جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

الكشف عن بعض جينات ضراوة بكتيريا *Salmonella typhi* المعزولة سريرياً في محافظة ديالى ودراسة الظروف المثلى لانتاج الغشاء الحيوي

رسالة مُقدَّمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

منن عبدالرزاق عبدالكاظم

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى (2016-2017)

بإشراف

أ.م.د علي جعفر سليم

1444هـ **2023 م**

1. المقدمة Introduction

تسمى حمى التيفوئيد أيضاً بالحمى المعوية وهي أكثر الأمراض المتوطنة في معظم البلدان ، والتي تسببها في الغالب بكتيريا *Salmonella typhi* والعامل المسبب الثاني هي بكتيريا *Salmonella Paratyphi* ، والإنسان هو المضيف الوحيد لهذه البكتيريا (Aljanaby و Medhat، 2017; Teferi وآخرون ، 2022) .

تعد هذه البكتريا من الممرضات المهمة للإنسان تصيب جميع الفئات العمرية ولكنها تكون أكثر خطورة عند الأطفال (Hanan، 2016). تنتمي بكتريا *S. typhi* إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae وقد سميت بذلك نسبة إلى الجراح البيطري سالمون ،الذي عزل عصيات بكتيريا السالمونيلا كوليرا *Salmonella cholerae* من الخنازير عام 1885 (Shen وآخرون ، 2007). يضم جنس السالمونيلا اكثر 2600 نمطاً مصلياً مختلف تسبب أمراض للإنسان والحيوانات تعد من مسببات الأمراض الرئيسية المسببة لتفشي الأمراض التي تتنتقل عن طريق الأغذية وتعد أيضاً مصدر قلق للصحة العامة في جميع أنحاء العالم (Akbarmehr، 2011).

أشار Yoon واخرون (2009) إلى أن حمى التيفوئيد Typhoid fever من أهم المشاكل التي تواجها المنظمات والمؤسسات الصحية في العالم لكونها من الأمراض المعدية الجهازية Systemic infections. إذ لا يزال ملايين الأشخاص يصابون بحمى التيفوئيد كل عام ، ولا تزال مشكلة صحية عامة رئيسية في الدول منخفضة الدخل مثل دول شرق وغرب اسيا (Galgallo وآخرون ،2018) .

تشير الاحصائيات الدولية الحديثة الى إن حمى التيفوئيد تساهم في اصابة 21.6– 26.9 مليون انسان سنوياً وتسبب 216000 حالة وفاة (WHO، 2018 ; Wong وآخرون ، 2019). اذ ان كمية الجرعة المرضية وضراوة البكتيريا هما العاملان الرئيسيان اللذان يحددان شدة العدوى بين السكان (Milligan وآخرون ، 2018 ; Im وآخرون ، 2020).

تتأثر إمراضية بكتريا السالمونيلا بعدد من العوامل منها ما يتعلق بالبكتريا، ومنها ما يتعلق بالمضيف ، تعتمد قدرة البكتريا على الغزو والبقاء والتكاثر في خلايا جسم المضيف على النمط المصلي للبكتريا ، وكمية الجرعة اللازمة لأحداث المرض وعوامل الضراوة Virulence factors الخاصة بها، والتي تتمثل بوجود أهلاب الإلتصاق والأسواط Flagella ومتعدد السكريد الشحمي LPS ، إن قابلية البكتيريا على إنتاج البروتينات الخالية من الحديد Iron – chelating proteins وحاملات الحديد Siderophores التي تأخذ عنصر الحديد وتساهم في نمو البكتريا ، وقدرة البكتريا العالية لمقاومة الهضم بوسطة الخلايا البلعمية والتحطم بوسطة المتمم في البلازما وإنتشارها في الجسم له علاقة بوجود البلازميدات البكتيرية، يعد نقص في عدد كريات الدم البيض من أهم أعراض الإصابة ببكتريا *S.typhi* (الناشي وفنطيل ، 2016).

بشكل عام ،يخضع نمو وتكاثر السالمونيلا داخل العائل بواسطة الجينات المحددة للضراوة في *Salmonella spp.* والتي ترتبط بالعوامل الكروموسومية او البلازميدية (Oliveira وآخرون ، 2003) ، وهذه الجينات لها دور في الإلتصاق والغزو وإنتاج السموم المعوية (Das وآخرون ، 2012).

