في العزلات السريرية و البيئية لبكتريا (*aggR,SLT.I*) عن جينات الضراوة الكشف *Escherichia coli*

وعد محمود رؤوف[1] ، سفانة أحمد محمد[2]

[1] كلية الصيدلة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

تم جمع (134) عينة من مصادر إصابات مختلفة لمرضى راقدين ومراجعين لمستشفى تكريت التعليمي ومن كلا الجنسين وبمختلف الأعمار لعزل بكتريا *Escherichia coli* وتشخيصها والتحري عن جينات (*aggR,SLT.I*) والتي توزعت بواقع 2 مسحة من أخماج الأذن الوسطى Otitis media و35 مسحة من الجروح wound swab و 6مسحات من الحروق فضلاً عن عينات الإدرار التي تضمنت 40 عينة urine و عينات الإسهال التي تضمنت 24 عينة هذا بالنسبة للعينات السريرية ، أما العينات البيئية فقد تم جمع (54) عينة من التربة والماء بواقع (43) عينة تربة و(11) عينة ماء. شخصت العزلات النامية بعد زرعها على الأوساط الزرعية المختلفة من خلال الصفات المظهرية و المجهرية والزرعية، وأظهرت نتائج التشخيص بأن 33 عزلة سريرية أي بنسبة (24.6%) تعود لبكتريا الـ *E.coli* توزعت بواقع 3 عزلات (10.3%) من أخماج الأذن الوسطى و 5 عزلات (14.2%) من أخماج الجروح و عزلة واحدة (16.6%) من أخماج الحروق و10 عزلات (25%) من حالات المسالك البولية فضلاً عن 14 عزلة (58.3%) من حالات الإسهال ، أما بالنسبة للعينات البيئية فأظهرت نتائج التشخيص بأن 11 عزلة أي بنسبة (22.2%) تعود لبكتريا الـ *E.coli* توزعت العزلات بواقع 6 عزلات (13.9%) تربة و 6 عزلات (54.5%) ماء.تم انتخاب 30 عزلة من مواقع الإصابات المختلفة وبواقع 4 عزلات من كل موقع إصابة ومن العينات البيئية لتقييم انتشار جينات (*SLT.I, aggR*) ضمن هذه العزلات بواسطة بادئات متخصصة باستخدام تقنية PCR.

أظهرت نتائج PCR وجود الجين المشفر للأهلاب *aggR* في جميع العزلات البيئية المدروسة 8 عزلات أي بنسبة (100%)، وبينت النتائج وجود الجين المشفر للذيفان المشابه لتوكسين الـ *SLT.I shigella* في 4 عزلات (50%) من عزلات هذه البكتريا توزعت بواقع 2 (50%) من عزلات أخماج الجروح ،2 (50%) من عزلات حالات الإسهال.بدلالة هذه الجينات ومن خلال نتائج الترحيل الكهربائي لناتج البلمرة للجينات قيد الدراسة يمكن الإستنتاج بأن السلالة المرضية *E.coli* Enteroaggregative هي الأكثر شيوعاً بين العزلات البيئية والتي تم تأكيدها بدلالة الجين *aggR* الذي يعد جين تشخيصي لهذه السلالة المرضية في بيئة مدينة تكريت، في حين فإن السلالة الأكثر شيوعاً بين العزلات السريرية هي السلالة المرضية *E.coli* Enterohemorrhagic والتي تم تأكيدها بدلالة الجين *SLT.I* الذي يعد جين تشخيصي لهذه السلالة المرضية في مستشفى تكريت التعليمي.

المقدمة

تعد بكتريا الإيشريكا القولونية *E.coli* من الفلورا المعوية الطبيعية بالإضافة إلى كونها بكتريا إنتهازية إذ تسبب الإصابات المكتسبة في المستشفيات بسبب الاستعمال المتزايد للمضادات الحياتية بشكل غير صحيح والذي يؤدي إلى إزدياد مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحياتية التي كانت حساسة لها في السابق [1].

