التحري الوراثي والمظهري لبعض عوامل الضراوة لبكتريا *Escherichia coli* الممرضة للمسالك البولية

أ.م.د.ازهار نوري حسين الموسوي م.مثال كريم عباس الحسني*

.....

الخلاصة:

جمعت 282 عينة ادرار وسطي من مرضى يعانون من اعراض أخماج المسالك البولية بفئات عمرية مختلفة ولكلا الجنسين ، من المرضى المراجعين الى المستشفى التعليمي العام ومستشفى الاطفال والولادة التعليمي في مدينة الديوانية وللمدة من 1 /3 /2012 لغاية 1 / 8 /2012 ، وكانت 232 عينة (82.3%) ذات نمو بكتيري معنوي ، في حين كانت 50 عينة (17.7%) ذات نمو بكتيري غير معنوي ، توزعت العينات مابين 152 عينة (65.5%) من الاناث مقارنة بالذكور 80 عينة (34.5%) . أظهرت نتائج الفحوصات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيميوحيوية عائدية 94 عزلة بكتيرية لبكتريا *E.coli* .

استعملت العزلات المحللة للدم 40 عزلة أساسا" لدراسة اهداف البحث ، اذ استعملت هذه العزلات لدراسة بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا . اذ تم اختبار عزلات بكتريا *E.coli* المنتجة للهيمولايسين مظهريا ومن ثم دراسة بعض عوامل الضراوة مظهريا" وجينيا" باستعمال تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة (Polymerase Chain Reaction (PCR ، اذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع العزلات 40 عزلة (100%) كانت منتجة للبكتريوسين الذي يؤثر على العزلات الاخرى قيد الدراسة مظهريا" ، وكذلك احتوائها على الجين *Colicin* الكروموسومي بنسبة (100%) 40 عزلة . كما أظهرت النتائج احتواء 23 عزلة وبنسبة (57.5%) على المحفظة مظهريا" باستعمال طريقة الحبر الهندي ، وجينيا" باستعمال تقنية PCR وذلك بأمتلاكها الجين *KpsMII* الكروموسومي المشفر لانتاج المحفظة .

كما بينت نتائج الدراسة الحالية قابلية جميع العزلات قيد الدراسة على تلازن كريات الدم الحمراء للانسان مظهريا" ، وقد تبين ان (100%) 40 عزلة كان التلازن الدموي فيها من النوع الحساس للمانوز Mannose- Resistant Heamagglutination (MRHA) وهذا دليل على احتواء العزلات على الاهلاب من النوع الاول ، وان (30%) 12 عزلة كان التلازن الدموي فيها من النوع المقاوم لسكر المانوز MRHA Mannose-Sensitive Heamagglutination (MSHA) وهذا دليل على احتواء العزلات على الاهلاب من نوع P . إما من الناحية الجينية فقد بينت النتائج امتلاك العزلات قيد الدراسة على الجينين الكروموسوميين *fimH* بنسبة (100%) 40 عزلة ، و *papG* بنسبة (30%) 12 عزلة ، أي ان النسبة المظهرية مساوية للنسبة الجينية ، كما بينت نتائج الدراسة الحالية قابلية جميع العزلات المحللة للدم قيد الدراسة (100%) 40 عزلة على انتاج السايدروفور مظهريا" من خلال نموها على وسط M9 الخاص بالفحص الحاوي على مادة 2,2-dipyridin ، كما أظهرت النتائج أيضا" احتواء العزلات قيد الدراسة على الجين *iucD* البلازميدي المشفر لانتاج السايدروفور بنسبة (90%) 36 عزلة .

المقدمة:

تتأثر قدرة البكتريا الممرضة في أحداث الأصابة بعوامل داخلية محددة للبكتريا تسرع من غزو وتحطيم النسيج الهدف للمضيف المتحسس ، اذ ان عوامل الضراوة هذه تمثل جزء من سطح الخلية البكتيرية والنواتج الخلوية ، وان هذه العوامل قادرة على تعزيز الالتصاق وغزو انسجة المضيف ، كما ان لها دورا" فعالا" في الأمراضية Zecchinon *et al* (2005) .

* البحث مستل من اطروحة دكتوراه

تمتلك بكتريا (UPEC) *Escherichia coli* Uropathogenic صفات عديدة تفتقر اليها بكتريا *E.coli* المتعايشة ، اذ انها تحمل عناقيد الجين على الكروموسوم الرئيسي للبكتريا في " جزر الامراضية " Pathogenicity islands التي تشفر الى بعض عوامل الضراوة Oliveira *et al* (2011) . ومنها قابلية الالتصاق بالخلايا الطلائية البولية ، الانماط المصلية الخاصة بالمستضدات O , K ، المقاومة لعملية البلعمة والفعل القاتل للبكتريا للمصل الطبيعي ، انتاج الهيمولايسين ، الكوليسين ، الايروباكتين ، عامل التنخر السام للخلايا ، ويمكن التحري عن ضراوة السلالات عن طريق وجود التعبير الحقيقي لجينات الضراوة الموجودة فيها وكذلك الظروف البيئية للمضيف (Mabbett *et al* ., 2009) . الهيمولايسين يجهز البكتريا بالحديد نتيجة لتحليل كريات الدم الحمراء ، ويحفز الأمراضية بواسطة تحطيم الخلايا الطلائية والبلعمية (2005) Naveen & Mathai .

