جامعة كربلاء
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التوصيف الجزيئي لبكتيريا الاشيرشيا القولونية المعزولة من الأطفال المصابين بالإسهال في محافظة كربلاء .

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

كتبت بوساطة الطالبة : هدى عباس محمد الطهمازي

بإشراف الاستاذ الدكتور علي عطية عبد الحسناوي

رمضان ـ ١٤٤٤ ه نيسان – ٢٠٢٣ م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ)

صدق الله العلي العظيم

المجادلة : ١١

إقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافِ في جامعة كربلاء / بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في قسم علوم الحياة .

التوقيع :

الاسم : د. علي عطية عبد الحسناوي

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : 6 / 4 /2023

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على توصيات المشرف أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها

التوقيع :

الاسم : د. خالد علي حسين

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : 6 / 4 /2023

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة ، نشهد بأننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (التوصيف الجزيئي لبكتيريا الاشيرشيا القولونية المعزولة من الأطفال المصابين بالإسهال في محافظة كربلاء) و ناقشنا الطالبة (هدى عباس محمد) في محتوياتها و فيما له علاقة بها بتأريخ 20 / 8 /2023 و نرى أنه جديرة لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة .

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع :

الاسم : د. وفاء صادق محسن

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التأريخ : ١١ / ٩ /2023

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم :.د. بلقيس عبد علي عبد عون

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل : / المعهد التقني / جامعة الفرات الأوسط

التأريخ : ١٢/ ٩ /2023

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. عزيز ياسر حسن

المرتبة العلمية : مدرس

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التأريخ : ١٢/ ٩ /2023

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :

الاسم : د. علي عطية عبد الحسناوي

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التأريخ ١٤/ ٩ / 2023

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع :

الاسم :.د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية : استاذ

التأريخ : ٢٥/ ٩ /2023

الاهداء

إلى نور عيني وسندي في الحياة . . امي الغالية ذات القلب الحنون .

إلى . . من أصر وساهم في وصولي الى سلم التعلم والدي الغالي .

إلى . . أحبتي والسند . . اخواتي واخواني الأعزاء .

إلى . . من وقف الى جانبي زوجي و رفيق عمري .

إلى فلذات كبدي . . أولادي.

الباحثة

شكر و تقدير

الحمد و الثناء لله رب العالمين والصلاة والسلام على خاتم النبيين سيدنا محمد وآل بيته الطيبين الطاهرين .

اتقدم بالشكر الجزيل وخالص الامتنان والتقدير إلى الأستاذ الدكتور (علي عطية عبد) لتفضله بالإشراف على هذه الرسالة و لكل ما قدمه من آراء ونصائح وتوجيهات علمية ، و لجهوده القيمة ومساعدته لإتمام الرسالة و جهوده المبذولة في التحليل الاحصائي و التوجيهات التي قدّمها للتنسيق في كتابة الرسالة ، كما اتقدم بالشكر والعرفان إلى كل الأساتذة الذين ساهموا في مسيرتي العلمية وما قدموه من اهتمام ونصائح حتى اصل الى هذا المستوى العلمي .

و شكري وتقديري إلى كل العاملين في مستشفى الاطفال التعليمي وعلى وجه الخصوص وحدة المختبر لما قدموه من مساعدة وتسهيلات .

خالص الامتنان والشكر إلى العاملين في مختبر الصحة العامة وأخص بالشكر وحدة تحضير الأوساط الزرعية و وحدة الأحياء المجهرية ، واشكر زملائي و زميلاتي من طلبة الدراسات العليا وكل من ساعدني بنصيحة او فعل .

الباحثة

الخلاصة Summary

هدفت هذه الدراسة إلى التحري عن بكتيريا اشريشيا القولون *Escherichia coli* التي تسبب الإسهال في الأطفال، و ايضاً عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتيريا اشريشيا القولون المعزولة من براز الاطفال دون عمر(٥ سنوات) المصابين بأعراض الاسهال وعلاقتها بمقاومة المضادات الحياتية بوصفها العامل المسبب الرئيس في الاسهال، فقد جمعت ١٠٠ عينة براز سريرية من الأطفال المراجعين الخارجين والداخلين لمستشفى الاطفال التعليمي في مدينة كربلاء المقدسة ، للمدة من ٢ / ٢ / ٢٠٢٢ ولغاية ١٥ / ٦ / ٢٠٢٢ ، و زرعت العينات في اوساط زرعية عدة ، ثم شخصت العزلات البكتيرية باستعمال تقنية الفايتك ٢ Vitek ، بعد ذلك تم إجراء اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية ، ثم خضعت ٤٠ عزلة من بكتيريا *E. coli* إلى الكشف الجزيئي بتقنية PCR ، وكان اختيار العينات بالاعتماد على فحص عينة البراز تحت المجهر الضوئي والتي كانت حاوية على الخلايا الالتهابية pus cells أو خلايا الدم الحمر Red blood cells .

أظهرت النتائج إنّ نسبة إصابة الذكور بالإسهال بلغت ٥٧.٥٪ (٤٦)، و هي أعلى من نسبة اصابة الاناث ٤٢.٥% (٣٤) ، و بيّن التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي بين الذكور والإناث المصابين ($P < ٠.٠٥$) . إذ كانت الفئة العمرية (١١-١) شهر كان فيها عدد الأطفال المصابين ٤٢.٥% (٣٤) ، والفئة العمرية (٢٣-١٢) شهر كان فيها عدد الاطفال المصابين ٢٦.٢٥% (٢١) ، و الفئة العمرية (٣٥-٢٤) شهر كان عدد الاطفال المصابين فيها ٢٠٪ (١٦)، بينما الفئة العمرية (٤٧-٣٦) شهر كان فيها عدد الأطفال المصابين ٨.٧٥% (٧) ، وكان في الفئة العمرية (٥٩-٤٨) شهر عدد الاطفال المصابين ٢.٥% (٢) ، إتضح مما سبق إنّ عدد الأطفال المصابين أعلى في الفئة العمرية (١١-١) شهر . إنّ عدد الأطفال الذين يقطنون في مناطق عشوائيات الأحياء السكنية ٦٥٪ (٥٢) ، وهم أكثر عرضة وبصورة معنوية ($P < ٠.٠٥$) للإصابة بالإسهال بالمقارنة مع عدد إصابة الأطفال الذين يقطنون الأحياء السكنية ٣٥٪ (٢٨) ، لوحظ إنّ عدد الأطفال الذين آباءهم يزاولون مهن حرة ٧٦.٢٥٪ (٦١) كانوا أكثر عرضة للإصابة بالإسهال وبصورة معنوية ($P < ٠.٠٥$) بالمقارنة مع الأطفال الذين آباءهم موظفين ٢٣.٧٥٪ (١٩) .

أظهرت نتائج فحص الحساسية إنّ (٤٠) ١٠٠٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Ampicillin وهي أعلى نسبة مقاومة ، تليها (٣٤) ٨٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Co-Trimoxazole ، بعدها (٣٣) ٨٢.٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Cefotaxime ، و من ثم (٢٩)٧٢.٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Ceftriaxone ، و (٢٦) ٦٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Tetracycline و (٢١)٥٢.٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Azthromycine ، تتبعها(٢٠)٥٠٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Doxycycline ، و (١٥) ٣٧.٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Ciprofloxacin ،

(٦) ١٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Gentamycin و أخيراً (٣) ٧.٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Amikacin وهي أقل نسبة مقاومة .

أظهرت نتائج الكشف الجزيئي إنّ (٢٠) ٥٠٪ عزلة بكتيرية حاملة للجينات (*stx١,stx٢,eae,bfpA*) ، والتي تعود للأنواع المرضية pathotypes لبكتيريا *E. coli* المسببة للإسهال Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) ، وإنّ (١٠) ٥٠٪ عزلات للبكتيريا الممرضة للأمعاء Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ، و(١٠) ٥٠٪ عزلات حاملة لجينين معا (*stx١ & stx٢*) تعود للبكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء Enterohemorrhagenic *E. coli* (EHEC)،لوحظ عدم وجود فرق معنوي واضح بين السلالتين ($P > ٠.٠٥$) ، وكان من ضمن عزلات البكتيريا الممرضة للأمعاء العشرة (٨) ٨٠٪ عزلات بكتيرية حاملة للجين (*eae*) تعود للبكتيريا الممرضة للأمعاء غير المثالية atypical Enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) ، وعزلتان ٢٠٪ حاملة لجينين معا (*eae &bfpA*) تعود للبكتيريا الممرضة للأمعاء المثالية typical Enteropathogenic *E. coli*(tEPEC)،وتبين من التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي واضح بين النوعين لهذه البكتيريا ($P < ٠.٠٥$)

أظهرت النتائج إنّ (١٢) ٦٦٪ عزلة حاملة للجين *CTX-M* ، و وهي الأعلى معنوياً ($P < ٠.٠٥$) من العزلات الحاملة للجين *TEM* و التي كانت بواقع (٦) ٣٣٪ عزلة ، ولم يظهر الجين *SHV* في أي عزلة من العزلات .

علاوة على ذلك ، فإنّ نتائج الدراسة الحالية أوضحت إنّ بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء موجودة بنسبة أعلى في الذكور (٦) ٦٠٪ بالمقارنة مع نسبة وجودها في الإناث (٤) ٤٠٪ ، ولكن بصورة غير معنوية ($P>٠.٠٥$) ، و أمّا بكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء فكانت موجودة في الإناث بنسبة (٧) ٧٠٪ أكثر من وجودها في الذكور (٣) ٣٠٪ ، وبصورة معنوية تقريباً ($P< ٠.٠٥$) .

أظهرت النتائج إنّ بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء كانت موجودة في الفئة العمرية (١١-١) شهر بعدد (٦) ٦٠% عزلة ، و في الفئة (٢٣-١٢) شهر بعدد (٢) ٢٠% عزلة ، تليها الفئة العمرية (٣٥-٢٤) شهر بعدد ١(١٠%)عزلة ، و الفئة العمرية (٤٧-٣٦) شهر بعدد (١) ١٠٪ عزلة، ولم تظهر في الفئة العمرية(٥٩-٤٨) شهر .

أظهرت النتائج إنّ بكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء لم تكن موجودة في الفئة العمرية (١١-١) شهر ، وكانت موجودة في الفئة العمرية (٢٣-١٢) شهر بعدد (٢)٢٠٪ عزلة ، في الفئة (٣٥-٢٤) شهر بعدد (٣) ٣٠٪ عزلة ، وفي الفئة (٤٧-٣٦) شهر بعدد (٢) ٥٠٪ عزلة ، و في الفئة العمرية (٥٩-٤٨) شهر بعدد (٣) ٣٠٪.

و أظهرت النتائج إنّ بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء حاملة لجين *CTX-M* في (٣) ٣٠٪ عزلات و بصورة معنوية ($P < ٠.٠٥$) عن بقية الجينات ، و أيضاً حاملة لجين TEM في عزلة واحدة وبنسبة ١٠٪ . و أمّا بخصوص بكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء كانت حاملة للجين *CTX-M* في عزلة واحدة وبنسبة ١٠٪ ، وحاملة للجين *TEM* في عزلتين وبنسبة ٢٠٪ .

قائمة المحتويات

ت	العنوان	الصفحة
	الخلاصة	III
	قائمة المحتويات	VI
	قائمة الجداول	IX
	قائمة الأشكال	X
	قائمة الملاحق	X
	قائمة المختصرات	XI
الفصل الأول / المقدمة واسِتعراض المراجع		
١	المقدمة واسِتعراض المراجع	١
١-١	المقدمة	١
١-٢	اسِتعراض المراجع	٤
١-٢-١	الإسهال	٤
١-٢-٢	العائلة المعوية	٥
١-٢-٣	بكتيريا *Escherichia coli*	٥
١-٢-٣-١	الصفات العامة لبكتيريا *E .coli*	٦
١-٢-٣-٢	تصنيف بكتيريا *E .coli*	٧
١-٢-٣-٣	Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC)	٧
١-٢-٣-٣-١	Enterohemorrhagenic *E. coli* (EHEC)	٨
١-٢-٣-٣-٢	Enteropathogenic *E .coli* (EPEC)	٩
١-٢-٣-٤	إمراضية بكتيريا *E. coli*	١٠
١-٢-٣-٥	ضراوة بكتيريا *E. coli*	١٠
١-٢-٣-٥-١	السموم	١٢
١-٢-٣-٥-١-١	سموم الشيكا	١٣
١-٢-٤	المضادات الحيوية	١٤
١-٢-٤-١	مضادات البيتا لاكتام	١٥

١-٢-٤-٢	آليات مقاومة المضادات الحياتية في البكتيريا	١٦
١-٢-٤-٢-١	إنتاج الانزيمات	١٦
١-٢-٤-٢-٢	تحوير الهدف	١٧
١-٢-٤-٢-٣	تغير نفاذية جدار الخلية	١٧
١-٢-٤-٢-٤	تغير مسارات الأيض	١٧
١-٢-٤-٢-٥	مضخات الدفق	١٧
الفصل الثاني / المواد وطرائق العمل		
٢	المواد وطرائق العمل	١٨
٢-١	المواد	١٨
٢-١-١	الاجهزة المختبرية	١٨
٢-١-٢	المواد الكيميائية	١٩
٢-١-٣	الأوساط الزرعية	٢٠
٢-١-٤	المضادات الحياتية	٢١
٢-١-٥	معدات اخرى	٢٢
٢-١-٦	البوادئ	٢٣
٢-١-٧	المواد المستعملة في التشخيص الجزيئي بتقنية PCR	٢٤
٢-٢	تحضير الاوساط الزرعية والمحاليل والكواشف	٢٥
٢-٢-١	تحضير الاوساط الزرعية	٢٥
٢-٢-١-١	تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة	٢٥
٢-٢-١-٢	تحضير الاوساط الزرعية التركيبية	٢٥
٢-٢-١-٢-١	وسط غراء الدم	٢٥
٢-٢-١-٢-٢	وسط نقيع القلب والدماغ	٢٥
٢-٢-١-٢-٣	وسط غراء كروم	٢٦
٢-٢-٢	تحضير الكواشف	٢٦
٢-٢-٢-١	كاشف الاوكسديز	٢٦
٢-٢-٢-٢	كاشف الكاتليز	٢٦
٢-٢-٣	تحضير المحاليل	٢٦

٢-٢-٣-١	محلول ماكفرلاند	٢٦
٢-٣	طرائق العمل	٢٧
٢-٣-١	جمع العينات	٢٧
٢-٣-٢	التشخيص المزرعي	٢٧
٢-٣-٣	التشخيص المجهري	٢٧
٢-٣-٤	التشخيص الكيموحيوي	٢٧
٢-٣-٤-١	اختبار الاوكسديز	٢٧
٢-٣-٤-٢	اختبار الكاتليز	٢٨
٢-٣-٤-٣	اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم	٢٨
٢-٣-٥	تشخيص البكتيريا باستخدام نظام الفايتك	٢٨
٢-٣-٦	حفظ العزلات البكتيرية	٢٨
٢-٣-٧	اختبار مقاومة المضادات الحياتية	٢٩
٢-٣-٨	التشخيص الجزيئي	٢٩
٢-٣-٨-١	استخلاص الحامض النووي المجيني	٢٩
٢-٣-٨-٢	محاليل البوادئ	٣٠
٢-٣-٨-٣	تفاعل البلمرة المتسلسل	٣٠
٢-٣-٨-٤	محلول بفر TBE buffer X١	٣٢
٢-٣-٨-٥	هلام الاكاروز	٣٢
٢-٣-٨-٦	الترحيل الكهربائي	٣٢
٢-٤	التحليل الاحصائي	٣٣
الفصل الثالث / النتائج والمناقشة		
٣	النتائج والمناقشة	٣٤
٣-١	عزلات بكتيريا اشريشيا القولون	٣٤
٣-١-١	جمع العينات	٣٤
٣-١-١-١	مجموعة السيطرة	٣٤
٣-١-١-٢	توزيع الاصابات حسب الجنس	٣٥
٣-١-١-٣	توزيع الاصابات حسب العمر	٣٦

٣-١-١-٤	توزيع الاصابات حسب طبيعة السكن والدخل المادي	٣٧
٣-١-٢	التشخيص المظهري	٣٩
٣-١-٣	التشخيص المجهري	٤٠
٣-١-٤	التشخيص الكيموحيوي	٤٠
٣-١-٥	تشخيص البكتيريا باستخدام نظام الفايتك	٤٠
٣-١-٦	مقاومة البكتيريا للمضادات الحياتية	٤٠
٣-١-٧	التشخيص الجزيئي	٤٤
٣-١-٨	توزيع العزلات المرضية لبكتيريا *E. coli*	٥٢
٣-١-٨-١	توزيع العزلات المرضية لبكتيريا *E. coli* حسب الجنس	٥٢
٣-١-٨-٢	توزيع العزلات المرضية لبكتيريا *E. coli* حسب العمر	٥٣
٣-١-٨-٣	توزيع العزلات المرضية لبكتيريا *E. coli* حسب جينات بيتا لاكتام	٥٤
الاستنتاجات والتوصيات		
	الاستنتاجات والتوصيات	٥٧
	الاستنتاجات	٥٧
	التوصيات	٥٧
	المصادر	٥٨
	الملاحق	٧٣

قائمة الجداول

ت	الجداول	الصفحة
٢-٨	مكونات وحجوم مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل	٣١
٢-٩	الأوضاع الحرارية المثلى لدورات تفاعل البلمرة المتسلسل في جهاز التدوير الحراري	٣١
٣-١	توزيع الجينات المشفرة لصفة المقاومة و عوامل الضراوة في العزلات البكتيرية قيد الدراسة	٥٦

قائمة الاشكال

ت	الشكل	الصفحة
٣-١٠	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين eae	٤٧
٣-١١	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين bfpA	٤٨
٣-١٢	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين STX١	٤٨
٣-١٣	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين STX٢	٤٩
٣-١٥	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين CTX-M	٥٠
٣-١٦	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين TEM	٥١
٣-١٧	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين SHV	٥١

قائمة الملاحق

ت	الملحق	الصفحة
١	نتائج فحص عينات البراز قيد الدراسة تحت المجهر الضوئي	٧٣
٢	النسبة المئوية لاحتمالية تشخيص عزلات بكتيريا *E. coli* باستعمال نظام الفايتك	٧٣
٣	نتيجة التشخيص باستعمال نظام الفايتك	٧٤
٤	مقاومة عزلات بكتيريا *E. coli* للمضادات الحيوية	٧٥

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
aEPEC	atypical Enteropathogenic *E. coli*
bfpA	Bundle-forming pilus major subunit
β –Lactamase	Beta-Lactamase
Bp	Base Pair
CLSI	Clinical And Laboratory Standards Institute
CNF	Cytotoxic necrotizing factor
CTX-M	Cefotaximase, B-Lactamase Active On Cefotaxime
DEC	Diarrheagenic *Escherichia coli*
eae	Intimin Gene
EAF	*E. coli* adherence factor
EHEC	Enterohemorrhagenic *E. coli*
EMB	Eosin Methylene Blue
EPEC	Enteropathogenic *E. coli*
ESB.Ls	β -Lactamases extended –spectrum
GUD	β-glucoronidase
HUS	Haemolytic uraemic syndrome
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Heat -labile toxin
PCR	Polymerase Chain Reaction
SHV	β-lactamase (Sulfhydryl reagent variable)
ST	Heat -stable toxin
stx ١	Shiga toxin first
stx ٢	Shiga toxin second
TEM	β-lactamase named after the patient (Temoneira) providing the first sample
tEPEC	typical Enteropathogenic *E. coli*
TSI	Triple sugar agar
T٣SS	Type-three-secretion-system
UPEC	Uropathogenic *Escherchia coli*

الفصل الأول

المقدمة و اسِتعراض المراجع

١- المقدمة واستِعراض المراجع

١-١ المقدمة Introduction

تعد بكتيريا *E. coli* هي واحدة من أفراد العائلة المعوية ، والأكثر شيوعاً واهمية في جنس *Escherichia* ، إذ تعيش بصورة طبيعية في القناة المعوية للإنسان والحيوان وايضاً توجد في التربة والماء ، وتنمو تحت أوضاع هوائية او لاهوائية ، وتمتلك وسائل تساعدها على الحركة و الالتصاق بأنسجة المضيف مثل الأهداب والاسواط ، وأغلب افرادها تكون متحركة، وتسبب العديد من الأمراض للإنسان، إذ تعد بكتيريا *E. coli* السبب الأكثر شيوعاً لإصابة القناة البولية ، كما تسبب الإسهال وتسمم الدم، وتعد من البكتيريا الممرضة الانتهازية عند ضعف مناعة المضيف (Murray *et al.*, ٢٠١٦) . وايضا تكون مسؤولة عن الالتهاب الرئوي المرتبط بأجهزة التنفس الصناعي (Garreto *et al.*, ٢٠٢٠) . وتعد بكتيريا اشريشيا القولون *E. coli* السبب الرئيس للإسهال لدى الاطفال دون سن الخامسة ثم يليها روتا فايروس Rota virus A ثم يليها الطفيليات (Saeed *et al.*, ٢٠١٥) .

تمتلك سلالات بكتيريا *E. coli* الممرضة عوامل ضراوة متخصصة تزيد من قدرة البكتيريا على التسبب بالكثير من الإصابات المرضية ، و تقسم عوامل الضراوة إلى فئتين هي تراكيب الالتصاق التي تمكن البكتيريا من الالتصاق والتغلب على الجهاز المناعي للمضيف ، والسموم الداخلية والخارجية المسؤولة عن الاصابة ، على سبيل المثال سم متعدد السكرايد الدهني من السموم الداخلية التي تسبب تخثر الدم من خلال ارتباطه ببروتينات موجودة في الاوعية الدموية ، وسموم تحلل خلايا الدم الحمراء للمضيف ، وسموم معوية مثل السموم المستقرة بالحرارة والمتغيرة بالحرارة التي تسبب اسهال من خلال احداث خلل في الوظيفة البايولوجية لخلية المضيف يؤدي إلى إفراز الماء و الالكتروليات الى خارج الخلية ، تساهم الاهداب بعملية الالتصاق بالخلايا الظهارية للمضيف وايضا في تكوين الاغشية الحيوية التي تحمي البكتيريا من الاجسام المضادة للمضيف و تمنح البكتيريا صفة مقاومة المضادات الحياتية .

تعد بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء المسبب الرئيس للإسهال عند الأطفال الرضع ولاسيما في البلدان النامية ، و أهم ما يميز بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء هو القدرة على احداث اضرار موضعية عن طريق الالتصاق بإحكام على سطح الخلايا الظهارية المعوية (Jawetz *et al.*, ٢٠١٩) . جميع سلالات بكتيريا بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء تحمل الجين *eae* ، و تعد اشريشيا القولون البكتيريا الممرضة للأمعاء نموذجية إذا كانت حاملة للجينين *eae* & *bfpA* ، و بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء غير نموذجية إذا كانت تحمل الجين *eae* فقط (Snehaa *et al.*, ٢٠٢١) . تسبب بكتيريا اشريشيا القولون النزفية للقولون الإسهال الدموي(Tareen *et al.*, ٢٠١٩) . و كذلك متلازمة انحلال الدم اليورمي الذي يُعدّ سبباً رئيساً للفشل الكلوي عند الأطفال (Bia *et al.*, ٢٠٢٢) . تمتلك بكتيريا بكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء عوامل

ضراوة مهمة مثل انتاج سموم الشيكا النوع الأول والثاني *stx١ , stx٢* ، التي يمكن أن تسبب ضرراً موضعياً في القولون مما يؤدي إلى نخر الامعاء فضلاً عن إسهال دموي (Kaper *et al.*, ٢٠٠٤) .

و تمتلك بكتيريا *E. coli* القدرة لمقاومة المضادات الحيوية لاحتوائها على انزيمات مثل انزيمات بيتا لاكتام التي تمنح صفة مقاومة المضاد الحيوي البنسيلين (Penicillin) و السيفالوسبورين (Cephalosporin) ، وتشفر هذه الانزيمات بواسطة جينات مثل *CTX-M , TEM , SHV* (Jawetz *et al.*, ٢٠١٩) . وهذه الجينات عادة ما تكون محمولة على بلازميدات ، ويمكن أنْ تحمل البلازميدات جينات مقاومة لعدد من فئات مختلفة من المضادات الحياتية غير ذات صلة (McCloskey *et al.*, ٢٠١٨) . ووجد إنّ استعمال المضادات الحياتية بشكل عشوائي أدىّ إلى زيادة السلالات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية المتعددة (Hamza & Omran , ٢٠٢٢) . ولهذا من الضروري إجراء اختبار الحساسية الدوائية من أجل تحديد المضاد الحيوي الفعال قبل وصف المضاد ، وبالتالي يمكن التقليل من ظهور السلالات المقاومة (Khan *et al.*, ٢٠١٩) .

وفرت التقنيات الجزيئية الحديثة أفضل الوسائل التشخيصية ومنها تقنية تفاعل تضاعف البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) وهي التقنية الأكثر شيوعاً والمقبولة على نطاق واسع مع دقة عالية جداً للتشخيص الصحيح (Rahman *et al.*, ٢٠١٣) . و يمكن التحري عن سلالات بكتيريا *E. coli* المعزولة من العينات السريرية (Stool) باستعمال تقنية (PCR) من خلال الكشف عن الجينات التي تشفر لإنتاج عوامل الضراوة ويمكن اعتماد هذه العوامل كمؤشرات جزيئية في الدراسات التشخيصية عند التحري عن هذه البكتيريا (Fujioka *et al.*, ٢٠١٣) . و قد اجريت الدراسة الحالية باستعمال تقنية Monoplex PCR ، والتي تعد من التقنيات الشائعة وذات الكفاءة ودقة في الكشف الجزيئي ، إذ وجدت دراسة سابقة إنّ نتائج التشخيص بتقنية Multiplex PCR كانت متطابقة مع نتائج التشخيص بتقنية Monoplex PCR الجينات المرضية نفسها , *eae* *bfpA , stx١, stx٢* (Fujioka *et al.*, ٢٠١٣) . فقد تم تشخيص البكتيريا بالاعتماد على الجينات *eae , bfpA* التي تحملها البكتيريا الممرضة للأمعاء ، والجينات *stx١ , stx٢* التي تحملها البكتيريا النزفية للأمعاء ، وهذه الجينات تشفر لعوامل الضراوة التي تسبب الإسهال (Khairy *et al.*, ٢٠٢٠) . وايضا تم التحري عن الجينات التي تشفر لصفة مقاومة المضاد الحيوي بيتا لاكتام وهي(*CTX-M , TEM , SHV)* (Khairy *et al.*, ٢٠٢٠ ; Amin *et al.*, ٢٠١٨) . و أجريت هذه الدراسة الحالية بهدف التحري عن وجود بكتيريا اشريشيا القولون المسببة للإسهال و التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها وعلاقتها بمقاومة المضادات الحيوية من خلال المحاور الأتية :

- عزل وتشخيص بكتيريا *E. coli* من عينات البراز للأطفال من دون عمر ٥ سنوات المصابين بأعراض الاسهال ، وزرع العينات ، وإجراء الاختبارات الكيموحيوية وتشخيص البكتيريا باستِعمال نظام الفايتك Vitek٢ ، و إجراء اختبار الحساسية للعزلات البكتيرية .
- التحري عن وجود أو غياب الجينات التي تشفر لعوامل الضراوة مثل *eae , bfpA , stx١, stx٢* في بكتيريا *E. coli* المعزولة من العينات المرضية باستِعمال تقنية (PCR) .
- التحري عن وجود أو غياب الجينات التي تشفر لصفة مقاومة المضادت الحياتية لمجموعة البيتا لاكتام وهي *CTX-M , TEM , SHV* .

١- ٢ اسِتعراض المراجع Literature review

١-٢-١ الإسهال Diarrhea

يُعد الإسهال ثاني أهم أسباب وفاة الاطفال دون سن الخامسة على مستوى العالم ،كما يمكن أن تؤدي نوبات الإسهال المتكررة إلى سوء التغذية و تأخر نمو الدماغ، إذ يمثل الجفاف أشد الاخطار التي تنجم عن الإسهال ، ويحدث عندما لا تعوض العناصر المفقودة مثل الصوديوم ، و الكلوريد ، و البوتاسيوم ، و البيكربونات والماء اثناء نوبة المرض ، ويحدث الإسهال أساساً جراء الاغذية ومصادر المياه الملوثة ، وإنّ امكانية الوقاية والعلاج من هذا المرض تعد من العوامل الايجابية لتجنب المرض ، و يمكن أن تشمل أعراض الإسهال تغوط متكرر رخو او سائل ، و الغثيان ، و القيء ،و حمى ، و تشنج او الم البطن (Manetu *et al*., ٢٠٢١). و يقدر عدد الوفيات السنوية بسبب الإسهال في البلدان النامية بحوالي ٢.٥ مليون (Estrada - Garcia *et al*., ٢٠٠٩ ; Barletta *et al*., ٢٠٠٩) . و ذكرت دراسة ان هناك ١.٧ مليار حالة إسهال سنويا و ٧٦٠٠٠٠ حالة وفاة بين الاطفال دون عمر ٥ سنوات كل عام من جراء الإسهال (Dong *et al*., ٢٠٢٠) .

و يمكن ايجاز العوامل المسببة للإسهال بالعوامل البكتيرية ، و الفايروسية و الطفيلية ، إذ تحدث الغالبية العظمى من نوبات الإسهال عن طريق المسببات الفايروسية التي تظهر في موسم الشتاء (podewils *et al*., ٢٠٠٤) . و من مسببات الاسهال البكتيرية عند الاطفال دون سن الخامسة هي : الشيغيلا *Shigella spp* , السالمونيلا *Salmonell spp* , *Diarrheagenic Escherichia coli* , *Vibrio cholera* , *Compylobacter* , *Yersinia entrocolitica* *Plesiomonas spp* , *Aeromonas spp* , (Tian *et al*., ٢٠١٦) . وضحت الدراسات السابقة إنّ بكتيريا *E. coli* هي السبب الرئيس للإسهال عند الاطفال دون سن الخامسة ، يليها روتا فايروس والطفيليات (Saeed *et al* ., ٢٠١٥) .

