تحضير أوساط زرعية محلية لتنمية جرثومة Salmonella typhi

محسن أيوب عيسى
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة الموصل

بشرى دلي حمد
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل

الاستلام ١١ / ١١ / ٢٠٠٧

القبول ٠٣ / ٠٣ / ٢٠٠٨

Abstract

This study deals with the ability of preparing local culture Media which can be used as a suitable replacement of Blood agar medium used for diagnosis of *Salmonella typhi* by using some of plant and animals extracts as fish, dates and Alfalfa extracts. fish and dates extracts were used together to prepare a local medium, the study showed that the optimum proportions were (70)% fish extracts and (30)% dates extracts and other medium consists of fish and alfalfa extracts with an optimum proportions of (70)% fish extracts and (30)% alfalfa extracts, it selective and differential media were prepared and used to isolate and identify *Salmonella typhi.*

الخلاصة

تتضمن الدراسة إمكانية تحضير وسط زرعي محلي ممكن ان يكون بديلاً ملائماً لوسط اكار الدم لتنمية و تشخيص جرثومة *S.typhi* وذلك بالإفادة من بعض المستخلصات النباتية والحيوانية منها مستخلص التمر ومستخلص الجت ومستخلص السمك اذ استخدم مستخلص التمر والسمك على حدة وأظهرت الدراسة ان النسبة المثلى لتحضير الوسط تتكون من (٧٠) % من مستخلص السمك (٣٠) % من مستخلص التمر كانت الافضل وحضر وسط اخر من مستخلص السمك والجت وكانت النسبة الامثل لتحضيرها (٧٠) % من مستخلص السمك و (٣٠) % من مستخلص الجت اذ حضرت اوساط انتخابية وتفريقية واستخدمت لعزل هذهالجرثومة وتشخيصها.

المقدمة

نالت الأوساط الزرعية المخصصة لتنمية جراثيم السالمونيلا وخاصة *S.typhi* اهتماما كبيراً من الباحثين من اجل تهيئة الاوساط الزرعية التفريقية والانتخابية لهذه الجرثومة لأهميتها الصحية ، مرت هذه الأوساط في مراحل مخت لفة من التطور لعمل أوساط جديدة وأخرى محورة ومطورة سواء الانتخابية منها أو التفريقية (١ و ٢ و ٣ و ٤). تعد جرثومة *S.typhi* المسبب للحمى التايفوئيدية typhoid fever احدى المشكلات الصحية الرئيسة في العالم وخاصة في الدول النامية اذ تنتشر هذه الإصابة على نحو واسع مؤدية الى نسب كبيرة من الوفيات في حالة عدم توفر المعالجة او ضعفها وانتشار العزلات المقاومة للمضادات الحيوية من الجرثومة المسببة للمرض(٥). وبناء على اهمية الخطورة المتعلقة بمرض الحمى التايفوئيدية والمشار اليها بسبب تداخل اعراض الحمى التايفوئيدية مع اعراض ا مراض اخرى تشوش الصورة على الاطباء تشخيص هذا المرض فقد سعى العلماء والباحثون بصورة مستمرة إلى اكتشاف وتطوير تقانات التشخيص والعلاج للجراثيم المسببة للمرض.

تستخدم عادة مزارع الدم Blood culture في عزل وتشخيص جرثومة *S.typhi* حيث تعطي نتائج موجبة خلال الاسبوع الا ول لـ(75-80) % من المرضى اما خلال الاسبوع الرابع فإن مزارع الدم تعطي نتائج موجبة لـ (10) % من المرضى فقط ، ويستخدم كذلك زرع الخروج حيث يمكن عزل هذه الجرثومة خلال الاسبوعين الثاني والثالث من الإصابة. كما يمكن عزل بكتريا *S.typhi* من الادرار في الاسبوع الثاني من الاصابة حيث تعطي اهمية للكشف عن الحاملين. ويزرع كذلك سائل النخاع الشوكي بالطريقة نفسها هو ما يشجَّع نمو الجرثومة عادةً بخطوات زرع اولية على اوساط أغنائية ثم زرعها على الاوساط الانتخابية الصلبة.

ان معظم تقانات التشخيص المتقدمة هي غير متداولة في الدول ال نامية ويعد العراق بوصف ه احدى الدول النامية وجزءا من قارة اسيا موبوءاً بمرض حمى التايفوئيد ويعاني موضوع التشخيص والعلاج لهذا المرض من ضعف وإهمال ، وهنالك استخدام محدود لطريقة الزرع في هذه الدول على الرغم من اهميتها وحساسيتها وقد لا تستخدم إطلاقاً سواء بسبب كلفتها او احتياجها الى وقت طويل نسبياً (٦ و ٧) .

تهدف هذه الدراسة الى امكانية تحضير اوساط زرعية كفوءة لعزل وتشخيص جرثومة *S.typhi* بحيث تكون هذه الاوساط في متناول اليد وضمن الامكانيات المحلية ومكافئة او افضل من الاوساط الاجنبية المستخدمة في هذا المجال.

المواد وطرائق العمل

أولاً :- الأوساط الزرعية

أ) الأوساط التجارية

- وسط أكار الدم Blood agar
- وسط ماء الببتون Peptone water
- وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفيت Glucose phosphate peptone water
- وسط ماء الببتون والرامينوز والفوسفيت Rhamnose phosphate peptone water
- وسط سترات سيمون Simmons citrate

ب) الأوساط المحلية

١- وسط السمك والتمر.

