# استخلاص الدنا اللاكروموسومي من جراثيم السالمونيلا المعزولة من الحليب الخام

**خلود خضير نزال**

فرع الصحة العامة البيطرية–كلية الطب البيطري– جامعة بغداد– العراق

**الخلاصة**

جمعت 25 عزلة من عزلات السالمونيلا التي تم عزلها من عينات الحليب الخام والتي جمعت من قرية أبو غريب لغرض دراسة العلاقة بين مقاومتها للمضادات الحيوية واحتوائها على دنا لاكروموسومي (DNA-Plasmid) .

حيث اجريت طريقة التحليل القاعدي ( Alkaline analysis) لتحليل بكتريا السالمونيلا والتي تعتبر الطريقة المثلى لعزل الدنا اللاكروموسومي (DNA-Plasmid) لسلالات السالمونيلا ذي الأوزان الجزيئية الصغيرة والكبيرة في آن واحد وبعد ذلك اجري الترحيل الكهربائي للدنا اللاكروموسومي في هلام الأكاروز والذي أظهرت نتائجه احتواء أغلب العزلات المقاومة لاثنين من المضادات الحيوية أو أكثر على بلازميد كبير منفرد قدر حجمه 50–70 كيلو قاعدة.

# DNA-Plasmid Extraction Of Salmonella Isolated From Raw Milk

**Khulood K.Nazal**
Dept.of vet. Public Health-College of Vet. Med.-Baghdad University-Iraq

**SUMMARY**

Twenty five Isolates of Salmonella were isolated from raw milk samples which were collected from Abu-Graib village to study the relationship between their resistance to antibiotics and their plasmids contents .

Antibiotic sensitivity test for different antibiotics revealed that most Salmonella isolates were resistant to two antibiotics .

The extraction of the DNA-plasmid revealed that most Salmonella isolates which resistant to two antibiotics or more were contained large, individual plasmids size of (50-70)Kilo Base (KB) while the others isolates were free from such plasmid.

**المقدمة**

يعد الحليب الخام ومشتقاته من الأغذية المسببة للثورات المرضية بداء السالمونيلا والذي يعتبر من اخطر الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان وتلعب جراثيم السالمونيلا دورا هاما في إحداث حالات التسمم الغذائي في أنحاء مختلفة من العالم والذي يعكس الصورة الصحية الرديئة أثناء الإنتاج والتداول (1). ازدادت في السنين الأخيرة مقاومة أنماط جراثيم السالمونيلا للكثير من المضادات الحيوية الأساسية المستخدمة في العلاج ولا سيما الأنماط المعزولة من الحيوانات الأليفة وفي مناطق مختلفة من العالم حيث يمكن لتلك المقاومة أن تنتقل إلى الإنسان مع تناول الحليب وأدت صفة المقاومة إلى زيادة ضراوة السالمونيلا والعدوى (4,3,2). وقد أظهرت العديد من الدراسات إن للبلازميدات دورا كبيرا في مقاومة السالمونيلا للمضادات الحيوية (6,5). ووجد إن للبلازميدات القدرة على التضاعف الذاتي ويتم توارثها بثبات عادة من جيل لأخر وتكون بأشكال وأحجام متباينة (7). كما أنها تحمل جينات تشفير إلى فعاليات خلوية مختلفة تسهم في زيادة ضراوة البكتريا الحاملة لها مع زيادة كفاءة البكتريا المرضية (9,8). ويمكن للبلازميد أن يحمل جينات مسئولة عن المقاومة لواحد أو أكثر من المضادات الحيوية المختلفة , وتصنف مثل هذه البلازميدات على أنها بلازميدات المقاومة (9).

أن مقاومة البكتريا الأمعائية السالبة لصبغة كرام للمضادات الحيوية تكون بسب

(R-Factor Plasmid) الذي يكون شائع في هذه البكتيريا والذي يحمل جينات تشفير المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (10).انصبت أهداف هذه الدراسة إلى دراسة المحتوى البلازميدي لعزلات السالمونيلا التي أبدت مقاومة لبعض المضادات الحيوية.

## المواد وطرائق العمل

اجري اختبار مقامة جرثومة السالمونيلا للمضادات الحيوية بطريقة التخفيف (Agar Dilution Method) للعزلات المجموعة اعتمادا على (12).

