



جامعة كربلاء
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التوصيف الجزئي لبعض عوامل الضراوة في بكتريا
Escherichia coli المعزولة من اصابت المسالك البولية
في محافظة كربلاء المقدسة

رسالة مقدمة الى مجلس كلية العلوم / جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة
كتبت بواسطة

علاء عبد الامير عزيز الياسي

بإشراف

أ.م. د. كوكب عبدالله حسين السعدي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

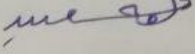
قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا
إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ
الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة «البقرة» الآية (32)

إقرار المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ(الكشف الجزيئي للجينات المسؤولة عن المقاومة المتعددة للعقاقير في الايشريشيا القولونية الممرضة البولية) قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع: 

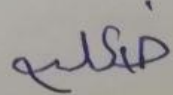
الاسم: أ.م.د . كوكب عبد الله حسين السعدي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : 2022 / 5 / 2

توصية رئيس قسم علوم الحياة

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

التوقيع: 

الاسم: د . خالد علي حسين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

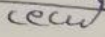
العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : 2022 / 5 / 2

(إقرار لجنة المناقشة)

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه ، نشهد بأننا قد أطلعنا على الرسالة الموسومة (التوصيف الجزيئي لبعض عوامل الضراوة في بكتيريا *Escherichia coli* المعزولة من إصابات المسالك البولية في محافظة كربلاء المقدسة) المقدمة من قبل الطالب (علاء عبد الامير عزيز) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة وبعد إجراء المناقشة العلمية وجد أنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير (امتياز).

عضو اللجنة



التوقيع:

الاسم : نور سلمان كاظم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة بابل /كلية العلوم

التاريخ: 2022/5/11

رئيس لجنة المناقشة



التوقيع:

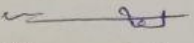
الاسم : د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ : 2022 /5/11

عضواً ومشرفاً



التوقيع:

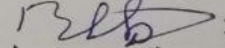
الاسم : د. كوكب عبدالله حسين

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ : 2022/ 5 /11

عضو اللجنة



التوقيع:

الاسم : د. بلقيس عبد علي عبد عون

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة الفرات الاوسط التقنية/

المعهد التقني كربلاء

التاريخ : 2022 / 5 /11

مصادقة عمادة كلية للعلوم / جامعة كربلاء

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه :

التوقيع:

الاسم : د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : عميد كلية العلوم

التاريخ : 2022 / 6 /12

إهداء

إلى

والدي والديتي برًا واحسانًا

زوجتي وأولادي مودةً وحنانًا

اخوتي واخواتي وفاءً وعرفانًا

وإلى من افتخر بها .. مشرفتي الدكتورة كوكب عبد الله السعدي

أهدي جهدي هذا

الباحث علاء

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين و الصلاة والسلام على أشرف الأنبياء و المرسلين سيدنا محمد وعلى آله و صحبه و من تبعهم باحسان الى يوم الدين .

وأما بعد :

فإنني أشكر الله تعالى إذ وفقني لإكمال هذه الرسالة فله الحمد على جزيل فضله و انعامه.

ويشرفني أن أقدم شكري وتقديري لأستاذتي الفاضلة الدكتورة (كوكب عبدالله السعدي) لأشرفها على هذه الرسالة ، وما قدمته من نصح وتوجيه ساعد في اخراج هذا النتاج العلمي وساهم في تجاوز الكثير من الصعاب.

ويطيب لي أن اوجه الشكر والتقدير إلى عمادة كلية العلوم وقسم علوم الحياة للمساعدة التي قدموها لي خلال مدة دراستي.

وانتقدم بمزيد من الشكر والامتنان إلى العاملين في مختبر الصحة العامة، واطم بالذكر السيدة أميرة محمد جبر ، جعل الله ثمرة ذلك في ميزان حسناتهم .

واود ان اعبر عن شكري وتقديري لأعضاء هيئة التدريس في قسم علوم الحياة بجامعة كربلاء الذين شملوني بعنايتهم و كانوا بمثابة عائلتي ، و أتأحوا لي السبل التي سهلت علي إتمام هذه الرسالة .

و من العرفان أن اتقدم بالشكر والامتنان إلى زملائي طلبة الدراسات العليا لما قدموه من المساعدة خلال مدة البحث .

و أخيراً خالص تقديري لكل من ساعدني و أعانني في انجاز هذه الرسالة ، فلهم في النفس منزلة و ان لم يسعف المقام ذكرهم ، فهم أهل للفضل و الخير والشكر .

الباحث

الخلاصة

تم الحصول على 24 عزلةً من بكتيريا *E. coli* التي تمت دراستها، ومن خلال دراسة الخصائص المظهرية والفحوصات الكيموحيوية ظهرت البكتيريا على وسط الماكونكي مخمرة لسكر اللاكتوز وكانت لون المستعمرات وردية مما يشير الى كونها بكتريا سالبة لصبغة غرام عن طريق تخمير اللاكتوز، بينما ظهرت المستعمرات غير المخمرة للاكتوز صافية عديمة اللون، كما اظهر فحص (vitek2) إن جميع العينات قيد الدراسة عائدة لبكتريا *E. coli*.

اما بالنسبة لنتائج الاختبارات الكيموحيوية (biochemical tests) فقد اتضح ان البكتريا محتوية على الكبسولة، إذ تعد الكبسولات من محددات عناصر الضراوة المهمة، والتي تمكن البكتيريا المسببة للأمراض من التهرب أو مواجهة دفاع المضيف غير المحدد خلال المرحلة المبكرة (ما قبل المناعة) من العدوى، وأما نتائج الاختبارات على وسط اكار الدم فقد كانت المستعمرات محلله بنسبة (79.1%) للدم (نوع التحلل الفا).

وقد بينت نتائج تكوين الأغشية الحيوية من خلال طريقة الانابيب تفاوت من حيث تكوين الأغشية الحيوية، فكان عدد العزلات التي كونت غشاء حيوي قوي 8 (33.3%)، والتي كونت غشاء حيوي متوسط 10 (41.7%)، وأخيرًا عدد العزلات التي شكلت غشاء حيوي ضعيف 6 (25%).

تم اختبار حساسية ومقاومة عزلات بكتريا *E. coli* لعشرة مضادات حيوية مختلفة اختيرت على أساس استعمالها في علاج الالتهابات ومنها التهاب المسالك البولية، وقد كانت البكتريا متنوعة في مقاومتها وحساسيتها لهذه المضادات الحيوية المختبرة، إذ كانت جميع العزلات متعددة المقاومة لادوية multi-drug resistance (MDR) فقد كانت نتائج معدل مقاومة العزلات للمضادات متغيرة بين المضادات، فكانت أعلى نسبة مقاومة ضد البنسلين Penicillin (100%) و ميترونيدازول Metronidazole (100%) يليها تريميثوبريم/سلفاميثوكسازول Trimethoprin

وحمض الناليديكسيك (Nalidixic acid) (87.5%) ، و sulphamethoxazole (87.5%) ، و بعدها نورفلوكساسين Norfloxacin (75%) و سيبروفلوكساسين Ciprofloxacin (75%) ، بينما بلغت حساسية البكتريا ضد بعض المضادات (37.5% و 33.3% و 12.5%) لكل من جنتاميسين Gentamicin و نيتروفورانتوين Nitrofuratoin و الاميكاسين Amikacin على التوالي .

تم استخلاص الحمض النووي من العزلات جميعها قيد الدراسة، وتم استعمال تفاعل البلمرة المتسلسل التحري عن جينات عوامل الضراوة (مورثة *tos A* و مورثة *csf A* و *integrin 1* class)، أظهرت النتائج احتواء جميع العزلات على المورثات المذكورة.

ومن جانب اخر فقد أظهرت نتائج التسلسل الجيني لجين (*tosA*) إن هناك استبدال بالنيوكليوتيدات مختلفة بين 10 عزلات من بكتريا *E.coli* المعزولة المحلية وعزلات *E. coli* QJF95785.1 وأظهرت استبدالات انتقالية عالية بين النيوكليوتيدات (C) التي استبدلت بالنيوكليوتيدات (T).

وفي الوقت نفسه لم يؤثر هذا التغير بالنيوكليوتيدات في الحامض الاميني وبهذا لم يحدث أي تغير في شكل البروتين (hemolysin activation protein) الذي ينتجه جين *tosA* .

قائمة المحتويات

الصفحة	المحتويات	التسلسل
1	المقدمة	1-1
	استعراض المراجع	2-1
3	التهاب المسالك البولية (UTI)	1-2-1
6	تصنيف اصابات المسالك البولية	2-2-1
6	التصنيف حسب الموقع	1-2-2-1
6	التصنيف حسب ظهور الأعراض المرضية	2-2-2-1
7	التصنيف بحسب عوامل التعقيد	3-2-2-1
8	التصنيف المعدل لأصابات المجاري البولية بحسب إرشادات الرابطة الأوروبية لجراحة المسالك البولية (EAU)	4-2-2-1
9	العائلة المعوية Enterobactriaceae	3-2-1
9	بكتريا <i>Escherichia coli</i>	4-2-1
13	المجموعة التطورية والأنماط المصلية لبكتريا <i>E.coli</i>	1-4-2-1
14	انتاج الاغشية الحيوية (Biofilme) في بكتريا <i>E.coli</i>	5-2-1
16	ضراوة بكتريا <i>E.coli</i>	6-2-1
19	أمراضية البكتريا للمسالك البولية	7-2-1
20	طرائق العدوى لالتهاب المسالك البولية	8-2-1
21	قابلية بكتيريا <i>E.coli</i> على الانتقال بين المضائف (العوائل)	9-2-1
22	مقاومة بكتيريا <i>E.coli</i> للمضادات الحيوية	10-2-1
24	اليات مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية	1-10-2-1
26	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymeres Chain Reaction (PCR)	11-2-1

	المواد وطرائق العمل	2
28	الأجهزة والمواد المستعملة	1-2
28	الأجهزة المستعملة والشركات المصنعة لها	1-1-2
29	المواد ذات الاستعمال الواحد والشركات المصنعة لها	2-1-2
30	المواد الكيميائية والبايولوجية والأوساط الزرعية المستعملة والشركات المصنعة لها	3-1-2
31	اقراص المضادات الحيوية المستعملة والشركة المصنعة لها والمنشأ:	4-1-2
34	طرائق العمل	2-2
34	البكتريا المستعملة في هذه الدراسة:	1-2-2
34	جمع العينات .	1-1-2-2
34	الأوساط الزرعية المستعملة في عزل البكتريا قيد الدراسة وتشخيصها .	2-1-2-2
35	الكواشف والمحاليل المستعملة في عزل وتشخيص بكتريا <i>Escherichia coli</i>	3-1-2-2
38	عزل وتشخيص بكتريا <i>Escherichia coli</i> .	4-1-2-2
38	التشخيص المظهري (Morphologic tests) .	1-4-1-2-2
38	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) .	2-4-1-2-2
39	التحري عن قابلية بكتريا <i>Escherichia coli</i> لتكوين الغشاء الحياتي Biofilm	5-1-2-2
40	اختبار حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية (Antibiogram Testing):	2-2-2
41	التشخيص الجزيئي لبكتريا <i>Escherichia coli</i> .:	3-2-2
41	استخلاص الحامض الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) من بكتريا <i>E.coli</i> المعزولة	1-3-2-2
43	الكشف عن جينات الضراوة باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction , PCR)	2-3-2-2

47	الترحيل الكهربائي في الهلام (Gel Electrophoresis) .	3-3-2-2
48	الكشف عن نواتج التضاعف	4-3-2-2
48	اختبار التسلسل الجيني (Gene sequences)	4-2-2
50	حفظ وإدامة العزلات	5-2-2
	النتائج والمناقشة	3
51	تشخيص العزلات البكتيرية	1-3
51	الفحوصات الكيموحيوية	2-3
55	التحري عن قابلية بكتريا <i>E.coli</i> لتكوين الغشاء الحيوي Biofilm	3-3
58	مقاومة بكتريا <i>E.coli</i> للمضادات الحيوية	4-3
62	استخلاص الحامض الرابيوزي منقوص الاوكسجين	5-3
63	التحري عن جينات عوامل الضراوة	6-3
68	اختبار التسلسل الجيني (Gene sequences) لجين <i>tos A</i>	7-3
	الاستنتاجات والتوصيات	4
71	الاستنتاجات	1-4
72	التوصيات	2-4
73	المصادر	

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
4	الجهاز البولي للانسان	(1-1)

13	تراكييب الحركة والالتصاق لبكتيريا <i>E.coli</i>	(2-1)
15	مراحل تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا <i>E. coli</i>	(3-1)
33	عزل وتشخيص بكتريا <i>E.coli</i>	(1-2)
52	بكتريا <i>E.coli</i> على وسط الايوسين مثيلين الازرق	(1-3)
53	التحري عن وجود الكبسولة في عزلات بكتريا <i>E.coli</i> تحت العدسة الزيتية في المجهر الضوئي	(2-3)
54	التحلل الفا لعزلات بكتريا <i>E.coli</i>	(3-3)
56	تكوين الأغشية الحيوية في عزلات بكتريا <i>E.coli</i> بطريقة الصفائح	(4-3)
59	نسب مقاومة عزلات بكتريا <i>E.coli</i> للمضادات الحيوية .	(5-3)
63	الترحيل الكهربائي لنتاج الدنا المستخلص من العزلات قيد الدراسة في 0.8 % اكاروز وفرق جهد 70 فولت لمدة نصف ساعة	(6-3)
64	الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين <i>tos A</i> (589 زوج قاعدي) لعزلات بكتريا <i>E.coli</i> في 0.8 % اكاروز وفرق جهد 70 فولت لمدة ساعة واحدة	(7-3)
65	الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين <i>csg A</i> (178 زوج قاعدي) لعزلات بكتريا <i>E.coli</i> في 0.8 % اكاروز وفرق جهد 70 فولت لمدة ساعة واحدة	(8-3)
65	الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين (<i>integron</i>) للإنتكرون الصنف 1 (<i>hep58 and hep59</i>) (الحجم يكون متغاير وقد يصل الى اكثر من 2000bp) من بكتريا <i>E.coli</i> في 0.8 % اكاروز وفرق جهد 70 فولت لساعة واحدة .	(9-3)
68	استبدال بين النوكليوتيدات (C) التي استبدلت بالنوكليوتيدات (T)	(10-3)
69	تحديد الاختلاف في الحامض الاميني في مكان الكودون المستبدل في بروتين (Hemolysin Activation protein)	(11-3)

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
(1-1)	المفتاح التصنيفي لبكتريا <i>E. coli</i>	11
(1-2)	الأجهزة المختبرية	28
(2-2)	المواد ذات الاستعمال الواحد	29
(3-2)	المواد الكيميائية والبايولوجية والأوساط الزرعية	30
(4-2)	أقراص المضادات الحيوية	31
(5-2)	مكونات المزيج Master Mix المستعمل في تفاعل البلمرة المتسلسل	32
(6-2)	البرادئ المستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في الدراسة	43
(7-2)	المواد المضافة إلى أنابيب PCR tube المستعمل في تفاعل البلمرة المتسلسل	44
(8-2)	ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين <i>CagA</i>	45
(9-2)	ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين <i>Tos A</i> على ضوء بروتوكول التدرج الحراري	45
(10-2)	ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين <i>Tos A</i> على ضوء بروتوكول (Touch down protocol)	46
(11-2)	ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين <i>Integron</i>	46
(12-2)	ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين <i>Integron</i> على ضوء بروتوكول (Touch down protocol) .	47
(13-2)	المواد المستعملة في تحضير تضخيم الجين لعمل تسلسل جيني	49
(14-2)	ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين <i>tos A</i> على ضوء بروتوكول (Touch down protocol) .	49

52	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>E.coli</i> المتحصل عليها في هذه الدراسة	(1-3)
56	فحص الغشاء الحيوي لعزلات بكتريا <i>E.coli</i> بطريقة انبوب الاختبار	(2-3)

قائمة المختصرات

AMEs	Aminoglycoside Modifying Enzymes
APEC	avian pathogenic <i>E. coli</i>
DAMPs	danger/damage-associated molecular patterns
DEC	Diarrheagenic <i>E. coli</i>
EnPEC	endometrial pathogenic <i>E. coli</i>
ESBLs	Extended-Spectrum β -lactamases
ExPEC	extra-intestinal pathogenic <i>E. coli</i>
HlyA	Alpha-hemolysin
IPEC	intestinal pathogenic <i>E. coli</i>
MDR	Multiple drug resistance
MTP	Microtiter plate
NMEC	neonatal meningitis-associated <i>E. coli</i>
PAI	genomic Pathogenicity Islands
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	polymerase Chain Reaction

PDR	Pan-drug resistance
PRRs	Pattern recognition receptors
QS	quorum sensing
RTX	repeat-in-toxin
SePEC	septicaemic <i>E. coli</i>
TBE	Tris Borate EDTA buffer
TosA	Target Of Splicing
UPEC	uropathogenic <i>Esherichia coli</i>
UTI	Urinary tract infection
XDR	extensively-drug resistant

الفصل الاول

المقدمة واستعراض المراجع

1-1 المقدمة

يعد التهاب المسالك البولية (Urinary tract infections (UTI) واحداً من أهم المشاكل الصحية الشائعة في كل من المجتمعات العامة والمؤسسات الصحية (المستشفيات)، إذ أشارت واحدة من تقارير المسح الوطني للرعاية الطبية إلى إن التهاب المسالك البولية مسؤول عن ما يقارب السبعة ملايين زيارة لمرضى العيادات الخارجية لتلقي العلاج فضلاً عن ما يصل إلى مليون زيارة في أقسام الطوارئ في المستشفيات، ومن هؤلاء فقد تم ادخال حوالي مئة ألف حالة مصابة ورفودهم في المستشفيات (Ahmed et al., 2019).

تُعد بكتيريا *Escherichia coli (E. coli)* من أهم مسببات التهابات المسالك البولية سواء أكانت مكتسبة من المجتمع أم من المؤسسات الصحية ، وهي بكتيريا سالبة لصبغة كرام و ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية وبالتالي تعد من أهم مسببات الإصابة بالتهابات المسالك البولية في كل المجتمعات البشرية (Demirci et al., 2019).

وقد اشارت العديد من الدراسات الى زيادة في انتاج إنزيمات البيبتالاكتاميز واسعة الطيف (Extended-Spectrum β -lactamases,ESBLs) في العائلة البكتيرية المعوية (Enterobacteriaceae) وبشكل اخص في بكتيريا *E.coli* التي ترتبط ارتباطاً وثيقاً بانتاج هذه الأنزيمات (Namaei et al., 2017 and Lee et al., 2018).

وأوضح Yasir et al.(2018) ان جينات عناصر الضراوة و مقاومة المضادات الحيوية تكون مشفرة في البلازميدات والكروموسومات والعائيات البكتيرية، إذ إن الجينات التي تشفر لأنزيمات البيبتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBL) عادة ما تكون موجودة في البلازميدات plasmids، وقد تظهر ايضاً في الدنا الكروموسومي chromosomal DNA (Guiral et al., 2018) ، ولهذا تعد البلازميدات وسيلة نقل رئيسة لجينات مقاومة المضادات الحيوية (Schembri et al., 2015)، وترتبط البلازميدات بعملية الاستنساخ الناجح لبكتيريا *E. coli* بصورة واسعة ، مما يسهل انتشارها عن طريق التوسع النسيلي clonal expansion (Burke et al., 2016)، وبالتالي فإن الزيادة في انتشار البكتيريا المعوية المقاومة للأدوية المتعددة Multiple drug

resistance (MDR) تؤدي إلى تقييد وحصر خيارات المضادات الحيوية المتاحة لمعالجة العدوى التي تسببها هذه العوامل الممرضة (Mazzariol *et al.*, 2017).

وبين Xicohtencatl-Cortes *et al.*(2019) ان الوحدة الرئيسية لبروتين *curlin* المشفرة بواسطة جين *CsgA* تعمل كجزئيات مستضدية (antigenic molecules) تحفز تحرر السيتوكين، مما يوفر الحماية اللازمة أثناء الالتصاقات البكتيرية في خلايا المثانة البشرية، و اوضح أيضا إن جين الارتباط بالهدف (*Tos A*) Target Of Splicing المشفر لبروتين سمي والذي اكتسب أهمية في السنوات الأخيرة كجزء مستضد له خاصية الالتصاق غير الهدبية (non-fimbrial adhesins) ويمكن ان يعمل كواسم للضراوة في سلالات بكتيريا *E.coli* المسببة لالتهابات المسالك البولية + *tosA* uropathogenic *Esherichia coli* (UPEC) ، ولا يعرف الكثير عن عملية ارتباط هذا البروتين مع مقاومة المضادات الحيوية في السلالات السريرية من بكتيريا *E.coli* المسببة لالتهابات المسالك البولية .

وبالنظر لخطورة بكتيريا *E.coli* فقد هدفت هذه الدراسة الى التحري عن نسب الاصابة للعزلات ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية من هذه البكتريا من خلال الكشف الجزيئي لبعض الجينات المسؤولة عن ضراوة بكتريا Uropathogenic *Esherichia coli* المسببة لالتهاب المسالك البولية الحاد للمرضى في محافظة كربلاء المقدسة عبر المحاور الآتية :

- 1- عزل وتشخيص بكتيريا *E.coli* من مرضى مصابين بالتهابات المسالك البولية الحادة
- 2- التحري عن قابلية بكتريا *E. coli* لتكوين الغشاء الحياتي (Biofilm)
- 3- التحري عن حساسية بكتريا *E. coli* المسببة لالتهابات المسالك البولية للمضادات الحيوية
- 4- الكشف عن جينات الضراوة مثل جين *CsgA* و جين *TosA* والعوامل الوراثية المرتبطة بالمقاومة المتعددة للأدوية .
- 5- إجراء التحليل التتابعي للدنا (DNA sequencing) للجين *tosA* .

2-1 استعراض المراجع

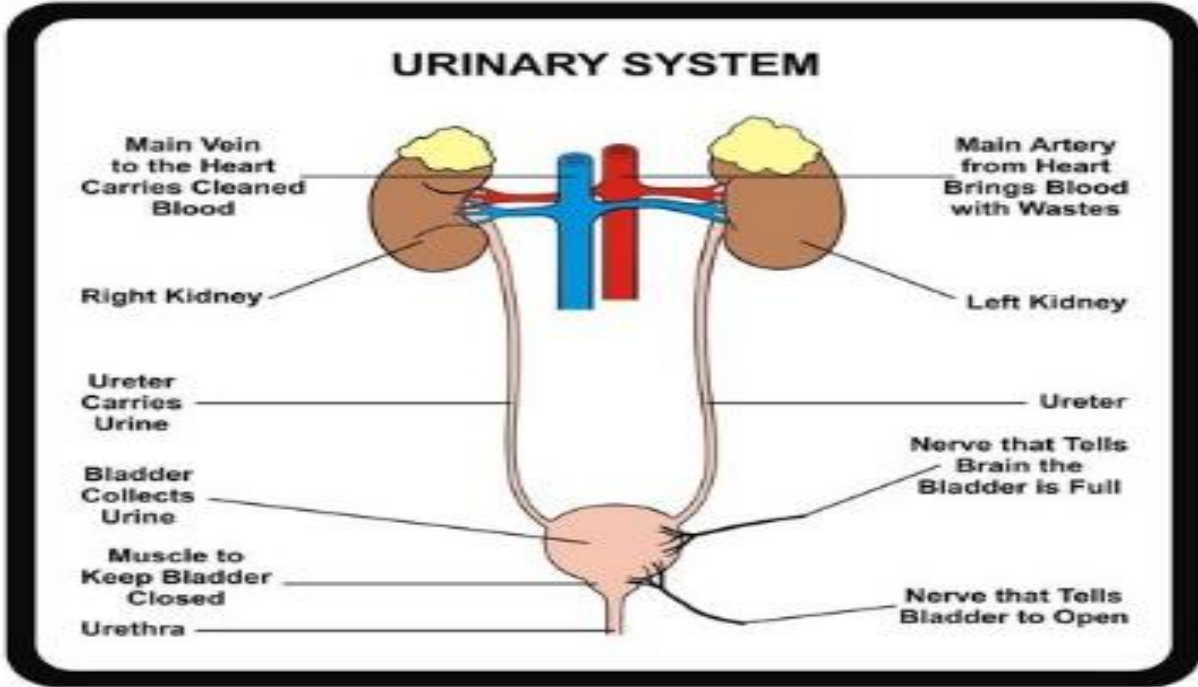
1-2-1 التهاب المسالك البولية (UTI)

تشير عدوى التهاب المسالك البولية عادة الى وجود كمية محددة من البكتيريا في الادرار (بصورة عامة اكثر من 10^5 Colony Forming Unit,CFU لكل مليلتر) (Terlizzi et al., 2017). ويؤثر التهاب المسالك البولية على ملايين الاشخاص سنويا ولهذا تُعد من أخطر انواع العدوى البكتيرية (Demirci et al., 2019). تنتشر عدوى التهاب المسالك البولية على نطاق واسع وتؤثر في نسبة عالية من السكان في جميع بلدان العالم، اذ اشارت الاحصائيات الى ان ما يقرب من 150000000 شخص يصابون بالتهاب المسالك البولية كل عام، مع ما يرافقها من نفقات كبيرة للاستشفاء والنفقات الطبية الاخرى. تعاني حوالي 40% من النساء من عدوى التهاب المسالك البولية في مرحلة من مراحل حياتهن وان 11% من النساء فوق 18 عامًا عادة ما يتعرضن الى الاصابة بعدوى التهاب المسالك البولية كل عام (Terlizzi et al., 2017).

