P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2013 ,(7), (1) :34-44

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

دراسة الطرز المظهرية والجينية للاشريكية القولونية المعزولة من مياه نهر الفرات في مدينة الرمادي

احمد محمد تركي

جامعة الانبار - كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2012/10/1
تاريخ القبول: 2013/4/30
تاريخ النشر: 30/ 11 / 2013

DOI: 10.37652/juaps.2013.80149

الكلمات المفتاحية:

Escherichia coli ،
الطرز الجينية،
الطرز المظهرية،
مياه نهر الفرات،
الرمادي

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة للمدة الممتدة من أوائل شهر تشرين الأول 2011 ولغاية تموز 2012 إذ تم جمع (408) عينة من مياه نهر الفرات في مدينة الرمادي. زرعت العينات مباشرة على الأوساط الزرعية وتم تشخيص هذه البكتريا مجهريا ومزرعيا وكيموحيويا إضافة إلى تعين النمط المصلي باستخدام عدة التشخيص المصلية، فضلا عن الكشف عن بعض جيناتها مثل eae, stx, bfp المسؤولة عن خواصها الامراضية في جميع الأنماط المصلية. وقد أمكن الكشف عن وجود Escherichia coli في (278) عينة من مياه نهر الفرات المدروسة أي بنسبة (68.137 %) واثبت نتائج التشخيص ان (28) عزلة عائدة إلى بكتريا EPEC وتبين ان النمط المصلي السائد باستعمال الأمصال متعددة التكافؤ هو Type 1 وبنسبة (39.28%) يتبعه الأمصال المتعددة التكافؤ Type4 بنسبة (25%) ثم الأمصال المتعددة التكافؤ Type3, Type2 بنسبة (17.85%) لكليهما. بينما وجد ان الأمصال الأحادية التكافؤ السائدة هي O55 بنسبة (21.42%) يتبعه O142 بنسبة (14.28%) ثم يليهما النمطان المصليان O126, O86 بنسبة (10.71%). اختبرت جميع الأنماط المصلية (28) للتأكد من احتوائها على الجينات المسؤولة عن الامراضية إذ وجد ان (19) عزلة تحتوي جين (eae) بنسبة (67.85%) بينما لم يتم الحصول على أي عزلة تحمل الجين (bfp, stx). كذلك صنفت بكتريا EPEC إلى نموذجية Typical EPEC وغير نموذجية Atypical EPEC إذ ان بكتريا E.coli النموذجية لم يتم تشخيصها في أي من العزلات (28) التي تم الحصول عليها في حين بكتريا E.coli غير النموذجية فقد شخصت في (19) عزلة أي بنسبة (67.85%).

المقدمة:

يعد نهر الفرات المصدر الرئيسي الذي يغذي مدينة الرمادي بالماء ونتيجة للتوسع السكاني والتطور الصناعي أصبحت مصادر المياه المتوفرة مشبعة بالفضلات الصناعية وفضلات الإنسان أو الحيوان حيث يمر هذا النهر بعدة مدن وقرى ريفية تستخدم النهر استخداما غير صحي وغير صحيح (1) إذ يعد تلوث المياه في الوقت الحاضر من المشاكل الأساسية بسبب تصريف الملوثات الكيميائية والفيزيائية والبايولوجية من قبل الإنسان إلى الأنهار بسبب احتوائها على كميات كبيرة من المواد العضوية والتي تعد مصدرا غذائيا جيد لنمو وتكاثر الكائنات المجهرية الحية وأهمها الملوثات المعوية التي مصدرها الإنسان والحيوان (2) إذ يدرج تلوث المياه في مقدمة المشاكل الأساسية حيث أشارت إحصائيات منظمة الصحة العالمية WHO إلى ان أكثر من 80 % من الأمراض في العالم كانت متلازمة مع الماء (3). تعد المؤشرات البكتيرية دليل لتلوث المياه بالفضلات وتمثل بكتريا E.coli احد ابرز هذه المؤشرات نظرا لتمكنها من النمو بوجود عناصر غذائية بسيطة فضلا عن قدرتها على البقاء لمدة أطول من الأحياء الممرضة الأخرى. وبهذا يكون فحص وجود هذه البكتريا في المياه مؤشرا جيدا وحساسا لتقيم نوعية المياه (4). وفي العراق أصبحت مياه الشرب المصدر الأول لحالات الإصابة بهذه البكتريا التي هي تعايشية طبيعية في امعاء الانسان.ومن المؤكد إنها دلالة على تلوث مياه الشرب من مصدر بشري او حيواني (5). كما تعد هذه البكتريا ملوث ومسبب مرضي لالتهاب الامعاء وتلوث المهبل والرحم عند النساء، ومسؤولة

* Corresponding author at: University of Anbar / College of Science;

E-mail address:

عن الاسهال الحاد لدى الاطفال الرضع (6). وتعد سلالة *E.coli* من المرضات الرئيسية لموت العديد من الاطفال تحت عمر خمس سنوات نتيجة الاصابة بالإسهال وخصوصا في الدول النامية (7). وفي الوقت الحاضر يمكن تميز Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) اعتماداً على الخواص المرضة الجزيئية Molecular pathogenic characteristic فبكتريا *E.coli* المسببة للإسهال تصنف ضمن EPEC اذا كانت تمتلك جين الارتباط والطمس Enteropathogenic *E.coli* attaching and effacing (eae) ولكن غير منتجة لسموم الشيكا Shiga toxins (8). هذا الجين يكون واقعا اساسا في المنطقة الكروموسومية التي تكون مولدة للامراضية والذي يعرف بموقع طمس الخلايا المعوية (9). فيما وجد ان EPEC تحتوي جينا يقع على البلازميد ويكون له دور في الالتصاق عن طريق تكوين الشعيرات المكونة للحزم (Bundle Forming pilus (BFP (10). واعتمادا على جينات الضراوة يوجد نوعان مختلفان من EPEC النموذجي Typical EPEC وغير النموذجي Atypical EPEC (11). ان *E.coli* المسببة للإسهال النموذجي تستعمل حزمة من الشعيرات (Bundle Forming pilus BFP) للالتصاق وبروتين الانتيمين Lntmin لاستعمار الامعاء. أما *E.coli* المرضة للأمعاء غير النموذجية فتحتوي بروتين الانتمين فقط (12)، بعد التصاق خلايا EPEC بالخلايا الظهارية للأمعاء تقوم بإفراز العديد من البروتينات خارج الخلايا وان اغلب البروتينات المنتجة من لدن EPEC تكون ضرورية في مواقع الالتصاق. وهذا ما يعرف بآفة الارتباط والطمس Attaching and effacing lesion (13).

