P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2012 ,( 6), ( 3 ) :01-08
مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)
Open Access

# التحري عن وجود الجين uidA والجين ureA 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

**معلومات البحث:**
تاريخ التسليم: 2012/2/26
تاريخ القبول: 2012/7/15
تاريخ النشر: 8/29 / 2013
DOI: 10.37652/juaps.2012.76846

**الكلمات المفتاحية:**
الجين uidA ،
الجين ureA ،
*Escherichia coli* ،
*Klebsiella pneumoniae* ،
تقنية التضاعف السلسلي لانزيم بلمرة الدنا.

**الخلاصة:**

جمعت العزلات البكتيرية من مستشفى الرمادي التعليمي من مجموع كلي للعينات التي شملت 65 عينة حصى مرارة و42 عينة من الحصى البولية و 8 عينات برازية وقد شملت عزلات بكتيريا Escherichia coli 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 النتائج امتلاك جميع عزلات بكتيريا E. coli المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية لجين uidA المسؤول عن التشفير لانزيم بيتا–كلوكورونيداز وعدم امتلاكها لجين ureA المسؤول عن التشفير لانتاج انزيم اليورياز في حين لم تظهر عزلات بكتيريا K. pneumoniae التي تم اختيارها عشوائيا وجود الجين uidA لكن اظهرت جميع عزلاتها وجود الجين ureA

## المقدمة

ان لبكتيريا Escherichia coli الدور الرئيسي بشكل غير مباشر في بداية تكوين نواة حصى الصبغة البنية والجزء الصبغي ان وجد لبعض الانواع الاخرى من حصى المرارة من خلال انتاجها انزيم بيتا كلوكيورونيداز B-glucuronidase (6,5,4,3,2,1) . اما فيما يخص الحصى البولية فقد تم اكتشاف دور البكتيريا في تكون حصى الكلية او القناة البولية منذ عام 1901 م (7) , وتكون البكتيريا المنتجة لانزيم اليورياز دور في وجودها مرافقة لبعض انواع الحصى البولية كالحصى التي تحتوي على الستروفيت Struvite وابيتات الكاربونات carbonate apatite ويورات الامونيوم ammonium urate اذ ان انزيم اليورياز له دور مهم في تكوين بعض من هذه الحصى البولية (8) . ان بكتيريا E. coli هي اكثر البكتيريا المعوية التي يتم عزلها من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية وتاتي بالمرتبة الثانية غالبا بكتيريا K. pneumonia (8,1) لذلك شملت دراستنا كل من هذين النوعين من البكتيريا المعزولة من ثلاثة بيئات من جسم الانسان وهي بيئة حصى المرارة وحصى الجهاز البولي والقناة الهضمية والكشف عن وجود الجين uidA الذي له دور مهم لانتاج انزيم بيتا–كلوكيورونيداز والجين ureA وهو احد الجينات التركيبية المهمة لانتاج انزيم اليورياز .

## المواد وطرائق العمل :

**عزل وتشخيص البكتيريا :** عزلت كل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* من عينات حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية من مستشفى الرمادي التعليمي للفترة من 2010/5/24 الى 2011/3/17 , شخصت العزلات البكتيرية بالاعتماد على مصنف بركي (9) وما تم إجرائه وفق (10) لغرض تأكيد تشخيص البكتيريا.

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Education for womin;
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5859-6212 .Mobil:777777
E-mail address:

وقد شملت 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 كرام المنتجة من قبل شركة بروميكا (Promega), وقد تم حساب تركيز الدنا بواسطة جهاز QuantiFluor™-PHandheld Fluorometer المجهز من شركة بروميكا .

**البادئات المستخدمة :** استخدمت البادئات النوعية المجهزة من شركة Alpha DNA للكشف عن بعض جينات الضراوة الخاصة لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* وهو الجين *uidA* المسؤول عن التشفير لكل من انزيمي بيتا–كلوكيورونيداز والجين *ureA* المسؤول عن التشفير لانزيم اليورياز كما موضح في الجدول (1) .