وبعد إجراء اختبار مقاومة جرثومة السالمونيلا لبعض المضادات الحيوية اختيرت (10)عزلات الأكثر مقاومة لتلك المضادات وأعيد زرعها على وسط مولرهنتن بعد إضافة المضاد الحيوي الذي أبدت مقاومتها له وذلك لغرض الأحتفاض بالبلازميد المسئول عن تلك المقاومة وبعدها تمت عملية استخلاص الدنا اللاكروموسومي من جراثيم السالمونيلا لتلك العزلات حسب ماجاء في (12). حيث تعتبر طريقة التحليل القاعدي ( Alkaline analysis) لتحليل بكتريا السالمونيلا بأنها الطريقة المثلى لعزل الدنا اللاكروموسومي لسلالات السالمونيلا ذي الأوزان الجزيئية الصغيرة والكبيرة في آن واحد (13).

بعد ذلك اجري الترحيل الكهربائي للدنا اللاكروموسومي للعزلات العشرة المقاومة في هلام الأكاروز حسب ماجاء في (12و14).

## النتائج

تشير النتائج الموضحة في الجدول (1) إلى نتائج حساسية ومقاومة عزلات السالمونيلا للمضادات الحيوية حيث اعتبر نمو البكتريا دليلا على مقاومتها للمضاد الحيوي المضاف للوسط ألزرعي بينما عدم نموها دليلا على حساسيتها للمضاد الحيوي المضاف للوسط ألزرعي . يتضح من الجدول نفسه إن النسبة المئوية لعزلات السالمونيلا التي قاومت Sulphamethazol كانت 52% وجاء المضاد الحيوي Tetracycline بالدرجة الثانية حيث كانت نسبة المقاومة له هي 24% يليه المضاد الحيوي Streptomycin حيث كانت نسبة المقاومة له هي 20%. بينما كانت النسبة المئوية لمقاومة المضاد الحيوي Kanamycineهي 4% وأبدت جميع عزلات السالمونيلا حساسيتها 100% لكل من المضادات الحيوية Ampicilline, Colistine Chloramphenicol, Carbencilline.

**جدول (1): النسبة المئوية لحساسية ومقاومة عزلات السالمونيلا للمضادات الحيوية بطريقة التخفيف**

| المضاد الحيوي | رمزه | عدد العتر المفحوصة | عدد العتر الحساسة | النسبة المئوية % | عدد العتر المقاومة | النسبة المئوية % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ampicilline | AP | 25 | 25 | 100 | 0 | 0 |
| Chloramphenicol | C | 25 | 25 | 100 | 0 | 0 |
| Colistine | CL | 25 | 25 | 100 | 0 | 0 |
| Carbencillin | PY | 25 | 25 | 100 | 0 | 0 |
| Kanamycine | K | 25 | 24 | 96 | 1 | 4 |
| Streptomycin | S | 25 | 20 | 80 | 5 | 20 |
| Tetracycline | T | 25 | 19 | 76 | 6 | 24 |
| Sulphamethazol | SM | 25 | 12 | 48 | 13 | 52 |

