



## Genotyping of bacteria isolated from clinical sources using (GTG)5-PCR and TP-RAPD

<b>1 Mohammed Ahmed Bazia Sawyan</b>	Tikrit University College of Sciences Department of Biology / <a href="mailto:www.mohammed0102@gmail.com">www.mohammed0102@gmail.com</a>
<b>2 Zeina Sabry Muslim Mohammed</b>	University of Babylon Department Microbiology / <a href="mailto:yoyo_sadas23@gmail.com">yoyo_sadas23@gmail.com</a>
<b>3 Haneen Zaman Khudair Omran Kaskul</b>	University of Babylon, College of Science, Biology department / <a href="mailto:haneenzaman06@gmail.com">haneenzaman06@gmail.com</a>
<b>4 Noor Mohammed Ahmed Mohammed</b>	University of slemani College of science / Biology Department / <a href="mailto:noor.altalabani@gmail.com">noor.altalabani@gmail.com</a>
<b>5 Saja Turkie Majeed Annag</b>	University Tikrit College science Department Biology / <a href="mailto:bio.saja.turki.1995@gmail.com">bio.saja.turki.1995@gmail.com</a>

### ABSTRACT

This study was conducted in the Molecular Biology Laboratory and the Central Laboratory - Tikrit University for a period of time with the aim of molecular characterization of Salmonella bacteria from 120 stool samples taken from children suffering from diarrhea, aged 1-60 months in the city of Tikrit, Iraq. DNA was extracted from samples previously diagnosed at the genus level based on the morphological characteristics of the colonies and biochemical tests. The diagnosis of bacterial isolates was also confirmed using the Vitek2 compact system.

The results showed the diagnosis of nine strains belonging to the type Salmonella enterica subsp. enterica GTG5 and TP RAPD PCR indicators, the presence of linkage regions and bands in all types of studies in a different manner, and thus it is possible to have closeness and genetic distance between the study samples according to the regions targeted in each indicator.

### Keywords:

Clinical Sources , Salmonella Enterica, Stool Sample

### التميط الوراثي للبكتريا المعزولة من مصادر سريرية باستخدام (GTG)5-PCR و TP-RAPD الملخص

أجريت هذه الدراسة في مختبر البايولوجي الجزيئي والمختبر المركزي -جامعة تكريت للمدة بهدف التوصيف الجزيئي لبكتيريا السالمونيلا Salmonella من 120 عينة براز مأخوذة من أطفال يعانون من الإسهال، بعمر 1-60 شهر في مدينة تكريت العراق. تم الـ DNA من العينات المشخصة سابقا على مستوى الجنس بالاعتماد على الصفات المورفولوجية للمستعمرات وعلى الاختبارات الكيموحيوية، كما تم تأكيد التشخيص العزلات البكتيرية باستعمال نظام التشخيص Vitek2 compact system.

أظهرت النتائج تشخيص لتسع سلالات تعود لتحت النوع Salmonella enterica subsp. enterica بؤشرات GTG5 and TP RAPD PCR وجود مناطق ارتباط وحزم في كل انواع الدراسة وبشكل متباين وبذلك يمكن وجود تقارب وبعد وراثي بين عينات الدراسة حسب المناطق المستهدفة في كل مؤشر.

## 1-1 المقدمة Introduction

يحدث الإسهال بسبب الإصابة بمسببات متعددة أهمها الفيروسات والبكتيريا والطفيليات والفطريات، وأنَّ تشابه أعراض الإصابة بين هذه المسببات يجعل من الصعوبة التمييز بينها، لذلك فإنَّ أغلب أسباب الإسهال لا يتم تحديدها بدقة، مما ينتج عنه استعمال مضادات حيوية غير مناسبة، وبالتالي يؤدي إلى ظهور سلالات مقاومة لتلك المضادات الحيوية كما هو الحال في حالات الإسهال الناتجة عن الإصابة بالسالمونيلا (Schatten and Eisenstark, 2015).

تعد السالمونيلا من مسببات الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء وتسبب ثلاث متلازمات سريرية مميزة وهي حمى التيفوئيد Typhoid fever والتهاب الأمعاء Gastroenteritis وتجرثم الدم Bacteremia. يوجد أكثر من 2610 نمط مصلي من السالمونيلا، التي تصيب مجموعة متنوعة من المضائف. تسبب السالمونيلا غير التيفية (NTS) Non-Typhoidal Salmonella بشكل رئيس التهاب المعدة والأمعاء في البشر، لكنها قد تسبب تجرثم الدم الحاد لدى الأطفال الصغار والمرضى الذين يعانون من نقص المناعة. تشير التقديرات إلى أنَّ حوالي 3.4 مليون حالة من حالات تجرثم الدم ناتجة عن الإصابة بالسالمونيلا غير التيفية تحدث كل سنة على مستوى العالم (Albert et al., 2019). تشير التقارير إلى أن 99% من عدوى السالمونيلا في البشر مرتبطة بالأنماط المصلية التي تعود إلى تحت النوع

ت	الجهاز	الشركة	المنشأ
---	--------	--------	--------

(Qamar et al., 2020) *Salmonella enterica* subspecies *enterica*.

يكون داء السالمونيلا أكثر شيوعاً لدى الأطفال دون سن الخامسة من العمر وفي البالغين الذين تتراوح أعمارهم بين 20 و30 سنة كذلك المرضى الذين يبلغون 70 سنة أو أكبر. تم تحديد حوالي 50 نمطاً مصلياً فقط من بين الأنماط المصلية التي تعود للنوع *S. enterica* باعتبارها من مسببات الأمراض البشرية. يعد النمط المصلي *S. Enteritidis* والنمط المصلي *S. Typhimurium* من أكثر الأسباب شيوعاً لتفشي داء السالمونيلا *Salmonellosis* المرتبط بتلوث الطعام (Ryan & Ray, 2010). تعد البيئات المحيطة بالمزارع مثل العلف والتربة والمياه والبراز مصادر شائعة للسالمونيلا، كما يؤدي توزيع السالمونيلا في المزارع إلى احتمالية تلوث الأطعمة التي تكون من أصل حيواني بالسالمونيلا المختلفة. تختلف أنماط السالمونيلا الموجودة في الطعام بشكل أساسي فعلى سبيل المثال، النمط المصلي *S. Enteritidis* والنمط المصلي *S. Typhimurium* شائعان في البيض (Hackett, 2015).