**التفاعل السلسلي لانزيم بلمرة الدنا (PCR) :** اجري هذا الاختبار في مختبرات قسم علوم الحياة التابع لكلية التربية للبنات–جامعة الانبار وحسب توصيات الباحثين (13,12,11) لعمل مزيج تفاعل الـ PCR باستخدام بادئات نوعية للكشف عن كل جين لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية بالاضافة الى استخدام البرنامج الحراري الخاص بجهاز المبلمر الحرارى Thermal Cycler المجهز من شركة Applied Biosystem موديل 2700 كما موضح بالجدول(1). البادئات الخاصة لبكتيريا *E. coli* تم اجراء تفاعل الـ PCR مع جميع عزلات هذه البكتيريا البالغ عددها 26 عزلة وثلاثة عزلات من بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية , اما البادئات 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 .

**الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز :** اجري الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز لكل من نواتج الـ PCR مع بادئات *UAL754*/UAL900 و *UAR*/UAL الخاصة لجين *uidA* بتركيز 2% لهلام الاكاروز والدليل الحجمي 100 bp المجهز من شركة بروميكا , اما مع بادئات جين *ureA* فاستخدم تركيز 1.5% لهلام الاكاروز واستخدم الدليل الحجمي 100bp المجهز من شركة بروميكا , 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 المرحلة في هلام الاكاروز باستخدام جهاز تصوير حزم الدنا بواسطة الاشعة الفوق البنفسجيةGel 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.**

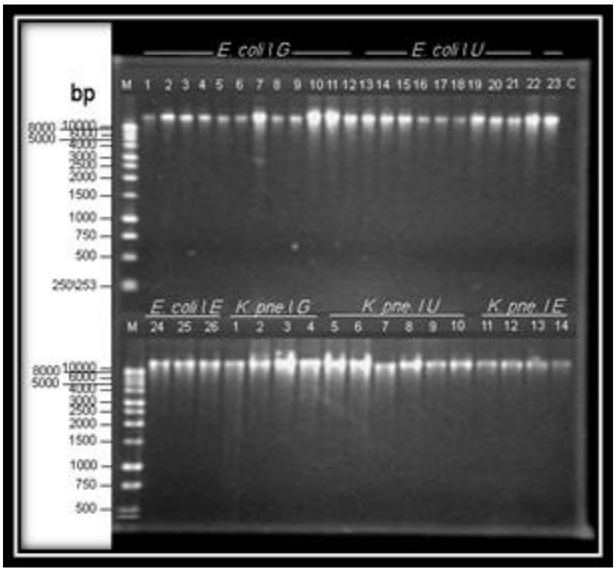
| اسم البادىء | تسلسل القواعد 3→5 | الجين الهدف والبكتيريا | برنامج جهاز المبلمر الحراري: درجة الحرارة | الوقت | الدورات | حجم الحزم الناتجة (bP) | المصدر |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *UAL754*<br>*UAR900* | AAAACGGCAAGAAAAAGCAG<br>ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG | *uidA*<br>*E. coli* | 95 م° | 5 د | 1 | 147 | 11 |
| | | | (72 ,55 ,95) م° | (55 ,30 ,25) ثا | 30 | | |
| | | | 72 م° | 10 د | 1 | | |
| *UAL*<br>*UAR* | TGGTAATTACCGACGAAAACG GC<br>ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG | *uidA*<br>*E. coli* | 94 م° | 10 د | 1 | 147 | 12 |
| | | | (72, 58 ,94) م° | (1,1,1) د | 36 | | |
| | | | 72 م° | 1 د | 1 | | |
| *UreA*-F<br>*Urea*- | GAAC GTTA TG GATC | *K. pneu mon* | 94 م° | 5 د | 1 | 337 | 13 |

| Primer | Sequence | Gene / Bacteria | Temperature | Time | Cycles | Size (bp) | Ref. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *UreA*-F<br>UreA-R2 | GCTGACTTAAGAGAACGTTAT<br>G<br>GATCATGGCGCTACCTCA | *ureA*<br>*K. pneumon-iae* | 94 °م ; (72,55,94) °م ; 72 °م | 5 د ; (60,30,30) ثا ; 1 د | 1 ; 35 ; 1 | 337 | 13 |
| | | | (72,55,94) °م ; 72 °م | (60,30,30) ثا ; 1 د | 35 ; 1 | | |

F: Forward, R: Reverse/ د:دقيقة, ثا: ثانية, °م: درجة مئوية.

**النتائج والمناقشة :**

**استخلاص الدنا (DNA) :** تم التاكد من توحيد التراكيز لجميع عينات الدنا المستخلصة من عزلات بكتيريتي *E. coli* البالغ عدده 26 عزلة و *K. pneumoniae* البالغ عدده 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 بروميكا وكما موضح بالصورة (1) والتي استخدم فيها تركيز الدنا الخزين 100 n \ µl .

