



استخدام مؤشرات الـ RAPD للكشف عن التنوع الوراثي لعزلات *E.coli* من مستشفيات كركوك

وعد محمود روؤف¹، عقيل حسين العاصي²، شيماء منشد مرشد²

¹كلية الصيدلة، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

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

الملخص

جمعت 300 عينة من مصادر إصابات مختلفة لمرضى راقدين ومراجعين لكل من مستشفى ازادي العام ومستشفى كركوك العام ومستشفى الأطفال في محافظة كركوك، ومن أعمار مختلفة ولكلا الجنسين لعزل بكتريا *Escherichia coli* وتشخيصها ودراسة التنوع الوراثي والتي توزعت إلى 140 عينة urine، 45 عينة لحالات الإسهال Diarrhea، 40 عينة من الجروح wound swab، 40 عينة من الحروق Burn، 35 عينة من أخماج الأذن الوسطى otitis media و قد تم تشخيص العزلات النامية بعد زرعها على الأوساط الزراعية المختلفة من خلال الصفات المظهرية والمجهريّة والزراعية وأظهرت نتائج التشخيص بأن 75 عينة سريرية أي بنسبة 38.65% تعود لبكتريا *E.coli*، توزعت بواقع 9 عزلات بنسبة 31% من أخماج الحروق و 6 عزلات بنسبة 1.26% من أخماج الجروح و 4 عزلات بنسبة 19% من أخماج الأذن الوسطى و 13 عينة من حالات الخروج بنسبة 4.40% و 43 عينة بنسبة 14.38% من أخماج المسالك البولية. تم دراسة حساسية عزلات بكتيريا *E.coli* لـ 9 مضادات حيوية من المضادات المختلفة وقد تفاوتت العزلات من حيث المقاومة للمضادات الحيوية. حيث بلغت أعلى نسبة مقاومة للعزلات السريرية للمضادين cephalixin، ampicillin بنسبة 97.3% و 92% على التوالي. كانت أقل نسبة مقاومة للعزلات السريرية لمضاد Amikacin بنسبة 17.3%. و قد تم انتخاب 24 عينة سريرية من عزلات *E.coli* اعتماداً على مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية وذلك لدراسة التنوع الوراثي لهذه العزلات ودراسة المؤشرات الوراثية المعتمدة على تقنية PCR وهي: مؤشرات التضاعف العشوائي لسلسلة الـ (DNA Randomly Amplified Polymorphic DNA CRAPD). والتي استثمرت في كشف التباينات الوراثية بين عزلات الـ *E.coli* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة حيث تم عزل مادة الدنا من الخلايا البكتيرية ثم نفذت تفاعلات الـ PCR عليها باستعمال مؤشرات الـ RAPD مع 3 بوادئ عشوائية وهي (OPF-16، OPA-O6، OPE-20) ومن ثم ترحيلها على هلام الاكاروز. وقد أظهرت هذه البادئات حزماً "متماثلة المواقع Monomorphic bands"، وحزماً متباينة المواقع polymorphic bands ثم أدخلت البيانات التي تم الحصول عليها إلى الحاسوب ووفق البرنامج الإحصائي NTSYS-PC version 2.02.

معلومات البحث

تأريخ الاستلام: 2018 / 4 / 30

تأريخ القبول: 2018 / 1 / 14

الكلمات المفتاحية:

العزلات السريرية، جرثومة *E.coli*،

مؤشرات RAPD

المراسلة مع:

الاسم: شيماء منشد مرشد

البريد الإلكتروني:

رقم الهاتف:

المقدمة

تكون دفاعات الجسم الطبيعية فيه ضعيفة، لذلك فهي تصيب الأطفال حديثي الولادة والمتقدمين بالعمر غالباً (2). وتمتاز جراثيم *E.coli* الممرضة الموجودة بصورة تعايشية في القولون على الانتقال الى مناطق الجسم الاخرى والتغلب على دفاعات المضيف واحداث الاصابات المتعددة في (3) اذ تمتلك هذه السلالات تنوعاً جينياً مميزاً والعديد من عوامل الضراوة تمكنها من غزو

ينتمي جنس *Escherichia* إلى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* (1)، ويعد النوع *E.coli* أكثر الأنواع التابعة لهذا الجنس شيوعاً.

وهي غير ممرضة لكن باستطاعتها إحداث العديد من الأخماج الانتهازية، إذ بإمكانها ان تصيب أي مكان في جسم الإنسان عندما

جمعت 300 عينة سريرية من (الادرار - الخروج - الجروح - الحروق - الاذن الوسطى) وتحت اشراف الاطباء المختصين لكلا الجنسين وباعمار مختلفة من (1-60 سنة) من المرضى الراقدين والمراجعين الى كل من مستشفى ازادي العام ومستشفى كركوك العام ومستشفى اطفال في محافظة كركوك للفترة الممتدة من 2015-2015 ولغاية 2015-8-1.