يمثل الجهاز البولي جهازاً تصريفيًا في جسم الانسان لأزالة الأملاح والماء الفائض، ويتكون هذا الجهاز من الكليتين والحالبين والمثانة والإحليل. يتم ترشيح الدم من خلال الكلية التي تعد عضوًا تنظيميًا يقع خلف الصفاق في الجدار الخلفي من البطن على كلتا جهتي العمود الفقري من الخلف قريبا من مستوى الضلع الثاني عشر. وتقوم الكلية بإعادة امتصاص السوائل المرشحة وطرح الادرار (الفضلات السائلة) والتي تتكون من مواد كيميائية مختلفة مذابة في مرشح الماء الفائض من الدم. يمر الادرار المتكون من الكليتين عبر الحالب الليفي العضلي ويتجمع في المثانة، ثم يطرح أخيرا الى خارج الجسم بواسطة الاحليل (Okonko et al., 2010) (وكما موضح بالشكل 1-1).

يبدأ التهاب المسالك البولية السفلى بالاستعمار البكتيري لمنطقة الإحليل الناجم عن التلوث بالبراز القادم من القناة الهضمية يعقبها صعود البكتيريا من خلال الإحليل الى المثانة مما يسبب التهاب المثانة (Cystitis) الذي في حال عدم معالجته يمكن أن يتطور أحيانا الى التهاب المسالك البولية العليا (pyelonephritis) وذلك عندما تجتاز البكتيريا الحالب وتدخل إحدى الكليتين أو كليتهما، ويتطور الالتهاب pyelonephritis في بعض الحالات الى asymptomatic

bacteriua وعليه فخلال مدة الإصابة يتعين على الممرض البولي الناجح (successful uropathogen) الانتقال عبر منافذ مختلفة تشتمل على القناة الهضمية و المنطقة المحيطة بالإحليل والاحليل والمثانة والحالب والكليتين ومجرى الدم (Forsyth et al.,2018).



الشكل 1-1 : الجهاز البولي للإنسان (Zimmermann, 2018)

عادة ما تحدث عدوى التهاب المسالك البولية نتيجة للهجوم البكتيري على المسالك البولية (UT) بما في ذلك الأجزاء السفلية والعلوية من المسالك البولية (Hamzah and Khan, 2017). اذ يتم تسمية المرض على اسم الجزء الملوث بالعدوى البكتيرية ويشار إليه على أنه التهاب المثانة Cystitis او التهاب الكلى pyelonephritis. وتتباين الاعراض ايضا تبعا لموقع حدوث الإصابة، ففي حالة اصابة المثانة (Cystitis) فالأعراض تشتمل على التبول المؤلم والمتكرر على سبيل المثال، واما في حال وصول الإصابة الى الكلى (pyelonephritis) فالأعراض عادة ما تكون مرتبطة بحدوث ارتفاع في درجة حرارة الجسم وألم شديد في الخصرة (Pollann, 2019). يتراوح طيف عدوى المسالك البولية من مرض خفيف يشفى دون اخذ المضادات الحيوية إلى تعفن الدم الحاد، بمعدل وفيات قد يصل الى 20-40 % (Gharbi et al., 2019).

و يمكن أن تكون عدوى المسالك البولية العلوية هي نتيجة لعدوى الجهاز السفلي غير المعالجة والتي تؤثر على الكلى وتزيد من حدوث العدوى المنقولة بالدم. و عدوى المسالك البولية قادرة على تهديد حياة الكثير من المرضى في ظل بعض الأوضاع السريرية الخطيرة وتعد ثاني أكثر أنواع التلوث البكتيري الأساسي بعد العدوى المنقولة عن طريق الدم (Vasudevan et al., 2020).

وترتبط القابلية لتطوير النمط الظاهري (phenotype) لالتهاب المسالك البولية بعوامل عدة مثل الاختلال الوظيفي للمسالك البولية و / أو الآليات الجينية المتضمنة في السيطرة على الاستجابات المناعية الذاتية للأمراض (Koves and Wullt, 2016).

يؤثر التهاب المسالك البولية غير المعقدة في الأشخاص الأصحاء والذين ليس لديهم تشوهات في المسالك البولية وتحدث في الغالب عن طريق الكائنات الدقيقة الحساسة للمضادات الحيوية، إذ يحدث التهاب المسالك البولية المعقدة في الغالب عند الأشخاص الذين يعانون من تشوهات تشريحية أو وظيفية في الجهاز البولي. وترتبط بعوامل الخطر مثل انسداد المسالك البولية و احتباس البول وإصابات الحبل الشوكي و إخماد المناعة والفشل الكلوي و زراعة الأعضاء ووجود أجسام غير مألوفة مثل القسطار والحصوات. يوجد أيضاً تقويم سريري لتوصيف عدوى المسالك البولية اعتماداً على تكرار الإصابة، إذ قد يحدث الالتهاب لمرة واحدة فقط و أحياناً يحدث بشكل متكرر وبالتالي فإن توصيف عدوى التهاب المسالك البولية بشكل جيد مهم في اختيار العلاج الأنسب للحالة المرضية (Versporten et al., 2016).

عادة ما تبدأ الالتهابات الحاصلة في المسالك البولية عن طريق الغزو البكتيري، وفي الغالب يحصل عن طريق البكتيريا السالبة لصبغة غرام مثل بكتيريا *E. coli* و بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و أنواع من بكتيريا *Proteus* و *Acinetobacter* و *Klebsiella* و *Enterobacter* و *Citrobacter*. ومن بين البكتيريا الموجبة لصبغة الجرام هي *Staphylococcus saprophyticus* و أنواع من *Enterococcus*، وقد تكون المكورات العنقودية *Staphylococci* السالبة لاختبار Coagulase من الاحتمالات الشائعة التي من الممكن أن تسبب التهاب المسالك البولية (Ahmed et al., 2019).

2-2-1 تصنيف إصابات المسالك البولية Classification of urinary tract infections

تتواجد طرائق عدة لتصنيف إصابات المجاري البولية تشتمل على : -

1-2-2-1 التصنيف حسب الموقع

a- إصابات المجاري البولية السفلى (Lower urinary tract infections , Cystitis) :-
هو التهاب في المسالك البولية في الغشاء المخاطي للمثانة يشتمل على أعراض عدة منها عسر البول والتبول اللاإرادي والرغبة في التبول و الرائحة الكريهة للأدرار و سلس البول والنبيلة الدموية فضلا عن ألم فوق العانة . ومع ذلك ، يتسم تشخيص هذه الأعراض بصعوبة عند الأطفال والرضع بعكس البالغين (Stein et al., 2015) .

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

هي إصابات قيحية تنتشر في الحوض والكليتين والنسيج الحشوي (parenchyma) تنسم بظهور أعراض أبرزها أعراض الحمى إذ ترتفع درجة الحرارة الى (37 درجة مئوية أو أكثر) ، ولكن على عكس البالغين فإن الرضع والأطفال الصغار قد يكون لديهم علامات غير محددة مثل ضعف الشهية و الخمول و التهيج و القيء أو الإسهال (Stein et al., 2015) .

2-2-2-1 التصنيف حسب ظهور الأعراض المرضية

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

b- الألتهاب البكتيري المقترن بظهور الاعراض (Symptomatic Bacteriuria)

يقترن هذا النوع من الإلتهاب بظهور أعراض مهيجة و ألم فوق العانة والتهاب المثانة والحمى (fever) والتوعك (malaise) وإلتهاب الحوض والكلية ومن الصعب التمييز بين ABU و المرضى الذين يعانون من (neurogenic bladder) وتتسم إصاباتهم برائحة البول الكريهة (Stein et al., 2015) .

3-2-2-1 التصنيف بحسب عوامل التعقيد Complicated factors

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

ترتبط إصابات المجاري البولية المعقدة بخلل تركيبى أو وظيفي في القناة البولية التناسلية أو مع وجود مرض داخلي يزيد من مخاطر فشل علاج هذه الأصابات . يستلزم حدوث هذا النوع من الأصابات وجود أكثر من 100000 وحدة مكونة للمستعمرة (Colony forming unit , CFU) في عينة الأدرار الوسطية (Midstream sample of urine , MSU) في النساء والرجال ، على التوالي (Rubin et al ., 1992) . يعد الطيف البكتيري (bacterial spectrum) في إصابات المجاري البولية المعقدة أكثر بكثير مما هو في الأصابات غير المعقدة . أن أكثر أنواع الاحياء المجهرية المسببة للأصابات المعقدة والتي تم عزلها من وحدات العناية المركزة في إحدى عشر بلداً أوربياً هي [*E. coli* (%26.2) و *Candida spp* (%16.9) و *Enterococcus spp* (%15.9) و *Pseudomonas aeruginosa* (%14.1) و *Klebsiella spp* (%7.8) و *staphylococci* (%4.2) و *Enterobacter spp* (%3.7) و *Proteus spp* (%2.5) و (السالبة لإنزيم التجلط) و *Morganella spp* (1.6%) فضلاً عن *Acinetobacter spp* (%1.5)] (Smelov et al., 2016) .

b- إصابات المجاري البولية الحادة غير المعقدة (Acute uncomplicated urinary tract infections)

تظهر إصابات المجاري البولية هذه غالباً عند النساء بغض النظر عن وجود أو عدم وجود تشوهات هيكلية أو وظيفية داخل تلك المجاري . وعلى الرغم من أن هذا النوع من الأصابات لا ينتقل

عن طريق الجنس إلا أن الألتهايات تتهيج عند ممارسته . أما في الرجال فقد أشارت الدراسات الى أن تلك الأصابات عادةً ما تقترن بألتهايات البروستات المزمن (Foxman, 2002) . يصل أعداد الأحياء المجهريية المسببية لأصابات المجاري البولية غير المعقدة في النساء الى أكثر من 1000 وحدة مكونة للمستعمرة في حالة إلتهايات الحوض والكلية الحادين . ومع ذلك فإن عدداً من السلالات المسببية للأمراض البولية تظهر معدلات نمو مماثلة في الأدرار البشري مما يشير الى أن قابليتها على النمو في الأدرار ليست سمة من سمات الضراوة في حد ذاته , Alteri and Mobley (2007) .

4-2-2-1 التصنيف المعدل لأصابات المجاري البولية بحسب إرشادات الرابطة الأوروبية لجراحة المسالك البولية (EAU)

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

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

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

d - إلتهايات المجاري البولية المعقدة : تكون أعراض هذا النوع من من الألتهايات مزيجاً من أعراض أنواع الألتهايات الثلاثة السابقة المشار إليها أعلاه .

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

1-2-3- العائلة المعوية (Enterobacteriaceae)

تحتوي مجموعة العائلة المعوية على اعداد كبيرة ومختلفة من الاجناس البكتيرية التي تستوطن امعاء الحيوان والانسان بشكل طبيعي، اذ تكون افرادها ذات شكل عصوي، سالبة لصبغة كرام، هوائية او لا هوائية اختيارية (facultative anaerobic) يمكن لأفرادها ان تسبب عدد كبير من الامراض للإنسان والحيوان منها اصابة الجروح المفتوحة و العدوى التي تنتقل جراء المكوث في المستشفيات (nosocomial infections) و اصابات الاعضاء التنفسية (respiratory infections) والاصابات التي تنتقل الى الجهاز البولي (urinary tract infections) فضلاً عن اصابات الاجهزة التناسلية (genital infections) (Oliveira et al., 2017). ولديها عوامل ضراوة مختلفة مثل افراز السموم والانزيمات، كذلك لها القابلية على تخمير مجموعة واسعة من الكربوهيدرات واغلب افرادها تستطيع تخمير سكر اللاكتوز (Lactose) واما الاختبارات الكيموحيوية فتكون سلبية لاختبار الاوكسيداز (oxidase) وموجبة لاختبار الكاتاليز (catalase) ولها القابلية على اختزال النترات (nitrate) الى النترت (nitrite) لانتاج الطاقة الضرورية، معظمها تحتوي الاسواط (flagella) وغير مكونة للأبواغ وتنمو بدرجة 37م (Jawetz et al., 2016).

1-2-4- بكتريا Escherichia coli

تنتمي بكتريا *Escherichia coli* الى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* (Nascimento et al., 2012) التي تضم مجموعة كبيرة و متباينة من الأنواع البكتيرية التي تستوطن في امعاء الأنسان والحيوانات بصورة طبيعية. تسبب أفراد هذه العائلة الكثير من الأمراض للإنسان والحيوانات مثل اصابات الجروح المفتوحة والإصابات المكتسبة في داخل المستشفيات (nosocomial infections) وإصابات الاجهزة التنفسية (respiratory infections) وإصابات الجهاز البولي (urinary tract infections) فضلاً عن احداث الإصابات في الجهاز التناسلي (genital infections) (Oliveira et al., 2017).

وقد قام العالم الألماني Theodore Escherich بتشخيص بكتريا *E. coli* في عام 1885 م من خلال دراسته على البكتريا الطبيعية (normal flora) الموجودة في الأمعاء والمنقلة الى براز الأطفال الصغار الرضع كبكتريا متعايشة تستوطن الأمعاء مباشرة بعد الولادة (Bray, 1945).

ويظهر إن جنس بكتريا *Escherchia* قريب الصلة من أجناس العائلة المعوية الأخرى وبالأخص جنس بكتريا *Shigella* إذ يضم هذا الجنس خمسة أنواع وهي (*E. coli* و *E. blattae* و *E. hermannii* و *E. fergusonii* و *E. vulneris*) إذ يكون الاختلاف في ما بينها في نتائج التفاعلات الكيموحيوية ، و يعد النوع *E. coli* هو الأكثر شيوعا والأكثر أهمية في أمراضية الإنسان (Olowe et al., 2017). وبعد تطور الطرائق الجزيئية في التشخيص تم وضع المفتاح التصنيفي لبكتريا *E. coli* بحسب ما هو موضح في الجدول 1-1.

تتصف خلايا بكتريا *E. coli* بكونها عصوية الشكل (rod-shaped) وسالبة لصبغة غرام وغير منتجة للمحفظة ويتراوح طولها من (1-3) مايكروميتر وقطرها 0.5 مايكروميتر , Welch (2006). تتصف أغلب سلالات هذه البكتريا بإعطائها نتيجة موجبة لفحص الأندول (Indol) وأحمر الميثيل (methyl red) فيما تعطي نتيجة سالبة في فحوصات Urease و Citrate و Oxidase (Roesch et al., 2003). أن بكتريا *E. coli* الممرضة للمسالك البولية (Uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC) تعد العامل المسبب في الغالبية العظمى من إصابات المسالك البولية والتي تتضمن التهاب المثانة (Cystitis) والتهاب الحوض والكلية (Pyelonephritis) فضلاً عن مضاعفات الإصابة والتي قد ينتج عنها فشل كلوي حاد فسي الأشخاص الأصحاء فضلاً عن مرضى زرع الكلية (Bien et al., 2012). إذ ان سلالة UPEC الممرضة تتسبب بحوالي 80% من إصابات المسالك البولية غير المعقدة و95% من الإصابات المكتسبة من المجتمع و50% من حالات الإصابة المكتسبة من المستشفيات فضلاً عن انها من أكثر مسببات الأمراض شيوعاً فسي إصابات المسالك البولية المعقدة (Tabasi et al., 2016).

الجدول 1-1 : المفتاح التصنيفي لبكتيريا *E. coli* (Garrity et al., 2005).

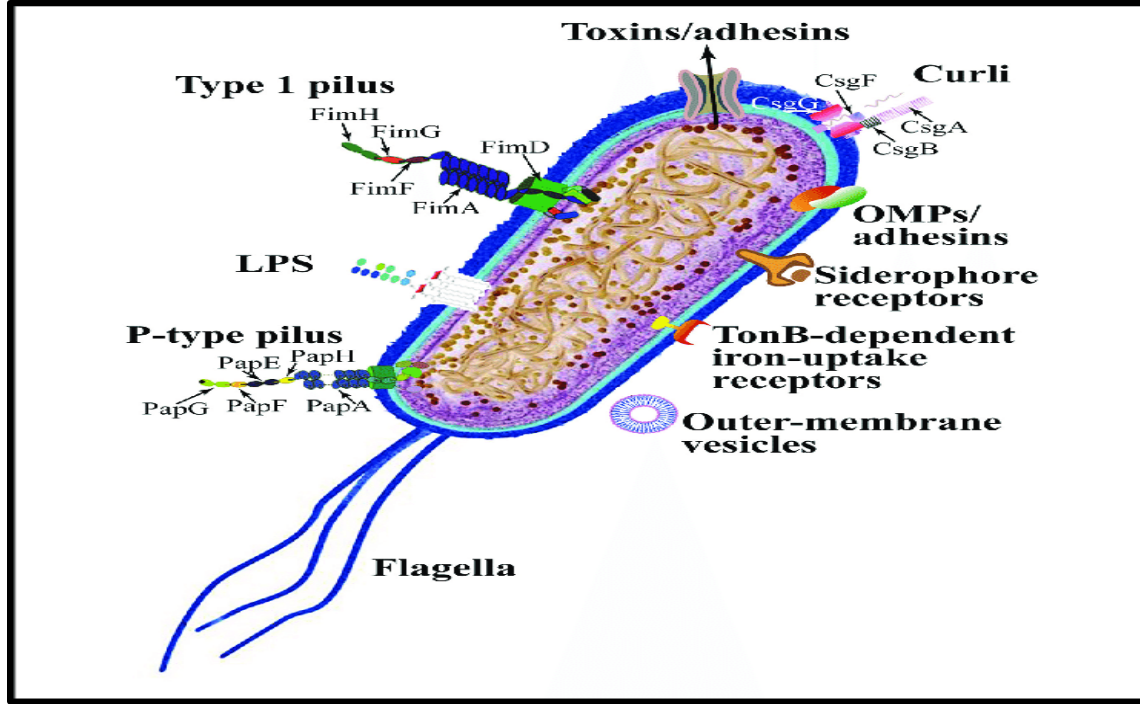
التصنيف	الاسم العلمي
المملكة (Kingdom)	<i>Bacteria</i>
الشعبة (Phylum)	<i>Proteobacteria</i>
الصف (Class)	<i>Gammaproteobacteria</i>
الرتبة (Order)	<i>Enterobacteriales</i>
العائلة (Family)	<i>Enterobacteriaceae</i>
الجنس (Genus)	<i>Escherichia</i>
النوع (Species)	<i>coli</i>

تكون بكتيريا *E. coli* اما متعايشة او مسببة لمجموعة من الامراض . فقد تم تصنيف قسم من سلالات بكتيريا *E. coli* على أنها مسببة للأمراض خارج الأمعاء (extra-intestinal) (*pathogenic E. coli* , ExPEC) لتمييزها عن السلالات المسببة لأمراض الأمعاء والتي يشار إليها عادة باسم الايشريشيا القولونية المعوية (intestinal pathogenic *E. coli* ,IPEC) . يمكن أن تسبب بكتيريا *E. coli* المسببة للأمراض خارج الأمعاء مجموعة واسعة من العدوى خارج الأمعاء في مواقع تشريحية متعددة ، وتتضمن بكتيريا *E. coli* المرتبطة بعدوى المسالك البولية في الإنسان والحيوان و بكتيريا *E. coli* المرتبطة بالتهاب السحايا الولادي (neonatal meningitis-associated *E. coli* ,NMEC) و بكتيريا *E. coli* المرتبطة بأمراض الدم (septicaemic *E. coli* ,SePEC) المسببة للعدوى الجهازية في الإنسان والحيوان و بكتيريا *E. coli* الممرضة للطيور (avian pathogenic *E. coli* ,APEC) التي تسبب داء القولونيات للطيور، يحتمل ان تنشأ (ExPEC) سلالة ممرضة لبطانة الرحم تسمى (endometrial pathogenic *E. coli* ,EnPEC) (Lindstedt et al., 2018) . وتُعد بكتيريا *E. coli* من أهم أسباب التهابات المسالك

البولية، بغض النظر عما إذا كان مكتسبًا من المستشفى أو مكتسبًا من المجتمع (Demirci *et al.*, 2019).

وتمتلك بكتيريا *E.coli* الممرضة (UPEC) الكثير من التراكيب الهيكلية مثل الاهداب (fimbriae) و الشعيرات (pili) و بروتين كيرلي (curli) و الاسواط (flagella) وافراز السموم و أنظمة اقتناص الحديد والتي تعد من عناصر الضراوة التي تسهم في زيادة إمراضيه البكتريا من خلال زيادة القدرة على التمسك بالخلايا الطلائية في المسالك البولية والتي تعد من أهم محددات الإمراضية ، وعلى الجانب الاخر فان الخلايا الطلائية للمثانة تظهر مجموعة متعددة الأوجه من آليات دفاعية، والتي تشمل تصريف البول وإفراز المواد المضادة للميكروبات التي توفر أدوات مهمة جدا لمحاربة الالتهابات البكتيرية والتخلص منها (Terlizzi *et al.*, 2017).

تعد بكتيريا *E. coli* الممرضة (UPEC) واحدة من الأسباب الرئيسية للإصابة بعدوى المسالك البولية المكتسبة في المجتمع (80-90 %) والتهابات المسالك البولية المكتسبة من المستشفيات (30-50 %) (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018). تقسم هذه البكتريا على أساس قابلية الجينوم البكتيري في التسبب بالإمراضية (genomic Pathogenicity Islands ,PAI) وإنتاج عوامل الضراوة مثل المواد اللاصقة والسموم ، السكريات المتعددة السطحية ،الاسواط، وأنظمة اقتناص الحديد الى اربع مجموعات (A, B1 , B2 and D) (Bien *et al.*, 2012). عادة ما تسبب بكتيريا *E. coli* الممرضة التهاب المسالك البولية بسبب امتلاكها مجموعة من عوامل الضراوة (Hannan *et al.*, 2012). وتستطيع بكتيريا *E.coli* الممرضة ان تستعمر المثانة بواسطة مجموعة من عوامل الضراوة، التي تُعد مهمة للبكتريا لإحداث الإمراضية في المسالك البولية، بما في ذلك مكونات السطح الهيكلية مثل متعدد السكريد الدهني (LPS) و محفظة متعدد السكريد والاسواط و حويصلات الغشاء الخارجي والاهداب و تراكيب كيرلي و مواد لاصقة غير هيدبية و بروتينات الغشاء الخارجي وغيرها من السموم المفرزة و أنظمة إفراز ومستقبلات امتصاص الحديد المعتمدة على Ton B بما في ذلك مستقبلات siderophore الشكل (3-1) (Klemm *et al.*, 2010; Werneburg *et al.*, 2015; O' Brien *et al.*, 2016).



الشكل 1-2: تراكيب الحركة والالتصاق لبكتيريا *E. coli* (Terlizzi et al., 2017)

1-4-2-1 المجموعة التطورية والأنماط المصلية لبكتيريا *E. coli*

يتكون التركيب الجينومي الشامل pan-genome لبكتيريا *E. coli* (العزلات الممرضة والمتعايشة) من 2200 جين أساس ومجموعة واسعة من الجينات الفريدة (unique genes) وكذلك حوالي أكثر من 13000 جين كمستودع احتياطي، مما يشير إلى أن هذه البكتيريا لديها امكانيات عالية للتنوع والإمراضية. على الرغم من عمليات إعادة الارتباط recombination، توصف المجتمعات المشكلة بواسطة بكتيريا *E. coli* على أنها ذات تركيب نسيلي محدد، كما يتضح من خلال عدة تقنيات مثل التنميط المصلي (serotyping) و التنميط الحيوي (biotyping) و التضخيم العشوائي للحمض النووي المتعدد الأشكال (random amplified polymorphic DNA) و تباين اطوال قطع تقييد (restriction fragment length polymorphism). ان التركيب النسيلي المحدد لسلاسل بكتيريا *E. coli* يظهر من خلال حقيقة أن كل شخص لديه في وقت معين سلالة سائدة تشكل أكثر من نصف المستعمرات المعزولة. ومع ذلك، فإن التنوع داخل المضيف ايضا يكون مختلف ومتنوع ما بين المجتمعات البشرية (Stoppe et al., 2017).

ان التنوع الحاصل في مجتمعات بكتيريا *E. coli* يمكن تمييزه في أربع مجموعات تطورية (A, B1, B2 and D) على أساس التغيرات (تعدد الأشكال) الجينية، وبالتالي أصبح من الواضح أن الانماط التطورية والتعبير عن جينات الضراوة يختلف باختلاف الموقع الجغرافي (Munkhdelger *et al.*, 2018; González-Alba *et al.*, 2017). في السنوات الاخيرة سمح العدد المتزايد من التسلسلات المتاحة بتحديد ثلاث مجموعات تطورية هي (C, E, and F) وخمس مجموعات خفية (cryptic clades) (ذات سلف مشترك)، مما يعني أن تركيب مجتمعات بكتيريا *E. coli* أكثر تعقيداً مما اقترح في البداية. وعدت بعض الدراسات أن المجموعة التطورية phylogroup B2 هي أكثر مجموع ممثلة للسلف (ancestor) لسلالة *E. coli* phylogroup في حين اقترحت دراسات أخرى أن المجموعة التطورية phylogroup D هي المجموعة الممثلة للسلف هذا من جانب، ومن جانب اخر تم اقتراح أن السلالتين الفرعيتين من phylogroup D يمكن أن يكونا أصل مسارين تطوريين رئيسيين يؤديان إلى مجموعات A / B1 / C / E و B2 / F. واقترح باحثون آخرون أن مجموعة B1 كانت أصل مجموعات E و A في حين شككت دراسات اخرى في تمايز المجموعة التطورية phylogroup C (González-Alba *et al.*, 2018).

