مجلة تكريت للعلوم الصرفة ، 2018 (5) 23

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

مجلة تكريت للعلوم الصرفة

Journal Homepage: http://main.tu-jo.com/ojs/index.php/TJPS/index

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

وعد محمود روؤف[1] ،عقيل حسين العاصي[2] ، شيماء منشد مرشد[2]

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

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

معلومات البحث

تأريخ الاستلال: 30 / 4 / 2018

تأريخ القبول: 14 / 1 / 2018

الكلمات المفتاحية:

العزلات السريرية، جرثومة *E.coli*، مؤشرات RAPD

المراسلة مع:

الاسم: شيماء منشد مرشد

البريد الاليكتروني:

رقم الهاتف:

الملخص

جمعت 300عينة 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 swab، 35 عينة من أخماج الأذن الوسطى otitis media وقد تم تشخيص العزلات النامية بعد زرعها على الأوساط الزراعية المختلفة من خلال الصفات المظهرية والمجهرية والزراعية وأظهرت نتائج التشخيص بأن 75 عزلة سريرية أي بنسبة38.65% تعود لبكتريا E.coli، توزعت بواقع 9 عزلات بنسبة 31% من أخماج الحروق و6 عزلات بنسبة 1. 26% من اخماج الجروح و4 عزلات بنسبة 19% من أخماج الأذن الوسطى و13 عزلة من حالات الخروج بنسبة 40.6% و43 عزلة بنسبة 84.3% من اخماج المسالك البولية. تم دراسة حساسية عزلات بيكتيريا 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 cephalexin،ampicillin بنسبة 97.3% و 92% على التوالي. كانت أقل نسبة مقاومة للعزلات السريرية لمضاد Amikacin بنسبة 17.3%.و قد تم انتخاب 24عزلة سريرية من عزلات E.coli اعتمادا 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 الE.coli المعزولة من مصادر سريرية مختلفة حيث تم عزل مادة الدنا من الخلايا البكتيرية ثم نفذت تفاعلات ال PCRعليها 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 حزما "متماثلة المواقع Monomorphic bands،وحزما متباينة المواقع polymorphic bands ثم أدخلت البيانات التي تم الحصول عليها إلى الحاسوب ووفق البرنامج الإحصائي NTSYS-PC version 2.02.

المقدمة

ينتمي جنس *Escherichia* إلى العائلة المعوية *Enterabacteriaceae* (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 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 تنوعا جينيا مميزا والعديد من عوامل الضراوة تمكنها من غزو

واستعمار الانسجة منها عوامل الالتصاق Adhesion factors وانتاج السموم Toxins وانتاج الهيمولاسين ومتعدد السكريد الشحمي LPS والمحفظة Capsule وعوامل الغزو Inrasive 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 (Rondom Amplified polymorphic DNA)، أمكن استنتاج صوراً من نتائج التضاعف للحامض النووي (DNA) تسمح بدراسة تراكيب العديد من الأحياء المختلفة (6) ويجد 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 اهدف 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 الاشريكيا 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 والتحري 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:

جمعت 300 عينه سريرية من (الادرار – الخروج– الجروح –الحروق– الاذن الوسطى) وتحت اشراف الاطباء المختصين لكلا الجنسين وباعمار مختلفة من (1–60سنة) من المرضى الراقدين والمراجعين الى كل من مستشفى ازادي العام ومستشفى كركوك العام ومستشفى اطفال في محافظة كركوك للفترة الممتدة من 15–2–2015 ولغاية 1–8–2015.

ثانياً: تشخيص العزلات البكتيرية

Identification of Bacterial Isolates

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

1– التشخيص البكتريولوجي الاولي:–

شخصت المستعمرات النامية على سطح الاوساط الزرعية الخاصة بالزرع الاولي مبدئياً بالاعتماد على الصفات الزرعية من حيث الشكل، الحجم، اللون، القوام، الدائمة، وتحلل الدم على وسط اكار الدم وتخميرها لسكر اللاكتوز على وسط اكاد الماكنونكي، كما درست صفات الخلايا البكتيرية عن طريق الفحص المجهري وذلك بعد تصبيغها 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 الحيويه

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 اعتمادا" 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)