المواد وطرائق العمل

1- جمع عينات المياه

تم جمع 408 عينة مياه من محطات الدراسة العشرين اثناء المدة الممتدة من أوائل شهر تشرين الاول 2011 ولغاية تموز 2012 وبواقع ثلاث عينات لكل موقع في الشهر الواحد. استخدمت قناني زجاجية معقمة سعة (500) مللتر لأخذ النماذج (14).

2- عزل البكتريا

بعد نقل عينات المياه الى المختبر رجت العينة بشدة عدة مرات وفي ظروف معقمة داخل الهود Hood ثم نقل (1) مللتر من عينة المياه الى الطبق ثم صب وسط اكار الماكونكي الصلب على الطبق وحرك الطبق حركة دائرية بسيطة لغرض تجانس عينة المياه مع الوسط ثم وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة (37) °م ولمدة (18 – 24) ساعة وبعد مدة الحضن تم قراءة النتائج فبكتريا *E.coli* التي تكون مخمرة لسكر اللاكتوز مستعمراتها وردية او حمراء. تم تنقية هذه المستعمرات لاكثر من مره للحصول على عزلات نقية. ولغرض التشخيص التاكيدي للبكتريا، لقحت المستعمرات المنقاة على وسط الايوسين مثلين الازرق (EMB) بطريقة التخطيط حضنت الاطباق عند درجة حرارة (37)°م لمدة (18 – 24) ساعة بعدها لوحظ شكل المستعمرات التي تكون صغيرة الحجم وملساء ذات بريق معدني اخضر (15) حفظت العزلات مؤقتا على وسط الاكار المغذي بعد تلقيحه بالمستعمرات النقية وتحضينه بدرجة (37)°م لمدة (18 – 24) ساعة ومن ثم حفظها بدرجة (4)°م وأما الحفظ لمدة طويلة فاستعمل مرق نقيع القلب والدماغ المضاف إلية كليسرول 20 % ثم حفظت العزلات بدرجة – 20 °م (16).

3- تشخيص البكتريا :

أجريت الفحوص المجهرية والكيموحيوية اعتمادا على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا (17)

4- التشخيص المصلي :

تم أجراء التشخيص المصلي وتنميط العزلات في قسم مختبرات الصحة العامة / وزارة الصحة. وذلك باستخدام طريقة التلازن على الشريحة الزجاجية مع مضادات الأمصال المتعددة التكافوء المجهزة من شركة Bio Rad الفرنسية. في حالة التفاعل الموجب تعاد الطريقة نفسها ولكن باستخدام مضادات المصول أحادية التكافوء لحين الوصول إلى نوع المصل المضاد الذي يعطي تلازنا موجبا.

5 – الكشف عن جينات الضراوة :

استخلصت عينات الدنا الجينومي والبلازميدي للعزلات البكتيرية باستخدام عدتا استخلاص الدنا الجينومي والبلازميدي المجهزان من شركة بروميكا ذي الرقم التسلسلي A1120 باسم منتج Wizard® Genomic DNA Purification pure Yield™ Plasmid miniprep kit system . وباستعمال البادئات الخاصة التي تستهدف جينات الهدف (eae , stx , bfp) وفقا لما مذكور(18) والمجهزة من شركة Biocorp والمبينة في جدول (1)، حضر خليط تفاعل سلسلة البلمره الانزيمة PCR كما مبين في جدول

(2). وتم الحصول على التراكيز النهائية لها باستخدام المعادلة الآتية ت1 χ ح1 = ت2 χ ح2.

أما حجم الماء المضاف فاستخرج عن طريق المعادلة الآتية:

(19): حجم الماء = حجم التفاعل الكلي – مجموع مكونات التفاعل الأخرى.

مع مراعاة وضع الأنابيب في الحمام الثلجي أثناء أجراء عمليات مزج المكونات الأساسية للتفاعل لتجنب حدوث تفاعلات تؤدي إلى تلف المواد الممزوجة أو حدوث مسخ للمتفاعلات. أدخلت الأنابيب بعناية في جهاز المبلمر الحراري لإجراء التفاعل. وباستعمال البرنامج المناسب في التضاعف الذي تم تطبيقه على وفق البرنامج الخاص (18) وكما مبين في جدول (3). بعد انتهاء وقت التفاعل نقل المزيج الى حفر هلام الاكاروز المحضر بتركيز(1.2 %)مع تخصيص حفرة لتحميل الدليل الحجمي Ladder (100bp) وبعدها رحلت العينات بجهاز الترحيل الكهربائي لمدة 1.5 ساعة بعدها صور الهلام بجهاز التصوير بالأشعة فوق البنفسجية Gel documentation.

