وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

التحري عن جين عامل الألتصاق fimH لبكتريا *Esherchia coli* المعزوله من مرضى التهابات المسالك البوليه في مدينة الديوانيه

بحث مقدم إلى مجلس علوم الحياة في كلية العلوم
كجزء من متطلبات نيل درجة البكلوريوس في علوم الحياة

من قبل

سيف عباس هلال

بإشراف

د.غيداء جهادي محمد

١٤٣٧هـ ٢٠١٦ م

بسم الله الرحمن الرحيم

وَعِنْدَهُ مَفَاتِحُ الْغَيْبِ لَا يَعْلَمُهَا إِلَّا هُوَ وَيَعْلَمُ مَا فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ وَمَا تَسْقُطُ مِنْ وَرَقَةٍ إِلَّا يَعْلَمُهَا وَلَا حَبَّةٍ فِي ظُلُمَاتِ الْأَرْضِ وَلَا رطب ولا يابس الا في كتاب مبين

صدق الله العلي العظيم
الانعام : ٢٩

الإهداء

الهي لايطيب الليل الا بشكرك ولا يطيب النهار الا بطاعتك .. ولإتطيب اللحظات الا بذكرك ..

الله جل جلاله

الى من بلغ الرسالة و ادى الامانة .. ونصح الامة .. الى نبي الرحمة ونور العالمين ..

سيدنا محمد "صلى الله عليه واله وسلم "

الى من كلله الله بالهيبة والوقار .. الى من علمني العطاء دون انتظار .. الى من احمل اسمه بكل افتخار .. ارجو من الله ان يمد في عمرك لترى ثمارا قد حان قطفها بعد طول انتظار

والدي العزيز

الى من كان دعاؤها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي الى أغلى الاحبة

أمي الحبيبة

الى من هو اغلى من نفسي من كان عونا لي في شدتي تاج رأسي و نبراس دربي و من اشد به ازري

اخي الغالي

الى شمس العلم المضيئة على مر الزمان

اساتذتي

الى قلب خفق حبا و وفاء لي .. اهدي ثمرة جهدي و فاء ً وعرفانا ً بالجميل

اصدقائي

سيف

الشكر والتقدير

"رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ وَعَلَى وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ" "سورة النمل". ﴿١٩﴾

الحمد الله رب العالمين حمدا يوافي نعمه ويكافئ مزيده ، والشكر لله على ما وهبني من صبر وهدى وتوفيق تخطيت به الصعاب لإنجاز هذا العمل ، والصلاة والسلام على الرحمة المهداة والنعمة المسداة نبينا محمد (ص) ، وعلى أله وصحبه وسلم تسليما كثيرا.

بشعور غامر بالتقدير والوفاء ، يتقدم الباحث بشكره الخالص مقرونا بجزيل العرفان والامتنان إلى كل من تفضل وأثرى جوانب هذا البحث ، سواء برأي أو توجيه أو نصيحة أو ساهم في هذا العمل ولو بجزءٍ يسير ، وفي مقدمة هؤلاء " الدكتورة غيداء جهادي " على ما تفضلت به علي من الإشراف والتوجيه ، وكذلك ما لمسته من حسن خلقها وتواضعها ومناقشتها لي بأدب جم ، وحرصها الشديد على تنمية قدرات الباحث العلمية واهتمامها الدائم ، الذي مهما كتبت لن أستطيع أن أوفي حقها من الشكر والامتنان ، فجزاها الله عني خير الجزاء ووفقها لفعل الخير دائما وأبدا.

ويتقدم الباحث بالشكر والامتنان إلى أساتذتي في قسم علوم الحياة لمساعدتهم لي طوال فترة دراستي .

الخلاصة Abstract

تعد بكتريا الأيشريشيا القولونية الممرضة البولية (UPEC) من أهم المجاميع البكتيرية الممرضة والتي تسبب التهابات المسالك البولية.

جمعت خلال الدراسة ٢٥ عينة إدرار من المرضى المصابين بالتهابات المسالك البولية UTIs والمراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي وللفترة من كانون الثاني ٢٠١٦ إلى شباط ٢٠١٦ .تم التحري عن بكتريا اشيريكيا القولون وتشخيصها مجهريا ، مزرعيا ،وكيموحيويا. وظهرت البكتريا في ٢٥/١٤ حالة مرضيه مقابل ٢٥/٥ بكتريا أخرى و ٢٥/٦ حالة لم يظهر فيها أي نمو بكتيري.

تم استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) من البكتريا *E. coli* مباشرة باستعمال عدة (Kit) الاستخلاص. استعمل جهاز التفاعل سلسلة البلمرة (PCR) للكشف عن جين عامل الألتصاق (Type 1 fimbriae, FimH) كعامل ضراوة ينتج من قبل بكتريا (UPEC) باستخدام بادئات Primers .

أظهرت نتائج فحص تفاعل البلمرة المتسلسل أن جميع عزلات *E.coli* (١٠٠%) كانت حاوية على جين (fimH).استنتجت هذه الدراسة إن الجين المسؤول عن أنتاج عامل الألتصاق Type1 fimbriae هو عامل ضراوة مهم لبكتريا الأيشريشيا القولونية المرضية البولية.

1.1.المقدمة

التهاب المسالك البولية Urinary Tract infections (UTIs)

التهاب المسالك البولية هو أحد الأمراض الالتهابية التي تنتج من التضاعف العالي للعديد من مسببات الأمراض في الجهاز البولي، مما يؤدي إلى إحداث تغييرات في الوظيفة المثالية للمسالك البولية والكلى (Hojati *et al*.,2015). وهو من أكثر الأمراض الالتهابية شيوعاً وانتشاراً بين الذكور والإناث، والأطفال، وكبار السن، ويُكتسب هذا المرض من المستشفيات Nosocomial Infection ويشكل ٤٦% من نسبة الإصابة، كما يكتسب من

المجتمعCommunity-Acquired Infection ويشكل ٨٠% من حالات التهاب البروستات المزمن Chronic bacterial prostatitis و ٩٠% من حالات التهاب الحويضة والكلية Pyelonephritis ،كما يشمل التهاب المثانة Cystitis والإحليل Urethritis (Orrett, 2001). إن العامل المسبب لهذا المرض هي البكتريا Bacteria والفطريات Fungi ونادراً ما تشترك الطفيليات والفيروسات في الإصابة، وتشكل جراثيم *Escherichia coli* ٨٠-٩٠% من نسبة الإصابة (ناجي ،٢٠٠٨).

تُوجد جراثيم *E.coli* في الطبيعة وهي عصيات سلبية الغرام تنتمي إلى فصيلة الأمعائيات Enterobacteriaceae وهي جراثيم متعايشة Commensals في أمعاء الإنسان والحيوان، كما توجد في التربة، والمياه، والمواد الغذائية، وتتحول إلى جراثيم انتهازية Opportumstic، وتسبب أمراضاً للإنسان كالإسهال Diarrhea ، والتهاب المجاري البولية، والتهاب السحايا Meningitis، والتهاب الحويصلة الصفراوية (Guentzel, 1996 ;ناجي ،٢٠٠٨).

