الكشف عن الشِّيغِيلَّة في الحليب البقري الخام باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل

نور سليمان[١]، أيمن المريري[٢] و فائزة الأطرش[١]

[١]قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، [٢]قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، الطاقة الذرية السورية، دمشق، سورية

(الاستلام ١٣ كانون الثاني ٢٠١٩، القبول ٢٩ أب ٢٠١٩)

الخلاصة

الشِّيغِيلَّة جراثيم داخل خلوية قادرة على إصابة كل من الإنسان والحيوان. تُسبب بعض الأنواع التابعة لها وبخاصة الشِّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة، داءُ الشِّيغِيلاَّت المُستوطن في جميع أنحاء العالم ومسؤول عن ١٦٥ مليون حالة من حالات الإسهال الشديد المُدمم والبراز المخاطي. الهدف من هذه الدراسة هو ايجاد طريقة سريعة وحساسة للتحري عن الشِّيغِيلَّة في الحليب البقري الخام المُلوث بها. ومن أجل تحقيق هذا الهدف، جمعت ٧٠ عينة من عينات الحليب البقري الخام في أوعية معقمة وذلك لعزل الشِّيغِيلَّة وزراعتها على أوساط انتخابية، وتحديد صفاتها الشكلية والكيميا حيوية والجزيئية. قارنت هذه الدراسة ثلاث تقنيات مختلفة لاستخلاص الدنا من أجل إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل (استخلاص الدنا باستخدام عدة التشخيص، استخلاص الدنا بالطريقة القلوية، ترشيح الحليب). أظهرت نتائجنا أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل استطاعت الكشف عن الشِّيغِيلَّة في ١٥ حالة من أصل ١٥ بعد أن تمَّ ترشيح عينات الحليب، أي أنه يمكن أن تُعتمَّد تقنية المُرشح للكشف عن الشِّيغِيلَّة في الحليب المُلوث في المستقبل.

Detection of *Shigella* in raw bovine milk by polymerase chain reaction

N. Soulieman[1], A. Al-Mariri[2] and F. Al-Atrash[3]

[1,3] Plant Biology Department, Faculty of Sciences, University of Damascus, [2] Molecular Biology and Biotechnology Department, Atomic Energy Commission, Syria
Email: [1] noursoulieman@hotmail.com, [2] aalmariri@aec.org.sy, [3] Faizah55@yahoo.com

Abstract

Shigella is an intracellular bacterium can infect both human and animal. Its species especially *Shigella dysenteriae* cause shigellosis worldwide, with 165 million cases of severe bloody diarrhea and mucoid feces. The aim of this study was to find a rapid, sensitive and specific method for screening *Shigella* in raw bovine contaminated milk. For this goal, 70 samples of milk collected in sterile containers for isolating of *Shigella* and culturing it on selective media to identify and characterize its morphology, biochemical and molecular characteristics. This study was compared between three different DNA extraction techniques for polymerase chain reaction (direct DNA extraction using a kit, alkaline DNA extraction, and filtrated milk). Our results showed that PCR was able to detect *Shigella* in 15 out of 15 cases after the milk samples filtered. In other words, the filter technique can be used to detect *Shigella* in contaminated milk.

Keywords: Raw Milk, *Shigella dysenteriae*, Filtration, Polymerase chain reaction, PCR
Available online at http://www.vetmedmosul.com, © 2020, College of Veterinary Medicine, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

المقدمة

يوفر الحليب العناصر الغذائية الأساسية، حيث يحوي أكثر من ٨٧% ماء مع عناصر أخرى مذابة أو مستحلبة مثل السكريات، الفيتامينات العديدة A، D، E، C، B1، B2، B6، B12، البروتينات، الدهون، الكالسيوم، المغنيسيوم، السيلنيوم، الرايبوفلافين، حامض البانتوثنيك، وحامض الفوليك (١،٢). لهذا يؤدي الحليب دوراً هاماً بالنسبة للأطفال خاصةً وللسكان الذين

يعانون من دخل منخفض جداً ولا يستطيعون تناول اللحوم (٣). تؤثر العديد من العوامل على مكونات الحليب الأساسية مثل (العمر، الحالة الصحية للحيوان، والظروف المناخية والبيئية). إضافة إلى ذلك يوفر الحليب بيئة مناسبة لنمو الكائنات الحية الدقيقة (٤). حيث يسمح بنمو العفن والخمائر وطيف واسع من الجراثيم، وخاصة في درجات الحرارة فوق ١٦ مº. يتلوث الحليب بوساطة الميكروبات المنتشرة في الهواء والأعلاف ومعدات الحلابة وأدوات تخزين الحليب وعلى جلد الحيوان (٥) وتعد السَّلْمونيلَة والبروسيلَة والشِّيغِيلَّة من الجراثيم المُلوثة للحليب والأكثر تكراراً وذلك تبعاً لمركز الوقاية من الأمراض والسيطرة عليها (٦،٧).

