



جامعة كربلاء
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

الكشف الجزيئي لبكتريا *Escherichia coli* المعزولة
من اصابات المسالك البولية والمقاومة للمضادات
الحوية المثبطة لبناء الحمض النووي الرايبوزي
منقوص الأوكسجين

رسالة ماجستير

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

احمد عباس علي ابو المعالي

بكالوريوس علوم حياة جامعة كربلاء 2008 م

بإشراف

أ.د. حسن محمود موسى ابو المعالي

أ.م.د زهير حميد عبود الظويهري

ايلول - 2024 م

صفر - 1446 هـ



يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ
وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ
وَالَّذِينَ آمَنُوا بِمَا نَزَّلْنَا مِن
عِندِ اللَّهِ حَقًّا حَقِيقًا

صدق الله العلي العظيم

سورة المجادلة ﴿ 11 ﴾

اقرار المشرفين

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافنا في جامعة كربلاء بوصفها جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع: 

الاسم: د. حسن محمود موسى

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2024

التوقيع: 

الاسم: د. زهير حميد جبور

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2024

توصية رئيس قسم علوم الحياة

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

التوقيع: 

الاسم: د. مؤيد نعيم كريم

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2024

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة، نشهد بأننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (الكشف الجزيئي لبكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية والمقاومة للمضادات الحيوية المثبطة لبناء الحمض النووي لراببوزي منقوص الأوكسجين)، وقد ناقشنا الطالب (احمد عباس علي ماجد) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 3 / 2024 ونرى انها جديرة لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة بتقدير (امتياز) .

رئيس اللجنة المناقشة
التوقيع :
الاسم : د. علاء عبد الحسين كريم

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ : 2024 / /

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. كوكب عبد الله حسين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التاريخ : 2024 / /

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. زهير حميد عبود

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل : كلية الزهراوي الجامعة

التاريخ : 2024 / /

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. حيدر تركي موسى

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل : كلية التقانات الاحيائية / جامعة القاسم الخضراء

التاريخ : 2024 / /

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. حسن محمود موسى

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية الصيدلة / جامعة كربلاء

التاريخ : 2024 / /

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع :

الاسم : د. حسن جميل جواد الفتلاوي

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : 2024 / /

الإهداء

الى الجواد الكريم، صاحب المن العظيم، مُمد الخلائق بعزمه ولطفه، فلولا منّه لكان دوام اي حال من المحال، لوجه الضارب بالقدم، بما منّ من النعم، وأفاض وعلم بالقلم، والى معلم الأمم، رسوله العالم ذي الكرم، وآله الاطهار والقمم، أهدي جهد المقل وعصارة الذهن وحصيلة العمر العلمي، فارفعه ببسم الله، والصلاة على الرسول المصطفى وعلي المرتضى وفاطمة الزهراء، والحسن المجتبي والحسين وذريته اهل الهدى، راجياً القبول (إِلَيْهِ يَصْعَدُ الْكَلِمُ الطَّيِّبُ وَالْعَمَلُ الصَّالِحُ يَرْفَعُهُ) فاطر 10.

- ◀ الى وطني الاعرق بكل شرائحه واطيافه.
- ◀ الى طرفي ابجدية الضاد، حرفي الألف والياء وهما يضمنان الباء من أبي، والميم من أمي، بأجمل تجليات اللغة "أبي وأمي" أشيب على حملكما في قلبي.
- ◀ الى اوتاد خيمتي اخوتي.
- ◀ الى ام ابداعي ومبدعتي، زوجتي الحبيبة.
- ◀ الى فلذتي فؤادي علي و محمد.
- ◀ الى من حملوني وتحملوني واحملهم بالقلب.. "اصدقائي"
- ◀ الى كل من اهتم لنجاحي ومسيرتي وأحب أن يراني دائماً في المقدمة... أهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع.

والحمد لله

الباحث : احمد عباس علي ماجد

شكر و إمتنان

الى ذاته غير المتناهية، الحي، العالم، القادر، اقدم الشكر حتى يبلغ منتهاه، على ما منّ ويمنُّ به عليّ من نعماء لا تحصى، ومن بعده الى خاتم الانبياء وآله المعصومين الأتقياء، نور الله الكاشف والكشاف الذي به يعرف العلم، شكر يليق بمقامهم. ولأن من لم يشكر المخلوق لم يشكر الخالق، فلخلقه الطيبين، العلماء المعلمين، اساتذتي الأجلاء، اقدم لكم اجزل الشكر واقصى الامتنان، من صميم القلب وأعماق الشعور، لكل من علمني حرف وحرفة.

وبعد؛ من لم يشكر المخلوق، لم يشكر الخالق..
الشكر الجزيل والثناء الجميل للمشرفين الافاضل الدكتور (زهير حميد عبود الظويهري) والدكتور (حسن محمود موسى ابو المعالي) لما ابدوه من تعاون وما بذل.

الشكر لزملائي الطلبة الذين شاركوني العلم والتعلم، وفاضوا بما لديهم من مساندة ومعونة.

الشكر اللائق والثناء المنبسط لصديقي وزميلي في الوظيفة والدراسة كرار كاظم هاشم لمساعدتي في المرحلة التحضيرية والبحثية.
الشكر الكبير والامتنان الوفير لجهود لموظفي الامانة العامة للعتبة الحسينية المقدسة /هيئة الصحة والتعليم الطبي/ مختبرات الصحة العامة وسلامة الغذاء في محافظة كربلاء المقدسة و بشكل خاص السيدة (أميرة محمد جبر).
من ثمّ الشكر الأعظم الى رئاسة جامعة كربلاء و عمادة كلية العلوم و رئاسة قسم علوم الحياة لإتاحتهم لي الفرصة لإكمال دراستي، وتذليل الصعوبات.
والشكر موصول الى مديرية زراعة كربلاء التي منحتني الفرصة للخوض في غمار هذه التجربة المميزة

وأخيراً، لختام المسك، سيد الإبداع، المؤثر بالجهد والوقت، جناب الأخ والصديق (الاستاذ مصطفى حمود عبود) لدوره الأكبر والمساهمة الفاعلة في إنجاز رسالتي، وتذليل كل صعوباتها، ودعمه الكامل لي، فله مني مضاعف الشكر وتمامه، متمنياً له دوام التوفيق.

