الكشف عن الجينات المنتجة للأوكراتوكسين Aفي الفطريات المعزولة من المرضى المصابين بالفشل الكلوي في محافظة القادسية

أ.م.د. بهيجة عبيس حمود الخالدي
كلية التمريض /جامعة القادسية

م.م هدى رحيم هاشم الموسوي
كلية العلوم /جامعة السماوة

الخلاصـــــة

صممت هذه الدراسة لغرض الكشف عن الجينات المنتجة لسموم الأوكرا A في الفطريات المعزولة من المرضى المصابون بالفشل الكلوي والذين راجعوا مستشفى الديوانية التعليمي للمدة من أذار 2013 ولغاية أيلول 2014 بعد تشخيصهم سريرياً من قبل الأطباء المختصين .

بالأعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية تم عزل وتشخيص ثلاثة أنواع تابعة للجنس *Aspergillus* ، ونوعين من خميرة *Candida* خلال هذه الدراسة إذ بلغت نسبة عزل الفطر *A.niger* (12.71)% وبالنسبة للفطر *A.ochraceus* عزل بنسبة (25.42)% وكانت نسبة العزل للفطر *A.candidus* (15.25)% أما خميرة*Candida albicans* بنسبة(46.61)% في الأدرار ولم تعزل الفطريات الخيطية من الدم في حين عزلت خميرة Candida albicans بنسبة (66.66)% و *C .krusi* بنسبة (33.33 %) فـي الدم مقارنة مع مجموعة السيطرة الذين لم تعزل منهم أي نوع من الفطريات المذكورة أعلاه أو غيرها.

كماأظهرت نتائج التحري عن جين OCR في الفطر *A.ochraceus* وجين PKS في الفطر *A.niger* المسؤولان عن أنتاج الأوكراتوكسين A أمتلاك الفطر *A.ochraceus* لجين الـ OCR (907 bp) وبنسبة 83.33 % من المحموع الكلي لعزلات الفطر. وكذالك أمتلاك الفطر *A.niger* لجين PKS (584 bp) وبنسبة 66.66% من المجموع الكلي لعزلات الفطر *A.niger* في حين لم تظهر هذه الجينات في عزلات الفطر *A. candidus* .

بحث مستل من اطروحة دكتوراه

Detection of genes production the Ochratoxin A in fungi isolated from patients with KidneyFailure in Al-Qadsiya province

Assistant Pro.Dr.Baheeja A.Hmood **Assistant lecture Huda R.Hashiem**

Abstract

This study was designed to detected gene –producing Ochratoxin A in fungi isolated from patients with Kidney failure who attended to Al-Diwanyia teaching hospital in period from March 2013 to January 2014 ,These patients were diagnosed by physician in above hospital .

The results of isolation and diagnosis by depending on Morphological ,Microscopical and Biochemical characters showed there were two species of fungi belong to ***Aspergillus* sp** ,include *A.ochraceaus* (25.42%) , *A.niger* (12.71%) and *A.candidus* (15.25%)and *Candida albicans* (46.61%) were isolated from urine patients where only *C. albicans* and C. krusi were isolated from blood of patient by percentage (66.66 %) and (33.33 %) respectively .

So the results of single PCR method selected to detection the OCR and PSK genes in *Aspergills* spp which responsible for ochratoxin A production ,showed (83.33%) from *A.ochraceaus* isolates had OCR gene (907 bp) and (66.66%) from *A.nger* had PSK gene (584bp),were A.candidus isolates don't have these gene

المقدمـــــــــــــة Introduction

على الرغم من أن نسبة وأهمية الأمراض التي تسببها الفطريات للإنسان أقل من تلك التي تسببها البكتـريا والفيروسات لكن أهميتها تتزايد ولاسيما في حالات تعرض المضيف إلى النقص المناعي الناتج عن الأورام الخبيثة وتعاطي الأدوية الكيمياوية ألمثبطة للمناعة ، فضلاً عن قدرة بعض الفطريات على إنتاج السموم الفطرية التي تسبب تأثيرات مرضية خطيرة أضافة إلى قدرتها على مهاجمة الأنسجة بشكل مباشر (Cast,2003).

تعود الأنواع الفطرية المنتجة للسموم إلى ستة أجناس رئيسة من الفطريات وهي الأكثر أنتشاراً وأمتازت بقدرتها على انتاج السموم الفطرية بتراكيز عالية والعيش في بيئات متنوعة وبمتطلبات نمو بسيطة من درجة حرارة ورطوبة وهذه الأجناس هي *Aspergillus* spp. ،*Penicillium*،*Fusarium*،*Claviceps*،*Stachybotrys*،*Neotyphodium* (Cast,2003).في حين أن هناك أجناس أخرى يمكن أن تنتج السموم بنسب متفاوتة مثل *Alternaria*،*Rhizopus*،*Mucor*،*Trichothecium*، *Trichoderma*، *Rhizoctonia* وغيرها (العزاوي،1977؛ نخيلان،2011)، وتعد الأجناس الثلاثة من الفطريات الـ *Aspergillus*، *Penicillium*، *Fusarium* هي الأكثر وجوداً وإنتاجاً للسموم الفطرية في مخازن الحبوب إذ يهاجم *Aspergillus* ، *Fusarium* الحبوب في الحقل وتستمر مع الحبوب أثناء الخزن (Abbas *et al*., 1988 ; FAO,2011).

