دراسة بكتيريولوجية وراثية لبعض الانواع المعزولة من المصابين وغير المصابين بداء السكري

قناة محمود عطية[1]، كركز محمد ثلج[2] ، رشيد حميد حسن[3]

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

[2]قسم الصناعات الغذائية ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[3]كلية العلوم التطبيقية ، جامعة سامراء ، سامراء ، العراق

الملخص

اجريت هذه الدراسة في مختبرات مستشفى تكريت التعليمي ومختبرات قسم علوم الحياة –كلية العلوم في جامعة تكريت للمدة من كانون الثاني 2010 لغاية كانون الثاني 2011 ، تضمنت الدراسة جمع 534 عينة من اخماج المسالك البولية والجروح للمرضى المصابين بالنوع الاول والثاني من السكري وغير المصابين به لكلا الجنسين ومن جميع الأعمار, لتحديد انواع البكتريا المرضية الاكثر عزلا وتشخيصها من خلال الصفات المظهرية والمزرعية والكيموحيوية وتحديد عوامل امراضيتها وكذلك التباين الوراثي بين النوع السائد منها اعتمادا على مصدر العزل ونوع الاصابة بداء السكري . بينت النتائج ان اعداد عينات المصابين باخماج المسالك البولية او الجروح من غير مرضى السكري كانت 118 و52 على التوالي وكانت نسب العزل للنموات البكتيرية لكل منهما 44 و 38.4% على الترتيب وللمصابين بالاخماج نفسها وداء السكري المعتمد على الانسولين عند 158عينة و 68عينة على الترتيب كانت نسبة وجود النموات البكتيرية منها 78.5 و 67.6 % على الترتيب وللمصابين بداء السكري غير المعتمد على الانسولين اعداد 96 عينة و 42 عينة على الترتيب كانا موجبين للنمو البكتيري بنسبة 75 و71.4% على الترتيب . وكانت الاصابات اكثرها نسبة في فصلي الشتاء والخريف من بين فصول السنة .بينت النتائج ايضا *ان النوع* *Escherichia coli* كان الاكثر عزلا من المصابين باخماج المسالك البولية وتلتها الانواع الاخرى وهي بكتريا *Citrobacter diversus* , *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* *Enterobacter aerogenes* . أما المصابين باخماج الجروح من مرضى السكري فقد كانت بكتريا *Escherichia coli* هي الاكثر نسبة تلتها بكتريا *Citrobacter diversus* , *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus*. وازدادت نسبة الاصابة بالسكري لاخماج المسالك البولية والجروح في فصل الشتاء والخريف اكثر مما في فصلي الربيع والصيف .

تبين إن اكثر العزلات البكتيرية كانت حساسة للمضاد الحيوي Chloramphenicol وتفاوتت انواع المضادات الاخرى في قدرتها على تثبيط العزلات.

كما تبين أن العزلات البكتيرية تفاوتت في قابليتها لانتاج عوامل الضراوة إذ أن حالة الاصابة بداء السكري سببت في قابليتها في انتاج تلك العوامل فقد كانت البكتريا المعزولة من المصابين منتجة لعامل تحلل الدم ومكونة للمحفظة.

استخدمت تقنية PCR لبيان التباين الوراثي للعزلات الاكثر تكرارا من بكتريا *Escherichia coli* لمصادر العزل المختلفة. واستخدام البادئات المتخصصة، haemolysine−(*HLY A*),(Cytotoxic Necrotizing Factor) (*CNFs)*,(*CNF1*) ((*KPSMT II*) group II Capsule), فقد ظهرت الحزم بعد الترحيل ممثلة لكل حالة من عوامل الضراوة التي مثلتها البادئات المستخدمة وظهرت حزمة في عزلة لمصاب بالسكري ومصاب بالتهاب المسالك البولية للبادئ *KPSMT II* التي كانت بحجم جزيئي 270 bp وكذلك حزمة واحدة في عزلة لمصاب بالسكري ومصاب بالتهاب المسالك البولية باستخدام البادئ *HLY A* بحجم جزيئي 177 bp وحزمة واحدة باستخدام البادئ *CNF1* في عزلة لمصاب بالسكري ومصاب بالتهاب الجروح بحجم جزيئي 450 bp ولم تظهر اية حزمة عند البادئ *CNFs* .

1− المقدمة

يعرف داء السكري (DM) Diabetes Mellitus بأنه نقص او عدم افراز او عدم الاستفادة من هرمون الانسولين المفروز من البنكرياس الذي يتم بواسطته الاستفادة من المواد السكرية في الجسم بالشكل المطلوب(1). إن الافراط في تناول الكلوكوز ووصول مستواه الى 120ملغم/ديسيلتر في الدم يؤدي الى تحوله وفق اليات ايضية محددة الى خزين في الكبد والعضلات بشكل كلايكوجين وان ارتفاعه اكثر من ذلك يؤدي الى تحوله الى دهن خزين في الخلايا الدهنية تحت الجلد وحول الاعضاء (2) .

ينقسم داء السكري الى نوعين رئيسين الأول يسمى السكري المعتمد على الأنسولين(Insulin Dependent Diabetes(IDD يصيب الأطفال والمراهقين بنسبة 200/1 منهم الذي غالبا ماتكون الاصابة به ناتجة عن عدم افراز الانسولين في الجسم ويكون المصاب به نحيفا. والثاني: السكري غير المعتمد على الأنسولين Non Insulin Dependent Diabetes(NIDD) الذي غالبا مايصاب به البالغين والكبار عند سن 40 سنة واكثر وتكون لديهم قلة في افراز الانسولين اوعدم فاعليته وقد ازدادت الإصابة في السنوات القليلة الماضية للأطفال والمراهقينً .ان سبب الاصابه يكون ناتجا عن الجانب الوراثي اضافه الى العوامل الاخرى كالبدانة وغيرها (3) إن من اهم الحالات المرضية التي تنتج عند الاصابة بداء السكري هي انخفاض مناعة

الجسم لكونه يسبب تحطيم الخلايا المناعية للخلايا الجسمية Autoimmune Disease(4)

والسكري يصيب اكثر من 15% من شعوب العالم لذلك يستدعي أن تتم مراعاة حالة المصاب به لتلافي المضاعفات المرضية الاخرى وحصول الاخماج وتعقيدها لاسيما مايحصل منها في المسالك البولية والجروح، التي تبين بأن اكثر الانواع المسببة لها والمعزولة من اخماج المسالك البولية Urinary Tract Infections(UTI) هي من الانواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام لاسيما البكتريا المعوية *Enterobacteriaceae* ومنها بكتريا *Enterobacter erogenes, Klebsiella pneumoniae, Proteus* (5). أما المسبب منها لأخماج الجروح Wounds Infections(WI) فهي فضلا" عن ماذكر فانها تصاب بالانواع *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* التي تعد الأكثر خطراً في حالة اصابة الجروح بها وقد تسبب الوفيات لامتلاكها عوامل ضراوة متنوعة منها الأسواط Flagella والأهلاب (الزغيبات) Pili ومتعدد السكريد الدهني Lipopolysaccharides (LPS) والصبغة الخضراء المزرقة (البايوسيانين) Pyocyanin والبروتين M Protein M والهيمولايسين Haemolysin وغيرها (6) وقد ازدادت خطورة الانواع البكتيرية المذكورة في العقود الاخيرة وذلك لما حصل فيها من تطور وراثي نتج عنه زيادة قابليتها على مقاومة المضادات الحيوية يعد استخدام المؤشرات الوراثية المتخصصة من خلال تقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة Polymerase Chain Reaction(PCR) احدى اكثر التقنيات السهلة الاستخدام والمهمة في تحديد المحتوى الوراثي للانواع البكتيرية والكشف عن وجود او عدم وجود الجينات المسؤولة عن عوامل ضراوة الانواع البكتيرية المسببة للاخماج المختلفة وبالتالي قابلية هذه الانواع في الاصابات المرضية (7).