و بيّنت دراسة محلية (Tuky & Semender , ٢٠١٩) في بابل إنّ التخلص غير السليم من مياه الصرف الصحي ، وعادات غسل اليدين السيئة ، وانخفاض الدخل الاسري من أكثر العوامل شيوعاً للإصابة بالإسهال الحاد لدى الأطفال . وأشارت دراسة محلية حديثة (Harb *et al*., ٢٠٢١) في ذي قار إلى حاجة تعزيز التثقيف الصحي العام لأمهات الاطفال ، وتجنب الاستعمال غير الضروري لمضادات الميكروبات .

١-٢-٢ العائلة المعوية Enterobacteriacea

العائلة المعوية مجموعة كبيرة من العصيات السالبة لصبغة كرام ، و توجد في التربة والماء وبصورة طبيعية في القناة المعوية للإنسان والحيوان ، و تضم العديد من الأجناس على سبيل المثال الأكثر شيوعاً , *Escherichia spp* , *Shigella spp* , *Salmonella spp* , *Serratia spp* , *Proteus spp* *Klebsiella spp* . و من صفات أفرادها هوائية (Aerobic) او لاهوائية اختيارية (Facultative anaerobic) ، و متحركة أو غير متحركة، إذ تخمر العديد من الكاربوهيدرات ، و تستعمل أوساط زرعية تفريقية عدة مثل وسط غراء الماكونكي MacConkey agar للتميز بين البكتيريا المعوية التي تخمر سكر اللاكتوز من البكتيريا المعوية التي لا تخمر سكر اللاكتوز، تصنف العائلة المعوية مصلياً (Serologic) بالاعتماد على ثلاث مستضدات (Antigens) رئيسة هي : somatic (O)-antigen المستضد الجسمي و يظهر في متعدد السكرايدالدهني (Lipopolysaccharide) وهو مهم للتصنيف السيرولوجي للسلالات (Strains) داخل النوع ،K- antigen و يظهر في الكبسول (Capsule) و المستضد H- antigen يكون في أسواط (Flagella) السلالات المتحركة (Murray *et al*., ٢٠١٦) . و هذه المستضدات وغيرها من عوامل الضراوة مثل الانزيمات والسموم تزيد من قدرة البكتيريا المعوية على التسبب بالكثير من الإصابات المرضية للإنسان داخل القناة الهضمية مثل الاسهال (Diarrhea) ، و إصابات القناة البولية (Urinary tract infections)، و إصابات الجهاز التنفسي (Respiratory tract infections) ، و السحايا (Meningitis) ، و تسمم الدم (Septicemia) و غيرها من الإصابات (Jawetz *et al*., ٢٠١٩).

١-٢-٣ بكتيريا *Escherichia coli*

بكتيريا *E. coli* هي واحدة من أفراد العائلة المعوية ، والأكثر شيوعاً واهمية في جنس *Escherichia* ، و يعيش في القناة المعوية للإنسان والحيوان بصورة طبيعية (Normal flora) ، وتعد من البكتيريا الممرضة الانتهازية (Opportunistic pathogen) عندما تكون دفاعات المضيف الطبيعية ضعيفة ، و لاسيما في مرحلة الطفولة او الشيخوخة ، و تسبب أمراض متنوعة مثل الإسهال فتسمى Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) ، وعندما تصيب القناة البولية فتسمى Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) ، وتسبب ايضاً التهاب السحايا لدى حديثي الولادة (Neonatal meningitis) ،و تسمم الدم (Septicemia) إذ تمتلك سلالات بكتيريا *E. coli* الممرضة عوامل ضراوة متخصصة يمكن تصنيفها في فئتين عامتين هي تراكيب الالتصاق (Adherence) والسموم (Toxins) الداخلية والخارجية (Murray *et al*., ٢٠١٦). تمتلك بكتيريا *E. coli* ثلاث مستضدات وهي مستضد الجدار الخلوي O-antigen ، مستضد السوط H-antigen ومستضد الكبسول K-antigen ،و نظراً لوجود أكثر من ١٥٠ مستضد O-antigen ، ٥٠ مستضد H-antigen و ٩٠

مستضد K-antigen نتج من هذه التركيبات المتنوعة أكثر من ١٠٠٠ نوع مستضد (Antigenic type) من بكتيريا *E. coli* (Levinson , ٢٠١٦) . وعلى الرغم من تطوير الأوساط الانتقائية للكشف عن اشريشيا القولون ، إلا إنّ التفريق بين سلالاتها المسببة للأمراض و غير المسببة للأمراض أمر صعب بسبب تشابه خصائصها الكيميائية الحيوية ، لهذا إزداد إستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الذي يُعد من الطرائق الجزيئية الحديثة الفعالة لتشخيص بكتيريا اشريشيا القولون المسببة للأمراض (Yim *et al.*, ٢٠٢١) .

إنّ أصل مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية أما جينات محمولة على كروموسومات أوعلى البلازميدات ، وواحدة من الطرائق لتحديد أصل المقاومة هي التخلص من البلازميد ، إذ استعملت هذه الطريقة مع عزلات بكتيريا اشريشيا القولون (Oriamah & Akpe, ٢٠١٩) .

١-٢-٣-١ الصفات العامة لبكتيريا *E. coli*

هي من العصيات السالبة لصبغة كرام لاهوائية اختيارية (Facultative anaerobic) و أغلب سلالاتها تخمر اللاكتوز ، و سالبة لاختبار الاوكسيدز (Oxidase) ، و موجبة لاختبار الكتاليز (Catalase) (Levinson, ٢٠١٦) . وأغلب افرادها متحركة بواسطة أسواط محيطية (Peritrichous flagella) وتمتلك أهداب (شعيرات) (Fimbriae(Pill او بروتينات ليفية (Fibrilar proteins) و غالباً ما تمتد بأعداد كبيرة على سطح الخلية البكتيرية (Pakbin *et al.*, ٢٠٢١) . إذ تختزل النترات الى نتريت كجزء من عمليات توليد الطاقة ، و موجبة لاختبار الاندول (Indol) وهو اختبار مهم لتفريقها عن بقية العصيات السالبة لصبغة كرام ، وتكون موجبة لاختبار (Acetate) الذي تستعمله كمصدر للكاربون، سالبة لاختبار اليوريز (Urease) ولا تنتج كبريتيد الهيدروجين H_2S في وسط السكر الثلاثي Triple sugar agar (TSI) (Levinson , ٢٠١٦) . و موجبة لاختبار المثيل الاحمر (Methyl red) ، و سالبة لاختبار السترات (Citrate) واختبار فوكس – بروسكاور (Voges-Proskauer) (Markey *et al.*, ٢٠١٣) . و أغلب افرادها تشكل مستعمرات وردية على وسط غراء ماكونكي (MacConkey agar) ومستعمرات خضراء معدنية على وسط ايوسين المثلين الازرق (Eosin methylene blue agar) ، غير مكونة للأبواغ ، و معظمها منتجة لإنزيم β-glucoronidase(GUD) ، و بعض أنواعها لها القدرة على تحليل كريات الدم الحمراء في وسط غراء الدم (Blood agar) لامتلاكها انزيم تحلل الدم (Hemolysin) ، و معظمها تخمر سكر السوربيتول ، ولا تنمو بوجود سيانيد البوتاسيوم KCN ، ودرجة الحرارة المثلى لنموها هي ٣٧ مْ (Jawetz *et al.*, ٢٠١٩) .

١-٢-٣-٢ تصنيف بكتيريا *E. coli* Classification of

تنتمي بكتيريا *E. coli* إلى جنس *Escherichia* ، الذي سمي على اسَم عالم الاحياء المجهرية الذي اكتشفه Theodor Escherichia عام ١٨٨٥ م ، و ذلك خلال دراسته البكتيريا التي تستوطن امعاء الرضع بعد الولادة مباشرة كبكتيريا قولون متعايشة شائعة ، إذ يضم جنس *Escherichia* خمسة انواع :

(*E. coli , E. hermanii , E. blattea E.vuneris E. fergosonii*) ، و يعد النوع *E. coli* قريب الصلة من الناحية الوراثية مع باقي أجناس العائلة المعوية ، ولاسيما جنس الشيكيلا *Shigella* ، والأكثر شيوعاً وأهمية في إصابات الإنسان وامراضيته (Olowe *et al.*, ٢٠١٧) .

صنفت بكتيريا *E. coli* كالآتي :

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacbacteria

Order : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriacea

Genus : *Escherichia*

Species : *Escherichia coli*

(Engelkirk and Duben - Engelkirk , ٢٠١٥) .

١-٢-٣-٣ Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC)

تصنف سلالات بكتيريا اشريشيا القولون المرتبطة بالإسهال الى ست مجاميع بناءً على المعايير السريرية والوبائية والجزيئية :

١-اشيرشيا القولون المعوية النزفية Enterohemorrhagenic *E. coli* (EHEC)

٢-اشيرشيا القولون المعوية الممرضة Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

٣-اشيرشيا القولون المعوية السمية Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

٤-اشيرشيا القولون المعوية الغازية Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

٥- اشيرشيا القولون المنتشرة بالالتصاق Diffusuely Adhering *E. coli* (DAEC)

٦- اشيرشيا القولون المعوية المتكتلة Entroaggregtive *E. coli* (EAEC) (Heydari *et al.*, ٢٠٢٠).

١-٢-٣-٣- Enterohemorrhagenic *E. coli* (EHEC)

تعد اشريشيا القولون النزفية للأمعاء (EHEC) من المجموعة المسببة للأمراض ، إذ يمكن أن تسبب إسهالاً دمويا (Tareen *et al.*, ٢٠١٩) . و كذلك متلازمة انحلال الدم اليورمي Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS) وهو السبب الرئيس للفشل الكلوي الحاد عند الاطفال (Bia *et al.*, ٢٠٢٢) .و تمتاز هذه البكتيريا ايضاً بقدرتها على تحلل الدم المشفر بواسطة البلازميدات ، وغالبا ما يرتبط الهيمولايسين المعوي (Enterohaemolysin) بالأمراض البشرية مثل التهاب القولون النزفي ومتلازمة انحلال الدم اليورمي (Schwidder *et al.*, ٢٠١٩) .إذ تمتلك هذه البكتيريا عوامل ضراوة مهمة مثل سموم الشيكا Shiga toxins من النوع الاول والثاني (stx١,stx٢) والانتمين *eaeA* ، و تسبب سلالات اشريشيا القولون النزفية للأمعاء التي تنتج سموم الشيكا تلفاً موضعياً في القولون مما يؤدي إلى نخر وثقب الامعاء فضلاً عن إسهال دموي ، وعندما تستهدف سموم الشيكا الكلى تسبب تلف الخلايا البطانية الكلوية وانسِداد الاوعية الدموية الدقيقة وينتج عن ذلك التهاب الكلية المؤدي إلى متلازمة انحلال الدم اليورمي (Kaper *et al.*, ٢٠٠٤) . و يعتمد خطر الإصابة ب متلازمة انحلال الدم اليورمي بسبب القولونية النزفية المنتجة لسموم الشيكا على عدة عوامل منها مناعية ، و نمط الحياة، و نوع السم، و النمط المصلي (Serotype) وجرعة الإصابة (Travert *et al.*, ٢٠٢١) .إذ تسمى اشريشيا القولون النزفية بإسم اشريشيا القولون المنتجة لسموم الشيكا (Luna–Guevara *et al.*, ٢٠١٩) .

و يعد النمط المصلي (Serotype) O١٥٧:H٧ في القولونية النزفية من أهم الانماط المصلية لتلك البكتيريا ، و إنّ شدة المرض الذي تسببه مع جرعته المعدية المنخفضة تؤهل O١٥٧:H٧ لتكون من بين أخطر مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء و الماء (Rani *et al.*, ٢٠٢١) . و يمكن عد بكتيريا O١٥٧:H٧ سبباً غير شائع ولكنّه خطير لالتهاب المعدة والامعاء (Pennington *et al.*, ٢٠١٠) . و تمتاز بكتيريا O١٥٧:H٧ بعدم قدرتها على تخمر سكر السوربتول (Sorbitol) وهي صفة مهمة للتميز بينها وبين بقية سلالات *E. coli* ، و يعد وسط غراء الكروم (Chrom agar) وسط مفيد للكشف عن بكتيريا O١٥٧:H٧ (Jenkins *et al.*, ٢٠٢٠) .

من الانماط المصلية الاخرى للبكتيريا التي تسبب أمراض سريرية شديدة وايضاً تنتج سموم الشيكا هي : O٢٦:H١١, O٤٥:H٢ , O١٠٣:H٢ , O١١١:H٨ O١٢١:H١٩ , O١٤٥:H٢٨ (Bieche - Terrier *et al.*, ٢٠١٩) . و غالباً ما يحمل النمط المصلي نفسه جينات ضراوة مختلفة وبالتالي يسبب أنواعاً مختلفة من الأمراض على سبيل المثال النمط المصلي O٢٦:H١١ يحمل جينات *stx* ١ التي نادراً ما تسبب حدوث HUS ، وأيضاً تحمل جينات *stx* ٢ الأكثر شيوعاً في حدوث متلازمة انحلال الدم اليورمي (Ogura *et al.*, ٢٠١٥) .

١-٢-٣-٣-٢ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء (EPEC) هي سبب مهم للإسهال عند الرضع ، ولاسيما في البلدان النامية ، و تتميز العدوى عند الرضع بالإسهال المائي الحاد ، والتقيؤ ، والحمى و يمكن أن تكون هذه أعراض مزمنة (Jawetz *et al.*, ٢٠١٩) . و تشترك بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء المعزولة من الانسان والحيوان في بعض الخصائص مثل عوامل الضراوة المرتبطة بالإسهال البشري ، وتسبب بعض المجموعات والانماط المصلية لهذه البكتيريا امراض للإنسان مثل O٧٦:H٧ , O١٢٨:H٢ , O٢٦:H١١ O١٤٥ , O١٠٨ ,O١٠٣ O١١١(٢٠٢٢ ,Beraldo *et al.*) .

إنّ اهم ما يميز بكتيريا EPEC هو القدرة على انتاج أضرار موضعية عن طريق الالتصاق بإحكام على سطح الخلية الظهارية ، مما يؤدي إلى تعطيل اسطح الخلايا وفي النهاية إزالة الزغابات الدقيقة (Microvilli) ، و يمكن تصنيف بكتيريا EPEC إلى بكتيريا نموذجية typical EPEC وغير نموذجية atypical EPEC ، بناءً على وجود أو عدم وجود عامل الالتصاق البلازميدي *E. coli* Adherence Factor (EAF) ، و تحمل كل سلالات بكتيريا الممرضة للأمعاء جين *eae* سواء أكانت سلالاتها نموذجية tEPEC أم غير نموذجية aEPEC (Andras *et al.*, ٢٠٢٢) . سلالات بكتيريا EPEC النموذجية تحمل الجينين *eae* + *bfpA* ، بينما السلالات غير النموذجية تحمل الجين *eae* دون الجين *bfpA* (Snehaa *et al.*, ٢٠٢١) .

و إنّ ضراوتها تتضمن عدد من المراحل المتميزة ، إذ يتم الالتصاق الأولي بخلايا الغشاء المخاطي المعوي بواسطة الاهداب مما يؤدي الى شكل مميز من الالتصاق الموضعي ، و قد ينتج الإسهال عن طريق تغير نفاذية الغشاء المخاطي وأيضاً من خلال آلية سوء الامتصاص (Govidarajan *et al.*, ٢٠٢٠) . لطريقة الالتصاق دور مهم في زيادة الامراضية لهذه السلالات ، ويعد الانتمين Intimin الموجود في بكتيريا EPEC بروتين رئيس ومهم في عملية الالتصاق ، إذ يتوسط ارتباط البكتيريا بسطح الخلية الظهارية والذي يشفر له بواسطة الجين *eae* المحمول على الكروموسوم البكتيري مع العديد من الجينات الأخرى المهمة أيضاً في إحداث الامراضية ، و يتم تسهيل الارتباط عن طريق Tir وهو مستجيب (Effector) يتم ادخاله في الغشاء البلازمي للمضيف ، إذ يعمل كمستقبل للانتمين ، و من خلال نظام من النوع الثالث للإفراز Type-Three-Secretion-System (T٣SS) يمكن لبكتيريا EPEC حقن عدد كبير على الأقل خمسة وعشرون من البروتينات المستجيبة في خلايا المضيف ، و جين *bfp* الذي يشفر تكوين حزمة الاهداب من النوع الرابع التي لها دور بعملية الالتصاق (Mare *et al.*, ٢٠٢١)

١-٢-٣-٤ امراضية بكتيريا *E. coli* Pathogenicity of

تسبب بكتيريا اشريشيا القولون العديد من الأمراض للإنسان ، حيث تدرج بكتيريا *E. coli* ضمن أكثر المجموعات أهمية فهي تعد المسبب الاكثر انتشاراً لعدوى المسالك البولية ، إذ تصيب الاناث أكثر من الذكور (Shah *et al.*, ٢٠١٩) . وأيضاً تعد السبب الأكثر شيوعاً لتجرثم الدم ، وتساهم عدوى المسالك البولية بنسبة ٥٣٪ كمصدر أولي لتجرثم الدم (Bonten *et al.*, ٢٠٢١) .

و أيضا تسبب الأمراض المعوية أو الإسهال (Enteric or Diarrheal diseases) ، إذ تسبب سلالات بكتيريا *E. coli* المرضية الإسهال بسبب السموم التي تفرزها على سبيل المثال السموم المتغيرة بالحرارة والسموم الثابتة بالحرارة اللذان يسببان إسهال مائي (Motyko *et al.*, ٢٠٢١) . . تفرز بكتيريا اشريشيا القولون السامة للأمعاء سلالات Enterotoxigen *E. coli* (ETEC) سموم معوية (Enterotoxin) ،إذ تكون هذه السموم ضمن مجموعتين الاولى هي السموم المستقرة بالحرارة Heat -Stable toxin (ST) ، و المجموعة الثانية هي السموم المتغيرة بالحرارة Heat -Labile toxin (LT) ، فتفرز بعض سلالات بكتيريا ETEC هذه السموم تحت سيطرة مجموعة من البلازميدات المختلفة ، وأيضاً تحمل جينات تشفر لعوامل الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء ، و يعتمد تأثير السموم المعوية الصافي على الوظيفة البيولوجية لخلية المضيف من خلال احداث خلل يؤدي إلى إفراز الماء والإلكتروليتات (Electrolytes) إلى خارج الخلية مسببة إسهال مائي (Jawetz *et al.*, ٢٠١٩). تماثل السموم المتغيرة بالحرارة تقريبا مع سموم الكوليرا في الوظيفة و البنية التركيبية الا انها أقل فعالية ، بينما السموم المستقرة بالحرارة تشبه السموم المتغيرة بالحرارة في الوظيفة لكنّها أقل منها في الوزن الجزيئي (Levinson, ٢٠١٦) . و أيضا تسبب سموم الشيكا النوع الاول والثاني الإسهال الدموي وغير دموي (Ardissino *et al.*, ٢٠٢١) .

١-٢-٣-٥ ضراوة بكتيريا *E. coli*

تمتلك بكتيريا *E. coli* العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من امراضيتها ، و من هذه العوامل السموم الخارجية (Exotoxin) التي تشمل السموم الخلوية (Cytotoxin)، والسموم التي تعمل كمثبطات تصنيع البروتين ، والسموم التي تغير مسارات الارسال (Messenger pathways) في خلايا المضيف ، فعلى سبيل المثال (Hemolysin) من السموم الخلوية التي تسبب تحلل كريات الدم الحمراء للمضيف ،ويكون بعدة اشكال (الفا α ،بيتا β، كاما γ) ، و يفرز هيمولايسين الفا (α- hemolysin) في حالة إصابة المسالك البولية ، و يعد عامل

النخر السام cytotoxic necrotizing factor (CNF) من السموم التي تعطل الاشارات الخلوية مع تأثيرات متعددة ، و غالبا ما يتم انتاج CNF بالتنسيق مع الفا هيمولاسين ، و تعد سموم الشيكا التي تثبط تصنيع البروتين كمثال على السموم الخارجية ، إذ تظهر توجد بشكلين جزيئين Shiga toxin١(stx١) و Shiga toxin٢ (stx٢) ، واطلق عليها هذا الاسم نسبة للعالم الذي اكتشف بكتيريا *Shigella desentriae* ، وكان يعتقد سابقاً إنّ هذا السم مقتصر على تلك الأنواع البكتيرية (Sherris, ٢٠١٨) . و ينتج السم الجيني colibactin من الايض الثانوي إذ يتسبب في حدوث انكسار مزدوج للحامض النووي البشري و له دور في مسببات سرطان القولون والمستقيم للإنسان (Dziubanska-Kusibab *et al.*, ٢٠١٩) . فضلاً عن ذلك فإنّ سم microcin B١٧ الذي تفرزه بعض سلالات بكتيريا *E. coli* تحت سيطرة البلازميد يمنع تضاعف الحامض النووي مما يمنح البكتيريا حماية من الانواع البكتيرية الأخرى إلى جانب سم bacterocin ، و أيضاً يمنح مقاومة للمضادات الحيوية (Collin& Maxwell, ٢٠١٩) .

يعد متعدد السكرايد الدهني lipopolysaccharide (LPS) من التراكيب السطحية الموجودة في الغشاء الخارجي (Outer membrane) ، إذ يمثل نوعاً من أنواع السموم الداخلية (Endotoxin) ،و يتكون من ثلاث مناطق رئيسة هي دهون lipid A ، وهذا التركيب مسؤول عن نشاط السموم الداخلية ،وأيضا احادي السكاريد (Oligosaccharide core) والمستضد الجسمي somatic antigen (o) ، إذ يساهم بعملية الالتصاق والتغلب على مناعة المضيف ، علاوة على ذلك ، فإنّ ارتباط سم متعدد السكرايد الدهني بالبروتينات الموجودة في مجرى الدم يحفز التخثر داخل الاوعية الدموية والموت من خلال خلل وظيفي كبير في الأعضاء مثل القلب ، الدماغ و الكلى ، و يظهر مستضد k- antigen في المحفظة ، و يسهل ارتباط البكتيريا بالخلايا الظهارية مما يؤدي إلى غزو الجهاز الهضمي أو القناة البولية ، وإنّ بعض سلالات بكتيريا *E. coli* تنتج مستضد النوع الأول K١- antigen الذي يسبب التهاب السحايا عند حديثي الولادة ، و أوضحت دراسات سابقة إنّ بعض أنواع بكتيريا *E. coli* تتحرك بواسطة الأسواط ، وتحتوي على المستضد السوطي H- antigen حيث يساهم الأخير في عملية الالتصاق بخلايا المضيف والتغلب على مناعة المضيف (Jawetz *et al.*, ٢٠١٩) .

ومن عوامل الضراوة الاخرى التي تمتلكها بكتيريا اشريشيا القولون هي الاهداب ، فالأهداب من نوع ١ Fimbria type لها دور مهم في الالتصاق بالخلايا الظهارية البولية ، مما يساهم في تلف الكلية اثناء التهاب الحويضة و الكلية الحاد (Day *et al.*, ٢٠٢١) . و الأهداب من نوع ٢ Fimbria type تساهم بشكل كبير في الالتصاق بالخلايا الظهارية المعوية للمضيف (Rajan *et al.*, ٢٠١٨) . وتعد الأهداب والشعيرات من أهم العوامل التي تساعد البكتيريا على الالتصاق بالخلايا الظهارية للمضيف وهي الخطوة الاولى لإصابة المضيف، و تساهم في تكوين الاغشية الحيوية (Biofilms) التي تحمي البكتيريا من الأجسام المضادة antibody والمتعادلة neutrophils للمضيف ، و تمنح البكتيريا صفة مقاومة المضادات الحيوية (Gajdács *et al.*, ٢٠٢١) .

و تمتلك بكتيريا *E. coli* العديد من الانزيمات التي تمنحها صفة مقاومة المضادات الحيوية منها انزيم بيتا لاكتام β-lactamase و التي تمنح البكتيريا صفة مقاومة المضاد الحيوي البنسلين (Penicillin) والمضاد الحيوي سيفالوسبورين (Cephalosporin) ، و انزيم (Carbapenemase) و التي تمنح البكتيريا صفة المقاومة لمضاد الكاربينيم (Carbapenem) (Levinson, ٢٠١٦) .

١-٢-٣-٥-١ السموم Toxins

تمتلك بكتيريا اشريشيا القولون *E. coli* العديد من عوامل الضراوة التي يمكن أن تسبب الأمراض للإنسان و الحيوان ، و منها على وجه الخصوص السموم ، إذ تمتلك بكتيريا *E. coli* نوعين من السموم وهي سموم داخلية المتمثلة بمتعدد السكرايد الدهني ، والسموم الخارجية وتشمل سموم خلوية و سموم تثبط تصنيع البروتين ، و سموم تغير مسارات الرسول في خلايا المضيف (Sherris, ٢٠١٨) .

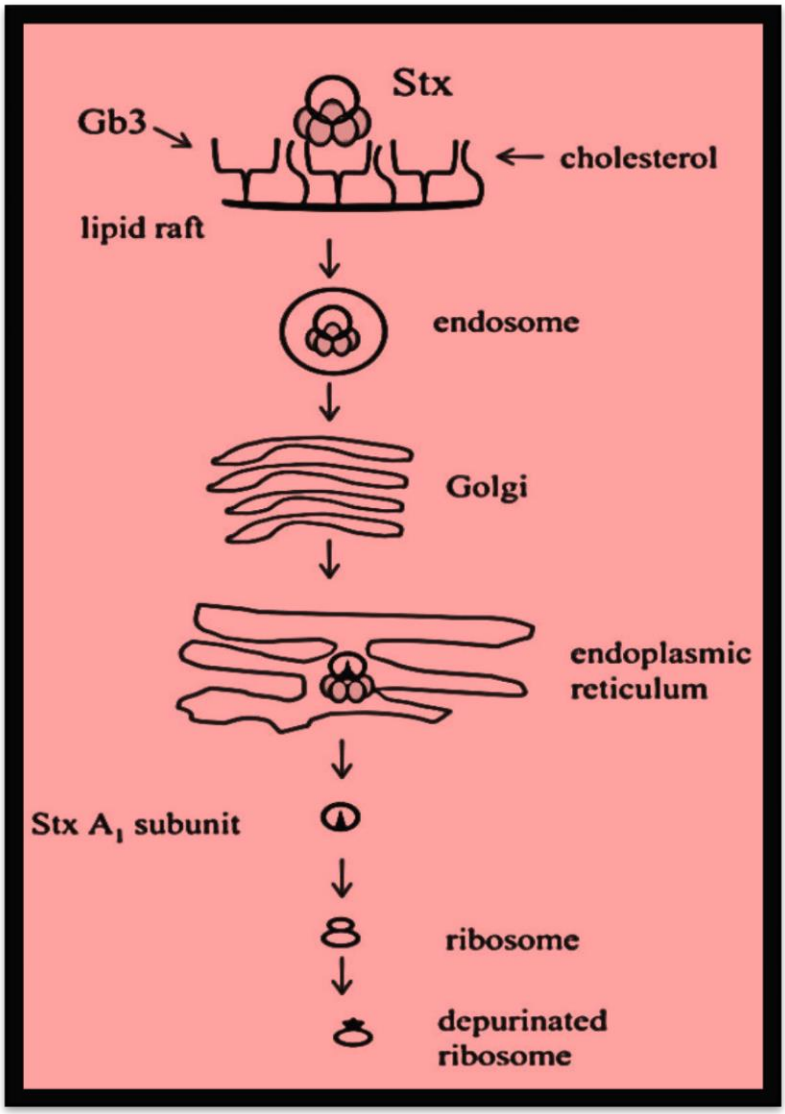
السموم الداخلية (Endotoxins) هي سموم موجودة في الجدار الخلوي cell wall في البكتيريا السالبة لصبغة كرام ، والمتمثلة بمتعدد السكرايد الدهني lipopolysaccharide (LPS) ، وتنطلق هذه السموم فقط عند موت الخلية البكتيرية ، وتنتج تحت سيطرة جينات محمولة على كروموسوم (Chromosomal genes) ، وتمتاز هذه السموم بعدم وجود مستقبلات محددة لها في المضيف ، اذ تكون متوسطة السمية ومميتة للحيوانات بكمية عشرات الى مئات المايكرو غرام ، و مستقرة نسبياً وتتحمل التسخين في درجات حرارة أعلى من ٦٠ مْ لساعات من دون فقدان تأثيرها السمي ، و تسبب السموم الداخلية الحمى للإنسان المصاب .

تفرز السموم الخارجية (Exotoxins) من قبل البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ، إذ تتكون من متعدد الببتيد (Polypeptide) ، و تنتج السموم الخارجية تحت سيطرة جينات خارج الكروموسوم (Extrachromosomal genes) مثل الجينات المحمولة على البلازميدات ، و تفرز هذه السموم من قبل الخلايا البكتيرية الحية بتركيز عالي في الاوساط السائلة ، و ترتبط بمستقبلات محددة في خلايا المضيف، وتمتاز بأنها عالية السمية و مميتة للحيوانات بكميات المايكرو غرام ، والسموم الخارجية غير مستقرة نسبياً إذ يمكن أن تتحطم بالتسخين عند درجة حرارة أعلى من ٦٠ مْ ، فأغلب السموم الخارجية تتكون من وحدتين فرعيتين هي الوحدة الفرعية A,B ، إذ تساهم الوحدة الفرعية B في الالتصاق ودخول مركب السم الى الخلية المضيفة بينما الوحدة الفرعية A مسؤولة عن النشاط السام ، و لا تسبب حمى للمصاب ، وتحفز تكوين الأضداد (Antibodies) (Jawetz *et al.*, ٢٠١٩) .