تختلف التأثيرات الحيوية التي تحدثها السموم الفطرية في جسم الكائن الحي بأختلاف نوع السم وجنس الفطر المفرز للسم ونوعه، وأن من أهم السموم الفطرية التي تشكل خطورة من الناحية العملية والمؤثرة بشكل رئيس والتي تلوث الحبوب ومكونات علائق الدواجن،هي الافلاتوكسينات والاوكراتوكسينات والسترگماتوسستين المنتجـــة من قبل أنواع الفطر *Aspergillus* spp.و السترنين والباتيولين والاوكراتوكسين المنتج من قبل أنواع الفطر.*Penicillium* spp والترايكوثيسينات والزيرالينون المنتجة من قبل أنواع الفطر *Fusarium* spp. (Hamilton *et al*.,1982 , Ezekiel *et al*.,2011)

تختلف السموم الفطرية أختلافاً كبيراً في تركيبها الكيميائي ومن ثم فأنها تختلف في تأثيراتها البايلوجية والسمية ، حيث تعتبر السموم بصورة عامة سامة للخلايا Cyto toxic وتتداخل في العمليات الفسيولوجية التي تقوم بها الخلية في الجهاز العصبي وجهاز الدوران والهضمي والتناسلي والجلد والأعضاء الداخلية مثل الكبد والكلى والقلب والطحال والرئتين وغيرها (نخيلان،2011) وبالرغم من تزايد المعلومات التي تم الحصول عليها بشأن السموم الفطرية وتأثيرها في صحة الأنسان أو الحيوانات الزراعية غير أن غالبية المعلومات التي تم الحصول عليها منشئها هو الدراسات الميدانية والأختبارات الخاصة بالحيوانات المختبرية والملاحظات

البيطرية الميدانية وأكدت تلك الدراسات على أن تأثير السموم الفطرية هو مسألة على جانب كبير من الخطورة ، وربما يحصل بالأمكان مستقبلاً التوصل إلى العلاقة ما بين السموم الفطرية والكثير من الأمراض التي تصيب الأنسان والحيوانات والنباتات بمختلف أنواعها إلى جانب تلك التي تم تشخيصها إلى يومنا هذا أذ لم يحض هذا الموضوع بأي أهتمام من قبل الجهات البحثية (أبراهيم والجبوري،1998) .

تلعب السموم الفطرية دوراً مهما في أحداث تأثيرات صحية مختلفة فهي أما تتواجد في الأغذية وتشكل خطراً ملحوضاً على الكائن المستهلك عند تناوله للغذاء الملوث بها أو تتواجد في الهواء وتسبب مشاكل صحية خطرة عند أستنشاقها من قبل الكائن الحي ويطلق على هذه الطريقة بالطرق المباشرة(Direct route)(Garrido *et al*.,2003).وتتفاقم المشاكل الصحية هناعندما تحدث في جماعات سكانية تكون معتمدة على نوع واحد من الغذاء، إذ يزداد تأثير السموم الفطرية بشكل تراكمي نتيجة للتعرض المستمر لها مقارنة مع الجماعات التي تعتمد على التنوع الغذائي في معيشتها (Belgin *et al*.,2004). أذ وجد ان هناك علاقة تازرية بين بعض الأمراض والسموم الفطرية ومنه العلاقة بين سموم الأفلا ومرض التهاب الكبد الفايروسي Hepatitis B Virus أذ وجد ان هذا المرض بوجود الافـــــــــــلاتوكسينات يؤدي الى حدوث سرطان الكبد

(Krish namachari *et al*., 1995)

الهدف من الدراسة :

تم التخطيط لهذه الدراسة كمحاولة للتعرف على العلاقة بين بعض السموم الفطرية وأزدياد أمراض الكلى والفشل الكلوي المزمن غير معروف الأسباب ، أذ لوحظ من خلال المتابعة الميدانية لبعض المستشفيات منها مستشفى الديوانية التعليمي أن هنالك عدد كبير من المرضى ممن يعانون من أمراض الكلى والفشل الكلوي دون الوقوف على الأسباب الرئيسية التي أدت الى ذلك رغم أجراء العديد من الفحوصات الكيموحيوية والبكتريولوجية المعتادة ، مما دفعنا الى دراسة الموضوع وطرحه بهدف البحث عن الأسباب التي تقف وراء ذلك . والدراسة الحالية الأولى من نوعها في منطقة الفرات الأوسط وقد جاءت بهدف :

1 . عزل وتشخيص الفطريات من أدرار ودم المرضى المصابون بالفشل الكلوي .

