تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* المعزولة من جذور اسنان الانسان باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

عذراء حميد حسون
قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم / جامعة بغداد
سوزان علي كاظم
مديرية تربية الكرخ الثالثة / وزارة التربية

استلم البحث في : ٢٠/كانون الثاني/٢٠١٥ ،قبل البحث :١٥/اذار/٢٠١٥

الخلاصة

تم التحري عن وجود بكتريا *Enterococcus faecalis* في (100) عينة مأخوذة من مرضى ذي اعمار مختلفة مصابين بالتهاب جذر السن للمرة الاولى ولم يخضعوا بعد للعلاج (اصابة ابتدائية)، ومرضى مصابين بالتهاب جذر السن بعد الخضوع للعلاج و فشل العلاج (اصابة ثانوية) ، اذ اخذت (70) عينة من الاصابات الابتدائية لجذر السن ، و (30) عينة من الاصابات الثانوية لجذر السن (اعادة العلاج) .
شخصت البكتريا بالاعتماد على الطرز المظهرية بالطرائق الكيموحياتية التقليدية حيث تم الحصول على 24 عزلة تعود لبكتريا المكورات المعوية ، وثم شخصت بالاعتماد على الطرز الجينية باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) assey وتم الحصول على 32 عينة تعود لبكتريا المكورات المعوية البرازية .

الكلمات المفتاحية : بكتريا المكورات المعوية البرازية ، جذر السن ، تفاعل البلمرة المتسلسل

المقدمة

تتواجد المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* كنبيت طبيعي (Normal flora) في امعاء الانسان والحيوان ،فضلاً عن وجودها في الجهاز التناسلي الانثوي وفي تجويف الفم وأحيانا في الجهاز التنفسي ، كما توجد في التربة والمياه[1]. ازدادت الاهمية السريرية لهذا النوع من البكتريا خلال عقد التسعينيات بسبب تنوع الاخماج التي تسببها ، اذ وجد انها المسؤولة عن حوالي (90%) من الاصابات المتسببة عن المكورات المعوية التي تصيب الانسان ، وان امراضيتها مرتبطة بقدرتها على انتاج العديد من عوامل الضراوة التي تشمل السايتولايسين(Cytolysin) والأنزيم الحال للدم وفرمون الجنس وعوامل الالتصاق وغيرها ، فضلاً عن مقاومتها العالية والمتعددة للمضادات الحيوية والمطهرات مما جعلها واحدة من الممرضات الرئيسة المسببة للاخماج المكتسبة بالمستشفيات[2]. اشتهرت بكتريا المكورات المعوية البرازية في طب الاسنان بسبب ارتباطها بالاصابات الابتدائية لجذور الاسنان ، و الاصابات الثانوية (فشل العلاج) [3,4]، وقد عزلت بكتريا *E.faecalis* في احيان قليلة من الاصابات الابتدائية لجذور الاسنان حيث وجدت جنبا لجنب مع البكتريا اللاهوائية ،بالمقابل كانت بكتريا *E.faecalis* اكثر الانواع المعزولة تكرارا من الاصابات الثانوية لجذور الاسنان [5].استخدمت الطرائق الزرعية والكيموحياتية التقليدية للتحري عن الكائنات الحية الدقيقة التي تسبب اخماج جذور الاسنان ، وأكدت ان بكتريا المكورات المعوية البرازية هي اكثر الانواع الموجودة تكرارا ولاسيما في الاصابات الثانوية لقنوات الجذور[6]. ان استعمال الطرائق الزرعية والطرائق الكيموحياتية التقليدية المستعملة في التشخيص محدود جدا في تشخيص الكائنات المجهرية المسببة لإصابات جذور الاسنان بسبب صعوبة عزل وتشخيص هذه البكتريا ، لهذا فقد استخدمت مؤخرا الطرائق الوراثية الجزيئية للتحري عن الانواع البكتيرية المسببة لاخماج جذور الاسنان ولتشمل الانواع البكتيرية التي تكون صعبة العزل والتشخيص [7]. اكدت طرائق التشخيص الجزيئية باستعمال تقنية (PCR) ايضا على ان بكتريا *E.faecalis* هي اكثر الانواع المعزولة تكرارا من الاصابات الثانوية للقنوات الجذرية[7,8]. ونظرا لقلة الدراسات التي تناولت دراسة بكتريا *E.faecalis*المعزولة من قنوات جذور الاسنان ، وتشخيصها بالطرائق الوراثية الجزيئية جاءت هذه الدراسة لتشخيص هذه البكتريا باستعمال تقنية (PCR) لأول مرة في بغداد بالاعتماد على الجين المتخصص 16s ribosomal RNA .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Sampling

