وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

دراسة مناعية وجزيئية لبكتريا SSP . *Proteus* المعزولة من مرض التهاب المجاري البولية في مدينة الديوانية

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم – جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة/أحياء مجهرية

من قبل

هند حسين علي

بكلوريوس علوم الحياة /جامعة القادسية/٢٠١٣

بأشراف

أ.م.د.ميثم خالي يوسف

١٤٣٦هـ ٢٠١٥ م

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿ وَيَسْـَٔلُونَكَ عَنِ ٱلرُّوحِ ۖ قُلِ ٱلرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّى
وَمَآ أُوتِيتُم مِّنَ ٱلْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا ﴿٨٥﴾ ﴾

صَدَقَ ٱللَّهُ ٱلْعَلِيُّ ٱلْعَظِيمُ

الإسراء: ٨٥

شكر وتقدير

الحمدلله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين محمد بن عبدالله الصادق الأمين وعلى اله الطيبين الطاهرين.

الحمدلله الذي انارلي دربي وأخذ بيدي لأكمل مشوارا طويلا ،لم أرجو به الأ قربه ولطفه ورحمته وسخر لي جمعا من خلقه أعانوني في خطواتي كلها ، وكانوا لي سندا ،لا املك الا شكرهم والدعاء لهم.

وأتقدم بجزيل الشكر والتقدير الى استاذي الفاضل **أ.م.د. ميثم غالي يوسف** لأقتراحه موضوع البحث واشرافه المباشر علية طوال مدة البحث والكتابة وفقه الله لدوام الخير والعطاء.

وأقدم الشكر والامتنان الى عميد كلية العلوم **أ.م.د. عبد الامير سمير سعدون** ورئيس قسم علوم الحياة الدكتور **جاسم حنون هاشم** .

ويسرني ان اقدم اجمل عبارات الشكر لمنتسبي قسم المختبرات ولاسيما شعبة البكتريولوجي في مستشفى الديوانية التعليمي واخص منهم **الست امل والست هيفاء** في مستشفى النسائية والاطفال.

ومن باب العرفان الجميل اقدم شكري وامتناني الى الاخوة الاعزاء في قسم علوم الحياة **مصطفى رعد جواد** والاخ **حيدر سعود** و **د.سلوان علي** في كلية العلوم قسم البيئة لما ابدوه من مساعدة جزاهم الله عني خير الجزاء.

واتوجه بعظيم امتناني الى من غمرني بفيض محبتهم ودوام دعائهم فكانوا لي خير عون وسند لأكمال دراستي **امي ....اخوتي واخواتي..**

ولايغيب عن ذهني ان اشكر زملائي طلاب الدراسات العليا واخص بالشكر صديقتي **رغدة سعد محمد** .

ومن الله التوفيق

هند

الاهداء

الـى مـن بلـغ الرسـالة وادى الامانـة ..ونصـح الامـة..الى نبـي الرحمـة ..ونـور العالمين..... **سيدنا محمد صلى الله عليه واله وسلم**

الى ملاكي في الحياة..الى معنى الحب والى معنى الحنان والتفاني..الى بسمة الحياة .. الى من كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي الى اغلى الحبايب

امي الغالية

الى سندي وقوتي.. وملاذي بعد الله..الـى مـن اثرونـي علـى انفسـهم..الى مـن علموني علم الحياه.. الى من اظهروا لي ماهو اجمل من الحياة

اخوتي

اهدي ثمرة جهدي المتواضع

هند

المحتويات

رقم الفقرة	العنوان	الصفحة
١	الفصل الاول / المقدمة Introduction	١
٢	الفصل الثاني / استعراض المراجع Literature Review	٣
٢-١	نبذة تاريخية Historical Aspect	٣
٢-٢	الصفات العامة للبكتيريا General Characters	٤
٢-٣	الامراضية Pathogenincity	٥
٢-٣-١	خمج المسالك البولية Urinary Tract Infection	٥
٢-٣-١-١	تصنيف اخماج المسالك البولية	٧
٢-٣-١-١-١	تصنيف اخماج المسالك البولية من حيث الامراضية	٧
أ	اخماج المسالك البولية المعقد	٧
ب	اخماج المسالك البولية غير المعقد	٧
٢-٣-١-١-٢	**تصنيف المسالك البولية اخماج المسالك البولية بحسب مكان الاصابة**	٨
أ	اخماج المسالك البولية العليا	٨
ب	اخماج المسالك البولية السفلى	٨
٢-٣-١-١-٣	تصنيف اخماج المسالك البولية بحسب شدة الاصابة	٨
أ	الاخماج الاولية	٨
ب	تكرار الخمج	٩
جـ	الاخماج المتواصلة	٩
٢-٣-١-٢	طرائق العدوى	٩
٢-٣-١-٣	العوامل المهيئة للأصابة بخمج المسالك البولية	٩

٤-٢	عوامل الضراوة Virulence Factors	١١
١-٤-٢	الانزيم الحال للدم Hemolysin	١١
٢-٤-٢	الاسواط والانثيال Flagella and Swarmming	١١
٣-٤-٢	انتاج انزيم اليوريز Urease Production	١٣
٤-٤-٢	انتاج انزيم البروتيز Protease Production	١٥
٥-٤-٢	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation	١٦
٥-٢	مقاومة بكتريا *P.mirablis* للمضادات الحيوية	١٦
١-٥-٢	مضادات البيتالاكتام β-Lactam Antibiotic	١٦
١-١-٥-٢	السيفالوسبورينات Cephalosporins	١٧
٢-١-٥-٢	مضادات الكاربابينيم Carbapenmes	١٩
٢-٥-٢	مضادات الكوينولونيات Quinolones	١٩
٣-٥-٢	المضادات الحيوية المثبطة لتصنيع البروتين	٢٠
١-٣-٥-٢	النايتروفيورانتون Nitrofuration	٢٠
٢-٣-٥-٢	الكلورامفينكول Chloramphenicol	٢٠
٣-٣-٥-٢	مضادات الامينوكلايكوسيدات Aminoglygosides	٢٠
٤-٣-٥-٢	الريفاميسين Rifamicin	٢١
٧-٢	الاستجابة المناعية Immune Response	٢١
١-٧-٢	الحركيات الخلوية ودورها في الالتهاب	٢٢
١-١-٧-٢	انترليوكين ٦ Interleukine	٢٣
١-٧-٢	عامل تنخر الورم نوع الفا Tumer Necrosis Factor-α	٢٤

٣	الفصل الثالث /المواد وطرائق العمل	٢٥
٣-١	المواد Materials	٢٥
٣-١-١	الاجهزة والادوات المختبرية	٢٥
٣-١-٢	الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Prepared media	٢٦
٣-١-٣	المواد الكيميائية المستعملة Chemical material	٢٧
٣-١-٤	الصبغات Stains	٢٧
٣-١-٥	المضادات الحيوية Antibiotic	٢٨
٣-١-٦	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction	٢٨
٣-١-٦-١	عدة استخلاص الـ DNA	٢٨
٣-١-٦-٢	عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR PreMix	٢٩
٣-١-٦-٣	تصميم البادئات Primer design	٢٩
٣-١-٦-٤	بادئات الدنا DNA Primer	٣٠
٣-١-٦-٥	الدليل الحجمي	٣٠
٣-١-٦-٦	العدد المستعملة في قياس المؤشرات الالتهابية	٣١
٣-٢-١	طرائق التعقيم Sterilization methods	٣١
A	التعقيم بالحرارة الرطبة	٣١
B	التعقيم بالحرارة الجافة	٣٢
٣-٢-٢	تحضير المحاليل والكواشف	٣٢
٣-٢-٢-١	المحاليل	٣٢
٣-٢-٢-١-١	المحلول الملحي الفسلجي	٣٢

٣-٢-٢-١-٢	محلول ثابت العكرة القياسي ماكفرلاند	٣٢
٣-٢-٢-٢	الكواشف	٣٢
٣-٢-٢-٢-١	كاشف الاوكسديز	٣٢
٣-٢-٢-٢-٢	كاشف الكاتليز	٣٢
٣-٢-٢-٢-٣	كاشف كوفاكس	٣٣
٣-٢-٢-٢-٤	كاشف احمر المثيل	٣٣
٣-٢-٢-٢-٥	كاشف كلوريد الحديديك الثلاثي	٣٣
٣-٢-٢-٢-٦	كاشف فوكس بروسكور	٣٣
٣-٢-٢-٢-٧	كاشف محلل الـ DNA	٣٣
٣-٢-٣	الاوساط الزرعية Culture media	٣٣
٣-٢-٣-١	الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Culture media	٣٣
٣-٢-٣-٢	الاوساط الزرعية التركيبية Structural Culture media	٣٣
٣-٢-٣-٢-١	وسط اكار الدم	٣٣
٣-٢-٣-٢-٢	وسط اكار اليوريا	٣٤
٣-٢-٣-٢-٣	وسط الجيلاتين	٣٤
٣-٢-٣-٢-٤	وسط التحري عن انتاج البروتيز	٣٤
٣-٢-٤	جمع العينات	٣٤
٣-٢-٥	تشخيص البكتريا المعزولة	٣٥
A	الخصائص المزرعية	٣٥
B	الخصائص المجهرية	٣٥

٣-٢-٦	الفحوصات الكيميوحيوية	٣٥
٣-٢-٦-١	الكشف عن انزيم الاوكسديز	٣٥
٣-٢-٦-٢	الكشف عن انزيم الكاتليز	٣٦
٣-٢-٦-٣	الكشف عن حلقة الاندول	٣٦
٣-٢-٦-٤	اختبار المثيل الاحمر	٣٦
٣-٢-٦-٥	اختبار الفوكس بروسكور	٣٦
٣-٢-٦-٦	اختبار استهلاك السترات	٣٦
٣-٢-٦-٧	التحري عن السكريات الثلاثية	٣٧
٣-٢-٦-٨	اختبار تحلل الدنيز	٣٧
٣-٢-٦-٩	الكشف عن انزيم الجيلاتينيز	٣٧
٣-٢-٦-١٠	الكشف عن انزيم اليوريز	٣٧
٣-٢-٦-١١	الكشف عن انزيم البروتيز	٣٧
٣-٢-٦-١٢	الكشف عن انتاج الهيمولايسين	٣٧
٣-٢-٦-١٣	حفظ العزلات البكتيرية وادامتها	٣٨
٣-٢-٧	اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية	٣٨
٣-٢-٨	استخلاص الـ DNA البلازميدي	٣٨
٣-٢-٩	تحضير هلام الاكاروز	٤٠
٣-٢-١٠	التحري عن حزم الDNA المستخلص	٤٠
٣-٢-١١	قياس الDNA المستخلص بواسطة النانودروب	٤٠
٣-٢-١٢	تحضير مزيج تفاعل انزيم البلمرة المفرد	٤٠

٣-٢-١٣	تحضير مزيج تفاعل انزيم البلمرة المتعدد	٤١
٣-٢-١٤	برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـDNA	٤٢
٣-٢-١٥	التحري عن وجود حزم الـ DNA المضخم	٤٣
٣-٢-١٦	الدراسة المناعية (قياس مستوى IL-6,TNFα) في مصول مرضى خمج المسالك البولية	٤٣
٣-٢-١٦-١	تحضير الكواشف	٤٣
٣-٢-١٦-٢	طريقة العمل	٤٤
٤	الفصل الرابع / النتائج	٤٦
٤-١	عزل بكتريا *P.mirablis* وتشخيصها	٤٦
٤-١-١	الصفات الزرعية Cultural characteres	٤٦
٤-١-٢	الصفات المجهرية Microscopic characteristic	٤٦
٤-١-٣	الفحوصات الكيميوحيوية Biochemical test	٤٦
٤-٢	الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ*P.mirablis*	٤٨
٤-٣	الكشف عن عوامل الضراوة	٤٩
٤-٤	اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية	٤٩
٤-٥	تقنية تفاعل انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction	٥١
٤-٥-١	استخلاص الـDNA	٥١
٤-٥-٢	تقنية تفاعل البلمرة المفرد والمتعدد	٥١
٤-٦	الدراسة المناعية	٥٤
٥	الفصل الخامس / المناقشة	٥٧

٥-١	العزل والتشخيص لبكتريا *P.mirablis*	٥٧
٥-٢	الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا *P.mirablis*	٥٨
٥-٣	الكشف عن عوامل الضراوة مظهريا	٥٩
٥-٤	اختبار فحص الحساسية	٦١
٥-٥	تقنية تفاعل انزيم البلمرة المفرد والمتعدد	٦٤
٥-٦	الدراسة المناعية	٦٧
	الاستنتاجات Conclusion	٧٠
	التوصيات Recommendation	٧١
	المصادر العربية	٧٣
	المصادر الاجنبية	٧٥

الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
٣-١	الاجهزة والادوات المختبرية Apparatus and Equipments	٢٦

٢-٣	الاوساط الزرعية الجاهزة الجاهزة المستعملة في الدراسة	٢٦
٣-٣	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها	٢٧
٤-٣	الصبغات الجاهزة المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها	٢٧
٥-٣	اقراص المضادات الحيوية التي جهزتها شركة Bioanalyse	٢٨
٦-٣	عدة استخلاص الدنا والشركة المجهزة لها	٢٨
٧-٣	عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة	٢٩
٨-٣	بادئات الدنا والتي تم شراؤها من شركة Bioneer(Korea)	٣٠
٩-٣	خصائص الدليل الحجمي	٣٠
١٠-٣	مكونات العدد IL-6 و TNF-α	٣١
١١-٣	مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة البلمرة المفرد	٤١
١٢-٣	مكونات وحجوم مزيج تفاعل انزيم البلمرة المتعدد	٤٢
١٣-٣	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل انزيم البلمرة المفرد	٤٢
١٤-٣	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل انزيم البلمرة المتعدد	٤٣
١-٤	يوضح الاختبارات الكيميوحيوية التشخيصية لبكتريا *P.mirablis*	٤٨
٢-٤	الاعداد والنسب المئوية للذكور والاناث المصابين بخمج المسالك البولية	٤٩
٣-٤ ٣-٤	يوضح نسب مقاومة٤٩عزلة لبكتريا*P.mirablis* للمضاداتالحيوية يوضح نسب مقاومة ٤٩ عزلة لبكتريا *P.mirablis* للمضادات الحيوية	٥٣ ٥٠
٤-٤	الاعداد والنسب المئوية لجينات عوامل الضراوة لعزلات بكتيريا *P.mirablis* بأستعمال تقنية Single and Multiplex PCR	٥٢

٤-٥	مقارنة تراكيز IL-6 في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية مع الاصحاء	٥٦
٤-٦	مقارنة تراكيز TNF-α في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية مع الاصحاء	٥٥

الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
٣-١	المنحني القياسي للـ IL-6	٤٥
٣-٢	المنحني القياسي للـ TNF-α	٤٥
٤-١	يوضح ظاهرة الانثيال على وسط blood agar	٤٧
٤-٢	بكتريا *P.mirablis* على وسط كروم اكار	٤٨
٤-٣	نواتج استخلاص الـDNA بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(١,٥%) وفولتية ١٠٠ لمدة ساعة واحدة لعزلات بكتريا *P.mirablis* بأستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit	٥١
٤-٤ A	نواتج تضخيم الجينات (*flaA+ureC*) لبكتريا *P.mirablis* باستعمال تقنية الـ Multiplex PCR والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز (١,٥%) وفولتية (١٠٠) لمدة ساعة .	٥٢
٤-٤ B	نواتج تضخيم الجينات (*flaA+ureC*) لبكتريا *P.mirablis* باستعمال تقنية الـ Multiplex PCR والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز (١,٥%) وفولتية (١٠٠) لمدة ساعة .	٥٣

٤ـ٥	نواتج تضخيم الجين *ZapA* لبكتريا *P.mirablis* بأستعمال تقنية الـ Single PCR والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز(١,٥%) وفولتية (١٠٠) لمدة ساعة .	٥٣
٤ـ٦	نـواتج تضـخيم الجينـات (*hpmA+ureC*) لبكتريـا *P.mirablis* باسـتعمال Multiplex PCR والمرحلـة كهربائيـا علـى هـلام الاكاروز (١,٥%) لمدة ساعة .	٥٤

المختصر	تـــعريـــفـــة
A/A	Acid/Acid
UTI	Urinary Tract Infection
IgA	Immunoglubulin Alpha
IgM	Immunoglubulin M
IgG	Immunoglubulin Gamma
RA	Rheumatoide Arthritis
IL-6	Interleukin-6
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-Alpha
No.	Number
bp	Base pair
EDTA	Ethylene-Diamine Tetra Acetic acid

dNTP	dineuclotide tri-phosphate
GC	Guanine Cytosine
PCR	Polymerase chain Reaction
ELISA	Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
β	Beta
IL-6R	Interleukin-6 Receptor
TLRs	Toll-like receptors

أقرار المقوم اللغوي

أشهد انة تم التقويم اللغوي لرسالة الطالبة هند حسين علي الموسومة بـ (**دراسة مناعية وجزيئية لبكتريا *Proteus*.SPP المعزولة من مرض التهاب المسالك البولية في محافظة الديوانية**).

الامضاء:

الاسم:سرحان جفات سلمان

اللقب العلمي:أستاذ

التاريخ: ٢٢ /٢/٢٠١٥

اقرار المشرف

أشـهد ان رسـالة الماجستير الموسومة **بـ (دراسـة مناعيـة وجزيئيـة لبكتريـا *Proteus.*SSP المعزولـة من مـرض التهـاب المجـاري البوليـة فـي محافظـة الديوانيـة)** قد اعدتها الطالبـة **هند حسين علي** بأشرافي وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير /علوم / علوم الحياة / أحياء مجهرية.

الأمضاء:

الاسم :أ.م.د. ميثم غالي يوسف

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم - جامعة القادسية

التاريخ : ٢٣ / ١٢ / ٢٠١٤

توصية رئيس قسم علوم الحياة

أشارة الى التوصية المقدمة من الاستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

الامضاء:

الأسم : م.د جاسم حنون

اللقب العلمي : مدرس

العنوان :كلية العلوم- جامعة القادسية

التاريخ: ٢٣ / ١٢ / ٢٠١٤

الخلاصـــة Summary

تم في هذه الدراسة جمع ١٧٠ عينة دم وادرارمن المرضى المصابين بخمج المسالك البولية لكلا الجنسين (١١٠أناث و٦٠ ذكور)،الذين راجعوا مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الولادة والاطفال في مدينة الديوانية ،للمدة من تشرين الثاني ٢٠١٣ الى نيسان ٢٠١٤ للتحري عن بكتريا المتقلبات *Proteus* اذ بينت نتائج الاختبارات المظهرية الكيميوحيوية عائدية ٤٩ (٢٨,٨٢%) عزلة لبكتريا *P.mirablis* ،كما بينت النتائج بأن الاناث كنَّ اكثر عرضة للأصابة بخمج المسالك البولية من الذكور اذ كان عدد الاناث المصابات ٣٣ من اصل ٤٩ وبنسبة (٦٧,١٩%) اما عدد الذكورالمصابة بخمج المسالك البولية ١٦ وبنسبة (٣٢,٦٥).

اختبرت حساسية عزلات بكتريا *P.mirablis* نحو١٢ نوعا من المضادات الحيوية بالاعتماد على طريقة انتشار الاقراص،اظهرت النتائج مقاومة العزلات قيد الدراسة بنسبة (١٠٠%) لكل من مضاد Amoxillin/Cluvanic acid، Erythromycin، Rifampin،

كما ابدت الدراسة الحالية نسبة مقاومة (٦١,٢٢%) لكل من المضادات التالية Chloramphenicol,Gentamicin ,Nitrofuration, Cephalothin ,Nalidic acid, ومضاد Cefotaxim بينما ابدت مقاومة مختلفة للمجاميع الاخرى بنسبة (٤٢,٨٥%) و(٣٢,٦٥%) لمضادي Cephaloxin و Ciprofloxacinعلى التوالي . كما اظهرت النتائج حساسية تامة بنسبة (١٠٠%) لمضاد Impenem.

تم التحري عن بعض جينات عوامل الضراوة Virulence Factors بأستعمال تقنية تفاعل انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction المفرد والمتعدد Single and Multiplex وهي كل من*ureC* و*ureA* المسؤولة عن انتاج انزيم اليوريز ،*hpmA* المسؤول عن انتاج انزيم الهيمولايسين ، *zapA* المسؤول عن انتاج انزيم البروتيز و *flaA* المسؤول عن الاسواط .اذ كانت نسبة ظهور هذه الجينات(٩٦,٦٦%) ،(١٠٠%) ،(١٠٠%)،(١٠٠%)،(٨٦,٦٦%) على التوالي.

كما تم في الدراسة الحالية قياس بعض المؤشرات الالتهابية (الحركيات الخلوية Cytokines)التي لها علاقة بخمج المسالك البولية اذ تم قياس Interleukine-6 و Tumor Necrosis Factors-Alpha في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية المتسبب بوساطة بكتريا *P.mirablis* بأستعمال تقنية الاليزا Enzyme Linked Immunosorbent Assay،اذ وجد ارتفاع كبير في نسبة هذه العوامل في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية .

اذ أظهرت الدراسة سيادة معظم الجينات المسؤولة عن الضراوة في العزلات المعزولة في محافظة الديوانية ، كما ان هنالك علاقة بين ارتفاع IL-6 و TNF-α لدى المصابين بخمج المسالك البولية المتسبب عن بكتريا *P.mirablis*.

١- المقدمة Introduction

تعد بكتريا *Proteus mirablis* من أهم الأنواع التابعة لجنس المتقلبات *Proteus* (العزاوي وآخرون ٢٠١١). وهي عصيات سالبة لصبغة كرام والعائدة للعائلة المعوية Enterobacteracea والتي تعد من أهم انواع البكتريا المنتشرة في المستشفيات (مصطفى ،٢٠١١). ان بكتريا المتقلبات هي العامل المرضي الأول في الإصابات المكتسبة من المستشفيات (Nosocomiol Infections) وقد تكون الإصابة بصورة منفردة أو مترافقة مع أجناس بكتيرية اخرى (Filimon and lacob, 2007). تسبب بكتريا *P.mirablis* العديد من

الإمراض في مقدمتها التهاب المسالك البولية لاسيما في القسم العلوي منها وتؤدي الإصابة احيانا الى حدوث التهاب حويض الكلية (Swierzko *et al.*,2000). تعد بكتريا *P.mirabilis* المسبب المرضي الثاني بعد بكتيريا *Escherichia coli* في إحداث التهاب القناة البولية وتكثر الإصابة بها في المرضى الراقدين في المستشفيات والمستعملين للقثاطر البولية لمدة زمنية طويلة وكذلك الأشخاص الذين يعانون من تشوهات تركيبيه في القناة البولية (Sosa *et al.*, 2006). اذ تستوطن هذه البكتريا اسطح القثاطر البولية (Sabbauba *et al.*2003). و تعد التهابات المسالك البولية من أهم الإمراض الشائعة ومتكررة الحدوث لدى الجنس البشري فهي تصيب جميع الفئات (Addose,2000).

ترتبط أمراضية هذه البكتريا بأمتلاكها العديد من عوامل الضراوة Virulence factors والتي تشمل الخمل (Fimbria) ، الاسواط (Flagella) ،وإنزيم اليوريز(Urease)، وانزيم البروتيز(Protease) وإنتاج الإنزيم الحال للدم (Hemolysin) ومتعدد السكريات الشحمي (lipopolysaccharide) ويسمى الذيفان الداخلي (Endotoxin) (Sosa *et al.*,2006). ويعد انزيم البروتيز Protease و اليوريز Urease من عوامل الضراوة الكامنة الذي تنتجه جميع سلالات بكتريا *Proteus*.spp الذي يعد صفة تشخيصية وتفريقية مهمة التي يتميز بها افراد هذا الجنس عن بعض اجناس العائلة المعوية (Brooke *et al.*,2007). تقوم بكتريا *Proteus mirablis* بإنتاج إنزيم البروتيز Protease لحماية نفسها من دفاعات الجسم المناعية (Dattelbaun *et al.*, 2003) . و يعمل هذا الإنزيم على تحطيم البيبتيدات التي لها فعالية مضادة للميكروبات والتي تعد من دفاعات الجسم التي تفرزها النبيبات البعيدة ، عروة هنلي والقنوات الجامعة في الكلية عند بداية الإصابة بالتهاب المسالك البولية (Belas *et al.*,2004).

كذلك تمتلك المتقلبات القدرة على تكوين ظاهرة الانثيال (Swarmming) (Stickler,2008). وهذه الظاهرة ناتجة عن هجرة مجموعة من الخلايا البكتيرية بعد تمايزها مكونة طبقة رقيقة لحلقات ممتدة (Almansouri,2005) . تعد حركة الانثيال من عوامل الضراوة المهمة لبكتريا المتقلبات لاحداث الاصابة باخماج المسالك البولية وتستطيع البكتيريا غزو اجزاء مختلفة من المسالك البولية بوساطة هذه الحركة السريعة والمتواسطة بالاسواط مما يزيد من امراضية بكتريا المتقلبات و يجعلها قادرة على غزوالكليتين واستعمارهما (Liaw *et al.*, 2001) . بالإضافة إلى إصابة المسالك البولية فهناك إصابات القناة التنفسية والجروح والحروق وإصابات القناة الهضمية عند تناول الغذاء الملوث بها (Thaler and Kennedy, 2000).

يلعب الجهاز المناعي دورا مهما في حماية الجسم عند حدوث الخمج حيث يساعد على تحفيز خلايا الجهاز المناعي الدفاعية ضد الاصابة البكتيرية وذلك بأفراز الحركيات الخلوية cytokines التي تكون اشبه بالهرمون من الناحية الوظيفية والتي لها دور في نقل الاشارة الكيميائية بين الخلايا المناعية وخلايا الجسم (Sheu *et al.*, 2006) . ويعد انتاج الحركيات الخلوية استجابة أولية للطبقة المخاطية عند الغزو البكتيري حيث يزداد تركيز الحركيات الخلوية بعد دقائق من الإصابة (Diepold *et al.*,2008). ونظرا للانتشار المتزايد لالتهابات المسالك البولية ولقلة الدراسات الجزيئية والمعلومات الوافية التي تتعلق بأمراضية هذه البكتريا فقد هدفت الدراسة الحالية الى دراسة ضراوة بكتريا *P.mirablis* المتسببة في إحداث التهابات المسالك البولية وعلاقة الإصابة البكتيرية ببعض المؤشرات المناعية التي تتحقق في المحاور الآتية :

١- عزل بكتريا *P.mirablis* وتشخيصها من المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية ودراسة حساسيتها لبعض المضادات الحيوية .

٢- التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة لهذه البكتريا باستعمال تقنية الـ PCR المفرد والمتعدد(Single and Multiplex PCR).

٣- تحديد بعض المؤشرات الالتهابية وهي (IL-6,TNF-α) عند المرضى المصابين بأخماج المسالك البولية الناجم عن بكتريا *P.mirablis* باستعمال تقنية الايلايزا ELISA.

٢: استعراض المراجع LITERATURES REVIEW

٢-١: نبذة تاريخية Historical Aspect

اكتشفت بكتريا المتقلبات *Proteus* لأول مرة العالم Hauser عام 1885 م حيث قام بعزلها لأول مرة من البراز و مياه المجاري و المواد العضوية المتحللة و أسماها المتقلبات *Proteus* لامتلاكها ظاهرة تعدد الأشكال Pleomorphism (O'hara *et al.*, 2000) . إذ ينتمي جنس *Proteus* إلى المجموعة الخامسة (Group 5) بحسب تصنيف Bergy لعام 1994 (Holt *et al.*, 1994). التي تضم مجموعة البكتريا العصوية السالبة لصبغة غرام و تحت المجموعة (subgroup1) العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* والى القبيلة Tribe

المعروفة بـ *Proteae* (Karlowsky *et al.*, 2003 ; Toth and Emody 2000).
وتضم قبيلة *proteae* ثلاثة اجناس هي : *providencia , proteus* والـ *Morganella* (Greenwood *et al.*, 2002 ; Holt *et al.*,1994).ولقد ذكر في مصنف بركي للعام ١٩٧٤ان جنس المتقلبات يضم خمسة انواع هي *P.mirabilis*، *P. vulgaris* ، *P.rettgri* ، *P. morganii* و*P. inconstans* (Buchanan and Gibbons, 1994).

بعد ذلك تغيرت مواقع هذه الانواع اذ تمكن العالم Henriksen عام ١٩٥٠ أنْ يميز بين جنسي *Proteus* و الـ *Providencia* بالاعتماد على الاختبارت الكيميوحيوية واوضح قابلية انتاجهما لانزيم Deaminase الذي لا تنتجه بقية افراد العائلة المعوية وبين ان جنس *Proteus* ينتج انزيمي Lipase والـ Gelatinase وعدم قدرته على انتاج الحامض من تخمر السكريات المختلفة كأرابينول ، والمانوز ، والمانيتول على خلاف جنس الـ *Providence* (Karlowsky *et al.*,2003;Swierzko *et al.*,2000).

واستناداً لدراسات تهجين (DNA) والاختلافات التركيبية في بروتينات معينة وكذلك الصفات المظهرية فقد نقل النوع *Proteus rettgeri* الذي اكتشفه Rettger عام ١٩٠٤الى جنس *Providencia* ليصبح النوع *Providencia rettgeri* (Penner,1981).ووضع النوع *P.inconstans* للأسباب السابقة نفسها ضمن جنس الـ *Providencia* وقسم الى نوعين :*Providencia alcalifaciens* ، *Providencia stuartii* (Greenwood *et al.*,2002). وقد ادرج حاليا النوع *P.morganii* ضمن الجنس *Morganella* ليصبح *M.morganii* اعتمادا في ذلك على نسبة الكوانين و السايتوسين(G+C) التي تشكل ٥٠% وهذه النسبة تكون عالية في هذا النوع مقارنة بالأنواع الأخرى العائدة للجنس الـ *Proteus* و التي شكلت ٣٩% (O'hara *et al.*,2000) . وقد اشارت الدراسات الى ان جنس المتقلبات يحتوي النوعين *P. mirabilis* و *P. vulgaris* فقط (Greenwood *et al.*, 2002).

وعلى وفق التصنيف الحديث أصبح جنس الـ *Proteus* يضم خمسة أنواع و هي *P.mirablis* ,*P.vulgaris*, *P. penneri* , *P.myxofaciens* و *P. hauseri* و ذلك اعتمادا على التفاعلات الكيميائية الحيوية (O'hara *et al.*, 2000) .

٢-٢ الصفات العامة للبكتريا General Characters

توصف هذه البكتريا بأنّها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام، قطرها يتراوح من (0.3 - 1.0) مايكرومتر و طولها (0.6-6.0) مايكرومتر ومتحركة غير مكونة للسبورات

(Abbott, 2007). كما ان هذه البكتريا مكونة للكبسولة وتحتوي على مخامل (Fimberiae) وكذلك تحتوي على الاسواط (Flagellae)، سالبة لفحص الأوكسيديز، منتجة لانزيم اليوريز، منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H_2S عند نموها على وسط (kligler iron agar) وموجبة لفحص احمر المثيل (Methyl red) وسالبة لفحص (Vogus Proskaur) وكذلك بأمكانها تكوين (Phenyl Pyruvic acid) عند تنميتها على وسط حاو على (Phenylalanine) بالاعتماد على انتاج انزيم (Phenylalanine deaminase) (Greenwood *et al*., 2002) .وتكون موجبة لفحص الكاتليز وأنواع بكتريا المتقلبات تعطي فحصا سالبا للاندول ماعدا النوع *P.vulgaris* ، وتظهر مستعمرات بكتريا المتقلبات بلون اصفر باهت على وسط أكار ماكونكي لعدم تخمرها سكر اللاكتوز غير إنها تخمر كلا من سكر الكلوكوز والسكروز والكالاكتوز (Holt *et al*., 1994). وتمتاز بكونها هوائية (Abbott,2007;Cooker *et al*.,2000).

تسلك بكتريا *P.mirabilis* شكلا من أشكال ظاهرة تعرف باسم الانثيال ويعتقد أن قدرتها على استيطان المسالك البولية تتحد مع حركة الانثيال (Jiang *et al*., 2010). إذ تتمايز من خلايا سابحة قصيرة تدعى بالخلية المنثالة (Swimmer cell) عند تلقيحها في وسط المرق المغذي، ولكن عند تلقيحها على وسط زرعي صلب تبدأ هذه البكتريا بالانقسام والتمايز الى خلايا منثالة ضعف طول الخلية السابحة ومحاطة بألاف الاسواط المحيطية وتكون الخلايا متجمعة ومتشابكة الاسواط تتحرك سوية على الوسط بمعدلات عالية جدا (Carey *et al*.,2013). و من النادر ملاحظة المستعمرات على وسط اكار الدم أو الأكار المغذي إذ بدلاً من ذلك يلاحظ انتشار واحتشاد امواج متوالية مع حلقات نمو كثيفة حول موقع التلقيح إذ يغطي النمو اسطح الوسط الصلب (Liaw *et al*., 2000;Greenwood *et al*., 2002). وقد وجد ان ظاهرة الانثيال تتاثر بالظروف البيئية المحيطة مثل وجود احماض امينية وببتيدات معينة (Gaisser and Hughes, 1997).

٢-٣ الامراضية Pathogenicity :

على الرغم من كون هذه البكتريا جزء من النبيت الطبيعي (Normal flora) في القناة المعوية مع باقي انواع البكترية المعوية للاشخاص الاصحاء لكن من الممكن ان تؤدي الى اصابة الأفراد ضعيفي المناعة في الغالب عندما تنتقل اليهم (Kearns, 2010).ولكونها بكتريا أنتهازية

(Opportunistic) لذا فهي تسبب كثيراً من الاصابات عند وجودها في غير موطنها الطبيعي كخمج المسالك البولية (Pellegrino *et al*.,2013).