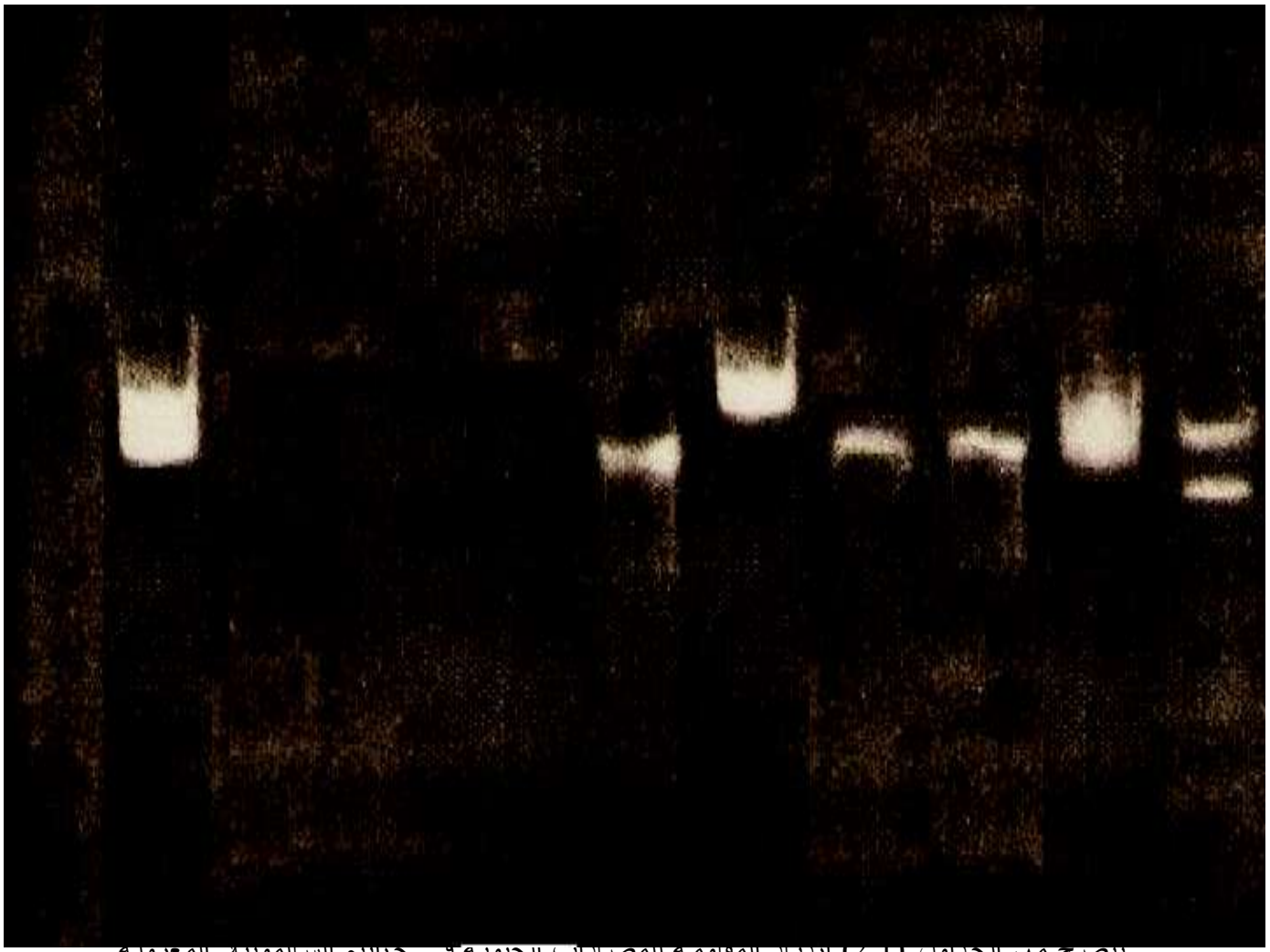
كما يبين الجدول (2) مقاومة العزلات العشرة التي اجري لها استخلاص الدنا اللاكوموسومي للمضادات الحيوية والتي عزلت من الحليب الخام وقد أخذ بنظر الاعتبار العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية والتي أظهرت مقاومتها لاثنين أو أكثر من المضادات الحيوية كما مبين في الجدول .

**جدول (2) : مقاومة العزلات العشرة التي اجري لها استخلاص الدنا البلازميدي للمضادات الحيوية**

| رقم العزلة | نوع المضاد الحيوي الذي أبدت له المقاومة |
|---|---|
| 1 | Streptomycin,Sulphamethazol, Tetracycline |
| 2 | Sulphamethazol |
| 3 | Streptomycin |
| 4 | Sulphamethazol,Streptomycin |
| 5 | Tetracycline,Sulphamethazol |
| 6 | ..... |
| 7 | Tetracycline |
| 8 | Sulphamethazol |
| 9 | Tetracycline, Kanamycin , Sulphamethazol |
| 10 | Tetracycline |

وعند التحري عن المحتوى البلازميدي في هذه العزلات أظهرت احتواء ستة عزلات على بلازميد منفرد كبير قدر حجمه الجزيئي 50 –70 كيلو قاعدة K.B بإستخدام البلازميدات المستخلصة من سلالة ايشريشيا القولون (B41) كدليل للمقارنة* اذ تحتوي هذه السلالة على بلازميدين الحجم الجزيئي لإحداهما 52 كيلو قاعدة والثاني 67 كيلو قاعدة (15). كما موضح في الشكل (1) . وقد خلت أربع عزلات من هذه العزلات وهي الأكثر حساسية للمضادات الحيوية ( عزلة رقم 10,8,7,6).

| 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | B41 * |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|



يتضح من الجداول (2,1) ازدياد المقاومة للمضادات الحيوية في جراثيم الستافيلوكوكس المعزولة من الحليب الخام وهذا يتفق مع نتائج كل من ( 18,17,16) والذي قد يكون نتيجة الاستخدام المفرط لهذه المضادات في الأعلاف لإغراض التسمين والوقاية أو العلاج اونتيجة انتقال عامل المقاومة من العتر المقاومة إلى العتر الحساسة كما أشار إلى ذلك العديد من الباحثين (20,19) .

