دور الغشاء الحيوي والحركة المحتشدة لانواع من بكتريا الـ *Proteus* في المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية المرتبطة بالقثطرة

أ.م.د. ضمياء محمود ابراهيم

نور شكيب محمد

الجامعة المستنصرية/ كلية التربية الاساسية

الملخص:-

جمعت (110) عينة ادرار من قثاطر المجاري البولية Catheter من المرضى الراقدين في وحدة العناية المركزة في مستشفيات بغداد(مستشفى الجراحات البولية المتعددة/ مدينة الطب)،(مستشفى ابن القف لاصابات الحبل الشوكي ومستشفى الكندي التعليمي) للفترة من تشرين الاول/2013 ولغاية كانون الثاني/2014، حيث تم الحصول على20 عزلة(24.3%) من بكتريا *P.mirabilis* من مجموع العزلات البكتيرية التي عزلت.

تم التحري عن تأثير المضادات الحيوية في العزلات البكتيرية باستعمال بطاقة AST-Cards(Antibiotics Sensitivity Tests) الخاصة بجهاز Vitek2اذ بينت النتائج تباين في مقاومة العزلات للمضادات الحيوية العشرين المختارة، كما اظهرت العزلات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية عندما قاومت(7–14) مضاد حيوي بنسبة(64.3%).

اظهرت(20) عزلة من بكتريا *Proteus mirabilis* قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي بنسبة (100%) ولكن بدرجات متفاوتة، اذ اظهرت(10) عزلات وبنسبة(50%) انتاجية عالية للغشاء الحيوي، في حين كانت العزلات الاخرى ذات انتاجية واطئة للغشاء الحيوي.

حضرت تراكيز متعددة من المستخلص الكحولي لورق الغار اذ تم اختبار تأثيره على العزلات البكتيرية (20) قيد الدراسة، لوحظ ان التركيز(200 ملغم/ مللتر) اعطى اعلى منطقة تثبيط(20ملم) بينما التركيز(6.25 ملغم/ مللتر) اعطى اقل منطقة تثبيط(10ملم).

تم اختبار تأثير محلول اللاكتوفيرين على عشرين عزلة من بكتريا *Proteus mirabilis* اذ بينت النتائج ان التركيز(200ملغم/ مللتر) اعطى منطقة تثبيط(7ملم) وكان هذا قبل ديلزة المحلول، اما بعد عملية الديلزة وتركيز حجمه الى النصف اعطى منطقة تثبيط(15ملم).

تم تحديد التراكيز المثبطة الدنيا MIC والتراكيز المثبطة لتكوين الغشاء الحيوي BIC لكل من المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين، اظهرت النتائج ان التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين كان(6.25– 100 ملغم/ مللتر) على التوالي، اما التركيز المثبط لتكوين الغشاء الحيوي للمستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين كان(100– 200 ملغم/ مللتر) على التوالي.

تم اختبار تأثير تركيز BIC لكل من المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين لتثبيط التصاق الغشاء الحيوي لبكتريا *Proteus mirabilis* بطريقة اطباق المعايرة الدقيقة، تراوحت نسبة التثبيط بين(8–43%) بالنسبة للمستخلص الكحولي لورق الغار، اما بالنسبة لمحلول اللاكتوفيرين فتراوحت نسبة التثبيط بين(18–59%).

اعتمدت التراكيز المثبطة لتكوين الغشاء الحيوي BIC لكل من المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين في اختبار تثبيط التصاق الغشاء الحيوي في انابيب القثطرة لبكتريا *Proteus mirabilis* وكذلك لعدة انواع من البكتريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من قثاطر المجاري البولية، واعتمد ايضا التركيز BIC في تثبيط ظاهرة الانثيال لبكتريا *Proteus mirabilis* ، حيث اظهرت النتائج ازالة واضحة للغشاء الحيوي من على انابيب القثطرة عند النظر اليها بالعين المجردة والمقارنة بالسيطرة، وكذلك تثبيط لظاهرة الانثيال مقارنة بالسيطرة.

اختيرت خمس عزلات لبكتريا *Proteus mirabilis* والتي اعطت انتاجية عالية للغشاء الحيوي لغرض دراسة جزيئية وراثية للكشف عن عوامل الضراوة المسؤولة عن تكوين الغشاء الحيوي ، حيث اعتمدت تقنية PCR كوسيلة لايضاح احد اهم عوامل

الضراوة وهي الاهلاب Fimbriae المسؤولة عن التصاق البكتريا على سطوح الاغشية الطلائية للمجاري البولية وعلى سطوح انابيب القثطرة التي تؤدي الى تكوين الغشاء الحيوي، اظهرت النتائج ان العزلات الخمسة التي تم اختيارها كانت جميعها تمتلك جين PMF(A *pmf*) المسؤول عن التشفير للاهلاب Fimbriae ، حيث ان حجم البادئ كان 618 للعزلات الخمسة حيث تم ترحيلها بنفس مسار الدليل الحجمي للقطعة 600 واعطت نتيجة موجبة بنسبة(100%).

كلمات البحث: بكتريا المتقلبات،الغشاء الحيوي،حركة الانثيال، مقاومة المضادات الحيوية،بعض، عوامل الضراوة، اللاكتوفيرين، نبات ورق الغار،تفاعل السلسلة التبلمري.

المقدمة

ان بكتريا الـ *P. mirabilis* مسؤولة عن إحداث الاخماج إلى امتلاكها الكثيرمن عوامل الضراوة كإنتاجها لإنزيمي اليوريز والهيمولايسين والإنزيمات المحللة للبروتين , فضلا عن قدرتها على غزو الخلايا والالتصاق بوساطة الأهداب وظاهرة الانثيال Swarming وتكوين الاغشية الحيوية Biofilms (Sosa واخرون،2006).

تقاوم هذه البكتريا العديد من المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام مثل مضادات البيتالاكتام (β-lactames) ، الامينوكلايكوسيدات(Aminoglycosides) وغيرها من أنواع المضادات الحيوية ، وأدى الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية الى ظهور سلالات مقاومة والذي أدى الى عدم فعالية العلاج لخمج المسالك البولية . وبسبب أنتاجها لعدد من الأنزيمات وقد لوحظ مؤخرا تزايد المقاومة للمضادات الحديثة مثل السيفالوسبورينات الجيل الثالث والرابع (Karlowsky واخرون،2003).

وبسبب التأثيرات الجانبية الخطيرة للمضادات الحياتية Antibiotics ومقاومة الاحياء المجهرية لها دفع المختصين الى استعمال المستخلصات والمركبات الفعالة حيويا والمستخلصة من انواع نباتية مختلفة تستعمل في طب الاعشاب (Essawi & Sour, 2000) ،حيث يمتلك نبات الغار عدة مركبات ثانوية فعالة متمثلة بالفلافونياتFlavones، والفلافونولات Flavonols ،والقلويدات Alkaloids ،والفلافونويدات Flavonoids والصابونيات Saponoins ،والتربينات الاحادية Monoterpene التي تعد ذو خصائص مضادة للاكسدة(Saalu واخرون،2011)، ومستخلصات اوراق نبات الغار يمكن

استعمالها فمويا لعلاج المشاكل المعدية–المعوية Gastrointestinal problems والام البطن Flatulence (Fang;Burt,2004 واخرون،2005).

ونظرا للاهمية البايولوجية الواسعة التي يتمتع بها بروتين اللاكتوفيرين، فقد اشارت العديد من الدراسات الى امتلاكه فعالية تثبيطية تجاه مجاميع واسعة من الاحياء المجهرية،كما ان اللاكتوفيرين بحالته الخالية من الحديد(Apo-Lf) يملك تأثيرا قاتلا Bactericidal ضد انواع من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وتبرز اهميته البايولوجية بكونه منظم مناعي Immunomodulator وله دور مهم في تنظيم الاستجابة المناعية داخل الجسم،واكتشف الباحثين ان الببتيد الفعال القاتل للاحياء المجهرية المسمى باللاكتوفيريسين Lactoferricin الذي تم الحصول عليه بوساطة تحلل لاكتوفيرين الابقار بأنزيم الببسين(Francesca;Baker&Baker,2005 واخرون،2011: Jenssen& Hancock,2009).

المواد وطرائق العمل

العزل والتشخيص:

جمعت (110) عينة ادرار من قثاطر المجاري البولية Catheters ،حيث اعتمدت طريقة ،(Cath واخرون،2011) وزرعت العينات على وسط اكارالدم والماكونكي ووسطCLED agar،حيث اعطت العزلات صفة الحركة المتموجة (swarming) ورائحة السمك على وسط اكار الدم ، وكذلك اعطت مستعمرات شاحبة اللون على وسط اكار الماكونكي ،اما على وسط CLED agar فاعطت العزلات لون اخضر مزرق، وكذلك تم فحص الشريحة الزجاجية المحضرة من المستعمرات المفردة المصبوغة بصبغة كرام واوضح الفحص المجهري ان خلايا *Proteus spp* عصوية قصيرة سالبة لصبغة كرام ذات لون أحمر وردي (Pink) وغير مكونة للسبورات ، وكذلك اجريت العديد من الاختبارات بما في ذلك :اختبار الكاتاليز،اختبار الاوكسديز،اختبار الاندول،اختبار احمر المثيل،اختبار فوكس بروسكاور،اختبار استهلاك السترات،اختبار انتاج كبريتيد الهيدروجين، اختبار انتاج انزيم الهيمولايسين،اختبار انتاج انزيم اليوريز(Patricia واخرون،2014) ،واستخدم جهاز الفايتك(Biomerieux,2010) لتأكيد تشخيص العزلات،وكذلك لفحص الحساسية للمضادات الحياتية.