هناك اهتمام كبير عند حدوث الأمراض بسبب الشِّيغِيلَّة، حيث تمتلك آليات خاصة للدفاع كونها من مسببات الأمراض داخل الخلوية، وعلى الرغم من وجود أنزيم البروتييز Protease وانخفاض الأس الهيدروجيني للسوائل في الأمعاء إلا أنها يمكن أن تبقى على قيد الحياة ساعة على الأقل في درجة الحموضة ٢,٥ (٨). تحدث العدوى بشكل مباشر بالشِّيغِيلَّة عن طريق تماس الأيدي المُلوثة بالبراز للفم وبشكل غير مباشر عن طريق تلوث الغذاء والماء بها (٩) ويمكن أن تحدث العدوى طوال العام، مع ملاحظة ازدياد تكرار الإصابة في الطقس الحار والجاف، أو المناخ عالي الرطوبة. تسبب بعض الأنواع التابعة لجنس الشِّيغِيلَّة داءُ الشِّيغِيلاَّت Shigellosis المستوطن في جميع أنحاء العالم والمسؤول عن ١٦٥ مليون حالة من حالات الإسهال الشديد المدمم والبراز المخاطي وذلك تبعاً لمنظمة الصحة العالمية (١٠،١١) فترة الحضانة تعتمد على النمط المصلي وتتراوح ما بين ١٢ ساعة إلى سبعة أيام، لكن عادة ما يكون من يوم إلى ثلاثة أيام (١٢).

تعد الشِّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة *S. dysenteriae* الشِّيغِيلَّةُ الفِلِكْسنرِيَّة *S. flexneri* وبائية في البلدان النامية وغالباً لدى الأطفال الذين تقل أعمارهم عن خمس سنوات فهي المسؤولة عن ٥ إلى ١٠% من حالات الإسهال لديهم وخاصةً في مناطق السكن العشوائي، والأخطر من ذلك أن ٢٥ % من جميع الوفيات المرتبطة بالإسهال سببها داء الشِّيغِيلاَّت (١٣). بينما تتواجد الشِّيغِيلَّةُ السُّونِيَّة *S. sonnei* و الشِّيغِيلَّةُ البُويدِيَّة *S. boydii* في البلدان المتقدمة وهي أقل إمراضيه للإنسان من تلك المستوطنة في البلدان النامية (١٤). أعراض الإصابة تتمثل بفقدان الشهية الشديد المترافق بفقدان الوزن وسوء التغذية، ونقص البروتينات وأملاح الصوديوم في الدم، وإسهال مستمّراً مصحوباً بالدم والمخاط والقيح يرافقه الحمى وتشنجات في المعدة (١٥). كما وتسبب تقرح في بطانة الأغشية المخاطية للأمعاء أو المستقيم مع التهاب وتلف الأنسجة. تستمَّر الأعراض الحادة لمدة أسبوعين تقريبًا، يحد العلاج بالمضادات الحيوية المرض ويمنع حدوث العدوى (١٦). لُوحظ أن مسببات الأمراض التي تنقلها الأغذية تؤدي إلى تفشي العدوى بغض النظر عن المنطقة التي جاءت منها. وبالتالي، يصبح الكشف السريع مهماً للحد من خطر انتشار العامل الممرض قبل حدوث الوباء. وقد تطورت تقنيات مختلفة لتحسين طرائق الكشف عنها، حيث يمكن دراسة الأحياء الدقيقة بطرائق تقليدية وأخرى كيميائية أو استخدام طرائق البيولوجيا الجزيئية (تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل). لذا كان الهدف من دراستنا هو إيجاد طريقة موثوقة وسريعة وحساسة ونوعية وفعّالة للتحري عن الشِّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة في عينات الحليب البقري الخام المُلوث بها.

المواد وطرائق العمل

الأوساط الزرعية

الشركة المُصنعة (HImedia- الهند، Roth- ألمانيا)، ماء الببتون الدارئ Buffered Pepton Water (BPW)، دارئ الفوسفات الملحي Phosphate buffered saline (PBS)، وسط إيوزين المثيلين الأزرق Eosin Methylen blue Agar (EMB)، وسط لوريا بيرتاني أكار Luria Bertani Agar (LB Agar)، وسط السالمونيلا-الشِّيغِيلَّة أكار *Sallmonella & Shigella* (SS Agar).

مواد الفحص المجهري والحركة

الشركة المُصنعة (Merck- ألمانيا)، صبغة غرام، وسط اختزال الكبريت- إنتاج الأندول- الحركة Sulfur (SIM) reduction-Indole production-Motility.

مواد الاختبارات الكيمياحيوية

الشركة المُصنعة (BD-الولايات المتحدة الأمريكية)، بيروكسيد الهايدروجين ٣%، شرائط الأوكسيداز (BBL™DrySlide™)، هايدروكسيد البوتاسيوم KOH، ألفا نفثول، وسط المثيل الأحمر- الفوكس برسكاور MR-VP، كاشف الأندول Indole test reagent (Kovacs)، وسط مولر هنغتون Mueller Hinton medium، وسط يوريا Urea، السكريات (الكلوكوز، السكروز، اللاكتوز، المالتوز، المانوز، التريهالوز، الأرابينوز، السيليبوز، الرافينوز).

مواد استخلاص الجينوم الجرثومي

الشركة المُصنعة (Sigma- الولايات المتحدة الأمريكية)، EDTA، 10% SDS، Tris-HCL/pH 8.0، محلول الاستخلاص القلوي (٠,٥ مول/لتر هيدروكسيد الصوديوم و٠,٠٥ مول/ لتر من سيترات الصوديوم)، بروتينيز K. الدارئ TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). دارئ الانحلال Lysis solution (8M Urea, 0.3M NaCl, 10 mM Tris HCl).