مماتقدم فان الدراسة الحاليه هدفت الى :

– تحديد العزلات البكتيرية المسببة للاصابات المرضية اعتمادا على نوع الاصابة بالسكري والخمج والعمر والجنس وفصول السنة للمصابين وغير المصابين بداء السكري .

– بيان قابلية الانواع البكتيرية المعزولة في انتاجها لعوامل الضراوة وبيان مدى مقاومتها للمضادات الحيوية الاكثر استعمالا.

– معرفة التباين الوراثي بين عزلات النوع البكتيري الاكثر نسبة عزلا ضمن مسببات الاخماج في المصابين وغير المصابين بداء السكري.

المواد وطرائق العمل

1_ جمع العينات : Samples Collection

تضمنت الدراسة جمع (534) عينة كانت ضمنها(364) عينة سريرية من مرضى السكري بنوعيه الاول والثاني المراجعين والراقدين في مستشفى تكريت التعليمي وحسب تشخيص الطبيب المختص وكان من ضمنها (170) عينة لغير المصابين بالسكري في المستشفى نفسه. بدأت عملية جمع العينات من شهر كانون الثاني عام 2010 واستمرت لمدة عام كامل حتى كانون الثاني عام 2011 ، تم فيها اخذ عينات الادرار الوسطي (MSU) Mid-Stream Urine من المرضى في قناني نظيفة معقمة Sterile cups (8)، اما عينات الجروح فقد تم جمعها بوساطة مسحات معقمة (قطاطن) Sterile Swabs نقلت المسحات الى المختبر باستخدام ماء البيتون Pepton water سجلت المعلومات في استمارة استبيان خاصة بكل مريض التي تضمنت (الاسم ، الجنس ،العمر، الوظيفة، السكن، تاريخ المرض، العلاج المستخدم) .

2_ زرع العينات Samples Cultures

تم زرع عينات الادرار على وسط اكار الماكونكي MacConkey Agar ووسط الاكار المغذي Nutrient Agar، أما المسحات من عينات الجروح فقد تم زراعتها على كل من وسط الماكونكي الصلب MacConkey Agar ووسط الاكار المغذي Nutrient Agar واكار الدم Blood Agar و وسط المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar التي حضنت عند (37) مْ لمدة 24 ساعة وحسب ماجاء في(9) .

3– تشخيص العزلات البكتيرية Identification of Bacterial Isolates

3–1–الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests :

اجريت الاختبارات التشخيصية الكيموحيوية التالية:–

1–اختبار الاندول Indol test: لقح وسط ماء البيتون بمزروع العزلة قيد الاختبار من خلال نقل جزء من المستعمرات بواسطة ناقل معقم وحضن الوسط بدرجة (37 مْ) لمدة (24) ساعة ثم اضيفت خمسة قطرات من كاشف كوفاك (Kovacs reagent)على السطح الداخلي للانبوبة وظهور الحلقة الحمراء اعلى الانبوبة دليلا على إيجابية الاختبار(10)

2–اختبار الكاتليز Catalase Test: اجري هذا الاختبار للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتليز الذي يعمل على تحرير غاز الاوكسجين من مركب بيروكسيد الهيدروجين H2O2 الناتج من عمليات الاكسدة النهائية لفعاليات التخمر الهوائي للسكريات إذ استخدمت شريحة زجاجية وضعت عليها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين تركيزه (3%) بواسطة اعواد خشبيه ثم نقلت مستعمرة واحدة من مزرعة فتية بعمر (18–24) ساعة ومزجت بهدوء مع القطره كان ظهور الفقاعات الغازية دلالة على ايجابية الاختبار(**11**).

3–اختبار احمر المثيل Methyl Red test : استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وتكوين احماض عضوية مثل حامض اللاكتيك Lactic acid وحامض الفورميك Formic acid الذي يؤدي الى خفض ال pH الوسط الى اقل من 4.5. اذ لقح (5 مل) من وسط Methyl Red Voges Proskauer وبعزلات نقيه من البكتريا, حضن بدرجة حراره 37 مْ ولمدة24 – 48 ساعة ثم اضيفت اليه خمس قطرات من كاشف المثيل الاحمر,إن تغير لون الوسط الى اللون الاحمر كان دليلا على ايجابية الاختبار.

4-اختبار فوكس بروسكور Voges proskauer test: استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج استيل ميثيل كاربونيل (اسيتون) ,اذا لقح (5) مل من وسط Methyl Red Voges Proskauer بعزلات نقيه من البكتريا قيد الدراسة ,وحضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24-48ساعة,ثم اضيفت (6) قطرات من محلول الفانفثول 5% و (3) قطرات من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم40% مع رج الانبوبة بلطف بعد ذلك تركت لمدة 5 – 15 دقيقه,استدل على ان النتيجة موجبة من خلال تغير اللون الى الاحمر القرمزي (12).

3-2- تحديد عوامل الضراوة Virulance Factors Determination :وتضمن ذلك كل من العوامل التالية:

1- انتاج الانزيم الحال للدم Production Of Haemolysine :

زرعت العزلات على وسط اكار الدم وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24ساعه لوحظت المستعمرات المنتجه لانزيم حل الدم Haemolysine إذ كانت محاطة بمنطقه شفافة غير ملونة فهذا دلالة على ان تحلل الدم من نوع بيتا (تحلل كامل للدم) β-Haemolysis بينما إذا كانت المستعمرة محاطة بمنطقة ذات لون اخضر دليلا على تحلل الدم من نوع الفا (تحلل جزئي للدم) α-Haemolysine (13) .

2- انتاج اليوريز Urease Production: استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا الى امونيا وثاني اوكسيد الكاربون الذي يزيد الرقم الهيدروجيني للوسط, اذ لقحت موائل وسط اكار اليوريا بعزلات نقية من البكتريا قيد الدراسة ثم حضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة واستدل على النتيجة الموجبة من خلال تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي والذي يدل على انتاج انزيم اليوريز,(14)

3- استخلاص DNA البكتريا

DNA Extraction of Bacteria :

تم استخلاص الدنا حسب الخطوات الاتية طريقة Chen and Kuo, 1993 (15): -

1- سحب (1.5) مل من الوسط الزرعي المشبع بالبكتيريا المنماة فيه ، ثم نبذ مركزياً لمدة (5) دقائق عند سرعة 14000 دورة /دقيقة باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد.

