P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :130-135

دراسة بايولوجية جزيئية لعامل الضراوة الهيمولايسين لبكتريا *E. Coli* المعزولة من خمج المجاري البولية للمرضى في مستشفى الرمادي التعليمي

حسن هلال رشيد ليث مصلح نجيب

جامعة الانبار / كلية العلوم

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127623

الكلمات المفتاحية:
هيمولايسين،
E. Coli،
خمج المجاري البولية،
مستشفى الرمادي التعليمي.

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة لعزل وتشخيص بكتريا *E. coli* المسببة لخمج المجاري البولية مع دراسة عامل الضراوة الهيمولايسين جزيئيا في العزلات الاكثر مقاومة للمضادات الحيوية. شملت الدراسة ٢٠٠ عينة بول من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى الرمادي التعليمي من الاناث والذكور وبأعمار مختلفة اعتباراً من (١) سنة ولغاية (٧٠) سنة حصلنا فيها على ١٠٦ عزلة من بكتريا الـ *E.Coli* بنسبة ٥٩%. عند اجراء فحص الحساسية لهذه العزلات أظهرت مقاومة عالية اتجاه المضادات الحيوية Naldicacid – Cefotaxime – Gentamicin وبنسبة ١٠٠% – ٩٧.٢% – ٩٥.٣% على التوالي. تمت دراسة عامل الضراوة HyLA اتجاه (١٠) من العزلات الاكثر مقاومة بعد ان تم اسخلاص الدنا الكروموسومي والبلازميدي بواسطة الترحيل الكهربائي. أظهرت النتائج وجود عزلة واحدة حاملة للجين HyA وهي العزلة رقم (٧) لعينات الدنا الجينومي فيما بينت النتائج وجود الجين في العينات ٣، ٦، ٧.

المقدمة

تعتمد امراضية بكتريا الـ E. coli الممرضة للمجرى البولي على عدد واسع من محددات الضراوة، إذ تعد اهم جرثومة مسؤولة عن اخماج المجرى البولي وهي عبارة عن مستعمرات منتقاة من الـ Normal Flora تمتلك عوامل ضراوة مختلفة تمكنها من استيطان وغزو القناة البولية واحداث الخمج (١) وتقريباً وفي معظم الحالات تصعد البكتريا الى المثانة عبر الاحليل الطريق الصاعد عندها تستوطن في المثانة وتنتقل الى الكليتين مسببة حدوث التهاب الكلى(٢). تسبب بكتريا الـ E. coli اخماج المجاري البولية من خلال امتلاكها عوامل ضراوة تساعدها في التكيف والبقاء في المضيف وعوامل الضراوة التي تمتلكها تسمح لها بالهروب من آليات الدفاع في المضيف مثل تدفق الادرار. الازموزية تغير الـ PH وانتاج السايتوكينات(٣). تنتج معظم سلالات الـ E. coli الممرضة للمجرى البولي الهيمولايسين الذي يسهل عملية الغزو للنسيج وتلف الخلايا الظهارية للكلى وحويضاتها (٤).

* Corresponding author at: University of Anbar / College of Science
E-mail address:

تعرف ذيفانات الهيمولايسين بأنها بروتينات سامة خارج خلوية تفرز من قبل العديد من الجراثيم السالبة والموجبة لملون كرام. ان الهيمولايسين مصطلح عام يشير الى البروتينات السامة المحللة لكريات الدم الحمر. تنتج بعض عزلات E. coli الهيمولايسين خاصة تلك المعزولة من اصابات خارج القناة الهضمية للأنسان إذ ان وجد ان ٥٠% من هذه العزلات منتجة للهيمولايسين، أما الـ ٥٠% الاخرى فتكون منتجة للهيمولايسين بمجرد ترسخها في القناة البولية(٥).

