



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

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 pneumoniae* 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 *fimH* المسؤولة عن التشفير لخمّل النمط الاول الحساس للمانوز وثلاثة طرز لجينات *papG* المسؤولة عن التشفير لخمّل 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 *papGII* و *papGIII* و *papGI* بنسبة 100% و 50% و 16.67% على التوالي في حين اظهرت عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من الحصى البولية امتلاكها لجينات *papGII* و *papGIII* بنسبة 70% و 20% على التوالي ولم يظهر وجود لجين *papGI* اما عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من القناة الهضمية فقد اظهرت امتلاكها لجينات *papGII* و *papGIII* 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.

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2012/2/2

تاريخ القبول: 2012/7/15

تاريخ النشر: 2013 / 8 / 29

DOI: [10.37652/juaps.2012.77316](https://doi.org/10.37652/juaps.2012.77316).

الكلمات المفتاحية:

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

المقدمة :

الذي تمتلكه هذه البكتيريا وارتباطه بمستقبلات نوعية توجد في الخلايا المبطنة للغشاء المخاطي لمنطقة الاصابة (1) ، ويعتبر الخمل النوعي من النمط الاول المقاوم للمانوز Mannose resistance Type=1 وهو الخمل P من الانواع المهمة التي تساعد البكتيريا 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 (2,3)، وتعتبر جينات *PapG* المسؤولة عن التشفير للخمل P من عوامل الامراضية Virulance المهمة لاحداث المرض وخصوصا في حويص

لضمان حصول الاصابة بالمرض لا بد 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

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

جينات الالتصاق لكل من خمل النمط الاول الحساس للمانوز Type-1 Mannose Sensitive (MS) وهو الجين *fimH* وخمل النمط الاول المقاوم للمانوز Type-1 Mannose Resistance وهي جينات *papG* 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 (7,8,9,10) كما موضح في الجدول (1) لعمل مزيج تفاعل ال 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 المبلر الحراري Thermal Cycler المجهد من شركة Applied Biosystem موديل 2700 كما موضح بالجدول(1). تم اجراء تفاعل ال 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 الخاصة *fimH1* و *fimH2* وجينات *papG*, اما البادئات الخاصة لبكتيريا *K. pneumoniae* فقد تم اجراء تفاعل ال 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 ال PCR (Multiplex PCR) لجميع مزيج بادئات *papG* لجينات *papGI* و *papGII* و *papGIII* في تفاعل واحد ال PCR.

الترجيل الكهربائي في هلام الاكاروز : اجري الترحيل

الكهربائي في هلام الاكاروز لكل من نواتج ال PCR مع البادئات النوعية لكل من جينات *fimH1* و *papG* بتركيز 2% لهلام الاكاروز والدليل الحجمي 100 bp المجهد من شركة بروميكا , اما مع بادئات الجين *fimH* فاستخدم تركيز 1.5% لهلام الاكاروز واستخدم اما بادئات الجين *fimH2* فاستخدم تركيز 1% لهلام الاكاروز واستخدم ايضا الدليل الحجمي 1Kbp المجهد من شركة بروميكا في الترحيلين, وقد استخدم لجميع حالات الترحيل الكهربائي تيار كهربائي بفرق جهد وقدره 5 فولت لكل سنتيمتر 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

الكلية بالاضافة الى ذلك فان الخمل النوعي الاخر وهو الخمل *fimH* 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 ارتائنا في بحثنا هذا الكشف عن وجود جين *fimH* وجينات *papG* المتمثلة بجينات *papGI* و *papGII* و *papGIII* 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 ابتداءً 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).

