

**Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Thi – Qar
Education College For Pure Sciences
Biology Department**



**Serotyping and molecular detection of some resistance
genes of *Escherichia coli* isolated from urinary tract
infected children in Nasiriyah City**

A Thesis submitted to the council of Education College for Pure
Sciences, University of Thi–Qar in partial fulfillment for the
requirements of the degree of Master in Biology (Microbiology)

By

Widad Sameer jaaz AL-Zirjawi

B. Sc. Biology, Thi–Qar University

(2006)

Supervised by

Assistant Prof. Dr. Saad Salman Hamim



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ذي قار
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

التميط المصلي والكشف الجزيئي لبعض جينات المقاومة لجراثومة الإشريشيا القولونية *Escherichia coli* المعزولة من الأطفال المصابين بأخماج المجاري البولية في مدينة الناصرية

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ذي قار وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير
في علوم الحياة / الأحياء المجهرية

من الطالبة

وداد سمير جعاز الازيرجاوي

بكالوريوس علوم حياة / جامعة ذي قار

(٢٠٠٦)

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

سعد سلمان هميم

آذار ٢٠١٦ م

جمادي الآخرة ١٤٣٧ هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(الَّذِي خَلَقَنِي فَهُوَ يَهْدِينِ ^(٧٨) وَالَّذِي هُوَ يُطْعِمُنِي وَيَسْقِينِ ^(٧٩) وَإِذَا

مَرَضْتُ فَهُوَ يَشفِينِ ^(٨٠))

صدق الله العليُّ العظيم

سورة الشعراء آية (٧٨-٨٠)

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة جرى بأشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ذي قار وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية.

التوقيع :

المشرف : د. سعد سلمان هميم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة ذي قار / كلية العلوم

التاريخ : 2016 / /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصية المقدمة من المشرف، أحيل هذه الرسالة على لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاسم : د. رحمن لعبي جلاب

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة ذي قار / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : ٢٠١٦ / /

قرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعون أدناه، نشهد بأننا اطلعنا على الرسالة الموسومة (التمييز المصلي والكشف الجزيئي لبعض جينات المقاومة لجراثومة الإشريشيا القولونية *Escherichia coli* المعزولة من الأطفال المصابين بأخماج المجاري البولية في مدينة الناصرية) المقدمة من قبل الطالبة (وداد سمير جعاز) وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة / احياء مجهرية وبعد اجراء المناقشة وجدت اللجنة أن الرسالة جديرة بالقبول لنيل الشهادة المذكورة وبتقدير (امتياز).

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. علي نعيم سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة ذي قار / كلية التمريض

التاريخ: 2016 / /

رئيس اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. باسل عبد الزهرة عباس

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان : جامعة البصرة / كلية الطب البيطري

التاريخ: 2016 / /

عضواً مشرفاً

التوقيع:

الاسم: د. سعد سلمان هميم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة ذي قار / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: 2016 / /

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. رحمن لعبيي جلاب

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة ذي قار / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: 2016 / /

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

توقيع العميد:

الاسم: د. ربيع هادي جاري

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: 2016 / /

الإهداء

إلى من ارتبطت طاعتهم بطاعة الله عز وجل.. والديّ حفظهما الله

إلى من تحملوا معي عناء المشقة وآلامها ..عائتي الكريمة

إلى أخواني الأعزاء وأخواتي حباً واعتزازاً

إلى كل من قدم لي العون أو النصيحة لإتمام هذه الرسالة.

وداد

شكر وتقدير

الحمد لله ذي المنّ والفضل والإحسان، حمداً يليق بجلاله وعظمته. وصلّى اللهم على خاتم الرسل وعلى اله وصحبه ومن والاه، صلاة تقضي لنا بها الحاجات، وترفعنا بها أعلى الدرجات، و تبلغنا بها أقصى الغايات من الخيرات، في الحياة وبعد الممات. والله الشكر أولاً وأخيراً، على حسن توفيقه وكريم عونه، وعلى ما من وفتح به علي من إنجاز هذه الرسالة، بعد أن يسّر العسير وذلّ الصعب .

يطيب لي وأنا أنهي كتابة بحثي أن أتقدم بخالص الشكر الجزيل والعرفان بالجميل والاحترام والتقدير لأستاذي المشرف أ.م. د. سعد سلمان هميم لتوجيهاته العلمية القيمة طيلة مدة البحث والكتابة.

وأتقدم بالشكر إلى السيد عميد كلية التربية للعلوم الصرفة أ.م.د. ربيع هادي جاري والسيد عميد كلية العلوم أ.د. محمد عجة عودة لدعمهم وتوجيهاتهم الكريمة .

ويسرني ويشرفني أن اسطر كل عرفان بالجميل إلى رئيس قسم علوم الحياة / أ.م.د. رحمن لعبي جلاب ورئيس قسم التحليلات المرضية / أ.م.د. سعد سلمان هميم لجهودهم المبذولة في تهيئة وتجهيز المختبرات وتزويدنا بمتطلبات البحث.

وشكري وتقديري الى أ.م.د. احمد عبد الكاظم وم.م زينب داخل دغيم (كلية الطب / جامعة ذي قار) وكل من قدم العون من أساتذتنا الكرام.

وأتقدم بالشكر إلى مدير مختبر الصحة العامة في ذي قار السيد ناظم جبار حبيب والأستاذ محمد يوسف والسيد حيدر زغير والست زينب إسماعيل حسن والسيد علوان مزيعل / مختبر العيادة الاستشارية / مستشفى بنت الهدى للولادة والأطفال وشكري وامتناني للسيد عبدالله عجيل عايد / مختبر الاستشارية / مستشفى محمد الموسوي للأطفال والعزيزة دنيا والي كوتي / مختبر البكتيريا / مستشفى السيد محمد سعيد الحبوبي على ما قدموه من الدعم والمساندة. ولا يفوتني أن أتقدم بالشكر والتقدير إلى زميلاتي وزملائي طلبة الدراسات العليا.

المستخلص

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل جراثيم الإشريشيا القولونية المسببة لأخماج المجاري البولية (UPEC) *Uropathogenic Escherichia coli* وتشخيصها والكشف الجزيئي عن موروثات بعض من أنماطها المصلية وكشف بعض الموروثات المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية. جمعت ٥٠٠ عينة إدرار من أطفال مرضى يعانون من أخماج المجاري البولية من مستشفى محمد الموسوي ومستشفى بنت الهدى للولادة والأطفال في مدينة الناصرية ولمدة من شهر أيلول (٢٠١٤) ولغاية شهر حزيران (٢٠١٥). بلغ عدد العزلات الموجبة للزرع الجرثومي 306 (61.20%) عزلة توزعت إلى العزلات السالبة لملون جرام وبلغت ١٩٢ عزلة (٦٢.٧٥%) أما الجراثيم الموجبة لملون جرام فقد بلغت ١١٤ عزلة (٣٧.٢٥%).

بلغ عدد الذكور المصابين من الأطفال ١٠٤ بنسبة مئوية بلغت (٣٣,٩٩%) والإناث المصابات ٢٠٢ طفلة مصابة بنسبة مئوية (٦٦,٠١%). النسبة المئوية الأعلى للعزلات السالبة مثلتها جراثيم *E.coli* بـ 75 عزلة (٣٩,٠٦%). عند توزيع المصابين بجراثيم الإشريشيا القولونية بحسب الجنس أظهرت النتائج إن ٢٤ عزلة بنسبة (٣٢,٠%) كانت من الذكور و ٥١ بنسبة (٦٨,٠%) عزلة من الإناث. من مجموع العزلات أخضعت ٥٠ عزلة لتفاعلات إنزيم سلسلة البلمرة (PCR) التقليدي للدنا المعزول باستخدام البادئات النوعية للموروثات (O6 و O15 و O25 و O16 و *16SrRNA*). أظهرت النتائج إن ٣٦ عزلة (٧٢,٠%) حاوية على ٥٧ نمط مصلي و ١٤ (٣٦,٠%) لم تحتوي الأنماط المذكورة، وتوزعت الأنماط أعلاه على التوالي إلى ٢٣ (٤٠.35%) و ١٨ (31.57%) و ٩ (١٥,٧8%) و ٧ (١٢.28%) و ٥ (١٠,٠%).

تم الكشف عن البادئات النوعية للموروثات المقاومة لبعض من المضادات الحيوية للأنماط الجرثومية للإشريشيا القولونية (*CITM* و *tet(A)* و *aac3-IV* و *Sul1* و *dfrA1*). وأظهرت النتائج العزلات الحاملة للجينات اعلاه كانت على التوالي 25 عزلة (50.٠٨%) و ٢٣ (٤٦,٠%) و 19 (38.0%) و ١٧ عزلة موجبة (٣٤,٠%) و ٥ (١٠.0%).

أختبرت حساسية الأنماط لعزلات (UPEC) تجاه (٨) أنواع من المضادات الحيوية المستعملة في علاج أخماج المجاري البولية، إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود تفاوت في نسبة مقاومتها لمضادات البنسلين والتتراسايكلين والاموكسيسلين وحامض الناليداس وترايمثوبريم - سلفاميثازول ونيتروفوران و جنتاميسين وكلورامافنيكول. إذ بلغ عدد العزلات المقاومة على التوالي ٥٠ عزلة (١٠٠%) و ٤٨ (٩٦,٠%) و ٤٧ (٩٤,٨%) و ٣٨ (٧٦,٠%) و ٣٠ (٦٠,٠%) و ٢٢ (٤٤,٠%) و ١١ (٢٢,٠%) و ٩ (١٨,٠%).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود أنماط مصلية عائدة لبعض سلالات *E.coli* تمتلك جينات لها قدرة عالية على المقاومة لمعظم المضادات الحيوية.

المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
الفصل الأول: المقدمة		
١-١	المقدمة	١
٢-١	هدف الدراسة	2
الفصل الثاني: استعراض المراجع		
1-2	الجهاز البولي	3
١-١-٢	الكليتان	3
٢-١-٢	الحالب	٣
٣-١-٢	المثانة البولية	٣
٢-٢	وظائف الجهاز البولي	4
٣-٢	أخماج المجاري البولية الجرثومية	٥
٤-٢	تصنيف أخماج المجرى البولي	6
٥-٢	إمراضية أخماج المجرى البولي	٨
١-٥-٢	خمج المجرى البولي غير المعقد	٨
٢-٥-٢	خمج المجرى البولي المعقد	٨
٦-٢	طرائق الإصابة بأخماج المجاري البولية	٨

٨	الطريق الصاعد	١-٦-٢
٩	الطريق الدمى	٢-٦-٢
٩	الطريق اللمفى	٣-٦-٢
٩	الفلورا الطبيعية فى القناة البولية	٧-٢
١٠	مسببات الخمج البولى الجرثومى	٨-٢
١٤	تصنيف الإشرىشيا القولونية	٩-٢
١٤	التركيب الخلوى للإشرىشيا القولونية	١٠-٢
١٥	المحتوى الوراثى للإشرىشيا القولونية	١١-٢
١٥	إمراضية إشرىشيا القولون	١٢-٢
١٦	إشرىشيا القولون المرضية الخارج معوية	١٣-٢
١٦	إمراضية إشرىشيا القولون المسببة للاخماج البولية	١٤-٢
١٧	مستضدات الإشرىشيا القولونية	١٥-٢
١٨	حساسية الجراثيم للمضادات الحياتية	١٦-٢
الفصل الثالث: مواد العمل وطرائقه		
٢٠	المواد	١-٣
٢٠	الأجهزة	١-١-٣
٢١	المواد الكيمائية	٢-١-٣
٢٢	الأوساط الزرعفة	٣-١-٣
٢٣	المواد والمعدات الجاهزة المستعملة فى التشخيص الجزيئى	٤-١-٣
٢٤	تسلسل البادئات المستعملة فى تشخيص الأنماط المصلية	٥-١-٣
٢٥	تسلسل البادئات المستعملة فى تشخيص الجينات المقاومة	٦-١-٣
٢٦	المضادات الحياتية	٧-١-٣

٢٧	طرائق العمل	٢-٣
٢٧	طرائق التعقيم	١-٢-٣
٢٧	تحضير الأوساط الزرعية	٢-٢-٣
٢٧	تحضير المحاليل والكواشف	٣-٢-٣
٢٨	جمع العينات	٣-٣
٢٩	تحليل البول	٤-٣
٢٩	زرع عينات البول	٥-٣
٣٠	تشخيص الجراثيم	٦-٣
٣٣	الجانب الجزيئي	٧-٣
٣٧	اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية بطريقة الأقراص	٨-٣
٣٧	التحليل الإحصائي	٩-٣
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
٣٨	عزل وتشخيص مسببات الجرثومية لاختلاج المجاري البولية	١-٤
٤٤	المرضات البولية الجرثومية المعزولة	٢-٤
٤٨	التشخيص الجزيئي لاشريشيا الاختلاج البولية بواسطة التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا	٣-٤
٤٨	تحديد الأنماط المصلية O لاشريشيا الاختلاج البولية بواسطة التفاعل السلسلي- المتعدد	١-٣-٤
٤٩	الكشف عن بعض جينات المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات UPEC	٢-٣-٤
٥٠	تعدد الأنماط والجينات المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات UPEC	3-٣-٤
٥٩	اختبار حساسية جراثيم UPEC للمضادات الحيوية	٤-٤
٧٠	الاستنتاجات	
٧٠	التوصيات	

٧١	المصادر باللغة العربية	
٧٣	المصادر باللغة الأجنبية	
89	الملاحق	

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
١-٤	النسبة المئوية للزرع الجرثومي	39
٢-٤	توزيع مرضى أخماج المجرى البولي بحسب الجنس	39
٣-٤	توزيع المصابين بحسب السكن والجنس	42
٤-٤	النسبة المئوية للعزلات الجرثومية بحسب تفاعلها مع ملون جرام	٤٣
٥-٤	العزلات الجرثومية المشخصة وإعدادها	٤٧
٦-٤	توزيع عزلات جراثيم <i>E.coli</i> بحسب الجنس والفئات العمرية للمضيف	٤٨
٧-٤	محتوى العزلات من جينات الانماط المصلية O15 و O25 و <i>16SrRNA</i>	٥٤
٨-٤	محتوى العزلات من جينات الانماط المصلية O6 و O16	٥٥
٩-٤	حزمتا الجينين <i>sul1</i> , <i>aac(3)-IV</i>	٥٦
١٠-٤	حزم لثلاث جينات مقاومة إضافة للجين <i>sul1</i>	٥٧
١١-٤	تعدد الأنماط المصلية في عزلات جراثيم UPEC	٥٨
١٢-٤	تعدد الجينات المقاومة لعزلات جراثيم UPEC للمضادات الحياتية	٥٨
١٣-٤	المقاومة المظهرية لجراثيم UPEC لبعض المضادات الحياتية	٦٣

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
١-٣	الأجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة مع المنشأ	٢٠
٢-٣	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	٢١
٣-٣	الأوساط الزراعية المستعملة في الدراسة مع الشركات المجهزة	٢٢
٤-٣	المواد والمعدات الجاهزة المستعملة في التشخيص الجزيئي	٢٣
٥-٣	تسلسل البادئات المستعملة في تشخيص الأنماط المصلية	٢٤
٦-٣	تسلسل البادئات المستعملة في تشخيص الجينات المقاومة	٢٥
٧-٣	أقرص المضادات الحيوية	٢٦
١-٤	أعداد الأنماط المصلية من عزلات جراثيم UPEC ونسبها	٥١
٢-٤	أعداد الجينات المقاومة للمضادات الحيوية ونسبها	٥١
٣-٤	تعدد الأنماط المصلية المشخصة	٥٢
٤-٤	أعداد ونسب تعدد الجينات المقاومة	٥٣
٥-٤	النسب المئوية للمقاومة المظهرية للعزلات للمضادات الحيوية	٦٢
٦-٤	إعداد ونسب تعدد المقاومة المظهرية للعزلات الجرثومية	٦٣

٦٥	علاقة الأنماط المصلية والمقاومة المظهرية المتعددة للعزلات المرضية	٧-٤
٦٦	علاقة الأنماط المصلية والمقاومة الجينية المتعددة للعزلات المرضية	٨-٤

قائمة الملاحق

رقم الملحق	العنوان	رقم الصفحة
٣-٣	أستمارة البيانات	٨٩
٢-٤	الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات الجرثومية	٩٠
٥-٤	تشخيص العزلات الجرثومية	٩١
٢-4A	صورة تشخيص الإشريشيا القولونية بواسطة Api 20E kit.	92
٢-4B	صورة تشخيص كلبسيلا الالتهاب الرئوي بواسطة Api 20E kit	٩٢
٢-4C	صورة تشخيص الزائفة الزنجارية بواسطة Api 20E kit وفحص الاوكسيديز	٩٣
٢-4D	صورة تشخيص المتقلبات بواسطة Api 20E kit وفحص الاوكسيديز	٩٣
٢-4E	صورة تشخيص العنقوديات الذهبية الموجبة لإنزيم التخثر بواسطة Api staph kit	٩٣
٢-4Ee	صورة التشخيص المصلي للعنقوديات الذهبية الموجبة لإنزيم التخثر	٩٤
٣-٤	صورة جهاز النانو دروب لقياس تركيز الدنا	٩٤
٣-٤	تركيز الدنا لعزلات الإشريشيا القولونية	٩٥

المختصرات

المختصر	المصطلح
<i>aac(3)-IV</i>	Gentamicin
AMX	Amoxicillin
API	Analytical Profile Index
bp	Base pairs
C	Chloramphenicol
CFU	Colony forming unit
<i>CITM</i>	Beta-lactams
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CoNS	Coagulase negative Staphylococci
<i>dfrA1</i>	Trimethoprim
DNA	Deoxyribonucleic Acid
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylen-Diamine-Tetra-Acetic acid
EMB	Eosin methylene blue
ExPEC	Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>
F	Nitrofurantoin
GN	Gentamycin
IgG	Immunoglobulin G
<i>K.</i>	<i>Klebsiella</i>

LPS	Lipopolysaccharides
MDR	Multidrug- resistant
MHA	Muller-Hinton Agar
MR-VP	Methyl Red- Vogus Proskauer Medium
NA	Nalidixic acid
O-AGC	O-antigen biosynthesis gene cluster
P	Penicillin
PAIs	Pathogenicity Associated islands
PBPs	Penicillin Binding Proteins
PCR	Polymerase chain reaction
<i>Pr.</i>	<i>Proteus</i>
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Ser</i>	<i>Serratia</i>
Spp.	Species
<i>sulI</i>	Sulfonamide
SXT	Trimethoprim- Sulphamethoxazol
TE	Tetracycline
<i>tet(A)</i>	Tetracycline
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
UTIs	Urinary tract infections
WBC	White blood cell
WHO	World health organization

تعد أخماج المجاري البولية (Urinary Tract Infections) (UTIs) من المشاكل الصحية المهمة والشائعة في مجتمعات الدول النامية والمتقدمة وتشكل النسبة الكبرى منها المسببات المرضية الجرثومية وخصوصاً عند الأطفال والأشخاص المصابين بالعجز الكلوي. يقدر عدد المصابين بأخماج المجاري البولية بـ ٢٥٠ مليون مصاب كل سنة (Ahmad *et al.*, 2015). تعدّ (UTIs) من المشاكل الطبية التي تعاني منها معظم دول العالم إذ ترتقي في العراق لتحتل المرتبة الأولى من مجموع الأخماج الجرثومية ونسبة (٢٣٪) (AL- Taha, 2000 ; AL-Karawyi *et al.*, 2013). بصورة عامة يتعرض الأطفال الذكور للإصابة بـ UTIs بنسبة تقارب (٢٠٪) والإناث بنسبة (٨٠٪) (Jonathan *et al.*, 2009). إن المجاري البولية هو المكان الأكثر شيوعاً لحصول العدوى عند الأطفال. وتعد أخماج المجرى البولي سبباً للإصابة بالأمراض الحادة والحالات المرضية المزمنة، والقصور الكلوي في مرحلة البلوغ (Barakat, 2013). قد يتسبب حدوث المضاعفات المرضية للمصابين بأخماج المجاري البولية إلى الوفاة وفي مختلف الفئات العمرية ولكلا الجنسين ، فمن الأهمية أن يكون هناك فهماً واضحاً لمسببات أخماج المجرى البولي وعوامل الخطر والاهتمام بالاختبارات التشخيصية وكيفية استخدام المضادات الحيوية المناسبة للقضاء على الجراثيم بالنسبة للأطفال الذين يعانون من أخماج المجرى البولي (Talebi, 2009).

تغير التاريخ الطبي لأخماج المجرى البولي عند الأطفال في الثلاثين سنة الماضية، نتيجة لاستخدام المضادات الحيوية والتحسينات في مجال الرعاية الصحية. وقد اسهم هذا التغيير إلى عدم اليقين حول الطريقة الأنسب والأكثر فعالية لعلاج UTIs في الأطفال وتحدث أخماج المجرى البولي نتيجة استيطان الأحياء المجهرية الخارجية (Exogenous Microorganisms) لمنطقة حول الإحليل (Peri Urethral Area) إذ إن عملية الالتصاق هي الخطوة الأولى والمحفزة لإحداث الإصابة و تبدأ من خلالها الجراثيم بعد أن تلتصق بالتضاعف وصولاً إلى تكوين مستعمرات دقيقة ومن ثم الاستيطان Colonization، وتعتمد قدرة العزلة الجرثومية في الالتصاق على مدى تشبع وتركيز المسببات ضمن أغشية الخلايا الطلائية (Epithelial Cells) (Brooks *et al.*, ٢٠١٣).

بعض سلالات جراثيم *E.coli* لها القدرة على الالتصاق بخلايا المثانة بواسطة الاهداب (Pili) مؤدية إلى حدوث أخماج المثانة Cystitis (الكعبي، 2012). يمكن أن تصعد هذه الجراثيم إلى المثانة عبر الإحليل، ومن ثم انتشارها عبر الحالبين لتصيب الكليتين، وإذا وصلت هذه الجراثيم الى مجرى الدم قد تؤدي إلى الإصابة بالإنتان (Sepsis) (Spyridis et al., 2015 ; Chih-Yen, 2015 ; Li et al., 2010). إن مسببات الاخماج البولية (Uropathogens) متنوعة ومن أكثرها شيوعا وأهمية الجراثيم السالبة لملون جرام حيث مثلت تلك العزلات المسببة لآخماج المجرى البولي للأطفال نسبة قد تصل إلى (98%) (Moore et al., 2015). تصيب تلك الجراثيم الجهاز البولي بآلية غزو النسيج المبطن المصحوبة بالآخماج اعتمادا على عدد واسع من عوامل الضراوة. تعد *Uropathogenic E.coli* (UPEC) المسبب الرئيسي والأكثر شيوعا لآخماج المجرى البولي في مختلف الفئات العمرية خاصة الأطفال وكبار السن والحوامل (Mark, 2015). ومن المسببات الجرثومية الأخرى السالبة لملون جرام ضمن العائلة المعوية Enterobacteriaceae هـي جراثيم *Proteus spp.* و *Klebsiella spp.* و *Pseudomonas spp.* والمكورات المعوية *Enterococcus spp.* إضافة لجراثيم المكورات العنقودية الموجبة لملون جرام (*Staphylococcus spp.*) (Verle et al., 2015 ; Emamghorashi , 2011).

١- ٢ هدف الدراسة Aim of the study

- نظرا لأهمية تشخيص المسببات الجرثومية لآخماج المجاري البولية خاصة السلالات المرضية لجراثيم الاشيريشيات القولونية فقد اتبعت الدراسة الخطوات الآتية:
- عزل وتشخيص الأنواع الجرثومية الهوائية السالبة و الموجبة لملون جرام المسببة لآخماج المجاري البولية عند الأطفال.
 - التشخيص الجزيئي لبعض الأنماط المصلية لجراثيم UPEC.
 - الكشف الجزيئي لعدد من جينات المقاومة للمضادات الحياتية للجراثيم المعزولة.
 - الكشف عن الحساسية الدوائية لجراثيم UPEC المعزولة.

Urinary System

١-٢ الجهاز البولي

يتألف الجهاز البولي من الكليتين (Kidneys) والحالبين (Ureters) والمثانة (Bladder) والإحليل (Urethra).

Kidneys

١-١-٢ الكليتان

تقع الكليتان على الجدار الخلفي للبطن، وشكل الكلية مثل حبة الفاصوليا ويوجد في الجزء المنخفض من احد الجوانب منطقة تدعى النقيير Hilum يمر من خلالها الشريان والوريد الكلويان واللمفاويان والإمداد العصبي والحالب الذي يحمل البول من الكلية إلى المثانة. يلاحظ عند التشريح النسيجي لها منطقتان رئيستان هما القشرة (Cortex) الخارجية والمنطقة الداخلية التي تسمى اللب (Medulla) يقع إلى الداخل من القشرة ويترتب على هيئة مجموعة من المناطق الهرمية الشكل ويقع الحويض (Pelvis) في مركز الكلية ويشبه شكل القمع. يدخل الدم إلى الكلية بواسطة الشريان الكلوي ويخرج منها بواسطة الوريد الكلوي يحمل الشريان الكلوي الغذاء إلى الكلية والفضلات من الكلية بحيث تستخدم الغذاء لبقاء خلاياها على قيد الحياة أما الفضلات فيتم التخلص منها (Jarrell et al., 2015).

Ureter

٢-١-٢ الحالب

يبلغ طول الحالب في الإنسان حوالي (25) سنتيمتر ، ويقع نصفه في البطن و النصف الآخر في الحوض، والحالب يصل حوض الكلية بالمثانة البولية ويدخل في المثانة البولية بشكل منحرف ويجري في جدارها قبل أن يفتح داخل جوفها وهذا يكون بمثابة صمام وخاصة عند تقلص عضلة المثانة إذ تغلق فتحة الحالب كلياً لمنع ارتجاع البول في الحالب (الربيعي، ٢٠١٣).

Bladder

٣-١-٢ المثانة البولية

عبارة عن مخزن للبول، وتقع في الجزء الأمامي من الحوض، لها أربعة أسطح وأربعة زوايا. الزاويتان العلويتان الخفيتين، اليمنى يدخل فيها الحالب الأيمن و اليسرى الحالب الأيسر. تبلغ سعة المثانة البولية من (200-300) مليلتر. الزاوية السفلية يخرج منها الإحليل Urethra والإحليل يفتح ليخرج البول خارج الجسم. تبلغ سعة المثانة في الأطفال حوالي (60) مليلتر من البول بالإضافة لـ (٣٠) مليلتر عن كل سنة من العمر. على سبيل المثال، يمكن للمثانة ولطفل عمره ٨ سنوات من تكوين حوالي (300) مليلتر من البول (Freedman, 2007).

٢-٢ وظائف الجهاز البولي The Functions of The Urinary System

يعمل الجهاز البولي على اداء الوظائف الاتية :

١. تخليص الجسم من المواد السامة وأهمها مشتقات الأمونيا (اليوريا) والأدوية. معظم فضلات عمليات الأيض في الثدييات هي اليوريا وهي فضلات نيتروجينية تنتج في الكبد. تصل الفضلات النيتروجينية إلى الكبد على شكل أمونيا Ammonia ويمكن أن تصبح سامة إذا بقيت طويلاً في الجسم.

٢. الحفاظ على تركيبة السوائل خارج الخلايا Extracellular Fluids من حيث تركيز الأملاح والماء , وذلك عن طريق امتصاص هذه الأملاح أو إفرازها حسب تركيزها في الدم الذي يمر خلال الكبيبات وكذلك امتصاص الماء أو طرحه خارج الجسم عن طريق الأنابيب الجامعة.

٣. تنظيم ضغط الدم عن طريق زيادة أو نقصان إفراز هرمون الرينين (Renin) من جهاز قرب الكبيبة (Juxta - Glomerular Apparatus), وهو عبارة عن خلايا متخصصة في الأنبوب الملتوي البعيد تقع قرب الكبيبة الكلوية إذ يقاس ضغط الدم بكمية الدم الذي يصل الكلية (التروية), حيث أنه أي حالة تسبب هبوط في ضغط الدم (في حالة الصدمة أو النزف الشديد أو الجفاف) تزيد الكلية من إفراز الرينين الذي يعمل على مواد أخرى في الدم من شأنها في النهاية تقلص الأوعية الدموية لرفع ضغط الدم.