تمتلك البكتريا عدة آليات مقاومة للمضادات الحيوية، منها المقاومة الطبيعية المسؤولة عن منع عمل المضادات الحيوية من خلال فشل أو عدم قدرة المضاد للوصول الى هدفه بسبب الصفات التركيبية والتشريحية للكائن الحي والتي تحول دون تفاعل المضاد مع مراكز تأثيراته الحيوية(٦). وقد تكون المقاومة ناتجة بسبب الطفرات الكروموسومية او البلازميدية التي تحمل صفة المقاومة عن طريق الجينات القافزة وهي قطع من جينات الـ DNA لها القدرة على الانتقال من موقع إلى آخر(٧). وقد تكون المقاومة ناتجة عن تغيير في تركيب انزيمات معينة او فقدانها الوظيفة مما يؤدي الى تغيرات سلبية في الموقع الذي يعمل عليه المضاد وقد تكون المقاومة ناتجة عن بناء

انزيمات تعمل على ازالة سمية المضادات الحيوية(٨). أما مقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام β Lactam فتأتي من خلال انتاجها لأنزيمات الـ β Lactam التي تعمل على تحليل حلقة البيتالاكتام(٩). إن مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية تكمن في قدرتها على البقاء رغم تعرضها للمضادات التي تخترقها البكتريا وتقاومها، وقد اصبحت هذه المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية ذات الوظائف والهيكليات المتعددة مشكلة كبيرة في الدول النامية من حيث اعباء الامراض المعدية والكائنات الحية الدقيقة تظهر مقاومتها للمضاد بموجب عدم نشاط الدواء وفعاليته عن طريق انتاج الانزيمات ومنع تراكم الدواء في البكتريا وحماية الموقع المستهدف واستخدام مسارات بديلة لمتطلبات النمو(١٠).

طريقة العمل

جمعت عينات الادرار من ٢٠٠ مريض من الراقدين والمراجعين للعيادة الاستشارية البولية لمستشفى الرمادي التعليمي ومن كلا الجنسين من الذين يعانون من اعراض اخماج القناة البولية وقد تم جمع كافة المعلومات للمرضى المشمولين بالدراسة والمتعلقة بالعمر والجنس ووجود اصابات سابقة ومستوى التعليم والمنطقة السكنية (المدينة او الريف) وفق استمارة خاصة. تم جمع العينات من شهر آذار ٢٠١٥ لغاية آب ٢٠١٥ وذلك من الدفق المتوسط للبول وكذلك استعملت القثطرة وارتشاق ادرار المثانة وعينة كيس الادرار من المرضى الذين لا يستطيعون التبول وبأستعمال انابيب بلاستيكية معقمة. جرى استعمال الطرق القياسية في معاملة العينات ونقلها وزرعها وحضنها وفحصها من أجل عزل العامل المسبب للخمج وتشخيصه واجراء فحص الحساسية الدوائية[١١].

الفحص المجهري

تم اجراء الفحص المجهري المباشر لكل عينة قبل اجراء عملية الزرع على الاوساط الزرعية وذلك بأخذ قطرة بول ووضعها على الشريحة وتغطيتها بغطاء الشريحة قبل اجراء الطرد المركزي وفحصها تحت المجهر الضوئي لمشاهدة الخلايا القيحية وخلايا البكتريا التي يزيد عددها على ١٠° لكل مل من الادرار وكذلك تم اجراء الفحص المجهري بعد عملية الطرد المركزي لجوالي (٥ مل) من الادرار بواسطة تيوبات خاصة سعة (١٥ مل) ونبذ الراشح ثم اخذ قطرة واحدة من الراسب لمشاهدة الخلايا القيحية وكل عينة خالية من هذه الخلايا تعد سالبة وتهمل قبل اجراء الزرع.

