وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية / كلية التربية
قسم علوم الحياة

دراسة جزيئية للجينات المسؤولة عن انتاج الهيمولايسين في البكتريا المسببة لأخماج المسالك البولية ومقاومتها لعوامل السيطرة

رسالة مُقدمة إلى مجلس كُلية التربية – جامعة القادسية
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير
في علوم الحياة/ أحياء مجهرية

من قبل الطالبة
ريام وسام حسن

إشراف
أ. م . علي عبدالرحيم الناشي

1438 هـ 2017 م

بسم الله الرحمن الرحيم

وَعَلّمكَ مَالَم تَكُن تَعلَمُ وَكَانَ فَضلُ اللهِ عَلَيكَ عَظِيمًا

صدق الله العظيم

سورة النساء (الآية 113)

إقرار المشرف

أشـــهد ان هذه الرسالة الموسومة بـــ (**دراسة جزيئية للجينات المسؤولة عن انتاج الهيمولايسين في البكتريا المسببة لأخماج المسالك البولية ومقاومتها لعوامل السيطرة**) التي قدمتها طالبة الماجستير (ريام وسام حسن) أعدت بإشرافي في كلية التربية – جامعة القادسية، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ أحياء مجهرية.

التوقيع:

الاسم: علي عبدالرحيم الناشي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: 18 / 9 / 2016

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناء على التوصيات المتوافرة، أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: د. رائد كاظم عبد

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: 18 / 9 / 2016

إقرار المقوم اللغوي

أشـــهد ان هذه الرسالة الموسومة بـــ (**دراسة جزيئية للجينات المسؤولة عن انتاج الهيمولايسين في البكتريا المسببة لأخماج المسالك البولية ومقاومتها لعوامل السيطرة**) لطالبة الماجستير (ريام وسام حسن) سليمة من الناحية اللغوية بعد مراجعتي لها.

التوقيع:

الاسم: علاء حميد جاسم

اللقب العلمي: مدرّس

التاريخ: 18 / 9 / 2016

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين في ادناه بأننا أطلعنا على الرسالة الموسومة بـــ (**دراسة جزيئية للجينات المسؤولة عن انتاج الهيمولايسين في البكتريا المسببة لأخماج المسالك البولية ومقاومتها لعوامل السيطرة**) وناقشنا الطالبة (ريام وسام حسن) في محتوياتها وفيما له علاقة بها، بتاريخ 6 / 3 / 2017 فوجدناها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / أحياء المجهرية بتقدير امتياز.

رئيس اللجنة

التوقيع:

الأسم: أ. د. ازهار نوري حسين

العنوان: جامعة القادسية / كلية الصيدلة

التاريخ: 20 / 3 / 2017

عضو اللجنة

التوقيع:

الأسم: أ. م . د. رحمن لعيبي جلاب

العنوان: جامعة ذي قار / كلية التربية

التاريخ: 23 / 3 / 2017

عضو اللجنة

التوقيع:

الأسم: أ. د. ماجد كاظم عبود

العنوان: جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ: 20 / 3 / 2017

عضو اللجنة والمشرف

التوقيع:

الأسم: أ. م. علي عبد رحيم الناشي

العنوان: جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ: 20 / 3 / 2017

مصادقة كلية التربية – جامعة القادسية

التوقيع:

العميد: أ. د. خالد جواد العادلي

التاريخ: 6 / 4 / 2017

الاهداء

الى سندي وقوتي ... الى المثل الاعلى والقلب الاغلى ... ابي الغالي

الى ملاكي في الحياة ... الى معنى الحب والحنان ... الى بسمة الحياة وسر الوجود
الى من كان دعاؤها سر نجاحي ... الى اغلى الأحبة ... امي الغالية

الى نبض فؤادي ... الى نعمة السماء ... أخوتي

اهدي جهدي المتواضع هذا...

الباحثة

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على افضل خلق الله محمد سيد المرسلين وخاتم النبيين وعلى اهل بيته الطيبين الطاهرين.

يسرني ويشرفني وأنا أنهي كتابة رسالتي هذه أن اتوجه بالشكر والامتنان الى كل من ساعدني وشد ازري ولو بكلمة.

بدءاً اقدم أسمى معاني الشكر والتقدير الى مشرفي الفاضل الأستاذ علي عبد الرحيم الناشي لاقتراحه موضوع البحث واشرافه المباشر عليه طوال مدة البحث والكتابة وفقه الله لدوام الخير والعطاء.

واقدم شكري وتقديري الى عمادة كلية التربية/ جامعة القادسية ممثلة بالأستاذ الدكتور خالد جواد العادلي والى رئاسة قسم علوم الحياة المتمثلة بالأستاذ المساعد الدكتور رائد كاظم عبد لجهودهم المستمرة في توفير متطلبات البحث.

ومن باب الوفاء اتقدم بشكري وامتناني الى منتسبي قسم المختبرات ولاسيما شعبة البكتريولوجي في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الاطفال والولادة واخص منهم البكتريولوجية هيفاء كاظم والبكتريولوجي انمار حميد حبيب في مستشفى الاطفال والولادة لما قدموه لي من مساعدات خلال مدة البحث.

وأشكر زملائي طلبة الدراسات العليا في كلية التربية/ قسم علوم الحياة ممن اكملوا دراستهم على تعاونهم معي أثناء فترة البحث.

وختاماً اتوجه بأرق كلمات الحب والامتنان وأسماها الى من كان عوناً لي في جميع اوقاتي والديّ العزيزين لتشجيعهما ودعمهما المتواصل وتحملهما معي عناء هذا الجهد وتوفيرهما لي كل ما يمكن ان يساعدني في الوصول الى هذه المرحلة جزاهما الله عني خير الجزاء.

الباحثة

الخلاصة: Summary

تضمنت الدراسة جمع 180 عينة من إدرار المرضى المصابين بخمج المسالك البولية (90 ذكور و 90 أناث) في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال في الديوانية للفترة من (1/ 9/ 2015 ولغاية 31/ 1/ 2016) لعزل البكتريا المسببة للخمج والمنتجة للهيمولايسين والكشف عن خواصها الجزيئية وعوامل الضراوة المرتبطة بالإمراضية وتحلل الدم ومقاومتها لعوامل السيطرة من المضادات الحيوية والمطهرات.

وجد ان 120 (66.67%) عينة اعطت نمواً بكتيرياً، بينما كانت 60 (33.33%) عينة سالبة. كانت الاناث اعلى نسبة في الإصابة بأخماج المسالك البولية مقارنة بالذكور فكان عدد المصابات 70 (77%) عينة وعدد المصابين 50 (55%) عينة.

البكتريا المعزولة في هذه الدراسة شملت Escherichia coli بنسبة 41.66% وهي أعلى النسب تردداً تلتها Staphylocccus aureus بنسبة 16.66% كما عزلت Staphylococcus epidermidis و Staphylococcus haemolyticus بنسبة 4.16% و3.33% على التوالي، في حين شكلت Kleibsiella spp. و Enterobacter spp. و Providentia spp. النسب 14.16% و 13.33% و 2.5% على التوالي بينما كانت النسبتان 3.33% و 0.8% من نصيب Proteus mirabilis و Proteus vulgaris على التوالي ايضاً.

كانت العزلات المنتجة للهيمولايسين قد شملت 20 (40%) عزلة من E.coli، وشملت جميع عزلات Staph. aureus و Staph. haemolyticus، في حين كانت عزلات Staph. epidermidis المنتجة للهيمولايسين قد بلغت 4 (80 %). ووجد ان فصيلة الدم AB هي الافضل في الكشف عن الهيمولايسين من بين فصائل الدم الاربع (A و B وAB و O) اذ كانت نسبة العزلات البكتيرية المحللة لهذه الفصائل 41% و 77% و 91% و 58% على التوالي. وباستعمال تقنية سلسلة تفاعل البلمرة Polymerase chain reaction (PCR) ثبت ان الجينين hla و hlb موجودان في بكتريا Staphylococcus spp. وهما يشفران لإنتاج الهيمولايسين بناتج حجمة 190 و 293 Base pair (Bp) على التوالي، بالمقابل حُدّد الجينان hlyA و hlyB في بكتريا E.coli يشفران لإنتاج الهيمولايسين بناتج حجمة 360 و 525 Base pair (Bp) على التوالي، تميزت جميع عزلات Staph. aureus المحللة للدم باحتوائها على الجين hla بنسبة (100%) وعلى الجين hlb بنسبة 40%، وعند اجراء الكشف عن جينات الهيمولايسين في Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus ظهر وجود الجين hla فيهما بنسبة 25% و 75%على التوالي، والجين hlb فيهما

بنسبة 50% و 25% على التوالي ايضاً، واظهرت تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ان جميع عزلات E.coli المنتجة للهيمولايسين تحتوي الجينين hlyA و hlyB بنسبة 100%.

جرى الكشف عن بعض عوامل الضراوة المرتبطة بإمراضية السلالات البكتيرية المحللة للدم التي شملت تكوين المحفظة وتلازن كريات الدم الحمراء وانتاج الغشاء الحيوي. انتجت عزلات E.coli و Staph. aureus و Staph. haemolyticus المحفظة بنسبة 35% و 40% و 25% على التوالي، بينما كانت جميع العزلات Staph. epidermidis غير منتجة للمحفظة. اما فيما يتعلق بقدرة العزلات على تلازن خلايا الدم الحمراء فتميزت كل من E.coli و Staph. aureus بقدرتها على احداث التلازن بنسبة 55% و 30% على التوالي، في حين كانت جميع عزلات Staph. haemolyticus و Staph. epidermidis غير قادرة على احداث التلازن. واظهرت الانواع البكتيرية المحللة للدم القدرة على انتاج الغشاء الحيوي بنسب مختلفة، اذ بلغت نسبة العزلات المنتجة للغشاء الحيوي 60% و45% و 50% و 25% لبكتريا E.coli و Staph. aureus و Staph. haemolyticus و Staph. epidermidis على التوالي.

اختبرت حساسية العزلات البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك البولية تجاه 13 مضاداً حيوياً وقد تفاوتت هذه العزلات في حساسيتها ومقاومتها تبعاً للنوع الجرثومي وطبيعة المضاد الحيوي. وقد تميزت جميع عزلات الانواع البكتيرية بمقاومة تامة (100%) تجاه مضاد Ampicillin وكانت اعلى المقاومات التي اظهرتها E.coli من غير مضاد Ampicillin هي تجاه مضادات Rifampicin و Cefalothin و Ciprofloxacin و Tetracyclin و Trimethoprim اذ بلغت 85% و80% و70% و65% و60% على التوالي.

ابدت Staph .aureus مقاومة عالية نسبياً بلغت نسبتها 90% و 75% و 75% و 60% تجاه مضادات Methicillin وCefalothin وTetracyclin وNorfloxacin على التوالي. اظهرت بكتريا Staph. haemolyticus مقاومة تامة 100% تجاه المضادين Tetracyclin و Methicillin ومقاومة عالية نسبياً تجاه المضادين Gentamysin و Cefalothin بلغت 75% لكل منهما. تميزت عزلات Staph. epidermidis بأنها لم تظهر مقاومة تامة الا لمضاد Ampicillin وابدت مقاومة بدرجة اقل تجاه Ciprofloxacin و Cefalothin بلغت نسبتها 75% لكل منهما. وقد تميزت جميع العزلات المدروسة بانعدام المقاومة تجاه مضاد Amikacin ولوحظ وجود فروق معنوية لمعظم الانواع البكتيرية المختبرة في مقاومتها تجاه المضادات الحيوية المستخدمة.

جرى التحري عن حساسية العزلات البكتيرية المحللة للدم تجاه ثلاثة من المطهرات المتداولة شملت الديتول والبوفيدين – ايودين والايودين بتراكيز مختلفة 1% و 5% و 10% لكل مطهر وقد تبين من قياس اقطار مناطق التثبيط ان هذه المواد كانت مثبطة للنمو الجرثومي وتزداد الفعالية مع زيادة تركيز المطهر وعموماً لوحظ ان الديتول هو المطهر الاكفأ في تثبيط نمو العزلات البكتيرية عند استعماله بالتركيز 10%، في حين سجل مطهر الايودين ادنى مدى تثبيطيٍ من بين المطهرات المستعملة.

قائمة المحتويات

الفقرة	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة العربية	أ- ت
	قائمة المحتويات	ث- خ
	قائمة الجداول	د
	الاشكال، الصور، الملاحق	ذ
	قائمة المختصرات	ر
1	الفصل الأول: المقدمة Introduction	3-1
2	الفصل الثاني: استعراض المراجع Literature Review	33-4
1-2	اخماج المسالك البولية Urinary Tract Infections (UTIs)	6-4
2-2	تصنيف اخماج المسالك البولية حسب موقع الاصابة	6
.1	اخماج المسالك البولية السفلى Lower Urinary Tract Infections	6
.2	اخماج المسالك البولية العليا Upper Urinary Tract Infections	6
3-2	تصنف اخماج المسالك البولية حسب مستوى الاصابة	7
.1	اخماج اولية Primary Infections	7
.2	اخماج راجعة Re – reccurent Infections	7
A	الاخماج النكسة Relapse Infections	7
B	عودة الخمج Re- Infection	7
.3	الاخماج المتواصلة Persniste Infections	8-7
4-2	تصنيف اخماج المسالك البولية حسب شدة الاصابة	8
.1	اخماج المسالك البولية المعقدة Complicated Urinary Tract Infection	8
.2	اخماج المسالك البولية غير المعقدة Uncomplicated Urinary Tract Infection	9 - 8
5-2	عوامل الخطورة لاخماج المسالك البولية Risk Factors of Urinary Tract Infection	10 - 9
6-2	طرائق وصول البكتريا المسببة لاخماج المسالك البولية	10
.1	المسلك الصاعد Asceding Route	10
.2	المسلك الدموي Hematogenous Route	11
.3	المسلك اللمفاوي Lymphatic Route	11
7-2	الاحياء المجهرية المسببة لاخماج المسالك البولية Microorganisms That Cause Urinary Tract Infections	12-11
1-7-2	بكتريا القولون Escherichia coli	13-12
2-7-2	بكتريا المكورات العنقودية .Staphylococcus spp	16-14
8-2	الانزيم الحال للدم Hemolysin	21-16
9-2	عوامل الضراوة Virulence Factors	21
1-9-2	المحفظة Capsule	22-21
2-9-2	الالتصاق وعوامل الاستعمار Adhesion and Colonization Factors	24-22
3-9-2	تكوين الاغشية الحيوية Biofilm Formation	25-24
10-2	مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Bacterial Resistance to Antibiotics	26-25
1-10-2	مقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام Bacterial Resistance to B – Lactams	27-26

2-10-2	مقاومة البكتريا لمضادات الامينوكلايكوسيدات Bacterial Resistance to Aminoglycosides	28-27
3-10-2	مقاومة البكتريا لمضادات الكوينولينات Bacterial Resistance to Quinolones	28
4-10-2	مقاومة البكتريا لمضادات التتراسايكلين Bacterial Resistance to Tetracyclin	29-28
5-10-2	مقاومة البكتريا لمضادات الريفامبسين Bacterial Resistance to Rifampicin	29
6-10-2	مقاومة البكتريا لمضاد الكلورامفنيكول Bacterial Resistance to Chloramphenicol	29
7-10-2	مقاومة البكتريا لمضادات الترايميثوبرين Bacterial Resistance to Trimethoprim	30-29
8-10-2	مقاومة البكتريا لمضادات الكلايكوببتيد Bacterial Resistance to Glycopeptide	30
9-10-2	مقاومة البكتريا لمضادات الماكروليدات Bacterial Resistance to Macrolides	30
11-2	المطهرات والمعقمات Antiseptics and Disinfectants	31
12-2	انواع المطهرات Types of disinfectants	32
1-12-2	الديتول Dettol	32
2-12-2	البوفيدون – ايودين Povidone –Iodine	32
3-12-2	الايودين Iodine	33-32
13-2	مقاومة البكتريا للمطهرات والمعقمات Bacterial Resistance to Antiseptics and Disinfectants	33
3	الفصل الثالث المواد وطرائق العمل Materials and Methods	53-34
1-3	المواد Materials	34
1-1-3	الأجهزة والادوات Equipments and Instruments	34
2-1-3	الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Prepared Media	35
3-1-3	المواد الكيمياوية Chemical Materials	36
4-1-3	الصبغات Stains	36
5-1-3	المضادات الحيوية Antibiotics	37
6-1-3	المطهرات Disinfectants	37
7-1-3	العُدد Kits	38
8-1-3	البادئات Primers	38
9-1-3	مواد متفرقة	39
2-3	طرائق العمل Work Methods	39
1-2-3	طرائق التعقيم Sterilization Methods	39
A	التعقيم بالحرارة الجافة Dry Hot Sterilization	39
B	التعقيم بالحرارة الرطبة Wet Hot Sterilization	39
C	التعقيم بالترشيح Filtration Sterilization	39
2-2-3	تحضير المحاليل والكواشف	39
1-2-2-3	المحاليل Solutions	39
1-1-2-2-3	المحلول الفسلجي Normal Saline	40-39

2-1-2-2-3	انبوبة ماكفرلاند القياسية Mcfarland Tube Standard No. (0.5)	40
3-1-2-2-3	محلول دارئ الفوسفات phosphate Buffer Solution PBS	40
2-2-2-3	الكواشف Reagents	40
1-2-2-2-3	كاشف الكاتاليز Catalase reagent	40
2-2-2-2-3	كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent	41- 41
3-2-2-2-3	كاشف فوكس – بروسكاور Voges – Proskaur Reagent	41
4-2-2-2-3	كاشف المثيل الاحمر Methyl Red Reagent	41
5-2-2-2-3	كاشف كوفاك Kovac' s Reagent	41
3-2-3	تحضير الاوساط الزرعية Preparation of Culture Media	41
1-3-2-3	الاوساط الزرعية الجاهزة Redey Media	41
2-3-2-3	الاوساط الزرعية التركيبية Structural Culture Media	42
1-2-3-2-3	وسط اكار الدم Blood Agar	42
2-2-3-2-3	وسط اكار اليوريا Urea Agar	42
4-2-3	جمع العينات Collection of Samples	42
5-2-3	زرع الإدرار Urine Culture	42
6-2-3	تشخيص العزلات البكتيرية Identification of Bacterial Isolates	43
1-6-2-3	الصفات الزرعية والفحص المجهري Cultural Characteristics and Microscopic Examination	43
2-6-2-3	الفحوصات الكيميوحيوية Biochemical Test	43
1-2-6-2-3	اختبار الاندول Indole Test	43
2-2-6-2-3	اختبار احمر المثيل Methyl Red Test	43
3-2-6-2-3	اختبار فوكس – بروسكاور Voges – Proskaur Test	43
4-2-6-2-3	اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test	44
5-2-6-2-3	اختبار تخمر السكريات وانتاج الغاز	44
6-2-6-2-3	اختبار الكاتاليز Catalase Test	44
7-2-6-2-3	اختبار الاوكسيديز Oxidase Test	44
8-2-6-2-3	الكشف عن أنزيم اليوريز Urease Test	45
9-2-6-2-3	أختبار النمو على وسط المانيتول الملحي Growth on Manitol Salt Medium Test	45
10-2-6-2-3	اختبار الحساسية للنوفوبايوسين Novobiocin Susceptible Test	45
11-2-6-2-3	اختبار انتاج انزيم مخثر البلازما بطريقة الانبوب Tube Coagulase Test	45
7-2-3	التشخيص بنظام Analytical Profile Index (API)	46
8-2-3	حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها	46
9-2-3	التحري عن بعض عوامل الضراوة البكتيرية	46
1-9-2-3	انتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	46
2-9-2-3	تكوين المحفظة البكتيرية Bacterial Capsule	47
3-9-2-3	التحري عن قابلية البكتريا على التلازن الدموي Haemagglutination Test	47
4-9-2-3	اختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation Test	47
10-2-3	فحص الحساسية للمضادات الحيوية	48
11-2-3	تحضير تراكيز المطهرات	48
12-2-3	اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمطهرات باستخدام طريقة الانتشار بالحفر	49
13-2-3	فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR)	49
1-13-2-3	استخلاص الحمض النووي البكتيري Bacterial Genomic DNA Extraction	51-49

2-13-2-3	فحص الحمض النووي المستخلص DNA Examination	51
3-13-2-3	تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR Master Mix	52-51
4-13-2-3	عدد الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler Conditions	52
5-13-2-3	الترحيل الكهربائي الهلامي Gel Electrophoresis	53
14-2-3	التحليل الإحصائي Statistical Analysis	53
4	الفصل الرابع النتائج والمناقشة Results and Discussion	83-54
1-4	العزل والتشخيص Isolation and Identification	59-54
2-4	العلاقة بين اخماج المسالك البولية والجنس Relationship Between Urinary Tract Infections and Sex	60-59
3-4	الكشف عن انتاج الهيمولايسين Detection of Heamolysin Production phenotypically and genetically	68-60
4-4	الكشف عن بعض عوامل الضراوة البكتيرية Detection of Some Bacterial Virulence Factors	69
1-4-4	انتاج المحفظة Capsule Production	70-69
2-4-4	اختبار التلازن الدموي Haemagglutination Test	71-70
3-4-4	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation	73-72
5-4	مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية Resistant Isolates Bacterial of Antibiotics	78-73
6-4	اختبار فعالية المطهرات تجاه الانواع البكتيرية المعزولة Test the Activity of Antiseptics Against Isolated Bacterial Species	82-78
5	الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations	84-83
1-5	الاستنتاجات Conclusions	83
2-5	التوصيات Recommendations	84
	المصادر References	117-85
	المصادر العربية	85
	المصادر الاجنبية	117-86
	الملاحق Appendices	125-118
	الخلاصة الانكليزية Summary	A-C

قائمة الجداول

رقم الجدول	اسم الجدول	الصفحة
1-3	الأجهزة والادوات المختبرية المستعملة في الدراسة.	34
2-3	الأوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في الدراسة والشركات المُصنِعة لها.	35
3-3	المواد الكيمياوية المستعملة في الدراسة والشركة المصنعة لها .	36
4-3	الصبغات الجاهزة المستعملة في الدراسة والشركات المُصنِعة لها والمنشأ.	36
5-3	أقراص المضادات الحيوية (Antibiotic disks) المجهزة من شركة Bioanalyse التركية.	37
6-3	المطهرات المستعملة في الدراسة .	37
7-3	العُدَد المستعملة في الدراسة والشركة المصنعة لها.	38
8-3	البادئات المستخدمة في هذه الدراسة.	38
9-3	المواد المتفرقة المستعملة في الدراسة.	39
10-3	مكونات مزيج تفاعل سلسلة البلمرة وأحجامه.	52
11-3	عدد الدورات الحرارية في تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام PCR.	52
1 - 4	عدد عينات الادرار الموجبة والسالبة للتواجد البكتيري ونسبها.	54
2 - 4	الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص البكتريا المعزولة من اخماج المسالك البولية.	55
3 - 4	البكتريا المعزولة من اخماج المسالك البولية.	58
4 - 4	اصابات المسالك البولية البكتيرية موزعة عيناتها حسب الجنس.	60
5- 4	اعداد ونسب العزلات البكتيرية موزعة حسب قدرتها على التحلل	60
6 – 4	أعداد ونسب العزلات البكتيرية موزعة حسب قدرتها على انتاج الهيمولايسين مظهرياً	61
7- 4	عدد العزلات البكتيرية المحللة لفصائل الدم البشري والمعزولة من أخماج المسالك البولية ونسبها	63
8 – 4	قابلية الانواع البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك البولية على انتاج المحفظة.	70
9 – 4	قابلية الانواع البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك البولية على تلازن كريات الدم الحمراء.	71
10- 4	قابلية الانواع البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك البولية على تكوين الاغشية الحيوية.	73
11- 4	مقاومة الانواع البكترية المعزولة من أخماج المسالك البولية تجاه مجموعة من المضادات الحيوية.	77
12- 4	مقاومة عزلات الانواع البكترية المحللة للدم تجاه بعض المطهرات المتداولة في المستشفيات.	82

قائمة الاشكال

رقم الشكل	اسم الشكل	الصفحة
1-4	النسب المئوية للبكتريا المعزولة من اخماج المسالك البولية.	59

قائمة الصور

رقم الصورة	اسم الصورة	الصفحة
1-4	شريط API 20 E المستخدم في تشخيص عزلات بكتريا E.coli المعزولة من اصابات المسالك البولية	56
2-4	نتائج تشخيص API Staph: Staph. aureus (A) و Staph. epidermidis (B) و Staph. haemolyticus (C)	56
3-4	التحلل الدموي نوع B- hemolysis على اوساط أكار الدم	62
4-4	صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hla في عزلات جرثومة Staphylococcus aureus.	64
5-4	صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hlb في عزلات جرثومة Staphylococcus aureus.	64
6-4	صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hla للمكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر CoNS.	65
7-4	صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hlb للمكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر CoNS.	66
8-4	صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hlyA في عزلات جرثومة Escherichia coli.	67
9-4	صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hlyB في عزلات جرثومة Escherichia coli.	68
10-4	اختبار المقاومة للمضادات الحيوية	78

قائمة الملاحق

رقم الملحق	اسم الملحق	الصفحة
1	القائمة التوضيحية للفحوصات التي تشملها عدة api 20 E التشخيصية عن الشركة المصنعة BioMerieux.	118
2	القائمة التوضيحية للفحوصات التي تشملها عدة api Staph التشخيصية عن الشركة المصنعة BioMerieux.	119
3	المعدلات القياسية لأقطار التثبيط للمضادات الحيوية (CLSI , 2012).	120
4	بعض عوامل الضراوة للعزلات البكتيرية المعزولة من أخماج المسالك البولية مظهرياً.	121
5	فحص الحساسية لعزلات بكتريا Staphylococcus spp. المعزولة من أخماج المسالك البولية.	122
6	فحص الحساسية لعزلات بكتريا E. coli المعزولة من أخماج المسالك البولية	123
7	جدول يبين حساسية البكتريا للمطهرات.	124
8	استمارة مرضية تتضمن المعلومات المهمة للمريض.	125

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
UTIs	Urinary Tract Infections اخماج المسالك البولية
ATP	Adenosine Triphsphate ادينوسين ثلاثي الفوسفات
U.V	Ultra Violet الأشعة فوق البنفسجية
UPEC	Uropathogenic E.coli اشيريشيا القولون الممرضة للمسالك البولية
VUR	Vesico Ureteric Reflux الانعكاس المثاني - الحالبي
PBPs	Penicilln-Binding Proteins البروتينات المرتبطة بالبنسلين
MNEC	Meninges-Associated E.coli بكتريا E.coli المتعلقة بأخماج السحايا
ExPEC	Extraintestinal Pathogenic E.coli بكتريا E.coli المسببة للاخماج خارج الامعاء
PAI	Pathogenicity Island جزر الامراضية
GyrA	DNA Gyrase الجين المشفر لانزيم كيريز الدنا
hla	Hemolysin a Gene الجين المشفر للهيمولايسين a
Hlb	Hemolysin b Gene الجين المشفر للهيمولايسين b
hlyA	Hemolysin A Gene الجين المشفر للهيمولايسين A
hlyB	Hemolysin B Gene الجين المشفر للهيمولايسين B
hlyC	Hemolysin C Gene الجين المشفر للهيمولايسين C
hlyD	Hemolysin D Gene الجين المشفر للهيمولايسين D
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid الحامض النووي منقوص الاوكسجين
dATP	Deoxy Adenosine Triphosphate دي اوكسي ادينوسين ثلاثي الفوسفات
dTTP	Deoxy Thymidine Triphosphate دي اوكسي ثايمدين ثلاثي الفوسفات
dCTP	Deoxy Cytidine Triphosphate دي اوكسي سايتيدين ثلاثي الفوسفات
dGTP	Deoxy Guanosine Triphosphate دي اوكسي كوانوسين ثلاثي الفوسفات
Bp	Base pair زوج قاعدي
PCR	Polymerase Chain Reaction سلسلة تفاعل انزيم البلمرة
RTX	Repeat Toxin Family عائلة السم
A , B1 , B2 , D	Phylogenetic Groups of E.coli المجاميع التصنيفية لبكتريا
NCCLs	National Committee for Clinical مجمع المختبرات القياسية السريرية الوطني Laboratory Standards
O	O antigen المستضد O
H	H antigen المستضد H
K	K antigen المستضد K
CoNS	Coagulase- Negative المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر Staphylococc
CLSI	Clinical and Laboratory مؤسسة المختبرات القياسية السريرية Standards Institute
NCBI	National community biological موقع المعلومات البايلوجية الوطني information
HLYA	Hemolysin A هيمولايسين A
HLYB	Hemolysin B هيمولايسين B
HLYC	Hemolysin C هيمولايسين C
HLYD	Hemolysin D هيمولايسين D
CFU	Colony Forming Unit وحدة تكوين المستعمرة
MR-VP	Methyl-Red Voges Proskaur وسط المثيل الاحمر-فوكس بروسكاور

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1- المقدمة Introduction

يعد الجهاز البولي من الاجهزة المهمة في الجسم، واي خلل في وظيفته يمكن ان يؤثر في بقية الاجهزة لدوره في تنظيم حجم السائل الخلوي ومكوناته (Gordon et al ., 2003). يعمل الجهاز البولي على إزالة المواد الضارة والزائدة عن حاجة الجسم من الدم والتخلص منها على شكل ادرار، ويعد الادرار ومحتوياته ومواصفاته مؤشرات جيدة تعكس الحالة الفسلجية المرضية او الطبيعية للجسم (Robinson et al., 2010). اذ يتميز الادرار بالاس الهيدروجيني المنخفض والتركيز العالي لليوريا مع نسبة عالية من الاحماض العضوية التي تعد من العوامل المثبطة للجراثيم (Patricia, 2014). يتكون الجهاز البولي من الكليتين والحالبين والمثانة ومجرى البول ان دخول الحالبين الى المثانة ووجود الصمام يمنع رجوع الادرار الى الكلية مرة ثانية، هذه الالية تساعد الكلية على عدم الاصابة بأمراض القناة البولية السفلى (Lower urinary tract infection) (Tortora et al., 2016). تُعَد حامضية الادرار الطبيعي احدى الصفات التي تمنع نمو الجراثيم، وان فعالية الادرار على التدفق السريع خلال عملية التبول (Urination) تعمل على التخلص من الجراثيم ألياً (Anderson et al., 2003).

تعد أخماج المسالك البولية احدى المشاكل الصحية التي تصيب نسبة كبيرة من افراد المجتمع البشري تقدر بالملايين سنويا (Boyko et al., 2005). وتعد أخماج المسالك البولية ايضا أكثر الاسباب شيوعاً لعدوى المستشفيات، إذ تشكل ما يصل الى 35% من الاصابات المكتسبة من المستشفى. تكون الاناث اكثر عرضة للإصابة من الذكور بسبب قصر الاحليل لهنَ مقارنة بالذكور وقربها من المنطقة الحارة والرطبة المحيطة بالمستقيم التي تعج بالكائنات الحية الدقيقة، حيث يمكن للبكتريا ان تصل المثانة بسهولة اكبر في الاناث (Patricia , 2014).

ترتبط اخماج المسالك البولية بالبكتريا التي تنتقل عبر مجرى البول مسببة أخماج مختلفة لأعضاء الجهاز البولي منها خمج المثانة (Cystitis) وخمج الحويض والكلية (Pyelonephritis). تعد اصابة المثانة أخماجاً للمسالك البولية السفلى بينما اصابة الحويض والكلية أخماجاً للمسالك البولية العليا وهو الأخطر من خمج المثانة (Foster, 2008).

تنوعت المسببات المرضية للجهاز البولي، إذ تعد بكتريا العائلة المعوية من الممرضات الشائعة في جميع الفئات العمرية، إذ ان اكثر من 95% من مجمل هذه الاصابة تسببها اجناس هذه العائلة (Talkoff-Robin et al., 2008). وتمتاز بكتريا E. coli بكونها المسبب الأكثر شيوعاً في حدوث اخماج المسالك البولية فهي تشكل حوالي 80 - 90% من مسببات حالات هذا الالتهاب الرئيسة

(Bahalo et al., 2013). وتعد المكورات العنقودية (Staphylococci) ايضاً احد المسببات الرئيسية لعدوى المسالك البولية في البشر (Farid et al., 2015) وذلك لامتلاك هذه المكورات مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة تمكنها من غزو الجهاز البولي (Brooks et al., 2004). وقد وجد ان مجموعة كبيرة من الجينات التي تشفر لعوامل الضراوة المرتبطة بالإمراضية موجودة على الكروموسوم البكتيري وهي توصف بالجزر المرضية Pathogenicity islands (PAIs) (Carroll et al., 2016). وقد تم التحري عن هذه الجينات من خلال فحص PCR الذي يسمح بالكشف عن جينات الضراوة باستعمال بادئات متخصصة، وذلك من خلال تضخيم هذه الجينات التي تشفر لصفات الضراوة المسببة للامراضية (Jordivila et al., 2004).

يعد انزيم الهيمولايسين من عوامل الضراوة المهمة ويلعب دوراً مهما في تزويد الجراثيم بالحديد (Dhakal and Mulvey, 2012). إذ انه يمثل احد النواتج البكتيرية التي تعمل على تحليل خلايا الدم الحمراء، بتكوين ثقوب في الغشاء الخلوي لهذه الخلايا (Sanchez et al., 2011). فضلاً عن ذلك فان انزيم الهيمولايسين يكون ساماً لخلايا المضيف المعرضة له والتي من الممكن ان تساهم في حدوث خمج الانسجة، وتدمير دفاعات المضيف فالفعالية السمية من المحتمل ان تساهم في تحطيم الكلية وهذا ما نلاحظه في حالة أخماج الكلية (Slavchev et al., 2009). وجد ان الانزيم الحال للدم يؤدي الى حدوث تنخر في الخلايا الطلائية البولية وحدوث نزف في الحيوانات التجريبية (Smith et al., 2008). وتنتج البكتيريا المحفظة التي تعد من عوامل الضراوة التي تتوسط العديد من العمليات البايولوجية بين البكتريا ومحيطها الخارجي، إذ انها تؤدي دوراً مهماً في تثبيط عملية البلعمة (Phagocytosis) (Ahmed et al., 2007). ومن عوامل الضراوة امتلاك البكتريا المرضية لوسائل الالتصاق كالاهلاب التي تعد من عوامل الضراوة التي ترسخ الغزو البكتيري لخلايا المضيف وفي حالة عدم التصاقها فأنها سوف تزال بوساطة المخاط والسوائل الاخرى التي تغسل سطح النسيج (Carroll et al., 2016). ووجد ان البكتريا المكونة للأغشية الحيوية تشكل مشكلة كبيرة اذ انها تعمل على مقاومة الدفاعات المناعية للمضيف والمواد القاتلة للجراثيم والمضادات الحيوية (Hancock et al., 2010).

ان كثرة تعاطي المضادات الحيوية لفترات زمنية طويلة ادى الى نشوء حالة المقاومة البكتيرية ثم ظهور سلالات ذات مقاومة عالية ومتعددة للمضادات الحيوية، وهي من المشاكل الصحية الخطيرة التي تواجه المجتمع الطبي (Adellowo and Fagade, 2012). وقد اشارت العديد من الابحاث ان هذه المعقمات والمطهرات من المواد الكيميائية المعول على استعمالها في تثبيط الاحياء المجهرية الممرضة على سطح الجسم وللأرضيات والأدوات الا انها يمكن ان تقوم بمساعدة هذه

الممرضات على مقاومة المضادات الحيوية، اذ انه من المعروف علمياً ان بعض البكتريا يمكن ان تكون محصنة ضد هذه المواد، ولكن يمكن ان تزداد مقاومتها لمضادات حيوية معينة نتيجة لتعرضها للمطهرات لفترة طويلة (Lalwani , 2006).

ونظراً لخطورة الاصابات الجرثومية التي يتعرض لها الجهاز البولي في الانسان وانتشارها في فئات عمرية متعددة وامتلاكها لآليات متعددة ومتغيرة في احداث أخماج سريعة ومميتة فقد أرتأينا القيام بهذه الدراسة لتهدف الى التعرف على دور الهيمولايسين في أمراضية البكتريا المسببة لأخماج المسالك البولية على المستوى المظهري والجزيئي من خلال الخطوات التالية :

1. عزل المسببات المرضية الجرثومية وتشخيصها والتحري عن العزلات المحللة للدم.
2. الكشف عن الجينات المشفرة لإنتاج الهيمولايسين في العزلات البكتيرية قيد الدراسة باستعمال تقنية PCR.
3. التحري عن امتلاك العزلات البكتيرية قيد الدراسة لبعض عوامل الضراوة وهي المحفظة وتلازن خلايا الدم والاغشية الحيوية التي تساعد هذه الممرضات على تحقيق الاصابة في المضيف.
4. البحث عن مدى مقاومة البكتريا المعزولة تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المتداولة الاستخدام في مجال اخماج المسالك البولية، واختبار فعالية المطهرات الشائعة الاستعمال في بيئة المستشفيات في السيطرة على البكتريا المعزولة.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures review

2- استعراض المراجع Literatures review

2-1: اخماج المسالك البولية Urinary Tract Infections (UTIs)

تعد أخماج المسالك البولية واحدة من الاصابات الشائعة في جميع انحاء العالم (Stamm and Norrby, 2001). وهي عدوى تسببها الكائنات الحية المسببة للأمراض كالبكتريا والفطريات والابتدائيات في الاعضاء المختلفة للجهاز البولي (Davis, 2011)، كالكلية (Kidney) والحالب (Ureter) والمثانة (Bladder) والاحليل (Urethra) يصنف الخمج حسب موقع الاصابة الى خمج الحويض والكلية (Pyelonephritis) وخمج المثانة (Cystitis) وخمج الاحليل (Urethritis) (Masson et al., 2009). يعتمد نشوء اخماج المسالك البولية على عوامل تشريحية، وعلى طبيعة الاجهزة الدفاعية لدى المضيف وعلى عوامل الضراوة التي تمتلكها الكائنات الحية المسببة للإصابة (Bien et al ., 2012). ويعد هذا الخمج ثاني الاخماج الاكثر شيوعاً في العالم اذ يقدر ان هناك حوالي 150 مليون حالة من خمج المسالك البولية تحدث كل سنة (Amin et al., 2009). وتكلف اقتصاد العالم ما يزيد على 6 مليارات دولار إذ وجد ان عدد المصابين بأخماج المسالك البولية في الولايات المتحدة حوالي 7 ملايين حالة سنويا (Carroll et al., 2016). اذ يعد خمج المسالك البولية من الاخماج الشائعة في المجتمع والمستشفيات (Irenge et al., 2014).

يعرف خمج المسالك البولية بأنه احتواء الادرار على الجراثيم سواء رافقته اعراض سريرية ام لم ترافقه (Beacker et al., 2007). وهناك تعريف اخر اكثر دقه يقصد به وجود البيلة الجرثومية (Bacteriuria) اذ ان العدد الكلي للبكتريا في عينة ادرار حديثة يبلغ 10^5 خلية او اكثر في المليتر الواحد في المسلك البولي وهو مترافق مع اعراض وعلامات الاصابة (Shanson, 2000).

يعد الإدرار الطبيعي معقماً ويحتوي السوائل والأملاح ونواتج الفضلات إلا أن الإصابة تحدث عند دخول الكائنات المجهرية المرضية من القناة الهضمية وصولا إلى المنطقة المفتوحة من الإحليل التي تبدأ بعدها البكتريا بالنمو هناك (Jureen et al., 2003). حيث تحدث عدوى أخماج المسالك البولية عندما تنتقل البكتريا من منطقة المستقيم وتدخل المسالك البولية عبر مجرى البول الى المثانة وتتضاعف في الادرار، وعندما تقتصر الاصابة على مجرى البول يسمى خمج الاحليل واذا تحركت البكتريا الى المثانة وتضاعفت يسمى خمج المثانة واذا لم تعالج الاصابة بسرعة قد تنتقل البكتريا الى

اعلى الحالب لتتكاثر وتصيب الكلى وتدعى الاصابة حينئذ خمج الحويض والكلية (Komala and Kumar, 2013).

تعد اخماج المسالك البولية (UTI) اكثر الاخماج البكتيرية شيوعاً في البشر (Anvarinejad et al., 2011). اذ يحدث الخمج في كلا الجنسين وفي مختلف الاعمار وتكون نسبة حدوثه في الاناث اكثر مما هي عليه في الذكور (Davidson et al., 2002). يحصل خمج الجهاز البولي عند الاناث عادة مبكرا اثناء الطفولة ثم يزداد مع تقدم العمر خاصة مع بداية البلوغ الجنسي والحمل ويعود السبب في ذلك الى الشكل التشريحي للجهاز البولي للأناث (Moges et al., 2002). اذ ان الاحليل لدى الاناث طوله اقل من (2 بوصه) فالكائنات الحية الدقيقة تستطيع اجتيازه بسهولة، فضلاً عن قربه من مجرى البول للذكور من فتحة الشرج وبذلك يتلوث بالجراثيم المعوية. وتنعكس هذه الاعتبارات في كون معدل أخماج المسالك البولية عند الاناث يعادل ثماني مرات من معدل اصابة الذكور (Tortora et al., 2016). ويعتقد ايضا ان حدوث الاصابة بالصغر يؤدي الى احتمالية تكرارها عند الكبر (Mcgladdery et al., 2009). واهتمت دراسات متعددة بأخماج المجاري البولية في الرجال ومنها التهاب البروستات (Prostatitis) الذي يصيب الذكور لاسيما مع تقدم السن، والذي يؤدي الى اخماج المسالك البولية السفلى ويلاحظ وجود خلايا قيحية مرافقة للخمج (Krieger et al., 2000).

