

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية العلوم / البيولوجي

اسم البحث

التحري الجزيئي لبكتيريا *Proteus mirabilis* المعزولة من
أصابات المسالك البولية باستخدام تقنية تفاعل المتعدد السلسلة
(PCR)

بإشراف الدكتور
ديار الجنابي

اعداد الطالب
حسين علي خوان

2016 هـ 1437
رجب

م آذار

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة عزل وتشخيص لبكتيريا *Proteus mirabilis* من مرضى يعانون من التهابات في المسالك البولية على مختلف انواعها (البسيطة و المعقدة) ومن انابيب القسطرة البولية التي تستخدم في حالات الالتهابات المعقدة والتشوهات الخلقية في اعضاء الجهاز البولي واللذين شخصت أصابتهم بجمع المسالك البولية سريريا.

تم جمع (310) عينة أدرار لمرضى يعانون من التهابات المسالك البولية من مستشفيات مختلفة لمدينتي بغداد والكوت للمدة من 2013-1-1 الى 2013-8-1. أظهرت النتائج وجود (218) عزلة كانت موجبة للفحص البكتريولوجي. وعند اكمال تشخيص العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام بالطرق الكيموحيوية واستخدام انظمة Api التشخيصية أظهرت بكتريا *Proteus spp.* نسبة عزل (17.88%) وبلغت نسبة عزل *P. mirabilis* (92.30%) أما نسبة عزل *P. vulgaris* فكانت (7.7%)

درست مقاومة عزلات بكتريا *P. mirabilis* للمضادات الحياتية الشائع استخدامها في علاج مرضى التهابات المسالك البولية في المستشفيات المحلية وقد اظهرت نتائج فحص الحساسية لعزلات بكتريا *P. mirabilis*. تجاه (11) مضاداً حيويّاً مختلفاً بأن جميعها تحمل صفة مقاومة متعددة للمضادات الحيوية مع وجود فروقات في نمط المقاومة بين العزلات المختلفة لكنها كانت جميعها مقاومة للمضادات Ampicillin, Tobramycin, Streptomycin, Tetracycline, Piperacillin, Gentamycin, Amoxillin وحساسية لمضادات Norfloxacin, Ciprofloxacin, Meropenem و Amikacin.

استخدام تفاعل سلسلة البلمرة (PCR) باستعمال بادئات نوعية (specific primer) للكشف عن وجود جنس المتقلبات *Proteus spp* وتمييزها عن باقي البكتريا المعوية وكذلك استخدام بادئات نوعية متخصصة للكشف عن وجود الجينات المشفرة لأنزيم اليوريز (*ureR*). وأظهرت نتائج التشخيص الوراثي للتحري عن بكتيريا *P. mirabilis* بأستعمال بواى متخصصة للجين *ureR* الخاص بهذه الدراسة عن وجود (36) عينة أعطت نتائج موجبة لعينات الأدرار.

وأظهرت نتائج تسلسل القواعد النروجينية لنواتج تقنية (PCR) للعينات قيد الدراسة تطابقاً يصل الى (98%) مع تسلسل القواعد النروجينية لجين *ureR* الموجودة في عزلة *P. mirabilis* العائدة لمنظمة الصحة العالمية WHO.

قدمت هذه الدراسة خصوصية وحساسية عالية لتشخيص البكتريا *P. mirabilis* إلى جانب إنخفاض التكلفة وسرعة أسلوب تقنية (PCR) على الطرائق التقليدية المستخدمة حالياً في المستشفيات والمختبرات التي تستغرق وقتاً طويلاً.

الفصل الاول

Introduction

المقدمة

يعد خمج المسالك البولية (Urinary Tract Infection) من الأمراض التي تصيب الانسان و لمختلف الاعمار و خاصة النساء بعد مرحلة البلوغ الجنسي و النساء المتزوجات و الحوامل و المرضى المستخدمين للقسطرة البولية (Pearson, et al, 2008).

حضي خمج المسالك البولية باهتمام الباحثين و العاملين في المجال الطبي , إذ إنه يمثل مشكلة من مشاكل الصحة العامة , وانه يعد من الأمراض المهمة و المتكررة الحدوث , تم التركيز في السنوات الاخيرة على بكتريا *Proteus mirabilis* لارتفاع نسبة الإصابة بهذه البكتيريا (CDCP, 1996;Senior, 1997).

تعدّ البكتيريا من اكثر الكائنات شيوعاً في أحداث التهابات المسالك البولية وخاصة العصيات السالبة لصبغة كرام والعائدة للعائلة المعوية . وتعد بكتريا *Proteus mirabilis* واحدة من الأنواع البكتيرية المهمة في هذا المجال فهي تأتي بالمرتبة الثانية بعد بكتريا *Escherichia coli* في إصابات المجرى البولي وخاصة في الأشخاص الراقدين في المستشفيات والأشخاص الذين يعانون من الانسداد في المسالك البولية ، والمرضى الذين تجرى لهم عملية القسطرة (Loh and Sivakingam, 2007) ، فضلا عن إنها تسبب الكثير من المضاعفات الخطيرة كتكوين الحصى وتجرثم الدم (Alamuri and Mobley, 2008), كما

تسبب ما يعرف بالاصابات المكتسبة بالمستشفيات (Nosocomail infection) (Pearson, et al,) (2008: Ani, et al, 2011).

ومن الأسباب المهمة التي أدت إلى الاهتمام ببكتريا *P. mirabilis* من قبل الباحثين هو ظهور سلالات مقاومة من هذه البكتيريا لأنواع كثيرة من المضادات الحيوية (Jombo, et al, 2012).

ولهذه البكتيريا ظاهرة مميزة هي الانثيال swarming على بعض الاوساط الصلبة وأنتاجها لأنزيم اليوريز والهيمولاسين وقابليتها للألتصاق بالخلايا الظهارية الطلائية وأنتاجها البكتريوسين (Belas and 2005; Suvanasuthi, 2005; Nielubowicz, 2010, AL-Mansouri, 2005).

تنتج بكتريا *P. mirabilis* خمل لاصق الخلايا الطلائية البولية (Uroepithelial cell adhesin) التي يعود لها الدور الاساسي بالالتصاق في الخلايا الطلائية البولية للانسان والتي أطلق عليها فيما بعد تسمية الخمل غير الملزن (Non-agglutaniting fimbriae) , كما تنتج هذه البكتيريا أيضا خمل المقاوم للمانوز شبيه البروتيس [Mannose resistance /Proteus like fimbriae (MR/P)] , و الخمل المقاوم للمانوز شبيه الكلبسيلا [Mannose resistance /Klebsiella like fimbriae (MR/K)] (Jacobsen, et al, 2008; Luzzaro, et al, 2009; Al-Duliami, et al, 2011).

ونظرا لأهمية هذه البكتيريا في أصابات الجهاز البولي في الانسان أجريت الدراسة الحالية بهدف إمكانية استخدام تقنية ألتفاعل المتعدد لسلسلة الدنا PCR كتقنية تكميلية كفوءة وسريعة لطرائق التشخيص التقليدية . وشملت أهداف الدراسة ما يأتي :-

● عزل وتشخيص بكتريا *P. mirabilis* عن طريق جين *ureR* المشفر لعوامل الضراوة الرئيسية في بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من العينات المرضية (الإدرار) باستخدام تقنية ألتفاعل المتعدد لسلسلة الدنا PCR .

الفصل الثاني

استعراض المراجع : Literature Review

1-2 ألتهاب المسالك البولية:

يعد التهاب المسالك البولية من المشاكل الصعبة الواسعة الانتشار في العالم والذي يصاب بها ملايين من الاشخاص سنويا وتعد النساء اكثر ميلا من الرجال للاصابة بهذا المرض. إذ يأتي بالمرتبة الثانية بعد التهابات المسالك التنفسية اذ يتعرض الذكور والاناث للاصابة بهذا المرض ولاسيما وأنه يعد من المسببات الرئيسية لوفاة الاطفال الرضع (Delzell, 2000).

ولقد نال مرض خمج المسالك البولية عناية الباحثين في العراق ومنذ العقد التاسع من القرن العشرين وحتى العقد الاول من القرن الحالي وقد شملت الدراسات السريرية او الدراسة البكتريولوجية وأختبار حساسية العزلات البكتيرية المسببة للخمج للمضادات الحيوية (الجبوري, ٢٠٠١ : محميد, ٢٠١١). وتوجد مجموعة مفاهيم لخمج المسالك البولية منها :-

1- نمو عدد غير سوي (شاذ) abnormal number من المستعمرات البكتيرية المعزولة من الادرار (Batsky , 1996)

2- وجود مئة ألف خلية بكتيرية في ١ مليلتر من الادرار مع ظهور عشرة خلايا قيقحية (Pus cell) تحت القوة الكبرى في الحقل المجهرى (Goya and Ramsay, 1997).

3- تكاثر الكائن الحي داخل الجهاز البولي (Davison., et al, 1995).

4- وجود أعداد من الجراثيم تزيد على المئة الف في المليلتر الواحد من الادرار المرتبط مع الأعراض السريرية لالتهاب المثانة (Cystitis), التهاب الكلية والحويطة (Pyelonephritis), والبليلة الجرثومية اللاعرضية (Bacterial Infection Asymptomatic) (Zamanzad and Moezzi, 2006).

لقد قسم الباحث Davison وجماعته (1995) خمج المسلك البولي حسب الأمراض Pathogenesis على قسمين رئيسين :-

1-1-2 إلتهابات المسالك البولية المعقدة Complicated U.T.I infection:

لوحظ أن ألتهابات المسالك البولية عادة يكون مترافقاً مع التشوهات التركيبية في القناة البولية والأنسدادات (Obstruction) والتشوهات الولادية، لكن المسبب الرئيس لتلك الألتهابات هي بكتريا (Li et al., 2004; *Proteus mirabilis* Dattebaum et al., 2003). هذا النوع من الألتهابات صعب العلاج بأستخدام

المضادات الحيوية وذلك بسبب وجود هذه البكتيريا داخل قالب الحصوة (Li b; Li and Mobley, 2002) *(et al. ,2002)*.

2-1-2 التهابات المسالك البولية غير المعقدة Uncomplicated U.T.I infection:

تكون القناة البولية طبيعية من الناحية التشريحية والفسولوجية في هذا النوع من الالتهابات كما أن الكلية تؤدي وظائفها بالشكل الطبيعي وقد تكون هذه الالتهابات مصحوبة بأعراض وأحياناً من دون أعراض (Torzewska *et al.*,2003) وأشار الباحث Kumamoto وجماعته (1997) الى ان أكثر الأصابات بهذا النوع في اليابان تكون بين الأنث.

2-2 طرائق حدوث الالتهابات Routes of infection :

هناك مجموعة طرائق تسلكها البكتيريا لأحداث الأصابة بالتهابات المسالك البولية ومنها:

1-2-2 الطريق الصاعد Ascending Route:

يعد أهم الطرق للأصابة بالتهاب المثانة (Cystitis)، وفي حالة إهمال معالجة الالتهاب تتطور الأصابة الى ألتهاب الكلية وحويضها (Mimis *et al.*,1995 ; Li & Mobley , 2002). أشار الباحث Lohr (1989) الى حدوث الإصابة عند الإنسان عن طريق انتقال الكائن الممرض من مناطق المستودعات وهي الكيس القلبي (Preputial Sac) والبروستات لدى الذكور والمستقيم (Rectum) والمهبل (Vagina) لدى الأنث الى المثانة، أن معظم أصابات المسالك البولية تحدث بوساطة الطريق الصاعد

2-2-2 الطريق الدموي Haematogenous Route:

تحدث الاصابة في هذه الحالة عن طريق طرح البكتيريا الموجودة في الدم الى الأدرار عن طريق الكلية وخاصة في الأطفال حديثي الولادة (Schaffer , 1985) وتزداد احتمالية حدوث التهاب الكلية عند حصول انسدادات تستوجب اجراء جراحة في الأكليل إذ توجد أنواع مختلفة من الجراثيم في الأكليل القاصي يمكن أن تدخل في اثناء الاجراءات الجراحية في الأكليل (Mims *et al.* , 1995)

3-2-2 الطريق اللمفوي Lymphatic route:

إذ تصل البكتيريا الموجودة في الأمعاء الى المثانة عن طريق الأوعية اللمفاوية (Santoro and Kaye ,) (1978).

3-2 العوامل الممهدة لالتهابات المسالك البولية U.T.I infection:

1-3-2 الأنعكاس المثاني-الحالبى: Vesicoretic reflux:

وهي ظاهرة إنعكاس جريان الأدرار بعد عملية التبول، إذ يصعد البول من المثانة ليدخل حوض الكلية عبر الفتحة الواصلة بين المثانة والحالب , وعند وجود بكتريا مرضية في الأدرار فإن ذلك يؤدي الى حدوث التهاب كلوي حاد (Haslett *et al.*,1999) ، وقد أشار الباحثان Stickler و Morris (1998) الى أن إنعكاس جريان الأدرار من الممكن أن يتسبب في إلتهاب حويض الكلية ومن ثم تجرثم الدم.

2-3-2 الحصى Stones:

تؤدي الحصى دوراً كبيراً في إحداث أنسدادات في المسالك البولية، وهذا الأنسداد يؤدي الى ركود الأدرار فيكون وسطاً "زرعياً" ملائماً" لنمو البكتريا المسببة لإلتهاب المسالك البولية، وأن الأنسداد يمهد إنتشار الألتهاب الى أعلى المسالك البولية من خلال التمهيد للأنعكاس المثاني الحالبى (Shigeta *et al.*,1995) . تعرف الحصى بأنها عبارة عن تجمع لتكوين معقد مترسب من محلول عالي التشبع، و تعرف بأنها تركيب صلب ينشأ عن اضطراب في التوازن الفيزيوكيميائي أو في النظام الهيدروديناميكي للأدرار والمسلك البولي (Aswegan *et al.*,1992) ويمكن تصنيف الحصى الى نوعين رئيسيين وهما:

1-2-3-2 حصى الأيض Metabolic Stones:

وهي التي من الممكن أن تتكون في الأدرار النقي وتشمل مجموعة أنواع منها حصى حمض البوليك، حصى الكالسيوم وحصى الزانثين وحصى السستين وحصى السليكا وحصى الأدوية (Stoller and Bolton,1995; Ito *et al.*,1995; Disilverio *et al.*,1996).

2-2-3-2 حصى الخمج Infection Stones:

تمثل حوالي (7 – 30) % من مجموع الحصى ويكون للبكتريا وخاصةً بكتريا جنس المتقلبات *Proteus* دور " كبير " في تكوينها (Cotran et al.,1996) , وهي تتكون من فوسفات الأمونيوم والمغنيسيوم ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) وتدعى بالستروفيت Struvite . تشكل حصى الخمج تهديداً أكبر من بقية أنواع الحصى الأخرى مما يجعلها تشكل خطراً كبيراً في تلف الكلى (Torzewska et al.,2003).

3-3-2 مرض السكر Diabetes Mellitus:

إن وجود تركيز عال من الكلوكوز في إدرار المرضى المصابين بداء السكر يساعد على حدوث الأصابة بالتهاب الكلية والحويض إذ يوفر هذا الأدرار وسطاً ملائماً لتكاثر البكتريا (Schaffer,1985) ; (Seftal et al.,2000)، وفي النساء الحوامل يزداد تركيز الكلوكوز في الأدرار مما يمهد للأصابة في أثناء الحمل (Makuyana et al., 2002).

4-3-2 الجنس والعمر Age and Sex:

أشار الباحث Shanson (1982) الى أن الاصابة عند الأناث كانت أعلى منها في الذكور ب(2-3) مرات بينما أشار Mattson (1994) الى أن الأصابة عند الذكور تزداد بعد سن الخمسين وذلك بسبب تضخم البروستات، إذ وجد من خلال دراسة أحصائية أن حوالي 20% من الذكور كبار السن و10% من النساء كبيرات السن يعانون من الأصابة الجرثومية وأن هذا العدد يزداد الى حوالي 25% من الرجال العاملين و20% من النساء العاملات .

ولاحظ الكثير من الباحثين بأن هناك علاقة بين الجنس وإلتهابات المسالك البولية وأن الأصابة بهذه الألتهايات في كل الأعمار تقريباً ولكلا الجنسين (Sato et al., 1998; Klufio e tal.,1996) ، كما أشار الباحث Raka وجماعته (2004) الى أن نسبة الأصابة بين الذكور 25.4% أما لدى الأناث فقد بلغت 74.6% ، وفي دراسة أخرى وجد الباحث Mehr وجماعته (2004) أن نسبة الأصابة عند الذكور المصابين بالتهابات المسالك البولية 39% بينما عند الأناث 56% وخاصة الأطفال دون (6) سنوات من العمر. بينما لاحظ Cohen وجماعته (2003) في دراسة على فتيان وفتيات في عمر العشرين أن نسبة الأصابة عند الأناث كانت 12.6% أما عند الذكور فقد كانت 8.5% .

2-3-5 : Catheterization القسطرة :

تعد عملية قسطرة المثانة من العوامل الشائعة لحدوث اصابات التهابات المسالك البولية فمن الممكن عن طريق أنابيب القسطرة ان تدخل الكثير من البكتريا مثل بكتريا *Proteus mirabilis* وخاصة لدى المقسطرين لمدة طويلة (Mobley,2000) و(Liedle,2001)، مسببة التهابات المسالك البولية في المستشفيات (Hospital Acquired U.T.I) إذ لوحظ أن الأطفال الذين تجرى لهم عمليات قسطرة في المستشفيات يحملون نسبة عالية من الاصابة بالتهابات المسالك البولية المكتسبة في المستشفيات (Pearson, et al, 2008) ، وأشار الباحث Verhaze وجماعته (2003) في دراسة أجريت في صربيا الى أن أغلب اصابات المسالك البولية كانت بين المقسطرين الراقدين في المستشفيات.

2-3-6 : Circumcision الختان :

أشار الكثير من الباحثين أن عملية الختان تقلل نسبة الأصابة بالتهابات المسالك البولية, إذ أكد الباحثان Hachey and Wiswell (1993) أن نسبة الأصابة بالتهابات المسالك البولية في الأطفال الرضع غير المختونين كانت عشرة أضعاف ما هو موجود لدى الأطفال الرضع المختونين , بينما أشار الباحث (Elder 1992) في دراسة قام بها على الأطفال الذكور غير المختونين إلى أن 25 % منهم يعانون من الأصابة بالتهابات المسالك البولية على الرغم من تعاطيهم العلاج.

2-3-7 : التشوهات في القناة البولية:

أن التشوهات التركيبية في القناة البولية تسهم باحداث الأصابة بالتهابات المسالك البولية وبوساطة البكتريا ومنها *P. mirabilis* (Torzewska et al.,2003;Zhao et al.,1999) . إن هذه التشوهات تعد من المسببات لأنسداد القناة البولية مما يؤدي الى ركود البول Stasis وبالتالي زيادة فرصة حصول الألتهابات (Cohen and Preminger,1996) , ونتيجة لذلك تتكوّن الحصوات في كل من المثانة والكلى والتي تعد من السمات المميزة لبكتريا *Proteus mirabilis* (Li, et ; Mobley, 2000) (al.,2002-a) مما يستدعي التدخل الجراحي (Rassweiler et al., 2001).

4-2 الاحياء المجهرية المسببة لالتهاب المسالك البولية :

تعد البكتريا من اكثر الكائنات شيوعاً في التهابات المسالك البولية ، ولا سيما العصيات الهوائية السالبة لصبغة كرام والعائدة للعائلة المعوية *Enterobacteriaceae*

(Ani et al, 2011; Lazarevic et al, 1998).

يمكن ان توجد البكتريا في الادرار نتيجة للحالات الثلاثة الآتية :

1. التلوث Contamination:

ويحصل عندما تدخل الاحياء المجهرية من الاعضاء التناسلية الخارجية ومن الاحليل إلى انموذج الادرار عند جمعه ويمكن ان يشمل البكتريا العائدة للاجناس *Lactobacillus*, *Staphylococcus* (Coagulase-ve) *Streptococcus viridans* , *Corynbacterium diphtheriae* (Broeren et al, 2011).

2. الاستيطان Colonization:

ويعني وجود مؤقت للبكتريا ويستمر من يوم إلى عدة ايام يعقبه شفاء ذاتي ولا يرافقه وجود خراج (Broeren et al 2011).

3. اصابة Infection:

وتشمل الاصابة بالبكتريا وغيرها من الاحياء المجهرية ، إذ تعد البكتريا هي الاكثر شيوعاً وتسبباً في حصول الالتهاب (Martinez et al, 2000).

● البكتريا الموجودة بصورة شائعة في الالتهابات البولية وتشمل :

E. coli, *Klebsiella* , *proteus* , *Pseudomonous aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* ,
(Martinez et al, 2000; Williams et al,2000 ;) *Staph. albus* , *Streptococcus faecalis*
(Brooks et al, 2007).

5-2 الصفات العامة للعائلة المعوية

تعد عائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae* واحد من اكبر ثلاث عوائل تقع ضمن المجموعة الخامسة Group-5 حسب تصنيف Bergy لعام 1994 (Holt et al., 1994).

تتألف العائلة المعوية من عدد كبير من الأجناس ذات صفات مشتركة سالبة لصبغة كرام عسوية، قصيرة ذات حافات مدورة ، طولها يتراوح بين (4- 5) مايكرون ، لا تنتج سبورات ، وإما أن تكون متحركة بوساطة اسواط محيطية أو أنها غير متحركة، البعض منها يحتوي على محفظة (Capsule) ، هوائية أو لا هوائية اختياريًا (Facultative anaerobes) جميعها تخمر سكر الكلوكوز بسرعة وتنتج غازاً وقد لا تنتج غازاً، وتكون غير منتجة لإنزيم لاوكسيداز (Oxidase) و منتجة لإنزيم الكتاليز (Catalase) و تختزل مركبات النترات إلى نترت (Duguid and Old, 1980) تحتوي العائلة المعوية على مستضدات عديدة وهي capsular antigen K و flagella antigen H و somatic antigen O (Jawetz et al. 2012).

تضم هذه العائلة مجموعة من الأجناس تكون ممرضات معوية (Intestinal pathogens) أو تكون تعايشية (Commensals) في حين إن هناك مجموعة القليل منها تكون رمية (Saprophytic) حيث توجد في التربة والماء (Rajanna et al., 2012) . تعيش أجناس هذه العائلة في القناة الهضمية (Intestinal tract) للإنسان والحيوان، وبصورة عامة كما يتضح ذلك من اسم العائلة ، إذ عزلت هذه الجراثيم بكثرة من الحالات المرضية للإنسان والحيوان (Gabriel, 2000) ، إذ تسبب تنوعاً واسعاً بالإصابة في أجزاء مختلفة في جسم الإنسان ، إذ تم عزل عدد كبير منها من الجروح و الحروق و القشع و السائل الشوكي و الإدرار و الخروج والدم إلى جانب وجودها مستوطنة طبيعياً وبنسبة عالية في القناة الهضمية للإنسان والحيوان (Crichton et al., 1993; Gabriel, 2000).

ومن بين هذه الاجناس المهمة طبياً والتي تعود لهذه العائلة ، جنس المتقلبات *Proteus*.

1-5-2 نبذة تاريخية عن بكتريا الـ *Proteus*

أن أول من وصف جنس *Proteus* هو العالم Hauser سنة 1885 فقد عزلها لأول مرة من الغائط و مياه المسالك و المواد العضوية وهي بكتريا عصوية سالبة لملون كرام و تنتمي للعائلة المعوية (Enterobactereace) (Holt et al.,1994) وأطلق على هذه البكتريا اسم الـ *Proteus* بسبب امتلاكها ظاهرة تعدد الاشكال (Pleomorphism) (Rozalski et al., 1997; O'hara et al.,2000).

ينتمي جنس المتقلبات *Proteus* الى المجموعة الخامسة (Group5) حسب تصنيف Bergy لعام 1994 (Holt et a.l,1994) والتي تضم مجموعة البكتريا العصوية السالبة لصبغة غرام ومنها العائلة المعوية Enterbacteraceae التي يعود اليها جنس المتقلبات *Proteus* (Toth and Emody, 2000) ; (Karlowksy et al., 2003).

استطاع العالم Henriksen سنة 1950 و بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية أن يميز ما بين جنسي *Proteus* و *Providencia* و بقية أفراد العائلة المعوية بقدرة هذين الجنسيتين على إنتاج أنزيم Deaminase , كما و يمكن التمييز ما بين أجناس القبيلة Proteeae باستخدام تقنية Molecular phylogentic و التي تعتمد على مستوى DNA للفصل و التمييز بين تلك الاجناس وبذلك تم تحويل النوع *Proteus morganii* الى جنس منفصل *Morganella* . كما و يمكن تمييز جنس *Proteus* عن جنس *Morganella* باستخدام الوسط الزراعي Lysine Iron Agar إذ تمتاز مستعمرات جنس *Proteus* بلونها الاحمر مقارنة بمستعمرات جنس *Morganella* التي تظهر عديمة اللون , و يمتاز جنس *Proteus* أيضا بقدرته على إنتاج أنزيم Lipase و أنزيم Gelatinase و عدم القدرة على إنتاج الحامض من اختبار تخمر السكريات المختلفة مثل : المانوز , و أنيوسيتول , و مانيتول , و أرابيتول على العكس من جنس الـ *Providencia* (Brenner et al.,1978 ; Swierzko et al., 2000; Karlowksy et al., 2003).

يضم جنس المتقلبات *Proteus spp* خمسة أنواع وهي *Proteus penneri*, *Proteus mirabilis* , *Proteus hauseri*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus vulgaris* , و ذلك بالاعتماد على التفاعلات الكيموحيوية (O'hara et al.,2000). يمتاز أفراد هذا الجنس بالانتشار الواسع في الطبيعة إذ أنها عزلت من التربة والغائط والمسالك والحيوانات المتعفنة (Walker et al.,1999, Volk et al., 1997) . تعد بكتريا المتقلبات *Proteus* من النبيت الطبيعي (Normal flora) في القناة المعوية للأشخاص الأصحاء أي أنها تكون رمية (Saprophytes) , بينما تكون بعضها متطفلة (Parasitic) أي ممكن أن تتواجد

كمرضات أنتهازية (Opportunistic Pathogens) مسببة أنواعاً عديدة من الألتهابات عند مغادرتها مكانها الطبيعي (Quinn et al.,1998; Davis et al., 1990).

2-5-2 الصفات العامة لبكتريا *Proteus*

جنس المتقلبات *Proteus* عصيات قصيرة سالبة لصبغة غرام ذات طول (3-1) مايكرون وعرضاً من (4-0.8) مايكرون (Toth and Emody 2000) , يمتاز بظاهرة تعدد الأشكال إذ أنها تظهر بأشكال مختلفة منها عصيات كروية قصيرة وعادة تكون غير متحركة أو بشكل خيطي طويل والذي يمتاز بحركة نشطة (Zunino et al.,1999) .

لا تحتوي على محفظة (Capsule) كما أنها غير مكونة للأبواغ (Spores) ولها القابلية على إنتاج انزيم اليوريز (Urease) فضلاً عن أنزيم Phenyl alanine deaminase (Toth and Emody, 2000) و أنها منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين (H₂S) , وجميع أنواع بكتريا المتقلبات *Proteus* تعطي فحصاً سالباً للأندول ماعدا النوع *Protes vulgaris* , كما أنها غير مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط الماكونكي.

تمتلك بكتريا المتقلبات *Proteus* أسواطاً " محيطية (Peritrichous flagella) تساعد على الحركة بسرعة وتظهر الحركة بصورة واضحة على سطح الأوساط الزرعية الصلبة وبشكل دوائر متحدة المركز وهذه الحركة تكون بشكل أمواج وهو ما يعرف بظاهرة الأنتيال (Swarming) الشبيهة بالسباحة (Liaw et al.,2001; Liaw et al.,2003)

أن بكتريا *Proteus* غير مكونة للأبواغ , و منتج للخمّل (Fimbriae) و الاسواط المحيطية (Peritrichous Flagella) , و لا هوائيه مخيرة (Facultatively anaerobic) , و ذات تغذية كيميائية عضوية (Chemoorganotrophis) , و درجة حرارتها المثلى للنمو 37° م فيما يبلغ الرقم الهيدروجيني الامثل لها 7.4 (Holt et al.,1994) و تتميز بظاهرة الحركة المتموجة على الاوساط الزرعية الصلبة , و ذات مستعمرات شاحبة اللون على وسط أكار الماكونكي ووسط أكار الدم , و برائحة مميزة تشبه رائحة السمك (O'hara et al.,2000).

الظاهرة التي ينفرد بها جنس *Proteus* هي ظاهرة الأنتيال Swarming, عند تلقح بكتريا *Proteus* في وسط المرق المغذي فالخلية المتميزة في هذا الوسط تسمى الخلية السباحة (Swimmer cell) تتصف

بأنها عصوية ذات طول (2-1.5) مايكرومتر و لها (6-10) أسواط محيطية (Allison,1993) , و عند تلقيح هذه الخلية على وسط زرعى صلب تتحول فسيولوجياً و مظهرياً بعد ملامسة السطح الصلب بوقت قصير و تسمى بالخلية المتموجة (Swarmer cell) التي تتميز بأن لها طولاً يتراوح ما بين (60-80) مايكرومتر مع مئات الالاف من الاسواط المحيطية التي تحتاجها الخلية للحركة (Higashitani et al.,1995). استنتج العالم Stewart (1997) أن للاسواط فعل تحسسي ملموس للبيئة الخارجية حيث وجد أن نقل خلية سابعة الى وسط زرعى صلب أو تعليقها في وسط سائل عالي اللزوجة أو حاوي على الاضداد ضد مستضدات السطح تقيد حركة هذه الخلية و يحفزها للتمايز الى خلية متموجة . كما أثبت تجريبياً العالم Massad و جماعته (1994) أن الخلية المتموجة لا تخلق الخمل عند تنمية بكتريا *Proteus* على وسط زرعى صلب .

أن الجين *RsbA* (Regulator of swarming behavior) هو المسؤول للتعبير عن ظاهرة الأنتيال نتيجة للتحسس بالظروف البيئية المحيطة (Lilley and Bassler ,2000) .
تعد بكتريا *Proteus mirabilis* النوع الأهم في جنس *Proteus* من الناحية الطبية إذ إنها تسبب الكثير من الألتهابات الجهازية والسطحية كألتهابات الجهاز التنفسي Respiratory Tract infection وألتهابات الجروح (Wounds) والأذن الوسطى (Otitis media) وهي من المسببات الرئيسة لألتهابات المسالك البولية اذ تأتي بالمرتبة الثانية بعد بكتريا *E.coli* (Shwu-Jen, 2000; Chanal et al .,2000).

3-5-2 أمراضية بكتريا *P. mirabilis*

تعد بكتريا *P.mirabilis* من الكائنات المجهرية الانتهازية التابعة للعائلة المعوية لما تسببه من مشاكل صحية للإنسان و الحيوان على حد سواء (Penner,1984) , إذ إنها تسبب خمج الجهاز الهضمي والجهاز التناسلي و تأتي الأهمية الطبية لهذه البكتريا بعد بكتريا *Escherichia coli* و بكتريا *Klebsiella pneumonia* لما تسببه من مشاكل صحية و اصابات مرضية للجهاز التناسلي و الجهاز الهضمي و الاجهزة الاخرى (Chown,1979) .

وتسبب بكتريا *P. mirabilis* الاسهال عند الأطفال و البالغين و تسبب تقرحات جلدية أيضاً (Rozalski et al.,1997) , و قد أمكن عزلها من حالات خمج الاذن الوسطى و خمج أغشية السحايا عند الاطفال حديثي الولادة و كذلك Gastrointestinal Syndrome (O'hara et al.,2000) , و أمكن عزل هذه البكتريا من مرضى مصابين بجروح مختلفة و خراجات و خمج الاذن , و خمج غشاء السحايا , و تجرثم الدم و الذي قد ينتج في بعض الاحيان عن أصابة المسلك البولي أو نتيجة إجراء العمليات الجراحية محدثة Systemic inflammatory response Syndrome أعراضها الحمى و انخفاض نسبة كريات الدم البيض نوع Neutropenia و بنسبة وفيات % (20-50) (Collee et al.,1996;Gonzals,2001) . و يعتقد أن لـ *P. mirabilis* دوراً مهماً في الإصابة بروماتزم المفاصل (Rheumatoid arthritis) و ذلك لان الاجسام المضادة لهذه البكتريا وجدت عند المصابين بهذا المرض (Dumanski et al.,1994; Rashid and Ebringer. 2007) .

