الاستخلاص والتنقية الجزئية لخملة UCA من بكتريا *Proteus mirabilis* ودراستة دورها في الالتصاق على الخلايا الطلائية البولية

مي طالب فليح و عامر سعيد علي

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بغداد

maytalib@yahoo.com

الخلاصة

عزلت البكتريا السالبة لملون كرام من 61 عينة أدرار وبنسبة عزل 28,9% من أصل 211 عينة أدرار ، كانت نسبة عزل بكتريا *Escherichia coli* 70,49% ، أما بكتريا *Klebsiella pneumoniae* ، و *Pseudomonas aeruginosa* فكانت نسبة عزلهما 8,19% و 6,55% وعلى التوالي .أظهرت بكتريا *Proteus* spp. نسبة عزل 14,75% وبلغت نسبة عزل *P.mirabilis* 11,47% أما نسبة عزل *P.vulgaris* فكانت 3,27% .

تم التحري عن قدرة سلالات بكتريا *P.mirabilis* للتعبير عن خمل لاصق الخلايا الطلائية البولية (UCA) (Uroepithelial Cell Adhesin) ، بالاعتماد على أعلى معدل التصاق للبكتريا بالخلايا الطلائية البولية للانسان ، أذ تم أختبار العزلة U7 *P.mirabilis* التي كان معدل ألتصاقها 30,2% عند تنميتها على وسط مرق اللوريا وفترة حضن 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م ، وعند تنميتها على وسط أكار اللوريا كان معدل التصاقها 20,3% مقارنة بالعزلة *P.mirabilis* U4 التي أبدت معدل التصاق واطيء عند تنميتها على وسط مرق اللوريا وأكار اللوريا أذ بلغ معدل الالتصاق 4,7% و 1,65% وعلى التوالي أظهرت العزلة U7 *P.mirabilis* قدرة للتعبير عن الخمل المقاوم للمانوز شبيه البروتيس (MR /P) والخمل المقاوم للمانوز شبيه الكلبسيلا (MR /K) أختزل التعبير عن الخمل MR /P و MR /K عند تنمية U7 *P.mirabilis* على الاوساط الزرعية الصلبة .عزل خمل UCA ونقي جزئياً بأستخدام اليوريا بتركيز 2 مولر و الصدمة الحرارية وكبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 50% و أملاح Deoxycholate ، كان تركيز بروتين UCA هو 1,65 مايكروغرام/مليلتر.أظهر الترحيل الكهربائي وبوجود المادة الماسخة SDS وبعد الترسيب بكبريتات الامونيوم ظهرت 6 حزم، الحزمة 5 تمثل بروتين UCA المنقى جزئيا والذي بلغ وزنه الجزيئي 17782 دالتون.

المقدمة:

حضى خمج المسالك البولية باهتمام الباحثين و العاملين في المجال الطبي ؛ لكونه يمثل مشكلة من مشاكل الصحة العامة ، كما انه يعد من الامراض المهمة والمتكررة الحدوث . تم التركيز في السنوات الاخيرة على بكتريا *P.mirabilis* لارتفاع نسبة الاصابة بهذه البكتريا قياساً بنسبة وجودها بوصفها جزءاً من النبيت الطبيعي للانسان إذ تشكل حوالي5 % [2,1]. تسبب بكتريا *P.mirabilis* الاصابة بالتهاب المسالك البولية للاطفال قبل بلوغ سن المدرسة بنسبة 21,2% [3] أما بالنسبة للمرضى بعد عملية زرع الكلى فتكون نسبة الاصابة بهذه البكتريا هي 5,17% [4]. تعود قدرة هذه البكتريا على إحداث خمج المسالك البولية لامتلاكها العديد من عوامل الفوعة فضلا عن قدرتها على أنتاج انزيم اليوريز، تمتلك القدرة على الحركة (Motility) ، و الاجتياح (Invasiveness) ، و انتاج الهيمولايسين (Hemolysin)، وانتاج انزيم البروتيز (Protease) [5] أما الانماط القادرة على انتاج انزيم البيتالاكتميز تكون ذات قدرة عالية على الالتصاق على جدران الخلايا الطلائية البولية والقثطر البولي وتكوين الغشاء الحيوي [6,5] ومن العوامل الاخرى التي تعمل على زيادة فوعة هذه البكتريا قدرتها على انتاج انواع مختلفة من الخملة [8,7] .تقاوم هذه البكتريا العديد من مضادات الحياة الشائعة الاستعمال مثل : مضادات البيتالاكتام و الامينوكلايكوسايد وغيرها من مضادات الحياة الاخرى . كما أن الاستعمال العشوائي لمضادات الحياة أدى الى ظهور السلالات المقاومة ومن ثم عدم كفاية العلاج ضد خمج المسالك البولية [9]. وجد حديثا ان المضاد الحيوي Ceftriaxone فعال 100% ضد جميع ألاجناس البكتيرية المسببة لالتهاب المسالك البولية وبضمنها *P.mirabilis* [3] كما ان الحصى البولية التي تكونها بكتريا *P. mirabilis* عند الاصابة بخمج المسالك البولية تحميها من مضادات الحياة المختلفة ؛ كما وتحميها أيضا من فعل الجهاز المناعي للانسان [10] .تنتج بكتريا *P.mirabilis* خمل لاصق الخلايا الطلائية البولية (Uroepithelial cell adhesion) التي يعود لها الدور الاساسي للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية للانسان والتي أطلق عليها فيما بعد تسمية الخمل غير الملزن (Non-agglutaniting fimbriae) . كما تنتج هذه البكتريا أيضا خمل المقاوم للمانوزشبيه البروتيس (Mannose resistant /*Proteus* like fimbriae) (MR/P) و الخمل المقاوم للمانوز شبيه الكلبسيلا (Mannose resistant /*Klebsiella* like fimbriae) (MR/K) ، إذ تمتلك خمل MR/P القدرة

للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية للانسان وهي أيضا ممنع جيد إذ تعمل على أحداث أستجابة مناعية عند حقن بكتريا *P.mirabilis* في الحيوانات التجريبية والذي يؤكد على قدرة هذه البكتريا على أنتاج خملMR/P وبمستويات عالية عند الاصابة ، أما الخمل MR/K فتمتلك قدرة الالتصاق على الخلايا الطلائية للكلية [11,10].وجد الباحثون بان هنالك علاقة وثيقة بين انتاج الاسواط والتعبير عن الخملة اذا تزداد قابلية البكتريا على انتاج الخملة كلما قلة قابليتها على الحركة كما وتزداد انتاجيتها ايضا كلما قل تركيز الاوكسجين أثناء مرحلة النمو[13,12].تقل قابلية بكتريا *P.mirabilis* المطفرة للجين المشفر للخملة نوع (MR/P) و *P. mirabilis* fimbriae (PMF) للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية خارج الجسم الحي وخلايا الكلية والمثانة البولية داخل الجسم الحي [14] . أتجهت العديد من الدراسات لتطوير لقاح ضد بكتريا *P.mirabilis* بسبب أرتفاع نسبة الاصابة بخمج المسالك البولية والذي تسببه هذه البكتريا وخاصة المرضى الذين يعانون من تشوهات وظيفية وتشريحية للمسالك البولية والمرضى المستخدمين للقثطرة البولية ولمدة طويلة و النساء اللاتي يعانين من تكرار الأصابة ببكتريا *Eschericia coli* قبل أن تتطور الاصابة ببكتريا *P.mirabilis* .لذلك استهدفت هذه الدراسة التحري عن الاجناس السالبة لملون كرام المسببة لخمج المسالك البولية و عزل وتشخيص بكتريا *P. mirabilis* والتحري عن قدرتها على انتاج الخملة ودراسة دورها في الالتصاق على الخلايا الطلائية البولية للانسان.