تشكل					
Italy	Asal S.R.L.	Autoclave	المؤصدة	1	
	Liton	pH-	جهاز قياس الاس الهيدروجيني Meter	2	
	Lab Tech		جهاز تقطير Distillator		
Germany	Sartorius	Sensitive Electronic	ميزان الكتروني حساس balance	6	
	Eppendorf	Eppendorf Centrifuge	جهاز طرد مركزي (أبندروف)	7	
	Writeg	Magnetic	مازج مغناطيسي stirrer	8	
	Memmert		Cooling centrifuge	جهاز طرد مركزي مبرد	9
			Incubator	حاضنة	10
			Shaker	حاضنة هزازة incubator	11
			Nanodrop	جهاز قياس تركيز ونقاوة DNA	12
		Vortex Mixer	مازج دوار	13	
	Water	حمام مائي bath	14		
Japan	Elekta	oven	فرن مايكروويف Microwave	15	
	Kelon		ثلاجة Refrigerator	16	
	Optima	UV	جهاز الأشعة فوق البنفسجية Transilluminator	17	
	sonny	Digital camera	كاميرا رقمية	18	
UK	MD-300N		جهاز ترحيل كهربائي Electrophoresis	19	
	Biolab	Thermo	جهاز التدوير الحراري Cycler	20	

معدلات الوفيات بسبب السالمونيلا المعوية قلق عالمي، ويأتي هذا القلق من مقاومة السالمونيلا للمضادات الحيوية التي تعد من أحد أهم عوامل ضراوتها التي تزيد صعوبة علاجها بالمضادات الحيوية، ومن ذلك فإن العزلات السريرية للسالمونيلا المقاومة للأدوية المتعددة تمثل مصدر قلق خطير للصحة العامة. ان الإنجاز الذي تحقق في البيولوجي الجزيئي وخاصة على الحامض النووي DNA، ادى الى استخدام المؤشرات الجزيئية بشكل واسع من اجل التتميط الوراثي للانواع البكتيرية المختلفة وايجاد العلاقة التطورية بينها.

إنّ هدف الدراسة الحالية هو ايجاد العلاقة الوراثية والبعد الوراثي بين انواع جنس السالمونيلا *Salmonella spp.* المسببة للإسهال عند الأطفال باستخدام مؤشرات TP- PCR و (GTG)5 PCR

**2: المواد وطرائق العمل****1-2 المواد****1-1-2 الأجهزة المستعملة**

استعملت الأجهزة المختبرية في الدراسة الحالية كما موضح في الجدول (1-3).  
الجدول (1-3) الأجهزة المستعملة والشركات المصنعة لها وبلد المنشأ.

**2-1-2 الأدوات المختبرية**

استعملت الأدوات المختبرية في الدراسة الحالية كما موضح في الجدول (2-3).

الجدول (2-3) الأدوات المختبرية المستعملة والشركات المصنعة لها وبلد المنشأ

المنشأ	الشركة	الأدوات	التسلسل
Germany	Eppendorf	Adjustable pipette	1 ماصة
		Eppendorf tubes	2 انابيب أبندروف
	Marine Feld	Glass ware	3 زجاجيات

**3-1-2 المواد الكيماوية**

استعملت المواد الكيماوية في الدراسة الحالية كما موضح في الجدول (3-3).

الجدول (3-3) المواد الكيميائية المستعملة والشركات المصنعة لها وبلد المنشأ

المنشأ	الشركة	المواد	ت
	GCC	NaOH	1 هيدروكسيد الصوديوم
		NaCl	2 كلوريد الصوديوم
		HCl	10 حامض الهيدروكلوريك
		Ethanol alcohol	11 كحول الإيثانول
	Geneaid	DNA Loading Buffer	23 داري تحميل
		Sucrose	سكروز
		DNA ladder	سلم DNA
		Red safe stain	صبغة الأحمر الامين
		SB	داري SB
		Agarose	أغاروز

#### 4-1-2 المحاليل Solutions

##### 1-4-1-2 محلول حامض الهيدروكلوريك (1N) HCl

حُضِر هذا المحلول بأخذ 8.4 مل من HCl بتركيز 37% بعدها تم اكمال الحجم الى 155 مل بإضافة الماء المقطر للحصول على محلول تركيزه 1 عياري. استعمل هذا المحلول لضبط الالاس الهيدروجيني pH للأوساط الزرعية والمحاليل.

##### 2-4-1-2 محلول هيدروكسيد الصوديوم (1N) NaOH

حُضِر هذا المحلول بإذابة 40 غم من NaOH في لتر من الماء المقطر للحصول على محلول تركيزه 1 عياري. تم استعمال هذا المحلول لضبط الأس الهيدروجيني pH للأوساط الزرعية والمحاليل.

#### 2-3 طرائق العمل

##### 1-2-3 جمع العينات Samples collection

جُمِعت 350 عينة براز من المراجعين لمستشفى صلاح الدين العام في تكريت الاطفال الذين كانوا يعانون من الإسهال، جُمِعت العينات خلال المدة من آذار 2019 إلى آذار 2020، بأخذ حوالي 1-2 غم من البراز، ثم وضعت العينات في علب نظيفة ومعقمة ذات غطاء محكم. بعدها كُتِب على العلب أسماء المرضى والعمر والتاريخ. بعدها زُرعت العينات بعد الجمع مباشرةً.