2 .الكشف عن الجينات المنتجة لسموم الأوكرا A في الفطريات المعزولة

طرائق العمل

1-جمع العينات Specimens collection

جمعت (230) عينة (دم وأدرار)بصورة عشوائية توزعت على مجموعتين الأولى (100) عينة من أشخاص أصحاء والثانية (130)عينة لمرضى يعانون من أمراض الكلى خصوصاً ألتهابات الكلى والفشل الكلوي غير معروف الأسباب بعد التشخيص سريرياً من قبل الأطباء المختصون ، للمرضى اللذين راجعوا مستشفى الديوانية التعليمي في محافظة الديوانية للمدة من كانون الأول 2013 ــ أيلول2014 ، أخذت العينات من كلا الجنسين وباعمار مختلفة ثبتت المعلومات في أستمارة خاصة أعدت لهذا الغرض ،فيما يخص عينات الأدرار جمعت في حاويات خاصة أعطيت للمريض مع التأكيد على إهمال قطرات البول الأولى Klotz *et al*.,1983)، أما عينات الدم فقد جمعت بسحب (5)مل من الدم من كل مريض ووضعت في أنابيب حاوية على مانع الخثرة ثم نقلت العينات إلى المختبر إذ أجريت عليها الفحوصات الأتية :

1-عزل وتشخيص الفطريات من العينات

لغرض التحري عن الفطريات في عينات الدم والأدرار بعد نقلها إلى مختبر المستشفى أخذ ملء الناقل Loop من عينات الدم والأدرار وزرع في أطباق بلاستيكية حاوية على وسط P.D.A المضاف له مضاد الكلورامفينكول لمنع نمو البكتريا ، حظنت بدرجة حرارة (25)ْ لمدة أسبوع وتم مراقبة الأطباق يومياً لملاحظة ظهور النمو الفطري فيها وبعدها تم التشخيص بالأعتماد على الصفات المظهرية والزرعية للمستعمرات النامية وهذا يشمل شكل ولون وطبيعية نمو المستعمرة وكذلك بالأعتماد على الصفات المجهرية للشرائح المحضرة من المستعمرات وبأستخدام صبغة Lactophenol blue وبالأعتماد على المفاتيح التصنيفية والصفات التي أوردها كل من Raper and Fennell (1965)، Collee *et al*.,(1996) .

2. الكشف عن الجينات المنتجة لسموم الاوكراA في الفطريات المعزولة

تم أجراء فحص تفاعل البلمرة المتسلسل Single-step PCR وذلك لـلتحري عن الجين المسؤول عن أنتاج سم الاوكروتوكسين Ochrotoxin في كل من فطر *Aspergillus ochraceus* وفطر *Aspergillus niger* وذلك حسب طريقة **(**Belen Patino *et al*.,2005**)** وكما يأتي :-

1.2 تصميم البادئات Primers

تم تصميم البادئات الخاصة بأنتاج الأوكراتوكسين Ochratoxin لكل من فطر الـ *Aspergillus ochraceus* وفطر *Aspergillus niger* وذلك بأستخدام التسلسل الكامل لجين الـ pks المسؤول عن أنتاج الأوكراتوكسين في كل من:-

1- *Aspergillus ochraceus* polyketide synthase *OCR*gene (GenBank: AY583209.1)

2- *Aspergillus niger* polyketide synthase *PKS* gene (GenBank: AY583209.1).

من موقع بنك الجينات NCBI-Genbank Data base وبأستخدام برنامج Primer3plus لتصميم البادئات والخاصة في فحص الـ PCR وتم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية وكما موضح في جدول (1).

الجدول(1): البادئات التي تم تصميمها لدراسة الجين المسؤول عن انتاج الأوكراتوكسين A مع حجم الناتج النهائي لكل بادئ .

البادئات	تسلسل القواعد النتروجينية		المصدر	حجم ناتج PCR
Aspergillus ochraceus OCRgene	F	GTTGCTCTACATTTGGCGGC	صمم في هذه الدراسة	907bp
	R	GCCGTCCAGATAATCCACGT		
Aspergillus niger pks gene	F	TTCTTCCGTGGCCAAGTTGT	صمم في هذه الدراسة	584bp
	R	GTTTCTGTGATGGCGCTTCG		

2.2.أستخلاص وتنقية الحامض النووي DNA DNA extraction and purification

تم أجراء أستخلاص الحامض النووي من مستعمرات الفطر وذلك بأستخدام عدة الـ (EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية، وتم الاستخلاص حسب تعليمات الشركة وكآلاتي:-

1-نقلت كمية (ملئ الناقل Loop) من مستعمرات النمو الفطري إلى حاوية خزفية معقمة وبأستخدام النايتروجين السائل ذو درجة حرارة(169-)مْ تحت الصفر تم سحق المستعمرات الفطرية ومن ثم نقلت الى أنابيب أبندروف معقمة سعة 1.5ml .