تعتبر ال *E.coli* من المسببات المرضية الأكثر شيوعا والمسؤولة عن أكثر من 80٪ من عدوى المسالك البولية (Wojincz,2007). هذه البكتيريا هي المسؤولة عن 85٪ و ٥٠٪ من عدوى المسالك البولية في المجتمع والمكتسبة بالمستشفى على التوالي (Su,2008).سلالات ال *E.coli* المرضية البولية (UPEC) تمتلك عوامل ضراوة متخصصة متضمنه الأهلاب (Pilli or Fimbriae) التي تكون وسيلة ارتباطها بالخلايا الظهارية البولية uroepithelil cell، ومقاومة الفعالية القاتلة للبكتريا في مصل الأنسان ، أنتاج أأنزيم الهيمولايسين Haemolysin، وزيادة كميات مستضد الكبسولة K (Emody *et al*.,2003).علاوة على ذلك عوامل الضراوة لسلالات UPEC لها دور مهم في حدوث التهاب المسالك البولية.أهم عوامل الضراوة لبكتريا *E.coli* تتضمن عوامل الألتصاق (type 1 fimbriae, p fimbriae, curli fimbriae, afimbrial adhesion and flagellum) و ال aerobactins، haemolysin، cytotoxic necrotizing factors (Mladin *et al*., 2009 and Agarwal *et al*.,2012).

الخطوة الأساسية لبداية وتطور التهاب المسالك البولية هي التصاق البكتيريا إلى خلايا uroepithelial .أرتباط ال *E.coli* يحدث بواسطة روابط من البكتريا (عموما بروتينات صغيرة تقع على قمة أهلاب البكتريا) التي ترتبط ببقايا كاربوهيدراتية في جدار خلية المضيف والتي تعمل كمستقبلات، لذلك ألتصاق بكتريا *E.coli* لمستقبلات المضيف يحدث عن طريق عوامل الالتصاق. يسمح التصاق البكتيريا على مقاومة الحركة الميكانيكية لتدفق البول وتفريغ المثانة وزيادة بقاء ال *E.coli* .سلالات ال *E.coli* تنتج أنواع مختلفة من عوامل الألتصاق adhesins، بما في ذلك الأهلاب من نوع ١ (Type1 fimbriae)، والتي هي ضرورية

للتعرف والتعلق بمستقبلات المسالك البولية (Oliveria *et al*.,2011) .من بين عوامل الألتصاق لل UPEC ، الوحدات اللاصقة للأهلاب نوع ١ ، FimH، وهو المحدد الرئيسي، والذي لديه جاذبية عالية لمستقبلات المسالك البولية،وبالتالي، FimH هو عامل التصاق مهم في استعمار البيئات المختلفة لل *E.coli* (Sokurenko *et al*.,2004).

الهدف من الدراسة

أجريت هذه الدراسة للكشف عن جين عامل الضراوة fimH لبكتريا ال *E.coli* المعزولة من مرضى التهاب المسالك البولية في مدينة الديوانية بأستخدام تقنية PCR.

2.1.أستعراض المراجع

1.2.1. التهاب المجاري البولية UTI

يعتبر الجهاز البولي أحد الاجهزة المهمة في الجسم, وأي خلل في وظيفة هذا الجهاز يمكن ان يؤثر على بقية الأجهزة لأنه يشارك مع بقية أعضاء الجسم في تنظيم حجم ومكونات السائل الخلوي , ويعمل على ازاله الفضلات السامة من الدم إضافة الى دوره في تنظيم الدم , وتركيز الايونات فيه واشراكه في تكوين خلايا الدم الحمر وتمثيل فيتامين D(Gordon *et al*. ,2003).

ان دخول الحالبين الى المثانة البولية و وجود صمام يمنع رجوع الادرار الى الكلية مرة ثانية , وهذه الميكانيكية تساعد الكلية على عدم الاصابة بأمراض القناة البولية السفلى Lower Urinary Tract Infection , بالإضافة الى حامضية الادرار الطبيعي اذ تعتبر احدى الصفات الرئيسية التي تمنع نمو الجراثيم , كما ان فعالية الادرار التدفق السريع خلال عملية البول Urination تعمل على ازالة الجراثيم . ورغم ذلك تم غزو هذه القناة في بعض الحالات من قبل مجموعة الفلورا الطبيعية التي تعمل ككائنات انتهازية أيضا اضافة الى الانواع الممرضة الرئيسية (Anderson *et al*.,2003).

تعد أخماج القناة البولية احدى المشاكل الصحية التي تصيب نسبة كبيرة من افراد المجتمع البشري تقدر بالملايين سنويا وتشير الدراسات الى ان معدل اصابة الذكور بهذه الأخماج أقل من معدل اصابة الاناث بسبب طول الاحليل لدى الذكور الذي يقلل من فرص استيطان المثانة من قبل الجراثيم (Boyko *et al*.,2005).

يعد الادرار الطبيعي معقما ويحتوي على السوائل والاملاح و نواتج الفضلات الا ان الاصابة تحدث عند دخول الكائنات المجهرية (غالبا الجراثيم) من القناة الهضمية وصولا الى المنطقة المفتوحة من الاحليل التي تبدا بالنمو هناك . تدعى الاصابة على الاحليل بالتهاب الاحليل Urethiritis , بعدها تبدأ الجراثيم بالتحرك نحو المثانة مسببة التهاب المثانة Cystitis,وفي حالة عدم معالجة هذه الاصابات فأن الجراثيم قد تصل الى الحالبين تمهيدا لأحداث الاصابة في الكليتين والتي تدعى حينئذ بألتهاب الكلى و حوضيها (Pylonephritis) (Jureen *et al*.,2003)

يجب ان تمتلك المسببات الممرضة القدرة على الدخول والتوغل داخل المثانة لحدوث الاصابة. كما يلعب وجود الادرار فيها دورا كبيرا في تشجيع نموها اذ يعتبر وسطا جيدا لنمو انواع مختلفة لما يحتويه من مواد عضوية واملاح تدعم نموها بالإضافة الى عوامل اخرى تحدد حدوث الاصابة كضراوة الممرضات (Lane *et al*., 2007) . وان هناك مجموعة من العوامل التي تعمل على زيادة خطورة التهاب المجاري البولية من اهمها (حالات السكري , تعدد العلاقات الجنسية , الحمل , استخدام بعض المواد المهيجة للجلد , تعاطي حبوب منع الحمل ,كثرة تعاطي المضادات الحياتية ,تضخم غدة البروستات, استخدام انبوبة الادرار) (Sakran *et al* .,2003)

2.2.1. الاعراض

لألتهابات المجاري البولية البكتيرية اعراض دالة عليه , فقد يحدث ان يشكو المريض من بعضها ويطلق على هذه الحالة الاصابة البكتيرية للبول المصاحبة بأعراض Symptomatic bacteriuria ومن هذه الأعراض :

١-الام بالجزء العلوي من المسالك البولية و ذلك عند الاصابة بالتهاب الكلى Pyelonephirtis

٢- حدوث حرقان بالبول , واحساس برغبة بالتبول , و لكن المريض يجد صعوبة في ذلك حيث يكون خروج البول على شكل قطرات

٣- ظهور دم بالبول قد يكون مجهريا , او واضحا للمريض بالعين المجردة

٤- خروج صديد من فتحة البول .

كما انه قد يكون الانسان مصابا بالالتهابات و لكن لا توجد هناك اعراض مرضية تدل عليه و يطلق على هذه الحالة الاصابة البكتيرية للبول اللأعراضية Asymptomic bacteriuria.

4.2.1. المسببات

ان من أهم أنواع الممرضات المسببة لالتهابات المجاري البولية

(*Proteus mirabilis* , *Enterobacter ssp.* , *Klebsella* , *Escherghia Coli* , *Streptococcus faecalies* , *Pseudomonas areuginosa* , *Providencia ssp.* , *Alcaligenes ssp.* , *Enterococci* , *Candida albicans* , *Vaginalis Haemophilus*) (Kau *et al* . , 2005).