تحدث عدوى أخماج المسالك البولية المكتسبة من المجتمع في اربع مجاميع رئيسة من فئات المجتمع الذين هم اكثر استعداداً وعرضة للإصابة باخماج المسالك البولية، وتشمل الفتيات بأعمار المدارس والنساء الشابات الناشطات جنسيا والذكور الذين يعانون انسداد البروستات وكبار السن (Zhang and Foxman, 2003). فضلاً عن خمج المسالك البولية هو العدوى الاكثر شيوعاً في الاصابات المكتسبة من المستشفيات، وهو يمثل ما يقارب 35% من عدوى المستشفيات، وهذا هو السبب الثاني الاكثر شيوعاً للتجرثم في المرضى الراقدين في المستشفيات (Kolawole et al., 2009). إذ تلعب بيئة المستشفى دورا مهما في تحديد البكتريا المسببة لهذه الاصابة وعادة ما يكون المرضى الراقدون في المستشفيات اكثر عرضة للإصابة بمسببات مايكروبية متعددة اهمها E.coli و Klebsiella spp. و Proteus spp. والانواع الاخرى من العائلة المعوية، Pseudomonas airugenosa و Staphylococcus spp. و Enterococcus spp. و Candida spp. (Patricia, 2014).

يعد الزرع المختبري والفحص المجهري للإدرار الوسطي من الاختبارات التشخيصية القياسية المهمة للتحري عن اخماج المسالك البولية، اذ يعد وجود البكتريا في الادرار بحوالي 10^5 وحدة تكوين المستعمرة لكل ملليتر (Colony Forming Unit (CFU / ml ضروريا جدا لتشخيص اخماج المسالك البولية (Chung et al., 2010). ويعد الفحص المجهري خطوة رئيسة ذات قيمة كبيرة في التشخيص والعلاج، ويترافق وجود الاصابة عادة مع وجود خلايا الخراج، اذ ان وجود 5 خلايا او اكثر في الحقل المجهري الواحد عند قوة التكبير العالية يعد دليلا على وجود الاصابة (Cheesbrough, 1992).

2-2 : تصنيف اخماج المسالك البولية حسب موقع الاصابة:

1- اخماج المسالك البولية السفلى Lower Urinary Tract Infections

تشمل كلاً من خمج المثانة وخمج الاحليل وكذلك خمج البروستات عند الذكور اذ يشكو مرضى خمج المثانة من الاعراض السريرية المتمثلة بعسر البول (Dysuria)، والحاجة للتبول (Urgency) وكثرة عدد مرات التبول (Frequent urination) وألم فوق منطقة العانة (Suprapubic) (Patricia, 2014). اما خمج الاحليل فيحدث نتيجة بعض الجراثيم التي تنتقل عن طريق الاتصال الجنسي مثل بكتريا الكلاميديا Chlamidia ومرض السيلان (Gonorrhoea) وتوجد ايضا متلازمة الاحليل لدى النساء خاصة بعد الاتصال الجنسي ويكون مشابها لاعراض خمج المثانة. اما خمج البروستات الحاد والمزمن فيكثر حدوثه عند الذكور نتيجة عدم معالجة الامراض التناسلية بنجاح ويكون خمجاً ثانويا بعد انتان دموي او خمج بولي حاد (Robert, 1997).

2- اخماج المسالك البولية العليا Upper Urinary Tract Infections

تشمل الكليتين والحالبين وترافق اخماج المسالك البولية العليا اعراض منها الحمى (Fever) والتعب وألم الخاصرة (Flank pain) وأسفل الظهر والقشعريرة (Chills) مع قلة كمية التبول وتكراره، وفي بعض الأحيان تكون مصحوبة بالتقيؤ (Vomiting) والإسهال (Diarrhea) مع الم في البطن والغثيان (Nausea) (Lane and Takhar, 2011). وقد اشار Reddy's (2002) الى ان اخماج المسالك البولية العليا أخطر واشد ضراراً من اخماج المسالك البولية السفلى، لكنها اقل انتشاراً منها وبذلك فإن تجنب اصابة الاحليل يحد من وصول الجراثيم الى المثانة ولكن عدم معالجتها يؤدي الى خمج المسالك البولية العليا.

3-2: تصنف التهابات المسالك البولية حسب مستوى الاصابة الى:

1- اخماج اولية Primary infections

تحدث نتيجة لاجتياح البكتريا للقناة البولية واستيطان انسجتها، وان مثل هذه الاخماج عادة ما تكون مترافقة بأعراض كالحمى مع وجود بيلة قيحية (pyuria) ويستدل عليها بوجود خمس خلايا بيض دموية في الحقل المجهري الواحد فضلا عن عسر التبول ولزوجته وتكراره (Li et al., 2004).

2 ـ اخماج راجعة Re – Reccurent Infections

تعد عودة الاصابة باخماج المسلك البولي اخماج راجعة بعدد معنوي اكثر او يساوي 10^5 خلية بكتيرية لكل1ملليتر من الادرار، وتكون الاناث اكثر استعداداً للإصابة بها من الذكور بسبب الاختلافات التشريحية (Awaness et al ., 2000). والاخماج الراجعة تصنف بدورها الى:

A- الاخماج النكسة Relapse Infections

وهي اقل شيوعا من اخماج المسالك البولية المتكررة، وتُشَخَص عندما يتكرر خمج المسالك البولية بعد اسبوعين من العلاج بالمضادات الحيوية لأول مرة (Le et al., 2004). تحدث نتيجة الاصابة بمسبب مرضي هو المسبب المرضي الاصلي نفسه، ويساعد على حدوثها وجود تشوهات تشريحية مثل وجود الحصى في الكلية (Renal Stones) او نتيجة خلل في التركيب الاحليلي او تحولات وظيفية مثل الانعكاس المثاني - الحالبي (Kill et al.,1997).

B- عودة الخمج Re- Infections

تحدث بعد اسابيع من العلاج بالمضادات الحيوية وتحصل نتيجة الاصابة بمسبب مرضي مختلف عن المسبب المرضي الاصلي. مسبب الاصابة هذا عادة ما يدخل من منطقة المستقيم ليصل الى المسالك البولية. ومما تجدر الاشارة اليه ان المسبب المرضي الاصلي في كثير من الاحيان لايزال قائما لذلك ففي كثير من الاحيان يكون من الصعب التمييز بين عودة الاصابة والانتكاس (Josip, 2006).

3 ـ الاخماج المتواصلة Persniste Infections

تعني استمرار وجود المسببات المرضية خلال فترة المعالجة وبعدها (Kill et al., 1997)، وهذا يدل على ان بؤرة الاصابة في المسالك البولية لم تعالج بعد، وان المسبب المرضي يستوطن في كثير من الاحيان مواقع محمية من وصول المضادات الحيوية، وهذه المواقع المحمية غالبا ما تكون

التشوهات التشريحية والحصاة البولية والأجسام الغريبة مثل القثطر البولي (Abrahams and Stoller, 2003) .

4-2: تصنيف اخماج المسالك البولية حسب شدة الاصابة:

1ـ أخماج المسالك البولية المعقدة Complicated Urinary Tract Infections

تتضمن أخماج المسالك البولية العليا وتحدث في الافراد الذين يمتلكون العوامل المؤهبة مثل التشوهات الهيكلية والوظيفية والاضطرابات الايضية او ضعف المناعة والتشوهات الخلقية في الاطفال واخماج البروستات في الرجال (Rena and Dasgupta, 2013) والاصابة بمرض السكري او بقاء القثطر البولي في المسلك البولي لفترة طويلة (Nicolle, 2008). ويكون الخمج مترافقا مع واحد او اكثر من اعراض متعددة اهمها ضيق في المجرى البولي وانسداد في القناة البولية بسبب وجود تراكيب غير طبيعية كأمراض الكلية الكيسية (Cystic Renal Disease) او وجود الاورام (Tumers) وحصاة كلوية (Kideny Stones) واصابات الحبل الشوكي. وقد تحدث ايضا بفعل عوامل ايضية مثل التغيرات الهرمونية عند الحمل او التغيرات الوظيفية مثل ارتداد البول من المثانة الى الحالب (Emmons, 2004). وتكون الممرضات الشائعة في هذا النوع من الالتهابات هي بكتريا E.coli و K. pneumonia و P. mirabilis و P.aeruginosa و Enterococcus spp. (Chamberlain, 2009).

2 ـ أخماج المسالك البولية غير المعقدة Uncomplicated Urinary Tract Infections

يشكل خمج المسلك البولي غير المعقد نسبة كبيرة من الاخماج، ويحصل الخمج عندما لا تكون هناك تغيرات وتشوهات تشريحية ووظيفية غير طبيعية بحيث تؤدي الكلية عملها بشكل طبيعي، ولا يترافق مع الاضطرابات التي تودي الى خلل في الاليات الدفاعية للجسم (Emmons, 2004). واكثر مسببات الامراض في هذا النوع من الاخماج هي بكتريا E . coli فضلاً عن Klebsiella spp. و Staph. saprophyticus و Enterococci (Patricia, 2014). وتتضمن أخماج المسالك البولية غير المعقدة كلاً من تجرثم الادرار اللاعرضي (Asymptomatic Bacteruria) وخمج المثانة وخمج الحويض والكلية (Gunther et al., 2001).

تجرثم الادرار اللاعرضي يقصد به وجود الاحياء المجهرية في الادرار دون ظهور علامات سريرية (Bien et al., 2012). اما خمج المثانة فهو الخمج الاكثر شيوعاً ويحدث في المسالك البولية السفلى (Car et al., 2003). ويعد الخمج الاكثر شيوعاً في المثانة البولية للنساء واكثر اعراضه شيوعاً والالم وعسر التبول والحاجة الملحة للتبول وجود بيلة قيحية (Tortora et al., 2016). وتتفاوت هذه الأعراض من الخفيفة إلى الخطرة

(Lane and Takhar, 2011). قد يكون هناك بعض الألم في منطقة أعلى عظام العانة أو أسفل الظهر. اما أخماج الكلية وحويضها فتحدث نتيجة انتقال الجراثيم التي تصيب الاحليل الى المثانة ثم صعودها من خلال الحالب لتصيب الخلايا الحشوية للكلية (Sobel, 1997) ان حوالي 25% من الحالات غير المعالجة وخمج المثانة قد تتطور الى خمج الحويض والكلية، الخمج يحدث في احدى الكليتين او كلتيهما (Tortora et al., 2016). يعاني الأشخاص المصابون بخمج الحويض والكلى من الحمى وألم الخاصرة والغثيان والقيء (Lane and Takhar, 2011).

5-2 : عوامل الخطورة لاخماج المسالك البولية Risk Factors of Urinary tract infections

في الظروف الطبيعية تكون الكلية والحالب والمثانة معقمة، ويكون الادرار الداخل الى المثانة البولية معقما ايضا، في كل من الذكور والاناث ومع ذلك فعدد قليل من البكتريا عادة ما يكون في الجزء الاعلى من مجرى البول. العوامل المسؤولة عن عملية التعقيم تتضمن انخفاض قيمة pH في الادرار والذي يعمل على قتل بعض انواع البكتريا فضلاً عن وجود اليوريا وغيرها من المنتجات النهائية الايضية والكثير من الانزيمات بحيث لا يمكن الا لكائنات قليلة من البقاء على قيد الحياة، فضلاً عن مسح المسالك البولية السفلى مع الادرار وبعض المخاط 4 - 5 مرات يوميا ويؤدي الى القضاء على المسببات المرضية المحتملة (Onuo et al., 2013). هناك مجموعة من العوامل تعمل على زيادة خطورة الاصابة باخماج المسالك البولية، منها التشوهات التركيبية والوظيفية وهذه تشمل التشوهات الخلقية والخراجات وعيوباً عصبية تسبب احتباس البول، إذ ان تعطيل التدفق الطبيعي للإدرار يؤدي الى ركود الادرار وفي ظل هذه الظروف تتمكن البكتريا من ان تنمو وتنقسم بسهولة اكبر وزيادة احتمال الالتصاق بالخلايا الظهارية واحداث الاصابة (Rane and Dasgupta, 2013). ويعد الانعكاس المثاني - الحالبي Vesico Ureteric Reflux (VUR) من التشوهات الوظيفية للقناة البولية والتي تساعد على حدوث الخمج (Dawson and Whitflid , 1996). فضلاً عن امتلاك بعض الخلايا في الغشاء المخاطي المهبلي ومجرى البول مستقبلات تسمح في الغالب لبعض انواع البكتريا لترتبط بها وتسحبها الى داخل المثانة مما يسبب زيادة خطر أخماج المسالك البولية (Komala and Kumar , 2013).

يعد الحمل من العوامل المهيئة للإصابة باخماج المسالك البولية (Emmons, 2004)، اذ ان النساء الحوامل اكثر عرضة للإصابة به وقد يعود ذلك الى تغيرات في الظروف البيئية للجهاز البولي التناسلي كالتغيرات التشريحية والفسلجية، وكذلك انحسار حجم المثانة نتيجة مزاحمة الرحم الحاوي للجنين وزيادة معدل الترشيح الذي يسبب الاجهاد للكليتين، فضلا عن ذلك هناك عوامل اخرى تزيد من

الاصـــابة وهـــذه تشـــمل العوامـــل الجنســـية (Sexual Factors) وتناضـــحية البـــول (Osmolarity of Urine) وحالة المفرز (Secretor State) وقيمة الاس الهيدروجيني في المهبل (Nicolle, 2008). كذلك استعمال وسائل منع الحمل وحجاب مبيد النطف يزيد من استعمار سلالات البكتريا المعوية المسببة للخمج (Komala and Kumar, 2013). فضعف المناعة والاستخدام المتزايد للأدوية الكابحة للمناعة وزرع نخاع العظم زادت من مخاطر أخماج المسالك البولية وانتان الدم وكذلك كبت المناعة بسبب فيروس نقص المناعة المكتسبة (AIDS) يؤهب ايضا الى أخماج المسلك البولي (Rane and Dasgubta, 2013).

يعد مرض السكري حالة مرضية اخرى مرتبطة مع أخماج المسالك البولية المتكررة وتجرثم الادرار اللاعرضي (Geerlings et al., 2000). وقد توصل Yeole وTenpe (2009)، الى ان ارتفاع السكر عن الحد الطبيعي يؤدي الى حصول تغيرات غير طبيعية في انسجة الكلية وحدوث تضخم في حجم الكبيبات الكلوية وتشقق الجسيمات النبيبية في الكلية وتوسع في فسحة محفظة بومان. وان ارتفاع نسبة سكر الكلوكوز الذي يطرح في الادرار يعد مصدر تغذية لتكاثر البكتريا ونموها وبذلك يساهم في غزو المسالك البولية واستيطانها من قبلها إذ لها القابلية على اختراق الدفاعات الطبيعية (Nicolle, 2001).

من جانب اخر تعد عملية القثطرة البولية من العوامل المهيئة للإصابة بخمج المسلك البولي إذ وجد ان حوالي 2% من اخماج المسالك البولية المكتسبة في المستشفيات تعود الى قثطرة المثانة (Smith, 2000). فضلا عن ذلك فان بقاء القثطار البولي لفترة طويلة في مكانه عند بعض المرضى يعد من عوامل الخطورة إذ يزيد من فرص التلوث الذي يتسبب عنه اخماج الدم والقناة البولية (Lindsay, 2010).

6-2 : طرائق وصول البكتريا المسببة لأخماج المسالك البولية:

1- المسلك الصاعد Asceding Route

وهو الطريق الأكثر شيوعاً لحدوث الاصابة في الاناث، وغالبا ما يرتبط مع ادخال الاجهزة على سبيل المثال القثطرة البولية (Urinary Catheterization) وتنظير المثانة (Cystoscopy) ويعد هو السبب الأكثر شيوعاً لعدوى المسالك البولية المكتسبة من المستشفيات في كلا الجنسين، اذ تحدث العدوى نتيجة لغزو المسببات المرضية المنطقة المحيطة بالإحليل وبمجرد وصولها المثانة قد تتكاثر وتمر من خلال الحالبين الى الكلى (Patricia, 2014).

2- المسلك الدموي Hematogenous Route

يعد هذا الطريق اكثر شيوعاً للعدوى في الاطفال الحديثي الولادة ولكن العدوى عن هذا الطريق تكون نادرة الحدوث (Mandell et al., 2000). غالبية العدوى تحدث عن طريق تجرثم الدم من خلال وصول الجراثيم المسببة للعدوى مثل Staph. aureus بوساطة مجرى الدم الى الكليتين (Ward and Jones, 1996).

3- المسلك اللمفاوي Lymphatic Route

ان حدوث الاصابة عن طريق هذا المسلك نادرة، اذ تستطيع الاحياء المجهرية الانتقال عن طريق القنوات اللمفاوية للقولون واحداث أخماج المسالك البولية (Tanagho and Jack, 2000).

2- 7 : الاحياء المجهرية المسببة لاخماج المسالك البولية Microorganisms That Cause Urinary Tract Infections

تعد البكتريا المسبب الرئيس لاخماج المجاري البولية (Ehinmidu, 2003) على الرغم من ان الفيروسات والفطريات والابتدائيات يمكن ان تسبب الخمج (Paris et al., 2003). اذ ان كلاً من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام يمكن ان تسبب اخماج المسالك البولية عند وجودها بعدد اكثر او يساوي 10^5 وحدة تكوين مستعمرة لكل ملليتر من الادرار(Chowdhury et al., 2013). تعد البكتريا السالبة لصبغة كرام التي تنتمي الى العائلة المعوية من اهم المسببات لعدوى المسالك البولية خاصة E.coli إذ تمثل حوالي 90% من عدوى المسالك البولية المكتسبة من المجتمع (AL-Chalabi et al., 2010). اذ تمتلك E.coli العديد من عوامل الضراوة التي تسهل عملية غزو النسيج وتلف الخلايا الظهارية والحشوية للنبيبات الكلوية منها افراز الانزيم الحال للدم والذي تنتجه معظم السلالات الممرضة للمسلك البولي (Brook et al., 2007). فضلاً عن ان هناك بكتريا اخرى سالبة لصبغة كرام تسبب أخماج المسالك البولية وهي Citrobacter spp. و Enterobacter spp. و Klebsiella spp. و Proteus spp. و Pseudomonas spp. (Hooton, 2012). اذ ان 90% من حالات أخماج المسالك البولية تسببها البكتريا السالبة لصبغة كرام (Lazarevic et al.,1998). كما تعد البكتريا السالبة لصبغة كرام من المصادر المهمة لاخماج المسالك البولية المكتسبة من المستشفيات وتجرثم الدم المرتبطة بالوفيات (Parslow et al., 2001)، فضلاً عن ذلك توجد مسببات مرضية من البكتريا الموجبة لصبغة كرام إذ اصبحت هذه البكتريا في الفترة الاخيرة مسببات شائعة لاخماج المسالك البولية بشكل متزايد (Fihn et al., 1998). فقد وجد ان Staph. aureus واحدة من البكتريا الاكثر شيوعاً كمسبب لاخماج المسالك البولية اثناء الحمل وينتج عنه مضاعفات خطيرة مثل خمج الحويض والكلية وارتفاع ضغط الدم

(Moyo et al., 2010). وتعد المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر Coagulase- Negative Staphylococci من المسببات الشائعة لاخماج المسالك البولية (Amin et al ., 2009). فهي من بين البكتريا السائدة التي تستعمر مجرى البول والمناطق المحيطة به في الذكور والاناث. ومعظم المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر المسببة لهذا الالتهاب تكون من النوعين Staph epidermidis. و Staph .saprophytic ، في حين خمج المثانة الحاد تسببه انواع اخرى من المكورات العنقودية مثل Staph. haemolyticus (Gunn and Davis, 1998).

1-7-2 : بكتريا القولون Escherichia coli

تعود بكتريا القولون الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae التي تنتشر افرادها في كل مكان فهي واسعة الانتشار في التربة والماء وعلى النباتات وهي جزء من الفلورا المعوية لمعظم الحيوانات بما فيها البشر، تسبب هذه العائلة مجموعة متنوعة من الامراض التي تصيب الانسان بما في ذلك تجرثم الدم، وأخماج المسالك البولية (UTI) والعديد من الاخماج المعوية (Murray et al ., 2013) تمتاز E.coli بكونها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات هوائية او لاهوائية اختياريا وتنمو في الاوساط الزرعية البسيطة ودرجة الحرارة المثلى للنمو 37مْ (Gupte , 2010)، وتكون مستعمرات دائرية وملساء ومحدبة مع حواف محددة وغير مخاطية، بعض سلالاتها تنتج الهيمولايسين على وسط (Blood agar) (Carroll et al., 2016). يكون لون المستعمرة على وسط الماكونكي ورديا اما على وسط (EMB Agar) فيتميز بتالق معدني (Green metallic shine)، متحركة بوساطة اسواط محيطية او غير متحركة وسالبة لاختبار الاوكسيديز (Patricia , 2014). موجبة لاختبار الاندول والمثيل الاحمر وسالبة لاختبار الفوكس بروسيكاور والسيترات ومخمرة لسكريات للاكتوز وكلوكوز وسكروز ومالتوز والمانيتول وتنتج حامضاً وغازاً، ولا تحلل اليوريز ولا تنتج غاز H_2S (Gupte , 2010). اما من ناحية الخواص المستضدية فان هذه البكتريا تحتوي ثلاثة انواع من المستضدات وهي المستضد الجسمي (O antigen) Somatic antigen ومستضد الكبسولة Capsular antigen (K antigen) والمستضد السوطي Flagellar antigen (H antigen) (Brook et al., 2004).

تعد E . coli من الكائنات الممرضة انتهازياً الاكثر شيوعاً في جميع انحاء العالم (Aswani et al., 2014) فهي تشترك في احداث التلوث الميكروبي وتسبب حوالي 90% من اخماج المسالك البولية، وخاصة لدى النساء وتأتي اهمية هذا الكائن الممرض من امتلاكه لمجموعة من عوامل الضراوة التي تمكنه من احداث الاصابة (Brook et al., 2010). تعد E. coli نبيتاً طبيعيا

في الامعاء الا انها بالرغم من ذلك تعد من اكثر العوامل انتهازية في إمراضية الجهاز البولي لما تمتلكه من عوامل ضراوة متنوعة مسؤوله عن امراضيتها مثل الهيمولايسين والذيفانات الداخلية وذيفانات الشيكا والغشاء الحيوي وغيرها (Al - Chalabi et al., 2010). تعد بكتريا E.coli أشيع مسبب لعدوى المستشفيات والسبب الرئيس لاخماج المسالك البولية المكتسبة من المجتمع (Patricia , 2014). إذ تشكل 90% من الاصابات المكتسبة من المجتمع وحوالي 50% من أخماج المسالك البولية المكتسبة في المستشفيات (Bien et al., 2012).

تصنف سلالات E.coli المسببة للأمراض الى مجموعتين، الاولى هي المسببة للاسهال (Diarrheagenic Group) والثانية هي الممرضة التي تسبب الاصابات خارج الامعاء Extraintestinal Pathogenic Group ويرمز لها (ExPEC) (Goldman and Green, 2009) وكثيرا ما ترتبط سلالات هذه الجرثومة المسببة للاخماج خارج الامعاء مع الاصابات المكتسبة من المستشفى والمجتمع (Allocati et al., 2013). تقسم سلالاتها المعزولة من خارج الامعاء الى فئتين، بكتريا E.coli المسببة لاخماج المسالك البولية وتسمى (UPEC) Uropathogenic E.coli وبكتريا E.coli المرتبطة بأخماج السحايا / تعفن الدم (MNEC) Meningitis / Sepsis Associated E .coli (Patricia , 2014).

وقد كشفت دراسات النشوء والتطور ان سلالات E. coli تنقسم الى اربع مجاميع رئيسة هي A و B1و B2 و D، وقد وجد ان السلالات الفتاكة لهذه البكتريا بما في ذلك المسببة لاخماج المسالك البولية (UPEC) تنتمي الى المجوعتين B2 و D بينما المتعايشة والاقل ضراوة تنتمي الى المجموعتين A وB1 (Lee et al., 2015). وقد وجد ان هذه الجرثومة في معظم الاحيان تنتمي الى مجوعة B2 اذ تتميز بامتلاكها العديد من الجينات التي تشفر للضراوة لكي تسبب الاخماج خارج الامعاء (Johnson et al., 2001) . وتختلف سلالات هذه البكتريا المسببة لاخماج المسالك البولية عن تلك المتعايشة في الصفات المظهرية وفي عوامل الضراوة، اذ ان الاولى هي الاكثر شيوعاً في تسبيب اخماج المسالك البولية لدى البشر (Allocati et al., 2013). تمتلك بكتريا القولون المسببة لاخماج المسالك البولية مجموعة من عوامل الضراوة اهمها الالفا هيمولايسين وعامل التنخر الخلوي وعوامل الالتصاق وانظمة سحب الحديد، ان هذه العوامل تدعم قدرتها على الالتصاق بالخلايا الظهارية البولية، إذ تساعدها على مقاومة تأثير المضادات الحيوية (Dobrindt , 2005).

2-7-2 :بكتريا المكورات العنقودية Staphylococcus spp.

هي مكورات موجبة لصبغة كرام وغير متحركة وغير مكونة للسبورات وتنمو في مجموعة متنوعة من الظروف هوائية ولا هوائية اختيارية وذات قطر يتراوح ما بين (0.5 - 1.5) مايكروميتر (Murray et al., 2013). تتجمع هذه البكتريا في نمط يشبه العناقيد وان سبب هذا التجمع هو انقسامها بأكثر من مستوى وتبقى مرتبطة مع بعضها البعض، ويمكن مشاهدتها بشكل مكورات منفردة او ازواج او رباعية او بهيئة عناقيد وخاصة عند تنميتها في الاوساط الزرعية السائلة، الدرجة المثلى لنموها 37مْ وتظهر المستعمرات دائرية ملساء ولماعة (Carroll et al., 2016). تنمو في مدى حراري (18 - 40) مْ، وهي قادرة على تحمل تراكيز عالية من NaCl تصل الى 10% (Murray et al., 2013).

يضم جنس المكورات العنقودية حاليا خمسة وأربعين نوعا واربعة وعشرين تحت نوع (Moura et al., 2012). تقسم المكورات العنقودية اعتمادا على انتاجها لانزيم Coagulase الى مجموعتين (Woo et al., 2001). وتتضمن المكورات العنقودية المنتجة لأنزيم Coagulase اهم نوع ممرض للإنسان وهي Staph. aureus (Finch, 2006). يعد جنس المكورات العنقودية من مسببات الامراض المهمة في البشر، إذ تسبب طيفا واسعا من الامراض التي تهدد الحياة بما في ذلك اخماج في انسجة الجلد واماج المسالك البولية والعدوى الانتهازية والانواع الأكثر شيوعاً المرتبطة بأمراض الانسان هي Staph. aureus و Staph. epidermides و Staph. saprophyticus و Staph. haemolyticus (Murray et al., 2013). تعزى إمراضية المكورات العنقودية الى قدرتها على تحلل الدم وانتاجها انزيم مخثر البلازما والانزيمات خارج خلوية والسموم الخارجية المسببة للتسمم الغذائي (Mims et al ., 2004).

تتميز جرثومة Staph. aureus بمستعمرات متوسطة الى كبيرة وملساء مرتفعة قليلا محدبة غير شفافة تتميز مستعمراتها بلون اصفر كريمي ومعظم سلالاتها محلله للدم نوع Beta-haemolysis (Patricia, 2014). تعد هذه البكتريا من اهم الانواع الممرضة للإنسان واكثرها شيوعاً لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة اذ تنتج العديد من المواد الخارج خلوية وانزيمات مثل Coagulase وHyaluronidase وLipase وProteinase وPhosphatas وDeoxyribonuoclease والذيفانات المعوية Enterotoxins والذيفانات المحللة للدم Haemolysins والبروتين القاتل لكريات الدم البيض Leucocidin وبروتين A الموجود في الجدار الخلوي الذي له خواص مستضدية، وكذلك لها القابلية على انتاج ذيفان متلازمة الصدمة

السمي1(1 - Toxic Shock Syndrome toxin (TSS والذيفان المسبب للتقشر الجلدي Exfoliative Toxin (Carroll et al., 2016).

تنشأ إمراضية بكتريا Staph. aureus جراء التأثير المشترك لعدد من العوامل المفرزة خارج الخلية التي تشمل الانزيمات والذيفانات مع خصائص الغزو للسلالة الممرضة (Todar, 2008). يمكن ان تكون الاصابة بهذه البكتريا مكتسبة من المستشفى والمجتمع وقد وجد انها تستعمر الجلد وسطح الغشاء المخاطي لـ 20 - 24 % من البشر. مما يعني ارتفاع مخاطر الاصابة بهذه البكتريا (Xie et al., 2011). تعد هذه البكتريا من الممرضات الانتهازية لاخماج المسالك البولية المكتسبة عن طريق المستشفى إذ تلعب بيئة المستشفى دورا مهما في تحديد الانواع المشتركة في أخماج الجهاز البولي. اذ ان المرضى الداخلين الى المستشفى للعلاج يكونون اكثر عرضة للإصابة بمختلف انواع المكورات العنقودية الممرضة (Nimmo and Coombs, 2008). تنتقل هذه البكتريا بين المرضى عن طريق ايدي مقدمي الخدمة الصحية بعد ملامستهم للمريض المصاب (Cooper et al., 2004). وقد توصل Mudur وجماعته (2012) الى ان بكتريا Staph. aureus تعزل في كثير من الاحيان من عينات الادرار التي يتم الحصول عليها من مرضى الرعاية الصحية على المدى الطويل. وارتفاع نسبة الاصابة التي تسببها اذ وجد انها تأتي بالمرتبة الثانية في احداث أخماج المسالك البولية (Saffar et al ., 2008).

اما النوع Staph. epidermidis فتميزت بكونها سالبة لفحص Coagulase، مستعمراتها صغيرة الى متوسطة، غير شفافة، بيضاء الى رمادية ومعظم سلالاتها غير محللة للدم (Patricia , 2014). وتعد من احد المسببات المرضية للعدوى المكتسبة من المستشفيات وهي من الممرضات الانتهازية وترتبط عادة مع الاخماج التي تسببها الاجهزة الخارجية بما في ذلك القثطرة الوعائية وصمامات القلب الاصطناعية فضلا عن الظروف المناعية (Kanai et al., 2014). ارتبط عزل Staph. epidermidis مع خراجات الجروح والخمج الرئوي وأخماج المسالك البولية وخمج الشغاف وخمج السرة وخمج السحايا (Von eiff et al., 2005). موقعها الطبيعي هو الجلد حيث تستطيع ان تسبب الاصابة من وقت الى أخر، ومعظم سلالاتها تنتج مادة مخاطية تساعدها على الالتصاق وهذه المادة تعطي الحماية للكائن من الدفاعات الطبيعية للعائل فضلا عن مقاومة المضادات الحيوية (Goldman and Green , 2009).

اما المكورات العنقودية الحالة للدم Staph . haemolyticus فتعد ثاني المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر المسببة للاخماج المكتسبة من المستشفيات ترتبط غالبا مع ادخال الاجهزة الطبية (Barros et al., 2012). تعد من الممرضات الانتهازية المعروفة والاكثر ترددا من بين المكورات العنقودية السالبة لفحص Coagulase بعد Staph. epidermidis (Daniel et al., 2014). تكون مستعمراتها متوسطة وناعمة وزبدية المظهر وغير شفافة ومحللة للدم من طراز Beta - haemolysis (Patricia , 2014). بكتريا Staph . haemolyticus غير متحركة وغير مكونة للسبورات ولاهوائية اختياريا وتنمو في مدى واسع من المواد مثل الكلوكوز والمالتوز والسكروز وتريهالوز. وهي سالبة لاختبارات Coagulase و DNAase و Urease و Ornithinine Decarboxylase و Oxidase و Phosphatase (Danial et al., 2014). تنمو هذه المكورات بأعداد متوسطة على جلد الانسان، وهي واحدة من بين عدد قليل من المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر التي تستعمر مجرى البول والمناطق المحيطة به في كل من الذكور والاناث. سلالاتها تنتج الذيفانات المحللة للدم Hemolysin والذيفانات المعوية Enterotoxin وغالبا ما تكون متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (Kunin and Steele, 1985).

8-2 : الانزيم الحال للدم Hemolysin

الهيمولايسين هو انزيم ذو تأثير سمي على الخلايا ويتميز بقدرته على تحليل خلايا الدم الحمراء ويلعب دوراً في أخماج المسالك البولية من خلال فعاليته السمية على الخلايا الطلائية للكلية (Mobely et al., 1990). يصنف الهيمولايسين الى ثلاثة انواع تبعا لقابليته على تحليل كريات الدم الحمراء واحداث الامراضية، النوع الاول يحلل الاغشية ويطلق عليه بالتحلل الدموي من نوع بيتا (Beta- hemolysis)، اما النوع الثاني فيكون ثقوباً في الغشاء الخلوي، وتظهر حول المستعمرة منطقة ذات لون اخضر ويطلق عليه التحلل الدموي نوع الفا (Alpha- hemolysis)، اما النوع الثالث فيحطم جدار الخلية ويطلق عليه التحلل من نوع كاما (Gamma- hemolysis)، وهناك بعض الانواع لا تظهر تحللا حول المستعمرات وتسمى البكتريا غير المحللة (Non—hemolytic) (Han et al., 2010).

يعد الهيمولايسين من انواع الانزيمات المحللة للخلايا، إذ يعمل على تحطيم الخلايا الطلائية البولية، اذ يعمل بعد ارتباطه بأغشية هذه الخلايا على تكوين ثقوب فيها تتسبب في خروج ATP منها، ثم موت الخلية. وتكون الاليات المنتجة للهيمولايسين والمسببة لاخماج الكلية وحويضها اكثر سمية

لخلايا النبيبات البولية الطلائية (Donnenberg et al., 1994). وتشير دراسات اخرى الى ان سميته ناتجة من تدمير خلايا المسلك البولي وتحرير اللايسوزايم والانزيمات المرتبطة معه وتدمير كريات الدم البيض خاصة والخلايا الأحادية النواة (Aitziber et al., 2003). كما يعد الهيمولايسين هذا عاملا منخرا ساما خلويا (Totoxic Necrotising Factor). اذ يسبق الخمج ويحث على افراز الانترلوكين (InterLeukin) مما يمهد للإصابة بالعديد من الامراض الكلوية (Raksha et al., 2003).

يعد الهيمولايسين من السموم الخارج خلوية المسببة للأخماج من خلال تأثيره على أغشية الخلايا وتحللها بإحداث الثقوب فيها، مثل كريات الدم الحمراء للإنسان والحيوان (Tomita and Kamio, 1997). اذ ان الالفا هيمولايسين يؤثر مباشرة في الطبقة المخاطية للمثانة مسببا اخماج المجاري البولية ويشارك ايضا في تدمير الخلايا الطلائية المخاطية خاصة بالمثانة فضلا عن ذلك ان هذا السم يعمل على تدمير وظيفة الخلايا اللمفاوية (Lymphocytes) (باقر واخرون ، 2001). اما البيتا هيمولايسين فيعمل على احداث تدمير كامل لكريات الدم الحمر إذ يصبح الوسط رائقا حول المستعمرات على اكار الدم (Soloaga et al., 1999).

يعد الهيمولايسين من عوامل الضراوة الرئيسة للبكتريا المسببة للاخماج خارج الامعاء، اذ ان تلف الانسجة يسهل انتشار البكتريا ويحرر المواد المغذية للمضيف ويمكن ان يحور المسارات الايضية للمضيف مما يدل على انه يوثر في العديد من العمليات بما في ذلك الاستجابات الالتهابية وبقاء الخلية المضيفة وديناميكيات هيكل الخلية (Schmidt et al.,1995). ان ميكانيكية عمل الهيمولايسين في احداث الامراض إما ان تكون بصورة مباشرة عن طريق تحليل كريات الدم الحمراء ثم يسبب تحرر الهيموغلوبين الذي يعد مصدرا مهما لنمو البكتريا وتكاثرها أو عن طريق التداخل مع العمليات الدفاعية داخل الجسم (Goni and Ostolaza ,1998). اذ ان الية عمل الهيمولايسين تعتمد على ارتباطه بمستقبلات (Glycoprotein) ثم يتحول عن طريق البلمرة الى مركب معقد قادر على اختراق الطبقة الثنائية الدهون من الغشاء الخلوي ويكون المسام التي تؤدي الى تحلل الخلية نتيجة لتغير الضغط (Aitziber et al., 2001). فهو يهاجم الخلايا المناعية للمضيف دون ان يحفز تحللها ولكنه بالمقابل يمنعها من اداء وظيفتها (Mulvey et al., 2000).

تتميز بكتريا E. coli بقابليتها على انتاج الهيمولايسين الذي يلعب دورا مهما في امراضيتها (Dhakal and Mulvey , 2012). اذ تكون سلالاتها المحللة للدم اكثر قدرة لتسبب المرض من غير المحللة (Grover et al., 2013). تستطيع هذه البكتريا انتاج العديد من انواع الهيمولايسين منها بروتينات خارج خلوية تتضمن الالفا هيمولايسين (Alpha – hemolysin) وبروتينات مرتبطة بالخلية من نوع بيتا (Beta – hemolysin) (AL .Chalabi et al., 2010) يجهز الهيمولايسين E.coli بخاصية انتقاء الحديد عن طريق تحرير الحديد من كريات الدم الحمر، ويزيد من الامراضية عن طريق تدمير الخلايا الطلائية ومنع عملية البلعمة (KuKanur et al., 2015).

ان اهم عوامل الضراوة التي تنتجها سلالات E.coli هو البروتين الدهني المسمى الفا- هيمولايسين (HlyA)، الذي يرتبط مع عدوى المسالك البولية العليا مثل خمج الحويض والكلية (Johnson, 1991). ويعمل الالفا هيمولايسن على تكوين المسام، وهو ينتمي الى عائلة Repeats In Toxin(RTX) اذ تعد هذه السموم واسعة الانتشار في العائلة المعوية (Bien et al., 2012). وجد ما يقارب 40 - 50% من E. coli المعزولة من المرضى الذين يعانون من أخماج المسالك البولية تشفر الى السم الذي يشكل المسام المعروف بـالفا هيمولايسين (Hannan et al., 2008)، فضلا عن ذلك فأن حوالي 50% من جميع حالات خمج الحويض والكلية الذي يؤدي الى مضاعفات الكلى سببها الالفا - هيمولايسين. بكتريا E.coli المنتجة للألفا - هيمولايسين يسبب تلف بطانة الاوعية الدموية وتضيق الاوعية الكلوية (Bien et al., 2012). ويكون الثقوب في الاغشية ويحلل عدداً من انواع خلايا الثديات، بما في ذلك كريات الدم الحمر (Welch et al., 1991) إذ ان الالفا الهيمولايسين المنتج من بكتريا E.coli يحلل الخلايا اللمفاوية اما البيتا هيمولايسين فهو يثبط عملية البلعمة والانجذاب الكيمياوي لكريات الدم البيض (Raksha et al., 2003).

يتطلب انتاج الهيمولايسين واطلاقه اربعة جينات هي hlyA و hlyB، hlyC و hlyD (Johanson, 1991). يشفر الجين hlyA للسم نفسه داخل السايتوبلازم للخلية البكتيرية المصنعة له اما hlyC فيكون ضروريا لنضج هذا السم في حين الجين hlyB فيعمل على تكوين المسام في الغشاء الداخلي للخلية البكتيرية المصنعة له بينما الجين hlyD يساهم في عبور جزيئة الهيمولايسين الى الفراغ البيريبلازمي والغشاء الخارجي للخلية البكتيرية المصنعة (Hyland et al., 2001). ان عملية افراز الهيمولايسين من E. coli تتم بخطوتين الاولى تجمع الهيمولايسين المنتج من الخلية البكتيرية في الغشاء السايتوبلازمي بعملية معتمدة على الطاقة تتطلب الجين hlyB والثانية اطلاق الهيمولايسين من الغشاء الخارجي الى البيئة بعملية لا تتطلب طاقة ولكنها تحتاج الحرارة وهذا يتطلب hlyD (Hacker and Hughes, 1985). التراكيز العليا للجين hlyA قادرة للتشفيرعلى

تحليل كريات الدم الحمر وإنوية الخلايا المضيفة وهذه العملية قد تمكن مسببات الاخماج خارج الامعاء مثل سلالات بكتريا E.coli المسببة لاخماج المسالك البولية لعبور الحواجز المخاطية وتدمير الاستجابة المناعية للخلايا وزيادة الحصول على المواد المغذية ومخزون الحديد، اما التراكيز المنخفضة من الجين hlyA فتستطيع حث الموت المبرمج للخلايا المضيفة الهدف بما في ذلك خلايا العدلات والخلايا اللمفاوية وخلايا الكلى وتزيد من تقشير الخلايا الظهارية للمثانة (Bien et al., 2012).

ويعد الهيمولايسين واحدا من اهم عوامل الضراوة لجنس المكورات العنقودية، اذ تنتج Staph. aureus التي هي من الانواع الموجبة لأنزيم التخثر اربعة انواع من الهيمولايسين (الفا و بيتا و دلتا و كاما)، وهذه السموم متميزة ومعروفة جدا فضلاً عن الية عملها. كما ان المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر (CoNS) نادرا ما تنتج الالفا او بيتا هيمولايسين في حين السم كاما يمكن الكشف عنه بسهولة بوساطة اختبار بسيط من انحلال الدم التأزري الذي وجد في معظم المكورات السالبة لأنزيم التخثر (CoNS) (Mak et al., 2008). يعد الالفا هيمولايسين للمكورات العنقودية عامل الامراضية الرئيس لأنه محلل للدم وناخر للجلد وبالإضافة الى التأثيرات السمية العصبية، كما ان البيتا هيمولايسين هو سفنغومايلين (Sphingomyelin) التي تنشط بشكل كبير ضد كريات الدم الحمر للأغنام والابقار، بينما الدلتا والالفا هيمولايسين تحفزان تشكيل المسام وتغيير نفاذية غشاء الخلية (Kathiravan and Sundaramanickam, 2013).