المواد و طرائق العمل:

جمع العينات

جمعت 211 عينة إدرار لأشخاص مصابين بالتهاب المجاري البولية ومن الجنسين كليهما و بمختلف المراحل العمرية ، و كانت العينات تؤخذ من الادرار الوسطي و ترك الانسياب الاولي للادرار ، وضعت العينات في قناني معقمة . أخذت العينات من مستشفيات محافظة بغداد و التي شملت : مستشفى الكاظمية ، و مستشفى اليرموك وللمدة من 16-11-2005و لغاية 20-2-2006 .

تشخيص العزلات

شخصت العزلات أعتمادا على مصنف بركي [15] وعلى وفق الطرائق المستخدمة من [17,16] . اما الاختبارات الكيموحيوية طبقت بالاعتماد على [18] .

أختبار التصاق بكتريا *P.mirabilis* على الخلايا الطلائية البولية للانسان [19] :

-1 تحضيرخلايا البكتريا

نشطت العزلة *P.mirabilis* U7 على أكار اللوريا لمدة 24 ساعة ، ثم نقلت مستعمرتان الى مرق اللوريا و حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ، نبذت الخلايا بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة ، اعيد تعليق الخلايا بـ PBS ذي الرقم الهيدروجيني 7,2 و أعيدت عملية النبذ مرتين ، ثم علقت الخلايا بـ PBS ، و ضبط عدد الخلايا الى (1×10^{8})وحدة مكونة لمستعمرة /مليلتر باجراء طريقة العد الحي للخلايا (Viable Count) .

2-تحضير الخلايا الطلائية

جمعت عينة إدرار أول الصباح للادرار المتوسط لفتاة غير متزوجة مع التأكد من عدم وجود حالة التهاب للمجاري البولية . نبذت الخلايا الطلائية بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة5 دقيقة .

سكب الرائق و أعيد تعليق الراسب الحاوي على الخلايا الطلائية بـ PBS ذي الرقم الهيدروجين 7,2 ، و رجت الانابيب ثم أعيدت عملية النبذ (3-4) مرات ، بعدها علق الراسب بـ PBS ذي الرقم الهيدروجيني 7,2 و ضبط عدد الخلايا الطلائية الى (1×10^{5})خلية طلائية / مليلتر باستعمال الـ Hemocytometer .

3- أختبار الالتصاق البكتيري

(1) مزج 1 مليلتر من العالق البكتيري بتركيز (1×10^{8})وحدة مكونة لمستعمرة / مليلتر مع 1 مليلترمن عالق الخلايا الطلائية (1×10^{5}) خلية طلائية / مليلتر في انبوبة اختبار، مع ترك أنبوبه بدون أضافة العالق البكتيري بوصفه سيطره .

(2) حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37م لمدة 60 دقيقة في حاضنة هزازة بسرعة 70 دورة/دقيقة.

(3) نبذ العالق بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 5 دقيقة، سكب الرائق و غسل الراسب بـPBS، و أعيدت الخطوة نفسها لـ (3-4) مرات للتخلص من البكتريا غير الملتصقة

(4) أهمل الرائق و حضرت شريحة زجاجية بنشر قطرة من كل أنبوبة على أنفراد تنشر القطرة بأستخدام حافة الشريحة الزجاجية، ثم تركت لتجف في الهواء.

(5) ثبتت الشريحة الزجاجية بقطرة من الميثانول المطلق لمدة 5دقائق، و ثم صبغت بملون كمزا.

تركت لمدة ساعة ثم غسلت لازالة الصبغة الزائدة ، و تركت لتجف ثم فحصت بالمجهر الضوئي بقوة تكبير 100 X بأستعمال الزيت ، سجلت النتائج بحساب عدد البكتريا الملتصقة بـ 40 خلية طلائية ، ثم حسب معدل التصاق البكتريا / خلية طلائية .

أختبار قابلية بكتريا *P.mirabilis* على أنتاج P ⁄ MR و MR ⁄K بأستخدام أختبار التلازن الدموي:

حضرت الخلايا البكتيرية و كريات الدم الحمر الطازجة بتركيز 3% مضاف اليها سكر المانوز بتركيز 1% وفق المصدر [20].

أما كريات الدم الحمر المدبغة حضرت بتركيز 3% مضاف اليها سكر المانوز بتركيز 1% بعد معاملتها بمحلول الTannic acid المحضر انيا وفق المصدر [21].

أختبار التلازن الدموي:

أجري الاختبار بوضع قطرة بحجم 30مايكرولتراً من العالق البكتيري وقطرة من الـ RBCs بحجم 30 مايكرولتراً على شريحة زجاجية نظيفة مع التحريك المستمر بدرجة حرارة الغرفة . يعد تلزن كريات الدم الحمر مع بعضها خلال 5 دقائق أو أقل نتيجة موجبة [20] .

الاستخلاص و التنقية الجزئية لبروتين خمل UCA [22] :

تنمية البكتريا

نشطت العزلة *P.mirabilis* U7 على وسط أكار اللوريا لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م ، ثم علقت الخلايا البكتيرية بـ PBS ذي الرقم الهيدروجيني7,2 بحجم5 مليلترات ونقل العالق البكتيري الى وسط مرق اللوريا . حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م . نبذت الخلايا بالطرد المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم غسلت الخلايا مرتين بمحلول داروء ترس الهيدروكلوريك .

فصل الخمل عن غشاء البكتريا

علق راسب الخلايا البكتيرية بمحلول فوسفات الصوديوم ، كما ويضاف أيضا حجم مساوٍ من محلول اليوريا . وضع عالق الخلايا البكتيرية في حمام مائي بدرجة حرارة 65م لمدة 20 دقيقة . تم التخلص من خلايا البكتريا منزوعة الخمل بترسيبها بوساطة المنبذة الدقيقة بسرعة g7500 لمدة 10 دقائق .

ترسيب بروتين خمل UCA و بروتينات الغشاء الاخرى

أضيفت كبريتات الامونيوم $(NH4)_2SO4$ للعالق بنسب تشبع مختلفة مع التحريك المستمر على جهاز المحرك المغناطيسي بدرجة حرارة 4 م لمدة 2 ساعة . جمع راسب البروتينات بوساطة المنبذة الدقيقة بسرعة دوران g12000 لمدة 20 دقيقة .