زرع العينات

زرعت عينات منتصف الادرار هوائياً على وسط اكار الدم Blood agar ووسط الماكونكي اكار MacC. Agar باستخدام عروة المعايرة ثم حضنت الاطباق الزرعية بدرجة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة. في النتائج الموجبة التي يظهر فيها نمو جرثومي يتم اختيار المستعمرات المفردة من الاوساط الزرعية ويعاد زرعها مرة اخرى على اطباق جديدة من الوسط نفسه لحين الحصول على عزلات نقية من تلك البكتريا بعدها يتم نقل هذه المستعمرات على وسط الاكار المغذي ويحضن في درجة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة ثم تحضن في الثلاجة بدرجة حرارة ٤ درجة مئوية لحين اجراء الاختبارات اللازمة مع مراعاة تجديدها شهريا وبالطريقة نفسها[١٢]

التشخيص

شخصت العينات البكتيرية المعزولة اوليا بملاحظة المستعمرات النامية وفق الشكل المختبري للمستعمرات من حيث حجم المستعمرة وقطرها وارتفاعها ولونها وشكل حافتها. كما تضمن التشخيص عمل مسحات من المستعمرات على شرائح زجاجية نظيفة صبغت بصبغة كرام بعد ذلك تم ملاحظة شكل ولون وترتيب الخلايا المصبوغة بواسطة المجهر الضوئي بأستخدام العدسة الزيتية وذلك لغرض تشخيص البكتريا كونها سالبة او موجبة لصبغة كرام[١٣]. بعد ذلك تم اجراء الفحوصات الكيمياوية وتم استخدام نظام APi20E ثم استخدام جهاز Vitek2 لأعطاء التشخيص النهائي.

استخلاص الدنا البلازميري

عزل الدنا البلازميري لبكتريا *E. coli* بأستخدام العدة المحضرة من شركة بروميكا Pure Yield minpref system

استخلاص الدنا الجينومي

عزل الدنا الجينومي لبكتريا *E. coli* بأستخدام العدة المحضرة من شركة بروميكا wizard genomic DNA purification

الترحيل الكهربائي

بعد اتمام عملية استخلاص الدنا البلازميري والجينومي يتم استخدام تقنية الترحيل الكهربائي للكشف عن نوعية الدنا المستخلص وظهور البلازميدات كما يتم استخدام هذه التقنية ايضاً في الكشف عن نتيجة تضاعف البلمرة المتسلسل.

قياس تركيز الدنا

تم قياس تركيز الدنا المستخلص (البلازميدي والجينومي) بأستخدام جهاز المطياف الضوئي النانوئي NanoDrop حيث يتم اضافة (١) مايكرو ليتر من عينة الدنا الى الجهاز وتعرض نتائج الفحص على شاشة الحاسبة المرتبطة به يتم حساب التركيز والنقاوة اعتمادا على قياس الطيف الضوئي الممتص عند ثلاث درجات وهي ٣٣٠ و ٢٦٠ و ٢٨٠ نانوميتر وعند هذه الدرجات تكون اعلى امتصاصية للدنا والرنا والبروتين على التوالي.

البوادئ

تم تحضير التفاعل بأستخدام بوادئ متخصصة تم تصميمها لهذا الغرض. البوادئ المجففة تمت اذابتها بالماء الخالي من انزيمات التقطيع للوصول الى التركيز ١٠٠ بيكومول لكل مايركوليتر كمحلول خزن. ومن ثم تم تحضير محلول العمل بتركيز ١٠ بيكومول لكل مايكرو ليتر وذلك باضافة ١٠ مايكرو ليتر من محلول الخزن الى ٩٠ مايكروليتر من الماء.

جدول (١) جين عامل الضراوة HylA الذي تمت دراسته وتسلسل البوادئ الخاصة به وحجم القطع الناتجة من التضاعف ودرجة الحرارة المستخدمة في تقنية تضاعف البلمرة التسلسلي.