ثانياً: تشخيص العزلات البكتيرية

Identification of Bacterial Isolates

شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على الفحوصات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية وشمل تشخيص العزلات البكتيرية مايلي:-

1- التشخيص البكتريولوجي الاول:-

شخصت المستعمرات النامية على سطح الاوساط الزرعية الخاصة بالزرع الاول مبدئياً بالاعتماد على الصفات الزرعية من حيث الشكل، الحجم، اللون، القوام، الدائمة، وتحلل الدم على وسط اكار الدم وتخميها لسكر اللاكتوز على وسط اكاد الماكونكي، كما درست صفات الخلايا البكتيرية عن طريق الفحص المجهرية وذلك بعد تصبغها بصيغة كرام (Gram stain) ثم فحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي لملاحظة حجم وشكل الخلايا البكتيرية وطريقة تجمعها وتفاعلها مع صبغة كرام وقد استخدمت عدد من الاوساط الزرعية والكواشف والمحاليل وحسب ما ورد في المصدر (8).

2- اختبار حساسية عزلات بكتريا *Escherichia coli* للمضادات الحيوية

درست حساسية عزلات بكتريا *E. coli* والبالغ عددها 75 عزلة سريرية عزلت من حالات مرضية متنوعة اتجاه 9 مضادات حيوية لمعرفة مدى حساسية او مقاومة هذه العزلات اتجاه هذه المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام والمتداولة في المؤسسات الصحية في معالجة أنواع مختلفة من الاخماج التي يتعرض لها الإنسان وقد تم تحديد مدى حساسية العزلات للمضادات الحيوية اعتماداً على قطر منطقة التثبيط المحيطة بأقراص هذه المضادات ومن ثم مقارنتها مع الجداول القياسية الواردة في (9) وقد تباينت العزلات السريرية لبكتريا *E. coli* في حساسيتها للمضادات الحيوية كما موضح بالجدول (1)

واستعمار الانسجة منها عوامل الالتصاق Adhesion factors و انتاج السموم Toxins و انتاج الهيمولاسين ومتعدد السكريد الشحمي LPS والمحفظة Capsule وعوامل الغزو Invasive factors (4). وذكر (5) ان بكتريا *E. coli* من البكتريا التي تسبب اصابات مرضية عديدة في الانسان واهم الاصابات التي تحدثها في الانسان هي اخماج المسالك البولية. اذ انها تشكل حوالي (80-90%) من مجموع مسببات الاصابات المرضية في هذه المنطقة، كما تعد هذه البكتيريا من المسببات الرئيسية للاصابات المعوية المختلفة enteric infections وبعد ظهور تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (Polymerase Chain Reaction) وباستخدام مؤشرات الدنا DNA markers ومنها مؤشرات التضاعف العشوائي للدنا ومتعدد الأشكال (Random Amplified polymorphic DNA)، أمكن استنتاج صوراً من نتائج التضاعف للحامض النووي (DNA) تسمح بدراسة تراكيب العديد من الأحياء المختلفة (6) ويوجد العديد أن المؤشرات الوراثية المعتمدة على تقانة ال PCR تشترك بمواصفات عامة ولكل منها محاسن ومساوئ، على العموم فبعد تحديد الهدف من الدراسة يتم الاطلاع على المؤشرات بصورة عامة، وتحديد اي منها يمكن ان يحقق اهداف الدراسة، اما اهم الاسس التي يتم بموجبها اختيار المؤشر دون الاخر هي ان يكون المؤشر سهل التطبيق، وغير مكلف، وعند الاعادة يعطي قابلية تكرار صحيحة (7).

الهدف من الدراسة: عزل وتشخيص بكتريا الاشريكية القولونية المعزولة من المرضى الراقدين والمراجعين الى كل من مستشفى ازادي العام ومستشفى كركوك العام ومستشفى الاطفال في كركوك والمصابين باخماج الجروح والحروق والاذن الوسطى والمسالك البولية والاسهال والتحصري عن مقاومة بكتيريا *E. coli* اتجاه تسعة انواع مختلفة من المضادات الحيوية ثم اجراء دراسة جزيئية بتقنية (RAPD-PCR) لعزلات (*E. coli*) المعزولة من مصادر سريرية مختلفة لتحديد التنوع الوراثي لها.

المواد وطرق العمل

اولاً: جمع العينات:

جدول رقم (1): اقراص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار حساسية *E. coli* للمضادات الحيوية.