٢-٣-١: خمج المسالك البولية Urinary tract infection

يشير خمج المسالك البولية الى وجود الكائنات الحية الدقيقة في المسالك البولية على الرغم من انه قد يكون من الصعب التميز بين التلوث والاستعمار او العدوى.(Verrier, 2000) ، ويعد خمج المسلك البولي من الاخماج الشائعة في المجتمع ويصيب الفئات العمرية كلها فضلا عن اصابة كلا الجنسين ذكوراً واناثاً (Orrett , 2001). إن الإصابة بالـ U.T.I تختلف باختلاف العمر و الجنس و تكون أكثر حدوثاً في الإناث مما هي عليه في الذكور في مختلف الأعمار عدا مرحلة الطفولة المبكرة (أقل من ثلاثة أشهر) حيث تكون نسبة حدوثها في الذكور أكثرمما هي عليه في الإناث و تكون هذه النسبة (3-5%) في الإناث و (1%) في الذكور (Egland and Egland , 2002). كما وجد ان الاصابة بالنسبة للفئات العمرية كانت اعلى نسبة للفئتين العمريتين للأطفال دون ١٠ سنوات والبالغين ٥١ سنة فأكثر اذ بلغت (٢٢,٢-٢٣,٧)%على التوالي (خميس،٢٠١٣). وان معظم اخماج المسالك البولية يكون سببها البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل بكتريا القولون *E.coli*،المتقلبات *P.mirablis* و*P.vulgaris* وانواع من الكلبسيلا *Klebsiella spp* ،الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* ،*Acintobacter*، *Serratia* و *Morganella morganii* ،كذلك يحدث خمج المسالك البولية بفعل البكتريا الموجبة لصبغة كرام ومن هذة البكتريا المكورات المعوية *Enterococcus*،المكورات العنقودية *Staphylococcus* و *Streptococcus agalacticae* (Tangho and Mcaninch,2004). واشارت الدراسة التي توصل اليها خلف وكاظم ٢٠١٢ الى ان بكتريا *P. mirablis* مسؤولة عن (١١,٨٥%) من اصابات المسالك البولية كما بين ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت في النساء اعلى مما في الرجال . و يمكن أنْ يحدث الخمج في أي جزء من المسالك البولية :الكلية (Kidney)، الحالب (Ureter)، المثانة (Bladder) ، والاحليل (Urethra) ، ويصنف بحسب موقع الاصابة الى اخماج حويض الكلى (Pyelonephritis)، اخماج المثانة (Cystits) ،اخماج الاحليل (Urethritis) وعندما تكون هناك تشوهات تركيبية و وظيفية أو وجود اجسام غريبة مثل بقاء القثتر البولي (Urinary catheter) لمدة طويلة أو وجود الحصى (Stones) فيعد الخمج معقداً (Masson *et al*., 2009).

وقد وجد ان *P. mirabilis* تفضل اصابة الجزء العلوي من المسلك البولي مما قد ينتج منه اخماج الكلية والحويض (Pyelonephritis) (Liaw *et al.*, 2001) ، ويصاحب هذا الخمج بعض الاعراض مثل الحمى ، والغثيان ، والالم في منطقة البطن ووجد ان ٥٠ % من الاطفال المصابين باخماج الكلية والحويض يعانون من تلف الانسجة الكلوية (Craig,2004). وتتراوح شدة اخماج المسالك البولية بين أخماج بكتيرية لا عرضية الى أخماج قاتلة حيث يعد الـ U.T.I سببا مهما لحدوث انتنان الدم (Septicaemia) ومحدثاً نسبة عالية من الوفيات ولاسيما عند المسنين حيث يعد من المسببات الرئيسة لتجرثم الدم (Bacteremia) بالبكتريا السالبة لكرام (Mathai *et al* ., 2001). وقد اثبت ان بكتريا *P.mirabilis* مسؤولة عن احداث اخماج المسالك البولية لا سيما في الافراد الذين يعانون من تغيرات تركيبية غير طبيعية في القناة البولية أوفي المرضى المستعملين للقثطرة من خلال اليوريز الذي تنتجه البكتريا (Poore *et al*., 2001) . وتعتمد شدة الإصابة ومدتها على عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا المسببة للمرض من ناحية ومن ناحية اخرى تعتمد على طبيعة الأجهزة الدفاعية لدى المضيف (Bass *et al*., 2003). ويعد اخماج المسالك البولية من اخطر العوامل التي تؤدي الى تطور القصور الكلوي (Elder , 2004) . بالإضافة الى اخماج المسالك البولية فهناك اخماج القناة التنفسية والحروق والجروح والاذنين والعينين والانف والحنجرة واخماج القناة الهضمية (Thaler and Kennedy, 2000). و تبين حديثاً دور بكتريا *P.mirbilis* بوصفها مسبباً لمرض خمج المفاصل الرثوي Rheumatoide Arthriti (RA) إذ لوحظ تكرار عزل البكتريا من ادرارالاشخاص المصابين بهذا المرض وأيضاً ارتفاع في مستوى اضداد بكتريا *P.mirabilis* ممايؤكد دور البكتريا في تطور هذا المرض (Rashid *et al*., 2001). فضلاً عن أصابات اخرى تشترك بها هذه البكتريا وهي خمج السحايا لدى الاطفال حديثي الولادة (Neonatal meningeocephalititis) ، وخمج العظام (Osteomyelitis) . (O,hara *et al*.,2000)

٢-٣-١-١: تصنيف اخماج المسالك البولية

٢-٣-١-١-١:تصنيف اخماج المسالك البولية من حيث الامراضية:

أ:اخماج المسالك البولية المعقد Complicatated U.T.I

ان إصابات بكتريا المتقلبات *Proteus mirabilis* للمسالك البولية غالبا ما يكون مترافقا مع خمج المسالك البولية المعقدة إضافة الى المرضى المقثطرين ويكون عادة

مترافـق مـع التشـوهات التركيبيـة فـي القنـاة البوليـة والانسـدادات والتشـوهات الولاديـة (Dattelbaum *et al*.,2003;Li *et al*.,2004).وهذا النوع من الاخماج صعب العلاج باسـتعمال المضـادات الحيويـة و ذلـك بسـبب وجـود هـذه البكتريـا داخـل قالـب الحصـوة (Torzewska *et al*.,2003).

ب :اخماج المسالك البولية غير المعقد Uncomplicatated U.T.I

يؤلف خمج المسلك البولي غير المعقد نسبة كبيرة من الاخماج ، ويحدث عندما لا يكون هناك تغيرات واختلالات تشريحية ووظيفية عصبية غير طبيعية في القناة البولية بحيث تؤدي الكلية وظائفها بشكل طبيعي فضلا عن أنه لا يتوافق مع الاضطرابات التي تؤدي الى عطل في اليات دفاع الجسم تشمل اخماج القناة البولية غير المعقدة بدورها كُلا من تجرثم الإدرار عديم الاعراض (Asymptomatic Bacteriuria) واخماج المثانة واخماج الكلية و حويضها (Gunther *et al*., 2001).

٢-٣-١-١-٢ :تصنف اخماج المسالك البولية بحسب مكان الاصابة الى

أ-اخماج المسالك البولية العليا Upper U.T.I

يشمل اخماج الكلية وحوضها (Pyelonephritis) الناتجة من غزو البكتريا للطبقة البارنيكيمية للكلية (Wagenlehner *et al*., 2009) تصاحب أخماج المسالك البولية العليا أعراض منها الحمى (Fever) والقشعريرة (Chills) والتعب والم الخاصرة واسفل الظهر مع قلة التبول وتكراره وفي بعض الأحيان تكون مصحوبة بالتقيؤ(Vomiting) والإسهال (Diarrhea) مع الم في البطن والغثيان (Nausea) (Lane and Takhar ,2011). وتعد اخماج المسالك البولية العليا اكثر خطورة من اخماج المسالك البولية السفلى ولكنها اقل شيوعا منها ولهذا فإنّ تجنب اصابة الاحليل يمنع من وصول البكتريا إلى المثانة وإنّ عدم علاجها يؤدي إلى خمج المسالك البولية العليا (Reddy's, 2002).

ب-اخماج المسالك البولية السفلى Lower U.T.I

يتضمن كل من خمج المثانة (Cystitis) وخمج الأحليل (Urethritis) (Joseph dipiro *et al*., 2011) .و يشكو مرضى خمج المثانة الحاد من مجموعة من الأعراض

السريرية المتضمنة عسر البول Dysuria وكثرة عدد مرات التبول والحاجة للتبول Urgency وألم فوق منطقة العانة Suprapubic (Lane and Takhar ,2011).

٢-٣-١-١-٣: تصنيف اخماج المسالك البولية بحسب شدة الاصابة:

أ- الاخماج الأولية Primary infection

يحصل هذا النوع من الاخماج نتيجة غزو البكتريا للمسالك البولية والاستيطان فيها لأول مرة، ومصحوب ذلك بأعراض كالحمى مع وجود خلايا قيحية (Pus cells) ، ويستدل عليها بوجود الخلايا الدموية البيضاء (Bethasda, 2002) ، فالاخماج الأولية :هي أول اصابة تحدث بالأشخاص سليمي الجهازالبولي من الناحية التشريحية والوظيفية وتسببها أحياء مجهرية حساسة لأغلب المضادات الحيوية ، ولا تستمر لفترة طويلة (Nicolle,2008) .

ب-تكرار الخمج Re-infiction

قد يرجع السبب في تكرار خمج المسالك البولية الى عدم استعمال علاج كاف او عدم الالتزام بالعلاج بالإضافة الى مقاومة الكائن الممرض للمضادات الحيوية (Pewitt and Schaeffe,1997).

جـ-الاخماج المتواصلة Persistent infection

تعرف هذه الأخماج بأنّها حالة استمرار تواجد البكتريا المرضية بعد المعالجة ، وهذا يعني أنّ بؤرة الاصابة في المسلك البولي لم تُعالج بعد، و إنّ الكائن الممرض يستوطن في كثير من الأحيان في مواقع محمية من وصول المضادات الحيوية ، والمواقع المحمية هي غالبا ما تكون التشوهات التشريحية والحصاة البولية والأجسام الغريبة كالقثاطرالبولية (Urinary catheter) (Abrahams and Stoller ,2003 ;Schlager *et al*., 2001).

٢-٣-١-٢ :طرائق العدوى

هناك ثلاث طرائق محتملة من قبل البكتريا التي يمكن ان تغزو وتنتشر داخل المسالك البولية (Soble and Kaye,2000) .وهي :-

أ-الطريق الصاعد ascending route

ب-الطريق الدموي hematogenous route

جـ-الطريق او المسار اللمفاوي lymphatic route

٢-٣-١-٣:العوامل المهيئة للاصابة بخمج المسالك البولية

أن العامل الذي يعيق الجريان الطبيعي للادرار او التفريغ الكامل للمثانة او يسهل اقتراب الكائنات من المثانة يكون عاملاً مهيئاً للاصابة بالخمج ، اذ يرى الباحثون ان بقاء كمية في الادرار اكثر من (2-3) مليلتر يعد عاملاً مهيئاً لتكاثر الجراثيم (Mims *et al.* , 1993). كما تهيئ عملية القثطرة Catheterization الاصابة باخماج المسالك البولية وان حوالي (٢%) من حالات اخماج المسالك البولية المكتسبة من المستشفيات سببها قثطرة المثانة (Smith *et al.* , 2000) .أن غرس القثاطر قد يؤدي الى حمل الجراثيم مباشرة الى المثانة عن طريق الفراغ الموجود فيه أو عن طريق التلامس على طول السطح الخارجي للأغشية المخاطية بين القثطر وجدار الاحليل (Nicolle , 2001). بينما هناك عوامل اخرى تؤدي الى الاصابة بالبكتريا وحدوث خمج المسالك البولية منها التغيرات الحاصلة في الضغط التناضحي (Osmolarity pressure) وتركيز اليوريا في الإدرار، ويؤدي تراكم السموم البولية المختلفة إلى تثبيط الفعاليات المستضدية لخلايا الدم الحبيبية والخلايا البلعمية، بالاضافة الى الاليات المناعية الأخرى (Reinhard *et al*., 2006) .

وان نسبة (٩٥%) من اخماج المسالك البولية مشخصة ضمن الحالات المرضية حيث تدخل عن طريق الاحليل urethra والمثانة (urinary bladder) ثم الحالب ureter والكلى kidney (Meryeir *et al*.,2000). وتصيب بكتريا *P.mirablis* الكبار والصغار من كلا الجنسين فضلا عن انها تسبب العديد من المضاعفات لانسجة الجهاز البولي (Zhao *et al*.,1999).تتطلب معيشة بكتريا *P.mirablis* وسطاً عالي القاعدية بمعنى محاليل ذات تركيز قلوي وان المحيط الذي يكون ذو pH قاعدي يعد مناسبا لنموها (Kellely *et al*.,2009).وباستطاعتها ان تسبب اضرارا كلوية خطيرة مثل (Pyelonephritis) وحصوة الكلى اوالمثانة وتجرثم الدم (Bacterriemia) (Burall *et al*., 2004). إذ ان الزوائد البروتينية التي تمتلكها هذه البكتريا التي تعرف بـ الخمل Fimbriae هي التي تساعدها في الالتصاق على الخلايا الطلائية البولية ، والخلايا الطلائية الكلوية واستيطانها (Li *et al*., 2004). ويعد النوع *P. mirabils* اكثر انواع جنس

المتقلبات تكرارا في احداث خمج المسالك البولية (Jacobsen , 2008) . وتعد هذه البكتريا من المسببات المرضية لاخماج المسلك البولي من النوع المعقد الجراحي ولاسيما في الافراد مستعملي القثطرة طويلة الامد او الذين يعانون من تشوهات او تغيرات تركيبية او وضيفية في القناة البولية (Li *et al*., 2002A). وهذا النوع من الأخماج صعب العلاج باستخدام المضادات الحيوية وذلك بسبب وجود هذه البكتريا داخل قالب الحصوة (Li and Mobley, 2002; Li *et al*., 2002-b) إذ يصاحب هذا الخمج بعض الأعراض مثل الحمى، والغثيان، والالم في منطقة البطن (Craig, 2004).

ان الاصابة بهذه البكتريا إمّا أنْ يكون داخلي المصدر (Endogenous) أو قد يكون من مصادرخارجية (Exogenous) نتيجة التلوث الحاصل لأجهزة المستشفى (Li *et al*.,2004).

٢-٤: عوامل الضراوة Virulence Factors

تمتلك بكتريا *P. mirabilis* العديد من عوامل الضراوة التي تساهم في أمراضيتها وتثبيتها في أنسجة المضيف (Corker *et al*.,2000). ومن عوامل الضراوة لهذه البكتريا الانزيم الحال للدم (Hemolysin) ، أنزيم اليوريز(urease) ، الأهداب (Fimbria) و الاسواط (Flagella) (Himpsl *et al*.,2008) . كما تتميزهذه البكتريا بظاهرة الانثيال (Swarming)، أضافتة الى قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation (Liaw *et al*.,2004).وأهم عوامل الضراوة في هذه البكتريا هي:

٢-٤-١: الانزيم الحال للدم Hemolysin

وهو عبارة عن انزيم ذات تأثير سمي على الخلايا و يمتاز بقابليته على تحليل كريات الدم الحمر وله دور في اصابات الـ U.T.I من خلال فعاليته السمية على الخلايا الطلائية (Epithelial cells) للكلية (Mobely *et al*,1990). هناك اربعة انواع من التحلل الدموي التحلل الدموي الكامل Beta haemolysis وفيه يحدث تحلل كلي للدم وتبدو المستعمرات محاطة بمنطقة رائقة او شفافة ، والتحلل الدموي الجزئي Alpha haemolysis وفيه يتحلل الدم جزئيا وتبدو المستعمرات محاطة بمنطقة شبه رائقة خضراء اللون،اما النوع الثالث هو Gamma haemolysis وفيه يقتصر التحلل الى ماتحت المستعمرة فقط والنوع الرابع Delta haemolysis وهو عدم القدرة على تحلل الدم (Brooks *et al*.,2001).

ان وظيفة الـ hemolysine هو تشكيل ثقوب (pore) في الخلايا المضيفة الهدف (target) ومن خلال الاصابة تنتشر بكتريا *P.mirablis* الى الكلى بمساعدة فعالية التحلل للهيمولايسن وبسبب سميته للخلايا Cytotoxic فأنة يؤدي الى تحطيم الانسجة (Liaw *et al.*, 2000).وقد لوحظ أن انتاج الهيمولايسين Hpm يزداد بشكل متوازٍ مع التعبير عن الجين المسؤل عن تكوين الاسواط وأن انتاج الهيمولايسين يزداد بحوالي ٢٠مرة في الخلايا الزاحفة مقارنة بالخلايا الاعتيادية (Fraser *et al.*, 2002).

٢-٤-٢:الاسواط والانثيال Flagella and Swarmming

ان وجود الاسواط على سطح البكتريا المرضية والانتهازية تسهل عملية الاستعمارcolonization ونشر الاصابة من المواقع الاولية (Mcmanus *et al.*, 1980). أن حركة البكتريا عامل مهم في الإصابة بخمج المسالك البولية إذ تتمكن بكتريا المتقلبات *Proteus* من غزو القناة البولية بوساطة الحركة السريعة المتواسطة بالأسواط مما يزيد من إمراضية هذه البكتريا و جعلها قادرة على غزو الكليتين و استعمارهما (Liaw *et al.*, 2000; Liaw *et al.*, 2001; Liaw *et al.*, 2003).

الأسواط عبارة عن زوائد خيطية طويلة تشبه الشعر Hair-like appendex حلزونية Helical مجوفة تبرز من على سطح الخلية يستفاد من نمط توزيع الأسواط على سطح الخلية في تشخيص و تصنيف البكتريا ويكون موقع و عدد الأسواط محدد لكل جنس فهناك أجناس ذات سوط قطبي واحد فقط و تسمى Monotrichous بينما الأجناس المحاطة بالأسواط تسمى Peritrichous كما في بكتريا *Escherichia coli* التي تمتلك مابين٦-١٠أسواط محيطية بينما تمتلك بكتريا المتقلبات *Proteus mirablis* مما يزيد على ١٠٠ سوط محيطي الموقع (Volk *et al*.,1997) والمكون الرئيس للاسواط هو عبارة عن بروتين يسمى (Flagillin) (Umpierrez *et al* .,2013). تمتلك بكتريا *Proteus mirablis* اثنين من الجينات المسؤولة عن توليد الفلاجلين هما (*flaA*) و(*fla*B) (Manos *et al*.,2004).كما لاحظ Belas (١٩٩٤) أن للأسواط دورا في مقاومة الجهاز المناعي.

الانثيالية (Swarming)هي حركة البكتريا بشكل امواج تبدا من حافة المستعمرة الاصلية بواساطة الاسواط flagella وتلاحظ هذة الظاهرة بوضوح على اسطح الاوساط الصلبة الاعتيادية حيث تميز هذة الظاهرة جنس المتقلبات *Proteus*عن بقية اجناس العائلة المعوية (Gue *et al.*, 2001; Liaw *et al.*, 2001; Liaw *et al.*, 2003). وتعد ظاهرة الانثيال

swarming مهمة خلال دورة حياة بكتريا *P.mirablis* اذ تتمايز من خلايا انثيالية صغيرة(٤-٢) مليلتر بالطول والتي تمتلك ٦-١٠ اسواط محيطية الى خلايا متطاولة تصل الى (٨) مليلتر تمتلك الالاف من الاسواط خلال الانثيال (Liaw *et al.*, 2000). وتلاحظ ظاهرة الانثيال ظاهريا من خلال الدورات المتكررة لهجرة الخلايا المنثالة نتيجة الدمج بشكل عين الثور خلال حركة البكتريا على الاسطح الصلبة (Gibbs and Greenberg 2011).

ان اول من لاحظ هذه الحركة هو Dienes (1946) اذ ان السلالات المتشابهة من بكتريا المتقلبات تتداخل امواج مستعمراتها مع بعضها بدون ان يكون بينها اخدود فاصل وهذا مايدعى بظاهرة دنيس (Dienes phenomenon) التي استعملت في تصنيف انواع المتقلبات (Sosa *et al.*, 2006). يبدأ نمو المتقلبات على الاوساط الصلبة من غير انثيال تبدأ الحركة الزاحفه بعد 3-8 ساعات من التلقيح عندما يصل قطر المستعمرة الى 8 مليلتر تقريبا ويكون هذا النوع من النمو والحركة غير مستمرة (Liaw *et al.*,2000). توفر الحركة استمرارية بقاء البكتريا تحت ظروف مناسبة وتساعدها في الاستجابة للظروف البيئية المناسبة وغير المناسبة ونجاح تنافسها مع الانواع الاخرى من البكتريا حيث تمتلك البكتريا المسوطة نظام حركة متطورا في الاوساط السائلة والاسطح الصلبة وهذا النظام مهم للنمو على السطوح والاوساط السائلة واللزجة (Harshy, 2003).

تعد حركة الانثيال من عوامل الضراوة المهمة لبكتريا المتقلبات لاحداث الاصابة باخماج المسالك البولية وتستطيع البكتريا غزو اجزاء مختلفة من المسالك البولية بوساطة هذه الحركة السريعة والمتواسطة بالاسواط مما يزيد من امراضية بكتريا المتقلبات ويجعلها قادرة على غزو الكليتين واستعمارهما (Liaw *et al.*, 2001). تعمل ظاهرة الانثيال على توسيع مساحة الاستعمار (Colonization) وتساهم في تكوين الاغشية الحيوية الرقيقة على السطوح المختلفة (Jacobsen *et al.*,2008).ويمكن تثبيط هذه الحركة بأستعمال مواد كيميائية كحامض البوريك Boric acid وازايد الصوديوم Sodium Azide (Liaw *et al.*,2003).

٢-٤-٣: انتاج انزيم اليوريز Urease production

يعد انزيم اليوريز من عوامل الضراوة المهمة في بكتريا المتقلبات وهو من الانزيمات المعدنية (Metoloenzymes) اذ يحتوي على النيكل الذي يعد وجوده ضروريا لتشكيل الموقع الفعال للانزيم (Li *et al.*, 2002). و ينتج اليوريز من العديد من الأجناس

البكتيريـــة المســـببة لاخمـــاج المســـالك البوليـــة مثـــل *Proteus* ssp و *Klebsiella* و *Staphlococcus* (Zhao *et al.*, 1998) . و تعد بكتريا المتقلبات *Proteus* من اهم الممرضـــات البوليـــة المنتجـــة لأنـــزيم اليـــوريز الـــذي يـــؤدي دورا كبيـــرا فـــي عمليـــة الإستـعمار (Colonization) (Dattelbaum *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003). وقد بينت العديد من الدراسات إنّ بكتريا المتقلبات تتمتع بقابلية عالية على إنتاج كمية كبيرة من انزيم اليوريز بخلاف البكتريا الأخرى (Gendlina *et al.*, ٢٠٠٢).

يلعـــب انـــزيم اليـــوريز دورا رئيســـيا فـــي تكـــوين الحصـــى البوليـــة (urolithiasis) و الحصـــى الكلويـــة مـــن خـــلال رفعـــه لـــلأس الهيـــدروجيني للمحـــيط الـــذي يعمـــل فيـــة وذلـــك بفعل ايونـات الامونيوم الناتجـة عن اليوريز (Zhao *et al.*, 1998). والذي بدوره يؤدي الـى ترسـيب امـلاح الــ Struvite وهــي ($MgNH_4Po_46H_2O$) وامـلاح Carbonateapatite وهي($Ca_{10}(PO_4)_6.CO_3$) في مادة مخاطية تنتج من البكتريا تدخل في تركيبها الخلوي وهي مادة تتكون من متعدد السكرايد تسمى Glycocalyx (Torzewska *et al.*,2003).

أظهرت الدراسات المتخصصة بالتنظيم الوراثي لمجاميع الجينات ذات العلاقة بانتاج انزيم اليوريز عن تحديد التسلسل الكامل للنيوكليوتيدات، قسمت هذه الجينات على مجموعتين تعرف المجموعـة الأولـى بالجينـات التركيبيـة (Structural genes) أمـا المجموعـة الأخـرى فتعرف بالجينات الإضافية (Accessory genes) و إنّ هناك جيناً يسيطر على الاستنساخ (Transcription) يعرف بـالجين التنظيمـي (Regulatory gene) يرمـز لـه بــ *ureR* ، وتتكون المحددات التركيبية المسؤولة عن تكوين الجزء غير الفعال من الأنزيم من ثلاثة جينـات مـا عـدا بكتريـا *Helicobacter pylori* التـي تتكـون مـن اثنـين مـن الجينـات (Mulrooney and Hausinger 2003) .

تضم بكتريا *P.mirabilis* ثمانية جينات مسؤولة عن تكوين انزيم اليوريز وتقسم على مجموعتين الأولى تعرف بالجينات التركيبية وتضم ثلاثة جينات وهي *ureA*، *ureB* و *ureC* المسـؤولة عـن تكـوين الوحـدات التركيبيـة المكونـة للأنـزيم غيـر الفعـال (Apoenzyme) (Poore *et al.*,2001) فيما تضم المجموعة الثانية جينات اضافية وهي *ureD*, *ureE* , *ureG* التي تشفر لمعقد البروتين الذي يربط ايونات النيكل وتدخل هذه الايونات في المواقع الفعالة للإنزيم غير الفعال وهكذا يتم تنشيط الموقع التحفزي ويتم السيطرة على الجينات السبعة من قبل جين أخر يعرف بالجين التنظيمي ويرمز لـه بـ *ureR* فعند وجود اليوريا في الوسط

يترجم هذا الجين إلى البروتين *ure R* الذي يرتبط بالـ Promotor على الجين *ureD* مما يؤدي إلى ترجمة الجينات الأخرى (Island and Mobley., 1995). ويمتاز انزيم اليوريز المنتج من بكتريا *P.mirablis* بكونه اكثر فعالية من اليوريز المنتج من الاجناس البكترية الاخرى حيث يؤدي الى تكوين الغشاء الحيوي البلوري (Crystallin biofilm) الذي يكون اكثر انواع الاغشية الحيوية تعقيدا والذي يعمل على غلق القثاطر البولية وحماية البكتريا من المضادات الحيوية مما يؤدي الى فشل العلاج بالمضادات الحيوية (Jones *et al.*,2005;Stickler,2008).

٢-٤-٤: انتاج انزيم البروتيز protease production

ينتمي انزيم البروتيز الى الانزيمات المحللة مائيا (hydrolasis) التي تعد من الانزيمات المهمة في نمو الكائن المجهري و تطوره (Mala *et al.*, 1998). يتمثل دور انزيم البروتيز في الامراضية من خلال قدرتة على شطر الكلوبيولينات المناعية IgA و IgG في منطقة العنق (hinge reigon) فينتج اجزاء بروتينية صغيره ذات فعالية ناقصة وبذلك تكون الاستجابة المناعية للبكتريا المنتجة لهذا الانزيم محدودة (Parsons *et al.*,2004).كما اكد الربيعي (٢٠٠١) ان انزيم البروتييز المنتج من *P. mirabilis* له القابلية على شطر الضد IgM فضلاً عن الاضداد IgA و IgG الموجودة في المصل القياسي وإن الانزيمات المحللة للبروتين تساهم في تكوين مركبات الكلوتامين التي لها دور مهم في تحفيز الخلايا المنثالة على الانثيال (swarming) فقد وجد أنْ انزيم البروتيز لاينتج من الخلايا غير المتحركة (Allison *et al.*, 1993; Loomes *et al.*, 1992). إلا أنّ السعدي (٢٠٠٥) وجد في دراسته انه ليس جميع العزلات القادرة على إظهار حركة الانثيال قادرة على إنتاج الانزيم الحال للبروتين فلم تكن هناك علاقة بين ظاهرة الانثيال وإنتاج الانزيم، وقد فسر السبب الى أن العزلات غير المنتجة للانزيم لا تمتلك الجينات التي تشفر لإنتاج الانزيم. وانزيم البروتييز يعد احد افراد عائلة البروتيزات المعدنية (Metalloproteases) (Cole *et al.*, 2000) .

إنّ الجين المسؤول عن تشفير هذا الأنزيم يرمز له بالرمز *zapA* كما أن هناك جينات اخرى مشابهة للجين المشفر لانزيم البروتيز وهي *zapB*، *zapC*، *zapD* و*zapE* التي تكون مسؤولة عن انتاج انزيمات اخرى مشابهة لأنزيم البروتيز (Walker *et al.*,1999). تلعب انزيمات البروتيز دور مهم في العديد من العمليات الفسلجية والمرضية مثل تجلط الدم ونمو الخلايا وهجرتها والتنظيم النسيجي وعملية التشكل (Morphogenesis) خلال تطور

الكائنات والتمايز (Differentiation) والالتهاب (Inflammation) ونمو الاورام الخبيثة وانتشارها وتنشيط الانزيمات الخاملة واطلاق الهرمونات والببتيدات الفعالة من الناحية العلاجية من بادئات بروتينية (Precursor proteins) وانتقال البروتينات المفرزة عبر الاغشية الحية وتنظيم الفعاليات الايضية وفي التعبير الجيني وتحوير الانزيمات (Rao *et al* .,1998) .

تؤثر بعض المثبطات والعوامل المختزلة والكلابية في فعالية الانزيم ،إذ إنّ فعالية الانزيم قد ازدادت عند معاملتة بايونات Ca^{++} و Zn^{++} مما يدل على انها تؤدي دوراً في تحفيز الانزيم وثباته ،اما العوامل الكلابية مثل (EDTA) فقط اظهرت تأثيرا مثبطا لفعالية الانزيم في حين لم تثبط فعاليتة بواسطة العوامل المختزلة مثل السستين (الشويخ وجماعتها، ٢٠٠٩).

٢-٤-٥: تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation

هو عبارة عن تجمع الاحياء المجهرية والتصاقها بالسطوح وتكون محاطة بـ بوليميرات خارج خلوية extracellular polymers وهذه البوليميرات هي عبارة عن سكريات متعددة اذ يساهم هذا الغشاء في حدوث الاصابة ومقاومة المضادات الحيوية (Kokare *et al*.,2009). اذا تؤدي المواد البوليمرية الخارج خلوية في تثبيت الغشاء الحيوي فهي توفر الحمايه للخلايا الموجوده بداخله من الظروف البيئية غير الملائمة مثل الاشعه فوق البنفسجية، تغير الـ pH , الصدمة الاوزموزية، الجفاف والمواد السامة للبكتريا (DeCharvalho,2007).

ترتبط البكتريا الحاوية على هذه الاغشية بالعديد من الأمراض المهمة في الإنسان مثل اخماج شغاف القلب والصمام ، اخماج الاذن الوسطى المزمن واخماج الجروح والحروق ، كما ان البكتريا التي تمتلك الاغشية الحيوية تتمكن من استعمار الاجهزة الطبية كجهاز القثطرة (Costerton *et al*., 1999) . ان الغشاء الحيوي الذي تكونه بكتريا *P.mirabilis* يمكن ان يسبب مشاكل خطيرة للمرضى عند استعمالهم لأنبوب قسطرة المثانة اذ أظهرت (93.75%) عزلة من بكتريا *P. mirabilis* القدرة على تكوين الغشاء الحيوي في أنابيب القسطرة (Ali,2012).

٢-٥: مقاومة بكتريا *P. mirablis* للمضادات الحيوية

P.mirablis Resistance to amtibiotics

٢-٥-١: مضادات البيتالاكتام ß-Lactam Antibiotics

إنّ مضادات البيتالاكتام عبارة عن مجاميع كبيرة من المضادات الحيوية تشترك جميعها باحتوائها على حلقة بيتالاكتام (ß-lactam ring)، وتضم هذه المضادات أربع مجاميع رئيسية هي: البنسيلينات (Penicillins) والسيفالوسبورينات (Cephalosporins) والكاربابينيم (Carbapenims) والموناباكتام (Monobactam) وتختلف هذه المجاميع في طبيعة الحلقة الإضافية المتصلة بحلقة البيتالاكتام، ففي مجموعة البنسيلينات نجد أنّ الحلقة الإضافية هي (5- Thiozolidin)، وفي مجموعة السيفالوسبورين هي (6- Cephem)، إضافة إلى وجود حلقتين إضافيتين في مضادات الكاربابينيم. أمّا مجموعة مضادات المونوباكتام فتقتصر على حلقة البيتالاكتام فقط، كذلك هنالك نجد اختلافات بين المضادات العائدة للمجموعة نفسها والذي يكون سببه اختلافها في نوع السلسلة الجانبية المتصلة بحلقة البيتالاكتام. (Samaha- Kfoury and Araj, 2003). وتعمل مجموعة مضادات الـ β-lactame على منع تكون الجسور الببتيدية التي تربط وحدات الاحماض الامينية في طبقة الببتيدوكلايكان ضمن جدار الخلية البكتيرية مما يؤدي الى وقف عملية تصنيع الجدار ومن ثم موت البكتريا نتيجة حساسيتها للضغط الاوزموزي (Jawetz *et al.*, 1998). ونظراً للأصابات المكتسبة في المستشفيات فقد أصبحت معظم اجناس المتقلبات مقاومة لهذه المضادات بسبب أنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز، استعملت هذه المضادات علاجلاً فعالاً ضد اخماج المسالك البولية واخماج الإذن الوسطى، وهي تعطى عن طريق الفم بسبب أمتصاصها الكامل في الأمعاء (Livermore and Woodford, 2006).

٢-٥-١-١: السيفالوسبورينات Cephalosporins

تتألف مضادات السيفالوسبورينات من حلقة البيتالاكتام متصلة مع حلقة (Dihydrothiazine) مكونة نواة تدعى (7-amino cephalosporanic acid) مع وجود سلسلتين جانبيتين متغيرتين R1، R2 تبعاً لنوع المشتق (Brook *et al* .,2007). ويمكن أن تقسم مركبات السيفالوسبورين كيمياوياً إلى مجموعتين:الاولى الاوكسي-امينوسيفالوسبورين (Oxyaminocephalosporin) والمجموعة الثانية هي الميثوكسي سيفالوسبورين (Methoxycephalosporin) ومن الأمثلة على مجموعة الأوكسي أمينو سيفالوسبورين هي مجموعة مضادات السيفوتاكسيم وسيفترياكسون وسيفتازيديم أمّا مجموعة الميثوكسي سيفالوسبورين أو السيفاميسين (Cephamicine) فتضم السيفوكسيتين والسيفوتيتان،وهذه المركبات وثيقة الصلة بالسيفالوسبورينات،ولكنها تمتلك مجموعة

8-ميثوكسي (OCH_3) التي تدعى (Oxacephem) بدلا عن (7-aminocephalosporanic-acid) الموجود في مجموعة الأوكسي أمينوسيفالوسبورين (Yao and Moellering, 2003) .