2-5-4 دور بكتريا *P. mirabilis* في أخماج المسالك البولية

تسبب بكتريا *Proteus* بصورة رئيسة خمج المسالك البولية ولاسيما النوع *P.mirabilis* وعلى الرغم من ذلك فانها تأتي بعد بكتريا *E. coli* في أحداث خمج المسالك البولية (Ramakrishnan and Scheid, 2005) . تسبب هذه البكتريا خمج المسالك البولية للمرضى الراقدين في المستشفيات و المستخدمين للفنطر البولي و لمدد طويلة و كذلك الاشخاص الذين يعانون من مشاكل وظيفية و تشريحية غير طبيعية للمسلك البولي (O'Hara et al., 2000), وأن قدرة هذه البكتريا على الاستيطان في المسلك البولي يعود الى إمكانية تخليق زوائد بروتينية تسمى الخمل تساعد على الالتصاق بالخلايا الطلانية البولية و الخلايا الطلانية الكلوية (Bahrani et al., 1994).

أن قدرة هذه البكتريا على أنتاج أنزيم Urease الذي يجعل الوسط قاعدياً مما يؤدي الى حدوث ضرر كبير في أنسجة الكلية أذ يقلل هذا الانزيم من التأثير الفعال للاضداد و إحداث ألم و عسر عند التبول فضلاً عن

تحلل كريات الدم البيض للمرضى المصابين بهذه البكتريا وتؤدي الإصابة بهذه البكتريا الى حدوث التهابات معقدة في أجزاء المسلك البولي أذ تؤدي الى خمج حوض الكلية الحاد و المزمن و تكوين حصى الكلية و تجرثم الادرار (Li et al.,2002a) , كما و تؤدي الى أحداث فقر الدم الكلوي و ذلك لقدرة هذه البكتريا على إحداث التلازن الدموي لكريات الدم الحمر مما يؤدي الى ضرر كبير في منطقة الإصابة و أنسداد الاوعية الدموية و بالتالي تلف الانسجة الكلوية (Gupta and Stamm ,2005) .

أما تكوين الحصى البولية نتيجة الإصابة ببكتريا *P. mirabilis* تبدأ بالتصاق هذه البكتريا على الخلايا الطلائية للمسلك البولي و الاستيطان و تكوين الفرشة العضوية و الغشاء الحيوي لتكاثر بكتريا *Proteus* و تحمي نفسها من مضادات الحياة و الادوية و الفعل المناعي للجسم و تستمر بانتاج أنزيم Urease الذي يجعل الوسط قاعديا الذي يبقى فعالا و لمدد طويلة و بالتالي ترسيب و تكوين Struvate و بلورات Carbonate apatite والتي تبدأ بتكلس الطبقة الشمعية (الفرشة العضوية) لتكون النواة الاولى لحصى المثانة أو الكلية . (Mclean et al.,1988) .

2-5-5 عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *P.mirabilis*

ان من اهم عوامل الضراوة Virulence factors لبكتريا *P.mirabilis* هي انتاج اليوريز urease production - إنتاج الهيمولايسين Haemolysin production - القابلية على الالتصاق بالخلايا الطلائية Adhesion to the Uro- epithelium - الحركة بشكل امواج (الأنثيال) Swarming بواسطة الاسواط Flagella - إنتاج البكتريوسين المعروف بـ Proticine (Zunino et al.,1999) , (Swierzko et al.,2000) .

2-5-5-1 أنتاج اليوريز Urease production

يعد أنزيم اليوريز من أهم عوامل الضراوة التي تنتج من قبل بكتريا جنس المتقلبات *Proteus* (Dattelbaum et al.,2003) و ينتج أنزيم اليوريز من قبل الكثير من الأجناس البكتيرية المسببة لخمج المسالك البولية مثل *Proteus* , *Klebsiella* , *Pseudomonas* (Ahmed et al.,2003) تأتي بكتريا المتقلبات *Proteus* في صدارة الممرضات البولية المنتجة لأنزيم اليوريز الذي يؤدي دوراً مهماً في عملية

الاستعمار (Colonization) وتحصي الكلية (Nephrolithiasis) وكذلك في تطور التهابات حويض الكلية (Dattelbaum *et al.*, 2003) أن إنتاج البكتريا لأنزيم اليوريز يكون أما بطريقة الحث (inducible) او بالطريقة التركيبية (Constitutive) وذلك حسب نوع البكتريا وحسب الظروف البيئية المحيطة بها (Mobley *et al.*, 1987) فإذا لم يكن للظروف المحيطة أي تأثير يتم تصنيع الأنزيم تركيباً أو يكون أنتاجه بطريقة الحث في حالة تأثير الظروف المحيطة على أنتاجه. تتموضع الجينات المسؤولة عن إنتاج اليوريز وفعالته في معظم أنواع البكتريا على الكروموسوم وقد تتموضع أحياناً على بلازميدات كبيرة الحجم من النوع المنتقل بالأقتران (D'orazio *et al.*, 1996). أظهرت الدراسات المتخصصة بالتنظيم الوراثي لمجاميع الجينات ذات العلاقة بإنتاج اليوريز أن هناك مجموعتين من الجينات تعرف الأولى بالجينات التركيبية Structural genes و هناك جين آخر يسيطر على الأستساخ (Transcription) يعرف بالجين التنظيمي Regulatory gene ويرمز له UreR (Heimer and Mobley 2001; Mulrooney and Hausinger, 2003)

يعمل أنزيم اليوريز على تحليل اليوريا الى الأمونيا NH_4 وحامض الكربونيك H_2CO_3 (Tanaka *et al.* 2003; Heimer & Mobley, 2001). يتجزأ حامض الكربونيك الى أيونات الهيدروجين H^+ وأيونات الكربونات CO_3^{2-} الذي يتحد مع أيون الكالسيوم Ca^{+2} مكوناً راسباً من كربونات الكالسيوم CaCO_3 . أما الأمونيا فأنها تتحد مع أيونات الفوسفات PO_4^{3-} وأيونات المغنيسيوم Mg^{+2} مكونةً راسباً من الأملاح الثلاثية $\text{Mg}^{+2} \text{NH}_4^+ \text{PO}_4^{3-}$ التي تسبب تكون الحصى في الكلية (Zhao *et al.*, 1998).

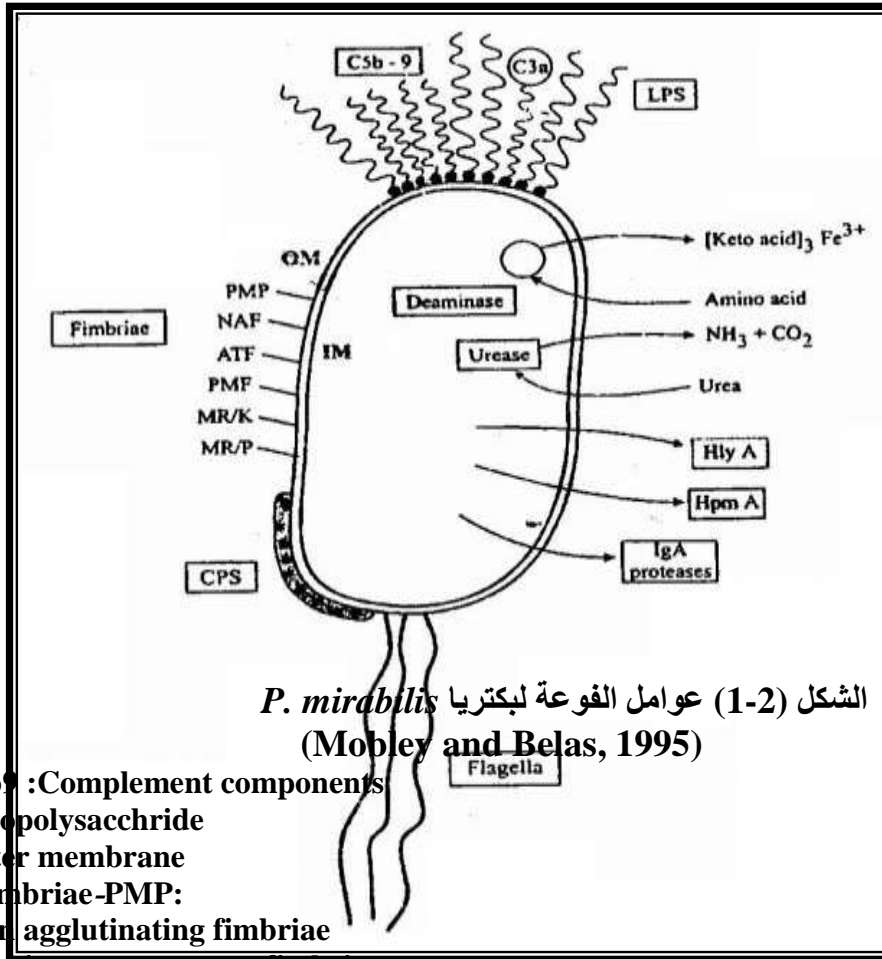
تعمل الأمونيا المتحررة من تحلل اليوريا الى زيادة قاعدية الأدرار مما يتسبب في تقليل الفعالية البايولوجية للأجسام المضادة (Antibodies) والى تحطيم خلايا الدم البيضاء (Leukocytes) (Larsson, 1978) ، وكذلك تؤدي الى ترسيب الأيونات التي عادة ما توجد في الأدرار بشكل ذائب الى الستروفيت Strovite $[\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ وهو المكون الرئيس للحصوات البولية فضلاً على حصوات كربونات الأبتايت $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{CO}_3]$ التي توجد بنسبة أقل (Mobley, *et al.*, 1995). أن زيادة قاعدية الأدرار يساعد في زيادة معدل تكوين الحصى (Kaitwatcharachi *et al.*, 1999; Itami *et al.*, 1990) ، و أمتصاص الأمونيا المتحررة من تحلل اليوريا بفعل أنزيم اليوريز يمكن أن يؤدي الى زيادة الأمونيا في الدم (Hyperammonaemia) مما يؤدي الى وفاة المريض (Van-Daele *et al.*, 1998).

● وراثة اليوريز والاقتران البكتيري :

يمكن ان تتموضع الجينات المسؤولة عن إنتاج انزيم اليوريز على الكروموسوم البكتيري او قد تكون موجودة على البلازميد ، ومعروف الآن ما لا يقل عن نوعين من البلازميدات التي وجد انها تحمل جينات اليوريز وهي من النوع المنتقل بالاقتران (D' orazio *et al.*, 1996) وأشار هذا الباحث إلى ان البلازميد المشفر لليوريز يحوي سبعة جينات وهي: Ure D, A, B, C, E, F.

اتضح من الدراسات الوراثية والكيموحيوية الحديثة ان التعبير عن جينات اليوريز في البكتريا السالبة لصبغة كرام لا يكفي بحد ذاته للتعبير عن انزيم فعال من الناحية الايضية ، اذ تبين ان هنالك حاجة لعدد مساعد من الجينات سميت بالجينات الاضافية Accessory genes وسميت نواتجها بالبروتينات الاضافية لليوريز والتي تؤدي دوراً مهماً في استكمال عمل هذا الانزيم (D'orazio *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998).

من المعروف ان بكتريا *E. coli* لا تنتج هذا الانزيم غير انه تم تسجيل عدد من عزلات *E. coli* المعزولة من الجهاز البولي تتميز بهذه الصفة ، ولوحظ ان بعض سلالات بكتريا *Proteus* قادرة على نقل صفة إنتاج اليوريز إلى بكتريا معوية اخرى مثل *E. coli* و *Salmonella* مما يشير إلى وجود الجينات المشفرة لهذا الانزيم على بلازميد ينتقل عن طريق الاقتران (Jansen *et al.*, 2003) .



- C3a, C5b-9 : Complement components
- LPS: Lipopolysacchride
- OM: Outer membrane
- P like fimbriae-PMP:
- NAF: Non agglutinating fimbriae
- ATF: Ambient-temperature fimbriae
- PMF : *P.mirabilis* Fimbriae
- MR/K : Mannose-Resistance like *Klebsiella* fimbriae
- MR/P: Mannose-Resistance like *Proteus* fimbriae
- IM: Inner membrane
- HIY A: Cytolysin Hemolysin A

Haemolysin Production إنتاج الحال الدموي 2-5-5-2

يؤدي الهيمولايسين دوراً مهماً في أمراضية بكتريا *Proteus mirabilis* وغالباً ما يرتبط أنتاج الهيمولايسين بالعزلات المرضية (Swihart and Welch,1990;Piccini *et al.*,1998). الهيمولايسين مادة بروتينية

تقوم بتدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء كما تعود اليه الكثير من التشخيصات السريرية المرضية أو الجهازية مثل الإصابة الجرثومية (Septic infection) (Liaw et al.,2000). ويؤدي الهيمولاسين الكثير من الوظائف أهمها عمل ثقب (Pores) في أغشية كريات الدم الحمراء (Erythrocytes) والخلايا الطلائية (Epithelial cell) وبسبب سميته Cytotoxic فإنه يؤدي الى تحطيم الأنسجة Tissue Damage (Liaw et al.,2000; Stephen and Sander , 1981).

● وراثية الحال الدموي والاقتران البكتيري:

تتم السيطرة على تصنيع الهيمولاسين الفعال وافرازه إلى المحيط بمحددات وراثية تقع اما على بلازميد قابل للانتقال Transmissible Plasmid او على الكروموسوم (Swihart and Welch , 1990). وتتشابه هذه المحددات مع بعضها البعض تركيبياً ووظيفياً فهناك اثنان من الجينات *hly A* , *hly C* التي تسهم في تصنيع الهيمولاسين الفعال ونقله لاحقاً خلال الغشاء السايئوبلازمي ، ويحتاج نقل الهيمولاسين من البلازم إلى الغشاء الخارجي إلى جين آخر هو *hly B* (Senior & Hughs, 1987) وهناك جين رابع هو *hly D* الذي يقوم بتحرير بروتين الهيمولاسين من الغشاء الخارجي إلى وسط النمو البكتيري وتظهر اهمية هذا الجين من خلال ان الطفرات في بكتريا *P.mirabilis* التي ينقصها هذا الجين (*hly D*) تظهر منطقة تحلل صغيرة فقط حول مستعمرات البكتريا على اوساط الدم المستخدم لانمائها فيكون وجوده ضرورياً لملاحظة الصفة المظهرية وهي تحلل كريات الدم الحمراء ، وكذلك فقد اشار Swihart & Welch (1990-b) إلى ان Operon الهيمولاسين في بكتريا *E.coli* , *P.mirabilis* يتألف من اربعة جينات هي *hly A-B-C-D*.

تقع الجينات المسؤولة عن إنتاج الهيمولاسين في معظم البكتريا المعزولة من الانسان ضمن الكروموسوم ، اما الجينات المسؤولة عنه في السلالات المعزولة من الحيوان فتقع غالباً على البلازميد (Goebel, 1973).

تتموضع الجينات المسؤولة عن أنتاجه على الكروموسوم وأحياناً على بلازميدات قابلة للانتقال ذاتياً Transmissible plasmid (Swihart and Welch,1990), وأشار الباحثان Swihart and Wech (1990) الى أن Operon الهيمولاسين في بكتريا *Proteus mirabilis* يتألف من أربعة جينات هي *hly A-B-C-D*, وأشار الباحثان Hughs and Senior (1987) الى أن هناك علاقة بين ضراوة بكتريا

Proteus mirabilis المسببة لألتهابات المسالك البولية وأنتاجها للهيمولاسين ولاحظ الباحث Hacker وجماعته (1986) أن العزلات المرضية المسببة لمرض ألتهابات الكلية والتي أزيل منها بلازميد الهيمولاسين قد فقدت قابليتها على أحداث المرض في الجرذان لكنها أستعادت قابليتها المرضية عند إعادة البلازميد الى داخل الخلية.

يتراوح الحجم الجزيئي لبلازميدات الهيمولاسين بين 60-110 كيلو قاعدة ولا تحمل معها جينات أخرى مثل جينات المقاومة للمضادات الحيوية او تلك التي تشفر لانتاج السموم . قام الباحث Hoffman وجماعته (1998) بدراسة ثلاثين سلالة لبكتريا *P. mirabilis* جمعت من اربعة بلدان اوربية لدراسة النسق البلازميدي Plasmid profile ، لاحظ أن جميع هذه العزلات احتوت على بلازميد كبيرين بحدود 60-70 كيلو قاعدة فضلا عن ان اربع سلالات احتوت بلازميد صغير بحدود 6 كيلو قاعدة .

ويمكن ان تنتج بكتريا *P. mirabilis* أنزيم حال الدم عند تنميتها في مزارع المرق المغذي و حضنها بدرجة حرارة 28, و 37 , و 42 م ولا تنتج هذا الانزيم عند درجة حرارة 4 , و 10 م , و ينتج هذا الانزيم في الطور اللوغارتمي و طور الثبات (Kaca and Rozalski,1991).

سلالات بكتريا *P. mirabilis* فتننتج أنزيم حال الدم من نوع الداخل خلوي (Intracellular) أو ما يسمى Cell-bound hemolysin (Rozalski et al.,1993) .

توصل Zunino و جماعته (1999) الى ان دور الانزيم الحال للدم غير ضروري عند بداية الاصابة بخمج المسالك البولية بسبب عدم تحديد وجوده في أدرار المصابين بخمج المسالك البولية و لكن أهمية هذا الانزيم تتجلى و بشكل واضح في المراحل الاخيرة من الاصابة , كما ان قدرة هذا الانزيم على تحليل كريات الدم تختفي في السلالات المزروعة في الادرار و يكون هذا الانزيم فعالا في السلالات المزروعة في مرق نقيع القلب و الدماغ و داخل الجسم الحي (*Invivo*) باستخدام الجرذان المختبرية باستخدام طريقة Intrapertoneal diffusion chambers .

و في دراسة قام بها Mishra و جماعته (2001) وجد حوالي 85.14% من سلالات بكتريا *P. mirabilis* منتجة لانزيم حال الدم على الرغم من عزلها من مصادر سريرية مختلفة.

3-5-5-2 قابلية الالتصاق Adhesion:

يعرف الالتصاق بأنه عملية التفاعل أو التداخل المعقدة التي تحدث بين البكتيريا و خلايا أنسجة المضيف و التي تؤثر فيها عوامل متعددة منها : الطبيعة الكارهة للماء, و الشحنة الموجودة على سطح الخلايا البكتيرية و كذلك المستقبلات البكتيرية و المتمثلة بالخمّل بمختلف أنواعه (Brooks *et al.*, 2001).

تعد قدرة الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية (uro- epithelium cells, UECs) والقابلية على تلزيم كريات الدم الحمراء (Hemagglutination activity) عوامل بكتيرية متعلقة بضرارة سلالات بكتيريا *P.mirabilis* (Mobley and Chippendale , 1990).

فقد اشار Tolson وجماعته (1997) , Zhao وجماعته (1999) إلى ان الالتصاق المتواسط بالخمّل Fimbriae - mediated Adherence بالخلايا الطلائية الظهارية يعد عامل ضرارة اساسي لبكتيريا *P.mirabilis*.

يعد الخمل أحد عوامل الفوعة المهمة التي تمتلكها أجناس البكتيريا من خلال دورها في الالتصاق على سطوح الخلايا (Luzzaro, *et al*, 2009).

أن قدره على الالتصاق غالبا ما تكون مرافقة لوجود الخمل على سطح الخلية البكتيرية مما يؤكد أن سبب الالتصاق بالدرجة الاولى يعود الى الخمل (Jacobsen, *et al*, 2008; Luzzaro, *et al*, 2009; Al- Duliami, *et al*, 2011).

لوحظ أيضا أن الخلية البكتيرية ذات الخملة الكثيفة العدد لها قدره في أحداث الإصابة أفضل من الخلايا البكتيرية ذات الخملة قليلة العدد (Mobley and Chippenale,1990). أشار Old و Adegbola (1982) أن بكتيريا *Proteus* تمتلك أنواعاً مميزة وواضحة من الخمل وهي :

٢-٥-٣-١ الخمل نوع (MR/P) Mannose Resistance Proteus Like Fimbriae

استطاع Sareneva و جماعته (1990) من عزل MR/P لأول مرة من بكتيريا *P. mirabilis* وقام بتنقيته بوساطة Sodium deoxycholate و اليوريا , إذ بلغ قطر هذه الخملة 7 نانومتر ووزنها الجزيئي 21 كيلو دالتون .

أما Bahrani و جماعته (1991) فقام بعزل وتنقية MR/P من بكتريا *P.mirabilis* بوساطة جهاز النبذ المركزي فائق السرعة و بسرعة 180000 g ولمدة 90 دقيقة و بدرجة حرارة 4 م وكلوريد السيزيوم و Sodium N-lauryl sarcosine و قدر وزنها الجزيئي بحوالي 18.5 كيلودالتون و أشار أيضا الى إن الوحدات الرئيسية لمتعدد ببتييد MR/P هو بروتين MrpA . تتألف MR/P من 175 حامض أميني و هنالك أيضا 23 حامض أميني تقع عند النهاية الامينية تكون محبة للماء (Bahrani and Mobley,1993).

يشفر للـ MR/P أوبرون يتألف من 8 جينات و هي على التوالي *mrp I* , و *mrp A* , و *mrp C* , و *mrp D* , و *mrp E* , و *mrp F* , و *mrp G* (Bahrani and Mobley, 1994). يشفر الجين *mrp H* لبروتين Mrp H , يعتقد أن هذا البروتين مسؤول عن تلازن كريات الدم الحمر المعاملة مع سكر المانوز و هو مسؤول أيضا عن الالتصاق بمستلمات الخلايا الطلانية و هذا ما أكدته نتائج المجهر الالكتروني و استخدام الاضداد المعلمة و كما وجد أنه عند تطفير *mrp H* فبكتريا *P.mirabilis* لا تلازن كريات الدم الحمر المعاملة بالمانوز كما تنخفض قدرتها على أستيطان المسلك البولي (Li, 1997; Li and Mobley, 1999).

تسهم الـ MR/P في أستيطان بكتريا *P. mirabilis* و تكوين الغشاء الحيوي في المسلك البولي , بينت نتائج دراسة قام بها Jansen و جماعته (2004) أن بكتريا *P.mirabilis* المنتجه للـ MR/P تكون غشاء حيويًا بسمك 65 مايكرومتر بينما البكتريا (الطافرة للجين المشفر) للـ MR/P فأنها تكون غشاء حيويًا بسمك 12 مايكرومتر بعد 7 أيام من خمج المسالك البولية .

و لوحظ أن الـ MR/P المستخدم كلقاح يحمي الفئران التجريبية من الاصابة بخمج المسالك البولية بنسبة 63% , أما بروتين Mrp H يحميها بنسبة 75% (Li et al., 2002; Li and Mobley, 2004).

٢-٣-٥-٥-٢ الخمل نوع Mannose Resistance Klebsiella Like Fimbriae (MR/K)

وجد إن هناك أختلافاً ما بين الـ MR/K و MR/P بنوع النسيج الذي ترتبط أو تلتصق عليه , أذ تلتصق و تستوطن الـ MR/K على الخلايا الطلانية لمحفظه بومان في كيبية الكلية و كذلك تلتصق على الاغشية القاعدية للخلايا النيبية و تلتصق أيضا على الخلايا الطلانية المنسلخة من المسلك البولي (Sareneva et al.,1990) , كما لوحظ أيضا بعد ترحيل مستخلص MR/K على SDS.PAGE أن هذه الخملة مؤلفة من أربعة حزم , أثنان منها رئيسة لها وزن جزيئي 17000 و 19000 دالتون أما الحزمتين

الثانويتين فلهما وزن جزيئي 2000 و 23000 دالتون , و أن هذه الخملة تلازن كريات الدم الحمر للانسان المدبغة بحامض التانيك و تلازن أيضا كريات الدم الحمر للابقار , كما أن بكتريا *P. penneri* تخلق الخملة MR / K أكثر من بكتريا *P.mirabilis* إذ لاحظ Yakubu و جماعته (1989) قدرت 12 سلالة من بين 18 سلالة على أنتاج أو تخليق فقط MR / K .

لوحظ أن الـ MR / K هي المسؤولة عن التصاق سلالات بكتريا *P.mirabilis* على سطح الفطر البولي و خاصة في حالة استمرار استخدام القسطرة البولية ولمدة طويلة من قبل المرضى و يلاحظ أن لسلالات البكتريا المخلفة للـ MR / K ألفة عالية للبوليمر الذي تصنع منه القسطرة البولية مثل Polysterene , و Sulfonated polysterene , و Ethylene , و (Roberts et Propylene (1990).
al.,1990).

٢-٥-٣-٣ الخملة نوع *Proteus mirabilis Fimbriae* (PMF)

عزل الجين المشفر لهذه الخملة وتم التعرف أيضا على تتابع الأحماض الامينية لمتعدد ببتيدي PMF وهو مؤلف من 128 حامضاً أمينياً , و أن هذه الاحماض الامينية تتشابه بنسبة 35% لمتعدد ببتيدي بروتين خملة بكتريا *Serratia marcescens* و بنسبة 15% من متعدد ببتيدي بروتين خملة بكتريا *Klebsiella pneumoniae* (Baharani et al.,1993), أن الجينات التي تشفر للـ PMF هي *pmf A* (38.9) كيلو دالتون , و *pmf F* (19.7) كيلو دالتون (Li et al.,2002a)

ولدراسة احتمالية الدور الذي تؤديه الخملة PMF كعامل فووعه لبكتريا *P.mirabilis* في الاستيطان على خلايا المثانة لا على خلايا الكلية لوحظ عند إصابة الحيوانات التجريبية عن طريق الاحليل بالسلالة الفاقدة لجين *pmf A* بوساطة التطهير ان أستيطان هذه البكتريا في مثانة أقل بكثير من سلالات البكتريا غير المطفرة (Massad et al.,1994), أما Zunino و جماعته (2003) أشار أن للخملة PMF التي تنتجها بكتريا *P.mirabilis* دوراً في الاستيطان على خلايا المثانة و الكلية باستخدام سلالات مطفرة للجين *pmf A* .

٢-٥-٣-٤ الخملة نوع *Ambient-Temperature Fimbriae* (ATF)

تم أستخلاص وتنقية هذه الخملة لأول مرة من قبل Massad و جماعته (1994) , وهي عبارة عن متعدد ببتيدي وحداتها الرئيسية لها وزن جزيئي 24 كيلو دالتون , ينفرد تتابع الاحماض الامينية للـ ATF بأنه لا يشابه تتابع الاحماض الامينية المؤلفة لببتيديات أنواع الخمل الأخرى .

أظهرت تقنية الاضداد المعلمة و المجهر الالكتروني ان هذه الخملة لها شكل عصوي . أما الظروف المثلى لانتاج هذه الخملة هي : مرق اللوريا ,وحضانة 48 ساعة ,و درجة حرارة 23 م والاوبرون الذي يشفر لهذه الخملة يتألف من جينين هما *atf A* و *atf B* (Li et al.,2002).

لوحظ أن ال-ATF ليس لها دور في أحداث خمج المسالك البولية عند تجريبيها على الفئران , أكدت هذه النتيجة الدور الكبير لهذه الخملة في عزلات بكتريا *P. mirabilis* في البيئة المعوية أو في البيئة الخارجية (Zunino et al.,2000).

٥-٣-٥-٥-٢ الخملة نوع (*P. mirabilis* P-like Pili)

شخصت هذه الخملة لأول مرة من قبل Bijlsma و جماعته (1995) من بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من كلب مصاب بخمج المسالك البولية وأمكن تشخيص الجين *pmp A* المشفر لهذه الخملة , يتألف بروتين الخملة P من 183 حامضاً أمينياً وهو يشابه بروتين Uroepithelial Cell Adhesion (UCA) , و أظهر بروتين Pmp A تشابهاً كبيراً مع بروتين خملة Pap لبكتريا *E. coli* , وأن الخملة نوع P يمكن أن تعبر عنها فقط بكتريا *P. mirabilis* ولا تعبر عنها بكتريا *P. vulgaris* , و *P. penneri* , و *Morganella morganii* , و *Providencia rettgeri* .

6-3-5-5-2 الخملة نوع (UCA) Uroepithelial Cell Adhesin

استطاع Wray و جماعته (1986) من عزل و تشخيص بروتين لاصق الخلايا الطلائية من بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من شخص مصاب بخمج المسالك البولية وهذه السلالة هي *P. mirabilis* HU 1069 , أن معظم سلالات بكتريا *P. mirabilis* تمتلك القدرة للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية و بالتالي تسبب خمج المسالك البولية , أن بروتين UCA له القابلية للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية للإنسان ومن خلال استخدام تقنية المجهر الالكتروني أتضح أن هذا البروتين يكون على شكل خيوط عصوية مرنة بقطر ٤ نانومتر وخيوط أخرى بقطر 6 نانومتر ولكن نسبتها 10% من البروتين الكلي , قدر الوزن جزيئي لهذا البروتين بواسطة SDS-PAGE بحوالي 17.5 كيلودالتون مع الحصول على حزمة أخرى

لبروتين ملوث بوزن جزيئي 37 كيلودالتون و بكميات قليلة جدا يعتقد أنها تمثل الخيوط ذات القطر 6 نانومتر على الرغم من كون وزنها الجزيئي يماثل البروتين المكون للاسواط .

و أشار Wray وجماعته (1986) أن قابلية بكتريا *P. mirabilis* HU 1069 للاتصاق على الخلايا الطلائية البولية علاقة بالوسط المستخدم للنمو , إذ لوحظ عند استخدام وسط مرق Luria , ووسط مرق Minimal تم الحصول على نسبة التصاق 29 و 25 خلية بكتيرية مكونة لمستعمرة/خلية طلائية على التوالي , أما في حالة استخدام وسط أكار Luria فإن نسبة الالتصاق تكون 15 خلية بكتيرية مكونة لمستعمرة/خلية طلائية , كما أن UCA ليس لها القدرة على ملازنة كريات الدم الحمر للانسان أو الحيوان .
لوحظ عند دراسة تتابع الاحماض الامينية الـ 20 في الطرف الاميني تماثله بنسبة 46% مع الاحماض الامينية المؤلفة لبروتين الخملة K99 لبكتريا *E. coli* ونسبة تماثل اقل مع بروتين الخملة نوع P ونوع I أيضا لبكتريا *E. coli* إذ تم الحصول على نسبة تماثل 20% و 26% على التوالي , و وجد أن هنالك تماثلاً مع بروتينات الوحدات الرئيسة للخمّل F 17 و F 111A بنسبة 58% و هذه البروتينات عائدة أيضا لبكتريا *E. coli* (Bijlsma et al.,1995) , كما لوحظ أن هنالك تماثلاً محدداً للاحماض الامينية المكونة لبروتين UCA و MR/P بنسبة 19% وكذلك مع PMF , أما التماثل ما بين UCA و خملة *Serratia type Ia* بنسبة 24% (Nichols et al.,1990) .

لوحظ أن الوزن الجزيئي لخملة UCA (17.5) كيلودالتون يختلف عن الوزن الجزيئي لـ MR/P (21) كيلودالتون لذا أقترح Cock و جماعته (1995) أن هنالك أكثر من صنف واحد للبروتين اللاصق و من الممكن أن يسهم في التصاق البكتريا على الخلايا الطلائية .

كان هنالك غموض في النتائج التي حصل عليها Wray و جماعته (1986) حول قدرة الـ UCA على ملازنة كريات الدم الحمر ولاي نوع من أنواع خمل بكتريا *P. mirabilis* يعود هذا البروتين , لذلك عمل Tolson و جماعته (1995) للتحري عن الظروف المثلى لانتاج هذا البروتين و تشخيص أكثر وضوحا لمستخلص الخملة و بالتالي أطلق تسمية جديدة على الـ UCA وأستبدلها بمصطلح Non-agglutinating Fimbriae (NAF) و التي حصل عليها من تلقيح بكتريا *P. mirabilis* HU 1069 على وسط أكار Luria , أذ أوضح هذا الباحث أن لهذه الخملة قطر بحوالي 5 نانومتر و معدل طول 2.2 مايكرومتر و وزن جزيئي 28 كيلودالتون , وبشكل عام فإن الاوزان الجزيئية لخملة NAF المستخلصة من 8 سلالات لبكتريا *P. mirabilis* تراوحت ما بين (23-29) كيلودالتون , أما تتابع الاحماض الامينية للـ 20 حامض أميني للطرف الاميني أظهر تشابهاً للاحماض الامينية المكونة لبروتين UCA الذي ذكرها Wray , و أظهرت

NAF قدرة للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية للانسان خارج الجسم الحي كما أنها غير قادره على ملازنة كريات الدم الحمر للانسان أو الحيوان .