##### 2-2-3 العزل Isolation

تم عزل بكتيريا Salmonella وفقاً لما ورد في (England public health, 2018). زرعت عينات البراز Stool samples بأخذ حلقة مملوءة Full loop من البراز وزرعها في أنابيب اختبار معقمة حاوية على 5 مل من مرق السيلينايت Selenite broth، بعدها تم حضن الأنابيب عند درجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة. بعد مدة الحضنة وملاحظة النمو تم زرع حلقة مملوءة من العالق البكتيري على وسط XLD agar المحضر حسب تعليمات الشركة المصنعة، حضنت الاطباق عند درجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة. المستعمرات ذات اللون الوردي ذات مركز اسود، بعدها تم إعادة زرعها على نفس الوسط للحصول على عزلات نقية. بعدها تم إعادة زرع العزلات النقية على الوسط المغذي الصلب لحين استكمال تشخيصها.

##### 3-2-3 التشخيص Identification

شُخصت العزلات الى مستوى الجنس ومستوى تحت النوع عن طريق دراسة الصفات المظهرية لمستعمراتها على مجموعة من الاوساط Nutrient agar , MacConkey agar , HE agar , SS agar فضلاً عن ذلك تم إجراء مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية اللازمة للتشخيص . كما تم تأكيد التشخيص باستعمال جهاز Vitek 2 compact system ..

##### 4-2-3 حفظ العزلات البكتيرية Preservation of the Bacterial Isolates

###### 1-4-2-3 الحفظ قصير الأمد Short time preservation

تم تنمية العزلات البكتيرية على الوسط المغذي الصلب بشكل مائل Slant عند درجة 37 م° لمدة 24 ساعة بعدها حفظت في الثلاجة عند درجة 4 م°، استمرت ادامة العزلات بشكل دوري كل شهر من اجل الحصول على عزلات نشيطة طيلة مدة الدراسة وذلك عن طريق إعادة تنشيطها في مرق نقيع القلب والدماع في أنابيب معقمة والتحصين عند درجة 37 م° لمدة 24 ساعة (Collee et al, 1996).

##### 10-2-3 الدراسة الجزيئية Molecular Study

###### 1-10-2-3 استخراج الحمض النووي الجينومي Extraction of Genomic DNA

## Genomic DNA Purification Kit

أستعمل في هذه الدراسة الجزيئية مجموعة أدوات لتنقية الحامض النووي الجينومي

المصنع من شركة Promega في الولايات المتحدة الأمريكية لغرض استخلاص الحامض النووي DNA (Miller et al., 1988).

الجدول (7-3) محتويات عدة الاستخلاص

المحتويات	الكمية (μl)
محلول تحلل الخلايا	100
محلول تحلل الانوية	50
محلول ترسيب البروتين	25
محلول إعادة اماهة DNA	50
محلول انزيم RNase	250

## Extraction method 2-10-2-3 طريقة الاستخلاص

تم تحضير العينات البكتيرية المراد استخلاص حامضها النووي DNA، عن طريق تنمية مستعمرة مفردة من العزلة البكتيرية بعمر 24 ساعة في 10 مل من وسط لوريا السائل Luria broth بعدها حضنت العينات عند درجة 37 م° في حاضنة هزازة ولمدة 24 ساعة وبسرعة 120 دورة /دقيقة.

استخلص الحامض النووي DNA وفقا لتعليمات الشركة المصنعة (Miller et al., 1988).

- 1- تم وضع 1مل من مزرعة بكتيرية سائلة في انبوبة أبندروف Eppendorf tube بسعة 1.5مل.
- 2- وضعت الانابيب بجهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 13000-16000 xg لمدة دقيقتين وذلك لترسيب الخلايا بشكل حبيبة صغيرة pellet، بعد ذلك تم التخلص من السائل الرائق supernatant لغرض الحصول على الخلايا المترسبة في قعر الانبوبة.
- 3- أضيف 600 مايكرو لتر من محلول تحلل الانوية Nuclei Lysis Solution الى الخلايا التي تم ترسيبها في قعر الانبوبة. بعدها تم تعليق الخلايا باستعمال الماصة الدقيقة Micropipette.
- 4- تم حضن العينات عند درجة حرارة 80 م° لمدة 5 دقائق لغرض تحلل الخلايا، بعدها بردت العينات لدرجة حرارة الغرفة.
- 5- تم إضافة 3 مايكرو لتر من محلول انزيم RNase إلى الخلايا المحللة. ثم قلب الأنبوب 2-5 مرات لمزج المحتويات جيدا.
- 6- تم حضن العينات عند درجة حرارة 37 م° لمدة 15-60 دقيقة. بعد ذلك بردت العينات إلى درجة حرارة الغرفة.
- 7- تم إضافة 200 مايكرو لتر من محلول تحلل البروتينات إلى الخلايا المحللة التي تم معالجتها بإنزيم RNase، عن طريق استعمال المازج الدوار Vortex بعدها مزجت المحتويات بقوة على السرعة العالية لمدة 20 ثانية لمزج محلول ترسيب البروتينات Protein Precipitation Solution مع الخلايا المحللة.
- 8- تم حضن العينات على الجليد لمدة 5 دقائق.
- 9- وضعت العينات بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000-16000 xg لمدة 3 دقائق.
- 10- تم نقل السائل الرائق supernatant الحاوي على الحامض النووي إلى أنبوب أبندروف اخر سعة 1.5مل الحاوي على 600 مايكرو لتر من الأيزوبروبانول Isopropanol عند درجة حرارة الغرفة. من الممكن بقاء بعض السائل الرائق supernatant في الأنبوب الأصلي الحاوي على راسب البروتين، يجب ترك هذا السائل المتبقي في الأنبوب لتلافي حدوث تلوث محلول الحامض النووي بالبروتين المترسب.
- 11- تم مزج محتويات الانابيب وذلك بتقليبها بلطف لحين تشكل اشربة DNA التي تشبه الخيوط.
- 12- تم وضع العينات بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000-16000 xg لمدة دقيقتين.
- 13- تم تفريغ الأنابيب من السائل، كما تم التخلص من السائل الملتصق بحافة الأنابيب باستعمال ورقة ماصة نظيفة. بعدها اضيف الى الأنابيب 600 مايكرو لتر من كحول الايثانول بتركيز 70% عند درجة حرارة الغرفة، بعد ذلك قلبت الأنابيب بلطف عدة مرات لغرض غسل الحامض النووي.
- 14- وضعت العينات بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000-16000 xg لمدة دقيقتين، بعد ذلك تم التخلص من الكحول بسكبه بعناية.
- 15- باستعمال ورقة ماصة نظيفة تم التخلص من الكحول الملتصق بحافة الأنابيب. بعدها ترك DNA ليحفظ لمدة 10-15 دقيقة.
- 16- تم إضافة 100 مايكرو لتر من محلول إعادة تمييه الحامض النووي إلى الأنابيب. لغرض اكمال إعادة تمييه الحامض النووي بعدها حضنت الانابيب عند درجة 65 م° لمدة 1 ساعة مع مزج المحلول بشكل دوري عن طريق النقر بلطف على الأنبوب. كما تم إعادة تمييه الحامض النووي بحضن الانابيب عند درجة حرارة الغرفة أو في 4 م° لمدة 24 ساعة.
- 17- تم خزن الحامض النووي عند درجة حرارة 20- م°.

