تحديد بعض جينات عوامل الضراوه لبكتريا الـ *E.coli* المعزولة من المرضى المصابين بخمج حويض الكلى Pyelonephritis في مدينة الديوانية

رواء ماجد محمد ميثم غالي يوسف

قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة القادسية

ألخلاصه Abstract:

تم جمع 100 عينه من المرضى المصابين بخمج حويض الكلى من فئات عمريه مختلفه والذين راجعو مستشفى الديوانيه التعليمي ومستشفى النسائيه والاطفال في مدينة الديوانيه خلال الفتره من تشرين الثاني 2012 الى اذار 2013 للتحري عن بكتريا *الـ E.coli*, بينت نتائج الاختبارات الكيموحيويه عائدية 56(56%) عزله الى بكتريا الـ *E.coli* من عينات الادرار بينما ظهرت 44 (44%) عزله من عينات الادرار تعود الى اجناس وانواع بكتيريه مختلفه اخرى, تم التحري عن بعض عوامل الضراوه Virulence Factors بأستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمره Polymerase chain reaction المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR. أظهرت نتائج PCR امتلاك جميع عزلات بكتريا *E.coli* التي اجري عليها الفحص والتي تبلغ 30 (100%) للجين *irp2* المسؤول عن اخذ الحديد من الدم, بينما أظهرت 11(36.6%) عزله امتلاكها للجين *pap* المسؤول عن انتاج نوع P من الاهداب , وأظهرت الدراسه الحاليه امتلاك 9(30.0%) للجين *afa* المسؤول عن الاهداب , وجاءت 29(96.6%) عزله امتلاكها للجين *hly* المسؤول عن انتاج السموم التحلليه , وأظهرت 3(30.0%) عزله فقط امتلاكها للجين *iha* المسؤول عن انتاج المحفظه , وأخيرا لم تسجل اي عزله امتلاكها للجين *tst* المسؤول عن الصدمه السميه .

ألمقدمه Introduction :

يعد خمج المسالك البوليه عدوى شائعه تحدث عند دخول البكتريا عبر فتحة الاحليل وبالتالي تكاثر البكتريا في المجرى البولي , المجرى البولي يتضمن الكليتين والانابيب التي تنقل البول من الكلى المثانه (الحالبين) والمثانه , وينزل البول من المثانه الى الخارج عبر الاحليل (1). تبدا خمجات المسالك البوليه عادة في المسالك السفليه (الاحليل والمثانه) وتسبب خمج المثانه Cystitis وخمج الاحليل Urethritis وفي حالة عدم علاجها فأنها تتطور لتصل الى المسالك البوليه العلويه (الحالبين والكليتين) حيث تسبب خمج الكلى وحويض الكلى Pyelonephritis , يحدث خمج المسالك البوليه في مختلف الأعمار مما جعله يأتي بالمرتبه الثانيه بعد خمجات الجهاز التنفسي في العالم(2) . ويصيب المرض كلا الجنسين ولكن نسبة حدوثه في الإناث أكثر مماهو عليه في الذكور نظراً لقصر احليل الأنثى وقربه من فتحة الشرج اضافة إلى النشاط الهرموني الاكثر في الاناث من الذكور (3) . ويعرف خمج المسالك البوليه على انه تواجد أعداد تزيد على مئة ألف من الأحياء المجهرية في (١) ملي لتر من البول المرافقه للأعراض السريرية لخمج المثانة (Cystitis) وخمج الكلية والحوضية (Pyelonephrititis) والبيلة الجرثومية اللإعراضية (Asymptomaticbacteriuria) (4). يعد خمج المسالك البولية من أكثر المشاكل شيوعاً لدى النساء وبالأخص خلال فترة الحمل حيث يقدر أن حوالي 10-20 % من النساء يعانين من خمج المسالك البوليه ولقد عانى هؤلاء النساء من خمج المسالك البوليه خلال مدة الطفولة واستمرت على هذا الحال ليصبن بهذه الاخماج خلال فترة الحمل وان اغلب حالات خمج المسالك البوليه سببها البكتريا وخصوصاً البكتريا المعوية – المعدية حيث تقوم بتلويث الاحليل من خلال تلويث المنطقة المحيطة بالشرج وصولاً إلى المثانة (5) .ان اعراض خمج المسالك البوليه العلويه تتضمن الم في الخاصرة او أسفل الظهر , التبول المتكرر, عدم القدره على انتاج سوى كميه قليله من البول , سلاسة البول , والم في منطقة البطن والحوض , وتبول مؤلم واحيانا تقيؤ في الحالات الحاد ه , اما الحالات المزمنه قد يكون بدون اعراض وتسبب خمج الكلى وحويض الكلى Pyelonephritis الذي يتطلب علاج فوري واذا لم يعالج سوف يحد من عمل الكلى ويسبب الوفاة في الحالات الحاده (6). وخمج المسالك البوليه عموما من الامراض المنتشره ويعد ثاني مرض اكثر تكرارا في المجتمعات (7).. ان حوالي 80% من حالات خمج المسالك البوليه تسبب بواسطة بكتريا سالبه لصبغة غرام , عصوية الشكل , مسوطه واختياريه لاهوائيه تنتمي الى العائله المعويه Enterobacteracea تسمى *Escherichia coli* من سلالة (UPEC) uropathogenic *E.coli* (8)(9). وان هذه السلاله البكتيريه تمتلك خصائص ضراوه مثل الالتصاق و الاجتياح و افراز السموم و انظمة اخذ الحديد وبناء السايتوتوكسين وغيرها من عوامل الضراوه , ان جينات الضراوه التي تمتلكها *E.coli* تعتبر عوامل مهمه لعودة المرض ويسمى خمج المسالك البوليه الراجع recurrent UTI وان جينات الضراوه المرتبطه بالسلاله (UPEC) الاكثر شيوعا هي , afimbreal adhesion 1(*afa*1) , cytotoxic necrotinzing factor 1 (*cnf*1) , aerobactin (*aer*) , (*pap*)fimbrea hemolysin (*hly*) (10) .لقد اشارة بعض الدراسات ان هنالك حالات من خمج المسالك البوليه تسببه بقية الانواع من جينات الضراوه مثل , *(omp t , kpsm t , usp i ha , ast a , iut a , tra t , fim h)* (11) .ان جينات الضراوه تساعد على استعمار البكتريا للبطانه

الطلائيه للقناة البوليه وتسبب اصابه قاسيه وان سلالة (UPEC) المسؤوله عن الامراضيه مقاومه للعلاج لذلك التحري عن عوامل الضراوه هواساسي خصوصا في الحالات الحاده من خمج لمسالك البوليه, ويعد خمج الجاري البوليه واحد من اهم المصادر الشائعه لاصابات مجرى الدم البكتيريه Bacteremia المتسبب عن احياء بكتيريه سالبه لصبغة غرام خصوصا عند المرضى الراقدين في المستشفيات (12) . هدفت الدراسه الحاليه الى تحديد بعض عوامل الضراوه لبكتريا *E.coli* المعزوله من المرضى المصابين بخمج حويض الكلى Pyelonephritis بأستخدام التقنيات الجزيئيه التي هي تفاعل البلمره المفرد والمتعدد.

المواد وطرق العمل Materials and methods:

جمع العينات Samples collection:

تم في الدراسة الحالية جمع 100 عينة سريرية من مستشفى الولادة والاطفال التعليمي، ومستشفى الديوانية التعليمي خلال المدة من تشرين الاول 2012- الى اذار2013. وذالك باخذ عينات الادرار من المرضى المصابين بخمج حويض الكلى , واوصي المرضى بجمع الادرار الوسطي midstream urine .

