الكشف الجيني لبعض عوامل الضراوة لبكتريا أخماج المسالك البولية المعزولة من إدرار المصابين بمرض الثلاسيميا

م.د. لؤي مناع ابراهيم الدوري
الجامعة التقنية الشمالية

أ.د. محمد نظير معروف
جامعة تكريت-كلية التربية للعلوم الصرفة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لغرض الكشف عن بعض جينات عوامل الضراوة لانواع البكتريا المعزولة من ادرار الاطفال المصابين بالثلاسيميا ، تم جمع 160 عينة إدرار من الأطفال الأصحاء و46 عينة من إدرار الأطفال المصابين بالثلاسيميا ، أظهرت نتائج العزل إن 84 عينة (52.5%) من العينات المدروسة أعطت نمو جرثومي موجب ،في حين أن 76 عينة من المجموع الكلي (47.5%) لم تظهر نموآ جرثوميآ على الأوساط المستعملة بالنسبة للأطفال الأصحاء. أما في الأطفال المصابين بالثلاسيميا فقد أظهرت 36 عينة نموآ أيجابيآ (78.3%) و10 عينات (21.7%) لم تعطي أي نموآ يذكر، لغرض الكشف عن بعض عوامل الضراوة لبعض العزلات المدروسة تم عزل الـDNA لجميع العزلات، تم أخذ أربع عزلات تمثلت بعزلتين من*E.coli* وعزلتين من بكتريا*Entero.faecalis* احدهما معزولة من الأطفال الأصحاء والثانية من المصابين بمرض الثلاسيميا وبأستعمال3 بادئات متخصصة لكل بكتريا.

كلمات مفتاحية:

بادئات متخصصة ، الثلاسيميا ، التهاب المسالك البولية، عوامل الضراوة ، إنزيم الهيمولايسين .

Genetic detection of some virulence factors for urinary tract infections isolated from Diuresis for people with thalassemia

L.M.I. Al-douri
Northern Technical university

M.N.Maarof
Tikrit University-college of education for pure science

Abstract

This study was conducted for the purpose of detecting some virulence factor genes of the bacterial species isolated from the urine of children with Thalassemia, 160 urine samples were collected from healthy children and 46 urine samples were collected from children with Thalassemia , Results showed that 84 sample (52.5%) of the total samples studied gave positive bacterial growth, while 76 (47.5%) gives negatives growth on media cultivation in healthy children samples.In children with Thalassemia have shown positive growth of 36 samples (78.3%) and 10 samples (21.7%) were not give any growth .the purpose of detecting some virulence factors for some studied isolates, DNA was isolated for all isolates. Four isolates were taken, represented by two isolates of *E. coli* and two isolates of *Entero.faecalis.*, one of them isolated from healthy children and the other one from Thalassemia infected children with use 3 specialized primers for each bacteria.

Keywords:

Specific primers, Thalassemia ,Urinary tract infection , Virulence factors, Hemolysin enzyme.

المقدمة :

يعد مرض الثلاسيميا (Thalassemia) من الامراض الدموية الوراثية الناتجة من حصول طفرة وراثية Mutation تكون اثارها في حصول حذف واحد أو أكثر من جينات الكلوبين Globin Genes المسؤولة عن إنتاج سلاسل الكلوبين وهذا يؤدي إلى حصول اختزال أو غياب تام في إنتاج سلاسل الهيموغلوبين [1].إن هيموغلوبين البالغين HbA يمتلك أربعة أجزاء بروتينية تدعى السلاسل المتعددة الببتيد وهذه السلاسل تصنف إلى سلسلتي ألفا α Chains وسلسلتي بيتا β Chains وفي الشخص المصاب بالثلاسيميا هناك غياب أو نقص في تصنيع أحدى أو كلتا سلاسل الالفا أو البيتا. كما انه يتضمن انواع متعدده منه تصل الى خمسة انواع [2].

يعرَف خمج المسلك البولي على أنه استجابة التهابية للجهاز البولي نتيجة غزوه واستيطانه من قبل الأحياء المجهرية الممرضة، وتُعد الاصابة بالتهابات المسالك البولية Urinary Tract Infection(UTI) من اكثر الاصابات الجرثومية في الانسان، لاسيما التهاب الاحليل والمثانة [3]. تعد أخماج المسالك البولية أحد المشاكل الطبية التي تعاني منها معظم دول العالم ، وتعد في الوقت نفسه من أكثر الأخماج البكتيرية إنتشاراً إذ إنَها تأتي بالدرجة الثانية من حيث الإنتشار بعد إصابات الجهاز التنفسي العلوي [4]. تتنوع الانواع الميكروبية المسببة لتلك الحالات وتعد بكتريا *E .coli* المسبب الرئيس لإصابات المسالك البولية نظراً لإمتلاكها تراكيب سطحية تساعدها في الإلتصاق بالخلايا الطلائية للمسالك البولية تليها أنـواع أخرى تكون أقل شيوعا مثل .Enterobacter sp, .Proteus spp و .Klebsiella sp ، أما أخماج المسالك البولية المكتسبة من المستشفيات عن طريق إستخدام القثاطر Catheter فإنها ترتبط بمدى واسع من الجراثيم الممرضة والمسببة لهذا النوع من الأخماج مثل البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus epidermidis* , *Staphylococcus aureus* فضلاً عن أنواع أخرى مثل .Enterobacter sp , *Pseudomonas aeruginosa* , ولا يقتصر دور هذه الأنواع البكتيرية على إحداث المشاكل الصحية لمستخدمي القثاطر وإنما تعد من الممرضات الأكثر تكرارًا في إحداث أخماج المسالك البولية المزمنة Chronic Bacteriuria وأخماج المسالك البولية المعقدة Complicated Bacteriuria [5].

تستعمل تقنية PCR في تشخيص الانواع الميكروبية الممرضة من خلال الكشف عن جيناتها والتي يتم مطابقتها مع بنك الجينات NCBI تاكيدا لتشخيصها، كذلك تم إستعمال هذه التقانة في دراسة المكتبات الجينية لجين الممرضات أو لجينات المضيف أو الممرض التي تتغير شفراتها في أثناء عمليات الإصابة [6] [7]، لذا كانت الفيصل للتداخل الحاصل بين الجين الممرض والمضيف ومن ثم تحديد المقاومة والحساسية عند تلك المضايف أو سواها أو قدرتها على كشف وتحليل الطفرات ومن ثم تصميم البادئات الخاصة بها بالاستعانة بالإنزيمات القاطعة والكلونة ليمكن فيما بعد التنبؤ بحدوثها من عدمه من خلال عدة طرق يكون لتفاعل الـ PCR دور رئيس فيها[8].

مواد وطرائق العمل

جمع العينات Specimens Collection: جُمِعَت 46 عينة من من ادرار الأطفال المصابين بمرض الثلاسيميا للفترة مابين شهر كانون الثاني 2018 الى نيسان 2018 ومن كلا الجنسين باعمار تراوحت بين (منذ الولادة–12) سنة من الراقدين والمراجعين لمستشفى تكريت العام والذين يعانون من اعراض اخماج المجاري البولية وهي حرقة وصعوبة البول. تم جمع العينات في قنان بلاستيكية معقمة وتم توصية المرضى بان تجمع العينة في منتصف الادرار (Clean–Catch–Midstream Urine) بعدغسل المنطقة التناسلية بواسطة الماء والصابون لتجنب التلوث بالنبيت الطبيعي الموجودة في هذه المنطقة[9]. سجلت المعلومات المتعلقة بالعمر والجنس ووجود إصابات سابقة باخماج المجاري البولية (Urinary Tract Infection(UTI وتناول المضادات الحيوية Antibiotics لكل مريض على حدة بأستعمال إستمارة معلومات معدة لهذا الغرض.