جمعت(100) عينة من المرضى المصابين باخماج قناة جذر السن المراجعين الى مركز اسنان النور ، والكرامة ، واليرموك ، وكلية طب الاسنان / جامعة بغداد ، في بغداد ، وللمدة ما بين(15-9-2013) الى (15-2-`2014) لكلا الجنسين ومن مختلف الفئات العمرية .جمعت العينات من اشخاص مصابين بالتهاب قناة جذر السن لأول مرة (الاصابة الابتدائية لقناة الجذر) Primary root canal infection, وعددهم 70 مصابا . وأشخاص مصابين بالتهاب قناة جذر السن بعد العلاج (الاصابة الثانوية لقناة الجذر) secondary root canal infection) (Post treatment ، وعددهم 30 مصابا ، اثناء خضوعهم لفتح قناة الجذر لغرض العلاج . وتم الحصول على العينات وذلك بأخذ الورقة الدقيقة Paper Point المستعملة لتجفيف القيح الموجود في مكان الخمج وزرعها مباشرة في الاوساط الزرعية المنتخبة.

عزل المكورات المعوية البرازية*E.faecalis*Isolation of

زرعت جميع العينات المأخوذة من الاشخاص المصابين بالتهاب قناة جذر السن بعد فتح وتنظيف قناة الجذر، وبعدها تم ادخال الورقة الدقيقة عبر القناة المفتوحة لغرض امتصاص القيح الموجود في موضع الالتهاب ، وتركت العزلات لمدة دقيقة داخل قناة الجذر ، ثم نقلت هذه الورقة الى انبوبة معقمة سعة مليلتر حاوية على 5 مليلتر من وسط (2xyet) (يتكون من 16غم تربتون ، و10غم مستخلص الخميرة ، و 0.5 كلوريد الصوديوم لكل لتر واحد)[9]. حضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، ثم نقلت المستعمرات النامية الى وسط (Azid Blood Agar) الصلب وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة. وانتخبت المستعمرات المفردة وزرعت على وسط (Pfizer selective enterococci) وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 لمدة 24-48 ساعة و نقلت هذه المستعمرات النامية الى وسط (No2MacConkey agar) بطريقة التخطيط وحضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

تشخيص المكورات المعوية البرازية *E.faecalis* Diagnosis of :

الفحص المجهريMicroscopic examination

عملت مسحات من المستعمرات النقية النامية على وسط (Pfizer selective enterococci) وذلك بأخذ جزء صغير من المستعمرات النامية بوساطة ناقل معقم الى شريحة زجاجية وفرشت بشكل متجانس ، وتركت لتجف ثم ثبتت وصبغت بملون غرام لملاحظة الشكل الخلوي وطبيعة اصطباغ البكتريا اتجاه صبغة غرام [10] .

الفحوصات الكيموحياتية Biochemical tests

لغرض تشخيص العزلات البكتيرية على مستوى النوع اجريت الاختبارات الكيموحياتية المعتمدة وكالاتي :

فحص الكاتاليز Catalase test

نقل جزء من النمو (بالناقل) من كل عزلة على شريحة زجاجية نظيفة واضيف لها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3 %.ان ملاحظة تكون الفقاعات دلالة على ايجابية الفحص [11] .