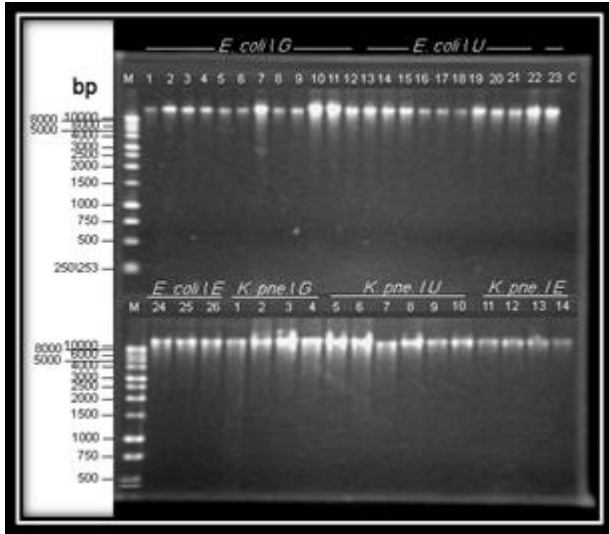
استخلاص الدنا الجينومي : استخلصت عينات الدنا الجينومي

للعزلات البكتيرية لبكتيريا *E. coli* و بكتيريا *K. pneumoniae* باستخدام عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتيريا السالبة لصبغة جرام 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

استخلاص الدنا (DNA): تم التأكد 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 من شركة بروميكا وكما موضح بالصورة (1) والتي استخدم فيها تركيز الدنا الخزين $100 \text{ n} \mu$.



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

بادئات *fimH1* و *fimH2*: اظهرت النتائج ان الحزم الناتجة من التضاعف لعينات دنا الجينومي الهدف باستخدام البادئين *fimH1R/fimH1F* وجود جين *fimH* 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 *fimH* 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 *fimH2R/fimH2F* وجود جين *fimH* 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 *fimH* في جميع عزلات حصى المرارة والقناة الهضمية

الاشعة الفوق البنفسجية Gel documentation الجهاز من شركة Major Science.

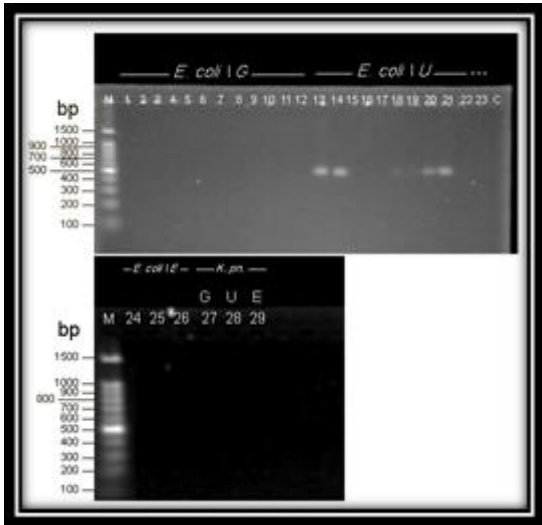
الجدول (1): البادئات النوعية ومواقع الجين الهدف الخاصة لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* مع البرنامج الخاص لجهاز المبلر الحراري وحسب البادئات المستخدمة (Reverse : R , Forward : F)
/ د: دقيقة , ثا: ثانية , °م : درجة مئوية).

المصدر	برنامج جهاز المبلر الحراري			الجين الهدف والبكتيريا	تسلسل القواعد 5→3	اسم البادئ
	الدورا	الوقت	درجة الحرارة			
7	1	30	94°م	<i>fimH</i> <i>E. coli</i>	AACAGCGATGATTCCAG TTTGTGTG TTGCGTACCAGCATTAGC AATGTCC	<i>fimH1-F</i> <i>fimH1-R</i>
	تضاف	2 ثا	-			
	1	30	95°م			
8	1	30	95°م	<i>fimH</i> <i>E. coli</i>	TGCGAAGCGGATAAGCCG TGG GCAGTCAACCTGCCCTCCG GTA	<i>fimH2-F</i> <i>fimH2-R</i>
	1	10	72°م			
	1	30	94°م			
9	1	25	94°م	<i>fimH</i> <i>K. pneumoniae</i>	CAGCGAAGGCCACCATTC GCTCAGAAATCAACATCG GTAAC	<i>fimH-F</i> <i>fimH-R</i>
	1	10	72°م			
	1	10	95°م			
10	1	15	72°م	<i>papG</i> <i>E. coli</i>	TCGTCTCAGGTCGGAAATT TGGCATCCCCAACATTATCG GGGATGAGCGGGCCTTGTGAT CGGGCCCCAAGTAACTCG GGCCTGCAATGGATTACCTGG CCACCAAAATGACCATGCCAGAC	<i>PapGI-F</i> <i>PapGI-R</i> <i>PapGII-F</i> <i>PapGII-R</i>
	1	10	95°م			
	1	10	72°م			