## 3-10-2-3 تقدير تركيز ونقاوة الحامض النووي

حددت تراكيز ونقاوة عينات الحامض النووي DNA عن طريق استعمال جهاز Nanodrop، تم استعمال الماء المقطر منزوع الأيونات لغرض التنظيف. ثم استعمل 1 مايكرو لتر من الحامض النووي الجينومي DNA لقياس الامتصاصية عند طول موجي 260 nm وذلك لتقدير تركيز الحامض النووي في ng/μl. بينما قدرت درجة النقاوة من خلال معرفة نسبة الامتصاصية (280 nm / 260 nm)، إن النسبة (~ 1.8) تكون مقبولة وتدل عموماً على درجة منخفضة من التلوث بالبروتين (Clark, 2005)

### 4-10-2-3 تحضير البادئات Primers Preparation

جهزت بادئات Primers الحامض النووي المذكورة في الجدول (3-8) والجدول (3-9) من قبل شركة ألفا Alpha في كندا، بشكل منتج مجفف Lyophilized product. تم وضع جميع البادئات في جهاز الطرد المركزي لبضع ثوان قبل الاستعمال، بعد ذلك تم إذابة البادئات بماء منزوع الأيونات معقم لغرض الحصول على التركيز النهائي لكل بادئ وهو 100 μM (محلول الخزين Stock solution)، بعدها أضيفت كمية من الماء المقطر لكل بادئ اعتماداً على ورقة البيانات التي أرسلت من قبل الشركة المجهزة تم اعداد محلول العمل بإضافة 10 مايكرو لتر من محلول الخزين إلى 90 مايكرو لتر من الماء المعقم منزوع الأيونات لغرض الحصول على محلول العمل للبادئ بتركيز 10 μM

الجدول (3-8) البادئات المستعملة للكشف عن بعض الجينات

الجينات Genes	تسلسل البادئات Primers sequence
TP RAPD	'F: 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3
	R: AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G
(GTG)5 PCR	'GTGGTGGTGGTGGT-3'-5

### 5-10-2-3 الترحيل على هلام الأكاروز Electrophoresis on agarose gel

#### 1-5-10-2-3 SB دارئ SB

تم تجهيز الدارئ SB كمحلول خزين stock solution من قبل شركة Promega الأمريكية بقوة 20X. وعند الاستعمال خفف بالماء المقطر لغاية 1X.

#### 2-5-10-2-3 دارئ التحميل Loading buffer

تم تحضير هذا الدارئ بإذابة 0.25 غم من Bromophenol blue، 30 مل من الجليسيرول في 50 مل من الماء المقطر، ثم ضبط الرقم الهيدروجيني pH إلى 8 عن طريق إضافة بضع قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بعيارية 1N بعدها أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر، ثم وضع في عبوة معتمة وحفظ عند درجة حرارة 4 م (Peter, 2019).

### 3-5-10-2-3 محلول التصبغ الامين الاحمر Red Safe Staining Solution

تم تجهيز المحلول كمحلول خزين Stock solution من شركة Promega الأمريكية بقوة 20000X، استعملت هذه الصبغة بمقدار 5 مايكرو لتر لكل 100 مل، ثم خزنت الصبغة في عبوة معتمة وحفظت عند درجة حرارة الغرفة.