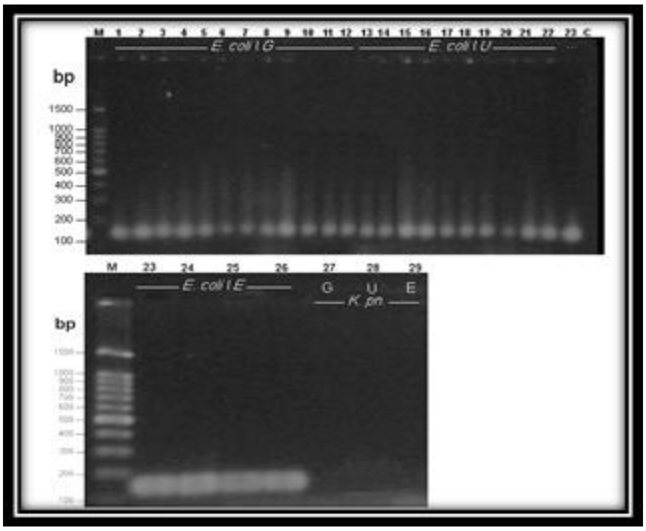



الصورة (1) ترحيل جينوم جميع العزلات البكتيرية لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumonia*/C: معاملة سيطرة/M: الدليل الحجمي 1Kb G البكتيريا المعزولة من حصى المرارة / U: البكتيريا المعزولة من الحصى البولية / E: البكتيريا المعزولة من القناة الهضمية.

**الجين uidA :** اظهرت جميع عزلات بكتيريا *E. coli* وجود جين *uid*A باستخدام البادئات (*UAR900*\|*UAL754*) ويتضح باحتمالية كبيرة من الصورة (2) ان جين *uid*A لعزلات *E. coli* في هذه الدراسة هو جين كروموسومي وليس بلازميديا لذا فان صفة انتاج انزيم بيتا-كلوكيورونيداز صفة ثابتة لا تفقدها البكتيريا الحاوية على جيناتها وهذا واضح من خلال ان جميع عزلات بكتيريا *E. coli* قد اظهرت وجود حزم دنا المرحلة في هلام الاكاروز وبالتالي يمكن الاستدلال على ان هذه البكتيريا المعزولة هي بكتيريا تعود للنوع *E. coli* وهذا ما يعتمد عليه في الكثير من البحوث التي يتم من خلالها الاستدلال على وجود بكتيريا *E. coli* في العينات الماخوذة من نماذج مختلفة من الادرار او البراز او عينات المياه الملوثة وغيرها ما عدا السلالة البكتيرية المرضية *E. coli* O 157:H7 التي تعطي نتيجة سالبه لوجود انزيم بيتا-كلوكيورونيداز (21,20,19,18,17,16,15,14,11).

اما في بكتيريا *K. pneumoniae* فيتضح من الصورة (2) عدم وجود جين الـ *uidA* مما يعني ان هذه البكتيريا لا تمتلك الشفرة الوراثية الخاصة لانتاج انزيم بيتا-كلوكيورونيداز ويؤكد اغلب الباحثين في اهذا المجال على عدم احتواء دنا بكتيريا *K. pneumoniae* سواء الدنا الكروموسومي او الدنا البلازميدي على جين الـ *uid*A (24,23,22) ومن جهة اخرى فان البادئ *UAL*754 (Forward) يقع بين منطقة زوج القواعد النتروجينية 754 – 773 اما البادئ *UAR*900 (Reverse) فيقع بين منطقة زوج القواعد النتروجينية 880 – 900 ويقع كل من هذين البادئين في منطقة جين الـ *uid*A التي تشفر الى النهاية الامينية الطرفية ( الاحماض الامينية القريبة من الطرف الاميني للانزيم) وبما ان جميع عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة وحصى القناة البولية والقناة الهضمية اعطت نتيجة ايجابية في ظهور الحزم المضاعفة باستخدام تقنية الـ PCR وفي نفس الوقت اعطت بكتيريا *K. pneumoniae* نتيجة سلبية لظهور الحزم المضاعفة فان ذلك يدل على ان منطقة الهدف للنهاية الطرفية الامينية لانزيم بيتا – كلوكيورونيداز لبكتيريا *E. coli* هي التي يشفر لها منطقة الهدف المحصورة لكل من البادئين المذكورين الخاصة لجين *uid*A وبالتالي فان هذه المنطقة تحتوي على تسلسلات فريدة Unique خاصة ببكتيريا *E. coli* وهذا ما اكده (22) عندما استعمل كل من البادئين

