جامعة القادسية
كلية العلوم
علوم الحياة

التحري عن عوامل الضراوة لبكتيريا اشيريشيا القولون المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية وقياس نمط بعض الحركيات الخلوية لديهم

رسالة مقدمه إلى
مجلس كلية العلوم/جامعة القادسية
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة/ أحياء مجهريه

من قبل
رواء ماجد محمد البو صالح
بكلوريوس علوم حياة \جامعة القادسية\ 2011

بإشراف
أ. م .د. ميثم غالي يوسف
كلية العلوم \ جامعة القادسية

1435 هـ 2014 م

رقم الفقرة	الموضوع	الصفحة
1	**الفصل الأول / المقدمة Introduction**	**1**
2	**الفصل الثاني / استعراض المراجع Literatures Review**	**4**
1-2	خمج المجاري البولية	**4**
2-2	العوامل المساعدة في حدوث المرض	**5**
3-2	تصنيف خمج المجاري البولية اعتماداً على موقع الاصابة	**6**
1-3-2	خمج المجاري البولية العليا	**7**
2-3-2	خمج المجاري البولية السفلى	**7**
4-2	تصنيف خمج الاصابة البولية اعتماداً على شدة الاصابة	**8**
1-4-2	الخمج الأولي	**8**
2-4-2	الخمج المتكرر	**8**
3-4-2	الخمج المزمن	**8**
5-2	تصنيف خمج المجاري البولية اعتماد على درجة خطورة الاصابة	**9**
1-5-2	الخمج المعقد	**9**
2-5-2	الخمج الغير معقد	**9**
6-2	الأسباب المساعدة في حدوث خمج المجاري البولية	
7-2	اهم البكتيريا المرضية المسببة لخمج المجاري البولية	**10**
1-7-2	العائلة المعوية *Enterobacteriaceae*	**11**
2-7-2	(UPEC) Uropathogenic *Escherichia coli*	**12**
8-2	عوامل الضراوة	**13**
1-8-2	التخمل عند بكتيريا*E.coli*	**14**
2-8-2	إنتاج البكتريوسين	**١٤**
3-8-2	المحفظة	**15**

4-8-2	إنتاج الهيمولايسين	16
5-8-2	إنتاج السايدروفور	17
6-8-2	انتاج انزيمات البيتالاكتميز	17
9-2	مقاومة بكتيريا *E.coli* للمضادات الحيوية	18
1-9-2	مضادات السيفالوسبورينات	18
أ	سيفالوسبورينات الجيل الأول	18
ب	سيفالوسبورينات الجيل الثاني	19
ج	سيفالوسبورينات الجيل الثالث	19
ء	سيفالوسبورينات الجيل الرابع	19
2-9-2	اليات المقاومة لمضادات البيتا لاكتام	19
أ	التحلل المائي للمضادات الحيوية بواسطة انزيمات البيتا لاكتاميز	20
ب	تقليل ألفة المضاد الحياتي لاستهداف البروتينات الرابطة للبنسلين	20
ج	انخفاض النفاذية في الغشاء الخارجي	٢١
ء	أنظمة الدفق	٢١
10-2	الآليات الدفاعية والاستجابة المناعية	22
1-10-2	الحركيات الخلوية	22
1-1-10-2	انترليوكين 6	23
2-1-10-2	انترليوكين 8	25
3-1-10-2	عامل تنخر الورم نوع الفا TNF-α	26

رقم الفقرة	الموضوع	الصفحة
3	**الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل**	29
1-3	المـــواد	29
1-1-3	الأجهــزة والأدوات المختبرية	29
2-1-3	المــواد الكيــميائيــة	29
3-1-3	الأوساط الزرعية الجاهزة	30

4-1-3	العدد الجاهزة Kits	31
أ	العدة المستعملة في استخلاص الحمض النووي	32
ب	العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المفرد Single PCR	33
ء	العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المتعدد Multiplex PCR	34
ج	العدة المستخدمة في قياس الحركيات الخلوية	34
5-1-3	المضادات الحيوية مجهزة من قبل شركة Bioanalys(Turkey)	34
2-3	طرائق العمل The methods	34
1-2-3	تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة	34
2-2-3	الاوساط الزرعية المحضرة في المختبر	34
أ	وسط اختبار الحركة	35
ب	وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور	35
ج	وسط تخمر الكربوهيدرات	35
ء	وسط الجيلاتين المغذي	35
3-3	محاليل الصبغات والكواشف	35
1-3-3	محلول صبغة المحفظة	36
2-3-3	المحلول الملحي الفسيولوجي	36
3-3-3	المحلول الدارئ الفوسفاتي الملحي	36
4-3-3	أنبوبة ماكفرلاند القياسية	36
أ	محلول كلوريد الباريوم	37
ب	محلول حامض الكبريتيك	37
5-3-3	كاشـــف الكتاليز	38
6-3-3	كاشف الأوكسيديز	38
7-3-3	كاشف فوكس بروسكاور	
8-3-3	كاشف احمر المثيل	
9-3-3	كاشف فرازير	
10-3-3	كاشف كوفاكس	
4-3	طرائق التعقيم	
1-4-3	التعقيم بالحرارة	
2-4-3	التعقيم بالترشيح	
5-3	جمع العينات	
6-3	تشخيص البكتيريا المعزولة	
1-6-3	الخصائص المظهرية والزرعية	
7-3	الفحوصات الكيموحيوية	
1-7-3	الكشف عن إنزيم الكاتيليز	
2-7-3	الكشف عن انزيم الاوكسيدز	
3-7-3	الكشف عن كبريتيد الهيدروجين	
4-7-3	اختبار استهلاك السترات	
5-7-3	اختبار قابلية الحركة	
6-7-3	فحص تخمير الكربوهيدرات	
7-7-3	الكشف عن انتاج ألا ندول	

8-7-3	اختبار احمر المثيل	
9-7-3	اختبار الفوكس بروسكور	
10-7-3	الكشف عن انزيم اليوريز	
8-3	التحري عن انتاج المحفظة البكتيرية	
9-3	التحري عن انتاج الهيمولايسين	
10-3	حفظ وإدامة العزلات البكتيرية	
1-10-3	الحفظ قصير الأمد	
2-10-3	وسط الحفظ طويل الأمد	
11-3	التحري عن مقاومه *E.coli* للمضادات الحيوية	
12-3	تفاعل السلسلة المتبلمرة PCR	
1-12-3	استخلاص الحامض النووي البكتيري	
2-12-3	تحضير هلام الأكاروز	
3-12-3	تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد	
4-12-3	تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد	
5-12-3	برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـDNA	
6-12-3	الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز	
13-3	قياس بعض المؤشرات الالتهابية	
1-13-3	قياس مستوى IL-6, IL-8, TNF-α في مصول المرضى	
أ	المواد المجهزة في العدد	
ب	تحضير المحاليل	
ج	طريقة العمل	
2-13-3	التحليل الإحصائي Statistical analysis	

رقم الفقرة	**الفصل الرابع/ النتائج**	**58**
1-4	عزل بكتريا الـ *E.coli* وتشخيصها	58
1-1-4	الصفات الزرعية	58
2-1-4	الصفات المجهرية	59
3-1-4	الفحوصات الكيموحيوية	59
2-4	الأعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *E.coli*	61
3-4	لأعداد والنسب المئوية لانتاج الهيمولايسين وتكوين المحفظة لبكتريا *E.coli*	63
4-4	علاقة خمج المجاري البولية بالجنس	65
5-4	علاقة خمج المجاري البولية بالعمر	65
6-4	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	66
7-4	تقنية تفاعل البلمرة	73
1-7-4	استخلاص الدنا	
2-7-4	تقنية تفاعل البلمرة المفرد والمتعدد	
8-4	الدراسة المناعية	
5	المناقشة Discussion	

1-5	عزل وتشخيص بكتيريا *E.coli*	
2-5	النسبة المئوية لظهور بكتيريا *E.coli* بين العزلات	
3-5	علاقة الجنس والعمر بالاصابة بخمج المجاري البولية	
2-5	انتاج بكتيريا *E.coli* للمحفظة وانزيم الهيمولايسين	
4-5	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	
5-5	انتشار عوامل الضراوة	
6-5	الدراسة المناعية	
	الاستنتاجات Conclusions	
	التوصيات Recommendations	
	المصادر العربية	
	المصادر الانكليزية	

الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-3	بـادئـات الـDNA (DNA primers): التي قامت بتجهيزها شركة (Bioneer)	**44**
2-3	مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد	**45**
3-3	مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد	**45**
4-3	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل البلمرة المفرد Single PCR	**46**
5-3	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المتعدد مايكروليترM tiplex PCR	**49**
1-4	الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية لبكتريا *E.coli*	**61**
2-4	الأعداد والنسب المئوية للانواع البكتيرية المعزولة من عينات الادرار.	**61**
3-4	ج الاعداد والنسب المئوية لعزلات *E.coli* المنتجة لانزيم الهيمولايسين المكونة للمحفظة	**62**
4-4	الأعداد والنسب المئوية للذكور والإناث المصابين بخمج المجاري البولية.	**62**
5-4	توزيع الاصابة بجرثومة *E.coli* حسب الفئة العمرية للمصاب ونسبتها	**64**

	المئوية .	
6-4	يوضح النسب المئوية لمقاومة عزلات *E.coli* لمضادات السيفالوسبورينات	67
7-4	لإعداد والنسب المئوية لجينات عوامل الضراوة في عزلات *E.coli* باستعمال تقنية الـSingle &Multiplex PCR .	73
8-4	مقارنة تراكيز IL-6 في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية.	
9-4	مقارنة تراكيز IL-8 في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية	
10-4	مقارنة تراكيز TNF-α في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية والاصحاء.	

الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1-3	المنحنى القياسي للـ IL- 6	53
2-3	المنحني القياسي IL- 8	55
3-3	المنحنى القياسي للـ TNF-α	57
1-4	واتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات *E.coli* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit .حيث أن M =(DNA Ladder 100-2000bp) .	58
2-4	الشكل (4-2): نواتج تضخيم الجين *irp2* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCRو المرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. يث أنM =(Ladder100-2000bp) (DNA , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجين *irp2* المسؤول عن اخذ الحديد من خلية العائل.	59
3-4	ال نواتج تضخيم الجين *iha* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCR المرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (100-1500bp DNA Ladder) , جميع العزلات أظهرت 4عزلات نتيجة موجبة لجين *iha* المسؤول عن تكوين المحفظة.	60
4-4	نواتج تضخيم الجين *pap* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM = (100-1500bp DNA Ladder) , أظهرت 11عزلة نتيجة موجبة لجين *pap*.	65
5-4	النواتج تضخيم الجين *afa* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية والمرحلة Single PCRكهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (DNA Ladder100-1500pb) حيث ان 9عزلات اظهرت نتيجة موجبة لجين *afa* المسؤول عن عامل الالتصاق .	66
6-4	ال نواتج تضخيم الجين *hly* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCR المرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M =(DNA Ladder 100-1500)bp , حيث ان 29 عزلة أظهرت نتيجة موجبة لجين *hly* المسؤول عن انزيم الهيمولايسين .	67

7-4	لنواتج تضخيم الجينات (*irp2+tst*) لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Multiplex PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (DNA Ladder 100-1500bp) , حيث أظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة لجين *irp2* المسؤول عن اخذ الحديد , ولم تظهر أي من العينات نتيجة موجبة للجين *tst* المسؤول عن متلازمة الصدمة السمية	**68**
8-4	نواتج تضخيم الجينات(*hly+iha*) لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Multiplex PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM =(DNA Ladder 100-1500bp) , حيث اظهرت 29 عزلة نتيجة موجبة للجين *hly* المسؤول عن انتاج انزيم الهيمولايسين بينما فقط 4 عزلات اظهرت نتيجة موجبة للجين *iha* المسؤول عن المحفظة.	**68**
9-4	واتج تضخيم الجينات (*pap+afa*) لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Multiplex PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M =(DNA Ladder 100-1500bp) , حيث أظهرت 9 عزلة نتيجة موجبة للجين *afa* المسؤول عن تكون اللواصق بينما أظهرت 11 عزلة فقط بنتيجة موجبة للجين *pap* المسؤول عن تكوين الاهداب .	**69**

رقم الفقرة	الموضوع	الصفحة
1	**الفصل الأول / المقدمة Introduction**	1
2	**الفصل الثاني / استعراض المراجع Literatures Review**	٣
1-2	خمج المجاري البولية	٣
2-2	العوامل المساعدة في حدوث المرض	٤
3-2	تصنيف خمج المجاري البولية اعتماداً على موقع الاصابة	٥
1-3-2	خمج المجاري البولية العليا	٥
2-3-2	خمج المجاري البولية السفلى	٥
4-2	تصنيف خمج الاصابة البولية اعتماداً على شدة الاصابة	٦
1-4-2	الخمج الأولي	٦
2-4-2	الخمج المتكرر	٦
3-4-2	الخمج المزمن	٦
5-2	تصنيف خمج المجاري البولية اعتماد على درجة خطورة الاصابة	٧
1-5-2	الخمج المعقد	٧
2-5-2	الخمج الغير معقد	٧
6-2	الأسباب المساعدة في حدوث خمج المجاري البولية	٧
7-2	اهم البكتيريا المرضية المسببة لخمج المجاري البولية	٨
1-7-2	العائلة المعوية *Enterobacteriaceae*	9
2-7-2	(UPEC) Uropathogenic *Escherichia coli*	9
8-2	عوامل الضراوة	١٠
1-8-2	التخمل عند بكتيريا*E.coli*	١٠
2-8-2	إنتاج البكتريوسين	١١
3-8-2	المحفظة	١1

4-8-2	إنتاج الهيمولايسين	12
5-8-2	إنتاج السايدروفور	12
6-8-2	انتاج انزيمات البيتالاكتميز	13
9-2	مقاومة بكتيريا *E.coli* للمضادات الحيوية	13
1-9-2	مضادات السيفالوسبورينات	13
أ	سيفالوسبورينات الجيل الأول	14
ب	سيفالوسبورينات الجيل الثاني	14
ج	سيفالوسبورينات الجيل الثالث	14
ء	سيفالوسبورينات الجيل الرابع	14
2-9-2	اليات المقاومة لمضادات البيتا لاكتام	15
أ	التحلل المائي للمضادات الحيوية بواسطة انزيمات البيتا لاكتاميز	15
ب	تقليل ألفة المضاد الحياتي لاستهداف البروتينات الرابطة للبنسلين	16
ج	انخفاض النفاذية في الغشاء الخارجي	١٦
ء	أنظمة الدفق	١٦
10-2	الآليات الدفاعية والاستجابة المناعية	١٧
1-10-2	الحركيات الخلوية	١٨
1-1-10-2	انترليوكين 6	١٩
2-1-10-2	انترليوكين 8	19
3-1-10-2	عامل تنخر الورم نوع الفا TNF-α	20

رقم الفقرة	الموضوع	الصفحة
3	**الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل**	21
1-3	المـــواد	21
1-1-3	الأجهــزة والأدوات المختبرية	21
2-1-3	المــواد الكيــميائيــة	22
3-1-3	الأوساط الزرعية الجاهزة	23
4-1-3	العدد الجاهزة Kits	24

أ	العدة المستعملة في استخلاص الحمض النووي	24
ب	العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المفرد Single PCR	24
ء	العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المتعدد Multiplex PCR	25
ج	العدة المستخدمة في قياس الحركيات الخلوية	25
3-1-5	المضادات الحيوية مجهزة من قبل شركة Bioanalys(Turkey)	26
3-2	طرائق العمل The methods	27
3-2-1	تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة	27
3-2-2	الاوساط الزرعية المحضرة في المختبر	27
أ	وسط اختبار الحركة	27
ب	وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور	27
ج	وسط تخمر الكربوهيدرات	27
ء	وسط الجيلاتين المغذي	28
3-3	محاليل الصبغات والكواشف	28
3-3-1	محلول صبغة المحفظة	28
3-3-2	المحلول الملحي الفسيولوجي	28
3-3-3	المحلول الدارئ الفوسفاتي الملحي	29
3-3-4	أنبوبة ماكفرلاند القياسية	29
أ	محلول كلوريد الباريوم	29
ب	محلول حامض الكبريتيك	29
3-3-5	كاشـــف الكتاليز	29
3-3-6	كاشف الأوكسيديز	30
3-3-7	كاشف فوكس بروسكاور	٣٠
3-3-8	كاشف احمر المثيل	٣٠
3-3-9	كاشف فرازير	٣٠
3-3-10	كاشف كوفاكس	٣٠
3-4	طرائق التعقيم	٣١
3-4-1	التعقيم بالحرارة	٣١
3-4-2	التعقيم بالترشيح	٣١
3-5	جمع العينات	٣١
3-6	تشخيص البكتيريا المعزولة	٣٢
3-6-1	الخصائص المظهرية والزرعية	٣٢
3-7	الفحوصات الكيموحيوية	٣٢
3-7-1	الكشف عن إنزيم الكاتيليز	٣٢
3-7-2	الكشف عن انزيم الاوكسيدز	٣٢
3-7-3	الكشف عن كبريتيد الهيدروجين	٣٢
3-7-4	اختبار استهلاك السترات	٣٣
3-7-5	اختبار قابلية الحركة	٣٣
3-7-6	فحص تخمير الكربوهيدرات	٣٣
3-7-7	الكشف عن انتاج ألا ندول	٣٣
3-7-8	اختبار احمر المثيل	٣٣

9-7-3	اختبار الفوكس بروسكور	٣٤
10-7-3	الكشف عن انزيم اليوريز	٣٤
8-3	التحري عن انتاج المحفظة البكتيرية	٣٤
9-3	التحري عن انتاج الهيمولايسين	٣٤
10-3	حفظ وإدامة العزلات البكتيرية	٣٥
1-10-3	الحفظ قصير الأمد	٣٥
2-10-3	وسط الحفظ طويل الأمد	٣٥
11-3	التحري عن مقاومه *E.coli* للمضادات الحيوية	٣٥
12-3	تفاعل السلسلة المتبلمرة PCR	٣٦
1-12-3	استخلاص الحامض النووي البكتيري	٣٦
2-12-3	تحضير هلام الأكاروز	٣٧
3-12-3	تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد	٣٨
4-12-3	تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد	٣٩
5-12-3	برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الDNA	٣٩
6-12-3	الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز	٤١
13-3	قياس بعض الحركيات الخلوية	٤١
1-13-3	قياس مستوى IL-6, IL-8, TNF-α في مصول المرضى	٤١
أ	المواد المجهزة في العدد	٤١
ب	تحضير المحاليل	٤٢
ج	طريقة العمل	٤٢
2-13-3	التحليل الإحصائي Statistical analysis	٤٥

رقم الفقرة	**الفصل الرابع/ النتائج**	٤٦
1-4	عزل بكتريا الـ *E.coli* وتشخيصها	46
1-1-4	الصفات الزرعية	46
2-1-4	الصفات المجهرية	46
3-1-4	الفحوصات الكيموحيوية	46
2-4	الأعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *E.coli*	47
3-4	لأعداد والنسب المئوية لانتاج الهيمولايسين وتكوين المحفظة لبكتريا *E.coli*	48
4-4	علاقة خمج المجاري البولية بالجنس	48
5-4	علاقة خمج المجاري البولية بالعمر	49
6-4	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	50
7-4	تقنية تفاعل البلمرة	52
1-7-4	استخلاص الدنا	٥٢
2-7-4	تقنية تفاعل البلمرة المفرد والمتعدد	52
8-4	الدراسة المناعية	٥٨
5	**الفصل الخامس \ المناقشة Discussion**	٥٩
1-5	عزل وتشخيص بكتيريا *E.coli*	٥٩
2-5	النسبة المئوية لظهور بكتيريا *E.coli* بين العزلات	٦١
3-5	علاقة الجنس والعمر بالاصابة بخمج المجاري البولية	٦١

2-5	انتاج بكتيريا *E.coli* للمحفظة وانزيم الهيمولايسين	٦٣
4-5	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	٦٣
5-5	انتشار عوامل الضراوة	٦٨
6-5	الدراسة المناعية	٧١
	الاستنتاجات Conclusions	٧٤
	التوصيات Recommendations	٧٥
	المصادر العربية	٧٦
	المصادر الانكليزية	٧٧

الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-3	بادئات الـDNA (DNA primers) التي قامت بتجهيزها شركة (Bioneer)	٣٦
2-3	مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد	٣٨
3-3	مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد	٣٩
4-3	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل البلمرة المفرد Single PCR	40
5-3	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المتعدد مايكروليترmtiplex PCR	40
1-4	الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية لبكتريا *E.coli*	٤٧
2-4	الأعداد والنسب المئوية للانواع البكتيرية المعزولة من عينات الادرار.	٤٨
3-4	ج الاعداد والنسب المئوية لعزلات *E.coli* المنتجة لانزيم الهيمولايسين المكونة للمحفظة	٤٨
4-4	الأعداد والنسب المئوية للذكور والإناث المصابين بخمج المجاري البولية.	٤٩
5-4	توزيع الاصابة بجرثومة *E.coli* حسب الفئة العمرية للمصاب ونسبتها المئوية .	٤٩
6-4	يوضح النسب المئوية لمقاومة عزلات *E.coli* لمضادات السيفالوسبورينات	٥١
7-4	لإعداد والنسب المئوية لجينات عوامل الضراوة في عزلات *E.coli* باستعمال تقنية الـSingle &Multiplex PCR .	٥٣
8-4	مقارنة تراكيز IL-6 في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية.	٥٨
9-4	مقارنة تراكيز IL-8 في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية	٥٨
10-4	مقارنة تراكيز TNF-α في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية والاصحاء.	٥٨

الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1-3	المنحنى القياسي للـ IL- 6	43
2-3	المنحني القياسي IL- 8	44
3-3	المنحنى القياسي للـ TNF-α	45
1-4	ناتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات *E.coli* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit. حيث أن M =(DNA Ladder 100-2000bp) .	52
2-4	ناتج تضخيم الجين *irp2* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنيةSingle PCR و المرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM (Ladder100-2000bp= DNA) , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجين *irp2* المسؤول عن اخذ الحديد من خلية العائل.	54
3-4	ناتج تضخيم الجين *iha* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (100-1500bp DNA Ladder) , جميع العزلات أظهرت 4عزلات نتيجة موجبة لجين *iha* المسؤول عن تكوين المحفظة.	54
4-4	نواتج تضخيم الجين *pap* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM = (100-1500bp DNA Ladder) , أظهرت 11عزلة نتيجة موجبة لجين *pap*.	٥٥
5-4	النواتج تضخيم الجين *afa* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية والمرحلة Single PCRكهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (DNA Ladder100-1500pb) حيث ان 9عزلات اظهرت نتيجة موجبة لجين *afa* المسؤول عن عامل الالتصاق .	٥٥
6-4	ال نواتج تضخيم الجين *hly* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M =(DNA Ladder 100-1500)bp , حيث ان 29 عزلة أظهرت نتيجة موجبة لجين *hly* المسؤول عن انزيم الهيمولايسين .	٥٦
7-4	نواتج تضخيم الجينات(*hly+iha*) لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Multiplex PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM =(DNA Ladder 100-1500bp) , حيث اظهرت 29 عزلة نتيجة موجبة للجين *hly* المسؤول عن انتاج انزيم الهيمولايسين بينما فقط 4 عزلات اظهرت	٥٧

	نتيجة موجبة للجين *iha* المسؤول عن المحفظة.	
٥٧	واتج تضخيم الجينات (*pap+afa*) لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Multiplex PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M =(DNA Ladder 100-1500bp) , حيث أظهرت 9 عزلة نتيجة موجبة للجين *afa* المسؤول عن تكون اللواصق بينما أظهرت 11 عزلة فقط بنتيجة موجبة للجين *pap* المسؤول عن تكوين الاهداب .	8-4

قائمة المختصرات

المختصر	تعريفه
A/A	Acid \ Acid
ACD	Anemia Chronic Disease
AMC	Acetyl Methyl Carbinol
bp	base pair
CRP	C Reactive Protein
EDTA	Ethylene-Diamine- Tetra Acetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMB	Eosin Mthylene Blue
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
LPS	Lipopolysaccharides
M.R.V.P	Methyl Red Vogas Prosekauer
No.	Number
PBPs	Penicillin Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodcyl Sulphate

TLRs	Toll Like Receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
UPEC	Urou Pathogenic *E.coli*
UTI	Urinary Tract Infection
UV	Ultra Violet
β	Beta

إقرار لجنة المناقشة

نشهد إننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ(**التحري عن عوامل الضراوة لبكتيريا اشيريشيا القولون المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية وقياس نمط بعض الحركيات الخلوية لديهم**) وناقشنا الطالبة رواء ماجد محمد في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 6 / 5 /2014 وإنها جديرة لنيل درجة الماجستير علوم / علوم الحياة / أحياء مجهرية.

التوقيع: رئيس التاريخ: / / 2014

اللجنة

الاسم: أ.د. علي محسن نعمة

اللقب العلمي:استاذ

العنوان: كلية الطب/ جامعة الكوفة

التاريخ: / / 2014

التوقيع:

عضو اللجنة (المشرف)

الاسم:أ.م د. ميثم غالي يوسف

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ: / / 2014

التوقيع :

عضو اللجنة

الاسم: أ.م.د. سيوف خومان علوان

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الصيدلة/جامعة القادسية

التاريخ: / / 2014

التوقيع:

عضو اللجنة

الاسم:أ.م.د. محمد عبد كاظم

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان:كلية الطب/جامعة بابل

إقرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته ..... المنعقدة في / / 2014 وقرر منحه شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية

التوقيع:

الاسم: أ.م.د.عبد الامير سمير سعدون

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: / / 2014

إقرار المشرف

أشهد إن رسالة الماجستير الموسومة بـ **(التحري عن عوامل الضراوة لبكتيريا اشيريشيا القولون المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية وقياس نمط بعض الحركيات الخلوية لديهم)** قد أعدتها الطالبه **رواء ماجد محمد** بإشرافي، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم / علوم الحياة / أحياء مجهرية.

التوقيع:

الأسم :أ.م د. ميثم غالي يوسف

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ: / / 2014

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة إلى التوصية المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الدراسة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الأسم : د. جاسم حنون

اللقب العلمي : مدرس
العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية
التاريخ: / / 2014

الخلاصـــــة Abstract:

تم في هذه الدراسة جمع 100 عينة دم Blood وإدرار Urine من أعمار مختلفة للمرضى المصابين بخمج حويض الكلى pyelonephritis الذين راجعوا مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والأطفال في مدينة الديوانية , خلال المدة من تشرين الثاني 2012 الى نيسان 2013 للتحري عن بكتريا الـ *E.coli*. حيث بينت نتائج الاختبارات الكيموحيوية عائدية 56(56%) عزلة إلى بكتريا الـ *E.coli* التي تم عزلها من عينات الادرار بينما ظهرت 44 (44%) عزلة تعود الى أجناس وأنواع بكتيرية مختلفة أخرى.

كذلك بينت نتائج الدراسة الحالية إن الإناث أكثر عرضة للأصابه بخمج حويض الكلى pyelonephritis من الذكور حيث كان عدد الإناث المصابات 38 من اصل 56 وبنسبة (67.86%) بينما كان عدد الذكور المصابين 18 من اصل 56 وبنسبة (32.14%).

ولقد بينت نتائج الدراسة الحالية ان أكثر فئة عمرية تصاب بخمج حويض الكلى 30-39سنة بنسبة (30.36%) , يأتي بعده العمر 40-49 سنة بنسبة (19.64%) وجاء العمر 20-29سنة بالمرتبة الثالثة وبنسبة (14.29%) , وجاء بعده العمر 60-69 سنة بنسبة (12.50%) وكان العمر50-59 سنة بنسبه (10.71%) , والعمر 10-19 سنة بنسبة (7.14%) , والعمر 70-79 سنة بنسبة (3.57%) وأخيرا جاء العمر الاقل من 10 سنة بالمرتبه الاخيره وبنسبة (1.79%) .

تم التحري عن مقاومة عزلات الـ *E.coli* للاجيال الاربعة لمضادات السيفالوسبورينات باستخدام طريقة الانتشار بالاقراص Disk Diffusion , و جاءت النسب متفاوتة , حيث بينت نتائج فحص الحساسية للجيل الاول مقاومة عزلات *E.coli* لمضاد Cephalothin بنسبة (78.6%) وجاءت نسبة المقاومة لمضاد (71.4%) Cefazolin بينما اظهرت نسبة المقاومة لمضاد Cephalexin هي (69.7%) ومضاد Cephadroxil بنسبة (66.1%) .

اما مضادات الجيل الثاني فجاءت نسبة المقاومة لمضاد Cefaclor هي (59.0%) وكذلك نسبة المقاومة لمضاد Cefonicid كانت (60.8%) ومضاد Cefprozil بنسبة مقاومة (50.0%) وكذلك نسبة المقاومة لمضاد Cefoxitin هي (64.2%) واخيرا نسبة المقاومة لمضاد Cefmetazole جاءت (55.3%)

وقد جاء الجيل الثالث أكثر حساسية من بقية الاجيال حيث بلغت نسبة المقاومة لمضاد Ceftriaxon (32.2%) بينما جاءت نسبة المقاومة لمضاد Cefotaxim هي (35.7%) واظهرت نسبة المقاومة لمضاد

Ceftazidimهي (37.5%) ونسبة المقاومة للمضاد Cefixim هي (42.9%) وجاءت نسبة المقاومة لمضاد Cefdinir هي (35.7%) واخيرا نسبة مقاومة (30.4%) لمضاد Ceftizoxim . اما الجيل الرابع والمتكون من مضاد واحد فقط هو مضاد Cefepime جاءت نسبة المقاومة له (39.3%) .

كذلك تم التحري عن بعض جينات عوامل الضراوة Virulence Factors بأستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة Polymerase chain reaction المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR , وهي كل من جين *irp2* المسؤول عن اخذ الحديد من الدم , *pap* الجين المسؤول عن انتاج نوع P من الاهداب ,*afa* الجين المسؤول عن انتاج الاهداب , *hly* الجين المسؤول عن انتاج السموم المحلله للدم , *iha* الجين المسؤول عن انتاج المحفظة capsule, *tst* الجين المسؤول عن الصدمة السمية toxic shock.

أظهرت نتائج PCR امتلاك جميع عزلات بكتريا *E.coli* التي اجري عليها الفحص والتي تبلغ 30 (100%) عزلة للجين *irp2*, بينما أظهرت 11(36.6%) عزلة امتلاكها للجين *pap*, وأظهرت الدراسة الحالية امتلاك 9(30.0%) للجين *afa*, وجاءت 29(96.6%) عزلة امتلاكها للجين *hly* , وأظهرت 3(10.0%) عزلة فقط امتلاكها للجين *iha*, وأخيرا لم تسجل اي عزلة امتلاكها للجين *tst*.

كذلك تم في الدراسة الحالية قياس العوامل المناعية التي لها علاقة بخمج المسالك البولية UTI بصورة عامة وخمج حويض الكلى Pyelonephritis بصورة خاصة , وقد تم قياس بعض من السايتوكينات وهي (IL-8,IL-6,TNF-α) ووجد ارتفاع كبير وملحوظ في نسبة هذه العوامل في مصول المرضى المصابين بخمج حويض الكلى Pyelonephritis مقارنة بالأشخاص الأصحاء .

ألمقدمه Introduction:

يعد خمج المجاري البولية عدوى شائعة تحدث عند دخول البكتيريا عبر فتحة الاحليل وبالتالي تكاثر البكتيريا في الجهاز البولي والذي يتضمن الكليتين والحالبين والمثانة البولية والاحليل ويعد الجهاز البولي من الاجهزة المهمة في جسم الانسان لطبيعة العمل الذي يقوم به في تنقية الدم من المواد الضارة والسامة للجسم والتخلص منها على شكل بول, حيث يعد البول خالياً من إي تلوث بكتيري او فطري او فيروسي تبدأ اخماج المجاري البولية عادة في المجاري السفلية (الاحليل والمثانة) ويسمى خمج المثانة وخمج الاحليل , وفي حالة عدم علاجها فأنها تتطور لتصل إلى المجاري البولية العلوية (الحالبين والكليتين) حيث تسبب خمج الكلى وحويض الكلى Pyelonephritis و يحدث خمج المجاري البولية في مختلف الأعمار مما جعله يأتي بالمرتبة الثانية بعد أخماج الجهاز التنفسي ويُعد خمج المجاري البولية من الاصابات البكتيرية التي يكون لها أثر واضح بين المرضى الذين يزورون المستشفيات والمراكز nالصحية(Audu,2007; Kuni ,1994).

