



جامعة كربلاء

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Escherichia coli* المرافقة لمرضى الفشل الكلوي والتهاب المسالك البولية

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة

كتبت من قبل

خوله عباس هادي الشمري

بكالوريوس علوم حياة - جامعة كربلاء 2010

بإشراف

أ.د. علي عبد الكاظم الغانمي

جامعة كربلاء / كلية العلوم

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(هُوَ الَّذِي جَعَلَ الشَّمْسَ ضِيَاءً وَالْقَمَرَ نُورًا وَقَدَرَهُ مَنَازِلَ لِتَعْلَمُوا
عَدَدَ السِّنِينَ وَالْحِسَابَ مَا خَلَقَ اللَّهُ ذَلِكَ إِلَّا بِالْحَقِّ يُفَصِّلُ الْآيَاتِ
لِقَوْمٍ يَعْلَمُونَ).

سورة يونس- الآية 5

إقرار المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع:

الاسم: د . علي عبد الكاظم الغانمي

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ: 2023 / 9 / 24

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاه, أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع: خلد

الاسم: د . خالد علي حسين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: 2023 / 9 / 24

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة، نشهد أننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Escherichia coli* المرافقة لمرضى الفشل الكلوي والتهاب المسالك البولية) وناقشنا الطالبة (خوله عباس هادي) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2023/11/13 ونرى أنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة.

رئيس اللجنة

التوقيع: 

الاسم: د. كوكب عبد الله حسين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية العلوم

التاريخ: 2023 / 11 / 28

عضو اللجنة

التوقيع: 

الاسم: د. هيام عبد الرضا كريم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: 2023 / 11 / 28

عضو اللجنة

التوقيع: 

الاسم: د. يازي عبد الله جاسم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: جامعة بابل / كلية العلوم

التاريخ: 2023 / 11 / 28

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع: 

الاسم: د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية العلوم

التاريخ: 2023 / 11 / 28

مصادقة عميد كلية العلوم/جامعة كربلاء

التوقيع: 

الاسم: د. حسن جميل جواد الفتلاوي

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية العلوم

التاريخ: 2023 / 12 / 15

الامداء

الى المبعوث رحمة للعالمين معلم الانسانية الاول

الى من انقذنا الله به من ظلمات الجهل الى نور العلم

خير البرية محمد صلى الله عليه واله الهداة الميامين

الى من احمل اسمه بكل افتخار

والذي رحمه الله

الى الشخص الذي أمدني بالحب والحنان

أمي الغالية

إلى التي أمدتني بالعطاء والقوة والشموخ صاحبة النصائح والروح التي لم تبخل يوماً

بالمساعدة

الى التي اعطتني العزيمة إلى نبع العطاء والكرم والسخاء

الى التي فارقت الحياة لكنها اقرب من الروح

الى اختي وعزيزة قلبي الست زينب عباس الشمري

الى الشموع التي تكتمل بوجودهم سعادتني

الى من شاركني افراحي واحزاني وكانوا لي سنداً وعوناً وذخراً

اخوتي الاعزاء

خوله

شكر و تقدير

الحمد لله تعالى الذي أفاض عليّ من نعمه وجمال عطائه وهداني لأسلك طريق العلم والمعرفة، وألهمني ما تيسر من دراسة هذه العلوم الجمّة وأعانني على ذلك، أثني عليه وأحمده كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه.

كما اتقدم بكل الشكر والتقدير والفضل والامتنان الى استاذي والمشرف على الرسالة الدكتور " علي عبد الكاظم جاسم الغانمي " الذي قدم نموذجاً منفرداً في الاثراء العلمي والمتابعة الدقيقة لكل خطواتي في اعداد الرسالة ليثريها بعلمه وملاحظاته وادعو الله ان يجزيه عني خير الجزاء

كما يطيب لي ان اتقدم بالشكر والتقدير الى عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لتفضلهم باتاحة الفرصة لي لأكمال دراستي وكما يطيب لي ان اتقدم بجزيل الشكر وعظيم الامتنان الى كادر مدينة الامام الحسين عليه السلام الطبية ومستشفى النسائية والتوليد التعليمي ومختبر الصحة العامة وبالأخص الدكتور "حسنين الخياط " والسيد" مصطفى جابر حسين " والسيد" مهند خلف" و السيدة "اميره محمد جبر " وادعوا الله ان يجزيهم على ارشادي خير الجزاء في الدنيا والاخرة.

ولا يفوتني ان اقدم خالص شكري وتقديري لزملائي طلبة الدراسات العليا في القسم لما قدموه لي من مساعدة طيلة فترة الدراسة كما اود ان اعبر عن عظيم امتناني وتقديري لكل من ساهم في اخراج الرسالة بهذه الصورة .

الباحثة

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة جمع 130 عينة ادرار اشتملت 30 عينة من كل من مرضى الفشل الكلوي ومرضى الفشل الكلوي المصحوب بالتهاب المسالك البولية ومرضى التهاب المسالك البولية المراجعين لمدينة الامام الحسين (ع) الطبية / وحدة الغسيل الكلوي (الديليزة) واستشارية المسالك البولية للفئات العمرية المحصورة بين (20-70) سنة لكلا الجنسين فضلاً عن 40 عينة من الاصحاء . زرعت العينات على وسطي أكار الدم والماكونكي ، ثم خضعت المزارع البكتيرية النامية الى الفحوصات المجهرية والكيموحيوية .

أشتملت هذه الدراسة ايضاً على جمع عينات دم من نفس المرضى الموصوفين أعلاه لتحديد تركيز المستقبل المناعي الشبيه بالتول (Toll like receptor 4, TLR₄) فضلاً عن تقدير فعالية انزيم Superoxide dismutase (SOD) وتركيز الكلوتاثيون . وقد أظهرت النتائج ما يأتي :

تم الحصول على 57 عزلة بكتيرية وبعد معاملتها بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم (3%) توزعت بواقع 47 عزلة سالبة لصبغة كرام من مجموع البكتريا المعزولة و10 عزلات بكتيرية موجبة لهذه الصبغة وبعد تشخيص العزلات البكتيرية بالطرائق المزرعية والكيموحيوية اتضح ان بكتريا *E.coli* هي السائدة بواقع 22 عزلة إذ تم تأكيد تشخيصها جزيئياً باستخدام جين *Pho A*.

من خلال اختبار حساسية عزلات بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية باستخدام نظام الفايترك تبين ان جميع العزلات كانت حساسة للمضاد Imipenem بنسبة بلغت 100% وبنسبة 95.4% للمضاد Amikacin وبنسبة 72.7% للمضادين Gentamicin و Cefepime، بينما كانت العزلات مقاومة بنسبة 90.9% للمضادين Ticarcillin و Piperacillin و بنسبة 63.6% للمضاد Sulfamethoxazole وبنسبة 50% للمضادات Ticarcillin-Clavulanic و Tobramycin و Aztreonam acid .

تم الكشف الجزيئي عن بعض جينات الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا *E.coli* إذ تبين ان 11(50%) عزلة تمتلك جين الهيمولايسين *hly A* و 12(54%) عزلة تمتلك جين *fimH* و 7(31.81%) عزلة بكتيرية تمتلك جين *ctx-M* .

من خلال نتائج تقدير المستقبل المناعي الشبيه بالتول TLR₄ اتضح أن الفئة العمرية المحصورة بين (40-59) سنة أظهرت أعلى تركيز من هذا المستقبل المناعي والذي بلغ 1.115 نانوغرام/مل .

وأكدت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية $P \leq 0.05$ في تركيز هذا المستقل في الفئة العمرية المحصورة بين (20-39) سنة فيما لم تظهر الفئتين العمريتين المتبقيتين أي فروقات معنوية.

من خلال تقدير فعالية مضادات الأكسدة الأنزيمية في مرضى الفشل الكلوي ومرضى الفشل الكلوي الذين لديهم إصابات المسالك البولية فضلاً عن المصابين بالتهاب المسالك البولية ومقارنتها بفعالية الأنزيم لدى الأشخاص الأصحاء اتضح من النتائج أن أعلى فعالية لانزيم SOD قد سجلت لدى الأشخاص الأصحاء والتي بلغت 15.353 وحدة /مل ، بينما لوحظ ان هناك انخفاضاً معنوياً في فعالية هذا الانزيم في كل من مرضى الفشل الكلوي ومرضى الفشل الكلوي المصحوب بالتهابات المسالك البولية .

أظهرت نتائج تقدير تركيز الكلوتاثيون في المجاميع قيد الدراسة ارتفاع تركيز هذا المركب في الأشخاص الأصحاء 6.697 مايكرومول /مل بينما لوحظ انخفاض تركيزه انخفاضاً معنوياً في كل من مرضى الفشل الكلوي و مرضى الفشل الكلوي ممن لديهم إصابات مسالك بولية .

قائمة المحتويات

الصفحة	المحتويات	التسلسل
1	المقدمة	1
4	استعراض المراجع	2
4	الجهاز البولي	1-2
4	الكليتان	2-2
5	الفشل الكلوي	3-2
5	أنواع الفشل الكلوي	1-3-2
5	الفشل الكلوي الحاد	1-1-3-2
6	الفشل الكلوي المزمن	2-1-3-2
9	الاحياء المجهرية المرافقة للفشل الكلوي واصابات المسالك البولية	4-2
10	بكتريا <i>Escherichia coli</i>	1-4-2
12	التوصيف الجزيئي لبكتريا <i>E.coli</i>	1-1-4-2
14	عوامل الضراوة في بكتريا <i>E.coli</i> الممرضة للمسالك البولية (UPEC)	2-1-4-2
15	جينات عوامل الضراوة	3-1-4-2
17	تصنيف اصابات المجاري البولية	5-2
17	التصنيف حسب الموقع	1-5-2
17	التصنيف حسب ظهور الاعراض المرضية	2-5-2
18	التصنيف بحسب عوامل التعقيد	3-5-2
19	التصنيف المعدل لاصابات المجاري البولية بحسب ارشادات الرابطة الاوربية لجراحة المسالك البولية (EAU)	4-5-2
20	الاستجابة المناعية	6-2
21	المستقبلات المناعية Toll -Like Receptors	1-6-2

22	المستقبلات المناعية الشبيهة بالتول, Toll – like receptors TLR _s	1-1-6-2
23	انواع المستقبلات المناعية الشبيهة بالتول	1-1-1-6-2
23	الاكسدة ومضادات الاكسدة	7-2
24	انزيم Superoxide dismutase (SOD)	1-7-2
25	الكلوتاثيون (Glutathione ,GSH)	2-7-2
27	المواد وطرائق العمل	3
27	المواد والاجهزة المستخدمة	1-3
30	طرائق العمل	2-3
30	. جمع عينات الادرار	1-2-3
30	جمع عينات الدم	2-2-3
31	الايوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص البكتيريا المعزولة من مرضى الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية	3-2-3
32	الكواشف والمحاليل المستخدمة في تشخيص البكتريا المعزولة في هذه الدراسة	4-2-3
33	تشخيص البكتريا المسببة لمرض الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية بالفحوصات المجهرية و الكيموحيوية	5-2-3
33	تمييز البكتريا السالبة عن الموجبة لصبغة كرام	1-5-2-3
34	تشخيص بكتريا <i>E.coli</i>	1-1-5-2-3
36	تشخيص بكتريا <i>Acinetobacter</i> و <i>Klebsiella</i> و <i>Proteus</i> و <i>Pseudomonas</i>	2-1-5-2-3
36	عزل وتشخيص الانواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام	2-5-2-3
36	عزل وتشخيص بكتيريا المكورات العنقودية <i>Staphylococcus</i>	1-2-5-2-3
38	عزل وتشخيص بكتريا <i>Enterococcus</i>	2-2-5-2-3
38	اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية	6-2-3
39	الكشف الجزيئي لبكتريا <i>E. coli</i>	7-2-3

39	استخلاص الحامض الرابيوزي منقوص الاوكسجين (DNA) من بكتريا <i>E. Coli</i> المعزولة	1-7-2-3
40	تشخيص البكتريا المعزولة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction , PCR)	2-7-2-3
43	الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis	1-2-7-2-3
44	الكشف عن نواتج التضاعف	2-2-7-2-3
44	حفظ وإدامة العزلات	8-2-3
45	الفحوصات المناعية	9-2-3
45	تقدير مستوى المستقبل المناعي Toll like receptor , TLR ₄ في مصل المرضى بطريقة الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم ELISA	1-9-2-3
45	مبدأ العمل	1-1-9-2-3
45	تحضير الكواشف والمحاليل	2-1-9-2-3
46	طريقة العمل	3-2-9-1-3
48	مضادات الاكسدة	10-2-3
48	تقدير فعالية انزيم Superoxide dismutase	1-10-2-3
50	تقدير تركيز الكلوتاثيون في مصلى الدم	2-10-2-3
53	التحليل الاحصائي	11-2-3
54	النتائج والمناقشة	4
54	عزل وتشخيص البكتيريا المسببة للفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية	1-4
56	تشخيص بكتريا <i>E. coli</i>	1-1-4
56	الصفات الزرعية والمجهرية (Cultural and microscopical characteristics)	1-1-1-4
57	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-1-1-4
57	تشخيص بكتريا <i>K. pneumonia</i>	2-1-4

57	الصفات الزرعية والمجهرية	1-2-1-4
57	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-2-1-4
58	تشخيص بكتريا <i>P. aeruginosa</i>	3-1-4
58	الصفات الزرعية والمجهرية	1-3-1-4
59	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-3-1-4
59	تشخيص بكتريا <i>Enterobacter aerogenes</i>	4-1-4
59	الصفات الزرعية والمجهرية	1-4-1-4
59	الفحوصات الكيموحيوية	2-4-1-4
59	تشخيص بكتريا <i>P. mirabilis</i>	5-1-4
59	الصفات الزرعية والمجهرية	1-5-1-4
60	الفحوصات الكيموحيوية	2-5-1-4
60	تشخيص بكتريا <i>Enterococcus faecalis</i>	6-1-4
60	الصفات الزرعية والمجهرية	1-6-1-4
60	الفحوصات الكيموحيوية	2-1-6-4
60	تشخيص بكتريا المكورات العنقودية <i>Staphylococcus</i>	7-1-4
61	اختبار حساسية العزلات المسببة لأصابات الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية للمضادات الحيوية	2-4
63	الكشف الجزيئي لبكتريا <i>E.coli</i>	3-4
64	الكشف الجزيئي عن جين الهيمولايسين <i>hly A</i>	1-3-4
65	الكشف الجزيئي عن الجين <i>fim H</i>	2-3-4
65	الكشف الجزيئي عن الجين <i>ctx-M</i>	3-3-4
77	الفحوصات المناعية	4-4
77	تقدير تركيز المستقبل المناعي الشبيهه بالتول TLR_4 عند مرضى الفشل الكلوي	1-4-4
79	بعض المعايير الكيموحيوية المرافقة للفشل الكلوي	5-4
79	تقدير فعالية انزيم superoxide dismutase (SOD)	1-5-4

81	تقدير تركيز الكلوتاثيون Glutathione	2-5-4
83	الاستنتاجات	1-5
84	التوصيات	2-5
85	المصادر	6

قائمة الاشكال

الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
46	تحضير سلسلة تخافيف محاليل المعايرة	1-3
48	المنحنى القياسي لتقدير تركيز المستقبل المناعي TLR ₄	2-3
52	المنحنى القياسي للكلوتاثيون	3-3
56	توزيع الأنواع البكتيرية المعزولة من إصابات الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية	1-4
63	النسب المئوية لمقاومة بكتيريا <i>E.coli</i> للمضادات الحيوية	2-4
66	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (16-1) بأستعمال بادئ الجين <i>PhoA</i> (903bp) , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	3-4
67	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (22-17) بأستعمال بادئ الجين <i>PhoA</i> 903bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	4-4
68	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (8-1) بأستعمال بادئ الجين <i>hly A</i> 1177bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	5-4

69	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (16-9) بأستعمال بادئ الجين <i>hly A</i> 1177bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	6-4
70	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (22-17) بأستعمال بادئ الجين <i>hly A</i> 1177bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	7-4
71	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (8-1) بأستعمال بادئ الجين <i>fim H</i> 559bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	8-4
72	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (16-9) بأستعمال بادئ الجين <i>fim H</i> 559bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	9-4
73	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (22-17) بأستعمال بادئ الجين <i>fim H</i> 559bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	10-4
74	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (16-1) بأستعمال بادئ الجين <i>ctx-M</i> 550bp بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	11-4
75	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>E.coli</i> (22-16) بأستعمال بادئ الجين <i>ctx-M</i> 550bp بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة	12-4

80	فعالية انزيم SOD (وحدة /مل) في الاشخاص الاصحاء و مرضى الفشل الكلوي ومرضى التهاب المسالك البولية	13-4
81	تركيز الكلوتاثيون في الاشخاص الاصحاء و مرضى الفشل الكلوي ومرضى التهاب المسالك البولية	14-4

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
7	مسببات الفشل الكلوي الحاد	1-2
8	مسببات الفشل الكلوي المزمن	2-2
10	اهم أنواع البكتريا المرافقة لل Nephropathies والمسببة لإصابات المسالك البولية	3-2
27	الأجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها	1-3
28	المواد الكيميائية والاطراف الزرع المستخدمة والشركات المصنعة لها	2-3
29	الأدوات ذات الاستخدام الواحد	3-3
29	العدد (Kits)	4-3
41	البوادي المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في الدراسة	5-3
42	مكونات المزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل	6-3
43	برمجة جهاز البلمرة المتسلسل المستخدم في هذه الدراسة	7-3
55	اعداد وأنواع البكتريا المعزولة في هذه الدراسة	1-4
58	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية للبكتريا المعزولة من اصابات الفشل الكلوي واصابات المسالك البولية	2-4
76	توزيع الجينات المدروسة في بكتريا <i>E.coli</i> المعزولة في هذه الدراسة	3-4
78	تركيز المستقبل المناعي الشبيه بالتول (TLR ₄) في الفئات العمرية و مجاميع الفشل الكلوي قيد الدراسة	4-4

جدول المحتويات

الصفحة	اسم المخطط	ت
34	عزل وتشخيص البكتريا المعزولة من مرضى الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية	1
37	عزل وتشخيص بكتريا <i>Staphylococcus</i>	2

قائمة المختصرات

الرمز	المعنى الكامل
AK	AmikacinA
ATM	Aztreonam
BUN	Blood urea Nitrogen
CAZ	Ceftazidime
CEF	Cefepime
CIP	Ciprofloxacin
DAMP _s	Damage associated molecular pattrens
GAT	Glutathione
GEN	Gentamicin
GDT	Cyclomodulins
GFR	Glomerular Filtration
GP _x	Glutathione Peroxidase

GR	Glutathione reductase
GSH	Reduced Glutathione
G-S-S-G	Glutathione disulfide
HLY A	Hemolysin A
LPS	Lipopolysaccharite
LRR	Leucine-rich repeat
Mar	Multiple antibiotic resistance locus
MIN	Minocyclin
MEM	Meropenem
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PET	Plasmid-Encoded Toxin
PAIs	Pathogenicity island
PIP	Piperacillin
PMN	Polymorphonucloctes
PRR _s	Pattren recognition receptors
RNS	Reactive Nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RTX	Reapts in toxin
SOD	Superoxide dismutase
STX	Sulfamethoxazole
TCA	Trichloroacetic acid
TLR _s	Tool- like receptors

TC	Ticarcillin
TCC	Ticarcillin–Clavulanic acid
TZP	Piperacillin - Tazobactam
TOB	Tobramycin
TNF	Tumor necrosis factor
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
UTI	Urinary tract infection

المقدمة:

أصبح الفشل الكلوي المزمن (Chronic Kidney disease) من المشكلات المهمة التي تواجه الطب في القرن الحادي والعشرين, إذ اشارت احدى الاحصائيات العالمية الى ان حوالي 10% من سكان العالم يتعرضون للأصابة بهذا المرض , وأكدت إحصائية أخرى وصول عدد المصابين في جميع انحاء العالم الى 843.6 مليون شخص لغاية عام 2017 (Kovesdy ,2022 ; Jager et al .,2019).

يصنف الفشل الكلوي الى نوعين :الأول حاد (Acute) والثاني مزمن (Chronic) . يتسم النوع الأول بتدهور سريع لوظائف الكلى بمدة قصيرة تتراوح من عدة أيام الى أسبوع، ترافقه العديد من المؤشرات تشتمل على حصول الازوتيميا (Azotemia) (المقترنة بتجمع المخلفات النيتروجينية), فضلاً عن انخفاض معدل الترشيح الكبيبي (Glomerular filtration Rate ,GFR). اما النوع المزمن فيعد تلفاً غير عكسي للتراكيب الكلوية ويستغرق وقتاً أطول لتطوره يصل الى عدة سنوات ويمكن تقسيمه الى خمس مراحل اعتماداً على معدل الترشيح الكبيبي وينتهي بفقدان الافراز . ويفترن بالعديد من الاعراض السريرية التي تشتمل على اضطرابات توازن ايونات الصوديوم والبوتاسيوم والماء واضطرابات الاملاح والعظام والاضطرابات الدموية والقلبية والمعوية والايضية والهرمونية فضلاً عن التشوهات الجلدية (Perlman and Heung ,2019).

تتعرض الكلى للإصابة ببعض أنواع الاحياء المجهرية أما عن طريق الاجتياح المباشر أو بشكل غير مباشر إذ تشترك البكتريا والفيروسات و Mycobacteria والفطريات والابتدائيات في احداث تلك الأصابة , تتنوع البكتريا المشاركة في الغزو المباشر للنسيج الكلوي , بيد ان بكتيريا *Escherichia coli* تنصدرها عبر امتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي تشتمل على الالتصاق (Adhesion) الذي يتحقق بفعل وجود نوعين من الاهلاب (P fimbriae ,Type 1 fimbriae) أولاً وانتاجها للسموم ثانياً وانتاجها أنظمة سحب الحديد (Siderophores) ثالثاً ووجود المحفظة (Capsule) رابعاً واحتواء جدارها

على متعدد السكريد الدهني (Lipopolysaccharide) خامساً فضلاً عن قابليتها على الحركة سادساً. (Prasad and Patel, 2018; Parves and Rahman, 2018).

ان تعرض الجسم للإصابة بالاحياء المجهرية يولد استجابة مناعية تظهر بوادرها عبر عدد من الاليات التي تسمح بالتعرف على الاحياء المجهرية الغازية , اذ تتمكن المستقبلات الشبيهة بالتول (Toll-like Receptors, TLR) من تمييز الأنماط الجزيئية المرتبطة بالمرض (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMPs) لذا فإنها تمثل خط الدفاع الأول ضد الإصابات الجرثومية. ينتمي المستقبل المناعي TLR4 الى هذا النوع من المستقبلات وقد عرف طويلاً بكونه المستقبل الحساس لمتعدد السكريد الدهني (LPS) الخاص بالبكتريا السالبة لصبغة كرام (Molteni et al., 2016).

تقترن العديد من الامراض المزمنة ومنها الفشل الكلوي المزمن بزيادة حالة الاجهاد التأكسدي (Oxidative stress) المتمثلة بعدم وجود توازن بين المواد المؤكسدة (Oxidants) ومضادات الاكسدة (Antioxidants) في الجسم وذلك بزيادة أنواع الاوكسجين الفعالة (Reactive Oxygen species, ROS) (التي تعد احد أنواع الجذور الحرة) لذا يلجأ الجسم الى كبح تأثير الجذور الحرة عبر توفير مضادات الاكسدة في الجسم التي تصنف الى نوعين: أنزيمية وغير أنزيمية . وينتمي انزيم (Superoxide dismutase SOD) الى النوع الأول منها بالنظر للدور الذي يلعبه في معادلة الزيادة في الجذور الحرة في العديد من الحالات المرضية , فيما ينتمي الكلوتاثيون الى مضادات الاكسدة غير الانزيمية (Rosa et al., 2021; Farhood et al., 2019; Aziz et al., 2016).

وبالنظر لخطورة الفشل الكلوي فقد هدفت الدراسة الى تحديد أهم الأنواع البكتيرية المرافقة لهذا المرض وعلاقتها بمستويات بعض مضادات الاكسدة وأحد أنواع المستقبلات المناعية عبر تحقيق المحاور الآتية :

- 1- عزل أنواع البكتريا المرافقة للفشل الكلوي من ادرار المرضى .
- 2- تشخيص النوع البكتيري السائد بالطرائق التقليدية والجزيئية .

- 3- الكشف الجزيئي عن بعض عوامل الضراوة والمقاومة في النوع البكتيري السائد.
- 4- تحديد العلاقة بين ارتفاع مستوى احد المستقبلات المناعية في دم المرضى المصابين بالفشل الكلوي وارتفاع شدة الإصابة بالنوع البكتيري السائد المعزول في هذه الدراسة .
- 5- تحديد مستويات بعض مضادات الاكسدة في دم مرضى الفشل الكلوي .

الفصل الثاني

1-2 - الجهاز البولي (Urinary System)

يعد الجهاز البولي في جسم الانسان من ركائز التوازن في اجهزته الجسمية المختلفة، ويشتمل هذا الجهاز على الكلى والحالب والمثانة والإحليل . تؤدي الكلى وظائف الإخراج في هذا الجهاز اذ تقوم هذه الأعضاء بإنتاج الادرار ، الذي يمثل نواتج عرضية سائلة تحتوي على الماء والأيونات والمركبات الصغيرة الذائبة . يمر البول الخارج من الكلى عبر المسالك البولية التي تتكون من الحالبين و المثانة البولية والإحليل ، اذ يتم تخزين البول مؤقتاً في المثانة البولية. عند حدوث التبول ، تنقبض المثانة البولية العضلية لدفع البول عبر الاحليل واخراجه من الجسم (Preston and Wilson, 2012; Martini ,2018).

2-2- الكليتان :

للانسان كليتان تقعان على جدار البطن الخلفي ، واحدة على كل جانب من جوانب العمود الفقري ، خلف الصفاق وأسفل الحجاب الحاجز. تمتد إلى مستوى الفقرة الصدرية الثانية عشرة إلى الفقرة القطنية الثالثة ، وتتلقى بعض الحماية من القفص الصدري السفلي. عادة ما تنخفض الكلية اليمنى قليلاً عن اليسرى ، ربما بسبب المساحة الكبيرة التي يشغلها الكبد. الكلى عبارة عن أعضاء على شكل حبة الفاصوليا ، يبلغ طولها حوالي 11 سم وعرضها 6 سم وسمكها 3 سم ، و تزن حوالي 150 غرام. تغطي بكتلة من الدهون لتثبيتها في مكانها . تنتج الكلى البول ، الذي يحتوي على نفايات التمثيل الغذائي ، بما في ذلك المركبات النيتروجينية (اليوريا وحامض اليوريك) والأيونات الزائدة ، وأحياناً الادوية (Waugh and Grant ,2018).

تتكون الكلية من ثلاث مناطق متميزة تشتمل على المحفظة (Capsule) والقشرة (Cortex) واللب (Medulla) الذي يعد اسمك طبقات الكلية (Preston and Wilson, 2012) وتتكون الكلية من (1-2 مليون وحدة وظيفية تدعى النفرونات (Nephron) وعدد اقل من القنوات الجامعة (Collecting ducts) (Waugh and Grant ,2018) ، تقدر فعالية الكلية من خلال قياس كفاءة الترشيح ممثلاً بكمية الكرياتينين المترشح إلى جوف النبيبات الكلوية لفترة زمنية محددة ، أذ تتراوح القيمة الطبيعية له

(Taskapan *et al.*,) الكلية في وجود خلل في الكلية (80- 120 مل / دقيقة، وأن أي اختلاف عن ذلك يدل على وجود خلل في الكلية (Taskapan *et al.*,) 2008.

2-3-الفشل الكلوي (Renal failure):

يمثل الفشل الكلوي حالة تعجز فيها الكلى عن إزالة النواتج الايضية النهائية من الدم وتنظيم السوائل والالكتروليت وتوازن الرقم الهيدروجيني للسوائل الخارج خلوية (Ricci and Ronco .,2012), وهناك أسباب عدة تقف وراء هذا المرض فقد تكون مرضاً كلوياً (Renal disease) او جهازياً (Systemic disease) أو خللاً في المسالك البولية . يضم الفشل الكلوي نوعين رئيسيين: حاد (Acute) و مزمن (Chronic). فأما الأول فيعد اضطراباً مفاجئاً وغالباً ما يكون عكسياً عند معالجته بطريقة مناسبة فيما يمثل المزمن نتيجة نهائية لتلف كلوي لا يمكن معالجته ويتطور ببطء عبر سنوات عدة (Chue *et al.* ,2010).

يعد تجمع المخلفات النيتروجينية علامة مبكرة للفشل الكلوي وعادة يحدث قبل ظهور الأعراض الأخرى للمرض .وتعد اليوريا أولى المخلفات النيتروجينية التي تتجمع في الدم ,اذ يزداد مستوى نيتروجين اليوريا في الدم (Blood Urea Nitrogen ,BUN) مع تقدم المرض .كما يرافق المرض وارتفاع مستويات البوتاسيوم والفوسفات وانخفاض مستويات الكالسيوم وفي مراحل لاحقة فقر الدم (Anemia) (Katzung and Furst ,2007).