1.4.2.1 -أيشريشيا القولولون *Escherchia coli*

وصفت هذه البكتيريا لأول مرة من قبل العالم Theoder Ederich عام ١٨٨٥ في المانيا وسميت آنذاك *Bacterium coli* و هي معروفة الان باسم *Escherichia coli* اذ عزلت من براز اطفال اصحاء لذا عدت غير مرضية آنذاك Non pathogenic (Cooks , 1985) . تمتاز هذه البكتيريا بكونها عصيات صغيرة الحجم (0.5-1.5) مايكرون , سالبة لصبغة كرام , تتحرك بواسطة اسواط محيطية , وقد تمتلك بعض سلالاتها محفظة , غير مكونة للأبواغ , هوائية او لاهوائية اختيارية , ولها درجة حرارة نمو مثلى هي 37°م و لكنها تستطيع

النمو في مديات حرارية واسعة من (45 -15°م) , (Jawetz *et al* ., 2004) تخمر اللاكتوز مع انتاج غاز خلال 48 ساعة و حرارة °35 م , موجبة لاختبار الأندول و المثيل الاحمر تنمو على الاوساط الزرعية التفريقية مثل وسط (Eiosine methelen blue EMB) تعطي بريقا معدنيا لماعا يسمى Metallic sheen (الجلبي , ٢٠٠٨) تتوافر هذه البكتيريا بصورة تعايشية في امعاء الانسان ولكن عندما تدخل موقعا غير طبيعي يمكن ان تسبب العدد من الامراض كالتهاب المجاري البولية و السحايا و تصيب الانسجة الرخوة لذلك تعد من البكتيريا الانتهازية (Sharma *et al* ., 2007).

1.4.2.1. أ- الوبائية Epidemology

تنشأ البكتيريا المعوية في القناة الهضمية بصورة طبيعية بعد ايام قليلة من الولادة مؤلفة النبيت الطبيعي (Normal flora) في الامعاء و تعد *E.coli* الجزء الرئيسي منها . بعض السلالات لها القابلية على ان تصبح انتهازية وتسبب امراضاً مختلفة عند مغادرتها الموقع الاصلي (الامعاء) و وصولها الى اعضاء اخرى مثل القناة البولية والقناة الصفراء واي عضو في التجويف البطني وخاصه عند توافر الظروف المناسبة مثل ضعف المناعة (Bischoff *et al* . , 2002) لذلك تعد من المشاكل الرئيسية في اصابات المستشفيات فهي تسبب المرض عند دخولها الى اشخاص في دور النقاهة (Jawetz *et al* ., 2004) وخاصة الأشخاص الذين يعانون ضعف المناعة وسوء التغذية وهذه تكثر من وحدات العناية المركزة لخصوصية الامراض التي يعانون منها مما يضطرهم الى اخذ كمية كبيرة من المضادات مؤدية الى نشوء بكتريا مقاومة للمضادات الحيوية (Decp *et al*. , 2004) تتوافر هذه الجراثيم بصورة طبيعية في امعاء الانسان والحيوان وتعد اكثر افراد العائلة المعوية اهمية فهي جراثيم انتهازية لها القدرة على أحداث العديد من الاصابات مثل التهابات المعدة والامعاء (Gastrointestinal) التي تصيب الاطفال الرضع والتهاب الغشاء المساريقي (Peritonitis) والتهاب القناة الصفراوية (cholecystitis) (الحائك ،٢٠٠٤)

ان سبب إمراضيه جرثومة الاشيرشيا القولونية يعود الى امتلاكها العديد من العوامل الأمراضية منها احتواء الجدار الخلوي على شعيرات متعددة الدهون Lipopolysaccaride او المحفظة وتسمى ايضا بالمستضد (K) او (B) التي تكون غير ثابتة بالحرارة heat labile ويتداخل هذا المستضد مع مستضد اخر هو المستضد الجسمي (O) والذي يكون ثابت بالحرارة Thermo stabile كذلك تمتلك هذه الجرثومة الاهداب او المستضد (F) ثابت للحرارة , ومن

اهم العوامل الموجودة على سطح الخلية , انواع مختلفة من الزوائد يطلق عليها أعضاء الالتصاق fimbriae , التي لها دور في الالتصاق على سطح خلية العائل , بالإضافة الى ذلك قد يكون لها وظائف اضافية اخرى , منها غزو نسيج العائل (Emdy *et al*.,2003).

وقد حظيت دراسة أعضاء الالتصاق fimbriae بأهمية في العديد من الابحاث , خاصة منذ عام 1998, لأدراك الباحثين لأهمية العلاقة بين اعضاء الالتصاق , والقدرة المرضية, وفي ما يلي أهم الابحاث المتعلقة بهذا المجال:

وجد ان هناك أنواع مختلفة من عوامل الالتصاق الــ fimbriae التي لها ارتباط قوي بأمراضية *E.coli* للجهاز البولي , مثل P-fimbriae , وفي دراسة جينية عن عضو الالتصاق G adhesine , تبين ان تواجده بالخلايا البكتيرية عن طريق شفرة جينية, تتمثل في صورة مجموعة من جينات Prs او Pap . وقد تمت هذه الدراسة على 257 عزلة من *E.coli* , معزولة من أدرار مرضى مصابين بالتهاب مثانة حاد او متكرر بالبكتريا *E.*coli (Karkkainen *et al*.,1998), كذلك سجلت أعضاء الالتصاق F1C fimbrial, S fimbrial المتشابهة جينيا , في *E.coli* الممرضة للجهاز البولي (Mitsumori *et al*., 1998) .

وفي دراسة جينية حديثة اجراها العالم Wullt,2003 عن دور P-fimbriae كعوامل التصاق في البكتريا *E.coli* , وجد ان هناك مجموعة من الجينات يطلق عليها pap gene (The pap gene cluster) هي المسئولة عن امتلاك الخلايا البكتيرية للــ P-fimbriae ,وأن امتلاك السلالة البكتيرية لتلك الجينات كافي لتصبح السلالة اكثر قدرة على الإمراضية , وكذلك أكثر سرعة في النمو . لذا فأن التصاق الخلايا البكتيرية على الغشاء المخاطي للمثانة تعتبر خطوة حاسمة وخطيرة في أمراضية *E.coli* المسببة لمرض البول البكتيري, وأن امتلاك *E.coli* لأعضاء الالتصاق fimbriae, شرط اساسي للتثبيت البكتيري في المجرى البولي للانسان ولزيادة استجابة العائل للإصابة (Karkkainen *et al* .,1998 ; Sakarya *et al* ., 2003)

أما بالنسبة لتأثير المضادات على عوامل الالتصاق P-fimbriae , فقد درس العالم (Funfstuck *et al* .,1999) تأثير المضاد الحيوي ofloxacin في علاج اصابة المسالك البولية , وقدرته على اضعاف شراسة الخلايا البكتيرية او التداخل بين الخلايا البكتيرية و العائل ,او قدرته على قتل الخلايا , و لوحظ انه بعد اليوم السادس من العلاج بالمضاد ان الخلايا

البكتيرية فقدت زوائد الالتصاق الـ P-fimbriae, ومن ثم حدث تناقص لمعدل التصاق الـ *E.coli* .