زرع العينات Samples Culture : زرعت العينات باخذ ملء ناقل البكتيريا المعقم الخاص بعينة الادرار من عينات البول – وقبل اجراء عملية الطرد المركزي – على وسط الأكار المغذي Nutrient agar ووسط أكار الدم Blood agar ووسط اكار ماكونكي MacConkey Agar Medium للتفريق بين العزلات الموجبة والسالبة وحضنت الاطباق بظروف هوائية بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة (24–48) ساعة، نقلت كل مستعمرات العزلات المفردة الى الوسط الملائم لها ثم شخصت المستعمرات مظهريا وباستخدام الاختبارات الكيموحيوية وتم تاكيد التشخيص باستخدام جهاز Vitek compact system 2 , وحسبت أعداد المستعمرات النامية وعدت العينة ذات نمو بكتيري معنوي significant عندما كان عدد المستعمرات في الطبق اكثر من (20) مستعمرة وغير معنوي non significant عندما كان عدد المستعمرات في الطبق اقل من (20) مستعمرة [10].

أستخلاص الـ DNA : تم أستخلاص الـ DNA من(4)عزلات سالبة و(6)عزلات موجبة من العزلات قيد الدراسة ، وذلك بأتباع توصيات الشركة المجهزة للعده من شركة Promega. ثم خزن الـ DNA المستخلص عند 2–8 °م ، حيث تراوحت نقاوة العينات (1.6–1.9) وهذا مؤشر على نقاوة عالية، فاذا كان أعلى من 2 فهذا يعني تلوثاً بالحامض النووي الرايبوزي RNA، أما النسب التي تكون أدنى من 1.6 فتعني تلوثاً بالبروتينات [11]. تم التأكد من التركيز والنقاوة بترحيل دنا العينات على هلام الأكاروز قبل أستخدامه كقالب في تفاعل PCR ،وقد تم تنمية العزلات على وسط نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth قبل عملية أستخلاص الدنا وكان الغرض من خطوة الأغناء للعزلات قيد الدراسة هي لزيادة أعداد الخلايا البكتيرية وبالتالي زيادة أعداد نسخ تتابع الهدف كقالب للدنا لإرتباط البادئات المكملة لها في تفاعل البلمرة المتسلسلPCR. تم الكشف عن الدنا المعزول بترحيل العينات كهربائياً على هلام الأكاروز بتركيز1.5% ،أعقبها فحص الهلام بعد عملية التصبيغ ببروميد الأثيديوم وتحت الأشعة فوق البنفسجية UV Transilluminator ، تم قياس تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص من العزلات البكتيرية قيد الدراسة بواسطة جهاز الـNano drop من خلال حقن مايكروليتر واحد من عينة الـ DNA المستخلص في الجهاز وقراءة تركيز العينة ونقاوتها كما في[11].

الترحيل الكهربائي لمستخلصات DNA: تم الكشف عن عينات DNA المستخلص باستعمال الترحيل الكهربائي على هلام الاگاروز بتركيز 1% .

ركب قالب الهلام ثم وضع المشط لصنع الحفر المستعملة لتحميل عينات الحامض النووي. سكب الاگاروز بعناية في القالب وترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة . بعد تصبيغ هلام الاگاروز بصبغة بروميد الاثيديوم فحص الهلام المصبغ في غرفة مظلمة وذلك بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه على جهاز UV Transilluminator عند الطول الموجي 366 نانوميتر وصور الهلام باستعمال كاميرا رقمية Digital camera.

البادئات Primers

استعمل الدنا البكتيري المستخلص من العزلتين *E.coli* والعزلتين *Entero.faecalis* من الأطفال المصابين بمرض الثلاسيميا كـ(Template) في تقنية PCR بأستخدام البادئات(hly، EHEC-hly، E−hlyA) المسؤولة عن الجين المنتج للهيمولايسين الخاص ببكتيريا *Escherichia coli* [12]. والبادئ (CylA) المسؤول عن إنتاج الهيمولايسين الخاص ببكتريا *Enterococcus faecalis* [13] وقد استعملت البادئات النوعية المبين تتابعها في الجدول (1) في تحديد التسلسل الخاص بالجينات المذكورة سابقآ .

جهزت البادئات بشكل مسحوق مجفد (Lyphilized) من قبل شركة (BioNEER/Korea)، وحفظت وهي مجفدة داخل أنابيب اختبار خاصة معدة لهذا الغرض بدرجة حرارة الغرفة ،بعدها تم إضافة 1 مل من الماء المقطر والمعقم لإذابة المسحوق المجفد للحصول على التركيز المطلوب محسوب بوحدة (Pmol/µL) وتكوين المحلول الخزين (Stock Solution) تم حفظ هذا المحلول الخزين بدرجة −20م°.

جدول (1) البادئات المستعملة لجينات عوامل الضراوة

النوع	اسم البادئ	تسلسل القواعد 3 → 5	التركيز النهائي للمحلول الخزين للبادئات Pmol/µl	Tm*	حجم الحزمة (Bp)
E.coli	hly-F	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	122	58.4 C	1171
	hly-R	CCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	131	62.5 C	
	IEC-hlyA-F	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	137	56.0 C	534
	EC-hlyA-R	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	101	56.7 C	
	E-hly-F	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	137.5	53.3 C	1550
	E-hly-R	TCTCGCCTGATAGTGTTTGGTA	145.6	53.8 C	

517	45.0 C	133.9	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	CylA-F	*Entero.faecalis*
	44.1 C	148.6	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	CylA-R	
688	53.1 C	106	GACTCGGGGATTGATAGGC	CylA1-F	
	54.6 C	110.3	GCTGCTAAAGCTGCGCTTAC	CylA1-R	
1.282	50.6 C	126.6	TAGCGAGTTATATCGTTCACTGTA	CylA2-F	
	51.9 C	136.5	CTCACCTCTTTGTATTTAAGCATG	CylA2-R	

Reverse :R *Forward : F التركيز النهائي بعد إضافة 1 مل ماء مقطر Bp : زوج قاعدي Base pair

Annealing temperature : Tm* درجة الحرارة الحرجة حسب المواصفات التي ذكرتها الشركة المنتجة .

البرنامج المستعمل في تقانة PCR

استعملت PCR Pre Mix المجهزة من شركة (BioNEER / Koria) للكشف عن وجود الـ DNA باستخدام بادئات متخصصة مصممة لهذا الغرض والتي تنتج حزم بأحجام معينة. وتجري طريقة العمل باستعمال PCR Micro tubes حجم 0.2 مل وحسب ماهو موضح في الجدول رقم **(2)** .