حُضر كل من مستخلص التمر ومستخلص السمك حيث حضر مستخلص السمك بحسب طريقة (٨) المحورة.

أما مستخلص التمر فقد حضر بحسب طريقة (٩).

ولتحضير وسط التمر والسمك مزج مستخلص السمك ومستخلص التمر حسب النسب المبينة في الجدول ١ وذلك لاختبار النسب المثلى لتحضير هذا الو سط وأضيف الاكار بنسبة (٢٠) غم/لتر وضبط الأس الهيدروجيني على (٧.٢) وعقم بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ْ م.

الجدول ١: يبين النسب المختلفة لاختيار التركيب الأمثل لتحضير الوسط المحلي وسط السمك والتمر.

نوع المستخلص	رمز النسبة والحجوم المستخدمة (سم^3)				
	A	B	C	D	E
مستخلص السمك	50	60	70	40	30
مستخلص التمر	50	40	30	60	70

٢- وسط السمك والجت.

حضر هذا الوسط من مستخلص الجت ومستخلص السمك المحضرة حسب ما ذكر في تحضير وسط السمك والتمر وبحسب طريقة (١٠) ثم مزجت نسب من هذا المستخلص مع مستخلص السمك بحسب النسب المبينة في الجدول (٢) وذلك لاختبار النسبة المثلى لتحضير هذا الوسط ، أضيف الأكار بنسبة (٢٠) غم / لتر لتصليب الوسط وضبط الأس الهيدروجيني على (٧.٢) وعقم بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ْ م .

الجدول ٢: يبين النسب المختلفة لاختيار التركيب الأمثل لتحضير وسط السمك والجت.

نوع المستخلص	رمز النسبة والحجوم المستخدمة (سم٣)				
	A	B	C	D	E
مستخلص السمك	50	60	70	40	30
مستخلص الجت	50	40	30	60	70

٣- الوسط التفريقي المحلي المحضر من مستخلص التمر والسمك.

حضر الوسط بإذابة (٠.٠٢٥) غم من صبغة Brillant green و(٠.٠٩) من صبغة Phenol red و في الحالة الصلبة اضيف (٢٠) غم أكار الى لتر من الوسط بإعتماد النسبة (C) في الجدول (١) وضبط الأس الهيدروجيني على (٧.٢) وعقم كذلك (١١).

٤- الوسط الإنتخابي المحلي المحضر من مستخلص الجت والسمك.

حضر هذا الوسط بإذابة (١٠) غم من سكر الرامينوز Rhamnose و (٠.٠٢٥) غم من صبغة Brillant green و (٠.٠٩) غم من صبغة Phenol red و في الحالة الصلبة اضيف (٢٠) غم من الأكار الى لتر من الوسط باعتماد النسبة (C) المبينة في الجدول (٢) وضبط الأس الهيدروجيني وعقم كذلك (١١).

ثانياً :- عزل جرثومة *S.typhi* وتشخيصها

استخدمت العزلات التي تم الحصول عليها من خلال تجارب زرع عينات دم المرضى (والتي عزلت في دراسة سابقة في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل) وكذلك العزلة القياسية والتي تم تشخيصها بالإستعانة بالاختبارات المجهرية والزرعية والكيموحيوية. (١٢ و ١).

إختبار تخمر سكر الرامينوز Rhamnose

لقح وسط ماء الببتون والرامينوز والفوسفيت بمستعمرة فتية لجرثومة *S.typhi* ثم حضن الوسط عند درجة حرارة (٣٧)°م مدة (١٨-٢٤) ساعة ، أضيف إلى الوسط (٥) قطرات من كاشف المثيل الأحمر لملاحظة النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط من الأصفر إلى الأحمر دلالة على إنتاج عدد من الأحماض العضوية من تخمر سكر الرامينوز فتخفض الدالة الحامضية (١٣).