### 4-5-10-2-3 تحضير هلام الأكاروز Agarose gel preparation

حضر قالب صب الهلام Gel tray الخاص بجهاز الترحيل الكهربائي، بعدها وضع المشط Comb الخاص لتكوين الحفر Wells على بعد 1 سم عن إحدى حافتي قالب الصب. تم استعمال الطريقة التي وصفها Sambrook and Ruseel (2001) لغرض تحضير هلام الأكاروز Agarose gel الأفقي المستعمل في الترحيل الكهربائي للحامض النووي الجينومي ومنتجات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Polymerase Chain Reaction. تم تحضير الهلام بتركيز 1 غم/ 100 مل في ترحيل الحامض النووي الجينومي وبتركيز 2 غم/ 100 مل في حالة ترحيل منتجات PCR. بعد ذلك أذيب الأكاروز في المحلول الدارئ SB بقوة 1X عند درجة الغليان وذلك بوضعه في فرن ميكروويف Microwave لمدة دقيقتين، بعدها ترك ليبرد إلى درجة حرارة 50 م. تم إضافة 5 مايكرو لتر من محلول التصبغ الامين الاحمر لكل 100 مل من هلام الأكاروز ثم سكب الهلام في القالب بلطف وبشكل مستمر وبهدوء لتجنب حدوث الفقاعات الهوائية التي يمكن ان تزال بالماصة إن وجدت، بعدها ترك الهلام ليتصلب لمدة 30-45 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة، ثم رفع المشط من الأكاروز المتصلب بهدوء ووضع القالب في حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على دارئ SB بقوة 1X بعدها غمر الهلام بالدارئ نفسه حتى يصل إلى ارتفاع 3-5 ملم فوق سطح الهلام.

### 5-5-10-2-3 الترحيل الكهربائي Electrophoresis

لترحيل الحامض النووي الجينومي تم مزج 3 μl من دارئ التحميل Loading buffer مع 1 مايكرو لتر من الحامض النووي الجينومي بتركيز 25-50 ng/μl، في حال اذا كان تركيز الحامض النووي الجينومي اقل من 25 ng/μl فقد تم مزج 3 μl من دارئ التحميل Loading buffer مع 2 μl من الحامض النووي الجينومي. بعد ذلك تم ملء الحفر بالمزيج بوساطة ماصة دقيقة Micropipette، بينما في ترحيل منتجات PCR تم ملء الحفر 5 μl من منتجات التفاعل. استعمل في الترحيل الكهربائي مع منتجات PCR سلم جزئي Molecular ladder بتدرجات مقدارها 100 bp (100bp DNA Lambda) الذي يستعمل كدليل للمقارنة، تم تحميله في الصف اليسار أو الصفين اليسار واليمين من الهلام. ضبط جهاز القدرة Power supply على 45 فولت وتيار 60 ملي امبير لمدة 10 دقائق في المرحلة الأولى، بينما في المرحلة الثانية فتم ضبط جهاز القدرة على 120 فولت وتيار 200 ملي امبير لمدة 50 دقيقة. يتم إيقاف الترحيل في حالة عند وصول الصبغة الزرقاء إلى ما قبل نهاية الهلام، وفي نهاية وقت الترحيل الكهربائي يفحص الهلام في غرفة مظلمة وذلك عن

طريق تعريضه للأشعة فوق البنفسجية وذلك بوضعه على جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV transilluminator عند طول موجي 260 نانوميتر ثم صور الهلام باستعمال كاميرا رقمية Digital camera. تم تقدير الحجم الجزيئي لقطع DNA وذلك بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل القياسي 100bp DNA Lambda (Pei et al.,2012).

### 3-2-10-6 تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Reaction

تم استعمال المزيج الرئيسي GoTaq® Green Master Mix في تفاعل البلمرة المتسلسل والمصنع من قبل شركة Promega الأمريكية. حيث يتكون هذا المزيج الذي هو محلول جاهز للاستعمال يتكون من انزيم Taq DNA polymerase ، 400µM dATP ، 400µM dGTP ، 400µM dCTP ، 400µM dTTP و 3mM MgCl<sub>2</sub> ودارئ التفاعل Reaction Buffer الحاي على مركب يزيد من كثافة العينة، والأصبغ الصفراء والزرقاء، والتي تعمل بمثابة أصباغ التحميل Loading dyes. عندما يتم ترحيل منتجات التفاعل عن طريق الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بتركيز 2%، فإن الصبغة الزرقاء blue dye تهاجر بنفس معدل قطع الحامض النووي DNA (بحجم من 3 إلى 5 كيلو زوج قاعدي)، أما الصبغة الصفراء Yellow dye فتهاجر بمعدل أسرع من البادئات Primers التي تكون بحجم اقل من 50 زوج قاعدي. تم إجراء جميع تفاعلات PCR في حجم 25µl في أنبوب أبندروف. وتم استعمال حجرة تدفق رقائقى Laminar flow cabinet مع مصباح الأشعة فوق البنفسجية لإعداد خليط التفاعل، وكانت جميع مكونات التفاعل محفوظة بالتجميد بشكل منفصل وتم استعمالها بالتركيز الأمثل. يبين الجدول (3-9) مكونات تفاعلات PCR

الجدول (3-9) يبين مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل

الحجم (µl)	المكونات
12.5	GoTaq Green Master Mix (2X) مزيج مكونات التفاعل (ماستر مكس)
8.5	Nuclease Free Water ماء خالي من النيوكليدات
2	DNA Template شريط DNA القالب
1	Forward Primer (10 µM) البادئ الامامي
1	Reverse Primer (10 µM) البادئ العكسي
25	Total volume الحجم الكلي

### 3-2-10-10 رسم الشجرة الوراثية

تم حفظ الصورة في الكمبيوتر وتم تسجيل البيانات على أنها 1 و 0 للنطاقات الحالية أو الغائبة بين اللعزلات العشر. بعد الكشف عن عدد وحجم العصابات مقارنة مع سلم الحمض النووي ، تم استخدام مصفوفة البيانات 0 أو 1 التي تم الحصول عليها من منتج PCR لحساب المسافة الجينية ببرنامج 1.8 (NTSYS) [Rohlf, 1993]. تم تنظيم مخطط الشجرة الوراثية باستخدام مصفوفة المسافة باستخدام طريقة مجموعة الزوج غير المتوازنة مع المتوسط الحسابي [UPGMA] [SENATH AND SOKAL, 1973].

