عزل وتوصيف بكتريا *E. coli* O157:H7 من اللحم والجبن والكشف عن جينات *Stx1* و *Stx2* و *hlyA* و *eaeA* باستخدام تقنية Multiplex PCR

Isolation and characterization *E. coli* O157:H7 from meat &cheese and detection of *Stx*1, *Stx*2, *hly*A, *eae*A by using multiplex PCR

شذى ذنون أحمد آمنة نصيف جاسم أياد محمد علي فاضل*

كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد

* كلية العلوم / جامعة النهرين

Shatha T. Ahmed Amina N. Jasim Ayad M. Ali*

Science Collage for Women\ Baghdad University

*Science Collage/ AL-Nahrin University

المستخلص

تم جمع 189عينة غذائية مختلفة اشتملت على 74 عينة لحم بقري مفروم ، 115 عينة جبن أبيض محلي من ثلاث مناطق من بغداد (الصدرية ، أبو غريب ، الفضيلية) ، أجري المسح لجميع العينات للتقصي عن وجود بكتريا *Escherichia coli* من النمط المصلي O157:H7 وتمييزها عن باقي سلالات ايشيريشيا القولون غير المخمرة للسوربتول Non-Sorbitol fermenting *Escherichia coli* (NSF *E.coli*) . زرعت العينات على وسط اغنائي سائل (Enrichment broth) وحضنت بدرجة حرارة 41.5 م لمدة 6 ساعات تبعها الزرع على وسط اكار الماكونكي الحاوي على سكر السوربتول والمضاف اليه مضاد الحيوية السفكسيم وملح التيلورايت (Cefixime Tellurite - Sorbitol MacConkey Agar) (CT-SMAC) . تم الحصول على 66 عزلة بكتيرية غيرمخمرة للسوربتول شخص منها 13عزلة ايشيريشيا القولون (6 عزلات من اللحم و 7 عزلات من الجبن) وذلك باستخدام الاختبارات الكيموحيوية التقليدية ونظام التشخيص Api20E والتي لم تعطِ نتائج كافية تمكن من تفريق النمط المصلي O157:H7 بشكل نهائي عن باقي عزلات NSF *E.coli* . أجريت أربع اختبارات كيموحيوية خاصة لتشخيص النمط المصليO157 وتمييزه عن باقي انواع البكتريا غير المخمرة للسوربتول(اختبار تخمر السليوبايوز ، انتاج انزيم β-Glocuronidase، النمو بوجود سيانيد البوتاسيوم وانتاج الانتيروهيمولايسين) حيث أظهرت النتائج عائدية عزلتان فقط إلى المجموعة المصلية O157 (عزلة واحدة من عينات اللحم وعزلة واحدة من عينات الجبن) ، تم إجراء فحص التلازن بحبيبات اللاتكس المرتبطة بالأجسام المضادة للمستضدين O157 وH7 وأعطت العزلتان نتيجة ايجابية . شخصت العزلات باستعمال تقنية التفاعل التضاعفي المتعدد لسلسلة الدنا (Multiplex Polymerase Chain Reaction) (MPCR) للكشف عن وجود أو غياب أربعة أنواع من الجينات هي *Stx1* ، *Stx2* ، *hlyA* ، *eaeA* المشفرة لعوامل ضراوة رئيسية لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 المعزولة وذلك بأستخدام بادئات نوعية تستهدف مواقع متخصصة للجينات الهدف المذكورة أنفا وفي تفاعل واحد ، وأظهرت النتائج وجود تباين في المحتوى الجيني بين عزلات بكتريا *E. coli* O157:H7 فقد احتوت احدى العزلات (من اللحم) على الجينات الأربعة بينما احتوت العزلة الثانية (من الجبن) على اثنين من الجينات فقط هي *Stx1* و*hlyA*.

Abstract

A total of 189 samples were collected from 74 raw uncooked minced beef meat, 115 local white cheeses from 3 different areas in Baghdad. All samples were surveyed and examined for the presence of the *Escherichia coli* O157:H7 and differentiate it from other Non -Sorbitol Fermenting *Escherichia coli* (NSF *E. coli*). The Bacterial isolates were identified by using morphological diagnostic methods; Samples were cultured on liquid enrichment medium, incubated at 41.5C° for 6 hrs, and then cultured on Cefixime Tellurite -Sorbitol MacConkey Agar (CT- SMAC). 66 non-sorbitol fermenting bacterial isolates were obtained of which 13 were

identified as *Escherichia coli* from (6 meat and 7 cheese samples). By using traditional biochemical tests and Api20E diagnostic system without differentiation between serotype O157:H7 and other NSF *E. coli* isolates. Four specific biochemical tests (Cellobiose fermentation, β-Glocuronidase production, KCN and Enterohemolysin production) were done to differentiate serotype O157 differentiation from other NSF bacteria. Only 2 isolates belonging to the serotype O157 were obtained of which one isolate from meat and other isolate from cheese. Latex agglutination test for O157 and H7 showed that the 5 isolates gave positive results with both kits. The Bacterial isolates were identified by using Multiplex Polymerase Chain Reaction (MPCR) technology for the presence or absence of 4 genes (*Stx1, Stx2, hlyA* and *eaeA*) that encode for main virulence factors to diagnose *E. coli* O157:H7 isolated from various sources by using specific primers in mPCR. The result showed that gene content variety in two *E. coli* O157:H7 isolates, 1 from meat contain all 4 genes and other isolate from cheese contains 2 genes: *Stx1* and *hlyA* .