مواد تفاعل البلمرة المتسلسل والرحلان

الشركة المُصنعة (Thermo، Fermentas- الولايات المتحدة الأمريكية)، نكليوتيدات (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)، أنزيم DNA بوليميريز، $MgSO_4$، بادئات نوعية الجدول ١، هلامة

الأكاروز ٢% (W/V). دارئ 10X PCR: (200 mM Tris-HCl pH8.8, 100 mM KCl,100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1mg/ml BSA, 1 Triton%)، الدارئ 1X TAE المحضر من الدارئ 50X TAE: (0.4M Tris-Base, 10 mM EDTA pH 8.0, 57.1 ml Glacial Acetic Acid).

العينات المشمولة بالدراسة

جُمِعَت ٥٠ عينة من الحليب البقري الخام من محافظتي دمشق وريفها، كما جُمعت ٢٠ عينة غير ملوثة من بعض المراكز الحكومية في الفترة الواقعة ما بين ٢٠١٥/٩/١ حتى ٢٠١٧/٩/١. حيث وضعت كل عينة بعد أخذها مباشرة في أنبوب معقم سعة ١٥ مل مع حافظة ثلجية، ثمَّ أُرسلت إلى المختبر مباشرة من أجل العمل. تم حقن ٠,٥ مل من عينة الحليب البقري الخام في ٤,٥ مل وسط ماء البيتون الدارئ (BPW)، وحُضِنت بدرجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة، مع الهز بسرعة ١٨٠ دورة / دقيقة. حقن ١٠ مايكوليتر من الوسط السابق وزرع على أوساط انتخابية (وسط EMB، ووسط SS-Agar) ثمَّ حضنت بالدرجة ٣٧ °م لمدة ١٨ ساعة. ظهرت جراثيم الشِّيغِيلَّة النامية على وسط EMB ظهرت بشكل مستعمرات عديمة اللون أو بلون أصفر خفيف (١٧). وظهرت مستعمرات الشِّيغِيلَّة النموذجية على وسط SS-Agar، واضحة، عديمة اللون وشفافة. نقيت هذه المستعمرات من أجل تصبيغها. تُحضر المسحة الجرثومية ثمَّ تصبغ بصبغة غرام.

دراسة الحركة الجرثومية

أُجري باستعمال وسط SIM، وهو وسط يتكون من الببتون الدارئ المُضاف إليه كمية من الأكار ويضاف إليه أملاح التترازوليوم Tetrazolium Salts (وهو ملون حيوي يحافظ على الخلايا الجرثومية ويصبغها باللون الأحمر ولا يصبغ الوسط)، حيث يتمَّ التلقيح بطريقة الوخز، فإذا كان الجرثوم متحرك يُلاحظ تفشي اللون الأحمر بالوسط حسب حركة الجرثوم، أما إذا كان الجرثوم غير متحرك فيلاحظ اللون الأحمر مكان الوخز فقط (١٨).

الخصائص الكيمياحيوية

أُجرِيَت هذه الاختبارات بعد أن نُقيت المستعمرات النموذجية للشِّيغِيلَّة النامية على الوسط الانتخابي، وتأكيدها بالفحص المجهري ودراسة الحركة، مُستخدمين شاهد ايجابي للشِّيغِيلَّة في كل اختبار (تمَّ الحصول على السلالات العيارية المُستخدمة في هذه الدراسة من مختبر الأحياء المجهرية والمناعيات في هيئة الطاقة الذريّة السورية). وصُنفت هذه الاختبارات تبعاً لدليل بيرجي في تنميط الجراثيم. الاختبارات المُنجزة هي (١٩): اختبار الأوكسيديز Oxidase، اختبار الكاتاليز Catalase، اختبار تحلل اليوريا Urease، اختبارات التحلل البروتيني (اختبار إنتاج الأندول Indole Production Test، اختبار إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S، أختبار نزع الكربوكسيل من الأحماض الأمينية (Orinithene decarboxylase)، اختبارات تخمر السكريات، اختبار المثيل الأحمر MR والفوكس بروسكاور VP.

ترشيح الحليب

أجري تمَّرير لعينات الحليب عبر مُرشح (فلتر) ذي مسامية ٠,٤٥ مايكروليتر (٢٠)، ثمَّ زرع المُرشح على الوسط الانتخابي SS-Agar، ثمَّ وُضِعَت هذه الأوساط في الحاضنة في الدرجة ٣٧ °م لمدة ١٨ ساعة. أيضاً مررت عينة الشِّيغِيلَّة على المُرشح ثمَّ زُرِعَت على الأوساط كما ذُكر سابقاً كشاهد إيجابي. وكشاهد سلبي اختيرت عينة حليب خالية من الشِّيغِيلَّة. ثمَّ أُخذت مستعمرة من المرشح الذي على الوسط الانتخابي وذوبت في دارئ الانحلال وخضعت العينة إلى ثلاث دورات متتالية من التجميد-الإذابة، ثمَّ أضيف لها ٠,٦ ملغرام من بروتينيز K وحُضنت لمدة ساعة عند الدرجة ٣٧ °م ثمَّ تمَّ غلي العينة لمدة ١٠ دقائق (٢١).

استخلاص الدنا (من الحليب)

أُخذ ٥ مل من الحليب من أجل استخلاص الدنا منها، حيث تم إجراء الطرد المركزي للعينات على السرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق. تمَّ التخلص من الجزء الحاوي على مصل الحليب بواسطة الماكروبايبيت، ثمَّ أُجرِيَ استخلاص الدنا باستخدام طريقتين مختلفتين وذلك للراسب الباقي أسفل الأنبوب.