النتائج والمناقشة Results & Discussion

أولاً – العزل:-

من مجموع ٢٥ عينة أخذت من المصابين بالتهاب المجاري البولية وزرعت على الأوساط الزرعية ، كان هناك ١٩ عينة أعطت نتيجة موجبة للزرع بينما ٦ عينات لم تظهر أي نمو بكتيري حتى بعد فترة حضانة ٤٨ ساعة والذي ربما يعود إلى تناول المرضى بعض المضادات الحياتية، أو وجود أنواع أخرى من العوامل المسببة التي ربما تحتاج تقنيات متخصصة لتحديدها مثل الفطريات كال Candida .

ثانياً-التشخيص :-

حيث تم تشخيص هذه البكتريا على أساس الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية وكما موضحة في جدول(3-1) فشخصت البكتريا التي عزلت من عينات الأدرار كالتالي :-

جدول(3-1):الصفات المظهرية والكيموحيوية التشخيصية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة غرام

الأختبار	*P.aeruginosa*	*Proteus spp.*	*E.coli*
Gram stain	G-ve short rods	G-ve short rods	G-ve short rods

Catalase	+	+	+
Oxidase	+	-	-
Indol	-	-	+
V.P.	-	-	-
Simmon Citrate	-	+	+
M.R.	+	-	-
Growth on KIA	K/k	K/A	A/a
Motility	-	Swarming	+

الصفة التشخيصية المميزة ل- *P.aeruginosa* هي قدرتها على أنتاج صبغة زرقاء مخضرة(Pyocyanin) التي تعطي المزرعة مظهر أزرق مخضر.

سبعة عشر حالة من التهابات المجاري البولية كان سببها أصابة بكتيرية مفردة حيث ظهرت بكتريا *E.coli* (13 /19)، *P. aeruginosa* (1/19) و *Proteus spp.* (3/19) لكل نوع بكتيري ، أما المزارع البكتيرية المختلطة التي تم الحصول عليها فكانت 2 من 19 عزلة وان أنواع البكتريا التي ظهرت في هذه المزارع المختلطة تضمنت *P.aeruginosa +E.coli* بواقع (2/ 2) وأن هذه النتائج موضحة بشكل أكثر في جدول (3-2).

جدول(3-2):توزيع العزلات البكتيرية من المرضى المصابين بإلتهاب المسالك البولية UTI تبعاً لنوع العزلة

نوع البكتريا	عزلات نقية	عزلات مختلطة	العدد الكلي	%
1-*Proteus spp*.	3	0	3	% 15.7

% 10.5	2	1	1	2- *P.aeruginosa*
%73.6	14	1	13	3- *E. coli*
%100	**19**	**2**	**17**	**المجموع**

كما نلاحظ في الجدول (3-2) فأن أعلى نسبة (٧٣,٦%) سجلت لبكتريا *E.coli* حيث أنها من البكتريا السائدة في التهابات المسالك البولية وهذه النتيجة جاءت مقاربة لما توصل اليه (Asahra *et al* ., 2001 , Raksha *et al*.,2003) حيث وجدوا أن بكتريا *E.coli* تشكل القسم الأكبر من إصابات التهابات المسالك البولية .وهذا ربما يعود إلى أن *E.coli* بطبيعتها ممرضات أنتهازية عند أنخفاض مقاومة جسم المضيف وعند أنتقالها من موقعها الطبيعي حيث أنها من أكثر أنواع البكتريا شيوعا في الجهاز الهضمي وعندما تنتقل من موقعها الطبيعي إلى مجرى البول من فتحة الشرج فأنها تسبب التهابات المسالك البولية (Jawetz *et al*., 2004).

وأن بكتريا *E.coli* تسبب حوالي 50٪ من حالات التهاب المسالك البولية .أما الأنواع البكتيريه الأخرى السالبة لصبغة غرام مثل *Klebsella* ، *Proteus*، *Pseudomonas*، فأنها تسبب نحو 40٪ من الحالات ،أما المكورات الإيجابية لصبغة غرام مثل بكتريا *E. faecalis* ، *S. saprophyticus*، *Staphylococcus aureus* تسبب النسبة المتبقية (Stickler *et al*.,2003).

بداية حدوث التهاب المسالك البولية UTIs تنتج من قابلية بكتريا Uropathogenic *E.coli* (UPEC) للأرتباط بالخلايا الظهارية epithelial cells للمسالك البولية عن طريق عوامل التصاق متخصصة متضمنة Type 1 fimbriae (Kaczmarek *et al*.,2012) . سلالات UPEC تمتلك العديد من عوامل الضراوه التي تعزز قدرتها على أستعمار الجهاز البولي التناسلي urogenital tract. التعلق بسطح الخلايا الظهارية البولية يحدث عن طريق عامل الألتصاق fimH الذي يقع في طرف الأهداب من نوع١(Type 1 fimbriae)، والذي

يمنع التخلص من البكتيريا بتدفق البول وبدأ الغزو البكتيري (Finer and Landau,2004 and Su,2008). بما أن عامل الضراوة fimH المرتبط بحالات التهاب المسالك البولية لم يحدد على نطاق واسع من UPEC المعزولة من مرضى عدوى المسالك البولية لذلك تم تحديد أنتشار جين fimH في هذه الدراسة . وأكد وجود الجين fimH بواسطة تقنية PCR وأظهرت النتائج أن الجين fimH كان موجودا في جميع عزلات *E. coli* (١٠٠%) وكما موضح في شكل (٣-١).

شكل(٣-١):الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة التسلسلي PCR لسلسة ال DNA بأستعمال البادىء fimH على هلام الأكاروز بتركيز ١,٥% ،الدليل الحجمي ladder (100bp) ،١٠-١٤ أرقام العزلات لبكتريا *E.coli*.

هذه النتائج أوضحت أن معظم سلالات ال UPEC تمتلك جين fimH ونتائجنا كانت متوافقة مع نتائج دراسات سابقة من قبل (Garofalo *et al.*,٢٠٠٧) الذين درسوا ١٨ عزلة UPEC جمعت من النساء ،ووجدوا أن جين fimH كان أكثر عوامل الضراوه انتشارا حيث ظهر بنسبة ١٠٠% من العزلات. وكذلك تتفق مع نتائج (Tarchoma *et al.*,٢٠١٥)، الذين أوضحوا أن من بين جينات عوامل الضراوة المدروسة لسلالات ال UPEC كان جين fimH من أكثر عوامل الضراوة انتشارا حيث وجد في ٦٨% (٦١/٩٠) من عزلا ت ال UPEC.