المقدمة

عرفت ايشيريشيا القولون المعوية النزفية Enterohemorrhagic*E. coli* (EHEC) أو الأيشيريشيا القولونية المنتجة لذيفان الفيرو (VeroToxin-producing *E. coli* (VTEC))لأول مرة كمسبب للإسهال الدموي وحالات الاصابة بالمتلازمة اليوريمية الحالة للدم (Hemolytic-Uremic Syndrome) (HUS) للإنسان عام 1982 عندما سجلت حالتين وبائيتين من التهاب القولون النزفي (Hemorrhagic Colitis) (HC) والذي أقترن بتناول همبركر غير مطبوخ بشكل جيد في احد مطاعم الوجبة السريعة ، وقد بينت نتائج التشخيص أن المسبب لهذه الحالات هي إحدى سلا لات بكتريا *E. coli* من النـمط O157:H7 [1] .

تنشأ الإصابة ببكتريا *E. coli* O157:H7 في الأبقار والتي تعد مخازن رئيسية لها وتنتقـل إلى الإنسان عن طـريق تنـاول الغذاء والشراب الملـوثين بها وخاصة اللحم البقري ومنتجاته والحليب ومنتجاتـه ، إذ يقـدر عدد حالات الإصابة الناجمة عن الأغذية والمسجلة في الولايات المتحـدة الأمريكية بما يقارب 75.000حالة إصابة سـنوياً منها على الأقل 250حالة وفـاة [2] . بسـبب أهمية وخطورة بكـتريا *E. coli* O157:H7 وتزايد حالات الإصابة بها وإمكانية انتشار وباء الإصابة الناتــج عن اسـتهلاك الأغذية الملوثة ، فضلا عن إن خطورة المرض وعدم توافر العلاج قد كان دافعـاً لتركيز الأبحاث في العالم حول تحسين كفاءة التشخيص مع تقليـل الوقت والجـهد ، لذا فأن التقنيـات الجزيئـية الحديثـة وان كانت ماتزال محـدودة الاسـتخدام في دول العالم الثالث إلا أنها وفـرت أفضل الوسائل التشخيصية ومنها تقنية الـتفاعـل التضاعفي لسلسلة الدنا (Polymerase Chain Reaction) (PCR) ، لما تمتاز به هذه التقنية من الخصوصية والسرعة العالية للتحري عن بكتريا *E. coli* O157:H7 في عينات الغذاء مثل اللحوم ومنتجات الألبان ولاسيما عند حدوث الأوبئة من خلال الكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة وإمكانية اعتماد هذه العوامل كمؤشرات جزيئية في الدراسات التشخيصية وتعزيـز المعلومات الوبائية عند التحري عن هذه البكتريا والتي تعجز طـرائق التشخيص المختبري التقليديـة التـحري عنها خاصــة عند التعامل مع أعداد كبيــرة من العينات [3] .

لذا فقد كان هدف الدراسة عزل وتشخيص بكتريا *E. coli* O157:H7 من عينات غذائية مــختلفة هي اللحم ألبقري المفروم والجبن الأبيض المحلي كمصدرين من مصادر التلوث بهذه البكتريا ، وتوصيف العزلات باستخدام طرائق التشخيص المظهري التقليدية وطرائق التشخيص الجزيئي المعتمدة على الـ PCR من خلال الكشف عن وجود أو غياب جينات *Stx1* ، *Stx2* ، *eaeA* ، *hlyA* المشفرة لعوامل ضـراوة رئيسية فـي بكتريا *E. coli* O157:H7 باسـتخدام تقنـية التفاعل التضـاعفي المتعدد لسلسلة الـدنا (MPCR) وإمكانية اعتماد هـذه الجينـات كمؤشرات تشخيصـية ووبــائية وتحديد مدى كفاءة هذه التقنية مقارنـة بطرائق التشخيص التقليدية .

المواد وطرائق العمل

تـم جمــع 74 عينـة لحـم بقـري مفـروم و115 عينة جبـن محلـي الصنع وبحدود 250 غرام من كل عينة ومن مناطق مختلفة في مدينة بغداد شملت الصدرية و أبو غريب و الفضيلية. جمعت العينات في أكياس بلاستيكية معقمة ووضعت في حاوية مبردة لحين نقلها إلى المختبر.

تم وزن 25 غم من العينة الغذائية في داخل كيس بلاستيكي معقم وتحت ظروف معقمة وأضيفت إليها كمية مناسبة من الوسط الاغنائي السائل Modified Trypticase Soy Broth((mTSB) والموضوع في قناني زجـاجية بمـعدل 225 مليلتر . تم مزج الخليط بأستخدام خلاط (Stomacher) لمدة دقيقتين والذي ساعد على تجانس العينة. بعد ذلك أضيف المزيج إلى باقي محتويات القنينة الحاوية على الوسط الاغنائي وحضنت القناني بدرجة 41.5م ولمدة 6 ساعات [4] .