نظرا" لقلة الدراسات المتوفرة عن عوامل الضراوة لبكتريا *E.coli* الممرضة للجهاز البولي من الناحية الجينية ، لذلك أرتأينا ان يكون موضوع دراستنا التركيز على الاساس الجيني لهذه العوامل بأستعمال تقنية تفاعل سلسلة انزيم البوليمريز (Polymerase chain reaction (PCR ، فضلا" عن دراسة هذه العوامل من الناحية المظهرية ، وعليه تضمنت اهداف الدراسة مايأتي :-

- عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* الممرضة للجهاز البولي ، وتحديد العزلات البكتيرية المنتجة لأنزيم الهيمولايسين مظهريا" .
- التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا مثل امتلاكها لعوامل الالتصاق (الاهلاب) ومنها Type -1- fimbriae , P-fimbriae ، نظام اخذ الحديد (السايدروفور) ، انتاجها للبكتريوسين ، وعوامل مقاومة البلعمة (المحفظة) مظهريا" وجينيا" .

المواد وطرائق العمل

جمع عينات الادرار

جمعت 282 عينة ادرار وسطي Midstream Urine من المرضى المراجعين الى مستشفى الديوانية العام ومستشفى الاطفال والولادة في محافظة القادسية والذين شخصت اصاباتهم سريريا" بأخماج المسالك البولية وبأعمار مختلفة لمدة خمسة اشهر من 1 / 3 / 2012 ولغاية 1/ 8 / 2012 . أوصي المريض بجمع الأدرار الوسطي في قنينة بلاستيكية معقمة . زرعت العينات بعد اجراء عملية الطرد المركزي وذلك بأخذ ملء عروة ناقلة على وسط أكار الماكونكي ووسط أكار الدم ووسط EMB ، حضنت هوائيا" بدرجة 37 م ° مدة 24 ساعة .

- التحري عن العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates -

الفحوصات الزرعية والمظهرية

اخذت مستعمرة واحدة نقية من كل نمو موجود على الاوساط الزرعية الخاصة بالزرع الاولي وشخصت مبدئيا" اعتمادا" على الصفات الشكلية المتضمنة حجم المستعمرات ولونها وحافاتها وارتفاعها ، ثم درست صفات الخلايا تحت المجهر بعد تصبيغها بصبغة كرام المتضمنة شكل الخلايا وتجمعها . بعد ذلك شخصت العزلات اعتمادا" على ما جاء في (MacFaddin (2000 . كما تم تأكيد التشخيص بأجراء الفحوصات الكيميوحيوية المتمثلة بمجموعة اختبارات الـ IMViC ، وكذلك اختبار الاوكسيديز والكاتاليز التي اجريت وفقا" لما ورد في Brown (2007) .

- التحري عن قابلية البكتريا على انتاج الهيمولايسين Haemolysin production

استعمل لاجراء هذا الاختبار اربعة فصائل من الدم البشري (A , B , AB , O) وفقا" لما ورد في Seniror & Haghes (1987) .

- التحري عن بعض عوامل الضراوة Detection of some virulence factor

- التحري عن قابلية البكتريا على انتاج البكتريوسين Bacteriocin production test

تم اختبار قابلية البكتريا على انتاج البكتريوسين مظهريا" بأستعمال طريقة اقراص الاكار Cup assay الواردة في القصاب والخفاجي (1992) .

- التحري عن وجود المحفظة البكتيرية Bacterial capsule

تم اختبار قابلية البكتريا على انتاج المحفظة البكتيرية مظهريا" بأستعمال طريقة التصبيغ بالحبر الهندي وحسب ما جاء في Atlas وجماعته (1995) .

- التحري عن قابلية البكتريا على التلازن الدموي Haemagglutination test

تم اختبار قابلية البكتريا على تلازن كريات الدم الحمراء مظهريا" . والتعرف على سلالات البكتريا الحساسة والمقاومة للمانوز ، اجري الاختبار وفقا" لما ورد في Duguid وجماعته (1979) .

- التحري عن قابلية البكتريا على انتاج السايدروفور Sidrophore production

تم اختبار قابلية البكتريا على انتاج السايدروفور وفقا" لما ورد في (1987) Harrigan & MacCance .

- تفاعل السلسلة المتبلمرة Polymerase chain reaction

أجري فحص تفاعل السلسلة المتبلمرة للتحري عن بعض جينات الضراوة التي تمتلكها بكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج المسالك البولية ، بأستعمال بادئات الـ DNA لهذه الجينات المستعملة في الدراسة والمصممة بأستعمال برنامج تصميم البادئات (جدول ١) .

جدول (1) البادئات التي استعملت في هذه الدراسة مع تسلسل القواعد النايتروجينية وحجم ناتج الـ (PCR)

اسم البادئ	تسلسل القواعد النتروجينية		حجم ناتج التضخيم	الصفة المشفرة
fimH	TATTTGACGCCTGTGAGCAG	F	319 bp	انتاج اهلاب من النوع الاول
	ACGCGGTATTGGTGAAAATC	R		
papG	TTAAGAATATCGGCGGATGC	F	241 bp	انتاج اهلاب P
	TCCACCCCGTTAACTGAAAC	R		
kpsMII	AGCGAACCAGGGACTGTTTA	F	382 bp	انتاج الكبسولة
	GCGGCTTAACTCCACAACAT	R		
colicin	CTTCAGGCTGTGGGACGTAT	F	587 bp	انتاج الكوليسين
	GTTTTCAGCGGGTTCTTCTG	R		
iucD	TTCTCCGGACTGAAGGAAGA	F	508 bp	انتاج السايدروفور
	ATAAATCACGCCCCAGTACG	R		

اذ يتكون الفحص من عدة خطوات :

- استخلاص الحامض النووي الديوكسي رايبوزي Genomic DNA extraction

تم استخلاص الحامض النووي DNA الكروموسومي والبلازميدي من بكتريا *E.coli* وذلك باستعمال العدة الجاهزة وحسب تعليمات الشركة المجهزة ، وحفظ في درجة حرارة -20 م ° لحين اجراء فحص تفاعل سلسة انزيم البلمرة .

