ISSN: 1991-8941

التحري عن وجود الجين fimH والجين papG في كل من بكتيريا *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية باستخدام تقنية التضاعف السلسلي لانزيم بلمرة الدنا .

مثنى بديع فرحان* علي صالح الجبوري ** اياد محمد علي العبيدي***

*جامعة الانبار – كلية التربية للبنات

** جامعة تكريت – كلية العلوم

*** جامعة النهرين – كلية العلوم

تاريخ الاستلام:2012/2/26 تاريخ القبول: 2012/7/15

الخلاصة :

جمعت عزلات بكتيريا Escherichia coli من مستشفى الرمادي التعليمي والتي شملت 26 عزلة (12 عزلة من حصى المرارة و 10 عزلات من الحصى البولية و 4 عزلات من القناة الهضمية) اما عزلات بكتيريا Klebsiella pneumonia فشملت 14 عزلة (4 عزلات من حصى المرارة و 6 عزلات من الحصى البولية و 4 عزلات من القناة الهضمية) وقد بينت نتائج التحري عن وجود جينات الالتصاق والمتمثلة بجينات fimHالمسؤولة عن التشفير لخمل النمط الاول الحساس للمانوز وثلاثة طرز لجينات papG المسؤولة عن التشفير لخمل النمط الاول المقاوم للمانوز ان %(50–60) من بكتيريا E. coli و(83.33%) K. pneumoniae المعزولة من الحصى البولية امتلكت جين fimH ولكنها لم تظهر وجود هذا الجين في جميع عزلات حصى المرارة والقناة الهضمية اما بالنسبة لجين papG فقد بينت النتائج امتلاك عزلات بكتيريا E. coli المعزولة من حصى المرارة لكل من جينات papGIII و papGII و papGI بنسبة 100% و 50% و 16.67% على التوالي في حين اظهرت عزلات بكتيريا E. coli المعزولة من الحصى البولية امتلاكها لجينات papGIII و papGII وبنسبة 70% و 20% على التوالي ولم يظهر وجود لجين papGI اما عزلات بكتيريا E. coli المعزولة من القناة الهضمية فقد اظهرت امتلاكها لجينات papGIII و papGII بنسبة 25% و 50% على التوالي وعدم امتلاكها للجين papGI اما عزلات بكتيريا K. pneumoniae المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية فلم تمتلك لأي من جينات papG الثلاثة .

كلمات مفتاحيه : جين fimH ، الجين papG ، *Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae* ، تقنية التضاعف السلسلي لانزيم بلمرة الدنا

المقدمة :

لضمان حصول الاصابة بالمرض لابد ان تمتلك البكتيريا المرضية القدرة على الوصول الى النسيج او العضو الملائم ومن ثم استعمار المنطقة وهذا له علاقة بقدرة هذه البكتيريا على اختراق الاغشية المخاطية واجتياح جسم المضيف وبالتالي فان استعمار منطقة الاصابة يبدأ من قدرة هذه البكتيريا من الالتصاق بواسطة الخمل النوعي الذي تمتلكه هذه البكتيريا وارتباطه بمستقبلات نوعـية توجد في الخلايا المبطنة للغشاء المخاطي لمنطقة الاصـابة(1) , ويعتبر الخمل النوعي من النمط الاول المقاوم للمانوز Mannose resistance Type–1 وهو الخمل P من الانواع المهمة التي تساعدالبكتيريا على الالتصاق بالخلايا الطلائية لمنطقة الصفراء لمرضى حصى المرارة والجهاز البولي لمرضى الحصى البولية ويوجد في كل من سلالات بكتيريا *E. coli* والسلالات الاخرى من بكتيريا العائلة المعوية (3,2), وتعتبر جينات *Pap*G المسؤول عن التشفير للخمل P من عوامل الامراضية Virulance المهمة لاحداث المرض وخصوصا في حويض الكلية بالاضافة الى ذلك فان الخمل النوعي الاخر وهو الخمل *fim*H هو ضمن النمط الاول

لكن الحساس للمانوز Mannose sensitive وله دور في امراضية بكتيريا *E. coli* من خلال مساعدتها على الالتصاق باغشية الخلايا (4) . لذا ارتاينا في بحثنا هذا الكشف عن وجود جين *fim*H وجينات *pap*G المتمثلة بجينات *pap*GI و papGII و *pap*GIII في بكتيريا العائلة المعوية الاكثر شيوعا لكل من مرضى حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية وهما بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* .

