ISSN: 1991-8941

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 ٣٩٩عينة من بيئات مختلفة والتي شملت السريرية والغير سريرية حيث جمعت ٢٩٣عينة سريرية(ادرار، جروح،حروق، خروج، قشع) اما الغيرسريرية (التربة والمياه) فقد كان مجموعها١٠٦ عينة خلال الفترة من تشرين الثاني ٢٠١٤ ولغاية شباط ٢٠١٥.تم تشخيص ٥١ عزلة بكتيرية تعود الى بكتريا *K. pneumoniae* بأستخدام طرق التشخيص المظهرية والزرعية والكيموحيوية وتم تأكيد التشخيص بأستخدام API20E وبأستخدام جهازالفايتك vaitek2.أظهرت نتائج اختبار مقاومة المضادات للعينات المعزولة من الحالات المرضية المختلفة والمصادرالبيئية (التربة،المياه) لـ١٢ من المضادات الحياتية من مختلف المجاميع تباينا فيما بينها بين مقاومة وحساسة لهذه المضادات بينما كانت البكتريا حساسة وبنسبة١٠٠% فقط للمضاد الحيوي Imipenem.صممت عدد من البادئات المتخصصة للكشف عن البكتريا باستخدام جين مميز فيها والكشف ايضا عن مقاومتها للمضادات بأستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex PCR للكشف عن وجود او غياب ثمانية انواع من الجينات *K. pneumoniae*.واظهرت النتائج وجود تباين في المحتوى الجيني بين العزلات فقد احتوت ٤٥عزلة بكتيرية على الجين rmpA والذي يمكن ان يتخذ كمؤشرتشخيصي وفي نفس التفاعل تم الكشف عن وجودجينات مقاومة لأربعة من المضادات الحياتية العائدة الى مجاميع مختلفة (*Str*A, *ter*A ,*bla*CTX, *gen*t−2) حيث احتوت كل عزلات*K.pneumoniae* على جين *Str*A. ومن خلال هذه الدراسة يمكن استثمار تقنية البلمرة التسلسلية المتعددة كوسيلة لتمييز البكتريا المعزولة من مصادرمختلفة بصورة دقيقة وتشخيص مقاومتها للمضادات الحياتية الشائعة الاستعمال بوقت قصير وجهد اقل دون الرجوع الى الفحوصات الروتينية المعروفة.

كلمات مفتاحية: multiplex PCR, antibiotic resistance, *Klebsiella pneumonia*, virulence gene

المقدمة

تعد الكليبسيلا الرئوية من بين أكثر الأجناس البكتيرية السالبة لملون كرام المسببة للأمراض [1]. وتنتشر الكليبسيلا الرئوية في اماكن واسعة من البيئة وهي التربة والمياه والنباتات وهذه البكتريا أصبحت تغطي مياه الصرف الصناعية[2]. 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 ستراتيجيات علاجية جديدة فضلاً عن العلاج بالمضادات الحيوية التقليدية [3].لقد ظهرت في العقود الثلاثة الاخيرة عزلات غازيه من الكلبسيلا الرئوية تسبب اصابات خطيرة تتضمن تقيحات الكبد والتهابات باطن العين والتهابات السحايا وهذه الاصابات قد تؤدي الى الموت وقد اقترنت هذه الاصابات بالانماط المصلية للكلبيسيلا الرئويه K1وK2. وتعد هذه الانماط من اخطر الانماط المصلية لامتلاكها عوامل ضراوة تمكنها من التهرب من الجهاز المناعي للمضيف والتسلل الى مجرى الدم ومن ثم غزو الانسجه وخاصة الصفه المظهرية فرط الزوجيه المخاطيه Hyper mucoviscosity[4] phenotype.تتوزع البكتريا على نطاق واسع في الجهازالهضميgastro intestinal والجهازالبولي urinary tractوالجهازالتنفسيrespiratory tract وكذلك توجد بصورة طبيعية لدى الاشخاص الاصحاء وهي تسبب العدوى الأنتهازية خصوصاً عدوى المستشفيات ويسبب هذا الممرض التهاب الجهاز التنفسي الحاد مثل الالتهاب الرئوي ومن الأمراض الاخرى الناجمة عن هذا الكائن تشمل التهاب

المسالك البولية urinary tract infection والتهابالجروح wound infection والخراجات abscesses والتسمم sepsis والاسهال diarrhea ومعظم الكلبسيلا الرئوية مرتبطةبمعدل الوفيات في المستشفى اذا عولجت بشكل غير صحيح[5].