الكشف عن قابلية بكتريا *Proteus mirabilis* لتكوين الغشاء الحيوي

طريقة انابيب الاختبار Test tube Method

اعتمدت طريقة (Dheepa واخرون ،2011) في الكشف عن قابلية 20 عزلة لتكوين الغشاء الحيوي . وذلك بزرع ٥ مليليتر من وسط BHI السائل المعقم المضاف اليه كلوكوز بتركيز 3% بالعزلة المراد اختبارها وحضانتها بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ٤٨ ساعة . ومن ثم اضافة صبغة البنفسج البلوري (1%) لكل أنبوبة ولمدة ١٥ دقيقة ، وازيلت بعدها الصبغة وتركت الانابيب بدرجةحرارة الغرفة (٢٠-٢٥) م لتجف ، ثم قرأت النتيجة بملاحظة تكوين الغشاء الحيوي بشكل طبقة على الجدار الداخلي للانابيب بالعين المجردة بعد مقارنته بانبوب السيطرة السالبة(وسط BHI دون زراعة بالعزلات الجرثومية) كما ان سمك وشدة لون الغشاء اعتمد كأساس لكفاءة العزلة البكتيرية على انتاج الغشاء الحيوي واعطيت درجة(+,++,+++).

طريقة اطباق المعايرة الدقيقة Microtiter-plate Method

تم الكشف عن قابلية عزلات بكتيريا *P.mirabilis* لتكوين الغشاء الحيوي بهذه الطريقة وفق ما جاء في (Dheepa واخرون،2011) وذلك بتنشيط هذه العزلات على وسط نقيع القلب والدماغ السائل BHIb والحضانة لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م بوجود كلوكوز بتركيز3%، وتم إجراء الاختبار بإضافة الوسط ألزرعي الحاوي على العزلات المنشطة بمقدار 200 مايكروليتر لكل حفرة من أطباق المعايرة (بثلاث مكررات في حفر الصفوف العمودية لطبق المعايرة لكل عزلة على حدة وبالتوالي بالنسبة للعزلات من1 إلى 20) ، إضافة الى سيطرة سالبة باضافة 200 مايكروليتر من نفس الوسط الزرعي المعقم غير الملقح بالبكتريا لثلاث مكررات في أخر صف عمودي ، و حضنت أطباق المعايرة بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وتم التخلص بعدها من محتويات الحفر وغسلت بالماء الملحي الفسلجي المعقم ومن ثم أضيف لكل حفرة من حفر الاختبار الميثانول بتركيز (99%) وبمقدار 200 مايكروليتر لمدة (15)دقيقة لتثبيت البكتريا الملتصقة بعدها سكب الكحول وترك الطبق ليجف , ثم صبغت الحفر بصبغة البنفسجي البلوري (1%) أزيلت بعدها ألصبغه وتركت لتجف بحرارة الغرفة , ثم أضيف 160مليلتر من حامض ألخليك الثلجي بتركيز (33%) لربط الصبغة بالخلايا الملتصقة ، وبعد ذلك تم قراءة الكثافة الضوئية بجهاز ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay reader)

لجميع المحتويات بطول موجي 630 نانوميتر لتحديد كفاءة العزلات في أنتاج الغشاء الحيوي ,تمت الحسابات وفق معادلات خاصة.

قياس الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لورق الغارفي نمو بكتريا *Proteus mirabilis*

تم تحضير محلول خزين Stock solution للمستخلص الكحولي لورق الغار وذلك بوزن(2) غم من المستخلص النباتي الجاف وأذيب في(10) مللتر من (DMSO) المذيب العضوي ثنائي مثيل سلفاكسايد Dimethyl sulfoxide ، حيث تم قياس الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي للعزلات((19-16-13-12-11 حسب ما ورد في(Ouibrahim واخرون،2013).

قياس الفعالية التثبيطية لمحلول اللاكتوفيرين في نمو بكتريا *Proteus mirabilis*

-طريقة الانتشار بالحفر Well diffusion method

لنفس العزلات السابقة اتبعت طريقة(Lin واخرون،2008) في قياس الفعالية التثبيطية لمحلول اللاكتوفيرين في نمو بكتريا *Proteus mirabilis*.

تأثير المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين على الغشاء الحيوي المنتج من قبل بكتريا *Proteus mirabilis*

طريقة انابيب الاختبار(درهم تيوب) Derhim Tube

استعملت طريقة بالأعتماد على طريقة(Dheepa واخرون،2011) في الكشف عن الغشاء الحيوي وكالأتي:

أضيف (500)مايكروليتر من وسط BHI السائل المعقم الى الانابيب ، ثم تم نقل (1-2) مستعمرة بوساطة ناقل معقم الى الوسط الزرعي،يضاف (500)مايكروليتر من مستخلص ورق الغار(ذو التركيز100 ملغم/مل)ومحلول اللاكتوفيرين(المركز بوساطة اكياس الديلزة)ذو التركيز(200 ملغم / مل)الى محتويات الانابيب،ترك انبوب كسيطرة سالبة حيث يوضع فيه(1مل)من وسط BHIالسائل.

ويترك أيضا انبوب اخر كسيطرة موجبة حيث يوضع فيه(1مل)من وسط BHI السائل الملقح بالبكتريا،وتحضن محتويات الانابيب بدرجة37م لمدة 48 ساعة،تسكب محتويات الانابيب برفق ومن ثم تصبغ بصبغةCrystal violetمدة 10 دقائق ومن ثم تسكب الصبغة وتترك الانابيب لتجف،تم ملاحظة النتائج بالعين المجرده مقارنة بالسيطرة السالبة (بدون وجود بكتريا) والسيطرة الموجبة (بوجود البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي

ولكن دون وجود المستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين)واعطيت درجة(+,++,+++) واعتبر هذا التركيز الذي اعطى نتيجة موجبة(++)بالتركيز المثبط لتكوين الغشاء الحيوي(BIC).

طريقة اطباق المعايرة الدقيقة Microtiter-Plate Method

نميت 20عزلة بكتريا على وسط BHI السائل بوجود كلوكوز3% وحضنت بدرجة37م لمدة 24 ساعة **ثم** نقل (50) مايكروليتر من المزروع الى أطباق المعايرة الحاوية على 96 حفرة(بواقع 3 مكررات(حفر) لكل عزلة)،يضاف(50) مايكروليتر من مستخلص ورق الغار(ذو التركيز100 ملغم/مل) ومحلول اللاكتوفيرين ذو التركيز(200 ملغم / مل)الى الحفر، تترك (3)حفر كسيطرة موجبة(بوجود البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي دون وجود المستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين) وكذلك(3) كسيطرة سالبة(وسط زرعي دون وجود البكتريا)،تم تغطية الاطباق بواسطة البارافيلم لتوفير ظروف معقمة،حضنت اطباق المعايرة بدرجة37م لمدة 24 ساعة،غسلت الحفربالمحلول الملحي الفسلجي وتركت لتجف بهواء الغرفة لمدة(15) دقيقة،تم أضافة(200) مايكرو ليتر من الكحول الأثيلي بتركيز(95%) مدة(15) دقيقة، يسكب الكحول ثم تترك الأطباق لتجف،تم أضافة (200) مايكروليتر من صبغة البنفسج البلوري(1%) لكل حفرة وحضنت لمدة(20) دقيقة،غسلت الحفر ثلاث مرات بالماء المقطر وتركت لتجف بهواء الغرفة لمدة (15) دقيقة، تم أضافة(160) مايكروليتر من (حامض الخليك الثلجي بتركيز33%)،قرأت النتائج بوساطة جهاز الاليزا ELISA بطول موجي (٦٣٠) نانوميتر(Dheepa واخرون،2011)وتمت الحسابات الذي ذكرت سابقا،ومن ثم حسبت النسبة المئوية لتثبيط التصاق البكتريا المرضية بتطبيق المعادلة الواردة في(Gudina واخرون،2010).

النسبة المئوية لتثبيط الغشاء الحيوي=1− O.D بوجود المثبط ÷O.D لمعاملة السيطرة ×100

تثبيط تكوين الغشاء الحيوي المنتج من قبل بكتريا *Proteus mirabilis* في انابيب القثطرة (Foly Catheter):

تمت دراسة تثبيط تكوين الغشاء الحيوي المنتج من قبل بكتريا*P.mirabilis* بطريقة مبسطة وفق ماجاء في(Harith واخرون،2011) (اختيرت العزلات-13-12-11 16-19)لكونها ذات انتاجية عالية للBiofilm .

تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من قبل انواع متعددة من البكتريا الممرضة (Polymicrobial cultures) في أنابيب القثطرة

أجريت التجربة وفقا لما جاء في(Noori واخرون،2012)،حيث تم أختيار5 عزلات من أنواع مختلفة من البكتريا الممرضة السالبة لصبغة كرام(المعزولة من قثاطر القناة البولية)التي تم عزلها وتشخيصها بجهازAPI في مستشفى ابن القف لاصابات الحبل الشوكي وهي:

Pseudomonas aeruginosa,Klebsiella pneumonia,E.coli,Serratia marscence,Acinetobacter baumanii.

حيث تم تنشيط كل عزلة على حدة في وسط المرق المغذيNutrient broth وذلك حتى تحتفظ كل بكتريا بعوامل ضراوتها ولا يحصل Antagonisim بينهما اذا نميت سوية،وحضنت الانابيب بدرجة37م لمدة24 ساعة،أخذنا من كل عزلة منشطة 1 مل ووضعت في أنبوب أختبارثم اضيف محلول اللاكتوفيرين الخزين واكمل الحجم الى (5مل) من وسط(BHI)السائل المعقم للحصول على تركيز نهائي (200 ملغم /مللتر) وكذلك بالنسبة للمستخلص الكحولي لورق الغارالخزين للحصول على تركيز نهائي (100ملغم /مللتر)ووضعت قطع أنابيب القثطرة المقطعة الى أبعاد متساوية ومزجت محتويات الانبوب جيدا،ثم حضن المزروع لمدة48 ساعة بدرجة37م،وبعد ذلك رفعت قطع انابيب القثطرة وتم غسلها بسيل ضعيف من الماء المقطر المعقم وتركت لتجف قليلا بحرارة الغرفة ومن ثم تم تصبيغها بالبلور البنفسجي (1%) وغسلت بعدها بالماء المقطر وقرات النتائج بالعين المجردة من خلال ملاحظة سمك ولون قطع انابيب القثطرة.

تقدير التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين

تم قياس التركيز المثبط الادنى لورق الغارذو التركيز(100ملغم/مل) ومحلول اللاكتوفيرين ذو التركيز(200 ملغم/مل) على العزلات(19-16-13-12-11) والتي أظهرت انتاجية عالية لل Biofilm،وفقا لما أشار اليه(Veronika واخرون، 2010) .

تأثير المستخلص الكحولي لورق الغار و محلول اللاكتوفيرين على حركة الانثيال

أستعملت طريقة محورة لما جاء في(احمد واخرون،2011) وذلك بنشر (2مل) من المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين، كل على طبق ثم ترك ساعة

ليتشرب سطح الوسط، ثم يضاف (0.1 مل) من العالق البكتيري ثم تحضن لمدة 24 ساعة بدرجة 37م.

الكشف عن جين الfimbriae لبكتريا*Proteus mirabilis* بتقنية تفاعل السلسلة التبلمري(PCR)Polymerase chain reaction

استخلاص الدنا البكتيريExtraction of genomic DNA from bacteria

تم استخلاص الدنا البكتيري من 5 عزلات من البكتريا(19-16-13-12-11)والتي أظهرت انتاجية عالية للغشاء الحيوي بأستعمال عدة الاستخلاص (Geneaid, Thailand) اذ نميت العزلات على وسطNutrient broth لمدة 24ساعة بدرجة37م، ومن ثم أخذ (1مل)من كل عزلة ووضعت في eppendorf tube ووضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة(دقيقة واحدة)بسرعة(14.ooo-16.000xg)،وبعدها تم التخلص من الراشح وبقاء الراسب الحاوي على الخلايا.

تقدير تركيز الـDNA ونقاوته

اتبعت الطريقة التي وصفت من قبل(Sambrook واخرون،2001) لتقدير نقاوة الـDNA وباستعمال جهاز المطياف الضوئي(Spectrophotometer)وكالاتي:

تم تخفيف الDNA المستخلص بداريء TE وبنسب مختلفة وتمت قراءة الكثافة الضوئية Optical density على الاطوال الموجية280-260نانومتر وفق المعادلة التالية:

O.D.260nm/O.D.280nm

تمثل النسبة درجة نقاوة الدنا وان الكثافة الضوئية البالغة1عند الطول الموجي260نانومتر تكافيء تركيز من الDNA بحدود50مايكروغرام/مل.

الترحيل الكهربائي للDNA في هلام الاكاروزAgarose gel electrophoresis

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي حسب ماجاء في(Sambrook واخرون،2001).

استخدام تقنيةPCR للكشف عن Fimbriae

اختيار البادىء Primer selection

استخدمت تقنية تفاعل السلسلة التبلمري(PCR) للكشف عن جين*pmfA* لتشخيص أحد عوامل ضراوة البكتريا المتخصص في تكوين الغشاء الحيوي وهو الاهلاب Fimbriae وفقا لما جاء في(Pablo واخرون،2003)،وهذا البادىء مصنع من قبل شركة Bioneer.

جدول(1)تسلسل القواعد النتروجينية في الباديء

الباديء	تسلسل القواعد النتروجينية	الحجم
*pmfA*Forward	CAAATTAATCTAGAACCACTC	618bp
*pmfA*Reverse	ATTATAGAGGATCCCTTGAAGGTA	

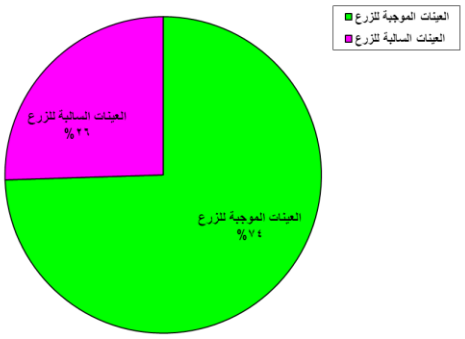
التحليل الاحصائي:

تم تحليل البيانات باستعمال البرنامج SAS– Statistical Analysis System (٢٠١٢) لدراسة العوامل المدروسة في الصفات المختلفة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي (LSD)، كما استعمل اختبار مربع كاي (Chi-square – χ^2) لمقارنة الفروق بين النسب المئوية.

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

اظهرت (82) عينة نتيجة موجبة للزرع البكتيري بنسبة (74.5%)بينما العزلات التي اعطت نتيجة سالبة(28)عينة بنسبة(25.5%) واظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عالية بين العينات الموجبة للزرع والسالبة بمستوى معنوية ($P\leq0.01$). وتقترب هذه النتيجة من نتائج كل من المرجاني (2000) والعجيلي (2007) وحميد (2014) اذ كانت النسب (68.8%) ، (78.2%) ، (79%) على التوالي، والشكل(1) يوضح النسبة المئوية للعينات الكلية.



الشكل (4-1) النسبة المئوية للعينات الكلية

اظهرت النتائج وجود بكتريا *Proteus spp* في (20) عينة ادرار (24.3%) من العينات الموجبة للزرع البكتيري (82) عينة اتفقت نتائجنا مع نتائج الباحثة الموسوي ،(2013) اذ بلغت نسبة بكتريا *Proteus spp* (21.3%) من مجموع عزلاتها المحلية. وفي دراسة قام بها (Mehr واخرون ، 2004) حول خمج المسالك البولية ، اذ كانت نسبة هذه البكتريا متدنية وهي (5%) غير انها تختلف عن نتائج كاظم (2010) حيث وجد نسبة انتشار بكتريا .*Proeus spp* (12.5 %)، ويعود التفاوت في النسبة المئوية لعزل هذه البكتريا الى عوامل عديدة منها : تباين انتشار اخماج UTIs من مكان لاخر ، والاخطاء في طريقة عمل الباحثين في المختبرات البكتريولوجية ، الحالة الصحية للمريض ، اختلاف اعمار المرضى واحتمال تناول الادوية لدى البعض منهم .

بلغت نسبة بكتريا *Proteus mirabilis* (20) عزلة بنسبة(100%) من العينات(20) لبكتريا*Proteus spp*، بينما اظهرت نتائج كاظم (2010) حيث سجل نسبة انتشار تعادل (81.96 %) للنوع *P.mirabilis* ،وكذلك نتائج الباحثة حميد (2014) حيث بلغت نسبة *P.mirabilis* (80%). ، وذلك لكون بكتريا *Proteus mirabilis* اكثر توجد في الادرار.

التشخيص

التشخيص المظهري

تم تشخيص المستعمرات مبدئياً وذلك بزراعتها على وسط اكار الدم و اكارالماكونكي ووسط CLED واظهرت (20) عزلة صفات جنس *Proteus* وهي تلك التي اظهرت صفة الحركة المتموجة (swarming) ورائحة السمك على وسط اكار الدم ، وكذلك اعطت مستعمرات شاحبة اللون على وسط اكار الماكونكي ، وهذا دليل على عدم قدرة هذه البكتريا على تخمر سكر اللاكتوز واستهلاكها الببتون مصدرا للنتروجين وانتاج مواد ايضية تزيد من قيمة الرقم الهيدروجيني (pH) الوسط الذي بدوره يؤثر في كاشف الاحمر المتعادل (Neutral red) مما يتسبب في جعل لون المستعمرات شاحباً، وعلى الرغم من ان هذه الصفة مشتركة مع اجناس بكتيرية اخرى الا انها تاكيدية مع ظاهرة الحركة المتموجة (Liaw واخرون،2000 :Pfaller واخرون،2000).

