



جامعة حلب
كلية الزراعة
قسم علوم الأغذية

تحديد بعض الأنواع المختلفة لجنس السالمونيدا المنقولة عن طريق الغذاء

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في قسم علوم الأغذية

إعداد المهندسة الزراعية

حنان محمد قربي

إشراف

المشرف المشارك	المشرف الرئيسي
الدكتور أديب حسن فالح	الدكتور أحمد رمزي دباغ
أستاذ في قسم علوم الأغذية	أستاذ في قسم علوم الأغذية
كلية الزراعة - جامعة حلب	كلية الزراعة - جامعة حلب

بالتعاون مع

الدكتور مصطفى بغدادى

مديرية الشؤون الصحية

مجلس مدينة حلب

٢٠٠٨/١٤٢٩

فهرس المحتويات

الصفحة	الموضوع
١	فهرس المحتويات
٣	فهرس الجداول
٥	فهرس الأشكال
٦	ملخص الدراسة
٩	المقدمة والدراسات المرجعية
١٥	الخصائص الجرثومية للسالمونيلا
١٦	العوامل المؤثرة في نمو ونشاط جراثيم السالمونيلا
١٧	شروط بقاء جراثيم السالمونيلا حية
١٨	شروط منع نمو جراثيم السالمونيلا وتنشيطها
٢٠	أشكال الإصابة بالسالمونيلا عند الإنسان
٢٢	مصادر عدوى الإنسان بالسالمونيلا
٢٣	الوبائية Epidemiology
٣١	الصادات الحيوية
٣٣	أنواع الصادات الحيوية
٤٦	جهاز التتميط الجرثومي Multiskan EX
٤٨	الهدف من الدراسة
٤٩	مواد وطرائق الدراسة
٤٩	مواد الدراسة
٥٢	المواد اللازمة لإجراء التتميط الجرثومي باستخدام جهاز Multiskan EX

الصفحة	الموضوع
٥٤	طرائق الدراسة
٥٤	مراحل العمل
٥٤	المرحلة الأولى
٥٦	المرحلة الثانية
٥٧	المرحلة الثالثة
٥٨	المرحلة الرابعة
٦٣	المرحلة الخامسة
٦٦	<u>النتائج</u>
٦٦	نتائج المرحلة الأولى ومناقشتها
٧٤	استنتاجات المرحلة الأولى
٧٦	نتائج المرحلة الثانية ومناقشتها
٧٧	استنتاجات المرحلة الثانية
٧٩	نتائج المرحلة الثالثة ومناقشتها
٨١	نتائج المرحلة الرابعة ومناقشتها
٨٩	نتائج المرحلة الخامسة ومناقشتها
١٠٠	الاستنتاجات
١٠٢	التوصيات
١٠٣	المراجع
١١٧	الملخص الأجنبي

فهرس الجداول

الصفحة	الموضوع
١٢	الجدول (١) أنواع جنس السالمونيلا
٤٢	الجدول (٢) النسبة المئوية للمقاومة الوحيدة أو المتعددة التي تبديها السالمونيلا
٦٠	الجدول (٣) التفاعلات الكيميائية التي تتم داخل صفيحة الـ Micronaut-E
٦١	الجدول (٤) التفاعلات الكيميائية في حجات الصفيحة الدقيقة ونتائجها المميزة بالعين
٦٥	الجدول (٥) الصادات الحيوية التي تحتويها الصفيحة Micronaut-SB ورمزها
٦٧	الجدول (٦) مستعمرات السالمونيلا في الأوساط المختلفة لـ ٢٠ عينة من مدينة
٦٨	الجدول (٧) مستعمرات السالمونيلا في الأوساط المختلفة لـ ٢٠ عينة من مدينة إدلب
٦٩	الجدول (٨) مستعمرات السالمونيلا في الأوساط المختلفة لـ ٣٠ عينة من مدينة حلب
٧١	الجدول (٩) مستعمرات السالمونيلا في الأوساط المختلفة لـ ٣٠ عينة من مدينة حلب
٧٢	الجدول (١٠) مستعمرات السالمونيلا في الأوساط المختلفة لـ ٣٠ عينة من مدينة حلب
٧٣	الجدول (١١) معامل الارتباط بين أوساط الزرع الجرثومي في المرحلة الأولى
٧٩	الجدول (١٢) اختبار الأندول و اليورياز لتأكيد وجود السالمونيلا
٨٢	الجدول (١٣) نتيجة التفاعلات الكيميائية للعينات (٤،٣،٢،١)
٨٣	الجدول (١٤) نتيجة التفاعلات الكيميائية للعينات (٨،٧،٦،٥)
٨٣	الجدول (١٥) نتيجة التفاعلات الكيميائية للعينات (١٢،١١،١٠،٩)
٨٤	الجدول (١٦) نتيجة التفاعلات الكيميائية للعينات (١٦،١٥،١٤،١٣)
٨٤	الجدول (١٧) نتيجة التفاعلات الكيميائية للعينات (٢٠،١٩،١٨،١٧)
٨٥	الجدول (١٨) نتيجة التفاعلات الكيميائية للعينة (٢١)
٨٨	الجدول (١٩) تنميط سبعة أنواع من جنس السالمونيلا تبعاً لصفاتهما الكيميائية
٩٠	الجدول (٢٠) تحسس <i>S. arizonae</i> للصادات الحيوية والحد الأدنى المثبط للنمو