### 4-1 عينة الدراسة Study sample

تم جمع 120 عينة براز Fecal samples من الأطفال المراجعين لمستشفى صلاح الدين العام في تكريت، الذين يعانون من الإسهال diarrhea خلال المدة من آذار 2019 إلى آذار 2020 للكشف عن أنواع السالمونيلا *Salmonella spp.* تراوحت أعمار المرضى ما بين 1-60 شهر..

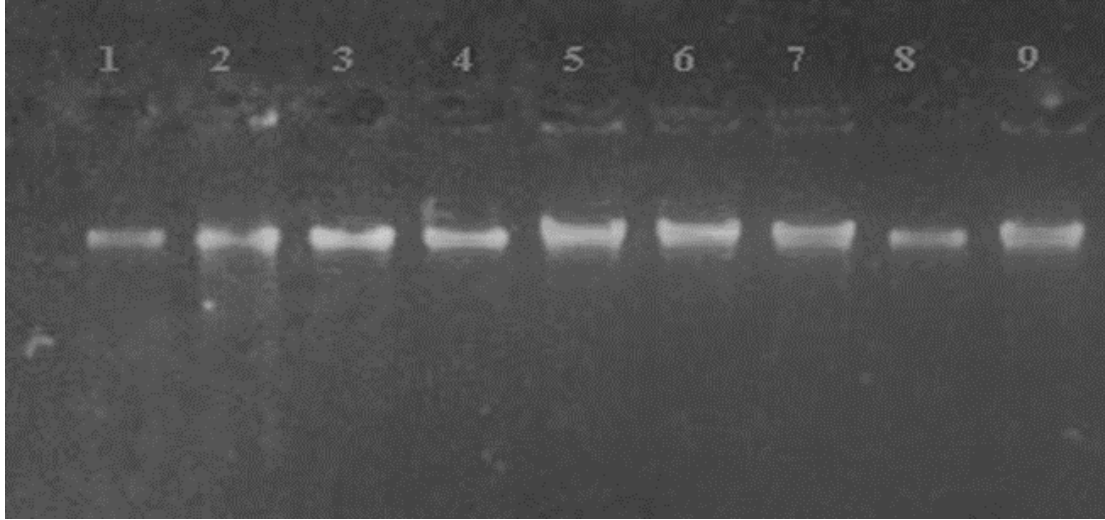
### 4-2 المحتوى الوراثي للسلاسل البكتيرية

#### 4-2-1 استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

أستخلص الحامض النووي الجينومي (الكروموسومي والبلازميدي) من سلاسل السالمونيلا المعزولة من براز أطفال بعمر 1-60 شهر والذين يعانون من الإسهال والبالغة 10 سلاسل. استعمل في إجراءات الاستخلاص مجموعة من المواد الكيميائية المكونة لمحاليل الاستخلاص، إذ إن كل مادة من هذه المواد تقوم بالتخلص من إحدى مكونات الخلية البكتيرية غير المرغوب فيها وبنفس الوقت تحافظ على الحامض النووي DNA بكونه الهدف من عملية الاستخلاص. تم التحقق من نجاح عملية استخلاص الحامض النووي بواسطة الترحيل الكهربائي للحامض النووي على هلام الأكاروز ذي التركيز 1%. بينت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز أن جميع العينات تحوي على الحامض النووي DNA كما في الصورة. تم تحديد تركيز ونقاوة عينات الحامض النووي المستخلص من سلاسل السالمونيلا باستعمال



مقياس الطيف الحيوي Nanodrop. عدلت تراكيز الحامض النووي الى التركيز (25ng/ $\mu$ l) باستعمال ماء مقطر منزوع الايونات والخالي من النيوكليوتيدات Free nucleotides. تم استعمال الحامض النووي بعد توحيد التركيز في تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR).



الصورة (1-4) ترحيل الحامض النووي DNA لسلاسل السالمونيلا على هلام الأكاروز بتركيز 1%.

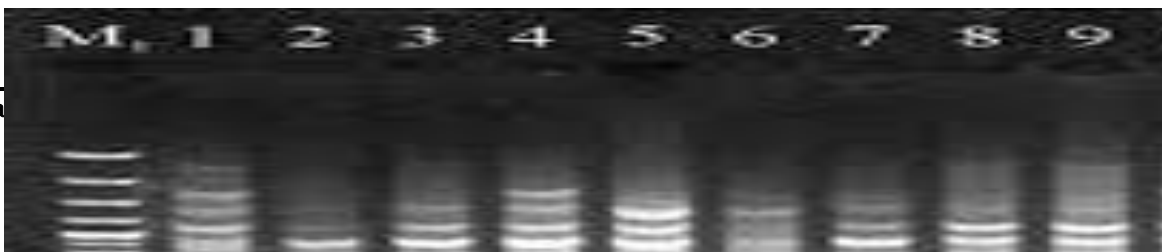
الجدول (4-8) تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA لسلاسل السالمونيلا

النقاوة	التركيز ng / $\mu$ l	السلاسل
1.56	65.5	1
1.49	73.2	2
1.68	57.0	3
1.71	44.3	4
1.65	75.8	5
1.52	91.2	6
1.80	111.7	7
1.59	94.6	8
1.72	98.7	9