2- تم تعليق الراسب (الحُبيبة) pellet وتم حله في 200 مل من محلول Lysis Buffer والذي يتكون من (40 mM من Tris acetate ويكون مقدار الpH 7.8 ، مع 1 Mm من EDTA مع 20mM من كبريتات الصوديوم، 1% من SDS) بواسطة السحب القوي .

أضيف (66)ul من (5M) لمحلول كلوريد الصوديوم لازالة اغلب البروتينات وبقايا الخلايا وخلطت جيداً وتم وضع الخليط اللزج في جهاز النبذ المركزي المبرد عند سرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 10دقائق عند درجة 4مْ .

3- بعد نقل الجزء الطافي والرائق الى انبوبة ابندورف جديدة ، تم اضافة حجم مساوي من الكلوروفورم الى الانبوبة ثم قلبت الانبوبة برفق على الاقل (50) مرة لحين تكون محلول مشابه للحليب Milky Solution بشكل كامل .

4- عرض المحلول للنبذ المركزي عند سرعة (14000) دورة / دقيقة لمدة (5) دقائق ثم نقل الجزء الطافي بعد ذلك الى انبوبة ابندورف جديده واضيف لها حجم مضاعف من الكحول الاثيلي Ethanol بتركيز 100% .

5- قلبت الانابيب من (5- 6) مرات لترسيب DNA ثم نبذت مركزياً بسرعة 10000 دورة/دقيقه لمدة (5) دقائق .

6- الجزء الطافي من الخطوة السابقة طرح خارجاً واضيف اليه (1مل) من الايثانول بتركيز 70% ونبذت الانابيب مركزياً مرة اخرى عند سرعة (10000) دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق .

7-الجزء الطافي من الخطوة السابقة طرح خارجاً واضيف اليه (1مل) من الايثانول بتركيز 70% ونبذت الانابيب مركزياً مرة اخرى عند سرعة (10000) دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق .

8- اعادة الخطوة (7) .

9- طرح الجزء الطافي خارجاً وأضيف الماء المقطر بمقدار حجم (100)ul لأذابة ال DNA .

10- الـ DNA المستحصل عليه تم خزنه عند درجة حرارة (-20م) لحين الاستعمال. (15)

4- تفاعل السلسلة المتبلمرة Polymerase chain (PCR) Reaction

1- حضرت انابيب ابندروف حاوية على محلول جاهز (Premix) لكل من Deoxynucleotides Taq DNA polymerase و للقواعد النتروجينية الاربعة dTTP, dGTP, dCTP, dATP و Buffer المتكون من Tris Hcl مع MgCl2 و KCl وصبغة ملونة إذ ان المجموع الكلي للمحلول المتكون هو ul (5) مايكروليتر.

2- اضيف الى جميع الانابيب 1 ul من البرايمر ومزجت جيداً .

3- اضيف الى جميع الانابيب 1ul من الـ DNA قيد الدراسة (الخاصة بالبكتريا) الحاوي على 50 نانوغرام من الدنا البكتيري.

4- اضيف 12ul من الماء المقطر الى كل انبوبه مع المزج وعدم رفع الماصة لتلافي تكون الفقاعة .

جدول (1_1) تسلسلات القواعد النتروجينية للبادئات النوعية

ت	اسم البادئ	تسلسل البادئ 3' – 5'	حجم الجين المتوقعbP	الشركة المنتجة
1	*KPsMTII*	F:GCGCATTTGCTG ATA CTG TTG R:CATCAG ACG ATA AGC ATG AGC A	272	Promega
2	*Hly A*	F:AACAAG GAT AAG CAC TGT TCT GGCT R:ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	1,177	
3	*CNF1*	F:GAA CTT ATT AAGG AT AG AGT R:CAT TATTT AT AACGCTG	543	
4	*CNFs*	F:CTGGACTCGAGGTGGTGG R:CTCCTGTCAACCACAGCC	533	

KPsMII :Group II capsular polysaccharide.
HlyA: Alfa heamolysine blood.
CNf1 : Cytotoxic necrotizing factor type1.
CNfs : Cytotoxic necrotizing factors.

حضرت محاليل البادئات حسب تعليمات شركة promega وذلك بأذابة كل بادئ في الماء المقطر الخالي من الايونات Water Deionized Distiled للحصول على محلول خزين بتراكيز محددة ووفق ما ورد في تعليمات الشركة المجهزة (20 بيكومول لكل (1) مايكروليتر والجدول (1–1) يوضح تسلسلات القواعد النتروجينية للبادئات النوعية. (16).

5- الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل السلسلة المتبلمرة Electrophoresis of Polymerase Chain Reaction product (PCR)

اجريت طريقة الترحيل الكهربائي السابقة نفسهامع الفروقات التالية :-

1- في المرحلة الاولى كان مقدار الفولتية (45V) والامبيرية (60) ملي امبير والوقت (15) دقيقة

2- في المرحلة الثانية كان مقدار الفولتية عند (60V) والامبيرية (90) ملي امبير والوقت ساعة ونصف الى ساعتين .

3- الاكاروز بتركيز 1.2% واستحصل ذلك باذابة 1.8 غم من الاكاروز واذيبت في 10 مل من (TBE) X10 واكمل الحجم بالماء المقطر بمقدار 135 مل . . . الخ .

4- لا توجد صبغة تمزج مع ناتج الـ PCR لكوننا استخدمنا Premix والحاوي اصلاً على الصبغة إذ اخذت احجام مختلفة من الناتج واضيفت مباشرة الى الحفر وبعد الانتهاء من الترحيل ابقي الاكاروز بالصبغة Ethidium Bromide لمدة ساعة . ثم وضع الاكاروز على مسرح جهاز الاشعة فوق البنفسجية لمعرفة النتيجة (17).