العزل والتشخيص Isolation and identification :

نقلت العينات مباشرة الى مختبر كلية العلوم لغرض تنميتها وتشخيصها اذ زرعت على اطباق بتري حاوية على وسط اغار الماكونكي ثم زرعت بطريقة التخطيط (Streaking method) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18-24 ساعة (13). تم دراسة الخصائص المظهرية للإحياء المجهرية المعزولة من خلال زرع عينات الادرار مباشرة من الأوساط الزرعية والتي صبغت بواسطة صبغة غرام لدراسة الخصائص المظهرية للأنواع البكتيرية المعزولة. كذلك درست الصفات المظهرية لكل من المستعمرات والخلايا البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة، شملت دراسة المستعمرات البكتيرية من حيث اللون والشكل و القوام والحواف والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية (Differential media) حيث زرعت على وسط اغارالماكونكي والانتقائية (Selective media) حيث زرعت على وسط اغار الايوسين الازرق ، أما الصفات المظهرية للخلايا فقد شملت شكل الخلية البكتيرية، انتظام الخلايا البكتيرية مع بعضها وطبيعة تفاعلها مع صبغة غرام.

الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests :

الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test : اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (14).

الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test : اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (13).

الكشف عن انتاج الهيمولايسين Haemolysin production: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (13).

الكشف عن كبريتيد الهيدروجين Production of hydrogen sulfite: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (13).

اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (14).

اختبار قابلية الحركة Motility test : اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (14).

فحص تخمير الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (13).

الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (13).

اختبار احمر المثيل Methyl red test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (14).

اختبار الفوكس بروسكور Voges pros-kauer test : اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (14).

الكشف عن انزيم اليوريز Urease test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (13).

استهلاك المالونيت Malonate utilization test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (14).

العّدد الجاهزة Kits:

عدة استخلاص الحمض النووي (DNA extraction kit) .South Korea. Geneaid .

العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المفرد (Single PCR) .South Korea. Geneaid .

العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المتعدد (Multiplex PCR). South Korea. Geneaid .

جدول (1): بـادئـات الـDNA (DNA primers): التي قامت بتجهيزها شركة (Bioneer)

نوع البادئ	تسلسل القواعد للنتروجينية ('3-'5)		حجم ناتج التضخيم	المصدر
PaP	**GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT**	**F**	**336 bp**	**(15)**
	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	**R**		
afa	**GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC**	**F**	**750 bp**	**(16)**
	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	**R**		
Irp2	**AAGGATTCGCTGTTACCGGAC**	**F**	**413 bp**	**(17)**
	AACTCCTGATACAGGTGGC	**R**		
tsh	**ACTATTCTCTGCAGGAAGTC**	**F**	**824bp**	**(17)**
	CTTCCGATGTTCTGAACGT	**R**		
Hly	**AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT**	**F**	**113 bp**	**(15)**
	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	**R**		
iha	**CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA**	**F**	**827 bp**	**(18)**
	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	**R**		

استخلاص الحامض النووي البكتيري (Genomic DNA extraction)

تم استخلاص الحمض النووي (DNA) من بكتريا *E.coli* وذلك بأستعمال العدة الجاهزة وبحسب تعليمات الشركة المجهزة Geneaid. South Korea.

تحضير مزيج تفاعل البلمرة المفرد Single PCR master mix:

تم تحضير مزيج تفاعل البلمره كما في تعليمات الشركه المجهزه (Single PCR) .South Korea. Geneaid .

تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR master mix:

تم تحضير مزيج تفاعل البلمره كما في تعليمات الشركه المجهزه (Multiplex PCR) .South Korea. Geneaid .

برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA

أجري تفاعل إنزيم البلمرة بأستخدام المضخّم الحراري لجهاز الـ (Thermocycler PCR). وتم برمجة الجهاز للجينات قيد الدراسة حسب التفاعل .

الترحيل الكهربائي في هلام الاغاروز Agarose gel electrophoresis:

تم أجراء الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المحضر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 امبير وزمن ساعة لغرض الكشف عن حزم (Bands) الـ DNA المستخلص والـ DNA المضخم والذي يمثل نواتج التضخيم (Amplicon size) او نواتج الـ PCR (PCR Products) وبالمقارنة مع سلم الحمض النووي القياسي (DNA Ladder 100-1500bp) .

النتائج Result:

الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

شخصت العزلات بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية حيث استجابة جميع العزلات لكل من اختبار الكتاليز والاندول وعدم استجابها لفحص الاوكسيديز , اما بالنسبه لزرعها على الوسط الانتقائي اغارالايوسين الازرق فكانت النتيجه موجبه لجميع العزلات, وكانت نسبه 95.3% من العزلات موجبه لفحص استهلاك السكريات, وجميع العزلات سالبه لفحص السايمون ستريت وفحص اليوريز.

الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *E.coli* :

شخصت 56 عزلة بنسبة عزل (56%) من مجموع 100 عينه و بنسبة (100%) , بنما كانت بقية الانواع والاجناس البكتيريه 44 عزله وبنسبة (44%) من اصل 100 بنسبة (100%) من المرضى المصابين بخمج حويض الكلى في مستشفى الديوانيه التعليمي ومستشفى الولاده والاطفال كما مبين في الجدول ادناه:

جدول (2): الاعداد والنسب المئوية لانواع البكتريا المعزوله من عينات الادرار

العينات	عدد العينات	النسبه المئويه (%)	عدد عزلات E.coli	النسبة المئوية (%)	الانواع البكتيريه الاخرى	النسبه المؤيه (%)
	100	100%	56	%56	44	%44

اما بالنسبه لتأثير المرض على اجنس فقد اوضحت نتائج الدراسه ان عدد الاناث المصابات بخمج حويض الكلى كان اكثر من عدد الذكور ,حيث وصل عدد الاناث المصابات بخمج حويض الكلى 41 من اصل 56 وبنسبة 73.3% , بينما وصل عدد الذكور المصابين الى15 من اصل 56 وبنسبة 26.7% كما موضح في الجدول (3):

جدول (3): الاعداد والنسب المئويه للذكور والاناث المصابين بخمج حويض الكلى

عدد العينات Number of samples	الاناث Female	النسبه المئويه (%) Percentage	الذكور Male	النسبه المئويه (%) Percentage
56	41	%73.3	15	%27.7

جدول(4): توزيع الاصابة بجرثومة *E.coli* حسب الفئة العمرية ونسبتها المئوية بالنسبه للمرضى والاصحاء (controls)

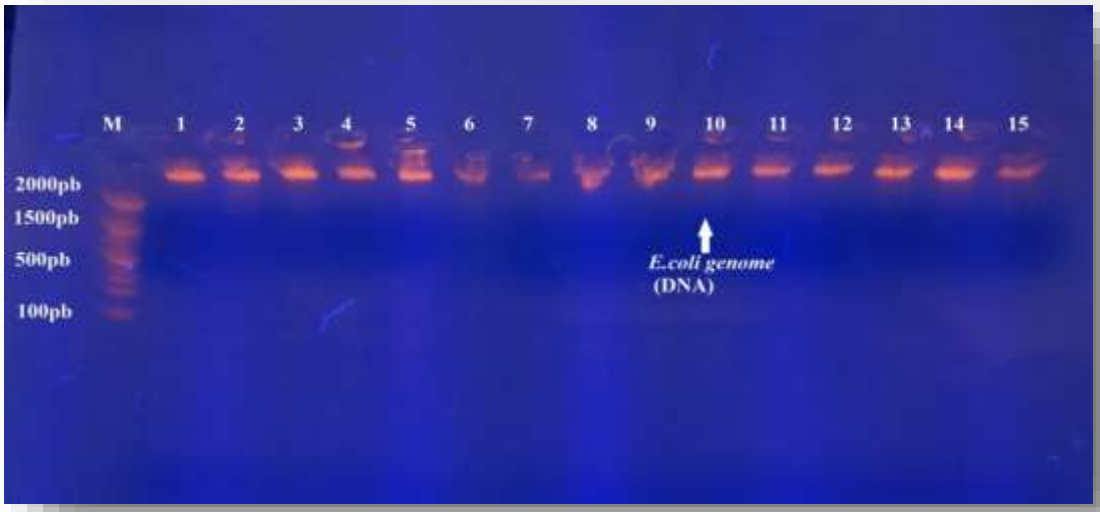
Age interval (year)	Control		UTI		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
<10	2	10	1	1.79	3	3.95
10-19	2	10	4	7.14	6	7.89
20-29	4	20	8	14.29	12	15.79
30-39	4	20	17	30.36	21	27.63
40-49	2	10	11	19.64	13	17.11
50-59	0	0	6	10.71	6	7.89
60-69	6	30	7	12.50	13	17.11
70-79	0	0	2	3.57	2	2.63
Total	20	100	56	100	76	100
Mean age (range)	36.8±20.11 (7-65)		40.68±15.77 (7-79)		39.66±16.96 (7-79)	