النتائج والمناقشة :



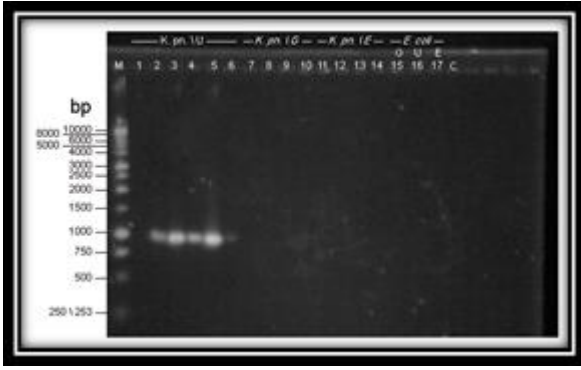
الصورة (2) الترحيل الكهربائي لعينات الدنا الجينومي الهدف لجين *fimH* لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* باستخدام البادئين *finH1R/finH1F* عزلات حصى المرارة / U عزلات الحصى البولية/ E عزلات القناة الهضمية/ M الدليل الحجمي 100bp / C معاملة السيطرة , نلاحظ ظهور الحزم لخمس عزلات *E. coli* المعزولة من الحصى البولية فقط.



الصورة (3) الترحيل الكهربائي لعينات الدنا الجينومي الهدف لجين *fimH* لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* باستخدام البادئين *finH2R/finH2F* 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 *finH* : اظهرت النتائج ملاحظة حزم الدنا الجينومي الهدف المرحلة في هلام الاكاروز لخمس عينات من دنا بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى القناة البولية بنسبة 83.33% في

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 *fimH* يمكن ان يكون غالبا محمولا في البلازميد وحيانا يكون محمولا في الكروموسوم (11,7,3) وهذا قد يكون تفسيراً في كون عدد من عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من الحصى البولية قد اعطت نتيجة موجبة لظهور حزم دنا لجين *fimH* لكل من البادئات النوعية المستخدمة وبالتالي هناك 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 الزرع المرق المغذي Nutrient broth و مرقي تربتيكيز الصويا Trypticase soya broth فانهما يجعلان البكتيريا غير قادرة على انتاج خمل النمط الاول *finH* (13,12) اما بكتيريا *K. pneumoniae* فلم تظهر امتلاكها لجين *finH* باستخدام البادئين *finH1R* و *finH1F* في مزيج تقاعل ال PCR وهذا طبيعي لكون ان تركيب جين *finH* يختلف من بكتيريا ل اخرى حسب اختلاف انواعها واجناسها وذلك لوجود تغيرات في تركيب هذا الخمل من بكتيريا ل اخرى وقد تصل نسبة التغيرات الى 99% لتسلسل الاحماض الامينية للخمل *finH* وبالمقابل فان الشفرة الوراثية ستختلف من بكتيريا ل اخرى (14), وبالتالي فان البادئين المستخدمين قد يكونان غير مناسبين لانهما لم يجدا موقع الارتباط المناسب في جين *finH* وبالتالي عدم ظهور حزم الدنا لهذا الجين, وقد وجد ان الجين المسؤول عن التشفير لخمل النمط الاول الحساس للمانوز وهو جين *finH* يختلف تركيبه الوراثي لكل من بكتيريا *E. coli* و بكتيريا *K. pneumoniae* (15).



الصورة (4) الترحيل الكهربائي لنتائج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا باستعمال البادئين *fimHF*, *fimHR* / 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 النروجينية.