تمتلك الكليبسيلا الرئوية العديد من جينات الضراوة الجديدة اذ يعد جين A*mag*جين كروموسومي يسبب فرط اللزوجة المخاطيةhyper mucoviscosity كما حددت بواسطة النتائج الأيجابية في أختبارات سلسلة اللزوجة والمادة المخاطية mucoviscosity وهذا الجين يعتبر جزءا من سكارید المحفظة polysaccharide المرتبط بالنمط المصلي K1 ويساهم في فوعة البكتريا [6] .لقد تم تحديد الجين A *mag* بأنه جين الضراوة والجين المرتبط باللزوجة في السلالات المسببة للأمراض في تايوان والمتسببة لتقرحات الكبد وقد وصف هذا الجين بأعتباره عامل من عوامل الفوعة اوالضراوة الجديدة المسؤولة عن زيادة الضراوة في بعض سلالات الكليبسيلا الرئوية [7].

أن جين الضراوة A*mag*الذي يرتبط بلزوجية أصبح مؤخرا معروف في السلالات المرضية في الكليبسيلا الرئوية وتم الكشف عنه في الغالبية العظمى في الكليبسيلا الرئوية المعزولة من خراجات الكبد والمرتبطه مع HIV والتي تكون مقاومة للقتل من قبل المصل والبلعمة [8]. كما يعد جين *rmpA* المسؤول عن الصفة المظهرية فرط اللزوجة المخاطية وهو من عوامل الضراوة الاخرى الموجودة في الجنس *Klebsiella* والمنقولة عن طريق البلازميد وان منظم النمط المظهري المخاطيAالذي يشفر تصنيع سكريات المحفظةو هذا الجين قد يزيد من قدرة البكتريا على التهرب من البلعمة من قبل الفاجات الكبيرة[9]. يمنح لزوجية عالية للنمط الظاهري وينظم تصنيع السكريات المتعددة للمحفظة وقد وصف لاول مرة من قبل Nassifوالذي اوضح ان ازالة الجين A*rmp*يمكن ان يقلل من الضراوة ،وقداثبتت الدراسات ان السلالات التي تحمل جين A*rmp*مرتبطة مع النمط المظهري الذي يعرف بأسم فرط اللزوجية المخاطية[5].ومن ناحية اخرى ان A*rmp* يلعب دورا "ثانويا" في الضراوة مقارنة مع وجود النمط المصلي K2,K1وان 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 acidمنUDP-glucoronic acid وهذا الجين يعتبر جزء من الكتلة الحيوية المصنعة للعديد السكريد الدهنيLipo poly saccharide بسبب ان سكارید المحفظة يحتوي على الحامضglucoronic الذي يدخل في تركيبها[10].

تتميز CTX-Mبتحللها الأنتقائي للسيفوتاكسيم (Cefotaxime) بدلا من سيفتازيديم (Ceftazidime) على الرغم من ان بعض أنواع CTX-Mمثل CTX-M-15 يمكن ان تحلل.Ceftazidim[11].

يعتبر جين*Htr*A من الجينات المسؤولة عن تصنيع Lipopolysaccharideفي الكليبسيلا الرئوية المتميزة وراثيا ويعدمن الأليات الجديدة لضراوة الكليبسيلا الرئوية .أن التحليل الجيني للكروموسومات المطفرة حددت وجود نواقل في جين HtrAوهو يشارك في ضراوة انواع مختلفة من الكائنات الحية وان طفرات هذا الجين في هذه الانواع أظهرت أنخفاضا في قدرتها على البقاء على قيد الحياة في الفاجات الكبيرة ربما بسبب زيادة الحساسية للأجهاد التأكسدي يجعلها أكثر عرضة لأليات القتل التي تعتمد على أوكسجين المضيف[12] وهذاالجين له دور كبير في مساعدة الكائنات الحية على البقاء تحت الضغوط البيئية على قيد الحياة مثل الأجهاد التأكسدي ودرجات الحرارة العالية[13].