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

ت	المضادات الحيوية	الرمز	تركيز القرص بالمايكروكرام µg/disc	قطر منطقة التثبيط القياسية بلملم			الشركة المصنعة
				حساسة <	متوسطة الحساسية	مقاومة >	
1	Ampicllin	Am	10	14	13-12	11	Bioanalyse (turkey)
2	Cephalexin	cI	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	Chlorampheicol	C	30	17	16-14	13	
9	Trimethoprim	Tmp	5	16	15-11	10	

R – Resistance S – Sensitive I – Intermediate

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

3- النتائج والمناقشة

اولا: العزل

أظهرت نتائج الزرع المختبري وجود نمو بكتيري في (194) عينة اعطت نموا" موجبا" على الأوساط المستعملة وبنسبة (64.7%) من مجموع (300) عينة جمعت من حالات سريرية متنوعة في حين ان (106) عينة وبنسبة (35.3%) لم تعطي نموا" جرثوميا" ويبين الجدول (2) الأعداد والنسب المئوية للنمو الجرثومي المأخوذ من عينات سريرية مختلفة.

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

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

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 فضلا" عن عوامل أخرى تتعلق بالنظافة الشخصية للمريض نفسه والكادر الطبي (12) لقد كانت اعلى نسبة عزل هي بيكتيريا *E.coli* مقارنة بالانواع البكتيرية الاخرى والتي تمثل محور البحث الحالي فقد عزلت من الادرار 43 عزلة بنسبة 48.3% و 13 عزلة 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 اشارَ 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 المنشا ، وقد تكون من مصدر خارجي كما في حالة تناول المياه والاغذية الملوثة ، وتتميز هذه البكتريا بكونها انتهازية ، ولكنها تمتلك بعض العوامل التي تساعدها على احداث الاصابة التي تساعدها على الالتصاق بخلايا المضيف وقدرتها 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 اعتمادا" على الصفات الزراعية والفحص ألمجهري 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 قليلا" 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 للدمnon- hemolytic لم تظهر لا هالة ولا لون حول المستعمرة وهذا دليل على عدم قدرة البكتريا على إنتاج الهيمولايسين (16) فنميت العزلات على وسط أكار الايوسين ازرق المثيلين(EMB) وتبين ان جميع العزلات وبنسبة 100% لها القدرة على النمو على هذا الوسط فهو وسط تفريقي لبكتريا *E.coli*. حيث تظهر المستعمرات بلون غامق مائل الى اللون البني وذات بريق معدني مخضر Green metallic sheen والتي تعد صفة مميزة لأيشريكيا 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 الظاهره.

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

درست حساسية عزلات بكتريا *Escherichia coli* والبالغ عددها 75 عزلة 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 تباينت العزلات لجرثومة *E.coli* في حساسيتها للمضادات الحيوية

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

I – Intermediate متوسط الحساسية **S – Sensitive** حساس **R – Resistance** مقاوم

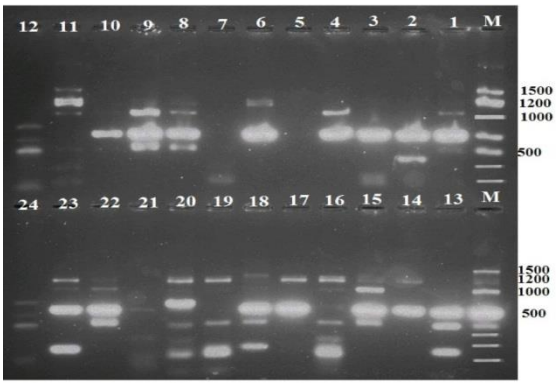
كشف التباين الوراثي:

تفاعلات الـRAPD:

لدراسة التباين الوراثي بين العزلات ضمن العزلات المقاومة للمضادات الحيوية والبالغ عددها 24 عزلة والتي تم اختيارها بالاعتماد على المقاومة لاغلبية 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 اعادتها والحصول على النتيجة نفسها Reproducibility فنتائجها تتغير 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 المبلمر الحلقي thermocycler ، وتركيز البادىء 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 لانواع الجنس *E.coli* وتحليل نتائج الـRAPD 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 المكملة لتتابعات البادىء على شريط الدنا المجيني وكذلك تختلف باختلاف المسافة بين موقع واخر (18).