ثالثاً :- طريقة زرع الجرثومة على الاوساط المحلية المحضرة

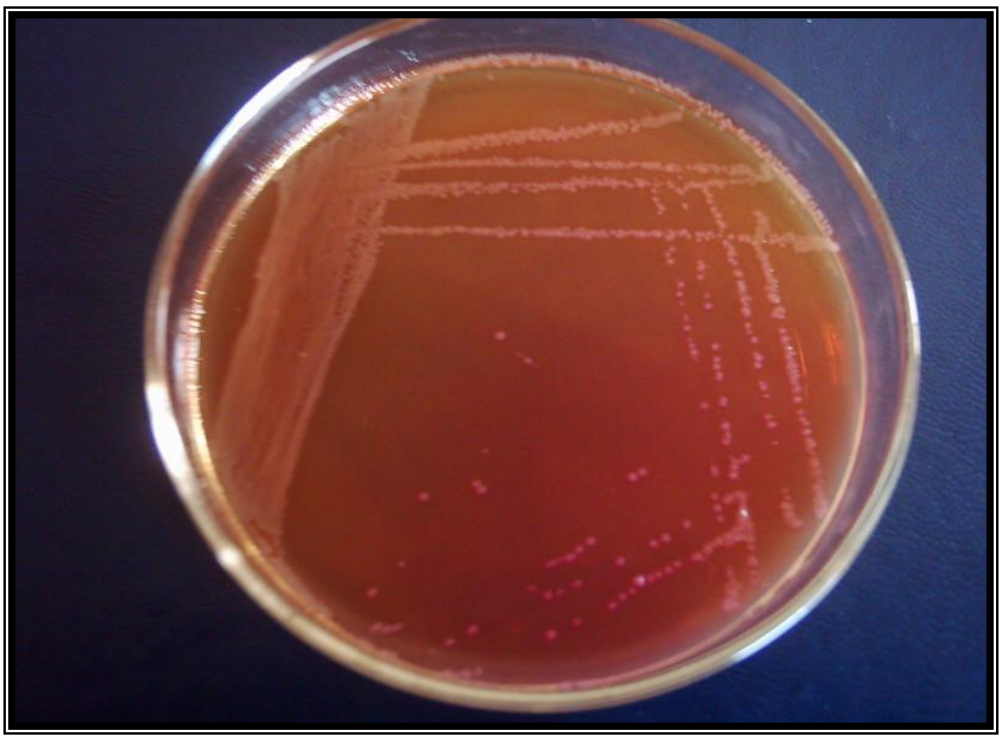
استخدمت في الدراسة (العزلة القياسية والعزلة المحلية) اذ زرعت بطريقة التخطيط Streaking على الاوساط المحلية الصلبة وحضنت بدرجة ٣٧ْ م لمدة ٢٤ ساعة ومن خلال مقارنة النمو في اطباق الزرع مع بعضها لوحظ النمو الناتج وتم اعتماد النمو الضعيف (+) والنمو الأكثر كثافة (++) والنمو الكثيف (+++) وتم تشخيص المستعمرات النامية باستخدام الفحوصات الكيموحيوية (١٤).

النتائج والمناقشة

عزل الجرثومة وتشخيصها

استندت عملية عزل الجرثومة وتشخيصها من عينات الدم المأخوذة من اشخاص يعانون من اعراض الحمى ولفترة اسبوع – اسبوعين (١٥)، أستخدم الوسط الإغنائي Selenit F broth لغرض دعم النمو الأولي للجرثومة وتنشيطه في حالة وجودها وأن النمو الناتج على هذا الوسط زرع في المراحل الآتية على الاوساط الزرعية الانتخابية.

شخصت المستعمرات النامية على الوسط الزرعي الانتخابي وسط اكار السالمونيلا والشايكلا S.S. agar وذلك بملاحظة أشكال مستعمرات وتم التأكد من الصفات الشكلية للجرثومة وذلك بعمل مسحات صبغت بصبغة كرام كما تم اجراء الفحوصات الكيموحيوية (١٦ و ١٢).

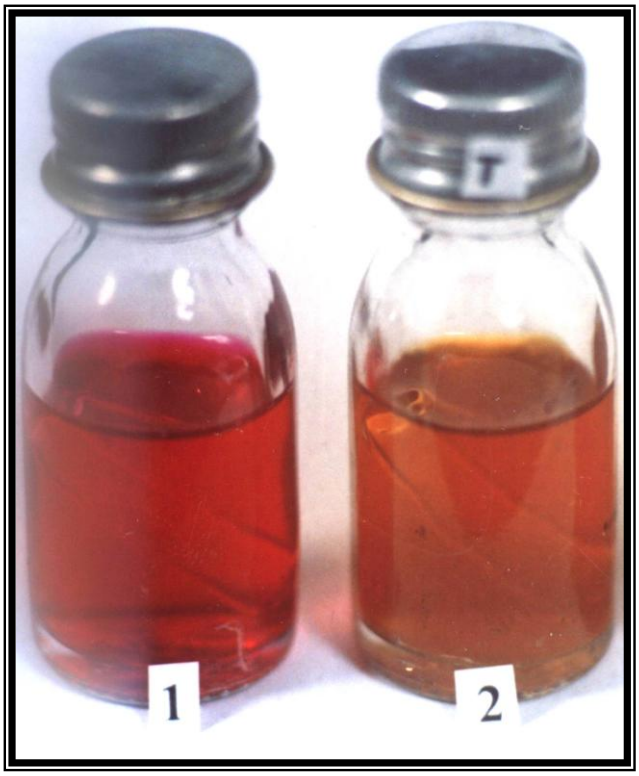


الصورة ١ : توضح نمو جرثومة *S. typhi* على وسط S.S.A Agar

ويبين الجدول ٣ نتائج اختبارات IMViC التي أجريت على العزلات كافة فضلاً عن نتائج بقية الاختبارات للتأكيد على أن العزلة تمث ل *S.typhi* اذ تكون الجرثومة عادة سالبة لاختبار الاندول والسترات والفوكس بروس كور وموجبة لاختبار المثيل الأحمر (تخمر الكلوكوز) وأنها من بين أنواع السالمونيلا التي لا تكون الغاز عند تخمير سكر الكلوكوز كما تتميز بكونها سالبة باختبار تخمر سكر الرامينوز (١٧) الصورة ٢ .