اما عند تنميتها على وسط CLED ظهرت المستعمرات بلون اخضر مزرق لعدم قدرة البكتريا على تخمر سكر اللاكتوز وكذلك يعتبر هذا الوسط مثبط لحركة الانثيال وذلك بسببelectrolyte deficiency(Forbes واخرون،2002).

كما أظهرت نتيجة الفحص المجهري للشريحة الزجاجية المحضرة من المستعمرات المفردة المصبوغة بصبغة كرام ان خلأيا *Proteus* spp عصوية قصيرة سالبة لصبغة كرام ذات لون أحمر وردي (Pink) وغير مكونة للسبورات (Brenner وآخرون ، 2005).

الاختبارات الكيموحيوية

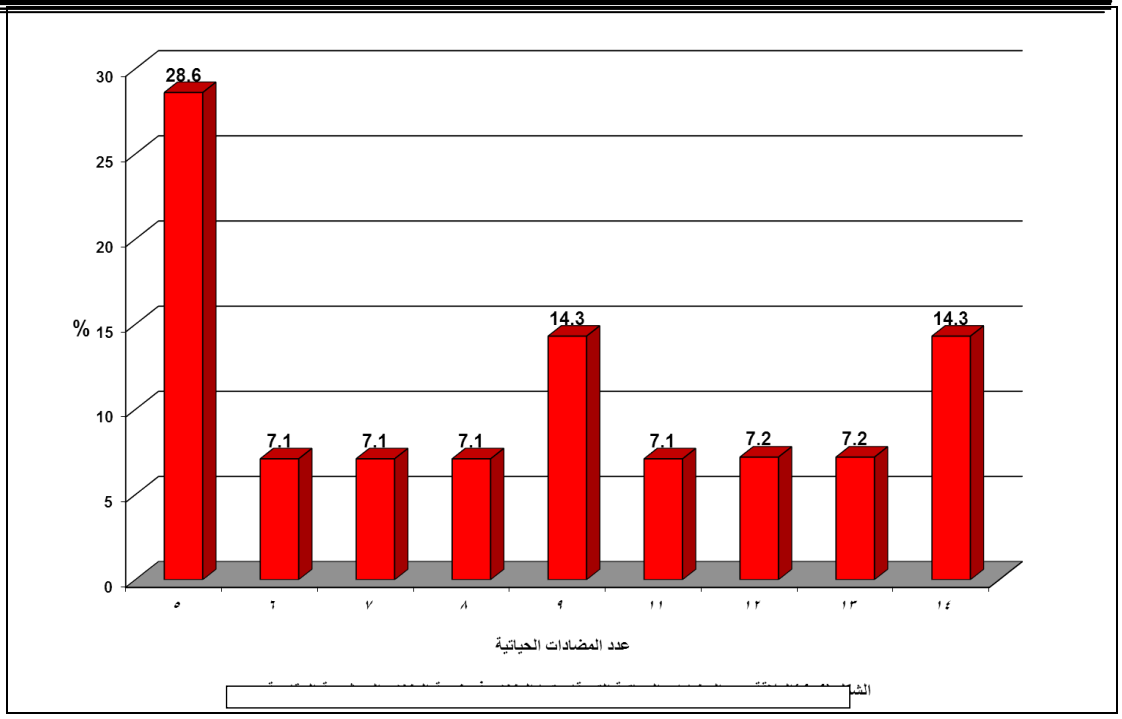
اعتمدت نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص انواع بكتريا. *Proteus spp* فقد تم تشخيص الأنواع المعزولة بحسب ما أشير إليه في Patricia وآخرون (2014)، حيث كانت البكتريا موجبة لاختبار الكاتاليز، والمثيل الاحمر، وانتاج غاز H_2S ، واختبار اليوريز، وسالبة لاختبار الاوكسديز، والاندول،ومتغايرة لاختبار السترات.

التشخيص بنظام Vitek 2

كما استعملت عدة التشخيص VITEK 2 التي تمتاز بالسهولة والسرعة في التشخيص ، وذلك لتاكيد نتائج الفحوصات الكيموحيوية وقد جاءت نتائج هذا الفحص مطابقة لنتائج الفحوصات الكيموحيوية, اجري التشخيص التأكيدي النهائي للعزلات العائدة لبكتريا *Proteus mirabilis* (14 عزلةً) بجهاز الفايتك اما العزلات الستة الباقية فقد تم تشخيصها بجهازAPI من مجموع (110)عينةٍ من الأدرار بأستخدام البطاقة السالبة (GN ID Card) والخاصة بجهاز Vitek 2 Compact

المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية MDR(Multi Drug Resist)

تظهر النتائج الواردة في الشكل (2) ان 9 من العزلات المشمولة بالدراسة كانت مقاومة ل (7–14) مضاد حيوي من عدد المضادات البالغ (20) مضاد بينما تظهر(4) عزلات مقاومتها ل(5) مضادات وعزلة واحدة مقاومة ل(6) مضادات .وتظهر نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عالية بين العزلات التي تمتلك مقاومة متعددة للمضادات الحيوية عند مستوى معنوية($P\leq0.01$).



شكل (2) علاقة عدد المضادات الحياتية التي قاومتها العزلات في نسبة العزلات الجرثومية المقاومة

بلغ عدد العزلات التي قاومت (7–14) مضاد حيوي هي (9) عزلات بنسبة(64.3%). وقد اتفقت نتائج دراستنا مع نتائج الدراسة التي قامت بها الباحثة الموسوي،(2013) اذ اشارت الى ان (9) عزلات كانت تقاوم (9–12) مضاد حيوي واكدت الباحثة ان هذه المجموعة هي السائدة اذ كانت نسبتها (52.9%).اما الدراسة التي قامت بها الباحثة حميد ،(2014) فقد كانت نتائج دراستها مقاربة لنتائج دراستنا اذ اشارت ان عزلاتها كانت تقاوم (8–9) مضادات حيوية بنسبة (45%).

الكشف عن قابلية بكتريا *Proteus mirabilis* على تكوين الغشاء الحيوي (طريقة انبوب الاختبار Tube method)(TM)

اظهرت (20) عزلة من العزلات المأخوذة من قثاطر اشخاص مصابين بالتهاب المجاري البولية قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي بنسبة (100%) ولكن بدرجات متفاوتة بأختلاف العزلات البكتيرية ، اذ اظهرت (10) عزلات وبنسبة 50% انتاجية عالية للغشاء الحيوي، في حين كانت العزلات الاخرى ذات انتاجية واطئة للغشاء الحيوي مقارنة بالسيطرة .

واظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين العزلات من حيث انتاجيتها للغشاء الحيوي عند مستوى معنوية($P\leq0.05$).وذكرت منظمة الصحة العالمية(NIH) National Institute of Health أن اكثر من 60% من الاصابات البكتيرية سببها الغشاء الحيوي(Sevanan واخرون،2011).

طريقة (اطباق المعايرة الدقيقة Microtiter plate)(MTP)

قسمت نتائج العزلات حسب انتاجيتها للغشاء الحيوي ،وكما موضح في الجدول(2) الى عزلات ذات انتاجية واطئة Weak producer ، وعزلات ذات انتاجية عالية High producer ،وقورنت النتائج مع السيطرة(0.2)،ويوضح التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين العزلات من حيث انتاجيتها للغشاء الحيوي عند مستوى معنوية($P\leq0.05$).

جدول(2) نتائج قراءة جهاز ELISA

العزلات	الكثافة الضوئية(OD)
P1	0.396
P2	0.400
P3	0.414
P4	0.577
P5	0.408
P6	0.409
P7	0.405
P8	0.392
P9	0.569
P10	0.392
P11	0.568
P12	0.584
P13	0.575
P14	0.564
P15	0.405
P16	0.594
P17	0.592
P18	0.392
P19	0.584
P20	0.567
LSD Value	0.1085 *
* ($P\leq0.05$).	

- واطئة الانتاجية Weak producer
- عالية الانتاجية High producer

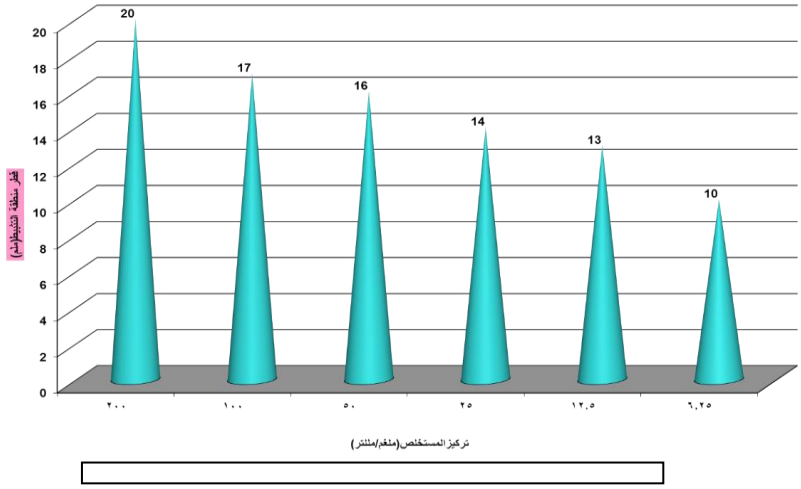
وبتطبيق المعادلة على كل قراءة لكل عزلة،اظهرت النتائج المبينة في الجدول اعلاه ان (10) عزلات بنسبة(50%) كانت انتاجيتها للغشاء الحيوي واطئة، والعزلات الاخرى بنسبة (50%) كانت عالية الانتاجية للغشاء الحيوي.

أختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لورق الغاربطريقة الانتشار بالحفر

يبين الجدول(3) تأثير المستخلص الكحولي لورق الغارعلى بكتريا *P.mirabilis* وعند التراكيز التي تراوحت بين(6.25-200) ملغم/مللتر، مقدرة بقطرمنطقة التثبيط. وكما موضح في الشكل(3) حيث اظهرت النتائج اختلاف في درجة تثبيط المستخلص باختلاف التركيز حيث ازدادت شدة التثبيط بزيادة تركيز المستخلص وهذا يعود الى زيادة تركيز المواد المثبطة فيه.ويظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين اقطار مناطق التثبيط تبعا لتراكيز المستخلص الكحولي بمستوى معنوية($P\leq0.05$).

جدول(3) تأثير المستخلص الكحولي لورق الغار على بكتريا *P.mirabilis*

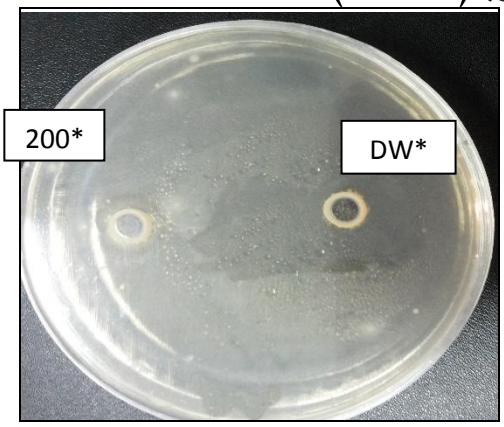
	تركيز المستخلص (ملغم/مللتر)	قطر منطقة التثبيط(ملم)
المستخلص الكحولي لورق الغار	200	20
	100	17
	50	16
	25	14
	12.5	13
	6.25	10
قيمة LSD	----	6.184 *
* ($P\leq0.05$) .		



شكل (3) تأثير المستخلص الكحولي لورق الغار على بكتريا *P.mirabilis*

-اختبار الفعالية التثبيطية لمحلول اللاكتوفيرين بطريقة الانتشار بالحفر

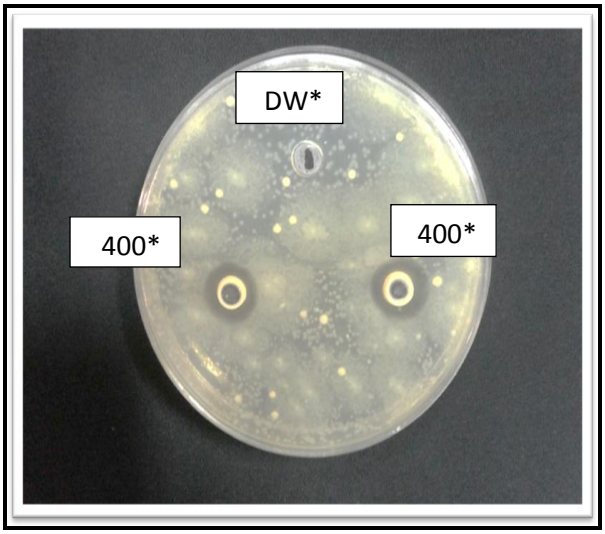
تم ديلزة محلول اللاكتوفيرين قبل دراسة الفعالية التثبيطية لزيادة كفاءته حيث كان قطر منطقة التثبيط (7ملغم/مللتر) قبل الديلزة وكما موضح في الشكل(4)،ثم ارتفعت بعد ديلزة المحلول وتقليصه الى النصف حيث اصبح قطر منطقة التثبيط (15ملغم/مللتر) وكما موضح في الشكل(5) ،ويظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية قبل وبعد ديلزة المحلول عند مستوى معنوية($P\leq0.05$).



شكل(4) تأثير محلول اللاكتوفيرين قبل الديلزة تجاه بكتريا*P.mirabilis*

*DW/ماء مقطر

*تركيز 200 ملغم/مللتر



شكل(5) تأثير محلول اللاكتوفيرين بعد الديلزة تجاه بكتريا*P.mirabilis*

*DW/ماء مقطر

*تركيز 400 ملغم/مللتر

تحديد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز المثبط لتكوين الغشاء الحيوي BIC للمستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين

يبين الجدول(4) ان قيمتي التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز المثبط لتكوين الغشاء الحيوي BIC تزداد مع زيادة تركيز المستخلص النباتي ومحلول اللاكتوفيرين،حيث اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عالية لقيمتي MIC وBIC لكل من المستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين عند مستوى معنوية ($P\leq0.01$) وقد يعود السبب في ذلك الى زيادة تركيز المادة الفعالة المثبطة فيه. وهذا يتفق مع ما اشارت اليه الباحثة(Nermeen واخرون،2011) اذ انه كلما زاد تركيز المادة المثبطة زاد تأثيره المثبط لتكوين الغشاء الحيوي تجاه البكتريا.

جدول(4) قيمتي التركيز المثبط الادنى والمثبط لتكوين الغشاء الحيوي للمستخلص النباتي ومحلول اللاكتوفيرين

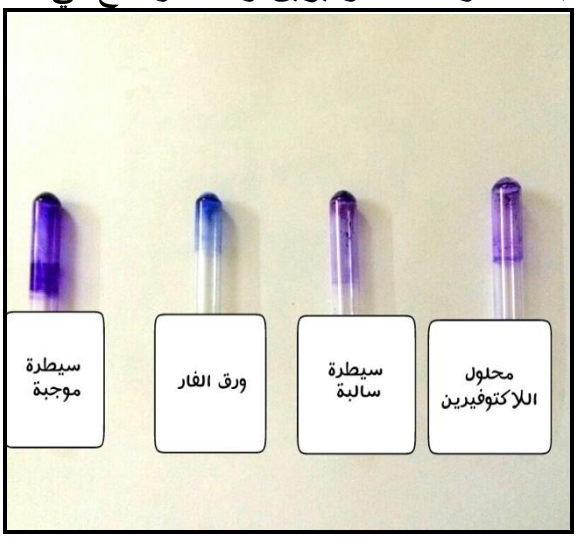
نوع المثبط	MIC (ملغم/مللتر)	BIC(ملغم/مللتر)
المستخلص الكحولي لورق الغار	6.25	100
محلول اللاكتوفيرين	100	200
قيمة LSD	14.91 **	17.22 **
** ($P\leq0.01$).		

اظهرت النتائج ان للمستخلص الكحولي لورق الغار فعلا تثبيطيا، اذ كان تأثيره المثبط بتركيز6.25 ملغم/مللتر تجاه بكتريا *P.mirabilis* ،اما التركيز المثبط لتكوين الغشاء الحيوي حيال البكتريا الاختبارية كان 100 ملغم/مللتر.

اما بالنسبة لمحلول اللاكتوفيرين فظهر تأثيره التثبيطي تجاه البكتريا الاختبارية قيد الدراسة بتركيز100 ملغم/مللتر،اما التركيز المثبط لتكوين الغشاء الحيوي فكان بتركيز200 ملغم/مللتر، ونلاحظ انه بزيادة التركيز تزداد القابلية للمحاليل المستخدمة في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي ومن الممكن اجراء المزيد من الدراسات باستعمال تراكيز اعلى للحصول على التركيز المانع تماما لتكوين الغشاء الحيوي BEC، باستعمال مادة اللاكتوفيرين بنقاوة اعلى من التي استخدمت في تجاربنا.

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين على تكوين الغشاء الحيوي بطريقتيMTP-TM

تم اختبار الفعالية التثبيطية على تكوين الغشاء الحيوي لكل من المستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين بطريقتيMTP-TM،حيث اعتمدت التراكيز المثبطة لتكوين الغشاء الحيوي BIC(100 ملغم/مللتر)بالنسبة للمستخلص الكحولي و(200ملغم/مللتر)بالنسبة لمحلول اللاكتوفيرين وكما موضح في الشكل(6).



شكل(6) اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين على التصاق الغشاء الحيوي

كانت قيم الكثافة الضوئية(O.D) لحفرالسيطرة(0.220) الحاوية على مزروع بكتيري فقط بالنسبة للطبق الحاوي على المستخلص الكحولي،اما بالنسبة للطبق الحاوي على محلول اللاكتوفيرين كانت قيمة الكثافة الضوئية لحفر السيطرة(0.20).وحسبت النسبة المئوية لتثبيط التصاق البكتريا المرضية بتطبيق المعادلة الواردة في(Gudina واخرون،2010).