معظم البكتيريا لها القدرة على تكوين تجمعات مصفوفة مغلقة او ما يسمى بالأغشية الحيوية Biofilm (عباس واحمد، 2014)، والذي ربما يساعدها على التخلص من الجهاز المناعي للمضيف (Prouty وآخرون 2002). يعرف الغشاء الحيوي بإنه تجمعات ميكروبية معقدة ترتبط بالأسطح الصلبة وتلتصق بها ، وتتأثر هذه الفعالية بالظروف البيئية المحيطة ، يعد الغشاء الحيوي Biofilm مهماً لتحديد الأصابة المزمنة، تظهر البكتريا في الأغشية الحيوية درجة عالية للمقاومة للمضادات الحيوية للبكتريا والجهاز المناعي للمضيف وهذا يعد عامل رئيسي للمساهمة في حدوث الأصابات (الخفاجي والكعبي ، 2016).

يعد العراق أحد الدول التي يتوطنها مرض الحمى التيفوئيدية (المعوية) ، لذا فقد هدفت الدراسة الى الكشف مظهرياً و وراثياً لقدرة بكتيريا السالمونيلا على تكوين الغشاء الحيوي من خلال المحاور الآتية :-

1- عزل وتشخيص بكتيريا *S. typhi* من الأشخاص المصابين بمرض التيفوئيد .

2- الكشف الجزيئي عن بعض جينات الضراوة *fimA, orfL ,tviA ,cdtB* .

3- الكشف عن قدرة بكتيريا *S.typhi* على إنتاج الغشاء الحيويBiofilm، والظروف المثلى لأنتاجه

4- دراسة بعض العوامل البيئية المؤثرة على إنتاج الغشاء الحيوي .

5- إجراء تسلسل القواعد النيتروجينية لجين *16SrRNA*، وتحديد الطفرات الوراثية فيه.

الخلاصة Summary

أجريت هذه الدراسة في مختبرات وحدة البحوث وتصنيع البدائل / كلية التقنيات الطبية والصحية / بغداد ، اذ تم جمع 75 عينة من دم وبراز المرضى المشكوك بأصابتهم بحمى التيفوئيد بأعمار مختلفة ولكلا الجنسين للمدة (2021/9/1 - 2021/12/31)، وتضمنت 45 عينة دم و 30 عينة براز من المختبرات الأهلية في ديالى (مختبر صحة ديالى / بعقوبة ، مختبر الغيث ، مختبر الأمل ، مختبر الإمتياز / الخالص) ، وشخصت العزلات البكتيرية إعتماداً على الطرائق التقليدية والفحوصات الكيموحيوية ، أظهرت النتائج ان 29 عزلة وبنسبة 39% تعود لبكتيريا *Salmonella typhi* تم الحصول عليها من عينات الدم ولم يتم الحصول على عزلات من عينات البراز ،وبعدها تم تأكيد التشخيص للعزلات بواسطة الكشف الجزيئي بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) للجين التشخيصي *16SrRNA* .

تم الكشف عن بعض جينات عوامل الضراوة وتضمنت *cdtB* ، *tviA* ، *fimA* ، *orfL* ، وأوضحت النتائج إن جميع العزلات البكتيرية تمتلك جينات عوامل الضراوة بنسبة 100% .وأُجري التحليل التتابعي DNA Sequencing للجين التشخيصي *16SrRNA* لعدد من العزلات؛ وأظهرت النتائج وجود عدد من الطفرات النقطية .

تمت دراسة قدرة البكتيريا على إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm بطريقتين الأُولى على وسط الكونغو الأحمر وكانت نسبة الإنتاجية للغشاء الحيوي 41.38% ، اما الطريقة الثانية فكانت باستخدام أطباق المعايرة باستخدام وسط مرق الصويا المغذي المدعم بـ 1% من سكر الكلوكوز وكانت نسبة الإنتاجية للغشاء الحيوي 100% ، منها الشديدة للغشاء الحيوي 17.24%، متوسطة الإنتاجية للغشاء 20.69 % ،اما البكتيريا الضعيفة الإنتاجية للغشاء فكانت بنسبة 62.07% .