الجدول ٣: يبين نتائج الاختبارات المعتمدة في تأكيد تشخيص عزلات *S.typhi*

الاختبارات	اندول	تخمير الكلوكوز	انتاج الغاز من الكلوكوز	V.P	استخدام السترات	تخمير الرامينوز	MR
النتيجة	–	+	–	–	–	–	+



الصورة ٢ : تبين نتائج اختبار تخمير وإنتاج الغاز لكل من سكر الكلوكوز (١) وسكر الرامينوز (٢) لجرثومة *S.typhi*

دراسة تحضير وسط زرعي محلي لعزل جرثومة *S.typhi* .

تشير المعلومات الاستبيانية والمبينة في البحوث ذات العلاقة بجرثومة *S.typhi* الى أن إحدى المشكلات الأساسية في ضعف تشخيص جرثومة *S.typhi* على المستوى المختبري هو عدم إجراء اختبار زرع العينات في هذه المختبرات علماً أن الحصول على نمو الجرثومة بعد زرع العينة يعد الاختبار التأكيدي الذي لا يقبل الشك في تأكيد تشخيصها سواء فيما يتعلق بجرثومة *S.typhi* أو غيرها من الجراثيم (١٨)، وقد درست امكانية تحضير وسط أو عدة أوساط زرعية محلية لعزل جرثومة *S.typhi* وتنميتها مما يجعل هذه الأوساط كفوءة وغير مكلفة وممكنة التحضير في كل وقت ومن خلال التجارب والدراسة تم الاستقرار على نوعين من الأوساط المحلية هما وسط التمر والسمك ووسط الجت والسمك.

وسط التمر والسمك

استندت دراسة تحضير هذا الوسط على استخدام نوعين من المستخلصات التي اثبتت كفاءتها في تنمية أنواع مختلفة من الجراثيم وهما كل من مستخلص السمك الذي أجريت عليه عدة دراسات محلية في تحضير الأوساط الزرعية وكانت النتائج جيدة (١٩ و ٢٠ و ١٠) والمستخلص الآخر هو مستخلص التمر الذي أجريت عليه دراسة سابقة في تحضير وسط زرعي وثبت أنه لا يستطيع تنمية جرثومة *S.typhi* إلا بعد إضافة الحامض الأميني تربتوفان Tryptophan (٩) لذلك كانت الفكرة في دمج كلا المستخلصين لتحضير الوسط المحلي وعليه تمت تجربة استخدام عدة نسب من هذه المستخلصات وكما هو موضح في الجدول ١ من طرائق العمل لبيان النسبة المثلى في تحضير الوسط.

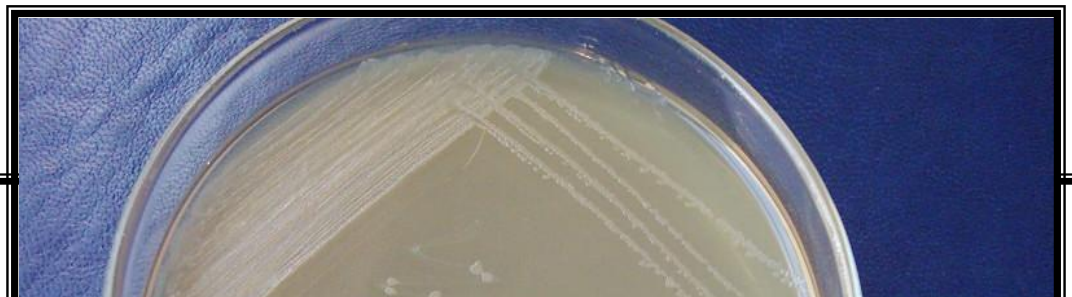
يبين الجدول ٤ نتائج نمو نوعين من عزلات جرثومة *S.typhi* إحداهما قياسية والأخرى محلية على وسط التمر والسمك المحضر من نسب مختلفة من مستخلص السمك والتمر اذ يلاحظ ان كلتا العزلتين قد نمت في حالات الوسط المحضر كلها ولكنها اشتركت في ان كثافة نموها في حالة الوسط (C) كانت الأفضل وهي التي تتكون من (٧٠)% مستخلص سمك و (٣٠)% مستخلص تمر الجدول ١ وقد يعود السبب في أفضلية هذه النسبة (C) إلى محتواها العالي من مستخلص السمك الذي يمثل بروتين حيواني لا بد ان يكون غنياً بالمغذيات البيتونات (الأحماض الأمينية) ومن ضمنها الحامض الاميني التربتوفان الذي يعد أساسياً لنمو هذه الجرثومة (١٢) كما كانت نسبة (٣٠)% ملائمة كما يبدو لتوفير تركيز من السكريات مناسب لاستهلاك هذه الجرثومة وخاصة فيما يتعلق بالكلوكوز وكذلك قد يعد تركيزاً تحت مستوى التركيز المثبط لنمو الجرثومة إذا ما أخذ بالحسبان أن التركيز العالي للسكريات يثبط نمو الجراثيم (٢١) لذا يبدو ان هذه النسبة قد حققت التوازن المطلوب لجعل الجرثومة تنمو على نحو جيد الصورة (٣، ٤).

