



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة مقارنة بكتريولوجية وسيرولوجية وجزئية

لتنشخيص بكتريا *Salmonella typhi*

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل

درجة الماجستير في علوم الحياة - الإحياء المجهرية

من قبل الطالبة

رقية إباد عباس القيسي

بكالوريوس علوم الحياة 2012

بإشراف

أ.د. محمد شمخي جبر

أ.د. عباس عبود فرحان

2018 م

1438 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ يَأَيُّهَا الَّذِينَ ءَامَنُوا إِذَا قِيلَ لَكُمْ تَفَسَّحُوا فِي
الْمَجَالِسِ فَافْسَحُوا يَفْسَحِ اللَّهُ لَكُمْ ^ص وَإِذَا قِيلَ أَنْشُرُوا
فَأَنْشُرُوا يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ ءَامَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا
الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ ^ج وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ ﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

المجادلة : الآية (١١)

أقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسه مقارنه بكتريولوجية وسيرولوجية وجزئية لتشخيص بكتريا *Salmonella typhi*) التي قدمتها طالبة الماجستير (رقية إياد عباس القيسي) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: كريم ابراهيم مبارك

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: / / 2018م

أقرارالمقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسه مقارنه بكتريولوجية وسيرولوجية وجزئية لتشخيص بكتريا *Salmonella typhi*) التي قدمتها طالبة الماجستير (رقية إيد عباس القيسي) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع :

الاسم :نوافل يونس سالم

اللقب العلمي :أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2018م

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن رئيس وأعضاء لجنة المناقشة نقر بأننا اطلعنا على هذه الرسالة الماجستير الموسومة ب (دراسه مقارنه بكتريولوجية وسيرولوجية وجزئية لتشخيص بكتريا *Salmonella typhi*) المقدمة من قبل الطالبة (رقية إياد عباس القيسي) قد ناقشناها في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الاحياء المجهرية بتقدير (أمتياز).

التوقيع:

الاسم: هادي رحمن رشيد

التاريخ: / / 2018م

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : غانم حسين مجيد

التاريخ : / / 2018م

عضوا

التوقيع :

الاسم : علي جعفر سليم

التاريخ : / / 2018 م

عضوا

التوقيع :

الاسم : محمد شمخي جبر

التاريخ : / / 2018 م

عضوا ومشرفا

التوقيع :

الاسم : عباس عبود فرحان

التاريخ : / / 2018 م

عضوا ومشرفا

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة ديالى

التوقيع:

أ.م.د. نصيف جاسم محمد الخفاجي

عميد كلية التربية للعلوم الصرفة /وكالة

التاريخ : / / 2018 م

الإهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

(قل اعملوا فسيرى الله عملكم ورسوله والمؤمنون)

صدق الله العظيم

إلهي لا يطيب الليل إلا بشكرك ولا يطيب النهار إلا بطاعتك .. ولا تطيب اللحظات إلا بذكرك .. ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك .. ولا تطيب الجنة إلا برويتك

"الله جل جلاله"

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة .. ونصح الأمة .. نبي الرحمة ونور العالمين ..

سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم

إلى من كلله الله بالهيبة والوقار .. علمني العطاء بدون انتظار

ومن أحمل أسمه بكل افتخار

أرجو من الله أن يمد في عمرك لتري ثماراً قد حان قطافها بعد طول انتظار

وستبقى كلماتك نجوم أهدي بها اليوم وفي الغد وإلى الأبد

والدي العزيز

إلى ملاكي في الحياة .. معنى الحب و معنى الحنان و التفاني .. و

بسمة الحياة وسر الوجود

ومن كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى الأعلى

أمي الحبيبة

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة رياحين حياتي

إخواني

رقبه

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا وحبيبنا محمد صلى الله عليه وعلى آله الطيبين الطاهرين. وبعد ..

أقدم أسمى آيات الشكر والامتنان والتقدير والمحبة إلى الذين حملوا أقدس رسالة في الحياة إلى الذين مهدوا لنا طريق العلم والمعرفة إلى جميع أساتذتنا الأفاضل

كما أتوجه بخالص شكري وامتناني وعميق احترامي إلى أستاذي الفاضل الأستاذ الدكتور محمد شمخي جبر لاقتراحه موضوع الرسالة، ولمتابعته المستمرة وتوجيهاته العلمية القيمة ودعمه لي طوال مدة البحث فقد كان أبا قبل إن يكون أستاذاً، وأتقدم بالشكر الجزيل وعظيم الامتنان والعرفان بالجميل إلى الأستاذ الدكتور عباس عبود فرحان لمتابعته المتواصلة وتوجيهاته السديدة لي طوال مدة البحث داعية الله أن يوفقهما لما يحبه ويرضاه .

وأقدم شكري وتقديري إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالأستاذ الدكتور غالب ادريس عطية ورئاسة قسم علوم الحياة وجميع الأساتذة لما قدموه لي من عون ومساعدة .

وأتقدم بالشكر والعرفان لكادر المختبرات التعليمية لمدينة الطب لما قدموه لي من العون و المساعدة وتعاونهم معي في جمع العينات وهم :الدكتور عباس زكي مهدي بكتريولوجي اختصاص أحياء مجهرية والبكتريولوجي جواد حميد حسن والبكتريولوجيه آمال أحمد زاير ولجميع المنتسبين والمنتسبات كما أتقدم بعميق شكري إلى جميع منتسبي المختبر في مستشفى حماية الطفل في مدينة الطب للمساعدة الكبيرة.

وأخيراً أتقدم بخالص شكري وامتناني إلى كل من مدّ يد العون والمساعدة لي ولو بكلمة تشجيع أو أشعل في طريقي نور الأمل لإتمام هذه الرسالة .

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مستشفى بغداد /استشارية باطنية /مدينة الطب ، ومستشفى حماية الطفل /مدينة الطب ومستشفى الكرامة التعليمي ابتداء من شهر تشرين الثاني 2016 إلى شهر أيار 2017 وذلك لغرض التحري عن أفضل الطرق التشخيصية المختبرية المعتمدة للكشف عن بكتريا *Salmonella enteric serover Typhi* المسببة للحمى التيفوئيدية التي تضمنت الفحوصات السيرولوجية (Widal test) والاختبارات البكتريولوجية من خلال العزل والكشف والفحوصات الجزيئية بتقنية (commercial polymerase chain reaction) للكشف عن الجين (*fliC*) *gene* إضافة إلى أنماط الحساسية للمضادات بالاعتماد على طريقة Kerby-Bauer خلال قياس قطر منطقة التثبيط حول قرص المضاد الحيائي المستخدم وفقا لما جاء (CLSI(2015).

تضمنت الدراسة جمع 120 عينة دم إذ شكلت نسبة الإصابة عند الذكور %59.16 (71) والإناث %40.83 (49) ، وتراوح أعمارهم بين (1-60) سنة ، %24,16 من مرضى راقدين في المستشفى و %75.83 مرضى غير راقدين في المستشفى .

شخصت العينات مبدئياً باستعمال فحص Widal test بوصفه طريقة تقليدية للتشخيص وكانت النسبة 75 موجبة و 45 سالبة، حيث زرعت عينات الدم مباشرة في قناني زرع الدم وبالطريقة التقليدية بزرع الدم في قناني تحوي على Brain heart infution broth (10ml) ، وزرعت النماذج المرضية على وسط أكار الماكونكي MacConky agar الصلب ووسط الدم Blood agar الصلب ووسط وسط SS agar الصلب الأساس على ووسط XLD ولوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات ، وأجريت الفحوصات الجرثومية والكيموحيوية القياسية لتشخيص العزلات الجرثومية التي تضمنت فحص انزيمي الاوكسيديزو الكتاليز ، تمّ تحقيق و تأكيد التشخيص باستخدام فحص APi20E.

ب

تم عزل 20 عينة دم من المرضى المشكوك بإصابتهم بالحمى التيفوئيدية، وبلغت نسبة تشخيص العزلات الجرثومية للحمى التيفوئيدية باستخدام kit (Widal test) 17 (85%) أعطت نتيجة موجبة مع وجود فرق معنوي إحصائي كبير عند مستوى دلالة ($P < 0.01$)، في حين أعطيت التشخيص البكتريولوجي لكل العينات 20 (16.66%) نتيجة موجبة للزرع البكتيري . وقد بينة الكشف عن العزلات المرضية قيد الدراسة باستخدام التشخيص الجزيئي Polymerase Chain Reaction وجود الجين *fliC* في 13 عينة ونسبة (72.22%)، اعتمادا على ظهور حزمة بحجم 599bp زوج قاعدي إما بالنسبة Nasted PCR فكانت بحجم 360bp زوج قاعدي في هلام الاكاروز، وتبين وجود فرق معنوي إحصائي ($P > 0.05$) بين الفحوصات السيروولوجية والبكتريولوجية للبكتيريا *Salmonella enteric serover Typhi*.

أُجري اختبار الحساسية لعشرة مضادات حيوية شائعة الاستخدام لمرضى الحمى التيفوئيدية باستخدام طريقة Kerby-Bauer ولجميع العزلات قيد الدراسة لمعرفة نوع الاستجابة ، أظهرت النتائج مقاومة اغلب العزلات للمضادات الحيوية حيث بلغت نسبة العزلات المقاومة للمضادات & Ampicillin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Co-trimoxazole (Nalidixic acid) و. 66.7%، 55.6%، 57.9%، 52.6%، 63.2%، على التوالي وحساسية للمضادات (Imipenen , Azithromycin , tetracycline , Ceftriaxon & Ceftazidime) 80.0%، 68.4%، 86.4%، 55.6%، 68.8% على التوالي.

المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
الفصل الأول : المقدمة		
1	المقدمة Introduction	1
الفصل الثاني : استعراض المراجع		
4	استعراض المراجع Literature Review	2
4	نبذة عن العائلة المعوية Enterobacteriaceae	1.2
5	نبذة تاريخية عن جنس السالمونيلا	2.2
7	بكتريا <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	3.2
9	تصنيف بكتريا <i>Salmonella</i> Classification of <i>Salmonella</i>	4.2
11	تسمية البكتريا حسب نظام (Kaufmann-white)	5.2
12	النمط المصلي (Serovar or Serotype)	6.2
14	ألتركيب المستضدي Antigenic Structure	7.2
14	المستضد الجسمي Somatic antigen (O) or Cell wall antigen	1.7.2
14	مستضد الضراوة Virulence antigen (Vi – Ag)	2.7.2
14	المستضد ألسوطي Flagellar (H – Ag)	3.7.2
15	أمراضية بكتريا السالمونيلا <i>Salmonella</i> pathogenicity	8.2
18	الوبائية والانتشار Epidimiology&Spread	9.2
20	طرائق التشخيص	10.2
20	التشخيص المختبري Laboratory diagnosis	1.10.2
20	الفحص المجهرى Microscopic examination	2.10.2
21	العزل الجرثومي Bacterial isolation	3.10.2

21	Biochemical test الفحوصات الكيمو حيوية	4.10.2
22	Serological diagnosis التشخيص المصلي	5.10.2
22	اختبار التلازن باستخدام المستضدين الجسمي والسوطي فحص (Widal test)	1.5.10.2
24	Molecular Identification التشخيص الجزيئي	6.10.2
26	Nasted PCR تضخيم العنقدة	11.2
28	Bacterial Sensitivity to Antibiotics حساسية البكتريا للمضادات الحيوية	12.2
30	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Multiple resistance to antibiotics)	13.2
الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل		
32	Material & Methods المواد وطرائق العمل	3
32	الأجهزة والمواد المستعملة	1.3
33	الأجهزة المستعملة	1.1.3
34	المواد الكيميائية والبايولوجية والكواشف	2.1.3
35	الأوساط الزرعية	3.1.3
36	قراص المضادات الحيوية المستخدمة في فحص الحساسية	4.1.3
36	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة	5.1.3
37	طرائق العمل	2.3
37	تحضير المحاليل والكواشف	1.2.3
38	المحلول الملحي الفسلجي Normal saline	1.1.2.3
38	محلول ثابت العكرة القياسي (Macfarlandstandare)	2.1.2.3
38	الكواشف المستخدمة في تشخيص الجرثومة	2.2.3
38	Catalase Reagent كاشف إنزيم الكاتاليز	1.2.2.3
39	Methyl red test كاشف احمر المثيل	2.2.2.3

39	Vogesproskauer reagent كاشف فوكس بروسكاور	3.2.2.3
39	Oxidase reagent كاشف الاوكسيديز	4.2.2.3
39	Kovacs reagent كاشف كوفاكس	5.2.2.3
40	Culture Media الأوساط الزرعية	3.3
40	Blood agar وسط اكار الدم	1.3.3
40	Urea agar وسط اليوريا	2.3.3
41	وسط نقيع القلب والدماغ المضاف له كليسيرول	3.3.3
41	peptone water وسط ماء البيبتون	4.3.3
41	kliglar Iron agar وسط اكار كليكلر الحديد	5.3.3
41	MacConkey agar وسط الماكونكي	6.3.3
41	Nutrient agar وسط اكار المغذي	7.3.3
41	Salmonella –shigella agar وسط أكار السالمونيلا – الشيكلا	8.3.3
42	Hekton agar وسط الهيكتون	9.3.3
42	Muller Hinton agar وسط مولر - هينتون	10.3.3
42	Simmon- Citrate test وسط سايمون - السترات	11.3.3
42	Xylose Lysine Deoxycholate Medium.	12.3.3
42	جمع العينات	4.3
43	Isolation of salmonella عزل البكتيريا	5.3
43	عزل البكتيريا من الدم	1.5.3
43	زرع العينات	6.3
44	حفظ العزلات الجرثومية وأدامتها	7.3
44	الحفظ لمدة قصيرة	1.7.3

44	الحفظ لمدة متوسطة	2.7.3
44	الحفظ لمدة طويلة	3.7.3
44	تشخيص العزلات الجرثومية	8.3
45	Identification by Serological methoed التشخيص المصلي	1.8.3
46	الفحوصات المضهرية	2.8.3
47	Gram stain	1.2.8.3
47	الاختبارات الكيمو حيوية	3.8.3
47	Catalase test اختبار أنزيم الكتاليز	1.3.8.3
47	Oxidase اختبار أنزيم الاوكسيديز	1.3.8.3
48	Sugar fermentation and H ₂ S production اختبار تخمير السكريات وإنتاج	1.3.8.3
48	Indol test اختبار الاندول	1.3.8.3
48	Citrate test اختبار استهلاك السترات	1.3.8.3
48	Urease test اختبار اليوريز	1.3.8.3
49	Methyl-red test فحص المثيل الأحمر	1.3.8.3
49	Voges –Proskauer test اختبار فوكس بروسكارو	1.3.8.3
49	Api-20E التشخيص بنظام	4.8.3
51	Antibiotic suscepitibility test فحص الحساسية لمضادات الحياة	9.3
53	extraction DVA for استخلاص الحامض النووي لبكتيريا الحمى التيفوئيدية salmonella enteric Typhi	10.3
54	Estimation DNA Concentration: DNA تقدير تركيز	11.3
55	Polymerase chain reaction (PCR) تفاعل البلمرة المتسلسل	12.3
56	Nasted PCR عملية النستد	2.12.3
57	PCR The cycling reactions program ظروف التفاعل الأول والثاني	13.3

58	الترجيل الكهربائي DNA في هلام الاكاروز Agarose gel electrophorsis	14.3
60	التحليل الإحصائي	15.3
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة		
61	النتائج والمناقشة Result&Discussion	4
61	التشخيص المصلي Serological Identification	1.4
63	عزل وتشخيص الحمى التيفوئيدية Isolation and identification of <i>Salmonella enteric serover Typhi</i>	2.4
63	التشخيص الزراعي Culture identification	1.2.4
66	التشخيص المجهرى Microscopical identification	2.2.4
67	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	3.2.4
68	تأثير الفئة العمرية على الإصابة	3.4
70	دراسة تأثير الجنس على الإصابة	4.4
72	توزيع الجغرافي للمرضى المصابين بحسب نتائج العزلات البكتيرية	5.4
73	نتائج حساسية بكتريا <i>Salmonella enteric Typhi</i> لمضادات الحياة Antimicrobial susceptibility testing	6.4
77	المضادات الحيوية الذي لا تتضمن أي مقاومة <i>Salmonella enteric Typhi</i>	7.4
79	التشخيص الجزيئي Molecular Identification	8.4
81	مقارنة نتائج فحص Widal test على أساس فحص الدقيق PCR	9.4
82	تقييم مدى كفاءة اختبار Widal test بالاعتماد على نتائج الزرع البكتيري	10.4
84	تقييم مدى كفاءة اختبار الويدال اعتمادا على نتائج اختبار الجيني للبكتيريا	11.4
الاستنتاجات والتوصيات		
85	الاستنتاجات	

85	التوصيات	
المصادر		
86	المصادر العربية	
89	المصادر الاجنبية	
	الملاحق	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	التسلسل
10	أنواع جنس السالمونيلا وتحت نوع وعدد أنماطه والمضيف	1-2
12	تسمية البكتريا حسب نظام (Kaufmann-white)	2-2
32	الأجهزة المستخدمة في الدراسة	1-3
34	المواد الكيميائية والبايولوجية والكواشف المستخدمة في الدراسة	2-3
35	الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة	3-3
36	أقراص مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة	5-3
36	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة	6-3
52	المضادات البكتيرية قيد الدراسة.	7-3
56	تتابعات البوادي النوعية لجين <i>fliC</i>	8-3
56	المكونات اللازمة للتفاعل التضاعفي لجين <i>fliC</i>	9-3
57	ظروف التفاعل الأول PCR	10-3
57	ظروف التفاعل الثاني PCRNasted	11-3
62	مقارنة نتائج فحص Widal test بالاعتماد على العزلات البكتيرية	1-4

66	فحص صبغة كرام تحت Microscope بالاعتماد على العزلات البكتيرية	2-4
68	اختبارات الكيموحيوية والموزعة بحسب نتائج النمو البكتيري <i>Salmonella enteric Typhi</i>	3-4
69	توزيع المجاميع العمرية (سنة) بحسب الاعتماد على نتائج العزلات البكتيرية	4-4
71	أجناس المرضى بحسب الاعتماد على نتائج فحص العزلات البكتيرية.	5-4
72	توزيع الجغرافي للمرضى بحسب نتائج العزلات البكتيرية	6-4
77	فحص حساسية المضادات الحيوية للبكتيريا <i>Salmonella enteric Typhi</i>	7-4
78	المضادات الغير مقاومة للبكتيريا <i>Salmonella enteric Typhi</i>	8-4
80	اختبار الفحوصات الوراثية <i>Genetics fliC (PCR) test</i> للعزلات البكتيرية	9-4
82	مقارنة نتائج فحص Widal test مع نتائج فحص الدقيق PCR	10-4
83	منحنى ROC المختص بتقييم مدى كفاءة اختبار الويدال اعتمادا على نتائج اختبار الزرع البكتيري أو نتيجة API 20	11-4
84	منحنى ROC المختص بتقييم مدى كفاءة اختبار الويدال اعتمادا على نتائج اختبار الجيني للبكتيريا (PCR)	12-4

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
27	عملية النستد Nested PCR	1.2
80	الترحيل الكهربائي لتفاعل الأول لجين <i>Flic</i> لجراثيم <i>Salmonella enteric Typhi</i> بواسطة هلام الأكاروز بتركيز 2% الحاوي على 0.5 µg/ML من صبغة <i>thidium bromide</i> وباستعمال DNA ladder (100bp-1000bp) ، وبفرق جهد 100 فولت/سم 65 دقيقة ، إذ تُبين المسارات 18,16,15,12,11,9,8,6,5 ، 4,3,2,1 احتوائها على الجين . أما المسارات 7, 10, 13, 14, 17 عدم احتوائها على الجين .	1.4
81	لترحيل الكهربائي لتفاعل الثاني لجين <i>Flic</i> لجراثيم <i>Salmonella enteric</i>	2.4

	Typhi بواسطة هلام الأكاروز بتركيز 2% الحاوي على 0.5 µg/ML من صبغة Ethidium bromide وباستعمال DNA ladder (100bp-1000bp) ، وبفرق جهد 100 فولت/سم 65 دقيقة ، إذ تُبين المسارات 18,16,15,12,11,9,8,6,5,4,3,2,1 احتوائها على الجين <i>fliC</i>	
83	منحنى ROC المختص بتقييم مدى كفاءة اختبار الوبدال اعتمادا على نتائج اختبار الزرع البكتيري أو نتيجة API 20	3-4
84	منحنى ROC المختص بتقييم مدى كفاءة اختبار الوبدال اعتمادا على نتائج اختبار الجيني للبكتيريا (PCR)	4-4

قائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	التسلسل
	استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى	1
	الفحوصات الكيموحيوية	2
	الفحوصات الكيموحيوية بنظام APi20E	3
	أختبار حساسية عزلات بكتريا <i>Salmonella enteric Typhi</i> لمضادات الحياة	4
	الشكل البياني مقارنة نتائج فحص Widal test بالاعتماد على العزلات البكتيرية	5
	الشكل البياني: فحص صبغة كرام تحت المجهر بالاعتماد على العزلات البكتيرية	6
	الشكل البياني: اختبارات الكيموحيوية والموزعة بحسب نتائج النمو البكتيري <i>Salmonella enteric Typhi</i>	7
	الشكل البياني: توزيع المجاميع العمرية (سنة) بحسب الاعتماد على نتائج العزلات البكتيرية	8
	الشكل البياني: أجناس المرضى بحسب الاعتماد على نتائج فحص العزلات البكتيرية	9
	الشكل البياني: توزيع مناطق سكان المرض بحسب نتائج العزلات البكتيرية	10
	الشكل البياني: مقارنة نتائج فحص Widal test بحسب نتائج PCR	11
	الشكل البياني: فحص حساسية المضادات الحيوية للبكتيريا <i>Salmonella enteric Typhi</i>	12
	الشكل البياني: المضادات الغير مقاومة للبكتيريا <i>Salmonella enteric</i>	13

	server Typhi	
	الشكل: اختبار الفحوصات الوراثية Genetics <i>fliC</i> (PCR) test للعزلات البكتيرية	14

(Abbreviation)

قائمة المختصرات الواردة في الرسالة

Abbreviation	Key
bp	Base pair
DNA	DeoxyRibo Nucleic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
O-antigen	Somatic antigen
H-Antigen	Flagellar Antigen
Vi – antigen	Virulence antigen
UV	Ultra Violet
CDC	Centers for Disease Control
MDR	Multidrug-Resistant
PH	Potential of Hydrogen
PCR	Polymerase Chain Reaction
mPCR	Multiplex Polymerase Chain Reaction
TBE	Tris-Boric acid-EDTA
US	United States
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization
CDC	Centers for Disease Control
μl	Micro letter

μM	Micro mol
ml	Milli letter
μg	Micro gram
mm	Milli meter
mM	Milli molar
LPS	Lipopolysaccharide
XLD	Xylose Lysine Desoxycholate
S.S agar	Salmonella –Shigella agar
S.typhi	<i>Salmonella typhi</i>
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M

الفصل الاول

المقدمة

1-المقدمة

Introduction

الحمى التيفوئيدية (*S.typhi*) *Salmonella enterica* serovarTyphi واحدة من أكثر المسببات المرضية للالتهابات شيوعا في الإنسان وتسبب مرض التيفوئيد (Salmonellosis) الذي يشمل التهاب المعدة والأمعاء والتجثرم والتسمم الدموي والحمى المعوية.

تعتبر هذه البكتيريا من الممرضات المهمة للإنسان بجميع الفئات العمرية ولكنها تكون أكثر خطورة عند الأطفال (Hanan, 2016). تنتمي بكتريا *Salmonella enterica* serovar Typhi إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae وقد سميت بذلك نسبة إلى الجراح البيطري سلمون (salmon) الذي عزل عصيات السالمونيلا كوليرا (*salmonella cholerae*) من الخنازير عام (1885) (Shen وآخرون, 2007). ويشار إلى أن الحمى التيفوئيدية (Typhoid fever) من أهم المشاكل التي تواجهها المنظمات والمؤسسات الصحية في العالم لكونها من الأمراض المعدية الجهازية (Systemic infections)(Yoon وآخرون, 2009).

يعد الغذاء والماء الملوثين والأشخاص المصابين المصدر الرئيسي للإصابة (Pegues وآخرون, 2005). ومن المعلوم أن هذا المرض يتميز بتغير نسب الإصابة به مع تغير الظروف المناخية الموسمية فضلاً عن العوامل الأخرى المؤثرة على نسبة حدوث المرض وتشمل هذه العوامل العمر والسكن والحالة النفسية وعوامل بيئية أخرى (AL- Araj وAli, 2012).

يصيب المرض الإنسان بجميع الأعمار مسبباً التهاب معدي معوي تظهر أعراضه بعد (12-72) ساعة من التعرض للمسبب المرضي بشكل آلام في البطن، حمى، إسهال، غثيان وتقيؤ وتعد بكتريا السالمونيلا من مسببات الإسهال المهمة في الأطفال الرضع لاسيما في الدول النامية، وقد تتطور الإصابة بالحمى التيفوئيدية لدى الأطفال مؤدية إلى حدوث التجثرم الدموي (Bacteremia)

كما تسبب أحياناً التهاب السحايا والوفاة (Khan وآخرون, 2009 ; Anil وآخرون, 2009).

أبرز أعراض الإصابة ببكتريا السالمونيلا تايفي هو نقص في العدد الكلي لكريات الدم البيض وتعتبر الحمى التيفوئيدية من الأمراض المستوطنة في البلدان النامية وذلك لقلة الإجراءات الصحية أو مياه الشرب الملوثة بالمسبب المرضي مما يؤدي إلى سرعة انتشار المرض (Gal-Mor وآخرون, 2014). وان حمى التيفوئيدية (*Salmonella enterica* serovar Typhi) هي عصيات سالبة الكرام غير مكونة للمحفظة متحركة وتستهلك السترات ولا تخمر سكر اللاكتوز والسكروز ولا تنتج الأندول ولا تمييع الجلاتين ولا تحلل اليوريا وتنتج غاز H_2S . تمتلك جراثيم السالمونيلا تايفي عدة مستضدات أهمها المستضدات الجسمي (O-AG) ذو الطبيعة السكرية والمستضد الجسمي (H-AG) ومستضد الضراوة (Vi-AG) ذو الطبيعة البروتينية (Quinn وآخرون, 2002).

تنتشر الحمى التيفوئيدية من الأمعاء إلى المجرى الدموي وبقية أجزاء الجسم وربما تسبب الموت إذا لم يتم العلاج بالسوائل المعوضة والمضادات الحيوية ويكون الأطفال حديثي الولادة أكثر عرضة للإصابة وكذلك المصابون بالتهاب المفاصل والأمراض المزمنة (Mcghie وآخرون, 2009).

تعد الحمى التيفوئيدية (*Salmonella enterica* serovar Typhi) من أكثر المسببات المرضية مقاومة للمضادات الحيوية (Rabsch وآخرون, 2001). وهذه الميزة تتسبب في زيادة نسبة الإصابة وزيادة نسبة الوفيات نتيجة الإصابة بأنواع مصلية مقاومة للمضادات الحيوية (Tsai وآخرون, 2010).

وأن الطرق السريعة للكشف عن هذه البكتيريا هي طريقة أختبار ويدال (Widal test) وهي من الطرق الرخيصة وسهلة الاستعمال (Willke وآخرون, 2001).

وأن التقنيات الأخرى التي يكون أساسها علم الإحياء الجزيئي (Molecular Biology) التي بضمنها PCR (Polymerase Chain Reaction) فقد أثبتت فعاليتها بكونها طريقة سريعة ونوعية وحساسة للكشف عن الأحياء المجهرية الحية (Microbiology) في النماذج السريرية المختلفة (Zhou وPollard, 2010).

تمت دراسة الحمى التيفوئيدية في بلدنا بشكل كبير ولأغلب محافظات العراق وكذلك تم تناول المسبب المرضي من جوانب عديدة. اعتمدت الدراسة الحالية على دراسة مقارنة لطرق تشخيص المسبب المرضي (*Salmonella enteric serovarTyphi*) من خلال الزرع البكتيري والطرق السيروولوجية بالإضافة إلى الطرق الجزيئية (PCR) ولذلك فقد تناولت الدراسة المحاور الآتية :

1. عزل وتشخيص السالمونيلا تايفي (*Salmonella typhi*).
2. تشخيص الإصابة باستخدام فحص الويدال (widal test).
3. تشخيص (*Salmonella typhi*) باستخدام تقنية PCR.
4. الكشف عن جين (fliC) لجراثومة (*Salmonella typhi*).
5. تقدير الحساسية والخصوصية (Sensitivity and specificity) للطرق التشخيصية المستخدمة.
6. التحري عن مقاومة هذه البكتيريا لبعض مضادات الحياة

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

2- استعراض المراجع

1.2 نبذة عن العائلة المعوية Enterobacteriaceae

تصنف العائلة المعوية ضمن المجموعة الخامسة (Group5) وتضم هذه العائلة أكثر من (20) جنسا ويعد جنس *Salmonella* من أهم أجناسها الممرضة وهي البكتريا اللاهوائية الاختيارية (Facultative anaerobic) والسالبة لصبغة غرام (Jawetz وآخرون , 2007) (Holt وآخرون, 2009) تتوطن الأجناس العائلة المعوية كنبات طبيعي (Normal intestina microflora) في الإنسان والحيوان، تعيش في درجة حرارة تقارب (37) مئوية (Karami وآخرون, 2007) تظهر اغلب أفرادها تماثلا في الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA بنسبة (20%) وتعد من أهم الصفات المميزة للعائلة المعوية ذات الأهمية الطبية التي تميزها عن بقية العوائل (Brenner وآخرون, 2005).

تظهر هذه العائلة انتشاراً واسعاً في الطبيعة إذ توجد في مختلف البيئات مثل النبات والتربة والمياه، تتميز أفراد هذه العائلة بأنها عصيات سالبة لصبغة غرام هوائية ولا هوائية اختيارية وتمتلك المتحركة منها اسواطاً محيطية (Peritrichous flagella) كما أنها غير مكونة للابواغ (OIE, 2006) كما أنها سريعة النمو على الأوساط الزرعية الاعتيادية ومتطلبات نموها بسيطة وغير معقدة ويمكن أن تنمو في وسط يحتوي على مصدر كاربوني واحد (Kenneth , 2007) فضلا عن نموها في الأوساط الزرعية الانتقائية والتفريقية مثل أوساط , Deoxycholate, MacConkey وكذلك Blood agar (Jawetz وآخرون , 2007) وقد استخدم حديثا وسط Deoxycholate citrate ، XLD agar, Bismuth sulfite and Brilliant green agar وكذلك وسط salmonella-shigella agar وهي أوساط تفريقية وانتخابية للسالمونيلا تافيني (Mary وآخرون, 2012).

تمتلك هذه البكتريا القدرة على تخمر سكر المانيتول، و سكر الكلوكوز ولا تخمر سكر السكروز (Jawetz وآخرون ، 2007).