ت	المضادات الحيوية	الرمز	تركيز القرص بالميكروغرام µg/disc	قطر منطقة التثبيط القياسية بمللم			الشركة المصنعة
				حساسة >	متوسطة الحساسية	مقاومة <	
1	Ampicillin	Am	10	14	13-12	11	Bioanalyse (turkey)
2	Cephalexin	cl	30	18	17-15	14	
3	Amikacin	Ak	30	22	21-20	21	
4	Gentamicin	Gn	10	23	22-20	19	
5	Tobramycin	Top	10	23	20-22	19	
6	Ciprofloxacin	Cip	5	21	20-16	15	
7	Nitrofurant	F	300	17	15-14	13	
8	Chloramphenicol	C	30	17	16-14	13	
9	Trimethoprim	Tmp	5	16	15-11	10	

R – Resistance S – Sensitive I – Intermediate

3- النتائج والمناقشة

اولا: العزل

مجموع (300) عينة جمعت من حالات سريرية متنوعة في حين ان (106) عينة وبنسبة (35.3%) لم تعطي نموًا جرثومياً وبيّن الجدول (2) الأعداد والنسب المئوية للنمو الجرثومي المأخوذ من عينات سريرية مختلفة.

أظهرت نتائج الزرع المختبري وجود نمو بكتيري في (194) عينة أعطت نموًا موجباً على الأوساط المستعملة وبنسبة (64.7%) من

جدول (2) الأعداد والنسب المئوية لوجود وعدم وجود النمو حسب مصدر العزل

ت	نوع العينة	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	المجموع
1	Urine الادرار	89	63.6	51	36.4	140
2	Stool الاسهال	32	71.1	13	28.9	45
3	Burn swab مسحات الحروق	29	72.5	11	27.5	40
4	Wound swab اخماج الجروح	23	57.5	17	42.5	40
5	ear swab مسحات الاذن	21	60.0	14	40.0	35
	المجموع	194	64.7	106	35.3	300

على انتاج الذيفانات المعوية واحتواء جدارها على مادة متعدد السكريد الشحمي كما تعد سببا مهما لعدوى المستشفيات (15).

ثانيا: التشخيص Identification

تم تشخيص عزلات *E. coli* السريرية اعتماداً على الصفات الزراعية والفحص المجهرى والفحوصات الكيموحيوية . حيث أظهرت جميع العزلات القدرة على النمو على وسط ماكونكي الصلب وكانت جميع المستعمرات صغيرة الحجم ومخمرة لسكر اللاكتوز كما ظهرت بشكل مستعمرات بيضاء معتمة قليلاً مع وجود او عدم وجود تحلل الدم على وسط أكار الدم فهي اما ان تكون محللة للدم تحليل كامل β -hemolytic أذ ظهرت حالة شفافة حول المستعمرة او محللة للدم تحلل جزئي α -hemolytic اذ ظهرت هالة خضراء حول المستعمرة. او تكون غير محللة للدم non-hemolytic لم تظهر لا هالة ولا لون حول المستعمرة وهذا دليل على عدم قدرة البكتريا على إنتاج الهيموليسين (16) فتميت العزلات على وسط أكار الايوسين ازرق المثيلين (EMB) وتبين ان جميع العزلات وبنسبة 100% لها القدرة على النمو على هذا الوسط فهو وسط تفرقي لبكتريا *E. coli*. حيث تظهر المستعمرات بلون غامق مائل الى اللون البني وذات بريق معدني مخضر Green metallic sheen والتي تعد صفة مميزة لأبشركيا القولون من غيرها من الاجناس البكتيرية العائدة الى العائلة المعوية وهذا يعود الى وجود صبغتي الايوسين والمثيل الأزرق وسكر اللاكتوز اللتان ترتبطان مع بعضهما وتترسبان لتكونا هذه الظاهرة.

ثالثاً : اختبار حساسية عزلات بكتيريا *Escherichia coli* المعزولة سريرياً للمضادات الحيوية

درست حساسية عزلات بكتريا *Escherichia coli* والبالغ عددها 75 عذلة سريرية عزلت من حالات مرضية متنوعة اتجاه 9 مضادات حيوية لمعرفة مدى حساسية او مقاومة هذه العزلات تجاه هذه المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام والمتداولة في المؤسسات الصحية في معالجة أنواع مختلفة من الاخماج التي يتعرض لها وقد تباننت العزلات لجرثومة *E. coli* في حساسيتها للمضادات الحيوية

وقد جاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه الباحث (10) والذي أشار الى ان النمو الجرثومي للعينات ظهر بنسبة (22،66%) وأما العينات التي لم تعطي نمو جرثومي فقد كانت بنسبة (37.77%) من خلال دراسة أجراها على عدد من المرضى الراقدين والمراجعين الى مستشفيات محافظة كركوك.

