جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية/كلية العلوم

قسم/علوم الحياة

"عنوان البحث"

"عزل وتشخيص بكتريا Proteus Volgaris من اشخاص يعانون التهاب المجاري البولية"

بحث مقدم الى مجلس كلية العلوم قسم علوم الحياة كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة...

اعداد الطالب

علي كاظم كريم

بأشراف

الأستاذ :ديار خلف فليفل

١٤٣٧هـ

٢٠١٦ م

الخلاصة :

أجريت هذه الدراسة لعزل وتشخيص بكتريا Proteus vulgarius من المرضى المصابين بالتهابات المجاري البولية (UTI) وقد جمعت 30 عشوائية من مستشفيات مختلفة من محافظة الديوانية وقد اظهرت نتائج العزلات ان 16% تقريبا من العينات الماخوذة من الاشخاص الذين يعانون التهابات المجاري البولية UTI سببها بكتريا Proteus vulgarius . اوضحت دراسة حساسية العزلات لبعض المضادات ان اعلى مقاومة كانت تبديها بكتريا Proteus vulgarius لمضاد Ampicillin بنسبة 100% بينما بلغت مقاومة Ciprofloxacin 0%.كذلك تم تشخيص بكتريا Proteus vulgarius بالاعتماد على التصبيغ بصبغة غرام Cram Stain والفحوصات البايوكيميائية المختلفة مثل فحص الاندول Indol test وتخمر الكلوكوز Glucose fermentation.

المقدمة

تعد التهابات المجاري لبولية احد المشاكل الطبية التي يعاني منها معظم دول العالم حيث تاتي بالمرتبة الثانية بعد التهابات المجاري التنفسية اذ يتعرض الذكور والاناث للاصابة بهذا المرض لاسيما وانه يعد من المسببات الرئيسية لوفاة الاطفال الرضع [1] . تعد بكتريا Proteus من اهم العوامل المسببة لالتهابات المجاري البولية ولاسيما انها تحطم اليوريا مما يؤدي الى ترسيب كميات املاح الفوسفات على جدران المثانة التي بدورها تعمل كنواة لتكوين الحصى [2-3].تصنف التهابات المجاري البولية من حيث الامراضية (Pathogeneses)الى التهابات المجاري البولية المعقدة Complicated U.T.I والتهابات المجاري البولية غير المعقدة[U.T.I Uncomplicated 5-4]يضم جنس المتقلبات خمسة انواع هي:

P.mirabilis،penneir،p.vulgaris،p.myxoffciens ، p.hauser وذلك بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية [6].

تعد بكتريا المتقلبات Proteus من النبييت الطبيعي (Normal flora) في القنات المعوية للاشخاص الاصحاء اي انها تكون رمية Saprophyte وممكن ان تتواجد كممرضات انتهازية pathogens(Opportunistic) مسببة العديد من الالتهابات عند مغادرتها مكانها الطبيعي [9-8-7] جنس المتقلبات Proteus عصيات قصيرة سالبة لصبغة غرام ذات طول (2-3) مايكرون وعرض[0.8-4] مايكرون وتمتاز بظاهرة الاشكال (Pleomorphisum) منها عصيات كروية قصيرة غير متحركة او بشكل خيطي طويلالذي يمتاز بحركة نشطة بواسطة اسواط محيطية , لا تحتوي على محفظة(Capsule) غير مكونة للابواغ [11,10]تمتلك بكتريا Proteus vulgarius العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على احداث التهابات ومنها انتاج اليوريز وانتاج الهيمولايسين والقابلية على الالتصاق بالخلايا الطلائية والحركة بشكل امواج (الانثيال) وانتاج البكتريوسينات [12-13-14] ان الاستعمال العشوائي المتزايد لمضادات البتالاكتام في علاج الالتهابات المختلفة ومنه التهابات المجاري البولية ادى الى زيادة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية من قبل البكتريا المسببة للالتهابات [15-16] تعد بعض المعادن كالنحاس والخارصين والكوبلت والنيكل والحديد عناصر ضرورية للفعاليات الايضية للخلايا البكتيرية

وبتراكيز منخفضة في حين يعد الزئبق والكادميوم من العناصر غير الضرورية والتي تكون سامة لتلك الاحياء المجهرية وان كانت بتراكيز ضئيلة [17-18] تستطيع البكتريا التكيف مع وجود بعض عناصر المعادن الثقيلة وهذا التكيف عن طريقين لولهما امتلاك بعض انواع البكتريا قابلية وراثية لمقاومة التراكيز العالية للمعادن الثقيلة وثانيها اكتسابها البلازميدات الحاملة لجينات مقاومة المعادن [19-20] ولاجل تكوين صورة واضحة عن اهمية هذه البكتريا من الناحية المرضية جاء هذا البحث ليسلط الضوء على مقاومتها للمضادات الحياتية وتحملها لبعض المعادن الثقيلة .