المواد وطرائق العمل :

عزل وتشخيص البكتيريا : عزلت كل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* من عينات حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية (براز) من مستشفى الرمادي التعليمي للفترة من 2010/5/24 ولغاية 2011/3/17 اذ تم اجراء الزرع البكتيري بعد الحصول على العينات مباشرة وذلك باستخدام الطرق التقليدية المتبعة لزرع العينات مع مراعاة الظروف المعقمة ابتداءاً من مرحلة اخذ العينات .ولغرض تشخيص العزلات أجريت الاختبارات الكيموحيوية بالاعتماد على مصنف بركي (5) وما تم إجرائه وفق (6) لغرض تأكيد تشخيص البكتيريا كما تم استعمال عدة التشخيص API System وهي API 20 E . وشملت العزلات البكتيرية 26 عزلة لبكتيريا *E. coli* تمثلت بـ 12 عزلة من حصى المرارة و 10 عزلات من الحصى البولية و 4 عزلات من القناة الهضمية (عينات برازية),اما بكتيريا *K. pneumoniae* فقد شملت 14 عزلة بكتيرية تمثلت بـ 4 عزلات من حصى المرارة و 6 عزلات من الحصى البولية و 4 عزلات من القناة الهضمية (عينات برازية).

استخلاص الدنا الجينومي : استخلصت عينات الدنا الجينومي للعزلات البكتيرية لبكتيريا *E. coli* و بكتيريا *K. pneumoniae* باستخدام عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتيريا السالبة لصبغة گرام المنتجة من قبل شركة بروميكا (Promega) ذي الرقم التسلسلي A1120 باسم منتج Wizard® Genomic DNA Purification Kit,وقد تم اجراء الاستخلاص في مختبر الاحياء الجزيئي في مركز بحوث التقنيات الاحيائية–كلية العلوم–جامعة النهرين (الجادرية–بغداد).

البادئات المستخدمة : استخدمت البادئات النوعية المجهزة من شركة Alpha DNA للكشف عن بعض الجينات الخاصة لكل من بكتيريا *E. coli* و *K.* وهي البادئات النوعية الخاصة للكشف عن جينات الالتصاق لكل من خمل النمط الاول الحساس للمانوز Type-1 Mannose Sensitive (MS) وهو الجين *fim*H وخمل النمط الاول المقاوم للمانوز Type-1 Mannose Resistance وهي جينات *pap*G التي شملت كل من جينات الموضحة في الجدول (1) .

التفاعل السلسلي لانزيم بلمرة الدنا (PCR) : تم اجراء هذا الاختبار في مختبرات قسم علوم الحياة–كلية التربية للبنات–جامعة الانبار وحسب توصيات الباحثين (10,9,8,7) كما موضح في الجدول (1) لعمل مزيج تفاعل الـ PCR باستخدام بادئات نوعية للكشف عن كل جين لكل من جينات الالتصاق لبكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية بالاضافة الى استخدام البرنامج الحراري الخاص بجهاز المبلمر الحراري Thermal Cycler المجهز من شركة Applied Biosystem موديل 2700 كما موضح بالجدول(1). تم اجراء تفاعل الـ PCR مع جميع عزلات بكتيريا *E. coli* البالغ عددها 26 عزلة وثلاثة عزلات من بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية وذلك باستخدام البادئات *fim*H1 و *fim*H2 وجينات *pap*G ,اما البادئات *fim*H الخاصة لبكتيريا *K. pneumoniae* فقد تم اجراء تفاعل الـ PCR مع جميع عزلات هذه البكتيريا البالغ عددها 14 عزلة وثلاثة عزلات من بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية , وقد تم اجراء التفاعل المضاعف لـ PCR (Multiplex PCR) لجميع مزيج بادئات *pap*G لجينات *pap*GI و *pap*GII و *pap*GIII في تفاعل واحد لـ PCR.

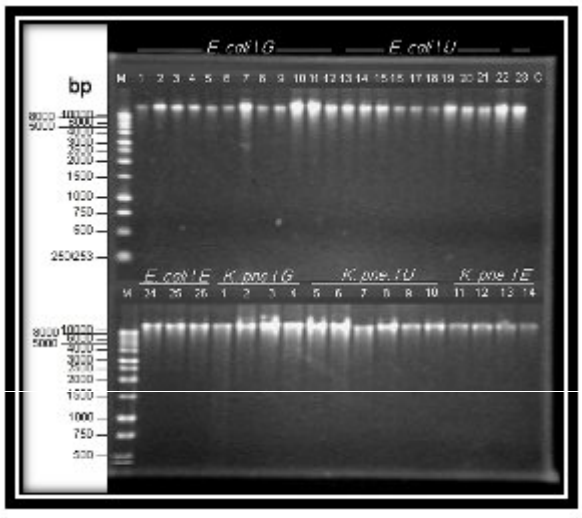
الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز : اجري الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز لكل من نواتج الـ PCR مع البادئات النوعية لكل من جينات *fim*H1 و *pap*G بتركيز 2% لهلام الاكاروز والدليل الحجمي 100 bp المجهز من شركة بروميكا , اما مع بادئات الجين *fim*H فاستخدم تركيز 1.5% لهلام الاكاروز واستخدم اما بادئات الجين *fim*H2 فاستخدم تركيز 1% لهلام الاكاروز واستخدم ايضا الدليل الحجمي1Kbp المجهز من شركة بروميكا في الترحيلين, وقد استخدم لجميع حالات الترحيل الكهربائي تيار كهربائي بفرق جهد وقدره 5 فولت لكل سنتمتر واحد من طول حوض الترحيل وبعد انتهاء الترحيل الكهربائي تم تصوير حزم الدنا الجينومي الهدف المتضخمة والمرحلة في هلام الاكاروز باستخدام جهاز تصوير حزم الدنا بواسطة الاشعة الفوق البنفسجية Gel documentation المجهز من شركة Major Science.