إن خمج المجاري البولية يصيب كلا الجنسين وهو يصيب الإناث أكثر من الذكور لأسباب غير معروفة تماماً غير إن الشك يدور حول قصر الاحليل عند الإناث مقارنة بالذكورحيث يبلغ طول المجرى البولي للاناث 2.8 سم بينما في الذكور يبلغ أكثر من 10سم وأثبت إن (40-50%) من النساء تصاب

بخمج المجاري البولية خلال حياتهن (Bollgren & Winberg , 1999) والسبب الإاخر قد يكون بسبب النشاط الهرموني لدى الأنثى الذي هو أنشط بكثير مما في الذكر مما يؤثر على الدالة الحامضية للوسط حيث يوفر بيئة ملائمة للنمو البكتيري (Martelli *et al*, 2000) .

ان اغلب حالات خمج المجاري البولية سببها البكتيريا وخصوصاً البكتيريا المعوية حيث تقوم بتلويث الاحليل من خلال تلويث المنطقة المحيطة بالشرج وصولا إلى المثانة (Sokeland ,1999) , وإن إعراض خمج المجاري البولية العلوية تتضمن الم في الخاصرة أو أسفل الظهر , التبول المتكرر, عدم القدرة على إنتاج سوى كمية قليلة من البول , سلاسة البول , وألم في منطقة البطن والحوض , وتبول مؤلم وأحيانا تقيؤ في الحالات الحادة , إما الحالات المزمنة فقد يكون بدون إعراض سببه خمج حويض الكلى الذي يتطلب علاج فوري وإذا لم يعالج سوف يحد من عمل الكلى ويسبب الوفاة في الحالات الحادة الناتجة من الفشل الكلوي (Ayazi P. *et al.* ,2003).

وإن حوالي 80% من حالات خمج المجاري البولية تتسبب بواسطة بكتيريا سالبة لصبغة غرام عصوية الشكل مسوطه واختياريه لاهوائيه تنتمي إلى العائلة المعوية *Enterobacteairacea* تسمى *Escherichiacoli* من سلالة *uorupathogenicE.coli* (UPEC) , Bachur & Caputo (1995) .

وتحتاج البكتيريا لتسبب المرض القدرة للوصول إلى النسيج أو العضو الملائم ومن ثم استعمار المنطقة وهذا لهُ علاقة بقدرة البكتيريا على اختراق الاغشية المخاطية واجتياح جسم المضيف ومن ثم إفراز السموم وبالتالي فأن استعمار منطقة الاصابة يبدأ بالالتصاق , حيث يعد الالتصاق من أهم عوامل الامراضية لدى البكتيريا وان هذه السلالة البكتيرية تمتلك خصائص ضراوة أخرى مكملة لعملية الالتصاق مثل الاجتياح و إفراز السموم و أنظمة اخذ الحديد وبناء السايتوتوكسين وغيرها (Otto *et al* ,2001) .

يلعب الجهاز المناعي دوراً كبيراً في حماية الجسم عند حدوث الخمج و تعتبر كمؤشر وإنذار لحدوث الخمج حيث يساعد في تحفيز خلايا الجهاز المناعي الدفاعية ضد الإصابة البكتيرية حيث يقوم بإفراز الحركيات الخلوية والتي هي أشبه بالهرمون من الناحية الوظيفية , حيث يكون لها دور في نقل الاشارة الكيميائية بين الخلايا المناعية وخلايا الجسم (Sheu *et al*., 2006) , وتعمل السايتوكينات كمؤشرات التهابية تحفز او تثبط خلايا الاستجابة المناعية حيث يعتبر أنتاج الانترليوكينات Interleukins كأستجابة أولية للطبقة المخاطية عند الغزو البكتيري حيث يزداد تركيز الانترليوكين بعد دقائق من الاصابة (Diepold *et al*.,2008) . ولقد انتشر خمج المجاري البولية المسبب من قبل بكتيريا *E.coli* في الفترة الاخيرة بصورة كبيرة لذلك هدفت الدراسة الى الكشف عن ضراوة بكتيريا *E.coli* في تسبيبها لمرض خمج المجاري البولية وعلاقة الاصابة البكتيرية ببعض المؤشرات الالتهابية , حيث شملت الدراسة المحاور التالية:

1- عزل وتشخيص بكتيريا *E.coli* من المرضى المصابين بخمج المجاري البولية.

2- تحديد بعض المورثات المسؤولة عن عوامل الضراوة لبكتيريا *E.coli* باستخدام التقنيات الجزيئية التي هي single and Multiplex PCR.

3- تحديد بعض المؤشرات الالتهابية والتي هي (TNF-α , IL-8, IL-6) عند المرضى المصابين بخمج المجاري البولية وعلاقتها بالمرض باستخدام تقنية ELISA.

4- تحديد حساسية بكتيريا *E.coli* لبعض المضادات الحيوية

2- استعراض المراجع Literature Review

2-1: خمج المجاري البولية

يعرف خمج المجاري البولية على إنّهُ استيطان Colonization المجرى البولي من قبل الاحياء المجهرية الممرضة ، والذي يؤدي إلى الاستجابة الخمجية للجهاز البولي (Foxman & Brown, 2003) , و يمكن أنْ يحدث الخمج في أي جزء من المجاري البولية : الكلية Kidney ، الحالب Ureter ، المثانة Bladder ، والاحليل Urethra ، ويصنف حسب موقع الاصابة إلى خمج كلوي حوضي Pyelonephritis ، وخمج المثانة Cystitis و خمج الاحليل Urethritis ، وعندما تكون هناك تشوهات تركيبية و وظيفية أو وجود أجسام غريبة مثل بقاء القثطرة البولية Urinary catheter لمدة طويلة أو وجود الحصى Stones فيعتبر الخمج معقداً (Masson *et al*., 2009).

تعتمد شدة الإصابة ومدتها على عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتيريا المسببة للمرض من ناحية وتعتمد على طبيعة الأجهزة الدفاعية لدى المضيف من ناحية اخرى (Bass *et al*., 2003) , يأتي خمج المجاري البولية - من حيث الاهمية الطبية - بالدرجة الثانية بعد خمج المجاري التنفسية ، إلا أنّ نسبة الوفيات التي تتسبب عنه تفوق خمسة اضعاف ما يسجل في اصابات المجاري التنفسية (Perry & Staley , 1997; Tortora *et al*.,1998) ، ويعد من اخطر العوامل التي تؤدي إلى تطور الفشل الكلوي (Elder , 2004) .

واخماج المجاري البولية سببها البكتيريا التي تكون موجودة عادة في الجهاز الهضمي ، وعلى الجلد حول المستقيم والمهبل , ويحدث خمج المجاري البولية في كلا الجنسين غير انهُ يحدث عند الاناث اكثر مما في الذكور نتيجة عدة اسباب منها قرب فتحة الشرج من الفتحة البولية عند الاناث اكثر مما في الذكور , كذلك نتيجة قصر الحالب, ويمكن للبكتيريا المعوية منها *Escherichia coli* ان تعبر إلى مجرى البول وتصل إلى المثانة (Roland & Harding, 1993), وكذلك عند الاناث بعد انقطاع الطمث قد تصبح عدوى المجاري البولية أكثر شيوعا لأن أنسجة المهبل ومجرى البول و قاعدة المثانة تصبح أرق و أكثر هشاشة بسبب فقدان هرمون الاستروجين مما يسهل اختراق البكتيريا للأنسجة وتكاثرها داخل الانسجة المبطنة للمجرى البولي (Geber-Selassie *et al*., 1998), وتشمل العوامل الأخرى التي تسبب الخمج أي شيء يعرقل تدفق ومرور البول ، مثل تضخم البروستات أو حصى الكلى و ترتبط 80-90% من عدوى المجاري البولية المكتسبة مع استخدام القثطرة البولية لدى المرضى المصابين بمشاكل كلوية مزمنة (Roland & Harding , 1993).

وان المسببات الأكثر شيوعا من عدوى المجاري البولية هي *E. coli* ، *Klebsilla pneumoniae* ، *Proteus mirabilis*، *Enterococcus* spp. ، *Pseudomonas aeruginosa* و يمكن أن يسبب فطر *C&ida albicans* خمج المجاري البولية في مرضى السكري (Martina & Walter, 1999) .

2-2 : العوامل المساعدة في حدوث المرض

في مجال دراسة العلاقة بين خمج المجاري البولية والفئات العمرية المختلفة للافراد , أفادت نتائج الدراسات التي اجريت على مرضى مصابين بخمج المجاري البولية أن تكرار الاصابة بخمج المجاري البولية كانت لدى كبار السن او فئة الكهول اكثر من بقية الفئات العمرية (El Tahawy & Khalaf , 1988), وفي دراسة أخرى وجد ان اكثر من 40% من كبار السن سواء الذكور او الاناث هم اكبر فئة مهدده بخطر الاصابة بخمج المجاري البولية وخصوصا اللاعرضية (Avalos *et al*., 1999 ; Orenstein & Wong , 1999), وان هؤلاء المرضى اذ لم يخضعوا للعلاج يتطور لديهم المرض فيما بعد الى خمج المثانة الحاد المصاحب اما صغار السن فكانت اقل فئة عمرية تصاب بالمرض (Howes, 2002 & Kass, 1998) .

اما عن علاقة الجنس بالاصابة بخمج المجاري البولية تعد الاناث اكثر عرضة للاصابة بمرض خمج المجاري البولية من الذكور حيث يرجع السبب إلى قصر الحالب وقرب الفتحة الشرجية من الفتحة البولية مما يسهل صعود بكتيريا الايشيرشيا الايشيرشياية إلى المجرى البولي وبالتالي حدوث الحالة الخمجية (Hoberman *et al*.,1997), وقد أشار Raka و جماعتة (2004) إلى أن نسبة الإصابة بين الذكور كانت (25.4%) أما الإناث فقد بلغت(74.6%) ، وهذا ما اكده Cohen و جماعتة (2003) في دراسة على مرضى خمج المجاري البولية بأن الإصابة عند الإناث كانت أعلى منها في الذكور أما Mehr و جماعتة (2004) فقد أشاروا إلى أن نسبة الذكور المصابين بخمج المجاري البولية (39 %) بينما كانت نسبة الاصابة عند الإناث (56%) و ذلك في دراسة اجريت في استراليا ، وأشار Sharm و جماعتة (2011) إلى أن الإصابة بخمج المجاري البولية عند الاطفال كانت بنسبة (65.0%) عند الإناث أما عند الذكور فقد كانت (35.0 %) و افادت دراسة اخرى إنّ خطر هذا الخمج قبل عمر ال 14 سنة يقدر بمعدل (1-3%) في الأولاد و (3-10) في الاناث (Chang & Shortliffe, 2006) .

إنّ أعراض خمج المجاري البولية عند حديثي الولادة والرضع غير واضحة و محددة في أغلب الاحيان لذا فإنّ تشخيص الخمج ومعالجتة بالسرعة الممكنة يمكن أنْ يمنع ضرر انسجة الكلية الذي من الممكن أنْ يسبب الضرر الكلوي التقدمّي (Smellie *et al* .,1998) , يضاف إلى ذلك إنّ تشخيص الخمج بعمر مبكر من الطفولة يعمل كمؤشر للكشف عن التشوهات الحاصلة في المجاري البولية ، ومن ناحية اخرى يعتبر ذواهمية في الحماية من الاصابات اثناء نمو الكلية (Schlager ,2001) , وعلى الرغم من أنّ خمج المجاري البولية قد يحدث من قبل أي ممرض يستوطن المجاري البولية على سبيل المثال (الطفيليات

،الفطريات والفيروسات) إلا أنّ اغلب الحالات تكون البكتيريا هي المسبب الرئيسي خصوصا البكتيريا التي يكون اصلها معوي (Wulte *et al*., 2004).

2-3:تصنيف خمج المجاري البولية اعتماداً على موقع الاصابة

2-3-1: خمج المجاري البولية العليا

يشمل أخماج الكلية وحوضها Pyelonephritis الناتجة عن غزو البكتيريا لنسيج الكلية (Wagenlehner *et al.*, 2009) ، تصاحب اخماج المجاري البولية العليا أعراض ، منها الحمى Fever والقشعريرة Chills والتعب وألم الخاصرة Flank pain وأسفل الظهر مع قلة التبول وتكراره ُوفي بعض الأحيان تكون مصحوبة بالتقيؤ Vomiting والإسهال Diarrhea مع الم في البطن والغثيان Nausea (Lane & Takhar , 2011) , ويعد خمج المجاري البولية العليا اكثر خطورة من اخماج المجاري البولية السفلى، ولكنها اقل شيوعا منها ولهذا فإنّ تجنب اصابة الاحليل يمنع من وصول البكتيريا إلى المثانة وإنّ عدم علاجها يؤدي إلى خمج المجاري البولية العليا (Reddy's, 2002).

2-3-2: خمج المجاري البولية السفلى

يتضمن كل من خمج المثانة Cystitis وخمج الأحليل Urethritis إذ يشكو مرضى خمج المثانة الحاد من متلازمة من الأعراض السريرية المتضمنة عسر البول Dysuria اوكثرة عدد مرات التبول Frequent urination والحاجة للتبول Urgency مع عدم خروج البول وألم فوق منطقة العانة (Lane & Takhar ,2011).

2-4: تصنيف خمج الاصابة البولية اعتماداً على شدة الاصابة

2-4-1:الخمج الأولي

يحصل نتيجة لغزو البكتيريا للمجاري البولية والاستيطان فيها لأول مرة، عادة تظهر بعض الأعراض ومصحوب ذلك بأعراض كالحمى مع وجود خلايا قيحية Pus Cells ، ويستدل عليها بوجود الخلايا الدموية البيضاء (Bethasda, 2002) ، فالاخماج الأولية : هي أول اصابة تحدث بالأشخاص سليمي الجهاز البولي من الناحية التشريحية والوظيفية وتسببها أحياء مجهرية حساسة لأغلب المضادات الحيوية ، ولا تستمر لمدة طويلة وتعد من الاخماج المتعلقة بالمجتمع حيث تشفى اخماج المجاري البولية من هذا النوع بالمعالجة الكافية بالمضادات الحيوية لعدة ايام او اسابيع (*et al*., 1998 ; Nicolle, 2011 Smellie).

2-4-2: الخمج المتكرر

قد يرجع السبب في تكرار خمج المجاري البولية إلى عدم استعمال علاج كافي او عدم الالتزام بالعلاج بالإضافة إلى مقاومة الكائن الممرض للمضادات الحيوية (Pewitt & Schaeffe ,1997), وقد تحدث اخماج المجاري البولية ولا تظهر أعراض وفي حالة ظهور الأعراض تسمى اصابات حادة وباستمرارها تتحول إلى الحالة المزمنة (Bethasda , 2002).

3-4-2 :الخمج المزمن

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

5-2: تصنيف خمج المجاري البولية اعتماد على درجة خطورة الاصابة

1-5-2: الخمج المعقد

يرتبط خمج المجاري البولية المعقد بوجود التشوهات غير الطبيعية التشريحية والوظيفية أو وجود الاجسام الغريبة، مثل بقاء القثطرة البولي لمدة طويلة في المسلك البولي او وجود مرض السكري او نقص المناعة (Nicolle, *et al*., 1998) , Smellie; 2011ويكون الخمج مترافقاً مع بعض الأمراض مثل ضيق في المجرى البولي أو انسداد في القناة البولية بسبب وجود تراكيب غير طبيعية Structural Abnormality كوجود الأورام Tumors أو أمراض الكلية الكيسية Cystic Renal Disease ، وكذلك تحدث نتيجة الحصاة الكلوية Kidney Stone أو التغيرات الوظيفية مثل ارتداد الادرار من المثانة إلى الحالب Vesico - Ureteral Reflux (Nicolle , 1997).

2-5-2: الخمج الغير معقد

يشكل خمج المجاري البولية الغير المعقد نسبة كبيرة من الاخماج ، ويحدث عندما لا يكون هناك تغيرات واختلالات تشريحية ووظيفية غير طبيعية في القناة البولية بحيث تؤدي الكلية وظائفها بشكل طبيعي، فضلا عن أنه لا يتوافق مع الاضطرابات التي تؤدي إلى تأثير على اليات دفاع الجسم تشمل اخماج القناة البولية غير المعقدة بدورها كلا من تجرثم الإدرار عديم واخماج المثانة واخماج الكلية و حويضها (Gunther *et al.*, 2001).

2-6: الأسباب المساعدة في حدوث خمج المجاري البولية

تحت الظروف الطبيعية تكون الكلية و المثانة البولية و الحالب معقمة، ويكون الإدرار في المثانة البولية معقماً ايضاً، إذ إنّ العوامل المسؤولة عن عملية التعقيم تشمل انخفاض قيمة pH في الإدرار والذي يقوم بقتل بعض أنواع البكتيريا بالإضافة إلى وجود اليوريا وبعض المنتجات الايضية الأخرى و طبيعة اللب Medulla في الكلية تكون مانعة لنمو البكتيريا ، بينما هناك عوامل اخرى تؤدي إلى الاصابة بالبكتيريا وحدوث خمج المجاري البولية منها التغيرات الحاصلة تركيز اليوريا في الإدرار، إذ يؤدي تراكم السموم البولية المختلفة إلى تثبيط الفعاليات المستضدية لخلايا الدم الحبيبية والخلايا البلعمية، بالاضافة إلى الاليات المناعية الأخرى (Reinhard *et al*., 2006) فيما تقوم البكتيريا المسببة لخمج الكلية وحويضها بالالتصاق بالمستقبل الدهني السكري Glycolipid Receptor الذي يوجد بالخلايا الظهارية المبطنة للمجاري البولية (Hooten,2000) , ويجدر بالذكرإنّ عمليات زرع الكلىKidney Transplantation تعد من العوامل المهيئة للإصابة بالخمج (Nicolle, 1997) . وكذلك يمكن أنْ يصعد الادرار من المثانة ليدخل الحوض الكلوي عبر الفتحة الواصلة بين المثانة و الحالب بظاهرة الانعكاس المثاني – الحالبي Vesico- Ureteric Reflux (VUR) أي : الظاهرة التي يحدث فيها انعكاساً لجريان الإدرار بعد عملية التبول و عند وجود بكتيريا مرضية في الإدرار فإنّ ذلك يؤدي إلى حدوث الخمج الكلوي الحاد (Bhat *et al* . , 2011).

إمّا الحصى Calculi التي تعد من الأجسام الغريبة التي تسبب انسداد المجاري البولية الذي يؤدي إلى ركود الادرار، ليتحول وسطاً زرعياً ملائماً لنمو البكتيريا المسببة لخمج المجاري البولية (Haslett *et al*., 1999)، بالإضافة إلى ذلك فإنّ الانسداد يمكن أنْ يمهد إلى إنتشار الخمج إلى أعلى المجاري البولية من خلال التمهيد للانعكاس المثاني الحالبي ، ومن العوامل المهمة التي يمكن أن تسبب الإصابة ببعض الكائنات المجهرية المحللة لليوريا مثل بكتيريا *Proteus spp.* (Coker *et al*., 2000) , في حين هناك عوامل تمنع حدوث الخمج منها الختان الذي له دور تشجيعي في التخلص من الاصابة (Nicolle , 2001; Elvis & feneley , 1997).

2-7: اهم البكتيريا المرضية المسببة لخمج المجاري البولية

في مجال العلاقة بين خمج المجاري البولية والبكتيريا المرضية المعزولة والدراسات التي اهتمت بخمج المجاري البولية ومسببات الخمج من الاجناس والانواع البكتيرية وجد ان افراد العائلة المعوية *Enterobacteriacea* وخاصة مجموعة الـ Coliform السالبة لصبغة غرام تمثل اكثر المسببات لخمج المجاري البولية (Mikhail & Anyaegbunam,1995) خاصة بكتيريا *E.coli* والتي تعتبر اكثرمسبب مرضي بكتيري معزول (Delzell & Lefevre, 2000 ; Wullt *et al*., 2002) , تمثل بكتيريا *E.coli* (80-90%) من اصابات المجاري البولية (Avalos *et al*. , 1999).

وهناك بكتيريا اخرى تم عزلها بتكرار عالي مثل *klebsiella pneumonia* و*Proteus mirabils* Patterson & Andriole, 1987 ;Barr *et al.*,1995)) وكذلك *Enterobacter spp.* و . *Serratia spp* كذلك بكتيريا *Pseudomonas* spp. , اضافة إلى قد يعزل انواع من فطر .*Candida* spp وذلك بالنسبة للمرضى الذين يقومون باستخدام القثطرة البولية نتيجة اصابتهم بخمج المجاري البولية بعد اجراء العمليات الجراحية او عند المرضى المصابين بداء السكري وقد وجد بكتيريا موجبه لصبغة غرام مسببه لخمج المجاري البولية مثل *Stroptococcus* group B و *Staphylococus saprophyticu* خصوصا عند الاناث البالغات جنسيا وهي من المسببات القلائل لخمج المجاري البولية (Hedstrom *et al.*, 1999 ; Orestein & Wong, 1999) .

2-7-1: العائلة المعوية *Enterobacteriaceae*

تمثل العائلة المعوية مجموعة متباينة كبيرة من الاشكال العصوية السالبة لصبغة غرام، التي تكون بيئتها الطبيعية هي امعاء الانسان والحيوان، إنّ علم تصنيف أنواع العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* معقد ، وتتضمن العائلة العديد من الأنواع البكتيرية التي تسبب العديد من الاخماج ، بل هي ايضاً السبب الرئيسي لاخماج الجروح و الاخماج المكتسبة من المستشفيات واخماج الجهاز التنفسي والجهاز البولي (Cabral ,2010) ، وتسبب ايضاً تجرثم واخماج السحايا إذا كانت الظروف مناسبة , تعد هذه المجموعة من البكتيريا المسؤولة عن ما يقرب من(100,000) حالة وفاة سنوياً في الولايات المتحدة، و تخمر تشكيلة واسعة من الكربوهيدرات، وتنتج سموم مختلفة بالاضافة إلى عوامل الضراوة الاخرى (O'hara *et al.*, 2000) , ومن الصفات المشتركة بين أفراد هذه العائلة هي كونها هوائية أولاهوائية اختيارياً، لها القابلية على تخمير سكر اللاكتوز، سالبة للاوكسيديز، لها القابلية على اختزال ألنترات إلى نتريت كجزء من عملية إنتاج الطاقة ،موجبة للكاتاليز، متحركة باسواط محيطية ،غير مكونة للسبورات ، درجة الحرارة المثلى لنموها 37 مْ , و تظهر أغلب أفرادها تماثلا للحامض النووي منقوص الأوكسجين بمقدار 20 % ، إنّ هذه الصفات تعد من أهم الصفات المميزة لأفراد العائلة المعوية ذات الأهمية الطبية التي تميزها عن بقية العوائل (Cabral , 2010) .

2-7-2: (UPEC) Uropathogenic *Escherichia coli*

البكتيريا الايشيرشياية يمكن ان تعزل من مواقع مختلفة من الجسم كفلورا طبيعية كما في الجهاز الهضمي او قد تكون احد العوامل المسببة للاخماج مختلفة كما في الجهاز البولي (Albert, 1998), ان سلالة *E.coli Uropathogenic* تسبب 90% من خمج المجاري البولية , حيث يمكن ان تنتقل البكتيريا من فتحة الشرج إلى الفتحة البولية ومن ثم تنتقل إلى المجاري البولية و المثانة إن اخماج المثانة Cystitis تكون أكثر شيوعا في الإناث من الذكور بحوالي 14مرة والسبب يعود إلى قصر المجرى البولي , وقد يكون السبب جنسيا نتيجة دفع هذه السلالة البكتيرية المارة من فتحة الشرج إلى داخل المجاري البولية اثناء الجماع وبسبب احتواء هذه البكتيريا على وسائل التصاق فانها سوف تلتصق على بطانة المثانة ومن ثم تنتقل إلى المجاري البولية العليا (Todar , 2002).

2-8: عوامل الضراوة

تمتلك البكتيريا المرضية العديد من عوامل الضراوة Virulence Factors التي تمثل مقياسا لقدرة البكتيريا على إحداث المرض في المضيف ومدى قدرتها على مقاومة وتجاوز الخطوط الدفاعية (Hurst *et al.*,1996) , تعود هذه الضراوة

لامتلاك البكتيريا للعديد من العوامل التي يوجد بعضها ضمن التركيب الخلوي والبعض الاخر خارج الجسم مثل الانزيمات والذيفانات المختلفة وتسهم هذه العوامل في جعل البكتيريا اكثر حدة في احداث الخمج (Prescott *et al*.,1990) , ومن هذه العوامل :

2-8-1: التخمل عند بكتيريا *E.coli*

وهي من اهم عوامل الضراوة الموجودة على سطح الخلية , وهي انواع مختلفة من الزوائد يطلق عليها اعضاء الالتصاق , التي لها دور في الالتصاق على سطح خلية العائل , بالاضافة إلى ذلك قد يكون لها وظائف اضافية اخرى, منها غزو نسيج العائل (Emdy *et al*. ,2003) , لقد وجدت دراسة اعضاء الالتصاق اهمية في العديد من الابحاث ,لادراك الباحثين اهمية العلاقة بين اعضاء الالتصاق والقدرة المرضية أذ وجد ان هناك انواعاً مختلفة من عوامل الالتصاق التي لها ارتباط قوي بامراضية *E.coli* للجهاز البولي مثل P-Fimbriae وفي دراسة جينية عن عضو الالتصاق G adhesion تبين إن تواجدهُ في الخلايا البكتيرية عن طريق شفرة جينية تتمثل في صورة مجموعة من الجينات هي *pap* و *prs* وقد تمت هذه الدراسة على 257 عزلة من *E.coli* معزولة من بول مرضى مصابين بخمج المجاري البولية (Karkkainen *et al* ., 1998) .

كذلك سجلت عوامل الالتصاق S fimbrial و F Fimbrial المتشابهة جينياً في الـ *E.coli* الممرضة للجهاز البولي وهناك سلالات تنتج نوعا واحدا من انواع وسائل الالتصاق بينما هنالك انواعا اخرى تنتج عدة انواع من وسائل الالتصاق على مراحل مختلفة من الخمج (Mitsumori *et al*. , 1998) , وفي دراسة جينية حديثة اجراها العالم Wullt (2003) عن دورالـ P-fimbriae كعوامل التصاق في البكتيريا *E.coli* , وجد إن هنالك مجموعة من الجينات يطلق عليها *Pap gene* (The *pap* gene cluster) هي المسؤوله عن امتلاك البكتيريا لـ P- Fimbriae , وان امتلاك البكتيريا لتلك الجينات كافية لتصبح السلالة أكثر قدرة مرضية لذا فان التصاق البكتيريا على الغشاء المخاطي للمثانة يعتبر خطوة حاسمة وخطيرة لامراضية الـ *E.coli* المسببة للبول البكتيري , وان امتلاك البكتيريا لعوامل التصاق شرط أساسي للتثبيت البكتيري في المجرى البولي للإنسان وزيادة استجابة العائل للاصابة (Kakkainen *et al*, 1998) .

اما بالنسبة لتأثير المضادات على عوامل الالتصاق P-fimbriae , فقد درس العالم Funfstuk وجماعتة (1999) تأثير المضاد الحياتي ofloxacin في علاج اصابة المجاري البولية وقدرتة على اضعاف شراسة الخلايا البكتيرية او التداخل بين الخلايا البكتيرية والعائل , و قدرتة على قتل الخلايا ووجد ان بعد اليوم السادس من العلاج بالمضاد بأن الخلايا البكتيرية فقدت زوائد الالتصاق P-fimbriae ومن ثم حدوث تناقص لالتصاق *E.coli* (Sakarya *et al* ., 2003).

2-8-2: إنتاج البكتريوسين

البكتريوسينات هي مركبات بروتينية مضادة للميكروبات منتجة من قبل البكتيريا ولها تأثير قاتل أو مثبط لنمو الانواع الاخرى ذات الصلة القريبة منها, وقد ثبت مدى تأثيرها الواسع في انواع مختلفة من الاحياء ولا تعد البكتريوسينات عوامل ضراوة مباشرة وانما تزيد من امكانية التنافس لدى السلالات المنتجة لها (Riely, 1998) , تنتج البكتريوسينات من العديد من البكتيريا مثل البايوسين Pyocin المنتج من قبل *P.aeroginosa* والكوليسين Colicin المنتج من قبل بكتيريا *E.coli* والمايكروسين Microcin والكليبسين Klebicin المنتج من قبل *K.pneumoniae* (Lagos et al.,1999).

2-8-3: المحفظة

تحاط بعض انواع البكتيريا بطبقة مخاطية مكونة من متعدد السكريد وتقع خارج الجدار الخلوي وتسمى هذة الطبقة بالمحفظة Capsule , عندما تكون منتظمة وملتصقة بالخلية بحيث يمكن ازالتها بسهولة , اما اذا كانت متكونة من مواد غير منتظمة ولايمكن ازالتها بسهولة فتسمى الطبقة اللزجة Slim Layer (Prescott *et al*.,1990). وتختلف السكريات المكونة للمحفظة بأختلاف نوع البكتيريا فقد تتكون من N-acetylglucosamine, Fructose , Calactose وغيرها من السكريات (Jawetz *et al*.,2007), تحمي المحفظة الخلية من الجفاف ولها اهمية كبيرة في امراضية البكتيريا (Atlas ,1995), كما تقوم المحفظة بحماية البكتيريا من الوسائل الدفاعية للمضيف مثل مقاومة عملية البلعمة بوساطة الخلايا العدلة وتثبيطها لهجرة البلاعم الكبيرة (Prescott *et al*.,1990), للمحفظة دور في عملية التصاق البكتيريا بسطوح الخلايا الطلائية والسطوح الملساء وتساعد هذه الظاهرة علي بقاء البكتيريا على الادوات الطبية مثل انبوب القثطرة وصمامات القلب الصناعية وبالتالي احداث الاصابة عند المرضى المستخدمين هذه الادوات (Jawetz *et al*.,2007).

2-8-4: إنتاج الهيمولايسين

الهيمولايسين انزيم ذو طبيعة بروتينية يفرز خارج الخلية من قبل انواع من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Lane, D.R.*et al*., 2011), تمتلك العديد من الانواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة غرام القابلية على انتاج الانزيم الحال للدم Haemolysin ومنها *Staphylococcus aureus* , *E.coli* (Thanoon, 1994) , للهيمولايسين اهمية كبيرة في زيادة امراضية البكتيريا أذ يعد من عوامل الضراوة المهمة للبكتيريا , أذ تعمل البكتيريا على الالتصاق بسطح كريات الدم الحمراء وتكون ثقوب صغيره في جدارها مسببة خروج الهيموغلوبين وبالتالي فقدان الحديد (Atlas ,1995), تتمثل وظيفته بتوفير عنصر الحديد من خلايا الجسم من اجل نمو وتكاثر البكتيريا فضلا عن تأثيره السام على خلايا الدم البيضاء والفيبروبلاست عند الانسان , ولقد اكد Johanson (1991) على دور الهيمولايسين في زيادة ضراوة البكتيريا أذ وجد ان سلالات من بكتيريا *E.coli* كانت اكثر ضراوة من السلالات الطافرة الفاقدة للجين المشفر لانتاج انزيم الهيمولايسين , صنف الهيمولايسين الى اربعة انواع هي الفا , بيتا , كاما , دلتا , واعتماداً على قابلية الانزيم في تحليل كريات الدم الحمراء على وسط اكار الدم . يتمثل التحلل الدموي من نوع بيتا تحلل كامل بظهور هالة شفافة حول المستعمرة , اما تحلل نوع الفا فيتضمن تحلل جزئي للدم ويتكلل بهالة خضراء حول المستعمرة البكتيرية , اما كاما ودلتا فهو غير حال للدم (Brooks *et al*.,1998).

2-8-5 :إنتاج السايدروفور

يعد الحديد من العناصر الأساسية للخلايا الحية، إذ يلعب دوراً رئيساً في عمليات نقل الالكترونات فضلاً عن دورهُ المهم في نقل الاوكسجين, كما إن العديد من الأنزيمات تحتاج لفعاليتها وتنشيطها إلى وجود تركيز معين من الحديد والبكتيريا التي يحصل فيها فقدان لأنظمة سحب الحديد يختزل فيها معدل النمو بصورة ملحوظة وذلك لان الحديد يعتبر من اهم عوامل النمو والتضاعف للبكتيريا وقد يؤدي ايضاً إلى حصول تغيرات شكلية للخلايا أو توقف انقسامها نتيجة لتوقف تضاعف الحمض النووي فيها (Lane, D.R. *et al* ., 2011) والحديد عنصر أساسي لنمو العديد من أنواع البكتيرية، وتعد عملية اخذ البكتيريا المرضية للحديد من المضيف خطوة أساسية لإحداث الخمج إذ يكون الحديد ضروريا لتضاعف أعداد البكتيريا وهي خطوة مهمة للاستعمار (Tiba, M.R. *et al* ., 2008).