تُصنف السيفالوسبورينات إلى أربعة أجيال، إستناداً إلى فعاليتها المضادة للنمو البكتيري وهي:-

- الجيل الأول: ويشمل السيفالوسبورينات ذات الطيف الضيق، تشمل، الـCephalothin، Cephaloridin و Cephalexin وهذه المركبات لها نشاط بسيط نسبياً ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام، ولكن في الوقت نفسه نجد أنّ أنواعاً عديدة من بكتريا *E.coli* و *Klebsiella pnumoniae* تكون حساسة لهذه المضادات (Moya *et al*., 2010).
- الجيل الثاني : وهذه المركبات تكون مستقرة نوعا ما بوجود انزيمات البيتالاكتاميز وهذه الخواص تزيد من نشاطها ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام وتشمل السيفاميسين ومثال على هذه المجموعة من المضادات Cefoxitin,Cefuroxim (Samaha-Kfouy and Araji,2003).
- الجيل الثالث: تضم هذه المجموعة مضادات حيوية ذات نشاط اكثر بكثير من المضادات ذات الطيف الضيق وهي اكثر استقرارا بوجود أنزيمات البيتالاكتاميز وتكون قادرة على عبورالجدار الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة غرام ومن الامثلة على هذه المضادات Ceftazidime،Cefotaximeو Ceftriaxo (Moya *et al*.,2010;Greer,200٩) ويعد مضاد السيفوتاكسيم Cefotaxim اول مشتقات هذه المجوعة ويمتاز بفعالية العالية تجاه البكتريا السالبة لصبغة غرام وبالأخص بكتريا *P.mirablis* ولكنة يمتلك فعالية متغايرة تجاه بكتريا *P. vulgaris* (Murray *et al*.,1999) ان سيفالوسبورينات الجيل الثالث هي اكثر الاجيال فعالية ضد بكتريا المتقلبات فهي تستعمل في اخماج القناة البولية الناتج عن *P.mirablis* (Okesola and Makanjuola, 2009).
- الجيل الرابع : مثل السيفيم (Cepheme) الذي طُوّر في سنة ١٩٩٤ويظهر هذا المضاد زيادة في الإستقرارية ليس فقط للإنزيمات التي تشفر لها على الكروموسومات بل حتى لبعض هذه الإنزيمات التي تكون جيناتها محمولة على البلازميدات Plasmids (Kalai *et al*.,2005;Yoa and Moellering,2003) .

٢-٥-١-٢: مضادات الكاربابينيم Carbapenemes

وتتميز هذه المجموعة من المضادات بكونها تمتلك طيف واسع الفعالية ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام والبكتريا اللاهوائية.ومن الأمثلة على هذه المجموعة مضادات الأميبينيم والميروبينيم والأرتابينيم، ويُعدّ الأميبينيم Impenem هو أول مضاد من مجموعة الكاربابينيم ذي الفعالية الجيدة ضد مجاميع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام، وكذلك ضد البكتريا اللاهوائية، فهو مركب مستقر جدا ولايتأثر بأنزيمات البيتالاكتاميز (Jacoby and Bush,2009; Queenan and Bush,2007).

٢-٥-٢ :مضادات الكوينولونيات Quinolones

تعد هذه المجموعة من المضادات واسعة الطيف في تأثيرها على العديد من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام (Katzung ,2001). ويعد المضاد Nalidix acid الجيل الأول لهذه المجموعة ، وإنّ استعمال هذا المضاد اقتصر على معالجة خمج المسالك البولية الامر الذي ادى الى تطور جيل جديد من الكوينولين عام ١٩٨٠ والذي سمي الفلوركوينولين (Fluroquinolones)اشتمل على Norfloxacin و Ciprofloxacin ويختلفCiprofloxacin عن NalidixAcid بوجود ذرة فلورF في تركيبه (Brooks *et al*.,2007) تعمل الكونيولينات على تثبيط فعالية انزيم DNA gyras البكتيري والمسؤول عن فك التفاف شريط الحامض النوويDNA اثناء عملية التضاعف وكذلك تثبط انزيم Topoisomerase ll مما يؤدي الى تثبيط عملية التضاعف واستنساخ الـ DNA (Hooper,2000;Prescott *et al*.,2005).ان مضادات الكوينولينات هي اكثر المضادات التي تطرح مع الادرار وهذا يجعلها من العلاجات المناسبة لعلاج اصابات اخماج القناة البولية الناتجة عن البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Naber *et al*.,2000).

٢-٥-٣:المضادات الحيوية المثبطة لتصنيع البروتين

Antibiotic that inhibit Protien synthesis

٢-٥-٣-١ :النايتروفيورانتون Nitrofuration

يعد من المضادات الفعالة ضد العديد من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام و تزداد فعالية المضاد عند الرقم الهيدروجيني pH 5.5 أو أقل (Katzung 2001). اتى استعماله منذ الخمسينيات من القرن الماضي اذ يعطى عن طريق الفم مع الطعام وله تأثيرات استثنائية ، يستخدم هذا المضاد في علاج اخماج الأمعاء والمسالك البولية، ويؤثر على عملية صنع البروتين من خلال الأضرار التي يسببها وبشكل مباشر على شريط DNA (Brooks *et al*.,2007).

٢-٥-٣-٢: الكلورامفينكول Chloramphenicol

يعمل مضاد الكلورومفينكول على تثبيط بناء البروتين من خلال منع استطالة السلسلة الببتيدية النامية وذلك بارتباطه بالوحدة (50S) من الرايبوسوم وبذلك يعمل على تثبيط انزيم Peptidyltransferase (Fluit *et al*., 2001). وبذلك يثبط نمو البكتريا عن طريق تثبيطه لبناء البروتين، ولا يعطى الكلورامفينيكول في حالة وجود حساسية لدى المريض وكذلك لايعطى للنساء الحوامل كما يسبب قلة النبيت الطبيعي للأمعاء ومن ثم تؤدي الى عدم تكون فيتامين K وهو ينتج من الفطر *Streptomyces venezuelae* ،و يحتوي على حلقة نتروبنزين في تركيبة (Brooks *et al*.,2007). تنشأ مقاومة البكتريا لمضاد الكلورومفينكول من خلال انتاج انزيمات Chloramphenicol acetyl transferase والتي تشفر من قبل جينات محمولة على البلازميد وهذه الانزيمات تحول المضاد الحيوي الى 3-Acetoxy chloramphenicol والذي بدوره يتحول الى 1-3-Diacetoxy chloramphnicol وهذه النواتج المشتقه تكون غير فعالة كمضادات حيوية بسبب فشل ارتباطها بالرايبوسوم (Fluit *et al*., 2001).

٢-٥-٣-٣ : مضادات الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides

تعمل على منع تصنيع البروتين عن طريق ارتباطها بالوحدة (30S) من الرايبوسوم, وتثبيط معقد البداية (Intiation complex) في عملية تصنيع البروتين مما يؤدي الى حدوث خطأ في قراءة mRNA ومن ثم انتاج بروتين غير فعال (Shahid *et al*.,2003). تقاوم البكتريا مضادات الامينوكلايكوسايد من خلال انتاج الانزيمات التي تحور الموقع الفعال للمضاد الحيوي مثل Phosphotransferase و Nucleusidyltrasferase و

Acetyltransferase والتي تعمل على تحوير موقع الهدف للمضاد الحيوي وكذلك انتاج انزيمات تعمل على تحوير جزيئة المضاد الحيوي مما يؤدي الى عدم قدرة المضاد من الارتباط بالرايبوسوم وفقدان فعاليته وهناك االيه اخرى تتضمن تغير حاجز النفاذيه مما يؤدي الى منع وصول المضاد الى موقع عمله (Karlowsky *et al*.,2003).ومن مضادات هذه المجموعة مضادات Gentamycin الذي له أهمية كبيرة في علاج اخماج المسالك البولية وهو من علاجات الخط الاول في هذا المجال ويكثر استعماله بوصفه مضاداً اولياً ضد البكتريا المعوية (Thureen *et al*.,1999). ويوصف كخليطُ مع مضادات البيتالاكتام لتقليل نشوء المقاومة ضد هذا المضاد، إذ يظهر فعالية كبيرة عند خلطه مع البنسلينات ضد بكتريا المتقلبات والزوائف والأنواع السالبة لصبغة غرام (Katzung, 2001).

٢-٥-٣-٤ :الريفاميسين Rifamicin

هو أحد المضادات المثبطة للبكتريا (Bacteriostatic) إذ يثبط تصنيع الدنا البكتيري، بارتباطه بإنزيم DNA- depended RNA polymerase مما يؤدي الى تثبيط تصنيع mRNA (Murray *et al*.,1999).

٢-٧: الاستجابة المناعية Immune Response

تنظم الاستجابة المناعية لعوامل الاصابة بوساطة مؤثرات مناعية وخلايا منتجة للحركات الخلوية مثل الخلايا التشجرية Dendritic Cells التي تحفز نضج الخلايا التائية (T Cell) الى الخلايا المساعدة (Th1 Cells) من خلال انتاج بعض الحركيات الخلوية Cytokines (Kadowki and Antonenko,2001; Wozniak,2006)**.** وفي احدى الدراسات بينت ان الـ Flagellin الذي تفروه بكتريا *P.mirablis* يحث الاستجابة المناعية الفطرية .كما بينت ان قدرة الـ Flagellin على ان يحث Pro-inflammatory ومن ثم تؤدي الى انتاج الحركيات الخلوية (Cytokines) والكيموكين (Chemokine) (Umpierrez *et al*.,2013). توفر الاستجابة المناعية الفطرية حاجزا ضد مسببات الامراض .وتستعمل اليات المناعة الفطرية من قبل المضيف للرد على مجموعة من مسببات الامراض البكترية بطريقة حادة،عندما تعبر الخلايا المضيفة حاجزالمستقبلات الذي تستشعرالحواجز الجزيئية المرتبطة بالمرض (Diacovich and Pierre Govel,2010).

٢-٧-١:الحركيات الخلوية ودورها في الالتهاب

Cytokines and their role in inflamatiom

الحركيات الخلوية عبارة عن بروتين ذات فعالية عالية ينظم نمو الخلايا وتمايزها وتساعد على حث الاستجابة المناعية عند بداية الاخماج (Thomoson,1998).تنسق الحركيات الخلوية عدة وظائف في الجهاز المناعي والاستجابة الخمجية اذ تعمل كمراسل يقوم بدور محوري في المراسلة بين كل من خلايا الجهاز المناعي وتنظيم نمو الخلايا المناعية المؤثرة من جهة وبين الجهاز المناعي وبقية اجهزة الجسم من جهة اخرى مكونة بذلك شبكة متكاملة تسهم بشكل كبير في تنظيم الاستجابة المناعية (Gloria *et al*.,2005).

ويمكن ان تقسم الحركيات الخلوية الالتهابية الى مجموعتين :منها الحركيات الخلوية المسؤولة عن الالتهابات الحادة والتي تؤدي دورها في الالتهابات الحادة مثل TNF-α, IL-8, IL-1, IL-6, IL-11 وكيموكينات اخرى كالعامل المحفز للمستعمرة المحببة Granulocyte Colony- Stimulation Factor (GM-CST) ،اما المجموعة الاخرى يمكن ان تقسم الى الحركيات الخلوية متوسطة للأستجابة الخلطية مثل IL-4, IL-5, IL-6, و IL-13 وسايتوكينات متوسطة للاستجابة الخلوية مثل IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9 , IL-10, IL-12 (Shaikh,2011).

بعض الحركيات الخلوية Cytokines مثل IL-6 و IL-8 تنشط في المرضى المصابين بخمج المسالك البولية (Benson *et al*.,1994). وبين (Hedges *et al*.,1992) ان الحركيات الخلوية تكون واسطة بين استجابة المضيف لخمج المسالك البولية والفرق بين حجم استجابة الحركيات الخلوية للمرضى الذين يعانون من خمج حويض الكلية الحاد ونوعيته. وان الخلايا المبطنة للغشاء المخاطي للمثانة تنتج الحركيات الخلوية والكيموكينات والببتيدات المضادة للميكروبات ،اذ تعمل هذه الخلايا على منع تعرض المسالك البولية العليا للبكتريا وتعمل كحاجز عند دخول الكائنات الممرضة (Kagnoff and Ekmann,1997).كما ان هنالك ثلاث اليات في البكتريا التي تنشط الاستجابة الالتهابية الخلوية ، الاولى هي عن طريق التفاعل المباشر بروابط الاسطح المايكروبية مع مستقبلات الخلايا الظهارية و أحد هذه الروابط المايكروبية القوية هي الخمل Fimbriae التي تمتلكها البكتريا وهذه التفاعلات تحث الغشاء على توليد الحركيات الخلوية ، والألية الثانية تتداخل المكونات البكترية مع الخلايا الظهارية الناتجة مباشرةٍ أثناء تنشيط الالتهاب ، اما الالية الثالثة فتتطلب تنشيط الخلايا غير الطلائية non-epithelial،

اذ تخترق البكتريا الطبقة الطلائية Epithelial Layer التي اجتاحت من قبل الخلايا المناعية الالتهامية وهذه الخلايا لها القدرة على انتاج الحركيات الخلوية (Svanborg *et al* .,1999).

٢-٧-١-١:انترليوكين ٦ Interleukin-6

هو عبارة عن سايتوكين متعدد المظاهرPleiotropic يؤدي دوراً مركزياً في تنظيم المناعة والالتهابات (Mihara *et al*.,2012).وان IL-6 هو سايتوكين استجابة اولية Proinflammatory Cytokine حيث يعمل بمثابة مؤشر لحدوث الحمى وله تأثير في الاستجابة الخمجية والجهازية (Uehling,١٩٩٩). له اهمية كبيرة في الأستجابة المناعية الأنية والمكتسبة على حد سواء ويفرز بوساطة مجموعة من الخلايا منها Monocyte،Macrophage، TCell و BCell (Jones *et al*.,2011).

يمتلك IL-6 مستقبلات خاصة ومعقدة على سطوح الخلايا مثل IL-6R وTLRs اذ يرتبط بها ويقوم بأرسال اشارات من السطح الى داخل الخلية المرتبط بها(Schwantner,2004). يمتلك IL-6 دوراً كبيراً في توليد الألتهابات المزمنة ونشوئها ،اذ ان في بداية الاخماجات الحادة تعمل الحركيات الخلوية على تراكم العدلة neutrophil ومن ثم تحرير٦-IL (Kaplanski *et al*.,2003). للأنترليوكين ٦ دور كبير في العديد من الفعاليات البايولوجية اذ يوجد في المصل وبقية السوائل الجسمية حيث يكون وجوده مرتبطاً مع الاصابات مثل الحروق والاصابات العامة وان الاصابة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام تحفز لانتاج مستويات عالية من الانترليوكين٦ في المصل ويستعمل كدلائل للمرض المتسبب عن البكتريا (Okamoto and Oyasu,1996).

٢-٧-١-٢:عامل تنخرالورم نوع الفا

Tumer Necrosis Factor-alpha (TNF-α)

هوسايتوكين متعدد الوظائف يمكن ان ينظم العديد من العمليات الخلوية والبايلوجية مثل تحفيز الخلايا المناعية ،تمايز الخلايا المناعية،الموت المبرمج للخلايا (Cawthorn *et al*.,2008) .ويتم انتاجه من عدة انواع من الخلايا المناعية غير المتخصصة

مثل الخلايا القاعدية Neutrophil ،الوحيدات Monocyte ،الخلايا التائية T-Cell والخلايا البدينة Mast cell ويعد سايتوكين استجابة اولية للخمج Proinflammatory Cytokine (Blake *et al*.,2001).

ويعد انتاج TNF-α دليلاً اواشارة على تنخر النسيج المصاب بالخمج ونزفه ، ويشفر لانتاجه جين موجود في الكروموسوم ٦ حيث يتكون من ٢٣٣ حامضاً امينياً (Krystyna *et al*.,2007). وقد وجد ان مستويات الـ TNF-α اكبر في المرضى الذين يعانون من انخفاض معدل الترشيح الكبيبي ،والمرضى الذين يقومون بالغسيل الكلوي وأن عامل تنخر الورم نوع الفا هو سايتوكين له دور بالمشاركة في الاخماج الجهازية وعضو في مجموعة السايتوكينات التي تحفز رد فعل المرحلة الحادة من المرض (Bolton *et al*.,2001).

٣-المواد وطرائق العمل Materials and Methods

٣-١: المواد Materials

٣-١-١:الأجهزة والأدوات المختبرية Apparatus and Equipments

جدول (٣-١) الأجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة والشركات المُصنِعة لها.

ت	أسم الجهاز	الشركة المصنعة

١	موصدة Autoclave	Marubeni (Japan)
٢	كابينة التعقيم Hood	
٣	حمام مائي Water bath	
٤	صفيحة التسخين Hot plate	
٥	ميزان ألكتروني حساس Sensitive electronic balance	
٦	حاضنة Incubator	Memmert (Germany)
٧	فرن كهربائي Oven	
٨	مصدر الأشعة فوق البنفسجية UV–Transilluminater	Scie – plas (Belgium)
٩	وحدة الترحيل الكهربائي Electrophoresis unit	
١٠	المازج الدوار Vortex mixer	Cyan (Belgium)
١١	مجهر ضوئي مركب Compound light microscope	Olympus (Japan)
١٢	كاميرا رقمية Digital camera	Sony (Japan)
١٣	جهاز تقطير Distiller	GFL (Germany)
١٤	جهاز الاليزا	USA
١٥	ماصات دقيقة Microliter pipettes	salmed(Germany)
١٦	جهاز قياس الحموضة pH–meter	Martini (USA)
١٧	جهاز المضخم الحراري Thermo cycler apparatus (PCR)	Techin (USA)
١٨	ثلاجة Refrigerator	Concord (Lebanon)
٢٩	الناقل الزرعي القياسي Standard wire loop (1µ)	Himedia (India)
٢٠	أطباق بتري بلاستيكية مختلفة الاحجامDisposable petri dishes	Sun (China)
٢١	مسحات قطنية معقمة Sterilized swabs cotton	Afco(Jordan)
٢٢	منبذة (مبردة) Cooling centrifuge	Janetzki (Germany)
٢٣	منبذة عالية السرعة High speed centrifuge	
٢٤	شرائح زجاجية Slides	Superestar (India)
٢٥	أنابيب إختبار Test tube	
٢٧	فيرنياCalipers	China

٣-١-٢:الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Prepared media

جدول (٣-٢): الأوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في الدراسة والشركات المُصنِعة لها.

الاوساط الزرعية	الغرض	المنشأ
وسط اكار الدم Blood agar Base	استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات على انتاج انزيم الهيمولايسين وملاحظة ظاهرة الانثيال Swarming	

ماء الببتون Pepton water	استعمل للكشف عن حلقة الاندول	Himedia (India)
وسط السيمون ستريت Cimon citrate	استعمل للكشف عن البكتريا المخمرة للسترات بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون	
وسط اكار DNase agar	استعمل للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج الDNase	
وسط اكار الماكونكي MacConkey agar	استعمل بوصفه وسطا انتخابيا للبكتريا السالبة لصبغة غرام وللتفريق بين المستعمرات المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز	
وسط الاكار المغذي Nutrient agar	منم عام	
وسط اكار الكروم Chrom agar	استعمل وسطاً تشخيصياً	
وسط المولرهنتون Muller hinton agar	استعمل الوسط لغرض فحص حساسية البكتريا تجاه المضادات الحيوية	
وسط اكار اليوريا Urea agar	استعمل للتحري على قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز	
وسط كلكلر الحديد Kligler's Iron Agar	استعمل لتميز البكتريا على أساس انتاج كبيرتيد الهيدروجين وتخمر السكريات ا لثنائية الكلوكلوز واللاكتوز	
وسط المرق المغذي Nutrient broth	منم عام	
وسط المثيل الاحمر و فوكس بروسكاور Methyl red vogas–Proskaour	استعمل للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الاستيل مثيل كاربون	
وسط نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth	استعمل كوسط ناقل و لغرض تنمية وتنشيط العزلات في التجارب.	Oxoid (England)

٣-١-٣: المواد الكيميائية المستعملة Chemical materials

جدول (٣-٣): المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة والشركات المُصنِعة لها.

ت	أســـــم المـــادة	الشـــركة المصـنعة
١	الاكاروز Agarose	BIOBASIC INC (USA)
٢	درائ TBE10X buffer	

٣	كلوريد الباريوم $BaCl_2$	BDH (England)
٤	كحول ايزواميلي Isoamylalcohol	
٥	كحول الإيثانول (96%) Ethanol	
٦	جيلاتين Gelaten	
٧	كلوريد الصوديوم NaCl	
٨	حامض الكبريتيك H_2SO_4	
٩	كليسرول ($C_3H_8O_3$) Glycerol	
١٠	ألفا– نفثول ($C_{10}H_8O$) α-naphthol	
١١	هيدروكسيد البوتاسيوم KOH	
١٢	حامض الهيدروكلوريك HCl	
١٣	P-Dimethyl amino Benzyl aldehyde	
١٤	المثيل الأحمر ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) Methyl red	
١٥	Tetra methyl-p-phenylene diamine dihydro chloride	Himedia (India)
١٦	بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) Hydrogen peroxide	SDI (Iraq)
١٧	الكحول الأثيلي ٩٦% Ethyl alcohol	Teba(Iraq)

٣-١-٤: الصبغات Stains

جدول (٣-٤): الصبغات الجاهزة المستعملة في الدراسة والشركات المُصنِعة لها.

ت	أسم الصـــبغة	الشركة المصنعة
١	صبغة بروميد الأثيديوم Ethidium bromide dye	BIO BASIC INC (USA)
٢	صبغة التحميل Loading dye	
٣	صبغة كرام Gram stain	SYRBIO (France)

٣-١-٥ :المضادات الحيوية Antibiotics

جدول (٣-٥) أقراص المضادات الحيوية التي جهزت من شركة (Turkey) Bioanalyse

صـــنف المضـــاد الحيوي	تحـــت صـــنف المضاد الحيوي	اسم المضاد الحيوي		الرمز	التركيز
/βlactam		اموكسيلين	Amoxcillin/	AMC	µg ٢٠/١٠

		Cluvanic acid	حامض كلوفولانك		βlactamase inhibitor combination
30 µg	KF	Cephalothine	سيفالوثن	Cephalosporine الجيل الأول	Cephems
30 µg	CL	Cephalexin	سيفالكسين		
30 µg	CTX	Cefotaxim	سيفاتكسيم	Cephalosporine الجيل الثالث	
10 µg	IMP	Impenem	أمبينيم	Carbapenem	Penems
30 µg	CN	Gentamicin	جنتاميسين		Aminoglycosides
5 µg	CIP	Ciprofloxacin	سبروفلوكساسين	Floquinolones	Quinolones
30 µg	NA	Nalidic acid	حامض الناليدك	Quinolon	
10 µg	C	Chloramphenicol	كلورامنفينيكول		Phenicols
300 µg	F	Nitrofuration	نيتروفوريشن		
15 µg	E	Erythromycin	ارثرومايسين		Macrolids
30 µg	RA	Rifampin	ريفامبين		Rifamycins

٣-١-٦: تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

٣-١- ٦-١:عدة استخلاص الـ DNA

جدول (٣-٦) عدة استخلاص الدنا و الشركة المجهزة لها .

ت	المكونات	الشركة المجهزة
1	GT Buffer 30 ml	Geneaid (Korea)
2	GB Buffer 40 ml	
3	W1 Buffer 45 ml	
4	Wash Buffer 100 with ethanol	
5	Elution Buffer 30 ml	
6	GD Column 100pcs	
7	2ml collection tubes 100 pcs	

٣-١-٦-٢: عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR PreMix

جدول (٣-٧) عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة

ت	المكونات	الكمية	الشركة المجهزة

١	Top DNA polymerase 1U	١U	Bioneer (Korea)
٢	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	٢٥٠µM	
٣	Tris-HCl (pH 9.0)	١٠ mM	
٤	KCl	٣٠Mm	
٥	$MgCl_2$	١,٥Mm	
٦	Stabilizer and tracking dye		
٧	Standard 96 PCR tubes		

٣-١-٦-٣ : تصميم البادئات Primer design

تم تصميم البادئات *hpmA* و*flaA* و *ureE* المستعملة في هذه الدراسة و المسؤولة عن أنتاج عوامل ضراوة في بكتريا الـ *P.mirablis* بالاستعانة ببرنامج Primer3Plus لتوفير ظروف ملائمة على وفق ما جاء في (Untergasser *et al*., 2007) وكما يأتي:

١- صممت البادئات *hpmA* و*flaA* و *ureE* عن طريق الحصول على التسلسل الجيني لكل بادئ من هذه البادئات من بنك الجينات GenBank الموجود في الموقع الالكتروني www.ncbi.nlm.nih.gov.

٢- ادخل هذا التسلسل الجيني في برنامج الـ Primer3Plus والذي يوجد على الموقع الالكتروني www.bioinformatics.nl اذ ضبطت الإعدادات الملائمة لكل بادئ مثل درجة حرارة الارتباط Annealing Temperature ونسبة G+C وحجم ناتج التضخيم Product size .

٣- اختير البادئ المناسب بعد التأكد من برنامج الدورات الحرارية لكل بادئ مصمم وذلك عن طريق برنامج Optimase Protocol Writer المبين في ملحق رقم (٢) . تم ذكر خطوات تصميم البادئ *hpmA* في ملحق رقم (1) كطريقة لتوضيح تصميم البوادئ في الدراسة الحالية.

٣-١-٦-٤: بادئات الدنا DNA primers

جدول (٣-٨) بادئات الدنا والتي تم شراؤها من شركة Bioneer(Korea)

نوع البادئ	تسلسل القواعد النتروجينية(٣"-٥")	حجم ناتج	المصدر

			التضخيم	
zapA	F*	ACCGCAGGAAAACATATAGCCC	٥٤٠ Pb	Stankowska *et al* .,2008
	R**	GCGACTATCTTCCGCATAATCA		
ureC	F	GTTATTCGTGATGGTATGGG	٣١٧Pb	
	R	GTAAAGGTGGTTACGCCAGA		
Urea	F	GATCTGGGCGACATAATCGT	٣٦٢Pb	صمم في هذه الدراسة
	R	TCACCGGGGATCATGTTATT		
hpmA	F	TGGTATCGATGTTGGCGTTA	٧١٧ pb	صمم في هذه الدراسة
	R	GTGGTGCCCACTTTCAGATT		
flaA	F	AGGATAAATGGCCACATTG	٤١٧Pb	صمم في هذه الدراسة
	R	CGGCATTGTTAATCGCTTTT		

*F:Forword **R:Reverse

٣-١-٦-٥:الدليل الحجمي

جدول (٣-٩) خصائص الدليل الحجمي.

الدليل الحجمي	الوصف	الشركة المجهزة
M	يتألف الدليل الحجمي من 11 حزمة من قطع الدنا ذات أحجام تبدأ بـ (١٠٠ ،٢٠٠ ،٣٠٠ ، ٤٠٠ ، **(٥٠٠) الحزمة المعلمة** ، ٦٠٠ ، ٧٠٠ ،٨٠٠ ،٩٠٠ ، ١٠٠٠، 1500) زوج قاعدي	Promega(USA)

٣-١-٦-٦:العدد المستعملة في قياس المؤشرات الالتهابية IL-6 و TNF-α

جدول (٣-١٠) مكونات العدد IL-6 و TNF-α

المكـــونات	نوع العدة	المنشأ
IL-6 Plate	IL-6 ELISA Kit	(Ray Biotech) U.S.A
IL-6 Standard		
IL-6 Conjugate		
Diluent A		
Diluent B		
Wash Solution		
Stop Solution		
TNF-α Plate	TNF-α ELISA Kit	(Ray Biotech) U.S.A
TNF-α Standard		
TNF-α Congugate		
Diluent A		
Diluent B		
Wash Solution		
Stop Solution		

٣-٢-١:طرائق التعقيم Sterilization methodes

A: التعقيم بالحرارة الرطبة Wet hot sterilization

عُقمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة والتركيبية بجهاز الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة(121) مْ وضغط (١٥) باوند/أنج٢ لمدة (١٥) دقيقة.

B: التعقيم بالحرارة الجافة Dry hot sterilization

عُقمت الزجاجيات المستعملة في الفرن الكهربائي (Oven) بدرجة حرارة (168) مْ ولمدة ساعة ونصف.

٣-٢-٢ :تحضير المحاليل والكواشف

Solution and Reagents Preperation

٣-٢-2-1 : المحاليل

٣ -٢-٢-١-١: المحلول الملحي الفسلجي Solution Normal saline

حُضر بإذابة (0.85) غم من (NaCl) في (90) ملليتر من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى (100) ملليتر ثم عقم بالموصدة لمدة 15 دقيقة وحفظَ بعد ذلك في درجة (٤) مْ . استعمل المحلول في تخفيف العالق البكتيري عند أجراء التجارب المختبرية (Macfaddin, 2000)

٣-٢-٢-١-٢ : محلول ثابت العكرة القياسي (ماكفرلاند) رقم (0.5)

حُضر المحلول على وفق ما جاء في (Benson, 2002)، وكالاتي:

محلول A : حضر بإذابة (١,٧٥) غم من كلوريد البار يوم (BaCl2) في (٩٠) ملليتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (١٠٠) ملليتر للحصول على تركيز (0.048) مول/لتر.

محلول B : أضيف (١) ملليتر من حامض الكبريتيك H_2So_4 إلى (٩٠) ملليتر ماء مقطر معقم ، وأكمل الحجم إلى (١٠٠) ملليتر.عند استعمال محلول ماكفرلاند مزج (٠,٥) ملليتر من محلول A مع (٩٩,٥) ملليتر من المحلول B للحصول على عدد تقريبي للخلايا البكتيرية بمقدار (1.5×١٠^{٨}) خلية/ملليتر .

٣-٢-2-2-2 : الكواشف

٣-٢ -2-2-1: كاشف الاوكسيديز Oxidase

حُضر الكاشف آنياً عند الاستعمال بإذابة (0.1) غم من Tetramethyl- P- Phenyl Diamine Dihydro chloride في (10) ملليتر من الماء المقطر وضع الكاشف في قنينة معتمة. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج أنزيم الاوكسيديز(Forbes *et al.*, 2007).

٣-٢-٢-٢-٢: كاشف الكاتليز Catalase reagent

استعمل محلول بيروكسيد الهيدروجين (Hydrogen peroxide) بتركيز(٣%) ،وذلك باذابة (٣) غم من H_2O_2 في في (100) ملليتر من الماء المقطر المعقم وحفظ في قنينة معتمة استعمل الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم الكاتليز(Collee ,1996,).

٣-٢-٢-٢-٣: كاشف كوفاكس Kovac's reagent

حُضر بإذابة (5) غم من مادة P-Dimethyl Aminobenzaldehyde في (75) ملليتر من كحول Isoamyalcohol و ٢٥ ملليتر من حامض HCl المركز. حفظ الكاشف لحين الاستعمال في قنينة معتمة في الثلاجة ، استعمل في اختبار إنتاج الاندول (Forbes *et al.*,٢٠٠٧).

٣-٢ -2-2-٤: كاشف احمر المثيل Reagent Methyl red

حُضر الكاشف بإذابة (0.1) غم من صبغة احمر المثيل في (300) ملليتر من (95%) كحول اثيلي وأكمل الحجم الى (500) ملليتر باستعمال الماء المقطر (Macfaddin, 2000).

٣-٢- 2-٢-٥: كاشف فوكس بروسكور Voges –Proskauer reagent

يتكون من :

A- كاشف الفانفثول (Alpha- nephthol) الذي حضر بإذابة (5) غم من المادة في (100) ملليتر من الكحول الاثيلي المطلق ليصبح التركيز(5%).

B- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH الذي حضر بإذابة (40) غم من المادة في (100) ملليتر من الماء المقطر ليصبح التركيز(40%) (Forbes *et al.*,٢٠٠٧).

٣-٢-٢-٢-٦: كاشف محلل الـ DNA

حُضر الكاشف بإضافة (8.4) ملليتر من حامض الهيدروكلوريك (HCL) الخزين ببطء الى (80) ملليتر الى الماء المقطر،ثم اكمل الحجم إلى (100) ملليتر من الماء المقطر للحصول على (1) مولار من (HCL). استخدم الكاشف للتحري عن البكتريا المنتجة للإنزيم المحلل لـ (DNA) (Macfaddin,2000) .

٣-٢- ٣:الأوساط الزرعية Culture media

٣-٢-٣-١:الأوساط الزرعية الجاهزة Ready Culture media

حُضرت الأوساط الزرعية الجاهزة في جدول (٣-٢) بحسب تعليمات الشركات المصنعة لها.

٣-٢-٣-٢: الاوساط الزرعية التركيبية Structural culture media

٣-٢-٣-٢-١: وسط اكار الدم Blood agar medium

أستعمل وسط اكار الدم المعقم والمحضر بحسب تعليمات الشركة المصنعة ، ثم بُرد الوسط لدرجة (٤٥-٥٠) مْ وأُضيف له (٥%) دم الإنسان صنف AB و من ثم صبه في إطباق بتري معقمة وحُفظ بالثلاجة لحين الاستعمال (Macfaddin,2000) .

٣-٢-٣-٢-٢: وسط اكار اليوريا Urea agar

استعمل وسط اكار اليوريا المعقم والمحضر بحسب تعليمات الشركة المصنعة ، بعدها أضيف (٥) ملليتر من محلول اليوريا ٢٠% بعد تبريد الوسط في الحمام المائي لدرجة (٥٠) م° ، ووزع الوسط على أنابيب وضعت بشكل مائل لتتصلب (Deep slop)، استعمل للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم اليوريز .

٣-٢-٣-٢-٣: وسط الجيلاتين Gelatine agar

أُذيب (٦) غم من الجيلاتين في (٥٠٠) ملليتر من المرق المغذي ووزع في أنابيب زجاجية بواقع (5) ملليتر لكل أنبوبة ثم عقم بالموصدة وحفظ في الثلاجة إلى حين الاستعمال استعمل الوسط للتحري عن العزلات القادرة على إسالة الجلاتين (Atlas *et al*., 1995).