النتائج والمناقشة

1_ اعداد ونسب انواع البكتريا المعزولة من عينات اخماج المصابين وغير المصابين بالسكري :

بينت النتائج في الجدول (1_3) حالة غير المصابين بالسكري ولكنهم مصابون باخماج المسالك البولية فقد عزل ما مجموعه 23 عزلة, كان عدد عزلات بكتريا *Escherichia coli* بواقع 8 عزلات (78 . 34%) التي تبين بأنها سائدة مقارنة مع الانواع الاخرى المعزولة كما لوحظ أن عدد عزلات بكتريا *Citrobacter diversus* بواقع 5 عزلات (74 . 21 %) أما عدد عزلات بكتريا *Proteus mirabilis* و *Enterobacter aerogenes* فقد كانت 3 عزلات (13.04 %) وظهرت اعداد عزلات بكتريا *Morganella morganii* بواقع 2عزلة (8.70 %) اما اعداد العزلات البكتيرية من غير المصابين بالسكري ومصابين باخماج الجروح فقد كانت 14عزلة كان منها اعداد بكتريا *Escherichia coli* بعدد 4 عزلات (28.57%)بينما كان عدد عزلات بكتريا *Citrobacter diversus* بواقع 2عزلة (14.28%) وكانت اعداد العزلات من بكتريا *Proteus mirabilis* و *Enterobacter aerogenes* 3عزلات (21.43%) اما عدد العزلات البكتيرية الاخرى فكانت عزلتين (28. 14%) اما انواع العزلات البكتيرية من المصابين باخماج المسالك البوليه وداء السكري المعتمد على الانسولين كانت 124 عزلة بكتيرية ساد منها النوع البكتيري *Escherichia coli* إذ كان بعدد 69 عزله (55.65 %) تلاه النوع *Citrobacter diversus* التي كانت عزلاتها بعدد 24 (19.35 %) بينماكانت عزلات النوع *Proteus mirabilis* تسعة عزلات (7.25 %) اما عزلات النوع *Enterobacter aerogenes* فكانت 11 عزله (8.87%) واقلها عددا كانت عزلات النوع *Morganella morganii* إذ كانت 8 عزلات (6.45 %) بينما الانواع البكتيرية الاخرى ثلاث عزلات (2.42 %) اما في حالة المصابين باخماج الجروح وداء السكري المعتمد على الأنسولين فقد كان مجموع العزلات عند 51 كان الاكثر عزلا منها النوع البكتيري *Escherichia coli* بعدد 13 عزله (28.5 %) بينما كان عدد عزلات بكتريا *Citrobacter diversus* 5 عزلات (9.8%) وعزلات بكتريا *Proteus mirabilis* 3 عزلات (5.88%) اما اعداد عزلات بكتريا *Enterobacter aerogenes* فكانت 7 عزلات (13.73 %) وعزلة واحدة بنسبة (96 . 1 %) من بكتريا *Morganella morganii* و 5 عزلات من بكتريا *Staphylococcus aureus* بنسبة (9.8 %) وكانت الانواع البكتيرية الأخرى 17 عينة (33.33 %) .

أما الاعداد الكلية للعزلات البكتيرية المعزولة من المصابين بداء السكري غير المعتمد على الانسولين ولأخماج المسالك البولية فكانت

بمجموع 98 عزله توزعت منها عزلات بكتريا *Escherichia coli* لتكـون عنـد 40 عزلـة(55.56%), بينمـا كانـت عـزلات بكتريـا *Citrobacter diversus* 18 عزلة (25 %) وكانت اعداد عزلات بكتريـا *Proteus mirabilis* 6 عـزلات (8.33%) .وقـد ظهـرت عزلات بكتريا *Enterobacter aerogenes* 4 عزلات (5.55 %) والحال نفسه من اعداد عزلات بكتريا *Morganella morganii* وكانت اعداد البكتريا الاخرى عند 26 عزلة (36.11%) .

أما مجموع العزلات البكتيرية للمصابين بداء السكري غير المعتمد على الأنسولين وباخماج الجروح فقد كان مجموعها 34 عزلة سادت منها اعـداد عـزلات بكتريـا *Escherichia coli* التـي كانـت9 عـزلات (26.47%) تلتها اعداد عزلات بكتريا *Enterobacter aerogenes* و *Citrobacter diversus* بعدد 4 عزلات لكل منهما (11.76%) بينما كانت اعداد عزلات بكتريا *Proteus mirabilis* 3 عزلات (8.82%) و 4 عزلات من بكتريا *Staphylococcus aureus* بنسبة (11.76%) وكانت اعداد البكتريا الأخرى 10 عزلات (29.42 %) .

 ISSN:1813 – 1662

جدول(3-1) اعداد ونسب الانواع البكتيرية المعزولة من اخماج الجروح والمسالك البولية للمصابين وغير المصابين بالسكري

حالة المصاب	مصادر العينات	اعداد ونسب انواع البكتريا المعزولة														المجموع
		E.coli		*C.diversus*		*P.mirabilis*		*E.aerogenes*		*M.morganii*		*Staph. aureus*		اخرى		
		العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%	
غير المصابين بالسكري	اخماج المسالك البولية	8	34.78	5	21.74	3	13.04	3	13.04	2	8.70	-	-	2	8.70	23
	اخماج الجروح	4	28.57	2	14.28	3	21.43	3	21.43	-	-	-	-	2	14.29	14
مصابين بداء السكري المعتمد على الانسولين	اخماج المسالك البولية	69	55.66	24	19.35	9	7.25	11	8.87	8	6.45	-	-	3	2.41	124
	اخماج الجروح	13	25.5	5	9.8	3	4.7	7	15.2	1	2.2	5	9.8	17	37	51
مصابين بداء السكري غير المعتمد على الانسولين	اخماج المسالك البولية	40	55.56	18	25	6	8.33	4	5.55	4	5.55	-	-	26	36.11	98
	اخماج الجروح	9	26.47	4	11.76	3	8.82	4	11.76	-	-	4	11.76	10	29.42	34
المجموع																**344**

(−) تعني عدم وجود خمج .

وجد أن النوع البكتيري الاكثر عزلا من المصابين وغير المصابين بداء السكري والمصابين باخماج المسالك البولية او الجروح هو النوع البكتيري *Escherichia coli* وهذايتفق مع ماوجده (18) (D) و (19) اللذان عزلا النوع البكتيري اعلاه ولكن بنسب مختلفة من المصابين وغير المصابين بالسكري وباخماج مختلفة.

وتبين ايضا أن نسبة العزل من المصابين بداء السكري بنوعيه وباخماج المسالك البولية او الجروح كانت اكثر مما في حالة

المصابين بالاخماج نفسها من غير المصابين بالسكري والتي يمكن أن ترجع الى تاثير الاصابة بالسكري وتاثيره في خفض مناعة الجسم مما تسبب في زيادة الاصابات البكتيرية وهذا يتفق مع نتائج (20);(21) .كما إن الاختلاف في اعداد العزل ونسبه بين الانواع البكتيرية في الاخماج المشار اليها لدى المصابين او غير المصابين بداء السكري يمكن أن يكون ناتجا" عن الاختلاف في قدرة هذه الانواع البكتيرية على مقاومة المضادات الحيوية ومن ثَمّ زيادة قدرتها على الاستيطان في انسجة تلك الاخماج من خلال امتلاكها عوامل الضراوة التي تمكنها في احداث تلك الاصابات.