الالفا - هيمولايسين لبكتريا Staph. aureus هو بروتين غير متجانس يعمل على طيف واسع من اغشية الخلايا الحقيقية النواة (Carroll et al., 2016). وان معظم سلالاتها التي تسبب الامراض للإنسان منتجة لهذا السم وهو سام لمدى واسع من انواع الخلايا بما في ذلك كريات الدم الحمر والخلايا البيض وخلايا الكبد والصفائح الدموية ويعطل العضلات الملساء في الاوعية ويعتقد انه يكون وسيطا هاما في تلف الانسجة في الاخماج التي تسببها Staph .aureus (Murray et al.,2013).

عزل الجين hla الذي يشفر لسم الالفا - هيمولايسين من قبل Gray و Kehone عام (1984) من كروموسوم بكتريا Staph. aureus والبروتين الناضج وزنه الجزيئي 34,000 دالتون وهو حاوٍ على 298 حامضاً امينياً ولا يحتوي الحامض الاميني Cystine (Orielly et al., 1990). وجد ان الفا هيمولايسين عبارة عن وحدة واحدة ترتبط بأغشية الخلايا المستهدفة إذ تسبب تحليل لكريات الدم الحمر والبيض والصفائح الدموية للإنسان.

ووجد ايضا ان ميكانيكية عمل هذا النوع من التحلل الدموي مماثلة لعملية التحلل الازموزي الذي يحصل للخلايا الحية (Butt et al., 1998). تتمثل عملية التحلل عندما تفرز جزيئات الالفا - هيمولايسين من بكتريا Staph. aureus وتتداخل هذه الجزيئات في غشاء الخلية المستهدفة مؤلفة شكلا اسطوانيا سباعياً (Valeva et al., 1997). هذا التركيب هو الذي يسبب تحللا للخلية حقيقية النواة وعندما يتكون هذا الشكل في غشاء الخلية يحدث ثقباً قطره (1- 2) نانوميتر (Belmonte et al., 1987). وقد توصل Valeva وجماعته عام (1997) الى ان هذا الثقب يتكون بصورة تدريجية ويسمح بتدفق سريع لأيونات البوتاسيوم وجزيئات صغيرة اخرى ويسمح بدخول ايونات الصوديوم وايونات الكالسيوم والجزيئات الصغيرة التي لا يزيد وزنها الجزيئي عن 1000 دالتون ما يؤدي الى الانتفاخ الازموزي لكريات الدم الحمر ثم انفجارها.

البيتا هيمولايسين Beta-hemolysin يسمى ايضا (Sphingomyelin) وزنه الجزيئي 35,000 دالتون تنتجه معظم سلالات Staph . aureus المسؤولة عن الامراض في الانسان والحيوانات. هذا السم له خصوصية (Sphingomyelin) وسام لمجموعة متنوعة من الخلايا، بما في ذلك كريات الدم الحمر والليفية والكريات البيض (Murry et al., 2013). تعتمد الفعالية التحليلية لهذا السم على تركيز مادة (Sphingomyelin) في اغشية الخلايا. تعد كريات الدم الحمر في الاغنام اكثر حساسية للتأثر بهذا السم حيث تتميز بمحتواها العالي من هذه المادة إذ تشكل 51% من مجموع الدهون (Titball et al., 1993). كما ان البيتا هيمولايسين معروف ايضا بسم الحرارة - البرودة (Hot - cold)، بسبب الفعالية التحليلية لهذا السم على اطباق اكار الدم للأغنام، اذ ان هذا السم عند درجة الحرارة 37 مْ يتفاعل مع كريات الدم الحمر للأغنام لكن لا يحللها، وفي حالة وضع الخلايا في درجة حرارة 4 مْ يتم تحلل الخلايا، ويلاحظ في ذلك عدم وجود الهيمولايسين في اطباق اكار الدم عند درجة الحرارة 37 مْ اذ يتم التحلل الكامل عند درجة الحرارة 4مْ (Huseby et al., 2007).

وتشير دراسات متعددة الى دور الهيمولايسين الفا وبيتا المنتج من Staph. aureus في تدمير الاغشية الخلوية للخلايا الملتهمة وبذلك التقليل من كفاءة عملية البلعمة (Gentry et al., 1995). ووجد ان العديد من الحالات المرضية الناتجة عن هذه البكتريا ومنها حالات النخر في الأعضاء مثل الكبد ترجع الى انتاجية هذه البكتريا لهذه الذيفانات ومنها الهيمولايسين إذ وجد ان الاشخاص الذين يعانون من هذه الحالات المرضية يكونّ

لـديهم انخفاضـا واضـحا فـي مناعـة الجسـم الخلويـة بسـبب تـأثيره فـي الخلايـا المناعيـة الملتهمـة (Johnson et al., 1981).

9-2 : عوامل الضراوة Virulence Factors

تعزى ضراوة البكتريا إلى العديد من الاليات التي تستخدمها في احداث الامراضية في جسم المضيف والتي تعرف بعوامل الضراوة والتي تمثل مقياساً لدرجة الامراضية التي تحدثها البكتريا في جسم المريض لذا تصبح البكتريا قادرة على تجاوز الخطوط الدفاعية وتعمل على تدمير النسيج الذي تستوطن فيه (Wilson et al., 2002) ومن هذه العوامل:

1-9-2: المحفظة Capsule

العديد من انواع البكتريا تنتج موادَ خارج خلوية تتركب من مواد كيميائية مختلفة وغالباً ما تتكون من متعدد السكريد (Polysaccharide) ويطلق عليها مصطلح المحفظة (Capsule) او الطبقة المخاطية (Slime layer) وتحيط بالخلية البكتيرية من خارج الجدار الخلوي (Brooks et al., 2007). يختلف تركيب المحفظة حسب نوع البكتريا، ففي بكتريا Streptococcus pyogens تتركب من حامض Hyaluronic acid (Glick et al., 2014). او قد تتركب من حامض Sialic acid مثل بكتريا Neisseria meningitis، وتقوم المحفظة بدور اساسي في حماية البكتريا ضد الية الجهاز المناعي وذلك بمقاومتها للمتمم (Clements et al ., 2008). تتكون المحفظة من انواع مختلفة من السكريات تتراوح من (4-6) أنواع، ومن هذه السكريات Galactose و Fructose أوN-actyl Glucosamin ، فضلاً عن السكريات هناك عدد من الحوامض مثل glucouronic acid و galactouronic acid و Uronic acid و pyrunic acid تدخل في تركيب المحفظات المختلفة (Pan et al., 2008). على الرغم من اختلاف التركيب الكيميائي للمحفظة الا انها تقي البكتريا من الاستجابة الالتهابية مثل مقاومة عملية البلعمة من قبل الخلايا العدلة (Jawetz et al., 2004). فضلا عن ذلك فانها تحمي البكتريا من ازالتها من القناة البولية (Slavcher et al ., 2009). اذ لها دور مهم في الالتصاق بسطوح الخلايا الطلائية بالإضافة الى ذلك تساعد البكتريا على الالتصاق بسطوح الادوات الطبية مثل انبوب القثطرة، وبذلك تعمل على احداث الاصابة في الاشخاص الذين يستخدمون هذه الادوات (Jawetz et al., 2004).

تعد المحفظة من عوامل الضراوة الرئيسة المرتبطة بسلالات E.coli المسببة لاخماج المسالك البولية (King et al., 2015). تمثل المحفظة حاجزاً وقائياً اضافياً مما يجعل المضيف اكثر تأثراً

وتوفر الحماية للبكتريا من الجفاف وتقوم بدور مضاد للبلعمة ومقاوم للمتمم. كما وجد ان بعض مستضدات المحفظة ولاسيما K1 وانماطاً معينة من المستضد O ترتبط بقوة مع الاصابات خارج الامعاء مثل تسمم الدم وخمج السحايا وأخماج المسالك البولية، تمثل السلالات ذات النمط المصلي (K1) والمكونة للمحفظة 80% من جميع سلالات E.coli المعزولة من حالات خمج السحايا في الاطفال الحديثي الولادة وتجرثم الدم في الانسان وايضا المسببة لاخماج المسالك البولية (Mark et al., 2004). صُنفت كبسولات بكتريا E.coli الى اربع مجاميع على اساس عدد من المعايير الكيموحيوية والوراثية، ويرتبط التعبير عن كبسولات المجموعة الثانية التي تمثل K1 مع عزلات E.coli المسببة للأمراض بما فيها المسببة لاخماج المسالك البولية (King et al., 2015). وجد ان كبسولات K1 هي مضادة للبلعمة وهذه السمة من شأنها ان تكون مفيدة للبكتريا من اجل البقاء في الدم والانسجة (Mark et al., 2004). وتغطى الطبقة الخارجية في العديد من المكورات العنقودية بالمحفظة المتعددة السكريات وقد حُدّدَ احد عشر نوعاً من الانماط المصلية المحفظية في Staph. aureus وقد وجد ان النمطين المصليين 1 و 2 يرتبطان بمحفظات سميكة جدا ولكن نادرا ما ترتبط مع الامراض التي تصيب البشر، بالمقابل الانماط المصلية 5 و 8 تترافق مع غالبية الامراض في الانسان (Murray et al., 2013). وتعد المحفظة المتعددة السكريات من عوامل الضراوة المهمة لبكتريا Staph . haemolyticus (Flahaut et al .,2008). اذ ان بعض سلالاتها تكون قادرة على انتاج المحفظة المتعددة السكريات. ووجد ايضا ان بكتريا Staph . epidermidis تمتلك محفظة متعددة السكريات تسمح لها بالالتصاق بالأسطح وتكوين الاغشية الحيوية (Bek-Thomson et al., 2008).

2-9-2 : الالتصاق وعوامل الاستعمار Adhesion and Colonization Factors

الالتصاق هو عملية التفاعل المعقدة بين البكتريا وسطوح انسجة الخلايا، وهناك عدة عوامل خارجية تؤثر على الالتصاق بما في ذلك كراهة الماء (Hydrophobicity) والشحنة الموجودة على سطح الخلايا وتفاعلات المستقبلات الموجودة في سطح خلايا المضيف فضلاً عن عوامل الالتصاق التي تمتلكها الخلية البكتيرية (Carroll et al., 2016). وتمثل القدرة على الالتصاق بسطح الخلية المضيفة الخطوة الاولى والاساسية للاستعمار لان ذلك يقلل من قدرة المضيف على التخلص منها (Phan et al., 2011). اذ يحدث ارتباط بين جزيئات سطحية توجد على سطح الكائن المسبب للإصابة تعرف هذه الجزيئات بالروابط (Ligands) او اللواصق (Adhesin) مع مستلمات سطحية متتامة معها توجد على سطح خلية المضيف (Tortora et al., 2016). وغالباً ما تكون مستلمات المضيف اللواصق التي هي عبارة عن بروتينات سكرية مثل سكر المانوز او بروتينات دهنية

(Tortora et al., 1998). وان اللواصق لها القابلية على التلازن مع كريات الدم الحمراء لمختلف انواع الكائنات كالانسان او خنازير غينيا او الدجاج او الاغنام لذلك تعرف احيانا بالملزنات الدموية hemagglutinin (Duguid and Old,1980). وقد وجد ان المستلمات المميزة المرتبطة بالأهلاب (Fimbrial – associated receptor recognition) تمكن البكتريا من الالتصاق بأهداف مختلفة مثل المواد اللاعضوية والجزيئات الحيوية العالية التعقيد، إذ تكون هذه القدرة ضرورية في استيطان البكتريا للأسطح الطلائية لأنسجة اللبائن، اذ يلعب التداخل بين اهلاب الالتصاق والمستلمات المتتامة معها دوراً مهماً في تحديد النسيج المضيف للبكتريا الممرضة (Ahmed et al., 2007).

واهلاب البكتريا هي عبارة عن بروزات خيطية قصيرة تكون مستقيمة ودقيقة تبرز من سطح البكتريا وترتبط بالغشاء الخلوي، يبلغ طولها حوالي (2 - 10) مايكروميتر ويبلغ قطرها (1 - 11) نانوميتر وتتكون من وحدات كروية متكررة من بروتين الهدبين (Pillin) إذ تبلغ الكتلة الجزيئية لها حوالي (15 - 26) كيلودالتون (Murray et al., 1999) اذ تكون الاهلاب بشكل تراكيب سطحية معقدة والتي هي بشكل عام تتوسط الالتصاق بالمستقبلات السطحية للمضيف، تمتلك العديد من سلالات E. coli الخمل او الاهلاب Fimbriae (Pili) التي تلعب دوراً هاماً في التصاق هذه البكتريا (Nielubowiez and Mobley, 2010). وقد وجد ان سلالات بكتريا E. coli المسببة لأخماج المسالك البولية تمتلك القابلية على انتاج انواعٍ مختلفة من اللواصق المهمة لتميز البكتريا والتصاقها بالمستقبلات الموجودة على طول القناة البولية، والتي تشمل الاهلاب من النوع الاول Type 1fimbriae التي يشفر لها من خلال عنقود الجين (fim gene cluster) واهلاب P المشفر بوساطة الجين pap (Antao et al., 2009). ان النوعين الرئيسين من الاهلاب (Type 1 and P fimbriae) وجدت في البكتريا المعزولة من المرضى الذين يعانون من أخماج المسالك البولية وهي تتشابه شكلياً ولكنها تختلف في قدرتها على التلازن (Svanborg and Godaly, 1997). إذ يشار الى اهلاب النوع الاول Type - 1fimbriae بالاهلاب الحساسة للمانوز D - manose التي تميل الى الارتباط ببعض البروتينات السكرية في مخاط الادرار (Mandella, 2000). اذ تعد اهلاب النوع الاول شائعة جداً بين سلالات E . coli المتعايشة والمسببة لاخماج المسالك البولية إذ انها تعد من اهم عوامل الضراوة المسببة لاخماج المسالك البولية (Bahrani - Mougeot et al., 2002). وقد وجد ان السلالات المكونة لهذا النوع من الاهلاب ليس له القدرة على تكوين المستعمرات في الامعاء والرئتين في حين يكون له دور في تكوين المستعمرات في المسالك البولية (Martin et al., 2008). وقد وجد ان سلالات E . coli الاكثر ضراوة والمعزولة من المرضى الذين يعانون خمج الحويض والكلية وأخماج المسالك البولية المتكرر تحتوي انواعاً اخرى من الاهلاب ولا سيما اهلاب خمج الحويض والكلية

(Svanborg and Godaly , 1997). وقد تم التحري عن وجود الاهلاب بصورة رئيسة بالاعتماد على قابليتها على تلازن كريات الدم الحمر لأنواع الحيوانات المختلفة (Wiskur et al., 2008). إذ وجد ان الاهلاب تمتلك نسق ارتباط متخصصاً ومختلف لخلايا الدم الحمراء التي تكون مأخوذة من مصادر مختلفة على اساس وجود جزيئات المستقبلات على هذه الخلايا فمثلاً اهلاب الالتصاق من النوع Type 1fimbrie تعمل على تلازن كريات الدم الحمر للدجاج وخنازير غينيا، في حين تعمل الاهلاب من نوع P – fimbriae على تلازن كريات الدم الحمر للإنسان (Brook et al., 2007).

اما فيما يتعلق بالمكورات العنقودية فتتميز بعدم احتوائها على عوامل الالتصاق المرتبطة بالاهلاب (Donnenberg, 2000)، فالتصاق Staph .aureus قد يكون بوساطة البروتينات الموجودة على سطح الخلية المحددة او ان يحدث نتيجة التفاعلات بين البروتينات الموجودة على سطح الخلية وبروتينات المضيف مثل الفايبرونكتين (Fibronectin) والكولاجين (Collagen) والفايبرينوجين (Fibrinogen) (Foster et al., 1998). اذ تحدث عملية الاستيطان لبكتريا Staph. aureus بوساطة هذه المركبات الخارج خلوية وعبر ملتصقات بروتينية سطحية تعرف بالمكونات الاحيائية المميزة والملتصقة بجزيئات الارضية (Grundmeier et al., 2004). فضلا عن ذلك يقوم عامل التكتل (Clumping Factor) للبكتريا بالارتباط مع الفايبرينوجين ثم تحصل عملية الالتصاق عن طريق انتاج مركبات سطحية تمكنها من الاستعمار مثل الملتصقات البروتينية (Protein Adhesion) والملصقات المتعددة السكريات (Polyscharide Intercellular Adhesions) (Backer et al., 2006).

3-9-2 : تكوين الاغشية الحيوية Biofilms Formation

الغشاء الحيوي هو تجمع الكائنات المجهرية والتصاقها بالأسطح إذ تكون محاطة ببوليمرات خارج خلوية (Extracellular Polymers) تحتوي سكريات متعددة اذ يشارك الغشاء الحيوي في حدوث الاصابة والمقاومة للمضادات الحيوية (Kokare et al., 2009). تعمل البوليمرات الخارج خلوية على تثبيت الغشاء الحيوي بالأسطح فهي توفر الحماية للخلايا البكتيرية الموجودة بداخله من الظروف البيئية غير الملائمة مثل الجفاف والمواد السامة للبكتريا وتغير pH والاشعة فوق البنفسجية (Decharvalho, 2007). إذ يكون للظروف البيئية المحيطة دور هام في تكوين الاغشية الحيوية وذلك من خلال توفير المغذيات والمحتوى المائي فضلاً عن وجود الاسطح الصلبة (Espinoseurgel, 2003). تعمل الاغشية الحيوية نقاطَ ارتباط للبكتريا بسطوح المواد الحية والمواد غير الحية، اذ تكون هذه الاغشية منظمة جيداً وبهيئة تجمعات احادية النوع البكتيري او من انواع

متعددة ويتألف من طبقة واحدة مستمرة او من عدة طبقات وله تركيب ثلاثي الابعاد او قد يتخذ اشكالاً اخرى (Bagge et al., 2001). وقد اشار Cucarella وجماعته (2004) الى وجود علاقة وثيقة بين قدرة الاحياء المجهرية على تكوين الاغشية الحيوية ودورها على احداث الامراضية وتكوين الالتهابات المزمنة، اذ ان السلالات البكتيرية المكونة للأغشية الحيوية ستمتلك القدرة على استيطان جسم المريض وتصبح اكثر مقاومة للمضادات الحيوية، كما ان السلالات تعمل على انتاج بروتينات تعرف بالبروتينات المرتبطة بالغشاء الحيوي Biofilm Aassociated - Protiens (BAP) اذ تقوم هذه البروتينات بتسهيل تكون الغشاء الحيوي المتعلق ببقاء الجرثومة مدة اطول في جسم المضيف، ويستجيب الجسم المعرض للإصابة مناعياً لهذه البروتينات لذلك يلاحظ وجود اجسام مضادة لهذه البروتينات في مصل المريض (Anti - BAP antibodies).

وقد ذكرت دراسات متعددة ان العائلة المعوية Enterobacteriaceae تُعَدَ من اكثر البكتريا تكويناً لطبقة الغشاء الحيوي على سطوح المعدات الطبية داخل جسم المريض (جهاز القثطرة البولية وجهاز تنظير المثانة) مسببة أخماج مرتبطة بالغشاء الحيوي كاخماج المسالك البولية (Ryder, 2005). اذ ان البكتريا التي تكون الاغشية الحيوية تتمكن من استيطان الاجهزة الطبية كجهاز القثطرة (Costerton et al., 1999). وان وجود الغشاء الحيوي يساهم في تطور مقاومة سلالات E .coli المرضية الذي ينتج عنه حدوث اخماج المسالك البولية المزمنة الذي قد يودي الى تكوين الحصى (Hanna et al., 2003).

وجد ان قدرة المكورات العنقودية على تشكيل الاغشية الحيوية يعد واحداً من اهم عوامل الضراوة التي تسهل ارتباط المكورات العنقودية واستيطانها للأنسجة، اذ انه يساهم في التخلص من الدفاعات المناعية للمضيف مما يودي الى الاصابات المتكررة او المستمرة نتيجة لصعوبة القضاء على المسببات المرضية (Darwish and Asfour, 2013). كما ان المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر المكونة للأغشية الحيوية تزداد مقاومتها للمضادات الحيوية حوالي 100 الى 1000 مرة اكثر من التي لا تكونه (Forrest and Tamura , 2010).

10-2: مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Bacterial Resistance to Antibiotics

يعد نشوء المقاومة للمضادات الحيوية من المشاكل الصحية الخطيرة والمتزايدة التأثير، إذ ان جميع الاصابات التي تسببها البكتريا تحدث غالباً بفعل السلالات المقاومة للمضادات الحيوية التي تعد من المشاكل الصحية في العديد من المستشفيات في جميع انحاء العالم وبخاصة ما يتعرض له المرضى الذين يتناولون الادوية المثبطة للمناعة (Grundmann et al., 2011). تنتج المقاومة للمضادات

الحيوية من التغيرات في المحتوى الوراثي للخلية البكتيرية وبتأثير اليات عديدة منها حدوث طفرات وراثية تلقائية في المواقع المسيطرة على هذه المضادات وبذلك تحصل المقاومة الكروموسومية لهذه المضادات، او من خلال جينات المقاومة المحمولة على البلازميدات او العناصر القافزة (Transposons) اذ تنتقل صفة المقاومة من السلالات البكتيرية المقاومة الى البكتريا الحساسة من خلال البلازميدات وبخاصة الاقترنية منها التي تؤدي دورا هاما في انتقال صفة المقاومة (Wellington et al., 2013). كما ان الاستعمال المتزايد والعشوائي للمضادات الحيوية ادى الى ظهور العديد من السلالات البكتيرية المرضية التي اكتسبت المقاومة لهذه المضادات (Diens and Rolain, 2013). وتوصف البكتريا التي تحتوي عدة جينات مقاومة بمتعددة المقاومة للأدوية Multi Drugs Resistant (MDR) (Tacconelli et al., 2008).

2-10-1: مقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام Bacterial Resistance to B – Lactams

تعد هذه المجموعة من المضادات من اكثر المضادات الحيوية فعالية ضد البكتريا، اذ تكون الية عملها ضد الجدار الخلوي للبكتريا مسببة تحللها ثم موتها (Brook et al., 2007). وبذلك فهي مثبطات انتقائية، اذ ان الخطوة الاولى في عمل مضادات البيتالاكتام هي ارتباطها مع مستقبلات الخلايا التي تعرف بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين Penicillin - Binding Proteins (PBPs) (Carroll et al., 2016). ويوجد في بكتريا E.coli سبعة انواع من هذه البروتينات وهي (la, lb, 2, 3, 4, 5, 6) مرتبة حسب الوزن الجزيئي (Davey et al., 2015). إذ ان ارتباط مضادات البيتالاكتام مع (PBPs) تؤدي الى ايقاف عملية تخليق الجدار الخلوي ثم تؤدي الى موت الخلية نتيجة لعدم ثباتها عند الضغط الازموزي الواطئ، تمتلك مضادات البيتالاكتام طيفا واسعا فهي تعمل ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Patricia, 2014). وتشمل مجموعة من المضادات اهمها Penicillin و Cephalosporin و Carbapenens و Monobactam (Diaz - Mejia et al., 2009).

تقاوم البكتريا مضادات البيتالاكتام اما عن طريق التغيير في موقع الهدف وذلك اما بحدوث طفرة وراثية في الجين الذي يعمل على المضاد الهدف او من خلال التغيير الكيمياوي في الانزيم الذي يعمل عليه المضاد (Guilfoile et al., 2007). كما ان البكتريا السالبة لصبغة كرام تقاوم مضادات البيتالاكتام من خلال التغيير في نفاذية غشاء الخلية الذي ينتج عنه فقدان بعض بروتينات القنوات (porins) مما يجعل من الصعب على المضادات الحيوية الوصول الى الخلايا (Fernando and Kuma, 2012). وتحصل المقاومة ايضا عن طريق انظمة التدفق (Efflux Pump System)، اذ

تلعب هذه الالية دورا هاما في اكتساب المقاومة لطيف واسع من المضادات الحيوية، التي يُقذَف من خلالها المضاد من داخل الخلية الى خارجها حيث انها تكون غشاء خاصاً يساعد الغشاء الداخلي والفسحة البيريبلازمية في احتجاز المضاد الحيوي وقذفه خارج الخلية البكتيرية (Mendonca, 2009). تحدث المقاومة لمضادات البيتالاكتام ايضا من خلال انتاج انزيمات البيتالاكتاميز، اذ يعد انتاج هذه الانزيمات من العوامل الاساسية لمقاومة المضادات الحيوية العائدة لمجموعة البيتالاكتام (Valverde et al., 2004). تحطم انزيمات البيتالاكتاميز في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام مضادات البيتالاكتام من خلال مهاجمة حلقة البيتالاكتام وكسر اصرة الامايد (Amide Bond) مما يجعلها جزيئات غير فعالة بايولوجيا (Al-Jubori et al., 2012). وتكون الجينات المشفرة لهذه الانزيمات التي تدعى bla genes محمولة اما على الكروموسوم او البلازميد (Fluit et al., 2001).

2-10-2: مقاومة البكتريا لمضادات الامينوكلايكوسيدات Bacterial Resistance to Aminoglycosides

الامينوكلايكوسايدات مجموعة من المضادات الحيوية القوية الواسعة الطيف وتكون ذات تاثير قاتل (Bacteicidal) للبكتريا (Wang et al., 2012). إذ تعمل على تثبيط تصنيع البروتين بوساطة الارتباط مع موقع الهدف في الوحدة الرايبوسومية الصغيرة (Subunit 30_S) التي تمنع تكوين المعقد ثم تمنع تكوين الاواصر الببتيدية وكذلك تكوين البوليمرات (Brook et al., 2007). وهي تشمل مجموعة من المضادات الحيوية منها Amikacin و Gentamicin و Kanamycin و Neomycin و Netilmicin و Sisomicin و Streptomycin و Tobramycin وتكون متشابهة في الخواص الحركية والتركيبية والدوائية والسمية (المرجاني، 2011).

يكون مضاد الجنتاميسين فعالاً ضد العديد من سلالات البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Todar, 2008). تحصل المقاومة في بكتريا المكورات العنقودية ضد الجنتاميسين سريعا نتيجة الطفرات الوراثية، كما ان البكتريا الموجبة لصبغة كرام المقاومة للجنتاميسين تكون حساسة للاميكاسين الذي يكون مقاوماً للانزيمات المحورة. في حين المقاومة التي تحصل في البكتريا السالبة لصبغة كرام تعزى في معظم الحالات الى انزيمات بروتينية مشفرة من بلازميدات محورة طافرة للامينوكلايكوسايد (Katzung et al., 2009). اذ انها تنتج انزيمات مثبطة لهذه المضادات وهي Adenylating enzyme و Acetylating enzyme وPhosphorylating enzyme (Brook et al ., 2001). كما ان المقاومة للاميكاسين وبعض الامينوكلايكوسايدات الاخرى تعتمد

على عدم نفاذية المضاد بسبب التغيير في نفاذية الغشاء الخارجي الذي يضعف النقل النشط في الخلية (Carroll et al., 2016).

2-10-3: مقاومة البكتريا لمضادات الكوينولينات Bacterial Resistance to Quinolones

تشمل هذه المجموعة عدة مضادات جرثومية اذ تمتلك طيفا واسعا من الفعالية ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام إذ تكون ذات تأثير قاتل للبكتريا (Bactericidal) (Brook et al., 2004). تعمل هذه المجموعة على تثبيط تخليق DNA البكتيري من خلال ايقاف عمل انزيم DNA gyrase او ما يسمى TopoisomeraseII المسؤول عن جعل الكروموسوم البكتيري فائق اللف، ثم يحدث الموت السريع للبكتريا (Madigan et al., 2003)، فضلاً عن ايقاف عمل انزيم Topoisomerase IV الذي ينتج عنه اعاقة انفصال DNA المتضاعف (Replicated DNA) خلال عملية الانقسام الخلوي (Fluit et al., 2001). ان انزيم Topoisomerase IV يكون هو الهدف في البكتريا الموجبة لصبغة غرام، بينما انزيم DNA gyrase يكون هو الهدف في البكتريا السالبة لصبغة غرام (Bennett and Brown, 2008).

تقسم هذه المجموعة من المضادات بالاعتماد على تركيبها وفعاليتها المضادة للجراثيم الى اربعة اجيال فمضاد Nalidixic acid يمثل احد مضادات الجيل الاول ويستخدم في علاج التهابات المسالك البولية اما الاجيال الاخرى التي اطلق عليها مجموعة Fluoroquinolones فتشمل Ciprofloxacin و Livofloxacin و Ofloxacin و Norfloxacin و Sparfloxacin (Carroll et al., 2016). تقاوم البكتريا هذه المجموعة من المضادات عن طريق احداث تغيير في الموقع المستهدف لارتباط المضاد الى الانزيم، إذ يحدث التغيير في GyrA الذي يعد من الوحدات البنائية لانزيم DNA gyrase (Brisse et al., 1999). وتقاوم بكتريا المكورات العنقودية هذه المجموعة من المضادات من خلال احداث تغيير في هيئة انزيم Topoisomerase IV وبذلك تقل الفة الانزيم للمضاد (Mycek et al., 2000).

2-10-4 :مقاومة البكتريا لمضادات التتراسايكلين Bacterial Resistance to Tetracyclin

يعد من المضادات المثبطة لنمو البكتريا (Bacteriostatic) الواسعة الطيف ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام. اذ تعمل هذه المضادات على منع عملية تخليق البروتين في البكتريا عن طريق الارتباط مع الوحدة الرايبوسومية (30s) ثم تمنع ارتباط Aminoacyl-Transfer RNA(TRNA) بالوحدة الرايبوسومية ومعقد الرايبوسوم mRNA

(Murray et al., 2013). الاستعمال العشوائي لهذه المضادات سبب ظهور بكتريا مقاومة لها في اغلب الانواع البكتيرية التابعة للعائلة المعوية التي تقع تحت سيطرة بلازميد انتقالي (Brook et al., 2007).

2-10-5 : مقاومة البكتريا لمضادات الريفامبسين Bacterial Resistance to Rifampicin

يعد من المضادات المثبطة للبكتريا ينتج من بكتريا Streptomyces mediterranei، ويوصف بانه مشتق شبه مصنع، مشتق من المركب Rifamycin B، يعمل هذا المضاد على تثبيط تخليق الرنا المراسل mRNA عن طريق ارتباطه بأنزيم DNA Dependent RNA Polymerase (Murray et al., 2013). يعمل هذا المضاد ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Tedor, 2008). تحدث مقاومة البكتريا لهذا المضاد بوساطة الطفرات الكروموسومية التي تؤدي إلى حصول تغيير في موقع الهدف للـ DNA-Dependent RNA Polymerase مما ينتج عدم قدرة مضاد الريفامبسين على الارتباط بهذا الإنزيم في البكتريا المقاومة له (Derman et al., 2012).

2-10-6 :مقاومة البكتريا لمضاد الكلورامفنيكول

Bacterial Resistance to Chloramphenicol

يعد من المضادات الواسعة الطيف التي تستعمل ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام، اذ يعمل على تثبيط تصنيع البروتين بوساطة الارتباط العكسي مع الوحدة الرايبوسومية 50s ثم يمنع عملية النقل الببتيدي (Transpeptidation) في عملية استطالة السلسلة الببتيدية (Patricia, 2014). المقاومة لهذا المضاد تكون من خلال انتاج الانزيمات المحورة للكلورامفنيكول Chloramphenicol Acetyl Transferase (CTA) . (Belt et al., 2013)

2-10-7:مقاومة البكتريا لمضادات الترايميثوبريم

Bacterial Resistance to Trimethoprim

يعد مضاد Trimethoprim من المضادات التي تعمل على تثبيط تخليق الحامض النووي البكتيري DNA (Tortora et al., 2016). اذ يعمل هذا المضاد على تثبيط انزيم Dihydrofolate Reductase، إذ انه يتداخل مع ايض حامض الفوليك Folic Acid (Murray et al., 2013). يستخدم هذا المضاد في علاج اخماج المسالك البولية (Davey et al., 2015)، اذ يكون فعالا في علاج اخماج المسالك البولية المعقدة (Carroll et al., 2016). تنشأ المقاومة البكتيرية لهذا المضاد

بوساطة التغيير في موقع الانزيم المستهدف Dihydrofolate Reductase وذلك عن طريق التشفير بفعل جينات dfr التي يكون موقعها اما على الكروموسوم او البلازميد (Kumar et al., 2011).

2-10-8 : مقاومة البكتريا لمضادات الكلايكوببتيـد

Bacterial Resistance to Glycopeptide

يعد مضاد الفانكومايسين Vancomycin احد المضادات التابعة لهذه المجموعة، اذ ينتج من البكتريا الخيطية Streptomyces orientalis ويكون تأثيره ساماً إذ نُقِّيَ ليصبح اقل سمية، وهو من المضادات الضيقة الطيف اذ يعمل على تثبيط تخليق الجدار الخلوي (Tortora et al., 2016). إذ يتداخل مع مجموعة D-alanyl-D-alanine الطرفية للسلاسل الجانبية (Pentapeptide) عند تكوين الببتيدوكلايكان (Murray et al., 2013). يستخدم هذا المضاد ضد العديد من البكتريا الموجبة لصبغة كرام، اذ يكون فعالاً ضد Staph. aureus المقاومة لمضاد المثيسيلين ويعد العلاج المناسب للمرضى الذين يعانون حساسية للبنسلين (Davey et al., 2015). ادى الاستعمال المتزايد لهذا المضاد الى ظهور مقاومة له في بعض سلالات بكتريا Staph .aureus (Tenover et al., 2004). مقاومة البكتريا لهذا المضاد تعزى الى فعالية جينات van التي توجه عملية تخليق السلاسل الطرفية لطبقة الببتيدوكلايكان (Serina et al., 2004).

2-10-9 : مقاومة البكتريا لمضادات الماكروليدات

Bacterial Resistance to Macrolides

تشمل هذه المجموعة من المضادات الحيوية كلاً من Erythromycin و Clindamycin و Lincomycin ظهرت هذه المضادات في سنة 1950 (Manuchair, 2000). تستعمل هذه المضادات وخاصة Clindamysin لعلاج بعض الاخماج التي تسببها Staph. aureus مثل التهابات الجلد والانسجة الرخوة وخاصة في المرضى الذين يعانون حساسية تجاه البنسلين (Patel et al., 2006). هذه المضادات الحيوية تعمل على تثبيط عملية تخليق البروتين داخل الخلية البكتيرية وذلك من خلال الارتباط مع تحت الوحدة الرايبوسومية الكبيرة 50_S (Carroll et al., 2016). تكون مقاومة البكتريا لهذه المجموعة من المضادات الحيوية باليات مختلفة اما عن طريق تحوير موقع الهدف للارتباط بالرايبوسوم او عن طريق مضخة التدفق (Luthje et al., 2007).

11-2 : المطهرات والمعقمات Antiseptics and Disinfectants

تستعمل المعقمات والمطهرات على نطاق واسع في المستشفيات واماكن الرعاية الصحية لعدد من الاستخدامات الموضعية والسطحية، وتؤدي دوراً مهماً كونها عوامل سيطرة على مسببات العدوى وتساعد في الوقاية من عدوى المستشفيات (Weerasinghe and Wijesinghe , 2010). يوصف التطهير (Distinfication) بانه العملية التي من شأنها ان تزيل العديد من الكائنات الحية الدقيقة المسببة للامراض باستثناء البكتريا المكونة للسبورات (Rutala et al., 2008). يكون التطهير اقل فعالية من التعقيم (Sterilization) الذي يتم فيه التخلص من كل الاحياء المجهرية من ضمنها الابواغ والبكتريا والفطريات والفايروسات (Atlas et al., 1995). اما المطهرات الجلدية (Antiseptics) فتوصف بكونها مركبات كيميائية قاتلة للميكروبات ماعدا الابواغ، تستخدم للتخلص من البكتريا المتواجدة على الانسجة الحية، اذ انها تمتلك تأثيرا اختياريا أي انها لا تدمر النظام الدفاعي الطبيعي للجسم مقارنة بالمطهرات الكيميائية المستخدمة للبيئة غير الحية، بالرغم من ان بعض هذه المطهرات يستعمل لكلا الغرضين مع مراعاة تركيز المطهر الكيميائي المستعمل لكل منهما، وهي تتضمن انواعاً عديدة من ضمنها الايودين والكحولات ونترات الفضة والزئبق وغيرها من المطهرات(Prescott et al., 2005).

يهدف التطهير الى اقامة او وضع حاجز كيميائي بين الانسجة ومصدر العدوى، اذ يوضع على جزء من الجسم بوصفه حاجزاً كيميائياً للقتل او على الاقل منع نمو البكتريا بحيث حتى لو كانت البكتريا موجودة على الجلد فانه يمنع مهاجمتها للجسم (Latchu et al., 2015). تشمل العوامل التي تؤثر على فعالية عملية التطهير والتعقيم والتنظيف المسبق ووجود المواد العضوية وغير العضوية ونوع التلوث الميكروبي ومستواه وتركيز المطهر وزمن التعرض والطبيعة الفيزيائية للكائن ووجود الاغشية الحيوية ودرجة الحرارة وطبيعة الاس الهيدروجيني في محاليلها.

ان التركيز المتزايد على استعمال المطهرات لإزالة التلوث الميكروبي كان نتيجة الزيادة العالمية في وجود الكائنات الحية الدقيقة المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية والذي يترافق ايضا مع معدلات مرتفعة للعدوى المكتسبة من المستشفيات (Gebel et al., 2013). فضلاً عن ذلك تشير العديد من الدراسات الى ان هذه الجراثيم تنتقل بين المرضى والاسطح (Otter et al., 2011)، ونتيجة لذلك تستعمل المطهرات الجلدية لتطهير جلد الانسان خارجيا للتخلص او للتقليل من الاخماج التي تسببها البكتريا وخاصة قبل اجراء العمليات الجراحية، كما ان بعض المطهرات تستعمل لتطهير الاسطح غير الحية (Nunez and Moretton,2007).

12-2 : انواع المطهرات Types of disinfectants

1-12-2 :الديتول Dettol

هو عامل مطهر سائل يحتوي على كلوروكزيلينول Chloroxylenol (C8H9ClO) الذي يمثل العنصر الفعال الذي يعطيه صفة التطهير (Bagga et al., 2008). والذي تكون نسبته 4.8%، ويحتوي ايضاً زيت الصنوبر الذي يشكل 9% والكحول الايزوبروبيلي 12% (Kumor, 2008). يستعمل الديتول على نطاق واسع في اماكن الرعاية الصحية لأغراض مختلفة بما في ذلك تطهير الجلد ولتطهير الاشياء والاجهزة وكذلك يمكن ان يستعمل لتعقيم الاسطح البيئية، اذ انه يعمل على تخفيض عدد الكائنات الحية الدقيقة التي تستعمر الجلد والاسطح الى حد كبير (Gardener, 2002).

2-12-2 : البوفيدون – ايودين Povidone –Iodine

وهو مركب معقد يتألف من عنصر اليود وبوليمر صناعي (Polyvinylpyrrolid one) قابل للذوبان في الماء، مستقر كيميائيا، ويكون غير مهيج للأنسجة ولا يسبب ردود فعل حتى في المرضى الذين يعانون حساسية من مادة اليود (Latchu et al., 2015). يعد البوفيدين – ايودين مطهراً واسع الطيف بوصفه عاملاً مضاداً جيداً ضد البكتريا والفطريات والطفيليات والفيروسات والركتيسيا (Ozkiris et al., 2013). يستعمل على نطاق واسع كغسول وفي التطهير قبل العمليات، وعلى النقيض من المطهرات الاخرى فهو يمتلك فعالية عالية ضد البكتريا التي تكون السبورات، كما انه يظهر سمية منخفضة في البشر فضلاً عن ذلك يعتقد ان البوفيدين - ايودين يكون واحدا من المطهرات الاكثر فعالية للوقاية من الامراض المكتسبة من المستشفيات (Velazquez et al., 2009).

3 -12-2 :الايودين Iodine

يعد الايودين احد انواع الهالوجينات، اذ تعد الهالوجينات من العوامل المضادة للجراثيم المهمة (Prescott et al., 2005). ويكون تأثيرها بوصفها مواد مضادة للميكروبات في المقام الاول في الحالة غير الايونية إذ انها من المطهرات الشديدة الفعالية، اذ تعد عوامل مؤكسدة قوية فهي تدمر الطور الخضري للبكتريا والفطريات ويمكن ان توثر على الابواغ عند التعرض لها لفترة طويلة، وتمتلك مركبات الايودين مدى واسعاً بوصفها عوامل مضادة للعدوى الموضعية فهي تعمل ضد البكتريا والفطريات والفيروسات والابتدائيات، اذ يستعمل الايودين اساسا مطهراً للجلد فهو يخترق بسرعة خلايا الكائنات الحية الدقيقة، اذ انه يسبب اضطرابا في مجموعة متنوعة من الوظائف الايضية

للكائنات المجهرية وذلك عن طريق التداخل مع الاواصر الثنائية الكبريتيد للبروتين (Weerasinghe and Wijesinghe , 2010).

13-2 : مقاومة البكتريا للمطهرات والمعقمات

Bacterial Resistance to Antiseptics and Disinfectants

المقاومة تعني القابلية الدائمة او المؤقتة التي تحتويها الكائنات الحية الدقيقة والتي تساعدها على البقاء حية تحت الظروف التي تثبط فيها الاحياء الاخرى او الاحياء التي تنتمي الى السلالة نفسها (Cloete, 2003).