P= 0.384 Not significant (Independent Sample t-test)

تقنية تفاعل إنزيم البلمرة(Polymerase Chain Reaction(PCR

استخلاص الـ DNA:

أظهرت نتائج استخلاص الـDNA لعزلات *E.coli* بأستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائياً في هلام الاغاروز(1.5 %) والكشف عنه بأستعمال صبغة الأثيديومبرومايد وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للـ DNAالمستخلص , وكما مبين في الشكل(1):



الشكل (1): نواتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات *E.coli* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit. حيث أنM =(DNA Ladde100-1500bp)

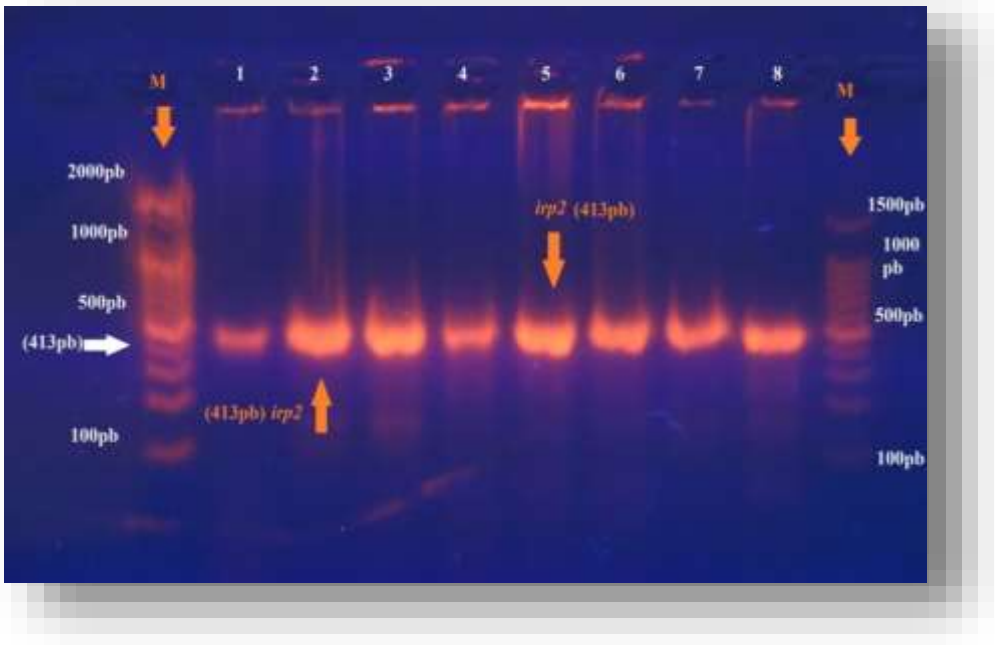
تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة لجميع عزلات E.coli البالغة (30) عزلة بأستعمال تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR, اذ تم التحري عن الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة وهي كل من*pap* الجين المسؤول عن التشفير لتكوين fimbriae, *hly* الجين المسؤول عن عامل التحلل heamolysin factor, *afa* الجين المسؤول عن afimbrial adhesion , و *iha* الجين المسؤول عن تكوين الكبسول capsule synthesis, *irp2* الجين المسؤول عن اخذ الحديد iron uptake , و *tst* الجين المسؤول عن ذيفان متلازمة الصدمه السميه toxic shok toxin .اذ أظهرت (29) عزلة بنسبة (96.6%) أمتلاكها *hly* , كما أظهرت (30) عزلة بنسبة (100%)

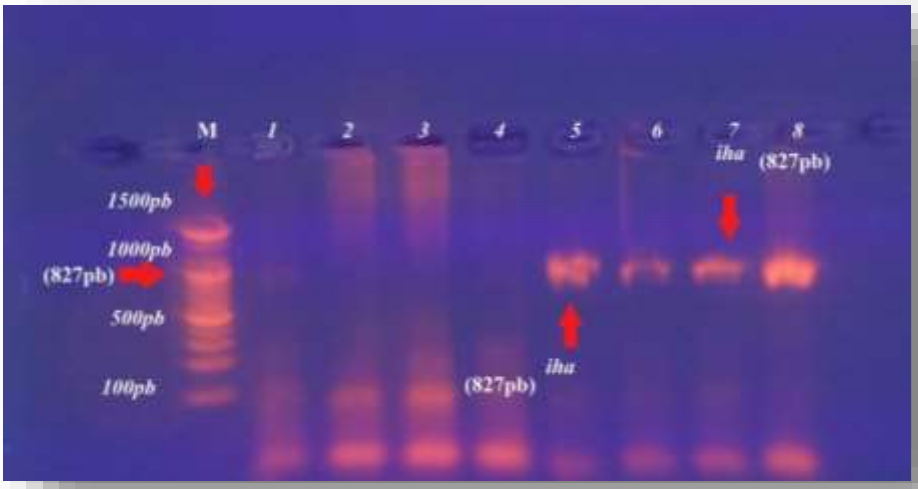
أمتلاكها لجين *irp2* , و (9) عزلة بنسبة (30.0%) أمتلاكها لجين*afa* , بينما أظهرت (4) عزلات فقط بنسبة (10.0%) من العزلات أمتلاكها لجين *iha* , وكانت (11) عزله وبنسبة (36.6%) بالنسبه للجين *pap* .لم تسجل اي عزله احتوائها على الجين *tst* وكما موضح في الجدول (4):

جدول(4): عزلات *(E.coli)* بأستعمال تقنية الـSingle &Multiplex PCR

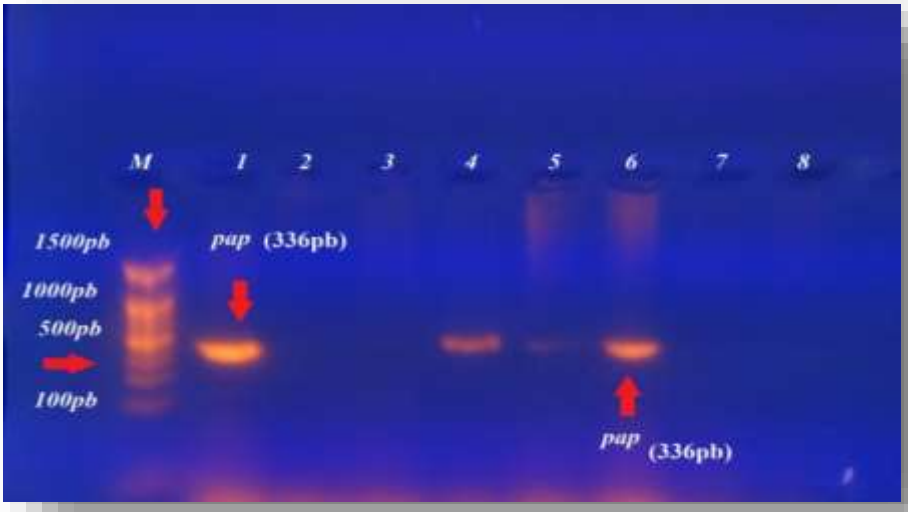
الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة Virulence Factor genes	عدد عزلات الـ *E.coli*	النسبة المئوية (%)
Pap	**11**	**36.6%**
afa	**9**	**30.0%**
hly	**29**	**96.6%**
iha	**3**	**30.0%**
irp2	**30**	**100%**
tst	**0**	**0.0%**