٢-٥-٥-٤ : الأنتيال Swarming

الأنثيال هو حركة البكتريا بشكل أمواج ابتداءً من حافة المستعمرة الأصلية بواسطة الأسواط Flagella وتلاحظ ظاهرة الأنتيال بوضوح على الأسطح الصلبة الأعتيادية، ويمتاز جنس المتقلبات *Proteus* بهذه الظاهرة عن بقية أجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae (Gue, et al, 2001)

تنمو بكتريا الـ *Proteus* على الأسطح الصلبة بدايةً من دون تموج (Swarming) ثم تبدأ الحركة الزاحفة بعد (3-8) ساعات من التلقيح عندما يصل قطر المستعمرة الى (8) ملم تقريباً ، ويكون هذا النمو غير مستمر (Discontinuous) إذ تبدأ الحركة لمدة معينة ثم تتوقف لمدة ثم تبدأ حركة ثانية من جديد وبذلك تكون الحركة بشكل أمواج تمثل دورة الأنتيال (Swarming Cycle) وينتج عن هذه الدورة مستعمرات بشكل (bull's eye) وتعني قلب الرمية أو نقطة الهدف الرئيسة (Liaw et al., 2000; Belas et al., 1998). تعد هذه الحركة ذات أهمية لبكتريا *Proteus* لأحداث الأصابة بالتهابات المسالك البولية إذ تستطيع البكتريا غزو أجزاء مختلفة من القناة البولية بواسطة هذه الحركة السريعة المتوسطة بالأسواط (Legnani - Murphy & Fasjardo et al., 1996 ; Kallenus et al., 1986) وفي دراسة أجراها الباحثان Murphy & Belase (1999) وجدا أن بكتريا *Proteus mirabilis* تملك جينين هما *FlaA*, *FlaB* متناظران مع بعضهما (Homologous) ومع جينات بروتين Flagellin لأنواع بكتيرية أخرى وهما يؤديان دوراً في ضراوة البكتريا بهذا العامل.

أشار الباحث Belase وجماعته (1998) الى أن الطافرات الفاقدة لهذه الصفة ينقصها موقع (5.4-K.b locus) على الكروموسوم يشفر لـ RsbA (Regulator of swarming behavior).

تعتمد سرعة هذه الظاهرة على كمية اللقاح (Inoculum) , تركيز الأكار بالوسط الزراعي وزمن الطور اللوغاريتمي للمزروع البكتيري ، ويمكن تثبيط هذه الحركة بأستعمال مواد كيميائية مثل Boric acid ,

(Liaw et al., 2000) P – nitro phenylglycerol, Sodium azide

أو استعمال وسط الماكونكي الذي يعمل على منع الحركة بسبب أحتوائه على أملاح الصفراء (Jones et al., 1990) . وكذلك تستعمل بعض المضادات الحيوية لتثبيط هذه الحركة مثل الأمبيسلين ، الكاناميسين

والتتراسايكلين والسلفونومايد (Swihart & Welch, 1990) .

٢-٥-٥-٥ Endo-Toxin الذيفانات الداخلية

تمتلك بكتريا المتقلبات *Proteus mirabilis* متعدد السكريد الشحمي Lipopoly (LPS) saccharide والذي يعد من المكونات الأساسية للغشاء الخارجية وهو أحد عوامل الضراوة الرئيسة لهذه البكتريا (Kaca *et al.*, 2000). أشار الباحث Torzewska وجماعته (2003) الى أنه يحتوي على سلسلة O'specific ومنطقة اللب Core علاوة على منطقة الـ Lipophilic وتدعى Lipid A الذي يعمل على تثبيت عديد السكري الشحمي (LPS) على الغشاء الخارجي للبكتريا, كما لاحظ أن السلسلة O'specific في سلالات بكتريا *Proteus* يكون حامضيا" نتيجة لوجود أحماض اليورنك (Uranic acids) زيادة الى مكونات حامضية أخرى غير كاربوهيدراتية مثل مجاميع الفوسفات. أشار الباحث Clapham وجماعته (1990) الى أن هذه الخاصية الحامضية لعديد السكريد الموجودة على السطح الخارجي لبكتريا *Proteus mirabilis* ربما تؤدي دوراً في تكوين الحصوات البولية ولاسيما حصوات الستروفيت Struvite فضلاً على حصوات كربونات الأبتايت apatite إذ تمكن هذه الشحنات مركبات عديد السكريد من الارتباط بأيونات الكالسيوم²⁺ Ca وأيونات المغنيسيوم Mg²⁺ مما يؤدي الى تكوين الحصوات (Torzewska Dumanski *et al.*, 1994). (et al ., 2003 ;

2-5-5-6 البكتريوسينات Bacteriocins :

تنتج بكتريا *Proteus mirabilis* نوعاً من البكتريوسينات يدعى بروتيسين (Proticine) وهو عبارة عن مادة بروتينية تزيد من ضراوة البكتريا كما أنه يؤدي دوراً مهماً في انتشار البكتريا المنتجة له في منطقة استيطانها داخل جسم المضيف (Green, *et al.*, 1997): العزاوي وجماعته (٢٠١١). أوضح الباحث Senior (1997) أن هناك ارتباطاً وثيقاً بين بكتريا *Proteus mirabilis* المنتجة للبروتيسين وألتهاب المسالك البولية العليا مقارنة بارتباطها بالتهابات المثانة ولا يعرف السبب فيما إذا كان هناك مستقبلات خاصة للبروتيسين موجودة على سطوح الخلايا في المسالك البولية العليا أكثر من وجودها في المثانة.

٢-٥-٥-٧ أنزيم البروتيز Protease

ان دور الكلوبوليينات المناعية هي حماية الانسان و الحيوان من الاصابات البكتيرية و أفرازاتها , لذلك غالبا ما ينتج IgA في طبقة الاغشية المخاطية و الانسجة المبطنة , كما و تقاوم هذه الكلوبوليينات معظم الانزيمات المحللة للبروتينات , أما أنزيم البروتيز يتميز بقدرته على شطر الكلوبوليينات الى جزيئين Fab و Fc عند منطقة العنق (Hinge region) (Loomes *et al.*, 1990) . ان الرقم الهيدروجيني الامثل لعمل أنزيم البروتيز هو الـ pH القاعدي (Rando *et al.*, 1990) .

ان ادرار الشخص غير المصاب بالتهاب المسالك البولية يحتوي ضمن مكوناته IgG و IgA أما أدرار الشخص المصاب بالتهاب المسالك البولية فيحتوي على جزيئات الكلوبولينات المناعية و بحجم مطابق للجزيئات المتكونه كنتيجة لفعل أنزيم البروتيز خارج الجسم الحي (Senior,1993) , كما أثبت الربيعي (2001) ان أنزيم البروتيز المستخلص من بكتريا *P.mirabilis* قد تمكن من شطر الضد IgM فضلا عن الاضداد IgA و IgG الموجود في المصل القياسي .

الكثير من سلالات بكتريا *P.mirabilis* تنتج أنزيم Zap A metalloproteases (Senior et al.,1987). وان أنتاج هذا الانزيم يرافق تمايز الخلايا المتموجة و ظاهرة (Walker et al.,1999) . يعد أنزيم Zap A أحد أفراد عائلة البروتيازات المعدنية (Metalloproteases) و تم التأكد من خلال الاستدلال على تتابع الاحماض الامينية لهذا الانزيم , هذا الانزيم يحتاج في عمله الى أيون الزنك و أيون موجب ثنائي التكافؤ (Collee et al.,1996).

يعمل أنزيم Zap A على تحلل الكلوبولينات المناعية IgA و IgG كما يعمل هذا الانزيم على تحلل و تحطيم الببتيدات الضد المايكروبية (Antimicrobial peptides) مثل (hBD1) Human β -definsin1 و LL-37 و هي تعتبر من دفاعات الجسم الذي تنتجها أو تفرزها النيبات البعيدة و عروة هنلي و القنوات الجامعة في الكلية عند بداية الاصابة بالتهاب المسالك البولية , كما ان الـ LD50 تكون أقل بنسبة 50% في السلالات المنتجة لانزيم Zap A مقارنة بالسلالات غير المنتجة لهذا الانزيم (Belas et al.,2004) .

٢-٥-٨ الخمل و تخليقها الحيوي

تبرز من سطح العديد من أجناس البكتريا المعوية زوائد لا يمكن رؤيتها الا بالمجهر الالكتروني و سميت بالخمل (Fimbriae) و لأول مرة من قبل Duguid سنة (1957) . وجد ومن خلال دراسات كثيرة أن للخمل دوراً في التصاق البكتريا على أنسجة المضيف ثم (Svanborg- الاستيطان (Eden et al.,1978) , وهذه العضيات عبارة عن تراكيب خيطية طويلة تقع على سطح البكتريا و بأعداد كبيرة تقريبا 500 نسخة/ خلية بكتيرية (Klemm and Schembri, 2000) .

تشارك بروتينات اللاصق التي تقع عند قمة الخملة مثل : Fim H , و Fim G , و Fim A , و Fim F في عملية بناء وتنظيم تخليق الخملة (Klemm and Christiansen,1987; Russell and Orndorff,1992) .

بروتين اللاصق (Fim H (adhesin) و الذي يقع في قمة الخملة التابعة للنمط الاول في بكتريا *E. coli* يتوسط الالتصاق بالمستلمات التي يدخل في تركيبها سكر D-mannosides و الموجودة على الخلايا الطلائية للمثانة (Schembri et al., 1996).

أما بروتين لاصق الخملة (P adhesin) نوع Pap G التابعة لبكتريا *E. coli* يتوسط الالتصاق بالمستلمات التي يدخل في تركيبها α -D-Gal (1-4) β -D-Gal و الموجودة على الخلايا الطلائية للكلىة (Roberts, 1996).

2-5-6 مقاومة بكتريا *P. mirabilis* للمضادات الحيوية

تعد مضادات الحياة من النواتج الايضية للاحياء المجهرية و هي مواد كيموحيوية قد يكون لها تأثير قاتل (Bacteriocidal) أو مثبط (Bacteriostatic) لاحياء مجهرية أخرى .

2-5-6-1 مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance

كان لإكتشاف المضادات الحيوية الأثر الكبير في انخفاض معدل الإصابات البكتيرية , ولكن التوسع في استخدام مضاد حيوي معين وبشكل متكرر, أدى إلى ظهور سلالات جديدة مقاومة له. وطبقا لتقارير منظمة الصحة العالمية لعام 2014 فإن هنالك مشكلة عالمية تتمثل بازدياد الإصابات بالمسببات المرضية وبشكل أوبئة , فضلاً عن كون هذه المسببات المرضية تحمل مقاومة للكثير من الأدوية , حتى إن بعض السلالات تكون مقاومة لمعظم المضادات المعروفة (Yah , et al, 2007; Laura et al., 2002).

أن الأساس الجزيئي لنشوء المقاومة قد ينتج من التغييرات الدائمة في المحتوى الوراثي عن طريق آليات كثيرة منها الطفرات , واكتساب جينات المقاومة من عزلات أو سلالات مقاومة , والتي تنتقل عن طريق العاثيات أو الاقتران أو عن طريق التحول (Transformation) , أو عن طريق نواقل وراثية (Transposons) (Normark and Normak, 2002) .

يعد الاقتران البكتيري من أكثر الطرق شيوعاً لانتقال بلازميدات المقاومة وعوامل الضراوة وبصورة سريعة والذي يعتمد على وجود البلازميدات الاقترانية (Conjugative plasmids) أو النواقل الوراثية الاقترانية (Conjugative transposons) , ومن هذه البلازميدات هو بلازميد R (R plasmid) اذ يحصل الاقتران بتكرار عال بين سلالات من النوع نفسه أو الأنواع المتقاربة (Dionisio et al., 2002).

إن تطور ونشوء المقاومة للمضادات الحيوية ما هو إلا نتيجة لسوء وكثرة استعمال هذه المضادات , كذلك الاستخدام غير السريري للمضادات والذي يؤدي دوراً كبيراً في انتشار المقاومة , فضلاً عن إن ما يقارب نصف المضادات الحيوية المنتجة في الدول الصناعية تستعمل لأغراض زراعية وفي تدعيم الأغذية للحيوانات

مثل الأبقار, إذ تستخدم لإغراض العلاج أو الوقاية من الإصابات أو لتحفيز نمو الحيوان ولزيادة الإنتاج , وبالتالي يمكن انتقال البكتريا المقاومة إلى الإنسان عن طريق السلسلة الغذائية أو بالتلامس المباشر مع الحيوانات الحاملة للبكتريا المقاومة للمضادات (Bergogne- Berezin,1997).

وتعمل البكتريا على مقاومة المضادات من خلال آليات متعددة وهي :

1- إحداث تغيير في المضاد الحيوي مثل تحطيم حلقة β -lactam في جزيء البنسلين بوساطة أنزيم β -lactamase وبذلك يصبح الجزيء غير فعال , وان الطريقة الرئيسية لمقاومة البكتريا للبنسيلينات هي إفرازها لأنزيمات البنسيلينيز أو β -lactamase عندما تتعرض للمضاد, كما تملك معظم البكتيريا الممرضة للجهاز البولي الشائعة ميكانيكيات مقاومة للمضادات الحيوية أو تكتسب هذه الميكانيكيات , خاصة المتضمنة أنتاج أنزيمات β -lactamases وذلك من خلال إعادة التركيب الوراثية, إلا أن بعض البنسيلينات والسيفالوسبورينات لا تتأثر بهذه الأنزيمات بل تكون ذات ألفة عالية لها, فترتبط بها وبالتالي قد تمنعها من تخريب البنسيلينات الحساسة لهذه الأنزيمات, وهذا هو أحد أشكال التعاضد (التعاون) بين مضادات الميكروبات, كما في حالة المضاد clavulanic acid الذي يبدي تأثيراً تعاونياً عند ارتباطه بـ Aztreonam او ceftazidime . (Arlet *et al.*, 1991 ; Petit *et al.*, 1992).

2- إحداث تغييرات في التركيب الوراثي البكتيري أي تغيير في الجينات الكروموسومية والذي يعرف بالشذوذ الكروموسومي, وبالتالي تكتسب هذه الجينات صفة وراثية مكتسبة تقاوم المضاد الحيوي, أو بوساطة اكتساب جينات المقاومة من الميكروبات الأخرى , مما قد تؤهل الخلايا البكتيرية سواء لإنتاج أنزيمات تغير في تركيب المضاد الحيوي , أو تغير أنظمة النفاذية مما يعوق وصول المضاد الحيوي إلى هدفه داخل الخلية البكتيرية, أو اتخاذ مسار أضي بديل والذي يجنب الخلية البكتيرية مفعول المضاد الحيوي (Tenover, 2006).

3- تثبيط المستقبلات المضاد الحيوي على خلايا البكتيرية , مثل بناء غشاء خلوي جديد من البروتين مختلف لا يحمل على سطحه مستقبلات المضاد الحيوي (Turnidge *et al.*, 2002).

استخدمت الأقراص الورقية بقطر 6.5 ملليمتر, وتمتاز طريقة استخدام أقراص المضادات الحيوية بسهولة و قابليتها على تمييز الكائنات النامية الى حساسة و مقاومة زيادة على توافرها بشكل واسع مما جعلها تستخدم بكثرة في المختبرات البكتريولوجية (Piddock, 2008).

ان من أهم العوامل التي تؤدي الى تحديد قطر منطقة التثبيط و حسب (Quinn *et al.*,1998) هي:

- الوسط الزراعي المستخدم لإجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية ، فقد وجد ان وسط آگار مولر هنتون هو الأنسب لإجراء فحص الحساسية لكونه يحتوي على كمية قليلة من كلوريد الصوديوم و نسبة قليلة من أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم و التي يمكن ان تؤثر في فعالية بعض المضادات.
- كثافة المزروع البكتيري : اذ يؤثر ذلك في أنزيمات تثبيط المضادات التي تنتجها البكتريا.
- نوع المضاد الحيوي المستعمل ، و تركيزه في القرص.
- ظروف الحضانة : حيث يتم الحضانة بدرجة ٣٥ م° و لمدة ١٦-١٨ ساعة ، و لا يفضل حضانة الأطباق بزيادة تركيز ثاني أو أكسيد الكربون اذ يؤثر ذلك في قطر منطقة التثبيط لبعض المضادات الحيوية.
- نوع البكتريا تحت الاختبار : حيث تختلف منطقة التثبيط حسب الأنواع و السلالات البكتيرية تحت الاختبار.

تأتي أهمية فحص الحساسية للمضادات الحيوية من خلال إمكانية اختيار المضاد الحيوي الكفوء بتأثيره في البكتريا تحت الاختبار (Alwan & Abou,1998) ، و بذلك يتم التقليل من الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية و الذي يعد احد الأسباب المهمة في ظهور المقاومة.

6-2 الطرائق المعتمدة على الدنا DNA-based methods

تعتمد الطرائق الجزيئية على التحري عن المادة الوراثية في بكتيريا *Proteus mirabilis* إذ تمتاز هذه التقنيات الحديثة بحساسية و خصوصية وسرعة عالية ، قد أسهمت هذه التقنيات في تجاوز سلبيات الطرائق المخبرية التقليدية من حيث استهلاكها للوقت والجهد، فضلاً عن اشتراط وجود بكتريا حية لكي يتم عزلها وتشخيصها (Meng et al .,1996). وتشتمل الطرائق الجزيئية على عدة تقنيات والتي منها :-

١-٦-٢ تقنية تهجين الحامض النووي Nucleic acid hybridization

اعتمدت طريقة تهجين الحامض النووي على استخدام مجسات (probs) معلمة ، والتي غالباً ما تكون من شريط مفرد من الدنا ، وذات تتابع نوعي للتحري عن جينات البكتريا، فقد يكون التتابع للجين بأكمله

فيسمى DNA prob أو قد يكون التابع لجزء من ألجين فيسمى Oligonucleotide prob , والذي هو عبارة عن قطعة صغيرة من شريط ألدنا المفرد والمكمل لتتابعات ألجين الهدف . تستند طرائق التهجين على وجود أو غياب الجينات خلافا للتقنيات المناعية والكيموحيوية التي تعتمد على نواتج التعبير الجيني أو النواتج النهائية للتفاعلات الكيموحيوية . وعلى نحو عام فإن التقنيات المعتمدة على التهجين تحتاج إلى الكثير من الوقت والجهد والكلفة بالإضافة إلى كميات كبيرة من ألدنا وبنقاوة عالية (Williams *et al.*, 1993 ; Hill *et al.*,1998) .

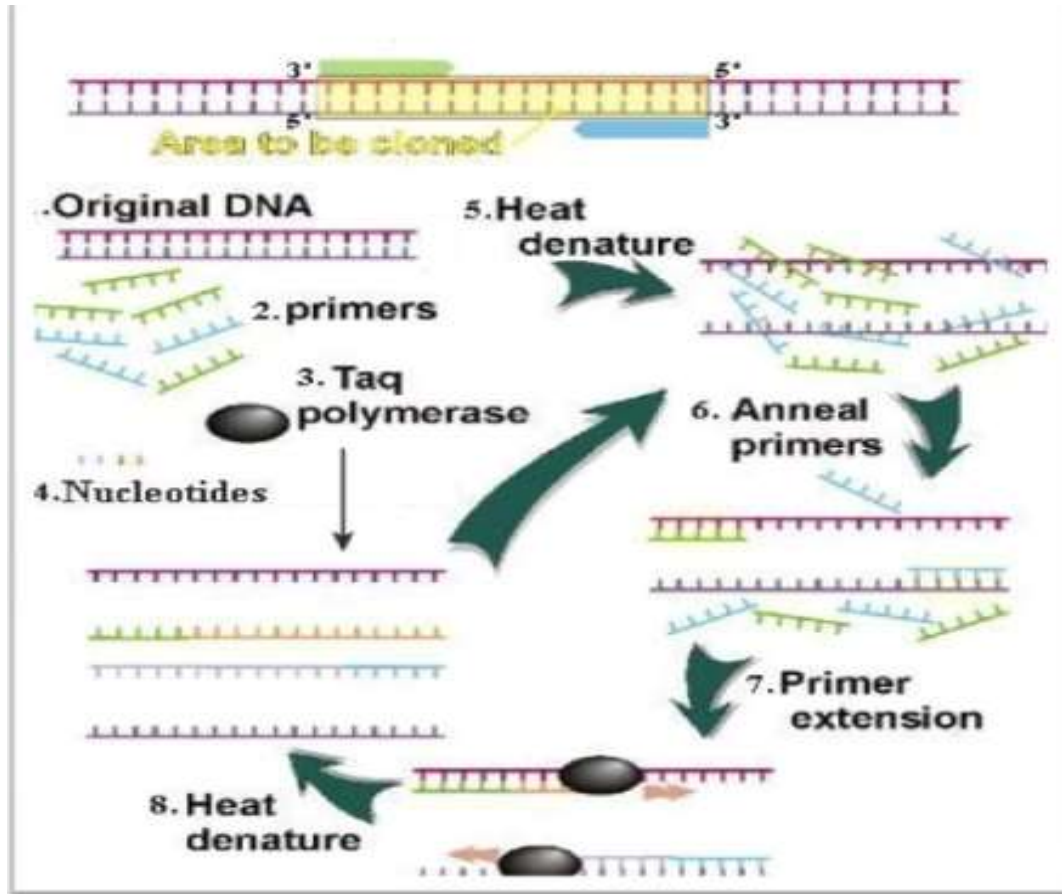
٢-٦-٢ تفاعل البوليميريز لسلسلة الدنا

تطور علم الوراثة الجزيئية عند النصف الثاني من القرن الماضي تطورات كبيرة فقد تمكن Kary Mullis عام (1986) من ابتكار تقانة التفاعل الكوثرية لسلسلة ألدنا (PCR) وقد بنيت الفكرة على أساس مضاعفة المادة الوراثية الدنا داخل الخلية بصورة طبيعية. وقد أحدثت هذه التقانة ثورة في عالم البيولوجيا الجزيئية وتطوراً هائلاً في هذا المجال, وجعلت للزمن مقاييس أخرى لسرعتها ولدقتها ومرورتها وبهذا استحق عليها Mullis جائزة نوبل عام 1993, ويمكن تعريف هذه التقانة بأنها القدرة على حدوث تضاعف نوعي وكمي لقطعة أو قطع من ألدنا أنزيميا ملايين المرات خارج الجسم الحي *in vitro* بوجود البادئات وبزمن قصير. تعد تقنية PCR اليوم التقنية الأكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع أنحاء العالم , و الأساس الذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى الدنا لما تمتاز به من خصوصية (Specificity) من حيث قدرتها على التعامل مع أعداد كبيرة من النماذج , وكونها لا تتطلب كميات كبيرة من ألدنا (Mullis and Fallona,1987).

ويمكن اعتبار تقنية PCR ترجمة مبسطة لعملية أنتساخ الحمض النووي DNA في أثناء الإنقسام الخلوي. ولكي يتم هذا الإنتساخ لا بد من توافر مواد معينة تساعد على ذلك (Joseph and David , 2001; Griffiths *et al.*, 1996)

- البادئات (Primers) وهي عبارة عن نيوكليوتيدات قليلة 18-20 Oligonucleotides قادرة على الإرتباط مع تسلسل الحامض النووي المراد تضخيمه، وذلك في منطقة ذات تسلسل مميز ونوعي وتعرف بمنطقة عالية الحفظ Highly Conserved Region.
- كميات وافرة من النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) (dATP,dCTP,dGTP,dTTP).
- انزيم البوليميراز (Polymerase) مقاوم للحرارة المرتفعة، وأهمها Taq Polymerase المستخلص من بكتيريا تعيش في الينابيع الحارة (Thermus aquaticus).
- محاليل دائرة Buffers .
- ايونات مناسبة أهمها أيون المغنيسيوم (Mg+2) الذي يعد عاملاً مساعداً (Cofactor) لأنزيم البوليميراز.
- قالب DNA (Template DNA) الذي يستعمل كقالب من لدن الانزيمات لعمل شرائط DNA جديدة.

- تتكون تقنية PCR من ثلاث مراحل في دورة واحدة , الشكل (2-2) ;
- (Griffiths et al., 1996 Sharkey et al., 1994):
- مرحلة المسخ الحراري (Thermal denaturation). وهي فصل الشريط المزدوج (ds-DNA) إلى شريطين منفصلين (ss-DNA) وتتم هذه المرحلة عند درجة حرارة 94 م.
 - مرحلة تشفع البادئات (Primers annealing).
 - آر تباط كلتا البادنتين مع الشريطين المنفصلين عند درجة حرارة 55 م.
 - أستطالة البادئات المتشعبة (Annealed primers extension).
- بمساعدة أنزيم البوليميراز وذلك بإضافة dNTPs ابتداءً من البادئة وفي الإتجاه 3 ← 5، وتتم هذه المرحلة عند درجة حرارة 72 م. تعاد هذه الدورة ذات الخطوات الثلاث عدداً من المرات، مما يؤدي إلى زيادة جزيئات DNA بشكل أسي.



الشكل (٢-٢) : عمليات تضخيم الجين داخل جهاز PCR (Griffiths *et al.*, 1996).

يمكن الكشف عن ناتج التضخيم (Amplicons) طرائق عدة أهمها: الترحيل الكهربائي على هلام

الأكاروز (Agarose Gel Electrophorsis) (Lopez-Rios *et al.*, 2004).

تتضمن هذه التقنية عدداً من الدورات لتضاعف قطعة الدنا وكل دورة تتكون من ثلاث مراحل متتابعة ومتكررة ضمن برنامج يغذى به جهاز التضخيم الحراري.

جهاز التضخيم الحراري الحلقي Thermocycler

يعد هذا الجهاز من أهم متطلبات إجراء تفاعل PCR , وقد تم تصميمه لتوفير الدرجات الحرارية المطلوبة لكل دورة , ولجميع العينات المدروسة , واستيعابه لعدد كبير من العينات , ويتوجب الدقة في تنظيم

البرنامج الذي يغذى به الجهاز والمتضمن الدرجات الحرارية والمدة التي تستغرقها كل دورة , إضافة لعدد الدورات والوقت المستغرق بين دورة وأخرى (Sambrook *et al.*, 1989).

٢-٦-٣ مميزات وتطبيقات تقنية PCR

أظهرت تقنية PCR مميزات كبيرة مما جعلها تأخذ مكانة واسعة في الأبحاث التجريبية والتطبيقية , لما تمتاز به من الدقة والخصوصية والحساسية العالية في الكشف عن قطعة دنا هدف ضمن الآلاف من تلك القطع , كما إنها تعد طريقة سهلة وسريعة وخاصة في حالات الأوبئة , فضلاً عن إن كمية ونوعية الدنا المستخدم ليس بالضرورة أن تكون عاليتين مما جعل تطبيقها يشمل اغلب المجالات العلمية , فضلاً عن استخدامها في التحليل الوراثي لعزل ودراسة المجينات (Fode-Vaughan *et al.*, 2003). أحدثت هذه التقنية ثورة في مجال تشخيص المسببات المرضية لتكون البديل القوي لطرائق التشخيص التقليدية , كالاعتماد على الصفات المظهرية والمقاومة لمضادات الحيوية بسبب حساسيتها في القدرة عن الكشف عن خلية واحدة من المسبب المرضي خلال مدة قصيرة جداً, بينما تتطلب الطرق التقليدية تنمية المسببات المرضية على الأوساط الملائمة التي قد تستغرق وقتاً طويلاً فضلاً عن كون بعض المسببات المرضية غير قادرة على النمو خارج الجسم الحي *in vitro* وان أهم ميزة في هذا النوع من التطبيقات هو تصميم البادئ المناسب الذي يكون متخصصاً لذلك المسبب المرضي (Hulton *et al.*, 1991).

3- المواد وطرائق العمل

1-3 المواد

1-1-3 الأجهزة والأدوات المستعملة

التسلسل	اسم الجهاز	الشركة المصنعة
1	ثلاجة (براد) Refrigerator	Sharp Inc. (Japan)
2	جهاز PCR Thermal cycler	ABI(USA)
3	جهاز الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet transilluminator	U V products , USA
4	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis apparatus minisub (Tm) DNA cell	Bio - Rad ,Italy
5	جهاز تقطير Water distiller	GFL(Germany)

Netherland and Himz Gmb 2000 , Germany	Eppendorf bench centrifuge	جهاز النبذ المركزي	6
Netheland (Germany)	Centrifuge	نابذ مركزي	7
Selecta , Germany	Incubator G24 shaker	حاضنة هزازة نوع	8
Selecta ,Spain	Incubator	حاضنة اعتيادية	9
GFL , Germany	Water Bath	حمام مائي	10
Clay Adams , Germany	Vortex	خلاط منضدي	11
Bio-Merieux (France)	ApI20E	عدة تشخيص	12
Gallen Kamp	Oven	فرن كهربائي	13
Sony , Japan	Digital camera	كاميرا رقمية	14
Hiryama(Japan)	Autoclave	مؤصدة	15
Brand -(W .Germany)	Micropipettes	ماصات دقيقة بإحجام مختلفة	16
Olympus , England	Microscope	مجهر ضوئي	17
Sartorius membrane , Germany	Filter paper	مرشحات دقيقة 0.22 ,0.45	18
Metrohm AG (Spain)	pH-meter	مقياس الأس الهيدروجيني	19
Mettler instrument , Swiss.	Sensitive Balance	ميزان حساس	20
Pioneer (Korea))	Nano drop	جهاز قياس تركيز ال DNA	٢١

3-1-2 المواد الكيماوية والحيوية المستعملة في الدراسة
استخدمت في هذه الدراسة كل من المواد الكيميائية والبايولوجية الآتية :

الشركة المجهزة والمنشأ	أسم المادة	ت
Fluka/ Switzerland	Acetone	1 أسيتون
BDH ,UK	EDTA	2 اثيلين ثنائي أمين رباعي حامض ألكيك
Promega , USA	Agarose	3 اكاروز

Promega , USA	Ethidium bromide	بروميد الاثيديوم	4
Difco ,UK	Pepton	بيبتون	5
BDH	Trypton	تربتون	6
BDH	Tris -HCl	ترس حامض الهيدروكلوريك	7
BDH	Tris - base	ترس قاعدي	8
Promega , USA	TBE	دارئ الترحيل	9
BDH	Bromophenol blue staining	صبغة البروموفينول الأزرق	10
BDH	Phenol red	صبغة الفينول الأحمر	11
BDH	Methyl red	صبغة المثيل الأحمر	12
Pioneer (Korea)	Master mix PCR	عدة المزيج الرئيسي للـ PCR	13
Geneaid	DNA extraction kit DNA	عدة أستخلاص	14
BDH	SDS	كبريتات دودسيل الصوديوم	15
BDH ,England	Butanol	كحول البيوتانول	16
BDH , UK	Absolute Ethanol 99%	كحول اثيلي مطلق	17
Fluka	Chloroform	كلورفورم	18
Fluka	Sodium chloride	كلوريد الصوديوم	19
Merck , Germany	Calcium chloride	كلوريد الكالسيوم	20
BDH	Magnesium chloride	كلوريد المغنيسيوم	21
Fluka , Germany	Glucose	كلوكوز	22
BDH	Glycerol	كليسيرول	23
Oxoid/ England	Mannitol	المانيتول	24
BDH	Sodium hydroxide	هيدروكسيد الصوديوم	25

3-1-3 الأوساط الزرعية المستعملة

1-3-1-3 الأوساط الزرعية الجاهزة

استخدمت في هذه الدراسة كل من الأوساط الزرعية الآتية:

الشركة المجهزة والمنشأ	أسم الوسط	ت
Oxoid , U.K	Blood base agar	أكار الدم الأساس 1
Oxoid	Brain haert infusion broth	نقيع القلب الدماغ السائل ٢
Oxoid	Muller - Hinton agar	أكار مولر هنتون 5
Oxoid	MacConkey agar	أكار الماكونكي 6
Oxoid	Motility medium	وسط الحركة 7
Oxoid	Nutrient agar	أكار المغذي 8
Oxoid	Nutrient broth	المغذي السائل 9
Himedia, India	Simmon citrate agar	أكار سترات سايمون 10
Oxoid	Urea base agar	أكار اليوريا 13
Oxoid	Xylose –Lysine Deoxycholate (XLD) medium	14

2-3-1-3 أقراص مضادات الحياة (Antibiotic Disks)

اسم المضاد	الرمز	تركيز (مايكروغرام / قرص)	الشركة المجهزة والمنشأ
Piperacillin	Pip	10	Oxoid / U K
Ampicillin	Am	30	Oxoid
Amoxillin	Amc	25	Oxoid
Amikacin	A	30	Oxoid
Ciprofloxacin	CIP	5	Oxoid
Norfloxacin	No	5	Oxoid
Gentamicin	GEN	10	Oxoid
Tetracycline	T	10	Oxoid
Tobramycin	To	10	Oxoid
Meropenem	Me	30	Oxoid
Streptomycin	St	30	Oxoid

2-3 طرائق العمل

1-2-3 الأوساط الزرعية الجاهزة

حضرت الأوساط الزرعية الجاهزة بحسب تعليمات الشركة المصنعة لها والمثبتة على العبوة الخاصة بكل وسط , وعدل الرقم الهيدروجيني (pH) لها وعمقت تبعاً لنوع الوسط الزراعي بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة وتحت ضغط ١٥ باوند/انج², حضنت الأوساط الزراعية بعد صبها في الإطباق أو الأنابيب وبحسب متطلبات التجربة في درجة 37 م° مدة 24 ساعة للتثبيت من عدم وجود تلوث ثم حفظ في درجة 4 م° لحين الاستعمال .