#### 2-2-4 التشخيص الجزيئي Molecular identification

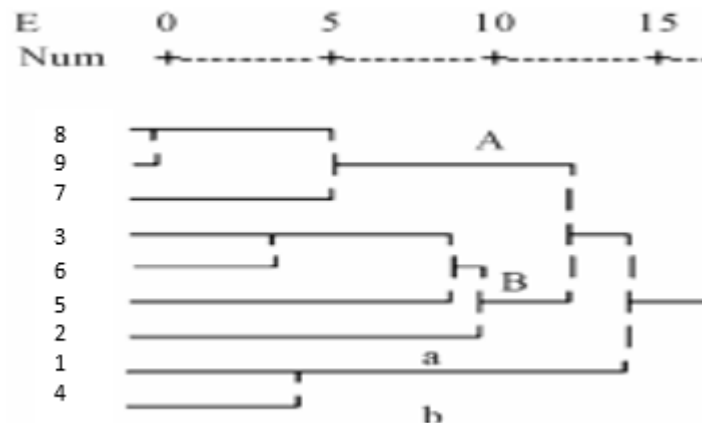
##### 1-2-2-4 نتائج مؤشر الـ TP-RAPD

أظهرت النتائج باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل والترحيل على هلام الأكاروز ذي التركيز 2% بأن جينوم كل سلالة من سلالات السالمونيلا المعزولة من براز الأطفال الذين يعانون من الاسهال يحتوي على عدد متباين من الحزم كما موضح على هلام الأكاروز وفي جميع السلالات بشكل حزمة تتراوح بين 180 bp الى 2600 bp . كما في الصورة ( 2-4 ) أي بنسبة ظهور 100% . اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي اجراها (Revas et al.,2001).



الصورة (2-4) نتائج مؤشر TP RAPD PCR لسلاسل السالمونيلا على هلام الأكاروز بتركيز 1.5 بينما اظهرت نتائج الشجرة الوراثية درجة القرب والبعد الوراثي بين عينات الدراسة وكما هو موضح في الشكل (3-4) اذ اظهر اقرب بعد وراثي بين العزلة 8 و9 واكبر بعد وراثي بين العزلتين 1 و8 ومن الملاحظ ان العزلات يمكن تقسيمها الى ثلاث مجاميع فرعية تتضمن المجموعة الاولى العزلات 1 و4 والمجموعة الثانية تضم العزلات 3 و5 و6 و2 بينما ضمت العزلة المجموعة الثالثة العزلتين 8 و9 و7.

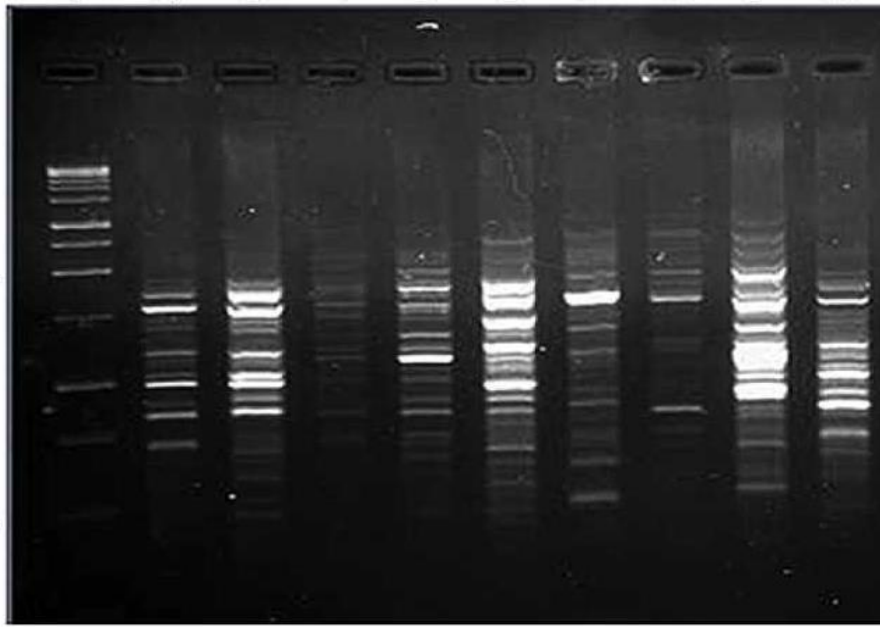
الشكل 3-4 : يمثل الشجرة الوراثية بالاعتماد على نتائج TP RAPD PCR



ويمكن تفسير الاختلاف في النتائج الى الاختلاف في تسلسل المادة الوراثية لتلك العينات وخصوصا الى اختلاف في الصفات الفسلجية والأمراضية والمقاومة لمضادات الحيوية والضرارة وغيرها من بقية الصفات التي لها اساس جيني وتتأثر بالبيئة بشكل والعوامل الاخرى مما ادى الى حدوث طفرات وتباين بين تلك العزلات.

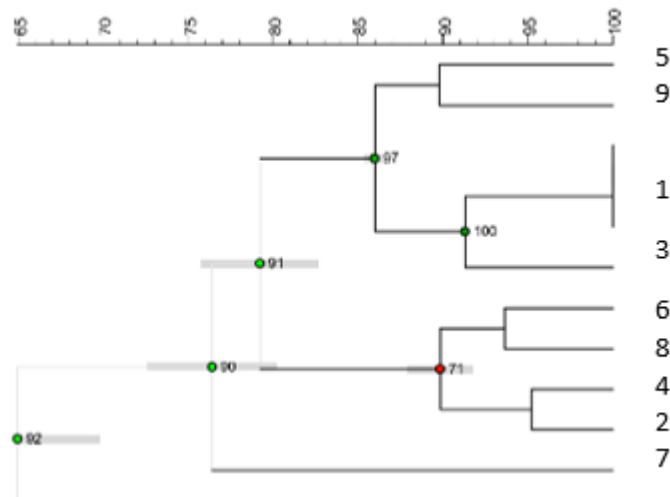
#### 2-2-2-4 نتائج مؤشر الـ PCR 5(GTG)

أظهرت النتائج باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل والترحيل على هلام الأكاروز ذي التركيز 2% بأن جينوم كل سلالة من سلالات السالمونيلا المعزولة من براز الأطفال الذين يعانون من الاسهال يحتوي على عدد متباين من الحزم كما موضح على هلام الأكاروز وفي جميع السلالات بشكل حزمة تتراوح بين 100 bp الى 1300 bp . كما في الصورة ( 4-4 ) أي بنسبة ظهور 100% . اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي اجراها (Kabori et al.,2022).