١-٢-٣-٥-١-١ سموم الشيكا Shiga toxins

سموم الشيكا Shiga toxins (Stx) هي سموم خلوية تثبط تصنيع البروتين ، تتكون من ارتباط وحدة فرعية انزيمية enzymatic A subunit مع خمس وحدات فرعية متطابقة identical B subunit ، و هذه الوحدات الفرعية الخمسة تكون مسؤولة عن الارتباط بمستقبلات خلوية ، حيث ترتبط سموم الشيكا بمستقبل الجليكوليبد (Glycolipid receptor) الموجود على سطح الخلية المستهدفة(Target cell) ، ثم يتم استيعاب معقدات سموم الشيكا (Stx-receptor complexes) بواسطة طرق النقل الى داخل الخلية ، بعد ذلك يتم نقلها الى جهاز كولجي (Golgi Apparatus) ثم الى الشبكة الاندوبلازمية حيث يتم تقسيم الوحدة الفرعية A الى أجزاء هي A١, A٢ ، الجزء النشط A١ ينقل إلى العصارة الخلوية (Cytosol) حيث يثبط ارتباط aminoacyl-tRNA الذي يساهم في عملية استطالة الببتيد مما يؤدي إلى تثبيط تصنيع البروتين وبالتالي موت الخلية ، إن قدرة السموم على تحفيز موت الخلايا قد تساهم في تطور الإسهال الدموي كما موضح في الشكل (١-١) (Cherla *et al* ., ٢٠٠٣) وهذه السموم تسبب متلازمة انحلال الدم اليورمي ، ولها تأثير قوي على الكلى ، ويمكن أن تتأثر أعضاء أخرى فتشمل مضاعفاتها السكتة الدماغية وإلتهاب القولون النزفي ونخر الامعاء ، ويمكن أن تحدث هذه المضاعفات أثناء المرحلة الحادة من متلازمة انحلال الدم اليورمي وأيضاً بعد الشفاء (Khalid & Andreoli , ٢٠١٩) .

هنالك نوعين رئيسيين من سموم الشيكا النوع الاول stx١ وله ثلاثة انواع فرعية stx١a , stx١c , stx١d ، والنوع الثاني stx ٢ وله سبعة أنواع فرعية stx٢a , stx٢b , stx٢c , stx٢d ,stx٢e ,stx٢f ,stx٢g (Scheutz *et al.*, ٢٠١٢) . فضلاً ما ذكر عن أنواع فرعية لسموم الشيكا ، فقد تم تحديد نوع فرعي جديد تابع للنوع الثاني stx ٢ يسمى ب stx٢h الذي وجد في سلالات بكتيريا اشريشيا القولون المنتجة لسموم الشيكا المعزولة من حيوانات برية في الصين (Bia *et al.*, ٢٠١٨) . و تعد تأثيرات سموم الشيكا من النوع الثاني stx٢ أكثر أهمية في حدوث نزف الدم اليوريمي عند الانسان (Alvarez *et al.*, ٢٠٢١) . و تتشابه سموم الشيكا لبكتيريا الشيكلا *Shigella* مع سموم الشيكا لبكتيريا *E. coli* النوع الاول stx١ (Lee *et al.*, ٢٠١٣) .



الشكل (١-١) آلية عمل سموم الشيكا (Melton – celsa ,٢٠١٤) .

١-٢-٤ المضادات الحيوية

المضادات الحيوية هي نواتج أيض ثانوية عضوية التركيب طبيعية او صناعية تنتجها الكائنات الحية المجهرية في طور الثبات stationary phase ، وتعد ذات تأثير قاتل أو مثبط للمايكروبات الاخرى. من دون التأثير في خلايا جسم المريض وهي خاصية تميزها عن المطهرات . كما هو معروف فإن أول مضاد حيوي اكتشف عن طريق الصدفة هو البنسلين بواسطة العالم Alexander Fleming سنة ١٩٢٩ الذي تم استعماله بعد ذلك كمضاد حيوي لعلاج الكثير من حالات الالتهابات والأمراض التي تسببها البكتيريا إذ تمكن فلوري Florey وزملائه من اثبات فعاليته السريرية في أوائل سنة ١٩٤٠ (Lewis , ٢٠٢٠) .

توصف بعض المضادات الحيوية بان لها فعالية محددة بنوع معين أو مجموعة محددة من الأحياء المجهرية فتعرف بمضادات الطيف المحدود (Narrow Spectrum Antibiotics) والبعض الآخر له فعالية على مختلف مجاميع الاحياء المجهرية فتعرف بمضادات الطيف الواسع (Broad Spectrum Antibiotics) (Sherris, ٢٠١٨) .

يؤدي الإستعمال الواسع النطاق للمضادات الحيوية في المجموعات السريرية البشرية الى ظهور كائنات مقاومة للمضادات الحيوية مع حدوث انتقاء للأنماط الجينية النادرة المقاومة ،و تعد هذه المقاومة من أهم المشاكل الصحية ويترتب على ذلك تطوير واكتشاف مضادات حيوية للقضاء على السلالات البكتيرية المقاومة ، و صفة المقاومة إما فطرية (Innate) أو مكتسبة (Acquired) ، تكتسبها البكتيريا عن طريق الطفرات في الجينات ، أو عن طريق نقل الجينات الأفقي الذي يحدث بواسطة التحول (Transformation) ، و الحث (Transduction) والاقتران (Conjugation) الذي يتم فيه نقل البلازميدات (Plasmids) بين الخلايا البكتيرية الحية ، و تتميز البلازميدات بقابليتها على جمع العديد من انزيمات المقاومة أثناء تنقلاتها ، و هناك انماط عدة من المقاومة للمضادات الحيوية منها مقاومة لواحد على الاقل من بين ثلاثة مضادات حيوية فتسمى المقاومة المتعددة Multi-Drug resistant و مقاومة لاثنين أو كل المضادات المستعملة Extensively-Drug resistant و مقاومة لكل المضادات Pan-Drug resistant (Larsson & Flach , ٢٠٢٢) .

١-٢-٤-١ مضادات البيتا لاكتام Beta – lactam

المضادات الحيوية من نوع البيتا لاكتام هي مجموعة ضخمة من المضادات تحتوي جميعها على حلقة البيتا لاكتام في تركيبها ، وتصنف هذه المجموعة إلى اربع فئات رئيسة هي بنسلينات (Penicillins) ، سيفالوسبورينات (Cephalosporins) ،و كاربابينيمات (Carbapenems) ، واحادية البكتم (Monobactams) ، وهذه الفئات الاربع تختلف عن بعضها البعض بنوع الحلقة الاضافية التي ترتبط بحلقة البيتا لاكتام ، و توجد حلقة الثيازولدين المكونة من خمسة عناصر في البنسلين ، و في السيفالوسبورين حلقة مكونة من ستة عناصر ، وحلقة مزدوجة في الكاربابينيمات وفي احادي البكتم فقط حلقة البيتا لاكتام (Veiga & Paiva ., ٢٠١٨) . و تعمل مضادت البيتا لاكتام على تثبيط الخلايا البكتيرية عن طريق تعطيل انزيمات transpeptidases التي تساهم في تشكيل جدار الخلية (Pandey & Cascella , ٢٠٢٢) .

و قد أدى تعرض السلالات البكتيرية المستمر إلى مضادات البيتا لاكتام إلى نشوء طفرات مسؤولة عن تكوين انزيمات البيتا لاكتام β-Lactamases ، وهذه الانزيمات لها قابلية تحطيم حلقة البيتا لاكتام لكل من البنسلينات ، و سيفالوسبورينات ، و كاربابينيمات ، واحادي البكتم ، فضلاً عن فئات أخرى من المضادات الحيوية

وبالتالي فان هذه الانزيمات تسمى بإنزيمات ممتدة الطيف (extended - β-Lactamases (ESBLs – spectrum (Jacoby & Munos –Price, ٢٠٠٥) . و نظراً لزيادة مقاومة مضادات البيتا لاكتام من قبل انزيمات البيتا لاكتام ، فقد تم إنتاج مركبات بيتا لاكتام في السنوات الاخيرة والتي تمتاز بتحملها تأثيرات التحلل المائي بواسطة انزيمات بيتا لاكتام ، حيث شهدت اوائل الثمانينيات تطور الجيل الثالث من المضاد سيفالوسبورين ، والتي تعتمد بشكل أساس على قدرتها على تفادي التحلل المائي بواسطة جميع انزيمات بيتا لاكتام الموجودة في البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Torres *et al.*,٢٠١٩).

١-٢-٤-٢ آليات مقاومة المضادات الحيوية في البكتيريا

طورت البكتيريا عدد من آليات المقاومة للمضادات الحيوية وهي كالاتي :

١- ٢-٤-٢-١ انتاج الانزيمات Enzymes production

أول طريقة مقاومة للمضادات الحيوية تم التعرف عليها من خلال الدراسات السابقة هي انتاج انزيمات β-lactamases بواسطة بكتيريا *E. coli* المسببة للأمراض (Gualerzi *et al.*, ٢٠١٤) . انزيمات البيتا لاكتام هي انزيمات قديمة يمكن ارجاع أصولها إلى ملايين السنين ، فقد ظهرت في البداية من مصادر بيئية على الأرجح لحماية البكتيريا من هجوم Beta – lactm الذي يحدث بشكل طبيعي و من المفترض أنها بالأصل بروتينات تطورت إلى انزيمات لاكتاميز (lactamases) (Bush, ٢٠١٨) . و تم اكتشاف أول انزيم من انزيمات البيتا لاكتام هو انزيم TEM-١ β-Lactamase في عام ١٩٦٤ المعزول من بكتيريا اشيرشيا القولون *E. coli* من عينة دم لرجل يعاني من تسمم الدم ، وسرعان ما تم اكتشاف انزيم SHV-١ β-Lactamase في سلالات من أنواع الكلبسيلا *Klebsiella* المقاومة للبيتا لاكتام ، (Bradford, ٢٠٠١) .

تنتج البكتيريا السالبة لصبغة كرام انزيمات بيتا لاكتام الممتدة الطيف ، التي تحلل ازتريونام Aztreonam والبنسيلين والجيل الاول والثاني والثالث من السيفالوسبورين مثل سيفترياكسون Ceftriaxone و سيفوتاكسيم Cefotaxime و سيفتازيديم Ceftazidime ، ومعظم الجينات التي تشفر لإنزيمات (ESBLs) تكون محمولة على البلازميدات ، و يمكن أن تحمل البلازميدات نفسها جينات مقاومة لعدد من فئات مختلفة من المضادات الحيوية غير ذات صلة (McCloskey *et al.*, ٢٠١٨) . و تحتوي العديد من المضادات الحيوية على روابط كيميائية حساسة للتحلل المائي مثل رابطة الاستر والاميد ، ومن المعروف إنّ انزيمات البيتا لاكتام تكسر حلقة اللاكتام للبنسيلين والسيفالوسبورين عن طريق التحلل المائي لرابطة الاميد ، و هذا يؤدي إلى تغير تركيب المضاد الحيوي وبالتالي يصبح غير فعال غالبا تنتشر انزيمات البيتا لاكتام في البكتيريا السالبة لصبغة كرام على سبيل المثال بكتيريا *E. coli* (Bush & Bradford , ٢٠١٩) .

١-٢-٤-٢-٢ تحوير الهدف Target modification

كل المضادات الحيوية لها أهداف مثل البروتينات أو تراكيب أخرى ،وإنّ أي تغير في تركيب الجزء المستهدف يؤدي إلى مقاومة المضاد الحيوي ، وعلى سبيل المثال مقاومة البكتيريا الموجبة لصبغة كرام للمضادات الحيوية من نوع ماكروليدات (Macrolides) إذ تخضع الجزيئات المستهدفة لتعديل انزيمي يقلل من ارتباط المضاد الحيوي (Mayers *et al*., ٢٠٠٩) .

١- ٢-٤-٢-٣ تغير نفاذية جدار الخلية Alteration of permeability of cell wall

تتميز البكتيريا السالبة لصبغة كرام بوجود غشاء خارجي Outer membrane الذي يعمل كحاجز إضافي يمنع انتقال المواد الكيميائية السامة والمضادات عن طريق تغير نفاذية البورينات (Porins) وهي بروتينات غشائية خارجية تمنع اختراق بعض المضادات الحيوية ومثال على ذلك بكتيريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* (Pang *et al*., ٢٠١٩) .

١- ٢-٤-٢-٤ تغير مسارات الايض Alteration of metabolic pathways

تم ملاحظة زيادة في مقاومة المضاد الحيوي البوليمكسين (Polymyxin) من قبل سلالات بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* الطافرة من خلال اضطرابات كبيرة في ايض الاحماض الامينية والكاربوهيدرات ، إذ وضحت بيانات الايض الخلوي انخفاض مستويات الدهون المفسفرة phospholipid والاحماض الدهنية في السلالة الطافرة ، و يعتقد إن تغير الايض الخلوي له دور في مقاومة البوليمكسين (Han *et al*., ٢٠١٨) .

١-٢-٤-٢-٥ مضخات الدفق Efflux pumps

مضخات الدفق عبارة عن بروتينات توجد في الغشاء السايتوبلازمي للخلية تقوم بضخ مجموعة واسعة من المضادات الحيوية غير ذات صلة الى خارج الخلية بنفس سرعة دخولها وايضا ضخ مركبات متنوعة ، وتوجد في معظم البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام مثل البكتيريا المعوية والمكورات العنقودية الذهبية ، حيث تكسبها القدرة على ضخ مجموعة واسعة من المضادات الحيوية مثل Fluoroquinolones و Macrolides وبالتالي تساهم بالمقاومة المتعددة للأدوية(Pasqua *et al* ., ٢٠١٩) .

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

٢- المواد وطرائق العمل Materials and methods

٢-١ المواد Materials

٢-١-١ الأجهزة المختبرية Laboratory equipments

الأجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة الحالية موضحة في الجدول رقم ٢-١ .

جدول ٢-١ الأجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة .

ت	الجهاز		الشركة المصنعة (المنشأ)
١	ثلاجة	Refrigerator	Concord (Lebanon)
٢	جهاز التدوير الحراري	PCR thermal cycler	Labnet (USA)
٣	جهاز الترحيل الكهربائي	Electrophoresis system	Clever (England)
٤	جهاز الفايتك	VITEK ٢	Biomerieux (France)
٥	جهاز تقطير	Water distillatory	GFL (Germany)
٦	جهاز طرد مركزي	Centrifuge	Hettich (Germany)
٧	جهاز قياس تركيز الدنا	DNA Nanodrop	AcTGen (Taiwan)
٨	جهاز مازج	Vortex	Stuart (UK)
٩	حاضنة	Incubator	Memmert (Germany)
١٠	فرن كهربائي	Oven	Memmert (Germany)
١١	كابينة زرع	Laminar air flow(hood)	Faster bio ٤٨ (Italy)
١٢	كاميرا رقمية	Digital camera	ATTO (Japan)
١٣	مجهر ضوئي	Light microscope	Olympus (Japan)
١٤	مصدر للأشعة فوق البنفسجية	Ultra violet transilluminator	Biopafe (Chain)
١٥	مؤصدة	Autoclave	Steam sterilize (Spain)
١٦	ميزان كهربائي حساس	Sensitive electric balance	Memmert (Germany)

٢-١-٢ المواد الكيميائية Chemical material

المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة الحالية موضحةً في الجدول رقم ٢-٢ .

جدول ٢-٢ المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة .

ت	المادة الكيميائية	الشركة المصنعة (المنشأ)
١	انزيم الاوكسديز Oxidase	(العراق) معهد المصول واللقاح
٢	بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide	(العراق) معهد المصول واللقاح
٣	زيت عدسات Seder oil	BDH (England)
٤	كليسرول Glycerol	PanReac (Spain)
٥	محلول ملحي Normal saline solution	Scharlau (Spain)
٦	مكونات صبغة كرام Gram stain * صبغة البنفسج البلوري Crystal violet stain * صبغة السفرانين Safranin stain * الايودين Iodine * الكحول الأثيلي Ethanol ٩٦%	(العراق) معهد المصول واللقاح
٧	هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH)	Scharlau (Spain)

٢-١-٣ الأوساط الزرعية Culture media

الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة الحالية موضحة في الجدول رقم ٢-٣ .

جدول ٢-٣ الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة .

ت	الوسط الزرعي وفائدة الاستخدام	الشركة المصنعة (المنشأ)
١	وسط اساس غراء الدم Blood Agar Base استعمل كوسط اغنائي لتعزيز نمو العزلات البكيرية الخاملة	Neogen (USA)
٢	وسط ايوسين مثلين الازرق Eosin Methylene Blue Agar استعمل كوسط تفريقي لبكتيريا *E. coli* التي تكون مستعمرات خضراء معدنية لامعة على الوسط	Himedia (India)
٣	وسط غراء الكروم HiCrome EC O١٥٧:H٧ selective Agar استعمل لتميز البكتيريا *E. coli* O١٥٧:H٧ التي تظهر مستعمراتها باللون الارجواني	Himedia (India)
٤	وسط غراء المكونكي MacConkey Agar استعمل للتفريق بين البكتيريا السالبة لصبغة كرام التي تخمر سكر اللاكتوز عن تلك التي لا تخمر سكر اللاكتوز	Neogen (USA)
٥	وسط غراء سوربيتول ماكونكي MacConkey Sorbitol Agar استعمل الوسط للتفريق بين عزلات بكتيريا *E. coli* المخمرة لسكر السوربيتول وغير المخمرة	Himedia (India)
٦	وسط مولر - هنتون Mueller - Hinton Agar استعمل في اختبار فحص حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية	Merck (Germany)
٧	وسط نقيع القلب والدماغ Brian –Heart infusion broth استعمل لحفظ العزلات البكتيرية	Himedia (India)

٢-١-٤ المضادات الحيوية Antibiotics

المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة الحالية موضحةً في الجدول رقم ٢-٤ .

جدول ٢-٤ أقراص المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة .

ت	المضاد الحيوي	الرمز	تركيز المضاد مايكرو غرام /القرص	الشركة المصنعة (المنشأ)
١	Amikacin	AK	٣٠	Himedia(India)
٢	Ampicillin	Amp	١٠	
٣	Azithromycin	AZM	١٥	
٤	Cefotaxime	CTX	٣٠	
٥	Ceftriaxone	CTR	٣٠	
٦	Ciprofloxacin	CIP	٥	
٧	Co-Trimoxazole	COT	٢٥	
٨	Doxycycline	DXT	٣٠	
٩	Gentamycin	GEN	١٠	
١٠	Tetracycline	TE	٣٠	Liofilchem (Italy)

٢-١-٥ معدات أخرى

معدات مستعملة في الدراسة الحالية موضحةً في الجدول رقم ٢-٥ .

جدول ٢-٥ معدات أخرى مستعملة في الدراسة .

ت	المواد	الشركة المصنعة (المنشأ)
١	أطباق بتري Petri dishes	Biozek (Switzerland)
٢	أنابيب معقمة Tubes	Biozek (Switzerland)
٣	دوارق زجاجية Flask	Human (Germany)
٤	ماصات دقيقة مختلفة الحجم Micro pipettes	Human (Germany)
٥	مسحات قطنية Cotton swabs	Afco (Jordan)
٦	مشعل حراري Burner	Jen way (Germany)
٧	ناقل Loop	Himedia (India)

٢-١-٦ البوادئ Primers sequences

الجينات المستعملة في الدراسة الحالية مع بوادئها موضحة في الجدول رقم ٢-٦ .

جدول ٢-٦ الجينات و البوادئ المستعملة في الدراسة .

ت	الجين	تتابع البادئ		المصدر	(bp)
١	*Eae*	F	CTGAACGGCGATTACGCGAA	Khairy *et al.*, ٢٠٢٠	٩١٧
		R	CCAGACGATACGATCCAG		
٢	*bfpA*	F	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC		٣٢٦
		R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
٣	*stx* ١	F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC		١٨٠
		R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
٤	*stx* ٢	F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC		٢٥٥
		R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
٥	*SHV*	F	ATGCGTTATATTCGCCTGTG		٧٥٣
		R	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA		
٦	*TEM*	F	AAACGCTGGTGAAAGTA		٨٢٢
		R	AGCGATCTGTCTAT		
٧	*CTX-M*	F	CGCTTTGCGATGTGCAG	Amin *et al.*, ٢٠١٨	٥٥٠
		R	ACCGCGATATCGTTGGT		

F= Forward

R= Reversed

٢-١-٧ المواد المستعملة في التشخيص الجزيئي بتقنية PCR

جدول ٢-٧ المواد المستعلمة في التشخيص الجزيئي بتقنية PCR في الدراسة الحالية .

المواد	الشركة (المنشأ)
عدة استخلاص جينوم الدنا Genomic DNA extraction kit - Lysis ٢٥ml -Proteinase k ١.٥ml *٢tube -Binding ٢٥ml -Washing١ ٣٠ml -Washing٢ ١٢ml -Elution ٢٥ml -Spin column with collection ١٠٠ p	Addbio(Korea)
Master Mix -Top DNA Polymerase ١U -dNTP(dATP,dCTP,dGTP,dTTP) ٢٥٠ mM -Tris –HCL(PH ٩.٠) ١٠mM -(MgCl٢ and KCl٢) ٣٠mM -Stabilizer and Tracking dye (loading dye)	Promega (USA)
الدليل الحجمي (Ladder DNA) بحجم bp (١٠٠- ٢٠٠٠)	Promega (USA)
محلول TBE Buffer (٥x) Tris Borate –EDTA-Na٢ ١L	Inno-train (Korea)
الاكاروز Agarose	BiobasicINK (Canada)
صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide dye ١٠mg/ml	Biotech (Korea)
كحول مطلق Absolute Ethanol	Scharlau (Spain)
ماء خالي من الايونات Deionized water	Bioneer (Korea)

٢-٢ تحضير الاوساط الزرعية والكواشف والمحاليل اللازمة

٢-٢-١ تحضير الأوساط الزرعية Preparation of Culture Media

٢-٢-١-١ تحضير الأوساط الزرعية الجاهزة

حُضرت الأوساط الزرعية الجاهزة وهي (وسط غراء ماكونكي MacConkey agar ، و وسط غراء الايوسين مثلين الازرق Eosin Methylene Blue agar (EMB) ، و وسط غراء سوربيتول ماكونكي MacConkey Sorbitol agar ، و وسط غراء مولر هنتون Mueller-Hinton) ، حسب تعليمات الشركة المصنعة لها والتي كانت مثبتة على العبوة الخاصة بكل وسط زرعي ، بإذابة كمية معينة من الوسط في حجم معين من الماء المقطر المعقم باستعمال قنينة زجاجية نظيفة ذات غطاء محكم ، ثم وضعت القنينة في حمام مائي water bath لحين ذوبان الوسط ،بعدها نقلت القنينة الى جهاز المؤصدة Autoclave لغرض التعقيم بدرجة حرارة ١٢١مْ وضغط ١٥باوند/انج ل ١٥ دقيقةً و ترك الوسط ليصبح درجة حرارته ٤٥ مْ تقريبا ثم صب في أطباق Petridishs معقمة ، بعدها حفظت الاطباق في الثلاجة بدرجة ٤مْ لحين الاستخدام .

٢-٢-١-٢ تحضير الأوساط الزرعية التركيبية

٢-٢-١-٢-١ وسط غراء الدم Blood Agar

حضر وسط أساس غراء الدم Blood agar base كما ذكر في الفقرة ٢-٢-١-١ ، و تم إضافة دم الإنسان بنسبة ٥% إلى الوسط ،مزج المحلول جيداً ثم صب في أطباق ، و حفظت الأطباق في الثلاجة بدرجة حرارة ٤ مْ لحين الاستعمال ، و تم استعمال وسط اكار الدم كوسط اغنائي (Enrichment media) لتعزيز نمو العزلات البكتيرية (Jawetz *et al*., ٢٠١٩) .

٢-٢-١-٢-٢ وسط نقيع القلب والدماغ Brian - Heart Infusion Broth

حضر الوسط كما ذكر في الفقرة ٢-٢-١-١ ، ثم اضيف ١٥% من الكليسرول Glycerol الى ٨٥% من الوسط ، مزج الوسط جيداً ، بعد ذلك صب في أنابيب معقمة Tubes، و حفظت الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة ٢٠- مْ لحين الاستعمال ، و تم استعمال الوسط لحفظ العزلات البكتيرية (Jawetz *et al*., ٢٠١٩) .

٢-٢-١-٢-٣ وسط غراء الكروم HiCrome EC O١٥٧:H٧ Agar

حضر الوسط كما ذكر في الفقرة ٢-٢-١-١ ، ثم تم إضافة مادة معززة supplement بمقدار ١٠ مليلتر الى لتر واحد من الوسط ، مزج الوسط جيداً و صب في أطباق معقمة ، و حفظت الأطباق في الثلاجة بدرجة حرارة ٤ مْ لحين الاستعمال ، و استعمل الوسط كوسط اختياري للكشف عن بكتيريا *Escherichia coli* O١٥٧:H٧ (Jenkins *et al.*, ٢٠٢٠) .

٢-٢-٢ تحضير الكواشف Reagents preparation

٢-٢-٢-١ كاشف الاوكسديز Oxidase Reagent

حضر الكاشف بإذابة ١غرام من مسحوق tetramethyle - phenylenediamine dihydrochloride في ١٠٠ مللتر من الماء المقطر المعقم ، و حفظ الكاشف في قنينة زجاجية معتمة ، و تم استعمال هذا الكاشف للكشف عن قابلية البكتيريا على إنتاج انزيم الاوكسديز (Tadesse & Alem , ٢٠٠٦) .

٢-٢-٢-٢ كاشف الكاتليز Catalase Reagent

حضر الكاشف من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز ٣% من المحلول الاصلي المركز ٣٠% ،حفظ المحلول في قنينة زجاجية معتمة ،و تم استعمال الكاشف للكشف عن قابلية البكتيريا لإنتاج انزيم الكاتليز (Tadesse & Alem, ٢٠٠٦) .

٢-٢-٣ تحضير المحاليل Preparation of Solution

٢-٢-٣-١ محلول ماكفرلاند McFarland Solution

حضر محلول ماكفرلاند من محلولين مثلما يأتي :

محلول (١) : حضر بإذابة ١.١٧٥غرام من كلوريد الباريوم ($BaCl_2$) في ١٠٠ ملليتر من الماء المقطر .

محلول (٢): حضر بإضافة ١ملليتر من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) إلى ٩٩ ملليتر من الماء المقطر .

أُضيف ٠.٥ ملليتر من محلول (١) إلى ٩٩.٥ ملليتر من محلول (٢) للحصول على محلول ماكفرلاند القياسي والذي يعادل ١.٥*١٠^8 (خلية / ملليتر) ، و حفظ المحلول في قنينة زجاجية معتمة ، ثم استعمل محلول ماكفرلاند في اختبار الحساسية الدوائية (Bailey & Scott , ٢٠٠٧) .

٢-٣ طرائق العمل Methods

٢-٣-١ جمع العينات Samples Collection

جمعت ١٠٠ عينة براز من الاطفال بعمر دون ٥ سنوات حسب تشخيص الطبيب ، وفحصت عينات البراز تحت المجهر الضوئي (General Stool Examination) وسجلت نتائج فحص العينات الحاوية على الخلايا الالتهابية وخلايا الدم الحمر ، كما هو موضح في الملحق (١) (Stoll *et al* ., ١٩٨٣) . وكانت ٨٠ عينة تعود للأطفال الذين يعانون من أعراض الاسهال و ٢٠ عينةً تعود للأطفال الاصحاء (أطفال يعانون من أمراض اخرى غير الإسهال) ، جمعت العينات من مستشفى الأطفال التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة للمدة من ٢٠٢٢/٢/٢ و لغاية ٢٠٢٢/٦/١٥ .

٢-٣-٢ التشخيص المزرعي Cultural Identification

جمعت العينات في علب بلاستيكية معقمة نظيفة ، وبعد إجراء التخافيف العشرية للعينات ، زرعت العينات على وسط غراء الماكونكي بحسب طريقة (Tomas *et al.*, ١٩٩٨) . و تمت ايضا ملاحظة ميزة تخمر سكر اللاكتوز ، ثم زرعت العزلات النقية على اوساط زرعية مختلفة (وسط ايوسين مثلين الازرق ، و وسط غراء سوربتول ماكونكي و وسط غراء كروم) من أجل الحصول على تشخيص مبدئي للعزلات البكتيرية بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية والتي شملت كل من اللون ،و الشكل ، والحجم ، والحافات ، و الارتفاعات (Mahon *et al.*, ٢٠١٥) .

٢-٣-٣ التشخيص المجهري Microscopic Identification

حضرت مسحات من العزلات البكتيرية النامية على وسط اكار ماكونكي بعمر (١٦- ١٨) ساعة بتقنية صبغة كرام ، بعدها فحصت باستعمال المجهر الضوئي لرؤية شكل ولون الخلايا ونمط تجمعاتها (Benson, ٢٠١٧) .

٢-٣-٤ التشخيص الكيمو حيوي Biochemical Identification

٢-٣-٤-١ اختبار الاوكسديز Oxidase Test

وضعت قطرة من كاشف الاوكسديز Oxidase reagent المحضر سابقاً على ورقة معقمة filter paper ، بعدها نقلت بضع مستعمرات نامية على وسط اكار ماكونكي بعمر ٢٤ساعة بوساطة عيدان خشبية wooden sticks على الورقة ، و يعد تغير لون المستعمرة إلى اللون الارجواني في غضون ثواني دليل قدرة البكتيريا على إنتاج انزيم الاوكسديز (Mahon *et al.*, ٢٠١٥) .