بعد انتهاء مدة الحضن نقل جزء من المزروع البكتيري بوساطة ناقل معقم إلى وسط CT-SMAC الصلب وزرع بطريقة التخطيط على الطبق ثم حضنت الأطباق بدرجة 37م لمدة(18-24) ساعة . فحصت جميع الأطباق وشخصت المستعمرات البكتيرية النامية ثم انتخبت المستعمرات غير المخمرة للسوربتول التي تكون عديمة اللون اوشاحبة مقارنة بالبكتريا المخمرة للسوربتول التي تبدو بشكل مستعمرات ذات لون وردي . زرعت المستعمرات غير المخمرة للسوربتول على وسط أكار الماكونكي لغرض استبعاد الأنواع البكتيرية غير المخمرة لسكر اللاكتوز وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة ثم انتخبت المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز لغرض إجراء الاختبارات التشخيصية اللازمة [5] .

شخصت المستعمرات النامية على وسط CT-SMAC غير المخمرة للسوربتول اعتماداً على صفاتها المظهرية ثم صفات الخلايا بعـد تصبيغها بصبغة كرام والفحوصات الكيموحيوية والتشخيص باستخدام نظام Api20E . وبعد الحصول على نتائج اختبار Api20E والتأكد من عائدية العزلات غير المخمرة للسوربتول إلى بكتريا *E. coli* تم أجراء أربع أختبارات كيموحيوية خاصة بالنمط المصلي لغرض تشخيصه وتفريقه عن باقي الأنماط المصلية من *E. coli* غيرالمخمرة للسوربتول . تضمنت الاختبارات الكيموحيوية مايلي: اختبار تخمر السيلوبايوز Cellobiose fermentation test ، اختبار النمو بسيانيد البوتاسيوم ، اختبار انتاج إنزيم β-Glocuronidase ، اختبار إنتاج Enterohemolysin . أن عزلات *E. coli* غير المخمرة للسوربتول والتي تعطي التفاعلات الآتية: سليوبايوز (–) ، KCN(–) ، MUG (–) ، Enterohemolysin (+) يمكن اعتبارها مبدئياً من النمط المصلي O157 ، ولتأكيد هذا اجري اختبار تلازن لاتكس السريع (Rapid latex agglutination test) باستخدام عدة اختبار لاتكس (Latex test Kit) للتحري عن المستضد الجسمي O157 والمستضد السوطيH7 لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7 . بعد ذلك تم التحري عن وجود جينات *Stx1* و *Stx2* و *eaeA* و *hlyA* في العزلات البكتيرية المشخصة مصليا باستخدام أربع أزواج من البادئات المذكورة في جدول (1) [6] .

جدول (1): مجموعة البادئات المتخصصة المستخدمة في تفاعلات MPCR(6)

أسم البادئ	تتابع البادئ (′3–′5)	طول البادئ	حجم ناتج التضخيم (bp)
stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	23	180
stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	21	
stx2 F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	21	255
stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	22	
eaeA F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	20	384
eaeA R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	20	
hlyA F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	21	534
hlyA R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	22	

تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي بحجم نهائي 50 مايكروليتر وذلك بمزج المكونات المذكورة في جدول رقم (2) في أنبوبة ابندروف واحدة معقمة بالتراكيز المبينة إزاء كل مادة .

جدول (2): مكونات خليط تفاعل mPCR

المكونات	الحجم لعينة (مايكروليتر)	التركيز النهائي
محلول دارئ PCR بقوة 10X	5	1X
مزيج القواعد النتروجينية (dNTPs)	1	200 مايكرومول
إنزيم البلمرة Taq DNApolymerase	0.2	1 وحدة
كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$	4	2 ملي مول
البادئ stx1R	2.5	25 بيكومول
البادئ stx1F	2.5	25 بيكومول
البادئ stx2R	2.5	25 بيكومول
البادئ stx2F	2.5	25 بيكومول
البادئ eaeAR	2.5	25 بيكومول
البادئ eaeAF	2.5	25 بيكومول
البادئ hlyAR	2.5	25 بيكومول
البادئ hlyAF	2.5	25 بيكومول
ماء مقطر لايوني معقم	17.8	

وزعت المحتويات بمعدل 48 مايكروليتر لكل أنبوبة من أنابيب ابندروف الصغيرة ثم اضيف 2 مايكروليتر من دنا كل عزلة الى الانبوب الخاص بها ونقلت الأنابيب إلى جهازالتضخيم الحراري التسلسلي (Thermocycler) وذلك وفق برنامج خاص وكما مذكور في جدول (3) [6] . تم الكشف عن نواتج التضخيم بترحيل العينات كهربائيا في هلام الاكاروز بتركيز (2 %) وتم تقدير الإحجام الجزيئية لنواتج التضاعف بالمقارنة مع مواقع الحزم ذات الاوزان الجزيئية المعروفة للدليل الحجمي للدنا (100 bp DNA ladder) والتي عدت كدليل حجمي قياسي .

