استخدام تفاعل سلسلة البلمرة (PCR) في تأكيد تشخيص جرثومة *Listeria monocytogenes* وتحديد مقاومتها لبعض المضادات الحيوية

هبة خالد محمود

أديبة يونس شريف

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

(أُستلم 30/ 9 /2013 ؛ قُبل 5/5/2014)

الملخص

أُستخدِمت تقنية PCR لتأكيد تشخيص (14) سلالة من *L.monocytogenes* تم الحصول عليها من من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل والمعزولة من ترب حظائر الحيوانات ومناطق رعيها في محافظة نينوى، والتي شخّصت مسبقاً بالطرائق التقليدية، وبإستخدام أشرطة *Listeria* API، إذ تم الكشف عن وجود الجين التشخيصي الأول *hlyA*، وأظهرت 13 سلالة نتيجةً موجبةً، وعند إستخدام تقنية PCR للكشف عن الجين التشخيصي الثاني *iap* أظهرت جميع السلالات نتيجةً موجبةً، أما الجين التشخيصي الثالث الذي تم الكشف عنه فكان *inlA* وأظهرت (14) سلالة نتيجةً موجبةً لهذا الجين وأعطت (11) سلالة نتيجةً موجبةً واضحة فيما أعطت ثلاث سلالات نتائج موجبةً ضعيفةً.

وجرى تحديد مقاومة سلالات *L.monocytogenes* لعدد من المضادات الحيوية: Tetracycline، Erythromycin و Trimethoprim، إذ كانت 78.6%، 35.7% و 57.1% على التوالي. أُستخدِمت تقنية PCR للكشف عن جينات مقاومة المضادات الحيوية في 14 سلالة تعود إلى *L.monocytogenes* مثل الجين *tet(S)* لمقاومة المضاد Tetracycline وقد أعطت سلالتان نتيجةً موجبةً، وأيضاً تم الكشف عن وجود الجين *dfrD* لمقاومة المضاد Trimethoprim وقد أعطت 3 سلالات نتيجةً موجبةً، وقد تمّت دراسة وجود الجين *ermB* المشفر لمقاومة المضاد Erythromycin وأعطت سلالتان نتيجةً موجبةً.

الكلمات الدالة: *L.monocytogenes*، PCR، *hlyA*، *iap*، *inlA*، *tet(S)*، *dfrD*، *ermB*.

Using of Polymerase Chain Reaction (PCR) to Confirm the Diagnosis of *Listeria monocytogenes* and Determination its Antimicrobial Resistance

Hiba Kh. Mahmud

Adeeba Y. Shareef

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

PCR technique was used for the identification of (14) strains of *L.monocytogenes* obtained from department of Biology/college of Science/university of Mosul isolated from soil animal barns and grazing areas in Nineveh governorate, that had been identified previously by traditional methods and API *Listeria*. The presence of the first identification gene *hlyA* had been detected, (13) strains exhibited positive result, but when PCR used for detection of second identification gene *iap*, all strains showed

positive result. The third identification gene that have been detected was *inlA*, (11) strains were clear positive, while (3) strains have weak positive results, so (14) strains were positive.

The resistance of *L.monocytogenes* strains was determined to a number of antibiotics: Tetracycline, Trimethoprim and Erythromycin, it was 78.6%, 35.7% and 57.1% respectively. PCR technique was used to detect antibiotic resistance genes like *tet(S)* for Tetracycline resistance, (2) strains gave positive result, the gene *dfrD* for Trimethoprim resistance has also detected and (3) strains showed positive result. The presence of *ermB* for Erythromycin resistance was studied, (2) strains showed positive result.

Keywords: *L.monocytogenes*, PCR, *hlyA*, *iap*, *inlA*, *tet(S)*, *dfrD*, *ermB*.

المقدمة

تُعَدُّ جرثومة *Listeria monocytogenes* من العوامل المسببة للأمراض المشتركة، وهي تُسبب الليستيرiosis والذي يصيب الإنسان والحيوانات (Borucki et al., 2004). وقد عُرِلَتْ من بيئاتٍ مختلفةٍ مثل التربة، والماء، والاعلاف، ومختلف أنواع الأغذية (Fenlon, 1999) وتُعَدُّ من الممرضات داخل خلوية انتهازية لها القدرة على الإنتقال من الحالة الرمية في التربة، والمواد الغذائية، والأنظمة المائية، وفضلات الحيوانات إلى الحياة داخل الخلية (Nightingale et al., 2004). تمتلك *L.monocytogenes* عدداً من البروتينات السطحية، ومنها *InlA* والتي يشفر لها الجين *inlA* وهي تساهم في غزو الجرثومة لخلية المضيف؛ إنَّ بروتينات *InlA* ترتبط بـ E-cadherin وهي جزيئة لالتصاق بخلية المضيف. وعندما ترتبط الجرثومة بتلك المستقبلات فإنها تدخل خلية المضيف عن طريق ميكانيكية الإدخال الخلوي Endocytic machinery. وإن الجرثومة تهرب من الفجوة المحاطة بغشاء عن طريق إفراز Cytolysin مكوناً للثقوب يعرف بـ *Listeriolysin O* (LLO) والذي يشفر له الجين *hlyA* واثنين من *Phospholipase*، والتي تعمل سوية لتحطيم الفجوة البلعمية Phagosome التي تتواجد فيها، وفي ساييتوسول خلية المضيف فإن الجرثومة تتضاعف باستخدام المغذيات التي تأخذها من المضيف، وبعد ذلك تتحرك ضمن الخلية والخلايا المجاورة. كما تمتلك *L.monocytogenes* عدد من البروتينات المفرزة ومنها بروتين P60 المسؤول عنه الجين *iap* (Pizarro- Cerda and Cossart, 2006; Schnupf and Portnoy, 2007).