٣-٢-٣-٢-٤ : وسط التحري عن إنتاج أنزيم البروتيز

Protease Modified solid casein medium

تم تحضير وسط الاكار المغذي وتعقيمه بالموصدة مدة (٢٠) دقيقة و بالوقت نفسه حضر (١٠%) من الحليب منزوع الدسم في (٩٠) ملليتر من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى (١٠٠) ملليتر، عقم بالموصدة لمدة (٥) دقائق ، ثم برد الى درجة حرارة (٥٠) مْ ، أضيف وهو في درجة حرارة (٥٠) مْ الى وسط الأكار المغذي المبرد الى درجة (٥٠) مْ . تم مجانسة الخليط برجه جيداً ثم صب في إطباق معقمة وترك ليتصلب . حضنت الإطباق بصورة مقلوبة في الحاضنة مدة (٢٤) ساعة وفي حرارة (٣٧) مْ للتأكد من عدم تلوث الإطباق(Senior , 1999).

٣-٢-٤ :جمع العينات

تضمنت الدراسة الحالية جمع ١٧٠ عينة من المرضى المصابين بخمج المسالك البولية او من يشك بأصابتهم بخمج المسالك البولية وبحسب تشخيص الطبيب المختص من مستشفى الولادة والاطفال ومستشفى الديوانية التعليمي خلال المدة من تشرين الثاني من سنة ٢٠١٣ ولغاية نيسان ٢٠١٤ ،شملت العينات المأخوذة عينات ادرار وعينات دم ،اذ حرص اثناء جمع العينات ان تهمل القطرات الاولى من الادرار وتؤخذ الكمية الوسطى منه وتحفظ في انابيب جمع خاصة معقمة ،وبعدها نقلت عينات الادرار الى المختبر لغرض زرعها وتشخيصها ، اذ زرعت في اطباق بتري حاوية على وسط الماكونكي وكذلك على وسط اكار الدم الصلب بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة٣٧ م ولمدة ١٨- ٢٤ساعة لغرض تشخيص البكتريا النامية على الاوساط ، وقد تم سحب ١٧٠ عينة دم من المرضى ذاتهم المصابين بخمج المسالك البولية بواقع ٥مل من كل مريض وايضا تم سحب ١٠عينات دم اخرى من اشخاص اصحاء

لاستخدامها كسيطرة اثناء مقارنة المؤشرات الألتهابية وهي IL-6 و TNF-α اذ وضعت عينات الدم في انابيب اختبار معقمة وبعدها تم وضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة٣٠٠٠دورة/دقيقة لمدة ١٥دقيقة ،لفصل المصل عن باقي مكونات الدم واستعماله في تقنية ELISA.

٣-٢-٥ : تشخيص البكتريا المعزولة Identification of isolated bacteria

شخصت العزلات النامية على وسطي اكار الدم والماكونكي اعتماداً على الاسس التالية :

A- الخصائص المزرعية

شُخصت مستعمرات بكتريا *P.mirabilis* مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية لها من حيث شكل وحجم ولون المستعمرات. إذ تم التركيز على المستعمرات التي تميزت بظاهرة الانثيال لبكتريا *P.mirabilis* على وسط اكار الدم. كذلك ظهرت بمستعمرات شاحبة غير مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط اكار الماكونكي.أذ تم دراسة اشكال المستعمرات النامية وخصائصها المزرعية والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية (Macfaddin,2000).كما شخصت على وسط كروم اكار الخاص ببكتريا *P.mirablis*.

B- الخصائص المجهرية Microscopic characteristics

تمت دراسة الخصائص المجهرية للخلايا البكتيرية من خلال اجراء صبغة غرام ،حيث أخذت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط الاكار المغذي بوساطة عروة ناقل معقم (Loop full) ، ووضعت على شريحة زجاجية مع بضع قطرات ماء معقمة ثم فرشت الخلايا وتركت لتجف ، وثبتت بإمرارها على اللهب ثلاث مرات بصورة سريعة .صبغت بصبغة غرام ، وتمت ملاحظة شكل وتجمع الخلايا بفحصها تحت المجهر الضوئي باستعمال العدسة الزيتية (Forbes *et al*.,2007).

٣-٢-٦: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical test

٣-٢-٦-١: الكشف عن إنزيم الاوكسديز Oxidase test

رطبت ورقة ترشيح بقطرات من كاشف الاوكسيديز المحضر على وفق الفقرة (٣-٢ -2-2-1) ثم نقل جزء من المستعمرات بوساطة عيدان خشبية إلى ورقة الترشيح ، يعد ظهور لون بنفسجي خلال ١٠-٣٠ ثانية نتيجة موجبة (Forbes *et al*., 2007).

٣-٢-٦-٢: الكشف عن انزيم الكاتاليز Catalase test

نقل جزء من مستعمرة منماة لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة على اكار المغذي بوساطة عيدان خشبية الى شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيفت قطرة من H_2O_2 (٣%) على المستعمرة ، يعد ظهور فقاعات هوائية نتيجة موجبة للاختبار (Forbes *et al*., 2002).

٣-٢-٦-٣: الكشف عن حلقة الاندول Indole test

اجري تلقيح وسط ماء الببتون بالبكتريا المراد اختبارها وبعد مدة حضانة ٢٤ ساعة، أضيف (٠,٥) ملليتر من كاشف كوفاكس (Kovac's reagent) إلى الوسط ، ان تكون اللون الأحمر في شكل حلقة دائرية بين الوسط والكاشف الكحوليّ التي ترتفع إلى الأعلى دلالة على إيجابية الاختبار (Macfadden, 2000).

٣-٢-٦-٤: اختبار المثيل الأحمر Methyl red test

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط الزرعيّMR-VP Medium بالمزروع البكتيري وحضنت عند حرارة (٣٧) مْ لمدة ٢٤-٤٨ ساعة بعد ذلك تتم اضافة (5) قطرات من كاشف احمر المثيل، ان ظهور اللون الأحمر في الأنبوبة بعد ١٥ دقيقة دلالة على تخمر الكلوكوز الكامل أي ان الفحص موجب (Collee *et al*., 1996).

٣-٢-٦-٥ :اختبار الفوكس بروسكور Voges proskaur test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة (٣٧) مْ لمدة ٢٤-٤٨ ساعة بعد ذلك تم إضافة (٠,٦) ملليتر من كاشف الفانفثول و (٠,٢) ملليتر من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم إلى كلّ انبوبة. ان ظهور اللون الورديّ خلال ٢-٥ دقائق دلالة على النتيجة الموجبة التي تشير إلى التحلل الجزئيّ للسكر وإنتاج مركب إستيل مثيل كاربونيل (Acetyl methyl-carbonyl) (Collee *et al*., 1996) .

٣-٢-٦-٦: اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

استعمل هذا الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا لاستهلاك السترات بوصفها مصدراً وحيداً للكاربون. لقح وسط Simmon citrate المائل بالعزلات البكتيرية وحضن لمدة (٢٤) ساعة بحرارة (٣٧) مْ. يعد تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق نتيجة موجبة (Macfaddin, 2000).

٣-٢-٦-٧:التحري عن السكريات الثلاثية (Triple – sugar iron agar)

استعمل هذا الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا على تخمير سكريات (كلوكوز – سكروز – لاكتوز). لقح الوسط المائل بالعزلات البكتيرية المنماة على وسط اكار المغذي، وحضن لمدة

(٢٤) ساعة بحرارة (٣٧) مْ . يعد تحول لون الوسط من الأحمر الى الأصفر في الجزء العميق نتيجة موجبة لتخمر سكر الكلوكوز فقط ، بينما تحول لون الوسط ككل الى الأصفر نتيجة موجبة لتخمر سكر اللاكتوز والسكروز ايضاً ، كذلك ان ظهور فقاعات غازية دلالة على انتاج غاز CO_2 وتكوين راسب اسود دلالة على انتاج كبريتيد الحديدوز(Macfaddin, 2000).

٣-٢-٦-٨ :اختبار تحلل انزيم الدنيز DNAase enzyme test

لقح وسط محلل الدنا بنقل خلايا فتية بعمر١٨-٤٨ ساعة ،على شكل بقع ، حضنت الأطباق في درجة حرارة (٣٥) مْ لمدة ٢٤ ساعة وبعد الحضن غطى الطبق بكاشف محلل الـ (DNA) المحضرعلى وفق الفقرة (٣-٢-٢-٣-٥) .أن تكون منطقة شفافة حول منطقة التلقيح بعد غمر الطبق دليل على ايجابية الاختبار (Collee *et al*., 1996) .

٣-٢-٦-٩ الكشف عن انزيم الجلاتينيز Gelatin liquification test

كشف هذا الاختبار عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم الجيلاتينيز(Gelatinase) الذي يعمل على إسالة الجيلاتين اذ لقحت انابيب الوسط بطريقة الطعن وحضنت بحرارة (٣٧) مْ لمدة ٢٤ ساعة. تم التحري عن إسالة الجيلاتين بعد وضع الوسط في الثلاجة (٤) مْ مدة نصف ساعة ، إنّ حدوث التميع يشير الى فعالية الانزيم (Collee *et al*., 1996) .

٣-٢-٦-١٠ :الكشف عن أنزيم اليوريز Urease test

لقح وسط اليوريا بطريقة الطعن والتخطيط . حضنت الانابيب بدرجة (٣٧) مْ ولمدة من ٤٨ -٢٤ ساعة. ان النتيجة الموجبة لهذا الفحص هو تغير لون الوسط من اللون الاصفر إلى الوردي دلالة على تحلل اليوريز من قبل البكتريا (Benson ,2002) .

٣ -٢-٦-١١: الكشف عن انزيم البروتيز Protease test

لقح وسط اكار الحليب المحضرعلى وفق الفقرة (٣-٢-٣-٢-٤) بنقل مستعمرة فتية بعمر١٨-٤٢ ساعة بلقاح على شكل بقع على وسط الحليب ، حضنت الإطباق في درجة حرارة (٣٥) مْ لمدة ٢٤ -٤٨ ساعة أن تكون منطقة شفافة حول منطقة التلقيح دليل على إيجابية الاختبار (Collee *et al*., 1996).

٣-٢-٦-١٢:الكشف عن انتاج الهيمولايسين Heamolysin test

لقح وسط الدم الصلب ببكتريا المراد فحصها (١٨-٢٤) ساعة ، ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة . إن ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات دلالة على قدرة البكتريا على تحليل الدم (Collee *et al*., 1996) .

٣-٢-٦-١٣: حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها

حفظت عزلات الـ *P.mirabilis* بنقل مستعمرة واحدة بعد أن تم التأكد من نقاوتها الى مائل الاكار المغذي، وتم حضنها بحرارة ٣٧ مْ لمدة ١٨ساعة ، ثم حفظت العزلات في الثلاجة بحرارة (٤) مْ . تمت ادامة العزلات بتكرار نقلها الى مائل الاكار المغذي شهرياً، وقد نشطت اثناء الادامة بتنميتها في وسط نقيع الدماغ والقلب (Forbes *et al.*, 2007). ولغرض حفظ العزلات مدة أطول من دون تعرضها لفقدان بعض صفاتها الوراثية حضر الوسط المغذي السائل وعقم بالموصدة ، ثم برد ، بعدها تم تلقيح الوسط بملء عروة الناقل (Loop ful) من خلايا المزروع البكتيري على الوسط الصلب ، ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ١٨-٢٤ ساعة بعدها أضيف اليه الكليسيرول بتركيز نهائي (١٥ %) وحفظت بحرارة (-٢٠) مْ. يمكن بهذه الطريقة الاحتفاظ بالعزلات لمدة سنة او أكثر(Forbes *et al.*, 2007).

٣-٢-٧:التحري عن مقاومة *P.mirablis* للمضادات الحيوية

أجري فحص الحساسية باستعمال طريقة انتشار القرص إذ نُقل 2-4 مستعمرات من بكتريا *P.mirabilis* إلى أنبوب اختبار يحوي 5 ملليتر من مرق نقيع القلب والدماغ وحضنت بحرارة (37) مْ لمدة 18 ساعة، وبعد تخفيفه بالمحلول الملحي الفسيولوجي للوصول إلى درجة عكوره مماثلة إلى عكورة أنبوبة ماكفرلاند القياسيه 0.5 . غمست المسحة القطنية بالوسط الزرعي المخفف ، وتم نشر البكتريا على وسط مولر هنتون الصلب بعدة اتجاهات وبشكل جيد على كل الطبق، ثم تُرك الطبق مدة ٥ دقائق، ثم وضعت بعد ذلك أقراص المضادات الحيوية على الطبق باستعمال ملقط معقم. حضنت الأطباق في درجة (35) مْ ولمدة 18 ساعة. قرئت النتائج بقياس أقطار التثبيط بأخذ قطرين متعامدين. وقورنت النتائج مع ما ورد من قياسات عالمية حسب ما جاء في (CLSI ,2010).

٣-٢-٨:استخلاص الحامض النووي البكتيري DNA Extraction Genomic

تم استخلاص الحامض النووي (DNA) للعزلات البكتيرية قيد الدراسة بحسب تعليمات الشركة المجهزة **المرفقة مع عدة الاستخلاص وكالاتي:**

١- نُقل (١.5) ملليتر من العالق البكتيري النامي على وسط مرق نقيع الدماغ والقلب الى انابيب ابندروف حجم (1.5) مللتير معقمة ثم رُسّبت الخلايا عن طريق نبذ العالق البكتيري بجهاز النبذ المركزي (Centerifuge) لمدة (٥) دقيقة وبسرعة (١٦٠٠٠) دورة / دقيقة.لترسيب الخلايا البكتيرية في قعر الأنبوب و التخلص من السائل الطافي.

٢- أُضيف (٢٠٠) مايكروليتر من محلـــــــول (GB Buffer) المجهز من العدة إلى الأنابيب الـحاوية على راسب الخلايا ثم مُـزج الخليط بالمازج الدوار(Vortex) بعدها حُضنت الأنابيب بدرجة حرارة (٦٠) مْ في الحمام المائي water bath مدة (١٠) دقائق.

٣- أُضيف (200) مايكروليتر من الكحول الاثيلي الى المزيج وُمزج الخليط بالمازج الدوار (Vortex) لمدة (١٠) ثوانٍ.

٤- نقل الخليط من أنبوبة الابندروف الى انابيب جمع (Collection tubes) سعة (2) ملليتر الحاوية على أعمدة تحوي مرشحات لتنقية الحمض النووي (GD filter colum) والمجهزة مع العدة.

٥- نُبذ المزيج بسرعة (١٦٠٠٠) دورة /الدقيقة لمدة (٢) دقيقة ، ثم أُهمل المحلول الراسب مع أنابيب الجمع ونقلت أنابيب (GD Column) الحاوية الحمض النووي الى أنابيب جمع جديدة (collection tubes) و معقمة.

٦- أُضيف (٤٠٠) مايكروليتر من (W1 Buffer) المجهز مع العدة الى انابيب (GD Column) الحاوية على الحامض النووي لغسل الحمض النووي ، و نُبذ المزيج بسرعة (١٦٠٠٠) دورة /الدقيقة لمدة (٣٠) ثانية ، ثم أُهملت انابيب الجمع مع الراسب مرة أخرى ثم نقلت أنابيب (GD Column) الحاوية على الحامض النووي الى انابيب جمع جديدة و معقمة.

٧- أُضيف (٦٠٠) مايكروليتر من محلول (Wash Buffer) المضاف له (Ethanol) إلى أنابيب (GD Column) الحاوية على الحامض النووي للتخلص من الدهون. نُبذ المزيج بسرعة (١٦٠٠٠) دورة /الدقيقة لمدة (٣٠) ثانية ثم أهُملت انابيب الجمع مع الراسب مرة أخرى ، ثم وضعت أنابيب (GD Column) في أنابيب جمع جديدة وأعيدت إلى النبذ المركزي بسرعة (١٦٠٠٠) دورة /الدقيقة لمدة (٣) دقائق لكي تجف ، ثم أهُملت أنابيب الجمع ونُقلت أنابيب (GD Column) إلى أنابيب ابندروف الجديدة.

٨- أضيف محلول (Preheated elution buffer) بمقدار (٥٠) مايكروليتر الى أنابيب (GD column) و تركت مدة (٣-٥) دقيقة لاذابة الـ DNA ثم نبذت مركزيا بسرعة (١٦٠٠٠) دورة /الدقيقة لمدة ٣٠ ثانية لكي يحصل على الـ DNA وحفظ في درجة حرارة (-٢٠)م° لحين اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة.

٣-٢-٩:تحضير هلام الأكاروز

حُضر بحسب طريقة Sambrook وجماعته (١٩٨٩) وكالآتي:

١- أُذيبَ (1.5)غم من هلام الأگاروز في (100) مل من محلول TBE buffer الدارئ بتركيز (1X) وبإستخدام الصفيحة الحرارية لمدة 15 دقيقة.

٢- تُركَ الهلام ليبرد بدرجة حرارة (٥٠) مْ وبعدها أُضيفَ ٣ مايكروليتر من صبغة الحامض النووي المُشعَّة Ethidium bromide ومُزجت جيداً مع الهلام.

٣- صُبَّ هلام الأگاروز في قالب الترحيل (Tray) الحاوي على المشط (Comb) وبعدها تُرك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة. تم إزالة المشط من الهلام بعناية للحفاظ على الحفر (wells) في الهلام اللازمة لحقن العينات المضخمة.

٣-٢-١٠: التحري عن حزم ألحامض النووي المستخلص (Extracted DNA)

مزج (١٠) مايكروليتر من عينة الدنا مع (١) مايكروليتر من صبغة التحميل Loading dye (لكل عينة) وبعدها نُقِل هذا المزيج الى الحفر (wells). نُقل القالب إلى حوض جهاز الترحيل الكهربائي (Tank) الحاوي على دارئ (TBE 1X) بحيث غمر سطح الهلام بالدارئ كلياً ، ورُحّلت عينات الدنا بإمرارها على فرق جهد قدره (١٠٠) فولت وتيار (80) أمبير لمدة ساعة واحدة، تم فحص مواقع حزم DNA المستخلص باستعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي (320) نانومتر ، وقد صُوّر الهلام لغرض توثيق النتائج (التاكد من وجود الدنا) (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

٣-٢-١1:قياس الـ DNA المستخلص بوساطة جهاز النانودروب

لغرض التأكد من نقاوة DNA وتركيزه تم اختبار عينات الدنا المستخلص بوساطة جهاز النانودروب وذلك بأضافة (١) مايكروليتر من الـ DNA المستخلص بعد تصفير الجهاز بأضافة (٢) مايكروليتر من PCR Water لمعرفة تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص .

٣-٢-١٢: تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد PCR master mix Single

حضرمزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد بأستعمال عدة AccuPower® PCR PreMix وبحسب تعليمات الشركة المجهزة و كألاتي :

1- حضر مزيج تفاعل إنزيم البلمرة في انابيب (**PCR**) المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل إنزيم البلمرة مع إضافة المكونات الأخرى لمزيج التفاعل كما في جدول (٣-١١) .

الجدول (3-11): مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة البلمرة المفرد Single PCR

ت	المكونات		الحجم بالمايكروليتر
١	مستخلص الدنا المستعمل كقالب DNA template		٥
٢	البادئ Primer	البادئ الأماميForward primer	1.5
٣		البادئ العكسيReversed primer	1.5
٤	الماء الخالي من الإنزيم المحلل للدناNuclease free water		12

٢- بعد إكمال تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة تم غلق الأنابيب مع المزج بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 5 ثوانٍ .

3- نقلت الأنابيب الى جهاز المضخم الحراري Thermocycler لتفاعل إنزيم البلمرة لاجراء عملية تضخيم للـ DNA . (DNA Amplication) على وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية Thermo cycling conditions والمتمثلة بعمليات فصل شريط الـ DNA **(**Denaturation**)** وارتباط البادئات مع الشريط المنفصل (Annealing) وتطويل سلسلة الـ DNA (Extension) .

٣-٢-١٣:تحضيرمزيج تفاعل انزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR master mix

حضر مزيج تفاعل إنزيم البلمرة في انابيب **(PCR)** المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل إنزيم البلمرة مع إضافة المكونات الأخرى لمزيج التفاعل كما في جدول(٣-١٢)

الجدول (3-١٢) : مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعددMultiplex PCR

ت	المكونات		الحجم بالمايكروليتر
١	مستخلص الدنا المستعمل كقالب DNA template		٥
٢	البادئ Primer	البادئ الأماميForward primer	1.5
٣		البادئ العكسيReversed primer	1.5
4		البادئ الأماميForward primer	1.5
5		البادئ العكسيReversed primer	1.5
6	الماء الخالي من الإنزيم المحلل للدناNuclease free water		9

٣-٢-١٤:برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA

أجري تفاعل إنزيم البلمرة بأستعمال المضخّم الحراري لجهاز الـ Thermocycler (PCR). وتم برمجة الجهاز للجينات قيد الدراسة حسب التفاعل , وكما مبين في جدول (13-3)

جدول (٣-١٣) برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single

Cycle NO.	Temperature / Time					Gene
	Final Extention	Cycling Condiation			Initial denaturation	
		extention	Annealing	denaturation		
٣٠	72/5min	72/60Sec	59/30Sec	٩٥/٣٠Sec	٩٥/ ٢min	*zapA*

جدول (٣-١٤) برنامج الدورات الحرارية لتفاعل انزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR

Cycle No.	Temperature/ Time					Gene
	Final Extension	Cycling condition			Initial Denaturation	
		Extension	Annealing	Denaturatin		
30	72/5 min	72/20 sec	56.2/30 sec	95/30 sec	95/2 min	*hpmA ureC*
30	72/5 min	72/30 sec	54.2/30 sec	95/30 sec	95/3 min	*flaA urea*

٣-٢-١٥: التحري عن وجود حزم ألـ DNA المضخّم

١- إستعملَ الدليل الحجمي DNA ladder بحجم (١٠٠ – ١٥٠٠) زوج قاعدي في الحُفرة الأولى لقياس ناتج أو حجم ألـ DNA المُضخَّم؛ وذلك بمقارنة حجم الجين المُضخم مع الحجوم الدليل الحجمي .

٢- وُضِعَ ١٠ مايكرولتر من ألـ DNA المُضخَّم (ناتج ألـ PCR في الحُفر) بعد إكتمال عملية التحميل.

٣- غمر سطح الهلام بالدارئ TBE Buffer بتركيز (1X) كلياً ، ورُحّلت عينات الدنا بإمرارها على فرق جهد قدره (١٠٠) فولت وتيار (80) أمبير لمدة ساعة (1) ، وبعد الإنتهاء من عملية الترحيل فُحِصَ الهلام الحاوي على ناتج ألـ PCR باستعمال مصدر الأشعة فوق البنفسجية لتحديد الحزم وقياس أوزانها الجزيئيَّة عند مقارنتها بالقيم القياسية للدليل الحجمي .

٣-٢-١٦:(الدراسة المناعية) قياس مستوى الحركيات الخلوية (IL-6 و TNF-α) في مصول مرضى خمج المسالك البولية

تم قياس تراكيز IL-6 و TNF-α في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية بأستخدام **Ray Biotech ELISA Kit** على وفق البروتوكول المذكور في العدد المجهزة من قبل الشركة .

٣-٢-١٤-١:تحضير الكواشف

١- **Dilluent A** :يتم تخفيفة وذلك باضافة ٥ أضعاف حجمة من الماء المقطر distal water

٢-**محلول الغسل Wash dilution:**تم تحضير المحلول بواسطة تخفيف المحلول المادة المرفقة بالعدة الى ١٠ اضعاف حجمة باستعمال الماء المقطر Distsal water.

٣-**محلول Conjugate**:تم تحضير المحلول بواسطة تخفيف المادة المرفقة بالعدة الى ٥ اضعاف حجمة ايضا باستعمال distal water.

٣-٢-١٤-٢:طريقة العمل

تم استعمال عدد الفحص لتحديد تراكيز IL-6 و TNF-α بوساطة تقنية الـ ELISA، ولكن قبل البدء بالعمل نقوم بترك عينات المصل بدرجة حرارة الغرفة بعد استخراجها من التجميد حتى تصل الى درجة حرارة الغرفة ،ثم نبدأ بالخطوات التالية .

١- حضرت الحفر الخاصة بالعدد IL-6 و TNFα بقدر عدد العينات .

٢- تمت اضافة ١٠٠ مايكروليتر من كلا من المحلول القياسي Standard Diluent والعينات في الحفر المجهزة في العدة وبعدها يتم تغطية الحفر بواسطة غطاء الحفر Cover plate ثم حضنت الحفر في درجة حرارة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ونصف.

٣- بعد الانتهاء من مدة الحضانة تم وضع الحفر في جهاز الغسل وتم غسلها ٤ مرات باستعمال محلول الغسل Wash solution .

٤- تم اضافة ٥٠ مايكروليتر من محلول Conjugate الـى كـل حفـرة وبحسـب تعلميـات الشـركة المجهزة.وبعـدها تـم حضـن الحفـر بدرجـة حـرارة الغرفـة لمـدة ساعتين.

٥- وبعد الانتهاء من مدة الحضانة تم وضع الحفر في جهاز الغسل وتم غسلها ٤ مرات بأسخدام محلول الغسل Wash solution المجهز بالعدة.

٦- تمـت اضـافة ١٠٠مـايكروليتر مـن Streptavidin الـى الحفر،وبعـدها تـم تغطيـة الحفر ثم جضنها بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة.

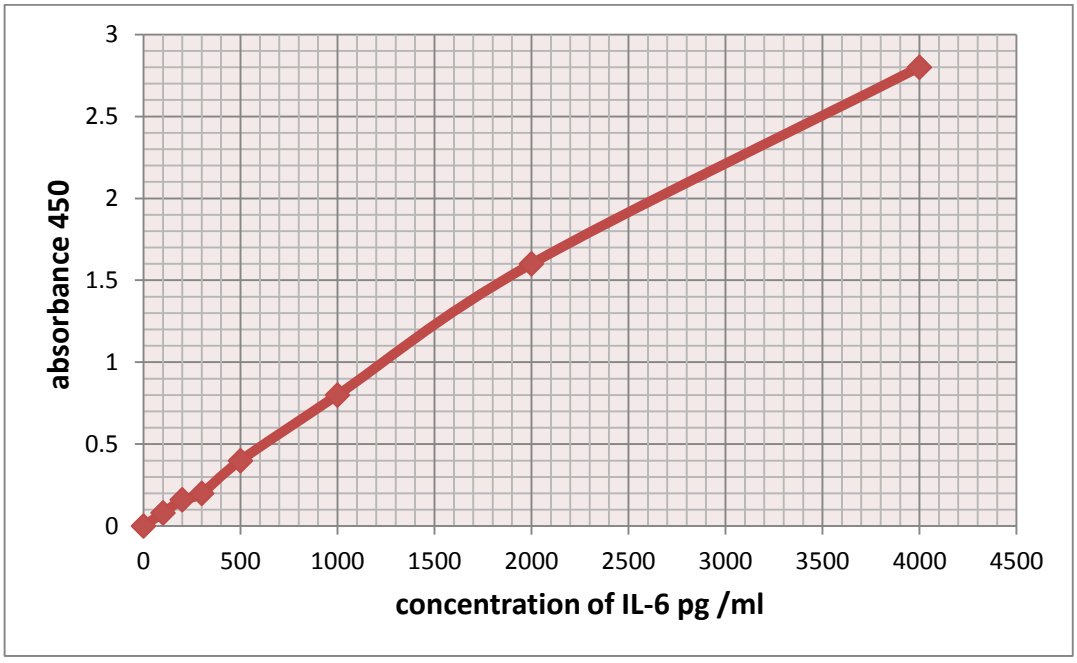
٧- تمت اعادة عملية الغسل بواسطة جهاز الغسل ٤ مرات.

٨- اضـافة ١٠٠مـايكروليترمن المحلول الملون Substrate الـى الحفر المجهزة وتـم حضنها بعيدا عن الضوء بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة.

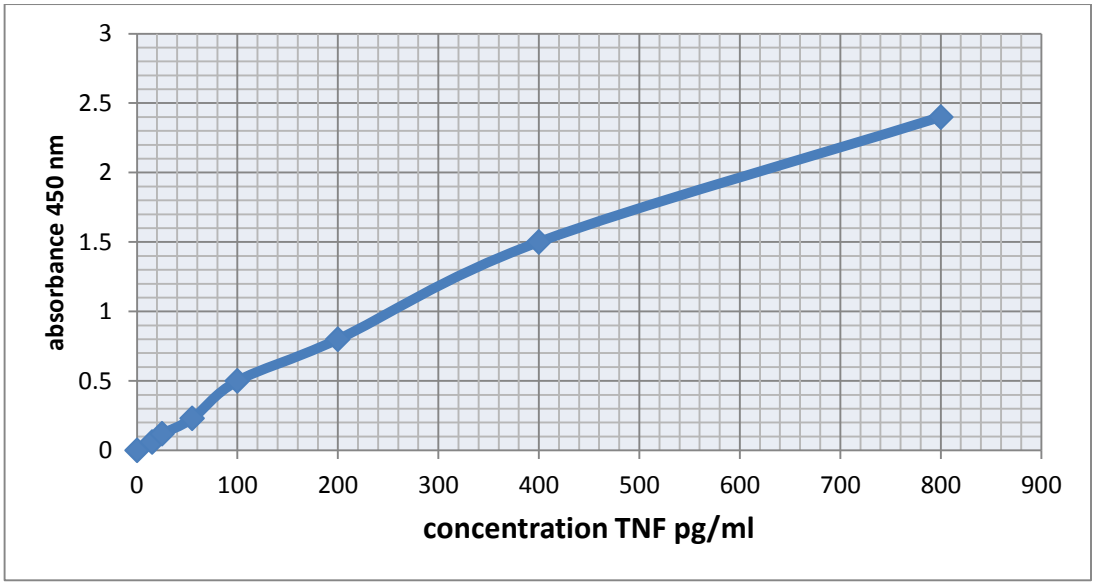
٩- تمت اضافة ٥٠مايكروليتر من محلول التوقف Stop solution الى كل الحفر

١٠- وضعت الحفر في جهاز الـReader تحت طول موجي ٤٥٠.

١١- تـم اسـتخراج النتـائج باسـتخدام برنـامج (soft ware) Curve Export Profissional.



شكل (٣-١) المنحني القياسي للـIL-6



شكل (٣-٢) المنحني القياسي لـ TNF-α

٤-النتائج Results

٤-١:عزل بكتريا الـ *P.mirablis* وتشخيصها

اثبتت الدراسة الحالية عائدية ٤٩ عزلة الى جنس الـ *P.mirablis* ،من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيميوحيوية وكما يلي:

٤-١-١:الصفات الزرعية Cultural characteristic

ظهرت المستعرات النامية على وسط اكار الماكونكي MacConkey Agar بشكل مستعمرات مفردة شاحبة اللون ، تكون متوسطة الحجم وذات حافات ملساء وغير مخمرة لسكر اللاكتوزفضلا عن رائحة النمو البكتيري التي تكون متشابهة لرائحة نموالسمك المتعفن، وظهرت الحركة التموجية او الأنثيال (Swarrming) على وسط اكار الدم Blood Agar والتي تعد صفة تشخيصية اولية لهذة البكتريا كما في الشكل (٤-١).وبعد ذلك شخصت هذة البكتريا على وسط الكروم اكار Chrom Agar وظهرت مستعمرات بلون بني Brown كما في الشكل (٤-٢). يعد وسط الكروم اكار وسطا تشخيصيا للبكتريا اذ يعطي لكل بكتريا لون معين بها

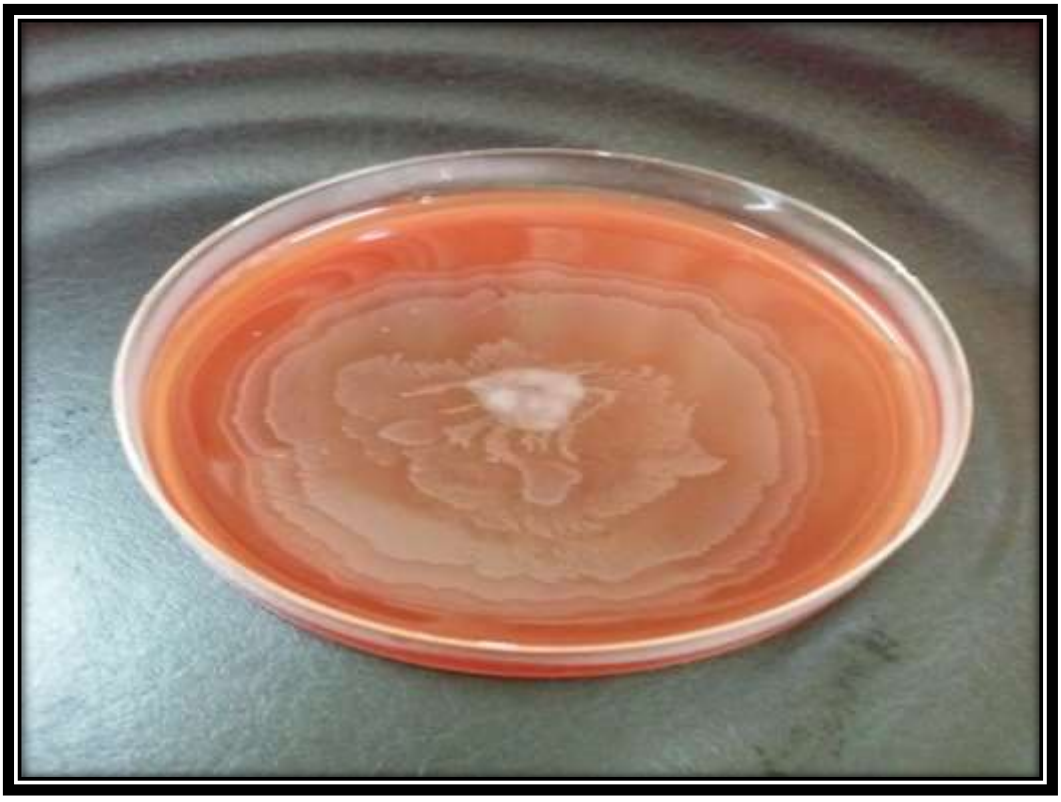
٤-١-٢:الصفات المجهرية Microscopic characteristic

أظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا البكتريا المعزولة بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام ،غير مكونة للسبورات .