الاستخلاص المباشر للدنا باستخدام عدة التشخيص

يُحل الراسب في ٨٠٠ مايكروليتر من دارئ الانحلال و٥٠٠ مايكروليتر من SDS ١٠%، ويُكْمَل الحجم إلى ٣,٦ مل باستخدام دارئ الانحلال. تُحضن العينات أفقياً في حمام مائي حرارته ٣٧ °م واهتزازه ٢٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة. رُسبت العينة بسرعة ٥٠٠٠ دورة / الدقيقة لمدة ٣٠ دقيقة في حرارة الغرفة باستخدام جهاز الطرد المركزي، ويُعاد حل الراسب في ٣,٢ مل من موقي الـ PBS وتُحضن أفقياً في حمام مائي حرارته ٣٧ °م واهتزازه ٢٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة. رُسبت العينة بسرعة ٥٠٠٠ دورة / الدقيقة لمدة ٣٠ دقيقة في حرارة الغرفة، ويزال الراشح بحذر. يُحل الراسب في ٥٠٠ µl من الـ PBS ويُنقل إلى أنبوب إبندورف من أجل الغسيل. رُسبت بسرعة ٨٠٠٠ دورة / الدقيقة لمدة ٥ دقائق ويزال الراشح وتُعاد هذه الخطوة مرة ثانية. يُزال الراشح ويُحل الراسب في ٥٦٧ مايكروليتر من TE ويُستكمل الاستخلاص كما هو موضح ضمن النشرة الخاصة بهذه العدة التشخيصية. أخيراً يّحل الـ DNA في ٥٠ مايكروليتر من الدارئ TE.

استخلاص الدنا بالطريقة القلوية

أجريت الطريقة القلوية لاستخلاص الدنا المقترحة من قبل Daly وزملاؤه (٢٢)، حُل راسب الحليب في ١ مل من محلول

الاستخلاص القلوي. رُجَّ المزيج لمدة ١٠ دقائق، ثمَّ رسب لمدة ٥ دقائق بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة. ذوب الراسب وجرى تعليقه في ٥٠٠ مايكروليتر من Tris-HCL/pH ٨,٠ (٠,٥ مول/ لتر). رُسب المزيج لمدة ٥ دقائق بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة، أعيدت هذه المرحلة مرة أخرى. عُلق الراسب النهائي في ١٠٠ مايكروليتر من Tris-HCL/pH ٨,٠ (١٠ ميلي مول/ لتر)، و EDTA/ pH ٨,٠ (١ ميلي مول/ لتر). وُضِعَ المزيج في حمام جاف في الدرجة ١٠٠ م° لمدة ساعة كاملة. في النهاية، خضعت العينة إلى دورتين متتاليتين من التجميد - الإذابة، ورسبت لمدة ١٥ دقيقة بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة أُخِذَ الراشح لإجراء اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل.

تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل

حُضر مزيج التفاعل بحجم ٢٥ مايكروليتر يحتوي على مايكروليتر من الدنا وبإضافة ٢,٥ مايكروليتر من موقي التفاعل ١,٥ مايكروليتر من شوارد $MgSO_4$ (50 mM) و ٠,٥ مايكروليتر من dNTPs (٢٠ mM) و ١ مايكروليتر من البادئات النوعية الموضحة في الجدول ١ و ٠,٢ مايكروليتر من أنزيم Taq DNA polymerase، ثم أكمل الحجم باستخدام الماء المقطر. تم اختيار المورثتين *virB* و *rfpB* من أجل تمييز جنس الشِّيغِيلَّة ونوع الشِّيغِيلَّة الزُّحاريَّة على التوالي. أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل على العينات التي تمَّ تحضيرها أعلاه باستخدام البادئات النوعية الموضحة في الجدول ١.

الجدول ١: البادئات النوعية المستخدمة لتحديد الشِّيغِيلَّة

المرجع	الهدف	الطول	المورثة	التسلسل (5′-3′)	اسم البادئة
٢٣	*Shigella* spp.	504 bp	*virB*	AAG TTC TGA CGC GAT TGG TGT ACG CGA TCA AGA ATC CC	RB89-F RB90-R
٢٤	*S. dysenteriae*	211 bp	*rfpB*	TCT CAA TAA TAG GGA ACA CAG C CAT AAA TCA CCA GCA AGG TT	SdysD-F SdysD-R

توضع العينة بعد تحضيرها في الجهاز المخصص لإجراء التفاعل وفق ما يلي: خطوة التهيئة Initialization Step: ترفع درجة حرارة العينة إلى ٩٤-٩٥ م° مدة ٥ - ١٠ دقائق. خطوة تمسخ الدنا DNA Denaturation Step: يُحافظ على درجة حرارة العينة ٩٥ م° مدة ٣٠ - ٦٠ ثانية. خطوة تشافع الدنا DNA Annealing Step: تُخفض درجة الحرارة حتى ٥٠ م° لمدة ٣٠ ثانية. خطوة استطالة الدنا DNA Extension Step: تضبط درجة الحرارة في هذه الخطوة على ٧٢ م° مدة ٦٠ ثانية (تم إعادة الخطوات السابقة ٣٥ مرة). خطوة الاستطالة النهائية Extension Step: ضرورية لضمان حصول استطالة لكامل سلسلة الدنا المنفردة وتستمر لمدة ١٠ دقائق بالدرجة ٧٢ م°. إيقاف التفاعل: تُخفض درجة التفاعل حتى ٤ م°.