النتائج والمناقشة

من مجموع عينات المياه المدروسة والبالغ عددها (408) عينة بلغت أعداد بكتريا *E.coli* المشخصة لمياه نهر الفرات لمنطقة الدراسة اثناء مدة الدراسة 278 عينة أي بنسبة(68.137 %) جدول (4). وان أعداد بكتريا *E.coli* وجدت في المحطات كافة اثناء مدة الدراسة. وظهر تباين في أعدادها اثناء أشهر الدراسة المختلفة وكذلك اثناء الشهر نفسه أيضا كما موضح في الجدول (5) إذ يظهر التغير الشهري لإعداد البكتريا حيث كان أعلى عدد في شهر حزيران وتموز واقل عدد كان في شهر كانون الثاني.

بينما شخصت بكتريا Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) في (28) عينة أي بنسبة (10.071 %) اذ تبين من نتائج توزيع بكتريا EPEC على وفق الامصال المتعددة التكافوء والموضحة في جدول (6) ان الأنماط المصلية الأكثر شيوعا باستعمال الأمصال المتعددة التكافوء هو Type 1 بنسبة (39.28 %) ثم تليه الامصال المتعددة التكافوء Type 4 بنسبة (25 %) واخيرا Type 2 وType 3 بنسبة (17.85 %) لكليهما، اختبرت هذه العزلات باستخدام الامصال الاحادية التكافوء اذ يبين الجدول (7) نتائج التشخيص باستخدام هذه الامصال اذ وجد ان O55 هو النمط المصلي الاحادي التكافوء الاكثر شيوعا في الدراسة الحالية بنسبة (21.42 %) تم يليه النمط المصلي الاحادي التكافوء O142 بنسبة (14.28 %) يتبعه كل من الانماط المصلية O126 و O86 بنسبة (10.71 %) ثم O111 وO125 وO114 وO119 بنسبة (7.14 %) واخيرا O127 وO128 و O26 و O124 بنسبة (3.57 %).

من خلال هذا يتبين ان مياه النهر ملوثة بالبكتريا المعوية الممرضة للإنسان وهذا التلوث الشديد وخاصة في شهر حزيران وتموز يعود إلى ارتفاع درجات الحرارة ونشاط الإنسان وخاصة في المناطق التي يمر بها النهر حيث ان المدن حول النهر تلقي بفضلاتها إلى مياه هذا النهر، إضافة إلى المجمعات السكنية الريفية التي يمر بها النهر، حيث تستخدم المجاميع السكانية النهر استخداما غير صحيح اذ يستهلكون المياه بدون تعقيم وتربية الحيوانات حول النهر اذ اجرى (18) تحليلا لمياه النهر القريبة من مناطق ترمى بها مياه الفضلات المنزلية في نيوزلندا حيث تم عزل بكتريا القولون البرازية والمسبحيات البرازية. وكذلك امكن عزل اربعة سلالات من *E.coli* في نهر ترمى فيه الفضلات المنزلية في مدينة ساوبولو في البرازيل (19). وكذلك هذا يتفق مع دراسات اخرى من ان طرح مخلفات الانسان والحيوان يعمل على زيادة بكتريا *E.coli* في ماء النهر مؤديا الى زيادة مستوى التلوث البكتيري (20). كما تتفق النتائج ايضا مع ما وجد عند اجراء دراسه لنهر الديوانية اذ شكلت بكتريا *E.coli* نسبة 48 % من مجموع عزلاتها البكتيرية البالغة 127 عزلة تم عزلها من مياه النهر (3).

جاءت نتائج عزل EPEC في هذه الدراسة متوافقة الى حد ما مع دراسات اخرى (21) اذ ان نسبة عزل EPEC كانت (26.5 %) في حين في الفلوجة فان نسبة EPEC هي (20.46%) (22). وهنا يعزى سبب وجود EPEC في المياه حيث يدل على ان مصدرها الإنسان بالدرجة الاساس ثم الحيوان بالدرجة الثانية مما يدل على التلوث البرازي لمياه النهر نتيجة لنشاط الانسان في المنطقة التي يمر بها النهر . كما بينت الدراسة الحالية ان الانماط المصلية الاكثر شيوعا باستعمال الامصال المتعددة التكافوء هو Type 1 بنسبة (39.28 %) وهذه النتيجة لاتتطابق مع نتائج محافظة ديالى الذي وجد ان Type 2 هو النمط المصلي المتعدد التكافوء (23). بينما وجد ان Type 2 و Type 3 هما من اكثر الانماط المصلية المتعددة التكافوء شيوعا (24)، وهذا التباين والاختلاف في الامصال المتعددة التكافوء قد يعزى الى اختلاف موقع اخذ النماذج واختلاف الظروف البيئية والمناخية

وعدد العينات والمدة الزمنية لاجراء البحث. ووجد في الدراسة الحالية ان النمط المصلي الاحادي التكافوء O55 هو الاكثر شيوعا وهذه تتفق مع دراسة اخرى (21) من ان النمط المصلي الشائع هو O55 أما الدراسات الأخرى (22) فقد وجد ان O111K69 و O111K58 و O126K7 هما الاكثر شيوعا في حين وجد ان O142 هو النمط المصلي الاحادي التكافوء الاكثر شيوعا (24) ويعزى هذا التباين الى اختلاف عدة التشخيص والمدة الزمنية للدراسة اضافة الى الموقع الجغرافي.