المواد وطرق العمل Materials and Methods

٢-١ : المواد Materials

أ- الأجهزة والمعدات المستخدمة Equipments and Instruments

أستخدمت الأجهزة والمعدات المختبرية الآتية :-

جدول (٢-١) الأجهزة والمعدات المختبرية المستخدمة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة (المنشـــأ)
١	Autoclave موصدة	Gallen Kaamp(England)
٢	Compound light مجهر ضوئي مركب microscope	Olympus (Japan)
٣	Laminar flow cabinet كابينة الزرع ألمجهري	South Korea)(Labtech
٤	Distillerجهاز تقطير	Fisons(Japan)
٥	Electric oven فرن كهربائي	Eriotti (Italy)
٦	Incubator حاضنة	Gallen Kaamp(England)
٧	pH-meter جهاز قياس الحموضة	Metter- Gmph/ England
٨	Refrigerator ثلاجة	Concord (Lebanon)
٩	Sensitive electronic ميزان الكتروني حساس balance	Gallen Kaamp(England)
١٠	Standard wire loop الناقل الزرعي القياسي	John Bolten/ England
١١	Water bath حمام مائي	Memmert (Germany)
١٢	Laminar flow cabinet كابينة الزرع ألمجهري	South Korea)(Labtech
١٣	Test tubesأنبوبة اختبار	Superestar(India)
١٤	Disposable Petri dishes أطباق بلاستيكية	Al-Hani (USA)
١٥	Slides and cover شرائح زجاجية وغطاء الشريحة	Superestar(India)

	slides	
BBL/USA	دورق مخروطيConical flasks	١٦
CYAN China	مازج Vortex	١٧
BioRad .USA	جهاز الدورات الحرارية Thermocycler apparatus(PCR)	١٨
Bioneer. Korea	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	١٩

ب- المواد الكيمياوية والصبغات

تم استخدام المواد الكيمياوية والصبغات الآتية :-

جدول (٢-٢) المواد الكيمياوية والصبغات

ت	اسم المادة أو الصبغة
١.	كحول الايثانول Absolute Ethanol (96%)
٢.	محلول الملح الفسلجي Normal saline
٣.	بلورات اليود Iodine crystal
٤.	صبغة البنفسج البلوري Crystal violet Dye
٥.	صبغة السفرانين Safranine Dye
٦.	هلام الاكروز Agarose gel
٧.	صبغة بروميد الاثيديوم Dye Ethidium bromide
٨.	ماء البي سي ار PCR water
٩.	محلول الترحيل الدارئ TBE buffer

١٠.	إنزيم تحليل الخلايا Lysozyme

ج – الأوساط الزرعية

تم استخدام الأوساط الزرعية الآتية في عزل ولتشخيص البكتريا

جدول (٢-٣) Culture Media

ت	اسم الوسط الزرعي	الغرض من استخدامه
١.	Blood agar اگار الدم	عزل وتشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام والسالبة لصبغة گرام
٢.	MacConkey agar ماكونكي اگار	لعزل معظم البكتريا السالبة لصبغة گرام وتتميز المخمرة للاكتوز من غير المخمرة
٣.	Pepton water ماء الببتون	التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج الاندول من الحامض الاميني التربتوفان
٤.	Methyl red-voges proskauer media	التحري عن الأسيتون والأحماض العضوية
٥.	Kligler Iron agar	يستعمل للتفريق بين البكتريا المخمرة لانواع مختلفة من السكريات وكشف بكتريا المنتجة لغاز H_2S
٦.	وسط سايمون Simmon Citrate	اختبار قابلية البكتريا على إنتاج الستريات
٧.	Eosin Methylene blue agar	لعزل معظم البكتريا السالبة لصبغة گرام وتتميز المخمرة للاكتوز من غير المخمرة ويستعمل لتفريق بكتريا *E.coli* عن بكتريا *Klebsiella*
٨.	Brain heart infusion medium	لتنمية وحفظ العزلات البكتيرية
٩.	Nutrient broth	لتنمية وحفظ العزلات البكتيرية
١٠.	Agarose	لترحيل ال DNA بجهاز الترحيل الكهربائي

د- المحاليل والكواشف

أستخدمت المحاليل والكواشف الاتية:-

جدول (٢-٤) المحاليل والكواشف المستخدمة

ت	اسم المحلول أو الكاشف	الهدف من استخدامه
١.	محاليل صبغة گرام Gram stain solution	لغرض تصبيغ وتمييز الخلايا البكترية
٢.	كاشف كوفاكس Kovac's reagent	للكشف عن الاندول المنتج من قبل البكتريا
٣.	كاشف احمر المثيل Methyl red reagent	للتحري عن أنتاج الأحماض العضوية نتيجة لتخمر سكر الكلوكوز من قبل البكتريا
٤.	كاشف فوكس بروس كاور Voges-proskauer	معرفة قابلية البكتريا على أنتاج الأسيتون
٥.	كاشف الأوكسديز Oxidase reagent	لتشخيص البكتريا

هـ-العدد Kits

جدول (٢-٥) يمثل جميع العُدد التي استخدمت في هذه الدراسة مع أسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.

ت	اسم العدة	مكوناتة	الشركة وبلد المنشأ
١	عدة استخلاص الحمض النووي البكتيري Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit	GT Buffer 30 ml	Geneaid (USA)
		GB Buffer 40 ml	
		W1 Buffer 45 ml	
		Wash Buffer 100	

	Elution Buffer 30 ml		
	GD Colum 100 pcs		
	2ml collection tubes 100 pcs		
	Proteinase K		
Bioneer (Korea)	Top DNA polymerase 1U	عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة AccuPower® PCR PreMix	٢
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) each: 250µM		
	Tris-HCl (pH 9.0) 10mM		
	KCl 30mM		
	MgCl2 1.5mM		
	Stabilizer and tracking dye		

و- البادئات Primers

تم استخدام البادئات الخاصة بجين fimH gene لبكتريا *E. coli* والتي تم الحصول عليها من قبل الباحث (Mladin *et al*., 2009) وتم تجهيز جميع البادئات عن طريق شركة Bioneer في كوريا.

جدول (٢-٦):البادئات المستخدمة لجين fimH

Primers of Target gene	Primer sequence (5′-3′)	Amplicon Size (bp)

fimH gene	**F**	**GCCAAACGAGTTATTACCCTGTT**	**465bp**
	R	**CCTTGATAAACAAAAGTCACGCC**	

F: Forward Primer, R: Reverse Primer

٢-٢-طريقة العمل:-

أولأ-تحضير الأوساط الغذائية :-

لقد تم تحضير الأوساط الغذائية الجاهزة حسب تعليمات الشركة المنتجة لها .

ثانيأ:-تحضير الكواشف

حضرت الكواشف التالية حسب ما ذكر في (MacFaddin,2000).

١- كاشف كوفاكس Kovac's reagent:-

أذيب ٥ غم من p-dimethyl amine benzylaldehyde في ٧٥ مل من Isoamyle-alcohol , وأضيف إليه ٢,٥ مل من حامض الهيدروكلوريك HCL المركز بحذر وبشكل تدريجي .

٢- كاشف المثيل الأحمر Methyl red reagent:-

تمت إذابة ٠,١ غم من صبغة احمر المثيل(methyl red) في ٣٠٠ مل من الكحول الاثيلي بتركيز ٩٥% وأكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل بأستخدام الماء المقطر D.W.

٣- كاشف فوكاس برو سكاور Vogas prokauer reagent:-

كاشف (A) حضر بأذابة ٥ غم من Naphthol في كمية قليلة من الكحول الاثيلي المطلق ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مل من الكحول الاثيلي المطلق .

كاشف (B) تمت اذابة ٤٠ غم من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في ١٠٠ مل من الماء المقطر.

٤- كاشف الاوكسيديز

حضر بإذابة ١ غم من Tetramethyl paraphenyene- dimine dihyro Chloride في ١٠٠ مل من الماء المقطر .