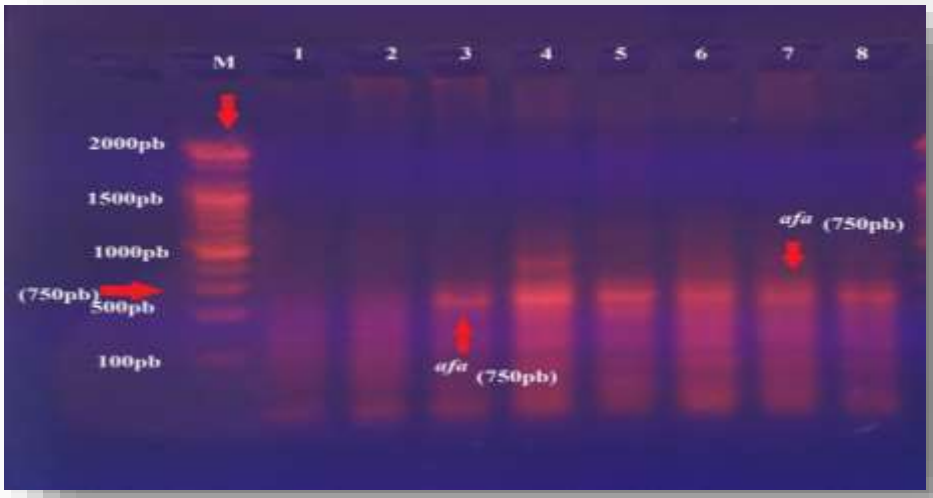
الشكل (3): نواتج تضخيم الجين *irp2* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنيةSingle PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M =(DNA Ladder100-1500bp) , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجين *irp2* المسؤول عن اخذ الحديد من خلية العائل .



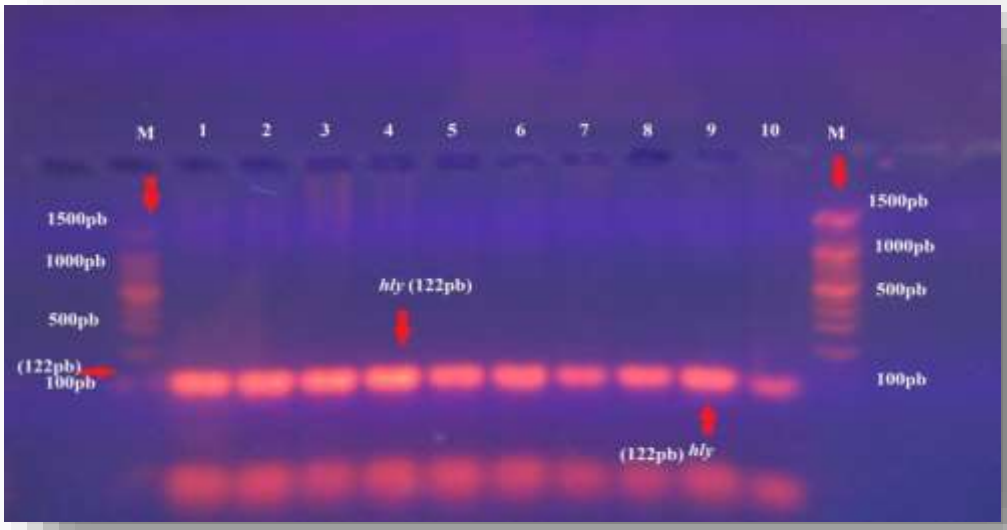
الشكل(4): يوضح نواتج تضخيم الجين *iha* لبكتريا ال *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM =(DNA Ladder100-1500bp), جميع العزلات أظهرت 4عزلات نتيجة موجبة لجين *iha* المسؤول عن تكوين المحفظه



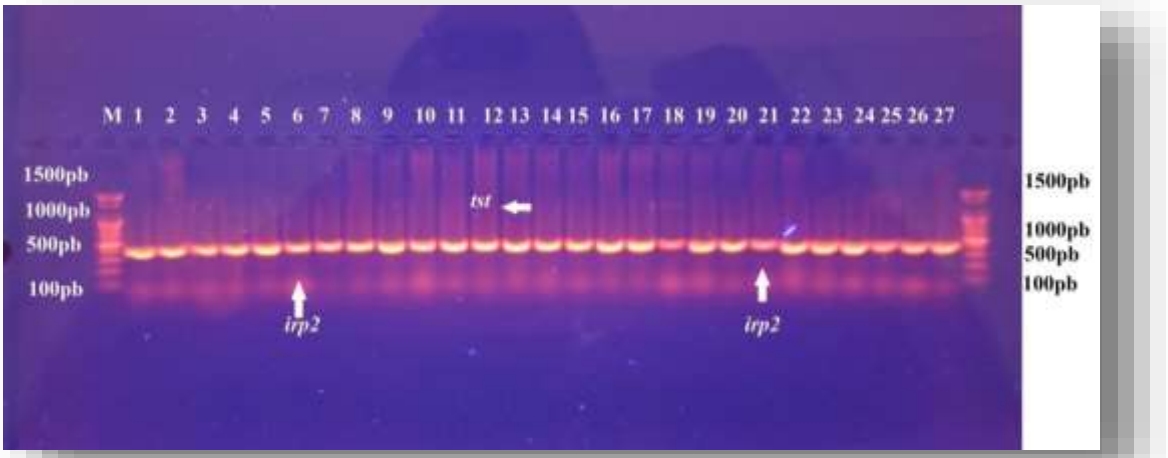
الشكل (5): يوضح نواتج تضخيم الجين *PAP* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM =(DNA Ladder 100-1500bp), أظهرت 11عزله نتيجة موجبة لجين *pap* المسؤول عن عوامل الالتصاق.



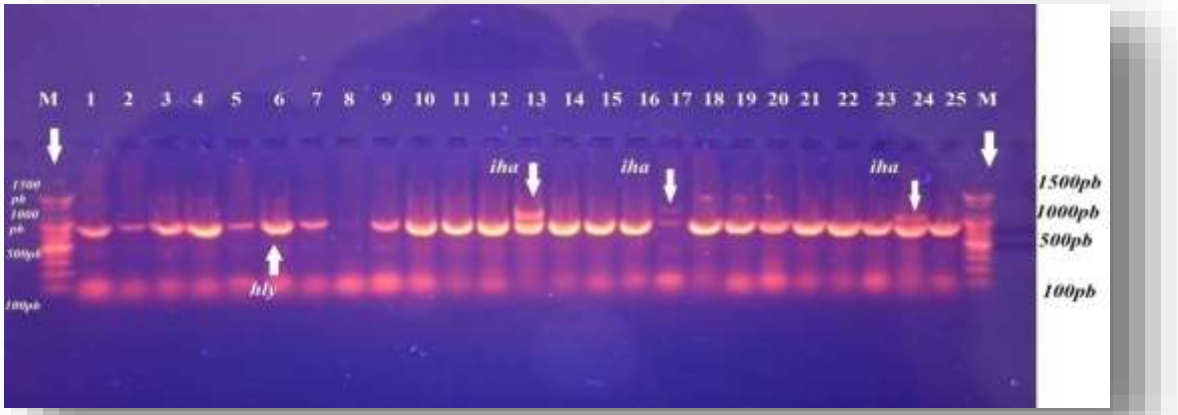
الشكل (6):يوضح نواتج تضخيم الجين *afa* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM =(DNA Ladder 100-1500bp), حيث ان 9عزلات اظهرت نتيجة موجبة لجين *afa* المسؤول عن عامل الالتصاق a fimbrieal adhesion.



