التحري المظهري والوراثي عن انزيم الهيمولايسين المنتج من بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من المسالك البولية

تاريخ الاستلام 2013/12/16 تاريخ القبول 2014/2/17

ازهار نوري حسين الموسوي
كلية الصيدلة/جامعة القادسية

مثال كريم عباس الحسني*
كلية التربية/جامعة القادسية

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 2012/3/1 لغاية 2012/8/1 ، أظهرت النتائج عائدية 94 عزلة لبكتريا *E.coli* . تم التحري عن قابلية العزلات على انتاج أنزيم الهيمولايسين في اطباق اكار الدم الحاوية على فصائل الدم البشري الاربع (A, B, AB, O) ، اذ وجد ان 40 عزلة (42.6%) كانت قادرة على انتاج انزيم الهيمولايسين على اطباق اكار الدم ، وكانت نسبة انتاج الهيمولايسين (72.5% , 20% , 40% , 55%) على التوالي لفصائل الدم المختلفة ، اذ استعملت هذه العزلات لدراسة الخصائص المظهرية والوراثية فيما يتعلق بانتاج الهيمولايسين . اذ تم اختبار عزلات بكتريا *E.coli* المنتجة للهيمولايسين مظهريا للتأكد من امتلاكها للجينين *hlyA , hlyB* الكروموسوميين ، والجين *hlyA plasmid* البلازميدي باستعمال تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR) ، اذ أظهرت 40 عزلة القادرة على انتاج الهيمولايسين احتوائها على الجينين *hlyA* , *hlyB* الكروموسوميين وبنسبة (100%) ، في حين احتوت 36 عزلة (90%) على الجين *hlyA plasmid* البلازميدي . أظهر الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز احتواء معظم العزلات البكتيرية قيد الدراسة على حزم بلازميدية تراوحت بين حزمة بلازميدية واحدة الى ثلاث حزم (90%) 36 عزلة ، اذ احتوت جميع العزلات على حزمة بلازميدية كبيرة الحجم بلغ حجمها الجزيئي 1200bp بنسبة (90%) 36 عزلة توزعت الحزم البلازميدية مابين حزمة بلازميدية واحدة (35%) 14 عزلة ، حزمتين بلازميديتين (47.5%) 19 عزلة ، وثلاث حزم بلازميدية (7.5%) 3 عزلات . فيما بين الاقتران البكتيري امكانية انتقال البلازميدات بين عزلات بكتريا *E.coli* 12 , *E.coli* 6 , *E.coli* 2 الواهبة وسلالة *E.coli* MM294 المستلمة بشكل كلي ، اذ درست صفات الخلايا الاقترانية من حيث انتاجها لانزيم الهيمولايسين مظهريا" ، اذ تم التحري عن هذا العامل المشفر له بلازميديا" المتمثل بالجين *hlyA plasmid* ، اذ بينت النتائج احتواء الخلايا الاقترانية على الجين اعلاه .

الكلمات المفتاحية : الهيمولايسين ، بكتريا Escherichia coli ، أخماج المسالك البولية

Microbiology Classification QR1 74.5

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني

المقدمة

يعد الهيمولايسين احد عوامل الضراوة المهمة للبكتريا المسببة للاخماج خارج الامعاء ، ويكون فعالا" على انواع مختلفة من الخلايا مثل الخلايا اللمفية Lymphocytes ، الخلايا الحبيبية Granulocytes ، خلايا الدم الحمراء ، والخلايا الكلوية الانبوبية Renal tubular cells (18) . والهيمولايسين له دور مهم في الاخماج خارج الامعاء والتي تتمثل بـــ اخماج المسالك البولية UTI ، تجرثم الدم Bacteremia ، اخماج غشاء البريتون Pertonitis ، والتعفن الدموي Septicemia (2) .

تختلف البكتريا المنتجة للهيمولايسين في قابليتها على تحليل انواع مختلفة من كريات الدم الحمراء مثل كريات الدم الحمراء للانسان ، الاغنام والارانب وكذلك تختلف في نوع التحلل الذي تحدثه (24) . ويمكن تشخيص السلالات البكتيرية المنتجة للسموم الخارجية المحللة Hemolytic exotoxin من خلال وجود منطقة شفافة حول المستعمرة البكتيرية النامية على اطباق اكار الدم ، او بواسطة انجاز اختبارات التحلل القياسية للسم الناتج (26) .