2-2-3 الأوساط الزرعية التركيبية

1-2-2-3 وسط أكار الدم (Blood Agar Medium)

حضر وسط أكار الدم الأساسي (Blood agar base) بحسب تعليمات الشركة المصنعة (Oxoid ,U.K) وعقم بالمؤصدة ثم برد إلى درجة حرارة (50) م وبعدها أضيف إليه الدم بنسبة 5% ومزج بلطف ثم صب في الإطباق , وترك ليتصلب.

3-2-2-2 وسط اليوريا (Urea -media) (Collee et al ,1996)

حضر هذا الوسط بإذابة 24 غرام من أكار اليوريا (Urea agar Base) في 950 مليلتر من الماء المقطر ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 وعقم بالمؤصدة ثم ترك ليبرد إلى درجة حرارة 50 م . ثم أضيف 50 مليلتر من محلول 40% من اليوريا المعقمة باستعمال مرشحات دقيقة بقطر 0.45 مايكروميتر. ثم صب بواقع 15 مليلتر لكل أنبوب بشكل مائل وحفظ في درجة حرارة 4 م . استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات لإنتاج إنزيم اليوريز.

3-2-2-3 وسط اختبار الاندول (Indol test media) (Collee et al,1996)

حضر هذا الوسط بإذابة 20 غراماً من البيبتون و 5 غرام من كلوريد الصوديوم في 950 مليلتر من الماء المقطر, ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 وأكمل الحجم إلى 1000 مليلتر وعقم بالمؤصدة , ثم صب في أنابيب بواقع 5 مليلتر لكل أنبوب , وحفظ في درجة حرارة 4 م , استعمل هذا الوسط لاختبار قابلية العزلات على استهلاك التربتوفان .

3-2-2-4 وسط لوريا السائل (Luria - bertani medium) (Monthon and Songtham,2008)

حضر هذا الوسط بإذابة 10 غرام من التربتون و 5 غرام من مستخلص الخميرة و 5 غرام من كلوريد الصوديوم في 950 مليلتر من الماء المقطر ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7 وأكمل الحجم إلى 1000 مليلتر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م ° ولمدة 15 دقيقة وتحت ضغط 10 باوند/انج².

3-2-2-5 وسط المثيل الأحمر- فوكس بروسكور Methyl RED -Voges Proskaur (Wistrieck, 2003) Media

حضر هذا الوسط بإذابة 7 غرام من الببتون و 5 غرام من كلوكوز و 5 غرام من فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين K_2HPO_4 في 950 مليلتر من ماء مقطر ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 وأكمل الحجم إلى 1000 مليلتر وعقم بالمؤسدة ثم صب بواقع 5 مليلتر لكل أنبوب وحفظ في درجة حرارة 4 م°.

3-2-2-6 وسط الحركة **Motility media** (Harley and Prescott, 1996)

حضر بإذابة 10 غرام من تربتون و 5 غرام من كلوريد الصوديوم و 5 غرام أكار-أكار في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر من الماء المقطر , ثم عقم في المؤسدة بعد ضبط الأس الهيدروجيني عند 7.2.

3-2-2-7 وسط اختبار تخمر السكريات **Sugars fermentation medium**

ويتكون هذا الوسط من جزئين حضر على وفق ما ورد في (Macfaddin, 2000).

أ- قاعدة الوسط (**Medium base**)

أذيب 10 غرام بيتون , 1 غرام خلاصة لحم البقر , 5 غرام NaCl, 0.018 غرام من احمر الفينول وأكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني عند 7.5 ثم وزعت على أنابيب اختبار وعقمت الأنابيب بالمؤسدة .

ب- محلول السكر (**Sugar solution**)

حضرت السكريات المستعملة بتركيز 1% باستعمال الماء المقطر وعقمت بالترشيح بمرشحات 0.22 مايكروميتر, وأضيف 0.1 مليلتر من المحلول السكري إلى كل أنبوب من الأنابيب السابقة (أ) . إذ استخدمت سكر كلوكوز ولاكتوز ومانتوز و سوربيتول و سكروز و مالتوز .

3-2-2-8 وسط إدامة العزلات البكتيرية (**Maintenance medium**)

لقت الأنابيب الحاوية على وسط الاكار المغذي المائل بالعزلات البكتيرية وتم حضنها في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة , بعدها حفظت في درجة حرارة 4 م° لحين الاستخدام , وتمت عملية إدامة العزلات بشكل دوري شهرياً وذلك بتنشيطها على الوسط المغذي السائل , ثم إعادة زرعها على وسط مائل جديد لضمان بقاء العزلات بشكل نشط حتى اكتمال مدة الدراسة (Benson, 2002).

3-2-2-9 وسط حفظ العزلات (Ausubel et al., 1987)

حُضِر الوسط المستعمل لحفظ العزلات البكتيرية , بإضافة 15 مليلتر من الكليسرول إلى 85 مليلتر من نقيع الدماغ والقلب (Brain heart infusion) , وزع في قناني صغيرة ذوات غطاء محكم وعقم بالمؤصدة ثم ترك ليبرد في درجة حرارة الغرفة , وبعد ذلك لفتح بمستعمرات نقية من البكتريا النامية على وسط الاكار المغذي بالناقل , وحفظت القناني في درجة حرارة -20 م° بعد حضانتها لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37 م° استعملت هذه الطريقة في الحفظ طويل الأمد .

3-2-3 عمليات التعقيم:

1- المؤصدة

عُقمت الأوساط الزرعية وبعض المحاليل بجهاز المؤصدة في درجة حرارة 121 م° مدة 15 دقيقة و تحت ضغط 15 باون / انج² .

2- التعقيم بالحرارة الجافة

عُقمت الزجاجيات المستعملة في تحضير الأوساط الزرعية والمحاليل بالفرن الكهربائي تحت درجة حرارة 180 م° مدة ساعتين .

3- التعقيم بالترشيح

استعملت في هذه الطريقة مرشحات غشائية ذوات قطر 0.45 و 0.22 مايكروميتر لتعقيم المحاليل التي تتأثر بالحرارة العالية .

3-2-4 الكواشف المستعملة في الاختبارات الكيموحيوية :

حضرت على وفق ما جاء في (Wistrich , 2003) وهي :

3-2-4-1 كاشف كوفاكس (Kovacs Reagent)

يتكون من 150 مليلتر من كحول أيزوأميلى (Isoamyl alchohol) و 10 غرامات من para-dimethyl-aminobenzaldehyde و 50 غراما من حامض الهيدروكلوريك المركز ، أُذيبت الالديهيد في الكحول تدريجيا ثم أُضيف الحامض ببطء وحفظ في درجة حرارة 4 م° . ورج بلطف قبل الاستعمال حيث يستخدم للكشف عن حلقة الاندول .

3-2-4-2 كاشف المثيل الأحمر (Methyl Red Reagent)

يتكون من إذابة 0.1 غرام من أحمر المثيل في 300 مليلتر كحول أثيلي 95 % ثم أضيف إليه 200 مليلتر ماء مقطر ثم حفظ في قنينة معتمدة في درجة حرارة 4 م° .

3-4-2-3 كاشف فوكس بروسكور (Voges-Proskauer Reagent)

يتكوّن من محلولين هما :

المحلول الأول: هيدروكسيد البوتاسيوم 40% .

المحلول الثاني: حضر بإذابة 5 غرامات من ألفا- نفتول (α -Naphthol) في 100 مليلتر من الكحول الاثيلي .

4-4-2-3 محلول كاشف إنزيم الاوكسيديز (Oxidase reagent)

حضر هذا الكاشف انيا بإذابة 1 غرام من مادة Tetra methyl-Para-phenylenediamine dihydrochloride في 90 مليلترًا من الماء المقطر, ثم أكمل الحجم إلى 100 مليلتر (هو مركب غير مستقر لذا يفضل تحضيره انيا, يستخدم للتحري عن قدرة البكتريا المرضية على إنتاج أنزيم الاوكسيديز) .

5-4-2-3 كاشف أنزيم الكاتاليز (Catalase reagent)

حضر بتركيز 3 % من بيروكسيد الهيدروجين المركز (30 %) (ملحق) وذلك بزيادة حجم منه إلى 9 حجوم من الماء المقطر المعقم . وأستعمل للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج أنزيم الكاتاليز .

5-2-3 تحضير محاليل :

1-5-2-3 المحلول الملحي الفسلجي (Normal saline)

حضر المحلول على وفق ما ذكره Baron *et al.*(1994) وذلك بإذابة 0.85 غرام من مادة كلوريد الصوديوم في 90 مليلتر من الماء المقطر , وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر بعد أن ضبط pH إلى 7 وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة وحفظ في درجة حرارة 4 م° واستخدم في إجراء التخافيف المطلوبة .

2-5-2-3 دارئ (Perifer, 1984) Tris-EDTA (TE)

حضر 10 ملي مول Tris-HCL و1ملي مول EDTA , مع تعديل pH إلى 8 وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° مدة 15 دقيقة .

3-5-2-3 محلول صبغة الفينول الأحمر Phenol red solution

حضر بإذابة 1 غرام من الصبغة في 10 مليلترات من هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولر ثم أضيف إليه 20 مليلتر من الماء المقطر ثم ذوب مع تسخين بسيط وبعدها أضيف إليه 10 مليلتر من المحلول HCL بتركيز 0.1 مولر ثم أكمل الحجم إلى 500 مليلتر بالماء المقطر للحصول على محلول من الصبغة بتركيز % 0.2 إذ يضاف بنسبة 5 % إلى الوسط (Collee et al., 1996).

4-5-2-3 تحضير محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions

حضرت محاليل الترحيل الكهربائي على وفق ماورد في (Sambrook et al., 1989) وكما يأتي:

• دارئ (10X TBE buffer) (Tris-Borate-EDTA buffer (10 X))

حُضِر بتركيز نهائي 10X : 0.089 M Tris-base و 0.089 M boric acid و 0.002 M EDTA ، ضبط الأس الهيدروجيني إلى 8 و عقم بالمؤصدة بدرجة 121 مئوية مدة 15 دقيقة.

• صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium bromide) :

حُضِر محلول خزين تركيزه 5 مليغرام/مليلتر، بإذابة 5 مليغرام من صبغة بروميد الاثيديوم في 1 مليلتر من الماء المقطر المعقم، وخفف عند الإستعمال للحصول على تركيز نهائي مقداره 0.5 مايكروغرام/مليلتر.

• دارئ التحميل (Loading buffer) :

حُضِر باستخدام 30 % كليسرول و 50 % TBE و 20 % ماء مقطر 0.25 % و صبغة أزرق البروموفينول .

5-5-2-3 محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland standard

حضر هذا المحلول بإذابة 1.175 غرام من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر بالماء المقطر وسمي المحلول (A) وأضيف واحد مليلتر من حامض الكبريتيك المركز إلى كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر بالماء المقطر وسمي المحلول (B) ولتحضير عالق ماكفرلانند القياسي رقم 2 مزج 0.2 مليلتر من محلول (A) إلى 9.8 مليلتر (B) في أنبوب اختبار وحفظ في الظلام وتم مزج محتويات الأنبوب قبل الاستعمال لمعيرة عدد الخلايا البكتيرية (Baron and Finegold,1994)

6-2-3 الصبغات

حضرت الصبغات والكواشف على وفق ما ورد في (Goldman and Lorrence, 2009) وكما يأتي :-

1-6-2-3 صبغة غرام (Gram stain)

- الصبغة الإبتدائية: البلور البنفسجي (Crystal violet) أذيب 2 غرام منها في 20 مليلتر من الايثانول المطلق وأضيفت أوكزالات الأمونيوم (Ammonium oxalate) 0.8 غرام، أكمل الحجم الى 100 مليلتر بالماء المقطر.
- محلول الأيودين: يوديد البوتاسيوم (Potassium iodide) أذيب 1 غرام منها في 20 مليلتر من الماء المقطر واضيف إليه 1 غرام بلورات اليود (iodine crystals)، ثم أكمل الحجم الى 100 مليلتر بالماء المقطر.
- مزيل اللون: كحول الإيثانول (ethanol) 50 مليلتر ، الاستون (acetone) 50 مليلتر.
- الصبغة المضادة : السفرانين (Safranin) أذيب 4 غرام منها في 200 مليلتر من الإيثانول المطلق ثم أكمل الحجم الى 1000 مليلتر بالماء المقطر.

7-2-3 جمع العينات المرضية

عينات الإدرار جمعت بحسب طريقة (Rajeshwari et al ., 2010).

جمعت (310) عينة إدرار للمدة من كانون الثاني 2013 م الى أب 2013 م من مرضى يعانون من التهابات المسالك البولية الذين تم تشخيصهم مسبقا من قبل اطباء مختصين ومن مستشفيات مختلفة لمدينة بغداد/مدينة الطب (مستشفى الجراحات التخصصية، مستشفى بغداد التعليمي، مستشفى حماية الطفل،المختبرات التعليمية لمدينة الطب) ومن مستشفيات مختلفة لمدينة الكوت (مستشفى الزهراء التعليمي، مستشفى الكرامة التعليمي , مستشفى البتول للولادة) وسجلت المعلومات المتعلقة بالمرضى من العمر والجنس أو الاصابة بامراض أخرى في استمارة خاصة وأستخدم لهذا الغرض قناني معقمة حجم 50 مليلتر وقد تم أخذ عينة الادرار الوسطي . زرعت عينات الادرار مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص .

1-7-2-3 زرع الإدرار Urine culture:

زرعت عينات الأدرار بطريقة التخطيط (باستخدام ناقل زرع قياسي معقم) على الوسط الأنمائي آكار الدم والوسط التفريقي اكارماكونكي، حضنت الأطباق في درجة 37 م لمدة 18-24 ساعة، بعدها تم تشخيص المستعمرات مظهريا اعتمادا على الصفات الشكلية لها، من حيث شكل وحجم ولون تلك المستعمرات، واختيرت العزلات التي اعطت ظاهرة الأنتيال فضلا" على رائحة تشبه رائحة السمك على وسط اكار الدم، اما على وسط الماكونكي تم الاعتماد على اللون الشاحب للمستعمرات لكونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز Non Lactose fermenter, نقلت العزلات المختارة الى وسط أكار ماكونكي جديد (Laiw et al., 2003).

3-2-7-2 حفظ وادامة العزلات البكتيرية:

حفظت العزلات البكتيرية بعد تشخيصها على اوساط زرع مائلة slants من الأكار المغذي في درجة 4 م واستمرت عملية الأدامة بشكل دوري شهريا من خلال تجديد زراعتها وذلك بنقل مستعمرة واحدة الى مائل اكار مغذي جديد لضمان بقائها نشطة طيلة مدة الدراسة. استخدم وسط نقيع الدماغ و القلب المضاف اليه كليسرول بنسبة 15% لحفظ العزلات لمدة طويلة وتم حفظها في درجة 20- م لحين الأستعمال.

3-2-8 تشخيص العزلات:

3-2-8-1 التشخيص الاولي

تم تشخيص العزلات مظهريا وكذلك كيموحيويا. إذ شخصت العزلات مبدئيا اعتمادا على الصفات الشكلية للمستعمرات على وسط الماكونكي، وملاحظة ظاهرة الأنتيال Swarming على وسط اكار الدم. كذلك شخصت اعتمادا على الصفات الشكلية تحت المجهر إذ استخدمت صبغة غرام (gram stain) وفق محاليلها الوصف بالمصدر (Goldman and Lorrence, 2009).

3-2-8-2 الاختبارات الكيموحيوية:

أجريت هذه الاختبارات وفق الطريقة التي بينها (Goldman and Lorrence, 2009)

1- فحص الاندول (Indol test)

اجري هذا الفحص من خلال تنمية البكتيريا في وسط الاندول المحضر في الفقرة (3-2-2-3) مدة 18-24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ثم أضيف للوسط 1-2 قطرة من كاشف كوفاكس المحضر في الفقرة (3-4-2-3) . ظهور حلقة حمراء اللون دليل على ايجابية الفحص.

2- فحص المثيل الأحمر (Methyl red test)

نمت البكتريا في وسط المثيل الأحمر المحضر في الفقرة (3-2-2-3) وحضنت مدة 18 - 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ثم أضيفت إلى الوسط 2 - 3 قطرة من كاشف المثيل الأحمر المحضر في الفقرة (2-4-3) ، ان تغير لون الوسط الى الأحمر يدل على ايجابية الفحص .

3- فحص الأوكسيديز (Oxidase test)

نقلت مستعمرة مفردة نامية لمدة 18 ساعة على وسط الأكار المغذي و وضع على ورق ترشيح ثم أضيفت إليه قطرة من كاشف Tetramethyl P - phenylenedihydrochloride ، أن تكوّن لون بنفسجي غامق في 30-60 ثانية دليل على ايجابية الاختبار. استخدم هذا الاختبار لتفريق سلالات البكتريا المعوية التي تتميز بعدم امتلاكها لهذا الانزيم.

4- فحص قابلية البكتريا على الحركة (Motility test)

لحق وسط الحركة (Motility media) بالبكتيريا بشكل طعنه (Stab) ثم حضن الوسط مدة 18-24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م. يدل انتشار النمو حول مكان الطعنة على إن البكتيريا متحركة. إما إذا كان النمو في مكان الطعنة فقط فيعني إن البكتيريا غير متحركة.

5 – اختبار ثلاثي السكر والحديد (TSI test) Tertiary Sugar Iron Test

استعمل لهذا الاختبار وسط اكار ثلاثي السكر والحديد الجاهز الذي حضر بحسب تعليمات الشركة باذابة (65) غراما من الوسط في لتر واحد من الماء المقطر, وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.2 , ووزع على انابيب زجاجية وعقم بالمؤصدة ثم ترك بعد ذلك ليتصلب بشكل مائل , ونقل كمية من النمو البكتيري بوساطة ابرة معقمة الى السطح المائل لوسط (TSI) وطعن السطح المائل للوسط ونشر جزء من البكتريا على سطح الوسط المائل , وحضن الوسط عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة , ظهور فقاعات غازية دلالة على تكوين غاز ثنائي اوكسيد الكربون نتيجة لتخمير الكلوكوز وظهور اللون الاسود دلالة على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S , و تقرأ النتائج كما يأتي :-

الحامضية	لون المائل	لون القعر	النتيجة
K/A	احمر	اصفر	تخمير الكلوكوز فقط
A/A	اصفر	اصفر	تخمير الكلوكوز واللاكتوز او الكلوكوز والسكروز او تخمير الثلاثة معاً
K/K	احمر	احمر	لا يوجد تخمير

(K) Alkaline, (A) Acid

6- اختبار انزيم اليوريز (Urease test)

زرعت العزلة البكتيرية المراد اختبارها على وسط اكار اليوريا المائل المحضر في الفقرة (2-2-2-3) وحضنت عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة. تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردى الارجواني دلالة على افراز العزلة البكتيرية لانزيم اليوريز.

7- اختبار انزيم الكاتاليز (Catalase test)

نقلت مستعمرة مفردة نامية على وسط الاكار المغذي بوساطة ناقل معقم إلى شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيفت إليها قطرة من محلول كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3% وتعد ظهور فقاعات غازية دلالة على ايجابية الفحص . استخدم هذا الفحص للتحري عن امتلاك العزلة لأنزيم الكاتاليز والذي يحفز على تحرر الأوكسجين من بيروكسيد الهيدروجين.

8- اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization)

استعمل في هذا الاختبار وسط سترات سايمون والذي حضر بحسب تعليمات الشركة بإذابة 24.2 غرام من الوسط في لتر واحد من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6.8 ثم وزع على أنابيب معقمة , تركت الأنابيب بشكل مائل للحصول على وسط مائل , لقمح الوسط بالعزلة البكتيرية وحضن عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة , يعد تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق مع ظهور نمو بكتيري دلالة على النتيجة الموجبة . استخدم هذا الاختبار لغرض معرفة قابلية العزلة البكتيرية على استهلاك السترات كمصدر للكربون والطاقة وعلى استهلاك أملاح الامونيوم كمصدر للنيتروجين.

9- اختبار فوكس – بروسكور (Voges-proskauer test)

حضر الوسط السابق نفسه (MR -VP) ولقمح بالعزلة البكتيرية وحضن عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 48 ساعة ثم أضيف بعد ذلك 1 مليلتر من المحلول الأول , و 3 مليلتر من المحلول الثاني المحضرين في الفقرة (3-2-4-3) إلى الوسط مع الرج . تغير لون الوسط إلى اللون الوردي خلال 2-5 دقائق دلالة على ايجابية الفحص , يجرى هذا الفحص لمعرفة قدرة العزلة البكتيرية على تكوين الأسيتون كنتاج لتخمير السكريات.

10- اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية: (CLSI, 2006)

اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية بطريقة صب الإطباق باستعمال الوسط الزراعي أكار موللر – هنتون , وقد اختبر حساسية البكتيريا المشخصة اتجاه 11 نوعاً من المضادات الحيوية , فقد حضر وسط أكار موللر هنتون وعقم بالمؤصدة ثم ترك ليبرد لدرجة حرارة 50 م° , , ثم زرعت العزلات البكتيرية المراد اختبار حساسيتها لمضادات الحيوية على هذه الأوساط , بحسب طريقة النقل بعيدان الأسنان الخشبية (Tooth Pick & Patching) , عندها اضيفت اقراص مضادات الحيوية وحضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة , ثم تمت قراءة النتائج اذ حددت العزلات المقاومة من خلال قدرتها على النمو حول اقراص المضادات فيما تعد العزلات الحساسة هي التي لاتمتلك القدرة على النمو.

11- التشخيص باستعمال نظام Api- 20E

أجريت فحوصات كيموحيوية باستخدام نظام Api- 20E وذلك لغرض تشخيص البكتريا المعزولة على إنها بكتريا المتقلبات , إذ يجري الاختبار لقسم من العينات في مختبرات مستشفى الكرامة التعليمي / واسط ,

أما باقي (أغلبية) العينات فقد إجري في المختبرات التعليمية / مدينة الطب وحسب تعليمات الشركة المصنعة. ويتألف هذا النظام من شريط حاو على ركائز فحص مجففة (Dehydrate test substrates) تمثل (20) تفاعلا كيموحيويًا موزعة في أنابيب دقيقة مفردة , يتم أولاً تعليق المستعمرة البكتيرية المعزولة ونقية من أكار الماكونكي في أنبوب اختبار حاوي على 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي ومزجت جيداً وقورنت مع انبوبة ماكفرلاند 0.5 . ثم نعمل على تلقیح الشريط بوساطة ماصة باستور معقمة بملء بعض الأنابيب الدقيقة وتغطيه الأنابيب الدقيقة الأخرى بالزيت لتوفير ظروف لاهوائية إذ حضن الشريط عند درجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة و بعد زيادة الكواشف إلى أنابيب معينة وتفسير النتائج للتمكن من معرفة نوع العزلة البكتيرية المراد اختبارها (Benson et al.,2002).

• طريقة الاستعمال:-

إن تحضير النظام Api- 20E و حضن شريط التشخيص يتم كالآتي :-

- 1- إعادة زرع العزلات على الأوساط التشخيصية الصلبة (MacConkey agar) وحضنها لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.
- 2- يجب التثبت من نقاوة العزلة البكتيرية وعائديتها إلى العائلة المعوية من خلال الصفات المظهرية، والصبغ بصبغة غرام.
- 3- عمل عالق متجانس من النمو البكتيري حاوي على عدد مقارب إلى أنبوبة ماكفرلاند 0.5.
- 4- تهيئة الوعاء البلاستيكي الذي سيقوم بحمل الشريط الحاوي على الركائز بملئه بحوالي 5 مليلتر من الماء المقطر لغرض تهيئة الرطوبة اللازمة للنمو.
- 5- تلقیح الأنابيب الدقيقة الحاوية على الركائز المجففة بالعالق البكتيري بوساطة ماصة معقمة.
- 6- تغطية فتحات الأنابيب الفحوصات ألتية (URE, ODC, LDC, ADH) بالزيت المعدني (Mineral oil) لتوفير ظروف لا هوائية فيها، ثم يغلق غطاء الوعاء.
- 7- حضن الشريط بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، ثم قرأت النتائج.

12- الاختبارات المصلية:-

أجري اختبار تلازن الشريحة (Slide agglutination test) باستخدام مصول قياسية من شركة (Wellcome) وذلك حسب طريقة (Collins and Lyne, 1987) و كما يأتي:-

- أ- وضعت قطرتان من محلول فسيولوجي على شريحة زجاجية نظيفة كلاً على حدة، ثم أخذت مستعمرة بكتيرية بوساطة ناقل معقم وأضيفت إلى كل من القطرتين ومزجت جيداً.
- ب- أضيف قطرة واحدة من المصل (Serum) إلى إحدى القطرتين السابقتين ومزجت جيداً و عدت القطرة الثانية سيطرة لهذا الاختبار.
- ت- حدوث التلازن (agglutination) بشكل واضح بعد مرور دقيقة واحدة يدل على نتيجة موجبة.
- ث- أجريت الاختبارات المصلية في مختبرات مدينة الطب ، وتم مقارنة النتائج مع جداول تصنيفية قياسية معتمدة من قبل معهد باستور في باريس تساعد في التعرف على اسم الجنس والنوع.

9-2-3 استخلاص الحمض النووي DNA (DNA extraction)

تمت عملية استخلاص الحمض النووي DNA من الخلايا البكتيرية المعلقة بمحلول مرق نقيع القلب والدماغ من عينات الادرار وحسب ما ورد في (Santos *et al.*, 2003) بأستخدام عدة الاستخلاص المجهزة من شركة Geneaid على وفق الخطوات الآتية :

الخطوة الأولى / تحضير الخلايا البكتيرية للتحليل الأولي Cell Harvesting / pre-lysis

- 1- نقلت خلايا البكتيريا المزروعة مسبقاً الى أنبوب صغير (Appendorf tube) حجم 1.5 مل.
- 2- عمل طرد مركزي لهذه الأنابيب الصغيرة بسرعة 14000 - 16000 دورة /دقيقة لمدة دقيقة واحدة وبدرجة حرارة الغرفة بعدها التخلص من الراشح .
- 3- أضيف 200 مايكروليتر من محلول GT Buffer الى الأنابيب الصغيرة لإعادة تعليق الخلايا بالمحلول وعن طريق التحريك بأستخدام الماصة أوأستخدام المازج (Vortex).
- 3- حضنت الأنابيب الصغيرة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة 25 م .

الخطوة الثانية / خطوة التحلل (lysis step)

- 1- أضيف 200 مايكروليتر من محلول GT Buffer لكل عينة ومزج جيداً بأستخدام جهاز المازج لمدة 5 ثوانٍ .
- 2- حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 70 م لمدة 10 دقائق و لحين الحصول على عينات متحللة صافية تقريباً وخلال الحضانة تم التقليب كل ثلاث دقائق. خلال هذه الخطوة حضر محلول Elution Buffer DNA وحضن بدرجة 70 م لحين استخدامه في الخطوة الأخيرة .

- يمكن استخدام هاضم الحامض النووي RNA (RNA Degradation) كخطوة إضافية optionl (step) إذا أُضيف بعد الحضانة بدرجة 70 م 5 مايكروليتر من RNase (10 mg/ml) وخط جهاز المازج وحضانة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق .

الخطوة الثالثة / خطوة ربط الحامض النووي DNA

- 1- أُضيف 200 مايكروليتر من الكحول المطلق لكل عينة ورج بشكل قوي وعند حصول ترسيب DNA تم التوقف عن الرج .
- 2- حضر عمود ربط الـ DNA (GD column) في أنبوب الجمع (collection tube).
- 3- نقلت محتويات العينة كلها وبضمنها المادة المترسبة الى عمود الربط GD column .
- 4- عمل طرد مركزي بسرعة 14000 - 16000 دورة /دقيقة لمدة 2 دقيقة واحدة وبدرجة حرارة الغرفة .
- 5- تم التخلص من الراشح الموجود في أنبوب الجمع .

الخطوة الرابعة / خطوه الغسل (washing step)

- 1- أُضيف 400 مايكروليتر من محلول الغسل الأول (W1 Buffer) الى عمود ربط الحامض النووي DNA .
- 2- عمل طرد مركزي بسرعة 14000 - 16000 دورة /دقيقة لمدة 30 ثانية وبدرجة حرارة الغرفة .
- 3- التخلص من الراشح الموجود في أنبوب الجمع .
- 4- أُضيف 600 مايكروليتر من محلول الغسل الثاني المضاف له محلول الإيثانول مسبقاً .
- 5- عمل طرد مركزي بسرعة 14000 - 16000 دورة /دقيقة لمدة 30 ثانية وبدرجة حرارة الغرفة .
- 6- التخلص من الراشح الموجود في أنبوب الجمع .
- 7- عمل طرد مركزي لمدة 3 دقائق بسرعة 14000 - 16000 دورة /دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة لتجفيف عمود ربط DNA.

الخطوة الخامسة / خطوه استرجاع DNA (DNA Elution)

- 1- نقل عمود ربط DNA (GD column) المجفف الى أنبوب صغير جديد حجم 1.5 مليلتر.

2- أضيف 100 مايكروليتر من Elution buffer المسخن مسبقاً (خطوة الثانية) أو محلول TE Buffer الى عمود ربط الـ DNA .

3- عمل طرد مركزي بسرعة 14000-16000 دورة /دقيقة لمدة 30 ثانية وبدرجة حرارة الغرفة .

4- الناتج هو DNA نقي مذاب في 100 مايكروليتر من محلول Elution buffer .

3-2-10 الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)

أجري الترحيل الكهربائي للتحري عن الدنا البكتيري بعد عملية الإستخلاص أو للكشف عن ناتج تفاعل

PCR بوجود DNA قياسي لتمييز حجم حزمة ناتج تفاعل PCR على هلام الأكاروز .

3-2-10-1 تحضير هلام الأكاروز

حضر الهلام 1% للتحري عن الدنا البكتيري بعد عملية الإستخلاص و 2% للكشف عن ناتج تفاعل PCR

على وفق ماذكره Sambrook وجماعته (1989) وذلك بإذابة 1 أو 2 غرام من الأكاروز في 100 مليلتر

من محلول دارىء TBE (1x) المحضر مسبقاً، سخن الأكاروز الى درجة الغليان لحين إكمال ذوبان

الهلام بعدها ترك ليبرد بدرجة 50 مئوية ثم أضيف مقدار 2 مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم

بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام/مليلتر. تم صب الهلام في قالب الصب، إذ حضرت صفيحة

إسناد الأكاروز بعد أن ثبت المشط لتكوين الحفر المعدة لتحميل العينات. صب هلام الأكاروز بهدوء

في الصفيحة لمنع حدوث فقاعات هوائية وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة. رفع المشط بهدوء من

الأكاروز المتصلب. ثبتت الصفيحة على مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي الافقية المتمثلة بالحوض

المستخدم للترحيل الكهربائي. ملئ الحوض بدارىء TBE، بحيث يغطي سطح الهلام .