الصفحة	الموضوع
٩١	الجدول (٢١) تحسس <i>S. choleraesuis</i> للصادات الحيوية والحد الأدنى المثبط للنمو
٩٢	الجدول (٢٢) تحسس <i>S. paratyphi B</i> للصادات الحيوية والحد الأدنى المثبط للنمو
٩٣	الجدول (٢٣) تحسس <i>S. pullorum</i> للصادات الحيوية و الحد الأدنى المثبط للنمو
٩٤	الجدول (٢٤) تحسس <i>S. typhimurium</i> للصادات الحيوية والحد الأدنى المثبط للنمو
٩٥	الجدول (٢٥) تحسس <i>S. enteritidis</i> للصادات الحيوية والحد الأدنى المثبط للنمو
٩٧	الجدول (٢٦) تحسس <i>S. gallinarum</i> للصادات الحيوية والحد الأدنى المثبط للنمو
٩٩	الجدول (٢٧) مقاومة أنواع السالمونيلا للصادات الحيوية

فهرس الأشكال

الصفحة	الموضوع
١٣	الشكل (١) جراثيم السالمونيلا
١٥	الشكل (٢) شكل جراثيم السالمونيلا
٢١	الشكل (٣) الأغذية المسببة للتسمم بالسالمونيلا
٤٦	الشكل (٤) جهاز Multiskan EX المستخدم في الدراسة
٤٩	الشكل (٥) عينات دجاج اللحم المدروسة
٥٢	الشكل (٦) صفيحة Micronaut-E للكشف عن المعويات
٥٥	الشكل (٧) جراثيم السالمونيلا على أطباق الأوساط الزرعفة
٥٥	الشكل (٨) نتائج الاختبار على وسط TSI
٥٨	الشكل (٩) لمواد المستخدمة في التتميط الجرثومي للسالمونيلا
٧٧	الشكل (١٠) نمو مستعمرات السالمونيلا على وسط SSA بعد التتميط
٧٨	الشكل (١١) مستعمرات نموذجفة من السالمونيلا على وسط BS
٨١	الشكل (١٢) صفيحة Micronaut-E بعد عملية التتميط الجرثومي

ملخص الدراسة

تعد السالمونيلا من أكثر الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء شيوعاً. وموطنها الطبيعي هو القناة الهضمية للإنسان والحيوان. يوجد ما يزيد عن ٢٥٠٠ نوعاً تابعاً لهذا الجنس، جميعها يسبب مرض السالمونيلا المشترك للإنسان والحيوان إلا النوع *Salmonella typhi* الذي يصيب الإنسان فقط مسبباً له الحمى التيفية.

وتعد الدواجن ومنتجاتها من أهم مصادر عدوى الإنسان بالسالمونيلا والتي تنتمي إلى فصيلة الجراثيم المعوية Enterobacteriaceae.