جدول (3) : خطوات البرنامج المستخدم في تفاعلات MPCR

No.	Steps	Temperature °(C)	Time (min)	No. of cycles
	Denaturation 1	95	3	1
	Denaturation	95	3	
	Annealing	65	2	10
	Extension	72	1.5	
	Denaturation	95	1	
	Annealing	60	2	15
	Extension	72	1.5	
	Denaturation	95	1	
	Annealing	60	2	10
	Extension	72	2.5	
	Extension	72	5	1

النتائج والمناقشة

تم الحصول على 66 عزلة بكتيرية غير مخمرة للسوربتول من مجموع 189 عينة غذائية كان منها 13عزلة *E. coli* غير المخمرة للسوربتول (NSF *E. coli*) تم تشخيصها اعتماداً على طرائق التشخيص المظهري كصفاتها على الوسط الزرعي الصلب (CT-SMAC) والاختبارات الكيموحيوية التقليدية المتبعة لتشخيص بكتريا ايشيريشيا القولون ونظام التشخيص Api20E . وعند اجراء أربع اختبارات كيموحيوية خاصة لتشخيص بكتريا *E. coli* O157:H7 تبعها اختبار التلازن الخاص بهذا النمط تم تشخيص عزلتين فقط تمتاز بكونها تعود إلى النمط المصلي O157:H7 تضمنت (عزلة واحدة من اللحم وعزلة واحدة من الجبن) وكما هو موضح في جدول (4).

جدول (4) : عدد ونسب عزلات بكتريا *E. coli* غير المخمرة للسوربتول

نوع العينة	عدد العينات	عدد العزلات غير المخمرة للسوربتول	عدد عزلات *E.coli*	عدد عزلات *E. coli* O_{157}:H_7	نسبة عزلها من عدد العينات المعتمدة(%)
لحم	74	39	6	1	1.4
جبن	115	27	7	1	0.9
المجموع	189	66	13	2	

تمكنت هذه الدراسة من تشخيص عزلتين لبكتريا *E. coli* O157:H7 من نوعين مختلفين من العينات الغذائية تضمنت عزلة واحدة (1.4%) من 74 عينة لحم بقري مفروم وعزلة واحدة (0.9 %) من 115 عينة جبن محلي ، واللذان يمثلان مؤشراً لتلوث الأغذية ذات المنشأ البقري والتي تعد مصدراً مهما للأوبئة الناتجة عن الإصابة بهذه البكتريا . فقد كانت منذ اكتشافها عام 1982 من المسببات الرئيسية لعدد من الأوبئة في العالم ولاسيما في الولايات المتحدة الأمريكية حيث سجل فيها حدوث 350 وباء لغاية عام 2002 وان المصادر الغذائية من المسببات الأكثر شيوعاً لحدوث الأوبئة ، حيث تشكل حوالي 52% من هذه الأوبئة و41 % منها بسبب استهلاك اللحم البقري و4 % بسبب استهلاك منتجات الحليب [7] .

لقد تباينت نتائج الدراسات السابقة في نسبة عزل بكتريا *E. coli* O157:H7 من عينات اللحم ، وبشكل عام وخلال السنوات الأخيرة ارتفع معدل انتشار هذه البكتريا (1.1- 36)% في شرائح اللحوم المقطعة ولاسيما اللحم البقري [8].

يشكل اللحم البقري خطورة استثنائية لسببين الأول هو انتشار سلالات STEC الممرضة ومنها النمط المصلي O157:H7 بنسبة عالية في قطعان الأبقار السليمة كمستودعات رئيسية لها أكثر من بقية أنواع الحيوانات . أما السبب الثاني فهو تلوث اللحوم أثناء الذبح وتماس الذبيحة مع برازها أوجلدها الملوث أو أحشائها ، فضلاً عن انتقال البكتريا من اللحم الملوث إلى أجهزة الفرم وبالتالي ستلوث باقي اللحوم [9] . أما بالنسبة لعينات الجبن فقد كانت نتائج الدراسة متفقة مع دراسة أجريت في فرنسا حيث عزلت بنسبة 1% من عينات الجبن [10].

أن الحضن بدرجات حرارة أعلى من 37م ضرورية لزيادة أعداد البكتريا الهدف في العينة فضلاً عن أنها قد تكون مثبطة للبكتريا الملوثة المتواجدة في عينة الغذاء[11] . كما وجد أن الحضن عند درجة حرارة 41.5 م يسمح بنمو هذا النمط المصلي ويؤثر على نمو البكتريا الملوثة المتواجدة في عينة اللحم البقري مع أهمية إضافة المثبطات المتمثلة بمضادات الحيوية وأملاح الصفراء [12] .