2-3-1-أنواع الفشل الكلوي :

2-3-1-1-الفشل الكلوي الحاد (Acute Renal Failure)

يتصف هذا النوع من الفشل بتدهور سريع لوظائف الكلى (عادة في غضون أيام الى أسبوع) مما يسمح بتجمع المخلفات النيتروجينية في الدم . ومن أهم المؤشرات لهذا المرض ارتفاع نيتروجين اليوريا في الدم (Blood Urea Nitrogen ,BUN) المعروف بـ Azotemia فضلا عن ارتفاع مستوى كرياتينين الدم الذي يمكن ان يصل الى (0.3mg/dl) او أكثر خلال 48 ساعة او انخفاض طرح الادرار الى أقل من 0.5ml/kg/h لست ساعات على الأقل (Perlman and Heung ,2019).

❖ مسببات الفشل الكلوي الحاد (Causes of acute renal failure)

اعتمادا على مسببات الفشل الكلوي الحاد يمكن تصنيف هذا المرض الى ثلاثة أصناف هي: Pre-renal و Renal و Post -renal (Conway et al .,2022). ويمكن توضيح مسببات الفشل الكلوي الحاد بالجدول 1-2:

يعد الاوزتيميا (Azotemia) مؤشرا شائعا للإصابة بالفشل الكلوي الحاد وهو يشير الى تجمع المخلفات النيتروجينية (نيتروجين اليوريا وحامض اليوريك والكرياتينين) في الدم . ومن المؤشرات الأخرى انخفاض معدل الترشيح الكبيبي (Glomerular filtration Rate, GFR) لا تظهر على المرضى المصابين بهذا الفشل غالبا اعراض بيد أنه يمكن تشخيصه عبر ارتفاع نيتروجين يوريا الدم (Blood Urea Nitrogen ,BUN) فضلا عن الكرياتينين.

2-1-3-2-الفشل الكلوي المزمن (Chronic renal failure):

يمثل هذا النوع من الفشل الكلوي تدهورا في وظائف الكلى بعد تطوره خلال عدة سنوات , وهو يظهر في البدء على شكل تغيرات كيموحيوية غير طبيعية الا انه ينتهي بفقدان الافراز (Loss of the excretory) كما ان الوظائف الايضية والهرمونية تؤدي الى اعراض وعلامات تعرف ب (Uraemia) . ويمكن تلخيص اهم مسببات هذا الفشل بالجدول 2-2 :

2-4-الاحياء المجهرية المرافقة للفشل الكلوي واصابات المسالك البولية :

ان امراض الكلى المتسببة بفعل الاحياء المجهرية تحظى بأهتمام العاملين في المجال الطبي بالنظر الى ان الكشف عن الإصابة وعلاجها في الوقت المناسب قد يشفي أو يحد من تلك الإصابة. تتعرض الكلى للإصابة اما عن طريق الاجتياح المباشر او بشكل غير مباشر وقد تكون المظاهر السريرية حادة او مزمنة اعتمادا على الكائنات المجهرية وطبيعتها فيما اذا كانت متوطنة أو وبائية فضلا عن مصدر الإصابة تشترك الفيروسات والبكتريا و Mycobacteria والفطريات والابتدائيات (protozoa) في امراض الكلى أما بأحداث اضرار مباشرة (Direct kidney injuries) او بأضرار مناعية (-Immune-mediated injuries) (Prasad and Patel, 2018).

الجدول 1-2: مسببات الفشل الكلوي الحاد (Conway et al., 2022)

ت	نوع الفشل الكلوي الحاد	المسببات
1	Pre-renal	خلل في النضج (Impaired perfusion) بسبب : عجز القلب (Cardiac failure), تعفن الدم (Sepsis), فقدان الدم (Blood loss), الجفاف (Dehydration), انسداد الاوعية (Vascular occlusion)
2	Renal	التهاب كبيبات الكلى (Glomerulonephritis) مرض الأوعية الدموية الصغيرة (small vessel disease) نخر انبوبي حاد (Acute tubular necrosis) الذي يتسبب عن طريق الادوية (Drug), السموم (toxins) انخفاض ضغط الدم لفترة طويلة (prolonged hypotension) التهاب الكلية الخلالي (interstitial nephritis) الذي يتسبب عن طريق الادوية (Drug), السموم (toxins) الامراض الالتهابية (Inflammatory disease) (Infection) الإصابة
3	Post-renal	حصوات المسالك البولية (ثنائية) (urinary calculi (bilateral)) تليف خلف الصفاق (Retroperitoneal fibrosis) تضخم البروستات الحميد (Benign prostatic enlargement) سرطان المثانة (Bladder cancer) سرطان البروستات (Prostate cancer) سرطان عنق الرحم (cervical cancer) تضييق / صمامات مجرى البول (urethral stricture/valves) تضييق الصماخ (meatal stenosis /phimosis)

الجدول 2-2: مسببات الفشل الكلوي المزمن (Conway et al., 2022)

المرض	النسبة	الملاحظات
السكر (Diabetes mellitus)	(20-40)%	توجد اختلافات كبيرة اعتمادا على العرق والمنطقة الجغرافية
أمراض خلالية (Interstitial disease)	(20-30)%	في كثير من الأحيان يتسبب بفعل المخدرات
مرض الكبيبات (Glumerular disease)	(10-20)%	اعتلال الكلية بالجلوبيولين المناعي (IgA) هو الأكثر شيوعًا
ارتفاع ضغط الدم (Hypertension)	(5-20)%	الأسباب مثيرة للجدل ، قد يكون الكثير منها ثانويًا لمرض كلوي أولي آخر
امراض الالتهاب الجهازية (Systemic inflammatory)	(5-10)%	الذئبة الحمامية الجهازية والتهاب الأوعية الدموية
مرض الأوعية الدموية (Renovascular disease)	5%	تصلب الشرايين في الغالب ، هو الأكثر شيوعا
امراض خلقية و وراثية (congenital and inherited)	5%	مرض الكلى المتعدد الكيسات ، متلازمة ألبرت
غير معروفة Unknown	(5-20)%	

ان مصدر إصابة المجرى البولي (Urinary tract infection) اما ان تكون ذات منشأ داخلي (Endogenous) نتيجة تلوث منطقة الاحليل (Urethral) بالبكتريا المتواجدة طبيعيا (Normal flora) او من مصادر خارجية (Exogenous) عبر الانتقال من مريض لآخر او عبر تلوث الأجهزة مثل جهاز القسطرة البولية او عبر إصابات مجرى الدم (Blood stream infection) (Greenwood et al., 2007).

ان الغزو المباشر للنسيج الكلوي من قبل البكتريا المختلفة يتم اما عن طريق البكتريا الصاعدة من الاحليل أو من خلال انتشار الدم والذي يؤدي الى التهاب المسالك البولية مما قد يؤدي الى اضطراب كلوي بشكل التهاب في الحوض والكلية ، بيد ان الاضطراب الكلوي قد ينجم أحيانا عن التأثيرات السامة للمضادات الحيوية المختلفة المستخدمة في العلاج (Wurpel et al., 2013).

وعموما يمكن تلخيص اهم الأنواع البكتيرية المرافقة لاعتلال الكلية (Nephropathies) وكذلك المسببة لإصابات المسالك البولية بنوعيهما المعقدة (Complicated UTIs) وغير المعقدة (Uncomplicated UTIs) في الجدول 2-3 (Foxman , 2013 ; Levison, and Kaye, 2013; Prasad and Patel, 2018).

2-4-1-1-4-1: *Escherichia coli* بكتريا

اكتشفت بكتريا *E. coli* من قبل العالم الالماني Theodore Escherich في عام 1885 بعد عزلها من براز الاطفال (Basavaraju and Gurashree , 2022) تنتمي هذه البكتريا الى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) التي تضم مجموعة كبيرة ومتباينة من الانواع البكتيرية التي تعيش في امعاء الانسان والحيوان بصورة طبيعية , تسبب افراد هذه العائلة العديد من الامراض للانسان والحيوان منها اصابات الجروح والاصابات المكتسبة في المستشفيات (Nosocomial infections) واصابات الجهاز التنفسي (Respiratory infections) واصابات الجهاز البولي (Urinary tract infection) فضلا عن إصابات الجهاز التناسلي (Genital infections) (Oliveira et al., 2017).

الجدول 2-3: اهم أنواع البكتريا المرافقة لاعتلال الكلية Nephropathies والمسببة لإصابات المسالك البولية:.

البكتريا المسببة لإصابات المسالك البولية غير المعقدة	البكتريا المسببة لإصابات المسالك البولية المعقدة	البكتريا المرافقة لاعتلال الكلية (Nephropathies)
<p><i>E. coli</i> UPEC</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p><i>Staphylococcus saprophyticu</i></p> <p><i>Enterococcus faecalis</i></p> <p>Group B <i>Streptococcus</i> (GBS)</p> <p><i>Proteus mirabilis</i></p> <p><i>Pseudomonas aeruginos</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Urophthogenic <i>Escherchia coli</i> (<i>E. coli</i> UPEC)</p> <p><i>Enterococcus spp.</i></p> <p><i>K. pneumoniae</i></p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabili</i></p>	<p><i>E.coli</i></p> <p><i>Strptococcus pyogens</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>S.epidermidis</i></p> <p><i>Salmonella typhi</i></p> <p><i>Salmonela paratyphi</i></p> <p><i>Leptospira</i></p> <p><i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p><i>Mycobacterium leprae</i></p> <p><i>Ligionella spp.</i></p> <p><i>Yersinia enterocolitica</i></p> <p><i>Brucella species</i></p> <p><i>Campylobacter jejumi</i></p> <p><i>Corynebacterium diphtheria</i></p>

يضم جنس *Escherichia* خمسة انواع وهي (*E.coli* و *E.blattae* و *E.hermanii* , *E.vuneris* و *E.fergosonii*) تختلف فيما بينها ببعض التفاعلات الكيموحيوية ، ويعد النوع *E.coli* هو الاكثر شيوعا واهمية في امراضية الانسان (Olowe et al .,2017). وبعد تطور الطرائق الجزيئية في التشخيص تم وضع المفتاح التصنيفي لبكتريا *E.coli* بحسب ما موضح في التصنيف الاتي : (Doring ,2022) (Bastos et al ., 2007).

التسلسل التصنيفي	الاسم العلمي
المملكة (Kingdom)	Bacteria
الشعبة (Phylum)	Protobacteria
الصف (Class)	Gamma Protobacteria
الرتبة (Order)	Enterobacteries
العائلة (Family)	Enterobacteriaceae
الجنس (Genus)	<i>Escherichia</i>
النوع (Species)	<i>Escherichia coli</i>

حظيت بكتريا *E.coli* بالنصيب الاوفر من الدراسات في حقل التقنية الحيوية والاحياء المجهرية ككائن انموذج لبدائية النواة . تستطيع هذه البكتريا البقاء فترات طويلة في الغائط والتربة والماء وقد استخدمت كدليل لتلوث المياه. تتصف بكتريا *E.coli* بكونها سالبة لصبغة كرام مستقيمة عصوية الشكل غير مكونة للسبورات يمكن ان تتواجد بشكل مفرد او ازواج ، يتراوح طولها من (1-3) مايكرومتر وعرضها (0.35) مايكرومتر في حين ينحصر قطرها بين (0.4 – 0.7) مايكرومتر. (Rogers and Kadner, 2015) تعد هذه البكتريا متحركة لامتلاكها سوط محيطي (Peritrichous) باستثناء بعض السلالات التي لا تتمكن من الحركة. تبلغ الدرجة الحرارية المثلى لنموها (37° م) ويعد زمن جيلها قصيراً (بحدود 20 دقيقة) (Köhler and Dobrindt, 2011).

تصنف بكتريا *E.coli* الى (50 – 200) نوع مصلي اعتماداً على ثلاثة مستضدات : مستضد جدار الخلية (O) ومستضد المحفظة (K) ومستضد السوط (H) (Van Dijk et al., 1979). تتمكن هذه البكتريا من النمو على بيئة الحد الأدنى من الاحتياجات الغذائية التي تقتصر على الكلوكوز كمصدر للكربون والطاقة واملاح الامونيوم كمصدر للنيتروجين واملاح اخرى وعناصر بكميات ضئيلة لذا فهي تتمكن من النمو بسهولة على الاكار المغذي (Nutrient agar) واکار الماكونكي (MacConkey)

استخدم جين *pho A* بوصفه جيناً تشخيصياً لبكتيريا *E. coli* بعد ان ثبت كونه دليلاً عاماً (Universal marker) يمتاز بثباتيته وفائدته في تشخيص هذه البكتيريا (Thong et al., 2011). ان فقدان الجينات والانتقال الجيني الافقي (Horizontal gene transfer) تعдан العمليات التي يتعرض لها حينوم بكتيريا *E. coli* باستمرار مما اسفر عن تكوين مجموعة مختلفة من الجينات بمرور الزمن (McClelland et al., 2000, Ochman and Jones, 2000, Riley and Serrs, 2000, Perna et al., 2001).

وقد لوحظ مؤخراً تطور مقاومة السلالات الممرضة من بكتيريا *E. coli* ويعزى ذلك الى اكتسابها العديد من جينات المقاومة بواسطة العناصر الوراثية المتحركة مثل البلازميدات والعناصر القافزة (transposons) واشرطة الجينات (gene cassettes) في الانتجرونات (Integrans) او التغيرات الحاصلة في الموقع التنظيمي المعروف بـ mar (Multiple Antibiotic Resistance locus) كروموسوم البكتيريا المذكورة اعلاه (Paniagua –Contreas et al., 2017; Tong et al., 2017).

2-1-4-2- عوامل الضراوة في بكتيريا *E. coli* الممرضة للمسالك البولية (UPEC):

من اجل تحقيق اصابة ناجحة وتوفير بيئة مرضية داخل المضيف تحتاج (*E. coli* (UPEC) ان تعبر عن بعض عوامل الضراوة (Virulence Factors) ويمكن استعراض اهم تلك العوامل بالاتي (Parvez and Rahman, 2018):

1- الالتصاق (Adhesion)

يتصف ادرار الشخص السليم بكونه معقماً بالنظر لتدفق الادرار والفعالية المضادة للأحياء المجهرية التي يمتلكها حامض اليوريك (Uric acid) ان التدفق المنتظم للإدرار لا يسمح للأحياء المجهرية بالاستعمار داخل القناة البولية لذا فان التصاق بكتيريا *E. coli* على الخلايا الظهارية (Uroepithelial) تسمح لها بالتغلب على تدفق الادرار وتعد الخطوة الاولى للاستعمار في انواع مختلفة من الأحياء المجهرية (Parvez and Rahman, 2018).

ان قابلية بكتيريا UPEC للاستعمار على التعبير (expression) عن تراكيب خيطية تدعى الاهلاب (Fimbriae) او الشعيرات (Pili) التي تعد تراكيب طويلة شبيهة بالشعر (Hair – like structure) موجودة في سطح الخلية البكتيرية تقوم بالتعرف على مركبات خاصة (عادة الكربوهيدرات) في خلايا

المضيف الهدف. تحتوي الاهلاب على بروتينات معينة تعد عوامل ضراوة للبكتيريا تشتمل على الاهداب (Thin (aggregative fimbriae و P- fimbriae و type 1 fimbriae).

2- انتاج السموم (Toxins)

تتمكن بكتريا (*E.coli* (UPEC) من انتاج العديد من السموم التي لها القابلية على تغيير اشارات الخلايا (Signaling) فضلاً عن توسطها للاستجابات الالتهابية. وقد اشارت العديد من الدراسات سواءاً في المختبر او في داخل الجسم الحي ان السموم تساهم في تحفيز موت المضيف وتحرير العناصر الغذائية الضرورية والتي تمنح القابلية على الوصول الى الانسجة العميقة داخل المسالك البولية (Agarwal et al., 2012). في عام 1987 تم الكشف لأول مرة عن سم Cyclomodulins (CDT) المنتج من بكتريا UPEC والذي فتح الباب لاكتشاف انواع اخرى من السموم مثل الهيمولاسين – الفا (α - Hemolysin) وعامل النخر السمي الخلوي (Cytotoxic necrotizing factors) والسم القابل للانتقال الذاتي المفرز (SAT) Secreted Auto transporter toxin وسم Cytolysin A والسم المشفر بالبلازميد Plasmid – Encoded Toxin (PET) وسم الشيكلا الداخلي وغيرها (Parvez and Rahman, 2018).

❖ سم الهيمولاسين Hemolysin

من بين جميع السموم يعد الهيمولاسين – الفا (HlyA) مهماً جداً ويعد بروتينا دهنيًا (Lipoprotein) وهو ينتمي الى عائلة السموم RTX (Repeats in toxin) (Johnson, 1991; Bhakdi et al., 1986; Eberspächer et al., 1989). وهي مادة تسبب تنخر الخلايا او تكوين الثقوب (Pore forming toxin) فيها كما تحت على تضرر الخلايا بوساطة انزيم Nitric oxide synthase) فضلا عن الموت المبرمج للخلايا (Apoptosis) (Chen et al., 2003). وقد اوضحت الدراسات انه عندما يكون تركيز (HlyA) عالياً فانه يؤدي الى تحلل خلايا الدم الحمراء (Erythrocytes) وخلايا المضيف الاخرى بما يمكن بكتريا UPEC من تلف خلايا الاستجابة المناعية للمضيف للحصول على المواد الغذائية والحديد بيد أنه عندما يكون تركيز السم منخفضاً فانه يؤدي الى تحفيز موت الخلايا المبرمج فضلاً عن تحفيزه لتقشير (exfoliation) الخلايا الظاهرية في المثانة .

3 – انتاج السايروفورات (Siderophores)

يعد الحديد جزيئة مهمة لجميع الكائنات الحية , اذ تستخدمه بكتريا *E.coli* لنقل و تخزين الاوكسجين وتصنيع (DNA) ونقل الالكترتون (Electron transport) وايض البيروكسيدات (metabolism of peroxides). ولغرض الحصول على الحديد تمتلك بكتريا *E.coli* انظمة متعددة لتحقيق ذلك عبر افرازها لجزيئات خالبة (chelating) ذات وزن جزئي واطي تدعى السايروفورات (Siderophores) التي تمتلك بكتريا UPEC اربعة انظمة مثل (Yersiniabactin , Aeroabactin , Eterobactin , Salmochelin) (Hagan and Mobley, 2009; Neilands et al ., 1985).

4 – وجود المحفظة (Capsule)

تتلخص الوظيفة الرئيسة للمحفظة بتغطية وحماية البكتريا من الظروف غير الملائمة ومن النظام المناعي للمضيف اذ تتكون المحفظة بشكل رئيس من متعددة السكريد (Polysaccharide).

5 – متعدد السكريد الدهني (Lipopolysaccharide ,LPS)

يعد LPS من مكونات جدار البكتريا *E.coli* المهمة ويحتوي على محور دهن (lipid A core) ووحدات مستضد O متكررة (repeating O- Antigen subunits) التي تختلف بين السلالات. ومن المعروف جيداً ان LPS ينشط استجابة المضيف ويقوم باستحثاث اوكسيد النتريك والساييتوكين (IL-1 , TNF- α) مما يعزز من الاستجابة الالتهابية (Bien et al ., 2012; Emody et al ., 2003).

6- الحركة (motility)

يعد السوط (Flagellum) مسؤولاً عن حركة البكتريا ويلعب دوراً في طور الالتصاق الاولي لتكوين الغشاء الحيوي (Bien et al ., 2012; Ong et al ., 2008). واوضحت الدراسات الاخيرة دور حركة البكتريا في انتقال الاصابة من المئانة الى الكلى . وتشير الاحصائيات الى أن (70 – 90) % من اصابات المسالك البولية تتسبب بفعل بكتريا UPEC المسوطة (Bien et al ., 2012).

2-3-1-4-2- جينات عوامل الضراوة

الضراوة هي قابلية البكتيريا على التسبب في المرض، وهي مقياس لإمراضيتها. تمتلك بكتريا *E.coli* العديد من عوامل الضراوة التي تسمح للبكتيريا بالتسبب في العدوى والأمراض، وفي مقدمتها

التهابات المسالك البولية (UTIs). أن السبب وراء قابلية بعض سلالات البكتيريا على التغلب على جهاز المناعة والتسبب في المرض هو جيناتها المشفرة الموجودة في مواقع محددة تعرف بأسم جزر الامراضية (Pathogenicity island , PAIs). يتراوح حجم هذه الجزر من 10 إلى 200 كيلو قاعدة وتختلف عن الأجزاء الأخرى من الجينوم في محتواها من قواعد الكوانين والسايبتوسين G+C. توجد PAIs في سلالات *E. coli* المسببة أكثر من السلالات غير المسببة للأمراض وهي ترمز لعوامل الضراوة مثل الالتصاق والسموم وحاملات الحديد والكبسولات والسكريات الدهنية والإنزيمات أذ يتوفر لكل عامل من العوامل الموصوفة أعلاه جينات التشفير الخاصة بها (Parvez and Rahman, 2018). تتطور سلالات جديدة من *E. coli* باستمرار من خلال عمليات التغيرات الوراثي مثل الطفرات ونقل الجينات الأفقي (Frankel and Ron, 2018). تستطيع بكتيريا *E. coli* نقل الحمض النووي الخاص بها من خلال ما يسمى الاقتران البكتيري، وهي عملية تقوم فيها بكتيريا بنقل مادتها الوراثية إلى أخرى من خلال نقل الجينات الأفقي. يعد النقل طريقة أخرى يمكن أن تنفذها *E. coli* لنقل مادتها الوراثية عن طريق إعادة دمج جيناتها مع جينوم العائيات التي ستبدأ دورة أخرى من العدوى في بكتيريا أخرى (Nair et al., 2019; Riedel et al., 2019).

❖ جين *fim H*

يعد الالتصاق أحد أهم عوامل ضراوة بكتيريا *E. coli*، أذ أن التصاق البكتيريا بالخلايا الظهارية البولية الخطوة يمثل الأولى للالتصاق (Kallas et al., 2020) ويعتمد ذلك على الجينات التي تشفر عوامل الالتصاق الضرورية، وهذه الجينات تشمل *pap*، *sfa*، *fim*، *eae*.

❖ جين *Ctx-M*

تعد بكتيريا UPEC المنتجة انزيم β -lactamase واسع الطيف Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)، *lactamase* مقاومة لمعظم لمضادات β -lactam، التي تضم penicillin, cephalosporins, monobactams. يتم التشفير عن جينات المقاومة لتلك المضادات بواسطة *bla-TEM*. أذ يعمل انزيم β -lactamase على تحطيم رابطة الأמיד في حلقة β -lactam الموجودة في المضاد مما يؤدي إلى تعطيل تلك المضادات الحيوية (Frankel and Ron, 2018). تنتج انزيمات β -lactamase من طفرات في جينات TEM-2 و TEM-1 و shv-1 الموجودة عادة في عائلة البكتيريا المعوية أذ يوجد هناك أكثر من 120 نوع من هذه الانزيمات وأشهرها هو CTX-M و OXA، ان ظهور

وانتشار هذه الجينات المقاومة للأدوية يمكن ان يحد من فرص العلاج المناسبة ويزيد من معدل الإصابة بالمرض و الوفيات (Sah et al .,2021).

❖ جين *hly A*

تعد العزلات المسببة للأمراض UPEC مجموعة غير متجانسة وراثيا أذ تظهر العديد من عوامل الضراوة المرتبطة بأحداث المرض ، ومن اهم تلك العوامل هي انتاج السموم أذ يعد سم الهيمولايسين Hemolysin هو اهم عامل ضراوة افرازي والذي يتم تشفيره بواسطة جين *hly A* بالإضافة الى ذلك تنتج بكتريا *E.coli* سموم أخرى مثل عامل النخر السام للخلايا (Cytotoxic necrotizing factor) الذي يشفر بواسطة جين *cnf-1* حيث توجد هذه الجينات في مناطق محددة على المادة الوراثية تسمى جزر الضراوة PAIs وهي عوامل وراثية متنقلة تساهم في النقل الافقي لجينات عوامل الضراوة (Firoozeh et al ,2014; Tiba et al ,2008) .

5-2- تصنيف أصابات المجاري البولية (Classification of urinary tract infections)

تتواجد طرائق عدة لتصنيف إصابات المجاري البولية تشتمل على :-

1-5-2- التصنيف حسب الموقع

ا- إصابات المجاري البولية السفلى (Lower urinary tract infections , Cystitis)

هو التهاب في المسالك البولية في الغشاء المخاطي للمثانة يشتمل على أعراض عدة منها عسر البول والتبول اللأرادي والرغبة في التبول و الرائحة الكريهة للأدرار و سلس البول والبييلة الدموية فضلا عن ألم فوق العانة . ومع ذلك ، يتسم تشخيص هذه الأعراض بصعوبة عند الأطفال والرضع بعكس البالغين (Stein et al., 2015) .

ب- إصابات المجاري البولية العليا (Upper urinary tract , Pyelonephritis) infections

هي إصابات قيحية تنتشر في الحوض والكليتين والنسيج الحشوي (parenchyma) تتسم بظهور أعراض أبرزها أعراض الحمى إذ ترتفع درجة الحرارة الى (38 درجة مئوية أو أكثر) ، ولكن على عكس البالغين فإن الرضع والأطفال الصغار قد يكون لديهم علامات غير محددة مثل ضعف الشهية والخمول و التهيج و القيء أو الإسهال (Stein et al., 2015) .

2-5-2- التصنيف حسب ظهور الأعراض المرضية

أ- الألتهاب البكتيري عديم الاعراض (Asymptomatic Bacteriuria , ABU)

هو إلتهاب يتم فيه تضعيف البكتيريا المسببة للأمراض البولية من قبل المضيف أو استعمار المثانة بواسطة بكتيريا غير ضارية ليست لها القابلية على تفعيل استجابة أعراض (لا توجد بيلة بيضاء leucocyturia أو أعراض). أما في المرضى الذين يعانون من إصابات بكتيرية حادة فيمكن أن تظهر leucocyturia دون أي أعراض (Stein et al., 2015) .

ب- الألتهاب البكتيري المقترن بظهور الأعراض (Symptomatic Bacteriuria)

يقترن هذا النوع من الإلتهاب بظهور أعراض مهيجة و ألم فوق العانة و التهاب المثانة و الحمى (fever) و التوعك (malaise) و إلتهاب الحوض و الكلية و من الصعب التمييز بين ABU و المرضى الذين يعانون من (neurogenic bladder) و تتسم إصاباتهم برائحة البول الكريهة (Stein et al., 2015) .

2-5-3 التصنيف بحسب عوامل التعقيد (Complicated factors)

أ- إصابات المجاري البولية المعقدة (Complicated urinary tract infections)

ترتبط إصابات المجاري البولية المعقدة بخلل تركيبى أو وظيفي في القناة البولية التناسلية أو مع وجود مرض داخلي يزيد من مخاطر فشل علاج هذه الأصابات . يستلزم حدوث هذا النوع من الأصابات وجود أكثر من 100000 و 10000 وحدة مكونة للمستعمرة (Colony forming unit , CFU) في عينة الأدرار الوسطية (Midstream sample of urine , MSU) في النساء و الرجال ،

على التوالي (Rubin *et al.*, 1992). يعد الطيف البكتيري (bacterial spectrum) في إصابات المجاري البولية المعقدة أكثر بكثير مما هو في الأصابات غير المعقدة. أن أكثر أنواع الاحياء المجهرية المسببة للأصابات المعقدة والتي تم عزلها من وحدات العناية المركزة في إحدى عشر بلداً أوريبياً هي [*E. coli* (%26.2) و *Candida spp* (%16.9) و *Enterococcus spp* (%15.9) و *Pseudomonas aeruginosa* (%14.1) و *Klebsiella spp* (%7.8) و *Enterobacter spp* (%4.2) و *Proteus spp* (%3.7) و *staphylococci* (%2.5) (السالبة لإنزيم التجلط) و *Morganella spp* (%1.6) فضلاً عن *Acinetobacter spp* (%1.5) (Smelov *et al.*, 2016).

ب- إصابات المجاري البولية الحادة غير المعقدة

(Acute uncomplicated urinary tract infections)

تظهر إصابات المجاري البولية هذه غالباً عند النساء بغض النظر عن وجود أو عدم وجود تشوهات هيكلية أو وظيفية داخل تلك المجاري. وعلى الرغم من أن هذا النوع من الأصابات لا ينتقل عن طريق الجنس إلا أن الألتهايات تتهيج عند ممارسته. أما في الرجال فقد أشارت الدراسات الى أن تلك الأصابات عادةً ما تقترن بألتهايات البروستات المزمن (Foxman, 2002). يصل أعداد الاحياء المجهرية المسببة لأصابات المجاري البولية غير المعقدة في النساء الى أكثر من 1000 وحدة مكونة للمستعمرة في حالة إلتهايات الحوض والكلية الحادين. ومع ذلك فإن عدداً من السلالات المسببة للأمراض البولية تظهر معدلات نمو مماثلة في الادرار البشري مما يشير الى أن قابليتها على النمو في الأدرار ليست سمة من سمات الضراوة في حد ذاته (Alteri and Mobley, 2007).

4-5-2 -التصنيف المعدل لأصابات المجاري البولية بحسب إرشادات الرابطة الأوروبية لجراحة المسالك البولية (EAU)

أ- إلتهايات المجاري البولية عديمة الاعراض : تتسم هذه الأصابات بعدم ظهور أعراض مرضية على المصابين.

ب- التهاب المجاري البولية الحادة والتهاب المثانة الحاد غير المصحوبين بمضاعفات عند النساء : تشتمل أعراض هذه الإصابات على عسر البول و كثرة التبول و ألم فوق العانة ، على الرغم من عدم ظهور أية أعراض بولية في الأسابيع الأربعة الأولى قبل هذه الإصابة.