3-2-10-2 تحضير الانموذج

مزج 3 مايكروولتر من محلول دارىء التحميل المحضر مسبقاً مع 7 مايكروولتر من الـ DNA

المراد ترحيله وبعد عملية المزج بينهما تم التحميل في حفر الهلام , مرر بعدها تيار كهربائي بفرق جهد

7 فولت/سم لمدة 30 دقيقة لحين وصول الصبغة الدالة الى الجهة الثانية من الهلام. فحص الهلام

بأستخدام مصدر للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي 302 نانوميتر.

3-2-11 التشخيص الجزيئي لبكتيريا المتقلبات *Proteus spp*

1-11-2-3 التحري عن جينات عوامل الضراوة باستعمال تقنية تفاعل السلسلة المتعددة (Polymerase Chain Reaction PCR)

2-11-2-3 البودائ المستخدمة في التفاعل (Limanskiĭ, et al, و Zhang, et al, 2012) : (2005

أولاً بادئ المتخصص بالجين (16S rRNA)

البادئ	التسلسل	طول البادئ bp	حجم التضخيم bp
Forward	5-GGAAACGGTGGCTAATACCGCATAAT-3	26	101
Reverse	5- GCAGCGCTAGGTGAGCCTAATGGG- 3	24	

ثانياً بادئ المتخصص بالجين (ureR)

البادئ	التسلسل	طول البادئ bp	حجم التضخيم bp
Forward	5-GGTGAGATTTGTATTAATGG-3	20	225
Reverse	5-ATAATCTGGAAGATGACGAG-3	20	

3-11-2-3 مكونات عدة AccuPower® PCR Premix

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام عدة AccuPower® PCR Premix الذي يتضمن المحتويات المدرجة في الجدول 1-3 والأس الهيدروجيني لدارئ التفاعل بقيمة 9.0.

جدول (1-3) محتويات عدة AccuPower® PCR Premix

	المواد
1.5 μ M	MgCl ₂
250 μ M	dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
1 U	<i>Taq</i> DNA polymerase
30 μ M	KCl
10 μ M	Tris-HCl (pH 9.0)

4-11-2-3 مزيج تفاعل PCR

تم تشخيص البكتيريا بواسطة تفاعل PCR ذلك باستخدام البادئ (Primer) للجين *16SrRNA* و استخدام البادئ (Primer) للجين *ureR* ويتكون مزيج التفاعل كما في الجدول (٢-٣) والجدول (٣-٣) إذ تتم إضافة البادئ الأمامي و البادئ العكسي و DNA و الماء المقطر الخالي من الايونات الى الحفر الموجود في عدة AccuPower® PCR Premix الحاوية على المكونات المبينة في الجدول (1-3).

جدول (2-3) مزيج التفاعل الخاص لتشخيص الجين *16S rRNA* .

الحجم	المكونات
-------	----------

بالميكرو لتر	
0.75	للجين البادئ الأمامي <i>16S rRNA</i>
0.75	البادئ العكسي للجين <i>16S rRNA</i>
1.5	DNA
17	ماء مقطر خالي من الأيونات
	AccuPower® PCR Premix
20	الحجم النهائي

جدول (٣-٣) مزيج التفاعل الخاص لتشخيص الجين *ureR* .

الحجم بالميكرو لتر	المكونات
0.75	<i>ureR</i> للجين البادئ الأمامي
0.75	<i>ureR</i> البادئ العكسي للجين
1.5	DNA
17	ماء مقطر خالي من الأيونات
	AccuPower® PCR Premix
20	الحجم النهائي

5-11-2-3 برنامج تفاعل PCR

• ضبطت الظروف المثلى لتنفيذ تقنية PCR للجين *16sRNA* كما في الجدول (٤-٣).

جدول (٤-٣) الظروف المثلى لتشخيص أجين *16sRNA*

التسلسل	المرحلة	درجة الحرارة المنوية	الوقت	عدد الدورات
1	مرحلة المسخ الاولي DNA	95	٥ دقائق	دورة واحدة
2	مسخ DNA	94	٣٠ ثانية	40 دورة
3	الالتحام	60	٣٠ ثانية	
4	الاستطالة	72	١٠ ثانية	
5	مرحلة الاستطالة النهائية	72	١٠ دقائق	دورة واحدة

• ضبطت الظروف المثلى لتنفيذ تقنية PCR للجين *ureR* كما في الجدول (٥-٣).

جدول (٥-٣) الظروف المثلى لتشخيص أجين *ureR*

التسلسل	المرحلة	درجة الحرارة المنوية	الوقت	عدد الدورات
1	مرحلة المسخ الأولي DNA	94	4 دقائق	دورة واحدة
2	مسخ DNA	٩٤	40 ثانية	40 دورة
3	الالتحام	٥٨	١ دقيقة	
4	الاستطالة	72	20 ثانية	
5	مرحلة الاستطالة النهائية	72	10 دقائق	دورة واحدة

وأجرى العمل بارتداء القفازات المطاطية وداخل كابينة الزرع المعقمة وتم وضع المحاليل كافة في الثلج أثناء تحضير مكونات تفاعلات PCR والتي شملت الخطوات الآتية :-

1- تحضير خليط التفاعل الرئيس (Master mix) بحجم نهائي 20 مل وذلك بمزج المكونات الآتية في أنبوبة ابندروف واحدة معقمة بالتراكيز المبينة أعلاه.

2- إضافة مكونات التفاعل والذي يبدأ بالدارئ المنظم وينتهي بالماء المقطر اللايوني لتلافي حدوث خطأ في حجوم المكونات المضافة, وقد تم حساب الحجم الواجب أخذها من كل مادة للحصول على التراكيز أعلاه حسب المعادلة الآتية :-

حساب Master mix = عدد العينات + 1

حساب كمية البادئ = عدد العينات + 1 × تركيز البادئ (يجرى هذه العملية مرة للبادئ الأمامي , ومرة أخرى للبادئ العكسي)

أما حجم الماء المضاف فيستخرج من حجم التفاعل الكلي مطروحا منه مجموع مكونات التفاعل

3- تمزج المكونات جيدا بسحبها بالماصة الدقيقة لعدة مرات.

4 - وزعت المحتويات بمعدل 20-مايكروليتر لكل أنبوبة من أنابيب ابندروف الصغيرة الخاصة للتفاعل الPCR.

5 - أضيف 2 مايكروليتر من الدنا من كل عزلة من عزلات بكتريا *Proteus* المشخصة إلى الأنبوب الخاص به , كما ترك أنبوب واحد بدون إضافة دنا كسيطرة سالبة.

6- نقلت الأنابيب بعد مزجها جيدا ولضمان ضبط التراكيز ليصبح الحجم النهائي لمحلول التفاعل 25

مايكروليتر إلى جهاز التضخيم الحراري الحلقي (Thermocycler) لبدء التفاعل الكوثرية بحسب ما ورد في

(Paton and Paton, 1998) وذلك على وفق برنامج خاص (Gradieant PCR) لكل من جين 16S

rRNA و جين *ureR*.

7- رفعت الانابيب من جهاز التضخيم الحراري وكشف عن نواتج التضخيم بالترحيل الكهربائي.

3-11-2-6 طريقة الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز

(Gel Electrophoresis)

1- تم مزج 10 مايكرولتز من كل عينة من عينات الدنا المراد ترحيله.

- 2- تم تحميل المزيج بهدوء بتوزيعه على حفر الهلام ويراعى في ذلك عدم خروج العينة من سطح الحفرة وفي تفاعلات PCR يحمل الدليل الحجمي (Marker) في الحفرة المخصصة له على احد جانبي الهلام (إضافة صبغة بروميد الاثيديوم لهلام الاكاروز في أثناء تحضيره .
- 3- تم توصيل أقطاب التيار الكهربائي إذ رحلت النماذج بفرق جهد مقداره 70 فولت على هلام الأكاروز لغاية وصول الصبغة الزرقاء إلى ما قبل نهاية الهلام حيث يتم إيقاف الترحيل.
- 4- بعد انتهاء مدة الترحيل تم رفع الهلام من على صفيحة الهلام الخاصة بجهاز الترحيل الكهربائي , ثم فحص الهلام في غرفة مظلمة وذلك بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه على جهاز الأشعة فوق البنفسجية (UV transilluminator) بطول موجي 302 نانوميتر وصور الهلام بجهاز التصوير .

3-11-7 تقدير الأحجام الجزيئية للدنا

- تم تقدير الإحجام الجزيئية لنواتج التضاعف بالمقارنة مع مواقع الحزم ذات الأوزان الجزيئية المعروفة للدليل الحجمي للدنا (100 bp DNA ladder) والتي عدت كدليل حجمي قياسي .

الفصل الرابع

Results and Discussion

4-النتائج والمناقشة

1-4 عزل وتشخيص العزلات المرضية لبكتريا *Proteus mirabilis*

1-1-4 العزل:

تم التحري عن وجود بكتريا *Proteus spp* المسببة لالتهاب المسالك البولية في (٣١٠) عينة إدرار وسطي لمرضى يشكون من أعراض تدل على أصابتهم بالتهاب المسالك البولية. شملت الدراسة (١٥٥) عينة لأطفال اقل من (١٣) سنة و (١٥٥) عينة للأشخاص البالغين فوق (١٣) سنة، إذ جمعت العينات من

مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد/مدينة الطب (مستشفى بغداد التعليمي، مستشفى الجراحات التخصصية، مستشفى حماية الطفل، المختبرات التعليمية لمدينة الطب) ومستشفيات مختلفة في مدينة الكوت (مستشفى الكرامة العام التعليمي، مستشفى الزهراء العام التعليمي ومستشفى البتول للولادة) وللفترة من كانون الثاني ٢٠١٣ والى آب/٢٠١٣ .

أظهرت النتائج وجود هذه البكتيريا في (٣٩) عينة من مجموع (٢١٨) عينة موجبة للزرع البكتريولوجي . و كانت النتائج موزعة كالاتي:

■ أعطت ٢١٨ (٧٠,٣٢ %) عينة نتيجة موجبة للزرع البكتريولوجي ، منها ١١٦ (٥٣,٢١ %) عينة موجبة عند الأطفال و ١٠٢ عينة موجبة عند البالغين وبنسبة (٤٦,٧٨ %).

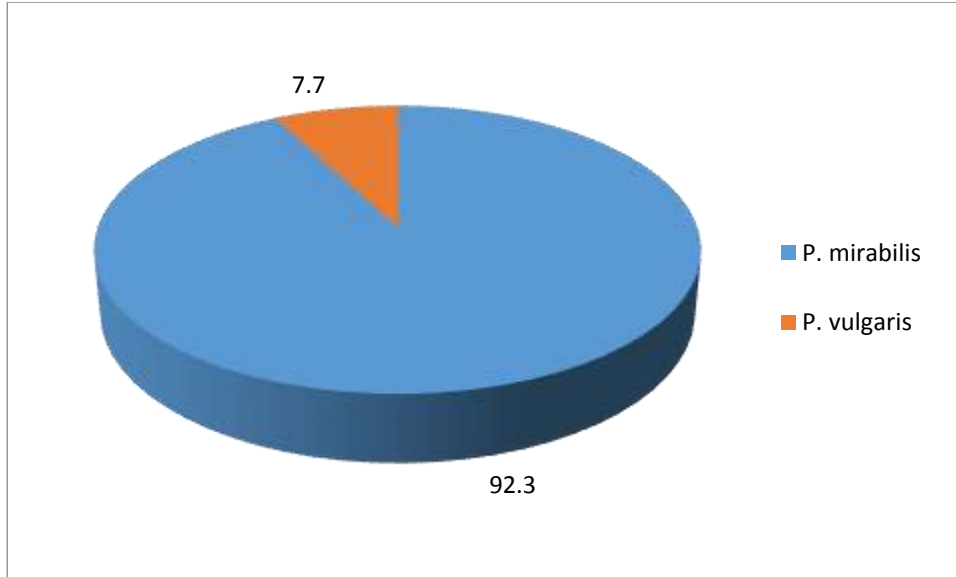
■ من بين النتائج الموجبة للزرع كانت (٣٩) حالة إصابة ببكتريا *Proteus spp.* أي بنسبة (١٧,٨٨ %) ، كان منها (٢٢) حالة إصابة عند الأطفال (٥٦,٤١ %) و (١٧) حالة إصابة عند البالغين (٤٣,٥٨ %) اما توزيعها حسب الجنس فكان (١٥) حالة إصابة عند الذكور (٣٨,٤٦ %) و (٢٤) حالة إصابة عند الإناث (٦١,٥٣ %) كما في جدول رقم- (٤-١). اما بقية العزلات فكانت تعود لأجناس بكتيرية أخرى وتم إهمالها.

■ شكلت بكتريا *Proteus mirabilis* في هذه الدراسة النوع الأكثر شيوعاً إذ بلغت (٣٦) عزلة (٩٢,٣٠ %) من (٣٩) حالة إصابة ببكتريا *Proteus spp.* مقارنة بالنوع *P. vulgaris* الذي كانت نسبة عزله تبلغ (٧,٧ %) شكل رقم (٤-١).

جدول (٤-١) توزيع بكتريا *Proteus spp.* حسب العمر و الجنس في المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية .

المجموع		الإناث		الذكور		الجنس العمر
العدد	%	العدد	%	العدد	%	

٥٦,٤١	٢٢	٢٨,٢٠	١١	١٥,٣٨	٦	أطفال اقل من ١٣ سنة
٤٣,٥٨	١٧	٣٣,٣٣	١٣	٢٣,٠٨	٩	بالغين اكبر من ١٣ سنة
١٠٠	٣٩	٦١,٥٣	٢٤	٣٨,٤٦	١٥	المجموع



شكل (٤-١) النسبة المئوية لعزل بكتريا *Proteus mirabilis* مقارنة ببكتريا *P. vulgaris* من عينات الإدرار الوسطى لـ (٣٩) مريض يعانون من التهاب المجاري البولية المتسبب بجنس *Proteus*.

وفيما يخص عينات الادرار التي لم تظهر أي نمو بكتيري فقد شكلت نسبة (29.27%) وهذا عائد الى احتمالية تناول المرضى لمضادات الحياة بشكل عشوائي ومن دون التقيد بأرشادات الطبيب المختص وهذا شائع بين أفراد المجتمع العراقي مما أدى الى أختفاء البكتريا أو انخفاض أعدادها من دون التخلص وبشكل كامل من المسبب البكتيري , وأحتمالية وجود مسببات أخرى للإصابة مثل *Staphylococcus*

, *Mycoplasma hominis* , Streptococci , *Staphylococcus aureus* , *saprophyticus* , كما قد يكون المسبب بعض أنواع الرواشح مثل *Cytomegalo virus* وبعض الانواع المصلية لكـ *Adeno virus* , وهذه المسببات تحتاج الى تقنيات خاصة لعزلها مما أدى الى عدم ظهور نمو بكتيري لأغلب عينات الإدرار (Shoff and Green-Mckenzie,2007) . أظهرت نتائج هذه الدراسة ان (٢١٨) عينة (٧٠,٣٢ %) و المأخوذة من (٣١٠) مريض قد أعطت نتيجة موجبة عند زرعها على وسطي اكار الماكونكي و اكار الدم ، و تتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات كل من Younis وجماعته (2009) ، Kumamoto وجماعته (١٩٩٧) الذين وجدوا ان نسبة عينات الإدرار التي أعطت نتيجة موجبة للفحص البكتريولوجي هي (٧٢,٥%)، (٧٠,٧) % و على التوالي ، وكذلك تتفق مع نتائج دراسات محليه لكل من Al-Taai (٢٠٠٥) ، Almarjani (٢٠٠٠) الذين وجدوا أن نسبة عينات الإدرار التي اعطت نتيجة موجبه للفحص البكتريولوجي (٧٥,٠٩%)، (٦٨,٨ %) على التوالي . وهذه النتيجة لاتتوافق مع نتائج دراسات أخرى , إذ وجد العبيدي (2004) أن عينات الإدرار التي أظهرت نمو بكتيري كانت بنسبة ١٨,٦٧% . كما أشار Ramakrishnan و Scheid (2005) الى أن نسبة ٩٠% من عينات أدرار مرضى تبدو عليهم أعراض التهاب الحويضة و الكلية الحاد أظهرت نمو بكتيري . أما Tsao وجماعته (2003) وجدوا أن (٦٣%) من عينات أدرار أطفال بعمر (٥ أيام- ١٥ سنة) أظهرت نمو بكتيري ،ولا تتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات كل من محميد (٢٠١١) ، وكذلك Al-Kabby (٢٠٠٧) الذين وجدوا أن نسبة عينات الإدرار التي اعطت نتيجة موجبه للفحص البكتريولوجي (٨٨,٣%)، (٢٨,٩%) على التوالي . وكذلك الباحث Obi وجماعته (١٩٩٦) الذي وجدها تشكل نسبة (٢٧%) و هي نسبة اقل بكثير من نتائج دراستنا الحالية. و يمكن ان يعود سبب الاختلاف في النسب المثوية الى الاختلافات في حجم و طبيعة العينات المشمولة بالدراسة و المأخوذة من مستشفيات مختلفة في أماكن مختلفة أو إلى كون المرضى الذين تم أخذ العينات منهم قد تعاطوا مضادات حيوية واسعة الطيف قبل اخذ العينات مما أدى إلى عدم ظهور البكتريا في العينة ،كما سبق و أن أوضح ذلك Mims وجماعته (١٩٩٥).

2-1-4 التشخيص :

شخصت (٣٩) عزلة مبدئياً على إنها تعود لجنس *Proteus spp.* اعتماداً على الحركة الزاحفة Swarming على وسط أكار الدم Blood Agar كما في الشكل (٤-٢) ولون وشكل المستعمرات على وسط أكار ماكونكي MacConkey's Agar كما في الشكل (٤-٣).



شكل (2-4) مستعمرات *Proteus spp.* النامية على وسط اكار الدم



شكل (3-4) مستعمرات *Proteus spp.* النامية على وسط ماكونكي اكار

عزلت البكتريا السالبة لملون كرام أعتماًداً على قدرتها للنمو على وسط أكار الماكونكي وتم تصبيغ المستعمرات بملون كرام , أظهرت بعض العزلات النامية بأنها مخمرة لسكر اللاكتوز تميزت بلونها الوردي وكان بعضها ذات حافة خشنة وجافة في حين كان بعضها الاخر ذات قوام لزج جداً وكانت محدبة وكبيرة

الحجم وحافتها ملساء. و على الرغم من إن هذه الصفة هي مشتركة مع أجناس أخرى إلا إنها تأكيدية مع ظاهرة الحركة الزاحفة كما أشار لذلك (Baron & Finegold,1994)، Atlas، (Liaw et al.,2003; Atlas، 1995).

3-1-4 تشخيص الأنواع التابعة لجنس *Proteus spp.*

تم تشخيص (٣٩) عزله تابعة إلى جنس *Proteus* بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية التي أشار لها Collee وجماعته (١٩٩٦) و Holt وجماعته (١٩٩٤) , كانت (٣٦) عزلة عائدة للنوع *P. mirabilis* وبنسبة عزل (92.3%) و (٣) عزلة عائدة للنوع *P. vulgaris* وبنسبة عزل (7.7%) من بين مجموع البكتريا السالبة لملون كرام و المسببة لخمج المسالك البولية . أذ تميز النوع *P. mirabilis* بكونه سالب لاختبار الاندول وغير مخمر لسكر المالتوز ومنتج للـ Ornithine decarboxylase بينما النوع *P. vulgaris* تميز بكونه موجب لاختبار الاندول ومخمر لسكر المالتوز وغير منتج للـ Ornithine decarboxylase الجدول (٢-٤)

من الممكن أن يعزى التفاوت في نسب عزل النوعين *P. mirabilis* و *P. vulgaris* الى شيوع النوع *P. mirabilis* في فضلات الانسان أذ يعد هذا النوع جزء من النبيت الطبيعي للانسان أذ يوجد بنسبة ٢٥% من مجموع البكتريا المعوية (Shoff and Green-Mckenzie,2007).

الجدول (٢-4) الاختبارات الكيموحيوية لأنواع جنس الـ *Proteus*

<i>P.vulgaris</i>	<i>P.mirabilis</i>	الاختبارات الكيموحيوية
+	-	Indol production
-	+	Ornithine Decarboxylase
+	-	Maltose Fermentation
K/A,+,+	K/A,+,+	KIA, CO2 ,H2S
+	+	MR
-	V	VP
+	V	أستهلاك السترات

(+) النتيجة الموجبة , (-) النتيجة السالبة , (V) مغاير , (K/A) Alkaline/Acid , (MR) Methyl Red , (VP) Voges proskauer.

4-1-4 نظام التشخيص (API 20E)

Analytic Profile Index 20 Enterobacteriaceae

لتأكيد التشخيص لعزلات *P.mirabilis* ولكمال الاختبارات الكيموحيوية المهمة استخدمت نظام API 20E . وان الكثير من الباحثين أكدوا على ضرورة استعمال هذا النظام التشخيصي، بدلاً عن الاختبارات الكيموحيوية لوصفة إياها بأنها مكلفة ومرهقة وبطيئة وغير دقيقة كفاية . (York et al.,1992; Turton et al.,2008), وجاءت النتائج مكملة لنتائج الفحوصات الكيموحيوية إذ كان عدد *P.mirabilis* الكلي بعد التشخيص بواسطة API 20E (36) عزلة من الإدراج وكانت النسبة (92.30%) من مجموع العينات الكلي والجدول (3-4)؛ يبين الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *P.mirabilis* المشخصة بواسطة API 20E وان الشكل (4-4) يوضح لاختبارات التشخيصية المكملة لبكتيريا *P.mirabilis* باستعمال نظام API 20E .



شكل (4-4) يوضح الاختبارات التشخيصية المكملة لبكتيريا *P.mirabilis* باستعمال نظام API 20E .

جدول (٤-٣) نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا *P.mirabilis* باستخدام نظام API
(Bio Merieux) 20E

الاختبار	المادة الاساس Substrate	الانزيمات Enzyme	النتيجة
ONPG	Ortho-nitrophenyl-galactoside	Beta-galactosidase	اصفر (-)
ADH	Arginine	Arginine dehydrolase	اصفر (-)
LDC	Lysine	Lysine decarboxylase	برتقالي (-)
ODC	Ornithine	Ornithine decarboxylase	اصفر (+)
CIT	Sodium Citrate	Citrate Utilization	اخضر شاحب (-)
H2S	Sodium thiosulphate	H2S production	عديم اللون (+)
URE	Urea	Urease	اصفر (+)
TDA	Tryptophane	Tryptophane deaminase	اصفر (+)
IND	Tryptophane	Indol production	حلقة حمراء (-)
VP	Sodium pyruvate	Acetoin production	عديم اللون (-)
GEL	Gelatin	Gelatinase	عدم انتشار الصبغة السوداء (+)
GIU	Glucose	Fermentation	اصفر (+)
MAN	Mannitol	Fermentation	اصفر (-)

ازرق(-)	Fermentation	Inositol	INO
اصفر(-)	Fermentation	Sorbitol	SOR
اصفر (-)	Fermentation	Rhamnose	PHA
ازرق(-)	Fermentation	Sucrose	SAC
اصفر (-)	Fermentation	Melibiose	MEL
ازرق(-)	Fermentation	Amygdalin	AMY
اصفر(-)	Fermentation	Arabinose	ABA

* (+) موجبة ، * (-) سالبة

إن تشخيص بنظام API 20E أمكن من الحصول على نتائج لتأكيد التشخيص لعزلات *P.mirabilis* إلا أن التشخيص بهذا النظام قد يعتمد على الرأي الشخصي للعامل إذ تحتاج هذه الأنظمة إلى الخبرة والدقة والحيطة والحذر عند العمل بها (Turton et al.,2008).

أظهرت نتائج التشخيص المظهري و البايوكيميائي ان نسبة عزل بكتريا جنس *Proteus spp* هي (١٧,٨٨ %) من بين بكتريا حالات التهابات المسالك البولية و هذا يتفق مع نتائج كل من Al-Taai (٢٠٠٥) و Al-Kabby (٢٠٠٧) الذين وجدوا ان نسبة عزل هذا الجنس هي (١٧,٩٧%)، (١٤,٧٠ %) من حالات التهاب المسالك البولية وعلى التوالي، كما و تتفق نتائجنا تقريبا مع Verhaz وجماعته (2003) وكذلك Orrett (١٩٩٩) الذين وجدوا ان نسبة عزلها هي (١٣,٣ %) (١٧,٤%) وعلى التوالي. لكنها بنفس الوقت لا تتفق مع النتائج التي توصل إليها الباحث Mehr وجماعته (2004) والباحث Khurana وجماعته (2002) إذ وجدوا أن نسبة الإصابة بهذه البكتريا كانت (٥ %) و (٣٣,٣%) على التوالي ، كما اشار الباحث Ling وجماعته (2003) في دراسة في جنوب شرق اسيا حول التهابات المسالك البولية ان نسبة عزل البكتريا جنس المتقلبات هي (8.3 %).

تشير الكثير من الدراسات الى ان بكتريا جنس المتقلبات تأتي بالمرتبة الثانية بعد بكتريا *E.coli* في أحداث الإصابة بالتهابات المسالك البولية في كل الأعمار وللجنسين (Nass et al ., 2000)، وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة ان نسبة الإصابة بالإناث كانت أعلى مقارنة بنسبة الإصابة للذكور التي بلغت

(61.53 %) وهذه النتيجة تتفق مع الدراسات التي أجراها الباحث Raka وجماعته (2004) إالذفن وءءوا أن نسبة الاصابة لءى الاناث (٧٤,٦ %) و لءى الذكور (٢٥,٨ %) وكذلك ءوصل Cohen وجماعته (2003) الى ان نسبة الاصابة لءى الاناث اعلى من الذكور , كما اشار الباحث Al-Taai (٢٠٠٥) والباحث Orrett (1999) الى ان نسبة الاصابة بالذكور اعلى من الاناث , وقد يعزى سبب ارتفاع نسبة الاصابة بالاناث عنها بالنسبة للذكور الى الاختلافات التشريحية الموجودة بين الجنسين , إذ الأليل في الاناث وقربه من فتحة المخرج يجعله عرضه للإصابة , كما إن وجود مركبات الزنك ضمن إفرازات البروستات قد يوفر حماية للذكور من الإصابة بالخمج (Stamey , 1975 ; Mears , 1984).

شكلت بكتريا *Proteus mirabilis* في هذه الدراسة النسبة الاعلى من مسببات الاصابة للمسالك البولية الناتجة عن جنس المتقلبات *Proteus spp* مقارنة بنوع *Proteus vulgaris* , إذ اظهرت الدراسة ان بكتريا *P. mirabilis* كانت (٣٦) عزلة من اصل (39) أي بنسبة (92.30 %) بينما بكتريا *Proteus vulgaris* كانت (3) عزلة أي بنسبة (٧,٧ %) وجاءت هذه النتائج مطابقة لما ءوصل اليه كل من Al-Taai (2005) و Almarjani (2000) في دراسته حول التهابات المسالك البولية الناتجة عن جنس المتقلبات *Proteus spp* إذ وءد أن نسبة الاصابة ببكتريا *Proteus mirabilis* كانت (86.14%) و (٨٥,١٤ %) مقارنة بنسبة عزل *Proteus vulgris* التي كانت (13.64%) و (14.86 %) على التوالي, و اشار الباحث Orrett (1999) الى ان نسبة عزل بكتريا *Proteus mirabilis* كانت 80 % .

4-2 مقاومة بكتريا *P. mirabilis* للمضادات الحيوية

تعد مقاومة العزلات المرضية للمضادات الحيوية مشكلة متزايدة قد تقود الى زيادة نسبة الوفيات (Kumar and Mahadeva. 2013). أشار Livermore (٢٠٠٣) الى ان زيادة نسبة المقاومة للمضادات الحيوية بين العزلات المسببة لالتهاب المسالك البولية. هذا وتعد بكتريا *Proteus spp* واحدة من بين هذه البكتريا المعروفة بمقاومتها للمضادات الحيوية .

إن ازدياد نسبة المقاومة بين سلالات هذه البكتريا في أنحاء مختلفة من العالم قد يعود الى الاستخدام الواسع للمضادات الحيوية في العلاج و في الوقاية من الأمراض, و كذلك لاحتمالية اكتسابها للعوامل الوراثية الناقلة لصفة المقاومة المتعددة من البكتريا المجاورة لها في الأمعاء عن طريق الاقتران-و التحويل- و التأبير , هذا و أن وجودها في الأمعاء ضمن الفلورا الطبيعية يؤدي الى تعرضها المستمر للمضادات الحيوية و بالتالي الى انتخاب السلالات المقاومة لهذه المضادات (Yah, et al, 2007).

تم في دراستنا الحالية اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. mirabilis* البالغ عددها (36) عزلة تجاه (11) مضاداً حيويًا مختلفاً ، وحددت حساسية أو مقاومة العزلات للمضادات الحيوية بالاعتماد على قياس قطر منطقة تثبيط النمو بالمليمتر (ملم) حول أقراص المضادات المستخدمة و قورنت النتائج مع ما ورد في (٢٠٠٦) NCCLS، و باستخدام العزلة القياسية للمقارنة.

وتوضح النتائج المعروضة في الجدول (4-4) أن (36) عزلة من بكتيريا *P. mirabilis* المعزولة من عينة إدرار مقاومة للمضاد Ampicillin وبنسبة 100% , ومقاومة للمضاد Tetracycline وبنسبة 91.3% ومقاومة للمضاد Amoxillin وبنسبة 84.9% وهي أعلى نسبة مقاومة سجلت لهذه المضادات إذ اتفقت هذه النسب مع ما جاء به. Guillou Joly- et al. (2010) , وكذلك مع ما توصل إليه كل من Hawser et al. (2009) و Al-Taai (2005) و الجبوري (2001) إذ بينوا إن نسبة مقاومة البكتريا المسببة لالتهابات المسالك البولية والإسهال عند الأطفال مرتفعة لهذه المضادات لذا نصحوا بعدم استخدام هذه المضادات في مجال علاج هذا المرض. إن ارتفاع نسب المقاومة لهذه المضادات يعود إلى الاستخدامات الواسعة لهما في مجالات مختلفة ولاسيما عند الأطفال مثل معالجة التهابات اللوزتين والإذن الوسطى , وبوجه عام التهابات الجهاز التنفسي (الجبوري, 2001).ومما يزيد من الأمر سوءا استخدام المضادات الحيوية دون إرشادات طبية متخصصة , فضلا عن عدم إكمال دورات العلاج اللازمة والتوقف عن تناول المضادات عند ظهور علامات التحسن الأولى على المريض (Fischbach and Saeed,1993; Walsh 2009).

أما مضاد Streptomycin فقد أظهرت العزلات قيد الدراسة أعلى مقاومة لهذا المضاد إذ بلغت نسبة المقاومة 83.21% وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه Al-Taai (2005) Saed (1993) الذين وجدوا أن نسبة المقاومة لهذا المضاد هي 78.73% و 75% على التوالي بين عزلات بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من مرضى التهابات المسالك البولية في مدينة بغداد.

أوضحت الدراسة الحالية إن معظم عزلات بكتيريا *P. mirabilis* حساسة للمضاد Norfloxacin بنسبة 91.66% وحساسة للمضاد Ciprofloxacin بنسبة 83.33% وحساسة للمضاد Amikacin بنسبة 80.55% وحساسة للمضاد Meropenem بنسبة 77.7%.

تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Singh وجماعته (2011) في الهند من أن جميع بكتريا *mirabilis* *Proteus* قيد الدراسة كانت حساسة للمضادات Ciprofloxacin و Norfloxacin و Meropenem مما دعاهم الى استخدامه في علاج التهابات المسالك البولية، كما أشار كل من Kahlmeter (2003) في السويد

وVaughan & Blondeau (2000) في كندا وكذلك Barrett وجماعته (1999) في بريطانيا الى أن نسبة المقاومة لمضاد Ciprofloxacin هي 2.1 % ، 1 % ، 1.1% بين عزلات بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من الأطفال الذين يعانون من التهابات المسالك البولية في السويد وكندا وبريطانيا على الترتيب. أشار Raka وجماعته (2004) أن مضاد Ciprofloxacin هو الأفضل في علاج التهابات المسالك البولية، كما أنها تتطابق مع ما أشار إليه Al-Taai (2005) و Almarjani (2000) اللذان وجدوا أن نسبة المقاومة لهذا المضاد هي 0% و 4.7% على التوالي بين عزلات بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من مرضى مصابين بالتهابات المسالك البولية في بغداد، من ناحية أخرى فإن الباحثين Karlowsky وجماعته (2003) و Mutnick وجماعته (2002) و ling وجماعته (2003) توصلوا الى أن بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من مرضى مصابين بالتهابات المسالك البولية كانت مقاومة Ciprofloxacin بنسبة 11.4 % ، 14 % على التوالي.