٤. الحفاظ على توازن الحمض- القلوي للدم (Blood Acid-Base Balance) وذلك عن طريق زيادة إفراز ذرات (شوارد) الهيدروجين H^+ وزيادة امتصاص البيكربونات HCO_3 عند زيادة حموضة الدم والعكس عند زيادة قلوية الدم.

٥. إفراز هرمون إريثروبويتين (Erythropoeitin) الذي يلعب دوراً مهماً في تحريض نخاع (نقي) العظم على تصنيع كريات الدم الحمراء ونقصه يسبب فقر الدم.

٦. تحويل فيتامين د (Vitamin D) إلى صورته الفعالة من دون هذا التحويل لا يعمل الفيتامين وقد يسبب مرض الكساح (Rickets) (Jason, ٢٠١٠).

٢-٣ أخماج المجاري البولية الجرثومية. Bacterial UTIs.

الأخماج الجرثومية هي الأكثر شيوعاً في جميع أنحاء العالم، والسبب الرئيس للعدوى المكتسبة من المستشفيات (Freedman, 2007 ; Levart and Rajko 2011). ففي الولايات المتحدة الأمريكية يبلغ عدد المرضى مليون ونصف حالة سنوياً وهذا يكلف الدولة كمضادات حيوية ما يقارب خمسمائة مليون دولار كل عام بنسبة تصل إلى ١٥٪ من الميزانية المحددة للمضادات الحيوية (Howell, 2013). وفي كل سنة تكلف الأخماج البولية اقتصاد العالم حوالي ستة مليارات دولار أمريكي (الجنابي, ٢٠٠٨). عرف (Aseem, 2007) خمج المجرى البولي بأنه الاستجابة الالتهابية للخلايا الظهارية المبطنة للقناة البولية (Uroepithelial cells) بسبب غزوها من قبل الجراثيم، وعادة ما يترافق ذلك مع وجود البيلة القححية (Pyruia) والبيلة الجرثومية (Bacteriuria). تعني البيلة القححية وجود خلايا الدم البيض في البول، وهي بوجه عام دليل الاستجابة الالتهابية الناتجة عن غزو الجراثيم لظهارة القناة البولية، ويقصد بالبيلة الجرثومية وجود الجراثيم في البول الذي يكون خالياً منها في الحالة الطبيعية، ويدل وجود البيلة الجرثومية في غياب البيلة القححية إلى الاستيطان أكثر من الإصابة بالخمج. ويترافق حدوث خمج المجرى البولي غالباً مع مرض السكري. إن مرض السكر يُقلل المناعة وأغلب مرضى السكر يعانون من المثانة العصبية (Neurogenic bladder) التي تؤدي إلى عدم الإفراغ الكامل للبول ونتيجة لوجود سكر الكلوكوز في البول يجعله وسطاً ملائماً لنمو الجراثيم وتكاثرها وارتفاع ضغط الدم (Barakat, 2013 ; Brown, 2009).

تقسم الأخماج حسب الموقع التشريحي للإصابة على قسمين رئيسيين :

أ- أخماج المجرى البولي السفلي. Lower UTIs.

يتضمن كلا من أخماج المثانة وأخماج الإحليل. يشكو مرضى خمج المثانة (Acute cystitis) من متلازمة من الأعراض السريرية المتضمنة عسر البول (Dysuria)، كثرة عدد مرات التبول (Frequent urination)، لاجأ البول (Urgency) وألم فوق منطقة العانة (Suprapubic). كما إن ٩٥٪ من الأخماج البولية في الأطفال يزول بعد التشخيص والعلاج المناسب (Rebekka et al., 2015 ; Kulkarni, 2009).

ب - أخماج المجرى البولي العلوي Upper UTIs.

يتضمن أخماج الكلية الحادة والمزمنة (Acute and chronic pyelonephritis). يمكن لإصابة المثانة أن تمتد عبر الحالبين لتشمل الكليتين، وقد وجد أن نسبة ١٥ - ٢٠ % من مرضى أخماج المثانة الحاد يعانون من متلازمة من الأعراض السريرية تتضمن القشعريرة (Chills) و الحمى (Fever) وألم فوق الخصرة (Flank pain) مع وجود البيلة القححية و البيلة الجرثومية (Jackson, 2015).

٢-٤ تصنيف أخماج المجرى البولي: Classification of UTIs

هنالك تصنيفات مختلفة لأخماج المجرى البولي حسبما تم التوصية بها لمساعدة الأطباء في اختيار العلاج المناسب وتحديد المسببات المرضية وهي:

1-4-2 أخماج المجرى البولي الأولية أو المتكررة Primary or Recurrent UTIs

صنف المرض سريريا على أساس أن إصابة القناة البولية بالخمج تحدث لأول مرة أو بصورة متكررة إلى :

- خمج المجرى البولي الأولي Primary UTI
هو خمج يحدث في القناة البولية للمرة الأولى First infection.
- خمج المجرى البولي المتكرر Recurrent UTI
يعد من الأنواع الشائعة خاصة بين الإناث ويعني ارتداد الخمج (Reinfection) أما بسبب الإصابة بجرثومة مختلفة مصدرها من خارج القناة البولية أو بسبب ثبوت جرثومي (Bacterial persistence).

2-4-2 أخماج المجرى البولي المكتسب من المجتمع أو من المستشفيات Community or Hospital Acquired UTIs

يصنف الخمج اعتماداً على الأسس الوبائية إلى :

• خمج المجرى البولي المكتسب من المجتمع Community Acquired UTI

تصل نسبة خمج المجرى البولي إلى ٨٥ % ويعد من الأمراض الشائعة المكتسبة من خلال المجتمع (Alghoribi *et al.*, 2014 ; Akram, 2007). تنشأ معظم الأخماج البولية المكتسبة من المجتمع بصورة متفرقة ، بسبب الجراثيم المقاومة للمضادات الحياتية الأمر الذي يوحى إلى وبائية الخمج وإمكانية انتشاره عن طريق الغذاء الملوث. فاستيطان الجراثيم أمعاء الإنسان قد يهيئ لإصابة القناة البولية (Parienti *et al.*, 2015).

• الخمج البولي المكتسب من المستشفيات (Hospital Acquired (Nosocomial UTIs

يعد الخمج المكتسب من المستشفى من الإصابات الشائعة ويمثل حوالي ١٥ % منها (Alghoribi *et al.*, 2014) ولدى المرضى ذوي القثطار البولي (Catheters)، قد تصل نسبة الإصابة إلى ٩٥ % (Ryder, 2005). تعود معظم أخماج المجرى البولي المكتسب من المستشفى إلى القثطار البولي الملوث بالجراثيم أو التداخل الجراحي (Talebi, 2009). تمتاز هذه الأخماج بشدة خطورتها لكون الجراثيم المسببة لها مقاومة للعلاج بالعقاقير فضلاً عن ضعف الحالة الصحية للمريض، وأكدت الدراسات إن معظم المرضى يعانون من ارتفاع درجات الحرارة والم خفيف في أسفل البطن مع وجود خلايا قلبية أثناء الفحص العام للإدرار. قد يعزى السبب إن القثطار البولي يعد عامل ميكانيكي يسهل صعود الأحياء المجهرية إلى المثانة نتيجة تلامس السطح الخارجي لأنبوب القثطار مع جدار الإحليل أو الجلد المحيط بالفتحة البولية والذي يحتوي على النبيت الطبيعي (U-Syn, 2006). تعد جرثومة *E.coli* النوع الأكثر انتشاراً في أحداث الأخماج البولية المعقدة المقترنة بالقثطرة (Pourakbari *et al.*, 2012 ; Jacobsen *et al.*, 2008).

Pathogenecity of Urinary Tract Infections

٢- ٥ أمراضية أخماج المجرى البولي

تصنف أخماج المجاري البولية من حيث الامراضية إلى:

١-٥-٢ خمج المجرى البولي غير المعقد (Uncomplicated UTI)

هو خمج بأحد أجزاء الجهاز البولي، إذ تكون القناة البولية طبيعية من الناحية التشريحية والفيسيولوجية وتؤدي وظائفها بشكل طبيعي، وقد يكون الالتهاب مصحوب بأعراض أو يكون غير مصحوب بأعراض (Thomas, 2012).

٢-٥-٢ خمج المجرى البولي المعقد (Complicated UTI)

هو خمج القناة البولية مع حدوث تغيرات وظيفية وفسلجية فيها كما هو الحال عند استمرار التهاب المثانة (Cystitis) الذي يؤدي إلى حدوث نزف دموي. غالباً ما يكون المسبب الرئيسي لآخماج المجاري البولية المعقدة هو الإصابة الجرثومية، وتكون هذه الآخماج مترافقة مع التشوهات التركيبية للقناة البولية والتشوهات الولادية والانسدادات (Obstruction) والمرضى الذين يستخدمون القثطار البولي لفترات طويلة يكونون أكثر عرضة للإصابة بالآخماج البولية المتكررة للمثانة والحالبين وقد تؤدي إلى تلف الكليتين

(Ann and Kieran , 2010 ; Li *et al.*, 2010 ; Dattelbaum *et al.*, 2003).

٢- ٦ طرق الإصابة بأخماج المجاري البولية Routes of UTIs

توجد ثلاث طرق محتملة يمكن للجراثيم من خلالها أن تغزو وتنتشر داخل القناة البولية وهي كالاتي :

١-٦-٢ الطريق الصاعد Ascending Route

ويعرف على أنه إصابة الكائنات المجهرية للمجرى البولي الصاعد من الإحليل إلى المثانة ويعزى إلى عوامل عدة منها :

١. عوامل ميكانيكية كالقثطرة البولية.

٢. انخفاض المناعة بسبب العمر (كالأطفال وكبار السن) أو بسبب الإصابة بمرض السكر.

٣. إعاقة الجريان الطبيعي للإدرار أو عدم الإفرار التام للمثانة بسبب بعض الأمراض

كتضخم البروستات ووجود حصوات الكلية و أورام الجهاز البولي و فقدان السيطرة العصبية على المثانة (Loss of Neurologic Control) والارتداد الإحليلي الوعائي

(Vesicoureteral reflux) (Jackson, 2015 ; Mims *et al.*, 2004).

٢-٦-٢ Haematogenous Route الطريق الدمى

تحدث الإصابة عن طريق انتقال الأحياء المجهرية الممرضة عن طريق الدم من أماكن بعيدة في الجسم ففي الأطفال قد تصل عن طريق الدم إلى الكلية محدثة أخماج المجاري البولية (Brandström *et al.*, 2010 ; Kaufman and Fairchild, 2004).

٢-٦-٣ Lymphatogenous (Lymphatic) Route الطريق اللمفى

يكتسب فيه خمج المجرى البولى بسبب انتقال الأحياء المجهرية من الأمعاء إلى القناة البولية من خلال الاقنية اللمفية (Davis and Flood, 2011).

٢-٧ Urogenital Flora الفلورا الطبيعية في القناة البولية

تكون القناة البولية والبول خاليين من الكائنات الممرضة والنبيت الطبيعى، وعلى الرغم من ذلك توجد أعداد من النببت الطبيعى من الاحياء المجهرية قد تستوطن الإحليل منها المكورات العنقودية (*Staphylococcus spp.*) وأنواع جنس المكورات المسبحية (*Streptococcus spp.*) الحالة للدم نوع ألفا (Viridans) وغير الحالة للدم، وأنواع جنس النيسيريا (*Neisseria spp.*) غير المرضية و الوتديات (Diphtheroids) والمكورات اللاهوائية (Anaerobic cocci) (Shoskes, 2011 ; Smith's, 2004 ;Todar, 2002).

٢-٨ مسببات الخمج البولى الجرثومى The Bacterial Causes of UTIs.

ازدادت أهمية الجراثيم الممرضة ليس لما تسببه من أخماج مرضية خطيرة فحسب و إنما لامتلاكها صفات خاصة تمكنها من إحداث الإصابة منها قدرتها على الالتصاق والغزو ثم الاستعمار في أنسجة

المضيف وقابليتها على الاقتران الوراثي Conjugation وتبادل الجينات الوراثية المعبرة عن عوامل الضراوة أو المقاومة المتعددة للمضادات الجرثومية Multidrug-resistant (MDR). لذا نالت هذه الجراثيم اهتمام الكثير من الباحثين مما أدى إلى جعلها هدفا أساسيا للبحوث والدراسات الحديثة، وهي تسبب المرض للإنسان بوساطة آليتين رئيسيتين. تعزى الآلية الأولى لفعل السموم (Toxins) المنتجة من قبل الجراثيم وهي على نوعين:

أ- السموم الخارجية (Exotoxins) تتكون من بروتينات حساسة للحرارة (Heat-Labile protein) تفرزها الخلية الجرثومية في البيئة التي تعيش فيها.

ب- السموم الداخلية (Endotoxins) وتتكون من عديد السكريد الدهني (Lipopolysaccharides) الذي يمثل أحد مكونات جدار الخلية الجرثومية السالبة لملون جرام، أما الآلية الثانية فهي آلية غزو النسيج المصحوب بالالتهاب (Invasion and inflammation) وهي الآلية التي تتسبب بها جراثيم الأخماج البولية (Levinson and Jawetz, 2000).

إن خمج المجرى البولي مصطلح عام ويشمل التهاب الكلية (Pyelonephritis) والتهاب المثانة (Cystitis) والبييلة الجرثومية اللاعرضية (Asymptomatic bacteriuria) والتهاب الإحليل (Urethritis)، وهذه الأخماج قد تكون حادة أو متكررة أو مزمنة (Paul et al., 2014 ; Ricea et al., 2006 ; Fabretti et al., 2006) ; ومن العوامل الجرثومية المسببة لأخماج المجاري البولية ماياتي: (Ahmad et al, 2015).

١- العائلة المعوية Enterobacteriaceae

هي عصيات سالبة لملون جرام جزء منها من النبيت الطبيعي الموجودة في أمعاء الإنسان والبعض منها تكون مرضية للإنسان لأنها تمتلك بنية معقدة ولها القدرة على إنتاج مجموعة من الإنزيمات والسموم فضلاً عن عوامل الضراوة الأخرى (Mims et al., ٢٠٠٤). ومن أكثرها شيوعاً في خمج المجرى البولي ما يأتي :

أ- الإشريشيات القولونية *E.coli*

تعد من أكثر أنواع الجراثيم شيوعاً في إمراضية الإنسان على الرغم من كونها من الفلورا الطبيعية لأمعاء الإنسان والحيوان (Ahmad et al., 2015). تستوطن جرثومة الإشريشيا القولونية الأمعاء الغليظة (Large intestine) للبائن والطيور وتسبب أخماجاً داخل وخارج

الأمعاء مثل أخماج المجرى البولي (UTIs) وأخماج المثانة وأخماج الكلية وأخماج السحايا الدماغية (Meningitis) والإنتان الدمى (Septicemia) وذات الرئة (Pneumonia).
توجد سلالات مرضية للإنسان والحيوانات تقسم إلى سلالات مسببة للأمراض داخل الأمعاء وأخرى قادرة على إحداث المرض في مواقع خارج الأمعاء وعادة ما تبقى غير مؤذية محددة في تجويف الأمعاء ومع ذلك يمكن لبعض السلالات التعايشية غير الممرضة القدرة على أن تسبب الإصابة والأذى للمضيف ذي المناعة الضعيفة أو المثبطة أو عندما تكون الحواجز المعوية المعدية مختربة (Makvana and Gloria et al., 2007 ; Kaper et al., 2004).

Krillov, 2014 ;

ب - المتقلبات *Proteus spp.*

تسبب المتقلبات تجرثم الدم والالتهاب الرئوي إذ تنتقل عن طريق الحقن الوريدية الملوثة وتسبب بعضها أخماج المجاري البولية من عدوى المستشفيات، مثل *Pr. vulgaris* وتنتج أنواع المتقلبات أنزيم Urease الذي يجعل البول قلوياً فيشجع على تكون الحصى والحركة السريعة لهذه الجراثيم تسرع من غزو المجاري البولية (Sabeen, 2012).

ج- كليبسيلا الالتهاب الرئوي *K. pneumonia*

وهي جراثيم من العائلة المعوية و مستعمراتها كبيرة ومخاطية وتعد المسبب الأكثر شيوعاً لأخماج المجاري البولية المكتسبة من المستشفيات أو التهابات الحروق والجروح ، تحوي الكبسولة التي تمنحها المقاومة للالتهام بواسطة الخلايا البلعمية. ويعتقد أنها تحتوي مادة aerobactin الحديد المرتبط بالبروتين مما يساعد الجراثيم على إنتاج إنزيم بيتا-لاكتاماز الذي يسهم في الأمراض والمقاومة للمضادات الحيوية، بعض سلالاتها تنتج hemagglutinins (يكون النمط الظاهري الحساس للمانوز) المسبب لبعض الحالات المرضية. الذيفان الداخلي له دور مهم في الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية للجراثيم (طعمة، ٢٠٠٦ ; Gregg et al., 2015).

د- السيراتيا *Serratia spp.*

هي جراثيم سالبة لملون جرام مخمرة للاكتوز على شكل قضبان قصيرة بسوطين. من مسببات الأمراض الانتهازية و عدوى المستشفيات مثل التهابات الجهاز التنفسي أو البولي.

تكون ضرورتها مرتبطة عادة مع إنتاج إنزيمات Urease و Gelatinase و Hemolysin كذلك وجود الأهداب يساعدها على الالتصاق (شريف, ٢٠٠٧).

٢- العنقوديات *Staphylococcus spp.*

وهي جراثيم موجبة لملون جرام كروية عادة ما تكون مرتبة على شكل عناقيد تكون الفلورا الطبيعية للجلد والأغشية المخاطية أنواعها كثيرة منها ما تسهم في تحلل الدم وتخثر البلازما الخارج خلوية وإنتاج الإنزيمات والسموم خارج خلوية الشائع منها هو *S. aureus* و *S. epidermidis* و Coagulase-negative Staphylococci (CoNS)

(Mctaggart et al., 2015 ; Mims et al., 2004).

أ- العنقودية البشرية *S. epidermidis*

هي المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر وتعتبر من الفلورا الطبيعية في الجلد والأغشية المخاطية، وجودها بأعداد كبيرة وانتشارها جعلها واحدة من الكائنات المعزولة الأكثر شيوعاً في المختبرات الطبية وأصبحت واحدة من أشهر العوامل من العدوى المكتسبة من المستشفيات. المرضى الذين يعانون كبت المناعة معرضين لخطر الإصابة بشكل خاص، وكذلك الأفراد الذين يستعملون القثطرة أو الأجهزة والأعضاء الاصطناعية كما إن لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) (Hogan et al. 2015). لأن الكثير من العزلات قد تكون متعددة المقاومة للمضادات الحيوية، لذا قد تسبب إصابات خطيرة للغاية يمكن أن تكون قاتلة. في الحالات المعقدة للاخماج البولية التي تسببها جراثيم *S. epidermidis* والتي تمثل أكثر من (٢٠ %) من عدوى المستشفيات (Guirguitzova et al., 2002).

ب- العنقوديات الذهبية *S. aureus*

تمتلك *S. aureus* الكثير من عوامل الضراوة التي تسهم في إمراضية هذه الجراثيم وتساعدها على الالتصاق. جدارها الخلوي الحاوي على حامض Teichoic acid ووجود الكبسولة وإفراز السموم والأنزيمات كلها عوامل قد تسهم في تحطيم غشاء الخلية المضيقة (Sabouni et al., 2014).

ج- العنقوديات السالبة لأنزيم التخثر Coagulase-Negative Staphylococci

عُدت المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر من مسببات المرضية التي ازداد الاهتمام بدراساتها في السنوات الأخيرة. فقد تكون المسبب الأكثر شيوعاً للتجريح بالنسبة للإصابات المكتسبة من المستشفيات، لكون ان الدراسات على مدى السنوات القليلة الماضية تشير الى إن

الآخماج التي تسببها تلك الجراثيم تشمل آخماج الجهاز العصبي المركزي (nervous system shunt) والتهاب الشغاف أو الصمام الأصلي أو الاصطناعي (native or prosthetic valve Endocarditis) وآخماج المجاري البولية (UTIs) والتهاب باطن مقلة العين (Endophthalmitis). عادة ما يتطلب علاج الآخماج الجهازية الناتجة عن العقوديات السلبية لانزيم التخثر العلاج عن طريق الوريد مما جعل مقاومتها للمضادات الحياتية متعددة (Karsten *et al.*, 2014).

٢- 9 التصنيف الحديث للاشريشيا القولونية *E.coli* Classification of

Modern

Domain–Bacteria

Phylum –Proteobacteria

Class –Zymobacteria

Order–Enterobacteriales

Family – Enterobacteriaceae

Genus – *Escherichia*

Species – *coli*

(Hogg, 2013)

١٠-٢ التركيب الخلوي للاشريشيا القولونية *E. coli* Cell Structure of *E. coli*

الاشريشيات القولونية جراثيم عصوية الشكل سالبة لملون جرام غير مكونة للسبورات قطرها ٠,٥ مايكرومتر وطولها ١,٠-٣,٠ مايكرومتر. يتألف الغلاف الخلوي من غشاء خارجي (مؤلف من Phospholipid و Proteins و Lipopolysaccharides) وغشاء داخلي وبينهما البلازما المحيطي الذي توجد داخله طبقة مفردة من السكريات الببتيدية (Peptidoglycan) والتي تتألف من وحدة تركيبية نموذجية فيها الحامض (-N acetylmuramic acid) مرتبط بأصرة أميدية إلى ببتيد مؤلف من D-alanine و L-alanine و D-alanine و meso-diaminopimelic acid و glutamic acid. تكون أغلبها متحركة بواسطة أسواط محيطية (Peritrichous flagella) في الوسط السائل وكذلك توجد الأهداب (Pili) وهي عبارة عن زوائد بروتينية رفيعة تبرز من سطح الخلية الجرثومية وتتكون من بروتينات كارهة للماء (Hydrophobic) مما يساعد في حدوث عملية الالتصاق (Adhesion) لجراثيم الاشريشيا القولونية (Sarah et al., Zahavi et al., 2011; 2014; Sargurunathan and Harry, 2015).

١١-٢ المحتوى الوراثي لاشريشيا القولون Genetic Content of *E.coli*

تحتوي *E.coli* على كروموسوم منفرد مرصوف إلى تركيب مدمج (Compact-structure) يعرف بالنيوكلويد (Nucleoid) وقد تحتوي أيضا على بلازميد حلقي. يبلغ حجم الجينوم لها ٤٦٠٠ كيلو زوج قاعدي وذي تسلسل معلوم بشكل كامل، تتجمع اغلب الجينات الامراضية مع بعضها في تجمعات كبيرة تسمى الجزر المرتبطة بالامراضية (Pathogenicity Associated Islands) (PAIs)

(Kryger et al., 2015 ; Farshad et al., 2012). هنالك الكثير من السلالات التي تختلف في طرازها الجيني (Genotype) عن الطراز الجيني في السلالة البرية (Wild-Type *E.coli*) بسبب الطفرات الطبيعية التي تحصل في الجينوم والتي تضيف سلالات مختلفة عديدة إضافة إلى الموجودة حالياً. قد تحمل جينات تشفر لصفات مفيدة للخلية المضيف مثل صفة مقاومة المضادات الحيوية. تؤثر البلازميدات المشفرة لمقاومة المضادات الحيوية في صحة الإنسان لأنها تسبب انتشار المقاومة بشكل سريع بين أنواع الجراثيم كذلك الصفات المشفرة من الكروموسوم مما تؤدي إلى فشل المضادات الحيوية الجديدة في علاج الأحمال الجرثومية (Melha, 2013; Johnson et al., 2012).

٢-١٢ إمراضية اشريشيا القولون *pathogenesis of E.coli*

تعيش هذه الجراثيم في أمعاء الإنسان وتعد من الفلورا الطبيعية (Normal Flora) ولها فوائـد جمـة في البيئـة المعـوية منها إنتاج الفيتامينات B و E و K2، فضلاً عن دورها في منع نمو الممرضات في الأمعاء، تتسبب بامراض للإنسان وتختلف شدة الامراضية حسب نوع السلالة وموقع الإصابة.

قد تصل نسبة تجرثم المجاري البولية لحديثي الولادة بجرثومة *E.coli* (١٧-٣ %) (Schroeder et al., 2015 ; Downey et al., 2010) وذلك لكونها جراثيم انتهازية لها القدرة على الانتقال من موقعها الطبيعي من الأمعاء في جسم الإنسان إلى مواقع مختلفة وإحداث إصابات انتهازية فيه (Opportunistic Infection) (Brooks et al., 2013). لها القدرة على البقاء حية خارج الجسم مما يجعل منها أدلة على التلوث البرازي. تعد الاشرشيات القولونية من أهم المسببات الجرثومية للإسهال عند الأطفال وعند المسافرين والإسهال المزمن و من الأمراض الأخرى التي تسببها الاشرشيات القولونية هو التهاب البريتون والتهاب كيس الصفراء و خراج الزائدة الدودية والتسمم الدموي والتهاب الجروح والحروق (Burton and Engelkirk, 2004).

٢-١٣ اشريشيا القولون المرضية الخارج معوية

Extra Intestinal Pathogenic *E.coli* (ExPEC)

تستهدف جراثيم الاشرشيات القولونية الخارج معوية كل أعضاء الإنسان و الحيوان وتشمل إصابات أنواع مرضية مختلفة منها أحمال المجاري البولية و السحايا (Meningitis) و إصابات

بطنية داخلية (Intra-Abdominal Infections) وذات الرئة (Pneumonia)، إصابات الأنسجة الرخوة (Soft Tissue Infections) الإصابات المتعلقة بالأداة الداخل وعائية (Intravascular Device-Associated Infections) والتهاب العظام (Osteomyelitis). تشمل (ExPEC) على الكثير من العوامل الامراضية منها أهداب الالتصاق و الهيمولايسين والبكتين الهوائي (Aerobactin) الذي يشترك في أمراضيتها (Lloyd *et al.*, 2007 ; Maynard *et al.*, 2004).

٢-١٤ إمراضية إشريشيا القولون المسببة للاخماج البولية

Uropathogenic *E.coli* (UPEC)

تعتمد إمراضية هذه الجراثيم كمسبب لاختماج المجرى البولي على عدد واسع من محددات الضراوة، إذ تعد أشهر جرثومة مسؤولة عن أختماج المجرى البولي وهي عبارة عن نسيلة (Clone) لمستعمرات منتقاة من الفلورا الطبيعية للأمعاء التي تمتلك عوامل الضراوة Virulence Factors (VFs) المختلفة بما يمكنها من أستيطان وغزو القناة البولية وإحداث الاختماج (Amanda *et al.*, 2010). تقريباً وفي معظم الحالات تصعد جراثيم UPEC إلى المثانة عبر الإحليل (الطريق الصاعد). بواسطة الأهداب ترتبط هذه الجراثيم مع المستقبلات الموجودة على سطوح الخلايا الظهارية للمضيف وبالتالي قد تؤسس لعوامل الضراوة وأستيطان القناة البولية (Farshad *et al.*, 2011).

٢-١٥ مستضدات الاشرشيا القولونية *E.coli* Antigens

تحتوي جراثيم *E.coli* على ثلاثة انواع من المستضدات السطحية الخاصة بتصنيف النوع وهي:

أ- المستضد السوطي Flagellar Antigen

يرمز له بالرمز H هو عبارة عن بروتين غير ثابت بالحرارة يتأثر بدرجة (١٠٠°م) ويشكل جزءاً من التركيب الخارجي للخلية وقد عرف دولياً (٥٠) مستضداً من نوع H-50

(H1) لها القدرة على تحفيز الضد IgG مناعياً ويدعى أيضاً بعامل الاستعمار (Subhash, 2012).

ب- مستضد المحفظة Capsular Antigen

يرمز له بالرمز K هو بروتين أو عديد سكريات غير ثابت الحرارة يأخذ شكل محفظة أو طبقة مخاطية تحيط بالخلية من الخارج ، قد يمثل المستضد ما يعرف بالأهداب (Pili) التي تساعد الجراثيم على الالتصاق على سطوح الخلايا وهناك سلالات لجرثومة *E.coli* يمكن أن تحتوي على أكثر من مستضد K المعروف منه دوليا (١٠٣) مستضد (K103-K1) وله القدرة على التحفيز المناعي (Subhash, 2012).