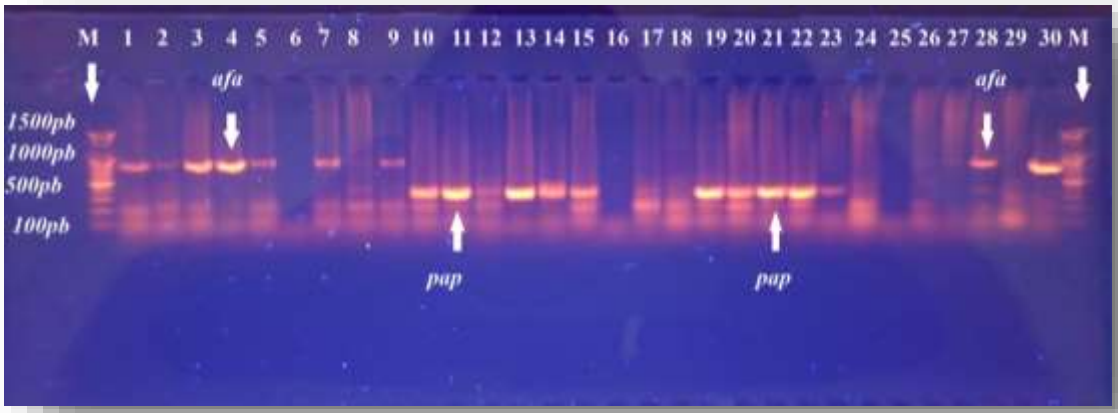
الشكل (7): يوضح نواتج تضخيم الجين *hly* لبكتريا *الـ E.coli* بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM =(DNA Ladder 100-1500bp), حيث ان 29 عزله أظهرت نتيجة موجبة لجين *hly* المسؤول عن انتاج الهيمولايسين المحلل للدم .



الشكل (8): يوضح نواتج تضخيم الجينات(*irp2+tst*) لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M =(DNA Ladder 100-1500bp), حيث أظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة لجين*irp2* , ولم تضهر أي من العينات نتيجه موجبه للجين *tst* المسؤول عن متلازمة الصدمه السميه .



الشكل (9): يوضح نواتج تضخيم الجينات (*hly+iha*) لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M =(DNA Ladder 100-1500bp), حيث اظهرت 29 عزله نتيجه موجبه للجين *hly* بينما فقط 4 عزلات اظهرت نتيجه موجبه للجين *iha*.



الشكل (10): يوضح نواتج تضخيم الجينات (*pap+afa*) لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM= 100- DNA Ladder (1500bp), حيث أظهرت 9عزله نتيجة موجبه للجين *afa* بينما أظهرت 11 عزله فقط بنتيجة موجبه للجين *pap* .

المناقشه Discestion:

عزل بكتريا الـ *E.coli* وتشخيصها

تمت عملية جمع العينات في هذه الدراسة من أصابات خمج حويض الكلى وما يترتب على ذلك من إجراءات تشخيصية ووقائية وعلاجية وقد تم تشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة تشخيصا أوليا من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيمو حيوية . تم زرع عينات الادرار في وسط الدم الصلب Blood Agar للحصول على مستعمرات نموذجية ، وكانت المستعمرات ناعمة ، مرتفعة قليلاً ، وتتراوح أقطارها بين (1-3) ملي متر ، ومحاطة بهالة تحلل نوع بيتا (β-hemolysis) ، كما ظهرت المستعمرات النامية على وسط اغار الماكونكي بلون وردي فاتح ،لماعه, مرتفعه , دائريه,وبلغت أقطارها (1-2) ملي متر تقريبا ، وهذه النتائج كانت متوافقة مع ماذكر(22) و (13).أظهرنتائج الفحص المجهري ان خلاياالبكتريا المعزولةعصوية الشكل، متجمعة بصورة ثنائية اومفرده ،وسالبه لصبغة غرام وهذا يتوافق مع ما ذكر من قبل (14) و (23) . اظهرت النتائج ان 56% من عينات اصابات خمج حويض الكلى كانت تسبب بواسطة بكتريا *E.coli* , بينما كانت بقية الانواع البكتيريه بنسبة 44 % وهذا يتطابق مع (27)(25)(26)(24)(1)(28)(29). ولايمكن تفسير هذه النتيجه بشكل دقيق الا انه ربما يعود السبب الى قابلية بكتريا *E.coli* على التكيف في المسالك البوليه لدى الانسان بدرجه عاليه نتيجة تحملها للظروف البيئيه في هذه الاماكن وكذلك امتلاكها لعوامل ضراوه وامراضيه مهمه جدا في الاصابه , منها عوامل الالتصاق التي توجد على سطح اهداب البكتريا حيث يحتوي الجدار البطاني للقناة البوليه مستلمات لهذه اللواصق والتي تعد الخطوه الاولى في الاصابه حيث تتمكن البكتريا من الالتصاق على النسيج الطلائي المبطن للقناة البوليه وبالتالي يعد الالتصاق الخطوه الاولى في الاجتاح والغزو البكتيري , وكذلك امتلاكها لعوامل ضراوه اخرى مثل انتاج الكبسوله وانتاج سموم تحلليه وغيرها من عوامل الضراوه المهمه التي تساعد البكتريا في غزو القناة البوليه وحدوث الاصابه , وجاءت هذه النتائج متفقه مع ما جاء به كل من(31)(30) . وكذلك مطابقه لدراسة (32) , والسبب الاخر الذي يشكل الاهميه الكبرى في كون بكتريا *E.coli* هي من اكثر انواع البكتريا المسببه لخمج المسالك البوليه يعود الى انتقال هذه البكتريا من فتحة المخرج التي توجد فيه كنبيت طبيعي الى الفتحه البوليه وبالتالي تدخل وتسبب المرض وهذا يتفق مع ما جاء به (32) .في مجال دراسة العلاقه بين الاصابه بالمرض والجنس فقد أظهرت النتائج ان الاناث كانت اعلى بكثير من الذكور في اصابات خمج حويض الكلى واصابة المسالك البوليه بصوره عامه حيث وصل عدد الاناث المصابات بخمج حويض الكلى 41 من اصل 56 وبنسبة 73.3%, بينما وصل عدد الذكور المصابين الى15 من اصل 56 وبنسبة 27.7% , وهذا يتطابق مع ما توصل اليه (33)(34) , وهذا غير معروف السبب بصوره اكيده لكن قد يكون بسبب قرب فتحة الشرج من الفتحه البوليه وقصر الحالب عند الاناث اكثر بكثير من عند الذكور مما يؤدي الى سهولة دخول البكتريا الى المجرى البولي للاناث اكثر من الذكور بالاضافه الى افرازات البروستات ذات الخاصيه المضاده للبكتريا والتي توفر حمايه ضد الغزو البكتيري (36) اما بالنسبه للفئات العمريه فقد بينت النتائج ان اكثر فئه عمريه كانت تتراوح بين 30 سنه فما فوق , يليها الفئه العمريه بين (20-30 سنه) بينما جائت الفئه العمريه بين (10-20 سنه) بالمرتبه الثالثه وجائت الفئه العمريه 10 سنوات فما دون بالمرتبه الرابعه من الاصابة وهذه النتائج كلها تتطابق مع ما توصل اليه (38)(37)(39)(40) . بينما تفاوتت هذه النتائج مع ما جاء به (41) الذي اوضح ان فئة الشباب هي اكثر فئه تصاب بالمرض تليها فئة الكهول ومن ثم فئة المراهقين والاطفال بالمرتبه الثالثه . الا ان الاتجاه العام متوافق لما توصلت اليه الدراسه الحاليه التي بينت بان الاناث هن الاكثر اصابه من الذكور في جميع الفئات العمريه , وكذلك فان احتمال الاصابه بالمرض يزداد مع التقدم بالعمر .اما كون ان فئة الشيخوخه هي اكثر فئه عمريه تصاب المرض فان ذلك يعزى الى فقد وجد ان المرض يزداد طرديا مع زيادة العمر (42) , والسبب في ذلك يعود الى ضعف المناعه الطبيعيه بتقدم العمر وتأثير بعض امراض الشيخوخه والامراض المزمنه التي تيسر التعرض للاصابه بخمج المسالك البوليه مثل داء السكري وهذا يتفق مع ما جاءت به دراسة