النسبة المئوية لتثبيط الغشاء الحيوي=1- O.D بوجود المثبط ÷O.D لمعاملة السيطرة ×100

يوضح الجدول(5) ان النسبة المئوية لتثبيط تكوين الغشاء الحيوي تراوحت بين(18-59%)بالنسبة لمحلول اللاكتوفيرين،و(8-43%)بالنسبة للمستخلص الكحولي،ويظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عالية بين اقل قيمة تثبيط واعلى قيمة بالنسبة لمحلول اللاكتوفيرين والمستخلص الكحولي لورق الغار عند مستوى معنوية ($P\leq0.01$).

جدول(5)الكثافة الضوئية(O.D) للعزلات البكتيرية بجهازELISA والنسبة المئوية(%) للتثبيط لكل من محلول اللاكتوفيرين والمستخلص الكحولي لورق الغار

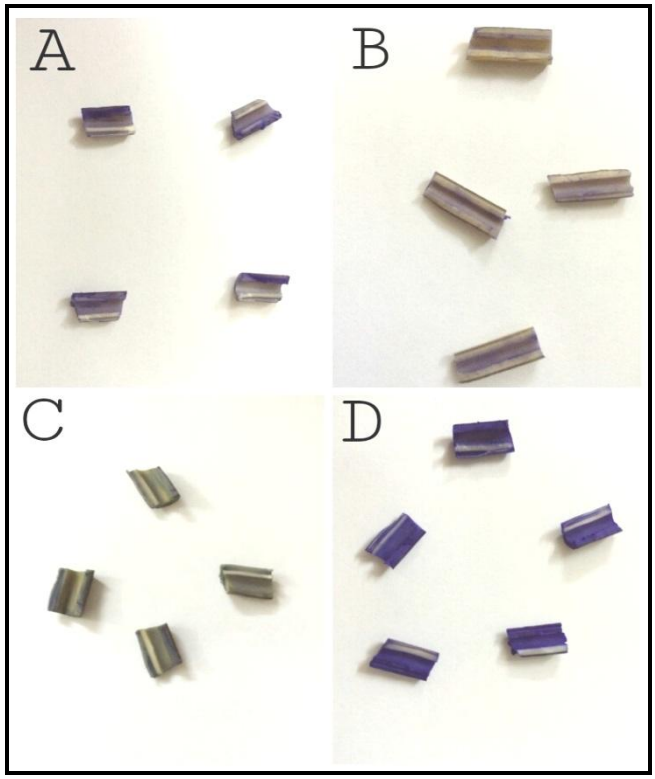
قيمة مربع كاي (χ^2)	المستخلص الكحولي لورق الغار			محلول اللاكتوفيرين		
	%	O.D	رقم العزلة	%	O.D	رقم العزلة
2.06 NS	38	0.125	P1	45	0.121	P1
7.52 **	23	0.154	P2	44.1	0.123	P2
2.29 NS	25	0.150	P3	**18**	0.182	P3
0.84 NS	22	0.155	P4	19	0.179	P4
0.035 NS	26	0.148	P5	27	0.162	P5
7.29 **	21	0.157	P6	40	0.132	P6
4.62 *	31	0.138	P7	47	0.117	P7
7.05 **	24	0.152	P8	49	0.114	P8
9.62 **	**8**	0.184	P9	53	0.104	P9
0.033 NS	**43**	0.114	P10	48	0.116	P10
6.72 **	41	0.117	P11	**59**	0.09	P11
7.15 **	30	0.139	P12	52	0.106	P12
7.92 **	16	0.167	P13	44	0.124	P13
9.62 **	**8**	0.184	P14	53	0.103	P14
7.81 **	22	0.156	P15	47	0.116	P15
4.72 *	30	0.139	P16	39	0.134	P16
8.04 *	27	0.146	P17	50	0.111	P17
5.62 *	22	0.156	P18	36	0.141	P18
4.72 *	28	0.144	P19	19	0.179	P19
0.031 NS	25	0.149	P20	27	0.160	P20
---	9.815 **	---	---	11.272 **	---	قيمة مربع كاي (χ^2)

* ($P\leq0.05$)، ** ($P\leq0.01$) ،NS: غير معنوي.

تثبيط فعالية التصاق البكتريا الممرضة في أنابيب القثطرة

تم اختيار التراكيز المثبطة لتكوين الغشاء الحيوي BIC للمستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين(100–200 ملغم/مللتر) على التوالي لدراسة تأثيرها في تثبيط التصاق بكتريا *P.mirabilis* بسطوح قطع انابيب القثطرة يوضح الشكل(7) نتائج تأثير كل من المستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي ،اذ لوحظ ان للمستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين كفاءة متقاربة من حيث تثبيط التصاق الغشاء الحيوي لهذه البكتريا بسطوح هذه القطع عند المقارنة بالقطع غير المعاملة بها(السيطرة).

حيث نلاحظ وجود غشاء حيوي اغمق واسمك بكثير من القطع المعاملة بالمستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين.



شكل(7)تأثير المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين في تثبيط التصاق الغشاء الحيوي في انابيب القثطرة

(A):قطعة انبوب قثطرة معامل بوسط(BHI) السائل فقط(سيطرة سالبة).

(B):قطعة انبوب قثطرة معامل ببكتريا *P.mirabilis* مع محلول اللاكتوفيرين.

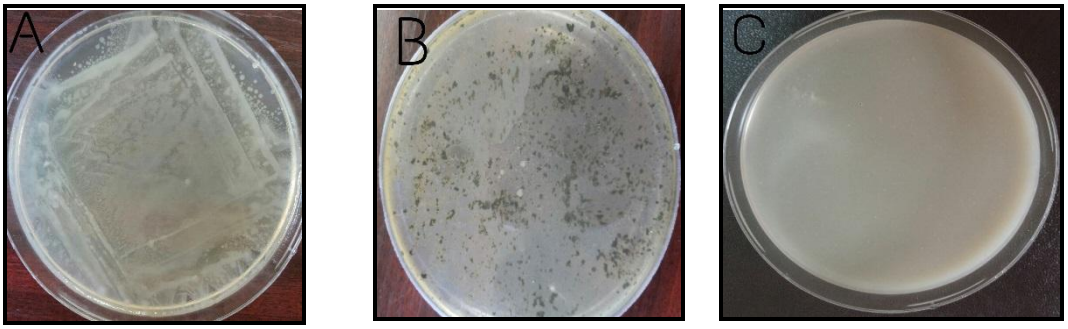
(C):قطعة انبوب قثطرة معامل ببكتريا *P.mirabilis* مع المستخلص الكحولي لورق الغار.

(D):قطعة انبوب قثطرة معامل ببكتريا *P.mirabilis* فقط(سيطرة موجبة).

تثبيط حركة(الانثيال) Swarming بالمستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين

ان حركة الانثيال تكسب بكتريا *Proteus* عامل ضراوة مهم مما يجعلها ذات امراضية عالية حيث تساعد في انتشار الاصابة من موقع الى اخر ومن ثم اجتياح خلايا المضيف(Butler واخرون،Carey:2010 واخرون،2013).

تم اختبارتأثير كل من المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين في تثبيط حركة الانثيال لبكتريا *Proteus mirabilis* وذلك باعتماد التراكيز المثبطة لتكوين الغشاء الحيوي(100 ملغم/مل)،و(200 ملغم/مل)على التوالي، الى الاوساط الزرعية المنماة فيها البكتريا ،والشكل(8) يظهر نتائج تأثير المستخلص الكحولي ومحلول اللاكتوفيرين في تثبيط ظاهرة الانثيال مقارنة بطبق السيطرة الحاوي على وسط المغذي الصلب.



(A)طبق سيطرة(وسط الاكار المغذي فقط)

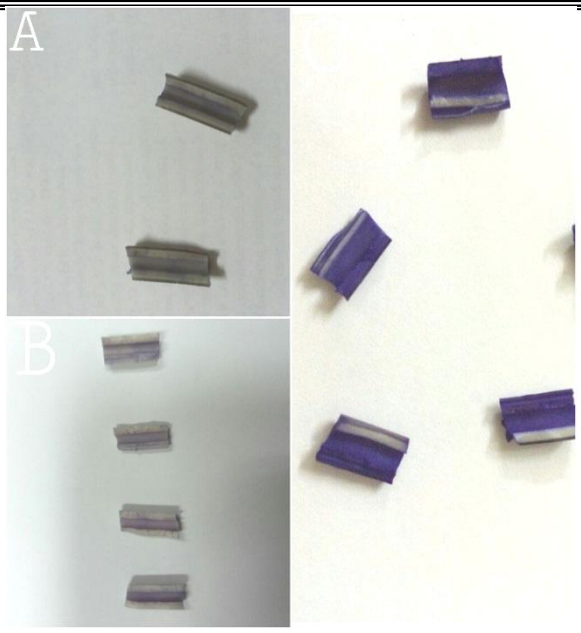
(B) وسط الاكار المغذي مضاف اليه مستخلص كحولي لورق الغار

(C)وسط الاكار المغذي مضاف اليه محلول اللاكتوفيرين

شكل(8) تأثير المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين على ظاهرة الانثيال على وسط الاكار المغذي

تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من قبل انواع متعددة من البكتريا الممرضة (Polymicrobial cultures) في أنابيب القثطرة

تم اختبار تركيز المستخلص الكحولي لورق الغار(100ملغم/مللتر)، وتركيزمحلول اللاكتوفيرين(200ملغم/مللتر) لتثبيط الغشاء الحيوي المنتج من قبل انواع متعددة من البكتريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من قثاطر المجاري البولية *Klebsiella pneumonii,Pseudomonas aeruginosa,E.coli,Serratia marscence,Acinetobacterbaumanii* ، يوضح الشكل(9) نتيجة تأثير المستخلص الكحولي لورق الغار بتركيز(100 ملغم/مل)، ومحلول اللاكتوفيرين بتركيز(200 ملغم/مل)،حيث يلاحظ ان القطع غيرالمعاملة بمحلول اللاكتوفيرين والمستخلص الكحولي (قطع السيطرة) ذات لون اغمق واسمك بكثير من القطع المعاملة عند النظر اليها بالعين المجردة.