5-2-1 انتاج الاغشية الحيوية (Biofilms) في بكتريا *E. coli*

الاجشية الحيوية عبارة عن تجمعات من الخلايا البكتيرية الملتصقة مع بعضها على السطح الصلب ، اذ تحيط نفسها بمادة بينية خارج خلوية (extracellular matrix) التي هي عبارة عن سكريات متعدد (polysaccharides) وبروتينات الدنا من البكتريا ، وتساهم هذه المادة في تثبيت الغشاء الحيوي، ويساعد هذا الغشاء في عمليات اصابة المضيف ويزيد من قابلية البكتريا على مقاومة الادوية ، كما يوفر الحماية للخلايا من الاليات الدفاعية المناعية للمضيف مثل خلايا البلعمة (Macrophages) (Soto, 2013) تمر عملية تكوين الغشاء الحيوي بخمس مراحل وكالاتي:

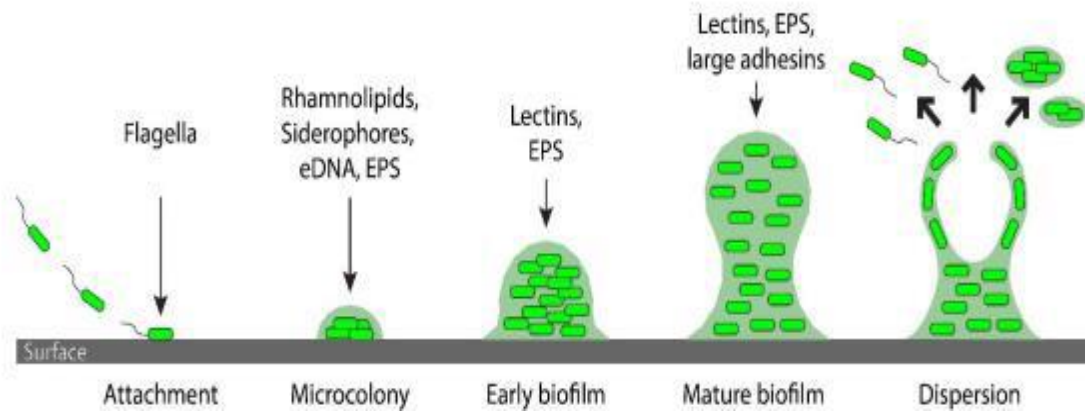
1- مرحلة الالتصاق العكسي (reversible attachment) على السطح، وتتم هذه المرحلة بواسطة الاسواط (flagella) و عوامل الجذب الكيميائية (chemotaxis) الاخرى للبكتريا.

2- مرحلة الالتصاق غير عكسي (irreversible attachment) على السطح: مرحلة ثبات الخلايا وقلة استطالتها، ويستعمل في هذه المرحلة النوع الأول من الأهداب (type 1 pili) و الياف كورلي (curli fibres) فضلاً عن نوع من المستضدات يدعى antigen 43.

3-مرحلة تكوين المادة الخارج خلوية (external matrix) إذ تنتج البكتريا السكريات المتعددة (polysaccharides) لتسهيل عملية تجمع الخلايا على الاسطح الصلبة والتصاقها ، وتتكون هذه المادة من السليلوز (cellulose) متعدد الكلوكوز الاميني (polyglucosamine) و حامض الكولونك (colonic acid) إضافة للعديد من المواد كالأحماض النووية والبروتينات.

4-مرحلة اكتساب الغشاء الحيوي للتركيب الثلاثي الابعاد (three-dimensional structure) وهذه تشمل تكون مستعمرات بكتيرية كثيفة مطمورة في العديد من المواد كالمغذيات والماء والنواتج الايضية الاخرى.

5- مرحلة الانفصال والتحرر (deattachment) : وتمثل مرحلة اكتمال نضج الغشاء الحيوي و انفصاله لكي تبدأ العملية من جديد على اسطح اخرى (Soto, 2014) كما في الشكل (1-2).



الشكل 1-3: مراحل تكون الاغشية الحيوية في بكتريا *E. coli* (Silva et al., 2017).

اشارت الدراسات الى ان قابلية انتاج الاغشية الحيوية لها دور اساس في 80% من الاصابات البكتيرية للجهاز البولي في الانسان ، ويمكن ان يثبط الغشاء الحيوي باستعمال مواد عديدة من مستخلصات نباتية او مواد كيميائية اخرى، التي تؤثر في نظام نقل الإشارات الكيميائية بين الخلايا

البكتيرية وتزداد صفة المقاومة للادوية في البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي نتيجة لعدم قابلية الادوية على النفاذ داخل الغشاء الحيوي (Poursina et al., 2018 ; Tajbakhsh et al., 2016).

1-2-6 ضراوة بكتيريا *E. coli*

تعد الاصابات التي تسببها بكتيريا *E. coli* الممرضة خارج الأمعاء السبب الرئيس للمرض والوفيات والتكاليف المرتفعة المتعلقة بالعلاج. اذ تتكيف بكتيريا *E. coli* مع بيئة المضيف (المثانة والكلى ومجرى الدم) وتلعب عوامل الضراوة دوراً مهماً في المراحل الأولى من التداخل مع بيئة المضيف، اذ يوجد نوعين أساسيين من عوامل الضراوة، النوع الاول يتم التعبير عنها على سطح الخلية (التي تؤدي وظائف التصاق بالأنسجة والغزو، وكذلك تكوين الأغشية الحيوية) و النوع الاخر هي التي يتم إنتاجها داخل الخلية البكتيرية ومن ثم تصديرها إلى موقع الإصابة مثل السموم البكتيرية (Miranda-Estrada et al., 2017).

اوضحت الدراسات ان العديد من عوامل الضراوة (virulence factors) تم تشخيصها في بكتيريا *E. coli* الممرضة خارج الامعاء ExPEC و أن سلالات مجموعة B2 تحتوي على العديد من الجينات المشفرة للعديد من عوامل الضراوة مقارنة بالمجموعات الأخرى من بكتيريا *E. coli*. ومن بين سلالات بكتيريا *E. coli* العائدة الى مجموعة B2 التي تحتوي على العديد من جينات المقاومة و عوامل ضراوة ، تشفر هذه العزلات لعوامل ضراوة مختلفة مثل السموم و المحفظة و البروتينات المساعدة في الاختراق (invasins) والمواد اللاصقة التي بمجموعها تساهم في إمراضية بكتيريا *E. coli* وبالتالي التسبب بالتهاب المسالك البولية الشديد او الحاد (Nicolas-Chanoine et al., 2014)

ان الجينات المشفرة لعوامل الضراوة في بكتيريا *E. coli* المسببة لالتهابات المسالك البولية (UPEC) يمكن ان تكون موجودة في الكروموسومات حصراً مثل الجينات *pap* و *hly* او مرتبطة حصرياً بالبلازميد مثل جينات *iss* و *traT* أو يمكن أن تكون في أي من الموقعين مثل the aerobactin operon و *afa/dra B*. تمتلك جينات عوامل الضراوة المحمولة بالبلازميد وسيلة واضحة للانتقال الأفقي بين سلالات بكتيريا *E. coli* و تميل هذه الجينات إلى الانتشار على

نطاق أوسع ولكن بشكل متقطع داخل الأنواع أكثر من الجينات المحمولة على الكروموسوم (Kudinha, 2017).

و يمكن أن تكون الجينات الموجودة في الجزر المسببة للأمراض مرتبطة أيضاً بالضراوة وتشفر مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة المختلفة مثل عوامل الالتصاق (P fimbriae) والسموم (مثل الهيموليسين (hemolysin) والعامل الناخر السام للخلايا (cytotoxic necrotizing factor) وانظمة الافراز و ناقلات الحديد (مثل aerobactin و yersinabactin) ، وان من أهم جينات الضراوة لسلاسل بكتيريا *E. coli* الممرضة المرتبطة بالتهابات المسالك البولية الشديدة هي جين *aer* (aerobactin) و جين *pap* (P fimbriae) و جين *fimH* (type 1 fimbriae) و جين *afal* (fimbrial adhesion I) و جين *hly* (hemolysin) و جين *sfa* (S fimbriae) وايضا هناك جينات ضراوة اخرى (*usp* و *vaC*, *ibeA*, *fyuA*)*kpsMT*, *traT*, *iutA*) قد تشترك ايضا في العملية الإمراضية (Munkhdelger et al., 2017).

تستخدم بكتيريا *E. coli* الممرضة للجهاز البولي مجموعة واسعة من عوامل الضراوة لاستعمار المضيف فالبروتين (repeat-in-toxin (RTX) الذي ينتج عن طريق الجين *tos A* والذي يتم التعبير عنه على وجه التحديد في المسالك البولية يساهم بشكل كبير في ضراوة وبقاء بكتيريا *E. coli* الممرضة للجهاز البولي UPEC.

ان الجين *tos A* الموجود في سلالات ضمن المجموعة التطورية B2 من بكتيريا *E. coli* ، يستخدم كواسم للسلاسل التي تحتوي أيضاً على عدد كبير من عوامل الضراوة التي تتميز بها بكتيريا *E. coli* الممرضة للجهاز البولي UPEC. يمكن التنبؤ على وجود جين *tos A* في عزلة بكتيريا *E. coli* وذلك باستعمار ناجح لنموذج الفئران لتسببها بانتشار عدوى المسالك البولية ، بغض النظر عن مصدر العزلة. هنا، كشف تحليل مفصل لوظيفة *tos A* أن هذا الجين مرتبط نسبياً بالجينات التي تشفر نظام إفراز محفوظ من النوع 1 مشابه لأفراد عائلة (repeat-in-toxin (RTX) الآخرين حيث وجد ان الجين *tos A* المترجمة على سطح الخلية يساعد على:

(1) الالتصاق على الخلايا المضيفة المشتقة من الجهاز البولي العلوي.

(2) البقاء على قيد الحياة في حالات العدوى المنتشرة .

(3) لتعزيز القدرة على القتل أثناء تسمم الدم (كما تم تقييمه في نموذجين حيوانيين مختلفين للعدوى. (Vigil et al., 2021).

Integrans عناصر وراثية موجودة في البكتيريا ، يمكنها التقاط أشربة الجينات المقاومة لمضادات الميكروبات والتعبير عنها . ترتبط Integrans ارتباطاً وثيقاً بنشر الجينات المضادة للميكروبات بين أجناس مختلفة من البكتيريا. تم العثور على عدة أنواع من فئات Integron في الوقت الحاضر في البكتيريا. غالباً ما توجد الأعداد الصحيحة في البلازميدات أو الترانسبوزونات المعدية، والتي يمكنها تسهل قابلية نقل الجينات المضادة للميكروبات بين البكتيريا. ظهور مثل هذا العامل الممرض Integrans قد يساهم بشكل كبير في زيادة انتشار مقاومة المضادات الحيوية، خاصة الفئتين 1 و2، لها امتداد واسع في البكتيريا المعوية. Enterobacteriace. وقد أدى ذلك إلى التكهن بأن Integrans ربما تشارك في نشر الجينات المقاومة لمضادات الميكروبات في بكتيريا *E.coli* (Huang et al., 2020).

تعمل ألياف Curli ، المشفرة بواسطة جينات *csg (B,A,C)* ، على تعزيز تكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *E.coli* والبكتيريا المعوية الأخرى. يعتمد إنتاج هذه الألياف على تنشيط نسخ *CsgD*، والذي يعزز أيضاً التخليق الحيوي للسليولوز. ومع ذلك، يظل تعبير *csg (B,A,C)* معتمداً على درجة الحرارة ووسط النمو. ينتج عن التعبير التأسيسي لبروتين *CsgD* أنماط نسخ متغيرة لما لا يقل عن 24 جيناً جديداً، فضلاً عن الجينات المعتمدة مسبقاً على *CsgD* (Brombacher et al., 2006).

وتُعد المواد اللاصقة نقاط الاتصال الأساس مع المضيف والتي تساعد في إنشاء العدوى والاستعمار. *CsgA* تنتج مادة لاصقة ، هي المكون الهيكلي الرئيس للألياف المتعرجة *curli* التي تشكل البوليمرات المتجانسة من عدة مئات من الوحدات. نظراً لالتصاقها على سطح الخلية يتم التعرف على ألياف الضفيرة بواسطة الجهاز المناعي للمضيف، مما ينتج عنه استجابة مناعية عالية، وبالتالي يمكن أن تكون بمثابة مرشح لقاح فعال. وقد كشفت فحوصات المناعة الخلوية مثل التنميط المتمائل للأجسام المضادة، وتحليل تكاثر الخلايا الطحالية في المختبر، والتنميط الخلوي عن استجابة مناعية مختلطة للخلايا التائية المساعدة. (Karan et al.,2021).

7-2-1 أمراض البكتريا للمسالك البولية

ان الامراضية لالتهاب المسالك البولية عادة ما يتم تحديدها من خلال تشريح المسالك البولية والتفاعل ما بين عوامل الضراوة للأحياء الدقيقة والجهاز المناعي للمضيف. وتُعد المناعة الذاتية هي خط الدفاع الاساس المضاد للبكتيريا في المسالك البولية. يعد البول وسيلة مثالية لاستنبات العديد من الاحياء الدقيقة المسببة للأمراض في الجهاز البولي، ومع ذلك، فإن البول يحتوي أيضاً على خواص مضادة للأحياء الدقيقة. تعمل المسالك البولية بشكل طبيعي على التخلص من العديد من الاحياء الدقيقة بشكل فعال و التي تدخل المثانة من خلال بعض العوامل الدفاعية التي تعمل كمضادات حيوية في المسالك البولية السفلية مثل النشاط القاتل للبكتريا في البول (الاوزموزية و الرقم الهيدروجيني و الأحماض العضوية) و عمليات تنظيف المثانة و ردود الفعل الالتهابية وجهاز المناعة المكتسب (Raka et al., 2016).

ويعد ظهور الامراضية للمسالك البولية عملية معقدة تتأثر بالعديد من العوامل الحياتية والسلوكية للمضيف وكذلك تتأثر بخصائص العامل الممرض المُعدي. ان النتائج المترتبة لالتهاب المسالك البولية غالبا ما تحدد بواسطة عوامل الضراوة للبكتيريا الغازية وآليات الدفاعية للمضيف (Kudinha, 2017). اذ ترتبط العديد من عوامل الضراوة بأمراضية المسالك البولية واهمها هي عوامل الالتصاق و الاهداب و الاسواط و انتاج السموم و ناقلات الحديد و السكريات المتعددة المكونة للمحفظة و السكريات المتعددة الدهنية و تكوين الغشاء الحيوي و والأيروباكتين (aerobactins). تشمل عوامل الخطر المحددة لالتهابات المسالك البولية في جميع الأعمار على الأجهزة أو الجراحة العصبية والقسطار وانسداد المسالك البولية والتهاب المثانة العصبية وعمليات زرع الكلى. ان بعض العوامل الخاصة بالمضيف مثل العمر والجنس والحمل والحالة المناعية يمكن أن تجعل بعض الاشخاص أكثر عرضه إلى عدوى المسالك البولية وبالتالي السماح لمسببات الأمراض الأقل ضراوة بالتسبب في حدوث المرض (Raka et al., 2016; Kudinha, 2017).

تبدأ التهابات المسالك البولية عادة بواسطة تلوث الانسجة حول الاحليل من خلال عامل ممرض للجهاز البولي ينتقل عن طريق الامعاء مما يؤدي الى استعمار مجرى البول ومن ثم الانتقال بواسطة الاسواط والشعيرات للأحياء الدقيقة إلى المثانة أو الكلى ، اذ يلعب الالتصاق البكتيري

بالخلايا الظهارية البولية دورا رئيسا في امراضية التهاب المسالك البولية. عندما يتم التغلب على آليات مقاومة المضيف بواسطة آليات الضراوة البكتيرية تحدث الأمراض التي تكون نتائجها وخيمة على الصحة العامة للإنسان (Lee and Le, 2018).

ان امراضية بكتيريا *E. coli* المسببة لعدوى المسالك البولية تتضمن الخطوات الآتية :

(أ) استعمار بكتيريا *E. coli* الممرضة للمناطق المحيطة بالإحليل والمهبل مع استعمار الإحليل.

(ب) الصعود إلى تجويف المثانة والنمو كخلايا العوالم في البول.

(ج) الالتصاق بسطح الخلايا الظهارية للمثانة والتفاعل مع النظام الدفاعي للمضيف .

(د) تكوين الأغشية الحيوية.

(هـ) الغزو والتكاثر عن طريق تكوين مجتمعات بكتيرية داخل الخلايا في المثانة.

(و) استعمار الكلى وتلف أنسجة العائل مع زيادة خطر تجرثم الدم (Terlizzi et al., 2017).

8-2-1 طرائق العدوى لالتهاب المسالك البولية

تمثل الحركة الدودية للأمعاء المصدر الرئيس التي من خلالها تستطيع الاحياء الدقيقة الممرضة ان تغزو وتجتاح الجهاز البولي وتستعمره ومن ثم حدوث العدوى لاحقاً. وتُعد بعض الأجهزة الطبية مثل القسطار إحدى الطرائق لحدوث الإصابة وايضا وفي حالات اخرى تستطيع الاحياء الدقيقة ان تجتاح المسالك البولية عبر مجرى البول بشكل طبيعي. تلتصق الاحياء الدقيقة بالخلايا الظهارية البولية ومن ثم ترتشح إلى بطانات الخلايا الظهارية مما يؤدي إلى حدوث الإصابة، فضلا عن حركة الأمعاء وتدفق البول ، هناك انواع بكتيرية لها القابلية على الحركة بسبب وجود الأسواط والتي تتيح لها بغزو واجتياح اجزاء مختلفة من المسالك البولية (Vasudevan, 2020).

تتبع مسببات الأمراض بشكل عام نمطاً تصاعدياً لغزو واجتياح الأجزاء المختلفة من المسالك البولية اذ يبدأ المسار للعدوى من المسالك البولية السفلية الذي يشمل مجرى البول (التهاب الإحليل) والذي يغزو المثانة (التهاب المثانة) ثم لاحقاً يصعد إلى أجزاء من مجرى البول للمسالك البولية العلوية مثل الحالب والكلى (التهاب الكلى والحوض) (Hilal, 2016). ان قابلية البكتيريا على الالتصاق بالخلايا المضييفة تعد شرطاً ضرورياً للسماح لمسببات الأمراض البكتيرية باستعمار الجسم

وحدوث الامراضية، اذ يشار إلى هذه الظاهرة بالانتحاء النسيجي (tissue tropism) وتتضمن تفاعلاً محددًا مع المستقبلات المستهدفة واسطح نسيجية معينة (Sarowska et al., 2019).

أن وصول الكائنات الحية الدقيقة إلى المسالك البولية يمكن ان يحدث عن طريق الانتشار الدموي أو للمفاوي، بيد ان أدلة سريرية وتجريبية وفيرة تثبت أن صعود الاحياء الدقيقة من مجرى البول هو المسار الأكثر شيوعاً لحدوث التهاب المسالك البولية وخاصة اذا كانت الاحياء الدقيقة ذات منشأ معوي. ومع ذلك، فإن عزلات بكتيريا *E. coli* المسببة للأمراض خارج الأمعاء قادرة على الوصول إلى مجرى الدم والبقاء على قيد الحياة فيه مما يسبب مجموعة متنوعة من الامراض بما في ذلك التهابات المسالك البولية (UTI) وتسمم الدم والتهاب السحايا لحيثي الولادة (Wagenlehner and Hussein, 2019 ; Naber, 2015). ان المكان الأكثر شيوعاً خارج الأمعاء الذي تستعمره هذه البكتيريا هو المسالك البولية، وهو بدوره مصدر شائع لعدوى مجرى الدم. يمكن أن يؤدي وجود بكتيريا *E.coli* في مجرى الدم إلى تشجيع استجابة التهابية قوية للمضيف تؤدي إلى تسمم الدم ، والذي يرتبط بارتفاع معدلات الامراضية والوفيات (Daga et al., 2019).

يعد انتشار الاحياء الدقيقة الممرضة المسببة لالتهاب المسالك البولية عن طريق مجرى الدم أقل شيوعاً بشكل عام وغالبا ما يحدث في المرضى الذين يعانون من انسداد الحالب أو المرضى الذين يعانون من ضعف المناعة والوهن (Belyayeva and Jeong, 2019).

استنتج Fulop.(2019) من خلال الاعتماد على العديد من الادلة التجريبية أن الانتشار عن طريق مجرى الدم للأحياء الدقيقة الممرضة السالبة لصبغة جرام إلى العدد الكلي أقل احتمالاً ما لم تكن هناك مشكلة مثل الانسداد. كذلك هناك القليل من الأدلة أو عدم وجود دليل يدعم انتشار مسببات الأمراض البولية الى الكلى.

1-2-9- قابلية بكتيريا *Escherichia .coli* على الانتقال بين المضائف (العوائل)

ان أليات تفشي التهاب المسالك البولية في المجتمعات البشرية اصبحت واضحة ولا يوجد دليل على انتقال العدوى من شخص لآخر ، حيث اوضحت العديد من الدراسات باقتراح الاطعمة والماء كوسيلة ممكنة لتفشي الالتهاب المسالك البولية (Kudinha, 2017).

سجلت احدى الدراسات حدوث انتقال لبكتيريا *E. coli* بين افراد بعض الاسر المختلفة مثل الأب لابنته والبنات للأم والأخت إلى الأخت وكذلك للحيوانات المصاحبة وبشكل خاص للكلاب والقطط (Banerjee and Johnson, 2014; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014).

واوضح (Hilty *et al.*, 2012) في دراسة اجريت في سويسرا إلى أن عزلات بكتيريا *E. coli* كانت أكثر عرضة للانتقال بين الافراد من عائلة مماثلة مقارنة بالمرضى الراقدين في المستشفى. وقد أفاد مركز الرعاية والحضانة الفرنسي أن نتيجة الفحص لمنطقة المستقيم لسبعة أطفال كانت ايجابية لبكتيريا *E. coli* المنتجة للـ CTX-M-15 ، مما يشير إلى أن هذا السلالة قد انتقلت بشكل فعال في البيئة الداخلية لمركز الرعاية (Blanc *et al.*, 2014).

واستنتج (Mathers *et al.*, 2015) الى أن بكتيريا *E. coli* يمكن أن تنتقل بشكل فعال بين الأفراد داخل الأسرة ، وقد يكون لهذا دور مهم في بدء هذا النوع من السلالات وانتشاره داخل المجتمعات ، كذلك أوضح (Owens and Mackman, 2011). حدوث حالات مميتة من الانتان البولي نتيجة للانتشار الحاصل داخل الأسرة لسلالة ST131 FQ-R المنتجة للـ CTX-M-15 .

من جهة اخرى أشار (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014) الى ان انتقال سلالات بكتيريا *E. coli* مثل السلالة ST131 بين البشر والحيوانات في نفس المنزل من خلال الانتقال المباشر من مضيف إلى مضيف اخر قد يساهم بشكل كبير في الانتشار الواسع النطاق لسلالات بكتيريا *E. coli* الممرضة الخارج المعوية المقاومة للمضادات الحيوية.

1-2-10- مقاومة بكتيريا *E. coli* للمضادات الحيوية

عادة ما تكون أعراض عدوى التهاب المسالك البولية بسيطة الى متوسطة ويمكن أن يؤدي الاستعمال الخاطئ للمضادات الحيوية إلى نشوء مقاومة لتلك المضادات، وبالتالي فمن الضروري وضع معايير مناسبة لعلاج تلك الحالات باستخدام مجموعة محدودة من المضادات الحيوية (Lee and Le, 2018).

ان حدوث مقاومة للعلاج بالمضادات الحيوية الفموية مثل Trimethoprim و Sulfomethoxazole و Ampicillin و Amoxicillin-clavulanic acid التي يتم استعمالها بشكل شائع في علاج عدوى بكتيريا *E. coli* المكتسبة من المجتمع قد زادت بشكل تدريجي ،

وبالتالي فإن دمج المضادات الحيوية التي تكون بكتيريا *E. coli* حساسة لها أمر بالغ الأهمية للاستعمال الأمثل للمضادات الحيوية (Lee and Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014; Le, 2018).

أشارت إحدى الدراسات في الولايات المتحدة إلى أن معدلات مقاومة بكتيريا *E. coli* للمضادات الحيوية مثل nitrofurantoin و ciprofloxacin و trimethoprim/Sulfomethoxazole في عام 2012 كانت 0.9% و 11.8% و 22.2% على التوالي، وأن معدلات الحساسية للعزلات مع cephalosporins و fluoroquinolones بين عامي 2013 و 2014 كانت أقل بشكل ملحوظ في المستشفى منها في عدوى المسالك البولية المكتسبة من المجتمع، وأن مقاومة بكتيريا *E. coli* لـ ciprofloxacin كانت 29% في المرضى التي تتراوح أعمارهم 65 فما فوق (Lee *et al.*, 2018). فضلا عن ذلك، فإن سلالات بكتيريا *E. coli*، ولا سيما تلك التي تسبب العدوى خارج الأمعاء، قد طورت مقاومة لكل أنواع اصناف المضادات الحيوية المستعملة في علاج العدوى البشرية والحيوانية. إن تزايد مقاومة بكتيريا *E. coli* للمضادات الحيوية بشكل سريع وملحوظ جعل الكثير من الأطباء يترددون عند اختيار المضادات الحيوية عن طريق الفم (Sanchez *et al.*, 2016).