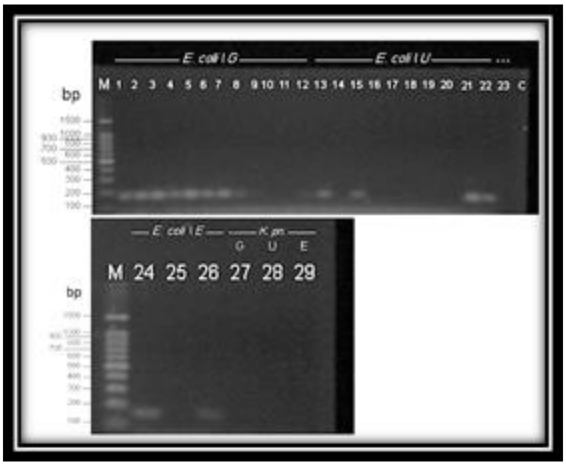
*UAL*754 و *UAR*900 في مزيج تفاعلات الـ PCR للكشف عن وجود جين *uid*A لمجموعة من البكتيريا المختلفة الاجناس والانواع والسلالات والتي تضمنت من بينها بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* فاظهرت نتائج الترحيل في هلام الاكاروز ظهور حزم الدنا فقط في جميع عزلات بكتيريا *E. coli* و(4) سلالات من بكتيريا *Shigella* spp. في حين لم تظهر الحزم في جميع عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* وباقي البكتيريا الاخرى مثل بكتيريا *Salmonella typhimurium* , *Enterobacter aerogenes* , *Aeronomas hydrophila* , *Citrobacter freundii* , الخ... . ويلاحظ من الصورة (2) ان جميع عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة او حصى القناة البولية او القناة الهضمية قد اعطت نتيجة موجبة جزيئيا لوجود جين *uid*A وهذا يدل ان هذا الجين على الرغم من كونه المسؤول عن تكوين الشفرة الوراثية لانزيم بيتا-كلوكيورونيداز واشتراك هذا الانزيم في تكوين حصى المرارة وخصوصا حصى الصبغة البنية لكن هذا الجين لم يقتصر وجوده في عزلات حصى المرارة فقط وبالتالي لا يمكن اعتباره كصفة مميزة للبكتيريا المعزولة من حصى المرارة وهذا يعني ان هنالك احتمالية كبيرة جدا في ان نجد الشفرة الوراثية لجين *uid*A من اي عزلة بكتيرية لبكتيريا *E. coli* من اي مصدر سواء من داخل جسم الانسان او من اي بيئة من حوله وان وصول هذه البكتيريا التي تحمل هذا الجين الى المنطقة الصفراوية داخل جسم الانسان فانه سيكون عرضة اكثر للاصابة بحصى المرارة التي مصدرها بصورة غير مباشر بكتيريا *E. coli*.




**الصورة (2)** تظهر وجود حزم الدنا الجينومي الهدف لجين *uid*A في بكتيريا *E. coli* باستخدام البادئين UAR900 /UAL754 وعدم ظهور هذه الحزم في بكتيريا *K. pneumoniae* /G: البكتيريا المعزولة من حصى المرارة / U: البكتيريا المعزولة من الحصى البولية / E: البكتيريا المعزولة من القناة الهضمية/ C: معاملة سيطرة / M: الدليل الحجمي 100bp .