التنقية الجزئية لبروتين خمل UCA

علق الراسب بمحلول دارىء ترس الهيدروكلوريك ، ثم أجريت عملية الديلزة ضد الداريء نفسه لمدة 16 ساعة بدرجة حرارة 4م وأزيلت المواد غير الذائبة بوساطة المنبذة الدقيقة بسرعة g20000 لمدة 30 دقيقة ، ثم أضيف للعالق محلول Sodium deoxycholate بنسبة 0,5 % ، ثم أجريت عملية الديلزة ضد دارىء ترس الهيدروكلوريك و المضاف إليه Sodium deoxycholate بنسبة 0,5 % لمدة 48 ساعة مع التغيير المستمر لمحلول الديلزة بدرجة حرارة 4 م .

تم إزالة جزيئات Sodium deoxycholate غير الذائبة بوساطة المنبذة الدقيقة بسرعة g12000 لمدة 20 دقيقة ، ثم أجريت عملية الديلزة ضد محلول الدارىء ترس الهيدروكلويك لمدة 72 ساعة مع التغيير المستمر لمحلول الديلزة بدرجة حرارة 4 م .وقدر تركيز البروتين بالاعتماد على طريقة [23].

الترحيل الكهربائي في هلام عديد الاكريل أمايد بوجود المادة الماسخة SDS وفق طريقة [24] حضر هلام الفصل بتركيز10 % ومحلول SDS 10%.

البروتينات القياسية

حضرت محاليل البروتينات القياسية Bovin serum albumin, Trypsin, Lysozyme Transferrin, التي أستخدمت لمعايرة بروتينات الانموذج بأذابة البروتينات القياسية المجفدة في 0,2 مليلتر من محلول الدارىء الخزين للانموذج والمجهزة من شركة BHD.

النتائج والمناقشة:

-العزل والتشخيص

جمعت 211 عينة إدرار مَثلت الأدرار الوسطي لأول الصباح ، وعند تنميتها على وسط أكار الماكونكي أظهرت النتائج أن 61 عينة إدرار ذات نمو بكتيري ، وهذا يعني أن نسبة عزل البكتريا السالبة لملون كرام والمسببة لخمج المسالك البولية

هي 28،9% ، وهذه النتيجة لاتتوافق مع نتائج دراسات أخرى ، إذ وجد العبيدي [25] أن عينات الادرار التي أظهرت نمواً بكتيرياً كانت بنسبة 18،67% . كما أشار Ramakrishnan و Scheid [26] الى أن نسبة 90% من عينات إدرار مرضى تبدو عليهم أعراض التهاب الحويضة و الكلية الحاد أظهرت نمو بكتيري . أما Tsao وجماعته [27] وجدوا أن 63% من عينات إدرار أطفال بعمر(5 أيام- 15 سنة) أظهرت نمواً بكتيرياً و 37% منها لم تظهر نمواً بكتيرياً.شخصت العزلات العائدة للعائلة المعوية و بكتريا *Pseudomonas* spp. بالاعتماد على مصنف بركي [15] وكما مبين في الجدول (1) .

أظهرت النتائج أن النسبة المعوية لعزلات بكتريا *E.coli* كانت 70،49% من مجموع عزلات البكتريا السالبة لملون كرام والبالغ عددها 61 عزلة ، في حين كانت نسبة كل من *Proteus* spp وبكتريا *K.pneumoniae* هي75 ،14% و 19،8% وعلى التوالي . أما نسبة عزل بكتريا *P. aeruginosa* فكانت 6,55% وكما مبينة في الشكل(1). أختلفت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسة المحلية التي قام بها العبيدي [25] إذ حصل على نسبة عزل لبكتريا *E.coli* هي 45,95% أما *K.pneumoniae* بنسبة 13,5% ونسبة 10,8% لبكتريا *P.mirabilis* .

كما أشار AL-Mayahie [28] الى أن نسبة عزل بكتريا *E.coli*هي 75% ، أما نسبة عزل بكتريا *K.pneumoniae* و *P. aeruginosa* و *P.mirabilis* هي 5% و للانواع جميعا .

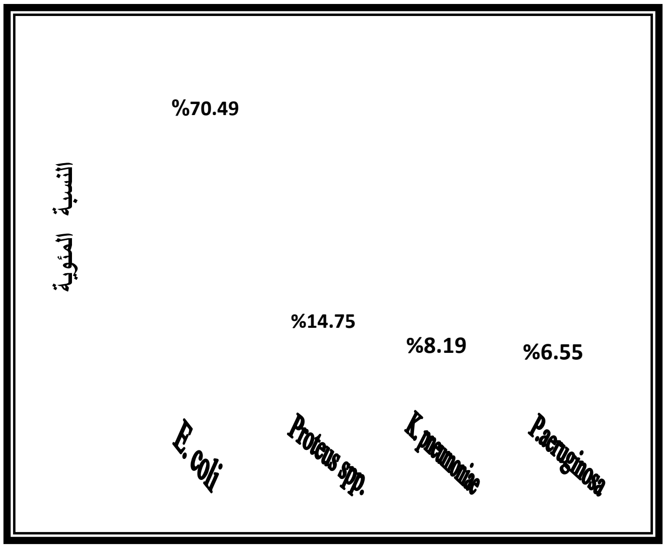
شخصت 9 عزلات تابعة الى جنس *Proteus* بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية التي أشار اليها Collee وجماعته [16] و Holt وجماعته [15] ، و كانت 7 عزلات عائدة للنوع *P.mirabilis* وبنسبة عزل 11,47% الشكل (2) ، و 2 عزلة عائدة للنوع *P.vulgaris* وبنسبة عزل 3,27% من بين مجموع البكتريا السالبة لملون كرام و المسببة لخمج المسالك البولية . إذ تميز النوع *P.mirabilis* بكونه سالباً لاختبار الاندول وغير مخمر لسكر المالتوز ومنتج للـ Ornithine decarboxylase . بينما النوع *P.vulgaris*فقد تميز بكونه موجباً لاختبار الاندول ومخمراً لسكر المالتوز ، وغير منتج للـ Ornithine decarboxylase الجدول (2) . كما أستخدم نظام التشخيص api-20E وذلك لتأكيد نتائج الفحوصات الكيموحيوية . وقد جاءت نتائج هذا الفحص مطابقة ومؤكدة للفحوصات الكيموحيوية . من الممكن أن يعزى التفاوت في نسب عزل النوعين *P.mirabilis* و *P.vulgaris* الى شيوع النوع *P.mirabilis* في فضلات الانسان إذ يعد هذا النوع جزءاً من النبيت

الطبيعي للانسان إذ يوجد بنسبة 25% من مجموع البكتريا المعوية [29] ،أما أنخفاض نسبة العزل للنوعين *P.vulgaris* و *P.penneri* يعود الى قلة وجودها بوصفها جزءاً من النبيت الطبيعي للانسان [30] .