الكشف عن جينات بعض عوامل ضراوة في عزلات EPEC باستخدام تقنية PCR تحتوي بكتريا *E.coli* سلالات منها ممرضة ومنها غير ممرضة وهذا ما وجد في الدراسه الحالية ومن هذه السلالات بكتريا *E.coli* الممرضة للامعاء والتي تعد من المسببات المهمة في حدوث الاسهال عند الاطفال في جميع دول العالم (6) وهذا بالتالي دفع الى اجراء الدراسة الحالية والدخول بشيء من التفصيل في بعض عوامل ضراوة بكتريا EPEC المعزولة من نهر الفرات والمتمثلة بالجين bundle forming pilus (*bfp*) والذي يقع على البلازميد ويؤدي دورا في التصاق EPEC بالخلايا الطلائية للطبقة المخاطية للامعاء عن طريق تكوين الشعيرات المكونة للحزم (25). وجين الارتباط والطمس Enteropathogenic *E.coli* attaching and effacing (eae)) الذي يقع في المنطقة الكروموسومية المولدة للامراضية والذي يعرف بموقع طمس الخلايا المعوية Locus of Enterocyte Effacement (LEE) وباستخدام الخواص الجزيئية يمكن تميز هذه السلالة عن سلالات *E.coli* النزفية التي تمتلك ايضا جين الالتصاق والطمس *eae* وذلك بعدم امتلاكها الجين المسؤول عن انتاج سموم الشيكا *stx* الذي يقع على كروموسوم بكتريا *E.coli* النزفية (8) لذلك تم عزل DNA الكروموسومي للتحري عن وجود جينات (*eae* , *stx* , *bfp*) بعد حساب نقاوةDNA الكروموسومي المستخلص من عزلات EPEC البالغ عددها (28) ورحلت على هلام الاكاروز وكانت النتيجة عزل DNA الكروموسومي من جميع العزلات وكما موضح في صورة (1).

1- عامل الالتصاق والطمس Enteropathogenc *E.coli* attaching and effacing (eae)

اجري اختبار التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA PCR باستعمال البادئ الخاص للجين *eae* الذي يقع في المنطقة الكروموسومية المولدة للامراضية التي تعرف بموقع طمس الخلايا المعوية (LEE) لذا ان وجود هذا الجين في هذه العزلات يمكن ان يؤكد اهمية هذه البكتريا في احداث الاصابة بالاسهال. وقد استخدم هذا البادئ مع محلول Green master mix مع (28) عينة DNA كروموسومي وبالاعتماد على البرنامج الذي وصفه (26) وبعد ترحيل نواتج تفاعل PCR على هلام الاكاروز بتركيز (1.2 %) وفحصة بالاشعة فوق البنفسجية ظهرت حزم ذات حجم جزيئي (482) قاعدة للتسعة عشر عينة DNA كروموسومي التي تتمثل بالعزلات (1، 2، 3، 4، 5،6، 7، 8، 13، 14، 15، 16، 19، 20، 21، 24، 25، 26، 27) ولم تظهر هذه الحزم في التسع عينات الأخرى التي تتمثل بالعزلات (9، 10، 11، 12، 17، 18، 22، 23، 28) مما يعني عدم وجود الجين في هذه العزلات كما هو موضح في صورة (2). ان ظهور الحزم في (19) عزلة تمثل الجينات المشفرة لعامل (*eae*) أي بنسبة (67.85 %) من اصل 28 نمطا مصليا وهذه النتيجة تتوافق مع ما تم التوصل اليه (27) اذ وجد ان نسبة وجود الجين تبلغ (75 %) من مجموع الانماط المصلية EPEC. في حين تم الحصول على نسبة 100% في الدراسة التي اجراها في ايران (28). اذ كانت جميع الانماط المصلية لبكتريا *E.coli* الممرضة للامعاء تحمل الجين *eae*. في حين وجد ان جين *eae* بنسبة (63.1 %) من مجموع (19) عزلة *E.coli* المعزولة في مدينة السليمانية (26).

2- عامل تكوين حزمة الشعيرات (bundle forming pilus (bfp

اجري اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات متخصصة لغرض الكشف عن وجود الجين *bfp* الذي يشفر لحزمة مكونة من الاهداب التي لها دور في التصاق البكتريا بالخلايا الظهارية للامعاء لذلك ان وجود هذا الجين في هذه العزلات يؤكد وجود الحزمة المكونة من الاهداب وقد تم استخدام البادئين (bfpF , bfpR) في مزيج تفاعل اختبار (PCR) ل (28) عينة DNA بلازميدي المستخلصة من عزلات بكتريا EPEC البالغة (28). وقد اعتمد على البرنامج الموصوف سابقا (26). وقد أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لعينات DNA البلازميدي عدم ظهور أي حزمة تعود للجين *bfp* في جميع عزلات EPEC كما موضحة في صورة (3). مما يعني عدم امتلاك هذه العزلات للجين *bfp* وبالتالي عدم امتلاكها للبلازميد الذي يحمل هذا الجين وقد يكون ذلك سببا في عدم ظهور الحزم في جميع عزلات EPEC وهذه النتيجة تتفق مع ما تم التوصل اليه (29) في

الفيتنام اذ لم تظهر أي من العزلات بعد اجراء عمليات التضخيم على الجين نتيجة ايجابية وهذا دلالة على انها لا تحمل هذا العامل. وفي جنوب افريقيا تم التوصل الى وجود الجين في (3.3 %) من مجموع العينات المدروسة (21). أما في الدراسة التي اجريت في السليمانية من (26) فقد تم التوصل الى وجود الجين *bfp* بنسبة (15.7 %) من مجموع العزلات. وقد يعزى هذا التباين الى الموقع الجغرافي واختلاف الظروف البيئية والمناخية والاختلاف في عدد العينات والمدة الزمنية لاجراء البحث.

3- عامل أنتاج سم الشيكا Shiga toxin (*stx*) اجري اختبار التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) باستعمال مزيج التفاعل والبادئ stx (Reverse , Forward) الذي يستهدف الجين المشفر لسم الشيكا والذي يقع على كروموسوم بكتريا *E.coli* النزفية واستخدم في هذه الدراسة لغرض تميز بكتريا *E.coli* المرضة للأمعاء عن بكتريا *E.coli* النزفية بعدم احتوائها على جين *stx*. بينت النتائج كما هي موضحة بالصورة (4) عدم ظهور حزم على هلام الاكاروز مما يدل على عدم وجود الجين في جميع العزلات وبالتالي فان العزلات التي درست لا تعود إلى بكتريا *E.coli* النزفية وهذه النتيجة تتفق مع ما تم التوصل إليه (26) في السليمانية وفي إيران (28) وفي الفيتنام (29) إذ لم يسجل وجود *E.coli* النزفية في عيناتهم .