ج- المستضد الجسمي Somatic Antigen

يمثل المستضد O وهو من السكريات المتعددة (Lipopolysaccharides) نوع من المستضدات المرتبطة بضرارة UPEC, تحمي طبقة LPS الخارج خلوية UPEC من عملية البلعمة من قبل الخلايا المناعية مثل الخلايا المتعادلة (Neutrophils) أو تمنع قتلها بواسطة النظام المتمم (Complement-Mediated) لذا تلعب طبقة LPS الجرثومية دوراً في مقاومة جراثيم UPEC لمصل دم الإنسان كمقاومة ضد جرثومية يتكون المستضد السطحي من الدهون أ (ipids-A) واللب (Core) وسلاسل السكر الجانبية (Side-Chain). إن الجزء المهم هو Lipids-A يكون سموما داخلية (Endotoxin) وهو ثابت بالحرارة يقاوم الغليان لمدة ساعتين وهناك (١٨٤) نوع مصلي من المستضد O هي (O184-O1) منها ٧٦ نمط تم تحديدها بصورة كاملة. (O-antigen Biosynthesis Gene Cluster) و ١٠٨ لم تعرف تسلسل قواعدها كاملة (Sohinee et al., 2014).

تم اكتشاف ثلاث مجاميع فرعية (O18ab/O18ac و O28ab/O28ac و O112ab/O112ac) حيث أصبح مجموع الأنماط المصلية المسجلة ١٨٧ مجموعة, وبينت الدراسات المصلية للجراثيم المسببة لاختلاج المجرى البولي مجموعة سلالات من جراثيم UPEC يبدو أنها تمثل النسب الجديدة من الأنواع المصلية التي تمتلك المقاومة للأدوية المتعددة

(Vijayalakshmi et al., 2015; Holly et al., 2015; Atsushi et al., 2015 a, b)

١٦-٢ حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية Antibiotics Sensitivity of

Bacteria

في مجال دراسة حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية هناك اتجاهان هما:

أولاً: آلية تأثير المضاد الحيوي على الخلية الجرثومية Mechanism of Action

قسمت ميكانيكية تأثير المضاد الحيوي على الخلية الى:
1- تعمل مجموعة المضادات على التدخل في بناء الجدار الخلوي Cell Wall Synthesis

مثل: β -lactams (Penicillins - Cephalosporins), Glycopeptide
تعمل البنسلينات على التدخل مع العمليات الحياتية لبناء الجدار، في تأثيرها على منع
تجميع مكونات الجدر الخلوية للخلايا الجرثومية، وبالتالي تحول دون ارتباطها واشترائها
في الجدار الخلوي، في حين تعمل السيفالوسبورينات على تثبيط الروابط المتعامدة في طبقة
الببتيدوجليكان المكونة لجدار الخلية الجرثومية.

2- مضادات حيوية تعمل على تثبيط بناء البروتين Inhibition of Protein Synthesis
مثل: Macrolides و Tetracyclines و Aminoglycosides إذ تعمل على الوحدة
البنائية 30S ribosomal

3- مضادات تعمل على تثبيط المسار الأيضي Inhibition of Metabolic Pathway
مثل: Cotrimoxazole يتكون من Trimethoprim - sulfamethoxazole ويتبع
عائلة Sulfonamides وتعمل كفاءة الخليط بعمل كل مضاد على مرحلة من مراحل تكوين
الأحماض النووية مما يؤدي إلى تأثير مميت على الخلايا الجرثومية.

4- مضادات تعمل على التدخل مع تكوين الأحماض النووية Nucleic Acid Synthesis
مثل: Rifampin و Quinolones.

5- مضادات تعمل على تثبيط حيوية الغشاء الخلوي

Inhibition of Cell Membrane function

مثل: Polymyxins و Daptomycin إذ أن مجموعة Polymyxins تعطل بناء
الفوسفوليبيد الخاصة بالخلية (Zeng and Lin , 2013; Tenover, 2006).

ثانيًا: مقاومة الجراثيم للمضاد الحيوي Antibiotics Resistance Bacteria

إن أصل مقاومة المضاد الحيوي هي قدرة الكائن الحي الدقيق على تحمل مفعول المضاد
الحياتي، وظهور سلالات تحمل جينات مقاومة المضادات الحياتية تحد من اختيار
المضاد الحيوي المناسب فنلاحظ ان الجين المقاوم نوع *aac(3)-IV* الذي يعمل على
Aminoglycoside N-Acetyltransferase بواسطة Acetylation ويكون مقاوم
للمضاد Gentamicin وله عدة انواع اخرى حسب نوع التطابق البروتيني الذي ينتج عنه
المقاومة من هذه الانواع (CAA25642 او ABB43029 او ACI04668 او
YP_002891158) اما الجين المقاوم *dfrAI* تتصف مجاميع أ(A) فيه بانها غير حساسة

للمضادات المختزلة للـ Dihydrofolate ولا يتم تثبيطها بواسطة المضاد الحياتي Trimethoprim ولها ارتباطات متعددة منها (ABP35558 و BAD38866 و ACL98095 و ABK60042 و ABB76658 و BAD08520) اما الجين المقاوم نوع *sulI* فالانواع المصلية التي تحمل هذا الجين تكون مقاومة للمضاد الحياتي Sulfonamide ويوجد منه ٢٨ نوع مقاوم نذكر منها (AAP51287 و BAE54325 و AAQ16671 و AAA92747... والـ) وكذلك الجين المقاوم *tetA* الذي يحتوي على ٨ مواضع لارتباط التماثل الذي يعمل على طرد المضاد الحياتي Tetracycline ومن انواعه (CAC41338 و YP_190205 و AAT37598 و P02982...الـ) (Center for Bioinformatics, 2016). وقد صنفنا مقاومة الجراثيم للمضادات الحياتية بآليات عدة منها الاتي:

1- إحداث تغيير في المضاد الحياتي مثل: تحطيم حلقة β -lactam الذي في جزيء البنسلين بواسطة أنزيم β -lactamase وبذلك يصبح الجزيء غير فعال كما في الجين المقاوم *CITM*.

٢- إحداث تغيير في التركيب الداخلي الجرثومي وهو أي تغيير في الجينات الكروموسومية، أو بواسطة اكتساب جينات المقاومة من الجراثيم الأخرى، مما قد تؤهل الخلايا الجرثومية لإنتاج أنزيمات تتلف المضاد الحياتي، أو تغيير أنظمة النفاذية مما يعوق وصول المضاد إلى هدفه داخل الخلية الجرثومية، أو إنتاج مسار أضي بديل، والذي يجنب الخلية الجرثومية مفعول المضاد الحياتي.

3- تثبيط المستقبلات Receptors Inhibition مثل بناء غشاء خلوي جديد من البروتين مختلف لا يوجد عليه مستقبلات المضاد الحياتي (Jun et al., 2015 ; Tenover, 2006 : Turnidge et al ., ٢٠٠٢).

مواد العمل وطرائقه

Materials and Methods

١-٣ المواد Materials

3-1-1 الأجهزة Instruments

أُستعملت في الدراسة الحالية عدداً من الأجهزة والمعدات جدول (١-٣).

جدول (١-٣): الأجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة مع المنشأ.

ت	الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
١	مؤصدة Autoclave	Hiclave, Hirayama(Japan)
٢	جهاز نبذ مركزي Centrifuge	Hettich(Germany)
٣	جهاز نبذ مركزي مبرد Cooling Centrifuge	GFL(Germany)
٤	جهاز تقطير Distilator	GFL(Germany)
٥	جهاز الترحيل الهلامي Gel Electrophoresis Apparatus	Labner (Taiwan)
٦	حاضنة Incubator	Memmert (Germany)
٧	مجهر ضوئي Microscope	Olympus, BH-2 (Japan)
٨	ماصات دقيقة Micropipette	Eppendorff (Germany)
٩	جهاز التسخيم الجزيئي الدوار الحراري Swift™ MiniPro Thermal Cycler	ESCO (Singapor)
١٠	مقياس الرقم الهيدروجيني Ph Meter	LKB (Sweeden)
١١	ميزان حساس Sensitive Balance	Mettler (USA)
١٢	شرائح زجاجية Slides	Meheco (China)
١٣	حمام مائي Water Bath	Kotterman(Germany)
١٤	جهاز قياس تركيز DNA Nano drop	Avans (USA)
١٥	مازج هزاز Vortex Mixer	Griffin (Germany)
١٦	نظام التوثيق الهلامي Gel Documentation System	Hipot Tested(UK)

٣-١-٢ المواد الكيميائية

Chemicals

يوضح الجدول (٣-٢) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة الحالية.

جدول (٣-٢): المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة.

ت	اسم المادة	الشركة المجهزة والمنشأ
١.	ايثانول ٩٦٪ - ايثانول ٩٩٪ Ethanol	BDH (England)
٢.	بروميد الاثيديوم Ethidium bromide	Sigma (USA)
٣.	ملون جرام Gram stain	Sybio (Syria)
٤.	كليسروول Glycerol	Sigma (USA)
٥.	فوق اوكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide	BDH (England)
٦.	ايزوبروبانول Isopropanol	Mast Diagnostic (UK)
٧.	كاشف كوفاك Kovac's reagent	Himedia (India)
٨.	احمر المثيل Methyl red	Fluka (India)
٩.	رباعي مثيل فنيولين ثنائي امين ثنائي كلوريد الهيدروجين- <i>N-N-N-tetra methyl -P-phenylenediamine</i> dihydro chloride	BDH (England)
١٠.	مسحوق تربتون Tryptone powder	Himedia (India)

٣-١-٣ : الأوساط الزرعية Culture Media

أُستعملت في الدراسة الحالية مجموعة من الأوساط الزرعية الموضحة في جدول (٣-٣).

جدول (٣-٣): الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة مع الشركات المجهزة.

ت	اسم الوسط الزراعي	الشركة المصنعة والمنشأ
١.	أكار الماكونكي MacConkey Agar	Soluacea(Netherlands)
٢.	أكار الايوسين مثيلين الأزرق Eosin Methylene Blue Agar	Oxoid (England)
٣.	أكار مولر هنتون Muller-Hinton Agar	Oxoid (England)
٤.	أكار سيمون سترات Simmons Citrate Agar	Oxoid (England)
٥.	أكار ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar iron agar	Oxoid (England)
٦.	ماء الببتون Peptone Water	Oxoid (England)
٧.	وسط احمر المثل – فوكس بروسكور Methyl Red- Vogus Proskaur Media	Oxoid (England)
٨.	وسط أكار المانيتول الملحي Mannitol salt agar	Soluacea(Netherlands)
٩.	مرق نقيع القلب- الدماغ Brain Heart Infusion Broth	Oxoid (England)
١٠.	وسط اختبار إنزيم الدنا DNase Test Medium	Oxoid (England)

٣-١-٤ المواد والمعدات الجاهزة المستعملة في التشخيص الجزيئي

أُستعملت الكثير من المواد والمعدات الجاهزة في التشخيص الجزيئي لعزلات جراثيم UPEC.

جدول (٣ - ٤): المواد والمعدات الجاهزة المستعملة في التشخيص الجزيئي.

ت	المادة	الوصف	الشركة المصنعة
1.	DNA ladder (Marker) 2000 bp	استخدم معلم الدنا (DNA Marker) لتحديد حجم قطع الدنا مزدوج الشريط و يتألف من ١٢ قطعة دنا مزدوجة الشريط بأحجام ١٠٠ - ٢٠٠٠ زوج قاعدي.	Bio Neer (Korea)
2.	PCR Pre Mix, Total 20, 50 ul.	جهزت اشربة الانابيب بالمواد: Top DNA Polymerase 1 مايكرون و ٢٥٠ مايكرو مول لكل من القواعد dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) و ١٠ ملي مول من Tris-HCl (pH 9.0) و ٣٠ ملي مول من KCl و ١,٥ ملي مول من MgCl ₂ وصبغة ومثبت وتضاعف الكميات حسب السعة.	Bio Neer (Korea)
3.	DNA extraction kit	ويجهز على شكل خمس محاليل هي: محلول GT و محلول W1 ومحلول W2 و Proteinase K و محلول التخفيف و GD Columns و انابيب سعة ٢ ml و ١,٢ ml.	geneaid genomic (Sweden)
4.	Api 20 E kit, Api staph, strep kits	عدة الفحص الذي يضم شريط الفحص بالإضافة إلى ما يأتي: 1-API suspension media 2ml 2-API GP Medium 3- VP1 +VP2 reagent 4-Nin reagent	Biomérieux (France)
5.	Serotyping kit for <i>S.aureus</i>	5- Zym A + Zym B reagent 6-Macfarland standard solution 0.5	Sigma-aldrich (Switzerland)

Biotech (Canada)	استخدم اثناء عملية الترحيل ويجهز على شكل ثلاث محاليل (Tris-Borate, EDTA, Tris Base, BoricAcid, EDTA)	X10 TBE Solution	6.
---------------------	---	---------------------	----

٣-١-٥ البادئات المستعملة في التشخيص الجزيئي للأنماط المصلية.

البادئات المستعملة لتشخيص الأنواع المصلية لجراثيم (UPEC) مجهزة من شركة (Li et al., 2010) (IDT. Coralville, USA).

الانماط	الجين	اسم البادئ وتسلسله	حجم الناتج (bp)	البرنامج	عدد الدورات
O6	wzx	wl-14646 GGATGACGATGTGATTTTGGCTAAC	783	95 °C / 5 min 95 °C / 30 s 55 °C / 1 min 72 °C / 1 min 72 °C / 5 min	30
		wl-14647 TCTGGGTTTGCTGTGTATGAGGC			
O15	wzy	wl-14672 CTTGTTAGAGTCATTGGTGTATCG	183	94 °C / 3 min 94 °C / 30 sec 55 °C / 30 sec 72 °C / 1 min 72 °C / 10 min	30
		wl-14673 ATAAAACGAGCAAGCACCACACC			
O16	wzx	wl-14654 GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG	302	95 °C / 5 min 95 °C / 30 s 55 °C / 1 min 72 °C / 1 min 72 °C / 5 min	30
		wl-14655 TTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG			
O25	wzy	wl-14666 GAGATCCGTCTTTTATTTGTTTCGC	230	94 °C / 3 min 94 °C / 30 sec 55 °C / 30 sec 72 °C / 1 min 72 °C / 10 min	30
		wl-14667 TTCTGGATACCTAACGCAATACCC			
E.coli	16SrRNA	wl-3110 AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	919	94 °C / 3 min 94 °C / 30 sec 55 °C / 30 sec 72 °C / 1 min 72 °C / 10 min	35
		wl-3111 CCGTCAATTCATTTGAGTTT			

جدول (٣ - ٥): تسلسل البادئات المستعملة في تشخيص الانماط المصلية.

٣-١-٦ البادئات المستعملة في التشخيص الجزيئي لجينات المقاومة.

يوضح جدول (٦-٣) البادئات المستعملة لتشخيص جينات المقاومة لجراثيم UPEC مجهزة من شركة (Momtaz *et al.*, 2013) (IDT . Coralville, USA).

جدول (٣ - ٦): تسلسل البادئات المستعملة في تشخيص الجينات المقاومة.

اسم الجين	تسلسل البادئ	حجم الناتج (bp)	البرنامج	عدد الدورات
<i>sulI</i>	TTCGGCATTCTGAATCTCAC	٨٢٢	95°C/15 min 94°C/ 30sec 58°C/1 min 72°C/10 min 72°C/ 1 min	35
	ATGATCTAACCCTCGGTCTC			
<i>aac(3)-IV</i>	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT	٢٨٦	95°C/15 min 94°C/ 30sec 58°C/1 min 72°C/10 min 72°C/ 1 min	30
	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT			
<i>CITM</i>	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	٤٦٢	95°C/15 min 94°C/ 30sec 58°C/1 min 72°C/10 min 72°C/ 1 min	30
	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
<i>tet(A)</i>	GGTTCACCTCGAACGACGTCA	٥٧٧	95°C/ 3 min 94°C/ 30sec 57°C/1 min 72°C/1 min 72°C/ 10 min	35
	CTGTCCGACAAGTTGCATGA			
<i>dfrA1</i>	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC	٣٦٧	95°C/15 min	35

	94°C/ 30sec ~55°C/ 1 min 72°C/1 min 72°C/ 10 min		GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	R	
--	---	--	-------------------------	---	--

- *sulI*:Sulfonamide, *aac(3)-IV*:Gentamicin,*CITM*:Beta-lactams,
tet(A):Tetracycline, *dfrA1*: Trimethoprim.

٧-١-٣ المضادات الحيوية Antibiotics

أقراص المضادات الحيوية اختيرت بحسب توصيات منظمة الصحة العالمية لعلاج الإصابة باخماج المجاري البولية مجهزة من شركة (Bioanalyse , Turkey)، (٢٠٠٣، WHO)، جدول (٧-٣).

جدول (٧-٣): أقراص المضادات الحيوية.

الرمز	التركيز (مايكروغرام /قرص)	المضاد الحيوي	ت
GN	١٠	Gentamycin / جنتاميسين	١.
P	١٠	Penicillin/ بنسلين	٢.
T	٣٠	Tetracycline / تتراسايكلين	٣.
NA	٣٠	Nalidixic acid / حامض النالدكس	٤.
F	٣٠٠	Nitrofurantoin/ نايتروفوران	٥.
AMX	٣٠	Amoxicillin / امكسوسلين	٦.
C	٣٠	Chloramphenicol/ كلورامفينيكول	٧.
SXT	٢٥	Trimethoprim- Sulphamethoxazol/ ترايمثوبريم- سلفامكسازول	٨.

٢-٣ طرائق العمل Methods

١-٢-٣ طرائق التعقيم:

أ- التعقيم بالبخر الرطب Steam-Under-Pressure Sterilization

عقمت الأوساط الزرعية بالبخر الرطب بجهاز بالمؤصدة (Autoclave) في درجة حرارة (١٢١م) وتحت ضغط (١٥ باوند/انج) لمدة (١٥) دقيقة.

ب- التعقيم بالحرارة الجافة Dry Heat Sterilization

عقمت الزجاجيات المستعملة في تحضير الأوساط الزرعية والمحاليل بالفرن الكهربائي (Oven) تحت درجة حرارة (180) م° لمدة ساعتين.

٢-٢-٣ تحضير الأوساط الزرعية Prepare Culture Media

حضرت الأوساط الزرعية بحسب تعليمات الشركة المصنعة لها والمثبتة على العبوة وعقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة ١٢١م وضغط ١٥ باوند/ انج^٢ ولمدة ١٥ دقيقة وحضنت بدرجة حرارة (٣٧) م° ولمدة (٢٤) ساعة للتأكد من عدم تلوثها. حفظت بعدها بدرجة حرارة (٤) م° لحين الاستعمال.

٣-٢-٣ تحضير المحاليل والكواشف Prepare Solution and Reagent

حضرت المحاليل و الكواشف والصبغات المستعملة كافة في عزل الجراثيم وتشخيصها بحسب ما ورد في (Macfaddin, 2000).

أ- كاشف الكتاليز Catalase Reagent Solution

حضر محلول بتركيز (3 %) من بيروكسيد الهيدروجين واستخدم للكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم Catalase وحفظ في قنينة معتمة .

ب- المحاليل المستعملة في اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية

• **محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard Solution 0.5**

استعمل المحلول الجاهز المجهز من شركة (Biomérieux France)

• **المحلول الملحي الفسلجي المتعادل Normal Saline Solution**

تم استعماله جاهزا وحفظ لحين العمل به.

ت - المحاليل الخاصة بتقنية PCR

المحاليل المستعملة في تفاعل التضاعف السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا PCR

• **محاليل البودائ Primers Solutions**

تم تحضير محاليل البودائ بحسب تعليمات الشركة المجهزة لها باستعمال الماء المقطر اللأأيوني المعقم للحصول على تركيز (100) بيكومول\مايكروليتر.

• **محلول 10X TBE**

تم أستعماله بإضافة جزء واحد من المحلول لكل 9 أجزاء من الماء المقطر ليكمل الحجم ل 10 مليليتر لعمل جل الاكاروز و الوسط الخاص بالترحيل.

3-3 جمع العينات Samples Collection

جمعت 500 عينة إدرار من أطفال تتراوح أعمارهم من شهرين حتى عمر 14 سنة من كلا الجنسين من المصابين ومن المشكوك بإصابتهم بخمج المجاري البولية في مستشفى محمد الموسوي ومستشفى بنت الهدى للولادة والأطفال في مدينة الناصرية للفترة من شهر أيلول 2014 إلى حزيران 2015. أخذت العينات من المرضى الراقدين والمراجعين للمستشفيات وتم تسجيل (معلومات طبية عن المريض باستمارة خاصة تشمل الاسم والجنس والعمر والسكن وتاريخ اخذ العينة) (ملحق 3-3). جمعت العينات من منتصف البول (Midstream urine) في حاويات خاصة معقمة أو أكياس خاصة بالأعمار الصغيرة ذات غطاء محكم وذات حجم 10 مليلتر ونقلت إلى مختبر الأحياء المجهرية في المستشفى لزراعتها على أوساط إنمائية لإجراء التجارب اللاحقة.

٣- ٤ تحليل البول Urine Analysis

شملت خطوات التشخيص المختبري الاحتمالي لاختماج المجرى البولي القياسات الاتية :

١. قياس الزيادة في عدد خلايا الدم البيض (البيلة القيفية) بوصفها مؤشراً لحدوث الاستجابة الالتهابية أو الإصابة باختماج المجرى البولي (عبد الرحمن، ٢٠٠٦). إذ يدل وجود أكثر من ٥ خلايا دم بيض لكل ٣ مايكروليتر من البول وجود البيلة القيفية.
٢. تستخدم أشرطة الفحص الكاشفة (Dip Stick) في تحليل البول وهي عبارة عن أشرطة بلاستيكية مشحونة بالكواشف.
٣. تقاس البيلة الجرثومية بالفحص المجهرى لعينة البول ويعني وجود أي جراثيم ولو خلية واحدة في الحقل المجهرى الواحد نتيجة موجبة معنوية (Significant Bacteriuria) أي وجود الجراثيم في عينة البول بعدد اكبر أو يساوي ٥ وحدات مكونة للمستعمرة لكل مل بول (Islam et al, 201٥).

٣ - ٥ زرع عينات البول Urine Culture

١. يساعد عدد الجراثيم الناتج من زرع البول لكل مل في التشخيص التفريقي لجراثيم أخماج المجرى البولي وبناءً عليه تستعمل عـرواـت معايرة (Calibrated Inoculating Loops) تنقل حجم معلوم من البول (٠,١ أو ٠,٠١ مل) ويعد الفحص موجباً عند وجود ١٠^٥ خلية /مل وحدة مكونة للمستعمرة (Colony Forming Unit (CFU)) من نوع واحد من الجراثيم.
٢. تزرع عينات منتصف البول على وسطين الوسط الأغثائي المتمثل بآكار الدم (Blood Agar) والتفريقي آكار الماكونكي (MacConkey Agar) وتحضن في ظروف هوائية بدرجة حرارة ٣٧ م^٥ لمدة ٢٤ ساعة.

٣-٦ تشخيص الجراثيم Bacterial Diagnosis

شُخصت الجراثيم اعتماداً على صفاتها الزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية وكالاتي:

أ- الصفات الزرعية Cultural Properties

شخصت العزلات الجرثومية النامية مبدئياً اعتماداً على صفاتها الزرعية من حيث حجم المستعمرات، ولونها، وقوام المستعمرات فضلاً عن قدرتها على تحليل كريات الدم الحمراء على وسط آكار الدم.

ب- الفحص المجهرى Microscopical Examination

أخضعت العزلات الجرثومية إلى الفحص المجهرى فقد صبغت مسحة خفيفة من المستعمرات الجرثومية بملون جرام، وفحصت تحت العدسة الزيتية لتمييز شكل الخلايا، وطريقة تجمعها، وإيجابيتها، وسلبيتها للملون.

ج- الاختبارات الكيموحياتية Biochemical Tests

وتوزعت العزلات الجرثومية اعتماداً على الاختبارات اعلاه الى قسمين رئيسيين:

١- الجراثيم السالبة لملون جرام Gram-Negative Bacteria

تم إجراء الفحوصات الكيموحيوية للجراثيم السالبة لملون جرام استناداً إلى (Forbes et al ., 2007). وشملت الاتي:

أ- اختبار أنزيم الكاتليز Catalase Test

تضمن هذا الاختبار الكشف عن قابلية الأجناس الجرثومية لإنتاج أنزيم الكاتليز، فقد تم نقل نمو جرثومي على شريحة زجاجية نظيفة وجافة، ووضع على النمو قطرة (3%) بيروكسيد الهيدروجين إذ تكون النتيجة موجبة بظهور الفقاعات الغازية .

ب- اختبار إنتاج إنزيم الاوكسيديز Oxidase Test

نقل جزء من مستعمرة مفردة ونشر على ورقة ترشيح مبللة مسبقا بكاشف أنزيم الاوكسيديز وتحول لون المستعمرة إلى اللون البنفسجي الغامق خلال 2-10 ثواني دليل على ايجابية الاختبار.

ج- اختبار إنتاج الاندول : Indole Production Test

أجري الفحص بتلقيح وسط ماء الببتون بالعزلات الجرثومية وحضنت الأنابيب بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة، بعد ذلك أضيفت قطرات عدة من كاشف كوفاكس Kovac's reagent، إن ظهور حلقة حمراء دليل على ايجابية الفحص.

د - اختبار المثيل الأحمر Methyl-Red Test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على وسط MR – VP بالعزلات الجرثومية وحضنت بدرجة 37 م° ولمدة ٢٤ ساعة أضيفت قطرات من كاشف المثيل الأحمر Methyl Red إلى النماذج المزروعة مع رج الأنبوبة وظهور اللون الأحمر دلالة على ايجابية الفحص.

هـ - اختبار فوكس فوكس بروسكاور Voges- Proskauer Test

لقت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP بالمستعمرات الجرثومية النقية وحضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 م°. بعد ذلك أضيفت قطرات من (الفانثول 5% و KOH 40%) للتحري عن قابلية الجراثيم على تحليل سكر الكلوكوز جزئيا وتكوين المركب الوسطي Acetyl Methyl Carbinol عند تنميتها في الوسط الحاوي على السكر. إن تحول الوسط إلى اللون الأحمر دليل على ايجابية الفحص.

و- اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

أجري هذا الفحص بنقل جزء من المزروع الجرثومي النامي على وسط الاكار المغذي وبعمق ٢٤ ساعة بواسطة إبرة معقمة إلى وسط اكار سيمون ستريت المائل (Simmon's Citrate Agar Slant) وزرع بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضنت الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧ م°. تغير لون الوسط من اللون الأخضر إلى الأزرق هو دليل على ايجابية الفحص.

ز - اختبار تخمر السكريات وإنتاج CO₂ و H₂S

Sugar Fermentation and CO₂, H₂S Production Test

تم تلقيح وسط كليكلر المائل بالعزلات الجرثومية وذلك بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضنت بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة، بعدها تم التحري عن وجود H₂S حيث يتكون راسب أسود في قعر الأنبوبة و CO₂ من خلال ظهور الفقاعات الغازية في قعر الأنبوبة ويعد دليلا على تحرر CO₂ و تغير لون الوسط إلى اللون الأصفر دليل على تخمير سكر الكلوكوز واللاكتوز.

ح- استعمال عدة التشخيص API 20- E Kit

لغرض التشخيص النهائي للعزلات الجرثومية استعملت عدة التشخيص APi 20E Kit

للتأكد من صحة تشخيص العزلات اعتمادا على الاختبارات الكيموحيوية. يحتوي الشريط على ٢٠ أنبوب صغير للاختبارات الكيموحيوية الخاصة بتشخيص جراثيم العائلة المعوية. استعملت العدة وفق تعليمات الشركة المجهزة.

٢ - الجراثيم الموجبة لملون جرام Gram-Positive Bacteria

لغرض التشخيص التأكيدي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية استعملت الفحوصات الكيموحيوية الآتية :

أ- اختبار النمو على وسط المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar

لقت الأطباق الحاوية على هذا الوسط بجراثيم *Staphylococcus* وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة. إن تغير لون المستعمرة والوسط المحيط بها إلى اللون الأصفر الذهبي دلالة على ايجابية الاختبار أما عدم تغير لون الوسط فتعد نتيجة سالبة.

ب- اختبار إنتاج إنزيم التجلط Coagulase Test

يستعمل هذا الاختبار لتشخيص *S. aureus* عن المكورات العنقودية الأخرى، وقد تم إجراء الاختبار باستعمال الطريقتين الآتيتين (Collee et al., 1996):

● فحص إنزيم التجلط بطريقة الشريحة الزجاجية Slide Test

عمل عالق للخلايا الجرثومية وذلك بمزج 1-2 مستعمرة مع قطرة من محلول الملح الفسلجي على شريحة زجاجية، وأضيفت للعالق قطرات من بلازما الدم ومزجت جيدا، عدت النتيجة موجبة عند تكتل العالق خلال 5-10 ثوان، ثم عمل فحص السيطرة السالبة بمزج الجراثيم مع قطرة من محلول الملح الفسلجي على الشريحة الزجاجية.