ان النسبة العالية للنمو الجرثومي التي ظهرت في هذه الدراسة قد تعود الى الاستخدام المتزايد للمضادات الحيوية بصورة عشوائية وبدون استشارة الطبيب المختص مما ادى الى جعل السلالات البكتيرية مقاومة على الرغم من إنتاج أجيال جديدة من المضادات الحيوية (11) ذلك عدم إتباع الأساليب الصحية من حيث النظافة وعدم الاكتراث بقواعد التعقيم من قبل العاملين في المستشفى فضلاً عن عوامل أخرى تتعلق بالنظافة الشخصية للمريض نفسه والكادر الطبي (12) لقد كانت اعلى نسبة عزل هي بكتيريا *E. coli* مقارنة بالانواع البكتيرية الاخرى والتي تمثل محور البحث الحالي فقد عزلت من الادرار 43 عذلة بنسبة 48.3% و 13 عذلة من الخروج بنسبة 40.6% و 9 عزلات من الحروق بنسبة 31% و 6 عزلات من الجروح بنسبة 26.1% و 4 عزلات من مسحات الاذن بنسبة 19% ان النتيجة التي تم الحصول عليها جاءت موافقة مع الدراسات التي أشارت الى سيادة بكتريا *E. coli* في تسببها للاخماج المختلفة ومنها دراسة (10) والذي اشار الى سيادة جرثومة *E. coli* وبنسبة 47.3% من المجموع الكلي للانواع البكتيرية الاخرى ، وكذلك دراسة (13) الذي اشار الى سيادة جرثومة *E. coli* وبنسبة 54.1% ومن حالات مرضية مختلفة ودراسة (14) . ويعزى سبب ارتفاع نسبة الإصابة بهذه البكتريا لكونها من الفلورا الطبيعية المتواجدة في امعاء الانسان والحيوان وتكون الاصابة بها في معظم الاحيان داخلية المنشأ ، وقد تكون من مصدر خارجي كما في حالة تناول المياه والاعذية الملوثة ، وتتميز هذه البكتريا بكونها انتهازية ، ولكنها تمتلك بعض العوامل التي تساعدها على احداث الاصابة التي تساعدها على الالتصاق بخلايا المضيف وقدرتها

المستخدمة قيد الدراسة الحالية وقد أظهرت النتائج ان العزلات السريرية ذات مقاومة عالية حسب الجدول (3).

جدول (3) نتائج حساسية عزلات *E.coli*.

ت	المضاد الحيوي	R العدد (%)	I العدد (%)	S العدد (%)	المجموع الكلي
1	Ampicillin	73 (97.3)	0 (0)	2 (2.7)	75 (100)
2	Cephalexin	69 (92)	2 (2.7)	4 (5.3)	75 (100)
3	Amikacin	13 (17.3)	0 (0)	62 (82.7)	75 (100)
4	Gentamicin	39 (52)	5 (6.7)	31 (41.3)	75 (100)
5	Tobramycin	32 (42.7)	0 (0)	43 (57.3)	75 (100)
6	Ciprofloxacin	31 (41.3)	0 (0)	44 (58.7)	75 (100)
7	Nitrofurantoin	29 (38.7)	0 (0)	46 (61.3)	75 (100)
8	Chloramphenicol	27 (36)	1 (1.3)	47 (62.7)	75 (100)
9	Trimethoprim	52 (69.3)	0 (0)	23 (30.7)	75 (100)