التنميط الجيني لعزلات EPEC

أظهرت الدراسات الحديثة ان بكتريا EPEC تحتوي على جين يقع على البلازميد ويؤدي دورا في التصاق EPEC عن طريق تكوين الشعيرات المكونة للحزم Bundle Forming pilus (BFP) واعتماداً على جينات الضراوة يوجد نوعان مختلفان من EPEC هما بكتريا اشريكية القولون النموذجية Typical EPEC وبكتريا اشريكية القولون غير النموذجية Atypical EPEC (10). ويوضح الجدول (8) التنميط الجيني لعزلات EPEC المشخصة مصليا حيث تظهر ان نسبة بكتريا اشريكية القولون الممرضة للأمعاء تبلغ (67.85%) من مجموع الانماط المصلية وعلية فان نسبة بكتريا اشريكية غير النموذجية Atypical EPEC تبلغ (67.85 %) من مجموع العزلات وهذا يعني خلوها من بكتريا اشريكية القولون النموذجية Typical EPEC أي لم توجد في أي عينة من عينات بكتريا EPEC المعزولة من مياه النهر، وجاءت هذه النتيجة متوافقة الى حد ما مع ما تم التوصل اليه (29) في الفيتنام بخلو عيناته من Typical EPEC في حين وجد ان نسبة Atypical EPEC تبلغ (6.6 %) في حين لم تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما وجد في السليمانية من ان نسبة Typical EPEC النموذجية (63.1 %) أما غير النموذجية Atypical EPEC فقد شكلت نسبتها (42.6 %) (26). أما في ايران فوجد ان نسبة بكتريا EPEC هي (44.9 %) من الانماط المصلية وبالتالي شكلت بكتريا اشريكية القولون النموذجية (9 %) في حين غير النموذجية (31.5 %) (30) .

المصادر

1- العثمان، ايثار منذر عبد الوهاب ابراهيم (2010). تاثير مياه الصرف الصحي في نوعية مياه نهر الفرات بين مدينتي هيت والرمادي. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الانبار.

2- طريف، محمد فليح (2010) تلوث نهر الكوفة بالبكتريا المعوية خلال اشهر الصيف(حزيران – تموز – اب) وعلاقتها بالصحة العامة. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة، المجلد (2) ا/(1)

3.جابر، جبار محسن (2011). دراسة لاحد مصادر التلوث الواقع على نهر الديوانية ببعض الاحياء المجهرية واختبار مقاومتها لبعض مضادات الحياتية. مجلة القادسية للعلوم الزراعية، المجلد (1) /(1).

3- Entry ,J. and Farmer, N. (2000). Influence of aquifers on movment and survival of colifrom bacteria.Water Agri –Res. 2(8): 1140 – 1145.

5. النزال، احمد اسماعيل، اغاريد علي حسين، ياسمين اسماعيل خليل (2009). عزل وتشخيص البكتريا المرضة من مياه الشرب في محافظة صلاح الدين بطريقة المرشحات الغشائية. مجلة جامعة الانبار 3 (3) : 1 – 6.

Browne, R. M. and Tauschek, M. (2009). Contribution of the pst-phoU operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *E. coli* and virulence *Citrobacter rodentium*. J.Am. Soc. Microbiol. 77(5): 1936-1944.

13- Samuel , L.; Marian ,M.M.; Apun, K.; Lesley , M.B. and Son ,R.(2011). Characterization of *Escherichia coli* isolation from cultured catfish by avtibiotic resistance and RAPP analysis. Internation Food Research Journal 18 (4) : 971-976.

14 – Wold Health organization (WHO). (1985) . Guidelines for drink water quality.2 nd ed.v/v 1 ,Geneva.

15 –Macfaddin , jf. (2004). Bio chemical tests for identification of medical Bacteria 3 rd ed. the Williams and wilkins Baltimore , USA.

16- Collee, J.G. ; Fraser, A.G. ; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology, fourteenth edition, Churchill Livingstone, New York.

17 - Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stalyt, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey`s manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Publication. 9th ed. London, New York

18- Martin. C. M. and. M. J. Nona. (1977). Effects of Domestic waste water Disposal by land Irrigation on water quality of the central canter bury plains. Water and soil, Technical publication, No.7, willington Newzcaland

19- Penna- Tc, schaffner-D: Abe-L E; Machoshvili-IA, (1996). Inactivation of Brazilian. Wild typc and enterotoxigcnic *Escherichia coli* by chlorine. J-Ind-MicrobioI. 1996. 16(1) 57- 61.

20 – السعدي، امل طالب عطية (2008). دراسة تاثير تلوث المياه بالمخلفات الطبية على بكتريا Escherichia coli المعزولة من

6 – Ji Anyng. HU ,. Ji achen shi ,.Hong chang., Dong Li., Minyang., and Yoi chi kamagata. (2008). Phenotyping and Genotyping of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Natural River Basin. Environ.Sci.Technol.,42: 3415 – 3420.

7- Raja , s.B.; Murali , M.R.; Malathi, G.K.; Anbarasu , K. and Devaraj ,S.N. (2009). Effect of aqueous extract of aegle marmelos fruit on adherence and β-lactam of enter pathogenic *E.coli* by down regulation outer membrane protein c.Amer. J. Infect. Dis.5 (2) : 161 – 169.

8 – Wani, S.A.; Hussain,I.; Fayaz, I.; Mir, M.A.; Nishikawa ,Y. (2008) Subtype analysis of *stx1,stx2* and *eae* genrs in Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E.coli* (EPEC) from lambs in India J.tvjl.p.07-017.

