دراسة حساسية ومقاومة ال *Salmonella typhimurium* المعزولة من المرضى والابقار للمضادات الحيوية وعلاقتها بالبلازميدات .

زينب سامي حبيب امل ماجد الشاوي
كلية الطب البيطري / جامعة بغداد

تأريخ التسليم 15/6/2008
تأريخ القبول 23/11/2008

الخلاصة

درست حساسية 27 عزلة من *Salmonella typhimurium* المعزولة من مرضى يعانون من الاسهال و7 عزلات من الجرثومة ذاتها والمعزولة من براز ابقار وعجول للخط الاول من المضادات الحيوية المستعملة في العلاج واظهرت نتائج العتر المعزولة من الابقار والعجول, ان عزلة واحدة فقط مقاومة للCo-trimoxazol وبنسبة 14٪ وعزلتان مقاومتان للChloramphenicol وبنسبة 28٪ وثلاث عزلات مقاومة للTetracycline وبنسبة42٪ واربع عزلات مقاومة للAmpicillin وبنسبة 57٪ وست عزلات مقاومة للNalidixic acid وبنسبة 85٪ ,ولم تكن هناك اي عزلة مقاومة للCefotaxime . اظهرت العتر المعزولة من الانسان مقاومة لاغلب المضادات الحيوية المستخدمة فقد كانت جميع العزلات مقاومة للAmpicillin وبنسبة 100٪, و26 عزلة مقاومة للChloramphenicol وبنسبة96٪ ,و23 عزلة مقاومة لكل من Co-trimoxazol و Tetracycline وبنسبة 85٪ لكل منهما, و21 عزلة مقاومة للNalidixic acid , وبنسبة 77٪ بينما كانت 9 عزلات مقاومة للCefotaxime وبنسبة 33٪ .
واظهرت نتائج عزل الدنا البلازميدي وجود حزمة وراثية ومشتركة في كل العزلات بالاضافة الى بعض الحزم الوراثية الصغيرة التي تختلف العتر بها عن بعضها وقد يكون ذلك تبعا لمقاومتها او حساسيتها للمضادات الحيوية وهذه الفرضية تحتاج الى المزيد من الدراسة لاثبات هذه العلاقة .

Study of Sensitivity and Resistivity of *Salmonella typhimurium* Isolated from Patient and Cattle to the Antibiotics and It ُ s Relation with Plasmids .

Zainab Sami Habeeb Amal m. a. Al-Shawii
College of Veterinary Medicine\ University of Baghdad .

Summary

The susceptibility of all *Salmonella typhimurium* isolates to the first line antimicrobial agents were studied and the results obtained showed a variable sensitivity and resistivity since it shows e.g resistivity for human isolated were Ampicillin 100% ,Chloramphenicol 96% , Co-Trimoxazol 85%, Tetracycline 85%, Nalidixic acid 77% and Cefotaxime 33%, While in animal isolates they were ampicillin 57%, Co-Trimoxazol 14%, Chloramphenicol 26%, Tetracycline 42%, Nalidixic acid 85% and there was no resistant isolate to cefotaxime (0)%.

Results obtained after the extration of the DNA plasmids revealed that acommon genetical bands has been seen in addition to smaller ones that may differs in their appearance from astrain to another according to their antibiotic individual resistivity and sensitivity and this hypothesis may need a deeper and further studies to find prone relation .

مستل من اطروحة ماجستير

المقدمة

لقد كان لاكتشاف المضادات الحيوية الاثر الكبير في انخفاض معدل الاصابة بداء السالمونيلا ولكن فرط استخدام مضادات معينة وبشكل متكرر ادى الى ظهور سلالات جديدة مقاومة لهذه المضادات وبالتالي زيادة معدل الاصابة (1) .

ان مقاومة عتر السالمونيلا للمضادات الحيوية عموما يشفر لها بواسطة جينات محمولة على بلازميدات يتم اكتسابها نتيجة لكثرة استعمال المضادات الحيوية سواء في الطب البيطري اوالطب البشري (2) . وغالبا ما تكتسب البلازميدات جينات المقاومة اما من بلازميدات اخرى ضمن نفس العترة او من الكروموسوم او من بلازميدات محمولة على عتر جرثومية اخرى في جسم المضيف (3) .