فحص النمو في درجة حرارة 10 و45 م°

لقحت انابيب حاوية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل بواقع انبوبتين لكل عزلة بالمزارع السائلة للعزلات البكتيرية بعمر 24ساعة بحجم لقاح 1% ثم حضنت احداهما في درجة حرارة 10 م° والأخرى في درجة حرارة 45 م ° لمدة 24 ساعة ولوحظ النمو من خلال تكون العكرة [12] .

فحص النمو بوجود (6.5 %) كلوريد الصوديوم

لقحت انابيب حاوية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل والحاوي على 6.5 % كلوريد الصوديوم بالمزارع السائلة للعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة وبحجم لقاح 1% ، ثم حضنت بدرجة حرارة 45 م° لمدة 24-18 ساعة. لوحظ النمو من خلال تكون العكرة دلالة على ايجابية الفحص[13] .

فحص قابلية البكتريا على النمو في الرقم الهيدروجيني(9.6)

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي الخاص بهذا الفحص (وسط نقيع القلب والدماغ السائل المعدل الرقم الهيدروجيني له الى 9.6 باضافة 0.1 مولاري من هيدروكسيد الصوديوم) بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة. ظهور النمو من خلال تكون العكرة دلالة على الفحص الموجب [14] .

التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية

عملية استخلاص وقياس تركيز ونقاوة الدنا

استخدمت العدة الجاهزة لاستخلاص الDNA الكلي والمصنعه في شركة (Promega USA) ، واستخلص الدنا بحسب النشرة المرفقة من قبل الشركة .

قيس تركيز الدنا ونقاوته باستعمال جهاز Nanodrop.

تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية بأ ستخدام تقنية ال PCR

استخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR assey لتشخيص بكتريا المكورات المعوية وذلك عن طريق استعمال بادئات صممت بتسلسل متخصص موجود ضمن المادة الوراثية للبكتريا ، الذي يطابق جين 16 S Ribosomal RNA . واستخدم البادئ المصنع في شركة الفا الكندية وكان تسلسل البادئ هو (e.f F GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG , e,f R CCG TCA GGG GAC GTT CAG) ، وطول القطعة 310 زوج قاعدي ، وتم اختيار البادئ المتخصص تبعا للمصدر [15] .

تخفيف البادئ

خفف البادئ اولا في 1مليلتر من الماء المقطر dd H2O (deionized sterile distilled water) ، وحفظ كخزين (Stock) في درجة حرارة 20- م ° . اخذ 100 مايكرولتر من هذا الخزين وخفف في 1 مليلتر من dd H2O للحصول على تركيز 10 مايكرو مولار . واستخدم الخليط الجاهز للPCR المسمى (Master mix) والمصنع في شركة (Promega USA) اذ مزج مع 3 مايكرولتر (50) نانو غرام من دنا البكتريا و1 مايكرو لتر من كلا من البادئ المصمم (Forward and Reverse) ذو التركيز 10 مايكرو مولار، اكمل الحجم الى 25 مايكرو لتر بالماء المقطر الخالي من nuclease وبحسب تعليمات الشركة .

ظروف التفاعل

اجري التفاعل في جهاز التدوير الحراري Thermal cycler بعد اجراء تجارب عديدة لتحديد الظروف المثلى للتفاعل .وطبق البرنامج بحسب (الجدول ١)

التحري عن نواتج الPCR باستعمال الترحيل الكهربائي

رحلت عشرة مايكرو لتر من النواتج المتضاعفة بوساطة الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بتركيز 0.2% الذي صبغ بعد انتهاء الترحيل باستعمال0.5 مايكرو لتر من صبغة الEthidium bromide في فولتية مقدارها 60 فولت ولمدة 30 دقيقة في 0.5 مايكرو لتر من TBE buffer . شوهدت الحزم تحت ضوء الاشعة فوق البنفسجية . واستعمل DNA ladder (pb 1000-100 زوج قاعدي) كمعلم (marker) . ثم صور بوساطة الكاميرا الرقمية (Digital camera) .عدت نتيجة التفاعل موجبة وذلك عند ظهور قطع DNA في الجل بطول 310 ازواج قاعدية .