Gene	Seq.	Size	Tm
Hly	AACAAGGATAAG CACTGTTCTGGCT	1117	60
	TCCATATAAGCG GTCATTCCCGTCA		

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج عزل البكتريا من (٢٠٠) عينة ادرار من مرضى يعانون من اخماج القناة البولية من المراجعين والراقدين في مستشفى الرمادي التعليمي خلال الفترة الممتدة من شهر آذار ٢٠١٥ لغاية آب ٢٠١٥ سيادة البكتريا السالبة لصبغة كرام حيث بلغ عدد العزلات ١٥٧ عزلة بنسبة ٨٧.٢% اما العزلات الموجبة لصبغة كرام فقد بلغت ٢٣ عزلة بنسبة ١٢.٨ % جدول (٢). وقد لوحظ من خلال الدراسة ان جرثومة الـ *E. coli* كانت من اكثر المسببات لخمج المجاري البولية حيث شكلت نسبة ٥٩% من مجموع العزلات جدول (٣) وقد يكون سبب الاصابة العالية بجرثومة الـ *E. coli* عائداً لتواجدها بصورة طبيعية في الجهاز الهضمي للأنسان ومنه تنتقل الى القناة البولية للشخص المصاب.

جدول (٢) عدد العزلات السالبة والموجبة لصبغة كرام ونسبها المئوية والتي تم عزلها من خمج المجاري البولية

النوع	عدد العزلات الموجبة	عدد العزلات السالبة	النسبة المئوية للعزل
البكتريا السالبة لصبغة كرام	١٥٧	-----	٨٧.٢
البكتريا الموجبة لصبغة كرام	٢٣	-----	١٢.٨
المجموع	١٨٠	٢٠	١٠٠

جدول (٣) أعداد الممرضات البولية المعزولة من خمج المجاري البولية ونسبها المئوية

العزلات الجرثومية	عدد العزلات	النسب المئوية
Escherichia coli	١٠٦	%٥٩
Klebsiella pneumonia	٣٦	% ٢٠
Staphylococcus aureus	١٣	% ٧
Staphylococcus saprophticus	١٠	% ٥.٦
Pseudomonas aroginosa	١٠	% ٥.٦
Proteus mirabilis	٥	% ٢.٨
مجموع العينات الموجبة	١٨٠	% ١٠٠

اختبار حساسية بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية

اختبرت حساسية (١٠٦) عزلة من بكتريا E. coli تجاه (١٠) من المضادات الحيوية – Impinem – Naldic acid Ciprofloxacin– Gentamicin – Netilimicin – Amikacin – Cefotaxime – Nitrofurantion – Augmentin – Rifampicin، حددت حساسية العزلات اعتماداً على قطر منطقة التثبيط المحيط بأقراص المضادات ومقارنتها بأقطار التثبيط القياسية. تبين من النتائج التي تم الحصول عليها مقاومة البكتريا العالية جداً لكل من المضادات الحيوية – Gentamicin – Naldic acid Cefotaxime وبنسبة ١٠٠% – ٩٧.٢% – ٩٥.٣ على التوالي فيما قاومت كل من المضادات الحيوية – Augmentin Netilimicin – ciprofloxacin وبنسبة ٨٦.٨% – ٨٣.١% – ٨١.٢% جدول (٤) وهذا يتفق مع [١٣] إذ يعود سبب المقاومة العالية للأستخدام العشوائي للمضادات الحيوية وكذلك لاحتواء هذه الانواع البكتيرية على البلازميات والي تعد ناقل مهم للجينات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية.

جدول (٤) يبين النسب المئوية لحساسية بكتريا E. coli والنسب المئوية للعزلات المقاومة للمضادات الحيوية قيد الدراسة.

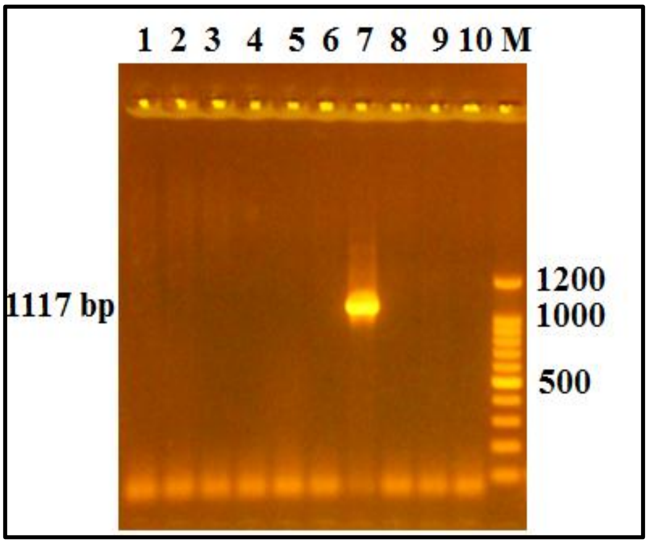
اسم المضاد	الرمز	عدد العزلات (١٠٦)