1_**البادىء 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 البادىء حزمة عامة للعزلات المدروسة، ولا حزم فريدة. وما يمكن ملاحظته حول عمل هذا البادىء على العزلات قيد الدراسة هو ان العينة رقم (5) المعزولة من الادرار والعينة رقم (21) المعزولة من اخماج الاذن الوسطى لم تنتج حزم ولأي حجم جزيئي ويعود السبب في ذلك الى عدم وجود موقع لارتباط البادىء على الدنا المجيني لهذه العزلات. وكذلك يمكن ملاحظة ان العينة رقم (10) المعزولة من اخماج الاذن الوسطى والعينة رقم (24) قد انتجت حزماً عند الوزن الجزيئي pb800 لكلتا العينتين مع عدم وجود حزم للاحجام الجزيئية الاخرى المعزولة من الخروج وعينة رقم (1) المعزولة من الادرار 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)pb،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 الـDNA المجيني للعزلتين المشتركين 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).



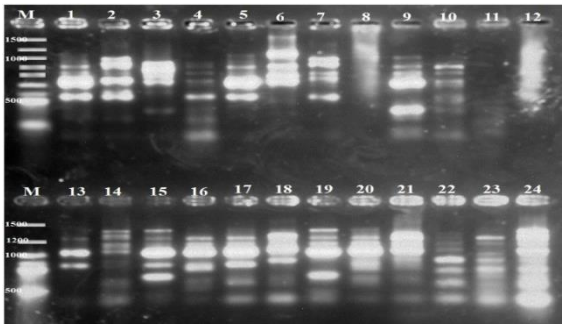
صورة (1) ناتج تفاعل PCR للكشف عن التنوع الوراثي باستعمال البادىء OPF-16

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

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 مكمله له على الدنا الجيني لهاتين العزلتين.

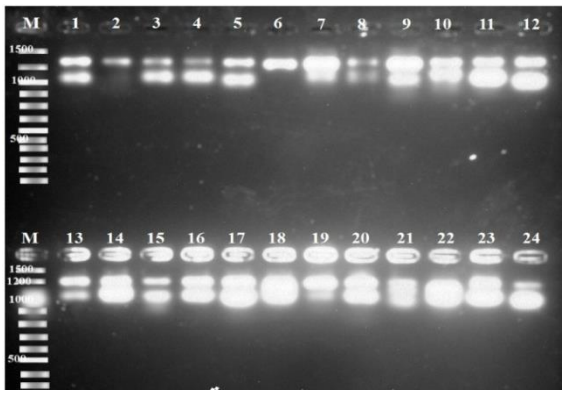
بينما اشتركت العينتان رقم (4) و (10) على التوالي حيث ان العزلة رقم (105) معزولة من اخماج الاذن الوسطى والعزلة رقم 4 معزولة من الخروج، اشتركتا في انتاج هذا البادئ لخمس حزم مشتركة بين هاتين العزلتين وباحجام جزيئية مشتركة (900، 700 ، 600 ، 550 ،200) bp ان وجود هذه الحزم المشتركة بين العزلتين يدل على تشابه المادة الوراثية في تلك المنطقة من الدنا الجيني للعزلتين مما يؤدي الى استنساج 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 الرئسية 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 كبر حجمها وازداد عددها لتكون ذات قدرة تمييزية اعلى (20) في حين كانت الحزمة الثانية متباينة وبحجم جزيئي bp1200 ، 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 المدروسه 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 سيكرر ارتباطه بهذه المواقع في كل دوره ليضيف قطعة دنا جديدة تعمل قالبا في الدورة اللاحقة (21) .

ويتضح من النتائج التي حصلنا عليها التباين في الاحجام الجزيئية للحزم الناتجة اذ يمثل حجم الحزمة البعد بين موقع واخر 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 واخر 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 منطقيا بسبب التغيير في تسلسل الدنا للعزلات اذ ان التفاوت في اعداد الحزم الناتجة يعود الى اختلاف ترتيب القواعد النتروجينية في الانماط

الوراثية للعينات المدروسة وهذه النتيجة تستخدم مع دراسات عديدة في هذا المجال منها (24) (22).