ان مقاومة البكتريا للمطهرات ومبيدات الجراثيم يعزى لقدرة البكتريا على خفض تركيز هذه المواد داخل الخلايا (SCENIHR, 2009). إذ ان من اهم اليات المقاومة تكون عن طريق التغيير في جدار الخلية او عن طريق التغيير في نفاذية غشاء الخلية او من خلال انظمة التدفق، اذ من الممكن ان تكون هذه العوامل هي المسبب لخفض فعالية المطهر ضد الاحياء المجهرية المرضية، ويمكن ان تكون هذه المقاومة ذاتية او مكتسبة، وتشير بعض النتائج التجريبية الى وجود علاقة محتملة بين المقاومة للمطهرات وبين المقاومة للمضادات الحيوية (Cole et al., 2011). وقد ذكر باحثون ان البكتريا تكون قادرة على افراز مواد للتخلص من عوامل السيطرة، أيا كانت مطهرات او مضادات حيوية، اذ توجد العديد من الدراسات التي تثير القلق بسبب الاثار الناتجة عن مقاومة المضادات الحيوية للمطهرات والمعقمات، إذ نشر تقرير للاتحاد الاوربي رُكِّز فيه على ضرورة الاستخدام المناسب والحكيم في استعمال المطهرات والمعقمات للحد من ان تصبح البكتريا مقاومة للعديد من الوسائل الدفاعية (Liverelli et al., 1996).

كما ان الاستعمال الواسع للمطهرات الجلدية ادى الى منح البكتريا صفة المقاومة للمضادات الحيوية (Gilbert and Mcbain, 2003). اذ تتباين مسببات الامراض المختلفة في استجابتها للمطهرات والمعقمات المختلفة وبذلك فهي تكتسب باستمرار المقاومة للمطهرات والمعقمات، ونتيجة لذلك فلا يوجد مطهر يكون مناسباً لجميع الكائنات الحية المسببة للأمراض (Russell, 1996).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1- المواد Materials

3-1- 1: الأجهزة والادوات Equipments and Instruments

الجدول (3-1): الأجهزة والادوات المختبرية المستعملة في الدراسة.

ت	أســـــم الجـــهـاز		الشركة المصنعة (المنشـــأ)
1	أطباق بلاستيكية	Disposable Petri dishes	Superestar (India)
2	أنابيب اختبار	Test tubes	
3	ثلاجة	Refrigerator	Concord (Lebanon)
4	جهاز الترحيل الكهربائي	Electrophoresis	Bioneer (Korea)
5	جهاز الدورات الحرارية	Thermocycler apparatus	BioRad (USA)
6	جهاز النبذ المركزي	Centrifuge	Olympus (Japan)
7	جهاز تقطير	Distiller	
8	جهاز قياس الحموضة	pH-meter	Metter- Gmph (England)
9	جهاز قياس تركيز الاحماض النووية	Nano drop spectrophotometer	Thermo (USA)
10	حاضنة	Incubator	Gallen Kaamp (England)
11	حمام مائي	Water bath	
12	شرائح زجاجية وغطاء الشريحة	Slides and cover slides	Superestar(India)
13	فرن كهربائي	Electric oven	Eriotti (Italy)
14	كابينة الزرع المجهري	Laminar flow cabinet	Labtech (South Korea)
15	مازج	Vortex	CYAN (China)
16	مجهر ضوئي مركب	Compound light Microscope	Olympus (Japan)
17	محاقن	Disposable Syringes	Superestar(India)
18	مسحات قطنية معقمة	Sterilized cotton Swabs	SterellinLtd (England)
19	مؤصدة	Autoclave	Gallen Kaamp (England)
20	ميزان الكتروني حساس	Sensitive electronic Balance	
21	الناقل الزرعي القياسي	Standard wire loop	John Bolten (England)

2-1-3 :الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Prepared Media

جدول (3- 2): الأوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في الدراسة والشركات المُصنِعة لها.

ت	اسم الوسط	الغرض من الاستعمال	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	اكار الماكونكي Macconkeys agar	وسط انتخابي للبكتريا السالبة لصبغة كرام وللتمييز بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة للاكتوز	Himedia (India)
2	اكار الدم الأساس Blood base agar	للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج الهيمولايسين	
3	اكار المانيتول الملحي الصلب Mannitol salt agar	للتفريق بين المكورات العنقودية المخمرة وغير المخمرة للمانيتول	
4	الاكار المغذي Nutrient Agar	وسط عام للتنمية	Oxoid(England)
5	اكار ايوسين المثيلين الازرق Eosine methylene blue agar	وسط انتقائي لتمييز بكتريا E.coli	
6	اكار سيمون سترات Simmons citrate agar	لفحص قابلية البكتريا لاستهلاك السترات	
7	اكار كليكلر حديد Kliglar iron medium	للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج غاز H_2S وتخمر السكريات	
8	اكار مولر هنتون Mueller Hinton agar	لفحص حساسية البكتريا للمضادات الحيوية والمطهرات	
9	أگار اليوريا Urea agar	لفحص قابلية البكتريا على إنتاج اليوريز	
10	ماء الببتون المغذي Peptone water broth	للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج حلقة الاندول	
11	المرق المغذي Nutrient broth	حفظ العزلات البكتيرية وادامتها	
12	وسط مثيل ريد فوكس بروسكاور السائل Methyl red vogas– Proskaour broth	استعمل للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الاستيل مثيل كاربون	
13	وسط تربتون الصويا السائل Trypticase soy broth	للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي	
14	وسط نقيع القلب-الدماغ السائل Brain heart infusion broth	وسط لتنشيط العزلات البكتيرية ونقلها	

3-1-3 : المواد الكيمياوية Chemical Materials

جدول (3-3): المواد الكيمياوية المستعملة في الدراسة والشركة المصنعة لها.

ت	اسم المادة		الشركة المصنعة (المنشأ)
1	إلفا نفثول	Alpha –naphthol	BDH (England)
2	إنزيم تحليل الخلايا	Lysozyme	Bio Basic Inc (USA)
3	بيروكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide (H_2O_2)	BDH (England)
4	حامض الكبريتيك	Sulfuric acid (H_2SO_4)	
5	سلم الحمض النووي القياسي	(2000bp) DNA ladder	Bioneer (Korea)
6	صبغة احمر المثيل	Methyl red	BDH (England)
7	فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين	Monopotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	
8	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	Dipotassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	
9	كاشف الاوكسديز	N,N,N,N,N-Tetra Methyl Para Phenylen Diamine Dihydrocholride	
10	كحول الايثانول	Absolute Ethanol (96%) Himedia (India)	Bio Basic Inc (USA)
11	كلوريد الباريوم	Barium Chloride $BaCl_2$	BDH (England)
12	كلوريد الصوديوم	Sodium Chloride	
13	كلوكوز	Glucose	
14	كليسرول	Glycerol	
15	ماء البي سي ار	PCR Water	Bioneer (Korea)
16	محلول الترحيل الدارئ	TBE Buffer	Bio Basic Inc (USA)
17	هلام الاكاروز	Agarose Gel	Promega (USA)
18	هيدروكسيد البوتاسيوم	Potassium Hydroxide	BDH (England)
19	يوريا	Urea	

4-1-3 الصبغات Stains

جدول (3-4): الصبغات الجاهزة المستعملة في الدراسة والشركات المُصنِعة لها والمنشأ.

ت	اسم الصبغة		الشركة المصنعة (المنشأ)
1	صبغة التحميل	Loading Dye	Bio Basic Inc (USA)
2	صبغة الحبر الهندي	Indian Ink	BDH (England)
3	صبغة بروميد الأثيديوم	Ethidium Bromide Dye	Bio Basic Inc (USA)
4	محاليل صبغة كرام	Gram Stain	Syrbio (France)

5-1-3 : المضادات الحيوية Antibiotics

جدول (3-5) أقراص المضادات الحيوية (Antibiotic disks) المجهزة من شركة Bioanalyse التركية.

ت	اسم المضاد الحيوي	رمز المضاد	تركيز المضاد مايكروغرام / قرص
1	Amikacin	AK	30
2	Ampicillin	AMP	10
3	Cephalothin	CF	30
4	Chloramphenicol	C	10
5	Ciprofloxacin	CIP	5
6	Clindamycin	CC	5
7	Gentamycin	CN	10
8	Methicillin	MET	5
9	Norfloxacin	NX	10
10	Novobiocin	NV	30
11	Rifampicin	RA	30
12	Tetracyclin	TE	30
13	Trimethoprim	TM	5
14	Vancomycin	VA	30

6-1-3 : المطهرات Disinfectants

جدول (3-6) المطهرات المستعملة في الدراسة.

ت	اسم المطهر	التركيز	الشركة المنتجة
1	ايودين Iodin	%100	السعودية
2	بوفيدين- أيودين Povidone – Iodin	%10	سوريا
3	ديتول Chloroxylenoil	%100	سامراء – العراق

7-1-3: العُدد Kits

جدول (3-7): العُدد المستعملة في الدراسة والشركة المصنعة لها.

ت	اسم العدة	مكوناته	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	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	
2	عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة AccuPower® PCR PreMix	Toq DNA polymerase 1U	Bioneer (Korea)
		dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) each: 250µM	
		Tris-HCl (pH 9.0) 10mM	
		KCl 30mM	
		MgCl2 1.5mM	
		Stabilizer and tracking dye	

8-1-3: البادئات Primers

صممّتْ بادئات خاصة بالتحري عن الجينات المحللة للدم في هذه الدراسة وذلك باستعمال موقع NCBI- Gen Bank (وبرنامج Primer3 plus) وكذلك استعملت وجُهّزت جميع البادئات من شركة Bioneer الكورية.

جدول (3-8) : البادئات المستخدمة في هذه الدراسة.

اسم البادئ	تسلسل القواعد النيتروجينية		حجم الناتج (bp)
hla-staph	F	TGGTTTAGCCTGGCCTTCAG	190
	R	ATTTGCACCAATAAGGCCGC	
hlb-staph	F	GGGGCAATATAAACGCGCTG	293
	R	TGTCGAATCCACAACCGCTT	
hlyA- E.coli	F	GGAGTTAGTGCAGCCTCCAG	360
	R	ACCACTCTGACTGCGATCAG	
hlyB-E.coli	F	TTGATATGGCGGGATGACGG	525
	R	TCCGACCCTGCGATTTTCAA	

F: Forword البادئ الامامي.

R: Reverse البادئ العكسي.

3-1-9 :مواد متفرقة

جدول (3-9) المواد المتفرقة المستعملة في الدراسة.

ت	المادة	المصدر المجهز
1	أشرطة نظام Api 20 E لتشخيص البكتريا المعوية وقسم من العصيات السالبة لصبغة كرام	Biomerieux (France)
2	اشرطة نظام Api staph لتشخيص انواع جنس المكورات العنقودية	
3	دم بشري بأصنافه الاربعة (O, AB, B, A)	مستشفى الديوانية التعليمي

3 -2: طرائق العمل Work Methods

3 -2 -1: طرائق التعقيم Sterilization Methods

A- التعقيم بالحرارة الجافة Dry Hot Sterilization

عقمت جميع الزجاجيات المستعملة في الفرن الكهربائي (Oven) بدرجة حرارة 168مْ لمدة ساعة ونصف.

B- التعقيم بالحرارة الرطبة Wet Hot Sterilization

عقمت الاوساط الزرعية الجاهزة والتركيبية المستعملة التي لا تتأثر بالحرارة باستعمال (Autoclave) بدرجة حرارة 121مْ وبضغط واحد جو لمدة 15دقيقة.

C- التعقيم بالترشيح Filtration Sterilization

عقمت المواد والمحاليل التي تتأثر بالحرارة باستعمال مرشحات دقيقة (Millipore filters) بقطر0.22 مايكرومتر (Benson, 2002).

3-2-2: تحضير المحاليل والكواشف Preparation of Solutions and Reagents

حضرت المحاليل والكواشف المستعملة في الدراسة كما يلي :

3-2-2-1: المحاليل Solutions

3-2-2-1-1: المحلول الفسلجي Normal Saline

حضر وفقاً لما اورده MacFaddin (2000)، وذلك بإذابة 0.85 غرام من كلوريد الصوديوم NaCl في 90 ملليتر من الماء المقطر. وأكمل الحجم الى 100 ملليتر ثم عقم بالمؤصدة

وحفظ بدرجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال. استعمل في تخفيف العالق البكتيري عند اجراء التجارب المختبرية.

2-1-2-2-3: انبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5) Mcfarland Tube Standard No. حضرت من المحاليل التالية على وفق ما جاء في Benson(2002):

A - محلول كلوريد الباريوم $BaCL_2$

أذيب 1.175 غرام من كلوريد الباريوم في 90 ملليتر من الماء المقطر المعقم، اكمل الحجم الى 100ملليتر للحصول على تركيز 0.048 مول / لتر من $BaCL_2$.

B - محلول حامض الكبريتيك H_2SO_4

أضيف 1ملليتر من حامض الكبريتيك H_2SO_4 إلى 90 ملليتر ماء مقطر معقم، وأكمل الحجم إلى 100 ملليتر. عند استعمال محلول ماكفرلاند مزج 0.5 ملليتر من محلول كلوريد الباريوم مع 99.5 ملليتر من محلول حامض الكبريتيك للحصول على عدد تقريبي للخلايا البكتيرية بمقدار 1.5×10^8 خلية /ملليتر، وزع المحلول على انابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم 4 ملليتر لكل انبوبة وحفظ في اماكن معتمة في درجة حرارة الغرفة، استخدمت الانبوبة لغرض مقارنة كثافة النمو البكتيري في اللقاح المستخدم مع كثافة المحلول في الانبوبة.

3-1-2-2-3 : محلول دارئ الفوسفات phosphate Buffer Solution (PBS)

حضر بإذابة 18 ملغم من كلوريد الصوديوم و0.34 ملغم من فوسفات البوتاسيوم الثنائية الهيدروجين و1.12 ملغم من فوسفات البوتاسيوم الأحادية الهيدروجين في 100ملليتر من الماء المقطر وعدل الأس الهيدروجيني الى 7.3 ثم عقم المحلول بالمؤصدة (Forbes et al., 2007).

2-2-2-3:الكواشف Reagents

1-2-2-2-3: كاشف الكاتاليز Catalase Reagent

حضر بتركيز 3 % بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2، استعمل هذا الكاشف لبيان قابلية البكتيريا على انتاج انزيم الكاتاليز المحلل لبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (Macfaddin, 2000).

3 -2- 2- 2- 2 : كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent

حضر هذا الكاشف آنيا عند الاستعمال وذلك بإذابة 0.1 غرام مـن مادة N,N,N,N -Tetra Methyl- P- Para Phenylene Diamine Dihydrochloride في 10ملليتر من الماء المقطر

وضع الكاشف في قنينة معتمة، استعمل للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيدز (Forbes et al., 2007).

3-2-2-2-3 : كاشف فوكس – بروسكاور Voges – Proskaur Reagent

و يتكون من محلولين :

محلول (A) هيدروكسيد البوتاسيوم KOH: حضر بإذابة 40غرام من المادة في 100ملليتر من الماء المقطر ليصبح التركيز40%.

محلول (B) الفانفثول (Alpha- nephthol): حضر بإذابة 5غرام من المادة في 100 ملليتر من الكحول الاثيلي المطلق ليصبح التركيز5%، استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج Acetyl Methyl Carbinol في اختبار الفوكس – بروسكاور (MacFaddin, 2000).

4-2-2-2-3 : كاشف المثيل الاحمر Methyl Red Reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة 0.1غرام من صبغة احمر المثيل في (300) ملليتر من 95% كحول اثيلي واكمل الحجم الى 500 ملليتر باستعمال الماء المقطر، استعمل للتحري عن قدرة البكتريا على تخمر الكلوكوز (MacFaddin, 2000).

5-2-2-2-3 : كاشف كوفاكس Kovac' s Reagent

هذا الكاشف مجهز من انتاج شركة معهد المصول واللقاحات ـ بغداد، استعمل في اختبار انتاج الاندول.

3-2-3 : تحضير الاوساط الزرعية Preparation of Culture Media

1-3-2-3: الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Media

حضّرت الاوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في التجربة حسب تعليمات الشركة المنتجة والمثبتة على العبوات وبعد ضبط الاس الهيدروجيني عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 15 دقيقة. حضنت الاوساط الزرعية عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة لضمان عدم تلوثها.

2-3-2-3 : الاوساط الزرعية التركيبية Structural Culture Media

حضّرت الاوساط الزرعية التركيبية كما هو موضح ادناه:

1-2-3-2-3 : وسط اكار الدم Blood Agar Medium

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المنتجة، بإذابة 40 غرام من (Blood agar base) في 950 ملليتر من الماء المقطر، ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.4، ثم أكمل الحجم الى 1000ملليتر وعقم بالمؤصدة، وبرد الى درجة حرارة 55 مْ، ثم اضيف اليه دم الانسان المغسول بفصائله الاربع بنسبة (5%)، صب الوسط في اطباق بتري وترك ليتصلب وحفظ بدرجة حرارة 4 مْ، استعمل للتحري عن قابلية البكتريا على تحلل الدم (MacFaddin, 2000).

2-2-3-2-3 : وسط اكار اليوريا Urea Agar Medium

حضر الوسط بإذابة 2.4 غرام من وسط اساس اليوريا في 95 ملليتر من الماء المقطر، عقم بالمؤصدة ثم برد الى 45مْ واضيف اليه 5 ملليتر من محلول اليوريا المعقم بالترشيح، صب في انابيب اختبار معقمة وترك ليتصلب بصورة مائلة، استعمل للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم اليوريز (Forbes et al., 2007).

4-2-3: جمع العينات Collection of Samples

جمعت 180 عينة ادرار وسطي (Midstream) مناصفة بين الذكور والاناث، من المرضى المراجعين للعيادات الاستشارية والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والولادة في مدينة الديوانية والذين يعانون التهاب المسالك البولية لمختلف الاعمار ولكلا الجنسين للفترة من 1– 9 – 2015 ولغاية 31 – 1 – 2016 وقد جمعت عينات الادرار في انابيب بلاستيكية معقمة ومحكمة الاغلاق ثم علمت الانابيب بأرقام ونقلت عينات الادرار الى المختبر خلال مدة لا تتجاوز نصف ساعة. وقد دونت المعلومات المتعلقة بالمريض من خلال استمارة استبيان تضمنت معلومات مهمة عن المريض.

5-2-3 : زرع الإدرار Urine Culture

اخذ ملء حلقة الناقل من العينة وزرعت على وسطي اكار الدم (Blood agar) واكار الماكونكي (MacConkey agar) بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، للتحري عن البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام.

3-2-6-2-3 : تشخيص العزلات البكتيرية Identification of Bacterial Isolates

3-2-6-2-1: الصفات الزرعية والفحص المجهري

Cultural Characteristics and Microscopic Examination

شخصت العزلات البكتيرية بالاعتماد على ما أورد في Macfaddin (2000). وذلك بأخذ مستعمرة واحدة نقية من كل نمو خاص بالزرع الاولي وشخصت مبدئيا بالاعتماد على الصفات المظهرية المتضمنة لون المستعمرة وحجمها وحافاتها وارتفاعها، واجري الفحص المجهري للخلايا البكتيرية ودرست صفات الخلايا تحت المجهر من خلال تصبيغها بصبغة كرام المتضمنة شكل الخلايا وتجمعها وانتظامها مع بعضها وطبيعة تفاعلها مع الصبغة.

3-2-6-2-2 : الفحوصات الكيميوحيوية Biochemical Test

3-2-6-2-2 -1: اختبار الاندول Indole Test

اجري الاختبار بتلقيح وسط ماء الببتون بالبكتريا المراد التحري عنها وحضنت بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة، اضيفت عدة قطرات من كاشف كوفاكس Kovacs reagent (فقرة :3-2-2-2-5) الى الوسط، ان تكون حلقة حمراء دائرية ترتفع الى الاعلى بين الوسط والكاشف الكحولي يعد دليلاً على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

3-2-6-2-2 : اختبار احمر المثيل Methyl Red Test

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR – VP medium بالمزرع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة. ثم اضيفت عدة قطرات من الكاشف Methyl Red (فقرة :3-2-2-2-4) ان تحول لون الوسط الى الاحمر بعد عدة دقائق دليل على ايجابية الاختبار. استعمل هذا الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا على تخمير الكلوكوز خلال 24 ساعة عند تنميتها في الوسط الغذائي الحاوي للسكر منتجة كمية كبيرة من الحامض (Brown, 2007).

3-2-6-2-3 : اختبار فوكس – بروسكاور Voges – Proskaur Test

لقحت الانابيب الحاوية للوسط الزرعي MR – VP medium، بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة ثم اضيفت بضع قطرات من كاشف الفا نفثول وبضع قطرات من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (فقرة : 3-2-2-2-3) إلى كلّ انبوبة، ان تحول لون الوسط الى اللون الاحمر دلالة على ايجابية الاختبار. استعمل هذا الفحص للكشف عن قدرة البكتريا على تحليل سكر الكلوكوز جزئيا وتكوين المركب الوسطي (Acetyl Methyl Carbinol) عند تنميتها على الوسط الحاوي للسكر (Brown, 2007).

4-2-6-2-3 : اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

اجري هذا الاختبار للتحري عن قابلية البكتريا على استهلاك السترات بوصفها مصدراً وحيداً للكاربون. لقح وسط Simmon Citrate Agar المائل بالعزلات البكتيرية وحضن بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة. اذ ان تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق يعد دليلا على ايجابية الاختبار (Macfaddin, 2000).

5-2-6-2-3 : اختبار تخمر السكريات وانتاج الغاز

Test Fermentation Sugar and Gas Production

تم التحري عن قابلية البكتريا على تخمر الكلوكوز واللاكتوز وانتاج كبريتيد الهيدروجين وذلك بتلقيح الانابيب الحاوية على وسط Kligler' s – iron agar بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل بالمزروع البكتيري حضنت الانابيب بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة، اعتمدت النتيجة على اساس التغيرات في الاس الهيدروجيني (pH) في القعر والسطح المائل، ان تغير لون الكاشف من الاحمر الى الاصفر دليل على قدرة البكتريا على تخمر سكري الكلوكوز واللاكتوز. اما انتاج الغاز فيكون على شكل فقاعات اسفل الوسط الصلب، بينما يكون انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين على شكل راسب اسود اسفل الوسط الصلب (Morello et al ., 2006).

6-2-6-2-3 : اختبار الكاتاليز Catalase Test

أجري الفحص بنقل جزء من مستعمرة منمّاة على وسط الاكار المغذي لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مْ بوساطة عيدان خشبية الى شريحة زجاجية نظيفة ثم أضيفت قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% (فقره :3-2-2-2-1) على المستعمرة، ان ظهور فقاعات هوائية دلالة على ايجابية الفحص، استعمل الاختبار للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم الكاتاليز (Forbes et al., 2007).

7-2-6-2-3 : اختبار الاوكسيديز Oxidase Test

أجري الفحص بنقل جزء من المستعمرة بوساطة عيدان خشبية الى ورقة ترشيح مرطبة بقطرات من كاشف الاوكسيديز (فقرة : 3 -2- 2- 2- 2)، ان تكون اللون البنفسجي خلال 10- 30 ثانية يعد نتيجة موجبة للفحص، استعمل للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيديز (Forbes et al., 2007).

3-2-6-2-8 : الكشف عن أنزيم اليوريز Urease Test

لقحت الانابيب الحاوية على وسط اليوريا بطريقة الطعن والتخطيط. حضنت الانابيب بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة. ان تغير لون الوسط من اللون الاصفر الى الوردي يعد نتيجة موجبة للاختبار، استعمل للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز (Benson, 2002).

3-2-6-2-9 : أختبار النمو على وسط المانيتول الملحي

Growth on Manitol Salt Medium Test

أجري هذا الاختبار للتفريق بين المكورات العنقودية الذهبية Staph. aureus المخمرة والانواع غير المخمرة للمانيتول، نقل جزء من المزروع البكتيري بعد التشخيص الاولي على وسط اكار الدم الى وسط المانيتول الملحي، وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة، إذ كانت مستعمراتها صفراء ذهبية على هذا الوسط نتيجة تخميرها لسكر المانيتول وتغييرها لون الكاشف الى الاصفر، اما الانواع التي لا تخمر سكر المانيتول فكانت مستعمراتها بيضاء او وردية (Brook et al., 2007).

3-2-6-2-10 : اختبار الحساسية للنوفوبايوسين Novobiocin Susceptible Test

استعمل هذا الاختبار للتفريق بين الانواع التابعة لجنس Staphylococcus spp.، إذ لُقّح وسط مولر ـ هنتون الصلب بالبكتريا بطريقة التخطيط، ثم وضع قرص النوفوبايوسين (30 mcg) على الوسط الملقح بالبكتريا وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مْ ولوحظت منطقة التثبيط حول النمو (Alexander et al., 2004).

3-2-6-2-11: اختبار انتاج انزيم مخثر البلازما بطريقة الانبوب Tube Coagulase Test

أجري الاختبار بالاعتماد على ما أورد في MacFaddin (2000). إذ كشف عن انزيم مخثر البلازما (Coagulase) باستعمال طريقة انبوبة الاختبارTube test، بإضافة 0.5 مللتر من بلازما دم الانسان غير المخفف الى انابيب اختبار حاوية على 0.5 ملليتر من وسط تربتون الصويا السائل المزروع بالعزلات البكتيرية المراد الكشف عنها وحضنت انابيب الاختبار بدرجة حرارة 37 م° لمدة 4 ساعات، روقب خلالها حدوث الخثرة التي تعد دليلا على ايجابية الاختبار، اما الانابيب ذات النتيجة السالبة فتركت في الحاضنة بدرجة 35 مْ لمدة 24 ساعة للتأكد من نتيجة الاختبار.

7-2-3 : التشخيص بنظام Analytical Profile Index (API)

بعد الحصول على نتائج الفحوصات الكيموحيوية التشخيصية التي تنطبق على العزلات البكتيرية، استعملت عدة التشخيص API 20E لتشخيص العزلات العائدة الى العائلة المعوية، فيما استعملت عدة التشخيص API Staph الخاصة بتشخيص عزلات المكورات العنقودية. اعتمدت تعليمات الشركة المجهزة (Biomerieux) من حيث كمية اللقاح البكتيري وانواع الكواشف المضافة واستُدِلَ على النتائج من خلال الدليل المجهز مع العُدَد.

8-2-3 : حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها

Preservation and maintenance of bacterial isolates

A - الحفظ القصير الامد Short Term Storage

لقحت الانابيب الحاوية للوسط المغذي الصلب المائل بالعزلات البكتيرية قيد البحث وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة، ثم حفظت في درجة حرارة 4 مْ، واستمرت عملية الادامة لتجديد حيوية العزلات وتجنب حدوث التلوث (Collee et al., 1996).

B - الحفظ الطويل الامد Long Term Storage

لقحت الانابيب الحاوية للوسط المغذي السائل المدعم بالكليسرول بتركيز 15% بالبكتريا قيد البحث وحفظت بدرجة – 20 مْ (Collee et al., 1996).

9-2-3 : التحري عن بعض عوامل الضراوة البكتيرية

1-9-2-3 : انتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Seniror and Haghes (1987) اذ استعمل لاجراء هذا الاختبار اربع فصائل من الدم البشري (A ، B ، AB ، O) وكما يلي:

1- نبذ مقدار5 ملليتر من عينة الدم المسحوبة آنياً باستعمال انابيب بلاستيكية حاوية مانع تخثر الدم (3 % سترات الصوديوم) للتخلص من البلازما والحصول على راسب كريات الدم الحمراء.

2 ـ غسلت الخلايا ثلاث مرات بالمحلول الملحي الفسلجي مع ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بعد كل غسلة.

3- استعملت كريات الدم الحمراء بنسبة 5% لتحضير وسط اكار الدم، زرعت العزلات بطريقة التخطيط على وسط اكار الدم وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، ان كلا النوعين من التحلل الفا وبيتا ظهرا بشكل هالة شفافة حول المستعمرة وهذا دلالة على ايجابية الفحص فضلاً عن ذلك سجل عدم القدرة على التحلل.

2-9-2-3 : تكوين المحفظة البكتيرية Bacterial Capsule

استعملت طريقة التصبيغ التي اوردها (Atlas et al., 1995) وكالآتي:

1- مزجت كمية صغيرة من النمو البكتيري المأخوذ من مستعمرة عمرها 24 ساعة مع قطرة صغيرة من محلول الملحي الفسلجي على شريحة زجاجية نظيفة.

2- اضيف الى الشريحة قطرة من الحبر الهندي ومزجت باستعمال عروة الناقل ووضع فوقها غطاء الشريحة الزجاجي، ترك السائل لينتشر بشكل طبقة خفيفة تحت الغطاء الزجاجي.

3- فحصت الشريحة تحت العدسة الزيتية، ان وجود هالة شفافة حول الخلية البكتيرية غير مصبوغة بالحبر الهندي تعد دليلا على وجود المحفظة.

3-9-2-3 : التحري عن قابلية البكتريا على التلازن الدموي Haemagglutination Test

اجري هذا الاختبار للكشف عن قابلية البكتريا على تلازن كريات الدم الحمراء باتباع ما يلي:

1- لقحت انبوبة اختبار حاوية على 5 ملليتر من المرق المغذي بالعزلة البكتيرية المراد اختبارها وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 48 ساعة للحصول على اهلاب كثيفة.

2- غسل الدم البشري فصيلة O (يمكن استخدام اي نوع من انواع الدم) ثلاث مرات بالمحلول الفسلجي وعلق بنسبة 3%.

3- وضعت قطرة من عالق كريات الدم الحمراء على شريحة زجاجية نظيفة واضيفت إليها قطرة من المرق المغذي المزروع بالبكتريا المراد اختبارها.

4- رجت الشريحة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة، ان وجود التماسك دليل على ايجابية الاختبار (Duguid et al., 1979).

4-9-2-3 : اختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation Test

اجري هذه الاختبار للكشف عن قابلية البكتريا على تكوين الأغشية الحيوية، اذ نقلت المستعمرات النامية للبكتريا الى انابيب اختبار زجاجية حاوية على وسط Tryptic soy broth المضاف اليه سكر الكلوكوز بتركيز 1% وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة. بعد انتهاء فترة الحضن سكبت العينات وغسلت الانابيب بمحلول الفوسفات الملحي المنظم (Phosphate Buffer Saline) ثم جففت وصبغت بصبغة البنفسجي البلوري بتركيز1% لمدة ثلاث دقائق بعدها سكبت الصبغة الزائدة وغسلت بالماء المقطر الخالي من الايونات بعدها وضعت الانابيب لتجف بشكل مقلوب لملاحظة تكون الاغشية الحيوية في قعر الانابيب والجدران الداخلية بشكل طبقة بنفسجية (Hassan et al., 2011).

10-2-3 : فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics Sensitivty Test

فُحِصت الحساسية بالاعتماد على طريقة Kirby –Bauer (CLSI, 2012) لاختبار الحساسية عن طريق انتشار اقراص المضادات الحيوية في الوسط.

1- حضر عالق بكتيري من المحلول الملحي الفسلجي بطريقة عالق المستعمرة إذ لقحت أنابيب حاوية على 5 ملليتر من المحلول الملحي الفسلجي بمستعمرات العزلات البكتيرية النامية على وسط أكار نقيع القلب والدماغ بعمر 24 ساعة ثم علقت في المحلول إلى أن أصبحت عكورة المحلول مساوية لعكورة محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standars واستعمل العالق البكتيري في خلال 15 دقيقة من تحضيره.

2- لقحت أطباق وسط أكار مولر هنتون المحضر مسبقاً باستعمال قطنة معقمة غمست في العالق البكتيري وأزيلت عنها الرطوبة الزائدة بضغطها على جدران الأنبوبة من الداخل، ووزع اللقاح على كل أجزاء الطبق.

3- ترك الطبق في درجة حرارة الغرفة لمدة مناسبة (3- 5 دقائق) ليجف ثم وزعت أقراص المضادات الحيوية فوق الوسط باستعمال ملقط معقم وضغط على الاقراص بعناية لتثبيتها مع مراعاة وجود مسافات مناسبة بينها من جهة وعن حافة الطبق من الجهة الأخرى.

4 - حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، ثم قرئت النتيجة عن طريق قياس منطقة التثبيط بالملمتر باستخدام المسطرة وقورنت مع القيم القياسية (CLSI, 2012).

11-2-3 :تحضير تراكيز المطهرات Prepare Concentrations of Disinfectants

حضرت التخافيف المختلفة من المطهرات بالاعتماد على ما ورد في المعموري (2010)، اذ عُدَّ المحلول التجاري محلولاً خزيناً (Stock Solution) وحضرت منه باقي التراكيز من خلال عمل تخافيف وذلك بإضافة الماء المقطر المعقم، وحسب متطلبات الدراسة حضرت ثلاثة تراكيز هي 1% و 5% و 10% وقد اعتبر الماء المقطر كعينة سيطرة.

12-2-3 : اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمطهرات باستخدام طريقة الانتشار بالحفر

Sensitivity Test of the Bacterial Isolates of Disinfectants Using The Method of Propagation of Holes

1- نقلت من 2-4 من المستعمرات النقية الى انابيب اختبار حاوية على 5 ملليتر من وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت بدرجة حرارة 37 م^{o} لمدة 24 ساعة.

2- خُفّفَ النمو الحاصل باستعمال المحلول الفسلجي الى ان تكون العكورة الحاصلة متجانسة مع عكورة انبوبة ماكفرلاند.

3 - ادخلت المسحة القطنية المعقمة في الانابيب الحاوية للنمو البكتيري وازيلت الزيادة بوساطة الضغط على جدران انبوبة الاختبار الداخلية ثم نشرت المسحة على سطح وسط مولر هنتون الصلب باتجاهات مختلفة لضمان تجانس اللقاح البكتيري المنشور.

4 - تم عمل حفر بقطر 5 مليلتر في الوسط الملقح بوساطة ثاقب الفلين، اضيف بعدها 0.1 ملليتر من المطهرات المحضرة سابقا الى كل حفرة باستعمال ماصة دقيقة (Micro pipette) حضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ.

5- قيست بعدها أقطار مناطق تثبيط النمو Inhibition Zone بوحدة المليمتر (Prize et al.,1990).

13-2-3 : فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR)

أجري فحص تفاعل سلسلة البلمره وذلك للتحري عن الجينات الحالة للدم Hemolysin Genes في كل من جراثيم E.coli و Staph. aureus و Staph . epidermidis و Staph . haemolyticus وبعدة خطوات كما يلي:

1-13-2-3 : استخلاص الحمض النووي البكتيري Bacterial Genomic DNA Extraction

استخلص الحمض النووي الجرثومي وذلك باستعمال عدة (Genomic DNA Extraction kit) المجهزة من شركة Geneaid الأمريكية، وأجريَ الاستخلاص حسب تعليمات الشركة المصنعة وكآلاتي :

1- نقل1 ملليتر من عالق كل عزلة جرثومية نامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في انابيب ابندروف قياس 1.5 ملليتر معقمة وبعدها نقلت الى جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 15000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.

2- أضيف 200 مايكروليتر من محلول انزيم اللايسوزايم Lysozyme Buffer (20mg/ml) ثم مزج الخليط بوساطة المازج vortex لمدة 5 ثوان.

3- حضن المزيج بدرجة حراره الغرفة لمدة 10 دقائق وخلال فترة الحضن قُلِّبت الانابيب لضمان التحلل الكامل للخلايا في المزيج.

4- أضيف 200 مايكروليتر من محلول GB Buffer المجهز من العدة الى مزيج الخلايا المتحللة ومزج جيدا بوساطة المازج vortex لمدة 5 ثوان.

5- حضن المزيج بدرجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقائق باستعمال الحمام المائي.

6- أضيف 200 مايكروليتر من الكحول الاثيلي المطلق الى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيدا بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثوان.

7- نقل الخليط من انبوبة الابندروف الى انابيب جمع Collection Tubes قياس 2مل الحاوية لأعمدة تحوي مرشحات لتنقية الحمض النووي GD Filter Colum وهي مجهزة مع العدة.

8- وضعت انابيب الجمع مع الاعمدة الحاوية للخليط في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 15000دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة.

9- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل الـ GD Colum الحاوي للحمض النووي الى انبوبة جمع Collection Tube جديدة.

10- أضيف 400 مايكروليتر من محلول الـ W1 Buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي للحمض النووي لغسل الحمض النووي ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة15000 دورة لمدة 30 ثانية.

11- تم التخلص من الراسب ثم أضيف 600 مايكروليتر من محلول الغسل الحاوي للكحول الاثيلي المطلق Wash Buffer المجهزة مع العدة الى العمود الحاوي للحمض النووي للتخلص من الدهون داخل العمود ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 15000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية.

12- تم التخلص من الراسب وأعيدت الانابيب الى جهاز الطرد المركزي مرة ثانية لتجفيف الاعمدة ونبذت بسرعة 15000 دورة/ دقيقة لمدة 3 دقائق.

13- نقلت الاعمدة الحاوية للحمض النووي الى انابيب ابندروف معقمة واضيف 50 مايكروليتر من محلول الاذابة Elution Buffer المجهز مع العدة الى وسط العمود وترك لمدة 5 دقائق ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 15000 دورة لمدة 30 ثانية لإذابة الحمض النووي، وحفظ بدرجة حراره - 20م لحين اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة.

2-13-2-3 : فحص الحمض النووي المستخلص DNA Examination

جرى الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص باستعمال جهاز Nano Drop Spectrophotometer الخاص بالكشف وقياس تركيز الأحماض النووية حيث جرى الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA وقياس نقاوته من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين 260 - 280 نانوميتر واستعمل هذا الجهاز على النحو التالي:

1- شغل جهاز Nanodrop واختير برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA.

2- صَفرُت ركيزة المقياس مرتين وذلك بوضع 2 مايكروليتر من Free Nuclease Water باستعمال ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير وبعدها نظفت الركيزة باستعمال ورق نشاف خاص بالجهاز.

3- وضع 1 مايكروليتر من كل عينة من DNA المستخلص على ركيزة المقياس للجهاز ثم شغل الجهاز لبدء عملية قياس تركيز DNA ثم نظفت مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.

4- حُددت نقاوة عينات DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية بجهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين 260 و280 نانوميتر إذ ان الحمض النووي DNA المستخلص يعد نقياً عندما تكون نسبة الامتصاصية تساوي (1.8).

3-13-2-3 : تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR Master Mix

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية حسب تعليمات الشركة كالاتي:

1- حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة في انابيب PCR المجهزة مع العدة والحاوية لمكونات تفاعل سلسلة البلمرة وأضيفت المكونات الاخرى لمزيج التفاعل حسب تعليمات الشركة وكما في الجدول التالي:

جدول (3-10) : مكونات مزيج تفاعل سلسلة البلمرة وأحجامه.

PCR master mix		Volume (ML)
DNA template		5
Primers	F. primer	1.5
	R. primer	1.5
PCR water		12
Total		**20**

2- بعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة تغلق الانابيب وتمزج محتوياتها بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثوان.

3- تنقل الانابيب الى جهاز PCR Thermocycler لإجراء حالات الدورات الحرارية PCR Thermocycler Conditions.

3-2-13-4 : عدد الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler Conditions

اجري فحص تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال جهاز PCR Thermocycler وفقاً لمعطيات الجدول التالي:

جدول (3-11) عدد الدورات الحرارية في تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام الـ PCR

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95°C	5min
Denaturation	30	95°C	30sec.
Annealing		$(58°C)^1$ $(52°C)^2$	30sec
Extension		72°C	1min
Final extension	1	72°C	5min
Hold	-	4°C	Forever

5-13-2-3 : الترحيل الكهربائي الهلامي Gel Electrophoresis

أجري الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز بنسبة 1.5% وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product و كما يأتي:

1- أذيب 1.5غرام من هلام الاكاروز Agarose Gel في 100 ملليتر من محلول TBE buffer الدارئ بتركيز 1X باستعمال الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50مْ ثُمَ أضيفت صبغة الحمض النووي المشعة Ethidium Bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

3- صُبَ هلام الاكاروز في قالب الترحيل (Tray) الحاوي للمشط (Comb) لتحديد اماكن عينات PCR، ثم ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ثم ازيل المشط من الهلام بعناية.

4- حملت العينات باستعمال صبغة التحميل (Loading dye) على ورق البارافلم (Parafilm paper) وذلك بإضافة 1حجم من صبغة التحميل لكل اربعة حجوم من ناتج PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5- استعمل DNA ladder (2000) زوج قاعدي لقياس ناتج PCR ووضع في الحفرة الاولى.

6- بعد اكتمال عملية التحميل غمر هلام الاكاروز باستعمال محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وأغلق غطاء الترحيل ثم شغل جهاز الترحيل بفرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير لمدة ساعة واحدة.

7- بعد انتهاء عملية الترحيل فحص الهلام الحاوي لناتج PCR باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V light Source لتحديد الناتج مع وحدة القياس.

14-2-3 : التحليل الإحصائي Statistical Analysis

أُخضعت جميع نتائج الدراسة للتحليل الإحصائي لمعرفة الاختلافات المعنوية استعمل اختبار مربع كاي Chi-Square Test لهذا الغرض وقد حددت الاختلافات المعنوية عند مستوى احتمال 5% (Schiefer,1980).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4 - النتائج والمناقشة Results and Discussion

4 -1 : العزل والتشخيص Isolation & Identification

استهدفت الدراسة عزل البكتريا المسببة لأخماج المسالك البولية والمحللة للدم على وسط اكار الدم والتحري عن الجينات المشفرة لإنتاج انزيم الهيمولايسين الحال للدم. جمعت 180 عينة ادرار وسطي (90) عينة ذكور و(90) عينة اناث من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال في مدينة الديوانية والذين يعانون اعراض اخماج المسالك البولية.