R – Resistance

S – Sensitive

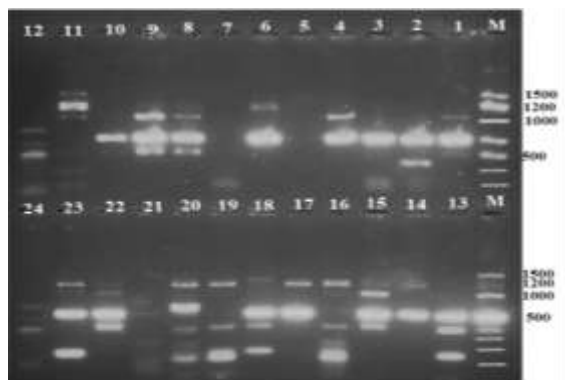
I – Intermediate

مقاوم

حساس

متوسط الحساسية

الباديء على الدنا المجيني لهذه العزلات. وكذلك يمكن ملاحظة ان العينة رقم (10) المعزولة من اخماج الاذن الوسطى والعينة رقم (24) قد انتجت حزمًا عند الوزن الجزيئي 800 pb لكلا العينتين مع عدم وجود حزم للاحجام الجزيئية الاخرى المعزولة من الخروج وعينة رقم (1) المعزولة من الادراج في اظهارها لحزم عند نفس الحجم الجزيئي وذلك عند الموقع 1150 bp، 800 ، اي اشتركت بموقعين، وهنالك عزلات اشتركت بثلاث مواقع في اظهارها للحزم وتشمل الحزم عينة رقم (96) والمعزولة من الجروح وعينة رقم (8) المعزولة من الحروق حيث اشتركت بالمواقع الثلاث 1150 bp، 800، 500 ، واشتركت بموقعين 1150 bp، 800 مع العينتين (4) و (1) المذكورة اعلاه. ان ظهور حزم مشتركة بين العزلات يدل على تشابه المادة الوراثية في تلك المنطقة من الدنا المجيني للعزلتين المشتركتين بالموقع نفسه، والذي قد يمثل تشابه في التكيف الوراثي للمتطلبات العينية الملائمة حيث ان العزلات المشتركة بمواقع ذات احجام جزيئية واحدة قد تبين انها مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية على الرغم من الاختلاف في مصدر العزل. وقد اظهرت باقي العينات تبايناً في اعداد الحزم حيث توزعت اعداد الحزم بين العزلات ما بين (1-4) حزمة، وبلغ عدد الحزم المتباينة 56 حزمة وكما موضح في الصورة (1).



صورة (1) ناتج تفاعل PCR للكشف عن التنوع الوراثي باستعمال الباديء OPF-16

كشف التباين الوراثي:

تفاعلات الـ RAPD:

لدراسة التباين الوراثي بين العزلات ضمن العزلات المقاومة للمضادات الحيوية والبالغ عددها 24 عزلة التي تم اختيارها بالاعتماد على المقاومة لاجلبية المضادات الحيوية المستخدمة ثم استخدمت تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال (RAPD) والتي تتصف بحساسيتها لاي تغيير في مكونات تفاعلاتها لهذا تعتبر من التفاعلات التي يصعب اعادةتها والحصول على النتيجة نفسها Reproducibility فتتغير بتغير تراكيز مكونات التفاعل والظروف المحيطة به لغرض الحصول على نتائج جيدة يجب اجراء عدة تجارب لغرض الوصول الى الظروف المثلى للتفاعل optimization، وهناك عدة عوامل يمكن من خلال السيطرة عليها اعادة التفاعل والحصول على النتائج نفسها ومنها تركيز الدنا المجيني، وملائمة البرنامج المنفذ على جهاز المبلر الحلقي thermocycler ، وتركيز الباديء المستخدم، وتركيز ايونات المغنسيوم Mg^{+2} ، ودقة المساحة المستخدمة في اجراء التجارب، ونوعية انزيم البلمرة وتركيز (17) . وتم اجراء هذه التقنية لدراسة التباينات الوراثية بين العزلات وتحديد التباين الوراثي لاناوع الجنس *E.coli* وتحليل نتائج الـ RAPD تم ايجاد التباينات بين العزلات واعتماداً على ظهور او عدم ظهور حزم التضاعف وكذلك الاختلاف في الاحجام الجزيئية لتلك الحزم والتي تختلف باختلاف عدد المواقع المكمل لتتابعات الباديء على شريط الدنا المجيني وكذلك تختلف باختلاف المسافة بين موقع واخر (18) .

1_الباديء OPF-16: اظهرت العزلات السريرية تبايناً في الاحجام الجزيئية للحزم الناتجة، اذ بلغ عدد مواقع الحزم الناشئة (8) مواقع تراوحت الاحجام الجزيئية لها ما بين (100-1500) bp، وقد كانت جميع الحزم متباينة ولم يظهر هذا الباديء حزمة عامة للعزلات المدروسة، ولا حزم فريدة. وما يمكن ملاحظته حول عمل هذا الباديء على العزلات قيد الدراسة هو ان العينة رقم (5) المعزولة من الادراج والعينة رقم (21) المعزولة من اخماج الاذن الوسطى لم تنتج حزم ولأي حجم جزيئي ويعود السبب في ذلك الى عدم وجود موقع لارتباط

كبر حجمها وازداد عددها لتكون ذات قدرة تمييزية اعلى (20) في حين كانت الحزمة الثانية متباينة وبحجم جزيئي 1200 bp ، وتوزعت اعداد الحزم بين العزلات ما بين (1-2) حزمة، حيث بلغ عدد الحزم المتباينة (21) حزمة. كما هو موضح في الصورة(3).



