc. Thesis, Univ. Mosul, Iraq.

Norgard, M. V.; Emigholz, K. and Monahan, J. J., 1979. Increased amplification of pBR322 plasmid deoxyribonucleic acid in *E. coli* K12 strain RP1 and X1776 grown in presence of high concentrations of nucleoside. J. Bacteriol., 138: pp.270-272.

Popoff, Y. M.; and Minor, L. L. ,1997. Antigenic Formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Institute Pasteur, France.