تُعَدُّ التربة مخزناً كبيراً للجراثيم، ولجينات مقاومة المضادات الحيوية، إذ تكون فقط في تماسٍ مباشرٍ مع المضادات المستخدمة في تربية الحيوانات، وعلاجها أو في الزراعة وهي تُعدُّ بيئةً طبيعيةً للكائنات المنتجة للمضادات، وبالتالي فإن التربة تحتوي أنواع جرثومية تتواجد في الأصل في التربة وتكون مقاومة للمضادات وتحمل مدىً واسعاً من جينات المقاومة والمسؤولة عن ميكانيكيات تسمح لها بالتغلب على المضادات الحيوية الموجودة في البيئة (Liu et al., 2011; Cytryn, 2013). وقد سجّلت الدراسات زيادةً في معدل المقاومة لواحدٍ أو أكثر من المضادات الحيوية المستعملة سريرياً في علاج الإصابة بجرثومة *L.monocytogenes*، وذلك في عزلات تم الحصول عليها من البيئة، كما سجلت المقاومة ويتردد أقل في عزلات مأخوذة من حالات سريرية (Conter et al., 2009).

يؤدي الإستعمال المفرط للمضاد الحيوي Tetracycline إلى ظهور سلالاتٍ مقاومةٍ له، وهناك 15 صنفاً من محددات مقاومة التتراسايكلين وضعت في 3 مجاميعٍ بالاعتماد على الميكانيكية الكيموحيوية للمقاومة، وهي مجموعةٌ تؤدي إلى ضخ التتراسايكلين خارج الخلية بميكانيكيةٍ تعتمد على الطاقة Energy-dependent efflux، والميكانيكية الثانية، هي حماية الرايبوسوم، وتتضمن الجين *tet(S)*، والميكانيكية الثالثة، هي تتمثل بالتحور الكيميائي للتتراسايكلين (Hansen et al., 1993).

يُعدُّ أنزيم Dihydrofolatereductase (DHFR) مفتاحاً في مسار Tetrahydrofolic والذي يُحفز إختزال Dihydrofolate إلى Tetrahydrofolate، وبسبب التركيب المناظر لل Trimethoprim مع Dihydrofolate، فإن هذا المضاد الحيوي يعمل كمثبط تنافسي لذلك الأنزيم الجرثومي، وأكثر ميكانيكيات المقاومة شيوعاً لذلك المضاد، هو تكوين ناتج قد يتوسطه البلازميد يعمل بديلاً عن الأنزيم الكروموسومي الحساس ويتواجد في البكتريا الموجبة لصبغة كرام أنواع قليلة من DHFRs تمنح المقاومة للمضاد الحيوي Trimethoprim، فالنوع الأول S1 وهو أنزيم يشفر بواسطة الجين *dfrA*. وهناك أنزيم آخر وهو النوع DHFR S2 والذي يشفر له الجين *dfrD* (Dale et al., 1995). وقد وُجدَ أن مقاومة Trimethoprim قد تكون بسبب الجين *dfrG* وهو يشفر لـ 165 حامض أميني والبروتين الناتج هو DHFR S3 (Sekiguchi et al., 2005). وهناك جين آخر أيضاً لمقاومة المضاد الحيوي Trimethoprim وهو *dfrK* ويشفر Dihydrofolatereductase، الذي يختلف عن الأنزيمات المعروفة سابقاً (Kadlec and Schwarz, 2009).

تنتج مقاومة المضاد الحيوي Erythromycin عن الأنزيم rRNAmethylase، إذ تضاف مجموعة مثيل لجزء الادنين في منطقة Peptidyltransferase للـ 23S rRNA وإن ذلك التحوير يقلل ألفة الوحدة الثانوية للرايبوسوم 50S للمضاد، وإن rRNAmethylase تشفر بواسطة جينات *(erm)* Erythromycin ribosome methylation، وقد تم وصف أكثر من 30 جيناً نوع *erm*، وذلك في أنواع مختلفة من الجراثيم (Weisblum, 1995).