وإن استعمال الصادات الحيوية بكميات كبيرة في معظم دول العالم المتقدمة للأغراض الطبية أو لإضافتها للمواد الغذائية والأعلاف الحيوانية أدى إلى ظهور صفة مقاومة جراثيم السالمونيلا لهذه الصادات، مما سبب مشاكل كثيرة في العالم، لذا كان الهدف من البحث التحري عن جراثيم السالمونيلا في عينات من دجاج اللحم الطازج المأخوذة من الأسواق المحلية لكل من محافظتي إربل وحلب، والكشف عن حجم التلوث بها وتصنيفها باستخدام الأوساط الزرعية الانتقائية، بإتباع الطريق الأحدث في التتميط الجرثومي لجراثيم جنس السالمونيلا ودراسة تحسسها للصادات الحيوية باستخدام جهاز Multiskan EX، وتمييز أنواع السالمونيلا المقاومة والحساسة للصادات الحيوية مع تحديد التركيز الأدنى من الصاد الحيوي MIC المثبط لنمو هذه الجراثيم.

استخدمت في الدراسة ٥٠ عينة من دجاج اللحم الطازج، كانت منها ٢٠ عينة من

أسواق إدلب المحلية و ٣٠ عينة من أسواق حلب المحلية. واستخدمت أوساط زرعية غير إنتقائية (متخصصة) [ماء الببتون الدارئ (الموقىء)، ووسط سيلينايت السيستين]، وأوساط زرعية إنتقائية (TSI -EMB-LIA-KIA-BSA -HEA -XLD -SSA).

كما استخدم جهاز التتميط الجرثومي Multiskan EX المزود ببرنامج MCN٦ من إنتاج شركة MERLIN الألمانية لقراءة وتقويم اختبارات التتميط والتحسس الجرثومي باستخدام صفائح دقيقة Micronaut-E خاصة بالتتميط الجرثومي و صفائح دقيقة Micronaut-SB خاصة بالتحسس الجرثومي للصادات الحيوية.

بينت نتائج المرحلة الأولى للتحري عن جراثيم السالمونيلا في ٥٠ عينة مختبرة من دجاج اللحم بأن نسبة العينات السلبية للسالمونيلا في عينات محافظة إدلب كانت ٤٠ %، وفي عينات محافظة حلب ٢٠ % . وكان وسط SSA هو الوسط الأكثر قابلية لنمو السالمونيلا، حيث أعطى معدل نمو سريع للمستعمرات خلال ٢٤ ساعة من التحضين مقارنة مع الأوساط الزرعية الأخرى.

في المرحلة الثانية تم استبعاد العينات السلبية للسالمونيلا (١٦ عينة)، ونشطت العينات الموجبة للسالمونيلا (٣٦) باستخدام وسط السيلينايت سيستين مما أدى إلى الزيادة والوضوح في عدد مستعمرات السالمونيلا النامية على الأوساط الزرعية المستعملة، مما سهل تمييزها جيداً والحصول على المستعمرات النقية بعملية التخطيط على سطح الأوساط. وتم في المرحلة الثالثة إجراء الاختبارات الكيمياحيوية التأكيدية مثل اختبار

اليورياز والأندول والحصول على ٢١ عينة ايجابية للسالمونيلا من أصل ٣٦ عينة، منها ٧ عينات من محافظة إدلب و ١٤ عينة من محافظة حلب.

بينت نتائج التتميط وجود سبعة أنواع تابعة لجنس السالمونيلا سلبية للأندول واليوريا ولا تملك أنزيم التريبتوفان داي أميناز وأنزيم بيتا كسايلوسيداز وأنزيم بيتا جلوكورونيداز، وجميع الأنواع لا تخمر السكروز والأدونيتول والإنيتول.

بلغت نسبة الإصابة في عينات دجاج اللحم بجراثيم *S. typhimurium* (٤٢,٨%) وللنوع *S. enteritidis* (٢٨,٥%)، وللنوع *S. paratyphi B* (٩,٥%) أما الأنواع الأخرى *S. gallinarum*, *S. arizonae*, *S. choleraesuis*, *S. pullorum* فتواجدت بنسبة واحدة هي (٤,٨٧%).