كما وجد أن السبب في ظهور السلالات البكتيرية المقاومة للمضادات الحياتية هو حدوث طفرات كروموسومية فضلاً عن إحتوائها على بلازميدات حاملة لمحددات وراثية مسؤولة عن تلك المقاومة وا ,مكانية إنتقال تلك البلازميدات بين سلالات النوع الواحد أو سلالات الأنواع المختلفة ضمن الجنس نفسه [2] و[3].

وقد أشير إلى أن سلالات إيشريكيا القولون الممرضة تسبب إلتهاب المعدة والأمعاء وتصيب الأطفال عادة في السنة الأولى من العمر وتحدث أوبئة في دور الحضانة أو في الأماكن السكانية المزدحمة [4].

كما تم معرفة الدور الذي تلعبه سلالات الإيشريكيا القولونية قبل عدة سنين من الآن حيث وجد أن الأطفال ذوي الرضاعة الصناعية أكثر عرضة للأصابة من الأطفال ذوي الرضاعة الطبيعية [5] ، وذكر أن مصادر العدوى هي الحالات المرضية أو من حاملي المسبب وتساعد الآواني في إنتشار المرض خاصة رضاعات الحليب التي لم تعقم بشكل جيد بعد تحضيره وتعبئته، وبهذه الطريقة وفي السنوات القليلة الأخيرة لوحظ إنحدار واضح في تسجيل نسبة حدوث إلتهاب المعدة والأمعاء المسببة بإيشريكيا القولون الممرضة للأمعاء *E.coli* Enteropathogenic[6].

ذكر أن هذه البكتريا من المسببات الرئيسة للإصابات المعوية المختلفة (enteric diseases) وبشكل خاص ما يعرف بمرض إسهال المسافر (Traveller`s diarrhea)، الذي يصيب عادة مواطني الدول المتقدمة عندما يسافرون إلى دول أخرى أقل عناية بمجال الوقاية من هذه الأمراض، حيث تشكل الإصابة بهذه البكتريا نسبة مئوية قدرها حوالي 50–65% تقريبا من مجموع هذه الحالات في جميع أنحاء العالم [7]. فضلاً عن ذلك ذكر أن حوالي 80% من إصابات الأطفال الرضع بمرض إلتهاب السحايا (Meningitis) هي ناتجة عن هذه البكتريا أيضاً [8].

وتعد بعض سلالاتها الضارية ذات الرمز المستضدي O157:H7 مسؤولة عن حدوث معظم الإصابات الناتجة عن متلازمتي إلتهاب القولون النزفي (Hemmorrhagic Colitis-HC) والتحلل الدموي البولي (Hemolytic Uremic Syndrome HUS) اللتان تتصفان بكونهما تسببان وبشكل خاص في الأطفال وكبار السن والأشخاص ذوي المناعات الضعيفة نسبة عالية من الوفيات. شهدت السنين الأخيرة استعمال عدد كبير من تقنيات التشخيص الجزيئي لتسهيل عملية التحري عن البكتريا المسببة للإلتهابات باعتماد المؤشرات الجزيئية لغرض التعرف على طبيعة العلاقة بين السلالات التي تم الحصول عليها ومصدر العزل [9].

كما أن هذه البكتريا تمتلك جينات تشفر لمقاومة المضادات الحياتية وجينات تشفر لعوامل الضراوة منها (*aggR,SLT.I*) لابد من الإشارة إلى إن سبب إختيار بكتريا الـ *E.coli* كمحور بحث الدراسة الحالية هو أنها ذات قدرة على إحداث العديد من الاخماج وذلك لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة المهمة التي من أهمها الأهلاب (pili) التي تساعدها على الإلتصاق بالخلايا الطلائية و إحتوائها على عوامل أخرى مسؤولة عن وظائف معينة بالإضافة إلى سرعة نموها وقصر زمن جيلها، ونظراً لعدم وجود معلومات عن تواجد وتكرار الجينات المشفرة (*SLT.I, aggR*) بالإضافة إلى أن الدراسات السابقة لم تتطرق لهذه العوامل لا على المستوى المختبري ولا على المستوى الجزيئي مما دفع بنا لإجراء الدراسة الحالية والدخول بشيء من التفصيل في تقييم انتشار جينات عوامل ضراوة بكتريا *E.coli* (*aggR,SLT.I*) باستعمال تقنيةPCR