شكل المستعمرات

اتبعت الخطوات الأولية في تمييز العزلات العائدة لبكتريا *E. coli* غير المخمرة للسوربتول بتنميتها على وسط SMAC CT- لغرض استبعاد الأنواع البكتيرية والأنماط المصلية الأخرى من *E. coli* المخمرة للسوربتول فقد ظهرت 13عزلة غير مخمرة للسوربتول بضمنها عزلات بكتريا *E. coli* O157:H7 . وامتازت المستعمرات بكونها غير مخمرة للسوربتول صغيرة الحجم ودائرية الشكل وعديمة اللون أو شاحبة مقارنة بالمستعمرات المخمرة للسوربتول وردية اللون ، بينما كانت العزلات وردية اللون مخمرة لسكر اللاكتوز عند تنميتها على وسط أكار الماكونكي . يعد وسط SMAC من الأوساط التي شاع استخدامها في مختبرات العالم لعزل بكتريا *E. coli* O157:H7 لما يتميز به هذا النمط من خصائص كيموحيوية منها عدم قدرته على تخمير السوربتول مقارنة بـأكثر من 90% من سلالات*E. coli* المخمرة للسوربتول ويكون الاختبار على هذا الوسط سريعاً وبسيطاً وغير مكلف [13] . وبسبب تشابه الطرز المظهرية لبكتريا *E. coli* غير المخمرة للسوربتول على وسط CT-SMAC ، لذا لا يمكن الاعتماد عليه بصورة قاطعة لتشخيص بكتريا *E. coli* O157:H7 .

نتائج الاختبارات الكيموحيوية ونظام التشخيص API20E

إعتمدت عدد من الاختبارات الكيموحيوية التقليدية لتأكيد تشخيص بكتريا*E. coli* والتي أظهرت عائدية 13 عزلة من بين 66عزلة غير مخمرة للسوربتول الى بكتريا *E. coli* بضمنها عزلتين من بكتريا *E.coli*O157:H7 حيث

اعطت جميعها تماثلاً في النتائج ، ثم اعتمد في التشخيص النهائي على استخدام نظام Api20E للتأكد من عائدية العزلات إلى بكتريا *E. coli* حيث أظهرت النتائج عائديه الـ 13 عزلة إلى بكتريا *E. coli* ولكنها كانت جميعها غير مخمرة للسوربتول .

نتائج الاختبارات الكيموحيوية الخاصة والمصلية لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7

أجريت أربع اختبارات كيموحيوية لغرض تشخيص بكتريا *E. coli* من النمط المصلي O157 وتمييزها عن الأنماط المصلية الأخرى من *E. coli* NSF والموضحة نتائجها في الجدول (5) حيث أظهرت عائدية عزلتان فقط إلى بكتريا *E. coli* O157 من بين 13عزلة *E. coli* NSF . تميزت العزلات بكونها غير مخمرة للسليوبايوز وغير قادرة على النمو بوجود سيانيد البوتاسيوم . أشارت الدراسات إلى إمكانية تداخل البكتريا المعوية *E. hermanni* مع *E. coli* O157:H7 حيث تشترك معها بعدم قدرتها على تخمير السوربتول لكنها تتمايز عنها وعن باقي سلالات *E. coli* الأنموذجية بتخميرها للسيلوبايوز وقدرتها على النمو بوجود سيانيد البوتاسيوم KCN . ولهذا السبب تم اللجوء إلى هذين الاختبارين لتشخيص كل عزلات بكتريا *E. coli* وبضمنها النمط المصلي O157:H7 والذي أعطى نتائج سالبة لكلا الاختبارين [5،14] .

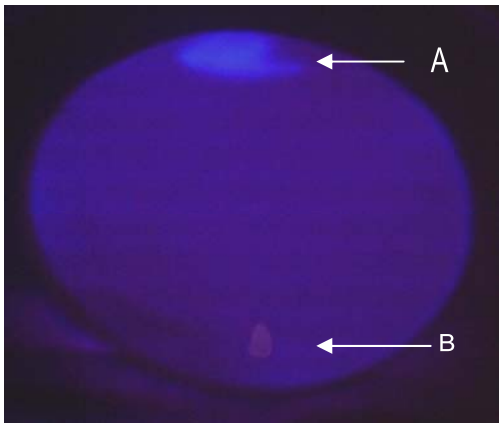
ولغرض تشخيص عزلات بكتريا *E. coli* O157:H7 وتمييزها عن باقي الأنماط المصلية من*E. coli* NSF تم إجراء اختبار ثالث هو اختبار قدرتهاعلى أنتاج إنزيم β-glucuronidase الذي يقوم بتحليل Methylumbelliferl β-D-glucoronide 4- (MUG)لإنتاج مركب متألق . حيث أعطت عزلات *E. coli* O157:H7 تفاعلاً سالباً (عدم ظهور تألق) مقارنة بباقي العزلات التي أعطت تفاعلاً موجباً (ظهور تألق ازرق) وكما هو موضح في شكل (1) ، إن هذه النتائج تتفق مع ما يتميز به هذا النمط المصلي من عدم قدرته على إنتاج انزيم β - glucuronidase مقارنة بنسبة 96% من سلالات *E. coli* المنتجة لهذا الإنزيم [15] . وأكدت ذلك دراسة أخرى وجد فيها أن جميع عزلات النمط المصلي O157:H7 غير قادرة على إنتاج هذا الأنزيم [16] .