ثالثـــاً- تحضـــير المحاليـــل :- تـــم تحضـــير المحاليـــل (١-٤) بحســـب مـــاذكر فـــي (MacFaddin,2000) كالآتي :-

محاليل صبغة گرام :-

١- محلول الكريستال البنفسجي :- تم إذابة ٠,٥ غم من الصبغة في ١٠٠ مل من الماء المقطر .
٢- محلول اليود :- مسحوق ١ غم من اليود و٩ غم من يوديد البوتاسيوم في جفنة وتمت إذابته في ٥ مل من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل وحفظ في قنينة معتمة .
٣- القاصر Decolorizer:- تمت استعمال الكحول بتركيز ٩٥% .
٤- محلول السفرانين :- تمت اذابة ٠,٥ غم من الصبغة في ١٠ مل من الكحول ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة .
٥- تحضير المحلول المنظم TE (Tris EDTA buffer solution)

حضر المحلول المنظم بأذابة (0.05M) من Tris-OH و (0.001M) من ال EDTA في ٨٠٠ مل من الماء المقطر.تم ضبط ال PH ل ٨ بعدها أكمل الحجم الى(١) لتر،وعقمت بالأوتوكليف (121ºC) لمدة ١٥ دقيقة وحفظت بدرجة ٤م˚ حتى الأستخدام (Stellwagen and Stellwagen, 2002).

٦-المحلول المنظم Tris Borate-EDTA-buffer solution (TBE)

حضر المحلول المنظم بأذابة (0.08M) من Tris-OH ، (0.05M) من ال Boric acid و(0.02M) من ال EDTA في ٥٠٠ مل من الماء المقطر.تم ضبط ال PH ل ٨ بعدها أكمل الحجم إلى (١) لتر،وعقمت بالأوتوكليف (121ºC) لمدة ١٥ دقيقة وحفظت بدرجة ٤م˚ (Sambrook and Rusell, 2001).

٧-محلول الأثديوم بروماید Ethidium bromide solution

حضرت بأذابة (٠,٠٥)غم من ال ethidium bromide في ١٠ مل من الماء المقطر وحفظت في قنينه معتمة (Sabnis, 2010).

رابعاً :- التعقيم Sterilization:-

١- التعقيم الرطب Autoclaving:- تم تعقيم الأوساط الغذائية كافة والمحاليل بالموصدة عند درجة ١٢١ م° ولمدة (١٠-١٥ دقيقة) . باستثناء وسط s-s agar حيث عقم بالغليان وتم التأكد من عدم تلوثها وذلك بحضنها بدون مزروع بكتيري.

٢- التعقيم الجاف Dry Sterilization:- استخدم الفرن الكهربائي لتعقيم الزجاجات عند درجة ١٨٠ م° لمدة ساعتين .

خامساً :- جمع العينات Collection of samples :-

لقد تم جمع ٢٥ عينة أدرار (عينة الأدرار الوسطي Midstream urine من المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية UTI والمراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي ، خلال ٣ أشهر (من كانون الثاني٢٠١٥ ولغاية آذار ٢٠١٦) وباستعمال حاويات بلاستيكية نظيفة ومعقمة ذات غطاء محكم. تم جلب العينات إلى المختبر وفي ظروف قياسية وزرعت على الأوساط الزرعية المناسبة.

سادساً :- زرع العينات Cultivation of isolates

لقد تم زرع العينات على وسط Blood agar و MacConkey agar و Eosin methylene blue agar إذ قمنا بتخطيط العينة المأخوذة على الوسط الزرعي بالقرب من نار مصباح بنزن وبعد ذلك تم حضن الطبق الملقح بالعينة في الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧ م° بشكل مقلوب ويراقب النمو (Collee ,1996) .

سابعاً :- تشخيص العزلات البكترية Identification of bacterial isolates

تم تشخيص العزلات من خلال مايأتي :-

١- خصائص المستعمرات المظهرية والمزرعية :- Morphological and cultural characteristic

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية كأشكالها ولونها –سطح المستعمرة – قوامها –شفافيتها – نمط التحلل على اگار الدم وتخمرها للسكريات في وسط Kligler Iron agar (MacFaddin ,2000 and Benson,2001).

٢- الخصائص المجهرية Microscopical characteristics

تم عمل مسحات من المستعمرات النقية على شرائح زجاجية وصبغت بصبغة گرام Gram وفحصت تحت المجهر بالقوة الكبرى في المجهر الضوئي المركزي ولوحظت

أشكال الخلايا – نوع تركيبها – استجابتها لصبغة گرام سالبة أو موجبة (MacFaddin, 2000) .

٣- الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

١- الأندول Indol test

تم تلقيح وسط ماء الببتون Pepton water بالبكتريا المراد اختبارها وحضنت عند درجة ٣٧م° لمدة ٤٨ ساعة اضيف ٠,٥ من الكاشف Kovac's reagent إلى الأنبوبة الملقحة ورجت بلطف . إن ظهور حلقة حمراء دليل على ايجابية الاختبار (Collee,1996).

٢- احمر المثيل Methyl red test

لقح وسط MR-VP بالبكتريا وحضن عند درجة ٣٧م° لمدة ٤٨ ساعة أضيف إلى الوسط ٥ قطرات من الكاشف احمر المثيل وتغير لون الوسط إلى الأحمر يدل على التحلل الكامل للسكر وإنتاج الحامض .أما إذا تغير اللون إلى الأصفر فهذا يدل على النتيجة السالبة للأختبار (Collee, 1996) .

٣-الفوكس بروسكاور Vogas –prosKauer test

لقحت الأنابيب المحتوية على وسط MR-VP بالبكتريا المراد اختبارها وحضنت على درجة ٣٧م° لمدة ٢٤ ساعة .أضيفت قطرات من كاشف (A) وقطرتان من كاشف (B) إلى كل أنبوبة حاوية على الوسط الملقح , قرأت النتيجة بعد ١٥ دقيقة . إن تغير اللون إلى الأحمر دلالة على التحلل الجزئي للسكر وان النتيجة موجبة للأختبار . أما ظهور اللون الأصفر فيدل على النتيجة السالبة (Baron *et al*.,1994).

٤- استهلاك السترات Citrate utilization :-

لقح وسط أگار السترات بالبكتريا المراد اختبارها .ثم حضنت عند درجة حرارة ٣٧م° لمدة ٢٤ ساعة . إن تغير اللون للكاشف من الأخضر الى الأزرق يدل على ايجابية الاختبار .أي استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون (MacFaddin, 2000).

٥- اختبار الحركة Motility test:-

لقد تم الأخذ بواسطة loop المعقم ماء مقطر بمقدار قطرة واحدة وتوضع في غطاء الشريحة الزجاجية وبعد ذلك يعقم ال loop الناقل بواسطة مصباح بنزن ويبرد ويؤخذ قليل جداً من المستعمرة البكتيرية المراد اختبارها وتمزج مع الماء المقطر وتوضع بعناية على الشريحة المعقمة الخاصة بأختبار الحركة ويتم الفحص بالتدريج من القوة القليلة الى القوة الكبرى . اذا لوحظت حركة فأن الاختبار ايجابي واذا لم تلاحظ حركة فأن الاختبار سالب(MacFaddin, 2000).

٦-تحلل الدم Hemolysis:-

لقح وسط اگار الدم بالمزروع البكتيري النقي وحضن عند درجة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات البكترية النامية يدل على قابلية البكتريا على إفراز hemolysin (Cowan ,1985 و.(Dulczak and Kirk, 2005).

ثامناً:حفظ العزلات البكتيريه Preservation of bacterial isolates

حفظت العزلات البكتيرية على وسط (Brain heart infusion broth و Nutrient broth) المدعمة ب ١٥% كليسرول بدرجة (-20ºC) لحين الاستخدام (Collee *et al*.,1996).