وأظهرت نتائج التحسس للصادات الحيوية أن الأنواع السبعة مقاومة للصاد الحيوي Chloramphenicol و Ciprofloxacin عدا *S. gallinarum*. وأن جميع الأنواع كانت مقاومة لـ Kanamycin إلا النوع *S. paratyphi B*، ومقاومة لـ Azithromycin عدا النوعين *S. enteritidis* و *S. gallinarum*، و مقاومة لـ Fusidic acid عدا *S. choleraesuis* و *S. gallinarum*، وكانت جميع الأنواع حساسة لـ Imipenem و Ofloxacin، عدا *S. paratyphi B*، وانفرد النوع *S. arizonae* بمقاومة الصادات الحيوية Penicillin - Oxacillin - Erythromycin - Cefuroxime. أما بالنسبة لتركيز الصاد الحيوي الأدنى المثبط للنمو MIC فتميز بارتفاع قيمته مما يشير إلى ارتفاع مقاومة أنواع السالمونيلا للصادات الحيوية.

المقدمة والدراسات المرجعية:

يعد الغذاء عاملاً ضرورياً للحياة، ووظيفته الأولى هي المحافظة على هذه الحياة، وعندما يتلوث الغذاء بإحدى الطرق المختلفة فإنه يصبح هادماً لهذه الحياة ويمكن أن يكون ساماً. فالتسمم الغذائي يحدث نتيجة تلوث الغذاء بأنواع مختلفة من الجراثيم أو ذيفاناتها عند تناول الأطعمة الملوثة. وتعد جراثيم السالمونيلا من أهم الجراثيم المسببة للأمراض المعدية المعوية التي تصطنع ذيفاناتها الداخلية في الجسم بعد تناول الغذاء الملوث بها، حيث تنمو فيه دون أن تسبب أي تغير في مظهر الغذاء ورائحته وطعمه، ومن هنا تنشأ خطورة الإصابة بها، إذ يصبح الغذاء نفسه وسيلة للعدوى (إبراهيم باشا، ١٩٩٠).

يعد مرض السالمونيلا من أكثر الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء شيوعاً، ويشكل عبئاً كبيراً على الصحة العامة وتكلفة اقتصادية ضخمة. ويوجد ما يزيد على ٢٥٠٠ نوع من السالمونيلا معظمها يسبب المرض للإنسان (WHO, ٢٠٠٥).

تعد القناة الهضمية للإنسان والحيوان الموطن الطبيعي للسالمونيلا، وقد عرف الماء والأغذية التي تتحدر من مصادر حيوانية وسائل لنقل هذه الجراثيم التي تعد - بجميع أنواعها- ممرضة للإنسان. وتعتمد درجة ضراوة السالمونيلا على السلالة، وقابلية الشخص للإصابة بحسب حالته الصحية، وقد تكون السالمونيلا متكيفة أو غير

متكيفة مع العائل، مع العلم أن معظم أنواع السالمونيلا غير متكيفة مع العائل، وهذا يعني أنها تحمل بوساطة حيوانات مختلفة، وأقل من ١% من سلالات السالمونيلا المعروفة مرتبطة بعائل، وأنواع محددة منها مرتبطة بحيوانات محددة أو بالإنسان.

كما يعد الإنسان مصدراً للسالمونيلا التيفية *S. typhi* والسالمونيلا باراتيفية *S. paratyphi A*، وإن السالمونيلا بللورم *S. pullorum* والسالمونيلا جاليناروم *S. gallinarum* هما النوعان المسؤولان عن الإسهال الأبيض العصوي، وتيفوئيد الطيور على التوالي في الدواجن (ولا يوجد هذان النوعان عموماً في حيوانات أخرى أو في الإنسان)، و *S. choleraesuis* مرتبطة بالخنزير و *S. dublin* مرتبطة بالمواشي، و *S. abortusequi* مرتبطة بالخيول، وهناك العديد من الأنواع التابعة للسالمونيلا والتي لها عوائل محددة (كلايفر، ٢٠٠٢).

وتتبع جراثيم السالمونيلا التصنيف العلمي التالي:

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: Salmonella (Tindall et al., ٢٠٠٥)

ووفقاً لـ CDC فإن جنس السالمونيلا يتضمن نوعين، وكل منهما يتضمن العديد من الأنواع المصلية، وهذان النوعان هما *S. bongori* و *S. enterica*.

