



استخدام تقنية Multiplex PCR لتشخيص بعض جينات الضراوة لبكتريا *Klebsiella sp.* المعزولة من مواقع بيئية مختلفة.

زينه جاسم محمد* . علي حازم عبدالكريم* . احمد عبدالجبار سليمان**

* جامعة الانبار/كلية العلوم

** جامعة الانبار/مركز دراسات الصحراء

الخلاصة:

تضمنت الدراسة جمع ٣٩٩ عينة من بيئات مختلفة والتي شملت السريرية والغير سريرية حيث جمعت ٢٩٣ عينة سريرية (الدرار، جروح، حروق، خروج، قشع) اما الغير سريرية (التربة والمياه) فقد كان مجموعها ١٠٦ عينة خلال الفترة من تشرين الثاني ٢٠١٤ ولغاية شباط ٢٠١٥. تم تشخيص ٥١ عينة بكتيرية تعود الى بكتريا *K. pneumoniae*. باستخدام طرق التشخيص المظهرية والزعرية والكيموحيوية وتم تأكيد التشخيص باستخدام API20E وباستخدام جهاز الفايترك vaitek2. أظهرت نتائج اختبار مقاومة المضادات للعينات المعزولة من الحالات المرضية المختلفة والمصادر البيئية (التربة، المياه) لـ ١٢ من المضادات الحياتية من مختلف المجاميع تباينا فيما بينها بين مقاومة وحساسة لهذه المضادات بينما كانت البكتريا حساسة ونسبة ١٠٠% فقط للمضاد الحيوي Imipenem. صممت عدد من البادئات المتخصصة للكشف عن البكتريا باستخدام جين مميز فيها والكشف ايضا عن مقاومتها للمضادات باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex PCR للكشف عن وجود او غياب ثمانية انواع من الجينات *magA*, *rmpA*, *htrA*, *Uge-1*, *gent-2*, *blaCTX*, *terA*-, *StrA-2* الرئيسية لتشخيص *K. pneumoniae*. وظهرت النتائج وجود تباين في المحتوى الجيني بين العزلات فقد احتوت ٤٥ عينة بكتيرية على الجين *rmpA* والذي يمكن ان يتخذ كمؤشر تشخيصي وفي نفس التفاعل تم الكشف عن وجود جينات مقاومة لأربعة من المضادات الحياتية العائدة الى مجاميع مختلفة (*StrA*, *terA*-, *blaCTX*, *gent-2*) حيث احتوت كل عزلات *K. pneumoniae* على جين *StrA*. ومن خلال هذه الدراسة يمكن استثمار تقنية البلمرة التسلسلية المتعددة كوسيلة لتمييز البكتريا المعزولة من مصادر مختلفة بصورة دقيقة وتشخيص مقاومتها للمضادات الحياتية الشائعة الاستعمال بوقت قصير وجهد اقل دون الرجوع الى الفحوصات الروتينية المعروفة.

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠

تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦

تاريخ النشر: ٢٠١٧ / ٤ / ٣٠

DOI:10.37652/juaps.2015.124384

الكلمات المفتاحية:

multiplex PCR,
antibiotic resistance,
Klebsiella pneumoniae,
virulence gene.

المقدمة

وهي من الممرضات الانتهازية المهمة التي تسبب العدوى المكتسبة من المستشفيات والتي تهدد الحياة وتسبب الأمراض السريرية المكتسبة كالتهاب مجرى الدم والالتهابات التي تصيب الأطفال الخدج في وحدات العناية المركزة وان سلالات الكلبسيلا الرئوية مقاومة لعدد من الأدوية وأصبحت متزايدة وذات صلة بالمشاكل الطبية في جميع انحاء العالم مما تؤدي الى جعل الخيارات العلاجية السريرية محدودة لذا برزت الحاجة لتطوير استراتيجيات علاجية جديدة فضلاً عن العلاج بالمضادات الحيوية التقليدية [3]. لقد ظهرت في العقود الثلاثة الاخيرة عزلات غازية من الكلبسيلا الرئوية تسبب اصابات خطيرة تتضمن تقنيات الكبد والتهابات باطن

تعد الكلبسيلا الرئوية من بين أكثر الأجناس البكتيرية السالبة لملون كرام المسببة للأمراض [1]. وتنتشر الكلبسيلا الرئوية في اماكن واسعة من البيئة وهي التربة والمياه والنباتات وهذه البكتريا أصبحت تغطي مياه الصرف الصناعية [2].