المواد وطرق العمل

جمع العينات Samples Collection:

تم في الدراسة الحالية جمع عينات سريرية وعينات بيئية من التربة والماء حيث جمعت العينات السريرية تحت إشراف الأطباء المختصين ومن حالات مرضية مختلفة وبواقع 134 عينة من المرضى الراقدين في مستشفى تكريت التعليمي في مدينة تكريت.

تضمنت 29 مسحة من أخماج الأذن الوسطى و6 مسحات من أخماج الحروق و35 مسحة من أخماج الجروح وأخماج مابعد العمليات الجراحيةوتم جمع 40 عينة إدرار (urine) وجمعت 24 عينة إسهال diarrhea.أما العينات البيئية(تربة ، ماء) فقد توزعت بواقع 43 عينة تربة و11 عينة ماء والتي جمعت بإستعمال أنابيب مضببة معقمة (sterial plain tubes) [10].

العزل والتشخيصIdentification and Isolation: زرعت العينات على أوساط آكار الماكونكي (MacConkey Agar Medium)، وسط آكار الدم (Blood Agar Medium) و وسط إيوسين المثيل الأزرق (Eosin-Methylene blue) وشخصت العزلات البكتيرية أولياً بملاحظة الشكل المظهري للمستعمرات على وسط Blood agar ووسط Eosin-Methylene blue (EMB) وتخميرها لسكر اللاكتوز الموجود في وسط الـ MacConkey agarوأجري لها الفحص المجهري حيث حضرت مسحات رقيقة من المستعمرات لملاحظة قابليتها للإصطباغ بصبغة كرام والتعرف على أشكال الخلايا.

أجريت اختبارات فحص الأوكسيديز (Oxidase test) ، الكتاليز (Catalase)، إختبار تخمر اللاكتوز (Lactose fermentation)، إختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease production testو إختبار إنتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S production test كما أجريت إختبارات الـ IMViC، بعد ذلك تم التحري عن وجود جينات *aggR* و*SLT.I* في العزلات البكتيرية المشخصة بإستخدام البادئات المذكورة في جدول 1 بالإعتماد على [11] و[12] بإستخدام برامج البلمرة المذكورة في جدول 2 بالإعتماد على[13] و[14].

جدول 1 تسلسلات القواعد النتروجينية للبادئات النوعية

ت	اسم البادئ	تسلسل البادئ	حجم الجين المتوقع	الشركة المنتجة
1	*aggR*	F:CGAAAAAGAGATTATAAAAATTAAC R:GCTTCCTTCTTTTGTGTAT	100	Alpha DNA
2	*SLT-I*	F:CAGTTAATGTGGTGGCGAAG R:CTGCTAATACTTCTGCGCATC	894	Bioneer

جدول (2) برنامج البلمرة لكل عامل من عوامل الضراوة :برنامج رقم (1)

اسم البادئ	برنامج البلمرة		
	درجة الحرارة	الفترة الزمنية	عدد الدورات
aggR	50° م	2 دقيقة	1
	95° م	5 دقائق	
	95° م	45 ثانية	40
	50° م	45 ثانية	
	72° م	45 ثانية	
	72° م	10دقيقة	1

برنامج رقم (2)

اسم البادئ	برنامج البلمرة		
	درجة الحرارة	الفترة الزمنية	عدد الدورات
SLT.I	94° م	3 دقائق	1
	94° م	1 دقيقة	30
	55° م	1 دقيقة	
	72° م	1 دقيقة	
	72° م	7 دقائق	1

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود نمو بكتيري في 33 عينة بنسبة (24.6%) من العينات السريرية متضمنة 3 عينات من الأذن الوسطى (10.3%) و عينة واحدة من الحروق (16.6%) و 5 عينات من الجروح (14.2%) و 10 عينات من الإدرار(25%) و 14 عينة من حالات الإسهال(58.3%)، أما العينات البيئية فظهر النمو في 12 عينة بنسبة (22.2%) متضمنة 6 عينات تربة (13.9%) و 6 عينات ماء (54.5%).وبينت نتائج الفحص المجهري ظهور البكتريا بشكل عصيات سالبة لصبغة كرام غير مكونة للأبواغ.