ج- التهاب الحوض والكلية الحادين غير المصحوبين بمضاعفات : تتمثل اعراضه السريرية بالحمى والقشعريرة وألم خاصة ولا توجد أي أدلة على ظهور تشوهات في المجاري البولية (أعتماداً على فحصي الموجات فوق الصوتية و التصوير الشعاعي).

د- التهاب المجاري البولية المعقدة : تكون أعراض هذا النوع من من الألتهاب مزيجاً من أعراض أنواع الألتهابات الثلاثة السابقة المشار إليها أعلاه .

هـ- التهاب المسالك البولية المتكررة : يتحقق هذا النوع من الالتهاب بتكرار الأصابات غير المعقدة على الأقل بثلاث مرات خلال 12 شهراً في النساء و يتصف بعدم ظهور تشوهات تركيبية (Smelov *et al.*, 2016).

2-6- الاستجابة المناعية :

يعد نظام المناعة البشري السليم عنصراً أساسياً في الحفاظ على توازن الجسم بالنظر لدوره في التعرف على الإصابات (Infections) المتسببة بفعل الأحياء المجهريّة الممرضة والسيطرة عليها. تقسم المناعة عادة الى ذاتية (Innate) ومكتسبة (Acquired) , وتشكل اليات المناعة غير المتخصصة (Non-specific immunity) خط الدفاع الأول ضد الممرضات التي تدخل الجسم بينما تتكلف المناعة المكتسبة مسؤولية القضاء على الإصابة في مراحلها المتأخرة وإنتاج الذاكرة المناعية (Romo *et al.* , 2016; Herwald and Egesten, 2017) في حين تعمل اليات المناعة الذاتية على تنشيط استجابة متخصصة موجهة بدقة نحو كل من الأحياء الدقيقة المسببة للمرض وخلايا المضيف المصابة (Herwald and Egesten, 2017)

تلعب مستقبلات التعرف على الأنماط (Pattern recognition receptors, PRRs) دوراً رئيساً في المناعة الذاتية ، وهي مجموعة كبيرة من المستقبلات تتميز بالعديد من السمات المشتركة مثل التعرف

على الأنماط الجزيئية المرتبطة بالمرض (Pathogen-associated molecular pattern ,PAMP) والتعبير المستمر في المضيف بشكل مستقل عن الإصابات السابقة واكتشاف الاحياء المجهرية بغض النظر عن مرحلة تطورها و دورة حياتها. تتموضع هذه المستقبلات على سطح او داخل الخلايا الوحيدة (monocytes) والخلايا البلعمية (macrophage) والخلايا الشجيرية (Dendritic cells) والخلايا القتالة الطبيعية (NK cells) والخلايا البدينة (Mast cells) والعدلات (Neutrophils) والحمضة (Eosinophils) فضلا عن وجودها على الخلايا الظهارية غير المتخصصة وغير المناعية او الارومات الليفية (Fibroblasts) (Akira *et al* .,2006, Takeuchi and Akira,2010).

تشمل الأنماط الجزيئية المرتبطة بالمرض (PAMP_S) وحدات بنائية في الاحياء المجهرية ضرورية لبقائها وتتسم بصعوبة تغييرها في عملية الهروب من اليات المناعة لدى المضيف ، وهي تشتمل على تركيب جدار البكتريا والفطريات والمادة الوراثية والعديد من المواد الأخرى التي يمكن التعرف عليها بوساطة مستقبلات خاصة (Specific receptors). (Tang *et al.*, 2012). وبالإضافة الى ، PAMP فإن مستقبلات التعرف على الأنماط (PRR_S) تتعرف أيضا على الأنماط الجزيئية المرتبطة بالتلف (Damage associated molecular pattrens ,DAMP_S) التي يتم اطلاقها في الخلايا والانسجة التالفة للمضيف. تشتمل DAMP_S على حامض الهيالورنيك (Hyaluronic acid) والهستونات (Histones) و mRNAs و بلورات الكوليسترول (Cholesterol crystals) وغيرها (Roh and Sohn ,2018 ;Tang *et al* .,2012).

2-6-1-المستقبلات المناعية Toll -Like Receptors

تتوافر ست مجاميع من مستقبلات التعرف على الأنماط (PRRs) يتصدرها النوعان : الأول , المستقبلات الشبيهة بالتول (Toll -like receptors TLR_S) وكذلك مستقبلات اللكتين نوع C_ (C- type lectin receptor) اللذان يعدان مستقبلات اغشية خلوية (Tranmembrane receptor) ويتواجدان على كل من سطح الخلايا والاعشية الداخلية (الشبكة الاندوبلازمية وجدار اللايسوسوم). تؤدي المستقبلات المحفزة الى سلسلة من مسارات الإشارات (Cascade of signaling pathways) التي تؤدي الى زيادة انتاج الانترفيرون 1 (IFN-1) وسايبتوكينات الاستجابة الالتهابية الأولية

(Proinflammatory cytokins) (انترليوكين 1(1L-1) وانترليوكين 6(1L-6) وعامل نخر الدم (Tumor necrosis factors ,TNF) ومواد الاستجابة الالتهابية الاولية الأخرى .

ان المواد المتحررة في هذه العملية تتسبب في زيادة تدفق الخلايا المناعية وتنشيط نظام الاستجابة غير المتخصص (Nonspecific receptor system), فضلا عما سبق هناك طريقة أخرى للتصدي للإصابة (Infection) عبر التدمير المباشر للخلايا المصابة بوساطة التحلل (Pyrolysis) او البلعمة الذاتية (Autophagocytosis). (Romo *et al.* , 2016, Akira *et al.* ,2006,). على الأنماط الجزيئية المرتبطة بالتلف (DAMPs) يتم أيضا تنشيط مسارات الإشارات داخل الخلايا مما يؤدي الى انتاج مختلف السيتوكينات والكيموكينات التي تقضي في النهاية الى حث مايسمى بالالتهاب العقيم (Sterile inflammation) تلعب هذه العملية دورا مهما في اصلاح وتجديد الانسجة التالفة. (Gong *et al.* , 2020 ;Roh and Sohn ,2018).

2-1-1-6-1-المستقبلات المناعية الشبيهة بالتول (Toll – like receptors TLRs)

تعد المستقبلات المناعية الشبيهة بالتول (TLRs) اول مجموعة ضمن عائلة PRRs الواسعة ويعد المستقبل TLR4 اول نوع منها تم تشخيصه عام 1997 وذلك بعد عام فقط من تحديد دور التول (Toll) في ذبابة الفاكهه للتصدي للإصابة الفطرية (Fungal infection), Belvin and Anderson , (1996) تلى ذلك في السنوات اللاحقة اكتشاف مجموعة المستقبلات الشبيهة بـ *Drosophila toll* من حيث التركيب والوظيفة والتي عرفت بالمستقبلات المناعية 5 (Medzhitov *et al.*, 1997) TLS.

اثبتت الدراسات الجزيئية ودراسات الوراثة الخلوية وجود المستقبلات المناعية الشبيهة بالتول في جميع الكائنات متعددة الخلايا التي تتعرض للإصابة بالأحياء المجهرية اذ ان كل نوع من تلك الكائنات يمتلك عدداً من المستقبلات المشار اليها يتراوح بين 9 في ذبابة الفاكهه الى 222 في قنفذ البحر (Purple sea urchin) (Beutler ,2004) .

ان المستقبلات المناعية الشبيهة بالتول ضرورية لاستشعار اجتياح الاحياء المجهرية مثل البكتريا والفيروسات والفطريات كخط دفاعي اول اذ تبدأ استجابة مناعية ذاتية تتضمن تنشيط كريات الدم البيضاء

أنواع الاوكسجين النشطة (Reactive oxygen species ,ROS) وأنواع النيتروجين النشطة (Reactive Nitrogen species ,RNS) والتي تعد بمجملها نواتج ايض خلوي طبيعية (Ifeanyi,2018).

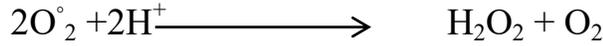
تلعب الجذور الحرة ادواراً مختلفة داخل الجسم الحي معظمها ضارة عبر تحويلها للدهون والبروتينات والحمض النووي DNA مما يساهم في حصول الشيخوخة (Aging) وعدد من الامراض التي يعاني منها الانسان (Devasagayam *et al* .,2004). يحصل الاجهاد التأكسدي (Oxidative stress) عندما تغطي كمية أنواع الاوكسجين النشطة (ROS) على مضادات الاكسدة (Antioxidants) بالدرجة التي تجعل ROS تطل مكونات الدهون والبروتين (Rani, 2015). وتشير الدراسات السابقة الى ان حالة الاجهاد التأكسدي تزداد في المرضى الذين يعانون من الفشل الكلوي المزمن (Morena *et al* .,2005).

ولغرض معادلة تأثير الجذور الحرة وكبحها يقوم الجسم بتوفير مجموعة من المركبات تعرف بمضادات الاكسدة (Antioxidants) التي تنتج اما داخليا (Endogenously) او يتم الحصول عليها من مصادر خارجية (Exogenous sources) , ويمكن تصنيف تلك المضادات الى صنفين رئيسيين هما : (Zulaikhah ,2017)

أ- مضادات الاكسدة الانزيمية (Enzymatic antioxidants): ينتمي هذا النوع من المضادات الى مضادات الاكسدة الداخلية وتشتمل على انزيمات (SOD) Superoxide dismutase و (CAT) Catalase و Glutathione peroxidase (GPx) و Glutathione reductase (GR) اذ تقوم هذه الانزيمات بحماية الانسجة من التلف التأكسدي المتسبب بفعل الجذور الحرة .

2-7-1-1-انزيم (SOD) Superoxide dismutase :

عزل هذا الانزيم لأول مرة عام 1938 من قبل Mann and Kleilin ويعد من الانزيمات المعدنية (Metalloenzyme) ويلعب دوراً مهماً في معادلة الزيادة في الجذور الحرة في العديد من الحالات المرضية (Rosa *et al* ., 2021) . يحفز هذا الانزيم تحويل انيونات السوبر أوكسيد (Superoxide anions) الى بيروكسيد الهيدروجين واوكسجين وفق التفاعل الاتي (Rani, 2015)



يحتاج انزيم SOD لعمله توفر بعض العناصر مثل المنغنيز والزنك والنحاس, و اعتمادا على نوع الفلز الذي يعمل كمرافق انزيمي (Cofactor) في الموقع الفعال للانزيم, توجد ثلاثة مجاميع من هذا الانزيم هي :

1- Fe-SOD: تتميز هذه المجموعة بوجود الحديد Fe بصورة حديديك Fe^{+3} في الموقع الفعال للانزيم (Lobo, 2010).

2- Cu/Zn-SOD: تعرف هذه المجموعة ايضاً ب SOD₁ ويتكون من وحدتين متجانستين (Homodimer) ويتواجد في حقيبة النواة في الساييتوبلازم و Peroxisomes والبلاستيدات, بينما يتواجد في بدائية النواة في Periplasm (Winarsi, 2007; Lobo, 2010).

3- Mn-SOD: تعرف هذه المجموعة ايضاً ب SOD₂ وهو يتواجد في المايوتوكندريا و Peroxisomes. ب- مضادات الاكسدة غير الانزيمية (Non-Enzymatic antioxidants): يتواجد هذا النوع من مضادات الاكسدة في الخضروات والفواكه التي تتضمن الكلوتاثيون المختزل (Reduced Glutathione, GSH) والكاتكينات (Catechins) وحامض اللايوبيك (Lipoic acid). (Rani, 2015).

2-7-2- الكلوتاثيون (Glutathione, GSH):

يعد الكلوتاثيون ببتيديا ثلاثيا (Y-glutamyl –cysteinyl –glycine) ويمكن ان يتواجد هذا المركب بصورتين : صورة مختزلة (GSH) وأخرى مؤكسدة (G-S-S-G) ويلعب دورا مهما في بعض تفاعلات الاكسدة – الاختزال . وبالنظر لاحتواء الصورة المختزلة على مجموعة سلفاهيدريل (-SH-) فإن الأخيرة تعمل كمحلول منظم (Redox buffer) لمعادلة حالة Redox في الخلية . يساعد الكلوتاثيون في المحافظة على الانزيمات بحالة فعالة عبر تثبيط اكسدة مجموعة السلفاهيدريل في الانزيم الى مجموعة ثنائي الكبريتيد (-S-S-) كما انه يساعد في المحافظة على التركيب الطبيعي لخلايا الدم الحمراء والمحافظة على الحديد في الهيموغلوبين . وتعد الخلايا ذات المستوى المنخفض من الكلوتاثيون اكثر

حساسية للتحلل (Hemolysis) . يلعب الكلوتاثيون دورا في إزالة السمية (Detoxification) بأختزال بيروكسيد الهيدروجين وهو ناتج عرضي ضار للأبيض وفق المعادلة الآتية :



ويكون الكلوتاثيون مطلوبا لنقل الاحماض الامينية عبر غشاء الخلية في الكلية والامعاء (Farhood *et al* ,2017 ;Naik ,2017).

3- المواد وطرائق العمل

1-3:-المواد والاجهزة المستخدمة

جدول 1-3 الاجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها :

الشركة المصنعة /المنشأ	اسم الجهاز	ت
Binder- Germany	حاضنة (Incubator)	1
BioMerieux-France	جهاز الفايترك Vitek-2 Compact System	2
BioTek-England	جهاز الاليزا (ELISA)	3
BioTek-England	فرن كهربائي (Oven)	4
Clever-England	وحدة الترحيل الكهربائي (Gel electrophoresis)	5
Denver – Germany	ميزان حساس (Sensitive Balance)	6
GFL-Germany	جهاز تقطير (Distiller)	7
Hettich – Germany	جهاز طرد مركزي (Centrifuge)	8
Human-Germany	ماصات دقيقة (Micropipettes)	9
Jeio-Tech-Korea	هود بايلوجي (Laminar flow cabinet)	10
Jenway-Germany	مصباح بنزن (Bunsen burner)	11
Lab net-USA	PCR Thermo cycler apparatus	12
Labtech-Korea	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Magnetic Stirrer with hot plate)	13
Labtech-Korea	مؤسدة (Autoclave)	14
LG-Korea	ثلاجة (Refrigerator)	15
Mauritius-Germany	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH-meter)	16
Motic-Germany	المجهر الضوئي (Light microscope)	17
ROMA-Italy	مازج (Vortex)	18
Tafesa – Germany	حمام مائي (Water path)	19
Tudor-Korea	مطياف ضوئي (spectrophotometer)	20

جدول 3-2: المواد الكيميائية والايوساط الزراعية المستخدمة والشركات المصنعة لها :

الشركة المصنعة / المنشأ	اسم المادة	ت
Analytical Rasayan	حامض الهيدروكلوريك (HCl)	1
BDH- England	كليسيرول (Glycerol)	2
BDH- England	كلوريد الباريوم (Barium chloride)	3
BDH- England	حامض الكبريتيك المركز (H ₂ SO ₄)	4
BDH- England	Ethylenediaminetetraacetid(EDTA)	5
BDH- England	Pyroglyllol	6
BDH- England	Methanol	7
BDH- England	5,5Di thio bis (2-Nitro benzoic acid (DTNB)	8
BDH- England	Trichloro acetic acid (TCA)	9
BDH- England	EDTA-Na ₂	10
BDH- England	Glutathione	11
Himedia –India	وسط Blood Agar	12
Himedia –India	وسط MacConkey Agar base	13
Himedia –India	وسط Brain – Heart infusion broth	14
Himedia –India	وسط Muller-Hinton agar	15
Himedia –India	وسط Chocolate agar	16
Himedia –India	وسط Eosin Methylene Blue	17
Himedia –India	وسط Nutrient Broth	18
Intron Biotechnology-Korea	DNA Ladder (100-1500 bp)	19
INtRON-Biotechnology	Genomic DNA Extraction Kit	20
INtRON Biotechnology	2x PCR Master mix solution (i-Taq TM)	21
Schorlau- European Union	هيدروكسيد البوتاسيوم KOH	22
Pioneer-Iraq	المحلول الملحي الفسلجي (Normal Saline)	23
Promega-USA	الاكاروز (Agarose)	24
Promega-USA	صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium bromide dye)	25
Promega-USA	Nuclease free water	26

معهد المصول واللقاحات العراقية (VSI)	كاشف الاوكسيديز	27
معهد المصول واللقاحات العراقية (VSI)	بيروكسيد الهيدروجين H ₂ O ₂	28
معهد المصول واللقاحات العراقية (VSI)	عدة صبغة كرام (Gram Stain)	29

جدول 3-3 : الادوات ذات الاستخدام الواحد

الشركة المصنعة	المادة	ت
Afco-Dipo – Jordan	ابر معقمة (Sterilized needles)	1
Afco-Dipo – Jordan	انابيب مختبرية حجم 10مل (Test tube)	2
Afco-Dipo – Jordan	مسحات قطنية (Sterilized cotton swabs) معقمة	3
Afco-Dipo – Jordan	اطباق (Petri dish)	4
BDH – England	Para film	5
Broche – Malaysia	قفازات مطاطية (Latex Gloves)	6
HDA- China	قطن (Cotton)	7
Mercury-China	Microplate	8
Sartorius – Germany	ورق ترشيح (Filter paper)	9
Sigma – England	أنابيب ايندروف (Eppendorf tube)	10
Sterellin Ltd – England	Tips	11

جدول 3-4 : العدد (Kits) :

الشركة المصنعة	نوع الاستعمال	اسم عدة التشخيص	ت
BioMerieux – France	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	VITEK-2 AST card	1

Promega-USA	عدة استخلاص DNA	عدة استخلاص DNA الجينومي Genomic Extraction Kit	2
Zhejiang-China	تقدير مستوى المستقبل المناعي الشبيه بالتول TLR ₄	Elisa Kit	3

2-3-: طرائق العمل :

1-2-3-: جمع عينات الادرار:

جمعت 130 عينة ادرار من المرضى اشتملت 30 عينة من كل من مرضى الفشل الكلوي ومرضى الفشل الكلوي المصحوب بالتهاب المسالك البولية ومرضى التهاب المسالك البولية المراجعين لمدينة الامام الحسين (ع) الطبية / وحدة الغسل الكلوي واستشارية المسالك البولية بأعمار مختلفة بعد تشخيصهم من قبل الطبيب المختص فضلاً عن 40 عينة من الاصحاء وتم جمع العينات في قناني بلاستيكية معقمة (universal urine (sampling) إذ تم اعتماد عينة الادرار الوسطي (mid-stream urine) وزرعت العينات على اوساط تفريقية وانتخابية متمثلة بوسطي اكار الدم واكار الماكونكي لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° وبعد ظهور المستعمرات تم تنقيتها للحصول على المستعمرات النقية التي خضعت للاختبارات التشخيصية والفحوصات الكيموحيوية .

2-2-3-: جمع عينات الدم :

جمعت 130 عينة دم من نفس الأشخاص الذين جمعت منهم عينات الادرار وبنفس العدد إذ سحبت عينات الدم من المرضى بوساطة محاقن طبية بواقع 4 مل ووضعت في انابيب بلاستيكية معقمة خالية من المواد المانعة للتخثر ثم نقلت العينات الى المختبر وبعد حصول التخثر اجري لها طرد مركزي بسرعة 4500 دورة / دقيقة لمدة 4 دقائق إذ سحب المصل ووضع في انابيب وتم حفظه في المجمدة بدرجة حرارة -20 م° في حين اُهملت بقية مكونات الدم (Garvey et al ., 1977) .

3-2-3:- الاوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص البكتيريا المعزولة من مرضى الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية :

❖ وسط: Blood Agar base :

حُضِرَ هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك بإذابة 40 غم في لتر من الماء المقطر وعُقم بالمؤصدة (autoclave) وبعد اكتمال عملية التعقيم ترك ليصل إلى درجة (45-50) م° وأضيف إليه دم الإنسان بنسبة (5-10) % ، أُستخدِمَ هذا الوسط وسطاً أغنائياً في عزل وتشخيص البكتيريا.

❖ وسط Brain – Heart infusion broth :

حُضِرَ هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة ، وذلك بإذابة 37غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر ووزع في أنابيب وعقم بالمؤصدة . وقد أُستخدِمَ هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتيريا فضلاً عن استخدامه لحفظ العزلات البكتيرية وذلك بإضافة 15% كليسيرون إلى 85% من الوسط السائل بعد تعقيمه.

❖ وسط MacConkey agar :

حُضِرَ هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة ، وذلك بإذابة 51.5 غم في لتر من الماء المقطر و عُقم بالمؤصدة ، أُستخدِمَ هذا الوسط لعزل البكتيريا السالبة لصبغة كرام وتشخيصها من حيث قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز .

❖ وسط Eosin Methylene Blue :

حُضِرَ هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك بأذابة 37.4غم في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ، استخدم هذا الوسط لعزل البكتيريا السالبة لصبغة كرام وتشخيصها من خلال ظهور مستعمرات خضراء فضية لامعة .

❖ وسط Chocolate agar :

حُضِرَ هذا الوسط بتسخين اكار الدم (blood agar) الى درجة 80م° لضمان تحلل كريات الدم الحمراء بالتسخين وقد استخدم هذا الوسط لعزل البكتيريا المرضية الحساسة.

❖ وسط **Nutrient Broth** :

حُضِرَ هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة , وذلك بإذابة 13 غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر ووزع في أنابيب وعُقم بالمؤصدة . وقد أُستخدم هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا.

❖ وسط **Muller- Hinton Agar** :

حُضِرَ هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة ، وذلك بإذابة 38 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر .عُقم الوسط باستخدام المؤصدة وبعد اكتمال عملية التعقيم ترك ليصل إلى درجة (45- 50) °م وتم صبه في أطباق بتري معقمة. وقد أُستخدمت الاطباق لتنمية العزلات البكتيرية لغرض اختبار فحصي الحساسية والفعالية التثبيطية للمضادات الحياتية .

3-2-4 :-الكواشف والمحاليل المستخدمة في تشخيص البكتريا المعزولة في هذه الدراسة :

● كاشف الكاتليز (Catalase reagent) :

أُستخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الكاتليز (Tille, 2014).

● كاشف الاوكسيديز (Oxidase reagent) :

حُضِرَ الكاشف أنياً بإذابة 1 غم من مادة رباعي مثيل بارافنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetramethyl P-phenylen diamine dihydrochloride) في 100 مل من الماء المقطر في قنينة معتمة. أُستخدم هذا الكاشف في التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز (Macfaddin,2000)

● عدة صبغة كرام (Gram stain):

أُستخدم هذا الملون لدراسة الخصائص المظهرية للبكتريا المعزولة تحت الفحص المجهرى .

● المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline) :

حضر بإذابة 0.85غم من كلوريد الصوديوم في 50مل من الماء المقطر , وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100مل بالماء المقطر ايضا .

• محلول ماكفرلاند (انبوب رقم 0.5) (Macfarland Solution) :

حضر هذا المحلول بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (Tille, 2014) اذ يتكون من محلولين :

A- محلول كلوريد الباريوم (1.175%) : اذيب 1.175غم من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة اكمل الحجم الى 100مل بالماء المقطر.

B- محلول حامض الكبريتيك (1%) : اضيف 1مل من حامض الكبريتيك المركز الى 99 مل من الماء المقطر.

حضر محلول مكفرلاند (انبوبة رقم 0.5) وذلك بأضافة 0.05 مل من محلول A الى 99.5 مل من محلول B ومزج المحلول جيدا.

استخدم المحلول لمقارنة الكثافة البكتيرية المستعملة في إختبارات فحص الحساسية إذ أن كثافة انبوبة رقم 0.5 تعادل كثافة بكتيرية مقدارها 1.5×10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مليلتر وهو ما يعادل إمتصاصاً ضوئياً مقداره (0.08-0.13) عند الطول الموجي 625 نانومتر .

5-2-3 :- تشخيص البكتريا المسببة لمرض الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية بالفحوصات المجهرية و الكيموحيوية .

يمكن ايجاز عملية العزل والتشخيص وفق المخطط 1 :

1-5-2-3 :- تمييز البكتريا السالبة عن الموجبة لصبغة كرام :

▪ أختبار هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH test) :

أجري هذا الأختبار بمزج عروة كاملة من المستعمرات النامية على وسط Blood agar الصلب مع كمية من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH بتركيز 3 % على شريحة زجاجية نظيفة . أن تكون مادة هلامية خلال 60 ثانية دليل على ايجابية الفحص و أن البكتريا تكون سالبة لصبغة كرام (Markey *et al.*, 2013) .

3-2-5-1: تشخيص بكتريا *E. coli* :

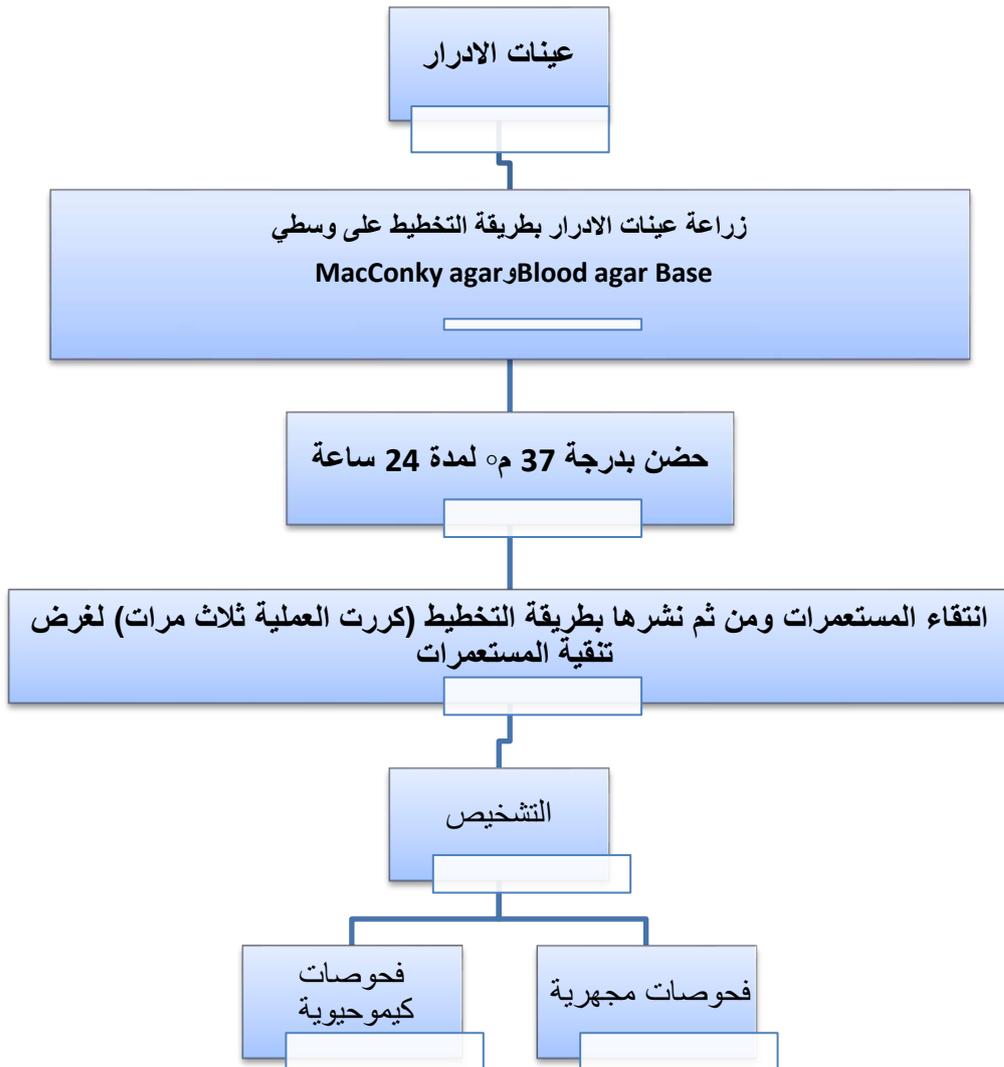
تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *E. coli* اذ تم تشخيصها من خلال تمييزها بدرجة 37 م° فضلاً عن الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الآتية:-

A_ الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) :

• تصبغ البكتريا :

تم انتقاء المستعمرات النامية على وسط MacConkey agar الصلب وتم تصبغها بصبغة غرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها .

المخطط 1 : عزل وتشخيص البكتيريا المعزولة من مرضى الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية.



B_ الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

• اختبار الكاتليز (Catalase test):

اجري هذا الاختبار بمزج مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة مع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3% على شريحة زجاجية نظيفة . ان ظهور الفقاعات دليل على ايجابية الفحص (Tille, 2014) .

• اختبار الاوكسيديز (Oxidase test) :

تم نقل مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة بواسطة عود خشبي معقم (stick) الى ورقة ترشيح واضيف لها قطرة من كاشف الاوكسيديز ، مع الاحتكام الى ان تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق دليل على ايجابية الفحص (Tille, 2014).

• اختبار تخمر اللاكتوز (Lactose Fermentation Test) :

وهي معرفة قابلية البكتريا على تخمير اللاكتوز عند زرعها على وسط الماكونكي وحضنها بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة إذ تعد النتيجة موجبة عند تحول لون الوسط الى اللون الوردي (Tille , 2014).