اما نتائج استخدام البادئين البادئين *UAL* / *UAR* الخاصين لجين uidA فقد اعطت بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة وحصى القناة البولية والقناة الهضمية نسب 75% (9 عزلات من مجموع 12عزلة) و 40% (4 عزلات من مجموع 10 عزلات) و 50% (2 عزلة من مجموع 4 عزلات) بالتتابع كما موضح بالصورة (3) وقد بين الباحثين من خلال بحوثهم انه لابد من استخدام عدد من البادئات النوعية تابعة لمجموعة البادئ المستخدم هنا للكشف عن وجود جين *uid*A في بكتيريا *E. coli* وهذه البادئات مثل *UAL*754 , *UAR*900 / *UAL*1939 , *UAR*2105 / *UAL*1939b , *UAR*2105b / *UAL* , *UAR* وغيرها (25,22) . ومن جهة اخرى فان البادئ *UAL* (Forward) يقع بين منطقة زوج القواعد النتروجينية 739 – 761 اما البادئ *UAR*900 (Reverse) فيقع بين منطقة زوج القواعد النتروجينية 880 – 900 ويقع كل من هذين البادئين في منطقة نسق القراءة المفتوح Open Reading Frame لجين الـ *uid*A (27,26) لذا فان منطقة الحزم المتضاعفة باستعمال البادئين *UAL* و *UAR* هي الى حد كبير تظهر بنفس الحجم الجزيئي للحزم المتضاعفة عند استعمال البادئين *UAL*754 و *UAR*900 ومن خلال عدم ظهور حزم لعدد من عينات الدنا لعزلات بكتيريا *E. coli* نلاحظ ان هنالك احتمالية اختلاف تسلسل القواعد النتروجينية لقاعدة واحدة او اكثر ضمن تركيب جين الـ *uidA* ضمن المسافة الجينية الواقعة بين موقع الزوج القاعدي 739 والزوج القاعدي 773 لجين الـ *uidA* باستثناء زوج القواعد النتروجينية الثمانية ابتداءا من من التسلسل 754 الى 761 وذلك لتشابه تسلسلات القواعد النتروجينية الثمانية الاولى من البادئ *UAL*754 وهي القواعد النتروجينية (AAAACGGC) مع القواعد الثمانية الاخيرة من البادئ *UAL* بالتالي قد تكون هنالك اختلافات على مستوى القواعد النتروجينية المكونة للشفرات الوراثية التي تشفر لنفس الحامض الاميني خصوصا اذا ما علمنا ان اغلب الاحماض الامينية يمكن ان تكون لها اكثر من شفرة وراثية تشفر لها وقد يشير ذلك الاختلاف الى ان نسبة كبيرة جدا من بكتيريا *E. coli* تمتلك القدرة على انتاج انزيم بيتا-كلوكيورونيداز على الرغم من اختلاف سلالاتها لذلك فعلى الرغم من ان جين *uid*A سائدا في اغلب سلالات بكتيريا *E. coli*

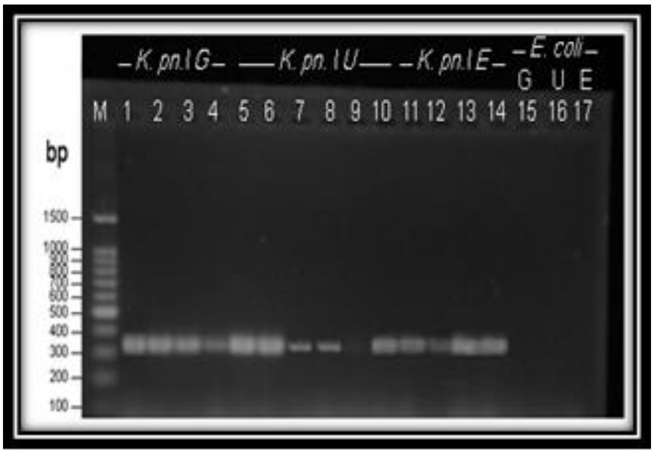
فلا يعني عدم ظهور الحزم باستخدام البادئين *UAL* و *UAR* في دراستنا هذه عدم وجود جين الـ *uid*A لانه تم الكشف عن وجوده عند استخدام كل من البادئين *UAL*754 و *UAR*900 . اما بالنسبة لبكتيريا *K. pneumoniae* فان عينات الدنا لها لم تبدي وجود حزم الدنا في اختبار تقنية الـ PCR كما موضح بالصورة (3) وبالتالي فهذا يؤكد النتيجة التي حصلنا عليها باستخدام البادئين *UAL*754 و *UAR*900 وهذه النتيجة تطابق جميع البحوث التي اجراها الباحثين والمذكور قسم منهم اعلاه والتي تؤيد عدم امتلاك بكتيريا *K. pneumoniae* لجين *uid*A المسؤول عن انتاج الشفرات الوراثية الخاصة لتصنيع انزيم بيتا–كلوكيورونيداز .




**الصورة (3)** تظهر وجود حزم الدنا الجينومي الهدف لجين *uid*A في بكتيريا *E. coli* باستخدام البادئين *UAL/ UAR* وعدم ظهور هذه الحزم في بكتيريا *K. pneumoniae* / G:البكتيريا المعزولة من حصى المرارة / U: البكتيريا المعزولة من الحصى البولية / E: البكتيريا المعزولة من القناة الهضمية/ C: معاملة سيطرة / M: الدليل الحجمي 100bp .