وقد وجد بان هنالك ثلاثة انواع من الهيمولايسين المنتج من سلالات بكتريا *E.coli* المسببة لخمج المسالك البولية ، الاول هو عبارة عن الهيمولايسين المنتشر Diffusible hemolysin ويسمى بـ الفا هيمولايسين α - hemolysin ، اما الثاني فانه يكون مرتبطا" بالخلية Cell – bound ويسمى بـ بيتا هيمولايسين β - hemolysin ان كلا النوعين من الهيمولايسين يسببان تحللا" من نوع بيتا β - hemolysis على اطباق اكار الدم ، والثالث يطلق عليه كاما هيمولايسين - ɣ hemolysin (9) .

يعود الالفا هيمولايسين الى عائلة RTX) – family) وتعني Repeats in Toxin ويكون من النوع المكون للثقب Pore forming cytolysin والمعتمد على الكالسيوم (5) . ان اغلب سلالات بكتريا *E.coli* التي تسبب الاخماج خارج الامعاء Extraintestinal disease تمتلك هذا النوع من الهيمولايسين الذي يعمل على تحليل خلايا الدم الحمراء في انواع مختلفة من الثدييات (23) .

ان المحددات الوراثية المسؤولة عن انتاج الالفا-هيمولايسين في سلالات بكتريا UPEC إما ان تقع في جزر الامراضية Pathogenicity islands الكروموسومية ، التي غالبا ما ترتبط مع السلالات O6(536) , J96 , O4 او قد تكون محمولة على بلازميدات مختلفة بالحجم لها القدرة على الانتقال خلال عملية الاقتران (5) ، وهذه المحددات تتمثل بالجينات الاربع *hly A , hly B , hly C , hly D* تشفر لانتاج اربعة نواتج جينية تشمل HLYA , HLYB , HLYC , HLYD على التوالي مسؤولة عن انتاج الهيمولايسين 16) .)

نظرا" لقلة الدراسات المتوفرة عن انزيم الهيمولايسين المنتج من بكتريا *E.coli* الممرضة للجهاز البولي ، لذلك أرتأينا ان يكون موضوع دراستنا تحديد الاساس الجيني لهذا الانزيم بأستعمال تقنية تفاعل سلسلة انزيم البوليمريز Polymerase chain reaction (PCR) ، فضلا" عن دراسته من الناحية المظهرية ، والتحري عن قابلية انتقال المحددات الوراثية المشفرة الى الخلايا المستلمة Recipient cells مختبريا" ، وعليه شملت الدراسة مايأتي :-

- عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* الممرضة للجهاز البولي من المرضى المراجعين الى مستشفى الاطفال والولادة التعليمي والمستشفى العام التعليمي في مدينة الديوانية .
- تحديد العزلات البكتيرية المنتجة لأنزيم الهيمولايسين مظهريا" والتشفير الجيني لها .
- التحري عن بعض البلازميدات الاقترانية وغير الاقترانية ودراسة علاقتها بانتاج الهيمولايسين والتحري عنها جينيا .

المواد وطرائق العمل

جمع عينات الادرار Collection of urine specimens

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 بأخذ ملىء عروة ناقلة على وسط أكار الماكونكي ووسط أكار الدم ووسط EMB ، حضنت هوائيا" بدرجة 37 ^{0}م مدة 24 ساعة .

- **التحري عن العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates**
- **الفحوصات الزرعية والمظهرية Cultural and morphological tests**

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 (12) . كما تم تأكيد التشخيص بأجراء الفحوصات الكيميوحيوية المتمثلة بمجموعة اختبارات الــــ IMViC ، وكذلك اختبار الاوكسيديز والكاتاليز التي اجريت وفقا" لما ورد في (4) .

- التحري عن قابلية البكتريا على انتاج الهيمولايسين Identification of the bacterial ability of haemolysin production

استعمل لاجراء هذا الاختبار اربع فصائل من الدم البشري (A , B , AB , O) وفقا" لما ورد في (20) .