- تحضير هلام الأكاروز

حضر بحسب طريقة Sambrook وجماعته (1989) وكالآتي :

1- أذيب 1.5 غم من هلام الأكاروز Agarose gel في 100 ملليلتر من محلول الـ TBE buffer الدارئ

بتركيز (1X) وبأستعمال الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer مدة 15 دقيقة .

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 م ° وبعدها تم اضافة 3 مايكروليتر من صبغة الحامض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا" مع الهلام .

3- صب هلام الأكاروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة مدة 15 دقيقة ، تم ازالة المشط من الهلام بعناية لغرض عمل وتحديد الحفر Wells في الهلام اللازمة لحقن العينات المضخمة .

- تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة بأستعمال عدة الـ AccuPower® PCR PreMix وحسب تعليمات الشركة المجهزة كالآتي :

1- حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة في انابيب PCR المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة مع اضافة المكونات الأخرى لمزيج التفاعل كما في الجدول (٢) .

جدول (2) مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR pre mix

PCR master mix		Volume
DNA template		2.5 µL
Primers	Forward primer	1.5 µL
	Reversed primer	1.5 µL
PCR water		19.5 µL
Total		25 µL

2- بعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة تم غلق الأنابيب مع المزج بعناية بجهاز المازج الدوار Vortex مدة 5 ثواني .

3- نقلت الأنابيب الى جهاز المضخم الحراري Thermocycler لتفاعل السلسلة المتبلمر لأجراء عملية تضخيم الـ DNA DNA Amplication على وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية Thermocycling conditions لبكتريا *E.coli* والمتمثلة بعمليات فصل شريط الـ DNA Denaturation وارتباط البادئات مع الشريط المنفصل Annealing وتطويل سلسلة الـ DNA Extension .

- برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA

أجري تفاعل سلسلة البلمرة بأستعمال المضخم الحراري لجهاز الـ Thermocycler PCR ، وتم برمجة الجهاز كما في الجدول (٣) :

جدول (3) الظروف المثلى لتضخيم الـ DNA بواسطة المضخم الحراري .

PCR steps	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 C	5 min
Denaturation	30	95 C	5 sec
Annealing		55 C	30 sec
Extension		72 C	45 sec
Final extention	1	72 C	7 min

Hold	–	4 C	Forever

- الترحيل الكهربائي في هلام الأكار Agar gel electrophoresis

تم أجراء الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز 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 الـ PCR Products PCR وحسب طريقة (Sambrook *et al* ., 1989) .

- التحري عن حزم الـ DNA المستخلص Extracted DNA :

1- تم تحميل 9 مايكروليتر من العينات لكل حفرة بصبغة التحميل Loading dye (Bromophenol blue) 3 مايكروليتر ووضعت في الحفر .

2- غمر هلام الأكاروز بعد ذلك في محلول الترحيل TBE Buffer الدارئ بتركيز 1x حتى يصل (3-5) ملم بحيث يغطي سطح الهلام ثم وضع غطاء الترحيل بأحكام وربط الأقطاب الكهربائية بجهد القدرة Power supply ، تم ايصال التيار الكهربائي وتم الترحيل بفرق جهد 100 فولت وتيار 80 امبير مدة ساعة واحدة .

3- بعد أنتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج الـ PCR بأستعمال مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V Transilluminator للتحري عن وجود الـ DNA .

- التحري عن وجود حزم الـ DNA المضخم Amplified DNA :

1- أستعمل سلم القياس DNA ladder حجم (100-2000) زوج قاعدي في الحفرة الأولى لقياس ناتج أو حجم الـ DNA المضخم وذلك بمقارنة حجم الجين المضخم مع الحجوم أو الأوزان الجزيئية لسلم قياس Marker .

2- تم وضع 8 مايكروليتر من الـ DNA المضخم (ناتج الـ PCR) في الحفر ، بعد أكتمال عملية التحميل .

3- تم غمر هلام الأكاروز بأستعمال محلول TBE Buffer الدارئ المحضر بتركيز 1X ويغلق غطاء جهاز الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل بأستعمال تيار 100 فولت و 80 امبير مدة ساعة واحدة .

4- بعد أنتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستعمال مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد الحزم Bands وقياس أوزانها الجزيئية عند مقارنتها بالقيم القياسية للدنا القياسي DNA marker .

- لقد تم التحري عن انتاج البكتريوسين جينيا" بأستعمال تقنية الـ Multiplex PCR ، والبادئ المتخصص المجهز من قبل شركة (Monterial) Alpha والمصمم وفق برنامج تصميم البادئات ، ، وبعد استخلاص الـ DNA بأستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائيا" في هلام الأكاروز (1.5%) والكشف عنه بأستعمال صبغة الأثيديوم بروميد وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV).

- كما تم التحري عن انتاج المحفظة جينيا" بأستعمال تقنية الـ Multiplex PCR ، والبرايمر المتخصص المجهز من قبل شركة (Monterial) Alpha ، وبعد ترحيلها على هلام الأكاروز (1.5%) والمصبوغة بصبغة الاثيديوم بروميد وفحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية .

- كما تم التحري جينيا" عن وجود الجينين الكروموسوميين المشفرين لكلا النوعين من الأهلاب بأستعمال تقنية PCR Multiplex وبأستعمال البادئين المجهزين من قبل شركة (Monterial) Alpha .