النتائج والمناقشة

عزل بكتريا المكورات المعوية البرازية

عزلت بكتريا *E.faecalis* اعتماداً على الصفات الزرعية للمستعمرات من شكل وحجم ولون وقوام المستعمرات ، اذ تحول لون وسط (2xyt) الى اللون الابيض وظهور العكورة دلالة على وجود نمو بكتيري في الوسط ويعد هذا الوسط جيدا لنمو البكتريا بسبب احتوائه على مستخلص الخميرة وتوفر المواد الغذائية الضرورية لنمو البكتريا مثل الكاربون ، والكبريت ، وفيتامين ب . ظهرت مستعمرات هذه البكتريا على وسط Azide blood base الصلب ذات شكل دائري محدب قليلاً وذي حافة ملساء بيضاء او كريميه اللون ، اذ يعد هذا الوسط جيداً للعزل الاولي للبكتريا وهو ذو كفاءة عالية في عزل بكتريا المكورات المعوية من العينات المرضية لاحتوائه على مادة ازايد الصوديوم (Sodium azide) التي تثبط نمو الانواع المختلفة من البكتريا السالبة لصبغة غرام والسماح للبكتريا الموجبة لصبغة غرام بالنمو عليـــــــه [16] . ظهرت المستعمرات على وسط Pfizer selective enterococcus الصلب لماعة وحولت لون الوسط الى اللون الاسود بسبب قابليتها على تحليل الاسكولين بوجود املاح الصفراء وشطره الى الكلوكوز واسكيولتين (Esculetin) ، وان انتشار

الاسكيوليتين في الاكار واتحاده مع الحديد يكون مركب Ferric ammonium citrate الذي يعطي اللون الاسود للوسط صورة (١) ، وان احتواء هذا الوسط على املاح الصفراء ومادة ازايد الصوديوم قد ساعد على تثبيط نمو المسبحيات المحللة للاسكولين التي تعود للمجموعة المستضدية (D) والانوع المختلفة من البكتريا السالبة لصبغة غرام مما يميز هذا الوسط ويجعله من الاوساط الاساسية في تشخيص المكورات المعوية عن الانواع الاخرى من غير المكورات المعوية التابعة لنفس المجموعة المستضدية [17] ، في حين ظهرت المستعمرات صغيرة الحجم ، ملساء دائرية الشكل ووردية اللون على وسط المكونكي الصلب وذلك لقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز ، وأكد العزل الاولي لهذه البكتريا لاعتباره من الاوساط ألانتخابية اذ يثبط نمو البكتريا الموجبة لصبغة غرام باستثناء المكورات المعوية لمقاومتها لأملاح الصفراء وصبغة البلورات البنفسجية[18,19]. حصل على45 عزلة تعود لبكتريا المكورات المعوية ، 19 عزلة من الاصابات الابتدائية لقنوات جذر السن ، و 26 عزلة من الاصابات الثانوية لقناة جذر السن . وذلك اعتمادا على صفاتها المظهرية و الزرعية .

التشخيص المجهري Microscopic diagnosis

اظهر الفحص المجهري لمسحات محضرة من المزروع البكتيري للمستعمرات والمصبوغة بصبغة غرام بأنها خلايا موجبة لصبغة غرام وغير مكونة للسبورات كروية مفردة او بيضوية متطاولة احياناً او على شكل ازواج في احيان اخرى او تظهر بشكل سلاسل قصيرة [11].

الفحوصات الكيموحياتية Biochemical tests

اجريت الفحوصات للعزلات النامية على الاوساط الانتقائية وذلك لتشخيص المكورات المعوية الى مستوى النوع واستبعاد الانواع البكتيرية الاخرى التي تتشابه معها في بعض الصفات .