ولذا فقد استهدفت الدراسة :

1- دراسة حساسية ومقاومة عتر السالمونيلا المعزولة من المرضى والابقار للمضادات الحيوية .
2- عزل الدنا البلازميدي .
3- دراسة علاقة البلازميدات بمقاومة الجرثومة للمضادات الحيوية .

المواد و طرق العمل

المواد:

1- الاوساط الزرعية :

استخدم في هذه الدراسة وسط تربتون صويا الصلب (Trypton soya agar) ووسط مولر هنتون الصلب (Mular – Hinton agar) وحضرت حسب تعليمات الشركة المنتجة (Oxoid) . كما استخدم وسط لوريا بيرتاني السائل (L . B) وحضر من اذابة المواد التالية :10 غم تربتون(Trypton),5غم كلوريد الصوديوم(Sodium Chloride) في لتر من الماء المقطر وعقم بجهاز الموصدة .

2 - المحاليل :

- محلول اليود Iodin Solution : تم اذابة 10 غم ايودين و 5غم يود في 20 مل من الماء المقطر واضيف بنسبة 20 مل / لتر من التتراثايونيت قبل الزرع مباشرة .
- محلول ماكفرلاند القياسي Standerd Macferland : تم تحضير 1% من محلول كلوريد الباريوم و1% من حامض الكبريتيك .واضيف (0،6 مل) من محلول كلوريد الباريوم الى (9،4 مل) من محلول حامض الكبريتيك واستخدم هذا المحلول للحصول على عدد تقريبي للخلايا الجرثومية 18× 10 ^ جرثومة / مل .
- داريء Tris – HCL – EDTA,Sodium Chloride : تم تحضيره باذابة 50 ملي مولار Tris-HCL و5 ملي مولار Na2EDTA و50 ملي مولار Nacl .
- داريء الكلوكوز ذو الاس الهيدروجيني 8 (TEG) Glocose Buffer : تم تحضيره من 50 ملي مولار كلوكوز و 10 ملي مولار EDTA و25 ملي مولار Tris-HCL .
- محلول SDS القاعدي Alkaline Sodium dodecyl sulfate : تم تحضيره من اذابة 1غم SDS في 100 مل من هيدروكسيد الصوديوم 0،2 عياري الذي يحضر آنيا .
- محلول خلات البوتاسيوم Potassium acetate solution :حضر 60 مل من 5 مولار خلات البوتاسيوم واضيف اليه 11،5 مل من حامض الخليك الثلجي 28،5 ماء مقطر وتم تعديل الاس الهيدروجيني الى 4،8 . (4)
- داريء Tris EDTA Buffer TE :تم تحضيره من 1 ملي مولار EDTA و50 ملي مولار Tris-HCL وعدل الاس الهيدروجيني الى 8 .
- داريء (10X) Tris Borate-EDTA buffer TBE :تم تحضيره من 89 ملي مولار حامض البوريك 2،3 ملي مولار Na2EDTA في 250 مل من الماء المقطر و الاس الهيدروجيني 8.
- محلول داريء الفينول – الكلوروفورم Phenol- chloroforms solution : تم تحضيره من مزج حجمين من الفينول مع حجم واحد من الكلوروفورم .

- داريء التحميل Loading buffer : اذيب البروموفينول الازرق في 20مل من الكلسيرول واكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .
- محلول صبغة بروميد الاثديوم Ethidium bromide : حضر باذابة 10 ملغم/ مللتر .

3-اقراص المضادات الحياتية Antibiotic discs :

تم استخدام عدد من المضادات الحيوية لبيان مدى حساسية ومقاومة العتر الجرثومية المعزولة لهذه المضادات المبينة انواعها وتراكيزها في الجدول رقم (1) . والتي حصل عليها من مركز الرازي للابحاث .