الحيوي		المقاومة	النسب المئوية	الحساسة	النسب المئوية
Cefotaxime	Cx	١٠٦	١٠٠	٠	٠.٠
Gentamicin	GEN	١٠٣	٩٧.٢	٣	٢.٨
Naldic acid	NA	١٠١	٩٥.٣	٥	٤.٧
Netilimicin	NET	٩٢	٨٦.٨	١٤	١٣.٢
Ciprofloxacin	Cip	٨٨	٨٣.١	١٨	١٦.٩
Augmentin	Ac	٨٥	٨١.٢	٢١	١٨.٨
Impinem	Imp	٢٤	٢٢.٧	٨٢	٧٧.٣
Refampicin	RF	٧١	٦٧	٣٥	٣٣
Nitrofurantion	NiT	٣٠	٢٨.٣	٧٦	٧١.٧
Amikacin	AK	٢٦	٢٤.٥	٨٠	٧٥.٥

الكشف عن عامل الضراوة الهيمولايسين *Haemolysin*

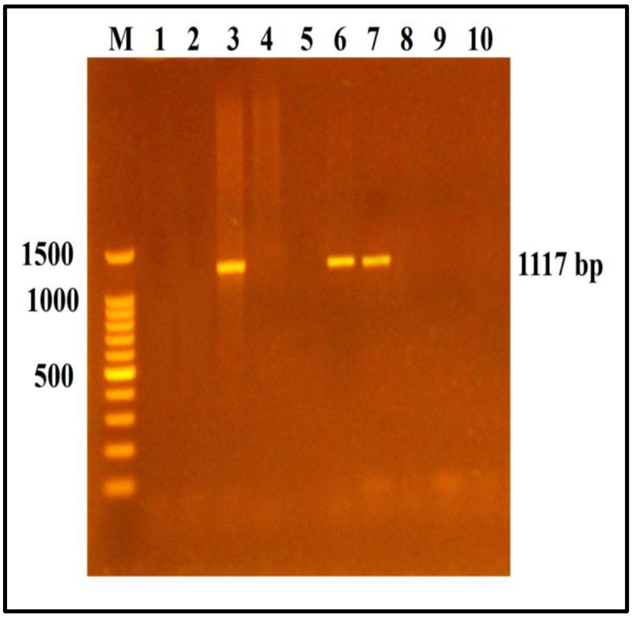
يعتبر الهيمولايسين احد أهم عوامل الضراوة لبكتريا *E. coli* التي تصيب الانسان وتحديداً الصنف المسبب للأسهال الدموي أو الصنف المسبب لالتهاب المجاري البولية. يعتبر الهيمولايسين عامل سمية لعدد من الخلايا الدموية البيضاء وكريات الدم الحمراء وخلايا النسيج البطاني الداخلي حيث يرتبط بروتين الهيمولايسين بمجسات على اسطح هذه الخلايا ثم ينغرس الى داخل الخلايا مؤديا الى تحللها. تمت دراسة آلية عمل الهيمولايسين كعامل ضراوة من قبل(١٤). حيث اوضح ان الهيمولايسين يعمل على استهداف المايتوكوندريا الخلوية مسببا حالة الموت المبرمج Apoprosis لخلايا النسيج البطاني الداخلي يشفر لعامل الهيمولايسين اوبرون متكون من خمسة جينات يتحكم في تشفيرها او عملها مشغل واحد. تتميز الكائنات بدائية النواة ومنها البكتريا بأنها تقوم بتنظيم التعبير الجيني من خلال ربط عدد من الجينات المسؤولة عن عمل معين او فعل معين بمشغل واحد ويسمى هذا الترتيب بالعنقود. تمت دراسة احتواء البكتريا على عامل الهيمولايسين من خلال تضاعف البلمرة التسلسلي حيث تم اعتماد الجينHylA لدراسة هذه الحالة حيث تم اعتماد بادئ متخصص ينتمي الى هذا الجين وعند احتواء البكتريا على هذا الجين فأن النتيجة ستظهر بوجود حزمة ذات وزن جزيئي ١١١٧ زوج قاعدة.