* Corresponding author at: University of Anbar/College of Science .E-mail address:

من قدرة البكتريا على التهرب من البلعمة من قبل الفاجات الكبيرة [9].
يمنح لزوجية عالية للنمط الظاهري وينظم تصنيع السكريات المتعددة
للمحفظة وقد وصف لأول مرة من قبل Nassif والذي اوضح ان ازالة
الجين *mpa* يمكن ان يقلل من الضراوة ،وقد اثبتت الدراسات ان
السلالات التي تحمل جين *mpa* مرتبطة مع النمط المظهري الذي
يعرف بأسم فرط للزوجية المخاطية [5]. ومن ناحية اخرى ان *mpa*
يلعب دورا ثانويا في الضراوة مقارنة مع وجود النمط المصلي
K1, K2 وان هذا الجين المشفر ينظم النمط المخاطي الظاهري الذي قد
يكون موجوداً على كروموسوم البكتريا او على البلازميد [7].

اما جين *Uge* فيشارك هذا الجين في تصنيع الحامض
galacturonic acid من *UDP-gluconic acid* وهذا الجين
يعتبر جزء من الكتلة الحيوية المصنعة للعديد السكريد الدهني *Lipo*
poly saccharide بسبب ان سكاريد المحفظة يحتوي على
الحامض *gluconic acid* الذي يدخل في تركيبها [10].

تتميز *CTX-M* بتحللها الأنتقائي للسيفوتاكسيم (Cefotaxime)
بدلا من سيفاتزيديم (Ceftazidime) على الرغم من ان بعض أنواع
CTX-M مثل *CTX-M-15* يمكن ان تحلل *Ceftazidim* [11].

يعتبر جين *HtrA* من الجينات المسؤولة عن
تصنيع *Lipopolysaccharide* في الكليسيلا الرئوية المتميزة وراثيا
ويعد من الأليات الجديدة لضراوة الكليسيلا الرئوية. أن التحليل الجيني
للكروموسومات المطفرة حددت وجود نواقل في جين *HtrA* وهو
يشارك في ضراوة انواع مختلفة من الكائنات الحية وان طفرات هذا
الجين في هذه الانواع أظهرت انخفاضاً في قدرتها على البقاء على قيد
الحياة في الفاجات الكبيرة ربما بسبب زيادة الحساسية للأجهد
التأكسدي يجعلها أكثر عرضة لأليات القتل التي تعتمد على أوكسجين
المضيف [12] وهذا الجين له دور كبير في مساعدة الكائنات الحية
على البقاء تحت الضغوط البيئية على قيد الحياة مثل الأجهد
التأكسدي ودرجات الحرارة العالية [13].

المواد وطرائق العمل

جمع العينات وتشخيص العينات:-

تم جمع (399) عينة من بيئات مختلفة والتي شملت
السريرية والغير سريرية حيث جمعت 293 عينة من حالات سريرية
مختلفة شملت (ادرار، خروج، جروح، حروق، قشع) من مستشفى
الرمادي التعليمي العام اما الغير سريرية شملت (التربة والمياه) جمعت

العين والتهابات السحايا وهذه الاصابات قد تؤدي الى الموت وقد اقترنت
هذه الاصابات بالانماط المصلية للكليسيلا الرئوي *K1* و *K2*. وتعد هذه
الانماط من اخطر الانماط المصلية لامتلاكها عوامل ضراوة تمكنها من
التهرب من الجهاز المناعي للمضيف والتسلل الى مجرى الدم ومن ثم
غزو الانسجة وخاصة الصفة المظهرية فرط الزوجية المخاطية
Hyper mucoviscosity phenotype [4]. تتوزع البكتريا على
نطاق واسع في الجهاز الهضمي *gastro intestinal* والجهاز البولي
urinary tract والجهاز التنفسي *respiratory tract* وكذلك توجد
بصورة طبيعية لدى الاشخاص الاصحاء وهي تسبب العدوى الأنتهازية
خصوصاً عدوى المستشفيات ويسبب هذا المرض التهاب الجهاز
التنفسي الحاد مثل الالتهاب الرئوي ومن الأمراض الاخرى الناجمة
عن هذا الكائن تشمل التهاب المسالك البولية *urinary tract*
infection والتهاب الجروح *wound infection* والخراجات
abscesses والتسمم *sepsis* والاسهال *diarrhea*
ومعظم الكليسيلا الرئوية مرتبطة بمعدل الوفيات في المستشفى اذا
عولجت بشكل غير صحيح [5]. تمتلك الكليسيلا الرئوية العديد من
جينات الضراوة الجديدة اذ يعد جين *magA* جين كروموسومي يسبب
فرط للزوجية المخاطية *hyper mucoviscosity* كما حددت
بواسطة النتائج الأيجابية في أختبارات سلسلة للزوجية والمادة
المخاطية *mucoviscosity* وهذا الجين يعتبر جزءا من سكاريد
المحفظة *polysaccharide* المرتبط بالنمط المصلي *K1* ويساهم في
فوعة البكتريا [6]. لقد تم تحديد الجين *magA* بأنه جين الضراوة
والجين المرتبط بالزوجية في السلالات المسببة للأمراض في تايوان
والمسببة لقرحات الكبد وقد وصف هذا الجين بأعتبره عامل من
عوامل الفوعة او الضراوة الجديدة المسؤولة عن زيادة الضراوة في
بعض سلالات الكليسيلا الرئوية [7].