جدول رقم (1)

اقراص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية

المضاد الحيوي	المختصر	التركيز
Ampicillin	AM	10 unit وحدة
Chloromphenicol	C	40 مايكرو غرام
Cefotaxime	CF	30 مايكروغرام
Tetracycline	TE	30 مايكروغرام
Co – trimoxazol	CO	30 مايكروغرام
Nalidixic acid	NA	30 مايكروغرام

طرائق العمل

1- اختبار حساسية جرثومة ال Salmonella typhimurium للمضادات الحيوية :
Bacterial Antibiotics Sensitivity test

اختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة في (6) انواع من المضادات الحيوية باستعمال الاقراص الموصى بها من قبل منظمة الصحة العالمية والمحدد رمزها وتركيزها في الجدول رقم (1) وبحسب طريقة (5) حيث حضر عالق جرثومي باخذ عدد من المستعمرات النقية وتعليقها في محلول الملح الفسلجي بما يعادل (18×10 ^) جرثومة / مل وفق طريقة ماكفرلاند . ثم نشر 0،1 مل على اطباق وسط مولر – هنتون بواسطة مسحة قطنية معقمة وتركت لتجف قليلا ثم وزعت المضادات الحيوية المستعملة وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة بعدها حدد قطر تثبيط اطباق النمو المتكون حول الاقراص وبالرجوع الى جداول قياسية خاصة بكل نوع من المضادات الحيوية , حكم على تلك العتر في كونها حساسة او مقاومة لذلك المضاد الحيوي .

2- عزل الدنا البلازميدي Plasmid DNA isolation :

تم استخدام طريقة التحلل القاعدي المصممة من قبل (6) والموصوفة من قبل (4) .

طريقة العمل :

- تم زرع العزلات المراد عزل الدنا البلازميدي منها على وسط تربتون صويا الصلب وفيه اخذت مستعمرات جرثومية مفردة ونقية ونميت في (50) مل من وسط L.B , وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة .
- تم نقل المزروع الجرثومي الى الانابيب الخاصة بجهاز النبذ المركزي المبرد سعة (50) مل ونبذ بسرعة (12000) دورة / دقيقة لمدة (15) دقيقة .

- بعد الحصول على راسب الخلايا (Pellet) , تم اضافة (5) مل من محلول غسل الخلايا المحضر (TES) وتم نبذ الانابيب بجهاز البذ المركزي بسرعة (12000) دورة / دقيقة لمدة (15) دقيقة .
- اعيد تعليق الخلايا بـ(5) مل من داريء (TES) المحضر ثم نبذ بجهاز النبذ المركزي لمدة (15) دقيقة بسرعة (12000 دورة / دقيقة) .
- اعيد تعليق الخلايا بداريء الكلوكوز (TEG) (1،2) مل وخلط بجهاز الانابيب الكهربائي , ثم اضيف له 2،4 مل من SDS%1 المذاب في 2 عياري NaOH وحضنت الانابيب لمدة (30) دقيقة بدرجة (25) م^{o} .
- اضيف (2) مل من محلول خلات البوتاسيوم 3 عياري , ثم مزج النموذج بالتقليب برفق لمدة دقيقتين ثم وضع في الثلج لمدة (10) دقائق .
- نبذ بجهاز النبذ المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة (5) دقائق , ونقل الراشح الى انبوب ابندروف معقم جديد .
- اضيف حجم من محلول داريء الفينول – كلوروفورم المشبع بقدر حجم الراشح المحصل عليه . قلب قليلا لمجانسته بعدها نبذ مركزيا بسرعة (12000) دورة / دقيقة لمدة (5) دقائق .
- نقلت الطبقة العلوية الى انبوب ابندروف جديد واضيف له ما يعادل ضعف الحجم من كحول الايثانول المطلق , قلب قليلا وترك بدرجة حرارة الغرفة مدة (10) دقائق ثم حفظ بدرجة –20 الى اليوم التالي .
- نبذ بجهاز النبذ المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة (5) دقائق , ازيل الرائق وترك الانبوب مقلوبا ليجف .
- علق الدنا بـ10 – 20 ميكروليتر من داريء TE وحفظ بدرجة (–20) لحين استخدامه .