• اختبار الحركة (Motility test):

لقحت الانابيب الحاوية على وسط اختبار الحركة بمزارع عمرها 24 ساعة بطريقة الطعن باستعمال الإبرة (Needle) وحضنت لمدة (18-24) ساعة . إن انتشار النمو حول محور الطعنة دلالة على قابلية البكتريا على الحركة (Hart and Shears, 2004) .

2-1-5-2-3 تشخيص بكتريا *Acinetobacter* و *Klebsiella* و *Proteus* و: *Pseudomonas*

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بكل من مستعمرات بكتريا *Acinetobacter* و *Klebsiella* و *Proteus* و *Pseudomonas* اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *E. coli* .

2-5-2-3-2- عزل وتشخيص الانواع البكتيرية الموجبة لصبغة كرام

2-5-2-3-1- عزل وتشخيص بكتيريا المكورات العنقودية *Staphylococcus*

يمكن تلخيص عملية عزل وتشخيص بكتيريا *Staphylococcus spp.* بالمخطط 2 يمكن تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* والتي ظهرت على الاكار المغذي خلال 24 ساعة من الحضان بدرجة 37م. اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الاتية :

❖ الفحوصات المجهرية :

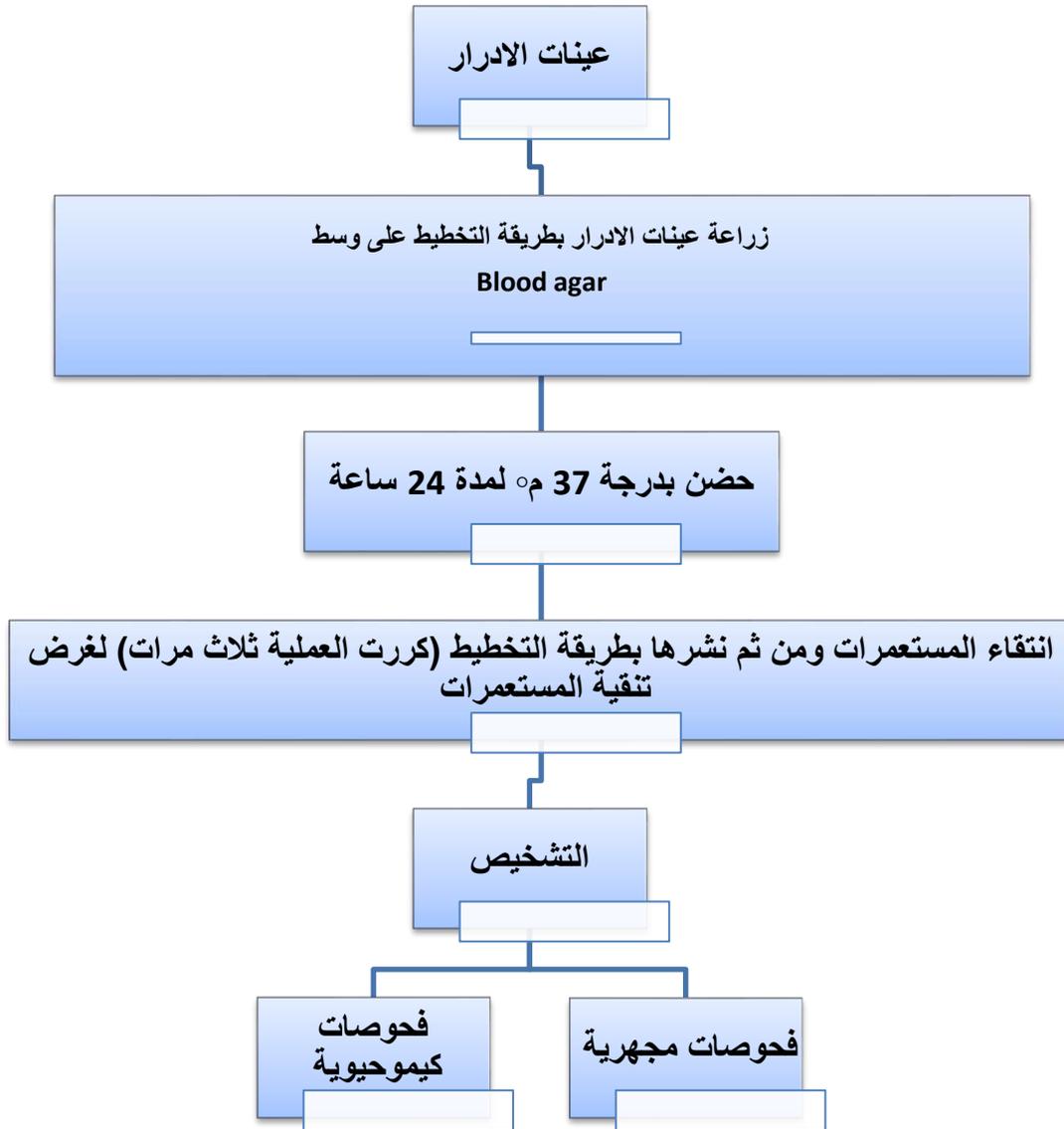
• تصبغ البكتريا :

تم انتقاء المستعمرات النامية على وسط Blood agar الصلب وتم تصبغها بصبغة كرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها .

❖ الفحوصات الكيموحيوية :

• اختباري الكاتليز والاكسيديز

اجري هذان الاختباران بحسب الطريقة الموصوفة في تشخيص بكتريا *E. coli* المذكورة سابقا .

المخطط 2: عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus*

الزرع على وسط Mannitol salt agar :

استخدم هذا الوسط لعزل المكورات العنقودية الذهبية وتشخيصها من حيث قابليتها على تحمل ملوحة الوسط، فضلا عن قابليتها على تخمير سكر المانيتول وتحويل لون الوسط الى الاصفر (Tille, 2014).

اختبار انزيم التجلط (coagulase test):

تم اختبار العينات بأستخدام بلازما الانسان اذ تم وضع 0.5 مل من البلازما في انابيب معقمة ثم نقلت مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة بواسطة عروة (Loop) الى الانابيب الحاوية على بلازما الدم ومزجت جيدا ثم حضنت بدرجة حرارة (35-37)° م ولمدة 4 ساعات . ان حصول التجلط دلالة على ايجابية الفحص (Tille, 2014).

3-2-2-5-2-2: عزل وتشخيص بكتريا *Enterococcus*:

تم تمييز مستعمرات بكتريا *Enterococcus* والتي ظهرت على اكار الدم خلال 24 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 37°م اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتيريا *S. aeures*.

3-2-3-6: اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية:

تمت جميع خطوات العمل وفقا لتعليمات الشركة المجهزة Biomerieux وكما يلي :

1- وضع 3 مل من المحلول الملحي (normal saline) في انابيب بلاستيكية معقمة .

2- نقلت عدد من المستعمرات النقية من البكتريا المراد تشخيصها والتي يتم تنشيطها على وسط مناسب لمدة (18-24) ساعة وذلك باستخدام عروة نقل معقمة (loop) ومزجت جيدا حتى يصبح المحلول عكرا".

3- تم قياس عكورة المعلق باستخدام جهاز Denis Chek والتي كانت مطابقة لعكورة محلول ماكفرلاند (1.5*10⁸ خلية / مل) .

4- تم نقل العالق الى حامل الجهاز وتوضع البطاقة الخاصة في الحامل وربطت البطاقة والعالق بواسطة قناة توصيل رفيعة جدا ثم ادخل رمز البطاقة بواسطة ماسح ضوئي .

5- وضع الحامل في حجرة خاصة مفرغة من الهواء (Vacuum chamber) إذ تم نقل البكتريا الى البطاقة وتوزيعها في الحفر الموجودة فيها.

6- تم قطع قناة الوصل اليا وتم غلق البطاقة جيدا لمنع أي تسرب ونقلت الى الحاضنة وحضنت بدرجة حرارة (35-37)°م.

7- تم قراءة نتائج التشخيص من خلال جهاز الحاسوب الذي يحتوي على برنامج خاص يتم من خلاله قراءة الاطوال الموجية للتفاعلات وترجمتها من خلال التغيرات اللونية والعكورة فضلا عن النواتج الايضية .

3-2-7:- الكشف الجزيئي لبكتريا *E. coli* :

3-2-7-1:-استخلاص الحامض الريبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) من بكتريا *E.*

Coli. المعزولة :

❖ الاستخلاص باستخدام عدة الاستخلاص :

استخدمت عدة التشخيص المجهزة من شركة. iNTRON Biotechnology , Inc ،

طريقة الاستخلاص :

1. تم تنمية عزلات بكتريا *E.coli* في وسط Brain heart infusion broth لمدة 20 ساعة بدرجة حرارة 37°م ثم سحب 1.5 مل من المزروع البكتيري النامي ووزع في أنابيب ابندروف.

2. أُجريت عملية طرد مركزي للمزروع البكتيري بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة 10 دقائق لترسيب الخلايا إذ أُزيل الجزء الرائق منها ، ثم عُلقَت الخلايا بعدها في 300 µl من محلول FATG ثم مُزجت جيداً و تُركت لمدة خمس دقائق بدرجة حرارة الغرفة.

3. أُضيف 250 µl من محلول FABG إلى معلق الخلايا ثم مُزجت جيداً أعقب ذلك حضن المزيج بدرجة حرارة 70°م لمدة عشر دقائق من اجل تحلل الخلايا .

4. أُضيف 200μ من الايثانول المطلق ثم مُزجت جيداً ، من جهة أخرى تم وضع انبوبة الحاوية على الفلتر FABG Column داخل انبوبة جمع (Collection tube) ثم تم سكب العالق البكتيري مع الاضافات السابقة داخل انبوبة الفلتر و أُجريت عملية طرد مركزي لمعلق الخلايا بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة 5 دقائق إذ أُزيل الرائق المتجمع في انبوبة الغسل وبقي DNA الخلايا البكتيرية مع رواسب اخرى عالقة في الفلتر .

5. أُضيف 500μ من محلول الغسل W1 ثم أُجريت عملية طرد مركزي لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح.

6. أُضيف 500μ من محلول الغسل الثاني Wash buffer المضاف له الايثانول المطلق، أعقب ذلك إجراء طرد مركزي للمزيج بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة 5 دقائق.

7. تم وضع انبوبة الفلتر داخل انبوبة ابندروف جديدة وتم التخلص من انبوبة الغسل ثم أُضيف محلول الاسترداد (Elution) المسخن سابقا في الحمام المائي بدرجة 70° م لعدة دقائق الى انبوبة الفلتر وتركت لعدة دقائق من اجل اعطاء الوقت اللازم لفك ارتباط DNA الخلية البكتيرية من الفلتر.

8. أُجريت عملية طرد مركزي لعدة دقائق اذ تم التخلص من انبوبة الفلتر وتم الاحتفاظ بأنبوبة الابندروف الحاوية على DNA وخزن بعدها بدرجة حرارة -20° م لحين الاستخدام .

3-2-7-2-- تشخيص البكتريا المعزولة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction , PCR) :

- البودائ المستخدمة في الكشف الجزيئي :

تم استخدام البودئ الموضحة صفاتها في الجدول 3-5 :

الجدول 3-5: البودئ المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في الدراسة

المصدر	Amplicon size (bp)	تتابع البادئ `5—`3	اسم البادئ	الجين المستخدم
Kong, et al., 1999	903bp	F GTGACAAAAGCCGGACACCATAAAATGC CT TACTACTGTCATTACGTTGCGGATTTGGC R GT	PhoA-F PhoA-R	Pho A
Jalali, et al., 2015	1177bp	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGTCCATCCCGTCA	Hly-F Hly-R	hly A
Karimian, et al., 2012	559bp	GAGAAGAGGTTTGGATTTAACTTATTG AGAGCCGCTGTAGAACTGAGG	Fim-F Fim-R	fim H
Messai et al., 2006	550bp	CGC TTT GCG ATG TGC AG ACC GCG ATA TCG TTG GT	Ctx-m-F Ctx-m-R	ctx-M

المحاليل المستخدمة :

A. تحضير محلول البادئ الخزين (Stock Primers) :

حُضِرَ محلول البودئ بحسب تعليمات الشركة المجهزة للحصول على تركيز نهائي

100 picomoles/ μ l ثم يحفظ بدرجة حرارة - 20°م لحين الاستخدام .

B. مزيج Master Mix :

أُستخدِمَ المزيج (Master Mix) المجهز من شركة Intron Biotechnology الموضحة

مكوناته في الجدول 3-6 .

الجدول 3-6 : مكونات المزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل

Component	20 µl reaction
Taq DNA Polymerase	1 U
Each: dNTP (dATP , dCTP , dGTP , dTTP)	250 µM
Tris- Hcl (PH 9.0)	10mM
KCL	30mM
MgCl ₂	1.5mM
Stabilizer and tracking dye	

اجراء تفاعل البلمرة (PCR Assay):

تم تحضير محلول كل بادئ وبشكل منفصل بتركيز 100 بيكو مول/مايكرو ليتر، وذلك بإضافة 10 مايكرو ليتر من المحلول الخزين لكل بادئ كلا على إنفراد إلى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللأأيوني ، ومُزج جيداً وحُفظ في الثلج لحين الاستخدام في حين حُفظت المحاليل الخزينة للبوادئ في درجة -20° م.

تم اضافة المواد الاتية لكل انبوبة من انابيب Master Mix

- 3 مايكروليتر (20 picomole) لكل من البوادئ الامامي والخلفي .
- 5 مايكروليتر من الحامض النووي DNA المستخلص من الفقرة 2-2-7-1 .
- أكمل الحجم الى 20 مايكروليتر وذلك بإضافة ماء مقطر معقم .
- تم برمجة جهاز PCR كما في الجدول 3-7 مع الاخذ بنظر الاعتبار استخدام درجات حرارة مختلفة في الخطوة الثانية (B) اذ استخدمت درجة حرارة حسب نوع البادئ لكل جين 62.9 °م لكل من جيني *Pho A* و *hly A* في حين استخدمت درجة حرارة 58.4°م لجين *fim H* و 54.5°م لجين *ctx-M*.

الجدول 3-7 : برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في هذه الدراسة

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 5 دقيقة عند درجة حرارة 95 °م للمسح الأولي لـ DNA القالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A 1 دقيقة عند درجة حرارة 96 °م لمسح DNA القالب .
	B 20 ثانية عند درجة حرارة 58.4, 62.9 °م لارتباط البوادي لـ DNA القالب .
C 1 دقيقة عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البوادي المرتبطة .	
3	دورة واحدة لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .

3-2-7-2-1: -- الترحيل الكهربائي في الهلام (Gel Electrophoresis) :

A- المحاليل المستخدمة:

• صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) :

استخدمت بالهيئة المجهزة بها من شركة Intron Biotechnology (Promega-USA).

• تحضير محلول 0.5 X TBE buffer :

تمت اضافة 500 مليلتر من الماء المقطر الى كيس واحد من TBE buffer

بتركيز (1X) بحسب تعليمات الشركة المجهزة.

• تحضير هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % :

حُضِر هلام الاكاروز وفق الطريقة الموصوفة من قبل (Sambrook & Russell 2001)

وذلك بإذابة 0.75 غم من الاكاروز في 50 مليلتر من محلول 0.5 X TBE buffer ، اذ تم

تسخين الأكاروز الى درجة الغليان ثم ترك ليصل الى درجة حرارة (45- 50) °م ثم أضيفت إليه 3 مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم ومُزج الأكاروز جيداً، تم إعداد صفيحة لإسناد الأكاروز (Tray) ثم تُبث المشط (Comb) لتكوين الحفر (Wells) المُعدة لتحميل العينات ثم صُبَّ الأكاروز بشكل هادئ ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم رُفِع المشط بهدوء. بعدها نُقِل الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل لإجراء عملية الترحيل الكهربائي .

3-2-7-2-2 :- الكشف عن نواتج التضاعف :

تم الكشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 1.5 % ، اذ تم تحميل 5 مايكرو ليتر من العينات فضلاً عن تحميل 5 مايكرو ليتر من الدليل الحجمي (DNA Ladder) . تم ترحيل النواتج والدليل الحجمي كهربائياً بفرق جهد 70 فولت لمدة 50 دقيقة ، وفُحص الهلام بعد الانتهاء من عملية الترحيل من خلال تعريضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالمقارنة مع مواقع الحزم للدليل الحجمي المستخدم والمُرحل مع نواتج التضاعف .

3-2-8 :- حفظ وإدامة العزلات :

تم حفظ العزلات لمدة قصيرة الامد و ذلك بزرعها في ممالات (Slants) حاوية على الوسط المغذي الصلب ، و حضنت لمدة 18 ساعة لتتميتها في درجة حرارة 37°م و بعدها حُفظت بالثلاجة ، اذ تم تجديد المزارع كل شهر ، كما تم حفظها لمدة طويلة الامد باستخدام الوسط المغذي السائل Brain heart infusion broth المدعم ب 15% من الكليسيروول .

3-2-9 :- الفحوصات المناعية :

3-2-9-1 :- تقدير مستوى المستقبل المناعي الشبيه بالتول (TLR₄) في مصل المرضى

بطريقة الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA) :

3-2-9-1-1 مبدأ العمل :

اجري هذا الفحص على وفق تعليمات الشركة المصنعة (Bioassay) والذي يعد اختبارا انزيميا مناعيا لقياس مستوى TLR4 البشري في مصل المرضى وفي محاليل المعايرة بالاعتماد على الارتباط المتخصص بينها وبين الاجسام المضادة المتخصصة له والمغلقة لحفر صفيحة الاختبار ذات 96 حفرة .

3-2-9-2-1 تحضير الكواشف والمحاليل :

A- وضعت جميع الكواشف المستخدمة في الفحص بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستخدام .

B- المحلول المنظم للغسل (Wash buffer) : سحب 20 مل من المحلول المنظم للغسل ذي

تركيز 25 x وخفف بالماء المقطر المنزوع الايونات بأكمال الحجم الى 200 مل .

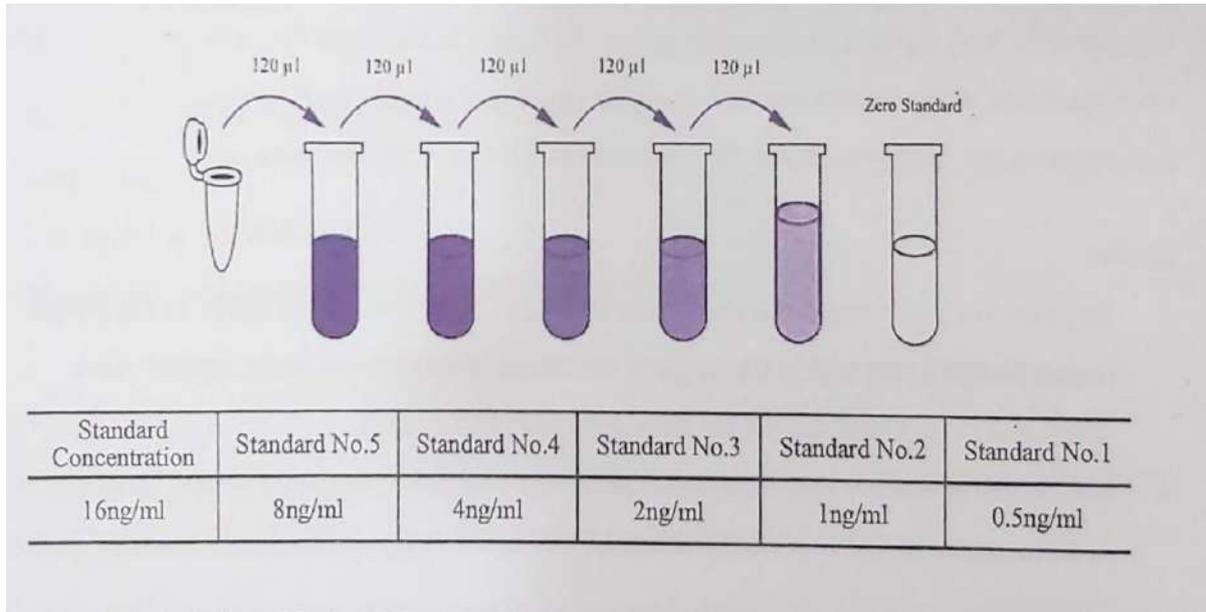
C- المحلول القياسي (Standard solution) : مزج 120 مايكروليتر من المحلول القياسي ذي

تركيز 16 نانوغرام/مل مع 120 مايكروليتر من محلول التخفيف القياسي Standard diluent

للحصول على المحلول الخزين من Standard stock solution بتركيز 8 نانوغرام /مل وترك

لمدة 15 دقيقة مع التحريك المستمر الهادئ قبل تحضير باقي التخفيف المطلوبة .

D-حضرت سلسلة من التخفيف (0.5 ، 1 ، 2 ، 4 ، 8 ، 16) نانوغرام / مل بمزج المحلول
الخيرين المحضر اعلاه بنسبة 2:1 مع محلول التخفيف القياسي للحصول على محاليل المعايرة
وقد جرت عملية التخفيف على وفق الشكل 3-1:



شكل 3-1 : تحضير سلسلة تخفيف محاليل المعايرة

E- Biotinylated Detection Antibody

حضر المحلول بتخفيف المحلول الخيرين بنسبة 1:100 بمزج 1مل من المحلول الاصلي

(Antibody solution) مع 99 مل من محلول التخفيف (Diluent solution) .

F- محلول HRP:

حضر المحلول بنسبة 1:100 وذلك بمزج 1مل من المحلول الاصلي الى 99 مل من

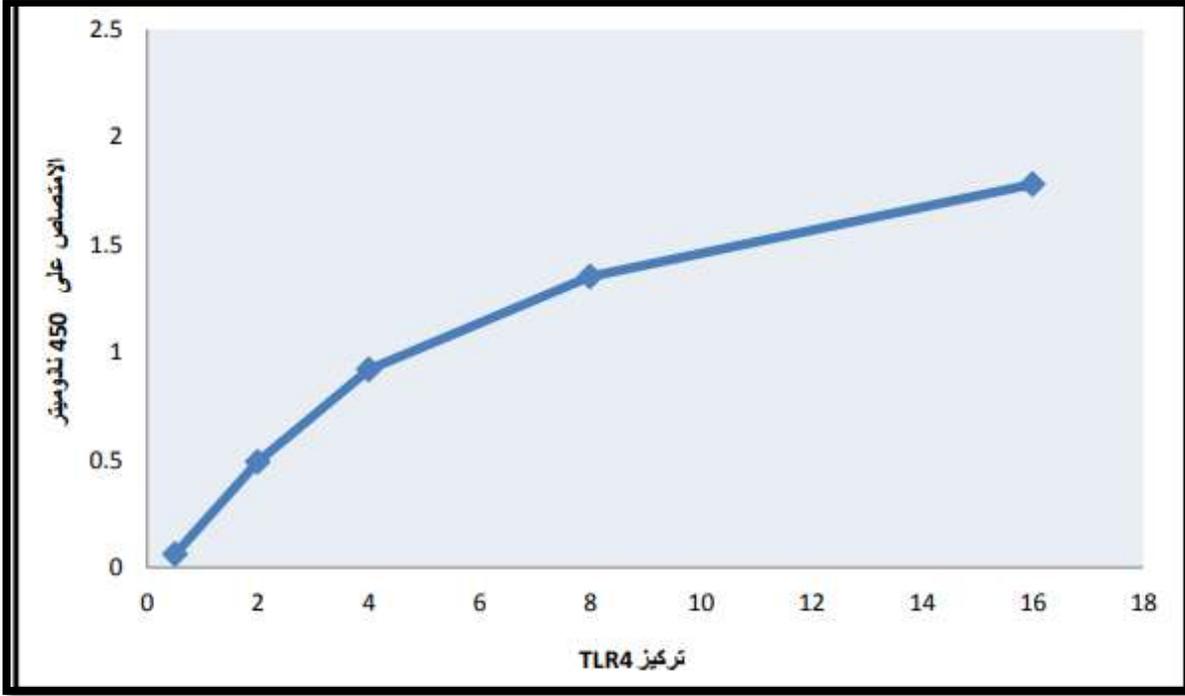
محلول التخفيف .

G- كاشف مادة التفاعل (Substrate Reagent): استخدم هذا المحلول مباشرة .

3-1-9-2-3 : طريقة العمل :

1. تم اضافة محاليل المعايرة والسيطرة والعينات في الحفر المخصصة لها وبحسب الخريطة التي تم وضعها على طبق .
2. تم اضافة 50 مايكروليتر من المحلول القياسي الى الحفر الخاصة به , مع تجنب اضافة الاجسام المضادة الى حفر المحلول القياسي بالنظر لاحتواء الاخير على Antibody Biotinylated.
3. اضيف 40 مايكروليتر من كل عينة الى الحفر الخاصة بالعينات اعقبها اضافة 10 مايكروليتر الجسم المضاد TLR (anti-TLR antibody) الى الحفر نفسها , أعقب ذلك اضافة streptavidin -HRP الى حفر العينات والمحلول القياسي باستثناء حفر السيطرة .مزج المحلول جيدا وتم تغطية الصفيحة بغطاء مناسب وضعت في الحاضنة بدرجة 37 °م لمدة 60 دقيقة .
4. تم ازالة غطاء الصفيحة وغسلت جيدا 5 مرات وبأستخدام المحلول المنظم الغاسل . اعقبها نقع الحفر بأضافة 0.35 مل من محلول الغسل لمدة (0.5-1) دقيقة لكل غسلة وتم تنشيف الصفيحة بأستخدام ورق الترشح او استخدام مواد ممتصة اخرى .
5. تم اضافة 50 مايكروليتر من A substrate solution لكل حفرة اعقبها اضافة 50 مايكروليتر من B substrate solution لكل حفرة ايضا وحضنت الصفيحة بعد تغطيتها جيدا بدرجة 37 °م لمدة 10 دقائق .
6. اضيف 50 مايكروليتر من محلول الايقاف (Stop solution) لكل حفرة ، مع ملاحظة تغير اللون في الحفر الى الاصفر .

7. تم قراءة الامتصاص باستخدام جهاز الاليزا عند طول موجي 450 نانومتر ثم سجلت النتائج اما بشكل امتصاص بالرجوع الى المنحنى القياسي الموضح في الشكل 2-3 لتحديد تركيز TLR_4 او بالاعتماد قيمة التركيز مباشرة.



الشكل 2-3: المنحنى القياسي لتقدير تركيز المستقبل المناعي TLR_4

3-2-10:-- تقدير مضادات الاكسدة

3-2-10-1:-- تقدير فعالية انزيم **Superoxide dismutase(SOD)** :

تم تقدير فعالية انزيم **Superoxide dismutase** اعتمادا على الطريقة الموصوفة من قبل

.Marklund and Marklund (1974).

المحاليل المستخدمة :

1- محلول Tris (pH=0.8) : تم تحضيره بأذابة 0.258 غم من مادة المحلول المنظم Tris و 0.111 غم من Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضا .

2- محلول Pyrogallol (0.2 mM): حضر بأذابة 0.0252 غم من مادة Pyrogallol في 10 مل من حامض الهيدروكلوريك HCL و اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

طريقة العمل:

يتكون مزيج التفاعل بأضافة 50 مايكروليتر من المصل مع 2 مل من محلول Tris و 0.5 مل من محلول Pyrogallol (0.2 mM) وبعد مزج المحلول جيدا يتم قراءة الامتصاص بأستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 420 nm بأستخدام الماء المقطر كمحلول صفري (Blank) . يتم ايضا قراءة الامتصاص لمحلول السيطرة (control) الذي يتم تحضيره بنفس طريقة تحضير النموذج عدا استبدال المصل بالماء المقطر .

يتم تعريف وحدة واحدة من الإنزيم على أنها كمية الإنزيم التي لها القابلية على تثبيط 50% من أكسدة مادة Pyrogallol . تم حساب فعالية SOD بأستخدام المعادلة الآتية:

$$SOD \text{ Activity (unit)} = \frac{\%P}{50\%} \times R$$

SOD Activity (unit)=x

اذ ان :

❖ P% النسبة المئوية لتثبيط اختزال مادة Pyrogallol

❖ ملاحظة: يتم حساب %P لكل نموذج بمقارنة التغير في الامتصاص (%X) مع التغير في امتصاص محلول السيطرة 100%.

R: إجمالي حجم التفاعل (2.55) مل

T: وقت التفاعل بالدقيقة (2 دقيقة)

3-2-10-2: تقدير تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم:

اتبعت الطريقة الموصوفه من قبل *Beutler et al. (1963)* و *Moron et al. (1979)* في تقدير تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم .

المحاليل المستخدمة :

❖ محلول منظم فوسفات الصوديوم 0.2 M

حضر بأذابة 2.4 غم من فوسفات الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة

عدل الرقم الهيدروجيني الى 8 ثم اكمل الحجم 100 مل بالماء المقطر .

❖ محلول Dithionitrobenzene (0.6mM) DTNB

حضر بأذابة 0.023 غم من مادة DTNB في كمية من محلول منظم فوسفات الصوديوم المحضر

اعلاه وبعد اتمام الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالمحلول المنظم نفسه .

❖ محلول ثلاثي كلورو حامض الخليك TCA (5%)

حضر بأذابة 5 غم من مادة ثلاثي كلورو حامض الخليك في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة اكمل

الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

❖ محلول الترسيب الدائري (Tris buffer solution) بتركيز 1.4 M : حضر بأذابة 4.82 مل من مادة Tris base في 10 مل من محلول EDTA-Na₂ بتركيز 0.4 M والمحضر من اذابة 1.4889 غم من EDTA-Na₂ في 10 مل ماء مقطر ثم اكمال الحجم الى 100 مل بالماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 8.9 بأضافة حامض الهيدروكلوريك (0.1 N).