صورة (3) ناتج تفاعل PCR للكشف عن التنوع الوراثي باستعمال البادئ OPE-20

وفي هذه الدراسة اظهرت البادئات التي استخدمت تباينا وراثيا واضحا بين العزلات المدروسة اذ ان البادئ يرتبط بمواقع مكملة له وبناء شريط جديد يمتد الى ان يستوقفه موقع ارتباطي اخر او نهاية شريط ال DNA القالب بالاضافة الى عامل الوقت المحدد لارتباط البادئ (annealing time) فالمنطقة المحصورة بين موقعي الارتباط هي التي ستشمل حجم القطعة المتضاعفة كون البادئ سكرار ارتباطه بهذه المواقع في كل دوره ليضيف قطعة دنا جديدة تعمل قالباً في الدورة اللاحقة (21) .

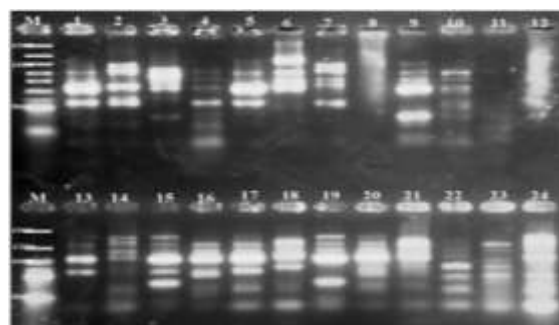
ويتضح من النتائج التي حصلنا عليها التباين في الاحجام الجزيئية للحزم الناتجة اذ يمثل حجم الحزمة البعد بين موقع وآخر لارتباط البادئ كما ذكر اعلاه اي كلما زادت المسافة بينهما كبر حجم القطعة المتضاعفة كما يتمثل عدد تلك الحزم بعدد تلك المواقع ويعود السبب في تباين اعداد حزم التضاعف باستخدام كل بادئ الى نتائج تفاعلات ال RPAD باستخدام بادئات عشوائية تتناسب مع حجم المجين للكائن المدروس وكذلك اعداد النيوكليوتيدات للبادئ المستخدم (22) ويرجع السبب في وجود اختلافات في اعداد الحزم المتضاعفة بين عزلات بكتريا *E-Coli* الى وجود اختلاف في اعداد المواقع التي يتعرف عليها البادئ وكذلك فأن اختلاف المسافة بين موقع وآخر يؤدي الى الحصول على قطع الاحجام الجزيئية.

فعندما يجد البادئ مناطق مشابهة له وفي شريط الدنا يتضاعف الناتج وعند تحليل الناتج تظهر حزم مختلفة (23) ، كما اكد ان الحزم المتضاعفة التي تظهر هلام الاكاروز والتي تختلف باوزانها الجزيئية تعتمد على نوع البادئ المستخدم، اذ انها تؤثر على حجم الحزم المتضاعفة. ان اختلاف عدد الحزم الناتجة باختلاف العينات يبدو منطقياً بسبب التغيير في تسلسل الدنا للعزلات اذ ان التفاوت في اعداد الحزم الناتجة يعود الى اختلاف ترتيب القواعد النروجينية في الانماط

2_البادئ OPA-06 :

اظهر هذا البادئ تباينا في الاحجام الجزيئية للحزم الناتجة للعينات السريرية اذ بلغ عدد مواقع الحزم الناتجة (9) مواقع تراوحت الاحجام الجزيئية لها ما بين (200 - 1500) وقد كانت جميع الحزم متباينة ولم يظهر هذا البادئ حزمة عامة للعينات المدروسة، وقد توزعت اعداد الحزم بين العزلات ما بين (2-9) حزمة لكل عينة، وما يمكن ملاحظته على هذا البادئ انه لم ينتج حزم لكل من عينة رقم (11) و (12) على التوالي المعزولين من الخروج Stool اي نفس مصدر العزل، ويعزى السبب في ذلك الى ان هذا البادئ لم يجد مواقع مكملة له على الدنا الجيني لهاتين العزلتين.

بينما اشتركت العينتان رقم (4) و (10) على التوالي حيث ان العزلة رقم (105) معزولة من اخماج الاذن الوسطى والعزلة رقم 4 معزولة من الخروج، اشتركتا في انتاج هذا البادئ لخمس حزم مشتركة بين هاتين العزلتين وباحجام جزيئية مشتركة (550 ، 600 ، 700 ، 900) ، 200 bp ان وجود هذه الحزم المشتركة بين العزلتين يدل على تشابه المادة الوراثية في تلك المنطقة من الدنا الجيني للعزلتين مما يؤدي الى استنتاج هو وجود تشابه وراثي بين هاتين العزلتين على الرغم من الاختلاف في مصدر العزل الا انها تنحدر من اصل مشترك. كذلك ما يمكن ملاحظته هو انتاج هذا البادئ حزم لكل الاحجام الجزيئية وذلك للعينة رقم 24 المعزولة من الحروق والتي تفردت في كونها اظهرت جميع الحزم ولجميع المواقع. وقد بلغ عدد الحزم المتباينة لهذا البادئ 104 كما موضح في الصورة (2).