هدف البحث:

تأكيد تشخيص جرثومة *L.monocytogenes* جزيئياً بعد تشخيصها باستخدام الطرائق التقليدية وأشرطة API *Listeria* وتحديد مقاومة جرثومة *L.monocytogenes* لعدد من المضادات الحيوية والكشف الجزيئي عن بعض جينات المقاومة للمضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل

العينات

تم الحصول على 14 سلالة تعود الى جرثومة *L.monocytogenes* من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل المعزولة من ترب حظائر الحيوانات ومناطق رعيها في محافظة نينوى والمشخصة مسبقاً باستخدام الطرائق التقليدية وأشرطة API *Listeria* في دراسة (شريف ومحمود، 2013)

المواد

1-المحاليل المستخدمة في إستخلاص DNA الجينوم:

حُضِرَت كما ورد في Moore وجماعته (2004)

2- SDS بتركيز 10%

1- المحلول المنظم TE (TE Buffer)

4- Proteinase k

3- NaCl بتركيز 5 مولاري

6- CTAB/NaCl

5- NaCl بتركيز 0.7 مولاري

2-المحاليل المستخدمة في تقنية PCR:

- 1- البوادئ Primers: كما موضحة في الجدول (1)
- 2- محلول Green Master Mix: مجهز من شركة Promega
- 3- الدليل الحجمي DNA Ladder 100 bp: مجهز من شركة Biolabs

الجدول 1: تسلسل البوادئ المستخدمة في الدراسة

الجين	3→5 تتابع البادئ	الحجم (زوج قاعدة)
<i>hlyA</i>	F: CATTAGTGGAAAGATGGAATG R: GTATCCTCCAGAGTGATCGA	730
<i>iap</i>	F: GCAACTATCGCGGCTACAGC R: CCAAGTTGCGCTAACAGATTT	250
<i>inlA</i>	F: ACTACTAGTAACACGATTAGTGA R: CAAATTTGTAAAAACCCAAGTGG	250
<i>tetS</i>	F: ATTGCAGAACTTGAAAAGGA AATCCCGTCATATTTCTTACC	589
<i>dfrD</i>	F: AGAGTAATCGGCAAGGATAAGG R: AATGGGCAATTTACATCC	199
<i>ermB</i>	F: GAAAAGGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTATTAAATTGTTTAC	636

3-المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي لـ DNA في هلام الاكاروز:

المحاليل المستخدمة في عملية الترحيل الكهربائي حُضِّرَت كما ذكره Sambrook وجماعته عام 1989.

- 1- المحلول المنظم TAE 1X
- 2- محلول التحميل Loading buffer قوة X10

- 3- محلول صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide (10 mg/ml)

طرائق العمل

1- اختبار الحساسية للمضادات الحيوية: اجري الاختبار باستخدام طريقة Kirby-Bauer المحورة (Bauer *et al.*, 1966)، اذ استعملت اقراص المضادات الحيوية 30µg Tetracycline، 10µg Trimethoprim و 15µg Erythromycin.

2- إستخلاص DNA الجينوم Genomic DNA extraction

أُستخدِم في الإستخلاص الطريقة المتبعة من قبل Moore وجماعته (2004)

3-تفاعلات PCR:

حُضِّرَ المزيج الرئيس للتفاعل، وحسب تعليمات الشركة المجهزة (Promega)، وأُدخل بعد ذلك في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler بحذرٍ لإنجاز التضاعف، وبإستعمال البرنامج المناسب، وكما في الجدول (2)، وبعد إنتهاء وقت التفاعل رُحِّلَت العينات بجهاز الترحيل الكهربائي لمدة 90 دقيقة.

الجدول 2: البرامج المستخدمة لتفاعلات الـ PCR

المصدر	برنامج التفاعل	الجين
(Gouws and Liedemann, 2005)	80C° for 10 min, 94 C° for 3 min, 30 cycles of 94 C° for 30s, 55 C° for 30s, 72 C° for 30s, 72 C° for 2 min	<i>hlyA</i>
(deMello <i>et al.</i> , 2008)	5 min at 94 C°, 30 cycles of 1 min at 94 C°, 1 min at 72 C°, 5min at 72 C°	<i>iap</i>
(Taban, 2012)	95 C° for 3 min, 35 cycles of 45s at 95 C°, 52 C° for 45s, 72 C° for 60s, 72 C° for 7 min	<i>inlA</i>
(Bertrand <i>et al.</i> , 2005)	94 C° for 10 min, 30 cycles of 94 C° for 1min, 55 C° for 1min, 72 C° for 2 min, 72C° for 10 min	<i>tetS</i>
(Charpentier <i>et al.</i> , 1999; Morvan <i>et al.</i> , 2010)	3 min at 94 C°, 35 cycle of 50s at 94 C°, 50s at 50 C°, 1min 30s at 72 C°	<i>dfrD</i>
(Morvan <i>et al.</i> , 2010)	94 C° for 30s, 50 C° for 30s, 72 C° for 2min, the cycle repeated 35 times	<i>ermB</i>