2- تم أضافة 180µl من محلول Universal Digestion Buffer و20µl من أنزيم Proteinase K الى كل عينة و مزجت جيداً بواسطة جهاز المازج ومن ثم حضنت العينات بدرجة حرارة 56 مْ لمدة 30 دقيقة.

3- بعدها أضيف 100µl من محلول Universal Buffer PF ومزج بواسطة قلب الأنابيب حضنت بدرجة حرارة 20- مْ لمدة 30 دقيقة.

4- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000rpm لمدة 5 دقائق. من ثم نقل السائل الطافي إلى أنبوبة ابندروف سعة 1.5ml جديدة وأضيف أليها 100µl من محلولUniversal Buffer BD ومزجت جيداً بواسطة المازج.

5- بعد ذلك تم أضافة الكحول الاثيلي المطلق Absolute ethanol 96% إلى العينة ومزجت جيداً بواسطة المازج.

6- نقل المزيج الى أنابيب خاصة تحتوي على فلتر لأستخلاص الحامض النووي المجهزه مع العدة EZ-10 column موضوعة داخل أنابيب للجمع سعة 2ml ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة ومن ثم تم التخلص من الراسب.

7- بعد ذلك تم أضافة 500 µl من محلول Universal PW Solution ومن ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة بعدها تم التخلص من الراسب.

8- وضعت ال EZ-10 column الحاوية على الحامض النووي في أنابيب ابندروف سعة 1.5 ml ومن ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقتان لتجفيف الـ EZ-10 column membrane من الكحول ومن ثم تم التخلص من الراسب.

10- أضيفً 50 µl من محلول الـTE Buffer لأذابة الحامض النووي داخل EZ-10 filter column ومن ثم حضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة وبعدها وضعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة لجمع الحامض النووي وبعدها نقل الى الحفظ بدرجة حرارة 20- مْ في الثلاجة لحين الأستعمال.

3.2. تقدير كمية الحامض النووي DNA DNA Quantity evalution

تم تقدير كمية الحامض النووي DNA وذلك بـأستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) والذي يستخدم لقياس تركيز الأحماض النوويۀ (DNA and RNA) حيث يتم تحديد تركيز الحامض النووي DNA (ng\µl) وقياس نقاوته من خلال قراءة الأمتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260-280nm) وكما يلي :-

1-بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA ،وتم تصفير ركيزة المقياس مرتين بأستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من الماء المقطر اللاأيوني (ddH2O)Deionized distillate بأستخدام ماصة دقيقة معقمة على سطح ركيزة المقياس وتم تصفير الجهاز وبعدها نظفت الركيزة لقياس العينات.

2- 1 أخذ كمية 1 ميكروليتر من كل عينة من الـ DNA المستخلص ومن ثم نظفت ركيزة المقياس مرة أخرى لقياس العينة الأخرى.

3-وكذلك تم تحديد نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية على طولين موجيين 260/280 (nm) حيث أن الحامض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الأمتصاصية (1.8).

4.2 تضخيم الجين Gene Amplification

جرت عملية تضخيم الجين المسؤول عن انتاج الأوكراتوكسين باستخدام عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة الـ Bioneer الكورية وتحت ظروف خاصة للتضخيم وكما هو مثبت في الجدول (2 و3).أذ تم تحضير خليط تفاعل الـ PCR بأضافة 5µl من PCR PreMix والذي يزود بشكل جاهز من الشركة بعدها أضيفت كمية 5µl من الـ DNA المستخلص و1.5µl من البادئات وبعدها اكمل الحجم الى 20µl بأضافة الماء المقطر اللأ ايوني بعدها خلط المزيج بأستخدام جهاز الطرد المركزي لعدة ثواني فقط .

