وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
كلية العلوم
جامعة ذي قار

التنميط الجيني والكشف عن بعض جينات الضراوة لبكتريا اشريكيا القولون المعزولة من عينات سريريه وبيئة المستشفيات في مدينة الناصرية .

رسالة مقدمة إلى
عمادة كلية العلوم – جامعة ذي قار
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير
في علوم الحياة/أحياء مجهرية

من قبل
رنا عبد الامير السلمان
بكالوريوس علوم في علوم الحياة – ٢٠١٠

بإشراف

الأستاذ الدكتور
يحيى عبد الرضا عباس

الأستاذ المساعدالدكتور
بسام ياسين خضير

٢٠١٤ م

١٤٣٥ هـ

الـخلاصة

السلالات المرضيه للاشريكية القولونية تسبب اصابات داخل وخارج أمعاء ألانسان . وهي مسوؤلة عن طيف واسع من الامراض المعدية منها اصابات المجاري البولية ,تسمم الدم ,التهاب السحايا لحديثي الولادة وكذلك اصابات الجهاز العصبي المركزي و الجهاز التنفسي . من بين العديد من البكتريا المسببة لإصابات الاسهال والمجاري البولية تعد الاشريكية القولونية واحدة من اهم مسببات الاسهال والتهاب المجاري البولية المؤدية للوفاة في كل انحاء العالم.

ان الهدف من الدراسة هو التشخيص والتنميط الجزيئي لبكتريا الاشريكية المعزولة من عينات سريريه (الحروق , الجروح , التهاب المجاري البولية , الإسهال ومسحات المهبل) وعينات من بيئة المستشفيات اضافة للكشف عن بعض جيناتها المسؤولة عن خواصها الامراضية بالإضافة الى تحديد حساسيتها تجاه المضادات الحياتية.

جمعت حوالي٣١٨ عينة خلال الفترة من ايلول ٢٠١٢ ولغاية اذار ٢٠١٣. أظهرت نتائج الزرع الأولي على وسط أكار الماكونكي واكار الايوسين مثيلين الازرق بعد التشخيص بالاعتماد على الصفات الزرعية والكيموحيوية وتوكيد التشخيص بأستعمال العدة AP١٢٠E ان ٩٠ عينة من اصل ٣١٨ عينة اعطت نمو موجبا لبكتريا الاشريكيه وكما يلي : ٤٢/١(٢.٣٨%)من الحروق،٢٥/٧(٢٨%)من المسحات المهبلية،٤١/١١ (٢٦.٨٢%)من حالات الجروح ، ٣٣/١٨(٥٤.٥٤%)من اصابات الاسهال و ٦٧/٣٨(٥٦.٧١%)من التهابات المجاري البولية في حيث تم الحصول على ١١٠/ ١٥(١٣.٦٣ %) من بيئة المستشفيات.

اظهرت جميع العزلات نتيجه موجبه تجاه التشخيص الجزيئي بأستعمال البادئة (*ITS*) التي اثبتت انها الاشريكيه القولونية .ثم فحصت بعد ذلك للكشف عن انماطهاالجينية بأستخدام البوادئ(*chuA,yjaA,TSP*) وبعض مورثات الضراوة المتمثلة *(Pap,VT1,VT2)*.اذ توزعت العزلات الى ثلاث مجاميع جزيئية المجموعةAوD (٤٠ %) لكل منهما ، B٢ (20%)بينما لم تنتمي أي من العينات الى المجموعة B1.اختيرت بعد ذلك ٥٠جرثومة وبصورة عشوائية لتحري عن جينات الشدة بينت النتائج احتواء جميع العزلات المفحوصة على المورثين(*Pap,VT1*) بينما اظهرت عزلة واحدة فقط نتيجة موجبة لمورثة *VT2*.

أظهرت نتائج اختبار الحساسية على ١٦ مضادا"حياتيا" أن ٨٧ (٩٢.٢٢ %)عزلة ابدت مقاومةَ متعددة لمضادات الحيويه و اظهرت جميع العزلات مقاومه لنوع واحد على الاقل من مضادات البيتا لاكتام.