الباحث : احمد عباس علي ماجد

الخلاصة

يعد التهاب المسالك البولية أحد أكثر الأمراض البكتيرية انتشاراً، وعادة ما تكون النساء أكثر عرضة للإصابة به من الرجال. غالباً ما تكون بكتريا *Escherichia coli* هي المسبب الأكبر لاصابات المسالك البولية. في هذا البحث تمت دراسة الطفرات في بكتريا *E.coli* المقاومة للمضادات الحيوية (الكينولونات) في محافظة كربلاء والتغيرات في الأحماض الأمينية، ودراسة الشكل ثلاثي الابعاد لجين *gyrB* لانزيم DNAgyrase، وامكانية اقتراح مركبات بإمكانها الارتباط بالمواقع الفعالة للانزيم وتنشيط عمله.

تم جمع 223 عينة ادرار من المصابين بالتهابات المسالك البولية (ذكور واناث) والذين تراوحت اعمارهم بين 6-77 سنة من المترددين على المستشفيات الحكومية والاهلية [مستشفى مدينة الامام الحسين(ع) الطبية ومستشفى الامام الحسن المجتبي(ع) التعليمي ومستشفى النسائية والتوليد التعليمي ومستشفى كربلاء التعليمي للأطفال ومستشفى الامام الحجة (ع)] والعيادات الخاصة في محافظة كربلاء المقدسة وتحت اشراف اطباء مختصين للفترة من 2023/8/3 الى 2023/11/25، وتم زرعها مباشرة على الاوساط الزرعية و تم حضنها في 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة .

عُزلت وشُخصت 223/60 (27%) عزلة لبكتريا *E.coli* من مجموع عينات الادرار وقد شخصت العزلات اعتماداً على الاختبارات المظهرية والمجهرية و الكيموحيوية واستخدام نظام API-20E لتأكيد التشخيص .

واظهر اختبار الحساسية لعزلات بكتريا *E.coli*، أنها ذات مقاومة متعددة، وكانت مقاومتها متغايرة، حيث كانت مقاومتها عالية لمضادات Ampicillin (AMP) 100%، و Co-trimoxazole (COT) 73.33%، و Tetracycline (TE) 68.33%، و Ceftriaxone (CTR) 65%، بينما بدرجة اقل مضادات Nalidixic acid (NA) 46.66%، و Ciprofloxacin (CIP) 36.66%، و Levofloxacin (LEV) 36.66%، و Gatifloxacin (GAT) 33.33%، و Imipenem (IMP) 31.66%، وكانت اقل مقاومة لمضاد Amikacin (AK) 6.66% .

أظهرت جميع عزلات بكتريا *E.coli* مقاومة متعددة لمجموعة مختلفة من المضادات الحيوية، اذ كانت عزلة واحدة مقاومة لسبعة انواع من المضادات الحيوية (E31)، وكانت عزلتان مقاومة لخمس أنواع من المضادات الحيوية (E19 , E44)، وعزلتان مقاومة لثمانية

أنواع من المضادات الحيوية (E57 , E45) وثلاث عزلات مقاومة لنوعين من المضادات الحيوية (E37 , E34 , E7)، وكانت ثلاثة عزلات مقاومة لجميع المضادات الحيوية (E22 , E60 , E50)، والتي كانت 10 مضادات حيوية مستعملة في هذه الدراسة، بينما أظهرت أربعة عزلات أخرى مقاومة لثلاثة أنواع من المضادات الحيوية (E14 , E8 , E2 , E1)، وأربعة عزلات متوسطة المقاومة لنوع واحد من المضادات الحيوية (E45 , E31 , E21 , E8)، وأظهرت 14 عزلة مقاومة لنوع واحد من المضادات الحيوية (E4 , E9 , E13 , E15 , E20 , E23 , E25 , E28 , E30 , E33 , E35 , E38 , E39 , E41)، و 15 عزلة مقاومة لأربعة أنواع من المضادات الحيوية (E10 , E16 , E17 , E18 , E21 , E29 , E36 , E42 , E43 , E46 , E47 , E48 , E49 , E52 , E53)، بينما أظهرت 16 عزلة مقاومة لتسعة أنواع من المضادات الحيوية (E3 , E5 , E6 , E11 , E12 , E24 , E26 , E27 , E32 , E40 , E51 , E54 , E55 , E56 , E58 , E59) وتم مضاعفة جين *gyrB* لأربعين عزلة من بكتريا *E. coli* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل الاعتيادي، وقد أظهرت العزلات إن نسبة وجود جين *gyrB* هي 100% .

ثم اجراء اختبار تسلسل الحمض النووي (DNA sequencing) لقطعتين من جين *gyrB* لأربعين عزلة بكتريا (80 قطعة DNA) وكانت القطعة الاولى بطول 998 زوج قاعدي والقطعة الثانية 971 زوج قاعدي، وقد اظهرت نتائج اختبار تسلسل الحمض النووي عدم وجود طفرات لها علاقة بمقاومة مضادات الكوينولونات المستخدمة في هذه التجربة.

تمت تعيين تسلسلات جميع العينات عن طريق استخدام برنامج MEGA11 واستخدام اختيار ClustalW، وتحليل الشجرة الوراثية (Phylogenetic Analysis) لجين *gyrB* وبذلك تضمنين واصطفاف العزلات السريرية المحلية مع تسلسلات عالمية مقابلة وهي تنتمي إلى عزلات مختلفة، واظهرت اكثر النتائج للعزلات المحلية تطابق بنسبة 100% مع العزلات العالمية. بينما أظهرت بعضها تطابق بنسبة 99% .

تم دراسة الشكل ثلاثي الابعاد، وتم تحديد جيب ربط ATP في جين *gyrB*، واظهرت النتائج إنَّ هنالك بعض المركبات الكيميائية المقترحة التي لها القابلية على الارتباط بالأحماض الأمينية الموجودة في جيب الربط وتثبيط عملها. وتم اخضاع بعض المركبات الكيميائية المقترحة ذات درجة الرسو العالية بالارتباط بالجين لقاعدة ليبينسكي لمعرفة امكانية تناول الدواء عن طريق الفم .