● فحص إنزيم التجلط بطريقة الأنبوب Tube Test

عمل عالق جرثومي الذي أخذ من مستعمرات عدة فتيه بعمر (18-24) ساعة، وتمت مجانسة هذا العالق مع المحلول الملحي الفسلجي، ثم مزج (0.1) مل من هذا العالق مع (0.5) مل من البلازما، حضنت الأنبوب بدرجة 35 م لمدة 4 ساعات، بعد ذلك تم الفحص أو التحقق من الخثرة (Clot)، إذ تكون النتائج موجبة بعد 4 ساعات، بعد ذلك حضنت الأنبوب التي أعطت نتيجة سالبة حتى اليوم التالي للتأكد من النتيجة.

ج- استعمال عدتي التشخيص Api Strip and Api Staph Kits

لغرض التشخيص النهائي لعزلات المكورات العنقودية و المسبقيات استعملت عدتا التشخيص Api-staph و Api Strip بحسب تعليمات الشركة المصنعة.

هـ - التشخيص المصلي Serological Diagnosis

تم التشخيص المصلي بمستوى حساسية (٩٨,٦%) باستعمال عدة التشخيص Staphylo mono test kit وأجري فحص التلازن الجرثومي مع عدة التشخيص لتفريق *Staph.aureus* عن باقي العنقوديات الأخرى بحسب تعليمات الشركة المصنعة (Fluka, Switzerland).

٧-٣ الجانب الجزيئي Molecular Side

Whole DNA Extraction

1-7-3 استخلاص الدنا الكلي

استخلص الدنا الكلي لجراثيم UPEC لاستعماله في التشخيص الجزيئي كالآتي:

١- اعداد العزلة Sample Preparation

نقل ١ مليلتر من المعلق البكتيري الى انبوب جمع سعة ١,٢ مليلتر ووضع في جهاز الطرد المركزي المبرد من ١٤٠٠٠-١٦٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الرائق واضيف ١٨٠ مايكرو لتر من محلول GT وتم خلطه بواسطة جهاز المازج الدوار (vortex) لغرض التنظيف والتعقيم ولقطع غشاء الخلية والجزء النووي الداخلي واطلاق الحامض النووي الـ DNA واضيف بعدها ٢٠ مايكرو لتر من انزيم Proteinase K لقطع جزء من بروتين الهيستون وتحرير الحامض النووي وحضنت الانابيب لمدة ١٠ دقائق في حمام مائي بدرجة حرارة 60 °م وخلال هذه الفترة يقلب كل ٣ دقائق.

٢- التلـ Lysis

أضيف ٢٠٠ مايكرو لتر من المحلول GB ولكل عذلة ومزجت بواسطة المازج الدوار لمدة ١٠ ثواني ووضع ٢٠٠ مايكرو لتر من محلول الاستخلاص (Elution Buffer) الذي يحتوي على ١٠ mM ملي مول من Tris-HCl وحضنت الانابيب بعدها بدرجة ٧٠ °م لمدة ١٠ دقائق للتأكد من تحلل الخلايا وخلال الحضانة تم تقلب الانابيب كل ٣ دقائق في الحاضنة.

٣- ارتباط الحامض النووي DNA Binding

أضيف ٢٠٠ مايكرو لتر من كحول الايثانول المطلق للعزلة المتحللة ورج بقوة وصب الخليط في انبوب الاستخلاص (GD Column) الموضوع داخل انبوبة الجمع (Collection Tube) سعة ٢ مايكرو لتر وتم وضع الانابيب بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة دقيقتين من ١٤٠٠٠-١٦٠٠٠ دورة / الدقيقة رمي بعدها الانبوب الجامع مع الراشب المتبقي لكل عذلة ووضعت انابيب الاستخلاص الحاوية على بقية المحتويات في انابيب جمع اخرى بنفس السعة.

٤- الغسل Wash

أضيف ٤٠٠ مايكرو لتر من محلول الغسل الى انبوب الاستخلاص وطرده بنفس الطريقة ولمدة ٣٠ ثانية ورفع انبوب الاستخلاص وتم وضعه في انبوب جمع بنفس السعة واضيف له ٦٠٠ مايكرو لتر من محلول الغسل الثاني بعد التأكد من اضافة الايثانول المطلق له وتم الطرد بنفس عدد الدورات لمدة

٣٠ ثانية ورمي انبوب الجمع ووضع انبوب الاستخلاص في انبوب جمع جديد وتم الطرد لمدة ٣ دقائق لتجفيف محتوى انبوب الترشيح.

٥- المسد

ينقل انبوب الاستخلاص لأنبوب سعة ١,٥ مليلتر ويضاف ١٠٠ مايكرو لتر من محلول الاستخلاص (Pre-Heated Elution Buffer) ويترك ٣ دقائق وبعدها تم الطرد لمدة ٣٠ ثانية يزال انبوب الاستخلاص ويؤخذ ١ مايكرو لتر لقياس تركيز الحامض النووي ويحفظ المتبقى بدرجة -٢٠ °م لحين التشخيص.

٣-٧-٢ تركيز الحامض النووي (DNA) Concentration of DNA

يعد قياس الحامض النووي DNA بتقنية Nano Drop عملية سهلة وسريعة إضافة إلى أنها تكشف عن نسبة الخطأ المحتمل وجودها في العينة إذ إن القراءات القياسية للحامض النووي هي كالآتي: DNA

إما القراءات التي تختلف عن هذه النسب فهي دلالة على وجود تلوث في العينة، أي إن العينة مازالت حاوية على البروتين أو بعض المواد الأخرى. تمت القراءة عند طول موجي 280 / 260 nm طريقة عمل الجهاز: (Desjardins and Conklin , 2010)

- 1- تم اختيار الإيقونة الخاصة بالجهاز (Nano Drope) الموجودة على سطح المكتب.
- 2- تم اختيار Nucleic Acid من القائمة.
- 3- تم اختيار نوع الحامض النووي DNA
- 4- تم اختيار الوحدة القياسية الخاصة بالحامض النووي وهي $\text{ng}/\mu\text{L}$.
- 5- تم اختيار الطول الموجي الملائم للمحلول المراد فحصه, إن الطول الموجي ٢٨٠-٢٦٠ هو الملائم لقياس وتقدير الحامض النووي.
- 6- تم اختيار الأيقونة (Add to the Report) لإضافة جميع القياسات الخاصة بجميع العينات وحفظها لحين الرجوع إليها عند الحاجة.
- 7- صفر الجهاز بواسطة (Blank) المحلول المذيب للحامض النووي.
- 8- وضع (١-٢) مايكرو لتر من محلول البلانك على عدسة الجهاز ثم تم انزال ذراع الجهاز والضغط على كلمة (Blank).
- 9- نظفت العدسة بورق التنظيف الخاص ثم وضعت العينة وتم الضغط على كلمة (Measure) ليبدأ الجهاز بالقياس (Colobătiu et al., 2014 ; Nathan and Jayne , 2012).

● تحضير البادئات

حضرت البادئات اعتمادا على تعليمات الشركة المصنعة لها بإذابة المنتج المجفد بالماء المقطر المنزوع الايونات المعقم بعد نبذ البادئ مركزيا بعناية. تم تخفيف البادئ للحصول على العدد النهائي المطلوب من البيكوميولات اعتمادا على التعليمات الخاصة لكل من البادئ (primer) والـ Pre Mix (Dormanesh *et al.*, 2013 ; Siraj *et al.*, 2011).

Preparation of Reaction Mixture

• تحضير مزيج التفاعل

حضر مزيج التفاعل وفقا لتعليمات الشركة المنتجة (BioNeer-Korea), باضافة البادئ العكسي (Upstream Primer) والبادئ الأمامي (Downstream Primer) بحسب كل مصدر و5 مايكرو لتر من قالب الدنا (DNA Template) الذي يكون بتركيز ٥٠ مايكرو غرام / مليلتر واكمل الحجم من الماء المقطر منزوع الايونات ومضاعفة الكمية بالنسبة لحجم ٥٠ مايكرو لتر، شغل جهاز ال-PCR و ضبطت إعداداته تبعا لكل برنامج كما في (جدول ٣-٥ و جدول ٣-٦) وتم التضخيم باستخدام جهاز PCR كمزيج ثنائي وثلاثي متعدد (Combination Multiplex) لتطابق درجات الالتصاق لكل من الجينات موضوع البحث (Siraj et al., 2011 ; Dormanesh et al., 2014).

Gel Preparation

• تحضير الهلام

- أ- وزن الاكاروز و وضع في ورق زجاجي مقاوم للحرارة (Erlenmeyer Flask)، إذ حضر الاكاروز بتركيز ١٪ لترحيل نواتج ال-PCR .
- ب- أضيف المحلول المنظم (TBE Buffer 0.5X) إلى الدورق الحاوي على الأكاروز و مزج جيدا من خلال تدوير الدورق .
- ت- ذوب مزيج الاكاروز والمحلول المنظم بالتسخين على اللهب لمدة ٣٠ ثانية ثم أزيل الدورق عن المصدر الحراري وهز لكي تمزج المحتويات جيدا، وكررت العملية لحين ذوبان الاكاروز بشكل كامل.
- ث- أضيف بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) إلى المزيج ليصبح تركيزه النهائي في الهلام ٠,٥ مايكرو كرام / مليلتر.
- ج- ترك الأكاروز ليبرد في حمام مائي عند درجة حرارة ٦٥ م° وذلك لمنع اعوجاج قالب الهلام (Gel Tray) عند صب الهلام.
- ح- صب الهلام في القالب بعد غلق حافتي القالب ووضع المشط المكون للحفر في حافة القالب وترك لكي يتصلب عند درجة حرارة الغرفة، بعد تصلب الهلام فتحت حافتي القالب ووضع الهلام في حوض الترحيل الكهربائي وأزيل المشط.

Agarose Gel Electrophoresis

٥- الترحيل الكهربائي الهلامي

- أ- أضيف لحوض الترحيل محلول منظم مماثل للمحلول المنظم المستخدم في تحضير الهلام (TBE Buffer 0.5X). إذ يقوم المحلول المنظم بمنع عمل أنزيم Exonuclease المقطع للدنا، وكذلك يمكن حركة الشحنات خلال الهلام.
- ب- أُضيفت خمسة أجزاء من نماذج الدنا في حفر الهلام. ووضع معلم مناسب (Lladder-L/DNA Size Marker) للدلالة على حجم قطع الدنا المفصولة.

ت- وصلت أقطاب حوض الترحيل إلى مجهز الطاقة بعد تحميل نماذج الدنا والمعلم في حفر الهلام.

ث- برمج مجهز الطاقة (Power Supply) إلى الفولتية المطلوبة (١-٥ فولت لكل سنتيمتر بين الأقطاب الكهربائية).

ج- شغل جهاز الترحيل إلى حين وصول الصبغة المهاجرة إلى المسافة المناسبة.

ح- لوحظت القطع المفصولة وصورت باستخدام جهاز التوثيق الهلامي (Gel Documentation System).

٣-٨ اختبار حساسية عزلات UPEC للمضادات الحيوية.

Antibiotic Susceptibility Testing of UPEC Isolates.

أختبرت حساسية العزلات الجرثومية للمضادات الحيوية وفقاً لطريقة انتشار الأقراص باستخدام وسط مولر هنتون (Muller Hinton Agar) تجاه ٨ مضادات حيوية. تم مقارنة مناطق التثبيط بالجدول الخاص بأقطار مناطق التثبيط (Inhibition Zones) المستعملة لمعرفة مدى مقاومة أو حساسية العزلات للمضادات الحيوية على وفق ما جاء في CLSI (Jean *et al.*, 2012).

٣-٩ التحليل الإحصائي Statistical Analysis

تم تحليل نتائج الدراسة إحصائياً باستعمال البرنامج الإحصائي (SPSS) الإصدار ٢٢ واستخدمت اختبارات التكرار واختبار مربع كاي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$).

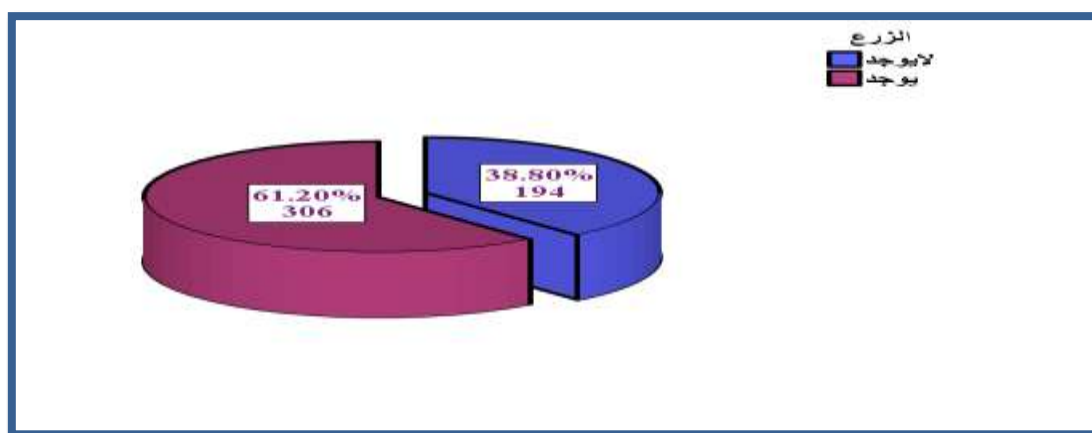
٤ - عزل وتشخيص المسببات الجرثومية لاختلاج المجاري البولية

Isolation and Diagnosis of Bacterial UTIs

أجريت الدراسة الحالية لغرض الكشف عن الجراثيم الهوائية الشائعة من أخماج المجرى البولي عند الأطفال (UTIs) في مدينة الناصرية. من مجموع (500) عينة إدرار من أطفال مصابين بخمج المجاري البولية من الراقيدين والمراجعين لمستشفى محمد الموسوي ومستشفى بنت الهدى للولادة والأطفال.

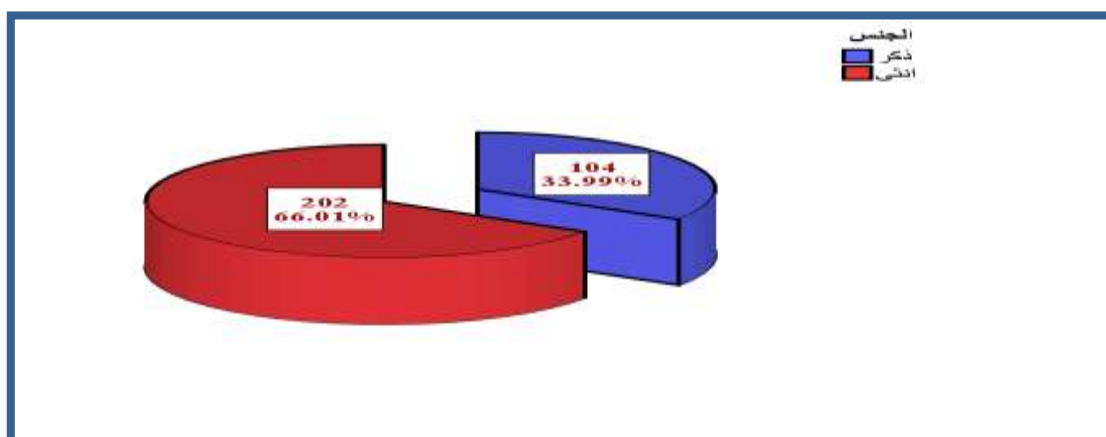
أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن 306 (61.20%) عزلة سجلت نموا موجبا للزرع الجرثومي بينما 194 عينة بنسبة (38.80%) لم تسجل نمواً معنوياً. أظهرت نتائج الاختبار الإحصائي لتحليل مربع كاي وجود فرق معنوي في ارتفاع نسبة الأطفال المصابين بالاختلاج البولية الجرثومية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) (شكل ١-٤).

إن نتائج الدراسة الحالية كانت مقارنة لنتائج دراسات محلية مثل دراسة كلا من طعمة (٢٠٠٦) في كربلاء و الطائي (٢٠١٠) في بغداد و AlKhateeb (2014) ، ومن دراسة ياسين (٢٠١٤) في كركوك إذ أظهرت الدراسات نموا موجبا للزرع الجرثومي وبنسب مئوية بلغت على التوالي (٧٠٪ و ٧٢.4٪ و ٥٠٪ و ٦٥,٨٪). من جهة أخرى كانت نتائج دراسة محيimid (٢٠١١) في بابل أعلى نسبة من الدراسات أنفة الذكر إذ بلغت ٨٨.3٪. وقد يفسر هذا الاختلاف في نسب توزيع الممرضات على أساس اختلاف مناطق الدراسة أو ربما يعود إلى العقاقير المستخدمة في العلاج التي لها دور مهم في توزيع وانتشار الجراثيم. بلغ عدد الإناث المصابات 20٢ طفلة بنسبة (6٦.01%) في حين بلغ عدد الذكور ١٠٤ طفلا بنسبة بلغت (٣٣,٩٩٪) شكل (٤-٢). يشير الاختبار الإحصائي لتحليل مربع كاي إلى وجود فروق ذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) أذ إن الإناث تكون أكثر عرضة للإصابة بالاختلاج البولية من الذكور. يمكن إرجاع ذلك إلى أسباب عدة منها الاختلاف في التركيب التشريحي للجهاز البولي التناسلي لكلا الجنسين الذكري والانثوي ; (Davidson et al, 2002) Livia et



Test Statistics	
العزلات	
25.088 ^a	Chi-Square
1	df
.000	Asymp. Sig.
a. 0 cells (0.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 250.0.	

شكل (١-٤): النسبة المئوية للزراع الجراثومي.



Test Statistics	
الجنس	
31.386 ^a	Chi-Square
1	df
.000	Asymp. Sig.
a. 0 cells (0.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 153.0.	

شكل (٢-٤): توزيع مرضى أخماج المجرى البولي بحسب الجنس.

يوضح الشكل (٣-٤) أعداد المصابين بحسب مكان السكن إذ بلغ عدد المصابين من سكان المدن ٢٠١ (65.68%) وعدد المصابين من الريف ١٠٥ (٣١.٣٤%) مصاب، كانت أعداد المصابات من الإناث ١٣٦ مصابة بنسبة مئوية (44.٤٤%) من سكان المدن في حين بلغ

عدد الإناث من سكان الريف 6٦ مصابة بنسبة (٢١,٥٧٪) وبلغ عدد الذكور من سكان المدن ٦٥ بنسبة (21.٢٤٪) و ٣٩ ذكر بنسبة (٧٥.١٢٪) من سكان الريف. وتحليل البيانات إحصائياً أتضح وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في تغلب المصابين في المدن على الريف. كانت نتائج الدراسة الحالية مقارنة لنتائج ياسين (٢٠١٤) في مدينة كركوك إذ بلغت نسبة الإصابة في المدن (67.72٪). قد يعود ذلك إلى الازدحام السكاني والتلوث البيئي في المدن مقارنة بالأرياف وقد يكون السبب قلة المراجعين من الريف لكون الدراسة أجريت في المدينة (ياسين، ٢٠١٤).

وجدت ٣١ عينة سالبة النمو بنسبة (٦,٢٪) للأطفال المشخص إصابتهم مجهرياً وذلك لاحتواء العينات على خلايا الدم الحمراء RBCs أكثر من ٥ خلايا ووجود خلايا قيقحية بكميات متفاوتة بحدود المعدل المذكور. إن زيادة خلايا الدم الحمراء عن المعدل الطبيعي (٠-١) خلية في البول دليل على حدوث أخماج المجاري البولية (Joan et al., 2014).

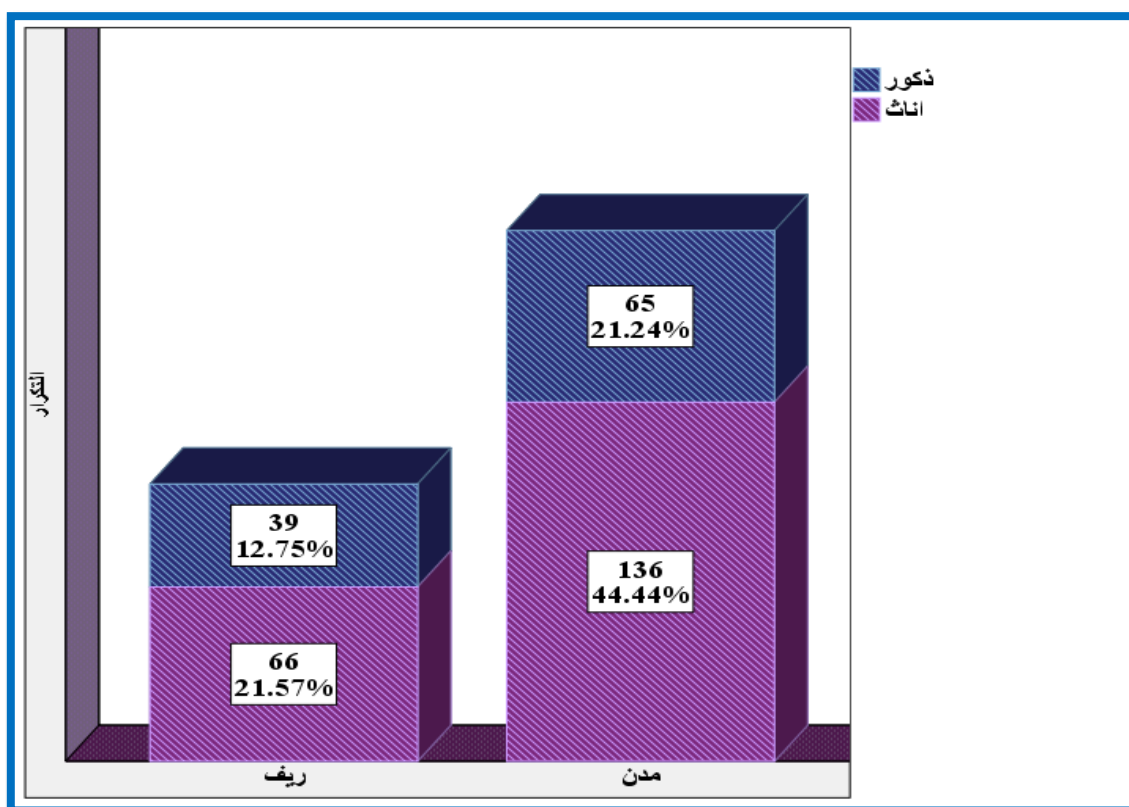
قد يعود احتمال اختفاء المسبب الجرثومي بسبب تعاطي الطفل المضادات الحياتية أثناء فترة اخذ العينة من المريض أو وجود أسباب مرضية أخرى. إن أخماج المجاري البولية لدى الأطفال شائعة بشكل كبير لكنها مبهمة أو مهملة مما قد يسبب مضاعفات غير محمودة بسبب التجاهل أو سوء التشخيص، إن التشخيص المبكر لأخماج المجرى البولي ومعالجتها يساعد على انخفاض كبير في الإصابات بارتفاع ضغط الدم والتندب الكلوي في المستقبل (Nevéus, 2013 ; Al-Rawi, ٢٠١٠).

أظهرت نتائج الدراسة ارتفاع معدل الإصابة بالجراثيم السالبة لملون جرام لمرضى أخماج المجرى البولي من الأطفال مقارنة بالجراثيم الموجبة لملون جرام. فمن ٣٠٦ عزلة كانت ١٩٢ عزلة (٦٢.٧٥٪) سالبة لملون جرام و ١١٤ عزلة (٣٧.٢٥٪) موجبة ويشير اختبار مربع كاي لوجود فروق ذات دلالة معنوية مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) كما في الشكل (٤-٤).

إن توزيع الجراثيم الذي سجلته الدراسة الحالية يتوافق مع ما توصلت له معظم الدراسات في تغلب الجراثيم السالبة في أخماج المجرى البولي المختلفة لاسيما جراثيم العائلة المعوية، كما في نتائج الدراسة التي أجراها عبد الرحمن (٢٠٠٦) في مدينة بغداد إذ كانت نسبة عزلات الجراثيم السالبة (٨٣,١٪). إن الفروق الأنفة الذكر في توزيع الممرضات البولية المعزولة من مرضى أخماج المجرى البولي كانت ذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) إذ يعتقد إن القدرة التضادية في التغلب أو منع نمو أنواع أخرى للجراثيم السالبة

أكبر منه في الجراثيم الموجبة وخاصة جراثيم *E.coli* (آل سماعيل، ٢٠٠٧ ؛ AL- ; Hamawandi, 2014).

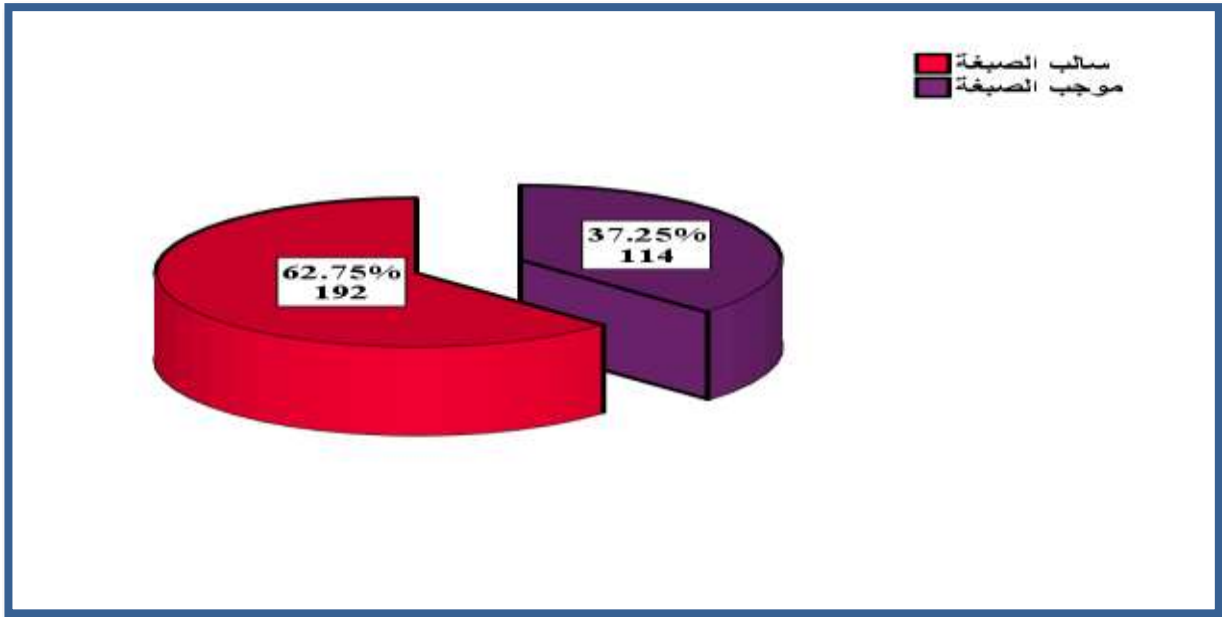
وقد أشارت تقارير منظمة الصحة العالمية إلى إن الارتفاع المتوقع والمستمر في أعداد المصابين باخماج المجاري البولية ناتج من مقاومة الجراثيم للمضادات الحياتية فالتقديرات العالمية تشير إلى تسجيل نحو ١٥٠ مليون مصاب سنويا باخماج المجاري البولية للفترة ما بين (٢٠٠٤ - ٢٠١٤) في جميع أنحاء العالم. إن إصابة شخص من كل تسعة أشخاص بالاخماج الجرثومية خاصة الأنواع السالبة لملون جرام التي تسبب قلقا عالميا لمسئوليتها عن بعض الإصابات الأكثر شيوعا في المجتمع وعدوى المستشفيات ومنها الإشيريشيا القولونية، في جميع أقاليم المنظمة الستة (أفريقيا والأمريكتين وشرق البحر الأبيض المتوسط وجنوب شرق آسيا وغرب المحيط الهادئ) (WHO, 2015 ; WHO, 2014 Fasugba et al., 2015).



Chi-Square Tests			
Asymp. Sig. (2-sided)	df	Value	
.000	3	306.000 ^a	Pearson Chi-Square
		306	N of Valid Cases

a. 0 cells (0.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 13.25.