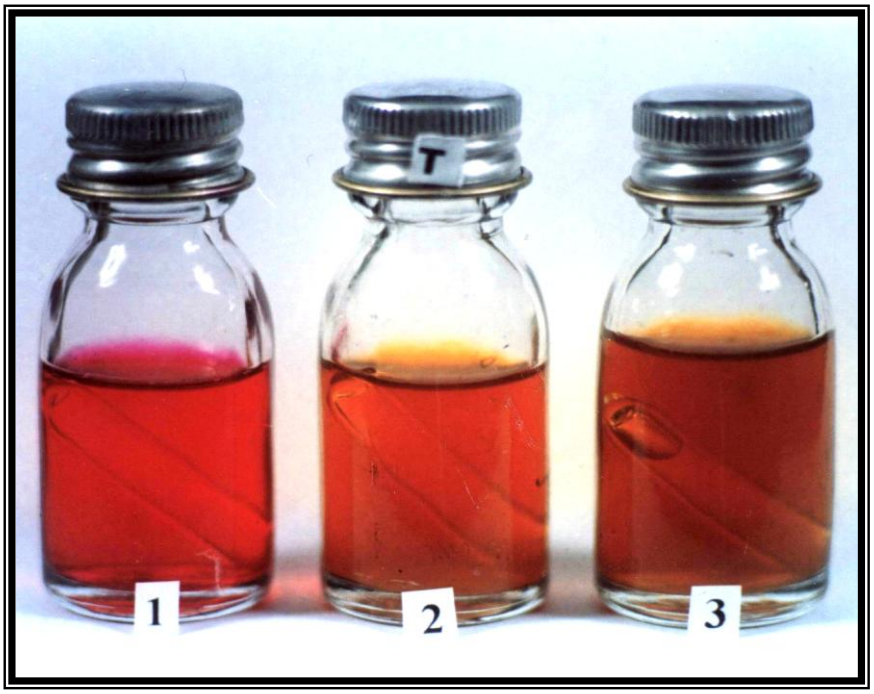
الجدول ٤ : يبين كثافة نمو كل من العزلة القياسية والعزلة المحلية لجرثومة *S.typhi* بعد نموها على النسب المختلفة لكل من مستخلص السمك ومستخلص التمر

رمز النسبة	كثافة النمو	
	العزلة القياسية	العزلة المحلية
A	++	++
B	++	+++
C	+++	+++
D	++	+
E	+	+

درس بعد ذلك إمكان تطوير هذا الوسط وتحويله إلى وسط إنتخابي تفريقي وذلك باستخدام مادة Brilliant green التي تقوم بتثبيط نمو عدد كبير من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام فضلا عن السالبة لصبغة كرام وتستخدم لهذا الغرض في معظم أوساط السالمونيلا الإنتخابية، واستخدم كاشف الفينول الأحمر Phenol Red الذي يتحول إلى الأصفر في حالة حصول التخمر وإنخفاض قيمة الأس الهيدروجيني pH بحدود (٦.٨-٨.٤) (٢ و ١) .

وفي حالة الوسط السائل المحضر أضيف أنبوب درهم إلى القناني الحاوية للوسط للتحري عن انتاج الغاز نتيجة إستهلاك السكر في الوسط، وقد استخدمت في هذه الحالة السائلة عزلة للنوع *S.typhimurium* لغرض المقارنة وتوضح الصورة ٦ قابلية *S.typhi* على النمو وتغير لون الدليل إلى الأصفر البرتقالي وعدم إنتاج الغاز في حين تمكنت العزلة *S.typhimurium* تغيير لون الوسط وإنتاج الغاز كذلك مما يتفق مع صفات التخمير المتعلقة بهذين النوعين من الجراثيم (٢٢ و ١٢) وعند إضافة الاكار الى هذا الوسط لجعله صلبا فان جرثومة *S.typhi* تمكنت من النمو وتكوين مستعمرات شفافة مغيرةً لون الوسط إلى الأصفر نتيجة تخمير السكر في الوسط وخصوصاً الكلوكوز الموجود بكمية جيدة في مستخلص التمر (٩) وتكوين الحامض وخفض الأس الهيدروجيني pH وتغير لون الدليل الصورة (٦ ، ٧).