أظهرت جميع العزلات القدرة على النمو على وسط الماكونكي الصلب وكانت جميع المستعمرات صغيرة الحجم ومخمرة لسكر اللاكتوز، وعند تنميتها على وسط آكار الدم كانت النتائج كالتالي: 13 عزلة (29%) محللة للدم تحلل كامل *β-hemolytic* حيث ظهرت هالة شفافة حول المستعمرة ، 5 عزلات (11%) محللة للدم تحلل جزئي *α-hemolytic* إذ ظهرت هالة خضراء حول المستعمرة و27 عزلة (60%) غيرمحللة للدم *non-hemolytic* إذ لم تظهر هالة ولا لون حول المستعمرة وتميزت المستعمرات بكونها ذات لون أبيض إلى حليبي وغير محللة للدم وهذا دليل على عدم قدرة البكتريا على إفراز الهيمولايسين [15] .

نميت العزلات على وسط (EMB) وتبين أن جميع العزلات 45 عزلة (100%) لها القدرة على النمو على هذا الوسط فهو وسط انتخابي للعائلة المعوية وتفريقي لبكتريا الـ*E.coli*، حيث ظهرت المستعمرات بلون غامق مائل إلى اللون البني وذات بريق معدني مخضر (Green metalic sheen) والتي تعتبر من الصفات المميزة لإشيريكيا القولون من غيرها من الأجناس البكتيرية العائدة إلى العائلة المعوية وهذا يعود إلى وجود صبغتي الإيوسين والمثيل الأزرق وسكر اللاكتوز اللتان ترتبطان مع بعضها وتترسبان لتكونا هذه الظاهرة [16] و [17].

أظهرت الفحوصات الكيموحيوية التي تم إجراؤها خلال الدراسة على العزلات النامية، إن جميع العزلات (100%) أظهرت نتيجة سالبة لاختبار إنتاج الاوكسديز و أظهرت جميع العزلات (100%) نتيجة موجبة للكتاليز.

أجريت إختبارات IMViC على العزلات قيد الدراسة وأظهرت النتائج أن جميع العزلات (100%) موجبة لإختبار الأندول ، كذلك كانت جميع العزلات (100%) موجبة لإختبار المثيل الأحمر.

أما فيما يخص إختبار فوكس بروسكور فكانت جميع العزلات (100%) سالبة لهذا الإختبار وأظهرت جميع العزلات وبنسبة (100%) نتيجة سالبة عند تنميتها على وسط (Simmon´s citrate) الذي أستخدم للتحري عن قابلية البكتريا على إستهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون وذلك بتحول لون الوسط إلى الأزرق.

نميت العزلات على وسط كلكلر الصلب المائل Kligler's Iron agar لإختبار قدرة البكتريا على تخمير السكريات الثلاث في الوسط (كلوكوز ، سكروز ، لاكتوز) والتحري عن إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S)، كذلك تبين عدم قدرة هذه البكتريا على تكوين راسب أسود من كبريتيد الهيدروجين ولكن لها القابلية على إنتاج غاز بدلالة حصول تشققات في الوسط.

أما بالنسبة لإختبار إنتاج اليوريز فمن خلال الدراسة وجد أن 33 عينة وبنسبة (73.3%) موجبة لهذا الإختبار تحول لون الوسط من الأصفر إلى الوردي .