أظهرت عزلات *Proteus mirabilis* مقاومة متوسطة لمضادات Tobramycin، Gentamicin و Pipracillin إذ بلغت 36.11 % ، 32.22 % ، و 44% على التوالي ، وتتفق هذه النتيجة مع ماتوصل إليه Winokur وجماعته (2001) الذين لاحظوا أن نسبة المقاومة لمضاد Tobramycin بلغت 33.3% من قبل بكتريا *P. mirabilis* معزولة من مرضى مصابين بالتهابات المسالك البولية في كندا . وكما أن نتائج دراستنا ليست بعيدة كثيراً مع ما أشار إليه كل من Al-Taai (2005) و Ling وجماعته (2003) والباحث Almarjani (2000) الذين وجدوا أن نسبة المقاومة لمضاد Gentamicin كانت 40% ، 27% ، 26.9% على التوالي. أما مضاد Piperacillin فقد كانت نسبة مقاومته 44% وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Al-Taai (2005) كما تقترب من نتيجة Almarjani (2000) الذين وجدوا ان نسبة المقاومة لمضاد Piperacillin هي 59.45 % و 50.7 % على التوالي ، تعد النتيجة التي توصلت إليها الدراسة مثيرة للتساؤل عن المقاومة المرتفعة لهذا المضاد وربما يعود ذلك الى الاستخدام العشوائي لهذا المضاد.

جدول (٤-٤) حساسية بكتيريا *P. mirabilis* لمضادات الحياة

نوع المضاد	الرمز	التركيز مايكروغرام/قرص	النتيجة
Piperacillin	Pip	10	متوسطة
Amoxicillin	Am	25	مقاومة
Norfloxacin	No	5	حساسه
Ampicillin	Amp	30	مقاومة
Gentamicin	GN	10	متوسطة
Ciprofloxacin	CF	5	حساسه
Amikacin	Ami	30	حساسه
Meropenem	Me	30	حساسه
Tetracycline	T	10	مقاومة
Tobramycin	To	10	متوسطة
Streptomycin	St	٣٠	مقاومة

3-4 التشخيص الوراثي

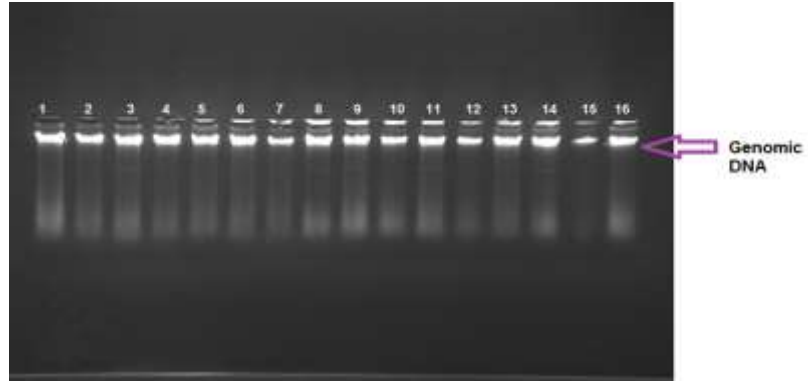
1-3-4 استخلاص الحامض النووي DNA

تم استخلاص الحامض النووي DNA من عزلات بكتيريا *Proteus mirabilis* بأستعمال عدة الإستخلاص المجهزة من شركة Geneied. نمت العزلات أولاً على وسط أكار الماكونكي لتنشيط العزلات والحصول على غزارة بالنمو ثم لقع وسط مرق نقيع القلب والدماغ بهذه العزلات إذ تنمى العزلات المراد

استخلاص المحتوى الوراثي منها مدة 24 ساعة ويستعمل كوسط مغدً لأنواع البكتيريا جميعها دون شروط وكانت نتائج الإستخلاص جيدة.

أستعملت خلايا البكتيريا المعلقة في محلول مرق نقيع القلب والدماغ المعزولة من عينات الأدرار لمرضى مصابين بالتهابات المسالك البولية وطردت مركزيا بسرعة عالية (5000 دورة بالدقيقة) لمدة 5 دقائق لترسيب خلايا البكتيريا وأستكملت بعدها خطوات الأستخلاص وكانت نتائج الاستخلاص جيدة وبتركيز ونقاوة عاليين, أذ تراوح تركيز الحمض النووي DNA بين 10-100 نانوغرام/مايكرو لتر ونقاوة تتراوح بين 1.5 - 1.8 اعتماداً على قراءة الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز Nano drop . وهذا دليل على كفاءة طريقة استخلاص الدنا المتبعة في هذه الدراسة . كذلك تم التثبت من الحجم بترحيل دنا العينات على هلام الاكاروز قبل استخدامه كقالب في تفاعل PCR , إذ إن من المتطلبات الأساسية لإجراء التفاعل ضبط تركيز الدنا لأهمية ذلك في تحقيق النتيجة المثلى القابلة للتكرار, وذلك لتوفير عدة نسخ من الدنا قالب , وقد كان التركيز الأمثل للدنا قالب المستخدم في هذه الدراسة هو 25 نانوغرام/ تفاعل.

تم الكشف عن DNA المعزول بترحيل العينات كهربائياً على هلام الأكاروز بتركيز 1% وقد رحلت العينات بفرق جهد 70 فولت لمدة ساعة أعقبها فحص الهلام بعد عملية التصبغ بصبغة بروميد الأثيديوم وتحت الأشعة فوق البنفسجية وصور الهلام, أظهرت نتائج الترحيل وجود حزم الحمض النووي (DNA) المستخلصة ذات حدة ووضوح عاليين مما يدل على التركيز والنقاوة العاليين. . يبين الشكل (4-5) حزم الحامض النووي DNA المستخلص من مجموعة عزلات بكتريا *P. mirabilis*



الشكل (4-5): الترحيل الكهربائي للمحتوى الوراثي المستخلص بأستعمال هلام الأكاروز 1% (45 دقيقة، 1 فولت/سم²). (مسار رقم 1, 2, 3, 16) الحامض النووي DNA المستخلص من عزلات البكتيريا) .

2-3-4 التشخيص بتقنية تفاعل السلسلة المتعددة

تعد طريقة تشخيص البكتيريا بواسطة تقنية PCR من الطرق المهمة وذلك بسبب تضخيم (DNA) المستخلص من خلايا بكتيرية خلال ساعة وتعد هذه الطريقة من أسرع الطرق مقارنة بالطرق السابقة (Winfield and Groisman, 2003).

تم تشخيص البكتيريا بواسطة تفاعل PCR ذلك باستخدام البادئ (Primer) للجين *16sRNA* والبادئ للجين *ureR* ويتكون مزيج التفاعل لهما كما في الجدولين (2-3) و (3-3) إذ تتم إضافة البادئ الأمامي و البادئ العكسي و DNA و الماء المقطر الخالي من الايونات الى الحفر الموجود في عدة AccuPower® PCR Premix الحاوية على المكونات المبينة في الجدول (1-3).

1-2-3-4 التشخيص الوراثي لبكتيريا *Proteus ssp* بواسطة الجين *16sRNA*

هي تقنية متخصصة تمتلك حساسية عالية ويعتمد تشخيص كثير من أجناس البكتيريا على الجين *16sRNA* (Amri et al. 2007; Anbazhagan et al. 2010; Brolund et al. 2010; Postollec et al. 2011)

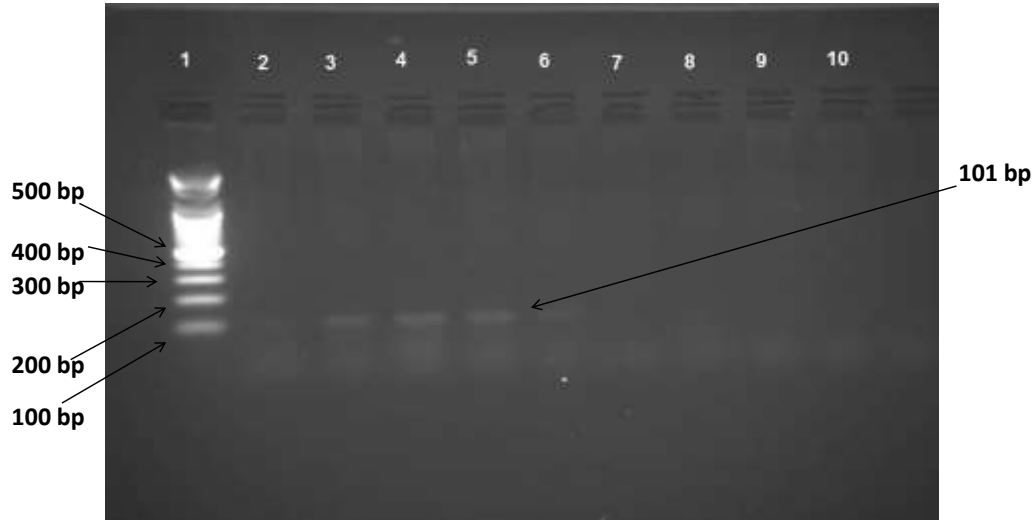
ويستخدم هذا الجين للدراسات التفريقية بين أنواع البكتيريا بالأضائة الى المايوتوكونديريا (Kolbert and Persing, 1999).

كما يستخدم كجين تفريقي لأنواع البكتيريا في الفحوصات السريرية الطبية (Weisburg et al, 1991) أجريت تفاعلات الكوثره لعزلات *Proteus ssp* لتحديد جينات *16sRNA* والمسؤول عن تشخيص وتمييز جنس المنقلبات *Proteus* عن باقي البكتيريا المعوية. باستعمال بادئات نوعية تستهدف جينات *16sRNA* بهدف التشخيص الدقيق لعزلات *Proteus* على هذا الجين. والمجهزة من قبل شركة Bionee, (Korea).

تم تحديد الظروف المثلى للتفاعل بعد إجراء عدد من تجارب لغرض الوصول إلى الظروف المثلى جدول

(3-4) إذ لوحظ إن أفضل تركيز DNA template كان 25 ng/ µl .

إن تركيز DNA الداخل في التفاعل يعد من المؤشرات المهمة لضمان ارتباط البادئ مع متمماته (الخفاجي وابو المعالي، 2013). واستعمل 10 $\mu\text{l/picomols}$ للبادئ الأمامي و 10 $\mu\text{l/picomols}$ للبادئ العكسي وفي خطوات تفاعل السلسلة المتعددة استعملت درجة حرارة 94 مئوية كبدائية تفاعل المسخ الأولي (initial denaturation) لمدة 5 دقائق لدورة واحدة وثبتت هذه الدرجة لكل العينات، وكمحاوله للوصول للدرجة المثلى لعمل أنزيم البلمرة والخروج بأفضل النتائج لذا اعتمدت بذلك على تفاعل (Gradieant PCR) لاختصار الوقت نسبةً لكثرة العينات، إذ ضبطت درجة الحرارة المثلى باستعمال أكثر من درجة بالوقت نفسه لان العمل في كل مرة بدرجة حرارة معينة تأخذ وقتاً طويلاً إذ تبلغ المدة الزمنية المجملة للتفاعل تقريباً ساعتان فضلاً عن إلى الوقت المستغل في عملية الترحيل الكهربائي للكشف عن حزمة DNA لنواقل السلسلة المتعددة، واستعملت الدرجات (50-56-58-60) مئوية إذ استعملت درجة حرارة 60 لمدة 30 ثانية حددت هذه الظروف بالاعتماد على أفضل النتائج التي ظهرت (Wang *et al.*, 2002)، وعند ترحيل النواتج كهربائياً كان أفضل وهج تحت الأشعة فوق البنفسجية هو لنواتج التفاعل المتضمن درجات الحرارة 60 مئوية، أما درجة الحرارة 56 مئوية كان الوهج ضئيل جداً وهذا يدل على أن هذه الدرجة غير مناسبة لالتحام البادئ المتخصص مع التوالي المستهدف على شريط DNA، في حين كان الترحيل غير واضح تماماً عند درجة الحرارة 58. لذا اعتمد الدرجة 60 مئوية والتي أعطت أفضل النتائج في عدة تجارب وعند مقارنة حجم ناتج التجارب مع DNA القياسي بالترحيل الكهربائي كان الحجم تقريباً (101 bp) وهذه النتيجة مطابقة مع نتائج Zhang *et al.* (2012) وكذلك مع نتائج Limanskiĭ *et al.* (2005)، الشكل (6-4).



شكل (4-6) ترحيل كهربائي لنتائج كوثرة لجين *16sRNA* على هلام الاكاروز بنسبة 1.5 % لمدة ساعة وبفارق جهد 70 فولت.

المسار (1): Lader DNA .

المسار (2): السيطرة السالبة (عدم ظهور ناتج).

المسار (3): المحتوى الوراثي لعزلة *P. mirabilis* رقم ٧٠ .

المسار (4) : المحتوى الوراثي لعزلة *P. mirabilis* رقم ٢٢ .

المسار (5) : المحتوى الوراثي لعزلة *P. mirabilis* رقم ٨٠ .

المسار (6) : المحتوى الوراثي لعزلة *P. mirabilis* رقم 17 .

المسار (7) : المحتوى الوراثي لعزلة *Klebsiella* رقم ١

المسار (8) : المحتوى الوراثي لعزلة *Salmonella* رقم ٤

وكذلك أعتمد الباحثون Limanskiĭ وجماعته (٢٠٠٥) و Mansy وجماعته (١٩٩٩) و

Takeuchi وجماعته (١٩٩٦) على تشخيص بكتيريا *P. mirabilis* بواسطة الجين *16sRNA*.

ووجد الباحث Fernández-Delgado وجماعته (٢٠٠٧) العديد من البكتيريا المعوية في مياه البحار

وخصوصا بكتيريا *P. mirabilis* وعزز قناعاته الزرعية بالاختبارات البايوكيميائية وعمل التسلسل الجيني

16sRNA.

كما أستعمل الباحث Mollet وجماعته (١٩٩٧) التسلسل الجيني *16sRNA* في تشخيص بكتيريا *P.*

mirabilis من الحالات السريرية.

بينما وجد الباحث Yu وجماعته (٢٠١٠) ان التسلسل الجيني *16sRNA* هو المسئول عن المقاومة التي تمتلكها بكتيريا *P. mirabilis* ضد المضادات الحيوية من مجموعة الامينوكلايكوسيد.

شخص الباحث Rothman وجماعته (٢٠٠٢) بكتيريا *P. mirabilis* بالاعتماد على الجين *16sRNA* من حالات مرضية بوجود البكتيريا في الدم.

واستخدم الباحث Kunikazu وجماعته (٢٠٠٧) الجين *16sRNA* في تشخيص بكتيريا *P. mirabilis* في اليابان, بينما أعتمد الباحثان Manos و Belas (٢٠٠٦) على نفس الجين لتفريق بكتيريا *P. mirabilis* عن الأنواع الخنسة التابعة لجنس *Proteus*.

في هذه الدراسة وبعد تثبيت الظروف المثلى للبادئ المستخدم للتشخيص في تفاعل PCR أُجري الفحص الوراثي على 36 عزلة شخصت على إنها *P. mirabilis* بالاختبارات الكيميائية الحيوية والفحص ألمجهري وعدت سيطرة إيجابية (Positive control) في تفاعل PCR للتثبت من عمل الانزيم وعمل البادئ وارتباطه بتسلسل الجين *16sRNA* ودرجات الحرارة المستخدمة في خطوات تفاعل PCR. وللتأكد من ان البادئ لا يرتبط مع التسلسل غير تسلسل الجين *16sRNA* أجريت سيطرة سلبية (Negative control) وذلك بإجراء تفاعل PCR لعينات بكتيرية مختلفة عدة شملت بكتيريا *Salmonella*, *Klebsiella*.

2-2-3-4 التشخيص الوراثي لبكتيريا *P. mirabilis* بواسطة الجين *ureR*

يعد جين *ureR* جين مهم في عملية تشخيص هذه البكتيريا (Mobley, et al, 1995). أعتبر الباحث Zhang وجماعته (٢٠١٢) أن جين *ureR* جين متخصص بشكل دقيق في تشخيص النوع *P. mirabilis* وهو المسئول عن انتاج أنزيم اليوريز وهو موجود في النوع *P. mirabilis* وغير موجود في كل من (*D'Orazio, et al.,1996; Helicobacter pylori, Klebsiella aerogenes, Bacillus sp* (Mulvaney and Bremner 1981).

تم التحري عن جينات *ureR* و المسئول عن إفراز اليوريز من عزلات بكتيريا والمعزولة من حالات التهاب المسالك البولية ولمختلف الأعمار, واستعمل بادئات نوعية مخصصة حددت الظروف المثلى للتفاعل PCR والمبين في الجدول (٣-٥).

بعد عدة تجارب تم تحديد أفضل تركيز وكان بحدود 25 نانوغرام / مايكرو لتر.

واستعمل أيضا 10 μl / picomols لكل من البادئ الأمامي والعكسي, أما درجات الحرارة فكانت 95 مئوية كبدائية تفاعل المسخ الأولي لمدة 5 دقائق لدورة واحدة وثبتت هذه الدرجة لكل العينات, وتم عمل Gradieant (PCR) لاختصار الوقت مشابه لتلك التي عملت للكشف عن جين *16sRNA* واستعملت الدرجات -58-60 (56-50) مئوية حددت هذه الظروف بالاعتماد على أفضل النتائج التي ظهرت, وكان أفضل وهج تحت الأشعة فوق البنفسجية أفضل حزم منفردة متخصصة لنتائج التفاعل عند درجة الحرارة 58 مئوية, وتم الاعتماد عليه لإعطاء نتيجة موجبة بالنسبة للكشف عن جينات *ureR*, وذلك مقارنة النتائج مع حجم DNA القياسي بالترحيل الكهربائي إذ كان مقارب لـ (225 bp) تقريبا وهي مطابقة مع نتائج Zhang et al. (2012), حيث إن حجم جين *ureR* هو (225 bp) الشكل (4-7).

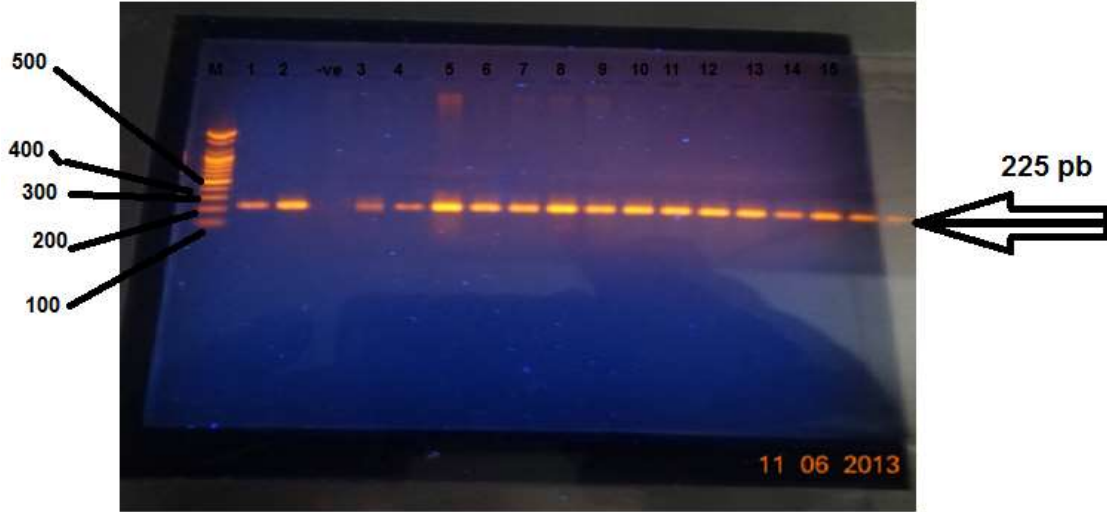
أشار كل من الباحثين Limanskiĭ وجماعته (2005) و Huang وجماعته (1999) ممكن افتراض بأن طريقة استخدام جين *ureR* يجب أن تكون أكثر نوعية وتخصص لتمييز عينات بكتيريا *P. mirabilis* تم اعتماد تقنية PCR أذ شخصت هذه البكتيريا بصورة خاصة عن طريق الجين *16sRNA* والجين *ureR* (Fiume et al. 2005; Maligoy et al. 2008, Postollec et al. 2011) ; dos Santos et al, 2001)

أشار الباحث Zhang وجماعته (2012) أنه يمكن الاعتماد على جين *ureR* في تشخيص هذا النوع من البكتيريا حتى من العينات المأخوذة بشكل مباشر من الطبيعة وهذه العملية ربما تحتاج أقل من ثلاث ساعات. يعد جين *ureR* أفضل وأكثر تخصص من جين *uerC* في تشخيص *P. mirabilis* حتى لو كان عدد البكتيريا قليل في العينة (Huang et al. 1999, Takeuchi et al. 1996).

بينما لاحظ الباحثان Hagi وجماعته (2010) و Nakayama (2007) أن تشخيص النوع *P. mirabilis* بواسطة الجين *ureR* أكثر تخصصا.

بعد تثبيت الظروف المثلى للبادئ المستخدم للتشخيص في تفاعل PCR أُجري الفحص الوراثي على 36 عزلة شخصت على إنها *P. mirabilis* بالاختبارات الكيميائية الحيوية والفحص المجهرى و عدت سيطرة إيجابية (Positive control) في تفاعل PCR للتثبت من عمل الانزيم وعمل البادئ وارتباطه بتسلسل الجين *ureR* ودرجات الحرارة المستخدمة في خطوات تفاعل PCR.

لقد أشار كل من الباحثين Limanskiĭ وجماعته (٢٠٠٥) و Mansy وجماعته (١٩٩٩) و Takeuchi وجماعته (١٩٩٦) أن تشخيص بكتيريا *P. mirabilis* كنوع وبشكل متخصص ودقيق يتم الاعتماد على الجين *16sRNA* والجين *ureR* وهو يفرق ويميز هذه البكتيريا عن غيرها.



شكل (٤-٧) ترحيل كهربائي لنتاج كوثرة لجين *ureR* على هلام الاكاروز بنسبة 1.5 % لمدة ساعة وبفرق جهد 70 % فولت.

3-3-4 تسلسل جين *ureR*

تم معرفة تسلسل القواعد النتروجينية لجين *ureR* في (10) عينة، إذ تم إرسال (50) مايكروليتر لكل عينة من نتاج تفاعل PCR مع البادئ الخاص لجين *ureR* الى شركة MacroGen في كوريا الجنوبية وبعد الحصول على النتائج (الملحق رقم ١).

قورنت نتائج التتابعات مع بعضها بواسطة برنامج MEAGA 5.1 لمعرفة الاختلافات فيما بينها.

وقورنت النتائج جميعها مع تسلسل القواعد النتروجينية لجين *ureR* الموجود في قاعدة البيانات العالمية بالرقم 815506.1 N2-JH (http: NCBI Reference Sequence) كما يلاحظ في (الملحق رقم ٢).

أستخدمت هذه الطريقة من قبل Al-Deresawi (٢٠١٢) في دراسة الطفرات الوراثية والاختلافات في الجين *TPo* في النساء مع متلازمة تكيس المبايض العراقية واستخدمت هذه الطريقة من قبل Al-Theab (2012) في دراسة جزيئية للترابط ما بين مقاومة الانسولين ومتلازمة المبايض متعددة الأكياس في نساء بغداد.

جين ureR 1-3-3-4

لخصت نتائج تحليل تسلسل الجين *ureR* في الجدول (٤-٧) وأظهرت أنه كان هناك (2) طفرة في (10) عينات من الجين *ureR* , إذ كانت النسبة المئوية للطفرات (percentage of mutations) هي (٢٠ %) العينات المدروسة. وتبين أن هناك طفرة واحدة في العينتين رقم (٧٠-٨٠) ان هذا التغير في مكان ونوع الطفرة قد يؤدي إلى اختلاف تأثير هذه الطفرة. وبعض هذه الطفرات تؤدي إلى تغيرات في الشفرات الوراثية ومن ثم تغير في الأحماض الأمينية عند الترجمة التي تعد أهم الأسباب التي زادت من مقاومة هذا الجين (Carruthers *et al.*, 1996).

ان حدوث طفرات نقطية في المناطق المشفرة يؤدي الى عدة حالات كأن يكون تغير في الحامض الأميني أو الاستبدال بحامض آخر وبالتالي تغير في طبيعة البروتين او الناتج وبالتالي يؤدي الى نشوء سلالات مقاومة او حساسة للمضادات الحيوية وحسب نوع الطفرة (Mordi and Momoh, 2009) .

جدول (٤-٧): انواع الطفرات في تسلسل الجين *ureR* في بكتيريا *P. mirabilis* المعزولة من المرضى.

Sample Number	Mutation Site	Codon Number	Wild type Codon seq	Mutant type Codon seq	Mutant type
70	11	4	TAG	TGA	Insertion G
80	17	6	GAG	AGA	Insertion A
Total samples 10 2 sample mutant					

2-3-3-4 نوع الطفرات ونسبتها المئوية

كشفت تحليل التركيب الوراثي لجين *ureR* بواسطة التسلسل أن هناك تغييرات وراثية. وأظهرت البيانات الموجودة في الجدول (٤-٨) أن هناك (0 %) طفرة استبدال (substitution) و (%) (Deletion) و (20 %) طفرات غرس (Insertion) وهذه النتائج تتفق تقريباً مع ما أشار إليه Katelynn وجماعته (٢٠١٢) إلى أن بعض السلالات يمكن أن تحتوي على عدد من الطفرات مثل حشر أو طفرات حذف في حين توجد سلالات تحمل جينات سليمة كتلك العائدة لبكتيريا *P. mirabilis*.

3-3-3-4 تأثير الطفرات (Effect of mutations)

إن الطفرات تؤثر في الجين *ureR* عن طريق إحداث تغيير في تنظيم الجين وعمله. ويبين الجدول (٤-٨) أن هناك ٢٠ % طفرة نوع Insertion مما قد يؤدي إلى التأثير في النمط الظاهري لكونها تؤدي إلى تبديل في الأحماض الأمينية ومن ثم في البروتين.

الجدول (٤-٨) انواع الطفرات في جين *ureR* ونسبتها المئوية.

Type of mutations	N	%
Substitution	0	0
Deletion	0	0
Insertion	2	20
Total	10	20

هذه الطفرة أثرت في الكودون (4) للعينة رقم (80) مما أدى إلى حصول خلل في الترجمة للحامض الاميني المسؤول عن هذا الكودون حيث أعطت حامض K (Lysine) والكود المشفر له أما (AAA) أو (AAG).

أما العينة (70) تشفر لشفرة توقف (TGA) وهذا معناه حدوث طفرة نقطية أدت إلى نشوء شفرة التوقف وبالتالي يكون البروتين الناتج غير مكتمل. تم مطابقة التتابعات التي تم تضخيمها لهذا الجين بين العزلات

المحلية وقواعد البيانات العالمية NCBI لجميع التتابعات للقواعد النروجينية للأحياء بصورة عامة لهذا الجين, ووجد أنها تتطابق بنسبة (98%).

نلاحظ تطابق (98%) من العزلات المحلية مع قاعدة البيانات NCBI وعدم وجود أي تطابق مع كائن حي آخر. مما يرشح هذه المنطقة والبوادي المستخدمة في هذه الدراسة على ان تكون مؤشر جزيئي molecular marker لهذا الجين وخاص لهذا النوع *P. mirabilis* والنوع يستخدم في الكشف والتشخيص على الاساس الجزيئي كما في (الملحق رقم 3).

ان طفرات Missense قد تؤدي إلى تغييرات ملموسة في البروتين إذ يمكن استبدال حامض أميني بحامض اميني آخر مشابهة جداً من حيث الخصائص الكيميائية وفي هذه الحالة البروتين يكون غير فعال ، أو يمكن أن يحدث استبدال الأحماض الأمينية في منطقة من البروتين التي لا تؤثر تأثيراً كبيراً في بنية البروتين الثانوية أو وظيفته.

وهناك أيضاً الأحماض الأمينية المشفرة بواسطة أكثر من شفرة والذي قد يحصل تحور في الشفرة ولكن لا ينتج أي تغيير في الترجمة (Satoshi et al., 2012).

وهناك نوع من الطفرات يؤدي الى تغير شفرة الحامض الأميني الأرجنين الى شفرة توقف stop (codon) كما حدث في تسلسل قواعد عينة رقم (70) ومن ثم الحصول على بروتين غير ناضج او فاقد لوظيفته.

أظهرت نتائج تتابع التسلسل بأن التتابع *ureR* أعطى أكثر تطابق عند مقارنته مع جينات البكتريا الموجودة في قاعدة البيانات العالمية لأسباب عملية يجب ان تكون الحساسية والدقة في التشخيص عالية كون الموضوع يتعلق بالمحتوى الوراثي للبكتريا وبأستخدام جينات خاصة بالبكتريا وبهذا فإن الطرق الجزيئية لا تحتاج الى نقاوة عالية او اجراء زرع جرثومي للبكتريا مقارنة بالطرق الاخرى والتي تحتاج الى اجراء زرع وفحص مجهري واختبارات كيميائية لغرض التشخيص الدقيق (Postollec, et al, 2011).

من خلال ما تقدم من تحليل النتائج تبين أن الكشف عن *P. mirabilis* بأستخدام الطرق الجزيئية الحديثة المتمثلة بطريقة تفاعل PCR افضل بكثير من الطرق التقليدية إذ انها تكون دقيقة جدا لحساسيتها العالية وسريعة وقل تكلفة ونتيجتها لا تتوقف على رأي الشخص العامل وكذلك يمكنها التعامل مع عدد كبير من العينات في وقت واحد وعدم الحاجة الى مختبرات كبيرة.

كما يمكن تجميد العينات اذ لا حاجة أن تكون البكتيريا حية مما يعني سهولة نقل العينات.

كما تبين في هذا البحث أن لمعرفة تتابعات القواعد النيتروجينية لنواتج تفاعل PCR دورا كبيرا في تأكيد مطابقة صحة التشخيص الجزيئي لتتابعات البكتيريا المعزولة محلياً ومقارنتها مع تتابعات العزلات العالمية وعن طريق التثبيت من أن البوادي الخاصة المستخدمة في هذا البحث تكون متخصصة للجين العائد ل *P. mirabilis*.

وخلصت الدراسة هي إمكانية الاعتماد على تقنية PCR لجينات *16sRNA* و *ureR* في تشخيص بكتريا *P. mirabilis* وبالتالي اختصار الوقت والكلفة وهذا ما تصبو إليه دراسات الوراثة الجزيئية بالنسبة لتشخيص الاحياء المجهرية.
الاستنتاجات

١. تعد بكتريا *Proteus mirabilis* المسبب الرئيس لاصابة الأشخاص بالتهابات المسالك البولية إذ كانت نسبة عزلها ٩٢,٣٠ % ضمن الدراسة الحالية مقارنة بالاجناس الاخرى .
٢. أظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة بان الغالبية العظمى من العزلات تمتلك عوامل الضراوة المتمثلة بإنتاج إنزيم اليوريز والحركة التموجية (Swarming) مما تزيد من امراضية هذه العزلات.
- ٣ . أن الاعتماد على الأوساط الزرعية الروتينية يؤدي إلى إهمال جزء لا بأس به من البكتريا في العينات واستبعاده ، مع إن هذه العينات قد تخفي بعض أنواع البكتريا المسببة لخمج السبيل البولي التي تحتاج إلى متطلبات غذائية خاصة .
٤. وجود مقاومة متعددة للمضادات الميكروبية بين عزلات بكتريا *P. mirabilis* على الرغم من حداثة استخدام بعض من المضادات ، مما قد يشير إلى قابلية البكتريا على تطوير نظام مقاومة سريع فضلاً عن إمكانية اكتسابها من سلالات ومصادر أخرى في البيئة. كذلك فقد أظهرت الدراسة أن هناك فروقات في نمط المقاومة بين العزلات.
- ٥ إمكانية استخدام تفاعل PCR واستخدام البادئ الخاص (*uerR*) للكشف عن البكتريا المرضية *P. mirabilis* في عينات أدرار لأشخاص كانت لديهم أعراض أولم تكن هناك أعراض بشكل دقيق وسريع عن طريق الكشف الوراثي وبأستعمال الجين *uerR*.