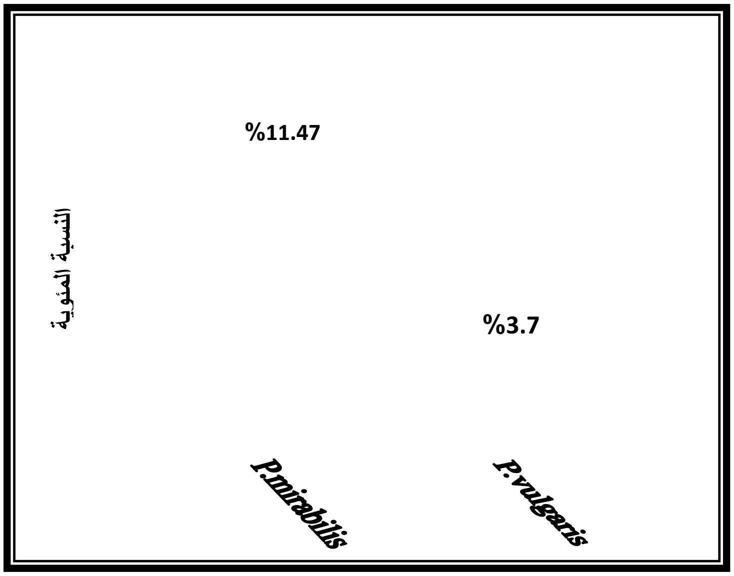
الجدول (1)نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص البكتريا السالبة لملون كرام المعزولة من عينات إدرار مرضى مصابين بخمج المسالك البولية

الاختبارات	***E.coli***	***K.pneumoniae***	***Proteus* spp**	***P. aeruginosa***
تخمر اللاكتوز	+	+	−	−
الاوكسيديز	−	−	−	+
الكتاليز	+	+	+	+
أنتاج الاندول	+	−	V	−
MR	+	−	+	+
VP	−	+	V	−
أستهلاك السترات	−	+	V	+
تمييؤ الجيلاتين	−	−	+	−
أنتاج اليوريز	−	+	+	V
الحركة	+	−	+	+
TSI ،CO_2، H_2S	A/A ، +،−	A/A، +،−	K/A ،+ ،+	K/K ،− ،−

(+)النتيجة الموجبة ، **(−)** النتيجة السالبة ، **(V)** مغاير ، **(K/A)** Alkalin /Acid ، Acid /Acid **(A/A)** ، **(K/K)** Alkalin /Alkalin ، **(MR)** Methyl red ، **(VP)** Voges proskauer ، **(TSI)** Triple Suger Iron Agar



الشكل (1) النسبة المئوية للبكتريا السالبة لملون كرام و المعزولة من المرضى المصابين بخمج المسالك البولية



الشكل (2) النسبة المئوية لانواع جنس *Proteus*

الجدول (2) الاختبارات الكيموحيوية لانواع جنس الـ *Proteus*

الاختبارات الكيموحيوية	*P.mirabilis*	*P.vulgaris*
Indol production	−	+
Ornithine Decarboxylase	+	−
Maltose Fermentation	−	+
TSI, CO_2 ,H2S	K/A,+,+	A/A,+,+
MR	+	+
VP	−	−
أستهلاك السترات	−	+

(+)النتيجةالموجبة ، **(−)** النتيجة السالبة ، **(V)** مغاير ، Alkalin/Acid **(K/A)** ، Acid /Acid **(A/A)**، **(VP)**

Methyl Red **(MR)** ، Triple Sugar Iron Agar **(TSI)** ، Voges proskauer

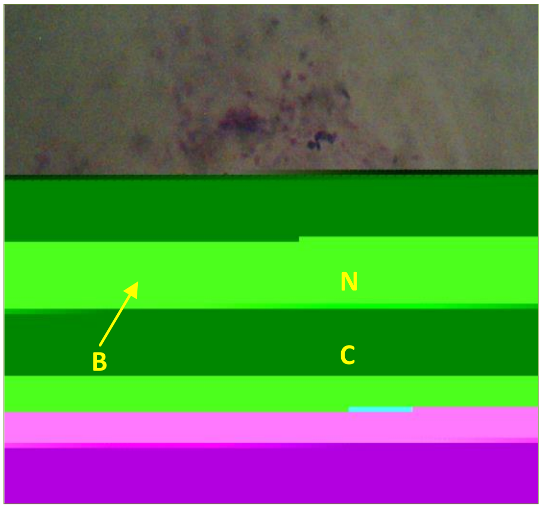
التحري عن قدرة بكتريا *P.mirabilis* على أنتاج الخمل :

1-اختبار قدرة بكتريا *P.mirabilis* للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية للانسان خارج الجسم الحي (*In Vitro*)

أظهرت العزلة U7 *P.mirabilis* أعلى معدل التصاق على الخلايا الطلائية البولية للانسان خارج الجسم الحي (*In Vitro*) بمعدل 30,2% الشكل(3)، قياساً بالعزلة U4 *P.mirabilis* التي أظهرت معدل التصاق واطيء بلغ 4,7% عند تنمية العزلتين على وسط مرق اللوريا بمدة حضانة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م . تشير هذه النتائج الى قدرة العزلة U7 *P.mirabilis* على أنتاج خمل UCA ، والذي تعزى له القدرة للالتصاق على مستلمات الخلايا الطلائية البولية للانسان قياساً بالعزلة U4 *P.mirabilis* غير المنتجة لخمل UCA . تتوافق هذه النتائج مع نتائج Wray وجماعته [22] إذ أشار الى أن الدور الاساسي لالتصاق بكتريا *P.mirabilis* يعود الى قدرة هذه البكتريا على أنتاج خمل UCA ولكن بمعدل التصاق أوطأ 25,5% عند تنميتها على وسط مرق اللوريا وحضانة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م . قد يعود الاختلاف في معدل الالتصاق الى كثافة خمل UCA المنتج ، ووجود المستلمات الخاصة بهذا الخمل على الخلايا

الطلائية البولية للانسان إذ تتأثر هذه المستلمات بالحالة الفسلجية و الهرمونية للفتاة المتطوعة بالادرار وهذا ما أكده Svanbory-Eden وجماعته [31] .