2-8-6:انتاج انزيمات البيتالاكتميز

البيتالاكتاميز هي انزيمات تنتج بواسطة بعض الانواع البكتيرية المرضية وتشمل البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام وهي المسؤولة عن المقاومة بنوع من المضادات الواسعة والتي تسمى مضادات البيتالاكتام ، والتي منها البنسلينات والسيفالوسبورينات , وتوجد مجموعات واصناف عديدة من هذه الأنزيمات التي تقاوم المضاد الحيوي, وتمتلك بكتيريا *E.coli* انزيمات البيتالاكتميز كجزء مهم من عوامل الامراضية لديها التي تقاوم في مدى واسع من المضادات الممتلكة لحلقة البيتالاكتام حيث يقوم هذا الانزيم بالتحلل المائي لهذه الحلقة (Bush *et al*., 1995 ; Macfaddin, 2000).

2-9: مقاومة بكتيريا *E.coli* للمضادات الحيوية

المقاومة هي قدرة الكائن الحيّ الدّقيق على تحمّل مفعول المضادّ الحيويّ ,هي نوع خاصّ من أنواع مقاومة الأدوية تنشأ مقاومة المضادّات الحيويّة طبيعيّا عن طريق حدوث الطفرات في الكرموسومات وان مفعول المضاد الحيوي يشكّل ضغطا بيئيّا على البكتيريا لكن الطفرات اللّتي تظهر في بعض الخلايا البكتيريّة تجعلها تنجو من مفعول المضاد الحيوي بعد ذلك، تنتقل هذه الميزة إلى النّسل المقبل الّذي يتميّز بكونه جيلا ذا مقاومة كاملة للمضاد الحيوي (Bradford, 2001) , بيّنت عدّة دراسات أنّ طريقة استعمال المضادات الحيوية تؤثّر بصفة كبيرة على تطوّر عدد الكائنات الحيّة الدّقيقة المقاومة, فرط استعمال المضادات الحيوية ذات الطيف الواسع، مثل سيفالوسبورين من الجيل الثّاني والثّالث، يسرّع عمليّة تطوّر مقاومة المثيسلين و هناك عوامل أخرى تتمثّل في التّشخيص الطّبّي غير الدّقيق، وصف الطّبيب أدوية غير ضروريّة، الاستعمال غير المناسب للمضادّات الحيويّة من طرف المريض (Bush *et al*., 1995 ; Macfaddin, 2000).

2-9-1 مضادات السيفالوسبورينات

عزلت السيفالوسبورينات لاول مرة سنة 1948 من مزارع الفطر *Cephalosporium acremonium* وادت التعديلات التي اجريت عليها إلى تطوير مضادات حيوية جيدة مثل السيفالوثين Cephalothin (Bradford, 2001), اذ تشتق جميع السيفالوسبورينات من اصل واحد هو السيفالوسبورين C، والذي يعتبر من المضادات الحيوية الفعالة ضد البكتيريا السالبة لصبغة غرام (Fuda *et al*., 2006)، تتشابه السيفالوسبورينات والبنسلينات تركيبياً الا انها تختلف عنها في التركيب المحوري بسبب احتوائها على السيفالوسبورانك الاميني 7-Aminocephalosporanicacid وتكون حلقة الثايوزلدين مكونة من ستة ذرات بدلاً من خمسة، اما مجموعة الجذر (R) فتكون موجودة في الذرة رقم (3) (Macfaddin, 2000), ان مضادات السيفالوسبورين هي مركبات قاتلة للبكتيريا، ولها نفس نمط العمل لمضادات البيتالاكتام الاخرى مثل البنسلين (Bush *et al*., 1995), وتصنف السيفالوسبورينات إلى اربعة اجيال اعتماداً على فعاليتها المضادة للنمو البكتيري وهي:

أ: سيفالوسبورينات الجيل الأول

تشمل السيفالوسبورينات ذات الطيف الضيق، ومن امثلتها مضادات الـ Cephalothin، Cephaloridin ، Cephalexin وتكون فعالة جداً ضد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام، ولكنها ذات نشاط بسيط نسبياً ضد

البكتيريا السالبة لصبغة غرام، ولكن وفي نفس الوقت توجد انواعاً عديدة من بكتيريا *E.coli* و*K.pneumonia* تكون حساسة لهذه المضادات (Moya *et al*., 2010).

ب: سيفالوسبورينات الجيل الثاني

هي مركبات مستقرة نوعاً ما بوجود انزيمات البيتالاكتاميز، ولها طيف واسع من الفعالية ضد البكتيريا السالبة لصبغة غرام، ولكن ليس *Ps.aeruginosa* ومن امثلتها مضاد Cefuroxime هذا وتتميز مضادات الـ Cephamycins بفعاليتها ضد البكتيريا الاهوائية ايضاً ومن هذه المضادات Cefotetan وCefoxitin (Samaha-Kfoury & Araj,2003).

ج: سيفالوسبورينات الجيل الثالث

تضم هذه المجموعة مضادات حيوية ذات نشاط اكثر بكثير من المضادات ذات الطيف الضيق، ولكنها قليلة الفعالية ضد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام، الانها غالباً ما تكون عالية الفعالية ضد معظم البكتيريا السالبة لصبغة غرام بما فيها *E.coli* وهي اكثر استقراراً بوجود انزيمات البيتالاكتاميز ، وقادرة على عبور الجدار الخارجي للبكتيريا السالبة لصبغة غرام، ومن امثلتها مضادات الـ Ceftazidime، Cefotaxime، Ceftriaxone (Greer, 2006; Moya *et al*.,2010).

ء: سيفالوسبورينات الجيل الرابع

مثالها الـ Cepheme , الذي طور سنة 1944، ويظهر هذا المضاد زيادة في الاستقرارية ليس فقط للانزيمات التي تتوسطها الكروموسومات بل حتى للانزيمات التي تكون مورثاتها محمولة على البلازميدات (Yoa & Moldering, 2003; Kalai *et al*., 2005). اذ تتميز هذه المجموعة من المضادات بفعاليتها الجيدة ضد انواع الـ *Enterobacter spp* و *Citrobacterspp*. المقاومة لمضادات الجيل الثالث ، وكذلك سلالات *Ps.aeruginosa*، ومن امثلتها مضادات الـ Cefepime، Cefpirone (Brooks *et al*.,2001; Perry & Scott, 2004).

2-9-2: اليات المقاومة لمضادات البيتا لاكتام

أ - التحلل المائي للمضادات الحيوية بواسطة انزيمات البيتا لاكتاميز

تمتلك الكثير من المضادات الحيوية اواصر كيمياوية حساسة لها القابلية على التحلل المائي، مثل اواصر الاستر والامايد، وقد عرف الكثير من الانزيمات التي لها القابلية على استهداف وكسر هذه الاواصر، اذ تنتج هذه الانزيمات من قبل العديد من البكتيريا والتي تعمل على تعطيل عمل المضاد قبل الوصول إلى الموقع الهدف داخل الخلية البكتيرية ومنها انزيمات البيتالاكتاميز β-lactamases اذ تعمل هذه الانزيمات على مجموعة مضادات البيتا لاكتام β-lactam antibiotics ، وهناك نوع اخر من هذه

الانزيمات تدعى بِـ السيفالوسبورينيزز Cephalosporinases والتي تحمل صفاتها على الكروموسوم البكتيري اذ تنتج هذه الانزيمات من قبل البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Cavallo *etal*. ,2000 ; Wright, 2005; Picao *et al* .,2009).

وتوجد المورثات التي تشفر لانزيمات البيتالاكتاميز على الكروموسوم البكتيري ، الحوافظ الجينية Gene cassete، وكذلك على البلازميدات البكتيرية Plasmids (Walsh ,2003), تفرز انزيمات البيتالاكتاميز في البكتيريا السالبة لصبغة غرام خارج الغشاء الخلوي كانزيمات خارجية Exoenzymes او تبقى في الفراغ المحيطي Periplasm والتي تهاجم المضاد قبل ان يصل إلى الموقع الهدف (PBPs) (Samaha-Kfoury & Araj ,2003), ومن اكثر اشكال المقاومة لمضادات البيتالاكتام هي انزيمات البيتالاكتاميز والتي تنشط فعاليتها عن طريق فتح حلقة البيتالاكتام ففي البكتيريا الموجبة لصبغة غرام، تفرز انزيمات البيتالاكتاميز إلى الوسط وبالتالي تعمل على تحطيم المضاد خارج الخلية البكتيرية (Albert & Sussman , 1998), اما في البكتيريا السالبة لصبغة غرام توجد توجد هذه الانزيمات في الفراغ المحيطي والتي تهاجم المضاد قبل ان يصل موقعهُ الهدف (Wiedmann *et al*.,1989).

ب - تقليل ألفة المضاد الحياتي لاستهداف البروتينات الرابطة للبنسلين

تمثل مكونات جدار الخلية البكتيرية اهدافاً انتقائية ممتازة لمضادات البيتالاكتام، ولكن ظهور الطفرات في البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) يمكن إن ينتج عنه تقليل الالفة تجاه المضاد الحياتي، إضافة إلى إن آلية المقاومة هذه تكون مرتفعة في اعداد مهمة سريرياً من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Livermore , 2002),إذ مكنت هذه الالية البكتيريا من تطوير مقاومتها لعدة انواع من مضادات الحياة اذ ان حدوث طفرات جينية مفردة يمكن ان يؤدي إلى تغير موقع الهدف بصورة كاملة، ومن ثم تنخفض الفة المضاد لهذا الموقع فعلى سبيل المثال تقوم بقية الادنين المفردة Single adenine residue في احد مواقع رايبوسوم البكتيريا بخفض الفة جميع العقاقير التي تقع ضمن صنف الارثرومايسين تجاه الهدف في الخلية البكتيرية (Walsh , 2003),إن مقاومة البنسلينات والسيفالوسبورينات ربما تعزى إلى تبدل او فقدان البروتينات الرابطة للبنسلين (Piddock *et al*.,1997) .

ج- انخفاض النفاذية في الغشاء الخارجي

يغلف سطح البكتيريا السالبة لصبغة غرام غشاء خارجي Outer membrane يمنع ويعيق كثيراً من المركبات السامة الموجودة في المحيط الخارجي من الدخول إلى الخلية، وبما ان على البكتيريا ان تتبادل الجزيئات مع البيئة الخارجية، لذا فأن الغشاء الخارجي يحتوي على ثغور بروتينية خاصة تعرف بالـ Porins مسؤولة عن هذه العملية، وتكون هذه الثغور على شكل

قنوات مملوءة بالماء وهي تشارك بصورة غير متخصصة في التبادل غير الفعال للايونات والجزيئات المحبة للماء (Yildirim *et al*.,2005). تدخل المضادات مثل البيتالاكتام والفلوركوينولونات Fluroquinolones عبر الغلاف الخارجي Outer membrane من خلال البورينات Porins (Nikaido, 2003).

ء - أنظمة الدفق

يستهدف هذا النوع من المقاومة طريق الوصول إلى الموقع الهدف Target site للمضاد الحياتي من خلال طرحهُ خارج الخلية (Mims *et al*., 2004)، اذ تكمن الية عمل هذه الانظمة من خلال قذف المضاد الحياتي خارج الخلية البكتيرية بعد احتجازه من قبل اغشية بروتينية خاصة يساعدها في ذلك الغشاء الداخلي وفسحة الفراغ المحيطي (Alekshun & levy, 1997; Ziha-Zarifi *et al*.,1999; Masuda *et al*.,2000), اذ يمكن ان تمتلك البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام مضخات مفردة او متعددة في بعض البكتيريا وخصوصا الـ*Ps. aeruginosa* يوجد هناك نظام دفق فعال يخفض تراكم المضاد الحياتي داخل الخلية البكتيرية ويسمح لانزيم ذو قابلية تحليلية محدودة على تثبيط المضاد قبل الوصول إلى هدفهِ كما ان بعض البكتيريا تستطيع ان تسلك مسار ايضي بديل وتصبح مقاومة لبعض المضادات عن طريق الـ bypassing من تجاوز تثبيط انزيم معين اذ تدعى هذه الميكانيكية بـِ Target bypassing (Tenover , 2006)، اذ تعتمد هذه الميكانيكية على طبيعة المضاد، الموقع الهدف، وكذلك النوع البكتيري فيما اذا كان يتوسط بالبلازميد اوعن طريق طفرة كروموسومية (Dzidic *et al*.,2008).

2-10:الآليات الدفاعية والاستجابة المناعية

يتعرض جسم الانسان والحيوان بصورة دائمة ضمن البيئة التي يعيش فيها الى انواع مختلفة من المسببات المرضية , حيث يبدي الجسم من جهته مقاومة ضد هذه المسببات المرضية من خلال شبكة من الاعضاء والخلايا المنتظمة والمرتبطة وظيفيا على شكل خطوط دفاعية يحدد يحدد تنشيطها نوعية وتركيز المسبب المرضي ومدى قدرتة على احداث الخمج (Stewart, 1993) , تعمل حواجز الجسم على منع دخول واحداث الاصابة مثل الحاجز الميكانيكي المتمثل بالسطوح المخاطية والجلد والعوامل الإفرازية (حامض الاكتيك والاحماض الدهنية) والبيئة الحمضية والنبيت الطبيعي (Goodman,1991), في حين يمثل خط الدفاع الاول عملية تمييز بعض العوامل المرضية دون الحاجة الى الاعتماد على مستقبلات متخصصة الموجودة على كل من الخلايا اللمفاوية التائية والبائية (T&B-Lymphocytes) بوساطة عملية البلعمة Phagocytosis التي تقوم بها الخلايا البلعمية (Roitt,1997) , ويؤلف مجرى الدم خط الدفاع الثاني والاخير ضد انتشار الاصابة بالجراثم لامتلاكه اليتين دفاعيتين رئيسيتين الاولى هي احتواء الدم على نظام واسع من المواد المضادة للعوامل المرضية مثل المتمم Complement واللاكتورفيرن Lactoferrin والمواد الطاهية Opsonins , والالية الثانية هي النظام الملتهم احادي النواة Mononuclear Phagocytes System(MPS) لاسيما الخلايا المبطنة Lining Cells أذ يؤلف هذا النظام الية الدفاع الرئيسية ضد الاصابات الجهازية (Levinso & Jawetz ,2000).

1-10-2: الحركيات الخلوية

ينظم الجهاز المناعي بوساطة وسائط ذائبة تنتجها خلايا الجهاز المناعي الفطرية والمكتسبة تعرف جميعها بالحركيات الخلوية , اشتق هذا المصطلح من الكلمة الاغريقية Cyto = Cell وتعني خلية و Kinose = Movment وتعني الحركة (Halonen *et al.* , 1998), وهي بروتينات او بيبتيدات او بروتينات سكرية glycoprotein, ذائبه بالماء ذات وزن جزيئي واطئ تنتج بصورة رئيسية من الخلايا اللمفاوية التائية والبائية وخلايا المناعة الانية كالخلايا الشجيرية وخلايا البلعم الكبير والخلايا وحيدة النواة والخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا الظهارية (Hunter *et al* ,1994) .

يمكن ان يكون عمل الحركيات الخلوية ذاتي Autocrine أذ يرتبط بالمستقبلات الموجودة على غشاء الخلية نفسها المنتجة له , او يكون عمله خارجي Paracrine يرتبط بالمستقبلات الموجودة على الخلية الهدف القريبة والمجاورة للخلايا المنتجة له وفي حالات قليلة يمكن ان يكون عمله داخلي Endocrine يرتبط بالخلايا الهدف بالجزء البعيد من الجسم (Goldsby *et al.*,2000). تنسق الحركيات الخلوية عدة وظائف في الجهاز المناعي والاستجابة الخمجية اذ تعمل كمراسل يقوم بدور محوري في المراسلة بين كل من خلايا الجهاز المناعي وتنظيم نمو وتصرف الخلايا المناعية المؤثرة من جهة وبين الجهاز المناعي وبقية اجهزة الجم من جهة اخرى مكونة شبكة متكاملة تسهم بشكل كبير في تنظيم الاستجابة المناعية (Gloria *et al* ,2005).

تشمل عائلة الحركيات الخلوية عوامل عديدة :الانترليوكينز , عائلة عوامل التنخر الورمي TNF والانترفيرون والكيموكاينيز مثل IL-8 وعوامل النمو المهاجر – بيتا (TGF-β) وعوامل تحفيز المستعمرات CSF وعوامل اخرى (Benjamine et al.,2000) ,الانترليوكينات Interleukins عبارة عن جزيئات مراسلة تنقل اشارة بين خلايا متنوعة في الجهاز المناعي , معظمها تفرز من الخلايا اللمفية والخلايا البلعمية ويحفز انتاجها كأستجابة للجروح او الاصابة , يوجد حوالي ثمانية عشر نوعا منها وصفت لحد الان , منها IL-10, IL-8, IL-6, IL-4, IL-2 IL-1التي تعتبر اهمها (Goldsby *et al.*,2000).

1-1-10-2: انترليوكين 6

هو عباره عن سايتوكين مشتق من الأنسجة الليفية المتنوعة بما في ذلك الخلايا المولدة للالياف والخلايا الطلائية والخلايا التحت الطلائية والخلايا الوحيدة وغيرها (Heinrich*et al.*,1990) , ان IL-6 هو سايتوكين استجابة اولية Proinflammatory Cytokine حيث يعمل بمثابة مؤشر لحدوث الحمى , ويظهر في وقت مبكر اذ يكون مسوؤل عن رد الفعل في المرحلة الحادة بما في ذلك زيادة إنتاج البروتينات المرحلة الحادة مثل C- reactive protein(CRP) وكذلك له تأثير في الاستجابة الخمجية الموضعية والجهازية (Uehling , 1999 ; Agace *et al* ., 1993) , للانترليوكين 6

مستقبلات خاصة ومعقدة على سطوح الخلايا مثل IL-6 R و TLRs وغيرها اذ يرتبط بها ويقوم بارسال اشارات من السطح الى داخل الخلية المرتبط بها , أذ يتفاعل مع هذه المستقبلات البروتينية لتشكيل معقد، وبالتالي تفعيل الخلية المرتبط بها و عند ارتباط الانترليوكين بالمستقبل فانهُ يرسل اشارات إلى داخل الخلية المستقبلة لبدء تتالي نقل الإشارة من داخل الخلية الى السطح (Schwantner, 2004; Heinrich *et al* ., 1998) .

2-10-1-2: انترليوكين 8

هو احد سايتوكينات عائلة الكيموكين ذات الوزن الجزيئي المنخفض حيث يعتبر سايتوكين استجابة اولية Proinflamatory Cytokine يتم انتاجة من قبل الخلايا الوحيدة Monocytes وبقية انواع خلايا التحت الطلائية مثل خلايا العضلات الملساء Smooth Muscle Cells ,و ان هذه الخلايا الاخيرة تخزن IL-8 في حويصلات داخل الخلية وتقوم بأطلاقه عند الحاجة , ويعتبر IL-8 Non-Glycosylated Protein حيث يتكون من (27 حامض اميني) وان IL-8 يحفز له بواسطة *IL-8 gene* (Michael *et al* ., 2010). وهنالك عدة مستقبلات للـ IL-8 على الغشاء البلازمي للخلايا في الجسم لها القدرة على الارتباط بـ IL-8 ويمتلك IL-8 وظيفتين اساسيتين الاولى هي الحث على انتاج اشارات كيميائية للخلايا الهدف والتي هي الخلايا القاعدية اولا ثم بقية الخلايا الحبيبية حيث تحفز هجرتها بأتجاه الاصابة , والوظيفة الاخرى هي تحفيز عملية البلعمة Phagocytosis حيث انها تصل لحظيا إلى منطقة الاصابة , ويرتبط IL-8 مع الاصابة مثلا إنتاجه له علاقة بالاخماج الجهازية مثلا عند الاصابة بخمج المجاري البولية تقوم الخلايا العدلة Neutrophil Cells بتحفيز انتاج IL-8 من النبيبات الكلوية نتيجة الاصابة حيث يرتفع مستوياته في الدم وكذلك في الادرار *et al* .(Hedges .,2000)

2-10-1-3: عامل تنخر الورم نوع الفا TNF-α

هو سايتوكين متعدد الوظائف يمكن ان ينظم العديد من العمليات الخلوية والبيولوجية مثل تحفيز الخلايا المناعة، تمايز الخلايا، وموت الخلايا المبرمج واستقلاب الطاقة (Cawthorn *et al* ., 2008) , ويعتبر سايتوكين استجابة اولية للخمج Proinflammatory Cytokine , ويتم إنتاجه من عدة انواع من الخلايا المناعية الغير متخصصة مثل الخلايا القاعدية Neutrophil والوحيدات Monocyte، الخلايا التائية T-Cell , والخلايا البدينة Mast Cell وغيرها , ويوجد مستقبلات خاصة على الغشاء البلازمي لكل الخلايا في الجسم ماعدا خلايا الدم الحمراء ومن هذه المستقبلات (TNF-α R1, 55 kDa & TNF-α R2) وهذه المستقبلات لها الدور الرئيسي في الفعالية البايولوجية لهذا السايتوكين حيث ان المستقبل TNF-α R1 له دوراً رئيسياً في التوسط للـ LPS وكذلك فانهُ يتوسط التسمم الخلوي Cell Cytotoxity , اما TNF-α R2 فان له دور في الولادة الخلوية , وهناك عدة امراض تعمل على رفع مستويات TNF-α مثل مرض نقص المناعة المكتسب HIV و السرطان Cancer والتدرن الرئوي Tuberculosis وكذلك الصدمة السمية Septic shock و التهاب الكبد الفايروسي hepatitis و تعفن الدم septicemia وغيرها (Blake *et al* .,2001).

ويعتبر انتاج TNF-α دليل او اشارة على تنخر ونزف النسيج المصاب بالخمج , ويشفر لانتاجة جين موجود في الكروموسوم 6 حيث يتكون من 233 حامض اميني (Krystyna *et al*. ,2007) . ويتوسط تأثير TNF-α من قبل اثنين من مستقبلات، النوع 1 والنوع 2 (TNF-R1 وTNF-R2) والتي تتحول إلى أشكال قابلة للذوبان (sTNF-R1 و R2-sTNF) (Aderka ,1996) . وفي تجارب تم قياس TNF-α بواسطة تقنية ELISA ، أذ بلغت مستويات مرتفعة في المرضى الذين

يعانون من قصور في القلب ويترافق مع أحداث الشريان التاجي في عموم السكان (*et al* ., 2000 &
Ridker Levine *et al* ., 1990) ,ان TNF-α يسبب اختلال وظيفي للخلايا البطانية ليست معروفة حتى الآن، وقد وجد ان مستويات TNF-α أكبر في المرضى الذين يعانون من انخفاض معدل الترشيح الكبيبي، والمرضى الذين يقومون بالغسيل الكلوي , وان عامل نخر الورم نوع الفا هو سايتوكين له دور بالمشاركة في الاخماج الجهازية وعضو في مجموعة من السيتوكينات التي تحفز رد فعل المرحلة الحادة، الدورالأساسي للـ TNF-α في تنظيم الخلايا المناعية، هي ايضاً قادرة على تحفيز الخلايا على الانتحار عندما تكون الظروف غير ملائمة للخلايا (Bolton *et al* ., 2001).

3: المواد وطرائق العمل Materials and methods

3-1:المـــــواد

3-1-1: الأجهــزة والأدوات المختبرية

أســـــــم الجـــهـاز		الشركة المصنعة (المنشـــأ)
انابيب (PCR)	PCR tubes	Ependorff / (USA)
انابيب ابندورف	Ependorff tubes	Sigma (England)
ثلاجة	Refrigerator	Concord (Lebanon)
جهاز الاليزا	ELISA	Aple (Japan)
جهاز التجميد العميق	Deep freezer	GFL (Germany)
جهاز التوثيق الهلامي	Gel documentation system	Biometra (Germany)
جهاز الدورات الحرارية	Thermocycler	A & B co. (Singapore)
جهاز المطياف الضوئي	Spectrophotometer	Apel (Japan)
جهاز تقطير	Distiller	GFL (Germany)
جهاز قياس الحموضة	pH-meter	Ino-lab. (Germany)
حاضنة	Incubator	Memmert (Germany)
حاضنة هزازة	Shaker incubator	Lab-line (USA)
حمام مائي	Water bath	Kottermann (Germany)
فرن كهربائي	Electric oven	Eriotti (Italy)
فيرنيا	Calipers	China
كابينة الزرع المجهري	Laminar flow cabient	Cruma (Spain)
كاميرا رقمية	Digital camera	Sony (Japan)
مازج	Vortex mixer	Melrosee park (USA)
ماصات دقيقة	Automatic micropipettes	Certyfied (Germany)
مجهر ضوئي مركب	Compound light microscope	Olympus (Japan)
مرشحات دقيقة	Millipore filters (0.22µm)	Difco (USA)
مسخن حراري	Hot plate	Gallan Kamp (England)
مصدر الأشعة فوق البنفسجية	UV-transilluminater	MUV (Taiwan)
منبذة (مبردة)	Cooling centrifuge	Hettich (Germany)
منبذة عالية السرعة	High speed centrifuge	Hettich (Germany)
موصدة	Autoclave	Hiclave (Japan)
ميزان الكتروني حساس	Sensitive electronic alance	A& D co. (Japan)
الناقل الزرعي القياسي	Standard wire loop (1µ)	Himedia (India)
وحدة ترحيل كهربائي	Electrophoresis unit	Lab-net (Tiwan)

2-1-3: المــواد الكيــميائيــة

الشــركة المصنعة (المنشـــأ)	أســـــم المــادة	
Biolife (Italy)	Agar	أكــار
BDH	Inositol	انوسيتول
BDH	Isopropanol	آيزوبروبانول
Difc	Peptone	ببتون
BDH CEngland)	Bromo phenol blue	بروموفينول الأزرق
BDH	Crystal violet	البلور البنفسجي
SDI (Iraq)	Hydrogen peroxide (H_2O_2) (70%)	بيروكسيد الهيدروجين
Difco	Trypton	تربتون
BBL	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan (Tris-OH)	ترس - (هايدروكسي مثيل) أمينوميثان ترس- قاعدي
BBL	Tris- (hydroxymethyl) hydrochlorid (Tris-HCl)	تــرس- (هايدروكســي مثيــل) كلوريــد الهيدروجين ترس- حامضي
BB	Gelatin	جيلاتين
BDH	Sمايكروليترphuric acid (H_2SO_4)	حامض الكبريتيك
BDH	Hydrochloric acid (HCl)	حامض الهيدروكلوريك
BDH	Tetramethyl-*P*-phenylene diamine dihydrochloride	ربـــاعي المثيـــل- ثنـــائي كلوريـــد الهيدروجين
BDH	Xylose	زايلوز
Sigma	Safranine	ســفرانين
BDH	Sucrose	سكروز
BDH	Fructosc	فركتوز
Fluka	Formaldehyde	فورمالديهايد
BDH	Monopotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين
Fluka	Sodium monohydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	فوســفات الصوديوم أحادية الهيدروجين
Fluka	Sodiumdihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	فوســفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين
BDH	Galactose	كالكتوز
BDH	Ethanol (96%)	كحول الايثانول
Fluka (swetzerland)	Barium chloride	كلوريد الباريوم
BBL	$FeCl_3$	كلوريد الحديديك
BDH	Sodium chloride (NaCl)	كلوريد الصوديوم
Difco	Glucose ($C_6 H_{12} O_6$)	كلـوكوز
Fluka	Glycerol ($C_3H_8O_3$)	كليســيرول
BDH	Lactose	لاكتوز
BDH	Maltose	مالتوز
BDH	Mannitol	مانيتول

BDH	Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	المثيل الاحمر
Mastdiagnostic	Urea solution	محلول اليوريا
Fluka	Nigrosin	نيكروسـين
BDH	Potassium hydroxide(KOH)	هيدروكسيد البوتاسيوم
Fluka	Sodium hydroxide (NaOH)	هيدروكسـيد الصوديوم
Mastdiagnostic (USA)	Iodine	اليود
BDH	Potassium iodide (KI)	يوديد البوتاسـيوم

3-1-3 الأوساط الزرعية الجاهزة

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الوسط الزرعي	
Himedia (India)	Triple sugar iron agar	اغار السكريات الثلاثي
Himedia	Nutrient broth	وسط المرق المغذي السائل
Himedia	Kligler's iron agar	وسط اغار كلكلر
Mastdiagnostic	Simmon citrate agar	وسط اغارالسايمون سترات
Himedia	Nutrient agar	وسط الاغار المغذي الصلب
Oxoid	Eosin methylene blue	وسط الايوسين الازرق
Himedia	Blood agar Base	وسط الدم الصلب
Himedia	MacConkey agar	وسط الماكونكي اغار
BDH (England)	Urea agar Base	وسط اليوريا الصلب
BDH	Pepton water	وسط ماء الببتون
Himedia	Mايكروليترler-Hinton agar	وسط مولر- هنتون الصلب
Mastdiagnostic	Brain heart infusion broth	وسط نقيع القلب-الدماغ السائل
Mastdiagnostic (USA)	Brain heart infusion agar	وسط نقيع القلب-الدماغ الصلب

3-1-4: العدد الجاهزة Kits

أ-العدة المستعملة في استخلاص الحمض النووي DNA extraction kit

الشركة وبلد المنشأ	المكونات	اسم العدة
Geneaid (USA)	GT Buffer 30 ml	عدة استخلاص الحمض النووي Genomic DNA Mini Kit
	GB Buffer 40 ml	
	W1 Buffer 45 ml	
	Wash Buffer 100 with ethanol	

	Elution Buffer 30 ml	
	GD Colum 100pcs	
	2ml collection tubes 100 pcs	

ب -العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المفرد Single PCR

الشركة وبلد المنشأ	المكونات	اسم العدة
Bioneer (South Korea)	Top DNA polymerase 1U	عدة مزيج تفاعل إنزيم البلمرة AccuPower® PCR PreMix
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) each: 250µM	
	Tris-HCl (pH 9.0) 10mM	
	KCl 30mM	
	MgCl2 1.5mM	
	Stabilizer and tracking dye	
	Standard 96 PCR tubes	

ء - العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المتعدد Multiplex PCR

الشركة وبلد المنشأ	المكونات	اسم العدة
KAPA (South Africa)	KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase 1U	عدة مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد KAPA2G Fast Multiplex PCR Kitمايكروليتر
	KAPA2G Buffer A (1.5X at 1X)	
	dNTPs (0.2 mM at 1X)	
	MgCl2 (3.0 mM at 1X)	
	Stabilizers	

ج – العدة المستخدمة في قياس المؤشرات الالتهابية

العدة	الشركة المصنعة (المنشأ)
IL-6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kit	Ray Biotech (USA)
IL-8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kit	Ray Biotech (USA)
TNF-α Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kit	Ray Biotech (USA)

3-1-5: المضادات الحيوية Antibiotics مجهزة من قبل شركة Bioanalys(Turkey)

صنف المضاد	تـــحت الصنف للمضـــادالحيوي	اســـــم المضاد الحيوي	الرمز	التركيز/مايكرو غرام
	الجيل الاول First generation	سيفالوثين Cephalotin	CEP	70
		سيفازولين Cefazolin	CZ	70
		سيفالكسين Cephalexin	CN	40
		سيفادروكسيل Cephadroxil	CL	70
		سيفوكستين Cefoxitin	FOX	40
		سيفونيسيد Cefonicid	CFN	40

السيفالوسبورينات Cephalosporin	الجيل الثاني Second generation	سيفاكلور Cefaclore	CFC	45
		سيفميتازول Cefmetazole	CFM	75
		سيفبروزيل Cefprozil	CPZ	45
	الجيل الثالث Third generation	سيفترياكسون Ceftriaxon	CTR	30
		سيفوتاكسيم Cefotaxime	CTX	30
		سيفيزوكسايم Ceftizoxime	CFZ	30
		سيفتازديم Ceftazidime	CAZ	30
		سيفدنير Cefdinir	CRD	30
		سيفكسيم Cefixime	CFM	30
	الجيل الرابع Fourth generation	سيفيبيم Cefipime	CEF	30

2-3: طرائق العمل The methods

1-2-3: تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة

حضرت جميع الاوساط الزرعية الجاهزة والمذكورة في الفقرة 3-1-3 حسب ماجاء بتعليمات الشركة المجزة لهذه الاوساط , اذ عقمت جميع الاوساط بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١مْ وتحت ضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة , ثم اضيف ٧% دم انسان الى وسط اساس اكار الدم وكذلك اضيف ٢٠% من محلول اليوريا الى وسط اساس اليوريا .