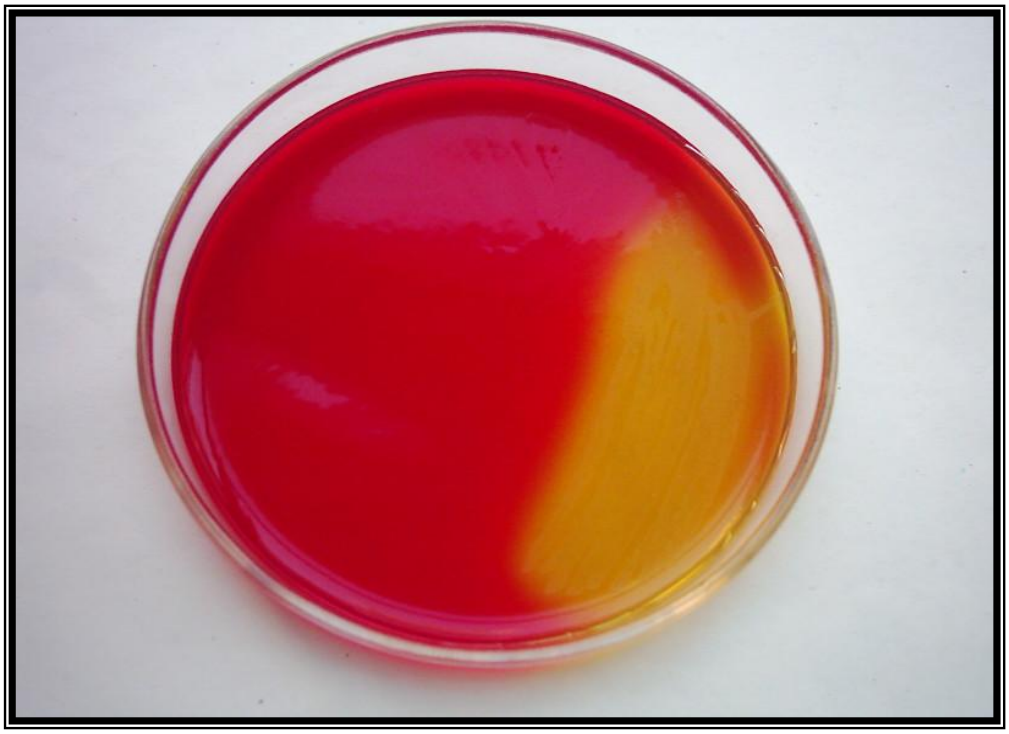




الصورة ٥ : تبين نمو جرثومة *S.typhi* و *S.typhimurium* على وسط السمك والتمر الانتخابي السائل

١ : Control . ٢ : *S.typhi* . ٣ : *S.typhimurium* .

الصورة ٦ : تبين نمو العزلة القياسية لجرثومة *S.typhi* على وسط السمك والتمر الانتخابي الصلب



الصورة ٧ : تبين نمو العزلة المحلية لجرثومة *S.typhi* على وسط السمك والتمر الانتخابي الصلب

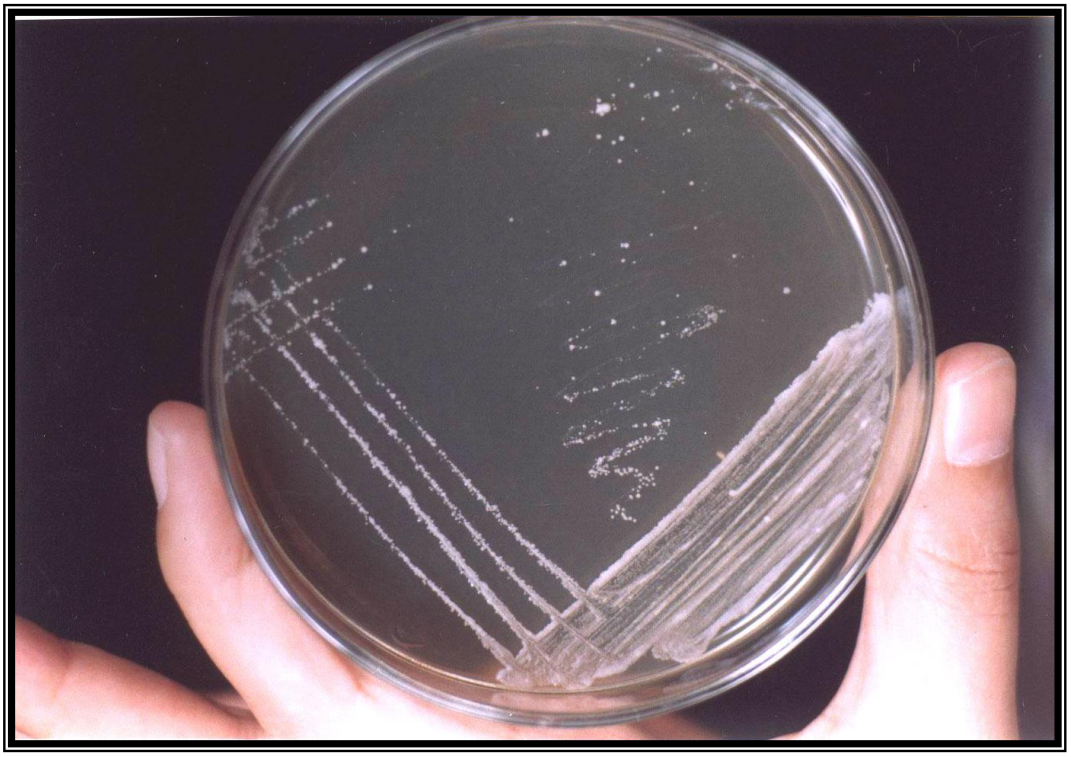
وسط الجت والسمك.

استخدم مستخلص نبات الجت بوصفه بروتيناً نباتياً في تحضير أوساط زرعية لتنمية مختلف الجراثيم في عدة دراسات (٢٣) وتعود فكرة إستخدامه مع مستخلص السمك الى ان محتوى مستخلص الجت من السكريات محدود مقارنة بمستخلص التمر المستخدم في تحضير الوسط المحلي السابق مما يمكن من إضافة السكر الملائم إلى الوسط حسب الحاجة لجعله تفريقياً.