أما الاختبار الرابع والأخير هو اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم الانتيروهيمولايسين . حيث أظهرت العزلتان القدرة على إنتاج الانتيروهيمولايسين عند تنميتها على وسط أكار دم الأغنام المغسول بعد 24 ساعة حضانة وبدرجة 37م . حيث يكون نمط التحلل بشكل مناطق تحلل صغيرة وعكرة غير واضحة حول المستعمرات النامية على هذا الوسط . بينما أظهرت باقي العزلات عدم قدرتها على إنتاج الأنتيروهيمولايسين وأعطت نتائج سالبة مع هذا الاختبار. أن هذه النتائج تتفق مع ما أشارت إليه إحدى الدراسات من أن أكثر من 90% من STEC منتجة للانتيروهيمولايسين [1] . بينت النتائج ايضا والموضحة في جدول (5) عائدية عزلتان فقط الى النمط المصلي O157:H7 حيث أعطت تلازناً مع كل من الاجسام المضادة للمستضدين O157 ،H7 .

جدول (5): نتائج الاختبارات الكيموحيوية والمصلية لتشخيص بكتريا *E.coli*O157:H7.

مصدر العينة	العزلات البكتيرية	العدد	الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بالنمط :O157 H7				اختبار التلازن المصلي	
			تخمر السليوبايوز	النمو بوجود KCN	MUG	تحلل الدم المعوي	O157	H7
لحم	*E.coli*O157:H7	1	–	–	–	+	+	+
	NSF*E.coli*	5	–	–	+	–	–	–
جبن	*E.coli*O157:H7	1	–	–	–	+	+	+
	NSF*E.coli*	6	–	–	+	–	–	–

MUG : 4- Methylumbelliferyl β-D- glucoronide .



شكل (1): اختبار إنتاج إنزيم β-glucuronidase.
A- عزلة من NSF*E. coli* الموجبة للاختبار (ظهور تألق) B - بكتريا *E.coli*O157:H7 السالبة للاختبار (عدم ظهور تألق)

تفاعلات mPCR

أجريت تفاعلات MPCR للتحري عن وجود أو غياب أربع جينات هي *eaeA , hlyA , stx2, stx1* المشفرة لعوامل ضراوة مهمة لتشخيص بكتريا *E. coli* O157:H7 وباستخدام أربع بادئات متخصصة يستهدف كل بادئ تتابعاً نوعياً لجين واحد من هذه الجينات ، والتأكد من عائديه العزلات قيد الدراسة إلى هذا النمط المصلي . وقد تبين من نتائج استخدام تلك البادئات اختلاف في عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والناتجة عن وجود أو غياب المواقع المكملة لذلك البادئ في جينوم كل عزلة من العزلات. كما إن ظهور حزم مشتركة بين العزلات المدروسة يدل على ارتبـاط البادئ بالتتابعات المتشـابهة والموجودة في جينوم كل عزلة ، وان عدم ظهور نواتج التضاعف لبعض العزلات يدل على عدم وجود مواقع ارتباط لهذا البادئ في جينوم العزلة البكتيرية كما أظهر المسار الثالث الذي يمثل السيطرة السالبة الذي لايحوي على الدنا خلوه من أي حزمة .

تم تقدير الاحجام الجزيئية للحزم اعتماداً على مواقع الحزم ذات الاحجام الجزيئية المعروفة للدليل الحجمي (100bp) والموضحة في المسارM شكل (1). حيث ظهرت النتائج مماثلة للحجم المتوقع تقريبا عند استعمال البادئات نفسها التي تم اعتمادها في الدراسة التي أجريت من قبل [6] ، عند اختبار 52سلالة من سلالات بكتريا STEC و بضمنها 19 سلالة مشخصة تعود للنمط المصلي O157:H7 معزولة من الغذاء وبراز الحيوان والإنسان وكانت نواتج التضاعف في تلك الدراسة هي 180pb لجين stx_1 و 255 pb لجين stx_2 و 384pb لجين *eaeA* و 534pb لجين EHEC*hlyA* .

يلاحظ من خلال نتائج الدراسة والموضحة في جدول (6) احتواء السلالة المعزولة من اللحم على جميع الجينات المشفرة لعوامل الضراوة المذكورة أنفا ، بينما احتوت السلالة المعزولة من الجبن على جينين فقط هما *stx1* و *hlyA*. لقد أظهرت النتائج على نحو عام أن البكتريا المعزولة من عينات الغذاء كالجبن تمتلك عوامل ضراوة أقل حيث وجد أن العديد من سلالات STEC المعزولة من الحيوانات المجترة لاسيما الأبقار كمصدر من مصادر الإصابة للإنسان تكون أقل في درجة أمراضيتها لإنتاجها عوامل ضراوة أقل مقارنة بالسلالات المعزولة من الإنسان وخاصة في أنتاجها الأنتمين أو الانتيروهيمولايسين [9] .