تاسعاً:**فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction(PCR)**

تم أجراء فحص تفاعل سلسلة البلمره وذلك للتحري عن جين FimH في عزلات جرثومة *E.coli* وحسب طريقة (Mladin *et al*., 2009) يتكون الفحص من عدة خطوات وكما يأتي:

أ- أستخلاص الحمض النووي البكتيري Bacterial genomic DNA extraction

تم أجراء استخلاص الحمض النووي من بكتريا ال *E. coli* وذلك باستخدام عدة ال (Genomic DNA extraction kit) المجهزة من شركة Geneaid الأمريكية, وتم أجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة كآلاتي:

١- تم نقل ١مل عالق من كل عزلة من جرثومة *E. coli* النامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في أنابيب ابندروف قياس ١,٥ مل معقمة وبعدها نقلت إلى جهاز

الطرد المركزي بسرعة ١٥٠٠٠xg لمدة دقيقة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.

٢- أضيف ٢٠٠ ميكروليتر من محلول إنزيم اللايسوزايم Lysozyme buffer (20mg/ml) وبعدها مزج الخليط بواسطة المازج vortex لمدة ٥ ثواني.

٣- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة ١٠ دقيقة وخلال فترة الحضن تم تقليب الأنابيب لضمان تحليل كامل للخلايا في المزيج.

٤- تم إضافة ٢٠٠ ميكروليتر من محلول GB Buffer المجهز من العدة إلى مزيج الخلايا المتحللة ومزج جيدا بواسطة المازج vortex لمدة ٥ ثواني.

٥- حضن المزيج بدرجة حرارة ٦٠ م° لمدة ١٠ دقيقة باستخدام الحمام المائي.

٦- تم إضافة ٢٠٠ ميكروليتر من الكحول الأثيلي المطلق إلى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيدا بجهاز المازج vortex لمدة ١٠ ثواني.

٧- تم نقل الخليط من أنبوبة الأبندروف إلى أنابيب جمع collection tubes قياس ٢مل الحاوية على أعمدة تحوي مصفى لتنقية الحمض النووي GD filter colum والمجهزة مع العدة.

٨- وضعت أنابيب الجمع مع الأعمدة الحاوية على خليط في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة ١٥،٠٠٠xg لمدة دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة.

٩- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل ال GD colum الحاوي على الحمض النووي إلى أنبوبة جمع collection tube جديدة.

١٠- تم إضافة ٤٠٠ ميكروليتر من محلول ال W1 Buffer المجهز مع العدة إلى العمود الحاوي لغسل الحمض النووي ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة ١٥،٠٠٠xg لمدة ٣٠ ثانية.

١١- تم التخلص من الراسب وبعد ذلك أضيف ٦٠٠ ميكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الأثيلي المطلق Wash buffer المجهزة مع العدة إلى العمود الحاوي على الحمض النووي للتخلص من الدهون داخل العمود ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة ١٥،٠٠٠xg لمدة ٣٠ ثانية.

١٢- تم التخلص من الراسب وأعيدت الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي مره ثانية لتجفيف الأعمده بسرعة ١٥،٠٠٠xg لمدة ٣ دقائق.

١٣- تم نقل الأعمده الحاوية على الحمض النووي إلى أنابيب ابندروف معقمة وأضيف ٥٠ ميكروليتر من محلول الإذابة Elution Buffer المجهز مع العدة إلى وسط العمود

وترك لمدة ٥ دقائق وبعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد الركزي بسرعة ١٥،٠٠٠xg لمدة ٣٠ ثانية لأذابة الحمض النووي وحفظ بدرجة حرارة -٢٠م لحين إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمره.

ب-فحص الحمض النووي المستخلص DNA examination

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص وذلك باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الأحماض النووي حيث يتم الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي(ng\µl DNA) وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260/280nm) وتم استخدام الجهازعلى النحو التالي :

١- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA .
٢- نقوم بتصفير ركيزة المقياس مرتين وذلك بوضع 2 مايكروليتر من(ddH2O) باستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وأجراء التصفير وبعدها نقوم بتنظيف الركيزة باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز .
٣- نقوم بوضع ١ ميكروليتر بالضبط من كل عينة من ال DNA المستخلص على ركيزة مقياس الجهاز ومن ثم ضغط زر OK لبدء عملية قياس تركيز ال DNA ومن ثم نقوم بتنظيفه مرة أخرى لقياس العينة الأخرى.
٤- وكذلك تم تحديد نقاوة عينات ال DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية بجهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280 nm) حيث إن الحمض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

ج- تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمره باستخدام عدة ال AccuPower® PCR PreMix المجهزه من قبل شركة ال Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كالآتي:

١- تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمره في أنابيب البي سي ار المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمره وأضيفت المكونات الأخرى لمزيج التفاعل وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول التالي:

PCR master mix		**Volume**
DNA template		5µL
Primers (10pmol)	FimH gene F. primer	1.5µL
	FimH gene R. primer	15µL
PCR water		12µL
Total		**20µL**

٢- بعد إكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمره تم غلق الأنابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثواني.

٣- نقلت الأنابيب لجهاز البي سي ار PCR Thermocycler لإجراء حالات الدورات الحرارية PCR thermocycler conditions .

د- حالات الدورات الحرارية لفحص البي سي أر PCR Thermocycler conditions

تم أجراء فحص تفاعل سلسلة البلمره باستخدام جهاز البي سي أر PCR thermocycler

PCR Step	**Repeat cycle**	**Temperature**	**Time**
Initial denaturation	1	95°C	5min
Denaturation	30	95°C	30sec.
Annealing		60°C	30sec
Extension		72°C	1min
Final extension	1	72°C	5min
Hold	-	4°C	Forever

هـ - الترحيل الكهربائي للهلام Gel electrophoresis

تم أجراء الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأكاروز بنسبة ١,٥% وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمره PCR product وكما يأتي:

١- تم إذابة ١,٥ غم من هلام الأكاروز Agarose gel في ١٠٠ مل من محلول ال TBE buffer الدارئ بتركيز 1X وباستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة ١٥ دقيقة.

٢- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة ٥٠مْ وبعدها تم إضافة صبغة الحمض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

٣- تم صب هلام الأكاروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد أماكن عينات البي سي ار, وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة ومن ثم أزيل المشط من الهلام بعناية.

٤- تم تحميل العينات باستخدام صبغة التحميل Loading dye على ورق البارافلم Parafilm paper وذلك بإضافة ١حجم من صبغة التحميل لكل أربعة حجوم من ناتج البي سي ار PCR product ووضعت في حفر الهلام.

٥- تم استخدام سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج البي سي أر ووضع في الحفرة الأولى.

٦- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الاكروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار ١٠٠فولت وأمبير ٨٠ لمدة ساعة واحده.

٧- بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج البي سي أر باستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية UV light source لتحديد الناتج مع وحدة القياس.

المصادرالعربية

1-الجلبي ,عامر يحيى حميد. (٢٠٠٨). دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص زيت الزعتر على ج راثيم *Streptococcus bovis* , *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entritidis* *Escherichia coli* , مختبريا. كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل .مجلة تكريت للعلوم الصرفة , المجلد ٤٤ , ص ٢٢٥-٢٤٢.

2-الحائك, منال فوزي محمد عبد الرحمن.(٢٠٠٤). تأثير الخل في بعض أنواع الجراثيم الملوثة للحروق .رسالة ماجستير, كلية التربية ,جامعة الموصل.
3-عبد الرحمن، سعيد ناجي.(٢٠٠٨). دراسة تاثير المضادات الحيوية البركة والثوم على جرثو مة الايشريشيا كولاي المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية في مستشفي الأطفال الجامع ي. رسالة جامعية.