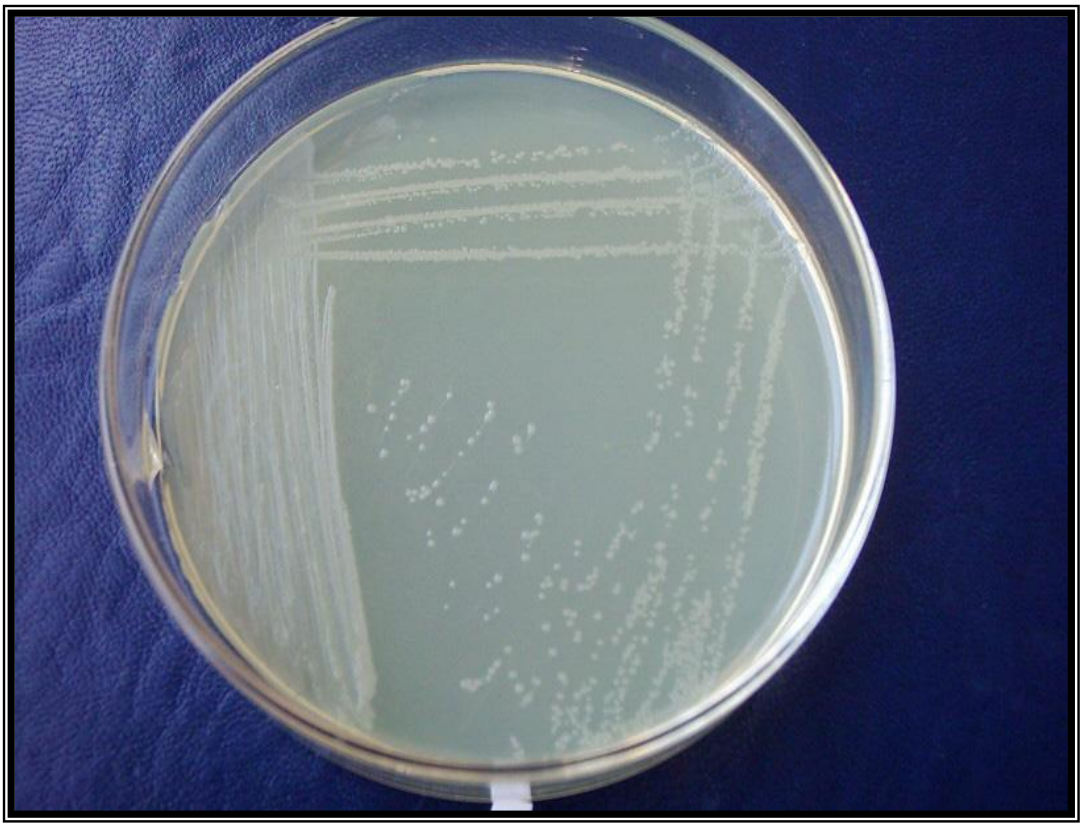
وكما هو الحال في تحضير وسط التمر والسمك فقد حضّر وسط الجت والسمك بعدة حالات باستخدام نسب مختلفة من مستخلص الجت والسمك كما هو مبين في الجدول ٢ من طرائق العمل ونتائج النمو في هذه التجربة موضحة في الجدول ٥ .

الجدول ٥ : يبين كثافة نمو كل من العزلة القياسية والعزلة المحلية لجرثومة *S.typhi* بعد نموها على النسب المختلفة لكل من مستخلص السمك والجت.

رمز النسبة	كثافة النمو	
	العزلة القياسية	العزلة المحلية
A	+	+++
B	++	++
C	+++	+++
D	+++	++
E	++	++



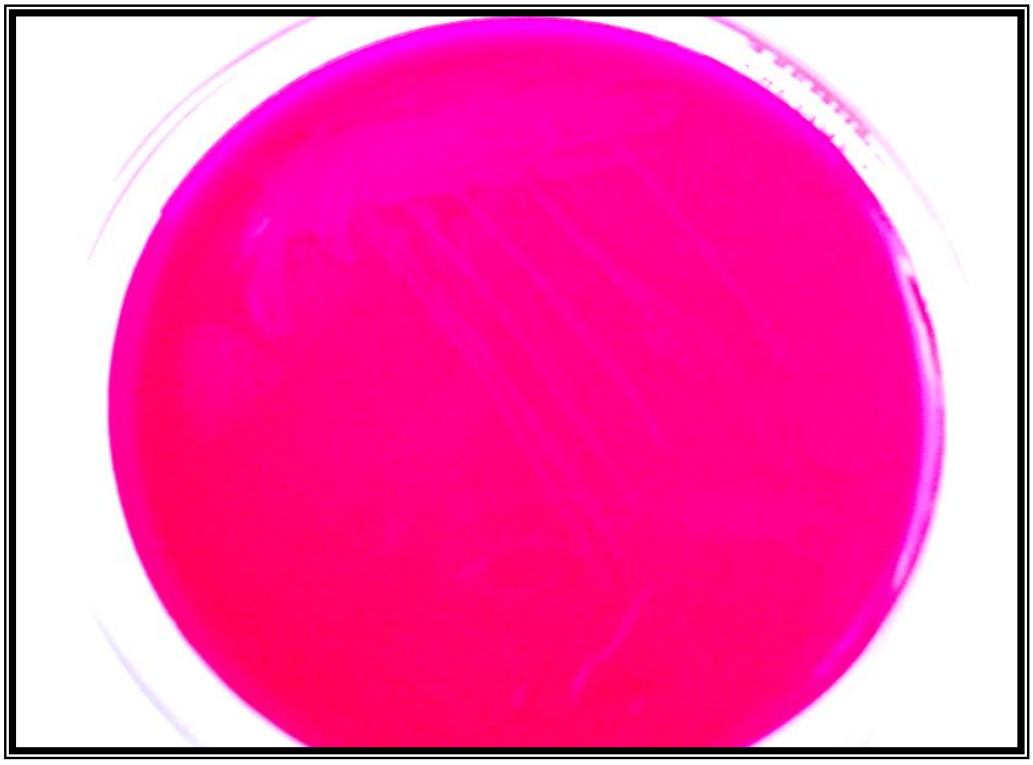
الصورة ٨ : تبين نمو العزلة القياسية لجرثومة *S.typhi* على وسط السمك والجت الصلب (النسبة C).