الترحيل الكهربائي للدنا على هلامة الأكاروز Agarose gel-electrophore

أُجري الاختبار حسب طريقة Lee وزملاؤه (٢٥) وثم تمَّ الاحتفاظ بالمستعمرات المؤكدة في ماء الببتون الدارىء مع الغليسيرول ٥٠%، ومن ثمَّ حُفِظت بالدرجة -٨٠ م° من أجل الدراسات اللاحقة.

النتائج

تلوث الحليب الخام البقري بالشِّيغِيلَّة

عزلت الشِّيغِيلَّة بعد تشخيصها في ١٥ عينة من أصل ٥٠ وذلك على أساس شكلها على الوسط الانتخابي، حيث ظهرت المستعمرات النموذجية للشِّيغِيلَّة على وسط الـ EMB بلون أصفر خفيف، وأحياناً عديمة اللون ولم تأخذ اللون الأحمر البنفسجي وذلك لأنها لم تخمر أي من اللاكتوز أو السكروز، كما ونمت على الوسط الانتخابي السالمونيلا- الشِّيغِيلَّة أكار بشكل مستعمرات شفافة غير ملونة وغير حاوية على مركز أسود، وهذا يدل على أنها غير مخمرة لسكر اللاكتوز وغير منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H_2S. نُقيت المستعمرات النموذجية من أجل تصبغها وإجراء الاختبارات الكيمياحيوية عليها.

دراسة الشكل والحركة

استخدم المجهر الضوئي لفحص الخلايا المأخوذة من المستعمرات النموذجية بعد تصبيغها بصبغة غرام. بدت الشِّيغِيلَّة تحت المجهر الضوئي بشكل عصيات سالبة الغرام، غير متبوغة. وبعد الزرع على الأكار نصف الصلب المضاف إليه أملاح التترازوليوم لدراسة الحركة، تبين أن جميع العزلات النموذجية التي تمَّت دراستها غير متحركة.

الاختبارات الحيوية الكيميائية

أُجريت الاختبارات الكيمياحيوية على ١٥ عزلة والتي نمت على الوسط الانتخابي. تشير نتائج هذه الاختبارات إلى أن الشِّيغِيلَّة المعزولة تابعة لأكثر من نوع. وهذا ما يتفق مع دليل بيرجي Bergey's Manual of Determinative Bacteriology والذي يُعدّ المرجع المعياري لتحديد هوية الجراثيم في المختبرات. يُوضح الجدول ٢ نتيجة هذه الاختبارات لمستعمرات نموذجية معزولة من الوسط الانتخابي للشِّيغِيلَّة.

تفاعل البلمرة المتسلسل

يُظهر الجدول ٣ أن تقنية الـ PCR استطاعت الكشف عن الشّيغِيلَّة في ١٥ حالة من أصل ١٥ بعد أن رشحت عينات الحليب، بينما شُخصت ١٣ عينة من أصل ١٥ عينة عندما استخلص الدنا DNA باستخدام الطريقة المباشرة بواسطة عدة التشخيص، وعندما أُستخدم طريقة استخلاص الدنا بالطريقة القلوية كشف عن الشّيغِيلَّة في ١٢ حالة من أصل ١٥، حيث بلغت الحساسية نسبة ١٠٠، ٨٦,٧ و٨٠% على التوالي. وكانت النتائج السلبية الكاذبة ١٥/٠، ١٥/٢، ١٥/٣ عند استخدام ترشيح الحليب، استخلاص الدنا مباشرة باستخدام عدة تشخيص، الطريقة القلوية لاستخلاص الدنا على التوالي. وكانت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل سالبة لجميع عينات الحليب البقري الخام (غير ملوث) حيث توافقت مع نتائج الزرع على الأوساط الانتخابية والتي لم تنمو عليها أي مستعمرة جرثومية نموذجية للشّيغِيلَّة (الجدول ٣).

الجدول ٢: نتائج الاختبارات الكمياحيوية للعزلة رقم 1 المعزولة من الحليب

العزلة	الاختبارات الحيوية الكيمائية									السكاكر								
	الحركة	الأوكسيداز	الكتالاز	اليوريز	الأندول	غاز كبريت الهدروجين	نزع الكربوكسيل	فوكس بروسكاور	المثيل الأحمر	الكلوكوز	اللاكتوز	المالتوز	المانوز	السكروز	تريهالوز	أرابينوز	سيليبيوز	رافينوز
Shigella *C+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
العزلة ١	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-

C+ : شاهد إيجابي (عزلة عيارية).

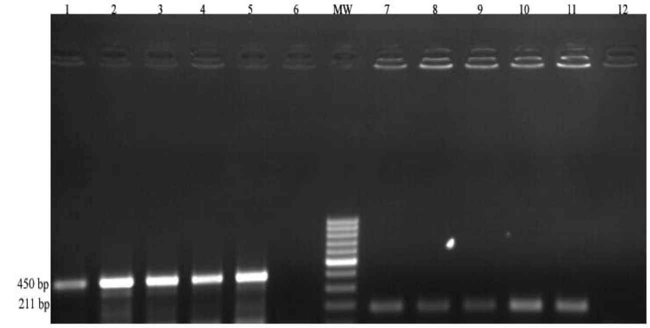
الجدول ٣: نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل للتحري عن الشّيغِيلَّة في عينات الحليب البقري الخام

عينة إيجابية [1]	عينة سلبية [2]	الحساسية	الاختبارات
١٥/١٥	١٥/٠	١٠٠%	ترشيح الحليب
١٥/١٣	١٥/٠	٩٠%	استخلاص الدنا مباشرة باستخدام عدة التشخيص
١٥/١٢	١٥/٠	٨٦%	الطريقة القلوية لاستخلاص الدنا

[1] نتائج زرع عينات محافظة دمشق وريفها على الأوساط الانتخابية ظهرت بنتيجة إيجابية.
[2] نتائج زرع عينات المركز الحكومي على الأوساط الانتخابية ظهرت بنتيجة سلبية.