- تفاعل السلسلة المتبلمرة Polymerase chain reaction

أجري فحص تفاعل السلسلة المتبلمرة للتحري عن انزيم الهيمولايسينالمنتج من بكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج المسالك البولية بأستعمال بادئات الــــ DNA للجينات المستعملة في الدراسة , *hly-plasmid* *hlyB* , *hlyA* والمصممة بأستعمال برنامج تصميم البادئات (جدول 1) .

جدول (1) البادئات وتسلسل القواعد النايتروجينية وحجم ناتج الــ (PCR) المستعملة في الدراسة .

اسم البادئ		تسلسل القواعد النتروجينية	حجم ناتج التضخيم	الصفة المشفرة
hlyA	**F**	**CTTAGGAAAGGCAGGCAGTG**	**575 bp**	**انتاج هيمولايسين A**
	R	**ACTTATCGGCAATGGACAGG**		
hlyB	**F**	**CTGGTTATTTCCGGGGATTT**	**323 bp**	**انتاج هيمولايسين B**
	R	**GAACCAGAACGTCCGACAAT**		
hlyA-plasmid	**F**	**TGGTGCAGCAGAAAAAGTTG**	**641 bp**	**انتاج هيمولايسين A من قبل البلازميد**
		CACTTGCAGCTGTTGTCGAT		

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 ^{0} لحين اجراء فحص تفاعل سلسة انزيم البلمرة .

- تحضير هلام الأكاروز

حضر بحسب طريقة (17) .

- تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة بأستعمال عدة الــــ AccuPower® PCR PreMix وحسب تعليمات الشركة المجهزة كما في الجدول (2) .

جدول (2) مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR pre mix المستعملة في الدراسة المظهرية والوراثية .

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**

- برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الــ DNA

أجري تفاعل سلسلة البلمرة بأستعمال المضخم الحراري لجهاز الـ Thermocycler PCR ، وتم برمجة الجهاز كما في الجدول (3) :

جدول (3) الظروف المثلى لتضخيم الـ DNA بأستخدام المضخم الحراري في بكتريا *E.coli* .

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 (17) .

- الاقتران البكتيري Bacterial Conjugation

اجريت عملية الاقتران البكتيري حسب ما ورد في (14) .

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص Isolation & Identification

لقد 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 4) . وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (1) والتي كانت (% 48.7) من مجموع العزلات المشخصة مختبريا" ، لكنها لا تتفق مع نتيجة (8) 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 يعطي مؤشرا" ارتفاع نسبة الاصابة بهذه البكتريا (15) . 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	

التحري عن انتاج الهيمولايسين Detection of Heamolysin production

درست قابلية بكتريا *E.coli* على انتاج الهيمولايسين في اطباق اكار الدم الحاوية على فصائل الدم البشري الاربع(A , B ، AB , O) اذ وجد ان 40 عزلة (42.6 %) من مجموع 94 عزلة عائدة لبكتريا *E.coli* كانت قادرة على انتاج الهيمولايسين على اطباق اكار الدم ، ويظهر ذلك من خلال ظهور

هالة شفافة حول المستعمرات البكتيرية أي ان التحلل هو من نوع بيتا β – hemolysis (الجدول 5) .

جدول (5) اعداد عزلات بكتريا *E.coli* المنتجة وغير المنتجة للهيمولايسين والنسبة المئوية لها

نوع التحلل	عدد العزلات	النسبة المئوية %
بيتا - هيمولايسز	40	42.6
بدون تحلل	54	57.4
المجموع	94	100

اما فيما يخص مجاميع الدم ، فقد كانت اعلى نسبة تحلل للدم على فصيلة الدم AB ، اذ بلغ عدد العزلات المحللة للدم والمنتجة للهيمولايسين 29 عزلة وبنسبة (72.5 %) من مجموع عدد العزلات الكلي . ثم تلاها صنف الدم O ، اذ بلغ عدد العزلات المحللة للدم 22 عزلة وبنسبة (55 %) ، تلاها صنف الدم A ، اذ بلغ عدد العزلات المحللة للدم والمنتجة للهيمولايسين 16 عزلة وبنسبة (40 %) ، بينما كانت اقل نسبة تحلل للدم هي على فصيلة الدم B ، اذ بلغ عدد العزلات 8 عزلة وبنسبة (20 %) (الجدول 6).