المواد وطرائق العمل

جمع العينات وتشخيص العينات:-تم جمع (٣٩٩) عينة من بيئات مختلفة والتي شملت السريرية والغيرسريريةحيث جمعت ٢٩٣ عينة من حالات سريرية مختلفة شملت(ادرار ،خروج،جروح،حروق،قشع)من مستشفى الرمادي التعليمي العام اما الغير سريرية شملت (التربةوالمياه)جمعت ١٠٦ عينة من اماكن مختلفة وللفترة الواقعه من تشرين الثاني ٢٠١٤ولغاية شهرشباط 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 الحياتية بطريقة الاقراص طبقا لـ[17] للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الحياتية بأستخدام مجموعة من اقراص المضادات الحياتية المجهزة من قبل شركة Al-Raze العراقية

استخلاص وتنقية الدنا الجينومي:-تم الاستخلاص بأستعمال عدة الاستخلاص المجهزة من شركة Geneaid واعتمادا على تعليمات الشركة المصنعة تمت عملية استخلاص الحمض النووي DNA من العزلات البكتيرية البالغ عددها ٥١عزلة بكتيرية التي تم تشخيصها مسبقا.

البادئات المستخدمة:- صممت عدة بادئات نوعية والتي تم تصميمها بشكل خاص لهذه الدراسة لغرض دراسة جينات الضراوة ومقاومة المضادات الحيـاتية بأعتماد برنامج Primers3 والـخارطة الـجينية لبـكتريا الكـليبسيلا الموجوده علـى موقع NCBIوالتـي تستهدف جـينات الـهدف (htrA,Uge,magA,rmpA,gentamycin,terA ,StrA ,blaCTX) والـتي جـهزت بشكل مسحوق مجفد(Lyophilized)من شركة Bioneer وقد تمت اعادة تذويبها 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	5'-ACCTGGGTCTGGTTGCTCTGCT-3	
uge F	5'-TGTAATCCCGCAGGCCAATGCC-3'	260
uge R	CCTTCACTGACGTTTGCGGCCT-3'5'-	
magA F	5'-AGGTCAGGCAGCTGTTGTGAACG-3'	323
magA R	ACTGGCCATATTGCTCCGTTGC-3'5'-	
rmpA F	5'-ATGTGGCTTGACGTTTCGGGGG-3'	191
rmpA R	5'-CATTGCAGCACTGCTTGTTCCTTT-3'	
gent F	5'-ATGCATCGATGGTCGCGGTTGG-3'	390
gent R	AGCACTGAGCAAAGCCCACGAC-3'5'-	
terA F	5'-CCGTGAACAGCTTTCGTGGGCA-3'	103
terA R	TCCGTCAGCTGATAACGGGCCA-3'5'-	
blaCTX F	5'-GCTTTGCGATGTGCAGCACCAG-3'	497
blaCTX R	AACCCAGGAAGCAGGCAGTCCA-3'5'-	
strA F	5'-CGCAATGCCGTCAATCCCGACT-3'	299
strA R	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:-حضرمزيج التفاعل الرئيسي الغير حاوي على الـ DNA المستخلص من العزلات البكتيرية لعمل تفاعل MultiplexPCR لبكتريا *K. pneumoniae* وتم تحضير مزيج تفاعل لـ٥١ عينة DNAمن هذه البكتريا بالأضافة الـى ذلك تم اضافة عينة سيطرة سالبة مع البادئات الـتي من المفترض ان تعطي نتيجة سالبة لهذه البكتريا ليصبح عدد العينات الكلية لكل مزيج تفاعل ٥٢عينة ومن ثم وزع المحلول التفاعل الرئيسي على انابيب سعة ٠.٢مليليتر وبحجم ٢٢مايكروليتر لكل انبوبة بعدها اضيف الى كل انبوبة ٣ مايكروليتر من الـDNAالخاص بكل عينة ليصبح الحجم النهائي لكل عينة ٢٥مايكروليترباستثناء السيطرة السالبة بعدها وضعت العينات في جهازالبلمرة الحراري وضبطت الظروف المثلى لتنفيذ تقنية PCR كما في الجدول رقم(٢) ثم حمل المزيج في حفر هلام الاكاروزالمحضربتركيز ١.٥%(٦٠دقيقة،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	
Denaturation	95 C°	30 sec	30
Annea ling	58 C°	1 min	
Extension	72 C°	1 min	
Final Extension	72 C°	7 min	