الجدول (1): البادئات النوعية ومواقع الجين الهدف الخاصة لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* مع البرنامج الخاص لجهاز المبلمر الحراري وحسب البادئات المستخدمة(F : Forward , R : Reverse / د: دقيقة , ثا: ثانية , ^{o}م : درجة مئوية).

اسم البادىء	تسلسل القواعد 3→5	الجين الهدف والبكتيريا	برنامج جهاز المبلمر الحراري			المصدر
			درجة الحرارة	الوقت	الدورات	
*fim*H1-F fimH1-R	AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG TTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC	*fim*H *E. coli*	94 ^{o}م	4 د	1	7
			(72,60,94) ^{o}م	(60,30,30) ثا	30	
			–	2 ثا	تضاف	
*fim*H2-F *fim*H2-R	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	*fim*H *E. coli*	95 ^{o}م	2.30 د	1	8
			(72,60,94) ^{o}م	(60,30,30) ثا	30	
			72	10	1	
*fim*H-F *fim*H-R	CACGCAAGGCACCATTC GCTCAGAATCAACATCGGTAAC	*fim*H *K. pneumon-iae*	94 ^{o}م	5	1	9
			(72,58,94) ^{o}م	(1,1,1) د	25	
			72 ^{o}م	10 د	1	
PapGI-F *PapGI*-R *PapGII*-F *PapGII*-R *PapGIII*-F *PapGIII*-R	TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT TGGCATCCCCCAACATTATCG GGGATGAGCGGGCCTTTGAT CGGGCCCCCAAGTAACTCG GGCCTGCAATGGATTTACCTGG CCACCAAATGACCATGCCAGAC	*pap*G *E. coli*	95 ^{o}م	7 د	1	10
			(72,68,94) ^{o}م	(3,2,1) د	10	
			(72,94) ^{o}م	(4,1) د	15	
			72 ^{o}م	10 د	1	

النتائج والمناقشة :

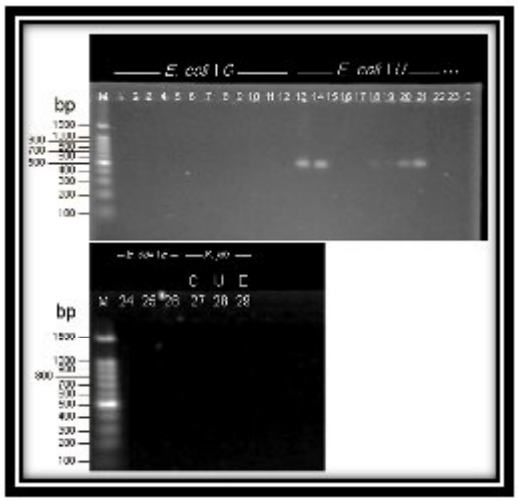
استخلاص الدنا (DNA):تم التاكد من توحيد التراكيز لجميع عينات الدنا المستخلصة من عزلات بكتيريا *E. coli* البالغ عددها 26 عزلة و *K. pneumoniae* البالغ عددها 14 عزلة وذلك بعد اجراء التخافيف المطلوبة لتركيز الدنا الاصلي الذي تم ضبط حساب تركيزه مسبقا باستخدام جهاز QuantiFluor™-P Handheld Fluorometer المجهز من شركة برومیکا وكما موضح بالصورة (1) والتي استخدم فيها تركيز الدنا الخزين 100 n \ µl .



الصورة (1) ترحيل جينوم جميع العزلات البكتيرية لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumonia* / c معاملة سيطرة /M: الدليل الحجمي/ G: عزلات حصى المرارة/ U: عزلات الحصى البولية/ E: عزلات القناة الهضمية.