جدول (6) عزلات بكتريا *E.coli* المنتجة للهيمولايسين حسب فصائل الدم البشري .

فصيلة الدم	N = 94	
	العدد	النسبة المئوية
AB	29	72.5
O	22	55
A	16	40
B	8	20
النسبة النهائية	40	42.6

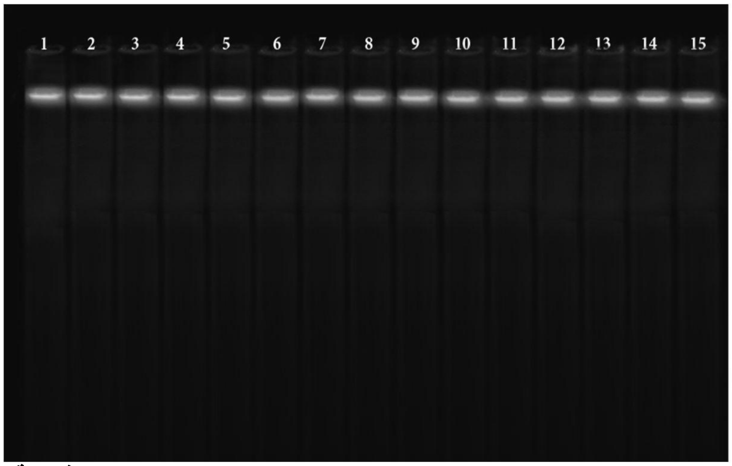
ان نتائج هذه الدراسة فيما يتعلق بنسبة العزلات المحللة للدم والمنتجة لانزيم الهيمولايسين تتفق مع ما توصل اليه (13) حيث ظهر ان نسبة عزل بكتريا *E.coli* المنتجة للهيمولايسين مظهريا" كانت (40.7 %) 24 عزلة من مجموع العزلات المعزولة من المرضى المصابين بأخماج الـ UTI ، لكنها لا تتفق مع دراسة (10) في الهند حيث كانت نسبة بكتريا *E.coli* المنتجة للهيمولايسين (21 %) 42 عزلة من مجموع 200 عزلة .

يعد الهيمولايسين عامل ضراوة مهم ، اذ ينتج من قبل اعداد كبيرة من الممرضات البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام . تنتج بعض سلالات بكتريا *E.coli* الهيمولايسين خاصة تلك المعزولة من الاخماج خارج القناة الهضمية للانسان ، اذ وجد ان (50 %) من هذه العزلات تكون منتجة للهيمولايسين (21) . كما قد وضحت الدراسات السابقة ان انتاج لهيمولايسين يقع ضمن المدى (16.6 – 41 %) (22) . ان الهيمولايسين المنتج من سلالات بكتريا *E.coli* يعد مهما" في ضراوة البكتريا خصوصا" في الاخماج خارج الامعاء لمختلف الحيوانات ، اذ وجد ان معظم سلالات بكتريا *E.coli* الموجودة بهيئة نبيت طبيعي في امعاء الانسان تكون غير منتجة للهيمولايسين ، ولكن بمجرد استيطانها للمسالك البولية فأنها تصبح منتجة له (3) .

يرتبط الهيمولايسين بأجسام بروتينية – دهنية توجد على سطح الخلية الهدف مكونة ثقوب غشائية في خلايا المضيف ، اذ ان انتاج الالفا – هيمولايسين من قبل بعض سلالات بكتريا *E.coli* المحدثة للاصابات خارج الامعاء يعتبر خاصية مهمة في ضراوة هذه البكتريا (25) ، وعليه فأن البكتريا تستعمل الهيمولايسين كطريق للحصول على المغذيات من خلايا المضيف ، فمثلا" يعتبر الحديد عاملا" محددا" لنمو الممرضات البكتيرية المختلفة (11) .