جدول (2) مكونات مزيج PCR Pre Mix

Component	20 µl/reaction
DNA polymerase	1U
Each:(dATP , dCTP,dGTP,Dttp)	250µM
Tris-HCl(pH 9.0)	10Mm
KCl	30mM
Mg Cl2	1.5 mM
D.W	14µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
DNA template	2 µl

أجريت طريقة العمل بحجم 20 مايكروليتر اعتماداً على النشرة المرفقة مع الـ PCR Pre Mix

حيث مزجت مكونات التفاعل جيدا باستخدام جهاز المزج vortex ثم نبذت لمدة 10 ثوانٍ في جهاز الطرد المركزي الدقيق Microcentrifuge لترسيب قطرات محلول التفاعل الموجودة على جدار الأنبوبة، وبعد إتمام جميع الإضافات وضعت الأنابيب في جهاز البلمرة الحراري الدوري Thermocycler بعناية لانجاز التفاعل وباستعمال البرامج الموضحة في الجدولين (3) و(4).

جدول (3) ظروف التفاعل المستعملة في تقنية PCR لبكتريا *E.coli*.

Steps	Temperature	Time	Number of cycles	Primer Name
Initial denaturation	**95 C°**	**3 min**	**1**	**Hly**
Denaturation	**95 C°**	**1min**	**30**	
Annealing	**60 C°**	**30 sec**		
Extension	**72 C°**	**3 min**		
Final extension	**72 C°**	**7 min**	**1**	
Initial denaturation	**94 C°**	**4 min**	**1**	**EHEC-hlyA**
Denaturation	**94 C°**	**50 sec**	**35**	
Annealing	**57 C°**	**50 sec**		
Extension	**72 C°**	**1 min**		
Final extension	**72 C°**	**10 min**	**1**	
Initial denaturation	**94 C°**	**2 min**	**1**	**E-hly**
Denaturation	**94 C°**	**1 min**	**35**	
Annealing	**60 C°**	**1min**		
Extension	**72 C°**	**1 min**		
Final extension	**72 C°**	**10 min**	**1**	

جدول (4) ظروف التفاعل المستعملة في تقنية PCR لبكتريا *Entero.faecalis*.

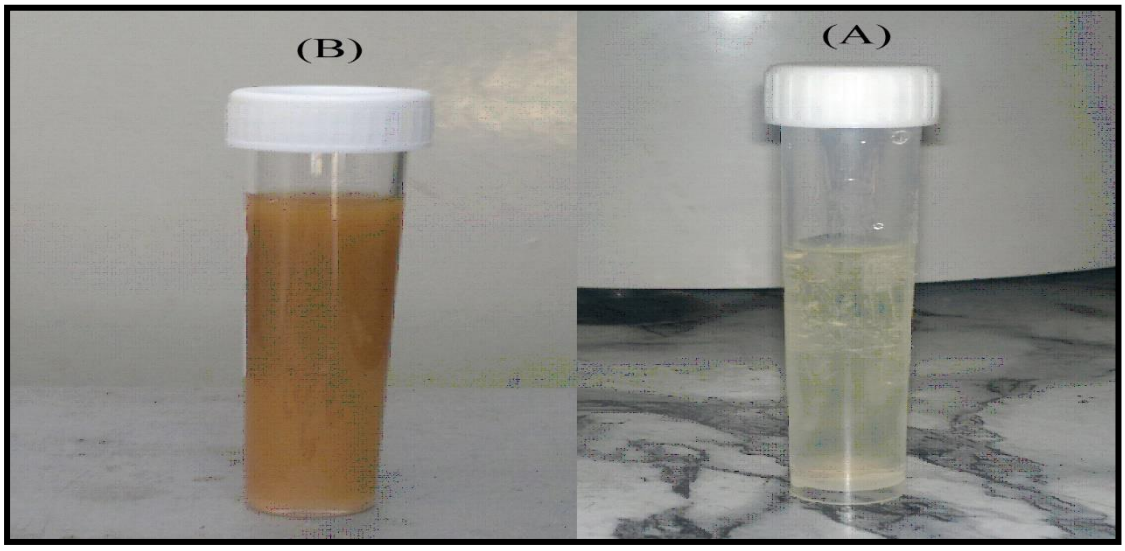
Steps	Temperature	Time	Number of cycles	Primer Name
Initial denaturation	94 C°	5 min	1	CylA
Denaturation	94 C°	45 sec	30	
Annealing	57 C°	1min		
Extension	72 C°	1 min		
Final extension	72 C°	3 min	1	
Initial denaturation	95 C°	5 min	1	CylA1
Denaturation	95 C°	1min	30	
Annealing	58 C°	1min		
Extension	72 C°	1 min		
Final extension	72 C°	10 min	1	
Initial denaturation	94 C°	3 min	1	CylA2
Denaturation	94 C°	1min	35	
Annealing	55 C°	1min		
Extension	72 C°	2 min		
Final extension	72 C°	7 min	1	

وبعد انتهاء وقت التفاعل رفعت العينات من الجهاز، ثم حمل المزيج في هلام الاگاروز بتركيز (1.5%) وترحيل العينات باستعمال جهاز الترحيل الكهربائي وكما في الطريقة المتبعة من قبل [14] لفحص الدنا باستعمال الترحيل الكهربائي بعد تحضير هلام الاگاروز بتركيز 1.5%. فُحصتْ نتائج الترحيل من خلال وضع الهلام على جهاز UV Transilluminator عند الطول الموجي 366 نانوميتر ويصور الهلام باستعمال كاميرا رقمية Digital camera عالية الدقة، ومن ثم مقارنة النتائج مع أحجام البادئات القياسية.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج العزل بأن عدد العينات التي ظهر منها نمواً جرثومياً موجباً على الأوساط المستخدمة 84 عينة أي بنسبة (52.5%) من مجموع العينات للأطفال الأصحاء المصابين بخمج المجاري البولية ، هذه النتيجة مقاربة مع النتائج التي حصل عليها الباحث[15] الذي وجد أن نسبة عينات الإدرار التي أعطت نتيجة موجبة للنمو هي 50% في حين أن 76عينة بنسبة (47.5%) من مجموع العينات الكلية لم تعطي نمواً جرثومياً بالنسبة للأطفال الأصحاء المصابين بال(UTI) ،أما بالنسبة لعينات المرضى المصابين بالثلاسيميا أظهرت 36 عينة نمواً جرثومياً (78.3%) على الأوساط المستخدمة و10عينات بنسبة (21.7%) لم تعطي نمواً من مجموع العينات الكلي ، وهي تتفق مع ماتوصل اليه الباحث [16] في دراسته داخل المملكة العربية السعودية.

قد يعزى سبب عدم ظهور نمو بكتيري كون المسبب قد يكون فايروسي او فطري او من البكتريا اللاهوائية التي لايمكن عزلها بطرق الزرع الاعتيادية المتبعة في هذه الدراسة والتي ربما تحتاج إلى أوساط زرعية وتنمية خاصة ، أو بسبب تعاطي الأطفال جرعات من المضادات الحيوية أو قد يعود السبب الى الاختلاف في حجم وطبيعة العينات المأخوذة وكذلك التفاوت في درجات الحرارة والرطوبة [17].



شكل(1) يظهر الفرق بين عينات الأدرار المأخوذة من الأطفال المصابين بالـ(UTI).:- (A) عينة أدرار مصدرها الأطفال الأصحاء (B) عينة أدرار مصدرها المصابين بمرض الثلاسيميا.