4-الترحيل الكهربائي للـ DNA في هلام الاكاروز:

كُشف عن عينات الـ DNA، وناتج تفاعلات PCR بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis

- 1- حُضِرَ الأكاروز بتركيز 1%، وتُرِكَ ليبرد إلى درجة حرارة 55°م.
- 2- رُكِبَ قالب الهلام Gel tray ثم وُضِعَ المشط Comb.
- 3- سُكِبَ الأكاروز في القالب، وتُرِكَ الهلام إلى أن تصلب ثم رفع المشط.
- 4- أُضِفَ 5 مايكرو ليتر من داريء التحميل إلى 10 مايكروليتر من DNA ثم وضع في الحفر.
- 5- وُضِعَ القالب مع الهلام في الحوض المملوء بـ 1X من TAE و غُطِيَ المحلول سطح الهلام.
- 6- شُغِلَ مجهز القدرة Power Supply وضُبطَ عند 80 فولت مدة 90 دقيقة.
- 7- صُبِغَ هلام الأكاروز بصبغة بروميد الاثيديوم.
- 8- فُحِصَ الهلام في غرفة مظلمة، وذلك بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه على جهاز U.V، وصُوِّرَ الهلام باستخدام كاميرا رقمية.
- 9- قُدِّرَ الحجم الجزيئي لقطع DNA بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل الحجمي القياسي DNA-Ladder والذي أعطى في الهلام 12 حزمة ذات أحجام جزيئية معلومة. (Sambrook and Russel, 2001).

النتائج والمناقشة

1- نتائج تشخيص *Listeria monocytogenes* باستخدام تقنية PCR:

أُسْتُخْدِمَتِ تقنية PCR لتأكيد تشخيص 14 سلالة من *L. monocytogenes* شُخِّصَت مسبقاً باستخدام طرائق الزرع التقليدية و*Listeria* API، وتعد تقنية PCR من الطرائق السريعة والعالية الدقة والحساسية والتخصصية، وهناك العديد من الدراسات التي شخّصت نتائج معينة من DNA *L. monocytogenes* لا تتواجد في بقية أنواع اللستيريا أو غيرها من الأجناس (Fitter *et al.*, 1992)، وفي الدراسة الحالية أُسْتُخْدِمَتِ عدّة جيناتٍ للتشخيص، ومنها الجين *hlyA* وهو من جينات الضراوة المتخصصة بـ *L. monocytogenes* والذي يُعدُّ ضرورياً لتحديد ذلك النوع (Deneer and Boychuk, 1991).

درس وجود الجين *hlyA* في 14 سلالة مشخصة مسبقاً بالطرائق الزرعية التقليدية وبطريقة *Listeria*API، على إنها *L. monocytogenes* وقد أعطت 13 سلالة نتائج موجبة لذلك الجين، إذ تم الكشف عن وجود الجين *hlyA* بعد إجراء الترحيل الكهربائي، وملاحظة موقع الحزمة ووزنها الجزيئي من خلال مقارنتها مع الدليل الحجمي DNA-Ladder، وكما موضح في الصورة (1)، ظهرت حزمة عند الموقع 730 زوج قاعدة، وذلك لـ 13 سلالة من السلالات قيد الاختبار وهذا يؤكد أنها سلالات تعود إلى النوع *L. monocytogenes* وهذا ما أشار إليه Gouws و Liedemann (2005).

الصورة 1: نواتج تضاعف DNA لجراثومة *L. Monocytogenes* باستخدام تقنية PCR والجين *hlyA*.

أما السلالة رقم 3، فقد أعطت نتيجة سالبة للاختبار وقد يعود ذلك إلى عدم وجود الجين، وأنها لا تعود للنوع *L. monocytogenes* لأن الجين *hlyA* يُعد من الجينات التشخيصية لها: أو أن تلك السلالة تعود لذلك النوع، وقد حدثت طفرة في موقع الجين *hlyA* أدت إلى تغير في نتاجه فلم يتم الكشف عنه باستخدام تقنية الـ PCR، وقد ذكر Cooray وجماعته (1994) أن بعض سلالات *L. monocytogenes* في الطبيعة تتعرض لحدوث خلل في الجين *hlyA* إذ قد يظهر بتتابع مختلف، ولذلك فإن استخدام جين واحد من أجل التشخيص، قد يعطي أحياناً أخطاء تشخيصية، ولذلك فقد تم الكشف عن جين آخر يتواجد أيضاً في *L. Monocytogenes* وهو *iap* والذي يُعد من الجينات الأساسية في تشخيص *L. Monocytogenes* (Ritu et al., 2007)، وقد أعطت جميع السلالات قيد الدراسة نتائج موجبة له إذ ظهرت حزمة بحجم 250 زوج قاعدة عند مقارنتها مع الدليل DNA-Ladder، وكما مبين في الصورة (2) وهذا ما بينه deMello وجماعته (2008).