❖ اعداد المنحني القياسي للكلوتاثيون :

المحاليل المستخدمة :

❖ محلول EDTA-Na₂ (0.2 M) : حضر بأذابة 0.477 غم من مادة EDTA-Na₂ في 100 مل من الماء المقطر

❖ محلول الكلوتاثيون القياسي (3 ملغم / مل) : حضر بأذابة 0.03 غم من الكلوتاثيون في 10 مل من محلول EDTA-Na₂ المذكور اعلاه

تم اعداد المنحني القياسي للكلوتاثيون وفق الخطوات الاتية :

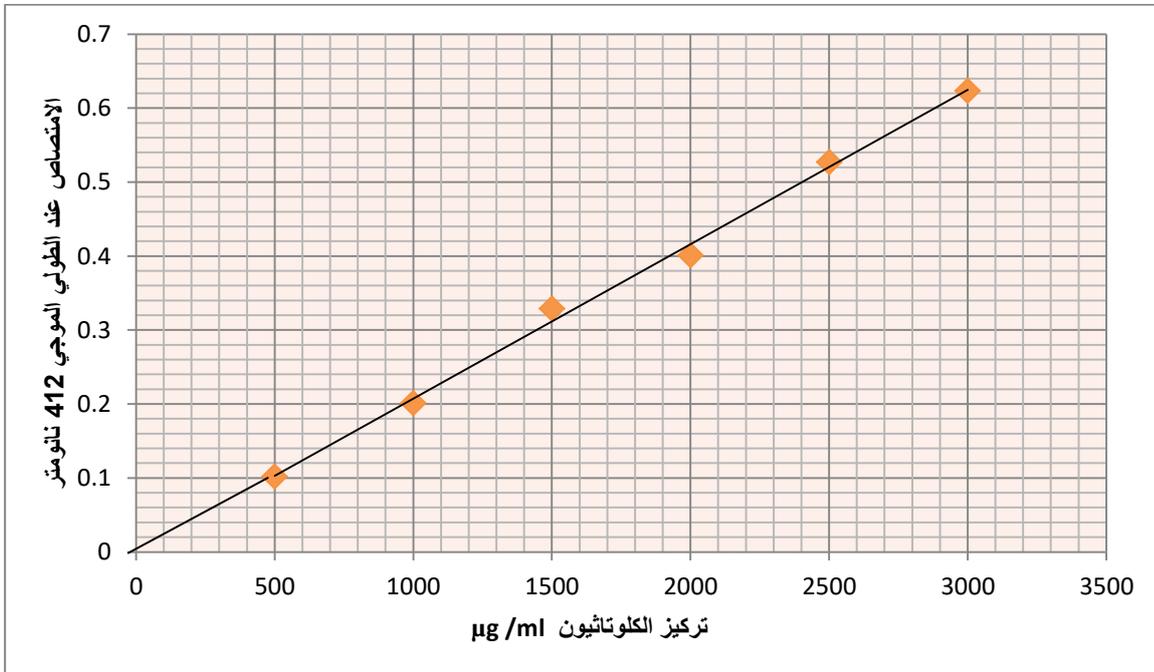
1- حضرت تراكيز متدرجة من المحلول القياسي للكلوتاثيون حسب الجدول الاتي:

رقم الانبوب	مل من محلول GSH القياسي	مل من محلول EDTA-Na ₂	الحجم الكلي مل	تركيز GSH µg /ml
1	0.0	2	2	0.0
2	0.3	1.7	2	500
3	0.6	1.4	2	1000
4	1	1	2	1500
5	1.3	0.7	2	2000
6	1.6	0.4	2	2500
7	2	0.0	2	3000

2- اضيف 0.02 مل من محلول DTNB لكل انبوب ثم اضيف 0.08 مل من محلول الترس الدارى و تم رج الانابيب جيدا .

3- تم قراءة الامتصاص للمحاليل عند طول موجي 412 nm لمدة لا تزيد عن 5 دقيقة بأستخدام جهاز المطياف الضوئي و رسم المنحني القياسي بين الامتصاص وتركيز الكلوتاثيون بحسب ما هو موضح بالشكل 3-3 :

ولتقدير تركيز الكلوتاثيون في نماذج المصل قيد الدراسة يمزج 100 مايكروليتر من المصل مع 0.7 مل من محلول منظم الفوسفات و 2 مل من محلول DTNB ويقاس الامتصاص للمحلول ذي اللون الاصفر المتكون عند طول موجي 412 نانوميتر .



الشكل 3-3 : المنحى القياسي للكلوتاثيون

3-2-11: التحليل الاحصائي

حللت النتائج احصائيا في برنامج SPSS بأستعمال تحليل التجارب العاملية باتجاه واحد (one-way) وأستخرج قيمة مستوى المعنوية P value وكذلك مقارنة المتوسطات لمجاميع الدراسة من خلال قيمة اقل فرق معنوي Least significance Differents عند مستوى معنوية 0.05.

4-الفصل الرابع

4-النتائج والمناقشة

4-1: عزل وتشخيص البكتيريا المرافقة للفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية

بعد زرع العينات التي تم الحصول عليها من إصابات الفشل الكلوي والمسالك البولية على وسطي أكار الدم والماكونكي تم الحصول على 57 عزلة بكتيرية منها. تمخضت عملية معاملة العزلات البكتيرية بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم (3%) عن الحصول على 47 عزلة سالبة لصبغة كرام اي بنسبة 82.45 % من مجموع البكتريا المعزولة ، فضلا عن 10 عزلة موجبة لهذه الصبغة أي بنسبة 17.54% من مجموع البكتريا المعزولة في هذه الدراسة ايضا . وأعتادا على نتائج التشخيص التي سيرد ذكرها لاحقا ، أسفرت عملية العزل عن الحصول على 12 عزلة (21.05%) من بكتيريا *Klebsiella Pneumoniae* وعزلتين (3.508%) من بكتيريا *Enterobacter* و 5 عزلات (8.77%) من بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و 22 عزلة (38.59%) من بكتيريا *E.coli* و 6 عزلات (10.52%) من بكتيريا *Proteus* و 4 عزلات (7.017%) من بكتيريا *Entreococcus faecales* و فضلا عن 6 عزلات (10.52%) من جنس بكتيريا *Staphylococcus aureus* وحسب ما موضح بالشكل 4-1 والجدول 4-1.

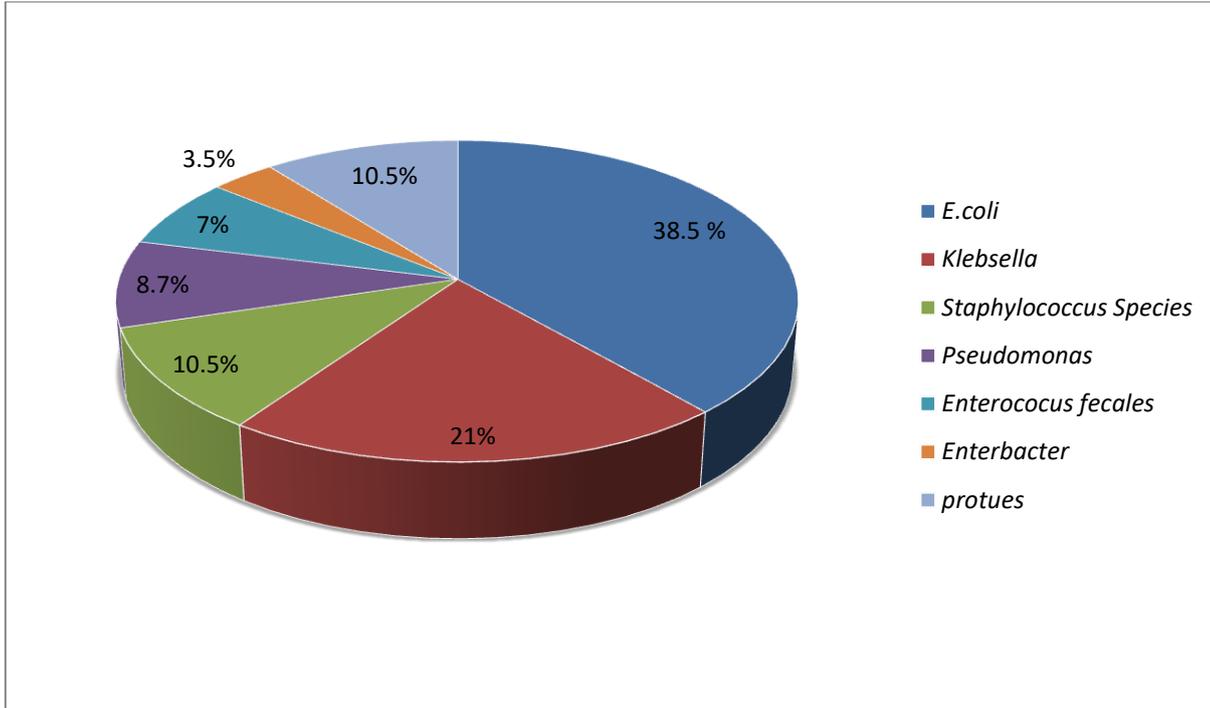
تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماورد في دراسات سابقة إذ أن النوع البكتيري السائد في هذه الدراسة يماثل ماأشار اليه (AL-jebouri & Al-Alwani (2015) اللذين تمكنوا من عزل بكتيريا *E.coli* من عينات الادرار بنسبة 44.7% كما تتفق ايضا نتائج هذه الدراسة مع ما وجده Osman. (2016) من ان الانواع البكتيرية المعزولة الاكثر شيوعا هي بكتيريا *E.coli* بنسبة 35.8% .

تمكن (jalil et al (2015) ايضا من عزل بكتيريا *E.coli* و *K.pneumoniae* من مرضى الفشل الكلوي واصابات المسالك البولية بنسب بلغت 38.8% , 34.32% , 6.71% , 4.47% بينما عزلت البكتيريا الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* بنسبة 13.41% , بالرجوع الى الشكل 4-1 يتضح سيادة بكتريا *E.coli* من اصابات المسالك البولية في محافظة كربلاء المقدسة وقد جاءت هذه النتائج موافقة لما اشارت اليه العديد من الدراسات السابقة إذ إن هذا النوع من البكتريا هو السائد في إصابات المسالك البولية .

ومن جهة اخرى لانتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما اشار اليه (Mohamed et al (2018 ان اكثر الانواع البكتيرية المعزولة هي بكتيريا *K.pneumoniae* من اصابات المسالك البولية .

الجدول 4-1: اعداد وانواع البكتريا المعزولة في هذه الدراسة

المجموعة	عدد العينات	الفئات العمرية	اعداد البكتريا الموجبة لصبغة كرام	اعداد البكتريا السالبة لصبغة كرام	عدد بكتريا E.COLI المعزولة
مرضى الفشل الكوي	30	70-20	2	3	2
مرضى الفشل الكلوي المصحوب بألتهاب المسالك البولية	30	70-20	5	12	11
مرضى التهاب المسالك البولية	30	70-20	3	10	9



الشكل 4-1: توزيع الأنواع البكتيرية المعزولة من إصابات الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية

1-1-4-1 تشخيص بكتريا *E. coli*

1-1-1-4 الصفات الزرعية والمجهرية (Cultural and microscopical characteristics)

بعد زرع مسحات الادرار التي تم الحصول عليها على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلات بهيئة مستعمرات رمادية اللون ناعمة براقية (Shiny) اما عند تنميتها على وسط الماكونكي فكانت المستعمرات وردية جافة مسطحة مُحاطة بمنطقة وردية غامقة نتيجة ترسب أملاح الصفراء, اما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلات البكتيرية هي *E. coli* (Markey et al., 2014 , Tille ; 2013) كما هو موضح في الجدول 4-2 .

يعد وسط الماكونكي وسطاً اختيارياً- تفريقياً ، فهو اختياري من جهة لأنه يحتوي على صبغة Crystal violet المثبطة لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام كما يحتوي ايضاً على ملح Bile

salt المثبط لنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام عدا مجموعة البكتريا المعوية (Enteric Bacteria) ومن جهة اخرى يعد هذا الوسط وسطاً تفریقياً كونه يميز بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز. يحتوي هذا الوسط على اللاكتوز والفينول الاحمر إذ يعد الاخير دليلاً للرقم الهيدروجيني (pH indicator) لذا فإن المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز تنتج حامض الذي يعمل بدوره على تغيير لون الدليل الى اللون الاحمر (Quinn *et al.*, 2004 ; Hart and Shears , 2004).

4-1-1-2 : الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 4-2 ان بكتريا *E. coli* سالبة لصبغة كرام لأعطائها نتيجة موجبة في فحص هيدروكسيد البوتاسيوم KOH كما كانت هوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسديز.

4-1-2-2 : تشخيص بكتريا *K. pneumonia*

4-1-2-1-1 : الصفات الزرعية والمجهرية

بعد زرع مسحات الادرار التي تم الحصول عليها من أصابات الفشل الكلوي والمسالك البولية على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة تم الحصول على 12 عزلة بهيئة مستعمرات رمادية اللون مخاطية (mucoid) بينما ظهرت المستعمرات على وسط الماكونكي كبيرة وردية فاتحة مخاطية , اما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *K. pneumoniae* (Markey *et al.*, 2013) (الجدول 4-2) .

4-1-2-2-2 : الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 4-2 ان بكتريا *K. pneumoniae* كانت سالبة لصبغة كرام لأعطائها نتيجة موجبة في فحص هيدروكسيد البوتاسيوم كما كانت لاهوائية أختيارية سالبة في فحصي الكاتليز والأوكسديز غير متحركة.

الجدول 4-2: الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية للبكتريا المعزولة من إصابات الفشل الكلوي و إصابات المسالك البولية

نتيجة الفحص							الاختبار	ت
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Proteus Mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>		
-	+	-	-	-	+	-	صبغة غرام	1
خلايا عصوية الشكل	خلايا كروية بشكل أزواج	خلايا عصوية الشكل	خلايا عصوية الشكل	خلايا عصوية الشكل	مكورات عنقودية	خلايا عصوية الشكل	المظهر الخلوي	2
لاهوائية اختيارية	لاهوائية اختيارية	لاهوائية اختيارية	هوائية	لاهوائية اختيارية	لاهوائية اختيارية	هوائية اختيارية	ظروف النمو	3
+	-	+	+	-	+	+	اختبار الكاتليز	4
-	+	-	+	-	-	-	اختبار الاوكسيديز	5
+		-	-	+	-	+	تخمير اللاكتوز	7
+		+	+	+	-	+	فحص KOH	9

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة

3-1-4 تشخيص بكتريا *P. aeruginosa*

1-3-1-4 الصفات الزرعية والمجهرية :

بعد زرع مسحات الادرار التي تم الحصول عليها من مرضى الفشل الكلوي و أصابات المسالك البولية على وسط أكارالدم و حضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على 5 عزلات بهيئة مستعمرات منتشرة و كانت مسطحة وذات حافات مسننة متموجة النمو وتمتلك بريقاً معدنياً ذا لون أخضر ولها رائحة شبيهة برائحة العنب فضلاً عن ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات بسبب إنتاج البكتريا للهيمولايسين الذي يحلل الدم الموجود في الوسط وغالباً ما يكون التحلل (نوع β) , اما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . وتميزت المستعمرات المنماة على وسط شبه صلب Semi solid بانتشارها حول منطقة الزرع دلالة على قابلية البكتريا على الحركة (Hart and Shears, 2004) . اما عند تنميتها على وسط الماكونكي فقد ظهرت المستعمرات شاحبة على هذا الوسط بسبب عدم قابليتها على تخمير اللاكتوز (Tille , 2014) . ان

هذه الصفات الزرعية والمجهريّة تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *P. aeruginosa* (Tille , 2014) (الجدول 2-4) .

2-3-1-4 : الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 2-4 ان بكتريا *P. aeruginosa* كانت سالبة لصبغة كرام لأعطائها نتيجة موجبة في فحص هيدروكسيد البوتاسيوم وقد أعطت نتائج موجبة في فحصي الكاتليز و الأوكسيديز .

4-1-4 : تشخيص بكتريا *Enterobacter aerogenes* :

1-4-1-4 : الصفات الزرعية والمجهريّة :

بعد زرع عينات الادرار التي تم الحصول عليها من اصابات المسالك البولية على وسط اكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلتين بهيئة مستعمرات كبيرة ناعمة مسطحة حافاتها كاملة بينما ظهرت المستعمرات على وسط الماكونكي وردية اللون (مخمرة للاكتوز) ومخاطية ، أما مجهريا فكانت بهيئة خلايا عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام ، ان هذه الصفات الزرعية والمجهريّة تشير الى ان العزلة هي *E.aerogenes* الجدول 2-4 (Tille , 2014).

2-4-1-4 : الفحوصات الكيموحيوية :

أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 2-4 ان بكتريا *Enterobacter aerogenes* كانت لاهوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز فيما أعطت نتيجة موجبة في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم.

5-1-4 - تشخيص بكتريا *P. mirabilis*

1-5-1-4 : الصفات الزرعية والمجهريّة

بعد زرع عينات الادرار التي تم الحصول عليها من اصابات المسالك البولية على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على 6 عزلة ذات مستعمرات رمادية يتميز نموها بكونه *Swarming* يُغطي سطح الطبق ويكون النمو بشكل امواج (Waves) وتحول اكار الدم الى اللون البني كما أن لها رائحة كريهة (Foul smell) اما على وسط الماكونكي فقد كانت المستعمرات شاحبة وذات حافات غير منتظمة , واوضح الفحص المجهرى أن العزلات كانت بهيئة

عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهريّة تشير الى ان العزلات البكتيرية هي *P. mirabilis* (Markey et al., 2013) (الجدول 2-4) .

2-5-1-4 الفحوصات الكيموحيوية :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول ان بكتريا *P. mirabilis* كانت سالبة لصبغة كرام لأعطائها نتيجة موجبة في فحص هيدروكسيد البوتاسيوم وكانت لاهوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديزو بحسب ماهو موضح في الجدول 2-4.

6-1-4 : تشخيص بكتريا *Enterococcus faecalis*

1-6-1-4 الصفات الزرعية والمجهريّة :

بعد زرع عينات الادرار التي تم الحصول عليها من أصابات المسالك البولية على وسط أكار الدم وحصنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلتين بكتيريتين بهيئة مستعمرات ملساء صغيرة ذات لون أصفر شاحب أو أبيض ، فيما كانت مجهرياً بهيئة خلايا كروية بشكل أزواج موجبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية و المجهريّة تشير الى ان العزلتين البكتيريتين هي *E. faecalis* (Tille , 2014) (الجدول 2-4) .

2-6-1-4 الفحوصات الكيموحيوية :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 2-4 ان بكتريا *E. faecalis* كانت موجبة لصبغة كرام لأعطائها نتيجة موجبة في فحص هيدروكسيد البوتاسيوم كما كانت لاهوائية اختيارية سالبة لفحص الكاتليز وموجبة لفحص الأوكسيديزو.

7-1-4: تشخيص بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus*

الصفات الزرعية والمجهريّة :

بعد زرع عينات الادرار التي تم الحصول عليها من مرضى الفشل الكلوي والمسالك البولية على وسط اكار الدم وحصنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على مستعمرات دائرية كبيرة ومحدبة وبراقة وذات لون أصفر ذهبي ، ولم تتمكن من النمو على اغلب تركيبات وسط الماكونكي ، من ناحية اخرى ظهرت بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococci* من خلال الفحص المجهري بشكل خلايا موجبة لصبغة كرام ذات شكل كروي (Spherical cells) متجمعة بشكل عنقيد (Clusters) مما يدل على ان البكتريا تعود لجنس *Staphylococcus* .

2-4: اختبار حساسية عزلات بكتريا *E.coli* المسببة لأصابات الفشل الكلوي والتهابات المسالك البولية للمضادات الحيوية

أستخدم نظام الفايترك لتحديد حساسية عزلات بكتريا *E.coli* تجاه عدد من المضادات الحيوية وقيست حساسية العزلات البكتيرية للمضادات بأستعمال التركيز المثبط الأدنى (Minimum inhibitory concentration, MIC) للمضاد .

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *E . coli* تجاه عدد من المضادات الحيوية اشتملت على Ticarcillin(TC) و Ticarcillin–Clavulanic acid (TCC) و Piperacillin(PIP) و Piperacillin - Tazobactam (TZP) و Ceftazidime (CAZ) و Cefepime (CEF) و Imipenem(IPM) و Aztreonam (ATM) و Meropenem(MEM) و Amikacin(AK) و Gentamicin(GEN) و Tobramycin(TOB) و Ciprofloxacin(CIP) و Minocyclin(MIN) و Trimethoprim- Sulfamethoxazole(STX) .

واظهرت النتائج الموضحة في الشكل 2-4 ان عزلات بكتريا *E . coli* كانت حساسة للمضاد Imipenem بنسبة بلغت 100 % وبنسبة 95.4% للمضاد Amikacin وبنسبة 72.7% للمضادات Gentamicin و Cefepime, بينما كانت العزلات مقاومة بنسبة 90.9% لمضادات Ticarcillin و Piperacillin وبنسبة 63.6% للمضاد Sulfamethoxazole وبنسبة 50 % للمضادات Ticarcillin–Clavulanic acid و Aztreonam و Tobramycin .

تتفق نتائج الدراسة الحالية في جزء منها مع ما حصل عليه Al-jebouri & Al-alwani (2015) إذ أن بكتريا *E.coli* كانت حساسة بنسبة 100% للمضادين imipenem و amikacin وبنسبة (59 و 82) % للمضادين gentamicin و Tobramycin ، على التوالي .

وفي دراسة اخرى اجريت في الهند قام بها Nerurkar *et al*, (2012) اتضح ان بكتيريا *E.coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية كانت حساسة للمضادين amikacin و gentamicin بنسبة (82.2 و 80.4) % , على التوالي .

اظهرت دراسة اخرى قام بها Jafri *et al* (2014) ان البكتيريا المعزولة من عينات ادرار المرضى المصابين كانت مقاومة للمضاد الحيوي Gentamicin بنسبة 70 % والمضاد

Amikacin بنسبة 55 % وهذه الدراسة لاتتفق مع الدراسة الحالية , في حين بلغت حساسيتها للمضاد imipenem 67.5%.

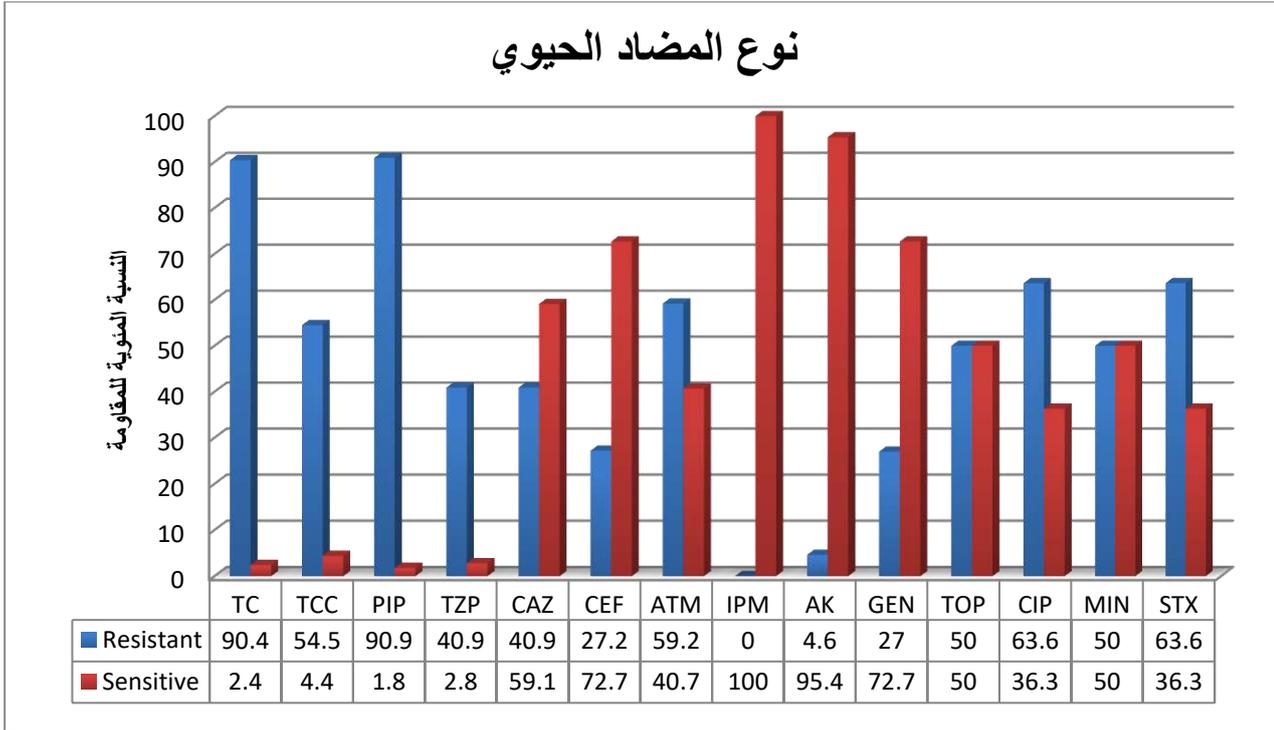
تتنمي مضادات Tobramycin و Gentamicin و Amikacin الى مجموعة Amimoglycosides وتقاوم البكتريا هذه المضادات من خلال عدة آليات تتضمن : الأولى : تثبيط المضاد من خلال أنزيم يعمل على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل مجموعة فعالة (Functional group) للمضاد مثل مجاميع acyl و ribosyl و phosphoryl او Thiol عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل انزيم Nucleotide transferase والثانية : تتمثل بتحويل الهدف للمضاد الحيوي بواسطة عملية Methylation على الحامض النووي 16S rRNA , والثالثة : تقليل نفاذية جدار البكتريا للمضادات الحيوية وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية (Kumar and Varela , 2013).

تُصنف مضادات TCC و CAZ و ATM ضمن مجموعة β -lactams ، ويمكن ان تتحقق مقاومة البكتريا لهذه المضادات بثلاث آليات الأولى تتمثل بافراز انزيمات β -Lactamases التي تعمل على تحلل حلقة البيتا لاكتام الموجودة في المضاد والثانية تقليل نفاذية البكتريا للمضادات وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية اما الثالثة فتعتمد على تغيير الهدف المحدد للمضاد الموجود في الخلية مما يتعذر على المضاد الارتباط بالهدف المرسوم له (Kumar and Varela , 2013).

يعود مضاد Ciprofloxacin لمجموعة Fluoroquinolones وتتمكن البكتريا من مقاومته من خلال تقليل نفاذية جدار البكتريا لمضادات الحيوية ، وبالتالي عدم قتل البكتريا (Kumar and Varela , 2013).

اوضحت النتائج ان عزلات بكتيريا *E.coli* كانت حساسة للمضاد imipenem بنسبة 100 % اذ يصنف هذا المضاد ضمن مجموعة carbapenem وهي صنف من مضادات البيتا لاكتام وتتلخص الية عمله بأنه يسبب تحلل الخلايا البكتيرية الحساسة له عبر ميلها العالي للارتباط بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين (Penicillin binding protein ,PBPs) (Zhanel et al.,1998).

ومن جهة اخرى تتمكن الاحياء المجهرية من مقاومة مضادات carbapenem عبر عدد من الاليات منها انتاج انزيمات Oxacillinase المحللة لحلقة البيتا لاكتام (Turton et al., 2006) او عن طريق فقدان احد بروتينات الغشاء الخارجي التي يمر من خلالها المضاد المعروف ببروتين (Mussi et al., 2005) Caro.



الشكل 4-2 : النسب المئوية لمقاومة بكتيريا *E. coli* للمضادات الحيوية

4-3- الكشف الجزيئي لبكتيريا *E. coli* :

يحق تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction , PCR) تشخيصاً سريعاً للعزلات البكتيرية إذ يستخدم هذا التفاعل اختباراً تأكيدياً بعد تشخيص البكتيريا بالطرائق الكيموحيوية وحالياً يلعب هذا التفاعل دوراً مهماً في الدراسات السريرية للأحياء المجهرية إذ يمكن بواسطته تشخيص هذه الأحياء وجيناتها (Jonas et al., 2009 ; Amghalia et al., 2002).

تتميز تقنية PCR بكونها سريعة و ذات حساسية (Sensitivity) و تخصص (Specificity) عاليين على الرغم من أنها مكلفة (Expensive) (Clifford et al., 2012) أذ استخدمت تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود جين *phoA* في بكتيريا *E. coli* . تم استخلاص DNA من البكتيريا قيد الدراسة باستخدام العدة (kit) وأوضحت النتائج إمكانية استخلاص DNA من البكتيريا *E. coli* بنجاح .

توضح الاشكال 3-4 و 4-4 والجدول 3-4 الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي يتبين من خلالها أن البادئ (primer) الخاص بالجين *phoA* كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين بنسبة 100% من خلال ظهور ناتج حجمه 903 bp لذا يمكن استخدام هذا الجين في تشخيص بكتيريا *E. coli* .