(A) انبوب قثطرة معامل بالمستخلص الكحولي لورق الغار

(B) انبوب قثطرة معامل بمحلول اللاكتوفيرين

(D) انبوب قثطرة معامل بالمزروع البكتيري لخليط من البكتريا السالبة لصبغة كرام(سيطرة موجبة)

شكل(9) تأثير التركيز المثبط لتكوين الغشاء الحيوي (BIC) لكل من المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين في انابيب القثطرة

دراسة جزيئية-وراثية للكشف عن عوامل ضراوة بكتريا *P.mirabilis* المسؤولة عن تكوين الغشاء الحيوي

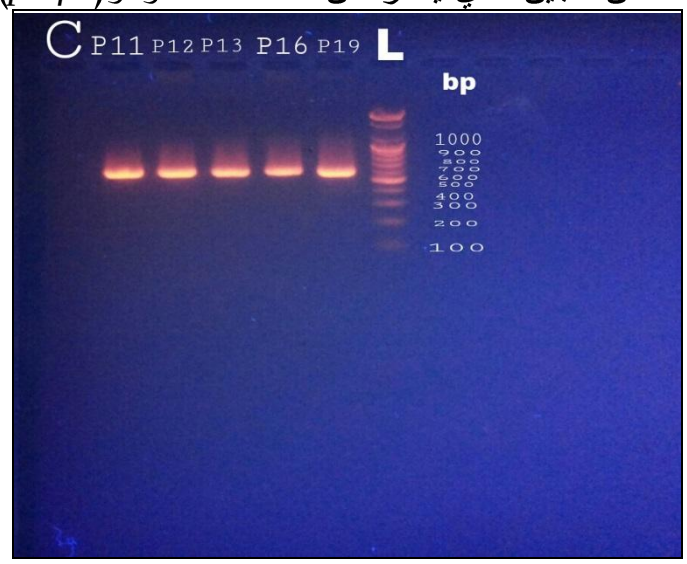
عزل واستخلاص الدنا البكتيري

اجريت تجارب العزل واستخلاص الدنا البكتيري ، حيث تم اختيار (5) عزلات(19-16-13-12-11) لكونها ذات انتاجية عالية للغشاء الحيوي، ويوضح الشكل(10) الترحيل الكهربائي لحزم الدنا البكتيري للعزلات البكتيرية في هلام الاكاروز، ومن الملاحظ ان الحزم تم ترحيلها حسب وزنها الجزيئي وحسب نقاوة وتركيز الدنا البكتيري.

شكل(10) الترحيل الكهربائي لحزم الدنا البكتيري في هلام الاكاروز بتركيز0.5% وفرق جهد60 فولت/سم^{2} لمدة ساعة واحدة.

استعمال تقنية تفاعل السلسلة التبلمري PCR للكشف عن Fimbriae

اعتمدت تقنية PCR كوسيلة لايضاح احد اهم عوامل ضراوة بكتريا *P.mirabilis* وهي الاهلاب Fimbriae المسؤولة عن التصاق البكتريا على سطوح الاغشية الطلائية للمجاري البولية،وكذلك على سطوح انابيب القثطرة،التي تؤدي بالتالي الى تكوين الغشاء الحيوي، وتم الكشف عن الجين الذي يشفر عن Fimbriae وهو(*pmfA*) شكل(11).



شكل(11) الترحيل الكهربائي للناتج النهائي PCR Product للعزلات(5) للجين *pmfA* مع الدليل الحجمي(100bp DNA Ladder) في هلام الاكاروز

L: الدليل الحجمي(100bp)

P(11-12-13-16-19): عزلات بكتريا *P.mirabilis* ذات الانتاجية العالية للغشاء الحيوي.

C:Control(ماء مقطر فقط)

الشكل(11) يبين ان المسار الاول يحوي(ماء مقطر فقط بدلا من DNA template كسيطرة سالبة) اما المسارات من(2–6) عزلات بكتريا *P.mirabilis* والمسار الاخير الدليل الحجمي(100bp DNA Ladder) ، ويتضح ايضا ان حجم الباديء 618 للعزلات اعطت نتيجة موجبة 100% وتم ترحيلها بنفس مسار الدليل الحجمي القطعة 600 ، وهذه النتيجة تعني ان العزلات الخمسة التي تم اختيارها كانت جميعها تمتلك جين (*pmfA*) PMF) المسؤول عن التشفير للاهلاب Fimbriae التي هي من اهم عوامل الضراوة لبكتريا *P.mirabilis* المسؤولة في التهابات المجاري البولية عن بدء الالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي.

ويتضح مما سبق ان نتيجة الطريقة الجزيئية واعتماد تقنية PCR جاءت مكملة ومؤكدة لنتائج الخطوات السابقة في الكشف عن الغشاء الحيوي لبكتريا *P.mirabilis* .

التوصيات Recommendations

1–دراسة التأثير التازري للمستخلص الكحولي لورق الغار مع المضادات الحيوية ضد بكتريا *P.mirabilis*.

2–دراسة التأثير التازري لمحلول اللاكتوفيرين مع المضادات الحيوية ضد بكتريا *P.mirabilis*

3–استعمال محلول اللاكتوفيرين بصورته النقية لتثبيط عوامل الضراوة لبكتريا *P.mirabilis*.

4–اجراء دراسة وراثية جزيئية لمعرفة الاليات التي تؤثر فيها كل من المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين على المكونات الخلوية للبكتريا.

5–اجراء دراسة داخل الجسم الحي In vivo لمعرفة تأثير المستخلص الكحولي لورق الغار ومحلول اللاكتوفيرين على التهابات المجاري البولية.

6–استعمال محلول اللاكتوفيرين والمستخلص الكحولي لورق الغار كمضاد امن في علاج التهابات المجاري البولية المتسببة عن القثطرة بدل المضادات المصنعة للبكتريا التي لها تأثيرات جانبية سلبية.

7-ينصح باستبدال انبوب القثطرة كل اسبوع وذلك لعدم تجمع البكتريا وتكوين الغشاء الحيوي وبالتالي تسبب التهاب المجاري البولية.

8-تعريض انابيب القثطرة الى محلول اللاكتوفيرين او المستخلص الكحولي لورق الغار قبل استعمالها من قبل المرضى.

المصادر

احمد , كرامة تحرير.(2011) .تثبيط ظاهرة الانثيال في بكتريا *P. mirabilis* بواسطة الشب (كبريتات الالمنيوم البوتاسيوم) مجلة جامعة الانبار. المجلد 5 العدد 2 .

المرجاني ، محمد فرج .(٢٠٠٠) . دراسة المقاومة المتعددة للمضادات وبعض عوامل الضراوة لبكتريا*Proteus mirabilis* ودراسة المحتوى البلازميدي فيها ، رسالة ماجستير- كلية العلوم- الجامعة المستنصرية

حميد،شيلان محمد.(٢٠١٤)العلاقة بين اليوريز والبروتسين المنتج من بكتريا *Proteus mirabilis*ومقاومتها للمضادات الحيوية،رسالة ماجستير- كلية التربية الاساسية- الجامعة المستنصرية.

كاظم , بشرى علي كاظم (٢٠١٠) . قابلية جرثومة *Proteus mirabilis* المعزولة من مصادر مختلفة على الالتصاق بالخلايا الطلائية البولية . مجلة جامعة الكوفة , المجلد ٢ , (عدد خاص للمؤتمر العلمي الاول لعلوم البايلوجية) , صفحة : ٣٩ – ٤٦ .

الموسوي،ليلى طه ياسين.(2013) تثبيط بعض عوامل ضراوة بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من قثاطر القناة البولية باستخدام بعض انواع الاحماض الدهنية.رسالة ماجستير-كلية العلوم-الجامعة المستنصرية.

Baker,E.N.;Baker,H.M.(2005). Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell.Mol.Life Sci.62:2531-2539.