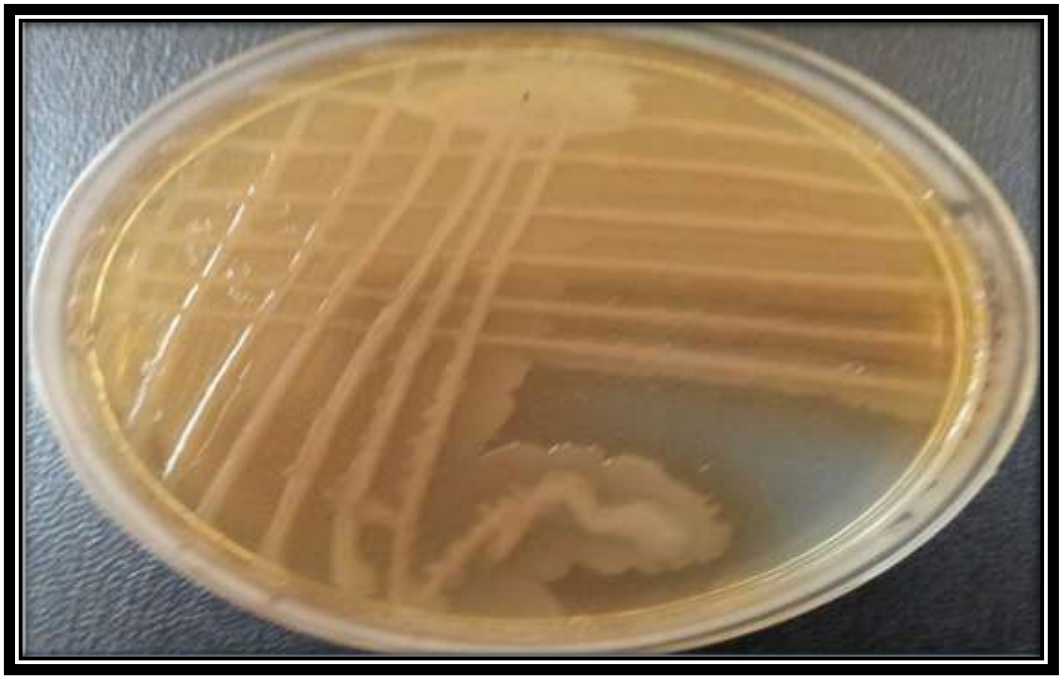
٤-١-٣:الفحوصات الكيميوحيوية Biochmical Test

شُخصت العزلات النامية على وسط كروم اكار بالأعتماد على الفحوصات الكيميوحيوية حيث اظهرالجدول (٤-١) استجابة جميع العزلات لكل من اختبار الكاتليز ،اختبار احمر المثيل ،اختبار الجيلاتينيز،واختبار استهلاك السترات بوصفه المصدر الوحيد للكاربون اذ لوحظ تغير لون الوسط من الازرق الى الأخضر نتيجة لتغير لون البروموثايمول الى الازرق لزيادة الاس الهيدروجيني. فيما خُمرت بكتريا *P.mirablis* كل من سكر السكروز والكلوكوز وتكوين راسب اسود على الوسط دلالة على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S .

تباينت استجابة العزلات لاختبار تحلل DNAase أذا ظهرت ٣٢ عزلة نتيجة موجبة حيث تكونت هالة شفافة حول المستعمرة البكتيرية بعد اضافة كاشف محلل DNAase(HCL) بينما اعطيت العزلات كلها نتيجة سالبة لكل من فحص الاوكسديز وفحص فوكس – بروسكاور.



شكل (٤-١) يوضح ظاهرة الانثيال (Swarming) على وسط اكار الدم Blood Agar



شكل (٤-٢) بكتريا *P.mirablis* على وسط كروم اكارChrom Ager باللون البني

كما اظهرت العزلات قيد الدراسة عدم تكونها حلقة الاندول اذ تؤدي النتيجة الموجبة الى تكوين حلقة حمراء في طبقة الكحول الايزوميلي Isoamyl alcohol نتيجة تحلل الحامض الاميني (التربتوفان) وتكوين الاندول.

جدول (٤-١) يوضح الاختبارات الكيميوحيوية التشخيصية لبكتريا *P.mirablis*

نوع الاختبار	النتيجة
الكاتليز	+
الاوكسديز	-
فوكس-بروسكاور	-
الجيلاتينيز	+
الاندول	-
احمر المثيل	+
تحلل الدنييز	+
استهلاك السترات	+

اليوريز	+
انتاج H2S	+
النمو على وسط TSI	Acid /Alkaline

+Positive - Negtive

٤-٢:الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *P.mirablis*

شخصت ٤٩ عزلة (بنسبة عزل ٢٨,٨٢% من مجموع العينات) التي جمعت من المرضى المصابين بخمج المسالك البولية . كما بينت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة اصابة الأناث بخمج المسالك البولية كانت اعلى مما في الذكور كما في جدول (٤-٢) أذ كانت نسبة العزل في الاناث ٣٣(٦٧,١٩%) اما في الذكور كانت النسبة ١٦ (٣٢,٦٥%).

جدول (٤-٢) الاعداد والنسب المئوية للذكور والاناث المصابين بخمج المسالك البولية

الجنس	المصابين	
	%	NO.
الاناث	٦٧,٣٤	٣٣
الذكور	٣٢,٦٥	١٦
الكلي	١٠٠	٤٩

٤-٣:الكشف عن عوامل الضراوة مظهريا

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *P.mirablis* ومن العوامل التي تم الكشف عنها هي البروتيز،اذ تم الكشف عنه بأستعمال وسط الحليب مقشوط الدسم وكانت النتيجة موجبة لـ ٤٠ عزلة من اصل ٤٩ عزلة ،كما بينت النتائج في الكشف عن الهيمولايسين وكانت النتيجة موجبة لـ ٤٤ عزلة .اما بالنسبة لأنزيم اليوريز فكانت النتيجة موجبة للعزلات جميعها.

٤-٤: اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية

Antibiotic Sensitivity Test

تم اختبار فحص الحساسية الدوائية لـ ٤٩ عزلة من بكتريا *P.mirablis* قيد الدراسة باستعمال ١٢ نوع من المضادات الحيوية القياسية .اظهرت النتائج وكما هو موضح في جدول (٤-٣) أن هناك تباينا في مقاومة العزلات تجاه المضادات الحيوية المستعملة .اذ اظهرت مقاومة عالية تجاه كل من مضاد Amoxicillin/ Cluvanic acid ، Rifampine ومضاد Erythromicin أذ بلغت نسبة المقاومة (١٠٠%) .

كما بينت نتائج الدراسة الحالية ان المضادات التالية Chloramphenicol ، Gentamicin، Nitroforation ، Cephalothin ، Nalidic acid ومضاد Cefotaxim ابدت مقاومة بنسبة (٦١,٢٢%).

بلغت نسبة المقاومة لمضادي Cephaloxin وCiprofloxacin (٤٢,٨٥%) و(٣٢,٦٥%) على التوالي.في حين اظهرت العزلات قيد الدراسة عالية الحساسية لمضاد Impenem والتي بلغت (١٠٠%).

وكما يتضح من نتائج الدراسة الحالية ان هناك ٣٠ عزلة من عزلات بكتريا *P.mirablis* ابدت مقاومة عالية لعدد من المضادات الحيوية اي امتلكت صفة المقاومة المتعددة ولذلك اختيرت هذه العزلات لغرض تنفيذ تقنية الـ PCR في الكشف عن عوامل الضراوة في هذه البكتريا.

جدول (٤-٣) يوضح نسب مقاومة ٤٩ عزلة لبكتريا *P.mirablis* للمضادات الحيوية

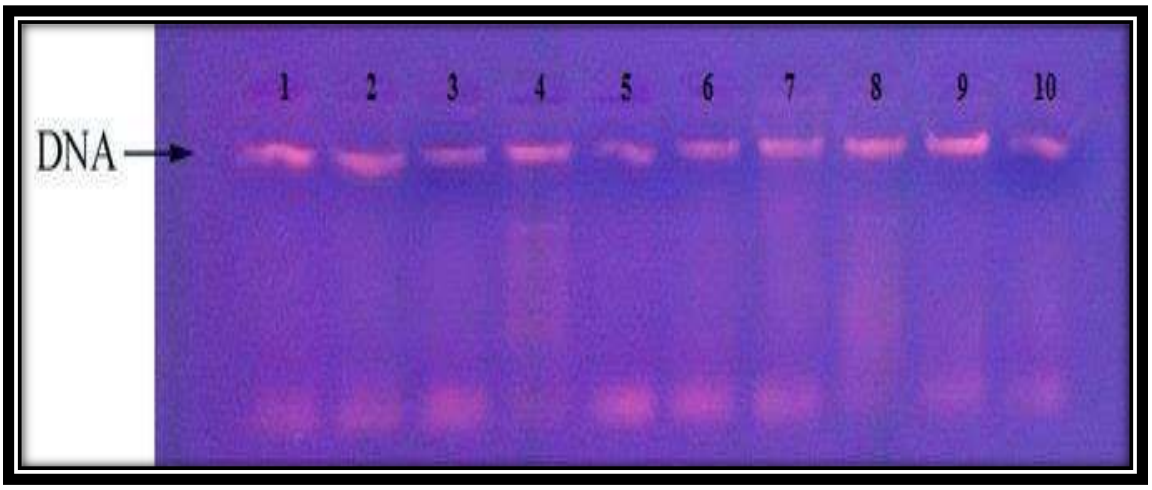
R %	I %	S %	Symbol	انواع المضادات الحيوية
(%61.22)30	(%٠)٠	(%٣٨,٧٧)١٩	**F**	**Nitrofuration**
(%100)49	(%0)0	(%0)0	**E**	**Erythromycin**
(%61.22)30	(%١٤,٢٨) ٧	(%24.48)12	**C**	**Chloramphenicol**
(%٤٢,٨٥) ٢١	١٠ (%٢٠,٤٠)	(%٣٦,٧٣) ١٨	**CL**	**Cephalexin**

(%١٠٠) ٤٩	(%٠)٠	(%٠) ٠	**RA**	**Rifampin**
(%61.22)30	(%20.40)10	(%18.36)9	**KF**	**Cephalothin**
(%٦١,٢٢) ٣٠	(%٠)٠	(%٣٨,٧٧) ١٩	**NA**	**Nalidic acid**
(%٦١,٢٢) ٣٠	(% ٢,٠٤)١	(%٣٦,٧٣) ١٨	**CN**	**Gentamicin**
(%١٠٠) ٤٩	(%٠)٠	(%٠)٠	**AMC**	**Amoxicillin/cluvanic acid**
(%٦١,٢٢) ٣٠	(% ١٢,٢٤) ٦	(%٢٦,٥٣) ١٣	**CTX**	**Cefotaxim**
(%٣٢,٦٥)16	(%١٤,٢٨) ٧	(%٥٣,٠٦) ٢٦	**CIP**	**Ciprofloxacin**
(%٠)٠	(%٠)٠	(%١٠٠) ٤٩	**IMP**	**Impenem**

٤-٥: تقنية تفاعل انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction(PCR)

٤-٥-١:استخلاص الـ DNA

أظهرت نتائج استخلاص الـ DNA لعزلات بكتريا *P.mirablis* بأستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائيا في هلام الاكاروز (١,٥%) والكشف عنه بأستعمال صبغة الايثيديوم بروماید وفحصة تحت الاشعة فوق البنفسجية Ultra violate (UV) احتواء العزلات كلها على حزمة واحدة ومفردة للـ DNA المستخلص ،وكما مبين في الشكل (٤-٣).



شكل (٤-٣) :نواتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(١,٥%) وفولتية ١٠٠ ولمدة ساعة لعزلات *P.mirablis* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit

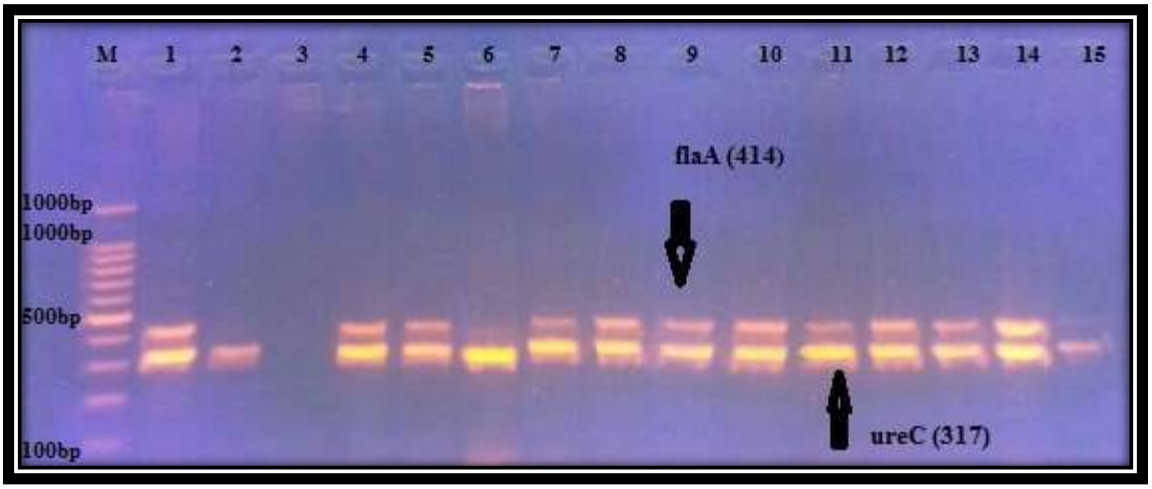
٤-٥-٢:تقنية تفاعل البلمرة المفرد والمتعدد Muitiplex and single PCR

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة لـ ٣٠ عزلة من عزلات *P.mirablis* باستعمال تقنية تفاعل انزيم البلمرة المفرد والمتعدد Multiplex and single PCR ،بعد ان تم التحري عن هذه العوامل مظهريا اذ تم التحري عن كل من الجين المسؤول عن انتاج الهيمولايسن *hpmA* ،انزيمي اليوريز *ureC*، *ureA* والجين المسؤول عن الاسواط *flaA* باستعمال تقنية الـ Multiplex PCR اما الجين المسؤول عن انتاج انزيم البروتيز والتي هو *zapA* تم التحري عنه باستعمال تقنية الـ Single PCR . اذ اظهرت ٣٠ عزلة لبكتريا *P.mirablis* بنسبة (١٠٠%)امتلاكها لكل من الجينات *ureA*، *hpmA* و *zapA* .كما اظهرت ٢٩ عزلة بنسبة

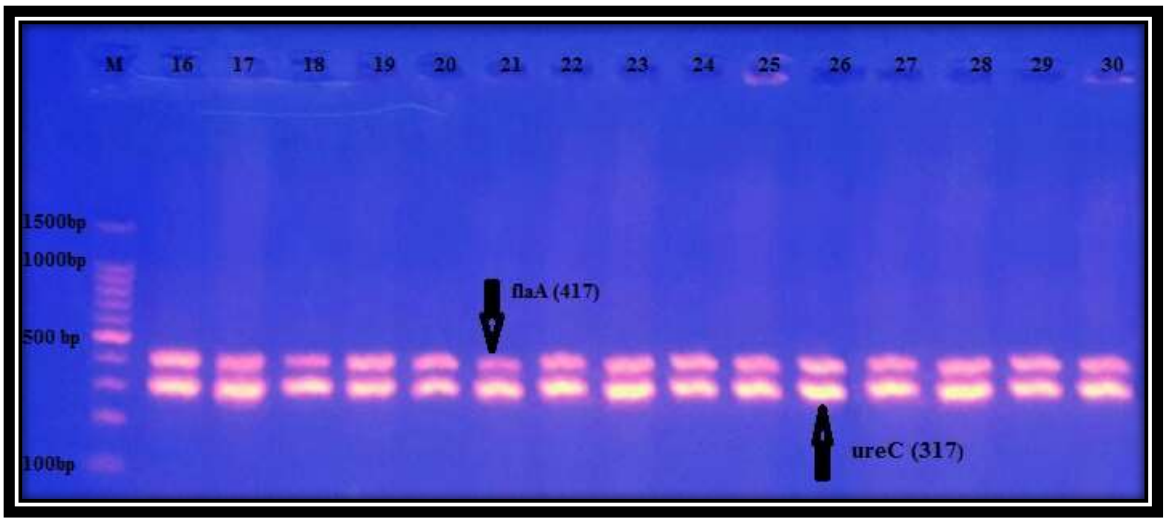
(٩٦,٦٦%) لجين *ureC* و٢٦ عزلة بنسبة (٨٦,٦٦%) لجين *flaA*. وكما موضح في الجدول(٤-٤).

جدول(٤-٤) الاعداد والنسب المئوية لجينات عوامل الضراوة لـ ٣٠عزلة من بكتيريا *P.mirablis* باستعمال تقنية الـ Single and Multiplex

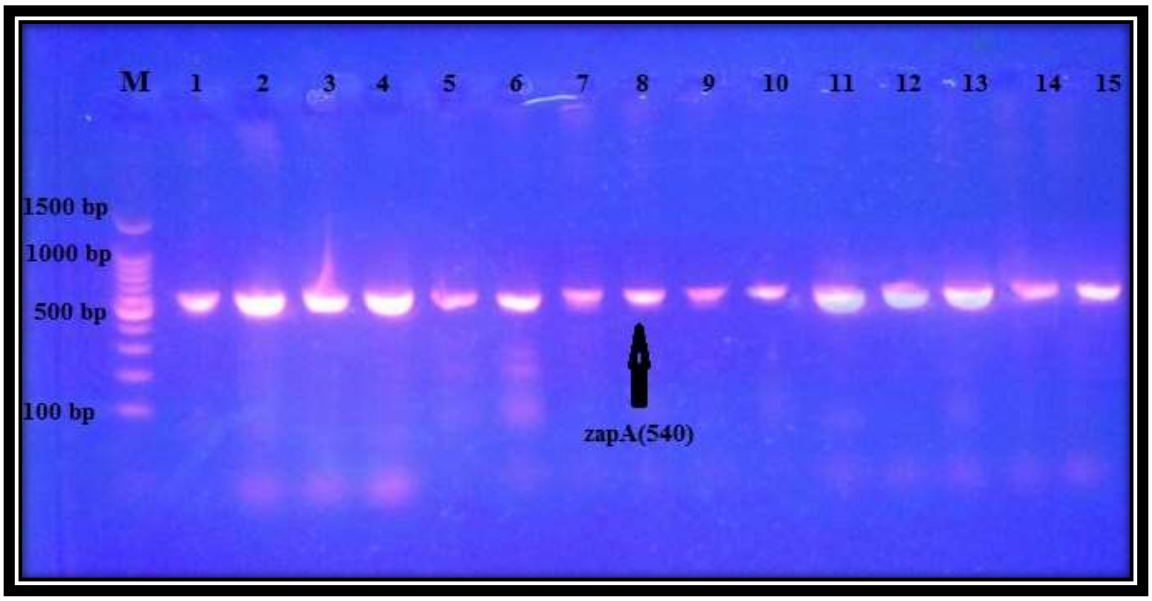
الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة	عدد عزلات بكتيريا الـ *P.mirablis*	النسبة المئوية %
ureC	**29**	**%٩٦,٦٦**
flaA	**26**	**%٨٦,٦٦**
zapA	**30**	**%١٠٠**
hpmA	**30**	**%١٠٠**
ureA	**30**	**%١٠٠**



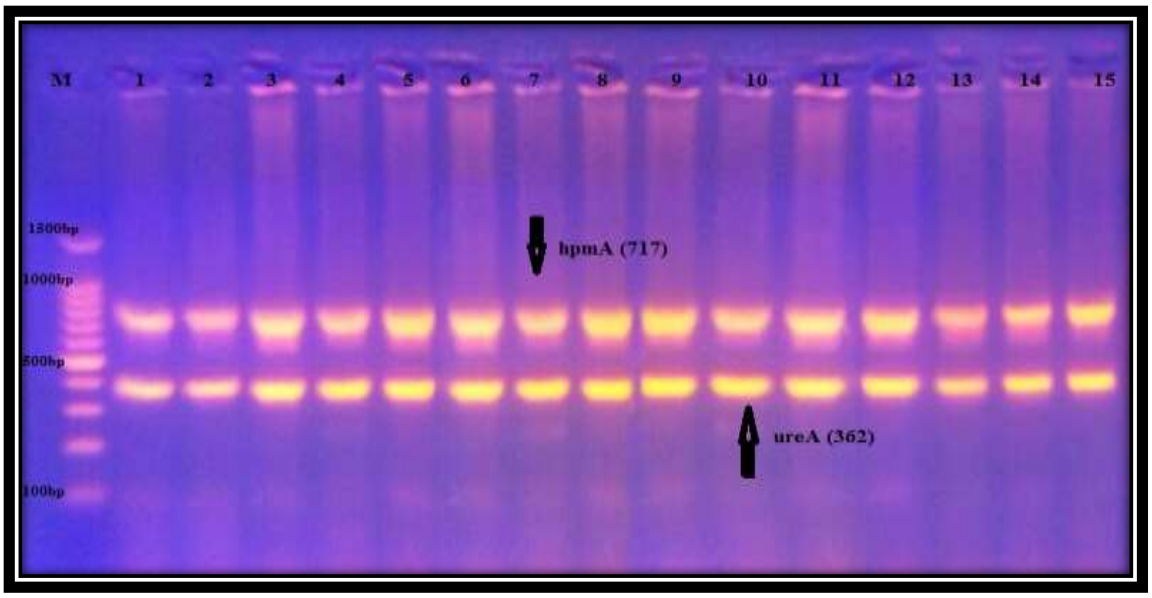
شكل (٤-٤):A نواتج تضخيم الجينات (*flaA+ureC*) لبكتريا *P.mirablis* باستعمال تقنية الـ Multiplex PCR والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز (١,٥%) وفولتية (١٠٠) ولمدة ساعة .حيث أن M =(DNA Ladder 100-1500bp)،حيث اضهرت ٢٦ عزلة موجبة لجين *flaA*المسؤول عن تكوين الاسواط و٢٩عزلة لجين *ureC* المسؤول عن انتاج انزيم اليوريز.



شكل (٤-٤):B نواتج تضخيم الجينات (*flaA+ureC*) لبكتريا *P.mirablis* للعينات(١٦-٣٠) باستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز(١,٥%) وفولتية (١٠٠) ولمدة ساعة ،حيث ان M=(DNA Ladder 100-1500) ،حيث أظهرت العزلات (١٦-٣٠) كانت موجبة لجيني *flaA* و*ureC*



شكل (٤-٥): نواتج تضخيم الجين *zapA* لبكتريا *P.mirablis* باستعمال تقنية الـSingle PCR والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز(١,٥%) وفولتية (١٠٠) ولمدة ساعة ،حيث ان :M= (DNA Ladder ١٠٠-١٥٠٠) ،حيث أظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة لجين *zapA* المسؤول عن انتاج انزيم البروتيز.



شكل (٤-٦) نواتج تضخيم الجينات (*hpmA+ureC*) لبكتريا *P.mirablis* والمرحلة كهربائيا على هلام الاكاروز (١,٥%) وفولتية (١٠٠)ولمدة ساعة باستعمال تقنية الـ Multiplex PCR، حيث ان (DNA Ladder 100-1500bp)=M،أظهرت العزلات كلها نتيجة موجبة لجينات *hpmA+ureA*.

٤-٦:الدراسة المناعية

أظهرت النتائج المناعية في الدراسة الحالية ارتفاع كبير في مستوى تراكيز الحركيات الخلوية (IL-6 و TNF-α) في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية كما مبين في الجداول (٤-٥) و (٤-٦)

جدول (٤-٥) مقارنة تراكيز IL-6 في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية والاصحاء.

المجاميع	العدد	المعدل
المرضى	49	288.96±28.46a
السيطرة	10	73.43±19.75b

- ± تمثل الخطأ القياسي

- الاحرف المختلفة تشير الى وجود اختلافات كبيرة في المجموعة عند مستوى احتمالية P< **0.05**

جدول (٤-٦) جدول مقارنة تراكيز TNF-α في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية والاصحاء

المجاميع	العدد	المعدل
المرضى	49	345.37±26.87a
السيطرة	10	89.4±26.73 b

- ± تمثل الخطأ القياسي
- الاحرف المختلفة تشير الى وجود اختلافات كبيرة في المجموعة عند مستوى احتمالية P< **0.05**

٤-١: عزل بكتريا *P.mirablis* وتشخيصها

يشكل أخماج المسالك البولية في الوقت الحاضر اهمية كبيرة لذا تمت عملية جمع العينات في الدراسة الحالية من مرضى خمج المسالك البولية .ويعد النوع *P.mirablis* من اكثر انواع المتقلبات شيوعا في اصابة الجهاز البولي ،وقد تم تشخيص العزلات البكترية قيد الدراسة تشخيصا اوليا من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية ومن ثم التشخيص على وسط كروم اكار وكذلك الفحوصات الكيميوحيوية التشخيصية.

تم زرع عينات الادرار على وسط اكار الماكونكي MacConkey Agar للحصول على مستعمرات نقية شاحبة اللون ،متوسطة الحجم ذات حافات ملساء وغير مخمرة لسكر اللاكتوز، وذات رائحة تشبة رائحة السمك المتعفن ويستعمل وسط اكار الماكونكي لنمو بكتريا *P.mirablis* لكونها بكتريا سالبة ويميزها عن باقي الانواع البكتيرية الموجبة لصبغة كرام. وكذلك ظهرت الحركة التموجية (Swarrming)على وسط اكار الدم Blood Agar التي تعد صفة تشخيصية اولية لهذة البكتريا وكما في الشكل (٤-١) وهذه النتيجة تتفق مع ماذكرهُ O'hara

(٢٠٠٠) وDharmadhikari وجماعتـه (٢٠٠٩) و Al-Bassam و Al-Kazaz (٢٠١٣).

بعد ذلك تم تشخيص العزلات قيد الدراسة على وسط كروم اكار Chrom Agar الذي يعد وسطا تشخيصيا للبكتريا اذ يعطي لوناً خاصاً لكل بكتريا وظهرت بكتريا *P.mirablis* بلون رمادي فاتح كما في الشكل (٤-٢).

كما اظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا البكتريا المعزولة تكون بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام وغير مكونة للسبورات وهذا متفق مع Holt وجماعته (١٩٩٤).

اما بالنسبة للفحوصات الكيميوحيوية التشخيصية التي استعملت كفحوصات تكميلية للتشخيص الاولي لبكتريا *P.mirablis* والغرض منها تأكيد تشخيص جنس البكتريا قيد الدراسة، فقد اوضحت النتائج المبينة في الجدول (٤-١) استجابة العزلات كلها قيد الدراسة لفحص الكاتليز دلالة على قدرتها على انتاج انزيم الكاتليز اذ كانت النتيجة الموجبة ظهور فقاعات هوائية بصورة مباشرة بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ، وكذلك كانت النتيجة موجبة لاختبار استهلاك السترات بوصفة المصدر الوحيد للكاربون اذ لوحظ تغير لون الوسط من الاخضر الى اللون الازرق نتيجة لتغير لون البروموثايمول الى اللون الازرق لزيادة الاس الهيدروجيني وهذه النتيجة كانت مطابقة مع Collee وجماعته (١٩٩٦)

وكما اعطت العزلات المشخصة فحصا موجبا لاختبار احمر المثيل وفحصا سالبا لاختيار الفوكس-بروسكاور وذلك لعدم تكوين المركب Acetyl-Methyl Carbinol من التحلل الجزيئي للسكروهذا مطابق مع Collee وجماعته (١٩٩٦).

اما بالنسبة لفحص الاندول فكانت النتيجة سالبة للعزلات قيد الدراسة ،ويستخدم هذا الفحص للتميز بين جنس *P.mirablis* وبقية انواع جنس المتقلبات اذ تكون النتيجة الموجبة تكوين حلقة حمراء نتيجة تحلل الحامض الاميني (التربتوفان) وتحوله الى الاندول ، وكذلك اعطت العزلات البكترية نتيجة سالبة لفحص الاوكسديز وذلك لعدم قدرتها على انتاج انزيم الاوكسديز وهذه النتائج مطابقة مع Holt وجماعتة (١٩٩٤) و Collee وجماعتة (١٩٩٦).

اعطت ٣٢ عزلة من اصل ٤٩ عزلة نتيجة موجبة لاختبار الـ DNAase ، اذ كونت هذه العزلات هالات شفافة حول المستعمرات ،في حين بينت دراسة الجناحي (٢٠١٣) ان ١٨ عزلة من اصل ٢٠ عزلة مكونة للهالة الشفافة حول المستعمرات.اظهرت جميع العزلات المشخصة

نتيجة موجبة لاختبار الجيلاتينيز وهي نتيجة مطابقة لما حصلت عليه الطائي (٢٠٠٢) وياسين(٢٠٠٨)، وقد تم تحديد الاختبار الموجب عن طريق بقاء وسط الجيلاتين سائلاً بعد تركه في الثلاجة بدرجة حرارة ٤ مْ ، وهو دليل على تحلل الجيلاتين اما تحوله الى الصلابة فهو دليل النتيجة السالبة (Collee *et al.*, 1996).

اظهرت جميع عزلات بكتريا *P.mirablis* قدرتها على تخمر كل من سكر السكروز والكلوكوز واعطت غازاً وراسباً اسود على الوسط دلالة على انتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S وهذ متفق مع Collee وجماعته (١٩٩٦).

٥-٢:الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا *P.mirablis*

عزلت بكتريا *P.mirablis* بنسبة (٢٨,٨٢%) في هذه الدراسة وكانت هذه النتيجة متقاربة مع Hussien(٢٠١٣) الذي بين في دراسة اجراها في مدينة النجف ان نسبة عزل هذه البكتريا من خمج المسالك البولية كانت (٢٦,٣%).اما دراسة Khurana وجماعته (٢٠٠٢) فقد عزلت فيها هذه البكتريا بنسبة (٣٣,٣%) وكانت هذه النتيجة ايضا متقاربة مع الدراسة الحالية .في حين اظهرت دراسة كاظم وخلف (٢٠١٢) ان نسبة عزل هذه البكتريا من خمج المسالك البولية كانت (١١,٨٥%) وهذه النتيجة اقل من الدراسة الحالية . كما وجد Hassan (٢٠٠٨) في دراسة اجراها في مدينة الناصرية ان نسبة عزل هذه البكتريا من خمج المسالك البولية كانت (٤٨,٨%).

وإنّ النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية تؤكد ان إمراضية بكتريا *P.mirabilis* للمسالك البولية جاءت نتيجة لاكتساب العديد من البكتريا مقاومة عالية للمضادات وذلك بسبب تعاطي المضادات قبل اجراء التحليلات المختبرية اللازمة و تطور المقاومة من قبل السلالات تجاه المضادات الحديثة (Corker *et al.*, 2000).

قد يكون سبب الاختلاف في نسب العزل لهذه البكتريا هو عدد المستشفيات المشمولة في الدراسة وحجومها وكذلك موسم ومدة جمع العينات .

اذ لوحظ من خلال الدراسة الحالية ان نسبة اصابة الاناث كانت (٦٧,٣٤%) وهي اكثر مما في الذكورالتي بلغت (٣٢,٦٥%)، ربما قد يرجع السبب الى بقاء محيط الاحليل والمهبل رطبا مما شجع الى حدوث الاصابة وبالإضافة الى ذلك فإنّ قصر الاحليل يزيد من التعرض للإصابة عن طريق صعود المسبب المرضي الى المسالك البولية (Freedman ,2005). وفي دراسة

اجراها خلف وكاظم (٢٠١٢) ان نسبة الاصابة للأناث كانت (٧,٥٢%) وهي ايضا اعلى مما في الذكور اذ كانت نسبة الاصابة لدراستهم (١,٥٨%).كما ان هذه البكتريا تكون متواجدة بشكل طبيعي في القناة المعوية وعند انتقالها الى الاحليل والمهبل تؤدي الى حدوث خمج المسالك البولية لذا تعد من الممرضات الانتهازية.

٥-٣:الكشف عن عوامل الضراوة مظهريا(اليوريز،الهيمولايسين ،البروتيز)

أ- تم الكشف عن انزيم اليوريز الذي يعد من اهم عوامل الضراوة لبكتريا *P.mirablis* والذي يؤدي دوراً مهماً في تكوين الحصى من خلال تغير pH الادرار مما يؤدي الى زيادة ترسيب الايونات في الادرار وبذلك يزيد من معدل تكوين الحصى (Itami *et al.*, 1990). وأظهرت النتائج للدراسة الحالية ان جميع عزلات بكتريا *P.mirablis* لها القابلية على انتاج انزيم اليوريز وبنسبة (١٠٠%) وذلك باستعمال وسط اليوريا ، وتغير لونه يعد صفة مظهرية وهو يعد من الفحوصات التشخيصية لهذه البكتريا وهذا مطابق لما اكده MacFaddin (2000) وكانت هذه النتيجة متفقة مع الطائي (٢٠١١) والجناحي (٢٠١٣) وEl.Baghdady (٢٠٠٩) اذ اشاروا الى ان جميع عزلاتهم كانت منتجة لهذا الانزيم .

ب- اما بالنسبة لانتاج الهيمولايسن ،فقد ابدت نتائج الدراسة الحالية ان ٤٤ عزلة وبنسبة (٨٩,٧%)،وكان التحلل من النوع β - heamolysis عند زراعته على وسط اكار الدم المضاف الية ٥% دم بشري صنف AB كونه يعطي مناطق تحلل اوضح .

وجد الباحث Mishra وجماعتة (٢٠٠١) ان (٨٥,١٤%) من بكتريا المتقلبات كانت منتجة للهيمولايسين . وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع النتيجة التي توصل اليها الطائي (٢٠٠٥) اذ وجد ان (٩٣,٤%) من عزلات بكتريا المتقلبات المعزولة من التهاب المسالك البولية .كما جاءت نتائج الدراسة الحالية اعلى مما توصل اليه الحسيني وجماعته (٢٠٠٩) اذ بين ان ٤٥% من عزلاته كانت محللة للدم .