شكل (٣-٤): توزيع المصابين بحسب السكن والجنس.



Test Statistics	
نوع العزلة حسب ملون جرام	
19.882 ^a	Chi-Square
1	df
.000	Asymp. Sig.
a. 0 cells (.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 153.0.	

شكل (٤-٤) : النسبة المئوية للعزلات الجرثومية بحسب تفاعلها مع ملون جرام.

4-2 الممرضات البولية الجرثومية المعزولة Isolated Bacterial Uropathogens

شخصت العزلات الجرثومية والبالغ عددها ٣٠٦ اعتماداً على الخواص الزرعية ونتائج الفحوصات الكيموحياتية التقليدية، وتم تأكيد دقة تشخيص العزلات الجرثومية باستخدام نظام Api (شكل ٤-٥).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن مسببات الجرثومية الأكثر شيوعاً في الإخماج البولية المعزولة من المرضى هي الإشريشيا القولونية *E.coli* إذ كان عددها ٧٥ عزلة ونسبة مئوية بلغت (٣٩.٠٦٪) من مجموع العزلات السالبة لملون جرام. تلتها عزلات المتقلبات *P.mirabilis* و *K.pneumoniae* و *Ser.plymuthica* والتي بلغت أعدادها على التوالي ٣٢ (١٦.٦٦٪) و ١٧ (٨.٨٥٪) و ١٦ (٨.٣٣٪). إن أخماج المجاري البولية واسعة الانتشار في العراق ومن أهم مسبباتها المرضية جراثيم إشريشيا القولون (ثويني وعبد جابك، ٢٠١٥).

أما الجراثيم الموجبة لملون جرام فكانت الأكثر شيوعاً المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* والمكورات العنقودية السالبة لإنزيم التخثر Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) وبلغت على التوالي ٢٢ عزلة بنسبة مئوية (١٩.٢٩٪) و ١٨ عزلة بنسبة (١٥,٧٨٪).

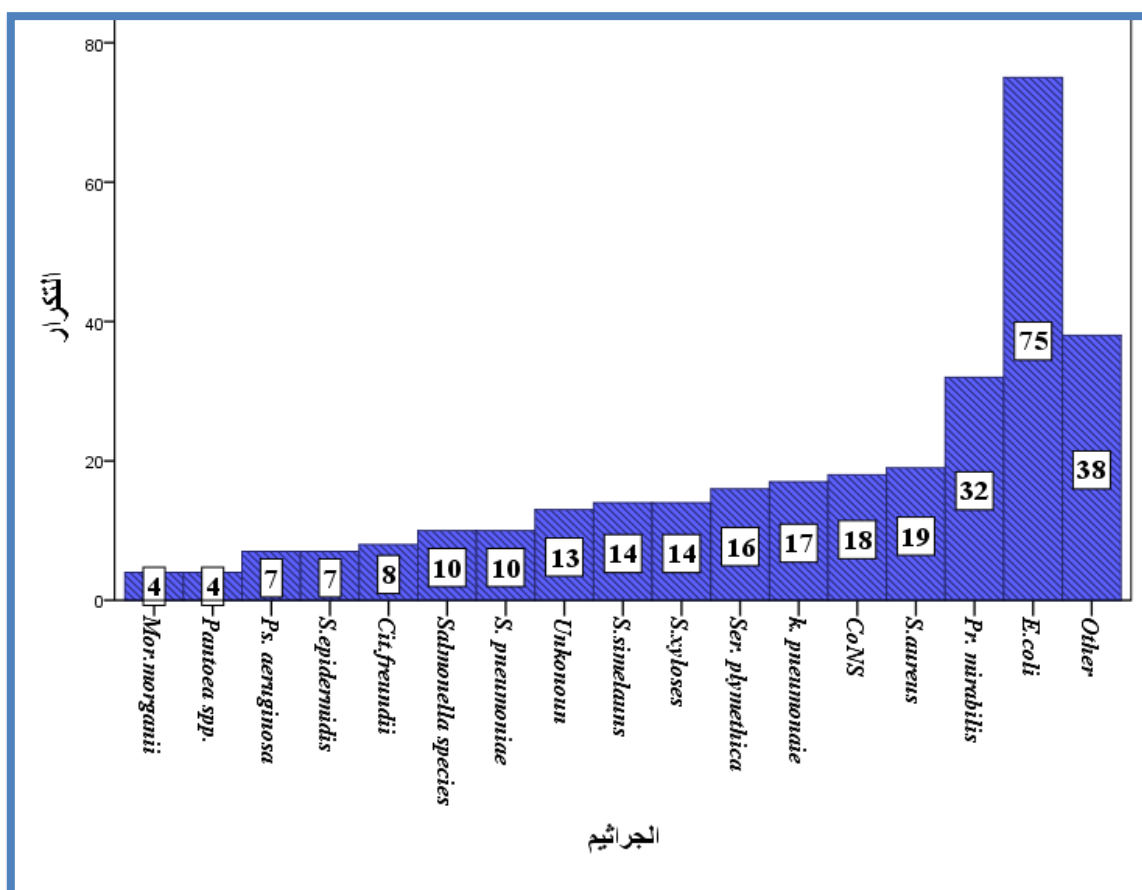
أظهرت نتائج الدراسة الحالية نسب عزل متفاوتة للمسببات الجرثومية من مرضى أخماج المجاري البولية مقارنة مع نتائج دراسة طعمة (٢٠٠٦) في كربلاء للعزلات المسببة للاخماج مثل *E.coli*, *P.mirabilis* و *K.pneumonia* إذ سجلت على التوالي ٣٧ عزلة بنسبة (٦٦.٠٪) و ١٠ عزلات بنسبة مئوية (١٧.٩٪) و ٣ عزلات بنسبة مئوية (٥.٤٪). وسجلت دراسة AbdulRazzaq (2013) في الموصل نسبة عزل مطابقة لجراثيم *E.coli* إذ بلغت ٦٦,٠٪ في حين سجل Muhsin (2013) في بغداد نسبة عزل ٥٤,٥٥٪.

عند توزيع المرضى المصابين بأخماج المجرى البولي بالنسبة لعزلات الإشريشيا القولونية حسب الجنس، أظهرت نتائج الدراسة الحالية زيادة في عدد الإناث المصابات وبـ ٥١ مصابة (٦٨,٠٪) مقارنة مع عدد الذكور المصابين والذين بلغوا ٢٤ مصاباً (٣٢,٠٪).

يوضح الشكل (٤-٦) توزيع الأطفال المصابين بحسب الفئات العمرية إذ أظهرت النتائج إن الفئة العمرية (٦-١٤) سنة قد سجلت أعلى نسبة من الإصابات وبـ ٣٨ طفل (٥٠,٦٧٪). وعند مقارنة النتائج الحالية نجد إن دراسة Saeed et al.(2014) في مدينة أربيل سجلت نسبة إصابة أقل بلغت (٤٠,٠٪).

من جهة أخرى سجلت نتائج الدراسة الحالية اقل عدد للاخماج في الفئة العمرية الأقل من سنة وبعدد إصابات بلغ ١٢ (١٦,٠٪). هذه النتائج تتفق مع دراسة (Saeed *et al.* 2014) إذ بلغت نسبة المصابين من الفئة العمرية سنة وقل (١٧,٧٪). سجلت الإناث النسبة الأعلى في الظهور من بين المصابين بالاخماج البولية ولجميع الفئات العمرية إذ كانت نتائج الدراسة الحالية اعتمادا على توزيع الاخماج بحسب الأعمار وأجناس المصابين متوافقة مع نتائج دراسة مشابهة في إيران (Farshad *et al.* 2012) إذ توزعت فيها نسب الإصابة بالنسبة للذكور والإناث على التوالي ٣٦ (37.5٪) و ٦٠ (62.5٪).

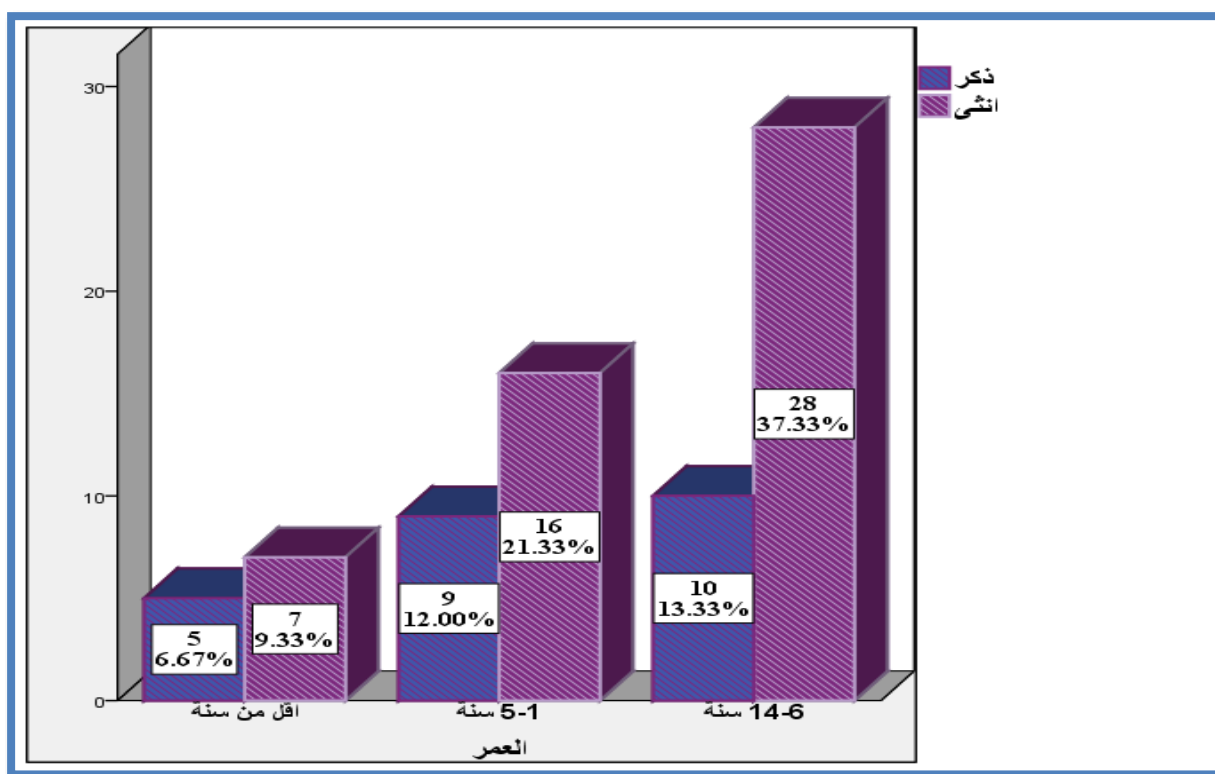
أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لاختبار التكرار ارتفاعا معنويا في نسبة وجود جراثيم الإشيريشيات القولونية مقارنة بالجراثيم الأخرى، وأظهرت نتائج اختبار مربع كاي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في توزيع الممرضات الجرثومية بينما لم تظهر فروق معنوية بين الفئات العمرية للمصابين.



Test Statistics	
التشخيص	
673.863 ^a	Chi-Square
32	df
.000	Asymp. Sig.

a. 0 cells (0.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 9.3.

شكل (٤ - ٥): العزلات الجرثومية المشخصة وأعدادها.



Chi-Square Tests			
Asymp. Sig. (2-sided)	df	Value	
.532	2	1.263 ^a	Pearson Chi-Square
		75	N of Valid Cases

a. 1 cells (16.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.84.

شكل (٤-٦): توزيع عزلات جراثيم *E.coli* بحسب الجنس والفئات العمرية للمضيف.

٤-٣ التشخيص الجزيئي لاشريشيا الاخماج البولية بواسطة التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا

Molecular Identification of UPEC Using PCR

تم تشخيص جراثيم UPEC بعد قياس تركيز الحامض النووي (DNA) ملحق (٣-٤) وصورة (٣-٤) وتم الكشف عن وجود الجين التشخيصي *16SrRNA* ودراسة أربعة من الجينات التي تحدد الأنماط المصلية للمستضد O الموجودة على سطح الخلية الجرثومية UPEC وهي عبارة عن سكريات دهنية متعددة (lipopolysaccharides) لها القابلية الكبيرة على التغير وهي من أكثر الهياكل المتغيرة على سطح الخلية التي توفر تنوع يعتمد عليه التصنيف المصلي للجراثيم الممرضة الذي تم الاعتماد عليه في تحديد أكثر من ٨٠ نمط من هذه الأنماط المصلية (Wang *et al.*, 2014 ; Rashki and Abdi, 2012). إن التشخيص والعلاج المبكرين يجنبنا حدوث مضاعفات عديدة تؤدي بالتالي للإصابة بأمراض الكلى (renal diseases) (Nickavar and Sotoudeh, 2011).

1-3-4 تحديد الأنماط المصلية O لأشريشيا الاخماج البولية بواسطة التفاعل السلسلي- المتعدد

O-Serotyping of UPEC by Multiplex Polymerase Chain Reaction

إن عملية تحديد جينات الأنماط المصلية باستخدام تقنية تفاعل التضاعف السلسلي لإنزيم بلمرة الدنا تعد من أفضل الطرق لتحديد جراثيم UPEC المسببة لآخماج المجاري البولية لما تمتاز به هذه التقنية من حساسية ودقة عاليتين (Ranjbar *et al.*, 2014). إذ استخدمت الدراسة الحالية بادئات ذات تسلسلات خاصة بمجموعة من الأنماط المصلية O6 و O15 و O16 و O25 تبعا لأكثر التسلسلات الواردة في الدراسات والبحوث السابقة فيما يخص الأنماط المسببة للآخماج البولي لغرض التحري وتفريق عزلات جراثيم UPEC عن عزلات *E.coli* الأخرى. ترتبط بعض عوامل الضراوة بالأنماط المصلية لسلاسلاتها (Salvador *et al.*, 2008 ; Yamamoto, ٢٠٠٧). شخّصت العزلات بتقنية تفاعل التضاعف السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا اعتمادا على وجود أو غياب تلك الجينات. من مجموع ٧٥ عزلة تم تشخيص ٥٠ عزلة جينيا أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن جميع العزلات حاوية على الجين التشخيصي *16SrRNA* بنسبة (١٠٠٪) و ٣٦ عزلة (72.0٪) حاوية على ٥٧ نمط مصلي واحد أو أكثر و ١٤ (٢٨,٠٪) عزلة لم تحتوي أي من هذه الأنماط المذكورة. الأنماط (O6 و O15 و O16 و O25) بلغت أعدادها ونسبها منفردة ٢٣ (٤٠,٤٪) و ١٨ (31.5٪) و ٧ (١٢,٣٪) و ٩ (١٥,٨٪) على التوالي. وتم تشخيص وجود الجين *16SrRNA* في كل العزلات موضوع الدراسة (جدول ٤-١).

إن أخماج المجاري البولية الجرثومية تسببها في الغالب انماط عائدة لسلاسل جراثيم UPEC التي قد تنتمي إلى ١٤ نمط هي O1 و O2 و O4 و O6 و O7 و O8 و O15 و O16 و O18 و O21 و O22 و O25 و O75 و O83 يتم الكشف عن السلالات الحاوية على هذه الانماط في معظم الأحيان من عينات البول السريرية (Li et al., 2010 ; Emamghorashi et al., 2011). أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسب انتشار الأنواع المصلية (O6 و O15 و O16) كانت أعلى من نتائج (2013) Momtaz et al. التي بلغت نسبها (١٠,٥٦٪ و ٢١,١٣٪ و ٢,٤٣٪) على التوالي. بينما سجلت نتائج ظهور الجين O25 نسبة أعلى إذ بلغت (٢٦,٠١٪). في دراسة مشابهة أخرى كما في دراسة Dormanesht et al. (2014) كانت الأعداد والنسب للأنماط المصلية (O6 و O15 و O25) هي ٦ (١٣,٣٣٪) و ٢ (٤,٤٤٪) و ٤ (١٧,٧٧٪) على التوالي. لم يشخص وجود النمط O16 منفردا من بين العزلات المدروسة. تشير الأبحاث إلى إن سلالات جراثيم UPEC تكون مختلفة عن السلالات التعايشية الموجودة في الأمعاء أو جراثيم EPEC الموجودة في البراز (Lloyd, 2007). استعملت الدراسة الحالية تقنية PCR لفحص النمطين O15 و O25 والجين التشخيصي *16SrRNA* كمزيج ثلاثي متعدد (combination multiplex) ونتائج تضخيم النمطين O6 و O16 تم فحصهما كمزيج ثنائي بالتقنية ذاتها شكل (7-4) وشكل (8-4). أظهرت نتائج اختبار مربع كاي وجود فروق إحصائية ذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في تفاوت نسب ظهور الأنماط المصلية المدروسة.

4-3-2 الكشف عن بعض جينات المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات UPEC

Detection of Some Antibiotic Resistance Genes in UPEC Isolates

تم تشخيص بعض الجينات الجرثومية المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن عزلات الجينات المقاومة (*sul1* و *CITM* و *tet(A)* و *aac3-IV* و *dfrA1*) بلغت أعدادها ونسبها ١٧ (34.0٪) و 25 (50.٠٪) و 19 (3٨,٠٪) و ٢٣ (٤٦.0٪) و 5 (١٠.0٪) على التوالي (جدول ٤-٢). إن عدد العزلات التي تحوي جينات المقاومة للمضادات الحيوية (*sul1* و *CITM* و *tet(A)* و *aac3-IV* و *dfrA1*) التي سجلتها الدراسة الحالية كانت أقل مما سجلتها نتائج Momtaz et al. (2013) إذ بلغت أعدادها ونسبها ٤٥ (٣٦,٥٨٪) و ٤٩ (٣٩,٨٣٪) و ٥٣ (٤٣,٨٪) و ٢٨ (٢٢,٧٦٪) و ٢٧ (٢١,٩٥٪) على التوالي. إن الاختلاف في نسب انتشار الجينات قد يعود لطبيعة المنطقة واختلاف طريقة التشخيص وتحديد المضاد الحيوي المناسب. فحصت العزلات موضوع الدراسة كمزيج متعدد (combination multiplex) وسجلت نتائج تضخيم الجينات المقاومة التي تم فحصها باستعمال تقنية PCR للجينين *sul1* و *aac3-IV* كما في شكل (٤-٤).

(٩)، ونتائج تضخيم الجينات *CITM* و *dfrA1* و *tet(A)* و *sulI* المرحلة كهربائيا في هلام الاكاروز كما في الشكل (٤-١٠).

٤-٣-٣ تعدد الأنماط والجينات المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات UPEC

Multiple Resistance Genes UPEC Isolates to Antibiotics

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود النمط المصلي O6 بصورة منفردة في ١٢ عزلة والنمط المصلي O15 بصورة منفردة في أربعة عزلات والنمط O25 موجود في ثلاث عزلات أخرى في حين لم تحتو ١٤ عزلة على أي من الأنماط المنفردة أو مجموعة من الأنماط موضوع الدراسة كما في الشكل (٤-١١). إن الأنماط المصلية من عزلات جراثيم UPEC قد تظهر بصورة منفردة في العزلة الواحدة وقد تحتوي العزلة على أكثر من نمط مصلي في الوقت نفسه. يوضح (جدول ٤-٣) تعدد وجود الأنماط المصلية لجراثيم UPEC. إن نتائج التحليل الإحصائي تبين وجود فروق بين نسب وجود الأنماط المصلية المشخصة في العزلات المرضية ذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$). يوضح (شكل ٤-١٢) وجود درجة عالية من تنوع المقاومة فقد سجلت عزلات مقاومة لجينات منفردة مثل *aac3-IV* و *tet A* و *sulI* وعزلات مقاومة متعددة إذ أظهرت النتائج أعلى مقاومة متنوعة و متعددة للجينين *CITM* و *tetA* إذ بلغ عدد العزلات ٩ عزلات جرثومية متعددة المقاومة. في حين بلغت نسبة وجود الجينين اعلاه (١٨,٠٪) إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في أعداد ونسب تعدد جينات المقاومة لجراثيم UPEC (جدول ٤-٤). إن وجود نسبة عالية لجينات المقاومة في سلالات *E. coli* للمضادات الحيوية قد يعود نتيجة استخدامها على نطاق واسع في مجال الطب البيطري. بالنسبة لحيوانات اللحوم المستخدمة للاستهلاك البشري إنها قد تسبب إصابات خطيرة للبشر وتخلق قلق شديد على الصحة العامة لأنها سبب لحدوث إصابات وبائية من أخماج المجاري البولية UTIs (Manges et al., 2007).

جدول (٤-١): أعداد الأنماط المصلية من عزلات UPEC ونسبها.

النسبة المئوية %	التكرار	نوع النمط المصلي
40.4	23	O6
31.6	18	O15
12.3	7	O16
15.8	9	O25
100.0	57	Total
Test Statistics		
الأنماط		
11.982		Chi-Square
3		df
.007		Asymp. Sig.

جدول (٤-٢): أعداد الجينات المقاومة للمضادات الحيوية ونسبها.

الجينات المقاومة من عزلات UPEC		
النسبة المئوية %	التكرار	الجين المقاوم
50.0	25	<i>CITM</i>
38.0	19	<i>aac3-IV</i>
46.0	23	<i>tet(A)</i>
10.0	5	<i>dfrA1</i>
34.0	17	<i>Sul1</i>
Test Statistics		
الجين المقاوم		
13.753		Chi-Square
4		df
.008		Asymp. Sig.

جدول (٤-٣): تعدد الأنماط المصلية المشخصة لجراثيم UPEC.

تعدد الأنماط المصلية		
النسبة المئوية %	عدد العزلات	النمط المصلي
24.0	12	O6

8.0	4	O15
6.0	3	O25
12.0	6	O6, O15
2.0	1	O6, O16
4.0	2	O15, O16
4.0	2	O15, O25
4.0	2	O16, O25
4.0	2	O6, O15, O16
4.0	2	O6, O15, O25
28.0	14	Others
100.0	50	Total

Test Statistics	
تعدد الأنماط المصلية	
42.840 ^a	Chi-Square
10	df
.000	Asymp. Sig.
a. 11 cells (100.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 4.5.	

جدول (٤-٤): أعداد ونسب تعدد الجينات المقاومة لعزلات جراثيم UPEC.

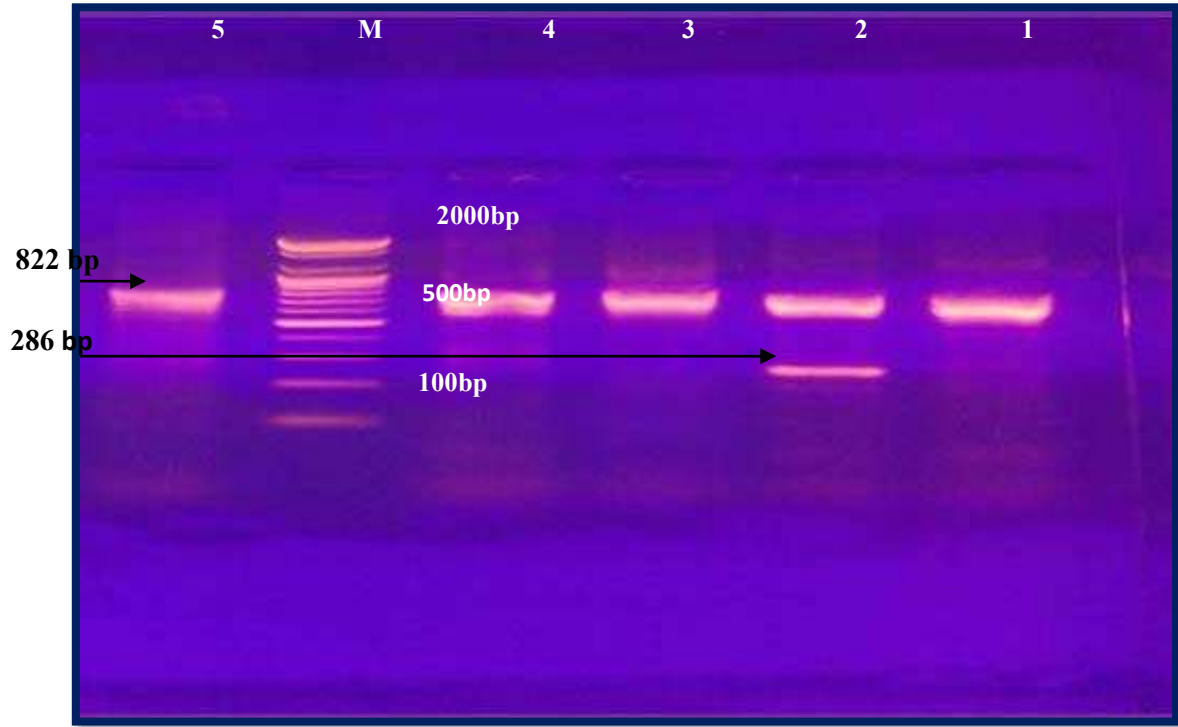
تعدد الجينات المقاومة		
النسبة المئوية %	عدد العزلات	جينات المقاومة
٦.0	٣	<i>aac3-IV</i>
4.0	2	<i>tet(A), aac3-IV</i>
8.0	4	<i>CITM, aac3-IV</i>
18.0	9	<i>tet(A), CITM</i>

2.0	1	<i>CITM, Sul1</i>
2.0	1	<i>aac3-IV, Sul1</i>
2.0	1	<i>tet(A), dfrA1</i>
4.0	2	<i>tet(A), Sul1</i>
2.0	1	<i>CITM, aac3-IV, tet(A)</i>
2.0	1	<i>CITM, Sul1, dfrA1</i>
4.0	2	<i>CITM, Sul1, tet(A)</i>
10.0	5	<i>CITM, aac3-IV, Sul1</i>
2.0	1	<i>aac3-IV, tet(A), dfrA1</i>
4.0	2	<i>aac3-IV, tet(A), Sul1</i>
2.0	1	<i>tet(A), dfrA1, Sul1</i>
2.0	1	<i>dfrA1, sul1</i>
4.0	2	<i>tet(A), dfrA1, Sul1, CITM</i>
22.0	11	Susceptible
100.0	50	Total

Test Statistics	
تعدد الجينات المقاومة	
50.800 ^a	Chi-Square
17	df
.000	Asymp. Sig.
a. 18 cells (100.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 2.8.	

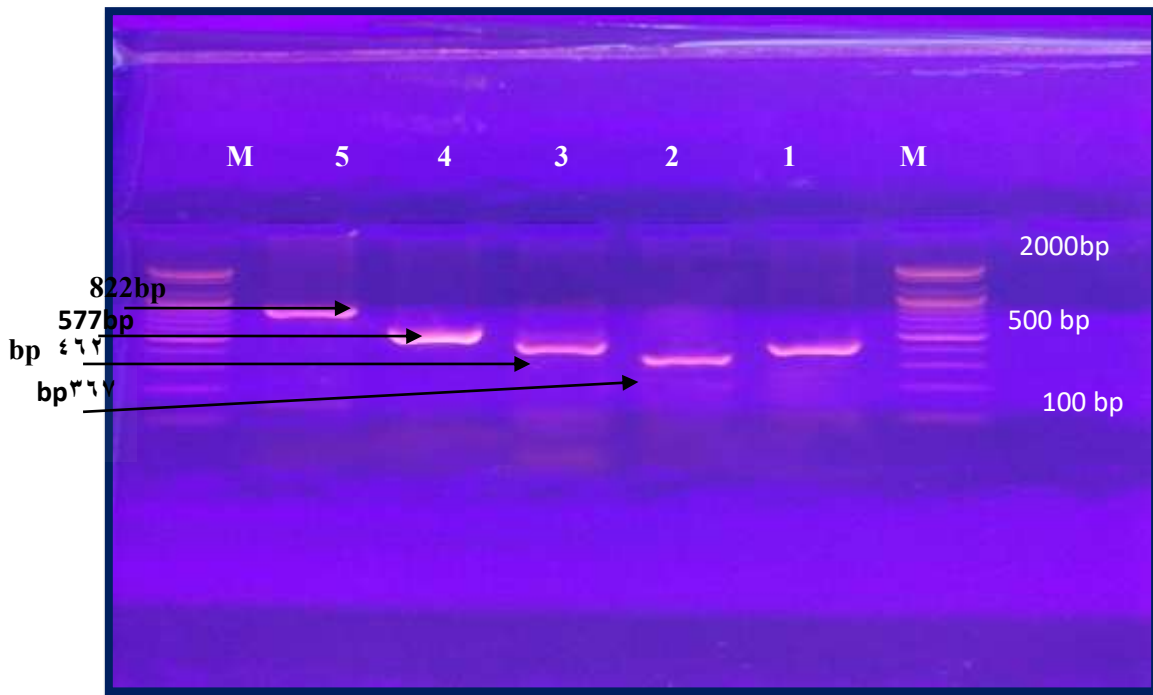
شكل (4-8): محتوى العزلات من جينات الانماط المصلية O16, O6 والمرحلة كهربائيا في هلام الاكاروز (١٪) بفرق جهد ٨٠ فولت لمدة ساعة ونصف بعد صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم وتعرضه للأشعة فوق البنفسجية ظهرت الحزم الجينية كالآتي:

- النمط O6 عزلة رقم (2,3,4) المؤشر وزنه 783 bp.
- النمط O16 عزلة رقم (5,7,8,9) المؤشر وزنه ٣٠٢ bp.
- المقياس (M) مثل المسار المؤشر وزنه (١٠٠-٢٠٠٠ bp).