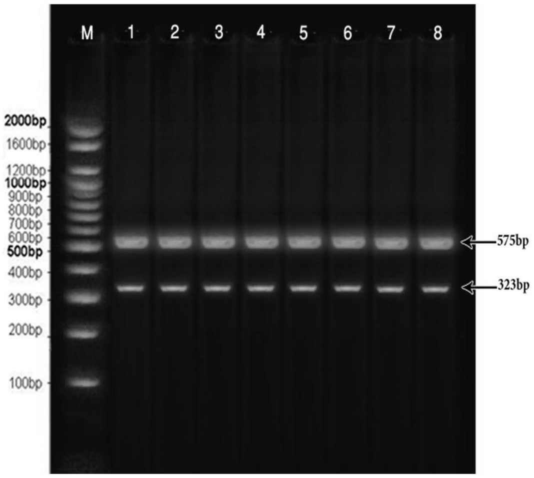
اما من الناحية الجينية فقد أظهرت نتائج الدراسة الحـــــالية وبأستـــــعمال تقنيـــــة الـ Multiplex PCR للعزلات البكتيرية والبالغ عددها (40) عزلة ، وبعد استخلاص الـــ

DNA بأستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائيا" في هلام الأكاروز (1.5%) والكشف عنه بأستعمال صبغة الأثيديوم برومايد وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للـ DNA (الشكل 1) .



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

أظهرت نتائج تضخيم البادئات احتواء جميع العزلات المستعملة في الدراسة 40 عزلة وبنسبة (100 %) على الجينين المشفرين لأنتاج الهيمولايسين وهما *hly A* , *hly B* الكروموسوميين ذو الاوزان الجزيئية (323 , 575) زوجا" قاعديا" على التوالي (شكل 2) والتي تمثل نواتج تضخيم الجينين *hlyA* , *hlyB* بعد ترحيلهماعلى هلام الأكاروز (1.5%) والمصبوغة بصبغة الاثيديوم برومايد وفحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية ثم تم حساب حجم DNA المضخم من خلال مقارنته بالحجم الجزيئي (marker 100-2000) زوجا" قاعديا" ، وهذه النتيجة تكون مقاربة للنتائج التي حصل عليها (19) في البرازيل فقد وجد ان الجين المشفر للهيمولايسين *hly* وجد في (96 %) من العزلات المعزولة من المرضى المصابين بأخماج الـ UTI .

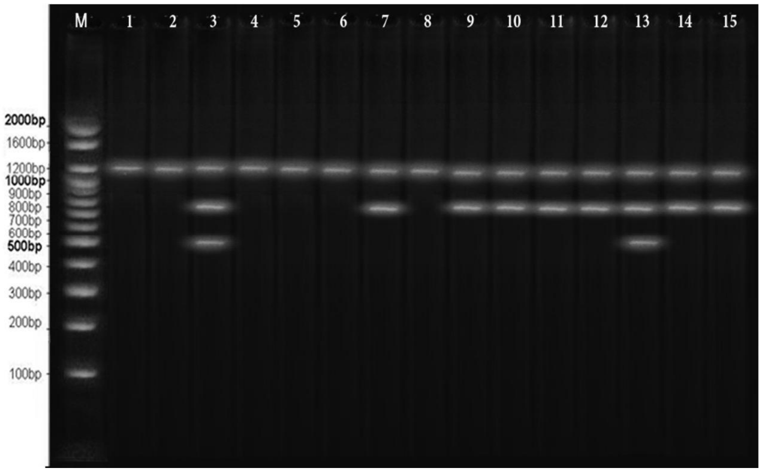


شكل (2) نواتج تضخيم الجينين *hlyA* , *hlyB* الكروموسوميين لبكتريا *E.coli* والمرحلة كهربائيا" على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة ، الاعمدة M يمثل (DNA Ladder) العزلات (1-8) موجبة لفحص (323 , 575) زوجا" قاعديا".