إن الجينات لبكتيريا العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) تشفر بكفاءة لمقاومة جميع المضادات الحيوية تقريباً، إذ يمكن أن تنتقل البلازميدات المحتوية على محددات المقاومة بين البكتيريا وحتى بين الأنواع وبالتالي فإن مسألة اكتساب مقاومة للمضادات الحيوية الجديدة مسألة وقت فقط (Lee *et al.*, 2018).

تُعد صفة المقاومة للدوية التي تمتلكها البكتيريا واحدة من أهم المشاكل الصحية والمالية في بلدان العالم، الأمر الذي دفع الباحثين إلى استخلاص والتحري عن مضادات جديدة لها القابلية على التغلب على السلالات البكتيرية المقاومة. إذ تؤدي الإصابة بالبكتيريا المقاومة إلى طول مدة العلاجات وزيادة خطورة المرض. وهناك العديد من أنماط المقاومة للمضادات الحيوية منها multi-drug resistant (MDR)، extensively-drug resistant (XDR)، Pan-Drug Resistant (PDR) المقاومة من نوع (MDR) تعني أن البكتيريا تكون مقاومة على الأقل لواحد

من بين ثلاث مضادات حيوية، والمقاومة من نوع (XDR) تعني ان البكتريا مقاومة لأثنين او كل المضادات الحيوية المستعملة، اما المقاومة من نوع (PDR) فتعني ان البكتريا تكون مقاومة لكل المضادات الحيوية (Basak *et al.*,2016) .

ان صفة المقاومة للمضادات الحيوية هذه تكون اما ذاتية innate او مكتسبة acquired تكتسبها اما عن طريق الطفرات في الجينات (طفرات كروموسومية chromosomal mutations) او تكتسبها عن طريق انتقال المادة الوراثية من بكتريا الى اخرى بعدة طرائق، اما عن طريق الاقتران البكتيري (conjugation) ويتم فيها انتقال المادة الوراثية بين خليتين بصورة مباشرة مثل البلازميدات (plasmids) و الجينات القافزة (transposons) او عن طريق التحول (transformation) ويتم فيها اخذ الجينوم البكتيري المتحرر من البكتريا الميتة، او عن طريق الحث (transduction) ويتم فيها انتقال المعلومات الوراثية بين الخلايا البكتيرية بوساطة العاثيات (bacteriophages) (Laird, 2016). وقد ادت الطفرات الى زيادة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية فكانت سابقا مقاومة لما يقارب الـ 70 % من التتراسايكلين (tetracycline)، الستربتومييسين (streptomycin)، والسلفيزوكسازول (sulfisoxazole)، لكن بعد حصول الطفرات وانتقال بلازميدات المقاومة لها اصبحت مقاومة ايضا الى الامبسلين (ampicillin)، الكنامايسين (kanamycin)، و التيكارسيلين (ticarcillin) (Afzal, 2017;Shariff *et al.*, 2013).

1-10-2-1 اليات مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

ان اليات المقاومة للدوية بعد انتقال جينات المقاومة اليها وهي كالاتي:

1 - التغيير في موقع الهدف (Target modification)

تؤثر هذه الالية في بناء الاحماض النووية الاساسية (nucliec acids) فتزيد من مقاومة البكتريا لمضادات الفلوروكينولونات (fluoroquinolones) مثل السبروفلوكساسين (ciprofloxacin)، والريفامايسين، (rifamycin)، فضلا عن تأثيرها في الريبوسومات

(ribosomes) محدثة خلا في صنع البروتين مما يتسبب في زيادة مقاومة البكتريا لمضادات الارثرومايسين (erythromycin)، والريفاماييسين (rifamycin) (Kotsyuba *et al.*, 2014).

2- التغيير في نفاذية الاغشية الخلوية للبكتريا (Alteration of cell membrane permeability)

نتيجة لتغير في طبيعة البروتينات في الغشاء الخلوي تتغير ثقبوب الاغشية الخلوية او نظام النقل فيه (membrane transport system) مما يؤثر في عمل المضاد الحيوي ويجعل منه غير قادر على عبور انظمة النقل في الغشاء، ونتيجة لهذه التغييرات تمنح هذه الالية مقاومة البكتريا لمضادات التتراسايكلين (tetracycline) والكينولينات (quinolones) مثل السبروفلوكساسين (ciprofloxacin) وبعض انواع الامينوكلايكوسايد (aminoglycoside) مثل الجنتاماييسين (gentamicin) (Kapoor *et al.*, 2017)

3- انتاج الانزيمات في البكتريا (Production of enzymes)

تؤثر هذه الالية في بناء الجدران الخلوية ،اذ يتم تحطيم حلقة البيتالاكتام (β -lactam ring) الموجودة في مضادات البنسلينات (penicillins) والسيفالوسبورينات (cephalosporins) بواسطة انزيمات البيتالاكتاميز (β -lactamases) الذي تنتجه البكتريا مؤديا الى اكتساب هذه البكتريا المقاومة لهذه الادوية ، فضلا عن دور الانزيمات في تحطيم مضادات الامينوكلايكوسايد (aminoglycosides)، الكلو رامفينيكول (chloramphenicol)، الكلايكوببتايد (glycopeptide)، والكينولينات (quinolones) التي تنتج انزيمات (topoisomerase) المثبطة لتضاعف الدنا في البكتريا (Kotsyuba *et al.*, 2014).

4 -التغيير في المسالك الايضية في البكتريا (Alteration of metabolic pathways)

تستعمل البكتريا حامض الفوليك (folic acid) الذي تحصل عليه من البيئة المحيطة بها جاهزاً ، محدثة تغييرات في المسالك الايضية لها، مما يتيح لها اكتساب المقاومة لمضادات التراميثوبريم (trimethoprim) ومضادات السلفا (sulfonamides) (Kapoor *et al.*, 2017) .

وقد أشارت العديد من الدراسات ان معظم العزلات السريرية لبكتيريا *E. coli* تكون مقاومة fluoroquinolone وان العديد منها مقاومة للـ aminoglycosides و / أو sulfamethoxazole trimethoprim- ، بينما القليل من هذه العزلات تكون منتجة للبيتا لاكتاماز و واسعة الطيف (ESBL) التي تمنح صفة المقاومة للسيفالوسبورينات (cephalosporin) (Kudinha, 2017).

و غالبًا ما تستعمل المضادات الحيوية مثل Cephalosporin و fluoroquinolone و trimethoprim-sulfamethoxazole لعلاج عدوى بكتيريا *E. coli* في المجتمع والمستشفيات ، وبالتالي ترتبط مقاومة هذه العوامل بالتأخير في العلاج غير السليم مما يؤدي الى زيادة معدلات الامراضية والوفيات (Munkhdelger et al., 2017).

وقد اوضح Nairoukh et al.(2018) في دراسته ان البتا-لاكتاماز من نوع CTX-M-15 يوجد في العديد من أجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae في كل أنحاء العالم وهو من بين المتغيرات الأكثر شيوعًا التي تم تحديدها في CTX-M والتي تم تسجيلها ايضا في أوروبا والشرق الأوسط ، اذ يرتبط وجود CTX-M-15 بمقاومة الفلوروكينولون fluoroquinolone في بكتيريا *E. coli* الموجودة في عينات البراز والبول للكثير من المرضى من بلدان مختلفة.

أن مقاومة الأمبيسلين / الأموكسيسيلين في عزلات بكتيريا *E. coli* تتم بشكل أساس عن طريق إنتاج الإنزيمات المشفرة بالبلازميد (TEM-1/-2, SHV-1, or OXA-1) ، وبشكل عام ان جينات *blaOXA-1* و *blaTEM-1* تكون مرتبطة بالجين *blaCTX-M* على البلازميدات ، اذ يمكن أن تكون عزلات بكتيريا *E. coli* المقاومة fluorquinolone وإنتاج TEM-1 و / أو OXA-1 بواسطة بلازميد IncF أسلافًا لعزلات بكتيريا *E. coli* المنتجة لـ CTX-M والموجودة في جميع أنحاء العالم (Ghodousi, 2016).

11-2-1 تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymeres Chain Reaction

هي عبارة عن عملية مضاعفة المادة الوراثية كيميا ونوعيا ملايين المرات بالطرائق الانزيمية وخارج الجسم الحي *In vitro* بزمن قصير جدا .ولإجراء العملية يجب توفير عدة مواد منها انزيم

البلمرة Taq polymerase ، البادئات primers (تحدد حسب نوع الجين) ، القواعد النيتروجينية nitrogen bases منقوصة الاوكسجين ثلاثية الفوسفات (dntp) ، وقالب الدنا DNA template ، وجهاز التدوير الحراري thermocycler.

ويمكن الاستفادة من هذه التقنية في التشخيص الجيني للكائنات الحية المتنوعة ومنها افراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae باستعمال البادئات الخاصة بالجينات المختلفة اذ تستعمل بشكل واسع في تشخيص الكائنات الحية ومنها الاحياء المجهرية، اذ تسهل تشخيص المكروبات التي يمكن تنميتها بالطرائق الزرعية التقليدية وتستعمل ايضا بشكل كبير في التعرف على التنوع الميكروبي في البيئة (Ravi *et al.*, 2014).

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

المواد وطرائق العمل

1-2 الاجهزة والمواد المستعملة :

1-1-2 الاجهزة المستعملة والشركات المصنعة لها :

الجدول 1-2: الاجهزة المختبرية

الشركة المصنعة/المنشأ	اسم الجهاز	ت
Concord/ Lebanon	ثلاجة (Refrigerator)	1
Biomerieux /France	جهاز VITEK 2	2
Lab net/ Germany	جهاز التدوير الحراري Thermo cycler apparatus	3
Labnet/Germany	جهاز الطرد المركزي المبرد (Cooling) (centrifuge)	4
Clever/England	جهاز اظهار الدنا بواسطة الاشعة فوق البنفسجية (UV transilluminator)	5
Clever/England	جهاز تعقيم بالاشعة فوق البنفسجية (UV translinkar)	6
Labtech/Korea	جهاز تقطير (Distiller)	7
Labtech/Korea	جهاز المزج ذي الصفيحة الساخنة (Magnetic Stirrer with hot plate)	8
Binder / Germany	حاضنة (Incubator)	9
Julabo/ Germany	حمام مائي (Water path)	10
Himedia – India	لوب (loop)	11
ROMA/Italy	مازج (Vortex)	12

Human-Germany	ماصات دقيقة (Micropipettes)	13
Olympus/Japan	مجهر الضوئي (Light microscope)	14
Jenway/Germany	مصباح بنزن (Bunsen burner)	15
Labtech/Korea	مؤصدة (Autoclave)	16
Denver / Germany	ميزان حساس (Sensitive Balance)	17
Jeio-Tech/Korea	هود بايلوجي (Laminar flow cabinet)	18
Consort/ Belgium	وحدة الترحيل الكهربائي (Gel electrophoresis)	19

2-1-2 المواد ذات الاستخدام الواحد والشركات المصنعة لها :

الجدول 2-2: المواد ذات الاستخدام الواحد

الشركة المصنعة/المنشأ	اسم المادة	ت
Afco-Dipo – Jordan	اطباق بلاستيكية (Petri dish)	1
Sigma – England	أنابيب ايندروف (Eppendorf tube)	2
Afco-Dipo – Jordan	أنابيب مختبرية (tubes) حجم 10ml	3
Sterellin Ltd – England	Tips	4
Sail Brand-China	شريحة زجاجية (slide)	5
Sail Brand-China	غطاء شريحة زجاجية (Cover slide)	6
BDH – England	Parafilm فيلم بارافين بلاستيكي	7
HDA- China	قطن طبي (Cotton)	8
Broche – Malaysia	قفازات مطاطية (Latex Gloves)	9
Afco-Dipo – Jordan	محاقن معقمة (Sterilized needles)	10
Afco-Dipo – Jordan	مسحات قطنية معقمة (Sterilized cotton swabs)	11

3-1-2 المواد الكيميائية والبايولوجية والأوساط الزرعية المستعملة والشركات المصنعة لها :

الجدول 2-3: المواد الكيميائية والبايولوجية والأوساط الزرعية

الشركة المصنعة	اسم المادة	ت
Bioanalyse-Turkey	اقراص مضادات حيوية	1
Intron – South Korea	اكاروز (Agarose)	2
Scharlau - European Union	ايتانول مطلق (C ₂ H ₅ OH)	3
Macrogen-South Korea	بوادئ Primers	4
Promega – USA	خلات الصوديوم 2%	5
Intron – South Korea	سلم الدنا DNA Ladder (100-1500 pb)	6
Spectrum-Egypt	صبغة الكريستال البنفسجي صبغة السفرانين الايودين الكحول الايثيلي (96%)	7
Intron Biotechnology- Korea	صبغة Red Safe	8
Promega – USA	صبغة النكروسين	9
Biolabs – England	صبغة تحميل (DNA Loading dye)	10
Favorgen-	عدة استخلاص الدنا	11
BDH – England	كليسيرول (Glycerol)	12
Bioneer – Korea	ماء خالي من الايونات (Deionized water)	13
Promega – USA	ماستر مكس Green master mex	14
Promega – USA	ماء منزوع الايونات	15

	Nuclease free water	
Pioneer – Iraq	محلول الملحي الفسلجي (Normal saline)	16
Promega – USA	محلول منظم الفوسفات المتعادل	17
Maxime – Turkey	TBE buffer(Tris-Borate-EDTA) 10X محلول منظم	18
Himedia – India	وسط اساس الدم	19
Himedia – India	وسط ماكونكي اكار	20
Himedia – India	وسط مغذي سائل	21
Himedia – India	وسط منقوع القلب والدماغ السائل	22
Himedia – India	وسط مولر-هنتن اكار	23

4-1-2 اقراص المضادات الحيوية المستعملة والشركة المصنعة لها والمنشأ:

الجدول 4-2: اقراص المضادات الحيوية

الشركة المصنعة/المنشأ	اسم المادة	ت
Bioanalyse-Turkey	Amikacin (AK30)	1
Bioanalyse-Turkey	Azithromycin (AZM15)	2
Bioanalyse-Turkey	Ciprofloxacin (CIP10)	3
Bioanalyse-Turkey	Gentamicin (CN10)	4
Bioanalyse-Turkey	Metronidazole (MET30)	5
Bioanalyse-Turkey	Nalidixic acid (NA30)	6
Bioanalyse-Turkey	Nitrofuratoin (F300)	7

Bioanalyse-Turkey	Norfloxacin(Nor10)	8
Bioanalyse-Turkey	Penicillin G (P10)	9
Bioanalyse-Turkey	Trimethoprin sulphamethoxazole (SXT25)	10

الجدول 5-2 : مكونات المزيج Master Mix المستعمل في تفاعل البلمرة المتسلسل

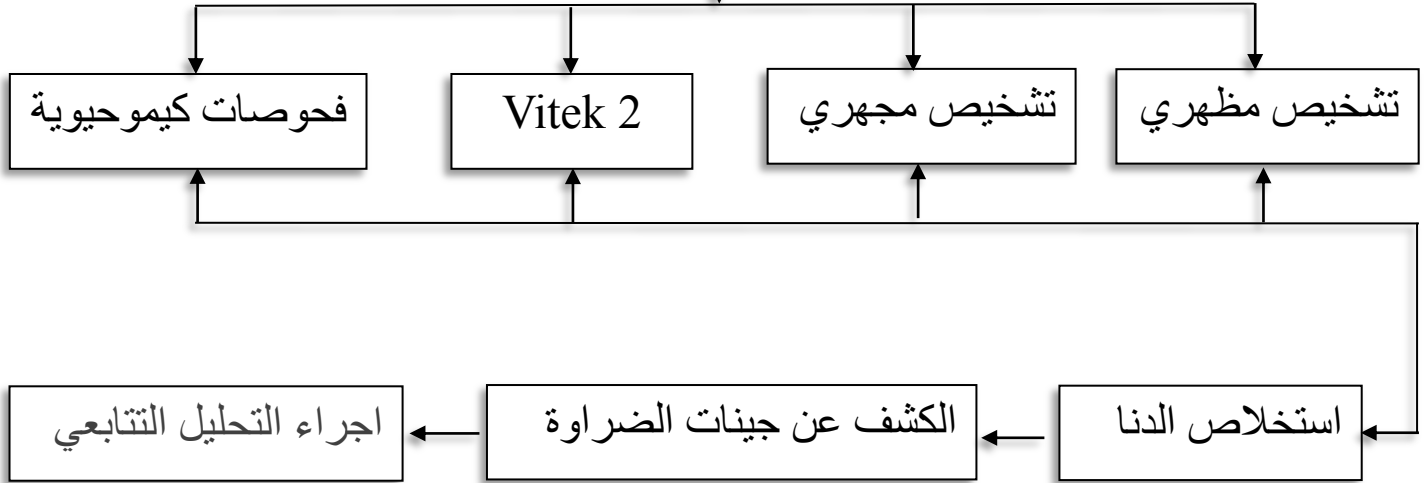
Component	25 µl reaction
Taq DNA Polymerase	2.5 U/ ml
Each: dNTP (dATP , dCTP , dGTP , dTTP)	2.5 Mm
Reaction Buffer(10x)	1x
Gel Loading buffer	1x

تصميم الدراسة

جمع العينات المرضية

زراعة العينات على وسطي , Blood agar و MacConky agar

تشخيص بكتريا *E. coli* باستخدام :



شكل 1-2: عزل وتشخيص بكتريا *E. coli*

2-2 طرائق العمل:

1-2-2 البكتريا المستعملة في هذه الدراسة:

1-1-2-2 جمع العينات :

تم الحصول على 19 عزلة من بكتريا *E.coli* المسببة لاصابات المسالك البولية من قسم علوم الحياة فضلاً عن 5 عزلات من مدينة الامام الحسين (ع) الطبية . ليصبح المجموع 24 عزلة معزولة من اصابات المسالك البولية في محافظة كربلاء المقدسة وقد خضعت العزلات المتحصل عليها والمشار اليها سابقا لبعض الفحوصات للتأكد من تصنيفها من حيث الجنس والنوع . وقد اشتملت تلك الفحوصات على الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) والكيموحيوية (Biochemical tests) فضلاً عن استعمال العدة VITEK 2 compact system .

2-1-2-2 الأوساط الزرعية المستعملة في عزل وتشخيص البكتريا قيد الدراسة :

❖ وسط اساس الدم Blood Agar base :

حُضِر هذا الوسط الزرعي حسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 40 غم في لتر من الماء المقطر وتم تعقيمه بالمؤصدة وبعد اكمال عملية التعقيم بُرد إلى درجة (45-50) م ° وأُضيف إليه دم الإنسان بنسبة (5-10) % ، استعمل هذا الوسط وسطاً أغنائياً في عزل وتشخيص البكتريا.

❖ وسط مغذي سائل Nutrient Broth :

حُضِر هذا الوسط الزرعي حسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 13 غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر وتم تعقيمه بالمؤصدة ووزع في أنابيب . وقد استعمل هذا الوسط لغرض تنمية البكتريا وتنشيطها.

❖ وسط Muller- Hinton Agar :

تم تحضير هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 38 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر . عُقم الوسط باستخدام المؤصدة وبعد اكمال عملية التعقيم بُرد إلى درجة (45-50) م ° وتم صبه في أطباق بتري معقمة. وقد استعملت الاطباق لتنمية

العزلات البكتيرية لغرض اختبار فحصي الحساسية والفعالية التنشيطية للمضادات الحياتية المستعملة.

❖ **وسط Brain – Heart infusion broth :**

حُضِر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 37غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ووزع في أنابيب. وقد استعمل هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا فضلا عن استخدامه لحفظ العزلات البكتيرية وذلك بإضافة 15% كليسيرون الى 85 % من الوسط السائل بعد تعقيمه.

❖ **وسط الماكونكي MacConkey :**

حُضِر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 51.5 غم في لتر من الماء المقطر و عُقم بالمؤصدة ، استعمل هذا الوسط لعزل البكتريا السالبة لصبغة غرام وتشخيصها من حيث قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز .

❖ **وسط ايبوسين ميثيلين الأزرق Eosin methylene blue :**

حُضِر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 38 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر .عُقم الوسط باستخدام المؤصدة وبعد اكمال عملية التعقيم بُرد إلى درجة (45-50) م° وتم صبه في أطباق بتري معقمة. ويعد هذا الوسط من الاوساط الانتقائية لبكتريا *E.coli* حيث تظهر بصورة مميزة من حيث اللون اللمعان المعدني (metallic shine).

3-1-2-2 الكواشف والمحاليل المستعملة في عزل وتشخيص بكتريا *Escherichia coli*

● **كاشف الكاتليز (Catalase reagent) :-**

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج

انزيم الكاتليز (Tille and van , 2014).

• كاشف الاوكسيديز (Oxidase reagent) :-

حضر الكاشف أنياً بإذابة 1 غم من مادة رباعي مثيل بارافنيلين ثنائي امين ثنائي

هيدروكلورايد (Tetramethyl P-phenylen diamine dihydrochlorid) في 100 مل من الماء المقطر في قنينة معتمدة . استخدم الكاشف في التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيديز (Tille and van , 2014) .

• عدة صبغة غرام (Gram stain) :-

استخدم هذا الملون لدراسة الخصائص المظهرية للبكتريا المعزولة .

• المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline) :

حُضِر هذا المحلول بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 50 مل ماء مقطر ، وبعد إتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضاً .

• محلول ماكفرلاند (أنبوب رقم 0.5) Macfarland Solution :

حُضِر هذا المحلول بحسب الطريقة التي تم وصفها من قبل (Tille and van , 2014) إذ يتكون من محلولين :

A- محلول كلوريد الباريوم (1.175%) : أذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

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

حُضِر محلول مكفرلاند (انبوبة رقم 0.5) وذلك باضافة 0.5 مل من محلول A الى 99.5 مل من محلول B ومزج المحلول جيداً .

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

• **محلول صبغة البنفسج البلوري 1% Crystal violate solution**

تم تحضير هذا المحلول بإذابة 1 غم من مسحوق البنفسج البلوري Crystal violate powder في كمية من الميثانول ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى 100 مليلتر ثم رشح المحلول باستعمال وحدات الترشيح الدقيقة ذات قطر نفاذية 0.22 مايكروميتر وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال. فضلاً عن استعمال هذا المحلول في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة (Christensen *et al.*, 1985).

• **محلول دارى الترحيل (TBE) Tris Borate EDTA buffer**

تم تحضير هذا المحلول بحسب تعليمات الشركة المصنعة Maxime باضافة 10 مليلتر من دارى TBE بتركيز 10X الى 90 مليلتر من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز 1X من الدارى في قنينة زجاجية معقمة ثم حفظه في الثلاجة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية لحين الاستعمال.

• **محاليل البودائ Primers solutions**

حضرت محاليل البودائ وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة Macrogen و ذلك باستعمال الماء المقطر اللاأيوني المعقم من اجل الحصول على تركيز 100 بيكومول/مايكروليتر، اذ تم تحضير محلول كل بادئ على نحو منفصل بتركيز 10 بيكومول/مايكروليتر، اذ تم اخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين (stock solution) لكل بادئ واضيف الى 90 مايكر وليتر من الماء المقطر اللاأيوني، ثم مزج جيداً بجهاز المازج (vortex) وحفظ في درجة حرارة 20- م لحين الاستعمال، في حين حفظت المحاليل الخزينة للبودائ في درجة حرارة 20 - م مع مراعات مزج المحاليل جيداً بعد اخراجها من الثلج بجهاز المازج لغرض مجانستها قبل الاستعمال.

• **محلول دارى الفوسفات الملحي (PBS) Phosphate buffer saline**

تم تحضير هذا المحلول حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك باذابة 9.86 غرام في 1000 مليلتر من الماء المقطر للحصول على الرقم الهيدروجيني 7.2. استعمل هذا المحلول في تجربة الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي من قبل العزلات قيد الدراسة.

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

تم تشخيص عزلات بكتريا *E.coli* من خلال تنميتها بدرجة 37 م° فضلاً عن الفحوصات المجهرية والإختبارات الكيموحيوية .

1-4-1-2-2 التشخيص المظهري (Morphologic tests) :

تمت دراسة الصفات المظهرية لمستعمرات البكتريا الشبيهة بصفات بكتريا *E.coli* من حيث الحجم واللون والشكل والقوام وشكل الحافة وتمت تنقية مستعمرة واحدة من اجل التشخيص المجهرى بإستعمال وسط Eiosin methylin blue .

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

• اختبار تخمر اللاكتوز (Lactose Fermentation Test) :

وهي معرفة قابلية البكتريا على تخمير اللاكتوز عند زرعها على وسط الماكونكي وحضنها بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة حيث تكون النتيجة الموجبة في حال تحول لون الوسط الى اللون الوردي (Tille and van , 2014).