الصورة 2: نواتج تضاعف DNA لجراثومة *L. Monocytogenes* باستخدام تقنية PCR والجين *iap*.

إن الاختلاف الذي ظهر في الكشف عن *L. monocytogenes* باستخدام الجين *hlyA* و *iap*، قد يعود إلى وجود اختلافات قليلة في تتابع النيوكليوتيدات لتلك الجينات، والخاصة بسلسلة معينة ضمن النوع *L. monocytogenes*، ويمكن التغلب على تلك المشاكل باستعمال عدة جينات هدف من أجل الكشف عن *L. monocytogenes* باستخدام تقنية PCR (Rasmussen et al., 1995). ولذلك فقد أُستخدم جين ثالث من أجل تأكيد تشخيص سلالات *L. monocytogenes*، وهو الجين *inlA* والذي يُعد من الجينات المتخصصة لتشخيص *L. monocytogenes*، وهو من جينات ضراوتها، وقد أعطت 11 سلالة من مجموع السلالات البالغ 14 نتيجة موجبة واضحة، وكما تبينه الصورة (3)، إذ ظهرت الحزم لكل منها بحجم 250 زوج قاعدة عند مقارنتها مع الدليل الحجمي DNA-Ladder، أما السلالات 7 و 8 و 12 فقد أعطت أيضاً نتائج موجبة بظهور الحزم عند الموقع 250 زوج قاعدة لكنها كانت ضعيفة مقارنةً بباقي السلالات الموجبة للاختبار.

وقد وجدَ Jacquet وجماعته (2004) أن عزلات *L. monocytogenes* المسببة للستريوسز في الإنسان تُظهر الجين *inlA* فعال وبطول كامل *Full-length Functional inlA*، بينما العزلات التي تم الحصول عليها من المواد الغذائية، والبيئة فتظهر شكلاً مقتضباً لذلك الجين، وغالباً ما تكون واطئة الضراوة.

الصورة 3: نواتج تضاعف DNA لجراثومة *L. Monocytogenes* باستخدام تقنية PCR والجين *inla*.

وقد قام Almeida و Almeida (2000) بدراسة تواجد جين *inla* في سلالات *L. monocytogenes* معزولة من حالات مرضية ومن البيئة، وقارن تواجده مع سلالات تعود لجميع أنواع اللستيريا الأخرى، وكذلك أنواع مختلفة من البكتيريا الموجبة لصبغة كرام وأنواع مختلفة أخرى سالبة لصبغة كرام ولاحظ وجود ذلك الجين فقط في سلالات تعود إلى *L. monocytogenes*، ولم يلاحظه في بقية الأنواع المختلفة التي جرت معها المقارنة، وتلك النتائج تؤكد أن الجين *inla* يكون متخصصاً في الكشف عن *L. monocytogenes*، وأستنتج من دراسته أن الجين *inla* يتواجد بصورة ثابتة في *L. monocytogenes* بغض النظر عن مصدر تلك السلالة، إلا أنه وجد أن سلالات *L. monocytogenes* المعزولة من البيئة، قد أعطت إشارات ضعيفة WeakerSignals عند الترحيل الكهربائي، وتلك الملاحظة تمثل طريقة للتمييز بين السلالات البيئية والسلالات المرضية.

2- نتائج الحساسية للمضادات الحيوية

أظهرت عزلات *L. monocytogenes* مقاومة عالية للـ Tetracycline إذ بلغت 78.6 % و قد ذكر Morvan وجماعته (2010) انه تم الحصول على عزلات من *L. monocytogenes* من الإنسان مقاومة للنتراسايكلين، وبين أنها من أكثر أنواع المقاومة شيوعاً في اللستيريا، وذلك لامتلاكها الجين *tet*. وأظهرت *L. monocytogenes* مقاومة للمضاد الحيوي Trimethoprim، وبنسبة 35.7 %، وقد عزلت أول سلالة من *L. monocytogenes* مقاومة لمستويات عالية من Trimethoprim عام 1995 من البيئة في فرنسا، وكانت تحمل الجين *dfrD* الذي يشفر لأنزيم المقاومة Dihydrofolatereductase (Charpentier and Courvalin,)

(1997). وأظهرت *L.monocytogenes* مقاومة للمضاد الحيوي Erythromycin بنسبة 57.1%، وقد سجّل الباحث MacGowan وجماعته (1990) مقاومة جرثومة *L.monocytogenes* لـ Erythromycin، وقد أعزى ذلك إلى المقاومة المكتسبة. وذكّر الباحثان Charpentier و Courvalin (1999) أن إكتساب جينات المقاومة للمضادات الحيوية، كما في الجين *ermA* لمقاومة الـ Erythromycin في *L.monocytogenes* تعود لاكتسابها عن طريق البلازميدات ذاتية الانتقال أو الترانسبوسونات الإقترانية Conjugative Transposons من أنواع أخرى من الجراثيم المقاومة للمضادات.