**الجين *ure*A :** وبينت النتائج ان عند استخدام البادئين ureAF و *ure*AR1 عدم ظهور اي حزمة من قطع الدنا المتضاعفة والذي قد يدل على عدم ملائمة البادئ *ure*AR1 للارتباط مع ما يكمله في شريط الدنا ضمن موقع الجين *ure*A لذلك قد يتلائم اذا البادئ مع استخدام البادئ *ure*AF مع عينات دنا لبكتيريا اخرى غير بكتيريا *K. pneumoniae* لها القدرة على انتاج انزيم اليورياز, في حين اظهرت جميع عينات الدنا لعزلات بكتيريا *K. pneumoniae* وجود الحزم المتضاعفة عند استعمال كل من البادئين *ure*AF و *ure*AR2 كما موضح في الصورة (4) كدلالة على امتلاك هذه البكتيريا على الجين المسؤول عن التشفير لانتاج انزيم اليورياز وهذه النتيجة يؤيدها ما تم التوصل اليه خلال اجراء الاختبارات التشخيصية لعزلات بكتيريا *K. pneumoniae* اذ اعطت جميع عزلات هذه البكتيريا نتيجة موجبة لانتاج انزيم اليورياز عند تنميتها على وسط اكار اليوريا Urea Agar. ان ظهور الحزم عند استعمال البادئين *ure*AF و *ure*AR2 وعدم ظهور الحزم عند استعمال البادئين *ure*AF و *ure*AR1 يعطي انطباع بانه عند استخدام البادئين*ure*AF و *ure*AR1 فان البادئ *ure*AF قد وجد موقع الارتباط مع الدنا القالب لعينات الدنا لعزلات بكتيريا *K. pneumoniae* ونظرا لعدم ارتباط البادئ الاخر *ure*AR1 فان ذلك سبب استهلاك لجهد انزيم Taq DNA Polymerase وفي نفس الوقت استهلاك اكثر للقواعد النتروجينية نظرا لطول شريط الدنا الجديد المتكامل مع احد شريطي دنا الاصلية وبالتالي بما ان احد شريطي الدنا سيتضاعف عدده وليس كلا الشريطين لان واحد فقط من البادئين وهو *ure*AF وجد الموقع الذي سيتكامل ويرتبط معه مع احدى شريطي الدنا لذا فان منطقة الهدف للجين التي من المفروض انها ستتضاعف اصبحت غير محددة وبالتالي فان ذلك يكون على حساب عدد القطع المتضاعفة وعدم وصولها الى العدد المطلوب الذي يمكن من خلاله ملاحظة الحزم المتضاعفة بوضوح وهذا قد يكون سببا في عدم ظهور الحزم المتضاعفة بعد عملية تصويرها بالاشعة الفوق البنفسجية . ان ظهور الحزم من قطع الدنا للجين الهدف باستعمال البادئين *ure*AF و *ure*AR2 يؤكد على الاغلب ان الجين المسؤول عن التشفير للصلة المظهرية لانزيم اليورياز محمول في الدنا الكروموسومي كما يؤيد ذلك الكثير من الباحثين اللذين اوضحوا ان جين *ure*A مكون من عدة اجزاء اذ يتضمن الجين التركيبي الذي يشفر لانزيم اليوريز من ثلاثة مواقع من قطع الدنا والتي تبدا من الاتجاه (3⟶5) بجين التركيبي *ure*A ثم جين *ure*B ثم جين ureC فهذه هي الجينات الاساسية التركيبية للتشفير لانتاج انزيم اليورياز في حين هنالك جينات ملحقة قسم منها تقع في منطقة Downstream مباشرة بعد مواقع الجينات التركيبية وهي جينات *ure*E و *ure*F و *ure*G وهذه الجينات الملحقة في حالة عملية حذفها فان انزيم اليورياز سوف تستطيع البكتيريا من انتاجه ولكن بصورة غير فعالة وكذلك هنالك جين ملحق آخر يكون له دور في فعالية انزيم اليورياز ايضا ولكن ليس في عملية التشفير لانتاجه وهو الجين *ure*D الذي يقع في منطقة اعلى المجرى Upstream التي تسبق مواقع الجينات التركيبية مباشرة (30,29,28,13) على الرغم من ان صفة