تقسم هذه العائلة اعتماداً على قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز على قسمين:

1- مخمرة لسكر اللاكتوز (Lactose fermenter) تظهر مستعمرات وردية عند نموها على وسط الماكونكي ، أقل من (1%) من السالمونيلا غير التيفوئيدية مثل *Salmonell arizonae* تكون مخمرة لسكر اللاكتوز (Quine وآخرون ، 2004).

2- غير مخمرة لسكر اللاكتوز (non Lactose fermenter) التي تظهر مستعمراتها صفراء شاحبة أو عديمة اللون عند نموها على وسط أكار الماكونكي إما بقية صفاتها فإنها تختزل النترات إلى نترت ، سالبة لاختبار الاوكسيديز و موجبة لاختبار الكتاليز عدا *Shigella dysenteriae* ومستهلكة للسترات ما عدا *Salmonella enterica serovar Typhi* (Brenner وآخرون ، 2005).

تسبب أفراد هذه العائلة العديد من الأمراض الخطيرة منها انتان الدم (Septicemia) ، التهاب المجاري البولية (UTI) (Urinary tract Infection) وتسبب التهاب المعدة والأمعاء (Gastroenteritis) وتسبب عدداً قليلاً منها الحمى المعوية (Enteric fever) (Kenneth)، (2007، Peques)، (Nosocomial infection) ، (2009).

2.2 نبذة تاريخيه عن جنس السالمونيلا :

يعد هذا الجنس من الأجناس المهمة مرضياً من العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) ، وقد اكتشف لأول مرة في عام 1885 من قبل الجراح البيطري Doniel E. Salmon إذ قام بعزل النوع *Salmonella cholerasuis* ولأول مرة من الخنازير المصابة *Hog cholera*

(W.H.O,1991). تنتمي السالمونيلا إلى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) التي تعيش في القناة المعوية للإنسان والحيوان ، ومع تطور الطرائق المصلية في الكشف عن المستضدات وتشخيصها فقد اكتشفت أعداد كبيرة من الأنماط المصلية للسالمونيلا وحتى نهاية عام (1987) شخص (2275) نمطا مصليا (Kelterbom وآخرون , 1988) وحاليا يوجد أكثر من (2400) نمط مصلية للسالمونيلا (Mims وآخرون 1993); (Jawetz وآخرون 2001, يتراوح طولها بين (1-7) ميكرون ، وسمكها (0.3-0.7) ميكرون يتصف الجنس باغلب صفات العائلة المعوية من حيث عدم احتوائها على سبورات وظهور البكتريا بلون شاحب على وسط أكار الماكونكي لأنها تعتبر غير مخمرة لسكر اللاكتوز (Quine وآخرون , 2004) كما أن نمو البكتريا في الأوساط الاعتيادية وتستطيع النمو ضمن مدى حراري يتراوح ما بين (15-45) مئوية (Jawetz وآخرون , 2007)

تنمو بكتريا السالمونيلا تاي في على الأوساط الاعتيادية وتتصف مستعمراتها بكونها كبيرة الحجم (2-3) ملم وتمتاز بمتطلبات نمو قليلة، تظهر مستعمراتها رطبة ومحدبة على وسطي الاكار المغذي وأكار الدم (Lee, 2002) في الوقت الذي تحتاج فيه إلى أوساط زرعية اختيارية متخصصة لغرض عزلها عن بقية الأنواع الأخرى (Jawetz وآخرون , 2007) بالإضافة إلى أنها تخمر سكر السكروز (Jawetz وآخرون , 2001) وتكون غير منتجة لإنزيم اليوريز وسالبة لاختبار الاوكسيديز وموجبة لاختبار الكاتاليز ومستهلكة للسترات ما عدا *Salmonella enterica* serover Typhi (Corales و Schmitt, 2004) .

تستوطن السالمونيلا القناة الهضمية للبائن والزواحف والطيور والحشرات (Pooley و Zapo 2002, كما أن معظم عزلات السالمونيلا توجد في طورين الأول هو المتحرك Motile phase I والثاني غير المتحرك Nonmotile phase II (Clark و Barret, 1987).

ويلاحظ أنه يمكن أن يتحول الطور الأول إلى الطور الثاني (Ryan و Ray, 2004).

أما أبرز اختبارات الكيموحيوية تكون سائلة لاختبار الاندول واختبار فوكس بروسكاور موجبة

لاختبار المثل الأحمر وغير محللة للجيلاتين (Holt وآخرون , 2009).

تمتلك البكتريا المستضدات الجسمية (O) وتصنف على مجاميع على أساس هذه المستضدات

فضلا عن امتلاكها المستضدات السوطية (H) والمستضد (Vi) (Corales و Schmitt ,

2004).

أمراض السالمونيلا Salmonellosis التي تسببها هذه البكتريا من أهم المشاكل

الصحية في العالم حيث تسبب أنواع هذا الجنس أنواع رئيسية من الأمراض هي حمى التيفوئيدية

، والباراتايفوئيدية Typhoid and Paratyphoid fever والتهاب الأمعاء أو التسمم

الغذائي (Food poisoning) وتسمم الدم (Septicemia) (Jawetz وآخرون , 2007)

يضم هذا الجنس أكثر من (2500) نمط مصلي جميعها قادرة على النمو في أمعاء الإنسان

والحيوان عدا النوعين (Salmonella typhi و Salmonella Paratyphi) فهما يصيبان

الإنسان فقط (Jawetz وآخرون , 2007); (Baron وآخرون , 1996). وكذلك تعد الحيوانات

مصدراً لنقل هذه البكتريا إلى الإنسان، وتوجد السالمونيلا على نحو واسع في الطبيعة وتصيب

الحيوانات ذوات الدم البارد والحار على حد سواء (Ryan و Ray , 2004) ، لذلك فإن فضلات

الحيوانات هي المصدر لنقل هذه البكتريا إلى الإنسان عند تناوله للأطعمة والمشروبات الملوثة بهذه

الفضلات (Prescott وآخرون , 1990) (Saha وآخرون , 2002).

3.2 بكتريا Salmonella enterica serovar Typhi

أطلق Picrré Louis في (1829) مصطلح التيفوئيد (Typhoid) على الأعراض المرضية الناتجة

اثر وباء متوطن حدث في باريس لكنه لم يستطع أن يميز بين التيفوئيد الذي انتشر في باريس

والتيفوس الذي كان شائعاً في بريطانيا وقد اشتق كلا المصطلحين من الكلمة الإغريقية (Typhose) التي تعني الدخان (Smoke) وهي تشير إلى الخمول (Apathy) والارتباك (Confusion) المرافق للحمى التيفوئيدية وقد استطاع العالم William wood في عام (1831) إن يميز بين حمى التيفوس و حمى التيفوئيد من الناحيتين السريرية والامراضية.

تم اكتشاف هذه البكتريا فيما بعد من قبل Elbert (1880) في العقد اللماوية المساريقية (Mesenteric lymph nod) وطحال مريض متوفى بالحمى التيفوئيدية. استطاع العالم Gaffy في عام (1884) إن يثبت انتقالها بوساطة الماء وليس الهواء. (Guerrant وآخرون, 1999).

يصيب هذا النوع الأطفال والبالغين ومدة حضانة المرض (7-14) يوماً منذ تناول البكتريا مع الغذاء والماء الملوثين بفضلات حاملي المرض حتى ظهور الأعراض وتعتمد مدة الحضانة على كمية الجرعة الممرضة (Infection dose) وكذلك حالة الجهاز المناعي للمضيف ضراوة النمط المصلي المسبب للإصابة (Pealver وآخرون, 2004).

لبكتريا السالمونيلا العديد من آليات البقاء (Survival mechanism) التي تمكنها للبقاء والاستمرار لمدة طويلة في مختلف الظروف البيئية فضلاً عن أنها قادرة على تغيير عوامل ضراوتها بحسب المتغيرات البيئية فتتمكن من مقاومة ظروف الجفاف ومقاومة المعقمات، لذلك تستطيع التكاثر على مختلف السطوح والتربة ومقاومة أشعة الشمس وتتمكن السالمونيلا من البقاء لمدة (9) أشهر أو أكثر في التربة الرطبة، الماء، المواد البرازية، علائق الحيوانات وبما في ذلك الحاوية على مواد مثل الدم والعظام أو في طعام الأسماك (Foster و Spector, 1995).

4.2 تصنيف بكتريا *Salmonella enteric serover Typhi*

تعد عملية تصنيف السالمونيلا معقدة نوعاً ما، فقد كانت البكتريا في بدايات عملية التصنيف تسمى اعتماداً على الأعراض السريرية (Clinical Symptoms) فمثلاً *Salmonella typhimurium* هي المسبب للحمى التيفوئيدية للفأر، و *Salmonella cholera-suis* تسبب كوليرا الخنازير، ولكن بعد أن تم تثبيت صفة الخصوصية للمضيف (Host specificity) كونها موجودة لعدة أنواع، فقد تمت التسمية على أساس المنطقة التي عزلت العترة الجديدة منها (LeMiner و Popoff, 1987).

بعد ذلك تم تمييزها بحسب نوع المضيف المصاب إذ ان الأنواع المصلية التي لها القدرة التعايشية العالية على إصابة الإنسان يعتبر هو المضيف الطبيعي لها مثل سالمونيللا التايفوئيد والباراتايفوئيد (*S.paratyphi, S.typhi*) وليس لهذه الأنواع مضيف معروف غير الإنسان (Baron وآخرون, 1994) تم حصل تغير في تصنيف السالمونيلا لعدة مرات، ولوحظ أن التسمية الحديثة حسب نظام Kaufmann-white المعتمدة من مركز السيطرة على الأمراض الانتقالية (CDC) (Judicial, 2005) (Janda و Abbott, 2006) يضم جنس (*Salmonella*) نوعين هما: *Salmonella enteric* و *Salmonella bongori* وكل واحد من هذين النوعين يحتوي الكثير من الأنماط المصلية التي كانت سابقاً تسمى تحت نوع Subspecies V . (Brenner وآخرون, 2000). وفي عام (2005) اعتماداً نوعاً ثالثاً وهو *Salmonella subterranean* بالإضافة للنوعين السابقين (Su و Chiu, 2007).

يقسم النوع *enteric* على ستة مجاميع تحت نوع Subspecies اعتماداً على تهجين DNA و DNA وتفاعلاتها الكيمو حيوية.

الجدول (1-2) أنواع جنس السالمونيلا وتحت نوع وعدد أنماطه والمضيف

نوع السالمونيلا	تحت النوع Subspecies	عدد الأنماط	المضيف
<i>S. enteric</i>	subsp. <i>enterica</i> (I)	1,454	الحيوانات ذوات الدم الحار
<i>S. enteric</i>	subsp. <i>salamae</i> (II)	489	الحيوانات ذوات الدم البارد والبيئة
<i>S. enteric</i>	subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	الحيوانات ذوات الدم البارد والبيئة
<i>S. enteric</i>	subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	الحيوانات ذوات الدم البارد والبيئة
<i>S. enteric</i>	subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	الحيوانات ذوات الدم البارد والبيئة
<i>S. enteric</i>	subsp. <i>indica</i> (VI)	12	الحيوانات ذوات الدم البارد والبيئة
<i>S. bongori</i>	Formerly Subspecies V	20	الحيوانات ذوات الدم البارد والبيئة
المجموع		2463	

(Tindall وآخرون, 2005); (Heyndricx وآخرون, 2005).

ويلاحظ أن تصنيف السالمونيلا على أساس انتخابها للمضيف :

1- الأنواع المصلية للسالمونيلا ذات القدرة التكيفية العالية على عدوى الإنسان كعصيات التايفوئيد

S. typhi على الرغم من أن *S. paratyphi A* و *S. paratyphi B* و *S. paratyphi C* و *S.*

sendia هي الأخرى ذات قدرة تكيفية عالية على عدوى الإنسان وليس لهذه الأنواع مضيف

معروف غير البشر .

2- السالمونيلا ذات القدرة التعايشية العالية على مضيفات محددة من غير البشر مثل *S. pullorum* و *S. gallinarum* التي تصيب الطيور والدواجن و *S. dublin* التي تصيب الأبقار و *S. abortus* التي تصيب الخيول و *S. choleraesuis* التي تصيب الخنازير التي يمكن أن تسبب العدوى للإنسان .

السالمونيلا التي تتكيف مع مدى أوسع من المضيفات وتنتمي إلى هذه المجموعة معظم أنواع السالمونيلا التي تسبب نوع العدوى البشرية وغير البشرية ، وتتمثل الاستجابة الاعتيادية لمثل هذه العدوى في الإصابة بالالتهاب المعوي الحاد وتعد *S. typhimurium* من أهم السلالات المصلية المسببة للالتهاب المعوي الناشئ عن السالمونيلا المنتشر في مختلف أنحاء العالم ، وتسبب أنتان الدم وقد تصيب الدواجن والقطط والكلاب ثم تنتقل إلى أغذية الإنسان . (Falkow و Mekalanos, 1990) .

5.2 تسمية البكتريا حسب نظام (Kaufmann-white)

هي التسمية المعتمدة حالياً، والتي تعتمد وجود أو غياب المستضد الجسمي (O-Antigen) ، ثم المستضد السوطي (H- Antigen)، الذي يقسم إلى : الطور الأول -1 phase والطور الثاني -2 phase وعلى النحو الآتي:

2 phase H-Ag : 1 phase (H-Ag, Vi : O-Ag) فمثلاً *Salmonella Enteritidis*

(-g,m;1,9,12) يعني المستضد الجسمي (O-Ag) هو 1,9,12 والمستضد السوطي (H-

Ag هو g,m وهناك عامل الضراوة الخاص بالنمط *Salmonella enterica* serovar Typhi

(d:Vi,12,9) وحسب ما موضح في الجدول (2-2) (Jawetz وآخرون, 2007) جدول (2)

للتسمية المعتمدة على وجود أو غياب المستضد الجسمي (O-Antigen) ، ثم المستضد السوطي

(H-Antigen)

الجدول (2-2) التسمية المعتمدة على وجود أو غياب المستضد الجسمي (O-Antigen)، ثم

المستضد السوطي (H-Antigen)

Group	Specific/Serotype	O Antigens	Phase 1	Phase 2
A	S. ser. Paratyphi A	1, 2, 12	A	(1,5)
B	S. ser. Schottmuelleri	1, 4, (5), 12	b	1, 2
	S. ser. Typhimurium	1, 4, (5), 12	i	1, 2
C1	S. ser. Hirschfeldii	6, 7, (Vi)	c	1, 5
	S. ser. Oranienburg	6, 7	m, t	-
	S. ser. Montevideo	6, 7	g, m, s, (p)	(1, 2, 7)
C2	S. ser. Newport	6, 8	e, h	1, 2
D	S. ser. Typhi	9, 12, (Vi)	d	-
	S. ser. Enteritidis	1, 9, 12	g, m	(1, 7)
	S. ser. Gallinarum	1, 9, 12	-	-
E1	S. ser. Anatum	3, 10	e, h	1,

(Jawetz وآخرون, 2007).

6.2 النمط المصلي : (Sero var or Serotype)

يلاحظ أن التتميط (Sero var or Serotype) والذي يضم مجموعة من الإحياء المجهرية

(Microorganisms) التي تعتمد على الاختلافات في المستضدات التي تملكها لتمييزها عن

باقي الأنواع، فالنمط المصلي قد يعتمد على عوامل الضراوة (virulence factors)، أو متعدد

السكريد الشحمي (LPS) للبكتريا سالبة لصبغة جرام، أو وجود عوامل الذيفانات الخارجية (Ex-

otoxin) أو (Plasmid) أو عوامل أخرى يمكن أن تميز بين عترتين للنوع نفسه (Baron ,

1996).

إن المستضد الجسمي (O-Antigen) يرتب تحت النوع (*enteric* (Subspecies) التابع لبكتريا *Salmonella* الذي يقسم على عدد من المجاميع المصلية (Serogroups) وهي :

(E, D, C₂, C₁, B, A) وإن الأنواع الموجودة ضمن هذه المجاميع المصلية (Serogroups) مسؤولة عن (99%) من إصابات السالمونيلا في الإنسان والحيوانات ذوات الدم الحار (Le Minor و Popoff, 1987) .

أن أحدث الطرق التي تم اعتمادها لتنميط الأنواع المصلية التابعة لجنس *Salmonell enterica*، هي الطرق المعتمدة على تحليل المحتوى الجيني لهذه البكتريا كطريقة الترحيل الكهربائي ذو الحقل النابض (pulsed-field Gel Electrophoresis) (PFGE) و تنميط التتابعات المتعددة المواقع (Multiplicity of multiple site sequences) (MLST) التفاعل التضاعفي لإنزيم بلمرة DNA متعدد الضفائر (Prowollik وآخرون، 2011) (MultiplexPCR-based methods) وأعتبره تصنيف (Murray وآخرون 2009) من أحدث التصنيفات العلمية لبكتريا *Salmonella enterica* serover Typhi وكالاتي:

Kingdom: Eubacteria
 Phylum: Proteobacteria
 Class: Gamma proteobacteria
 Order: Enterobacteriale
 Family: Enterobacteriaceae
 Genus: *Salmonella*
 Species: *enterica*
 Subspecie : *enterica enterica*
 Sero var: *Salmonell Typhi*

7.2 التركيب المستضدي Antigenic Structure

يمتلك جنس السالمونيلا تاي في شأنه شأن كل أجناس العائلة المعوية ثلاثة أنواع رئيسة من المستضدات التي تستخدم لتعريف النمط الجرثومي ،وهي المستضد الجسمي (antigen Somatic) والسطحي (Surface) والسوطي (Flagellar) وكالاتي:

1.7.2 المستضد الجسمي Somatic antigen (O) or Cell wall antigen

تكون المستضدات الجسمية السلاسل الجانبية لوحدات السكر المتكررة التي تبرز من طبقة عديد السكريد ألشحي LPS الموجودة ضمن الغشاء الخارجي (Outer membrane) في الخلية البكتيرية، وهذه المستضدات تمتاز باستقرارها الحراري والكحولي- (Heat and Alcohol stable) (Old, 1996); (Todar, 2008).

2.7.2 مستضد الضراوة Virulence antigen (Vi – Ag)

تمتلك بعض أنواع السالمونيلا مستضدا يغطي المستضد الجسمي وتركيبه الكيميائي: (1, 4, 2Deoxy-2-N-acetylc galactounic Acid). والفعالية المستضدية تعود إلى وجود O-acetylc ، أما الطبيعة الكيميائية فهي سكريات متعددة حامضية (Acidicpolysaccharide) (Old, 1996). ويستطيع هذا المستضد التلازم مع الأضداد الخاصة به ولكنه لا يتلازم مع الأضداد النوعية للمستضد الجسمي (O)، ويلاحظ هذا المستضد في ثلاثة أنواع مصلية من السالمونيلا وهي S. typhi وبعض سلالات S. dublin and S. paratyphi. ويكون هذا المستضد غير ثابت حراريا (Todar, 2008).

3.7.2 المستضد السوطي Flagellar (H – Ag)

عبارة عن مجموعة من المحددات المستضدية تحوي على البروتين السوطي ، يوجد في البكتيريا المتحركة فقط لامتلاكها السوط البكتيري الذي يمتاز بطبيعته البروتينية المتأثرة بالحرارة

يوجد بطورين (ليس في كل أنواع السالمونيلا) ،الطور الأول (Phase 1) وهو طور متخصص ، أما الطور الثاني (Phase 2) غير متخصص ، وتتنوع الاسواط حسب ظروف الزرع والطرز الوراثي Genotype . ومن أهم صفاته انه غير ثابت حراريا (Heat labile) كما انه غير ثابت تجاه الكحول والحوامض (2008,Todar) توجد مستضدات أخرى في بكتريا السالمونيلا منها المستضدات الهدبية (Fimbrial antigens) والمستضد (R antigen) الذي يظهر في السلالات التي تعاني من طفرات من النوع الناعم إلى الخشن (Smooth to rough) إذ تفقد هذه السلالات المستضد الجسمي ويظهر هذا المستضد على سطح الخلية (1996,Old)

8.2 أمراضية بكتريا السالمونيلا Salmonella pathogenicity

الحمى التيفوئيدية هي مرض بكتيري مميت وقد أصبح من الأمراض الوبائية في دول جنوب آسيا التي تقتقر إلى مجاري تصريف المياه (Bhutta , 2006) .

تعتمد قابلية السالمونيلا على إحداث المرض في جسم المضيف على الكثير من عوامل الضراوة (Virulence factors) التي تمتلكها البكتريا مثل امتلاكها لغلاف كامل من متعدد السكريد الشحمي .(Complete LPS coat) الذي يتحرر بعد تحلل الخلية البكتيرية ويعد عاملا مهما لتحديد الضراوة التي تمكن البكتريا من إنتاج السموم. لإحداث الإصابة (Rahman وآخرون 1997) وتبلغ الجرعة الخمجية لبكتريا السالمونيلا (10^3-10^6) خلية بكتيرية وتنتقل إلى الجسم عن طريق الطعام والماء الملوث مسببة حمى التيفوئيدية التي تقتل ما يقرب من (600 ألف شخص سنويا في جميع أنحاء العالم (Adachi وآخرون 2005) تمر بكتريا السالمونيلا بثلاث مراحل خلال أمراضيتها في الجسم المضيف وهي:

المرحلة الأولى:

تتصق البكتريا بخلايا المضيف (Adhesion) فعند تناول المواد الملوثة بالبكتريا فإنها تلجأ وبوساطة الأهداب، أو الشعيرات التي تملكها للاتصاق بالخلايا المبطنة لتجويف الأمعاء (Epithelial cells) من خلال مستقبلات خاصة على الخلايا البطانية التي تسمى (M-cells) مواقع باير (Payers patches) حيث تعتمد قابلية البكتريا على الالتصاق بخلايا المضيف على عدد كبير من العوامل مثل الخمل (Fimbria) وأخرى (Non fimbrial). كما أن بكتريا السالمونيلا تملك بروتينات خاصة تساعد على اختراق الخلايا البلعمية تسمى (Salmonella invasion protein) مثل SipA و SipB) هذه البروتينات تسبب موت الخلية البلعمية . (2010, conti و Rabinowitz)

المرحلة الثانية:

عند التصاق البكتريا بخلية المضيف تعمل على إرسال إشارة بروتينية (Protein signal) عبر جدار خلية المضيف التي بدورها تؤدي الى إنشاء بروزات تشبه السويقات تحيط بالبكتريا مكونة ما يشبه الحفرة سرعان ما تنغلق لتدخل البكتريا خلية المضيف بعملية الالتهام الخلوي (Endocytosis) وفي الوقت نفسه تحفز إفراز (Cytokines) ثم تنتقل البكتريا عبر Phagosome الى طبقة الصفيحة الأساسية (Laminapropria) وتلتهم البكتريا هناك من قبل الخلايا البلعمية (Macrophages) أو العدلات (Neutrophils) (Dhanao و Fatt, 2009)

المرحلة الثالثة:

بعد أن تستقر البكتريا في الخلايا البطانية للمضيف فإن البكتريا تبدأ بالتكاثر في الخلايا البلعمية في مواقع باير ، والعقد المساريقية للمفاوية (Mesenteric lymph node) ، والكبد والطحال ثم تنتشر عبر الدورة الدموية إلى الرئة وكيس الصفراء (Gall bladder)،

والجهاز العصبي المركزي ، والعظام والكليتين (Guillaumat وآخرون, 2008).

بعد اختراق السالمونيلا لبطانة الأمعاء فإنها تؤدي إلى حدوث استجابة التهابية حادة (Acute inflammatory response) ونتيجة لهذه الاستجابة تظهر على المصاب أعراض حمى، ورعشة وآلام في البطن وزيادة في عدد الكريات البيض (Leukocytosis) و إسهال (Donnenberg, 2005) ينجم عن الاستجابة الالتهابية إفراز العديد من المدورات الخلوية بالإضافة إلى البروستاغلاندين (Prostaglandins) الذي يقوم بتنشيط أنزيم (Adenylate cyclase) الذي بدوره يتحول إلى (Cyclic-AMP) الذي يحفز إفراز الكهارل (Electrolytes) والسوائل إلى تجويف الأمعاء محدثاً حالة الإسهال (Raffatellu وآخرون, 2006) و (Chopra وآخرون, 1999).

من الجدير بالذكر أن قدرة البكتريا على تكوين الغلاف الحيوي (Biofilm) ربما يساعدها على التخلص من الجهاز المناعي (Prouty وآخرون 2002) يمتاز المرض بشكله الحاد والمزمن وتكمن خطورة حملي المرض بأنهم ناقلون للعدوى ولا يعانون من أية أعراض ، على وفق مراكز السيطرة على الأمراض فإن نسبة ما يقرب من (5%) من الأشخاص الذين يصابون بالحمى التيفوئيدية يصبحون حاملين للمرض بعد الشفاء (Centers for Diseases Control, 2001). إن الخطوة الأساسية في أمراضية هذه البكتريا هو قدرتها على تقادي واختراق حاجز الحامضية للمعدة، حيث يعتبر حاجزاً كيميائياً ووقائياً فعالاً ضد العديد من الأحياء المجهرية الممرضة (Chapel وآخرون, 1999). ويلاحظ أن بكتريا السالمونيلا تمتاز بقدرتها على تحمل الحموضة المنخفضة للمعدة إذ إن لهذه البكتريا القدرة على استجابة التكيف للحامض، إذ اصطلح على تسميتها (ATR (Acidic tolerance resposne) (Guerrente وآخرون, 1999).

حيث وجد إن تعرض بكتريا الـ *Salmonella* إلى مستويات منخفضة من الحامضية يدفعها الى صنع ما لا يقل عن 40 نوعاً من البروتين التي يلعب بعضها دوراً مهماً في امراضيتها إذ تساعدها على تجاوز البيئة الحامضية للمعدة عند مرورها من خلال المعدة (Fauci وآخرون 1998, (Small intestine) وتخرق الطبقة المخاطية المبطنة للأمعاء وهناك تتواجد مع الخلايا المعوية (Enterocytes) وخلايا M-cells (Mandell وآخرون 2000).

فخلايا M-cells هي نوع من الخلايا الطلائية المعوية التي تكون منتشرة على النسيج المكون لمواقع باير (Peyer's patches) وهذه المواقع تقع مباشرة تحت الخلايا الطلائية (Johnsonet Gorbach وآخرون 1998)

9.2 الوبائية والانتشار (*Salmonella enterica serover*) Epidemiology& Spread (Typhi)

ترتبط الوبائية بانتشار الحمى التيفوئيدية أي بانتقالها من شخص إلى آخر وذلك لان هذه البكتريا تفتقر إلى مضائف وسطية أخرى غير الإنسان فارتباطها بالإنسان بوصفه مضيفا أساسياً يعد هو العامل الرئيس لانتشار المرض. والناقل الطبيعي هو الماء الملوث ومن حين إلى آخر الطعام الملوث أيضا (WHO, 2006).

تزداد الإصابة ببكتريا السالمونيلا لمرضى نقص المناعة المكتسب (AIDS) ويقدر بعشرين مرة أعلى من الأشخاص العاديين كما أنهم غالبا ما يعانون من إصابات متكررة (U.S.F و Drug Administration 2003, Schneider وآخرون 2000) وتعد الإصابة

بالسالمونيلا من الأمراض واسعة الانتشار في الطبيعة بسبب العدد الكبير من الأنماط المصلية

للبكتريا فضلا عن تعدد المضائيف التي تصيبها وتشمل الإنسان والحيوان

(Matherson وآخرون, 2010). أكدت الدراسات الوبائية إن جنوب شرق وجنوب ووسط آسيا هي المناطق الأعلى استيطاناً للمرض مع معدلات أعلى من (100/100000) حالة إصابة سنوياً ، وكذلك باقي دول آسيا وإفريقيا وأمريكا اللاتينية ومنطقة الكاريبي وإفانوسيا والمناطق المحيطة ويستثنى من ذلك استراليا ونيوزيلندا . وتأتي بالمرتبة الثانية من حيث معدلات الإصابة التي تتراوح بين (10 - 100 / 100000) حالة في أوروبا وأمريكا الشمالية وبقية دول العالم المتقدم (Crump وآخرون, 2004) .

أوضحت دراسة في إسبانيا إن حالات الإصابة ببكتريا السالمونيلا بين (1990-1996) كان سببها بكتريا *S. enteritidis* و *S. typhimurium* وبنسبة (83.7 %) وإن أكثر المجاميع العمرية إصابة كانت بعمر اقل من أربع سنوات (Wall وآخرون, 1994) (Gonzalez-Hevia وآخرون, 1999) أما في العراق ففي دراسة لوبائية أمراض السالمونيلا للفترة ما بين (1989-1985) لوحظ وجود إصابات بمعدل سنوي مقداره (7.5) حالة لكل (100000) شخص ، حيث بلغت عدد الحالات المرضية المسجلة خلال سنة واحدة (1286) حالة (Al-Hayali وآخرون, 1993).

كل الفئات العمرية قابلة للإصابة بالسالمونيلا ، ولكنها تكون الأعراض اشد في المسنين والأطفال الذين يعانون من حالات مرضية مزمنة (Centers for Diseases Control, 2001).

سجلت تقارير منظمة الصحة العالمية حالات الإصابة منذ عام (1980) إذ بلغت (1812) حالة بينما ارتفع هذا العدد إلى (21356) في عام (1989) أشارت منظمة الصحة العالمية إلى إن من بين (1656) عزلة للسالمونيلا سجلت في المركز الوطني للسالمونيلا في العراق كانت النسبة الأعلى فيها لـ *S. typhimurium* تلتها بالمرتبة الثانية *Salmonella enterica serovar* Typhi (WHO, 1980).

أما في عام (1982) فقد كانت أعلى نسبة مسجلة للبكتيريا المعزولة من الإنسان هي *Salmonella enterica serover Typhi* حيث كانت نسبتها (31.3%) (WHO, 1982). وفي عام (1984) سجلت بكتيريا *Salmonella enterica serover Typhi* المرتبة الثانية للحالات المصابة والمشخصة بنسبة (16.6%) بعد السالمونيلا *S. typhimurium* وخلال الفترة من عام (1985) إلى عام (1989) نشرت الحيالي دراسة حول عزلات السالمونيلا التي أرسلت إلى المركز الوطني حيث أشارت فيها إلى أنه قد شخصت خلال المدة المذكورة (4162) عزلة من مصدر أنساني وكانت أعلى نسبة قد سجلت هي عزلات *S.typhi* (29.5%) (Al-Hayali, 1993). في عام (2001) لم تشر التقارير إلى وجود حالات وفاة (WHO, 2003)، وهناك حوالي 21 مليون حالة إصابة بالتيفوئيد وتقع حوالي 222,000 حالة وفاة بسبب مرض التيفوئيد سنوياً في جميع أنحاء العالم (WHO, 2014).

10.2 طرائق التشخيص

1.10.2 التشخيص المختبري Laboratory diagnosis

إن الأعراض والعلامات المرضية تجعل عملية تشخيص الحمى التيفوئيدية سريريا أمراً سهلاً ولكن لوجود تشابه في العلامات السريرية (ارتفاع درجات الحرارة، أو الإسهال) بين ماتسببه بكتيريا السالمونيلا وغيرها من الإحياء المجهرية الأخرى فأن الاعتماد على التشخيص المختبري يمكن أن يكون أكثر دقة ونوعية في التشخيص النهائي للمسبب المرضي (Kundu وآخرون, 2006) ومن أبرز هذه الاختبارات.

