

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

أياد محمد علي فاضل\*\*

آمنة نصيف جاسم\*

شذى نون أحمد\*

تاريخ قبول النشر 2010/ 3/ 1

### 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 للسوربتول *Non-Sorbitol Fermenting Escherichia coli* (NSF *E.coli*).

شخصت العزلات البكتيرية باستخدام 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 غير مخمرة 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*.

اجري أربع اختبارات كيموحيوية خاصة لتشخيص *E.coli* النمط المصلي O157:H7 وتمييزه عن باقي NSF *E.coli* وأظهرت النتائج أن 3 عزلات فقط كانت من النمط O157:H7، ثم اجري فحص التلازن بجيببات اللاتكس المرتبطة بالأجسام المضادة للمستضدين O157 و H7 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 أو غياب أربعة أنواع من الجينات هي *Stx1* و *Stx2* و *hlyA* و *eaeA* المشفرة لعوامل ضراوة رئيسية لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 المعزولة وذلك باستخدام 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 الاخرتان على ثلاثة جينات هي *Stx2* و *hlyA* و *eaeA*.

### الكلمات المفتاحية: *E.coli*O157:H7, MPCR, *Stx1*, *Stx2*

### المقدمة:

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 والشرب 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 فإن التشخيص لا يمكن أن يتم بالاعتماد على الأعراض السريرية والطرائق التقليدية فقط والتي قد تعطي أحيانا نتائج ايجابية خاطئة فإن التقنيات

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 الإسهال 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:H7 منذ أن تم عزلها لأول مرة عام 1982 عند حدوث وباء اثر تناول وجبة همبركر في

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

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 عائدة العزلات غير المخمرة للسوربتول إلى بكتريا *E. coli* تم إجراء أربع اختبارات كيموحيوية خاصة بالنمط المصلي لغرض تشخيصه وتقريبه عن باقي الأنماط المصلية من *E. coli* غير المخمرة للسوربتول ، تضمنت الاختبارات الكيموحيوية ما يأتي :- اختبار تخمر السيلوبايوز *Cellobiose fermentation test* ، اختبار النمو بسيانيد البوتاسيوم ، اختبار إنتاج إنزيم  $\beta$ -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 السوطي H7 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].

اسم البادئ	تتابع البادئ (3'-5')	طول البادئ	حجم ناتج التضخيم (bp)
stx1F	ATAAATCGCCATTCTGGTACTAC	23	180
stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	21	
stx2F	GGCACTGTCTGAACTGCTCC	21	255
stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	22	
eaeA F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	20	384
eaeA R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	20	
hlyA F	GCATCATCAAGCGTACGTCC	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 ايندروف واحدة معقمة بالترابيز المبينة ازاء كل مادة.

الجزئية 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 تتماز به هذه التقنية من الخصوصية والسرعة العالية ولاسيما عند حدوث الأوبئة من خلال الكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة وإمكانية اعتماد هذه العوامل كمؤشرات جزئية 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 5مليلتر من الوسط الأغثائي 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 37 م° لمدة 18-24 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

## 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 ( *NSFE. 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 تبعتها 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 العزلات غير المخمرة للسوربتول	عدد عزلات <i>E. coli</i>	عدد عزلات <i>E. coli</i> O157:H7	نسبة عزلاتها من عدد العزلات المصنفة (%)
براز	96	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 SMAC- CT 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.

## جدول (2) مكونات خليط تفاعل MPCR

المكونات	الحجم لعينة (مايكروليتر)	التركيز النهائي في حجم 50 مايكروليتر
محلول داري PCR بقوة 10X	5	1X
مزيج القواعد النروجينية (dNTPs)	1	200 مايكرومول
إنزيم البلمرة Taq DNA Polymerase	0.2	1 وحدة
كلوريد المغنيسيوم MgCl <sub>2</sub>	4	2 ملي مول
البيدئ stx1R	2.5	250 بيكرومول
البيدئ stx1F	2.5	250 بيكرومول
البيدئ stx2R	2.5	250 بيكرومول
البيدئ stx2F	2.5	250 بيكرومول
البيدئ eaeAR	2.5	250 بيكرومول
البيدئ eaeAF	2.5	250 بيكرومول
البيدئ hlyAR	2.5	250 بيكرومول
البيدئ hlyAF	2.5	250 بيكرومول
ماء مقطر لا يوي 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 كهربائياً 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	
III.	Extension	72	1.5	15
	Denaturation	95	1	
	Annealing	60	2	
IV.	Extension	72	1.5	10
	Denaturation	95	1	
	Annealing	60	2	
V.	Extension	72	2.5	1
	Extension	72	5	