2-2-3:الاوساط الزرعية المحضرة في المختبر

أ - وسط اختبار الحركة

حضُر هذا الوسط ، باذابة 0.5 غرام من الببتون (Peptone) و0.5 غرام من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) و0.25 غرام أغار– أغار (Agar-Agar) في 100 مل من الماء المقطر، عدل الأس الهيدروجيني PH للوسط إلى 7، ثم وزع الوسط في أنابيب زجاجية معقمة ثم عقم بالموصدة, وحفظ الوسط في درجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال (Collee *etal*., 1996).

ب- وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور

حضُر الوسط بإذابة 5 غرام ببتون و5 غرام K_2HPO_4 في 1000 ملليتر ماء مقطر ذوبت المكونات بواسطة

الحمام المائي جيداً وعدل الاس الهيدروجيني إلى 7.6 وعقمت بالموصدة، برد الوسط إلى 50 مْ ثم أضيف إليه 50 مليليتر من محلول 10% كلوكوز والذي عقم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة استخدم الوسط للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الحامض أو الاستيل مثيل كاربون (MacFaddin, 2000).

ج- وسط تخمر الكربوهيدرات

حيث يتكون من الاوساط التالية :

*** الوسط الاساس**

حضُرت قاعدة الوسط بإذابة 10 غرام ببتون و1 غرام خلاصة اللحم و5 غرام كلوريد الصوديوم (NaCl) و0.018 غرام كاشف احمر الفينول في 1000 مليليتر من الماء المقطر ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى 7.4ووزع الوسط في أنابيب زجاجية نظيفة ومعقمة حاوية على انبوبة درهم (Durham tube) للتحري عن إنتاج الغاز (يجب التأكد من ملئ أنبوبة درهم بالوسط الزرعي أي عدم وجود فقاعة هوائية فيه قبل الزرع)، ثم عقمت بالموصدة (MacFaddin, 2000).

*** المحلول السكري**

حضُرت محاليل سكريات الكلوكوز D-glucose، لاكتوزLactose ، سكروز Sucrose، فركتوز Fructosc، زايلوز Xylose، انوسيتول L-Inositol، كالكتوز Galactose مانيتول Mannitol، مالتوز Maltose بإذابة 1 غرام من السكر في 100 مليليتر من الماء المقطر المعقم ثم عقمت المحاليل بواسطة ورق الترشيح، ثم اضيف 0.1 مليليتر من محلول السكر الى كل انبوبة من انابيب الفقرة A الحاوية على 5 مليليتر من قاعدة الوسط استخدم الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على تخمير السكريات المختلفة وانتاج الغاز (MacFaddin, 2000).

ء- وسط الجيلاتين المغذي

حضُر الوسط بإذابة 120 غرام من الجيلاتين في 800 مل لتر من الماء المقطر، وسخن الى درجة حرارة 50 مْ، وأضيف إليه 3 غرام من خلاصة اللحم، و 5 غرام من الببتون، وأكمل الحجم إلى 1000 ملي لتر من الماء المقطر، وأعيد تسخينه بالدرجة نفسها، ثم ’عدِّل الأس الهيدروجيني إلى 7، ووزع الوسط على أنابيب اختبار، وعقم بالموصدة، وترك ليتصلب أفقياً وحفظ في درجة 4 مْ لحين الاستعمال. استخدم للتحري عن البكتريا المنتجة لإنزيم الجيلاتينيز (MacFaddin, 2000).

3-3: محاليل الصبغات والكواشف

1-3-3: محلول صبغة المحفظة

حضُر المحلول بإذابة 10 غرام من النيكروسين في 90 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وتم تسخينه إلى درجة الغليان مدة 20 دقيقة، ورشح مرتين متتاليتين ثم أضيف إليه 0.5 ملي لتر من الفورمالديهايد، وحفظ في درجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال, استعملت هذه الصبغة للتحري عن البكتريا المنتجة للمحفظة (Stukus, 1997).

2-3-3 المحلول الملحي الفسيولوجي

حضُر المحلول بإذابة 0.85 غرام من كلوريد الصوديوم في 90 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالموصدة, استعمل هذا المحلول في أعداد اللقاح البكتيري المباشر (MacFaddin, 2000).

3-3-3: المحلول الدارئ الفوسفاتي الملحي

حضُر بإذابة 8 غم من (NaCl), 0.2 غم من (KCl) 0.2 غم من (KH_2PO_4) و 1.15 غم من (Na_2HPO_4) في 1 لتر من الماء المقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى وعقمت بالموصدة (MacFaddin, 2000).

4-3-3: أنبوبة ماكفرلاند القياسية

حضُرت من المحاليل الآتية:

أ- محلول كلوريد الباريوم

حضُر المحلول بإذابة 1.175 غرام من $BaCl_2$ في 50 ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر للحصول على تركيز 0.048 مول/لتر من $BaCl_2$ (NCCLS, 2003).

ب- محلول حامض الكبريتيك

حضُر المحلول بإضافة 18 ملي لتر من حامضH_2SO_4 المركز ببطء إلى 50 ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر للحصول على تركيز 0.18 مول/لتر من H_2SO_4. أضيف 0.5 ملي لتر من محلول (A) إلى 99.5 ملي لتر من محلول (B) وعدلت قراءة العكورة القياسية إلى (0.1-0.08) عند طول موجي 625 نانومتر وهذه القراءة تمثل ما يقارب عكورة (1-2 $x10^8$) Colony forming unit وحدة تكوين المستعمرة في ملي لتر واحد من البكتريا النامية، ووزع المحلول على أنابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم 4 ملي لتر لكل أنبوبة وحفظ في أماكن معتمة في درجة حرارة الغرفة، استعملت الأنبوبة لغرض مقارنة كثافة النمو البكتيري في اللقاح المستعمل مع كثافة المحلول في الأنبوبة (NCCLS, 2003a).

5-3-3: كاشـــــف الكتاليز

حضُر الكاشف آنياً بإضافة 21 ملي لتر من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز (70%) إلى 50 ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر للحصول على تركيز نهائي (3%)، وحفظ في قنينة معقمة. استعمل هذا الكاشف للاستدلال على البكتريا المنتجة لإنزيم الكتاليز (MacFaddin, 2000).

6-3-3: كاشف الأوكسيديز

حضُر الكاشف آنياً بإذابة 0.1 غرام من رباعي المثيل- بارافنيلين ثنائي أمين ثنائي كلوريد الهيدروجين في 10

ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وحفظ في قنينة معتمة, استعمل هذا الكاشف في اختبار الأوكسيديز للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز (MacFaddin, 2000).

3-3-7: كاشف فوكس بروسكاور

حضُر بإذابة 40 غرام من KOH في حجم من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100ملي لتر. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج الاستيل مثيل كاربينول في اختبار الفوكس– بروسكاور (MacFaddin, 2000).

3-3-8: كاشف احمر المثيل

حضُر الكاشف بإذابة 0.1 غرام من صبغة احمر المثيل في 300 مليليتر من 95 % كحول اثيلي واكمل الحجم الى 500 مليليتر باستخدام الماء المقطر استخدم للكشف عن التحلل الكامل للسكريات (MacFaddin, 2000).

3-3-9: كاشف فرازير

حضُر الكاشف بإذابة 15 غرام من كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ في 20 مليليتر من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl المركزثم أكمل الحجم إلى 100 مليليتر من الماء المقطر، استخدم للكشف عن تحلل الجيلاتين (Collee *etal*., 1996).

3-3-10:كاشف كوفاكس

حضُر بإذابة 5 غم من Paradimethyl aminobenzaldehyde في 75 ملليتر من كحول اثيلي ثم أضيف له 25 ملليتر من حامض الهيدروكلوريك المركز(MacFaddin, 2000) .

3-4: طرائق التعقيم

3-4-1 التعقيم بالحرارة

عقمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة، والتركيبية، وأغلب المحاليل المستخدمة التي لاتتأثر بالحرارة بجهاز الموصدة عند درجة حرارة 121 مْ وتحت ضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 15 دقيقة ،أما الزجاجيات فقد تم تعقيمها بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة 168 مْ لمدة ساعتين (MacFaddin, 2000).

2-4-3: التعقيم بالترشيح

عقمت بعض المحاليل التي تتأثر بالحرارة مثل السكريات واليوريا باستعمال مرشحات غشائية (Millipore) filter ذات فتحـــات دقيقة بقطر(0.22) مايكرون(MacFaddin, 2000).

5-3 جمع العينات

تم في الدراسة الحالية جمع 100 عينة سريرية من المرضى المصابين بخمج المجاري البولية من مستشفى الولادة والاطفال ، ومستشفى الديوانية التعليمي خلال المدة من تشرين الاول 2012- الى نيسان 2013, أذ شملت العينات المأخوذة من المرضى كل من عينات دم وعينات ادرار , حرص اثناء جمع عينات الادرار ان تهمل القطرات الاولى من الادرار وتؤخذ الكمية الوسطى Mid Stream Urin وتحفظ في انابيب جمع خاصة معقمة , بعدها نقلت عينات الادرار الى المختبر وتم اخذ ٥ مل من كل عينة تحت ظروف معقمة ووضعها في انابيب معقمة داخل جهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة , بعدها تم اهمال الراشح واخذ الراسب وتم فحصه تحت المجهر الضوئي عند القوة X٤٠ لغرض فحصها وتشخيص موشرات الخمج مثل الخلايا القيحية وخلايا الدم وغيرها, اما المتبقى من عينات الادرار فتم زرعها على اطباق بتري حاوية على وسط اغار الماكونكي Macconkey agar وكذلك على وسط اكار الدم الصلب Blood agar ثم زرعت بطريقة التخطيط Streaking method وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة18-24 ساعة لغرض تشخيص البكتيريا النامية على الاوساط ,(MacFaddin, 2000) , وقد تم سحب ١٠٠ عينة دم ايضا من المرضى ذاتهم المصابين بخمج المجاري البولية بواقع ٥ مل من كل مريض وايضا تم سحب ٢٠ عينة دم اخرى من اشخاص اصحاء لاستخدامها كسيطرة اثناء مقارنة المؤشرات الالتهابية وهي TNF-α, IL-8 , IL-6 , أذ وضعت عينات الدم جميعا في انابيب اختبار معقمة وبعدها تم وضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة , لفصل المصل عن باقي مكونات الدم واستخدامة في تقنية ELISA (Collee *et al*., 1996).

6-3: تشخيص البكتيريا المعزولة

1-6-3: الخصائص المظهرية والزرعية

تم دراسة الخصائص المظهرية للإحياء للبكتيريا من خلال زرع عينات الادرار مباشرة من الأوساط الزرعية والتي صبغت بواسطة صبغة غرام لدراسة الخصائص المظهرية للأنواع البكتيرية المعزولة , كذلك درست الصفات المظهرية لكل من المستعمرات والخلايا البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة، شملت دراسة المستعمرات البكتيرية من حيث اللون والشكل و القوام والحواف والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية Differential media حيث زرعت على وسط اكارالماكونكي والانتقائية Selective media حيث زرعت على وسط اغار الايوسين الازرق ، أما الصفات المظهرية للخلايا فقد شملت شكل الخلية البكتيرية، انتظام الخلايا البكتيرية مع بعضها وطبيعة تفاعلها مع صبغة غرام.

7-3: الفحوصات الكيموحيوية

1-7-3: الكشف عن إنزيم الكاتيليز

تم إجراء الفحص بنقل كمية قليلة من النمو البكتيري النامـي على الوسط الزرعي بعمر 24 ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من 3% (H_2O_2) ،إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

3-7-2: الكشف عن انزيم الاوكسيدز

تم إجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية المعقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف ، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي بعد مرور عشرة ثواني يدل على النتيجة الموجبة للكشف (Collee *et al*., 1996).

3-7-3: الكشف عن كبريتيد الهيدروجين

تم اجراء الفحص بتلقيح وسط كلكلر بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، أن ظهور الراسب الاسود في الانبوبة يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000).

3-7-4: اختبار استهلاك السترات

اجري الفحص بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصهُ وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة. ان تحول لون الوسط الاخضر الى الازرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000).

3-7-5: اختبار قابلية الحركة

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

3-7-6: فحص تخمير الكربوهيدرات

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر الكربوهيدرات بالمزروع البكتيري ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 2-5 يوم تحول لون الوسط من الاحمر الى الاصفر وظهور الفقاعات الغازية في انبوبة درهم يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000).

3-7-7: الكشف عن انتاج ألا ندول

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24- 18 ساعة، عندها أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى كل أنبوبة مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000).

3-7-8: اختبار احمر المثيل

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي M.R.V.P Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة عندها تم اضافة 5 قطرات من كاشف احمر المثيل المحضُر سابقا مع رج الانبوبة ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة بعد 15 دقيقة يدل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض (Collee *et al*., 1996).

3-7-9: اختبار الفوكس بروسكور

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة 3347مْ لمدة 24-48 ساعة بعد ذلك تم إضافة 1 مليليتر من الكاشف المحضُر سابقا إلى كل أنبوبة مع الرج، ان ظهور اللون الوردي خلال 2-5 دقيقة والذي يصبح كرزي غامق خلال 30 دقيقة مع الرج المتواصل يعبر عن النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

3-7-10: الكشف عن انزيم اليوريز

تم الكشف عن هذا الانزيم بتلقيح وسط اغار اليوريا بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة تتراوح من 24 ساعة ولغاية سبعة ايام، ظهور اللون الوردي يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

3-8: التحري عن انتاج المحفظة البكتيرية

استخدمت الصبغة الخاصة بالمحفظة المحضرة في الفقرة 2.1.4.3 وكالاتي:

- مزجت مستعمرة بكتيرية واحدة بعمر ٢٤ ساعة مع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي المعقم على شريحة زجاجية نظيفة .
- اضيف للشريحة قطرة من الصبغة المحضره سابقا ومزجت جيدا باستخدام عروة الناقل.
- نشرت القطرة بواسطة سلايد ثاني وبزاوية ٤٥ درجة بحيث تغطي السلايد الزجاجي.
- فحصت الشريحة مباشرة تحت العدسة الزيتية مع مراعاة تقليل اضاءة المجهر.

3-9: التحري عن انتاج الهيمولايسين

استخدم دم بشري صنف AB للتحري عن انتاج الانزيم الحال للدم (Senior & Hughes, 1987):

- نبذ مقدار ٥ مل من عينة الدم المسحوبة انيا باستخدام انابيب نبذ بلاستيكية معقمة ومزودة بمانع التخثر الهيبارين للتخلص من البلازما والحصول على راسب كريات الدم الحمر.

- غسلت الكريات مرتين متتاليتين بالمحلول الملحي الفسلجي المعقم وتم ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بعد كل غسلة وبسرعة ٣٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ٥ دقايق.
- اضيف نسبة ٥% من الراسب الى وسط اكار الدم الاساس المعقم بعد تبريده الى درجة حرارة ٥٠مْ , ثم وزع في اطباق زجاجية معقمة وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة للتأكد من خلوه من التلوث.
- زرعت العزلات البكتيرية بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة لملاحظة قابلية العزلات على تحليل كريات الدم الحمر من خلال تكوين هالات شفافة حول المستعمرات النامية .

10-3 حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

1-10-3: الحفظ قصير الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، ثم حفظت في درجة 4 مْ، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات، وتجنب حدوث التلوث (Collee *et al.*, 1996).

2-10-3: وسط الحفظ طويل الأمد

حضُر الوسط بإضافة 15% من الكليسيرول إلى الوسط نقيع القلب والدماغ السائل المحضُر بإذابة 4 غرام من الوسط في 50 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالموصدة، وترك ليبرد في درجة حرارة 56 مْ باستعمال الحمام المائي، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في 4 مْ لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - 20 مْ (NCCLS, 2003a).

11-3: التحري عن مقاومه *E.coli* للمضادات الحيوية

اجري اختبار الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بالاعتماد على طريقة (Bauer *et al.*, 1966 ; CLSI, 2010) وذلك بأخذ 4-5 مستعمرات نقية باستعمال عروة الناقل الحلقي إلى أنابيب اختبار حاوية على 5 مليليتر من الوسط المغذي السائل، وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 2-8 ساعة او لحين ظهور العكورة عندها تم مقارنة الأنابيب مع أنبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5) باستعمال المحلول الملحي الفسيولوجي المعقم حيث تم تعديل كثافة الانابيب حتى تساوى كثافة أنبوبة ماكفرلاند و باستعمال مسحة قطنية معقمة نشرت البكتريا بطريقة التخطيط لاكثر من مرتين وباتجاهات مختلفة لغرض التاكد من نشر البكتريا المراد اختبار حساسيتها على وسط اغار مولر هنتون بالتساوي و تركت الاطباق لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان امتصاص الرطوبة عندها وزعت أقراص المضادات الحيوية بواقع (4-6 اقراص)بوساطة ملقط معقم وضعت الاقراص على وسط اغار مولر هنتون وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة ١٨ ساعة , ثم قرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط باستعمال الفيرنيا Caliper و مقارنتها بالجداول القياسية المحددة من قبل (CLSI, 2010) لتحديد البكتريا المقاومة او الحساسة.

12-3: تفاعل السلسلة المتبلمرة PCR

جدول (3-1) بـادئـات الـDNA (DNA primers): التي قامت بتجهيزها شركة (Bioneer)

نوع	تسلسل القواعد النتروجينيه ('3-'5)	حجم ناتج	المصدر

	التضخيم			البادئ
Yamamoto *et al.*,1995	336 bp	F	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	***pap***
		R	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	
Le Bouguenec *et al.*,1992	750 bp	F	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC	***afa***
		R	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	
Ewers *et al* ., 2005	413 bp	F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	***Irp2***
		R	AACTCCTGATACAGGTGGC	
Yamamoto *et al.*,1995	113 bp	F	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	***hly***
		R	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	
Johnson *et al* .,2000	827 bp	F	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	***iha***
		R	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	

البادئ الامامي F: Forward primer **البادئ العكسي R: Reverse primer**

3-12-1:استخلاص الحامض النووي البكتيري

تم استخلاص الحمض النووي (DNA) من بكتريا *E.coli* وذلك باستعمال العدة الجاهزة وبحسب تعليمات الشركة المجهزة وكآلاتي :

1- نقل 1مل من عالق كل عزلة من جرثومة *E.coli* النامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في انابيب ابندروف قياس 1.5مل معقمة

2- نقلت الى جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 15000 دورة / دقيقة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.

3- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وخلال مدة الحضن تم تقليب الأنابيب لضمان تحليل كامل للخلايا في المزيج.

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

5- حضن المزيج بدرجة حرارة 70 مْ لمدة 10 دقائق باستخدام الحمام المائي.

6- أضيف 200 ميكروليتر من الكحول الأثيلي المطلق الى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيداً بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثوانٍ .

7- نقل الخليط من أنبوبة الابندروف الى انابيب جمع (collection tubes) قياس 2 مل الحاوية على أعمدة تحوي مرشحات لتنقية الحمض النووي (GD filter colum) والمجهزة مع العدة.

8- وضعت انابيب الجمع مع الأعمدة الحاويه على خليط في جهاز الطرد المركزي المبرد ودورت بسرعة 15000دورة / دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة.

9- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل الـ (GD column) الحاوي على الحمض النووي الى أنبوبة جمع collection tube جديدة .

10- أضيف 400 ميكروليتر من محلول W1 Buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض النووي لغسل الحمض النووي بعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطـــرد المـــركزي بـسرعة 15000 دورة لـمدة 30 ثـــانية.

11- تم التخلص من الراسب ومن ثم أضيف 600 ميكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الاثيلي المطلق Wash buffer المجهزة مع العدة الى العمود الحاوي على الحمض النووي للتخلص من الدهون ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسـرعة 15000 دورة لمـدة 30 ثانـية.

12- تم التخلص من الراسب وإعادة الأنابيب الى جهاز الطرد المركزي المبرد مرة ثانية لتجفيف الأعمدة بسرعة 15000 دورة لمدة 3 دقائق.

13- نقلت الأعمدة الحاوية على الحمض النووي الى انابيب ابندروف معقمة مع إضافة 50 ميكروليتر من محلول الإذابة Elution Buffer المجهز مع العدة الى وسط العمود وترك لمدة 5 دقائق وبعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 15000 دورة لمدة 30 ثانية لأذابة الحمض النووي وحفظ في درجة جرارة (-20) مْ لحين أجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة .

3-12-2: تحضير هلام الأكاروز

حضُر بحسـب طريقة (1989) Sambrook *et al*., وكـــالأتي:

1- أذيب 1.5غم من هلام الأكاروز Agarose gel في 100 مل من محلول الـ TBE buffer الدارئ بتركيز (1X) وباستعمال الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 مْ وبعدها تم إضافة (3) مايكروليتر من صبغة الحامض النووي المشـــعة Ethidium bromide ومـزجت جيـداً مــع الهلام .

3- صب هلام الأكاروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة , تم إزالة المشط من الهلام بعناية لغرض عمل وتحديد الحفر في الهلام اللازمة لحقن العينات المضخمة .

3-12-3: تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد

حضُرمزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد بأُستعمال عدة AccuPower® PCR PreMix وبحـــسب تعليـــمات الشـــركة المجــهزة كألاتـــي :

1- حضُرمزيج تفاعل إنزيم البلمرة في انابيب (PCR) المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل إنزيم البلمرة مع إضافة المكونات الأخرى لمزيج التفاعل كما في جدول (3-2):

الجدول (3-2): مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد

PCR master mix		Volume
DNA template		5 µL
Primer	Forward primer	1.5µL

	Reverse primer	1.5µL
PCR water		12 µL
Total		20 µL

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

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

3-12-4: تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد

حضُرمزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد بأستعمال عدة KAPA2G Fast Mمايكروليترtiplex PCR Kit وبحـــسب تعليــمات الشـــركة المجــهزة وكما موضح في الجدول (3-3):

الجدول (3-3) : مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد

خليط (PCRMastermix)		**الحجم**
قالب DNA		2.5µL
KAPA2G Fast Multiplex		12.5µL
البادئ Primer	البادئ الامامي	0.5µL
	البادئ العكسي	0.5µL
ماء PCR		up to 25µL
الكلي		25 µL

3-12-5: برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA

أجري تفاعل إنزيم البلمرة باستخدام المضخّم الحراري لجهاز الـ (Thermocycler PCR). وتم برمجة الجهاز للجينات قيد الدراسة حسب التفاعل , وكما مبين في جدول (3-4) وجدول (3-5) .

جدول (3-4) : برنامج الدورات الحرارية لتفاعل البلمرة المفرد Single PCR

الجين	درجة الحرارة \ الوقت					عدد الدروات
	بداية المسخ	ظروف الدورات			الاستطالة النهائية	
		المسخ	الارتباط	الاستطالة		
Pap	95/2 min	95/30 sec	63.2/30 sec	72/40 sec	72/5 min	**30**
afa	95/2 min	95/30 sec	64.9/30 sec	72/80 sec	72/5 min	**30**
Irp2	95/2 min	95/30 sec	58.2/30 sec	72/50 sec	72/5 min	**30**
hly	95/2 min	95/30 sec	61.6/30 sec	72/120 sec	72/5 min	**30**
iha	95/2 min	95/30 sec	63.5/30 sec	72/90 sec	72/5 min	**30**

جدول (3-5) : برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Mمايكروليترtiplex PCR

الجين	درجة الحرارة \ الوقت					عدد الدورات
	بداية المسخ	ظروف الدورات			الاستطالة النهائية	
		المسخ	الارتباط	الاستطالة		
pap ***afa***	95/2 min	95/30 sec	64/30 sec	72/60sce	72/5 min	**30**

30	72/5 min	72/70 sec	56/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***Irp2***
30	72/5 min	72/110 sec	62/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***Iha hly***

3-12-6: الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز

تم أجراء الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز المحضُر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 امبير وزمن ساعة لغرض الكشف عن حزم (Bands) الـDNA المستخلص والـ DNA المضخم والذي يمثل نواتج التضخيم Amplicon (size) او نواتج الـ PCR (PCR Products) وبالمقارنة مع سلم الحمض النووي القياسي (100- DNA Ladder 1500bp) .

3-13: قياس الحركيات الخلوية

سحبت خمسة ملليترات من دم من مرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية , وتم وضع الدم في انابيب اختبار , بعدها وضعت الانابيب الحاوية على الدم في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دوره/دقيقة للحصول على المصل واستخدامه في تحديد تراكيز كل من TNF-α , IL-8 , IL-6 بأستخدام تقنية ELISA.

3-13-1: قياس مستوى IL-6, IL-8, TNF-α في مصول المرضى

أ- المواد المجهزة في العدد

- الحفرPlates: جهزت كل عدة ب٨x١٢ من الحفر الجاهزة للاستخدام
- Calibrator: تم تخفيفها باستخدام الماء المقطر, تحفظ في درجة حرارة -١٨مْ لحين استخدامها , او تستخدم مباشرتاً.
- الانزيم الرابط : IL-6 Conjugate , IL-8 Congugate , TNF-α Congugate حيث تم تخفيفها الانزيم باستخدام الماء المقطر بواقع ١٠ اضعاف حجمه , ويمكن ان يبقى الانزيم ثابت لمدة ١-٢ اسبوع بدرجة حرارة -١٨مْ او يستخدم مباشرتاً.
- Diluent 1 :كل علبة محتوية على ٢٥ مل من المادة الجاهزة للاستخدام.
- Diluent 2 : تم تخفيف العلبة باستخدام الماء المقطر بواقع ٥ اضعاف وخزنها بدرجة حرارة -١٨مْ او استخدامها مباشرتاً.
- محلول الغسل Wash Solution : حيث تحتوي العليبة عل ٥٠مل تم تخفيفة X٢٠ باستخدام الماء المقطر وبعدها تم حفظها بدرجة ١٨ مْ لحين الاستخدام .

ب- تحضير المحاليل

1 - محلول الغسل Wash Solution: تم تحضير المحلول بواسطة تخفيف مادة الغسل المرفقة بالعدة الى 10 اضعاف بأستخدام الماء المقطر Distal Water.

2 - محلول الانزيم الرابط Conjugate Enzyme: تم تحضير المحلول بواسطة تخفيف مادة الانزيم الرابط المرفقة بالعدة (1:50) باستخدام الماء المقطر Distal Water.

ج - طريقة العمل

استخدمت عدة الفحص لتحديد تركيز IL-6 بتقنية الاليزا ELISA حيث تم اجراء الفحص كما في الطريقه ادناه , وقبل بدء العمل نقوم بترك عينات المصل بدرجة حرارة الغرفة بعد استخراجها من التجميد حتى تصل الى درجة حرارة الغرفة ثم نبدأ بالخطوت التاليه حسب طريقة العمل المرفقة بالعدة:

1- حضُرت الحفرالخاصة بعدة IL-6 بقدر عدد العينات المراد قياس IL-6 فيها وعدد المحاليل القياسية .

2- تم اضافة 100 مايكروليتر من المحلول القياسي Stander Diluent الى كل حفرة من الحفر الفارغة.

3- تم اضافة مايكروليتر 100 من العينات (المصل) قيد الدراسه الى كل حفرة , وبنفس الكمية نضيف المحاليل القياسية الى الحفر التي خصصت لها.

4- تم اضافة 50مايكروليتر من الانزيم الرابط Congugate Enzyme الى كل الحفر وحسب التعليمات من الشركه المجهزة للعدة .

5- تم تغطية الحفربواسطة غطاء الحفرCover Plate ثم حضنت الحفر في درجة حرارة 25مْ لمدة ساعتين.

6- بعد انتهاء مدة الحضانة , تم وضع الحفر في جهاز الغسل وتم غسلها 4 مرات بواسطة الجهاز باستخدام محلول الغسل المجهز بالعدة.

7- تم اضافة 100 مايكروليتر من انزيم Streptavidin-HRP الى الحفر.

8- تم تغطية الحفر ثم حضنها بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة.

9- بعد انتهاء مدة الحضانة تم اعادة عملية الغسل بواسطة جهاز الغسل 4 مرات للانترليوكين ٦ و٣ مرات لكن من انترليوكين ٨ وعامل تنخر الورم الفا.

10- تم اضافة 100 مايكروليتر من المحلول الملون Substrate الى جميع الحفر .

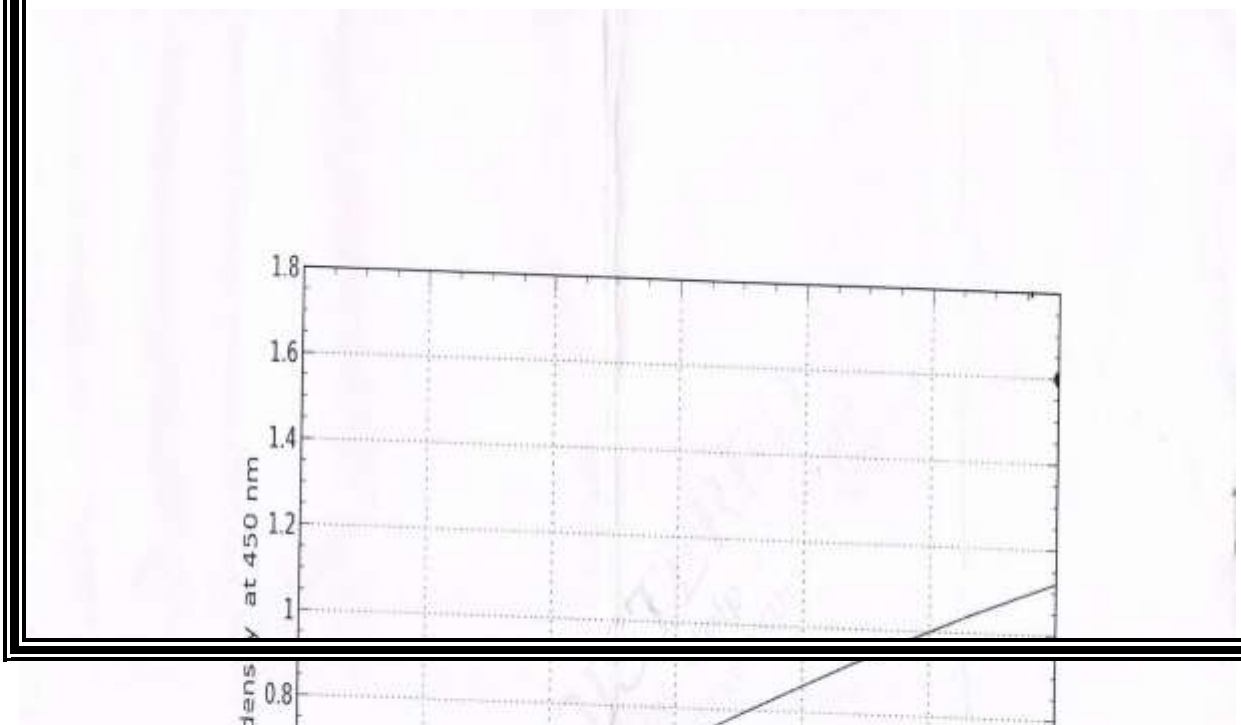
11- حضنت الحفر في الحاضنة وبعيدا عن الضوء بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة.

12- تم اضافة 100 مايكروليتر من المحلول الموقف للتفاعل Stop Solution, بحيث يتغير لون الماده في الحفرة من اللون الازرق الى اللون الاصفر.

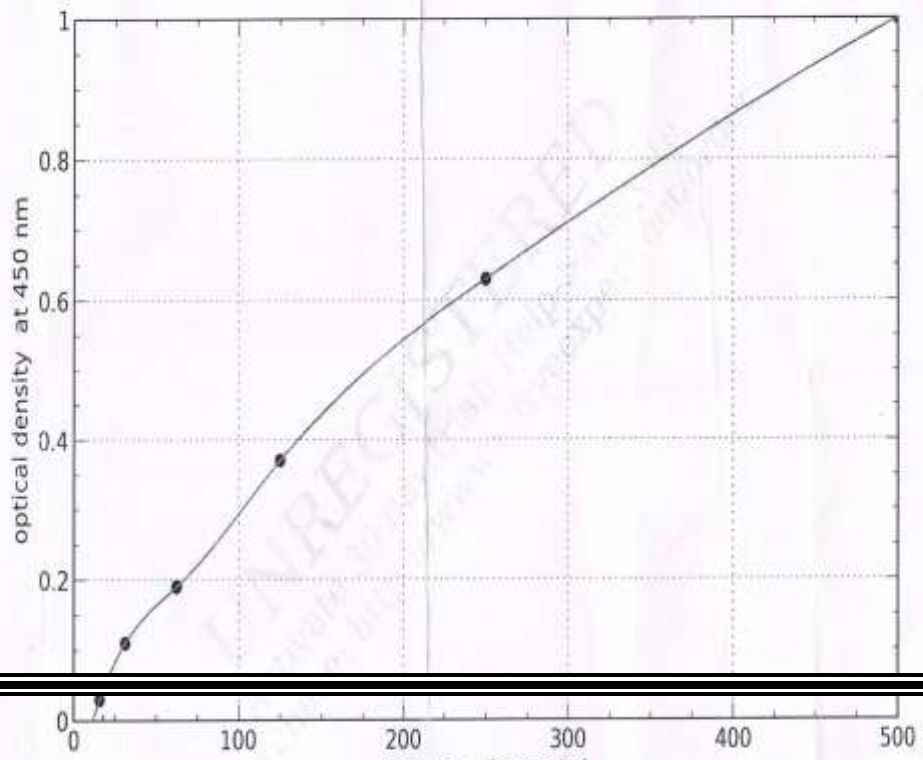
13- وضعت الحفر في جهاز القارئ Reader تحت طول موجي 450 nm .