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص Isolation & Identification

جمعت 282 عينة ادرار وسطي من مرضى يعانون من اعراض اخماج المسالك البولية بفئات عمرية مختلفة ولكلا الجنسين ، من المرضى المراجعين الى المستشفى التعليمي العام ومستشفى الاطفال والولادة التعليمي في مدينة الديوانية وللفترة من 2012/3/1 لغاية 2012/8/1 ، فقد وجد ان بكتريا *E. coli* حققت اعلى نسبة عزل (40.5 %) ، اما النسبة المتبقية (59.5 %) فكانت تشمل الانواع البكتيرية الاخرى المسببة لاخماج المسالك البولية (جدول ٤) . وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه طلحة (2009) والتي كانت (48.7 %) من مجموع العزلات المشخصة مختبريا" ، لكنها لا تتفق مع نتيجة Goswam وجماعته (2013) اذ بلغت نسبة عزل بكتريا *E.coli* (77.9%) 46 عزلة من المجموع الكلي للعزلات . ان انتقال بكتريا *E.coli* من مكانها الطبيعي في الامعاء ودخولها الى المسالك البولية مسببة الاخماج لهذه المسالك يفسر سبب ارتفاع نسبة الاصابة بهذه البكتريا (Robinson *et al* ., 2010) . ان هذه الاختلافات في نسب عزل بكتريا *E.coli* ربما يرجع الى المستوى الصحي والاجتماعي والاقتصادي في المجتمعات المختلفة .

جدول (4) بكتريا *E.coli* المعزولة من المرضى المصابين بأخماج المسالك البولية .

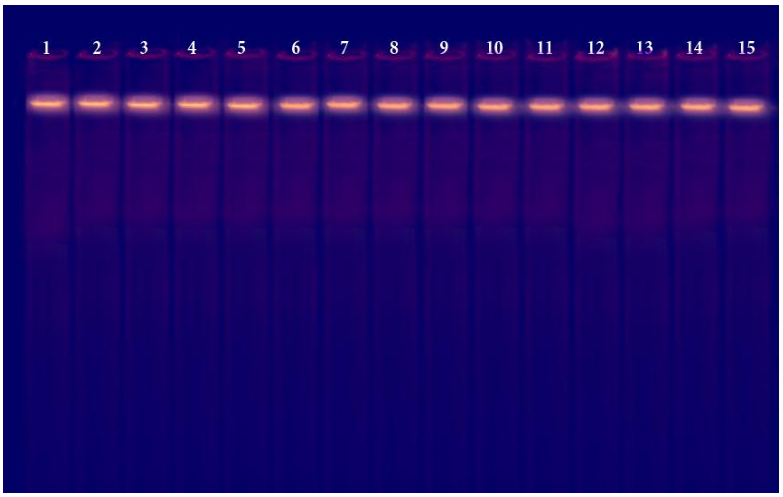
العزلات		العدد		النسب المئوية	
يوجد نمو	*E.coli*	94	232	40.5	82.3
	الاجناس الاخرى	138		59.5	
لا يوجد نمو		50		17.7	
المجموع		282		100	

عوامل الضراوة

- التحري عن انتاج البكتريوسين (الكوليسين)

تم الكشف عن قابلية عزلات بكتريا *E.coli* على انتاج البكتريوسين ، وقد اظهرت نتائج هذه الدراسة ان العزلات المنتجة للبكتريوسين مظهريا" شكلت نسبة (100 %) 40 عزلة . وهذا ولا يتفق مع الدراسة التي اجراها Santo وجماعته (2006) في البرازيل اذ وجدوا ان حوالي (24 %) من العزلات كانت منتجة للبكتريوسين (الكوليسين) . تمتلك العديد من السلالات البكتيرية القدرة على تصنيع البكتريوسينات التي تؤثر في تثبيط نمو عدد من السلالات البكتيرية القريبة لنوعها او تلك المزاحمة لها في بيئتها (Garcia *et al* ., 2000) . وقد اشار كل من Bauer & Dicks (2005) الى ان البكتريوسينات عوامل قاتلة للبكتريا تتميز عن المضادات الحيوية بكبر وزنها الجزيئي وتخصص تأثيرها على الانواع القريبة منها. كما ويمتلك البكتريوسين الفعل القاتل والقدرة على الارتباط بمستلمات الخلايا المتخصصة (Mishra & Lambert , 1996) .

لقد تم التحري عن انتاج البكتريوسين جينيا" بأستعمال تقنية الـ PCR Multiplex ، اذ بينت النتائج احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للـ DNA (الشكل 1) .



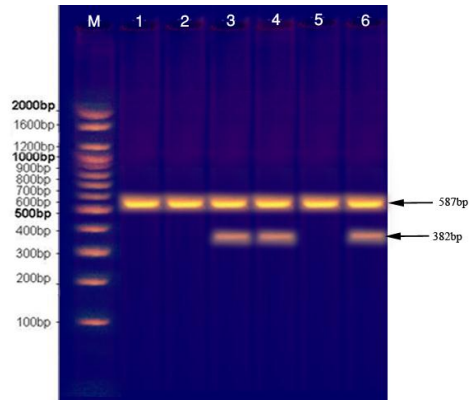
شكل (1) نواتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5 %) وفولتية (100) فولت وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة لبكتريا *E.coli* الاعمدة (16-1) العزلات المختبرة .

فقد أظهرت نتائج تضخيم البادئات للجين *colicin* المشفر لأنتاج البكتريوسين وبعد ترحيلها على هلام الأكاروز (1.5%) والمصبوغة بصبغة الاثيديوم بروميد وفحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية احتواء جميع العزلات قيد الدراسة على الجين *colicin* الكروموسومي بنسبة (100 %) 40 عزلة (الشكل ٢) .