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	المحتويات	التسلسل
1	المقدمة	
4	استعراض المراجع	1
4	العائلة المعوية Enterobactriaceae	1-1
5	بكتريا الاشريشيا القولونية <i>Escherichia coli</i>	1-1-1
6	وبائية بكتريا <i>E.coli</i>	1-1-1-1
7	عوامل ضراوة لـ <i>E.coli</i>	2-1-1-1
7	عوامل الضراوة المرتبطة بسطح الخلايا البكتيرية	1-2-1-1-1
8	عوامل الضراوة التي يتم إفرازها وتصديرها إلى المضيف	2-2-1-1-1
8	إمراضه بكتريا <i>E.coli</i>	3-1-1-1
8	الأمراض المعوية او الاسهال	1-3-1-1-1
9	التهاب السحايا / تسمم الدم	2-3-1-1-1
9	إصابة المسالك البولية	3-3-1-1-1
11	مقاومة بكتريا <i>E.coli</i> للمضادات الحياتية	4-1-1-1
13	الحد من امتصاص العلاجات	1-4-1-1-1
14	تغيير موقع الهدف للعلاج	2-4-1-1-1
14	تعطيل الدواء	3-4-1-1-1
15	انتاج الانزيمات	4-4-1-1-1
15	مضخات الدفع	5-4-1-1-1
16	العلاجات المستخدمة وآليات العلاج	5-1-1-1
16	العلاجات المستخدمة	1-5-1-1-1
18	آليات العلاج	2-5-1-1-1
19	الأدوية التي تمنع تصنيع جدار الخلية البكتيرية	1-2-5-1-1-1
20	الأدوية التي تزيل استقطاب غشاء الخلية	2-2-5-1-1-1
21	الأدوية التي تمنع تصنيع البروتين البكتيري	3-2-5-1-1-1
21	الأدوية التي تمنع المسارات الأيضية البكتيرية	4-2-5-1-1-1
22	الأدوية التي تثبط تصنيع الحمض النووي البكتيري	5-2-5-1-1-1
23	مثبطات الحمض النووي الرايبيني (RNA)	1-5-2-5-1-1-1
23	مثبطات الحمض النووي الريبوزي (DNA)	2-5-2-5-1-1-1
23	الكينولونات Quinolones	2-1
24	الخواص الكيميائية للكينولونات	1-2-1
25	آلية عمل الكينولونات	2-2-1
26	انزيم Topoisomerase IV	1-2-2-1

27	انزيم DNA gyrase	2-2-2-1
28	الوحدات الفرعية DNA gyrase A & DNA gyrase B (<i>GyrA</i> & <i>GyrB</i>)	1-2-2-2-1
28	الخصائص العامة والتركيب	1-1-2-2-2-1
28	تركيب <i>GryA</i>	1-1-1-2-2-2-1
29	تركيب <i>GryB</i>	2-1-1-2-2-2-1
30	آلية تثبيط الانزيم من قبل الكوينولونات واستهداف المواقع الفعالة لـ <i>gyrA</i> و <i>gyrB</i>	3-2-2-1
34	المواد وطرائق العمل	2
34	المواد والأجهزة المستعملة	1-2
34	الأدوات والمعدات	1-1-2
35	المواد الكيماوية	2-1-2
36	الأوساط الزرعية الجاهزة	3-1-2
36	المحاليل والصبغات والكواشف	4-1-2
37	المضادات الحيوية	5-1-2
38	العدد المختبرية	6-1-2
39	تسلسلات البودئ	7-1-2
39	البرامج والمواقع	8-1-2
40	مخطط التجربة	
41	طرق العمل	2-2
41	جمع العينات	1-2-2
41	تعقيم الاوساط الزرعية	2-2-2
41	تحضير الاوساط الزرعية	3-2-2
41	وسط اكار الدم	1-3-2-2
42	وسط اكار الماكونكي	2-3-2-2
42	وسط اكار الأيوسين مثيلين الازرق	3-3-2-2
42	وسط مرق نقيع القلب والدماغ	4-3-2-2
42	وسط الاكار المغذي	5-3-2-2
43	تحضير الكواشف والمحاليل	4-2-2
43	تحضير الكواشف	1-4-2-2
43	كاشف الاوكسيديز	1-1-4-2-2
43	كاشف الكتاليز	2-1-4-2-2
43	تحضير المحاليل	2-4-2-2

43	محلول دارئ الترحيل	1-2-4-2-2
43	محاليل البوادي	2-2-4-2-2
43	محلول العكورة ماكفر لاند	3-2-4-2-2
44	طريقة الزرع	5-2-2
44	التشخيص المزرعي	6-2-2
44	الفحص المظهري	1-6-2-2
45	التشخيص الكيموحيوي	2-6-2-2
45	اختبار الاوكسيديز	1-2-6-2-2
45	اختبار الكتاليز	2-2-6-2-2
45	اختبار [API 20E]	3-2-6-2-2
46	حفظ العزلات البكتيرية	7-2-2
46	الحفظ قصير المدى	1-7-2-2
46	الحفظ طويل المدى	2-7-2-2
46	اختبار حساسية المضادات الحيوية	8-2-2
47	استخلاص الحمض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين	9-2-2
48	تفاعل التضخيم لجين <i>gyrB</i>	10-2-2
49	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز	11-2-2
50	التحليل التسلسلي للحمض النووي	12-2-2
50	الشكل الثلاثي لجين <i>gyrB</i>	13-2-2
51	الإرساء (الاتحام الجزيئي) الجزيئي	14-2-2
51	التحليل الاحصائي	15-2-2
52	النتائج والمناقشة	3
52	عزل وتشخيص البكتريا	1-3
52	عزل بكتريا <i>Escherichia coli</i>	1-1-3
53	الفحص المظهري	2-1-3
55	التشخيص المجهرى	3-1-3
55	التشخيص الكيموحيوي	4-1-3
57	مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية	2-3
62	تفاعل تضخيم جين <i>gyrB</i> لبكتريا <i>E.coli</i>	3-3
63	التحليل التسلسلي لجين <i>gyrB</i>	4-3
75	اصطفاة التسلسلات المتعدد لجين <i>gyrB</i>	5-3
85	توليد شعار التسلسل	6-3
91	تحليل الشجرة الوراثية للجين <i>gyrB</i>	7-3
96	الشكل الثلاثي لجين <i>gyrB</i>	8-3

97	تحديد جيب ربط ATP في جين <i>gyrB</i>	9-3
99	الرسو الجزيئي	10-3
103	التحليل الاحصائي	11-3
104	الاستنتاجات والتوصيات	4
104	الاستنتاجات	1-4
105	التوصيات	2-4
106	المصادر والمراجع	
133	الملاحق	