التشخيص الجزيئي لبعض جينات عوامل ضراوة عزلات بكتريا *E. coli* قيد الدراسة

التحري عن جينات الـ aggregative adherence fimbrial regulator(*aggR*) في العزلات قيد الدراسة

أظهرت النتائج وجود جين *aggR* في جميع العزلات البيئية (8\8) (100%) في حين لم يظهر هذا الجين في أي عزلة من العزلات السريرية وهذا ما أكدته نتائج الترحيل الكهربائي التي بينت إمتلاك هذه العزلات حزم DNA ذات وزن جزيئي 100bp مقارنة مع الدليل الحجمي 100bp وكما في الشكل (1) .

وجاءت هذه النتيجة مخالفة للدراسات الذين أشاروا إلى وجود هذا العامل وبنسبة (82%) أي23 عينة إسهال من أصل 28 عينة [18] ، وقد وجد أن أكثر السلالات التي تظهر هذا الجين هي من مسببات الإسهال مقارنة مع تلك التي لا تمتلك هذا الجين، حيث أن *aggR* ينظم عملية الإستنساخ لسلالة enteroaggregative *E.coli* (EAEC) بوصفه العامل الحاسم لسلالات الـ(EAEC) النموذجية، وقد تم العثور على عامل إفراز نوع VIينظم بواسطة الـ*aggR*وا ,ن

الـ *aggR* هو عضو من عائلة الـAraC/XylS من منشطات الإستنساخ البكتيرية [19].

شكل (1) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لدنا عزلات بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من عينات التربة والماء باستعمال بادئات متخصصة لجينات *aggR* على هلام الآكاروز بتركيز (2%) وفرق جهد (60) فولت لمدة (2) ساعة .

المسار M الدليل الحجمي (100bp DNA ladder)

المسار 1 ناتج عملية التضخيم لجين *aggR* في دنا العزلة EcW_1*

المسار 2 ناتج عملية التضخيم لجين *aggR* في دنا العزلة EcW_2*

المسار 3 ناتج عملية التضخيم لجين *aggR* في دنا العزلة EcW_3 *

المسار 4 ناتج عملية التضخيم لجين *aggR* في دنا العزلة EcW_4 *

المسار 5 ناتج عملية التضخيم لجين *aggR* في دنا العزلة EcS_1*

المسار 6 ناتج عملية التضخيم لجين *aggR* في دنا العزلة EcS_2 *

المسار 7 ناتج عملية التضخيم لجين *aggR* في دنا العزلة EcS_3 *

المسار 8 ناتج عملية التضخيم لجين *aggR* في دنا العزلة EcS_4 *

* EcW_1 *Escherichia coli* (Ec)، (W) معزولة من الماء ،(1) رقم العزلة

* EcS_1 *Escherichia coli* (Ec)، (S) معزولة من التربة ،(1) رقم العزلة

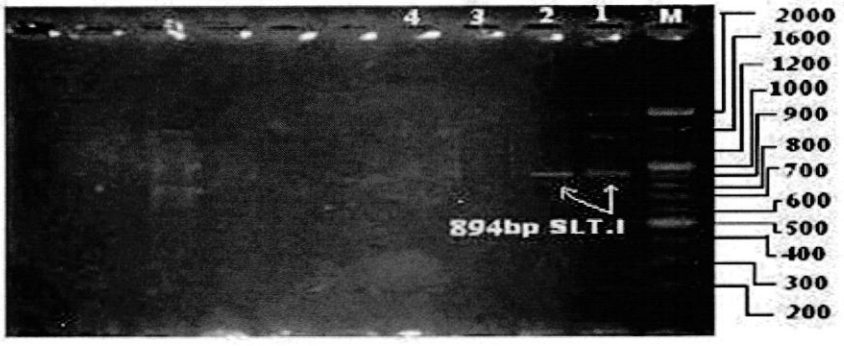
التحري عن جينات الذيفان المشابه لذيفان الشيكيلا (*SLT.I*) shiga-like toxin I في العزلات قيد الدراسة