14- تم استخراج النتائج باستخدام برنامج (soft wear) Curve Expert Profissiona

شكل (3-1): المنحنى القياسي للـ IL- 6



شكل (3-2): المنحنى القياسي لـ IL– 8



شكل (3-3): المنحني القياسي للـ TNF-α

3-13-2:التحليل الإحصائي Statistical analysis

لقد تم استخدام نوعين من البرامج في وصف وتحليل البيانات الواردة في هذه الدراسة. وهي SPSS (الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية؛ إصدار 16) و Microsoft Office Excel 2007.

4- النتائج Results

4-1: عزل بكتريا الـ *E.coli* وتشخيصها

تم في الدراسة الحالية عزل 56 عينة من بكتريا *E.coli* من أصل 100 عينة جمعت من المرضى المصابين بخمج المجاري البولية , شملت الدراسة مستشفى الديوانية التعليمي , ومستشفى الولادة والاطفال في مدينة الديوانية خلال المدة من تشرين الثاني 2012 لغاية نيسان 2013.

4-1-1: الصفات الزرعية

ظهرت المستعمرات النامية على وسط اغار الماكونكي Macconkey Agar باللون الوردي دائرية الشكل منتظمة الحافات , لماعة السطح , صغيرة الحجم وتتراوح أقطارها بين (1-2) ملي متر, كما في الشكل (4-1) , بيبما ظهرت مستعمرات صغيرة الحجم بلون رمادي لماع على وسط اغار الدم ومحاطة بهالة تحلل نوع بيتا (β-) hemolysis تتراوح اقطارها (1-2) ملي متر.

4-1-2: الصفات المجهرية

أظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا البكتريا المعزولة عصوية الشكل، مفردة او مزدوجة الترتيب حمراء اللون ، سالبة لصبغة غرام ،غير مكونة للسبورات .

4-1-3:الفحوصات الكيموحيوية

تم تشخيص العزلات النامية على الوسط الانتقائي بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية, حيث بينت النتائج في الجدول (4-1) استجابة جميع العزلات بنسبة 100% لكل من اختبار الكتاليز Catalase وعدم استجابة أي من العزلات لفحص الاوكسيديز Oxidase , اما بالنسبة لزرع العزلات على الوسط الانتقائي اغارالايوسين الازرق Eiosin Methylene Blue , فكانت النتيجة موجبة بنسبة 100% حيث ظهرت المستعمرات البكتيرية بلون اخضر معدني لماع بعد زرعها على هذا الوسط لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ , حيث تعتبر نتيجة موجبة .اما بالنسبة لفحص الاندول Indole Test , فقد تم زرع البكتريا على وسط ماء الببتون Water Peptone وبعد مدة حضانة دامت 24 ساعة بدرجة حرارة 37مْ اضيف إلى انبوب الزرع البكتيري (2-3) قطرات من كاشف كوفاكس Covax Reagent وبعد لحظات ظهرت حلقة الاندول الحمراء والتي تعتبر نتيجة موجبة لكل العزلات لهذا الفحص وبنسبة 100% ,وبعد أن تم زراعة البكتريا على وسط استهلاك السكريات تم الكشف عنها باستخدام كاشف الاحمر المثيلي Methyl Red حيث كانت النتيجة موجبة لهذا الاختبار بنسبة 95.3% . اما في اختبار استهلاك السترات فقد تم زراعة البكتريا على وسط السايمون ستريت Simon Citrate وبعد مدة الحضانة كانت النتيجة سالبة لجميع العزلات وبنسبة 100 % لهذا الفحص حيث بقي لون الوسط اخضر ولم يتحول الى اللون الأزرق حيث تحول الوسط الى اللون الازرق يعتبر نتيجة موجبة, ولم تظهر اي من العزلات نتيجة موجبة لفحص انتاج اليوريز .

جدول (4-1): الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية لبكتريا *E.coli*

Maltose	Sucrose	Lactose	Urease	Gas production	H2S Production	Kligler iron agar	Simons citrate	Voges-Proskauer	Methyl Red	Indol	Eosin-Methylene blue	Catalase	Oxidase	Motality
+	**d**	+	-	+	-	A/A	-	-	+	+	+	+	-	+

(d) ; (A) = Acid ; (+) = Positive ; (-) = Negative =عزلات مختلفة اعطت نتائج متأخرة

4-2:الأعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *E.coli*

شخصت 56 عزلة لبكتيريا *E.coli* بنسبة 56% من مجموع ١٠٠عينة جمعت من المرضى المصابين بخمج المجاري البولية, بينما كانت بقية الأنواع والأجناس البكتيرية 44 عزلة وبنسبة 44 % , من المرضى المصابين بخمج المجاري البولية في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الولادة والأطفال كما موضح في الجدول (4-2) :

جدول (4-2) : الأعداد والنسب المئوية للانواع البكتيرية المعزولة من عينات الادرار.

العزلات	عدد العزلات	عدد عزلات *E.coli*	الانواع الاخرى
	100	56	44
النسب المئوية	%١٠٠	%٥٦	%٤٤

4-3:الأعداد والنسب المئوية لانتاج وتكوين المحفظة لبكتريا *E.coli*

اما بالنسبة للعزلات البكتيرية المنتجة للمحفظة والعزلات المنتجة للهيمولايسين فقد بنت النتائج المدرجة في الجدول (4-3) ظهور 48 عزلة من مجموع ٥٦ جمعت من المرضى المصابين بخمج المجاري البولية وبنسبة ٨٥,٧% انتاجها لإنزيم الهيمولايسين , بينما اظهرت ١٦ عزلة من اصل ٥٦ عزلة جمعت وبنسبة ٢٨,٣% مكونة للمحفظة.

جدول رقم (4-3): الاعداد والنسب المئوية لعزلات *E.coli* المنتجة لانزيم الهيمولايسين المكونة للمحفظة

عزلات بكتيريا *E.coli*	عدد العزلات المنتجة للهيمولايسين	النسبة المئوية	عدد العزلات المنتجة للمحفظة	النسبة المئوية
56	48	%٨٥,٧	16	%٢٨,٣

4-4 علاقة خمج المجاري البولية بالجنس

اما بالنسبة لتأثير المرض على الجنس فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية المدرجة في الجدول (4-4) ان عدد الإناث المصابات بخمج المجاري البولية كان اكثر من عدد الذكور , حيث وصل عدد الاناث 38 من اصل 56 وبنسبة 67.86% بينما وصل عدد الذكور المصابين الى 18 من اصل 56 وبنسبة 32.14%.

جدول (4-4): الأعداد والنسب المئوية للذكور والإناث المصابين بخمج المجاري البولية.

الجنس	المصابين	
	%	No.
الذكور	32.14	18
الإناث	67.86	38
الكلي	100	56

- **وجود فروق معنوية عند مقارنة المرضى مع مجموعة السيطرة**

4-5:علاقة خمج المجاري البولية بالعمر

اما عن تأثير مرض خمج المجاري البولية على العمر فقد بينت النتائج المدرجة في الجدول (4-5)الخاص باتوزيع المرض حسب الفئات العمرية ان اعلى فئة يمكن ان تصاب بالمرض هي الفئة العمرية (31-40) سنة حيث كان عدد المصابين ١٧ من اصل ٥٦ مريض وبنسبة 30.36% , بينما كانت اقل فئة عمرية تصاب بالمرض هي الفئة (1-10) سنة حيث كان عدد المصابين ضمن هذه الفئة العمرية ١ من اصل ٥٦ مريض وبنسبة 1.79%.

جدول (4-5) : توزيع الاصابة بجرثومة *E.coli* حسب الفئة العمرية للمصاب ونسبتها المئوية .

علاقة المرض بالعمر	المصابين	
	%	No.
1-10سنة	1.79	1
11-20 سنة	7.14	4
21-30 سنة	14.29	8
31-40 سنة	30.36	17
41-50 سنة	19.64	11
51-60 سنة	10.71	6
61-70 سنة	12.50	7
اكبرمن 71 سنة	3.57	2
الكلي	100	56

- **وجود فروق معنوية عند مقارنة المرضى مع مجموعة السيطرة**

4-6:اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

بينت نتائج الدراسة الحالية مقاومة عالية نسبياً ابدتها عزلات الـ *E.coli* تجاه المضادات ألحيوية حيث تم اختبار الحساسية الدوائية لجميع العزلات قيد الدراسة باستعمال 16 نوعاً من المضادات الحيوية القياسية وهي

الأجيال الاربعة لمضادات السيفالوسبورينات Cephalosporin .أظهرت النتائج وكما هو موضح في الجدول (-٦4) إن هناك تبايناً في مقاومة العزلات قيد الدراسة تجاه المضادات المستخدمة , حيث تم إجراء فحص الحساسية الدوائية على 56 عزلة من بكتريا *E .coli* اذ اظهرت العزلات اقل نسبة مقاومة وأكثر حساسية لمضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات حيث كانت اغلب العزلات قيد الدراسة حساسة لمضادات هذا الجيل .

بلغت نسبة المقاومة لمضاد Ceftriaxon (32.2%) , وقد جائت نسبة مقاومة مضاد Cefotaxim (35.7%) , و نسبة (37.5%) لم ضاد Ceftazidim , و كانت نسبة (42.9%) لمضاد Cefixim وكذلك نسبة (35.7%) لمضاد Cefdinir , وأخيرا نسبة (30.4%) لمضاد Ceftizoxim .

اما بالنسبة لمضادات الجيل الثاني للسيفالوسبورينات كانت حساسية العزلات البكتيرية متوسطة نسبياً حيث بلغت نسبة المقاومة (59.0%) لمضاد Cefaclor , وجائت نسبة (60.8%) لمضاد Cefonicid , وكذلك كانت نسبة (50.0%) لمضاد Cefprozil , و نسبة (64.2%) لمضاد Cefoxitin واخيراً نسبة (55.3%) لمضاد Cefmetazole.

اما بالنسبة للجيل الأول فكانت نسبة المقاومة ضعيفة حيث بلغت نسبة المقاومة لمضاد Cephalothin (78.6%) ,إما مضاد Cefazolin (71.4%) , وكانت نسبة (69.7%) لمضاد Cephalexin , وأخيرا جاءت نسبة المضاد Cephadroxil (66.1%) . أما بالنسبة لمضاد الجيل الرابع Cefepime (39.3%) حيث تعتبر نسبة متوسطة تقريباً.

جدول(4-6): يوضح النسب المئوية لمقاومة عزلات *E.coli* لمضادات السيفالوسبورينات

R= Resistant S= Sensitive I= Intermediate

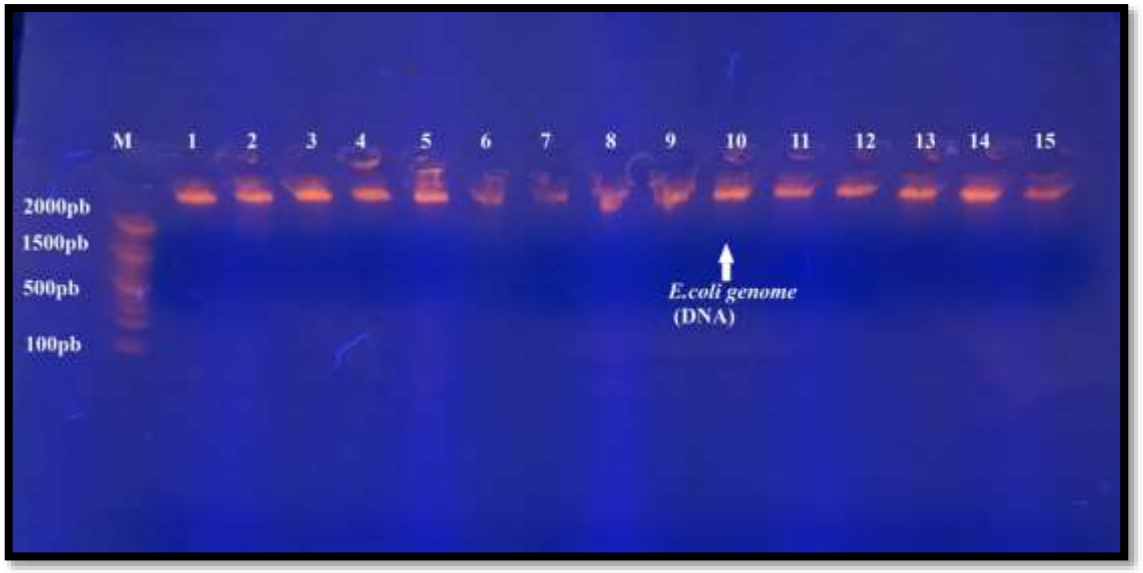
أنواع المضادات الحيوية	الرمز	النسبة المئوية للمقاومة	االنسب المتوسطة	النسبة المئوية للحساسية
Cephalothin	CEP	(78.6%)44	(3.5%)2	(17.9%)10
Cefazolin	CZ	(71.4%)40	(1.8%)1	(26.8%)15
Cephalexin	CN	(69.7%)39	(5.3%)3	(25.0%)14
Cephadroxil	CL	(66.1%)37	(8.9%)5	(25.0%)14
Cefoxitin	FOX	(64.2%)36	(3.6%)2	(32.2%)18
Cefonicid	CFN	(60.8%)34	(5.2%)3	(34.0%)19
Cefaclor	CFC	(59.0%)33	(1.7%)1	(39.3%)22
Cefmetazole	CFM	(55.3%)31	(3.6%)2	(41.1%)23
Cefprozil	CPZ	(50.0%)28	(5.3%)3	(44.7%)25
Ceftriaxon	CTR	(32.2%)18	(0.0%)0	(67.8%)38
Cefotaxime	CTX	(35.7%)20	(1.8%)1	(62.5%)35
Ceftizoxime	CFZ	(30.4%)17	(3.6%)2	(66.0%)37
Ceftazidime	CAZ	(37.5%)21	(1.8%)1	(60.7%)34
Cefdinir	CRD	(35.7%)20	(7.1%)4	(57.2%)32
Cefixim	CFM	(42.9%)24	(1.6%)1	(55.1%)33
Cefepim	CPM	(39.3%)22	(8.9%)5	(51.8%)29

4-7: تقنية تفاعل البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR)

4-7-1:استخلاص الدنا

أظهـرت نتـائج اسـتخلاص الــDNA لعـزلات *E.coli* باسـتعمال العـدة المسـتعملة لهـذا الغـرض وترحيله كهربائياً في هلام الاغاروز(1.5 %) والكشف عنه باستعمال صبغة الأثيديومبرومايد bromide

Ethidium وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية Ultra violate احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للـDNA المستخلص , وكما مبين في الشكل (4-5):



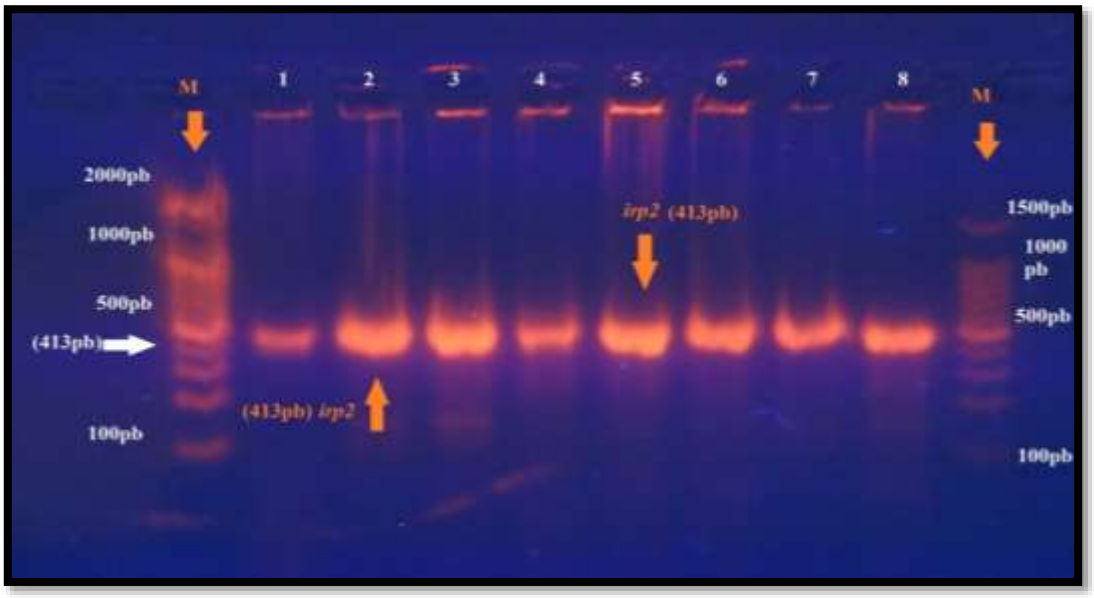
الشكل (4-1) : نواتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات *E.coli* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit. حيث أن (M =DNA Ladder 100-2000bp) .

4-7-2: تقنية تفاعل البلمرة المفرد والمتعدد

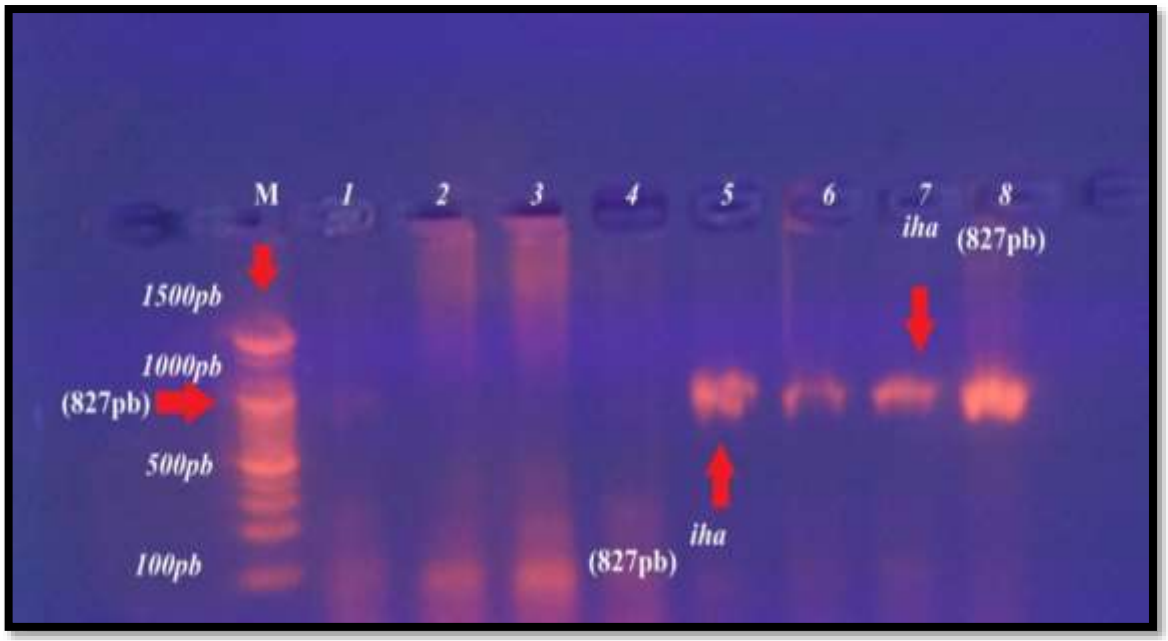
تم التحري عن بعض عوامل الضراوة لـ 30 عزلة من عزلات *E.coli* بأستعمال تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعددSingle & Multiplex PCR, اذ تم التحري عن الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة وهي كل من*pap* الجين المسؤول عن التشفير لتكوين fimbriae, *hly* الجين المسؤول عن عامل التحلل heamolysin factor, *afa* الجين المسؤول عن afimbrial adhesion و *iha* الجين المسؤول عن تكوين المحفظة capsule synthesis, *irp2* الجين المسؤول عن اخذ الحديد iron uptake , و *tst* الجين المسؤول عن ذيفان متلازمة الصدمة السمية toxic shok syndrome . اذ أظهرت 29 عزلة بنسبة (96.6%) أمتلاكه لجين *hly* , كما أظهرت 30 عزلة بنسبة (100%) أمتلاكها لجين *irp2* , و 9 عزلة بنسبة (30.0%) أمتلاكها لجين *afa* , بينما أظهرت 4 عزلات فقط بنسبة (10.0%) من العزلات أمتلاكها لجين *iha* , وكانت 11 عزلة وبنسبة (36.6%) تمتلك الجين *pap* ولم تسجل اي عزلة تحتوي على الجين *tst* وكما موضح في الجدول (4-7).

جدول (4-7) : الإعداد والنسب المئوية لجينات عوامل الضراوة في عزلات *E.coli* باستعمال تقنية الـ Single &Multiplex PCR .

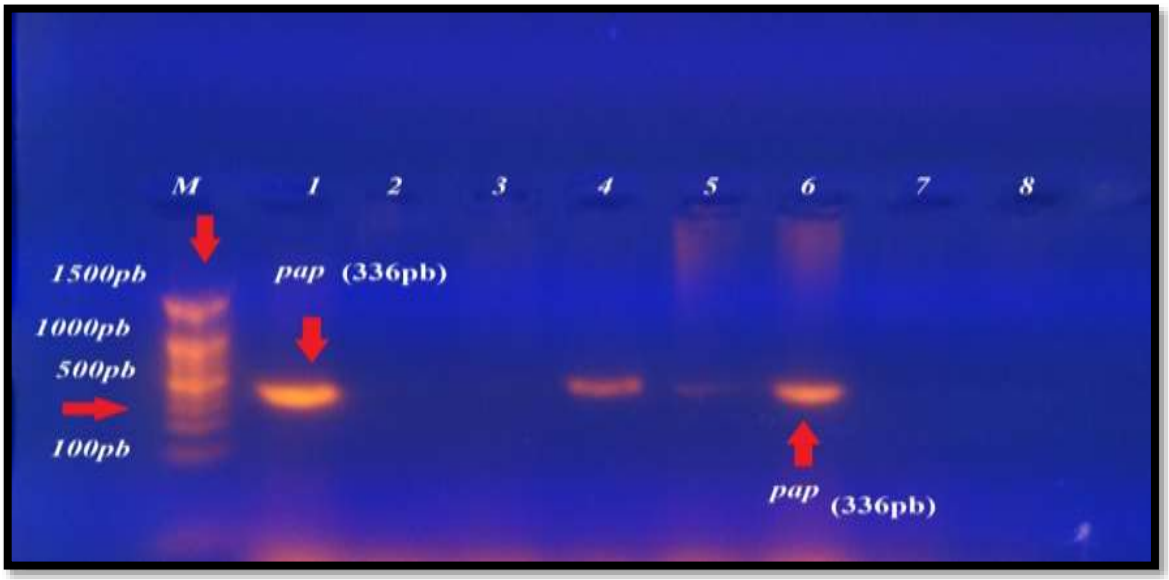
الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة Virulence Factor genes	عدد عزلات الـ *E.coli*	النسبة المئوية (%)
Pap	11	36.6%
afa	9	30.0%
hly	29	96.6%
iha	3	10.0%
irp2	30	100%



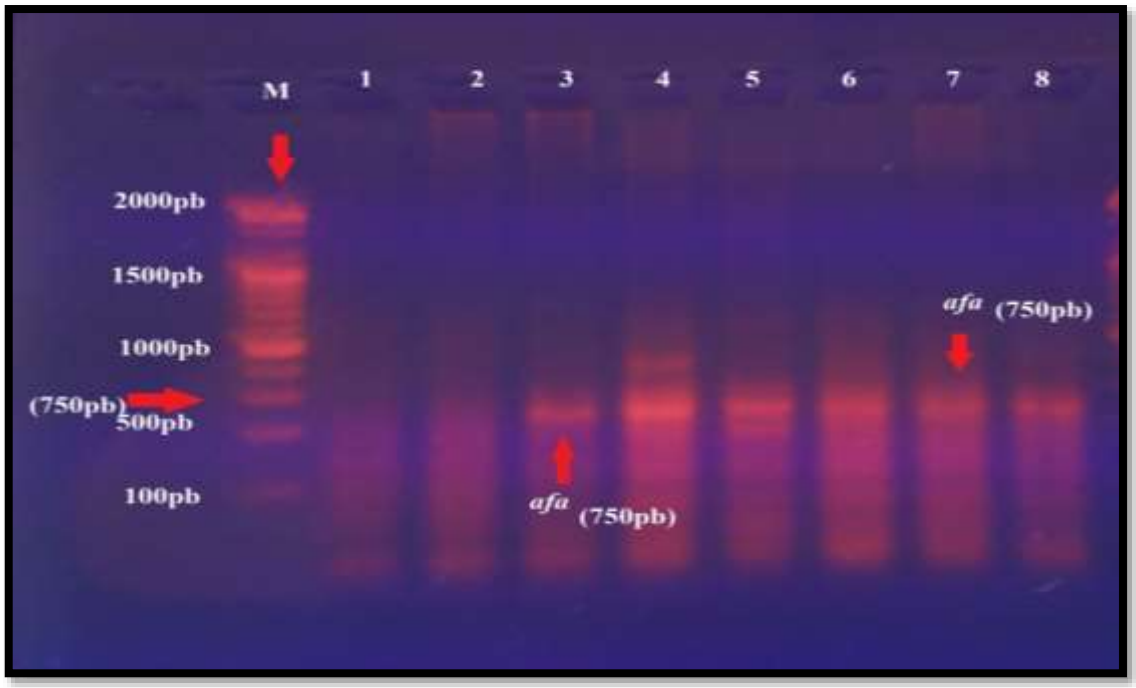
الشكل (4-2): نواتج تضخيم الجين *irp2* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنيةSingle PCR و المرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (DNA Ladder100-2000bp) , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجين *irp2* المسؤول عن اخذ الحديد من خلية العائل.



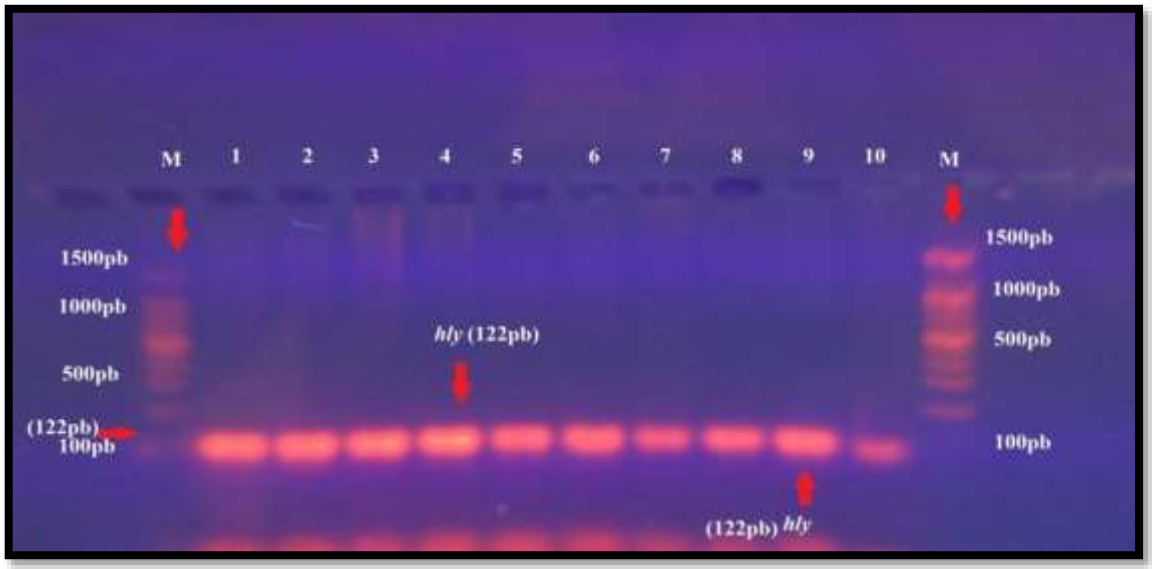
الشكل (4-3): نواتج تضخيم الجين *iha* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنيـة Single PCR والمرحلـة كهربائياً علـى هـلام الاغـاروز (1.5%) وفولتيـة (100) ولمـدة سـاعة. حيـث أن M = -100) DNA Ladder) 1500bp , جميع العزلات أظهرت 4عزلات نتيجة موجبة لجين *iha* المسؤول عن تكوين المحفظة.



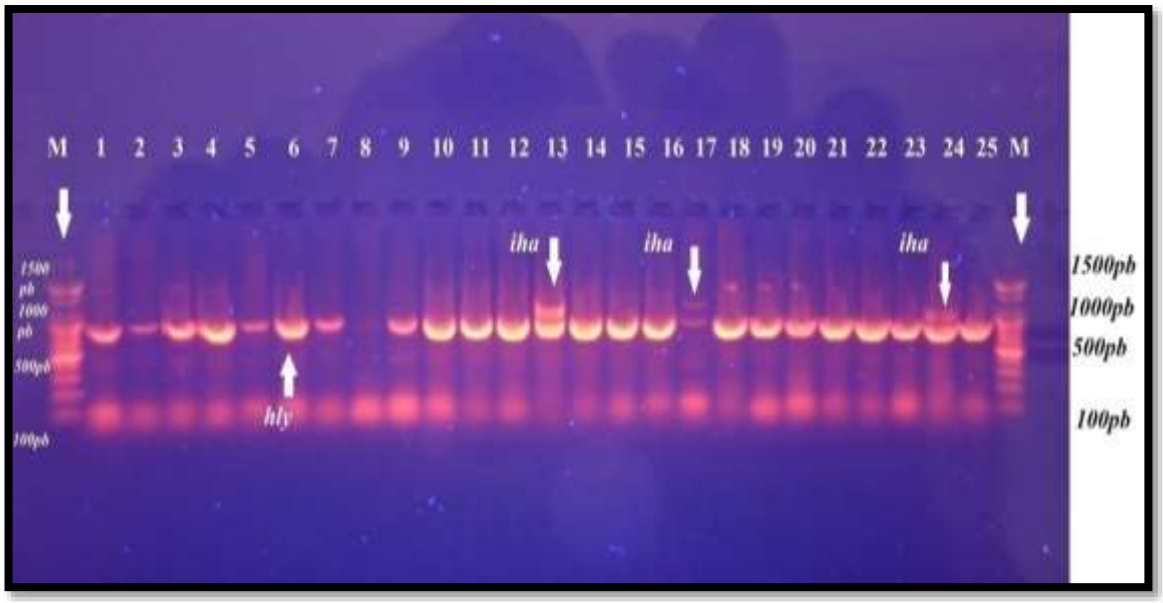
الشكل (4-4):نواتج تضخيم الجين *pap* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنيـة Single PCR والمرحلـة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أنM = (100-1500bp DNA Ladder) , أظهرت 11عزلة نتيجة موجبة لجين *pap* المسؤول عن عوامل الالتصاق.



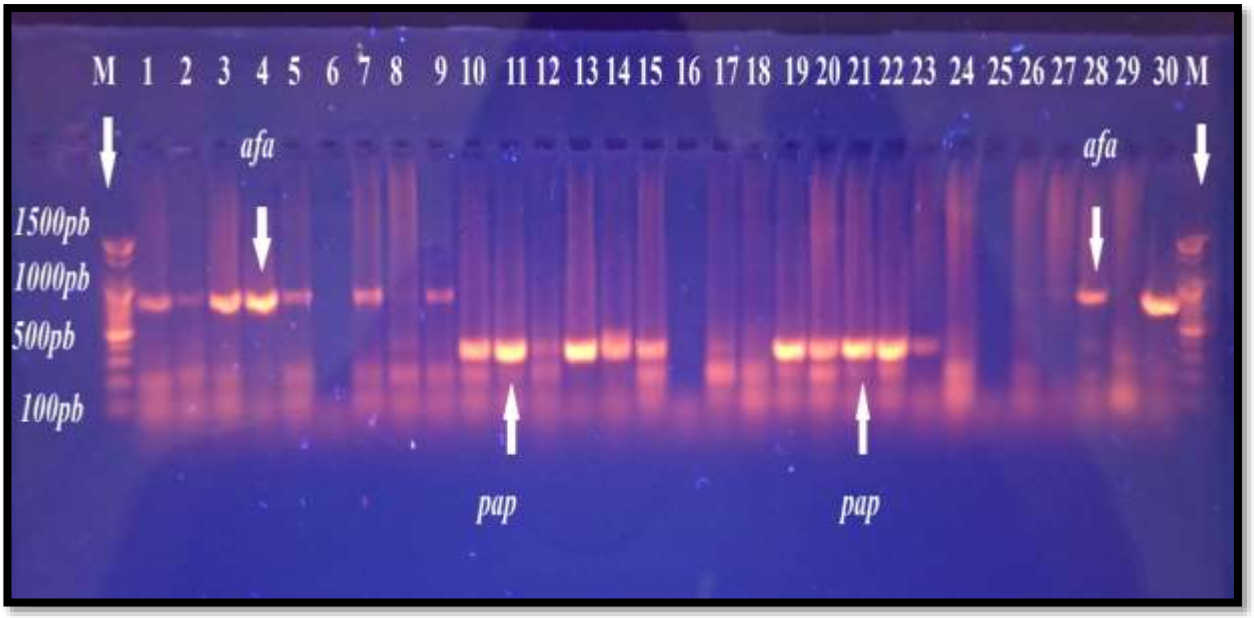
الشكل (4-5):نواتج تضخيم الجين *afa* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية والمرحلة Single PCR كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن (DNA = M Ladder100-1500pb) حيث ان 9عزلات اظهرت نتيجة موجبة لجين *afa* المسؤول عن عامل الالتصاق .