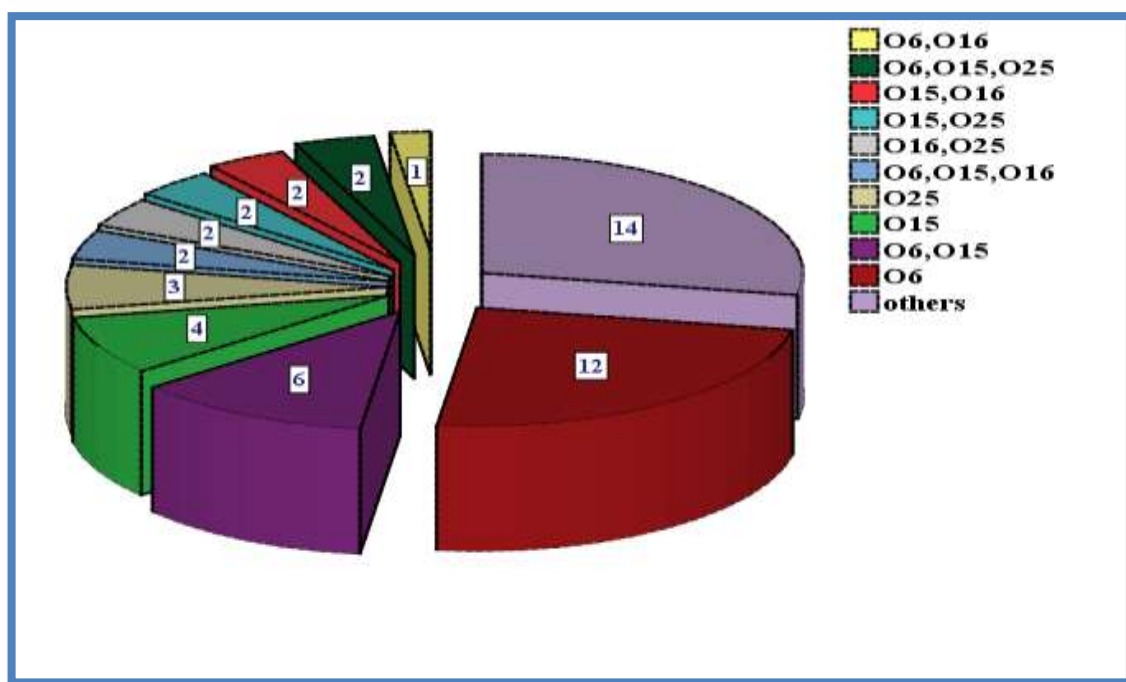
شكل (٤-٩): حزمنا الجينين *sulI*, *aac(3)-IV* المرحلان كهربائيا في هلام الاكاروز (١٪) بفرق جهد ٨٠ فولت لمدة ساعة ونصف بعد صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم وتعرضه للأشعة فوق البنفسجية ظهرت الحزم كالآتي.

- الجين *sulI* في العزلات (١-٥) المؤشر وزنه 822 bp.
- الجين *aac3-IV* في عزلة رقم (٢) المؤشر وزنه ٢٨٦bp .
- المقياس (M) مثل المسار المؤشر وزنه (١٠٠-٢٠٠٠ bp).

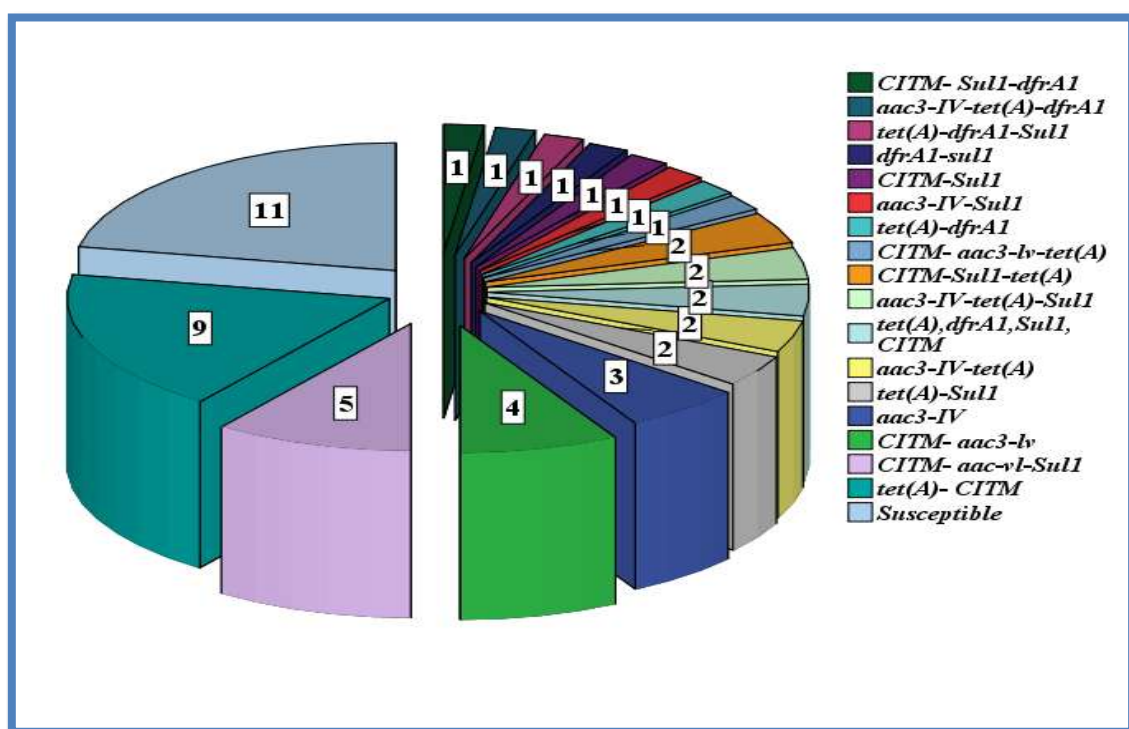


شكل (٤-١٠): حزم لثلاث جينات مقاومة إضافة للجين *sulI* المؤشر وزنه 822 bp والتي تم فحصها حسب مصدر كل جين والمرحلة كهربائيا في هلام الاكاروزيفرق جهد ٨٠ فولت للجينات *CITM* و *dfrA1* و *tet(A)* و *sulI* في العزلات (١-٥) على التوالي.

- الجين *CITM* في عزلة (٣,١) المؤشر وزنه 462bp.
- الجين *dfrA1* في عزلة (٢) المؤشر وزنه 367bp.
- الجين *tet(A)* في عزلة (٤) المؤشر وزنه 577bp.
- المقياس (M) مثل المسار المؤشر وزنه (١٠٠bp-٢٠٠٠bp).



شكل (١١-٤): تعدد الأنماط المصلية في عزلات جراثيم UPEC.



شكل (١٢-٤): تعدد الجينات المقاومة لعزلات جراثيم UPEC للمضادات الحيوية.

٤-٤ اختبار حساسية جراثيم UPEC للمضادات الحيوية

Antibiotics Sensitivity Test of UPEC Isolates

تم اختبار الحساسية الدوائية لـ ٥٠ عزلة من جراثيم UPEC بطريقة انتشار القرص (disc diffusion method) لثمانية أنواع من المضادات الحيوية المستخدمة في علاج أخماج المجرى البولي حسب توصيات منظمة الصحة العالمية (WHO, 2003).

يوضح الجدول (٤-٥) النسب المئوية لحساسية العزلات للمضادات الحيوية، إذ أظهرت جميع العزلات المختبرة مقاومة عالية لمعظم المضادات الحيوية إذ كانت أعلى نسبة مقاومة للمضاد الحيائي Penicillin بنسبة (١٠٠٪) وأقل نسبة مقاومة للمضاد الحيائي Chloramphenicol وب ٩ عزلات (18.0%).

يوضح جدول (٤-6) كذلك إعداد العزلات بحسب مقاومتها المظهرية المتعددة حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن أعداد العزلات متعددة المقاومة المظهرية بلغت ٨ عزلات بنسبة مئوية (١٦,٠٪) للمضادات الحيوية AMX و P و T و SXT و NA و F. أظهرت النتائج الإحصائية لاختبار مربع كاي وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$).

إن المقاومة الجرثومية للمضادات الحيوية في زيادة مستمرة في دول أسيا (Moore et al., 2015).

إن من الأهمية بمكان معرفة المعلومات الحديثة المتوفرة عن حساسية الممرضات للعقاقير المتاحة للعلاج لتجنب فشله. لقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع كبير في نسبة مقاومة البنسلينات كما في شكل (٤-١٣). حيث كانت مقارنة لدراسة الحلفي (٢٠٠٩) في محافظة كركوك و Momtaz et al. (2013) و Sultana et al. (٢٠١٥) فقد بلغت على التوالي (٩٥٪) و (١٠٠٪) و (١٠٠٪). وسجلت دراسة José et al. (2011) أعلى نسبة مقاومة في المكسيك حيث بلغت (٨٣,٧٪) لمجموعة البنسلينات المتمثلة بالمضادات الحيوية Penicillin و Ampicillin و Amoxcillin. ويعود السبب في ذلك إلى امتلاك الجراثيم

لأنزيمات البييتالاكتاميز ومضادات البييتالاكتاميز تعمل بشكل غير عكسي من خلال ارتباطها مع بعض البروتينات في الغشاء الساييتوبلازمي تسمى بروتينات المرتبطة بالبنسلين (Penicillin Binding Proteins (PBPs)). وهذه البروتينات (أنزيمات) مسؤولة عن بعض التفاعلات في عملية تخليق طبقة الببتايدوكلايكان. لذلك أرتباط مضادات البييتالاكتام بهذه الأنزيمات مكونة آصرة تساهمية مع الإنزيم لينتج معقد يسمى Acyl-enzyme Complex يؤدي إلى تعطيل عمل إنزيم PBPs وبالتالي إلى وقف عملية تصنيع جدار الخلية لينتج جدار خلوي ناقص غير متماسك مما يجعل البكتريا حساسة للضغط الاوزموزي

ومن ثم موت الجراثيم. التثبيط الإنزيمي للبكتيريا عند بعض الجراثيم المقاومة للبكتيريا عن طريق تصنيع أنزيم بيتا لكتاميز (الربيعي، ٢٠١١).

تليه مقاومة العزلات للمضاد الحيوي Tetracycline حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية مقاومة الجراثيم للمضاد بنسبة مئوية بلغت (96.0%) وهذه النسبة تتوافق مع نتائج توفيق (٢٠٠٥) حيث أشار إلى أن نسبة مقاومة العزلات لهذا المضاد بلغت (٩٢,٥ %) وكانت بالفعل ثاني أعلى نسبة للمقاومة سجلتها دراسة Momtaz *et al.* (٢٠١٣) بنسبة (٧٣,٩٨%). هنالك مجموعة مضادات مثل Aminoglycosides، Tetracycline، Chloramphenicol. هذه المضادات تعمل على مواقع تخليق البروتينات في الخلية الجرثومية منها ما يعمل على منع تكوين سلسلة الأحماض الأمينية ومنها ما يعمل في مواقع ترجمة الحامض النووي الرايبوزي الرسول (mRNA). تعتبر هذه المضادات مثبطة Bacteriostatic إذا كان تأثيرها على تخليق البروتينات الوظيفية وتعتبر المضادات قاتلة Bacteriosidal إذا كان تأثيرها على تخليق البروتينات التركيبية (الربيعي، ٢٠١١).

إن قدرة الجراثيم على مقاومة هذا المضاد يعود إلى امتلاك بعض العزلات الإنزيمات المحطمة للمضاد فقد ذكر (Aleksun and Levy, 2007). إن بعض الإنزيمات المنتجة من الجراثيم السالبة لملون جرام لها القدرة على تحطيم مضاد التتراسايكلين.

اختلفت نتائج الدراسة الحالية عن نتائج دراسة Igwe *et al.* (2015) إذ سجلت نسبة مقاومة أقل للمضاد أعلاه بلغت (٦٨,٦%).

أظهرت تقريبا كل العزلات الممرضة من جراثيم UPEC مقاومة لأكثر من مضاد حيوي سواء على مستوى اختبار تعدد المقاومة المظهرية أو المقاومة الجينية للأنماط المصلية بحيث أصبحت مشكلة تهدد الصحة العامة للمجتمع كذلك تكلفة الرعاية الصحية حيث لا بد من إعداد ووضع سياسة صارمة لإعطاء الوصفة الطبية (Akram *et al.*, 2007).

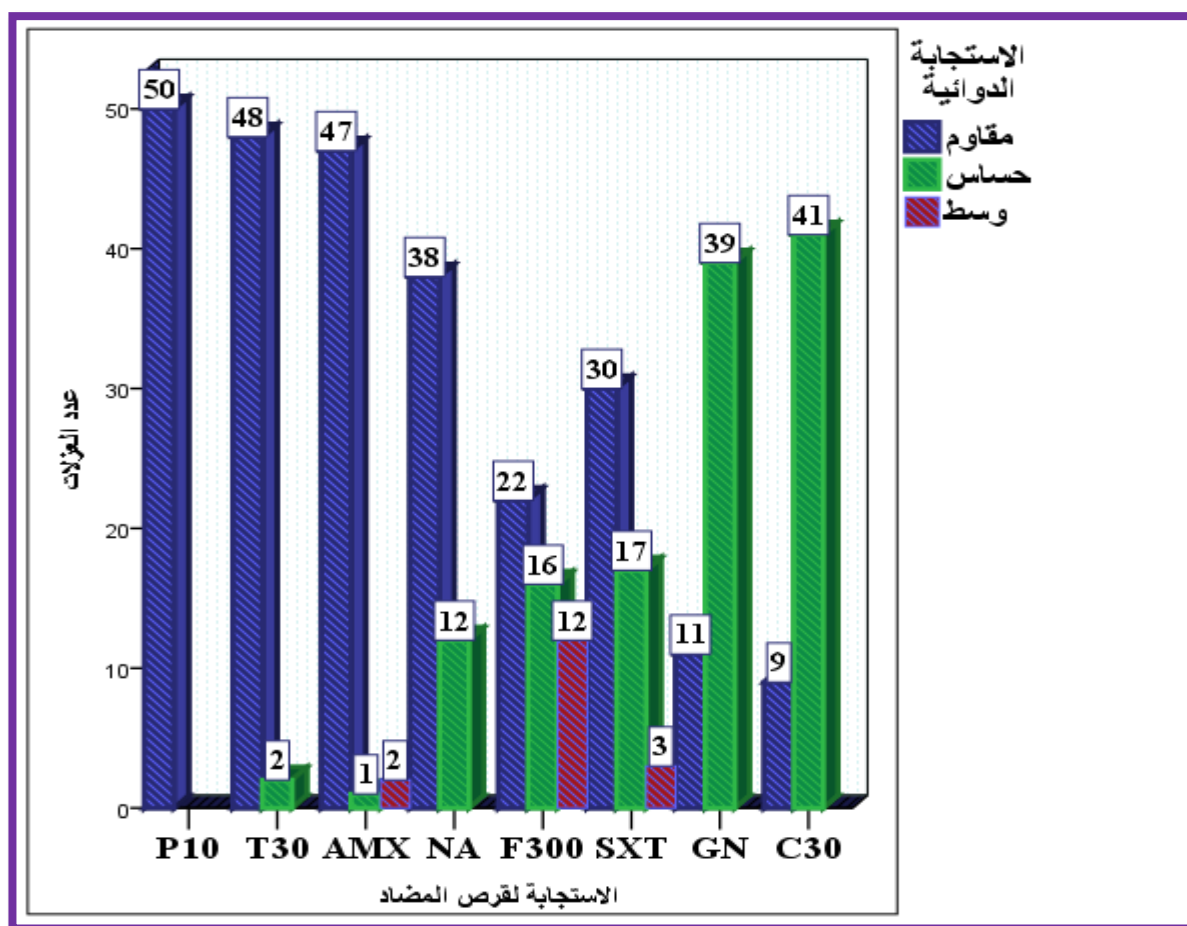
يوضح جدول (٤-٦) أعداد ونسب تعدد المقاومة المظهرية للأنماط المصلية، إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية تعدد المقاومة المظهرية للأنماط المصلية لأكثر من مضاد حيوي وجود فروق إحصائية ذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$).

يوضح جدول (٤-٧) و جدول (٤-٨) ارتباط الأنماط المصلية المتعددة بتعدد كل من المقاومة المظهرية والمقاومة الجينية للعزلات الجرثومية ومن نتائج التحليل الإحصائي باستخدام مربع كاي لم تظهر فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$).

جدول (٥-٤): النسب المئوية للمقاومة المظهرية للعزلات للمضادات الحيوية.

الاستجابة الدوائية * قرص المضاد					
Total	الاستجابة الدوائية			قرص المضاد	
	وسط	حساس	مقاوم		
50	0	0	50	Count	P
100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	قرص المضاد %	
12.5%	0.0%	0.0%	19.6%	الاستجابة الدوائية %	
12.5%	0.0%	0.0%	12.5%	% of Total	
50	0 _{a, b}	2 _b	48 _a	Count	T
100.0%	0.0%	4.0%	96.0%	قرص المضاد %	
12.5%	0.0%	1.6%	18.8%	الاستجابة الدوائية %	
12.5%	0.0%	0.5%	12.0%	% of Total	
50	2 _a	1 _b	47 _a	Count	AMX
100.0%	4.0%	2.0%	94.0%	قرص المضاد %	
12.5%	11.8%	0.8%	18.4%	الاستجابة الدوائية %	

12.5%	0.5%	0.3%	11.8%	% of Total	NA
50	0 _a	12 _a	38 _a	Count	
100.0%	0.0%	24.0%	76.0%	قرص المضاد %	
12.5%	0.0%	9.4%	14.9%	الاستجابة الدوائية %	
12.5%	0.0%	3.0%	9.5%	% of Total	F
50	12 _b	16 _a	22 _a	Count	
100.0%	24.0%	32.0%	44.0%	قرص المضاد %	
12.5%	70.6%	12.5%	8.6%	الاستجابة الدوائية %	
12.5%	3.0%	4.0%	5.5%	% of Total	SXT
50	3 _a	17 _a	30 _a	Count	
100.0%	6.0%	34.0%	60.0%	قرص المضاد %	
12.5%	17.6%	13.3%	11.8%	الاستجابة الدوائية %	
12.5%	0.8%	4.3%	7.5%	% of Total	GN
50	0 _a	39 _b	11 _a	Count	
100.0%	0.0%	78.0%	22.0%	قرص المضاد %	
12.5%	0.0%	30.5%	4.3%	الاستجابة الدوائية %	
12.5%	0.0%	9.8%	2.8%	% of Total	C
50	0 _a	41 _b	9 _a	Count	
100.0%	0.0%	82.0%	18.0%	قرص المضاد %	
12.5%	0.0%	32.0%	3.5%	الاستجابة الدوائية %	
12.5%	0.0%	10.3%	2.3%	% of Total	Total
400	17	128	255	Count	
100.0%	4.3%	32.0%	63.8%	قرص المضاد %	
100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	الاستجابة الدوائية %	
100.0%	4.3%	32.0%	63.8%	% of Total	



P10:Penicillin,AMX30: Amoxicillin,T30:Tetracycline,NA30:Nalidixic,acid,F300:Nitrofurantoin,
SXT25:trimethoprim/sulfamethoxazole,GN10:Gentamicin,C30: Chloramphenicol

شكل (٤-١٣): المقاومة المظهرية لجراثيم UPEC لبعض المضادات الحيوية.

جدول (٤-٦): أعداد ونسب تعدد المقاومة المظهرية للعزلات الجرثومية.

النسبة المئوية %	عدد العزلات المقاومة	المقاومة المتعددة للمضادات
2.0	1	P

2.0	1	P, AMX
2.0	1	P, T
14.0	7	AMX, P, T, SXT, NA
8.0	4	AMX, P, T, NA, F
10.0	5	GN, AMX, P, T, SXT, NA
2.0	1	GN, AMX,P, T, SXT
8.0	4	C, AMX, P, T, SXT, NA, F
4.0	2	GN, AMX,P, T,F
16.0	8	AMX, P, T, SXT, NA, F
10.0	5	AMX, P, T, NA
2.0	1	SXT, P, T, F
4.0	2	AMX, P, T, SXT, F
2.0	1	C, AMX, P, T, NA
2.0	1	C, AMX, P, T, NA, F
2.0	1	C,AMX, P, T
4.0	2	GN, AMX, P, T
2.0	1	C, GN, AMX, P, T, SXT, NA, F
2.0	1	AMX, P, T, NA, F
2.0	1	C, AMX, P,T, SXT, NA
100.0	50	Total

Test Statistics	
تعدد انواع المقاومة المظهرية للعضلات	
37.200 ^a	Chi-Square
19	df
.007	Asymp. Sig.
a. 20 cells (100.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 2.5.	

جدول (٤ - ٧): علاقة الأنماط المصلية والمقاومة المظهرية المتعددة للعضلات المرضية.

ارتباط تعدد الانماط المصلية * المقاومة المظهرية المتعددة للعضلات Cross tabulation												
Total	الأنماط المصلية المتعددة											المقاومة المظهرية المتعددة
	others	O6,O15, O25	O6,O15 ,O16	O16, O25	O15, O25	O15, O16	O6, O16	O6, O15	O25	O15	O6	
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	p
1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	P,AMX

1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	P, T
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	AMX, P, T, SXT, NA
4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	AMX, P, T, NA, F
5	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	GN,AMX,P, T, SXT, NA
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	GN, AMX,P, T, SXT
4	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	C,AMX,P,T,SXT, NA, F
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	GN, AMX,P, T,F
8	3	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2	AMX, P, T, SXT, NA, F
5	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	AMX, P, T, NA
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	SXT, P, T, F
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	AMX, P, T, SXT, F
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	C, AMX, P, T, NA
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	C, AMX, P, T, NA, F
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	C,AMX, P, T
2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	GN, AMX, P, T
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C, GN, AMX, P, T, SXT, NA, F
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	AMX, P, T, NA, F
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C, AMX, P,T, SXT, NA
50	14	2	2	2	2	2	1	6	3	4	12	Total

Chi-Square Tests			
Asymp. Sig. (2-sided)	df	Value	
.034	190	227.058 ^a	Pearson Chi-Square
		50	N of Valid Cases

a. 220 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .02.

جدول (٤-٨): علاقة الأنماط المصلية والمقاومة الجينية المتعددة للعزلات المرضية.

ارتباط تعدد الأنماط المصلية * المقاومة الجينية للمضادات Crosstabulation												
Total	نوع النمط المصلي											الجينات المقاومة
	Others	O6,O15,O25	O6,O15,O16	O16,O25	O15,O25	O15,O16	O6,O16	O6,O15	O25	O15	O6	
3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	<i>aac3-IV</i>
4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	<i>CITM, aac3-lv</i>

9	3	0	0	0	2	0	0	1	0	1	2	<i>tet(A), CITM</i>
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	<i>CITM, Sul1</i>
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	<i>aac3-IV, tet(A)</i>
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	<i>aac3-IV, Sul1</i>
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>tet(A), dfrA1</i>
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	<i>tet(A), Sul1</i>
1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>CITM, aac3-vl, tet(A)</i>
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<i>CITM, Sul1, dfrA1</i>
2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>CITM, Sul1, tet(A)</i>
5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	<i>CITM, aac3-vl, Sul1</i>
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>aac3-IV, tet(A), dfrA1</i>
2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	<i>aac3-IV, tet(A), Sul1</i>
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>tet(A), dfrA1, Sul1</i>
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<i>dfrA1, sul1</i>
2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	<i>tet(A), dfrA1, Sul1, CITM</i>
11	3	0	0	1	0	1	0	1	1	2	2	Susceptible
50	14	2	2	2	2	2	1	6	3	4	12	Total

Chi-Square Tests			
Asymp. Sig. (2-sided)	df	Value	
.384	170	174.829 ^a	Pearson Chi-Square
		50	N of Valid Cases

a. 198 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .02.

إن نسبة المقاومة للمضاد الحيوي Amoxicillin كانت مرتفعة (94.0%) مثلما كانت في نتائج دراسة طلحة (٢٠٠٩) ودراسة طعمة (٢٠٠٦) إذ بلغت على التوالي (١٠٠٪) و(83.8%). ومطابقة لدراسة النيجيري (Olorunmola et al., 2013).

سجلت نتائج الدراسة الحالية نسبة مقاومة للحامض Nalidixic acid بلغت (76.0%) وسجل الباحث طعمة (٢٠٠٦) و Farshad et al. (2012) نسب مقاومة اقل من الدراسة الحالية حيث بلغت على التوالي (٢٣,٢٪) و(٢٤,٥٪).

بلغت النسبة المئوية للمقاومة المظهرية للعزلات للمضاد الحيوي Trimethoprim-Sulfamethoxazole (60.0%) وسجلت دراسة Raz et al. (2002) و Sedighi et al. (2014) و Ahmad et al. (2015) نسباً متفاوتة بلغت على التوالي

(٤٦ %) و (٧٠,٨ %) و (٥٥ %). قد يعزى الارتفاع بنسبة المقاومة إلى زيادة الاستعمال العشوائي للمضاد الذي من شأنه أن يزيد من نشوء المقاومة الجرثومية.

من الجدير بالذكر إن فحص الحساسية بطريقة الأقراص المنتشرة للمضاد أعلاه يعتمد أساسا على مكونات الوسط لذا تعد طريقة غير فعالة بالنسبة لهذا المضاد الحيائي فقد يكون غير فعال على الجراثيم (الربيعي، ٢٠١١). لذلك يعتقد إن الفحص الجزيئي يظهر خصوصية ودقة أعلى في اختيار المضادات الحياتية المناسبة كعلاج للاخماج البولية Uropathogens، إن المقاومة الجرثومية للمضادات الحياتية إذا كانت نسبتها أكبر من ٢٠ % يفضل اختيار نوع آخر من المضادات الحياتية (Jackson, 2015).

بلغت مقاومة المضاد Nitrofurantoin (44.0%) في حين سجلت دراسة يونس وجماعته (٢٠٠٨) في محافظة الموصل و (Echeverri et al. (2014 نسبها بلغت (٣٣,٧ %) و (18.0%). و سجلت دراسة Farshad et al. (2012 و Singh and (2013 و Madhup لمقاومة المضاد الحيائي Gentamicin نسبها بلغت على التوالي (15.6) و 15 و (١٣,٢ %).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية مقاومة بنسبة (18.0%) للمضاد الحيائي Chloramphenicol وسجل الباحث Sedighi et al. (2014) و Ahmad et al. (2015) نسب مقاومة مقاربة إذ بلغت (١٧,٥ %) و (١٠ %) وأقل نسبة مقاومة سجلها Al-Hamdani and Abas (2013) في محافظة البصرة و بلغت (٥,٥٥ %).

نلاحظ انخفاض المقاومة لهذا المضاد Chloramphenicol مقارنة بالدراسات الأخرى فقد كان عدد العزلات في الدراسة الحالية بنسبة اقل مقارنة بدراسة Momtaz et al. (2013) التي بلغ نسبة أنماط العزلات المقاومة فيها (٢٦ %). وهذا قد يعود لطبيعة البيئة واكتساب الجراثيم لعوامل الضراوة شجع على مقاومتها للمضاد المذكور. وقد يكون السبب قلة استخدام المضاد الحيوي للسنين الماضية نتيجة احتمال وجود أعراض جانبية التي قد تنشأ من تعاطيه قد تكون خطيرة يمكن أن تهدد الحياة، فقد يسبب فقر الدم اللاتنسجي (Aplastic Anaemia). حيث إن استخدامه أساسا كان مقتصرًا على المرضى المصابين بحمى التيفوئيد (Typhoid fever) والتهاب السحايا (Meningitis) ومن المحتمل أنها حافظت على حساسيتها لان استخدام المضاد أقل تواترا خلال السنوات السابقة.