مزيغ بادئات **papG** : بينت النتائج كما موضح بالصورة (5)

ان هنالك تفاوتاً بين وجود جينات الالتصاق الثلاثة في عينات الدنا لعزلات البكتيرية التابعة لبكتيريا *E. coli* فقد اظهرت عينات الدنا لعزلات هذه البكتيريا وجود جين *papGIII* 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 *papGII* و *papGI* 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 يمكن ان يشفر للجزء القمي منه بنسبة 100% من خلال وجود الجين الهدف *papGIII* وبنسب 50% لجين الهدف *papGII* وبنسبة 16.67% لجين الهدف *papGI* 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 المضاعفة لجين *papGIII* بنسبة اكبر من الجينين الاخرين اذ اعطت 8 (بنسبة 70%) منها نتيجة موجبة لظهور الحزم في حين ظهرت حزمتين فقط (بنسبة 20%) لجين الهدف *papGII* في حين لم تظهر اي حزمة دنا لجين الهدف *papGI* 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 وخصوصاً فيما

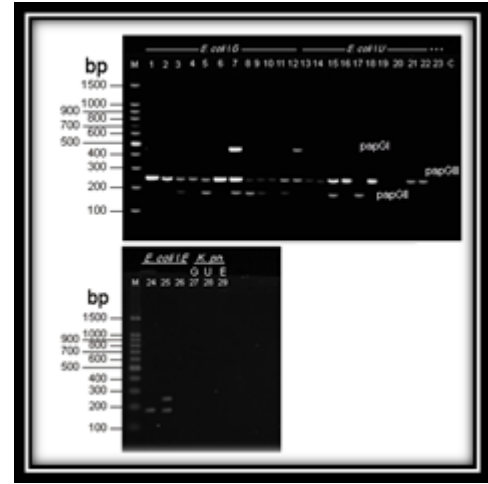
حين لم تظهر اي حزمة دنا لهذه البكتيريا المعزولة من حصى المرارة والقناة الهضمية كما موضح في الصورة(4) مما يرفع من احتمالية عدم امتلاك البكتيريا المعزولة من حصى المرارة على الطراز الوراثي الخاص لجين الالتصاق *fimH* او ان هذا الجين هو صفة محمولة في الدنا البلازميدي وتم فقده من قبل البكتيريا وعموماً فان 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 لحمل 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. pneumoniae* المعزولة من القناة الهضمية فان جين *fimH* يمتلك عدة طرز وراثية ممكن ان تختلف في التركيب الوراثي لتسلسل النيوكليوتيدات لكنها تتشابه في الطراز المظهر لحمل الالتصاق *fimH* (17) وبالتالي قد يكون البادئين غير مناسبين ليجدا موقع الارتباط المناسب لجين *fimH* لكلا شريطي الدنا المنفصلين خلال تفاعل اختبار ال PCR ومن جهة اخرى قد يكون هذا الجين محمولاً في الدنا البلازميدي وليس في الدنا الكروموسومي لذا فان عينات الدنا التي لم تظهر وجود حزم الدنا المتضاعفة لجين *fimH* 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 المضاعفة بنسبة 83.33% من عينات الدنا لبكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى القناة البولية فان هذه النتيجة جاءت مقارنة لما توصل اليه (17) عند استعماله لنفس البادئين *fimHR* و *fimHF* اذ كانت نسبة وجود هذا الجين في 65 عزلة بكتيرية لبكتيريا *K. pneumoniae* 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 وخصوصاً البكتيريا المعزولة من منطقة الجهاز البولي قد تمتلك جميعها لهذا الخمل ولكن نظراً 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 .