تأتي سمية الهيمولايسين المنتج من هذه البكتريا من خلال تدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمر ومن ثم تؤدي الى تحطيم الانسجة (Liaw *et al.*,2003).

وبين Al-Hamawandi (٢٠١٤) ان عزلات بكتريا *P.mirablis* المعزولة من الادرار لها القدرة على تحلل الدم اذ لاحظ بوضوح مناطق تحلل الدم نوع β-heamolysis حول المستعمرات على وسط اكار الدم.

جـ كما تم الكشف عن انزيم البروتيز لبكتريا *P.mirablis* وأظهرت النتائج ان ٤٠ عزلة لها القدرة على انتاج هذا الانزيم وبنسبة (٨١,٦٣%). جاءت نتائج هذه الدراسة متقاربة مع دراسة الجميلي (٢٠٠١) اذ وجدت ان (٧٥,٥%) من عزلات المتقلبات كانت منتجة لهذا الانزيم .كما بينت دراسة الجناحي (٢٠١٣) ان العزلات كلها كانت منتجة لهذا الانزيم.

أذ يعد انتاج انزيم البروتيز من عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *P.mirablis* ويعد هذا الانزيم من الانزيمات المهمة التي لها القابلية على تكسير الاجسام المضادة نوع IGg وIGA ومن ثم تفقد القدرة المناعية (Naidu *et al*.,2005) .

إنّ من الاسباب التي تؤدي الى زيادة او انخفاض فعالية الإنزيم في الاوساط الغذائية ربما تعود الى مكونات تلك الاوساط إذ إنّ التباين في نوعية المواد العضوية و تركيزها وكذلك المواد اللاعضوية وتركيزها ودور كل منها في تحفيز إنتاجية الإنزيم في البكتريا يسبب اختلافات في إنتاجية الإنزيم وفي قطر منطقة التحلل في الاوساط التركيبية المستعملة (Chen *et al*.,1997). كما أظهرت نتائج Al-Saedi وجماعتها (٢٠١٣) ان جميع عزلات بكتريا *P.mirablis* كانت منتجة لانزيم البروتيز.

جاءت الدراسة الحالية أعلى مما سجله السعدي (٢٠٠٥) اذ بين ان (٢٧%) من عزلاته كانت منتجة لهذا الانزيم .كما وجدت عبد الرزاق (٢٠٠٤) ان(٤٥%) من عزلات المتقلبات المعزولة من ردهات الخدج كانت منتجة لانزيم البروتيز.بينما لم يسجل El-Baghdady (٢٠٠٩) اي عزلة منتجة لهذا الانزيم.

٥-٤:اختبار فحص الحساسية

تم اختبار الحساسية الدوائية لـ ٤٩ عزلة من بكتريا *P.mirablis* بأستعمال ١٢ نوع من اقراص المضادات الحيوية القياسية . وعند ملاحظة جدول (٤-٣) ظهر ان عزلات بكتريا *P.mirablis* قيد الدراسة قد ابدت مقاومة تامة لجميع عزلات هذه البكتريا وبنسبة (١٠٠%) لكل من مضاد Amoxillin/Cluvanic acid ، Rifampin وErythromicin، وكانت نسبة المقاومة لمضاد Amoxillin/Cluvanic acid في الدراسة الحالية متوافقة مع الجناحي (٢٠١٣) ومرتفعة قليلا عن Al-Muhannak(٢٠١٠) التي بلغت (٩٠,٤%). اما بالنسبة لمضاد Rifambin فهو يقع ضمن مجموعة الـ Isoniazid التي تثبط النمو البكتيري بوساطة الارتباط بقوة بانزيم بلمرة RNA مما يثبط تصنيع RNA (Fluit *et al*., 2001) .

كما أن البكتريا تقاومه عن طريق تغيير في انزيم البلمرة بسبب حدوث الطفرات الكروموسومية التي تحدث عادة بتكرار عال (Jawetz *et al.*, 1998) .وكانت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع Al- Saedi وجماعتها (٢٠١٣) و الطائي (٢٠١١) في نسبة المقاومة لمضاد Rifamipin والتي كانت (١٠٠%).ولاتتفق نتائج الدراسة الحالية مع اسماعيل (٢٠٠٤) اذ وجد ان مقاومة عزلاته كانت (٦٩,٣٥%).

ونسبة المقاومة لمضاد Erythromicin الذي يعود لمجموعة Macrolides في هذه الدراسة الحالية كانت متفقة مع Mordi و Mamoh (٢٠٠٩) الذي وجد ان جميع عزلات المتقلبات كانت مقاومة لهذا المضاد . كما اشار الطائي (٢٠١١) الى ان جميع عزلات بكتريا *P.mirablis* المعزولة من الادرار كانت مقاومة لمضاد Erythromycin.

اذ تقاوم البكتريا مضاد الارثرومايسين عن طريق التحوير لموقع الهدف وكذلك وجود نظام الدفق بالاضافة الى انتاج انزيمات تثبيط المضاد EreA ، EreB التي تعمل على تحليل حلقة اللاكتون في نواة مضادات Macrolides وكذلك عن طريق تغير نفاذية الغشاء الخلوي (Fluit *et al* ., 2001).

اما بالنسبة للمضادات Nitrofuration ، Chloramphenicol ،Cephalothin، Nalidic acid ، Gentamicin ومضاد Cifotaxim فقد بلغت نسبة المقاومة (٦١,٢٢%).وكانت نسبة المقاومة لمضاد Nitrofuration في الدراسة الحالية اقل مما توصل اليه Zhanel وجماعته (٢٠٠٠) اذ وجد ان نسبة المقاومة لمضاد Nitrofuration كانت (٧٦,٦%). في حين توصلت الـ Al- Saedi وجماعتها (٢٠١٣) الى ان نسبة المقاومة لمضاد Nitrofuration بالنسبة لبكتريا المتقلبات المعزولة من عينات سريرية مختلفة كانت (١٠٠%). وان نسبة المقاومة لمضاد Cephalothin كانت متقاربة مع الجناحي (٢٠١٣) والتي بلغت (٧٠%). في حين اشارKarim (٢٠١٢) الى ان نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت (١٠٠%).

كما كانت نسبة المقاومة لمضاد Chloramphenicol في الدراسة الحالية متقاربة من دراسة الجناحي (٢٠١٣) اذ قاومت عزلاتها مضاد Chloramphenicol بنسبة (٧٥%).واقل مما توصل اليه Hassan (2008) اذ بلغت نسبة المقاومة لديه (٨٣,٧%).

تظهر السلالات البكتيرية في اغلب الاحيان مقاومة لأنواع مختلفة من المضادات الحيوية نتيجة لعدم استعمالها بصورة صحيحة في علاج الاصابات البكتيرية ، إذ اصبح من الشائع جداً

فـي المستشـفيات عـزل سـلالات متعـددة المقاومـة للمـــضادات الحيـــوية ضـمن أفـراد العائلـة المعوية (Silva *et al.*, 2001).

امـا بالنسـبة لمضـاد Gentamicn العائـد لمجموعـة الـ Aminoglycosides فقد جـاءت نسبة المقاومة في الدراسـة الحاليـة متوافقـة مـع ياسين (٢٠٠٨) ولاتتفق مـع الطـائي (٢٠١١) اذ سـجلا نسـبة مقاومـة (٥٧%) و (٢٥%) علـى التـوالي.في حـين سـجل Hussien (٢٠١٣) نسـبة مقاومة (٣٠%) لمضـاد Gentamicin.

لقد اشـار Katzung (٢٠٠١) الـى ان مقاومـة مضـاد الجنتامايسـين التـي تبـديها البكتريـا الســالبة لصــبغة غــرام تعــود الــى وجــود بلازميــدات مشــفرة الــى الانزيمــات المحــورة للامينوكلايكوسايد.

كما تمتلك البكتريـا العديد من الاليـات التـي تجعلهـا مقاومـة لمضـادات الامينوكلايكوسيدات منها التغير في موقع الهدف (30S) من الرايبوسوم نتيجة حدوث طفرة في هذا الموقع تؤدي الى فقدان الالفة للمضاد او قلة نفاذية الغشـاء الخـارجي لجزئيـات المضـاد، وقد تكـون المقاومـة ناتجـة عــن انــزيم تنتجــة البكتريــا يعمــل علــى تحــوير جزيئيــة المضــاد وبالتــالي فقــدان فعاليتــه (Guven,2004).

وكانت نسبة المقاومة لمضاد Cefotaxim في هذه الدراسة اعلى مما توصل اليها ياسين (٢٠٠٨) والطـائي (٢٠٠٥) اذ كانـت نسبتهما (٢٨,٥٧%) و(١٢,٩٠%) علـى التـوالي. وبينـت نتائج Felego وجماعتـه (٢٠١٠) ان (٧٠%) مـن عـزلات بكتريـا *P.mirablis* كانـت مقاومـة لمضاد Cefotaxim.

كما اظهرCephalexin في الدراسـة الحاليـة نسـبة مقاومـة (٤٢,٨٥%) وكانـت هـذه النتيجـة اقل مما توصل اليه خورشيد (٢٠٠٥) اذ بين ان نسبة المقاومة لهذا المضـاد كانـت (٧٠%) بينمـا توصلت الجناحي (٢٠١٣) الى نسبة مقاومة (٨٠%) لمضاد Cephalexin.

لاتقتصـر مقاومـة مضـادات السيفالوسـبورينات علـى انتـاج انزيمـات البيتـالاكتميز واسـعة الطيف فقط وانما هناك طرائق اخرى تتضمن تغيير نفاذيـة غشـاء الخليـة للمضـاد ممـا يـؤدي الـى صعوبة مرور المضاد ووصوله الى موقع عمله وهذه الالية خاصـة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام اذ يحتوي الغشاء الخارجي على قنوات بروتينيـة تـدعى البورينـات والتـي تعمل علـى منـع دخـول المضاد الى داخل الخلية البكتيرية (Spanu *et al.*,2002).

كما جاءت نسبة المقاومة لمضاد Ciprofloxacin في الدراسة الحالية (٣٢,٦٥%) وهذه النسبة تختلف كثيرا عن النتائج المحلية اذ بينت ياسين (٢٠٠٨) والطائي (٢٠١١) ان جميع عزلات بكتريا *P.mirablis* كانت حساسة (١٠٠%) لهذا المضاد.كما بين بين Mishra وجماعته (٢٠٠١) ان نسبة المقاومة لمضاد Ciprofloxacin كانت (٢١,٧%) اذ كانت هذه النتيجة متقاربة مع نتائج الدراسة الحالية . ولاتتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل الية Karlowsky وجماعته (٢٠٠٣) والذين وجدوا ان نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت (٩,١%) . كما اشار Raka وجماعته (٢٠٠٤) ان مضاد Ciprofloxacin كان المضاد الاكثر فعالية تجاه البكتريا المسببة في اخماج المسالك البولية .

ان المقاومة القليلة التي تظهرها هذه البكتريا تجاه مضاد الـ Ciprofloxacin قد يعود الى حدوث طفرة وراثية تؤدي الى تغيير في موقع الهدف (الانزيمات المستهدفة) فيمنع ارتباط المضاد بها او زيادة انظمة الدفق (Johnson *et al*., 2005).

كما اظهرت نتائج الدراسة الحالية فعالية عالية تجاه مضاد Impenem لعزلات بكتريا *P.mirablis* اذ كانت حساسة (١٠٠%) لهذا المضاد .وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع Hussien(٢٠١٣) و الطائي (٢٠١١) اذ كانت جميع عزلات بكتريا المتقلبات حساسة لهذا المضاد.وتختلف نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت الية سلمان (٢٠٠٨) اذ وجدت ان نسبة المقاومة كانت متوسطة لهذا المضاد (٥٨%). ولاتتفق مع Al-khateeb (٢٠١٤) اذ وجد ان نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت (٢٥%).

لوحظ من خلال هذه النتائج ان عزلات بكتريا *P.mirablis* كانت مقاومة لاغلب المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال طبياً وقد يعزى السبب في ذلك الى تكييف البكتريا لبيئة المستشفيات المتميزة بالتواجد المستمر للمضادات الحيوية, وهذا يشجع على حدوث الطفرات في المادة الوراثية، اذ ان العلاج بالتراكيز الاعتيادية للمضادات الحيوية يؤدي الى قتل البكتريا المحيطية والمكونة للغشاء الحيوي بينما تبقى البكتريا داخل حشوة متعدد السكريات محافظة على حيويتها وتطور مقاومتها للمضادات وتعمل كبؤرة للاصابة بشكل متكرر (Ehrlich *et al* .,٢٠٠٢) .

كما لوحظ في الدراسة الحالية أنَ بكتريا *P. mirabilis* تبدي مقاومتها للمضادات الحيوية بسرعة وذلك لامتلاكها كباقي أفراد العائلة المعوية ما يسمى ببلازميدات المقاومة او عوامل المقاومة Resistance Plasmids أو Resistance factor (R-F) التي تشفر لجينات

خاصة بمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية وهذه العوامل يمكن لها ان تنتقل من السلالات المقاومة الى السلالات الحساسة لتصبح مقاومة لمضاد معين أو لأكثر من مضاد (Koneman *et al* ., 1997) ومن أسباب تطور المقاومة عند البكتريا هو الاستتعمال العشوائي للمضادات الحيوية وبشكل رئيس عند الأشخاص الراقدين في المستشفى.

٥-٥ :تقنية تفاعل انزيم البلمرة المفرد والمتعدد

تم استعمال تقنية تفاعل انزيم البلمرة المفردSingle PCR والمتعدد Multiplex PCR في التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن بعض عوامل الضراوة Virulence Factors في بكتريا *P.mirablis* ،من خلال استعمال قطع من الـDNA ذات عدد محدود من النيوكليوتيدات (Oligonucleotide) والتي تعمل كبادئات (Primers) متخصصة لجينات الضراوة في بكتريا *P.mirablis* ،والتي شملت الجينات كل من *ureC*، *ureA*، *hpmA*، *flaA* و*zapA* ،اذ تم اعتماد مستخلص الـDNA الكلي للبكتريا قيد الدراسة الذي حصلنا عليه باستعمال عدة الاستخلاص Genomic DNA Mini Kit كقالب Template تجري عليه عملية البلمرة .

تستعمل تقنية الـ Single PCR في التحري عن جين واحد في التفاعل الواحد ،بينما تستعمل تقنية Multiplex PCR في التحري عن جينات متعددة (بادئات متعددة) في نفس التفاعل ، وتتأثر عدد البادئات المستعملة في هذه الطريقة بظروف تفاعل الـ PCR التي تتضمن درجة الحرارة annealing temperature , تركيز الـ dNTP ، تركيزالـ Mg، تركيز DNA template ، نسبة الـ GC ، وحجم ناتج التضخيم Size product (Berg *et al*., 2000) ، بالأضافة الى نوعية الـ Master Mix المستعملة في التفاعل .

يعد جين *ureC* المسؤول عن انتاج انزيم اليوريزمن الصفات التشخيصية لبكتريا *P.mirablis*،عد في الدراسة الحالية من عوامل الضراوة التي تم تشخيصها باستعمال تقنية تفاعل البلمرة بالاضافة الى جين *ureA*، *hpmA*، *zapA* و*flaA* .

وجد ان انزيم اليوريز البكتيري يتألف من ثلاث وحدات فرعية هي الفا وبيتا وكاما التي يشفر لها بواسطة جينات *ure*A,B,C (Chen *et al*.,1998).وفي الدراسة الحالية تم دراسة كل من جين *ureA* و *ureC*.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان ٢٩ عزلة من اصل ٣٠ عزلة وبنسبة (٩٦,٦٦%) كانت تحتوي على جين *ureC* اذ تم التحري عنه باستعمال تقنية الـMultiplex PCR.كما في الشكل

(٤-٤) وكذلك بينت هذه الدراسة ان جميع العزلات كانت منتجة لجين *ureA* المسؤول ايضا عن انتاج انزيم اليوريزبنسبة ١٠٠% كما في الشكل (٤-٦).

يمتاز انزيم اليوريز المنتج من بكتريا *P. mirabilis* بكونه اكثر فعالية من انزيم اليوريز المنتج من اجناس البكتريا الاخرى ، حيث يعمل انزيم اليوريز على تغير pH الادرار الى القاعدي وهذا يعمل على ترسيب فوسفات الكالسيوم والمغنيسيوم في الغشاء الحيوي المتكون مما يؤدي الى تكوين الغشاء الحيوي البلوري (Crystallin biofilm) والذي يكون اكثر انواع الاغشية الحيوية تعقيداً اذ يعمل على غلق القثاطر البولية وحماية البكتريا من المضادات الحيوية مما يؤدي الى فشل العلاج بالمضادات الحيوية (Jonese *et al.*,2005 ; Stickler, 2008).

جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع (Stankowska) وجماعته (٢٠٠٨) اذ كانت جميع عزلاته كانت منتجة لانزيم اليوريز.وكذلك متقاربة مع Takeuchiوجماعته (١٩٩٦) الذين بينوا انتاج جين *ureC* من *P.mirablis* وكذلك اوضحوا امتلاك العزلات الناتجة من زرع الادرار وزرع الحصى على انزيم اليوريز.كما اتفقت مع دراسة اسماعيل (٢٠٠٤) الذي بين امتلاك جميع عزلاته التي عزلها على على انزيم اليوريز .

تأتي اهمية اليوريز في الامراضية من خلال تحلل اليوريا الى الامونيا ومن ثم يحمي البكتريا من التراكيز السامة والعالية من اليوريا (Tanaka *et al.*, 2003).كما اوضح Alamuri وجماعته (٢٠٠٩) ان هذا الانزيم يساعد بكتريا *P.mirablis* على استعمال اليوريا كمصدر للنتروجين ،المتطلب لتصنيع الـDNA والبروتين .يعد انزيم اليوريز من عوامل الضراوة المهمة مما يجعله سببا في حدوث العديد من المشاكل الصحية مثل تكوين حصوات الكلى والتهاب حويض الكلى (Tanka *et al.*,2004).

وقد وجد (Li *et al.*,2004) ان هذه البكتريا تقوم باستغلال اليوريا الموجود في الادرار بوصفها مصدرا وحيد للطاقة فتنتج الامونيا وCo_2 وبذلك ترفع من الاس الهيدروجيني للبول نحو القاعدية مسببة ترسيب ايونات ذائبة اخرى فتكون الحصى وبذلك تعمل على عرقلة انسياب الادرار واحتباسه كما ان قاعدية الادرار سامة للخلايا الكلوية اذ تؤدي الى احداث ضرر في الانسجة الكلوية.

يعد جين *hpmA* المسؤول عن انتاج الهيمولايسين عامل ضراوة مهم لبكتريا *P.mirablis* ،وفي هذه الدراسة تم التحري عنه باستعمال تقنية الـMultiplex PCR وأظهرت النتائج في الدراسة الحالية ٣٠عزلة وبنسبة (١٠٠%) امتلاكها لجين *hpmA* كما في الشكل

(٤-٦).في حين بين Cestari وجماعته (٢٠١٣) ان نسبة وجود هذا الجين في عزلات بكتريا *P.mirablis* كانت (٩٧,١٥%).

يقوم انزيم الهيمولايسين بتدمير غشاء كريات الدم الحمر عن طريق احداث فتحات صغيرة في اغشية كريات الدم الحمر والخلايا الطلائيه وان وجوده يعد عامل مهم في تزويد البكتريا بالحديد، وبسبب سميته للخلايا(Cytotoxic) فأنه يؤدي الى تحطيم انسجة الكلية للمضيف (Liaw *et al*., 2000).ومن ثم يزيد من امراضيتها بخمج المسالك البولية (Abedel Wahed *et al*.,2001).ويعد هذا الانزيم من عوامل الضراوة التي تساهم في امراضية هذه البكتريا ،اذ يعمل على توفير المغذيات نتيجة عمليات التحلل التي يقوم بها (Hynes and Walton,2000).

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية امتلاك عزلات بكتريا *P.mirablis* لجين *zapA* المسؤول عن انتاج البروتيز ،وبنسبة (١٠٠%).الذي تم التحري عنة بأستعمال تقنية الـ Single PCR كما في الشكل (٤-٥) وجاءت هذه النتيجة متفقة مع ماتوصل اليه (Stankowska) وجماعته (٢٠٠٨) والجناحي (٢٠١٣).اذ بينوا ان جميع عزلاتهم كانت منتجة لهذا الجين وبنسبة (١٠٠%).

تعد انزيمات البروتيز من الانزيمات المهمة التي لها القابلية على تكسير الاجسام المضادة من نوع IgA و IgG ومن ثم تقليل الاستجابة المناعية لذلك اكتسبت هذا الانزيمات اهمية كبيرة با عتبارها عامل ضراوة مهم للبكتريا المنتجة لها، تملك بكتريا المتقلبات القابلية على انتاج الانزيم الحال للبروتين من نوع (Metaloprotease) الذي كُشِف عنه بادرار المصابين بالتهاب المسالك البولية والاصابات الاخرى، اما السلالات غير الممرضة من جنس المتقلبات فهي اقل كفاءة في انتاج هذا النوع من الانزيمات (Belas *et al*., 2004).

يؤدي انزيم البروتيز دوراً مهماً في انتاج الحامض الاميني الكلوتامين المهم في عملية حث وتكوين الخلايا السابحة ومن ثم زيادة القدرة على غزو المضيف (Senior,1999).

اما بالنسبة للجين المسؤول عن الاسواط *flaA* التي يعد من عوامل الضراوة المهمة التي تساعد هذه البكتريا على الحركة بصورة سريعة ،اذ تم التحري عنه في الدراسة الحالية بوساطة تقنية الـ Multiplex PCR واظهرت نتائج الدراسة الحالية ان ٢٦ عزلة بنسبة (٨٦,٦٦%) من اصل ٣٠ من عزلات بكتريا *P.mirablis* كانت تحتوي على جين *flaA* كما في الشكل(٤-٤). مما تقدم نستطيع القول إن إمراضية البكتريا تطورت من خلال العديد من عومل الضراوة

لتتكيف مع بيئة المضيف ،وان ضراوة بكتريا *P. mirabilis* تزيد من فهمنا عن كيفية قدرة النبيت الطبيعي على غزو و إصابة المسالك البولية .

٥-٦:الدراسة المناعية

تم في الدراسة الحالية قياس بعض المؤشرات الالتهابية التي لها علاقة في حالة خمج المسالك البولية ، اذ تم قياس مستوى IL-6 و TNF-α في مصول مرضى خمج المسالك البولية اذ تعد سايتوكينات استجابة اولية للخمج حيث ترتفع مستوياتها في الدم في الحالات الحادة للخمج وترتبط مستوياتها مع حدية وضراوة المرض ،اذ تزداد مع زيادة ضراوة الخمج ومدى تأثيره على النسيج المصاب (Hedges *et al.*,1992).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاعاً كبيراً في مستوى IL-6 كمؤشر للخمج وهذا يتوافق مع ما جاء به Abdulmohymen وجماعته (٢٠١٢) اذ بين ارتفاع كبير في مستوى IL-6 في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية المزمن وكذلك المصابين بخمج المثانة الحاد. وكذلك جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع Abolfazl وجماعته (٢٠١٣) الذي بين ايضا ارتفاع في مستوى IL-6 في مصول الاطفال حديثي الولادة المصابين بخمج المسالك البولية الحاد .

كما اكد (Jones *et al.*, 2001) ان مستوى IL-6 يبدأ بالارتفاع في مصول المرضى بعد ٦ ساعات من دخول المسبب المرضي كأستجابة مناعية من قبل الجسم ضد الاصابة البكتيرية ،اذ يعتبر بمثابة انذار او تنبيه يقوم به الجهاز المناعي عند حدوث الاصابة اذ تشبة الوسيط الهرموني الذي يتم افرازه عند حدوث الخمج او التلف النسيجي .

كما بينت الدراسة الحالية ايضا ارتفاع مستوى TNF-α في مصول المرضى المصابين بخمج المسالك البولية وكانت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات ،كدراسة Mohkam وجماعته (٢٠٠٩) الذي اكد ارتفاع نسبة TNF-α لدى الاطفال المصابين بخمج المسالك البولية الحاد.وكذلك تتفق مع Mohkam وجماعته (٢٠١٣) التي بين ارتفاع مستوى TNF-α بشكل كبير وملحوظ عند المرضى المصابين بخمج المسالك البولية الحاد والمزمن.

يحفز TNF-α على انتاج اوكسيد الزنك الذي يساعد في بناء الخلايا التشجيرية Dendritic Cells التي تتجه الى المثانة والمجاري البولية في حالة الاصابة بالخمج ،وان TNF-α سرعان ماينتشرداخل المثانة وبقية اجزاء الجهاز البولي كجزء من المناعة الذاتية ضد

الاصابات البكتيرية ،اذ توجد مستقبلات خاصة للحركيات الخلوية على سطوح الخلايا المصابة (Engel *et al*.,2006).

الاستنتـــاجـــات Conclusion

١-تزايد نسب الاصابة بخمج المسالك البولية بواسطة بكتريا *P.mirablis* ، كما ان لبكتريا *P.mirablis* دور اساسي في اصابات القناة البولبة للنساء نظرا لاحتوائها على مؤثرات الامراضية بعد الكشف عنها مظهريا وتحديدها جينيا في تقنية الـ PCR

٢- ظهور عزلات بكتيرية تقاوم المضادات الحيوية

٣-ان مضادات Amoxicillin/cluvanic acid ، Rifampin وErythromicin لم تعد فعالة ضد عزلات بكتريا *P.mirablis* المعزولة من خمج المسالك البولية ،اذ كانت نسبة المقاومة لهذة المضادات ١٠٠%.اما مضادات Ciprofloxacin وImpenem هما الافضل فعالية تجاه هذه البكتريا.

٤-امتلاك عزلات بكتريا *P.mirablis* لكل من انزيم اليوريز والبروتيز والهيمولايسن وكذلك امتلاكها البروتين المسؤول عن تكوين الاسواط من خلال التحري عن الجينات المشفرة لهم.

٥-لوحظ ان هناك ارتفاع في مستوى الحركيات الخلوية (Interleukin-6 , Tumor Necrosis Factor-α) كمؤشرات التهابية بين المرضى المصابين.

التوصيـــــات Recommendation

١-استعمال مضادات Ciprofloxacin و Impenem بشكل منفرد في علاج خمج المسالك البولية المتسبب بواسطة بكتريا *P.mirablis*.

٢-دراسة تأثير انزيم البروتيز على الخلايا البلعمية ومدى ارتباطه بظاهرة الانثيال ،ودراسة الانزيمات الاخرى التي تشفر من قبل الجينات zapB،zapC،zapD ،zapE في بكتريا *P.mirablis*.

٣-تقنية الـ Multiplex PCR طريقة مميزة من حيث السرعة وتقليل الوقت في اعطاء النتائج مقارنة بنتائج الـ Single PCR.

٤-ضرورة استعمال طريقة التخطيط على وسط Chrom Agar في تشخيص بكتريا *P.mirablis*.

٥-استعمال تقنية تصميم البادئات Primer design واعتمادها في البحوث كونها ذات نتائج موثوقة وتوفيرها لظروف مثالية للبادئات المصممة المستعملة في تقنية الـ PCR ولاسيما تقنية الـ Multiplex PCR.

Abbott, S. L. (2007). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas,* and Other *Enterobacteriaceae*. In:Manual of Clinical Microbiology, Murray, P. R.; *Baron, E. J.; Jorgensen, J.* H.; Landry M. L. and Pfaller, M. A.(eds.) 9th ed. ASM Press. Washington. USA, pp. 698-711 .

Abdulmohymen, N. ; Khodher, A. and Ashoor , Z. F. (2010). Serum interleukin-6 level using ELISA in patients with bladder cancer and having urinary tract infection .*Iraqi J.Comm*. Med.4:251-256.

Abed-Wahed, B, AL-Husane, R. and AL-Zaa´k, A. (2001). Isolated and identification of bacteria caused UTIs and its ability to urease and hemolysin production.*J. AL-Mustanseriah Science* 12:13.

Abolfazl , M .; Parviz , A.;Mohammed , R. M. ; Mohammed , M ; Daneshi-kohan,L.D.;Hamid,R.S.;Hassan,J.H.;and Mousa,T. (2013). Serum levels of interleukin-6 and interleukine-8 as diagnostic markers of acute pylonephritis in children .*Korean J.Pediatr*.**56**(5):218-113

Abrahams,H.M.;and Stoller, M.L. (2003) . Infection and urinary stones**.***Curr Opin Urol*, **13**(1):63 – 67.

Addose ,S.A.(2000) . Urinary tract infection among burn patients with special reference to *Psendomonas aeruginosa .kufa , Med . J.* , 3(**1**) : 55-61 .

Al- Mansouri , S. ; Amari, A. and Asad, A. G. (2005). Inhibition effect of some medical plants from Iran on swarming motility of *Proteus* rods . *J. med. Sci.* , **5**(3)**:** 216-221.

Alamuri, P.; Eaton, K.A.; Himpsl, S.D.; Smith, S.N. and Mobley, H.L.T. (2009). Vaccination with *Proteus* toxic agglutinin, a hemolysin-independent cytotoxin *in vivo*, protects against *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Infect. Immun*. **77**: 632-641.

AL-Bassam ,W. W. ; and Al-Kazaz,AK. (2013) . The Isolation and Characterization of *Proteus mirablis* from different Clinical Sample.*Journal of Biotechoology Research center* .**2**(7):26

AL-hamadan, A. H. ; Hussien, A. N. and AL-Nashaa, A. A.(2007). Curing of Plasmid Contents of *Proteus* spp. Isolated in from urinary tract in AL-Diwaniyah city.*QMJ*.**3**(1):

Al-Hamawandi , Jwan Ahmed. (2014). Study of some Virulence Factors of urepathogenic bacteria.*Journal of Babylon University / pure and Applied Sciences*.3(**22**):1356.

Ali,**O**.**A.(2012**). Prevention of *Proteus mirabilis* Biofilm by Surfactant Solution. Egypt. Acad. *J. Biolog. Sci*. **4**(1): 1- 8

Alkerele , J. ; Abhulimen, P. ; and Okonofua, F. (2001). Prevalence of a symptomatic bacteriuria among pregnant women in Benin city , Nigeria. *J. Obstetrics. Gynaecology***. 21** (2) : 141 – 144.

Al-khateeb,Ahmed Fadhil.(2014). Role of *Proteus mirabilis* DNA in Comparison to *Candida albicans* DNA in rats' joints infection.M.SC.Thesis.

Allison, C.; Lai, H. C. ; Gypiand,D. Haughes,C. (1993). Cell differentiation of *Proteus mirabilis* is initiated by glutamine aspecific chemo attractant for swarming cells. *Mol. Microbiol*., 8**(1):** 53 – 60.

Al-Muhannak, F. H. N. (2010). Spread of some Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Isolates of Gram-Negative Bacilli in Najaf. M.Sc. Thesis. College of medicine. Kufa university.

Al-saedi,E.A.,Jabur,M.Hadi and Trad,J.K.(2013).Isolation of *Proteus Vuligaris* from different Clinical Sources and Study of some Virulence Factors.*Jurrnal of Babylon Unvirsity*.1(**21**):46.

Atlas, R.M. (1995) :Principle of Microbiology. 1st.ed. Mosby-Year book company. USA.

Bass, P. F.; Jarvis, J. A.;and Mitchell, C. K. (2003). Urinary Tract Infections. Primary Care; *Clinics in Office Practice*, **30**(1): 41-61.

Belas, R. ; Manos, J and Suvanasuthi,R. (2004). *Proteus mirabilis* ZapA metalloproteases degrades abroad spectrum of substrates including antimicrobial peptides. *Infect Immun*. **72** : 5159 – 5167.

Belas, R.(1994). Expression of multiple flagellin -encoding genes of *Proteus mirabilis. J. Bacteriol***. 176 :**7169-7181.

Benson, M.; Jodal, U.; Andreasson, A.; Karlsson, A.; Rydberg, J.; Svanborg, C. (1994) . Interleukin 6 response to urinary tract infection in childhood. *Ped Infect Dis J*; **13**:612-6.

Benson, H.J. (2002). Microbiological Application Laboratory Manual in General.

Berg, K. D., Glaser, C. L. and Thompson, R. E. (2000) . Detection of microsattelite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J . molec. Diagnostics*, **2**: 20-28 .

Bethesda, A. (2002). Urinary tract infection in adults. NIH Publication . 2095-2097.

Blake,G.J. and Ridker,P.M.(2001).Novel clinicl markers of vascular wall inflammation .*Circ.Res*.**89**:763-771.

Bolton,C.H.; Downs,L.G.;Victory, J.G.;Dwight ,J.F.; Tomson, C.R.; Mackness,M.I.;and Pinkney , J. H . (2001) . Endothelial dysfunction in chronic renal failure: Roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol.Dial.Transplant*. **16**(6): 1189-1197.

Bradford, **P.A. (2001)**. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev*. **14**: 933-951.

Brooks, G. F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology 22nd ed .McGraw-Hill. U.S.A

Brooks , G.F. ; Carroll , K. C. ; Butel , J.S. and Morse , S. A. (2007) . Jawets, Melnick, Adelberg's Medical microbiology. 24th ed. McGraw-Hill com. PP. 174.

Buchaman, R.E.;and Gibbous, N.E.(1994). Berge's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Willkins Company. Baltimore.

Burall L.S.; Harro, J.M. ; Li, X. ; Lockatell, C.V. ; Himpsl, S.D. ; Hebel, J.R. ; Johnson, D.E.and Mobley, H.L.T. (2004). *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infect. Immun*., **72**(5): 2922-2938.

Carey, S. Copeland, M.F. ; Sacotte, R. ; Tuson, H.H.and Weibel, D.B. (2013). Flagellum density regulates *Proteus mirabilis* swarmer cell motility in viscous environments. *J. Bacteriol.*, **195**(2): 368-377.

Cawthorn,W.P. and Sethi, J.K.(2008).Review TNF-α and adipocyte biology .*FEBS LEFT*. **582**:117-131.

Cestari, S. E. ; Ludovico, M. S. Martins, F. H.; Da Rocha, W. P. Elisa, W.P.; Pelayo, J. S. (2013) . Molecular detection of HpmA and hlyA hemolysin of uropathogenic *Proteus mirablis .journal microbial*.**67** (6).703-7.