2.10.2 الفحص المجهرى Microscopic examination

أن طريقة الفحص المجهرى Microscopical examination للمسبب المرض بعد أصطباغة بصبغة كرام للتحري عن عصيات السالمونيلا من أولى الخطوات التي تجرى خلال التشخيص

المختبري للمرض وذلك عبر ما تمتاز به البكتريا من صفات من حيث أنها عصوية غير مكونة للابواغ وغير مكونة للكبسول متحركة باسواط محيطية بكتريا السالمونيلا تكون سالبة لصبغة كرام -G مما يسهل تشخيص الجراثيم إذ تأخذ جرثومة *S. typhi* اللون الأحمر والشكل العصوي عند اصطبائها بهذه الصبغة علماً أنها تشترك في هذه الصبغة مع العديد من الجراثيم وخاصة الهوائية المعوية لذا تعد هذه الطريقة إما اختباراً أولياً أو مكملًا للاختبارات التشخيصية الأخرى (Atlas وآخرون ، 1995 ؛ Koneman وآخرون ، 1997) .

3.10.2 العزل البكتيري Bacterial isolation

غالبا ما تعزل الجرثومة من البراز والدم والإدرار وعصارة الصفراء ونخاع العظام (Veling وآخرون , 2002) ويعد وسط الدم (blood culture) الوسط الأمثل لتشخيص الحمى المعوية، كما إن حساسية وسط الدم تكون في أعلى مستوياتها في الأسبوع الأول من المرض وتبدأ بالانخفاض مع تقدم المرض، إن التحسس الكلي للوسط يكون بحدود (50%) ولكنه ينخفض إلى حد كبير مع العلاج بالمضادات الحيوية (Parry وآخرون , 2002) .

وتمتاز السالمونيلا بسهولة زرعها في معظم مختبرات الإحياء المجهرية وباستخدام الأوساط الزرعية المعتادة مثل وسط الدم Blood agar ، وسط الماكونكي MacConkey's ، وسط بزموت Basmoth agar ، وسط Xylose Lysine Desoxycholate ، وسط السالمونيلا -شيكلا SS agar ، (Wain وآخرون , 2001).

4.10.2 الفحوصات الكيمو حيوية Biochemical test

يعتمد في تشخيص بكتريا السالمونيلا على الطرق التقليدية التي تتضمن اختبار قابلية البكتريا على تخمر سكر الكلوكوز واللاكتوز وإنتاج H_2S بوسط (Kliglar Iron agar) ، إما وسط (Semisolid mannitol) فقد أعتمد للكشف عن قابلية البكتريا لتخمر سكر المانتول

وملاحظة حركة البكتريا، في حين وسط السيمون يستخدم (Simmon citrate) لتوضح قابلية البكتريا على استهلاك السترات، إما التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج الاندول من خلال وسط ماء الببتون (Pepton water)، وللتحري عن قابلية البكتريا لإنتاج إنزيم اليوريز فقد استخدم وسط اليوريا (Urea).

ولوحظ أن استخدم نظام (API20E) الذي يتضمن (20) اختبارا كان لتأكيد التشخيص (Quinn وآخرون, 2004)

5.10.2 ألتشخيص المصلي Serological diagnosis

يتم تشخيص أنواع السالمونيلا العائدة لها اعتمادا على التحليل المستضدي (Antigenic analysis) لامتلاكها عددا من المستضدات الجسدية (Somatic antigens) (O-Ags) ، وأخرى سوطية (Flagellar antigens) (H-Ags) ، ومستضد الفوعة (Virulence antigen) (Vi-Ag) الذي له أهمية في إصابة البكتريا لجسم المضيف ولربما يتداخل مع المستضد الجسدي في إثراء التلازن حيث يوجد هذا المستضد في بعض أنواع السالمونيلا مثل *Salmonella typhi* و *Salmonella paratyphi* (Jawetz وآخرون, 1989) .

1.5.10.2 اختبار التلازن باستخدام المستضدين الجسدي والسوطي (Widal test)

يعد فحص واختبار ويدال الأقدم والأكثر استعمالا في العالم ويعبر من خلال فحص تلازني للتحري عن الأجسام المضادة المكونة لدى المرضى المصابين بالحمى التايفوئيدية والبارا تايفوئيدية يحدد معيار الاضداد المتكونة كاستجابة للمستضدات الجسمية والسوطية المستخدمة في الفحص (Lennet وآخرون, 1985). وقد استطاع (Widal 1896) أن يبرهن على الأمصال المأخوذة من أشخاص مصابين بحمى التيفوئيدية تجعل عصيات الجرثومة تلتصق به مكونة تركيبا

يشبه الشبكة تعيق وتمنع حركة الجرثومة وأطلقوا على هذه الحالة مصطلح التلازن، وقد أشار

(Levine, 1978) إلى إن إعطاء اختبار ويدال نتيجة جيدة دليل على الإصابة بحمى التيفوئيدية

في الأشخاص الساكنين في منطقة لا يوجد فيها المرض أو عند الأطفال الذين لأتزيد أعمارهم عن عشر سنوات ويسكنون المناطق المتوطن فيها المرض .

إن فحص ويدال سهل الاستعمال ويمكن استخدامه في كثير من الحالات بديلاً عن

عمليات الزرع، كما إن إجراء الفحص بعد (7-10) أيام بعد العلاج يعطي نتائج مقبولة

(Willke وآخرون, 2001)

يتأثر فحص الويدال بعوامل عديدة تؤثر سلباً على نتائجه كالتشابه بين تركيب المستضدات

الجسمية لجرثومة السالمونيلا وإفراد عائلة الجراثيم المعوية حيث إن الإصابة بأحد أفراد هذه

العائلة يؤدي إلى توليد أجسام مضادة تعطي تفاعلات مع المستضد الجسمي في فحص ويدال.

(Shimada وآخرون, 1992)

وان المعالجة بالمضادات الحيوية تؤثر في مستوى الأجسام المضادة فإذا تم العلاج في وقت

مبكر من الإصابة قبل تكوين الأجسام المضادة سوف لا يحدث ارتفاع في المعيار الحجمي

للأجسام المضادة مما يعطي نتائج خاطئة في التشخيص .

كما يمكن أن يعطي اختبار الويدال نتيجة موجبة وسالبة في تشخيص حاملي المرض ،بالإضافة

إلى إن اخذ اللقاح يؤدي إلى تكوين اضداد تبقى لمدة طويلة في الجسم مما قد يؤدي إلى نتيجة

موجبة خاطئة عند فحصها ويؤدي تكرار التعرض إلى الخمج تحت السريري (Subclinical) في

المناطق المتوطنة بالمرض إلى حصول ارتفاع في الأجسام المضادة في مصول الأصحاء

(Bhatia و Inchhpugm, 1994).

6.10.2 التشخيص الجزيئي Molecular diagnosis

إن التطور الكبير الذي طرأ على تقنيات البايولوجي الجزيئي Molecular biology خلال السنين الأخيرة وضع في تناول اليد تطبيقات كفاءة عديدة في مجال تشخيص الإحياء المجهرية ولعل استخدام مجسات الأحماض النووية Nucleic Acid Probes من أهم هذه التطبيقات سواء في تشخيص الجراثيم النامية على الأوساط الزرعية أو الموجودة ضمن العينات المرضية المختلفة وتشير الدراسات التي أجريت في أنحاء مختلفة من العالم ولتقنيات مختلفة في تشخيص البكتريا المسببة لمرض حمى التيفوئيدية أن تقنية (PCR) هي التقنية الأدق والأكثر فعالية في الكشف عن بكتريا السالمونيلا وفي الأوقات المبكرة من الإصابة .

وفيما يتعلق بمرض الحمى التيفوئيدية فقد استخدمت المجسات المشعة وغير المشعة لغرض تشخيص الجراثيم المزروعة أو أنها عدت من الطرائق المفيدة في التشخيص السريع لهذه العزلات المعروفة بتضخيم الأحماض النووية إلا إن التقنيات المعروفة تقنيات تضخم الحامض النووي Nucleic Acid Amplification Techniques كانت ولا تزال هي الأفضل والأوسع استخداماً من بين تقنيات البايولوجي الجزيئي في تشخيص جرثومة السالمونيلا *S.typhi* في العينات المختلفة وهي تمثل مجموعتين رئيسيتين من التقنيات الأولى تكون معتمدة على وجود أنزيم البوليميريز والأخرى لا تعتمد على وجود هذا الإنزيم (Cohen وآخرون ، 1993 ؛ Andrews ، 1996 ؛ Koneman وآخرون ، 1997 ؛ Jayakumar وآخرون ، 2003).

إن الاختبارات المصلية باستخدام الأمصال المضادة (Antisera) يمكن إن تعطي نتائج ايجابية مع أنواع أخرى من البكتريا فمثلا المستضد الجسمي (O157) في ايشريشيا القولون (*E. coli*) غير الممرضة يشبه مستضد (O30₁) للسالمونيلا (Shimada وآخرون ,1992). و الصعوبة في تشخيص هذا المرض هو بسبب تشابه أعراضه مع أعراض كثير من الأمراض مثل

الملاريا وحمى البارانتافي والتدرن ولاسيما في المراحل المبكرة من المرض فقد أصبحت الحاجة ملحة للتشخيص والسيطرة المبكرة على حمى التيفوئيدية لتجنب التعقيدات وحالات الوفاة المتوقعة (Nelwan وآخرون, 2006)

ولذلك أصبحت تقنية (PCR) التقنية الأمثل والأفضل في التشخيص وبات من الضروري استخدامها إذ أنها أثبتت قدرتها على الكشف عن الكميات القليلة من (DNA) المسبب المرضي، عن طريق مضاعفة قطع DNA المعرفة (الهدف) وتمييزها من بين أحياء مجهرية مختلفة وإن كانت ذات علاقة قريبة جدا . وبوجود الطريقة الملائمة لتحضير العينات فإن هذه التقنية من الممكن أن تجرى من خلال عينات الدم، والبراز، والإدرار. (Hatta و Smits, 2007)

إن مستوى التحسس للكشف عن *S. typhi* في الدم يزداد باستعمال تقنية (PCR) وذلك بتضخيم القطع المتخصصة اعتمادا على الجين السوطي (H1-d) flagellar gene في هذه البكتريا وذلك على نحو كبير جدا; (Aziah وآخرون, 2007) (Hatta و Smits, 2007)

مما يؤكد إن تقنية (PCR) من الطرق المثلى للتشخيص السريع والدقيق فقد اثبت Kumar وجماعته في عام (2002) إن من (40) حالة مرضية أظهرت فيها تقنية (PCR) إن نسبة الإصابة هي (80%) في حين كانت نتيجة الزرع البكتيري لعينات الدم (50%)

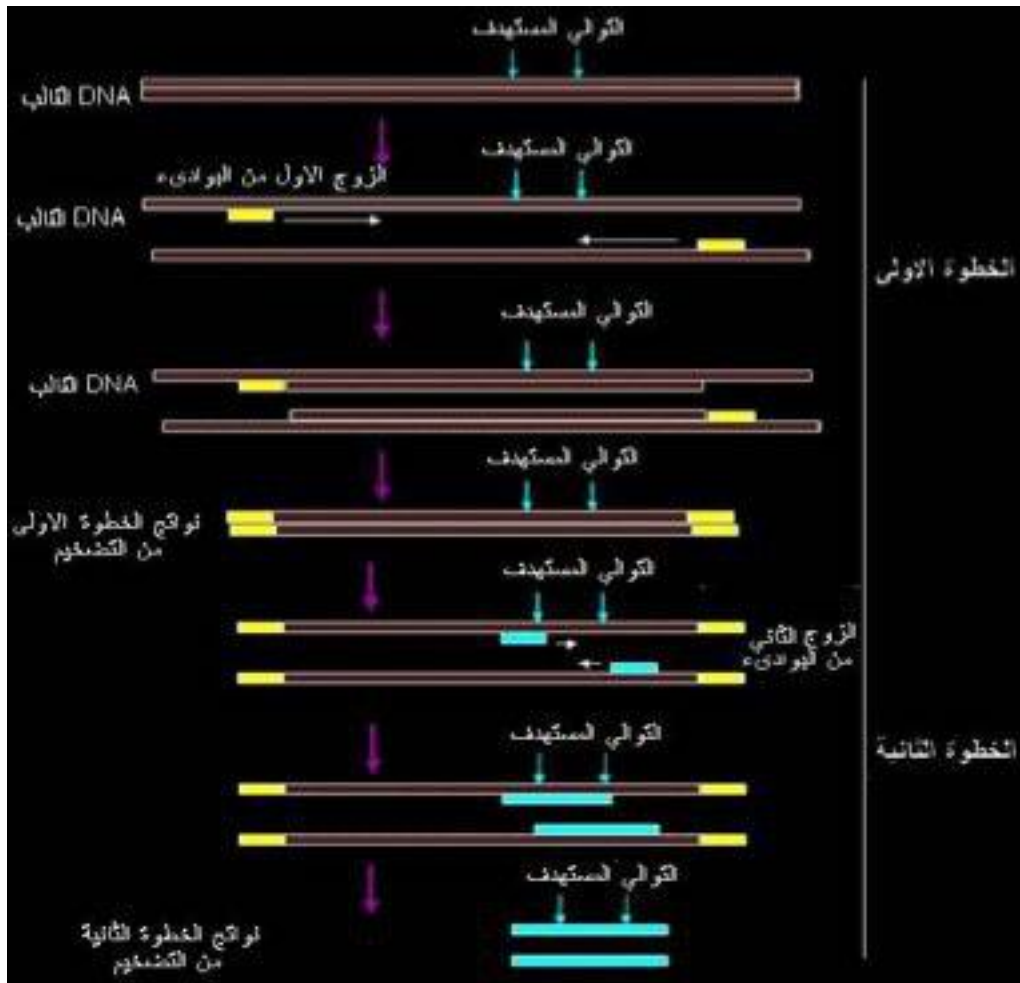
إما في عام (2003) فقد قام Massi بالكشف عن بكتريا *S.typhi* باستخدام ثلاث طرائق مختلفة هي تقنية (PCR و Widal test و Blood culture) وكانت نسبة الإصابة بالمرض وعلى التوالي (63.01%) و (35.6%) و (13.7%) مما يدل على كفاءة تقنية (PCR) مقارنة مع التقنيات الأخرى في الكشف عن المرض لقد تم تطوير تقنية (PCR) باستخدام أزواج متعددة من البادئات النوعية لتضخيم اثنين أو أكثر من تتابعات DNA الهدف

وفي تفاعل واحد مما يؤدي إلى زيادة في إمكانية التشخيص المتكامل للبكتريا وبكلفة اقل ووقت اقصر. وتدعى هذه التقنية بالتفاعل التسلسلي لأنزيم بلمرة DNA متعدد الضفائر (Multiplex PCR). ويكون ناتج التضخيم بإحجام مختلفة ومنفصلة على هلام الاكاروز ،لذا يجب إجراء معايرة لدرجة الحرارة والوقت اللازم لارتباط كل بادئ فضلا عن تركيز البادئات و dNTPs (Henegariu وآخرون ,1997). وتعد هذه التقنية من التقنيات الأكثر أتباعاً في جميع أنحاء العالم وقد اعتمدت عليها كثير من الدراسات مع اختلاف أنواع البادئات المستخدمة وإعدادها وإعدادها ، أما *flC gene* هو الجين الذي يشفر إلى البروتين الفلاجين السوطي في بكتريا (*Salmonella enteric serover Typhi*) وهو جين تشخيصي للإصابة بهذه البكتريا (شهاب وآخرون ،2014).

1.2 تضخيم العقدة Nested PCR

يعد هذا النوع من البادئات المتخصصة ،وهو مكون من أكثر من جزء يستطيع الارتباط مع أكثر من موقع على DNA الهدف. صمم هذا البادئ لمضاعفة قطعة من DNA ذات حجم كبير لا يمكن مضاعفتها بالبادئات العادية الأخرى وهو عملية تضخيم لجزيئه DNA تساعد في تقليل الخلفية الناتجة من التضخيم غير المتخصص لجزيئه DNA تشبه طريقة الكثرة الاعتيادية ولكن يستعمل فيها زوجين من البوادئ لتكبير قطعة ما ويكون على خطوتين:

- 1- تضخيم قطعة معينة من جزيئه DNA بطول يتعدى طول المستهدف في النهاية
- 2- تضخيم منطقة تقع ضمن المنطقة التي تم تضخيمها في الخطوة الأولى وبذلك تكون نواتج التضخيم أقصر مما في الخطوة الأولى وتحتوي التوالي المستهدف فقط . لذلك فان كانت النتائج في الخطوة الأولى قد تحمل أخطاءً. فمن المستبعد أن تكون الخطوة الثانية كذلك وبذلك يكون تضخيم العقدة عملية تضخيم متخصصة جدا. والعملية موضحة بالشكل التالي



الشكل (1-2) يوضح عملية النستد Nested PCR

يتضح من الشكل أن الطريقة تحتاج إلى عمليتين منفصلة ، في الأولى تربط البوادي (المجموعة الأولى) إلى جانبي قطعة DNA المستهدفة ،ومجموعة البوادي الثانية تربط إلى نواتج الخطوة الأولى ومجموعة البوادي الثانية تربط إلى نواتج الخطوة الأولى التي تضخم ب 20-30 دورة ثم يتم تضخيم القطعة الداخلية (من نواتج الخطوة الأولى ب 15-25 دورة)

لذلك لا يتوقع أن تكون هنالك مواقع لارتباط المواقع غير المتخصصة وبذا تضمن العملية الخلو من التلوث والنواتج غير المتخصصة ويفضل أن تكون مواقع ارتباط المجموعة الثانية تختلف بشكل كامل أو جزئي عن تلك المستعملة في التفاعل الأولي ويفضل إن تقع في الطرف الثالث 3'

ويتم اختيارها بحث لا تكون مزدوجات بوائى .وتتوفر برامج خاصة لتصميم البوائى لتضخيم العنقدة .

يكون تضخيم العنقدة ناجح جدا في تضخيم قطع DNA الطويلة التي تكون أكبر من قابلية الطرق العادية ولكن تحتاج إلى معرفة وتفاصيل أكثر عن التوالي والقطع .ويمكن أن تستعمل الطريقة في تضخيم القطع قليلة النسخ مثلا اقل من 100 نسخة . وكذلك عند إجراء الكثرة لتحديد الكميات فضلا عن أهداف أخرى (الخفاجي والمعالى , 2013).

يمكن أن تتم عملية تضخيم العنقدة في خليط التفاعل نفسه بدون تخفيف أو تفاعل مكونات التفاعل بين مرحلتي التضخيم على شرط زيادة الاهتمام بتصميم البوائى لتجنب الازدواج الذاتي للبائى أو الازدواج بين البوائى الداخلية أو الخارجية كما ذكر اعلاه.

وفي حالة التضخيم الشبه المعنقد PCR Seminested فيصمم بائى الخطوة الثانية لإحدى نهايات التوالي المستهدف (والذي يكون عادة cDNA) سواء لطرف 3' أو 5' يراد تحديد ألجين Gene walking كما في حالة (RACE) Rapid amplification of cDNA ends (RACE) (الخفاجي والمعالى , 2013).

12.2 حساسية البكتريا للمضادات الحيوية Bacterial Sensitivity to Antibiotics

تستخدم المضادات الحيوية في الحد من الإصابات البكتيرية ، و تحديد مصدر الإصابة ،وتقليل مدتها ، استخدام أقراص المضادات الحيوية لغرض اختيار العلاج المناسب .أكثر المرضى استفادة من المضادات الحيوية هم من المصابين ذوي الإصابات البكتيرية،وفي أحيان أخرى يؤدي استخدام المضادات الحيوية دونما تميز إلى سرعة استهلاك المخزون منها وسرعة تكوين المقاومة، يعرف المضاد الحيوي انه مادة عضوية تنتج من قبل كائن مجهري ولها القدرة على تثبيط نمو كائن مجهري آخر (Kariuki وآخرون , 2004) .

تستخدم المضادات الحيوية (Ampicillin, Trimethoprim- Ciprofloxacin) (Sulfamethaxazole, or عادة في حالة الإصابة بالحمى التيفوئيدية. ويتم تحديد المضاد الحيوي اعتمادا على نمط المقاومة للمضادات الحياتية في المنطقة التي يتم فيها تحديد الإصابة واكتساب صفة المقاومة (EL-Mahdy وآخرون ، 1993) ; (Khan ; وآخرون ، 1996)

استخدم مضاد الكلورامفينيكول لعلاج إصابات *Salmonella* ولا سيما *Salmonella entericTyphi* (Shanson وآخرون, 1982) (Volk و Wheeler, 1988) واستخدم المضاد (Trimethoprim-Sulfamethoxazole) في علاج حمى التايفوئيدية والباراتايفوئيد في شيلي، فيما استخدم المضاد نفسه بكفاءة في علاج الحاملين المزمنين لـ *S. typhi* و *S. Paratyphi*، B في استراليا (Pichler وآخرون ، 1973) لاحظ (Hitchings, 1973) إن لهذا الخليط طيفا واسع الفعالية ضد البكتريا وسرعة في القضاء عليها فضلا عن قلة تطور المقاومة له مقارنة مع العلاجات الأخرى .

وجد الباحث Calderon (1974) عند إعطاء مضاد (Amoxicillin) عن طريق الفم له فعالية تماثل إعطاء (Ampicillin) عن طريق الوريد لمعالجة المصابين بحمى التيفوئيدية المقاومة لـ (Chloramphenicol) وقد أوصي في السنوات الأخيرة باستخدام (Ciprofloxacin) و Cefotaxine) علاجا لإصابات *Salmonella* بعد ظهور سلالات مقاومة من *Salmonella* لمضادي الكلورامفينيكول والامبيسيلين (Bhutta وآخرون , 2006) كما أشار (Paerregaard و Thomsen, 1998) إلى كفاءة استعمال مضاد (Ciprofloxacin) لمعالجة المصابين بحمى التيفوئيدية ونظير التيفوئيدية. وعندما تكون المقاومة قليلة، تكون المعالجة المختارة تابعة لمجموعة (Fluorquinolones) مثل Ciprofloxacin (Thaver وآخرون, 2008); (Parry و 2009)

Beeching وإلا يكون الجيل الثالث من السيفالوسبورين مثل Ciprofloxacin

أو Cefotaxine هو الاختيار الأول (Dutta وآخرون , 2001). يعد هذا المضاد بديلا مناسباً عن طريق الفم .كذلك يقلل العلاج الفوري للمرض بالمضادات الحيوية من معدل خطورة الحالة بنسبة (1%) تقريبا

13.2 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Multiple resistance to antibiotics)

ازدادت المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتريا السالمونيلا ومعدل المقاومة أصبح بازدياد في السنوات الأخيرة ،والأسوأ من ذلك أن بعض سلالات السالمونيلا أخذت تطور المقاومة عنصرا مكتملا منذ عام (1948) أصبح الكلورامفينيكول هو العلاج الأمثل لمعالجة مرضى الإصابة بحمى التيفوئيدية ،إلا إن انتشار المرض في عام (1972) في كل من المكسيك والهند وفيتنام وتايلند وكوريا والبيرو اظهر المشكلة الكبرى في مقاومة بكتريا *Salmonella enteric Typhi* لهذا المضاد الحيوي ، وبالرغم من أن المقاومة كانت قد طرأت بعد سنتين من استخدامه كعلاجاً مثالي (Mirza وآخرون , 1996).

لقد ازدادت المقاومة في السنوات الأخيرة للخط الأول من المضادات الحيوية وبدرجة عالية وملحوظة في بعض دول العالم ولاسيما في دول جنوب شرق آسيا(Weill وآخرون , 2007) أظهرت البكتريا من النوع Typhi مقاومة لكل من Sulfonamides, Tetracycline و Streptomycin وبقية Amoxicillin و Trimethoprim هي افضل أنواع العلاج الفعالة حتى عام (1980) وفي عام(1990) طورت بكتريا *S. typhi* مقاومتها بشكل تدريجي لكل أنواع العلاج التي استخدمت خطأ أول مثل: Chloramphenicol, Trimethoprim- (Ampicillin و sulfamethoxazole) (Haque, 2005) ; (Mirza وآخرون , 1996) إن نتائج انتشار المرض حصل عن طريق انتشار المستعمرات الخلوية لسلالات مفردة تعود لبكتريا *Salmonella enteric Typhi* المقاومة، أو من خلال انتقال البلازميدات إلى سلالات

متعددة من جنس *Salmonella* النوع المصلي Typhi (Mirza وآخرون, 2000) (Thong وآخرون, 2000). وقد أشار (Schwalbe وآخرون, 1990) إن المقاومة نادرا ما تظهر خلال فترة العلاج. وما تزال *Salmonella typhi* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية منتشرة في كثير من مناطق آسيا، على الرغم من أن سلالات بعض المناطق السريعة التأثير بالخط الأول من المضادات الحيوية قد عادت للظهور مرة أخرى (Weill وآخرون, 2007); (Sood وآخرون, 1999). كما أظهرت بعض البحوث مستوى عال من المقاومة لـ Ceftriaxone وبمقدار 64mg لكل لتر في بكتريا *S. typhi* و *S. Paratyphi A* على الرغم من إن هذه السلالات نادرة جدا (Saha وآخرون, 1999) (Bhutta وآخرون, 1992).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3. المواد وطرائق العمل

1.1.3 الأجهزة والمواد المستعملة :

جدول 1.3: الأجهزة المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة و(المنشأ)	اسم الجهاز	ت
IMS (Mauritius)	Oven فرن كهربائي	1
Stuart Scentific (UK)	Vortex مازج	2
Hermle (Germany)	Centrifuge جهاز طرد مركزي	3
Radiometer (Danmark)	pHmeter مقياس الرقم الهيدروجيني	4
Gallenkamp (England)	Incubator حاضنة	5
	Autoclave موصدة	6
	Magnatic stirrer محرك مغناطيسي	7
	Water bath حمام مائي	8
	Hot plate مسخن حراري ممغنط	9
	Water Distillator جهاز تقطير	10
Mettler (Switzerland)	Analytical balance ميزان حساس	11
ThermoScientific (US)	Gel electrophoresis جهاز الترحيل الكهربائي	12
ThermoScientific (US)	Microcenterfuge جهاز طرد مركزي صغير	13
Benchmark (US)	Spin centerfuge جهاز طرد مركزي سريع	14
Bioneer (Korea)	Eppendrof tube أنابيب ابندروف	15

Brand (Germany)	Glass cylinders	اسطوانات مدرجة	16
AFMA (Jordan)	Wood sticks	أعواد خشبية	17
AFMA (Jordan)	Plstic cups	أكواب بلاستيكية بغطاء	18
Brand (Germany)	parafilm	شريط تغليف	19
Himedia (fndia)	Loop	ناقل بكتريا	20
Brand (Germany)	Filter	اوراق ترشيح	21
AFMA (Jordan)	Pipette	ماصات	22
Brand (Germany)	Glass flasks	دوارق بأحجام مختلفة	23
Brand (Germany)	Glass test tubes	أنابيب اختبار زجاجية	24
Qean (Egypt)	Refrigerator	ثلاجة	25
BioRad (USA)	Thermal cyclcer	جهاز البلمرة	26
Herolab (Germany)	UV-transillumination	الأشعة فوق البنفسجية	27
Heraeus (Germany)	Centerfuge	جهاز طرد مركزي كبير	28
Promega (USA)	Quantiflou flurometer	قياس تركيز الدنا	29
Eppendorf Germany	Micropipette	(Automatic)	30
Promega (USA)	Thermo hood		31

Biological and chemical material

2.1.3. المواد الكيميائية والبايولوجية

جدول 2.3: المواد الكيميائية والبايولوجية والكواشف المستخدمة في الدراسة

ت	المادة	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	كاشف الأوكسيداز Oxidase reagent N,N,N,N-Tetra-Methyl-P-Phenylene Diamine Dihydro Chloride	Hi – media (India)
2	كاشف كوفاكس Kovacs reagent Para dimethyl amino benzyldehyde	Hi – media (India)
3	Agarose ;ethidium bromide ; blue/orange loading dye 6x;TAE40x;DNA Ladder (100bp),DNA, Ladder(1kb)	Promega (US)
4	Lyticase enzyme (20mg/ml)	Sigma-Aldrich (US)
5	Oligonucleotides	Alpha DNA,Canada
6	Isopropanol;ethanol	BDH (UK)
7	زيت Mineral Oil	Biomérieux (France)
8	محلول ثابت العكرة القياسي 0.5Macfarlandsoluton	Biomérieux (France)
9	كلوريد الصوديوم NaCl	BDH (England)
10	كلسيرول Glycerol	BDH (England)
11	أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك EDTA	
12	كحول أثيلي Ethanol	
13	Whatman filter paper No.1	Whatman (USA)

Fluka (Switzerland)	H ₂ O ₂ بيروكسيد الهيدروجين	14
Sigma (USA)	Ethidium Bromide صبغة بروميد الإيثيديوم	15
Himedia (India)	Kovac's Indole Reagent كاشف الاندول	16
B.B.H(England)	Hydrogen peroxide محلول بيروكسيد الهيدروجين	17
Syrbio (S.A.R)	Gram stain Solution محاليل صبغة غرام	18
B.B.H(England)	BaCl ₂ كلوريد الباريوم	19
B.B.H(England)	KOH هيدروكسيد البوتاسيوم	20
B.B.H(England)	H ₂ SO ₄ حامض الكبريتك المركز	21

Culture media**3.1.3 الأوساط الزرعية****جدول 3.3: الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة**

Mast (UK)	Blood agar اكار الدم	1
Mast (UK)	Nutrient agar الاكار المغذي	2
Mast (UK)	Urea agar, XLD agar	3
Mast (UK)	Salmonella-Shigella agar	4
Oxoid (England)	Simmon citrate agar	5
Oxoid (England)	Kliglar's iron agar	6
Oxoid (England)	MacConkey's agar	7
Oxoid (England)	Muller Hinton agar	8
Oxoid (England)	Brain Heart Infusion bottle	9

Aantibiotics

4.1.3. أقراص ومساحيق مضادات الحياة المستخدمة

جدول (4.3): أقراص مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	تركيز المضاد مايكروغرام/قرص	الرمز	اسم المضاد	ت
Mast(UK)	5	CIP	Ciprofloxacin	1
Mast(UK)	25	AM	Ampicillin	2
Mast(UK)	15	AZ	Azithromycin	3
Mast(UK)	30	NA	Nalidixic acid	4
Mast(UK)	10	IMP	Imipenem	5
Mast(UK)	30	CF	Ceftriaxone	6
Mast(UK)	36	CAZ	Ceftazidime	8
Mast(UK)	30	TE	Tetracyclin	9
Mast(UK)	30	C	Chloramphenicol	10

5.1.3. العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة:

جدول 5.3: العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	عدة الفحص	ت
Biomérieux (France)	عُدة الفحص : API 20 - E الذي يضم شريط الفحص بالإضافة إلى ما يأتي : 1-API20E suspension media5ml 2- Indol reagent 3- VP1 +VP2 reagent كاشف اختزال NO ₂ إلى N ₂ 4 5- Tryptophan deaminase(TDA)	1

Promega (USA)	عُدة فحص Go taq Green master mix PCR لخليط التفاعل الأولي مايأتي 2x1.25ml 2x PCR master mix 2x1.25 ml Nuclease free water	3
Promega (USA)	1000_10000bp DNA Ladder تحتوي على المحلولين الآتيين :- 10000 bp DNA Ladder Blue /orange 6X loading dye	4
Omega diagnostic (UK) China	عدة الوبدال O Dantigen&Hd OB&HBantigen vacuum tub sterile(gel &clot activater)	5
India	Antigen salmonella Typhi smart عدة التشخيص السريع	6
Promega (USA)	DNA عدة استخلاص	7
Promega (USA)	Quantiflors عدة قياس تركيز الدنا صبغة مركزة DNA	8

2.3. طرائق العمل

1.2.3. تحضير المحاليل والكواشف: (Brown ، 2005) .

