شذى ذنون أحمد

Saturday, December 25, 2010
4:34 PM

التشخيص الجزيئي لبكتريا *E.coli*O157:H7 المعزولة من براز أطفال مصابين بالإسهال باستخدام Multiplex Polymerase Chain Reaction

شذى ذنون أحمد *   آمنة نصيف جاسم*   أياد محمد علي فاضل**

تاريخ قبول النشر 1 /3 /2010

الخلاصة

جمعت 96 عينة براز لأطفال مصابين بالإسهال الدموي من مستشفى أطفال العلوية ومستشفى المنصور التخصصي. اجري المسح لجميع العينات للتحري وعزل بكتريا *Escherichia coli* O157:H7 وتمييزها عن باقي سلالات *E.coli* غير المخمرة للسور بتول Non-Sorbitol Fermenting *Escherichia coli* (NSF *E.coli*).

شخصت العزلات البكتيرية بإستخدام طرائق التشخيص المظهري حيث زرعت العينات على وسط اغنائي سائل وحضنت بدرجة حرارية 37 م لمدة 24 ساعة تبعها الزرع على وسط Cefixime - Tellurite Sorbitol MacConkey Agar (CT-SMAC) . تم الحصول على 32 عزلة بكتيرية غيرمخمرة للسوربتول شخص منها 11 عزلة *E.coli* وذلك باستخدام الاختبارات الكيموحيوية التقليدية ونظام التشخيص API20E والتي لم تعط نتائج كافية تمكن من تفريق النمط المصلي O157 بشكل نهائي عن باقي عزلات NSF *E.coli*.

أجري أربع اختبارات كيموحيوية خاصة لتشخيص *E.coli* النمط المصليO157:H7 وتمييزه عن باقي NSF *E.coli* وأظهرت النتائج أن 3عزلات فقط كانت من النمط O157:H7 ، ثم اجري فحص التلازن بحبيبات اللاتكس المرتبطة بالأجسام المضادة للمستضدين O157 وH7 وأعطت العزلات الثلاث نتيجة ايجابية مع كلا العدتين.

شخصت العزلات باستعمال تقنية التفاعل التضاعفي المتعدد لسلسلة الدنا (Multiplex Polymerase Chain Reaction)(MPCR) للكشف عن وجود أوغياب أربعة أنواع من الجينات هي *Stx1* و *Stx2* و *hlyA* و *eaeA* المشفرة لعوامل ضراوة رئيسية لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 المعزولة وذلك بأستخدام بادئات نوعية تستهدف مواقع متخصصة للجينات الهدف المذكورة انفاً وفي تفاعل واحد ، وأظهرت النتائج وجود تباين في المحتوى الجيني بين عزلات بكتريا *E.coli*O157:H7 حيث احتوت احدى العزلات على الجينات الأربعة بينما احتوت العزلتان الاخريتان على ثلاثة جينات هي *Stx2* و *hlyA* و *eaeA* .

الكلمات المفتاحية: E.coliO157:H7, MPCR, Stx_1, Stx_2

المقدمة:

يعد الإسهال في العراق من الأمراض الشائعة وخاصة في فصل الصيف وان معدلات حدوثه أخذت بالتزايد الملحوظ بعد حرب الخليج عام (1991) وأصبح من الأسباب المهمة لحدوث الوفيات عند الأطفال دون سن الخامسة من العمر [1]. وتعد Enterohemorrhagic *E.coli*(EHEC) وتعرف أيضاً بـ VeroToxin- producing *E.coli* (VTEC)واحدة من مسببات الاسهال وبالأخص النمط O157:H7 كونه أحد المسببات المرضية المهمة والمسؤول عن إحداث وباء الإصابة بالإسهال الدموي الذي قد يؤدي إلى حدوث مضاعفات تصل إلى الوفاة أحيانا [2] .

زاد الاهتمام بعزل وتشخيص بكتريا *E.coli* O157:H7منذ أن تم عزلها لأول مرة عام 1982 عند حدوث وباء اثر تناول وجبة همبركر في ولايتي مشيغن و اريكون الأمريكيتين [3]، وبعد ذلك سجلت الإصابات بهذه البكتريا في مختلف القارات وفي أكثر من ثلاثين بلداً . تنشأ الإصابة بهذه البكتريا في الأبقار والتي تعد مخازناً رئيسية لها وتنتقل إلى الإنسان عن طريق تناول الغذاء والشراب الملوثين بها وخاصة اللحم البقري ومنتجاته والحليب ومنتجاته [4].