جدول (4) : يمثل مكونات مزيج تفاعل الـ PCR المستخدمة في الكشف عن الجين المسؤول عن انتاج الأوكراتوكسن A

مزيج تفاعل PCR	الحجم
DNA template	5µL
Forward primer(10pmol)	1.5µL
Reverse primer(10pmol)	1.5µL
PCR water Mix	5µL
Deionized distilled water	**7** µL
Total	**20 µL**

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل PCR التي ذكرت في الجدول أعلاه إلى الخاصة بعدة AccuPower® PCR PreMix والحاوية على جميع مكونات تفاعل الـ PCR ومن ثم ونقلت جميع الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000rpm لمدة ثلاثة دقائق وثم وضعت في جهاز PCR وأعتمدت البرنامج الموضح في الجدولين (2) و(3) لتضخيم DNA المستخلص وحسب تعليمات الشركة المجهزة AccuPower® PCR PreMix كما في الجدول (2)

جدول (3): البرنامج المعتمد لتضخيم جين OCR المسؤول عن انتاج الأوكراتوكسين في الفطر *Asp. ochraceus*

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	5sec.
Annealing		60C	30sec
Extension		72C	1.5min
Final extension	1	72C	10min
Hold	-	4C	Forever

جدول (4) البرنامج المعتمد لتضخيم جين pks المسؤول عن انتاج الأوكراتوكسين في الفطر *Asp. niger*

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	5sec.
Annealing		58C	30sec
Extension		72C	60sec
Final extension	1	72C	5min
Hold	-	4C	Forever

5.2 الترحيل الكهربائي الهلام Gel electrophoresis

تم أجراء الترحيل الكهربائي بأستخدام هلام الاكاروز بنسبة 1% وذلك لقراءة ناتج تفاعل سلسلة البلمرة PCR product analysis كما يأتي:

1- تم أذابة (1)غم من هلام الاكروز Agarose gel في 90 مل من الماء المقطر المضاف اليه 10 مل من محلول ال TBE buffer الدارئ بتركيز 1X وبأستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 56 مْ وبعدها تم إضافة 5 µL من صبغة Ethidium bromide المشعة ومزجت جيداً مع الهلام.

3- صب هلام الاكاروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم أزيل المشط من الهلام بعناية.

4- حُملت العينات بأستخدام صبغة التحميل Loading dye على ورق البارافلم Parafilm paper وذلك بأضافة1 µLمن صبغة التحميل الى 4 µL من DNA المستخلص ووضعت في حفر الهلام.

5- بعد أكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الاكاروز بأستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل بأستخدام تيار 100فولت و80 أمبير لمدة ساعة واحدة.

6-بعد أنتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج الترحيل بأستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد الناتج ومن ثم تم تصويره .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-عزل و تشخيص الفطريات من أدرار ودم المرضى المصابون بالفشل الكلوي

من مجموع 230 عينة تم جمعها من مرضى يعانون من التهاب الكلى والفشل الكلوي غير معروف الأسباب 110 (47.82 %) عينة اعطت نتيجة موجبة عند زرعها على الأوساط الخاصة وهذه العينات جميعها تعود للمرضى دون الأصحاء كون عينات الأصحاء لم تعط أي نمو زرعي كما هو واضح في الجدول (5).

جدول (5) العدد والنسبة المئوية للعزلات النامية من عينات الدم والأدرار المأخوذة من المرضى والأصحاء

المجموعة	العدد الكلي للعينات	العدد والنسبة المئوية للعينات الموجبة
مجموعة المرضى	130	110 (84.61 %)
مجموعة الأصحاء	100	صفر (صفر)
المجموع الكلي	230	110 (47.82 %)

تم عزل وتشخيص ثلاثة أنواع تابعة للجنس *Aspergillus* ، ونوع واحد من خميرة *Candida* خلال هذه الدراسة إذ بلغت نسبة عزل الفطر *A.niger* (12.71)% وبالنسبة للفطر *A.ochraceus* عزل بنسبة (25.42)% وكانت نسبة العزل للفطر *A.candidus* (15.25)% أما خميرة*Candida albicans* بنسبة(46.61)% في الأدرار ولم تعزل الفطريات الخيطية من الدم في حين عزلت خميرة *C. albicans* بنسبة (66.66)% و *C .krusi* بنسبة (33.33 %) فـي الدم مقارنة مع مجموعة السيطرة الذين لم تعزل منهم أي نوع من الفطريات المذكورة أعلاه أو غيرها. جدول(6) .

جدول (6) العدد والنسبة المئوية للانواع الفطرية المعزولة من عينات الدم والأدرار للمرضى المصابين بالفشل الكلوي .

نوع العينة	عدد العينات التي أعطت نتيجة موجبة للفطر	أعداد ونوع الفطريات المعزولة والنسبة المئوية	النسب المئوية للفطريات المعزولة
الأدرار (130)	80	*Aspergillus niger*	15(12.71 %)
		A.ochraceus	30 (25.42%)
		A.candidus	18(15.25%)
		Candida albicans	(46.61%)55
الدم (130)	30	*C.albicans* *C.krusi*	20(66.66%) 10(33.33%)

تعد هذه الفطريات تعد من الملوثات الأساسية للأغذية إذ من الممكن أن تنتقل من اليدين للمرضى الحاملين لها في الأدرار إلى الغذاء وبالتالي تعمل منتجاتها الأيضية ومنها السموم على أحداث تأثيرات مرضية معتمدة على الموقع الهدف لها في الجسم (Cast,2003).