Chen, S. C.;Muller, M.; Zhou, J. Z.; Wright, L. C.and Sorrel, T. C. (1997). Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor. *J. Infect. Dis*. **175**: 414–420.

Chen,Y. Y. ;Weaver , M.; Cheryl,A.; Mendehlson,D.R. and Burne, R. A. (1998). Transcription regulation of the *Streptococcus salivarius* urease operon .*J. Bacterial*., **180**(21):5769-5775.

CLSI, clinicaland laboratory standards institute.(2010) :Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M 100-S20., Wayne, Pa; **30** (1).

Cole, A. M. ; R. O. Darouiche ; D. Legarda ; N. Conne;; and G. `Diamond (2000). Characterization of a fish antimicrobial peptide gene expression , subcellular localization and spectrum of activity. *Antimicrob. Agents. Chemother* **44** : 2039 – 2045.

Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P.;and Simmon, A. (1996). Mackie and McCarteny Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone Inc; USA.

Corker, **C. ; Poore, C. A. ; Li , X. and Mobley , H. L. (2000) .** Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect* ; **2**(12) : 1497-1505.

Costerton, **J.W.; Stewart, P.S. and Greenberg, E.P.(1999**) . Bacterial common cause of persistent infections. Science **284**:1318 -1322.

Craig, J. C. (2004). Treatment of acute pyelonephritis in children. Br. *Med. J.* 10: 179 – 180.

Dattelbaum, J. D. ; Lockatell ,C. V.; Johnson, D. E. ; Harry ,L. and Mobley, T. (2003). UreR , the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections. *Infections and Immunity.* **71**(2):1026-1030.

De Charvalho ,C. R. (2007). Biofilms : Recent developments on an old battle. Recent patents. *Biotechnol*. **1**: 49-57.

Dharmadhikari , S. M. ; and Peshwe,A. S. (2009). Molecular level studies on multiple antibiotic and serum resistance in UTI pathogens.*Indian J.Biotechnol*.**8**:40-50.

Diacovich,Lautaro and Pierre Govel,Jean,(2010) .Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection.*Nature Reviews Microbiology* .**8** :117-128.

Diepold, M. ; Noellke, P. ; Duffner, U.; Kontny , U.;Berner , R. (2008). Performance of interleukin-6 and interleukin-8 serum levels in pediatric oncology patients with neutropenia and fever for assessment of low-risk.*BMC Infect.Dis*.**8**:28.

Ehrlich,G. D. ; Veeh,R. ; Wang,X. ; Costerton,J. W. ; Hayes,J. D. ; Hu, F. Z. ; Daigle, B. J. ; Ehrlich, M. D. and Post , J. C. (2002). Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA.* **287**(13):1710-1715.

El-Baghdady,K. Z.; Abooulwafa, M.M.; Ghobashy, M.O.; Gebreel, H. M. (2009). Plasmid mediated virulence factors of some *Proteus* isolates. *J. Biolog. Sci*.,**1** (1):7-22.

Elder, J.S.(2004) .Urinary disorders in infants and children,In: Nelson Textbook of Pediatrics, Behrman, R.E.; Kleigman, R.M.; Jenson, H.B.(eds), 17th ed. , Saunders, New Delhi. 1785-1789.

Engel , D.; Dobrindt,U.;Tittel , A. Peters,P. ; Maurer,J.; Gutgemann , I; Kaissling, B. ; Kuziel,W.; Jung,S.;Kurts , C. (2006). Tumor Necrosis Factor-Alpha and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance.*Infect Immun*.**74**(11): 6100-7.

England ,A.C.and England,T.K.(2002). Pediatrics ,Urinary tract Infection and Pylonephritis.Emed.Com,*Inc.J.Med*; **2** (6).

Feglo, P. K; Gbedema, S. Y.; Qaury, S. N.A.; Adu-Sarkodie , Y. and Opoku-Okrah C. (2010). Occurrence, species distribution and antibiotic resistance of *Proteus* isolates: A case study at the Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana. Inter. *J. Pharm. Sci.* **1**(9):347-352.

Filimon , R. and Iacob , E. (2007). Incidence of nosocomial infections at the recovery clinic of Iasi hospital,in 2004-2005. Rev. *Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*. 111(1):255-257.

Fluit, A.C.; Visser, M.R. and Schmitz, F.J.(2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. Oct. 836-871.

Forbes , B. A. ; Sahm, D. F. and Wessifld, A. S. (2002) . Diagnostic Microbiology. 10th ed. Bailey and Scotts'. Mosby. U.S.A., **1**: 509.

Forbes , B. A. ; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic Microbiology 12th ed. Bailey and Scotts'. Mosby Elsevier. China., pp: 93-247.

Foxman, B.and Brown, P. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: Transmission and risk factors, incidence and costs. Infect. Dis. *Clin. North Am*., **17**(2): 227-241.

Fraser, G.M.; Claret, L.; Furness, R.; Gupta, S.; Hughes, C.(2002). Swarmingcoupled expression of the *Proteus mirabilis hpmBA* hemolysin operon. *Microbiology*. **148**: 2191-201.

Freedman, A. L. (2005). Urologic Diseases in North America Project: trends in resource utilization for urinary tract infections in children. *J. Urol*., **173**(3)**:**949-954.

Gaisser, S.and C. Hughes (1997). A locus coding for putative non-ribosomal peptide / polyketide synthas functions and mutated in a swarming of *Proteus mirabilis* strain. *J. Bacteriol*., **181**: 2008 – 2016.

Gendlina I.; Gutman, D.M.; Thomas, V. and Collins, C.M. (2002). Urea dependent signal transduction by the virulence regulator UreR. *J. Biol.* Chem., **277**(40):37349-37358.

Gibbs, K.A., Wenren, L.M., and Greenberg, E.P. (2011). Identity gene expression in *Proteus mirabilis J. Bacteriol*. **193**(13): 3286–3292. doi:10.1128/JB.01167-10. PMID 21551301. a

Gilbert, D. N.; Kohlhepp, S. T.; Slama, K. A.; Grunkemeier, G.; Lewis, G.; Dioorkin, R.J.; Slanghter, S. E. and Leggett, J. E.(2001). Phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus*, selected Enterobacteriaceae, and *Pseudomonas aeruginosa* after single and multiple *in vitro* exposures to ciprofloxacin, levofloxacin and trovafloxacin. Antimicrob. *Agents Chemother. Mar***. 45**(3): 883-892.

Gloria , Y . F . ; Xiao-Nan , X . ; Robert , D . ; Kaplan , R .C.; Cornell,E . ; Cushman,M .(2005). Variability of serum levels of tumer necrosis factor-alpha,interleukin 6 receptor over 2 years in young women .Cytokine.**30**:1-6.

Greenwood, D. ; R. C. B. Slack and J. F. Peuthere (eds) (2002). Medical Microbiology. A guide to microbial infections , pathogenesis , immunity , laboratory diagnosis and control. 16th ed. Edinburl, London , New York , Philadephia , Sydney , Toronto.

Greer , N. D. (2009) . Tigecycline (tygacil): the firstin the glycylcyclineclass of antibiotics.proc, (Bayl univ med cent). **19** (2): p: 155-61.

Gue, **M.; Duport, V.; Dufour, A.; Sire, O.(2001).** Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR studt of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation. *Biochemistry. Oct*. **40**(39): 11938-45

Gunther , N.W. ; Virginia , L. ; David , E.and Harry , L.(2001). *In Vivo* Dynamics of Type 1 Fimbriae Regulation in Uropathogenic *Escherichia coli* During Experimental Urinary Tract Infection . *Infec.and Innune* . **69**(5) : 2838- 2846 .

Guven , A. (2004). Intramuscular antibiotic treatment of urinary tract infection. Ind. *J. pediat*. **71**(11): 979-981.

Harshy,R.M. (2003). Bacterial motility on a surface : many ways to acommon goal. Annu. Rev. *Microbiol*. **57:**249-273.

Hassan,Talib Falah.(2008). Study of *Proteus mirablis* Infections in AL-Nassiria City.*Journal of Thi-Qar University* **4**(3):9.

Hedges, S.; Stenqvist, K.; Lidin-Janson, G. Martinell, J.; Sandberg, T, Svanborg , C. (1992) . Comparison of urine and serum concentrations of interleukin-6 in women with acute pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria. *J. Infect. Dis*.**166**:653-6.

Hedges , J . C . ; Singer , C .A. and Gerthoffer , W .T.(2000). Mitogen-activated protein kinase regulate cytokine gene expression in human airway myocytes .*Am.J.Respir.Cell Mol.Biol***.23**(1):86-94.

Himpsl , **S .D. ; Lockatell , C.V.; Hebel , J.R . ; Johnson , D . E . and Mobley , H . L. (2008)**. Identification of virulence determinants in

uropathogenic Proteus mirabilis using signature-tagged mutagenesis. *J. Med .Microbiolo*, **57**: 1068-1078.

Holt, J. G. ; Kreig , N. R. ; Sneath, P. H.A. ; Stanley, J. T. and Williams , S. T. (eds) (1994) Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th. ed Williams and Wilkins , *USA.* P. 532 – 553.

Hooper,D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis*. **31**(2):S24-28.

Hussien,Ahmed Aleiwi (2013). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase in *Proteus .mirablis* isolation from Patients With Significat Bacteriuria in Najaf Provina.*QMJ*. **16**(9):149.

Hynes , W.L.; Walton , S. L. (2000) . Hyaluronidase of Gram positive bacteria.*FEMS microbial Leftt*.**(2)** 183:201-7.

Island, M.D.and Mobley, H.L.T.(1995). *Proteus mirabilis* Urease: Operon Fusion and Linker Insertion Analysis of ure Gene Organization, Regulationand Function. *J.Bacteriol*, **177**(19): 5653-5660.

Itami, N.; Akustu, Y.; Yasoshima, K. and Yamamato, K.(1990). Renal tubular acidosis and urinary tract infections. *J. Pediatric*. **117:** 156-161.

Jacobsen, S. M.; Stickler, D. J. Mobley,H. L. T and . Shirtliff, M. E. (2008). Complicated Catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev*. **1** (21):26–59 .

Jacoby, J. A. and Bush, K. (2009)."Amino Acid Sequences for Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant ß- TEM, SHV and OXA Lactamases.

Jawetz, E. ; J. K. Melnick and E. A. Adelberg (1998). Enterobacteriaceae in medical microbiology review. 12th ed. P : 223 – 224. Apelton and large , Middle eastol Libravie Dublin , Beirut.

Jiang, S., Lin, T., Wang, W., Liu, M., Hsueh, P.and Liaw, S. (2010) .Characterization of UDP-Glucose dehydro-genaseand UDP-Glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis*: Defectiveness in polymyxin B resis-tance, swarming, and virulence. *Antimicrob. Agents and Chemother*, **54**(5): 2000-2009.

Johnson,R. J.; Kuskowski,A. M.; O'Bryan,T. T.; Raul,C. and Raz,R. (2005). Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from women with acute uncomplicated cystitis. Antimicrob. *Agents. Chemother*. **49**: 26-31.

Jones S.A.; Horiuchi S.;Topley N.;Yamamoto N.;Fuller G.M.(2001). The solube interleukin-6 receptor:mechanisms of production and implications in disease.*FASEB J*. **15**:43-58.

Jones, S. A.; Scheller, J.;Rose-John, S. (2011) . Therapeutic strategies for clinical blockade of IL-6/gp 130 signaling . *j Clin. Invest* :**121**:3375-83

Jones,B. V. ; Mahenthiralingam,E. ; Sabbuba,N. A. and Stickler,D. J. (2005). Role of swarming in the formation of crystaline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. *J. Med.Microbiol*. ***54***: 807-813.

Joseph DiPiro, R.T., Gary Yee, Gary Matzke, Barbara Wells, L. Michael Posey (2011) Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. McGraw-Hill Medical.

Kadowki , N.; Ho. S. and Antonenko , S. (2001). Subsets of human dendritic cells precursors express different toll – like receptors and respond to deferent microbial antigen .*J. EXP* . *Med* ; **194**: 9-863 .

Kagnoff, M. F.; and Eckmann, L. (1997): Epithelial cells as sensors for microbial infection.*J.Clin.Investig.***100**:6-10 .

Kalai , S.; Achour, W. ; Abdeladhim , A. ; Bejaoui , M. and Benttassen, A. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* isolated in immunocompromised patients: antimicrobial resistance, serotyping and molecular typing. *Med. Mal. Infect.* **35** (11): 530 – 535.

Kaplanski , G. ; Marin , V.; Montero-Julian , F. ; Mantovani , A. ; Farnarier, C. (2003) . IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24: 25–29.

Karim , G. F. (2012) . Plasmid mediated multidrug resistance of uropathogenic *Proteus.mirablis* . *Kirkuk university journal scientific studies*.**2(7**):30-41.

Karlowsky, J. A.; Jones, M. E.; Thornsberry, C.; Friedland, I. R. and Sahm, D. F. (2003). Trend in antimicrobial susceptibilities among enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in United States from 1980-2001. *Antimicrob Agents. chemother*. **47**(5):1672-1680.

Katzung, B. G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. 8th ed. New York, Lange Medical Books. McGraw-Hill medical Publishing division. 1217.

Kearns, D.B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol*; **8**(9): 634-644

Kelley, Struble.; Michael ,Stuart .Bronze.; Rhett, L. Jackson.and Gus. Gonzalez. (2009). *Proteus* Infections: Overview, e.Medicine.

Khurana, S.; Taneja, N. and Sharma, M. (2002). Extended-spectrum beta-lactamase mediated resistance in urinary tract isolates of family enterobacteriaceae. Indian. *J. Med. Res*. Oct.**116**: 145-149.

Kokare, **C.R.; Chakraborty, S.**; **Khopade , A . N . and Mahadik , K.R. (2009).** Biofilm : Importance and applications. *Indian J. Biotechnology*.,**8**: 159-168.

Koneman, E. W. ; Allen , S. D. ; Janada , W. M. ; Schreckenberger , P. C. and Winn , W. C. (1997). Color atlas and text book of Diagnostic Microbiology.5th ed., Lippincott-Raben publishers , Philadelphia, U.S.A.

Krystyna , P. **; Dariusz , P. ; Michal , M. (2007) .** Impaired renl function and duration of dialysis therapy are associated with oxidative stress and proatherogenic cytokine levels in patients with end-stage renal disease .*Clinical Biochmistry*. **40**:81-85.

Krzemien, G.; Roszkowska-Blaim, M.; Kostro, I. ; Szmiqielska , A. ; Karpinska , M. ; Sieniawska , M. ;Bartomiejczyk,I.;Paczek,L.; Toth , K. (2004). Urinary levels of interleukin-6 and interleukin-8 in children with urinary tract infections to age 2. *Med Sci Monit*.**10**(11):CR593-7.

Lane, D.R. and Takhar, S.S. (2011). Diagnosis and management of urinary tract infection and pyelonephritis. *Emergency medicine clinics of North America*. **29** (3): 539–52.

Li, X.,and Mobley, H. L. T. (2002). Vaccines for *Proteus mirabilis* in urinary tract infection. *Int.J. Antimicrob. Agents*., **6**(190):461-465.

Li, X.; Lockatel, C.V.; Johnson, D.E.; Lane, M.C.; Warren, J-W.; Mobley, H.L.T.(2004). Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis. Infect. Immun. Jan*. **72**(1): 66-75.

Li, X.; Lockatell, V.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T.(2002-b). Identification of MrpI as the sole recombinase that regulates the phase variation of MR/P fimbria, a bladder colonization factor of uropathogenic *Proteus mirabilis. Molecular Microbiology*. **45**(3): 865-74.

Li, X.; Zhao, H.; Lockatell, V.; Drachenberg, C.B.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T.(2002-a). Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. *Infectionand Immunity*.,(70) :389-394.

Li, X. ; Lockatel , C. V. ; Johnson , D. E. Lane ,M.C.Warren, J.W. and Mobely, H.L.T. (2004) . Development of international Vaccine to prevent infection *Proteus mirablis* infection *J.Immune.clin*. **72**(1):66-75.

Li,x.;Lokatell , C.V. ; Johnson , D. E. and Mobely, H. L. (2002A) . identification of mrp1 as the sole recombinase that regulates the phase varation of MR/P fimbriae ,bladder colonation factor of uropathogenic *proteus mirablis. j.mol.microbial* .Ag .vol 45,p(865_875)

Liaw, S. J.; La, H. C.; Ho, S. W. and Wang, W. B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swaring differentiation in *Proteus mirabilis* by.P.nitrophnylglycerol. *Med. Microbiol*. **49**:725-731.

Liaw, S.J., Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.; Wang, W.B.(2001). Characterization of *p*-nitrophenylglycerol-resistant *Proteus mirabilis* super-swarming mutants. *J. Med. Microbiology*. **50**: 1039-48

Liaw, S.J., Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.; Wang, W.B.(2003). Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *Journal of Medical Microbiology*. **52**: 19-28

Livermore, D. M.and Woodford, N . (2006) . The β-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.*, 14(**9)**: 413-420.

Loomes, L.M.; Senior, B.W.and Kerr. M.A. (1992). Proteinases of *Proteus* Spp.: Purification, properties,and detection in urine of infected patients. *Infect. Immun*., **60**(60):267-273.

Macfaddin, J.F. (2000).Biochemical test for bacteria, 3nded.the Williams andWilkins. London. identification of medical Microbiology .8thed .The McGraw-Hill Companies.USA.

Mala, B. R.; Aparna, M. T.;Mohini, S. G.and Vasanthi. S. D.; (1998) . Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Molbiol Rev*., **62**(3): 597-635.

Manos, J. Artimovich, E. Belas, R.(2004). Enhanced motility of *Proteus mirabilis* strain expressing hybrid FlaAB flagella, Microbiology. **150;**1291-9.

Masson, P.; Matheson, S.; Webster, A.C.and Craig, J.C. (2009). Meta-analyses in prevention and treatment of urinary tract infections. *Infect. Dis. Clin. North. Am.,* **23**(2): 355-385.

Mathai , D. ; Jones , R. N.; Pfaller , M. A. (2001) . Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infection in 1,510 hospitalized patients : areport from the sentry antimicrobial surveillance program (North America) Diagn , *Microbiol ,Infect . Dis. J.,* **40**(3) :129-136

McManus, A. T., Moody,E. E. and Mason, A. D. (1980). Bacterial motility: a component in experimental *Pseudomonas aeruginosa* burn wound sepsis.(**6)**:235-239.

Meyrier, A. (2000) . Urinary tract Infection .The textbook of medical microbiology (9)third.Stough,London.P:124-150.

Mihara, M.; Hashizume, M.; Yoshida, H.; Suzuki, M.;Shiina, M. (2012) . IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions .*Clin Sci (Lond).*

Mims ,C.; Playfair ,J.; Roitt ,I.; Wakelin ,D.; Williams , R.; Anderson, R.M.(1993) .Medical Microbiology. mosby .London .

Mishra,M.; Thakar,Y. S. and Pathak,A. A. (2001). Haemagglutination, haemolysin production and serum resistance of *Proteus* and related species isolated from clinical sources. Ind. *J. Med. Microbiol*. **19**:5-11.

Mobley, H.L.T. and Chippendle, G.R. (1990). Hemagglutinin, urease and hemolysin production by *Proteus mirabilis*. *J. Inf. Dis*. 161: 525-530.

Mohkam, M. ; Karimi, A. ; Karimi, H. ; Sharifian, M. ; Armin, S. ; Dalirani , R. and Gorgi, F.A. (2009) . Diagnostic Potential of

urinary Tumer Necrosis Factor-Alpha in Children with Acute Pyelonephritis.*Iranian J. of kidney Disease*.**3**:89-92.

Mohkam, M. ; Tabatabae , S. R. ; Asgarian , F. ; Armin, S. ; Fahimzed, A. ; Sharifian , M. and Dalirani, R. (2013) .Urinary Tumor Necrosis Factor-Alpha AGood Indicator For Inflammatory Response in Pylonephritis.*Arch Pediatr Infect Dis*.**1**(2):87-91.

Mordi , R. M. and Momoh, M. I. (2009). Incidence of *Proteus* Spp. in wound infections and their sensitivity pattern in the university of Benin teaching hospital. *J. Biotech***. 8**(5):725-730.

Moya, **B.; Zamorano, L.; Juan, C.; Perez, J. L.; Ge, Y.; Oliver, A. (2010).** Activity of a New Cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against {beta}-lactam-resistant pseudomonas aeruginosa mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. *Antimicrob*. *Agents Chemother*. **54:** 1213-1217.

Mulroony, S. B.; and Hausinger, R. P.(2003).Nickel up takeand utilization by microorganisim. *FEMS Microbial*. Rev., **27** (23):239-261.

Murray, P. R.; Baron, E.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.and Yolken, R. H. (1999). Manual of clinical microbiology. 7th ed. A smpress. Washington. U.S.A.P.116-135.

Naber, K.G.; Hollauer, K.; Kirchbauer, D.; Witte, W.(2000). *In vitro* activity of gatifloxacin compared with gemifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin against uropathogen cultured from patients with complicated urinary tract infections. Int. *J. Antimicrob. Agents. Nov*. **16**(3): 239-243.

Naidu, K.S.B. and Devi, K.L.(2005). Optimization of thermostable alkaline Protease production From Species of bacillus using rice bran.African *J.of Biotechnology*.**4**(7):724-6 .

Nicolle ,L.E. (2001) . The chronic indwelling catheter and urinary tract infection Long-Term care .facility residents in infect . *control , Hosp*; **22** : 316-322 .

Nicolle, L.E. (2008). Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. *Urol. Clin. North Am.*, **35** (1): 1–12.

O'Hara, C. M. ; Brenner, F. M. ; Miller, J. M. (2000) . Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. Clinical Microbiology Reviews, **13**(4): 534-546.

Okamoto, M. ; and Oyasu, R. (1996) . Effect of transfected urothelial cell lines .*Inter.J.Cancer*.**68**(5):616-21.

Okesola, A. O. and Makanjuola, O. (2009). Resistance to third-generation cephalosporins and other antibiotics by enterobacteriacea in Western Nigeria. *Am. J. Infect. Dise*. **5** (1): 17-20.

Orrett , F.A. **(2001)** .Urinary tract infection in general practice in arural community in south trinidad .saudi ; *Med .J*. **22**(6) : 537-540 .

Parsons,H.K. ; Vitovski,S. and Sayer,J.R. (2004). Immunoglobulin A_1 proteases: a structure-function up data. *Biochemical Society Transaction.* **32**(**6**):1130-1132.

Pellegrino. R.; Scavone, P.; Umpiérrez, A.; Maskell, D.J.and Zunino, P.(2013). *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *J. Phatho. Dis.*, **2**(67):104-107.

Penner, J. L. (1981). The tribe proteeae P : 1204 – 1224 In:The Prokaryotes, Starr,M.p.; Stolp,H. ; Truper, H. G.; Balows,A. and Schlegel,H. C. (eds). Springer – Virlage , Berlin.

Pewitt , E. B. and Schaeffer, A. J. (1997) . Urinary tract infection in urology, including acute and chronic prostatitis.*Infect Dis Clin North Am.*, **11**(3):623–646.

Poore, C.A.; Coker, C.; Dattelbaum, J.D. and Mobley, H.L.T. (2001). Identification of the domains of UreR, an Ara C-linke transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis .J. Bacteriol*. 183 **(15):** 4526-4535.

Prescott, L.M.; Harley, J.P. and Klein, D.A. (2005). Microbiology: 780-798 Antimicrobiolgy chemotherapy. 6th ed., McGraw Hill, Boston, New York.

Queenan, **A. M. and Bush, K. (2007**). "Carbapenemases: the Versatile -Lactamases." *Clin. Microbiol. Rev* **20**: 440-458.

Raka, **L.; Mulliqi,-Osmani, G.; Berisha, L.; Begolli, L.; Omeragiq, S.; Parsons, L.; Salfinger, M.; Jaka, A.; Kurti, A.; Jakupi, X.(2004).** Etiology and susceptibility of urinary tract isolates in Kosova. *Int.J.Antimicrob.Agents. Mar*.23(Suppl 1): 2-5.

Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.and Deshpande. V.V. (1998). Molecular, and biotechnological aspects of microbial proteases *Microbiol.Mol.Biol.Rev*., (**61**):65-89.

Rashid ,T.; Tiwana, H.; Wilson, C.and Ebringer ,A.(2001). Rheumatoid arthritis as an autoimmune disease caused by *Proteus* urinary tract infections: A proposal for a therapeutic protocol. *IMA J*. 3:675–680.

Reddy's, S. (2002). Urinary tract (Kidney and Bladder) infection. *J. of Infection Disease,* **159**(4): 400- 600..

Reinhard Fünfstück ; Undine Ott; and Kurt ,G. Naber. (2006). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(Supplement 1): 72-77.

Sabubba, N. A. ; E. Mahenthiralingan and D. J. Stickler (2003). Molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* infections of the catheterized urinary tract. *Clin. Microbiol.* **41** (11) : 4961 – 4965.

Samaha-Kfoury, **J. N.; and Araj, G. F. (2003).** Recent developments in β-lactamases and extended-spectrum β-lactamases. *BMJ*. **327**: 1209-1213.

Sambrook, J.; Fritsh, E.F., and Maniatis, (1989) . Molecular cloning,laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

Schlager, T.A.; Clark, M.andanderson, S.(2001) .Effect of a single-use sterile catheter for each void on the frequency of bacteriuria in children with neurogenic bladder on intermittent catheterization for bladder emptying. *Pediatrics*,**108**(4)**:**71–74.

Schwannter , A. ; Dingely , A. J.; Ozbek, S. ; Rose-John , S. ; Grotzing, J. (2004). Direct determination of the interleukin-6 binding epitop of the interleukine -6 receptor by NMR spectroscopy .*J.Biol .Chem*.**279**(1):571-6.

Senior,B.W. (1999). Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzymes formed by diverse strains of *Proteus* species. *J. Med. Microbiol.* **48**(7):623-628.

Shahid, M. ; Malik, A. and Sheeba, V. (2003). Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmid and Ampc

β-lactamases isolated from hospitalized burn patients in a tertiary care hospital of North India. *J. Med. Microbiol*. **228**(2):181-186.

Shaikh,P.Zuber (2011). Cytokines and their physiologic functions in inflammation .*INTERNATIONAL J. OF PHARMACY AND LINE LIFE*.**2**(11).

Sheu, J.N; Chen, M.C; Lue, K. H. Cheng, S. H. ; Lee, I. C.; Chen, S. M.; Tasy , G. J. (**2006).** Serum and urine levels of interleukin-6 and interleukin-8 in children with acute pyelonephritis.**36**:276-82.

Silva, J.; Gatica, R.; Aguilar, C.; Becerra, Z.; Garza-Ramos, U.; Velazquez, M.; Miranda, G.; Leanos, B. ; Solorzano, F.and Echaniz, G. (2001). Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J. Clin. Microbiol*., **39**(9)**:**3193-3196 .

Smith ,P.W.; Siep ,C.W.; Schaefer , S. C. and Dixon ,C.B .(2000) . Microbiologic survey of long term care facilities .*Infect , control .epidem* .**28** : 8-13 .

Sobel .JD.;Kaye, D. (2000). Urinary tract infections. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (ed). Mandell, Douglas and Bennetts Principles and Practice of Infectious Diseases. (5^{th} ed). *Philadelphia: Churchill Livingstone*; **62**: p 773-805.

Sosa,V. ; Schlapp,G. and Zunino,P.(2006). *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. *Microbiol*. **152:**2149-2157.

Spanu, T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosanti, G.; Toniolo, A.; Fadda, G.; and The Italian ESBL Study Group (2002).

Occurance of extended-spectrum β-lactamases in members of the family enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to β-lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrobial Agents . Chemotherapy. Jan.* **46** (1): 196-202.

Stankowska ,Dorota .; Kwinkowski, Marek .; Kaca ,Wieslaw .(2008). Quantification of *Proteus mirabilis* virulence factors and modulation by acylated homoserine lactones. *J. Microbiol. Immunol. Infect*.,**41**(3):243-253.

Stickler, D. J.(2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Rev. Nature. *Clin. Urol*. **11**(5): 598-608.

Stickler, D. J. and Morgan, S. D. (2006). Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms development on urinary catheters. J. *Med. Microbiol.* **55**, 489-494.

Svanborg , C.; Godaly, G.; Hedlund, M. (1999). Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Current Opinion in Microbiology*;**2**:99–105.

Swierzko, A.S.; Kirikae, T.; Kirikae, F.; Hirata, M.; Cedzynsk, M.; Ziolkowski, A.; Hirai, Y.; Kusumoto, S.; Yokochi, T.;and Nakano, M.(2000). Biological Activities of Lipopolysaccharides Of *Proteus* Species & Their Interactions With Polymyxin-B and An 18-Kda Cationic Antimicrobial Protein (cap 18) Derived Peptide. *J.Med.Microbiology*. **49**(2): 127-138.

Takeuchi, H.; Yamamoto,S.; Terai, A.; Kurazono,H.; Takeda,Y.; Okada,Y.and Yoshida,O.(1996). Detection of *Proteus mirabilis* urease gene in urinary calculi by polymerase. chain reaction. *International journal of Urology* , **3**(3):202-206.

Tangho, E. A. and Mcaninch, J. W. (2004) . Bacterial infection of the genitourinary tract in General Urology .Smith (Edi).*United State of American:MC Graw-Hill Companies Inc*., 203-227.

Tanaka, **T.; Kawase, M.; Tani, S.(2003).** Urease inhibitory activity of simple α,β-unsaturated ketones. *Life Sciences*. **73**: 2985-90.

Tanka , T. ; Kawase , M. and Tani , S. (2004). α-hydroxyketones as inhibitors of urease .*Bioorganic and medicinal chemistry*. **12**: 501-5.

Thaler, E.R. ; and Kennedy , D.W. (2000) . Cited in human ,H.D.; Dupont, H.L. Gradner,L.B. Griffin,J.W. Textbook of internal Medicine. 4thed. Wolters kluwer company.USA.

Thomson, A.W. (1998). The Cytokines Handlbook **.**3 rd ed.: Academic Press, San Diego, P.1017.

Thureen ,P.J.; Reiter, P.D.; Gresores ,A.; Stolpman, N.M.; Kawato, K.andHall, D.M. (1999). Once- versus twice-daily gentamicin dosing in neonates 34 weeks' gestation: cost-effectiveness analyses. *Pediatrics*,**103**(3):594-598

Torzewska, A.; Staczek, P. and Rozalski, A. (2003). Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysaccharide. *J. Med. Microbiol*. **52**(6): 471-477.

Toth , V.; Emody, L. (2000) . *Proteus* virulence: in-vement of the pore forming alpha-hemolysin. *Acta.Microbiol.Immunol.Hung*., **47**(4): 457-70.

Ueheling ,D.T. ;Johnson, D.B. ;Hopkins ,W.J. 1999).The urinary tract response to entry of pathogene .*World J. Urol***.17(6)**: 351-358.

Umpierreze,A.;Scavone,P.;Romanin,D.;martenMarques,J.;Alejandre Chabalgoity, J.;Rumbo,M.;Zunino,P.(2013). Innate immune responses to Proteus mirabilis flagellin in the urinary tract.1-9.

Untergasser, A. ; Nijveen , H. ; Rao, X. ; Bisseling , T. ; Geurts , R. ; Leunissen , J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res. 35(Web Server issue):W71-74.

Verrier, J. K. (2000) . Screening after urinary tract infection in childhood. *Arch Dis Child*; **2**: 123-124.

Volk , W.A. Benjamin , D.C.; Kander , R. J. ; and Prson, J. T. (1997) . Essential Of Medical Microbiology. (4th) ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia.

Wagenlehner, F.M.; Weidner, W.and Naber, K.G. (2009). An update on uncomplicated urinary tract infections in women. *Curr. Opin. Urol.*, **19**(4): 368-374.

Walker, K. E., S. Moghaddame-Jafari, C. V. Lockatell, D. Johnson, and R. Belas.(1999). ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol. Microbiol*. **32:**825–836.

Wozniak , T.M .; Ryan , A.A.; Triccas , J.A.and Britton ,W.J.(2006). Plasmid IL-23,but not plasmid IL-27 Enhances the protective efficaay of Adna vaccine aginst *M.tuberculosis* infection .*infected.Immune*.,**74**:65-557.

Yao, **J. D. C. and R. C. J. Moellering (2003).** Antibacterial Agents. Manual of Clinical Microbiology P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Yolken. Washington, DC.; *American Society of Microbiology***:** 1039-1073.

Zhanel , G. G. ; J. A. ; Karlowsky, G. K. M. ; Harding, A.; Carrle, T.; Mazzullit and Low,D.E.A. (2000) . Acanadiannational surveillance of urinary tract isolates from outpatients: Comparision national of the activites of trimethoorim-sulfamethoxazol,ampicillin, mecillinam , ,nitrofuration and ciprofloxacin .*J.Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(4):1089-1092.

Zhao,H. ; Johnson,D. E. and Mobley,H.L. (1999). Identification of *Proteus* and rponassociated genes of uropathogenic *Proteus mirablis* by negative selection in Mose model of ascending U.T.I. *Microbial*:**154**:185-95.

Zhao,H. ;Thompson, R. B.;Lockatel, V.; and Mobley,H. L. T. (1998). Use of Green Fluorescent protein to assess urease gene expression by uropathogenic *Proteus mirablis* during experimental ascending U.T.I. *Infect and Immun*. **66** :330-5

إسماعيل، سعيد محمد عوض. (٢٠٠٤). إستخلاص وتوصيف إنزيم اليوريز من بكتريا المتقلبات المعزولة من مرضى خمج المسالك البولية في اليمن. إطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. العراق.

الجميلي، بان عباس فاضل. (2001). دراسة الفعالية الانزيمية للبروتيس المعزولة من مختلف الأصابات وعلاقتها بمضادات الحياة. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

الجناحي ،مروة راهي عبد المنعم. (٢٠١٣).دراسة وراثية لبكتريا *Proteus.mirablis* المسببة لالتهاب المجاري البولية في الاطفال .رسالة ماجستير ،كلية التربية .جامعة القادسية.

الحسيني،رعد خليل .عبد اللطيف،رغد والجوفي ،اقبال خضر(٢٠٠٩).دراسة انتاجية بعض عوامل الضراوة لبعض البكتريا المعزولة من ردهات الاطفال الخدج.مجلة علوم المستنصرية.٢(٢٠).