أظهرت النتائج وجود عزلة واحدة حاملة لهذا الجين (شكل ١) عند استخدام الدنا الكرموسومي في تقنية التضاعف البلمرة المتسلسل بينما اظهرت النتائج احتواء ثلاث عزلات على هذاالجين محمولاً على البلازميد (شكل ٢) اشار (١٥) الى ان الجين المشفر للهيمولايسين عادة ما يكون محمولاً على الكروموسوم بعكس عدد من الجينات مقاومة المضادات الحيوية التي غالباً ما تكون محمولة على البلازميدات. لذا فأن انتقال عامل الضراوة الهيمولايسين من بكتريا الـ *E. coli* افقياً ما بين الانواع حالة نادرة وهذا ما لا يتفق مع النتائج المستحصلة من هذا البحث. اشار (١٦) الى وجود جين الهيمولايسين محمولاً على بعض البلازميدات المحتواة في بعض انواع بكتريا الـ *E. coli* وعند مقارنة وتحليل التسلسل الخاص بهذا الجين تبين انه لا يتطابق مع جين الهيمولايسين المحمول على كروموسوم *E. coli* وقد عزى هذا الباحث تلك النتيجة الى انتقال بلازميدات حاملة لهذا الجين افقياً من بعض انواع البكتريا المعوية مثل *Enterobacter Cloacae* حيث تتميز الانواع التابعة للعائلة المعوية بقابليتها على الاقتران فيما بينها ويمكن للبلازميدات ان تنتقل بهذه الطريقة فيما بين الانواع وهذا التفسير يتطابق مع ظهور نتيجة الجين عند استخدام الدنا البلازميدي لبعض العينات في هذا البحث.



الشكل(١): نتيجة الترحيل الكهربائي لنتيجة تضاعف البلمرة التسلسلي لجين hylA لعينات الدنا الجينومي. تظهر الصورة وجود الجين في العزلة رقم ٧ وخلوه من باقي العزلات. كان تركيز الأكاروز المستخدم ١% والعزلتية ٧عزلت لكل ١سم طول، ووقت الترحيل ساعة ونصف، وقد تم استخدام بروميد الأثيديوم لتصبيغ الدنا.

7. Gary , C.F.(2006). Urinary tract infection during pregnancy. American Academy of family physicians. Williams obstetrics 22 ed. Ch. 48.
8. Kadir , Dr.Mohammed , Majida N. lbrahim and Najeeba M. Salih (2010).Prevalence of Urinary Tract Infections in Patients with Renal stones.Kirkuk
9. Magdy m. Afifi. (2013). D etection of extended spectrum Beta- lactamase producing *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* of environmental surfaces at upper Egypt Jnternatiomal journal of Biological chemistry; 10:3923.
10. Wult, B. G. Bergsten ,H. Connel ,P.R.OIIqno (2000).P. fimbriae enhance the early establishment of *E. coli* in the human urinary tract ,mol.microbiology ,38:456-464.
11. Brooks , g, f , Butal , j.s. and Morse , S.A. (2001). " jawetz , melnick & abelbergs medical microbiology ". 22nd ed , lange medical books / McGraw – Hill inc , U.S.A.
12. Bartolon. A.i , L. Pallecchi, E. Riccobono , A. Mantella , D. Magnelli, T. Di Maggio , A. L. Villagran , Y. Lara, C. Saavedra ,M. Strohmeyer , F. Bartalesi , C. Trigoso and G. M. Rossolini. (2013). Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expandedspectrum cephalosporins in Escherichia coli: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. J Clinical Microbiology and Infection; 19: 356-361.
13. MAcfaddin, J.E. (2000) individual biochemical test. In: Biochemical test for identification of medical bacteria (3rded) Macfaddin J. E. (ed.) p:27-439. Lionicott Williams & wilkins Co. Blatimore. U.S.A.
14. MartinaBielaszewska, Christian Rüter, Lisa Kunsmann, LiloGreune, Andreas Bauwens, Wenlan Zhang, Thorsten Kuczius, KwangSik Kim, Alexander Mellmann, M. Alexander Schmidt, HelgeKarchPLoSPathog. 2013.
15. Koronakis V, Hughes C, 2002. Hemolysin. In Donnenberg MS (ed.), *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen.* Academic Press. San Diego, Calif. pp. 361-378
16. Al – khozai , Ziad M. (2009). Studying the adhesion properties of Pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus on contact lenses and the effect of radiation with electrons and positrons on its adhesion in the laboratory , Journal of Karbala university. vol7 , no1:34- 39.