يُوضح الشكل ١ نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل على المستعمرات النموذجية للشّيغِيلَّة في عينة الحليب المُلوثة، وذلك باستعمال البادئات النوعية لجنس الشّيغِيلَّة والبادئات النوعية لتمَّيز الشّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة.

يُلاحظ في العينة رقم ١ ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لدنا الشّيغِيلَّة العيارية (شاهد إيجابي) والتي يقارب طولها ٤٥٠ زوج قاعدي، بينما العينة رقم ٢ لدنا الشّيغِيلَّة العيارية بعد ترشيحها بمرشح ذو مسامية ٠,٤٥ مايكروميتر (شاهد إيجابي). بينما العينات ٣-٥ هي لدنا الشّيغِيلَّة المستخلصة من عينات الحليب الخام البقري باستخدام ثلاثة طرائق مختلفة، طريقة تمَّرير العينة على المُرشح، الطريقة المباشرة باستخدام عدة التشخيص لاستخلاص الدنا، الطريقة القلوية لاستخلاص الدنا على التوالي، العينة رقم ٧ ناتج التفاعل لدنا الشّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة العيارية مع بادئاتها النوعية والتي يقارب طولها إلى ٢١١ زوج قاعدي، والعينة رقم ٨ بنفس الطول لدنا الشّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة العيارية بعد ترشيحها بمرشح ذو مسامية ٠,٤٥ مايكروميتر (شاهد إيجابي). بينما العينات ٩-١١ نتيجة تضخيم دنا لشّيغِيلَّة زحارية المعزولة من الحليب الخام البقري باستخدام الطرائق الثلاثة السابقة. والعينات ٦ و١٢ هي عينتين خاليتين من الدنا مع بادئات كل من جنس الشّيغِيلَّة ونوع الشّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة (شاهد سلبي) لتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل.



الشكل ١: الترحيل الكهربائي لهلامة لأكاروز ١,٥% المضاف إليها اثيديوم برومايد وتظهر نتائج اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل. الرقم ١: دنا لعينة شِيغِيلَّة عيارية، الرقم ٢: دنا لعينة شِيغِيلَّة بعد تمَّريرها على المُرشح ، الرقم ٣، ٤، ٥: عينات دنا لشِيغِيلَّة معزولة من عينات حليب باستخدام ثلاثة طرائق مختلفة (طريقة تمَّرير العينة على المُرشح والطريقة المباشرة باستخدام عدة التشخيص والطريقة القلوية لاستخلاص الدنا، الرقم ٦: عينة بدون دنا (شاهد سلبي)، MW: عبارة عن الدليل الحجمي لعينة دنا ذات الوزن 100-bp، الرقم ٧: دنا لعينة شِيغِيلَّة زحارية عيارية، الرقم ٨: دنا لعينة شِيغِيلَّة زحارية بعد تمَّريرها على المُرشح ، الرقم ٩، ١٠، ١١: عينات دنا للشِيغِيلَّة الزُّحارِيَّة المعزولة من عينات حليب باستخدام الطرائق السابقة، الرقم ١٢: عينة بدون دنا (شاهد سلبي).

المناقشة

إن مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية تسبب عدد كبير من الأمراض في جميع أنحاء العالم وبتكرار أعلى في البلدان النامية. فهي ذات تأثير اقتصادي وصحي لذلك من المهم الحد من انتشارها، بواسطة الكشف المبكر عنها (٢٦). الجهاز الهضمي هو أحد أكثر الأجهزة التي تدخل عبرها الجراثيم إلى جسم الإنسان لتسبب العديد من الأمراض المنقولة بالغذاء. يمكن لهذه الممرضات أن تدخل من خلال الأطعمة والمياه الملوثة أو الحليب غير المبستر. وبالتالي، من المهم اكتشاف وجودها قبل دخولها إلى الجسم وحدوث عدوى خطيرة (٢٧). الشِّيغِيلَّة مُعدية بدرجة عالية حيث تُسبب العدوى بجرعة صغيرة جداً، وقُدّرت جرعة العدوى infectivity dose (ID) بعدد قليل من الجراثيم قد يصل إلى ١٠-١٠٠ جرثومة (٢٨) والتي عند وصولها الى الجهاز الهضمي للإنسان، تتكاثر في الأمعاء وبعدها تغزو بطانة القولون مُحدثة الالتهابات المعوية بإنتاجها للذيفانات الداخلية، ولا تزال العدوى بها واسعة الانتشار في بلدان العالم النامي ومن بينها عدد من البلدان العربية، أما في البلدان الصناعية المتقدمة فقد أصبحت حالات نادرة الحدوث ومستوردة من البلدان النامية أثناء السفر أو الإقامة بها.