أظهرت النتائج وجود جين *SLT.I* في (4\8) (50%) من العزلات السريرية توزعت بواقع (4\2) بنسبة (50%) عزلات من أخماج الجروح والحروق و التي قد يكون مصدرها من حالات التلوث البرازي و (4\2) بنسبة (50%) عزلة من حالات الإسهال وهذا ما أكدته نتائج الترحيل الكهربائي التي بينت إمتلاك هذه العزلات حزم DNA ذات وزن جزيئي 894 bp مقارنة مع الدليل الحجمي 100bp وكما في الأشكال 2 و 3، إن هاتان العزلتان لكلا نوعي العينات تعود للسلالة المرضية Enterohemorrhagic *E.coli* بدلالة وجود جين *SLT.I* ، تعد سلالة إشيريكيا القولون النزفية المعوية Enterohemorrhagic *E.coli* من المسببات المنتقلة عن طريق الأغذية و تكون الإصابة بها عن طريق تناول اللحوم غير المطبوخة جيدا والحليب الخام وتنتج ذيفان معوي يدعى ذيفان الشيكا. وتعد الأبقار المضيف الخازن لها، ولها القابلية على إفراز ذيفان الفيروتوكسين أو مايدعى بذيفان الشيكا الذي يؤثر مباشرة على الأمعاء الغليظة مما يؤدي إلى حدوث الإسهال [20].

إن أعراض الخمج متمثلةً بالإسهال المائي مصحوباً بالدم مع وجود أو عدم وجود حمى مع الم في البطن ثم يؤدي في حالات الإصابة الحادة إلى متلازمة التحلل الدموي البولي (Hemolytic uremia syndrome) في 10% من الحالات المرضية [21] .

إن ذيفانات (shiga-like toxins) هي سموم بكتيرية تنتج من قبل بعض أعضاء العائلة المعوية Enterobacteriaceae خاصة بكتريا الـ *shigella dysenteria* و *Escherichia coli* وكذلك *Acintobacter* spp، يتكون السم من وحدتين هي الوحدة A (A subunit) والمسؤولة عن إدخال العصارة الخلوية (cytosol) وتثبط بناء الأنزيمات ، و الوحدة B (B subunit) المسؤولة عن إرتباط المستقبلات بسطح الخلية.

وتأثير هاتين الوحدتين المرضية في الإنسان هي أساساً نتيجة لتثبيط بناء البروتينات الخلوية (cellular proteins) [22] .



شكل (2) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لدنا عزلات بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من أخماج الجروح والحروق باستعمال بادئات متخصصة لجينات *SLT.I* على هلام الآكاروز بتركيز (2%) وفرق جهد (60) فولت لمدة (2) ساعة .

المسار M الدليل الحجمي (100bp DNA ladder)

المسار 1 ناتج عملية التضخيم لجين *SLT.I* في دنا العزلة EcW_1*

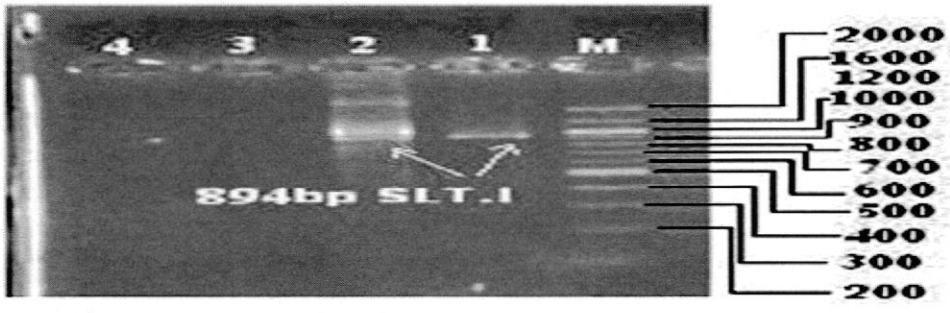
المسار 2 ناتج عملية التضخيم لجين *SLT.I* في دنا العزلة EcW_2*

المسار 3 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة EcW_3*

المسار 4 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة EcB_4*

* EcW_1 (Ec):*Escherichia coli*، (W) معزولة من أخماج الجروح ،(1) رقم العزلة

* EcB_4: (Ec)*Escherichia coli*، (B) معزولة من أخماج الحروق ،(4) رقم العزلة



شكل (3) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لدنا عزلات بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من حالات الإسهال باستعمال بادئات متخصصة لجينات *SLT.I* على هلام الآكاروز بتركيز (2%) وفرق جهد (60) فولت لمدة (2) ساعة .