• اختبار تحلل الدم (Hemolyssis) :

حضر وسط اكار الدم بإضافة 5% دم وحسب التعليمات المرفقة مع العبوة ثم لفق بالعزلة المراد اختبارها و حضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم لوحظ تغير لون الوسط حول المستعمرات البكتيرية التي تمثل دليلاً على قدرة هذه البكتريا على تحليل الدم .

• اختبار المحفظة (capsule test)

تم في هذه الطريقة مزج قطرة من صبغة النكروسين (negrosin) مع عروة كاملة (loopful) من العالق البكتيري المنشط على وسط اكار الدم لمدة 24 ساعة على درجة 37 م° وخلطها مع بعض على طرف سلايد زجاجي ، بواسطة سلايد اخر تسحب على طول السلايد ، بعد ذلك تترك لتجف بدرجة حرارة الغرفة ، يغطى السلايد بطبقة من صبغة ال Crystal violate لمدة دقيقة واحدة ، بعد ذلك يغسل بلطف بالماء ويترك ليحجف ، تفحص السلايدات بواسطة العدسة الزيتية بالمجهر الضوئي.

2-2-1-5 التحري عن قابلية بكتريا *Escherichia coli* لتكوين الغشاء الحياتي Biofilm

A- طريقة الانابيب tube method

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Christensen *et al.*, (1985) اذ زرعت عروة كاملة (loopful) من البكتريا قيد الدراسة في 10 مل من وسط المغذي السائل في انابيب زجاجية ومن ثم حضنها في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضان ازيل الوسط من الانابيب وغسلت عدة مرات بمحلول منظم الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني المتعادل وتركت لتجف تماما بدرجة حرارة الغرفة ومن ثم صبغت بصبغة الازرق البنفسجي . ازيلت الصبغة الزائدة وغسلت بالماء المقطر وتركت الانابيب لتجف بشكل مقلوب وتم قراءة النتائج اعتمادا على تكون طبقة سميكة ودرجة سمك تلك الطبقة على الجدران الداخلية للانابيب الزجاجية وكذلك على قعر الانابيب .

B- اختبار الصفائح المعايرة Microtiter plate (MTP)

تم الكشف عن قابلية البكتيريا على انتاج الغشاء الحيوي و مدى قوته (قوي او متوسط او ضعيف) بموجب الخطوات الاتية (Shakibaie *et al.* , 2015)

1. تم زراعة العزلات المحفوظة بدرجة حرارة المختبر على الأوساط الزراعية الجاهزة مثل وسط الأكار المغذي (Nutrient agar) وحضنت بدرجة حرارة 37م° و لمدة 24 ساعة لغرض تنقية العزلات تحسباً لأي تلوث من مزرع بكتيري آخر وكذلك لتلافي التالف من العزلات المحفوظة، ثم تمت إعادة زراعة المستعمرة البكتيرية المنفردة بعمر 24 ساعة في وسط المرق المغذي (Nutrient broth) وبالطريقة نفسها لغرض إعادة تنشيط العينات إضافةً إلى ضمان الحصول على عزلات نقية نشطة تظهر نتائج واضحة .
2. تم تحضير العالق البكتيري من تخفيف العزلات بالمحلول الفسيولوجي للوصول إلى عكورة أنبوبة ماكفر لاند القياسية الموجودة بالمختبر البالغة $(10^8 \times 1.5)$ خلية / مل .
3. تم ملء حفر الصفيحة 175 ميكروميتر من وسط المغذي السائل ثم لقت الحفر بكمية 25 ميكروميتر من العالق البكتيري المطابق لماكفر لاند.

4. ملئت الحفر في الصف الأخير و بشكل أفقي بالوسط المغذي السائل المعقم وقسمت الى نصفين نصف دون لقاح بكتيري و استعملت هذه الحفر كسيطرة سالبة (Control negative) والنصف الاخر لثق ببيكتريا منتجة قوية للغشاء الحيوي مفحوصة مسبقا واستعمل في هذه الدراسة بكتريا (*pseudomonas aurginosa*) كسيطرة موجبة .
5. حركت الصفيحة بهدوء و غلفت بشريط شمعي لاصق (parafilm) و حضنت الصفيحة في الحاضنة بدرجة 37م° و لمدة 24 ساعة .
6. بعد انتهاء مدة الحضانة أفرغت الصفيحة من المزروع البكتيري وغسلت الحفر بمحلول داري الفوسفات الملحي (Phosphate buffer saline (PBS) ثم تركت بدرجة حرارة الغرفة.
7. تم تصبغ حفر الصفيحة 200 ميكروميتر من صبغة الكريستال البنفسجي 1 % Crystal violete و تركت لمدة 20 دقيقة ثم غسلت عدة مرات بماء مزال الايونات Deionized water و تركت بدرجة حرارة الغرفة حتى تجف.
8. استعمل بعدها مباشرةً جهاز قارئ الصفيحة المعايرة الدقيقة (ELISA) بطول موجي 492 - 750 نانوميتر لقراءة النتائج.
9. قرأت النتائج بجهاز (ELISA) لتقدير الكثافة الضوئية (Optical density (OD) وتم قياس الكثافة الضوئية للغشاء الحيوي Biofilm حسب المعادلة التالية :-

$$\text{Mean (OD) control} - \text{Mean (OD) test} = (\text{OD}) \text{ biofilm}$$

2-2-2 اختبار حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية (Antibiotic

:susptibility Test)

- استعملت طريقة الانتشار بالأقراص (Disk diffusion test) لتحديد حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية على وفق ما جاء في (Clinical & Laboratory Standards Institute ,CLSI,2018) بحسب الخطوات الاتية :

1. نشطت عزلات بكتريا *E.coli* على وسط Nutrient Broth ثم حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .
2. تم نقل كمية قليلة من مستعمرات البكتريا النامية المشار اليها انفاً بواسطة العروة (loop) الى أنابيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي ومزجت جيداً ، وقورنت عكورة النمو مع عكوره محلول ثابت العكورة القياسي (McFarland standard 0.5) والذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا $10^8 \times 1.5$ وحدة تكوين مستعمرة / مليلتر .
3. نقل 100 مايكرو ليتر من العالق البكتيري بواسطة الماصة الدقيقة (Micropipette) ، ثم نشر بواسطة الناشر الزجاجي شكل حرف(L) على سطح وسط أكار مولر – هنتون بصورة متجانسة ، بعدها تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة (10-15) دقيقة .
4. وزعت أقراص المضادات الحيوية بواسطة ملقط معقم إلى الأطباق ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .
5. تم قراءة النتائج بقياس أقطار مناطق التنشيط بالمليمتر حول أقراص المضادات الحيوية .

3-2-2 التشخيص الجزيئي لبكتريا *Escherichia coli*:

1-3-2-2 استخلاص الحامض الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) من بكتريا *E.coli* المعزولة :

الاستخلاص باستخدام عدة الاستخلاص :

استعملت عدة التشخيص المجهزة من شركة Favorgen Biotech Corporation
.Taiwan

طريقة الاستخلاص :

1. تم تنمية عزلات بكتريا *E.coli* في وسط المغذي السائل Nutrient Broth لمدة 20 ساعة بدرجة حرارة 37 م° ثم سحب 1.5 مل من المزروع البكتيري النامي ووزع في أنابيب ابندروف .

2. أُجريت عملية طرد مركزي للمزروع البكتيري بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة دقيقة واحدة لترسيب الخلايا إذ أُزيل الجزء الرائق منها ، ثم عُلقَت الخلايا بعدها في $200 \mu\text{l}$ من محلول FATG ثم مُزجت جيداً و تُركت لمدة خمس دقائق بدرجة حرارة الغرفة.
3. أُضيف $200 \mu\text{l}$ من محلول FABG إلى معلق الخلايا ثم مُزجت جيداً أعقب ذلك حضن المزيج بدرجة حرارة 70°C لمدة عشر دقائق في الحمام المائي من أجل تحلل الخلايا .
4. اضيف $5 \mu\text{l}$ من انزيم RNase الى معلق الخلايا ثم مزج جيدا لمدة خمس دقائق لتحطيم جزيئات الحمض النووي الرايبي RNA .
5. أُضيف $200 \mu\text{l}$ من الايثانول المطلق ثم مُزجت جيداً ، من جهة أخرى تم وضع انبوبة الحاوية على الفلتر FABG Column داخل انبوبة جمع (Collection tube) ثم تم سكب العالق البكتيري مع الاضافات السابقة داخل انبوبة الفلتر و أُجريت عملية طرد مركزي لمعلق الخلايا بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة 30 ثانية إذ أُزيل الرائق المتجمع في انبوبة الغسل وبقي DNA الخلايا البكتيرية مع رواسب اخرى عالقة في الفلتر .
6. أُضيف $600 \mu\text{l}$ من محلول الغسل W1 ثم أُجريت عملية طرد مركزي لمدة 30 ثانية وتم التخلص من الراشح.
7. أُضيف $400 \mu\text{l}$ من محلول الغسل الثاني Wash buffer المضاف له الايثانول المطلق، أعقب ذلك إجراء طرد مركزي للمزيج بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة 30 ثانية .
8. تم وضع انبوبة الفلتر داخل انبوبة بندروف جديدة وتم التخلص من انبوبة الغسل ثم أُضيف $100 \mu\text{l}$ من محلول Elution المسخن سابقا في الحمام المائي بدرجة 70°C م لعدة دقائق الى انبوبة الفلتر وتركت لدقائق قليلة من اجل اعطاء الوقت اللازم لفك ارتباط DNA الخلية البكتيرية من الفلتر.

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

2-2-3-2 الكشف عن جينات الضراوة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction , PCR) :

• البودائ المستعملة للكشف عن جينات الضراوة:

تم استعمال البودائ الموضحة صفاتها في الجدول الاتي:-

الجدول 2-6: البودائ المستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في الدراسة

المصدر	Amplicon size (bp)	تتابع البادئ 5`—3`	الجين المستعمل
(Xicohtenacatl-cortes ,2019)	589	F GCACAGCATAACGGGAAAAT R CCAGCATGTTACCACGAATG	<i>tos A</i>
(Moori and Javadmakoei ,2017)	178	F ACT TAC TTC AAC TCG CGA CG R TAA ACA CCA CAT ATG TTC CG	<i>cag A</i>
(Pai et al. ,2003)	متغاير	F TCATGGCTTGTTATGACTGT R GTAGGGCTTATTATGCACGC	<i>Class I integron gene cassette</i>

المحاليل المستعملة :

A. تحضير محلول البادئ الخزين (Stock Primers) :

حُضر محلول البودائ حسب تعليمات الشركة المجهزة للحصول على تركيز نهائي 100

picomoles/μl . ثم حفظ بدرجة حرارة - 20 م ° لحين الاستخدام .

B. مزيج Master Mix :

استعمل المزيج (Master Mix) المجهز من شركة Promega – USA

B- اجراء تفاعل البلمرة (PCR Assay):

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

تم اضافة المواد الاتية لكل انبوبة من انابيب PCR حسب الجدول(7-2).

الجدول 7-2: المواد المضافة إلى أنابيب PCR tube المستعمل في تفاعل البلمرة المتسلسل للجينات

(*tosA, cagA, Integron class I*)

Component	Concentration	Amount (µl)
DNA sample	-	3
Primer (F)	10µM/µl	1
Primer(R)	10µM/µl	1
Nuclease free water	-	7.5
Master Mix		12.5
Total volume	-	25

تم برمجة جهاز الـ PCR كما في الجدول الاتي

الجدول 2-8: ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين *cag A*

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 94 °م للمسح الأولي لـ DNA القالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A 20 ثانية عند درجة حرارة 94 °م لمسح DNA القالب .
	B 20 ثانية عند درجة حرارة 62.6 °م لارتباط البوادي لـ DNA القالب .
C 30 ثانية عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البوادي المرتبطة .	
3	دورة واحدة لمدة (5) دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف .

الجدول 2-9 : ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين *tos A* على

ضوء بروتوكول التدرج الحراري

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 95 °م للمسح الأولي لـ DNA القالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A 30 ثانية عند درجة حرارة 94 °م لمسح DNA القالب .
	B 60 ثانية عند درجة حرارة 48-65 °م لارتباط البوادي لـ DNA القالب .
C 3 دقائق عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البوادي المرتبطة .	
3	دورة واحدة لمدة (5) دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف .

الجدول 10-2: ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين *tos A* على ضوء بروتوكول (Touch down protocol) .

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 95 °م للمسخ الأولي لـ DNA القالب
2	14 دورة تضمنت :
	A 30 ثانية عند درجة حرارة 95 °م لمسح DNA القالب .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 60.2 °م (- 0.5م°) لكل دورة لارتباط البودئ لـ DNA القالب .
C 1 دقيقة عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .	
3	19 دورة تضمنت:
	A 30 ثانية عند درجة حرارة 95 °م لمسح DNA القالب .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 53.2 °م لارتباط البودئ لـ DNA القالب .
C 1 دقيقة عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .	
4	دورة واحدة لمدة (5) دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف .

الجدول 11-2: ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين *Integron*

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 95 °م للمسخ الأولي لـ DNA القالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A 30 ثانية عند درجة حرارة 95 °م لمسح DNA القالب .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 54.3 °م لارتباط البودئ لـ DNA القالب .
C 50 ثانية عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .	
3	دورة واحدة لمدة (5) دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف .

الجدول 2-12: ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين *Integron*

على ضوء بروتوكول (Touch downe protocol) .

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 95 °م للمسح الأولي لـ DNA القالب
2	14 دورة تضمنت :
	A 30 ثانية عند درجة حرارة 95 °م لمسح DNA القالب .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 65.3 °م (-0.5م°) لكل دورة لارتباط البوادي لـ DNA القالب .
C 50 ثانية عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البوادي المرتبطة .	
3	19 دورة تضمنت:
	A 30 ثانية عند درجة حرارة 95 °م لمسح DNA القالب .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 58.3 °م لارتباط البوادي لـ DNA القالب .
C 50 ثانية عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البوادي المرتبطة .	
4	دورة واحدة لمدة (5) دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف .

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

A- المحاليل المستعملة:

• صبغة Red safe : استعملت بالهيئة المجهزة بها من شركة Intron Biotechnology.

• تحضير 0.5 X TBE buffer :

تمت اضافة 950 مليلتر من الماء المقطر الى 50مليلتر من TBE buffer بتركيز(10X)

بحسب تعليمات الشركة المجهزة لتحضير 0.5X.

• تحضير هلام الاكاروز بتركيز 0.8 % :

حُضِر هلام الاكاروز وفق الطريقة الموصوفة من قبل (Sambrook 2011) وذلك بإذابة 0.48 غم من الاكاروز في 60 مليلتر من محلول 0.5 X TBE buffer ، اذ تم اذابة الاكاروز الى درجة الغليان ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة (45- 50) م° ثم أُضيفت إليه 1µl من صبغة Red safe ومُزج الاكاروز جيداً . تم إعداد صفيحة لإسناد الأكاروز (Tray) ثم تُثبت المشط (Comb) في الصفيحة لتكوين الحفر (Wells) المُعدة لتحميل العينات ثم صُبَّ الأكاروز بشكل هادئ ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها تُترك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم رُفِع المشط بهدوء.و بعدها نُقِل الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل لإجراء عملية الترحيل الكهربائي.

4-3-2-2 الكشف عن نواتج التضاعف :

تم الكشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 0.8 % ، اذ تم تحميل 10 مايكرو ليتر من العينات فضلاً عن تحميل 4 مايكرو ليتر من الدليل الحجمي (DNA Ladder) . تم ترحيل النواتج والدليل الحجمي كهربائياً بفرق جهد 70 فولت لمدة 60 دقيقة ، وفُحص الهلام بعد الانتهاء من عملية الترحيل من خلال تعريضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالمقارنة مع مواقع الحزم للدليل الحجمي المستعمل والمُرحل مع نواتج التضاعف .

4-2-2 اختبار التسلسل الجيني (Gene sequences)

تم تحضير 50µl لتفاعل PCR للجين *tos A* مع تغيير تركيز البوادئ من 10µM/µl الى 17µM/µl لتصبح كميات المواد كما في الجدول(2-13) :

الجدول 2-13 المواد المستعملة في تحضير تضخيم الجين لعمل تسلسل جيني

Component	Concentration	Amount (µl)
DNA sample	-	8
Primer (F)	17µM/µl	3.6
Primer(R)	17µM/µl	3.6
Nuclease free water	-	9.8
Master Mix tube		25
Total volume	-	50

الجدول 2-14: ظروف التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في هذه الدراسة للجين *tos A* على

ضوء بروتوكول (Touch down protocol) .

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 95 °م للمسخ الأولي لـ DNA القالب
2	14 دورة تضمنت :
	A 30 ثانية عند درجة حرارة 95 °م لمسخ DNA القالب .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 60.2 °م (- 0.5م) لكل دورة لارتباط البودئ لـ DNA القالب .
C 1 دقيقة عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .	
3	19 دورة تضمنت:
A 30 ثانية عند درجة حرارة 95 °م لمسخ DNA القالب .	
B 30 ثانية عند درجة حرارة 53.2 °م لارتباط البودئ لـ DNA القالب .	
C 1 دقيقة عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .	
4	دورة واحدة لمدة (5) دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف .

بعد ذلك تم ارسال العينات لاجراء التسلسل الجيني

5-2-2 حفظ وإدامة العزلات :

تم حفظ العزلات لمدة طويلة الامد باستعمال الوسط المغذي السائل Brain heart

infusion broth المدعم بـ 15% من الكليسيروول اذ تعاد العملية كل اربعة اشهر لضمان

المحافظة على العزلات .

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

3- النتائج و المناقشة (Results and discussion)

1-3- تشخيص العزلات البكتيرية

تم الحصول على 19 عزلة من العزلات البكتيرية (*E.coli*) المسببة لاصابات المجاري البولية من قسم علوم الحياة وعلى 5 عزلات من مدينة الامام الحسين (ع) الطبية. تم استنبات هذه العينات على اطباق أكار الدم و اكار الماكونكي فضلاً عن الوسط التفريقي (Eosine methylene blue) لتمييز البكتيريا السالبة لصبغة غرام.

من خلال الخصائص المظهرية لمستعمرات بكتيريا *E.coli* على الأوساط الزرعية تم الحصول على 24 عزلة من هذه بكتيريا التي ظهرت على وسط الماكونكي مخمرة لسكر اللاكتوز وكان لون المستعمرات وردياً. تتصف بكتيريا *E.coli* بكونها عصيات اختيارية لا هوائية، سالبة لصبغة كرام تخمر اللاكتوز لإنتاج كبريتيد الهيدروجين (Yaratha et al., 2017). الذي يؤدي الى تكوين لمعان معدني أخضر (Tsai et al., 2000). اذ تكون هذه الصفة من الصفات المميزة لبكتيريا *E. coli* عن غيرها من افراد بكتيريا العائلة المعوية، بسبب احتواء الوسط على صبغات الايوسين والمثلين الازرق التي تترسب في الوسط الحامضي بعد ارتباطها مع بعضها فتعطي لمعناً اخضر معدنياً مما يدل على ان البكتيريا انتجت الحوامض العضوية نتيجة لتخميرها سكريات اللاكتوز والسكروز كما في الشكل (1-3).

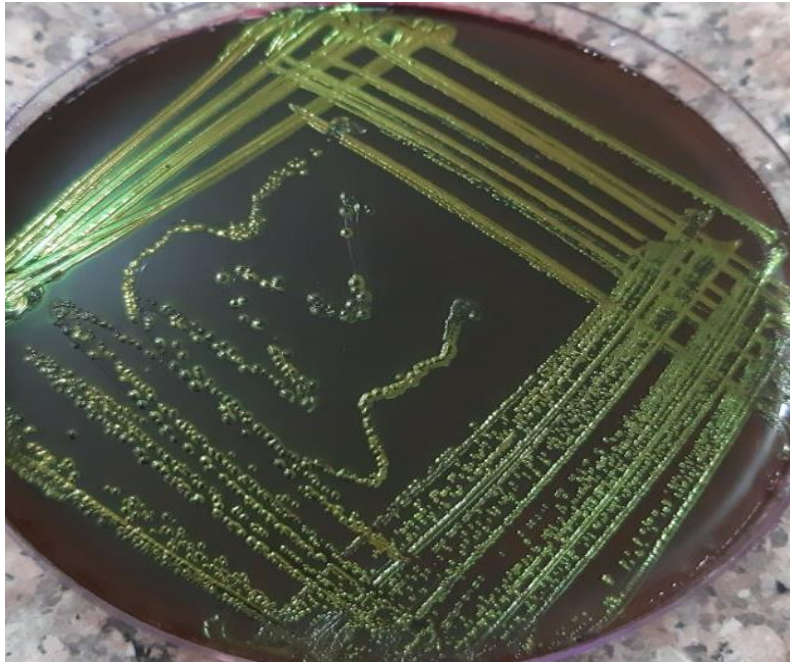
2-3 الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول (1-3) ان بكتيريا *E.coli* سالبة لصبغة غرام لاعطائها نتيجة موجبة في فحص هيدروكسيد البوتاسيوم KOH وكما كانت هوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الاوكسيديز ومتحركة كما اعطت النتيجة A\A with gas في اختبار KIA وكما هو موضح في الجدول (1-3).

الجدول 1-3: الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *E.coli* المتحصل عليها في هذه الدراسة

الاختبار	صبغة غرام	المظهر الخلوي	ظروف النمو	اختبار الكاتليز	اختبار الاوكسيديز	اختبار الحركة	تخمير اللاكتوز	KIA	فحص KOH
استجابة بكتريا <i>E.coli</i>	-	خلايا عصوية الشكل	هوائية اختيارية	+	-	+	+	A/A with gas	+

اظهرت نتائج اختبار الكبسولة بان البكتريا محتوية على الكبسولة. حيث تُعد الكبسولات من محددات عناصر الضراوة الهامة ، والتي تمكن البكتيريا المسببة للأمراض من التهرب أو مواجهة دفاع المضيف غير المحدد خلال المرحلة المبكرة (ما قبل المناعة) من العدوى (Sachdeva *et al.*, 2017) كما في الشكل (2-3).



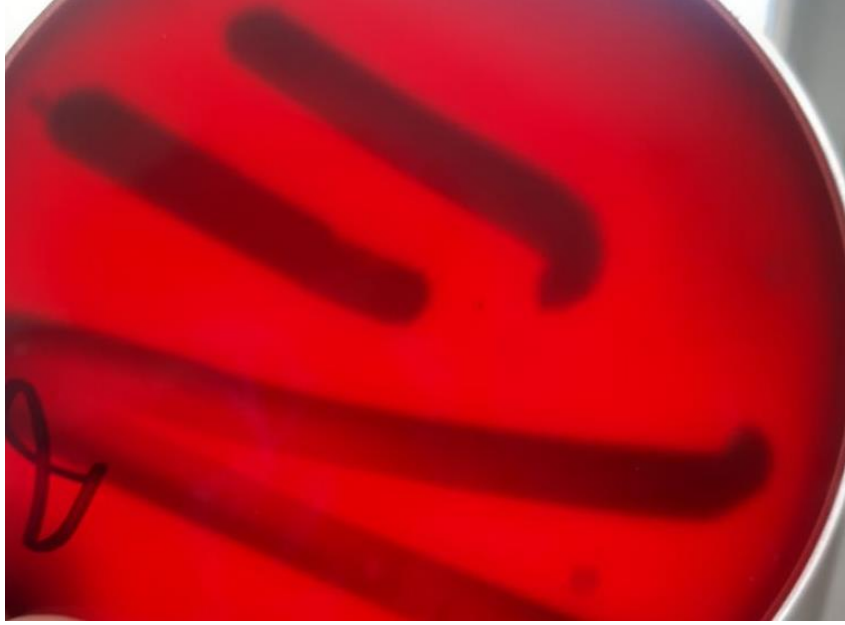
الشكل 1-3 : بكتريا *E.coli* على وسط الايوسين مثيلين الازرق



الشكل 3-2 : التحري عن وجود الكبسولة في عزلات بكتريا *E.coli* تحت العدسة الزيتية في المجهر الضوئي

اما على وسط اكار الدم كانت المستعمرات محله بنسبة (79.1%) للدم (نوع التحلل الفا) (α -hemolysin) كما في الشكل (3-3) وهذه توافقت مع ما ذكره (Aghemwenhio *et al.*, 2017).

واظهرت النتائج التي توصل اليها الباحث (Bhattacharyya *et al.*, 2015) في الهند ان نسبة عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية المحللة للدم كانت (10%) كما اشار الى ان البكتيريا كانت متغايرة في انتاجها لانزيم الهيمولايسين hemolysin لذا فإنها كانت ضعيفة الضراوة.



الشكل 3-3: التحلل الفا لعزلات بكتيريا *E.coli*

لا تتفق النتائج المتحصلة في هذه الدراسة مع ما توصل اليه الباحث (Ranjan *et al.*, 2010) الذي درس بكتيريا *E. coli* المسببة للأمراض (UPEC) والذي وجد انه من اصل 220 عزلة كانت 91 عزلت (41.36%) تحلل الدم نوع الفا على طبق اكار الدم خلال التحري على عوامل الضراوة لهذه العزلات. كما لا تتفق مع ما وجدته (Hossain *et al.*, 2020) فمن اصل 25 عزلة كانت 11 عزلة تسبب التحلل نوع الفا.