2- انواع عوامل الضراوة في انواع البكتريا المعزولة من عينات اخماج مختلفة

إن النوع البكتيري *Staphylococus aureus* الذي تم عزله من المصابين بداء السكري تبين أنه منتج لعوامل الضراوة إذ كان منتجا لعامل التجلط Coagulase ومحللا للدم من نوع بيتا (β−Haemolysine) وكان ايضا حاوي على المحفظة Capsuleومنتجا" للانزيم الحال للدهن Lipase واليوريز Urease ,أما النوع نفسه المعزول من غير المصابين فقد كان متشابها مع النوع المعزول من المصابين في قابليته لانتاج عوامل الضراوة ولكنه تبين أنه غير مكون للمحفظة وفي حالة *Staphylococcus epidermidis* فقد تبين أنه كانت فقط منتج لانزيم اليوريز وسالب في انتاج كل من عامل التجلط والحال للدم والانزيم الحال للدهن وغير مكونة للمحفظة وقد تماثلت في هذه الحالة في كل من المصابين وغير المصابين بالسكري.كذلك عزل النوع *S.epidermidis* من الاشخاص المصابين وكان غير منتج لعامل التجلط والهيمولايسين وغير مكون للمحفظة ولكنه منتج لكل من Lipase و Urease .

اما الانواع السالبة لصبغة كرام فقد عزلت الانواع *Escherichia coli* *Proteus mirabilis* , *,Citrobacter diversus* *Enterobacter aerogenes ,Morganella morganii*,في حالة المصابين اوغير المصابين بداء السكري ولوحظ أنه في حالة الانواع المعزولة من المصابين كانت منتجه لانزيم التجلط ماعدا النوع *Morganella morganii* الذي كان غير منتج وكانت جميعها منتجه للهيمولايسين(بيتا) β-haemolysine ومكونه للمحفظة ولم ينتج انزيم الحال للدهن من كل من *Proteus mirabilis* ;` *Morganella morganii* كذلك لم ينتج انزيم اليوريز من النوع *Proteus mirabilis* وقد اختلفت العزلات في قابليتها على انتاج عوامل الضراوة في حالة غير المصابين بداء السكري إذ كانت غير منتجة لانزيم الهيمولايسين كل من *Escherichia coli* و*Proteus mirabilis* و*Morganella morganii* ولم تكون المحفظة كل من *Escherichia coli* و *aerogenes Enterobacter* و *Morganella morganii* ولم تنتج *Citrobacter diversus* الانزيم الحال للدهن وكذلك النوع *Enterobacter aerogenes*.إن الاختلاف في قابلية الانواع المعزولة من المصابين بداء السكري وغير المصابين به في امتلاكها عوامل الضراوة يمكن أن يعود الى الاختلاف في حالة الجهاز المناعي بين الحالتين التي كانت منخفضة في حالة المصابين بداء

السكري مما اعطى الفرصة للانواع البكتيرية المعزولة في زيادة قابليتها على انتاج عوامل الضراوة والتعبير الجيني عنها فضلا عن الاختلاف في تركيبة ومحتوى الخلايا من المركبات لاسيما الكلوكوز في حالة المصابين يمكن أن يكون مشجعا لبعض الانواع على النمو وانتاج عوامل الضراوة عنه في حالة غير المصابين (22). كما في الجدول .(3_2)

جدول (2-3) انتاج عوامل الضراوة في انواع البكتريا المعزولة من عينات اخماج مختلفة

حالة الأصابة بالسكري	انواع العزلات البكتيرية	انواع عوامل الضراوة				
		Coagulase	Haemolysis	Capsule Formation	Lipase	Urease
المصابون بالسكري	*Staphylococcus aureus*	الأنواع الموجبة لصبغة كرام				
		+	*B*	+	+	+
	Staphylococcusepidermidis	-	Non	-	+	+
	Escherichia coli	الأنواع السالبة لصبغة كرام				
		+	*β*	+	+	+
	Citrobacter diversus	+	*β*	+	+	+
	Proteus mirabilis	+	*β*	+	+	+
	Enterobacter aerogenes	+	*β*	+	+	+
	Morganella morganii	-	*β*	+	-	+
غير المصابين بالسكري		الأنواع الموجبة لصبغة كرام				
	Staphylococcus aureus	+	*β*	-	+	+
	Staphylococcus epidermidis	-	-	-	-	+
		الأنواع السالبة لصبغة كرام				
	Escherichia coli	+	Non	-	+	+
	Citrobacter diversus	+	*β*	+	-	+
	Proteus mirabilis	+	Non	+	-	-
	Enterobacter aerogenes	+	*β*	-	-	+
	Morganella morganii	+	Non	-	-	+

3- الاختبارات الكيموحيوية لانواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام :

يظهر الجدول (3_3) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لانواع البكتريا السالبة لصبغة كرام والمعزولة من المصابين وغير المصابين بداء السكري واخماج المسالك البولية والجروح والتي تبين منها ان العزلات كانت جميعها متحركة وتم تنميتها على وسط الماكونكي وكذلك ايجابية في استجابتها لاختبار انزيم الكاتليز وسالبة في استجابتها لاختبار انزيم الاوكسيديز والذي اكد على أن العزلات هي من ضمن اجناس البكتريا المعوية ومن خلال مجموعة اختبارات IMViC فقد امكن التفريق بين انواع العزلات وقد امكن الوصول الى النوع لكل من العزلات من خلال قدرتها على انتاج H2S وتحليل اليوريا Ureaوالجيلاتين Gelatine وانتاج غاز CO2 من تخمر الكلوكوز فضلا عن بيان قابليتها على تخمير بعض انواع السكريات وهي سكر Mannitol, Sucrose, Lactose, Sorbitol, Arabinose, Raffinose, Xylose وقد تبين أن العزلات هي من الأنواع البكتيرية المعوية وهي *Escherichia coli, Citrobacter diversus ,Proteus mirabilis, Enterobacter aerogenes* و *Morganella morganii* .

اما الانواع البكتيرية الموجبة لصبغة كرام التي تم عزلها من عينات اخماج المسالك البولية والجروح من المصابين وغير المصابين بالسكري التي تم تنميتها على وسط Mannitol Salt Agar ولوحظ مدى قابليتها على النمو وكذلك قدرتها على تخمير سكر المانيتول كذلك لوحظت قابليتها في الحركة ومدى استجابتها لاختباري الكاتليز والاوكسيديز وكذلك قابليتها على انتاج انزيم التجلط Coagulase وقدرتها على تخمير انواع السكريات Trehalose, Mannose, Sucrose, Glucose ومدى مقاومتها للمضاد الحيوي Bacitracin والذي يستخدم لتفريق النوع *Staphylococcus aureus* عن النوع *Streptococcus pyogenes* إذ يكون النوع الاول مقاوما" والثاني حساسا" له.وقد تبين من نتائج الاختبارات المشار اليها أن العزلات البكتيرية من الانواع الموجبة لصبغة كرام هي كل من *Staphylococcus aureus , Staphylococcus epidermedis* كما في جدول (3_4).