وحيث أن الإصابات المعوية بشكل عام يمكن أن تتسبب عن عدد من الميكروبات ، وكذلك وجد ولسنوات عديدة بأن سلالات VTEC المسببة لأمراض الإنسان تقع ضمن مدى واسع من المجاميع المصلية (O serogroups) والتي قد تتداخل في تشخيصها مع المجاميع المصلية الأخرى ، لذا فأن التشخيص لا يمكن أن يتم بالاعتماد على الأعراض السريرية والطرائق التقليدية فقط والتي قد تعطي أحيانا نتائج ايجابية خاطئة فأن التقنيات

*كلية العلوم للبنات ، قسم علوم الحياة / جامعة بغداد
**كلية العلوم ، قسم التقنيات الإحيائية / جامعة النهرين

الجزيئية الحديثة وان كانت محدودة الاستخدام في دول العالم الثالث إلا أنها وفرت أفضل الوسائل التشخيصية ومنها تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (Polymerase Chain Reaction) (PCR) لما تمتاز به هذه التقنية من الخصوصية والسرعة العالية ولاسيما عند حدوث الأوبئة من خلال الكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة وإمكانية اعتماد هذه العوامل كمؤشرات جزيئية في الدراسات التشخيصية وتعزيز المعلومات الوبائية عند التحري عن هذه البكتريا والتي تعجز طرائق التشخيص المختبري التقليدية التحري عنها خاصة عند التعامل مع أعداد كبيرة من العينات [5] .لذا جاءت الدراسة الحالية لتهدف الى عزل وتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 من عينات براز لأطفال مصابين بالإسهال الدموي دون سن الخامسة من العمر وتوصيف العزلات باستخدام طرائق التشخيص المظهري والاختبارات الكيموحيوية ودراسة مدى كفاءة هذه الطرق في التشخيص ، ثم الكشف عن وجود أو غياب جينات *Stx1* و *Stx2*و *eaeA* و *hlyA* المشفرة لعوامل ضراوة رئيسية في بكتريا *E.coli*O157:H7 باستخدام تقنية Multiplex PCR (MPCR) وإمكانية اعتماد هذه الجينات كمؤشرات تشخيصية ووبائية وتحديد مدى كفاءة هذه التقنية مقارنة بطرائق التشخيص التقليدية .

المواد وطرائق العمل :

تم جمع 96 عينة براز من اطفال مصابين بإسهال دموي ممن كانت اعمارهم دون سن الخامسة من الراقدين والمراجعين لمستشفى اطفال العلوية ومستشفى المنصور التخصصي ، جمعت العينات في أوعية بلاستيكية معقم ووضعت في حاوية مبردة لحين نقلها إلى المختبر. زرعت العينات باستخدام ناقل معقم في أنابيب حاوية على 5ملیلتر من الوسط الأغنائي السائل modified Trypticase Soy Broth((mTSB) وحضنت بدرجة 37 م لمدة 18-24 ساعة [6] ،ثم نقل جزء من المزروع البكتيري الى وسط CT-SMAC الصلب وحضنت الأطباق بدرجة 37م° لمدة 24- 18 ساعة.

شخصت المستعمرات البكتيرية النامية على وسط CT-SMAC ثم انتخبت المستعمرات غير المخمرة للسوربتول التي تكون عديمة اللون مقارنة بالبكتريا المخمرة للسوربتول التي تبدو بشكل مستعمرات ذات لون وردي . زرعت المستعمرات غير المخمرة للسوربتول على وسط اكار الماكونكي لغرض استبعاد الأنواع البكتيرية غير المخمرة لسكر اللاكتوز وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم انتخبت المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز وشخصت البكتريا اعتمادا على صفاتها المظهرية ثم صفات الخلايا بعد تصبيغها بصبغة كرام والفحوصات الكيموحيوية التقليدية فضلا عن استخدام نظام API20E [7] على انها تعود مبدئياً لبكتريا *E.coli* غير المخمرة للسوربتول (NSF .*coli*).

بعد التأكد من عائدية العزلات غير المخمرة للسوربتول إلى بكتريا *E.coli* تم أجراء أربع اختبارات كيموحيوية خاصة بالنمط المصلي لغرض تشخيصه وتفريقه عن باقي الأنماط المصلية من *E.coli* غير المخمرة للسوربتول ، تضمنت الاختبارات الكيموحيوية مايأتي :- اختبار تخمر السيلوبايوز Cellobiose fermentation test ، اختبار النمو بسيانيد البوتاسيوم ، اختبار انتاج إنزيم β-Glocuronidase ، اختبار إنتاج Enterohemolysin . أن عزلات *E.coli* غير المخمرة للسوربتول والتي تعطي التفاعلات الآتية: سليوبايوز (–) ، KCN(–)، MUG (–) و Enterohemolysin (+) يمكن اعتبارها مبدئياً من النمط المصلي O157.