الصورة ٩ : تبين نمو العزلة المحلية لجرثومة *S. typhi* على وسط السمك والجت الصلب (النسبة C).

إذ يلاحظ كذلك أن النسبة (C) كانت الأفضل والمشتركة بين العزلتين كلتيهما القياسية والمحلية على الرغم من ظهور النمو على نحو متفاوت في النسب الأخرى كافة وقد اعتمدت النسبة (C) في تحضير هـ ذا الوسط الصورة (٨، ٩). وفي دراسة تحويل هذا الوسط إلى وسط إنتخابي تفريقي أضيفت مادة Brilliant green وكاشف الفينول الأحمر وأضيف كذلك سكر الرامينوز التي تعد جرثومة *S.typhi* الوحيدة التي لا تخمره بين أنواع السالمونيلا (٢٢) وهكذا حضر الوسط الإنتخابي السائل واستخدمت كذلك جرثومة *S.typhimurium* للمقارنة والصورة ١٠ توضح عدم قدرة *S.typhi* على تخمير الرامينوز وتغيير لون الوسط وقابلية *S.typhimurim* على القيام بذلك . وعندما أضيف الاكار إلى الوسط فان جرثومة *S.typhi* أظهرت نمواً شفافاً ومن دون تغيير لون الوسط، الصورة ١١

الصورة ١٠ : تبين نمو جرثومة *S.typhi* (١) و *S.typhimurium* (٢) على وسط السمك والجت التفريقي السائل.



الصورة ١١ : تبين نمو جرثومة *S. typhi* على وسط السمك والجت التفريقي الصلب.

المصادر

1. Cruickshank, R., Dugiud, J. P., Marmion, B. P. and Swain, R. H. A. "Medical Microbiology The practice of Microbiology". 12th ed. Churchill living Stone. Edinburgh. (1975).
2. Difco. M. "Dehydrated Culture and Media Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures". 9th ed., Difco Laboratories Incorporated Detvoit, Michigan. (1977).
3. Baron, E. J. and Finegold, S. M. "Bailey and Scott's diagnostic Microbiology". 8th ed., C. V. Mosby company. (1990).
4. Edwards, C. R. W. and Bouchier, I. A. D. "Typhoid and paratyphoid fever. In: Davidson's principles and practice of medicine". 19th ed. Churchill Livingstone. London.,: 122-132. (2000).
5. Basit, S., Mahmood, I. and Khalid, Q. 6: 28-29. (1996).
6. Thong, K., Cheong, Y., Puthucheary, S., Koii, C.L. and Pang, T. J. Clin Microbiol., 32 : 1135 – 41. (1994).
7. The World Health Report. (2004).
8. Khalaf, S. H. ph. D. Thesis, University of Istanbul. (1975).

٩. محمود، كوكب ادريس، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، (١٩٩٤).

١٠. العكيدي، محسن أيوب عيسى ، مجلة علوم الرافدين ١٤ (٤) : ٧٣-٧٦ ، (٢٠٠٢).

11. Fricker, C. R. and Bakt, Z. H. "Brilliant Green Agar modified". 179-170. (1984).

12. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C. "Coloratlas and textbook of diagnostic microbiology". 5thed. J. B. Lippincott Company, New York. (1997).

13. Ellen, JO., Lance, R. and Sydney, M. "Diagnostic Microbiology", 9th ed. St. Louis Baltimore Boston Chicago London Madrid Philadelphia Sydney Toronto. (1994).

14. Vandepitte, L., Engbac, K., pito, p. and Heuch, C. C. "Basic Laboratory procedures in Clinical Bacteriology". World Health Organization. Geneva. (1991).

15. Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmion, b. P. and Simmons, A. "Macie and McCartney practical medical microbiology". 14th ed. Churchill Livingstone Inc. New York. (1996).

16. Andrews, W. H. J. Ao Ac International., 79: 4-12. (1996).

17. Bailey, W. R. and Scott, E. G. "Diagnostic microbiology a textbook for the isolation and identification of pathologenic microorganisms". The C. V. Mosby Company. London. (1974).

18. Sood, R. "Medical Laboratory Technolog Methods and Interpretations". 4th ed. Medical publishers CPL, New Delhi. India., 658-656.

١٩. نصيف، زينب محمد ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم، جامعة الموصل ، (١٩٨٧).

٢٠. محمد، ذكرى سليم علي ، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامع ة الموصل ، (٢٠٠١).

21. Finegold, S. M. and Martin, W. J. "Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology". The C. V. Mosby Company. London. (1982).

22. Atlas, R. M., Brown, A. E. and Parks, L. C. "Laboratory Manual. Experimential Microbiology". Mosby Comp. (1995).

٢٣. العكيدي، محسن ايوب وبلند عبد الله وارجوان شكر ، مجلة الرافدين لطب الاسنان (٢): ٤٥، (٢٠٠١).