الجدول 3: حساسية أنواع جنس اللستيريا لبعض المضادات الحيوية

عزلة 14 / <i>L. monocytogenes</i>						المضادات الحيوية
المقاومة		المتوسطة		الحساسية		
%	العدد	%	العدد	%	العدد	
78.6	11	7.1	1	14.3	2	Tetracycline
35.7	5	7.1	1	57.1	8	Trimethoprim
57.1	8	-	0	42.9	6	Erythromycin

3- نتائج تشخيص جينات مقاومة المضادات الحيوية في *L. Monocytogenes* باستخدام تقنية PCR:

كُشف عن جين المقاومة للتتراسايكلين *tet(S)*، وبعد إجراء عملية الترحيل الكهربائي، تم الحصول على حزمة بحجم 589 زوج قاعدة وذلك عند مقارنتها بالدليل الحجمي DNA-Ladder في السلالة رقم 2 و 5، وأما بقية العزلات فكانت سالبةً بالنسبة للجين *tet(S)*، كما مبين في الصورة (4)، وعند إجراء فحص الحساسية كانت هناك سلالتين حساستين للتتراسايكلين، أما بقية السلالات المقاومة للتتراسايكلين فقد أعطت نتيجةً سالبةً للجين *tet(S)* وقد يعزى ذلك إلى إنها تمتلك جيناتٍ أخرى لمقاومة التتراسايكلين وليس الجين *tet(S)*، ومنها الجينات *tetK*، *tetL*، *tetM*.

الصورة 4: نواتج تضاعف DNA لجرثومة *L.monocytogenes* باستخدام تقنية PCR والجين *tet(S)*

إن المقاومة للنتراسايكلين تكون شائعة في البيئة، إذ ذكر Granier وجماعته (2011) أنه لو تم الحصول على أربعة عُزلاتٍ مقاومةٍ للنتراسايكلين فإن ثلاثة منها تكون من مصادرٍ بيئية، وفي تلك الدراسة تم الحصول على عُزلات *L.monocytogenes* من الغذاء والمصادر البيئية، وأظهرت مقاومة للنتراسايكلين وكانت تحمل الجين *tet(M)*. كما وجد Poyart-Salmeron وجماعته (1990) أن تواجد الجين *tet(S)* في سلالة *E.faecalis* يمثل دعماً إضافياً على أن بلازميد pIP811 من سلالة BM4210 *L.monocytogenes* نشأ من *Enterococci*، وقد وجد أن تردد الإقتران لـ *E.faecalis* الحاوية على الجين *tet(S)* أو غيره من محددات *tet* مع *E.faecalis* JH 2-2 و *L.monocytogenes* L017 كان متشابهاً (Charpentier et al., 1994).

وفي الدراسة الحالية تم التحري عن وجود جين مقاومة المضاد الحيوي Trimethoprim (*dfrD*) في جميع عُزلات *L.monocytogenes* قيد الدراسة باستخدام تقنية PCR، وقد أظهرت العُزلات 2، 7، 13 نتيجةً موجبةً للجين، وهي عُزلات كانت مقاومة لذلك المضاد عند إجراء إختبار الحساسية، بينما أعطت 11 عِزلةً نتيجةً سالبةً له، ومن بينها عزلتان كانتا مقاومتين للمضاد الحيوي Trimethoprim. وبعد إجراء الترحيل الكهربائي، ظهرت حزمة عند الموقع 199 زوج قاعدة كما ذكره Charpentier وجماعته (1999)، وكما موضح في الصورة (5). وقد ذكر Courvalin وCharpentier (1997) أن الجين *dfrD* يمنح المقاومة لـ Trimethoprim في *L.monocytogenes* BM4293 وهو مشابهة للجين *dfrD* في *Staphylococcus aureus* MUR313، وقد افترض أن مقاومة الـ Trimethoprim في *L.monocytogenes* BM4293 قد تكون نشأت في *Staphylococci*.

الصورة 5: نواتج

إن السلالات التي لم تظهر مقاومة للمضاد الحيوي Trimethoprim في إختبار الحساسية أعطت نتيجةً سالبةً عند الكشف عن الجين *dfrD*، بينما أظهرت سلالتان نتيجةً سالبةً للجين *dfrD*، والتي كانت مقاومة للمضاد Trimethoprim عند إجراء إختبار الحساسية، وهذا قد يعزى إلى إن الجين الذي منحها المقاومة لـ Trimethoprim هو ليس *dfrD*، وإنما نوع آخر من جينات مقاومة ذلك المضاد، والتي لم يتم الكشف عنها في الدراسة الحالية، فقد يكون سبب المقاومة هو الجين *dfrG* الذي تم اكتشافه في ترانوسون Tn6198 في *L.monocytogenes*، وذلك الترانبوسون له قدرةً عاليةً على الإنتشار سواءً بين الأنواع intra-species أو بين الأجناس inter-genus (Bertschet et al., 2013).