تم إجراء اختبار تلازن لاتكس السريع (Rapid latex agglutination test) باستخدام عدة اختبار لاتكس(Latex test Kit) للتحري عن المستضد الجسمي O157 والمستضد السوطيH7 لتشخيص بكتريا :*E.coli*O157 .بعد ذلك تم التحري عن وجود جينات *Stx1* و *Stx2* و *eaeA* و *hlyA* في العزلات البكتيرية المشخصة مصليا باستخدام أربع أزواج من البادئات المذكورة في (جدول 1) [8].

جدول (1): مجموعة البادئات المتخصصة المستخدمة في تفاعلات MPCR [8].

أسم البادئ	تتابع البادئ (3′–5′)	طول البادئ	حجم ناتج التضخيم (bp)
stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	23	180
stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	21	
stx2 F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	21	255
stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	22	
eaeA F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	20	384
eaeA R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	20	
hlyA F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	21	534
hlyA R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	22	

تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي بحجم نهائي 50 مايكروليتر وذلك بمزج المكونات المذكورة في جدول رقم (2) في انبوبة ابندروف واحدة معقمة بالتراكيز المبينة ازاء كل مادة.

Unfiled Notes Page 2

جدول (2) مكونات خليط تفاعل MPCR

المكونات	الحجم لعينة (مايكروليتر)	التركيز النهائي في حجم 50 مايكروليتر
محلول دارئ PCR بقوة 10X	5	1X
مزيج القواعد النتروجينية (dNTPs)	1	200 مايكرومول
إنزيم البلمرة Taq DNApolymerase	0.2	1 وحدة
كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$	4	2 ملي مول
البادئ stx1R	2.5	250 بيكومول
البادئ stx1F	2.5	250 بيكومول
البادئ stx2R	2.5	250 بيكومول
البادئ stx2F	2.5	250 بيكومول
البادئ eaeAR	2.5	250 بيكومول
البادئ eaeAF	2.5	250 بيكومول
البادئ hlyAR	2.5	250 بيكومول
البادئ hlyAF	2.5	250 بيكومول
ماء مقطر لاايوني معقم	17.8	

وزعت المحتويات بمعدل 48 مايكروليتر لكل أنبوبة من أنابيب ابندروف معلمة بأرقام العزلات ثم اضيف 2 مايكروليتر من دنا كل عزلة الى الانبوب الخاص بها كما ترك أنبوب واحد بدون إضافة دنا كسيطرة سالبة ونقلت الأنابيب إلى جهاز التضخيم الحراري الحلقي(Thermocycler) لبدء التفاعل التضاعفي وذلك وفق برنامج خاص مذكور في (جدول 3) [8]. تم الكشف عن نواتج التضخيم بترحيل العينات كهربائيا في هلام الاكاروز بتركيز (2 %) وتم تقدير الإحجام الجزيئية لنواتج التضاعف بالمقارنة مع مواقع الحزم ذات الاوزان الجزيئية المعروفة للدليل الحجمي (100 bp DNA ladder) والتي عدت كدليل حجمي قياسي .

جدول (3) : خطوات البرنامج المستخدم في تفاعلات MPCR

No.	Steps	Temperature (°C)	Time (min)	No. of cycles
I.	Denaturation 1	95	3	1
II.	Denaturation	95	3	10
	Annealing	65	2	
	Extension	72	1.5	
III.	Denaturation	95	1	15
	Annealing	60	2	
	Extension	72	1.5	
IV.	Denaturation	95	1	10
	Annealing	60	2	
	Extension	72	2.5	
V.	Extension	72	5	1

النتائج والمناقشة :

تم الحصول على 32 عزلة بكتيرية غير مخمرة للسوربتول من مجموع 96 عينة براز كان منها 11 عزلة *E.coli* غير المخمرة للسوربتول (NSF*E.coli*) تم تشخيصها اعتماداً على طرائق التشخيص المظهري كصفاتها على الوسط الزرعي الصلب (CT-SMAC) والاختبارات الكيموحيوية التقليدية المتبعة لتشخيص بكتريا ايشيريشيا القولون ونظام التشخيص API20E . وعند اجراء أربع اختبارات كيموحيوية خاصة لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 تبعها اختبار التلازن الخاص بهذا النمط تم تشخيص 3 عزلات بكتيرية فقط تمتاز بكونها تعود إلى النمط المصلي O157:H7 تضمنت وكما هو موضح في جدول رقم (4).

جدول(4) : عدد ونسب عزلات بكتريا *E.coli* غير المخمرة للسوربتول .