إن هذه النتائج تتفق مع إحدى 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 الحضانة [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 11 عزلة من بين 32 عزلة غير مخمرة للسوربتول الى بكتريا *E. coli* بضمنها 3 عزلات من بكتريا *E. coli*O157:H7، حيث اعطت جميعها تماثلاً 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 تماثلاً في اغلب تفاعلاتها ولكنها كانت جميعها غير مخمرة للسوربتول.

إن هذه النتائج تتفق مع إحدى 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 الحضانة [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 11 عزلة من بين 32 عزلة غير مخمرة للسوربتول الى بكتريا *E. coli* بضمنها 3 عزلات من بكتريا *E. coli*O157:H7، حيث اعطت جميعها تماثلاً 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 تماثلاً 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 O157 وتمييزها عن الأنماط المصلية الأخرى من *E. coli* NSF والموضحة نتائجها في الجدول رقم (5). وقد أظهرت عائدية 3 عزلات فقط إلى بكتريا *E. coli*O157:H7 من بين 11 عزلة NSF *E. coli* حيث تميزت العزلات الثلاث بكونها غير مخمرة للسيلوبايوز 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 تتميز 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 [2,7].

يتبين من خلال النتائج أن كل عزلات *E. coli*O157:H7 قد أعطت نتائج سالبة مع الاختبارين المذكورين آنفاً، ولغرض تشخيص بكتريا *E. coli*O157:H7 وتمييزها عن باقي الأنماط المصلية من *NSFE. coli* تم إجراء اختبار ثالث هو اختبار قدرتها على إنتاج إنزيم  $\beta$ -glucuronidase الذي يقوم بتحليل 4-Methylumbelliferyl (MUG)

أما الاختبار الرابع والأخير هو اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم الانتيروهيوموليسين. حيث أظهرت العزلات الثلاث القدرة على إنتاج الانتيروهيوموليسين عند تنميتها على وسط أكار دم الأغنام المغسول بعد 24 ساعة حضانة وبدرجة 37°م. أن هذه النتائج تتفق مع ما أشارت إليه إحدى الدراسات من أن أكثر من 90% من STEC منتجة للانتيروهيوموليسين [12]. كما وجدت دراسة أخرى أن هناك نسبة كبيرة من عزلات *E. coli*O157:H7 لها القدرة على تحليل كريات الدم الحمراء للأغنام بإنتاجها الانتيروهيوموليسين [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 تلامناً مع كل من الأجسام المضادة للمستضدين O157 و H7.

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

اختبار التلازن المصلي	الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بالنمط O157: H7						النتيجة	العزلات البكتيرية
	H7	O157	المعوي تحمل الدم	MUG	النمو بوجود KCN	تخمير السيلوبايوز		
-	-	-	+	-	-	-	8	NSFE.coli
+	+	+	-	-	-	-	3	E.coliO157:H7

MUG : 4-

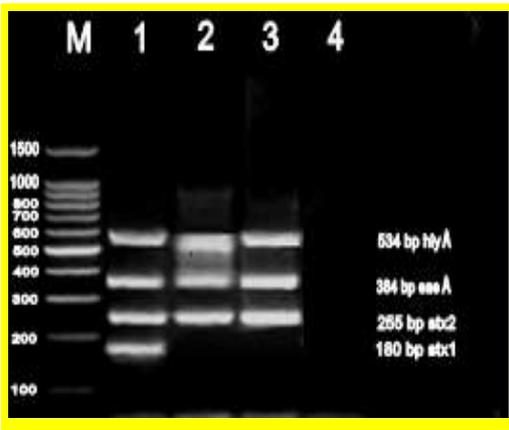
Methylumbelliferyl  $\beta$ -D- glucuronide .