تم تشخيص العزلات النامية بالاعتماد على الفحوصات المجهرية والمظهرية وجهاز الـ Vitek 2 Compact System ،حيث اظهرت نتائج التشخيص الأختلاف في أنواع البكتريا المعزولة وأعدادها ونسبها كما موضح في الجدول (5).

جدول(5) أنواع وأعداد العزلات والنسبة المئوية للأطفال المصابين بالثلاسيميا.

عزلات البكتريا لمرضى (الثلاسيميا)	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزل الإجمالي*	النسبة المئوية للعزل النوعي**
E.coli	20	43.48	**55.6**
Staph.gallinarum	3	6.52	**8.33**
Klebsiella.pneumonia	4	8.69	**11.11**
Strep.uberies	4	8.69	**11.11**
Staph.haemolyticus	2	4.35	**5.55**
Entero.faecalis	1	2.17	**2.8**
Staph.saprophyticus	1	2.17	**2.8**
Pseudomonas.aeruginosa	1	2.17	**2.8**
المجمــوع	**36**		**%100**

جدول(6) أنواع وأعداد العزلات والنسبة المئوية للأطفال الأصحاء.

العزلات الجرثومية للأطفال الأصحاء	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزل الإجمالي*	النسبة المئوية للعزل النوعي**
E.coli	52	32.5	61.9
Staph.gallinarum	10	6.25	11.9
Klebsiella.pneumonia	6	3.75	7.14
Entero.faecalis	4	2.5	4.8
Strep.uberies	3	1.88	3.57
Salmonella.entrica	3	1.88	3.57
Staph.sciuri	2	1.25	2.38
Serratia.fonticola	2	1.25	2.38

Staph.haemolyticus	1	0.625	1.19
Proteus.mirabilis	1	0.625	1.19
المجمـــوع	84		%100

* النسبة المئوية للعزل الإجمالي = عدد العزلات / عدد العينات الكلي.

** النسبة المئوية للعزل النوعي = عدد العزلات / المجموع الكلي للعزلات.

أظهرت النتائج الوضحة في الجدول (6) أن بكتريا *E. coli* شكلت النسبة الأكبر من العزلات المتحصل عليها بالنسبة للأطفال الأصحاء وبواقع 52 عزلة(61.9%)، ان هذه النتائج جاءت متقاربة لنتائج ماتوصل اليه كل من: [18] [19] [20] عند دراستهم لمرضى الاخماج البولية في مناطق مختلفة من العراق حيث وجدوا بان نسبة تواجد بكتريا *E. coli* عند هؤلاء المرضى تتراوح بين (48.9- 67.7%) ، في حين تختلف النتائج مع دراسة [21] التي سجلت فيها بكتريا *E. coli* نسبة (11%) من مجموع العينات المدروسة،كما تختلف نتائجنا مع ما توصل اليه [22] عند دراسته لاكثر من 200000 مريض يعانون من اخماج المجاري البولية في مستشفيات مختلفة في ايرلندا اذ سجلت بكتريا *E. coli* نسبة (14.4%) من جميع العينات ان سبب هذا الاختلاف يعزى للموقع الجغرافي لمنطقة العزل أواختلاف الظروف البيئية .

كما وجدت بكتريا *E. coli* بأعلى نسبة في مرضى الثلاسيميا أيضآ وبواقع 20 عزلة(55.6%) ، أتفقت هذه النتائج مع الدراسة التي قام بها [23] على 53 طفل مصابين بالثلاسيميا حيث حصلوا على نسبة (51.1%) ، ولكنها أختلفت مع الدراسة المحلية للباحثة [24] في دراستها لمرضى الثلاسيميا في مدينة الموصل التي وجدت 2 عزلة فقط تابعة لـ *E. coli* في الأطفال ضمن الفئة (1-10) سنة.

ان النسبة العالية لبكتريا *E. coli* المعزولة من المجاري البولية قد تعزى الى سبب تواجد هذه البكتريا بصورة طبيعية في الجهاز الهضمي للانسان ومنها تنتقل الى المجاري البولية للشخص المصاب وتعد من البكتريا الانتهازية وخصوصا في حالة توفر الفرصة الملائمة لها [25].

كما ان هذه الاختلافات في نسب عزل *E. coli* المعزولة ربما يعود الى المستوى الصحي في المجتمعات المختلفة ، ويمتلك هذا النوع من الأهلاب Pili التي تعد من عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا والتي تساعدها على الالتصاق بجزيئات مستلمة خاصة Specific receptor molecules على الخلايا الطلائية للمجاري البولية[26] .

أحتلت بكتريا *Staph.gallinarum* المرتبة الثانية من حيث نسبة العزل من الأطفال الأصحاء والمصابين بالثلاسيميا بواقع 10عزلات(11.9%) من الأطفال الأصحاء ، اتفقت هذه النتائج تقريبآ مع ماتوصلت اليه الباحثة [27] وكذلك مع [28] التي وجدت نسبة عزل 8.7 % ، كما يوضح الجدول (5) ظهور 3 عزلات وبواقع (8.33%) للنوع *Staph.gallinarum* بالنسبة لمرضى الثلاسيميا ، حيث تقاربت هذه النتائج مع [29] بحصولهم على 6عزلات

(9.84%) من مجموع61 عزلة ،وجائت مختلفة مع الدراسة التي أجراها [30] في تايوان حيث حصلوا على نسبة (1.3%)، وقد يعود سبب تواجدها الى إن الأنواع العنقودية المختلفة تمثل أعلى نسبة للجراثيم الموجودة في الجلد ، حيث تمثل اكثر من (50%) من الجراثيم الموجودة على الجلد في مناطق مختلفة من الجسم ومن ضمنها الاحليل وهي ممرضات انتهازية ممكن ان تحدث خدشاً في الجلد وتدخل الجرثومة الى القناة التناسلية وتحدث التهابات الـ UTI[31].

وتم الحصول على عزلات تتبع النوع البكتيري *K. pneumoniae* وبواقع 6 عزلات وبنسبة(7.14%) من مجموع العزلات ، أتفقت الدراسة الحالية مع الباحثة [32] التي بينت ان نسبة عزل جنس Klebsiella من أخماج المسالك البولية هو (10.4%). وعند مقارنتها مع احدى الدراسات العالمية للباحث [33] تبين انها مختلفة اذ عزلوا هذه البكتريا بنسبة (21.3%) وقد يعزى سبب الأختلاف الى الفترة الزمنية والى استعمال المضادات الحيوية التي حدت من النسب العالية لهذه البكتريا ، وتقاربت نسبة عزل هذه البكتريا مع مرضى الثلاسيميا حيث كانت 4 عزلات وبنسبة (11.11%) وقد جائت متفقة مع [34] وبحصولهم على نسبة (10.8%) ولكنها أختلفت مع الدراسة العالمية [35] والذين تحصلوا على نسبة عزل (34.57%) للـ*K.* pneumoniae من بين 79عزلة.