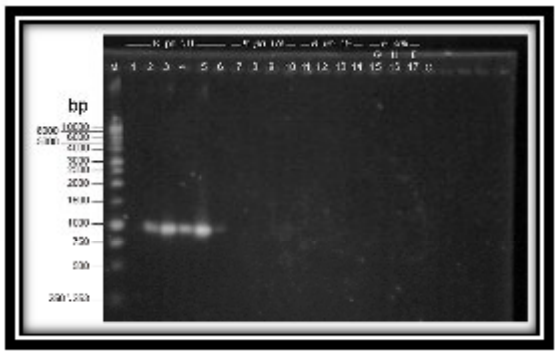
بادئات *fim*H1 و *fim*H2:اظهرت النتائج ان الحزم الناتجة من التضاعف لعينات دنا الجينومي الهدف باستخدام البادئين *fim*H1F/*fim*H1R وجود جين *fim*H في خمسة عزلات بكتيريا *E. coli* فقط والمعزولة من الحصى البولية وبنسبة 50% من مجموع عزلات هذه البكتيريا المعزولة من الحصى البولية في حين لم يظهر هلام الاكاروز وجود اي حزمة من الجين *fim*H في جميع عزلات حصى المرارة والقناة الهضمية لبكتيريا *E. coli* كما موضح بالصورة(2) في حين اظهرت النتائج ان الحزم الناتجة من التضاعف لعينات دنا الجينومي الهدف باستخدام البادئين *fim*H2F/*fim*H2R وجود جين *fim*H في ستة عزلات بكتيريا *E. coli* فقط والمعزولة من الحصى البولية ايضا وبنسبة 60% من مجموع عزلات هذه البكتيريا المعزولة من الحصى البولية في حين لم يظهر هلام الاكاروز وجود اي حزمة من الجين *fim*H في جميع عزلات حصى المرارة والقناة الهضمية لبكتيريا *E. coli* كما موضح بالصورة (3) وقد اثبت سابقا عدم وجود هذا الخمل النوعي عند اجراء اختبارات التلازن الدموي باضافة سكر المانوز لدم خنزير غينيا مع العزلات البكتيرية وخصوصا بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة(6,3), وقد وجد ان هذا الخمل يمكن ان يكون صفة موجودة لدى الكثير من العزلات البكتيرية التي تصيب الجهاز البولي وان جين *fim*H يمكن ان يكون غالبا محمولا في البلازميد واحيانا يكون محمولا في الكروموسوم (11,7,3) وهذا قد يكون تفسيرا في كون عدد من عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من الحصى البولية قد اعطت نتيجة موجبة لظهور حزم دنا لجين *fim*H لكل من البادئات النوعية المستخدمة وبالتالي هنالك احتمالية فقدان البلازميد الحامل لهذا الجين وخصوصا في عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من الحصى البولية والقناة الهضمية, ومن جهة اخرى فقد اكد الباحثين ان الاوساط الزرعية المعقدة مثل الوسط الزرعي المرق المغذي Nutrient broth ومرق تربتيكيز الصويا Trypticase soya broth فانهما يجعلان البكتيريا غير قادرة على انتاج خمل النمط الاول*fim*H (13,12) اما بكتيريا *K. pneumoniae* فلم تظهر امتلاكها لجين *fim*H باستخدام البادئين *fim*H1F و *fim*H1R في مزيج تفاعل الـ PCR وهذا طبيعي لكون ان تركيب جين *fim*H يختلف من بكتيريا لاخرى حسب اختلاف انواعها واجناسها وذلك لوجود تغايرات في تركيب هذا الخمل من بكتيريا لاخرى وقد تصل نسبة التغاير الى 99% لتسلسل الاحماض الامينية للخمل *fim*H وبالمقابل فان الشفرة الوراثية ستختلف من بكتيريا لاخرى (14),وبالتالي فان البادئين المستخدمين قد يكونان غير مناسبين لانهما لم يجدا موقع الارتباط المناسب في جين *fim*H وبالتالي عدم ظهور حزم الدنا لهذا الجين ,وقد وجد ان الجين المسؤول عن التشفير لخمل النمط الاول الحساس للمانوز وهو جين *fimH* يختلف تركيبه الوراثي لكل من بكتيريا *E. coli* وبكتيريا *K. pneumoniae* (15).

الصورة(2) الترحيل الكهربائي لعينات الدنا الجينومي الهدف لجين *fim*H لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* باستخدام البادئين *fim*H1F/*fim*H1R عزلات حصى المرارة / U عزلات الحصى البولية/ E عزلات القناة الهضمية/ M الدليل الحجمي 100bp / C معاملة السيطرة , نلاحظ ظهور الحزم لخمسة عزلات *E. coli* المعزولة من الحصى البولية فقط .



الصورة(3) الترحيل الكهربائي لعينات الدنا الجينومي الهدف لجين *fim*H لكل من بكتيريا E. coli و *K. pneumoniae* باستخدام البادئين fimH2F/fimH2R عزلات حصى المرارة / U عزلات الحصى البولية/E عزلات القناة الهضمية/ M الدليل الحجمي 100bp / C معاملة السيطرة , نلاحظ ظهور الحزم لستة عزلات من بكتيريا *E. coli* المعزولة من الحصى البولية فقط .