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 *papGI* و *papGII* و *papGIII* وجد في العزلة البكتيرية رقم 7 اما وجود اثنين من الجينات في نفس العزلة فقد لوحظ لجين الهدف لكل من *papGI* و *papGIII* فقد وجد في العزلة رقم 12 اما كل من الجينين الهدف *papGI* و *papGIII* فقد وجدا في عزلات رقم (3,5,8, 9,11) 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 *papGII* 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 *papGIII* لوحده لعزلات رقم (1,2,4,6,10) من عزلات حصى المرارة والعزلات رقم (13,14,16,18,21,22) 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 *papG* في سلالات بكتيريا *E. coli* من قبل العديد من الباحثين والذي قد يفسر حاجة هذه البكتيريا الى اكثر من جين واحد للتشغيل 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 *papA* يمكن ان يشفر لنهاية امامية مختلفة للخمل P (19). اما عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* الثلاثة المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية لم تظهر جميعها اي حزم دنا لجينات الهدف الثلاثة *papGI* و *papGII* و *papGIII* وهذا يدل على احتمالية عدم امتلاك هذه العزلات من البكتيريا لهذا النوع من الخمل P, ولكن الاكثر احتمالا ان البادئات المستخدمة لم تجد ما تتكامل معه من مواقع معينة في شريطي الدنا وبالتالي عدم تضاعف الموقع الهدف من جينات *papG* خلال مراحل اختبار الـ PCR وبالتالي عدم ظهور الحزم المتضاعفة

يتعلق في عدم وجود الجين الهدف من النوع *papGI* 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 النروجينية في الدنا DNA Sequencing Analysis اثبتت ان هنالك اختلاف في تعاقب هذه القواعد لجين *pap* والمتمثلة بجينات *papGI* و *papGII* و *papGIII* 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 *papG* 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 *papGIII* وبفارق كبير عن *papGII* وهذا لا يتفق اذا ما تم مقارنة نتائج دراستنا مع ما توصل اليه الباحثين (18) اذ كانت السيادة في نتائجهم لجين الهدف *papGI* وبنسبة 42% والجين الهدف *papGIII* بنسبة 23% في حين اتفقت نتائجنا مع وجده نفس الباحثين بخصوص الجين الهدف *papGI* لم يكن هنالك وجود لجين الهدف *papGI* 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 *papGII* في حين اعطت عزلة واحدة نتيجة موجبة الجين الهدف *papGIII* كما موضح في الصورة (5) وقد وجد ان من مجموع 74 عينة دنا لعزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من القناة الهضمية (ماخوذة من عينات برزية) كانت نسبة وجود الجين الهدف *papG* 20% وقد كانت نسبة وجود الجين الهدف *papGII* 18% في حين كانت نسبة وجود الجين الهدف *papGIII* 5% في حين لم يكن هنالك وجود لجين الهدف *papGI* (18) وهذه النتيجة الاخيرة اتفقت مع ما تم التوصل اليه في دراستنا وهذا ما يؤكد ان الجين الهدف *papGI* 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 *papGI* في عزلتين من عزلات حصى المرارة وهما العزلة رقم 7 والعزلة رقم 12 فقد يدل ذلك ان هذه السلالة من الممكن ان يكون تواجدتها في منطقة الشجرة الصفراوية اكثر من اي

- 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 patients 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 Microbiologie , Lishbona university , sciece college , pp:38 .
- 10-Johnson, J. R. and Brown, J. J. (1996) . A Novel Multiply Primed Polymerase Chain Reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the Gal(α -1-4)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.;Thomas, 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).*FimC* 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). *fimH* 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-

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 لا تتوفر معلومات كافية سوى دور هذا الخمل في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm خارج جسم الكائن الحي (في المختبر) .(15)



الصورة (5) الترحيل الكهربائي لنتائج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا باستعمال البادئات الخاصة لجينات *papG* / 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 النروجينية .

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. ; Bottino, 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.

- 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 group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of *papG* . Infec. and Imm. , 65 (6): 2153-2159 .
- 20-Melican,K.;Sandoval,R.M.;Abdul-Kader; Josefsson, L.;Tanner,G.A.;Molitoris, B.A.and Richter-Dahlfors, A.(2011). Uropathogenic *Escherichia coli* P and type I fimbriae act in synergy in living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. PLoS Pathogens,7(2):100-112.
- 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 kinds 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 *fimH* 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

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

ABSTRACT :

During this work 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 pneumoniae* (4 from gallstones , 6 from urine stones and 4 from gastrointestinal canal) from Al-Ramadi Teaching Hospital. The results 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 gallstone 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. pneumoniae* isolates didn't possess any of three *papG* genes.