الحديثي (43) ففي حالة النساء من فئة الشيخوخه وجد انه هناك عدة عوامل تساعد على حدوث المرض لديهن مثل التلف الوظيفي للجهاز البولي (44) والتي تاتي مع التقدم بالعمر مما يؤثر في الوظيفه الطبيعيه للجهاز البولي (45), كذلك زيادة المتبقي من البول في المثانه بالاضافه الى بعض السلوكيات للمرضى منها التعايش مع المرض التاريخ الصحي للاصابه بالمسالك البوليه وكذلك مكان الاقامه (46,) اما بالنسبه للذكور التابعين الى فئة الشيخوخه فان حدوث خمج المسالك البوليه يزداد بنسبة 5% مقارنة مع الذكور الاقل عمرا وذلك بسبب تضخم البروستات prostatic hypertrophy (36).اما كون ان البالغين هم ثاني فئه عرضه للاصابه من المراهقين والاطفال فانه يعزى الى عدة عوامل مؤثره منها الدوره الشهريه عند الاناث(47), ومايتبعه من تغير في الفلورا الطبيعيه وتغير حموضة المهبل pH يؤدي الى استيطان البكتريا للخلايا الطلائيه مما يسهل حدوث الاصابه (48) (49) وقد اظهرت نتائج الدراسه الحاليه ان هم اقل فئه عمريه معرضه للمرض وقد اضاف (50)ان الاصابه بخمج المسالك البوليه هو من الامراض الشائعه لدى الفتيات في عمر المراهقه ويصاحبه عسر بالتبول بشكل رئيسي , وان الطفل السليم الطبيعي لايتعرض للاصابه بخمج المسالك البوليه وذلك لعدة اسباب منها : الوضع التشريحي والفسيولوجي السليم للمجرى البولي , والذي يكون فيه جريان البول احادي الاتجاه unidirectional urinary flow , والتفريغ الكامل للمثانه من البول خلال فترات منتظمه كل هذه الاسباب تحمي الاطفال من الاصابه (35) لذا جاءت فئة الطفال نادره الحدوث في هذه الدراسه

تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR

تم أستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR والمتعدد Multiplex PCR في التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة Virulent Factors في بكتريا *E.coli*,.اذ أظهرت النتائج وجود 29 عزله من اصل 30 وبنسبة 96.6% أمتلاكها *hly* وهذا يختلف قليلا مع ما جاء به (52) اذا اظهر ان نسبة هذا الجين كانت 50.4% وكذلك يختلف مع (53) الذي جاء بنسبة 53.0% من عزلات الـ *E.coli*امتلاكها لجين *hly* وكذلك يختلف عن ما جاء به (52) اذ بين ان نسبة 25.3% من عزلات الـ *E.coli* تمتلك هذا الجين ,الا انها تتطابق مع ماجاء به (55) حيث كانت النسبه التي توصل لها 93.2 % , ويعتبر جين *hly* عامل ضراوه مهم لبكتريا *E.coli* المسببه لخمج المسالك البوليه حيث يشفر لافراز بروتين السموم التحلليه وبالتالي فان هذا البروتين او الانزيم له القدره في الحث على التحلل الاوزموزي لكريات الدم الحمراء لان يعمل على ثقب الغشاء الخارجي للكريات الحمراء وان عدة انواع من بكتريا *E. coli* لها القدره على انتاج عدة انواع من بروتين الهيمولايسين يتضمن الهيمولايسين الخارج خلوي والمسمى (α-hemolysin) وهذا قيد الدراسه الحاليه وبالتالي فهو عامل مهم جدا لخمج حويض الكلى كما جاء به (52) , وان هذه الانزيمات اكثر ذيفانية للخلايا الطلائية الانبوبية المكونة للكلية من العزلات غير المنتجة لهذا النزيم اي العزلات التي لاتمتلك الجين *hly* المشفر لهذا الانزيم , وذكرت دراسات اخرى ان ذيفانيته تتاتى من تدمير خلايا المجرى البولي، وتحرير الانزيم الحال (Lysozyme) والانزيمات المرتبطة معه، وتدمير كريات الدم البيض والخلايا احادية النواة بشكل خاص، والحث على صنع الليوكوترين (Leukototriene)، كما أظهرت 30 عزلة من اصل 30 و بنسبة 100% أمتلاكها لجين *irp2* وهذا يختلف عن ما جاء به (56) التي كانت نسبة وجود هذا الجين في دراسته 32.0% من عزلات الـ *E.coli* وكذلك تختلف مع ما جاء به (52) اذ اظهر امتلاك 11.4% من عزلات الـ *E.coli* امتلاكها لهذا ا الجين , بينما كان يتفق مع ما جاء به (57) حيث كانت نسبة امتلاك العزلات لهذا الجين هي (96.2%) , ولهذا الجين اهميه كبيره في مساعدة البكتريا في اخذ الحديد وخزنه لاستخدامه في الظروف اللاهوائيه حيث يشفر هذا الجين لانتاج السايدروفور , يعد انتاج السايديروفور (Siderophore) (وهي مجموعة من الحركيات التي لها الفة عالية للحديد وذات اوزان جزيئية واطئة وتمتلك الفة كافية لأن تحول الحديد الى حالته السائلة او سحبه من المعقدات الحاوية عليه ثم تسهل عملية نقله الى داخل الخلية البكتيرية بوساطة مستقبلات خاصة) عامل فوعة مهم عن طريقه تستطيع البكتريا الممرضة مقاومة البروتينات الناقلة للحديد داخل جسم المضيف إيكونالحديد ضروري لتضاعف أعداد البكتريا وهي خطوة مهمة للاستعمار (58),كما اظهرت نتائج الدراسه الحاليه وجود 9 عزلة من اصل 30 و بنسبة 30.0% أمتلاكها لجين *afa* وهذا يختلف عن ماجاء به (52) حيث كانت النسبه التي توصل لها 8.2 % من العزلات امتلاكها لهذا الجين, وكذلك يختلف عن ما جاء به (56) في دراسته حيث كانت نسبة وجود هذا الجين لديه 45.3 % , بينما كانت النتائج في هذه الدراسه لهذا الجين تتفق مع ما جاء به (57) حيث توصل لنسبة 34.3 % لهذا الجين وكذلك تتفق مع ما توصل اليه (55) حيث كانت نسبته التي توصل اليها 32.9 % , ويعد هذا الجين احد جينات الاهلاب التي تساعد البكتريا في الالتصاق وبالتالي اجتياح النسيج البطاني للمسلك البولي حيث يشكل الالتصاق الخطوه الاولى في تموقع البكتريا وتمركزها ومن ثم تكاثرها وبالتالي احداث الاصابه (58) , ففي بعض الاحيان هناك لاصق واحد يظهر ويكون له الدور المهم في احداث المرض , وفي احيان اخرى فات المسبب المرضي يكون له القدره على انتاج عدة انواع من اللواصق المختلفه وعلى مراحل مختلفه من الاصابه كما في بكتريا *E.coli* . بينما أظهرت 4 عزلات فقط من اصل 30 و بنسبة (10.0%) من العزلات أمتلاكها لجين *iha* وهذا يختلف عن ماجاء به (52) حيث توصل لنسبة 17.9 % ويختلف ايضا مع ما جاء به (56) حيث كانت نسبته 21.0% , بينما كان يتفق مع ما توصل اليه (57) حيث كانت النسبه التي توصل اليها 13.8%, و يعتبر جين *iha* هو الجين المسؤول عن تكوين المحفظه (capsule) التي تساعد البكتريا على الالتصاق بالجدار الطلائي لنسيج المجرى البولي وكذلك للمحفظه اهميه كبيره في مقاومة البكتريا للمضادات الحيويه كما ان وجود المحفظة يجعلها مقاومة لعملية البلعمة بوساطة كريات الدم البيض (52) . واظهرت الدراسه الحاليه 11 عزله من اصل 30 وبنسبة 36.6% بالنسبه للجين *pap* وهذا يخالف ما جاء به (55) حيث كانت نسبته 91.3 %, وكذلك مختلف لما جاء به (59) حيث كانت النسبه التي توصل اليها 91.0% من هذا الجين, بينما يتفق تماما مع ما توصل اليه (60) حيث كانت النسبه 36.0 % لجين *pap* وكذلك يتفق مع ماجاء به (61) حيث توصل لنسبة 32.7% لجين *pap* و جدا قريب مع ماتوصل اليه (55) حيث كانت النسبه التي توصل اليها 30% لهذا الجين بينا يختلف مع ما جاء به (59) حيث توصل الى نسبة 91.0% لهذا الجين , ويعتبر هذا الجين مهم بالنسبه لضراوة بكتريا *E.coli* حيث لضمان حصول المرض لابد للبكتريا من ان تمتلك القدره على الوصول الى النسيج او العضو الملائم ومن ثم استعمار المنطقه وهذا له علاقه بقدرة هذه البكتريا على اختراق الاغشيه