- المحفظة البكتيرية

لقد بينت نتائج الدراسة الحالية احتواء العزلات قيد الدراسة على المحفظة مظهريا" وذلك بأستعمال طريقة الحبر الهندي ، اذ بلغت نسبتها (57.5 %) 23 عزلة ، وهذا لا يتفق مع ما توصلت اليه الموسوي (2006) في مدينة الديوانية التي وجدت ان (17 %) 5 عزلات من مجموع 30 عزلة من عزلات بكتريا *E.coli* المسببة لأخماج المسالك البولية عند النساء الحوامل كانت حاوية على المحفظة .

تتوسط المحفظة العديد من العمليات البايلوجية بين البكتريا ومحيطها الخارجي ، اذ انها تلعب دورا" مهما" في تثبيط عملية البلعمة Phagocytosis من قبل الخلايا البلعمية ، بالاضافة الى معادلة الأضداد ومقاومة المضادات الحيوية . فضلا" عن ان الانواع الحاوية على المحفظة تكون اكثر مقاومة للجفاف من تلك الفاقدة لها ، كما ان وجودها يسهل التصاق الخلايا مع بعضها لتوليد الغشاء الحيوي فضلا" عن استيطان الاجسام الصلبة (Ahmed *et al* ., 2007) . لقد أظهرت نتائج تضخيم البادئات للجين *kpsMII* المشفر لأنتاج المحفظة ذو وزن جزيئي (382) زوج قاعدي ، احتواء العزلات قيد الدراسة على الجين *kpsMII* الكروموسومي بنسبة (57.5%) 23 عزلة (الشكل ٢) . تتفق نتائج دراستنا الحالية مع النتائج التي توصل اليها Tiba وجماعته (2008) ، اذ وجد ان الجين المشفر لانتاج المحفظة *KpsMT* شكل نسبة (53.1%) 86 عزلة من المجموع الكلي للعزلات المسببة لاخماج الـ UTI ، لكن لا تتفق نتائجنا مع ما توصل اليه Yamamoto (2007) ، اذ وجد ان الجين المشفر لانتاج المحفظة شكل نسبة (91.1%) .



الشكل (٢) نواتج تضخيم الجينين *kpsMII* , *colicin* لبكتريا *E.coli* والمرحلة كهربائيا" على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة ، الاعمدة M يمثل (DNA Ladder) العزلات (6-1) موجبة لفحص (587) زوجا" قاعديا" لجين *colicin* ، فيما تعد العزلات (6 , 4 , 3) موجبة لفحص (382) زوجا" قاعديا" لجين *kpsMII* .

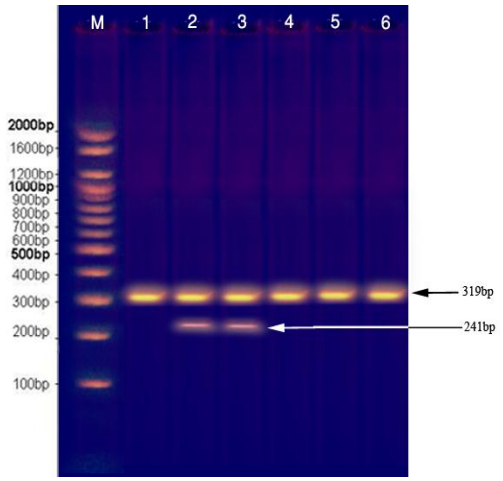
- التحري عن قابلية البكتريا على التلازن الدموي

لقد اختبرت قابلية عزلات بكتريا *E.coli* على تلازن كريات الدم الحمراء للأنسان فصيلة (A) بوجود او غياب سكر المانوز ، وقد بينت نتائج الدراسة الحالية ان جميع العزلات قيد الدراسة (100 %) 40 عزلة كانت تعمل على تلازن كريات الدم الحمراء ، وقد وجد ان نسبة (100%) 40 عزلة كان التلازن الدموي فيها من النوع الحساس للمانوز MSHA ، وهذا دليل على احتواء هذه العزلات على الاهلاب من النوع الاول . كما بينت الدراسة ايضا" ان حوالي (30 %) 12 عزلة ، كان التلازن الدموي فيها من النوع المقاوم لسكر المانوز MRHA ، وهذا دليل على احتواء هذه العزلات على الاهلاب من نوع P . وهذا يتفق مع ما توصل اليه Naveen & Mathia (2005) في ان جميع السلالات المحللة للدم كانت تعمل على تلازن كريات الدم الحمراء للانسان ، وهذا يشير اما الى وجود Type 1 fimbriae او P fimbriae ، ولكن لا يتفق مع ما توصل اليه هذان الباحثان اذ وجدا ان نسبة السلالات التي تحمل تلازن حساس للمانوز (32.2 %) ، في حين كانت النتيجة مقاربة لما توصل اليه هذان الباحثان بخصوص السلالات المقاومة للمانوز اذ كانت نسبتها (42.4 %) . كما لا تتفق نتائج دراستنا مع النتائج التي حصل عليها Abd EL-Hamid وجماعته (2009) في مصر ، اذ وجد ان السلالات التي تحمل تلازن حساس للمانوز شكلت نسبة (26.6%) 4 عزلات ، في حين شكلت السلالات التي تحمل تلازن مقاوم للمانوز نسبة (20%) 3 عزلات . في حين كانت النتيجة كانت مطابقة لما توصل اليه Raksha وجماعته (2003) في ان السلالات التي تحمل تلازن مقاوم لسكر المانوز شكلت نسبة (30.9%) 68 عزلة من المجموع الكلي للعزلات .