Title	Page No.
Summary	**I**
Contents	**III**
List of Tables	**VII**
List of Figures	**VIII**
List of Abbreviations	**XI**
Chapter one	
1-1-Introduction	1
Chapter two	
2-Literature Review	4
2-1 Genus *Escherichia*	4
2-3*Escherichia coli*	6
2-3-1 Classification	6
2-3-2 General characterization	7
2-3-3 Typing Methods	13
2-3-4 Conventional typing methods-serotyping	13
2-3-5 *E. coli* phylotype	15
2-3-6 Intestinal pathogenic *E. coli*	17
2-3-6-1Enteropathogenic *E. coli*	17
2-3-6-2Enterohaemorrhagic *E.coli*	18
2-3-6-3Enterotoxigenic *E. coli*	20
3-6-4Enteroadherent *E.coli*	21
2-3-6-5 Enteroinvasive EIEC and *Shigella* spp	22
2-3-6-6Diffusely adherent *E. coli*	23
2-3-7 Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC)	24
2-3-8 Virulence factorsof *E.coli*	26
2-3-8-1 Pathogenicity islands	26
2-3-8-2 Adhesins	27
2-3-8-3 Aggregation factors antigen 43	28
2-3-8-4 Toxins	28
2-3-8-5 Serine protease autotransporters	39
2-4 Antimicrobial susceptibility	30
Chapter Three	
3- Materials and methods	33

3-1-1 Equipments and Instrument	33
3-1-2 Biological and Chemical Material	34
3-1-3-Culture Media	35
3-1-4- Antibiotics	36
3-1-5 Rapid Multitest System	37
3-1-6 PCR Materials	37
3-1-6-1 PCR PreMix	37
3-1-6-2 Molecular Weight Marker	37
3-1-6-3 Primers (Alpha DNA, Montreal)	38
3-1-7 Kits	39
3-1-7-1:Genomic DNA Mini Kit(Blood/Culture Cell) Bacteria Protocol(Geneaid, England)	39
3-2 Methods	40
3-2-1 Preparation of Buffers and Solutions	40
3-2-1-1 McFarland (0.5) Turbidity Standard	40
3-2-1-2 Solution Used for Agarose Gel Electrophoresis	40
3-2-1-2-1 Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA)	40
3-2-1-2-2 Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer(5X)	40
3-2-1-2-3 Ethidium Bromide Solution	41
3-2-2 Preparation of Reagents	41
3-2-2 Preparation of Reagents	41
3-2-2-2 Voges-Proskauer reagents	41
3-2-3: Preparation of Culture and Diagnostic Media	41
3-2-4 Biochemical Test	41
3-2-4-1 Indole Production Test	41
3-2-4-2 Methyl red Test	42
3-2-4-3 Voges-Proskauer Test	42
3-2-4-4 Simmons citrate Test	42
3-2-4-5 Urease test	42
3-2-4-6 Kliglers iron agar test	42
3-2-5 Samples Collection	43
3-2-5-1Clinical samples	43
3-2-5-2 Hospital Environmental Samples	43
3-2-6 Isolation and Identification of Bacterial Isolates	43

3-2-7 Storage of the isolates	44
3-2-8 Polymerase Chain Reaction Assay	45
3-2-8-1 Preparing the Primer	45
3-2-8-2 *E. coli* DNA Extraction	45
3-2-8-3 PCR Supplies Assembling and Thermocycling Conditions	47
3-2-4 PCR cycling profiles	47
a. Monoplex PCR Mixture	47
b. Mutiplex PCR Mixture	48
3-2-8-5 Preparation of Agarose Gel	48
3-2-9 PCR Product Analysis	49
3-2-9-1 Agarose Gel Electrophoresis	49
3-2-9-2 Electrophoresis Results	49
3-2-10 Antibiotic Susceptibility Testing	49
Chapter four	
4-1- Isolation and Identification of *E.coli*	51
4-1-1- Primary Diagnosis	54
4-1-2- Identification by used API System	54
4-2- Antibiotic Susceptibility Pattern	54
4.3 Molecular identification of *E. coli* Isolates	56
4-4 phylogenetic grouping of *E.coli* isolates	57
4-5 phylogenicity and virulance 4-5-1 Detection of Pap operon	58 58
4-5-2 Detection of verocytotoxin genes(*VT1&VT2*)	59
Chapter Five	
5-1- Isolation and Identification of Bacterial Isolates	62
5-2-Antimicrobial Susceptibility Pattern	64
5-3 molecular identification of *E.coli*	69
5-4Genotyping of *E. coli*	70
5-5 Virulence characterization of the *E. coli*	73
Conclusions and Recommendations	75-76
References **Appendix**	77-99 100-10