كما أظهرت النتائج وجود 4 عزلات بنسبة (4.8 %) تعود الى النوع *Entero.faecalis* ، جاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصلت اليه [36] التي بينت ان نسبة عزل هذا النوع من أخماج المجاري البولية يقارب(6.1%) وأختلفت مع ماتوصلت اليه الباحثة [37] بنسبة(23.4%). بينماأظهر الجدول (5) وجود عزلة وحيدة للنوع *Entero.faecalis* في مرضى الثلاسيميا بواقع (2.8%) ،وتطابقت هذه النتائج مع الدراسة المحلية التي قامت بها الباحثة [24] في مدينة الموصل حيث وجدت عزلة واحدة فقط لهذا النوع ضمن الفئة العمرية (1–10) سنة ، وأختلفت النتائج مع الدراسة العالمية التي أجراها [38] في مدينة أبادان النيجيرية حيث وجدوا نسبة عالية مقارنة مع نتائجنا حيث بلغت (32.9%)، وقد يعزى السبب الى أختلاف المناطق الجغرافية والمستوى الصحي والتعليمي بين الدراستين.

كما تم الحصول على 3 عزلات وبنسبة (3.57%) من بكتريا *Salmonella.entrica* وجاءت هذه النسبة متفقة مع ماتوصل اليه كل من [39] والباحثة [40] حيث أظهرت نتائجهم وجود هذا النوع بنسبة (5.8%) و(2.73%)على التوالي ، وأختلفت مع ماتوصلت اليه الباحثة [41] بحصولها على(11.4%).

أظهرت النتائج الحصول على عزلتين وبنسبة(2.38%) من بكتريا*Serratia.fonticola* من الأطفال الأصحاء، وتقاربت نتائجنا مع [42] والذي قام بعزل البكتريا من الأطفال دون سن الثالثة في مدينة بغداد واتفقت مع الدراسة التي أجراها[20] في مدينة بابل والذي حصل على نسبة عزل(4.13%) ، وإن نتائجنا لم تتفق مع ماتوصل اليه [43] الذي قام بعزل البكتريا من مستشفيات عديده في مدينة بغداد.

كذلك تم الحصول على عزلتين وبنسبة (2.38%) وعزلة واحدة بواقع نسبة (1.19%) تابعة لكل من *Staph.sciuri* و*Staph.haemolyticus* على التوالي من الأطفال الاصحاء، وهذا يتطابق مع ماذكره الباحثان [31] وكذلك جاءت هذه النتيجة مقاربة لنتيجة الباحث [44] في مدينة بلغراد الصربية اذ شكلت بكتريا *S. sciuri* (3.43%) و بنسبة (0.94%) لـ *Staph.haemolyticus* ،واختلفت مع الدراسة التي قام بها [45] في مدينة هرار Harare في

زيمبابوي Zimbabwe حيث درس (49)عزلة لاخماج المجاري البولية وكانت تعود جميعها لبكتريا *Staph. haemolyticus* و *Staph.sciuri* .

كما أظهرت نتائج العزل من المصابين بمرض الثلاسيميا الحصول على عزلتين وبنسبة (5.55%) من بكتريا *Staph.haemolyticus* ،أتفقت هذه النتيجة مع ماتوصل اليه الباحث [30] في تايوان بحصولهم على نسبة (7.22%) ، ولكنها أختلفت كلياً مع دراسة [46] بحصولهم على (23.87%) ،قد يعزى هذا الأختلاف الى الفترة الزمنية وكذلك أستعمال مضادات فعالة أدت الى التقليل من خمج الأصابة بهذا النوع البكتيري.

كما تم الحصول على عزلة واحدة وبواقع (1.19%) من بكتريا *Proteus.mirabilis* للأطفال الأصحاء،أتفقت هذه النتيجه مع ماتوصل اليه الباحث [47] والتي كانت بواقع (3%) كما أتفقت مع نتائج الباحثان[48] اللذان اشارا الى ان نسبة عزل النوع *P.mirabilis* من أخماج المسالك البولية كان بواقع عزلة واحدة وبنسبة (2.33%) ، ولكنها أختلفت مع نتائج كل من [49] و[50] بحصولهم على نسب عالية وصلت الى(34.76%). إن هذه الاختلافات في نسب العزل قد تعود إلى أعمار وجنس المرضى و البيئة التي عزلت منها هذه البكتريا والظروف الصحية التي يعيش فيها الأطفال المرضى، كما قد يعزى سبب عزلها الى كونها تعد احدى افراد عصيات القولون المتواجدة بشكل طبيعي في القناة المعوية ولها القدرة على احداث امراض انتهازية عند توفر الفرصة الملائمة لها مثل اخماج المجاري البولية [51].

كما أظهر الجدول (5) الخاص بمرضى الثلاسيميا ظهور عزلة واحدة فقط لكل من النوع *Staph.saprophyticus*، *Pseudomonas.aeruginosa* ،بنسبة عزل بلغت (2.8%) لكل منهما ،جاءت هذه النسبة مقاربة لما توصل اليه الباحث [52] بواقع (3.75%) من بين54 مصاب ، وأختلفت مع الباحث [23] في دراستهم على 53 طفل مصابين بالثلاسيميا حيث وجدوا نسبة (9.97%) للنوع *Staph.saprophyticus* ، أما عزل بكتيريا*Pseudomonas.aeruginosa* ، فقد أتفقت مع الدراسة العالمية للباحث [53] حيث وجدوا نسبة (2.21%) من المجموع الكلي للعزلات تابعة لهذا النوع ، وأختلفت مع الدراسة التي قام بها الباحثان [54] بحصولهم على 14 عزلة وبنسبة عزل بلغت (32.41%).

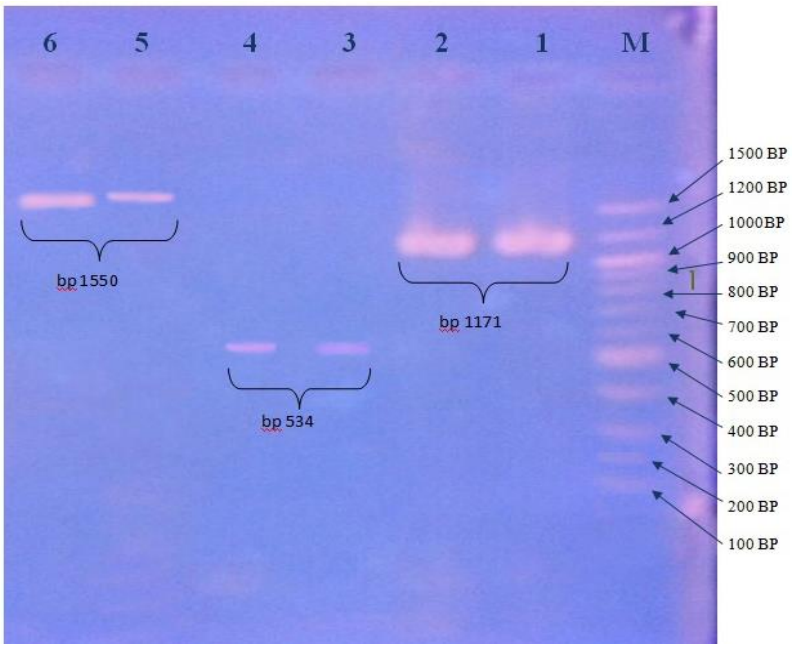
تميزت دراستنا بالحصول على 4 عزلات من بكتريا *Strep.uberies* *وبنسبة* (11.11%) من الأطفال المصابين بالثلاسيميا و3 عزلات وبنسبة (3.57%) من الأطفال المصابين الأصحاء ،والتي من النادر عزلها من الأنسان لأن مصدر عزلها الرئيسي هي الأبقار، تقاربت هذه النتائج نسبياً مع الدراستين العالميتين لكل من [55] بحصولهم على نسبة(9.61%) و [56] بحصولهم على نسبة بلغت(12.52%)، وقد يعزى أصابة الأطفال بهذا النوع الى أنتقالها عبر تلامس الطفل مع الابقار والعادات السيئة أو أنتقالها بواسطة الحليب أو من الأم عبر الرضاعة.