٢-٣-٤-٢ اختبار الكاتليز Catalase Test

نقلت مستعمرات بكتيرية نامية على وسط المكونكي بعمر ٢٤ ساعة بوساطة عيدان خشبية wooden sticks على شريحة زجاجية معقمة وجافة ، بعدها أضيفت قطرة من كاشف الكاتليز Catalase reagent المحضر سابقاً ، و يعد ظهور فقاعات مائية (ماء و اوكسجين) فورية دليل قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكاتليز (Mahon *et al.*, ٢٠١٥) .

٢-٣-٤-٣ اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم KOH Test

نقلت مستعمرات بكتيرية نامية على وسط اكار مكونكي بعمر ٢٤ ساعة على شريحة زجاجية معقمة جافة بواسطة عيدان خشبية wooden sticks نظيفة ومعقمة ، بعدها اضيفت قطرة من هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) ، و يعد تكون مادة تشبه الهلام في تركيبها في غضون ما يقارب ٣٠ ثانية دليل ان البكتيريا سالبة لصبغة كرام (Markey *et al.*, ٢٠١٣) .

٢-٣-٥ تشخيص البكتيريا باستخدام نظام الفايتك VITEK٢ Compact System

حضر المعلق البكتيري وفقا لتعليمات الشركة المصنعة Biomrieux ، وذلك بنقل كمية من المستعمرات النامية على وسط غراء المكونكي بطريقة subculture بعمر (١٨-٢٤) ساعة إلى أنبوبة تحتوي ٣ ملليتر من محلول ملحي معقم sterile saline ، وضبطت عكارة المعلق البكتيري بالمقارنة إلى محلول ماكفرلاند القياسي ٠.٥ باستعمال جهاز Densi-chek ، وضعت انبوبة المعلق في الجهاز مع وضع بطاقة التشخيص الخاص بالبكتيريا سالبة لصبغة كرام (GN-ID) ، و قد ظهرت نتائج التشخيص على شاشة الحاسوب الخاص بجهاز الفايتك بعد حوالي ٤-١٢ ساعة (Ling *et al.*, ٢٠٠١) .

٢-٣-٦ حفظ العزلات البكتيرية Preservation of Bacterial Isolates

حفظت العزلات البكتيرية في انابيب تحتوي وسط نقيع القلب والدماغ Brian – Heart infusion broth المحضر مسبقا في الفقرة ٢-٢-١-٢-٢ والمضاف إليه كليسيرول Glycerol ،بعدها حفظت الانابيب في درجة حرارة ٢٠ - مْ لحين الاستعمال (Jawetz, ٢٠١٧) .

٢-٣-٧اختبار مقاومة المضادات الحياتية Antibiotic Resistance Test

استعملت طريقة Kirby & Baure لاختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية مثلما يأتي :

- نقلت (٣-٥) من المستعمرات النامية على وسط اكار ماكونكي بعمر(١٨-٢٤) ساعة إلى انبوبة تحتوي ٥ ملليتر من المحلول الملحي الفسلجي normal saline ، ومزج جيداً باستعمال جهاز المازج vortex مع مراعاة ضبط عكورة المعلق البكتيري مع عكورة محلول ماكفرلاند ٠.٥ المحضر سابقا .
- أُدخلت مسحة قطنية cotton swab معقمة في الأنبوبة الحاوية على المعلق البكتيري، ثم ضغطت على الجدار الداخلي للأنبوبة لإزالة اللقاح الزائد ، بعدها مررت باتجاهات مختلفة على سطح طبق اكار مولر-هنتون Mueller – Hinton agar للحصول على نمو متجانس .
- وضعت أقراص المضادات الحيوية Antibiotic disk على سطح الطبق المزروع بواسطة ملقط معقم باللهب على ابعاد متساوية وضغطت الأقراص بلطف ، بعدها نقلت الأطباق الى الحاضنة Incubator وحضنت بدرجة حرارة ٣٥ مْ لمدة (١٦- ١٨) ساعة .
- سجلت أقطار مناطق التثبيط حول الأقراص بالملليتر باسِتعمال مسطرة ، و قورنت نتائج القياس بجداول قياسية (CLSI , ٢٠٢٢) ، و استعملت هذه الطريقة بحسب ما ذكر في (Benson, ٢٠١٧) .

٢-٣-٨ التشخيص الجزيئي Molecular Identification

٢-٣-٨-١ استخلاص الحامض النووي Genomic DNA Extraction

تم استخلاص الحامض النووي الدنا DNA بكتيريا *E. coli* السالبة لصبغة كرام حسب تعليمات الشركة المصنعة Addbio للعدة kit الموضحة مكوناته في الجدول (٢-٧) ، وكانت التعليمات كالاتي :

١- نقلت مستعمرات بكتيريا *E. coli* النامية بعمر (١٨-٢٤) ساعة إلى أنابيب ابندروف eppendrof تحتوي ٢٠٠مايكروليتر من محلول lysis و ٢٠مايكروليتر من محلول proteinase ، و مزج أنبوب العالق بجهاز المازج vortex ، ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٥٦ مْ لعشر دقائق .

٢- أضيف ٢٠٠ مايكروليتر من محلول Binding و ٢٠٠ مايكروليتر من الايثانول المطلق absolute ethanol إلى أنبوبة العالق ، و مزجت الأنبوبة بجهاز المازج vortex لنصف دقيقة .

٣- فصل العالق بجهاز centrifuge بسرعة ١٣٠٠٠(دورة /دقيقة) ل ٣ دقائق .

٤- نقل بحذر ٥٠٠ مايكروليتر من الجزء العلوي للمعلق لتجنب خلط الجزء العلوي الحاوي علىDNA الطافي مع الجزء السفلي الحاوي على رواسب أخرى ، إلى عمود الفصل مع انبوبة الجمع spin column with collection tube، ثم وضعت بجهاز centrifuge بسرعة ١٣٠٠٠ (دورة/دقيقة) لدقيقة واحدة .

٥- أضيف ٥٠٠ مايكروليتر من محلول washing١ إلى عمود الفصل مع أنبوبة الجمع ، و ثم وضعت بجهاز centrifuge بسرعة ١٣٠٠٠ (دورة /دقيقة) لدقيقة واحدة بعد ذلك سكب الراشح .

٦- كررت الخطوة السابقة ولكن بإضافة ٥٠٠ مايكروليتر من محلول washing٢ .

٧- تم تحريك عمود الفصل مع أنبوبة الجمع spin column with collection tube بجهاز centrifuge بسرعة ١٣٠٠٠(دورة /دقيقة) لدقيقة واحدة للتخلص من الايثانول المتبقي في عمود الفصل ، نقل عمود الفصل spin column إلى أنبوبة اخرى .

٨- أضيف (٢٠٠ -١٠٠) مايكروليتر من محلول Elution إلى عمود الفصل spin column ، ثم وضعت بجهاز centrifuge بسرعة ١٣٠٠٠(دورة /دقيقة) لدقيقة واحدة ، تم التخلص من عمود الفصل واحتفظ بأنبوبة الحاوية على DNA بدرجة حرارة (٢٠-) مْ لحين الاستعمال .

٢-٣-٨-٢ محاليل البوادئ Primers Solution

حضرت محاليل البوادئ حسب تعليمات الشركة المصنعة Oligo ، وذلك بإضافة ٩٠ مايكروليتر من الماء المقطر اللاأيوني إلى البادئ الذي يكون على شكل حبيبات من أجل الحصول على محلول بادئ بتركيز ١٠٠ بيكومول/ مايكروليتر ، وبعدها يؤخذ ١ مايكروليتر من البادئ ويضاف له ٩ مايكروليتر من الماء المقطر اللاأيوني ليصبح التركيز ١٠ بيكومول /مايكروليتر ، ثم يمزج المحلول جيدا بجهاز المازج vortex ، و يتم حفظ المحلول بدرجة حرارة ٢٠- مْ لحين الاستعمال ، وحفظت المحاليل الخزينة للبوادئ بدرجة حرارة ٢٠- مْ مع مراعاة مزج المحلول بعد اخراجه من التجميد لغرض مجانسته قبل الاستعمال .

٢-٣-٨-٣ تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

يتكون تفاعل البلمرة المتسلسل من عدة خطوات مثلما يأتي :

١- حضر مزيج التفاعل حسب تعليمات الشركة المصنعة ، مثلما موضح الجدول ادناه

جدول ٢-٨ مكونات وحجوم مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل

المكونات		الحجم مايكروليتر
Master Mix		١٢.٥
مستخلص الدنا DNA extraction		٣
البادئ Primer	Forward primer	١
	Reversed primer	١
الماء اللاأيونى		٧.٥
الحجم النهائى		٢٥

٢- مزجت الأنابيب حاوية على مزيج التفاعل بجهاز المازج vortex ل ٥ ثواني .

٣- وضعت الأنابيب في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض إجراء عملية تضخيم الدنا amplifaction DNA حسب الاوضاع الحرارية المثلى للدورات ، بعد ذلك تم برمجة جهاز التدوير الحراري حسب ما جاء في (Khairy *et al.*, ٢٠٢٠ , Amin *et al.*, ٢٠١٨) مثلما موضح الجدول ادناه :-

جدول ٢-٩ الظروف الحرارية المثلى لدورات تفاعل البلمرة المتسلسل في جهاز التدوير الحراري

ت	الجين	مرحلة المسخ الاولى	مرحلة المسخ الثانية	مرحلة الارتباط	مرحلة الاستطالة	مرحلة الاستطالة النهائية
١	*eae*	٩٥ مْ / ٥ دقيقة (دورة واحدة)	٩٥ مْ / ١ دقيقة (٣٠ دورة)	٥٨ مْ / ٣٠ ثانية (٣٠ دورة)	٧٢ مْ / ١ دقيقة (٣٠ دورة)	٧٢ مْ / ١٠ دقيقة (دورة واحدة)
٢	*bfpA*					
٣	*TEM*					
٤	*CTX-M*					
٥	*stx* ١	٩٥ مْ / ٥ دقيقة (دورة واحدة)	٩٥ مْ /١ دقيقة (٣٠ دورة)	٥٠ مْ / ٣٠ ثانية (٣٠ دورة)		
٦	*stx* ٢					
٧	*SHV*	٩٥ مْ / ٥ دقيقة (دورة واحدة)	٩٥ مْ / ١ دقيقة (٣٠ دورة)	٦٠ مْ / ٣٠ ثانية (٣٠ دورة)		

مْ = درجة الحرارة

٢-٣-٨-٤ محلول بفر TBE buffer X١

حضر TBE buffer X١ حسب تعليمات الشركة المصنعة Inno-trian ، بإضافة ٢٠ مل من TBE buffer ذي تركيز X٥ الى ٨٠ مل من الماء المقطر .

٢-٣-٨-٥ هلام الاكاروز Agarose gel

حضر هلام الاكاروز كالاتي :

١- أُذيب ١غم من مسحوق الاكاروز في ١٠٠ملليتر من محلول TBE buffer X١ ، و سخن المحلول في حمام مائي إلى الدرجة الذوبان ثم ترك لتصبح درجة حرارته ٥٠ مْ تقريباً ، بعد ذلك اضيف إليه ٣ مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم Bromide ethidium ومزجت جيداً مع المحلول .

٢- صب هلام الاكاروز بشكل هادئ ومستمر لتجنب حدوث الفقاعات في قالب tray بعد تثبيت الامشاط comb .

٣- ترك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، ثم رفعت الأمشاط بعناية للحصول على حفر wells .

. (Mahon *et al.*, ٢٠١٥)

٢-٣-٨-٦ الترحيل الكهربائي Electrophoresis

١- أضيف ٥ مايكروليتر من ناتج تضاعف الدنا لكل عينة إلى حفر هلام الاكاروز ، ثم اضيف ٥ مايكروليتر من محلول DNA ladder إلى حفرة هلام الاكاروز الأولى حسب الترتيب .

٢- نقل قالب هلام الاكاروز الى جهاز الترحيل الكهربائي electrophoresis ، ثم غمر سطح الهلام بمحلول X١ TBE buffer، بعد ذلك رحل القالب بإمراره على فرق جهد قدره ١٠٠ فولت لنصف ساعة .

٣- تم تعريض قالب الهلام لمصدر الأشعة فوق البنفسجية ، ثم صورت النتائج و قدرت الأحجام الجزيئية بالمقارنة مع مواقع حزم الدليل الحجمي DNA ladder ذي وزن ١٠٠ - ٢٠٠٠ زوج قاعدي .

٢-٤ التحليل الاحصائي

تم كتابة النتائج بصيغة (متوسط ± الانحراف المعياري) لثلاثة مكررات . تم اختبار T المستقل لتحديد وجود فروقات معنوية بين مجموعتين، و أما التجارب التي تحتوي اكثر من مجموعتين لعامل واحد فقد تم استعمال اختبار تحليل التباين احادي الاتجاه One way ANOVA ، و في كلتا الحالتين تم إستعمال برنامج Mini Tab الإحصائي الإصدار ١٧ (Pennsylvania). تم استخدام اختبار Duncan متعدد المدى كاختبار مخصص للمقارنة بين المتوسطات عند مستوى احتمالية مساوي او أقل من ٠.٠٥ ($P \leq ٠.٠٥$) .

الفصل الثالث

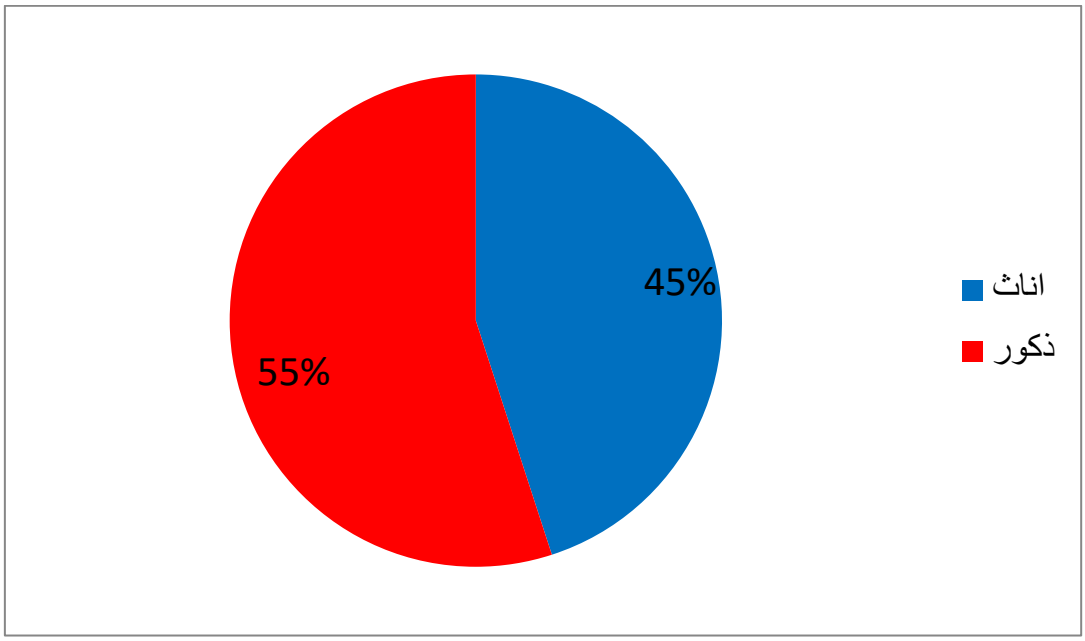
النتائج والمناقشة

٣- النتائج والمناقشة Results and Discussion

٣-١ عزلات بكتيريا اشريشيا القولون *Escherichia coli* Isolates

٣-١-١ جمع العينات Samples Collection

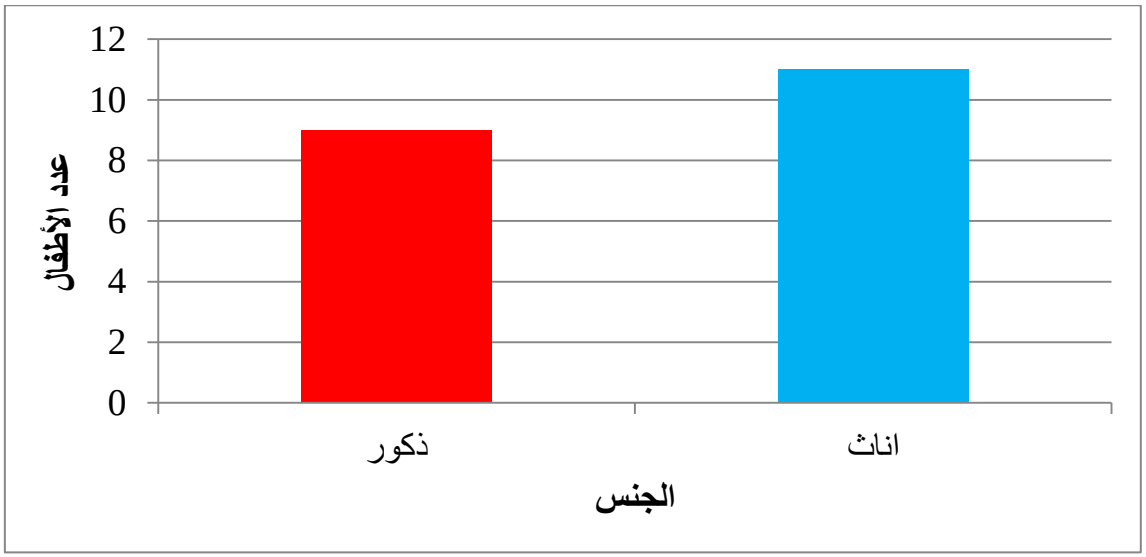
جمعت ١٠٠ عينة براز من الاطفال بعمر دون ٥ سنوات الذين راجعوا مستشفى الاطفال التعليمي في مدينة كربلاء المقدسة ، و كانت بواقع (٥٥) عينة من الذكور و (٤٥) عينة من الإناث مثلما موضح في الشكل (٣-١).



الشكل (٣-١) توزيع العدد العينات الكلي .

٣-١-١-١ مجموعة السيطرة

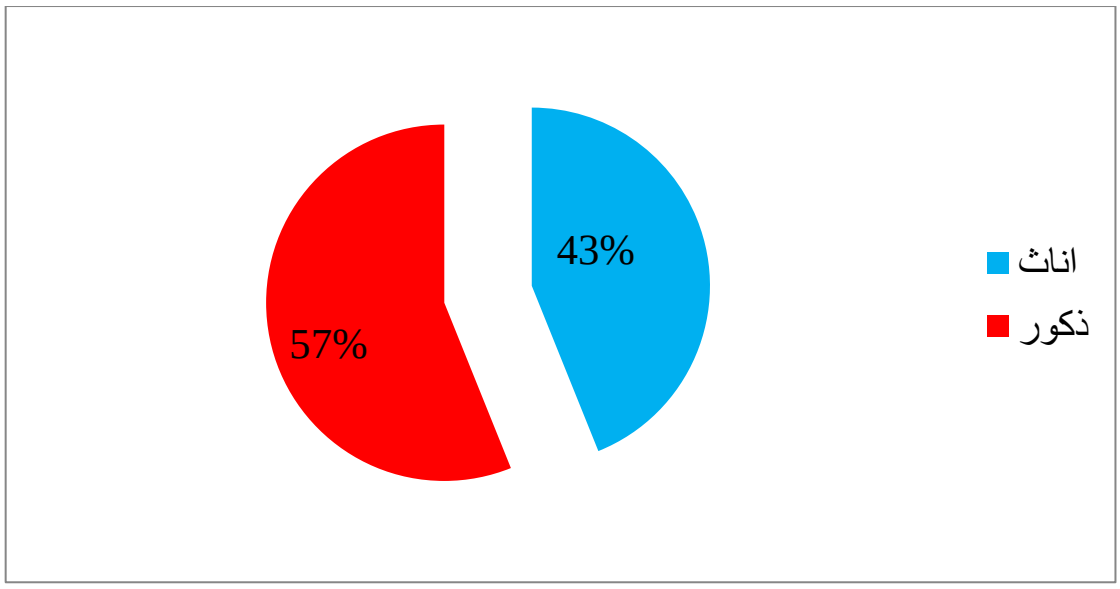
تم تقسيم العدد الكلي للعينات إلى مجموعتين المجموعة الأولى هي مجموعة السيطرة ، وكانت بواقع ٢٠ عينة من الأطفال الأصحاء وكان عدد الذكور (٩) ٤٥٪ عينة وعدد الاناث (١١) ٥٥٪ عينة ،وعند إجراء التحليل الاحصائي تبين عدم وجود فروقات معنوية بين الجنسين لهذه المجموعة ($P \geq ٠.٠٥$) مثلما موضح في الشكل (٣-٢)



الشكل (٣-٢) توزيع عينات السيطرة .

٣-١-١-٢ توزيع الإصابات حسب الجنس

أما المجموعة الثانية من العدد الكلي للعينات فكانت بواقع ٨٠ عينة من الأطفال التي ظهرت عليهم أعراض الإسهال وكانت فيها عدد الذكور (٤٦) ٥٧.٥٪ عينة و الاناث (٣٤) ٤٢.٥% كما موضح في الشكل (٣-٣) ، وبين التحليل الاحصائي وجود فرق بين الذكور والإناث المصابين ($P = ٠.٠٢$) .

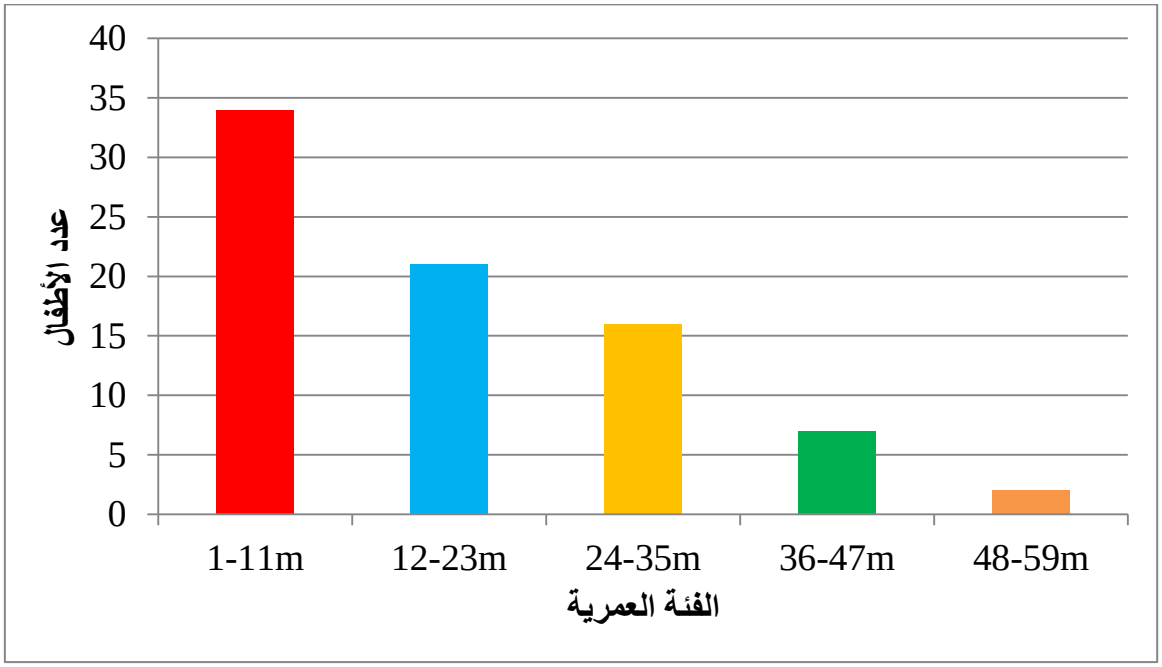


الشكل (٣-٣) نسب توزيع المصابين حسب الجنس .

تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لإصابة الذكور بنسبة أعلى من الإناث مع نتائج دراسة محلية (Ali *et al.*, ٢٠٢٢) أجريت في مدينة بغداد والتي كانت فيها نسبة الإصابة بالذكور ٥٨.٤٤٪ وهي أعلى من نسبة الإصابة بالإناث ٤١.٤٥٪ ، و ذكرت أيضا الدراسة المحلية إن إصابة الذكور من الأطفال بالإسهال أعلى من الإناث ربما يعود السبب إلى عوامل وراثية وفسلجية . و تتفق الدراسة الحالية مع نتائج دراسة (Elkasaby *et al* ., ٢٠٢٢) في مصر والتي توصلت نتائج دراستها إلى إنّ نسبة اصابة الذكور ٥٦.٩٪ اما إصابة الإناث كانت ٤٣.١٪ ، و لم تختلف الدراسة الحالية كثيراً مع دراسة (Samuel *et al.*, ٢٠١٩) والتي كانت نسبة الذكور المصابين ٤٤.٧٤٪ أقل من نسبة الإناث المصابات بمرض الإسهال ٥٥.٢٦٪ ، حيث ذكرت الدراسة بانه لا يوجد فرق معنوي كبير بين المرضى من الذكور والاناث .

٣-١-١-٣ توزيع الاصابات حسب العمر

أظهرت النتائج إن الفئة العمرية (١١-١) شهر كان فيها عدد الأطفال المصابين ٤٢.٥٪ (٣٤) ، والفئة العمرية (٢٣-١٢) شهر كان فيها عدد الاطفال المصابين ٢٦.٢٥٪ (٢١) ، و الفئة العمرية (٣٥-٢٤) شهر كان عدد الاطفال المصابين فيها ٢٠٪ (١٦)، بينما الفئة العمرية (٤٧-٣٦) شهر كان فيها عدد الأطفال المصابين (٧) ٨.٧٥٪ ، وكان في الفئة العمرية (٥٩-٤٨) شهر عدد الاطفال المصابين ٢.٥٪ (٢) ، اتضح مما سبق إنّ عدد الأطفال المصابين أعلى في الفئة العمرية (١١-١) شهر ، كما موضح في الشكل (٣-٤) .



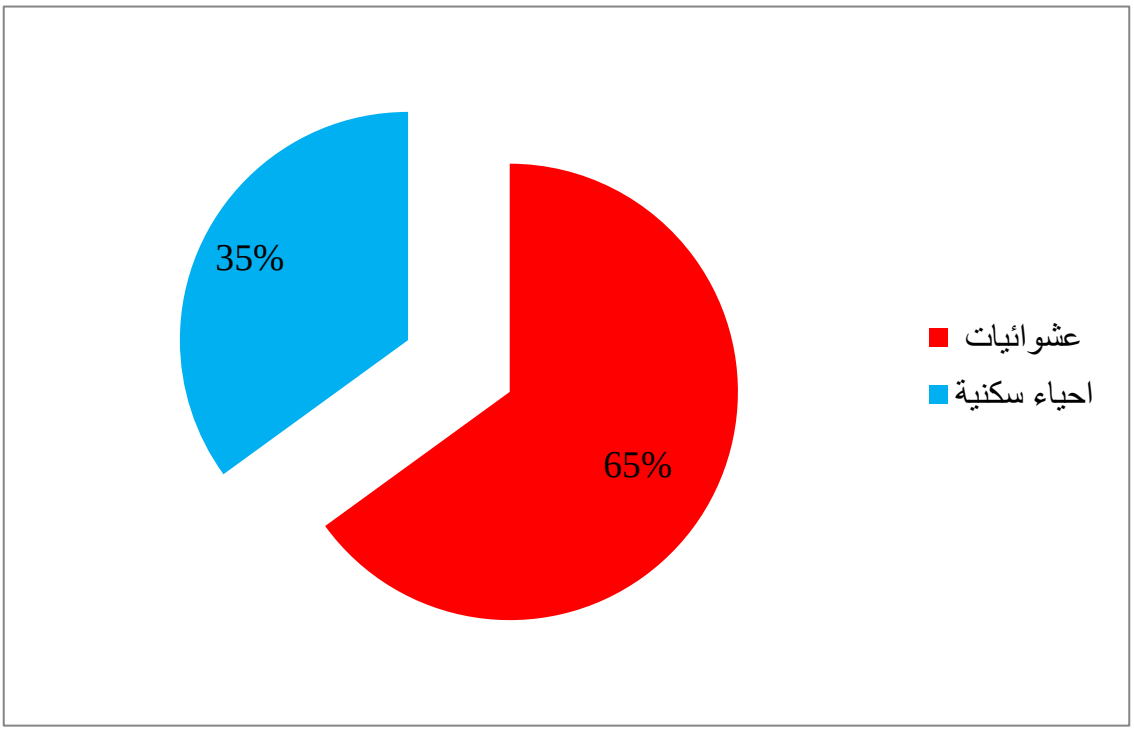
الشكل (٣-٤) الفئات العمرية للأطفال المصابين بالإسهال .

تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للفئات العمرية مع دراسة محلية (Harb *et al.*, ٢٠٢١) في ذي قار ، إذ كانت نسبة الفئة العمرية أقل من سنتين ٦٠٪ والفئة (٥-٢) سنة بنسبة ٤٠٪ ، و تتوافق الدراسة الحالية مع دراسة في نيجيريا (Akinnbosun & Nwafor, ٢٠١٥) ، فقد كانت الفئات العمرية (٦-٠) شهر بنسبة ١٨٪ ، و (١٢-٧) شهر بنسبة ٣٤٪ ، و (٢٤-١٣) شهر بنسبة ٢٢٪ ، و (٣٦-٢٥) شهر بنسبة ١٢٪ ، و (٤٨-٣٧) شهر بنسبة ٤٪ ، و (٦٠-٤٩) شهر بنسبة ١٠٪ ، و تبين من نتائج الدراسة إنّ أعلى نسبة اصابة بين الأطفال في الفئة العمرية (١٢-٧) شهر ٣٤٪ تليها الفئة العمرية (٢٤-١٣) شهر ٢٢٪ ، و ذكرت الدراسة إن السبب وراء انخفاض معدلات الإصابة لدى الأطفال فوق ٢٥ شهر هو تطور المناعة ضد الاحياء الدقيقة بعد الإصابة (Dessalegn *et al.*, ٢٠١١) ، واختلفت الدراسة الحالية مع دراسة (Moharana, ٢٠١٩) في الهند وكانت نسبة الإصابة في الفئة العمرية (٦-٠) شهر بنسبة ٣.١٪ ، و الفئة العمرية (٢٤-٧) شهر بنسبة ٢٤.٤٪ ، والفئة العمرية (٣٦-٢٥) شهر بنسبة ٢٣.١٪ ، والفئة العمرية (٤٨-٣٧) شهر بنسبة ٣٠٪ ، والفئة العمرية (٦٠-٤٩) شهر بنسبة ١٨.٨٪ ، إذ كانت اعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية (٤٨-٣٧) شهر بنسبة ٣٠٪ ، و قد يعزى سبب الاختلاف بين الدراستين في انخفاض معدل الإصابة في الفئة العمرية دون سنة هو إنّ الأطفال في هذا العمر تحت رعاية الام الكاملة بالمقارنة مع الفئات الأكبر سناً (Sang *et al.*, ٢٠١٢) .