اظهرت 24 عزلة من العزلات عدم قدرتها على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يعمل على تحرير غاز الاوكسجين من بيروكسيد الهيدروجين بشكل فقاعات غازية ،الا انها ذات قدرة على النمو بدرجات حرارية تتراوح ما بين 10-45 م° ، والنمو في وسط ذي رقم هيدروجيني قاعدي يصل الى (9.6) ، والنمو في وسط سائل ذي تركيز ملحي 6.5 % من كلوريد الصوديوم . وتعد هذه التفاعلات الكيموحياتية المفتاح التشخيصي لجنس المكورات المعوية التي تميزها عن بقية المسبحيات التابعة للمجموعة المستضدية (D) التي ليس لها القدرة على النمو في مثل هذه الظروف [11].

التشخيص الجزيئي لبكتريا *E.faecali* باستعمال تقنية ال PCR

شخصت جميع العزلات النامية على الاوساط الانتقائية بتقنية PCR assay التي شخصت مسبقا بالطرائق الزرعية و الكيموحياتية لغرض تاكيد التشخيص ، اذ استخدم باديء جين 16srRNA للارتباط بقالب DNA وتضخيم القطعة المطلوبة منه . حصل على (32) عزلة تعود لجنس *E.faecalis* التي اعطت عند ترحيلها باستعمال هلام الاكاروز قطعة DNA طولها 310 ازواج قاعدية (الصورة 2) (13) عزلة منها معزولة من الاصابات الابتدائية لقناة جذر السن Primary root canal infection (11عزلة منها معزولة من الاناث و2عزلة معزولة من الذكور) و (19) عزلة من الاصابات الثانوية لقناة جذر السن Secondary root canal infection (14عزلة معزولة من الاناث و5 عزلات معزولة من الذكور) كما في الجدول(2) .

لوحظ ان هناك اختلاف واضح بين نتائج التشخيص بالطرائق الزرعية والطرائق الكيموحياتية والطرائق الجزيئية حيث اظهرت نتائج التشخيص الكيموحيوي ان 24 عزلة فقط من 45 عزلة النامية على الاوساط الانتقائية اظهرت عائديتها لبكتريا المكورات المعوية البرازية *E.faecalis* . بينما اظهرت نتائج التشخيص الجزيئي عائدية 32 عزلة من ال 45عزلة لنوع *E.faecalis* .

اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه Coguluet *al.* [15] في دراسته بالتحري عن نسبة تواجد بكتريا *E.faecalis* في قنوات الجذور الملتهبة و ذلك عن طريق تشخيصها باستعمال طرائق التشخيص الزرعية والكيموحياتية التقليدية وباستعمال تقنية ال PCR اذ وجد بانها كانت متواجدة بنسبة 26 % عند تشخيصها بالطرائق الزرعية في حين وجد عند تشخيصها بطريقة ال PCR انها تشكل نسبة 35 % .كما اتفقت هذه النتائج جزئيا مع نتائج دراسة [20]. حول التحري عن تواجد بكتريا *E.faecalis* في قنوات الجذور الاسنان بالطرائق الزرعية وطريقة ال PCR اذ وجد انها تشكل نسبة 4 % و 82 % في الاصابات الابتدائية لقنوات الجذور و42 % و 76 % في الاصابات الثانوية لقنوات الجذور عند استعمال الطرائق الزرعية والكيموحياتية التقليدية وتقنية ال PCR في التشخيص على التوالي .وجاءت هذه النتيجة متفقة مع نتائج [21]حيث اوضح في دراسته حول التحقق من وجود بكتريا *E.faecalis* في الاصابات الابتدائية والثانوية لقنوات جذور الاسنان باستعمال Real time PCR في تركيا اذ اثبت ان هذه البكتريا توجد بنسبة اعلى في الاصابات الثانوية لقنوات الجذور وكانت تشكل نسبة 74.4 % في الاصابات الثانوية لقناة جذر السن وبنسبة 25 % الاصابات الابتدائية لقناة جذر السن . كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة [22] حيث اثبت تواجد بكتريا *E.faecalis* بنسبة 19 % في اللعاب ونسبة 38 % في جذور الاسنان لاشخاص يحتاجون لاعادة العلاج لقناة الجذر المصابة بالتهاب دواعم السن . واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج [23]دراسة حيث وجد ان بكتريا *E.faecalis* تشكل نسبة 33% من الاصابات الثانوية لقنوات الجذور وذلك عند دراسته في التحري عن الانواع البكترية الموجودة في الاصابات الابتدائية والثانوية لجذور الاسنان .