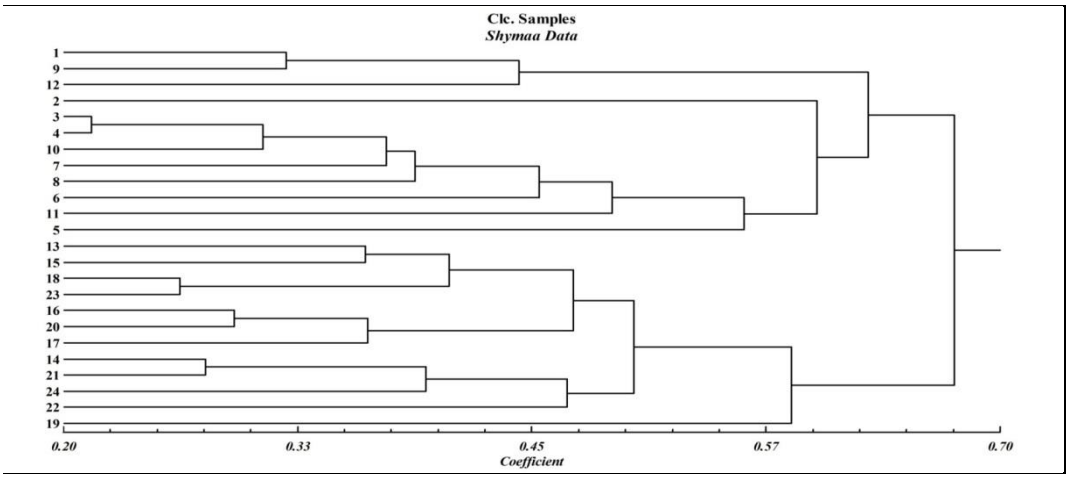
ان ناتج عملية تحليل RAPD-PCR تعتمد على نوع البادئ المستعمل، وبوجود بادئات مختلفة تنتج انماط مختلفة من الحزم ايضا، ان الاختلاف في هذه الحزم واعدادها واحجامها الجزيئية هو الذي يحدد كمية التباين الوراثي بين العزلات ان هذا التنوع الوراثي هو احد فروع التنوع الحيوي والذي يمكن الافراد من التكيف مع التغييرات البيئية وهو ناتج عم مجموعة من الاختلافات الوراثية بين الافراد على مستوى DNA (25)

البعد الوراثي للعزلات السريرية

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 المعزلة من الخروج ايضا Stool اي انهما معزولين من نفس مصدر العزل وهذا يدل على انهما يمتلكان أكبر تشابهاً في المادة الوراثية بالإستناد الى البادئات المستخدمة في هذه الدراسة و بالإضافة لمصدر العزل فإن هاتين العزلتين مقاومتان للمضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية في هذه الدراسة بالإضافة الي قدرة هذه العزلات على التكيف الوراثي مع الظروف البيئية المختلفة. أما أعلى بعد وراثي كان (0.997) بين العينة رقم (2) المتمثلة بالعزلة رقم (11) المأخوذة من الإدرار Urine والعينة رقم 19 المتمثلة بالعزلة رقم (202)المعزولة من الخروج , Stool وهذا يعني وجود اقل نسبة للتشابه في المادة الوراثية بين هاتين العزلتين فقد اشتركنا بأقل عدد من الحزم بالنسبة للعزلات الأُخرى وقد اختلفت العزلتان فيما بينهما من حيث مصدر العزل فالبعد الوراثي يعود الأختلاف في مكان العزل وطبيعة مصدر العزل (المادة المعزولة منها البكتريا) بالإضافة الى ان هذا الإختلاف قد يعود الى إختلاف المواقع التي يتعرف عليها البادئ ضمن الجنين او الى عدد هذه المواقع الذي قد يتغير لظروف معينة كالإتحادات الجديدة أو الطفرات. وقد تراوحت الابعاد الوراثية للعزلات الأخرى بين هذه القيم .وتم استثمار قيم البعد الوراثي بين العزلات ال 24 لإيجاد العلاقة الوراثية التي تربطها جميعاً بشكل مجاميع groups حيث تم تقسيم العزلات الي مجاميع بلاعتماد على نتائج التحليل الاحصائي كما في الشكل (2) :