كُشف في الدراسة الحالية عن جين *ermB* الذي يمنح المقاومة للمضاد الحيوي Erythromycin وذلك في 14 سلالة تعود للـ *L.monocytogenes*، وقد أعطت السلالتان 4 و 10 نتيجةً موجبةً لذلك الجين، وكانت أيضاً مقاومةً للمضاد الحيوي Erythromycin عند إجراء إختبار الحساسية، وكما مبين في الصورة (6) إذ ظهرت حزمة عند الموقع 636 زوج قاعدة عند مقارنتها بالدليل الحجمي DNA-Ladder وكما ذكره Morvan وجماعته (2010)، إذ تمكنوا من الحصول على 3 سلالات من *L.monocytogenes* مقاومة لـ Erythromycin وتبين أن اثنين منها تحمل الجين *ermB* والذي يشفر لـ 23s rRNA Methyl transferase والذي يحور منطقة إرتباط مضادات Macrolide-lincosamide-streptograminB (MLS_B).

الصورة 6: نواتج تضاعف DNA لجراثومة *L.monocytogenes* باستخدام تقنية PCR والجين *ermB*

وفي دراسة أجراها Hadorn وجماعته (1993) أكتشف الجين *ermB* في بلازميد من سلالات تعود إلى *L.monocytogenes*. ثم لوحظ أن ذلك البلازميد يحمل المقاومة المتعددة، وكذلك وُجدَ الجين *ermB* في الترانبوسون الاقتراني Tn1545، وكلاهما يستطيع الانتقال بين سلالات *L.monocytogenes*، وإلى غيرها من الأنواع (Doucet-Populaire et al., 1996).

أما سلالات *L.monocytogenes* المتبقية سواءً أكانت مقاومةً أو غير مقاومة في إختبار الحساسية، فقد أعطت نتيجةً سالبةً للجين *ermB* عند الكشف عنه، فبالنسبة للسلالات غير المقاومة، فإن النتيجة السالبة باستخدام تقنية PCR تدل على عدم وجود الجين *ermB*، أما السلالات المقاومة للمضاد الحيوي Erythromycin، والتي أعطت نتيجةً سالبةً للجين *ermB* فقد يعود إلى إمتلاكها لنوع آخر من جينات مقاومة ذلك المضاد.

شريف، أدبية يونس ومحمود، هبة خالد (2013)، عزل وتشخيص أنواع الليستيريا *Listeria* من ترب حظائر الحيوانات ومناطق رعيها. وقائع المؤتمر العلمي السنوي السادس (الدولي الثاني) لكلية التربية الأساسية، المجلد الأول (العلوم الصرفة والرياضيات)، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الأجنبية

- Almeida, P.F.; Almeida, R.C.C. (2000). A PCR protocol using *inl* gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **11**, 97-101.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.A.M.; Sherris, J.S.; Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **44**, 493-496.
- Bertrand, S.; Huys, G.; Yde, M.; D'Haene, K.; Tardy, F.; Vrints, M.; Swings, J.; Collard, J. (2005). Detection and characterization of *tet* (M) in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. *J. Medical Microb.*, **54**, 1151-1156.
- Bertsch, D.; Uruty, A.; Anderegg, J.; Lacroix, C.; Perreten, V.; Meile, L. (2013). Tn6198, a novel transposon containing the trimethoprim resistance gene *dfrG* embedded into a Tn916 element in *Listeria monocytogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, 986-991.
- Borucki, M.K.; Reynolds, J.; Gay, C.C.; McElwain, K.L.; Kim, S.H.; Knowles, D.P.; Hu, J. (2004). Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sopradic and epidemic strains. *J. Food Protection*, **67**, 2496-2499.
- Charpentier, E.; Courvalin, P. (1997). Emergence of trimethoprim resistance gene *dfr* D in *Listeria monocytogenes* BM 4293. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1134-1136.
- Charpentier, E.; Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *American Society for Microbiology*, **43**, 2103- 2108.
- Charpentier, E.; Gerbaud, G.; Courvalin, P. (1994). Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene *tet*(S) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **83**, 2330-2335.
- Charpentier, E.; Gerbaud, G.; Courvalin, P. (1999). Conjugative mobilization of the rolling – circle plasmid pIP823 from *Listeria monocytogenes* BM4293 among gram- positive and gram – negative bacteria. *J. Bacteriol.*, **181**, 3368-3374.
- Conter, M.; Paludi, D.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Vergara, A.; Lanieri, A. (2009). Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International J. Food Microb.*, **128**, 497-500.
- Cooray, K.J.; Nishibori, T.; Xiong, H.; Matsuyama, T.; Fujita, M.; Mitsuyama, M. (1994). Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Appl. and Environm. Microb.*, **60**, 3032-3026.
- Cytryn, E. (2013). The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemsitry*, **63**, 18-23.
- Dale, G.E.; Broger, C.; Hartman, P.G.; Langen, H.; Page, M.G.P.; Then, R.L.; Stuber, D. (1995). Characterization of the gene for the chromosomal dihydrofolatereductase (DHFR) of *Staphylococcus epidermidis* ATCC: 14990: the origin of the Trimethoprim-resistant S1 DHFR from *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.*, **177**, 2965-2970.
- deMello, J.F.; Einsfeldt, K.; Frazzon, A.P.G.; daCosta, M.; Frazzon, J. (2008). Molecular analysis of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses in Rio Grande Do Sul, Brazil. *Brazillian J. Microb.*, **39**, 169-172.
- Deneer, H.G.; Boychuk, I. (1991). *L. monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, **55**, 476-511.
- Doucet-Populaire, F.; Trieu-Cuot, P.; Dosbaa, I.; Andreumont, A.; Courvalin, P. (1996). Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria*

- monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 185-187.
- Fenlon, D.R. (1999). *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: E.T. Ryser; E.H. Marth (eds.). "Listeria, Listeriosis and food safety". 2nd. ed., Marcel Dekker, New York.
- Fitter, S.; Heuzenroeder, M.; Thomas, C.J. (1992). A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *L. monocytogenes*. *J. Applied Bacteriology*, **73**, 53-59.
- Gouws, P.A.; Liedemann, I. (2005). Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Technol Biotechnol.*, **43**, 201-205.
- Granier, S.A.; Moubareck, C.; Colaneri, C.; Lemire, A.; Roussel, S.; Dao, T.; Courvalin, P.; Brisabois, A. (2011). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from food and the Environment in France over a 10-Year period. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 2788-2790.
- Hadorn, K.; Hchler, H.; Sxhaffner, A.; Kayser, F.H. (1993). Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis. *Eur. J. Clin Microbiol. Inf. Dis.*, **12**, 928-937.
- Hansen, L.M.; McMurry, L.M.; Levy, S.B.; Hirsh, D.C. (1993). A new tetracycline-resistance determinant, *tet H*, from *Pasteurella multocida* specifying active efflux of tetracycline. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 2699-2705.
- Jacquet, C.D.; Doumith, M.; Gordon, J.I.; Martin, P.M.; Cossart, P. (2004). A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of food borne *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.*, **189**, 2094-2100.
- Kadlec, K.; Schwarz, S. (2009). Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dftrK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet (L)*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 776-778.
- Liu, P.; Soupir, M.L.; Zwonitzer, M.; Huss, B.; Jarboe, L.R. (2011). Association of antibiotic resistance in Agricultural *Escherichia coli* isolates with attachment to Quartz. *Appl Environ Microbiol*, **77**, 6945-6953.
- MacGowan, A.; Reeves, D.; Mclanchlin, J. (1990). Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*, **336**, 513-514.
- Moore, E.; Arnscheidt, A.; Kruger, A.; Stromple, C.; Mau, M. (2004). "Molecular Microbial Ecology Manual". Kluwer Academic publishers, Netherland.
- Morvan, A.; Moubareck, C.; Leclercq, A.; Herve – Bazin, M.; Bremont, S.; Lecuit, M.; Courvalin, P.; Le Monnier, A. (2010). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob. Agents Chemther.*, **54**, 2728-2731.
- Nightingale, K.K.; Schukken, Y.H.; Nightingale, C.R.; Fortes, E.D.; Ho, A.J.; Her, Z.; Grohn, Y.T.; McDonough, P.L. (2004). Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and environmental L. Microbiology*, **70**, 4458-4467.
- Pizarro-Cerda, J.; Cossart, P. (2006). Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*, *J. Pathol*, **208**, 215-223.
- Poyart – Salmeron, C.; Carlier, C.; Trieu-C, P.; Courtien, A.L.; Courvalin, P. (1990). Transferable plasmid – mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **36**, 463-466.
- Rasmussen, O.F.; Skouboe, P.; Dons, L.; Rossen, L. (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and Listeriolysin O genes. *Microbiology*, **141**, 2053-2061.

- Ritu, A.; Alk, P.; Sant, P. (2007). A comparative study of conventional culture and PCR method for the detection of *Listeria monocytogenes* from artificially inoculated milk. *Ind. J. Dairy Sci.*, **60**, 331-337.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. (2001). "Molecular cloning". 3rd.ed., Cold spring Harbor Laboratory Protocols, Cold Spring Harbor, New York.
- Schnupf, P.; Portnoy, D.A. (2007). Listeriolysin O: a phagosome-specific lysine. *Microbes Infect*, **9**, 1176-1187.
- Sekiguchi, J.; Tharavichitkul, P.; Miyoshi-Akiyama, T.; Chupia, V.; Fujuno, T; Araake, M.; Irie, A.; Morita, K.; Kuratsuji, T.; Kirikae, T. (2005). Cloning and characterization of a novel trimethoprim-resistant dihydrofolatereductase from a nosocomial isolate of *Staphylococcus aureus* CM.S2 (IMCJ1454). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 3948-3951.
- Taban, B.M. (2012). *Listeria monocytogenes* in cig kofte without meat : A novel bulgur ball product. *Journal of Food , Agriculture & Environment*, **10**,130-132
- Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**, 577-585.