بادئات *fim*H : اظهرت النتائج ملاحظة حزم الدنا الجينومي الهدف المرحلة في هلام الاكاروز لخمسة عينات من دنا بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى القناة البولية بنسبة 83.33% في حين لم تظهر اي حزمة دنا لهذه البكتيريا المعزولة من حصى المرارة والقناة الهضمية كما موضح في الصورة(4) مما يرفع من احتمالية عدم امتلاك البكتيريا المعزولة من حصى المرارة على الطراز الوراثي الخاص لجين الالتصاق *fim*H او ان هذا الجين هو صفة محمولة في الدنا البلازميدي وتم فقده من قبل البكتيريا وعموما فان هذه النتيجة تؤكد ماتم الحصول عليه من قبل الباحثين العاني و ملكونيان, عام 2002 (16) على البكتيريا المعزولة من حصى المرارة وذلك من خلال عدم وجود الطراز المظهري لخمل النمط الاول الحساس للمانوز عند اجراء اختبارات التلازن الدموي للكشف عن وجود هذا النوع من الخمل لجميع البكتيريا المعزولة من حصى المرارة والتي كان من بينها عزلات لبكتيريا *K. pneumoniae* ,اما فيما يخص عدم ظهور حزم الدنا لعزلات بكتيريا *K. pneumonia* المعزولة من القناة الهضمية فان جين *fim*H يمتلك عدة طرز وراثية ممكن ان تختلف في التركيب الوراثي لتسلسل النيوكليوتيدات لكنها تتشابه في الطراز المظهر لخمل الالتصاق *fim*H (17)وبالتالي قد يكون البادئين غير مناسبين ليجدا موقع الارتباط المناسب لجين *fim*H لكلا شريطي الدنا المنفصلين خلال تفاعل اختبار الـ PCR ومن جهة اخرى قد يكون هذا الجين محمولا في الدنا البلازميدي وليس في الدنا الكروموسومي لذا فان عينات الدنا التي لم تظهر وجود حزم الدنا المتضاعفة لجين *fim*H قد تكون قد فقدت هذا البلازميد وكلا هذين التفسيران قد ينطبقان على عينات الدنا الثلاثة لبكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة وحصى القناة البولية والقناة الهضمية والتي لم تظهر وجود أي حزمة من الحزم المتضاعفة , اما بخصوص ظهور الحزم المتضاعفة بنسبة 83.33% من عينات الدنا لبكتيريا *K. pneumonia* المعزولة من حصى القناة البولية فان هذه النتيجة جاءت مقاربة لما توصل اليه (17) عند استعماله لنفس البادئين *fim*HF و *fim*HR اذ كانت نسبة وجود هذا الجين في 65 عزلة بكتيرية لبكتيريا *K. pneumonia* 87.5% والتي تضمنت نسبة 90.4% من عزلات هذه البكتيريا من منطقة الجهاز البولي ونسبة 80% من عزلات هذه البكتيريا من مجرى الدم للاشخاص المصابين وقد عزى ذلك ان هذه البكتيريا وخصوصا البكتيريا المعزولة من منطقة الجهاز البولي قد تمتلك جميعها لهذا الخمل ولكن نظرا للتغاير الوراثي في التركيب الجيني لهذا الخمل قد لا تظهر جميع هذه العزلات انها تمتلك هذا الطراز الوراثي للجين بالرغم من وجود الطراز المظهري له .

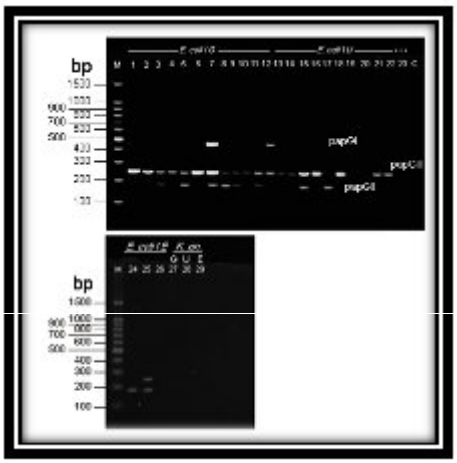


الصورة (4) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا باستعمال البادئين *fim*HF , *fim*HR / M : الدليل الحجمي 1Kb مجهز من شركة بروميكا / U : عزلات الحصى البولية / G : عزلات حصى المرارة / E : عزلات القناة الهضمية / C : معاملة السيطرة بدون عينة الدنا / bp : زوج من القواعد النتروجينية.

مزيج بادئات papG : بينت النتائج كما موضح بالصورة (5) ان هنالك تفاوتا بين وجود جينات الالتصاق الثلاثة في عينات الدنا للعزلات البكتيرية التابعة لبكتيريا *E. coli* فقد اظهرت عينات الدنا لعزلات هذه البكتيريا وجود جين *pap*GIII في جميع عزلاتها المعزولة من حصى المرارة من خلال ظهور حزم الدنا في هلام الاكاروز في حين ظهرت هذه الحزم في ستة واثنين من عينات الدنا لعزلات من بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة لكل من جين *pap*GII و *pap*GI بالتتابع وقد اوضح الباحثين وجود الخمل النوعي p في جميع عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة من خلال اختبارات التلازن الدموي(3), وقد بينت نتائج دراستنا ان هذا النوع من الخمل ممكن ان يشفر للجزء القمي منه بنسبة 100% من خلال وجود الجين الهدف *pap*GIII وبنسب 50% لجين الهدف *pap*GII وبنسبة 16.67% لجين الهدف *pap*G1 وذلك من خلال ظهور الحزم المضاعفة لقطع الدنا