قائمة الاشكال

رقم الصفحة	الشكل	التسلسل
10	مراحل اصابة المسالك البولية	1-1
13	تمثيل تخطيطي للآليات الرئيسية لـ HGT في البكتيريا	2-1
16	يوضح مضخات الدفع Drug efflux pumps	3-1
19	الأهداف الرئيسية للمضادات الحيوية، والآليات ومسارات اكتساب المقاومة	4-1
24	تركيب الكينولونات	5-1
30	التركيب الهيكلي لـ DNA Gyrase	6-1
52	النسبة المئوية بين عزلات <i>E.coli</i> النامية وبقية العزلات الأخرى	1-3
55	زراعة بكتريا <i>E.coli</i>	2-3
56	نتيجة اختبار API 20E على عزلة سريرية لتشخيص بكتريا <i>E.coli</i> بعد حضنها من 18-24 ساعة واطافة الكواشف الخاصة بها	3-3
56	جدول القراءة الخاص باختبار API 20E الذي اثبت أنها بكتريا <i>E.coli</i> بعد الرجوع الى فهرس الخاص بالاختبار	4-3
58	عدد العينات والنسبة المئوية لمقاومة بكتريا <i>E.coli</i> لمقاومتها لمضادات الحيوية مختلفة بعد تميمتها على وسط Muller Hinton agar	5-3
58	اختبار بكتريا <i>E.coli</i> ومقاومتها المختلفة للمضادات الحيوية بعد حضنها لمدة 18 ساعة على وسط Muller Hinton agar	6-3
63	الترحيل الكهربائي لجل الاكاروز	7-3
64	الاصطفاف (Alignment) لنوكليوتيدات جين <i>gyrB</i> للقطعة الاولى من العزلة المحلية (Query) E.S6S1 AH-R nucleotide BLAST بوساطة <i>E.coli</i> لبكتريا	8-3
65	الاصطفاف (Alignment) لنوكليوتيدات جين <i>gyrB</i> للقطعة الاولى من العزلة المحلية (Query) E.S1S1 AH nucleotide BLAST بوساطة <i>E.coli</i> لبكتريا	9-3

66	اصطفااف تسلسل الببتيدات (Polypeptide sequence alignment) للقطعة الاولى من العزلة المحلية (Query) <i>E.coli</i> AH S1S1 E. من بكتريا	10-3
66	اصطفااف تسلسل الببتيدات (Polypeptide sequence alignment) للقطعة الاولى من العزلة المحلية (Query) <i>E.coli</i> AH S1S1 E. من بكتريا	11-3
67	الاصطفااف (Alignment) لنيوكليوتيدات جين <i>gyrB</i> للقطعة الثانية من العزلة المحلية (Query) AH-R S3S2 E. لبكتريا بواسطة Nucleotide BLAST <i>E.coli</i>	12-3
68	الاصطفااف (Alignment) لنيوكليوتيدات جين <i>gyrB</i> للقطعة الثانية من العزلة المحلية (Query) AH-R S6S2 E. لبكتريا بواسطة Nucleotide BLAST <i>E.coli</i>	13-3
69	اصطفااف تسلسل الببتيدات (Polypeptide sequence alignment) للقطعة الثانية من العزلة المحلية (Query) BLASTx <i>E.coli</i> AH-R S3S2 E. من بكتريا بواسطة	14-3
69	اصطفااف تسلسل الببتيدات (Polypeptide sequence alignment) للقطعة الثانية من العزلة المحلية (Query) BLASTx <i>E.coli</i> AH-R S6S2 E. من بكتريا بواسطة	15-3
77	اصطفااف تسلسلات جين <i>gyrB</i> للعزلات المحلية للقطعة الاولى من الجين	16-3
78	اصطفااف تسلسلات جين <i>gyrB</i> للعزلات المحلية للقطعة الاولى من الجين ومقارنتها مع تسلسلات لعزلات عالمية للجين نفسه	17-3
79	اصطفااف تسلسلات الاحماض الأمينية لجين <i>gyrB</i> للعزلات المحلية من الجين للقطعة الاولى	18-3
80	اصطفااف تسلسلات الاحماض الأمينية لجين <i>gyrB</i> للعزلات المحلية من الجين للقطعة الاولى ومقارنتها مع تسلسلات لعزلات عالمية للجين نفسه	19-3
81	اصطفااف تسلسلات جين <i>gyrB</i> للعزلات المحلية للقطعة الثانية من الجين	20-3
82	اصطفااف تسلسلات جين <i>gyrB</i> للعزلات المحلية للقطعة الثانية من الجين ومقارنتها مع تسلسلات لعزلات عالمية للجين نفسه	21-3
83	اصطفااف تسلسلات الاحماض الأمينية لجين <i>gyrB</i> للعزلات المحلية من الجين للقطعة الثانية	22-3
84	اصطفااف تسلسلات الاحماض الأمينية لجين <i>gyrB</i> للعزلات المحلية من الجين للقطعة الثانية ومقارنتها مع تسلسلات لعزلات عالمية للجين نفسه	23-3

88	تمثيل التسلسلات للعضلات المحلية للقطعة الأولى لجين <i>gyrB</i> بواسطة برنامج Weblogo لتوضيح التطابقات او التغيرات في الأحماض الأمينية	24-3
89	تمثيل التسلسلات للعضلات المحلية للقطعة الثانية لجين <i>gyrB</i> بواسطة برنامج Weblogo لتوضيح التطابقات او التغيرات في الأحماض الأمينية	25-3
92	الشجرة الوراثية لبكتريا <i>E.coli</i> بطريقة Neighbor joining للقطعة الاولى من جين <i>gyrB</i>	26-3
93	الشجرة الوراثية لبكتريا <i>E.coli</i> بطريقة Neighbor joining للقطعة الاولى من جين <i>gyrB</i>	27-3
94	الشجرة الوراثية لبكتريا <i>E.coli</i> بطريقة Neighbor joining للقطعة الثانية من جين <i>gyrB</i>	28-3
95	الشجرة الوراثية لبكتريا <i>E.coli</i> بطريقة Neighbor joining للقطعة الثانية من جين <i>gyrB</i>	29-3
97	التركيب ثلاثي الأبعاد لجين <i>gyrB</i> للعزلة السريية المحلية (E.S1S1 AH) (اللون الاخضر) ومطابقتها مع عزلة دولية (اللون الاحمر) باستخدام UCSF Chimera	30-3
98	منطقة ATP binding pocket لجين <i>gyrB</i> لبكتريا <i>E.coli</i> والاحماض الأمينية المكونة لها بواسطة برنامج USCF Chimera	31-3
100	ارتباط المركب الكيميائي Dieckol → ATP active pocket للـ <i>gyrB</i>	32-3
102	يوضح الرسو الجزيئي لبعض المركبات الكيميائية و ATP Active pocket في جين <i>gyrB</i> لبكتريا <i>E.coli</i>	33-3