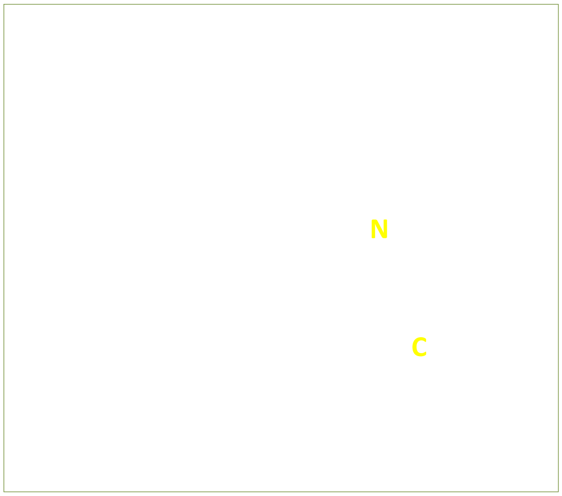
للتأكد من أنتاج العزلة *P.mirabilis* U7 لخمل UCA تم تنميتها على وسط أكار اللوريا فأظهرت النتائج أن العزلة لها قدرة للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية للانسان . ولكن معدل الالتصاق قد أنخفض الى 20,3% ، وهذه النتيجة تؤكد قدرة هذه العزلة على أنتاج خمل UCA واليه يعود سبب التصاق البكتريا على الخلايا الطلائية البولية لا الى خمل MR/ P أو MR / K عند تنمية بكتريا *P.mirabilis* على وسط أكار اللوريا بمدة حضانة 24 ساعة ودرجة حرارة 37 م. وقد أكد Latta وجماعته [32] على أن بكتريا *P.mirabilis* تعبر فقط عن الخمل UCA عند تنميتها على وسط أكار اللوريا ، وتم التأكد من ذلك بأستخدام المجهر الالكتروني ، وعدم قدرة هذه البكتريا على ملازنة كريات الدم الحمر للانسان و الابقار ؛ مما يؤكد على عدم قدرتها على أنتاج MR/P أو MR / K . كما أظهرت العزلة *P.mirabilis* U4 قدرة واطئة للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية وبمعدل 1,65% ؛ مما يؤكد على عدم قدرة هذه البكتريا على أنتاج خمل الـ UCA حتى عند تنميتها على وسط أكار اللوريا .



الشكل (3) الخلايا الطلائية البولية للانسان بتركيز 1×10^5 خلية طلائية/ مليلتر المعاملة مع بكتريا U7 *P.mirabilis* بتركيز 1×10^8 وحدة مكونة لمستعمرة/ مليلتر . صبغة كمزا (100 X)

Cytoplasm : **C** ، Nucleus : **N** .

B : بكتريا *P.mirabilis* U7



الشكل (3) الخلايا الطلائية البولية للانسان غير المعاملة مع بكتريا *P.mirabilis* (السيطرة) ، صبغة كمزا (100 X)

Cytoplasm: **C** ، Nucleus : **N**

2-أختبار التلازن الدموي وتشخيص نوع الخمل

يعد ظهور تلازن دموي بأستخدام الشريحة الزجاجية للمجهر الضوئي ومشاهدة تجمع كريات الدم الحمر بالعين المجردة خلال (1- 2) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة دليلاً على قدرة بكتريا *P.mirabilis* على أنتاج الخمل عند تنميتها على أوساط زرعية مختلفة ومدة حضن ودرجات حرارة مختلفتين أيضا . أظهرت العزلة *P.mirabilis* U7 عدم قدرتها على ملازنة كريات الدم الحمر للانسان نوع O^+ بوجود سكر المانوز وكريات الدم الحمر المدبغة للابقار بوجود سكر المانوز أيضا ؛ مما يؤكد عدم قدرتها على أنتاج خمل MR/P و MR/ K عند تنميتها على وسط مرق اللوريا بمدة حضانة 24 ساعة ودرجة حرارة 37 م . كما أظهرت العزلة نفسها عدم القدرة أيضا على أنتاج خمل MR/P أو MR/ K عند تنميتها على وسط أكار اللوريا وبمدة حضن مختلفة 24 و 48 و 72 ساعة وكما مبين في الجدول(3) وعند تنمية العزلة *P.mirabilis* U7 على وسط مرق اللوريا ولكن بمدة حضانة 48 ساعة ودرجة حرارة 37 م أظهرت هذه العزلة قدرتها على أنتاج خمل /P MR و MR/ K . تتوافق هذه النتيجة مع النتائج التي حصل عليها كل من Belase و Mobley [33] إذ أكدا على أن الوسط الملائم لانتاج خمل P MR/ هو مرق اللوريا بمدة حضانة 48 ساعة ودرجة حرارة 37 م ، مع عدم ذكر أنه الوسط الملائم لانتاج MR / K . كما بينت نتائج الدراسة الحالية القدرة العالية للعزلة *P.mirabilis* U7 عند تنميتها على وسط مرق نقيع القلب والدماغ بمدة حضانة 72 ساعة ودرجة حرارة 30 م على أنتاج خمل MR/P و MR/ K . جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما أشار إليه Zunino وجماعته [34] إذ أكدوا أن بمقدور بكتريا *P.mirabilis* أنتاج خمل MR/P و MR/ K عند تنميتها على وسط مرق نقيع القلب و الدماغ بمدة حضانة 72 ساعة ودرجة حرارة 30 م .

بالاعتماد على النتائج التي حصلنا عليها تم أنتخاب العزلة *P.mirabilis* U7 لقدرتها العالية للالتصاق على الخلايا الطلائية البولية للانسان خارج الجسم الحي (*In Vitro*) وقدرتها على أنتاج خمل MR/ P و MR/ K ؛ مما يؤكد على أن البكتريا المعزولة من شخص مصاب بخمج المسالك البولية هي المسببة لهذا الخمج ؛ إذ أشار Jansen وجماعته [35] أن بمقدور بكتريا *P.mirabilis* المنتجة للخمل MR/P و MR/ K الالتصاق و الاستيطان على الخلايا الطلائية البولية وتكوين الغشاء الحيوي وأحداث الاصابة .

الجدول (3)التلازن الدموي لبكتريا *P.mirabilis* وتشخيص نوع الخمل الذي تنتجه

ظروف التنمية	*P.mirabilis* U7 MR ⁄P[a]	*P.mirabilis* U7 MR ⁄K[b]	*P.mirabilis* U4 MR ⁄P	*P.mirabilis* U4 MR ⁄K
اللوريا ، 24 ساعة و 37° م	−[c]	−	−	−
مرق اللوريا ،48 ساعة و37° م	++	+	−	−
مرق نقيع القلب والدماغ، 24 ساعة، 37° م	−	−	−	−
مرق نقيع القلب والدماغ، 72 ساعة و 30° م	+++	+ +	−	−
أكار مرق اللوريا ،24 ساعة و 37° م	−	−	−	−
أكار اللوريا ،48 ساعة و 37° م	−	−	−	−
أكار ومرق نقيع القلب والدماغ ،72 ساعة و 30° م	−	−	−	−

a : التلازن الدموي لكريات الدم الحمر للانسان نوع O^+ بوجود المانوز وكذلك كريات الدم لخنازير غينيا و الاغنام بوجود المانوز

b : التلازن الدموي لكريات الدم الحمر للابقار المدبغة بوجود المانوز

c : درجة التلازن الدموي أو أنتاج الخمل ، **(−)** غير ملزنة ، **(+)** تلازن ضعيف ،**(++)** تلازن متوسط ، **(+++)** تلازن قوي

أما العزلة *P.mirabilis* U4 لم تظهر القدرة على أنتاج الخمل MR/P و MR/ K على الرغم من أستخدام أوساط زرعية وظروف تنمية مختلفة الجدول (2) ، كما أبدت قدرة التصاق بمعدل واطيء على الخلايا الطلائية البولية ، وهذا يؤكد أن العزلة لاتمتلك عوامل الفوعة المهمة لاحداث المرحلة الاولى من خمج المسالك البولية ، إذ أشار Bahrani وجماعته [36] أن بكتريا

P.mirabilis المعزولة من أصابات الكلية تكون منتجه للخمل MR/P فقط ، أما المعزولة من شخص مستخدم للقثطرة البولية فتكون منتجه للخمل MR/P و MR/ K .