حضرت المحاليل والكواشف المستخدمة في الدراسة حسب تعليمات الشركة المصنعة إذ عقمت بجهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة (121) مئوية لمدة (15) دقيقة وبضغط (15) باوند/انج²، فيما استخدمت طريقة الترشيح بمرشحات دقيقة (Millipore filter) بقطر (0.22) مايكرون للمحاليل التي تتعرض للتلف في درجات الحرارة العالية مثل محاليل المضادات الحيوية.

1.1.2.3 المحلول الملحي الفسلجي Normal saline

حضر المحلول بإذابة (0.85) غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 90 مل من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى (100) مل ثم عقم بالمؤصدة وحفظ بالثلاجة بدرجة حرارة (4) م° لحين الاستعمال .

2.1.2.3 محلول ثابت العكرة القياسي (Macfarlandstandare)

حُضر المحلول وفق ما جاء في (Bauer وآخرون, 1996) كما يلي:-

حضر المحلول A : حامض الكبريتيك 2% بإضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) إلى 90 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم بالماء المقطر إلى (100) مل.

المحلول B : كلوريد الباريوم . حضر بإذابة (1.175) غم من كلوريد الباريوم $BaCl_2.H_2O$ في (100) مل ماء مقطر ، ومزج (0.5) مل من المحلول (A) مع (99.5) مل من المحلول (B) في أنبوبة جافة ذات غطاء محكم يمنع التبخر وتحفظ في الظلام ، يتم رج محتويات الأنبوبة جيداً قبل كل استعمال واستعمل المحلول للتعرف على عدد الخلايا البكتيرية.

2.2.3 الكواشف المستخدمة في تشخيص الجرثومة:

1.2.2.3 كاشف إنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

حُضر بخلط 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز (30%) مع 9 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3% بيروكسيد الهيدروجين، وحفظ في الثلاجة في عبوة داكنة ، أستعمل للكشف عن قابلية العزلات الجرثومية قيد الدراسة على إنتاج إنزيم الكاتاليز (Collee وآخرون, 1996).

2.2.2.3. ميثيل أحمر الكاشف Methyl red test

حُضر كاشف احمر الميثيل بإذابة 0.1 غرام من صبغة أحمر الميثيل في 300 مليلتر من كحول اثيلي تركيزه 95% وأكمل الحجم إلى 500 مليلتر باستخدام الماء المقطر، وأستعمل للكشف عن قدرة الجرثومة على التحلل الكلي لسكر الكلوكوز (Harly و Prescott, 2002).

3.2.2.3. ميثيل فوكس بروسكاور Vogesproskauer reagent ويتكون من :

1- محلول كاشف الفانفثول: حضر بإذابة 5غم من مادة الالفا نفثول في 90 مل كحول أثيلي بتركيز 99% وأكمل الحجم إلى 100 مل من الكحول.

2- محلول كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم: حضر بإذابة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 90 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل من الماء المقطر.

4.2.2.3. كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حُضر الكاشف أنيا عند الاستخدام و ذلك بإذابة 0.1 غرام من مادة N-N-N-N- Tetra methyl para phenylene diamine dihydro chloride في 10 مليلتر من الماء المقطر في قنينة غامقة ومعتمة ، أستعمل للكشف عن قابلية الجراثيم على إنتاج أنزيم الاوكسيديز (Brown ، 2005) .

5.2.2.3. كاشف كوفاكس: Kovacs reagent

حضر بإذابة 5 غم من (para di methyl amino benzylddehyde) في 75 مل من الكحول الازوميلي باستخدام حمام مائي ثم أكمل الحجم إلى 100 مل من حامض HCl المركز وأضيف الأخير ببطء حتى يصبح لون الكاشف احمر شاحباً حفظ الكاشف في قنينة معتمة واستعمل لاختبار إنتاج الاندول.

3.3. الأوساط الزرعية: Culture Media

حضرت الأوساط الزرعية المبينة في الجدول 3.3 وحسب تعليمات الشركة المصنعة لها المبينة على العبوات وضبط الاس الهيدروجيني لها بإضافة قطرات من حامض HCL بتركيز (1N) أو إضافة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) بتركيز (1N). عقت الأوساط بالموصدة في درجة حرارة (121) مئوية، مدة (15) دقيقة، وبضغط (15) باوند/انج² حضنت الأوساط الزراعية بعد صبها في الأطباق أو الأنابيب حسب متطلبات التجربة في درجة حرارة (37) مئوية لفترة (24) ساعة للتأكد من عدم تلوثها فيما حضرت الأوساط التالية.

1.3.3. وسط الدم الصلب الأساس: (Blood agar base media)

حضر أكار الدم الأساس حسب تعليمات الشركة المجهزة ،عقم بالموصدة .بعدها ترك ليبرد على درجة (45-50) مئوية ثم أضيف الدم بنسبة (7%) مزج جيدا وترك ليبرد ثم صب الوسط في إطباق معقمة ،وترك في الحاضنة إلى اليوم التالي للتأكد من خلوه من التلوث استخدم للكشف عن قدرة العزلات على إنتاج الإنزيم الحال Haemolysin للدم، بالإضافة لكونه وسطاً أغنياً للبكتريا المنماة.

2.3.3. وسط اليوريا: (Urea agar)

حضر بإذابة (2.5) غم من أكار قاعدة اليوريا في (95) مل من الماء المقطر ،عقم بالموصدة بعدها ترك ليبرد إلى درجة (45-50) مئوية ثم أضيف إليه (5) مل من (Urea Supplement 40%) مزج جيدا وزرع جيدا في أنابيب بمقدار (10) مل ، استخدم الوسط للتحري عن إنزيم اليوريز .

3.3.3. وسط نقيع القلب والدماغ المضاف له كليسيروول

حضر هذا الوسط وفقا لتعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة الخاصة بها فقد مزج (85%) من الوسط (Brain-heart Infusion) مع (15%) كليسيروول (Glycerol) ،حيث استخدم هذا الوسط لحفظ العزلات تحت التجميد (-20 م°).

4.3.3. وسط ماء البيبتون (peptone water)

حضر بإذابة (2) غرام من البيبتون و(0.5)غم من كلوريد الصوديوم في 100مل من الماء المقطر ثم عقم بالموصدة بعد تعديل الأس الهيدروجيني إلى (7) استخدم في تجربة التحري عن الاندول .

5.3.3. وسط اكار كليكلر الحديد: (Kliglar Iron agar)

يعد من الأوساط التي توضح قابلية البكتريا على إنتاج غاز (H_2S) وتخمير سكر الكلوكوز، واللاكتوز حضر حسب الشركة المصنعة.

6.3.3. وسط الماكونكي (MacConkey agar)

استخدم هذا الوسط في العزل الأولي للبكتريا لأنه يعد من الأوساط التفرقية .

7.3.3. وسط اكار المغذي (Nutrient agar)

استخدم هذا الوسط لتنشيط البكتريا وتكثيرها لإجراء الفحوصات الكيموحيوية والمصلية ولحفظ العزلات في الثلاجة لمدة أسبوع.

8.3.3. وسط الهيكتون (Hekton agar)

يعد من الأوساط التي تستخدم في تشخيص بكتريا السالمونيلا تايفي على وفق تعليمات منظمة الصحة الدولية WHO, 2003 .

9.3.3. وسط أكار السالمونيلا - الشكيلي Salmonella-Shigella agar :

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة يعد من الأوساط التي تستخدم في تشخيص السالمونيلا تايفي

10.3.3. وسط مولر - هينتون (Muller Hinton agar)

استخدم هذا الوسط لإجراء فحوصات الحساسية للمضادات الحيوية .

11.3.3. وسط سايمون السترات (Simon- Citrate test)

حضر الوسط على وفق الشركة المصنعة ، استخدم لتشخيص البكتريا من خلال قابلية البكتريا على استهلاك السترات الموجود بالوسط.

12.3.3 (XLD) Xylose Lysine Desoxycholate Medium.

يعد من الأوساط الانتخابية لبكتريا السالمونيلا على وفق ما ورد في WHO,2003 حضر بإذابة (53.5) غراما من الوسط في لتر من الماء المقطر حيث سخن بالحرارة إلى درجة الغليان لإذابة المواد ولكن بحذر، ولم تستخدم الموصدة (فقط تسخين) وإنما برد في حمام مائي عند درجة (50 مئوية) وصب في أطباق بتري بعدما تم تبريده. (Brooks وآخرون ، 2010)

4.3. جمع العينات: Collection of Samples

تم جمع (125) عينة دم من المرضى المشكوك بإصابتهم بالحمى التيفوئيدية . حيث جمعت عينات الدم من مستشفى/بغداد استشارة الباطنية/مدينة الطب ، مستشفى حماية الطفل /مدينة الطب ومستشفى الكرامة التعليمي. سجلت المعلومات المتعلقة بالمرضى المراجعين أو الراقدين في المستشفيات كالعمر والجنس ومصدر العينة وكما موضح في الاستمارة المبينة في الملحق 1. شملت العينات السريرية عينة من الدم زُرعت مباشرة بعد أخذها لغرض التشخيص.

أما الفئات العمرية فقد تراوحت ما بين (1-60) عاما وللفترة من/2016/11/1 إلى 2017/5/1

عوملت عينات الدم المسحوبة من المرضى المشكوك بإصابتهم بالحمى التيفوئيدية كالآتي:

5.3. عزل بكتريا Salmonella Isolation

1.5.3. عزل البكتريا من الدم

اتبعت طريقة (Lowis و Hawkey, 1986) لعزل بكتريا السالمونيلا من الدم وتمت بطريقتين

التقليدية والحديثة وكالآتي :

سحب مقدار (5ml) للبالغين و(2.5 ml) للأطفال من الدم ونقل إلى قنينة زرع الدم الحاوية على (10ml) من (Blood culture bottle) الحاوي على (Brain heart infusion broth)

وباستخدام الكحول والايودين للتعقيم فوهة القنينة ويد المريض وهذه تمثل الطريقة التقليدية

حضنت القناني في الحاضنة الاعتيادية بدرجة (37) مئوية لمدة (24) ساعة. ثم زرعت على الإطباق الاغنائية والتفريقية والانتقائية وبطريقتين:

A. فصل مصل الدم من عينة الدم المسحوب من المرضى حيث وضع في أنابيب خاصة خالية من أي مادة مانعة للتخثر وتركت بدرجة حرارة المختبر ولمدة (15-10) دقيقة ، ثم نبذت بواسطة جهاز النبذ المركزي Centrifuge بسرعة 3000 دورة/دقيقة لغرض فصل مصل الدم عن بقية مكوناته لإجراء:

- فحص الويدال بوصفه طريقة تقليدية للتشخيص

B. زرعت عينة الدم مباشرة في قناني زرع الدم وبطريقة التقليدية بزرع الدم في قناني Brain heart infusion broth

6.3. زرع العينات: Samples culture

زُرعت العينات (عينات الدم) مباشرة بعد الجمع على وسط الدم الصلب ووسط مأكونكي ووسط XLD ، وتم تنقية العزلات على وسط Salmonella-Shigella agar وحُضنت كافة الأطباق هوائياً بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة، أُجري بعدها عدد من الفحوصات التشخيصية المظهرية والكيموحيوية والجزئية للجراثيم المعنية بالدراسة.

7.3. حفظ العزلات الجرثومية وإدامتها:

وكالاتي حسب طريقة العالم : (Quinn وآخرون, 2004)

1.7.3. الحفظ لمدة قصيرة:

لغرض الاستعمال اليومي في التجارب حفظت البكتريا المعزولة في أطباق وسط أكار المغذي (Nutrient agar) حضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة (37) مئوية لمدة (24) ساعة. ثم وضعت في الثلاجة بدرجة حرارة (4) مئوية ويراعى تجديدها أسبوعيا.

2.7.3. الحفظ لمدة متوسطة:

حضرت أوساط زرعية صلبة مائلة (Nutrient slant agar) في قناني محكمة (Screw cup)، لحفظ البكتيريا لمدة شهر فقد زرع الوسط وحضن بدرجة حرارة (37) مئوية لمدة (24) ساعة ثم وضع في الثلاجة بدرجة حرارة (4) مئوية.

3.7.3. الحفظ لمدة طويلة:

تم حفظ هذه العزلات لمدة طويلة بوضعها في قناني صغيرة حاوية على وسط نقيع القلب والدماغ المضاف إليه الكليسروول وبنسبة (15%) بعد زرع العينات على وسط أكار الماكونكي أو وسط أكار الدم وجمع النمو البكتيري ووضعه في هذه القناني ، وتحفظ هذه القناني بدرجة حرارة (-20) مئوية لمدة سنة أو أكثر.

8.3. تشخيص العزلات الجرثومية

شخصت العزلات قيد الدراسة اعتمادا على الفحوصات التشخيصية الآتية:

- التشخيص المصلي

- الفحوصات المظهرية والكيمو حيوية.

- التشخيص بنظام Api-20E

- التشخيص الجزيئي

1.8.3. التشخيص أَلْمختبري المصلي Identification by Serological methoed

يعد اختبار الويدال (Widal test) من الفحوصات السيرولوجية المهمة المستخدمة في المختبرات استخدم في الاختبار عدة جاهزة (Widal test kit) ويتألف من أنابيب حاوية على مستضدات بكتريا *Salmonella enteric Typhi* هي :

1-*Salmonella typhi* H.

2-*Salmonella typhi* O.

يعتمد هذا الاختيار على التلازن Agglutination الحاصل بعد مزج قطرات من مادة الفحص مع سلسلة تخافيف من مصل (Serum) المريض ، وللحصول على المصل للمصاب بالحمى التيفوئيدية اتبعت طريقتين:

1-المصل الذي تم الحصول عليه بعد فصله عن الخلايا الدموية بواسطة استخدام جهاز النبذ المركزي وبسرعة (3000) دورة/دقيقة لمدة (10) دقائق.

2-تم فصل المصل بواسطة أنابيب Vacuum tub sterile(Gel &clot activater)، الذي لا يحتاج للطرد المركزي ولا يحتاج للطاقة الكهربائية وبمساعدة الجل السليكوني الذي يحتويه الأنبوب يتم فصل مصل المريض بعد بضع دقائق من سحب الدم.

3- نقل (20µl) من مادة الفحص إلى شريحة زجاجية أو(شريحة اللاتكس)

،ثم أضيفت لكل منها (20µl) من مصل المريض Serum . ومزجت بواسطة عود خشبي

(Stick) ثم حركت الشريحة مدة دقيقتين أوتوضع شريحة الاتكس على الهزاز Shaker ولوخط

التلازن إذ يظهر التلازن تحت ضوء مناسب ولا تؤخذ النتيجة بعد مرور أكثر من 3 دقائق لأن

بدء جفاف العينة قد يؤدي إلى ظهور نتيجة ايجابية كاذبة Positive False . إذ أن حصول

التلازن Agglutination (Ab-Ag Reaction) دليل على إن ايجابية الفحص (Positive+)

، وعدم حصول التلازن Non Agglutination (Ab-Ag Non Reaction)

يعني أن الاختبار سالب (-Negative)، عند ذلك أخذت سلسلة من تخافيف مصل المريض ذات الاختبار الموجب للتعرف على عياريه الأضداد (Antibodies Titer) المتكونة في دم المريض ضد بكتريا (*Salmonella*) النمط Typhi حيث أخذت التخافيف الآتية (1:160 1:80 ، 1:320، 1:640) و أضيفت قطرة من مادة كل أنبوبة في عدة الفحص إلى قطرة من المصل المخفف وحركت الشريحة مدة دقيقتين ،وجرى بعد ذلك التحري عن التلازن الحاصل وسجلت عيارية الأضداد عندما كان الفحص موجبا عند أعلى تخفيف. (Shimada وآخرون, 1992)، (حسوني وآخرون, 2017) واعتمدت النتائج الموجبة لفحص الويدال باعتباره فحص كشمي للعينات (Screening test).

2.8.3. الفحوصات المظهرية

زرعت العينات على الأوساط الزرعية الاغنائية والتفريقية والانتخابية وشملت:

1- وسط الماكونكي (وسط تفريقي وانتخابي)

2- وسط الاكار المغذي (وسط اغنائي)

3- وسط الدم (وسط اغنائي وتفريقي)

4- وسط XLD (وسط انتخابي)

5- وسط SS (وسط تفريقي)

زرعت القناني التي تحتوي على عكورة على الأوساط الزرعية المحضرة لمشاهدة شكل المستعمرات ولونها و حافاتها على كل وسط وملاحظة أشكالها المظهرية. شُخصت العزلات الجرثومية اعتمادا على ما ورد في (Baron وآخرون, 2007) ، إذ شُخصت المستعمرات مبدئياً اعتمادا على قدرتها على النمو على وسط، *Salmonella-Shigella agar* وكذلك زُرعت على وسط *MacConky* ووسط *Blood agar* لتشخيص صفاتها الزرعية التي تضمنت شكل المستعمرات، ولونها.

Gram stain.1.2.8.3

فحصت مجهرياً بصبغها بصبغة كرام و تمت ملاحظة صفاتها كونها سالبة لصبغة كرام او موجبة ،وكونها عصوية أو كروية .بالإضافة إلى شكل التجمعات البكتيرية تحت المجهر الضوئي (Koneman وآخرون, 1997). وتتكون صبغة كرام (Gram stain) من :

1-محلول البلور البنفسجي.

2-محلول اليود.

3-محلول الكحول (الاسيتون).

4-محلول السفرانين.

Biochemical tests: الكيموحيوية: 3.8.3.3

أجريت وفقاً لما جاء في (Stee و Cawon, 2004)

Catalase test: 1.3.8.3. اختبار إنزيم الكاتاليز:

نقل جزء من مستعمرة مفردة نامية على وسط الاكار المغذي بدرجة (37) مئوية وبعمر (24) ساعة إلى شريحة زجاجية نظيفة ثم أضيف اليها بضع قطرات من كاشف إنزيم الكاتاليز المتمثل بمحلول (3%) بيروكسيد الهيدروجين وباستخدام ماصة باستور لوحظ ظهور فقاعات غاز الاوكسجين دلالة على ايجابية الاختبار.

Oxidase test: 2.3.8.3. اختبار إنزيم الاوكسيديز:

أُجري فحص الأوكسيديز وذلك بنقل إحدى المستعمرات النامية على وسط الماكونكي الى ورقة ترشيح ثم وضع 2-3 قطرات من كاشف الاوكسيديز المحضر آنياً فوق المستعمرة ومزجها مع المستعمرة بواسطة عيدان خشبية معقمة ، إنَّ ظهور اللون البنفسجي خلال 20-30 ثانية يدل على إيجابية الاختبار (Tadesse وAlem, 2006).

3.3.8.3. Sugar fermentation and H₂S production اختبار تخمير السكريات وإنتاج

نقل جزء من المزروع البكتيري على وسط أكار المغذي وبعمر (24) ساعة ،بوساطة الناقل الميكروبي إلى وسط أكار كليكلر الحديد المائل (Kliglar iron agar) وزرع بطريقة التخطيط على السطح المائل و القعر . حضن بدرجة حرارة (37) مئوية ولمدة (24) ساعة، في هذا الفحص تم الكشف عن وجود (H₂S) وتخمير سكر الكلوكوز واللاكتوز وإنتاج الغاز إذ إن تحول لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر وظهور نمو اسود في قعر الأنبوبة ووجود فقاعات دلالة على ايجابية الفحص.

4.3.8.3. اختبار الاندول: Indol test

لقح وسط ماء البيبتون السائل بالنمو البكتري وحضن بدرجة (37) مئوية ولمدة (24) ساعة وفي اليوم التالي تم إضافة (0.5) مل من كاشف كوفاكس لكل أنبوب ورج حتى ظهور حلقة حمراء على سطح السائل دلالة على أن البكتريا موجبة لهذا الفحص.

5.2.8.3. اختبار استهلاك السترات: Citrate test

لحقت البكتريا النامية على مائل وسط سايمون سترات وحفظت بدرجة حرارة (37)مئوي لمدة (24) ساعة . عدت النتيجة موجبة بتحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق .

6.3.8.3. اختبار اليوريز: Urease test

أخذت مستعمرات منفردة و نقية من أكار الأخضر اللماع أو الأوساط الأخرى بواسطة ناقل (Loop) وزرعت على وسط اليوريا الصلب وساطة الطعن والتخطيط وحضنت بدرجة (37)مئوية لمدة (24) ساعة وإن تغير لون الوسط من الأصفر إلى الأحمر دلالة على ايجابية الفحص وأجريت وفقاً لما جاء في (Cawon و Steel, 2007).

7.3.8.3. فحص المثل الأحمر: Methyl – Red test

لُقحت الأنابيب الحاوية على وسط (MR-VP) بمستعمرات مفردة منمأة على وسط مانوكوي وحُضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، تضاف 5 قطرات من كاشف المثل الأحمر إلى كل أنبوبة ورجت بهدوء. يعد ظهور اللون الأحمر الغامق دلالة على النتيجة الموجبة.

8.3.8.3. اختبار فوكس بروسكاور: Voges-Proskauer test

لُقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP بمستعمرات مفردة منمأة على وسط مانوكوي و حُضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة ، وبعد إنتهاء مدة الحضانة أُضيف 6 قطرات من كاشف (A) الفانفثول وقطرتين من كاشف (B) هيدروكسيد البوتاسيوم ومزج الخليط جيداً دلّ ظهور اللون الوردي مباشرة أو بعد ترك الأنابيب لمدة 20 دقيقة على إيجابية الاختبار.

4.8.3. التشخيص بنظام: Api-20E

استخدم نظام API المجهز من شركة Bio Merieux الفرنسية كطريقة قياسية تتضمن (20) اختبارا كيموحيويا لتشخيص البكتريا التي تنتمي للعائلة المعوية المعزولة على أساس الجنس (Genus) والنوع (Species). يتألف هذا النظام من شريط حاوي على وحدات فحص مجففة (Dehydrated test substrates) في أنابيب دقيقة مفردة (Individual micro tubes) إذ يعاد تحميلها (Reconstitution) بعد إضافة كمية مناسبة من عالق البكتريا المراد تشخيصها . وبعد حضن الشريط بدرجة حرارة (37) مئوية لمدة (24) ساعة اضيف لها الكواشف الخاصة بالعدة وبعد ذلك قرأت النتائج وفسرت اعتمادا على رقم يتألف من (7) أرقام قرأت بواسطة الدليل المرفق Index الخاص بالشركة المصنعة.

وتم إجراء الاختبار بالطريقة الاتية:

- 1- زرعت البكتريا المراد تشخيصها على الأوساط الزرعية الصلبة مثل وسط - salmonella (shigella agar) وتم حضنها بدرجة حرارة (37) مئوية لمدة (24) ساعة.
- 2- تم التأكد من نقاوة البكتريا وعائديتها إلى العائلة المعوية (Enterobacteriace) عن طريق الفحوص الكيموحيوية الاولى .
- 3- عمل عالق متجانس من النمو البكتري: حيث لقح (5مل) من محلول الملح الفسلجي (85% Nacl) بالبكتريا للحصول على عالق تركيزه (0.5) Macfrland عن طريق قياسه بجهاز العكورة وأحياناً عن طريق الموازنة مع محلول ثابت العكرة القياسي (0.5Macfrland) الذي يعادل (1.5 $\times 10^8$) خلية بكتيرية لكل مل (C.f.u/ml) .
- 4- تم تهيئة الوعاء البلاستيكي الذي يوضع فيه الشريط الحاوي على الوحدات ممتلئة بحدود (5) مل من ماء المقطر لغرض تهيئة الرطوبة اللازمة للنمو.
- 5- لقحت الأنابيب الدقيقة الحاوية على الركائز المجففة بالعالق البكتيري بوساطة أنابيب باستور Pasteur pipette بحسب التعليمات المرفقة معه.
- 6- أضيف الزيت (Mineral oil) إلى الفحوصات الآتية (ADH, LDC, ODC, H₂S, URE) لتوفير ظروف لاهوائية فيها.
- 7- فحصت CIT, VP, GEL بعد غمر الأنبوب بالسائل.
- 8- حضن الشريط في درجة حرارة (37) مئوية لمدة (24) ساعة. وبعد انتهاء مدة الحضن : قرأت النتائج بعد إضافة الكواشف الآتية إلى الأنابيب الدقيقة في الفقرة السابقة لبعض الفحوص - كاشف الفوكس بروسكور (VP) : بعد إضافة قطرة واحدة من VP1 و VP2 يعد التفاعل موجبا عند ظهور لون (وردي-احمر) ، وسالبا عند عدم تغير اللون بعد مدة انتظار لا تقل عن عشر دقائق .

- كاشف إنتاج حلقة الاندول (James reagent) : يكون التفاعل موجبا عند ظهور اللون الأحمر وسالبا عند عدم ظهوره .

- كاشف إنتاج إنزيم TDA (Tryptophan deaminase): من الحامض الأميني (Tryptophan) يعد التفاعل موجبا في حالة ظهور لون بني داكن وسالبا عند ظهور لون اصفر.

- كاشف اختزال NO_2 إلى N_2 : تضاف قطرة واحدة من كل (NIT2, NIT1) إلى أنبوب سكر الكلوكوز (GLU) ، يعد التفاعل موجبا في حالة ظهور لون احمر بعد مرور (2-4) دقائق وقد قرأت بقية الاختبارات بالرجوع إلى الملحق (3) وموازنة نتائج التفاعلات للعزلة الجرثومية المشخصة مبدئيا على أساس الاختبارات الكيموحيوية التقليدية مع تلك الموجودة في الجدول المذكور

رتبت نتيجة التفاعلات المستحصل عليها على نحو أنموذج رقمي (Numerical profile) إذ توزعت الاختبارات على نحو مجاميع يحتوي كل منها على ثلاثة اختبارات يؤثر عليها بالأرقام (1,2,4) وبإعطاء رقم التفاعل الموجب لكل مجموعة فان ذلك يؤدي إلى الحصول على أنموذج رقمي مؤلف من سبعة أرقام (7-digitprofile) للاختبارات العشرين في شريط تشخيص (API 20 E) وبالرجوع إلى دليل الأنموذج التحليلي (API 20 E analytic profile index) يتسنى معرفة نوع العزلة البكتيرية بوساطة الرقم المذكور وصولا للجنس والنوع .

9.3. فحص الحساسية لمضادات الحياة: Antibiotic susceptibility test

أُجري اختبار حساسية الجراثيم لمضادات الحياة المذكورة في جدول (3-7) بالاعتماد على طريقة Kerby- Bauer method على وسط مولر-هنتون الصلب بحسب ما ورد في (CLSI,2015) وكالاتي : تم تحضير الأوساط الزرعية للبكتيريا بعمر (24) ساعة وعمل لها عالق بكتيري في

محلول (85%) NaCl وقورنت عكورته بجهاز العكورة بحيث تكون مقارنة

Macfrlaned 0.5

تم نشر العالق البكتيري بوساطة المسحة القطنية على طبق وسط أكار المولر هنتون وبعدها تركت الأطباق لمدة (10-15) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة للسماح للعالق البكتيري التغلغل داخل الوسط

ثم تم تثبيت أقراص المضادات بملقط معقم على الإطباق بواقع (6-7) أقراص وحضنت الأطباق بدرجة (37) مئوية ولمدة (24) ساعة. سجلت النتائج في اليوم التالي بعد مطابقتها بالجدول القياسية كونها حساسة أو مقاومة وحسب ما ورد في (CSLI, 2015)

واستخدمت السلالة القياسية للموازنة. والجدول (3-7) يوضح أقطار التثبيط لكل مضاد بكتيري تم استخدامه.

جدول (3-7): المضادات البكتيرية قيد الدراسة.

المضاد	S	I	R
Ampicillin	>17	14_16	<13
Ciprofloxacin	>31	21_30	<20
Co-trimoxazole	<13	14-17	>18
Tetracyclin	>19	15-18	>14
Azithromycin	>18	14-17	<13
Nalidixic acid	>19	14_18	<13
Imipenem	>23	20_22	<19
Ceftriaxone	>23	20_22	<19
Chloramphenicol	>18	13_17	<12

S: الحساسية للمضادات البكتيرية.

I: متوسط الحساسية للمضادات البكتيرية.

R: المقاومة للمضادات البكتيرية.

10.3. استخلاص الحامض النووي لبكتيريا الحمى التيفوئيدية: *Salmonella enteric*

Typhi DNA extraction

أستخلص DNA البكتيريا حسب الطريقة الموصوفة من الشركة المصنعة لعدة الاستخلاص و حسب تعليمات الشركة (Promega الامريكية) وتمت في ظروف معقمة وكالاتي:

1-نقل 1 مليلتر من مزروع العزلات البكتيرية المنماة بعمر 24 ساعة على وسط Brian heart infusion broth إلى أنابيب أبندروف (1.5 مل) ورسبت الخلايا الجرثومية بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة وبسرعة 13000-16000 دورة /دقيقة وسحب العالق بواسطة ماصة وترك. الراسب .

2-أضيف 300 مايكرو لتر الى الراسب بواسطة Pipet من Nuclei lysis solution ومزجت المحتويات جيداً بواسطة المازج (Vortex) لمدة 5 ثوان ثم حُضنت الأنابيب في حمام مائي هزاز water bath بدرجة حرارة 70 م لمدة 5 دقائق وتركت الانابيب لتبرد بدرجة حرارة الغرفة وضعت بجهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 13000-16000 دورة/دقيقة لترسيب المحتويات

3- أضيف 3ml Solution RNase ومزجت المحتويات جيداً بواسطة المازج (Vortex) ثم حضنت في 37 مئوية لمدة 60-15 دقيقة ثم بعد ذلك تركت لتبرد في درجة حرارة الغرفة.

4-أضيف لمحتويات الأنبوبة 250 مايكرو لتر من Protein Precipitaion Solution ومزجت المحتويات جيداً بواسطة المازج (Vortex) ثم حُضنت الأنابيب في التجميد لمدة 5 دقائق وبعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 13000-16000 دورة /دقيقة لترسيب البروتينات .

5-بعدها تم سحب السائل الموجود في الأنابيب ونقلته إلى أنابيب جديدة.

6- أضيف إلى DNA المخفف الموجود في أنابيب الجديدة 500 مايكرو لتر من Isopropanol ووضعت بعدها في التجميد لمدة 5 دقائق وذلك لزيادة ترسيب DNA ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 13000-16000 دورة /دقيقة.