المحتوى الوراثي للعزلات البكتيرية:

أظهرت نتائج الدراسة الحاليه وجود حزم الدنا وبوزن جزيئي عالي في العينات قيد الدراسة للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة كَرام.

الكشف الجيني للجينات المدروسة باستعمال تقانة PCR

بعد إجراء عملية الترحيل الكهربائي لـ(4) عزلات تابعة لـ *E.coli* و*Entero.faecalis* ومن كلا المصدرين وبأستعمال 3 بادئات متخصصة لكل نوع بكتيري مسؤولة عن أنتاج الهيمولايسين ،وجد ظهور حزم حجمها مقارب لحجم حزم الـ(DNA Ladder)المتوقعة المصدرية والتي كانت(1550،534،1171)Bp بالنسبة للنوع *E.coli* هذا دليل على ظهور الجين المسؤول عن هذه الصفة الخاص بالبادئات (hly، EHEC−hly، E−hlyA) وكما هو موضح في الشكل (2)، وظهور حزم حجمها مقارب للحجم المتوقع مسبقاً(1282،688،517)Bp على التوالي بالنسبة للنوع *Entero.faecalis* دليل على ظهور الجين المنتج للهيمولايسين الخاص بالبادئ(CylA) كما هو موضح في الشكل (3) .

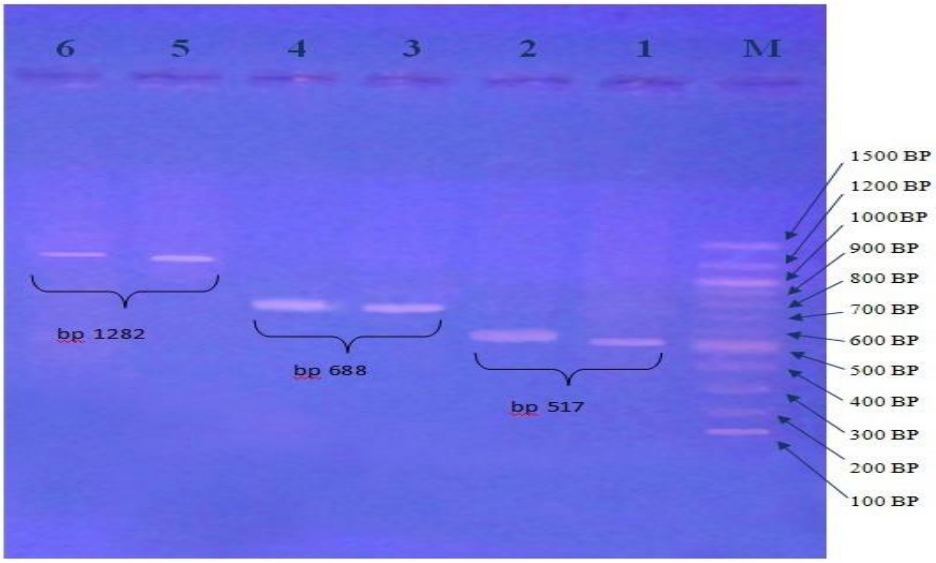


شكل (2) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل PCR لدنا عزلات بكتريا *E.coli*على هلام الاگاروز بتركيز (1.5%) باستعمال بادئات متخصصة للكشف عن الجين المنتج للهيمولايسين :

*العينة (1،3،5) تمثل *E.coli* مصدرها الأطفال الأصحاء.

*العينة (2،4،6) تمثل *E.coli* مصدرها الأطفال المصابين بالثلاسيميا.

*البادئات ممثلة بـ(hly) العينة(1،2) و(EHEC−hlyA) العينة (3،4) و(E−hly) العينة (5،6).



شكل (3) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل PCR **لدنا عزلات بكتريا** *Entero.faecalis* على **هلام الاگاروز بتركيز (1.5%) باستعمال بادئات متخصصة للكشف عن الجين المنتج للهيمولايسين:**

*البادئات ممثلة بـ(CylA) العينة(2،1) و(CylA1) العينة (4،3) و(CylA2) العينة (6،5).

أظهرت نتائج التضاعف للكشف عن عوامل الضراوة للعزلات الـ4 المختارة والتي تمثلت بعزلتين من بكتريا *E.coli* وكذلك عزلتين من بكتريا *Entero.faecalis* أحدهما من الأطفال الأصحاء والثانية من المصابين بمرض الثلاسيميا وبأستعمال 3 بادئات متخصصة Specific Primers لكل بكتريا وجود اختلافات وراثية واضحة بين العينات المدروسة ،حيث أظهرت العينات كما ظاهرة بالشكل (2) حزم ذات أوزان جزيئية للبادئات المسؤولة عن صفة أنتاج الهيمولايسين في بكتريا *E.coli* مقاربة للحزم المتوقعة للبادئات والتي بلغت(1171)bp للبادئ hly و(1550،534) bp لكل من(E-hly، EHEC-hlyA) على التوالي مع وجود تباين وراثي واضح من ناحية الأختلاف في الأوزان الجزيئية بين جينات البكتريا المعزولة من الأطفال الأصحاء والمصابين بالثلاسيميا، جاءت هذه النتائج مقاربة للدراسة العالمية التي قام بها[57] بدراستهم لـ8عزلات من بكتريا *E.coli* حيث وجدوا حزم ذات أوزان جزيئية بلغت (513، 1200، 1555)bp للبادئات(hly ، EHEC-hlyA، E-hly) على التوالي ، بينما أختلفت نتائجنا مع الدراسة التي أجراها الباحثان [58] حيث لم تظهر لديهم حزم تدل على الجين المسؤول عن أنتاج الهيمولايسين عند أستعمالهم للبادئات المذكورة عدا ظهور حزم للبادئ EHEC-hlyA ولعزلتين من بكتريا*E.coli* فقط وبوزن جزيئي واطئ بلغ(232)bp ، كما أظهرت العزلتين التابعة لبكتريا *Entero.faecalis* والظاهرة بالشكل (5) وجود حزم لجميع البادئات المستعملة والمسؤولة عن جين الهيمولايسين مقاربة للحزم المتوقعة للبادئات (CylA2، CylA) والبالغة(517،1282)bp على التوالي وظهور حزمة تقارب الـ700bp بالنسبة للبادئCylA1 الذي كان متوقعآ بـ(688) bp،مع وجود تباين وراثي بين العينات بالنسبة لنفس البادئات بين كلا المصدرين،حيث اظهرت البكتريا المعزولة من الأطفال المصابين بالثلاسيميا أوزان جزيئية أعلى من البكتريا المعزولة من الأطفال الأصحاء وكما وضحت في الصورة(4-8) ، تقاربت نتائجنا مع الدراسة التي أجراها [59] في أحدى الجامعات الصينية وذلك بحصولهم على (6)