نوع العينة	عدد العينات	عدد العزلات غير المخمرة للسوربتول	عدد عزلات *E.coli*	عدد عزلات *E.coli* O_{157}:H_7	نسبة عزلها من عدد العينات المعتمدة(%)
براز	96	32	11	3	3.12

تعد بكتريا *E.coli*O157:H7 أحد أهم الممرضات المسببة للإسهال الدموي عند الأطفال فقد عزلت في بعض الدراسات كأعلى نسبة للإصابات البكتيرية من عينات الإسهال مقارنة ببكتريا *Shigella spp.* ، وتأتي كثاني أو ثالث ممرض عزل بشكل كبير بعد *Campylobacter* أو *Salmonella* [9]. وفي الدراسة الحالية كانت نسبة عزل هذه البكتريا هي (3.1%) من 96 عينة براز لأطفال مصابين بإسهال دموي دون سن الخامسة.

شكل المستعمرات

اتبعت الخطوات الأولية في تمييز العزلات العائدة لبكتريا *E.coli* غير المخمرة للسوربتول بتنميتها على وسط CT- SMAC لغرض استبعاد الأنواع البكتيرية والأنماط المصلية الأخرى من *E.coli* المخمرة للسوربتول فقد ظهرت 32 عزلة غير مخمرة للسوربتول بضمنها عزلات بكتريا *E.coli*O157:H7 وامتازت المستعمرات بكونها غير مخمرة للسوربتول خلال 24 ساعة صغيرة الحجم ودائرية الشكل وعديمة اللون مقارنة بالمستعمرات المخمرة للسوربتول وردية اللون .بينما كانت العزلات وردية اللون مخمرة لسكر اللاكتوز عند تنميتها على وسط أكار الماكونكي.

إن هذه النتائج تتفق مع احدى الدراسات اختبرت فيها 24 عزلة كانت جميعها غير مخمرة للسوربتول على وسط CT-SMAC و لا توجد أي عزلة من هذه العزلات مخمرة للسوربتول بعد 24 ساعة من الحضن [10]، وبسبب تشابه الطرز المظهرية لبكتريا *E.coli* غير المخمرة للسوربتول على هذا الوسط فلا يمكن الاعتماد عليه بصورة قاطعة لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 لذا فقد اعتمدت عدد من الاختبارات الكيموحيوية التقليدية لتأكيد تشخيص بكتريا *E.coli* والتي أظهرت عائدية 11عزلة من بين 32 عزلة غير مخمرة للسوربتول الى بكتريا *E.coli* بضمنها 3 عزلات من بكتريا *E.coli*O157:H7 ، حيث اعطت جميعها تماثلا في النتائج . ثم اعتمد في التشخيص النهائي على استخدام نظام API20E للتأكد من عائدية العزلات إلى بكتريا *E.coli* وكذلك للتأكد من كونها غير مخمرة للسوربتول حيث أظهرت النتائج عائديه جميع العزلات قيد الدراسة إلى بكتريا *E.coli* فقد ابدت العزلات تماثلا في اغلب تفاعلاتها ولكنها كانت جميعها غير مخمرة للسوربتول.

نتائج الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7

أجريت أربع اختبارات كيموحيوية لغرض تشخيص بكتريا *E.coli* من النمط المصلي O157وتمييزها عن الأنماط المصلية الأخرى من *E.coli* NSF والموضحة نتائجها في الجدول رقم (5) . وقد أظهرت عائدية 3عزلات فقط إلى بكتريا *E.coli*O157:H7: من بين 11عزلة NSF *E.coli*. حيث تميزت العزلات الثلاث بكونها غير مخمرة للسليوبايوز وغير قادرة على النمو بوجود سيانيد البوتاسيوم. أشارت الدراسات إلى إمكانية تداخل البكتريا المعوية *E. hermanni* مع بكتريا *E.coli*O157:H7 حيث تشترك معها بعدم قدرتها على تخمير السوربتول لكنها تتمايز عنها وعن باقي سلالات *E.coli* الأنموذجية بتخميرها للسيلوبايوز وقدرتها على النمو بوجود سيانيد البوتاسيوم . ولهذا السبب تم اللجوء إلى هذين الاختبارين لتشخيص كل عزلات بكتريا *E.coli* وبضمنها النمط المصلي O157:H7 والذي أعطى نتائج سالبة لكلا الاختبارين[7,2].

يتبين من خلال النتائج أن كل عزلات *E.coli*O157:H7 قد أعطت نتائج سالبة مع الاختبارين المذكورين آنفا، ولغرض تشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 وتمييزها عن باقي الأنماط المصلية من NSF*E.coli* تم إجراء اختبار ثالث هو اختبار قدرتها على أنتاج إنزيم β-glucuronidaseالذي يقوم بتحليل 4- β-D-glucoronide Methylumbelliferyl (MUG) لإنتاج مركب متألق. حيث أعطت جميع عزلات *E.coli*O157:H7 تفاعلا سالباً (عدم ظهور تألق) مقارنة بباقي العزلات التي أعطت تفاعلا موجباً (ظهور تألق ازرق) إن هذه النتائج تتفق مع ما يتميز به هذا النمط المصلي من عدم قدرته على إنتاج انزيم β - glucuronidase مقارنة بنسبة 96% من سلالات *E.coli* المنتجة لهذا الإنزيم[11]. وتتفق كذلك مع نتائج دراسة حديثة وجد فيها أن جميع عزلات النمط المصلي O157:H7 غير قادرة على إنتاج هذا الأنزيم [10].