كما تم التحري جينيا" عن وجود الجينين الكروموسوميين المشفرين لهذين النوعين من الأهلاب بأستعمال تقنية Multiplex PCR ، اذ بينت النتائج احتواء جميع العزلات على الجين *fimH* بنسبة (100%)40 عزلة ، في حين احتوت العزلات على الجين *papG* بنسبة (30 %) 12 عزلة(الشكل ٣) ، أي ان النسبة المظهرية مساوية للنسبة الجينية . وهذا يتفق مع ما توصل اليه Santo وجماعته (2006) في البرازيل وباستعمال تقنية PCR ان الجين *pap* شكل نسبة (32 %) من المجموع الكلي للعزلات وكان من بينها (26.6 %) من السلالات الحاملة لهذا الجين معزولة من حالات اخماج الكلية . وتتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي حصل عليها Kawamura-Sato (2010) في اليابان وبأستعمال تقنية Multiplex PCR ، اذ شكل الجين *fimH* نسبة (99.4%) 310 عزلة في حين شكل الجين *pap* نسبة (37.8%) 118 عزلة من المجموع الكلي للعزلات ، كما وجد Bashir وجماعته (2012) ان الجين *pap* شكل نسبة (24%) 14 عزلة من المجموع الكلي للعزلات .

مـن العوامـل الرئيسـة التـي تتعلـق بضـراوة سـلالات UPEC هـي الاهـلاب ، التـي تتوسـط عمليـة الالتصـاق بالمستقبلات المتخصصة لخلايا جسم المضيف ، مما يحافظ على ديمومتها وبقائها في القناة البولية وحمايتها من تأثير استجابة المضيف (Ulett *et al* ., 2007) . ان التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية البولية تعد مرحلة ضرورية لبدء وتطور الاصابة بـ UTI ، اذ ان هذه العملية تسمح للبكتريا بمقاومة الفعل التدفقي Flushing action لجريان الادرار وتفريغ المثانة ، محفزة تنشيط البكتريا وديمومتها في المسالك البولية للمضيف (Antao *et al* . , 2009) .

تكون جميع سلالات UPEC تمتلك اهلاب من النوع الاول (Ong *et al* ., 2010) ، والتي هي عبارة عن تراكيب التصاقية مكونة من وحدتين ثانويتين هما FimH , FimA ، وتقع الوحدة الثانوية الالتصاقية FimH في قمة نهاية الهلب ، وترتبط بمستقبلات تراي مانوسيل Trimannosyl receptor الموجودة في الخلايا الطلائية البولية (Robinson *et al* ., 2010) . كما ان سلالات بكتريا *E.coli* الحاملة للأهلاب نوع P غالبا" ما تكـون هـي المسـبب الرئيسـي لحـالات التهـاب الكليـة ، اذ ان هـذه البكتريـا يكـون لهـا القابليـة علـى الارتبـاط بـ Digalactoside في الخلايا الطلائية الانبوبية Renal tubular epithelium ، وهذا الارتباط يحفز الخلايا المتعادلة Neutrophils على انتاج السايتوكاين Cytokine ، والانتحاء الكيميائي Chemotaxis ، لبدء الاستجابة الالتهابية (Karper *et al* . , 2004) .



شكل (٣) نواتج تضخيم الجينين *papG* , *fimH* لبكتريا *E.coli* والمرحلة كهربائيا" على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة ، الاعمدة M يمثل (DNA Ladder) العزلات (6-1) موجبة لفحص (319) زوجا" قاعديا" لجين *fimH* ، فيما تعد العزلات (3 , 2) موجبة لفحص (241) زوجا" قاعديا" لجين *papG* .

- التحري عن انتاج السايدروفور (الايروباكتين)

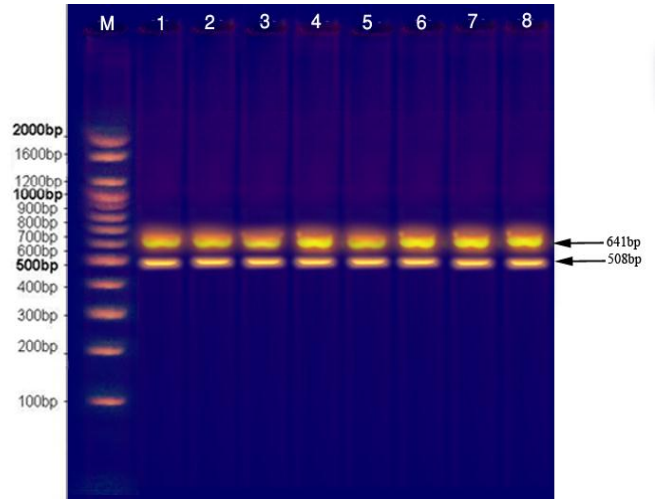
بينت نتائج الدراسة الحالية ان جميع العزلات (100 %) 40 عزلة ، تمتلك قابلية التعبير عن نظام السايدروفور مظهريا" وذلك من خلال نموها على وسط M9 الخاص بالفحص الحاوي على مادة 2 , 2 - dipyridin المجهزة لمادة الحديد في الوسط بعد فترة حضانة 24 ساعة ، وهذا لا يتفق مع ما توصل اليه Santo وجماعته (2006) في ان (76 %) من العزلات كانت منتجة للسايدروفور (الايروباكتين) .