ISSN:1813 – 1662

مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (2) 2016

جدول (3-3) الأختبارات الكيموحيوية لانواع البكتريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من اخماج مختلفة

الإختبارات الكيموحيوية											العزلات البكتيرية
D – Glucose gas	Gelatine hydrolysis	Urea Hydrolysis	H_2S	Citrate Simmons	Voges Proskauer	Methyl red	Indole Production	Oxidase	Catalase	Motility	
+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	*Escherichia coli*
+	-	-/+	-	+	-	+	+	-	+	+	*Citrobacter diversus*
+	+	+	+	-/+	-/+	+	-	-	+	+	*Proteus mirabilis*
+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	*Enterobacter aerogenes*
+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	*Morganella morganii*

جدول (4- 3)الاختبارات الكيموحيوية لأنواع البكتريا الموجبة لصبغة كرام المعزولة من اخماج مختلفة

الإختبارات الكيموحيوية										العزلات البكتيرية
	Sugar Fermentation									
Bacitracin	Trehalose	Mannose	Sucrose	Glucose	Mannitol	Coagulase	Oxidase	Catalase	Motility	
R	+	+	+	+	+	+	–	+	–	*Staphylococcus aureus*
R	–	+	+	+	–	–	–	+	–	*Staphylococcus epidermidis*

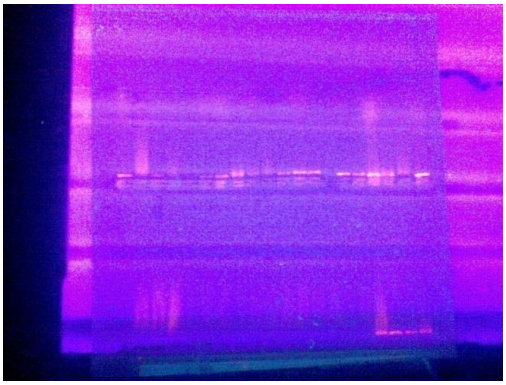
جدول (5– 3) اختبارات قدرة تخمير بعض السكريات من قبل انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من اخماج مختلفة

العزلات البكتيرية	القدرة في تخمير السكريات						
	Lactose	Sucrose	Mannitol	Sorbitol	Arabinose	Raffinose	Xylose
Escherichia coli	+	−/+	+	+	+	−/+	+
Citrobacter diversus	-	−/+	+	+	+	-	+
Proteus mirabilis	-	-	-	-	-	-	+
Morganella morganii	-	-	-	-	-	-	-

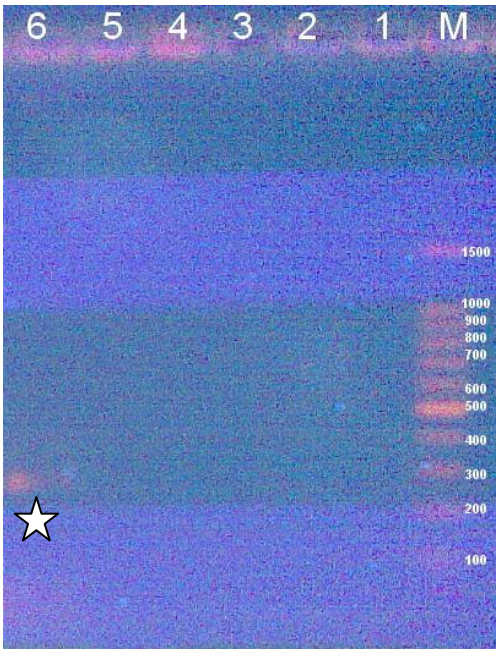
4– تحديد الاختلافات الوراثية باستخدام تقنية الـ PCR :

استخدمت 6 عزلات من النوع البكتيري الاكثر تكراراً في الاصابات البكتيرية لاخماج المصابين وغير المصابين بالسكري التي كانت تعود للنوع *Escherichia coli* منها اثنتان معزولتان من المصابين باخماج المسالك البولية وغير مصابين بالسكري واثنتان من المصابين باخماج الجروح للمصابين بالسكري وكانت الاثنتان الاخيرتان من اخماج المسالك البولية للمصابين بالسكري واستخدمت البادئات المتخصصة (Specific Primers) وكانت (Group II HlyA(α-Haemolysine) ,*CNfs* , ،*KPSMT II* (Capsule ولتحديد *CNf1*(Cytotoxic Necrotizing Factors type 1) مدى وجود تلك البادئات في العزلات البكتيرية وعلاقتها مع قدرتها في احداث الاخماج فقد أظهرت الحزم بعد الترحيل امتلاك العزلات لكل حالة من عوامل الضراوة التي مثلتها البادئات المستخدمةولم يظهر البادئ *CNFs* أي حزمة.

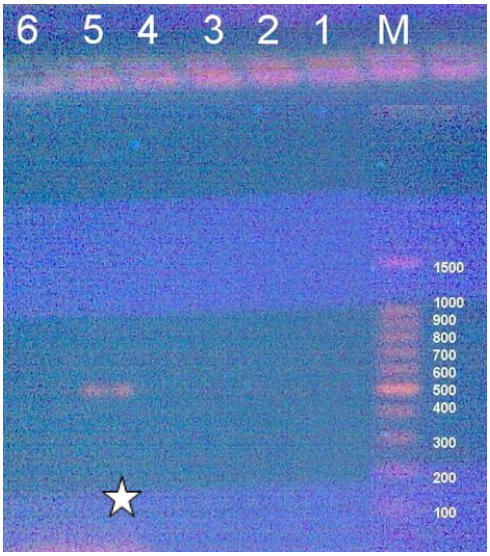
ان الجين *HLY A* اظهر الحزمة في عزلة بكتريا *E.coli* من المصابين باخماج المسالك البولية (UTI) Urinary Tract Infectionsومصابين بالسكري الذي يدل ان لهذه العزلة قدرة على التعبير الوراثي للجين المحلل للدم *HLY A* بحجم جزيئي 177 bp كما في الشكل (1) (25) ; (24) ; (23) في هذا النوع من الاصابة مقارنة في حالة العزلتين من المصابين باخماج المسالك البوليةUrinary Tract Infections وغيرمصابين بالسكري حيث لم تظهر حزم لهذا الجين مما يدل على عدم ملائمة الظروف للتعبير عنه في حالة غير المصابين بالسكري ; (28) ; *(27)* ;(26) وقد ظهرت في العزلتين من المصابين باخماج المسالك البولية والسكري الحزم المعبرة عن الجين *KPSMT II* بحجم جزيئي bp 270 كما في الشكل (2) المسيطر على امتلاك البكتريا للمحفظة والجين *CNF 1* بحجم جزيئي bp 450 كما في الشكل (3) المسيطر على امتلاك البكتريا لعامل النخر السمي في عينة الجروح للمصابين بالسكري (30); (29)ان هذا يؤكد ان هاتين العزلتين قد عبرتا عن انتاج عوامل الضراوة الخاصة بهذين الجينين وكانت الظروف البيئية ملائمة للتعبير عن فاعليتهما ولم تكن ملائمة لهما في حالة المصابين باخماج المسالك البولية وغير مصابين بالسكري (32) ; (31) مماتقدم يتبين في ان حالة الاصابة بالسكري تتسبب في توفير ظروف بيئية للتعبير الوراثي(34) ; (33). يكون مختلفا عنه في حالة عدم الاصابة به مما ينتج عنه زيادة في قابلية الانواع البكتيرية الملوثة(36) ; (35) المسببة للاصابة في انتاج عوامل الضراوة (VFS) Virulence Factors (38) ;(37) وبالتالي زيادة مستوى الاصابة بالامراضية لدى المصاب بالسكري (40); (39) ان هذا التغيير بالظروف ناتج عن زيادة نسبة الكلوكوز (41) والتغيير في تركيز الحموضة بالدم فضلا عن وجود مركبات عضوية اخرى مثل الاجسام الكيتونية Ketone Bodies وغيرها (43) ; (42)