7- سحب الايزوبروبانول من الانابيب

8- أضيف 500 مايكرو لتر من كحول Ethanol بتركيز 70% إلى الراسب ونضعها في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 13000-16000 دورة /دقيقة.

9- تترك الأنابيب التي تحتوي على راسب DNA لمدة تتراوح من 10-15 دقائق ليجمد.

10- تم إذابة DNA المترسب بإضافة 100ml من (Rehydration Solution) وحضن في حمام المائي لمدة 5 دقائق تحت درجة حرارة 60°C مئوية ثم حفظ بالتجميد .

11.3. تقدير تركيز DNA: Estimation DNA Concentration:

لقياس تركيز DNA استخدمت طريقة التقدير باستخدام تقنية fluorometer حيث اتبعت تعليمات الشركة المنتجة Promega وكما يأتي:

أضيف من DNA المستخلص (1) مايكرو لتر إلى (90) مايكرو لتر من (Nuclease free water) ومزجت جيدا بجهاز Vortex تتضمن العدة الخاصة :

(DsDNA Dye) وهي صبغة برتقالية تتأثر بالضوء تحفظ داخل ورق القصدير بتركيز

(200x) ، و (DNA Standard) ، وبفر (Nuclease free water) للتخفيف.

حضرت الصبغة البرتقالية لقياس تركيز DNA وذلك بإضافة (99) مايكرو لتر من بفر التخفيف إلى (1) مايكرو لتر من الصبغة وهذه الكمية مناسبة لقياس عينتين فقط.

ثم اخذ (100) مايكرو لتر من الصبغة المحضرة وأضيف إلى (1) مايكرو لتر من DNA

المخفف وترك لمدة خمسة دقائق تحت الظلام (كي لا تتأثر الصبغة) ثم مزج جيدا Vorte

بعدها تقاس نقاوة وتركيز DNA بجهاز (Quantifluor).

12.3. تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

تم إجراء التشخيص الجزيئي للعزلات الجرثومية الداخلة في الدراسة من خلال الكشف عن

الجين *fliC* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبإتباع الخطوات الآتية:

حضير مزيج سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة PCR Master mixture preparation حسب ما

جاء في تعليمات الشركة المصنعة Promga وبالخطوات الآتية :

المحلول الذائب من master max(2x)Green والمحضر مسبقاً والمجهز من قبل الشركة والذي يتكون من :

Taq DNA polymerase 2 U/ml

MgCl₂ 3Mm

Reaction buffer PH=8.5

dNTPs 400uM

المستخدم (pH=8.5) في درجة حرارة الغرفة ومُزج بالمازج لغرض مجانسته قبل الاستعمال .

أُذيبت محاليل البودائ المحضرة لجين في درجة حرارة الغرفة ومُزجت بالمازج لغرض مجانستها قبل الاستعمال ، وقد تمت إضافة المحاليل كما موضح في الجدول (8.3). مُزجت محتويات

الأنابيب جيداً باستعمال المازج بعدها وضعت في جهاز PCR

تم إجراء التفاعل التضاعفي حسب ما ذكر من قبل (Haque وآخرون, 2005)، نُقل بعد ذلك

(10) مايكروليتر من ناتج التضاعف للترحيل الكهربائي. ثم حُفظ المتبقي من ناتج التضاعف في

درجة (-20) مئوية.

1.12.3 عملية النستد Nasted PCR بالنسبة لجين *fliC*

فهي عملية تضخيم وتضاعف لجزيئية DNA تساعد في تقليل الخلفية الناتجة من التضخيم

غير المتخصص لجزيئات DNA وذلك بإتباع الخطوات التالية:

يتم إضافة المزيج المتكون من (master mix , primer F, primer R, H₂O)

بنفس التراكيز السابقة إلى 1 مايكروليتر من الناتج PCR (Khan وآخرون, 2012).

جدول 8.3: تتابعات البودئ النوعية لجين *fliC*.

F = Forward / R = Revers

ت	البادئ	تتابع البادئ 5`—3`	عدد القواعد	حجم الناتج bp	المصدر
1	fliC	F/5'-TATGCCGCTACATATGATGAG 3'	21	599	Khan وآخرون 2012,
		R/5'-TTAACGCAGTAAAGAGAG-3'	18		
2	Nasted fliC	F/5'-ACTGCTAAAACCACTACT -3'	18	360	
		R/5'-TGGAGACTTCGGTTGCGTAG-3'	20		

جدول 9.3: المكونات اللازمة للتفاعل التضاعفي لجين *fliC*

ت	المكونات	الحجم التفاعل الاولي	التركيز	الحجم التفاعل الثاني
1	PCR PreMix	10µl	2x	10µl
2	البودئ الأمامي	1µl	10µl	1µl
3	البودئ الخلفي	1µl	10µl	1µl
4	قالب DNA	2µl	50-100mg	1µl
5	ddH ₂ O	6µl		7µl
	الحجم النهائي	20µl		20µl

13.3. ظروف التفاعل الأول والثاني PCR The cycling reactions program

تمَّ إجراء خطوات التضاعف للكشف عن ألجين و بحسب ما جاء في (Khan وآخرون

(2012, تمَّت برمجة جهاز PCR كما موضح في الجدول (11.3 - 10.3).

جدول 10.3: ظروف التفاعل الأول PCR

Gene	Programing	Temperature	Time	No of cycle
<i>fliC</i>	Initial denaturation	95 ⁰ c	5min	1
	Denaturation	95 ⁰ c	30s	35
	Annealing	58 ⁰ c	30s	35
	Extension	72 ⁰ c	30s	35
	Final Extension	72 ⁰ c	7min	1
	Hold	4 ⁰ c	&	&

جدول 11.3: ظروف التفاعل الثاني PCR Nasted

Gene	Programing	Temperature	Time	No of cycle
<i>Nasted fliC</i>	Initial denaturation	95 ⁰ c	5min	1
	Denaturation	95 ⁰ c	30s	35
	Annealing	56 ⁰ c	30s	35
	Extension	72 ⁰ c	30s	35
	Final Extension	72 ⁰ c	7min	1
	Hold	4 ⁰ c	&	&

14.3. الترحيل الكهربائي DNA في هلام الاكاروز Agarose gel electrophorsis

تعد طريقة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز من الطرائق السريعة المستخدمة لفصل جزيئات DNA المستخدمة المختلفة بالحجم والشكل (Maniatis وآخرون, 1989) وكما الآتي:

تم تحضير الاكاروز (2%) بإضافة (1) غرام اكاروز إلى (50) مل بفر (1X TBE).

سخن الاكاروز إلى درجة الغليان وترك ليبرد الى درجة (45-50) درجة مئوية، ثم أضيف (6) مايكروليتر من بروميد الاثديوم بتركيز (0.5) مايكوغرام/مل .

ثم صب الاكاروز المبرد بهدوء لمنع تكون الفقاعات الهوائية في صفيحة الإسناد (Tray) بعد

تثبيت المشط Comb المعد لعمل الحفر (Wells) في الصفيحة المعدة لتحميل العينات.

ترك الاكاروز ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ولمدة (30) دقيقة ليرفع المشط بهدوء من الاكاروزو تثبيت الصفيحة في وحدة الترحيل الأفقية والمتمثلة بالحوض المستخدم للترحيل الكهربائي ، ملأ الحوض بعدها بدارئ (TBE) بحيث يغطي سطح الهلام نقل (7) مايكروليتر من العينة المراد فحصها ،

وأضيف إليها (3-5) مايكروليتر من دارئ التحميل (Loading buffer) ثم تم تحميلها في الحفر المخصصة لها.

اما بالنسبة لنواتج التضاعف (PCR) فقد تم ترحيلها مباشرة وذلك كون Mastermix يحتوي على صبغة الترحيل مرر تيار كهربائي بفرق جهد مقداره (100) فولت و (65) أمبير لكل سم لمدة (65) دقيقة،

بعد انتهاء الترحيل فحص الهلام باستخدام جهاز المطياف الضوئي بطول موجي (265) نانوميتر.

ثم تم تصور الهلام باستخدام كاميرا رقمية حاوية على مرشحات خاصة لأشعة U.R ومثبتة فوق مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator.

3-15 التحليل الإحصائي:

لإنجاز البحث الحالي تم استخدام البرنامج الإحصائي (SPSS) الإصدار 21 و برنامج (Microsoft Excel 2010) في الرسم البياني.

أن النظام الإحصائي المتبع يتضمن جزئين أساسيين هما كالتالي:

1- الإحصاء الوصفي:

A- إنشاء الجدول الإحصائي و المحتوي على التكرارات و النسبة المئوية والوسط الحسابي و

الانحراف المعياري و الخطأ القياسي و الحد الأدنى والأعلى (المدى).

B- الرسم البياني و يشمل الشكل العمودي و منحنى (ROC curve).

2- الإحصاء الاستدلالي:

A- اختبار مربع كاي (χ^2) Chi-Square test.

B- اختبار (Z- test) Binomial test.

C- اختبار (Z) Kolmogorov-Smirnov.

D- اختبار فحص التباين -multi (ANOVA) test & Analysis of variation

test (LSD) comparison less significant difference.

E- فحص الكفاءة : Validity test:

1- الحساسية (%) Sensitivity

2- الخصوصية (%) Specificity

3- القيمة التنبؤية الايجابية (PPV %) Positive predictive value

4- القيمة التنبؤية السلبية (NPV %) Negative predictive value

5- الدقة (%) Accuracy

6- المنطقة تحت المنحنى (AUC) Area under the curve

7- قيمة الحد الفاصل Cut off value

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4. النتائج والمناقشة

1.4. التشخيص المصلي Serological Identification

التشخيص الأولي تم بأجراء فحص الويدال Widal test واعتمدت طريقة التلازن على الشريحة الزجاجية Slide agglutination باستخدام مصول متعددة التكافؤ ضد المستضدات الجسمية والسوطية الخاصة ببكتريا الـ *Salmonella enteric serover Typhi* ، للكشف عن وجود الإصابة.

اجري الاختبار على 120 شخصا أظهرت النتائج بأن الفحوص الموجبة 75 من أصل 120 في جميع العينات الداخلة في الدراسة حيث كانت النسبة المئوية للعينات الموجبة Widal test 62.5% وكما موضح في الجدول (4.1) وكانت نسبة حدوث التلازن الموجب لعزلات السالمونيلا 17 (85%) مؤكدة على انها عائدة لجنس *Salmonella enteric Typhi* ، أما بالنسبة لبقية العزلات 40 other bacteria (85.1%) وأخيرا العزلات التي لم يظهر بها أي نمو بكتيري ولكن أعطيت نتيجة موجبة وكانت نسبتها 18 (34%) لوحظ إن هنالك فرقاً معنوياً أحصائياً كبير (P<0.01).

خالفت نتائج هذه الدراسة نتائج الدراسة التي حصلت عليها الباحثة (غلام، 2013)، إذ بلغت النسبة المئوية لعزلات لسالمونيلا 11.7%، إن اختبار Widal test حيث لم يكن بالمستوى الدقيق في تشخيص حالات الإصابة بالحمى التيفوئيدية. وقد أكدت العديد من الدراسات اختلاف حساسية وخصوصية اختبار Widal test من مختبر لآخر وهذا الاختلاف ينشأ نتيجة اختلاف في طريقة تنفيذ وتقنية هذا الاختبار وتفسير نتائجه من مختبر لآخر ومن بلدة لأخرى كذلك هذه النتيجة لا تتفق مع نتائج الباحثين (فائق، 2007) ; (Devrim وآخرون 2008) ; (السبعلاوي، 2005) من إن أكثر الاختبارات المصلية اعتمادا في المستشفيات والمختبرات هو اختبار

Widal test التقليدي لتحديد الإصابة بالحمى التيفوئيدية الذي يعتمد على التوازن الحاصل بين

مستضدات البكتريا والأضداد الموجودة في مصل المريض ،كما إن تحديد نوع الإصابة فيما اذا

كانت حادة (Acute) أو مزمنة (Chronic) هو أسبقية ظهور اضرار المستضدات وسرعتها.

ففي الإصابة الحادة تظهر اضرار المستضد (H) بسرعة و تظهر بعدها اضرار المستضد (O)

وتزداد نسبتها ثم تختفي بعد شهور بينما تبقى اضرار المستضد H لفترة طويلة.

كما أن وجود نسبة عالية من أضرار المستضد (O) يدل على الإصابة الحادة بينما وجود نسبة

عالية من أضرار المستضد (H) حيث بمرور الوقت تقل نسبة (IgM) وتبقى أضرار (IgG) هي

السائدة , فيدل على الإصابة المزمنة (Corales و Schmitt, 2004) وذلك لان فحص

الويدال و (IgG) يعطي نتائج موجبة حتى لو كانت بالجسم إصابة قديمة أو قد تعطي نتائج موجبة

لتداخلها مع إصابات أخرى (Cross reaction) ،كما يؤثر اللقاح على فحص الويدال فتظهر

نتيجة موجبة أيضا ولكنها غير دقيقة.

الجدول (4-1) مقارنة نتائج فحص Widal test بالاعتماد على العزلات البكتيرية

Widal test		Bacterial isolation			Pearson Chi-Square Test (P-value)
		<i>Salmonella typhi</i>	Others	NO growth	
Positive	N	17	40	18	P=0.00 Highly sign. (P<0.01)
	%	85 %	85.1 %	34 %	
Negative	N	3	7	35	
	%	15 %	14.9 %	66 %	
Total	N	20	47	53	
	%	100 %	100 %	100 %	

2.4. عزل وتشخيص الحمى التيفوئيدية Isolation and identification of

Salmonella enteric serover Typhi

1.2.4. التشخيص الزرعي Culture identification

تمَّ عزل وتشخيص 20 عزلة جرثومية *Salmonella enteric serover Typhi*

(16.66%) من مجموع 120 عينة دم من الأشخاص الذين يعانون من صداع وألم حاد بالبطن،

وحمى عالية ، المشكوك بإصابتهم بالحمى التيفوئيدية .

تم تشخيص هذه العزلات استناداً إلى التشخيص الزرعي Cultural identification بالاعتماد

على الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية النامية على وسط نقيع القلب والدماغ كوسط

اغنائي Brainheart infusion broth (غلام، 2013) والفحص المجهرى والاختبارات

الكيموحيوية. ثم تم تأكيد التشخيص بنظام API-20E ومن ثم أجريت الاختبارات الجزئية.

عزلت البكتريا المسببة للحمى التيفوئيدية Typhoid fever بطريقتين من الدم مباشرة، حيث

أظهرت الطريقة التقليدية باستخدام قناني Brain heart infusion bottl في الكشف عن بكتريا

السالمونيلا وكانت النتيجة 20 من أصل 120 عينة لغرض عزل البكتريا من الدم وأستخدام الوسط

الإغنائي Brain heart infusion broth لغرض دعم النمو الأولي للجرثومة وتنشيطه في حالة

وجودها وأن النمو الناتج على هذا الوسط زرع في المراحل التالية على الأوساط الزرعية الصلبة

(السباعوي، 2005) .

وبعد انتهاء فترة الحضان شخصت البكتريا زرعيا اعتمادا على الصفات المظهرية للمستعمرات من

شكل وحجم ولون وقوام المستعمرة ، إذ تميزت مستعمرات بكتريا *Salmonella enteric serover*

Typhi على وسط أكار الماكونكي كونها شاحبة عديمة اللون لعدم تخميرها سكر اللاكتوز الموجود

في الوسط .

فيما أظهرت على وسط الدم الذي يعتبر وسطاً اغنائياً انها غير محللة للدم وتكون مستعمرات كبيرة نوعاً ما بيضاء رمادية رطبة مخاطية . فيما كانت البكتيريا قيد الدراسة على وسط (XLD) ذات لون أحمر مع أو دون مركز اسود والذي يظهر نتيجة تفاعل البكتيريا مع سترات امونيوم الحديد الموجود في الوسط إذ تنتج البكتيريا غاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S) (غلام, 2013) إما على وسط الـ S.S Agar فقد أظهرت صفراء شاحبة لعدم تخميرها سكر اللاكتوز وذات مركز اسود لإنتاجها غاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S) ، اذ يعد وسط S.S Agar من الأوساط المهمة المستخدمة لعزل السالمونيلا لوجود أملاح الصفراء (Bile salt) المثبطة لنمو البكتيريا الموجبة لصبغة غرام والمشجعة لنمو السالمونيلا (رمضان, 2006) .

كما أن استخدام الوسط ألزري الانتخابي وسط أكار السالمونيلا والشيكل S.S. agar لاستبعاد الأنواع المختلفة من الجراثيم ولاسيما بكتيريا القولون Coliform وحصر النمو في أنواع محددة منها جرثومة السالمونيلا التي تنمو على هذا الوسط على نحو جيد للتأكد من الصفات الشكالية للجرثومة (Andrews ، 1996 ؛ Koneman وآخرون ، 1997) .

إما بالنسبة لطرق عزل البكتيريا فقد تم ملاحظة إن الطريقة التقليدية أو الكلاسيكية باستخدام (Brain heart infusion bottle) أظهرت هذه الطريقة دقة عالية مقارنة بالطرق الأخرى المستخدمة بالبحث حيث كان مؤشر الدقة لفحص الويدال الذي يتحري عن المستضد (25%) والطريقة التقليدية بزراعة الدم بقناني نقيع القلب والدماغ، ونسبة دقة (98.2%) كما كانت نسبة عزل البكتيريا قليلة نسبياً (20) حالة موجبة . وكانت النتائج المستحصلة بهذه الطريقة مطابقة لنتائج الباحثين (Karim وآخرون, 2008) و (الشمري ، 2008) . (وغلام, 2013) .

حيث يمكن أن يكون سبب قلة العزلات في هذه الحالة إلى انه من الصعب عزل هذه البكتيريا إلا بعد الأسبوع الأول أو قد يكون المصاب قد تناول المضادات الحيوية وفي هذه الحالة يعطي نتائج

سالبة وهذا سبب تفضيل الطريقة (Brain heart infusion bottle) تتميز هذه الطريقة بإمكانية عزل البكتيريا حتى في الأسبوع الثاني من الإصابة دون تأثير المضادات الحيوية المأخوذة من قبل المريض اعتمادا على الطريقة المعتمدة من قبل منظمة الصحة الدولية ومتفق مع نتائج الباحثين Raveendran وآخرون (2008) (Abama وآخرون, 2009). إن عملية العزل و التشخيص تمت بالاعتماد على الطريقة المتبعة للباحثين (Quine وآخرون, 2004) وتلك المثبتة في (Brenner وآخرون, 2005).

وباستخدام الأوساط الزرعية والانتقائية السائلة ثم الأوساط الزرعية الانتقائية الصلبة وباستخدام الفحص المجهرى والاختبارات الكيمو حيوية الأولية إضافة إلى استخدام نظام (API20E) اظهر التشخيص في هذه الدراسة تطابقا في صفات البكتيريا التي تم عزلها مع نتائج كل من الباحثين (AL-karawiy, 2006): (الزيوري, 2003) ; (الشمري, 2008); (Karim وآخرون, 2008) (Hong وآخرون, 2008). (Hjartardottir وآخرون, 2002).

بلغت النسبة الكلية لعزلات الحمى التيفوئيدية *Salmonella enteric serover Typhi* 16.66% من العينات المرضية ، إذ بلغت نسبة عزل جراثيم السالمونيلا من الذكور 70% ومن الإناث 30% وتعد نسبة العزلات في الدراسة الحالية مقارنة لما توصل إليه، إذ قام بعزل السالمونيلا من عينات الدم السريرية بنسبة 4.3% (الناشي وفنظل ، 2016)، وأقل من النسبة الناتجة من دراسة الباحثة التي أجريت في العراق ، إذ كانت نسبة عزلات السالمونيلا المعزولة من العينات المرضية 27.65% (رمضان، 2006). وقد يعود سبب هذا التفاوت في نسب العزل والتشخيص لعدة أسباب منها عدد أنواع العينات المرضية الداخلة في الدراسة واختلاف التقنيات المختبرية المستخدمة في العزل والتشخيص الجرثومي (غلام, 2013). (Hong وآخرون, 2008). (Hjartardottir وآخرون, 2002).

بلغت النسبة الكلية لعزلات الحمى التيفوئيدية *Salmonella enteric serover Typhi*

16.66% من العينات المرضية ، إذ بلغت نسبة عزل جراثيم السالمونيلا من الذكور 70% ومن الإناث 30% وتعد نسبة العزلات في الدراسة الحالية مقارنة لما توصل إليه، إذ قام بعزل السالمونيلا من عينات الدم السريرية بنسبة 4.3% (الناشي وفنطل ، 2016)، وأقل من النسبة الناتجة من دراسة الباحثة التي أجريت في العراق ، إذ كانت نسبة عزلات السالمونيلا المعزولة من العينات المرضية 27.65% (رمضان، 2006).

وقد يعود سبب هذا التفاوت في نسب العزل والتشخيص لعدة أسباب منها عدد أنواع العينات المرضية الداخلة في الدراسة واختلاف التقنيات المختبرية المستخدمة في العزل والتشخيص الجرثومي (غلام، 2013).

3.2.4. التشخيص المجهرى Microscopical identification

بين الفحص المجهرى للشرائح المحضرة من المستعمرات لهذه البكتريا المصبوغة بصبغة غرام

بأنها عصوية مكورة Coccibacilli ، سالبة لصبغة غرام (Koneman وآخرون، 1997).

كما أظهرت الدراسة بأن هنالك فرقاً معنوياً إحصائياً كبير عند مستوى دلالة ($P < 0.01$) وأن

الحمى التيفوئيدية *Salmonella enteric Typhi* (100%) 20 سالبة لصبغة كرام.

الجدول (2-4) فحص صبغة كرام تحت Microscope بالاعتماد على العزلات البكتيرية

Gram stain		Bacterial isolation		Pearson Chi-Square Test (P-value)
		<i>Salmonella typhi</i>	Others	
Positive	N	0	16	P=0.003 Highly sign. (P<0.01)
	%	0%	34%	
Negative	N	20	31	
	%	100%	66%	
Total	N	20	47	
	%	100%	100%	

4.2.4 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

تم إجراء الفحوصات الكيموحيوية للبكتريا المسببة للحمى التيفوئيدية قيد الدراسة بعد زرعها على الأوساط الزرعية المختلفة حيث أظهر الجدول (3-4) وجود فرق معنوي كبير ($P<0,01$) تجمع الفحوصات المدروسة إذ اجري فحص الاوكسيديز وكانت النتيجة للبكتريا سالبة لفحص الاوكسيديز وبنسبة 20 (100%) . في حين أظهرت فحصا موجبا لاختبار الكاتليز وبنسبة 100% (20) وأظهرت بقية الفحوصات الكيمو حيوية بالطرق التقليدية وباستخدام تخمر السكريات أظهرت النتائج على وسط (Kliglar Iron media) أن جرثومة *Salmonella enteric* serover Typhi مخمرة لسكر الكلوكوز وغيرمخمرة لسكر اللاكتوز مع انتاج (H_2S) (90%) 18 positive.

كانت النتيجة سلبية الفحص لم يظهر جميع العزلات قدرة على استهلاك السترات اذ يبقى لون الوسط (Simmon citrate) اخضر ونسبتها 20 negative (100%).

تم الكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم (urease) من خلال فحصها على وسط (urea agar) إذ أظهرت البكتريا بقاء لون الوسط اصفر وهذه دلالة على سلبية الفحص وبنسبة 20negative (100%) وأن التحري عن قابلية البكتريا في فحص الاندول على وسط (Pepton water) من خلال إضافة كاشف Kovax إذ لا تظهر حلقة وردية في أعلى الأنبوب مما يدل على سلبية البكتريا لهذا الفحص وكانت نسبتها 20 negative (100 %).

في حين أعطت نتائج اختبار للفوكس بروسكاور واحمر المثيل (MR) methyl red ايجابية ونسبة 20 positive (100%), 20 positive (100%) على التوالي. كما جاء في (Quinne وآخرون, 2004) كذلك النتائج المستحصلة من قبل (Brenner, 2005) .

جدول (3-4) اختبارات الكيموحيوية والموزعة بحسب نتائج النمو البكتيري *Salmonella enteric Typhi*

Biochemical tests		Positive	Negative	Binomial (Z) Test (P-value)
Oxidase test	N	0	20	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	0%	100%	
Catalase test	N	20	0	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	100%	0%	
Kliglar test	N	18	2	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	90%	10%	
Simmon Citratetest	N	0	20	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	0%	100%	
Manntol test	N	19	1	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	95%	5%	
Urea test	N	0	20	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	0%	100%	
Indol test	N	0	20	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	0%	100%	
MR test	N	20	0	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	100%	0%	
VP test	N	20	0	P=0.00 Highly Sign. (P<0.01)
	%	100%	0%	

3.4. تأثير الفئة العمرية على الإصابة

يبين الجدول (4-4) توزيع المجاميع العمرية وذلك بحسب نتائج الزرع البكتيري والعزلات البكتيرية التي أكدت إن الفئة العمرية (20-40) سنة كانت أعلى نسبة مئوية في العزل البكتيري ويليهما الفئة العمرية (<20) سنة وأخيراً أقل نسبة مئوية ضمن الفئة عمرية (41-60) سنة حيث كان المصابين بالحمى التيفوئيدية ضمن الفئة 20-40 (9) ونسبة 45% والفئة العمرية اقل من (20) سنة (8) مصابين ونسبة 40% وأن الفئة العمرية 41-60 حيث كانوا المصابين (3) ونسبة 15% ويلاحظ أن هنالك فرقاً معنوياً من الناحية الإحصائية ($P=0.338, P>0.05$) لنسب إصابة بكتريا *Salmonella enteric Typhi* مختلف الفئات العمرية ابتداءً من الأطفال بعمر (1.5) سنة وذلك بسبب انخفاض نسبة الأضداد المكتسبة من الأم فضلاً عن عدم نضج

المناعة المكتسبة حيث إن الجهاز المناعي لايزال في طور النمو ، وصولاً إلى فئات عمرية متقدمة تتجاوز (60) سنة (Corales و Schmitt، 2004).

وجاءت هذه النتائج مشابهة لنتائج الباحثين حيث أن الفئة العمرية 20-40 كانت بنسبة 70% إما المصابين بعمر أقل من 20 كانت النسبة 15% إما الفئة العمرية (40-60) سنة كانت بنسبة 15% (ناشي وفنطل، 2016).

كما تشابهت أيضاً مع دراسة (ياكوت، 2011) التي أظهرت فيها أن نسبة الإصابة للفئة العمرية (20) سنة فما دون كانت للذكور (23.88%) وللإناث (14.92%) وبالنسبة للفئة العمرية (20-40) سنة فقد كانت للذكور (14.92%) و للإناث (35.82%) أما بالنسبة للفئة العمرية (أكبر من 40 سنة) فكانت نسبة الإصابة بالنسبة للذكور (4.47%) وللإناث (5.97%).

وفيما يخص الفئات العمرية التي دون (20) سنة فيمكن أن يعزى سبب ارتفاع نسبة الإصابة لديهم إلى قلة الإدراك والوعي الصحي لديهم فضلاً عن عدم نضج المناعة المكتسبة في السنوات الأولى من العمر (Corales و Schmitt، 2004).

يظهر الجدول (4-4) توزيع المجاميع العمرية (سنة) بحسب الاعتماد على نتائج العزلات البكتيرية

Age groups / Year		Bacterial isolation			Pearson Chi-Square Test (P-value)
		<i>Salmonella typhi</i>	Others	NO growth	
< 20	N	8	16	12	P=0.338 Non sign. (P>0.05)
	%	40%	34.0%	22.6%	
20 - 40	N	9	19	31	
	%	45%	40.4%	58.5%	
41 - 60	N	3	12	10	
	%	15%	25.5%	18.9%	
Total	N	20	47	53	
	%	100%	100%	100%	

4-4 دراسة تأثير الجنس على الإصابة

أن الجدول (4-5) يوضح توزيع أجناس المرضى بحسب الاعتماد على نتائج فحص العزلات البكتيرية لقد تبين من الجدول عدم وجود فرق معنوي إحصائي عند مستوى احتمالية ($P=0.531, P>0.05$) مع ارتفاع نسبة مرضى الذكور على الإناث في كل مجاميع العزلات البكتيرية وخصوصا الحمى التيفوئيدية حيث أن الذكور (14) وبنسبة 70% أكثر من الإناث (6) وبنسبة 30%. توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة الباحثة (غلام, 2013) حيث وجدت (14) حالة موجبة في الذكور وبنسبة (61.9%)، والإناث (8) حالات موجبة وبنسبة (38.1%).

اتفقت هذه النتائج مع دراسات سابقة حيث اثبت كل من (فائق، 2007) و (رمضان 2007، ارتفاع نسبة إصابة الذكور على الإناث ، حيث أثبتت أن نسبة إصابة الذكور (76.7%) والإناث كانت (23.3%). كذلك اتفقت نتائج الدراسة الحالية فيما يخص النسبة العالية للإصابة في الذكور مقارنة مع الإناث مع الدراسة التي أجراها (Saleh, 2013) على المرضى المصابين بحمى التيفوئيدية وشملت دراسته 120 عينة كان عدد الذكور المصابين 77 وبنسبة 64.1% أما عدد الإناث المصابات فكان 43 وبنسبة 35.8%،

وقد اختلفت نتائج الدراسة الحالية هذه مع الدراسة التي قام بها (Anyebe وآخرون, 2008) إذ كانت نسبة الإصابة في الإناث أكثر مما في الذكور حيث بلغ عدد الإصابات في الإناث 104 وبنسبة 55.3% وفي الذكور 84 وبنسبة 44.7%.

يلاحظ أن كلا الجنسين يمكن أن يصاب بحمى التيفوئيدية ويبقى سبب الإصابة للذكور أعلى مما في الإناث غير معروف، وربما يعزى سبب ارتفاع نسبة الإصابة ببكتريا حمى التيفوئيدية بين مجموعة الذكور إلى الطبيعة الاجتماعية والمجتمع المحلي من الشعب العراقي الذي يترك مسؤولية العمل على الذكور وحرية الحركة بالنسبة لهم مقارنة مع الإناث وبقاتهم فترات طويلة خارج المنزل

ويؤدي هذا إلى اتصال الذكور مع مسببات الأمراض أكثر من اتصال الإناث فضلا عن الفروق الفسلجية والوراثية المرتبطة بالجنس التي قد تعطي فرصة أكبر للمسببات المرضية لإصابة الذكور أكثر من الإناث، أو قد يتعلق الأمر بالعوامل المناعية المتأثرة بالهرمونات والتي تكون مختلفة بين الجنسين (ناشي وفنظل، 2016) .

تتفق نتائج الدراسة الحالية من حيث ارتفاع نسبة إصابة الذكور مقارنة بالإناث وكذلك ارتفاع نسبة الإصابة بالمرض لدى الفئات العمرية (20) سنة مع إحصائيات منظمة الصحة العالمية (WHO,2010) .