البكتريا المرضية يجب ان تتنافس بنجاح مع البكتريا غير المرضية للحصول على المغذيات ، او بالاحرى ان هذه البكتريا يجب ان تغير من بيئتها للحصول على احتياجاتها ، وعليه يعتبر الحديد العنصر المغذي الضروري للبكتريا

لكي تستمر بمراحل الخمج ، فضلا" عن ان الحديد يمتلك فعالية اكسدة واختزال كامنة تجعله مهم لمختلف الوظائف الايضية ، يعد وجود الحديد حاجة غذائية مهمة للخلايا الحية الا ان الحديد غير متوفر بشكل جاهز ، اذ ان الاحياء المجهرية الغازية لا تستطيع الحصول عليه بسهولة ، ويعد وجود الحديد بشكل يصعب استغلاله من قبل البكتريا بصورة مباشرة احد الطرق الدفاعية للمضيف (Brooks *et al* ., 2007) . من الوسائل التي تستعملها البكتريا للحصول على الحديد هي انتاجها السايدروفور ، وذلك لان الحديد يعد من العناصر المهمة التي تلعب دورا" اساسيا" في معظم الخلايا الحية وله وظائف عديدة منها نقل الالكترونات بالاضافة الى نقل الاوكسجين ، كما ان العديد من الانزيمات تحتاج الى تركيز معين من الحديد لغرض تنشيطها (الزعاك , 1994) . ان انتاج السايدروفور يعمل على زيادة ضراوة السلالات المرضية . وعليه لوحظ ان السايدروفور (الايروباكتين) وجد بشكل اكثر تكرارا" في السلالات المعزولة من اخماج الكلية اكثر مما في العزلات البرازية (Marrs *et al* . , 2002) .

لقد تم التحري عن الجين المشفر للسايدروفور *iucD* البلازميدي بأستعمال تقنية Multiplex PCR ، ، وبعد استخلاص الـ DNA البلازميدي بأستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائيا" في هلام الأكاروز (1.5%) والكشف عنه بأستعمال صبغة الأثيديوم بروماید وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) ، اذ تبين احتواء العزلات بنسبة (90 %) 36 عزلة (الشكل ٤) ، ان نتائج دراستنا الحالية مطابقة للنتائج التي حصل عليها Kown وجماعته (2008) في كوريا ، اذ وجد ان الجين *iucD* شكل نسبة (90%) بأستعمال نفس التقنية . وهذا لا يتفق مع نتائج Bahalo وجماعته (2013) في ايران ، اذ شكل الجين نسبة (12%) من العزلات .

ان عدم مطابقة النسبة المظهرية (100 %) مع النسبة الجينية (90 %) لهذا العامل ، يعود الى اننا في هذه الدراسة قمنا بالتحري عن الجين المحمول على البلازميد فقط ، أي انه يوجد هذا الجين فقط في العزلات الحاوية على البلازميدات والتي شكلت نسبة (90 %) من العزلات المدروسة ، كما يمكن ان يعزى السبب الى انه من المحتمل ان يكون هذا الجين موجود بعدة نسخ اخرى كأن تكون على الكروموسوم او على الجينات القافزة مما يؤدي الى وجود زيادة في النسبة المظهرية .



شكل (٤) نواتج تضخيم الجين *iucD* البلازميدي لبكتريا *E.coli* والمرحلة كهربائيا" على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة ، الاعمدة M يمثل (DNA Ladder) العزلات (8-1) موجبة لفحص (508) زوجا" قاعديا" .

المصادر العربية:

الزعاك ، علي (1994) . البايلوجي الجزيئي لضراوة البكتريا .الطبعة الاولى . جامعة بغداد .

القصاب، عبد الجبار عمر والخفاجي ، زهرة محمود (1992) . تأثير الظروف المختلفة على فعالية تثبيط العصيات اللبنية المعوية تجاه البكتريا المعوية المسببة للأسهال . مجلة العلوم الزراعية العراقية . المجلد3 . العدد 1 . ص 18-26 .

الموسوي ، أزهار نوري (2006). العزل والتثبيت الوراثي للخمج البكتيري والفطري في المسالك البولية وعلاقته بمرض السكري بين النساء الحوامل في محافظة القادسية. أطروحة دكتوراه . كلية التربية / جامعة القادسية.

طلحة ، مصطفى حسن زينل (2009) . مقارنة النشاط الأنزيمي لبكتريا *Escherichia coli* المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية للمصابين وغير المصابين بالعجز الكلوي . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.

المصادر الاجنبية:

Abd EL-Hamid, N. ; Sharaf, H. ; & Mowafy, H. (2009). Virulence Factors of *Escherichia coli* causing Bacteriuria during Pregnancy in comparision with isolates from Community- Acquired Cystitis. *Egypt.J.of Med. Microb*. 18(2): 21-28.

Ahmed, N. ; Dawson, M. ; Smith, G. ; & Wood, E. (2007). Biology of Disease. Taylor & Francis group., pp: 25-41.

Antão, E. ; Wieler, L . ; & Ewers, C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ., *Gut. Pathog.*1: 22.

Atlas, R. ; Parks, L. ; & Brown, A. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology., 1st ed. Mosby. USA.

Bahalo, S. ; Tajbakhsh, E. ; Tajbakhsh, S. ; Momeni, M. ; & 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 J. Sci. Res.* ,14(1):29-32.

Bashir, S. ; Haque, A. ; Sarwar, Y. ; Ali, A. ; & Anwar, M. (2012). Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community aquired uropathogenic *E.coli* from Faisalabad region of Pakistan. *BioMed Central*. 11(23).

http://www.ann-clin microb.

Bauer, R. & Dicks, L.M. (2005). Mod of action of lipid II-trageting antibiotics., *Int. J. Food Microbiol*.,101:201-216.

Brooks, G.; Butel, J.; Carroll, K. & Morse, S. (2007). Jawetz , Melnich & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. McGraw-Hill, NewYork. U.S.A.

Brown, A. (2007). Benson`s Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology. 10th ed. McGraw-Hill comp. Inc., USA. ., p. 102-263.

Duguid, J ; Clegg, S. ; & Wilson, M. (1979). The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli* . *J Med Microbiol.* , 12: 213-27.

Garcia, M. ; Jouve, M. ; Nataro, J. ; Gounon, P. ; Le Bouguenec, C. (2000). Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extraintestinal infections. *FEBS Lett*. 479: 11-7.