قائمة الجداول

رقم الصفحة	الجدول	التسلسل
18	يبين آليات عمل الادوية وبعض مجموعات المضادات الحياتية المستخدمة للعلاج	1-1
34	الأدوات والمعدات والشركات المصنعة لها	1-2
35	المواد الكيميائية او المحاليل والشركات المصنعة لها	2-2
36	الأوساط الزراعية	3-2
36	المحاليل والصبغات و الكواشف	4-2
37	أقراص المضادات الحيوية	5-2
38	العدد المختبرية Kits	6-2
39	تسلسلات البوادئ Primer sequence	7-2
39	البرامج والمواقع الالكترونية Programs and Websites	8-2
49	المراحل ودرجة الحرارة وتوقيت كل مرحلة في أثناء عملية تضخيم الجين	9-2
52	عدد العينات المستهدفة في الدراسة وجنس المرضى والفئات العمرية	1-3
59	عدد العزلات ومقاومتها للمضادات الحيوية	2-3
70	مقارنة بالتطابق بين تسلسلات العزلات المحلية لجين gyrB مع التسلسلات الدولية المتطابقة الموجودة في GenBank. للقطعة الاولى للجين gyrB	3-3
71	مقارنة بالتطابق بين تسلسلات العزلات المحلية لجين gyrB مع التسلسلات الدولية المتطابقة الموجودة في GenBank. للقطعة الثانية للجين gyrB	4-3
99	بعض المركبات الكيميائية المقترحة للإرتباط بـ ATP binding pocket لجين gyrB	5-3
101	المركبات الكيميائية الاكثر ملائمة لتناولها عن طريق الفم	6-3
103	العلاقة بين الطفرات للعزلات المقاومة التابعة لأنزيم gyrB بالمقاومة للمضادات الحيوية العائدة لعائلة الكوينولونات احصائياً	7-3

قائمة المختصرات

المعنى	الاختصار
Antimicrobial Resistance	AMR
Analytical Profile Index 20 Enterobacteriaceae	API 20E
Nucleotide basic local alignment search tool	BLASTn
Nucleotide to protein basic local alignment search tool	BLASTx
Base pair	bp
Celsius	°C
Clinical and Laboratory Standard Institute	CLSI
C-terminal domain	CTD
Diffusely adherent <i>E.coli</i>	DAEC
DNA double-strand break	DSB
Enterogaagregative <i>E.coli</i>	EAEC
Enterohaemorrhagic <i>E.coli</i>	EHEC
Enteroinvasive <i>E.coli</i>	EIEC
Eosin Methylene Blue	EMB
Enteropathogenic <i>E.coli</i>	ETEC
Extraintestinal pathogenic <i>E.coli</i>	ExPEC
horizontal gene transfer	HGT
Intestinal pathogenic <i>E.coli</i>	IPEC
Multidrug resistant	MDR
Molecular Evolutionary Genetics Analysis	MEGA
multi-locus sequence typing	MLST
National Center Biotechnology Information	NCBI
Meningitis-associated <i>E.coli</i>	NMEC
N-terminal domain	NTD
Open Reading Frames	ORFs
penicillin-binding proteins	PBPs
Polymerase chain reaction	PCR
Pandrug-resistant	PDR
Quinolone Resistance- Determining Region	QRDR
RNA polymerase	RNAP
Reactive oxygen species	ROS

sulfamethoxazole	SMX
Statistical Package for the Social Sciences	SPSS
Statistical Package for the social sciences	SPSS
Trimethoprim	TMP
Uropathogenic <i>E.coli</i>	UPEC
Urinary tract infection	UTI
Extensively drug-resistant	XDR



المقدمة

Introduction



Introduction

المقدمة

تعد بكتريا *Escherichia coli* من أهم أفراد العائلة المعوية، توجد بشكل طبيعي (normal flora) في الجهاز الهضمي منطقة القولون، ونادراً ما تسبب الأمراض إلا أنها من الممكن أن تتكيف؛ لتكون ممرضة بعد اكتساب عوامل ضراوة (Dicks., 2018 ; Liu et al., 2020).

تُعد *E.coli* بكتيريا سالبة لصبغة جرام، عصوية الشكل، هوائية او لاهوائية اختيارية (Facultative anaerobic)، غير مكونة للأبواغ، متحركة او غير متحركة، و عادة ما تشكل مستعمرات محدبة ذات سطح أملس، ذات حواف حادة، غير مخاطية وقد تكون مخاطية عند امتلاكها للمحفظة Capsule، مخمرة لسكر اللاكتوز lactose، واغلبها مخمر لسكر الرامنوز ramenose وسكر السوربتول Sorbetole، وتكون موجبة لاختبار الكاتليز catalase، و اختبار الاندول indole، واختبار المثيل الاحمر methyl red، وسالبة لاختبار الاوكسيديز oxidase، واختبار اليوريز urease (Wanger et al., 2017; Riedel et al., 2019).

تسبب بكتريا *E.coli* الاسهال diarrheal diseases، والتهاب السحايا meningitis، وتسمم الدم sepsis، وتجرثم الدم bacteremia، وكذلك تسبب إلتهاب المسالك البولية (UPEC) اذ تكون مسؤولة عن حوالي 90% من اصابات المسالك البولية في العالم، وتكون الاصابات اكثر شيوعا في الإناث منها في الذكور بحوالي 14 مرة (Levinson, 2016).

تمتلك بكتريا *E.coli* العديد من عوامل الضراوة وهي المسؤولة عن امراضيتها. ومن أهم عوامل الضراوة، هي امتلاكها لمخربات الحديد siderophores، وعامل التخر السمي cytotoxic necrotizing factor، و امتلاكها لعوامل الضراوة المرتبطة بسطح الخلايا البكتيرية تشمل عدد الأنواع المختلفة من العضيات اللاصقة التي تعزز ارتباطها بالأنسجة المضيفة، مثل المحفظة Capsule، الاسواط Flagella و Lipopolysaccharide التي توفر الحماية والحركة وسمية بكتريا *E.coli*. ولكل نمط مرضي لبكتريا *E.coli* آليات إمراضية مميزة وملف تعريف ويكون مشفر بوساطة مجموعات جينية محددة. قد تقوم الجينات المرتبطة بالإمراضية بتشغيل أنشطة مثل: الالتصاق adhesion، و الغزو invasion، والارتباط attachment، وانظمة امتصاص الحديد iron uptake systems، والحركة motility، والانشطة السمية toxin activity (Kudinha et al., 2012 ; Mainil., 2013 ; Valvano, 2022).