تعد بكتيريا (UPEC) السبب الرئيس لعدوى المسالك البولية (UTIs)، مما يؤدي إلى التهاب الحويضة والكلية الحاد وقد يؤدي إلى حدوث ندبات وفشل كلوي دائم. وتسبب تحلل من نوع الفا- α hemolysin (HlyA)، وهو سم أساس في هذه العزلات في تلف الأنسجة الشديد؛ ومع ذلك، فإن الآلية التي من خلالها يتسبب HlyA في إصابة الكلى لا تزال غير واضحة (Wang *et al.*, 2020).

ومن المتوقع انتشار بكتيريا *E. coli* في مرضى التهاب المسالك البولية وهو معروف جيداً من قبل الأطباء والباحثين في كل أنحاء العالم بالنظر لأن هذه البكتيريا تمثل مكوناً طبيعياً من البكتيريا

المعوية للإنسان والحيوان ولديها سلالات من المحتمل أن تسبب التهاب المسالك البولية. وغيرها من الالتهابات خارج الأمعاء، اذ تمتلك هذه السلالات سمات ضراوة تسمح باستعمارها الناجح. لذلك، تُعد عوامل الضراوة هذه أهم الميزات التي تميز بكتريا *E.coli* الممرضة خارج معوية عن تلك المتعايشة والمعوية (Wasiński, 2019).

وبعد التشخيص المظهري والكيموحيوي تم الحصول على 24 عزلة بكتيرية تعود الى بكتريا (*E. coli*). اذ تعد هذه البكتريا من المسببات الرئيسية لاصابات المسالك البولية (UTIs) اذ تصيب حوالي (90%) من المرضى الذين يعانون من اصابات المسالك البولية (UTIs) في بلدان العالم (Levinson, 2016).

ان سبب وجود النسبة العالية لبكتريا *E. coli* قد يكون بسبب تكيف هذه البكتريا للعيش في بيئة المسالك البولية وتحملها للأوضاع البيئية غير الملائمة فضلا عن امتلاكها لعوامل ضراوة كثيرة وقوية تزيد من قابليتها على احداث الاصابة منها امتلاكها لعوامل الالتصاق التي تمكن البكتريا من الخطوة الاولى من الاصابة وهي الالتصاق (adherence) ، ونتاج المحفظة (capsule)، والسموم (toxins) المحللة لأنسجة المضيف، فضلاً عن امكانية انتقال البكتريا من فتحة المخرج التي تعد البيئة الطبيعية لها الى الفتحة البولية (Raeispour and Ranjbar, 2018).

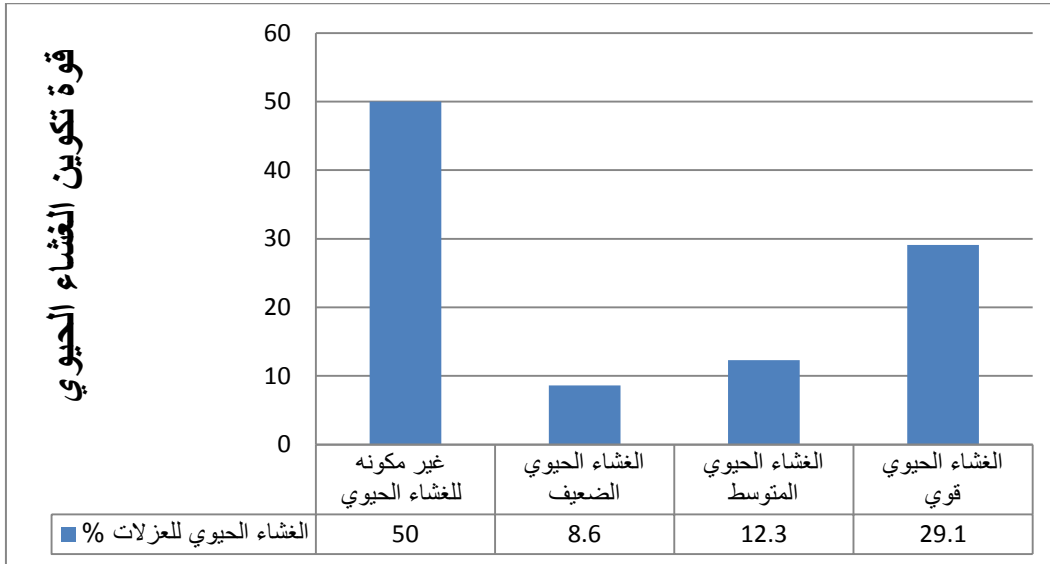
3-3- التحري عن قابلية بكتريا *E.coli* لتكوين الغشاء الحيوي (Biofilm)

بينت نتائج تكوين الأغشية الحيوية عن طريقة الانابيب تفاوتاً واضحاً بين العزلات البكتيرية اذ بلغ عدد العزلات المكونة لغشاء حيوي قوي 8 (33.3%) بينما بلغ عدد العزلات المكونة لغشاء حيوي متوسط 10 (41.7%) فيما بلغ عدد العزلات المكونة لغشاء حيوي ضعيف 6 (25%) بحسب ما هو موضح في الجدول (2-3).

الجدول 3-2: فحص الغشاء الحيوي لعزلات بكتريا *E.coli* بطريقة انبوب الاختبار

عدد العينات الكلي	قوة الغشاء الحيوي	عدد العزلات	النسبة المئوية
24	قوي	8	33.3%
	متوسط	10	41.7%
	ضعيف	6	25%

وعند فحص الغشاء الحيوي باستخدام اختبار الصفائح المعايرة (MTP) Microtiter (MTP) plate فقد اظهرت العزلات بهذه الطريقة اختلافات من حيث قوة الأغشية الحيوية فكان 50% من العزلات غير مكونه للغشاء الحيوي بينما 29.1% لها غشاء حيوي قوي و 12.3% كونت غشاء حيوياً متوسط القوة و 8.6% غشاءً حيوياً ضعيفاً شكل(3-4).



الشكل 3-4: تكوين الأغشية الحيوية في عزلات بكتريا *E.coli* بطريقة الصفائح

تعد البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي هي المسؤولة عن العديد من الإصابات ويصعب تثبيطها ومعالجتها. يساعد إنتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *E.coli* على الاستعمار ويؤدي إلى زيادة التهاب المسالك البولية. قد يكون من الصعب علاج مثل هذه العدوى لأنها تظهر مقاومة متعددة للأدوية (Karigoudar et al., 2019).

تعد قابلية بكتريا *E. coli* على انتاج الغشاء الحيوي واحدة من اهم عوامل ضراوة هذه البكتريا التي تمنحها المقاومة لأغلب المضادات الحيوية المستعملة في العلاجات . عند تواجد البكتريا في البيئة السائلة وعند توافر الأوضاع البيئية سوف تتحول من بكتريا غير منتجة للغشاء الحيوي تعيش في البيئة السائلة الى بكتريا منتجة للغشاء الحيوي تعيش على السطوح الصلبة ،اذ تعمل البكتريا العديد من التحويلات والتغيرات لتلائم البيئة الجديدة ومنها التغيرات في التعبير عن الجزيئات السطحية مثل المستقبلات الموجودة على سطح الاسواط (flagella) وعوامل الضراوة (virulence factors) و المخلفات الايضية مثل الحوامض والكاربوهيدرات والسموم وغيرها، فتتاح للبكتريا فرصة اكبر للبقاء في الأوضاع غير الملائمة. تعد البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي مقاومة للمضادات الحيوية بأكثر 1000 مرة من البكتريا غير المنتجة له، ويعود ذلك لاسباب عدة منها قلة انتشار المضاد الحيوي خلال المادة البيئية اللزجة للغشاء الحيوي و انتقال جينات المقاومة في داخل بيئة الغشاء الحيوي بين الخلايا البكتيرية سواء كان بوساطة البلازميد (plasmid) ام الجينات القافزة (transposons) ام بفعل حدوث الطفرات العشوائية التي تؤدي الى زيادة مقاومة الخلايا للسموم والمضادات الحيوية و تثبيت الغشاء الحيوي عن طريق تغير في تراكيز الايونات والرقم الهيدروجيني pH واخيرا وجود الخلايا المقيمة (persister cell) غير الفعالة ايضياً التي لها دور في الحفاظ على الخلايا البكتيرية الموجودة تحت الغشاء الحيوي كآلية دفاعية ذاتية ميكانيكية (Soto, 2014).

لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع تلك التي توصل اليها Karigoudar et al.(2019) اذ تضمنت تلك الدراسة عزل 100 عزلة من بكتريا *E. coli* من مرضى اجري لهم عمليات القسطرة وغيرهم ممن لم يجري لهم القسطرة ، ثم التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي إيجابياً باستخدام أكار الكونغو الأحمر (Agar Congo red) وطريقة الانابيب وطريقة الصفائح وظهرت النتائج ان نسب العزلات المكونة للغشاء الحيوي كانت 49 (49%) و 55 (55%) و 69 (69%) على التوالي. توافقت هذه النتائج مع ما توصل اليه Tajbakhsh et al.(2016) اذ انه من بين 130 عزلة من بكتريا *E. coli* ،كانت 80 (61.53%) لها القابلية على صنع الأغشية الحيوية و أظهرت

(18.75%) غشاء حيوي قوي و (25%) أظهرت غشاء حيوي متوسط و (56.25%) أظهرت غشاءً حيويًا ضعيفاً .

قام Murugan et al.(2011) بدراسة تكوين الأغشية الحيوية بواسطة طريقة الانابيب و أظهرت عزلات بكتريا *E.coli* ان 81 (84.37%) نمطاً ظاهرياً إيجابياً للغشاء الحيوي تحت الأوضاع المُحسَّنة في طريقة الأنبوب وتم تصنيف السلالات أيضاً على أنها موجبة قوية 9 (9.4%)، وغشاء حيوي متوسطة 33 (34.4%) ، غشاء حيوي ضعيف 39 (40.6%) بينما في 15 عزلة (15.6%) لم يتم الكشف عن الغشاء الحيوي بواسطة طريقة الانابيب .

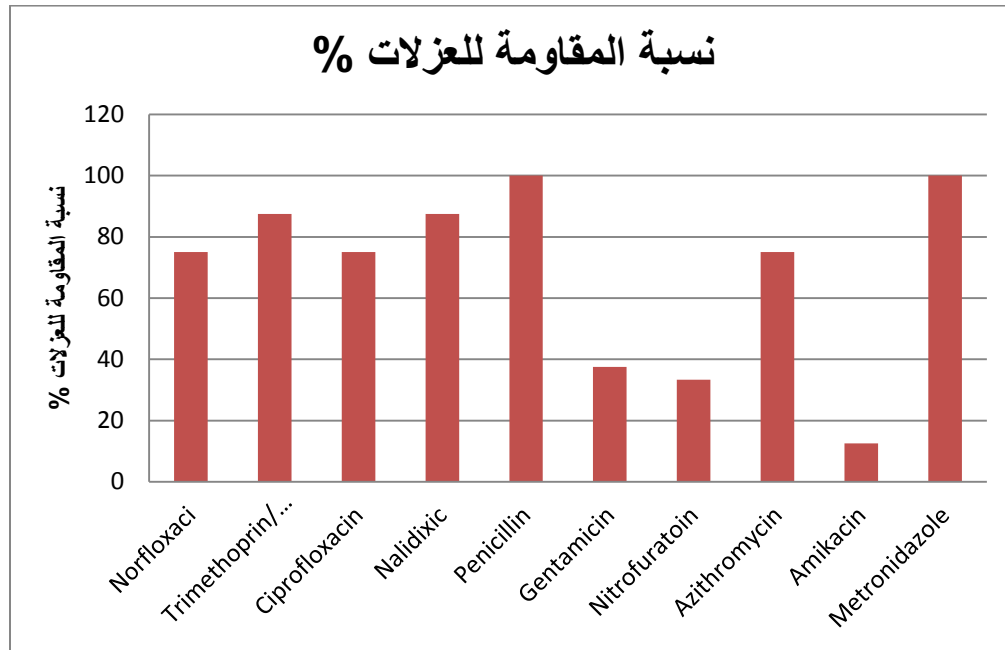
تعد بكتريا *Uropathogenic Escherichia coli* (UPEC) السبب الأكثر شيوعاً للإصابة بالتهاب المسالك البولية، اذ تمثل حوالي 80% من حالات العدوى (Behzadi et al., 2020) كما انها تشكل بسهولة مجتمعات متعددة الخلايا تُعرف باسم الأغشية الحيوية على سطح مواد القسطرة، وجدران المثانة، وكذلك داخل الخلايا الظهارية للمثانة (Schaffer et al., 2016).

ويعيق تكوين الأغشية الحيوية بشكل ملحوظ علاج عدوى المسالك البولية عن طريق حماية البكتيريا المغلفة من الاستجابة المناعية للمضيف والعلاج بمضادات الميكروبات. وهذه البكتيريا موجودة على مسافة قريبة داخل الأغشية الحيوية، مما يسهل تبادل المواد الجينية، مثل البلازميدات المقاومة لمضادات الميكروبات (Flemming and Wingender, 2010).

3-4 مقاومة بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية

تم اختبار حساسية العزلات البكتيرية لعشرة مضادات حيوية مختلفة المستعملة في علاج التهاب المسالك البولية وقد كانت البكتريا متباينة في مقاومتها لهذه المضادات المختبرة، اذ كانت جميع العزلات البكتيرية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. (MDR) multi-drug resistance كانت نتائج معدل مقاومة العزلات للمضادات متغيرة بين المضادات، فكانت اعلى نسبة مقاومة ضد البنسلين (Penicillin) (100%) و ميترونيدازول (Metronidazole) (100%) يليها

تريميثوبريم/سلفاميثوكسازول (Trimethoprin sulphamethoxazole) (87.5%) ، حمض الناليديكسيك (Nalidixic acid) (87.5%) وبعدها نورفلوكساسين (Norfloxacin) (75%) و سيبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) (75%)، ولكن بعض المضادات اظهرت مقاومة مثل جنتاميسين (Gentamicin) (37.5%) بعدها نيتروفورانتوين Nitrofuratoin (33.3%)، واخيرا العزلات اظهرت حساسية بشكل كبير للاميكاسين (Amikacin) بنسبة مقاومة (12.5%) شكل (3-5).



الشكل 3-5: نسب مقاومة عزلات بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية.

توافقت هذه الدراسة في جزء منها مع دراسة Ali et al.(2014) والتي عزلت فيها 50 عزلة من بكتريا *E. coli* من المسالك البولية كانت جميعها مقاومة (100%) للبنسلين والإريثروميسين ، تليها 49 (98%) لحمض الناليديكسيك ، 47 (94%) للسيفاليكسين ، 43 (86%) للأموكسيسيلين ، 42 (84%) للأمبيسلين ، 37 (74%) للسيبروفلوكساسين ، 32 (64%) للنتراسيكلين ، 27 (54%) للسيفيكسيم و 18 (36%) للجنتاميسين.

تتفق دراستنا الحالية ايضاً مع دراسة كل من Raheel and Sher(2015) اللذين وجدوا ان عزلات بكتريا *E.coli* كانت مقاومة للسيبروفلوكساسين مرتفعة من 39.8% وأشارا في دراستهما انه من عوامل الخطر تامؤثر في معدلات مقاومة سيبروفلوكساسين هي الاستخدام المسبق للسيبروفلوكساسين ، والتهابات المسالك البولية المتكررة .

من جانب اخر اظهرت الدراسات ان حساسية بعض عزلات بكتريا *E.coli* للميترونيدازول ومقاومة البعض الاخر (Iswara, 2015) يمكن أن تحدث مقاومة الميترونيدازول من خلال عدد من الآليات المختلفة التي تنطوي على انخفاض امتصاص الدواء ، وزيادة الإزالة من الخلية البكتيرية أو عن طريق تقليل معدل تنشيط الميترونيدازول تحت أوضاع اللاهوائية (Smith, 2018).

ان أحد أهم المشاكل المرتبطة بعلاج التهابات المسالك البولية هو ظهور وانتشار سلالات بكتيرية مقاومة للأدوية المتعددة (MDR) بالنظر لتعدد طرائق المقاومة لهذه الادوية (Ramírez-Castillo et al., 2018) . واوضحت الدراسات ظهور مستويات عالية من المقاومة ضد المضادات الحيوية في البكتيريا سالبة الجرام في المناطق التي لم يتم فيها فرض قيود على استخدامها في المجتمع (Garau , 2006).

فضلا عن آليات المقاومة هذه ، فإن إنتاج الأغشية الحيوية هو مصدر قلق رئيسي آخر ، وغالبًا ما يؤدي إلى فشل علاجي (Jamal et al., 2018) ، توفر الحماية لهذه البكتيريا من المواد القاسية الأوضاع البيئية والعوامل الضارة ، مثل المضادات الحيوية (Wu et al., 2015) في الواقع ، قد يكون الحد الأدنى للتركيز المثبط للمضادات الحيوية ضد البكتيريا الموجودة في الأغشية الحيوية أعلى بمقدار 10^1-10^4 مرة من كون الخلايا منفردة (Lebeaux et al., 2014).

تعد مضادات الاحياء المجهرية غير مكلفة ، وان الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية بدون استشارة الطبيب و لمدة غير مثالية يمكن أن يؤدي إلى مقاومة عالية للمضادات الحيوية التي تستعمل عادة في عدوى المسالك البولية التي تسببها بكتريا *E.coli* ، بالإضافة إلى ذلك ، يمكن أن تنتقل البلازميدات التي تحتوي على محددات المقاومة بين البكتيريا ، حتى بين الأنواع ، مما يؤدي

إلى اكتساب مقاومة للمضادات الحيوية الجديدة عن طريق ظهور سلالات متحولة (Lee *et al.*, 2018).

من اهم اسباب مقاومة بكتريا *E. coli* لمضادات البيتا لكتام β -lactams هو انتاج انزيمات البيتا لكتاميز β -lactamases التي تتضمن انزيمات cephalosporinase و penicillinase اذ تعمل هذه الانزيمات على تحطيم حلقة البيتا لكتام β -lactam فتثبط بذلك عمل المضادات الحيوية التابعة لمجاميع البنسلينات (penicillins) و السيفالوسبورينات (cephalosporins) (Paltansing, 2015).

ان مقاومة بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية التابعة لمجموعة الكينولونات quinolones تعود الى تغيير في الموقع الهدف، تقليل في نفاذية الغشاء الخارجي للبكتريا (Paltansing, 2015). وتثبيط تصنيع ال DNA عن طريق تثبيط انزيم DNA gyrase او بفعل حدوث طفرات جينية فيه (Zaman *et al.*, 2017).

من اسباب مقاومة بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية التابعة لمجموعة الامينوكلايكوسايدات aminoglycosides تغيير في نفاذية الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية (Paltansing, 2015). وكذلك امتلاكها الانزيمات المحورة Aminoglycoside Modifying Enzymes (AMEs) مثل N-acetyl transferase و phosphotransferase (Zaman *et al.*, 2017).

ان سبب مقاومة عزلات بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية التابعة لمجموعة الماكروليدات macrolides مثل الازثرومايسين (Azithromycin) هي التحلل المائي (hydrolysis) الذي يساهم في تحلل المضاد الحيوي وتثبيط فعاليته العلاجية ، انتاج انزيمات Glogsylation و phosphorylation التي تثبط عمل المضاد الحيوي فضلا عن تغيير في الموقع الهدف target alteration (Zaman *et al.*, 2017).

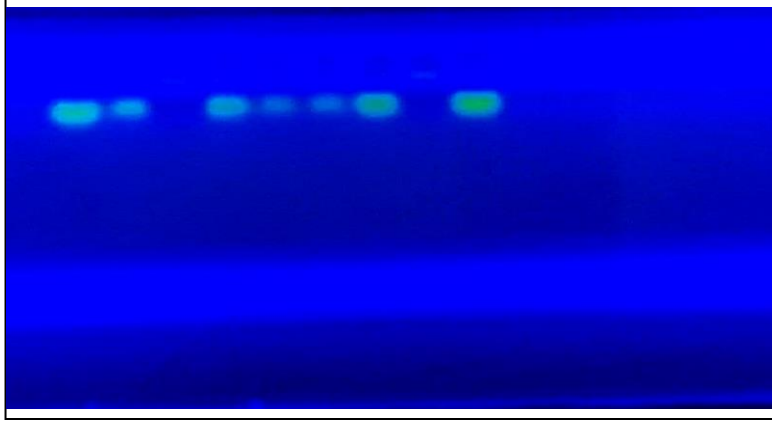
ويعد المضاد الحيوي nitrofurantoin من اقدم المضادات الحيوية وافضلها التي يجب استعمالها في علاج المرضى المصابين بإصابات المسالك البولية، وذلك للمقاومة الضعيفة التي

اظهرتها عزلات لبكتريا *E. coli* لهذا المضاد الحيوي. جاءت هذه الدراسة متوافقة مع الكثير من الدراسات السابقة ومنها نتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث (Mittal *et al.* (2014) في الهند، ونتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث (Abujnah *et al.* (2015) في مصر، و نتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث (Tajbakhsh *et al.* (2016) في ايران، بعد عزلهم للبكتريا من المرضى الذين يعانون من اصابات المسالك البولية اظهرت نتائج دراساتهم ان نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي كانت ضعيفة جدا اذ بلغت (6%) و (1.9%) و (6.25%) على التوالي. بينما اظهرت نتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث (Mishra *et al.* (2015) في الهند، ونتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث (Abdu *et al.* (2018) في السودان، ان نسبة مقاومة البكتريا للمضاد الحيوي nitrofurantoin بلغت (45.5%) و (22%) على التوالي. ومن اسباب مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي هو قلة نفاذية الغشاء الخلوي و حدوث الطفرات الكروموسومية (Zaman *et al.*, 2017 ؛ Kapoor *et al.*, 2017).

ان السبب الرئيس لهذه المشكلة الخطيرة يرجع الى الزيادة الكبيرة في مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية الواسعة الطيف نتيجة الاستعمال المفرط وغير المنتظم لهذه المضادات الحيوية (Gawad *et al.*, 2018) وان مقاومة بكتريا *E. coli* المسببة لإصابات المسالك البولية تمثل خطرا كبيرا على الصحة العامة في بلدان مختلفة من العالم لأنها مقاومة لمختلف مجاميع المضادات الحيوية المتنوعة (Polse *et al.* 2016).

3-5- استخلاص الحامض الرايبوزي منقوص الاوكسجين

بعد استخلاص DNA بواسطة Favorgen Biotech Corporation ,Taiwan (Genomic DNA Mini Kit). تم إجراء الترحيل الكهربائي للهلام لتأكيد نقاوة الحمض النووي المستخلص. يوضح الشكل (3-6) ظهور حزم واضحة للـDNA المستخلص مما يؤكد نقاوته.



الشكل 3-6: الترحيل الكهربائي لنتاج الدنا المستخلص من العزلات قيد الدراسة في 0.8 % اكاروز وفرق جهد 70 فولت لمدة نصف ساعة

3-6- التحري عن جينات عوامل الضراوة

يعد تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لاجراء تشخيص سريع للعزلات البكتيرية، يستخدم هذا التفاعل كاختبار تأكيدي بعد تشخيص البكتريا بالطرائق الكيموحيوية. وحالياً يلعب الـ PCR دوراً مهماً في الدراسات السريرية للاحياء المجهرية اذ يمكن بواسطته تشخيص هذه الاحياء وجيناتها (Aghamali *et al.*, 2019).

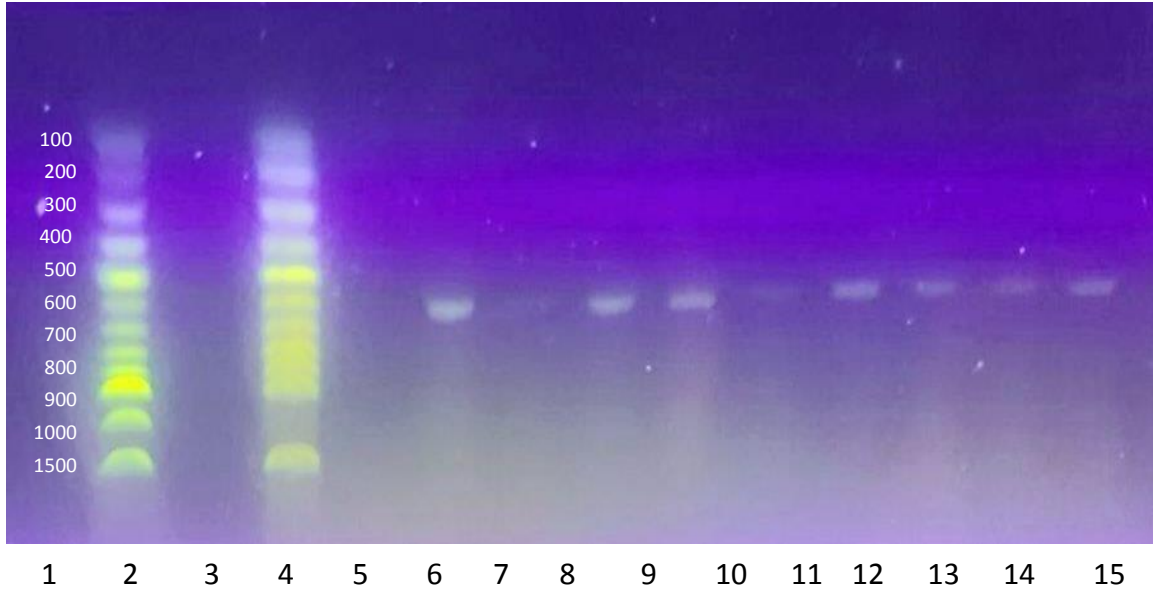
استخدمت تقنية الـ PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود جين *tos A* وجين *csG A* والانتكرون من الصنف 1 في عزلات بكتريا *E. coli*.