الشكل (4-6): نواتج تضخيم الجين *hly* لبكتريا الـ *E.coli* بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (DNA Ladder 100-1500)bp , حيث ان 29 عزلة أظهرت نتيجة موجبة لجين *hly* المسؤول عن انزيم الهيمولايسين .



الشكل (4-7): نـواتج تضـخيم الجينـات(*hly+iha*) لبكتريـا الـ *E.coli* بأسـتعمال تقنيـة Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (DNA Ladder 100-1500bp) , حيث اظهرت 29 عزلـة نتيجـة موجبـة للجين *hly* المسؤول عن انتـاج انزيم الهيمولايسين بينما فقط 4 عزلات اظهرت نتيجة موجبة للجين *iha* المسؤول عن المحفظة.



الشـكل (4-8):نـواتج تضـخيم الجينـات (*pap+afa*) لبكتريـا الـ *E.coli* بأسـتعمال تقنيـة Multiplex PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الاغاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة. حيث أن M = (DNA Ladder 100-1500bp) , حيث أظهرت 9 عزلـة نتيجـة موجبـة للجين *afa* المسؤول عن تكون اللواصق بينما أظهرت 11 عزلة فقط بنتيجة موجبة للجين *pap* المسؤول عن تكوين الاهداب .

4-8: الدراسة المناعية

اظهرت نتائج الفحوصات المناعية وجود ارتفاع كبير في مستويات الانترليوكينات (IL-8,IL-6,TNF-α) في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية كما مبين في الجداول (4-8) , (4-9) , (4-10):

جدول (4-8): مقارنة تراكيز IL-6 في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية والاصحاء.

المجاميع	العدد	تركيز IL-6			
		اقل قيمة	أعلى قيمة	المعدل	الخطأ القياسي
المرضى	٥٦	018.40	202.2	69.95	5.49
السيطرة	٢٠	0.00	12.00	3.05	0.90

- وجود فروق معنوية عند مقارنة المرضى مع مجموعة السيطرة

جدول (4-9): مقارنة تراكيز IL-8 في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية والاصحاء.

المجاميع	العدد	تركيز IL-8			
		اقل قيمة	أعلى قيمة	المعدل	الخطأ القياسي
المرضى	٥٦	27.20	319.20	120.65	10.29
السيطرة	٢٠	0.11	12.10	3.4	0.71

- وجود فروق معنوية عند مقارنة المرضى مع مجموعة السيطرة

جدول (4-10): مقارنة تراكيز TNF-α في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية والاصحاء.

		تركيز TNF-α

المجاميع	العدد	اقل قيمة	أعلى قيمة	المعدل	الخطأ القياسي
المرضى	٥٦	18.60	334.80	71	12.04
السيطرة	٢٠	0.00	16.30	4.75	1.13

- وجود فروق معنوية عند مقارنة المرضى مع مجموعة السيطرة.

5 - المناقشة Discussion

5-1: عزل وتشخيص بكتيريا *E.coli*

تمت عملية جمع العينات في الدراسة الحالية من مرضى خمج المجاري البولية وما يترتب على ذلك من إجراءات تشخيصية ووقائية وقد تم تشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة تشخيصاً أولياً من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيموحيوية التشخيصية.

تم زرع عينات الادرار في وسط اغارالدم الصلب Blood Agar للحصول على مستعمرات نموذجية ، وكانت المستعمرات رمادية اللون , ناعمة ، مرتفعة قليلاً ، وتتراوح أقطارها بين (1-2) ملي متر ومحاطة بهالة تحلل نوع بيتا β-hemolysis ، كما ظهرت المستعمرات النامية على وسط اغار الماكونكي Macconkey agarبلون وردي فاتح لماعة , مرتفعة , دائرية , وبلغت أقطارها (1-2) ملي متر تقريبا ، بالإضافة إلى تغير لون الوسط من الوردي إلى اللون الأصفر نتيجة لتخمر اللاكتوز وانتاج الحامض بعد مدة 48ساعة ، وهذه النتائج كانت متفقة مع دراسة Holt وجماعة (2000) و Stukus (1997) و MacFaddin (2000).

أظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا البكتيريا المعزولة عصوية الشكل، متجمعة بصورة ثنائية اومفردة ، سالبة لصبغة غرام , وهذا متفق مع دراسة Collee وجماعة (1996), و Brooks وجماعة (2001).

أما بالنسبة للفحوصات الكيموحيوية التشخيصية فقد أوضحت النتائج ألمبينة في الجدول (4-1) استجابة جميع العزلات و بنسبة 100% لكل من اختبارالكتاليز Catalase test , ويعد هذا الفحص مهم جدا للتمييز بين البكتيريا الهوائية و اللاهوائية أذ كانت نتيجة هذا الفحص ظهور فقاعات هوائية دلالة على ايجابية بكتيريا *E.coli* لهذا الفحص, بينما أظهرت جميع العزلات نتيجة سالبة لاختبار الاوكسيديز Oxidase test أذ اعطت لون وردي فاتح دلالة على سلبية بكتيريا *E.coli* لهذا الاختبار ويعد اختبار الاوكسيديز مهم جدا للتمييز بين الأنواع البكتيرية في قدرتها على انتاج إنزيم الاوكسيديز والذي يسمح باستخدام الأوكسمورث مباشرةً كمستقبل للهيدروجين (MacFaddin, 2000; Collee,1994) .

اما بالنسبة لزرع بكتيريا *E.coli* على الوسط الانتقائي اغار الايوسين مثلين الازرق فكانت النتيجة موجبة لجميع العزلات وبنسبة 100% , أذ اظهرت المستعمرات البكتيرية بلون اخضرذات بريق معدني بعد زرعها على هذا الوسط لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ , أذ تعتبر نتيجة موجبة , اما بالنسبة لفحص الاندول Indol test فقد كانت النتيجة موجبة لكل العزلات لهذا الفحص ويستخدم هذا الفحص للتمييز بين بكتيريا *E.coli* وبقية اجناس البكتيريا المنتميه إلى العائلة المعوية لتي لها القدرة على هدم الحامض الاميني التربتوفان وانتاج الاندول بوجود انزيم التربتوفاينيز (MacFaddin, 2000) .

اما بالنسبة لاختبار استهلاك السكريات تم زراعة البكتيريا على وسط استهلاك السكريات أذ تم الكشف عنها باستخدام كاشف الاحمرالمثيلي MR reagent أذ كانت النتيجة موجبة لهذا الاختبار بنسبة 95.3% , ويعتبر فحص استهلاك السكريات من الفحوصات المهمة للتمييز بين الانواع البكتيرية من خلال معرفة قدرتها في استهلاك السكريات وإنتاج الغاز والحامض وهذا متفق مع MacFaddin (2000) .

اما في اختبار استهلاك السترات فقد تم زراعة البكتيريا على وسط السايمون ستريت وبعد مدة الحضانة كانت النتيجة سالبة لجميع العزلات قيد الدراسة لهذا الفحص أذ بقي لون الوسط اخضر ولم يتحول إلى اللون الازرق أذ تحول الوسط إلى اللون الازرق يعتبر نتيجة موجبة أذ يستخدم هذا الفحص للتفريق بين الاجناس البكتيرية في استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون , ولم تظهر اي من العزلات نتيجة موجبة لفحص اليوريز urase test أذ يستخدم هذا الفحص للكشف عن البكتيريا المستهلكة لليوريا نتيجة إفراز إنزيم اليوريز ولم يحدث اي تغير لوني لهذا الفحص مما يدل على سلبية بكتيريا *E.coli* لهذا الاختبار , وكذلك أظهرت جميع العزلات بنتيجة سالبة لفحص فوكس بروسكاور ويستعمل هذا الاختبار لمعرفة قابلية البكتيريا على تحرير نواتج نهائية متعادلة مثل Acetylmethyl-carbinol (AMC) والأسيتون من خلال تخمير الكلوكوز, وكذلك اظهرت جميع العزلات نتيجة سالبة لفحص انتاج كبريتيد الهيدروجين (MacFaddin , 2000).

2-5:النسبة المئوية لظهور بكتيريا *E.coli* بين العزلات

أوضحت النتائج المبينة في الجدول (4-2) الخاص بالأعداد والنسب المئوية للبكترية المعزولة من المرضى المصابين بخمج المجاري البولية إن 56% من عينات إصابات خمج المجاري البولية كانت تسبب بواسطة بكتيريا *E.coli* وهذا يتفق مع دراسة Staman و Hotton (1993) و Funfostuk

,جماعتة (1999) , و Delzell و Lefever (2000) , Akbar (2001) , Woult وجماعتة (2002) حيث توصلا الى نسب ٥٥%,٥٩%, ٥١% , ٦٠% , ٥٨%, ٦١% على التوالي .

بينما كانت بقية الأنواع البكتيرية بنسبة 44 %, ولا يمكن تفسير هذه النتيجة بشكل دقيق الا انه ربما يعود السبب إلى قابلية بكتيريا *E.coli* على التكيف في بيئة المجاري البولية لدى الانسان بدرجة عالية نتيجة تحملها للظروف البيئية في هذه الاماكن وكذلك امتلاكها لعوامل ضراوة وامراضية مهمة جدا في الاصابة وحدوث الخمج , منها عوامل الالتصاق التي توجد على سطح اهداب البكتيريا أذ يحتوي الجدار البطاني للقناة البولية مستلمات لهذه اللواصق والتي تعد الخطوة الاولى في الاصابة أذ تتمكن البكتيريا من الالتصاق على النسيج الطلائي المبطن للقناة البولية وبالتالي يعد الالتصاق الخطوة الاولى في الاجتياح والغزو البكتيري , وكذلك امتلاكها لعوامل ضراوة اخرى مثل انتاج المحفظة وانتاج سموم تحللية وغيرها التي تساعد البكتيريا في غزو القناة البولية وحدوث الاصابة(Haslett, 1999 ;Naylor, 1999). والسبب الأخر الذي يشكل الاهمية الكبرى في كون بكتيريا *E.coli* هي من اكثر انواع الجراثيم المسببة لخمج المجاري البولية يعود إلى انتقال هذه البكتيريا من فتحة المخرج التي توجد فيه طبيعياً إلى الفتحة البولية وبالتالي تدخل وتسبب المرض به (Haslett, 1999).

3-5: علاقة الجنس والعمر بالاصابة بخمج المجاري البولية

في مجال دراسة العلاقة بين الاصابة بالمرض والجنس فقد أظهر الجدول (4-4) الخاص بجنس المصابين إن الإناث كانت اعلى بكثير من الذكور في اصابات خمج المجاري البولية أذ وصل عدد الاناث المصابات بخمج المجاري البولية 38 من اصل 56 وبنسبة (67.86%) , بينما وصل عدد الذكور المصابين إلى 18 من أصل 56 وبنسبة (32.14%) , وهذا يتفق مع دراسة Hows وجماعتة (2003) أذ كانت النسبة في دراسته ٦١,٣% للاناث و ٣٦,٢% للذكور ,قد يكون السبب قرب فتحة الشرج من الفتحة البولية عند الاناث وكذلك قصر حالب الاناث بالنسبة للذكور مما يؤدي إلى سهولة دخول البكتيريا إلى المجرى البولي للاناث اكثر من الذكورحيث يبلغ طول القناة البولية لدى الاناث 2.8سم بينما في الذكور اكثر من 10سم , بالاضافة إلى افرازات البروستات ذات الخاصية المضادة للبكتيريا والتي توفر حماية ضد الغزو البكتيري ايضا من العوامل المهمة التي تجعل الاناث تصاب بالخمج اكثر من الذكور (Abu Daia *et al* ., 2000)

اما بالنسبة للفئات العمرية فقد بينت النتائج المدرجة في الجدول (4-5) الذي يبين تأثير العمر على الاصابة , ان اكثر فئة عمرية كانت تتراوح بين 30 سنة فما فوق وهي فئة كبار السن , يليها الفئة العمرية بين (20-30 سنة) وهي فئة البالغين بينما جاءت الفئة العمرية بين (10-20سنة) بالمرتبة الثالثة وهي فئة المراهقين , وجاءت الفئة العمرية 10 سنوات فما دون بالمرتبة الرابعة من الاصابة بخمج المجاري البولية

وهي فئة الاطفال , وهذه النتائج كلها تتفق مع ما توصل إليه Avalose وجماعتة (1999) , Orenestien و Wong (1999) , Abu Daia وجماعتة (2000).

بينما تفاوتت هذه النتائج مع ما جاء به Winberg وجماعتة (1998) الذي اوضح ان فئة الشباب هي اكثر فئة تصاب بالمرض تليها فئة الكهول ومن ثم فئة المراهقين والاطفال بالمرتبة الثالثة , الا ان الاتجاه العام متفق لما توصلت إليه الدراسة الحالية التي بينت بان الإناث هن الأكثر اصابة من الذكور في جميع الاعمار , وكذلك فان احتمال الاصابة بالمرض يزداد مع التقدم بالعمر , اما كون ان فئة الشيخوخة هي اكثر فئة عمرية تصاب المرض فان ذلك يعزى إلى إن المرض يزداد طردياً مع زيادة العمر (Riff , 1988) , والسبب في ذلك يعود إلى ضعف المناعة الطبيعية بتقدم العمر وتأثير بعض امراض الشيخوخة والامراض المزمنة التي تيسر التعرض للاصابة بخمج المجاري البولية مثل داء السكري (AL-Hadithi ,1996) .

ففي حالة النساء من فئة الشيخوخة وجد انه هناك عدة عوامل تساعد على حدوث المرض لديهن مثل التلف الوظيفي للجهاز البولي (Dontas *et al*,, 1997) , والتي تاتي مع التقدم بالعمر مما يؤثر في الوظيفة الطبيعية للجهاز البولي , كذلك زيادة المتبقي من البول في المثانة بالاضافة إلى بعض السلوكيات للمرضى منها التعايش مع المرض خصوصا في القرى والارياف , اما بالنسبة للذكور التابعين إلى فئة الشيخوخة فان حدوث خمج المجاري البولية يزداد بنسبة 5% مقارنة مع الذكور الاقل عمراً وذلك بسبب تضخم البروستات Prostatic hypertrophy (Fair, 1999 ; Nicolle, 1994) .

اما كون البالغين هم ثاني فئة عرضة للاصابة من المراهقين والاطفال فانه يعزى إلى عدة عوامل مؤثرة منها الدوره الشهريه عند الاناث ومايتبعه من تغير في النبيت الطبيعي وتغير حموضة المهبل يؤدي إلى استيطان البكتيريا للخلايا الطلائية مما يسهل حدوث الاصابة (Svanborg- 1993) Eden, 1996 ; Stamey *et al*., .

ان الاصابة بخمج المجاري البولية هو من الامراض الشائعة لدى الفتيات في عمر المراهقة ويصاحبه عسر بالتبول بشكل رئيسي , وان الطفل السليم الطبيعي لايتعرض للاصابة بخمج المجاري البولية وذلك لعدة اسباب منها الوضع التشريحي والفسيولوجي السليم للمجرى البولي , والذي يكون فيه جريان البول احادي الاتجاه , والتفريغ الكامل للمثانة من البول خلال فترات منتظمة كل هذه الاسباب تحمي الاطفال من الاصابة لذا جاءت فئة الاطفال نادرة الحدوث في هذه الدراسة (Abu Daia *et al*., 2000).

5-2:انتاج بكتيريا *E.coli* للمحفظة وانزيم الهيمولايسين

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (4-3) الخاص بالعزلات المنتجة لانزيم الهيمولايسين وانتاج المحفظة ظهور 48عزلة من مجموع ٥٦ جمعت وبنسبة ٨٥,٧%, أذ يعد انتاج الهيمولايسين من عوامل الضراوة المهمة لبكتيريا *E.coli* أذ له القدرة على حل كريات الدم الحمراء والخلايا البيضاء متعددة الانوية وكذلك يؤدي هذا الانزيم الى تقليل كفاءة عملية البلعمة خارج جسم الكائن الحي (Dupot *et al*.,1998).وهناك عدة عوامل تؤخذ

بنظر الاعتبار عند دراسة الفعالية التحليلية للهيمولايسين مثل مدة الحضن ودرجة الحرارة ووجود المصل والكولسترول اللذان يعملان على تثبيط التحلل مما يؤدي الى عدم الكشف عن الهيمولايسين (الحسيني ,1996). بينما اظهرت ١٦ عزلة من اصل ٥٦ عزلة جمعت وبنسبة ٢٨,٣% مكونة للمحفظة. أذ تعد المحفظة من عوامل الضراوة المهمة لانها تحمي البكتيريا من الوسائل الدفاعية للمضيف كمقاومة عملية البلعمة الكبيرة أذ توصل Hejnova وجماعتة (2002) ان بكتيريا *E.coli* تمتلك محفظة يشفر لها بواسطة مورثات كروموسومية خاصة. ان كفاءة انزيم الهيمولايسين يعتمد على نوع الدم المستخدم أذ لاحظو ان دم الارنب هو الافضل أذ يعطي مناطق تحلل اوضح من الدم البشري في حين اشار الحسيني (1996) ان صنف دم AB يعد افضل مصادر الدم للكشف عن الهيمولايسين اذ تبين من خلال دراسته ان العزلات الحالة للدم قد حللت جميعها الدم AB في الاطباق بنسبة 100% وقد عزى ذلك الى ان صنف AB يحتوي على مستقبلات اقل تخصصا مما تحتويه بقية الاصناف (مفتن, 2000).

4-5:اختبارالحساسية للمضادات الحيوية

تعد مشكلة المقاومة للمضادات الحيوية من المشاكل المهمة والتي تؤدي إلى زيادة معاناة المرضى ونسبة الوفيات بينهم وهذه الظاهرة لم تعد مثيره للعجب نظرا للاستخدام الواسع للمضادات او تكرار نفس المضاد الحيوي لمدة طويل او استخدام جرعات قليلة غير مميتة للكائن المسبب الاصابة (Bero *et al* , 2000) .

وفي السنوات الاخيرة زادت مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية وخاصة البكتيريا السالبة لصبغة غرام نظرا لما تمتلكه من مقاومة داخلية Intrinsic resistant والتي تفتقر إليها البكتيريا الموجبة لصبغة غرام وقد شكلت أجناس العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* مؤخرا حالة طارئة في المجالات الصحية لامتلاكها الاستعداد الكافي لاكتساب اليات مقاومة جديدة للادوية والمضادات الفعالة ويبرز من بين هذه الاجناس بكتيريا *E.coli* (Bert & Lembert , 1999).

ولقد تم اختبار الحساسية الدوائية لجميع عزلات *E.coli* قيد الدراسة باستعمال 16 نوعاً من المضادات الحيوية القياسية وقد اختيرت هذه المضادات من الاجيال الاربعة لمضادات السيفالوسبورينات وكما هو موضح في النتائج المبينة في الجدول (4-5) ، ولقد اختيرت هذه المجموعة من المضادات الحيوية لشيوع استعمالها في معالجة خمج المجاري البولية وخصوصا النتاتج عن بكتيريا *E.coli* ، وذلك لمعرفة مدى المقاومة التي تبديها بكتيريا *E.coli* للمضادات الحيوية وخطورة انتشار تلك المقاومة التي قد تمتد لتشمل عدداً واسعاً من المضادات الحيوية (Bero *et al* , 2000).

أظهرت نتائج اختبار فحص الحساسية الدوائية في الدراسة الحالية ارتفاع مستويات المقاومة لأغلب مضادات السيفالوسبورينات ، والسبب في المقاومة يعتمد على عوامل الضراوة للبكتيريا ذاتها امتلاك البكتيريا

للمحفظة الذي يعتبر عامل ضراوة مهم يمنع وصول المضاد الى هدفه على سطح او داخل الخلية البكتيرية ، كما أن الاختلاف في ظروف الاختبارات ونوع التقنيات المستعملة في الدراسة كل ذاك مجتمعا قد يوجد اختلافا في مستويات المقاومة (Brown *et al*., 2005).

والسبب الأخر قد يكون هو نتيجة انتاج إنزيمات البيتالاكتاميز والتي يشفر لها عن طريق مورثات توجد على الكروموسومات او البلازميدات، ومن اليات المقاومة الاخرى هي قلة الفة البروتينات الرابطة للبنسلينات (PBPs) او قلة نفاذ المضاد إلى داخل الخلية البكتيرية (Jacoby & Munoz-Price, 2005).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان العزلات اكثر حساسية لمضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات أذ كانت اغلب العزلات قيد الدراسة قليلة المقاومة لافراد مضادات هذا الجيل أذ يمتلك هذا الجيل تأثيراً علاجياً طويل الأمد قد يمتد إلى ما بعد إيقاف العلاج وتعمل *E.coli* على مقاومة هذه المضادات بنفس الآليات المستعملة في مقاومة البنسيلينات من إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز الغير متفقة والبروتينات الرابطة للبنسيلين(Fuda ,*et al*., 2004).

بلغت نسبة المقاومة لمضاد Ceftriaxon (32.2%) وان هذه النسبة جاءت متفقة لدراسة Abdullah وجماعتة (2009) أذ بلغت مقاومة العزلات لهذا المضاد لديه (34.1%) , كذلك جاءت متفقة مع ماجاء به Dharmishtha وجماعتة (2012) أذ توصلوا في دراستهم إلى نسبة مقاومة (35.0%) بينما لم تتفق مع Ali (2007) أذ كانت النسبة في دراسته (48.0%) وكذلك تختلف عن ما جاء به Shafaq وجماعتة (2011) أذ بلغت النسبة في دراستة (74.3%).

وقد جاءت نسبة مقاومة مضاد Cefotaxime (35.7%) اذ يتفق مع دراسة الحسو (2006) أذ توصل إلى نسبة (37.2%) مقاومة لهذا المضاد وكذلك جاءت متفقة مع دراسة Abdullah وجماعتة (2009) أذ كانت النسبة التي توصل إليها (33.9%) . وايضاً تتفق مع دراسة العباسي (2000) أذ بلغت النسبة التي توصل إليها في المقاومة هي (32.8%). بينما اختلفت هذه النتائج مع دراسة Fakhriddeen (2011) أذ توصل إلى نسبة (73.7%) وكذلك يختلف مع Dharmishtha وجماعتة (2012) أذ كانت نسبة المقاومة في دراستهم (55.0%) وايضاً لم تتفق مع حران (2012) أذ كانت نسبة المقاومة لديه (76.6%).

وكانت نسبة المقاومة (37.5%) لمضاد Ceftazidim وهذه النسبة جاءت متفقة مع نتائج الحسو (2006) اذ كانت نسب المقاومة التي توصل ألية هي (41.3%) , وكذلك تتفق مع Dharmishtha وجماعتة

(2012) أذ كانت نسبة المقاومة لديهم (30.0 %) , وايضا متفقة لما توصل إليه Abdullah وجماعة (2009) أذ بلغت نسبته(36.1%). بينما لم تتفق مع حران (2012) أذ كانت نتائجه لمضاد الـ Ceftazidim (78.6%) , وكذلك جاءت نتيجة الدراسة الحالية غير متفقة لما توصلت لهُ Ali (2007) أذ كانت النسب التي توصلت إليها هي (54.0 %), وكذلك جاءت هذه النسبة غير متفقة ايضاً لما جاء به Al-salamy (2012) أذ بلغت نسبة المقاومة لهُ (70.0%).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة مقاومة (42.9%) لمضاد Cefixim ,اذ كانت هذة النسبة متفقة مع دراسة Dharmishtha وجماعة (2012) أذ كانت النسبة في دراستهم (38.0%),وايضا متفقة مع الخالدي (2002) أذ كانت نسبة المقاومة لديه (41.0%) وكذلك تتفق لما توصل إليه العباسي (2000) أذ بلغت النسبة لديه (46.1%). بينما لم تتفق مع ما توصلت إليه Ali (2007) أذ كانت نسبته (81.0 %) وايضاً لم تتفق مع Reza وجماعة (2012) أذ كانت نسبة المقاومة لديه (21.0%) ,

اظهرت الدراسة الحالية نسبة (35.7%) لمضاد Cefdinir , اذ اتفقت هذة النسبة مع دراسة Al-(2009) Kuriashy أذ كانت نسبة المقاومة لديه (37.0%) , وايضاً متفقة لما جاء به الخالدي (2002) أذ كانت النسبة التي توصل إليها (31.1%) . بينما كانت غير متفقة مع العباسي (2000) الذي توصل إلى نسبة مقاومة (67.0%) وايضاً غير متفقة مع Reza وجماعة (2012) أذ بلغت نسبة المقاومة لديه (71.0%).

وقد بينت نتائج الدراسة الحالية هان نسبة (30.4%) لمضاد Ceftizoxim في هذه الدراسة , اذا كانت متفقة لما جاء به Reza وجماعة (2012) بينما لم تتفق مع Abdullah وجماعة (2009) أذ كانت نسبة المقاومة لديه (49.9%) وكذلك غير متفقة لنتائج Al-salamy , A. K(2012) أذ كانت النسبة التي توصل إليها (51.7%).

إذ يتميز الجيل الثالث بتأثيرهُ الدوائي الفعال في معالجة الأخماج الناتجة عن الإصابة ببكتيريا *E.coli* فضلاً عن امتلاك هذا الجيل تأثيراً علاجياً طويل الأمد قد يمتد إلى ما بعد إيقاف العلاج و لقد فسر Segreti وجماعة (1996) انخفاض المقاومة لهذه الجيل من المضادات في كونهُ من المضادات حديثة الاستخدام مقارنة بغيرهُ من اجيال مضادات السيفالوسبورينات كما ان استخدامهُ انحسر لمدة ثم اعيد استخدامهُ من جديد مما جعل البكتيريا اكثر استجابة لهُ في حين كان يعتقد Jawetz وجماعة (1998) ان السلالات المحلية لبكتيريا *E.coli* لم تطور مقاومة عالية تجاه هذا المضاد مقارنة بدول اوربا وامريكا الذي دخل هذا المضاد حيز الاستعمال فيها منذ بداية الثمانينات . اما بالنسبة لمضادات الجيل الثاني للسيفالوسبورينات كانت

حساسية العزلات البكتيرية لها متوسطة نسبيا أذ بلغت نسبة المقاومة (59.0%) لمضاد Cefaclor وهذه النسبة متفقة لما توصل إليه العباسي (2000) بأن نسبة المقاومة (60.2%) , وكذلك متفقة لما توصل الحسو (2006) أذ توصل إلى نسبة (57.2%) بينما لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Fakhriddeen (2011) الذي توصل إلى نسبة (84.4%), وكذلك غير متفقة مع .Yong وجماعة (2005) أذ توصل إلى نسبة (75.8%) في دراسة .

وقد بينت الدراسة الحالية نسبة مقاومة (60.8%) لمضاد Cefonicid وهذه النسبة متفقة مع العباسي (2000) بأن نسبة المقاومة لهذا المضاد هي (65.3%) وكذلك متفقة مع الحسو (2006) أذ بلغت نسبة المقاومة في دراسة (58.9%) , بينما جاءت غير متفقة مع دراسة Yong وجماعة (2005) أذ كانت النسبة لديه (77.4%) وايضاً لم تتفقمع Ali (2007) أذ توصل لنسبة (81.4%).

وكذلك بينت نتائج الدراسة الحالية للمقاومة نسبة (50.0%) لمضاد Cefprozil وهذه النسبة جاءت متفقة مع دراسة Yong وجماعة (2005) الذي توصل لنسبة (48.9%) كنسبة مقاومة لهذا المضاد الحياتي , بينما لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج .R, Reza وجماعة (2012) الذي توصل لنسبة مقاومة (71.8%).

ولقد جاءت نسبة (64.2%) من العزلات مقاومة لمضاد لمضاد Cefoxitin اذ تتفق مع الحسو (2006) أذ كانت نسبة المقاومة التي توصل إليها لهذا المضاد هي (65.2%) .بينما لم تتفق مع Fakhriddeen (2011) أذ كانت نسبة المقاومة هي (100%) وايضاً هذه النسبة لم تتفق مع حران (2012) أذ بلغت نسبته (34.6%) .

واخيراً نسبة (55.1%) لمضادCefmetazole أذ تتفق أذ النسبة مع دراسة Panhorta وجماعة (2000) الذي بين نسبة المقاومة لهذا المضاد في دراسة هي (57.8%) وكذلك متفقة مع دراسة Koujima (2001) الذي بين ان نسبة المقاومة في دراسة هي (58.0%) . بينما لم تتفق مع Panhorta وجماعة (2000) أذ توصل لنسبة (73.8%) مقاومة لهذا المضاد .

اما بالنسبة للجيل الاول فكانت نسبة المقاومة عالية أذ بلغت نسبة المقاومة لمضاد Cephalothi (78.6%) وهذه النسبة متفقة مع الخالدي (2002) أذ كانت نسبة المقاومة بين العزلات لديه (77.0%) وايضاً تتفق مع Al-Kuriashy (2009) أذ توصل لنسبة (79.3%),بينما لم تتفق مع Ali (2007) أذ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد (100%) .

وقد بينت نتائج الدراسة الحالية نسبة مقاومة المضاد Cefazolin هي (71.6%) أذ تتفق هذه النسبة مع Shafaq وجماعتة (2011) أذ توصل لنسبة مقاومة (74.2%) لهذا المضاد وكذلك متفقة لما مع Panhorta وجماعتة (2000) أذ توصل لنسبة مقاومة (69.7%), بينما لم تتفق مع دراسة Dharmishtha وجماعتة (2012)أذ كانت نسبة المقاومة في دراستة (91.9%). وكانت نسبة (69.7%) لمضاد Cephalexin وهي تتفق مع حران (2012) أذ توصل إلى نسبة (71.7%) لمضاد Cephalxin كذلك متفقة مع الحسو (2006) اذ بلغت نسبة في دراسته (76.0%) , بينما لم تتفق مع Ali (2007) أذ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد (87.0%) , وكذلك غير متفقة مع دراسة Gupta وجماعتة (2002) أذ كانت نسبة المقاومة في دراستة (41.0%).

واخيرا نسبة المضاد Cephadroxil (66.1%) وهذه النتائج متفقة مع دراسة مع Yong وجماعتة (2005) الذي جاءت نسبة المقاومة لهذا المضاد في دراستة (61.9%) , بينما كانت غير متفقة لما توصل إليه Dharmishtha وجماعتة (2012) أذ توصل لنسبة (38.0%), وايضاً اختلفت مع دراسة Panhorta وجماعتة (2000) الذي توصل لنسبة مقاومة (87.4%) لهذا المضاد.

ان العائلة المعوية غالباً ماتظهر مقاومة مرتفعه نسبياً لمضادات سيفالوسبورينات الجيل الاول، اذ ان هذه البكتيريا عادة ماتكون قد اكتسبت انزيمات المقاومة لمثل هذه المضادات بأذ اصبحت المقاومة لها ظاهرة شائعة ومتزايدة، وكذلك نتيجة الاستخدام المتزايد لمضادات هذا الجيل Bush,2001; Bradford , (1995).

أما بالنسبة لمضاد الجيل الرابع Cefepime (39.3%) أذ تعتبر نسبة متوسطة تقريبا وهذه النسبة تتفق مع الحسو (2006) أذ كانت نسبة المقاومة (42.1%). بينما تختلف عن ما جاء به حران (2012) أذ توصل إلى نسبة (36.1%) مقاومة لهذا المضاد , كذلك تختلف لما جاء به Dharmishtha وجماعتة (2002) أذ كانت النسبة التي تصل إليها مقاومة هذا المضاد في دراستة (20.0%).