أما الاختبار الرابع والأخير هو اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم الانتيروهيمولايسين. حيث أظهرت العزلات الثلاث القدرة على إنتاج الانتيروهيمولايسين عند تنميتها على وسط أكار دم الأغنام المغسول بعد 24 ساعة حضانة وبدرجة 37م ° .أن هذه النتائج تتفق مع ما أشارت إليه إحدى الدراسات من أن أكثر من 90% من STEC منتجة للانتيروهيمولايسين [12]. كما وجدت دراسة أخرى أن هناك نسبة كبيرة من عزلات *E.coli*O157:H7 لها القدرة على تحلل كريات الدم الحمراء للأغنام بإنتاجها الانتيروهيمولايسين [13] . وعند إجراء اختبار التلازن مع حبيبات اللاتكس المرتبطة بالأجسام المضادة للمستضدين O157 و H7 باستخدام عدة خاصة بالنمط بينت النتائج الموضحة في الجدول رقم (5) عائديه العزلات الثلاث إلى النمط المصلي O157:H7 حيث أعطت تلازناً مع كل من الأجسام المضادة للمستضدين O157 وH7 .

جدول (5): نتائج الاختبارات الكيموحيوية والمصلية لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7.

العزلات البكتيرية	العدد	الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بالنمطO157: H7				اختبار التلازن المصلي	
		تخمر السليوبايوز	النمو بوجود KCN	MUG	تحلل الدم المعوي	O157	H7
NSF*E.coli*	8	–	–	+	–	–	–
*E.coli*O157:H7	3	–	–	–	+	+	+

MUG : 4-Methylumbelliferyl β-D- glucoronide .

نتائج تفاعلات MPCR

أجريت تفاعلات MPCR للتحري عن وجود أو غياب أربع جينات هي *eaeA* , *hlyA* , *stx1* , *stx2*, المشفرة لعوامل ضراوة مهمة لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 وباستخدام أربع بادئات متخصصة يستهدف كل بادئ تتابعاً نوعياً لجين واحد من هذه الجينات ، والتأكد من

Unfiled Notes Page 4

عائديه العزلات قيد الدراسة إلى هذا النمط المصلي .

وقد تبين من نتائج استخدام تلك البادئات الحصول على عدد من الحزم المتضاعفة التي كانت أوزانها الجزيئية مطابقة لما هو متوقع وحسب البادئات المصممة لهذا الغرض والناتجة عن وجود أو غياب المواقع المكملة لذلك البادئ في جينوم كل عزلة من العزلات المستخدمة في هذه الدراسة. كما إن ظهور حزم مشتركة بين العزلات المدروسة يدل على ارتباط البادئ بالتتابعات المتشابهة والموجودة في جينوم كل عزلة، وان عدم ظهور نواتج التضاعف لبعض العزلات يدل على عدم وجود مواقع ارتباط لهذا البادئ في جينوم العزلة البكتيرية كما أظهر المسار الرابع الذي يمثل السيطرة السالبة الذي لايحوي على الدنا خلوه من أي حزمة .

تم تقدير الاحجام الجزيئية للحزم اعتمادا على مواقع الحزم ذات الاحجام الجزيئية المعروفة للدليل الحجمي (100bp) والموضحة في المسار M (الشكل1).حيث ظهرت النتائج مماثلة للحجم المتوقع تقريبا عند استعمال البادئات نفسها التي تم اعتمادها في دراسة سابقة [8] ، عند اختبار 52سلالة من سلالات بكتريا STEC و بضمنها 19 سلالة مشخصة تعود للنمط المصلي O157:H7 معزولة من الغذاء وبراز الحيوان والإنسان وكانت نواتج التضاعف في تلك الدراسة هي 180pb لجين stx_1 و 255 pb لجين stx_2 و 384pb لجين *eaeA* و 534pb لجين EHEC*hlyA* .