من الجدير بالذكر أن (٧٣ %) من سلالات UPEC كانت مقاومة لثلاثة أو أكثر من المضادات الحياتية مما يجعلها متعددة المقاومة للمضادات - Multi Drug Resistant

(MDR)، وأبرزها مضادات Tetracycline و Penicillin. علما إن نسبها و معدلاتها تتفاوت من دولة إلى أخرى (Farshad *et al.*, 2012). كانت نتائج Momtaz (2013) *et al.* متطابقة فيما يخص مقاومة الأنماط المذكورة المطلقة للمضاد الحيائي Penicillin .

هناك تباين في تركيب طبقة (LPS) الذي يمكن أن يكون مختلف في النوع الواحد وقد يكون احد أسباب اكتساب الجراثيم المقاومة للمضادات الحياتية , إن دراسة أنماط مقاومة الجراثيم للمضادات الحياتية مهم في التحريات الوبائية خاصة بين عزلات المستشفيات للتحري عن تلك العزلات ومحاولة الحد من انتشارها (Atsushi *et al.* , 2015 b).

أظهرت الدراسة الحالية أن سلالات UPEC تملك جينات مسئولة عن الضراوة تمنحها القدرة العالية على المقاومة لمعظم المضادات الحياتية. لوحظ مقاومة العزلات للبنسلين والنتراسايكلين كمضادات حيائية لمعالجة الاخماج البولية للأطفال.

إن مقاومة المضادات الحياتية قد تظهر نتيجة النشوء عن طريق الاصطفاء الطبيعي. إذ إن مفعول المضاد الحيائي يشكل ضغطا بيئيا على الجراثيم لكن الطفرات التي تظهر في بعض الخلايا الجرثومية تجعلها تنجو من مفعول المضاد الحيائي. بعد ذلك تنتقل هذه الميزة إلى النسل المقبل الذي يتميز بكونه جيلا يملك مقاومة كاملة للمضاد الحيائي. بينت دراسات عدة أن طريقة استعمال المضادات الحياتية تؤثر بصفة كبيرة على تطور عدد الكائنات الحية الدقيقة المقاومة. وفرط استخدام المضادات الحياتية ذات الطيف الواسع، يسرع عملية تطور المقاومة الجرثومية. هناك عوامل أخرى تتمثل في التشخيص الطبي غير الدقيق، وصف الطبيب أدوية غير ضرورية، الاستعمال غير المناسب للمضادات الحياتية من قبل المريض، إلى جانب استعمال المضادات الحياتية كمواد إضافية لطعام المواشي والدواجن لتشجيع نموها وهذا يؤدي إلى حدوث إصابات وبائية مكتسبة من المجتمع منها الإصابة باخماج المجاري البولية (Olivare *et al.*, 2013 ; *et al.*, 2013 ;

(Colobatiu *et al.*, 2014 Pehrsson).

١. إن سلالات جراثيم UPEC احد العوامل الرئيسية المسببة لخمج المجاري البولية في الأطفال في مدينة الناصرية.
٢. النمط المصلي O6 هو السائد بين أنماط جراثيم UPEC المسببة لخمج المجاري البولية.
٣. أكثر عدد من الجينات المقاومة للمضادات الحياتية موضوع الدراسة كان CITM للمضاد الحياتي Penicillin يليها مقاومة الجين *tet(A)* للمضاد الحياتي Tetracycline من بين الأنماط المصلية لعزلات جراثيم UPEC. بينما كان أقل عدد للعزلات المقاومة للجين *dfra* للمضاد الحياتي Trimethoprim.
٤. أظهر اختبار الحساسية بطريقة الانتشار بالقرص إن أكبر مقاومة تجاه مضادات البيتا لكتام مثل Penicillin للعزلات المأخوذة من العينات السريرية يليها عدد العزلات المقاومة Tetracycline. كان أقل عدد عزلات هي المقاومة للمضاد Chloramphenicol.
٥. استخدام الطرق الجزيئية وسيلة سريعة وفعالة للتنميط المصلي أو الكشف عن جينات المقاومة للجراثيم المرضية.

Recommendations

التوصيات

- ١- ينصح بعدم استخدام المضادان الحياتيان Penicillin و Tetracycline لعلاج الاخماج البولية في الاطفال.
- ٢- ينصح بإجراء دراسات مستقبلية أخرى عن المضاد الحياتي Trimethoprim لأهميته في علاج الاخماج البولية.
- ٣- إجراء دراسات دورية منتظمة لتقييم الانتشار الجغرافي لعزلات جراثيم الإشيريشيا القولونية المسببة لاختلاج المجاري البولية في الأطفال.
- ٤- التأكيد على استخدام التقنيات الجزيئية الحديثة في المستشفيات لتشخيص العزلات المرضية واستكمال التشخيص المصلي للأنواع المسببة للاختلاج البولية وتمييزها عن غيرها باستخدام الطرق التقنية الحديثة المتبعة عالمياً.
- ٥- إتباع طرق التعقيم المثلى وتجنب الاختلاط بين المرضى وكذلك الحد من الاستخدام المشترك للمواد لتفادي انتشار العزلات المقاومة للمضادات الحياتية. ولابد من إعداد ووضع سياسة صارمة لإعطاء الوصفة الطبية بسبب تعدد المقاومة المظهرية والمقاومة

الجينية للأنماط المصلية بحيث أصبحت مشكلة تهدد الصحة العامة للمجتمع بالإضافة لتكلفة الرعاية الصحية.

• المصادر باللغة العربية:

- ❖ **أل سماعيل, وجيهة عبد الكريم محمد. (٢٠٠٧).** البكتريا المسببة لالتهاب المسالك البولية، خاصة اشيريشيا كولاي ونمط مقاومتها للمضادات الحيوية في المملكة العربية السعودية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الملك سعود.
- ❖ **توفيق، شاميران محمود (٢٠٠٥).** أنتشار صفة المقاومة للمضادات الحيوية الحديثة في بعض انواع البكتيريا السالبة المسببة لالتهابات المجاري البولية في الاطفال من الذكور والاناث دون سن الثالثة, رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- ❖ **ثويني، قاسم نجم وعبد جابك، سرى إحسان. (٢٠١٥).** التغيرات النسيجية المرضية لبعض أعضاء الفأر المحقون ببكتيريا اشيريشيا القولون البولية المرضية *Uropathogenic E.coli* عبر البريتون والوريد.مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية, المجلد (٢٣) العدد (١): ٨٢-٧٠.
- ❖ **الجنابي، حمدي نايف وعبد الرضا، حسن علي ومطر، حسن علي، والعسافي، دهام علي. (٢٠٠٨).** انتشار بكتريا *Staphylococcus saprophyticus* في الجهاز البولي لمرضى مدينة الفلوجة. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة، المجلد(٢)، العدد(٢): ٨٩-٩٩.
- ❖ **الحلفي، سوسن محمد كريم. (٢٠٠٩).** حساسية بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اخماج المجاري البولية لمضادي Ciprofloxacin و Lomefloxacin. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- ❖ **الخزرجي، منعم رضوان علي. (٢٠٠١).** دراسة مقاومة للعوامل ضد المايكروبية على بعض العصيات السالبة . لصبغة كرام المعزولة من التهاب المجاري البولية ، رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- ❖ **الربيعي، عباس حسين. (2011).** المضادات الحياتية آلية عمل المضادات الحياتية. قسم العلوم العامة ، نظام التعليم الالكتروني، جامعة بابل.

- ❖ الربيعي، عباس حسين. (2013). بايولوجية الانسان الجهاز البولي ، أجزاء الجهاز البولي. قسم العلوم العامة. نظام التعليم الالكتروني، جامعة بابل.
- ❖ شريف، اديبة يونس و احمد، عامرة علي. (٢٠٠٧). دراسة حساسية جرثومة *Serratia marcescens* المعزولة من اخماج الجروح لبعض المضادات الحيوية. مجلة التربية والعلوم، المجلد (١٩) ، العدد (٢): ٢٢-٣٠.
- ❖ الطائي، هادي رحمن رشيد. (2010). عزل *Proteus vulgaris* المنتجة لليوريز من اطفال مصابين بالتهابات المجاري البولية، مجلة ديالى للعلوم البحتة، المجلد (٢)، العدد (٦): ٢٦٩-٢٧٤.
- ❖ طعمة، منير عبد الرسول. (٢٠٠٦). دراسة في التهاب المجاري البولية عند الأطفال دون سن الخامسة من العمر في مستشفى الأطفال في كربلاء. رسالة ماجستير. كلية الطب ، جامعة بابل.
- ❖ طلحة، مصطفى حسن زينل (٢٠٠٩). مقارنة النشاط الأنزيمي لبكتريا *Escherichia coli* المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية للمصابين وغير المصابين بالعجز الكلوي. رسالة ماجستير. كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- ❖ عبد الرحمن، محمود إبراهيم إسماعيل. (٢٠٠٦). دراسة بعض الجوانب البكتيرية والمناعية لخمج المجرى البولي المزمن. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- ❖ العبيدي، منى جلال علي. (٢٠٠٧). دراسة مايكروبية وبائية لاختلاج المجاري البولية لدى الأطفال في قضاء الحويجة. رسالة ماجستير. كلية التربية، جامعة تكريت.
- ❖ الكعبي، سهام جاسم محسن. (٢٠١٢). تأثير المستخلص المائي لكفشة الذرة الصفراء على التصاق بعض العزلات البكتيرية بالخلايا الطلائية المسببة لخمج السبيل البولي. مجلة جامعة بابل للعلوم التطبيقية والصرفة، المجلد (٤)، العدد (٢٠): ١٢٠٢-١٢٠٩.
- ❖ محميد، شيماء جاسم. (٢٠١١). المسببات الجرثومية المرافقة لخمج السبيل البولي في النساء الحوامل، مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية. المجلد (١٩)، العدد (٣): ٩٢١-٩٢٥.
- ❖ ياسين، سيلدا سعيد. (٢٠١٤). دراسة احصائية عن اخماج المجاري البولية في الاطفال دون سن الخامسة في مدينة كركوك. جامعة كركوك، كلية الطب البيطري، مجلة جامعة كركوك. المجلد (٩)، العدد (٢): ٢٢-٤٢.

❖ **يونس، ضياء عبد الحي، مصطفى، خالدة نايف، يحيى، مؤيد قاسم. (٢٠٠٨). دور بعض أنواع البكتيريا في التهاب المجاري البولية في مدينة الموصل. هيئة التعليم التقني في الموصل. مجلة التقني. المجلد (٢١)، العدد (٣): 44-48.**

• المصادر باللغة الأجنبية:

- ❖ **Abdul-Razzaq, G.M. (2013).** Pattern of antibiotic sensitivity and resistance of uropathogenes among pediatric patients with urinary tract infection. Iraq J. Pharm.; 13(1): 64-76.
- ❖ **Ahmad, W.; Jamshed, F. and Ahmad, W. (2015).** Frequency of *Escherichia coli* in patients with community acquired urinary tract infection and their resistance pattern against some commonly used antibacterials. J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad.; 27(2): 333-337.
- ❖ **Akram, M.; Shahid, M. and Khan, A.U. (2007).** Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. Annals Clin. Mic. Anti.; 6(4): 1-7.
- ❖ **Alekshun, M.N. and Levy, S.B.(2007).** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance.J. Cell.; 128(6):1037-1050.
- ❖ **Al-ghoribi, M.F.; Beatson, S. and Upton, M. (2014).** Comparative genomics reveals that O-antigen is essential for virulence of ST127 UPEC in *Galleria mellonella* larvae.Conference. The European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, At Barcelona - Spain. J. pone.; 9(7): 1-2.
- ❖ **AL-Hamawandi, J.A. (2014).** Study of some virulence factors of some urepathogenic bacteria. J. Babylon Uni. Pure App. Sci.; 3(22): 1355-1362.
- ❖ **Al-Hamdani, M.A. and Abbas, D.S. (2013).** Isolation, Antibiotic resistance Patterns and Plasmid Profile of *E.coli* 0157:H7 from Environmental Samples in Basrah Governorate– Iraq. Int. J. Pha. Med. Res.; 3(2):1-4.
- ❖ **AL-karawyi, A.M.; AL-Jubouri, S.A. and Alasadiy, Y.D. (2013).** Molecular Detection of AmpC Family Genes Encoding Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* isolated from Patients with Urinary Tract Infection (UTI) in Najaf Hospitals. Vet. Med. Sci.; 4(1): 152-161.
- ❖ **AlKhateeb, N.E.; Al-Azzawi, S. and Al-Tawil, N.G. (2014).** Association between UTI and urinary tract abnormalities: A case-control study in Erbil

City. Iraq. J. Ped. Uro.; 10: 1165-1169.

- ❖ **Al-Rawi, M.A. (2010).** Ultrasound, Excretory Urography and Urinary problems in Iraqi Children. Iraqi, J. Comm. Med.; 23 (2):105-109.
- ❖ **Al-Taha, N.K. (2000).** The Role of Gram Negative Bacteria in Hospital Infection. M.Sc. Thesis, College of Medicine, Al-Mustansiriya University.
- ❖ **Amanda, A.P.; Theoklis, Z.; Patrick, H.C.; Dawei, X. and Ron, K. (2010).** Previous Antimicrobial Exposure Is Associated With Drug-Resistant Urinary Tract Infections in Children. Official J. A. A. Ped .; 125(4): 664-672.
- ❖ **Ann, P. and Kieran, H. (2010).** Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. J. Anti. Chemother.; 65 (3): 25–33.
- ❖ **Aseem R.; Shukla, P.F.; Austin, C.D. and Anthony H. (٢٠٠٧).** The Kelalis-King-Belman Textbook of Clinical Pediatric Urology Study Guide, 5th ed., Publisher: Informa Healthcare. :1396. P.
- ❖ **Atsushi, I.; Sunao I.; Kazuko, S.; Tomoko, M.I.; Flemming, S. and Makoto, O. (2015 a).** *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: A Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. J. Clin. Mic.; 53(8): 2427-2432.
- ❖ **Atsushi, I.; Sunao I.; Taisei K.; Yoshitoshi, O.; Keisuke, K.; Makoto, O.; Tetsuya H.; and Nicholas R.T. (2015 b).** A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. J. PMC.; 22(1): 101–107.
- ❖ **Balduino, A.; Coelho, V.M.; Wang, Z.; Taichman, R.S.; Krebsbach, P.H.; Ashani, T.W.; Kevin, G.B.; Wallace, D.M.; Dennis, D.T. and Radovan, B. (2013).** Molecular signature and in vivo behavior of bone marrow endosteal and subendosteal stromal cell populations and their relevance to hematopoiesis. J. yexcr.; 318(19): 2427-2437.
- ❖ **Barakat, A.J. (2013).** Presentation of renal disease in children. Intern. J. Ped. Ann.; 42(٣): ٤٠-٤٤.

- ❖ **Brandstrom, P.; Neveus, T.; Sixt, R. and Stokland, E.(2010).** The Swedish reflux trial in children: IV. Renal damage. J. Urol.; 184(1) :292-297.
- ❖ **Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2013).** Medical Microbiology. 24th.ed. McGraw- Hill Companies, Inc., New York. Pp: 224-232.
- ❖ **Brown, J.S. (2009).** Diabetic cystopathy-what does it mean? J. Urol.; 181(1): 13-14.
- ❖ **Burton, G.R.W. and Engelkirk, P.G. (2004).** Microbiology for the health sciences, 7th .ed. Lippincott Williams & Wilkins : 368p.
- ❖ **Center for Bioinformatics and Computational Biology.(2016).** ARDB- Antibiotic Resistance Genes Database. University of Maryland, College Park, MD 20742, USA.
- ❖ **Chih-Yen, H.; Huang-Yu Y.; Chih-Hsiang C.; Hsing-L.; Chao-Yi W.; Meng-Chang H.; Peir-Haur H.; Su-HsunL.; Cheng-Hao W.; Cheng-Chia L.; Tzung-Hai Y. and Tzu-Chin W. (2015).** Risk Factors for Development of Septic Shock in Patients with Urinary Tract Infection. Bio.Med. R. Inte., ID 717094:1-7.
- ❖ **Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996).** Practical medical microbiology 14th ed. The Churchill livingstone. Inc. NewYork , USA.
- ❖ **Colobatiu, L.; Ovidiu, O.; Alexandra, T.; Romolica, M.; Simona, .; Sorin, D.; and Marian, M.(2014).** An analysis of *Escherichia coli* isolations for antimicrobial resistance genes. J. Food Safety; 34(3): 233-238.
- ❖ **Dattelbaum, J.D.; Lockatell, C.V.; Johanson, D.E. and Mobley, H.L. (2003).** The transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in expermental urinary tract infections. J. Infect. Immun.; 71(2): 1026-1030.
- ❖ **Davidison, A.M.; Cumming, A.D. and Swainson, C.D. (2002).** Disease of the kidney and system. In: Davidison's principle and practice of medicine.7th ed. Chrichill. Livingston. London. Pp: 611-653.

- ❖ **Davis N.F. and Flood H.D. (2011).** The Pathogenesis of Urinary Tract Infections. In: Clin. Management of Complicated Urinary Tract Infection (ed Ahmad Nikibakhsh). ; pp :101-120.
- ❖ **Desjardins, P. and Conklin, D. (2010).** NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. J. Vis. Exp.; 22 (45). 1-4.
- ❖ **Dormanesh, B.; Dehkordi, F.S.; Sahar, H.; Hassan, M.; Reza, M. ; Mohammad, J.H.; Emad, Y.; Vahideh, T. and Ebrahim, K.D. (2013).** Virulence Factors and O-Serogroups Profiles of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Iranian Pediatric Patients. Iran Red Crescent Med. J. ; 16(2): e14627:1-7.
- ❖ **Downey, L.C.; Benjamin, D.K.; Reese, H.C.; Kevin, M.W.; Christoph, H.; Matthew, M.L.; Michael, C.W and Brian, P.S. (2010).** Urinary tract infection concordance with positive blood and cerebrospinal fluid cultures in the neonatal intensive care unit. J. Perinatol. ; 33(4): 302–306.
- ❖ **Echeverri, C.; Serna-Higueta, M.; Serrano, A.; Ochoa-García, C.; Rosas, L.; Bedoya, A.; Suárez, M.; Hincapié C.; Adriana, H.; Diana, O.; Juan, J.; John, J. and David E. (2014).** Profile resistance of pathogens causing urinary tract infection in the pediatric population, and antibiotic treatment response, at a University Hospital 2010-2011. Colomb Med. 45(1): 39-44.
- ❖ **Emamghorashi, F.; Shohreh, F.; Mehdi, K.; Shadokht, R. and Maryam, H. (2011).** The Prevalence of O Serogroups of *Escherichia coli* strains causing acute urinary tract infection in children in Iran. Saudi. J. Kidney Dis., Transpl. ; 22(3): 597-601.
- ❖ **Fabretti, F.; Theilacker, C.; Baldassarri, L.; Kaczynski, Z.; Kropec, A.; Holst, O. and Huebner, J. (2006).** Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. Infect. Immun ; 74(7): 4164- 4171.
- ❖ **Farshad, S.; Mojtaba, A.; Ali, MT.; Reza, R.; Aziz, J.; Reza, M.Z. and Abdolvahab, A. (2011).** Molecular epidemiology of *Escherichia coli*

strains isolated from children with community acquired urinary tract infections. Iran. African J. Mic.; 5(26): 4476-4483.

- ❖ **Farshad, S.; Reza, R.; Aziz, J.; Marziyeh, H.; Mojtaba, A. and Reza, M. (2012).** Microbial Susceptibility, Virulence Factors and Plasmid Profiles of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in Jahrom, Shiraz, Iran. Arch. Iranian med.; 15(5): 312-316.
- ❖ **Fasugba, O.; Gardner, A. and Mnatzaganian, G.(2015).** Ciprofloxacin resistance in community and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. BMC. Infect. Dis.; 15(1): 1-16.
- ❖ **Forbes, B.A.; Daniel, F.S.; and Alice, S.W. (2007).** Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 12th Edition .P: 1031.
- ❖ **Freedman, A.L. (2007).** Urologic Diseases in America. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH publication 07-5512,: 439-458.
- ❖ **Gloria, I.P. ; Eric, M. ; Octavio, G. ; Javier, A. ; Erasmo, N. and Sergio, V. (2007).** Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children . Ann. Clin. Mic. Anti. 6 (17) : 1-8.
- ❖ **Gregg, S.D.; Kara, W.; Lora, N.; Brett, W.; Maliha, A.; Lori, G.; Heidi, G.; Rick, B.; Joseph, H.; Stephen, P.; Marc, S.; James, R.J.; Cindy, M.L. and Lance, B.P. (2015).** Intermingled *Klebsiella pneumoniae* Populations between Retail Meats and Human Urinary Tract Infections. Oxford J.; 61(6): 892-899.
- ❖ **Guirguitsova, B.; Chankov, D. and Zozikov, B. (2002).** Staphylococci as uropathogens-frequency of isolation in hospitalized patients and sensitivity antimicrobial agents. J. Ann. Urol.; 36(5): 341-347.
- ❖ **Hogan, S.; Stevens N.T.; Humphreys H.; O'Gara J.P. and O'Neill, E. (2015).** Current and Future Approaches to the Prevention and Treatment of

Staphylococcal Medical Device-Related Infections. J. mp. Drug disc. Curr. Pharm. Des. 21; (1):100-113.

- ❖ **Hogg, S. (2013).** Essential Microbiology. 2nd Edition. USA Oxford.: John Wiley and Sons .: 528p.
- ❖ **Holly, C.; Jonathon, B.; Lynnette, P.; Michel, D.; Russell, H.; Neil, W. and David, W. (2015).** Comparative virulence of urinary and blood stream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. J. Med. Mic.; 6(12): 145-151.
- ❖ **Howell, A.B. (2013).** Updated systematic review suggests that cranberry juice is not effective at preventing urinary tract infection. J. EBN.; 16 (4): 114-115
- ❖ **Igwe, J.C.; Musa, A. Olayinka, B.O.; Ehnimidu, J.O. and Onaolapo, J.A.(2015).** Tetracycline Resistant Genes in *E. coli* Isolated from UTI and Diarrhea Patients in Zaria, Nigeria, Clin. Mic.; 4(6):1-7.
- ❖ **Islam, M. S; Yusuf, M.A.; Shaheen, A.B.; Sattar, A.F.; Afzal, H. and Sushmita, R. (2015)** Extended-spectrum-beta-lactamase producing uropathogenic *Escherichia coli* infection in Dhaka, Bangladesh. J. Bact. Res.; 7(1): 1-7.
- ❖ **Jackson, E C.(2015).** Urinary Tract Infections in Children: Knowledge Updates and a Salute to the Future. Ped. in Rev.: 36 (4): 153-166.
- ❖ **Jackson, E.C. (2015).** Urinary Tract Infections in Children: Knowledge Updates and A Salute to the Future. American Academy of Pediatrics, Pediatrics in Review; 36: 153-166 .
- ❖ **Jacobsen, S.M.; Stickler, D.J.; Mobley, H.L. and Shirtliff, M.E. (2008).** Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin. Mic. Rev.; 21(1): 26-59.
- ❖ **Jarrell, A.S.; Wood, G.C.; Ponnappula, S.; Magnotti, L.J.; Croce, M.A.; Swanson, J.M.; Boucher, B.A. and Fabian, T.C. (2015).** Short-duration treatment for catheter-associated urinary tract infections in critically ill trauma patients. J. Trauma Acute Care Surg. ; 79(4): 649-653.

- ❖ **Jason, L.(2010).** Essentials of anatomy and physiology,18th5ed, The Urinary System, Pearson Education, Inc, :187p.
- ❖ **Jean, B.P.; Franklin, R.C.; Jeff, A.; Patricia, A.B.; George, M.E.; Dwight, J.H.; Janet A.H. and Stephen G.J. (2012).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Clin. Lab. Standards Inst.; 33 (1): 1-12.
- ❖ **Joan, L.R.; Jane C.F.; Mia E.L. and Robert B. (2014).** Urinary tract infection in infants and children: Diagnosis and management. Canadian Paediatric Society Community Paediatrics Committee, J. Ped. Child Health ; 19(6): 315-319.
- ❖ **Johnson, J.R.; Porter S.B.; Zhanel G.; Kuskowski M.A. and Denamur E.(2012).**Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoro quinolone resistance, and virulence genotype. Infect. Immun.; 80(4): 1554-1562.
- ❖ **Jonathan, C.C.; Judy, M.S.; Gabrielle, J.W.; Alison, L.; Graham, J.R.; Steven, J.M.; Elisabeth, M.H.; Jonathan, R.C.; Noel, E.C.; Grahame, S., Les M.I.; Patrina, H.Y. C; Sana, H and Leslie, P.R. (2009).** Antibiotic Prophylaxis and Recurrent Urinary Tract Infection in Children. N. Engl. J. Med. ;361:1748-1759.
- ❖ **Jun, L.; Kunihiro, N.; Marilyn C.R.; Marcelo T.; Rustam, I.A. and Lixin, Z. (2015).** Mechanisms of antibiotic resistance. Fron. Mic.; 6(34) : 1-3.
- ❖ **Kaper, J.B.; Nataro, J.P. and Mobley, L.T. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Mic. 2 : 123-140 .
- ❖ **Karsten, B.; Christine, H. and Georg, P. (2014).** Coagulase-Negative Staphylococci. Clin. Mic. Rev.; 27(4) : 870-926.
- ❖ **Kryger, J.; Burleigh, A.; Christensen, M. and Walter H. (2015).** Genetic Evaluation of E. coli Strains Isolated from Asymptomatic Children with Neurogenic Bladders. Int. J. Chro. Dis., Wisconsin; ID 206570: 1-5.

- ❖ **Kulkarni, R. ; Dhakal, B.K.; Slechta, E.S.; Kurtz, Z.; Mulvey, M.A. and Thanassi, D.G. (2009).** Roles of putative type II secretion and type IV pilus systems in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. J. pone ; 4(3): 47-52.
- ❖ **Larabi, K. ; Masmoudi, A. and Fendri, C. (2003).** Bacteriological and susceptibility study of 1,930 strains isolated from UTIs in a Tunis university hospital . Med. Maladies Infect.; 33(7): 348-352.
- ❖ **Levart, T.K. and Rajko, B.K. (2011).** Urinary Tract Infection in Children Onset of a New Era? Urinary Tract Infections, Peter Tenke Slovenia, :270-300.
- ❖ **Levinson, W. and Jawetz, E. (2000).** Medical Microbiology and Immunology. 6th ed. McGraw-hill, USA.472.
- ❖ **Li, D.; Liu, B.; Chen, M.; Guo, D.; Guo, X.; Liu, F.; Feng, L. and Wang L. (2010).** A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. J. Mic. Methods.; 82(1): 71-77.
- ❖ **Lívia, S.; Câmara, B.; Andra, T.; Lima, G.; Micheline, S.; Quinídia, L.; Duarte, A.; Quithé, V.; Rhayssa, O and Gilson, V. (2013).** Risk Factors for infection and infectious ousagents associated with vesicle cathteri. J. Nurs.;7(5): 4261-4268.
- ❖ **Lloyd, L.A.; Rasko, A.D and Harry, L.T.(2007).** Defining Genomic Islands and Uropathogen-Specific Genes in Uropathogenic *E.coli*. American Society for Microbiology. J. Bact.; 189(9):3532–3546.
- ❖ **MacFaddin, J.F. (2000).** Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Williams and Wilkins Baltimore, USA.:912
- ❖ **Makvana, S. and Krilov, L.R. (2014).** *Escherichia coli* Infections. Previous Antimicrobial Exposure Is Associated With Drug-Resistant Urinary Tract Infections in Children. Ped. Rev.; 36(4): 167-171.
- ❖ **Manges, A.R.; Smith, S.P.; Lau, B.J.; Nuva, C.J.; Eisenberg, J.N.; Dietrich, P.S. and Riley L.W. (2007).** Retail meat consumption and the

acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: A case control study. Food borne Path. Dis. 4(4): 419-431.