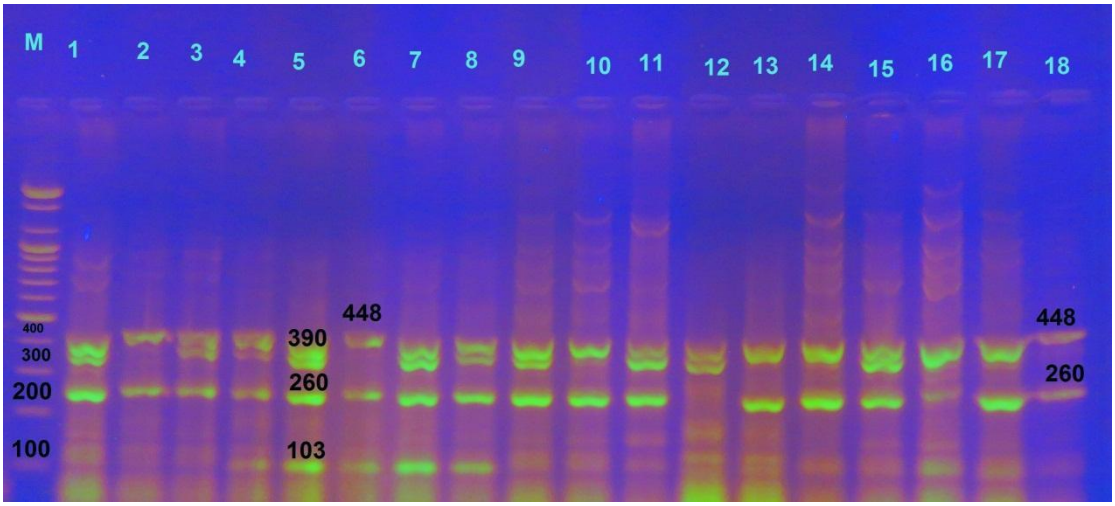
النتائج والمناقشة

بعد اجراء الفحوصات الكيموحيويةللعزلات البكتيرية المعزولة من المصادر السريرية والغير سريرية تم تشخيص ٥١ عزلة من مجموع العينات الكلي والمعزولة من مصادر مختلفة(ادرار،حروق، قشع،خروج ،جروح،التربة واخيرا المياه وتعد الاخيرتان من المصادرالبيئية)والبالغ عددها ٣٩٩ وذلك اعتمادا على الصفات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية وباستخدام نظامAPI20Eوكذلك استخدم جهازالفايتك2vitek.اذ اظهرالفحص المجهري والتصبيغ بصبغة كرام بانها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام مرتبة بشكل مفرد او مزدوجة او بشكل سلاسل قصيرة مطابقة لما جاء في[18].اجري أختبار مقاومة المضادات بطريقة الاقراص لمعرفة مدى حساسية او مقاومة عزلات بكتريا *K.pneumpniae*تجاة ١٢مضادا حيويا.اعتمادا على قطرمنطقة التثبيط المحيطة باقراص هذه المضادات ومن ثم مقارنتها مع الجداول القياسية الواردة في[19]. واظهرت 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 ومصادربيئية 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 بالأضافة 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 *Klebsiellapneumoniae* 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
الخروج	34	R	36	R	R	16	22	30	26	R	46	R
الادرار	30	R	30	R	R	24	20	30	R	R	36	R
القشع	30	R	24	30	30	20	36	40	R	R	34	R
التربة	30	R	36	30	30	24	43	30	20	R	36	18
المياة	30	R	30	R	R	R	R	34	R	R	40	R