التوصيات

١. اجراء دراسات موسعة على عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا من الناحية الوراثة والمناعية و استخدام التقنيات الحديثة مثل تقنية **Polymerase Chain Reaction (PCR)** في الدراسات المستقبلية لتحديد وبائية العزلات المرضية
٢. اجراء المزيد من الدراسات المتعلقة بعزل البكتريا وتشخيصها المسببة لخمج السبيل البولي في النساء الحوامل والأطفال دون الخمس سنوات في المساحات الجغرافية المختلفة وبشكل دوري للوقوف على حقيقة وجود وانتشار هذه البكتريا لغرض وضع آلية للسيطرة عليها والوقاية منها.
٣. استخدام تفاعل **PCR** في مستشفيات العراق , لكونه دقيقاً في التشخيص فضلاً عن إمكانية فحص عدد كبير من النماذج في وقت واحد .
٤. إمكانية إجراء **Direct PCR** باستخدام **DNA** خام معزول مباشرة من عينات الإدرار للتحري السريع عن **enterotoxin P mirabilis** ، وذلك باستخدام البادئات النوعية وبرنامج التفاعل التضاعفي المستخدم في هذه الدراسة دون المرور بمراحل العزل والتشخيص بالطرائق التقليدية والمقارنة بين كفاءة وحساسية كل من الطريقتين .
٥. دراسة وراثية جزيئية للبروتين الغشائي الذي يشفر من قبل الجين **ureR** الذي يعد عالي الضراوة ومن العوامل الخطرة .
٦. اجراء المزيد من الدراسات حول وبائية خمج المسالك البولية وتحديد نسبة انتشارها على مستوى المرضى الراقدين و المستخدمين للقسطرة البولية .

المصادر الاجنبية

A

- Adler, J.L.; Burke, J.P.; Martin, D.F & Finland, M. (1971) *Proteus* infections in a general hospital. Biochemical characteristics and antibiotic susceptibility of the organisms. *Annals, Intern. Med* 75:517-530. •
- Ahmed, V.U.; Hussain, J.; Hussain, H.; Jassbi, A.R.; Ullah, F.; Lodhi, M.A.; Yasin, A. & Choudhary, M.I. (2003) First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. *Chem. Pharm. Bull.* 51(6): 719-23 •
- 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., and Mobley H. L. (2008) A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Mol Microbiol* 68:997- 1017. •
- Al-Deresawi, M. (2012) Hormonal- Genetical Study on Women with Polycystic Ovary Syndrome and Thyroid Disorders. MSc thesis, Genetic Engineering and Biotechnology Institute for Postgraduate Studies Univ. of Baghdad. p115 •
- Al-Duliami AA, Nauman NG, Hasan ARSH, Al-Azawi ZH. (2011) Virulence Factors of *Proteus Mirabilis* Isolated From Patients Otitis Media in Baquba And it's Peripheries. *Diyala J Medicine* 2011; 1: 69-75. •
- Al-Jubori, S.S. (1997) Genetic and Molecular Study on Beta – Lactamase Enzyme produced by local Isolates of Gram – Negative Bacteria. Ph.D. thesis, Al-Mustansiriya Univ. (In Arabic). •
- Al-Kabby, A. S. A. (2007) Extraction and Partial Purification for Fimbriae from *Proteus mirabilis* and Study Their Role in Adhesion to Uroepithelial Cells, MsC thesis, Baghdad University, p110 •
- Allison, C.; Lai, H.; Gygi, D. and Hughes, C. (1993) Cell differentiation of *P. mirabilis* is initiated by glutamine, a specific chemo attractant for swarming cells. *Mol. Microbiol.* 8:53-60 •
- Almarjani, M.F.(2000) Multiple antimicrobial resistance and some virulence factors of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection and study of their plasmid content. M.Sc. thesis Al-Mustansiriya Univ. (In Arabic). •
- AL-Taai, H. R. R. (2005) Bacteriological, Biochemical and Molecular Study of *Proteus mirabilis* Isolated from Urinary Tract Infections in some •

Hospitals of Baghdad City. PhD thesis, AL-Mustansiriya Univ, 180 p.

Al-Theab, M. (2012). Molecular Study of Correlation Between Insulin Resistance and Polycystic Ovary Syndrome in Baghdad women. Ms.C. thesis , Genetic Engineering and Biotechnology Institute for Postgraduate Studies Univ. of Baghdad.

Alwan, A., T. Deignan, M. O'Sullivan, J. Kelly and C. O'Farrelly. (1998) Quantitative assay of Salmonella adherence to intestinal epithelia: A new method for assessing novel intervention products. J. Microbiol. Methods 33:163-170.

Amri AA, Senok AC, Ismaeel AY, Al-Mahmeed AE, Botta GA (2007) Multiplex PCR for direct identification of Campylobacter spp. in human and chicken stools. J Med Microbiol 56:1350–1355

Anbazhagan D, Kathirvalu GG, Mansor M, Siok Yan GO, Yusof MY, Sekaran SD (2010) Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of Enterobacteriaceae in clinical samples. Afi J Microbiol Res 4:1186–1191

Ani IMA, Murayati HYA, Salman MO, Ghani HM. Histological findings of ascending urinary tract infections in experimental rats caused by *Proteus mirabilis*. Biomed Res 2011; 22 (4): 425-430.

Arlet, G. ; Rouveau, M. ; Bengoufa, D. ; Nicolas, M. H. and Philippon,A. (1991). Novel transferable extended-spectrum β -lactamase(SHV-6) from *Klebsiella pneumoniae* conferring selective resistance to ceftazidime. FEMS Microbiology Letters 81 (1): 57- 62

Aswegan, C.; Dirksen, Van Sckalkwyk, J.; Toit, P.; Verster, I.; Franz, R.; & Plessis, D.(1992). The Effect of Calcium & Mg Ions On Urkinase & Sialidase Activity. Urol. Res. 20: 41

Atlas, R. (1995) Laboratory Manual of Experimental Microbiology. 1st (ed). Mosby, Inc. Missouri.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Smith, J A.; Seidman, J. D. and Struhi, K. (1987) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. New York.

B

- Bahrani, F. K. and Mobley, H. L. T. (1993) *P. mirabilis* MR/P fimbriae: molecular cloning, expression, and nucleotide sequence of the major fimbrial subunit gene. *J. Bacteriol.* *175*:457-464. •
- Bahrani, F. K.; Cook, S.; Hull, R. A.; Massad, G. and Mobley, H. L. (1993) *Proteus mirabilis* fimbriae N-terminal amino acids sequence of a major fimbrial subunit and nucleotide sequence of the genes from two strains. *Infect. Immun.* *61*:884-891. •
- Bahrani, F. K.; Johnson, D. E.; Robbins, D. and Mobley, H. L. T. (1991). *Proteus mirabilis* flagella and MR/P fimbriae: Isolation, Purification, N-terminal analysis and serum antibody response following experimental urinary tract infection. *Infect. Immun.* *59(10)*:3574 •
- Bahrani, F. K.; Massad, G.; Lockatell, C. V.; Johnson, D. E.; Russell, R.G.; Warren, J. W. and Mobley, H. L. (1994). Construction of an MR/P fimbrial mutant of *Proteus mirabilis*: Role in virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* *61*:884-891. •
- Baron, E.J. & Finegold, S.M. (1994) Microorganisms Encountered In Urinary Tract in Baily & Scott's Diagnostic Microbiology. (9th) ed. Mosby Company U.S.A. •
- Barrett, S.P.; Savage, M.A.; Rebec, M.P.; Guyot, A.; Andrews, N.& Shrimpton, S.B. (1999). Antibiotic sensitivity of bacteria associated with community-acquired urinary tract infection in Britain. *Journal of Antimicrob. Chemoth.* *44*: 359-65 •
- Batisky, D. (1996) Pediatric urinary tract infection. *Ped. Annal. J. contium Ped. Educat.*, *25(5)*: 266-271 •
- Belas, R., and Suvanasuthi, R. (2005) The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *J. Bacteriol.* *187*:6789–6803. •
- Belase, R.; Manos, J. and Suvanasuthi, R. (2004). *Proteus mirabilis* ZapA metalloproteases degrades abroad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* *72*:5159-5167. •
- Belase, R.; Schneider, R. and Melch, M. (1998). Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutant: Identification of *rbsA*, encoding a regulator of swarming behavior. *J. Bacteriol.* *180*:6126-6139. •

- Benson, H.J. (2002) Microbiological application : Laboratory manual in general microbiology, 8th ed. McGraw – Hill Co., Inc., New York •
- Bergogne-Berezin, E. (1997) Antibiotic resistance. J. Med. Microbiol. 46:461-464. •**
- Bijlsma, I. G. W.; Van Dijk, L.; Kusters, J. G. and Gaastra, W. (1995) Nucleotide sequence of two fimbrial major subunit genes, *pmpA* and *ucaA* from canine – uropathogenic *Proteus mirabilis* strains. Microbiol. 141:1349-1357 •
- Blondeau, J.M.& Vaughan, D. (2000) *In vitro* activity of 19 antimicrobial agents against 3513 nosocomial pathogens collected from 48 Canadian medical centers. The Canadian Antimicrobial Study Group. Int. J. Antimicrob. Agents. Aug; 15(3): 213-9 •
- Brenner, D. J.; Farmer, J. J.; Fanning, G. R.; Steigerwalt, A. G. ; Klykken, P.; Wathen, H. G.; Hickman, F. W. and Ewing, W. H. (1978) Deoxyribonucleic acid relatedness of *Proteus* and *Providencia* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:269-282. •
- Broeren MCC, Bahçeci S, Vader HL, Arents NLA. Screening for urinary tract infection with the Sysmex UF-1000i urine flow cytometer. J Clin Microbiol 2011; 49(3): 1025-1029. •
- Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfström L, Walder M, Giske CG (2010) Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in Enterobacteriaceae. J Microbiol Meth 82:229–233 •
- Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Mores, M. (2001). Medical Microbiology. 22nd ed. Appelton and Lange. PP.217-223 •
- Brooks,G.f.;Janet,S.B.,Karen,C.&Stephen .A.M .(2007).Jawetz, Melnick& The Adelbergs, Medical Microbiology.Twenty –fourth edition McGraw-Hill companies.p.253 . •

C

- Carruthers, M. M.; and Kabat, W. J. C. (1996) Mediation of Staphylococcal adherence to mucosal cells by lipoteichoic acid. Infect. Immune. 40: 444-446. •
- CDCP (Centers for Disease Control and Prevention) (1996) National nosocomial infections surveillance (NNIS) report, data summary •

- from October 1986-April 1996, issued May 1996. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *Am J Infect Control* 1996;24(5):380-8.
- Chanal. C., Bonnet, N.; Champs, C.; Sirot, D.; Labia, R. & Sirot, J. (2000). •
Prevalence of β -lactamase among 1, 072 Clinical Strains of *Proteus mirabilis*: a 2-Year survey in French Hospital,. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44(7): 1930-1935.
- Chaudhary, N. K. and Murthy, S. M. (2013) Extended Expectrum •
Betalactamases in Uropathogen. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 6, Issue 3, 2013, 207-210
- Chown, A. W.; Taylor, P. R.; Yoshikaw, T. T. and Guze, L. B. (1979). •
Anosocomial outbreak of infection due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colinization as amajor reservoir. *J. Infect. Dis.* 130:621-627
- Clapham, L.; McLean, R.J.C.; Nickel, J.C.; Downey, J.; & Costerton, J.W. •
(1990) The influence of bacteria on struvite crystal habit and its importance in urinary stone formation. *J.Crystal Growth.* 104: 475-84
- CLSI. (2006) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for •
Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M7-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Cohen, L.A.; Gary, A.T.; Fales, W.H.& Madsen, R.W. (2003) Trends in •
fluoroquinone resistance of bacteria isolated from canine urinary tract. *J. Vet. Diagn. Invest.* Jul.15 (4): 338-43
- Cohen, T.D.; Preminger, G.M. (1996) Struvite calculi. *Semin. Nephrol.* 16: •
425-34.
- Collee, J.G.; Miles, R.S. and Watt, B. (1996). Practical Medical Microbiology. •
Churchill. Living Stone, London
- Collins, C.H. and Lyne, P.M. (1987). Microbiological methods.5th ed. •
Butteworths Co. publishers Ltd. U.K.
- Cock, S. W.; Mody, N.; Vall, J. and Hull, R. (1995). Molecular cloning of •
Proteus mirabilis uroepithelial cell adherence (*uca*) genes. *Infect. Immun.* 63:2082-2086.

- Cotran, R.; Kumar, V.; Robbins, S.; & Schoen, F. (1996). Pathologic Basis Of Disease. (5th) ed. W.B.Saunders Co. London. Pp: 930, 984-6 •
- Crichton, P.M.; Logan, J.M.; and Old, D.C. (1993). Aminiaturized biotyping system for strain discrimin in *Escherichia coli*. J. Epidemiology and Infection. 111: 81-88. •
- Cruickshank, R.; Duguid, J.P. Marmion, B.P.& Swain, R.H.A. (1975) The Practical of Medical Microbiology (12th) ed. Churchill Livingstone. •

D

- Dattelbaum; J.D.; Lockatell, C.V.; Johanson, D.E.& Mobley, H.L.T. (2003) •
Ure R, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections. Infect. Immun. Feb. 71(2): 1026-30. •
- Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; & Ginsberg, H.S. (1990) •
Microbiology. (4th) ed. Philadelphia. •
- Delzell, M.L. (2000) Urinary tract infection during pregnancy” . The •
American Academy of family physicians, Feb .1. 2000. •
- Dienes, L. (1946) Reproductive processes in Proteus cultures. Proc. Soc. •
Exptl. Biol. Med., 63, 265-270. •
- Dijkshoorn, L.and Ursing, B.M.(2000) Strain Clone & species comments on •
three basic concepts of bacteriology. J. Med. Microbiol., 49:397-401. •
- Dionisio, F.; Matic, I. ; Radman, M.; Rodrigues, O. R. and Taddei, F. (2002) •
Plasmids spread very fast in heterogenous bacterial communities. •
.Genetics. 162:1525-1532 •
- Disilverio, F.; Dangelo, A.; Gallucci, M.; Seccareccia, F.; & Menotti, A. •
(1996) Incidence & Prediction of Stone Recurrence After •
Lithotripsy In Idiopathic Calcium Patients: A multivariate •
Approach. Eur. Urol. 29: 41-6. •
- D'orazio, S.E.; Thomas, V.; & Collins, C.M. (1996) Activation Of •
Transcription at Divergent Urea-dependent Promotor By The •
Urease Gene Regulator *ure R*. Mol.Microbiol. 12: 213-27. •

- dos Santos LR, do Nascimento VP, de Oliveira SD, Flores ML, Pontes AP, Ribeiro AR, Salle CT, Lopes RF (2001) Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Salmonella in artificially inoculated chicken meat. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 43:247–250
- Duguide, J. P. and Gillies, P. R. (1957) Fimbrial and adhesive properties in dysentery bacilli. J. Pathol. Bacteriol. 74:397-411
- Duguid, J. P. and Old, D. C. (1980) Adhesive properties of enterobacteriaceae. In Bacterial adherence, edited by E. H. Beachey, Chapman and Hall, London, pp. 185-217.
- Dumanski, A.J.; Hedelin, H.; Edin-Lijegren, A.; Beauchemin, D. & McLean, R.J.C.(1994). Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. Infect. Immun. 62: 2998-3003.
- Dvison, A.M., Cumming A.D. and Swainson C.P. (1995). Disease of the kidney and genitourinary System. In Edwards Elder, J.S. (1992). Important of untreated diagnosis of vesico ureteral reflux. J. Urol. 148: 1750-4.

E

- Elder, J.S. (1992). Important of untreated diagnosis of vesico ureteral reflux. J. Urol. 148: 1750-4.

F

- Fernández-Delgado, M.; Contreras, M.; García-Amado, M.A.; Gueneau, P. & Suárez, P. (2007) Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan oysters. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 49(6): 355-359.
- 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.
- Fischbach, M.A. and Walsh, C.T.(2009). Antibiotics for emerging pathogens . Sciece 325(5944):1089-93
- Mears, E.M. (1984) Nonspecific infections of Kidneys. In: smith D.R. ed : General urology , 11th edn . ch. 12, PP: 182 . Lange Medical Pub. (LMP).
- Fiume L, Bucci Sabattini MA, Poda G (2005) Detection of Legionella pneumophila in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays. Lett Appl Microbiol 41:470–475

- Fode-Vaughan, K. A.; Maki, J. S.; Benson, J. A. and Collins, M. L. P. (2003). •
 Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. Lett .Appl.
 Microbiol . 37 : 239–243.
- Forbes, B.A.; Sahm, D. F.and Weissfeld, A. S. (2002) Baily and Scott's •
 Diagnostic Microbiology. 11th edition, Mosby, Company Baltimore.
 USA

G

- Gabriel, V., (2000). Gram negative rods 111:Opportunestic and zoonotic •
 bacteria .In: Microbiology and Infectious disease.3rd ed .pp.165-
 166. Awaverly Company. London
- Gilbert, D.N.; Kolheoo, S.T.; Slama, K. A.; Grunkemeier, G.; Lewis, G.; •
 Dioorkin, R.J.; Slaughter, S.E.; Leggett, J.E. (2001) Phenotypic
 resistance of *Staphylococcus aureus*, Selected
 Enterobacteriaceae, and *Pseudomonas aeruginosa* after Single
 and multiple in vitro exposures to Ciprofloxacin, Levefloxacin and
 Trovafloxacin. Antimicrob. Agents. Chemother Mar. 45(3)
- Goebel W. (1973) The influence of DNA A and DNA C mutations on the •
 initiation of plasmid DNA replication. Biochem Biophys Res
 Commun. 1973 Apr 16;51(4):1000–1007.
- Goldman, E. and Lorrence, H. G.(2009) Practical Handbook of microbiology. •
 2nd ed. Printed in the USA.
- Gonzales, G. (2001). *Proteus* infections. EMedicine. J.; (Internet). •
- Gonzales, G. (2006) *Proteus* Infections. eMedicine from WebMD. Last edited •
 4 August. Accessed Dec. 21, 2013.
- Goya, G, Ada and Ramsay, A. (1997) Vaccines, vaccination and the Immune •
 response. Pp 76-85
- Green W., D.; Slack, R. and Pentherer, J. Medical microbiology. 15th edition. •
 Churchill, Livingstone. London, 1997
- Griffiths, A.J.F.; J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart, (•
 1996). An Introduction To Genetic Analysis (6th edn.). W.H.
 Freeman and Co., NY.
- Gue, M.; Duport, V.; Dufour, A.; Sire, O. (2001). Bacterial swarming: a •
 biochemical time-resolved FTIR-ATR study of *Proteus mirabilis*
 swarm-cell differentiation. Biochemistry. Oct. 40(39): 11938-45

H

- Hacker, J.; Hof, H.; Emody, L. & Goebel, W. (1986) Influence of cloned *E. coli* haemolysin genes, S fimbriae and Serum resistance on pathogenicity in different Animal models. *Microb. Pathol.*1: 533-547. •
- Hagi T, Kobayashi M, Nomura M (2010) Molecular-based analysis of changes in indigenous milk microflora during the grazing period. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:484–487 •
- Harley, J.P and Prescott, L.M .(1996) *Laboratory Exercises in Microbiology* .3rd ed .McGraw-Hill publishing company .New York •
- Haslett, C.; Chilvers, E.R.; Hunter, J.A.A & Boon, N.A (1999). *Davidson's principles & Practice of medicine*. (18th) ed. U.K. •
- Hawser, S. P.; Bouchillon, S. K.; Hoban, D. J.; Badal, R. E.; Hsueh, P.-R. and Paterson, D. L. (2009) Emergence of high levels of extended spectrum-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region. *Antimicrob, Agents Chemother* 53 , 3280–3284 •
- Heimer, S.R., & Mobley, H.L.T. (2001). Interaction of *Proteus mirabilis* urease apoenzyme and accessory identified with yeast two-hybrid technology. *J. of Bacteriology*. Feb. 183(4): 1423-33. •
- Hickman, F. W.; Farmer, J. J. D.; Steigerwalt, A. G. and Brenner, D. J. (1982) Identification of *Proteus penneri* sp. Nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup 1. *J. Clin. Microbiol.* 15:1097-1102. •
- Higashitani, A.; Higashitani, N. and Horiuchi, K. (1995) A cell division inhibitor SulA of *Escherichia coli* directly interacts with FysZ through GTP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:198-204 •
- Hill, W.E.; Datta, A.R.; Feng, P.; Lampel, K.A. and Payne, W.L.(1998). Identification of food born bacterial pathogens by gene probes *in:U. S. Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed., Chapter 24. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. Washington, U.S.A. •
- Hoffmann, G.; Gajdes, G.; Czako, M.; Toth, V. and Tomcsanyi, T. (1998) Diversity among clinical isolates of *Proteus penneri* detected by •

random amplified polymorphic DNA analysis. Zentralbi-
Bakteriol. 288:351-60. (Abstract).

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; & Williams, S.T. (1994) •
Berg's Manual of Determinative Bacteriology. (9th) ed. Williams
and Wilkins.

Hughes, M.N. and Poole, R.K. (1989) Metals, and microorganisms. Chapman •
and Hall, London.

Huang H. S., Chen J., Teng L. J., Lai, MK (1999) Use of polymerase chain •
reaction to detect *Proteus mirabilis* and *Ureaplasma urealyticum* in
urinary calculi. J Formos Med Assoc 98:844–850.

Hultgern, S. J.; Jones, C. H. and Normark, S. (1996) Bacterial adhesins and •
their assembly. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and
Molecular Biology. (2)nd ed. Vol. IIP. 2730-2756.

Hulton, C. S. J.; Higgins, C.F. and Sharp, P.M. (1991). ERIC sequence : A novel •
family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*,
Salmonella typhimurium and other enterobacteria. Mol.
Microbiol. 5: 825-834.

I

Itami, N.; Akustu, Y.; Yasoshima, K. & Yamamoto, K.(1990) Renal Tubular •
Acidosis & U.T.I. J. Pediatric. 117: 156

Ito, H.; Kotake, T.; Nomura, K.; & Masai, M. (1995) Clinical & Biochemical •
Features of Uric Acid Nephrolithiasis. Eur. Urol.27: 324-8

J

Jacobsen, S. M., M. C. Lane, J. M. Harro, M. E. Shirtliff, and H. L. Mobley •
(2008) The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence
factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract
infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 52:180–193.

Jansen, A. M., Lockatell, V., Johnson, D. E. and Mobley, H. L (2004) •
Mannose- resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most
Proteus mirabilis strains infecting the urinary tract, dictate the in

vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation.

Infect. Immun. 72:7294–7305.

Jansen, A.M.; Lockatell, C.V.; Johnson, D.E. and Mobley, H.L.T. (2003) •
Visualization of *Proteus mirabilis* morphotypes in the urinary tract
elongated swarmer cell is rarely observed in ascending urinary
tract infection. Infect. Immun. 71(6):3607-3613.

Jawetz, Melnick & Adelberg, S. (1998) Medical Microbiology. (2nd) ed. •
Middle East Edition, Lebanon.

Joly-Guillou.; M.L.; Kempf, M.; Cavallo, J.D.; Chomarat, M.;Dubreuil, L.; •
Maugein, J.; Muller-Serieys, C.and Roussel-Delvallez, M.B. (2010
)Comparative in vitro activity of Meropenem, Imipenem and
Piperacillin/tazobactam against 1071 clinical isolates using 2
different methods: a French multicentre study doi: 10.1186/1471-
2334-10-72.

Jombo GTA, Emanghe UE, Amefule EN, Damen JG. (2012) Nosocomial and •
community acquired uropathogenic isolates of *Proteus mirabilis*
and antimicrobial susceptibility profiles at a university hospital in
Sub-Saharan Africa. Asian Paci J Trop Dis 2012; 2(1): 7-11.

Jones, B.D.; Virginia-Locatel, C.; Johnson, D.E.; & Mobley, H.L.T. (1990). •
Construction Of a Urease-Negative Mutants of *Proteus mirabilis*.
Infect. & Immun. 58: 1120-3.

Joseph, Sambrook, and David, W. Russel, (2001). Molecular Cloning: A •
Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold
Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 8: In vitro Amplification
of DNA by the Polymerase Chain Reaction.

K

Kaca, W. and Rozalski, A. (1991). Charecrerization of cell-bound and cell- free •
haemolytic activity of *Proteus* strains. Eur. J. Epidemiol. 7:159-
165.

Kaca, W.; Literacka, E.; Sjöholm, A.G.& Weintraub, A. (2000). Complement •
activation by *Proteus mirabilis* negatively charged
lipopolysaccharides. J.Endotoxin Res. 6(3): 223-34

Kahlmeter, G. (2003). An international survey of the antimicrobial •
susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract

infections: the ECO.SENS Project. J. of Antimicrobial
Chemotherapy. 51: 69-76.

Kaitwatcharachi, C.; Vasuvattakul, S.; Yenchitsomeans, P. (1999) Distal •
Renal Tubular Acidosis & High Urine Carbon Dioxide Tension In
Patients With South East Asian Ovalocytosis. Am. J. of Kidney.
Dis. 33: 1147-51

Kallenus, G., Mobley, R. & Severson, S.B. (1986) Microbiological Aspect of •
U.T.I. in Pediatric Nephrology, Holliday, Barrtes, and Vernies
(eds.) (2nd) ed.P:626.

Karlowsky, J.A.; Jones, M.E.; Thornsberry, C.; Friedland, I.R.& Sahn, D.F. •
(2003). Trends in antimicrobial susceptibilities among
Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in United
States from 1998 to 2001. Antimicrobial. Agents. Chemother.
May; 47(5): 1672-80.

; Zachary, L. Benet; Sarah, E. Blonsky; Kathleen, T. Katelynn, L. Woodhams •

Hackett and Joseph, P. Dillard (2012) Prevalence and Detailed
Mapping of the Gonococcal Genetic Island in *Neisseria*
meningitidis. J. Bacteriol. May v. 194 (9): 2275-2285.

Khurana, S.; Taneja, N.; Sharma, M. (2002). Extended-spectrum beta- •
lactamase mediated resistance in urinary tract isolates of family
Enterobacteriaceae. Indian J.Med.Res. Oct.116: 145-9

Klemm, P. and Christiansen, G. (1987). Three *fim D* gene required for surface •
localization of *E. coli* type 1 fimbriae. Mol. Genet. 220:334-338.

Klemm, P. and Schembri, M. A. (2000). Bacterial adhesins: functions and •
structure. Int. J. Med. Microbiol. 290:27-35

Klufio, G.; Bentsi, I.; Yeboah, E.; & Quarey, J.(1996). Upper Urinary Tract •
Stones In Accra, Ghana. West Africa J. Med. 15: 173-6.

Kolbert, CP; Persing, DH (1999) Ribosomal DNA sequencing as a tool for •
identification of bacterial pathogens. *Current Opinion in*
Microbiology 2 (3): 299–305

Kumamoto, 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.I.s,
11 Backgrounds of Patients. Japn. J. Antibiotic. 50: 251- 64.

Kumar, C. N. and Mahadeva, M. S. (2013) Extended Expectrum •
Betalactamases in Uropathogen, *Asian J Pharm Clin Res, Vol 6,*
Issue 3, 2013, 207-210

Kunikazu Y., Jun-ichi W., Satowa S., Naohiro S, Haru K, Keigo S, Kouji K, •
Kumiko K, Satoshi I, Yoshiyuki O, Toshifumi K, and Yoshichika
Arakawa (2007) 16s rRNA Methylase producing, Gram-negative •
Pathogens, Japan. Emerging Infectious Diseases. Vol. 13, No. 4

L

Larsson, P. (1978) Acomparison of the host Parasite relationship in U.T.I. •
caused by *Proteus* and *E.coli* in Animal and children. •
Goeteborg.P. 12

Laura, P.; Roberta, M.; Lucia; P.; Ceilia, M.; Ernesto G; Gianfranco, A.; •
Egidio, R. & Gian, M. (2002) Emerging extended spectrum β -
Lactamases in *Proteus mirabilis*.

Lazarevic, G.; Petreska, D.; & Povlovic, S. (1998) Antibiotic Sensitivity Of •
Bacteria Isolated From The Urine Of Children With U.T.I. From •
1986-1995. Srp-Arch-Celok-Lek. 126: 423-9 (Abstract).

Legnani- Fasjado, G., Zunino, P., Piccini, G., Allen, A. & Masjell, D. (1996) •
Defined mutants of *Proteus mirabilis* lacking flagella cause •
ascending urinary tract infection in mice. Microb. Pathogene. 21:
395-405

Li, X. and Mobley, H. L. T. (2002) Vaccines for *Proteus mirabilis* in urinary •
tract infection. Inter. J. Ant. Agents. 19:461-465.