واكدت نتائج الدراسة الحالية ان تقنية ال PCR كانت اسهل الطرائق المستعملة في التشخيص ، واقلها استهلاكا للوقت (اذ يتطلب التشخيص حوالي 9 ساعات ونصف) ، واكثر كفائة في التشخيص مقارنة بالتشخيص بالطرائق التي تعتمد على الطرز المظهرية في التشخيص.

لقد استخدم تسلسل محدد من الحمض النووي البكتيري والذي يسمى جين ال16sr RNA في تشخيص البكتريا وذلك لكونه عالي الثبات وغير قابل للتغير مع مرور الزمن لذلك فان يعد معيارا ذهبيا في التصنيف حيث انه استعمل ومنذ مدد طويلة في دراسة العلاقات التطورية في البكتريا [24]. وفضلا عن ثباته العالي فان جين ال16sr RNA يحتوي على مناطق عالية التغاير بين الانواع البكتيرية وبذلك فانه يوفر تسلسل خاص بكل نوع من الانواع البكتيرية التي يستفاد منها في تشخيص الانواع البكتيرية ونتيجة لذلك اصبح تسلسل جين ال16sr RNA البديل الاسرع والأرخص في تشخيص الانواع البكتيرية بالمقارنة مع الطرائق المعتمدة على الطرز المظهرية في تشخيص البكتريا[25] .

المصادر

1- Hayes,J.R. ; English,L.L. ; Carr,L.E. , Wagner,D.D. and Joseph,S.(2004).Multiple-antibiotic resistance of Enterococcus spp.isolated from commercial poultry productionenvironments.APPL.Environ.Microbiol.,70(10):6005 -11.

2- De-Marques,E.B. and Suzart,S. (2004). Occurrence of virulence-associated genes in clinical*Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. Brazil. J.Med.Microbiol.53:1069-7 .

3- Love, R.M.(2001). *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. Int. Endod. 34(5): 3 40.ArticlePubMed.

4- Kayaoglu, G. and Orstavik, D.(2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* : relationship to endodontic disease. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 15(5).: 308 – 320
ArticlePubMed,

5- Peciuline, V.; Reynauld, A.H.; Balciuniene, I. and Haapasalo, M. (2001) .Isolation of yeasts and enteric bacteria in root filled teeth with chronic apical periodontitis. Int. Endod;34:429-34.

6-Molander, A .; Reit, C. ; Dahlen, G. and Kvist, T.(1998). Microbiological status of root- filled teeth with apical periodontitis. Int. Endod. J. ;31:17.

7- Siqueira, J.F. and Rôças, I.N.(2005). Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. J. Clin. Microbiol ;43:3314.

8- Rôças, I.N.;Siqueira, J.F.; Aboim,M.C.and Rosado, A.S.(2014). Denaturing gradient gelelectrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. ; 98:741–9.

9- Mhmoudpour,A.;Rahimi,S.;Sina,M.;Soroush,H.M.Shahisa ,S.andAminabadi,N. (2007) . Isolation and identification of *Enterococcusfaecalis*from necroticroot canal using multiplex PCR . Journal of oral sci..49(3) :221-227.