الاستخلاص و التنقية الجزئية لخمل

Uroepithelial Cell Adhesin

نميت بكتريا *P.mirabilis* U7 على وسط مرق اللوريا بمدة حضانة 24ساعة و درجة حرارة 37 م ، وأختير هذا الوسط لانه ملائم لانتاج خمل UCA ومدة الحضن غير ملائمة لانتاج خمل MR/ P و MR / K . وهذا ما أكدته نتائج دراستنا الحالية. كما أستعمل 3 لترات من مرق اللوريا للحصول على أكبر كمية ممكنة من بروتين خمل UCA خلال مرحلة الاستخلاص.

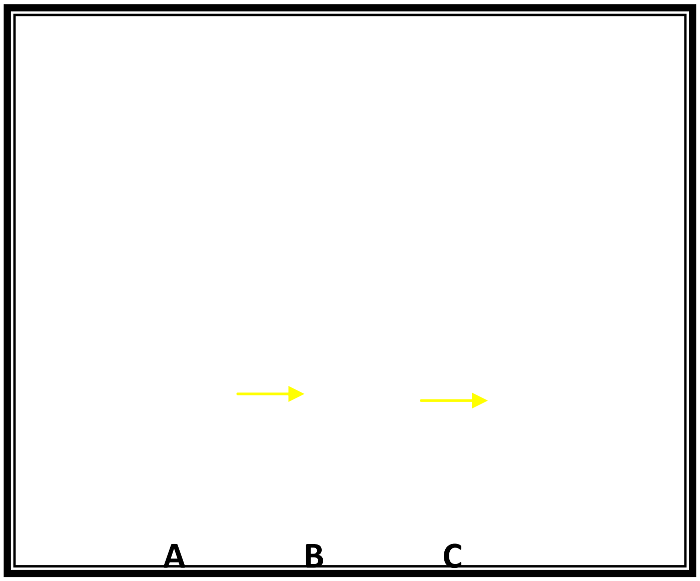
استعملت اليوريا بتركيز 2 مولار و حمام مائي بدرجة حرارة 65 م ولمدة 30 دقيقة لنزع الخملة عن غشاء البكتريا ، كما و تعمل اليوريا على فصل الخملة عن بقية مستضدات السطح ، هذا من جانب ومن جانب أخر تعمل على فصل تجمعات الخملة و تجعلها على شكل وحدات مفردة ، و كذلك تبقيها فعالة بايولوجيا [37] .

استعملت كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ لترسيب بروتين خمل UCA و بروتينات الغشاء الاخرى ، وجد الدراسة الحالية أن أفضل نسبة تشبع هي 50% لترسيب أكبر كمية من البروتينات ، إذ استعملت نسبة التشبع الاولى 30% ووجد أن تركيز البروتينات المترسبة 1,35 ملغرام/مليلتر ، أما عند استعمال نسبتي التشبع 50% و 70% وكان تركيز البروتينات نسبتي التشبع كلتيهما هو 2 ملغرام/مليلتر ، لذلك استعملت نسبة الاشباع 50% وهذه النسبة توافق نسبة الاشباع التي استعملها Korhonen وجماعته [38].

بعد عملية الديلزة و التخلص من المواد الصلبة غير الذائبة بترسيب هذه المواد بالنبذ المركزي بسرعة g20000 ولمدة 30 دقيقة وللتخلص من البروتينات الملوثة أضيف الـ Deoxycholate بتركيز 0,5% ، إذ يعمل على أذابة الدهون الفوسفاتية ومتعدد السكريد الشحمي وبروتين الاسواط لان من خصائص بروتينات الخمل أمتلاكها ميل أو نزعة للتجمع مع بروتينات الغشاء لكون بروتينات الخمل كارة للماء ، كما يعمل الـ Deoxycholate أيضا على الفصل بين تجمعات الخملة ويجعلها بشكل وحدات مفردة [39]. تمت عملية ديلزة المحلول ضد Tris-HCl ذو الرقم الهيدروجيني 7,8 والمضاف اليه Deoxycholate بنسبة 0,5% ولمدة 48 ساعة لضمان التخلص من البروتينات الملوثة مع

التغيير المستمر لمحلول الديلزة ، بعدها ترسبت جزيئـــات Deoxycholate غيـــر الذائبـــة و البروتينـات الملوثـة الاخـرى بالنبـذ المركـزي بسرعة 12000 g لمدة 20 دقيقة [39].

بعد عملية ديلزة العالق ركز محلول البروتين النهائي ضد السكر و حبيبات الـ Polyethylenglycol (PEG) ، إذ تم الحصول على بروتين بتركيز 1,65 ملغرام/مليلتر وبحجم نهائي 1,5 مليلتر . وهذه النتيجة لا توافق النتيجة التي حصل عليها Wray وجماعته (14) إذ قدر تركيز بروتين خمل UCA بـ 0,5 ملغرام/مليلتر . أما Hoschutzky وجماعته [40] قدر تركيز بروتين خمل بكتريا *E.coli* نوع P بـ 10 ملغرام/مليلتر . قد يعود الفرق في تركيز البروتين النهائي الى سبب أستخدام عمود التنقية الذي أستخدمه Wray وجماعته [22] والذي خلصه من البروتينات الملوثة التي زادت من تركيز البروتين الذي حصلنا عليه في دراستنا الحالية . أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي كما في الشكل(4) أن نموذج ترحيل البروتينات الخام بعد ترسيبها بكبريتات الامونيوم أتضح أنها مؤلفة من 6 حزم مختلفة الاوزان الجزيئية الشكل (4 B)، وبعد التخلص من البروتينات الملوثة خلال مرحلة التنقية وترحيل نموذج البروتين تم الحصول على حزمة بروتينية شكل (4 C)قدر وزنها الجزيئي بحوالي 17782 دالتون بالرجوع الى منحنى البروتينات القياسية الشكل (5) . ومن ملاحظة الشكل (4 C)نلاحظ ان هنالك حزمة أخرى لبروتين ملوث قدر وزنه الجزيئي بحوالي 50000 دالتون. وهذه النتائج مقاربة للنتائج التي حصل عليها Wray وجماعته (14) إذ قدر الوزن الجزيئي لبروتين خمل UCA بـ 17500 دالتون ، أما الوزن الجزيئي للبروتين الملوث قدر بـ 39000 دالتون ، وتوقع أنه يعود لبروتين الاسواط (Flagellin). ممكن أن يعزى فرق الاوزان الجزيئية التي تم الحصول عليها قياساً بالدراسات الاخرى الى وجود بروتينات ملوثة أخرى مثل بروتينات الغشاء الخارجي ، إذ أشار Korhonen و جماعته [38] الى أن بروتينات الغشاء الخارجي يصعب التخلص منها حتى عند أستخدام الـ Deoxycholate قياساً بالبروتينات الملوثة الاخرى .