المسار M الدليل الحجمي (100bp DNA ladder)

المسار 1 ناتج عملية التضخيم لجين *SLT.I* في دنا العزلة EcD_1*

المسار 2 ناتج عملية التضخيم لجين *SLT.I* في دنا العزلة EcD_4*

المسار 3 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة EcD_2 *

المسار 4 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة EcD_3*

* EcD_1 (Ec):Escherichia coli، (D) معزولة من حالات الإسهال ،(1) رقم العزلة

بينت نتائج دراسة للجينات في الدراسة الحالية أن السلالة المرضية Eenteroaggregative *E.coli* هي الأكثر شيوعاً بين العزلات البيئية والتي تم تأكيدها بدلالة الجين *aggR* الذي يعد جين تشخيصي لهذه السلالة المرضية في بيئة مدينة تكريت، في حين إن السلالة الأكثر شيوعاً بين العزلات السريرية هي السلالة المرضية Enterohemorrhagic *E.coli* والتي تم تأكيدها بدلالة الجين *SLT.I* الذي يعد جين تشخيصي لهذه السلالة المرضية في مستشفى تكريت التعليمي.

المصادر

1- Doi, Y.; Shibiro, N.; Shibayama, K.; Kamachi, K.; Kurokawa, H.; Yokoyama, K.; Yagi, T. and Y. Arakawa (2002). Characterization of a novel plasmed Mediated cephalo - Sporins and it is genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother.; 46: 2427-2434.

2- Mims, C.A.; Playfair, J.; Roitt, I.W.; Wakelin, D. and Williams, R. (1995). Medical Microbiology. Mosby.

3- Hummers-Pradier, E.; Ohse, A.M.; Koch, M.; Heizmann, W.R. and M.M. Kochen (2005). Management of urinary tract Infections in female general practice patients. Fam.Pract.; 22:71-77.

4- Le, J.; Briggs, G.G.; Mckeown, A. and G. Bustillo (2004). Urinary tract infections durig pregnancy. The annals of pharmacotherapy; 38:1692-1697.

5- Koschinski, A.; Repp, H.; Unver, B.; Dreyer, F.; Brockmeier, D.; Valeva, A.; Bhakdi S., and Walev,I. (2006). Why *EScherichia coli* alpha hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells-the pore is onitsown.FASEB J.; 20:973-975.

6- Donnenberg Michaels (2002). *Escherichia coli* virulence mechanisms of a versatile pathogen. San Diego: Elsev Ier Science.

7- Tortora, Gerard J.; Funk, R.; Bedroll and Case, Christine, L.(1997). Microbiology, an introduction; sixth ed. Addison Wesley Longman, InC. Melon park, California.

8- Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. Jawetz Melnick and Adel berg's(2001). Med. Microbiol. 22nd. Large Books / Mc Graw-Hill. Medical.

9- Brubaker, L. (2005). Urinary urgency and frequency: What should a clinician do?. Obstet Gynecol; 105:661-667.

10- Campbell, G.R.; Prosser. J. Glover. A. and Killham, K.(2001). Detection of Escherichiacoli O157: H7 in soil and water using multiplex PCR. J. Appli. Microbial. 91:1004-1010.

11- Jiang, Z. D.; Greenberg, D.; Nataro, J. P.; Steffen, R.; & DuPont, H. L. (2002).Rate of accurance and pathogenic effect of enteroaggregative *E. coli* virulence factors in international travelers. J. Clin. Microbiol. 40:4185- 4190.

12- Afset, J.E., L. Bevanger, P. Romundstad, and K. Bergh. 2004. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea.J.Med.Microbial.531137-1144. [PubMed].

13- Jorge, F.C.; James, P.N. and Garcia, T. (2003). Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains. J Clin Microbiol. 41(5): 2138–2140.