الشكل (٢): نتيجة الترحيل الكهربائي لنتيجة تضاعف البلمرة التسلسلي لجين hylA لعينات الدنا البلازميدي. تظهر الصورة وجود الجين في العزلات ٣ و٦ و٧ وخلوه من باقي العزلات. كان تركيز الأكاروز المستخدم ١% والعزلتية ٧عزلت لكل ١سم طول، ووقت الترحيل ساعة ونصف، وقد تم استخدام بروميد الأثيديوم لتصبيغ الدنا.

References

1. Stapleton,Ann(2005).Novel Mechanism of p-Fimbriated *E. coli* Virulence in Pyelonephritis.J.am.soc. nephrol. 16:3458-3460.
2. Al – Begat , Saad Taha Mutlk Hmidon (2007). Study of most commen aerobic bacteria causing lower urinary tract infection (UTI) in Ramadi general hospital. thesis , college of medicine – university of Al – Anbar.
3. Emody ,I, Kereny M. and Nagy G.(2003).Virulance factor of uropathogenic E. coli. antimicrob. agents. 22 (suppl 2) : 29 – 33
4. Brooks, g, butel, j and morse, s.(2007). jawetz , melnick and ad elberg's medical microbiology , 4th ed. macGraw hill co. Newyork : 151-152.
5. Nioclle, L.E. (feb 2008) Uncomplicated Urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. Urologic elinics of north America. 35 (1)
6. Hooten,T.M. (2000).Pathogenesis of urinary tract infection: anUpdate. J. Antimicro. Chemo. 45, (Sapplment) : 1-7

Biological study for virulence factor Haemolycin A in *E. coli* Bactria Causes urinary tract infection.

Hassan Helal Rashed **Laith Muslih Najeeb**

E.mail:

Abstract:

This study was carried out to isolated and diagnoses *E. Coli* bacteria case infection of the urinary tract also study virulence factor Haemolysin A in the isolated more than resistance to antibiotic. This aim of the study 200 sample of urinc were collected from patients in Ramadi teaching hospital (male and female) of different age (one year – 70 years). the *E. Coli* bacteria were the most spreading type in the case of urinary tract infection since they were isolated with percentage 59% out the total number of bacterial isolates, indentification the disc diffusion method was used test the isolate towards (10) ten antibiotics this work also includes the study of some virulenece factor of isolated bacteria. The result revealted that a high ratio of bacteria which are gram negative *E. Coli* isolated from urinary tract infection showed high resistance to the antibiotic particularly cefotaxim 100%. Naldic acid 95.3% Gentimicin 97.2%. ten isolatedwere chosen from each bacteria types for the sake of studying their genetics homogeneity. DNA was extracted from ten isolated of each of the following bacteria *E. coli* this extracted DNA was used in multiplex (PCR) technique by using gen of Haemolysin. A. This result found one coloney this carries the gen (Hyl A_ number (7) to DNA genome sample. While the other result fond (Hyl A) for plasmed DNA in the samples (3 -6- 7).