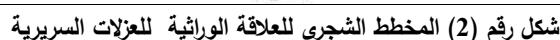
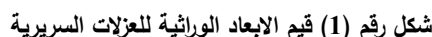


صورة (2) ناتج تفاعل PCR للكشف عن التنوع الوراثي باستعمال البادئ OPA-06

3_البادئ OPE – 20 :

يتبين من خلال نتائج تفاعلات ال RAPD للبادئ OPE – 20 للعزلات السريرية انتاجه حزم باحجام جزيئية مختلفة اذ بلغ عدد مواقع الحزم الناتجة موقعين فقط وباحجام جزيئية (1200-1350) bp ، وقد انتج هذا البادئ حزمة عامة عند الحجم الجزيئي 1350 bp وهذا يدل على وجود تشابه وراثي بين العزلات التي تعود للنوع نفسه، ان هذه النتائج متشابهة الحزم من حيث العدد او الحجم يطلق عليها الحزمة الرئيسية Main bands وهي تعكس المسافة المتماثلة بين مواقع ارتباط البادئ على دنا العزلات المدروسة. وهي تمثل موقعا تشترك به كل افراد النوع المدروس (19) وتزداد اهميتها نسبيا كلما

تراوحت قيمة البعد الوراثي للعينات السريرية ما بين (0.215-0.997) كما موضح في الشكل (1). حيث كانت اقل قيمة للبعد الوراثي بالنسبة للعزلات السريرية 0.215 وذلك بين العينة رقم 3 المتمثلة بالعزلة رقم 20 المعزولة من الخروج Stool والعينة رقم 4 المتمثلة بالعزلة رقم 29 المعزولة من الخروج ايضا Stool اي انها معزولين من نفس مصدر العزل وهذا يدل على انها يمتلكان أكبر تشابهاً في المادة الوراثية بالاستناد الى البيانات المستخدمة في هذه الدراسة و