تظهر هذه نسب المقاومة العالية التي تمتلكها هذه العزلات تجاه مضادات البيتالاكتام واسعة الطيف ولاسيما سيفالوسبورينات الجيل الثالث التي تمتاز بفاعليتها ضد مدى واسع من البكتيريا السالبة لصبغة غرام وهذا يشير بشكل واضح إلى مدى انتشار المقاومة لمثل هذه المضادات، اذ ان ذلك قد يفسر بكون آلية المقاومة التي تستخدمها هذه البكتيريا هي غالباً ماتكون انزيمات البيتالاكتاميز وبانواعها الغير متفقة والتي تكون فعالة ليس فقط ضد مضاد معين وانما ضد مجموعة من المضادات المرتبطة ببعضها من الناحية التركيبية (Knox, 1995; Matagne *etal*., 1998; Bradford, 2001).

5-5 :انتشار عوامل الضراوة

تم أستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR والمتعدد Multiplex PCR في التحري عن بعض المورثات المسؤولة عن عوامل الضراوة Virulent Factors في بكتيريا *E.coli*, ومن خلال استعمال قطع من الـDNA ذات عدد محدود من النيوكليوتايد (Oligonucleotide) والتي تعمل كبادئات (Primers) متخصصة لمورثات الضراوة في سلالة ال UPEC، والتي شملت مورثات كل من *tst,hly,iha,irp2,pap,afa* أذ تعتبر هذه المورثات من اهم انواع مورثات الضراوة لبكتيريا *E.coli* والتي تعتبر من المسببات المهمة لعدوى المجاري البولية المتكررة , كذلك فأن هذه المورثات لها دور كبير في استعمار البكتيريا لخلايا النسيج المبطن للمجرى البولي وبالتالي السبب في الاصابة القاسية (Soto, 2009).

أظهرت النتائج وجود (29) عزلة من اصل 30 وبنسبة (96.6%) أمتلاكها *hly* اذ تتفق مع ماجاء به Bahalo وجماعتة (2013) أذ كانت النسبة التي توصل لها (92.3%) .بينما يختلف مع Karemian وجماعتة (2012) بأن نسبة هذا المورث كانت (50.4%) من عزلات الـ *E.coli* امتلاكها لمورث *hly* وكذلك يختلف عن ما جاء به Tiba وجماعتة (2008) بأن نسبة (25.3%) من عزلات الـ *E.coli* تمتلك هذا المورث.

ويعتبر مورث *hly* عامل ضراوة مهم لبكتيريا *E.coli* المسببة لخمج المجاري البولية أذ يشفر لافراز بروتين السموم التحللية وبالتالي فان هذا البروتين او الانزيم لهُ القدرة في الحث على التحلل الاوزموزي لكريات الدم الحمراء لانهُ يعمل على ثقب الغشاء الخارجي للكريات الحمراء وان عدة انواع من بكتيريا *E. coli* لها القدرة على انتاج عدة انواع من بروتين الهيمولايسين يتضمن الهيمولايسين الخارج خلوي والمسمى α-hemolysin وهذا قيد الدراسة الحالية وبالتالي فهو عامل مهم جدا لخمج المجاري البولية وان هذه الانزيمات اكثر ذيفانية للخلايا الطلائية الانبوبية المكونة للكلية من العزلات غير المنتجة لهذا الانزيم اي العزلات التي لاتمتلك المورث *hly* المشفر لهذا الانزيم , وذكرت دراسات اخرى ان ذيفانيتة تتأتى من تدمير خلايا المجرى البولي وتحرير الانزيم الحال Lysozyme والانزيمات المرتبطة معهُ، وتدمير كريات الدم البيض والخلايا احادية النواة بشكل خاص(Karemian, 2012).

كما أظهرت (30) عزلة من اصل 30 و بنسبة (100%) أمتلاكها لمورث *irp2* اذ يتفق مع ما جاء به Bahalo وجماعتة (2013) أذ كانت نسبة امتلاك العزلات لهذا المورث (96.2%) بينما لم يتفق مع Hassan Momtaz وجماعتة (2013) التي كانت نسبة وجود هذا المورث في دراستة (32.0%) وكذلك تختلفعن ما جاء به Karemian وجماعتة (2012) اذ اظهر امتلاك (11.4%) من عزلات *E.coli* امتلاكها لهذا المورث.

ولمورث *irp2* اهمية كبيرة في مساعدة البكتيريا في اخذ الحديد وخزنه لاستخدامه في الظروف اللاهوائية أذ يشفر هذا المورث لانتاج السايدروفور , يعد انتاج السايديروفور (وهي مجموعة من الحركيات التي لها الفة عالية للحديد وذات اوزان جزيئية واطئة وتمتلك الفة كافية لأن تحول الحديد إلى حالتهُ السائلة او سحبهُ من

المعقدات الحاوية عليه ثم تسهل عملية نقلهُ إلى داخل الخلية البكتيرية بوساطة مستقبلات خاصة) عامل فوعة مهم عن طريقه تستطيع البكتيريا الممرضة مقاومة البروتينات الناقلة للحديد داخل جسم المضيف إذ يكون الحديد ضروري لتضاعف أعداد البكتيريا وهي خطوة مهمة للاستعمار (Livermore, 2001).

كما اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود (9) عزلة من اصل 30 و بنسبة (30.0%) أمتلاكها لمورث *afa* اذ تتفق مع ما جاء به Bahalo وجماعتة (2013) أذ توصل لنسبة (34.3%) المورث يختلف عن ماجاء به Karemian وجماعتة (2012) أذ كانت لهذا النسبة التي توصل لها (8.2%) من العزلات امتلاكها لهذا المورث.

ويعد هذا المورث احد مورثات الاهداب التي تساعد البكتيريا في الالتصاق وبالتالي اجتياح النسيج البطاني للمسلك البولي أذ يشكل الالتصاق الخطوة الاولى في تموقع البكتيريا وتمركزها ومن ثم تكاثرها وبالتالي احداث الاصابة (Wult & Connell, 2000.) , ففي بعض الاحيان هناك لاصق واحد يظهر ويكون لهُ الدور المهم في احداث المرض , وفي احيان اخرى فإن المسبب المرضي يكون لهُ القدرة على انتاج عدة انواع من اللواصق الغير متفقة وعلى مراحل مختلفة من الاصابة كما في بكتيريا *E.coli* .

بينما أظهرت (4) عزلات فقط من 30 و بنسبة (10.0%) من العزلات أمتلاكها لمورث *iha* اذ يتفق مع ما توصل إليه Bahalo وجماعتة (2013) أذ كانت النسبة التي توصل إليها (13.8%) بينما لم يتفق مع Karemian وجماعتة (2012) أذ توصل لنسبة (17.9%).

و يعد مورث *iha* هو المورث المسؤول عن تكوين المحفظة التي تساعد البكتيريا على الالتصاق بالجدار الطلائي لنسيج المجرى البولي وكذلك للمحفظة اهمية كبيرة في مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية كما ان وجود المحفظة يجعلها مقاومة لعملية البلعمة بوساطة كريات الدم البيض (Karemian, 2012).

واظهرت الدراسة الحالية امتلاك (11) عزلة من 30 بنسبة (36.6%) بالنسبة للمورث *pap* بينما يتفق مع Usein وجماعتة (2001) أذ كانت النسبة (36.0%) لمورث *pap* وكذلك يتفق مع Tiba وجماعتة (2008) أذ توصل لنسبة (32.7%) وايضاً متفق مع Bahalo وجماعتة (2013) أذ كانت النسبة التي توصل إليها (30%) لهذا المورث بينا يختلف مع Hae-Kyung وجماعتة (2011) أذ توصل إلى نسبة (91.0%) .

ويعتبر هذا المورث مهماً بالنسبة لضراوة بكتيريا *E.coli* أذ لضمان حصول المرض لابد للبكتيريا من ان تمتلك القدرة على الوصول إلى النسيج او العضو الملائم ومن ثم استعمار المنطقة وهذا لهُ علاقة بقدرة هذه البكتيريا على اختراق الاغشية المخاطية واجتياح جسم المضيف وبالتالي فان اجتياح النسيج يبدأ من قدرة هذه البكتيريا على الالتصاق بواسطة الخمل النوعي الذي تمتلكه هذه البكتيريا وارتباطهُ بمستقبلات نوعية توجد في الخلايا الطلائية المبطنة للغشاء المخاطي في منطقة الاصابة و بسبب ارتباط المورث *pap* مع P-fimbriae الاهداب التي تساعد البكتيريا على الالتصاق بالخلايا البطانية لنسيج المجرى البولي أذ تعتبر

خطوة الالتصاق اول خطوة تقوم بها البكتيريا للغزو النسيجي ويعتبر الخمل النوعي P من الانواع المهمة التي تساعد البكتيريا على الالتصاق أذ يعتبر مورث *pap* المسؤول عن التشفير للخمل P من عوامل الامراضية المهمة لاحداث المرض وخصوصاً في المجاري البولية Knobl وجماعتة (2004) اذ يعطي البكتيريا القدرة على الالتصاق بالخلايا الطلائية وتلزين كريا الدم الحمراء للانسان مرتبط بقدرتها على التسبب بخمج المجاري البولية (Karemian, 2012).

6-5 :الدراسة المناعية

تم في هذه الدراسة قياس بعض المؤشرات الالتهابية التي لها علاقة في حالة خمج المجاري البولية, أذ تم قياس مستوى السايتوكينات Interleukin 6 و Interleukin 8 وكذلك عامل تنخر الورم نوع الفا Tumor Necrosis Factor -Alpha , اذ تعتبر سايتوكينات استجابة اولية للخمج حيث ترتفع مستوياتها في الدم في الحالات الحادة للخمج الى مستويات عالية وترتبط مستوياتها مع حدية وضراوة المرض اذ تزداد مع زيادة ضراوة الخمج ومدى تأثيره على النسيج المصاب وشدة الاصابة أذ ترتبط هذه العوامل ارتباط كبير في هذه الحالة الخمجية كاستجابة مناعية من قبل الجسم للاصابة , أذ تنخفض نسبة السايتوكينات (IL-6 و IL-8) في اول 6 ساعات من الاصابة البكتيرية في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية Hedges *et al.*, 1992), بعد مرور 6 ساعات من دخول المسبب الخمجي تبدأ مستويات السايتوكينات (IL-6و IL-8) بالارتفاع في مصول المرضى كاستجابة مناعية من قبل الجسم ضد الاصابة البكتيرية أذ تعتبر بمثابة انذار او تنبيه يقوم به الجهاز المناعي عند حدوث الاصابة أذ تشبه بالوسيط الهُرموني الذي يتم افرازهُ عند حدوث خمج او تلف نسيجي (Jones *et al.* , 2001).

أظهرت نتائج الدراسة ألحالية ارتفاع كبير في مستوى (IL-6) كمؤشر للخمج وهذا يتوافق مع ما جاء به Abolfazl وجماعتة (2013) أذ بين ارتفاع كبير في مستويات IL-6 في مصول الاطفال حديثي الولادة المصابين بخمج المجاري البولية الحاد, وكذلك يتفق مع ما جاء به Emmanuel وجماعتة (1999) الذي بين ارتفاع مستوى IL-6 إلى مستويات عالية لدى المرضى المصابين بخمج المجاري البولية المراجعين إلى شعب الطوارئ في المستشفيات وكذلك يتفق مع دراسة Abdulmohymen وجماعتة (2010) الذي اكد ايضاً ارتفاع مستوى IL-6 في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية المزمن وكذلك المصابين بخمج المثانة الحاد, بينما لم نجد دراسة تختلف مع دراستنا الحالية.

للانترليوكين ٦ دوركبير في العديد من الفعاليات البايولوجية في وله تأثير في مدى واسع من الخلايا اذ يوجد في المصل وبقية السوائل الجسمية حيث يكون وجوده مرتبط مع الاصابات القاسية مثل الحروق والالتهابات والاصابات العامة وان الاصابة بالبكتيريا السالبة لصبغة غرام تحفز لانتاج مستويات عالية من الانترليوكين ٦ في المصل اذ يستخدم كدلائل للمرض المتسبب عن البكتيريا اذ يلعب IL-6 عند ارتفاعه دورا هاماً في تسريع معدل نمو خلايا النسيج التالف نتيجة الاصابة الخمجية للخلايه الظهارية للنسيج من خلال

التسريع عمل الخلايا المولدة للخلايا البطانية اذ له دور في تحفيزها وتسريع عملية الانقسام وكذلك له دور في تحفيز الاستجابة المناعية ضد الاصابة البكتيرية من خلال تحفيز خلايا البلعم الخلايا القاعدية وبقية انواع الخلايا المناعية وحثها للوصول الى منطقة الاصابة وكذلك له دور كبير في التفاعلات الكيموحيوية والفسلجية بالاضافه الى المناعية (Okamoto & Oyasu ,1996), وفي معظم الدراسات التي درست هذا المجال اكدت ارتفاع مستويات IL-6 ويكون مرتبطاً مع حدية وقساوة المرض (Jones *et al.* , 2001).

واثبتت الدراسة الحالية ارتفاع مستوى السايتوكين IL-8 ايضاً في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية بشكل كبير وملحوظ وهذا يتفق مع العديد من الدراسات في هذا المجال ومنها دراسة Abolfazl وجماعتة (2013) الذي بينت ارتفاع كبير في مستوى IL-8 في مصول الاطفال حديثي الولادة المصابين بخمج المجاري البولية الحاد .

وكذلك جاءت نتائج الدراسة الحالية متفقة لما جاءت به Mohkam وجماعته (2008) التي اكدت ارتفاع نسبة IL-8 في عينات المصل والإدرار لدى المرضى المصابين بخمج المجاري البولية إلى مستويات عالية وكذلك يتفق مع دراسة Horcajada وجماعتة (2004) الذي اكد ارتفاع مستويات IL-8 إلى مستويات عالية لدى النساء المصابات بخمج المجاري البولية الحاد اثناء مدة استخدامهن للمضادات الحيوية , ويعتبرIL-8 سايتوكين خمجي يتم افرازهُ اثناء الامراض المعدية والخمجية من عدة انواع من الخلايا المناعية منها الخلايا البلعمية والخلايا الوحيدة والخلايا المولدة للالياف والخلايا التحت الطلائية والوظيفة الاساسية له هو تحفيز الخلايا المناعية polymorphonuclear leukocyes أذ يعتبر كدليل ينتج من قبل الجهاز المناعي يدل على حدوث الخمجات ويرتبط مع شدة المرض أذ يرتفع إلى مستويات عالية جدا في الحالات الحادة من الاصابات البكتيرية الخمجية اذ يحفز الخلايا المناعية المتعددة النواة الى التجمع في منطقة الاصابة لتقوم بمهامها للتخلص من الاصابة في حالة الاصابة الحادة (Diepold *et al* , 2008).

وقد بينت الدراسة الحالية ارتفاع عامل تنخر الورم نوع الفا (TNF-α) ايضاً إلى مستويات عالية في مصول المرضى المصابين بخمج المجاري البولية وقد جاءت نتائج الدراسة الحالية متفقة للعديد من الدراسات ومنها دراسة Mohkam وجماعتة (2008) الذي اكد ارتفاع نسبة TNF-α بشكل كبير وملحوظ عند المرضى المصابين بخمج المجاري البولية الحاد والمزمن , كذلك جاءت نتائج الدراسة الحالية متفقة ايضاً مع ما جاء به Horcajada وجماعتة (2004) الذي بين ارتفاعاً مستوى TNF-α إلى مدى كبير لدى النساء المصابات بخمج المجاري البولية الحاد اثناء مدة العلاج باستخدام المضادات الحيوية كذلك جاءت متفقة مع دراسة Mohkam وجماعتة (2009) الذي اكد ارتفاع نسبة TNF-α لدى الاطفال المصابين بخمج المجاري البولية الحاد.

عند حدوث الاصابة البكتيرية او الفايروسية فمن المتوقع مبدئيا أن يتم الاعتماد على الخلايا المناعية الذاتية مثل الخلايا الالتهامية Macrophages والخلايا الحبيبية Granulocytes وتتحفز

هذه الخلايا بمساعدة السايتوكين TNF-α الذي يحفز على بناء هذه الخلايا وتوجهها إلى منطقة الاصابة (Davidoff *et al* , 1997), كذلك فان TNF-α يحفز على انتاج اوكسيد النتريك الي يساعد في بناء الخلايا الشيجيرية Dendritic Cells التي تتجه إلى المثانة والمجاري البولية في حالة الاصابة والخمج وان TNF-α سرعان ما ينتشر داخل المثانة وبقية اجزاء الجهاز البولي كجزء من المناعة الذاتية ضد الاصابات البكتيرية والفايروسية أذ توجد مستقبلات خاصة للسايتوكينات توجد على سطوح الخلايا المصابة (Engel *et al*. , 2006) .

الاستنتاجات Conclusions:

1- بكتريا *E.coli* أكثر الأنواع البكتيرية المسببة لاخماج المجاري البولية .

2- الإناث أكثر عرضة للاصابة بخمج المجاري البولية من الذكور.

3- كانت الفئة المتوسطة وفئة الشيخوخة هما اكثر الفئات العمرية عرضة لأخماج المجاري البولية يأتي بعدها بالمرتبة الثانية فئة الشباب واخيراً فئة الاطفال والمراهقين تأتي بالمرتبة الثالثة من ناحية الاصابة.

4- ان مضادات الجيل الثالث للسيفالوسبورينات هي الاكثر حساسية واقل مقاومة من بقية اجيال السيفالوسبورينات من قبل بكتريا *E.coli* لذلك يعتبر الجيل الثالث هو افضل الاجيال الاخرى في معالجة اخماج المجاري البولية.

5- يعد جين *irp2* المسؤول عن اخذ الحديد هو اكثر الجينات قيد الدراسة المسببة لخمج المجاري البولية يأتي بعدهُ جين *hly* المسؤول انتاج انزيم الهيمولايسين بالمرتبة الثانية بين جينات عوامل الضراوة قيد الدراسة.

6- أظهرت تقنية الـ Multiplex PCR نتائج مميزة من حيث السرعة وتقليل الوقت في اعطاء النتائج الخاصة بجينات عوامل الضراوة مقارنة باستعمال تقنية الـ Single PCR .

7- ارتفاع مستويات (Interleukin -6 , Interleukin -8 , Tumor Necrosis factor-α) كمؤشرات التهابية لمستويات عالية لدى المرضى المصابين بخمج المجاري البولية.

التوصيات Recommendations:

1- يفضل استعمال تقنية الـ Multiplex PCR عند التحري عن أكثر من جين (جينات متعددة وموجودة في نفس النوع او السلالة البكتيرية) مسؤول عن عامل ضراوة او مقاومة لمضاد حيوي معين .

2- يجب عمل اختبار الحساسية الدوائية قبل التداوي بها حيث ان اخذ المضادات الحياتية بصورة عشوائية يؤدي الى ظهور سلالات مقاومة وكذلك تؤدي الى قتل النبيت الطبيعي التي لها دور كبير في حماية الجسم من الامراض عن طريق تثبيط نمو الكائنات الممرضة .

3- اعتماد قياس بعض المؤشرات الالتهابية والمتضمنة السايتوكينات في مصول المرضى واستخدمها كمؤشرات لحدوث الاخماج الناتجة عن الإصابات البكتيرية.

المصادر العربية :

الحسو، محمود زكي سليمان سلطان.(٢٠٠٦). استخلاص وتنقية انزيمات البيتالاكتاميز من بعض العصيات السالبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات الجهاز التنفسي السفلي ودراسة بعض خصائصها. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم , جامعة الموصل.

الجبوري، محيميد مدا الله. (١٩٩٠). علم البكتريا الطبية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

الخالدي , بهيجه عبيس حمود. (٢٠٠٢). دراسة حول البكتريا الهوائية المسببة لعدوى المستشفيات ومقاومتها للمضادات الحياتية والمطهرات.رسالة ماجستير ,قسم علوم الحياة ,كلية التربية , جامعة القادسية .

العابدي، هدف مهدي كاظم.(٢٠٠٢). عزل وتشخيص البكتريا الهوائية المشاركة في خمج السبيل البولي لاطفال مدينة الديوانية وحساسيتها لبعض مضادات الحياة. رسالة ماجستير, كلية التربية, جامعة القادسية.

العباسي, انعام جواد مطرود .(٢٠٠٠). دراسة لخمج المسالك البولية البكتيري لدى الاطفال في محافظة النجف رسالة ماجستير, كلية القائد للتربيه للبنات ,جامعة الكوفة.

حران , عمر حسين. (٢٠١٢) .التحري عن جينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام من البكتريا المعزولة من بعض الاصابات السريرية في الديوانية. رسالة ماجستير , كلية العلوم , جامعة القادسية .

ال اسماعيل , وجيهه عبد الكريم محمد.(٢٠٠٥). البكتريات المسببة لالتهاب المسالك البولية خاصة ايشرشيا كولاي ونمط مقاومتها للمضادات الحياتية في المملكة العربية السعودية . رسالة ماجستير, قسم النبات والاحياء الدقيقة , كلية العلوم , جامعة الملك سعود .

- **A**bdullah, A. M. ; Abdullah, R. M. and Salman , S. L.(2009). Useof chromogenic Agar in detection of urinary tract pathogens and antimicrobial Susceptibility. *J. Fac. Med Baghdad*. **51**:39-42.
- **A**bdulmohymen, N.; Khodher, A. and Ashoor, Z. F.(2010). Serum interleukin-6 level using ELISA in patients with bladder cancer and having urinary tract infection . *Iraqi J. Comm. Med.***4**: 251-256.
- **A**bolfazl, M.; Parviz, A.; Mohammad, R. M. *et al* .,(2013). Serum levels of interleukin-6 and interleukin-8 as diagnostic markers of acute pyelonephritis in children. *Korean J. Pediatr.* **56**(5):218-223.
- **Abrahams, H.M. and Stoller, M.L.** (2003) **.** Infection and urinary stones.Curr Opin Urol, **13**(1):63 – 67.
- A**bu Daia, J. M. ; Al-Aaly, M. A. and De Castro, R.** (2000). Urinary tract infection in childhood. *Saudi Medical J.* **21**: 711-714.

- **A**

derka, D. (1996).The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. Cytokine Growth Factor Rev. **7**:231-240.

- **A**

gace , W.W. ; Hedges , S.R. ; Ceska, M. and C. Svanborg *et al*., (1993) .Interleukin-8 and the neutrophil response to mucosal gram-negative infection. *J. Clin. Invest*. **92**: 780–785.

- **A**

ggarwal , B.B. and Pocsik E.(1992). Cytokines: From clone to clinic. Arch. Biochem. Biophys. **292**: 335–359.

- **A**

kbar, D. H. (2001). Diabetics and non- diabetics patients. *Saudi Medical J.* **22**(4): 326-329.

- **A**

l Mugeiren, M. M. ; Al Rasheed, S. A. ; Abdulrrahman, M. B. *et al* ., (1992). Are childrenwith urinary tract infection adequately managed. *Saudi Medical J.* .**13**(4): 300-304.

- **A**

lbert, B. and Sussman, M. (1998). Microbiology, and microbial infections, ninth edition, Oxford University Press, Inc., New York.

- **A**

lekshun, M. N. and Levy, S. B. (1997). Mini review: Regulation of chromosomaly mediated multiple antibiotics resistance. Antimicrobial agents chemotherapy. **41**:2067-2075.

- **A**

L-Hadithi , H. A. (1996) .Urinary tract infection in Ramadi city : A bacterio-logical study . *J.AL-Anbar uriv* **1** (1) : 76 – 81 .

- **A**

  li J. Fakhriddeen .(2011). Occurrence of *Escherichia coli* in Patients with Urinary Tract Infections in Najaf City. *Kufa. J. Veterinary Medical Sciences*. **2**: 19-29.

- **A**

  li, Z.M. (2007). A Bacteriological and genetic study of Enteropathogenic *E.coli* in AL-Najaf AL-Ashraf Governorate . *Kufa. J. Veterinary Medical Sciences*.**3**:100-140.

- **A**

  l-Kuriashy, J.H. Al-Thwani, A. N. and Khaki , I. A.(2009). Phenotypic dete-ction of some virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from recurrent urinary tract infection patients.Mse . sciences college.AlKufa university .

- **A**

  l-salamy , A. K. (2012). Detection of extended spectrum-beta lactamase enzymes producing *E. coli* that isolated from urine. Kufa. J. Veterinary Medical Sciences .**3**: 55-66.

- **A**

  valos, G. A. ; Silva , M. L. Z. ; Nova, A. D. *et al* .,(1999). Asymptomatic Bacteriuria and Inflammatory Response to Urinary Tract Infection of Elderly Ambulatory Women in Nursing Homes. Archives of Medical Research **30** : 29-32 .

- **A**

  yazi, P.; Moshiri, S.A.; Mahyar, A. and Moradi, M.(2003). The effect of vitamin A on renal damage following acute pyelonephritis in children. Eur J Pediatr.**170** : 50-347.

- **B**

  achur, R. and Caputo, G. L. (1995). Bacteremia and meningitis among infants with urinary tract infections. Pediatr. Emerg. Care **11**:280–284.

- **B**

  ahalo, S. ; Elahe,T. ; Tajbakhsh, S. *et al* ., (2013). Detection of Some Virulence Factors of *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection Isolated of Children in Shahrekord Iran by Multiplex PCR. *Middle-East J. of Scientific Research* **14** (1): 29-32.

- **B**

  aron, E.J. ; Peterson, L.R. and Finegold , S. M. (1994) . BaileyandScott's Diagnostic Microbiology .9th.ed. Mosby-Year Book .Inc..U.S.A.

- **B**

  arr, J. G. ; Ritchie, J. W. ; Henryo, O. *et al.*, (1995). Microaerophilic \ anaerobic bacteria as a cause of urinary tract infection in Pergnacy. *Br. J. Obstet Gynaeco* **l 92**: 506-1000 .

- **B**

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

- **B**

  atalla, M. A. ; Balodimos, M. C. and Bradley, R. F. (1999). Bacteriuria in diabetes mellitus. Diabetologia **7**: 297-301.

- **B**

  auer, A.W.; Kirby, W. A. M.; Sherris, J. S. and Turk, M. (1966) . Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method . *Am.J.Clin.Pathol*. **45**: 493-496.

- **B**

  erman, M.; Singh, J. ; Arrieta, A. *et al.*, (2001). Cytokine Profiles of Pediatric Patients Treated with Antibiotics for Pyelonephritis: Potential Therapeutic Impact *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8(6):1060. DOI: 10.1128/CDLI .8.6. 1060-1063.

- **B**

ert , F . and Lambert , Z . N . (1999). Cument microbiological problems antibiotic Resistance and therapeutic proplems raised by *E.coli* . Press , med . **28** : 451 .

- **Bethesda, A**. (2002). Urinary tract infection in adults. NIH Publication . 2-2097.

- **Bhat, R.G.; Katy, T.A. and Place, F.C.** (2011). Pediatric Urinary Tract Infections. Emergency medicine clinics of North America. **29**(3): 637–653 .

- **B**

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

- **B**

ollgren, I. and Winberg, J. (1999). The periurethral aerobic flora in girls highly susceptible to urinary infections. Acta Paediatr Scand .**65**(1): 81-87.

- **B**

olton , C.H.; Downs, L.G. ; Victory, J.G. *et al*. (2001). Endothelial dysfunction in chronic renal failure: Roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. Nephrol .Dial. Transplant. **16** : 1189–1197.

- **B**

radford, P.A.(2001). Extended-spectrum β- lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*.**14**: 933-51.

- **B**

rooks, G.F. ; Butel, J.S. and Morse, S.A.(2001). "Jawetz, Melnickand Adelberg's Medical Microbiology". 22nd ed., Lange Medical Books/ McGraw-Hill Inc., U.S.A.

- **B**

rown, D. F. J.; Edwards, D. I.; Hawkey, P. M. *et al.,* (2005). Behalf of

the joint working party of the britis guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing cephalosporins-resistant *E.coli* . *J. Antimicrob. Chemother*. **56** (6): 1000-1018.

- **Bush, K.; Jacoby G. and Medeiros , A.** (1995). A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother **39**: 1211-1233.
- **Cabral, J.P.S. (2010).** Water Microbiology. Bacterial Pathogensand Water. Int. *J. Environ. Res. Public Health*. 7: 3657–3703.
- **Cavallo, J. D.; Fabre, R.; Leblanc, F. *et al*.,** (2000). Antibiotic susceptibility and mechanisms of β-lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa* : a French multicentre study (1996). *J. of Antimicrobial Chemotherapy* . **46**: 133–6.
- **Cawthorn, W.P. and Sethi, J.K.**(2008). review TNF-α and adipocyte biology . FEBS Left **. 582**:117-131.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. (2007). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997-1999. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 1999. **48** (32): 707-710.
- **Chang, S.L. and Shortliffe ,L.D.** (2006). Pediatric Urinary Tract Infections. Pediatr. Clin. North Am. **53**(3):379–400 .

- **C linical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. (2010) .Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M 100-S20.Wayne. Pannsylvannia .**30** (1).
- **Coker, C.; Poore, C.A.; Li ,X . and Mobley, H.L.** (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. Microbes Infect, **2**(12):1497-1505.
- **C ollee, J.G., Marmion, B.P, Fraser, A.G. and Simmons, A**.(1996). Mackie and McCarthy–Practical Medical Microbiology. 4th ed., Longman Singapore Publishers (Pte) Lt. Singapore pp **3** : 61 – 381.
- **C urfs, J.H.; Meis, J.F. and Hoogkamp-Korstanje , J.A.**. (1997). A primer on cytokines: source, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol* .**266**: 742–780.
- **D avidoff, R. ;Yamaguchi, R. ; Leach, G.E. *et al*.,** (1997) .Multiple urinary cytokine levels of bacterial cystitis. *J. Urol*. **157**: 1980-50.
- **D e-Aguia, L. G. ; Carneiro, J. R. ; Ginzbarg, D. *et al.*,** (1997). Infections in hospitalized diabetics. Rev Assoc. Med. Bras. **43**: 314-318.
- **D elzell, J. E. J. R. and Lefevre, M. L.** (2000). Urinary Tract Infections During Pregnancy American Family Physician. www. aafp. org/afp/20000201/713. html.
- **D harmishtha, T.; Paragi , G. and Kiran , P.**(2012). A study on antibiotic related resistance UTI patient : Comparison between acquired and hospital *E.coli* . *N. J. of Community Medicine*. **3**:255-258.

- **Diepold, M. ;Noellke, P. ; Duffner, U. *et al.*,** (2008).Performance of interleukin-6 and interleukin-8 serum levels in pediatric oncology patients with neutropenia and fever for the assessment of low-risk. BMC Infect. Dis .8:28.
- **Donta , S . T . ; Peduzzi , P. ; Cross , A . S . *et al*** (1996) Immu-nopro phylaxis against *Klebsiella* and *E.coli* . *J . Infect . Dis* . **174** : 537 – 543 .
- **Dontas , A. S. ; Papanayiotou, P. ; Marketos, S. *et al*.,** (1997). Bacteriuria in old age. **2**: 305.
- **Dzidic, S.; Suskovic , J. and Kos, B.**(2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria. biochemical and genetic aspects. **46**: 11-21.
- **Elder, J.S**.(2004) .Urinary disorders in infantsand children,In: Nelson Textbook of Pediatrics, Behrman, R.E.; Kleigman, R.M.; Jenson, H.B.(eds), 17th ed. , Saunders, New Delhi.
- **Elvis ,A.Wand Feneley ,R.C.** (1997) **.**Long term urethral Catheterization and the urine bio-material interface .*British* . *J. urol* . **80** :1-5 .
- **Emdy, L. ; Kerenyi, M. and Nagy, G**. (2003). Virulence factors of Uropathogenic *E. coli*. *International J. of Am*. Ag. **22**(2): 29-33.
- **Emmanuel, R.; Fotis, P.; Elias, G. *et al*.,**(1999). Increased Urine Interleukin-6 Concentrations Correlate with Pyelon-ephritic Changes on 99mTc-Dimercaptosuccinic Acid Scans in Neonates with Urinary Tract Infections. *J. of Infectious Diseases*. **180**:955-997.

- **E**

ngel, D. ; Dobrindt, U.; Tittel ,A. ***et al.*** (2006).Tumor necrosis factor alpha- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance. Infect Immun. **74**: 6100-7.

- **E**

wers ,C. ; Janssen, T.; Kiessling, S. ***et al.,*** (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. Avian Dis. **49**:269-273.

- **F**

air, W. R. (1999). Observations on the origin of urinary tractinfections. In: Kincaid-Smith, P. E. Ferley, K. F., eds: Renal Infections and Renal Scarring. Mercedes 1999 pp. 98-123.