وقد يعود سبب وجود مثل هذه الفطريات في أدار المرضى الخاضعين لهذه الدراسة إلى عدم أدراكهم لمفاهيم النظافة الصحيحة ، أذ تعد هذه الفطريات من الملوثات الخارجية للجهاز البولي (Ogra and Faden,1985;Davison *et al*.,1995)، ولكنها من الممكن أن تفرز منتجاتها الأيضية الثانوية (السموم) التي تعد أخطر من جسم الفطر نفسه في مكان تواجدها وعند وصولها إلى مجرى الدم فأنها تتوزع إلى عدة مناطق في الجسم مؤثرة تأثيراً شديدة على الموقع الهدف لها (Eaton and Gallagher,1994).

بالنسبة للصفات الزرعية للفطر *Aspergillus niger* ظهرت المستعمرات سوداء اللون متمنطقة الرؤوس الكونيدية ، نمت سريعاً على وسط PDA وبلغ قطرها حافة الطبق بعد مرور إسبوعين من حضنها بدرجة حرارة (25±2) مْ. أما الفحص المجهري فقد أظهر أن لهذه العزلة غزلاً فطرياً مقسماً تنشأ منه حوامل كونيدية شفافة ذات جدران سميكة تنتهي بحويصلات كروية الشكل يغطي سطحها بالكامل صف واحد من التراكيب القارورية ، تحمل على قممها سلاسل من الكونيدات الكروية المشوكة ، أما الفطر *A.ochraceus* فقد ظهرت المستعمرات بشكل باودر أصفر ليموني إلى البرتقالي أو الوردي الشاحب، تكون الكونيدات مرتبة على شكل صفوف قصيرة صلبة الملمس وبعضها يتفرع إلى صفين أو ثلاثة ، الحامل الكونيدي يكون خيطي محبب ،الكونيدات محوصلة خصبة تماماً ممكن أن تتفرع إلى فرعين تكون ملساء إلى خشنة ، الحويصلة تكون كروية الشكل كاملة النضج، يتحول لون الكونيدات من أبيض إلى وردي أو بنفسجي عند تقدم في العمر، الفحص

المجهري أظهر الكونيدات بيضوية قصيرة أو اسطوانية .و بالنسبة لفطر *A.candidus* فقد ظهرت أن المستعمرات متكاملة ذات لون أبيض إلى كريمي مع أجسام حجرية بنية إلى سوداء اللون ، الرؤوس الكونيدية شعاعية أو إلى أعمدة قصيرة ، اما الحوامل الكونيدية فكانت ملساء وأحيانا تكون مقسمة ، الحويصلة تكون ذات شكل كروي إلى شبة كروي ملساء.

أماخميرة المبيضات (*Candida*) فهي تعد من الأحياء المجهرية المتواجدة بصورة طبيعية في جسم الأنسان وهي جزء من النبيت الطبيعي للأمعاء والمهبل والفم أذ تتوافر بصورة تعايشية (Commensal) أو رمية (Saprophytic) (Odds,1988)، ويعد النوع *C.albicans* من أهم الأنواع الممرضة وتعد من الخمائر الأنتهازية Opportunistic Yeasts إذ تتواجد بصورة تعايشية في جسم الأنسان في الغشاء المخاطي للفم والمهبل والأمعاء كجزء من النبيت الطبيعي للإنسان وتسبب الأمراض في الظروف غير الأعتيادية للجسم لاسيما عند حدوث ضرر للجهاز المناعي ، تتصف بكونها ثنائية الشكل (Dimorphic) إذ تتواجد بشكل خميرة أو بشكل خيوط فطرية أعتماداً على الظروف البيئية التي تتواجد فيها ،وأظهر فحص الخلايا بالمجهر الألكتروني التراكيب الدقيقة لخلية هذه الخميرة ، إذ وجد أنها تمتلك نواة واحدة مع عدد كبير من المايتوكوندريا والأجسام الدهنية (Perry and Staley,1997)

وقد يعود سبب سيادة لجنس *Aspergillus* spp. ألى متطلباتهُ الغذائية البسيطة فضلاً عن قدرة تلك الفطريات على إنتاج وحدات تكاثرية لاجنسية (الكونيدات) بأعداد كبيرة وصغر حجم تلك الوحدات ، أضافة إلى القابلية العالية على تحمل الظروف البيئية الحرجة وأمتلاكهُ لنظام إنزيمي متعدد مكنتهُ من أستغلال المصادر الغذائية المختلفة (أبو هيلة ،1987) .