10- Collee, J.G.;Fraser,A.G.;Marmion,B.P. and Simmons,A.(1996). "Practical Medical Microbiology" 14th editionChurchill Livingstone,U.K.

11- Macfaddin,J.F. (2000). Biochemical test for identification of medical Bacteria.3rdedition.Lippincott Williams &Wilkins,Co. London.

12-Holt,J.G. ; Kreieg,N.R. ; Sneath,P.H. ; Staley,J.T. and Williams,S.T. (1994)."Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology .9th edition. Williams2 & Wilkins. P:1063.

13-Facklam ,R.R.and Wilkinson ,H.W.(1981).The Prokaryotes . A Handbook on Habbitats , Isolation and Identification of Bacteria. The Family Streptococcaceae (Medical Aspect). *127:*1572-1597. . Berlin Heidelberg , NewYork .

14-Facklam, R.R. (1972). Recognition of Group D Streptococcal SpeciesOf Human Origin by Biochemical and Physiological Tests. Appi.Microbiol.*23*(6).

15- Cogulu,D.; Uzel,A. and Eronat,C.(2007).Detectio of *Enterococcus faecalis* in Necrotic Teeth Root Canals by Culture and Polymerase Chain Reaction Method . Eur.J. Dent.:216-221.

16- Facklm,R.R. and Teixeira,L.M. (1997).Enterococcus.In :Collier,A. ;Balow,S. &Sussman,M.(Eds.). "Microbiology & Microbial Infections".Topiey&Wilson.9th edition.Edward Arnold, London.pp:669-82.

18-Huycke,M.M. ; Sahm,D.F. and Gilmore,M.S. (1998) . Multiple- Drugresistant Enterococci : the nature of the problem & an agenda for the future . Emerg.Infect.Dis.,4(2).

19- Murray,B.E. ; Baron,E.J. ; Paller,M.A. ; Tenover,F.C. and Yolken,R.H. (1999). "Manual of Clinical Microbiology".7th edition.ASM Press. Waashington. D.C.PP:297-305.

20-Gomes, P.B.; Pinhiero,T.E.; Sousa, L.R.E.; Jacinto,C.R. and Zaia,A. A .(2006). *Enterococcus faecalis* in dental root canal detected by culture and By polymerase chain reaction analysis. Oral Sur., Oral Pathol. and Endod. 102(2): 247-253.

21-Selcuk,M.; Ozbek, A. and Erdorgan, A.S. (2009). Analysis of*Enterococcus faecalis*in Samples from Turkish Patients with Primary endodontic infections and failed endodontic treatmenby real –time PCR SYBR green method. Jornalof Appl.OralSci . 17 (5) .

22- Wang ,Q.Q. ;Zhange, C.F.;Chu,C.H.andZuh,X.F. (2011). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filledroot canals of teeth associatedwith apical periodontitis.Internationa journal of Oral Sci: 19–23. .

23-Tennert,C. ;Fuhrmann,M ;Wittmer,A.;Karygianni,L.; Altenburger , M .J.; Palz,K. Hellwig, E. and Al-Ahmad, A. Copyright © (2014).American AssociationofEndodontists.40(5).

24- Woese, C.R. and Fox, G.E. (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : The primary kingdoms". PNAS 74(11): 5088–509.

25 - Kolbert, C.P. and Persing, D.H. (1999). "Ribosomal DNA sequencing as atool for identification of bacterial pathogens.".Current opinion in microbiology.2 (3): 299- 305.

المواقع الالكترونية

17-Himedialalabs.com/TD/M787.pdf.