9- AL – Chalabi.; Rawa'a.; Ayad AL-ubaidy.; Muneera AL – lbadi.(2010) Detection of urovirulence Genes (eae , E- hly –a-hly) of uropathogenic *Escherichia coli* by specific PCR. jornal of Biotechnonogog Research Center .4 (1) : 44- 50.

10- Hien, B. T.; Trang do, T.; Scheutz, F.; Cam, P. D.;Molbak, K. and Dalsgaard, A. (2007).Diarrhoeagenic Escherichia coli and other causes of childhood diarrhoea: a casecontrol study in children living in a wastewater-use area in Hanoi, Vietnam. J. Medical Microbiology.56: 1086-1096 .

11- Momtaz , H.; Rahimi , E.; Moshkelani , S.(2012). Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E.coli* isolated form slaughtered commercial chickens in Iran. Veterinarni Medicina , 57 (4) : 193 – 197.

12- Cheng, C.; Tennant, S. M.; Azzopardi, K. I.; Bennett - Wood, V.; Hartland, E. L.; Robins-

مياه النهر ومقاومتها للمضادات الحياتية. مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد (13) العدد (2). صفحة 57)

21-Galane, Petronella M. andRoux, Marie Le.(2001). Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Isolated from Young South African Children with Diarrhoeal Diseases.J. Health Population nutr. 19(1):31-38.

22 – العاني، ابراهيم عبد الكريم عبد الرحمن (2007). دراسة الاشيريكية القولون الممرضة للامعاء المعزولة من الاطفال المصابين بالاسهال في مستشفى الفلوجة. مجلة جامعه الانبار للعلوم الصرفة. المجلد (1) العدد (1).

23- Ali,Ali Ibrahim and Abood,Walaa Najm.(2010).Possible correlation between O-antigen serogroup of Enteropathogenic / Enteroinvasive *E.coli* and infection with Giardia lamblia and Entamoeba histolytica as a possible pathological strategy for acute diarrhea among children of Baghdad governorate.J. Diyala.6(1) : 205-226.

24- علي, زهرة محسن (2007). دراسة بكتيريولوجية ووراثية لبكتريا القولون المرضية في محافظة النجف الأشراف. أطروحة دكتوراه , كلية التربية للبنات , جامعة الكوفة. العراق

25- Clark, S. C.; Haigh, R. D.; Freestone, P.P.E. and Williams, P. H.(2003). Virulence of enteropathogenic *E. coli* a global pathogen. J.Clin. Microbiol. Rev. 16(3):365-378.

26- Arif,Sehand K. and Salih, layla I.F. (2010). Identification of Different Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Stool Samples by Using Multiplex PCR Technique. J. Medical Sciences. 2(5): 237-243.

27- Giammanco, A.; Maggio, M.; Giammanco ,G.; Morelli, R.; Minelli, F.and Scheutz F.(1996). Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to Enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. J.Clin Microbiol. 34: 689-694.

28- Asadi, Karam MR.; Bouzari, S.; Oloomi, M.; Aslani, MM. and Jafari, A.(2010). Phenotypic and Genotypic Characterization of Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) strains in Tehran, Iran.. J. microbiol. 2 (1) : 3-7.

29- Nguyen , Trung Vu ; Van, Phung Le; Chinh , L.; Huy, Khanh Nguyen Gia and Andrej, Weintraub.(2005) Detection and Characterization of Diarrheagenic Escherichia coli fromYoung Children in Hanoi, Vietnam.J.clinical microbiology.43: (2) 755–760.

30- Alikhani, M. Yousef ; Mirsalehian, Akbar and Aslani, M. Mehdi.(2006). Detection of typical and atypical Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea.J. Medical Microbiology.55: 1159–1163.

جدول (1) البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

اسم البادئ	تسلسل القواعد 3→5	حجم الجين المستهدف bp
eae –F	TCAATGCAGTT CCGTTATCAGTT	482
eae –R	GTAAAGTCCGTT ACCCCAACCTG	482
Stx –F	AGTTAATGTGGT GGCGAAGG	306
Stx –R	TGTGAAAAAT CAGCAAAGCG	306
bfp-F	AATGGTGCTT GCGCTTGCTGC	324
bfp-R	TACCAGGTTG GATAAAGCGGC	324

bfp : bundle forming pilus ; ***stx*** : ; **R** : Reverse ; Forward **F** : shiga toxin ***eae*** : effacing attaching

جدول (2) مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل

المكونات	الحجم لعينة واحدة ((µl	التركيز النهائي
الماء المقطر	5.5	——
Green Master Mix.	12.5	1X
Primer forward	2.5	10 Pmol/µl
Primer reverse	2.5	10 Pmol/µl
DNA template	2	——
الحجم النهائي	25	——

جدول (3) برنامج جهاز المبلمر الحراري الخاص لمزيج تفاعل PCR لبادئات (eae,stx,bfp)

درجة الحرارة ©	الزمن	عدد الدورات	الخطوات الرئيسة
95	2 دقيقة	1	المسخ الأولي لشريط الدنا Initial denaturation
93	45 ثانية	35	مسخ دنا القالب Denaturation
58	30 ثانية		ارتباط البادئات بدنا القالب Primer annealing
72	45 ثانية		استطالة البادئات المرتبطة Primer extension
72	7 دقيقة	1	الاستطالة النهائية Final extension

جدول (4) الفحوصات الكيموحيوية التي اعتمدت في تشخيص E.coli

عدد العزلات	النمو على وسط EMB	Gram stain	Motility	Indole	Methyl Red	Voges-Proskauer	Simmon citrate	Catalase	Oxidase	Urease	H_2S	Nitrate Reduction	Gelation Liquefication	Starch Hydrolysis	Glucose	Lactose	Dnase
278	ذات بريق معدني مخضر	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-