التحري عن جينات *Stx1* و*Stx2*

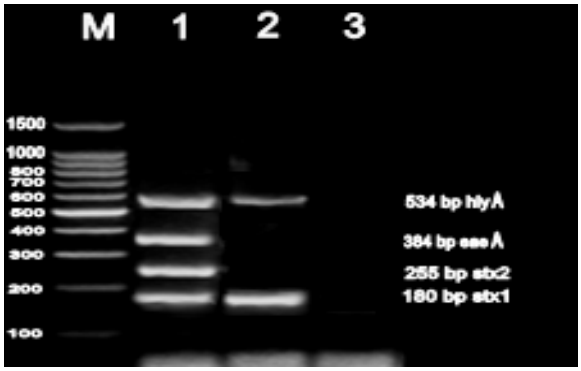
أظهرت نتائج الترحيل على هلام الأكاروز للكشف عن نواتج التضخيم باستخدام زوجين من البادئات المتخصصة لتضخيم تتابع جينات *Stx1* و *Stx2* المشفرة لإنتاج ذيفاني Stx1 وStx2 على التوالي ، ووجود حزم ناتجة عن ارتباط هذه البادئات مع التسلسل المكمل لها في جينوم بعض العزلات . فقد احتوت السلالة المعزولة من اللحم على جينات *Stx1*و *Stx2* معاً مقارنة بالسلالة المعزولة من الجبن التي احتوت على جين *Stx1*. كما لوحظ تماثل حجـوم الحزم المتضاعفة لجـينات *Stx1* ، *Stx2* مع الحجوم المتوقعة تقريباً وهي 180 ، 255 زوج قاعدي على التوالي

شكل (2) . ان نتائج هذه الدراسة تتفق مع نتائج دراسة وجدت أن السلالات المعزولة من اللحم البقري المفروم المحتوية على هذه الجينات هي الأكثر انتشاراً مقارنة بالسلالات المحتوية على جين *Stx2* لوحده [17] .

جدول (6): نتائج تفاعل MPCR لعزلات بكتريا *E.coli*O157:H7

مصدر العزلة البكتيرية		
جبن	لحم	رمز الجين
–	+	***Stx1***
–	+	***Stx2***
+	+	***eaeA***
	+	***hlyA***

+ : نتيجة موجبة (وجود الجين) ، – : نتيجة سالبة (غياب الجين)



شكل (2) : الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التضاعفي المتعدد لسلسلة الدنا لعزلات بكتريا *E. coli* O157: H7 باستعمال البادئات المتخصصة على هلام الاكاروز بتركيز2 % وبفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة
المسارM الدليل الحجمي (100bp DNA ladder)
المسار1 : دنا السلالة المعزولة من اللحم (*hlyA* ، *eaeA* ، *stx1* ، *stx2*)
المسار 2: دنا السلالة المعزولة من الجبن (*hlyA* ، *stx1*)

التحري عن جينات *hlyA*

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز أن كلتا العزلتان تحويان الجينات المشفرة لإنتاج إنزيم تحلل الدم من نوع Enterohemolysin ، حيث ظهرت حزم متماثلة في احجامها الجزيئية الناتجة من ارتباط البادئ المتخصص الذي يستهدف التتابع النوعي لجين *hlyA* والتي كانت مماثلة للحجم المتوقع تقريباً وهو 534 زوج قاعدي شكل (2) . اذ يعطي وجود هذا الجين مؤشرا لامتلاك العزلات لبلازميد ضراوة يرمز له pO157 [18] وان أكثر من 90 % من سلالات STEC منتجة للانتيروهيمولايسين [19] .

كما وجد أن معظم السلالات المعزولة من اللحم والبراز الحاملة لجينات *hly* و *eae* تملك جين *stx2*[17] ، وبالتالي يعد الجين المشفر لإنتاج الانتيروهيمولايسين من عوامل الضراوة الأكثر خطورة في أمراضية البكتريا من جين *eaeA* ، وان العزلات الفاقدة لـهذا الجين تكون اقل أمراضية أو قد تكون غير ممرضة للإنسان [20] .

التحري عن جين *eaeA*

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز للكشف عن نواتج التضخيم باستخدام زوج من البادئات المتخصصة لتضخيم تتابع جينات *eaeA* ظهور حزم ناتجة عن ارتباط هذا البادئ مع التسلسل المكمل له في جينوم العزلة السلالة المعزولة من اللحم وان عدم ظهور حزمة في المسار 2 الذي يمثل دنا السلالة المعزولة من الجبن دلالة على غياب هذا الجين في هذه العزلة .

أشارت الدراسات الى تواجد هذا الجين بنسبة اقل في السلالات المعزولة من الأبقار 17% مقارنة بالسلالات المعزولة من الإنسان 45% [21] ، وأكدت دراسة أخرى عدم احتواء بعض السلالات المعزولة من العينات الغذائية على جين *eaeA* مع تواجده في جميع السلالات المعزولة من العينات المرضية [22] وإن عدم امتلاك

بعض العزلات لجين *eaeA* قد يكون نتيجة لكونه يشفر لبروتين خارج غشائي الذي قد يتعرض لضغط انتخابي يؤدي الى حدوث طفرات في الجين [20] .