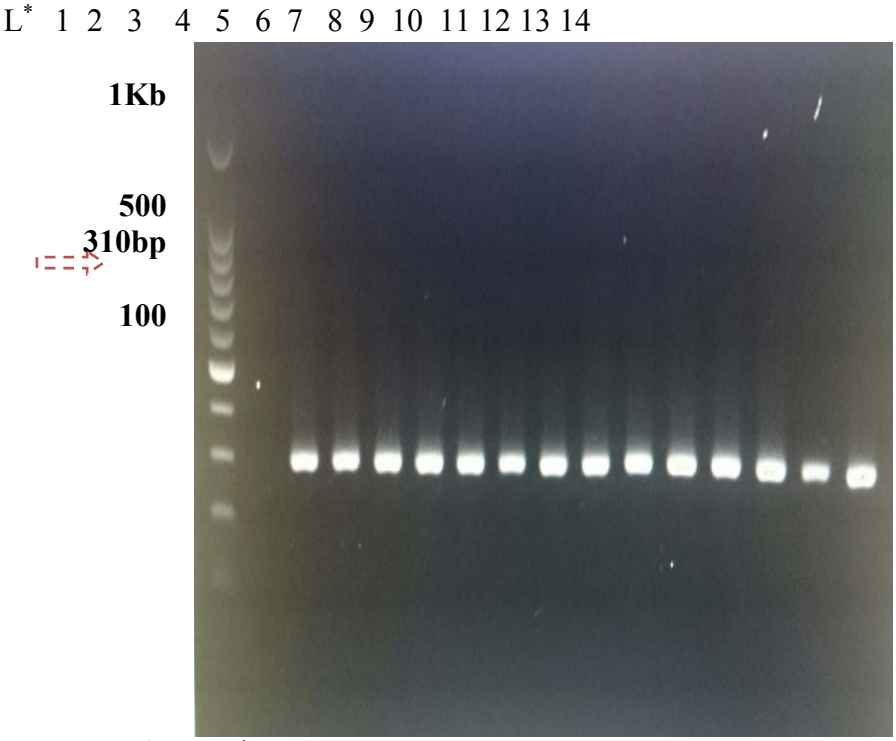
جدول رقم (1) : ظروف تفاعل الPCR البوادئ المستعملة لتضخيم جين 16s ribosomal RNA

الخطوات	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
المسخ الاولي	94 c°	3 min	1
المسخ	94 c°	30 sec	35
درجة ارتباط البادئ	58c°	1 min	
الاستطالة	72 c°	40 sec	
الاستطالة النهائية	72 c°	5 min	1

جدول رقم (2) : اعداد ونسب عزلات المكورات المعوية البرازية المعزولة من اصابات جذور الاسنان وفقا لنتائج التشخيص الجزيئي باستعمال تقنية الPCR

نوع اصابة جذر السن	عدد العزلات	النسبة المئوية
الاصابة الابتدائية للجذر	13 عزلة من 70 عينة	%18.5
الاصابة الثانوية للجذر	19عزلة من30 عينة	%63.3

صورة رقم (1) : نمو بكتريا*E.faecalis* على وسط Pfizer selective enterococcus



صورة رقم(2): الترحيل الكهربائي لنواتج التشخيص الجزيئي باستعمال تقنية PCR في هلام الاكاروز تركيز 2% من1- 14 هي عينات موجبة للتشخيص بال PCR ، (L* Ladder1Kb)

Identification of *Enterococcus faecalis* Isolated from Infected Human Tooth Root Canals Human by Using Polymerase Chain Reaction

Athraa H. Hasson
Biology Dept. College of Education for Pure Science (Ibn Al.Haithem)/ Univeristy of Baghdad
Susan A. Kadhem
Directorate-General of Education Baghdad/ Karkh 3

Received in :20/1/2015, Accepted in :15/3/2015

Abstract

One hundred samples of root canal bacteria were isolated from patients teeth with primary and secondary infected root canal from all the ages . Biochemical and microscopial tests were done for identification of these isolates. Twenty four isolates were confirmed as *E. faecalis* species by using these tests. Genetic diagnosis for the all isolates was also done by using polymerase chain reaction (PCR). Thirty two isolates were confirmed to belong to *E. faecalis* species by using this test.

Key Words :*E.faecalis* , Root canal , PCR