وفي إحصائية أجريت في الولايات المتحدة الأمريكية بين عامي (1999-2006) أثبتت إن نسبة الإصابة بهذا المرض كانت أعلى لدى الذكور (54%) منها لدى الإناث وإن النسبة الأعلى للإصابة تحدث في الفئات العمرية التي دون سن (20) سنة (Brusch وآخرون,2010). إضافة إلى دراسات عديدة أثبتت إن إصابة الذكور أكثر من الإناث التي قد تصل أحيانا إلى الضعف (Kapil وآخرون, 1997); (الشاهين ، 1999) (العريض,2001) .

أن الجدول (4-5) أجناس المرضى بحسب الاعتماد على نتائج فحص العزلات البكتيرية.

Gender		Bacterial isolation			Pearson Chi-Square Test (P-value)
		<i>Salmonella typhi</i>	Others	NO growth	
Male	N	14	26	31	P=0.531 Non sign. (P>0.05)
	%	70%	55.3%	58.5%	
Female	N	6	21	22	
	%	30%	44.7%	41.5%	
Total	N	20	47	53	
	%	100%	100%	100%	

5.4 توزيع الجغرافي للمرضى المصابين حسب نتائج العزلات البكتيرية

عند توزيع الإصابة حسب المناطق المعزولة منها أظهرت النتائج المبينة في الجدول (4.6) بأن نتائج المقارنة المعنوية لتوزيع أعداد المصابين ما بين المناطق شكل فارقاً معنوياً إحصائياً عند مستوى دلالة ($P=0.034, P<0.05$) مع ارتفاع الإصابة عند المناطق الحضرية من الريفية في كل مجاميع العزلات البكتيرية و أما المناطق الريفية فكانت إعداد المصابين بالحمى التيفوئيدية *Salmonella enteric Typhi* 2 (10%).

أما المناطق الحضرية فكانت 18 (90%) يعزى سبب ارتفاع الإصابة بالمناطق الحضرية قد يكون المرضى يسكنون المناطق الريفية المحيطة ببغداد وبذلك اعتبارها إصابات وافدة للمدينة بسبب قلة الاهتمام بالوضع الصحي ، وقلة نظافة البيئة، وتدني المستوى المعاشي، وتردي الوضع الاجتماعي لتلك المناطق مع الأخذ بنظر الاعتبار مصدر مياه الشرب (غلام، 2013). توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة الباحثة (فائق، 2007) حيث كانت الإصابة (20) ونسبة 95.23% عزلة في بغداد وعزلة 1 من الريفية ونسبة 4.76% والشكل البياني (4-6) بين ذلك.

جدول (4-6) توزيع الجغرافي للمرضى المصابين حسب نتائج العزلات البكتيرية

Residency		Bacterial isolation			Pearson Chi-Square Test (P-value)
		<i>Salmonella typhi</i>	Others	NO growth	
Rural	N	2	12	4	P=0.034 Sign. (P<0.05)
	%	10%	25.5%	7.5%	
Urban	N	18	35	49	
	%	90%	74.5%	92.5%	
Total	N	20	47	53	
	%	100%	100%	100%	

6.4. نتائج حساسية بكتريا *Salmonella enteric Typhi* لمضادات الحياة

Antimicrobial susceptibility testing

درست حساسية بكتريا *Salmonella enteric Typhi* المعزولة لمجموعة من المضادات الحياتية التي يمكن استخدامها في علاج المرضى المصابين بالحمى التيفوئيدية لمعرفة نوع الاستجابة حسب طريقة Kirby-Bauer من خلال قياس قطر منطقة تثبيط النمو ومقارنة النتائج مع ما ورد في (CLSI,2015) .

بعد زرع جميع العينات على وسط اكارمولر - هنتون ووضع أقراص المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة ظهر إن عزلات *Salmonella enteric Typhi* مقاومة بنسبة عالية لبعض المضادات الحيوية المستخدمة ويبين الجدول (4-8) نتائج الاختبار للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة ، إذ بلغت نسبة حساسية عزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد Imiepnen 16 عزلة 80.0% والمتوسط 3 عزلات (15.0%) في حين عزلة واحدة فقط (5.0%) كانت مقاومة لهذا المضاد الحيوي ويوجد فرق معنوي إحصائيا كبير ($P=0.00, P<0.01$).

تتوافق هذه النتيجة مع نتيجة الباحثة غلام في دراسة أجريت في العراق (غلام ، 2013)، إذ بلغت نسبة عزلات الحمى التيفوئيدية الحساسة لمضاد Imiepnen 100% . كما تتفق مع دراسة الباحث Reshetneva في دراسة أجريت في روسيا، إذ بلغت نسبة عزلات الحمى التيفوئيدية الحساسة لمضاد Imiepnen في دراسته 88-99% (Reshetneva وآخرون . 2015) كما تطابقت مع دراسة الباحث (Med,2016) في الهند، إذ بلغت نسبة مقاومة عزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد Imiepnen (100%) وأظهرت عزلات الحمى التيفوئيدية الداخلة في الدراسة نسبة حساسية لمضاد Ceftriaxone 10 عزلات (55.6%) وإن نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 6(33.3%) ، .

في حين 2 عزلة فقط (11.1%) كانت مقاومة لهذا المضاد الحيوي وبفرق معنوي إحصائي ($P=0.069, P<0.05$) حيث تقاربت هذه النسبة مع دراسة، (غلام, 2013) إذ كانت نسبة حساسية عزلات لمضاد Ceftriaxone (90.47%) .

كما توافقت هذه النتائج مع نتائج الباحث (رمضان, 2006)، إذ كانت نسبة الحساسية للمضاد Ceftriaxone (94.3%) إذ أظهرت عزلتين من أصل (35) عزله مقاومتها لمضاد ال Ceftriaxone بنسبة 5.7%.

أظهرت نتائج اختبار مقاومة العزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد Ciprofloxacin في 11 عزلة بنسبة 57.9% ونسبة العزلات المتوسطة 7 عزلات وكانت النسبة 36.8% وإما الحساسية كانت عزلة واحدة 5.3% ويوجد فرق معنوي إحصائي ($P=0.018, P<0.05$).

توافقت هذه النتائج مع نتائج الباحث (Rai وآخرون 2015) ، إذ كانت نسبة حساسية للمضاد Ciprofloxacin بنسبة 50.4% ، كما خالفت هذه النتائج نتائج الباحث (ناشي وفنطل, 2016)، إذ كانت نسبة مقاومة الحمى التيفوئيدية للمضاد 100% . بلغت نسبة مقاومة عزلات الحمى التيفوئيدية الداخلة في الدراسة 12 عزلة لمضاد Nalidixic acid 66.7% ، وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 4 عزلة 22.2% ونسبة العزلات الحساسة للمضاد بلغت 2 عزلة 11.1% وبفارق إحصائي معنوي عالي جدا ($P=0.009, P<0.01$)،

توافقت هذه النسبة مع دراسة (ناشي وفنطل, 2016) ، إذ كانت نسبة مقاومة عزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد Nalidixic acid 65% ، كما توافقت أيضا مع نتائج الباحث (Abunna وآخرون, 2017) وكانت النسبة 58.1% .

وخالفت هذه النتائج نتائج الباحث (Muthu وآخرون, 2011)، إذ كانت نسبة مقاومة الحمى التيفوئيدية للمضاد عالية 95.5%

ويلاحظ في دراسة (Krishnan وآخرون, 2009) مرتفعة المقاومة إلى 95% بينما كانت نسبة المقاومة منخفضة كثيرا في دراسة (Nagshetty وآخرون, 2010) إذ بلغت النسبة 31.5% ومن المعروف إن معظم أفراد العائلة المعوية تبدي مقاومة لا بأس بها اتجاه مضادات الكوينولونات Ciprofloxacin , Nalidixic acid وتأتي هذه المقاومة من خلال عدة آليات وهي إما أن يحصل تبديل أو تغير أنزيمات هدف المقاومة DNA gyrase نتيجة طفرة في ألجين gyrase الذي يؤدي الى تغير في تكوين موقع ارتباط المضاد مما يؤثر على ارتباط الكوينولين مع الإنزيم DNA gyrase أو أن يعمل الغشاء الخارجي على أن يخفض من نفوذية الغشاء أو من خلال تطوير ميكانيكية أنظمة الدفع التي تعمل على قذف المضاد خارج الخلية (ناشي وهبة, 2016).

بلغت نسبة مقاومة عزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد Ampicillin 12 (63.2%) ، وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 5 (26.3%)، ونسبة العزلات الحساسة للمضاد بلغت 2 (10.5%) ولا يوجد فرق معنوي إحصائي (P=0.016,P>0.05).
توافقت هذه النسبة مع دراسة (طلال وآخرون, 2010)، إذ كانت نسبة مقاومة عزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد Ampicillin 50% ، كما خالفت هذه النتائج نتائج الباحث (ناشي وفنطل, 2016) ، إذ كانت نسبة مقاومة الحمى التيفوئيدية للمضاد 85% .

وفي دراسة (Acharya وآخرون, 2012) وجد هنالك حساسية عالية لهذه البكتريا اتجاه هذا المضاد بلغت 67,5% .

أوضحت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة مقاومة العزلات لمضاد Chloramphenicol 10 (52.6%)، وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 8 (42.1%) ونسبة العزلات

الحساسية للمضاد بلغت 1(5.3%) وبفارق إحصائي معنوي ($P=0.016, P<0.05$).

تقاربت هذه النسبة مع دراسة (Lee وآخرون, 2008) ، إذ كانت نسبة مقاومة العزلات لمضاد

Chloramphenicol 66.7% ، بينما خالفت هذه النتائج نتائج الباحث ناشي وفنظل

(2016). ، إذ كانت نسبة مقاومة عزلات الحمى التيفوئيدية للمضاد 70%.

كما خالفت أيضا نتائج (طلال وآخرون, 2010) حيث كانت نسبة المقاومة للمضاد

100% كما خالفت أيضا نتائج (Afroz وآخرون, 2013) حيث كانت نسبة المقاومة لهذا

المضاد 80% .

أدى الاستعمال الخاطئ والعشوائي لمضادي Ampicillin و Chloramphenicol ضد

الإصابات بحمى التيفوئيدية ونزلات البرد إلى ظهور المقاومة هذه المضادات الحيوية التي كانت

تستعمل في الماضي كمضادات الخط الأول ضد بكتريا *Salmonella enteric Typhi*

(Hammad وآخرون, 2011) حيث منذ بدء استخدام المضادات الحيوية كان الكلورامفينيكول هو

الخيار الأفضل لعلاج الحمى التيفوئيدية وقد أدى الاستعمال إلى خفض نسبة الوفيات من

20% إلى 1% (Mandal وآخرون, 2004).

بلغت نسبة العزلات المقاومة لمضاد C0-trimoxazole 10 عزلات ونسبة 55.6%، وإن نسبة

العزلات متوسطة الحساسية للمضاد بلغت 6 عزلات ونسبة 33.3%، إما العزلات الحساسة

للمضاد فقد بلغت عزلتان ونسبتها 11.1% ولا يوجد فرق معنوي إحصائي (

$P=0.069, P>0.05$) حيث خالفت هذه النتائج ما جاء في دراسة (غلام, 2013) ، إذ كانت

نسبة مقاومة عزلات الحمى التيفوئيدية 95% .

جدول (4-7) فحص حساسية المضادات الحيوية للبكتيريا *Salmonella enteric server* Typhi

Antibiotics sensitivity test		Sensitive	Intermediate	Resist	Kolmogorov-Smirnov Test (P-value)
Ampicillin	N	2	5	12	P=0.016
	%	10.5%	26.3%	63.2%	Sign. (P<0.05)
Chloramphenicol	N	1	8	10	P=0.029
	%	5.3%	42.1%	52.6%	Sign. (P<0.05)
Ciprofloxacin	N	1	7	11	P=0.018
	%	5.3%	36.8%	57.9%	Sign. (P<0.05)
Co-trimoxazole	N	2	6	10	P=0.069 Non
	%	11.1%	33.3%	55.6%	Sign. (P>0.05)
Nalidixic acid	N	2	4	12	P=0.009 Highly
	%	11.1%	22.2%	66.7%	Sign. (P<0.01)
Imipenem	N	16	3	1	P=0.00 Highly
	%	80.0%	15.0%	5.0%	Sign. (P<0.01)
Ceftriaxone	N	10	6	2	P=0.069 Non
	%	55.6%	33.3%	11.1%	Sign. (P>0.05)

7.4. المضادات الحيوية التي لا تظهر أية مقاومة للبكتيريا *Salmonella enteric Typhi*

يوضح الجدول (4-9) المضادات غير المقاومة لبكتيريا الحمى التيفوئيدية بينت نتائج اختبار الحساسية لمضاد Azithromycin عدم ظهور أي عزلة مقاومة للمضاد من العزلات الداخلة في الدراسة ، وبلغت نسبة حساسية عزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد Azithromycin 68.4%، والعزلات المتوسطة كانت نسبتها 31.6% ولا يوجد فرق معنوي إحصائي (P=0.167,P>0.05) .

توافقت هذه الدراسة مع دراسة (غلام، 2013) من حيث حساسيتها إلى المضاد ، إذ لم تظهر العزلات الداخلة في دراستها أي مقاومة جميعها حساسة لكنها اختلفت بالنسبة وكانت النسبة 100% بينما توافقت هذه الدراسة مع دراسة (Kalpana وآخرون، 2015) من حيث حساسيتها إلى المضاد 66.67%،

بينت نتائج اختبار الحساسية لمضاد Tetracycline 13 عزلة عن عدم ظهور مقاومة للمضاد من العزلات الداخلة في الدراسة ، وبلغت نسبة حساسية عزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد Tetracycline 68.4% ، أما المتوسط الحساسية فكانت 6 عزلات ونسبتها 31.6% ولا يوجد فرق معنوي إحصائي ($P=0.167, P<0.05$).

توافقت هذه الدراسة مع دراسة (غلام, 2013) ، إذ لم تظهر العزلات الداخلة في دراستها أي مقاومة لمضاد Tetracycline. ولكنها بنسبة أعلى 100%.

بينما اختلفت الدراسة الحالية مع دراسة (ناشي وفنطل, 2016) ، إذ كانت مقاومة لهذا المضاد بنسبة 70% >

بينت نتائج اختبار الحساسية لمضاد Ceftazidime 11 عزلة عن عدم ظهور مقاومة للمضاد من العزلات الداخلة في الدراسة ، وبلغت نسبة حساسية عزلات الحمى التيفوئيدية لمضاد 68.8% Ceftazidime ، أما المتوسط الحساسية فكانت 5 عزلات ونسبتها 31.2% ولا يوجد فرق معنوي إحصائي ($P=0.211, P<0.05$).

توافقت هذه الدراسة مع دراسة (غلام, 2013) من حيث الحساسية ، إذ لم تظهر العزلات الداخلة في دراستها أي مقاومة لمضاد Ceftazidime ولكنها بنسبة أعلى 100%.

الجدول (4-8) المضادات الغير مقاومة للبكتيريا *Salmonella enteric serover Typhi*

Antibiotics sensitivity test		Sensitive	Intermediate	Binomial (Z) Test (P-value)
Azithromycin	N	13	6	P=0.167 Non Sign. (P>0.05)
	%	68.4%	31.6%	
Tetracycline	N	13	6	P=0.167 Non Sign. (P>0.05)
	%	68.4%	31.6%	
Ceftazidime	N	11	5	P=0.211 Non Sign. (P>0.05)
	%	68.8%	31.2%	

8.4. التشخيص الجزيئي : Molecular Identification

اظهرت نتائج تقدير الحامض النووي DNA الجرثومي المستخلص للبكتيريا قيد الدراسة انها تراوحت ما بين (50-100) وهو من المتطلبات الأساسية لإجراء تفاعلات PCR لغرض تحقيق النتيجة (شهاب وآخرون, 2014).

تمّ الكشف عن الجين *fliC* الذي يشفر إلى الفلاجين البروتين ألسوطي في بكتيريا *Salmonella enteric Typhi* وهو جين تشخيصي للإصابة بهذه البكتيريا وصمم حسب ما ورد في طرائق العمل وكذلك البرنامج التفاعلي (Khan وآخرون, 2012) (شهاب وآخرون, 2014) في 18 عزلة (90%) من العزلات الداخلة في الدراسة، إذ كانت نتائج الكشف بالنسبة للتفاعل الأول إن 13 عزلات كانت حاملة للجين *fliC* بنسبة 72,22% في حين أن 5 عزلة سالبة لهذا الجين 5 (27.78%) ومع وجود فرق معنوي إحصائي كبير عند مستوى دلالة $P=0.96, P>0.05$.

إذ بيّنت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *fliC* إنه يمتلك حجم 599 زوج قاعدي عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder ذي الحزم المعروفة الأحجام الجزيئية والمجهز من قبل شركة promega حيث لوحظ إن أحجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع.

توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة الباحث (Hassuny وآخرون, 2015) إذ كانت نسبة بكتيريا السالمونيلا الحاوية على الجين 58.33%، وبحجم 587bp زوج قاعدي، فيما اختلفت الدراسة الحالية مع دراسة (شهاب وآخرون, 2014) في الكشف عن جين في الجراثيم السالبة الغرام، إذ كانت نسبة عزلات السالمونيلا الحاوية على الجين 5.26% وبحجم 363bp.

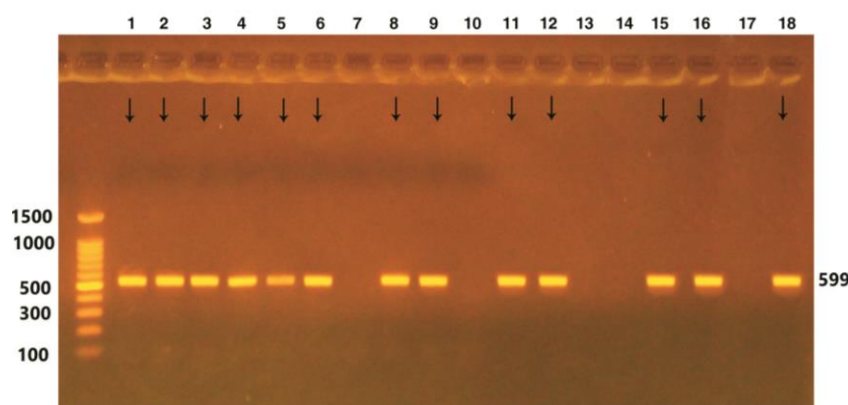
أن التفاعل الثاني Nasted PCR للعينات التي تملك جين *fliC* كذلك لوحظ بأن هنالك ثلاث عشر عينات تملك هذا الجين ولكن بحجم أقل 360bp زوج قاعدي عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder ذي الحزم المعروفة الأحجام الجزيئية والمجهز

من قبل شركة promega كما لوحظ إن أحجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع.

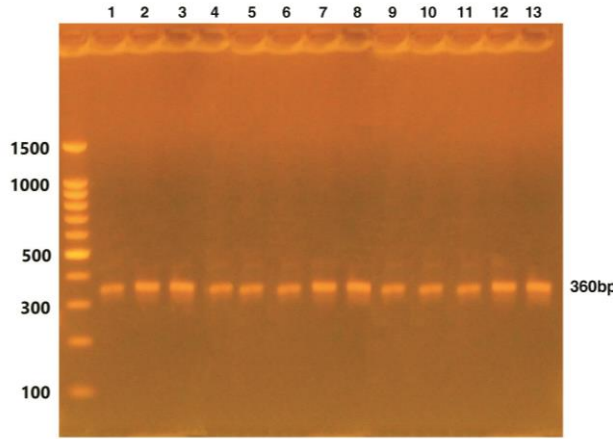
توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة الباحث وبحجم 343bp زوج قاعدي (Gopal Kumar وآخرون, 2012)، توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة الباحث وبحجم 364bp زوج قاعدي (Chandra Bhan Pratap وآخرون, 2014).
توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة الباحث وبحجم 366bp زوج قاعدي (Khan وآخرون, 2012).

الجدول (4-9) اختبار الفحوصات الوراثية *Genetics fliC (PCR) test* للعدلات البكتيرية

Genetics		Positive	Negative	Binomial (Z) Test (P-value)
<i>fliC</i> test (PCR)	N	13	5	P=0.096 Non sign. (P>0.05)
	%	72.22%	27.78%	



الشكل (4-1) الترحيل الكهربائي لتفاعل الأول لجين *fliC* لجراثيم *Salmonella enteric Typhi* بواسطة هلام الأكاروز بتركيز 2% الحاوي على 0.5 µg/ML من صبغة Ethidium bromide وباستعمال DNA ladder (100bp-1500bp) ، وبفرق جهد 100 فولت/سم 65 دقيقة ، إذ تُبين المسارات 1,2,3,4,5,6,8,9,11,12,15,16,18 احتوائها على الجين أما المسارات 7, 10, 13, 14, 17 عدم احتوائها على الجين .



الشكل (2-4) الترحيل الكهربائي لتفاعل الثاني لجين *fliC* لجراثيم *Salmonella enteric Typhi* بواسطة هلام الأكاروز بتركيز 2% الحاوي على 0.5 µg/ML من صبغة Ethidium bromide وباستعمال DNA ladder (100bp–1500bp) ، وبفرق جهد 100 فولت/سم 65 دقيقة ، إذ تُبين المسارات 1,2,3,4,5,6,8,9,11,12,13، وبفرق جهد 18,16,15,12,11,9,8,6,5,4,3,2,1 احتوائها على ألجين *fliC*.

وبالاعتماد على الصفات المظهرية والزربية والاختبارات الكيموحيوية و التشخيص الجزيئي باستخدام ألجين *fliC* ، ووفقاً لما ورد في (غلام ، 2013);(فائق، 2014) (شهاب وآخرون، 2014) (رمضان، 2006) أظهرت النتائج إن جميع العزلات المشخصة تابعة لنوع *Salmonella Typhi*.

9.4. مقارنة نتائج فحص Widal test مع نتائج فحص الدقيق PCR

أظهرت الدراسة بأنه لا يوجد فرق معنوي من الناحية الإحصائية ($P=0.352, P>0.05$) وذلك بحسب النتائج المبينة في الجدول (7-4) حيث أن فحص Widal test قد أعطي نتائج موجبة حقيقية 11 (84.6%) وذلك بدليل إن نفس المرضى كانت موجبة ضمن فحص PCR في حين أن 2 (15.4%) كانت نتيجة سالبة مزيفة لفحص Widal test وكذلك لكونهم قد أعطوا نتيجة موجبة ضمن اختبار PCR الدقيق ، بالإضافة إلى أن كل نتائج PCR السالبة 5 (100%) كانت ضمن فحص Widal test نتائج موجبة مزيفة false positive.

أن الاختبار PCR يمثل الاختبار الأكثر دقة في تشخيص البكتيريا المسببة للإصابات المرضية

ومنها الإصابة بالحمى التيفوئيدية وخلال جميع مراحله من الاختبارات السريرية المستخدمة في تشخيص الإصابة بالحمى التيفوئيدية مثل اختبار Widal test وأن تزايد حالات الإصابة بالحمى التيفوئيدية قاد إلى تركيز الجهود لإيجاد وسيلة لتشخيص هذه البكتيريا التي تتسم بالسرعة والدقة والحساسية العالية (Al-Galas وآخرون، 2002).

إذ إن الاعتماد على الطرق التقليدية كاختبار Widal test المعتمدة حالياً في المستشفيات والمختبرات الحكومية والأهلية يعتمد على التلازن بين المستضدات والاضداد الذي يعتمد على ظهور اضعاد المستضد (H) خلال (6-8) أيام وظهور اضعاد المستضد (O) خلال (10-12) يوم (Ismail, 2006) وهذا يؤدي إلى تأخير الكشف عن الإصابة لذلك فإن تقنية PCR تستغرق ساعات قليلة فقط، جاءت هذه النتائج مطابقة لما أثبتته (شهاب وآخرون، 2014) في دقة اختبار PCR مقارنة ب Widal test في تشخيص بكتيريا *Salmonlla enteric Typhi* جاءت هذه النتائج مطابقة (Khan وآخرون 2012).

الجدول (4-10) مقارنة نتائج فحص Widal test بحسب نتائج PCR

Widal test		fliC (PCR) test		Pearson Chi-Square Test (P-value)
		Positive	Negative	
Positive	N	11	5	P=0.352 Non sign. (P>0.05)
	%	84.6%	100%	
Negative	N	2	0	
	%	15.4%	0%	
Total	N	13	5	
	%	100%	100%	

10.4. تقييم مدى كفاءة اختبار Widal test بالاعتماد على نتائج الزرع البكتيري

وهو الفحص الأدق حيث تم إثبات إن الكفاءة كانت كما يأتي:

حساسية فحص الويدال كانت (85%)، بإضافة إلى إن القيمة التنبؤية السالبة (70%) كانت جيدة

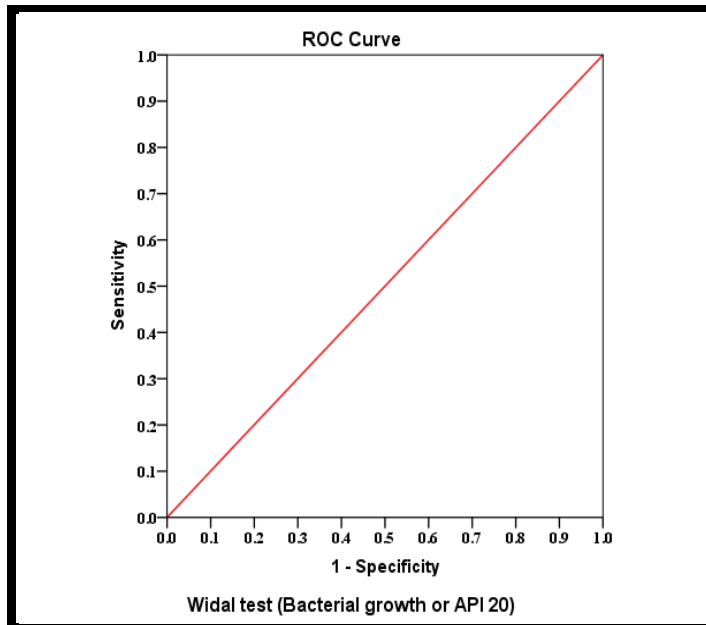
في حين إن الخصوصية كانت سيئة (14,9%) كذلك دقة (35,3%) و القيمة التنبؤية الموجبة (29.8%) سيئة أيضا وضمن نفس الموضوع ، المساحة تحت المنحنى كانت (0.501) قليلة و لا يوجد فرق معنوي إحصائي عند مستوى دلالة ($P=0.995$, $P<0.00$).
القرار النهائي هو ان كفاءة فحص الويدال كانت سيئة جدا خصوصا في الحالات السالبة حيث إن معظمها كانت نتائج موجبة كاذبة (fals positive) برغم كونه سالبة ضمن نتائج اختبار الزرع البكتيري (السباعوي, 2005).

الجدول (4.11) منحنى ROC المختص بتقييم مدى كفاءة اختبار الويدال اعتمادا على

نتائج اختبار الزرع البكتيري أو نتيجة API 20

Widal test (Bacterial growth or API 20)	
Sensitivity	85%
Specificity	14.9%
Positive predictive value (PPV)	29.8%
Negative predictive value (NPV)	70%
Accuracy	35.3%
Area Under the curve (AUC)	0.501
P-value	0.995 NS

NS=Non significant difference ($P>0.05$).



الشكل (3-4) منحنى ROC المختص بتقييم مدى كفاءة اختبار الويدال اعتمادا على نتائج اختبار الزرع البكتيري أو نتيجة API 20

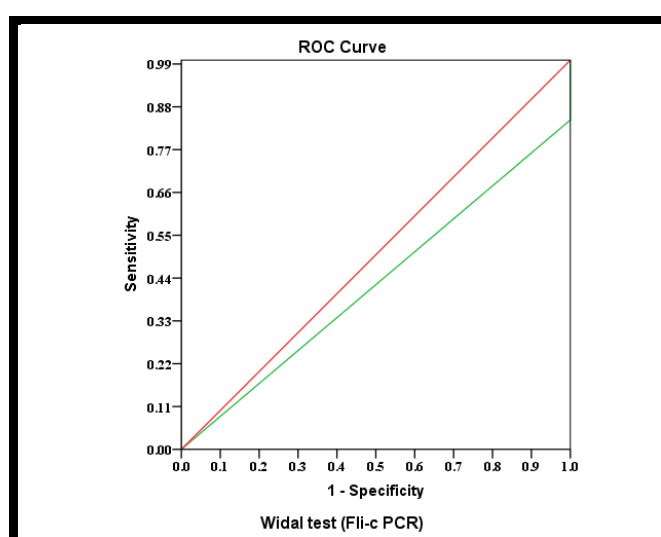
11.4. تقييم مدى كفاءة اختبار الويدال اعتمادا على نتائج اختبار الجيني للبكتيريا

وهو الفحص الادق حيث تم اثبات ان الكفاءة كانت كما يلي: حساسية فحص الويدال كانت (84.6%) جيدة جداً، بالإضافة الى ان القيمة التنبؤية الموجبة (68.8%) كذلك دقة (61.11%) كانت جيدة في حين ان الخصوصية و القيمة التنبؤية السالبة كانت سيئة (0%). وضمن نفس الموضوع ، المساحة تحت المنحنى كانت (0.423) قليلة و لا يوجد فرق معنوي احصائي عند مستوى دلالة (P=0.622, P>0.05). القرار النهائي هو ان كفاءة فحص الويدال كانت سيئة جدا خصوصا في الحالات السالبة (شهاب وآخرون، 2014).

الجدول (4.12) منحنى ROC المختص بتقييم مدى كفاءة اختبار الويدال اعتمادا على نتائج اختبار الجيني للبكتيريا (PCR)

Widal test (<i>fliC</i> PCR)	
Sensitivity	84.6%
Specificity	0%
Positive predictive value (PPV)	68.8%
Negative predictive value (NPV)	0%
Accuracy	61.11%
Area Under the curve (AUC)	0.423
P-value	0.622 NS

NS=Non significant difference (P>0.05).



الشكل (4-4) منحنى ROC المختص بتقييم مدى كفاءة اختبار الويدال اعتمادا على نتائج اختبار الجيني للبكتيريا (PCR)

الاستنتاجات: Conclusions

- ❖ أظهرت الطرق السيرولوجية كفحص ويدال (Widal test) أقل كفاءة في التشخيص المختبري للبكتيريا المسببة بالحمى التيفوئيدية.
- ❖ يمكن الاعتماد على الزرع البكتيري للدم Blood culture في تشخيص الإصابة بالمرض والعزل من الدم بوساطة جهاز Bact /alert 3D وتأكيده العزل البكتيري بفحص API20E بشكل أكفأ من اختبار ألويال Widal test .
- ❖ يمكن الاعتماد على التشخيص الجزيئي PCR باعتباره التشخيص الأدق في تحديد الإصابة بالحمى التيفوئيدية من العزلات البكتيرية التي تملك جين fliC
- ❖ كانت أفضل المضادات الحيوية في علاج مرض الحمى التيفوئيدية , (Imipenem) (Azthromycin) بنسبة حساسية عالية 68.4%,80% أظهرت البكتيريا المسببة للحمى التيفوئيدية مقاومة شديدة للمضادات شائعة الاستخدام مثل (Ampicillin, Chloromphenicol, Nalidixicacid, Ciprofloxacin, Cotrimoxazole)
- ❖ إن الأعمار المتوسطة من الأشخاص (20-40 سنة) هم أكثر الفئات العمرية عرضة للإصابة
- ❖ لوحظ أن نسبة الإصابة الذكور أعلى من الإناث

التوصيات: Recommendations

- ❖ اعتماد الطرائق الحديثة والسريعة في التشخيص للبكتيريا المسببة للحمى التيفوئيدية في إجراء فحوصات دورية باستخدام تقنيات أكفاً من الويدال Widal test كتقنية زرع الدم Blood culture وتقنية PCR لكافة العاملين في إعداد الطعام في المطاعم للتأكد من خلوهم من البكتيريا المسببة للمرض.
- ❖ التوجه لاستخدام الطرق الجزيئية PCR في تشخيص الأنماط المصلية لعزلات بكتيريا *Salmonella enteric serover Typhi* الموجودة في العراق.
- ❖ إجراء دراسات مستقبلية حول جينات أخرى تشخيصية لبكتيريا السالمونيلا.
- ❖ دراسة التتابع الجيني لبكتيريا السالمونيلا Genotyping and sequencing للتعرف بدقة عن وبائية البكتيريا ومصادرها المختلفة.