تم الحصول على الحمض النووي من العزلات جميعها قيد الدراسة وقد تم ذلك باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل التحري عن جينات عوامل الضراوة كما مذكور في الجدول (2-6). اظهرت النتائج ان جميع العزلات تحتوي على جين *tos A* , و جين *csG A* و الإنتكرون من الصنف 1 .

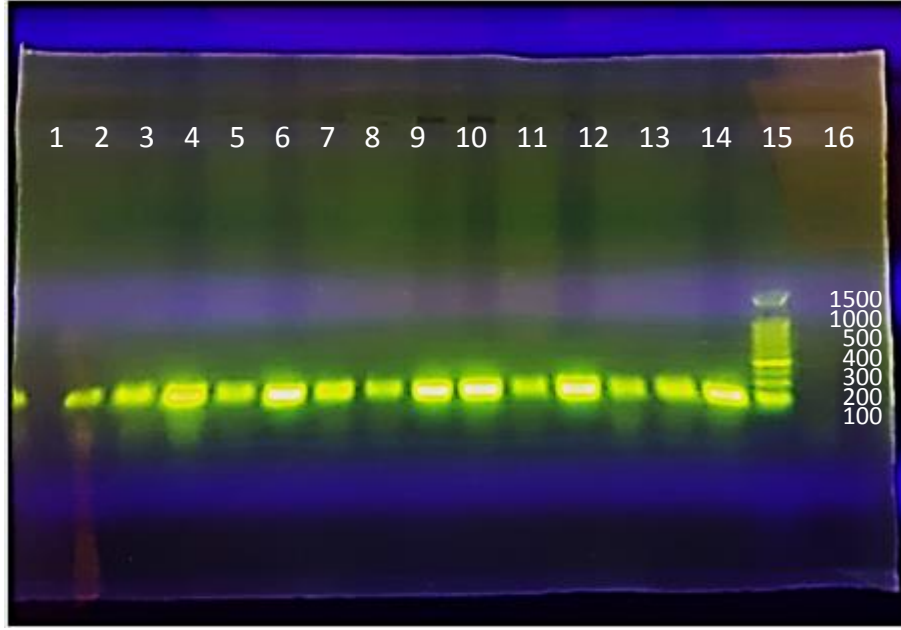
يوضح الشكل (3-7) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي يتبين من خلالها ان البادئ (primer) الخاص بالجين *tos A* كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه 589bp .

اما الشكل(3-8) فيوضح الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي يتبين من خلالها ان البادئ(primer) الخاص بالجين A csg كان ناجحا في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه 178bp.

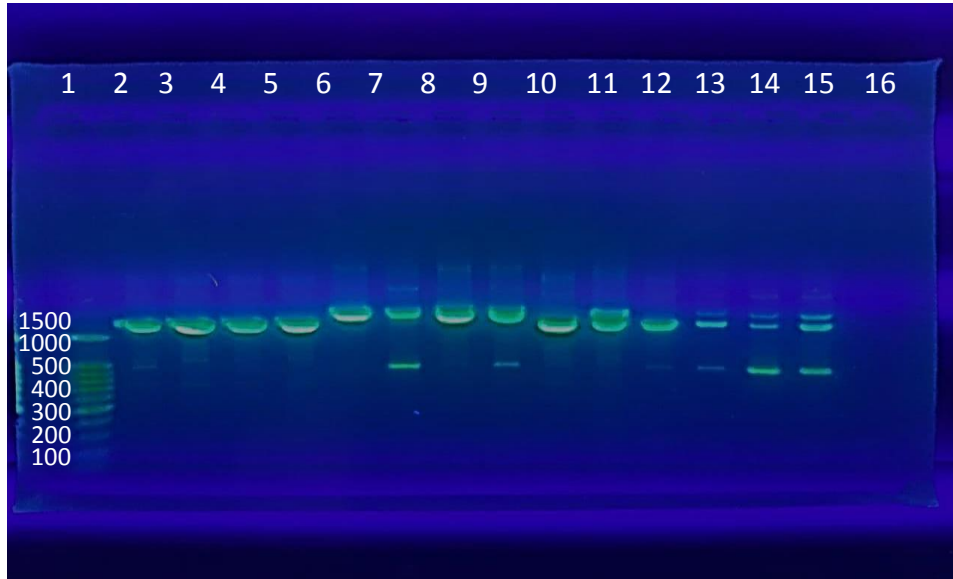
الشكل(3-7) يوضح الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي يتبين من خلالها ان البادئ(primer) الخاص بلانتكرون الصنف 1 كان ناجحا في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه (الحجم يكون متغاير وقد يصل الى اكثر من 2000bp).



الشكل 3-7 : الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين *tos A* (589 زوج قاعدي) لعزلات بكتريا الايشريشيا القولونية في 0.8 % اكاروز وفرق جهد 70 فولت لمدة ساعة واحدة المسار (2,4) يمثل الدليل الحجمي(100-1500 زوج قاعدي) المسارات (6-15) تمثل عزلات البكتريا التي تملك جين *tosA* المسار (5) يمثل السيطرة السالبة (n.c).



الشكل 3-8: الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين *csg A* (178 زوج قاعدي) لعزلات بكتريا الايشريشيا القولونية في 0.8 % اكاروز وفرق جهد 70 فولت لمدة ساعة واحدة المسار (15) يمثل الدليل الحجمي (100-1500 زوج قاعدي) المسارات (1-14) تمثل عزلات البكتريا التي تملك جين *csg A* المسار (16) يمثل السيطرة السالبة (n.c).



الشكل 3-9: الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين (integron) للإنتكرون الصنف 1 (الحجم يكون متغاير وقد يصل الى اكثر من 2000bp) من بكتريا الايشريشيا القولونية في 0.8 % اكاروز وفرق جهد 70 فولت لمدة ساعة واحدة المسار (1) يمثل الدليل الحجمي (100-1500 زوج قاعدي) المسارات (2-15) تمثل عزلات البكتريا التي تملك جين للإنتكرون الصنف 1 المسار (16) يمثل السيطرة السالبة (n.c).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجدته Xicohtencatl-Cortes *et al.*(2019) من خلال عزل 55 عزلة لبكتريا *E.coli* المسببة لالتهاب المسالك البولية ووجدها جميعها حاملة لهذا الجين *tos A* وهو بروتين مفترض يتكرر في السم اكتسب أهمية مؤخرًا كجزء مستضد ويمكن وصف *tos A* على أنه مادة التصاق غير ليفية (*a non fimbrial adhesions*) تساهم في التسبب في المرض من خلال الارتباط بالمستقبلات الموجودة على أسطح الخلايا الظهارية المضيفة المشتقة من المسالك البولية العلوية (Vigil *et al.*,2012).

ويعد جين *tos A* بمثابة عامل ضراوة في سلالات بكتريا *E.coli* المسببة لأمراض المسالك البولية إذ يساعد على الارتباط بالمستقبلات الموجودة على بطانة المسالك البولية (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2019).

كذلك سجلت الدراسة الحالية وجود جين *csf A* (*curli fimbria*) في جميع العزلات وتتفق هذه مع ما اشار اليه Cordeiro *et al.*(2016) إذ أظهر التحليل الجزيئي الذي اجري بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل أن 100% من 31 سلالة من بكتريا *E.coli* المعزولة من المرضى الذين يعانون من اصابات المسالك البولية المتكررة (التهابات المسالك البولية) أظهرت وجود جين *csfA* (*curli fimbria*) كما توافقت هذه الدراسة مع ما وجدته Abd El-Baky *et al.*(2020) الذين قاموا بجمع 200 عينة من مصادر سريرية مختلفة ، كانت 96 (48%) و 88 (44%) عينة بكتيريا سالبة الجرام وموجبة الجرام على التوالي ، من بين 96 بكتيريا سالبة الجرام ، تم تأكيد 64 عزلة (66.66%) على أنها بكتريا *E.coli* 10 (15.6%) من عينات الجرح ، 22 (34.4%) من عينات الادرار ، 23 (35.9%) من عينات البراز و 9 (14%) من عينات الدم. أظهرت بكتريا *E.coli* المعزولة من عينات الادرار بان إنتاج *Curli fimbriae* (90.9%) مقارنة بـ *E. coli* المعزولة من مصادر أخرى.

وفي دراسة اخرى اجريت من قبل Moghadas Kasani (2020) تم عزل 45 عزلة من بكتريا *E.coli* في مرضى مصابين بعدوى المسالك البولية وبناءً على نتائج اختبار تفاعل البلمرة

المتسلسل اتضح ان 60% و 82% من العزلات لديها جينات ضراوة *flu* و *csgA* ، على التوالي ، وكلا الجينين كانا موجودين في 55.5% من العزلات.

تصنف *Curli fimbriae* على أنها ألياف أميلويد وتشارك في الالتصاق السطحي ، وتجميع الخلايا ، وتكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *E.coli* وغيرها من البكتيريا المعوية (*Kikuchi et al.*, 2005). يسهل *Curli* الارتباط البكتيري مع المصفوفة خارج الخلية وبروتينات المصل المختلفة ، مثل بروتين الفبرونيكتين واللامينين والبالازمينوجين والبالازمينوجين المنشط (*Barnhart and Chapman*, 2006). يتم ترميز الوحدات الفرعية لـ *curli* وآلات التجميع الخاصة بها على اثنين من الأوبرينات المنسوخة بشكل متباين ؛ يقوم مشغل *csgBAC* بتشفير وحدة *curli* الفرعية الرئيسية *CsgA* ، المسؤولة عن التفاعل مع مكونات المضيف (*Hufnagel et al.*, 2015).

الى جانب ذلك فقد اظهرت نتائج التحري عن الانتكرون من الصنف 1 احتواء جميع العزلات على الانتكرونات الصنف 1 (*Singh et al.*, 2017) الذين درسوا تحديد سمات مقاومة المضادات الحيوية والجينات المرتبطة بها ، لاكتساب نظرة ثاقبة في توزيع مجموعات *phylogroups* ، وانتشارها ، وتوصيفها من الصنف 1 ، 2 ، و 3 من التكامل بين عزلات الايشريشيا القولونية المسببة للأمراض المعوية (EPEC). وسجل في الدراسة من اصل 80 عزله على سلالات *E. coli* كان منها 23 سلالة *Enteropathogenic E. coli*، منها 2 فقط كانت متعدد المقاومة للمضادات ومن بين 80 حالة من حالات الإسهال ، لوحظ الانتكرون الصنف الاول في 43 عزلة ، وفي دراسة اخرى ايضا تبحث عن علاقة المقاومة للمضادات مع الانتكرون وجد (*Khan et al.*, 2018) من بين 500 عزلة ، تم تحديد 105 عزلة *uropathogenic E. coli* على أنها مقاومة للأدوية المتعددة (MDR) واحتوت بكتيريا *E. coli* على الانتكرون من صنف 1 58% من العزلات المقاومة للمضادات المتعددة.

وقد لوحظ وجود الانتكرون *Integrans* فارغة في دراسات أخرى (*Fonseca et al.*, 2005) ، مما يشير إلى أن هذه البكتيريا يمكن أن يكون لديها القابلية على تحويل نفسها بسرعة إلى

سلالات متعددة المقاومة. اقترحت دراسات أخرى أن هذه الإنتكرونات "الفارغة" تمثل عناصر أسلاف لم تكتسب بعد أشربة الجينات ، التي يتم ادخالها بين الأجزاء المحفوظة من integrons (Rosser and Young, 1999).

أظهرت بعض الدراسات ان الصنف الثاني كان اقل من الصنف 1 كما اشار (Kashif et al., 2013) الذي وجد ان نسبة وجود الصنف الاول والثاني 60% و 16% على التوالي في 38 عزلة من بكتريا *E.coli* كما سجلت النتيجة ذاتها في دراسات اخرى (Odetoyin et al., 2017).

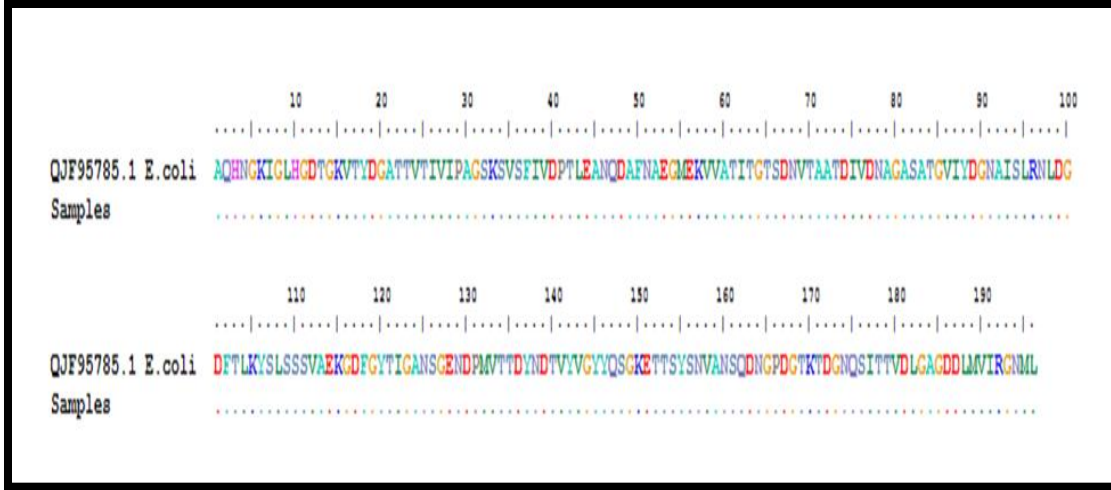
3-7- اختبار التسلسل الجيني (Gene sequences) لجين *tos A*

أظهرت نتائج التسلسل الجيني لجين *tosA* هناك استبدال بالنيوكليوتيدات مختلفه بين 10 عزلات من بكتريا *E.coli* المحلية وعزلات *E. coli* QJF95785.1 أظهرت استبدالات انتقالية عالية بين النوكليوتيدات (C) التي استبدلت بالنيوكليوتيدات (T) الشكل (3-10).

	310	320	330	340	350
QJF95785.1 <i>E. coli</i>	ACTTTGGGTATACCAT	TGCCCGCAATAGCCGGT	GAAAAATGATCCAAT	GGTAACAACAC	
sample 1		T			
sample 2		T			
sample 3		T			
sample 4		T			
sample 5		T			
sample 6		T			
sample 7		T			
sample 8		T			
sample 9		T			
sample 10		T			

الشكل 3-10: استبدال بين النوكليوتيدات (C) التي استبدلت بالنيوكليوتيدات (T)

وفي نفس الوقت لم يؤثر هذا التغير في بالنيوكليوتيدات في الحامض الاميني وبذلك لم يحدث اي تغير في شكل البروتين (hemolysin activation protein) الذي ينتجه جين *tosA* كما في الشكل (3-11).



الشكل 3-11: تحديد الاختلاف في الحامض الاميني في مكان الكودون المستبدل في بروتين Hemolysin (Activation protein)

تعود هذه التغير في النيوكليدات الى التغيرات الجيني الذي يحدث بين عزلات بكتريا *E. coli* في الجينات المسؤولة اذ سجلت عدد من الدراسات هذه التغيرات في الجينات بين العزلات (*Eid et al., 2016, Wu et al., 2008*) وبما ان هذه التغير لم يحدث تغير في شكل البروتين المنتج فهذا التغيرات في الجين هو طفرة من نوع الطفرة الصامتة (Silent mutation): التي تعرف باستبدال نيوكليد واحد بأخر ولكن يعطي نفس الحمض الأميني الذي يكون البروتين النهائي ولا تتسبب في تغيير البروتين الناتج يحدث هذا التغيير عادةً في الموضع الثالث من الكودون (Gutman *et al., 2021*). سجلت دراسات مختلفة حدوث مثل هذه الطفرات الصامتة مثلا الطفرة صامته في وحيدات أنزيم RNA Polymerase وسجل عدم وجود تغير في تركيب الانزيم. ووضحت دراسة ثنائية حول تسجيل طفره صامته في جين *fecA* في بكتريا *E. coli* (Lupino *et al., 2018*).

وجد Foster *et al.* (2015) باستعمال تسلسل الجينوم الكامل لبكتريا *E. coli* ، أن معدلات الطفرات لثلاث سلالات متعايشة متباينة على نطاق واسع تختلف فقط بحوالي 50% ، وافتراضوا أن أربع عوامل رئيسية تساهم في حدوث طفرات تلقائية: تشمل على انزيم DNA polymerase ، وتلف الحمض النووي المستحث داخليًا ، فضلاً عن تلف الحمض النووي الناجم عن العوامل

الخارجية ، وأنشطة البوليميرات المعرضة للخطأ كذلك كشفوا ان آلاف الطفرات الناتجة عن الضرر التأكسدي .

وجد Long *et al.*(2016) ان الطفرات في بكتريا *E.coli* تنتج نتيجة التعرض الى مستويات تحت قاتلة لمدى طويل من المضاد الحيوي باستعمال تسلسل الجينوم للبكتيريا، اذ لوحظ ايضا ان معدل الطفرات يزيد على مستوى الجينوم بشكل ملحوظ مع تركيز النورفلوكساسين. ترتبط هذه الاستجابة عن طريق بوليميرات الحمض النووي المعرضة للخطأ وقد تتضمن أيضاً تأثيرات غير مباشرة للنورفلوكساسين على عدم تطابق الحمض النووي وتصليح الضرر الناتج من الجهد التأكسدي. علاوة على ذلك ، فان اكتساب مقاومة المضادات الحيوية يزيد من مستوي الطفرات.

الفصل الرابع

الاستنتاجات و التوصيات

1-4 الاستنتاجات

- 1- ظهور نسبة عالية من عزلات بكتريا *E. coli* ذات المقاومة الشديدة للمضادات الحيوية مما يعكس الاستعمال غير المدروس للمضادات الحيوية في علاج الإصابات المتسببة بفعل هذه البكتريا في محافظة كربلاء المقدسة .
- 2- ان ظهور نسبة عالية من عزلات بكتريا *E.coli* المكونة للغشاء الحيوي يشير الى مدى ضراوة هذه العزلات .
- 3- ان عزلات بكتريا *E.coli* المستخدمة في الدراسة كانت ضارية عبر امتلاكها الجينات *tosA*، *integrin class 1*، *csg A* المشفرة لعناصر ضراوة في هذه البكتريا .
- 4- بينت نتائج فحص التحليل التتابعي للدنا DNA sequencing لجين *tosA* تغير في قاعدة نتروجينية واحدة مع عدم تغير الحامض الاميني في البروتين الناتج عن هذا الجين وهذا ما يسمى بالطفرة الصامتة .

2-4 التوصيات

1. اجراء العديد من الدراسات للكشف عن اسباب زيادة مقاومة بكتريا *E. coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية للمضادات الحيوية من خلال الكشف عن جينات المقاومة للمضادات الحيوية وبالأخص الجينات المسؤولة عن تشفير عوامل الضراوة.
2. دراسة التعبير الجيني gene expression لجينات المقاومة المشفرة عن بروتينات عناصر الضراوة باعتماد تقانة real time PCR.
3. عزل اهم انواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام المسببة لاصابات المسالك البولية وخصوصاً بكتريا *S.saprophyticus* واجراء توصيف جزيئي لها.

المصادر

References

References

- Abd El-Baky**, R. M., Ibrahim, R. A., Mohamed, D. S., Ahmed, E. F., & Hashem, Z. S. (2020). Prevalence of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among pathogenic *E. coli* isolated from Egyptian patients with different clinical infections. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1221.
- Abdu**, A. ; Kachallah, M. and Yusuf Bolus, D. (2018). Antibiotic Susceptibility Patterns of Uropathogenic *Escherichia coli* Among Patients with Urinary Tract Infections in a Tertiary Care Hospital in Maiduguri, North Eastern, Nigeria. *J. Biosci Biotechnol Discov*. 3: 14-24.
- Abujnah**, A. A. Zorgani, A. ; Sabri, M. A. M. ; El-Mohammady, H.; Khalek, R. A. and Ghenghesh, K. S. (2015). Multidrug Resistance and Extended-Spectrum β -Lactamases Genes Among *Escherichia coli* from Patients with Urinary Tract Infections in Northwestern Libya. *Libyan J Med*. 10(1): 26412-3402.
- Afzal**, A. M. S. (2017). Antibiotic Resistance Pattern of *Escherichia coli* and *Klebsiella* Species in Pakistan: A Brief Overview. *J Microb. Biochem. Technol*. 9(6): 277-279.
- Aghemwenhio**, I. S., Timilehin, A. A., & Alpheus, G. A. (2017). Susceptibility of beta haemolytic *Escherichia coli* to commonly used antibiotics in selected hospitals in Delta State, Southern Nigeria. *Arc Clin Microbiol*, 8(2), 36.
- Aghamali**, M.; Sedighi, M.; Mohammadzadeh, N.; Abbasian, S.; Ghafouri, Z. and Kouhsari, E. (2019). Fosfomycin: mechanisms and the increasing prevalence of resistance. *Journal of medical microbiology*, 68(1), 11-25.

- Ahmed**, S. S.; Shariq, A.; Alsalloom, A. A.; Babikir, I. H.; and Alhomoud, B. N. (2019). Uropathogens and their antimicrobial resistance patterns: Relationship with urinary tract infections. *International journal of health sciences*, 13(2): 48-55.
- Alteri**, C. J., & Mobley, H. L. (2007). Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infection and immunity*, 75(6), 2679-2688.
- Ali**, K., Malahat, A., & Mahdi, D. (2014). Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis.
- Banerjee**, R.; and Johnson, J. R. (2014). A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(9): 4997-5004.
- Barnhart**, M. M., and Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 131–147.
- Basak**, S.; Singh, P. and Rajurkar, M. (2016). Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. *Journal of Pathogens* . 1-5.
- Behzadi**, P., Urbán, E., & Gajdács, M. (2020). Association between biofilm-production and antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): an in vitro study. *Diseases*, 8(2), 17.
- Belyayeva**, M., & Jeong, J. M. (2019). Acute Pyelonephritis.[Updated 2019 Feb 28]. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*, 10-14.
- Bhattacharyya**, S.; Sarfraz, A.; Ansari, M. A. A. and Jaiswal, N. (2015). Characterization and antibiogram of Uropathogenic *Escherichia coli* from a tertiary care hospital in Eastern India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 4(2): 701-705.

- Bien, J.;** Sokolova, O. & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International journal of nephrology*, 2012.
- Blanc, V.;** Leflon-Guibout, V.; Blanco, J.; Haenni, M.; Madec, J. Y.; Ragainon, G. *et al.* (2014). Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M producing *Escherichia coli* comprising O25b: H4 and O16: H5 ST131 strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5): 1231-1237.
- Bray, J.** (1945). Isolation of antigenically homogeneous strains of Bacteria *E. coli* neop olitanum from summer diarrhea of infants. *J Pathol Bacteriol.* 57:239-247.
- Brombacher, E.,** Baratto, A., Dorel, C., & Landini, P. (2006). Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *Journal of bacteriology*, 188(6), 2027-2037.
- Burke, L.;** Humphreys, H.; and Fitzgerald-Hughes, D. (2016). The molecular epidemiology of resistance in cefotaximase-producing *Escherichia coli* clinical isolates from Dublin, Ireland. *Microbial Drug Resistance*, 22(7): 552-558.
- Christensen, G. D.,** Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
- Cordeiro, M. A.,** Werle, C. H., Milanez, G. P., & Yano, T. (2016). Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *brazilian journal of microbiology*, 47, 414-416.

- Daga**, A. P.; Koga, V. L.; de Matos, C. M.; Perugini, M. R. E.; Pelisson, M.; Kobayashi, R. K. T.; and Vespero, E. C. (2019). *Escherichia coli* bloodstream infection in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9: 191.
- Demirci**, M.; Ünlü, Ö.; and Tosun, A. I. (2019). Detection of O25b-ST131 clone, CTX M-1 and CTX-M-15 genes via real-time PCR in *Escherichia coli* strains in patients with UTIs obtained from a university hospital in Istanbul. *Journal of Infection and Public Health*, 12(5): 640-644.
- Eid**, H. I., Algammal, A. M., Nasef, S. A., Elfeil, W. K., & Mansour, G. H. (2016). Genetic variation among avian pathogenic *E. coli* strains isolated from broiler chickens. *Asian J. Anim. Vet. Adv*, 11(6), 350-356.
- Flemming**, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Fonseca**, É. L., Vieira, V. V., Cipriano, R., & Vicente, A. C. (2005). Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44(3), 303-309.
- Forsyth**, V. S., Armbruster, C. E., Smith, S. N., Pirani, A., Springman, A. C., Walters, M. S., ... & Mobley, H. L. (2018). Rapid growth of uropathogenic *Escherichia coli* during human urinary tract infection. *MBio*, 9(2).
- Foster**, P. L., Lee, H., Popodi, E., Townes, J. P., & Tang, H. (2015). Determinants of spontaneous mutation in the bacterium *Escherichia coli* as revealed by whole genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), E5990-E5999.
- Foxman**, B., Manning, S. D., Tallman, P., Bauer, R., Zhang, L., Koopman, J. S., ... & Marrs, C. F. (2002). Uropathogenic *Escherichia coli* are more

likely than commensal *E. coli* to be shared between heterosexual sex partners. *American journal of epidemiology*, 156(12), 1133-1140.