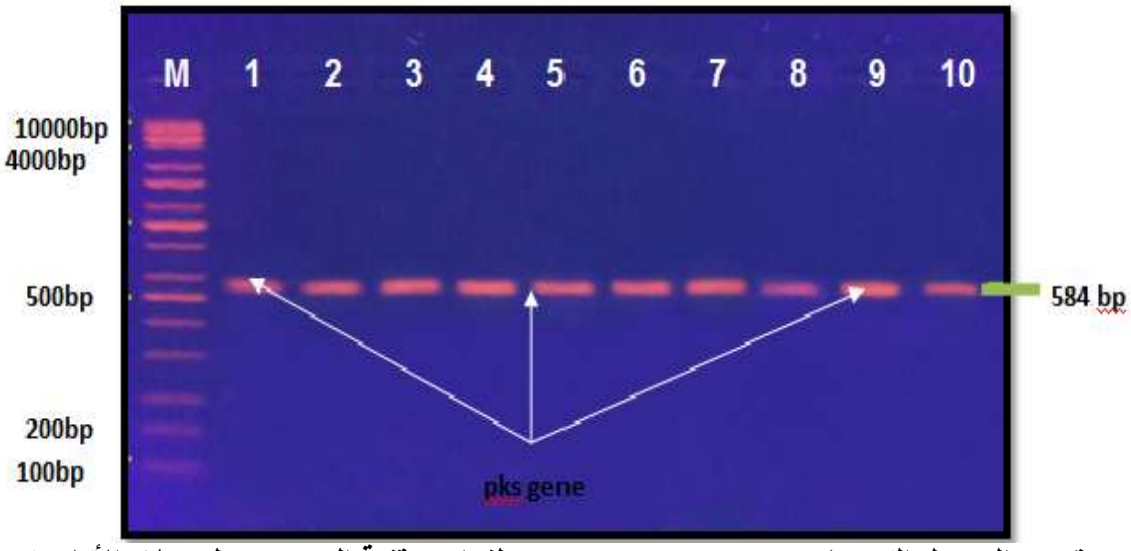
2-الكشف عن الجينات المسؤولة عن انتاج الأوكراتوكسين في الفطريات المعزولة .

أظهرت نتائج دراسة التحري عن جين OCR في الفطر *A.ochraceus* وجين PKS في الفطر *A.niger* المسؤولان عن أنتاج الأوكراتوكسين أمتلاك الفطر *A.ochraceus* لجين الـ OCR (907 bp) وبنسبة 83.33 % من العزلات الفطرية . وكذالك أمتلاك الفطر *A.niger* لجين PKS (584 bp) وبنسبة 66.66% من المجموع الكلي لعزلات الفطر A.niger جدول (7) (شكل 2 و3)

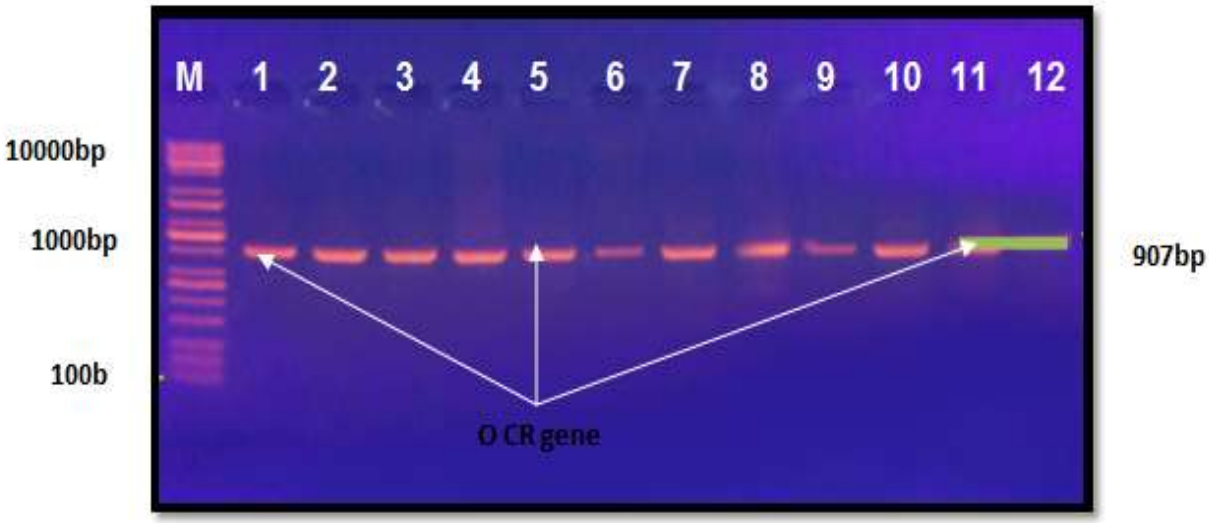
يعد جين OCR مسؤولاً عن أنتاج الأوكراتوكسين في الفطر *A.ochraceus* إذ أشارت العديد من الدراسات إلى امتلاك أغلب عزلات *A.ochraceus* لجين OCR المسؤول عن انتاج هذا النوع من السموم الفطرية.