3- الهجرة الكهربائية للدنا على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis of DNA :

- اذيب 0،525 غم من الاكاروز في 75 مل من الداريء (×1) TBE وتمت اذابته بتسخينه الى درجة (100) م^{o} وترك بعد ذلك ليبرد الى درجة (50) م^{o} .
- صب الهلام في صفيحة اسناد الاكاروز Tray الخاصة بجهاز الهجرة الكهربائي وثبت مشط تكوين الحفر على بعد 1 سم من احدى حافتي الصفيحة وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وبعدها وضع القالب داخل حوض الهجرة الكهربائي الحاوي على داريء ×1 TBE وتمت تغطية الهلام بارتفاع 1 ملمتر من نفس الداريء .
- تمت عملية اضافة الدنا المراد تهجيره في حفرة الهلام اذ مزج (5) مايكرو لترات من الدنا مع (4) مايكرو لترات من محلول صبغة البروموفينول الازرق (Loading buffer) .
- حمل مزيج الدنا والصبغة في حفر الهلام وبدات عملية الهجرة الكهربائية لمدة ساعتين بفولتية مقدارها (70) فولت .
- تم تصبيغ الهلام لمدة 30 دقيقة باضافة صبغة بروميد الاثديوم بتركيز نهائي 0،5 مايكرو غرام .
- تم الكشف عن حزم الدنا وتصويرها وذلك بتعريض هلام الاكاروز للاشعة فوق البنفسجية Uv. (7) Transillumenator

النتائج

1- نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية :

اظهر اختبار الحساسية ان معظم العتر قيد الدراسة والتي تم عزلها من الابقار والعجول حساسية متفاوتة لاغلب المضادات الحيوية المستعملة حيث كانت وعزلة واحدة فقط (14%) مقاومة لل Co-trimoxazole , وعزلتان (28%) مقاومة لل Chloromphenicol وثلاث عزلات (42%) مقاومة لل Tetracycline , واربع عزلات (57%) مقاومة لل Ampicillin , وستة عزلات (85%) مقاومة لل Nalidixic acid , ولم تكن هناك اي عزلة مقاومة لل Cefotaxime وكما هو موضح في الجدول رقم (2)

بينما اظهرت معظم العتر قيد الدراسة والمعزولة من الانسان مقاومة لاغلب المضادات الحيوية المستخدمة . فقد كانت جميع العزلات (100%) مقاومة لل Ampicillin , و 26 عزلة مقاومة لل Chloromphenicol وبنسبة (96%) , و 23 عزلة مقاومة لكل من ال Co- trimoxazo و Tetracycline وبنسبة (85%) لكل منهما , و 21 عزلة مقاومة

للNalidixic acid وبنسبة (77%) بينما كانت 9 عزلات مقاومة للCefotaxime وبنسبة (33%) . وكما هو موضح في الجدول رقم (3). جدول رقم (4) يوضح النسب المئوية لمقاومة عزلات جرثومة *S. typhimurium* المعزولة من الانسان والعجول والابقار لتراكيز معينة من المضادات الحيوية .

جدول رقم (2) يوضح نتائج اختبارات الحساسية لتراكيز معينة من المضادات الحيوية لعتر *S.typhimurium* المعزولة من الابقار والعجول .

رقم العزلة	المقاومة للمضادات الحيوية					
	CF	**CO**	**C**	**TE**	**NA**	**AM**
1	S	S	S	R	R	S
2	S	S	S	S	R	S
3	S	S	S	S	R	S
4	S	S	S	S	R	R
5	S	S	S	S	R	R
6	S	S	R	R	S	R
7	S	R	R	R	R	R

S : Sensitive .
R : Resistant .

جدول رقم (3) يوضح نتائج اختبارات الحساسية لتراكيز معينة من المضادات الحيوية لعتر *S.typhimurium* المعزولة من الانسان .