اظهرت نتائج الزرع ان 120 عينة (66.67%) من المجموع الكلي اظهرت نمواً بكتيريا، ان سبب قيمة التواجد البكتيري هذه قد يعزى الى عدد العينات المدروسة او الى المستوى الاجتماعي للأشخاص وعمر الاشخاص الذين جمعت منهم العينات وجنسهم. اما نماذج الادرار التي لم تظهر نمواً بكتيرياً فبلغت 60 (33.33%) وقد يعزى ذلك الى ان اخماج المسالك البولية ناجمة عن مسببات مرضية اخرى غير البكتريا مثل الفايروسات او الكلاميديا التي لا يمكن الكشف عنها في هذه الدراسة او بسبب كفاءة المضادات الحيوية المستعملة في علاج اخماج المسالك البولية وطيفها الواسع وقدرتها على قتل البكتريا واختفائها (Al-Douri, 2011). وقد اوضحت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية من ناحية عدد الحالات الموجبة والسالبة للزرع عند مستوى معنوية ($P<0.05$) (الجدول 4-1).

تتفق نتائج العزل البكتيري هذه مع ما توصلت اليه AL- Salayi (2002) اذ بلغت العزلات الموجبة للنمو البكتيري نسبة (65%)، وكذلك مقاربة لنتائج Ibraheem (2006) اذ توصل الى نسبة تواجد بكتيري بلغت (61.5%) بينما لا تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه Heijer وجماعته (2010) اذ سجلت هذه الدراسة نمواً بكتيريا بنسبة (81%)، كما جاءت هذه النتائج مقاربة لما حصلت عليه عوض (2005) اذ وجدت ان عينات الادرار التي لم تظهر نمواً بكتيرياً بلغت 27.88% .

جدول (4-1) عدد عينات الادرار الموجبة والسالبة للتواجد البكتيري ونسبها.

نتائج الزرع	عدد العينات	النسبة المئوية %
عدد الحالات الموجبة	120	66.67^{A}
عدد الحالات السالبة	60	33.33^{B}
المجموع	180	100

الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).

شخصت العزلات البكتيرية المسببة لأخماج المسالك البولية وذلك بعد زراعتها وتنقيتها بالاعتماد على الخصائص المزرعية للمستعمرات على الاوساط الصلبة، كما اعتمدت الخصائص المجهرية من خلال الفحص المجهري لمعرفة أشكال الخلايا البكتيرية المعزولة وترتيبها وصبغها بصبغة كرام، فخلايا E.coli ظهرت بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات، اما بالنسبة للمكورات العنقودية .Staphylococcus spp فقد اظهر الفحص المجهري للخلايا المصبوغة بصبغة كرام انها مكورات موجبة لصبغة كرام مرتبة بشكل ازواج او عناقيد، ثم استعملت مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية حسب الطرائق التي اوردها (Forbes et al., 2007; Macfaddin,2000). (الجدول 4-2) الذي يظهر العزلات البكتيرية المشخصة وفقاً للاختبارات الكيموحيوية.

جدول (4-2) الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص البكتريا المعزولة من اخما ج المسالك البولية.

ت	العزلات البكتيرية	الاختبارات الكيموحيوية											
		Gram stain	Catalase	Oxidase	Urease production	Hemolysis	Goagulase	Manitole salt agar	Novobiocin sensetive	Kligler' s – iron agar	IMVC Tests		
											Indol	Citrate utilization	Methyl red	Voges – Proskauer
1	**E.coli**	-	+	-	-	-+	/	/	/	A/A+-	+	-	+	-
2	**Staph. aureus**	+	+	-	-+	+	+	+	S	/	/	/	/	/
3	**Klebsiella spp.**	-	+	-	+	-	/	/	/	A/A+-	-	+	-	+
4	**Enterobacter spp.**	-	+	-	-	-	/	/	/	A/A+-	-	+	-	+
5	**Staph. epidermidis**	+	+	-	-+	+	-	-	S	/	/	/	/	/
6	**Staph. haemolyticus**	+	+	-	-	+	-	-	S	/	/	/	/	/
7	**P. mirabilis**	-	+	-	+	-	/	/	/	K/A++ A/A++	-	+	+	-
8	**P. vulgais**	-	+	-	+	-	/	/	/	K/A++ A/A++	+	+	+	-
9	**Providencia spp.**	-	+	-	+	-	/	/	/	K/A--	+	+	+	-

/ : تدل على عدم اجراء الفحص

-A/A+ : مخمرة لسكر الكلوكوز واللاكتوز منتجة للغاز غير منتجة للـ H_2S

--K/A: مخمرة لسكر الكلوكوز غير منتجة للغاز و H_2S

++K/A: مخمرة لسكر الكلوكوز منتجة للغاز وH_2S

كما تم التأكد من التشخيص البكتيري وذلك باستعمال نظام التشخيص API اذ يتميز هذا النظام بسرعة الكشف عن البكتريا دون الحاجة الى الاوساط الزرعية المتعددة وكذلك يقلل من عملية التلوث الزرعي وقد اعتمد هذا النظام للتأكد من صحة التشخيص، اذ استعمل نظام API 20E لتشخيص افراد العائلة المعوية والبكتريا السالبة لصبغة كرام (الصورة 4-1)، كما استعمل نظام API Staph لتشخيص الانواع التابعة للمكورات العنقودية (الصور 4-2).

صورة (4-1) شريط API 20 E المستخدم في تشخيص عزلات بكتريا *E.coli* المعزولة من اخماج المسالك البولية.

صورة (4-2) نتائج تشخيص API Staph: Staph. aureus (A) و Staph. epidermidis (B) و Staph. haemolyticus (C)

تبين النتائج الموضحة في الجدول (4-3) والشكل (4-1) البكتريا المعزولة من اخماج المسالك البولية واعدادها ونسبة تواجدها في النماذج اذ بينت نتائج الزرع ان E.coli قد حققت اعلى نسبة عزل 41.66% تلتها Staph .aureus بنسبة 16.66% ثم Kleibssela spp. بنسبة 14.16% اما بكتريا. Enterobacter spp فبلغت نسبة تواجدها 13.33 % والنسبة 4.16% كانت من نصيب بكتريا Staph. epidermidis بينما كانت نسبة التواجد 3.33% لكل من Staph. haemolyticus و P. mirabilis ، كما بلغت نسبة تواجد Providentia spp. و P. vulgaris (2.5%) و (0.8%) على التوالي.

ولما كان الهدف الاساسي من البحث هو دراسة البكتريا المحللة للدم لذا تم التركيز على الانواع البكتيرية التي اظهرت تحللا للدم والتي تضمنت كلاً من E.coli و Staph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus.

وقد لوحظ من هذه الدراسة ان من اكثر المسببات البكتيرية المرضية شيوعاً لاخماج المسالك البولية بكتريا E.coli اذ شكلت نسبة 41.66%، ان اسباب هذا الانتشار الواسع لبكتريا E.coli في اخماج المسالك البولية قد يعود لامتلاكها مجموعة من عوامل الضراوة منها انتاج الهيمولايسين وعوامل الاستعمار فضلاً عن الاهلاب ومستضد الكبسولة (K antigens) الذي يكون له دور مهم في التصاق البكتريا بالخلايا المضيفة فضلا عن اكتساب المقاومة للمضادات الحيوية (Jarvis et al., 2014)، وقد جاءت هذه النتائج متفقة مع النتيجة التي حصل عليها Hassan وجماعته (2015) والتي كانت 40.86%، كما انها تتفق مع نتائج (Prakash and Saxena, 2013) اذ وجدا ان نسبة الاصابة بهذه البكتريا كانت 42.58%. ولكنها لا تتفق مع دراسة AL- sohili (2015) اذ عزل هذه البكتريا بنسبة 80.8%.

جاءت بكتريا Staph. aureus بالمرتبة الثانية بعد بكتريا E.coli إذ عزلت بنسبة 16.66%، اذ تعد بكتريا Staph. aureus من مسببات الامراض المهمة في البشر الواسعة الانتشار في جميع انحاء العالم (Stryjewski and Corey, 2014)، بسبب امتلاكها مجموعة من عوامل الضراوة التي تساعدها على احداث الامراضية واستيطان المضيف (Greenwood et al., 2002). فهي واحدة من بين أشيع البكتريا التي تصيب الانسان، والتي تسبب العدوى المكتسبة من المجتمع والمستشفيات على حد سواء (Ryan and Ray, 2004). وقد بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود اختلافات معنوية بينهما عند مستوى ($P<0.05$). وهذه النتيجة مقاربة للنتيجة التي حصل عليها Aziz (2013) اذ بلغت نسبة عزلها 19.23%، وكذلك مقاربة لنتيجة Ocokoru وجماعته (2015) اذ بلغت نسبتها 14.8%، لكنها لا تتفق مع ما توصل اليه Sabir وجماعته (2014) الذين وجدوا ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت 9.4%.

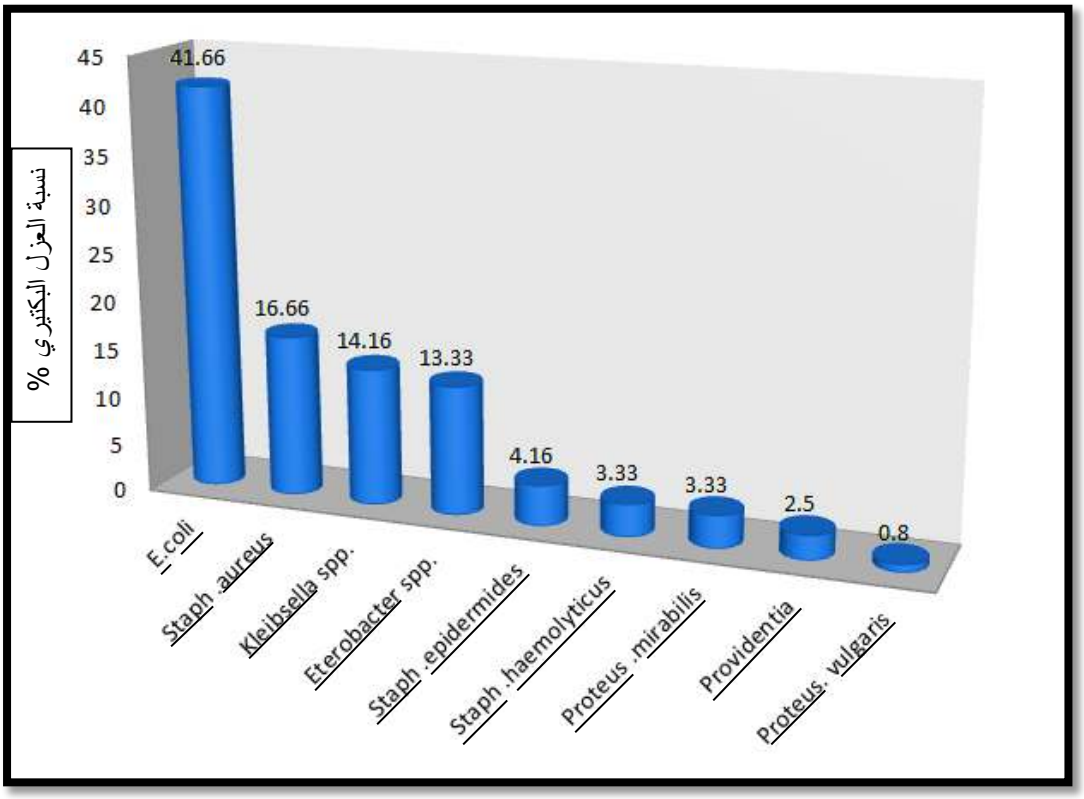
عزلت بكتريا العنقوديات السالبة لفحص Coagulase التي تضمنت النوعين Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus بنسب منخفضة بلغت 4.16% و 3.33% على التوالي، تلعب البكتريا الموجبة لصبغة كرام وفي مقدمتها المكورات العنقودية Staphylococcus spp. دوراً كبيراً في حدوث اخماج المسالك البولية (Perez and Moellinger, 2003). إذ تعد بكتريا Staph. epidermidis واحدة من مسببات عدوى المستشفيات، وعادة ما تدخل المسالك البولية من

خلال مجرى البول وتتواجد على الجلد والاغشية المخاطية (Golding et al., 2012). كما وجد ان هذه البكتريا تسبب العدوى المرتبطة بالقثطرة بفعل قدرتها على التكيف ومقاومة المضادات الحيوية مما يمكنها من البقاء حية في بيئة المستشفى (Cherifi et al., 2014)، اذ لم يظهر اختلاف معنوي بينهما عند مستوى (P>0.05). وقد جاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصلت اليه الشمري (2014) اذ كانت نسبة العزل 4.75% لكل منهما، كما ان هذه النتائج مقاربة لنتيجة Ocokoru وجماعته (2015) اذ عزلوا Staph. haemlyticus بنسبة 2.5%، فيما جاءت هذه النتائج مخالفة لما توصل اليه AL-Hilu (2014) اذ وجد ان كلاً من Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus بلغت نسبة عزلهما من الادرار 21.28% و 74.47% على التوالي.

جدول (4 -3) البكتريا المعزولة من اخماج المسالك البولية.

العزلات البكتيرية	العدد	النسب المئوية%
E.coli	**50**	**41.66^{A}**
Staph. aureus	**20**	**16.66^{B}**
Kleibsella spp.	**17**	**14.16^{B}**
Enterobacter spp.	**16**	**13.33^{B}**
Staph. epidermides	**5**	**4.16^{C}**
Staph. haemolyticus	**4**	**3.33^{C}**
P. mirabilis	**4**	**3.33^{C}**
Providentia spp.	**3**	**2.5^{C}**
P. vulgaris	**1**	**0.8^{C}**
المجموع	**120**	**100**

الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية (P>0.05).
الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية (P<0.05)



الشكل (4-1) النسب المئوية للبكتريا المعزولة من اخماج المسالك البولية.

2-4 : العلاقة بين اخماج المسالك البولية والجنس Relationship Between Urinary Tract Infections and Sex

اظهرت نتائج هذه الدراسة ان معدل انتشار اخماج المسالك البولية في الاناث اعلى مما هو عليه في الذكور. إذ وجد ان عدد الاناث المصابات 70 بنسبة (77%)، والمصابين من الذكور 50 وبنسبة (55%)، وبينت نتائج التحليل الاحصائي ان هناك فروقاً معنوية بين الجنسين عند مستوى معنوية ($P< 0.05$) (الجدول 4-4).

يعزى ارتفاع اخماج المسالك البولية في الاناث الى قصر الاحليل لدى الانثى وقربه من فتحة الشرج مما يسهل استيطان الفلورا المعوية منطقة ما حول الاحليل (Salvatore et al.,2011). فضلاً عن العوامل الاخرى المساهمة والمتمثلة في كثرة تعرض الاناث للإصابة بخمج المسالك البولية خلال الحمل والولادة واستخدام وسائل منع الحمل (Dielubanza and Schaeffer, 2011).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه (Nasrolahi et al., 2013) في ايران الذين اشاروا الى ان اخماج المسالك البولية اكثر انتشاراً في الاناث مقارنة مع الذكور، وكذلك تتفق مع ما

توصل اليه (Linhares et al., 2013) اذ وجدوا ان اخماج المسالك البولية اكثر شيوعاً في الاناث مقارنة بالذكور.

جدول (4 - 4) اصابات المسالك البولية البكتيرية موزعة عيناتها حسب الجنس.

الجنس	العدد الكلي للعينات	الحالات الموجبة	النسب المئوية%
الذكور	90	50	55^{A}
الاناث	90	70	77^{B}
المجموع الكلي	180	120	66

الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).

3-4 : الكشف عن انتاج الهيمولايسين مظهرياً ووراثياً Detection of Heamolysin Production phenotypically and genetically

تم التحري عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج الهيمولايسين في اطباق اكار الدم الحاوية لفصائل الدم البشري الاربع (A ، B ، AB ،O) وقد اظهرت النتائج ان 48 عزله (40%) من المجموع الكلي للعزلات البكتيرية المشخصة البالغة 120عزلة قد اظهرت القدرة على انتاج الانزيم الحال للدم (الهيمولايسين)، ويظهر ذلك من خلال تكون هالة حول المستعمرات (الجدول 4-5).

الجدول (4 - 5) اعداد ونسب العزلات البكتيرية موزعة حسب قدرتها على التحلل.

العزلات البكتيرية	العدد	النسبة المئوية %
العزلات البكترية المحللة للدم	48	40^{A}
العزلات البكتيرية غير المحللة	72	60^{B}
المجموع الكلي	120	100

الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).

توزعت العزلات البكتيرية المنتجة للهيمولايسين على اطباق اكار الدم المحضرة والبالغ عددها 48 عزلة الى 20 عزلة (100%) لبكتيريا Staph. aureus و 4 عزلات (100%) لبكتيريا Staph. haemolyticus و4 عزلات (80%) لبكتيريا Staph. epidermidis و20 عزلة (40%) لبكتيريا E . coli، وقد اظهرت هذه العزلات تحللاً دموياً من نوع بيتا β – hemolysis اذ لوحظ ذلك من خلال ظهور هالة شفافة حول المستعمرات البكتيرية (الجدول 4-6) و (الصورة 4-3).

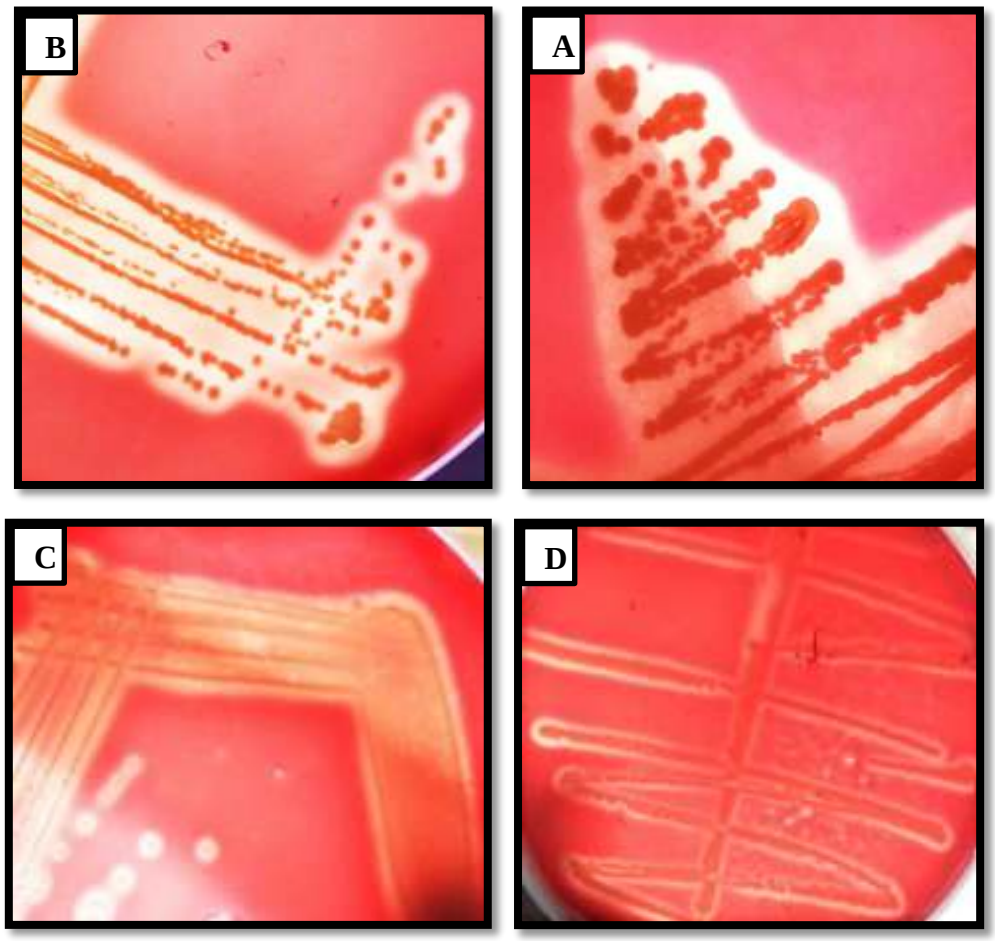
اذ لوحظ من النتائج المبينة في (الجدول 4-6) وجود اختلاف في نسب الانواع البكتيرية المعزولة المنتجة وغير المنتجة للهيمولايسين وهذا ما اكدته نتائج التحليل الاحصائي التي اظهرت فروقاً معنوية بين العزلات البكتيرية قيد الدراسة عند مستوى معنوية ($P < 0.05$).

جاءت هذه النتائج مطابقة لما توصلت اليه الشمري (2014) اذ وجدت ان جميع العزلات العائدة لبكتريا Staph .aureus و Staph. haemolyticus قد حللت الدم بنسبة 100%. كما انها تتفق مع دراسة Kahalid وجماعته (2012) التي كشفت عن قابلية بكتريا Staph. epidermidis على انتاج الهيمولايسين، كما جاءت هذه النتائج متوافقة مع نتائج Ali (2012) الذي وجد ان نسبة عزل بكتيريا E.coli المنتجة للهيمولايسين كانت 40%. لكنها لا تتفق مع Olorunmola وجماعته (2013) الذين وجدوا ان نسبة انتاجها للهيمولايسين كانت 7.3%. ان هذا الاختلاف في نسب العزلات المحللة للدم قد يعزى الى عدة عوامل منها مصدر الدم ونوع الهيمولايسين المنتج ومصدر البكتريا وطريقة الفحص.

جدول (4 - 6) أعداد ونسب العزلات البكتيرية موزعة حسب قدرتها على انتاج الهيمولايسين مظهرياً .

ت	العزلات البكتيرية	العدد الكلي للعزلات	العزلات المنتجة		العزلات الغير المنتجة	
			العدد	النسبة المئوية%	العدد	النسبة المئوية%
1	E.coli	50	20	40^{Aa}	30	60^{Ab}
2	Staph. aureus	20	20	100^{Ba}	0	0^{Bb}
3	Staph .epidermidis	5	4	80^{Ba}	1	20^{Cb}
4	Staph. haemolyticus	4	4	100^{Ba}	0	0^{Bb}
	المجموع	79	48	60	31	39.2

الحروف الكبيرة تدل على القراءة الاحصائية العمودية (بين الجراثيم) ، الحروف الصغيرة تشير الى القراءة الاحصائية الافقية (ضمن الجرثومة الواحدة)، الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية ($P>0.05$)، الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).



صورة (3-4) التحلل الدموي نوع B- hemolysis على اوساط آكار الدم.
(A) Staph. aureus (B) Staph. haemolyticus (C) Staph. epidermidis (D) E. coli

استعملت مجاميع الدم البشري الاربع (A و B و AB و O) كمادة اساس لفعالية العزلات البكتيرية المنتجة لأنزيم الهيمولايسين واختبار كفاءتها في تحليل الدم على اطباق اكار الدم، وقد بينت النتائج ان العزلات البكتيرية المحللة للدم قد اظهرت اختلافاً في تحليلها لاصناف الدم البشري الاربعة، اذ بلغت العزلات المحللة للدم من فصيلة الدم AB (91%) وهي النسبة العليا، تليها فصيلة الدم B اذ بلغت نسبة العزلات المحللة لها (77%) من المجموع الكلي للعزلات البكتيرية المحللة للدم، بينما فصيلة الدم O فبلغت نسبة العزلات المحللة لها (58%)، اما اقل نسبة تحلل فكانت من نصيب الفصيلة A اذ بلغت (41%) (الجدول4-7).

يبدو من هذه النتائج ان صنف الدم AB هو افضل الانواع للكشف عن التحلل الهيمولايسيني واعلاها ترددا، وقد يعود السبب في ذلك الى ان فصيلة الدم AB تحتوي مستقبلات اقل تخصصاً من انواع فصائل الدم الاخرى (الحسيني، 1996)، وهذا ما اكدته العديد من الدراسات ومنها دراسة الموسوي (2006) اذ اشارت في دراستها بأن صنف الدم AB يعد افضل مصادر الدم للكشف عن الهيمولايسين.

جدول (4 -7) عدد العزلات البكتيرية المحللة لفصائل الدم البشري والمعزولة من أخماج المسالك البولية ونسبها.

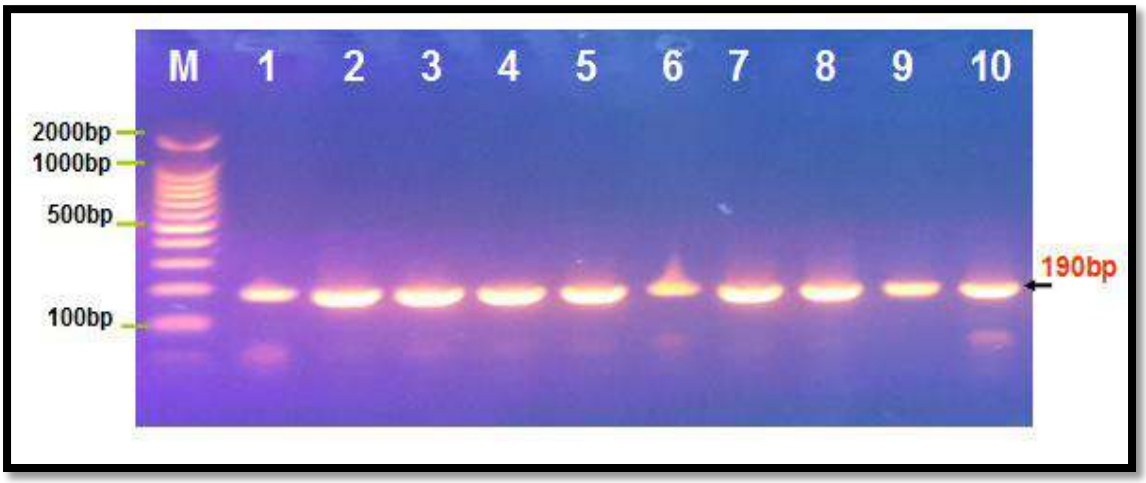
العزلات البكتيرية	العدد الكلي للعزلات المحللة للدم	انتاج انزيم الهيمولايسن فصائل الدم البشري			
		(%) A	(%) B	(%) AB	(%) O
E.coli	20	(30) 6^{A}	(70) 14^{A}	(85) 17^{AB}	(45) 9^{A}
Staph. aureus	20	(60) 12^{B}	(85) 17^{A}	(100) 20^{A}	(80) 16^{B}
Staph. epidermidis	4	(25)1^{A}	(75) 3^{A}	(75) 3^{B}	(25) 1^{C}
Staph. haemolyticus	4	(25) 1^{A}	(75) 3^{A}	(100)4^{A}	(50) 2^{A}
المجموع الكلي	48	(41) 20	(77) 37	(91) 44	(58) 28

الحروف الكبيرة تدل على القراءة الاحصائية العمودية (بين الجراثيم لنفس الفصيلة).
الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية ($P>0.05$).
الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).

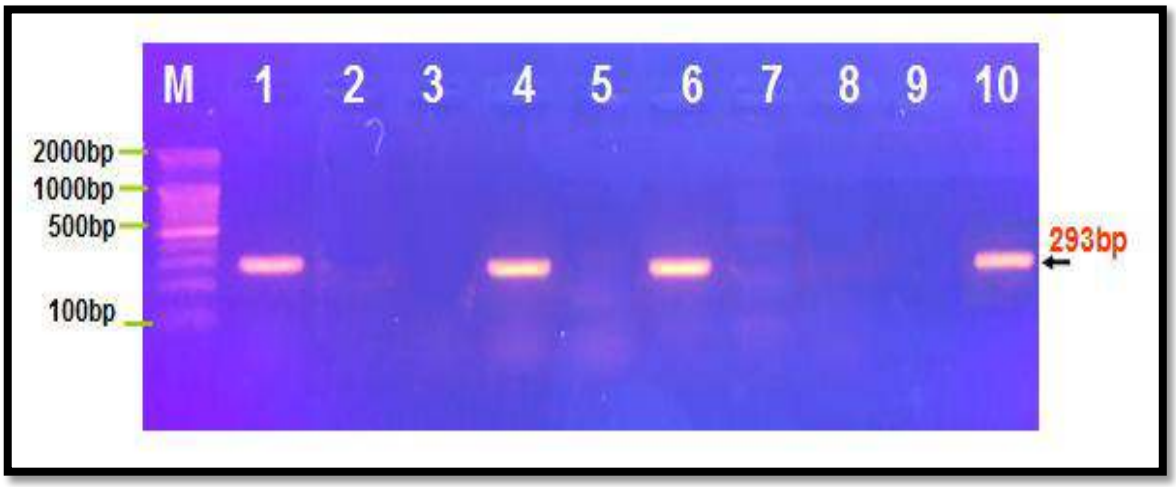
اما من الناحية الجينيـة فقد استعملت تقنية PCR للتحري عن الجينات المحللة للدم haemolysins gens التي تمتلكها العزلات البكتيرية، إذ استخلص DNA باستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض ورحّلَ كهربائياً على هلام الاكاروز (1.5%) وكشف عنه باستعمال صبغة الاثيديوم بروماید وفحص تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV).

فبالنسبة لبكتريا Staph . aureus فقد انتخبت 10 عزلات منها للتحري عن الجينات المحللة للدم، وقد اظهرت نواتج تضخيم البادئات احتواء جميع العزلات المختبرة بنسبة 100% للجين المشفر لإنتاج الهيمولايسين hla بناتج حجمة 190 bp (صورة 4-4)، ونسبة 40% من العزلات البكتيرية حاوية على الجين hlb بناتج حجمة 293 bp (صورة 4-5)، وهذا يعطي مؤشراً الى دور هذه الجينات في التسبب بإمراضية المكورات العنقودية الذهبية بين المرضى في المستشفيات. يعد الجين hla عامل الفوعة الرئيس المشفر الى إمراضيتها فهو ينشط ضد مجموعة من الخلايا المضيفة بما في ذلك كريات الدم الحمراء (Berube and Wardenburg, 2013)، اذ يكون الالفا - هيمولايسين hla مترافقاً مع الحالات السريرية الشديدة الامراضية عند مرضى اخماج المسالك البولية (Marrs et al., 2005).

وجاءت هذه النتائج مقاربة لما حصل عليه Ariyanti (2011) إذ ذكر ان إمراضيه هذه البكتريا تعزى الى انتاجها لأنزيم الهيمولايسين المشفر بالجين hla الذي تبلغ نسبة وجوده (81.18 %)، كما تتفق مع Moraveji وجماعته (2014) في ايران اذ وجدوا ان الجين hlb شكل نسبة (40%) من عزلات Staph .aureus التي مصدرها الانسان، كذلك تتفق مع ما توصل اليه Fei وجماعته (2011) الذين وجدوا ان نسبة (42.60%) من عزلات Staph .aureus حاوية على الجين hlb، في حين لا تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليه Ariyanti (2011) اذ وجد ان الجين hlb شكل نسبة (18.18%).



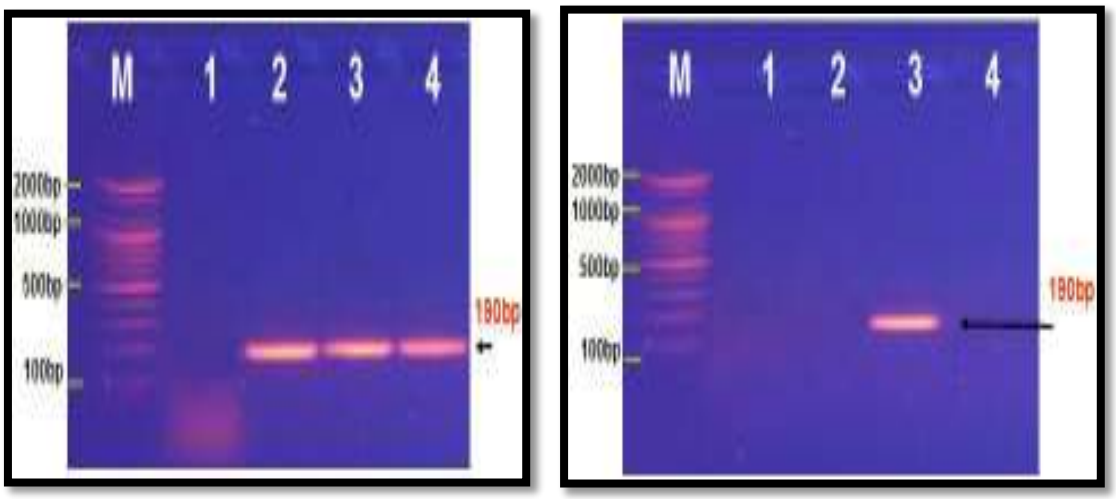
صورة (4-4): الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة، الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hla في عزلات جرثومة Staphylococcus aureus. إذ يمثل M: Marker (2000bp)، العزلات من (1-10) عزلات البكتريا الموجبة للفحص بناتج 190bp.



صورة (4-5): الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة، الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hlb في عزلات جرثومة Staphylococcus aureus. إذ يمثل M: Marker (2000bp)، العزلات من (1، 4، 6، 10) عزلات البكتريا الموجبة للفحص بناتج 293bp.

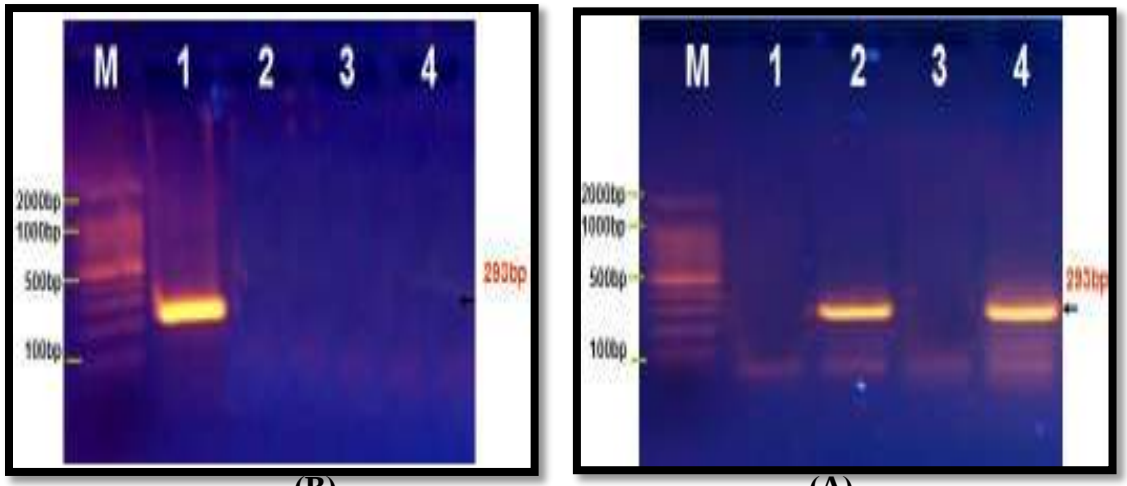
اما النوعان Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus فقد تم التحري عن الجينات المشفرة لانتاج الهيمولايسين hla و hlb في كلا النوعين، وقد اظهرت نواتج تضخيم الجينين بعد ترحيلهما على هلام الاكاروز (1.5%) المصبوغ بصبغة الاثيديوم بروماید وفحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية احتواء العزلات للجين hla بنسبة (25% و 75%) على التوالي بناتج حجمة bp190 (صورة 4-6)، اما الجين hlb فقد شكل نسبة تواجد بلغت (50% و 25%) على التوالي ايضاً بناتج حجمة293 bp (صورة 4-7).

جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Okee وجماعته (2012) اذ وجدوا ان 20% من عزلات Staph .epidermidis حاوية للجين hla، في حين جاءت هذه النتائج مخالفة لما توصل اليه Pinheiro وجماعته (2015) في البرازيل اذ وجدوا ان نسبة الجين hla في Staph .epidermidis و Staph .haemolyticus بلغت 92.9% و 91.7% على التوالي، اما الجين hlb فقد شكل نسبة 92.9% في Staph .epidermidis بينما لم يسجل وجود هذا الجين في Staph. haemolyticus.



(B) **(A)**

صورة (4-6): الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة، الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hla للمكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر CoNS إذ يمثل M: Marker (2000bp)، العزلة (3) في (A) عزلة بكتريا Staphylococcus epidermidis الموجبة للفحص، العزلات من (2-4) في (B) عزلات البكتريا Staphylococcus haemolyticus الموجبة للفحص بناتج 190bp.



(B) **(A)**

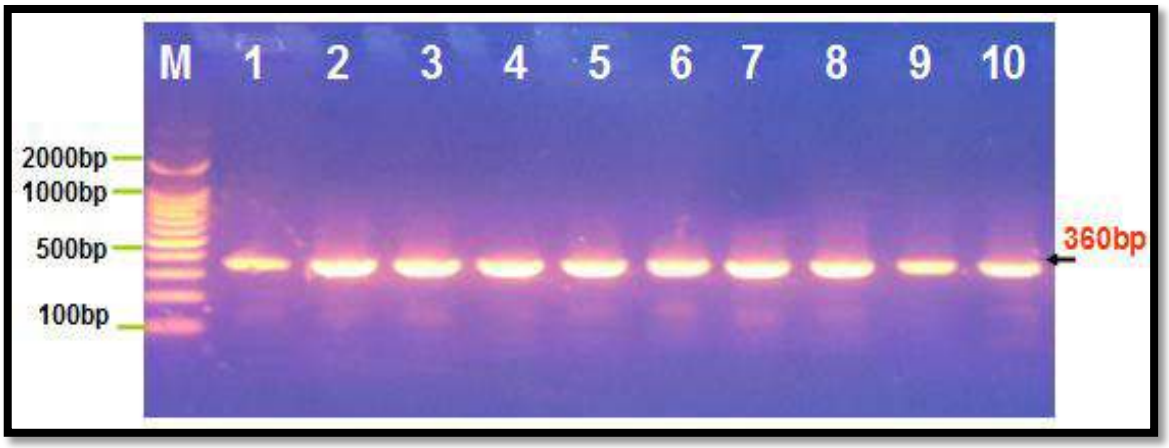
صورة (4-7): الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة، الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hlb للمكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر CoNS، أذ يمثل M: Marker (2000bp)، العزلات (4 و 2) في (A) عزلات بكتريا Staphylococcus epidermidisالموجبة للفحص، العزلة (1) في (B) عزلات بكتريا Staphylococcus haemolyticus الموجبة للفحص بناتج 293bp .

يعد الهيمولايسين المنتج من المكورات العنقودية واحداً من اهم عوامل الضراوة التي ترتبط بإمراضية هذه البكتريا (Ohlsen et al ., 1998). إذ يتداخل في اغشية الخلايا المضيفة وهو فعال ضد العديد من انواع الخلايا، بما في ذلك الخلايا الظهارية البولية (Nielubowicz and Mobley , 2010). تحلل المكورات العنقودية خلايا الدم الحمراء في المقام الاول بوساطة الالفا الهيمولايسين والبيتا هيمولايسين، اذ ان الالفا الهيمولايسين يشفر له بوساطة الجين hla (Wardenburg et al., 2007).

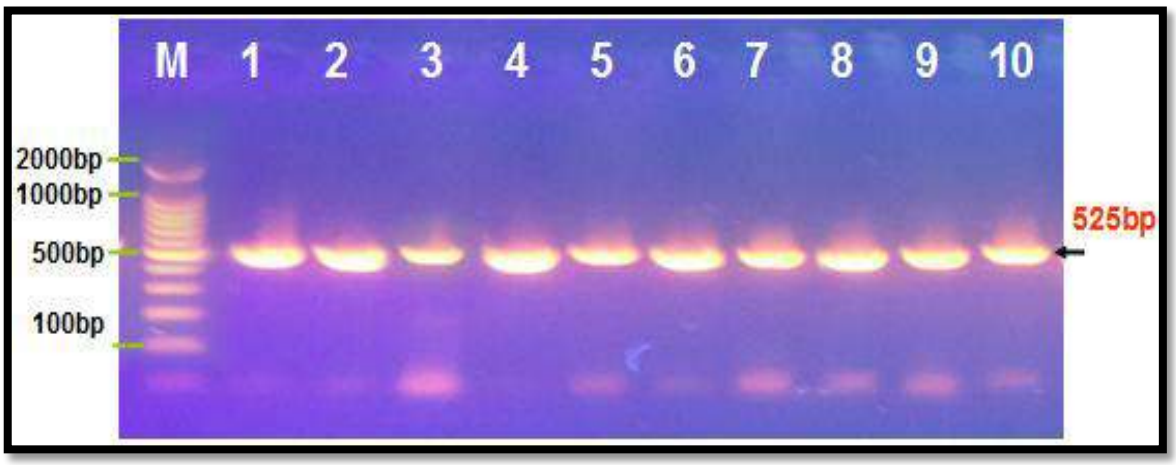
يفرز هذا السم من قبل الغالبية العظمى من المكورات العنقودية المعزولة سريرياً وهو فعال ضد مجموعة واسعة من خلايا الثديات مع نشاط ملحوظ خصوصاً ضد خلايا الدم الحمراء للأرانب (Husmann et al., 2009). اذ ان حال الدم الفا يمكن ان يتفاعل مع مستقبلات سطح الخلايا المضيفة ويشكل مسام صغيرة ويعمل على تحرير الايونات بشكل انتقائي او قد يؤثر على اشارات الخلية المضيفة ثم يحفز الموت الخلوي لمختلف انواع الخلايا (Liang et al.,2009). فضلاً عن ذلك فان سلالات معينة من المكورات العنقودية ايضاً تفرز السم بيتا الذي يشفر له بوساطة الجين hlb، اذ وجد ان السم بيتا له فعالية تحليلية عالية ضد خلايا الدم الحمر للاغنام وليس لخلايا الدم الحمراء للأرانب (Dinges et al., 2000).