أن جين الضراوة *magA* الذي يرتبط بلزوجية أصبح مؤخرًا
معروف في السلالات المرضية في الكليسيلا الرئوية وتم الكشف عنه
في الغالبية العظمى في الكليسيلا الرئوية المعزولة من خراجات الكبد
والمرتبطه مع *HIV* والتي تكون مقاومة للقتل من قبل المصل والبلعمة
[8]. كما يعد جين *mpa* المسؤول عن الصفة المظهرية فرط للزوجية
المخاطية وهو من عوامل الضراوة الاخرى الموجودة في الجنس
Klebsiella والمنقولة عن طريق البلازميد وان منظم النمط المظهري
المخاطي *A* الذي يشفر تصنيع سكريات المحفظة هذا الجين قد يزيد

rmpA.F	5'- ATGTGGCTTGACGTTTCGGGGG-3'	191
rmpA.R	5'- CATTGCAGCACTGCTTGTTCCTTT- 3'	
gent. F	5'- ATGCATCGATGGTCGCGGTTGG-3'	390
gent. R	5'- AGCACTGAGCAAAGCCACGAC- 3'5'	
terA. F	5'- CCGTGAACAGCTTTTCGTGGGCA-3'	103
terA. R	5'- TCCGTCAGCTGATAACGGGCCA- 3'5'	
blaCTX F	5'- GCTTIGCGATGTGCAGCACCAG-3'	497
blaCTX R	5'- AACCCAGGAAGCAGGCAGTCCA- 3'5'	
strA. F	5'-CGCAATGCCGTCATCCCGACT- 3'	299
strA. R	5'- AAGGCGCGCTCTGCTTCATCTG- 3'5'	

HtrA: high temperature requirement A ,Uge: uridinediphosphate galacturonate4-epimerase , magA: mucoviscosity associated geneA , terA: tetracyclines ,StrA: streptomycinA, rmpA: regulatore of mucoidphenotypeA ,gent: gentamycin, blaCTX: B-Lactamase cefotaxime

التحري عن الجينات البكتيرية باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل

-:Multiplex PCR

حضر مزيج التفاعل الرئيسي الغير حاوي على الـ DNA المستخلص من العزلات البكتيرية لعمل تفاعل MultiplexPCR ليكتريا *K. pneumoniae* وتم تحضير مزيج تفاعل لـ ٥١ عينة DNA من هذه البكتريا بالإضافة الى ذلك تم اضافة عينة سيطرة سالبة مع البادئات التي من المفترض ان تعطي نتيجة سالبة لهذه البكتريا ليصبح عدد العينات الكلية لكل مزيج تفاعل ٥٢ عينة ومن ثم وزع المحلول التفاعل الرئيسي على انابيب سعة ٠.٢ مليليلتر وبحجم ٢٢ مايكروليلتر لكل انبوبة بعدها اضيف الى كل انبوبة ٣ مايكروليلتر من الـ DNA الخاص بكل عينة ليصبح الحجم النهائي لكل عينة ٢٥ مايكروليلتر باستثناء السيطرة السالبة بعدها وضعت العينات في جهاز البلمرة الحراري وضبطت الظروف المثلى لتنفيذ تقنية PCR كما في الجدول رقم (٢) ثم حمل المزيج في حفر هلام الاكاروز المحضر بتركيز ١.٥% (٦٠ دقيقة، ٧ فولت/ سم^٢) للكشف عن وجود الجينات.