رقم العزلة	المقاومة للمضادات الحيوية					
	CF	**CO**	**C**	**TE**	**NA**	**AM**
1	R	R	R	R	R	R
2	R	R	R	R	R	R
3	R	R	R	R	R	R
4	R	R	R	R	R	R
5	S	R	R	R	S	R
6	R	R	R	R	R	R
7	R	R	R	R	R	R
8	R	R	R	R	R	R
9	R	R	S	S	S	R
10	S	R	R	R	R	R

R	R	S	S	S	R	11
R	S	R	R	S	S	12
R	S	R	R	R	S	13
R	S	R	R	R	S	14
R	R	R	R	S	S	15
R	R	R	R	S	S	16
R	R	R	R	R	S	17
R	R	S	R	R	S	18
R	R	S	R	R	S	19
R	S	R	R	R	S	20
R	R	R	R	R	S	21
R	R	R	R	R	S	22
R	R	R	R	R	S	23
R	R	R	R	R	S	24
R	R	R	R	R	S	25
R	R	R	R	R	S	26
R	R	R	R	R	S	27

جدول رقم (4) يوضح النسب المئوية لمقاومة عزلات جرثومة *S. typhimurium* المعزولة من الانسان والعجول والابقار لتراكيز معينة من المضادات الحيوية .

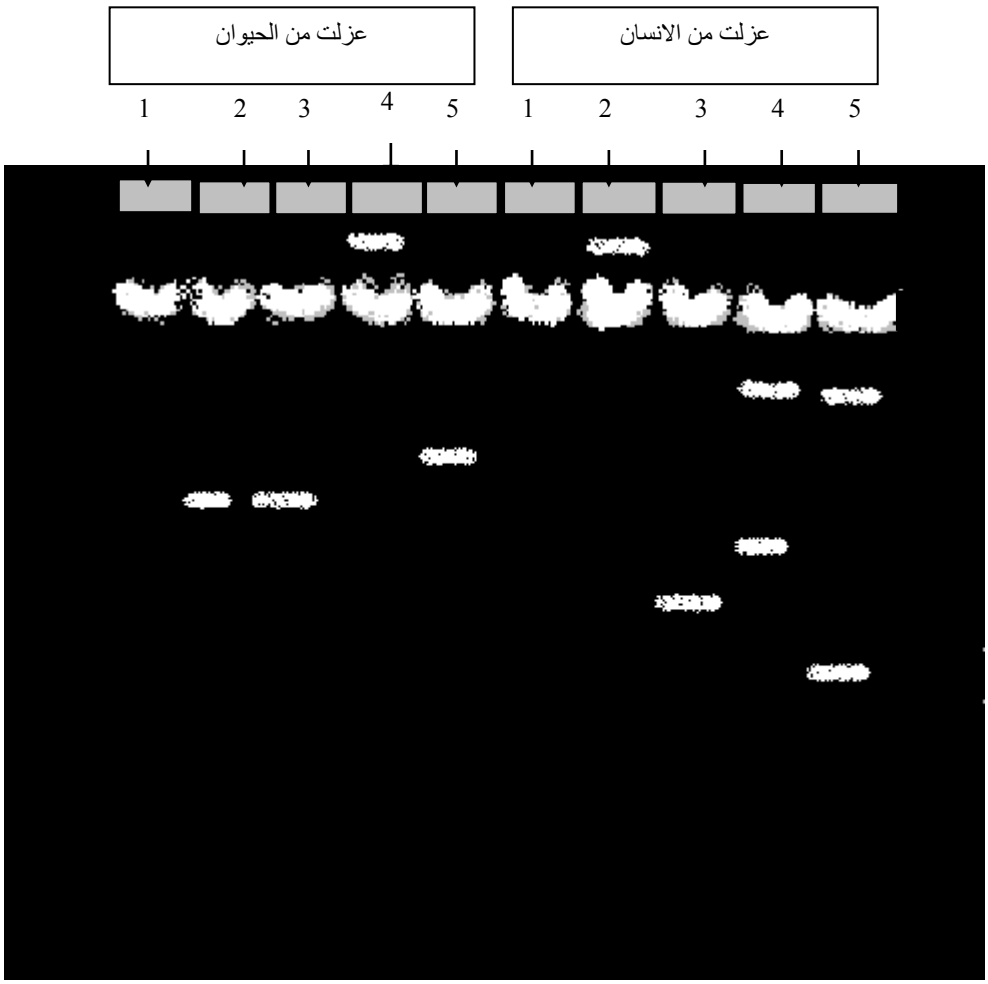
المضاد الحيوي	عدد العزلات المقاومة من العتر المعزولة من الانسان	النسبة المئوية	عدد العزلات المقاومة من العتر المعزولة من الابقار والعجول	النسب المئوية
Ampicillin	27	%100	4	%57
Chloromphenicol	26	%96	2	%28
Co-Trimoxazol	23	%85	1	%14
Tetracycline	23	%85	3	%42
Nalidixic acid	21	%77	6	%58
Cefotaxime	9	%33	صفر	صفر