جدول (5) عدد عينات المياه الحاوية على بكتريا E.coli في مياه نهر الفرات

الشهور	كانون الثاني	شباط	آذار	نيسان	أيار	حزيران	تموز	آب	أيلول	تشرين الأول	تشرين الثاني	كانون الأول	المجموع
العدد	8	12	14	22	28	38	39	32	33	27	13	12	278

جدول (6) توزيع EPEC وفق الأمصال متعددة التكافؤ

الأمصال المتعددة التكافؤ	عدد الاصابة	النسبة المئوية للإصابة
Type 1	11	%39.28
Type 2	5	%17.85
Type 3	5	%17.85
Type 4	7	%25
المجموع	28	100%

جدول (7) توزيع EPEC وفق الأمصال احادية التكافؤ

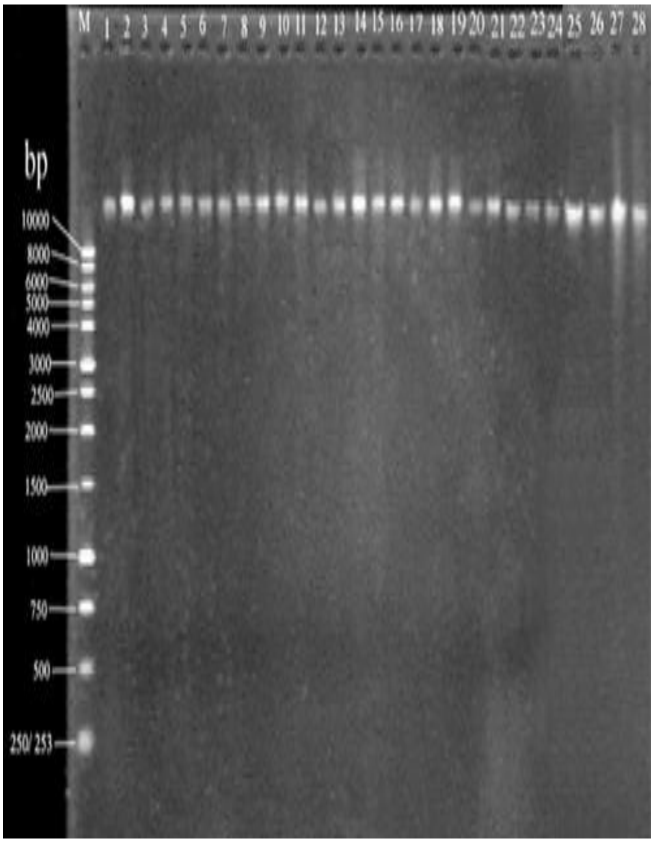
الأمصال الأحادية التكافؤ	عدد الاصابة	النسبة المئوية للاصابة
O126	3	%10.71
O55	6	%21.42
O86	3	%10.71
O111	2	%7.14
O142	4	%14.28
O125	2	%7.14
O127	1	%3.57
O128	1	%3.57
O114	2	%7.14
O26	1	%3.57
O119	2	%7.14
O124	1	%3.57
المجموع	28	%100

جدول (8) توزيع جينات الضراوة التي شخصت بطريقة PCR لعزلات EPEC وعلاقتها بالتنميط المصلي

النمط الجيني	جينات الضراوة المشخصة بطريقة PCR	التنميط المصلي للعزلة	رمز العزلة
Atypical EPCE	*eae*+ *bfp*- *stx*-	O125	1
Atypical EPCE	*eae*+ *bfp*- *stx*-	O55	2
Atypical EPCE	*eae*+ *bfp*- *stx*-	O111	3
Atypical EPCE	*eae*+ *bfp*-	O142	4

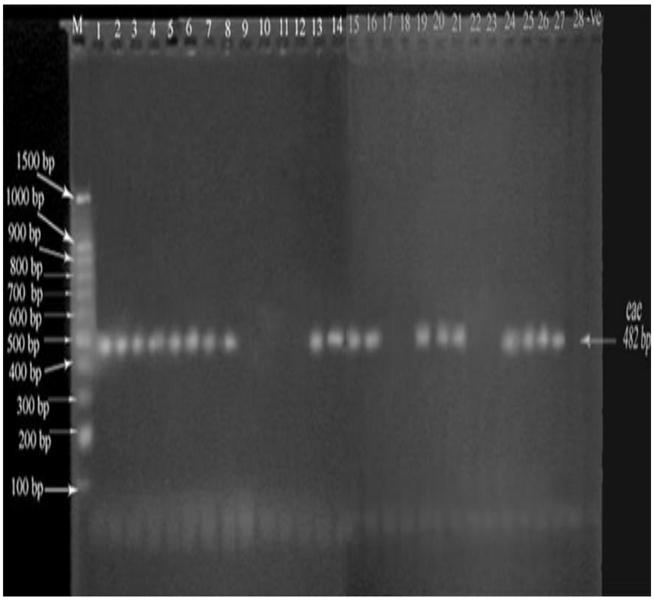
رمز العزلة	التنميط المصلي للعزلة	جينات الضراوة المشخصة بطريقة PCR	النمط الجيني
		stx-	
5	O 86	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
6	O 142	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
7	O111	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
8	O126	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
9	O 55	eae- bfp- stx-	Non – EPEC
10	O 142	eae- bfp- stx-	Non – EPEC
11	O142	eae- bfp- stx-	Non – EPEC
12	O114	eae- bfp- stx-	Non – EPEC
13	O119	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
14	O 114	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
15	O 124	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
16	O 86	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
17	O 125	eae- bfp- stx-	Non – EPEC
18	O 86	eae- bfp- stx-	Non – EPEC
19	O 119	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
20	O 127	eae+ bfp-	Atypical EPCE