التحري عن وجود الدنا البلازميدي Screening of DNA plasmid

بينت النتائج (الشكل 3) احتواء معظم العزلات البكتيرية قيد الدراسة على حزم بلازميدية تراوحت بين حزمة بلازميدية واحدة الى ثلاثة حزم (90%) 36 عزلة ، اذ احتوت جميع هذه العزلات الحاوية على بلازميدات على حزمة بلازميدية كبيرة الحجم 1200 bp اذ شكلت نسبة (90%) 36 عزلة وقد توزعت الحزم البلازميدية مابين حزمة بلازميدية واحدة (35%) 14 عزلة ، حزمتين بلازميديتين (47.5%) 19 عزلة ، وثلاثة حزم بلازميدية (7.5%) 3 عزلات (جدول 7) ، فقد امتازت هذه العزلات بانتاجها للهيمولايسين والسايدروفور مظهريا . وفي دراسة اجراها Farshad وجماعته (2012) في ايران كشفت ان حوالي (79%) 76 عزلة تمتلك بلازميدات بمعدل حوالي 10-1 بلازميد في كل عزلة ، يصل حجم البلازميد حوالي 1-33 Kbp ، وكانت البلازميدات الاكثر تكرارا" بحجم 4-5 Kbp ، اذ شكلت نسبة (28.9%) .

كما اظهرت اربعة عزلات (10%) خلوها من الحزم البلازميدية متمثلة بالعزلات (37 , 35 , 23 , 18) على الرغم من انتاجها للهيمولايسين . ويمكن ان يعزى السبب في ذلك الى كون صفة انتاجها الهيمولايسين مشفرة من قبل جينات محمولة على الكروموسوم او على الجينات القافزة ، وبالمقارنة فقد وجد 6 ( ) في ايران ان حوالي (21%) من العزلات كانت خالية من البلازميدات ، ولكنها كانت تحمل مقاومة متعددة للمضادات الحيوية وهذا يشير الى ان بعض جينات المقاومة للمضادات الحيوية لا تقع على البلازميدات وانما تكون محمولة على الكروموسوم البكتيري

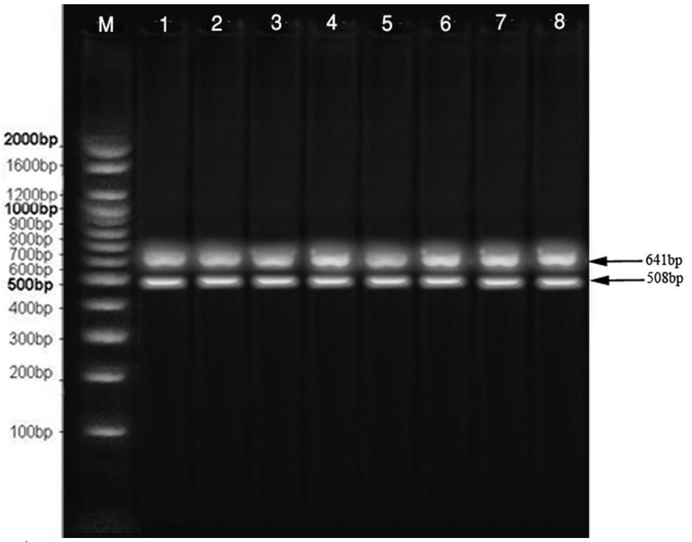


شكل (3) نواتج استخلاص الـ DNA البلازميدي بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5 %) وفولتية (100) فولت وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة لبكتريا *E.coli* الاعمدة M يمثل (DNA Ladder) ، والاعمدة (1-15) العزلات المختبرة .

جدول (7) النسبة المئوية لعدد الحزم البلازميدية في العزلات البكتيرية قيد الدراسة

عدد الحزم البلازميدية	عدد العزلات	النسبة المئوية
0	4	10
1	14	35
2	19	47.5
3	3	7.5

كما تم التحري عن الجين المشفر لأنتاج الهيمولايسين المحمول على البلازميد وبأستعمال بادئ متخصص ، اذ اظهرت نواتج تضخيم الجين *hlyA plasmid* بعد ترحيلها على هلام الأكاروز (1.5%) والمصبوغة بصبغة الاثيديوم برومايد وفحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية احتواء العزلات قيد الدراسة على الجين *hlyA plasmid* بنسبة (90 %) 36 عزلة (الشكل 4) .



صورة (4) نواتج تضخيم الجين *hlyA plasmid* 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 (1- 8) موجبة لفحص (641) زوجا" قاعديا" على التوالي .