0.000																						
0.517	0.000																					
0.417	0.513	0.000																				
0.300	0.438	**0.215**	0.000																			
0.470	0.661	0.513	0.529	0.000																		
0.523	0.529	0.430	0.455	0.629	0.000																	
0.472	0.590	0.259	0.362	0.389	0.401	0.000																
0.514	0.689	0.339	0.330	0.632	0.527	0.433	0.000															
0.319	0.811	0.634	0.545	0.885	0.756	0.723	0.543	0.000														
0.531	0.404	0.311	0.302	0.604	0.456	0.496	0.448	0.566	0.000													
0.717	0.995	0.336	0.529	0.647	0.484	0.435	0.524	0.931	0.650	0.000												
0.457	0.658	0.579	0.693	0.910	0.644	0.651	0.693	0.429	0.665	0.651	0.000											
0.648	0.757	0.596	0.609	0.826	0.661	0.621	0.720	0.591	0.693	0.803	0.636	0.000										
0.626	0.856	0.736	0.744	0.787	0.590	0.768	0.693	0.677	0.722	0.596	0.719	0.693	0.000									
0.498	0.658	0.628	0.598	0.716	0.470	0.504	0.693	0.569	0.614	0.599	0.573	0.361	0.474	0.000								
0.850	0.930	0.736	0.862	0.930	0.690	0.768	0.693	0.738	0.665	0.708	0.665	0.435	0.560	0.431	0.000							
0.746	0.944	0.811	0.815	0.944	0.704	0.782	0.764	0.817	0.797	0.782	0.790	0.596	0.434	0.532	0.311	0.000						
0.668	0.763	0.615	0.631	0.763	0.540	0.537	0.580	0.556	0.552	0.537	0.760	0.348	0.461	0.355	0.418	0.520	0.000					
0.927	**0.997**	0.955	0.797	0.996	0.671	0.846	0.968	0.816	0.941	0.772	0.915	0.688	0.592	0.484	0.535	0.667	0.522	0.000				
0.506	0.653	0.537	0.602	0.653	0.442	0.599	0.642	0.618	0.523	0.553	0.577	0.451	0.480	0.380	0.291	0.414	0.441	0.584	0.000			
0.617	0.869	0.564	0.629	0.661	0.529	0.536	0.689	0.677	0.604	0.436	0.841	0.575	0.276	0.458	0.450	0.513	0.358	0.532	0.339	0.000		
0.563	0.772	0.722	0.676	0.647	0.624	0.693	0.735	0.552	0.596	0.818	0.651	0.567	0.450	0.550	0.650	0.510	0.446	0.772	0.599	0.484	0.000	
0.598	0.671	0.692	0.657	0.566	0.482	0.517	0.654	0.687	0.678	0.563	0.541	0.502	0.403	0.418	0.487	0.545	0.262	0.497	0.429	0.426	0.389	0.000
0.511	0.517	0.458	0.482	0.566	0.523	0.472	0.514	0.533	0.403	0.774	0.632	0.597	0.444	0.541	0.487	0.746	0.444	0.602	0.506	0.343	0.472	0.470	0.000

شكل رقم (1) قيم الابعاد الوراثية للعزلات السريرية



شكل رقم (2) المخطط الشجري للعلاقة الوراثية للعزلات السريرية

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**). Jawets Melnick and Adelbergs Medical Microbiology .12 ed., abbleton and 22th ed., abbleetoh and lange , California, U.S.A.

(3) Johnson, J.R. and Rusoo .T.A. (**2005**). Molecular epidemiology of extrinstinal pathogeniac (uropathogenic) 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 10 th 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 dactyliferq 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 وبيئية لبكتريا ايشريكيا 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 ضراوتها 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.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)
مجلة تكريت للعلوم الصرفة ، 2018 (5) 23

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

Waa'd M. Raoof [1] , Akeel H. Al-Assie[2] , Shaimaa Monshed Morshed[2]

[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 sourcel for a 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).