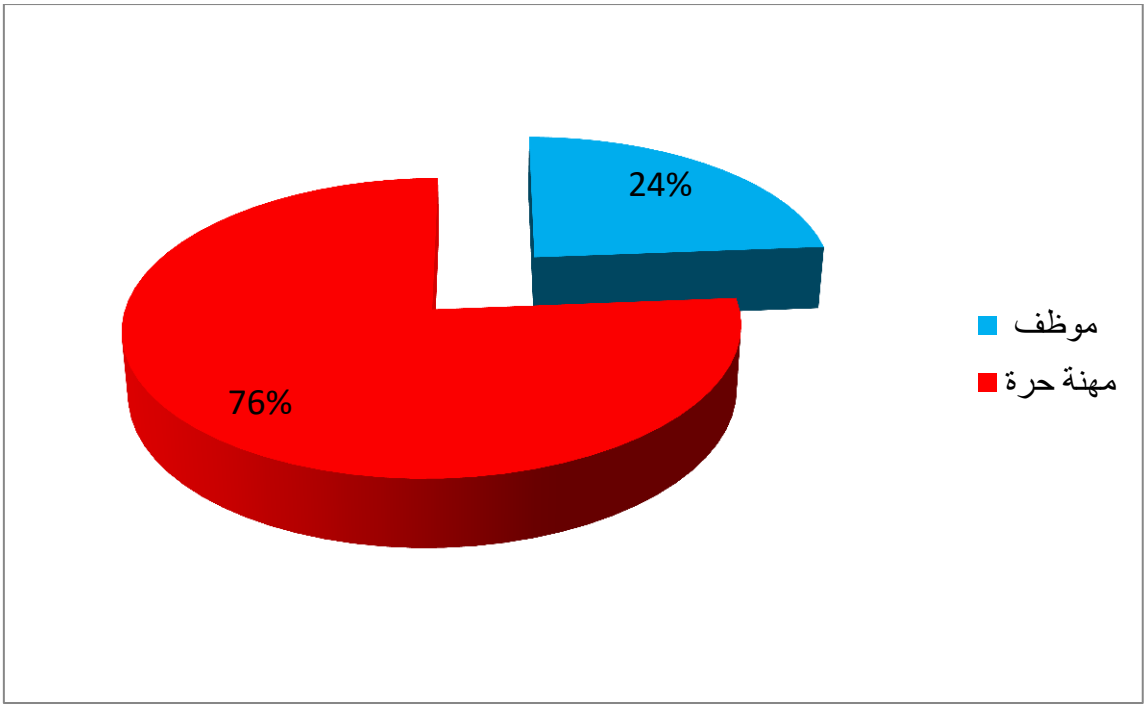
٣-١-١-٤ توزيع الاصابات حسب طبيعة السكن والدخل المادي

أظهرت النتائج إنّ عدد الأطفال الذين يقطنون في مناطق عشوائيات الأحياء السكنية (٥٢) ٦٥٪ هم أكثر عرضة وبصورة معنوية (P = ٠.٠٠١) للإصابة بالإسهال بالمقارنة مع عدد إصابة الأطفال الذين يقطنون الأحياء السكنية (٢٨) ٣٥٪ ، مثلما في الشكل (٣-٥) .

وجد إنّ عدد الأطفال المرضى الذين آباءهم يزاولون مهن حرة ٧٦.٢٥٪(٦١) كانوا أكثر عرضة للإصابة بالإسهال وبصورة معنوية (P = ٠.٠٠٩) بالمقارنة مع الأطفال الذين يعمل اباءهم موظفين لدى الدولة ٢٣.٧٥٪ (١٩) ، مثلما موضح في الشكل (٣-٦) .



الشكل (٣-٥) نسب توزيع الاصابات حسب طبيعة السكن .



الشكل (٣-٦) نسب توزيع الاصابات حسب طبيعة الدخل لعوائل الأطفال المصابين .

تتوافق الدراسة الحالية بالنسبة للسكن والدخل الأسري مع دراسة محلية (Tuky & Semender , ٢٠١٩) في كربلاء / الهندية ، إذ ذكرت إنّ نسبة الأطفال الذين يعيشون في سكن مزود بنظام رديء لشبكات الصرف الصحي كانت ٦٢.٤٪ بالمقارنة بالأطفال الذين يعيشون في سكن جيد ٣٧.٦٪ ، و ذكرت الدراسة إنّ نسبة الأطفال ذوي الدخل الاسري المنخفض هي ٨٩.٢٪ ونسبة الأطفال ذوي الدخل الجيد كانت ١٠٪ . ذكرت دراسة (Ali *et al.*, ٢٠٢٢) في اربيل والسليمانية إنّ اوضاع المعيشة من السكن رديء شبكات تصريف مياه المجاري والدخل الأسري المنخفض كانت مرتبطة بشكل كبير في ارتفاع نسبة الإصابة بالإسهال بين الاطفال دون عمر ٥ سنوات .

٣-١-٢ التشخيص المظهري Morphological Identification

شُخصت عزلات بكتيريا *E. coli* مبدئياً بالاعتماد على الصفات المظهرية ، وذلك بعد تنميتها على كل من أوساط (غراء المكونكي ، و غراء الايوسين مثلين الازرق ، و غراء سوربيتول مكونكي ، و غراء كروم HiCrome EC O١٥٧:H٧ ، و اوضحت النتائج إنّ أفراد بكتيريا *E. coli* هي مخمرة لسكر اللاكتوز ، فظهرت مستعمراتها وردية ناعمة ، مائلة إلى التسطح على وسط غراء مكونكي التفريقي ،الذي يحتوي على أملاح الصفراء bile salts وصبغة البنفسج البلورية crystal violet التي تسمح بنمو البكتيريا السالبة لصبغة كرام وبضمنها العائلة المعوية وتثبط نمو البكتيريا الموجبة لصبغة كرام ، و ينتج غالباً عن تخمر سكر اللاكتوز كميات كبيرة من الحوامض المختلطة التي تسبب ترسب أملاح الصفراء في الوسط المحيط بالمستعمرة ، و مسببة اللون الوردي للمستعمرات . و على وسط غراء الايوسين مثلين الازرق ظهرت مستعمرات بكتيريا *E. coli* خضراء معدنية metallic sheen براقة و هذه صفة مميزة لبكتيريا *E. coli* ، ويظهر هذا اللون نتيجة احتواء الوسط على صبغات الايوسين والمثلين الازرق التي تترسب في الوسط الحامضي بعد ارتباطها مع بعضها فتعطي لون أخضر معدني براق ، وهذا يدل على إنّ البكتيريا تخمر سكريات اللاكتوز أو السكروز و نواتج عملية تخمرها أحماض عضوية ، و أما على وسط غراء سوربيتول المكونكي ، فظهرت معظم عزلات مستعمرات بكتيريا *E. coli* وردية اللون، وعزلات اخرى من بكتيريا *E. coli* ظهرت مستعمراتها شاحبة اللون لأنها لا تخمر سكر السوربيتول او تخمره في وقت متأخر ، و ظهرت بعض عزلات مستعمرات بكتيريا *E. coli* على وسط غراء كروم بلون ارجواني و أما السلالات الأخرى من بكتيريا *E. coli* فظهرت مستعمراتها باللون الأخضر المزرق ، وهذه النتائج تتوافق مع ما ذكر في (Mahon *et al.*, ٢٠١٥) .

٣-١-٣ التشخيص المجهري Microscopic Identification

بعد إجراء التصبيغ بصبغة كرام Gram stain ، فحصت المسحة باستعمال المجهر الضوئي microscopic light ، إذ كانت جميع خلايا بكتيريا *E. coli* عصوية الشكل قصيرة سالبة لصبغة كرام ، وهذه النتائج تتطابق مع ما ذكر في (Jawetz *et al*., ٢٠١٩) .

٣-١-٤ التشخيص الكيموحيوي Biochemical Identification

بعد إجراء الاختبارات الكيموحيوية على كل العزلات ، ظهرت جميع بكتيريا *E. coli* سالبة لاختبار الاوكسديز من خلال عدم تحول لون المستعمرات إلى الارجواني ، لأن بكتيريا *E. coli* لا تمتلك انزيم (Cytochrome oxidase) الذي يعمل كمستقبل نهائي للإلكترونات (الهيدروجين) في عملية التنفس الهوائي ، كانت جميع العزلات موجبة لاختبار الكاتليز ، لأن بكتيريا *E. coli* تمتلك انزيم (Catalase) الذي يقوم بتحليل مركب بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى ماء واوكسجين (فقاعات) ، وكانت جميع عزلات بكتيريا *E. coli* موجبة لاختبار هيدروكسيد البوتاسيوم KOH ، من خلال تكون مادة هلامية

وهذا يدل على إنّ البكتيريا سالبة لصبغة كرام ، وهذه النتائج تنسجم مع ما ذكر في (Jawetz *et al* ., ٢٠١٩ ; Markey *et al* ., ٢٠١٣) .

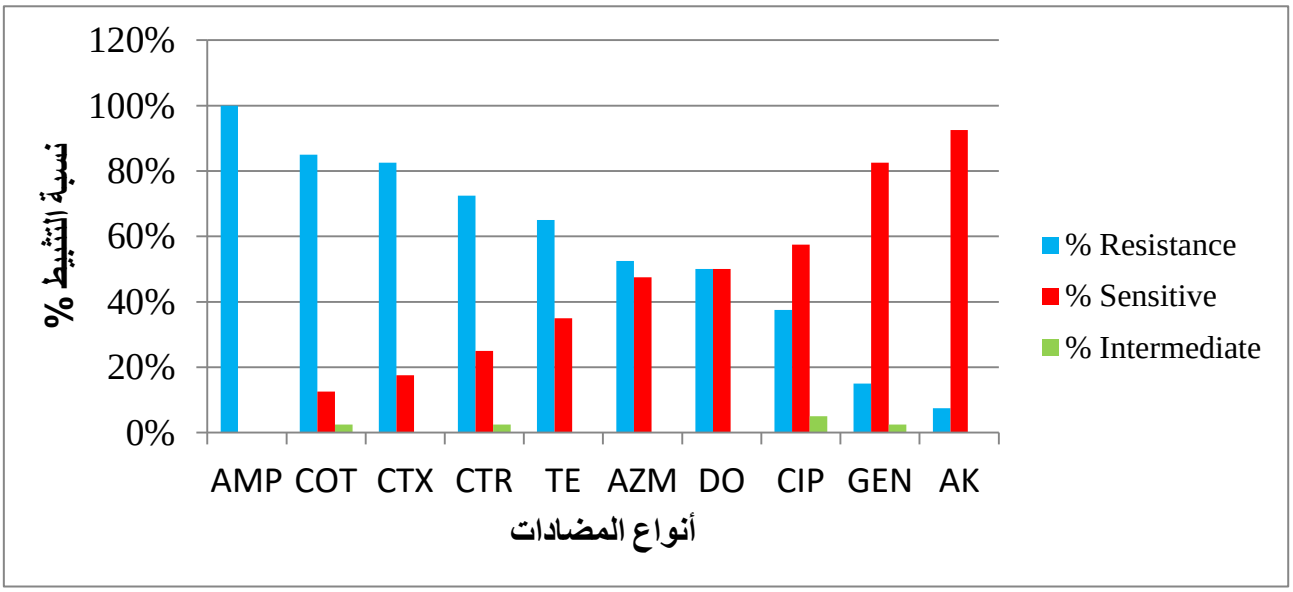
٣-١-٥ تشخيص البكتيريا باستخدام نظام الفايتك ٢ Vitek

اختبرت ٤٠ عزلة من أصل ١٠٠ عزلة لغرض التشخيص باستعمال نظام الفايتك ٢ Vitek ، وكان اختيار العزلات البكتيرية بالاعتماد على فحص عينة البراز تحت المجهر الضوئي والتي كانت حاوية على خلايا الدم الحمراء red blood cells او خلايا التهابية pus cells ، وكانت النتائج تشير إلى أنّ ٤٠ عزلة تعود لبكتيريا *E. coli* ، كما موضح في الملحق (٢) و (٣) .

٣-١-٦ مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية

أختبرت حساسية العزلات البكتيرية ضد عشرة أنواع من المضادات الحيوية وكان اختيار المضادات شائعة الاستعمال ، وقد كانت العزلات البكتيرية متباينة في مقاومتها لهذه المضادات كالاتي :

أظهرت النتائج إنّ (٤٠) ١٠٠٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Ampicillin وهي أعلى نسبة مقاومة، و تليها ٣٤ عزلة بكتيرية تمثل نسبة ٨٥٪ كانت مقاومة للمضاد الحيوي Co-Trimoxazole ، ثم٣٣ عزلة بكتيرية بنسبة ٨٢.٥٪ مقاومة للمضاد الحيوي Cefotaxime ،و (٢٩) ٧٢.٥٪ عزلة بكتيرية كانت مقاومة للمضاد الحيوي Ceftriaxone ،و ٢٦ عزلة بكتيرية بنسبة ٦٥٪ مقاومة للمضاد الحيوي Tetracycline ، و٢١ عزلة بكتيرية تمثل نسبة ٥٢.٥٪ مقاومة للمضاد الحيوي Azithromycin ، و (٢٠) ٥٠٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Doxycycline ، و ١٥ عزلة بكتيرية بنسبة ٣٧.٥٪ مقاومة للمضاد الحيوي Ciprofloxacin ، (٦) ١٥٪ عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي Gentamycin ، و اخيراً ٣ عزلات بكتيرية تمثل نسبة ٧.٥٪ مقاومة للمضاد الحيوي Amikacin وهي تمثل أقل عدد من العزلات المقاومة للمضادات الحياتية ، مثلما موضح في الشكل (٣-٧) و الملحق (٤) .



الشكل (٣-٧) النسبة المئوية لمقاومة بكتيريا *E. coli* لمضادات حيوية مختلفة باستعمال طريقة التخفيف للعالمين Kirby and Bauer ، من الاعلى مقاومة الى الاقل وبالعكس بالنسبة للحساسية .

AMP=Ampicillin , AK = Amikacin , AZM =Azithromycin , CTX = Cefotaxime , CTR=Ceftriaxone , COT = Co-Trimoxazole , DXT = Doxycycline , GEN = Gentamycin , TE = Tetracycline , CIP = Ciprofloxacin .

توافقت نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي Ampicillin مع نتائج الدراسات السابقة ومنها دراسة محلية للباحثة (Shatub *et al.*, ٢٠٢١) في تكريت التي أوضحت فيها إنّ نسبة العزلات البكتيرية المقاومة لهذا المضاد الحيوي ٩٧٪ . بينما اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة الباحث (Webale *et al.*, ٢٠٢٠) في كينيا إذ كانت نسبة مقاومة البكتيريا لهذا المضاد ٥٥.٢٪ .

و من أسباب مقاومة المضادات الحيوية التابعة لمجموعة البيتا لاكتام مثل البنسيلين والسيفالوسبورين وغيرهما هو وجود طفرات في موقع ارتباط البنسلين بالبروتينات (penicillin – binding proteins (PBPs ، أو تغيير في نفاذية الجدار الخلوي بواسطة طفرات في بروتينات الغشاء الخارجي ، أو انظمة دفق efflux pump

أو انزيمات البيتا لاكتام (Mancuso *et al.*, ٢٠٢١) . ربما يعود سبب إختلاف نسب مقاومة البكتيريا للمضاد نفسه إلى استعمال الاعشاب والنباتات الطبية الشائع استعمالها في كينيا كبديل عن استعمال المضادات الحياتية وبالتالي انخفاض نشوء المقاومة أو انتقالها بين البكتيريا (Mutai *et al.*, ٢٠٢١) .

تماثلت نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي كو- تريموكسازول Co-Trimoxazole مع دراسة محلية(Al-Dahmoshi *et al.*, ٢٠١٥) أجريت في مدينة بابل والتي بلغت فيها نسبة مقاومة البكتيريا لهذا المضاد الحيوي٨٢٪ . وأيضاً تماثلت نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل اليها الباحث(Verma *et al.*, ٢٠١٩)

في شمال الهند والتي كانت نسبة مقاومة البكتيريا ٩٥٪ ، بينما اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة (Chukwu *et al.*, ٢٠١٩) في جنوب افريقيا والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا لهذا المضاد ٢٦.٥٪ .

وجد إنّ الاستعمال المستمر خلال العقود الماضية لمثبطات حامض الفوليك Folic acid والتي من ضمنها المضاد الحيوي كو- تريموكسازول ادى الى مقاومة مكتسبة مشفرة بواسطة جينات ، و هذه المقاومة تعتمد على التغيرات في ايض الخلية فضلا عن تغير مستويات التعبير عن الانزيمات المشاركة في التخليق الحيوي لحامض الفوليك (Lauxen *et al.*, ٢٠٢١) . قد يكون سبب اختلاف نسب مقاومة البكتيريا لنفس المضاد هو استعمال طرق بدائل عن استعمال المضادات الحيوية كما هو معروف من طرق في افريقيا كالعلاج النفسي واستخدام مواد قد تكون سامة للإنسان وبالتالي يؤدي عدم استعمال المضاد باستمرار إلى انخفاض نشوء المقاومة و انتقال صفة المقاومة بين البكتيريا (Sorsdahl *et al.*, ٢٠١٠) .

تتطابق نتائج الدراسة الحالية بخصوص المضاد الحيوي Cefotaxime التابع لمجموعة البيتا لاكتام مع نتائج دراسة محلية (Al-Dahmoshi *et al.*, ٢٠١٥) في بابل والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا فيها لهذا النوع من المضادات ٨٩.٧٪ ، لكن اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة (Huang *et al.*, ٢٠١٦) في الصين والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا ٢٤.٥٪ .

قد يكون سبب الاختلاف في نسب مقاومة البكتيريا لنفس المضاد هو استعمال الاعشاب الطبية الشائعة الاستعمال في الصين كبديل عن استخدام المضادات الحياتية وبالتالي انخفاض نشوء المقاومة وانتقالها بين البكتيريا (Ji *et al* ., ٢٠٢٠) .

امّا نتائج الدراسة الحالية فيما يتعلق للمضاد الحيوي Ceftriaxone التابع لمجموعة البيتا لاكتام فقد توافقت مع نتائج دراسة (Broujerdi *et al.*, ٢٠١٨) في ايران والتي كانت نسبة مقاومة البكتيريا لهذا المضاد ٧١٪ ، وايضا تتوافق الدراسة الحالية مع نتائج دراسة الباحثة (Khairy *et al.*, ٢٠٢٠) في مصر و التي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا ٦٦.٧٪ . من جهة اخرى فان نتائج الدراسة الحالية اختلفت مع دراسة الباحث (Webale *et al.*, ٢٠٢٠) في كينيا والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا لهذا المضاد ١٢.٣٪ .

تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي Tetracycline مع دراسة الباحث (Manhique-Coutinho *et al.*, ٢٠٢٢) في موزمبيق والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا للمضاد الحيوي التتراسايكلين في هذه الدراسة ٦٨.٣٪ ، و لم تتماثل الدراسة الحالية مع دراسة سابقة (Verma *et al.*, ٢٠١٩) في شمال الهند والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا ٩٧.٣٠٪ .

قد يكون السبب وراء اختلاف نسب مقاومة البكتيريا لنفس المضاد الحيوي هو ما اشارت اليه منظمة الصحة العالمية من عوامل رئيسية ادت الى حدوث مشكلة مقاومة المضادات الحياتية في جميع انحاء العالم وتتلخص بالإسراف العشوائي في استخدام المضادات الحياتية و بشكل رئيسي في البلدان النامية التي يسهل فيها الحصول على المضادات الحياتية دون وصفة طبية إضافة الى نقص وسائل التشخيص الدقيقة في المختبرات من اجل السيطرة على ظهور مقاومة المضادات الحيوية ، وهذه الأسباب قد تفسر الارتفاع الخطير في نسب المقاومة (Abadi *et al.*, ٢٠١٩) . من أسباب مقاومة المضاد الحيوي التتراسايكلين هو حدوث طفرات جينية مقاومة وانتقالها بين البكتيريا أو تغير في نفاذية الغشاء الخارجي عن طريق تغير نفاذية البروتينات من البورينات التي تمنع دخول بعض المضادات الحيوية (Yu *et al.*, ٢٠٢٠) .

أما نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي Azithromycin التابع لمجموعة ماكروليدات فقد توافقت مع نتائج دراسة الباحث (Rahman *et al.*, ٢٠٢٠) في بنكلادش ، إذ بلغت نسبة مقاومة البكتيريا للازوثرومايسين ٦٧.٧٤٪ ، ولم تتوافق الدراسة الحالية مع نتائج دراسة (Abbasi *et al.*, ٢٠٢٠) في ايران والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا ٢٨.١٪ .

بالنسبة للمضاد الحيوي دوكسيسايكلين Doxycycline التابع لمجموعة التتراسايكلين كانت نتائج الدراسة الحالية تتطابق مع دراسة سابقة (Gu *et al.*, ٢٠٢٢) في الصين والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا فيها ٣٩.٩٪ ، و اختلفت الدراسة الحالية مع دراسة (Verma *et al.*, ٢٠١٩) في الهند والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا ٧٨.٢٠ % .

أمّا نتائج الدراسة الحالية بخصوص المضاد الحيوي Ciprofloxacin التابع لمجموعة فلوروكينول Fluoroquinolones فكانت متوافقة مع نتائج دراسة محلية (Hasan *et al.*, ٢٠٢٠) في دهوك والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا (٤٢.٩٪) ، واختلفت الدراسة الحالية مع نتائج دراسة الباحث (Verma *et al.*, ٢٠١٩) في الهند والتي كانت نسبة مقاومة البكتيريا لهذا المضاد (٩٣.٢٤٪) . و من اهم العوامل وراء مقاومة البكتيريا هو

الأغشية الحيوية biofilms ، إذ تعد عاملاً اساسياً يساهم بمنح البكتيريا صفة مقاومة للمضادات الحيوية وتحملها ، لمضخات الدفق دور مباشر في مقاومة المضادات والتي تكون موجودة في تراكيب الاغشية الحيوية للبكتيريا السالبة لصبغة كرام (Reza *et al.*, ٢٠١٩) .

و تتطابق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي Gentamycin التابع لمجموعة امينوكلايكوسايد مع دراسة محلية (Al-Imam &Flayyih, ٢٠٢٠) في بغداد والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا ١٥٪ ، ولم تتوافق الدراسة الحالية مع نتائج دراسة (Hasan *et al.*, ٢٠٢٠) والتي كانت نسبة مقاومة البكتيريا ٨٢.٩٪ .

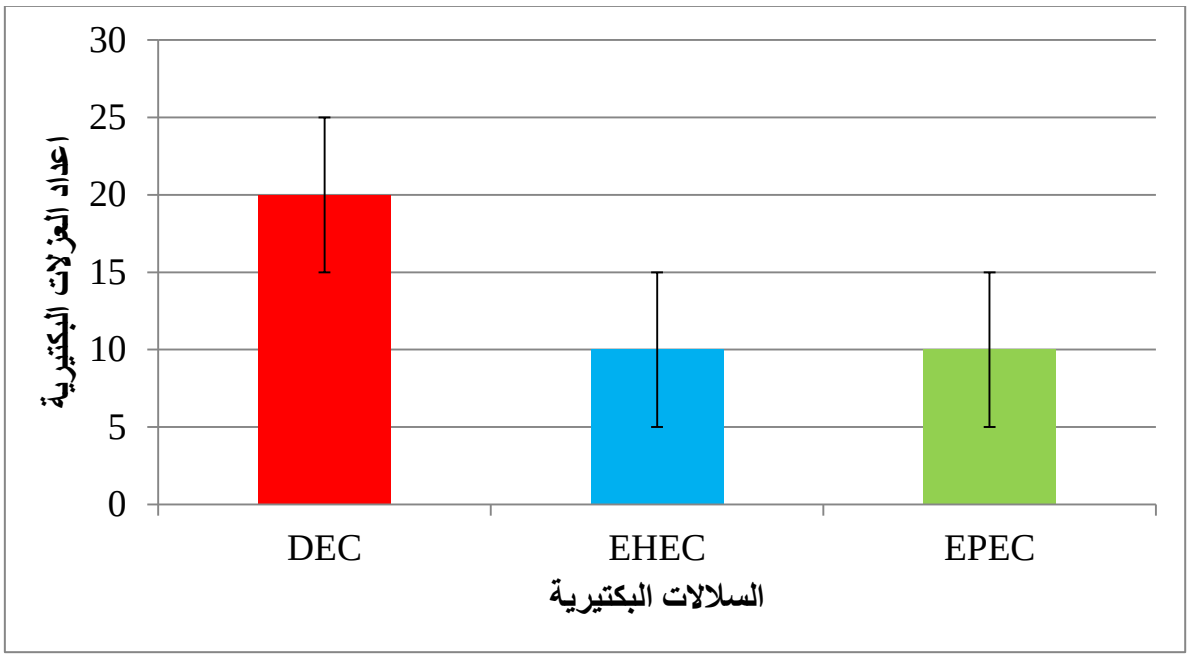
الأغشية الحيوية لها دور مهم في اكتساب البكتيريا صفة مقاومة المضادات الحيوية المتعددة ، وتوجد في البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Uruen *et al.*, ٢٠٢٠) . قد يعود سبب الاختلاف في نسب المقاومة المضاد الحيوي نفسه هو الاستعمال العشوائي والتعرض المستمر للمضادات الحيوية أدى إلى نشوء مقاومة للمضادات ، فضلاً عن الضغط الانتقائي من قبل الطبيعة التي كان لها دور في انتقال صفة المقاومة بين البكتيريا وانتشارها بشكل واسع (Hamza & Omran , ٢٠٢٢) .

تماثلت نتائج الدراسة الحالية بخصوص المضاد الحيوي Amikacin التابع لمجموعة امينوكلايكوسايد مع نتائج دراسة محلية (Al-Zubaidi & Abbas , ٢٠٢٠) في ديالى والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا ٣.٤٪ ، و اختلفت الدراسة الحالية مع الدراسة المحلية للباحثة (Shatub *et al.*, ٢٠٢١) في تكريت والتي بلغت نسبة مقاومة البكتيريا ٨٧٪ . قد يكون سبب اختلاف نسب مقاومة البكتيريا المضاد نفسه هو الافراط باستعمال المضادات الحياتية مما يؤدي إلى نشوء طفرات مسؤولة عن صفة المقاومة أو انتقال صفة المقاومة من بكتيريا إلى اخرى (Davies & Davies , ٢٠١٠).

٣-١-٧ التشخيص الجزيئي Molecular identification

تم اختيار ٤٠ عزلة من بكتيريا *E. coli* لغرض التحري الجزيئي وذلك باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، وكان اختيار العزلات البكتيرية بالاعتماد على فحص عينة البراز تحت المجهر الضوئي والتي كانت حاوية على خلايا الدم الحمراء red blood cells او خلايا التهابية pus cells ، حيث أظهرت النتائج إن

(٢٠) ٥٠٪ عزلة بكتيرية والتي تعود للأنواع المرضية pathotypes لبكتيريا *E. coli* المسببة للإسهال، وإن (١٠) ٥٠٪ عزلات لبكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء ، و(١٠) ٥٠٪ عزلات حاملة لجينين معا (*stx* ٢&*stx* ١) تعود لبكتيريا اشريشيا القولون النزفية المعوية ولوحظ عدم وجود فرق معنوي واضح بين السلالتين ($P \geq$ ٠.٠٥) ، مثلما موضح في الشكل (٣-٨) و الجدول (٣-١) .



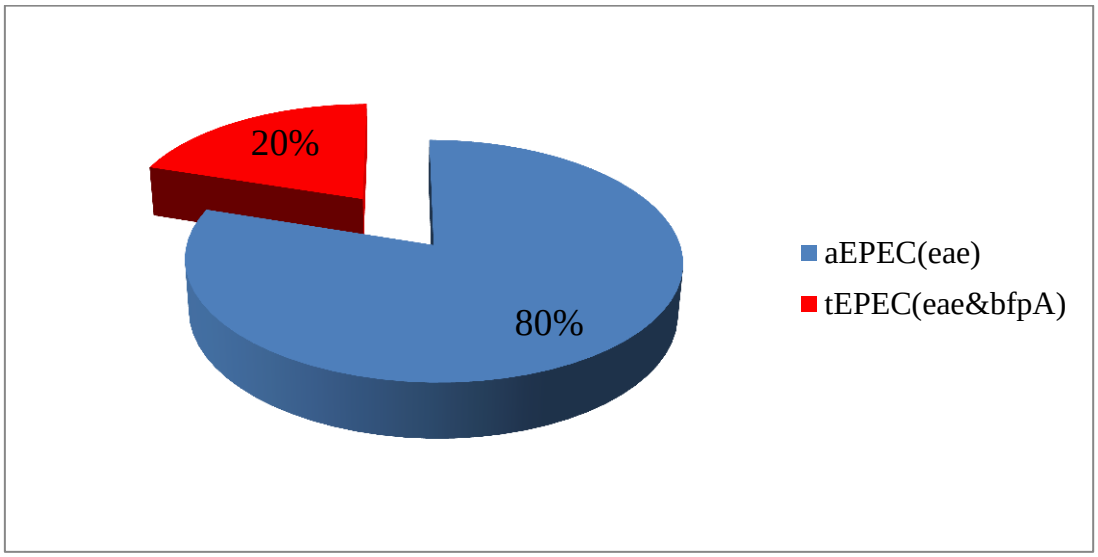
الشكل (٣-٨) عدد عزلات بكتيريا DEC وسلالاتها (EPEC ، EHEC).

تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لبكتيريا اشريشيا القولون المسببة للإسهال مع نتائج الدراسات السابقة ، و منها دراسة محلية (Abdul-Hussein *et al.*, ٢٠١٨) في واسط والتي كانت نسبة العزل لهذه البكتيريا ٤٥.٥٪ ، و تتوافق الدراسة الحالية مع دراسة الباحث (Roy *et al.*, ٢٠١٣) في بنكلادش التي كانت النتائج فيها ٥٠.٣٧ % . هذا من جهة أخرى فإنّ نتائج الدراسة الحالية اختلفت مع نتائج دراسة الباحثة (Khairy *et al.*, ٢٠٢٠) في مصر والتي كانت نتائج نسبة عزل البكتيريا فيها ٢٠.٦٪ ، و ذكرت هذه الدراسة إنّ من اسباب اختلاف نسبة انتشار بكتيريا اشريشيا القولون المسببة للإسهال مع دراسات أخرى هو إنّ البكتيريا مسؤولة عن معظم حالات الإسهال الحادة في الأطفال دون ٥ سنوات في الدول النامية ، وإنّ السفر لتلك الدول او السفر داخل المنطقة المصابة نفسها يزيد من خطر العدوى .

تتوافق نتائج الدراسة الحالية لنسب وجود بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء و بكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء مع نتائج الدراسة السابقة في جنوب افريقيا للباحث (Omolajaiye *et al.*, ٢٠٢٠) والتي

كانت نسب النتائج فيها ١٧٪ و ١٧٪ على التوالي . واختلفت مع نتائج دراسة الباحث (Zhou *et al* ., ٢٠١٨) في الصين والتي كانت النسب فيها ٥٠٪ و ٣.٧٪ على التوالي . قد يكون سبب اختلاف نسب انماط بكتيريا اشريشيا القولون المسببة للإسهال مع الدراسات الأخرى هو ارتباطها بعوامل عدة مثل المناخ و مستوى نظافة الفرد والموقع الجغرافي (Gomes *et al.*, ٢٠١٦) .

أظهرت النتائج في الدراسة الحالية إنّ من بين عزلات بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء العشرة منها (٨) ٨٠٪ عزلات بكتيرية حاملة للجين (*eae*) تعود للبكتيريا الممرضة للأمعاء غير المثالية aEPEC ، وعزلتان ٢٠٪ حاملة لجينين معا (*eae &bfpA*) تعود للبكتيريا الممرضة للأمعاء المثالية tEPEC ، وتبين من التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي بين النوعين لهذه البكتيريا (P = ٠.٠٥) كما موضح في الشكل (٣-٩) .



الشكل (٣-٩) نسب عزلات انواع بكتيريا EPEC وهي المثالية tEPEC وغير المثالية aEPEC .

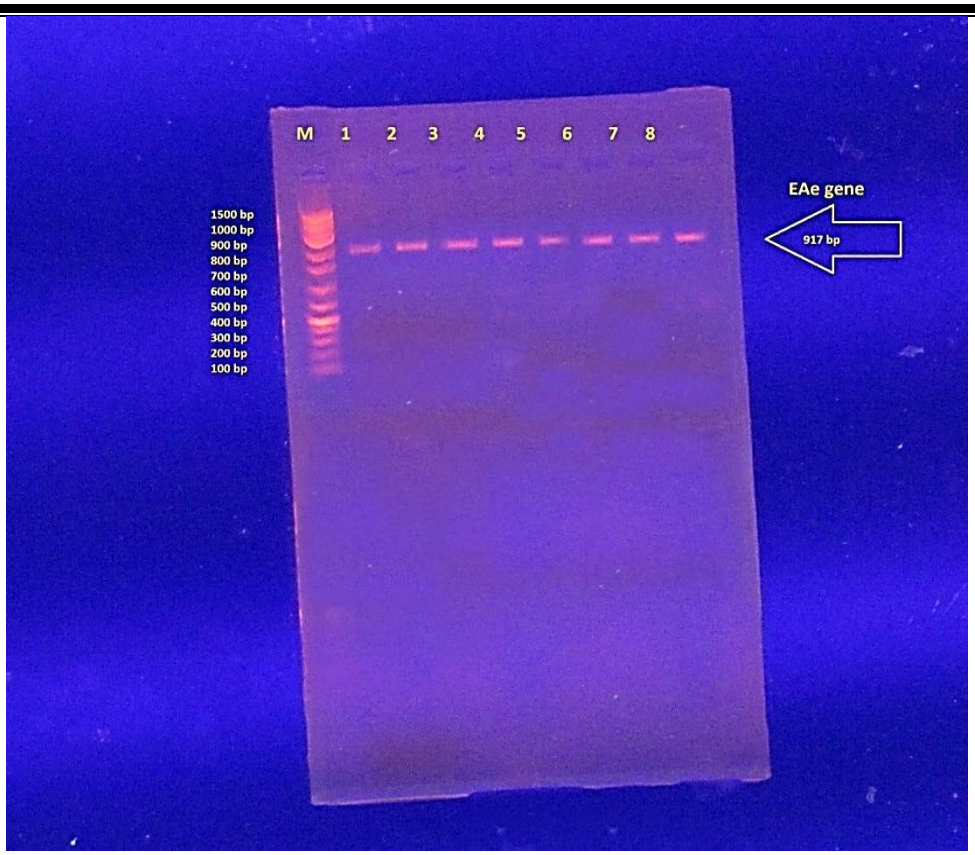
تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لبكتيريا (tEPEC, aEPEC, EPEC) مع نتائج الدراسة المحلية للباحثة شتاب (Shatub *et al*,. ٢٠٢١) في تكريت والتي كانت فيها النسب ٤٥.٧٪ , ٨٥.٧٪, ١٤.٣٪ ، وايضا تتوافق مع دراسة الباحث (Zhou *et al.*, ٢٠١٨) في الصين والتي كانت النتائج فيها ٥٠٪ , ٧٧.٨٪ , ٢٢.٢٪ على التوالي . بينما لم تتطابق نتائج الدراسة الحالية فيما يخص توزيع نسب بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء مع دراسة الباحثة (Khairy *et al.*, ٢٠٢٠) في مصر و التي كانت نسبة وجود البكتيريا الممرضة للأمعاء المثالية ٢٨.٨٪ أعلى من نسبة وجود البكتيريا الممرضة للأمعاء غير المثالية ١٦.٦٪ ، وذكرت هذه الدراسة إنّ

اسباب الاختلاف في نسب انتشار بكتيريا اشريشيا القولون المسببة للإسهال قد يكون الموقع الجغرافي على سبيل المثال.

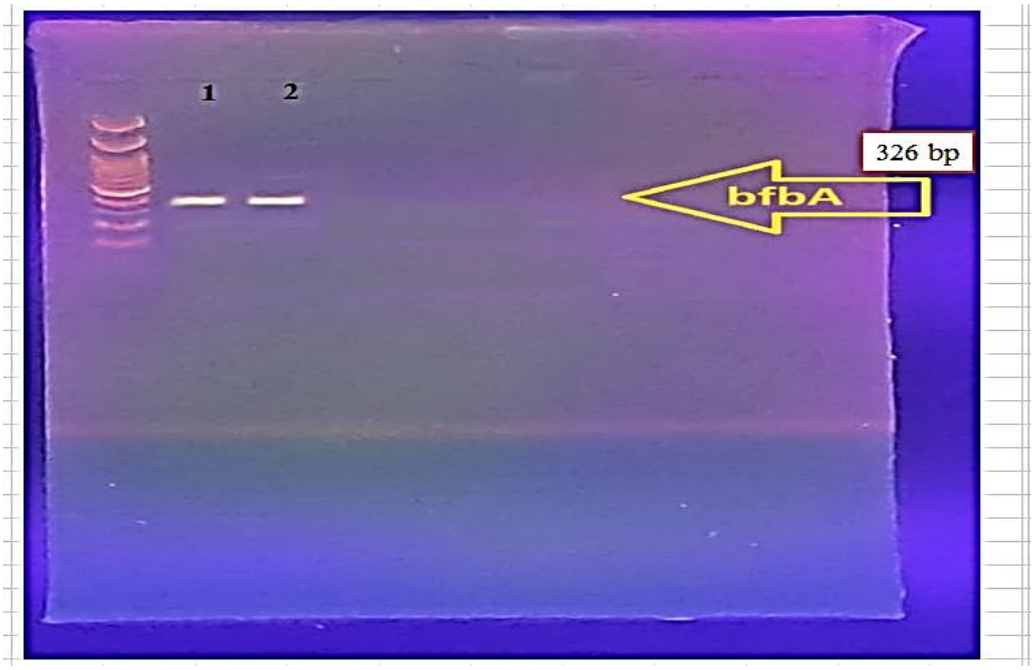
تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لبكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء مع دراسة الباحثة (Eltai *et al.*, ٢٠٢٠) في قطر والتي كانت فيها النتائج ٤٣٪ بينما لم تتماثل النتائج الحالية مع نتائج الدراسة المحلية للباحثة (Hasan *et al* ., ٢٠٢٠) في دهوك والتي كانت نسبة التواجد ١٠٪ .

قد يكون سبب الاختلاف في نسب انتشار بكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء مع الدراسات السابقة هو تأثير المناخ ، إذ وجد ان الزيادة في درجة الحرارة المحيطة تتوافق مع ارتفاع نسبة الإصابة ببكتيريا اشريشيا القولون المسببة للإسهال (Philipsborn *et al.*, ٢٠١٦).

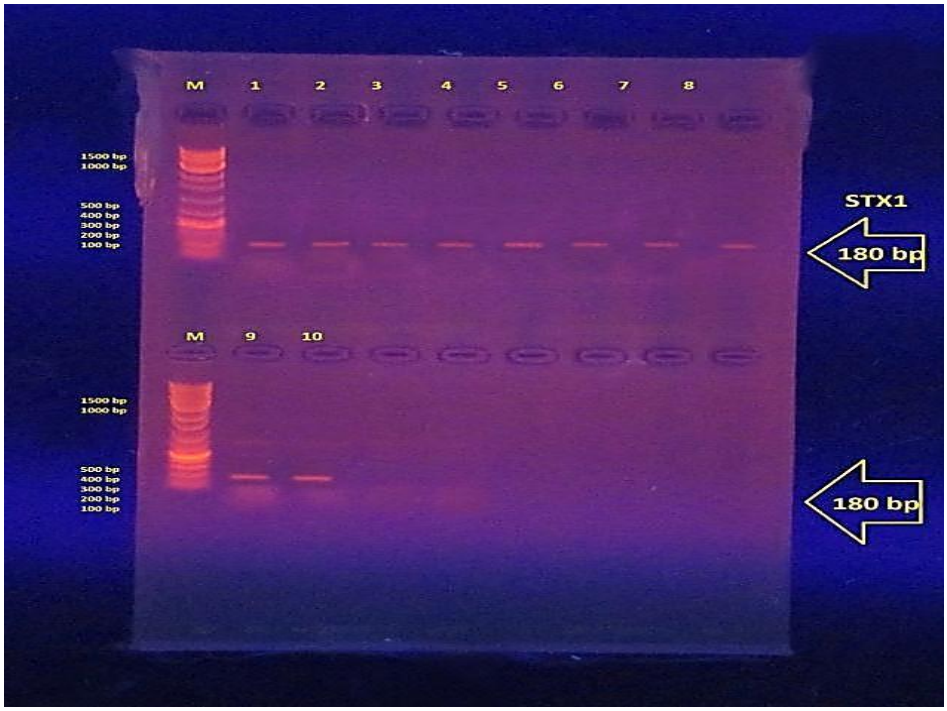
و قد اوضحت نتائج ترحيل نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن الجينات قيد الدراسة إن حجم الجين *eae* الموجود في بكتيريا EPEC هو (٩١٧) bp ، والجين *bfpA* الموجود ايضا في بكتيريا EPEC حجمه (٣٢٦) bp ، والجين *stx* ١ الموجود في بكتيريا EHEC حجمه (١٨٠) bp ، والجين *stx* ٢ الموجود أيضاً في بكتيريا EHEC حجمه (٢٥٥) bp ، إذ تتطابق هذه النتائج مع معظم الدراسات في هذا المجال ، و هذه الجينات الاربعة موضحة في الاشكال (٣-١٠) , (٣-١١) , (٣-١٢) , (٣-١٣) .



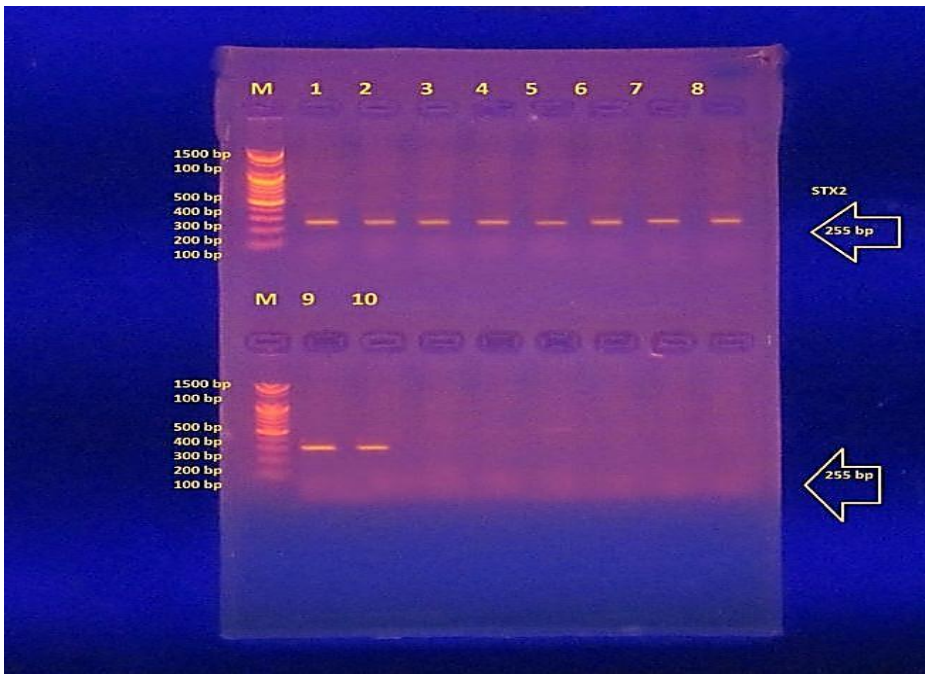
شكل (٣-١٠) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *eae* (٩١٧ bp) لعزلات بكتيريا EPEC في الاكاروز ١.٥٪ وفرق جهد ١٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة . تمثل الاعداد من ١ الى ٨ عدد العزلات البكتيرية الحاملة للجين *eae* .



شكل (٣-١١) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *bfpA* (٣٢٦ bp) لعزلات بكتيريا EPEC في الاكاروز ١.٥٪ وفرق جهد ١٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة . تمثل الاعداد من ١ الى ٢ عدد العزلات البكتيرية الحاملة للجين *bfpA* .

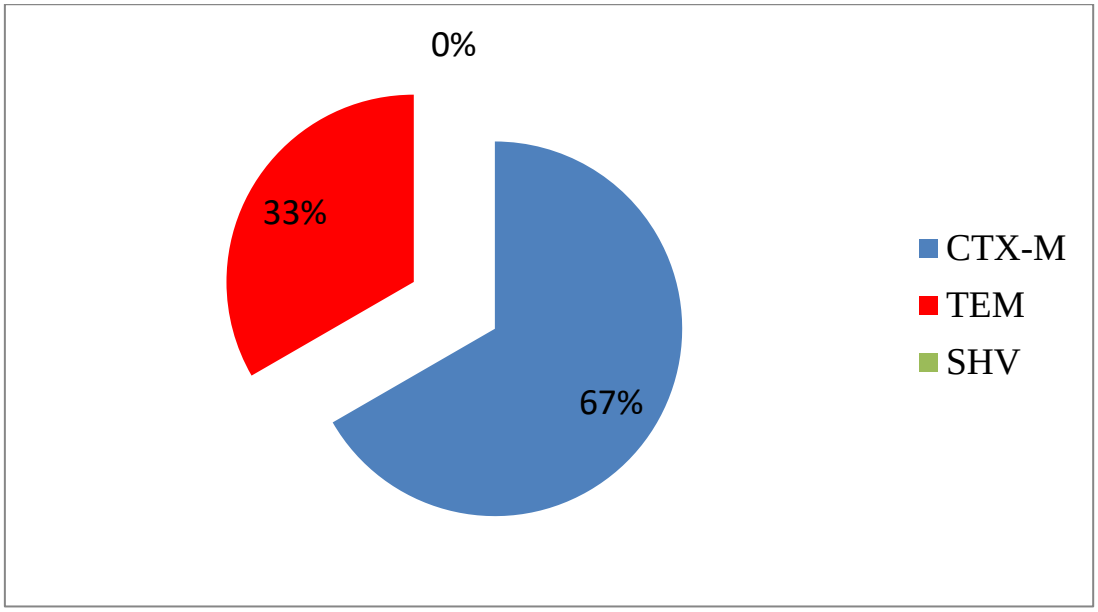


شكل (٣-١٢) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *stx ١* (١٨٠ bp) لعزلات بكتيريا EHEC في الاكاروز ١.٥٪ وفرق جهد ١٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة ، وتمثل الاعداد من ١ الى ١٠ عدد العزلات البكتيرية الحاملة لجين *stx ١* .



شكل (٣-١٣) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *stx* ٢ (٢٥٥ bp) لعزلات بكتيريا EHECفي الاكاروز ١.٥٪ وفرق جهد ١٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة . ، وتمثل الاعداد من ١ الى ١٠ عدد العزلات البكتيرية الحاملة لجين *stx* ٢ .

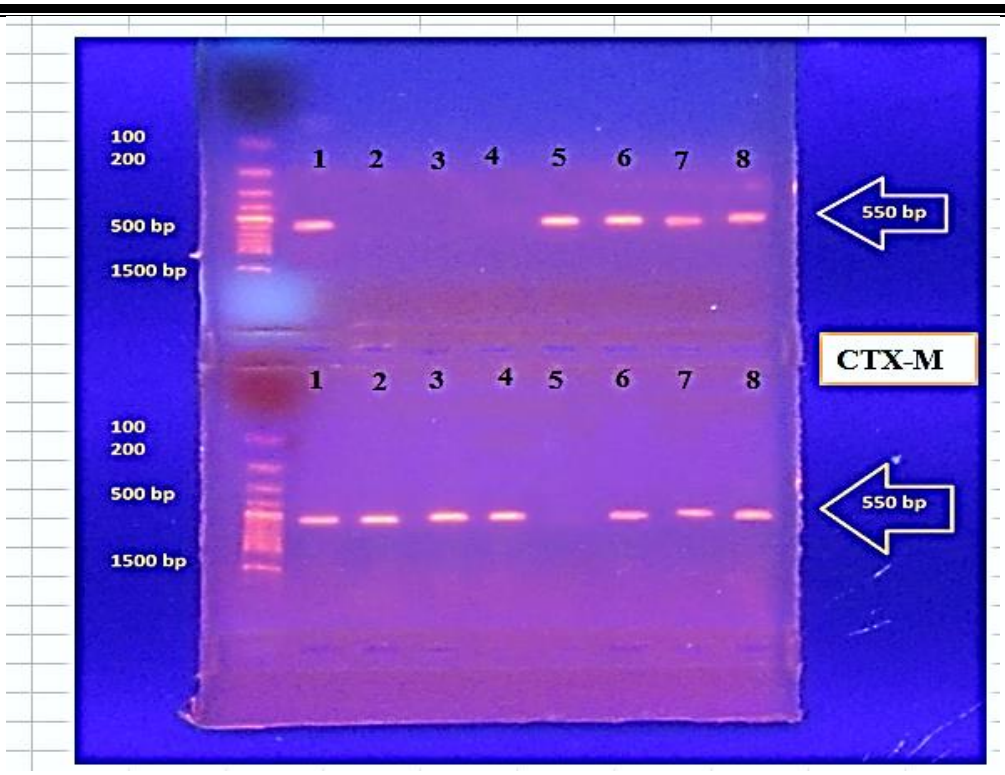
و أظهرت النتائج إنّ العزلات الحاملة للجين *CTX-M* كانت (١٢) ٦٦٪ عزلة و هي الأعلى معنوياً (*P*= ٠.٠٠٣) من العزلات الحاملة للجين *TEM* بواقع (٦) ٣٣٪ عزلة ، ولم يظهر الجين *SHV* في أي عزلة من العزلات ، كما موضح في الشكل (٣-١٤) و الجدول (٣-١) .



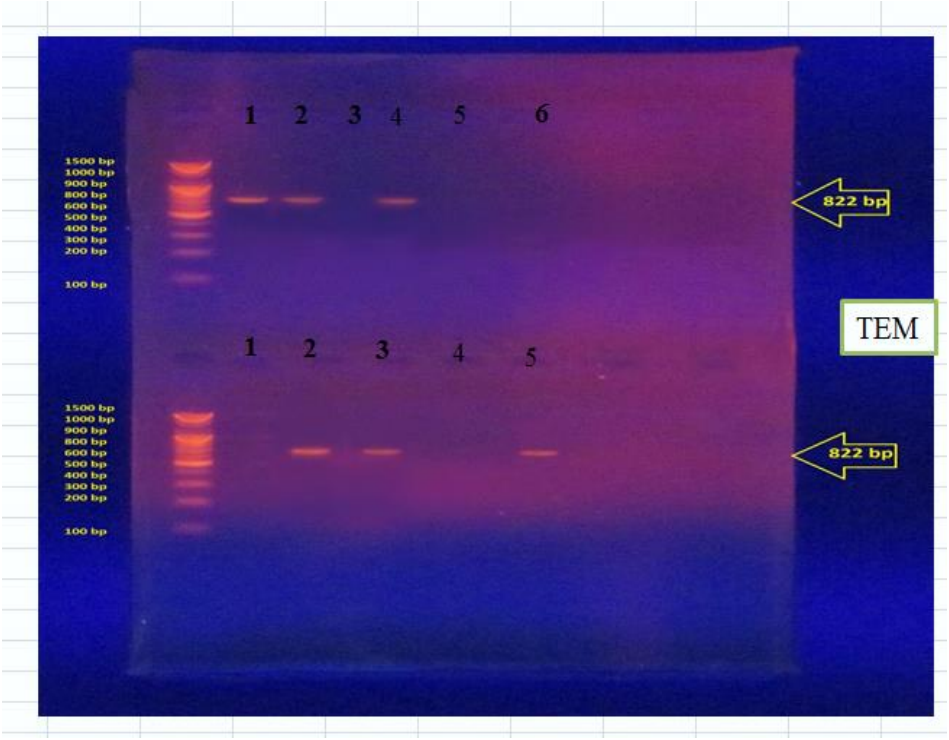
الشكل (٣-١٤) نسب جينات مقاومة المضاد بيتا لاكتام (*CTX-M , SHV, TEM*) .

و تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للجينات (*CTX-M , TEM, SHV*) التي كانت فيها الجين الأعلى نسبة هو *CTX-M* ثم يليه الجين *TEM* مع نتائج دراسة سابقة للباحثين (Alshehri & Moussa ., ٢٠٢١) في السعودية والتي كانت النتائج فيها (٥٧٪ , ٣٩٪ , ٠٪) على التوالي ، واختلفت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة محلية (Alsherees & Ali , ٢٠١٩) في النجف التي كانت فيها الجين السائد *SHV* بنسبة ١٠٠٪ ، ثم يليه الجين *TEM* بنسبة ٨١.٨٪ ، والجين *CTX-M* بنسبة ٧٧.٣٪ .

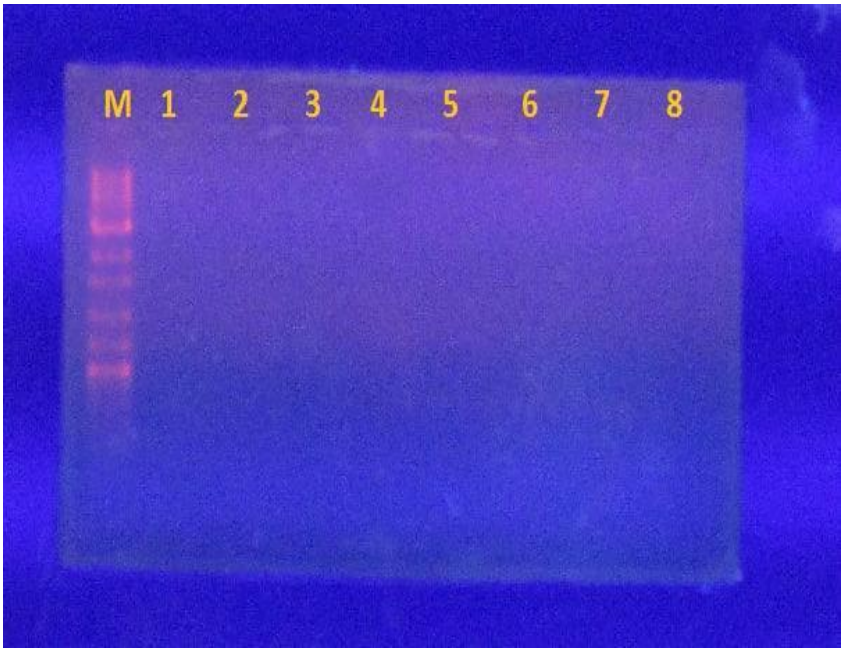
وقد أوضحت نتائج ترحيل نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن الجينات قيد الدراسة إنّ حجم الجين *CTX-M* الموجود في بكتيريا *E. coli* هو (٥٥٠) bp ، والجين *TEM* الموجود في بكتيريا *E. coli* حجمه (٨٢٢) bp ، ولم يظهر الجين *SHV* أثناء الترحيل الكهربائي ، وهو ما يتوافق مع الدراسات السابقة بهذا الخصوص ، مثلما موضح في الاشكال (٣-١٥) , (٣-١٦) , (٣-١٧) .



شكل (٣-١٥) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *CTX-M* (٥٥٠ bp) لعزلات بكتيريا *E. coli* في الاكاروز ١.٥٪ وفرق جهد ١٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة .



شكل (٣-١٦) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *TEM* (٨٢٢ bp) لعزلات بكتيريا *E . coli* في الاكاروز ١.٥٪ وفرق جهد ١٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة .



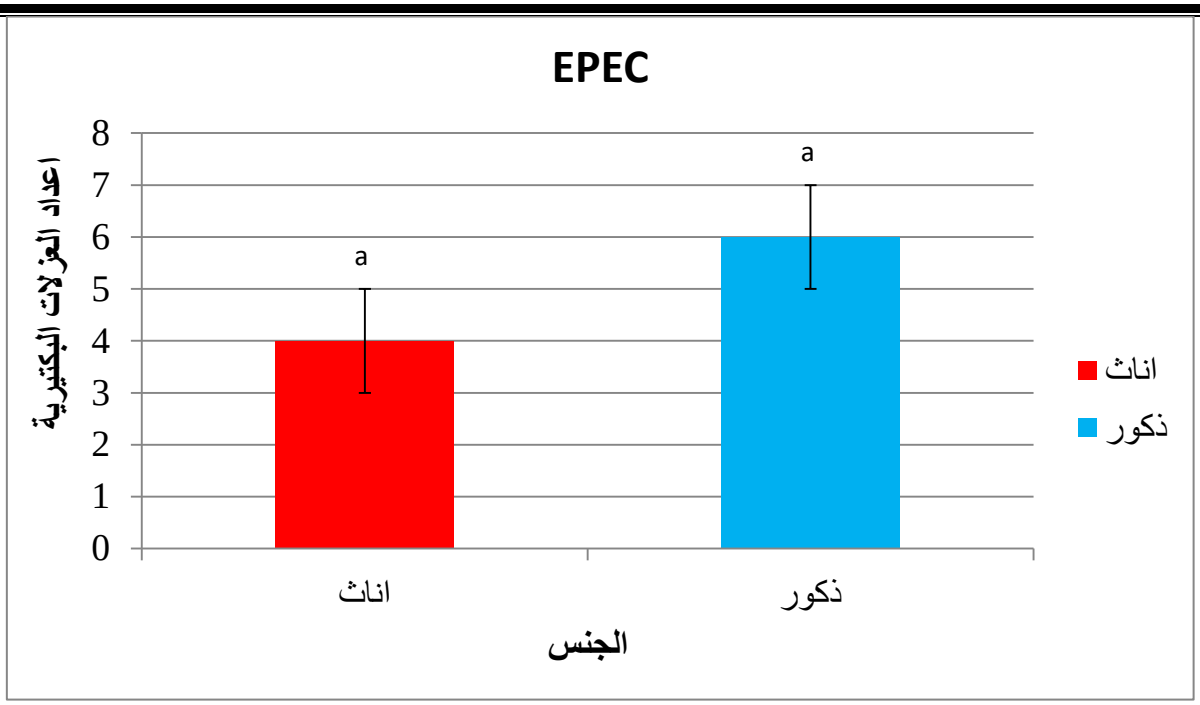
شكل (٣-١٧) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *SHV* (٧٥٣bp) لعزلات بكتيريا *E . coli* في الاكاروز ١.٥٪ وفرق جهد ١٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة ، اذ لم يظهر الجين اثناء الترحيل الكهربائي .