جدول (٢) الظروف المثلى للتفاعل

Step	Temperature	Time	No.of cycles
Pre-Denaturation	95 C°	3 min	30
Denaturation	95 C°	30 sec	
Annea ling	58 C°	1 min	
Extension	72 C°	1 min	
Final Extension	72 C°	7 min	

١٠٦ عينة من اماكن مختلفة وللفترة الواقعة من تشرين الثاني ٢٠١٤ ولغاية شهر شباط ٢٠١٥. واجريت الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية اعتمادا على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا [14],[15], [16] اضافة الى استخدام نظام API20E واخيرا تم استخدام التشخيص الكيموحيوي باستخدام جهاز vitek2 ومن ثم اختبرت مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص طبقا لـ [17] للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الحيوية باستخدام مجموعة من اقراص المضادات الحيوية المجهزة من قبل شركة Al-Raze العراقية استخلاص وتنقية الدنا الجينومي:-

تم الاستخلاص باستعمال عدة الاستخلاص المجهزة من شركة Geneaid واعتمادا على تعليمات الشركة المصنعة تمت عملية استخلاص الحمض النووي DNA من العزلات البكتيرية البالغ عددها ٥١ عينة بكتيرية التي تم تشخيصها مسبقا.

البادئات المستخدمة:-

صممت عدة بادئات نوعية والتي تم تصميمها بشكل خاص لهذه الدراسة لغرض دراسة جينات الضراوة ومقاومة المضادات الحيوية بأعتماد برنامج 3Primers والخارطة الجينية لبكتريا الكليسيلا الموجوده على موقع NCBI والتي تستهدف جينات الهدف (htrA, htrA, StrA, blaCTX, terA, rmpA, magA, Uge) والتي جهزت بشكل مسحوق مجفف (Lyophilized) من شركة Bioneer وقد تمت اعادة تدويرها بحجم من الماء المقطر والمعقم بحسب توصيات الشركة والحصول على محلول خزين لكل بادئ بتركيز ١٠٠Pmol/μl ثم حفظ هذا المحلول الخزين بدرجة حرارة -٢٠م.

جدول (١) البادئات المستخدمة في الدراسة Primer Selection

اسم البادئ	تسلسل البادئ	حجم الناتج (bp)
htrA. F	5'- GCTGGTGAACCTCAACGGCGAA-3'	447
htrA. R	-ACCTGGGTCTGGTTGCTCTGCT-3' 5'	
uge. F	5'- TGTAATCCCGCAGGCCAATGCC-3'	260
uge. R	CCTTCACTGACGTTTTCGCGCCT- 3'5'	
magA.F	5'- AGGTCAGGCAGCTGTTGTGAACG- 3'	323
magA.R	ACTGGCCATATTGCTCCGTTGC- 3'5'	

الخروج	R	46	R	26	30	22	16	R	R	36	R	34
الادراج	R	36	R	R	30	20	24	R	R	30	R	30
القشع	R	34	R	R	40	36	20	30	30	24	R	30
التربة	18	36	R	20	30	43	24	30	30	36	R	30
المياه	R	40	R	R	34	R	R	R	R	30	R	30

النتائج والمناقشة

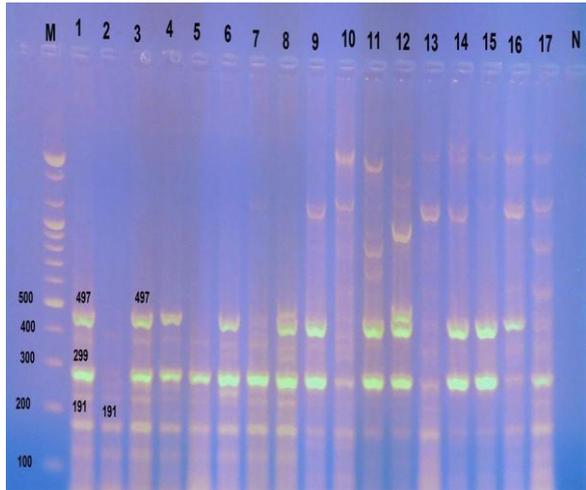
بعد اجراء الفحوصات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المعزولة من المصادر السريرية والغير سريرية تم تشخيص ٥١ عزلة من مجموع العينات الكلي والمعزولة من مصادر مختلفة (ادراج، حروق، قشع، خروج، جروح، التربة واخيرا المياه وتعد الاخيرتان من المصادر البيئية) والبالغ عددها ٣٩٩ وذلك اعتمادا على الصفات الزرعية والمجهية والكيموحيوية وباستخدام نظام API20E وكذلك استخدم جهاز الفايتهك2 vitek. اذ اظهر الفحص المجهرى والتصبيغ بصبغة كرام بانها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام مرتبة بشكل مفرد او مزدوجة او بشكل سلاسل قصيرة مطابقة لما جاء في [18]. اجري اختبار مقاومة المضادات بطريقة الاقراص لمعرفة مدى حساسية او مقاومة عزلات بكتريا *K.pneumoniae* تجاة ١٢ مضادا حيويًا. اعتمادا على قطر منطقة التثبيط المحيطة باقراص هذه المضادات ومن ثم مقارنتها مع الجداول القياسية الواردة في [19]. وظهرت النتائج المبينة في الجدول (٣) ان هنالك تباينا واضحا في مقاومة العزلات قيد الدراسة تجاة المضادات المستعملة فقد اوضحت النتائج ان العزلات المحلية لبكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من مناطق اصابات مختلفة ومصادر بيئية شملت التربة والمياه كانت مقاومة لاغلب المضادات الحيوية واختلفت العزلات فيما بينها بين مقاومة وحساسة للمضادات الحيوية قيد الدراسة. بينما كانت البكتريا حساسة بنسبة ١٠٠% فقط للمضاد الحيوي Imipenem. وهذه النتيجة متوقعة ربما يعود السبب الى الاستعمال الواسع والعشوائي للمضادات الجرثومية وقلة الوعي الصحي بالاضافة الى استخدام معقمات عشوائية من قبل السكان لتعقيم مياه الشرب وهذا يقود الى تطور اليات مقاومة في سلالات بكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية [20].