المرحلة في هلام الاكاروز . اما عينات الدنا لعزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من الحصى البولية فقد ظهرت حزم الدنا المتضاعفة لجين *pap*GIII بنسبة اكبر من الجينين الاخرين اذ اعطت 8 (بنسبة 70%) منها نتيجة موجبة لظهور الحزم في حين ظهرت حزمتين فقط (بنسبة 20%) لجين الهدف *pap*GII في حين لم تظهر اي حزمة دنا لجين الهدف *pap*GI وان هذا الاختلاف في نسب وجود هذه جينات الهدف الثلاثة ينطبق مع ما توصل اليه العديد من الباحثين الذين حاولوا الكشف عن وجود هذه الجينات في عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من حالات التهاب القناة البولية وخصوصا فيما يتعلق في عدم وجود الجين الهدف من النوع *pap*GI الذي يعتقد انه يمتلك تسلسلات فريدة Unique من النيوكليوتيدات وانه قد يوجد في سلالة واحدة فقط من سلالات بكتيريا *E. coli* (10) , وقد وجد ان تجمعات Cluster جين *pap* هي التي تشفر للخمل من نوع P وان اختبار التحليل للتعرف على تعاقب القواعد النتروجينية في الدنا DNA Sequencing Analysis اثبتت ان هنالك اختلاف في تعاقب هذه القواعد لجين *pap* والمتمثلة بجينات *pap*GI و *pap*GII و *pap*GIII والتي كل منها يشفر الى نوعية معينة من قمة الخمل P تساعد البكتيريا على الالتصاق النوعي بالخلايا الطلائية وقد وجد نفس الباحثين ان نسبة وجود جينات *pap*G في DNA عيناته لبكتيريا *E. coli* البالغة 244 عينة كانت 71% (18), ونجد على غرار ذلك ان نتائجنا اثبتت ان غالبية عينات دنا لبكتيريا *E. coli* احتوت في الدنا التابع لها على الجين *pap*GIII وبفارق كبير عن *pap*GII وهذا لا يتفق اذا ما تم مقارنة نتائج دراستنا مع ما توصل اليه الباحثين (18) اذ كانت السيادة في نتائجهم لجين الهدف *papG*II وبنسبة 42% والجين الهدف *pap*GIII بنسبة *23*% في حين اتفقت نتائجنا مع وجده نفس الباحثين بخصوص الجين الهدف *pap*GI لم يكن هنالك وجود لجين الهدف *pap*GI في عينات الدنا لبكتيريا *E. coli* في دراستهم . اما بالنسبة لعينات دنا لبكتيريا *E. coli* المعزولة من القناة الهضمية فقد اعطت عينتين (24 , 25) من مجموع اربع عينات نتيجة موجبة في ظهور حزم الدنا لجين الهدف *pap*GII في حين اعطت عزلة واحدة نتيجة موجبة الجين الهدف *pap*GIII كما موضح في الصورة (5) وقد وجد ان من مجموع 74 عينة دنا لعزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من القناة الهضمية (ماخوذة من عينات برازية) كانت نسبة وجود الجين الهدف *pap*G 20% وقد كانت نسبة وجود الجين الهدف papGII 18% في حين كانت نسبة وجود الجين الهدف *pap*GIII 5% في حين لم يكن هنالك وجود لجين الهدف *pap*GI (18) وهذه النتيجة الاخيرة اتفقت مع ما تم التوصل اليه في دراستنا وهذا ما يؤكد ان الجين الهدف *pap*GI قد يكون موجودا فعلا في سلالة واحدة فقط لم تكن ضمن عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من القناة الهضمية وبما ان عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة قد اعطت عينات الدنا لها في دراستنا وجود حزم المضاعفة لجين الهدف *pap*GI في عزلتين من عزلات حصى المرارة وهما العزلة رقم 7 والعزلة رقم 12 فقد يدل ذلك ان هذه السلالة من الممكن ان يكون تواجدها في منطقة الشجرة الصفراوية اكثر من اي بيئة اخرى من جسم الانسان.وحسب الصورة (5) بينت نتائج ظهور الحزم المضاعفة من الدنا لجينات الهدف الثلاثة التي تشفر للخمل من نوع P ان هذه الجينات ممكن ان يوجد واحد او اثنان منها في نفس العزلة البكتيرية لبكتيريا *E. coli* فكل من الجين الهدف *pap*GI و *pap*GII و *pap*GIII وجد في العزلة البكتيرية رقم 7 اما وجود اثنين من الجينات في نفس العزلة فقد لوحظ لجين الهدف لكل من *pap*GI و *pap*GIII فقد وجد في العزلة رقم 12 اما كل من الجينين الهدف *pap*GII و *pap*GIII فقد وجدا في عزلات رقم (11,9, 8,5,3) لعزلات حصى المرارة والعزلة رقم 15 من عزلات الحصى البولية والعزلة رقم 25 من عزلات القناة الهضمية ,اما وجود جين واحد فقط من جينات الهدف فقد تمثل بوجود الجين الهدف *pap*GII لوحده في عزلتين فقط هما العزلة رقم 17 وهي احدى عزلات الحصى البولية والعزلة رقم 24 وهي احدى عزلات القناة الهضمية , وكذلك وجود الجين الهدف *pap*GIII لوحده لعزلات رقم (10,6,4,2,1) من عزلات حصى المرارة والعزلات رقم (22,21,18,16,14,13) من عزلات الحصى البولية . ويلاحظ من النتائج عدم ظهور حزم الدنا المتضاعفة لثلاثة عزلات من بكتيريا *E. coli* هما العزلتين ذات رقمي (19 , 20) من عزلات الحصى البولية والعزلة رقم 23 من عزلات القناة الهضمية وقد اثبت هذا التباين في وجود الجينات الهدف *pap*G في سلالات بكتيريا *E. coli* من قبل العديد من الباحثين والذي قد يفسر حاجة هذه البكتيريا الى اكثر من جين واحد للتشفير عن الخمل P الضروري للالتصاق بالخلايا الطلائية بعملية تنظيمية تساعدها في تحفيز تكوين هذا الخمل في مختلف الظروف (19),وحتى العزلات البكتيرية التي لم تظهر وجود حزم الدنا المتضاعفة في هلام الاكاروز فهذا لا يعني عدم امتلاكها للخمل P وذلك لان هذا الخمل يشفر له اكثر من جين واحد لكونه يكون مكون من مكونات متغايرة في تركيبه فهناك مثلا الجين *pap*A يمكن ان يشفر لنهاية امامية مختلفة للخمل P (19).اما عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* الثلاثة المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية لم تظهرجميعها اي حزم دنا لجينات الهدف الثلاثة *pap*GI و *pap*GII و *pap*GIII وهذا يدل على احتمالية عدم امتلاك هذه العزلات من البكتيريا لهذا النوع من الخملP,ولكن الاكثر احتمالا ان البادئات المستخدمة لم تجد ما تتكامل معه من مواقع معينة في شريطي الدنا وبالتالي عدم تضاعف الموقع الهدف من جينات *pap*G خلال مراحل اختبار الـ PCR وبالتالي عدم ظهور الحزم