#### نتائج تفاعلات MPCR

أجريت تفاعلات MPCR للتحري عن وجود أو غياب أربع جينات هي *hlyA* , *aeA* , *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

### ● 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 ذيفان *Stx1* و *Stx2* على التوالي، وجود حزم ناتجة عن ارتباط هذه البادئات مع التسلسل المكمل لها في جينوم بعض العزلات. فقد احتوت العزلات E2 و E3 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 و 255 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 الأكاروز بتركيز 2% 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*) المسار 4: 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 *Stx2* فقط، وأن 88% من حالات HUS كانت مترافقة مع سلالات منتجة لذيفان *Stx2* أو *Stx2c* أو الاثنيين معاً (15). وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية إذا أخذ بنظر الاعتبار العزلات المرضية فقط حيث ظهر احتواء عزلتين مرضيتين على جين *Stx2* لوحده مقارنة

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 المكملية 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، وإن 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 لا يحوي على الدنا خلوه من أي حزمة. تم تقدير الاحجام الجزيئية للحزم اعتماداً على مواقع الحزم ذات الاحجام الجزيئية المعروفة للدليل الحجمي (100bp) والموضحة في المسار M (الشكل 1). حيث ظهرت النتائج مماثلة للحجم المتوقع تقريبا عند استعمال البادئات نفسها التي تم اعتمادها في دراسة سابقة [8]، عند اختبار 52 سلالة 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 *stx1* و 255 pb لجين *stx2* و 384pb لجين *eaeA* و 534pb لجين *EHEC hlyA*.

وبلاحظ من خلال نتائج الدراسة والموضحة في الجدول (6) احتواء واحدة من العزلات على جميع الجينات المشفرة لعوامل الضراوة المذكورة أنفاً بينما احتوت العزلات الاخرتان على ثلاث جينات هي *stx2* 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 أو 4 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
<i>Stx1</i>	+	-	-
<i>Stx2</i>	+	+	+
<i>eaeA</i>	+	+	+
<i>hlyA</i>	+	+	+

ضراوتها للإنسان مقارنة بالسلاطات التي تمتلك جين *eae* (22).

#### المصادر:

1. WHO. 2003. Communicable diseases profile, Iraq. WHO, Communicable diseases working group on emergencies, 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.;Potamouisis, 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

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:H7 تحوي 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 مؤشراً لامتلاك العزلات لبلازميد الضراوة pO157 (17) . وان 99 % من سلاطات بكتريا *E.coli*O157:H7 تمتلك هذا البلازميد (18) وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة أخرى حيث كان أكثر من 90 % من سلاطات STEC منتجة للانثيروهيموليسين (12). وقد تمكنت عدد من الدراسات من دراسة العلاقة بين امتلاك البكتريا لبلازميد الضراوة وبين إنتاجها لذيفانات الفيرو حيث وجد ان عزلات البكتريا *E.coli*O157:H7 التي تمتلك البلازميد كانت منتجة للذيفان وبالاخص ذيفان *Stx2* . كما وجد أن معظم السلاطات 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 بسلاطات STEC الممرضة للإنسان (19) ، وأن 90 % من حالات أعراض HUS و 70 % من حالات الإسهال الدموي سببها سلاطات STEC المحتوية على هذا الجين. كما أشارت دراسة ثانية الى تواجد هذا الجين بنسبة اقل في السلاطات المعزولة من الأبقار 17% مقارنة بالسلاطات المعزولة من الإنسان (45%) (20). وأكدت دراسة ثالثة عدم احتواء بعض السلاطات المعزولة من العينات الغذائية على جين *eaeA* مع تواجده في جميع السلاطات المعزولة من العينات المرضية (21) . حيث يعتقد أن السلاطات الموجبة لجين *stx* والفاقد لجين *eaeA* تكون اقل في درجة

- 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, 8<sup>th</sup> 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 *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E coli hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>. 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

- 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.
- 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 coli* 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.

## 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 identified 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 identified 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*.