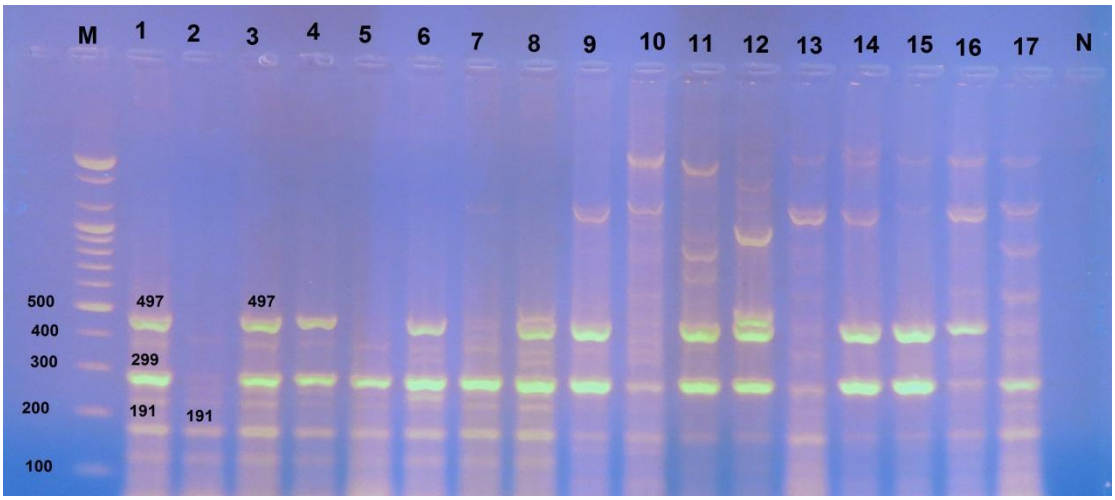
من خلال استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل Multiplex PCR وباستخدام ثمانية بوادئ حيث قسمت هذه البوادئ الى مجموعتين،المجموعة الاولى شملت البادئات الاربعة المستخدمة للتعرف على اربع مناطق جينية وهي(*htr*A,*gent*–2,*ter*A, *Uge*–1) حيث تبين عند دمج هذه الجينات الاربعة في تفاعل واحد اظهرت النتائج الموضحة في الصورة(١) ظهور الجين التشخيصي اضافة الى جينات البوادئ للمضادات الحيوية(*gent*–2,*Uge*–1,*ter*A–1)في جميع العزلاتالبكترية مع ظهور حزم واضحة في العزلات (١،٢،٥،٦،١٨)اما بالنسبة للبادئ *htr*A لم يظهرهذا البادئ في بقية العزلات وان ظهور جينات الضراوة الاربعة في اغلب عينات البكتريا المعزولة من الادرار يشير الى ضراوة العزلات فضلا عن مقاومتها لاغلب المضادات الحيوية وهذا ما يؤكدان لبكتريا *K.pneumoniae*دورا مهما في احداث الخمج بالمجاري البولية طبقا لما ذكره[21].فضلا عن متعدد السكرايد المكون للمحفظه ومتعدد السكرايد الشحمي فان بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك اليات اخرى لمقاومة التاثيرالقاتل في نظام المتمم وتشمل تلك الاليات انتاج الانزيم المحلل لبروتين السيرين المحفزبالصدمة الحرارية والذي يشفرمن قبل جين*htr*A [22].واوضحت 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 المستضد Oمع وجود الكبسولة على جدران البكتريا[23].



صورة(١): تفاعل PCR للكشف عن جينات الضراوهبأستعمال البوادئ الاربعة (1 – *ter*A وحجمها 103 زوج قاعده ، *uge*-1 وحجمها 260 زوج قاعده ،*gent*-2 وحجمها 390 زوج قاعده ، *htr*A وحجمها 447 زوج قاعدة)،المسار M DNA قياسي ،المسار 1-3عزلات الخروج ، المسار4-9عزلات الحروق ،المسار 10-13عزلات الماء ، المسار 14-18عزلات الادرار ، بأستعمال هلام الاكاروز1.5% (60 دقيقة ،7 فولت\سم٢) .