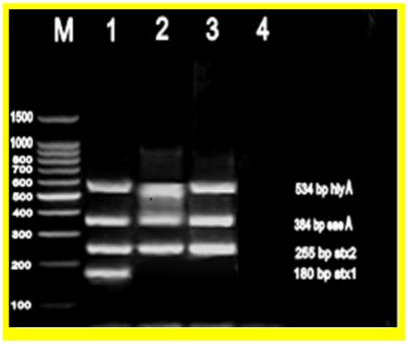
ويلاحظ من خلال نتائج الدراسة والموضحة في الجدول (6) احتواء واحدة من العزلات على جميع الجينات المشفرة لعوامل الضراوة المذكورة أنفا بينما احتوت العزلتان الاخريتان على ثلاث جينات هي stx_2 و*eaeA*, و *hlyA*. أن هذه النتائج تتفق مع نتائج احدى الدراسات حيث وجد ان معظم سلالات بكتريا *E.coli*O157:H7 المعزولة من الغذاء ومن براز المرضى كانت تحمل 3 أو4 جينات مشفرة لعوامل الضراوة ولكن 84% من سلالات هذه البكتريا المعزولة من الغذاء ومن المرضى تمتلك الجينات الأربع [19]وأكدت ذلك دراسة أخرى وجدت أن نسبة عزل البكتريا المنتجة للجينات الأربع والمعزولة من البراز أكثر مقارنة بالبكتريا المنتجة للثلاث جينات المذكورة[10].

جدول (6): نتائج تفاعل MPCR لعزلات بكتريا *E.coli*O157:H7

رمز الجين	رمز العزلة		
	E1	E2	E3
Stx1	+	–	–
Stx2	+	+	+
eaeA	+	+	+
hlyA	+	+	+

- **التحري عن جينات *Stx1* و*Stx2***

أظهرت نتائج الترحيل على هلام الأكاروز للكشف عن نواتج التضخيم باستخدام زوجين من البادئات المتخصصة لتضخيم تتابع جينات *Stx1* و *Stx2*المشفرة لإنتاج ذيفاني Stx1 وStx2 على التوالي، وجود حزم ناتجة عن ارتباط هذه البادئات مع التسلسل المكمل لها في جينوم بعض العزلات. فقد احتوت العزلتان E2 وE3 على جين *Stx2*فقط ، بينما احتوت العزلة E1 على جينات *Stx1* و *Stx2* معاً كما لوحظ تماثل حجوم الحزم المتضاعفة لجينات *Stx1* و *Stx2*مع الحجوم المتوقعة تقريباً وهي 180 و255 زوج قاعدي على التوالي (شكل 1).



شكل (1) : الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التضاعفي المتعدد لسلسلة الدنا لعزلات بكتريا :*E.coli* O157: H7
استعمال البادئات المتخصصة على هلام الاكاروز بتركيز2 % وبفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة.
المسار M الدليل الحجمي (100bp DNA ladder)
المسار 1 : دنا العزلة E1 (*hlyA* ، *eaeA* ، *stx1* ، *stx2*)
المسار 2: دنا العزلة E2 (*hlyA* ، *eaeA* ، *stx2*)
المسار 3: دنا العزلة E3 (*hlyA* ، *eaeA* ، *stx2*)
المسار4 : السيطرة السالبة (عدم ظهور ناتج).

لقد أكدت العديد من الدراسات على أن سلالات *E.coli*O157:H7 المنتجة لذيفان Stx2 لوحده هي الأكثر شيوعاً وترابطاً مع حالات متلازمة HUS من السلالات المنتجة لذيفان Stx1 لوحده أو كلاهما [14] ، فقد وجد إن معظم السلالات كانت منتجة لذيفان Stx2فقط ، وأن 88% من حالات HUSكانت مترافقة مع سلالات منتجة لذيفان Stx2 أو Stx2c أو الاثنين معا(15). وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية إذا أخذ بنظر الاعتبار العزلات المرضية فقط حيث ظهر احتواء عزلتين مرضيتين على جين *Stx2* لوحده مقارنة

Unfiled Notes Page 5

بعزلة واحدة احتوت على جينات *Stx1* و*Stx2* معا.

- **التحري عن جين *hlyA***

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز أن جميع عزلات النمط المصلي O157:H7تحوي الجينات المشفرة لإنتاج إنزيم تحلل الدم من نوع Enterohemolysin ، حيث ظهرت حزم متماثلة في احجامها الجزيئية لجميع العزلات الناتجة من ارتباط البادئ المتخصص الذي يستهدف التتابع النوعي لجين *hlyA* والتي كانت مماثلة للحجم المتوقع تقريباً وهو 534 زوج قاعدي (شكل 1) . إذ يعطي وجود هذا الجين مؤشرا لامتلاك العزلات لبلازميد الضراوة pO157 (17) . وان 99 %من سلالات بكتريا *E.coli*O157:H7 تمتلك هذا البلازميد(18) وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة أخرى حيث كان أكثر من 90 % من سلالات STEC منتجة للانتيروهيمولايسين (12). وقد تمكنت عدد من الدراسات من دراسة العلاقة بين امتلاك االبكتريا لبلازميد الضراوة وبين إنتاجها لذيفانات الفيرو حيث وجد ان عزلات البكتريا *E.coli*O157:H7التي تمتلك البلازميد كانت منتجة للذيفان وبالاخص ذيفان Stx2 . كما وجد أن معظم السلالات المعزولة من اللحم والبراز الحاملة لجينات *hly* و *eae* تملك جين *stx2* (16).