Brenner, E.D.; Katari, M.S.; Stevenson, D.W.; Rudd, S.A.; Douglas, A.W.; Moss, W.N.; Twigg, R.W.; Runko, S.J.; Stellari, G.M.; Richard, M.W.; Coruzzi, G.M.(2005). EST analysis in Ginkgo biloba: an assessment of conserved developmental regulators and gymnosperm specific genes. BMC Genomics.;6(1):143.

Butler, M.T.; Wang, Q.; Harshey, R.M. (2010). Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 107(8): 3776-3781.

Burt,S.A.(2004).Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review.Inter J.Food Microbiology 94:223-53.

Carey,S.; Copeland,M.F.; Sacotte,R.; Tuson,H.H. and Weibel, D.B. (2013) . Fagellum density regulates *Proteus mirabilis* swarmer cell motility in viscous environment. J. Bacteriol. 195(2): 368-377.

Cath,W.;Sue,H.(2011). Catheter Urine Sampling Policy. North Somerest(NHS)60.328:1-9.

Dheepa,M.;Rashme,V.L.;Appalaraju,B.;(2011).Comparision of biofilm Production and multiple drug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumanii* from a tertiary care hospital in south India,Int.J.Pharm.Biomed.Sci.,2(4),103-107.

Essawi,T. and Sour,M.(2000).Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity.J.Ethnopharmacol,70,343-349.

Fang,F.;Shengmin,S.;Chen,K.;Gosslau,A.;Ho,C.and Robert,T.(2005).Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf(*Laurus nobilis*).J.Food Chem.,93:497-501.

Francesca,B.;Fabrizio,P.;Tiziana,N.;Alessandra,F.;Rosalba,P.; Antonella,P.; and Piera,V.(2011).Antiviral Properties of Lactoferrin – A natural Immunity Molecule.Molecules,16:6992-7018.

Forbes, B.A;Shm,D.F.and Weissfeld,A.S.(2002)."Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology " 11th ed. Mosby.Inc.St.Louis.USA.

Gudina,E.J.;Rocha,V.;Teixeira,J.A.;Rodrigues, L.R. (2010).Antimicrobial and anti-adhesive properties of a biosurfactant isolated from *lactobacillus paracasei* spp. Paracasei A20.Lett.Appi. Microbiol. 50:419-424.

Harith,.J.F.A.;Ali,A.S.;Ghafil,J.A.(2011).Antagonistic effect of bacteriocin against Urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm.North Am.J.Med.Sci.;3:367-370.

Jenssen, H. and Hancock, R. E.(2009). Antimicrobial properties of lactoferrin.*Biochimie*, 91: 19-29.

Karlowsky, J.A.; Jones, M.E.; Thormsberry, C.; Friedland,L. R. and Sahm, D.F. (2003). Trend in antimicrobial susceptibility among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in United State from (1980-2001). Antimicrobial agents and chemotherapy. May. 47(5): 1672-80.

Liaw,S.J.;Lai,H.C.;Ho,S.W. and Wang,W.B.(2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by p- nitrophenylglycerol.J. Med. Microbiol.49:725-731.

Lin, C.K.; Tsai, H.C.; Lin, P.P.; Tsen, H. Y. and Tsai, C.C. (2008). *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco -2 epithelial cell Anaerobe., 14:251-255.

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

Nermeen , M.;Ahmed abdallah,A.(2011). Biofilm forming bacteria isolated from urinary tract infection, relation to catheterization and susceptibility to antibiotics. International j. for Biotechnology and Molecular Biol. Research. Vol.2(10), pp.172-178.

Noori,Al-waili.;Ahmad, Al-Ghamdi;Mohammad,J.A.;Y.Al-Attal; Khelod, S. (2012).Synergistic effects of Honey and Propolis toward Drug Multi – Resistant *Staphylococcus aureus,E.coli* and *Candida Albicans* isolates in single and Poly

Ouibrahim,A.;Tlili-Ait-Kaki,Y.; Bennadja, S.; Amrouni, S.; Djahoudi, G.A.; Djebar,R.M. (2013).Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilisL.,Rosemarinus officinalis L.*and *Ocimum basilicum L.*from North of Algeria,African Journal of Microbiology Research,Oct 18;7(42):4968-4973.microbial Cultures, Int.J. Med. Sci.;9 (9):793-800.

Pablo,Z.; Vanessa,S.; Andrew,G.A.; Andrew, P.;Geraldine,S. and Duncan,J.M.(2003).*Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. Microbiology. 149, 3231-3237.

Pfaller, M.A.; Mujeeb, I.; Hollis, R.J. ; Jones, R.N. and Doen, G.V.(2000). Evalution of the discriminatory power of the Deines test and ribotyping as typing methods for *Proteus mirabilis*. Clin-microbial 38:1077-80 .

Patricia , M. Tille.(2014). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Mosby.

Saalu,L.C.;Osinubi,A.A.;Akinbami,A.A.;Yama,O.E.;Oyewopo,A.O. and Enaibe,B.U.(2011).*Moringa oleifera Lamarck* (drumstick) leaf extract modulates the evidences of hydroxyurea-induced testicular derangement.int.J.Appl.Res.in Nat.prod.,2:32-45.

Sambrook, J.; Fritisch, E.F. and Maniatis,T.(2001).Molecular cloning: alaboratory manual. 2nd ed.,Cold spring harbor laboratory press , cold spring harbor ,New York.

SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C.USA.

Sevanan, M.; Pongiya, U.; Peedikayil, N.J.(2011). Antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing *E.coli* of urinary tract infections. Curr. Res. Bacteriol.; 4:73-80.

Sosa,V.;Schlapp,G. and Zunino,P.(2006). *Proteus mirabilis* isolated of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice.Microbiol. 152:2149- 2157.

Veronika,H. and Filip, R.(2010).The formation of poly-Microbial Biofilms on Urinary Catheters.FEMS Immunol. Med. Microbiol.59(3):525-8.

Role of Biofilm and swarming of Some Species of *Proteus* in catheter-associated urinary tract infection

Noor Shakeeb Mohammed **Dr.Dhamia Mahmood Ibrahim**

Abstract

110 urinary sample were collected from urethral catheters of patients who had admitted to the intensive care units in 3 hospitals in Baghdad(Surgical subspecialities hospital/ Medical city, Al-Kindy teaching hospital & Ibn Al-Kuff hospital) during the period between October 2013 & January 2014, *Proteus spp*. Was present in 20 urinary samples (24.3%) and *Proteus mirabilis* represented 20 strains (100%).

The effect of antibiotics on bacterial strains was investigated using AST-card and the results revealed differences in the resistance of strains to the 20 chosen antibiotics, , while some strains have shown multidrug resistance to 7-14 antibiotics (64.3%).

The 20 strains of *Proteus mirabilis* have shown an ability to form biofilm in a rate of 100% but with variable degrees. The Biofilm was highly produced by 10 strains (50%), the other 10 strains have shown low ability to produce the biofilm.

Multiple concentrations of alcoholic extract of *Laurus nobilis* were prepared & their effect on the studied dacteria strains was investigated. It was noticed that the concentration of 200 mg/ml had given the highest area of inhibition (20 mm) , while the concentration of 6.25 mg/ml had given the lowest area of inhibition (10 mm).

The effect of lactoferrin solution on the 20 strains of *Proteus mirabilis* was investigated and the results revealed that the concentration of 200 mg/ml had given an area of inhibition of 7 mm before performing solution dialysis whereas after dialysis and decreasing volume to the half , the area of inhibition increased to 15 mm.

The minimal inhibitory concentration (MIC) , & the biofilm inhibitory concentration for both of alcoholic extract of *Laurus nobilis* & lactoferrin solution were quantified , and the results have shown that MIC of alcoholic exract of *Laurus nobilis* & lactoferrin was 6.25 & 100mg/ml respectively whereas BIC of alcoholic extract & lactoferrin was 100 & 200 mg/ml respectively.

The effect of BIC of alcoholic exract & lactoferrin on the inhibition of adhesion of biofilm of *Proteus mirabilis* was investigated using microtiter plate method , the rate of 8-43%for alcoholic extract, & 18-59% for lactoferrin solution .

The BIC of alcoholic extract of *Laurus nobilis* & lactoferrin solution were adopted in investigating the inhibition of adhesion into catheter tubes of *Proteus mirabilis* and other types of gram negative bacteria isolated from urethral catheters.

BIC was also adopted for inhibition of swarming phenomena where the results have shown significant removal of biofilm from catheter tubes when seen by naked eye compared to control, as well as inhibition of swarming phenomena compared to control.

Five strains of *Proteus mirabilis* were selected according to their high rate of production of biofilm , for molecular & genetic study to discover the virulence factors responsible for biofilm production. PCR technology was used to demonstrate one of the most important virulence factors which is (fimbriae) responsible for bacterial adhesion on the surfaces of lining epithelium of urinary tract and catheter tnbes which leads to biofilm production .

The results have shown that all the selected five strains had PMF gene which is responsible for fimbriae encoding , were the volume of primer was (618 bp) for all the five strains ; the five strains have given a positive results (100%) in the same path of ladder of band (600bp) when examined by electrophoresis.