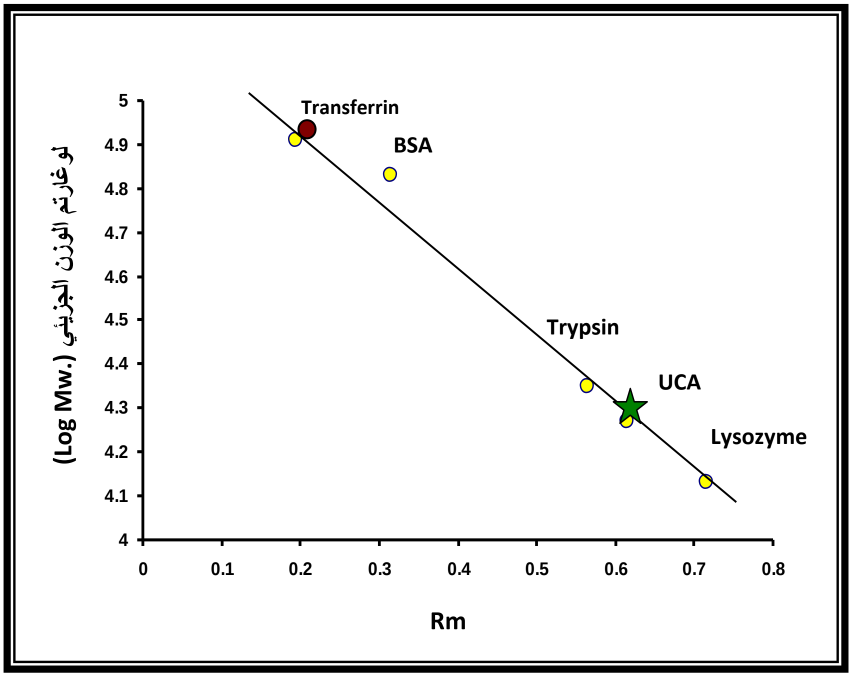
الشكل (4) نمط الترحيل الكهربائي لبروتين خمل UCA المنقى جزئيا من بكتريا *P.mirabilis* U7 في هلام عديد الاكريل أمايد وبوجود SDS و 2-β-mercaptoethanol .

A : بروتينات المعايرة من الاعلى الى الاسفل مع أوزانها الجزيئية

1. Transferrin : 80000 دالتون
2. Bovin serum albumin : 67000 دالتون
3. Trypsin : 23300 دالتون
4. Lysozyme : 14400 دالتون

B : البروتينات الخام بعد أزالة الخلايا المنزوعة الخمل وترسيبها بـ $(NH_4)_2SO_4$

C : بروتين الخمل UCA المنقى جزئيا



الشكل(5) منحنى العلاقة بين لوغارتم الوزن الجزيئي (Log Mw.) والحركة النسبية (Rm) للبروتينات القياسية وبروتين خمل UCA في هلام الاكريل أمايد المتعدد وبوجود المواد الماسخة للبروتين SDS و -2-β . mercaptoethanol

References:

1-**Nicolle, L.E.** (2002) Resistant pathogens in urinary tract infections.J. Am.Geriatr.
Soc. *50*:230-235.

2-**Pearson, M. M.; Sebaihia, M.; Churcher, C.; Quail, M. A.; Seshasayee, A. S.; Luscombe,N. M.; Abdellah, Z.; Arrosmith, C.; Atkin,**

B.; Chillingworth, T.; Hauser, H.; Jagels, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Norbertczak, H.; Rabinowitsch, E.; Walker, D.; Whithead, S.; Thomson, N. R.; Rather, P. N.; Parkhill, J. and Mobley, H. L. T. (2008). Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, amaser of both adherence and motility. J. of Bacter. *190(1)*:4027-4037.

3- **Jombo, G. T.; Gyuse, A. N.; Odey, F.; Ibro,S.; Bolarin, D. M.; Utsalo, S. J.; Denen, A. P. and Okwori, E. E**. (2010). Asurvey of antimicrobial susceptibility pattrrns of bacterial isolates from community acquired significant bacteriuria among pre-school children in a municipality in calabar. J. BioMed. *1(4)*: 172-176.

4- **Zeighami, H**. (2008). Urinary tract infection in renal transplantation patient. J. of Bio. Sci. *3(10)*:1194-1196.

5- **Mobley, H. L. and Chippendale, G. R.** (1990). Hemagglutination, urease and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. J. Infect. Dis. *161*:525-530.

6- **Nucleo, E.; Fugazza, G.; Migliavacca, R.; Spalla, M.; Comelli, M.; Pagani, L. and Debiaggi, M.** (2010). Differences in biofilm formation and aggregative adherence between β-lactmases susceptibility and β-lactmases producing *P.mirabilis* clinical isolates. J. new Micr.*33*:37-45.

7- **Mufida, D. C**. (2008). Identifekasin protein hemagglutinin pili *Proteus mirabilis* P355. J.KM. *7(2)*:1-8.

8- **Alamuri, P. and Mobley, H. L. T.** (2008). A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both cytotoxin and an agglutinin. J. Mol. Micro.*68(4)*:997-1017.

9- **Ling, J. M.; Lam, A. W.; Chan, E. W. and Cheng, A. F.** (2003).

What have we learn from community-acquired infection Hong Kong. J. Antimicrob. Chemother. *51(4)*:895-904.

10- **Li, X.; Lockatell, C. V.; Drachenberg, C.B.; Johanson, D. E. and Mobley, H. L**. (2002). Identification of MrpI as the sole recombinase that regulates the phase variation of MR/P fimbria, abladder colonization factor of uropathogenic *Proteus mirabilis*. Mol. Microbiol. *45(3)*:865-874.

11- **Scavone, P.; Sosa, V.; Pellegrino, R.; Galvalisi, U. and Zunino, P**. (2004). Mucosal vaccination of mice with recombinant *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins. Microbes Infect. 6(9):853-860.

12- **Pearson, M. M. and Mobley, H. L.** (2008). Repression of motility during fimbrial expression identification of 14 mrpJ gene paralogues in *Proteus mirabilis*.J. Mol. Micro. *69(2)*:548-558.

13- **Lane, M. C.; Li, X.; Pearson, M. M.; Simms, A. N. and Mobley, H. L. T**. (2009). Oxygen limiting conditions enrich for fimbriate cells of uropathogenic *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. J. Bact. *19(50)*:1382-1392.

14- **Zunino, P.; Sosa, V.; Schlapp, G.; Allen, A. G.; Preston, A. and Meskell, D. J**.(2007). Mannose-resistant *Proteus*-like and *P,mirabilis* fimbriae have specific and additive roles in *Proteus mirabilis* urniray tract infections. FEMS. Imm. Med. Micro. 51:125-133.

15- **Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. A.; Staley, J. A. and Williams, S. T.** (1994). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. (9)th ed. Williams and Wilkins.

16- **Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, R. P. and Simmon, A**. (1996). Mackie and Mecartney Practical Medical Microbiology. (14)th ed. Churchill Livingston, New York.

17- **MacFaddin J. F**. (2000). Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria. (3)th ed. Lippincott Williams and Wilkins, London.