الاقتران البكتيري

اختبرت (5 عزلات) والتي اتصفت بكونها حساسة للريفامبسين ، اذ اظهرت نتائج الاقتران نجاح 3 عزلات من بكتريا *E.coli* بعملية الاقتران من اصل (5 عزلات) وبنسبة (60 %) ، اذ اعتبرت الخلايا الاقترانية الناتجة من تزاوج العزلات قيد الدراسة مع السلالة القياسية دليل على نجاح عملية الاقتران من خلال نموها على الاوساط الانتقائية الحاوية على المضادين الحيويين الريفامبسين والامبسلين بتركيز نهائي 100 مايكروغرام / مل لكلا المضادين ، وعند ترحيل الخلايا المقترنة على هلام الاكاروز أظهرت احتواء جميع الخلايا الاقترانية على حزم بلازميدية مساوية للحزم البلازميدية للخلايا الواهبة .

ومن خلال مطابقة نتائج الـ PCR يمكننا الاستنتاج بأن الجين *hlyA plasmid* محمول على بلازميد من النوع الاقتراني اذ يمكنه الانتقال خلال عملية الاقتران ، وذلك من خلال ملاحظة انتقال البلازميد الوحيد الذي تمتلكه العزلات (6 و 2) الى الخلايا المستلمة ومن ثم تم التأكد من انتقال الجين *hlyA plasmid* بأجراء اختبار PCR للخلايا الاقترانية اذ تم التأكد من احتواء الخلايا الاقترانية لهذا الجين .

كما أظهرت النتائج فشل عزلتين في تحقيق عملية الاقتران وبنسبة (40 %) على الرغم من احتوائها على بلازميدات ، وقد يعود السبب الى احتواء هذه العزلات على بلازميدات غير اقترانية ليس لها القدرة على الانتقال خلال عملية الاقتران . او قد يعود فشل انتقال قسم من البلازميدات الى السلالة المستلمة في عملية الاقتران على الرغم من وجود بلازميدات اقترانية منتقلة ذاتيا" الى حدوث طفرة او فقدان في الجينات المشفرة للأنزيمات القاطعة لشريط الدنا ، مما يؤدي الى فشل في انتقال البلازميدات غير الاقترانية على الرغم من وجود تلك المقترنة معها (7) ، وقد يعزى الفشل الى الاختلاف في نمط الانتقال والى طبيعة تركيب هذه البلازميدات نفسها الذي قد يكون سببا" اخر في فشل انتقال البلازميدات خلال عملية الاقتران .

المصادر العربية:

1- 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:

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

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

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

5-Burgos, Y.; & Beutin, L. (2010). Common origin of plasmid encoded alpha-hemolysin genes in *Escherichia coli* ., *BMC Microb*.10:193.

6-Farshad, S. ;Ranjbar, R. ; Japoni, A. ; Hosseini, M. ; Anvarinejad, M. ; Mohammadzadegan, R. (2012). Microbial Susceptibility, Virulence factors , and Plasmid profile of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Arch. of Iranian Med. Original Article*. 15(5):312-317.

7--Feridfelder, D. (1987). Molecular biology. 2nd ed. Yones and Barttett. Boston.

8-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.

9-Hull, S. ; Hull, R. ; Minshew, B. ; & Falkow, S. (1982). Genetics of Hemolysin of *Escherichia coli* . *J. Bacter.*, 151(2) : 1006-1012.

10-Kausar, Y. ; Chunchanur, S. ; Nadagir, S. ; Halesh, L. ; & Chandrasekhar, M. (2009). Virulence factors, Serotypes and Antimicrobial Suspectibility Pattern of *Escherichia coli* in Urinary Tract Infections. *Al Ameen. J. Med. Sci.* 2(1): 47-51.

11-Laixh, A. ; Arenciba, I. ; Johansson, A. ; Wai, S. ; & Uhtin, B. (2000). Cytocidal and apoptotic affect of Cly A protein from E.coli primary and cultured monocytes and macrophages. *Infect. Immun*., 68(7): 4363-7.