رمز العزلة	التنميط المصلي للعزلة	جينات الضراوة المشخصة بطريقة PCR	النمط الجيني
		stx-	
21	O 128	eae+ bfp- stx-	Atypical EPCE
22	O 126	bfp- eae- stx-	Non – EPEC
23	O 26	bfp- eae- stx-	Non – EPEC
24	O 55	eae+ stx- bfp-	Atypical EPCE
25	O 55	eae+ stx- bfp-	Atypical EPCE
26	O 126	eae+ stx- bfp-	Atypical EPCE
27	O 55	eae+ stx- bfp-	Atypical EPCE
28	O 55	bfp- eae- stx-	Non – EPEC

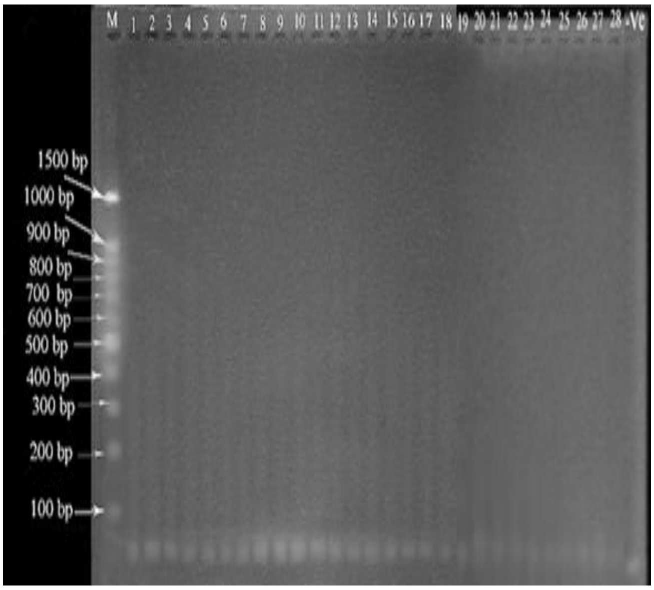


صورة (1) ترحيل DNA الكروموسومي لعزلات EPEC M (Marker):

الدليل الحجمي 1 Kbp DNA Ladder

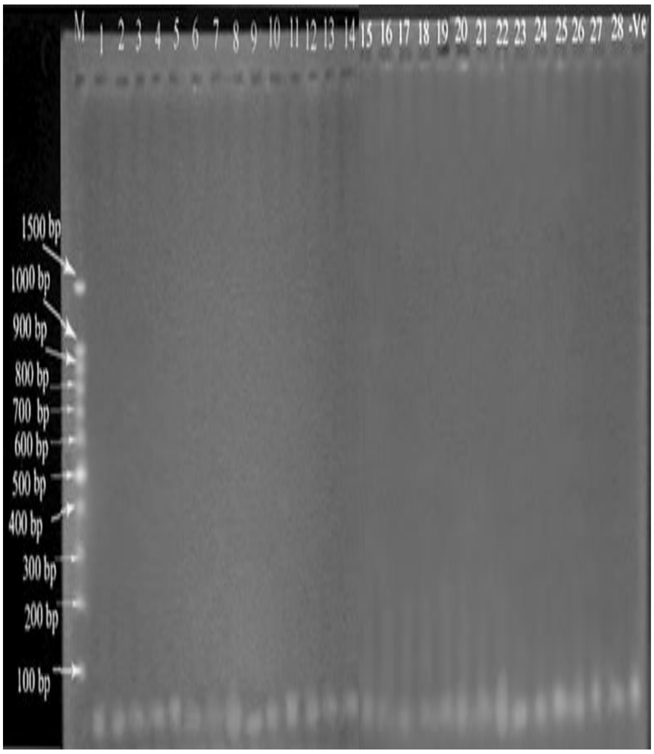


الصورة (2) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA باستعمال البادئين **eae F , eae R : M** الدليل الحجمي **100bp -ve ,**: معاملة السيطرة السالبة من دون عينة الدنا , **bp** : زوج من القواعد النتروجينية



الصور(3) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسلةDNA باستعمال البادئين , **bfp F , bfp R : M** الدليل الحجمي **100bp ,–ve**

: معاملة السيطرة السالبة من دون عينة الدنا **,bp** : زوج من القواعد النتروجينية



الصورة (4) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسلةDNA باستعمال البادئين **stxR,stxf M** : الدليل الحجمي **100bp ve ,** –: معاملة السيطرة السالبة من دون عينة الدنا **,bp** : زوج من القواعد النتروجينية

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2013 ,(7), (1) :34-44

STUDY OF PHENOTYPIC AND GENOTYPIC ATTERNS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM EUPHRATES RIVER IN RAMADI CITY

AHMED M. TURKEY

ABSTRACT :

The present study was preformed in period between October 2011 to July 2012, isolated were isolated from Euphrates river in Ramadi city. samples were cultured on several culture media microscopical, cultural, biochemical,serotypical (by use of serotype Diagnosis kit of bacteria) and genotypical (eae , stx , bfp) diagnosis of bacteria were done. The results showed that 278 from Euphrates samples were E.Coli (68.137 %) also the results indicated that (28) isolates belong to EPEC and the dominant serotype were type1 multisampling equivalent. with ratio of (39.28%) followed by the multi-samples equivalent type4 (25%) and the multisampling equivalent type2 and type2 with a ratio of (17.85%) for each one.In addition the mono sample equivalent serotype ratio was O55 (21.42%) followed by 0142 with a ratio of (14.28%). Then , the sample typing 088 and 0126 come with a ratio of (10.7 %). All serotype patterns were tested to check the content of virulence determinant and the results showed that 19 isolates contained the gene eae ratio(67.85%) ,when as there is no any isolates contained bfp , stx genes EPEC bacteria also disinfected to typical EPEC and Atypical EPEC , where the typical EPEC were found in 28 isolates and Atypical EPEC identified in 19 isolates with the ratio (67.85%).