المتضاعفة المرحلة في هلام الاكاروز وقد ذكر العديد من الباحثين ان بكتيريا *K. pneumoniae* تمتلك للخمل المقاوم للمانوز ولكن الجينات المسؤولة عنها تختلف في تركيبها الوراثي عن ما هو موجود في بكتيريا *E. coli* وفي نفس الوقت لاتتوفر معلومات كافية سوى دور هذا الخمل في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm خارج جسم الكائن الحي (في المختبر) (15).



الصورة (5) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا باستعمال البادئات الخاصة لجينات *pap*G / M : الدليل الحجمي 1Kb مجهز من شركة بروميكا / U : عزلات الحصى البولية / G : عزلات حصى المرارة / E : عزلات القناة الهضمية / C : معاملة السيطرة بدون عينة الدنا / bp : زوج من القواعد النتروجينية .

المصادر :

1−Wizemann, T. M.; Adamou, J. E. and Langermann, S. (1999) . Adhesins as targets for vaccine development. Emerging Infec. Dis., 5(3): 395-403.

2-Oudega,B.andGraaf,F.K.(1988).Genetic organization and biogenesis of adhesive fimbriaeof *Escherichia coli* . Biomed. and Life Sci. ,54(4):285-299.

3-Wetter, L.A. ;Hamadeh,R.M.;Griffiss,J.M. ;Oesterle,A.;Aagaard,B.andWay,L.W.(1994). Differences in outer membrane characteristics between gallstone–associated bacteria and normal bacterial flora.Lancet,343:444-448.

4- Knobl, T. ; Gomes, T. A. ; Vieira, M. A. ; Bottinoa, J. A. and Ferreira, A. J. (2004) . Detection of *pap, sfa, afa* and *fim* adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli* . Intern. J. Appl. Res. Vet. Med. , 2 (2); 135-141.

5- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath. P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T.(1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth edition, Williams and Wilkins, U.S.A.

6- Collee, J.G. ; Fraser, A.G.;Marmion,B.P. andSimmons,A.(1996).Practical Medical Microbiology,fourteenth edition,Vol.1,Churchill Livingstone, New York.

7- Mladin, C. ; Usein, C, ; Chifiriuc, M. ; Andi-Palade ; Luminita, C. ; Slavu, A. ; Negut, M. and Damian, M. (2009) . Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patietns with neurogenic bladder . Roman. Biotech. Let. ,14(6): 4900-4905 .