جدول (7) النسبة المئوية لتوزيع جين OCR وPKS في الفطريات المعزولة

الجين	الفطريات	العدد والنسبة المئوية %
OCR	*A.ochraceus*	25 (83.33)
PKS	*A.niger*	10 (66.66)



صورة (2) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) لنواتج تقنية الـPCR على هلام الأكاروز بتركيز 1 %
Lane (1-10). عزلات الفطر *A.niger* الحاوية على جين pksبتسلسل قاعدي (584bp) . M = DNA Leader



صورة (3) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) لنواتج تقنية الـPCR على هلام الأكاروز بتركيز 1 %
Lane (1-11). عزلات الفطر *A.ochraceus* الحاوية على جين OCR بتسلسل قاعدي (907 bp) .
Lane (12) عزلة للفطر *A. candidus* لاتمتلك جين OCR
M = DNA Leader

References المـــصادر

*أبراهيم،أسماعيل خليل وكركز محمد ثلج الجبوري.(1998).السموم الفطرية_ أثارها ومخاطرها.الطبعة الثانية. مركز اباء للابحاث الزراعية.

* ابو هيلة ، عبد الله ناصر ، (1987) أساسيات علم الفطريات ، عمادة شؤون المكتبات –جامعة الملك سعود ، الرياض . 325 صفحة .

*العــزاوي، بتـــول زينل. (١٩٧٧). دراســـــة مدى تلوث العلائق الحيوانية بالافلاتوكسين والفطريات المنتجة له والمعزولة منها. رسالة ماجستير- كلية العلوم - جامعة بغداد.

* نخيلان، عبد العزيز مجيد. (٢٠١١). السموم الفطرية Mycotoxin. دار دجلة، عمان – الأردن، ط١، ص ٣٢٠.

-Abbas, D. Bisiman,R. and Sawsan ,M. (1988). Fungi in food . Australin ,J. of Food research .77:45-98.

-Belgin ,M,Ozlem ,K. and Halukcelik ,T. (2004). Detection of aflatoxin M1 in cheese samples by ELISA . Food Control. J. 15(1): 45-49 .

-Belen patino ,A.K. Payane ,F.N.and Pitte ,M.K. (2005). Molecular detection of afla A gene in toxi genic fungi ,Appl.Microbiol., Biottecnalogy . 65-98.

-Cast, .(2003). Mycotoxins : risks in plant , animal and hnman system (Cuncil for Agricultaral Science and Technology). Task Force Report , Ames Low , USA . No. 139 . pp:45- 60 .

-Collee,J.G. ; Fraser, A.G. and Marmion , B.P. (1996). Practical medical microbiology . (14 th ed.) Churchill Livinston . USA. a37 .

-Davison ,A.J. Burow,M.H., and Gantt ,B.O(1995) Biology of microorganisms .11 ed .prentice Hall.ISBNO,13:144-329.

-Eaton,D.L and Gallagher,E.P. (1994) Mechanisms of Aflatoxin carcinogenesis ,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 34:135-171.

-Ezekiel, C. N.; Odebode.; Fapohunda,G.O.; Tayo,O.J.; Olawuyi, O.B. and Adeyemi, O. O. (2011). Toxigenic Potential of Co- occurring Aflatoxin and Ochratoxin A Detected in Poultry feed on Clarias gariepinus Larvae . Nature and Science , 9 (5) : 186- 192 .

-FAO,(2011) Practices for the prevention of mycotoxins .120-165

-Garrido, N.S. ; Iha, M. H. ; Santos, M. R. and Duarte, R. M. (2003). Occurrence of aflatoxin M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirao Preto-SP , Brazil . Food Addit . Contam. 20:30-70 .

-Hamilton ,M. Curtis ,I. and John .N. (1982) Update of survey , regulation and toxic effects of fungi and its metabolites in Europe doxicol .lette .65:98-99.

-Krishnamachari, K.A.V. ; Bhat, R. V. ; Nagarajan, V. and Tilak, T.B.G. (1995) . Investigation into an break of hepatitis in part of western India . Indian J. Med. Rej. 63:1036- 1048 .

-Klotz,S.A.;Drutz,D.J.; Harrison,J. L. and Huppert, M. (1983). Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeast. Infect. Immun. 42: 374-384.

-Ogra and Faden ,(1985) An algorithmic approach to the diagnosis and management of invasive fungal disease in the immunocompromised patients .clini.N.Amer .33:323-334.

-Odds , S. (1988) Fungi and yeast (2ed ed.) Shampan and Hall .london ,UK .888 pp.

-Perry, J. J. and Staley, J. T. (1997). Microbiology and dynamic. Library of congres. Philadelphia. Toronto. London.

-Raper ,K.B and Fennell ,D.I.(1965) The genus Aspergillus .Williams and Wikins Company ,Baltimore .686 pp.