وقد اشار Ariyanti (2011) ان وجود الجينين hla و hlb في بكتريا Staph .aureus والمكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر تكون هامة لهذه العزلات في التسبب بإصابات او عدوى هذه البكتريا التي تصيب الانسان والحيوان.

اما بالنسبة لبكتريا E.coli فقد اختيرت 10 عزلات منها للتحري عن الجينين hlyA و hlyB المشفرين لانتاج الهيمولايسين، وباستعمال تقنية PCR اظهرت نتائج تضخيم الجينات بعد الترحيل على هلام الاكاروز (1.5%) المصبوغة بصبغة الاثيديوم بروماید وفحصها تحت الاشعة فوق البنفسجية احتواء جميع العزلات قيد الدراسة بنسبة 100% على الجينين المشفرين لانتاج الهيمولايسين hlyA وhlyB بناتج حجمة 360 و 525 bp على التوالي (الصورتين 4-8 و 4-9). جاءت هذه النتيجة مقاربة لما حصل عليه Santo وجماعته (2006) اذ وجدوا ان سلالات E .coli المعزولة من مرضى اخماج المسالك البولية حاوية للجين hlyA بنسبة 96%، بينما لا تتفق نتائجنا مع Firoozeh وجماعته (2014) إذ وجدوا ان عزلات E.coli المسببة لخمج الحويض والكلية وخمج المثانة كانت حاوية للجين hly بنسبة 6.9% و 1.3% على التوالي.



صورة (4-8): الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة، الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hlyA في عزلات جرثومة Escherichia coli. إذ يمثل M: Marker (2000bp)، العزلات من (10 - 1) العزلات الموجبة للفحص بناتج 360bp.



صورة (4-9): الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير ولمدة ساعة واحدة، الذي يظهر نتائج فحص PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع hlyB في عزلات جرثومة Escherichia coli. إذ يمثل M: Marker (2000bp)، العزلات من (10 - 1) العزلات الموجبة للفحص بناتج 525bp.

يمثل الهيمولايسين واحداً من اهم عوامل الضراوة للبكتريا المسببة للاخماج خارج الامعاء، فهو يعمل ضد انواع مختلفة من الخلايا مثل خلايا الدم البيضاء الحبيبية وخلايا الدم البيضاء اللمفية وكريات الدم الحمراء والخلايا الكلوية الانبوبية (Sanchez et al., 2011). إذ يحطّم انزيم الهيمولايسين اغشية خلايا الدم الحمر من خلال احداث ثقوب صغيرة في اغشيتها، اذ ان وجود الهيمولايسين يعد عاملاً مهماً في تزويد البكتريا بما تحتاجه من الحديد، ونتيجة لسميته للخلايا فإنه يؤدي الى تدمير انسجة الكلية للمضيف (Liaw et al., 2000). اذ ان الهيمولايسين المنتج من بعض سلالات E. coli يعد من عوامل الضراوة المهمة في العديد من الاصابات مثل خمج الحويض والكلية وتسمم الدم (Johnson and Stell, 2000). وقد اشار May وجماعته (2000) الى ان السلالات غير القادرة على انتاج الهيمولايسين تكون اقل ضراوة وإمراضية من تلك المنتجه له. إذ ان معظم سلالات هذه البكتريا المتواجدة بهيئة نبيت طبيعي في امعاء الانسان ليس لها القابلية على انتاج الهيمولايسين، ولكن بمجرد استعمارها للمسالك البولية فإنها تصبح منتجة له (Brook et al., 2007).

4-4 : الكشف عن بعض عوامل الضراوة البكتيرية Detection of Some Bacterial Virulence Factors

1-4-4 : انتاج المحفظة Capsule Production

تم التحري عن احتواء العزلات البكتيرية المحللة للدم والبالغ عددها 48 عزلة للمحفظة بوساطة الفحص المجهري المباشر وباستعمال صبغة الحبر الهندي. وقد بينت نتائج الفحص (الجدول 4-8) احتواء 16 عزلة (33.%) للمحفظة من مجموع 48 عزلة، اذ كانت 8 عزلات (40%) مكونة للمحفظة تعود لبكتريا Staph. aureus، في حين كانت 7 عزلات (35%) منها تعود لبكتريا E.coli، فيما اظهرت عزلة واحدة من بكتريا Staph .haemolyticus القدرة على انتاج المحفظة بنسبة 25%، في حين لم يلاحظ وجود المحفظة في اية عزلة تابعة لبكتريا Staph .epidermidis وقد بين التحليل الاحصائي ان كلاً من E. coli و Staph. aureus و Staph .haemolyticus لم تختلف معنوياً في قدرتها على انتاج المحفظة عند مستوى معنوية ($P >0.05$)، في حين لوحظ اختلاف معنوي بينهما وبين Staph. epidermidis عند مستوى معنوية ($P <0.05$).

تشكل المحفظة الهيكل الخارجي من الخلية البكتيرية ولها دور مهم في التفاعل مع البيئة، إذ ان وجودها يمكن البكتريا من مقاومة الجفاف ويسهل استعمار انسجة المضيف فضلا عن مقاومة عملية البلعمة (Taylor and Roberts , 2005). وقد وجد ان المحفظة تكون عاملاً مهماً لمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية مثل E.coli لأنها تشترك في تنظيم مرور الجزيئات من خلال غلاف الخلية (Ganal et al., 2007). كما ان وجود المحفظة يوفر الحماية للبكتريا من تأثير المضادات الحيوية مما ينتج عنه زيادة في الاستجابة الالتهابية ثم الزيادة في تدمير الانسجة (Wilson et al., 2002).

جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه AL- Rubaey وجماعته (2007) الذين وجدوا ان 42% من Staph .aureus كانت قادرة على انتاج المحفظة. كما وجد ان معظم السلالات العائدة الى هذه البكتريا تحتوي طبقة مخاطية تدعى متعدد السكريد او تدعى المحفظة وهي التي تمكنها من مقاومة عملية البلعمة (Carey et al.,2008). كما جاءت هذه النتائج مقاربة أيضاً لما توصل اليه Olorunmola وجماعته (2013) اذ وجدوا ان 37.2% من عزلاتهم التابعة لبكتريا E.coli كانت حاوية للمحفظة، فيما جاءت نتائج هذه الدراسة مخالفة لما توصل اليه Al-Hilu (2014) فيما يتعلق بعزلاته العائدة الى Staph. haemolyticus اذ اشار في دراسته الى ان هذه البكتريا ليس لها

القدرة على انتاج المحفظة، في حين تتفق هذه النتائج معه فيما يخص عزلات Staph .epidermidis اذ لم يسجل انتاج المحفظة في عزلاته التابعة الى هذه البكتريا، كذلك تتفق مع ما توصلت اليه الموسوي (2006) اذ لم تكشف عن وجود المحفظة في Staph. epidermidis، فيما جاءت نتائج هذه الدراسة مخالفة لما توصلت اليه الشمري (2014) اذ بينت وجود المحفظة في جميع عزلات E.coli و Staph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus.

جدول (4 - 8) قابلية الانواع البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك البولية على انتاج المحفظة.

العزلات البكتيرية	العدد الكلي	العزلات المكونة للمحفظة	
		العدد	النسبة المئوية %
E.coli	20	7	35^{A}
Staph . aureus	20	8	40^{A}
Staph . epidermidis	4	0	0^{B}
Staph. haemolyticus	4	1	25^{A}
المجموع	48	16	33

الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية ($P>0.05$).
الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).

4-4-2: اختبار التلازن الدموي Haemagglutination Test

جرى التحري عن احتواء العزلات البكتيرية المحللة للدم على اهلاب الالتصاق من خلال قدرتها على تلازن كريات الدم الحمراء Haemagglutination of RBCs، أذ بينت نتائج الفحص (الجدول 4-9) ان 55% من عزلات E . coli اعطت نتيجة موجبة لهذا الاختبار، اما عزلات Staph aureus . فقد اظهرت قابلية على تلازن كريات الدم الحمراء بنسبة 30%، في حين كانت العزلات التابعة للنوعين Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus غير قادرة على تلازن خلايا الدم. وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود اختلافات معنوية بين الانواع البكتيرية عند مستوى معنوية ($P<0.05$).

تعد الاهلاب احد عوامل الضراوة الرئيسة المرتبطة بسلالات E.coli المسببة لاخماج الجهاز البولي، اذ تتوسط عملية الالتصاق بالمستقبلات المتخصصة للخلايا المضيفة، ثم تحافظ على بقائها وديمومتها في القناة البولية وتوفر لها الحماية من تأثير استجابة المضيف (Ulett et al., 2007). اما العزلات العائدة الى الأنواع التي يضمها جنس المكورات العنقودية فتمتاز بعدم امتلاكها عوامل الالتصاق المرتبطة بالاهلاب (Fimbrial adhesions) (Bermudez and Sangari, 2000)،

لكنها تمتلك مجموعة من البروتينات السطحية (Surface Proteins) التي تُعَدّ مهمة في الالتصاق ببروتينات المضيف مثل البروتين المرتبط بـ Fibronectin – binding protein وFibrinogen وElastin و Collagen و Protein A (Murray et al., 2013). اذ تمثل هذه البروتينات مركبات خارج خلوية تعطي البكتريا القدرة على الالتصاق بالسطوح الخارجية والداخلية لأنسجة المضيف فضلاً عن ذلك تمتلك معظم سلالات Staph .aureus بروتينات لها القابلية على الارتباط مع Fibrin و Fibrinogen وClumping factors والتي تمكنها من الالتصاق مع الدم المتخثر واحداث الاصابة في الانسجة المختلفة (Todar, 2005).

جاءت هذه النتائج متقاربة مع نتائج العزاوي والدليمي (2007) اذ وجدا ان 50% من عزلات E .coli اظهرت القدرة على تلازن كريات الدم الحمراء، في حين اختلفت نتائجنا معهما فيما يخص Staph .aureus إذ لم تظهر اية عزلة من عزلاتهم قدرة على تلازن كريات الدم الحمراء. وقد جاءت نتائج هذه الدراسة مخالفة لنتيجة الموسوي (2006) اذ وجدت ان 83% من عزلات E.coli اعطت نتيجة موجبة لهذا الفحص، في حين تتفق نتائجنا معها اذ لم تظهر عزلات Staph . epidermidis قدرة على تلازن خلايا الدم الحمراء.

جدول (4 -9) قابلية الانواع البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك البولية على تلازن كريات الدم الحمراء.

العزلات البكتيرية	العدد الكلي	العزلات القادرة على التلازن	
		العدد	نسبة المئوية%
E.coli	20	11	55^{A}
Staph. aureus	20	6	30^{B}
Staph .epidermidis	4	0	0^{C}
Staph. haemolyticus	4	0	0^{C}
المجموع	48	17	35

الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية ($P>0.05$).
الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).

4-4 -3 :تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation

أجري اختبار التحري عن قابلية العزلات البكتيرية على تكون طبقة الغشاء الحيوي باستخدام طريقة الأنبوب (Tube Method)، تكون النتيجة الموجبة عندما تتكون الاغشية الحيوية على الجدران الداخلية وقعر الانابيب بشكل طبقة بنفسجية.

وقد اظهرت النتائج المبينة في (الجدول 4-10) ان E.coli ابدت اعلى نسبة لتكوين الغشاء الحيوي اذ كانت 12 عزلة بنسبة 60% مكونة لهذا الغشاء، بينما اظهرت 9 عزلات بنسبة 45% من Staph .aureus نتيجة موجبة للاختبار، اما بكتريا Staph. haemolyticus فقد اظهرت عزلتان منها فقط القدرة على انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 50%، في حين كانت بكتريا Staph. epidermidis لها عزلة واحدة فقط هي المنتجة للغشاء الحيوي بنسبة 25%. وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود اختلافات معنوية بين كل من E.coli و Staph .aureus و Staph haemolyticus. في قدرتها على تكون طبقة الغشاء الحيوي، لكن اظهرت اختلافات معنوية بينهما وبين Staph. epidermidis عند مستوى ($P>0.05$).

تعد قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي من اكثر عوامل الضراوة انتشاراً، وهي ممكن ان تتواجد في البكتريا التي تعيش في البيئة الخارجية او ضمن الممرضات (Hola et al., 2006). تتميز E.coli المسببة لاخماج المسالك البولية بإنتاجها لطبقة الغشاء الحيوي الذي يعمل على توفير الحماية لها من الدفاعات المناعية الكامنة في المضيف، نظراً لكونه يعمل على تحوير البيئة للخلايا الملتصقة من خلال تركيز المواد المغذية وحماية الخلايا البكتيرية من المضادات الحيوية والبايولوجية والخلايا البلعمية (Garofalo Corinne et al., 2007)، كما تتميز المكورات العنقودية الذهبية والمكورات العنقودية الموجبة والسالبة لأنزيم التجلط بقابليتها على استيطان المضيف والالتصاق بالأسطح الحية من خلال انتاج الاغشية الحيوية، اذ ان قدرتها على تكوين الاغشية يسمح لها بالتخلص من الدفاعات المناعية للمضيف والعلاج بالمضادات الحيوية (Evgueny et al., 2006).

جاءت هذه النتائج متقاربة مع ما حصل عليه Nair وجماعته (2013) الذين وجدوا ان نسبة 67% من E.coli اظهرت القابلية على تكوين الغشاء الحيوي، كما جاءت نتائج هذه الدراسة فيما يتعلق ببكتريا Staph .aureus ادنى مما توصلت اليه Al-Omari وجماعتها (2013) اذ وجدوا ان نسبة عزلاتها المنتجة للغشاء الحيوي بطريقة الانبوب بلغت 87.5%، كما ان نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه Silva وجماعته (2013) اذ وجدوا ان نسبة Staph .haemolyticus المنتجة للغشاء الحيوي بلغت 60%، كذلك تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليه AL-Hilu (2014) اذ اشار

الى ان نسبة Staph .epidermidis المكونة لطبقة الغشاء الحيوي بلغت 26%، فيما جاءت هذه النتائج مخالفة لما توصل اليه Gad وجماعته (2009) اذ وجدوا ان 88.6% من عزلات Staph. epidermidis كانت مكونة لطبقة الغشاء الحيوي.

جدول (4- 10) قابلية الانواع البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك البولية على تكوين الاغشية الحيوية.

العزلات البكتيرية	العدد الكلي	العزلات المكونة للغشاء الحيوي	
		العدد	النسبة المئوية%
E.coli	20	12	60^{A}
Staph .aureus	20	9	45^{A}
Staph .epidermidis	4	1	25^{B}
Staph .haemolyticus	4	2	50^{A}
المجموع	48	24	50

الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية ($P>0.05$).
الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).

5-4 : مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية Resistant Isolates Bacterial of Antibiotics

اختبرت حساسية العزلات البكتيرية المحللة للدم البالغ عددها (48) عزلة تجاه (13) نوعاً من المضادات الحيوية، وقد اظهرت نتائج الاختبار أن مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية كانت متفاوتة تبعاً لنوع العزلة البكتيرية وطبيعة المضاد الحيوي.

اظهرت النتائج المبينة في (الجدول 4-11) ان جميع العزلات البكتيرية اظهرت مقاومة لمضادات البيتالاكتام المتمثلة بمجموعة البنسلينات والسيفالوسبورينات، اذ ان كلاً من E.coli و Staph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus تميزت بمقاومة تامة لمضاد Ampicillin بنسبة 100% أي ان البكتريا لا تتأثر بوجود هذا المضاد. اما فيما يتعلق بمضاد Mathecillin فقد قاومته عزلات Staph. aureus وStaph. epidermidis و Staph. haemolyticus بنسبة 90% و 25% و 100% على التوالي، اذ بينت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود اختلافات معنوية بين كل من Staph. aureus و Staph. haemolyticus في حين لوحظ اختلاف معنوي بينهما وبين Staph. epidermidis عند مستوى معنوية ($P<0.05$)، قد يرجع سبب

هذه المقاومة لمضاد Methicillin الى حصول تغيير في موقع الهدف متمثلة بأنزيمات Transpeptidases وعادة ما تسمى بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين ((PBPs) (Ryan and Ray, 2004).

اما بالنسبة لمضادات السيفالوسبورينات المتمثلة بالمضاد Cephalothin فقد اظهرت بكتريا E.coli مقاومة بنسبة 80%، في حين ابدت عزلات كل من Staph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus مقاومة بلغت 75%.

ابدت العزلات البكتيرية في هذه الدراسة تبايناً ملحوظاً في مقاومتها لمضادات البيتالاكتام. وقد تعزى اسباب المقاومة البكتيرية هذه نتيجة افرازها لأنزيمات البيتالاكتام التي تعمل على تثبيط فعالية مضادات البيتالاكتام من خلال كسر حلقة البيتالاكتام في مجموعة البنسلينات والسيفالوسبورينات (Anderwes et al., 2002). تتفق هذه النتائج مع دراسة Ibraheim (2006) اذ وجد ان E.coli قد قاومت مضاد Ampicillin بنسبة 100%، كما انها مقاربة لما توصل اليه Ghadiri وجماعته (2012) اذ وجدوا ان المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التجلط قاومت هذا المضاد بنسبة 97.1%، بينما لا تتفق مع النتيجة التي توصل اليها Shah and Kumar (2014) اللذان وجدا ان نسبة المقاومة لمضاد Ampicillin من قبل Staph. aureus هي 24%، كما انها مقاربة لما توصل اليه Czekaj وجماعته (2015) اذ وجدوا ان Staph. haemolyticus قاومت مضاد Methicillin بنسبة 80%، في حين لم تتفق نتائجنا مع Ghadiri وجماعته (2012) اذ وجدوا ان E.coli قاومت مضاد Cephalothin بنسبة 10%.

اما بالنسبة لمضادات مجموعة Aminoglycosides التي ضمت Amikacin و Gentamycin فقد تميزت جميع العزلات البكتيرية المدروسة بانعدام المقاومة لمضاد Amikacin، في حين كانت المقاومة لمضاد Gentamycin قد بلغت 40% و 50% و 25 % و 75% ابدتها E.coli وStaph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus على التوالي، ان سبب المقاومة لمضاد Gentamycin قد يرجع الى وجود الجين الذي يشفر لإحداث تغيير في الموقع الهدف الذي يتمثل بالوحدة الرايبوسومية الثانوية (30S) الذي يرتبط به المضاد مسبباً حدوث المقاومة الجرثومية (Hanaki, 2004). جاءت هذه النتائج متفقة مع النتائج التي حصلت عليها الشمري (2014) اذ اشارت الى ان جميع عزلات E.coli وStaph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus المعزولة من مرضى اخماج المسالك البولية تميزت بانعدام المقاومة لمضاد Amikacin، في حين تباينت نتائجنا معها فيما يخص مضاد

Gentamycin اذ كانت عزلات Staph. aureus حساسة 100% لهذا المضاد بينما Staph. haemolyticus قاومت هذا المضاد بنسبة 33.33%، كذلك تتفق نتائجنا مع ما توصل اليه Czekaj وجماعته (2015) اذ وجدوا ان نسبة المقاومة لهذا المضاد من قبل Staph. haemolyticus بلغت 73%.

اما مضاد Ciprofloxacin الذي يعود الى مجموعة Quinolones فقد ابدت عزلات E.coli و Staph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus نسبة مقاومة بلغت 70% و 75% و 50% و 55% على التوالي، كما وجد ان نسبة المقاومة لمضاد Norfloxacin من قبل E.coli و Staph. aureus كانت 30% و 60% على التولي، بينما ابدت كل من Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus نسبة مقاومة لهذا المضاد بلغت25% لكل منهما، قد تحدث المقاومة لهذه المجموعة من المضادات الحيوية نتيجة الطفرات الكروموسومية في الجينات المشفرة لانتاج DNA gyrase و Topoisomerase type IV، ومن اليات المقاومة الاخرى التي تقلل امتصاص المضاد نتيجة الطفرات في الجينات المنظمة لأغشية النفاذية او عن طريق انظمة التدفق (Murray et al., 2013).

جاءت هذه النتائج مقاربة للنتيجة التي حصلت عليها الشمري (2014) اذ وجدت ان مقاومة Staph. aureus لمضاد Ciprofloxacin بلغت 50%، بينما لم تتفق نتائجنا معها فيما يخص عزلاتها العائدة لبكتريا Staph .epidermidis و Staph. haemolyticus فقد بلغت نسبة المقاومة 0% و 33.33% على التوالي، كما جاءت هذه النتائج متقاربة مع Alsohaili (2015) فيما يخص مضاد Norfloxacin اذ بلغت نسبة مقاومة بكتريا E.coli ضده 34.8% ، وقد جاءت هذه النتيجة مخالفة لما توصل اليه Frashad وجماعته (2012) اذ توصلوا الى ان نسبة المقاومة لهذين المضادين من قبل E.coli كانت 8.3%.

اما المضاد Trimethoprim فقد اظهرت E.coli و Staph. aureus مقاومة له بلغت 60% و 45% في حين اعطت كل من Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus نسبة مقاومة 50% لكل منهما، اذ اظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود اختلافات معنوية بين الانواع البكتيرية عند مستوى ($P>0.05$). جاءت نتائجنا متفقة مع النتائج التي حصل عليها Hadi (2008) اذ وجد ان نسبة مقاومة بكتريا E.coli له 60.5%، في حين جاءت هذه النتائج مخالفة لنتيجة Shah and Kumar (2014) اذ وجدا ان نسبة المقاومة له من قبل Staph. aureus كانت 66.6%.

كما ابدت بكتريا E.coli و Staph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus مقاومة لمضاد Tetracycline بلغت 65% و 75% و 50% و 100% على التوالي مع وجود اختلافات معنوية بين هذه الانواع البكتيرية في مقاومتها للمضاد، قد يعزى سبب المقاومة هذه الى انظمة التدفق Efflux systems التي تمتلكها البكتريا اذ تقلل هذه الانظمة تراكم المضاد الحيوي داخل الخلية (Tortora et al., 2004). جاءت هذه النتائج متقاربة مع Sabir وجماعته (2014) اذ بلغت مقاومة E.coli له 69.4%، الا ان هذه النتيجة لا تتفق مع Nasrolahi وجماعته (2013) في ايران اذ وجدوا ان نسبة مقاومة هذه البكتريا لهذا المضاد هي 26.3%، كما لم تتفق مع Al-Hilu (2014) فيما يخص عزلاته التابعة لـ Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus التي قاومت هذا المضاد بنسبة 38.46%، 50.94% على التوالي.

اما مضاد Chloramphynicol فقد اظهرت E.coli و Staph. aureus نسبة مقاومة له بلغت 30% و55% على التوالي بينما ازدادت نسبة المقاومة له من قبل كل من Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus لتصبح 50% لكل منهما، قد يعود سبب المقاومة لهذا المضاد الى تحطمه من قبل انزيم Chloramphenicol Acetyl Transferase الذي هو تحت سيطرة بلازميدية (Carroll et al., 2016).

اما مضاد Rifampicin فقد بينت النتائج ان بكتريا E . coli اظهرت اختلافاً معنوياً عند مقارنتها بمثيلاتها من الانواع البكتيرية الاخرى قيد الدراسة، اذ ابدت هذه البكتريا مقاومة عالية لهذا المضاد بلغت 85%، اذ ابدت عزلات Staph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus مقاومة لهذا المضاد بنسبة 55% و 25% و 50% على التوالي، قد يرجع سبب مقاومة العزلات لمضاد Rifampicin نتيجة لحدوث الطفرات الوراثية التي تؤدي الى تغيير في تركيب انزيم RNA Polymerease ثم يفقد المضاد القدرة على الارتباط به (Brook et al., 2004). وهذه النتيجة مقاربة لنتيجة Ibrahim وجماعته (2014) اذ وجدوا ان نسبة مقاومة بكتريا E.coli لهذا المضاد 80%، كما جاءت نتائجنا متقاربة مع ما توصل اليه AL-Hilu (2014) اذ كانت نسبة مقاومة Staph. haemolyticus لهذا المضاد 47.17%.

وبينت النتائج ان Staph. aureus و Staph. epidermidis قد قاومت مضاد Clindamycin بنسبة 55% و 50% على التوالي، ولوحظ وجود اختلافات معنوية بينهما وبين Staph. haemolyticus اذ ابدت الاخيرة حساسية تامة لهذا المضاد، وقد اشار Murray وجماعته (2013) ان مورثة inuA هي المسؤولة بالدرجة الاولى عن المقاومة للكلندامايسين.

وقد اظهرت نتائج هذه الدراسة ان المضاد الحيوي Vancomycin قد انفرد بكونه المضاد الافضل اذ تميزت جميع عزلات Staph. aureus و Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus بانعدام المقاومة له. ولا بد ان نشير الى ان انخفاض مقاومة بكتريا Staph. aureus لمضاد Vancomysins كان سبباً في استعمال هذا المضاد لعلاج الاخماج الشديدة الناجمة عن بكتريا Staph. aureus المقاومة للمستلين ومضادات البيتالاكتام. وهذه النتيجة متفقة تماماً مع ما حصل عليه Shah and Kumar (2014) اذ وجدا ان جميع عزلات Staph. aureus انعدمت مقاومتها له، كما انها تتفق مع نتيجة AL-HiLu (2014) اذ وجد كل من Staph. haemoluticus و Staph. epidermidis انعدامت مقاومتها لهذا المضاد.

جدول (4 -11) مقاومة الانواع البكترية المعزولة من أخماج المسالك البولية تجاه مجموعة من المضادات الحيوية.

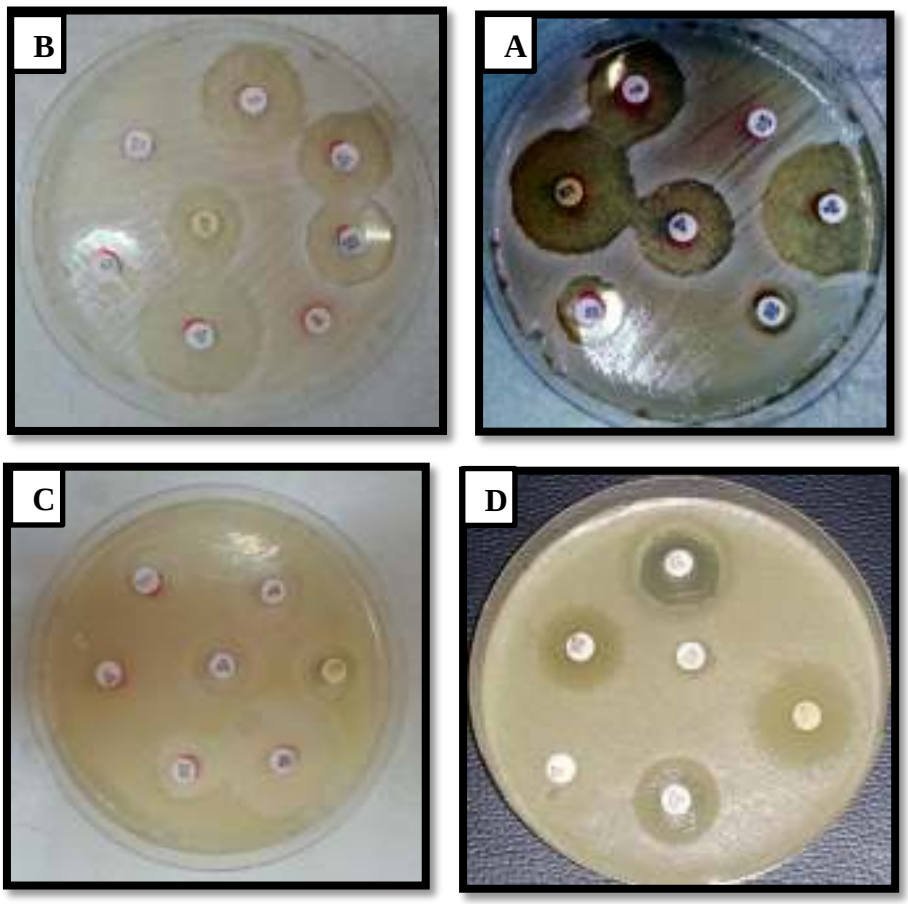
Staph .haemolyticus N=4		Staph .epidermidi N=4		Staph .aureus N=20		E.coli N=20		الانواع البكتيرية
%	R	%	R	%	R	%	R	المضاد البكتيري
100^{a}	4	100^{a}	4	100^{a}	20	100^{a}	20	Ampicillin
100^{a}	4	25^{b}	1	90^{a}	18	*	*	Methicillin
75^{a}	3	75^{a}	3	75^{a}	15	80^{a}	16	Cephalothin
0^{a}	0	0^{a}	0	0^{a}	0	0^{a}	0	Amikacin
75^{c}	3	25^{b}	1	50^{a}	10	40^{ba}	8	Gentamycin
50^{b}	2	75^{a}	3	55^{b}	11	70^{a}	14	Ciprofloxacin
25^{a}	1	25^{a}	1	60^{b}	12	30^{a}	6	Norfloxacin
50^{a}	2	50^{a}	2	45^{a}	9	60^{a}	12	Trimethoprim
100^{c}	4	50^{b}	2	75^{a}	15	65^{ba}	13	Tetracyclin
50^{a}	2	50^{a}	2	30^{b}	6	55^{a}	11	Chloramphynicol
50^{b}	2	25^{c}	1	55^{b}	11	85^{a}	17	Rifampicin
0^{b}	0	50^{a}	2	55^{a}	11	*	*	Clindamysin
0^{a}	0	0^{a}	0	0^{a}	0	*	*	Vancomycin

* / تدل على عدم استخدام المضاد

الحروف الصغيرة تشير الى القراءة الاحصائية الافقية (بين الجراثيم لنفس المضاد).

الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية ($P>0.05$).

الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).



صورة (4-10) اختبار المقاومة للمضادات الحيوية.
(A) Staph. aureus (B) Staph. haemolyticus (C) Staph. epidermidis (D) E. coli

4-6: اختبار فعالية المطهرات تجاه الانواع البكتيرية المعزولة Test the Activity of Antiseptics Against Isolated Bacterial Species

تم التحري عن حساسية العزلات البكتيرية المحللة للدم تجاه المطهرات المستعملة في الدراسة (الديتول والبوفيدين - ايودين والايودين) كونها الاكثر استعمالاً وتداولا في عمليات التعقيم والتطهير في المستشفيات، لبيان تأثيرها على البكتريا المعزولة من المرضى المصابين باخماج المسالك البولية.

وقد اظهرت النتائج المبينة في الجدول (4-12) ان نسب التثبيط كانت متباينة حسب نوع البكتريا وطبيعة المطهر وتركيزه، إذ كان الديتول هو المطهر الاكفأ في تأثيره على الانواع البكتيرية عند استعماله بتركيز 10% اذ اظهرت E.coli نسبة مقاومة بلغت 25%، وقد تراوحت اقطار مناطق التثبيط لعزلاتها بين (10- 26) ملم (الملحق 7). في حين اظهرت Staph .aureus نسبة مقاومة بلغت 30% بأقطار مناطق تثبيط تراوحت بين (11 – 22) ملم وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية بينهما عند مستوى ($P>0.05$) في حين وجدت فروقات معنوية بينهما وبين النوعين Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus إذ انعدمت المقاومة وكانت جميع

عزلاتها حساسة لمطهر الديتول عند استعماله بالتركيز 10% ضد Staph. epidermidis وقد كانت اقطار التثبيط لعزلاتها بين (5 – 21) ملم ولبكتريا Staph. haemolyticus بين (12 - 20) ملم. اما عند استعمال مطهر الديتول بتركيز 5% ابدت Staph. epidermidis اعلى نسبة مقاومة بلغت 50%، بينما اظهرت Staph. haemolyticus اقل نسبة مقاومة بلغت 25% مع اقطار تثبيط بلغت (7 – 16) ملم (الملحق 7)، لكن عند استعماله بالتركيز 1% قاومته عزلات Staph. epidermidis بنسبة 75%، بينما ابدت كل من E.coli و Staph. aureus نسبة مقاومة بلغت 55% و 45% على التوالي.

يتضح من النتائج المبينة في الجدول (4-12) انه كلما زاد تركيز الديتول زادت فعاليته في التأثير على العزلات البكتيرية وانخفضت نسبة المقاومة له، و قد يعزى سبب ذلك الى ان فعالية الديتول تنخفض عند التخفيف، إذ ان المطهر بتراكيزه الواطئة يعمل على الغشاء السايتوبلازمي موديا الى زيادة نضوحيته، اما عند زيادة التركيز فيعمل على تخثر البروتينات الخلوية والانزيمات مسبباً موت الخلية بشكل اسرع (الزيدي، 2000). تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما حصلت عليه الأوسي (2012) اذ اشارت في دراستها الى ان الديتول هو الاكفأ في تثبيط العزلات البكتيرية ذات المصدر السريري. لوحظ ان الديتول يثبط الجراثيم من خلال فعاليته في تخثر البروتوبلازم وتحطيم الجدار الخلوي وبروتيناته (Block, 1983). اذ يعد الديتول من المطهرات التي تُحْدِث تحوير فيزيائي وكيميائي للبروتينات والانزيمات وDNA للخلية البكتيرية من خلال كسر الاصرة الهيدروجينية الكبريتية محدثاً تلازناً ودنترة وترسيباً (Babb, 1996). عند استعمال الديتول معقماً سيقضي على البكتريا ويقي الجسم من البكتريا التي من شأنها ان تسبب الامراض والعدوى وتعزى فعاليته في ابادة البكتريا الى ما يحتويه من مكونات مضادة للميكروبات فهو يعمل بفعالية ضد مجموعة البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Mcdonell and Russel, 1999).

أما مطهر البوفيدين - ايودين فلوحظ ان العزلات البكتيرية قد قاومته بنسب متفاوتة تبعاً لنوع البكتريا ومستوى تركيزه، إذ عند التركيز 10% اظهرت Staph. aureus مقاومة له بلغت 50% وقد تراوحت اقطار مناطق التثبيط لها بين (5 – 20) ملم (الملحق 7) واظهرت E.coli نسبة مقاومه 35% وقد بلغت اقطار مناطق التثبيط لها بين (8 - 22) ملم واظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية بين Staph. aureus و E.coli في مقاومتهما لمطهر البوفيدين - ايودين بتركيز 10% في حين توجد اختلافات معنوية بينهما وبين Staph. haemolyticus، اذ كانت جميع عزلات Staph. haemolyticus حساسة لهذا المطهر بتركيز10% مع اقطار مناطق تثبيط تراوحت بين (9 - 18) ملم (الملحق 7).

اما عند التركيز 5% لمطهر البوفيدين - ايودين فأظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود اختلافات معنوية بين الانواع البكتيرية في مقاومتها لهذا المطهر عند مستوى معنوية ($P>0.05$)، إذ كانت نسبة المقاومة له 40% من قبل Staph. aureus مع اقطار مناطق تثبيط تراوحت بين (6 – 15) ملم بينما اظهرت E.coli نسبة مقاومة بلغت 30% وتراوحت اقطار مناطق التثبيط لها بين (7 - 16) ملم، في حين كانت نسبة المقاومة متساوية لكل من Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus وهي 25% عند التركيز 5% ايضاً.

وعند التركيز 1% لمطهر البوفيدين - ايودين اظهرت E.coli نسبة مقاومة بلغت 60% وقد بلغت اقطار مناطق التثبيط لعزلاتها بين (6 – 10) ملم، كما اظهرت Staph. aureus نسبة مقاومة بلغت 65% وكانت اقطار مناطق التثبيط لها تتراوح من (3 - 9) ملم (الملحق 7)، في حين زادت نسبة المقاومة له عند التركيز1% ايضاً لتصبح 75% ابدتها Staph. epidermidis وهي اعلى نسبة مقاومة له، بينما اظهرت Staph. haemolyticus نسبة مقاومة 50% عند هذا التركيز مع وجود فروق معنوية قدرت بـ ($P<0.05$) بين هذين النوعين من البكتريا.

وقد وجد ان البوفيدين - ايودين يعمل على القضاء على البكتريا دون ان يسبب تهيجاً ولا يتفاعل مع المواد التي يطهرها (Jones and Milton, 2000). إذ ان وجود البوفيدين- ايودين يزيد من كفاءة بعض العقاقير الضعيفة (Kibbe, 2000)، كما يمكن استعماله لأكثر من غرض واحد اذ يكون قاتلاً للبكتريا فضلاً عن الاستعمالات التطهيرية الاخرى (Goldenheim, 1993) كما انه لا ينتج عنه تهيج او تحسس او احمرار للجلد (Walwaikar et al., 2002).

اما مطهر الايودين فقد اظهرت العزلات البكتيرية المدروسة مقاومة له بتراكيزه المختلفة، فعند استعماله بالتركيز 10% كانت اعلى نسب مقاومة له اظهرتها Staph. epidermidis بلغت 75% كما ابدت E.coli نسبة مقاومة بلغت 70% وقد تراوحت اقطار مناطق التثبيط لها بين (4 – 10) ملم كما هو مبين في الملحق (7)، بينما اظهرت Staph. aureus نسبة مقاومة بلغت 55% وقد كانت اقطار مناطق التثبيط لها تتراوح بين (5- 11) ملم في حين اظهرت Staph. haemolyticus اقل نسبة مقاومة بلغت 50% وتراوحت اقطار التثبيط لها بين (6- 13) ملم. اما عند التركيز 5% فقد اعطت كل من عزلات Staph. epidermidis و Staph. haemolyticus نسبة مقاومة بلغت 75%.

وفي التركيز 1% من هذا المطهر فقد كانت المقاومة تامة ضده هي 100% ابدتها Staph. epidermidis، كما اظهرت E. coli نسبة مقاومة عالية نسبياً عند هذا التركيز بلغت 85% مع أقطار مناطق تثبيط صغيرة بلغت (3 – 5) ملم، بينما سجلت Staph. aureus نسبة مقاومة بلغت

70% وقد بلغت اقطار التثبيط لها (4 – 9) ملم، في حين اظهرت Staph. haemolyticus نسبة مقاومة بلغت 50% وقد كانت اقطار مناطق التثبيط لعزلاتها عند هذا التركيز تتراوح بين (3 - 5) ملم (الملحق 7).

وقد يرجع سبب المقاومة التي تبديها العزلات البكتيرية للمطهرات في هذه الدراسة الى تعرض تلك العزلات بكثرة الى المضادات الحيوية ومواد التعقيم التي قد ينتج عنها حدوث طفرات جينية مقاومة، إذ ان تعرض البكتريا المتكرر للمطهر يعمل على زيادة مقاومتها ثم يؤدي الى حدوث تغيرات في انزيمات النفاذية (permeases) للخلايا المعرضة بحيث لا تتمكن من امتصاص المضاد الحيوي والمطهر مما يؤدي الى زيادة مقاومتها (Shamsuddeen et al., 2010). كما ان عدم معرفة الية عمل هذه المطهرات والاستعمال المستمر والعشوائي لها ادى الى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لهذه المطهرات (Guimaraes et al., 2000).

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

5- الاستنتاجات والتوصيات: Conclusions and Recommendations

5-1 الاستنتاجات: Conclusions

1. تميزت كل من بكتريا E.coli و Staph .aureus بأنها الأشيع والاوسع انتشاراً بوصفها مسببات لأخماج المسالك البولية، كما كانت جميع السلالات البكتيرية المحللة للدم تقع ضمن عزلات E.coli وعزلات الانواع التابعة لجنس .Staphylococcus spp.
2. أخماج المسالك البولية البكتيري منتشر في النساء بنسبة اعلى مما هي عليه في الرجال.
3. قدرة عزلات E.coli وانواع المكورات العنقودية .Staphylococcus spp المنتجة للهيمولايسين على تحليل فصائل الدم البشري بنسب مختلفة وكانت الفصيلة AB هي أعلى الفصائل تحللاً.
4. الفعالية الايضية التي تمكن البكتريا من انتاج الهيمولايسين وتحليل الدم مشفرة وراثياً تتمثل بالجينين hla و hlb في .Staphylococcus spp وبالجينين hlyA و hlyB في E.coli.
5. ثبت امتلاك العزلات البكتيرية لبعض عوامل الضراوة وهي تكوين المحفظة وتلازن كريات الدم الحمراء وتكوين الاغشية الحيوية بنسب مختلفة، اذ كانت E.coli الاعلى نسبة في تلازن كريات الدم الحمراء وتكوين الاغشية الحيوية بينما Staph .aureus الاعلى نسبة في تكوين المحفظة.
6. مضاد Amikacin كان فعالاً في علاج هذه الأخماج لكون جميع العزلات حساسة له، كما يمكن عدّ مضاد Vancomycin مناسباً في علاج الاخماج التي تسببها المكورات العنقودية وذلك لحساسية عزلاتها لهذا المضاد بينما مضاد Ampicillin لا ينفع في علاج اخماج المسالك البولية وذلك بسبب مقاومة جميع العزلات البكتيرية له.
7. المطهرات المستخدمة في السيطرة على البكتريا المعزولة من أخماج المسالك البولية كانت مؤثرة في جميع التراكيز وكانت أفضل حالات التثبيط عند التركيز 10% وكان الديتول هو الأكفأ من بين المطهرات المستخدمة.