تتنتمي السالمونيلا إلى فصيلة الأمعائيات (المعويات) Enterobacteriaceae التي تضم أكثر الجراثيم انتشاراً في الطبيعة، والتي أمكن التمييز بين أجناسها اعتماداً على خواصها الكيمياحيوية، ومن أهم الصفات المشتركة بين أجناس هذه الفصيلة:

- عصيات سلبية الغرام متشابهة بالشكل، غير متبوعة، متحركة بوساطة سياط محيطية أو عديمة الحركة، ذات محفظة أو عديمة المحفظة (الكبسولة).
- هوائية لا هوائية مخيرة.
- تنمو في الأوساط العادية لعدم حاجتها إلى عوامل نمو خاصة.
- سلبية الأوكسيداز.
- ترجع النترات إلى النتريت.
- تخمر الغلوكوز مع أو بدون إطلاق غاز (يوسف، ٢٠٠٥).

يعرف حالياً أكثر من ٢٥٠٠ نوع من الأنواع التابعة لجنس السالمونيلا المعروفه (Popoff et al., ٢٠٠٤) وقد تغيرت تسمية جنس السالمونيلا كثيراً، واتفق في الآونة الأخيرة على أن جنس السالمونيلا يضم نوعان *S. bongori* و *S. enterica*. ويقسم

S. enterica إلى ستة تحت أنواع، وتتنمي معظم أنواع السالمونيلا المعروفة إلى النوع

S. enterica (Tindall et al., ٢٠٠٥).

وكانت تسمى جراثيم السالمونيلا بحسب اسم العالم المكتشف لها، ثم أصبحت

تسمى بحسب المكان الذي اكتشفت فيه لأول مرة وفق تسمية كوفمان وايتس مثل

سالمونيلا نيويورك، سالمونيلا يافا، سالمونيلا القدس، سالمونيلا القاهرة، أما العالم ايوينغ

Ewing فقد قسم هذا الجنس إلى ثلاثة أنواع ممرضة هي:

١- السالمونيلا التيفية *Salmonella typhi*.

٢- السالمونيلا نظيرة التيفية *Salmonella paratyphi A&B*.

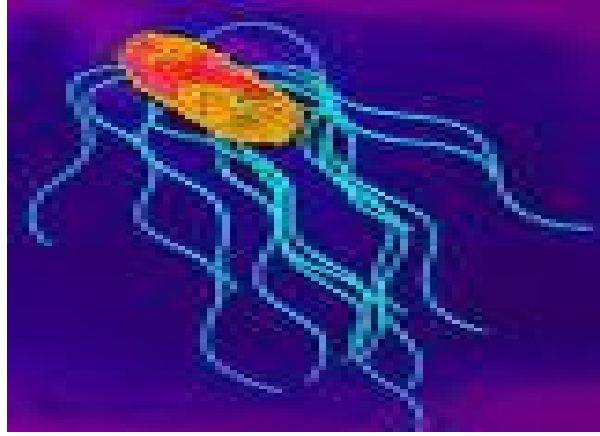
٣- السالمونيلا الملتهبة للأمعاء *Salmonella enteritidis* (بلاش، ٢٠٠٥).

الجدول (١) أنواع جنس السالمونيلا

Usual habitat	No. of serotypes within subspecies	<i>Salmonella</i> species and subspecies
Warm-blooded animals	١,٤٥٤	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)
Cold-blooded animals and the environment	٤٨٩	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)
Cold-blooded animals and the environment	٩٤	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)
Cold-blooded animals and the environment	٣٢٤	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)
Cold-blooded animals and the environment	٧٠	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)

Cold-blooded animals and the environment	١٢	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Indica</i> (VI)
Cold-blooded animals and the environment	٢٠	<i>S. bongori</i> (V)
	٢,٤٦٣	Total

(Kauffmann; ١٩٥٢, Brenner; ١٩٩٨).



الشكل (١) جراثيم السالمونيلا

أعطيت جميع الأنواع المصلية الموجودة ضمن الأنواع الفرعية أسماء قبل عام ١٩٦٦ باستثناء الأنواع (IIIa) و (IIIb). وهذه التسمية الرسمية اللاتينية قد لا تكون مفهومة بشكل واضح من قبل الأطباء وأخصائيي الوبائيات، لذا قام المركز المتعاون مع منظمة الصحة العالمية في عام ١٩٦٦ بتسمية الأنواع المصلية باسم واحد فقط في النوع الفرعي من أجل التوافق مع البيانات القديمة المتعارف عليها في الممارسة الطبية وتسهيل كتابة التقارير الطبية وكمثال على ذلك بدلاً من كتابة النوع *Salmonella enterica*

Salmonella subsp. *enterica* serotype typhimurium أصبح يكتب *typhimurium* أو *S. typhimurium* (Brenner., ١٩٩٨), (Bopp et al., ١٩٩٩), (Brenner& McWhorter., ١٩٩٨).