- **التحري عن جين *eaeA***

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز للكشف عن نواتج التضخيم باستخدام زوج من البادئات المتخصصة لتضخيم تتابع جينات *eaeA* ظهور حزم ناتجة عن ارتباط هذا البادئ مع التسلسل المكمل له في جينوم جميع العزلات. كذلك بينت النتائج تماثل الاحجام الجزيئية للحزم المتضاعفة والتي كانت بحجم 384bp مقارنة بالدليل الحجمي ، وبذلك تكون هذه النتائج مماثلة لنتائج الدراسة التي اجريت من قبل [8] .

أن نتائج الدراسة الحالية جاءت متفقة مع العديد من الدراسات فقد وجد ارتباط جين *eaeA* بشكل كبير بسلالات STEC الممرضة للإنسان(19) ، وأن 90 % من حالات أعراض HUS و 70 % من حالات الإسهال الدموي سببها سلالات STEC المحتوية على هذا الجين. كما أشارت دراسة ثانية الى تواجد هذا الجين بنسبة اقل في السلالات المعزولة من الأبقار 17% مقارنة بالسلالات المعزولة من الإنسان (45%) (20). وأكدت دراسة ثالثة عدم احتواء بعض السلالات المعزولة من العينات الغذائية على جين *eaeA* مع تواجده في جميع السلالات المعزولة من العينات المرضية (21) . حيث يعتقد أن السلالات الموجبة لجين*stx* والفاقدة لجين *eaeA* تكون اقل في درجة ضراوتها للإنسان مقارنة بالسلالات التي تمتلك جين *eae* (22).

المصـــادر:

1. **WHO.** 2003. Communicable diseases profile, Iraq. WHO, Communicable diseases working group on emergenicies, HQ. Division of Communicable diseases control, EMRO.WHO Office, Baghdad.
2. **Nataro**, J. P. and Kaper, J. B .1998 . Diarrhagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev.11(1): 142-201.
3. **Riley,** L.W.; Remis, R. S.; Helgerson, S. D.; McGee, H.B.; Wells, J.G.; Davis, B.R.; Hebert, R.J.; Olcott, E.S.; Johnson, L. M.; Hargrett, N.T.; Blake, P.A. and Cohen, M.L.1983.Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype O157:H7. N. Eng. J. Med. 308: 681-685.
4. **Perna,** N. T.; Plunket, G.; Burland, V.; Mau, B.; Glasner, J.D.; Rose, D.J.; Mayhew, G.F.; Evans, P.S.; Gregor, J.; Kirkpatrick, H.A.; Posfai, G.; Hackett, J.; Klink, S.; Boutin, A.; Shao, Y.; Miller, L.;Grotbeck, E.J.;Davis, N.W.;Lim, A.;Dimalanta, E.T.;Potamousis, K.D.;Apodaca, J.;Anantharaman, T.S.;Lin, J.;Yen, G.;Schwartz, D.C.;Welch, R.A.; and Blattner, F.R.2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature 409:529-533.
5. **Tsung -Yu**, T.; Wan-Ju, L.; Yu-Ju, H.; Kuang-Lo, C. and Tzu-Mi, P.2006. Detection of Viable Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Using the Combination of Immunomagnetic Separation with the Reverse Transcription Multiplex TaqMan PCR System in

Fermentative Gram-Negative Rod Identification System EB-20 Gives a Unique Profile for Typical Non-Sorbitol Fermenting *Escherichia coli* O157:H7 J.Clin. Microbiol. 42(1):354-358.