عزلات لبكتريا *Entero.faecalis* أظهرت حزم ذات أوزان(1310،713)bp بالنسبة للبادئين(CylA2،CylA1) على التوالي،وأختلفت بالنسبة للبادئCylA بحصولهم على وزن(943)bp ،وكذلك أتفقت مع الدراسة التي قام بها [60] في دراستهم لعوامل ضراوة هذه البكتريا وقدرتها على أنتاج الهيمولايسين والمعزولة من المستشفيات الأوربية بحصولهم على حزم تقارب(544) bp بأستخدام نفس البادئ ،وجاءت دراستنا مختلفة مع ماتوصل اليه[61] في دراستهم للفرق بين عوامل الضراوة المنتجة من قبل بكتريا*Entero.faecalis* والمعزولة من الأطفال المصابين بالثلاسيميا وبحصولهم على 32 عزلة، حيث وجدوا جينات بحزم ذات أوزان جزيئية عالية مقارنة مع دراستنا بلغت(1972،1840)bp لنفس البادئات المستعملة.

المصادر

1. **Sengupta,M. (2008).** Thalassemia among the tribal communities of India. The internal Jornal of Biological Anthropology. 1.(2).

2. **Rund,D.and Rachmilewitz,E.(2005).** Medical progress p-Thalassemia. NEngl J Med. 353.(1135-46).

3. **Sim, J. (2001)**. Urinary Tract Infection. Nidus Info. Services, Inc. New York, U.S.A.

4. **Stamm , W . E . ; Hooton , T . M . ; Johnxon , J . R . ; and Johnson , C . (1989)** . UTIs from pathogenesis to treatment , J . Inf . Dis .3.(159-400).

5. **Wilks , D . ;Farrington , M and Rubenstein , D . (2003) .** Urinary Tract Infection in :The Infections Diseases Manual . 2nd ed . Blackwell . Scie . 8 .(77-81) .

6. **Hara E, Yamaguchi T, Tahara H, Tsuyama N, Tsurui H, Ide T, Oda K. (1991)**.DNA-DNA subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-Latex and PCR: identification of cellular genes which are overexpressed in senescent human diploid fibroblasts. Anal Biochem.(354-377).

7. **Duiguid JR, & Dinauer MC. (1992).** Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res*;18.(2789–2792).

8. **Millemann Y. Gaubert S. Remy D. & Colmin C. (2000).** Evaluation of IS200-PCR and comparision with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. J Clin Microbiol. 38.(2204-2209).

9. **Vandepitte , J . ;Verhaegen , J . ; Engbaek , K . ; Rohner , P. ; Piot , P. and Heuck , C . C . (2003)** . Basic laboratory Prodceduresin Clinical bacteriology . 2nd ed .WHO . Geneva .

10. **Skulnick, M.; Mitchell B.; Mazzulli, T.; Small, G.W.; Low, D.E. and Cruz, R.H.(2004).** Cost Effectiveness of BBL™ CHROMagar Orientation Medium for Routine Urine Cultures., Dept of Microbiology, TML/Mount Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto, Canada, (1-4).

11. **Sinha, R. P.; Dautz, M. and Hader, D. P. (2001).** A simple and efficient method for quantitative analysis of Thymine Dimers in Cyanobacteria, Phytoplankton and Macroalgae. Acta Protozoologica. 40.(187-195).

12. **Ariane Liebchen, Inga Benz, Alexander Mellmann, and M. Alexander Schmidt(2011).** Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Diarrhea in São Paulo, Brazil: Identification of Intermediate Virulence Factor Profiles by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 49(6):2274. DOI: 10.1128/JCM.00386-11.

13. **Roberta Creti, Monica Imperi, Lucia Bertuccini, and Lucilla Baldassarri (2004).** Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different Sources. Dipartimento di Medicina Clinica, , P. le Aldo Moro, 5-00185 Rome, Italy.

14. **Sambrook, J. and Rusell, D.W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor laboratory press, NY. (Cited by Hadi, 2008).

15. **Anad , F. (2001)** . A simple method for selecting urine samples that need culturing . Annals of saud . Med . 21.(104 – 106) .

16. **El-Harith EA, Kühnau W,and Schmidtke J (2000**) Identification and clinical presentation of β thalassemia mutations in the eastern region of Saudi Arabia. J Med Genet. 36(935–937).

17. **Balat, A. and Hill, L.(2003).** Genitourinary abnormalities is children with urinary tract infection., *J. Med. Sciences*. 29.(59-63).

18. **الخياط، محمد زغلول سعيد**(2008).تحييد محتوى البلازميدي في الجراثيم المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية في مدينة الموصل رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

19. **المياحي، سعاد عبد الفتاح** (2005).عزل وتشخيص البكتريا الهوائية المسببة لخمج السبيل البولي لدى النساء الحوامل في مدينة الديوانية وحساسيتها لبعض المستخلصات النباتية .رسالة ماجستير،كلية العلوم ،جامعة البصرة.

20. **الدباغ ، نبراس نصر الله.**(1998).عزل وتشخيص العزلات البكتيرية المسببة لألتهابات المجاري البولية لدى أطفال محافظة بابل.رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة بابل.

21. **الهلالي، فرح هاشم حسين** (2005). العلاقة بين اصابة اللوزتين بالمكورات السبحية والتهاب المجاري البولية في محافظة نينوى. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

22. **Vellinga, A.; Cormican, M.; Hanahoe, B. and Murphy, A. W. (2010).** Predictive value of antimicrobial susceptibility from previous urinary tract infection in the treatment of re-infection., British Journal of General Practice; 60. (511–513).
23. **Asinobi AO, Fatunde OJ, Brown BJ, Osinusi K, and Fasina NA (2003**): Urinary tract infection in febrile children with sickle cell anaemia in Ibadan, Nigeria. Ann Trop Paediatr, 23.(129-134).

24. **علي، غيداء محمد عبد العزيز**.(2009).تشخيص بعض العوامل الممرضة المنقولة أثناء إعطاء الدم لمرضى الثلاسيميا.رسالة ماجستير،كلية العلوم ،جامعة الموصل.

25. **Roborts, J. A.(1996).** Factores predisposing to urinary tract infection in children. Pediatr. Nephrol. 10.(517-522).

26. **Braunwald, F.; Fauci, A.; Kasper, E.; Hauser, C.; Longo, W. and Jameson, B. (2001).** Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition , Volume 3, London.,(1620-1626).

27. **الزبيدي، لبنى عبد الجبار**.(2001).التهاب المجاري البولية وتفتيت الحصى .رسالة ماجستير، الكلية الطبية ،جامعة بغداد.

28. **عاكف، ورود كمال**.(2003).دراسة مقارنة لألتهاب المجاري البولية المتسببة عن بكتريا *E.coli* و*Staph.aureus* وتأثير الزعتر عليهما وعلى أنسجة الجهاز البولي.رسالة ماجستير ،كلية العلوم،الجامعة المستنصرية.

29. **Shih-Chung Wang,. Kai-Hsin Lin, Jimmy P. S. Chern, Meng-Yao Lu, Shiann-Tarng Jou, Dong-Tsamn Lin, and Kuo-Sin Lin .(2003).**Severe Bacterial Infection in Transfusion-Dependent Patients with Thalassemia Major, Department of Health, Tao-Yuan, Taiwan.