الشكل (1) يمثل العزل الدنا المجيني للبكتريا



الشكل(2) يوضح الحزمة المميزة 270 زوج قاعدي لعامل الضراوة في عينة (6) في عزلات الاشريكيا القولونية المعزولة من المسالك البولية لمرضى السكري والمرحلة على هلام الاكاروز1.2 %مع الدليل الحجمي القياسي DNA Ladder 100 bp(M)



الشكل(3) يوضح الحزمة المميزة 450 زوج قاعدي لعامل الضراوة في عينة (5)في عزلات الاشريكيا القولونية المعزولة من جروح مرضى السكري والمرحلة على هلام الاكاروز1.2 %مع الدليل الحجمي القياسي DNA Ladder 100 bp(M)

المصادر

1_ Mahan, L .K. and Escott-Stump,S.(2004).Food Nutrition and Diet Therpy (11th ed.) W.B. Savnders company, Philadelphia, USA.

2_ محسن ، خليل (1989) مرض السكري ، الدار الوطنية للطباعة والتوزيع . بيروت كركول الدروز ، شارع الأستقلال .

3_ الشيخلي ، فؤاد فاضل وشبر ، ضياء احمد (2007) داء السكر انتهاء الأسطورة ، مطبعة العمال المركزية ، بغداد .

4_ Wang, S. Cunha, B.A; Hamid, N.S.; Amato, B.M.; Feuerman, M.; Malon, B. (2007). Metronidazole single versus multiple daily dosing in serous intraabdominal, Pelvic and diabetes foot infection . J. Chemother Aug, 26(2):113-116.

5_البياتي ، سروى عزيز خالد (2010) دراسة بكتريولوجية ووراثية لأنواع بكتريا *Proteus s pp* المسببة لأخماج المسالك البولية في منطقة تكريت ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة تكريت .

6_Glazer, A.N. and Nikaido, H.(2007). Microbial Biotchnology Fundamentals of Applied Microbiology. 2nd ed. Cambridge Univerdity press. New York,: 324 – 339 . 8_ 8 7 _ Mullis, K.B., and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase. Catalyzed chain reaction Methods Enzymol. 155: 335 – 340. 8_Mims, C., Dockrell, H. M.; Goering, R. V.; Roitt, L.; Wakelin, D. and Zuckerman, M. (2004). Medical Microbiology . 3rd Ed. Mosby company . U. S. A.30-32.

9_Bensons, H. J. (2001). Microbial application: Laboratory manual in general Microbiology 8th ed. McGrow-Hill Co., Inc., New York.

10_Atlas, R . M. (1995). Principles of Microbiology. 1sted . Mosby Chicago. P. 208_507.

11_Prescott, L. M.; Harly, J. R. and Klein, D. A. (2005). Microbiology16th Ed. McGrow Hill companies

12_Murray, P. R.; Baron, E. J.; jorgenen, J.H., et. Al. eds (2003). Manual of clinical microbiology. 8th ed. Americian society for microbiology. Washington, DC.

13_Lennette, E. H.; Albert , B.; Hausler, W. J. and Shadomy, H. J. (1985). A Manual Clinical Microbiology 4th ed. J. Ameri. Socie. Microbiol. Washington, D.C..

14_Tang, Y. and Stratton, C.W. (2006). Advance techniques in diagnostic microbiology. Spriner science, New York .55-59.

15_Chen, W.; Kuo , T. (17 March 1993). A Simple and Rapid method of gram – negative bacterial genomic DNA. Institute of Botany and Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan, Nucleic acid Research, Vol. 2, No. 9 16_ Ribeiro, M. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Dep. Microbiol. Imm., Lab. antigen. Bact. II, Inst. Biol. Cidade Univers. Campinas,:70-81 .

17_Sambrook , J.; Fritsch, E. and Maniats, T. (2001). In vitro Application of DNA by the polymerase chain Reaction, in Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, New Yourk, USA, 691-692.

18_المجمعي، كفاح ابراهيم طه. (2005) قوة الجراثيم المسببة لألتهابات المجاري البولية لدى مرضى السكري غير المعتمد على الأنسولين. رسالة ماجستير، جامعة بغداد ، كلية التربية ، ابن الهيثم .

19_Tsung-Yu,T.; Wan-ju.; Yu-Ju, H.; Kaung- Lo, C. and Tzu-mi, P. (2006). Detection of viable Entreohmorrhagic *Escherichia coli* 0157 using the combination of Immuno magnetic sparation with the Reverse Transcription Multiplex Taq man PCR system in food and stool sample. J. Food. Prot, 69(10): 2320-2328.

20_Chang, C.H; Shiau, Y.C; Lin, C.C; Kao, C.H; Hsu, C.H.(2003).Using tc-99m DMSA renal damage in Taiwanese women with Type 2 Diabetes–A-Preliminary. Report . 99(1): 15-17.

21_Goswam, R.; Bal, C. S.; Tejaswi, S.; Punjabi, G. V.; Kapil, and A; Kochupill.; N.(2001).Prevalence of urinary tract infections & renal scars in patients with Diabetes Mellitus .53(3): 181-184.

22_العزاوي , رحاب رشيد طه(2001).علم السموم البكتيريه .مطبعة بغداد–جامعة بغداد .

23_Vila, J.; Simon, K .; Ruiz, J.; Horcajada, J. P.; Velase, M.; Barranco, M.; Moreno, A .; and Mensa, J. (2002). Are Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? J. infect Dis; 186:1039-1042

24_ Sobestainsky, J.; Barcellos, D., Moraes, N.; Carvalha, L.; and Oliveira, S.(1999). Clinical Patologiasuina. Goiania: Art. 3 impressos especiais. 16-19.

25_Doss, S.A.(1994). Chromosomally – mediated antibiotic resistance and virulence. J. Med. Microbiol., 40, 305-306.

26_Kurazono, H., Yamamoto, S.; Nakano, M.; Nair, G.B.; Terai, A.; and chaicumpa, W. (2000). Characterization of putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing agene encoding a uropathogenic-specific protein. Microb. Pathog., 28, 183-189.

27_Silveira, W.; Bennetti, F.; Lancelotti, M.; Ferreira, A.; Solferini, V.; and Brochii, M.(2001). Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains.Rev. Inst. Med. Trop saopanlo, 43,303-310.