المصادر

- (1) Ryan, K. J. and George Ray, C. (2004) Introduction to Infection Disease Isherries Medical Microbiology 4th ed ; Mc. Graw -Hill, New York.
- (2) Jawetz, E.; Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A (2001). Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology .12 ed., abbleton and 22th ed., abbletoth and lange , California, U.S.A.
- (3) Johnson, J.R. and Rusoo .T.A. (2005). Molecular epidemiology of extrinstinal pathogeniac (uopathogenic) Escherichia coli. Intjmed microbiology 295(6-7):383-404 .
- (4) Li,k;Zhou;Hong y.Sacks.S.H and Shecrin .N.S. (2009). Synergy between type1 Fimbriae expression and C3 Opsionisation in creases internalisation of *E.coli* by human tubular epithelial cell BMC Microbiology :9:64.
- (5) Tortora, G. J, Funke, B. R and Case, C. L(2010). Microbiology An introduction 10th ed.; Perason Benjamin Cummings U.S.A .
- (6) Williams, J.G.; Kubelic, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by aribitary primers are useful as genetic markers nucleic acids Res . 18: 6531-6535 .
- (7) Abass, M.H. (2013). Microbial Contaminants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in Iraqi tissue Culture laboratories. Emir. J.Food Agric. 25(11):875-882.
- (8) الراشدي، سفانة احمد محمد.(2014). التحري عن بعض جينات الضراوة في عزلات سريرية وبائية لبكتريا ايشريشيا كولاي المعزولة محليا. رسالة ماجستير كلية العلوم جامعة تكريت.
- (9) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. twenty first informational supplement M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, U.S.A.
- (10) الجومرد، مصطفى ماهر خضر.(2015). دراسة انتشار جينات ادراك النصاب في العزلات السريرية لبعض الانواع البكتيرية المرضية رسالة ماجستير كلية العلوم جامعة تكريت.
- (11) Nester, E. W, Roberts, C. E, Pearsall, N.N, Anderson, D.G and Nester, M.T(2004). Microbiology a human perspective 4th ed . WCB .Mc Graw-Hill companies .pp:599-604 .
- (12) Manngialotti, M.D. (2001) The current studies of surveillance of resistance to antimicrobial agents . Report on melting. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49:17-23
- (13) حلو ، محمود خلف صالح.(2014). تحديد جينات المقاومة البلازميدية المنقولة الى بكتريا اشريشيا القولونية والكشف عن بعض عوامل ضرورتها لدى المرضى الراقدين في مستشفى تكريت التعليمي اطروحة دكتوراه كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة تكريت.
- (14) Sonavane, A.J.; Mathur, M.J.; Turbadkar, D. and Baradkar V. (2008). Antimicrobial susceptibility pattern in urinary bacterial isolates . Bomby hospital . Journal, 50(2) : 240-244 .
- (15) Lindblad, W. J., (2008). Considerations for determining if a Watural product is an Effective wound Healing Agent. International. Journal of lower Extremity wounds 7 (2) 75- 81.
- (16) Brooks, C.F, Carrol, K.C, Butel, J.S and Mores, S.A(2007). Jawetz melnick and Adelerg medical microbiology 24th ed. Mc Graw-Hill.U.S.A.
- (17) Caetano-Anollés, G. Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. (1998). Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicon profiling of endonuclease-digested DNA: identification of markers tightly linked to the super nodulation locus in soybean . Molec. Gen. Genet. PP : 57-64 .
- (18) Mayer, M. S.; Tullu, A.; Simon, C. J.; Kumar, J. ; Kaiser, W. J.; Kraft, J. M. and Muehlbauer, W. H. (1997). Development of DNA marker for *Fusarium* resistance in Chickpea in: Udupa, S. M. and Wigand, F. (eds). DNA markers and breeding for resistance to Ascochyta blight in Chickpea.
- (19) Sundari, Arumingtyas EL., Hakim L.,(2011) Markers and Its Applications of RAPD Markers In Genetic Variance Detection among Local Durian (*Durio zibethinus* Murr). On the west Halmahera province North Maluku Indonesia.
- (20) العاصي ، عقيل حسين على. (2002). استخدام مؤشرات الدنا في تحليل التنوع الوراثي للشعير (*Hordeum vulgare* L.) المزروع في العراق. أطروحة دكتوراه. كلية التربية ابن الهيثم - جامعة بغداد.
- (21) Welsh, J.; McClelland, M. (1990). Fingerprint Genomes using PCR with Arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18 (24): 7213- 7218.
- (22) Taghi, Z.S.; Seyed A. M.; Vahid, K. and Fatemeh, A. K. (2008). Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. Braz j. Microbiol; 39 (3): 494- 497.
- (23) Wang, M., Sahm DF, Jacoby GA, Zhang Y, and Hooper D.C.(2004). Activities of Newer Quinolones Against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Containing the Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant qnr. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.48: 1400–1401.
- (24) Vipin, K.; Ravindra k. G., Heena, K.; Yogeshs., Meeta, S. and Surya N. (2015). International Journal of Microbiology and Allied sciences (IJOMAS) 2 (1): 17- 22.
- (25) Ghazi F.; Benmechernene Z.; Kihal M.; and Gurakan. G.C. (2013). The Reproducibility of RAPD profiles of *streptococcus thermophiles* strains with XDG, M13 and OPI. O2 MOD primers, African Journal of Biotechnology.; 12 (44): 6245- 6252.

Using RAPD markers for Detection the genetic diversity of *E. coli* isolates from Kirkuk hospitals

Waa'd M. Raoof¹, Akeel H. Al-Assie², Shaimaa Monshed Morshed²

¹ College of Pharmacy, University of Tikrit, Tikrit, Iraq

² Department of Biology, College of Science, University of Tikrit, Tikrit, Iraq

Abstract

300 samples from different infection sources for patients and revisers in Azadi hospital, Kirkuk generic hospital, and children hospital, from various ages for both genders, to isolate *Escherichia coli* bacteria and diagnosis it, and study the genetic variety which distribution to clinical samples by (140) urine samples, (45) diarrhea samples, (40) wound swab, (40) burn swab, and (35) from otitis media infection.

The growth isolation on the different cultural media was diagnosed from the appearance, microscopical, and cultural characteristics. The results the diagnosis showed that (75) clinical isolation about (38.65%) refers to *E. coli* bacteria distributed by (9) isolation at ratio (31%) from the burn swab, (6) isolation at ratio (26.1) from wound swab, (4) isolation from otitis media infection (19%), (13) isolation from the stool about (40.6%), and (43) isolation (84.3%) from the urinary tract infection (UTI).

The sensitivity of the clinical and ecological isolations was studied for nine antibiotics from different antibiotics, broadly. Where the highest resistance for the antibiotics in the clinical isolations to both (ampicillin and cephalexin) reaching in the rate of (97.3%) and (92%), respectively. While the lowest resistance rate for the clinical isolations was to the (Amikacin) in the rate of (17.3%).

It has been selected 24 clinical isolations, and 24 ecological isolations from *E. coli* isolations depending on here resistance to many of antibiotics. To study the genetic variation for these isolations and the genetic markers it has been used a type of molecular markers which is depending on PCR technical it is: randomly Amplified polymorphic DNA (RAPD).