جدول (٣) مقاومة البكتريا *Klebsiella pneumoniae*

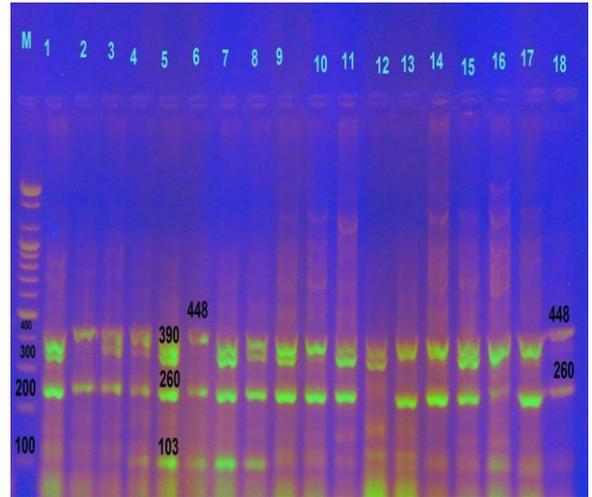
للمضادات الحيوية من مختلف مناطق العزل

العزلات	AK	AMC	CIP	CTX	CFM	GN	TMP	Cm	TE	CEP	IPM	V
الجروح	R	R	40	R	R	R	30	36	16	R	28	20
الحروق	R	R	34	R	R	R	40	30	R	R	20	R

من خلال استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل Multiplex PCR وباستخدام ثمانية بوادئ حيث قسمت هذه البوادئ الى مجموعتين، المجموعة الاولى شملت البادئات الاربعة المستخدمة للتعرف على اربع مناطق جينية وهي (*Uge-1, htrA, gent-2, terA*) حيث تبين عند دمج هذه الجينات الاربعة في تفاعل واحد اظهرت النتائج الموضحة في الصورة (١) ظهور الجين التشخيصي اضافة الى جينات البوادئ للمضادات الحيوية (*Uge-1, terA-1, gent-2*) في جميع العزلات البكتيرية مع ظهور حزم واضحة في العزلات (١٨، ١٥، ٢٠، ١) اما بالنسبة للبادئ *htrA* لم يظهر هذا البادئ في بقية العزلات وان ظهور جينات الضراوة الاربعة في اغلب عينات البكتريا المعزولة من الادراج يشير الى ضراوة العزلات فضلا عن مقاومتها لاغلب المضادات الحيوية وهذا ما يؤكد ان لبكتريا *K.pneumoniae* دورا مهما في احداث الخمج بالمجري البولية طبقا لما ذكره [21]. فضلا عن متعدد السكريد المكون للمحفظة ومتعدد السكريد الشحمي فان بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك اليات اخرى لمقاومة التأثير القاتل في نظام المتمم وتشمل تلك الاليات انتاج الانزيم المحلل لبروتين السيرين المحفز بالصدمة الحرارية والذي يشفر من قبل جين *htrA* [22]. ووضحت النتائج وجود جين *Uge* في العزلات البكتيرية يدل على حملها لاحد عوامل الضراوة التي لها دور كبير في امراضية البكتريا اذ يعبر الجين عن متعدد السكريات مع المستند O مع وجود الكبسولة على جدران البكتريا [23].