٣-١-٨ توزيع العزلات المرضية لبكتيريا *E. coli*

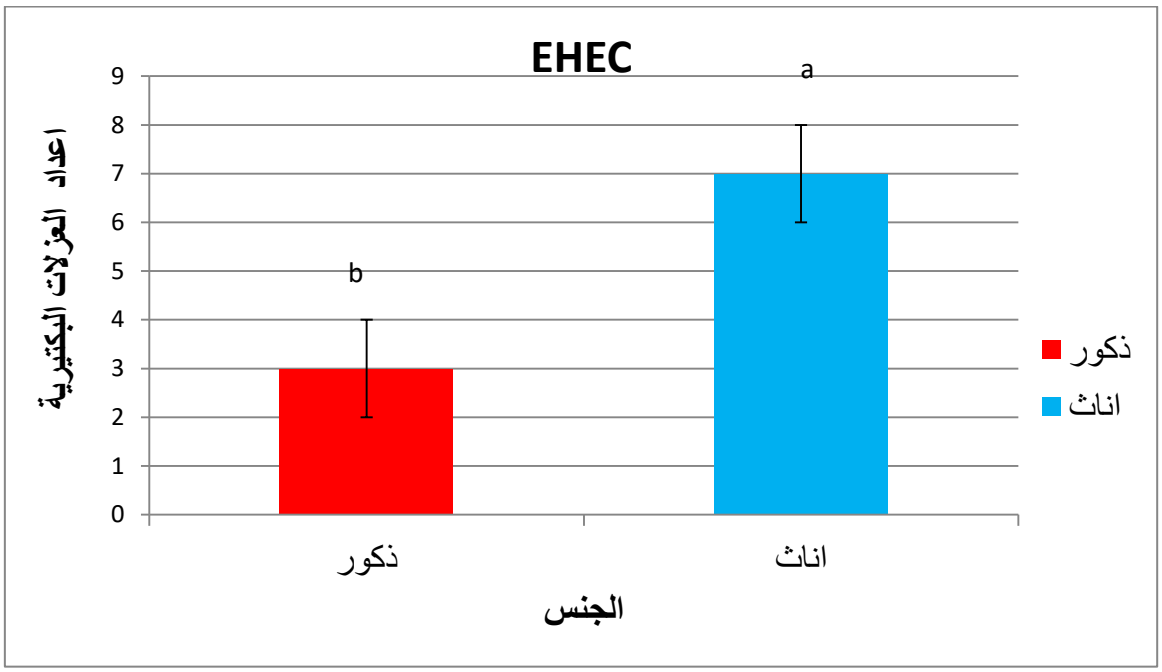
كان توزيع العزلات المرضية لبكتيريا الممرضة للأمعاء EPEC و بكتيريا المعوية النزفية EHEC بين الذكور والاناث ، والفئات العمرية ، و جينات البيتا لاكتام (*CTX-M* , *TEM*) ، كما يلي :

٣-١-٨-١ توزيع العزلات المرضية لبكتيريا *E. coli* حسب الجنس

أظهرت النتائج إنّ بكتيريا الممرضة للأمعاء EPEC موجودة بنسبة أعلى في الذكور (٦) ٦٠٪ من وجودها في الإناث (٤) ٤٠٪ ، ولكن بصورة غير معنوية (P = ٠.٠٧٠) ، وكانت بكتيريا المعوية النزفية EHEC موجودة في الاناث (٧) ٧٠٪ أكثر من الذكور (٣) ٣٠٪ ، وبصورة معنوية تقريباً (P = ٠.٠٥٣) ، مثلما موضح في الشكلين (٣-١٨) و (٣-١٩) .



الشكل (٣-١٨) توزيع عزلات بكتيريا EPEC حسب الجنس ، النتائج تمثل (المعدل ± الانحراف المعياري) ، والاعمدة التي تحمل نفس الحروف لا تعطي فروقات معنوية ($P \geq$ ٠.٠٥) .



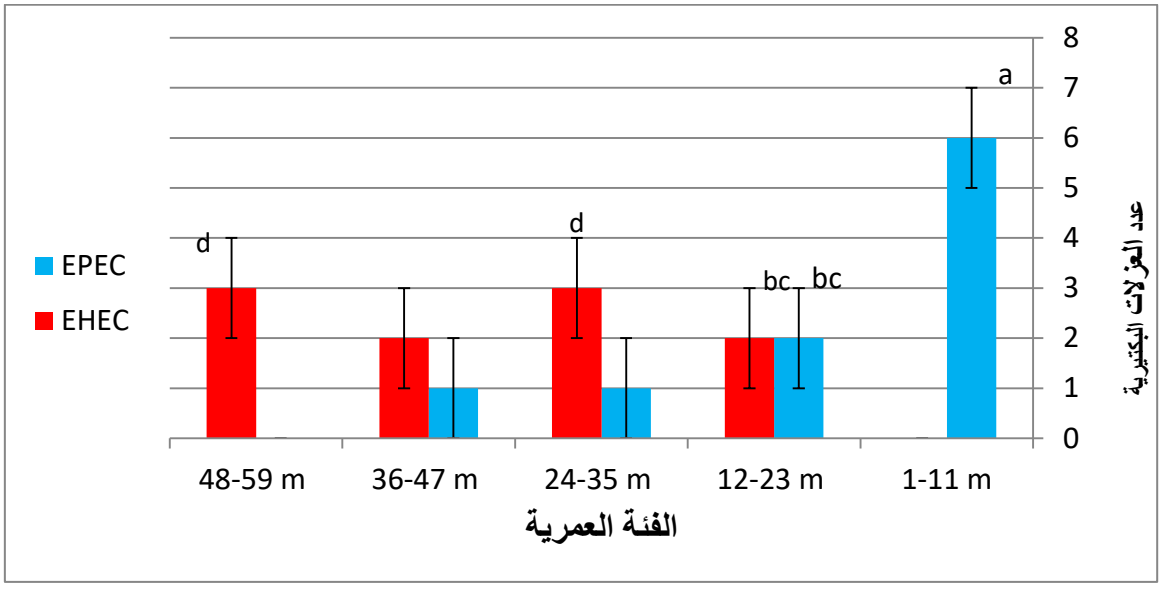
الشكل (٣-١٩) توزيع عزلات بكتيريا EHEC حسب الجنس، النتائج تمثل (المعدل ± الانحراف المعياري) والاعمدة التي تحمل حروف مختلفة تعطي فروقات معنوية ($P \leq ٠.٠٥$) .

٣-١-٨-٢ توزيع العزلات المرضية لبكتيريا *E. coli* حسب العمر

أظهرت النتائج إنّ بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء كانت موجودة في الفئة العمرية (١١-١) شهر بعدد (٦) ٦٠٪ عزلة ، و في الفئة (٢٣-١٢) شهر بعدد (٢) ٢٠٪ عزلة ، تليها الفئة العمرية (٣٥-٢٤) شهر بعدد ١(١٠٪)عزلة ، و الفئة العمرية (٤٧-٣٦) شهر بعدد (١) ١٠٪ عزلة، ولم تظهر في الفئة العمرية(٥٩-٤٨)

أظهرت النتائج إنّ بكتيريا اشريشيا القولون النزفية للأمعاء لم تكن موجودة في الفئة العمرية (١١-١) شهر ، وكانت موجودة في الفئة العمرية (٢٣-١٢) شهر بعدد (٢)٢٠٪ عزلة ، في الفئة (٣٥-٢٤) شهر بعدد (٣) ٣٠٪ عزلة ، وفي الفئة (٤٧-٣٦) شهر بعدد (٢) ٥٠٪ عزلة ، و في الفئة العمرية (٥٩-٤٨) شهر بعدد (٣) ٣٠٪ ,

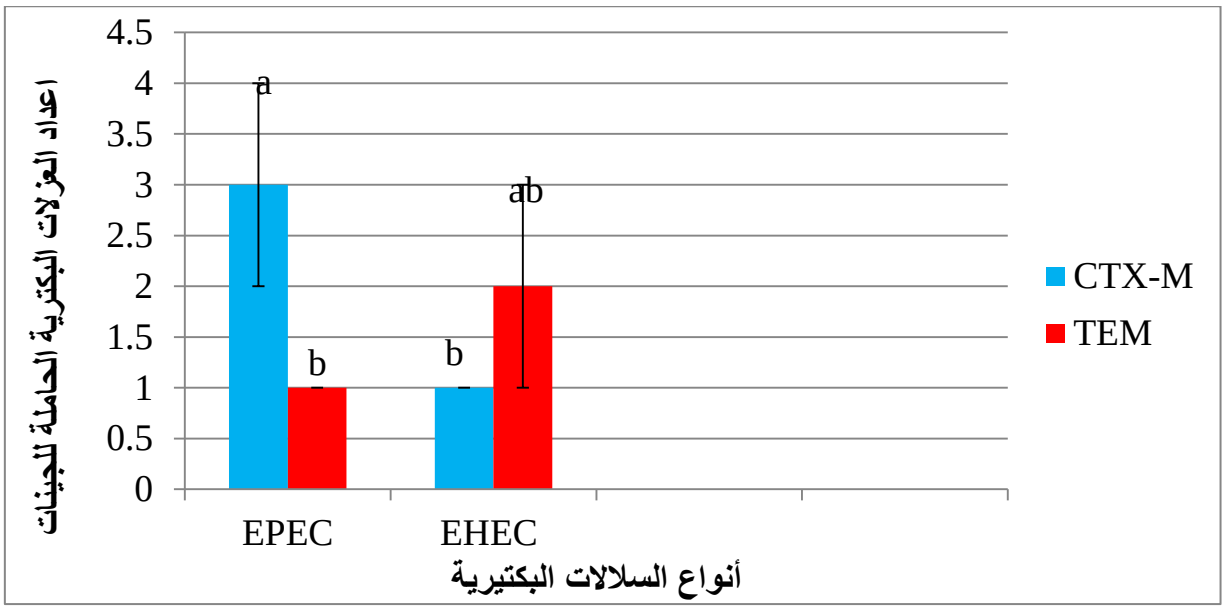
كما موضح في الشكل (٣-٢٠) . أظهر التحليل الاحصائي بما يخص بكتيريا اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء عدم وجود فرق معنوي بين الفئات العمرية عدا الفئة العمرية (١١-١) شهر إذ كانت الاعلى معنويا .



الشكل (٣-٢٠) توزيع العزلات المرضية حسب العمر ، النتائج تمثل (المعدل ± الانحراف المعياري) والاعمدة التي تحمل حروف مختلفة تعطي فروقات معنوي ($P \leq$ ٠.٠٥) .

٣-١-٨-٣ توزيع العزلات المرضية لبكتيريا *E. coli* حسب جينات البيتا لاكتام

أظهرت النتائج إنّ بكتيريا EPEC حاملة جين *CTX-M* في (٣) ٣٠٪ عزلات وبصورة معنوية (P=٠.٠٠٢٤) عن بقية الجينات ، وحاملة الجين *TEM* في عزلة واحدة وبنسبة ١٠٪ . و أيضاً سلالة بكتيريا EHEC كانت حاملة جين *CTX-M* في عزلة واحدة و بنسبة ١٠٪ ، وحاملة الجين *TEM* في عزلتين و بنسبة ٢٠٪ ،مثلما موضح في الشكل (٣-٢١) .



الشكل (٣-٢١) توزيع العزلات المرضية بين جينين (CTX-M و TEM) ، النتائج تمثل (المعدل ± الانحراف المعياري) والاعمدة التي تحمل حروف مختلفة تبين وجود فروقات معنوية ($P \leq$ ٠.٠٥) .

تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لوجود بكتيريا EPEC وبكتيريا EHEC في الذكور والإناث مع دراسة سابقة (Abbasi *et al.*, ٢٠٢٠) في ايران ، إذ كانت بكتيريا EPEC موجودة في الذكور بنسبة (٥٥.٥٪) وفي الاناث ٤٤.٤٪ ، وبكتيريا EHEC موجودة في الذكور بنسبة ٣٣٪ وفي الإناث بنسبة ٦٦.٦٪ .

تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لوجود بكتيريا EPEC في الفئات العمرية مع نتائج دراسة سابقة محلية للباحثة (Khalil , ٢٠١٥) في بغداد ، إذ كانت موجودة في الفئة العمرية (١-٠) سنة بنسبة ٦٠٪ ، والفئة العمرية (٢-١) سنة تتواجد بنسبة ٢٧٪ ، والفئة العمرية (٥-٢) سنة بنسبة ١٣٪ ، واختلفت الدراسة الحالية مع دراسة (Raghavan *et al.*, ٢٠١٧) في السعودية ، إذ كانت البكتيريا موجودة في الفئة العمرية (٦-٠) شهر في عزلة واحدة ، والفئة العمرية (١١-٧) شهر بعدد ٤ عزلات بكتيرية ، و أما الفئة العمرية (٣-١) سنة تواجدت البكتيريا

بعدد ٩ عزلات ، و أخيراً الفئة العمرية (٥-٣) سنة بعدد ٤ عزلة ، حيث كانت أعلى نسبة موجودة فيها في الفئة العمرية (٣-١) سنة .

تتوافق الدراسة الحالية بالنسبة لوجود بكتيريا EHEC في الفئات العمرية مع دراسة سابقة محلية (Khalil , ٢٠١٥) في بغداد ، إذ كانت في فئة (١-٠) سنة بنسبة ٠٪ ، وفئة (٢-١) سنة بنسبة ٢٥% ، وفئة (٥-٢) سنة بنسبة ٧٥% . ولم تتوافق الدراسة الحالية مع دراسة محلية سابقة (Shatub *et al.*, ٢٠٢١) في تكريت ، إذ كانت بكتيريا EHEC متواجدة في فئة (١-٠) سنة ولم تتواجد في الفئات العمرية الأخرى .

تتوافق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لبكتيريا EPEC الحاملة للجين *CTX-M* والجين TEM مع دراسة سابقة للباحثة (Elkasaby *et al.*, ٢٠٢٢) في مصر ، إذ كانت النتائج ٩.٦٪حاملة للجين *CTX-M* ، و ٤٦.٩٥٪ حاملة للجين *TEM* . واختلفت الدراسة الحالية مع دراسة (Jomehzadeh *et al.*, ٢٠٢١) في ايران ، حيث كانت النتائج هي ٨٣.٣٪ , ٥٨٪ على التوالي .

اختلفت النتائج بالنسبة لبكتيريا EHEC الحاملة للجين *TEM* مع دراسة (Abbasi *et al* ., ٢٠٢٠) في ايران ، إذ كانت النتائج بالنسبة للجين *TEM* ١٠٠٪ . قد يعزى سبب اختلاف نسب توزيع السلالات المرضية الحاملة لجينات المقاومة مع الدراسات السابقة إلى دور البلازميدات في انتشار جينات التي تشفر لصفة مقاومة المضادات الحياتية من بكتيريا إلى أخرى أثناء الإصابة (Pfeifer *et al.*, ٢٠٢٢) .

جدول (٣-١) توزيع الجينات المشفرة لصفة المقاومة وعوامل الضراوة في العزلات البكتيرية قيد الدراسة .

NO.	*eae*	*bfpA*	*stx* ١	*stx* ٢	*CTX-M*	*TEM*	*SHV*
EC١	+	+	-	-	-	-	-
EC٢	+	+	-	-	-	-	-
EC٣	+	-	-	-	+	+	-
EC٤	+	-	-	-	+	-	-
EC٥	+	-	-	-	+	-	-
EC٦	+	-	-	-	-	-	-
EC٧	+	-	-	-	-	-	-
EC٨	+	-	-	-	-	-	-
EC٩	-	-	+	+	-	+	-

EC١٠	-	-	+	+	-	+	-
EC١١	-	-	+	+	+	-	-
EC١٢	-	-	+	+	-	-	-
EC١٣	-	-	+	+	-	-	-
EC١٤	-	-	+	+	-	-	-
EC١٥	-	-	+	+	-	-	-
EC١٦	-	-	+	+	-	-	-
EC١٧	-	-	+	+	-	-	-
EC١٨	-	-	+	+	-	-	-
EC١٩	-	-	-	-	-	+	-
EC٢٠	-	-	-	-	-	+	-
EC٢١	-	-	-	-	+	+	-
EC٢٢	-	-	-	-	+	-	-
EC٢٣	-	-	-	-	+	-	-
EC٢٥	-	-	-	-	+	-	-
EC٢٦	-	-	-	-	+	-	-
EC٢٧	-	-	-	-	+	-	-
EC٢٧	-	-	-	-	+	-	-
EC٢٨	-	-	-	-	+	-	-

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

- كانت معظم العزلات البكتيرية مقاومة لطيف واسع من المضادات الحياتية نظراً لأنها تحمل جين *CTX-M* الذي يشفر لصفة المقاومة لمضادات البيتا لاكتام ، بينما كانت معظمها في الوقت نفسه حساسة جدا للمضادات الحيوية Amikacin , Gentamycin .
- كانت نسبة عزل البكتيريا aEPEC أكثر من البكتيريا tEPEC الامر الذي يشير إلى امكانية انتقالها من مصادر عدوى أخرى غير الانسان .
- إنّ العوامل مثل السكن والدخل اليومي أو الشهري للعائلة قد تكون سبباً في تفشي مرض الإسهال بصورة عامة .
- بعض السلالات البكتيرية تكون حاملة لجينات عدة تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية ، و إنّ صفة المقاومة لطيف واسع من المضادات موجودة في أغلب العزلات .

التوصيات

- اختبار فعالية البكتيريا المحفزة الحيوية وبعض المستخلصات النباتية ضد البكتيريا المعوية المسببة لمرض للإسهال .
- يجب التحري الدوري في المستشفيات باستعمال التقنيات الجزيئية الحديثة للكشف عن وجود الجينات المشفرة لصفة المقاومة للمضادات الحياتية في البكتيريا المعزولة من الأمراض .
- الكشف عن الممرضات المعوية الأخرى وكذلك الكائنات الأخرى التي تسبب الإسهال مثل الفايروسات والطفيليات .
- اختبار قدرة البكتيريا المعوية المسببة لمرض الإسهال على امتلاكها بعض عوامل الضراوة مثل تكوينها للغشاء الحيوي Biofilm وانتاجها للإنزيمات المحللة للدم .

المصادر

المصادر

- Abadi, T. ; Rizvanov, A. ; Haertlé, T. & Blatt, N. (٢٠١٩). World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. Bio Nano Science, Vol. ٩ .
- Abbasi, E. ; Mondanizadeh, M. ; Belkum, A. & Ghaznavi-Rad, E. (٢٠٢٠). Multi-drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in pediatric patients with gastroenteritis from central Iran. Infection and Drug Resistance, Vol. ١٣ .
- Abdul-hussein, Z. ; Raheema, R. & Inssaf, A. (٢٠١٨). Molecular diagnosis of diarrheagenic *E. coli* infections among the pediatric patients in Wasit Province, Iraq. Journal of Pure and Applied Microbiology, Vol. ١٢ , No. ٤ .
- Akinnibosun, F. & Nwafor, F. (٢٠١٥). Prevalence of diarrhea and antibiotic susceptibility test in children below ٥ years at University of Benin Teaching Hospital, Nigeria. International Research Journal of Public and Environmental Health, Vol. ٢, No.٤.
- Al zubaidi, A. & Abbas, M. (٢٠٢٠). Microbial Etiology of Acute Diarrhea in Children Under Ten Years of Age in Diyala, Iraq/Hospital-Based Study. Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology, Vol. ١٤, No. ٤.
- Al-Dahmoshi, H. ; Al-Yassari, A. ; Al-Saad, N. ; Al-Dabagh, N. ; Al-Khafaji, N. ; Mahdi, R. & Naji, N. (٢٠١٥). Occurrence of AmpC, MBL, CRE and ESBLs among diarrheagenic *Escherichia coli* recovered from Infantile Diarrhea, Iraq. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Vol. ٥ , No. ٣, P. ١٨٩-٩٥.
- Ali, N. ; Abdulkareem, R. & Ali, R. (٢٠٢٢, January). Study of diarrheageneic *E. coli* in Iraqi children. In AIP Conference Proceedings , Vol. ٢٣٨٦, No. ١ .
- Ali, S. ; Babakir-Mina, M. & Ahmad, H. (٢٠٢٢). Epidemiology and Hematological study of certain enteric bacteria Isolated from Children with Acute Diarrhea in Sulaymania and Erbil Governarates/Iraq. Journal of Pharmaceutical Negative Results, Vol.١٣ , No. ١ .

- Al-Imam, M. & Flayyih, M. (٢٠٢٠). Molecular Study of Regulatory Gene (Ler) in Enteropathogenic *Escherichia Coli* (EPEC) of Diarrheagenic Patients. Iraqi Journal of Science, Vol. ٦١, No. ١٠ , P. ٢٤٨٦-٢٤٩٣.
- Alshehri, W. & Moussa, T. (٢٠٢١). Extended-spectrum β-lactamase Enterobacteriaceae from patients in Jeddah, Saudi Arabia: Antibiotic susceptibility and molecular approaches. Journal Contemporary Medical Science , Vol. ٧ , No. ١.
- Alsherees, H. & Ali, S. (٢٠١٩). A Preliminary Occurrence of Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases in Clinical Isolates of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Najaf, Iraq. bioRxiv, P. ٥١٢٧٣١.
- Álvarez, R. S. ; Gómez, F. ; Zotta, E. ; Paton, A. ; Paton, J. ; Ibarra, C. ; ... & Amaral, M. (٢٠٢١). Combined action of shiga toxin type ٢ and subtilase cytotoxin in the pathogenesis of hemolytic uremic syndrome. Toxins, Vol. ١٣ , No. ٨ .
- Amin, M. ; Sirous, M. ; Javaherizadeh, H. ; Motamedifar, M. ; Saki, M. ; Veisi, H. ; ... & Hashemzadeh, M. (٢٠١٨). Antibiotic resistance pattern and molecular characterization of extended-spectrum β-lactamase producing enteroaggregative *Escherichia coli* isolates in children from southwest Iran. Infection and drug resistance, Vol. ١١, P. ١٠٩٧- ١١٠٤.
- András, A., László, M., László, K., & István, T. (٢٠٢١). Enteropatogén *Escherichia coli* (EPEC) Rövid irodalmi összefoglaló. Magyar Állatorvosok Lapja, Vol.١٤٣, No. ٧.
- Ardissino, G. ; Vignati, C. ; Masia, C. ; Capone, V. ; Colombo, R. ; Tel, F. ; ... & Arghittu , M. (٢٠٢١). Bloody Diarrhea and Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Hemolytic Uremic Syndrome in Children: Data from the ItalKid-HUS Network. The Journal of Pediatrics, Vol. ٢٣٧, P. ٣٤-٤٠ .
- Bailey & Scott (٢٠٠٧) . Diagnostic microbiology ١٢ edition. Mosby- Elsevier , P.١٨٧.

- Bai, X. ; Fu, S. ; Zhang, J. ; Fan, R. ; Xu, Y. ; Sun, H. ; ... & Xiong, Y. (٢٠١٨). Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin ٢ subtype. Scientific reports, Vol. ٨ .
- Bai, X. ; Ylinen, E. ; Zhang, J. ; Salmenlinna, S. ; Halkilahti, J. ;Saxen, H. ; ... & Matussek, A. (٢٠٢٢). Comparative genomics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from pediatric patients with and without hemolytic uremic syndrome from ٢٠٠٠ to ٢٠١٦ in Finland. Microbiology spectrum, Vol. ١٠ , No. ٤
- Barletta, F. ; Ochoa, T. ; Ecker, L. ; Gil, A. ; Lanata, C. & Cleary, T. (٢٠٠٩). Validation of five-colony pool analysis using multiplex real-time PCR for detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of clinical microbiology, Vol. ٤٧ , No. ٦.
- Benson, (٢٠١٧) . Microbiological applications , ١٤ edition . McGraw-Hill Education , P.١٠٥-٢١٥ .
- Beraldo, L. ; Borges, C. ; Maluta, R. ; Cardozo, M. & de Ávila, F. (٢٠٢٣). Molecular analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from healthy food-producing animals and humans with diarrhoea. Zoonoses and Public Health, Vol.٧٠ , No. ٢.
- Bieche-Terrier, C. ; Auvray, F. ; Um, M. ; Allais, L. & Drouet, M. (٢٠١٩). Prevalence of fecal carriage of main enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes among slaughtered dairy calves in France.. International Congress of Meat Science and Technology.
- Bonten, M. ; Johnson, J. ; Biggelaar, A. ; Georgalis, L. ; Geurtsen, J. ; de Palacios, P. ; ... & Poolman, J. (٢٠٢١). Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: a systematic literature review. Clinical Infectious Diseases, Vol. ٧٢ , No.٧, P. ١٢١١-١٢١٩.

- Bradford, P. (٢٠٠١). Extended-spectrum β-lactamases in the ٢١st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical microbiology reviews, Vol.١٤, No. ٤.
- Broujerdi, S. ; Ardakani, M. & Rezatofighi, S. E. (٢٠١٨). Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in children, Khouzestan, Iran. The Journal of Infection in Developing Countries, Vol. ١٢ , No. ٨.
- Bush, K. & Bradford, P. A. (٢٠١٩). Interplay between β-lactamases and new β-lactamase inhibitors. Nature Reviews Microbiology, Vol. ١٧ , P. ٢٩٥-٣٠٦.
- Bush, K. (٢٠١٨). Past and present perspectives on β-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol. ٦٢ , No.١٠ .
- Cherla, R. ; Lee, S. & Tesh, V. (٢٠٠٣). Shiga toxins and apoptosis. FEMS microbiology letters, Vol. ٢٢٨, No. ٢, P.١٥٩-١٦٦.
- Chukwu, M. ; Abia, A. ; Ubomba-Jaswa, E. ; Obi, L. & Dewar, J. (٢٠١٩). Antibiotic resistance profile and clonality of *E. coli* isolated from water and paediatric stool samples in the north-west, province South Africa. Journal Pure Application Microbial, Vol.١٣ , No.١.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (٢٠٢٢) "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing." CLSI supplement M١٠٠ ١٠٦-١١٢.
- Collin, F. & Maxwell, A. (٢٠١٩). The microbial toxin microcin B١٧: prospects for the development of new antibacterial agents. Journal of molecular biology, Vol. ٤٣١ , No.١٨, P. ٣٤٠٠-٣٤٢٦.
- Davies, J. & Davies, D. (٢٠١٠). Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and molecular biology reviews, Vol.٧٤ , No. ٣.
- Day, C. ; Lo, A. ; Hartley-Tassell, L. ; Argente, M. ; Poole, J ; King, N. ; ... & Schembri, M. (٢٠٢١). Discovery of bacterial fimbria–glycan interactions using whole-cell recombinant *Escherichia coli* expression. Mbio, Vol. ١٢ .

- Dessalegn, M. ; Kumie, A. & Tefera, W. (٢٠١١). Predictors of under-five childhood diarrhea: Mecha District, west Gojam, Ethiopia. Ethiopian journal of health development, Vol. ٢٥ , No. ٣ .
- Dong, H. ; Tang, C. ; He, Z. ; Liu, H. ; Xu, Y. ; Huang, H. ; ... & He, N. (٢٠٢٠). Rapid identification of diarrheagenic *Escherichia coli* based on barcoded magnetic bead hybridization. Chinese Chemical Letters, Vol. ٣١ , No. ٧, P.١٨١٢-١٨١٦.
- Dziubańska-Kusibab, P. ; Berger, H. ; Battistini, F. ; Bouwman, B. ; Iftekhar, A. ; Katainen, R. ; ... & Meyer, T. (٢٠١٩). Colibactin DNA damage signature indicates causative role in colorectal cancer. BioRxiv .
- Elkasaby, N. ; Alsayed, M. ; Zaki, M. ; Bakr, A. & Rizk, M. A. (٢٠٢٢). Study of Enteropathogenic *Escherichia coli* producing Extended Spectrum β-lactamase in Children with Acute Gastroenteritis. Egyptian Journal of Medical Microbiology, ٣١(٣), ٨٣-٩٠.
- Eltai, N. ; Al Thani, A. ; Al Hadidi, S. ; Al Ansari, K. & Yassine, H. (٢٠٢٠). Antibiotic resistance and virulence patterns of pathogenic *Escherichia coli* strains associated with acute gastroenteritis among children in Qatar. BMC microbiology, Vol. ٢٠ .
- Engelkirk, P. and Duben-Engelkirk, J. (٢٠١٥). Burtons Microbiology for the Health Sciences . ١٠th ed. Philadelphia, New York.:٤٠-١٤٠.
- Estrada-Garcia, T. ; Lopez-Saucedo, C. ; Thompson-Bonilla, R. ; Abonce, M. ; Lopez-Hernandez, D. ; Santos, J. ; ... & Long, K. (٢٠٠٩). Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. Journal of clinical microbiology, Vol. ٤٧, No. ١ .

- Fujioka, M. ; Otomo, Y. & Ahsan, C. (٢٠١٣). A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of microbiological methods, Vol. ٩٢ , No. ٣, P. ٢٨٩-٢٩٢.