2- نتائج عزل الدنا البلازميدي :

تم استخلاص الدنا البلازميدي لـ (10) عزلات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية كما هو موضح في الجدول رقم (5) خمسة منها كانت معزولة من الانسان , والخمسة الاخرى كانت معزولة من العجول والابقار . وقد احتوت العزلة الاولى حزمة وراثية والعزلة الثانية والثالثة والرابعة والخامسة احتوت على حزمتين وراثيتين . اما العزلات الخمسة الاخيرة والتي تمثل عتر تم عزلها من الانسان فقد احتوت الاولى على حزمة وراثية والثانية والثالثة على حزمتين وراثيتين اما الرابعة والخامسة فقد احتوت على ثلاث حزم وراثية . والصورة رقم (1) توضح التماثل والاختلاف في المحتوى الوراثي لعزلات الانسان وعزلات الابقار والعجول .

جدول رقم (5) يوضح مقاومة عزلات الانسان والابقار المستخدمة لعزل الدنا البلازميدي تجاه المضادات الحيوية

رقم العزلة	المقاومة للمضادات الحيوية					
	CF	**CO**	**C**	**TE**	**NA**	**AM**
1	S	S	S	R	R	S
2	S	S	S	S	R	R
3	S	S	S	S	R	R
4	S	S	R	R	S	R
5	S	R	R	R	R	R
6	S	S	R	R	R	R
7	S	S	R	R	R	R
8	R	R	R	R	R	R
9	R	R	R	S	S	R
10	R	R	R	R	R	R



شكل رقم (1) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز للدنا البلازميدي لعزلات منتخبة من عتر *S. typhimurium* المعزولة من الإنسان والابقار والعجول

المناقشة

اظهرت معظم العزلات الجرثومية المعزولة من الانسان والعجول والابقار مقاومة متفاوتة للعديد من المضادات الحيوية المستخدمة : Co-Trimoxazol ,Ampicillin , Cefotaxime , Nalidixic acid , Chloromphenicol , Tetracycline, .

وكانت العتر المعزولة من الانسان اكثر مقاومة للمضادات الجيوية نسبيا من العتر المعزولة من العجول والابقار حيث كانت غالبية هذه العزلات مقاومة لثلاث مضادات حيوية او اكثر وهذا ما يتفق مع الدراسات العالمية حيث ارتفعت نسبة مقاومة هذه الجرثومة في اسبانيا بين عامي 1980 – 1994 م للامبيسيلين من15،2٪ الى 73،3 ٪ و Chloromphenicol من 7،2 ٪ الى 46،7 ٪ وللCo-trimoxazol من اقل من 1 ٪ الى 6 ٪ (8) .

وفي المملكة المتحدة كانت نسبة مقاومة جرثومة *S.typhimurium* لكل من الـ Co- , Chloromphenicol,Ampicillin trimoxazol اكثر من 87،2 ٪ (9) . وقد اظهرت العزلات نسبة مقاومة غير مالوفة للNalidixic acid بالرغم من قلة استعماله في العلاج وهذا يتفق مع ما سجلته المختبرات البيطرية في المملكة المتحدة من ان 5،3 ٪ من عتر السالمونيلا المعزولة من الحيوانات كانت مقاومة للNalidixic acid (10),(11) .