صورة (٢) : ناتج تفاعل PCR للكشف عن جينات الضراوة باستعمال البودائ الأربعة *rmpA* وحجمها 191 زوج قاعده ، *strA* وحجمها 299 زوج قاعده ، *magA* وحجمها 323 زوج قاعده ، *bla CTX* وحجمها 497 زوج قاعده)، المسار M DNA قياسي ، المسار 1-3 عزلات الخروج ، المسار 4-9 عزلات الحروق ، المسار 10-13 عزلات الماء ، المسار 14-18 عزلات الادرار ، بأستعمال هلام الاكاروز 1.5% (60 دقيقة ، 7 فولت اسم^٢) .



صورة (١): تفاعل PCR للكشف عن جينات الضراوة بأستعمال البودائ الأربعة (1 - *terA* وحجمها 103 زوج قاعده ، *uge-1* وحجمها 260 زوج قاعده ، *gent-2* وحجمها 390 زوج قاعده ، *htrA* وحجمها 447 زوج قاعده)، المسار M DNA قياسي ، المسار 1-3 عزلات الخروج ، المسار 4-9 عزلات الحروق ، المسار 10-13 عزلات الماء ، المسار 14-18 عزلات الادرار ، بأستعمال هلام الاكاروز 1.5% (60 دقيقة ، 7 فولت اسم^٢) .

كما أشار [30] الى الاسس الجزيئية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من احدى مستشفيات بكين وجدوا انتشار الجينات المشفرة لانزيمات البيتا لكتاميز بينها بشكل واسع ولكنها اختلفت في نسبة انتشارها بين العزلات ويعزى ذلك الى كون الجينات المحمولة على بلازميدات اقترانية تنتشر بشكل اسرع عن طريق عملية الاقتران فضلا عن اختلاف الجينات عن بعضها في نسبة انتقالها بعملية التحول.

المصادر

- [1]Manikandan C and Amsath A.(2013) Antibiotic susceptibility pattern of *Klebsiella Pneumoniae* isolated from urine samples. *International Journal of Current Microbiology*. APP.Sci Vol.2 No.8 PP.330-337.
- [2]Brisse S, Grimont F, and Grimont P.A.D (2006) The Genus *Klebsiella* Prokaryotes 6:159-196 CHAPTER 3.3.8
- [3]Hackstein H, Kranz S, Lippitsch A, Wachtendorf A, Kershaw O, Gruber A.D, Michel G, Lohmeyer J, Bein G, Baal N and Herold S.(2013) Modulation of respiratory dendritic cells during *Klebsiella Pneumoniae* infection . *Respiratory*

اما المجموعة الثانية شملت الجينات (*rmpA*, *magA*, *StrA*, *blaCTX*) حيث تبين بانه عند دمج هذه الجينات في تفاعل واحد اظهرت النتائج الموضحة في صورة (٢) ظهور المناطق الجينية للجينات الأربعة في جميع العزلات وتفاوتت ظهورها من عذلة الى اخرى اعتمادا على نوع ومكان عزل البكتريا وضراوتها وقد ظهر بان جميع العزلات تمتلك جين الضراوة *rmpA* مما يدل على امتلاك العزلات فرط لزوجة مخاطية منتجة من جين *rmpA* والذي يقع على بلازميد اقتراني كبير الحجم حسب ما اشار اليها، [24][25] وان امتلاك العزلات لجين *rmpA* من الصفات التشخيصية وتدل الى ان العزلة ذات نمط مصلي نوع K2 [26] . ومعظم العينات الحاملة لجين *rmpA* تحمل ايضا جينات انتاج انزيم *blaCTX* وهذا يطابق ما اشار اليه [27] [28]، وان امتلاك العينات لجين *magA* هو محدد بالنمط المصلي K1 ويرتبط بالصفة فرط اللزوجة المخاطية نلاحظ من خلال هذه النتائج الحصول على نسبة قليلة من البكتريا تابعة للنمط المصلي K1 وتغلب النمط المصلي K2 على [29] K1 بينما تمتلك جميع العزلات على جين الضراوة *StrA* مما يدل على ضراوة العزلات ومقاومتها للمضادات الحيوية قيد الدراسة.