12. **Beutin**, L.; Bode, L.; O¨zel, M. and Stephan, R.1990. Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains. J. Bacteriol. 172:6469–6475.
13. **Bettelheim,** K.A.2003. Non-O157 Verotoxin-Producing *Escherichia coli*: A Problem, Paradox, and Paradigm. Supplement . Food Safety Concerns of verotoxin – producing *Escherichia coli*. Exp. Biol. Med. 228:333-344.
14. **Scotland,** S.M.; Willshaw, G.A.; Smith, H.R. and Rowe, B.1987. Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of Vero cytotoxin VT1 and VT2. Epidemiol. Infect. 99 : 613-624.
15. **Law**, D.2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli*. J. Appl. Microbiol. 88:729-745.
16. **Fegan**, N. and Desmarchelier, P.2002. Comparision between human and animal isolates of Shiga toxin–producing *Escherichia coli*O157 from Australia. Epidemiol. Infect.128:357-362.
17. **Paton,** A. W. and Paton, J. C. 2005. Multiplex PCR for Direct Detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Strains Producing the Novel Subtilase Cytotoxin. J. Clin. Microbiol. 43: 2944-2947.
18. **Levine,** M.M.1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, Food and Stool Samples. J. Food Prot. 69 (10):.2320-2328.
6. **Sanderson,** M.W.; Gay, J. M.; Hancock, D.D.; Gay, C.C.; Fox, L.K. and Besser, T.E.1995. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. J. Clin. Microbiol. 33:2616-2619.
7. **Hitchins,** A.D.; Feng, P.; Watkins, W.D.; Rippey, S.R. and Chandler L.A. 1998. *Esherichia coli* and the coliform bacteria *in*: U.S. Food and Drug Adiminstration (FDA) Bacteriological Analytical Manual, 8th ed ., Chapter4. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. Washington, U.S.A.
8. **Paton,** A.W. and Paton, J.C. 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx_1, stx_2, *eaeA*, enterohemorrhagic *E coli* *hlyA*, rfb_{O111}, and rfb_{O157}. J. Clin. Microbiol. 36:598-602.
9. **Griffin,** P. M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *In*: Infections of the Gastrointestinal Tract. Blaser, M. J.; Smith, P. D. ; Ravdin, J. I. ;Greenberg, H.B. and Guerrant, R.L. (eds.), Raven Press, New York . pp. 739-761
10. **Blanco**, J. E. ; Blanco, M. P. ; Alonso, M.P.; Mora, A.; Dhabi, G.; Coira, M. A. and Blanco, J.2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients :Prevalence in Lugo,Spain, from 1992 through 1999. J. Clin. Microbiol. 42(1):311-319.
11. **Kodaka,** H .; Uesaka , Y. and Kashitani F**.** 2004 . Nissui Glucose

and enteroadherent. J.Infect . Dis. 155:377-389.

19. **Paton,** A.W.; Voss, E.; Manning, P.A. and Paton, J .C.1997. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells. Infect. Immun. 65:3799–3805.

20. **Blanco**, J. ; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; González, E.A.; Bernárdez, M. I. ; Alonso, M. P. ; Coira, A. ; Rodríguez, A.; Rey, J.; Alonso, J. M. and Usera, M. A. 2003. Verotoxin-Producing *Escherichia co*li in Spain: Prevalence, Serotypes, and Virulence Genes of O157:H7 and Non-O157 VTEC in Ruminants, Raw Beef Products, and Humans. Exp. Biol. Med. 228:345-351.

21. **Paton**, A.W.; Ratcliff, R.; Doyle, R .M.; Seymour-Murray, J.; Davos, D.; Lanser, J. A.and Paton, J.C.1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 34:1622–1627.

22. **Fagan,** P.K.; Hornitzky, M.A.; Bettelheim, K.A.and Djordjevic, S.P.1999. Detection of Shiga-Like Toxin (*stx1* and *stx2*), Intimin (*eaeA*), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC *hlyA*) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol.65:868 - 872.

Molecular diagnosis of *E.coli*O157:H7 Which Isolated from Children with Diarrhea by using Multiplex PCR

Shatha T. Ahmed* ***Amna N. Jassim**** ***Ayad M.Ali*****

*Biology Dept., College of science for women, University of Baghdad.
** Biotechnology Dept., College of science, AL-Nahrin University.

Abstract:

A total of 96 stool samples were collected from children with bloody diarrhea from two hospitals in Baghdad. All samples were surveyed and examined for the presence of the *Escherichia coli* O157:H7 and differentiate it from other Non -Sorbitol Fermenting *Escherichia coli* (NSF *E. coli*).

The Bacterial isolates were identifed by using morphological diagnostic methods, Samples were cultured on liquid enrichment medium, incubated at 37C° for 24 hrs, and then cultured on Cefixime Tellurite -Sorbitol MacConkey Agar (CT- SMAC). 32 non-sorbitol fermenting bacterial isolates were obtained of which 11 were identified as *Escherichia coli* by using traditional biochemical tests and API20E diagnostic system without differentiation between serotype O157:H7 and other NSF *E. coli* isolates .

Four special biochemical tests were done for serotype O157:H7 differentiation from other NSF bacteria. Only 3 isolates belonging to the serotype O157:H7 were obtained . Latex agglutination test for O157 and H7 showed that the 3 isolates gave positive results with both tests.

The Bacterial isolates were identifed by using Multiplex Polymerase Chain Reaction (MPCR) technology for the presence or absence of 4 genes (*Stx1, Stx2, hlyA* and *eaeA*) that encode for main virulence factors to diagnose *E. coli* O157:H7 isolated By using specific primers in MPCR . The result showed that one *E. coli* O157:H7 isolates contain all 4 genes , other isolates contain 3 genes: *Stx2, hlyA* & *eaeA*.