المصادر العربية

- الخفاجي ،زهرة محمود ، ابو المعالي ،حسن محمود .(2012). تفاعلات الكوثرية وتصميم البوادي . الصفحة (12) ،كتاب.
- رمضان،اروى تحرير .(2006).دراسة وبائية ووراثية لمسببات الحمى التيفوئيدية. أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.
- الزوي، رغد محمد نجيب ابراهيم . (2003). دراسة مناعية ومرضية لتأثير مستضد الرؤيسات الاولى على الإصابة بجراثيم *Salmonella Typhimurium* في خنازير غينيا. رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد.
- السباعوي، بشرى دلي حمد. (2005).تقييم وتحسين التشخيص المختبري لجرثومة *S. typhi* و حساسيتها تجاه المضادات الحيوية في محافظة نينوى. رسالة ماجستير، كلية العلوم ،جامعة الموصل.
- الشاهين، زهير غالب عبيد. (1999). دراسة بكتريولوجية ومناعية وكيمياء حياتية لمرض الحمى التيفية ومحاولة تحضير لقاح تجريبي لها عن طريق الفم .اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية .
- الشمري، ايهاب غازي مهدي. (2008). دراسة وبائية لجراثيم السالمونيلا المعزولة في بعض محافظات وسط العراق رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
- حسوني ،عادل عبيد، سيلان حسين صكر، هديل عباس حسن.(2017). مقارنة بين اختبار الويدال وتقنية الزرع المختبري في تشخيص الحمى المعوية في محافظة بابل. مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية ،25 (4).

- شهاب ، بتول علي، ساهرة ياكوت رويح، أشنا جمال فائق. (2014). استخدام الطرق الجزيئية في الكشف عن جينات المقاومة للمضادات في بكتيريا التايفوئيد (*Salmonella typhi*) . مجلة بغداد للعلوم، 11(2).
- طلال ، اسعد خلف ويوسف ، عفاف عبدالرحمن . (2010) . تأثير بعض المضادات الحياتية في بعض انواع السالمونيلا *Salmonella* والشيكلا *Shigella* المعزولة من حالات الإسهال،مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة، 4 (1) .
- العريض ، ميرفت علي كناوي . (2001) . التحري عن عزلات السالمونيلا المقاومة للكلورامفينيكول ودراسة العوامل الوراثية المسيطرة عليها. رسالة ماجستير ،كلية العلوم،الجامعة المستنصرية .
- غلام ،دنيا جواد رضا .(2013) . دراسة كفاءة الاختبارات التشخيصية لبكتيريا *Salmonella typhi* ومقاومتها للمضادات الحيوية بالطرق الجزيئية . رسالة ماجستير، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية
- فائق،أشنا جمال .(2007) . التحليل الوبائي الجزيئي لبكتيريا *Salmonella enteric serovar Typhi*. اطروحة دكتوراه ،كلية العلوم، الجامعة المستنصرية .
- الناشي ، علي عبد الرحيم ، هبة اركان فنطل .(2016) .دراسة بكتريولوجية لجراثيم السالمونيلا المعزولة من حالات سريرييه في الديوانية وتأثيرها على صور الدم وبيان مقاومتها للمضادات الحيوية. كلية التربية، جامعة القادسية، مجلة القادسية للعلوم الصرفة، 21 (1).
- ياكوت ،ساهرة رويح .(2011) . استخدام الطرق الجزيئية في الكشف عن جينات المقاومة بكتيريا سالمونيلا تايفي. رسالة ماجستير ،كلية العلوم ،جامعه بغداد.

المصادر الأجنبية

A

- **ABMA**, W.; Khalil,M.; AKM ,S.; Islam ;M.; Mondal,B. ; Banda,K.and Shahid,M. (2009) Bacteriological profiles of Blood culture isolates by BacT /ALERT 3D automated system Original Article J. of Shaheed Suhrawardy Medical College.1(2).
- **Abunna**,F. M. Bedasa, T. Beyene, D. Ayana, B. Mamo, and R. Duguma.(2017).Salmonella: Isolation and antimicrobial susceptibility tests on isolates collected from poultryfarms in and around Modjo, Central Oromia, and Ethiopia,Journal of Animal and Poultry Sciences (JAPSC), 5(2): 21-35
- **Acharya**, D.; Trakulsomboon,S.; Madhup,S.K.; and Korbsrisate , S.(2012) . Antibiotic Susceptibility Pattern and the Indicator of Decreased Ciprofloxacin Susceptibility of *Salmonella enteric* Serovar Typhi Isolated from Dhulikhel Hospital, Nepal.Jpn. J. Infect. Dis., 65: 264-267.
- **Adachi**,T.; Sagara, H.;Hirose ,K. and Watanable, H.(2005).Fluoroquinolon resistant *Salmonella* ParatyphiA .E Infect Dis.11:172-174.
- **Afroz**, H.; Hossain, M.; Fakruddin; Hossain,A and Khan,Z.U.(2013). Prevalence and Antibiotic Susceptibility Patterns of Blood stream *Salmonella* infection in a Tertiary Care Hospital Dhaka.J.Med.Sci.,13(5):360-366.
- **AL- Araji**,E. M. H.; Al-Ameri, A, M,J.(2012). Typhoid fever in Karbala Governorate, an epidemiological study. Lecturer, Kerbala University, College of Medicine, Microbiology Dept. Karbala J. Med. 5(2).
- **Al-Galas**,N;BenAissa, R.; Attia, Th & .Bahri ,O .(2002) .Isolation and Characterization of Shiga Toxin- Producing *E coli* from meat and dairy products. Food Microbiol- .398 - 19.389.

- **Al-Hayali**, G.M.F.(1993). *Salmonella* in Iraq ,a five –years review.1985-1989 . Diploma dissertation of the currently Al-Nahrain College of Medicine.
- **AL-Iedani**, Ali A.; Khudor , Mohammed H.; Oufi, Nael M.(2014). Isolation and identification of salmonella ssp from poultry farms by using different techniques and evaluation of their antimicrobial susceptibilities. Bas.J.Vet.Res.Vol.1, No.1.
- **Al-karawiy**, H. A. H. (2006). Isolation and Identification of *Salmonella* Typhimurium and detection of gene encoded Type -1-fimbriae by using Polymerase Chain Reaction. M.Sc. Thesis. Vet. Med. College- Basrah University- Iraq
- **Andrews**, W. H. (1996). Evaluation of methods for the detection of *Salmonella* in food. J. Ao Ac international., 79: 4-12.
- **Anil**, M.; Helvacı, M.; Ozkalay, N.; Toprak, E.; Anil, AB.; Dilek, M. and Agus, N. (2009). *Salmonella* Typhimurium outbreak in a neonatal unit in Turkey. Indian J. Pediatr. ;76(6):629-633.
- **Anyebe**, A.A; Opaluma, S.A; Ajayi, A.D.(2008). The social and clinical correlates of typhoid fever infection in Zaria, northern Nigeria. Africa J. Nursing and Midwifery 10 (1): 109-120
- **Atlas**, R. M., Brown, A. E. and Parks, L. C. (1995). Laboratory Manual. Experimental Microbiology, Mosby Comp.
- **Aziah**, I.; Ravichandran, M. and Ismail, A.(2007). Amplification of ST50 gene using drug-reagent-based polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella* Typhi. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 59:373-377.

B

- **Baron**, E. J. (1996). Classification. In S. Baron's Medical Microbiology, 4th edition. University of Texas Medical Branch. ISBN 0963117211

- **Baron**, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007) .Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9th. ed. Mosby Company. Missouri.
- **Bauer** , S.W. ,Kirby, W.M.M., Sherris ,J.C. ,Turck , M.D. (1996). Susceptibility testing by standardized single dose methode . American Journal Clinical Path . 2(3) : P : 485- 493 .
- **Bhatia**,R.&Inchhpujam,R.L.(1994).Essential of medical microbiology , 1st ed . Jaypee brother medical publisher,New Delhi.
- **Bhutta**,Z.A.(2006).Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid . fever.BM.J;333:78-82.
- **Bhutta**,Z.A.;Farooqui,B.J. and Strurm,A.W.(1992).Eradication of amultiple drug resistant *Salmonella* ParaTyphiA causing meningitis with Ciprofloxacin J.Infect.25:215-219.
- **Brenner**, D.J.; Krieg, N.R. and Staley, J.T .(2005).Bergey's Manual of systematic Proteobacteria, Springer, 2:207-213.
- **Brenner**, F. ,W.; Villar,R. G.; Angulo, F. J.; Tauxe, R. and Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. J.Clin.Microbiol.38: 2465–2467.
- **Brooks** , G.F. ; Carroll, K.C. ; Butel , J.S. ; Mores , S.A. and Maletzner , T.A. (2010) . Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology . 25thed . The McGraw – Hill companies.
- **Brown**, A. E. (2005). Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology .McGraw-Hill. New York. companies, Inc., 1221 Avenue of the Americas, New York. 144-6.
- **Brusch**,J.L.;Garvey,T.;Corales,R.;Schmitt,S.K.(2010).Typhoid fever : Differential Diagnoses & Workup .
<http://emedicine.medscape.com/article/231135-diagnosis>

- **Calderone,E.**(1974). Amoxicillin in the treatment of typhoid fever.due to chloramphenicol resistant *Salmonella* Typhi.J.Infect.Dis.128.S433-S442.
- **Centers for Diseases Control and Prevention** (CDC). (2001). Salmonellosis. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, Ga. (Internet).
- **Chaitram,J.M.;** Jevitt,L.A.; Lary,S.; Tenover,F.C. and The WHO Antimicrobial Resistance Group.(2003).The World Health Organization's external quality assurance system proficiency testing program has improved the accuracy of antimicrobial susceptibility testing and reporting among participating laboratories using NCCLS methods. J. Clin. Microbiol., 41(6): 2372–2377
- **Chandra BhanPratap,** Gopal Kumar, Saurabh Kumar Patel, Vijay K Shukla, Kailash Kumar, Tej Bali Singh, and GopalNath. (2014). Mix-infection of S. Typhi and ParaTyphi A in Typhoid Fever and Chronic Typhoid Carriers: A Nested PCR Based Study in North India,Nov; journal list .j ClinDiagnRes.Nov, 8(11): DC09–DC14.
- **Chapel ,H.;**Haeney ,M.;Misbah,S.;and Showden , N. (1999) . Essentials of Clinical Immunology . 4th. E. Blach Well science.
- **Chopra,** A. K.; Huang, J. H.;. Burden X. X. K, D.; Niesel, W.; Rosenbaum, M. W.; Popov, V. L. and Peterson, J. W. (1999). Role of *Salmonella* enterotoxin in overall virulence of the organism. Microb. Pathog. 27:155-171.
- **Chopra,H.L.**(1985).Text Book of medical microbiology.Lud hiana . India . PP : 394-415.
- **Clark,M.A.&Barret,E.L.**(1987). "The *Phs* gene and Hydrogene Sulfide production by *Salmonella typhimurium*.J. Bacteriology 169(6):2391-2379.
-

- **Clark, M.A.** and Barret, E.L. (1987). "The *Phs* gene and Hydrogene Sulfide production by *Salmonella* Typhimurium. J. Bacteriology 169(6):2391-2379.
- **Cohen, N. D.,** Neiberger, H. L., McGruuder, E. D., Witford, H. W., Behle, R. W., Ray, P. M. and Hargis, B. M. (1993). Genus Specific detection of *Salmonella* using the Polymerase chain reaction. J. Vent Diagn. Invest., 5: 368-371.
- **Crump JA,** Stephen P, Luby ED and Mintz. The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ 2004; 82:1-24.
- **Collee ,J. G. ;** Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A. (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . 14thed. Churchill Livingston Inc. New York..
- **Corales, R.** and Schmitt, S.K. (2004). Typhoid fever. internet : emedicin.com.
- **Cowan , S.T.** and Steel, K.J. (2004) . Edited and rev. by Barrow, G.I. and Feltham , R.K.A. Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rded . Doc House, The water front , Cape Town 8001, South Africa .

D

- **Devrim, I.;** Ergunay, K.; Kara, A.; Tezer, H.; Yigitkanl, I.; Cengiz, A.B.; Ceyhan, M.; Gur, D.; Secmeer, G. and Ustacelebi, S. (2008). The comparison cultures , Widal agglutination test and polymerase chain reaction as a diagnostic tool in typhoid fever . Cent. Eur. J. Med. 3(4):470-474.
- **Dhanoo, A.** and Fatt, Q. K. (2009): Non-typhoidal *Salmonella* Bacteraemia: Epidemiology, Clinical Characteristics and its' Association with Severe Immunosuppression, Ann Clin Microbiol Antimicrob Bio Med Central, Ltd.

Dutta, P.; Mitra, U. and Dutta, S. (2001). "Ceftriaxone therapy in ciprofloxacin treatment failure typhoid fever in children." Indian J. Med. Res. 113:210-213.

E

- **EL-Mahdy**, A., El-Din, M.S., EL-Nagdi, M. and EL-Desouky,M. (1993). Multiresistance *Salmonella typhi* to different antibiotics. New Egypt. J. Med., 9: 791-796.

F

- **Faik**,A. J.; Al-wardy, A.H.; Mohammad, R. A. E.;(2014). Multiplex PCR for Identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Para typhi A by Selective Amplification of *tyv*, *prt*, *viaB*, *fliC-d* and *fliC-a* Genes. Journal of Biotechnology Research Center (Special edition).8.(2).
- **Falkow**, S. and Mekalanos, J. (1990). The Enteric Bacilli and Vibrios in Microbiology. 4th ed. John Willy and sons , IMC, New York. U.S.A.
- **Fauci**,A. S. Braunwald E;Isselbacher ,K.I.;Wilson ,J.D.;Martin , J . B . ; Kasper ,D.L.;Hauser, S.L.and Longo .L.(1998).Harrison's Principles of Internal Medicine .vol.1, 14th E. McGraw-Hill –New York .
- **Foster**, J.W.and Spector, M.P. (1995). How *Salmonella* survive against the odds. Ann Rev Microbiol 49:145-174

G

- **Gal-Mor**Ohad, Erin C. Boyle and.Guntram A. Grassl. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enteric* serovars differ.Frontiers in microbiology, V: 5, 391,1-10.
- **Gonzalez-Hevia**, M.A.; Cruz-Martin, M.; Lobato, M.J.; Gutierrez, F.; Solmon, P. and Alvarez-Riesgo,J.A. (1999). *Salmonella* and Salmonellosis in the Asturias District, Spain, during a seven year period (1990-1996). Enferm-Infec-Microbiol- Clin.,17 (4): 166-170.
- **Gopal Kumar**, Chandra Bhan Pratap, Om Prakash Mishra, Kailash Kumar,) and Gopal Nath .(2012). Use of Urine with Nested PCR Targeting the Flagellin Gene (*fliC*) for Diagnosis of Typhoid Fever.J Clin Microbiol.50(6).

- **Gorbach**,S.L.;Bartlett, J.G. ;and Blacklow ,N.R.(1998). Infectious Disease .2nd E. W.B.Saunders Company . Philadelphia .
- **Guerrant** , R.L.;Walker,D.H. ;and Weller, P.F.(1999). Tropical Infectious Diseases . Vol. 1 .1st E. Churchill Living stone . Philadelphia.
- **Guerrant**, R. L.; Steiner, T. S.; Lima, A. M. and Bobak, D.A. (1999). How intestinal bacteria cause disease. J. Infect. Dis., 179(Suppl 2): 331-337.
- **Guillaumat**, C.; Dang-Duy, TL.; Levy, C.; Cohen, R.and Leblanc, A. (2008). *Salmonella meningitis* in newborns and infants. The importance of fluoroquinolones Arch Pediatr.;15 Suppl 3:S161-166.

H

- **Hanan ,Z .K.** (2016) .Isolation and Molecular Detection of Some Virulence Genes and Plasmids of *Salmonella enteric* from Diarrheal Children in Thi-Qar Province /Iraq .M.Sc. Thesis. College of Science –Thi-Qar University.
- **Hammad**, O.M.; Hifnawy,T; Omran, D; El Tantawi, M.A; Girgis, N.I .(2011) . Ceftriaxone versus Chloramphenicol for Treatment of Acute typhoid Fever. Life Science Journal, 8(2):100-105.
- **Haque**,A.; Abdul, H; Sarwar,S.;Ali,A.;Bashir,S.;Tariq , A. and Mohsin , M . (2005).Identification of drug resistance gene in clinical isolates of *Salmonella* Typhi for development of diagnostic multiplex PCR . Pak . J . med . Sci .. 21, (4):402-407.
- **Harley, J.** and Prescott, L. (2002). Laboratory exercises in Microbiology. 5th. ed. 466 – 7.The McGraw Hill, Companies . New York .
- **Hassuny**, A. A.; Kadhim, I.J.and Kadhim, A.H.(2015) Molecular Characterization of *Salmonella* Typhi Isolated from Typhoidial Humans. University of Babylon ,Medical Journal of Babylon. 12 (3): 646-652.

-
- **Hatta**, M.and Smits , H.L.(2007).Detection of *Salmonella* Typhi by nested polymerase chain reaction in blood samples . Am . J . Trop . med . Hyg . 76 (1): 139-143.
 - **Hawkey** , P.M. and Lewis , D.A. Medical bacteriology . a practical approach , Oxford, Newyork, Tokyo,1989. P: 21-29.
 - **Henegariu**,O.;Heereman,N.A.;Dlouhy,S.R.Vance,G.H.and Vogt , P . H . (1997).Multiplex PCR:Critical parameters and step-by-step protocol . Biotechniques .23:504- 511.
 - **Heyndrickx**.KX,M.F.; Pasmans,R.; Ducatelle ,A.;Decoster,F.and Haesebrouk .(2005).Recent Changes in *Salmonella* nomenclature :the need for classification .Vet.J.170:275-277.
 - **Hitchings**,G.(1973).Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazole. I.J.Infect.Dis.128: 433- 442.
 - **Hjartardóttir**, S.; Gunnarsson, E.; Sigvaldadóttir, J. (2002). *Salmonella* in Sheep in Iceland *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43:43-48doi:10.1186/1751-0147-43-43
 - **Holt**,K.E.;Thomson,N.R.and Wain,J.(2009).Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enteric* serovars Para Typhi A and Typhi.BMC Genomics.10:36.
 - **Hong**, Y.; Liu, T.; Lee, MD.; Hofacre, CL.; Maier, M.; White, DG.; Ayers, S.; Wang, L.; Berghaus, R.and Maurer, J. (2008). Rapid screening of *Salmonella enteric* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. BMC Microbiol. 9 8:178.

I

- **Ismail**,T.F.(2006).Rapid diagnosis of typhoid fever. Indian.T. Med.Res 123.:489-492.

J

- **Janada**,J.M.andAbbott,S.L.(2006)."The *Enterobacteria*",Asm Press
- **Jawetz**, E; Melnick, J.L., and Adelberg, E. A. (2001). Enterobacteriaceae. In: Review of Medical Microbiology, 22nd ed., Geo,F.; Janet,S. and Stephen, A.(ed.) ,McGraw-Hill Compaies, USA. pp.219-228.
- **Jawetz**, E.;Melnick ,J . L . and Adelberg ,E.A.(1989).Review of Medical Microbiology.24th . ed .Middle-East edition- P -209-212
- **Jawetz**, E.; Melnick , J . L.and Adelberg ,E.A.(2007).Review of Medical Microbiology.24th . ed . McCraw-Hill Companies .Inc .chap (16).P.258-260.chap(10).p.161-162.
- **Jayakumar**, K., Appalaraju, B. and Govindan, V. K. (2003). An atypical presentation of *Salmonella typhi* -acasereport. Indian J. Medical Microbiology., 21(3): 211-212.
- **Judicial**,(2005).Commission of the international Committee on systematic of prokaryotes:The type species of genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica*(ex Kauffmann and Edwards 1952).

K

- **KalpanaPandey**, Vijay K. Sharma and RoshaniMaharjan.(2015). Prevalence and Antibiotic Sensitivity test of Salmonella Serovars from Enteric Fever Suspected Patients Visiting Alka Hospital, Lalitpur;;; Kalpana Pandey et al. / American Journal of Microbiology, 6 (2): 40.43.
- **Kapil**,A .;Sood ,S .;Reddaiah ,V.P.;Das ,B. and Seth,P.(1997).Paratyphi fever due to *Salmonella enteric* serotype ParatyphiA.Emer.Infect.Dis.3(3):407.

-
- **Karami** ,A .; Ranjbar ,R .;Ahmadi , Z.and Safiri ,Z.(2007).Rapid Detection of different serovares of *Salmonella enteric* by multiplex PCR .Iranian .J .Publ Health,vol.36,No2,pp.38-42.
 - **Karim**, M. R.; Khan, M. S. R.; Kayesh, M. E. H.; Islam,M. R. and Gani,M. O. (2008).Isolation and Characterization of Sheep *Salmonella* in and Around Bangladesh Agriculture University Campus . Bangl. J. Vet. Med. 6 (1): 75–78.
 - **Kariuki**, S. ,Revathi, G., Muyodi, J. ,Mwituria, J. ,Munyalo, A. ,Mirza, S. ,Hart, C. A. (2004). Characterization of Multidrug –resistant typhoid outbreaks in Kenya . J .Clin. Microbiol. 42:1477-1482.
 - **Kelterborm**, E.(1988). The Kauffmann-white scheme for 1987. Trihygiene information.20: 181.Cited in Vet. Bull.,(1989). 259:334.
 - **Kenneth**,J.; RYAN, M.D.(2007) .Sherris medical microbiology 4TH edition.
 - **Khan S**, Harish BN, Menezes GA, Acharya NS, Parija SC.(2012). Early diagnosis of typhoid fever by nested PCR for flagellin gene of *Salmonella enterica* serotype typhi. Indian J Med Res, 136:850-4.
 - **Khan**, A.M.; Hossain, M.S.; Khan, AI.; Chisti, MJ.; Chowdhury, F.; Faruque, AS. and Salam, MA. (2009). Bacterial enteropathogens of neonates admitted to an urban diarrhoeal hospital in Bangladesh. J Trop Pediatr.;55(2):122-124.
 - **Khan**, M. H., Ain, Q. and Jamil, H. (1996). Multi-drug resistant typhoid in adults. J College PhysSurg Pakistan., 6: 33-35.
 - **Koneman**, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C. (1997). Coloratlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. J. B. Lippincott company, New York.

- **Koneman**, E.W.; Allen , S.D .Jauda, W.M .; Schreckenberger,P.C.and Winn , W . C . (1 997).Color Atlas and text book of diagnostic Microbiology .5th ed. Lippincott-Ravanpublisher . philadelephia NewYork.pp.237-239.
- **Krishnan** ,P.; Stalin,M.; and Balasubramanian,S.(2009).Changing trends in antimicrobial resistance of *salmonella enteric seraver typhi enteric serave rparatayphi A* in Chennai. Indian J. Path. Mic.52(4).
- **Kumar**,A.;Arora,V.;Bashamboo.A. and Ali,S.(2002).Detection of *Salmonella* Typhiby polymerase Chain reaction:Implications in diagnosis of typhoid fever. Infection ,Genetics and Evolution.2:107-110.
- Kundu**,R.;Ganguly.N.;Ghosh,T.K.;Veewale,V.N . ; Shah , R . C . and Shah , N . K .(2006).IAP Task Force Report:Diagnosis of Enterica Fever in Children.India Pediatrics.43:875-883.

L

- **Le Minor**, L. and M. Y. Popoff. (1987). Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:465-468
- Lee HY**,Yang YJ ,Su LH ,Hsu, CH, FuYM ,Chiu CH.(2008) .Genotyping and antimicrobial susceptibility of salmonella enerica serotype panama isolated in Taiwan. J Microbiollmmunol Infect .Dec;41(6):507-12.
- Lee**,P.(2002).*Salmonella* .Internet :www.ce.berkeley.edu.
- **Lennet**,E.H.;Balows,A.;Hansler,W.J.and Shadomy,H.J.(1985).Manual of clinical microbiology 4thed.American Microbiology , Washington ,D.C.USA.
- Levine**,M.M.;Grados,O.;Gilman,R.H.;WoodWord,W.E.;Solisplaza,R.and Woldman,W.(1978).Diagnostic value of the Widal test in areas endemic for typhoid fever.Am.J.Trop.Med.Hyg.27(4):795-800.

M

- **Mandal, S, Mandal MD, Kumar NP.** (2004). Reduced minimum inhibitory concentration of chloramphenicol for *Salmonella enteric* serova rtyphi. Indian J. Med. Sci, 16-23.
- **Mandell, G. L.; Bennet, J. E.; and Dolin, R.** (2000). Principles and Practice Of Infectious Disease. 5th Ed. Churchill Livingston. New York.
- **Mary, J. Z.:** David, A.; Sharon, M.; George, E.; Wilson ,J. (2012) .Manual of Microbiological Culture Media.
- **Matheson, N.; Kingsley, R.A.; Sturgess, K.; Aliyu, S.H.; Wain, J.; Dougan, G.andCooke, FJ.** (2010). Ten years experience of *Salmonella* infections in Cambridge, UK. J. Infect. ;60(1):21-25.
- **Mcghie,e.;brown,l.;hume,p.;rey,d.; koronakis,v.**(2009) .salmonella takes cantrole :effective or driven manipulation of the nost .j.curr. opin microbiol.,12(1):117-124.
- **Med J, Armed Forces India.** (2016). Blood culture isolates and antibiogram of Salmonella: Experience of a tertiary care hospital. /j .mjafi. 72(3):281-4.
- **Mims.C.A.;**Playfair,J.;Roirt,J.;Wakelin,D.and.Williams,R.(1993).Medical Microbiology.Mosby.st.Louis;Baltimore,Boston,Chicago,London,Toronto.
- **Mirza,S.H.;**Reeching,N.J. and Hart,C.A.(1996). Multi-drug resistant Typhoid: aglobal problem .J .med microbial.,44:317-319.
- **Mirza,S.;**Kariuki,S.;Mamun,K.Z.;Beeching,N.J.andHart,C.A.(2000).Analysis of plasmide and Chromosomal DNA of multidrug-resistant *Salmonella enteric* serotype Typhi from Asia .J.Clin microbial.,38:1449-1452.
- **Murray,P.R.;**Rosenthal,K.S.and P falle r,M.A .(2009) .Medical . Microbiology (6th.ed.). Philadelphia ,PA :Mosaby Elsevier.P307.

- **Muthu,G.;** Suresh ,A. ;Sumathy ,G.; and Srlvanl,R.;;(2011). Studies on antimicrobial susceptibility pattern of salmonella isolates from chennai , india .International Journal of Pharma and Bio Sciences. Vol 2/ Issue 2. www.ijpbs.net.

N

- **Nagshetty,K.;**Channappa,S.T.; and Gaddad ,S.M.(2010). Antimicro- obial susceptibility of monella Typhi in India. J Infect DevCtries . 4(2):070-073.
- **Nelwan,R.H.;**Chen,K.;;Nafrialdi and Paramita,D.(2006).Open Study on Efficacy And Safety Of Levofloxacin in Treatment of uncomplicated Typhoid Fever .Southeast Asian J Trop Med Public Health Vol37.No.1

O

- **OIE(2006)** . Salmonellosis. <http://www.int/chapter X>.
- **Old,D.C.(1996).***Salmonella* in :Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology.4thed.Edited.by.Collee,J.G.;Fraser,A.G.;Marmion,B.P.;Simmons ,A.Longman Singapore Publishera (Pte)Ltd.PP.385-403.

P

- **Paerrgaard,L.L.** and Thomsen ,A.(1998).Treatment with Ciprofloxacin in Children with typhoid fever.Scand.J.Infect.Dis.30:355-357.
- **Parry,C.M.;**Hien,T.T.;;Dougou,G.;;White,N.J.andFarrar,J.J.(2002).Typhoid fever.N.Engl.J.Med.347:1770-1782.
- **Parry,C.M.**and Beeching ,N.J.(2009)."TreParry ,C.M.(2004).Typhoid fever .Curr Infect Dis.,6:27-33.
- **Pealver, C.M.C.;** Medina, J.; Quiones, G.; Wochinger, A.V. and Vega ,E.Z. (2004). Development of DNA sequences for the detection of *Salmonella*. Biology Department, University of Puerto Rico .

- **Pegues, D.A .;**Oh ,M.E. .(2005).*Salmonella* Species including *Salmonella* Typhi.In:Mondell, douglas and Bennett's principles and practice of infectious.Diseases,6thed.Mandell,G.L.;Bennett,J.E.and Dolin,R.(editors).Churchill Livingstone.
- **Peques, D.A.;** Miller, S.I. (2009). *Salmonella* Species, Including *Salmonella* Typhi. In: Mandell: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease. 7th ed. Elsevier; :chap. 223.
- **Picheler,H.;** Knothe, H.;Spitzzy ,K. H. and Viekind ,G.(1973).Treatment of chronic Carriers of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* ParaTyphi B with Trimethoprim-Sulfa-Methoxazole.J.Infect.Dis.128:S743-S744.
- **Presscott, L. M.;** Harleg, J .P .and Klein ,D.A. (1990). Microbiology W .M.C . Brown publishers.
- **Prouty ,A. M.;** Schwesinger, W .H .and Gunn, J.S.(2002). Biofilm formation and interaction with surfaces of gallstones by *Salmonella* SPP. Infect Immun : 70:2640-90.
- **Prowollik ,S .**(2011).*Salmonella* From Genom to Function.Coister Academic Press.ISBN978-1-904455-73-8.