- pneumonia Virulence. *INFECTION AND IMMUNITY*. Vol.70 ,No.9 PP. 4772-4776.
- [13] Ibrahim Y.M (2013) Attenuated HtrA-mutant of streptococcus pneumonia induces protection in murine models of pneumococcal pneumonia and bacteraemia. *African Journal of Microbiology Research* Vol.7(3), PP. 237-244
- [14] Bergeron M. G and Kee D.(2001). New DNA-Based PCR Approaches For Rapid Real-Time Detection and Prevention of GBS Infection In New borns and Pregnant women. *J.Molec.Medi.*;3:1423.
- [15] Macfaddin, J.F.(2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia .London.
- [16] Prescott ,L.M.;Harly, J.P.and Klein, D.A. (1996). *Microbiology*, 3rd ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., U.S.A.
- [17] Vandepitte J, Engback K., Piot,P. and Heuck C.C.(1991). *Basic Laboratory Procedures in clinical Bacteriology*. WHO, Geneva.,PP: 78- 110.
- [18] Holt , J.J., Krieg , N.R., Sneath , B.H.A., Staley ,J.T. and Williams ,S.T. (1994). *Bergey's manual determinative bacteriology*. 9th Ed. Williams and Wilken , Baltimore , PP.175-248.
- [19] CLSI, (Clinical and laboratory standars in statute) (2007). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement M100-S17. Vol. 27 No (1).
- [20] Woodford, N.; ward, M.E.; kanfmann, M.E.; Fagan, J.; James, D.J.; Johnson, A.D., warner, R.; pearson, A.; Leach, J.S.; warren, M and Livemore, D.M. (2006). Molerular characterization of Escherichia coli isolates producing CTX-M-5 extended spectrum B-Lactamases (ESBLs)in the united kingdom. *Health protection Agency.*, 57: 154-155.
- [21] Petite, p.l., schneeberger, p., lidala, V., Butter, M., Wamola, IA. (1991). Bacteriology of infections in aural tropical area of Kenya: isolates and antibiotic Susceptibility. (abs). *East. Afr. Med. J.*, 68 (7): 500-6.
- [22] Cortés G., de Astorza B., Benedi V.J and Alberti S. (2002). Role of the htrA Gene in Klebsiella pneumoniae Virulence. *Infection and Immunity*; 70(9) pp 4772- 4776.
- [23] Regue, M., Hita, B., Pique, N., Izquierdo, L., Merino, S., Fresno, S., Benedi, V. J., and Tomas J. M.: A Gene, uge, Is Essential for Research :14:91 PP. 1-11 [http:// respiratory-research.com/ content/14/1/91](http://respiratory-research.com/content/14/1/91).
- [4] Fang C.T., Shan Y.L., Wen C.Y., PoR. H., Kao L.L.(2010). The Function of wzy-k1 (maga) the Serotype K1 polymerase Gene in klebsiella pneumonia CPS Gene cluster. *The Journal of Infections Diseases*. 201:1268-1269.
- [5] Al-Jailawi M. H, Zedan T.H and Jassim K.A, (2014). Multiplex PCR Assay for Identification of Klebsiella pneumonia. *Int.J.Pharm .Sci. Rev .Res .*,26(1) No.18 Pages: 112-117.
- [6] Aher, T, Roy ,A. and Kumar P(2012). Molecular Detection of Virulence Genes Associated with Pathogenicity of Klebsiella spp. Isolated from the Respiratory Tract of Apparently Healthy as well as Sick Goats. *Israel Journal of Veterinary Medicine* Vol. 67(4) .PP. 249-252.
- [7] Abdul Razzaq M.S, Trad J.K and Al-Maamory E .H .KH. (2013). Genotyping and Detection of Some Virulence Genes of Klebsiella pneumonia Isolated from clinical Cases. *Medical Journal of Babylon* Vol.10, No.2, PP.387-399.
- [8] Zamani A, Mashouf R.Y, Namvar A.M.E and Alikhani M. Y.(2013). Detection of magA Gene in Klebsiella spp. Isolated from Clinical Samples .*Iranian Journal of Basic Medical Sciences* ;16(2), PP. 173-176.
- [9] Turton J.F, Perry C, Elgohari S and Hampton C.V(2010). PCR characterization and typing of Klebsiella pneumonia using capsular type- specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *Journal of Medical Microbiology*, 59; PP.541-547.
- [10] Fevre C, Passet V, Detetoile A, Barbe V, Frangeul L, Almeida A.S, Sansonetti Ph, Tournebize R and Brisse S(2011). PCR-Based Identification of Klebsiella pneumoniae Subsp. Rhinoscleromatis, the Agent of Rhinoscleroma . *PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES* VOL.5, Issue 5, e1052 pp. 1-7.
- [11] Ahmed O.I, EL-Hady S.A, Ahmed T.M and Ahmed I.Z (2013). Detection of blaSHV and blaCTX-M genes in ESBL producing Klebsiella pneumonia isolated from Egyptian Patients with suspected nosocomial infections .*The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* ,14, PP.277-283.
- [12] Cortes G, Astorza B.d, Benedi V .J and Alberti S(2002). Role of the htrA Gene in Klebsiella