30. **Peng, C. T., C. H. Tsai, J. H. Wang, C. F. Chiu, and K. C. Chow. (**2000). Bacterial infection in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia in central Taiwan. Acta Paediatr. Taiwan. **41(**318–321).

31. **Kwok ,A. Y. and Chow, A.W .(2003).** Phylogenetic study Staphylococcus and Micrococcus species based on partial hsp 60 gene seguences .Ine.J.Syst.Evol.Microbiol.,53.(87 – 92) .

32. **مفتن ، فاطمة شغيث.**(2000).انتشار وضراوة بكتريا الكليبسيلا المعزولة من التهابات المجاري البولية في الانسان ودراسة محتواها البلازميدي.رسالة ماجستير .كلية العلوم.الجامعة المستنصرية.

33. **Rozalski , A ; Sidorczyk , Z . and Kotelko , K . (1997) .** Potential virulence factor of *proteus bacilli* . Microbiol . Mol . Biol . Rev. 16 .(65-89).

34. **Li , Shing MM,and Chik KW,(2001).** *Klebsiella pneumoniae* meningitis in thalassemia major patients. Pediatr Hematol Oncol; 18.(229–32).

35. **Yao TC, Hung IJ,and Su LH,(2001).** Endogenous endophthalmitis and necrotizing pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* in a child with beta thalassaemia major. Eur J Pediatr; 160(449–56).

36. **Zeamanuel tesfahunegn , B. Sc.(2007).**Hospital acquired surgical site and catheter related urinary tract infection among patients admitted in mekekke hospital , mekelle , Tigray , Ethiopia .MSc. Thesis . College of Medicine , Addis Ababa University.

37. **الجبوري،خلود كريم حسن.**(2001).دراسة عن البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية.رسالة ماجستير ،كلية العلوم،جامعة بغداد.

38. **Brown BJ, Asinobi AO, Fatunde OJ, Osinusi K, and Fasina NA.(2003).** Antimicrobial sensitivity pattern of organisms causing urinary tract infection in children with sickle cell anaemia in Ibadan, Nigeria. Department of Paediatrics, University College Hospital, Ibadan, Nigeria.

39. **الطائي، مهدي صالح عبد الرحمن.**(2004).عزل وتشخيص جرثومة السالمونيلا من عينات سريرية مختلفة من الأنسان ودراسة إمكانية توليد طفرات بتأثير أشعة كاما في المورثات مانحة المقاومة.رسالة ماجستير ،كلية التربية ،جامعة الموصل.

40. **البكر، شيماء منقذ عبد الجبار.**(2000).دراسة تأثير الكولسين المنقى جزئياً على بكتريا *E.coli* و*Salmonella* .رسالة ماجستير ،كلية العلوم،الجامعة المستنصرية.

41. **أسماعيل،هاجر علي شريف.**(2005).دراسة عوامل الضراوة لجراثيم السالمونيلا المعزولة من المرضى في مدينة كركوك ومقارنتها مع بعض العزلات القياسية.أطروحة دكتوراه ،كلية العلوم ، جامعة الموصل.

42. **توفيق، شاهيران محمود.**(2005).إنتشار صفة المقاومة للمضادات الحيوية في بعض أنواع البكتريا السالبة المسببة للألتهاب المجاري البولية لدى الأطفال من الذكور والأناث دون السنة الثالثة.رسالة ماجستير ،كلية العلوم،الجامعة المستنصرية.

43. **الخزرجي، منعم رضوان علي**(2001). دراسة مقارنة للعوامل ضد الماكروبية على بعض العصيات السالبة لصبغة كرام المعزولة من التهاب المجاري البولية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

44. **Stepanovic, S.; Jezek, P.; Vukovic, D., Dakic, I. and Petras. (2003)** Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to Urinary tract infection. J. Clin. Microbiol., 41 (11)(5262 – 5264).

45. **Simango, C. (2005).** Characterisation of *Staphylococcus haemolyticus* isolated from urinary tract infections. 51.(11-12).(112-4).

46. **Wong WY, Powars DR, Chan L, Hiti A, Johnson C,and Overturf G(1992)** Polysaccharide encapsulated bacterial infection in sickle cell anemia: A thirty year epidemiologic experience. Am J Hematol(39- 176).

47. **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).

48. **Buzayan , M. and Taher , I.(2009).**Urinary tract infection among HIV-infected patients.The Libyan Journal of Infectious Diseases.3(2)(19-24).

49. **السعدي ، حسن علي حسين** . (2005) . دراسة مناعية للأنزيم الحال للبروتين المستخلص من بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من خمج السبيل البولي . أطروحة دكتوراه، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

50. **الطائي ، هادي عبد الرحمن رشيد**.(2005). دراسة بكترولوجية ، وراثية وجزيئية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات مدينة بغداد.اطروحة دكتوراه .كلية العلوم.جامعة المستنصرية.

51. **Harshy, R. M. (2003).** Bacterial motility on a surface : many ways to acommon goal.,Annu.Rev.Microbiol.,57.(249-273).

52. **Shih-Chung Wang,. Kai-Hsin Lin, Jimmy P. S. Chern, Meng-Yao Lu, Shiann-Tarng Jou, Dong-Tsamn Lin, and Kuo-Sin Lin .(2003).**Severe Bacterial Infection in Transfusion-Dependent Patients with Thalassemia Major, Department of Health, Tao-Yuan, Taiwan.

53. **Ghosh, K., S. Daar, D. Hıwase, and N. Nusrat. (2000)**. Primary *Pseudomonas meningitis* in an adult, splenectomized, multitransfused thalassemia major patient. Haematologia **30.(**69–72).

54. **Ander DS and Vallee PA(1997).** Diagnostic evaluation for infectious etiology of sickle cell pain crisis. Am J Emerg Med, 15.(290-292).

55. **Denis M, Parlane NA, Lacy-Hulbert SJ, Summers EL, Buddle BM, and Wedlock DN (2006).** Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. Vet Immunol Immunopathol 114.(111–120).

56. **Bannerman DD, Paape MJ, Goff JP, Kimura K, Lippolis JD,and Hope JC (2004).** Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. Vet Res .35.(681–700).

57. **Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N.,and Herman, L.,(2003).** Detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* by VTEC/EHEC multiplex PCR in procine faeces and pig carcass swabs. Res. Microbiol. 154.(97– 104).

58. **Adrienne W. and James C. (1998)**. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx*1, *stx*2, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*. Journal Of Clinical Microbiology, (598–602).

59. **Guijun Ma, Sujuan Han, Genqiang Yan, and Xia Zhou (2009).** Cloning and Analysis of DNA Sequence of Gene CylA of Enterococci Inducing Sheeps Encephalitis. College of Animal Sciences and Technology ShiHeZi University /China.(154-161).

60. **Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C,and Chapelle S, (2004)** Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus*. *faecalis*. J Clin Microbiol 42.(4473–4479).

61. **Emanuel N. Vergis, Nathan Shankar, Joseph W. ,David R. Snydman, Marcus J., Peter K., Marilyn M., and Robert R. (2002)**. Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with anemia Due to *Enterococcus faecalis*. Clinical Infectious Diseases; 35.(570–577).