Q

- **Quine, P.J.;** Carter, M,E.; Markey, B .and Radotits, S.M. (2004). Clinical Veterinary microbiology. 6th ed. Mosby an imp. Wolf, London.
- **Quinn, P. J;** Markey, B. K; Carter, M. E; Donnelly, W. J. C. and Leonard, F. C. (2002). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st ed. Blackwell Science Ltd; London. p. 163-167

R

- **Rabinowitz**, P.M.; and Conti, L. A.; (2010). Salmonellosis in Human- animal medicine: clinical approaches to zoonosis, toxicants and other shared Health risks. Saunders Elsevier, united state America. PP248-254.
- **Rabsch** ,W.; Tschpe , H., and Bumler , A.J.(2001). Non-typhoid salmonellosis: emerging problems. Microbes Infect., 3: 237- 247.
- **Raffatellu**, M.; Chessa ,D.; Paul Wilson, R. ;Tu"kel, C.A.; Akc ,M.; elik, and Ba"umler1.A. J. (2006). Capsule-Mediated Immune Evasion: a New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis. Infect. Immun. 74:19–27.
- **Rahman**, M.M.; Guard-Petter, J. and Carlson, R.W. (1997).A virulent isolate of *Salmonella enteritidis* produces a *Salmonella* Typhi-like lipopolysaccharide. J Ba.
- **Rai K**, Shah PK, Rai G, Rai SK, Rai KR, Gautam AK, Yanagida JI, Ono K, Thapa S. (2015) .Bacteriology of enteric fever cases at Nepal Police Hospital, Kathmandu2015. Original Article Nepal Med Coll J; 17(1-2): 54-57
- **Raveendran**, R. ;Wattal, C. ;Sharma, A. ;Oberoi, J.K. ;Prasad, K.J. and Datta, S.(2008). High level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* isolated from blood. Volume : 26 | Issue : 1 | Page : 50-53 .
- **Reshetneva IT**, Per'ianova OV, Dmitrieva GM, Ostapova TS.(2015).Antibiotic resistance salmonella spp .isolatedin the territory of the krasnoiask region. Gig Sanit. Article in Russian,;94(2):35-8.
- **Ryan**, K.J.; Ray, C.G. (2004). *salmonella*, Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 362–368. ISBN 0-8385-8529-9.

S

- **Saha**, S. K.; Talukder, S.Y.; Islam ,M .and Saha ,S.(1999).Ahighly Ceftriaxone-resistant *Salmonella* Typhiin Bangladesh . Pediat r . Infect . Dis . J .18:387.
- **Saha** MR., Dutta P., Niyogi SK., Dutta S., Mitra U., Ramamurthy T., et al .,(2002). Decreasing trend in the occurrence of *Salmonella enterica* serotype typhi amongsthospitalized children in Kolkata India during 1990-2000, Indian.J.Med. Sec. 56: 1-8.
- **Saleh**,M.A.(2013).Comparison of widal agglutination test with ELISA typhi test for serological diagnosis of typhoid fever in some Iraqi patients in Diyala governorate. 1(5): 59-64.
- **Schneider**, K.R.; Goodrich, R.M. and Waithe, S.Z. (2000). Preventing Food borne Illness: Sallmonellosis. I.F.A.S., University of Florida.
- **Schwalbe**,R.S.;Hoge,C.W.;Morris,J.G.;O'Hanlon,P>N.;Grawford,R.A.and Gilligan,P.H.(1990).invivo selection for transmissible drug resistance in *Salmonella* Typhi during antimicrobial therapy.Antimicrob Agents Chemother.34=161-163.
- **Shanson**,D.C.(1982).Microbiology in clinical practice.wright.PSG.
- **Shen** H. W., Yu RC. And Chou C. 2007. "Acid adaptation affects the viability of *Salmonella typhimurium* during the lactic fermentation of Skin milk and product storade" international journal of food microbiology. 114 (3): 380 – 385.
- **Shimada**,T.;Kosako,Y.;Isshiki,Y.and Hisatsune,K.(1992).Enterо hemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7Possesses(O)antigen identical with that of *Salmonella* O301.Curr.Microbiol.25:215-217.

- **Sood, S.;** Kapil, A.; Das, B.; Jain ,Y. and Kabras ,S.K.(1999).Re-emergence of Chloramphenicol-sensitive *Salmonella* Typhi.Lancet,353:1241-1242.
- **Su, L .H .**and Chiu, C.H. (2007). *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med J. May-Jun;30 (3):210-219

T

- **Tadesse, A.** and Alem, M. (2006) . Medical Bacteriology . EPHTI . Gondar University .
- **Thaver, D;** Zaidi ,A .K .and Critchly ,J.A.(2008)".Floroquinolones for treating typhoid and paratyphoid fever enteric fever". Cochrane Database SystRev8 (4) : C D 00 4530 .PMID 18843659 . (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843659?dopt=Abstract>).
- **Thong, K. L.;** Bhutta, Z. A. and Pang ,T.(2000).Multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhi are genetically homogenous and Coexist with antibiotic-sensitive strains as distinct, independent clones .Int .J. Infect Dis.,4:194-197.
- **Tindall, B .J. ;**P. A. D.; Grimont, G. M.; Garrity, J. P. and Euzeby .(2005) .Nomenclature and taxonomy of thegenus *Salmonella* .Int .J. Syst .Evol . Microbiol .55:521-524
- **Todar,K.**(2008). *Salmonella*.and. Salmonellosis. Antibiotic susceptibility . [http : // www .textbook of bacteriology.net/Salmonella_5.html](http://www.textbookofbacteriology.net/Salmonella_5.html).
- **Tsai, M. H.;** Huang, Y. C.; Lin, T. Y.; Huang, Y. L.; Kuo, C. C. and Chiu, C. H. , (2010). Reappraisal of parenteral antimicrobial therapy for non typhoidal *Salmonella enteric* infection in children. Clinical Microbiology and Infection, no. doi: 10.1111/j.1469-0691. 03230.x

U

- **U.S.Food** and Drug Admenstration.(2003). Salmonella species. Bad bug book.(Internet).

V

- **Veling**, J.; Barkema ,H.W.;Vander Schans ,J .;VanZijderfeld ,F. and Verhoeff ,J.(2002).Herd-level diagnosis for *Salmonella enteric* subsp-enterica serovar Dublin infection in bovine dairy herds-prev.vet Med.53:31-42.
- **Volk**, W.A. and Wheeler ,M.F.(1988).Basic Microbiology.6th Ed. Harper and Row .New York.

W

- **Wain**, J.; Pham ,V .B.; Ha, V.; Nguyen ,N .M.;To, S .D .and Walsh ,A.L. (2001). Quantitation of bacteria in bone marrow from patients with typhoid fever :relationship between Counts and clinical features .J.Clin.Microbiol.39:1571-1576
- **Wall**, P.; Morgan, D.; Lamden, K.; Ryan, M.; Griffin, M. and Rowe, B. (1994). A case control study of infection with epidemic strain of multiresistant *Salmonella* Typhimurium in England and Wales. Com. Dis. Rep., 4:130-135.
- **Weill**,F.;Huytran,H.;Roumaghac,PH.;Fabre,L.Minh,N.B.;Stavnes,T.;Lassen,J.; Bjune,G.;Grimont,P.A.D.andGurin,P.J.(2007).Clonal Reconquest of antibiotic-Susceptible *Salmonella enteric* Serotyp Typhi in son La province , Vietnam.Am.J.Trop.Med.Hyg.76(6).pp.1174-118.
- **Willke**, A.W;. Ergun, H& .Bayar, B.B.(2001) Evaluation of Gruber. Widal test in diagnosis of typhoid fever. Clin. Microb & Infect.394-7:1.
- **Willke**, A .W.; Ergun ,H. and Bayar, B.B.(2001).Evaluation of Gruber Widal test in diagnosis of typhoid fever. Clin .Microb and Infect.7:39 1-394.

-
- **World Health Organization (WHO).** (1991). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. Geneva. London.
 - **World Health Organization.** (1980). *Salmonella* Surveillance, Central Public Health, Colindale avenue London .U.K.
 - **World Health Organization.** (1982).*Salmonella* Surveillance ,Central Public Health Laboratory , Colindale avenue..London, U.K.
 - **World Health Organization.**(2003).Communicable Disease Profile for Iraq.
 - **World Health Organization.**(2006).6th International Conference on typhoid fever and other *Salmonella*. Geneva.WHO.
 - **World.Health.Organization.**(2010).Typhoid.fever.(http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index/html)

Y

- **Yoon, H. J.;** Cho, S. H .and Kim ,S.H.(2009).A Case of Multidrug-Resistant *Salmonella enteric* Serovar Typhi Treated with a Bench to Bedside Approach.

Z

- **Zapor, M .and Pooley, D.P.** (2002). Salmonellosis. eMedicine World Medical Library .pp.1-14. eMedicine .com,Inc.
- **Zhou ,L.& Pollard ,A.J.**(2010).A Fast and Highly sensitive Blood culture PCR method for Clinical Detection of *Salmonella enteric* serovar *Typhi*. Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.9(1):14.

ملحق رقم (1): استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

Questioner

أسم المريض:-----

العمر:-----

الجنس:-----

الموقع:-----

الحالة المادية:-----

السكن : ريفي:----- مدينة:-----

Widal test result:-----

أهم الأعراض :-----:-----:-----

عزل other bacteria:-----

نتيجة الزرع:-----

نتيجة PCR:-----

ملحق رقم (2): الفحوصات الكيموحيوية

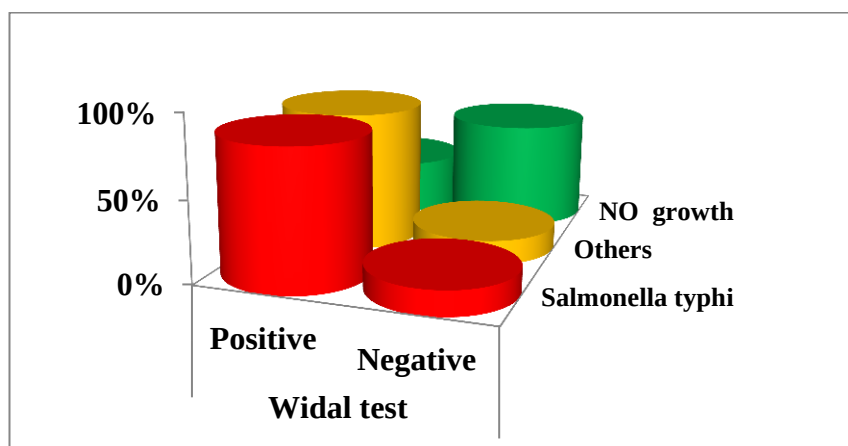
الفحص	النتيجة
Oxidase	-
Catalase	+
Kliglar iron	Acid /Alklain no gas with H2S
Simmoncitreat	-
Semisoildmanntol	Motile/manitolfermentation
Urea test	-
Pepton water for Indol	-
methyl red(MR)	+
Voges-Proskauer(VP)	+

ملحق رقم (3) : الفحوصات الكيموحيوية بنظام API20E

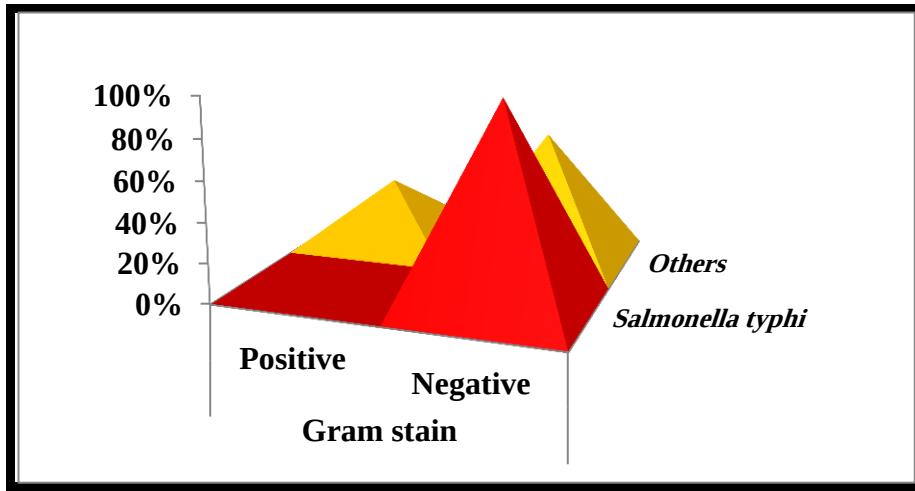
نتائج بكتريا السالمونيلا	النتيجة الموجبة	النتيجة السالبة	التفاعلات الانزيمية EnzymesReaction	مادة التفاعل Substrates	الاختبارات Test
—	اصفر	عديم اللون	بيتا كالاكتوسايديز	ارثرو-نايتروفيينولكلايكوسيد	ONPG
—	احمر- برتقالي	اصفر	ارجينين ثنائي هيدروليز	ارجينين	ADH
+	برتقالي	اصفر	لايسين دي كاربوكسيليز	لايسين	LDC
+	احمر- برتقالي	اصفر	اورنثين دي كاربوكسيليز	اورنثين	ODC
+	ازرق مخضر- اخضر	مائل الى الاخضر\الاصفر	استهلاك السترات	سترات الصوديوم	CIT
+	اسود	عديم اللون\ارصاصي	انتاج كبريتيد الهيدروجين	ثايكبريتات الصوديوم	H2S
—	احمر- برتقالي	اصفر	انزيم اليوريز	اليوريا	URE
—	بني غامق	اصفر	تربتوفان دي امينيز	تربتوفان	TDA
—	حلقة حمراء	حلقة صفراء	انتاج الاندول	تربتوفان	IND
—	وردي- احمر	عديم اللون	انتاج الاسيتون	بروفيت الصوديوم	VP
—	وجود اختلاف باللون	تبقى الصبغة السوداء	الجيلاتينيز	بلاطين كوهين	GEL
+	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	كلوكوز	GLU
+	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	مانتول	MAN
—	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	انوسيتول	INO
+	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	سوربيتول	SOR
+	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	رافينوز	RHA
—	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	سكروز	SAC
+	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	ملبيوز	MEL
—	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	امكدالين	AMY
+	اصفر	ازرق\ازرق مخضر	تخمير الكسدة	ارابينوز	ARA

ملحق رقم (4): اختبار حساسية عزلات بكتريا *Salmonella enteric Typhi* لمضادات الحياة

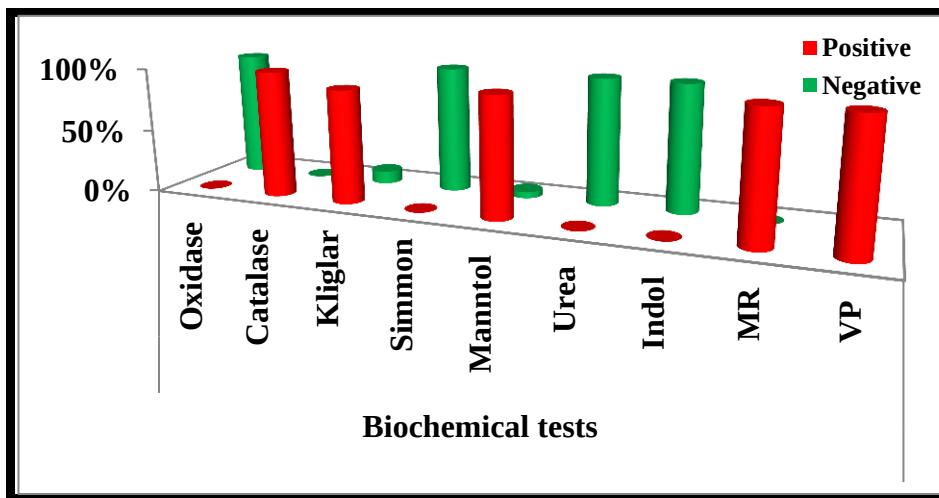
N	Ampicillin	Chloramphenicol	Ciprofloxacin	Co-trimoxazole	Nalidixic acid	Imipenem	Azithromycin	Tetracycline	Ceftriaxone	Ceftazidime
1	R	R	M	R	R	S	S	S	S	S
2	R	R	R	R	M	S	S	M	S	S
3	R	M	M		R	S	S	S	M	M
4	M	R	R	S	R	S	S	S	R	
5	R	R	R	M	S	M	M	M	S	S
6	S	M		M	R	S		S	S	
7	R	M	R	R	M	S	S	S		M
8	R	R	S		R	S	S	S	S	S
9	M	R	R	R	R	S	S	M	S	M
10	R	R	M	M	S	S	S	S	M	S
11	S	M	R	R	R	M	S	M	S	S
12	M	M	R	S	R	S	S	S	M	S
13	M		R	M	R	S	M	S	M	S
14	R	S	M	R	M	R	M	S	S	M
15	R	R	R	R		M	S	S		S
16	M	R	M	R	R	S	M		M	S
17	R	M	M	M	R	S	M	M	S	
18		M	R	R		S	S	S	R	M
19	R	M	M	M	R	S	M	M	S	S
20	R	R	R	R	M	S	S	S	M	



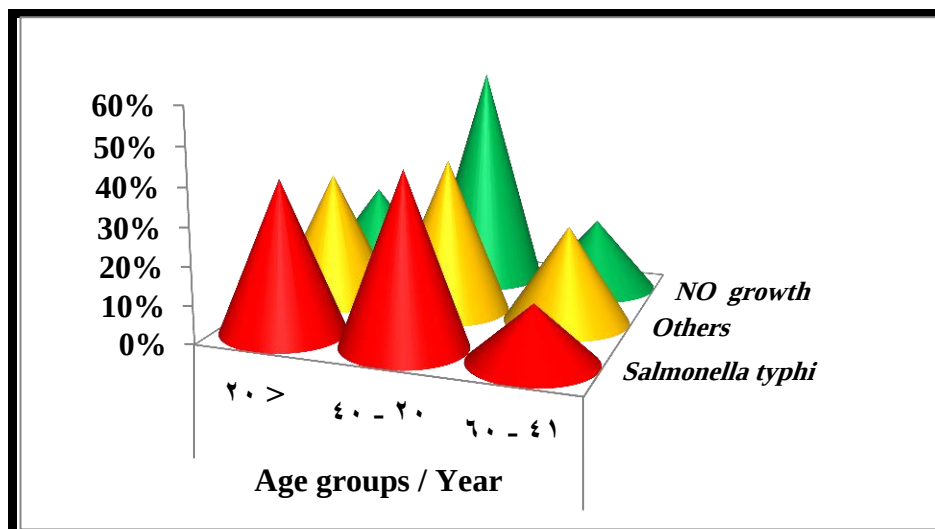
الشكل البياني مقارنة نتائج فحص Widal test بالاعتماد على العزلات البكتيرية



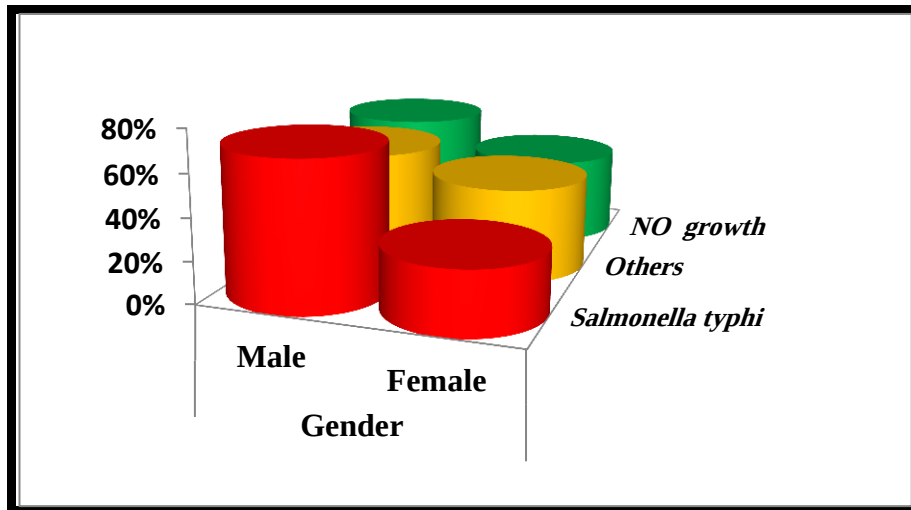
الشكل البياني: فحص صبغة كرام تحت المجهر بالاعتماد على العزلات البكتيرية



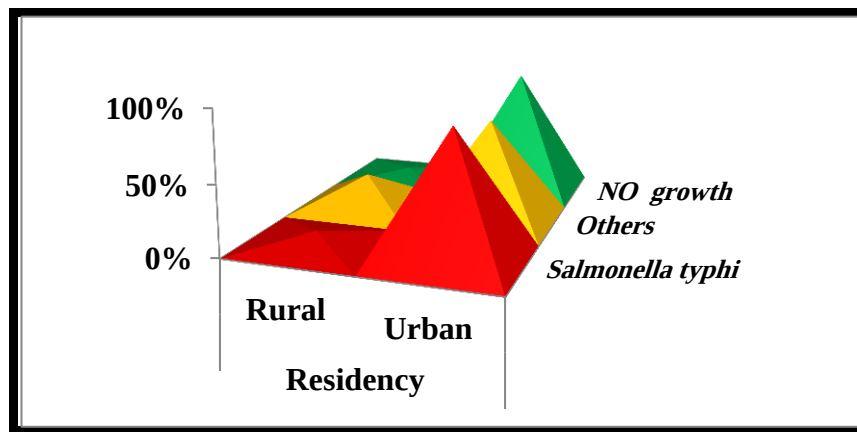
الشكل البياني: اختبارات الكيموحيوية والموزعة بحسب نتائج النمو البكتيري *Salmonella enteric* Typhi



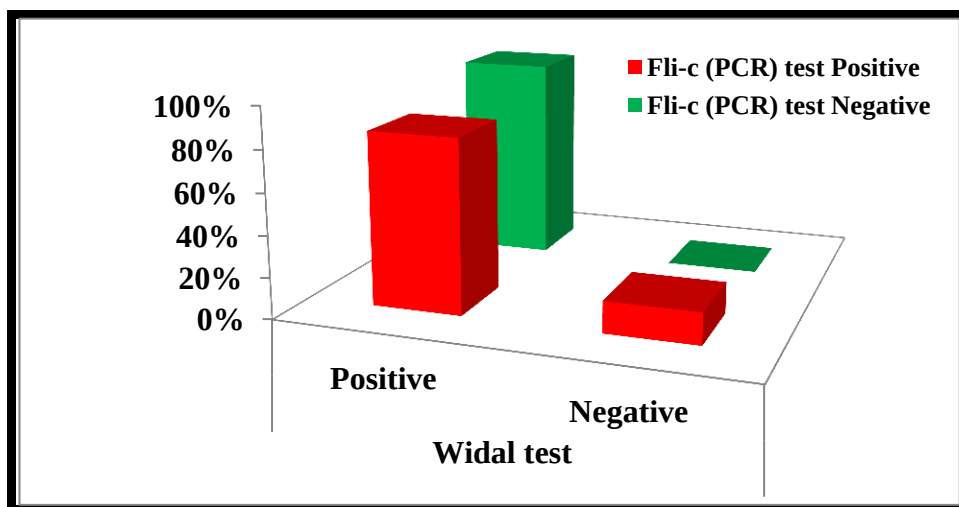
الشكل البياني: توزيع المجاميع العمرية (سنة) بحسب الاعتماد على نتائج العزلات البكتيرية



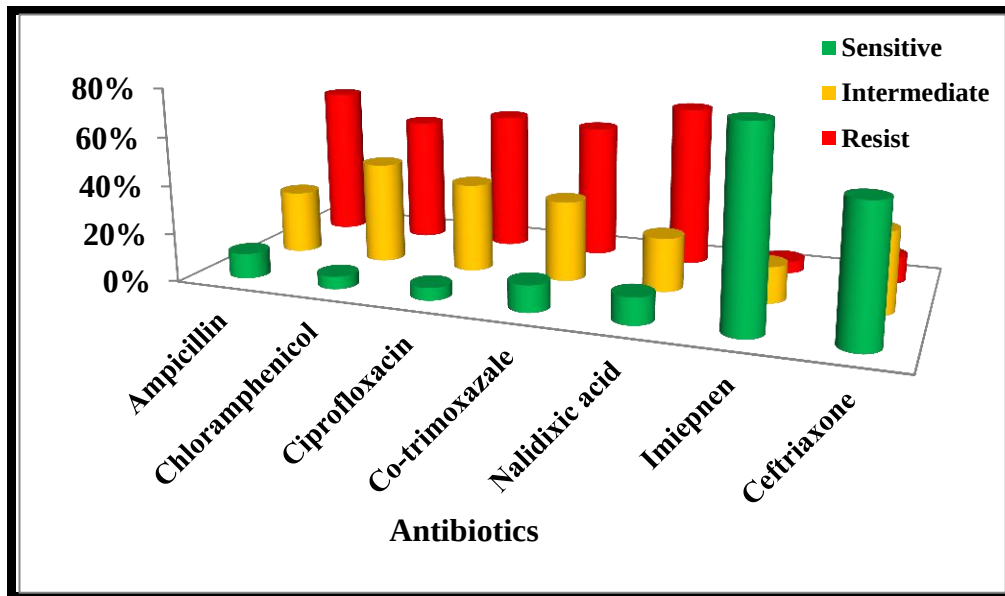
الشكل البياني: أجناس المرضى بحسب الاعتماد على نتائج فحص العزلات البكتيرية



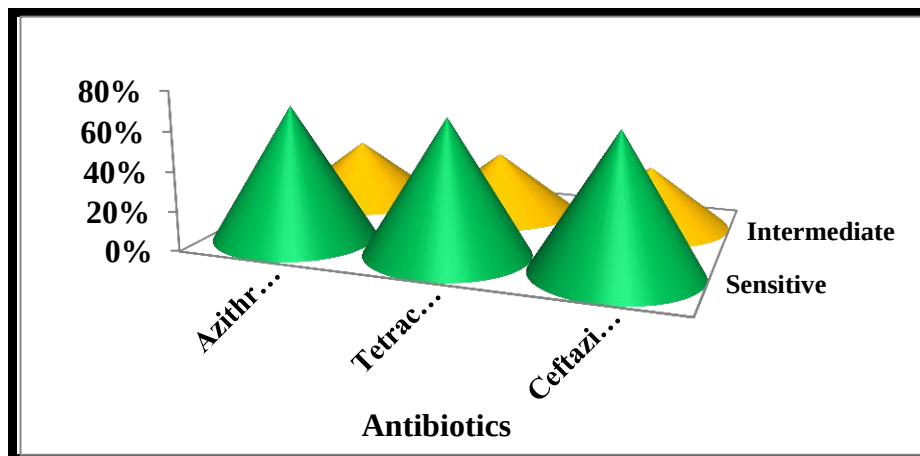
الشكل البياني: توزيع مناطق سكان المرض بحسب نتائج العزلات البكتيرية



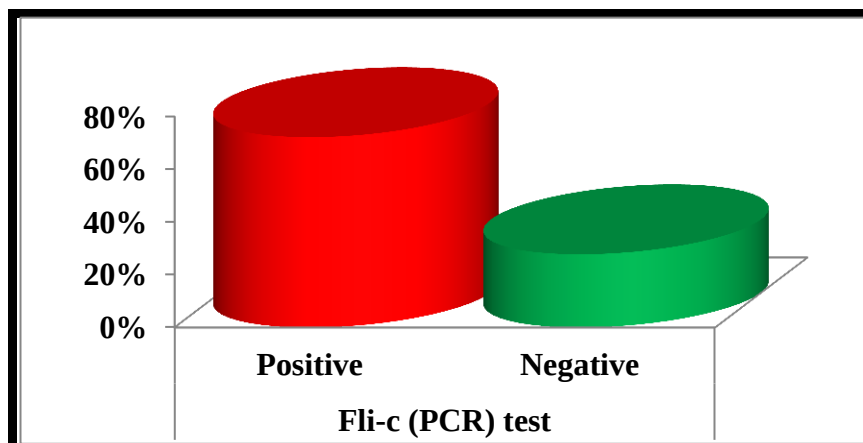
الشكل البياني: مقارنة نتائج فحص Widal test بحسب نتائج PCR



الشكل البياني: فحص حساسية المضادات الحيوية للبكتيريا *Salmonella enteric Typhi*



الشكل البياني: المضادات الغير مقاومة للبكتيريا *Salmonella enteric server Typhi*



الشكل: اختبار الفحوصات الوراثية *Genetics fliC (PCR) test* للعزلات البكتيرية

Summary

This study was conducted outpatients' clinic in Baghdad teaching hospital and baby protection hospital at Medical city; Al-Karama teaching hospital for the period starting from November 2016 to May 2016.

The study has aimed to highlights to find out the most precise laboratory method for *Salmonella enteric* serovar Typhi diagnosis, which responsible for typhoid fever infection. The laboratory methods has included serological methods (Widal test), bacteriological methods through isolation and identification of *Salmonella enteric* serovar Typhi and molecular procedure (by commercial polymerase chain reaction) for detection of *fliC gene*. In addition antibiotic susceptibility patterns have done by Kerby-Bauer methods and recorded the diameter of zone of bacterial inhibition according to CLSI(2015).

One hundred twenty blood samples were included in this study. These were collected from individuals suspected as typhoid fever patients so that 71(59.16%) of the patients were males and 49(40.83%) were females. The age range of the patients was 1-60 years; 24.16% were inpatients and 75.83% were outpatients.

All blood specimens were initially screened by widal test the ratio was 75 positive and 45 negative and The blood samples were directly implanted in blood transfusion tubes and in the traditional way by cultured in blood in bottles containing (10ml) Brain heart infusion broth then cultured on blood agar, MacConkey agar, SSagar and XLD medium. The colony morphology and microscopic findings had thoroughly investigated. Others bacteriological and biochemical tests were done according to standard procedures which include catalase, oxidase. Final diagnosis of the isolates has achieved by using an API20E procedure for confirmation of bacterial diagnosis.

Twenty blood samples were isolated from the suspected disease of typhoid fever. The rate of diagnosis of bacterial isolates of typhoid fever using 17 (kit Widal test) was 85% given positive result with significant statistical difference at ($P < 0.01$).

Results of bacterial diagnosis of all these blood samples showed there were (16.66%) were positive for bacterial culture as *Salmonella enteric* serovar Typhi with significantly statistical difference ($P < 0.01$).

Furthermore, the isolates studied under the Polymerase Chain Reaction were detected **gene (*fliC*)** in 13 samples (72.22%), depending on the appearance of a 599 bp package. the base pair was either nested PCR and was 360bp, and there was significant statistical difference ($P > 0.05$) between the serological and bacterial diagnosis of *Salmonella enteric* serover Typhi.

The antibiotic susceptibility patterns for 10 antibiotics used for typhoid fever treatment had carried out using the Kerby-Bauer technique. Bacterial isolates had showed resistance for Ampicillin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Co-trimoxazole and Nalidixicacid with 63.2%, 52.6%, 57.9%, 55.6%, 66.7% respectively. While its showed sensitivity for Imipenem, Azithromycin, tetracycline, Ceftriaxon and Ceftazidime with 80.0%, 68.4%, 86.4%, 55.6%, 68.8% respectively.

**Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
And Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology**



**comparative study Bacteriological,
serological and molecular diagnosis of
bacteria *Salmonella typhi***

A Thesis submitted

To

**Council of college of Education for Pure Science Diyala
University Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science In Biology\Microbiology**

By

Ruqia ayad abbas AL-Qayssei

Bachelors of Biology 2012

Supervised by

prof.Dr.Mohammed Shamkhi Jebur

prof.Dr. Abbas A .Farhan

A.H1438

A.D2018