وجد أن ٥٩٪ من الأنواع المصلية التابعة لجنس السالمونيلا والتي يبلغ عددها ٢٤٦٣ تنتمي إلى نوع *S. enterica* subsp *enterica* فهي الأكثر شيوعاً، ويعود حوالي ٩٩٪ من حالات العدوى بالسالمونيلا في الانسان وذوات الدم الحار إلى ذلك النوع (Popoff., ١٩٩٧).

يوجد خمس خطوات مشتركة بين الطرق المستخدمة للتعرف على جراثيم السالمونيلا وعزلها في الأغذية وهي:

١. التمهيد للنمو في وسط زرعية غير انتقائية.
٢. تنشيط نمو جراثيم السالمونيلا في وسط زرعية مكثرة للسالمونيلا ومثبطة لغيرها من الجراثيم.
٣. عزل السالمونيلا بوساطة التخطيط على سطح الآغار.
٤. التصنيف الكيميائي الحيوي للعزلات مثل: اختبار اليورياز، والليسين داي كربوكسيلاز، وإنتاج الأندول، وتخدير اللاكتوز والسكروز، واختبار فوكس بروسكار، وغيرها من الاختبارات الكيميائية.

Selenite Cystine broth), and specialized cultures (BSA-HEA-XLD-SSA-TSI-EMB-LIA-KIA).

Multiskan Ex provider of software from MERLIN (German. company production) used to read and evaluate the tests, using Micronaut-E for identification, and Micronaut-SB for antibiotic susceptibility.

The results of first stage of Salmonella investigating in ٥٠ samples showed the percentage of negative Salmonella samples was ٤٠% in Idleb, and ٢٠% in Aleppo. SSA is the best culture for Salmonella growth, gave a rapid colonies growth rate within ٢٤ hours of incubation compared with other cultures

In second stage we excepted negative Salmonella samples (١٦), and enriched (٣٦) positive samples by using Selenite-Cystine Broth, which leading to increase the number and clarity of grew Salmonella colonies on used cultures, making it easier to distinguish and access to clean colonies by planning process on the culture surface.

In the third stage biochemical tests has been done to identify genus such as urease and indole tests. and access to (٣١) samples of positive Salmonella out of (٣٦) samples, it was including (٧) samples from Idleb, and (١٤) samples from Aleppo. Serotyping results showed presence of seven species of Salmonella genus negative for Indole and Urease, do not have TDA, ONPX, PGUR enzymes, all species do not ferment sucrose, Adonitol , Inositol, and the presence

of *S. typhimurium* rate was (٤٢,٨%), *S. enteritidis* (٢٨,٥%), *S. paratyphi B* (٩,٥%), and either *S. choleraesuis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. arizonae* were (٤,٨٧%).

The results of antibiotics susceptibility showed that seven strain were resistance to Chloramphenicol and Ciprofloxacin except *S. gallinarum*. all species were resistance to Kanamycin except *S. paratyphi B*, and all species resistance to Azithromycin except *S. enteritidis* and *S. gallinarum*, and resistance to Fusidic acid except *S. choleraesuis* and *S. gallinarum*, and all species were sensitive to Imipenem, Ofloxacin , except *S. paratyphi B*, *S. arizonae* was resistant to antibiotics: Oxacillin-Penicillin- Erythromycin- Cefuroxime. for the minimum inhibitory concentration MIC, it had high values, which indicating a high *Salmonella* resistance to antibiotics.

University of Aleppo
Faculty of Agriculture
Department of Food Sciences



Serotyping some Different Species for Salmonella Genus which Transmitted by Food.

**Thesis has been submitted for the degree of Master
in Agriculture Engineering
(Food Science)**

By

Eng. Hanan Muhamad Kurabi

Under supervisor

Dabbagh Ahmad Ramzi

Dept. of Food Science
Faculty of Agriculture
University of Aleppo

Adib Hasan Faleh

Dept. of Food Science
Faculty of Agriculture
University of Aleppo

In collaboration

Dr. Mustafa Baghdadi

Dep. Of Health Affairs
Consul of Aleppo City