اولا: **<u>المواد والادوات المستخدمة في التجربة.</u>**

١. اوساط غذائية :

أ:وسط اكار الدم Blood agar .

ب:وسط الماكونكي اكار Mueller agar.

ج:وسط مولرهنتون اكار Mueller- Hinton agar.

٢. عينات الاشخاص المصابين :

٣. اطباق بترية .

٤. بيكرات ذات حجم (500,250)مل .

٥. ماسحات قطنية معقمة .

٦. حاضنة .

٧. اوتوكليف.

٨. غرفة التعقيم.

٩. ملقط لحمل اقراص المضادات الحيوية .

١٠. مجهر ضوئي .

١١. شرائح زجاجية

١٢. صبغة غرام .

١٣. مصباح بنزين.

١٤. ورق نشاف .

١٥. Loop.

١٦. جهاز الطراد المركزي.

١٧. مضادات حياتية .

١٨. ثاقب فليني .

ثانيا : <u>طريقة العمل</u>.

١- جمع العزلات البكتيرية : تم جمع 30 عينة عشوائية من مستشفيات مختلفة في مدينة الديوانية من اشخاص كانوا يعانون التهابات المجاري البولية(U.T.I) .زرعت هذه العينات بطريقة التخطيط على الوسط الاغنائي اكار الدم Blood Agar والوسط التفريغي اكار الماكونكي Macconeky Agar وذلك للتحري عن وجود بكتيرياprotus valgaris لالتهاب المجاري ثم خضعت العزلات للتشخيص باتباع التشخيص المظهري البايوكيميائي [21] .

٢- العزل والتشخيص:نشرت العينات بواسطة Swab بطريقة التخطيط على وسط Blood Agar اكار الدم وسط Macconeky Agar الماكونكي اكار وحضنت الاطباق بدرجة (37م) لمدة (24) ساعة . وقد شخصت المستعمرات النامية بالاعتماد على ظاهرة الانشيالات (Swarming).
وكذلك رائحتها المميزة على هذا الوسط التي تشبه رائحة السمك فضلا عن لون المستعمرات الشاحبة على الوسط التفريغي الماكونكي اكار كونها غير مخمرة لسكر اللاكتفز .

٣- اختبار حساسية البكتيريا للمضادات حيوية : اعتمد هذا الاختبار على استخدام وسط مولر هنتون اكار Mueller- Hinton agar . حي اخذت مسحة بواسطة ماسحة قطنية معقمة (Sterile cotton swab) وزرعت على الوسط بالتخطيط بثلاث اتجاهات للحصول على نمو متجانس وتركت الاطباق لتجف لمدة 15 دقيقة ثم اضفت اقراص المضادات الحيوية مثل Tetracyclin,Ampicillin باستخدام ملقط معقم وحضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 18 ساعة قورنت النتائج حسب ما جاء في [21].

٤- **التصبيغ بصبغة غرام.**

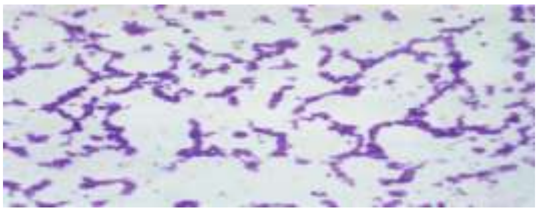
مكونات صبغة غرام:

١- الصبغة الاساس البنفسج البلوري Crystal violet .
٢- الصبغة البديلة السفرانين Safranin.
٣- محلول اليود .
٤- الكحول Alchol.

طريقة العمل بصبغة غرام :

١- تحضير اللطخة البكتيرية باستخدام محلول ملحي ونجففه بأمراره على لهب مصباح بنزين .

٢- نغمر الشريحة بمحلول اليود لمدة 30-60 دقية ثم نغسل الشريحة جيدا بماء الحنفية الهادئ.
٣- غمر الشريحة بمحلول اليود لمدة 30-60 ثانية ثم نغسل الشريحة جيدا بماء الحنفية الهادئ.
٤- غمر الشريحة في الكحول لمدة 30 ثانية ثم نغسل االشريحة جيدا .-
٥- نغمر الشريحة في الصبغة البديلة السفرانين Safranin لمدة 30-60 ثانية .
٦- نغسل الشريحة ثم نجففها ونفحصها تحت المجهر .