أستخدمت العديد من الدراسات جين *phoA* كونه يعد جيناً تشخيصياً لبكتيريا *E. coli* بعد ان ثبت كونه دليلاً عاماً (Universal marker) يمتاز بثباته وفائدته في تشخيص هذه البكتيريا (Thong et al ., 2011).

في دراسة اجريت في مصر في جامعة المنصورة قام (Younis et al (2017) بتشخيص 32 (%16) عزلة من بكتيريا *E. coli* بأستخدام جين *phoA* . وفي دراسة اخرى اجريت في الهند قام (Athira et al (2018) بالكشف الجزيئي عن بكتيريا *E. coli* بأستخدام هذا الجين ايضاً . و في تركيا اتضح وجود هذا الجين في 56 عزلة في دراسة قام بها (Telli et al (2022) .

2-3-4 : الكشف الجزيئي عن جين الهيمولايسين *hly A*

تمتلك بكتيريا *E. coli* القابلية على اكتساب العديد من الجينات المشفرة لعوامل الضراوة وتعرف هذه الجينات بجينات الضراوة (Virulence genes) التي تمنحها القابلية على احداث العديد من الامراض مثل الاسهال و اخماج المسالك البولية و تسمم الدم واخماج السحايا (Janka et al , 2003) .

اظهرت نتائج الكشف الجزيئي عن جين الهيمولايسين *hly A* ان 11 (%50) عزلة بكتيرية تمتلك هذا الجين اذ ان البادئ المستخدم كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين عبر ظهور ناتج حجمه 1177 bp كما هو موضح في الاشكال 4-5 و 4-6 و 4-7 . والجدول 3-4.

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما توصل اليه (Karimian et al (2012) في دراسة اجريت في طهران اذ تبين وجود هذا الجين بنسبة 47 % في عزلات بكتيريا *E. coli* المدروسة . واظهرت دراسة أخرى قام بها (López-Banda et al (2014) وجود هذا الجين بنسبة قليلة بلغت 7.4 % . وفي دراسة عربية في تونس بلغت نسبة تواجد هذا الجين 19 % عبر وجوده في 17 عزلة من اصل 90 (Tarchouna et al ., 2013).

تساعد السموم العامل الممرض على البقاء على قيد الحياة في المضيف عن طريق قتل الخلايا المناعية ومساعدة العامل الممرض على الوصول إلى العناصر الغذائية داخل الخلية المضيفة ، والسماح للممرض بالانتشار في الأنسجة العميقة لإحداث التهابات شديدة (Zhao et al., 2009).

3-3-4: الكشف الجزيئي عن الجين *fim H*

يشفر جين *fim H* الى اهلاب النوع الاول والتي تعد من عوامل الضراوة التي تساعد الخلايا البكتيرية على الالتصاق بالخلايا المبطنة للجزء السفلي من الجهاز البولي ، وتوجد اهلاب النوع الاول في العديد من أنواع البكتريا الاخرى التابعة للعائلة المعوية (Bien et al .,2012) وهذا النوع من الجينات يلعب دورا مهما في الاصابة البكتيرية ويعزز ضراوة بكتيريا *E.coli* .

اظهرت نتائج الكشف الجزيئي عن الجين *fim H* ان 12(54%) عزلة من عزلات بكتريا *E.coli* تمتلك هذا الجين عبر ظهور ناتج PCR حجمه 559 bp بعد مقارنته بالدليل الحجمي . كما موضح بالاشكال 8-4 و 9-4 و 10-4 والجدول 3-4 .

لا تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما توصل اليه Zhao et al (2009) إذ بلغت نسبة وجود هذا الجين 92% في العزلات المدروسة . كما لا تتفق ايضاً مع ما وجدته Tarchouna et al (2013) إذ تبين وجود هذا الجين بنسبة 68% في عزلات بكتريا *E.coli* في دراسة شملت التحري عن عدد من جينات عوامل الضراوة الخاصة في هذه البكتريا الممرضة للمسالك البولية .

وفي دراسة أخرى أجريت في الصين عام 2021 بلغت نسبة تواجد هذا الجين 64.1 % (Wang et al .,2021) .

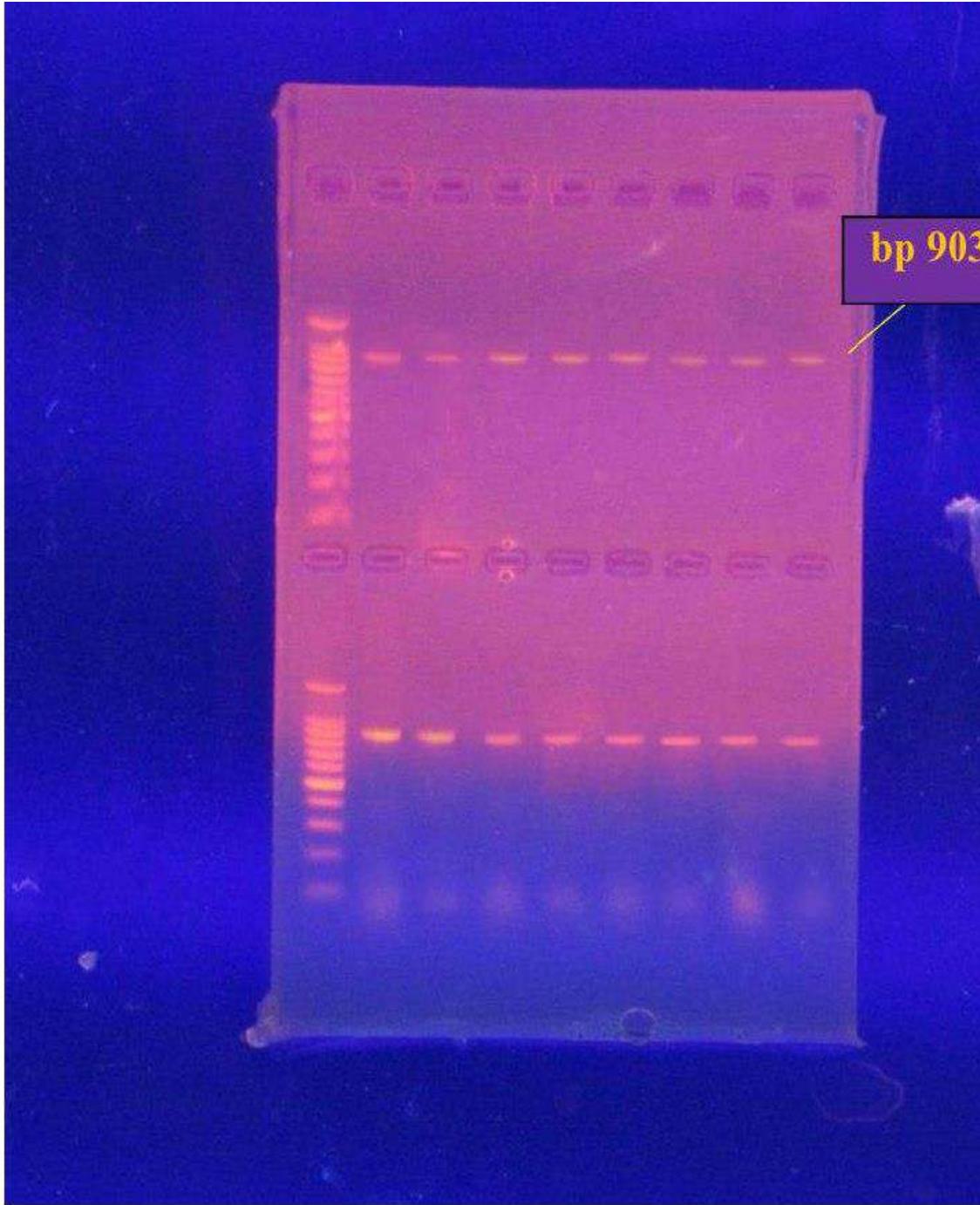
4-3-4: الكشف الجزيئي عن الجين *ctx-M*

تنتج بعض انواع البكتريا انزيمات مسؤولة عن مقاومة العديد من المضادات الحيوية الحاوية على حلقة البيتا لاكتام والتي يتصدرها البنسلين وان الانزيمات التي يشفر عنها بواسطة الجين *ctx-M* تكون اكثر فعالية ضد المضادين cefotaxime ,ceftriaxone بالمقارنة مع المضاد cefazidime (Edelstein et al .,2003).

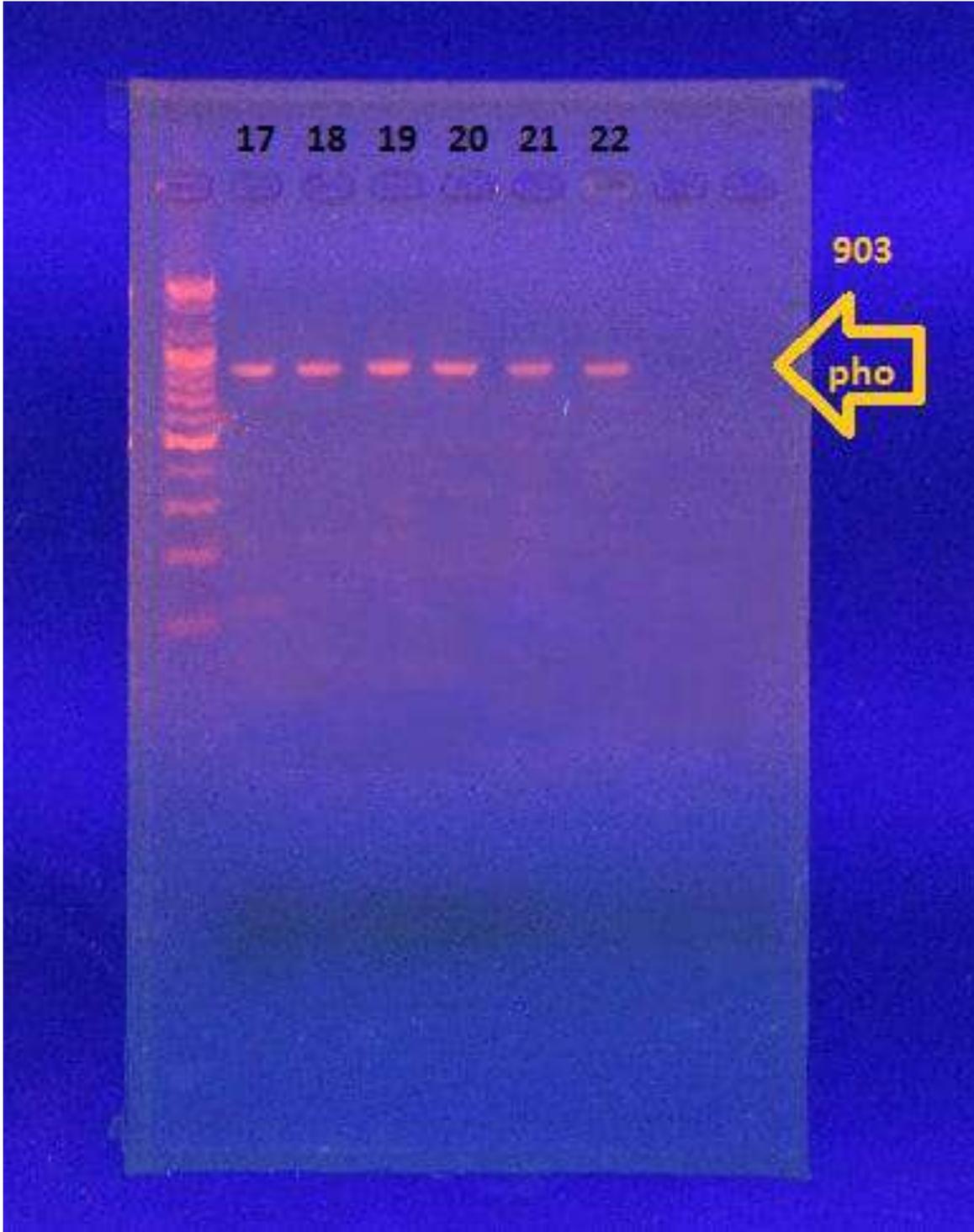
اظهرت نتائج الكشف الجزيئي عن الجين *ctx-M* ان البادئ الخاص بهذا الجين كان ناجحا في تضخيم الجين عبر ظهور ناتج PCR حجمه (550bp) في 7 (31.81%) عزلة من عزلات بكتريا *E.coli* المعزولة في هذه الدراسة كما موضح بالاشكال 11-4 و 12-4 والجدول 3-4 .

في دراسة اجريت في الاردن Nimri and Azaizeh (2012) بلغت نسبة تواجد هذا الجين 50.3% اي (83) عزلة من اصل 165 عزلة من عزلات بكتريا *E.coli* وفي دراسة اخرى

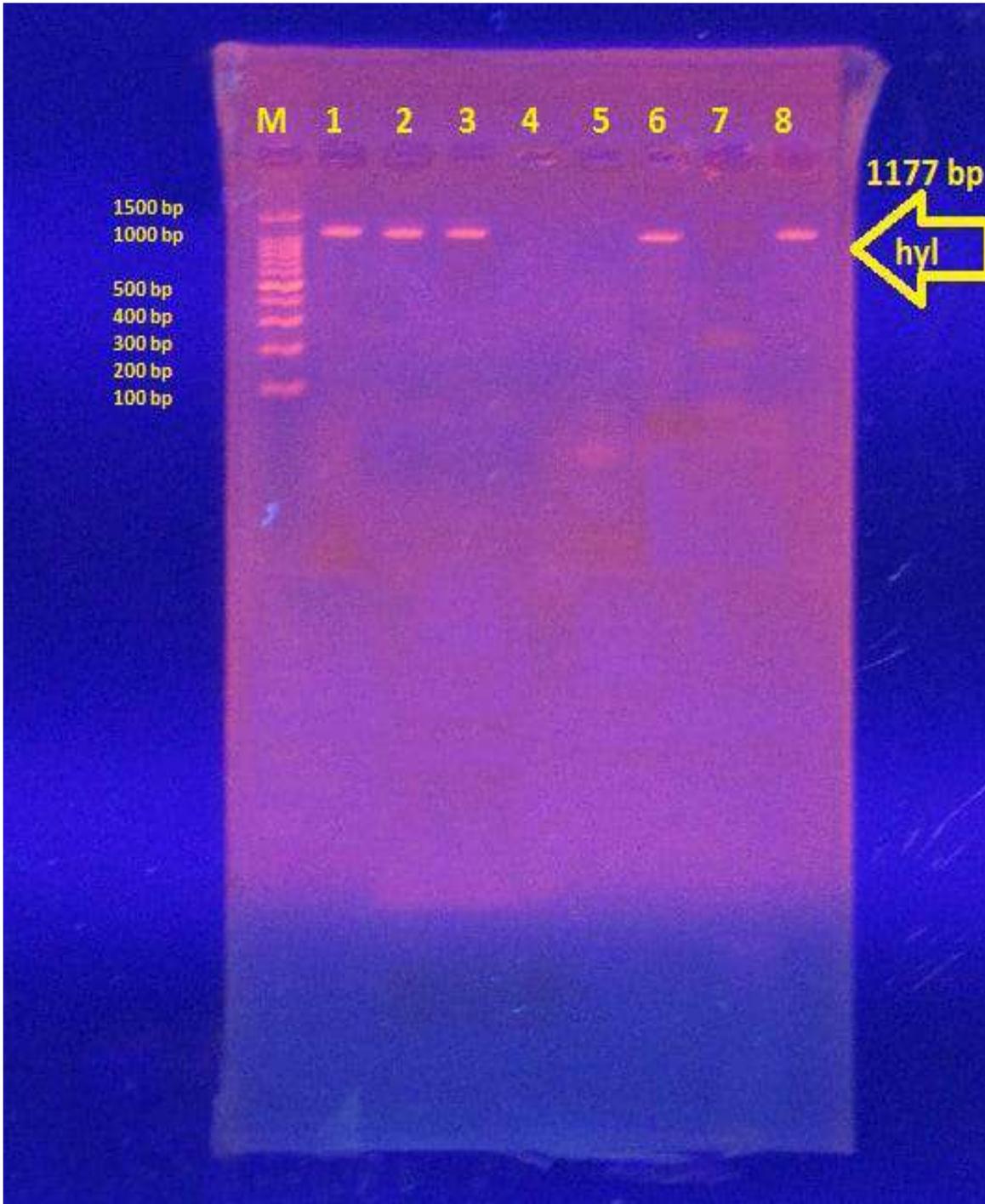
اجريت في السعودية عام 2010 تم الكشف عن جين *ctx-M* حيث تبين ان (76%) 64 عزلة من اصل 84 عزلة تحمل هذا الجين (Bindayna *et al.*, 2010).



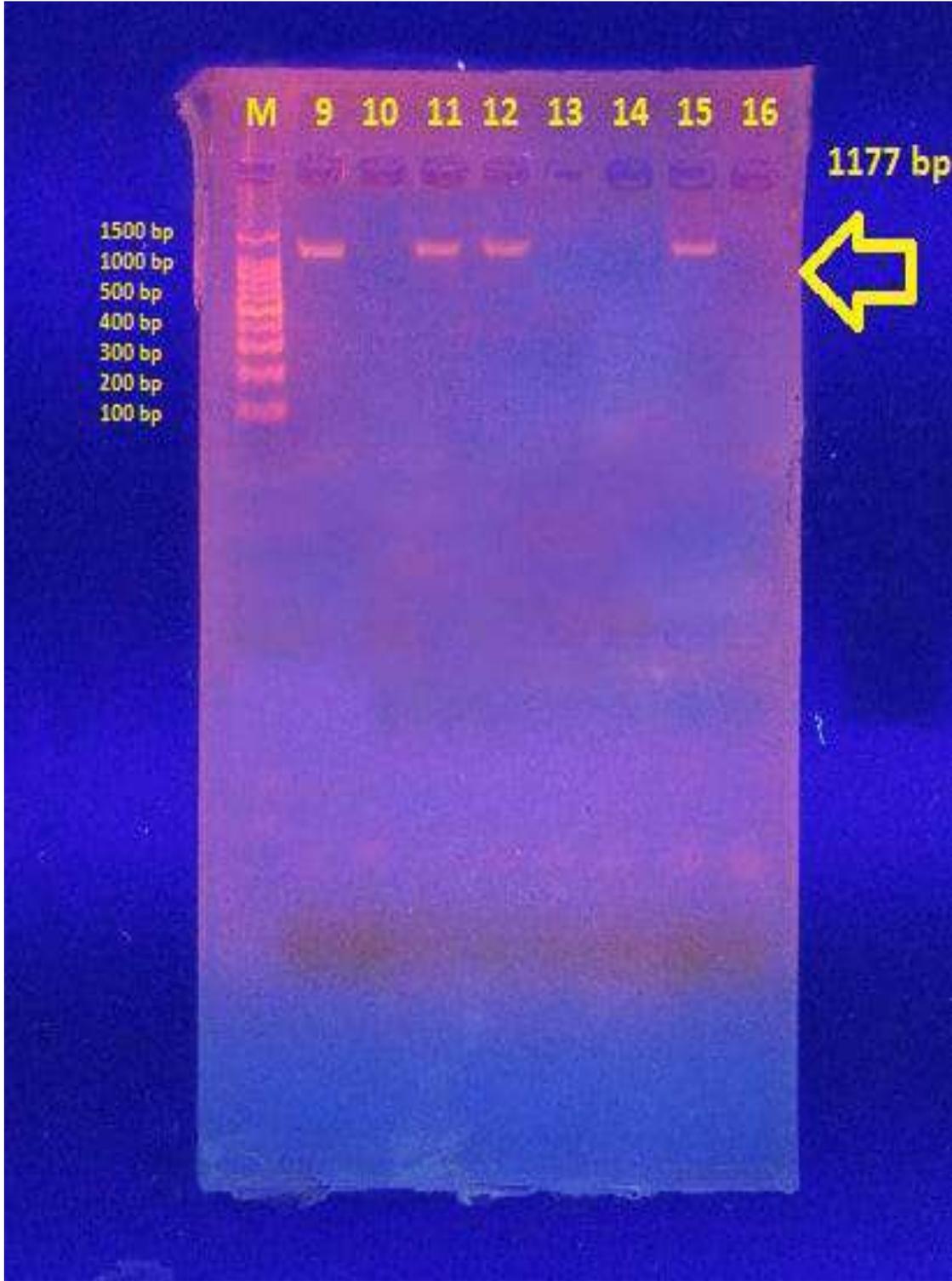
الشكل 3-4 : الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا (16-1) *E. coli* بأستعمال بادئ الجين *Pho A* (903bp) , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة .



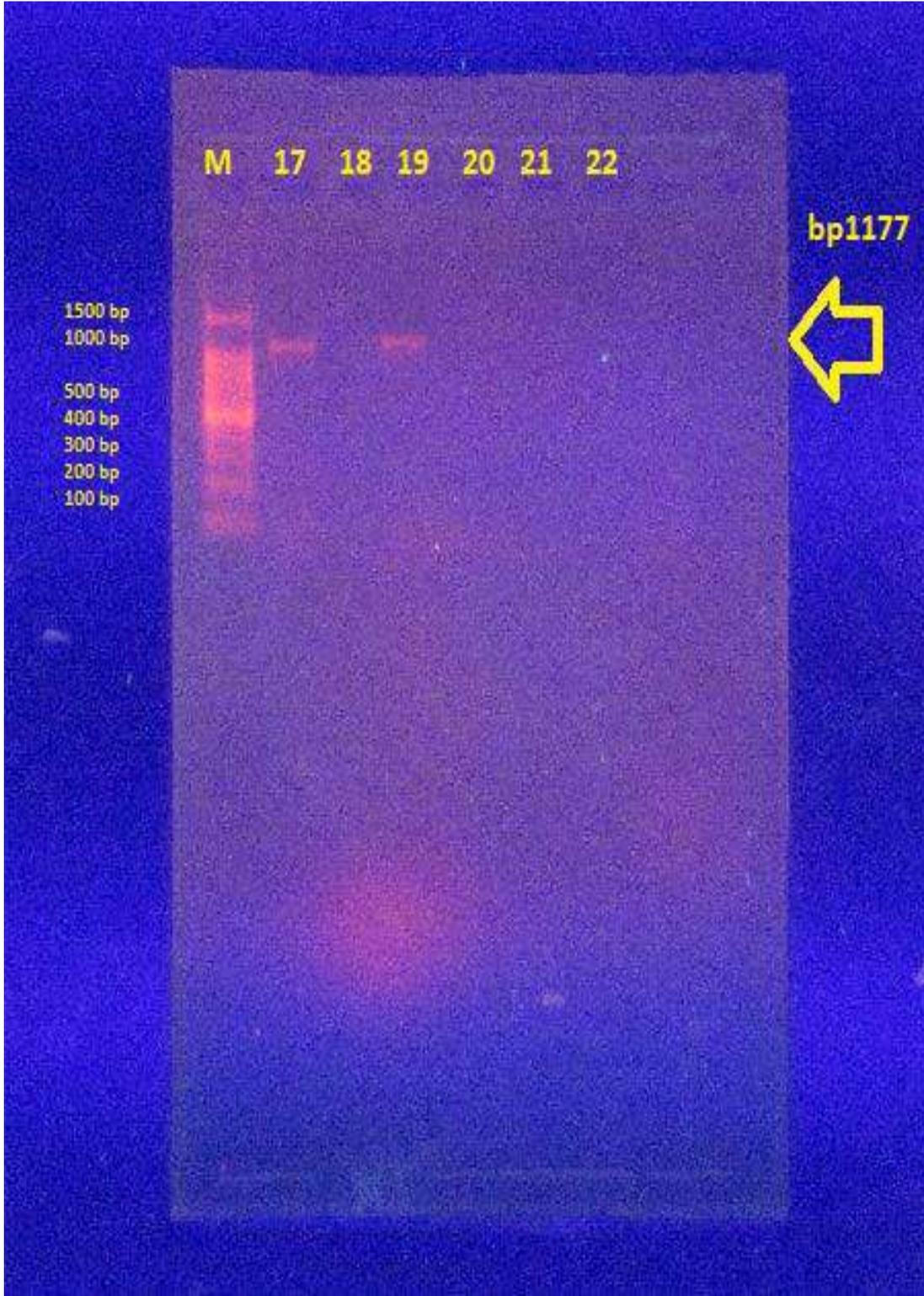
الشكل 4-4: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E. coli* (17-22) بأستعمال بادئ الجين *Pho A* 903bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة



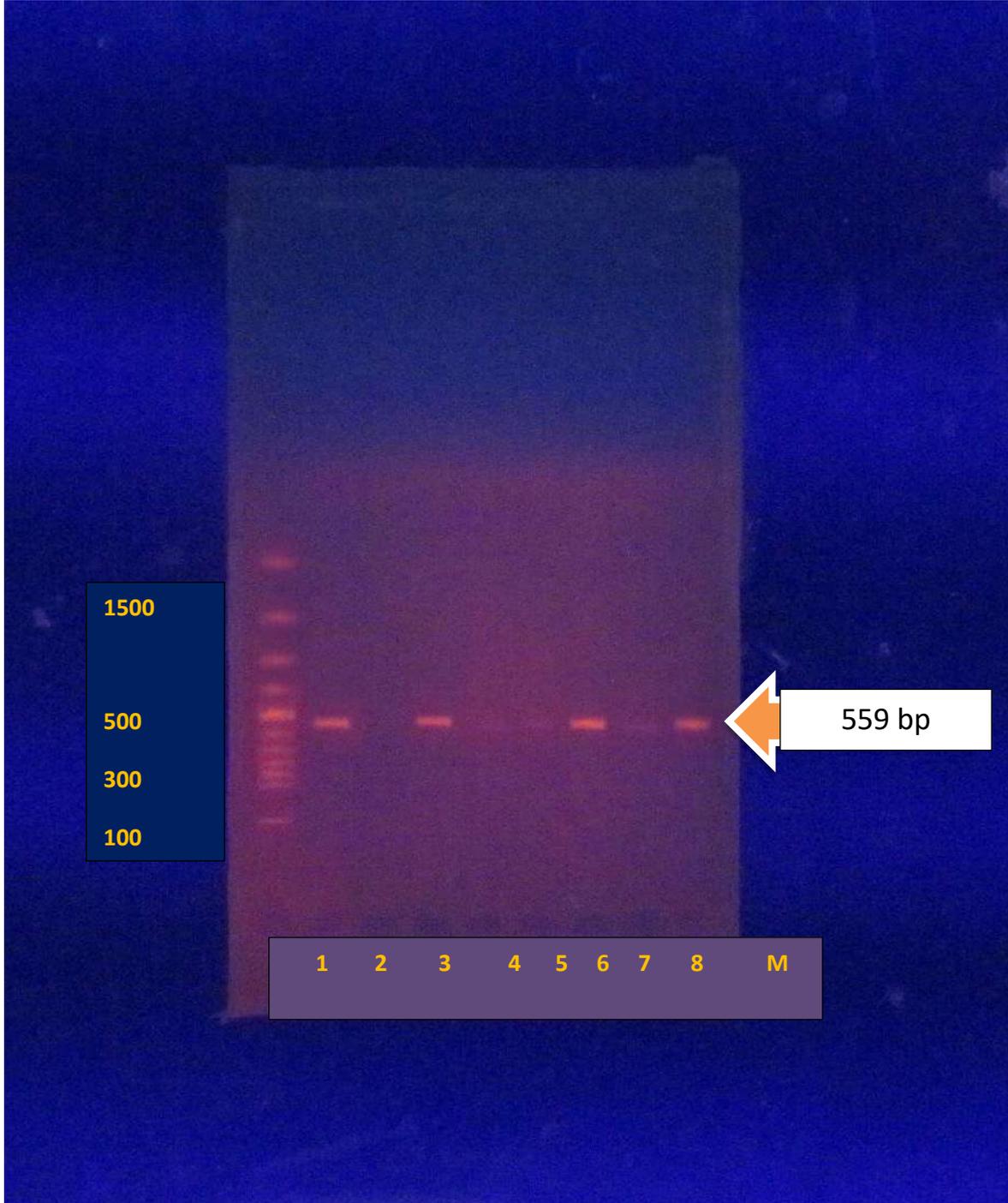
الشكل 4-5: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E. coli* (8-1) بأستعمال بادئ الجين *hly A* 1177bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