28_Kurazono, H.; Nakano, M.; Yamamoto, S.; Ogawa, O.; Yuri, K.; Nakata, K.; Kimura, M.; Makino, S. ;and Nair, G.B. (2003). Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variation of the pathogenicity island. J. Microbiol. Immunol, 47, 797-802.

29_Brito, B.G.; Leite, D.S.; Linhares, R.E.; vidotto, M.C. (1999). Virulence associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from Bigs.ret . Microbiol, 65, 123-132.

30_ Davis, J.M. Rasmussen, S.B; and C' Brien, A.D. (2005). Cytotoxic necrotizing factor type 1 producing by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. Infect. Immun., 73, 5301-5310.

31_Brito, B; vidotto, M; Berbel, M.; and Tagliari , k. (2004) Factors de virulencia presents emamostras de Quinolone –resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. J. Clin Microbiol ;43:2962 -2964 .

39_Velasco M, Horcajada JP, Mensa J, Moreno – Martinez A, Vila J, Martinez JA, Ruiz J, Barranco M, Roig G ,and Soriano E . (2001) . Decreased invasive capacity of quinolone-resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. Clin Infect Dis ;33:1682-6 .

40_Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary Tract Infection. J. Clin. Microbiol. Rev. 4:80-128.

41_Johnson, J.R.; Stapleton, A.E.; Russo, T.A.; Scheutz, F.; Brown, J.J. and Maslow, J.N. (1997). Characteristics and prevalence within serogroup O4 of J 96 - like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4: H5 containing the class I and class III alleles of pap G. Infect Immun; 65:2153-2159.

42_Orskov, I; Orskov, F. (1985*). Escherichia* c*oli* in extra intestiual infections. J. Hyg. Lond.; 95: 551-75.

43_Donnenberg, M.S.; and Welch, R.A. (1996). Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in : Mobley HLT , Warren J w. Eds. Urinary Tract Infections: Molecular pathogenesis and clinical management. Washington, Dc : ASM Press. 135-174.

E-coli Uropathogenic – UPEC parasuinos. Eiencia Rural , 34, 645-652 .

32_Hacker, J.; Blum- Oehler, G.; and Muhldorfer, I. (1997). Pathogenecity islands of virulent bacteria: structures function and impact on Microbial evolution. Mol. Microbial 1997 ; 23 : 1089-1099.

33_Mulvey, M. A.; Schilling , J.D.; Martinez; J.J. and Hultgrens, S. (2000). Bud bags and beleaguered bladders; interplay between Uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defences. Proc. Nat. Acad. Sci. (wash). 97: 8829-8835.

34_ Mulvey, M.A. (2002) Adhesion and entry of Uropathogenic *Eschericia coli*. Cell Microbiol., 4: 257- 27.

35_Arisoy, M.; Aysev D, Ekim M, Ozel D, Kose SK, Ozsey ED ,and Akar A. (2005). Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction .Inter J Clin Pract .60: 170.

36_Yamamoto, S., Tsukamoto Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y.,& Yoshida, O. (2008) .Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patients. Microbiology and Immunology, 39, 401-404.

37_Svanborg, C.; Godaly, G.(1991). Bacterial virulence in urinary Tract infection. Infect Dis.clin North Am- 11: 513-529 Horcajada JP, Soto S, Gajewski A, Smithson A, Jimenez de Anta MT, Mensa J, Johnson JR (2005). Quinolone –resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. J. Clin Microbiol ;43:2962 -2964 .

38_ Horcajada JP ,Soto S, Gajewski A, Smithson A, Jimenez de Anta MT ,Mensa J, Johnson JR (2005).

Bacteriological and Genetic study of some species of Bacteria that isolated from patients and healthy of Diabetes

Qanat Mahmmoud Atiyae[1] , Karkaz Mohammed Thalij[2] , Rashid Hamid Hassan[3]

[1] *Dep. Of Biology, College of Science , University of Tikrit , Tikrit , Iraq*

[2] *College of Agric , University of Tikrit , Tikrit , Iraq*

[3] *Applied Sciences College , University of Samarra , Samarra , Iraq*

Abstract

The study was conducted in the Laboratories of Teaching Tikrit Hospital and the laboratories of the Biology Department - College of Science –Tikrit University from January 2010 to the January 2011. In this study five hundreds thirty four samples of urine and wounds from patients with diabetes and healthy were collected from both sexes and all ages to isolation and identification of pathogenic bacteria by morphological, cultural and biochemical characteristics then determination of virulence factors and genetic variation between dominant type depending on the isolating source and the type of infection in diabetic patients. The counts of urinary tract infections and wound infection in non _diabetic patients were 118 and 52 respectively.The percentage of positive isolation of bacteria for both of them were 44, and 38.4% respectively and from the same patients with urinary tract Infections and wounds and Insulin Depended Diabetes (IDD) patients were 158 and 68 samples respectively and the percentage of bacterial isolation were at 78.5 and 67.6% respectively. The patients with Insulin Non-dependent Diabetes (INDD) were 69 and 42 samples, where positive isolates from bacteria were 75 and 71.4% respectively. The infections females from the Healthy and Diabetes Patients that (IDD) or (INDD) were larger than that of the males patients and with the same state with the wounds infections state for (IDD) patients, whereas the rate was smaller than of males for wounds infections to patients with the other diabetes infections type. The age group between 41-60 years was the larger percentage with all infections, except with wounds infections to (INDD) patients, while the age group between 16-40 years was the larger, and the infections were the largest means in the Winter and Autumn compare the other seasons. The higher rate of bacteria that isolated from patients with Urinary Tract Infections was *Escherichia coli* then other types like *Citrobacter diversus* , *Proteus mirabilis, Morganella morganii,* and *Enterobacter aerogenes.* The larger rate of bacteria in patients with diabetes and wounds Infections was *Escherichia coli* then *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis, Enterobacter aerogenes, Morganella morganii* and *Staphylococcus aureus.* The rate of diabetes infections with urinary tract infections and wounds increased in winter and autumn seasons more than of summer and spring seasons, Most bacterial isolates where sensitive for chloramphenicol. Other antibiotics were highly variable in their ability to inhibit bacterial isolates. the bacterial isolates were different in their ability to produce virulence factors, the diabetes infections was the reason of increase the variation in their ability to produce that virulence factor and the bacteria that isolated from diabetes patients produced haemolysine factor and capsule .PCR technique was used to show the genetic variations for the more repeats bacterial isolates isolated from all sources infections and used the Specific Primers (*KPSMT II*) group II capsule, (*CNF1*) Cytotoxic Necrotizing factor, *(CNFs*) and (*HLY A*) haemolysine, the bands appeared after electrophoresis to represent the used Primers, one band was appeared in the sample of diabetes Patients with Urinary Tract Infections (*KPSMT II*) at molecular weight 270 bp ,and one band appeared in the sample of diabetes with urinary tract infections for Primer *(HLY A*) and it is molecular weight was 177 bp. One band appeared in the sample of diabetes patients for the primer (*CNF1*) hg with Wound Infections and it is molecular weight 450bp, and there is not any band in the Primer (*CNFs*).