٥- حساسية العزلات لبعض الفحوصات البايوكيميائية مثل :
اولا:فحص الاندول Indol test.
ثانيا:تخمر الكلوكوز Glucose fermentation

اختبار الاندول : Indol Test

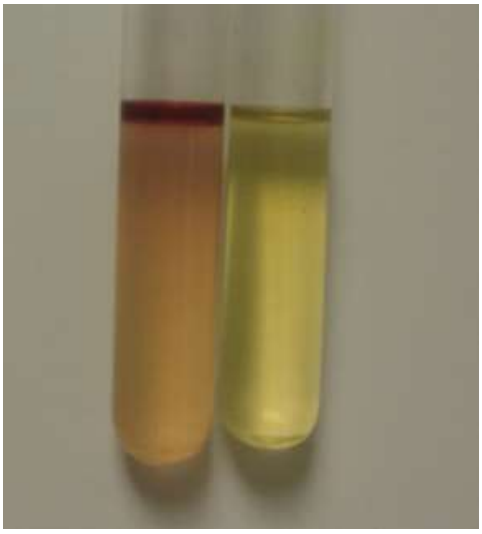
الاندول مركب عضوي له الصيغة C8H7N وهو من المركبات العطرية الحلقية غير المتجانسة له بنية ثنائية الحلقة تتالف من حلقة سداسية من البنزين مدمجة مع حلقة خماسية حاوية ذرة نتروجين (حلقة البيرول) يوجد على شكل مسحوق صلب عديم اللون ولماع تعد طريقة فيثر للاندوز من بين العديد من الطرق الصناعية لتحضيره.

يستخدم هذا الفحص لتحديد قدرة البكتريا على تكسير الحمض الاميني المسمى Tryptophan بواسطة انزيم Tryptophanase مع تكوين الاندول، حمض البيروفيك والامونيا ،تتكون حلقة حمراء على السطح وهي دليل على انتاج مركب الاندول حيث يتم الكشف عن هذه الحلقة بعد اضافة كاشف كوفاكس.

طريقة العمل:

١- بواسطة الناقل لقح وسط ماء الببتون بالبكتيريا .
٢- تحضن الوسط لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م.

٣- بعد انتهاء فترة الحضانة اخراج الانابيب من الحاضنة .
٤- اضف نصف مللتر من كاشف كوفاكس الى كل انبوبة من الأنابيب.
٥- اقراء النتيجة تكون النتيجة موجبة في حالة تكون حلقة حمراء وسالبة عندما تكون الحلقة ذات لون اصفر .



النتائج والمناقشة:

تم التحري عن وجود بكتريا proteus vulgaris المسببة لالتهابات المجاري البولية وذلك في 30 عينة ادرار في اشخاص بعمر (20-30)سنة يشكون من اعراض تدل على اصابتهم بالتهابات المجاري البولية ،فكانت جميع العينات ملوثة بأنواع مختلفة من البكتريا وبنسبة تلوث عالية جدا .

كانت النتيجة الموجبة للزرع البكتريولوجي لبكتريا proteus vulgaris هي 5 حالات اصابة ببكتريا جنس المتقلبات proteus vulgaris اي بنسبة (16%) اما بقية العينات التي اعطت نتائج موجبة للزرع البكتريولوجي فقد كانت تعود الى اجناس اخرى .

تم اختبار حساسية عزلات proteus vulgaris للمضادات الحيوية والبالغ عددها (7) مضادات حيوية واظهرت النتائج من خلال قياس قطر منطقة تثبيط النمو ومقارنتها بما ورد من قيم الاقطار القياسية في Nccls ان اعلى مقاومة كانت لمضاد Ampicillin و Tetracycline و Amoxicillin و Erythromycin و Choramphenicol بلغت مقاومة Ampicillin 100% اما اقل مقاومة لمضادات ciprofloxacin و ofloxacin اذ بلغت مقاومة الاول هي (0 %).

جدول رقم (١) يوضح حساسية عزلات proteus vulgaris للمضادات الحيائية.

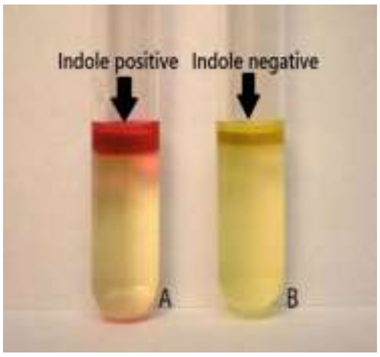
Antibiotics	Sensitivity
Ciprofloxacin	Sensitive
Ofloxacin	Sensitive
Color ampnencol	Rsistance

Erythromycin	Resistance
Amoxicillin	Resistance
Tetracycline	Resistance
Ampicillin	Resistance

فالبكتريا السالبة لصبغة غرام proteus vulgaris ابدت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية في حين لم تظهر اي مقاومة لـ ciprofloxacin [22] ان ظهور المقاومة لمضادات شائعة الاستخدام في العزلات البكترية الملوثة للادرار والتي تعرف بكونها مسؤولة عن العديد من الاخماج المكتسبة في المجتمع والمستشفيات لدى الاشخاص الاصحاء يجعل من الخطورة بامكان تلوث واصابة الاشخاص بها مما يجعل من هذا الشخص اداة معدية (fomite) تلعب دورا مهما في نقل ونشر البكتريا المقاومة للأدوية(dray resistance bacteria) في المجتمع والتي تكون صعبة العلاج .