المخاطيه واجتياح جسم المضيف وبالتالي فان اجتياح النسيج يبدا من قدرة هذه البكتريا على الالتصاق بواسطة الخمل النوعي الذي تمتلكه هذه البكتريا وارتباطه بمستقبلات نوعيه توجد في الخلايا الطلائيه المبطنه للغشاء المخاطي في منطقة الاصابه و بسبب ارتباط الجين *pap* مع P-fimbriae الاهلاب التي تساعد البكتريا على الالتصاق بالخلايا البطانيه لنسيج المجرى البولي حيث تعتبر خطوة الالتصاق اول خطوه تقوم بها البكتريا للغزو النسيجي (52) ويعتبر الخمل النوعي P من الانواع المهمه التي تساعد البكتريا على الالتصاق حيث يعتبر جين *pap* المسؤول عن التشفير للخمل P من عوامل الامراضيه المهمه لاحداث المرض وخصوصا في حويض الكلى (62) وما يدعم هذه النتيجه ما توصل اليه (54) . ولم تسجل اي عزله احتوائها على الجين *tst* وهذا يتطابق مع ماجاء به (52) و (56) حيث لم تسجل دراستهم اي تواجد لهذا الجين بين عزلاتهم .

المصادر References:

1-Kunin, C. M. (1994)**.** Urinary tract infections in females. Clin. Infect.Dis. 18: 1-12.

2-Fischbach , M., Simeoni , U., Mengus , L . , Jehl , F ., Monteil , H. ; G eisert, J.and Janin , A.(1989) .Urinary tract infections with tissue penetration in a children : Cefotaxime Compired with Amoxycillin/clavulanate . J.Antimicrob . chemother . (24): 177-183.

3-Martelli , A.; Cortecchia , V. and Ventriglia , L.(2000). Aztreonam in the treatment of urinary tract infection : A multicentertral . Chemother. , 35 (suppl 1) : 8-14.

4- Karkkainen, U-M. ; Kauppinen, J. ; Ikaheimo, R. ; Katila, M. L. and Siitonen, A. 1998. polymerase chain reaction. J. Microbio. Methods, 34(1): 23-29.

5- Sokeland , J. (1989) . Infectious diseases : Non specific infections disease . In: Urology. 2nd ed. Thieme textbook .P. 164.

6-Ayazi ,P.; Moshiri, S.A.; Mahyar, A. and Moradi, M.(2003) The effect of vitamin A on renal damage following acute pyelonephritis in children. Eur. J. Pediatr, 2011;170:347-50.

7-Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; and Sambrook, J. 1982. Molecular coloning . A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 545 pp.

8-Bollgren, I. and Winberg, J. (1998). The periurethral aerobic flora in girls highly susceptible to urinary infections. Acta Paediatr Scand 65(1): 81-87.

9-Bachur, R., and G. L. Caputo. (1995). Bacteremia and meningitis among infants with urinary tract infections. Pediatr. Emerg. Care ,11**:**280–284.

10-Otto, G.; Magnusson, M. ; Svensson, M. ; Braconier, J. and Svanborg , C. (2001) . *pap* genotype and P fimbrial expression in *Escherichia coli* causing bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. Clin. Infect. Dis. 32:1523–1531.

11-Mladin, C.; Usein, C.R.; Chifiriuc, M.C.; Palade, A.; Slavu, C.L.; Negut, M. and Damian, M. (2009). Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patietns with neurogenic bladder. Rom. Biotechnol. Lett. 14:4900-4905.

12- Soto, S.; Jimenez de Anta, M. and Vila, J. (2006). Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or-independent pathways, respectively. Antimicrob Agents Chemother. 50: 649 – 653.

13- MacFaddin, J.F.(2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

14-Collee, J.G., Marmion, B.P, Fraser, A.G. and Simmons, A.(1996). Mackie & McCarthy–Practical Medical Microbiology. 4th ed., Longman Singapore Publishers (Pte) Lt. Singapore pp 361 – 381.

15-Yamamoto, S.; Terai, A.;Yuri, K.; Kurazono, H.; Takeda, Y. and Yoshida, O.(1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol. Med. Microbiol.12:85-90.

16- Le Bouguenec ,C.; Archambaud, M. and Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30:1189-1193.

17- Ewers, C.; Janssen, T.; Kiessling, S. Philipp, H.C. and Wieler, L.H. (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. Avian Dis. 49:269-273.

18-Johnson , J.R.; Russo, T.A.; Tarr, P.I.; Carlino, U. ; Bilge, S.S.; Vary, J.C. Jr. and Stell, A.L. (2000a). Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN* (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. Infect. Immun. 68:3040-3047.

19-Bauer, A.W.; Kirby,W.A.M.; Sherris, J .S. and Turk,M. (1966) . Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method . Am.J.Clin.Pathol.,45: 493-496.

20-Forbes, B.A., Sahm, D.F., and Weissfeild, A.S. (2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby, USA. pp: 323.

21-Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) . (2010) .Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M 100-S20.,Wayne, Pannsylvannia;30 (1).

23-Brooks, G.F.; Butel, J.S.and Morse, S.A .(1998). antimicrobial chemotherapy, In: Medical microbiology. (21ed). Typo Press. Lebanon.

24-Funfstuck, R. ; Wolfram, M. ; Gerth, J. ; Schubert, K. ; Staube, E. and Stein, G. (1999). The influence of ofloxacin on the parasite-host inter-relationship in patient with chronic urinary tract infection. International Journal of Antimicrobial Agents 11: 279-303.

25- Akbar, D. H. (2001). Diabetics and non- diabetics patients. Saudi Med. J. 22(4): 326-329.

26-Delzell, J. E. J. R. and Lefevre, M. L. (2000). Urinary Tract InfectionsDuring Pregnancy American Family Physician. www. aafp.org/afp/20000201/713. html.

27- Wullt, B. ; Bergsten, G. ; Samuelsson, M. and Svanborg, C. (2002). The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. Interna.l J. of Antimicrob. Agents, 19: 522-538.

28-Stamm, W. E. and Hotton, T. M. (1993). Management of urinary tractinfection in adults. N. Engl. J. Med. 329: 1328-1334 .Kunin, C. M. 1994. Urinary tract infections in females. Clin. Infect.Dis. 18: 1-12.

29- Talukder, M. A. ; Admaway, A. O. and Abu Al Saud, A.(1982). Urinary tract infection: a study of bacterial etiology in Riyadh military hospital. The Seventh Saudi Medical Meeting.

30-Ishtoya , Satoshi . (2003).Distribution of Afae Adhesins in Escherichia coli isolated from Japanese patient with urinary tract infection .J. Uro. May, 169(5). 1758-1761.

31-Naylor, G.H. (1998) .A16 month analysis of Urinary tract infection in children. J. Med. Microbio. 17 (1). 31-36 .