خلف ، صبحي حسين ،كاظم ، بشرى علي.(٢٠١١).دراسة عن تنميط جرثوبة *Proteus mirablis* المعزولة من المسالك البولية.مجلة بغداد للعلوم.٩(٢).

خميس ,ازهر صبحي (٢٠١٣).دراسة الحساسية الدوائية للجراثيم المعزولة من خمج المسالك البولية في مدينة بعقوبة.كلية التربية للعلوم الصرفة .مجلة ديالي للعلوم الصرفة.٣(٩).

خورشيد، ثري أحمد (٢٠٠٥). دراسة جرثومية لبعض مسببات أخماج المسلك البولي للمرضى في مستشفى آزادي العام في مدينة كركوك. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة تكريت. العراق.

الربيعي ، بهاء عبد الله لفتة (٢٠٠١) دراسة انزيم Protease المنتج من بكتريا *Proteus mirabilis* المسببة لاصابات الجهاز البولي. رسالة ماجستير- كلية العلوم – جامعة بغداد.

السعدي، حسن علي حسين (٢٠٠٥). دراسة بكتيرية ومناعية للإنزيم الحال للبروتين نوع – أ المستخلص من بكتيريا *Proteus mirabilis* المعزولة من خمج السبل البولية. إطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. العراق.

سلمان , آفاق رشيد. (2008) . فوعة بعض انواع المتقلبات Spp *Proteus* المعزولة من خمج الاذن الوسطى في بعقوبة وضواحيها. رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة ديالى.

الشويخ،رنا مجاهد عبدالله والعاني ،سعود رشيد وسمعان ،سمير فتح الله ،(٢٠٠٩) ،تنقية وتوصيف انزيم البروتيز Proteaseمن بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من بعض التهابات الجروح والحروق ،مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة ،٣(٣): ٨٩٤١-١٩٩١.

الطائي، كرامة تحرير أحمد .(٢٠٠٢). دراسة تصنيفية وجزيئية لبعض عوامل الضراوة للبكتريا الممرضة *Proteus mirabilis* . رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد. العراق.

الطائي، هادي رحمن رشيد. (2005). دراسة بكتريولوجية وكيموحيوية وجزيئية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من إلتهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات بغداد. رسالة دكتوراه, كلية العلوم, الجامعة المستنصرية.

الطائي،خالد عبد الكاظم هادي .(٢٠١١).دراسة وراثية لبكتريا المتقلبات المعزولة من الاغشية الحيوية للعدد الطبية العلاجية .رسالة ماجستير.كلية العلوم.جامعة بابل.

عبد الرزاق، رغد عبد الطيف. (2006). دراسة بعض عوامل الضراوة للبكتريا المعزولة من ردهات الاطفال الخدج ومقاومتها للمضادات الحيوية والمطهرات. رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة المستنصرية.

العزاوي ،رغد حربي ،رباب كزار,والاء رحيم .(٢٠١١) دراسة التأثير التثبيطي وتقدير كمية البروتين للبروستين المستخلص من بكتريا *Proteus mirablis* المعزلة من عينة الادرار، مجلة جامعة النهرين. ١٤ (٣).

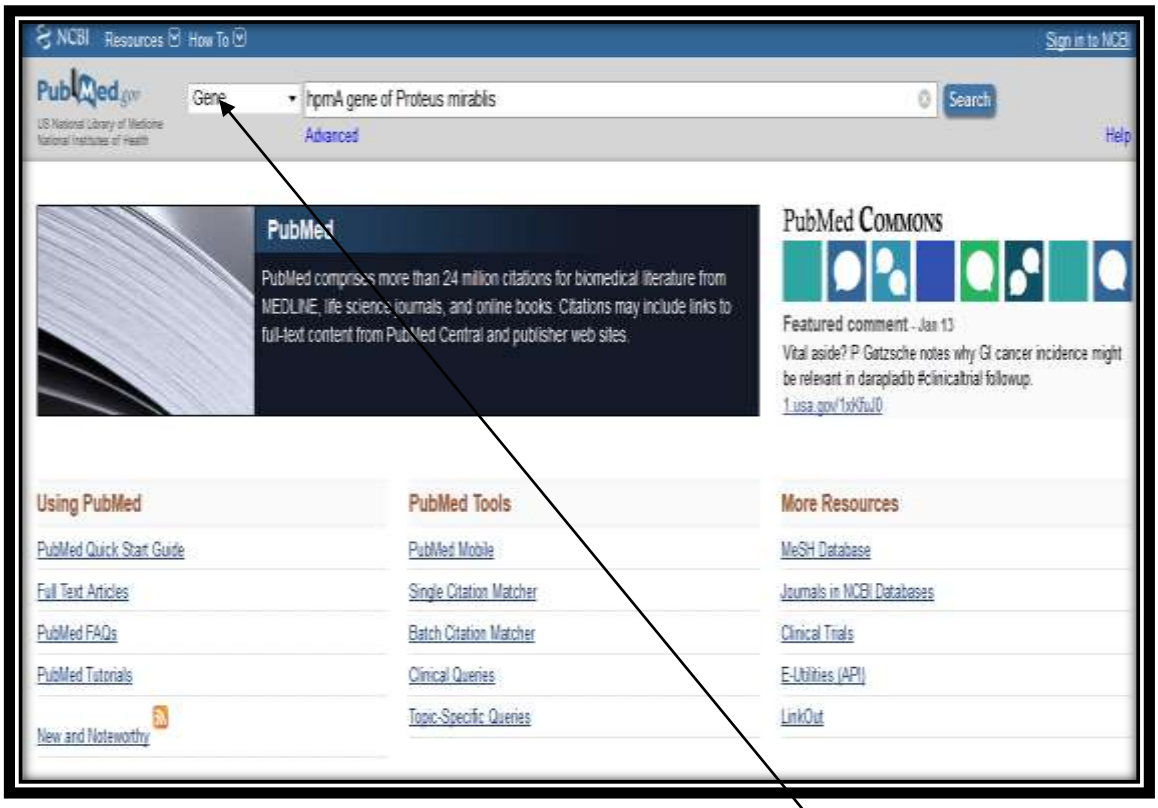
كاظم، بشرى علي. (٢٠٠٥). عزل ودراسة مرضية لجرثومة *Proteus mirabilis*. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الموصل. العراق.

كاظم،بشرى علي وخلف ،حسين خلف .(٢٠١٢).دراسة عن تنميط جرثومة بكتريا *Proteus.mirablis* المعزولة من اصابات المسالك البولية ،مجلة بغداد للعلوم ٩(٢):٢٢٩

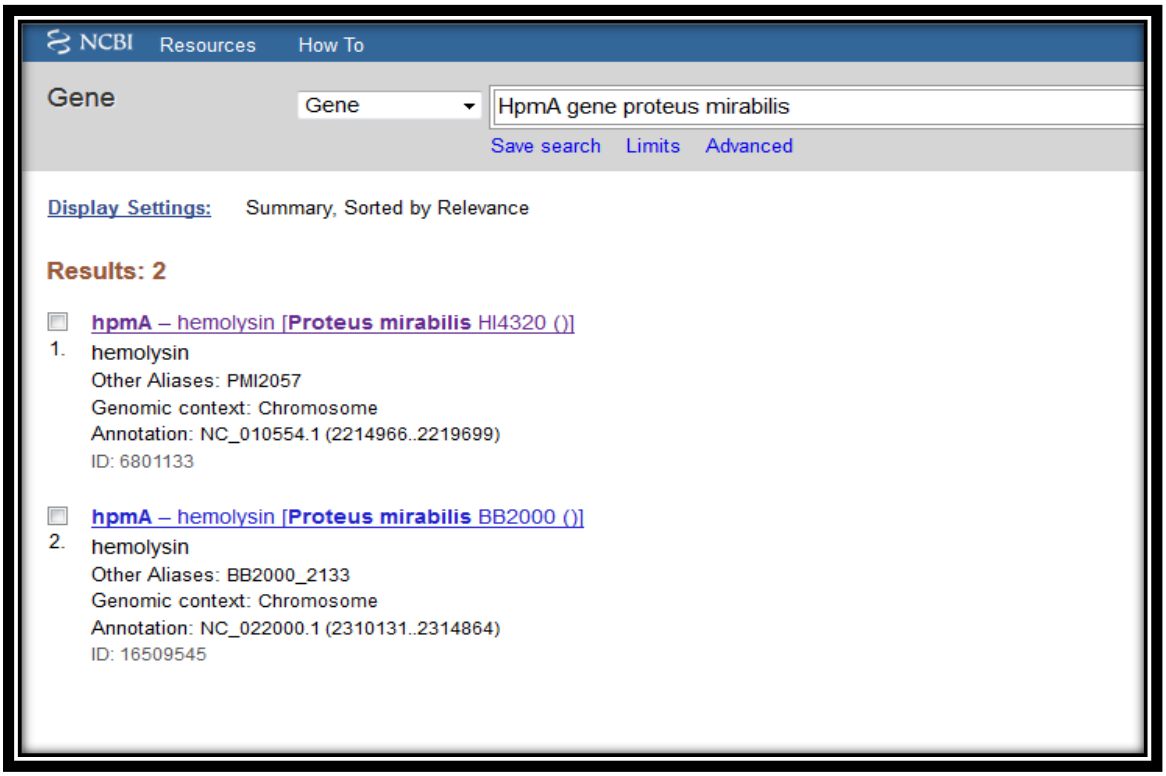
المرجاني ، محمد فرج شذر. (٢٠٠٠). دراسة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وبعض عوامل الضراوة لبكتريا *Proteus mirabilis* المسببة لالتهابات المجاري البولية ودراسة المحتوى البلازميدي. رسالة ماجستير- كلية العلوم – الجامعة المستنصرية.

مصطفى،ديانا نور الدين. (٢٠١١).تطفير المحتوى الوراثي .مجلة التربية والعلم . ٢٤(٢).

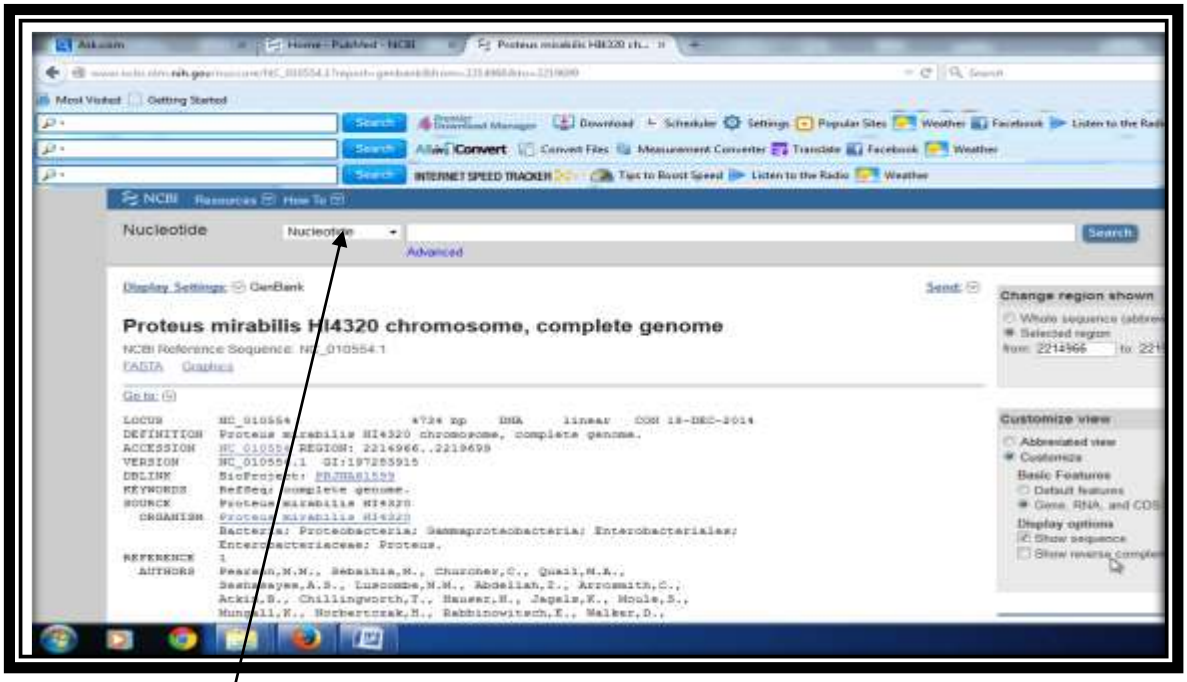
ياسين, نجلاء نبهان. (٢٠٠٨). دراسة تأثير الأوزون المذاب في الماء على بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من المصابين بجروح وحروق مختلفة وعلى عملية شفاء الحيوانات المختبرية المصابة بالبكتريا نفسها. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد. العراق.



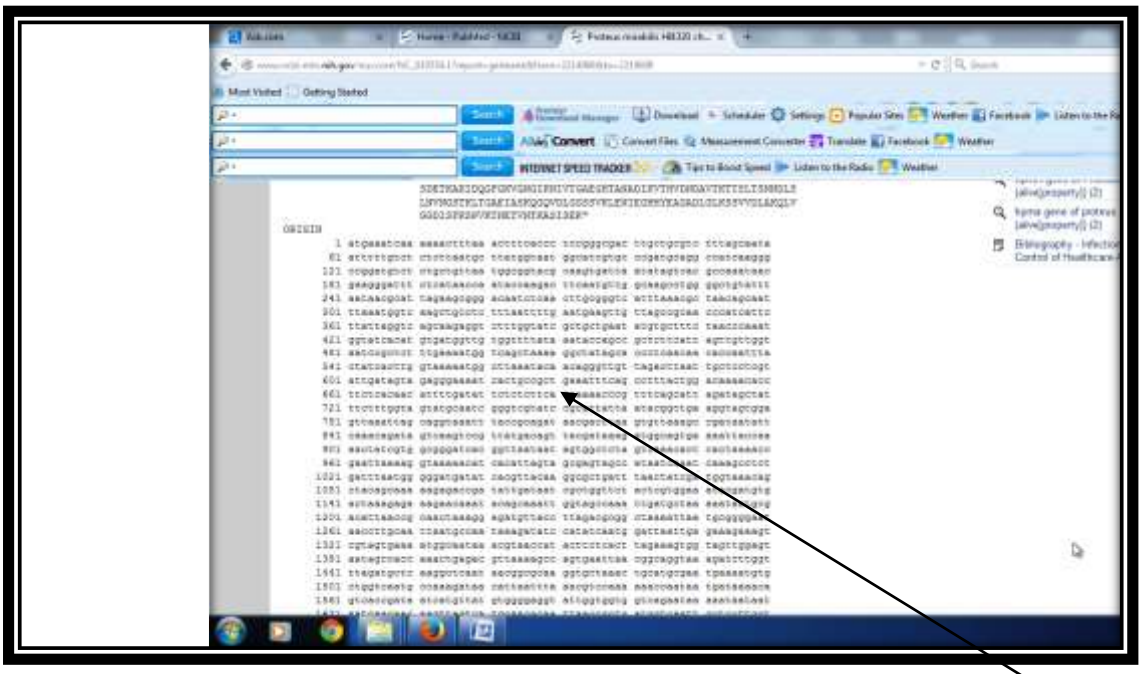
١-الدخول الى الموقع الالكتروني NCBI ومن ثم كتابة اسم البادئ المراد تصميمة مع نوع البكتريا في حقل الـ GENE كما في الشكل .



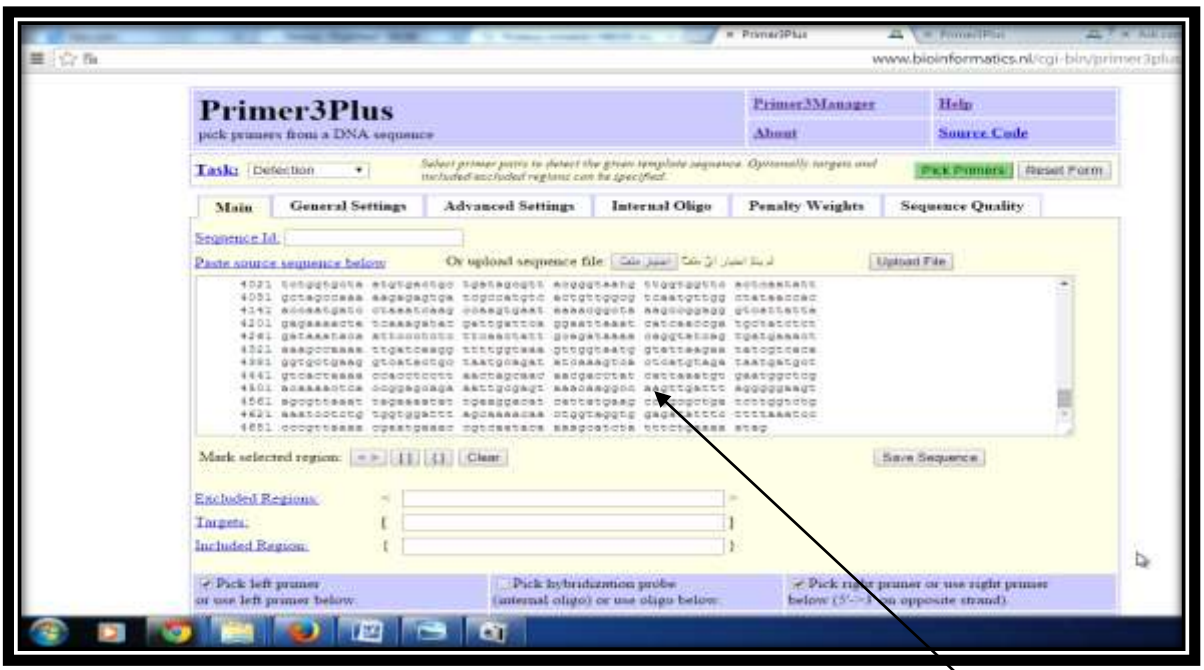
٢-سيعطي الموقع تقريرا كاملا عن البادئ من حيث اسمه الكامل واسم السلالة البكترية الذي يوجد فيها وكما مبينة بالشكل



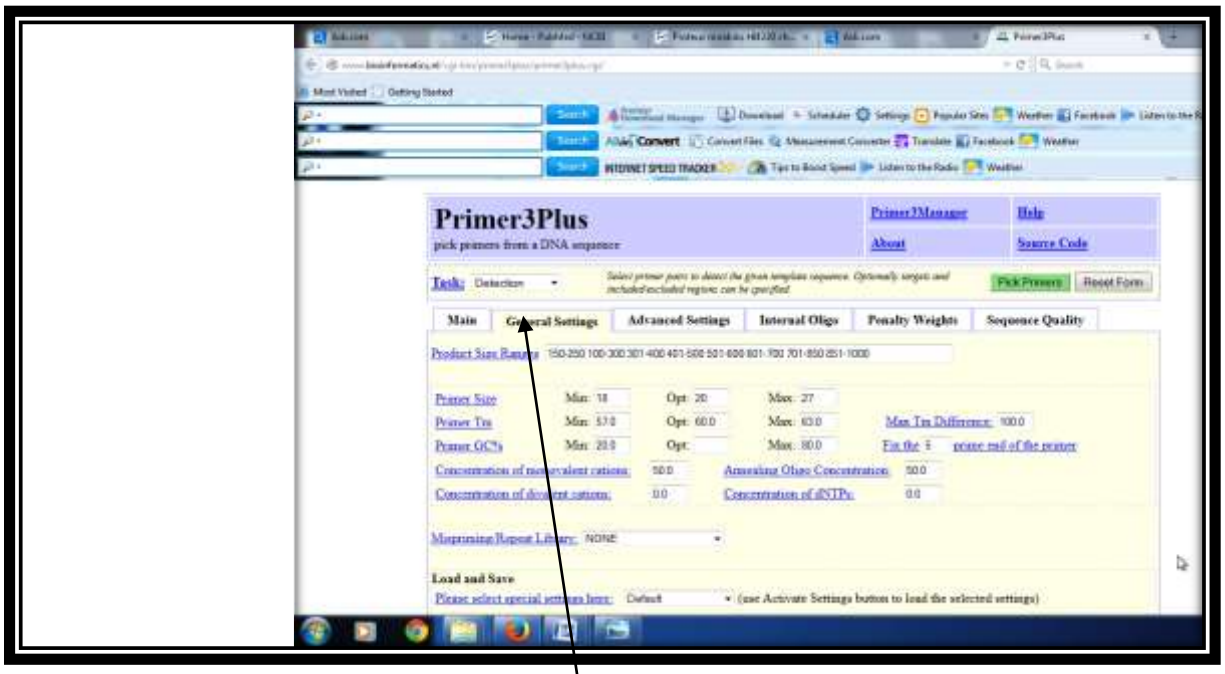
٣-الحصول على التسلسل الجيني الـ Sequence للبادئ من بنك الجينات Gene Bank وكما مبين بالشكل.



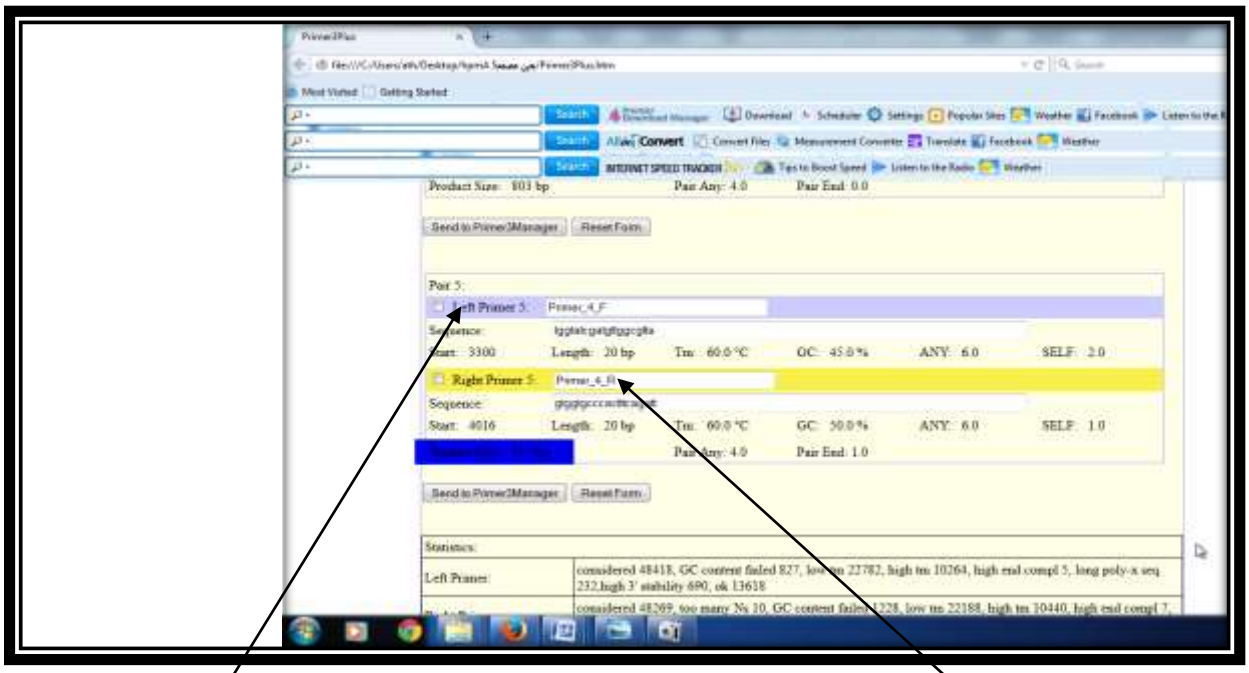
٤- نسخ التسلسل الجيني الكامل الـ Sequence للبادئ كما مبين بالشكل والانتقال الى برنامج Primer 3 Plus وكما يأتي .



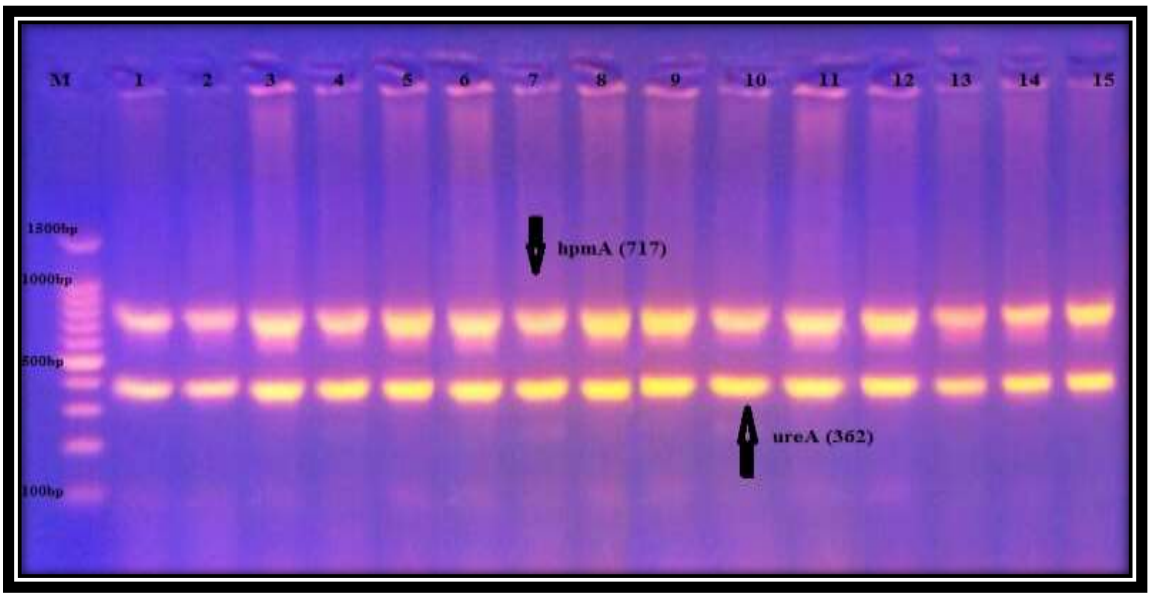
٥- لصق الـ Sequence للبادئ في الحقل المخصص له في برنامج Primer 3 plus وكما مبين بالشكل.



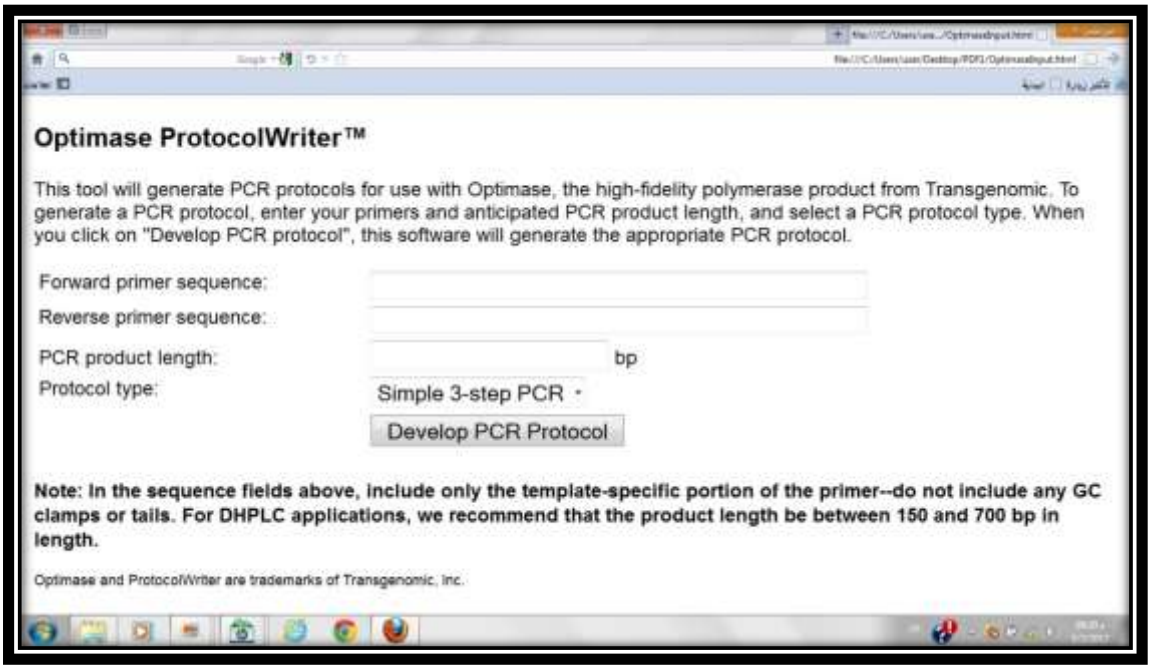
٦- يتم ضبط الاعدادات الملائمة للبادئ من الايعاز General settings مثل درجة الحرارة وحجم ناتج التضخيم وغيرها ومن ثم النقر على ايعاز Pick primers الموجود باللون الاخضر في الشكل.

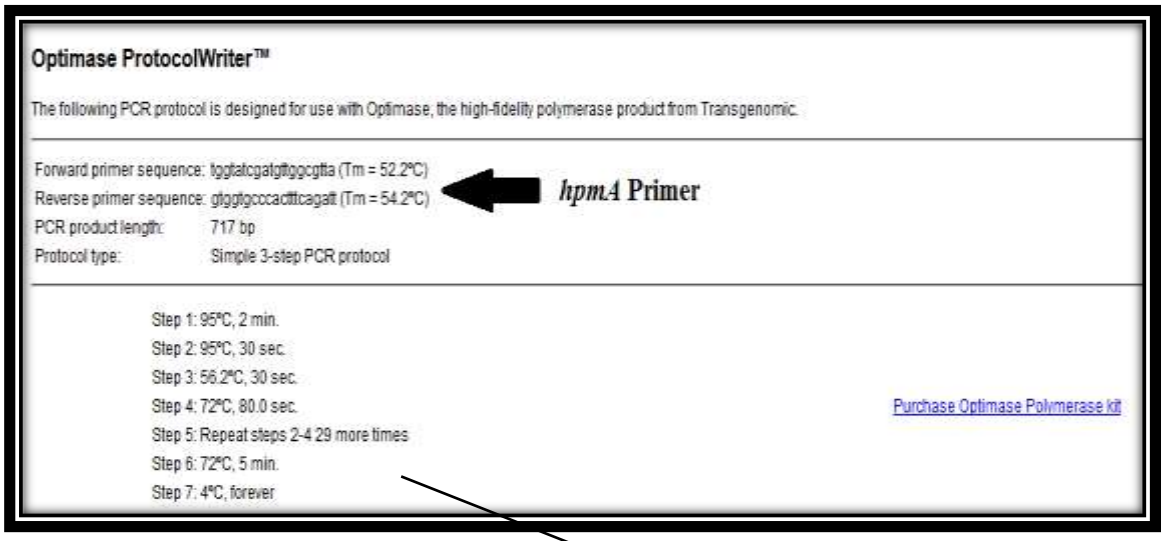


٧- اخيرا يعطي برنامج Primer 3 plus البادئ المصمم والذي يتكون من البادئ الامامي F والبادئ العكسي F كما مبين بالشكل .



٨-الشكل يبن ناتج تضخيم البادئ المصمم *hpmA* والذي يساوي (٧١٧) المرحل كهربائيا على هلام الاكاروز بأستعمال تقنية الـ Multiplex PCR.





- استعمل برنامج **Optimase Protocol Writer™** في ضبط (برنامج الدورات الحرارية) للبادئ المصمم *hpmA* والبادئات الاخرى المستعملة في تفاعل انزيم البلمرة PCR بعد ادخال تسلسل وحجم ناتج البادئ وكما مبين.

Summary

In the present study ,170 blood and urine sample were collect of from Patients suffering from urinary tract infection from both sexes and from different ages , who attended to Al-Diwanyia Teaching Hospital , and Al-Diwanyia women and children Hospital in Al-Diwanyia city ,during the period from October 2013 to April 2014. The biochemical tests showed that 49% (%28.82) sample belong to *P.mirablis* . The results

also that females are highed to infection by urinary tract infection than males for the number of infected females was 33/49 (%67.19) While the number of infected males by urinary tract infection was 16 (%32.65).

The sensevity of *P.mirablis* bacteria samples was tested towards 12 type of antibiotics depending on the way of spreading disics , and the results showed that the resistence of all the samples under present study were in a rate of (%100) for each of the following antibiotics Amoxicillin/ Cluvanic acid, Rifampin, Erythromycine, a rate of the following antibiotic Chloramphenicol , Gentamicin , Nitrofuration , Cephalothin , Nalidic acid and Cefotaxim was (%61.22).As shown resistance rate Cephaloxin and Ciprofloxacin (%42.85 (%32.65) respectively While the results showed sensitivity in a rate (%100) to Impenem.

Some of the genes of virulence factors were investigated using Single and Multiplex Polymerase Chain Reaction Technique and they are *ureA* and *ureC* responsible for producing urease enzyme , *hpmA* ,Which is responsible for producing of hemolycin ,*zapA* Which is responsible for producing protease enzyme , *flaA* ,Which is responsible for flagella. For the rates of the appearance of these genes were (%96.66) , (%100) , (%100) , (%100) and (%86.66).respectively.

Also in the present study some of the indicating infections (Cytokines) Which has aconnection with urinary tract infection . For Tumor necrosis Factor – Alpha and Interleukine-6 were measured in the serum of the patients of the urinary tract infection caused by *P.mirablis* bacteria using Enzyme Linked Immunosorbent Assay technique ,for they found a high rising in the rate of these factors in the serum of the infected patient in the urinary tract infection .

The results showed the role of most of the genes responsible for the virulence factors in isolates that isolated in the Al-Diwaniyah ,and that there is a relationship between high IL-6 and TNF-α in patients that infected with urinary tract infection caused by *P.mirablis*.

Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Al-Qadisiya University
College of Science
Department of Biology

Immunolgical and Molecular Study for *Proteus* .spp isolated from Urinary Tract Infection disease in AL-Diwanyia City

A Thesis

Submitted to The Council of TheCollege of Science University of Al-Qadisiya as Partial Fulfillment of The Requirements for The Degree Of Master of Science inBiology / Microbiology

By

Hind Hussien Ali

(B.Sc/ Biology/ Al-Qadisiya University (2012)

Supervised by

Assist. Prof. Dr.Maitham Ghali Yousif

2015 A.D *1436 A.H*