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

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

14-O'connell, M. (1984). Genetic transfer in prokaryotes: transformation, transduction and conjugation. In " Advanced molecular genetics . Auhler , A. & Timmis , K. (eds). Advanced in Molecular genetics. Sipringer. Verlage , New York. P:2-12.

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

16-Saidenberg, A. ; Guedes, N. ; Seixas, G. ; Allgayer, M. ; Assis, E. ; Silveira, L. ; Melville, P. ; & Benites, N. (2012). Asurvey of *Escherichia coli* virulence factors in Asymptomatic Free-Ranging Parrots. *Inter.*

Schol. Res. ISRN Veterinary Science. 20(12):1-6.

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

18-Sanchez, S. ; Bakas, L. ; Gratton, E. ; & Herlax, V. (2011). Alpha Hemolysin Induces an Increase of Erythrocytes Calcium: A Flim 2-Photon Phasor Analysis Approach. *Org. Plosone. Argentina*. 6:1-9.

19-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.

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

21-Slavchev, G.; Pisareva, E. ; & Markova, N. (2009). Virulence of uropathogenic *Escherichia coli* . *J. Cult. Coll.* Vol.6 , 3-9.

22-Srikanth, N. ; & Macaden, R. (2003). Uropathogenic *Escherichia coli* a preliminary study. *Indian. J. Pathol. Microbiol. 46*: 6-145.

23-Sugamata, Y. ; & Shib, T. (2005). Improved Secretory Production of Recombinant Proteins by Random Mutagenesis of *hlyB* , an Alpha-Hemolysin Transporter from *Escherichia coli* ., Applied and Environmental Microbiology , Japan.71(2):656-662.

24-Tortora , G.; Funke , B. ; & Case , C. (1998). MicrobiologyAn Introduction . 6th ed. Benjamin / Cummings publishing Company.Inc.

25-Valeva, A. ; Walev, I. ; Kemmer, H. ; Weis, S. ; & Bhakdi, S. (2005). Binding of *E.coli* hemolysin and activation of target cell is not receptor – dependent. *J. Biological Chem.* 280(44):36657-36663.

26-Williams, P. ; Ketley, J. ; & Salmond, G. (1998). Methods in Microbiology. Bacterial Pathogenesis. Volume 27. Academic Press. NewYork.pp 240-340.

Genotypical and phenotypical detection of hemolysin enzyme of *Escherichia coli* causing urinary tract infections

Receved :16/12/2013 **Accepted :17/2/2014**

Azhar N. Hussein
College of pharmacy/
AL-Qadisiya university

Mithal Kareem Abass AL-Hassani
College of Education/
AL-Qadisiya university

Abstract

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 .

The results of morphological and biochemical tests appeared that 94 isolates belong to bacteria *E. coli* , among them 40 (42.6%) isolates were hemolysis on blood agar plates containing human blood (A, B, AB, O) and were production percentage of hemolysin (55%, 72.5%, 20%, and 40%) respectively .

Some virulence factors, which bacteria have, were studied in both phenotypical and genotypical . Such as hemolysin production . The results showed that all the bacterial samples 40 (100%) were hemolysin production phenotypically as well as had the chromosomal genes *hlyA* and *hlyB* 40 (100%) and also had the plasmid gene *hlyA plasmid* 36 (90%) by using the polymerase chain reaction for detection about these genes .

The results of electrophoresis on Agarose gel showed that most of the bacterial isolates contain plasmid bands between one to three 36 (90%) . All isolates contained one plasmid band large in size, it molecular weight was about 1200 bp 36 (90%) isolate, the plasmid bands distributed among one plasmid band 14 (35%) isolates, two plasmid band 19 (47.5%) isolates, and three plsmid band 3 (7.5%) isolates .

The results of bacterial conjugation showed the possibility of transmitting of plasmids among *E.coli* giving isolates and *E.coli* MM294 receiving strain in complete process . The features of the conjugation cells were studied as having virulence factor phenotypically included hemolysin production, and also were detected about *hlyA plasmid* the results showed that isolates were contained of that gene .

Key word : hemolysin , bacteria *Escherichia coli* , urinary tract infection
Microbiology Classification QR1 74.5

*The research is Apart of on PhD. thesis in case of the second researcher.