14- Blanco,J.E.; Blanco, M.; Mora, A. and Blabco, J.(1997). Prevalence of bacterial resistance to Quniolones and other antimicrobial among avian *Escherichia coli* strains isolate from septicemia and healthy human in Spain. Journal of clinical microbiology. 35:2184-2185.

15- Brook, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J.S.& Morse, S.A. (2007). Medical Microbiology and Immunology. 24thed., P.26-254. McGraw-Hill comp. Inc., USA.

16- Collins, C. H.; Lyne, P. M.; Grange, J. M. & Falkinham, J. O. (2004). Microbiological Method. 8thed., P.76-287. Arnold Amember of The Hodder Headline Group.London.

17- Singha, P. & Prakash, A.(2008).Isolation of *E. coli*, *S. aureus* & *L. monocytogenes* from milk products sold under market conditions region. Acta. agricul. Slov. 92(1):83-88.

18- Jorge, F.C. ; James, P.N. and Garcia, T.(2003). Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains. J Clin Microbiol. 41(5): 2138–2140.

19- Morin, N. ; Araceli, E.S; Robert, K.E. ; Stacey, J.G. and James, P.N.(2012). Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative *E. coli*. Am .Soc .For Microbial.

20-Mohawk, K. L.; Melton-Celsa, A. R.; Zangari, T.; Carroll, E. E. & O'Brien, A. D.(2010).Pathogenesis of *E. coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. J. Microb . Patho. 48(3): 131- 142.

21-Karch, H. (2001). The role of virulence factors in enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC) associated hemolytic uremic syndrome, Semin. Thromb. Hemost. 27(3):207-214.

22- James,H. D.; Patrick, A. N.; Izanne , S. H. and Spinney Bennade.(2009). Shiga toxins (Verocytotoxins). Afr. J. Microbiol. 3(11):681-693.

Detection of (*aggR,SLT.I*) virulence genes in clinical and environmental isolates of *Escherichia coli*

Waa'd M .Raoof[1], Saffana A. Mohammed[2]

[1] *College of Pharmacy , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

[2] *Department of Biology , College of Science , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

Abstract

A total of (134) samples were collected from inpatients and out patients attending Tikrit Teaching hospital from both sexes and different ages to determine *E.coli* genes (*aggR,SLT.I*).These specimens included 29 swabs from cases of Otitis media, 35 from Wound cases, 6 from Burn cases and 40 Urine samples from UTI cases and 24 diarrheal samples with respect to clinical samples, on the other hand the environmental samples (54) samples were collected from soil and water, of then 43 samples from soil and 11 water samples. Isolates were identified according to morphlogical ,microscopic and cultural characterstics .Identification results showed that 33 clinical isolates (24.6 %) were *E.coli.* distributed as: 3(10.3%) from Otitis media, 5(14.2%) from Wounds, 1(16.6%) from Burns, 10(25%) from UTI and 14(58.3%) from diarrheal cases, for environmental samples identification results showed that 11 environmental isolates (22.2%) were *E.coli*, distributed as 6\ 13.9% from soil and 6\ 54.5% water. Thirty isolates were chosen from different sites of infections (4 isolates from each infection sites) and from environmental isolates to evalute the prevalence of (*SLT.I, aggR*) genes in these isolates by PCR using specific primers.The results of PCR showed the presence of *aggR* gene in 8(100%) chosen isolates, and *SLT.I* gene is found in 4 (50%) isolates and then 2 (50%) from Wound and 2 (50%) from diarrheal cases. Function of these genes and through the results of the electrophoresis of polymerization product of the genes under study it can be concluded that the pathogenic strain Eenteroaggregative *E. coli* is the most common among environmental isolates and which were confirmed in terms of gene *aggR* which is a diagnostic gene for this pathogenic strain in Tikrit city environment, while the strain the most common among clinical isolates are pathogenic strain Enterohemorrhagic *E. coli*, which has been confirmed in terms of gene *SLT.I* which is a diagnostic gene for this pathogenic strain at the Tikrit Teaching Hospital.