18- **Atlas, R. M.; Brown, A.E. and Parks, C**. (1995). Laboratory Manual Experimental of Microbiology. Mosby-Year Book, Inc., USA.

19- **Svanborg Eden, C.; Eriksson, B.; Hanson, L.A.; Jodal, U.; Kallser, B.; Lidin-Janson, G.; Lindberg, U. and Olling, S**. (1978). Adhesion to normal human uroepithelial cells of *Escherichia coli* from children with various forms urinary tract infection. J. Pediater. *39*:398-403.

20- **Old, D. C. and Adegbola, R. A**. (1982). Haemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. J. Med. Microbiol. *15:*4551-4564. (Abstract).

21-**Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. and Swain, R. H. A.** (1975). Medical Microbiology, Vol.2. (12)th ed. Churchill Livingstone (publ.), London.

22- **Wray, S. K.; Hull, S. I.; Cook, R. G.; Barrish, J. and Hull, R. A**. (1986). Identification and characterization of auroepithelial cell adhesion from auropathogenic isolate of *Proteus mirabilis.* Infect. Immun. *54(1)*:43-49.

23-**Lowry, O.H., Rosennbrouch, N.J.; Farr, A.L. and Randali, R.J**. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. *193(1)*: 265-275.

24- **Laemmli, U. K**. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. Nature (London) *227*:680-685.

25-**العبيدي، مروج عبد الستار محمد**.(2004). التنقية الجزئية لخمل النمط الاول المستخلص من جراثيم *Escherichia coli* ودورة في الاصابة. أطروحة دكتوراة. كلية العلوم. جامعة بغداد.

26- **Ramakrishnan, K. and Scheid, D.C**. (2005). Diagnosis and Management of acute pyelonephritis in adults. American family physician. *71*(5): 933-942.

27-**Tsao, C-H.; Huang, W-S.; Cheng, C-Y.; Wu. S-L.; Lin, Y-Z. and Lin, M-H.** (2003). Evaluation of culture negative acute pyelonephritis with ^{99m} Tc-DMSA renal scan in children Ann. Nucl. Med. Sci., *16*(3): 117-122.

28-**Al-Mayahie, S.M**. (2007). *In Vitro* comparison between Anti-P-Fimbriae and Anti-Pap GII Adhesin antibodies in prevention of Pyelonephritic *Escherichia Coli* adhesion to human uroepithelia cells. Ph.D. Thesis, College of Science, University of Baghdad.

29-**Shoff, W. H. and Green-McKenzie, J**. (2007). Pyelonephritis, Acute. eMedicine (Internet).

30- **Senior, B.W. and Leslie, D.L**. (1986). Rare occurrence of *Proteus vulgaris* in faeces: areason for it's rare association with urinary tract infection. J. Med. Microbiol. *21*:139-144.

31-**Svanborg-Eden, C., Larsson, P. and Lomberg, H.** (1980). Attachment of *Proteus mirabilis* to human urinary sediment epithelial cells *in vitro* is deffernt from that of *Escherichia coli* Infec. Immun. *27*(3): 804-807.

32-**Latta, R. K.; G rondin, A., Jarrell, H.C., Nichoils, B.G. and Berube, L.R.** (1999). Differential expression of nonagglutinating fimbriae and MR/P pili in swarm

Proteus mirabilis. J. Bacteriol. *181*(10): 3220-3225.

33-**Mobley, H. L. and Belase, R**. (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. Trends Microbiol. *3*:280-284.

34- **Zunino, P.; Piccini, C. and Legnani-Fajardo, C**. (1999). Growth, cellular differentiation and virulance factor expression by *Proteus mirabilis in vitro* and *in vivo*. J. Med. Microbiol. *48*:527-534.

35- **Jansen, A. M.; Lockatell, V.; Johnson, D. E. and Mobley, H. L. T.** (2004). Mannose-Resistant *Proteus* like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, Dictate the In Vivo localization of bacteria and contribute to biofilm formation. Infect. Immun. *72*:7294-7305.

36-**Bahrani, F. K.; Johnson, D. E.; Robbins, D. and Mobley, H. L. T**. (1991). *Proteus mirabilis* flagella and MR/P fimbriae: Isolation, Purification, N-terminal analysis and serum antibody response following experimental urinary tract infection. Infect. Immun. *59(10)*:3574-3580.

37- **Korhonen, T.K**. (1979). Yeast cell agglutination by purified enterobacterial pili. FEMS Microbiol. Lett. 6:421-425.

38- **Korhonen, T. K.; Nurmiaho, E-L.; Ranta, H. and Svanborg-Eden, C**. (1980). New method for isolation of immunologically pure pili from *Escherichia coli.* Infec. Immun. 27(2):569-575.

39- **Salit, I. E. and Gotschlich, E.C**. (1977). Type I *Escherichia coli* pili: characterization of binding to monkey kidney cells. J. Exp. Med. 146:1182-1194.

40- H**oschutzky, H.; Lottspeich, F. and Jann, K.** (1989). Isolation and

characterization of the α-galactosyl-1,4-β-galactosyl-specific adhesin (P adhesin) from fimbriated *Escherichia coli*. Infect. Immum. *57*(1): 76-81.

Extraction and Partial Purification of UCA Fimbriae from *Proteus mirabilis* and Study Their Role in Adhesion to Uroepithlial Cells

May T. Flayyih and Amir S. Ali

Dept. of Biology / College of Science/Baghdad University

maytalib@yahoo.com

Summary

From 211 urine samples, Gram negative bacteria were isolated from only 61 urine samples with isolation percentage 28.9%. *Escherichia coli* were isolated percentage 70.49% while *Klebsiella pneumoniae* and *Psendomonas aeruginosa* were 8.19% and 6.55%, respectively.*Proteus spp.* Were isolated from 9 (14.75%), *P. mirablis* and *P. vulgaris* were isolates percentage 11.47% and 3.27%, respectively.

Uroepithelial Cell Adhesin (UCA) fimbriae expression by *P.mirabilis* isolates was detected by the high capacity to adhesion to human uroepithetial cells, the isolate *p.mirabilis* U7 was adhesion to human uroepithelial cells mean no.30.2 bacteria/cell when grown on luria broth at 37°C for 24h, but then grown it's on luria agar at 37°C for 24h the adhesion mean no. was 20.3 bacteria/cell. *P.mirabilis* U4 the adhesion

mean no.4.7% and 1.65% when grown on luria broth and luria agar at 37°C for 24h, respectively. MR/P and MR/K fimbriae was induced by growth on luria broth at 37°C for 48h and reduced by growth on agar media.

UCA fimbriae were isolated and partially purified by using 2 molar urea, heat shock, saturated ammonium sulphate 50% and deoxycholate, yielded 1.65 μg/ml. SDS.PAGE of partially purified UCA-fimbriae after ammonium sulfate precipitation showed 6 protein containing bands, for 5 bands (molecular weight 17782 Dalton) represented UCA-fimbriae.

Key words: proteus mirabilis , fimbriae , MR/P fimbria ,MR/K fimbria , Uroepithelial cell adhesion ,Non-agglutaniting fimbriae .