انتاج اليوريز قد تكون الجينات المسؤولة عن انتاجه وتنظيم فعاليته محمولة في البلازميد كما في البعض من سلالات بكتيريا *E. coli* و *Salmonella cubana* والتي قد تنتقل الى بكتيريا *K. pneumonia* المتعايشة معها في نفس البيئة (29). ان عدم ظهور الحزم المتضاعفة من قطع الدنا الهدف لجين *ure*A في عينات الدنا لبكتيريا *E. coli* يثبت عدم امتلاك هذه البكتيريا لهذا الجين وهذا ما يؤكده ايضا ان جميع عزلات بكتيريا قد اعطت نتيجة سالبة لانتاج انزيم اليورياز خلال اجراء الاختبارات التشخيصية لهذه البكتيريا وقد اوضحت نتائج عدد من الباحثين عدم ظهور حزم الدنا المتضاعفة للجين الهدف *ure*A باستخدام البادئات المستخدمة في هذه الدراسة (13).




**الصورة (4)** تظهر وجود حزم الدنا الجينومي الهدف لجين *ure*A في بكتيريا *K. pneumoniae* باستخدام البادئين *ure*A-F*ure*A-R2 وعدم ظهور هذه الحزم في بكتيريا *E. coli* /G:البكتيريا المعزولة من حصى المرارة / U: البكتيريا المعزولة من الحصى البولية / E: البكتيريا المعزولة من القناة الهضمية/ M: الدليل الحجمي 100bp .

**المصادر:**


1-Tabata, M. and Nakayama, F. (1981) . Bacteria and gallstones – etiological significance. Diges. Dis. And Scien., 26(3): 218-224.

2-Cetta, F.M. (1986) . Bile infection documented as initial event in the pathogenesis of brown pigment biliary stones . Hepatology, 6 (3): 482-489.

3-Carey, M. C. (1993) . Pathogenesis of Gallstones . Am. J. Surg. , 165 : 410-419.

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

5-Tazuma, S. (2006) . Epidemiology, pathogenesis, and classification of biliary stones (common bile duct and intrahepatic) . Best Prac. and Res. Gastr. , 20 (6): 1075-1083.

6-Attasaranya, S. ; Fogel, E. L. and Lehman, G. A. (2008) . Choledocholithiasis, Ascending Cholangitis, and Gallstone Pancreatitis . Med. Clin. Nor. Amer. 92 : 925-960.

7-David, S. Fredric, L. (1999) . Prevention of recurrent nephrolithiasis. Am. Fam. Physician. 60:2269-2276.

8-Tiselius, H. G. ; Ackermann, D. ; Alken, P. ; Buck, C. ; Conort, P. ; Gallucci, M. and Knoll, T. (2006) . Guidelines on Urolithiasis . European Association of Urology , pp: 11-74.

9- 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.

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

11- Culec,M. ;Bakir,B. ;Ogur,R. and Tekbas,O.M.(2002).Determination of enteric bacteria at microbiologically risky points by multiplex polymerase chain reaction.J.Micro.,40(4):327-330.

12- Tantawiwat, S. ; Tansuphasiri, U. ; Wongwit, W. ; Wongchotigul, V. and Kitayaporn, D. (2005) . Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in drinking water . South. Asian J. Trop. Med. Puplic Health , 36 (1): 162-169.

13-Brisse, S. ; Fever, C. ; Passet, V. ; Issenhut-Jeanjean, S. ; Tournebize, R. ; Diacourt. L. and Grimont, P. (2009) . Virulent clones of *Klebsiella pneumonia* identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization . Plos One , 4: 4982-4994.

14-Jefferson, R. A. ; Burgess, S. M. and Hirsh, D. (1986) . *B*-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker . Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 83: 4847-4851.

15-Feng, P. ; Lum, R. and Chang, G. W. (1991) . Identification of *uid*A gene sequences in B-D-Glucuronidase-Negative *Escherichia coli* . Appl. and Envir. Micr. , 57 (1): 320-323.

33 (1): 248-250 .

24-Anbazhagan,D.;Kathirvalu,G.G.; Mansor,M.;Yan,G.O.;Yusof,M.Y.and Sekaran,S.D.(2010).Multiplex polymerase chain reaction(PCR) assays for the detection of Enterobacteriaceae in clinical samples .African J.Microb.Res,4(11):1186-1191.