وتتميز بكتيريا *E. coli* بمقاومتها للمضادات الحيوية، ولها عدة انماط مثل: المقاومة للأدوية المتعددة (Multidrug resistant (MDR)، المقاومة للأدوية على نطاق واسع extensively drug-resistant (XDR)، والمقاومة للأدوية الشاملة (pandrug-resistant (PDR) (Basak *et al.*, 2016)، وتمتاز بقدرتها العالية على مقاومة المضادات الحيوية نتيجة امتلاكها انزيمات المقاومة مثل: انزيم البيتا لاكتاميز β -lactamases، التي تمنح المقاومة لمضادات البيتا لاكتام، والانزيمات التي تمنح المقاومة لمضادات الكوينولونات والامينوكلايكوسيد aminoglycosides (Kumar *et al.*, 2013 ; Bush & Bradford, 2016). وتمتلك بكتيريا *E. coli* آليات أخرى تمكنها من مقاومة المضادات الحيوية مثل: الحد من امتصاص العلاجات، وتعطيل الدواء، وتغيير موقع الهدف للدواء، ومضخات الدفع (Randall *et al.*, 2013 ; Blair *et al.*, 2014 ; Jo *et al.*, 2017)

توجد عدة آليات تسلكها المضادات الحيوية لعلاج الأمراض التي تسببها بكتيريا *E. coli* ولا سيما إلتهاب المسالك البولية، ومنها الأدوية التي تمنع تصنيع جدار الخلية البكتيرية مثل: عائلة β -Lactams والأدوية التي تزيل استقطاب غشاء الخلية مثل: عائلة المضادات الحيوية الببتيدية Lipopeptides، والأدوية التي تمنع تصنيع البروتين البكتيري مثل: أدوية Tetracyclines و Chloramphenicol وغيرها، والأدوية التي تمنع المسارات الأيضية البكتيرية مثل: Sulfonamides و Trimethoprim، والأدوية التي تثبط تصنيع الحمض النووي البكتيري مثل: الكولينولونات Quinolones (Adams *et al.*, 2021 ; Lyu *et al.*, 2016).

تمنع الكولينولونات تصنيع الحمض النووي DNA للبكتيريا عن طريق تثبيط انزيمي topoisomerase IV و DNA gyrase، هذان الإنزيمان يلعبان دوراً رئيسياً في تنظيم عملية اللف الفائق للكروموسومات المطلوب لتصنيع DNA، و ترتبط هذه المضادات الحيوية بمواقع ربط الانزيم المستهدفة DNA gyrase و topoisomerase IV (Aldred *et al.*, 2013).

وتعد الكينولونات من أهم العلاجات التي تستهدف تعطيل هذه الانزيمات (Pham *et al.*, 2019) حيث تستهدف الكوينولونات بشكل رئيسي الوحدات الفرعية [وحدتين من *GyrA* أو *ParC* و وحدتين *GyrB* أو *ParE*] لأنزيمي الجايريز والتوبو IV، يمكن لهذه الأنزيمات نقل منطقة واحدة من شريط DNA المزدوج إلى منطقة أخرى؛ ومن ثمَّ يسمح للكينولونات بتشكيل معقدات انزيمية مع DNA، تمنع هذه المعقدات حركة شوكات النسخ replication forks وعملية النسخ transcription بالتالي تمنع نمو البكتيريا (Tang & Zhao, 2023).

وتعمل بكتريا *E.coli* على مقاومة الكوينولونات عن طريق تكوين طفرات في التركيب الجيني للوحدات الفرعية *gyrA* و *gyrB* ، حيث ترتبط الكينولونات بالمواقع الفعالة لهذه الوحدات الفرعية وتكوين معقدات مع بعض الأحماض الأمينية وبالتالي فإن حدوث طفرات في *gyrA* و *gyrB*؛ يؤدي الى تغير في الأحماض الأمينية التي لها القابلية على الارتباط بالكوينولونات، وتكوين المعقدات التي من شأنها تعطيل عمل *gyrase* (Spencer & Panda, 2023).

يوجد داخل جين *gyrB* الخاص بـ *E.coli* موقعان لارتباط الكوينولونات هما: Asp426 و Lys447، وكما هو الحال في بقايا الأحماض الأمينية في *gyrA* التي لها سلاسل جانبية مشحونة بنفس الشحنة فإن استبدال الحمض الأميني اسبارتك اسد (Asp) aspartic acid بالحمض الأميني اسباراجين (Asn) asparagine او استبدال الحمض الأميني اللايسين (Lys) lysine بالحمض الأميني الكلوتامك اسد (Glu) glutamic acid يمنح البكتريا مقاومة للأدوية التي ترتبط بالأحماض الأمينية Asp و Lys (Finstad , 2022).

أهداف البحث:

بالنظر للدور الذي تلعبه بكتريا *E.coli* بإصابات المسالك البولية، وزيادة مقاومتها للمضادات الحيوية، و لأهمية توفير علاجات فعالة للحد من الإصابات وتقليل مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية؛ لذا هدفت هذه الدراسة الى إجراء دراسة جزيئية عن بكتريا *Escherichia coli* المسببة لالتهاب المسالك البولية، والمقاومة للمضادات الحيوية الكينولونات (Quinolones) المثبطة لتصنيع الحامض النووي الرايبوزي DNA، ومحاولة ايجاد بدائل علاجية أكثر فعالية للحد من انتشار البكتريا المرضية ذات المقاومة العالية ؛ وذلك عن طريق تحقيق المحاور الآتية :

1. عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* من عينات إدرار المرضى الذين يعانون من التهاب المسالك البولية بالطرق الزرعية والكيموحيوية، وإجراء اختبار الحساسية لمجاميع مختلفة من المضادات الحيوية.
2. إجراء التحليل التسلسلي، واصطفاف التسلسلات المتعدد لجين *gyrB* (*gyrB* multiple Sequence Alignment) للعزلات المحلية مع العزلات العالمية، وتوليد شعار التسلسل (Sequence logo generation).
3. إجراء تحليل الشجرة الوراثية للجين *gyrB* للعزلات المحلية مع العزلات العالمية.
4. رسم شكل ثلاثي الأبعاد لجين *gyrB* وتحديد جيب ربط ATP في جين *gyrB*.
5. إجراء الرسو الجزيئي (Molecular Docking)، لبعض المركبات الكيميائية المقترحة



الفصل الاول

استعراض المراجع

**Literature
Review**



1 – استعراض المراجع

1-1 العائلة المعوية Enterobacteriaceae

تستوطن العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) داخل الأمعاء لدى البشر والحيوانات على حد سواء، وتضم مجاميع كبيرة ومتنوعة من الأنواع البكتيرية ذات الخصائص المختلفة، وتعد من أكثر العزلات التي يتم التعامل معها سريريًا في المستشفيات (Procop *et al.*, 2020).