المصادر

1. Bettelheim, K.A. (2003). Non-O157 Verotoxin-Producing *Escherichia coli*: A Problem, Paradox, and Paradigm. Supplement. Food Safety Concerns of Vero toxin – producing *Escherichia coli*. Exp. Biol. Med. 228:333-344.
2. Perna, N. T.; Plunket, G.; Burland, V.; Mau, B.; Glasner, J.D.; Rose, D.J.; Mayhew, G.F.; Evans, P.S.; Gregor, J.; Kirkpatrick, H.A.; Posfai, G.; Hackett, J.; Klink, S.; Boutin, A.; Shao, Y.; Miller, L.;Grotbeck, E.J.;Davis, N.W.;Lim, A.;Dimalanta, E.T.;Potamousis, K.D.;Apodaca, J.;Anantharaman, T.S.;Lin, J.;Yen, G.;Schwartz, D.C.;Welch, R.A.; and Blattner, F.R.(2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature 409:529-533.
3. Tsung -Yu, T.; Wan-Ju, L.; Yu-Ju, H.; Kuang-Lo, C. and Tzu-Mi, P.(2006). Detection of Viable Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Using the Combination of Immunomagnetic Separation with the Reverse Transcription Multiplex TaqMan PCRSystem in Food and Stool Samples. J. Food Prot. 69 (10):.2320-2328.
4. Blackburn, C. W. and MacCarthy, J. D. (2000). Modification to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. Int. J. Food Microbiol.55:285-290.
5. Hitchins, A.D.; Feng, P.; Watkins, W.D.; Rippey, S.R. and Chandler L.A. (1998). *Esherichia coli* and the coliform bacteria *in*: U.S. Food and Drug Adiminstration (FDA) Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., Chapter4. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. Washington, U.S.A.
6. Paton, A.W. and Paton, J.C. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx_1, stx_2, *eaeA*, enterohemorrhagic *E coli hlyA*, rfb_{O111}, and rfb_{O157}. J. Clin. Microbiol. 36:598-602.
7. Rangel, J.M.; Sparling, P.H.; Crowe, C.; Griffin, P.M. and Swards low, D.L.(2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg. Infect. Dis. 11(4):603-609.
8. Hussein, H. S. (2007). Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. J Anim. Sci .85: E63-E72.
9. Paton, J.C. and Paton, A.W.(1998).Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. Clin. Microbiol. Rev. 11(3): 450-479.
10. Pra, Pradel, N.; Livrelli, V.; Champs, C.; Palcoux, J.;Reynaud, A.;Scheutz, F.; Sirot, J.;Joly, B.and Forestier, C. (2000). Prevalence and characterization of Shiga toxin during a one producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children year prospective study in France. J.Clin .Microbiol.38 (3):1023 -1031.
11. Ogden, I. D.; Hepburn, N.F. and Macrae, M. (2001). The optimization of isolation media used in immunomagnetic methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. J. Appl. Microbiol. 91:373-379.

12. Blais, B. W.; Booth, R. A.; Phillipe, L. M. and Yamazaki, H. (1997).Effect of temperature and agitation on enrichment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using modified EC broth with novobiocin. Int. J. Food Microbiol.36:221-225.

13. Feng, P. Lampel, K. A.; Karch, H. and Whittam, T. S. (1998). Genotypic and; phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis. 177:1750-1753.

14. Nataro, J. P. and Kaper, J. B. (1998). Diarrhagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11(1): 142-201.

15. Kodaka, H.; Uesaka , Y. and Kashitani F. (2004) . Nissui Glucose Fermentative Gram-Negative Rod Identification System EB-20 Gives a Unique Profile for Typical Non-Sorbitol Fermenting *Escherichia coli* O157:H7 J.Clin. Microbiol. 42(1):354-358.

16. Blanco, J. E. ; Blanco, M. P. ; Alonso, M.P.; Mora, A.; Dhabi, G.; Coira, M. A. and Blanco, J.(2004). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo,Spain, from 1992 through 1999. J. Clin. Microbiol. 42(1):311-319.

17. Fegan, N. and Desmarchelier, P.(2002). Comparision between human and animal isolates of Shiga toxin–producing *Escherichia coli*O157 from Australia. Epidemiol. Infect .128:357-362.

18. Paton, A. W. and Paton, J. C. (2005). Multiplex PCR for Direct Detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Strains Producing the Novel Subtilase Cytotoxin. J. Clin. Microbiol. 43: 2944-2947.

19. Beutin, L.; Bode, L.; O¨zel, M. and Stephan, R. (1990). Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains. J. Bacteriol. 172:6469–6475.

20. Wang, G.; Clark, C.G. and Rodgers, F.G. (2002). Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol . 40 (10): 3613-3619.

21. Blanco, J. ; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; González, E.A.; Bernárdez, M. I. ; Alonso, M. P. ; Coira, A. ; Rodríguez, A.; Rey, J.; Alonso, J. M. and Usera, M. A. (2003). Verotoxin-Producing *Escherichia co*li in Spain: Prevalence, Serotypes, and Virulence Genes of O157:H7 and Non-O157 VTEC in Ruminants, Raw Beef Products, and Humans. Exp. Biol. Med. 228:345-351**.**

22. Paton, A.W.; Ratcliff, R.; Doyle, R .M.; Seymour-Murray, J.; Davos, D.; Lanser, J. A.and Paton, J.C.(1996). Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 34:1622–1627.