ان المقاومة للTetracycline والتي اتفقت نتائجها مع العديد من الدراسات الاخرى تشفر لها جينات بلازميدية تسبب قلة الامتصاص وهذه الجينات منتشرة جدا بين هذه الجراثيم اما المقاومة للCo-trimoxazol ناتجة عن البلازميد الذي يسبب انتاج خميرة Dihydrofolate synthetase التي لها الفة واطئة للSulfa وبذلك تتمكن الجراثيم من تكوين حامض الفوليك (12) .

ان حساسية العتر التي تم عزلها من العجول والابقار للCefotaxime فيمكن ان تفسر بعدم استعمال هذا المضاد في المجال البيطري .

ان الزيادة الحاصلة في مقاومة جرثومة الـ *S.typhimurium* قد اوهن من كفاءة الخط الاول من المضادات الحيوية المستعملة في علاج الاصابات بجراثيم السالمونيلا . وقد يقود الفشل في التعامل الفعال مع هذه المشكلة الصحية الى الانتشار الواسع لجرثومة ال*S.typhimurium* متعددة المقاومة والتي سجلت اعلى مستوى للمقاومة بين الانماط المصلية الاخرى في معظم دول العالم .

ولغرض التحري عن المحتوى الوراثي لعتر مختارة من الاطفال والعجول والكشف عن مدى التشابه في الاساس الوراثي لها فقد تم ترحيل العتر في هلام الاكاروز الذي اظهر ان كافة العزلات تشترك باحتوائها على حزمة متماثلة وهذا ما يتفق مع الدراسات التي اثبتت احتواء *ال S.typhimurium* على بلازميد خاص بالنمط المصلي يبلغ وزنه الجزيئي (60) ميكادالتون وان لهذا البلازميد القابلية على التكرار الذاتي وهو مسؤول عن ضراوة الجرثومة (13) بينما ربطت دراسات اخرى بين البلازميدات ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة في الانماط المصلية التي تعود لجنس السالمونيلا مع المقاومة للمضادات الحيوية (14) . وفي دراسة لـ (15) تم الكشف عن الدنا البلازميدي لكل عزلات ال*S.typhimurium* متعددة المقاومة المستخدمة في دراسته ولكنه لم يستطيع ذلك بالنسبة للعزلات الحساسة .

كما اظهرت النتائج وجود تشابه في المحتوى الوراثي للعزلة (2) والعزلة (3) المعزولة من العجول وهذا يتفق مع الدراسات التي تشير الى ان العتر التي تعود الى النمط المصلي نفسه وتظهر نسق بلازميدي متشابه وصفات مظهرية مشتركة قد تكون ناشئة من نفس مصدرالاصابة (16) .

اما عدم التناسق في المحتوى الوراثي فيعزى الى وجود 3 بلازميدات مختلفة الانواع مسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية . وقد تم التعرف على (7) صور للنسق البلازميدي ضمن النمط العاثي (204) للنمط المصلي *S.typhimurium* التي تم عزلها من الابقار في بريطانيا وهذه الطريقة تستخدم الآن بصورة روتينية في بحوث الخدمات البيطرية الوبائية للتمييز ضمن النمط العاثي 204 (17) . بينما ذكر (18) في دراسته لعدد محدود من عزلات ال*S.typhimurium* لا تربطها علاقة وبائية وتعود الى 16 نمط عاثي , ان نسبة عالية من العزلات تحمل بلازميد مفرد ذو وزن جزيئي (60) ميكادالتو

الاستنتاجات والتوصيات

1- ارتفاع نسبة المقاومة الجرثومية لاغلب انواع المضادات الحيوية المستخدمة في العلاج بسبب الاستعمال العشوائي لها مما ادى الى نشوء سلالات تحمل صفة المقاومة للعديد من المضادت الحيوية .
2- اظهرت العزلات بعض الاختلاف في النسق البلازميدي على الرغم من كونها نمط مصلي واحد مما قد يؤثر مستقبلا على الحساسية للمضادات الحيوية .
3- نوصي بالتوسع في الدراسة الوراثية لجرثومة *ال S.typhimurium* من خلال استخدام المؤشرات الجزيئية الحديثة مثل تجارب الاقتران الجرثومي والتحويل الوراثي اضافة الى دراسة امكانية استخدام المجسات الجينية (Genetic probe) لغرض تحديد الجينات المسؤولة عن اظهار صفات معينة في الجرثومة

.