جدول رقم (٢) الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية لجرثومة proteus vulgaris :

Test	Result
Gram stain	-
Indol test	+
Glucose fermentation	+



1. Zunino, P.; Piccini, C. & Legnani-Fajard, C. (1999). Growth, Cellu lar Differentiation And Virulance Factor Expression By Proteus mirabilis In Vitro And In Vivo. J.Med.Microbiol. 48: 527-34.

2. Mobley, H.L.T. & Hausinger, R.P. (1989). Microbial Urease: Significance, Regulation & Molecular Characterization. Microbiological Reviews. 53(1): 85-108.

3. AL-Taai, H.R.R. Bacteriological ,Biochemical and Molecular Study of Proteus mirabilis .Ph.D. thesis isolated from urinary tract infections in some Hospital of Baghdad city submitted to the college of science AL- Mustansiriya university (In Arabic) .

4.Torzewska, A.; Staczek, P. & Rozalski, A.(2003). Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of Proteus endotoxin polysaccharides. J.Med. Microbiology. 52(6): 471-7.

5. 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.

6. O'hara, C.M.; Brenner, F.M.& Miller, J.M.(2000). Classification, identification, and clinical significance of Proteus, Providencia and Morganella. Clinical Microbiology Reviews. Oct. 13(4): 534-46.

7. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; & Ginsberg, H.S. (1990). Microbiology. (4th) ed. Philadelphia.

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

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

10. Liaw, S.J., Lai, H.C.; Ho, S.W.and Wang, W.B. (2000). Inhibition Of Virulence Factor p-nitrophenylglycerol. J. Expression and Swarming Differentiation In Proteus mirabilis by Med. Microbiology.

11. Swierzko, A.S.; Kirikae, T.; Kirikae, F.; Hirata, M.; Cedzynsk, M.; Ziolkowski, A.; Hirai, Y.; Of Activities Biological M.(2000). Nakano, & T.; Yokochi, S.; Kusumoto,

Lipopolysaccharides Of Proteus Species & Their Interactions With Polymyxin-B, & An 18-Kda Cationic Antimicrobial Protein (cap 18) Derived Peptide. J.Med.Microbiology. 49: 127-38 .

12. 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.

13.Morcillo. MA.&Santamaria, J (1995). Whole-body retention and urinary and Faecul excretion of mercucy rats. Biochem.J 8: 301- 308.

14. Silver, S. (1983) Bacterial interactions with mineral cations and anions: Good ions and bad. In : Biomineralisation and Biological metal accumulation, PP. 439-457. Edited by P.westbroek and E.W. Jong. D. Reided Publishing Company.

15. Weatherburn, M.W.(1967). Phenol-Hypochlorite Reaction For Determination Of Ammonia. Analytical Biochemistry. 39(8): 971-4 .

16. Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive methode for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72: 248-55.

17. Bhattacherjee, J.W., Pathak, S.P. & Gaur, A. (1988). Antibiotic resistance and metal tolerance of Coliform bacteria isolated from Gomati river water at lucknow.

20.Filali, B.K., Taoufik, J.; Zeroual, R. Dzairi, F.Z.; Tslbi, M. & Blaghen, M. (2000). Waste water Bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Current. Microbiol, (91): 151-156.

18.National Committee For Clinical Laboratory Standareds (1988). Performance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.

19.National Committee For Clinical Laboratory Standareds (2002). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.

20.. Kumamato, Y.; Tsukamoto, T.; Hirose, T.; Yokoo, A.& Takahashi,T. (1997). Comparative Studies On Activities Of Antimicrobial Agents Against Causative Organisms, Isolated From Patients With U.T.Is. 11 Backgrounds Of Patients. Japn. J. Antibiotic. 50: 251- 64.

21. Summers, A.O. (1985). Bacterial resistance to toxic elements. Trends Biotech. 3: 122-125.

22. Cervantes-vega, C.; Chavez, J.; Cordora, N. More, P. & Velasco, A. (1986). Resistances to metals by Pseudomonas aeurgenosa clinical isolate. Microbios .48: 159 –1.