- **F**

erguson, D. (2007). A study of clinical strains of Pseudomonas aeruginosa and the investigation of antibiotic resistancent mechanisms in the multi drug resistant strain PA13 Ph.D. Thesis School of Biotechnology and National Institute for Cellular Biotechnology, Dublin City Univercity.

- **F**

orbes, B. A. ; Sahm, D. F. and Weissfeild, A .S. (2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby, USA. pp: 323.

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

- **F**

uda, C.; Hesek, D.; Lee, M.; Heilmayer, W. ***et al.,*** (2006). Mechanistic basis for the action of new cephalosporin antibiotics effective against

methicillin-and vancomycin-resistant Staphyloccocus aureus. *J. Biol. Chem.* **281**: 10035-10041.

- **F**

uda, C.; Suvorov, M.; Vakulenko, S. B.; and Mobashery, S. (2004). The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin binding protein 2a of methecillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **279**: 40802-40806.

- **F**

unfstuck, R. ; Wolfram, M. ; Gerth, J. *et al* ., (1999). The influence of ofloxacin on the parasite-host inter-relationship in patient with chronic urinary tract infection. *International J. of Antimicrobial Agents*. **11**: 279-303.

- **F**

unfstuck, R., *et al*. (2001). Secretion of cytokines by uroepithelial cells stimulated by Escherichia coli and Citrobacter spp. Int. *J. Antimicrob. Agents* **17**:253–258.

- **G**

abay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res.**8**(Suppl. 2):S3.

- **G**

ebre-Seassie, S. (1998). Asymptomatic bacteriuria in pregnancy: epidemiological approach. *Ethiop Med. J*. **36**: 185-192.

- **G**

loria ,Y.F.; Xiao-Nan, X. ; Robert, D. *et al* .(2005). Variability of serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6, and soluble interleukin 6 receptor over 2 years in young women .Cytokine, **30**: 1-6.

- **G**

oicoechea, M. ; Martin, J. ; de Sequera, P. *et al* . (1998). Role of

cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. Kidney Int.**54**:1337-1343.

- **G**

reer,N.D. (2006). Tigecycline (tygacil): the firstin the glycylcyclineclass of antibiotics.proc, (Bayl univ med cent) .**19**(2): 55-61.

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

- **G**

upta, V .; Yadav, A . and Joshi, **R.M.** (2002). Antibiotic resistance pattern in uropathogens.*India J. of M. Micro*.**20**(2): 96-98.

- **H**

ae-Kyung, P.; Woo, S.; Lee1, E. *et al.*, (2011). *Escherichia coli pap* Genes as well as Adenovirus Type 11 and Type 21 , and BK Virus were Involved with Severe Urinary Tract Infection in Infants. *J. of Bacteriology and Virology*.**41**:245-254.

- **H**

alonen, S. ; Chiu, K. and Weiss, M. (1998). Effect of Cytokines on Growth of *Toxoplasma gondii* in Murine Astrocytes. Infection and immunity. **66**(10): 4989–4993.

- **H**

ang, L. B.; Wullt, Z. X.; Shen, D. and Svanborg. **C.** (1998). Cytokine repertoire of epithelial cells lining the human urinary tract. *J. Urol.* **159**:2185–2192.

- **H**

aslett, C., Chilvers , E.R., Hunter , J.A .A. and Boon , N.A. (1999).

Davidson`s principles and Practice of medicine .18th ed. Churchill Livingstone, New York .P. 458-470 .

- **Haslett**, **C.; Chilvers, E.R. ;Hunter ,J.A. and Boon,N.A(1999).** Davidson sprinciples and practice of medicine. 18th ed. U.K.
- **H assan, M.; Azam, K. ; Mahboobeh, M. *et al.*,** (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distrib-utions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Department of Microbiology, ShahreKord Branch, Islamic Azad University, P.O. Box: 166, ShahreKord, Iran.
- **H edges , S.; Anderson , P. ; G. Lidin-Janson ; P. de Man and C. Svanborg.** (1991). Interleukin-6 response to deliberate colonization of the human urinary tract with Gram-negative bacteria. Infect. Immun. **59**:421–427.
- **H edges, J.C. ; Singer, C.A. and Gerthoffer, W.T.** (2000). Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **23** (1): 86–94.
- **H edges, S. K. ;Stenqvist, G ; Lidin-Janson, J . *et al.*, (**1992). Comparison of urine and serum concentrations of interleukin- 6 in women with acute pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria . *J. Infect. Dis*. **166:**653–656.
- **H edstrom, M. ; Grondal, L. and Ahl, T.** (1999). Urinary tract infection in patient with hip fractures Injury. *J. Fam. Parct*. **30** (5): 341-343.

- **Heinrich, P.C. ; Castell, J.V. ; Andus, T. *et al*** . (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. **265**:621-636.
- **Heinrich, P.C.; Behrmann, I.; Müller-Newen, G. *et al***.(1998). Interleukin-6 type cytokine signalling through the gp130 . *Biochem. J*. **334**: 297–314.
- **Hoberman , A . and Wald, E.R.** (1997) Urinary tract infections in young febrile children pediatr infect . *Dis . J.* **16** (1): 11-7.
- **Holt , J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, H. A.; Stanley, J. T.; and Williams, S.T.** (1994). Bergeys manual of determinative bacteriology. 9th ed., Baltimore; Wiliams and Wilkins, USA.
- **Holt, J. G. ; Krieg, N. R. ; Sneath, P. H. A. ; Staley, J. T. and Williams, S. T.** (2000). Bergey's manual of determinative bacteriology– 9th ed. Library of Congress Cataloging-in- Publication Data.
- **Hooten, T.M. (2000).**Pathogensis of urinary tract infection: an update. J. Antimicro. Chemother., **45** (1):1-7.
- **Hooton, T. M. and Stamm, W. E. (**1997). Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis. Clin. North Am*. **11**: 551-581.
- **Hooton, T.; Steapleton, A. and Roberts, P**. (2001). Perineal anatomy and urine-voiding characteristics of young women with and without recurrent urinary tract infections. Clin Infect Dis., **29**:1600.

- **Howes, D.S**. (2002). Urinary Tract Infection, Female. Medicine.www.emedicine.com/EMERG/topic 626.htm.
- **Huland, H. and Busch, R.** (1984). Pyelonephritic scarring in 213 patients with upper and lower urinary tract infections: long term follow-up. J. of Urology 132: 936-939.
- **Hunter, C.; Subauste, C. and Remington, J.** (1994). The role of cytokines in toxoplasmosis. Biotherapy.**7**: 237-47.
- **Ishtoya and Satoshi** .(2003). Distribution of Afae Adhesins in *Escherichia coli* isolated from Japanese patient with urinary tract infection *.J. of urology*. **169**(5) : 1758-1761.
- **Jacoby GA. and Munoz-Price LS.** (2005). The new beta-lactamases**.** *N Engl. J. Med.* **352**(4): 380-91.
- **Jawetz, E.; Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A.** (1998). Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 21st ed., Appleton and Lange, California, U.S.A.
- **Johnson , J.R. ; Russo, T.A. ; Tarr ,P. I. ; Carlino, U. ; Bilge ,S.S. ; Vary, J.C. and Stell, A.L.** (2000). Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN* (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. Infect. Immun. **68** :3040-3047.
- **Jones S.A., Horiuchi S., Topley N., Yamamoto N., Fuller G.M**.(2001)

.The soluble interleukin-6 receptor :mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*. **15**:43-58.

- **K**

aizu, Y.; Kimura, M.; Yoneyama ,T. *et al*. (1998).Interleukin-6 may mediate malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 31:93-100.

- **K**

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

- **K**

ang, K.M.; Choi, I.U.; Shin, D. W. and Lee, Y.H., (2006). Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamathasone. *Korean J. Parasitol*. **44** (3): 19-209.

- **K**

arimian1, A. ; Momtaz, H. and Madani , M. (2012). Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *African J. of Microb. Res*. **6**(39): 6811-6816.

- **K**

arkkainen, U-M. ; Kauppinen, J. ; Ikaheimo, R. ; Katila, M. L. and Siitonen, A. (1998). polymerase chain reaction. *J. of Microb. Methods* .**34**(1): 23-29.

- **K**

ass, E. H. (1998). Pregnancy, Pyelonephritis and prematurity. Clin. Obstet Gynecol .**13**: 239-254.

- **K**

han; I. A.; Tadashi, M. and Loyed , H. K. (1994). Interleukin-12

Enhances Murine Survival against Acute Toxoplasmosis. Infection and Immunity. 1639-1642.

- **K**

ishimoto T., Tanaka T., Yoshida K., Akira S., Taga T.(1995): Cytokine signal transduction through a homo-or hetro-dimer of gp130 .Ann. Y. Acad. Sci. **766**:224-234.

- **K**

ishimoto, T.; Akira, S. and T. Taga *et al* . (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. Science. **258**: 593–597 .

- **K**

nobl, T. ; Gomes, T. A. ; Vieira, M. A. ; Bottinoa, J. A. and Ferreira, A. J. (2004) . Detection of *pap, sfa, afa* and *fim* adhesinencodingoperons in avian pathogenic *Escherichia coli* . *Intern. J. Appl. Res. Vet.Med*. **2** (2): 135-141.

- **K**

nox,J.R. (1995). Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β-lactamases: Mutations, specificity, and three-dimensional structure . Antimicrob. Agent Chemother. **39**: 2593-2601.

- **K**

oujima , I . (2001) Genetic and microbial study of ***Escherichia coli*** and *Proteus* in patient with cystitis . Koshn . Eisei Zassh . **39** (5) : 278 – 283 .

- **K**

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

- **K**

rystyna, P. ;Dariusz ,P. ; Michal, M. *et al*. (2007)Impaired renal function and duration of dialysis therapy are associated with oxidative stress and

proatherogenic cytokine levels in patients with end-stage renal disease. Clinical Biochemistry. **40**: 81–85.

- **K unin, C. M.** (1994). Urinary tract infections in females. *Clin. Infect Dis*. **18**: 1-12.
- **K unin, C. M. ; White, L. V. and Hua, T. H.** (1993). Areassessment of the importance of "low-count" bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. Ann. Intern . Med. **118**: 454-460.
- **L ambert, O.; Michea-Hamzehpour, M.; Kohler, T.; Chau, F.; Fanrisson, F.; Dautrey, S. and Pechere, J.** (2001). Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of Pseudomonas aeruginosa acutrtimice pneumoniae in rats. Antimicrobial agents chemotherapy. **44**:571-576.
- **Lane, D.R. and Takhar, S.S.** (2011). Diagnosis and management of urinary tract infection and pyelonephritis. Emergency medicine clinics of North America **29** (3): 539–52.
- **L arabi, K. ; Masmoudi, A. and Fendri, C.** (2003). Bacteriological andsusceptibility study of 1.930 strains isolated from UTIs in a Tunisuniversity hospital . Me'decine et Maladies Infectieuses. **33**:348-352.
- **L e Bouguenec, C. ; Archambaud, M. and Labigne, A.** (1992). Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol*. **30**:1189-1193.

- **Levine, B.; Kalman, J. ; Mayer, L. *et al*** ., (1990). Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N .Engl .J .Med*.**323**: 236–241.
- **Livermore , D .M .**(1992a). Interplay of impermeability and chromosomal β-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob. Agent Chemother. **36**: 2046-2048.
- **Livermore, D. M.** (1995). β-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev*. **8**: 557–584.
- **Livermore, D. M.** (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis*. **34** (5): 634-640.
- **Livermore, D.M.** (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J. Antimicrob. Chemother. **47**: 247–250.
- **MacFaddin, J .F**.(2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- **Marín, J. L. ; Collvinent, B.; Smithson, A.; Martínez, J. A. ; Noguero, Jdi Vila, M. and Mensa, J.**(2004). Evaluation of Inflammatory and Renal-Injury Markers in Women Treated with Antibiotics for Acute Pyelonephritis Caused by *Escherichia coli*. *clinical and diagnostic laboratory immunology, J*.**11**: 142–146.
- **Martelli , A.; Cortecchia , V. and Ventriglia , L**.(2000). Aztreonam in the

treatment of urinary tract infection : A multicentertral . Chemotherapy , **35** (1): 8-14.

- **M**

artina, F. and Walter, H. (1999). Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection I: pathophysiology and diagnostic techniques . **14**: 2746-2753.

- **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.

- **M**

asuda, N.; Sakagawa, E.; Ohya, S.; Gotoh, N.; Tsujimato, H. and Nishino, T.(2000). Contribution of MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeroginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **46**: 2242 – 2246.

- **M**

atagne, A.; Lamott-Brasseur ,J. and Frere, J.(1998). Catalytic properties of class A β-lactamases: Efficiency and diversity . *Biochem.J.* **330**: 581-598.

- **Mehar, S.S.; Powell, C.V.and Curtis, N**.(2004). Cephalosporin resistant urinary tract infections in young children. *J. Paediatr. Child. Health*. **40**(1-2): 48-52.

- **M**

ichael ,W. ; Wood, E.; Breitschwerdt , B. and Jody, L.(2010). Autocrine Effects of Interleukin-6 Mediate Acute-Phase Proinflammatory and Tissue-Reparative Tran-scriptional Responses of Canine Bladder Mucosa. *Infect. Immun.* 2011, **79**(2):708. DOI: 10.1128/IAI.01102-10.

- **M**

ichael, C.; Mohsen, M.; Alice, L. *et al*. (2010). Sex hormone modulation

of proinflammatory cytokine and IL-8 expression in macrophages from older men and postmenopausal women. *J. of Endocrinology.* **28**: 84-89.

- **M**

ikhail, M. S. and Anyaegbunam, A.(1995). Lower urinary tract dysfunction in pregnancy: a review. Obstet Gynecol Surv. **50**: 675-683.

- **M**

illar, L. K. and Cox, S. M.(1997). Urinary tract infections complicating pregnancy . Infect Dis. Clin. North Am. 11: 13-26.

- **M**

ims, C. A., Dockrell, H. M. ; Goering, R. V. ; Roitt, I; Wakelin, D. and Zuckerman, M. (2004). Medical Microbiology. 3rd ed. Mosbey of Elsevier Limited.

- **M**

itsumori, K. ; Terai, A. ; Yamamoto, S. and Yoshida, O. (1998). Identification of S, F1C and three PapG fimbrial adhesions in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. FEMS Immunology and Medical Microbiology **21**(4): 261-268.

- **M**

ladin, C.; Usein, C.R.; Chifiriuc, M.C.; Palade, A.; Slavu, C.L.; Negut, M. and Damian, M. (2009). Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patietns with neurogenic bladder. Rom. Biotechnol. Lett. **14**:4900-4905.

- **M**

ohkam, M. ; Karimi, A.; Karimi, H.; Sharifian, M. ;Armin, S. ; Dalirani, R. and Gorgi, F. A.(2008). Urinary Interleukin-8 in Acute Pyelonephritis of Children . Iranian J.of Kidney Diseases. **2**: 193-196.

- **M**

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

Tumor Necrosis Factor-Alpha in Children With Acute Pyelonephritis. *Iranian J.of Kidney Diseases*. **3**: 89-92.

- **M**

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

- **M**

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

- **N**

ational Committee for Clinical Laboratory Standards.(NCCLS). (2003a) Performance standards for disk susceptibility testing; approved standard M 100-S13. NCCLS, Wayne, Pa.

- **N**

aylor, G.H. (1998). A16 month analysis of Urinary tract infection in children . *J. of medical microbiology* .**17** (1) : 31-36.

- **N**

guyen-Van-Tam, S. E. ; Nguyen-Van-Tam, J. S. ; Myin, S. and Pearson, J. C. (1999). Risk factors for hospital acquired urinary tract infection in a large English teaching hospital: a case-control study. Infection **7**: 192-197.

- **Nicolle ,L.E.** (1997). Apractical guide to the management of complicated urinary tract infection .Drugs. **53**(4): 583-592 .

- **N**

icolle, L. E.(1994). Urinary tract infection in the elderly. *J. Antimicrob. Chemother* . **33**: 99.

- **N**

ikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited . *Microb.Mol.Biol.Rev*. **67**: 593-656.

- **N**

ishimoto, N.; Kishimoto, T. and Yoshizaki, K. ***et al***., (2000) .Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. Ann Rheum Dis, **59**: 121–127.

- **O**

'Brien, G. J. ; Chambers, S. T. ; Peddie, B. and Mahanty, K. H. (1996). The asso-ciation between colicinogenicity and pathogenesis amoung uropathogenic isolates of *Escherichia coli* . Microbial Pathogenesis **20**(3): 185-190.

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

- **O**

elschlaeger, T. A. ; Dobrindt, U. and Hacker, J.(2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E.coli* and the evolution of virulence. *International J. of Anti-microbial Agents*. **19**(6): 517-521.

- **O**

hsugi, Y. (2007). Recent advances in immunopathophysiology of interleukin- 6: an innovative therapeutic drug, tocilizumab (recombinant humanized anti-human interieukin-6 receptor antibody), unveils the mysterious etiology of immune mediated inflammatory diseases. Biol. Pharm. Bull. **30**:2001–2006.

- **O**

kamoto M., and Oyasu R.(1996) . Effect of transfected interleukin-6 in non-tum-origenic and tumorigenic rat urothelial cell lines. *Inter. J. Cancer*. **68**(5):616-21.

- **O**

renstein, R. and Wong, E. S.(1999).Urinary tract infections in adults.American Family Physician .www. aafp.org / afp / 9903 1ap /1225. Html .

- **O**

tto, G.; M. Magnusson, M. ;Svensson, J. Braconier, and C. Svanborg. (2001) . pap genotype and P fimbrial expression in Escherichia coli causing bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. Clin. Infect. Dis. **32**:1523–1531.

- **P**

anhorta , B . R . ; Agrawal , K . C . and Agnihotri , V . (1999) transferable drug resistance in ***Escherichia coli*** isolated from Pateint with UTI . *Ind* . *J* . *Med* . *Res* .**66** : 81 – 87 .

- **P**

anhorta , B . R . ; Agrawal , K . C . and Agnihotri , V . (2000) transferable drug resistance in ***Escherichia coli*** isolated from women with chronic UTI . *Ind* . *J* . *Med* . *Res* . **71**: 83 – 91 .

- **P**

anichi , V. ; Maggiore, U. and Taccola, D. *et al* . (2004).Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients. Nephrol. Dial. Transplant. **19**: 1154–1160.

- **P**

anichi, V.; Migliori, M. and De Pietro, S. (2002). C-Reactive protein and

interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure. Nephron. **91**: 594–600.

- **P**

atterson, T. F. and Andriole, V. T. (1987). Bacteriuria in pregnancy. Infect Dis. Clin. North Am. **1**: 807-822.

- **P**

atterson, T. F. and Andriole, V. T. (1997). Detection, significance, and therapy of bacteriuria in pregnancy. Update in the managed care era. Infect Dis. Clin. North Am. **11** :593-608.

- **P**

atton, J. P. ; Nash, D. B. and Abrutyn, E. (1991). Urinary tract infection: economic consideration. Med. Clin. North Am. **75** :495-513.

- **P**

ereira, B.J.G ; Shapiro , L.; King A. ***et al*** ., (1994).Plasma levels of IL-1b, TNF-a and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. Kidney Int. **45**:890-896.

- **P**

erry, C.M. and Scott,L.J. (2004). Cefdinir: a review of its use in the management of mild-to-moderate bacterial infections. Drugs .**64**: 1433-1464.

- **Perry, J.J. and Staley, J. T. (1997).** Microbiology. Dynamicsand Diversity. Saunders college publishing. Harcourt Braceand company. Orlando, Florida. USA. pp.780.

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

- **P**

icao, R. C.; Poirel, L.; Gales, A. C.; Nordmann, P. (2009). Further

Identification of CTX-M-2 Extended-Spectrum {beta}-Lactamase in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.***53**: 2225-2226.

- **P**

iddock , L.J.V. ; Walters ,R.N. ; Jin ,Y.F. *et al*., (1997). Prevalence and mechanism of resistance to third- generation cephalosporins in clinically relevant isolates of Enterobacteriaceae from 43 hospitals in the UK, 1990-1991. *J. Antimicrob. Chemother*, **39**: 177-187.

- **P**

rescott, L. M.; Harelry, L. P. and Klein, D. A. (1990). Microbiology 1st ed. W.M.C.Brown publisher. New York.

- **Q**

unibi, W. Y. (1982). Urinary Tract infection. *King Faisal Specialist Hospital J.* . **21**: 37-46.

- **Raka, L.; Mulliqi,-Osmani, G.; Berisha, L. *et al*.,**(2004). Etiology and susceptibility of urinary tract isolates in Kosova. *Int. J.Antimicrob. Agents*. **23**(1): 2-5.

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

- **Reinhard , F. ; Undine, O.; and Kurt ,G.** (2006). International J. of Antimicrobial Agents. **28**(1): 72-77.

- **R**

eza , R; Aziz , J. ; Marziyeh, H. *et al* ., (2012).Microbial susceptibility,Virulance factors , and plasmid profiles of Uropathogenic Escherichia coli strains isolated from children in Jahrom, Iran . *J. Archives of Iranian Medicine* .**15**: 312-316.

- **R**

idker, P.M.; Rifai , N.; Pfeffer, M. *et al* . (2000).Elevation of tumor

necrosis factor-α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. Circulation. **101**: 2149–2153.

- **R**

isdon, R. A. ; Godley, M. L. ; Parkhouse , H. F. *et al.*, (1994b). Renal pathology and the Tc-99m DMSA image during the evolution of the early pyelonephritic scar: an experimental study. *J. of Urology*. **151**: 767-773.

- **R**

oland, A. and Harding, G. (1993). Complicated urinary tract infections. Infectious Disease Clinicals of North America. **11**: 583-592.

- **R**

ouse, D. J. ; Andrews, W. W. ; Goldenbery, R. L. and Owen, J. (1995). Screening and treatment of asymptomatic bacteriuria of pregnancy to prevent pyelonephritis: a cost-effectiveness and cost-benefit analysis. Obstet Gynecol. **86**: 119-123.

- **R**

uiz, J. K. ; Simon, J. P. ; Horcajada, M. V. *et al.*, (2002). Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis and Pyelon-ephritis in Women and Prostatitis in Men. *J. of clinical microbiology*.

- **S**

akarya, S. ; Ertemb, G. T.; Oncua, S. *et al.*, (2003). *E. coli* bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence. FEMS Microbiology. **112**(2).

- **S**

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

- **S**

chito , O . C . ; presca , A . and Debia , E . A . (1994) .Stability in the

presence of wide spread beta lactamases – Aprerequisite for the antibacterial activity of B – Lactam drugs . Drugs .**3** : 1 – 3 .

- **Schlager, T.; Clark, M. and Erson, S**.(2001) .Effect of a single-use sterile catheter for each void on the frequency of bacteriuria in children with neurogenic bladder on intermittent catheterization for bladder emptying. Pediatrics.**108**(4):71–74.
- **S chwantner, A.; Dingley, A.J.** ***et al*** .(2004). Direct determination of the interleukin-6 binding epitope of the interleukin-6 receptor by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem*. **279** (1): 571-6.
- **S egreti , J . ; Levin , S . and Marshal , A .** (1996). Bacteriological and clinical applications of anew extended spectrum pareteral cephalosporin . AM . *J . med* . **100** (6) : 45 – 5.
- **S hafaq, A. H. ; Jamal, S. A. and Kamal, M.**(2011). Occurance of multidrug resistance and ESBL producing E.coli causing Urinary Tract Infection. *J. of Basic and Applied Sciences*.**7**(1):39- 43.
- **Sharma, .A; Shrestha, S.; Upadhyay, S .and Rijal, P.** (2011).Clinicaland Bacteriological profile of urinary tract infection in children at Nepal Medical College Teaching Hospital .*J. Nepal Med. Coll.* **13**(1): 24-26.
- **S heu, J.N; Chen, M.C; Lue, K.H.** ***et al***. (2006). Serum and urine levels of interleukin-6 and interleukin-8 in children with acute pyelonephritis.**36**:276-82.
- **Shigeta, M. and Mand Igaw, M.(1995).** Fever After Extra Coporeal Shock Wave

Lithotripcy For Patients With Upper Urinary Tract Calculi Associated With Bacteriuria Before Treatment. Eur. Urol. **27**(2): 121-123.

- **S**

hlipak, M.G. ; Fried, L.F. ; Cushman, M. *et al*. (2005). Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: Comparison of traditional and novel risk factors. JAMA. **293**: 1737–1745.

- **Smellie, J.; Prescod, N.; Shaw, P. *et al*.,** (1998) .Childhood reflux and urinary infection: a follow-up of 10–41 years in 226 adults. Pediatr. Nephrol. **12**(9):727– 736.

- **S**

okeland , J. (1999) . Infectious diseases : Non specific infections disease .Urology 2nd ed. Thieme textbook .P. 164.

- **S**

oto, S.; Jimenez de Anta, M. and Vila, J.(2006). Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or-independent pathways, respectively. Antimicrob Agents Chemother. **50**: 649 – 653.

- **S**

oto, S.M. ; Guiral ,E.; Bosch, J. and Vila, J. (2009). Prevalence of the set-1B and astA genes encoding enterotoxins in uropathogenic *E. coli* clinical isolates. Microb. Pathog. **47**:305-307.

- **S**

tamey, T. A. ; Wehner, N. ; Mihara, G. *et al.*, (1993). The immunologic basis of recurrent bacteriuria : role of cervicovaginal antibody in enterobacterial coloniza-tion of the introital mucosa. Medicine **88**(5): 49-66.

- **S**

tamm, W. E. and Hotton, T. M. (1993). Management of urinary tract infection in adults. N. Engl. J. Med. 329: 1328-1334 .

- **S**

  tukus, P. E. (1997). Investigating microbiology. Harcout Brace and Companies.

- **S**

  vanborg-Eden, C. S. (1996). Attachment of *E. coli* to human urinary tract epithelial cells. Acta. Microbiol. Scand (Supp 8).

- **T**

  ambyah, P.A. and Maki, D.G. (2000). Catheter associated urinary tract infection is rarely symptomatic; a prospective study of 1497 catheterized patients Arch. Int. Med. **113**: 709-13.

- **T**

  enover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am. J. Med*. **119**: 3–10.

- **T**

  iba, M.R. ; Yano, T. and Leite, D. S.(2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. ***50****(5):255-260*.

- **T**

  iba, M.R. ; Yano, T. and Leite, D. S. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. ***50****(5):255-260*.

- **T**

  ilg, H. ; Trehu, E. ; Atkins , M. B. *et al* ., (1994). Interleukin 6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor P55. Blood **83**:113–118.

- **T**

  odar, K. (2002). Pathogenic *Escherichia coli* Todar's Oline Textbook of Bacteriology.

- **Tortora, G. T. ; Funk, B. R.and Case, C. L. (1998)**. Microbiology: An introduction, 6th ed., The Benjamin, Cummings publishing company, USA. pp. 692-708.
- **Uehling , D.T. ; Johnson, D.B. ; Hopkins , W.J. *et al*** . (1999).The urinary tract response to entry of pathogen. World J. Urol. **17**: 351–358.
- **Umegaki, H., *et al*.** (1996). Protective effect of interleukin-6 against the death of PC12 cells caused by serum deprivation or by the addition of a calcium ionophore. Biochem. Pharmacol. **52**:911–916.
- **Usein , C.R. ; Damian, M.; Chitoiu , D. T. *et al*.,** (2001). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. J.*Cell .Mol. Med* **. 5**(3): 303-310.
- **Vernon ; Foo , C.k. and colthard , M . G** . (1997). How general practitioners manage children with urinary tract infection : an audit in the former . *Northern ,Region . Br. J. Gen* . **47**(418) : 297-70 .
- **Wadland, W. C. and Plante, D. A**. (1989). Screening for asymptomatic bacteriuria in pregnancy. *Adecision and cost analysis. J. Fam. Parct* . **29**: 372-406 .
- **Wagenlehner, F.M.; Weidner, W. and Naber , K.G.** (2009). An update on uncomplicated urinary tract infections in women. Curr. Opin. Urol., **19**(4): 368-374.
- **Walsh, C.** (2003). Antibiotics actions, origins, resistance. ASM Press, Washington D.C.

- **W**

  icher, J.T. and Evans, **S.W**. (1990) .Cytokines in disease. Clin.Chem. **36**: 1269–1281.

- **W**

  ilson, M.l. and Gidol , M. (2004). Laboratory diagnosis of urinary tract infection in adalt patients. Clin. Infect. Dis. **38**: 1150-1158.

- **W**

  inberg, J. ; Anderson, H. J. ; Bergstrom, T. *et al*., (1998). Epidemiology of symptomatic UTI in childhood. Acta. Paediat Scand. **63**(252): 1-20.

- **W**

  right, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Advanced Drug Delivery Reviews. **57**: 1451-1470.

- **W**

  ullt, B. (2004).Erraturm to "The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract". *International J. of Antimicrobial Agents* .**21**: 605-621.

- **W**

  ult, B. ; Bergsten, G.; Samuelsson, M. and Svanborg, C. (2002). The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *International J. of Antimicrobial Agents*. **19**: 522-538.

- **W**

  ult , B .G.;Connell ,H .Ollano ,P. R.(2000) .P-fimbriae enhance the early establishment of *E.coli* in the human urinary tract .Mol.Miccrobiol .**38**:456-464.

- **Y**

  amamoto, S. ; Terai, A.; Yuri , K. *et al*., (1995) . Detection of

urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **12**:85-90.

- **Y**

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

- **Y**

ildirim, S. ; Narsal, T. Z. ;Tarim, A. *et al*., (2005). Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care unit, and the hospital services unit of a single center, *J. Burn. Car. Rehabil*. **26** (6): 488 – 492.

- **Y**

ong, D. and Chong, Y. (2005). Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC β-lactamases–producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* . Dignostic Microbiology and Infectious Disease .**53**(4): 319-323.

- **Y**

udkin, J.S. ; Kumari, M.; Humphries, S.E. *et al*. (2000) .Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin -6 the link? Atherosclerosis. **148**:209-214.

- **Z**

iha-Zarifi, I.; Llanes, C.; Kohler, T.*et al*., (1999). Invitro emergence of multi drug resistant mutants of Pseudomonas aeruginosa over expressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrobial agents chemotherapy, **43**:287-291.

- **Z**

immermann ,W. (1980). Penetration of β-lactam antibiotics into their target enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a highly

sensitive mutant with its parent strain. Antimicrob. Agents Chemother. **18**: 94-100.

Summery

One hundred of blood and urine samples which collected from different age groups of patient with pyelonephritis , whose visited Al-Dewaniya teaching and Woman s and children hospital in Al-Dewaniya city during the period from November 2012 to April 2013 for detection the isolates of *Escherichia coli* .

The results showed that 56% of bacterial isolates were *E.coli* and 44% isolates belonged to others bacterial types . These results indicated that the females were more infected 67.86%(38\56) with pyelonephritis than the males 32.41(18\56). Always our result were pointed that the age of 30-39 old years have beeninfected with pyelonephritis and present the high percentage infection 30.36% comparison with others age groups (1-9,10-19,20-29,30-39,40-49,50-59,60-69,70-79) ,with percentage of (1.79% ,7.14% ,14.29% ,30.36% ,19.64% ,10.71% ,12.50% ,3.57%) respectively.

The resistance of *E.coli* isolates to the four generation of Cephalosporin antibiotics were showed the following state:

-The first generation of Cephalosporin antibiotic were indicated to Cephalothin 76.6% ,Cefazolin 71.4% ,Cephlexin 69.7% and Cephadroxil 66.1%.

-The second generation of Cephalosporin antibiotic were indicated to Cefaclor 59.0% ,Cefonicid 60.8% , Cefprozil 50.0% ,Cefoxitin 64.2% and Cefmetazole 55.3%.

-The third generation of Cephalosporin antibiotic were indicated to Ceftriaxone 32.2%, Cefotaxim 35.7% ,Ceftazidim 37.5% ,Cefixim 42.9% ,Cefdinir 35.7% and Ceftizoxim 30.4%.

-The fourth generation of Cephalosporin antibiotic were consisting of one antibiotic only like Cefepime with percentage of 39.3%

The results concerned the virulence factors genes showed that the gene *irp2* witch responsible for taking the iron from the blood ,whereas the gene *pap* responsible for the production of P-type Pilli , *afa* gene responsible for the production fimbriae , *iha* gene responsible for production of capsule and the gene *tst* responsible for toxic shock.

The result of PCR for the *E.coli* DNA showed that all the thirty isolates of this bacteria contain the gene *irp2*, while the others genes pap,afa,hly,and iha were presented the following percentage 36.6%,30.0%,96.6% and 10.0%respectively , whereas the gene tst didn't recorded any isolates concerting.

So in this study was to measure immune factors related to the urinary tract infection is in general and pyelonephritis in specially , has been measure some of cytokines which(Interleukin-8,Interleukin-6,Tumor necrosis factor-α) , they found increase in these factors in sera of patients with pyelonephritis compared to healthy persons.