يشارك أفراد هذه العائلة بصفات، من حيث التركيب والعمليات الأيضية بأربع صفات رئيسية : جميعها لاهوائية اختيارية، وجميعها تخمر الجلوكوز، لا يحتوي أي منها على cytochrome c oxidase أي أنها oxidase-negative، وأخيراً تختزل النترات إلى النتريت كجزء من عمليات توليد الطاقة. وبهذه الصفات الأربعة يمكن تمييز البكتيريا المعوية عن غيرها من العصيات السالبة لصبغة جرام (Levinson, 2018).

تنتشر البكتيريا المعوية في جميع أنحاء العالم، ويتم العثور عليها بشكل طبيعي في التربة، المياه، الفواكه، اللحوم، البيض، الخضروات، الحبوب، النباتات المزهرة، الأشجار وفي الحيوانات من الحشرات إضافةً إلى الإنسان، استهدفت الدراسات هذه العائلة؛ لقدرتها على إحداث الأمراض لدى الإنسان والحيوان، وأهميتها الاقتصادية، فضلاً عن سرعة تكاثرها، وقدرتها على النمو في أوساط محددة، وسهولة التلاعب الجيني، ويعدّ العديد من أفراد هذه العائلة مسببة أمراض للإنسان، إذ تسبب طيفاً واسعاً من الأمراض مثل: مرض الإسهال (diarrheal)، تسمم الدم (septicemia)، أمراض الجهاز التنفسي (respiratory diseases)، التهابات الجروح والحروق (wound and burn infections)، والتهابات المسالك البولية (urinary tract infections)، والتهاب السحايا (meningitis) (Brenner & Farmer, 2015).

Escherichia coli

1-1-1 بكتريا الاشريشيا القولونية

تعد من أهم أفراد العائلة المعوية وتعيش مع المضيف البشري بعلاقة تعايش وتبادل منفعة (Dicks, 2018). توجد بشكل طبيعي (Normal flora) في الجهاز الهضمي البشري وتحديدًا في منطقة القولون، وعادة ما تستعمر الجهاز الهضمي للأطفال الرضع في غضون ساعات قليلة بعد الولادة، وبالرغم من أن بكتريا *E.coli* نادرًا ما تسبب الأمراض، إلا أنها في بعض حالات نقص المناعة أو عندما يتم اختراق الحواجز المعدية المعوية الطبيعية، فإن بعض هذه البكتريا تتكيف لتكون ممرضة، وتتسبب بمجموعة واسعة من الأمراض عن طريق اكتساب عوامل ضراوة محددة (Liu et al., 2020).

وقد تم وصف ثمانية أنماط مرضية لبكتريا *E.coli* تسبب المرض لدى البشر، ستة منها معوية (Intestinal pathogenic *E.coli* (IPEC)، وتشمل الأنماط الممرضة المعوية الستة:-

1. اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء Enteropathogenic *E.coli* (EPEC).
2. اشريشيا القولون السامة للأمعاء Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC).
3. اشريشيا القولون الامعائية التكتلية Enterogastric *E.coli* (EAEC).
4. اشريشيا القولون الغازية للأمعاء Enteroinvasive *E.coli* (EIEC).
5. اشريشيا القولون الملتصقة بالامعاء Diffusely adherent *E.coli* (DAEC).
6. اشريشيا القولون النزفية للأمعاء Enterohaemorrhagic *E.coli* (EHEC).

وتشمل الأنماط الممرضة خارج المعوية (Extraintestinal pathogenic *E.coli*) (ExPEC) تكون مسببة لأمراض المسالك البولية (Uropathogenic *E.coli*) (UPEC)، و المسببة لالتهاب السحايا (Meningitis-associated *E.coli*) (NMEC) (Van Hoek et al., 2019).

تعد بكتريا *E.coli* من البكتريا الانتهازية الممرضة (opportunistic pathogen)، حيث تسبب الإسهال diarrheal diseases، فضلا عن العديد من الأمراض ومنها التهاب المسالك البولية (UPEC) اذ تسبب حوالي 90% من اصابات المسالك البولية، حيث بإمكانها الانتقال بسهولة من منطقة الشرج الى المسالك البولية والمثانة و تكون أكثر شيوعاً في الإناث منها في الذكور بحوالي 14 مرة (Levinson, 2016).

تعد بكتريا *E.coli* بكتيريا سالبة لصبغة جرام، غير مكونة للأبواغ، تستخدم الأسواط للتنقل و عادة ما تشكل مستعمرات محدبة ذات سطح أملس إذ تظهر مستعمرات مسطحة رطبة، ذات حواف حادة، غير مخاطية وقد تكون مخاطية عند امتلاكها للمحفظة (Capsule)، ووردية اللون في وسط الماكونكي (MacConkey agar)، بينما تبدو خضراء معدنية ذات لمعان ملون على وسط إيوسين ميثيلين الأزرق (Eosin Methylene Blu) (EMB)، مخمرة لسكر الرامنوز ramenose وسكر السوربيتول sorbetole وغير مخمرة لسكر السليلوبايوز cellulobios. تعد درجة الحرارة المثلى لنمو بكتريا *E.coli* هي 36 – 37م° ودرجة الحموضة 4.4 – 9، و تعطي بكتريا *E.coli* نتيجة سلبية لاختبارات الأوكسيداز واليورياز، بينما لها نتيجة إيجابية في اختبار الكاتليز، أما بالنسبة لاختبار الإندول فإن معظم السلالات تعطي نتيجة إيجابية، ولا تنمو بوجود سيانيد البوتاسيوم (Wanger et al., 2017 ; Riedel et al., 2019).

Epidemiology of *E.coli*

1-1-1-1 وبائية بكتريا *E.coli*

تعد التهابات المسالك البولية (UTI) Urinary tract infection واحدة من أكثر أنواع الاصابات البكتيرية شيوعاً في جميع أنحاء العالم، إذ تقارب 150 مليون حالة سنوياً. وتكون معدلات الإصابة لدى النساء اعلى منها عند الذكور، إذ يعاني ما يقرب من 50% من النساء من التهاب المسالك البولية مرة واحدة على الأقل في حياتهن. و تصنف اصابات المسالك البولية الى معقدة أو غير معقدة على أساس نوع و بروتوكول العلاج المعطى للمريض، و نادراً ما تسبب اصابات المسالك البولية غير المعقدة أي ضرر جسيم ويمكن علاجها بالاعتماد على الاستجابة المناعية او استخدام بعض المضادات الحيوية، بينما ترتبط اصابات المسالك البولية المعقدة بنتشوهات المسالك البولية مثل: انسداد المسالك البولية واحتباسها، وتثبيط المناعة، والفشل الكلوي مما يتطلب علاجاً طويلاً؛ وقد يؤدي الى اصابات مزمنة (Mann et al., 2017).