هناك طلب كبير لإيجاد طرائق سريعة وحساسة ومحددة ودقيقة للكشف عن مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية. كانت الطرائق التقليدية القائمة على زراعتها من البروتوكولات القياسية الذهبية. ومع ذلك، فإنها تستغرق ما يصل إلى أسبوع لإعطاء النتيجة المطلوبة. كما ويمكن للتقنيات الجزيئية مثل تفاعل البلمرة المتسلسل أن تساعد في الكشف عن هذه الممرضات وتحديد أنواعها ومع ذلك، فإن هناك عيب رئيس في PCR وهو عدم قدرته على التمييز بين الحمض النووي للخلايا الميتة أو الخلايا القابلة للحياة، وهذا هو عامل حاسم بالنسبة لصناعة المواد الغذائية وللمستهلك (٢٩). العديد من الأبحاث استخدمت مورثات الفوعة للشِّيغِيلَّة عند التحري عنها باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل مثل *virA, virB, set1A, set1B, ipaH, ial, rfpB* (٣٠-٣٢) وقد تم اختيار المورثتين *virB* و *rfpB* لتشخيص الشِّيغِيلَّة كجنس ونوع الزُّحارِيَّة على التوالي. بشكل عام، تتمَّثل المزايا الرئيسية لتفاعل البلمرة المتسلسل في أنها تقنية سريعة وحساسة حيث يمكن أن تصل حدود كشف الدنا إلى حد الفيمتوغرام Femtograms ($١٠^{-١٥}$غ) (٣٣). أوضح Dutta وزملاؤه (٣٤) والباحث Lindqvist (٣٥) أن تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدية لها حدود كشف أقل من طرائق الزرع التقليدية، لذلك حاولنا في دراستنا دمج الطريقتين لنصل لحساسية ونوعية ١٠٠%.

في دراستنا الحالية حاولنا استخدام طريقة تعتمد على ترشيح العينة عبر مُرشح ذو مسامية ٠,٤٥ مايكروميتر ومن ثمَّ الزرع على وسط انتخابي وإجراء تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات نوعية لجنس الشِّيغِيلَّة ونوع الشيغلة الزُّحارِيَّة، وذلك للوصول لطريقة بسيطة وسريعة ومحددة الغاية ذات نوعية وحساسية ١٠٠% والتي يمكن لها التحري عن أنواع الشِّيغِيلَّة بعينات الحليب مهما كان تركيزها منخفضاً بدون نتائج إيجابية كاذبة أو سلبية كاذبة. هذه الطريقة التي لا ينتج عنها أي نتيجة سلبية خاطئة تسمح للتحري عن الشِّيغِيلَّة ولو بعينة واحدة إن وُجدت، وخاصةً إذا علمنا أن منظمة الفاو تعتبر جميع العينات إيجابية إذا كانت عينة وحيدة إيجابية (٣٦). تمَّكننا هذه الطريقة من التحري عن الشِّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة بنسبة ١٠٠% وموثوقة بدون نتائج إيجابية كاذبة.

الاستنتاجات

نستنتج من هذه الدراسة أن استخدام الترشيح للحليب ثم الزرع على الوسط الانتخابي وإجراء تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل عليها هي طريقة موثوقة للتحري عن الشِّيغِيلَّة الزُّحارِيَّة ولأول مرة بسورية (على حد علمنا). هذه الطريقة تسمح لنا بالتحري عن العامل الممرض خلال ٤٨ ساعة بحساسية ونوعية ١٠٠%.

الشكر والتقدير

لقسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية في هيئة الطاقة الذرية السورية وقسم علم الحياة النباتية في جامعة دمشق، سوريا.