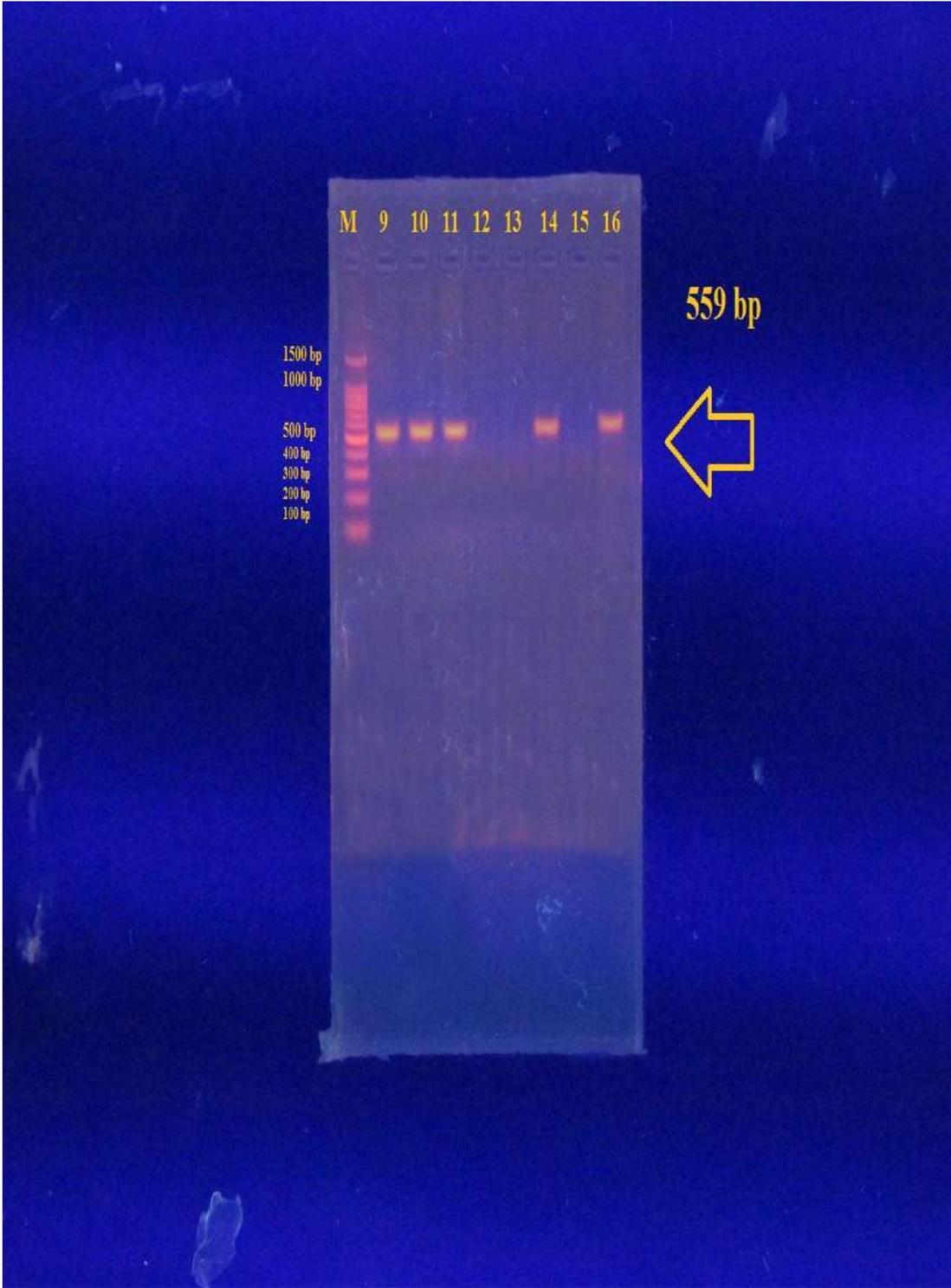
الشكل 4-6 : الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E. coli* (9-16) بأستعمال بادئ الجين *hly A* 1177bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



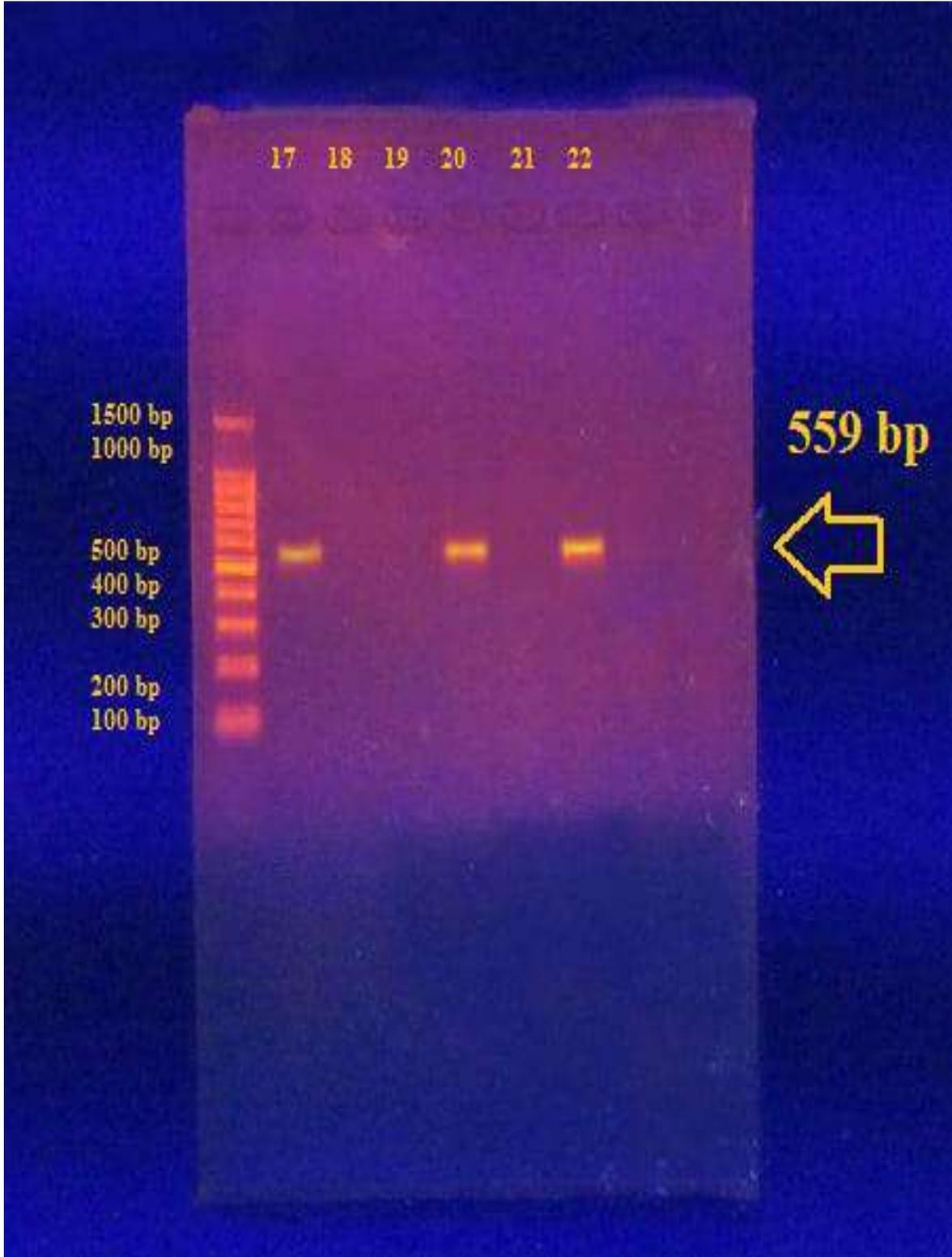
الشكل 4-7: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E. coli* (17-22) بأستعمال بادئ الجين *hly A* 1177bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



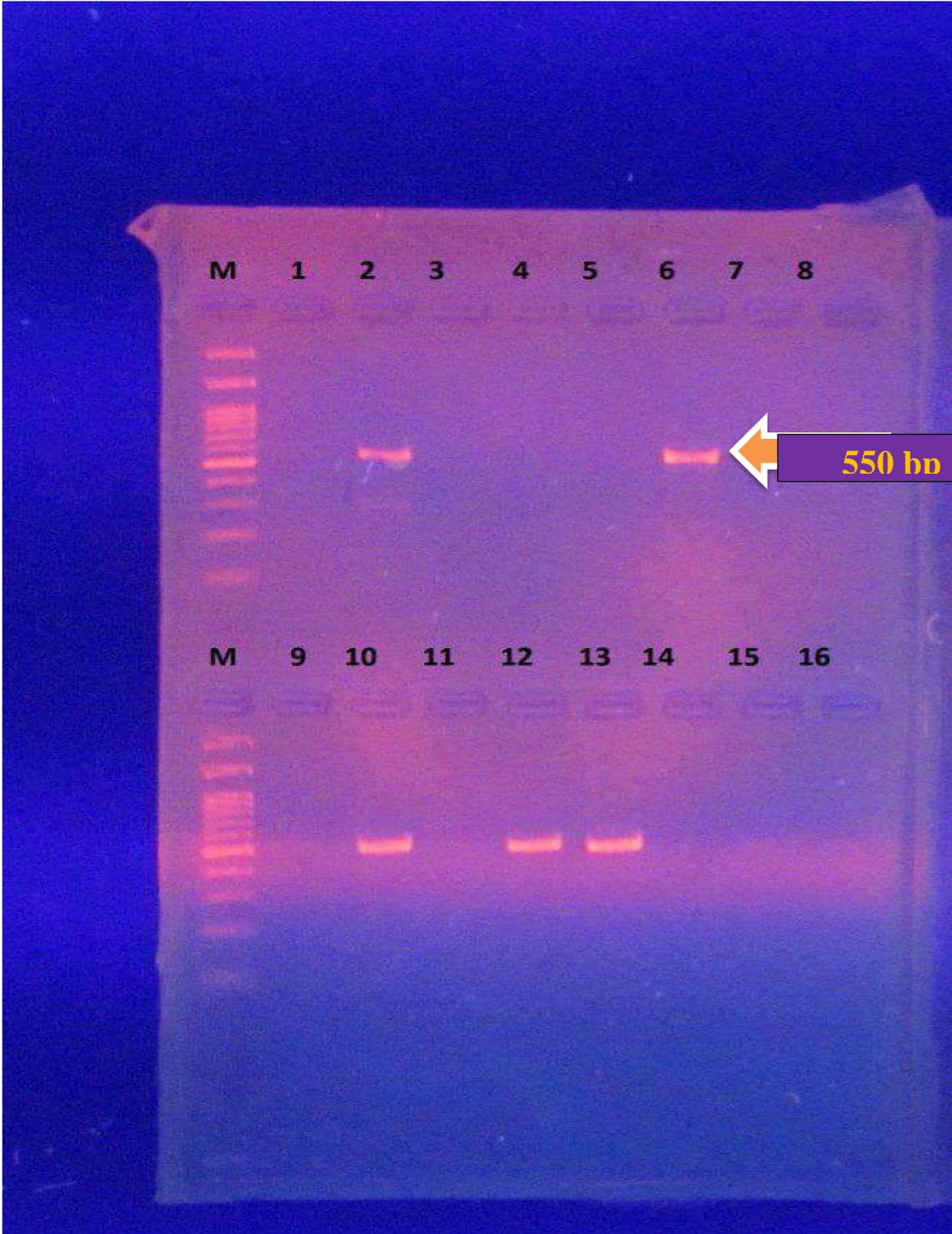
الشكل 8-4 : الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E.coli* (8-1) بأستعمال بادئ الجين *fim H* 559bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



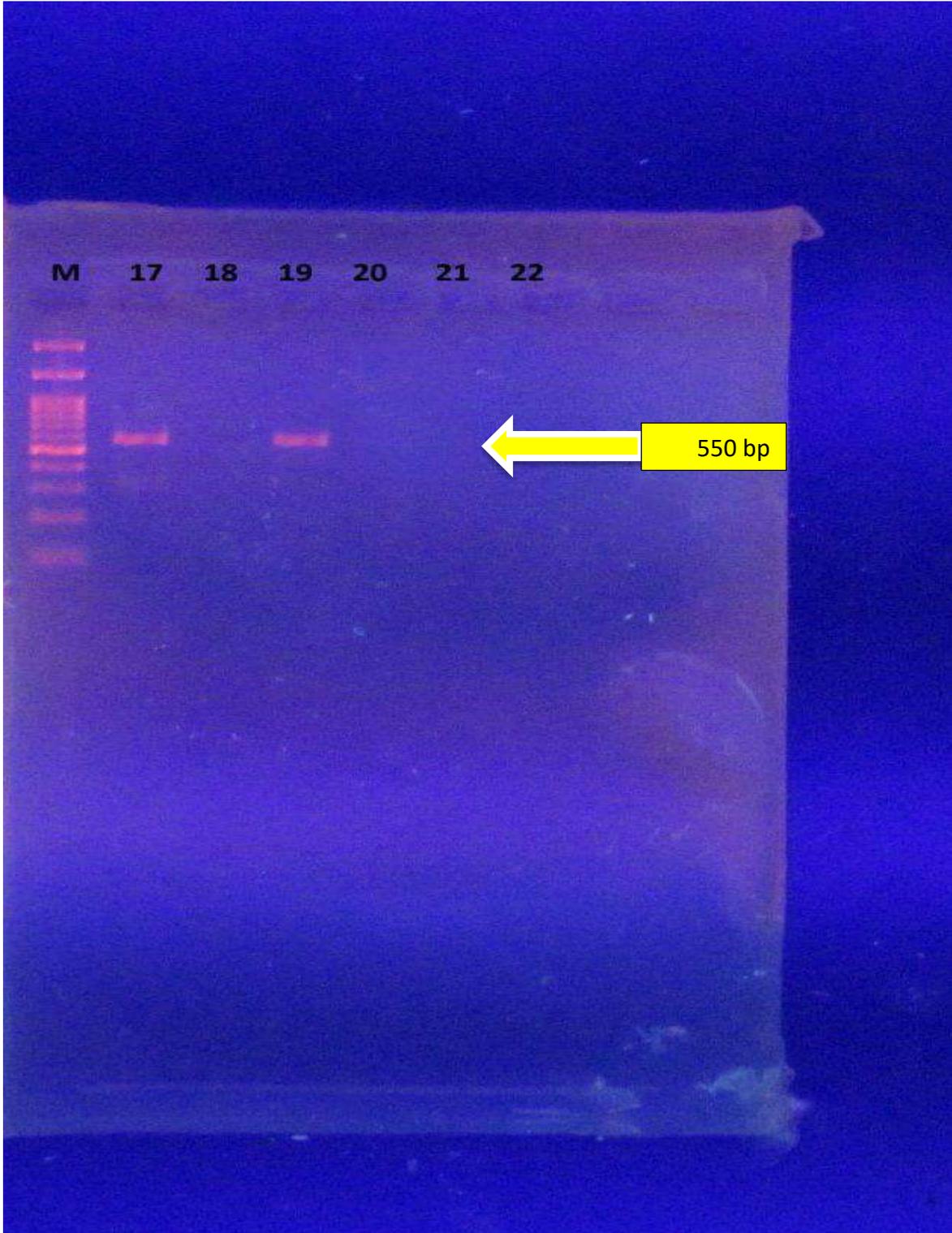
الشكل 4-9: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E.coli* (9-16) بأستعمال بادئ الجين *fim H* 559bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 4-10 : الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E. coli* (17-22) بأستعمال بادئ الجين *fim H* 559bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 4-11: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E. coli* (1-16) بأستعمال بادئ الجين *ctx-M* 550bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 4-12: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *E.coli* (16-22) بأستعمال بادئ الجين *ctx-M* 550bp , بتركيز هلام الاكاروز 1.5 % وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.

الجدول 3-4: توزيع الجينات المدروسة في بكتريا *E.coli* المعزولة في هذه الدراسة

<i>ctx-M</i>	<i>hly A</i>	<i>fim H</i>	<i>Pho-A</i>	رقم العزلة
-	+	+	+	1
+	+	-	+	2
-	+	+	+	3
-	-	-	+	4
-	-	-	+	5
+	+	+	+	6
-	-	-	+	7
-	+	+	+	8
-	+	+	+	9
+	-	+	+	10
-	+	+	+	11
+	+	-	+	12
+	-	-	+	13
-	+	+	+	14
-	+	-	+	15
-	-	+	+	16
+	+	+	+	17
-	-	-	+	18
+	+	-	+	19
-	-	+	+	20
-	-	-	+	21
-	-	+	+	22
% 31.81	%50	%54.54	%100	النسبة المئوية

4-4: الفحوصات المناعية

1-4-4: تقدير تركيز المستقبل المناعي الشبيه بالتول TLR4 عند مرضى الفشل

الكليوي

درس تركيز المستقبل المناعي الشبيه بالتول TLR₄ من جانبين هما : الفئة العمرية وكذلك نوع الإصابة المرضية ذات العلاقة بالفشل الكلوي .

يتضح من الجدول 4-4 أعلى تركيز للمستقبل المناعي بلغ 1.115 نانوغرام / مل في المصابين بالفشل الكلوي المصحوب بالتهاب المسالك البولية . وأكدت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p < 0.05$ لكل من الأشخاص الاصحاء ومرضى الفشل الكلوي المصحوب بالتهاب المسالك البولية فضلا عن المصابين بالتهاب المسالك البولية في حين لم تظهر مجموعة الفشل الكلوي أي فروقات معنوية .

يتواجد متعدد السكريد الدهني LPS في جدار بكتريا *E.coli* الممرضة للمسالك البولية لذا فإن تعبير المستقبل المناعي TLR₄ على خلايا الكلية ربما يساهم في بدء التمنيع ضد البكتريا خلال فترة الإصابة بها بالنظر الى أن وظيفة هذا المستقبل المناعي تتمثل في التعرف على الجزيئات الخارجية من مسببات الامراض (جزيئات النمط الجزيئي المرتبطة بالمرض, PAMPs) الموجودة في المسببات المرضية مثل LPS الموجود في بكتريا *E.coli* فضلاً عن التعرف على الجزيئات الداخلية التي تطلقها الانسجة المصابة والخلايا الميتة (Akira and Takeda, 2004; Patole et al ., 2005).

لقد اشارت العديد من الدراسات الى دور المستقبل TLR₄ في تمييز وجود الإصابة الميكروبية وتحقيق الاستجابة الالتهابية الأولية المضادة للجراثيم فضلاً عن دوره الفعال في عملية البلعمة لذا فإن الزيادة في مستوى TLR₄ يمكن ان تعد أحد المؤشرات المهمة والمحتملة للتمييز بين المرضى والاصحاء , كما أن ارتفاع معدل تركيز هذا المستقبل في مصل المرضى أثناء الإصابة يؤكد قابلية المستقبلات على تحفيز التفاعلات الالتهابية للمريض (Molteni et al ., 2016).

الجدول 4-4 : تركيز المستقبل المناعي الشبيه بالتول (TLR_4) في الفئات العمرية و مجاميع الفشل الكلوي قيد الدراسة

الفرق معنوي LSD	مستوى المعنوية P value	التهاب المسالك البولية	الفشل الكلوي + التهاب المسالك البولية	الفشل الكلوي	الاصحاء	الفئات العمرية
تركيز TLR_4 (ng/ml) المعدل \pm الانحراف القياسي						
0.326	* 0.047	0.212 \pm 0.506	0.382 \pm 0.733	0.251 \pm 0.576	0.196 \pm 0.301	40 – 20
NS	0.076	0.290 \pm 0.801	0.432 \pm 1.115	0.463 \pm 0.787	0.115 \pm 0.596	60 – 40
NS	0.360	0.106 \pm 0.599	0.295 \pm 0.629	0.039 \pm 0.606	0.105 \pm 0.462	70 – 60
		* 0.048	* 0.050	0.392	** 0.002	مستوى المعنوية P value
		0.247	0.423	NS	0.146	اقل فرق معنوي LSD

ومن جانب آخر تم في هذه الدراسة تصنيف المجاميع المدروسة الى ثلاث فئات عمرية، وبالرجوع الى نتائج الموضحة في الجدول 4-4 ايضاً يتضح أن الفئة العمرية المحصورة بين (40-59) سنة أظهرت أعلى استجابة مناعية اذ بلغ تركيز المستقبل المناعي TLR_4 1.115 نانوغرام/مل. وأكدت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية $p > 0.05$ في تركيز هذا المستقبل في الفئة العمرية المحصورة بين (20-39) سنة فيما لم تظهر الفئتين العمريتين المتبقيتين أي فروقات معنوية .

وتشير هذه النتائج الى الدور الاساس الذي تلعبه هذه المستقبلات في تنظيم الاستجابة المناعية الأولية دون أن تتأثر بشكل كبير بالعمر ،على الرغم من أن الفئات العمرية الأكبر تتعرض غالباً لحالة تعرف بالتحمل المناعي مع تقدم العمر والتي تؤثر على فعالية الجهاز المناعي بصورة مباشرة مع تقدم العمر (Boehmer et al .,2004 ; Chessa et al .,2014). ولم تشر سوى دراسات قليلة عن التعبير المنخفض للمستقبل المناعي TLR_4 على خلايا Monocytes في المرضى البالغين والأصابات المتكررة للمسالك البولية فيما أشارت دراسات عدة الى التعبير العالي للمستقبل المناعي المذكور على الخلايا نفسها في الأطفال (Karananou et al .,2016).

وأوضحت دراسة قام بها (Boehmer *et al* ., (2004) أن مستويات المستقبل TLR_4 لم تتغير مع تقدم العمر وذلك بمشاركة TLR_4 في تنشيط الساييتوكين الالتهابي المحفزة بمتعدد السكريد الدهني (LPS) وبالتالي قد يكون التعبير المتناقص لهذا المستقبل على سطح الخلية آلية مسؤولة عن التطور المرتبط بالعمر وانخفاض TNF وIL-6.

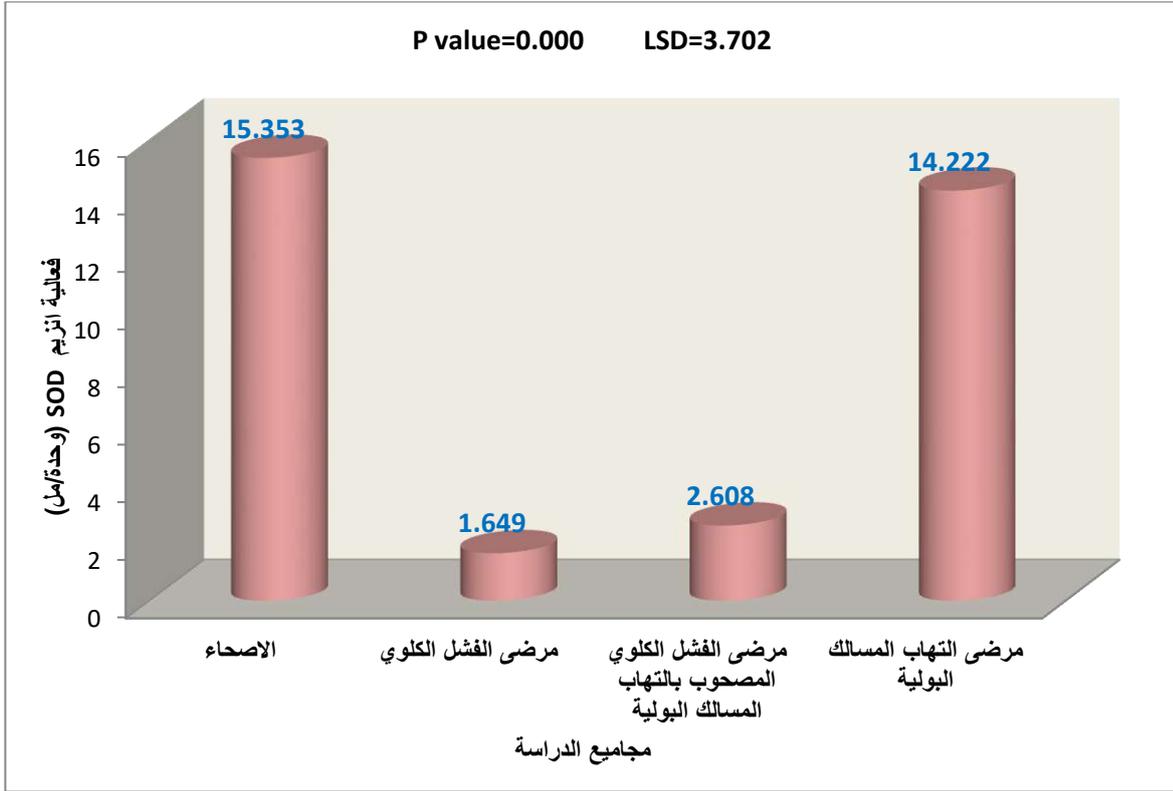
وأوضح (Panda *et al* , (2010) وجود علاقة واضحة بين العمر والنقص الحاصل في معدل الخلايا أحادية النواة والخلايا البلعمية مع حصول تغير في معدل أظهار المستقبلات السطحية TLR_s وبالتالي حصول ضعف في الاستجابة المناعية ، الشيء الذي يؤكد على ضعف المناعة عند كبار السن .

5-4: تقدير بعض المعايير الكيموحيوية المرافقة للفشل الكلوي

1-5-4: تقدير فعالية انزيم superoxide dismutase (SOD):

درست فعالية انزيم SOD في مرضى الفشل الكلوي ومرضى الفشل الكلوي ممن لديهم إصابات مسالك بولية فضلا عن المصابين بالتهابات المسالك البولية ومقارنتها بفعالية الانزيم لدى الأشخاص الاصحاء . ويتضح من الشكل 4-13 ان اعلى فعالية لانزيم SOD سجلت لدى الأشخاص الاصحاء والتي بلغت 15.353 وحدة /مل ,بينما سجلت فعالية مقاربة 14.222 وحدة / مل في الأشخاص المصابين بالتهابات المسالك البولية فيما سجلت اوطأ فعالية انزيمية لدى مرضى الفشل الكلوي والتي بلغت 1.649 وحدة / مل .

وقد جاءت نتائج التحليل الاحصائي تأكيداً للنتائج أعلاه إذ انخفضت فعالية انزيم SOD انخفاضاً معنوياً في مرضى كل من الفشل الكلوي ، الفشل الكلوي المصحوب بالتهاب المسالك البولية . إذ بلغت الفعالية الأنزيمية (1.649 و 2.608) وحدة / مل ، على التوالي ، بينما لم يلاحظ وجود أي فروقات معنوية في فعالية الأنزيم بين كل من الاصحاء ومرضى المسالك البولية . فيما لم تتحقق فروقات معنوية ايضاً بين كل من مرضى الفشل الكلوي ومرضى الفشل الكلوي المصحوب بالتهاب المسالك البولية .



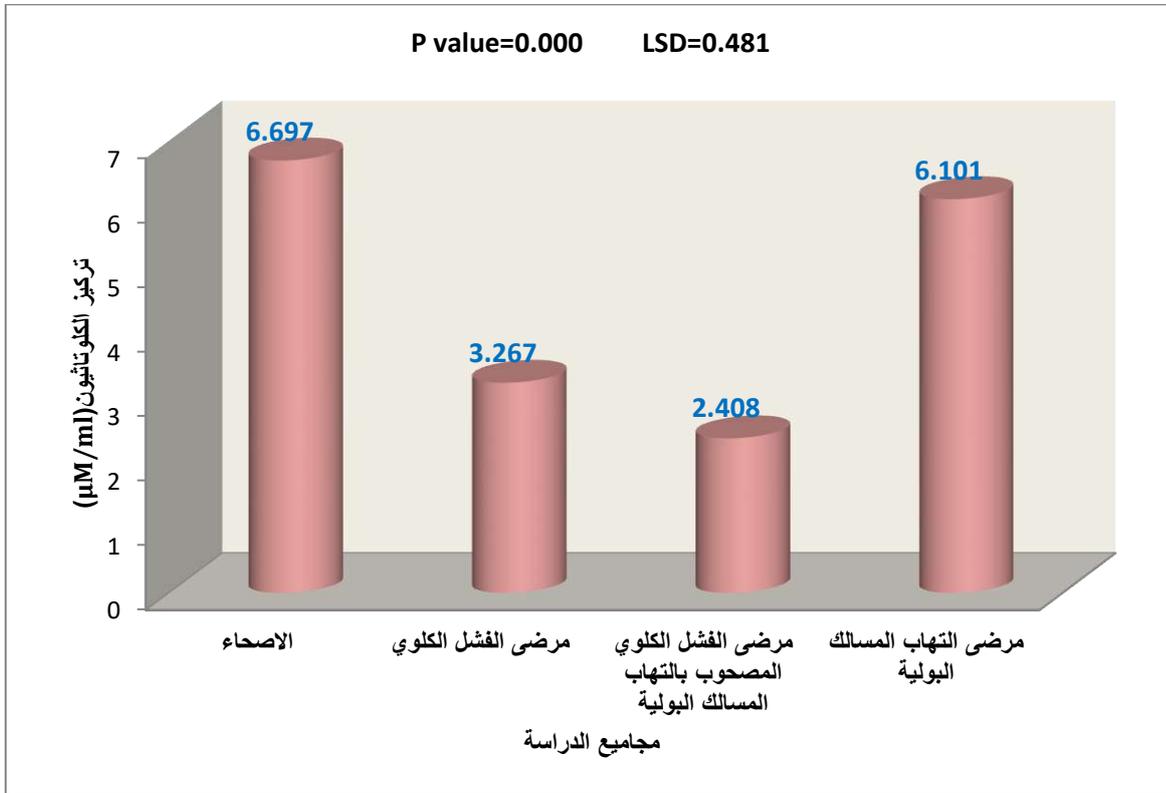
الشكل 4-13: فعالية انزيم SOD (وحدة / مل) في الاشخاص الاصحاء و مرضى الفشل الكلوي و مرضى التهاب المسالك البولية.

تعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة موافقة لما حصل عليه (Magalhães et al., 2011) إذ لوحظ انخفاض فعالية انزيم SOD في مرضى الفشل الكلوي 3533 وحدة / غم هيموغلوبين مقارنة بالاصحاء 4120 وحدة / غم هيموغلوبين ، وحصل (Tian et al., 2022) على النتيجة ذاتها إذ بلغت فعالية انزيم SOD في مرضى الفشل الكلوي 108.4 وحدة / مل مقارنة بالاصحاء (164.23 وحدة / مل) وفي دراسة ثالثة اتضح ان فعالية الانزيم في المرضى بلغت 1080 وحدة/غم هيموغلوبين بالمقارنة بالاصحاء (1307 وحدة /غم هيموغلوبين) . (Nouri et al .,1999).