- ❖ **Mark, A.S.; Nouri, L.B.; Minh-Duy P.; Brian M.F.; Mitchell S. and Scott, A.B. (2015).** Molecular Characterization of the Multidrug Resistant *Escherichia coli* ST131 Clone. Edi.: Young, L., J. Path.; 4(3): 422-430.
- ❖ **Maynard, C.; Bekal, S.; Sanschargin, F.; Levesque, R.C.; Brousseau, R.; Masson, L.; Lariviere, S. and Harel, J. (2004) .** Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin . J. Clin. Mic.; 42 (12) : 5444-5452 .
- ❖ **McTaggart, S.; Danchin, M.; Ditchfield, M.; Hewitt, I.; Kausman, J.; Kennedy, S.; Trnka, P. and Williams, G. (2015).** diagnosis and treatment of urinary tract infection in children. J. Nephrology, 20 (2): 55-60.
- ❖ **Melha, M. (2013).** Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks and Antibiotic Resistance Trends. Food borne Path. Dis.; 10 (11): 916-932.
- ❖ **Mims, C.; Dockrell, H.M.; Goering, R.V.; Roitt, I.; Wakelin, D. and Zuckerman, M. (2004).** Medical Microbiology 3rd ed. Elsevier Limited. Spain.: Pp. 241-248.
- ❖ **Momtaz, H.; Azam, K.; Mahboobeh, M.; Farhad, S.D.; Reza, R.; Meysam, S. and Negar, S. (2013).** Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Clin. Mic. Anti.; 12(8):2-12.
- ❖ **Momtaz, H.; Rahimi, E. and Moshkelani S. (2012).** Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E.coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. Veterinarni Medicina, 57; (4): 193-197.
- ❖ **Moore, C.E.; Soeng, S.; Sar, P.; Hor, P.; Varun, K. ; Sun, S.; Nicole, S.; Rachel, B.; Nicholas, D. and Christopher, M.P. (2015).** Antimicrobial

susceptibility of uropathogens isolated from Cambodian children. Paed. Int. Chi. : 237:1-6.

- ❖ **Muhsin, E.A.; Essa, R.H. and Shakir S.M.(2013).** A Study of Some Bacteria Affecting Urinary Tract of Children with Renal Disease. J. M. Alelem Col.; 5(1): 22-35.
- ❖ **Nathan, D.O. and Jayne, B.M. (2012).** DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. BMC.; 5: 668:1-14.
- ❖ **Nevéus, T. (2013).** Can post pyelonephritic renal scarring be prevented?. Pediatr Nephrol. ; 28(2): 187-190.
- ❖ **Nickavar, A. and Sotoudeh, K. (2011).** Treatment and Prophylaxis in Pediatric Urinary Tract Infection. Int. J. Prev. Med.; 2(1): 4-9.
- ❖ **Nikaido, H. (2009).** Multidrug Resistance in Bacteria. Annu Rev Biochem. California ; 78: 119–146.
- ❖ **Olivares, J.; Bernardini, A.; Garcia-Leon, G.; Corona, F.; Sanchez, B. and Martinez, J. (2013).** The intrinsic resistome of bacterial pathogens. Front. Mic.; 4:103:1-15.
- ❖ **Olorunmola, F.O.; Kolawole, D. and Lamikanra, A. (2013).** Antibiotic resistance and virulence properties in *Escherichia coli* strains from cases of urinary tract infections. Afr. J. Infect. Dis.; 7(1): 1-7.
- ❖ **Paul, J.L.; Robert, A.B. and Latania, K.L. (2014).** Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing Enterobacteriaceae in Children: Old Foe Emerging Threat. Clin. Infect. Dis.; 60 (9): 1389-1397.
- ❖ **Pehrsson, E.C., Forsberg, K.J., Gibson, M.K., Ahmadi, S.; Dantas, G.(2013).** Novel resistance functions uncovered using functional metagenomic investigations of resistance reservoirs. Front Mic.; 7(4):145:1-11.
- ❖ **Pourakbari, B.; Ezazizadh, G.; Mahmoodi, S. and Mamishi, S. (2012).** Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients in an

Iranian referral hospital. University of Medical Sciences, Tehran, Iran. J. prev. med. Hyg.; 53: 204-206.

- ❖ **Ranjbar, R.; Bahman, A. and Nematollah, J. (2014).** The Prevalance of Beta Lactamase Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from the Urine Samples in Valiasr Hospital. Bio. Pharmacology J.; 7(2): 425-431.
- ❖ **Rashki, A. and Abdi, H.A. (2014).** O-serotyping of *Escherichia coli* Strains isolated from Patients With Urinary Tract Infection in Southeast of Iran. Int. J. Enteric Pathogen.; 2(4):1-4.
- ❖ **Raz, R.; Chazan, B.; Kennes Y.; Colodner, R.; Rottensterich, E.; Dan, M.; Lavi, I.; Stamm, W. (2002).** Empiric use of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) in the treatment of women with uncomplicated urinary tract infections, in a geographical area with a high prevalence of TMP-SMX-resistant uropathogens. Clin. Infect. Dis. 34:1165–1169.
- ❖ **Rebekka, L.; Kristine, KJ.; Akhlaq, A.; Haidar, KA.; Jørgen, T.; Jenny, D.K. and Dina, C. (2015).** A follow-up urine sample has limited value after treatment for urinary tract infection in children. Danish M. J.;62(1):4989.1-5.
- ❖ **Ricea, J.C.; Penga, T.; Kuoa, Y.f.; Pendyalaa, S.; Simmonsb, L.; Boughtonb, J.; Ishiharaa, K.; Nowickic, S. and Nowickic, B.J. (2006).** Renal Allograft Injury Is Associated with Urinary Tract Infection Caused by *Escherichia coli* Bearing Adherence Factors. A. J. Transplantation ; (6): 2375-2383.
- ❖ **Ryder, M.A. (2005).** Catheter–Related Infections: It's All About Biofilm. Advanced practice nurs. J.; 5 (3) : 1-15 .
- ❖ **Sabeen, H. (2012).** Highlights for Management of a Child with a Urinary Tract Infection. Inte. J. Ped. :1-6.
- ❖ **Sabouni, F.; Mahmoudi, S.; Bahador, A.; Pourakbari, B.; Sadeghi, R H.; Ashtiani, M.T.; Nikmanesh, B. and Mamishi, S. (2014).** Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolates in an Iranian Referral Children’s Hospital. Osong Public Health Res. Perspect ; 5(2): 96-100.

- ❖ **Saeed, C.H.; AL-Otraqchi, K.I. and Mansoor, B.I.Y. (2014).** Prevalence of urinary tract infections and antibiotics susceptibility pattern among infants and young children in Erbil city. *Zanco J. Med. Sci.*; 19(1): 915-922.
- ❖ **Salvador, S.C.; Pereira, M.N.; Santos, J.F. ; Melo, L.Q. and Chaves, M.L. (2008).** Response of lactating cows to the total replacement of corn by citrus pulp and to the supplementation of organic trace minerals I: Intake and digestion. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*; 60 (3): 682-690.
- ❖ **Sarah, E.G.; Michael, E.H.; James, J.; Swaine, B.L. and Chen, S.J. (2014).** Human Urine Decreases Function and Expression of Type1 Pilli in Uropathogenic *Escherichia coli*. University School of Medicine in St. Louis. *J. ASM .org.*; 33(4): 342-344.
- ❖ **Sargurunathan, S. and Harry, L.T. (2015).**Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* .*Mic. Spectr.*; 3(4):1- 32.
- ❖ **Schroeder, A.R.; Shen, M.W.; Biondi, E.A.; Bendel-Stenzel, M.; Chen, C.N.; French J.; Lee, V. Evans, R.C., Jerardi, K.E.; Mischler, M. Wood, K.E.; Chang, P.W.; Roman, H.K.; Greenhow, T.L. (2015).** Bacteraemic urinary tract infection: management and outcomes in young infants. *Arch. Dis. Child.*;101(2):125-130.
- ❖ **Sedighi, I.; Solgi, A.; Amanati, A. and Alikhani, M. Y. (2014).** Choosing the correct empirical antibiotic for urinary tract infection in pediatric: Surveillance of antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* by E-Test method. *Iranian J. Mic.*, 6(6), 387-391.
- ❖ **Shoskes, D. (2011).** Urinary Tract Infections Retrieved From: The American Urological Association Educational Review Manual in Urology: 3rd ed. Pp: 737-766.
- ❖ **Singh, S.D. and Madhup, S.K. (2013).** Clinical Profile and Antibiotics Sensitivity in Childhood Urinary Tract Infection at Dhulikhel Hospital. *Kathmandu Univ. Med. J.*; 44(4): 319-324.
- ❖ **Siraj, M.; Anup, K.; Anil, K.R. and Shipra, S. (2011).** Identification of

Escherichia coli through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences. Bio.med. Inf.; (10): 370-371.

- ❖ **Smith's. (2004).** General Urology 16th ed., Bacterial Infections of the Urinary Tract. Pp: 203- 227.
- ❖ **Sohinee, S.; Glen, C. Ulett, M.; Totsika, M. P. and Mark A. S. (2014).** Role of Capsule and O Antigen in the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. J. pone.; 9(4):1-11.
- ❖ **Spyridis N.; Syridou G.; Goossens H.; Versporten A.; Kopsidas J.; Kourlaba G.; Bielicki J.; Drapier N.; Zaoutis T.; Tsolia M and Sharland M. (2015).** Variation in paediatric hospital antibiotic guidelines in Europe. Arch. Dis. Child.; 101(1) : 72-76.
- ❖ **Subash, C.S. and Mobley, H.L.T. (2015).** Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. J. Mic. Bio. Edu., Mic. Spectr.; 3(4):1- 32
- ❖ **Subhash, C.P. (2012).** Textbook of Microbiology and Immunology, 2nd ed. Imprint: Elsevier. Copy Ed.: Shrayosee Dutta. Typeset by Mukesh Tech. Pvt. Ltd., Pudhucherry, India. : 666 p.
- ❖ **Sultana, S.; Khatun, M.; Khoybar, AM.; Mawla, N. and Akhter, N. (2015).** Pattern of antibiotic sensitivity of bacteria causing urinary tract infection in a private Medical College Hospital in Bangladesh. J. Med. Science .; 14 (1):70-74.
- ❖ **Talebi, M. and Golestanpour, A .(2009).** Symptomatic nosocomial urinary tract infection in ICU patients. Iranian J. Clin. Infect. Dis.; 4(1): 25-29.
- ❖ **Tenover, F.C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. A. J. Med.; 119(6): 3-10.
- ❖ **Thomas, M. and Hooton, M.D. (2012).** Uncomplicated Urinary Tract Infection. New Eng. J. Med. ; 366:1028-1037.
- ❖ **Timothy, J.J. and Nolan, L.K. (2009).** Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. Mic. Mol. Bio. Rev. 74(3): 477-478.
- ❖ **Todar, k. (2002).** The bacterial flora of humans: Bacteriology. www.textbookofbacteriology.net.

- ❖ **Turnidge, J.; Bell, J.; Biedenbach, D.J. and Jones, R.N. (2002).** Pathogen occurrence and antimicrobial resistance trends among urinary tract infection isolates in the Asia-Western Pacific Region: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998–1999 *Int. J. Anti. Agents.*; 20 (1): 10-17.
- ❖ **U-Syn, H. and Yong-Hyun, C. (2006).** Catheter-associated urinary tract infections: new aspects of novel urinary catheters. *Inte. J. Anti. Agents.*; 28(6): 485-490.
- ❖ **Verle, V.A.; Jefferson, B.M.; Arnold Joseph, M.F.; Januario, D.V. and Sonu, B. (2015).** Predict Urinary Tract Infection and to Estimate Causative Bacterial Class in a Philippine Subspecialty Hospital. Singapore.*J. Neph. Ther.*; 5(2):2-6.
- ❖ **Vijayalakshmi, J.; Hymavathi, R.; Renuka, D.A.; ; Swarnalatha, G.A.; Surekha, A.; AnithaLavanya,V. and Somasekhar, R. (2015).** Study of Virulence Factors in Uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Evol. Med. Den. Sci.*; 4(8): 1297-1305.
- ❖ **Wang, C.H.; Fang, C.C.; Chen, N.C.; Liu, S.S.; Yu, P.H.; W., T.Y.; Chen, W.T.; Lee, C.C. and Chen, S.C. (2012).** Cranberry containing products for prevention of urinary tract infections in susceptible populations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.*; 9 (13): 988-996.
- ❖ **World Health Organization. (2003).** Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology: Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engbaek, K. Rohner, P. ; Piot, P. and Heuck, 2 nd. ed., Geneva. Switzerland:188.p.
- ❖ **World Health Organization. (2014).** Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. Library Cataloguing-in-Publication Data, 20 avenue Appia 1211Geneva 27-Switzerland.
[ttp://www.who.int/drugresistance/en](http://www.who.int/drugresistance/en).

- ❖ **World Health Organization. (2015).** Library Cataloguing-in-Publication Data Antimicrobial resistance global report on surveillance. (www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html).
- ❖ **Yamamoto, S. (2007).** Molecular epidemiology of Uropathogenic *Escherichia coli*. J. Infect. Chemother.; 13(2):68-73.
- ❖ **Zahavi, E.E.; Lieberman, J.A.; Donnenberg, M.S.; Nitzan, M.; Baruch, K.; Rosenshine, I.; Turner, J.R.; Melamed, B.N.; Feinstein, N.; Rivkin, Z.E. and Aroeti, B. (2011).** Bundle forming pilus retraction enhances enteropathogenic *Escherichia coli* infectivity. Mol. Bio. Cell; 22(14): 2436-3447 .
- ❖ **Zeng, X. and Lin, J. (2013).** Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. Edited by: Lixin Zhang, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China. Frontiers in Mic. Anti. Res. Che. ; 128(4): 1-9.

ملحق (٣-٣) استمارة البيانات

استمارة ترصد الإصابة بالتهاب الجهاز البولي بالجراثيم الهوائية عند الأطفال

مكان جمع العينة (.....) تاريخها

• بيانات المريض:

١- الاسم السن الجنس السكن

٢- رقم الملف الطبي تاريخ الدخول صلة الوالدين اقارب نعم
..... لا

٣- التشخيص

٤- مشكلات مزمنة يعاني منها المريض

أ-السكر : نعم لا غير معروف

ب-استخدام الكورتيزون نعم لا

-R.B.C

-Pus .Cells

-Reaction

- Color

- Others

ملحق (٢-٤) : الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات الجرثومية.

نتائج اختبار تشخيص الممرضات البولية					أسم الاختبار
<i>S.aureus</i>	<i>Ser.plymuthica</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.coli</i>	
+	-	-	-	-	الاصطباغ بملون غرام
-	-	-	-	-	انتاج أنزيم الأوكسيديز
+	+	+	+	+	انتاج أنزيم الكاتليز
/	-	-	-	+	انتاج الأندول
/	-	+	-	+	انتاج أحمر المثيل
/	-	+/-	+	-	اختبار فوكس-بروسكاور
/	+	+/-	+	-	استهلاك السترات
+	/	/	/	/	أنزيم مخثر البلازما
+	/	/	/	/	تخمير المانيتول على وسط آكار المانيتول الملحي
+	/	/	/	/	اختبار الإنزيم المحلل للدهن المقاوم للحرارة
/	-	-	+	+	تخمير اللاكتوز على وسط آكار الماكونكي
/	+	/	/	/	النمو بحرارة ٢٥°م
/	-	+	-	-	أختبار ثلاثي السكر الحديد (انتاج كبريتيد الهيدروجين)

ملحق (٤ - ٥): تشخيص العزلات الجرثومية.

النسبة	التكرار	التشخيص
.3	1	Acinetobacter spp.
.3	1	<i>S.Capitis</i>
2.6	8	<i>Cit. freundii</i>
5.9	18	CoNS
.3	1	<i>Ent.sakazakii</i>
.7	2	Enterobacter spp.
.3	1	<i>Enterococci</i>
24.5	75	<i>E.coli</i>
.3	1	<i>K.oxytoca</i>
.7	2	<i>K.planticola</i>
1.0	3	<i>K.oxytoca</i>
5.6	17	<i>K.pneumoniae</i>
.7	2	Kluyvera.spp
1.6	5	<i>Mor.morganii</i>
.7	2	<i>P.vulgari</i>
1.3	4	Pantoea spp.
10.5	32	<i>Pr.mirabilis</i>
2.3	7	<i>Ps.aeruginosa</i>
٧,١	٢٢	<i>S.aureus</i>
2.3	7	<i>S.epidermidis</i>
1.0	3	<i>S.saprothicus</i>
.7	2	<i>S.hemolyticus</i>
1.0	3	<i>S.hominis</i>
1.0	3	<i>S.sciuri</i>
4.9	15	<i>S.simelans</i>
4.6	14	<i>S.xyloso</i>
3.3	10	<i>Salmonella species</i>
.7	2	<i>Ser.liquefaciens</i>
.3	1	<i>Ser.rubidaea</i>
5.2	16	<i>Ser.plymethica</i>
.3	1	<i>Sh dysenteriae/edwardsii/flexner</i>
.3	1	<i>St.agalactiae</i>
3.3	10	<i>St.pneumoniae</i>
4.2	13	Unkonoun
.3	1	<i>Yersinia species</i>
100.0	306	Total



صورة رقم (2-4A): تشخيص الإشريشيا القولونية *E.coli* بواسطة Api 20E kit.



صورة رقم (B 2-4): تشخيص كلبسيلا الالتهاب الرئوي *K. pneumoniae* بواسطة Api 20E kit.



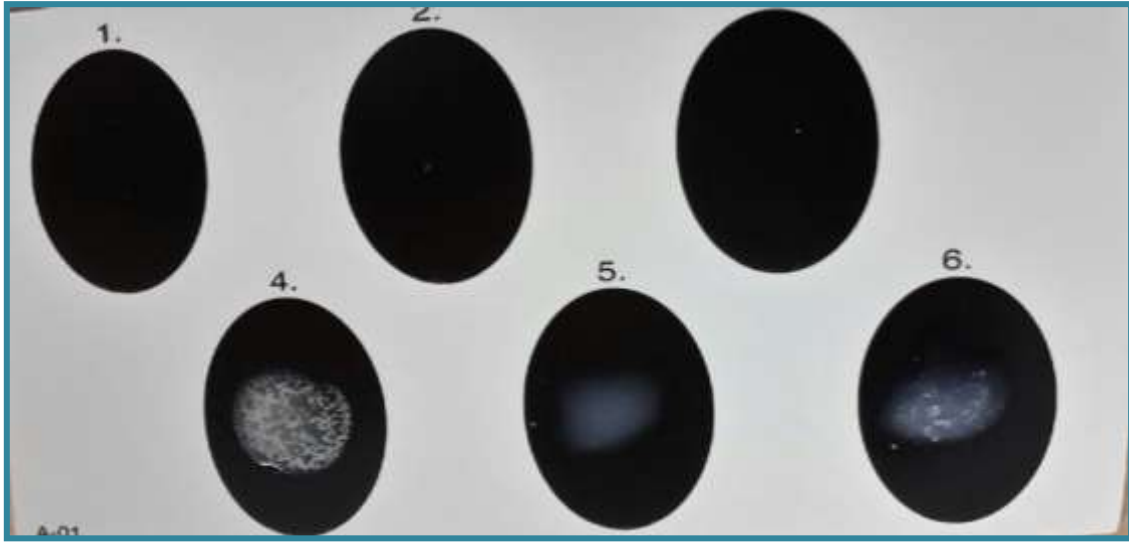
صورة (C ٤-2): تشخيص الزائفة الزنجارية *P. aeruginosa* بواسطة Api 20E kit وفحص الاوكسيديز.



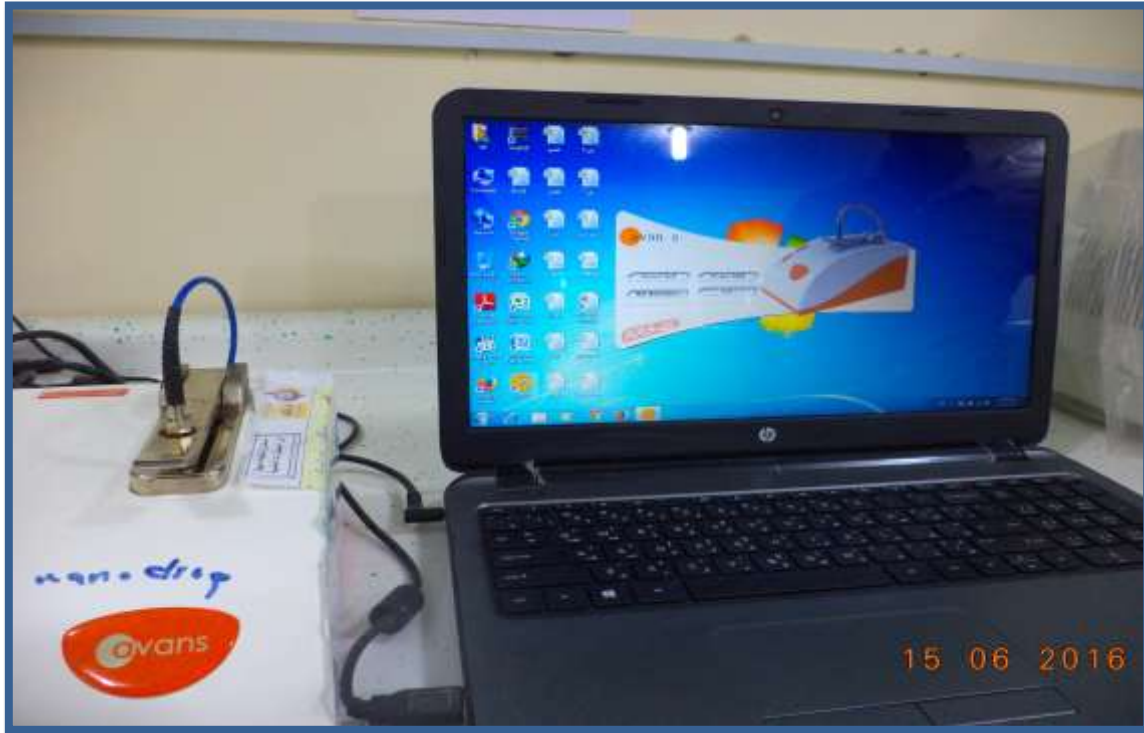
صورة رقم (D ٤-2): تشخيص المتقلبات *P. mirabilis* بواسطة Api 20E kit وفحص الاوكسيديز.



صورة رقم (E ٤-٢): تشخيص العنقوديات الذهبية الموجبة لأنزيم التخرثر *S. aureus* بواسطة Api staph kit.



صورة رقم (Ee-٢): التشخيص المصلي للعنقوديات الذهبية *S.aureus* الموجبة لإنزيم التخثر.



صورة رقم (٣-٤): جهاز النانو دروب لقياس تركيز الدنا.

ملحق (٣-٤): تراكيز الدنا لعزلات الإشريشيا القولونية.

Sample Type	Con(ng/ul)	260/280	Abs280	Abs260	No
dsDNA	116.8	1.9	1.231	2.337	1
dsDNA	197.2	1.85	2.126	3.943	2
dsDNA	70.5	1.88	0.75	1.41	3
dsDNA	82.6	1.91	0.864	1.653	4
dsDNA	86.5	1.88	0.921	1.731	5
dsDNA	95.5	1.87	1.023	1.91	6
dsDNA	50.4	1.91	0.528	1.008	7
dsDNA	57.3	1.93	0.594	1.146	8
dsDNA	86.3	1.84	0.939	1.725	9
dsDNA	87.5	1.95	0.899	1.75	10
dsDNA	126.8	1.89	1.341	2.535	11
dsDNA	88.7	1.91	0.928	1.775	12
dsDNA	49.3	1.99	0.496	0.985	13
dsDNA	113	1.94	1.168	2.261	14
dsDNA	92.9	1.86	1.002	1.859	15
dsDNA	109.7	1.94	1.13	2.193	16
dsDNA	95	1.89	1.005	1.899	17
dsDNA	83.8	1.9	0.88	1.676	18
dsDNA	119.5	1.98	1.208	2.39	19
dsDNA	45.4	2.07	0.44	0.909	20
dsDNA	43.1	3.83	0.225	0.861	21
dsDNA	69.5	1.77	0.784	1.389	22
dsDNA	158.7	1.96	1.62	3.173	23
dsDNA	169.7	1.53	2.214	3.395	24
dsDNA	98.1	1.29	1.524	1.962	25
dsDNA	104.4	1.89	1.104	2.089	26
dsDNA	91.5	1.96	0.933	1.83	27
dsDNA	79.9	1.96	0.815	1.599	28
dsDNA	100.8	2.2	0.916	2.015	29
dsDNA	86.3	1.88	0.921	1.727	30
dsDNA	38.2	1.72	0.445	0.764	31
dsDNA	106.4	1.95	1.094	2.128	32
dsDNA	120.2	1.35	1.784	2.405	33
dsDNA	51.3	1.97	0.521	1.027	34
dsDNA	83.8	1.94	0.865	1.676	35
dsDNA	51.7	1.26	0.821	1.034	36
dsDNA	103.1	1.79	1.149	2.061	37
dsDNA	49.3	1.79	0.551	0.985	38

Sample Type	Con(ng/ul)	260/280	Abs280	Abs260	No
dsDNA	66.9	1.83	0.73	1.338	39
dsDNA	122.6	1.84	1.333	2.452	40
dsDNA	63.8	1.6	0.799	1.277	41
dsDNA	58.8	1.93	0.609	1.176	42
dsDNA	42	1.13	0.745	0.84	43
dsDNA	81.2	1.98	0.821	1.623	44
dsDNA	88.6	1.08	1.643	1.771	45
dsDNA	62.5	1.76	0.712	1.25	46
dsDNA	71.1	1.52	0.935	1.421	47
dsDNA	49.6	1.9	0.523	0.993	50
dsDNA	90.9	1.3	1.403	1.818	51
dsDNA	136	1.99	1.363	2.719	52
dsDNA	112	1.96	1.145	2.239	54

Abstract

The present study aimed to isolation and identification of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) from urinary tract infections and molecular detection of some serotypes and determine some of drug resistant genes. 500 urine samples were collected from Mohammed Al-Moussawi hospital and Bint-Alhuda hospital from urinary tract infected children in Nasiriyah City From September (2014) to June (2015).

The positive bacterial culture were 306 isolate (61.20%), distributed to gram negative with 192 isolate (62.75%) and gram positive with 114 isolate (37.25%).

The number of infected males were 104(33.99%) and females were with 202 child (66.01%). The highest percentage of gram negative bacteria represented by *Escherichia coli* with 75 isolate (39.06%).

Depending on sex distribution of *Escherichia coli* infection, the results showed that 24 (32.0%) isolates were males and 51 (68.0%) were females. Of a total of *E.coli* 50 isolates, were identify by convential polymerase chain reaction (PCR) for the isolated DNA by using specific primers for (O6, O15, O25, O16 and *16SrRNA*) genes. the results showed that 36 (72.0%) isolate represent 57 serotype and 14(36.0%) were negative. The serotypes were distributed as 23(40.35%), 18(31.57%), 9(15.78%), 7(12.28%) and 50(100%) respectively.

The antibiotic resistant genes of *E.coli* included (*CITM*, *tet(A)*, *aac3-IV*, *Sul1*, *dfrAI*). The results of the present study showed appositive reaction with 25(50.08%), 23(46.0%), 19(38.0%), 17(34.0%) and 5(10.0%) respectively.

Antibiotic susceptibility test was done for UPEC isolates against (8) types of antibiotics which used in urinary tract infections treatment, the results showed a disparity in the rate of resistance to Penicillin, Tetracyclin, Amoxicillin, Nalidixic Acid, Trimethoprim-Sulphamethoxazol, Nitrofurantoin, Gentamicin and Chloramphenicol with a resistant rates of 50(100%), 48(96.0%), 47(94.8%), 38(76.0%), 30(60.0%), 22(44.0%), 11(22.0%) and 9(18.0%), respectively.

The present study results showed that some of *E.coli* Serogroups carry genes responsible for its resistance to most used antibiotics.

الفصل الأول

Chapter One

المقدمة

Introduction

الفصل الثاني

Chapter Two

استعراض المراجع

Literatures Review

الفصل الثالث

Chapter Three

مواد العمل وطرائقه

Materials & Methods

الفصل الرابع

Chapter Four

النتائج و المناقشة

Results & Discussion

الملاحق

Appendixes

المصادر

References

الاستنتاجات والتوصيات

*Conclusions &
Recommendations*