Fulop, T. (2019). Acute pyelonephritis. Medscape (On line). Available: <https://emedicine.medscape.com/article/245559-overview#a3>.

Garau, J.(2006). Impact of antibiotic restrictions: The ethical perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 16–24.

Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.; Chairman, J.; Boone, D. R.; Chairman, V.; Devos, P.; Goodfellow, M.; Rainey, F. A. and Schleifer, K-H. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol Two. Part B. 2nded. Springer. USA. PP 1106.

Gawad, W. E.; Helmy, O. M.; Tawakkol, W. M. and Hashem, A. M. (2018). Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, And Phylogenetic Grouping of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Egypt: The Role of Efflux Pump Mediated Resistance. *Jundishapur J. Microbiol.* 11(2):1-7.

Gharbi, M., Drysdale, J. H., Lishman, H., Goudie, R., Molokhia, M., Johnson, A. P., ... & Aylin, P. (2019). Antibiotic management of urinary tract infection in elderly patients in primary care and its association with bloodstream infections and all cause mortality: population based cohort study. *Bmj*, 364.

Ghodousi, A. (2016). Comparison of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from human, foods and animals to investigate the possible chains of transmission. Ph.D. Thesis, Department of Biology and Medical Biotechnology, Italy.

González-Alba, J. M.; Baquero, F.; Canton, R.; and Galán, J. C. (2018). Reconstruction of *Escherichia coli* ancient diversification by layered phylogenomics and polymorphism fingerprinting. *BioRxiv*, 486399.

- Guiral**, E.; Pons, M. J.; Vubil, D.; Marí-Almirall, M.; Sigaúque, B.; Soto, S. M. et al. (2018). Epidemiology and molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates harboring blaCTX-M group 1 extended-spectrum β lactamases causing bacteremia and urinary tract infection in Manhiça, Mozambique. *Infection and drug resistance*, 11: 927- 936.
- Gutman**, T., Goren, G., Efroni, O., & Tuller, T. (2021). Estimating the predictive power of silent mutations on cancer classification and prognosis. *NPJ Genomic Medicine*, 6(1), 1-15.
- Hamzah**, W. K.; and Khan M. Y. (2017). Isolation and molecular characterization of bacteria from urinary tract infections. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(9): 810-825.
- Hannan**, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A., & Hultgren, S. J. (2012). Host–pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS microbiology reviews*, 36(3), 616-648.
- Hilal**, S. A. (2016). Investigation of the adhesion gene fimH of *Escherichia coli* bacteria isolated from urinary tract patients in Al-Diwaniyah city. B.Sc. Research, Department of Biology, College of science, University of Al-Qadisiyah, Iraq.
- Hilty**, M.; Betsch, B. Y.; Bögli-Stuber, K.; Heiniger, N.; Stadler, M.; Küffer, M. et al. (2012). Transmission dynamics of extended-spectrum β - lactamase–producing Enterobacteriaceae in the tertiary care hospital and the household setting. *Clinical infectious diseases*, 55(7): 967-975.
- Hossain**, M., Tabassum, T., Rahman, A., Hossain, A., Afroze, T., Momen, A. M. I., ... & Colwell, R. R. (2020). Genotype–phenotype correlation of β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains from Bangladesh. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.

- Huang, J., Lan, F., Lu, Y., & Li, B. (2020).** Characterization of integrons and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* sequence type 131 isolates. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020.
- Hufnagel, D. A., Depas, W. H., and Chapman, M. R. (2015).** The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiol. Spectr.* 3, 249–273.
- Hussein, A. A. (2019).** Distribution of ESBLs and multidrug resistance among Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Patients with First Time and Recurrent Urinary Tract Infection: A comparison study. M.Sc. Thesis, College of science, University of Wasit, Iraq.
- Iswara, A. (2015).** Pola sensitivitas *Escherichia coli* terhadap antibiotik metronidazole. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional*.
- Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Nawaz, M.A.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M. and Kamil, M.A. (2018).** Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med Assoc.* 81, 7–11.
- Jawetz, E.; Melnick, J. A. and Adelberg, E. A. (2016).** Review of Medical Microbiology 27th ed. McGraw-Hill education, Inc : 851pp.
- Kapoor, J.; Saigal, S. and Elongavan, A. (2017).** Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 33(3):300-305.
- Karan, S., Choudhury, D., & Dixit, A. (2021).** Immunogenic characterization and protective efficacy of recombinant CsgA, major subunit of curli fibers, against *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(2), 599-616.
- Karigoudar, R. M., Karigoudar, M. H., Wavare, S. M., & Mangalgi, S. S. (2019).** Detection of biofilm among uropathogenic *Escherichia coli* and its correlation with antibiotic resistance pattern. *Journal of laboratory physicians*, 11(01), 017-022.

- Kashif, J., Buriro, R., Memon, J., Yaqoob, M., Soomro, J., Dongxue, D., ... & Liping, W.** (2013). Detection of class 1 and 2 integrons, β -lactamase genes and molecular characterization of sulfonamide resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from poultry in China. *Pak. Vet. J*, 33(3), 321-324.
- Khan, F. Z., Nawaz, T., Mirani, Z. A., Khan, S., Raza, Y., & Kazmi, S. U.** (2018). Study of class 1 integrons in multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different hospitals in Karachi. *Iranian journal of basic medical sciences*, 21(10), 1079.
- Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S., and Yoshida, S.** (2005). Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol. Immunol.* 49, 875–884.
- Klemm, P., Vejborg, R. M., & Hancock, V.** (2010). Prevention of bacterial adhesion. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(2), 451-459.
- Kotsyuba, K. R.; Voronkova, O. S.; Vinnikov, A. I. and Shevchenko, T. M.** (2014). Mechanisms of Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Family Representatives. *Visn Dnìpropetr Unìv Ser Bìol Med.* 5(1): 33-38.
- Köves, B., & Wullt, B.** (2016). The roles of the host and the pathogens in urinary tract infections. *European Urology Supplements*, 15(4), 88-94.
- Kudinha, T.** (2017). The pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Escherichia coli—Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. InTech*, 45-61.
- Laird, T.** (2016). *Isolation and genomic characterization of bacteriophages targeting extended-spectrum cephalosporin resistant E. coli* (Doctoral dissertation, Murdoch University).
- Lebeaux, D.; Ghigo, J.-M. and Beloin, C.** (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental

Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.*78, 510–543.

Lee, D. S.; Lee, S. J.; and Choe, H. S. (2018). Community-acquired urinary tract infection by *Escherichia coli* in the era of antibiotic resistance. *BioMed research international*, 2018: Article ID 7656752, 14 pages.

Lee, H. S.; and Le, J. (2018). Urinary Tract Infections: a review. *PSAP 2018 Book 1. Infectious Diseases*, 7-28.

Levinson, W. (2016). *Review of Medical Microbiology and Immunology*. 14th ed. McGraw-Hill education, Inc. PP 821.

Lindstedt, B. A., Finton, M. D., Porcellato, D., & Brandal, L. T. (2018). High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. *BMC infectious diseases*, 18(1), 1-12.

Long, H., Miller, S. F., Strauss, C., Zhao, C., Cheng, L., Ye, Z., ... & Lynch, M. (2016). Antibiotic treatment enhances the genome-wide mutation rate of target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(18), E2498-E2505.

Lupino, K. M., Romano, K. A., Simons, M. J., Gregg, J. T., Panepinto, L., Cruz, G. M., ... & Hecht, G. B. (2018). A recurrent silent mutation implicates *fecA* in ethanol tolerance by *Escherichia coli*. *BMC microbiology*, 18(1), 1-17.

Mathers, A. J.; Peirano, G.; and Pitout, J. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*, 28(3): 565-591.

- Mazzariol, A.; Bazaj, A.; and Cornaglia, G. (2017).** Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy*, 29(s1): 2-9.
- Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017).** Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)*, 35(7), 426-433.
- Mishra, S. K.; Basukala, P.; Basukala, O.; Parajuli, K.; Pokhrel, B. M. and Rijal, B. P. (2015).** Detection of Biofilm Production and Antibiotic Resistance Pattern in Clinical Isolates from Indwelling Medical Devices. *Springer*. 70: 128–134.
- Mittal, S.; Sharma, M. and Chaudhary, U. (2014).** Study of Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* and its Antibiotic Susceptibility Pattern. *Indian J Pathol Microbiol*. 57(1): 61-64.
- Moghadas Kasani, F., Salehzadeh, A., & Jalali, A. (2020).** Relationship between flu and *csgA* Virulence Genes and Biofilm Production in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 10(4), 2775-2785..
- Moori, B. N., & Javadmakoei, S. (2017).** Survey on Biofilm Production and Presence of Attachment Factors in Human Uropathogenic Strains of *Escherichia coli*.
- Munkhdelger, Y., Gunregjav, N., Dorjpurev, A., Juniichiro, N., & Sarantuya, J. (2017).** Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(01), 51-57.

- Murugan, S., Devi, P. U., & John, P. N. (2011).** Antimicrobial susceptibility pattern of biofilm producing *Escherichia coli* of urinary tract infections. *Current Research in bacteriology*, 4(2), 73-80.
- Nairoukh, Y. R.; Mahafzah, A. M.; Irshaid, A.; and Shehabi, A. A. (2018).** Molecular characterization of multidrug resistant uropathogenic *E. coli* isolates from Jordanian patients. *The open microbiology journal*, 12: 1-7.
- Namaei, M. H.; Yousefi, M.; Ziaee, M.; Salehabadi, A.; Ghannadkafi, M.; Amini, E.; and Askari, P. (2017).** First report of prevalence of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* O25b/ST131 from Iran. *Microbial Drug Resistance*, 23(7): 879- 884.
- Nascimento LL, Conceição Natália, Silva Paulo Roberto da, Oliveira Adriana Gonçalves, França Júnior Luiz Carlos de, and pelli,A. (2012)** Padronização de procedimentos para coleta e semeadura de microorganismos em ambientes aquáticos neotropicais mesotróficos. *Revista UNINGÁ Review* 12(1): 54-57.
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014).** *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 543-574.
- O'Brien, D., Laurison, D., Miles, A., & Friedman, S. (2016).** Are the creative industries meritocratic? An analysis of the 2014 British Labour Force Survey. *Cultural Trends*, 25(2), 116-131.
- Odetoyin, B. W., Labar, A. S., Lamikanra, A., Aboderin, A. O., & Okeke, I. N. (2017).** Classes 1 and 2 integrons in faecal *Escherichia coli* strains isolated from mother-child pairs in Nigeria. *PLoS One*, 12(8), e0183383.
- Okonko, I. O. Ijandipe, L. A., Ilusanya, A. O., Donbraye-Emmanuel, O. B., Ejembi, J., Udeze, A. O., ... & Nkang, A. O. (2010).** Detection of urinary tract infection (UTI) among pregnant women in Oluyoro Catholic

Hospital, Ibadan, South-Western Nigeria. *Malaysian journal of Microbiology*, 6(1), 16-24.

Oliveira, R. V.; Oliveira, M. C. & Pelli, A. (2017). Disease infection by Enterobacteriaceae family in Fishes: a review. *J Microbiol Exp*, 4(5), 00128.

Olowe, B.; Oluyeye, J.; Famurewa, O.; Ogunniran, A. & Adelegan, O. (2017). Molecular identification of Escherichia coli and new emerging enteropathogen, Escherichia fergusonii, from drinking water sources in Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria. *J. Microbiol. Res*, 7, 45-54.

Owens III, A. P., & Mackman, N. (2011). Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation research*, 108(10), 1284-1297.

Paltansing, S. (2015). Antimicrobial Resistance In Enterobacteriaceae : Characterization and Detection . Leiden University. 155pp.

Pai, M., Flores, L. L., Pai, N., Hubbard, A., Riley, L. W., & Colford Jr, J. M. (2003). Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 3(10), 633-643.

Pollann, M. (2019). CBD Oil For Urinary tract infection (UTI): A Comprehensive Guide to Treating UTI Using CBD Oil. Independently published.

Polse, R.F.; Yousif, S. Y. and Assafi, M. S. (2016). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Uropathogenic *E. coli* Among People in Zakho, Iraq. *Int J Res Med Sci*. 4(4): 1219-1223.

Poursina, F., Sepehrpour, S., & Mobasherizadeh, S. (2018). Biofilm formation in nonmultidrug-resistant Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan, Iran. *Advanced biomedical research*, 7.

- Raeispour**, M. and **Ranjbar**, R. (2018). Antibiotic Resistance, Virulence Factors and Genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains. *Antimicrob Resist Infect Control*. 7(118):1-9.
- Raheel Jahangir**, J., & **Sher Ali**, K. (2015). E. coli resistance to ciprofloxacin and common associated factors.
- Raka**, L.; **Mulliqli-Osmani**, G.; **Kurti**, A.; **Bajrami**, R.; and **Lila**, G. (2016). Urinary Tract Infections. SM. Group , pp.11.
- Ramírez-Castillo**, F.Y.; **Moreno-Flores**, A.C.; **Avelar-González**, F.J.; **Márquez-Díaz**, F.; **Harel**, J.; **Guerrero-Barrera**, A.L. 2018. An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: Cross-sectional study. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 17, 34.
- Ranjan**, K. P., **Ranjan**, N., **Chakraborty**, A., & **Arora**, D. R. (2010). An approach to uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Journal of laboratory physicians*, 2(02), 070-073.
- Ravi**, I.; **Baunthiyal**, M. and **Saxena**, J. (2014). *Advances in Biotechnology*. Springer. India. PP.259.
- Roesch**, P. L., **Redford**, P., **Batchelet**, S., **Moritz**, R. L., **Pellett**, S., **Haugen**, B. J., ... & **Welch**, R. A. (2003). Uropathogenic *Escherichia coli* use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. *Molecular microbiology*, 49(1), 55-67.
- Rosser**, S. J., & **Young**, H. K. (1999). Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(1), 11-18.
- Rubin**, R. H., **Shapiro**, E. D., **Andriole**, V. T., **Davis**, R. J., & **Stamm**, W. E. (1992). Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infection. *Clinical Infectious Diseases*, 15(Supplement_1), S216-S227.

- Sahu, C., Jain, V., Mishra, P., & Prasad, K. N.** (2018). Clinical and laboratory standards institute versus European committee for antimicrobial susceptibility testing guidelines for interpretation of carbapenem antimicrobial susceptibility results for *Escherichia coli* in urinary tract infection (UTI). *Journal of laboratory physicians*, *10*(03), 289-293.
- Sachdeva, S., Palur, R. V., Sudhakar, K. U., & Rathinavelan, T.** (2017). E. coli group 1 capsular polysaccharide exportation nanomachinery as a plausible antivirulence target in the perspective of emerging antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, *8*, 70.
- Sambrook, R. J.** (2011). Are foreign correspondents redundant? The changing face of international news. *Reuters Institute for the Study of Journalism*, 1-102.
- Sanchez, G. V.; Babiker, A.; Master, R. N.; Luu, T.; Mathur, A.; and Bordon, J.** (2016). Antibiotic resistance among urinary isolates from female outpatients in the United States in 2003 and 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *60*(5): 2680-2683.
- Sarowska, J.; Futoma-Koloch, B.; Jama-Kmiecik, A.; Frej-Madrzak, M.; Ksiazczyk, M.; Bugla-Ploskonska, G.; and Choroszy-Krol, I.** (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*, *11*(1): 10.
- Schaffer, J. N., Norsworthy, A. N., Sun, T. T., & Pearson, M. M.** (2016). *Proteus mirabilis* fimbriae-and urease-dependent clusters assemble in an extracellular niche to initiate bladder stone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(16), 4494-4499.
- Schembri, M. A.; Zakour, N. L. B.; Phan, M. D.; Forde, B. M.; Stanton-Cook, M.; and Beatson, S. A.** (2015). Molecular characterization of the

multidrug resistant *Escherichia coli* ST131 clone. *Pathogens*, 4(3): 422-430.

Shakibaie, M., Forootanfar, H., Golkari, Y., Mohammadi-Khorsand, T., & Shakibaie, M. R. (2015). Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 235-241.

Shariff, A.; Shenoy, M. S.; Yadav, T. and Radhakrishna, M. (2013). The Antibiotic Susceptibility Patterns of Uropathogenic *Escherichia coli*, with Special Reference to the Fluoroquinolones. *J Of Clin And Dia Res*. 7(6): 1027-1030.

Silva, D. P.; Schofield, M. C.; Parsek, M. R. and Tseng, B. S. (2017). An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. *Pathogens*. 6(51): 1-9.

Singh, T., Das, S., Ramachandran, V. G., Wani, S., Shah, D., Maroof, K. A., & Sharma, A. (2017). Distribution of integrons and phylogenetic groups among enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from children < 5 years of age in Delhi, India. *Frontiers in microbiology*, 8, 561.

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

Smith, A. (2018). Metronidazole resistance: a hidden epidemic?. *British dental journal*, 224(6), 403-404.

Soto, S. M. (2013). Role of Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of Bacteria Embedded in a Biofilm. *Virulence*. 4(3): 223-229.

Soto, S. M. (2014). Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Advances in Biology*. 13pp.

- Stoppe, C.,** Goetzenich, A., Whitman, G., Ohkuma, R., Brown, T., Hatzakorzian, R., ... & Heyland, D. K. (2017). Role of nutrition support in adult cardiac surgery: a consensus statement from an International Multidisciplinary Expert Group on Nutrition in Cardiac Surgery. *Critical Care, 21*(1), 1-16.
- Stein, R.;** Dogan, H. S.; Hoebeke, P.; Kočvara, R.; Nijman, R. J.; Radmayr, C. & Tekgül, S. (2015). Urinary tract infections in children: EAU/ESPU guidelines. *European urology, 67*(3), 546-558.
- Szijártó, V.,** Lukasiewicz, J., Gozdiewicz, T. K., Magyarics, Z., Nagy, E., & Nagy, G. (2014). Diagnostic potential of monoclonal antibodies specific to the unique O-antigen of multidrug-resistant epidemic *Escherichia coli* clone ST131-O25b: H4. *Clinical and Vaccine Immunology, 21*(7), 930-939.
- Tabasi, M.;** Karam, M. R. A.; Habibi, M.; Mostafavi, E. & Bouzari, S. (2016). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from patients with acute cystitis, pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 10*(12), DC01.
- Tajbakhsh, E.,** Ahmadi, P., Abedpour-Dehkordi, E., Arbab-Soleimani, N., & Khamesipour, F. (2016). Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrobial Resistance & Infection Control, 5*(1), 1-8.
- Terlizzi, M. E.;** Gribaudo, G.; and Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in microbiology, 8*: 1566.

- Tille, C., & van Wincoop, E.** (2014). International capital flows under dispersed private information. *Journal of International Economics*, 93(1), 31-49.
- Tsai, W. L., Miller, C. E., & Richter, E. R.** (2000). Determination of the sensitivity of a rapid Escherichia coli O157: H7 assay for testing 375-gram composite samples. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 4149-4151.
- Vasudevan, S., Thamil Selvan, G., Bhaskaran, S., Hari, N., & Solomon, A. P.** (2020). Reciprocal cooperation of type A procyanidin and nitrofurantoin against multi-drug resistant (MDR) UPEC: a pH-dependent study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 421.
- Versporten, A., Bielicki, J., Drapier, N., Sharland, M., Goossens, H., ARPEC Project Group, ... & Bell, E.** (2016). The Worldwide Antibiotic Resistance and Prescribing in European Children (ARPEC) point prevalence survey: developing hospital-quality indicators of antibiotic prescribing for children. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(4), 1106-1117.
- Vigil, G. D., Winebarger, A. R., Kobayashi, K., Cheimets, P. N., Champey, P. R., Savage, S. L., ... & Walsh, R. W.** (2021). Marshall Grazing Incidence X-ray Spectrometer Slitjaw Imager Implementation and Performance. *Solar Physics*, 296(6), 1-16.
- Vigil, P. D., Wiles, T. J., Engstrom, M. D., Prasov, L., Mulvey, M. A., & Mobley, H. L.** (2012). The repeat-in-toxin family member TosA mediates adherence of uropathogenic Escherichia coli and survival during bacteremia. *Infection and immunity*, 80(2), 493-505.
- Wagenlehner, F. M. E.; and Naber, KG.** (2015). Urinary Tract Infections- General. Antimicrob

- Wang, C., Li, Q., Lv, J., Sun, X., Cao, Y., Yu, K., ... & Wang, Q.** (2020). Alpha-hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* induces GM-CSF-mediated acute kidney injury. *Mucosal immunology*, 13(1), 22-33.
- Wasiński, B.** (2019). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*–threat connected with food-borne infections. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(4), 532-537.
- Welch, R.A.** (2006) . The Genus *Escherichia*. *Prokaryotes*. 6:60–71
- Werneburg, I., Hinz, J. K., Gumpenberger, M., Volpato, V., Natchev, N., & Joyce, W. G.** (2015). Modeling neck mobility in fossil turtles. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 324(3), 230-243.
- Wu, G., Carter, B., Mafura, M., Liebana, E., Woodward, M. J., & Anjum, M. F.** (2008). Genetic diversity among *Escherichia coli* O157: H7 isolates and identification of genes linked to human infections. *Infection and immunity*, 76(2), 845-856.
- Wu, H.; Moser, C.; Wang, H.-Z.; Høiby, N. and Song, Z.-J.** (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7, 1–7.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Cruz-Cordova, A., Cazares-Dominguez, V., Escalona-Venegas, G., Zavala-Vega, S., Arellano-Galindo, J., ... & Luna-Pineda, V. M.** (2019). Uropathogenic *Escherichia coli* strains harboring *tosA* gene were associated to high virulence genes and a multidrug-resistant profile. *Microbial pathogenesis*, 134, 103593.
- Yasir, M., Ajlan, A. M., Shakil, S., Jiman-Fatani, A. A., Almasaudi, S. B., Farman, M., ... & Azhar, E. I.** (2018). Molecular characterization, antimicrobial resistance and clinico-bioinformatics approaches to address the problem of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in western Saudi Arabia. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.

- Yaratha, G., Perloff, S., & Changala, K. (2017).** Lactose vs Non-Lactose Fermenting *E. coli*: Epidemiology, Clinical Outcomes, and Resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, 4(Suppl 1), S589–S590.
- Zaman, S. B.; Hussain, M. A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K. T. and Hossain, N. (2017).** A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. 9(6): 1-9.
- Zimmermann, K. A. (2018).** Urinary System: Facts. *Functions & Diseases*.

Summary

Twenty-four *E. coli* isolates were obtained, and by studying the phenotypic characteristics and biochemical assays, the bacteria appeared on Macunkey medium fermented with lactose sugar, and the color of the colonies was pink, indicating that they were Gram-negative bacteria by lactose fermentation, while the non-fermented colonies appeared The lactose is clear and colorless, as (vitek2) assay showed that all samples under study belong to *E. coli* bacteria.

As for the results of biochemical tests, it was found that the bacteria contain the capsule, as the capsules are determinants of important virulence elements, which enable pathogenic bacteria to evade or confront the non-specific host defense during the early (pre-immune) stage of infection, As for the results of the tests on the blood agar medium, the colonies were analyzed with a percentage of (79.1%) for blood (type of alpha hemolysis).

The results of biofilm formation through the tube method showed variation in terms of biofilm formation. The number of isolates that formed a strong biofilm was 8 (33.3%), which formed an average biofilm of 10 (41.7%), and finally the number of isolates that formed a weak biofilm 6 (25%).

The sensitivity and resistance of *E. coli* isolates to ten different antibiotics were selected based on their use in treating infections, including urinary tract infection. The bacteria were varied in their resistance and sensitivity to these tested antibiotics, as all isolates were multi-drug resistance (MDR). The results of the rate of isolates resistance to antibiotics were variable among the antibiotics. The highest percentage

of resistance was against penicillin (100%) and metronidazole 100 (%), followed by trimethoprin sulphamethoxazole (87.5%) and nalidixic acid (87.5%).) Then Norfloxacin (75%) and Ciprofloxacin (75%), while the sensitivity of bacteria against some antibiotics was (37.5%, 33.3% and 12.5%) for each of Gentamicin, Nitrofurantoin and Amikacin, respectively.

DNA was extracted from all isolates under study, and polymerase chain reaction was used to investigate the genes of virulence factors (tosA gene, csgA gene and 1 integrin class), the results showed that all isolates contained the mentioned genes.

On the other hand, the results of the genetic sequencing of the *tosA* gene showed that there is a substitution of different nucleotides between 10 isolates of the local *E. coli* bacteria and QJF95785.1 *E. coli* isolates, and they showed high transitional substitutions between nucleotides (C) that were replaced by nucleotides (T).

At the same time, this change did not affect the nucleotides in the histidine, so there was no change in the shape of the protein (hemolysin activation protein) produced by the *tosA* gene.



**University of Kerbala
College of Science
Department of Biology**

**Molecular characterization of some virulence
factors in *Escherichia coli* Isolated from
Urinary Tract infections in Sacred Karbala
province**

A thesis

**Submitted to the council of the
College of Science – University of Kerbala**

**In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of
Science in Biology**

By

Alaa Abdulameer Azeez Al-Yasi

Supervised by

Prof.

Dr.Kawkab A.H. Alsaadi

1443 A.H

2022 A.D