اما المجموعة الثانية شملت الجينات (*rmp*A,*mag*A,*Str*A,*bla*CTX) حيث تبين بانه عند دمج هذه الجينات في تفاعل واحد اظهرت النتائج الموضحة في صورة (٢) ظهور المناطق الجينية للجينات الاربعة في جميع العزلات وتتفاوت ظهورها من عزلة الى اخرى اعتمادا على نوع ومكان عزل البكتريا وضراوتها وقد ظهر بان جميع العزلات تمتلك جين الضراوة *rmp*Aمما يدل على امتلاك العزلات فرط لزوجة مخاطية منتجة من جين *rmp*A والذي يقع على بلازميد اقتراني كبير الحجم حسب ما اشار اليها,[24][25]وان امتلاك العزلات لجينrmpA من الصفات التشخيصية وتدل الى ان العزلة ذات نمط مصلي نوع K2[26]. ومعظم العينات الحاملة لجين *rmp*A تحمل ايضا جينات انتاج انزيم *bla*CTX وهذا يطابق ما اشار الية [27 ,[28].وان امتلاك العينات لجين magAهومحدد بالنمط المصليK1ويرتبط بالصفة فرط اللزوجية المخاطية نلاحظ من خلال هذه النتائج الحصول على نسبة قليلة من البكتريا تابعة للنمط المصلي K1 وتغلب النمط المصلي K2على[29]K1 بينما تمتلك جميع العزلات على جين الضراوة*Str*A مما يدل على ضراوة العزلات ومقاومتها للمضادات الحيوية قيد الدراسة

صورة (٢) : ناتج تفاعل PCR للكشف عن جينات الضراوة باستعمال البوادئ الأربعة*rmp*Aوحجمها 191 زوج قاعده ، *str*A وجحمها 299 زوج قاعده ، *mag* A وحجمها 323 زوج قاعده ، *bla* CTX وحجمها 497 زوج قاعدة)،المسار M DNA قياسي ، المسار 1-3عزلات الخروج ، المسار4-9عزلات الحروق ، المسار 10-13عزلات الماء ، المسار 14-18عزلات الادرار ، بأستعمال هلام الاكاروز1.5% (60 دقيقة ،7 فولت\سم٢) .



كما أشار[30] الى الاسس الجزيئية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا K.pneumoniae المعزولة من احدى مستشفيات بكين وجدوا انتشار الجينات المشفرة لانزيماتالبيتالاكتاميز 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 KlebsiellaPneumoniae isolated from urine samples.International Journal of Current Microbiology. APP.Sci Vol.2 No.8 PP.330-337.

[2]Brisse S, GrimontF,andGrimont P.A.D(2006) The Genus KlebsiellaProkaryotes 6:159-196 CHAPTER3.3.8

[3]Hackstein H, Kranz S, LippitschA,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 KlebsiellaPneumoniae infection . Respiratory Research :14:91 PP. 1-11 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 Respiratiry Tract of Apparently Healthy as well as Sick Goats. Israel Journal of Veterinary Medicine Vol. 67(4) .PP. 249-252.

[7]Abdul RazzaqM.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, Almeide A.S, SansonettiPh, Tournebize R and Brisse S(2011).PCR-Based Identification of KlebsiellaPneumoniae 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 in fections .The Egyptian Journal of Medical Human Genetics ,14, PP.277-283.

[12]Cortes G, AstorzaB.d, Benedi V .J and AlbertiS(2002). Role of the htrA Gene in Klebsiella 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 andAlberti S. (2002).Role of the htrA Gene in Klebsiellapneumoniae 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 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).Genetic 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 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 Klebsiellaoxytocaisolate 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.

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 : dean_coll.science@uoanbar.edu.iq

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(*mag*A, *rmp*A, *htr*A, *Uge*-1, *gent*-2,*bla*CTX, *ter*A-1,*Str*A-2) that encodes for main virulence factors to diagnose *K. pneumoniae*. The result showed that that 45 isolates had *rmp*A 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(*Str*A,*ter*A,*bla*CTX,*gent*-2) were done all *K,pneumonia*e contained *Str*A 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.