32-Haslett, C.; Chilvers , E.R.; Hunter , J.A.A. and Boon , N.A. (1999). Davidson`s principles and Practice of medicine .18th ed. Churchill Livingstone, New York .P. 458-470 .

33-Howes, D. S. (2002). Urinary Tract Infection, Female. e Medicine ..www.emedicine.com/EMERG/topic 626.htm.

34-Larabi, K. ; Masmoudi, A. and Fendri, **C.** (2003). Bacteriological andsusceptibility study of 1.930 strains isolated from UTIs in a Tunisuniversity hospital . Me'decine et Maladies Infectieuses 33:348-352.

36-Qunibi , W. Y. (1982). Urinary Tract infection. K. F. Specialist Hos. J. 21: 37-46.

37-Al Mugeiren, M. M. ; Al Rasheed, S. A. ; Abdulrrahman, M. B. ; AlOufi, M. A. ; Patel, P. J. and Al Boukai, A. A. (1992). Are childrenwith urinary tract infection adequately managed. S. Med. J.13(4): 300-304.

38-Abu Daia, J. M. ; Al-Aaly, M. A. and De Castro, R. (2000). Urinary tract infection in childhood. Saudi Med. J. 21(8): 711-714.

39-Avalos, G. A. ; Silva , M. L. Z. ; Nova, A. D. ; Tapia , G. A. and Benavides, S. A. . (1999). Asymptomatic Bacteriuria andInflammatory Response to Urinary Tract Infection of Elderly Ambulatory Women in Nursing Homes. Arch. Med. Res. 30 : 29-32 .

40-Orenstein, R. and Wong, E. S. (1999) .urinary tract infections in adults.American Family Physician .www. aafp.org /afp/99031ap /1225. Html .

41-Winberg, J. ; Anderson, H. J. ; Bergstrom, T. ; Jacobsen, B. ; Lansion, H. and Lincoln, K. (1974). Epidemiology of symptomatic UTI in childhood. Acta. Paediat Scand 63(252): 1-20.

42-Riff, L. J. M. (1978). Evaluation and treatment of urinary infection. Med. Clin. North Am. 62(6): 1183-1199.

43- AL-Hadithi , H.A.(1996) .Urinary tract infection in Ramadi city : A bacteriological study . J.AL-Anbar univ 1 (1) : 76 – 81 .

44-Dontas, A. S. ; Papanayiotou, P. ; Marketos, S. ; Papanicolaou, N. and Economoou, P. (1987). Bacteriuria in old age. Lancet 2: 305.

45-Carlile, A. ; Davies, I. ; Rigby, A. and Brocklehurst, J. C. (1988). Age changes in the human female urethra: a morphometric study. J.Urol. 139:532.

46-Nicolle, L. E. (1994). Urinary tract infection in the elderly. J. Antimicrob. Chemother. 33: 99.

47-Fair, W. R. (1999). Observations on the origin of urinary tractinfections. In: Kincaid-Smith, P. E. Ferley, K. F., eds: Renal Infections and Renal Scarring. Mercedes 1999 pp 89-101.

48-Svanborg-Eden, C. S. (1978). Attachment of *E. coli* to human urinary tract epithelial cells. Acta. Microbiol. Scand (Supp l).

49-Stamey, T. A. ; Wehner, N. ; Mihara, G. *et al.*, (1978). The immunologic basis of recurrent bacteriuria : role of cervicovaginal antibody in enterobacterial colonization of the introital mucosa. Medicine 57(1):47-56.

50- Millar, L. K. and Cox, S. M. (1997). Urinary tract infections complicating pregnancy. Infect Dis. Clin. North Am. 11: 13-26.

51- Soto, S.M.; Guiral ,E.; Bosch, J.;Vila, J. (2009). Prevalence of the set-1B and astA genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. Microb. Pathog. 47:305-307.

52- Karimian1, A. ; Momtaz, H. and Madani , M.(2012). Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr. J. M. Res, 6 (39): 6811-6816.

53- Johnson, J.R.; Russo, T.A.; Tarr, P.I.; Carlino ,U. ;Bilge, S.S. and Vary, J.C. (2000). Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN* (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. Infect. Immun.68:3040-3047.

54- الجبوري, احمد صالح مشكورو شبر, ابتهال ادريس. (٢٠٠٥) .دراسة دور الالتصاق في احداث الخمجات الناجمه عن بكتريا *Escherichiacoli*. رسالة ماجستير,كلية العلوم , جامعة الكوفه.

55- Ruiz, J. K. ; Simon, J. P. ; Horcajada, M. V. ; **Margarita, B. G. ; Roig, A. ; Jose A. M.** ; **Teresa, J. A ; Josep M. and Jordi V.**(2002).Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichiacoli* Causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. J. Clin. Microbio. 12:25 - 41.

56- Hassan, M.; Azam, K. ; **Mahboobeh, M.; Farhad ,S.; Dehkordi, R. ; Meysam, S. and Negar, S**.(2013). Uropathogenic Escherichia coli in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Department of Microbiology, ShahreKord Branch, Islamic Azad University, P.O. Box: 166, ShahreKord, Iran.

57- Bahalo, S. ; Elahe,T. ; Tajbakhsh, S. ; Momeni, M. and Tajbakhsh, F.(2013). Detection of Some Virulence Factors of *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection Isolated of Children in Shahrekord Iran by Multiplex PCR. Middle-East Journal of Scientific Research 14 (1): 29-32.

84-Livermore, D.M.(2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J. Antimicrob. Chemother. 47: 247–250

58- Wult,B.G.;Connell,H.Ollano,P.R.(2000).P-fimbriae enhance the early establishment of *E.coli* in the human urinary tract .Mol.Miccrobiol .38:456-464.

59- Hae-Kyung, P.; Woo, S.; Lee1, E. ; Cha, J.; Park, H. and Lee, S. J.(2011). *Escherichia coli pap* Genes as well as Adenovirus Type 11 and Type 21, and BK Virus were Involved with SevereUrinary Tract Infection in Infants. Journal of Bacteriology and Virology.41:245-254.

60- Usein , **C.R. ; Damian, M.; Chitoiu** , **D. T.; Capusa** , **C. F.; Tudorache** , **D.; Nica, M. and Bouguénec,C. L**.(2001). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. J.Cell.Mol.Med.(5)3: *303-310*.

61- Tiba, M.R.; Yano, T. and Leite, D. S.(2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 50(5):255-260.

62- Knobl, T. ; Gomes, T. A. ; Vieira, M. A. ; Bottinoa, J. A. and Ferreira, A. J. (2004) . Detection of *pap, sfa, afa* and *fim* adhesinencodingoperons in avian pathogenic *Escherichia coli* . Inter. J. Appl. Res. Vet.Med. , 2 (2); 135-141.

Detection of some virulance factor genes for *E.coli* bacteria wich isolated from patient with pyelonephritis in AL-Dewaniya City

Rawaa Magid Mohammed MaithamGhalyYousif

Biology Department , Collage of Science , Al-Qadissiay University

Abstract:

One handred urine sample were collected of different ages for patients with pyelonephritis who visited the Hospital Diwaniya Teaching and Hospital of women and pediatries in AL-Diwaniya City during the period from November 2012 to April 2013 to isolate of *E.coli* bacteria , the results showed of 56 (56%) isolates to *E.coli*, while 44 (44%) isolates belong to other bacterial types. It was also detection some of the genes of virulence factors using a single and multiplex polymerase chain reaction (PCR) , The PCR results of all *E.coli* isolates are: 30 isolates (100%) of *irp2* gene (responsible for taking the iron from the blood), 11 isolates (36.6%) of *pap* gene (responsible for producing the type P fimbrea) , 9 isolates (30.0%) of *afa* gene (responsible for pilli) , 29 isolates (96.6%) of *hly* gene (responsible for producing heamolysin toxins), 3 isolates (30.0%) of *iha* gene (responsible for the production of the capsule) , and finally did not record anyisolates of *tst* gene (responsible for toxic shock syndrome) .