المصادر

1. Bobe G, Lindberg GL, Freeman AE, and Beitz DC. Short communication: composition of milk protein and milk fatty acids is stable for cows differing in genetic merit for milk production. J Dairy Sci. 2007;90:3955-3960. DOI :10.3168/jds.2007-0099
2. Glantz M, Mansson HL, Stalhammar H, Barstrom LO, Frojelin M, and Knutsson A. Effects of animal selection on milk composition and processability. J Dairy Sci. 2009;92:4589-4603. DOI: 10.3168/jds.2008-1506
3. Murphy SC, Martin NH, Barbano DM, Wiedmann M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: how do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. J Dairy Sci. 2016;99:10128-10149. DOI: 10.3168/jds.2016-11172
4. Alrabadi NI. The effect of freezing on different bacterial counts in raw milk. Inter J Biol. 2015;7:9-12. DOI: 10.5539/ijb.v7n4p9
5. Doyle MM, Garcia S, Bahati E, Karamuzi D, Cullor JS, Nandi S. Microbiological analysis of raw milk in Rwanda. Afr J Food Sci Technol. 2015;6:141-143. DOI: 10.14303/ajfst.2015.053
6. Kouame, SM, Makita K, Costard S, Grace D, Dadie A, Dje M, Bonfoh B. Hazard identification and exposure assessment for bacterial risk assessment of informally marketed milk in Abidjan, Cote d'Ivoire. Food Nutr Bull. 2012;33:223-234. DOI: 10.1177/156482651203300402
7. Foods linked to foodborne illness [Internet]: Centers for Disease Control and Prevention: 2018. [cited 2018 April 19]. Available from: http://cdc.gov/foodsafety/foods-linked-illness.html/
8. Zaika LL, Phillips JG. Model for the combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on survival of *Shigella flexneri* strain 5348 under aerobic conditions. Inter J Food Microbiol. 2005;101:179-187. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.004
9. Jesudason MV. *Shigella* isolation in Vellore, South India (1997-2001). Indian J Med Res. 2002;115:11-13. PMID: 12424931
10. Traa C, Munos, M, Black R. Antibiotics for the treatment of dysentery in children. Inter Epidemiol. 2010;39:70-74. DOI: 10.1093/ije/dyq024
11. Williams PH, Berkley J. Dysentry (Shigellosis): Current WHO guidelines and the WHO essential medicine list for children. November 2016. Available from: ttps:// www .who. int/ selection _ medicines/committees/expert/21/applications/s6paed_antibiotics_appendix5_dysentery.pdf).
12. Missouri Department of Health and Senior Services. Shigellosis. 2017. available from: https:// health. mo.gov /living /healthcondiseases/communicable/communicabledisease/cdmanual/pdf/*Shigella*.pdf
13. Von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Hyejon Lee H, Wang M, Thiem VD, Canh DG, Chaicumpa W, Agtini MD, Hossain A, Bhutta ZA, Mason C, Sethabutr O, Talukder K, Nair GB, Deen JL, Kotloff K, Clemens J. A multicenter study of *Shigella diarrhoea* in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. PLoS Med. 2006;3(e353):1556-1569. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030353
14. Li YL, Tewari D, Yealy CC, Fardig D, M'ikanatha NM. Surveillance for travel and domestically acquired multidrug-resistant human *Shigella* infections-Pennsylvania, 2006-2014. Health Secur. 2006;14:143-51. DOI: 10.1089/hs.2016.0026
15. Taneja N, Khurana S, Verma AD, Sharma M. Changing trends in Shigellosis at a tertiary care center. Indian J Pathol Microbiol. 2003;46:280-281. DOI: 10.4103/0971-5916.187104
16. Taneja N, Lyngdoh VW, Sharma M. Haemolytic uraemic syndrome due to ciprofloxacin-resistant *Shigella dysenteriae* serotype 1. J Med Microbiol. 2005;54:997-998. DOI:10.1099/jmm.0.45993-0
17. Lampel KA, Sandlin R. *Shigell*a. Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed. New York: Elsevier Press; 2003. 5261-5268 p.
18. Shields P, Cathcart L. Motility test medium protocol. Am Soc Microbiol. 2016;1(1):1-10.
19. Souleman N, Al-Mariri A, Hamad. Isolation of *Klebsiella* spp. from bovine raw and identification using polymerase chain reaction. J Biotechnol Res. 2013;13:112-122.
20. Peterkin P, Sharpe A. membrane filtration of dairy products for microbiological analysis. Appl Environ Microbiol. 1980;39:1138-1143.
21. Al-Mariri A, Haj-Mahmoud N. Detection of *Brucella abortus* in bovine milk by polymerase chain reaction. Acta Vet. 2010;79:277-280. DOI: 10.2754/avb201079020277
22. Daly P, Collier T, Doyls S. PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. Lett Appl Microb. 2002;34:222-226. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01074.x
23. Binet R, Deer DM, Uhlfelder SJ. Rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive Escherichia coli in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay. Food Microbiol. 2014;40:48-54. DOI: 10.1016/j.fm.2013.12.001
24. Ojha SC, Yean Yean C, Ismail A, Singh KK. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. Biomed Res Int. 2013;20(13):70-79. DOI: 10.1155/2013/412370
25. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. J Vis Exp. 2013;62:3791-3923. DOI: 10.3791/3923
26. Cantas L, Suer K. The important bacterial zoonoses in "one health" concept. Front Public Health. 2014;2:144. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00144
27. World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. In Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015.Available form: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-cha-who-estimates global-foodborne-diseases.pdf.
28. Phalipon A, Sansonetti PJ. *Shigella* 's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival. Immunol and Cell Biology. 2007;85:119-129. DOI:10.1038/sj.icb7100025
29. Zeng D, Chen Z, Jiang Y, Xue F, Li B. Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. Front Microbiol. 2016;7:1833. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01833
30. Thong KL, Hoe SL, Puthucheary SD, Yasin R. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. BMC Infect Dis. 2005;14:5-8. DOI: 10.1186/1471-2334-5-8
31. Gao X, Zou T, Mu Z, Qin B, Yang J, Waltersperger S, Wang M, Cui S, Jin Q. Structural insights into *VirB*-DNA complexes reveal mechanism of transcriptional activation of virulence genes. Nucleic Acids Res. 2013;41(22):29-41. DOI: 10.1093/nar/gkt748

32. Campbell FX, Sachse M, Sansonetti PJ, Parsot C. Escape of actively secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3-positive vacuoles formed during cell-to-cell spread is facilitated by *IcsB* and *VirA*. Mol Biol. 2015;6(3):7-14. DOI: 10.1128/mBio.02567-14
33. Priyomka B, Patil R, Dwarakanath S. A review on detection methods used for foodborne pathogens. Indian J Med Res. 2016;144:327-338. DOI: 10.4103/0971-5916.198677
34. Dutta S, Chatterjee A, Dutta P, Rajendran K, Roy S, Pramanik KC, Bhattacharya SK. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhea in Calcutta, India. J Med Microbiol. 2001;50:667-674. DOI:10.1099/0022-1317-50-8-667
35. Lindqvist R. Detection of *Shigella* spp. in food with a nested PCR method sensitivity and performance compared with a conventional culture method. J Appl Microbiol.1999;86:971-978. DOI:10.1046/j.13652672.1999.00777.x
36. Lin W, Cheng C, Van KH. Quantitative PCR assay for rapid detection of *shigella* species in fresh produce. J Food Prot. 2010;73(2):221-233. DOI:10.4315/0362-028x-73.2.221