English References المصادر الأجنبية

1-Agarwal, J.; Srivastava, S,; and Singh, M.(2012). Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol.* 30(2):141–9.

2-Anderson, G. G.; Palermo, J. J.; Schilling, J. D.; Roth, R.; Heuser, J. an d Hultgren , S. J. (2003) . Intracellular bacterial biofilm-like pods in urina ry tract infections. Science 301:105–107.

3-Asahra, T.; Nomoto, K.; Watanuki, M. and Yokokuura, T. (2001) Antimicrobiol activity of intravrethrally adminisged probiotic Lactobacillus case in amurine model of *E.coil* UTI. Antimicrobia. Agents chemother. *45*: 1715-60.

4- Baron, E. J.; Peterson, L. R. and Finegold, S. M. (1994). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed., The C.V. Mosby Company, U.S.A. .

5-Bischoff, K.M.; White, D.G.; Mcdermott, P.F.; Zhao, S.; Gaines, S.; M aurer, J.J. and Nisbet, D.J. (2002). Characterization of chloromphenicol re sistant in Beta-Hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neo natal swin. J. of Clinical Microbiology. VOL .40 ,No. 2 : 389-94.

6-Boyko, E. J.; Fihn, S. D. ; Scholes, D. ; Abraham, L. and Monsey ,B. (2005) . Risk of urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria amon g diabetic and nondiabetic postmenopausal women. Am. J. Epidemiol. 16

1:557–564.

7-Collee, J. G. ;Fraser, A. G. ;Marmino, B. P. and Simons, A. (1996). Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology.14th ed., The Churchill Livingstone, Inc. U. S. A.

8-Cowan,A. S. T.(1985).Cowan and steel's manual for identification medical bacteria .2nd ed. London , Cambridge University Press ,UK.

9-Deep , A.; Childiyal , R.; Kandian , S. and Shinker , N. (2004) . Clinical and microbiology profile of nosocomial infection in the pediatric intensive care unit (PICU) . Indian Pediatrics . , 41 : pp.1238 – 44.

10-Dulczak, S. and Kirk, G. (2005). Overview of evaluation, diagnosis, and management of urinary tract infections. Urol Nurs. 25(3):185-91.

11-Emody, L.; Kerenyi, M. and Nagy, G.(2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*;22 Suppl **2**:29–33.

12-Finer, G. and Landau, D.(2004). Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infec Dis.*;**4**(10):631–5.

13-Garofalo, C.K.; Hooton, T.M.; Martin, S.M.; Stamm, W.E.; Palermo, J.J. and Gordon, J.I. et al.(2007). *Escherichia coli* from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation. *Infect Immun.*;**75**(1):52–60.

14-Gordon, K.A. and Jones, R.N.(2003). Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America. Diagn. Microbiol. Dis. 45(4): 295 301.

15-Guentzel, M.N. (1996). *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus.* In: Baron's Medical Microbiology (Baron S *et al*., eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf) ISBN 0-9631172-1-1. .

16-Hojati,Z. ; Zamanzad,B.; Hashemzadeh,M.; Molaie,R. and Gholipour, A. (2015). Detection of FimH Gene in Uropathogenic *Escherichia coli*

B. Strains Isolated From Patients With Urinary Tract Infection. Jundishapur J Microbiol.; 8(2): e17520.

17-Jawetz, Melnick and Adelberg, S. (1998). Medical Microbiology. (2nd) ed. Middle East Edition, Lebanon.

18-Jawetz, E.; Melnick, J.L. and Adelberg, E.A.(2004). Medical Microobiology, 23th ed. Appelton and Lang. U.S.A.

19-Jureen, R.; Digranes , A. and Baerhcim, A. (2003) . Urinary tract pathogens in uncomplicated lower urinary tract infections in women in Norway. Tidsskr. Nor. Laegeforen. 14: 123(15): 2021-2024.

20-Kaczmarek, A.; Budzynska, A. and Gospodarek, E. (2012). Prevalence of genes encoding virulence factors among *Escherichia coli* with K1 antigen and non-K1 *E. coli* strains. *J Med Microbiol.*;**61**(Pt 10):1360–5.

21-Kau, A. L.; Martin, S. M. ; Lyon,W. ; Hayes, E. ; M. G. and Caparon, S. J. (2005) . *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. Infect. Immun. 73:2461–246.

22-MacFaddin, J. F.(2000). Biochemical tests for the identification of medical bacteria 3rd ed., The Williams and Williams and Wilkins Baltimor, U.S.A.Stellwagen, E. and Stellwagen, N.C. (2002). The free solution mobility of DNA in Tris-acetate-EDTA buffers of different concentrations, with and without added NaCl. *Electrophoresis*, 23(12): 1935-41.

23-Mladin,C.;Usein,C-R.;Chifiriuc,M_C.;Andel-Palade; Slavu, C. ;Negut, M.D.(2009). Phylogenetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *E.coli* isolated from neurogenic bladder. *Romanian Biotechnological Letters*. *Vol. 14, No. 6, 2009, pp. 4900-4905.*

24-Mladin, C.; Usein, C.R.;Chifiriuc, M.; Palade, A.; Slavu, C.L. and Negut, M. *et al*.(2009). Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with neu rogenic bladder. *Rom Biotech Lett.*;**14**(6):4906–11.

25-Oliveira, F.A.; Paludo, K.S.; Arend, L.N.; Farah, S.M.; Pedrosa, F.O. and Souza, E.M. et al.(2011). Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic Escherichia coli strains. *Genet Mol Res.* **10**(4):4114–25.

26-Raksha, H. ; Srinivasa, H. and Macaden, R.S. (2003). Occurrence & characterization of uropathogenic *E.Coli* in UTI, Indian J. Med. Microbiol., *21*(2) :102-107.

27-Rudd, K.E. (2000). EcoGene: a genome sequence database for *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **28**:60-4.

28-Sabnis, R. W. (Ram Wasudeo). (2010). Handbook of biological dyes and stains: synthesis and industrial application. Hoboken, N.J.: Wiley.

29-Sakran, W.; Miron, D.; Halevy, R. and Colodner, R. (2003). Community acquired-urinary tract infection among hospitalized children in northern Israel: pathogens, susceptibility patterns and urinary tract anomalies Harefuah. 142: 249-52.

30-Sambrook, J. and Rusell, D. W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. Third ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

31-Sharma, S.; Bhat, G. K.; and Shenoy, S. (2007). Virulence factors and drug resistance in Escherichia coli isolated from extraintestinalinfections. Indian J. Med. Microbiol. Vol.25, No. 4 : pp.369-373.

32-Sokurenko, E.V.; Feldgarden, M.; Trintchina, E.; Weissman, S.J.; Avagyan, S. and Chattopadhyay, S. *et al*.(2004). Selection footprint in the FimH adhesin shows pathoadaptive niche differentiation in Escherichia coli. *Mol Biol Evol.* **21**(7):1373–83.

33-Stickler, D. J., G. L. Jones, and A. D. Russell. (2003). Control of encrustation and blockage of Foley catheters. Lancet, 361:1435-1437.

34-Su, C.(2008). Female lower urinary tract infection. *JTUA*.;**19**:12–20.

Tarchouna, M.; Ferjani, A.; Ben-Selma, W. and Boukadida, J.(2013).

35-Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* iso lated from patients with urinary tract infection. Int J Infect Dis.;**17**(6):e450–3.
36-Wojnicz, D. (2007).Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children with chronic pyelonephritis. Adv Clin Exp Med. **16**(5):651.