- rRNAmethylasesconferring high-level aminoglycoside resistance in Escherichia coliandKlebsiellapneumoniaeisolates from two Taiwanese hospitals. JAntimicrobChemother 54, 1007–1012.
- [28]Yang Zhang,¹ Hua Zhou,¹ Xiao-qiang Shen,² Ping Shen,¹ Yun-song Yu¹and Lan-juan Li. Plasmid-borne armAmethylase gene, together with blaCTX-M-15 and blaTEM-1, in a Klebsiellaoxytocaisolat from China. Journal of Medical Microbiology (2008), 57, 1273–1276 .
- [29]Lin,Y.T., Yuan,Y. J., Chen ,T. L., Chang,P. F. (2010). Bacteremic community-acquired pneumonia due to Klebsiellapneumoniae: Clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008. BMC Infectious Diseases, 10:307.
- [30]Li B., Yi Y., Wang Q., Woo P.C.Y., Tan L., Jing H., Gao G.F and Liu C.H. (2012). Analysis of Drug Resistance Determinants in Klebsiellapneumoniae Isolates from a Tertiary-Care Hospital in Beijing, China. PLoS ONE 7(7): e42280
- K.pneumoniaVirulence. Infect. Immun. 54–61, 2004
- [24]Lin H. An ,HuangYa. Li, Yeh K. M, Siu L.K, Lin J.Ch and Chang F.Y,(2014) Regulator of the mucoid phenotype A gene increases the virulent ability of extended- spectrum beta-lactamase-producing serotype non-K1/K2 Klebsiella pneumonia .Journal of Microbiology ,Immunology and infection (2014) xx,1-8.
- [25]Gonza´lez-Zorn, B., Catalan, A., Escudero, J. A., Dominguez, L,Teshager,T.,Porrero,C.andMoreno,M.A.(2005).G enetic basis for dissemination of armA.JAntimicrob Chemother.56,583-585.
- [26]Galimand, M., Courvalin, P. & Lambert, T. (2003). Plasmid-mediatedhigh-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to16S rRNA methylation.Antimicrob Agents Chemother 47, 2565–2571.
- [27]Yan, J. J., Wu, J. J., Ko, W. C., Tsai, S. H., Chuang, C. L., Wu, H. M., Lu,Y. J. & Li, J. D. (2004). Plasmid-mediated 16S

Use Multiplex PCR For Detection of Some Virulence Genes of Klebsiella Isolated From Different Environmental loci.

Zena J. Mohammed.Ali H. Abdulkareem. Ahmed A. Sulaiman

E.mail :

Abstract:-

This study includes collected of 399 samples from different sources included clinical and non clinical samples. 293 clinical samples (urine, wounds, burns, stool, sputum). Non- clinical samples included 106 samples (water, soil) from November 2014 through February 2015. 51 samples were diagnosed as *K. pneumoniae* using phenotypic, biochemical and cultural diagnosis features and definitely diagnosed with API20E and vaitek test. Results of antibiotic resistance against different antibiotics showed that *K. pneumoniae* isolated from clinical and non- clinical samples varied in their resistance to these antibiotics and all isolates were sensitive 100% to Imipenem. A number of specific primers were designed to detect bacteria by using distinct gene and also to detects resistance to antibiotics using multiplex PCR technology for the presence or absence of 8 genes(*magA*, *rmpA*, *htrA*, *Uge-1*, *gent-2*,*blaCTX*, *terA-1*,*StrA-2*) that encodes for main virulence factors to diagnose *K. pneumoniae*. The result showed that that 45 isolates had *rmpA* which might be used as detection marker, in the same reaction of multiplex PCR detection of 4 genes related with resistance to different antibiotic groups(*StrA*,*terA*,*blaCTX*,*gent-2*) were done all *K.pneumoniae* contained *StrA* gene. According to this study we can concluded that multiplex PCR can use to distinguish isolated bacteria from different sources more correctly and also to determine its antibiotic resistance that are widely used in short time and little effort without need to routine testing.