المصادر

1- Dargatz, D.A. ; Well, S.J. ; and Akkina. J. (1998). The Veterinarian ́s Role in Diagnosis, Treatment and Prevention of Multidrug Resistant *Salmonella typhimurium* DT104. J. bovine practitionar .

2- Richmond, M.H. and Linton, K.B (1980) . The use of Tetracycline in the community and its possible relation to the excretion of tetracycline-resistant bacteria . J. Antimicrob. Chemotherapy(6) :33-41 .

3- Threlfall, E.J. and Forst J.A. (1990) . The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella* : laboratory aspects and epidemiological aplications . J. APPL Bacteriol , 68 : 5-16 .

4- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) ."Molecular cloning Alaboratory Manual , Cold spring Laboratory .

5- Kirby, W.M. ; Bauer , A.W.;Sherris, J.C., and Turch,A.(1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk methods. Amer. J. Clin. Pathol . 45: 493-6 .

6- Brinboim, H.C. and Doly , J. (1979). "Arapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA" Nuclic acid Res. 7: 1513-1523 .

7- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T.(1989) . "Molecular cloning : A Laboratory Manual " Cold-Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York .

8- Ramos, J.M. ; Alés ,J.M. ; Cuenca-Estrella,M. (1996). Changes in susceptibility of *Salmonella entritidis* , *Salmonella typhimurium* and *Salmonella virchow* to six antimicrobial agents in aspanish hospital , 1980-1984. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.Dis. 15: 85-88.

9- Threlfall, E.J. ; Hampton , M..D. ; Schofeild, S.L. , (1996). Epidemiological applicationof differentialing multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 by plasmid profile commune. Disease Rep. CDR. Rev. 6 R155-R159.

10- Davis, R.H. ; Teale , C. J. ; Wary,C.(1999). Nalidixic acid resistance Vet. Rec. 144: 320-322 .

11- Week, C.G. ;Hutcheson, H.J. ;Kim L . M .(2002). Identification of two phylogenitically Related Organism from Feces by PCR for Detection of *Salmonella Spp*.J.Clin, Microbiol. 40(4) : 1487-1492 .

12- Jawetz,E.; Melnick, J. L . ; and Adelberg, E.A.(2001). Antigen and reactions In : Medical Microbiology ,22ed . Hall International Inc. U.S.A.

13- Helmuth, R. ; Stephan, R. ; Bunge, C. (1985). Epidemiology of virulance associated plasmids and outer membrane portein patterns with seven common *Salmonella* serotypes. Infection and Immunity . 48: 175-182.

14- Willetts, N. (1985)." Plasmids" in Scaife,J. ; Leach , D. and Galizzi, A. (eds.) "Genitic of Bacteria " Academic Press London . PP. : 16-19.

15- Sood, S. ; Peters, T. ; Word , L.R. ; Threlfall, E.J. (2002). Combination of plused-field gel electrophoresis(PFGE) and single enzyme amplified fragment length polymorphisim(SAFLP) for differentiation of multiresistant *Salmonella enterica* Serotype *typhimurium*. J. Clin. Microbiol. Infect,8(3): 1154-61.

16- Barrow, P.A. , and Lovell, M.A. (1988). The association between a large Molecular mass plasmid and virulance in astrain of *Salmonella pullorum* J. General. Microbiol.134: 2307-2316.

17 - Threlfall , E.J. ; Rowe, B. ; Ferguson, J.L., (1986). Characterization of Plasmids conferring resistance to Gentamicin and Apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolatedin Britain. J. Hygiene. 97 : 419-426.

18 -Brown, D.J . ;Munro, D.S. and Plat, D.J. (1986) . Recognition of the cryptic plasmid , PSLT, by restriction fingerprinting and a study of its incidencei in Scottish Salmonella isolates.J.Hygiene 97: 193-197.