الصورة (4-4) نتائج مؤشر GTG5 PCR لسلاسل السالمونيلا على هلام الأكاروز بتركيز 1.5

بينما اظهرت نتائج الشجرة الوراثية درجة القرب والبعد الوراثي بين عينات الدراسة وكما هو موضح في الشكل (3-4) اذ اظهر اقرب بعد وراثي بين العزلة 2 و4 واكبر بعد وراثي بين العزلتين 1 و7 ومن الملاحظ ان العزلات يمكن تقسيمها الى ثلاث مجاميع فرعية تتضمن المجموعة الاولى العزلات 5 و9 و1 و3 والمجموعة الثانية تضم العزلات 6 و8 و4 و2 والمجموعة الثالثة تضم العزلة رقم 7.



الشكل 4-5 : يمثل الشجرة الوراثية بالاعتماد على نتائج GTG5 PCR

ويمكن تفسير الاختلاف في النتائج الى الاختلاف في تسلسل المادة الوراثية لتلك العينات وخصوصا الى اختلاف في الصفات الفسلجية والامراضية والمقاومة لمضادات الحيوية والضرارة وغيرها من بقية الصفات التي لها اساس جيني وتتأثر بالبيئة بشكل والعوامل الاخرى مما ادى الى حدوث طفرات وتباين بين تلك العزلات

المصادر

1. Abd El-Tawab, A. A.; Maarouf, A. A.; El-Hofy, F. I. and Abd El-Ghaffar, M. S. (2020). Bacteriological and Molecular Studies on Salmonella Isolated from Duckling Farms at Kaliobia, Egypt. *Benha Veterinary Medical Journal* 39: 169-174.
2. Albert, M. J.; Bulach, D.; Alfouzan, W.; Izumiya, H.; Carter, G. and Alobaid, K. (2019). Non-typhoidal Salmonella blood stream infection in Kuwait: Clinical and microbiological characteristics. *PLOS Neglected Tropical Diseases Journal* 13(4).
3. Al-Kubaisy, W.; Al Badre, A.; Al-Naggar, R. A. and Shamsidah, N. (2015). Epidemiological Study of Bloody Diarrhea among Children in Baghdad, Iraq. *Insight Medical Publishing Journal* 8(4), doi: 10.3823/1603.

4. Almashhadany, D. A. (2019). Occurrence and antimicrobial susceptibility of Salmonella isolates from grilled chicken meat sold at retail outlets in Erbil City, Kurdistan region, Iraq. *Italy Italian Journal of Food Safety* 8:8233 doi:10.4081/ijfs.2019.8233.
5. Beshiru, A.; Igbinsosa, I. H. and Igbinsosa, E. O. (2018). Biofilm formation and potential virulence factors of Salmonella strains isolated from ready to-eat shrimps. *PLOS ONE Journal* 13(9):1-22, doi.org/10.1371/journal.pone.0204345.
6. Borovinskaya, M. A.; Pai, R. D.; Zhang, W.; Schuwirth, B. S.; Holton, J. M.; Hirokawa, G. (2007). Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (8): 27-32. doi:10.1038/nsmb1271.
7. Brook, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (2004). Jawetz, Melnick and adelbergs Medical Microbiology 23rd ed. Mc Graw Hill Companies, Inc.
8. Burkinshaw, B. J. and Strynadka, N. C. J. (2014). Assembly and structure of the T3SS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Molecular Cell Research Journal* 1843(8): 1649-1663.
9. Burrowes, B.; Harper, D. R.; Anderson, J.; McConville, M. and Enright, M. C. (2011). Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy Journal* 9(9): 775-85.
10. Chessa, D.; Spiga, L.; De Riu, N.; Delaconi, P.; Mazzarello, V.; Ganau, G. and Rubinoa, S. (2014). Lipopolysaccharides Belonging to Different Salmonella Serovars Are Differentially Capable of Activating Toll-Like Receptor 4. *Infection and Immunity Journal* 82(11): 4553-4562.
11. Choi, Y.; Shin, H.; Lee, J. H. and Ryu, S. (2013). Identification and characterization of a novel flagellum-dependent Salmonella-infecting bacteriophage, iEPS5. *Applied Environmental Microbiology Journal* 79(16): 4829-4837.
12. Christensen, G.; Simpson, W.; Bison, A. and Beachy, E. (1982). Adherence of slime layer producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity Journal* 37(1): 318-326.
13. Chu, W.; Michele, L.; Erik, Z.; Jens, B.; Roland, Th. and Michael, K. (2019). Role of flagellar hydrogen bonding in Salmonella motility and flagellar polymorphic transition, *Journal of Molecular Microbiology* 112(5):1519-1530, doi:10.1111/mmi.14377.
14. Citorik, R. J.; Mimee, M. and Lu, T. K. (2014). Bacteriophage-based synthetic biology for the study of infectious diseases. *Current Opinion in Microbiology*, 19C, 59-69.
15. Clark, D. (2005). *Molecular Biology*. Elsevier Inc., Amsterdam. pp. 438-439.
16. Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996). "Practical microbiology " 4th Ed., short course, p.245-258.
17. Dahal, N. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in imported Chicken carcasses in Bhutan. Ph.D. thesis, Chiang Mai university.
18. Edgell, D. R.; Gibb, E. A. and Belfort, M. (2010). Mobile DNA elements in T4 and related phages. *Virology Journal* 7: 290.
19. Elbossaty, W. F. (2017). Antibiotic Drugs and Multidrug Resistance Bacteria. *International Journal of Public Health and Safety* 2(3):1-3.