2-5 التوصيات : Recommendations

1. أجراء دراسات تتناول الربط بين تأثير المضادات الحيوية وبين عوامل الضراوة في البكتريا المسببة لإصابات المسالك البولية وعلاقة ذلك بصحة الانسان.
2. دراسة طرز تحلل الدم في الانسان واللبائن الاخرى والكشف عن الاليات المختلفة لتأثير المضادات الحيوية والمطهرات في خصائص البكتريا وقدرتها على تحلل الدم التي تشترك في تطوير عمل هذه المواد في التأثير على البكتريا الممرضة مستقبلاً.
3. اجراء المزيد من الدراسات على بكتريا E.coli والانواع التابعة لجنس Staphylococcus spp. فيما يخص عوامل الضراوة المتعلقة بأمراضيتها بأستعمال التقنيات الحديثة مثل تقنية Real time PCR (RT PCR) .
4. ضرورة تنفيذ دراسات جزيئية متطورة للكشف عن الطرائق التي تؤدي الى انتاج عزلات بكتيرية ذات خصائص إمراضية تمكنها من استعمار الجهاز البولي مستقبلاً واحداث الخمج فيه.
5. التعرض لدراسة الاحياء المجهرية الاخرى من غير البكتريا التي تغزو المسالك البولية وتخمجها كألاعفان والخمائر والفايروسات والابتدائيات.
6. استعمال المواد الطبية المضادة للبكتريا والمستخلصة من النباتات وخلطها مع المضادات الحيوية لرفع كفاءة هذه المضادات في تثبيط البكتريا المرضية وقتلها.
7. التركيز على تحديد مسببات المقاومة للجراثيم المرضية تجاه المضادات الحيوية وبيان منشئها الجزيئي ان كان كروموسومياً او بلازميدياً وايجاد طريقة للتخلص من البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة.
8. زيادة نشر الوعي الصحي بين مختلف فئات المجتمع في مجال النظافة والعناية بالصحة وعدم استعمال المضادات الحيوية الإ بإشراف طبي واجراء تقويم دوري للمضادات الحيوية والمطهرات المتداولة في المراكز الصحية للحيلولة دون ظهور السلالات البكتيرية المقاومة.

المصادر

References

المصادر: **References**

المصادر العربية :

الاوسي، غيداء لطيف رحيم. (2012). دراسة وتشخيص الأحياء المجهرية المتواجدة في مستشفيات مدينة الديوانية وبيان أليات السيطرة عليها باستخدام المطهرات والمضادات الحيوية. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة القادسية. العراق.

باقر، عبد الواحد، الحسيني، رعد خليل والزعاك، علي عبد الرحمن. (2001). عزل وتشخيص البكتيريا المسببة لالتهاب الجهاز البولي وقابليتها على أنتاج أنزيمي اليوريز واليهمولايسين. مجلة علوم المستنصيرية. 12 (3): 11- 27.

الحسيني، رعد خليل. (1996). عزل وتشخيص بكتريا التهاب الجهاز البولي وقابليتها على انتاج الهيمولايسين ومقاومتها للمضادات الحيوية. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. العراق.

الزيدي، حامد مجيد .(2000). علم الاحياء المجهرية النظري. الطبعة الثانية. جامعة بغداد. العراق.

الشمري، زهراء باسم شاكر. (2014). دراسة بكتريولوجية وجزيئية للمسببات البكتيرية المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية في النجف. رسالة ماجستير. كلية العلوم ـ جامعة الكوفة. العراق.

العزاوي، سندس عادل ناجي والدليمي، عباس عبود فرحان. (2007). دراسة بعض عوامل الضراوة في البكتريا الملوثة للحروق. مجلة الفتح. 29: 1- 12.

عوض، هالة عبد الكريم. (2005). التأثير التثبيطي لبعض المستخلصات النباتية على البكتريا المسببة لخمج السبيل البولي. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات. جامعة تكريت. العراق.

المرجاني، محمد فرج. (2011). المضادات الحيوية ـ المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية. دار دجلة. عمان. الصفحة 1- 330.

المعموري، ايناس عباس خير الله. (2010). تقييم كفاءة بعض العوامل المضادة للفطريات والخمائر الانتهازية المعزولة من بعض مستشفيات محافظة بابل. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بابل. العراق.

الموسوي، أزهار نوري حسين. (2006). العزل والتثبيت الوراثي للخمج البكتيري والفطري في المسالك البولية وعلاقته بمرض السكري بين النساء الحوامل في محافظة القادسية. أطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة القادسية. العراق.

المصادر الانكليزية:

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

Adelowo, O. and Fagade, O. (2012). Phylogenetic characterization, antimicrobial susceptibilities, and mechanisms of resistance in bacteria isolates from poultry waste-polluted river, southwestern Nigeria. J. Turk . Biol., 36:37- 45.

Ahmed, N.; Dawson, M.; Smith, G. and Wood, E. (2007). Biology of Disease. Taylor & Francis group., pp: 25-41.

Aitziber, L.; Gone, F. M. and Ostolaza, H. (2003). Areceptor – binding region in Escherichia coli α- hemolysin. J. Biol. Chem., 278:19159-19163.

Aitziber, L.; Goni, F. M. and H. Ostolaza (2001). Glycophorin as are receptor for Escherichia coli α-hemolysin. in erythrocytes. J. Biol. Chem., 276:12513-12519.

Al-Chalabi, R.; Al- Ibadi, M. and Al-Ubaidy, A. (2010). Detection of Urovirulence Genes (eae,E-hly,α-hly) of Uropathogenic Escherichia coli by Specific PCR. J. Bio. Res. Center (special edition)., 4(1):44-54.

Al-Douri, A.Y.M. (2011). Diagnostic and Genetic study of the bacteria causing urinary tract infections in patients in tikrit city. ph. D. thesis. college of education. University of Tikrit.

Alexander, S.K.; Strete, D. and Niles, M. J. (2004). Laboratory exercises in organismal and molecular microbiology. The mcgraw – Hill companies. USA.

AL-HiLu, S.A. (2014). Molecular Study of Virulence Factors of Some Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Different Infections. ph. D. thesis. Faculty of Science. University of Kufa.

Ali, J.A. (2012). Hemolysin and Bacteriocin Production of E. coli Isolated from Urinary tract infection. J. of Babylon University. pure and Applied Scinces., 20(5): 1448-1451.

Al-Jubouri, A. S.; Mahmood, Y. A. and AL-Salihi, S. S. (2012). Pathogenicity of Klebsiella pneumoniae isolated from diarrheal cases among children in Kirkuk city. J. of Tikrit Pure Science., 17 (4): 17-25.

Allocati, N.; Masulli, M.; Mikhai, F.; Alexeyev, and Ilio, C.D. (2013). Escherichia coli in Europe: J. Int. Environ. Res. Public Health., 10: 6235-6254.

Al-Omari, A.W.; Mohamad, A.M. and Raoof, W.M. (2013). Detection of Biofilm Formation in some Pathogenic Bacteria Using Tube and Congo Red Agar Methods. J. of Rafidain science., 24(6): 55-65.

AL-Rubaey, N.K.F.; Sabri, M. and AL- Rubaey, O.K. (2007). Isolation and Charactization of Bacteria from Patients of Conjunctivitis in Hilla. Province. J. Med. Babylon., 4(1): 44-63.

AL-Salayi, T.S. (2002). Common bacterial causes of urinary tract infections in children below five years of age in Maternity and pediatrics Hospital – Erbil. MSc thesis. University of Salahaddin.

Al-sohaili, S.A.; Alharahsheh, M.H.; Almshagbeh, M.A.; Alkhawaldeh, R. A. and ALkhawaldeh, W.M. (2015). Bacterial pathogen in urinary tract infection and antibiotic resistance patteern in zaraqa in jordan. J. European. Scientific., 11(12):171-177.

Amin, M.; Mehdinejad, M. and Pourdangchi, Z. (2009). Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. Jundishapur. J. M.B., 2(3): 118-123.

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

Andrews, S. J.; Brooks, P. T. and Hanbury, D. (2002). Ultrasonography and abdominal radiography versus intravenous urography in investigation of urinary tract infection in men: Prospective incident cohort study. J. M. B., 324(7335): 454-456.

Antão, E.; Wieler, L. and Ewers, C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. Gut. Pathog., 1(22):1-12.

Anvarinejad, M.; Farshad, S.; Alborzi, A.; Ranjbar, R.; Giammanco, G. and Japoni, A. (2011). Integron and genotype patterns of Quinolones –resistant uropathogenic Escherichia coli., J. Afr. M. B. Res Italy., 5(22):3765-3770.

Ariyanti, D.; Isrina, S.; Salasia, O. and Toto, S.F. (2011). Characterization of hemolysin of Staphylococcus aureus isolated from food of animal origin. J. Bio., 16(1):32-37.

Aswani, S.M.; Chandrashekar, U.K.; Shivashankara, K.N. and Pruthvi, B.C. (2014). Clinical profile of urinary tract infections in diabetics and non-diabetics. J. Australas Med., 7(1): 29-34.

Atlas, R.M.; Parks, L.C. and Brown, A.E. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology.1st. ed. Mosby. USA.

Awaness, A.M. and AL- Saadi, M.G. (2000). Antibiotics resistance in recurrent Urinary tract infection . Kufa. Med. J., 3(10): 159-166.

Aziz, S.A. (2013). Bacterial Urinary tract Infection in Diabetic Patients in AL–Najaf City. A thesis. Collage of Medicine. University of Kufa.

Babb, J.R. (1996). Application of disinfectants in hospitals and other health care establishments, Infect. Control. J. South Afr., 1: 4-12.

Backer, K.; Pagnier, I.; Schuhen, B.; Wenzelburger, F.; Friedrich, A.W. and Kipp, F. (2006). Nasal Colonization by Methicillin–resistant, coagulase– necative Staphylococci and Methicillin–susceptible Staphylococcus aureus strains occur frequently enough to represent a risk of false– positive methicillin–resistant Staph. aureus derterminations by molecular methods .J. clin. Microbiol., 44(1): 229– 231.

Bagga, S.; Thomas, B.S. and Bhat, M. (2008). Garlic burn as self-inflicted mucosal injury–a case report and review of the literature. Quintessence Int., 39: 491–504.

Bagge, D.; Hjelm, M.; Johansen, C.; Huber, I. and gram, L. (2001). Shewnella putrefaciens adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. Appl. Environ. Microbial., 67(5): 2319-2325.

Bahalo, S.; Tajbakhsh, E.; Tajbakhsh, S.; Momeni, M. and Tajbakhsh, F. (2013). Detection of Some virulence factors of Escherichia coli isolated from urinary tract infection isolated of children in shahrekord iran by multiplex PCR. J. Middle- East of Scientific. Res., 14 (1):29-32.

Bahrani-Mougeot, F.K.; Buckles, E.L.; Lockatell, C.V.; Hebel, J.R.; Johnson, D.E.; Tang, C.M. and Donnenberg, M.S. (2002). Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic Escherichia coli virulence determinants in the murine urinary tract. Mol Microbiol., 45:1079–1093.

Barros, E.M.; Ceotto, H.; Basto, M.C.; Dos Santos, K.R. and Giambiagi–Demarval, M. (2012). Staphylococcus haemolyticus as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. J. Clin. Microbiol ., 50(1):166-168.

Beacker, E.L.; Kory, M. and Hammond C.E.(2007). Introduction in Kidney and Urinary tract infections published by the Lilly research Labrotories. Indiana polis, Ind Introduction., p:13.

Bek-Thomson, M.; Lomholt, H.B. and Kilian, M. (2008). Acne is not associated with yet– uncultured bacteria. J. Clin .Microbiol., 46 (10): 3355 -3360.

Belmonte, G.; Cescatti, L.; Ferrari, B.; Nicolussi, T.; Ropele, M. and Menestrina, G. (1987). Pore- formation by Staphylococcus aureus alpha- toxin in lipid bilayers temperature and toxin concentration dependence. Eur . J. Biophys., 14: 349 – 358.

Belt, P.; Butterworth, R. and Livingston, R.J. (2013). Reaction or infection topical chloramphenicol treatment. Annals of the royal college of surgeous of England., 95(1):20-21.

Bennett, P and Brown, M. (2008). Clinical pharmacology. 10th ed. Churchill Livingstone. Elesiver. Spain.

Benson, H.J. (2002). Microbiological A pplication Laboratory Manual in General Microbiology. 8th ed. The McGraw-Hill Companies .USA.

Bermudez, L. and Sangari, F. (2000). Mycobacterial invasion of epithelial cells. Sub cell Biochem., 33: 231- 249.

Berube, B.J. and Wardenburg, B. J. (2013). Staphylococcus aureus alpha-Toxin: Nearly a Century of Intrigue. Toxins (Basel)., 5: 1140–1166.

Bien, J.; Sokolova, O. and Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. J. Int. of Nephrology., 20(12): 1-15.

Block, S.S. (1983). Disinfection, Sterilization and Preservation. 3rd ed. Phelagelphia: Lea and Febiger.

Boyko, E. J.; Fihn, S. D.; Scholes, D.; Abraham, L. and Monsey, B. (2005). Risk of urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria among diabetic and nondiabetic postmenopausal women. J. Am. Epidemiol., 161:557–564.

Brisse, S; Milatovic, D.; Fluit, A. C .and Verhoef, J. (1999). Comparative in vitro activitie ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin &trofloxacina, a gainst K.pneumoniae, K .oxytoca, Enterobacter aerogenes clinical isolates with alteration in Gyr A& Par Cproteins .J.A. Antimicrobial gents Chemother.,43:2051-2055.

Brook, G .F.; Butel, J.J. and Morse, S.A.(2004). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed. McGrow-Hill. NewYork.

Brook, G.; Butel, J.; Carroll, K. and Morse, S. (2007). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. McGraw-Hill. NewYork. U.S.A.

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

Brook, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2010). Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 25thed. McGraw - Hill. New York.

Brown, A. (2007). Benson`s Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology. 10thed. McGraw-Hill comp. Inc. USA., p. 102-263.

Butt, H. L.; Dunsyon, R.; McGregor, N.; Roberts, J.; Zerbes, M. and Klincherg, I. (1998). An association of membrane damaging toxin from coagulase negative Staphylococcus and chronic orofacial muscle pain. J. Med Microbiol., 47(7):577-84.

Car, J.; Svab, I.; Kersnik, J. and M. Vegnuti (2003). Management of lower urinary tract infection in women by Slovene GPs. Fam. Pract.; 20: 452- 456.

Carey, R.B.; Schuster, M.G. and McGowan, K.L. (2008). Medical Microbiology for The New Curriculum. John Wiley and Sons Company. England.

Carroll, K.C.; Hobden , J.A.; Miller, S .; Morse, S.A.; Mietzner, T.A.; Detrick ,B.; Mitchell ,T.G.; McKerrow, J.M. and Sakanari , J.A. (2016). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 27th ed. Mc Graw- Hill. New York.

Chamberlain, N. (2009). Medical Microbiology. McGraw Hill companies, Sydney. Tornoto. p: 341-347.

Cherifi, S.; By, l. B.; Deplano, A.; Nagant, C.; Nonhoff, C. and Denis, O.(2014). Genetic characteristics and antimicrobial resistance of Staphylococcus epidermidis isolates from patients with catheter-related bloodstream infections and from colonized healthcare workers in a Belgian hospital. Ann Clin Microbiol Antimicrob., 13(20):1-8.

Chessbrugh, M.(1992). Medical Laboratory Mannual for contries. Butter Worth, Heine Mann. Tropical Health Technol ., 2 : 214 -216.

Chowdhury, F.; Ahsan, S. and Kabir, M.D. (2013). Antibiotic resistance patterns of pathogenic Gram negative bacteria isolated from UTI patients in Sirajganj district. Stamford J. of M. B., 3(1): 17-20.

Chung, A.; Arianayagam, M. and Rashid, P. (2010). Bacterial cystitis in women. Aust. Fam. Physician., 39: 295-298.

Clements, A.; Gaboriaud, F.; Duval, J. F. L.; Farn, J. L.; Jenney, A. W.; Lithgow, T.; Wijburg, O. L. C.; Hartland, E. L. and Strugnell, R. A. (2008). The Major Surface-Associated Saccharides of Klebsiella pneumoniae Contribute to Host Cell Association. J. pone. PLoS ONE., 3(11): 1-10.

Cloete, T.E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. International Bio deterioration and Biodegradation ., 51:277-282.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22th Informational Supplement., 32(3). Wayne, Pannsylvannia, USA.

Cole, E.C.; Addison, R.M.; Dulaney, P.D.; Leese, K.E.; Madanat, H.M. and Guffey, A.M. (2011). Investigation of antibiotic and antibacterial susceptibility and resistance in Staphylococcus from the skin of users and non-users of antibacterial wash products in home environments. J . Int. Microbiol Res., 3(2): 90– 96.

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

Cooper, B.; Medley, G.; Stone, S.; Kibb1er, C.; Cookson, B.; Roberts, J.; Duckworth, G.; Lai, R. and Ebrahim, S. (2004). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in hospitals and the community: Stealth dynamics and control catastrophes.

Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) of the USA .,101 (27): 10223-10228.

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

Cucarella, C.; Tormo, M.A.; Ubed, C.; Trotonda, M.P.; Monzon, M.; Peris, C.; Amorena, B.; Lasa, I. and Penades, J.R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine Staphylococcus aureus. Infect. Immun., 72(4): 2177-2158.

Czekaj, T.; Ciszewski, M. and Szewczyk, E. (2015). Staphylococcus haemolyticus – an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. Microbiology., 161: 2061-2068.

Daniel, B.; Saleem, M.; Gousia Naseer, G. and Alsaba Fida, A. (2014). Significance of Staphylococcus haemolyticus in hospital acquired infections pioneer med sci., 4(3): 125–199.

Darwish, S.F. and Asfour, H.A.(2013). Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovin mastitis using phenotyping and genotypic assay. J. scientific world.,vol 2013: 1-9.

Davey, P.; Wilcox, M.; Irving, W. and Thwaites, G. (2015). Antimicrobial Chemotherapy. 7th ed. Oxford University Press. United Kingdom.

Davidison, A.M.; Cumming, A.D. and Swainson, C.D.(2002). Disease of the kiolney and system. In: Davidison's principle and practice of medicine. 7th ed. C.R.W. Davidson; A .B .Bbouchier & C. Haslett(eds), p: 611-653,Chrichill.Livingston.London.

Davis, C. P. (2011). Urinary tract infection. Medicine net. Inc.

Dawson, C. and Whitfeild, W.H. (1996). ABC of Urology, Urinary in continence and urinary infection ,Brit . Med. J., 13(4):312-961.

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

Derman, S. E.; Coldberg, S. and Stout, J. E. (2012). Substitution of rifampin for rifampin during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis. Study 29 of the tuberculosis trails consortium. J. Infect. Dis., 206: 334 – 347.

Dhakal, B. K. and Mulvey, M. A.(2012). The UPEC Pore-Forming Toxin α-Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory, and Survival Pathways. Cell Host & Microbe, 11(1): 58-69.

Diaz-Mejia, J. J.; Babu, M. and Emili, A . (2009) . Computational and experimental approaches to chart the Escherichia coli cell-en velope-associated proteome and interactome. FEMS Microbiol. Rev., 33: 66–97.

Dielubanza, E.J. and Schaeffer, A.J.(2011). Urinary tract infections in women. The Medical clinics of North America., 95(1):27– 41.

Diens, S. and Rolian, J. (2013). Investigation of antibiotic resistance in the genomic are of multidrug-resistance gram-negative bacilli, enterobacteriaceae especially Pseudomonas and Acinetobacter. Anti. Infication therapy., 11(3):277-296.

Dinges, M.M.; Owrin, P.M. and Schlievert, P.M.(2000). Exotoxine of Staphylococcus aureus . Clin Microbiol. Rev., 13: 16 -34.

Dobrindt, U. (2005). Patho- Genomics of Escherichia coli. J. Int. Med Microbiol., 295: 357– 371.

Donnenberg, M.S.(2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature Microbiology., 406:768-774.

Donnenberg, M.S.; Newman, B.; Ustalo, S. and Trifllins, A.(1994). Internalization of E.coli in to human kidney epithelial cells comparison Faecal and pyelonephritis associated strains. J. Infect. Dis., 169: 338-381.

Duguid, J.P. and Old, D.C.(1980). Adhesive Properties of Enterobacteriaceae. In Beachey, E.H. Bacterial Adherence. London Chapman and Hall.

Duguid, J.; Clegg, S. and Wilson, M. (1979). The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of Escherichia coli. J. Med Microbiol ., 12: 213-227.

Ehinmidu, J. (2003). Antibiotics susceptibility patterns of urine bacterial isolates in Zaria, Nigeria. Trop. J. Pharm. Res., 2(2) :223-228.

Emmons, W. (2004). Urinary tract infection, females, J., e.medicine, instant access to the minds of medicine.

Espinosecurgel, M. (2003). Resident parking only: Rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. J. Bacteriol., 185(3): 699–700.

Evgueny, V.; Irina, S.; Jianjun, L. and Said, J. (2006). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of Staphylococcus aureus MN8m, a biofilm forming strain. Institute for Biological Sciences . National Research Council, 100 Sussex Drive. Ottawa. ON. Canada KIA OR6.Carbohydrate Research., 341: 738–743.

Farid, A.; Naz, I.; Ashraf, A.; Ali, A.; Rehman, A.; Yasra Sarwar, Y. and Haque, A. (2015). Molecular Detection of Anti-Microbial Resistance in Local Isolates of Staphylococcus epidermidis From Urinary Tract Infecyions in Faisalabad Region of Pakistan. EXCLI. J., 14:697-705.

Farshad, S.; Ranjbar, R.; Japoni, A.; Hosseini, M.; Anvarinejad, M. and Mohammadzadegan, R. (2012). Microbial Susceptibility, Virulence factors, and Plasmid profile of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from children in Jahrom, Iran. Arch. of Iranian Med. Original Article., 15(5):312-317.

Fei, W.; Hongjun, Y.; Bin, H.; Changfa, W.; Yundong, G.; Qifeng, Z.; Xiaohong, W. and Yanjun, Z.(2011). Study on the hemolysin phenotype and genotype distribution of Staphylococcus aureus caused bovine mastitis in shandong dairy farms. J. Int. Appl Res Vet Med ., 9(4):416-421.

Fernando, D. and Kumar, A. (2012). Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porinencoding genes in Acinetobacter baumannii ATCC 19606. J. Antimicrob. Chemother., 67: 569–572.

Fihn, S.; Boyko, E.; Chin, C.; Normand, E.; Yarbro, P. and Scholes, D.(1998). Use of spermicide–coated condoms and other risk factors for urinary tract infection caused by Staph. Saprophyticus. Arch. Intern. Med .158(3):281- 287.

Finch, R. G. (2006). Coagulase-Negative Staphylococci, in Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Second Edition (Gillespie,S.H. and P. M. Hawkey, P.M. eds), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. ch6**.**

Firoozeh, F.; Mahmood, S.; Neamati, F. and Zebaei, M.(2014). Detection of virulence genes in Escherichia coli isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. International journal of infections diseases., 29:219-222.

Flahaut, S.; Vinogradov, E.; Kelley, K.A.; Brennan, S.; Hiramatsu, K. and Lee, J.C.(2008). Structural and biological characterization of a capsular polysaccharide produced by Staphylococcus haemolyticus. J. Bacteriol., 190(5):1649-1657.

Fluit, A.C.; Visser, M.R. and Schmitz, F.J.(2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Rev., 14:836-871.

Forbes, B. A.; Daniel, F. S. and Alice, S. W. (2007). Bailey and scott's diagnostic microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier company. USA.

Forrest, G.N. and Tamura, K.(2010). Rifampin combination therapy for non-mycobacterial infeaction. Clinical Microbiology. Reviews., 23: 14-34.

Foster, R.T. (2008). Uncomplicated Urinary tract infection in women. Obstet. Ggnecol. Clin North Am.,35(2):235–248.

Foster, T.J. and Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. 12: 484–488.

Gad, M.G.F.; El-Feky, M.A.; El-Rehewy, M.S.; Hassan, M.A.; Abolella, H. and Abd El-Baky, R.M. (2009). Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by Staphylococcus

epidermidis isolated from urinary tract catheterized patient. J. infect Dev Ctries., 3(5): 342-351.

Ganal, S.; Guadin, C.; Roensch, K. and Tran, M. (2007). Effects of streptomycin and kanamycin on the production of capsular polysaccharides in Escherichia coli B23 cells. J. Exp. Microbiol. Immunol., 11:54-99.

Gardener, J.S. (2002). Guideline for isolation precautions in hospitals. Infections Control in Hospital and Epidemiology., 17: 53-80.

Garofalo Corinne, K.; Hooton, T.; Steven, M. M.; Walter, E. S.; Joseph, J. p.; Jeffrey, I.; Gordon, S. and Hultgre, J. (2007). Escherichia coli from urine off female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation. Infect. and Immu., 75(1): 52 -60.

Gebel, J.; Exner, M.; Gemein, S.; French, G.; Chartier, Y.; Christiansen, B.; Goroncy-Bermes, P.; Oltmanns, P.; Hartemann, P.; Heudorf, U.; Krame, A.; Maillard, J. Rotter, M. and Sonntag, H. (2013). The role of surface disinfection in infection prevention Die Rolle der Flächendesinfektion in der Infektionsprävention. GMS Hygiene and Infection Control., 8(1): 1-12.

Geerlings, S.E.; Stolk, R. P.; Camps, M. J.; Netten, P.M. and Collet, T. J.(2000). Risk factors for symptomatic urinary tract infection in women with diabetes. American Diabetes Association. Diabetes Care., 23(12): 1737-1741.

Gentry, M.J.; Snitility, M.U. and Prehicne, L.C. (1995). Phagocytosis of Streptococcus pneumoniae in vitro and in vivo in a rat model of carbon tetra-chloride induced liver cirrhosis. J. Infect. Dis., 7:350-355.

Ghadiri, H.; Vaez, H.; Khosravi, S. and Soleymani, E. (2012). The Antibiotic Resistance Profiles of Bacterial Strains Isolated from Patients with Hospital-Acquired Blood stream and Urinary Tract Infections. J. Int. of Nephrology.; 20(12): 1-6.

Gilbert, p. and Mcbain, A.J. (2003). Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance . clinical microbiology reviews. , 16(2) : 189–208.

Glick, B. R.; Delovitch, T.L. and Patten, C.L. (2014). Medical biotechnology. 4th ed. American Society for Microbiology. Washington. Dc.

Goldenheim, P.D. (1993). "An appraisal of povidone-iodine and wound healing". Postgrad. Med. J., 69(3): 97- 105.

Golding, G.R.; Persaud, N.; Levett, P.N.; McDonald, R.R.; Irvine, J. and Nsungu, M. (2012). Characterization of Escherichia coli urinary tract infection isolates in remote northern Saskatchewan communities: The Northern Antibiotic Resistance Partnership. Diagn Micr Infec Dis., 74:242-247.

Goldman, E. and Green, L. (2009). Practical Handbook of Microbiology. 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group. London. New York. pp: 217-224.

Goni, F.M. and Ostolaza, H.(1998). E.coli alpha hemolysin :a membrane active protein toxin. Brazilian J. Med. Biological. Res., 31: 1019-1034.

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.

Greenwood, D .; Salk, R.C.B. and Putherer, J.F. (2002). Pathogenesis immunity, laboratory diagnosis and control. In: Medical Microbiology – a guide to microbial infections. 16th ed. Edinburgh: Elsevier Science. United Kingdom. pp: 662 -669.

Grover, P.S.; Bareja, R.; Narang, V.K. and Jaryal, S.C.(2013). Incidence of fimbriated strains amongst haemolytic Escherichia coli, International Organization of Scientific Research. J. of Dental and Medical Sciences., 4(3) 69-72.

Grundmann, H.; Klugman, K. P.; Walsh, T.; Ramon-Pardo, P.; Sigauque, B.; Khan, W.; Laxminarayan, R.; Heddini, A.

and Stelling, J. (2011). A framework for global surveillance of antibiotic resistance. Drug Resist. Updat., 14: 79–87.

Grundmerier, M.; Hussain, M.; Becker, P.; Heilmann, C.; Peters, G. and Sinha, B. (2004). Trunction of fibronection– binding proteins in Staphylococcus aureus strain newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to l0ss of the cell wall anchor function. Infect. Immun., 72: 7155 – 7163.

Guilfoile, P.; Alcamo, E. and Heymann, D.(2007). Antibiotic-Resistant Bacteria. Chelsea House. New York. P:38-39.

Guimaraes, M.A.; Tibana, A.; Nunes, M.P. and Santos, K.R.N. (2000). Disinfectant and antibiotic activities: a Comparative an alysis in Brazilian hospital bacterial isolates. Braz. J. Microbiol., 31(3):1-9.

Gunn, B.A. and Davis, C.E. (1998). Staphylococcus haemolyticus Urinary Tract Infection in a Male Patients. J. Clin Microbiol., 26(5):1055–1057.

Gunther, N.W.; Virginia, L.; David, E. and Harry, L. (2001). In vivo Dynamics of Type 1 Fimbriae Regulation in Uropathogenic Escherichia coli During Experimental Urinary tract infection. Infec. and Innune., 69: 2838 – 2846.

Gupte, S. (2010). The Short Textbook of Medical Microbiology (Including Parasitology). 10th ed . India .p. 486.

Hadi, Z.J.(2008). Detection of extended-spectrum beta-lactamases of Escherichia coli and Klebsiella spp. isolated from patients with significant bacteriuria in Najaf. M.Sc. Thesis, College of Medicine. Kufa University.

Haker, J. and Hughes, C. (1985). Genetic of Escherichia coli hemolysin. Curr. Top. Microbiol. Immun., 118 : 139 – 162.

Han, J. S.; Jang, I.Y.; Ryu, H.S. and Kim, W.Y.(2010). Similarity with the Yersinia pestis Plasmid PCRY and Integrative Conjugative Elements. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., pp. 401-406.

Hanaki, H. (2004). Epidemiology and clinical effect against "beta-lactam antibiotic induce" . J. Antibiotic., 78 (8): 204-216.

Hancock, V.; Dahl, M. and Klemm, P. (2010). Abolition of biofilm formation in urinary tract Escherichia coli and klebsiella isolates by metal interference through competition for. Fur. Appl. Environ. Microbial., 76(12): 3836-3841.

Hanna, A.; Berg, M.; Stout, V. and Razatos, A. (2003). Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic Escherichia coli. Applied Environmental Microbiology., 69 (8): 4474-4481.

Hannan, T.J. (2008). LeuX tRNA-dependent and-independent mechanisms of Escherichia coli pathogenesis in acute cystitis. Mol Microbio., l67(1):116–128.

Hassan, A.; Usman, J.; Kaleem, Fatima.; Omair, M.; Khalid, A. and Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz. J. Infect. Dis., 15(4), 305-311.

Hassan, M.H.; Flayih, M.T.; Yaseen, N.Y. and Suleiman, A.A. (2015). Detection the Virulence Factor (Cytotoxic necrosis factor1) Produce from Uropathogenic Escherichia coli Isolates. J. Iraqi of Science., 56(3): 1920-1924.

Heijer, C.; Donker, G.; Maes, J. and Stobberingh, E. (2010). Antibiotic susceptibility of unselected uropathogenic Escherichia coli from female Dutch general practice patients: a comparison of two surveys with a 5 year interval. J. Antimicrob. Chemother.,65(10): 286-289.

Hola, V.; Ruzicka, F. and Votava, M. (2006). The dynamics of Staphylococcus epidermis biofilm formation in relation to nutrition, temperature and time. Scripta Medica (BRNO)., 79(3): 169-174.

Hooton, T.M . (2012). Clinical practice: uncomplicated urinary tract infection. N Engl. J. Med., 366: 1028 –1037.

Huseby, M.; Shi, K.; Brown, C.K.; Digre, J.; Mengistu, F.; Seo, K.S.; Bohach, G.A; Schlievert, P.M.; Ohlendorf, D.H. and Earhart, C.A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from Staphylococcus aureus. J. Bacteriol., 189: 8719-8726.

Husmann, M.; Beckmann, E.; Boller, K.; Kloft, N. and Tenzer, S. (2009). Elimination of a bacterial pore-forming toxin by squential endocytosis and exocytosis. FEBS Letters., 583: 337 - 344.

Hyland, C.; Vuilard, L.; Hughes, C. and koronakis, V. (2001). Membrane intraction of Escherichia coli Hemolysin .Flotation and insertion - dependent labeling by phospholipid vesicles. J. Bactcriol., 183: 5364 - 5370.

Ibraheem, A. H. (2006). A Study on the Possible Involvement of Antibiotic Resistant Plasmids in Adherence of Uropathogenic E.coli to Uroepithelial Cells. Thesis. College of Science Biotechnology Department. Al-Nahrain University.

Ibrahim, I.; Al-Shwaikh, R.M. and Ismaeil, M.I.(2014). Virulence and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from Tigris River and children diarrhea . J. Infect and Drug Resist., 7: 317-322.

Irenge, L.M.; Kabego, L.; Vandenberg, O.; Chirimwami, R.B. and Gala, J.L. (2014). Antimicrobial resistance in urinary isolates from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in South-Kivu Province (Democratic Republic of Congo). BMC Res Notes., 7(374): 1-6.

Jarvis, T.R.; Chan, L. and Gottlieb, T. (2014). Assessment and management of lower urinary tract infection in adults. Australian presc., 37(1): 3-7.

Jawetze, E.; Brooks, G.; Butel, J. and Morse, S. (2004). Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 21st ed. Appleton and Lange. California. USA.

Johnson, J.R. (1991). "Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection," Clinical Microbiology . Rev., 4(1): 80–128.

Johnson, J. R. and Stell, A. L.(2000). Extended virulence genotypes of E.coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J. Infect . Dis., 181:261-272.

Johnson, J.R.; Delavari, P.; Kuskowski, M. and Stell, A.L. (2001). Phylogenetic distribution of extra intestinal virulence-associated traits in Escherichia coli .J. Infect. Dis., 183(1):78–88.

Johnson, M.K.; Boes - Marrazo, D. and Pierce, W. (1981). Effect of pneumolysin on human polymorphnuclear leukocyte and platelets. Infect. Human., 34(1): 171-176.

Jones, V. and Milton, T. (2000). When and how to use iodine dressings. Nurs. Times., 96 (45): 2 – 3.

Jordivila, Karine, S.; Joaquin, R.; Horcajada, J. P.; Velasco, M.; Barraanco, M.; Moreno, A. and Mensa, J. (2004). Are–Quinolone resistant uropathogenic Escherichia coli less virulent. J. infect. Dis., 186: 1039-1042.

Josip, C. (2006). Urinary tract infection in women :diagnosis and management in primary care. BM.J.; 332 : 94 – 97.

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

Kahalid, S.W.; Salah, R.F. and AlShkargy, O. (2012). Physiobacteriological study of urinary tract infections of diabetic patientsType II. J. al-qadisiyah for pure sci., 17(2): 1-18.

Kanai, H.; Sato, H. and Takei, Y. (2014). Community–acquired methicillin–resistant Staphylococcus epidermidis pyelonephritis in a child. J. of Med. Case Reports., 8(415): 1-6.

Kathiravan, T. and Sundaramanickam, A. (2013). Characterization of haemolytic activity of Staphylococcus aureus Isolated from parangipttai cost of India. J. Int. Pharm .Bio .Sci., 4(3): 988–994.

Katzung, B.G.; Trevor, A.J. and Masters, S.B. (2009). Aminoglycosides. Pharmacology. Examination & Board Review. 11th ed. McGraw-Hill Medical., 773-8804.

Kibbe, A.H. (2000). Povidone In Hand book of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed. Pharmacutical Press. New York., pp: 433-439.

Kill, K.S.; Rabih, A. H.; Mohammad, D.M. and Daneil, M.M.(1997). Identification of a Kleibsiell pneumonia strain associated with Nosocomial Urinary tract infection. J. Clin .Microbiol., 35: 2370 – 2374.

King, J.E.; Owaif, H.A.A.; Jia, J. and Robertsa, I.S. (2015). Phenotypic Heterogeneity in Expression of the K1 Polysaccharide Capsule of Uropathogenic Escherichia coli and Downregulation of the Capsule Genes during Growth in Urine. J. ASM. Org., 83(7). 2605- 2613.

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

Kolawole, A.S.; Kolawole, O.M.; Kandaki-Olukemi, Y.T.; Babatunde, S.K., Durowade, K.A. and Kolawole, C.F. (2009). Prevalence of urinary tract infections (UTI) among patients attending Dalhatu Araf Specialist Hospital. Lafia. Nasarawa State. Nigeria. J. Int. Medicinal. Med. Sci., 5(1):163–167.

Komala, M. and Kumar, K.P. (2013). Urinary Tract infection: causes, symptoms, diagnosis and it's management. J. Indian of Res. in Pharm. and Bio., 1 (10) :226 – 233.

Krieger, J. N.; Jacobs, R. and Ross, S. O. (2000). Detection urethral and prostatic inflammation in patients with chronic Prostatitis. Urology 55: 186-192.

Kukanur, S.; Meundi, M.; Bajaj, A.and Kotigadde, S. (2015). Co-Relation between Virulence Factors and Antibiotic Resistance of E. coli, With Special Reference to Uropathogenic E. coli. J. IOSR of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)., 14(3): 15-21.

Kumar, V.; Sun, P.; Vamathevan, J.; Li, Y.; Ingraham, K.; Palmer, L.; Huang, J. and Brown, J. R. (2011). Comparative Genomics of Klebsiella pneumoniae Strains with Different Antibiotic Resistance Profiles. Antimicrobial agents and chemotherapy., 55(9): 4267–4276.

Kumor, S. (2008). Dettol poisoning Clinical features and management. J. Indian of forensic Med and toxicol., 2(2): 29-31.

Kunin, C. M. and Steele, C. (1985). Culture of the surfaces of urinary tract catheters to sample urethral flora and study the effect of antimicrobial therapy. J. Clin. Microbiol., 21: 902– 908.

Lalwani, A. (2006). Current Diagnosis & treatment in otolaryngology – head& neck surgery. 3th ed. McGraw-Hill-Education-Medical. USA.

Lane, D.; and Takhar, S. (2011). Diagnosis & management of urinary tract infection and pyelonephritis. Emergency medicine clinics of North America., 29(3):539-552.

Latchu, G. L.; Babu, S.; Reddy, B.; Madhusudhan, K.V.; Lokesh, K. and Babu, M.Y. (2015). Clinical Evaluation Of Preoperative Skin Preparation With Aqueous Povidone Iodine Only In Combination With Alcholic Chlorhexidine In Patients Under Going Elective And Emergency Surgeries. J. of Evidence Based Med and Hlthcare ., 2 (41): 7056-7076.

Lazarevic, G.; Petreska, D. and Pavlovic, S. (1998). Antibiotic sensitivity of bacteria isolated from the urine of children with urinary tract infections from 1986 to 1995. Srp Arh Celok Lek., 126 (11-12): 423-9.

Le, J.; Briggs, G. G.; Mckeown, A. and Bustillo, G. (2004). Urinary tract infections during pregnancy. The Annals of Pharmacotherapy., 38: 1692-1701.

Lee, J.H.; Subhadra, B.; Son, Y. j.; Kim, D.H.; H.S. Park, H.S.; J.M. Kim, J.M.; Koo, S.H.; Oh, M.H.; Kim, H.J. and Choi, C.H. (2015). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea Letters in Applied Microbiology., 62: 84- 90.

Li, X. C.; Lockaten, **D. E. and Johnson, M.C.(2004**). Development of an intranasal vaccine to prevent UTI Proteus mirabilis .Infect.Immmun.,72(1):66-75.

Liang, X.; Yan, M. and Ji, Y. (2009). The H35A Mutated Alpha – Toxin Interferes with Cytotoxicity of Staphylococcal Alpha- Toxine. Infect . Immun ., 77(3) :977-983.

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

Lindsay, E.N.(2010). Catheter acquired urinary tract infection : the once and future guideline control and hospital epidemiology . Infect. Control and Hospital Epidemiol., 31 (4): 327 – 329**.**

Linhares, I.; Raposo, T.; Rodrigues, A. and Almeida, A. (2013). Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten- year surveillance study (2000–2009). BMC Infectious Diseases., 13(19): 1-14.

Liverelli, V.; Champs, C. h.; Martino, D. P.; Joly, B.; Michaad, D. F. A. and Forestie, C.h. (1996). Adheseive properties and Antibiotics resist of Klebsiella, Enterobacter, Serratia clinical isolets involved in Nosocomial infections. journal of clinical microbiology., American society of microbiology., pp: 1963-1969.

Luthje, P.; von Köckritz–Blickwede, M. and Schwarz, S. (2007). Identification and characterization of nine novel types of small Staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyl transferase gene lnu(A). J. Antimicrob. Chemother., 59: 600-606.

MacFaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3nd ed. the Williams and Wilkins. London.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M. and Parker, J. (2003). Prock Biology of Microorganisms. 10th ed. Prentice- Hall, Inc. London, Sydney, pte. Ltd. Hong, Kong, Toronto, S.A. dec .v. Tokyo, pte, Ltd, Uper Saddle River, New jersey.

Mak, P.; Maszewaka, A. and Rozalska, M.(2008). The amino acid sequences and activities of synergistic hemolysins from

Staphylococcus cohnni. FEMS. Microbiology Letters., 287: 230 – 235.

Mandell, G.L.; Douglas, R.G. and Benett's, J.E. (2000). In Urinary Tract Infections. Principles and practice of infections diseases. 5th ed .New York.,(1): 773-780.

Manuchair, E. (2000). Antimicrobial Chemotherapy. In: Pharmacology, 3ed ed. The Churchill Livingstone. Inc. USA.

Mark, A.; Schembri, Dalsgaard, D. and Klemm, P. (2004). Capsule Shields the Function of Short Bacterial Adhesins ., 186 (5): 1249 – 1257.