8-Erjavec, M. S. and Bertok, D. Z. (2008) . Prevalence, distribution and genetic association of adhesin gene sequences of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Slovenia . Acta Biol. Slov. , 51 (1): 21-31 .

9-Anderia,F.(2009). Determenantes genetics of virulence bacteria wich relation with urinary tract infection and primary of bacteremia . Master thesis of Human Microbiologe , Lishbona university , secience college , pp:38 .

10-Johnson, J. R. and Brown, J. J. (1996) . A Novel Multiply Primed Polymerase Chain Reaction assay for identification of variant *pap*G genes encoding the Gal(α-l-4)Gal-Binding PapG adhesins of *Escherichia coli* . J. Infec. Dis. , 173: 920-926.

11Aprikian,P.;Tchesnokova,V.;Kidd,B.;Yakovenko, O.;YarovYarovoy,V.;Trinchina,E.;Vogel,V.;T homas,W.andSokurenko,E.(2007).Interdomain Interaction in the FimH Adhesin of *Escherichia coli* Regulates the Affinity to

Mannose.J.Biolog.Chem.,282(32):23437-23446

12-Jones ,C.H.;Pinkner,J.S.;Roth,R.: Heuser ,J.; Nicholes , A.V. ; Abraham , S. : HultgrenS.J.(1993).*Fim*C is a periplasmic PapC like chaperone that directs assembly of type – 1 pili in bacteria . Proc. Natl . Acad . Sci . USA. , 90:8397 – 8401.

13-Jones,C.H.;Pinkner,J.S.;Roth,R.; Heuser,J.;Nicholoes,A.V.;Abraham, S. N. ; and Hultgren S.J.(1995). *fim*H adresin of type – 1 pili is assembled into afibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. Proc. Natl. Acad . Sci. USA. , 92: 2081 – 2085.

14-Thomas,W.E.;Trintchina,E.;Forero,M.; Vogel,V. and Sokurenko,E.V.(2002). Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force.Cell,109: 913-923.

15-Struve, C. ; Bojer, M. and Krogfelt, K. A. (2008) . Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 fimbriae by detection of Phase variation during colonization and infection and impact on virulence . Infec. and Imm. , 76 (9): 4055-4065 .

16-Al-Ani, B.F. and Milkonian, A.G. (2002). The role of bacteria in the formation of some kindes of gallstone disease. Thesis of M. Sc. , Biology department, Science college, Baghdad University .

17-Stahlhut, S. G. ; Chattopadhyay, S. ; Struve, C. ; Weissman, S. J. ; Aprikian, P. ; Libby, S. J. ; Fang, F. C. ; Krogfelt, K. A. and Sokurenko, E. V. (2009) . Population variability of the *fim*H Type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae* . J. Bacter. , 191 (6): 1941-1950 .

18-Johanson, M. ; Plos, K. ; Marklund, B. and Svanborg, C. (1993) . Pap, papG and prsG DNA sequences in *Escherichia coli* from the fecal flora and the urinary tract . Micro. Patho. , 15: 121-129 . (Abstract) .

19- 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 a J96-Like clonal groupof uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of *pap*G . Infec. and Imm. , 65 (6): 2153-2159 .

20-Melican,K.;Sandoval,R.M.;Abdul- Kader ;Josefsson,L.;Tanner,G.A.;Molitoris, B.A.andRichter-Dahlfors,A.(2011) . Uropathogenic *Escherichia coli* P and type1fimbriae act in synergy in living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction.PLoS Pathogens,7(2):100-112

DETECTION FIMH AND PAPG GENES OF ESCHERICHIA COLI AND KLEBSIELLA PNEUMONIA ISOLATED FROM GALLSTONE , URINE STONE AND GASTROINTESTINAL CANAL BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) .

MUTHANA BADEEA FARHAN ALI SALIH HUSSAIN AYAD MOHAMED ALI
E.mail: scianb@yahoo.com

ABSTRACT :

During this work twenty six isolates of Escherichia coli were collected (12 from gallstones , 10 from urin stones and 4 from gastrointestinal canal) and 14 isolates of Klebsiella pneumonia (4 from gallstones , 6 from urine stones and 4 from gastrointestinal canal) from Al-Ramadi Teaching Hospital. The resulte about Detection of fimH gene which are responsible for coding to Mannose sensitive fimbriae and three types of papG genes which are responsible for coding to Mannose resistance fimbriae showed (50-60)% of E. coli and (83.33%) of K. pneumoniae both of bacteria were isolated from urine stones only have fimH gene. E. coli isolates from gallston have papGI gene (16.67%) , papGII (50%) and papGIII gene (100%), While E. coli isolates from urine stone have papGII (20%) and papGIII (70%), While E. coli isolates from gastrointestinal canal have papGII (50%) and papGIII (25%), but K. pneumonia isolates didn,t possess any of three papG genes.