يمكن للبلازميد ان يحمل مورثات تشفر للمقاومة لواحد أو أكثر من المضادات الحيوية المختلفة ويوصف على انه بلازميد المقاومة(R-Factor Plasmid) الذي يكون شائعا في البكتريا الأمعائية السالبة لصبغة كرام ( 10,9) . وقد ازداد الاهتمام العالمي في السنوات الأخيرة بجراثيم السالمونيلا ذات المنشأ الحيواني لكون هذه الجراثيم تحمل بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية ولكونها المسئولة عن الكثير من الثورات المرضية في الإنسان نتيجة تناول أغذية ذات منشأ حيواني كالحليب ومشتقاته واللحوم (21).

**المصادر**


1.Watson, W.A.(1975).Salmonellosis and meat hygiene –red meat Vet. Rec. 96:374.

2.Anderson, W.H; Wilson, C.R.And Remero (1979). "Relative productivity of five selective plating agars for the recovery of Salmonella from selected food types" .J.Ass-offic. Annual Chain . 62:320-326.

3.Murray, C.J; Reteliff,R.M.Cameron,P.A.And Dixon, S.F.(1986).Drug resistance and anti-microbial agent aus.Vet.J.63(9).286.

4.Centers for Disease Control and prevention (1999). "Salmonellosis" Illinois Morbid Mortal Weekly Rep.12:40.

5.Timoney, F.John (1978). The epidemiology and genetics of antibiotic resistance of Salmonella typhimurium isolated from diseased animals in New York J-infection disease.137 (1):67.

6.Blackburn, B.O.; Schater, L.K. and Sawanson, M.R.(1984). Antibiotic resistance of members of the genus Salmonella isolated from chickens, turkeys, cattle and swine in USA dairy Oct.1981 through Sept.1982 Am.J.Vet.Res.42:1945.

7.Sommers,D.and Sherratt,J.(1986)."Methods in enzymology Ed.M. P. deutscher, 182:317-328.

8. الزعاك : علي عبد الرحمن (1994). البايلوجي الجزيئي لضراوة البكتريا . وزارة التعليم العالي – جامعة بغداد –كلية العلوم .

9.Willetts,N.(1985)."Plasmide"Pp.1619.InScaife, J.; Leach, D. and Galizzi, A. (Eds.)."Genetics of bacteria "academic press, London.

10.Quiun, J.; Garter, M.E.; Markey, B. and Garter, G.R. (1998)."Salmonella" Clinical Veterinary Microbiology". 226 -234.

11. Al-Zaag, A. (1987). "Cloning and molecular characterization of b-glucosidase of Citrobacter ferundii" ph.D.Thesis University of Queens Land.

12. Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning , Manual cold spring , harbor laboratory " Cold-spring harbor. New York.

13. Aznar, R. ; Amaro, C. and Alcaido, E. (1988). "Characterization of R-plasmids in environmental isolates of Salmonella: Host Rang and Stability" Current Microbial . 17:173-177.

14. Sambrook,J. ; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory Manual " Cold- spring Harbor Laboratory, Cold-spring Harbor. New York.

15. Bertin, A. (1985)." F41 ntigen as a virulence Factor in infant mouse of E.coli diarrhea" journal of general Microb. 131:3037-3045.

16. Deanna, A.G. (1999). " Salmonella cereal scare" Information Resource center. [ February 26.12:32].

17. الخزعلي: هيفاء حسين علي (1990). أنماط السالمونيلا المعزولة من الحليب ومشتقاته وحساسيتها للمضادات الحياتية – رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري/ جامعة الموصل .

18. علي : جليل حسين (1986) . تلوث لحوم الأبقار المنتجة في مجزرة الدورة بجراثيم السالمونيلا وتأثيرها على الصحة العامة . رسالة ماجستير– الطب البيطري / جامعة بغداد .

19. Ikeda, Jack, S.; Dawight, C. Hirsh; Speneers, Jang; Event, L.9 Biberstier (1986). Characteristic of Salmonella isolation from animals at a veterinary medical tenching hospital Am.J. Vet. Res.47(2):232.

20. Hadad, J.J and Jemel, A. (1990). Anti-microbial resistance among Salmonella from animals, Vet. Med.-J.Giza.38(1):35-43.

21. Benenson, A.S.(1990).Salmonellosis control Of communicable Disease in man (15 thed) (Pp.381-385) Washington, D.C.: American Public Health Association.