Li, X.; Johnson, D. E. and Mobley, H. L. T. (1999). Requirement of MrpH for •
mannose-resistant *Proteus* like fimbriae mediated •
hemagglutination by *Proteus mirabilis*. Infect. Immun.
67(6):2822-2833

Li, X.; Locketel, 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.; Lockett, C. V.; Johnson, D. E. and Mobley, H. L. (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*. *Mol. Microbiol.* 45(3):865-874. •
- Li, X.; Zhao, H.; Geymonat, L.; Bahrani, F.; Johnson, D. E. and Mobley, H. L. T. (1997) *Proteus mirabilis* mannose-resistant, *Proteus* like fimbriae: MrpG is located at the fimbrial tip and is required for fimbrial assembly. *Infect. Immun.* 65(4):1327-1334. •
- Li, X.; Zhao, H.; Lockett, 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. *Infection and Immunity.* Jan. 389-94. •
- 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 Med. Microbiol.* 52: 19-28. •
- Liaw, S.J., Lai, H.C.; Ho, S.W.; Wang, W.B. (2000) Inhibition Of Virulence Factor Expression and Swarming Differentiation In *Proteus mirabilis* by *p*-nitrophenylglycerol. *J. Med. Microbiol.* 49: 725-31. •
- 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. Microbiol.* 50: 1039-48. •
- Liedle, B. (2001) Catheter-associated urinary tract infections. *Curr.Opin.Urol.* Jan.11(1):75-9. •
- Lilley, B. N. and Bassler, B. L. (2000) Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by Luxo and sigma-54. *Mol. Microbiol.* 36:940-954. •
- Limanskiĭ A, Minukhin V, Limanskaia O, Pavlenko N, Mishina M, Tsygenenko A (2005) Species-specific detection of *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* by the polymerase chain reaction. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 3:33–39. •

- Ling, J.M.; Lam, A.W.; Chan, E.W.& Cheng, A.F. (2003) What have we learn from community-acquired infections in Hong Kong? *J. Antimicrob. Chemother.* Apr.51 (4): 895-904. •
- Livermore DM. (2003) Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 11-23. •
- Loh, KY. & Sivakingam, N.(2007) Urinary tract infection in pregnancy, *Academy of Family physicians of Malaysia*, v. 2, Number 2. •
- Lohr, J.A.(1989) The Foreskin & U.T.I. *J. Pediatrics.* 114: 502-4. •
- Loomes, L. M.; Senior, B. W. and Kerr, M. A. (1990) A proteolytic enzyme secreted by *Proteus mirabilis* degrades immunoglobulins of the immunoglobulin A₁ (IgA₁), IgA₂ and IgG isotypes. *Infect. Immun.* 58:1979-1985. •
- Lopez-Rios, F.; Illei, P. B.; Rusch, V., and Ladanyi, M., (2004). Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet.* 364;1157–1166. •
- Luzzaro F, Brigante G, D’Adrea MM, Pini B, Giani T, Mantengoli E, *et al.* (2009) Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type beta-lactamase: epidemiology and clinical management. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **33**(4): 320-323. •

M

- Macfaddin , J. F. (2000). *Biochemical test for identification of medical bacteria.* 3rd ed. The Williams and Wilkins. Baltimore, USA. •
- Macleod, J. & Edwards, C.(1995). *Disease Of The Kidney & Genito Urinary System* In: *Davidson’s Principles & Practice Of Medicine* (17th) ed. P:650. ELBS & Bouchier, I. •
- Makuyana, D.; Mhlabi, D.; Chipfupa, M.; Munyombwe, T. & Gwanzura, L.(2002). A symptomatic bacteriuria among outpatients with diabetes mellitus in an urban black population. *Cent. Afr. J. Med.* Jul-Aug.48 (7): 78-82. •

- Manos, J. and Belas, R. (2006) The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Prokaryotes* (2006) 6:245–269. •
- Mansy MSM, Fadl AA, Ashour MSE, Khan MI (1999) Amplification of *Proteus mirabilis* chromosomal DNA using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probe* 13:133–140 •
- Martinez, J.J.; Mulvery, M.A.; Schilling, J.D.; Pinkner, J.S. and Hultgren, S.J. (2000). Type – I pilus – mediated in-vasion of bladder epithelial cells. *The EMBO journal*. 19 (12): 2803 – 2812 •
- Massad, G.; Lockett, C. V.; Johnson, D. E. and Mobley, H. L. (1994). *Proteus mirabilis* fimbriae: Construction of an isogenic *pmfA* mutant and analysis of virulence in a CBA mouse model of ascending urinary tract infection . *Infect. Immun.* 62:536-542. •
- Mattson, C. (1994). Alteration in renal function in pathophysiology concepts of altered health state. (4th) ed. J. B .Lippincott Company Philadelphia. •
- McClean, R. J. C.; Nickel, J. C.; Cheng, K.-J. and Costerton, J. W. (1988) The ecology and pathogenicity of urease-producing bacteria in the urinary tract. *Crit. Rev. Microbiol.* 16:37-79. •
- Mears, E.M. (1984) Nonspecific infections of Kidneys . In : Smith D.R. ed : *General urology* , 11th edn . ch. 12 , PP : 182 . Lange Medical Publication (LMP) . •
- Mehr, S.S.; Powell, C.V.; Curtis, N.(2004) Cephalosporin resistant urinary tract infections in young children. *J. Paediatr. Child. Health.* Jan-Feb. 40(1-2): 48-52 *Microbiol.* 24:175-180. •
- Meng, J.; Zhao, S.; Doyel, M.P.; and Kresovich, S. (1996). *microbiology.* *Food Microbiol* 28:848–861 •
- Mimis, C.A.; Playfair, J.H.; Roitt, I.M. & Wakelin, D.(1995) *Medical Microbiology.* Mosby. Times Mirror Intern. Publisher Ltd. Hong Kong. •
- 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(2):5-11. •

- Mobley, H. L. and Belase, R. (1995) Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. Trends Microbiol. 3:280-284. •
- Mobley, H.L.T. (2000) Virulence of the two primary uropathogens. Am. Soc. Microbiol. News. 66: 403-10 •
- Mobley, H.L.T.& Chippendale, G.R.(1990). Hemagglutinin urease and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. J. Infect. Dis. 161: 525-30 •
- Mobley, H.L.T., Jones, B.D., & Penner, J.L.(1987). Urease activity of *Proteus penneri*. Journal of Clinical Microbiology. 25(12): Dec, 2302-5. •
- Mobley, H.L.T.; Island, M.D.; & Hausinger, R.P.(1995). Molecular Biology of Microbial Ureases. Microbiological Reviews. 59(3): 451-80 •
- Mohammad, A. Farraj; Gabi, M. Abusada; Abed Alraoof, M. Saleem; Monthon , L .and Songtham ,S.(2008) A comparison of Two methods used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus spp* . J .Sci and Tech .Vol .5(2):161-171 •
- Mollet C, Drancourt M, Raoult D. (1997) *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol Microbiol 1997; 26(5):1005-11. •
- Monthon , L .and Songtham ,S.(2008) Acomparison of Two methods used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus spp* . J .Sci and Tech .Vol .5(2):161-171 •
- Mordi, R. M.; Momoh, M. I. (2009) Incidence of *Proteus* species in wound infections and their sensitivity pattern in the University of Benin Teaching Hospital. African J. of Biotechnol, 8(5):725-730. •
- Morris, N.S.; & Stickler, DJ.(1998). The Effect of Urease Inhibitors on The Encrustation of Urethral Catheters. Urological Research. 26: 275-9. •
- Mulrooney, S.B.; & Hausinger, R.P. (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. FEMS Microbiol. Reviews. 27: 239-61 •
- Mullis, K .B. and Fallona , F. (1987) . Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chian reaction. Methods Enzymol .25:155-335 •

- Mulvaney RL, Bremner JM (1981) Control of urea transformations in soils. •
 Soil Biochem 5:153–196 D’Orazio SEF, Collins CM (1993) The
 plasmid-encoded urease gene cluster of the Enterobacteriaceae
 is positively regulated by UreRa member of the AraC family of
 transcriptional activators. J Bacteriol 175:3459–3467
- Murphy, C.A. & Belase, R. (1999) Genomic rearrangement in the flagellin •
 genes of *Proteus mirabilis*. Mol. Microbiol. 31: 670-90.
- Mutnick, A.H.; Turner, P.J.& Jones, R.N.(2002) Emerging antimicrobial •
 resistance among *Proteus mirabilis* in Europe: report from the
 MYSTIC Program (1997-2001), Meropenem Yearly
 Susceptibility Test Information Collection. J. Chemother. Jun.
 14(3): 253-8.

N

- Naas, T.; Benaoudia, F.; Massuard, S. & Nordman, P. (2000) Integron- •
 located VEB-1 extended- spectrum β -Lactamase gene in *a*
proteus mirabilis clinical isolate from Vietnam. J. Antimicrob.
 Chemoth. 46: 703-711.
- Nakayama J, Hoshiko H, Fukuda M, Tanaka H, Sakamoto N, Tanaka S, Ohue •
 K, Sakai K, Sonomoto K (2007) Molecular monitoring of Ann
 Microbiol bacterial community structure in long-aged nukadoko:
 pickling bed of fermented rice bran dominated by slow-growing
 lactobacilli. J Biosci Bioeng 104:481–489
- Nichols, W. A.; Clegg, S. and Brown, M. R. (1990) Chracterization of the type •
 1 fimbrial sub unit gene (*fimA*) of *Serratia marcescens*. Mol.
 Microbiol. 4:2119-2126.
- Nielubowicz, G. R. (2010) Identification of the Outer Membrane •
 Immunoproteome of the Uropathogen *Proteus mirabilis*: Insights
 into Virulence and Potential Vaccine Candidates, PhD thesis,
 University of Michigan. 161 p.
- NCCL (National Committee for Clinical Laboratory standards) (2006). •
 Approved standard M2-A8 . performance standards for method.
 AIn.Clin.Pathol.45:493-496.
- Normark, B.H. and Normark, S.(2002) Evolution and spread of antibiotic •
 resistance. J. Intern. Med. 252:91-106**

O

- 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
- Obi, C.L.; Tarupiwa, A. & Simango, C. (1996). Scope of urinary pathogens isolated in the Public Health Bacteriology Laboratory, Harare: antibiotic susceptibility patterns of isolated and incidence of hemolytic bacteria. *Cent. Afr. J. Med.* Aug; 42(8): 244-9.
- Old, D. C. and Adegbola, R. A. (1982). Haemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. *J. Med. Microbiol.* 15:4551-4564. (Abstract).
- Orenstein, R. and Wong, E. (1999) Urinary tract infections in adults. *Am Fam Physician*. 1999 Mar 1;59 (5):1225-34, 1237.
- Orrett, F.A (1999) Prevalence of *Proteus spp.* In U.T.I. in a regional hospital in Trinidad. *Chung-Hua-I-Hsuch-Isa-Chin-Taibei.* 62: 438-42 (Abstract)
- Orrett, F.A. and Shurland, S.M. (2001). Bacteriuria in the elderly population in a developing country. *J. Natl. Med. Assoc.* Jul-Aug; 93(7-8): 238-42

P

- Pearson, M. M., Sebahia, M., Churcher, C., Quail, M. A., Seshasayee, A. S., Luscombe, N. M., Abdallah, Z., Arrosmith, C., Atkin, B., Chillingworth, T., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabbinowitsch, E., Walker, D., Whithead, S., Thomson, N. R. Rather, P. N. Parkhill, J. and Mobley, H. L. T. (2008) Complete Genome Sequence of Uropathogenic *Proteus mirabilis*, a Master of both Adherence and Motility. *J. of Bacteriology*, June 2008, p. 4027–4037 Vol. 190, No. 11
- Penner, J. L. (1984) Genus XI *Proteus* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Kreig, N. R. and Holt, J. G., eds.). William and Wilkins Baltimore, MD. P.491-494.

- Perifer, U. (1984) Isolation of plasmid DNA. Advanced molecular genetics by Puhler, A. and Timm, K. Springer Verlag, Berlin
- Petit, A. ; Yaghlane-Bousslama, H. B. ; Sofer, L. and Labia, R. (1992) Does high level production of SHV-type penicillinase confer resistance to ceftazidime in enterobacteriaceae?. FEMS Microbiology Letters 92(1): 89-94.
- Piccini, C.D.; Barbe, F.M.; & Legnani-Fajardo, C.L.(1998) Identification of Iron- Regulated Outer Membrane Proteins In Uropathogenic *Proteus mirabilis* & Its Relationship With Heme Uptake. FEMS-Microb. Lett. 15: 243-8.
- Piddock, L. J. V. (2008) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. Journal of Applied Bacteriology ,Vol 68 Issue 4
- Pignato, S.; Giammanco, G. M.; Grimont, F.; Grimont, P. A. D. and Giammanco, G. (1999). Molecular characterization of the genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia*, by ribotyping. J. Clin. Microbiol. 37:2480-2487
- Polymerase chainreaction for detection *Escherichia coli* O157:H7. Int. J. Food Microbiol.32: 103-113.
- Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J, Sohier D (2011) Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in foodmicrobiology. Food Microbiol 28:848–861
- Prinarakis, E.E.; Tzelepi, E.; Gazouli, M.; Mentis, A.F. and Tzouvelekis, L.S.(1996). Characterization of a novel SHV-5 enzyme. Federation of Eurp. Microb. Societies. 139: 229-234.

Q

- Quinn, P.J.; Carter, M.E.; & Markey, B.K.(1998) Clinical Veterinary Microbiology. Mosby. Philadelphia -36

R

- Rajehwari ,H. ; Nagaveni ,S .; Oli , A. and Chandrakanth ,K. (2010) Multiple Antibiotic Resistance and Esbl Producing *Klebsiella pneumonia* isolated from clinical Urine Samples . 5(1): 89-9

- Rajanna A.H, Shyamala D.C. and Belagali S.L (2012) Bacteriological analysis of water and soil samples around Nanjangud industrial area, Mysore district, Karnataka, India, International Journal of Environmental Sciences V: 3, No 1, 2012 •
- 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 •
- Ramakrishnan, K. and Scheid, D.C. (2005). Diagnosis and Management of acute pyelonephritis in adults. American family physician. 71(5): 933-942. •
- Rando, D.; Steglitz, U.; Morsdorf, G. and Kaltwasser, H. (1990) Nickel availability and urease expression in *Proteus mirabilis*. Arch. Microbiol. 154:428-432. •
- Rang, H.P.; Dale, M.M.; & Ritter, J.M.(1999) Pharmacology. (4th) ed. Churchill Livingstone. London. •
- Rashid, T., and A. Ebringer. 2007. Rheumatoid arthritis is linked to *Proteus* the evidence. Clin. Rheumatol. 26:1036–1043 •
- Rassweiler, J.J.; Renner, C.; Chaussy, C.; Thuroff, S.(2001) Treatment of renal stones by extracorporeal shockwave lithotripsy: an update. Eur. Urol. 39: 187-99 •
- Roberts, J. A.; Fussell, E. N. and Koach, M. B. (1990) Bacterial adherence to urethral catheters. J. Urol. 144:264-269. •
- Roberts, J. A. (1996) Tropism in bacterial infections: urinary tract infections. J. Urol. 156:1552-1559. •
- Rothman, R. E. Maulik, M. D., Gabor D., Guillermo M., Charlotte A. G., Tarik W., and Thomas C. (2002) Detection of Bacteremia in Emergency Department Patients at Risk for Infective Endocarditis Using J. Universal 16S rRNA Primers in a Decontaminated PCR Assay. Infect. Dis. 2002;186:1677–81 •
- Rozalski, A.; Bartodziejska, B.; Wykorta, M. Serwecinska, L.; Lukomski, S. and Koteko, K. (1993) Charecterization of haemolytic activity of *Proteus penneri*. Med. Dosw. Micribiol. 45:79-83. •

- Rozalski, A.; Sidorczyk, Z. and Kotelko, K. (1997) Potential virulence factor of *Proteus bacilli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:65-89. •
- Russel, P. V. and Orndorf, P. E. (1992). Lesion in two *Escherichia coli* type 1 pilus gene alter pilus number and length with out affecting receptor binding. J. Bacteriol. 174: 5923-5935. •

S

- Saed, R.S. (1993) *Proteus* and other microorganisms causing U.T.I. in children. M.Sc. Thesis, Col. of Med. Univ. of Baghdad. •
- Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning and laboratory manual 2nd ed. Cold spring Harbour laboratories, New York. •
- Santoro, J. & Kay, D.(1978) Recurrend U.T.I pathogenesis and management. Medical. Clin. North. Am. 62:1005. •
- Santos, C.; Texeira, F.; Vicente, A. and Astoifi-Filho, S. (2003) Detection of *C. trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. Braz. J. Infect. Dis., Brazil. 7:91-95 •
- Sareneva, T.; Holthofer, H. and Korhonen, T. K. (1990) Tissue-binding affinity of *Proteus mirabilis* fimbriae in the human urinary tract. Infect. Immun. 56(10):3330-3336 •
- Satoh, M.; Takeuchi,H.; Munakata, K.; Kitoh, & Yoshida, O. (1998) Therapeutic Effect Of Ceflaprenam On Polymicrobial Urinary Tract Infection Associated With *Enterococcus faecalis*. Using The Infections Urolithiasis Model In Rats. Kansenshogaku. Zasshi. 72: 371-8. (Abstract). •
- Yuichiro, K. Jiro, H., Teruhisa, U., Yoshiki, H., Akihiko, Satoshi, T., I., Masahiro, Nishimura; Kenichi, Sunaoshi; Koichi, Takeda; Nobukazu, Suzuki and Taiji, Tsukamoto, (2012) Antimicrobial susceptibility and penicillin-binding protein 1 and 2 mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolated from male urethritis in Sapporo, Japan *J. of Infec. and Chemoth.* 450-453 •
- Satoshi, Takahashi; Yuichiro, Kurimura; Jiro, Hashimoto; Teruhisa, Scavone, P.; Sosa, V.; Pellegrino, R.; Galvalisi, U. and Zunino, P. (2004) Mucosal vaccination of mice with recombinant *Proteus* •

- mirabilis* structural fimbrial proteins. *Microbes Infect.* 6(9):853-860.
- Scavone, P.; Sosa, V.; Pellegrino, R.; Galvalisi, U. and Zunino, P. (2004) •
Mucosal vaccination of mice with recombinant *Proteus mirabilis*
structural fimbrial proteins. *Microbes Infect.* 6(9):853-860
- Schaffer, J.A.(1985) Cystitis and Pyelonephritis in: *The Biologic & Clinical* •
Basis Of Infection diseases. Youmans, G.P.; Paterson, P.Y.; &
Sommer, H.M. p: 418.
- Schembri, M. A.; Pallesen, L.; Connel, H. and Klemm, P. (1996) Linker •
insertion mutagenesis of the Fim H adhesin type 1 fimbriae in an
Escherichia coli fimH – null host. *J. Microbiol.* 137:257-263.
- Seftal, z.; Madhun, T.; & Kim, E.D.(2000) Sexuaz Function In Med With •
Diabetes. Association with Glycemic Control. *J. Urol.* 163: 788-
92.
- Senior, B. W. (1993) The production of HIYA toxin by *Proteus penneri* •
strains. *J. Med. Microbiol.* 39:282-289.
- Senior, B. W.; Albrechtsen, M. and Kerr, M. A. (1987). *Proteus mirabilis* •
strains of divers type have IgA protease activity. *J. Med.*
Microbiol. 24:175-180.
- Senior, B.W. (1997). The Special Affinity of *Proteus mirabilis* Strain To •
Invade The Blood Stream Is Independently Of Its Proticine
Production, Proticine Sensitivity Type. *J.Med.Microbiology.* 46:
407-12
- Senior, B.W.; & Hughes, C. (1987). Production & Properties Of Hemolysins •
From Clinical Isoletes of The Proteeae. *J.Med. Microbiology.* 24:
17-25.
- Shanson, D.C.(1982) *Microbiology in Clinical Practice.* (2nd) ed. Tohn •
Wright, London.
- Sharkey, D. J.; Scalice, E. R.; Christy, K. G.; Atwood, S. M., and Daiss, J. L., (•
1994). Antibodies as thermolabile switches: high temperature
triggering for the polymerase chain reaction. *Biotechnol.,* 12:
506-509.

- Shigeta, M.; Hayashi, M & Igaw, M.(1995) Fever After Extra Coporeal Shock Wave Lithotripsy For Patients With Upper Urinary Tract Calculi Associated With Bacteriuria Before Treatment. *Eur. Urol.* 27: 121-3. •
- Shoff, W. H. and Green-McKenzie, J. (2007) Pyelonephritis, Acute. *eMedicine* (Internet). •
- Shwu- Jen, L; Lai, Ho, S.W.; Luh, K.T.; Wang, W.B. (2000) Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Potews mirabilis* by P- nitrophenylglycerol. *J. Med- Microbiol.*49: 723-731 •
- Silverblatt, F. J. (1974) Host parasite interaction in the rat renal pelvis. A possible role for pili in the pathogenesis of pyelonephritis. *J. Exp. Med.* 140:1696-1711. •
- Singh, V., Chauhan, P. K. , Kanta, R., Puri, A. and Garg, B.R. (2011) Antimicrobial sensitivity and resistance pattern of bacteria causing UTI infection in pregnant women, *J. of Pharmacy Research* 2011,4(7),2361 •
- Stammey, T.A. (1975) A clinical Classification Of U.T.I. Based Upon Origin. *Southern Med. J.* 68: 934-9 •
- Stephen, J.C & Sander, L,S(1981).Effect of *Escherichia coli* Alpha- Hemolysin on Human peripheral Leukocyte viability In vitro. *Infect. Immun.* 30 (2): 455-46 •
- Stewart, B. J.; Enos-Berlage, J. L. and McCarter, L. L. (1997). The *lonS* gene regulates swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 179:107-114. •
- Stoller, M.; & Bolton, D.(1995). Urinary Stone Disease, In: E.A. Tanagho & J.W. McAninch (eds.), *General Urology.* (14th) ed. Appleton & Large. New York. •
- Svanborg-Eden, C.; Eriksson, B.; Hanson, L.A.; Jodal, U.; Kallser, B.; Lidin-Janson, G.; Lindberg, U. and Olling, S. (1978). Adhesion to normal human uroepithelial cells of *Escherichia coli* from children with various forms urinary tract infection. *J. Pediat.* 39:398-403. •

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

Swihart, K. G. and Welch, R. A. (1990). The HpmA hemolysin is more common than HIYA among *Proteus* isolates . *Infect. Immun.* 58:1853-1860. •

T

Takeuchi, H. Yamamoto, S., Terai, A., Kurazono, H., Takeda Y, Okada Y, Yoshida O (1996) Detection of *Proteus mirabilis* urease gene in urinary calculi by polymerase chain reaction. *Int J Urol* 3:202–206 •

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

Tenover, F. C.(2006) . Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine* 119(6): 3-10. •

Tolson, D. L.; Barrigar, D. L.; Mclean, R. J. C. and Altman E. (1995). Expression of anonagglutinating fimbria by *Proteus mirabilis*. *63(3):1127-1129.* •

Tolson, DL.; Harrison, B.A.; Latta, Pk; Lee, KK& Alrman, E. (1997). The expression of non agglutinating fimbriae and its role in *proteus mirabilis* adherence to epithelial cell. *Can.J. Microb.* 45:69-72 •

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

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

Tsao, C-H.; Huang, W-S.; Cheng, C-Y.; Wu. S-L.; Lin, Y-Z. and Lin, M-H. (2003). Evaluation of culture negative acute pyelonephritis with ^{99m}Tc-DMSA renal scan in children *Ann. Nucl. Med. Sci.*, 16(3): 117-122. •

- Tsygenenko A (2005) Species-specific detection of *Proteus vulgaris* •
 UeharaYoshiki, Hiyama; Akihiko, Iwasawa; Masahiro, Nishimura;
 urethritis in Sapporo, Japan J. of Infec. and Chemoth. 450-453. V.
 4): 637-640(4
- Turnidge, J. ; Bell, J. ; Biedenbach, D. J. and Jones, R. N. (2002) Pathogen •
 occurrence and antimicrobial resistance trends among urinary
 tract infection isolates in the Asia-Western Pacific Region: report
 from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998–1999
 Inter. J. of Antimicrobial Agents 20 (1): 10-17.
- Turton ,J.F.;Hatice, B.; Siu,L.K.; Mary,E.K. and Tyrone,L.P. (2008) Evaluation of •
 amultiplex PCR for detection of serotypes K1,K2and k5 in *Klabsilla*
*sp.*and comparison of isolates within these serotypes. Fems
 Microbiol Lett 284,247-252

V

- Van-Daele, P.L. ; Quero-Guillen, J.C. ; Lesterhuis, W.; & Van-Der- Menlen, J. •
 (1998) Hyperammonemia In Hydronephrosis. Ned. Tijdschr-
 Geneesked. 142: 2414-5 (Abstract).
- Verhaz, A.; Skrbic, R.; Rakic-Music, M& Sabo, A.(2003) Catheter- related •
 urinary infections at the clinical center in Banja Luka. Med. Pregl.
 Sep-Oct.56 (9-10): 460-4 (Abstract
- Volk, W.A. Benjamin, D.C.; Kander, R.J.; & Prson, J.T.(1997) Essential Of •
 Medical Microbiology. (4th) ed. J.B. Lippincott Company.
 Philadelphia.

W

- Walker, K.E.; Moghaddame-Jafari, S.; Lockett, C.V.; Johnson, D.; Belas, •
 R. (1999) ZapA, the IgA-degrading metallo protease of *Proteus*
mirabilis, is a virulence factor expressed specifically in swarmer
 cells. Mol. Microbiol. 32: 825-36
- Wassif, C., D. Cheek, and R. Belas (1995) Molecular analysis of a •
 metalloprotease from *Proteus mirabilis*. J Bacteriol 177:5790-
 5798. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991).
 "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *J*
Bacteriol 173 (2): 697–703.

- Weller, T.M.A.; Mackenzie, F.M.; & Forbes, K.J.(1997) Molecular Epidemiology of a Large Outbreak of Multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. J. Med. Microb. 46:922-6. •
- Williams, J.G.K.; Hanafey, M.K.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.(1993). Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. •
 . 218: 704-741. Methods Enzymol
- Williams, P.; Comara , M.; Hardman , A.;Swift, S.; Mihon , A.,Hope •
 ,V.J.,Win2ar K.;Middleton ,B.;Pritchard, A.I.and By croft ,
 B.W.(2000) .Quorum Sensing and the population dependent
 Control of Virulence .Ph.Trans R.Soc.L and B.355. 667-680. •
- Winfiela, M. D. and Groisman E. A. (2003) Phenotype difference between •
Salmonilla and *Eschcerichia coli* resulting from the disparate
 regulation of homologous genes. PNAS.101:17162-17167. •
- Winokur, P.L.; Canton, R.; Casellas, J-M.; Legakis, N.(2001). Variations in •
 the performance of strains expressing an extended-spectrum β -
 Lactamase phenotype and characterization of isolates from
 Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clinical
 Infections Diseases. 32(Suppl 2): S94-103. •
- G.A.(2003) Microbiology Laboratory, Fundamentals and Wistreich, •
 Aplications, 2nd ed ., Prentice Hall, Pearson Education, Inc., New
 Jersey
- Wiswell, T.E.; & Hachey, W.E.(1993) U.T.I. & The Uncircumcised State An •
 Update. Clin. Pediatr. 32: 130-4. •
- Wray, S. K.; Hull, S. I.; Cook, R. G.; Barrish, J. and Hull, R. A. (1986) •
 Identification and characterization of auroepithelial cell adhesion
 from auropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. Infect. Immun.
 54(1):43-49. •

Y

- Yah, S. C.; Eghafona, N. O.; Oranusi, S.; Abouo, A. M., (2007) The Assessment •
 of *Proteus mirabilis* Susceptibility to Ceftazidime and

Ciprofloxacin and the Impact of These Antibiotics at Subinhibitory Concentrations on *Proteus mirabilis* Biofilms African J. of Biotechnol.,6 (15):1757-1762.

Yakubu, D. E.; Old, D. C. and Senior, B. W. (1989). The hemagglutinins and fimbriae of *Proteus penneri*. J. Med. Microbiol. 30:279-284 •

York, M.K.; Brooks, G.F. and Fiss, E.H.(1992). Evaluation of the auto SCANW/A rapid system for Identification and Susceptibility testing of gram negative fermentative bacilli. J. Clin. Microbiol.;30(11):2903-10. •

Younis, D., Mustafa, K. and Yahia, M. (2009) Role of Some Pathogenic Bacteria in Urinary Tract Infection in Mosul City. Al-Ttagani J. •

ISSN: 1818653X Year: 2009 V: 22 Issue: 2

Yu, F., Pan, J. Ding, B., Yang, L., Zhang, X. and Wang, L. (2010) Prevalence of plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among *Proteus mirabilis* isolates from a Chinese hospital. African J. of Microbiol. Res. Vol. 4(24) pp. 2790-2794, 18 •

Z

Zamanzad, B. and Moezzi, M.(2006) Prevalence of Asympomatic Bacteruria and Assocaited Host Factors in womwn with Diabetes type 2 shahre-Kord University of Medical Sience, Iran. J Res Health Sci, Vol 6, No 1 pp. 14- 20. •

Zhang, W., Niu, Z. Yin, K. and Liu, P. (2012) Quick identification and quantification of *Proteus mirabilis* by polymerase chain reaction (PCR) assays. Ann Microbiol, DOI 10.1007/s13213-012-0520-x •

Zhao, H.; Li, X.; Johnson, D.E.& Mobley, H.L.T.(1999) Identification of Protease and *rpoN*-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection. Microbiology. Jan. 145(pt 1): 185-95. •

Zhao, H.; Thompson, R.B.; Lockatel, V.; & Mobley, H.L.T.(1998). Use Of Green Fluorescent Protein To Assess Urease Gene Expression By Uropathogenic *Proteus mirabilis* During Experimental Ascending U.T.I. Infect. & Immun. 66: 330-5. •

Zunino, P.; Geymonat, L.; Allen, A. G.; Legnani-Fajardo, C. and Maskell, D. J. (2000) Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not •

impaired in amouse model of ascending urinary tract infection.
Immunol. J. Med. Microbiol. 29:137-143.

- Zunino, P.; Piccini, C. & Legnani-Fajard, C. (1999) Growth, Cellular Differentiation and Virulance Factor Expression By *Proteus mirabilis* In Vitro And In Vivo. J. Med. Microbiol. 48: 527-34.
- Zunino, P.; Piccini, C.; Legnani- Fajardo, (1994) Flagellate and non-Flagellate *proteus mirabilis* in the development of experimental urinary tract in Fection. Med.Microbiol.16: 379-385.
- Zunino, P.; Sosa, V.; Allen, A. G.; Preston, A.; Schlapp, G. and Maskell, D. J. (2003). *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for colonization in mice. Microbiol. 149:3231-3237

المصادر العربية

- الجبوري ، خلود كريم حسن . ٢٠٠١ . دراسة عن البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد.
- الخفاجي, زهرة و أبو المعالي , حسن (٢٠١٣) تفاعلات الكوثرية وتصميم البوداي. جامعة بغداد, معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا, ٣٢١ صفحة
- العبيدي, مروج عبد الستار محمد.(٢٠٠٤). التنقية الجزئية لخمّل النمط الاول المستخلص من جراثيم *Escherichia coli* ودورة في الاصابة. أطروحة دكتوراة. كلية العلوم. جامعة بغداد.
- العزاوي, رغد حربي:كزار,رباب ورحيم, ألاء (٢٠١١) د ا رسة التأثير التثبيطي وتقدير كمية البروتين والتنقية الجزئية لمبروتسين المستخلص من بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من عينة إد ا رر, مجلة جامعة النهرين المجلد ١٤ العدد(٣) أيلول، ٢٠١١ ص ٤٥-٤٠.
- محميد, شيماء جاسم (٢٠١١) المسببات الجرثومية المرافقة لخمج السبيل البولي في النساء الحوامل. مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية / العدد (٣) / المجلد (١٩).

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
١-٣	محتويات عدة AccuPower® PCR Premix	٥٥

٥٦	مزيج التفاعل الخاص لتشخيص الجين <i>16S rRNA</i>	٢-٣
٥٦	مزيج التفاعل الخاص لتشخيص الجين <i>ureR</i>	٣-٣
٥٧	الظروف المثلى لتشخيص الجين <i>16sRNA</i>	٤=٣
٥٧	الظروف المثلى لتشخيص الجين <i>ureR</i>	٥=٣
٦١	توزيع بكتريا <i>Proteus spp.</i> حسب العمر و الجنس في المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية .	1-4
٦٥	الاختبارات الكيموحيوية لأنواع جنس الـ <i>Proteus</i>	2-4
٦٧	نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا <i>P.mirabilis</i> باستخدام نظام (Bio Merieux) API 20E	3-4
٧٢	حساسية بكتيريا <i>P. mirabilis</i> لمضادات الحياة	4-4
٨١	أنواع الطفرات في تسلسل الجين <i>uerR</i> في بكتيريا <i>P. mirabilis</i> المعزولة من المرضى.	7-4
٨٢	أنواع الطفرات في جين <i>uerR</i> ونسبتها المنوية.	8-4

قائمة الأشكال

الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
١٧	عوامل الفوعة لبكتريا <i>P. mirabilis</i>	1-2
٣٤	عمليات تضخيم الجين داخل جهاز PCR	٢-٢
٦١	النسبة المنوية لعزل بكتريا <i>Proteus mirabilis</i> مقارنة ببكتريا <i>P.vulgaris</i> من عينات الإدرار.	1-4
٦٣	مستعمرات <i>Proteus spp.</i> النامية على وسط اكار الدم	2-4
٦٤	مستعمرات <i>Proteus spp.</i> النامية على وسط	3-4

	ماكونكي اكار	
٦٦	يوضح الاختبارات التشخيصية المكملة لبكتريا <i>P.mirabilis</i> باستعمال نظام API 20E .	4-4
٧٣	الترحيل الكهربائي للمحتوى الوراثي المستخلص بأستعمال هلام الأكاروز	5-4
٧٦	ترحيل كهربائي لنتائج كوثرة لجين <i>16sRNA</i> على هلام الأكاروز	6-4
٧٩	ترحيل كهربائي لنتائج كوثرة لجين <i>uerR</i> على هلام الأكاروز بنسبة 1.5 % لمدة ساعة وبفرق جهد 70 % فولت.	7-4

قائمة المختصرات

ATF	Ambient-Temperature Fimbriae
API 20E	Analytic Profile Index 20 Enterobacteriaceae
bp	Base pair
CFA/3	Colonization Factors Antigens /type 3
CFA/1	Colonization Factors Antigens /type1
DNA	Deoxynucleic acid
dNTP	Dinucleotide phosphate
EBB	Elution Buffer
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid
ESBLs	Extended Spectrum β -Lactamases

PMF	<i>Proteus mirabilis</i> Fimbriae
LPS	Lipopolysaccharide
MR/K	Mannose resistance/ Klebsiella like fimbriae
MR/P	Mannose resistance/ Proteus like fimbriae
µg	Microgram
mg	Milligram
ml	Millilitre
NCCLs	National Committee for Clinical Laboratory Standard
NAF	Non agglutinating fimbriae
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMF	<i>Proteus mirabilis</i> Fimbriae
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tris-borate-EDTA
<i>ure</i>	Urease gene
UTIs	Urinary tract infections
UECs	uro- epithelium cells
UCA	Uroepithelial Cell Adhesin
WHO	World Health Organization