- Gajdács, M. ; Kárpáti, K. ; Nagy, Á. ; Gugolya, M. ; Stájer, A. & Burián, K. (٢٠٢١). Association between biofilm-production and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates: A laboratory-based case study and a literature review. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, Vol. ٦٨ , No. ٤ .
- Garretto, A. ; Miller-Ensminger, T. ; Ene, A. ; Merchant, Z. ; Shah, A. ; Gerodias, A. ; ... & Putonti, C. (٢٠٢٠). Genomic survey of *E. coli* from the bladders of women with and without lower urinary tract symptoms. Frontiers in microbiology, Vol.١١
- Gomes, T. ; Elias, W. ; Scaletsky, I. ; Guth, B. ; Rodrigues, J. ; Piazza, R. ; Ferreial , L. ... & Martinez, M. (٢٠١٦). Diarrheagenic *Escherichia coli* . brazilian journal of microbiology, Vol. ٤٧, No.١ .
- Govindarajan, D. ; Viswalingam, N. ; Meganathan, Y.& Kandaswamy, K. (٢٠٢٠). Adherence patterns of *Escherichia coli* in the intestine and its role in pathogenesis. Medicine in Microecology, Vol. ٥ .
- Gu, S. ; Lai, J. ; Kang, W. ; Li, Y. ; Zhu, X. ; Ji, T. ; ... & Wang, Y. (٢٠٢٢). Drug resistance characteristics and molecular typing of *Escherichia coli* isolates from neonates in class A tertiary hospitals: A multicentre study across China. Journal of Infection, Vol. ٨٥ , No. ٥, P. ٤٩٩-٥٠٦.
- Gualerzi, C.; Brandi, L.; Fabbretti, A.& Pon, C. (٢٠١٤). Targets, Mechanisims and Resistance Antibiotics .Willy –VCH , pp٨٠ .
- Hamza, O. & Omran, R. (٢٠٢٢). Multidrug Drug Resistance of *Escherichia coli* and *Klebsiella* Isolated from Iraqi Patients and Microbiota. Journal of Biosciences and Medicines, Vol. ١٠, No. ١١, P. ٢٤٠-٢٥٢.
- Han, M. ; Zhu, Y. ; Creek, D. ; Lin, Y. ; Anderson, D. ; Shen, H. ; ... & Li, J. (٢٠١٨). Alterations of metabolic and lipid profiles in polymyxin-resistant

Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol. ٦٢ , No. ٦ .

- Harb, A. ; Abraham, S. ; O'Dea, M. ; Hantosh, H. ; Jordan, D. & Habib, I. (٢٠٢١). Sociodemographic Determinants of Healthcare-Seeking Options and Alternative Management Practices of Childhood Diarrheal Illness: A Household Survey among Mothers in Iraq. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Vol.١٠٤ .
- Hasan, H. ; Yassin, N. & Eassa, S. (٢٠٢٠). Bacteriological and Molecular Characterization of Diarrheagenic *Escherichia Coli* Pathotypes From Children in Duhok City, Iraq. Science Journal of University of Zakho, Vol. ٨ , No. ٢ .
- Heydari, F. ; Bonyadian, M. ; Moshtaghi, H. & Sami, M. (٢٠٢٠). Prevalence and antibiotic resistance profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrheal samples. Iranian Journal of Microbiology, Vol. ١٢ No.٤.
- Huang, Z. ; Pan, H. ; Zhang, P. ; Cao, X. ; Ju, W. ; Wang, C. ; ... & Xu, X. (٢٠١٦). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* in Shanghai, China. The Pediatric infectious disease journal, Vol. ٣٥, No. ٨, P. ٨٣٥-٨٣٩.
- Jacoby, G. & Munoz-Price, L. (٢٠٠٥). The new β-lactamases. New England Journal of Medicine, vol. ٣٥٢ .
- Jawetz , Melnick & Adelbergs (٢٠١٩). Medical microbiology ٢٨ edition . McGraw-Hill Education , P. ٢٣٥.
- Jenkins, C. ; Perry, N. ; Godbole, G. & Gharbia, S. (٢٠٢٠). Evaluation of chromogenic selective agar (CHROMagar STEC) for the direct detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from fecal specimens. Journal of Medical Microbiology, Vol. ٦٩ , No.٣.

- Ji, Y. ; Fang, Q. ; Liu, S. ; Zhang, B. & Long, C. (٢٠٢٠). Herbal medicinal markets in China: an ethnobotanical survey. Medicinal plants: biodiversity, sustainable utilization and conservation, P. ٤١٥-٤٢٩.

- Jomehzadeh, N; Ahmadi, K.; Javaherizadeh, H. & Afzali, M. (٢٠٢١). The first evaluation relationship of integron genes and the multidrug-resistance in class A ESBLs genes in enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Southwestern Iran. Molecular Biology Reports, Vol. ٤٨, No. ١.
- Kaper, J. ; Nataro, J. ; & Mobley, H. (٢٠٠٤). Pathogenic *Escherichia coli*. Nature reviews microbiology, Vol. ٢ .
- Khairy, R. ; Fathy, Z. ; Mahrous, D. ; Mohamed, E. & Abdelrahim, S. (٢٠٢٠). Prevalence, phylogeny, and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* pathotypes isolated from children less than ٥ years old with community acquired-diarrhea in Upper Egypt. BMC Infectious Diseases, Vol. ٢٠ , No. ١.
- Khalid, M. & Andreoli, S. (٢٠١٩). Extrarenal manifestations of the hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC HUS). Pediatric Nephrology, Vol. ٣٤ .
- Khalil, Z. (٢٠١٥). Isolation and identification of different diarrheagenic (DEC) *Escherichia coli* pathotypes from children under five years old in Baghdad. Iraqi journal of community medicine .
- Khan, Z. ; Siddiqui, M. & Park, S. (٢٠١٩). Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. Diagnostics, Vol. ٩, No. ٢, P. ٤٩.
- Larsson, D. & Flach, C. (٢٠٢٢). Antibiotic resistance in the environment. Nature Reviews Microbiology, Vol. ٢٠ .
- Lauxen, A. ; Kobauri, P. ; Wegener, M. ; Hansen, M. J. ; Galenkamp, N. ; Maglia, G. ; ... & Kuipers, O. (٢٠٢١). Mechanism of resistance development in *E.*

coli against TCAT, a trimethoprim-based photoswitchable antibiotic. Pharmaceuticals, Vol.١٤ , No. ٥.

- Lee, M. ; Kim, M. & Tesh, V. (٢٠١٣). Shiga toxins expressed by human pathogenic bacteria induce immune responses in host cells. Journal of microbiology, Vol. ٥١
- Luna-Guevara, J.; Arenas-Hernandez, M. ; Martínez de la Peña, C.; Silva, J. & Luna-Guevara, M. (٢٠١٩). The role of pathogenic *E. coli* in fresh vegetables: Behavior, contamination factors, and preventive measures. International journal of microbiology.
- Levinson, W. (٢٠١٦) . Review of medical microbiology and immunology ١٤ edition . Mc Graw – Hill Educcation , P. ٦٩-١٤٨ .
- Lewis, K. (٢٠٢٠). The science of antibiotic discovery. Cell, Vol. ١٨١ No. ١, P ٢٩-٤٥.
- Ling, T. ; Tam, P. ; Liu, Z. & Cheng, A. (٢٠٠١). Evaluation of VITEK ٢ rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. Journal of clinical microbiology, Vol. ٣٩, No. ٨.
- Mahon, C. ; Lehman, D. & Manuselis, G. (٢٠١٥). Textbook of diagnostic microbiology .٥ edition . Elsevier, PP ١٨١ - ٢٢٦.
- Mancuso, G. ; Midiri, A. ; Gerace, E. & Biondo, C. (٢٠٢١). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. Pathogens, Vol. ١٠ , No. ١٠. P. ١٣١٠ .
- Manetu, W. ; M'masi, S. & Recha, C. (٢٠٢١). Diarrhea disease among children under ٥ years of age: a global systematic review. Open Journal of Epidemiology, Vol. ١١ .
- Manhique-Coutinho, L. ; Chiani, P. ; Michelacci, V. ; Taviani, E. ; Bauhofer, A. ; Chissaque, A.; ... & de Deus, N. (٢٠٢٢). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from children with diarrhea: A cross-sectional study in four provinces of Mozambique: Diarrheagenic *Escherichia coli*

in Mozambique. International Journal of Infectious Diseases, Vol. ١٢١, P. ١٩٠-١٩٤.

- Mare, A. ; Ciurea, C. ; Man, A. ; Tudor, B. ; Moldovan, V. ; Decean, L. & Toma, F. (٢٠٢١). Enteropathogenic *Escherichia coli*—A summary of the literature. Gastroenterology Insights, Vol.١٢ , No.١ .
- Markey, B. ; Leonard, F. ; Archambault, M. ; Cullinane, A. and Maguire, D. (٢٠١٣). Clinical veterinary microbiology. ٢ edition. Mosby, Elsevier. P. ٢٤٦-٢٤٩.
- Mayers, L.; Lerner,S.; Ouelltte,M.& Sobel,L.(٢٠٠٩). Antimicrobial Drug Resistance . Human Press , Vol. ١. P. ٧٩ .
- McCloskey, D. ; Xu, S. ; Sandberg, T. ; Brunk, E., Hefner, Y. ; Szubin, R. ; Feist, A. & Palsson, B. (٢٠١٨). Growth adaptation of gnd and sdhCB *Escherichia coli* deletion strains diverges from a similar initial perturbation of the transcriptome. Frontiers in microbiology, Vol. ٩.
- Melton-Celsa, A. (٢٠١٤). Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. Microbiology spectrum, Vol. ٢, No. ٤, P. ٢-٤.
- Moharana, S. ; Panda, R. ; Dash, M. ; Chayani, N. ; Bokade, P. ; Pati, S. & Bhattacharya, D. (٢٠١٩). Etiology of childhood diarrhoea among under five children and molecular analysis of antibiotic resistance in isolated enteric bacterial pathogens from a tertiary care hospital, Eastern Odisha, India. BMC Infectious Diseases, Vol.١٩ .
- Motyka, N. ; Stewart, S. ; Hollifield, I. ; Kyllo, T. ; Mansfield, J. ; Norton, E. ; ... & Bitoun, J. (٢٠٢١). Elevated extracellular cGMP produced after exposure to enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin induces epithelial IL-٣٣ release and alters intestinal immunity. Infection and immunity, Vol. ٨٩ , No.٤ .
- Murray, P. ; Rosenthal, K. & Pfaller, M. (٢٠١٦) . Medical microbiology ٨ edition . Elsevier , P. ٢٥١ .

- Mutai, M. ; Njeru, E. ; & Ntabo, R. (٢٠٢١). Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants Used By the Marakwet Community in Cherangani Forest, Kenya. Journal of Medicinal and Chemical Sciences, Vol. ٤ , No. ٣ , P. ٢٨٩-٣٠٠.
- Ogura, Y. ; Mondal, S. ; Islam, M. ; Mako, T. ; Arisawa, K. ; Katsura, K. ; ... & Hayashi, T. (٢٠١٥). The Shiga toxin ٢ production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O١٥٧: H٧ is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage. Scientific reports, Vol.٥١, P.١٦٦٦٣.
- Olowe, B.; Oluyege, J. ; Famurewa, O. ; Ogunniran, A. & Adelegan, O.(٢٠١٧). Molecular Identification of *Escherichia coli* and New Emerging enteropathogen, *Escherichia fergusonii*, from drinking water sources in Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria. Journal of Microbiology Research, Vol. ٧, No. ٣.
- Omolajaiye, S. ; Afolabi, K. & Iweriebor, B. (٢٠٢٠). Pathotyping and antibiotic resistance profiling of *Escherichia coli* isolates from children with acute diarrhea in amatole district municipality of Eastern Cape, South Africa. BioMed Research International.
- Oriomah, C. & Akpe, A. R. (٢٠١٩). Plasmid curing of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolates from urine and stool samples. Journal of Microbiology and Antimicrobials, Vol.١ , P. ١-٤.
- Pakbin, B. ; Brück, W. & Rossen, J. (٢٠٢١). Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. International journal of molecular sciences, Vol. ٢٢ , No.١٨.
- Pandey, N. & Cascella, M. (٢٠٢٢). Beta lactam antibiotics. Stat Pearls Publishing.
- Pang, Z. ; Raudonis, R. ; Glick, B. ; Lin, T. & Cheng, Z. (٢٠١٩). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology advances, Vol. ٣٧ , No. ١ , P. ١٧٧-١٩٢ .

- Pasqua, M. ; Grossi, M. ; Zennaro, A. ; Fanelli, G. ; Micheli, G. ; Barras, F.; ... & Prosseda, G. (٢٠١٩). The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria with animal and plant cells. Microorganisms, Vol. ٧ , No. ٩ .
- Pennington, H. (٢٠١٠). *Escherichia coli* O١٥٧. The Lancet, Vol.٣٧٦, No. ٩٧٥٠, P.١٤٢٨-١٤٣٥.
- Pfeifer, E. ; Bonnin, R. & Rocha, E. (٢٠٢٢). Phage-Plasmids spread antibiotic resistance genes through infection and lysogenic conversion. Mbio, Vol. ١٣ , No. ٥.
- Philipsborn, R. ; Ahmed, S. ; Brosi, B. & Levy, K. (٢٠١٦). Climatic drivers of diarrheagenic *Escherichia coli* incidence: a systematic review and meta-analysis. The Journal of infectious diseases, Vol. ٢١٤, No. ١, P. ٦-١٥.
- Podewils, L. ; Mintz, E. ; Nataro, J. & Parashar, U. (٢٠٠٤). Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. In Seminars in pediatric infectious diseases ,Vol. ١٥, No. ٣, P. ١٥٥ .
- Raghavan, P. ; Roy, S. ; Thamizhmani, R. & Sugunan, A. (٢٠١٧). Diarrheagenic *Escherichia coli* infections among the children of Andaman Islands with special reference to pathotype distribution and clinical profile. Journal of epidemiology and global health, Vol. ٧ , No. ٤, P. ٣٠٥-٣٠٨.
- Rahman, M. ; Ahmed, P. ; Kar, A. ; Sakib, N. ; Shibly, A. ; Zohora, F. & Hasan, M. (٢٠٢٠). Prevalence, antimicrobial resistance, and pathogenic potential of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* associated with acute diarrheal patients in Tangail, Bangladesh. Foodborne Pathogens and Disease, vol.١٧ , No. ٧.
- Rahman, M. ; Uddin, M. ; Sultana, R. ; Moue, A. & Setu, M. (٢٠١٣). Polymerase chain reaction (PCR): a short review. Anwer Khan Modern Medical College Journal, Vol. ٤, No.١, P. ٣٠-٣٦.

- Rani, A. ; Ravindran, V. B. ; Surapaneni, A. ; Mantri, N. & Ball, A. (٢٠٢١). Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O١٥٧: H٧ in food and water. International Journal of Food Microbiology, Vol. ٣٤٩ .
- Reza, A., Sutton, J. & Rahman, K. (٢٠١٩). Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram-negative (ESKAPEE) bacteria. Antibiotics, Vol. ٨ , No. ٤.
- Roy, S. ; Shamsuzzaman, S. ; & Mamun, K. (٢٠١٣). Antimicrobial resistance pattern of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from acute diarrhea patients. International Journal of Pharmaceutical Science Invention, Vol. ٢, No. ٦, P.٤٣-٦.
- Saeed, A. ; Abd, H. & Sandstrom, G. (٢٠١٥). Microbial aetiology of acute diarrhea in children under five years of age in Khartoum, Sudan. Journal of medical microbiology , Vol. ٦٤.
- Samuel, S. ; Moses, N. ; & Too, E. (٢٠١٩). Prevalence of Enterobacteriaceae Isolated from Childhood Diarrhoea in Mukuru Slums, Nairobi-Kenya . Journal of Advances in Microbiology .
- Sang, W. ; Oundo, V. & Schnabel, D. (٢٠١٢). Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhea in four provinces of Kenya. The Journal of Infection in Developing Countries, Vol. ٦ , No. ٠٧
- Scheutz, F. ; Teel, L. ; Beutin, L. ; Piérard, D. ; Buvens, G. ; Karch, H. ; ... & O'Brien, A. (٢٠١٢). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. Journal of clinical microbiology, Vol. ٥٠ , No. ٩ .
- Schwidder, M. ; Heinisch, L. & Schmidt, H. (٢٠١٩). Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin. Toxins, Vol. ١١ , No. ٩ .

- Shah, C. ; Baral, R. ; Bartaula, B. & Shrestha, L. (٢٠١٩). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. BMC microbiology, Vol. ١٩ .
- Shatub, W. ; Jafar, N. & Melconian, A. (٢٠٢١). Detection of diarrheagenic *E. coli* among children under ٥ years age in Tikrit city of Iraq by using single multiplex PCR technique. Plant Archives , Vol. ٢١, No. ١, P. ١٢٣٠-١٢٣٧ .
- Sherris, J. (٢٠١٨). Medical microbiology . New York, NY, USA: McGraw-Hill Education , P. ٤٣١-٦٣١ .
- Snehaa, K. ; Singh, T. ; Dar, S. ; Haque, S. ; Ramachandran, V. ; Saha, R. ; ... & Das, S. (٢٠٢١). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in children with acute diarrhoea: changing trend in East Delhi. Biomedical journal, Vol. ٤٤ , No. (٤), P. ٤٧١-٤٧٨.
- Sorsdahl, K. ; Flisher, A. ; Wilson, Z. & Stein, D. (٢٠١٠). Explanatory models of mental disorders and treatment practices among traditional healers in Mpumulanga, South Africa. African Journal of Psychiatry, vol. ١٣ , No.٤.
- Stoll, B. ; Glass, R. ; Banu, H. ; Huq, M. ; Khan, M. & Ahmed, M. (١٩٨٣). Value of stool examination in patients with diarrhea . British medical journal, Vol. ٢٨٦.
- Tadesse, A. & Alem, M. (٢٠٠٦). Medical bacteriology. EPHTI. PP. ٤٣٣.
- Tareen, A. ; Ullah, K. ; Asmat, T. ; Samad, A. ; Iqbal, A. ; Mustafa, M. ; Ahmad, I. & Rahman, S. (٢٠١٩). Incidence of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in children suffering from diarrhea in tertiary care hospitals, Quetta, Pakistan. Pakistan Journal of Zoology, Vol. ٥١ .
- Tian L. ; Zhu X. ; Chen Z. ; Liu W. ; Li S. ; Yu W. ; ... & Sun Z. (٢٠١٦). Characteristics of bacterial pathogens associated with acute diarrhea in children under ٥ years of age: a hospital-based cross-sectional study. BMC infectious diseases, Vol. ١٦ , No. ١, P.١-٨.

- Tomas, J. ; Camprubi, S. & Williams, P. (١٩٨٨). Surface exposure of the O-antigen in Klebsiella pneumoniae O١: K١ serotype strains. Microbial pathogenesis, Vol. ٥, No. ٢.
- Torres, M. ; Adkinson, Jr. ; Caubet, J. ; Khan, D. ; Kidon, M. ; Mendelson, L. ; ... & Macy, E. (٢٠١٩). Controversies in drug allergy: beta-lactam hypersensitivity testing. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, Vol.٧ , No. ١ , P.٤٠-٤٥.
- Travert, B. ; Rafat, C. ; Mariani, P. ; Cointe, A. ; Dossier, A. ; Coppo, P. & Joseph, A. (٢٠٢١). Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Specificities of adult patients and implications for critical care management. Toxins, Vol. ١٣ , No ٥ .
- Tuky, H. & Semender, B. (٢٠١٩). Assessing risk factors and causative organisms of acute diarrhea in children under ٥ years in Al-Hindiya, Karbala, Iraq. Medical journal of Babylon, Vol. ١٦ , No. ٤ .

- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (٢٠٢٠). Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. Antibiotics, Vol.١٠ , No. ١.
- Veiga, R. & Paiva, J. (٢٠١٨). Pharmacokinetics–pharmacodynamics issues relevant for the clinical use of beta-lactam antibiotics in critically ill patients. Critical Care, Vol. ٢٢ .
- Verma, S. ; Venkatesh, V. ; Kumar, R. ; Kashyap, S. ; Kumar, M. ; Maurya, A. ; ... & Singh, M. (٢٠١٩). Etiological agents of diarrhea in hospitalized pediatric patients with special emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli* in North India. Journal of Laboratory Physicians, Vol.١١, No. ٠١.
- Webale, M. ; Wanjala, C. ; Guyah, B. ; Shaviya, N. ; Munyekenye, G. ; Nyanga, P. ; ... & Kitungulu, N. (٢٠٢٠). Epidemiological patterns and antimicrobial resistance of bacterial diarrhea among children in Nairobi City,

Kenya. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench, Vol. ١٣ , No. ٣, P. ٢٣٨ ٢٤٦ .

- Yim, J. ; Seo, K. ; Chon, J. ; Jeong, D. & Song, K. (٢٠٢١). Status and Prospects of PCR Detection Methods for Diagnosing Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. Journal of Dairy Science and Biotechnology, Vol. ٣٩ .
- Yu, P. ; Zhou, X. ; Li, Z. & Yan, Y. (٢٠٢٠). Inactivation and change of tetracycline-resistant *Escherichia coli* in secondary effluent by visible light-driven photocatalytic process using Ag/AgBr/g-C٣N٤. Science of the Total Environment, Vol.٧٠٥ .
- Zhou, Y. ; Zhu, X. ; Hou, H. ; Lu, Y. ; Yu, J. ; Mao, L. ; ... & Sun, Z. (٢٠١٨). Characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among children under ٥ years of age with acute diarrhea: a hospital based study. BMC infectious diseases, Vol.١٨.

ملحق (١) نتائج فحص عينات البراز قيد الدراسة تحت المجهر الضوئي

		عدد خلايا الدم الحمراء				عدد الخلايا الالتهابية			
		١-١٠	١١-٢٠	٢١-٥٠	> ٥٠	١-١٠	١١-٢٠	٢١-٥٠	>٥٠
عدد المصابين	٣٤	+	-	-	-	-	-	+	-
	٢١	-	+	-	-	-	-	+	-
	١٣	-	-	-	+	+	-	-	-
	١٢	-	+	-	-	-	-	-	+
عدد الاصحاء	١٤	-	-	-	-	-	+	-	-
	٦	-	-	-	-	+	-	-	-

موجبة = + ، سالبة = -

ملحق (٢) النسبة المئوية لاحتمالية التشخيص لعزلات بكتيريا *E. coli* باستعمال نظام الفايتك

عدد عزلات بكتيريا *E. coli*	النسبة المئوية لاحتمالية التشخيص
٣٨	٩٩
١	٩٧
١	٩٥

ملحق (٣) نتيجة التشخيص باستعمال نظام الفايتك

مختبر ميديكا التخصصي

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed May 12, 2022 10:12:45 PM CDT

Patient Name: 49, .
Location:
Lab ID: 1090

Patient ID: 1090
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	2.92 hours	**Status:** Final
Selected Organism	99% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0005610454026611	
ID Analysis Messages			

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	+
40	lLATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	+	64	lLATa	-			

ملحق (٤) مقاومة عزلات بكتيريا *E. coli* للمضادات الحيوية

No	Amp	AK	AZm	CTX	CTR	COT	DXT	GEN	TE	CIP
EC١	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S
EC٢	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
EC٣	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
EC٤	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
EC٥	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
EC٦	R	R	S	R	R	I	S	S	R	S
EC٧	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
EC٨	R	S	S	R	R	R	S	S	R	I
EC٩	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
EC١٠	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
EC١١	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
EC١٢	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S
EC١٣	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
EC١٤	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
EC١٥	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S
EC١٦	R	S	S	R	R	S	S	S	S	I
EC١٧	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
EC١٨	R	S	R	R	I	R	S	S	S	R
EC١٩	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S
EC٢٠	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R
EC٢١	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
EC٢٢	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
EC٢٣	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
EC٢٤	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
EC٢٥	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S

EC٢٦	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S
EC٢٧	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S
EC٢٨	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
EC٢٩	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S
EC٣٠	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
EC٣١	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
EC٣٢	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
EC٣٣	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R
EC٣٤	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R
EC٣٥	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
EC٣٦	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S
EC٣٧	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
EC٣٨	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S
EC٣٩	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R
EC٤٠	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R

Summary

The present study was performed to determine the bacterial causative agents of diarrhea in children and also the virulence factors possessed by *Escherichia coli* which isolated from the stool of children under ٥ years of age with symptoms of diarrhea and its relationship to antibiotic resistance as the main causative factor in diarrhea. One hundred samples were collected from stool of children who attended the Children's Teaching Hospital in the holy city of Karbala, for the period from ٢/٢/٢٠٢٢ to ١٥/٦/٢٠٢٢. The samples were cultured on several culture media, and then the bacterial isolates were identified using the Vitek٢ technique. After that an antibiotic sensitivity test was performed, then prior to detection by PCR technique ٤٠ isolates of *E. coli* were selected based on examining a stool sample under a light microscope, which contained pus cells, or Red blood cells.

The results showed that the percentage of males infected with diarrhea was ٤٦ (٥٧.٥٪), which was higher than the percentage of females ٣٤ (٤٥٪). Statistical analysis showed that there was a significant difference between infected males and females (*P* = ٠.٠٢). The infected children ١١(١٣.٧٥٪) was found in the age group of (٠-٦) months, and the number of infected children ٢٣ (٢٨.٧٥٪)was in the age group (٧-١١) months and the age group (١-٢) years had the number of infected children ٢١ (٢٦.٢٥٪) . The number of affected children was ١٦ (٢٠٪) in the age group of (٢-٣) years, followed by ٩ (١١.٢٥٪) in the age group of (٣-٥) years .It is clear from the above that the number of affected children was higher in the age of groups between (٧-١١) months and (١-٢) years, but no significant differences were appeared between the age groups (*P* = ٠. ٩٩) . The number of children who live in randimals areas ٥٢ (٦٥٪) were significantly higher infected by bacterial causative agents of diarrhea in comparison to those children live in residential neighborhoods ٢٨ (٣٥٪) (*P* = ٠.٠٠١).

It was found that the number of children whose parents practiced free professions ٦١ (٧٦.٢٥٪) which were significantly more likely to suffer from diarrhea compared to children whose fathers were employed ١٩ (٢٣.٧٣٪) (P =٠.٠٠٩) .

The results from the sensitivity test showed that (١٠٠٪) ٤٠ bacterial isolates were resistant to the antibiotic Ampicillin, which is the highest percentage of resistance , followed by (٨٥٪) ٣٤ bacterial isolates resistant to the antibiotic Co-Trimoxazole , then (٨٢.٥٪) ٣٣ bacterial isolates were resistant to the antibiotic Cefotaxime . In addition, (٧٢.٥٪) ٢٩ bacterial isolates were resistant to the antibiotic Ceftriaxone , ٢٦ (٦٥٪) bacterial isolate resistant to the antibiotic Tetracycline . Results also showed that (٥٢.٥٪) ٢١ bacterial isolates were resistant to the antibiotic Azthromycine followed by (٥٠٪) ٢٠ bacterial isolates had resistance activity against to the antibiotic Doxycycline . Beside, ١٥ (٣٧.٥٪) isolate were resistant to the antibiotic Ciprofloxacin and ٦ (١٥٪) isolate were resistant to the antibiotic Gentamycin. Finally (٧.٥٪) ٣ bacterial isolate resistant to the antibiotic Amikacin which is the lowest percentage of resistance.

Molecular detection which represented by polymerase chain reaction PCR results showed that (٥٠٪) of ٢٠ bacterial isolates carrying genes (*stx* ١, *stx* ٢, *eae*, *bfpA*), which belong to the pathotypes of *E. coli* bacteria causing diarrhea (DEC), and (٥٠٪) ١٠ isolates of enteropathogenic bacteria EPEC, (٥٠٪) ١٠ isolates carrying two genes together (*stx* ١ & *stx* ٢) belong to the intestinal hemorrhagic bacteria EHEC .It was noted that there no significant differences were found between the two strains ($P \geq$ ٠.٠٥) , On the other hand among the ten isolates of enteropathogenic bacteria EPEC were (٨٠٪) ٨ bacterial isolates carrying the (*eae*) gene for the atypical enteropathogenic bacteria aEPEC, and two isolates (٢٠٪) carrying two genes together (*eae* & *bfpA*) belong to the typical enteropathogenic bacteria tEPEC . The statistical analysis showed that there was a clear significant difference between the two types of these bacteria ($P \leq$ ٠.٠٥).

The results appeared that the number of bacterial isolates which carried the *CTX-M* gene were (٦٦٪) ١٢ and was significantly higher (P = ٠.٠٠٣) compared to the isolates

carried the *TEM* gene, which were (٣٣٪) ٦ isolates, and the *SHV* gene was not appeared in any bacterial isolates .

Moreover, the results of the current study showed that EPEC bacteria were present in a higher percentage in males (٦٠٪) ٦ compared to their presence in females (٤٠٪) ٤, with a non-significant manner (P = ٠.٠٧٠). In contrast EHEC bacteria were present in females by (٧٠٪) ٧ which significantly higher than their presence in males (٣٠٪) ٣ and almost (P = ٠.٠٥٣) .

The results showed that EPEC bacteria were present in the age group of (١-٦) months with (٢٠٪) ٢ isolates, while (٤٠٪) ٤ isolates were present in the age group of (٧-١١) months , followed by the age group of (١-٢) years with a number of (٢٠٪) ٢ isolates .Finally, (١٠٪) ١ bacterial isolate was present in the age groups of (٢-٣) years and (٣-٥) years.

The results also revealed that EHEC bacteria were not present in the age group of (١-٦) months and (١١-٧) months, and were present in the of (١-٢) years with a number of (٢٠٪) ٢ isolates , (٣٠٪) ٣ bacterial isolates were found in the age category of (٢-٣) years. Finally, (٥٠٪) ٥ isolates were recorded in the age category of (٣-٥) years. The statistical analysis regarding present of EPEC bacteria among age groups showed that there was no significant difference between the age , except for the age group of (٧-١١) months, which was the number of the bacteria in this group significantly higher compared to the two age groups of (٢-٣) and (٣-٥) years. On the contrary, the number of EHEC was significantly higher in the age group of (٣-٥) years compared to the rest of the age groups ($P \leq$ ٠.٠٥) .

Finally, the current results appeared that (٣٠٪) of ٣ EPEC isolates was significantly carried the *CTX-M* gene and (P = ٠.٠٠٢٤) in comparison to other genes. In addition, the TEM gene was carried by one bacterial isolate at a rate of (١٠٪) . *CTX-M* gene was carried by one isolate of EHEC with a percentage of (١٠٪) and two isolates of EHEC carried the *TEM* gene in with a percentage of (٢٠٪).

Kerbala University

College of Science

Department of biology

Molecular characterization of E. coli isolated from children infected with diarrhea in Kerbala province.

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Science / Kerbala University and it is Part of the Requirements for a Master's Degree in Biology Science

Written by student : Huda Abbas Muhammad Al- Tuhmazi

Supervised by : D. Ali A. Abid . Al-Hisnawi

٢٠٢٣- April **١٤٤٤- Ramadan**