Goswami, M. ; Rahman, H. ; & Deka, M. (2013). Occurrence of Virulence Factors Among Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Urinary Tract Infection. *Inter. J. of Innovative Res. and Studies*. 2(5):637-646.

Harrigan, M. ; & MacCance, M. (1987). Laboratory methods in Microbiology. Academic Press. NewYork.

Karper, J. ; Nataro, J. ; Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli .Nat Rev Microbiol.* , 2:123-40.

Kawamura-Sato, K. ; Yoshida, R. ; Shibayama, K. ; & Ohta, M. (2010) . Virulence Genes, Quinolone and Fluoroquinolone Resistance, andPhylogenetic Bachground of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated in Japan. *J. Infect. Dis*. 63: 113-115.

Kwon, S. ; Cha, S. ; Choi, E. ; Kim, B. ; Song, H. ; & Jang, H. (2008). Epidemiological prevalence of Avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by multiplex PCR from commercial Chickens and Hatchery in Korea. *J. of Bacter. and Vir*. 38(4):179-188.

Mabbett, A. ; Ulett, G. ; Watts, R. ; Tree, J. ; Totsika, M. ; Ong, C. ; Wood, J. ; Monaghan, W. ; Looke, D. ; Nimmo, G. ; Svanborg, C. & Schembri, M. (2009). Virulence properties of asymptomatic bacteriuria *E. coli. Intern. J. Med. Microbio*. 299(1): 53-63.

MacFadden, J. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd ed. The Williams and Wilkins-Baltimor. USA.

Marrs, C. ; Zhang, L. ; Tallman, P. ; & Manning, S. (2002). Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urithral *Escherichia coli* . *J. Med. Microbiol.* 51: 138-142.

Mishra, C. ; & Lambert, J. (1996) . Production of anti - microbial substances by Probiotics . Asia Pacific . *J.Clin. Nutr* . , 5: 20 – 24 .

* البحث مستل من اطروحة دكتوراه

Naveen, R. ; & Mathai, E. (2005). Some virulence characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* in different patient groups . *Indian. J. Med. Res*. 122 : 143-147 .

Oliveira, F. ; Paludo, K. ; Arend, L. ; Farah, S. ; Pedrosa, F. (2011). Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains . *GMR* .

Ong, C. ; Beatson, S. ; Totsika, M. ; Forestier, C. ; McEwan, A. ; & Schembri, M. (2010). Molecular analysis of type 3 fimbrial Genes from *Escherichia coli* , *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiol.* 10:183-185.

Raksha, R. ; Srinivasa, H. ; & Macaden, R. (2003). Occurrence and Characterization uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Indian. J. Med. Microbiol*. 21(2): 102-107.

Robinson, D. ; Falush, D. ; & Feil, E. (2010). Bacterial Population Genetics in Infections Disease. Wiley & Sons. Inc. publication. p:269-280.

Sambrook, J. ; Friegan, E.; & Miniatis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory. New York.

Santo, E. ; Macedo, C. ; & Marin, J. (2006). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from auniversity hospital in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 48:185-188.

Seniror, B. ; & Hughes, C. (1987). Production and properties of haemolysin from clinical isolates of *Proteus*. *J. Med. Microbiol.* 24:17-25.

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

Ulett, G. ; Mabbett, A. ; Fung, K. ; Webb, R. ; & Schembri, M. (2007). The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in Biofilm formation. J. Microbiology. Australia. 153:2321-2331.

Yamamoto, S. (2007). Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli* . *J Infect Chemother.* 13: 68-73.

Zecchinon, L. ; Fett, T. ; & Desmecht, D. (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kise of death mechanism Veterinary Research, 36:133-156.

* البحث مستل من اطروحة دكتوراه

Genotypical and phenotypical detection of some virulence factors of *Escherichia coli* causing Urinary tract infections

A.P.Dr. Azhar N. Hussein **Mithal Kareem Abass AL-Hassani**

Summery

The present study included isolation and diagnosis of the bacteria *Escherichia coli* from patients suffering urinary tract infection symptoms in different ages and both sexes, which was taken from the consulting patients in Maternal Hospital, and General Teaching Hospital in AL-Diwianyia city during the period from 1/3/2012 till 1/8/2012 .

About 232 (82.3%) samples from (282) samples of mid stream were with significant bacterial growth, while 50 (17.7%) samples with non-significant bacterial growth, these samples distribution between 152 (65.5%) samples of female and 80 (34.5%) samples of male .The results of morphological and biochemical tests appeared that 94 isolates belong to bacteria *E. coli* .

Some virulence factors, which bacteria have, were studied in both phenotypical and genotypical .The results showed that all the bacterial samples 40 (100%) were hemolysin production phenotypically , These samples were used the base to study the aim of research .

The results showed that all bacterial samples 40 (100%) were produced bacteriocin that effect on the other isolates phenotypically, and had the chromosomal gene *Colicin* 40 (100%) . And also the results showed that 23 (57.5%) had capsule phenotypically by using Indian ink method, and genotypically had chromosomal gene *KpsMII* coding for capsule production.

All isolates had the ability of heamagglutination of human red blood cells phenotypically, it was 40 (100%) isolate were Mannose-Sensitive heamagglutination (type-1-fimbriae), and 12 (30%) were Mannose-Resistant heamagglutination (P fimbriae) . Genotypically the results showed that the chromosomal gene *fimH* 40 (100%) and *papG* 12 (30%) . And also the results showed that all isolates 40 (100%) had the ability of sidrophore production phenotypically through the growth on M9 medium that contain on 2,2-dipyridin, while about 36 (90%) had plasmid gene *iucD* that coding for sidrophore production .

* البحث مستل من اطروحة دكتوراه