Marrs, C.; Zhang, L. and Foxman, B. (2005). Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E.coli (UPEC) pathotypes. FEMS Microbiol. Lett., 252:183-190.

Martin, B.; Karen, A. K. and Carsten, S. (2008). Characterization of Klebsiella pneumoniae Type 1 Fimbriae by Detection of Phase Variation during Colonization and Infection and Impact on Virulence. Infection and Immunity., 76(9): 4055 - 4065.

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

May, A. K.; Gleason, T. G.; Sawyer, R. G. and Pruett, T. L. (2000). Contribution of E. coli alpha-haemolysin to bacterial virulence and to interperitoneal alteration in peritonitis. Amer. Soci. Microbial., 68 (1): 176-183.

Mcdonell, G. and Russel, A. (1999). Antiseptic and disinfections activity, action and Resistance. Clin. Microbiol. Rev., 12: 147 – 176.

Mcgladderly, S.L.; Aparicio, S.; Verrier–Jones, K.; Roberts, R. and Sacks, S. (2009). Outcome of Pregnancyin an Oxford – Gardiff Cohort of Women with pervious bacteriuria. J. Q. Med., 83: 533-539.

Mendonça, N.R.F.D. (2009). Molecular diversity of bla genes in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates. Ph.D.

thesis. Faculdade de Ciências e Tecnologia. University Nova de Lisboa.

Mims, C.; Dockrell, H. M.; Goering, R. V.; Roitt, I.; Wakelin, D. and Znckerman, M. (2004). Medical Microbiology. 3rd ed. Mosby Comp., USA.

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

Moges, A.F.; Genetu, A. and Mengistu, G. (2002). "Antibiotic sensitivities of common bacterial pathogens in urinary tract infections" J. East Afric. Medi., 79(3): 167-169.

Moraveji, Z.; Tabatabaei, M.; Shirzad Aski, H. and Khoshbakht, R.(2014). Characterization of hemolysins of Staphylococcus strains isolated from human and bovine, southern Iran. J. Iranian of Veterinary Res, Shiraz University., 15(4): 326-330.

Morellow, C.; Palmer, K.; Whiteley, M.; Sircili, M.; Trabulsi, L. Castro, A. and Sperandio, V. (2006). Bundle - forming pili and ESPA are involved in biofilm formation by enteropathogenic Escherichia coli. J. Bact., 188(11): 3952-3961.

Moura, T.M.; Campos, F.S.; Dazevedo, P.A.; Sand, S.T.; Franco, A.C.; Frazzon, J. and Guedes Frazzon, A. P.(2012). Prevalence of enterotoxin- encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase negative and coagulase positive Staphylococcus isolates from black pudding. Revista da Sociedede Brasileira De Medicina Tropical., 45(4):579-585.

Moyo, S.J.; Aboud, S.; Kasubi, M. and Masselle, S.Y. (2010). Bacterial Isolates and durg susceptibility patterns of Urinary tract infection among pregnant women at Muhimbili National Hospital in Tanzania. Tanzania. J. Health Res., 12(4): 236 – 240.

Muder, R.R.; Brennen, C.; Rihs, J.D.; Maryiln, M.; Wagener, M.M.; Obman, A.A.; Stutto, J.E.J.E. and vector, L. (2012). Isolation of Staphylococcus aureus from the urinary tract. Association of

isolation with symptomatic urinary tract infection and subsequent Staphylococcal bacteremia. CID. 42(1) : 46 – 50.

Mulvey, M. A.; Schilling, J. D.; Martinez, J. J. and Hultgren, S .J. (2000). Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defense. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 16: 8829 – 8835.

Murray, P. R.; Baron, E. J.; Tenover, F. C. and Yolken, R. H. (1999). Manual of Clinical Microbiology.7th ed. American society for Microbiology, Asm press. Washington. D. C. pp: 80 – 82.

Murray, P.R.; Ken S. Rosenthal, K. S.; and Pfaller, M.A.(2013). Medical Microbiology, with student consult online access. 7th ed. Midical Microbiology, pp.874.

Mycek, M. J.; Harrey, R. A.; Champe, P.C.; Fisher, B.D. and Cooper, M.(2000). Lippincott's lllstrated Rev. Pharmacology. 2nd ed. J.B. Lippimcott Company. U.S.A.

Nair, B. T.; Bhat, K.G. and Shantaram, M.(2013). In vitro biofilm production and virulence factors of uropathogenic Escherichia coli . J. Int. Pharm .Bio .Sci.,4(1):951-956.

Nasrolahei, M.; Poorhagibagher, M.; VAHEDI, M. and Maleki, I. (2013). Urinary tract infection among intellectual disability individuals "Etiology and antibiotic resistance patterns" in rehabilitation centers of Mazandaran province, Northern Iran . J. prev med hyg., 54: 170-175.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2003). Performance standards for discs susceptibility testing; approved Standard, 6th ed. Wayne, Pennsylvania, USA., P: 100–113.

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

Nicolle, L.E.(2001). Urinary tract infection in Diabetes. Curr Opin Infect. Dis.,18(1):49-53.

Nielubowicz, G.R. and Mobley, H.L.(2010). Host–pathogen infections in urinary tract infection. Nature Rev. Uro., 7(8): 430 -441.

Nimmo, G. and Coombs, G. (2008). The Australian society for Microbiology Inc., 29(3):6-10.

Nunez, L. and Moretton, J. (2007). Disinfectant- resistant bacteria in Buenos aires city hospital wastewater J. . Brazilian. Microbiol., 38:644-648.

Ocokoru, C.; Onzima, R.; Govule, P. and Katongole, S. (2015). Prevalence and Drug Susceptibility of Isolates of Urinary Tract Infections Among Febrile Under-Fives in Nsambya Hospital, Uganda. J. Open Science of Clinical Medicine., 3(6): 199-204.

Ohsen, K.; Ziebular, W.; Koller, K.P.; Hell, W.; Wichehans, T. and Hacker, J. (1998). Effect of sub inhibitory concentration of antibiotic on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin sensitive & methicillin resistant Staphylococcus aureus Isolated. Antimicrobial. Agent. & Chemotherapy., 41(11): 2817-2823.

Okee, M.S.; Joloba, M.L.; Okello, M.; Najjuka, F.C.; Katabazi, F.A.; Bwanga, F.; Nanteza, A. and Kateete, D.P.(2012). Prevalence of virulence determinants in Staphylococcus epidermidis from ICU patients in Kampala. Uganda. J. Infect. Dev. Ctries., 6:242–250.

Olorunmola, F.O.; Kolawole, D.O. and Lamikanra, A. (2013). Antibiotic resistance and virulence properties in Escherichia coli strains from cases of urinary tract infections. J. Infect . Dis., 7(1): 1 – 7.

Oreilly, M.; Keriswirth, B.N. and Foster, T.J.(1990). Molecular analysis of a nonexpressed toxin gene (hla) of clinical isolates of Staphylococcus aureus . J. Braz. Med . Biol. Res., 35: 175- 180.

Otter, J .A.; Yezli, S. and French, G.L. (2011). The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens .Infect Control Hosp Epidemiol Jul., 32(7): 687-699.

Ouno, G.A.; Korir, S.C.; Cheruiyot, J.C.; Ratemo, O.D.; Mabeya, B.M.; Mauti, G.O.; Mauti, E.M. and Kiprono, S.J.(2013). Isolation, Identification and Characterization of Urinary Tract Infectious Bacteria and the Effect of Different Antibiotics. J. of Natural Sciences Res., 3(6): 150-159.

Ozkiriş, M.; Kapusuz, Z. and Saydam, L.(2013). Ototoxicity of different concentrations povidone-iodine solution applied to the middle ear cavity of rats. J. Indian. Otolaryngol Head Neck Surg., 65: 168-172.

Pan, Y.; Fang, H.; Yang, H.; Lin, T.; Hsieh, P.; Tsai, F.; Kenynan, Y. and Wang, J.(2008). Capsular Polysaccharide Synthesis Regions in Klebsiella pneumoniae Serotype K57 and a New Capsular Serotype. J. Clin .Microbial .,46 :2222 - 2231.

Parslow, T. G.; Stites, D. P.; Terr, A. I. and Imboden, J. B. (2001). Medical immunology. 10th ed. New York. Chicago. pp. 607.

Patel, M.; Waites, K.B.; Moser, S.A.; Cloud, G.A . and Hoesley, C.J. (2006). Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-and hospital-associated Staphylococcus aureus isolates. J. Clin .Microbiol., 44(7):2481- 2484.

Patricia, M. (2014). Bailey and Scott's Diagnostic microbiology.13th ed. Mosby Elsevier. China. pp .1193.

Perez, M. and Moellinger, D. (2003). Practical work–up of pediatrics UTI. Contemporary Urology Archive., P:61-65.

Phan, G.; Remaut, H.; Wang, T.; Allen, W.J.; Pirker, K.F. and Lebedve, A .(2011). Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC- FimH substrate. Nature., 474: 49-53.

Pinheiro, L.; Brito, C.I.; Oliveira, A.D.; Martins, P.Y.; Pereira, V.C. and Cunha, M. D.(2015). Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus: Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes toxins., ISSN 2072-6651.

Prais, D.; Straussberg, R. and Avitzur, Y. (2003). Bacterial susceptibility to oral antibiotics in community acquired urinary tract infection. Arch. Dis. Child., 88: 215-218.

Prakash, D. and Saxena, R.S. (2013). Distribution and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Bacterial Pathogens Causing Urinary Tract Infection in Urban Community of Meerut City, India. ISRN Microbiol., p: 1-13.

Prescott, L.M.; Harley, J.P. and Klein, A.K. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw Hill. USA., pp: 134-146.

Prize, C.; Pauli, M. and Bazerque, P.(1990). Antibiotic assay by the agar-well diffusion Method . J. Actabiologiae., 15:113-115.

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

Rena, A. and Dasgupta, R.(2013). Urinary tract infection. Clinical perspective on urinary tract infection. Springer. London. Heidelberg New York. Dordrecht. p: 1-89.

Reddy's, S. (2002). Urinary tract (Kidneyand Bladder) infection. J. of Infect. Dis., 159(4): 400- 600.

Robert, W.; schrier, M. D.; Carl, W. and Gottschalk, M.D. (1997). Diseale of the kidney. 6th ed . Little. Brown. Company, Bosten, New york, Toronto, London. pp: 885- 888.

Robinson, D.; Falush, D. and Feil, E. (2010). Bacterial Population Genetics in Infections Disease. Wiley & Sons. Inc. publication., p:269-280.

Russell, A.D. (1996). Activity of biocides against mycobacteria . J. of Applied Bacteriology Symposium Supplement., 81: 87-101.

Rutala, W.A.; David J. and Weber, D.J.(2008). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities . the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Center for disease control, department of health and human services.

Ryan, K. J. and Ray, C.G.(2004). Introduction to Infectious Diseases: Sherris Medical Microbiology. 4th ed. Mc Graw- Hill. New York.

Ryder, M. A. (2005). Cather-related infection: it's all about biofilm. J. Adv. Pract. Nursing, 5(3): 1 – 15.

Sabir, S.; Anjum, A .A.; Ijaz, T.; Ali, M.A.; Khan, M.R. and Nawaz, M. (2014). Isolation and antibiotic susceptibility of E. coli from urinary tract infections in a tertiary care hospital. J. Pak .Med. Sci .30(2):389-392.

Saffar, M.; Enati, A.; Abdolla, I.; Razai, M. and Saffar, H.(2008). Antimicrobiol susceptibility of Uroppathgens in3 hospital Sari, Islamic republic of Iran, 2002-2003. J. Eastern Med iterranean heth., 14(3):1-8.

Salvatore, S.; Cattoni, E.; Siesto, G.; Serati, M.; Sorice, P. and Torella, M. (2011). Urinary tract infections in women. European journal of obstetrics, gynecology and reproductive biology., 156(2):131– 136.

Sanchez, S.; Bakas, L.; Gratton, E. and Herlax, V. (2011). Alpha Hemolysin Induces an Increase of Erythrocytes Calcium: A Flim 2- Photon Phasor Analysis Approach. Org. Plosone. Argentina., 6:1-9.

Santo, E.; Macedo, C. and Marin, J. (2006). Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli from auniversity hospital in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., 48:185-188.

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Brussels: European Commission.

Schielfer, W.C.(1980). Statistics for the biological sciences.2nd ed. Addison .Wesley publComp. California. London.

Schlager, T.A.(2003). Urinary tract infections in infants and children. Infect. Dis. Clin. North Am., 17: 353-365.

Schmidt, H.; Kernbach, C. and Karch, H. (1995). Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Microbiology., 142(4): 907-914.

Seniror, B. W. and Hughes, C. (1987). Production and properties of haemolysin from clinical isolates of Proteus. J. Med. Microbiol ., 24:17-25.

Serina, S.; Radice, F.; Maffioli, S.; Donadio, S. and Sosio, M. (2004). Glycopeptide resistance determinants from the teicoplanin producer actinoplanes teichomyceticus. FEMS. Microbiol. Lett., 240(1):69-74.

Shah, J. and Kumar, S. (2014). In vitro Antimicrobial susceptibilities and pathogenic attributes of Staphylococcus aureus isolates from UTI patients in Punjab. J. India. Int. Curr .Microbiol .App. Sci., 3(2): 424-430.

Shamsuddeen, U.; Usman, A. D.; Bukara, A. and Safia, I. A. (2010). Bacterial agents of Otitis Media and their antibiotics in Amino Kano teaching Hospital. J. Bayero of Pure and Applied Sci., 3(1): 191 – 194.

Shanson, D.C.(2000). Microbiology in Clinical Practice. 3rd ed. Butterworth Heinemann. Oxford., P: 326 – 339.

Silva, P.V.; Cruz, R .S.; Keim, L.S.; De Paula, G.R.; Carvalho, B.T.F.; Coelho, L.R.; Carvalho, M.C.D.; Rosa, J.M.C.; Figuriredo, A.M .and Teixeria, L.A. (2013). The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of Staphylococcus haemolyticus from bloodstream infections. Men .Inst. Oswaldo Cruz. Rio .de. Janeiro., 108 (6): 812-816.

Slavchev, G.; Pisareva, E. and Markova, N. (2009). Virulence of uropathogenic Escherichia coli. J. Culture Collections., 6: 3 – 9.

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

Smith, Y.; Rasmussen, S.; Grande, K.; Conran, R . (2008). Hemolysin of uropathogenic Escherichia coli evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. Infect. Immun., 76: 2978-2990.

Sobel, J.D. (1997). Pathogenesis of urinary tract infection role of host defences. Infect. Dis. Clin north. Am., 11: 531-549.

Soloaga, A.; Veiga, M.P.; García-Segura, L.M.; Ostolaza, H.; Brasseur, R. and Goñi , F.M. (1999). Insertion of Escherichia coli alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. Mol. Microbiol., 31:1013–1024.

Stamm, W.E. and Norrby, S.R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. J. Infect. Dis., 183(1): 1-4.

Stryjewski, M.E. and Corey, G.R. (2014). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. anevolving pathogen. Clin Infect Dis., 58(1) : 9-10.

Svanborg, C. and Godaly, G. (1997). Bacterial virulence in urinary tract infection. Infect Dis Clin North Am., 11(3):513-529.

Tacconelli, E.; De Angelis, G.; Cataldo, M.; Pozzi, E. and Cauda, R. (2008). Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolation a systematic review and meta-analysis. J. Antimicrob. C hemother., 61(1):26-38.

Talkoff-Rubin, N.E.; Cotran, R.S. and Rubin, R.H. (2008). Urinary tract infection, pyelonephritis, and reflux nephropathy. In: Brenner BM (editor). Brenner and Rector's The Kidney. Saunders Elsevier, Philadelphia.,1203-1238.

Tanagho, E. A. and Jack, W.M.(2000). Smith General Urology. 15th ed. Lange Medical Books, Mc Graw–Hill. NewYork. Health Profession Divisions. p: 237- 246.

Taylor, C.M. and Roberts, I.S. (2005). Capsular polysaccharides and their role in virulence. Contrib Microbiol., 12:55–66.

Tenover, F. C.; Weigel, L. M .; Appelbaum, P . C.; McDougal, L. K.; Chaitram, J.; McAllister, S.; Clark, N.; Killgore, G.; O'Hara, C. M.; Jevitt, L.; Patel, J. P. and Bozdogan, B. (2004). Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Isolate from a Patient in Pennsylvania. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. Jan., 48 (1):275 - 280.

Tenpe, C. and Yeole, p. (2009). Comparative evaluation of antidiabetic activity of some markted polyherbal formulations in alloxan induced diabetic rats. J . Int. Pharm. Tech .Res., 1(1):43-49.

Titball, R. W. (1993). Bacterial phospholipase C . Microbiol. Rev., 57: 347 – 366.

Todar, K. (2005). Staphylococcus aureus. Text book of bacteriology, Univercity of Wiscofonsin, Department of bacteriology. USA.

Todar, K. (2008). Todar's Textbook of Bacteriology. 1st ed ., Madison and Wisconsin .USA., 1- 6.

Tomita, T. and Kamio, Y. (1997). Molecular Biology of pore - forming cytolysine from Staphylococcus aureus, alpha and gamma-hemolysin and leucocidin . Biosci. Biotechnol. Biochem., 61(4): 565.

Tortora, G.J.; Funke, B.R. and Case, C.E. (1998). Microbiology An Introduction. 6th ed. Benjamin. Cummings publishing Company .Inc.

Tortora, G.J.; Funke, B.R. and Case, C.L. (2016). Microbiology an introduction.12th ed. Benjamin. Cummings publishing Company. United States. America.

Tortora, G.J; Funke, B.R. and Case, C.L. (2004). Microbiology an Introduction. 8thed. pearson Benjamin. Cummings. SanFrancisco. Boston. New York San Francisco.

Ulett, G.; Mabbett, A.; Fung, K.; Webb, R. and Schembri, M. (2007). The role of F9 fimbriae of uropathogenic Escherichia coli in Biofilm formation. J. M.B. Australia. ,153:2321-2331.

Valeva, A.; Palmer, M. and Bhakdi, S.(1997). Staphylococcal exotoxin: Formation of heptameric pore is cooperative and proceeds through multiple intermdiate stages. Biochemistry., 36: 13298 – 13304.

Valverde, A.; Coque, t. M.; Sanchez-Moreno, M.P.; Rollan, A.; Baquero, F. and Canton, R. (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended - spectrum- lactamase – producing Enterobacteriaceae during non-outbreak situations in Spain. J. Clin. Microbiol., 42(10): 4769- 4775.

Velazquez, D.; Zamberk, P.; Suarez, R. and Lazaro, P. (2009). Allergic contact dermatitis to povidone-iodine. Contact Dermatitis., 60: 348-349.

Von eiff, C.; Jansen, B.; Kohuen, W. and Becker, K. (2005). Infection associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis . Drugs., 65(2): 179 – 214 .

Walwaikar, P.P.; Morye, V.K. and Gawde, A.S. (2002). "Open, prospective trail to evaluate the efficacy and safety of combination of metronidazole and povidone- iodine in comparison to povidone-iodine alone in pre- and postoperative sterilization and surgical wound healing". J. AMA., 100(8): 456-458.

Wang, L.; Pulk, A.; Wasserman, M.R.; Feldman, M.B.; Altman ,R.B.; Cate, J.H. and Blanchard, S.C. (2012). Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. Nat. Struct. Mol. Biol., 19(9): 957– 963.

Ward, T.T. and Jones, S.R. (1996). Genitourinary tract infections. In: Resse, R .E . and Betts, R.E. Editior. Aparactical Approach to infections disease .4th ed .U.S.A.: 422-518.

Wardenburg, B.J.; Patel, R.J. and Schneewind, O. (2007). Surface protein and exotoxins are required for the pathogenesis of Staphylococcus aureus pneumonia. Infection and Immunity., 75: 1040 – 1044.

Weerasinghe, T.K. and Wijesinghe, L.P. (2010). A Study on the Bactericidal Efficiency of Selected Chemical Disinfectants and Antiseptics. J.OUSL., 6: 44 -58.

Welch, R.A.(1991). Pore-forming cytolysins of gram negative bacteria. Mol. Microbiol., 5(3):521–528.

Wellington, E. M.; Boxall, A.; Cross, P.; Fell, E. J.; Howkey, P. M.; Jones, D. L.; Lee, N. M. and Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. J. Infect. Dis., 13(2): 155 – 165.

Wilson, J. W.; Schurr, M. J.; Leblane, C. L.; Ramamurthy, R.; Buchanan, K. L. and Nickerson, C. A. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. J. Postgraduate Medical., 78: 216-224.

Wiskur, B.J.; Hunt, J.J. and Callegan, M.C. (2008). Hypermucoviscosity as a virulence factor in Experimental Klebsiella pneumoniae Endophthalmitis. Invest. Ophthalmol. Vis .Sci., 49(11): 4931-4938.

Woo, P.; Leung, A.; Leung, K.W. and Yuen. (2001). Identification of slide coagulase positive, Tube coagulase negative Staphylococcus aureus by 16S ribosomal RNA gene sequencing. J. Clin. Pathol., 54: 244-277.

Xie, Y.; He, Y.; Gehring, A.; Hu, Y.; Li, Q.; Tu, S. and Shi, X. (2011). Genotype and Toxin Gene Profiles of Staphylococcus aureus Clinical Isolates from China. PLoS ONE., 6(12): 28276.

Zhang, L. and Foxman, B. (2003). Molecular epidemiology of Escherichia coli. mediated urinary tract infections. University of Michigan. 1(8):235-244.

الملاحق

Appendices

ملحق (1) القائمة التوضيحية للفحوصات التي تشملها عدة api 20E التشخيصية عن الشركة المصنعة BioMerieux.

Test	Substrates	Enzymes	Results	
			Positive	Negative
ONPG	2-Nitrophenyl-B-D galactopyranoside	B-galactoside orthonitrophenyl-B-D	Yellow	Colourless
ADH	L-Arginine	Arginine dehydrolase	Orange – red	Yellow
LDC	L-Lysine	Lysine Decarboxylase	Orange	Yellow
ODC	L-Ornithine	Ornithine decarboxylase	Orange – red	Yellow
CIT	Trisodium thiosulfate	Citrate utilization	Bluish green – Blue	Glaucous – Yellow
H2S	Sodiumthiosulfate	H2S production	Black precipitate	Colourless
URE	Urea	Urease	Red- Pink	Yellow
TDA	2-Tryptophane	Tryptophane Deaminase	Brown	Yellow
IND	L-Tryptophane	Indol production	Red ring	Colourless - Yellow ring
[VP]	Sodium pyruvate	Acetone production	Pink- Red	/Colourless Yellow
GEL	Gelatin	Gelatinase	diffusion of black pigment	no pigment diffusion
GLU	D-Glucose	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green
MAN	D-ManitoL	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green
INO	Insitol	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green
SOR	D-Sorbitol	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green
RHA	Rhamnose	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green
SAC	D-Sucrose	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green
MEL	D-Melibiose	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green
AMY	Amygdalin	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green
ARA	L-Arabinose	Fermination/oxidation	Yellow	blue to green

*تقرأ النتيجة بعد إضافة الكواشف.

ملحق (2) القائمة التوضيحية للفحوصات التي تشملها عدة api Staph التشخيصية عن الشركة المصنعة BioMerieux.

Tests	Active Ingredients	Result	
		Negative	Positive
0	No substrate	Red	-
GLU	D- glucose	Red	Yellow
FRU	D-fructose		
MNE	D-mannose		
MAL	D-maltose		
LAC	D-Lactose (bovine origin)		
TRE	D-trehalose		
MAN	D-mannitol		
XLT	Xylitol		
MEL	D-melibiose		
NIT	Potassium nitrate	NIT1 + NIT2/ 10 min	
		Colorless-light pink	Red
PAL	β –naphthyl acid phosphate	ZYM A+ZYM B/ 10 min	
		Yellow	Violet
VP	Sodium pyruvate	VP 1 + VP 2/ 10 min	
		Colorless- light pink	Violet- pink
RAF	D-raffinose	Red	Yellow
XYL	D-xylose		
SAC	D-saccharose (sucrose)		
MDG	Methyl –α D-glucopyranoside		
NAG	N-acetyl-glucosamine		
ADH	L-arginine	Yellow	Orange – red
URE	Urea	Yellow	Red- Pink

*تقرأ النتيجة بعد إضافة الكواشف .

الملحق (3) المعدلات القياسية لأقطار التثبيط للمضادات الحيوية (CLSI, 2012).

ت	اسم المضاد	الرمز	محتوى القرص	البكتريا المستخدمة بالاختبار	حساسة اقل او يساوي	مقاومة اقل او يساوي
1	Ampicillin	AM	10	Enterobacteriacea Staphylococci	17 29	13 28
2	Methecillin	MET	5	Staphylococci	14	9
3	Cephalothin	CF	30	Enterobacteriacea Staphylococci	18	14
4	Amikacin	AK	30	Enterobacteriacea Staphylococci	17	14
5	Gentamycin	GM	10	Enterobacteriacea Staphylococci	15	12
6	Ciprofloxacin	CIP	5	Enterobacteriacea Staphylococci	31 21	20 15
7	Norfloxacin	NX	10	Enterobacteriacea Staphylococci	17	12
8	Vancomycin	VA	30	Staphylococci	15	-
9	Clindamycin	CC	5	Staphylococci	21	14
10	Tetracyclin	TE	30	Enterobacteriacea Staphylococci	15 19	11 14
11	Trimethoprim	TM	5	Enterobacteriacea Staphylococci	16	10
12	Chloramphenicol	C	10	Enterobacteriacea Staphylococci	18	12
13	Rifampicin	RA	30	Enterobacteriacea Staphylococci	20	16

ملحق (4) بعض عوامل الضراوة للعزلات البكتيرية المعزولة من أخماج المسالك البولية مظهرياً.

ت	الانواع البكتيرية	تحلل الدم				المحفظة	تلازن كريات الدم الحمراء	الغشاء الحيوي
		A	B	AB	O			
1	E.coli	+	+	+	+	+	+	+
2	E.coli	-	+	+	+	-	+	+
3	E.coli	-	+	+	+	+	+	+
4	E.coli	-	+	+	+	+	-	-
5	E.coli	+	+	-	+	-	+	-
6	E.coli	-	+	+	-	-	-	+
7	E.coli	-	-	+	+	-	-	-
8	E.coli	-	-	+	-	-	-	-
9	E.coli	-	+	+	-	-	-	-
10	E.coli	+	+	+	+	+	+	+
11	E.coli	-	+	+	-	-	-	-
12	E.coli	+	+	+	-	-	+	+
13	E.coli	-	+	+	-	-	+	+
14	E.coli	-	-	+	-	-	+	+
15	E.coli	+	-	-	-	+	-	+
16	E.coli	-	+	-	-	-	-	-
17	E.coli	+	+	+	+	+	+	+
18	E.coli	-	+	+	+	+	+	+
19	E.coli	-	-	+	-	-	+	+
20	E.coli	-	-	+	-	-	-	-
21	Staph .aureus	+	+	+	+	+	+	+
22	Staph .aureus	+	-	+	-	-	-	-
23	Staph .aureus	-	+	+	+	+	-	-
24	Staph .aureus	+	+	+	+	-	+	+
25	Staph .aureus	-	+	+	+	-	+	-
26	Staph .aureus	+	+	+	+	+	-	+
27	Staph .aureus	+	-	+	+	-	-	+
28	Staph .aureus	+	+	+	-	-	-	-
29	Staph .aureus	+	+	+	-	-	-	+
30	Staph. aureus	+	+	+	-	-	+	-
31	Staph. aureus	-	+	+	+	-	-	-
32	Staph. aureus	+	+	+	+	+	+	+
33	Staph. aureus	+	+	+	+	+	-	+
34	Staph. aureus	-	+	+	+	-	-	-
35	Staph. aureus	+	+	+	+	-	-	-
36	Staph. aureus	-	+	+	+	-	-	+
37	Staph. aureus	+	+	+	+	+	+	-
38	Staph. aureus	-	+	+	+	-	-	+
39	Staph. aureus	-	+	+	+	-	-	-
40	Staph. aureus	-	-	+	+	+	-	-
41	Staph. epidermidis	-	-	+	-	-	-	-
42	Staph. epidermidis	-	+	+	+	-	-	-
43	Staph .epidermidis	-	+	+	-	-	-	+
44	Staph. epidermidis	+	+	-	-	-	-	-
45	Staph .haemolyticus	+	+	+	+	-	-	-
46	Staph. haemolyticus	-	+	+	-	+	-	+
47	Staph. haemolyticus	-	+	+	+	-	-	+
48	Staph. haemolyticus	-	-	+	-	-	-	-

ملحق (5) فحص الحساسية لعزلات بكتريا .Staphylococcus spp المعزولة من أخماج المسالك البولية.

Clindamycin	Methicillin	Vancomycin	Cephalothin	Norfloxacin	Rifampicin	Trimethoprin	Tetracyclin	Ciprofloxacin	Gentamycin	Chloramphynicol	Ampicillin	Amikacin	المضادات الحيوية / الانواع البكتيرية	ت
S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	Staph. aureus	1
R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	Staph .aureus	2
R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	Staph. aureus	3
S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	Staph .aureus	4
R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	Staph .aureus	5
S	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	Staph .aureus	6
R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	Staph .aureus	7
R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	Staph .aureus	8
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Staph .aureus	9
R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	Staph .aureus	10
R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Staph. aureus	11
R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	Staph .aureus	12
S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	Staph. aureus	13
R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	Staph. aureus	14
R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	Staph. aureus	15
S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	Staph. aureus	16
S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	Staph. aureus	17
R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	Staph. aureus	18
S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S	Staph. aureus	19
S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	Staph. aureus	20
S	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	Staph. epidermidis	21
R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	Staph. epidermidis	22
R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	Staph. epidermidis	23
S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	Staph. epidermidis	24
S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	Staph. haemolyticus	25
S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	Staph. haemolyticus	26
S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	Staph. haemolyticus	27
S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	R	S	Staph .haemolyticus	28

R: Resistance S: Sensitive

ملحق (6) فحص الحساسية لعزلات بكتريا E. coli المعزولة من أخماج المسالك البولية.

Cephalothin	Norfloxacin	Rifampicin	Trimethoprin	Tetracyclin	Ciprofloxacin	Gentamysin	Chloramphynicol	Ampicillins	Amikasin	العزلات البكتيرية	ت
S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	E.coli	1
S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	E.coli	2
R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	E.coli	3
R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	E.coli	4
R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	E.coli	5
R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	E.coli	6
R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	E.coli	7
R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	E.coli	8
R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	E.coli	9
R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	E.coli	10
R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	E.coli	11
R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	E.coli	12
R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	E.coli	13
R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	E.coli	14
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	E.coli	15
R	S	R	S	R	R	S	R	R	S	E.coli	16
R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	E.coli	17
R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	E.coli	18
R	S	R	S	R	R	R	S	R	S	E.coli	19
S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	E.coli	20

R: Resistance S: Sensitive

ملحق (7) حساسية البكتريا للمطهرات ------ اقطار التثبيط مقاسة بالملم.

ت	المطهرات / نوع البكتريا	الديتول			بوفيدين – ايودين			ايودين		
		%1	% 5	%10	%1	%5	%10	%1	%5	%10
1	E.coli	R	R	11	10	10	20	R	R	R
2	E.coli	5	11	18	9	11	19	R	7	10
3	E.coli	5	R	R	R	14	14	R	R	R
4	E.coli	9	9	10	8	9	11	R	5	R
5	E.coli	R	R	13	R	9	9	3	R	R
6	E.coli	R	R	12	R	R	11	R	R	4
7	E.coli	9	11	18	R	7	15	R	R	R
8	E.coli	R	R	20	6	13	18	3	R	R
9	E.coli	8	13	15	R	R	R	R	6	5
10	E.coli	6	9	21	7	16	22	R	R	R
11	E.coli	R	R	R	R	8	R	R	R	R
12	E.coli	8	16	26	R	10	R	R	9	7
13	E.coli	R	11	12	R	8	18	R	R	R
14	E.coli	R	14	16	10	R	10	R	R	R
15	E.coli	R	R	R	R	R	R	R	R	4
16	E.coli	R	12	18	10	12	15	R	R	R
17	E.coli	R	R	R	R	R	R	R	5	5
18	E.coli	R	R	R	R	R	R	R	R	R
19	E.coli	11	10	10	R	10	R	R	R	R
20	E.coli	5	10	22	8	15	8	R	R	R
21	Staph .aureus	4	15	20	3	12	14	5	R	R
22	Staph .aureus	10	10	18	R	R	5	R	R	R
23	Staph .aureus	5	10	12	6	R	R	R	R	R
24	Staph .aureus	R	R	R	6	10	20	R	R	5
25	Staph . aureus	7	10	16	R	R	R	R	9	R
26	Staph .aureus	R	R	R	9	11	14	7	10	9
27	Staph .aureus	R	11	18	6	10	18	R	9	6
28	Staph .aureus	9	9	22	R	15	R	6	7	R
29	Staph .aureus	R	R	R	R	R	R	R	R	R
30	Staph .aureus	5	12	11	7	14	12	4	7	9
31	Staph .aureus	R	R	11	R	R	16	R	R	11
32	Staph . aureus	R	6	16	R	10	R	R	R	7
33	Staph .aureus	R	R	R	R	R	R	5	R	6
34	Staph .aureus	R	18	R	R	R	R	R	5	9
35	Staph .aureus	10	12	17	R	R	R	R	R	R
36	Staph .aureus	6	R	22	R	9	20	9	9	5
37	Staph .aureus	9	15	18	R	6	R	R	R	R
38	Staph .aureus	R	R	11	4	10	R	R	R	R
39	Staph .aureus	5	16	14	R	14	13	R	R	R
40	Staph .aureus	8	R	R	R	7	11	R	R	R
41	Staph .epidermidis	R	R	5	R	R	22	R	R	R
42	Staph .epidermidis	R	R	9	5	10	R	R	R	3
43	Staph .epidermidis	R	7	21	R	6	11	R	4	R
44	Staph .epidermidis	5	9	18	R	15	10	R	R	R
45	Staph .haemolyticus	10	16	20	9	6	18	3	6	6
46	Staph .haemolyticus	R	R	12	R	10	10	R	R	R
47	Staph .haemolyticus	9	7	20	R	R	9	5	R	13
48	Staph .haemolyticus	7	10	15	5	9	10	R	R	R

ملحق (8) استمارة مرضية تتضمن المعلومات المهمة للمريض.

1- التاريخ :

2- اسم المريض:

3 - الجنس:

4- العمر:

5- منطقة السكن:

6- هل تناول المضادات الحيوية :

7- نتيجة الزرع المختبري :

- **نوع المسبب البكتيري للمرض:**

- **هل منتجة للهيمولايسين:**

Summary

The study included collection of 180 samples of urine from patients with urinary tract infection (90 males and 90 females) in Diwaniya Teaching Hospital and Women's Hospital and children in Diwaniya for the period from (1/ 9/2015 until 1/31/2016) to isolate the bacteria causing the inflammation and producing hemolysin and to detect of molecular properties, virulence factors associated with pathogenesis, blood analysis and resistance to control agents of antibiotics and antiseptics.

It was found that 120 (66.67%) samples gave bacterial growth, while 60 (33.33%) were negative. Females had the highest percentage of Urinary tract infections compared to males. The number of infected women was 77 (77%) and the number of infected males was 50 (55%).

The isolated bacteria in this study included Escherichia coli in the rate 41.66%, Which is the highest frequency Followed by Staphylococcus aureus in the rate 16.66%, Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus also isolated in the rate 4.16% and 3.33% respectively, While formed Kleibsiella spp. , Enterobacter spp. , Providentia spp. the percentages are 14.16%, 13.33% and 2.5% respectively, While the percentages were 3.33% and 0.8%. of the share of Proteus mirabilis and Proteus vulgaris respectively as well.

The isolates producing hemolysin has included 20(40%) isolates of E.coli it was also included all isolates of Staph. aureus and Staph. haemolyticus, while the isolates of Staph. epidermidis producing hemolysin has reached to 4(80%). It was found that the blood type AB is the best in the detection of hemolysin among blood groups four (A, B, AB and O) as she was bacterial isolates analysis for these factions reached (41%, 77%, 91%, 58%) respectively. Using polymerase chain reaction technique (PCR) the hla and hlb genes were found in Staphylococcus spp. they encoded to produce hemolysin with size of 190 and 293 Base pair (Bp) respectively, In contrast the two genes have been identified hlyA and hlyB in E.coli bacteria to encoded for the production of hemolysin with size of 360 and 525 Base pair (Bp) respectively, All isolates were characterized by Staph. aureus, a blood analysis containing the hla gene (100%) and the hlb gene in the rate 40%, And when the detection of hemolysin genes in Staph. epidermidis and Staph. haemolyticus showed the presence of the hla gene in them at 25% and 75%

respectively, and the hlb gene in them increased in the rate 50% and 25% respectively, the electrophoresis technique showed that all isolates of E. coli produced hemolysin contained genes hlyA and hlyB in the rate100% .

It was detected some virulence factors associated with the pathogenesis of bacterial strains analysis for the blood which included the formation capsule, agglutination of red blood cells and biofilm production. Produced isolates of E.coli, Staph. aureus, Staph. haemolyticus capsule in the rate 35%, 40%, 25% respectively, while all isolates Staph. epidermidis unproductive capsule. As for the ability of the isolates the agglutination of red blood cells marked by both E.coli and Staph. aureus ability to events agglutination and in the rate 55% and 30% respectively, while the all isolates of Staph. haemolyticus and Staph. epidermidis is able to make a clumping. Bacterial species also showed a blood analyst the ability to produce biofilm different proportions, reaching isolates producing biofilm 60%, 45%, 50%, 25% of the bacteria E.coli, Staph. aureus, Staph. haemolyticus, Staph. epidermidis, respectively.

Tested the sensitivity of the isolates bacterial isolated from urinary tract infections at 13 to an antibiotic, these isolates varied in sensitivity and resistance depending on the type of bacterial and nature of the antibiotic. All isolates of bacterial species were characterized by complete resistance (100%) toward anti-Ampicillin were also higher resistors shown by E.coli is anti-Ampicillin is toward antibiotics Rifampicin, Cefalothin, Ciprofloxacin, Tetracyclin and Trimethoprim as it was 85%, 80%, 70% , 65% , 60% respectively.

Showed Staph. aureus relatively high resistance, which represented 90%, 75%, 75%, 60% to ward anti-Methicillin, Cefalothin, Tetracyclin, Norfloxacin respectively. Showed bacteria Staph. haemolyticus. full resistance (100%) towards Tetracyclin, and Methicillin relatively high towards and resistance Gentamysin and Cefalothin was 75% each. characterized isolates of Staph. epidermidis that it did not appear fully resistant only to anti Ampicillin also demonstrated resistance to a lesser extent towards Ciprofloxacin and Cefalothin which represented (75%) each. All isolates were studied were characterized by a lack of resistance to the towards anti Amikacin and Significant differences were observed in most tested bacterial strains in their resistance to antibiotics.

Summary……

Was investigating the sensitivity of the bacterial isolates analysis blood toward three common disinfectants included Dettol, Povidone – Iodine and Iodine with different concentrations (1%, 5%, 10%) for each disinfectant has It was found to measure the diameters of inhibition zones that these items were inhibited bacterial growth and increase efficiency with the increase in the concentration of sanitizer, It was generally observed that Dettol disinfectant is the most efficient in the inhibition of bacterial isolates growth when used in the concentration of 10%, while the iodine disinfectant recorded the lowest inhibitory among the disinfectants used.

Ministry of Higher Education and Scientific Research

AL-Qadisiyah University/ College of Education

Department of Biology

Molecular Study of Genes Responsible For The Production of Hemolysin in Bacteria Causing Urinary Tract Infections and Resistance to Control Factors

A Thesis
Submitted to The Council of College of Education / AL-Qadisiya University in Partial Fulfillment of The Requirements For Degree of Master in Biology/ Microbiology

By
Riyam Wissam Hassan

Supervisor By

Asst. prof. Ali Abed Al-Rahim Al-Nashi

1438 A. H. **2017 A. C.**

جدول (4 -12) مقاومة عزلات الانواع البكترية المحللة للدم تجاه بعض المطهرات المتداولة في المستشفيات .

المطهرات		الديتول			البوفيدين – ايودين			ايودين		
التراكيز		%1	%5	%10	%1	%5	%10	%1	%5	%10
الانواع البكتيرية	العدد الكلي	R العدد (%)	R العدد (%)	R العدد (%)	R العدد (%)	R العدد (%)	R العدد (%)	R العدد (%)	R العدد (%)	R العدد (%)
E.coli	20	(55) 11 ^{A}	(45) 9 ^{A}	(25) 5^{A}	(60)12^{AB}	(30)6 ^{A}	(35) 7^{AB}	(85) 17 ^{AB}	(80) 16^{A}	(70)14 ^{A}
Staph. aureus	20	(45)9 ^{A}	(40)8^{AB}	(30) 6^{A}	(65) 13 ^{AB}	(40) 8^{A}	(50)10^{A}	(70) 14^{A}	(65) 13^{A}	(55) 11^{B}
Staph. epidermidis	4	(75) 3 ^{B}	(50) 2 ^{A}	(0) 0 ^{B}	(75) 3 ^{A}	(25) 1^{A}	(25) 1^{B}	(100) 4^{B}	(75) 3^{A}	(75) 3^{A}
Staph .haemolytics	4	(25) 1 ^{C}	(25) 1 ^{B}	(0) 0 ^{B}	(50) 2 ^{B}	(25) 1 ^{A}	(0) 0^{C}	(50) 2^{C}	(75) 3^{A}	(50)2^{B}

الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية (P>0.05).
الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية (P<0.05).