ويمكن تفسير النتائج أعلاه الى ان بعض العوامل تلعب دورا مهما في تغيير فعالية انزيم SOD في المرضى تشتمل على نقص العناصر النادرة الضرورية لتنشيط فعالية الانزيم مثل الزنك (Zn) et (Magalhães al., 2011) ومن جانب اخر ، يمكن ان يعزى انخفاض فعالية الانزيم الى زيادة تركيز بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الناتج عن انخفاض فعالية انزيم Glutathione peroxidase (Nouri et al .,1999) . يلعب انزيم SOD دورا مهما في معادلة الزيادة في الجذور الحرة في العديد من الحالات المرضية (Rosa et al ., 2021).

2-5-4: تقدير تركيز الكلوتاثيون (Glutathione)

تم تقدير تركيز الكلوتاثيون في مرضى الفشل الكلوي ومرضى الفشل الكلوي ممن لديهم إصابات المسالك البولية فضلا عن المصابين بالتهابات المسالك البولية ومقارنتها بتركيز الكلوتاثيون لدى الأشخاص الاصحاء ويتضح من الشكل 4-14 ارتفاع تركيز هذا المركب في الاصحاء 6.697 مايكرومول /مل بينما بلغ تركيزه 6.101 مايكرومول / مل في المصابين بالتهابات المسالك البولية ، فيما بلغ اوطاً تركيز له 2.408 مايكرومول / مل في مرضى الفشل الكلوي ممن لديهم إصابات مسالك بولية .



الشكل 4-14: تركيز الكلوتاثيون في الاشخاص الاصحاء و مرضى الفشل الكلوي و مرضى التهاب المسالك البولية

أوضحت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين مجاميع الدراسة إذ انخفض تركيز الكلوتاثيون انخفاضاً معنوياً في المرضى مقارنة بالأصحاء ، كما يلاحظ انخفاض معنوي ايضاً في تركيز مضاد الاكسدة هذا في مرضى الفشل الكلوي بالمقارنة بمرضى المسالك البولية ، فضلاً عن الانخفاض المعنوي في تركيزه في مرضى الفشل الكلوي المصحوب بالتهاب المسالك البولية بالمقارنة مع مرضى الفشل الكلوي .

تتفق النتائج المتحصلة عليها من هذه الدراسة مع ما وجدته (Rico *et al* ., 2006) اذ انخفضت قيمة الكلوتاثيون الى 14.23 نانو مول /ملغم بروتين في مرضى الفشل الكلوي مقارنة بالأصحاء التي بلغت 26.19 نانو مول /ملغم بروتين.

يؤدي الكلوتاثيون وظائف فسيولوجية عدة تشمل على حماية الخلايا من التأثير المدمر لأنواع الاوكسجين الفعالة، وإزالة سمية بعض المواد مثل الادوية والملوثات البيئية، والمحافظة على ثباتية غشاء الخلية الحمراء، فضلا عن تعزيز الوظيفة المناعية عبر تأثيره في خلايا Lymphocytes (Julius *et al* ., 1994). يتواجد الكلوتاثيون بصورتين في الخلايا : الأولى الصورة المؤكسدة (GSSG) ذات السمية العالية لذا يقوم الكائن الحي بتحويلها الى الصورة الثانية (المختزلة، GSH) لذا فإن النسبة بين هاتين الصورتين مهمة لتحديد درجة الاجهاد التأكسدي في الخلية (Rico *et al* ., 2006).

الاستنتاجات

1- على الرغم من تنوع الأنواع البكتيرية المرافقة للفشل الكلوي إلا أن السيادة كانت لبكتريا

E.coli.

2- إمكانية استخدام تركيز المستقبل المناعي الشبيه بالتول TLR₄ كمؤشر للكشف عن

وجود بكتريا *E.coli* ومرافقتها لحالات الفشل الكلوي .

3- أغلب عزلات بكتريا *E.coli* المعزولة في هذه الدراسة كانت مقاومة للمضادات الحيوية

.MDR

4- تفاوت جينات بكتريا *E.coli* قيد الدراسة في مقاومتها للمضادات الحيوية .

التوصيات

1- التوسع في التوصيف الجزيئي لعوامل الضراوة لبكتريا *E.coli* كونها تمثل النوع البكتيري السائد المرافق للفشل الكلوي .

2- التحري عن دور بكتريا *Staphylococcus saprophyticus* في الإصابة بالفشل الكلوي بالنظر لكونها اكثر انواع البكتريا الموجبة لصبغة كرام المرافقة لهذا المرض .

3- تحديد جينات المقاومة للمضادات الحيوية التي تبديها بكتريا *E.coli* .

المصادر:

Ahumada-Santos, Y. P., Báez-Flores, M. E., Díaz-Camacho, S. P., de Jesús Uribe-Beltrán, M., Eslava-Campos, C. A., Parra-Unda, J. R., & Delgado-Vargas, F. (2020). Association of phylogenetic distribution and presence of integrons with multidrug resistance in *Escherichia coli* clinical isolates from children with diarrhoea. *Journal of Infection and Public Health*, 13(5), 767-772.

Agarwal, J., Srivastava, S., & Singh, M. (2012). Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian journal of medical microbiology*, 30(2), 141-149.

Akira, S.; Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) ,Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783–801.

Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, 4(7), 499-511.

AL-jebouri, M. M., & Al-Alwani, H. R. (2015). Antibiotic Resistance patient of bacterial type isolated from urine of Iraq patients with renal failure. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(4), 217-233.

Alteri, C. J. & Mobley, H. L. (2007). Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infection and immunity*, 75(6), 2679-2688.

Amghalia, E., Al-Haj, N. A., Shamsudin, M. N., Radu, S., Rosli, R., Neela, V., & Rahim, R. A. (2009). Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolated from Malaysian hospitals. *Research Journal of Biological Sciences*, 4(4), 444-448.

Anderberg, S. B.; Luther, T., & Frithiof, R. (2017). Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiologica*, 219(3), 575-590.

Athira, S., Priya, P. M., Sheikh Moin Ahmad, R. B., & Mini, M. (2018). Standardisation of multiplex PCR for simultaneous detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in ducks.

Aziz M.A., Ghanim H.M., Diab KS and Al-Tamimi RJ.(2016) The association of oxidant-antioxidant status in patients with chronic renal failure. *Renal Failure.*;38(1):20-26

Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2022). *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. *Escherichia coli*.

Belvin, M. P., Anderson, K. V. (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 393-416.

Beutler, B.(2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nat. Cell Biol.* 2004, 430, 257–263. [CrossRef] [PubMed]

Beutler, E., & Kelly, B. M. (1963). The effect of sodium nitrite on red cell GSH. *Experientia*, 19(2), 96-97.

Bhakdi, S. U. C. H. A. R. I. T.; Mackman, N.; Nicaud, J. M., & Holland, I. B. (1986). *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infection and immunity*, 52(1), 63-69.

Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International journal of nephrology*, 2012.

Bindayna, K., Khanfar, H. S., Senok, A. C., & Botta, G. A. (2010). Predominance of CTX-M genotype among extended spectrum beta lactamase isolates in a tertiary hospital in Saudi Arabia. *Saudi Med J*, 31(8), 859-863.

Boehmer, E. D., Goral, J., Faunce, D. E., & Kovacs, E. J. (2004). Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *Journal of Leucocyte Biology*, 75(2), 342-349.

Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, 34, 100622.

Chen, M.; Jahnukainen, T.; Bao, W.; Daré, E.; Ceccatelli, S., & Celsi, G. (2003). Uropathogenic *Escherichia coli* toxins induce caspase-independent apoptosis in renal proximal tubular cells via ERK signaling. *American journal of nephrology*, 23(3), 140-151.

Chue CD; Townend J.N; Steeds RP, and Ferro CJ (2010). Arterial stiffness in chronic kidney disease: causes and consequences. *Heart* 96: 817–823.

Chessa, D., Spiga, L., De Riu, N., Delaconi, P., Mazzarello, V., Ganau, G., & Rubino, S. (2014). Lipopolysaccharides belonging to different *Salmonella serovars* are differentially capable of activating Toll-like receptor 4. *Infection and immunity*, 82(11), 4553-4562.

Clifford, R. J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D. V., Kwak, Y. I., ... & Mc Gann, P. (2012). Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PloS one*, 7(11), e48558.

Cohen J.(2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*;420:885-91.

Connell, H.; AGACE, W.; KLEMM, P. *et al.* - Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 93: 9827-9832, 1996.

Conway,B.; Phelan ,PJ and Stewart ,GD. (2022).Nephrology and Urology . In :Davidsons Principles and practice of medicine .24th Edition.

Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 52(794804), 4.

Döring M (2022) *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani & Chalmers, 1919. English Wikipedia - Species Pages. Wikimedia Foundation. Checklist dataset. DOI: 10.15468/c3kkgh. Available from: <https://www.gbif.org/species/113662963>.

Eberspächer, B., Hugo, F. E. R. D. I. N. A. N. D., & Bhakdi, S. U. C. H. A. R. I. T. (1989). Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. *Infection and Immunity*, 57(3), 983-988.

Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., & Strachounski, L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella*

pneumoniae in Russian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12), 3724-3732.

Elbing, K. L., & Brent, R. (2019). Recipes and tools for culture of *Escherichia coli*. *Current protocols in molecular biology*, 125(1), e83.

Emody, L.; Kerenyi, M., & Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents*, 22, 29-33.

Erjavec, M. S. (Ed.). (2023). *Escherichia coli: Old and New Insights*. BoD–Books on Demand.

Farhood, H. B.; Aljabery, R. N., & Majid, A. (2019). The study of oxidant-antioxidant status in type 2 diabetes mellitus. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1294, No. 5, p. 052037). IOP Publishing.

Farina, C.; Theil, D.; Semlinger, B.; Hohlfeld, R. & Meinl, E. 2004. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol* 16, 799–809.

Firoozeh, F., Saffari, M., Neamati, F., & Zibaei, M. (2014). Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. *International Journal of Infectious Diseases*, 29, 219-222.

Foxman, B. (2002). Epidemiology of Urinary Tract Infections: Incidence, Morbidity, and Economic Costs. *The American Journal of Medicine*, 113, 5-13.

Frankel, G., and Ron, E. Z. (2018). *Escherichia coli, a Versatile Pathogen*. Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-99664-6.

Garvey ,J.S.;Gemer,N.E.; and Sussdiof ,D.H.(1977).Method in immunology.p:517- 534.

- Gong, T.;** Liu, L.; Jiang, W. and Zhou, R.(2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 20, 95–112. [CrossRef] [PubMed]
- Greenwood, D. ;** Slack, R. ; Peutherer, J. and Barer, M. (2007). *Medical Microbiology*. 17th ed. Churchill Livingstone Elsevier. *Annu. Rev. Immunol.* 23 : 518 –552.
- Hart,T** and Shears, P.(2004).*Color Atlas of Medical Microbiology*. 2nd edn.Mosby,an imprint of Elsevier Limited
- Hayashi, F.,** Means, T.K. & Luster, A.D. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660–2669.
- Herwald, H.and** Egesten, A. (2017) Cells of Innate and Adaptive Immunity: A Matter of Class? *J. Innate Immunity*, 9, 109–110.
- Ifeanyi, O. E.** (2018). A review on free radicals and antioxidants. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci*, 4(2), 123-133.
- Jafri, S. A.;** Qasim, M.; Masoud, M. S.; Izhar, M., & Kazmi, S. (2014). Antibiotic resistance of *E. coli* isolates from urine samples of Urinary Tract Infection (UTI) patients in Pakistan. *Bioinformation*, 10(7), 419.
- Jager, K. J.,** Kovesdy, C., Langham, R., Rosenberg, M. Jha, V., & Zoccali, C. (2019). A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 34(11), 1803-1805.
- Jalali, H. R.,** Pourbakhsh, A., Fallah, F., & Eslami, G. (2015). Genotyping of virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* by PCR. *Novelty in Biomedicine*, 3(4), 177-181

Jalil, A. J. A. R.(2015). Some Microbial and Immunophysiological Parameter in Patients with Renal Failure.

Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M. A., & Karch, H. (2003). Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H⁻ and O157: H7: characterization and evolutionary considerations. *Infection and immunity*, 71(6), 3634-3638.

Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical microbiology reviews*, 4(1), 80-128.

Jonas, D.; Speck, M.; Daschner, F. D. and Grundmann, H. (2002). Rapid PCRbased identification of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1821-1823.

Julius, M.; Lang, C. A.; Gleiberman, L.; Harburg, E.; Difranceisco, W., & Schork, A. (1994). Glutathione and morbidity in a community-based sample of elderly. *Journal of Clinical Epidemiology*, 47(9), 1021-1026.

Karimian, A., Momtaz, H., & Madani, M. (2012). Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 6(39), 6811-6816.

Karananou, P., Fleva, A., Tramma, D., Alataki, A., Pavlitou-Tsiontsi, A., Emporiadou-Peticopoulou, M., & Papadopoulou-Alataki, E. (2016). Altered expression of TLR2 and TLR4 on peripheral CD14⁺ blood monocytes in children with urinary tract infection. *BioMed research international*, 2016.

Kallas, P., Haugen, H.J., Gadegaard, N., Stormonth-Darling, J., Hulander, M., Andersson, M., Valen, H. (2020). Adhesion of *Escherichia coli* to Nanostructured Surfaces and Role of Type 1 Fimbriae. *Nanomaterials*, 10: 2247 – 2259. DOI: 10.3390/nano10112247.

Katzung, B. G., & Furst, D. C. (2007). Non steroidal anti-inflammatory drugs. *Basic and clinical pharmacology. 10th ed. USA: Mc Graw Hill*, 591.

Köhler CD, Dobrindt U.(2011). What defines extra intestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*.;301:642-664

Kovesdy, C. P. (2022). Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney International Supplements*, 12(1), 7-11.

Kong, R. Y. C., So, C. L., Law, W. F., & Wu, R. S. S. (1999). A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic (ETEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) strains of *Escherichia coli*. *Marine Pollution Bulletin*, 38(12), 1207-1215.

Kumar, S., & Varela, M. F. (2013). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *chemotherapy*, 14, 522-534.

López-Banda, D. A., Carrillo-Casas, E. M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, Á. H., Arroyo-Escalante, S., ... & Hernández-Castro, R. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed research international* .

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.

Macffadin, J.F. (2000). Biochemical test for identification of medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins. U.S.A

Magalhães, R. N., de Araujo, C. G. B., de Sousa Lima, V. B., Neto, J. M. M., do Nascimento Nogueira, N., & do Nascimento Marreiro, D. (2011). Nutritional status of zinc and activity superoxide dismutase in chronic renal patients undergoing hemodialysis. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1456-1461.

Mahmoud, S. (2012). how to live a vegetarian, the first edition, the Arab Center for Publishing and Distribution, Egypt, Alexandria.

Manavalan B; Basith S; Choi S. (2011) Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol*;2:41.

Markey, B.; Leonard, F.; Archambault, M.; Cullinane, A. and Maguire, D. (2013). Clinical veterinary microbiology. 2nd ed. Mosby Elsevier.

Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474.

Mcclelland, M.; Florea, L.; Sanderson, K.; Clifton, S. W.; Parkhill, J.; Churcher, C., ... & Miller, W. (2000). Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, *Typhimurium*, *Typhi* and *Paratyphi*. *Nucleic acids research*, 28(24), 4974-4986.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A. J. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

- Mehrotra, M.;** Wang, G. and Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1032-1035.
- Medzhitov, R.** (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 135-145.
- Messai, Y.,** Benhassine T., Naim M., Paul, G., and Bakour, R. (2006). Prevalence of β -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 19 (2): 144-151.
- Mohamed, H. I.;** El-Shimy, A.; Omran, A.; Kamel, I., & El-Tair, E. (2018). Identification of different bacterial species isolated from infected renal stones and evaluation of its uricolytic activity. *Journal of Medicine in Scientific Research*, 1(1), 35.
- Molteni, M.;** Gemma, S., & Rossetti, C. (2016). The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. *Mediators of inflammation*, 2016.
- Morena, M.,** Delbosc, S., Dupuy, A. M., Canaud, B., & Cristol, J. P. (2005). Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodialysis international*, 9(1), 37-46.
- Moron, M. S.,** Depierre, J. W., & Mannervik, B. (1979). Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*, 582(1), 67-78.

- Mussi**, M. A., Limansky, A. S., & Viale, A. M. (2005). Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(4), 1432-1440.
- Naik** ,H.B.:(2017) Essentials of biochemistry 2end Edition .jaypee Brothers Medical publishers .New Delhi. India.
- Nair**, R.R., Vasse, M., Wielgoss, S., Sun, L., Yu, Y.N., Velicer, G.J. (2019). Bacterial predator-prey coevolution accelerates genome evolution and selects on virulence associated prey defenses. *Nature Communications*, 10, 4301.
- Nerurkar**, A.; Solanky, P., & Naik, S. S. (2012). Bacterial pathogens in urinary tract infection and antibiotic susceptibility pattern. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 21(21).
- Nimri**, L. F., & Azaizeh, B. A. (2012). First report of multidrug-resistant ESBL-producing urinary *Escherichia coli* in Jordan. *British Microbiology Research Journal*, 2(2), 71-81.
- Nouri**, M., Rahbani-Nobar, M., Argani, H., & Rokhforooz, F. (1999). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in hemodialyzed patients and renal transplant recipients and their relationship to osmotic fragility. *Med J Islam Academ Sci*, 12, 33-38.
- Ochman**, H., & Jones, I. B. (2000). Evolutionary dynamics of full genomecontent in *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, 19(24), 6637-6643.
- Oliveira**, R. V.; Oliveira, M. C. & Pelli, A. (2017). Disease infection by Enterobacteriaceae family in Fishes: a review. *J Microbiol Exp*, 4(5), 00128.

- Olowe**, B.; Oluyeye, J.; Famurewa, O.; Ogunniran, A. & Adelegan, O. (2017). Molecular identification of *Escherichia coli* and new emerging enteropathogen, *Escherichia fergusonii*, from drinking water sources in Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria. *J. Microbiol. Res*, 7, 45-54.
- Ong**, C. L. Y., Ulett, G. C., Mabbett, A. N., Beatson, S. A., Webb, R. I., Monaghan, W., ... & Schembri, M. A. (2008). Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 190(3), 1054-1063.
- Osman**, N. A. (2016). Characterization of Bacterial Species associated with Urinary Tract Infections among Sudanese Chronic Renal Dialysis Patients. *African Journal of Medical Sciences*, 1, 12.
- Paniagua-Contreras**, G. L.; Monroy-Pérez, E., Rodríguez-Moctezuma, J. R.; Domínguez-Trejo, P.; Vaca-Paniagua, F. & Vaca, S. (2017). Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(4), 478-485.
- Panda**, A., Qian, F., Mohanty, S., Van Duin, D., Newman, F. K., Zhang, L., ... & Shaw, A. C. (2010). Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *The Journal of Immunology*, 184(5), 2518-2527.
- Parvez**, S. A., & Rahman, D. (2018). Virulence factors of uropathogenic *E. coli*. *Microbiology of Urinary Tract Infections-Microbial Agents and Predisposing Factors*, 7-21.
- Patond**, A., & Narang, R. (2020). A low cost ingenious approach for ultraviolet decontamination of N95 filtering face-piece respirators to deal

with dwindling supply during the COVID-19 pandemic. *Journal of Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences*, 25(2), 80.

Patole, P. S., Schubert, S., Hildinger, K., Khandoga, S., Khandoga, A., Segerer, S., ... & Anders, H. J. (2005). Toll-like receptor-4: renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis. *Kidney international*, 68(6), 2582-2587.

Perlman ,R.L.and Heung ,M.(2019) .Renal disease in : Pathology of Disease An introduction to clinical eight edition .Mc Graw Hill Education.

Perna, N. T.; Plunkett, G.; Burland, V.; Mau, B.; Glasner, J. D.; Rose, D. J. ... & Blattner, F. R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature*, 409(6819), 529-533.

Prasad, N., & Patel, M. R. (2018). Infection-induced kidney diseases. *Frontiers in medicine*, 5, 327.

Preston R. and Wilson T.(2012). Physiology. Lippincott Williams and Wilkins. P 313-327.

Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. and Carter, G. R. (2004). Clinical veterinary microbiology ,Elsevier limited.

Rani, V., & Yadav, U. C. S. (2015). *Free Radicals in Human Health and Disease* (pp. 1-430). New Delhi: Springer.

Ricci, Z., & Ronco, C. (2012). New insights in acute kidney failure in the critically ill. *Swiss medical weekly*, 142(3334), w13662-w13662.

Rico, M. G., Puchades, M. J., Ramón, R. G., Saez, G., Tormos, M. C., & Miguel, A. (2006). Effect of hemodialysis therapy on oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Nefrologia*, 26, 218-225.

Riedel, S., Morse, S.A., Mietzner, T., Miller, S. (2019). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology (28th ed.). McGraw Hill Education.

Riley, M. & Serres, M. H. (2000). Interim report on genomics of *Escherichia coli*. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 341-411.

Rogers, K., & Kadner, R. J.(2015). Facts about *E. coli*: Dimensions, as Discussed in Bacteria: Diversity of Structure of Bacteria. *Encyclopedia Britannica Online*.

Roh, J.S.and Sohn, D.H.(2018). Origin and List of DAMPS. *Immune Netw*, 18, 1-14.

Romo, M.R.; Pérez-Martínez, D.; Ferrer, C.C.(2016) Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, 148, 125-139.

Rubin, R. H.; Shapiro, E. D.; Andriole, V. T.; Davis, R. J. & Stamm, W. E. (1992). Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infection. *Clinical Infectious Diseases*, 15(Supplement_1), S216-S227.

Rosa, A. C.; Corsi, D.; Cavi, N.; Bruni, N., & Dosio, F. (2021). Superoxide dismutase administration: a review of proposed human uses. *Molecules*, 26(7), 1844.

Sambrook , J.; & Russell , D. (2001) . Molecular Cloning : A laboratory Manual , 3rd ed. , Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.

Sah, R. S. P., Dhungel, B., Yadav, B. K., Adhikari, N., Thapa Shrestha, U., Lekhak, B., ... & Rijal, K. R. (2021). Detection of TEM and CTX-M Genes in *Escherichia coli* isolated from clinical specimens at tertiary care heart hospital, Kathmandu, Nepal. *Diseases*, 9(1), 15.

Smelov, V.; Naber, K. & Johansen, T. E. B. (2016). Improved classification of urinary tract infection: future considerations. *European Urology Supplements*, 15(4), 71-80.

Stein, R.; Dogan, H. S.; Hoebeke, P.; Kočvara, R.; Nijman, R. J.; Radmayr, C. & Tekgül, S. (2015). Urinary tract infections in children: EAU/ESPU guidelines. *European urology*, 67(3), 546-558.

Tabasi, M.; Karam, M. R. A.; Habibi, M.; Mostafavi, E. & Bouzari, S. (2016). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from patients with acute cystitis, pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(12), DC01.

Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010, 140, 805–820. [CrossRef]

Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C.B.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T. (2012) PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 2012, 249, 158–175. [CrossRef] [PubMed]

Tarchouna, M.; Ferjani, A.; Ben-Selma, W., & Boukadida, J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(6), e450-e453.

Taskapan, H. ; Tam, P. ; Au, V. ; Chow, S. ; Fung ,J. ; Nagai, G. ; Roscoe, J. ; Ng, P. ; Sikaneta, T. ; Ting, R. and Oreopoulos DG. (2008). Improvement in GFR in patients with chronic kidney disease attending a nephrology clinic. *Int Urol Nephrol* 40(3):841-848 .

Telli, A. E.; Biçer, Y.; Telli, N.; Güngör, C.; Turkal, G. & Onmaz, N. E. (2022). Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Chicken Carcass Rinses: Isolation and Genotyping by ERIC-PCR.

Thong, K. L.;Lai, M. Y.; Teh, C. S. J. & Chua, K. H. (2011). Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR. *Tropical Biomedicine*, 28(1), 21-31.

Tiba, M. R., Yano, T., & Leite, D. D. S. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50, 255-260.

Tille, P. (2014).Bailey &Scott's Diagnostic Microbiology.13th Mosby, Inc.,an affiliate of Elsevier Inc.

Tong, Y. Q.; Sun, M.; Hu, C. & Zhao, D. (2017). Plasmid transfer capacities of multi-resistant UPEC clinical isolates in biofilms.

Van Dijk, W. C.; Verbrugh, H. A.; Van der Tol, M. E.; Peters, R., & Verhoef, J. (1979). Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infection and immunity*, 25(2), 603-609.

Wang, Q.; Zhao, K.; Guo, C., Li, H.; Huang, T., Ji, J., ... & Wang, H. (2021). Antibiotic resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections after kidney transplantation from deceased donors. *Infection and Drug Resistance*, 4039-4046.

Wang, X., & Quinn, P. J. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in lipid research*, 49(2), 97-107.

- Waugh** and Grant .(2018) .Ross and Wilson Anatomy and Physiology in health and illness.13 th Edition . ELSEVIER.
- Winarsi**, H. (2007). Natural Antioxidants and Free Radicals. 3 ed. Yogyakarta: Kanisius
- Wurpel** DJ; Beatson SA.; Totsika M; Petty NK, and Schembri MA.(2013) Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. PLoS One.;8(1):e52835.
- Younis**, G.; Awad, A., & Samir, S. (2017). Prevalence and virulence profile of avian pathogenic E.coli isolated from clinical disease profile chicken . *Mansoura Veterinary Medical Journal*, 18(1), 419-430.
- Zhanel**, G. G.; Simor, A. E.; Vercaigne, L.; Mandell, L., & Canadian Carbapenem Discussion Group. (1998). Imipenem and meropenem: comparison of in vitro activity, pharmacokinetics, clinical trials and adverse effects. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 9, 215-228.
- Zhao**, L.; Chen, X.; Zhu, X.; Yang, W.; Dong, L.; Xu, X., ... & Liu, X. (2009). Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). *Urology*, 74(3), 702-707.
- Zhaxybayeva**, O. & Doolittle, W. F. (2011). Lateral gene transfer. *Current Biology*, 21(7), R242-R246.
- Zulaikhah**, S. T. (2017). The role of antioxidant to prevent free radicals in the body. *Sains Medika*, 8(1), 39-45.

Summary

This study included the collection of 130 urine samples. It included 30 samples each from patients with kidney failure, patients with kidney failure accompanied by urinary tract infection, and patients with urinary tract infection who were attending the Imam Hussein medical city / dialysis unit and a urology consultant for age groups between (20-70) years for both sexes, As well as 40 samples from healthy people. The samples were cultured on the medium of blood agars and MacConkey , then the growing bacterial cultures were subjected to microscopic and biochemical examinations.

This study also included collecting blood samples from the same patients described above to determine the concentration of the Toll-like immune receptor TLR4 as well as to estimate the activity of the enzyme Superoxide Dismutase (SOD) and the concentration of glutathione. The results showed the following:

The collection of 57 bacterial isolates and after treatment with a potassium hydroxide solution (3%), they were distributed as 47 negative isolates for Gram stain from the total number of isolated bacteria, and 10 positive isolates for this stain. After diagnosing the bacterial isolates by culture and biochemical methods, it became clear that *E.coli* bacteria are dominant, With 22 isolates. as their diagnosis was molecularly confirmed using the *Pho A* gene.

By testing the sensitivity of *E.coli* isolates to antibiotics using the Vitec system, it was found that all isolates were 100% sensitive to Imipenem, 95.4% to Amikacin, 72.7% to Gentamicin and Cefepime, while the isolates were 90.9% resistant to Ticarcillin and Piperacillin, and 63.6% to Sulfamethoxazole and 50% for the antibiotics Ticarcillin-Clavulanic acid, Aztreonam and Tobramycin.

Molecular detection of some virulence and antibiotic resistance genes in *E.coli* bacteria, as it was found that 11 (50%) isolates possess the hemolysin gene *hly A*, 12 (54%) isolates possess the *fim H* gene, and 7 (31.81%) bacterial isolates possess the *ctx-M* gene.

Through the results of estimating the toll -like immune receptor TLR4, it became clear that the age group between (40-59) years showed the highest immune response, as the concentration of this immune receptor reached 1.115 ng / ml. The results of the statistical analysis confirmed the presence of significant differences $p<0.05$ in the concentration of this receptor in the age group between (20-39) years, while the remaining two age groups did not show any significant differences.

By estimating the effectiveness of the Automatic antioxidants in patients with kidney failure and patients with kidney failure who have urinary tract injuries as well as people with urinary tract infection and compare them with the effectiveness of the enzyme in healthy people, it became clear from the results that the highest effectiveness of the SOD enzyme was recorded in healthy people, which amounted to 15.353 units /ml , while it was noted that there is a moral decrease in the

effectiveness of this in both patients with kidney failure and patients with kidney failure accompanied by urinary tract infections.

The results of estimating the concentration of glutathione in the groups under study showed a high concentration of this compound in healthy people (6.697 $\mu\text{m/ml}$), while a significant decrease in its concentration was observed in both patients with renal failure and patients with renal failure who had urinary tract injuries.



University of Kerbala

College of Science

Department of Biology

**Investigation of some Virulence Factors of *Escherichia Coli* Associated
with Renal Failure and Urinary Tract Patients**

A thesis

Submitted to the council of the College of Science – University of Kerbala in
partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology

Write By

Khawla Abass Hadi Alshemmari

BSc. Kerbala University 2010

Supervised by

Prof. Dr. Ali Abdul Kadhim Al-Ghanimi

2023 .A.D.

1444 A.H.