25- Maheux, A. F. ; Picard, F. J. ; Boissinot, M. ; Bissonnette, L. ; Paradis, S. and Bergeron, M. G. (2009) . Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli/Shigella* in water samples . Water Res. , 43: 3019-3028.

26-Iqbal, S. ; Robinson, J. ; Deere, D. ; Saunder, J. R. ; Edward, C. and Porter, J. (1997) . Efficiency of the polymerasr chain reaction ampilification of the *uid* fene for detection *Escherichia coli* in contaminated water . Appl. Micro. , 24: 498-502 .

27-Brasher, C. ; Panicker, G. and Bej, A. K. (2002) . Evaluation of PCR Amplification-based Detection of Heat-killed *Escherichia coli* and Cell-free DNA in Shellfish . Mol. Bio. Today , 3 : 85-90.

28-Lee, M. H. ; Mulrooney, S. B. ; Renner, M. J. , Markowicz, Y. and Hausinger, R. P. (1992) . *Klebsiella pneumoniae* urease gene cluster: Sequence of ureD and demonstration that four accessory genes (ureD , ureE , ureF , and ureG) are involved in nickel metallocenter biosynthesis , J. Bacter. , 174 (13): 4324-4330.

29-Mobley, H. L. ; Island, M. D. and Hausinger,R.P.(1995). Molecular biology of microbial ureases . Microb. Rev. , 59 (3): 451-480 .

30-Maroncle, N ;Balestrino, D.; Rich, C.andForestier,C. (2002). Identification of *Klebsiella pneumoniae* genesinvolved in intestinal colonization and adhesion using signature-tagged mutagenesis . Infec. and Imm. , 70 (8):4729-473.

16-Feng, P. and Lampel, K. A. (1994) . Genetic analysis of *uid*A expression in enterohaemorrhagic Escherichia colr' serotype 01 57 : H7 . Microbiology , 140 : 2101-2107.

17-Yaron, S. ; Kolling, G. L. ; Simon, L. and Matthews, K. R. (2000) . Vesicle-Mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria . Appl. and Enviro. Micro. , 66 (10): 4414-4420.

18- Lim. S. H. ; Salmah, I. ; Ooi, W. L. ; Sushil, K. ; Sahilash, A. M. and Son, R. (2004).PCR primers designed from the uidA gene sequence for the detection of *Escherichia coli* O157:H7.

19- Ram, J. L. ; Ritchic, R. P. ; Fang. J. ; Gonzales, F. S. and Selegean, J. P. (2004) . Sequence-Based tracking of *Escherichia coli* based on genetic diversity of *B*-Glucuronidase . J. Environ. Qual. , 33: 1024-1032.

20- Moyo, S. J. ; Maselle, S. Y. ; Matee, M. I. ; Langeland, N. and Mylvaganam, H. (2007) . Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania . B. M. C. Infec.Dis.7:92-98.

21- Abdelrahman, L. Q. ; Elbagir, N. M. ; Osman, A. M. ; Sharfi, S. A. ; Saeed, A. M. ; Musa, H. A. ; Ashmaig, A. A. and Aradaib, L. E. (2008). PCR detection of *E. coli* in chicken fecal sample . Inter. J. Molec. Med. and Adv. Sci. , 4 (3): 82-85 .

22- Bej,A.K.;Dicesare,J.L.;Haff, L. and Atlas, R.M.(1991) . Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in Water by Using the Polymerase Chain Reaction and Gene Probes for *uid* . Applied andEnviro.Microb.57(4): 1013-1017 .

23- Cebula, T. A. ; Payne, W. L. and Feng, P. (1995) . Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-Like Toxin type by Mismatch Amplification Mutation Assay-Multiplex PCR . J. Clin. Micro. ,

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2012 ,( 6), ( 3 ) :01-08

# DETECTION UIDA AND UREA 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**

ABSTRACT :

Bacterial isolated were collected from Al-Ramadi Teaching Hospital from total samples 65 of gallstone , 42 of urine stone and 8 samples of stoole. Twenty six isolates of Escherichia coli were collected (12 from gallstones , 10 from urine stones and 4 from gastrointestinal canal) and 14 isolates of Klebsiella pneumonia (4 from gallstones , 6 from urine stones and 4 from gastrointestinal canal). The result showed all isolates of E. coli have uidA gene which are responsible for coding to production B-glucuronidase enzyme, but doesn,t have ureA gene which are responsible for coding to broduction urease enzyme . while it showed all isolates of K. pneumonia have ureA gene, but doesn,t have uidA gene.