بالإضافة الى بكتريا *E.coli*، هناك مجموعة من مسببات الأمراض (موجبة وسالبة لصبغة جرام) تكون مسؤولة ايضاً عن اصابات المسالك البولية، مثل: *Proteus mirabilis*، *Klebsiella pneumoniae*، *Staphylococcus saprophyticus* و *Enterococcus faecalis* (Schulz, 2011; Flores-Mireles et al., 2015; Su & Lv, 2016).

يزداد خطر الإصابة بالتهاب المسالك البولية الناتجة عن بكتريا *E.coli* مع تقدم العمر بسبب التغيرات الفسيولوجية، والتي بدورها تؤدي إلى خلل في وظائف المثانة، وكذلك العمليات

الجراحية و القسطرة البولية ايضاً تزيد من خطر الإصابة؛ ونتيجة لذلك، فإنّ التهاب المسالك البولية هو الإصابة البكتيرية الأكثر شيوعاً لدى كبار السن، اذ يصل معدل الإصابة به من 30-100 لكل 1000 شخص بين الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم بين 60-90 عاماً (Bonten *et al.*, 2021).

2-1-1-1 عوامل ضراوة لبكتريا *E.coli* Virulence factors for *E.coli*

عوامل الضراوة هي جزيئات خاصة تنتجها وتطلقها البكتيريا او الفطريات او الاوليات (Protozoa) او الفيروسات. يتم تشفير هذه العوامل بواسطة جينات محددة موجودة على الكروموسوم أو العناصر الوراثية المتنقلة مثل البلازميدات أو plasmids أو transposons في مسببات الأمراض البكتيرية (Alegbeleye *et al.*, 2018).

كل نمط مرضي لبكتريا *E.coli* له آليات إمراضية مميزة وملف تعريف محدد لعوامل الضراوة ويكون مشفر بواسطة مجموعات جينية محددة. قد تقوم الجينات المرتبطة بالأمراض بتشغيل أنشطة مثل: الالتصاق (adhesion)، والغزو (invasion)، والارتباط (attachment)، وانظمة امتصاص الحديد (iron uptake systems)، والحركة (motility)، والانشطة السمية (toxin activity). و من الجدير بالذكر أن الأنماط المرضية المعوية وخارج الأمعاء المختلفة لعزلات بكتريا *E.coli* تشترك في نفس عوامل واستراتيجيات الضراوة (Mainil, 2013).

تكن عوامل ضراوة بكتريا *E.coli* من استعمار الأنسجة المضيفة والاستمرار في مواجهة دفاعات الجهاز المناعي للمضيف بكفاءة. و يمكن تقسيم عوامل الضراوة للـ *E.coli* الى مجموعتين : عوامل الضراوة المرتبطة بسطح الخلايا البكتيرية وعوامل الضراوة التي يتم إفرازها وتصديرها إلى المضيف (Bien *et al.*, 2012).

1-2-1-1-1 عوامل الضراوة المرتبطة بسطح الخلايا البكتيرية :

تشمل عوامل الضراوة المرتبطة بسطح الخلايا البكتيرية عدد الأنواع المختلفة من العضيات اللاصقة مثل: Type 1 fimbriae، P Fimbriae، S Fimbriae و F1C التي تعزز الارتباط البكتيري بالأنسجة المضيفة (Kudinha *et al.*, 2012). وكذلك المحفظة (Capsule)، الاسواط (Flagella) و Lipopolysaccharide التي توفر الحماية والحركة وسمية بكتريا *E.coli* (Pichon *et al.*, 2009 ; Miajlovic & smith, 2014 ; Valvano, 2022).

1-1-1-2 عوامل الضراوة التي يتم إفرازها وتصديرها إلى المضيف :

تفرز العديد من بكتريا *E.coli* مواد مثل: السموم (Toxins) وانزيم Protease، والتي من شأنها أحداث الإصابة والالتهاب عن طريق إتلاف أنسجة المضيف أو عن طريق تعطيل الجهاز المناعي للمضيف وتعزز من بقائها وزيادة المقاومة لدفاعات المضيف (Enrico, 2019 ; Ramírez & Eckhard, 2022).

Pathogenicity of *E.coli*

3-1-1-1 إمرضيه بكتريا *E.coli*

تُعرف الإراضية على أنها قدرة البكتريا لإحداث المرض، بناءً على عوامل الضراوة والمقاومة التي تمتلكها تلك البكتريا، إنَّ معظم سلالات بكتريا *E.coli* هي كائنات غير ضارة ونادراً ما تسبب المرض، ومع ذلك، فإنَّ بكتريا *E.coli* كونت سلالات مسببة للأمراض بالنظر لما تمتلكه من عوامل ضراوة وقدرتها على مقاومة المضادات الحياتية (Lindstedt *et al.*, 2018).

ومن أهم الأمراض التي يمكن ان تسببها بكتريا *E.coli* : -

Enteric or diarrheal diseases

1-1-1-3-1 الأمراض المعوية او الاسهال

تسبب بعض عزلات بكتريا *E.coli* أمراضاً معوية تتراوح أعراضها من الإسهال المائي (watery diarrhea) إلى التهاب القولون النزفي الشديد (hemorrhagic colitis)، وترتبط إصابات بكتريا *E.coli* المعوية بالسلالات الستة الممرضة EPEC، ETEC، EAEC، EIEC، DAEC و EHEC والتي تم ذكرها سابقاً، معظم حالات الإسهال لبكتريا *E.coli* سببها سلالة ETEC (95% حوالي من 154 الى 380 مليون) في جميع أنحاء العالم، وبنسبة اقل للسلالات الأخرى (Pires *et al.*, 2015)، اذ يرتبط تنوع الإصابات وشدها على عوامل الضراوة لكل سلالة منها، والتي تؤثر على مجموعة واسعة من العمليات الحياتية داخل خلية المضيف، منها تصنيع البروتينات، ونقل الإشارة، وظائف الهيكل الخلوي، وانقسام الخلايا، وإفراز الأيونات، والنسخ، وموت الخلايا المبرمج (apoptosis) ، والتأثير على وظيفة الميتوكوندريا. بالإضافة إلى السموم ; (Rolhion & Darfeuille-Michaud , 2007 ; Gaytán *et al.*, 2016).

تنتج بكتريا *E.coli* خصائص التهابية معوية تُعرف بأسم الالتصاق والغزو (adherent and invasive)، وكذلك لها القدرة على انتاج سموم (Shiga toxins) (Rivas *et al.*, 2016). تنتج بكتريا *E.coli* نوعين من السموم المعوية enterotoxins،

والتي تكون بنوعين : السموم المعوية المتغيرة بالحرارة (heat-labile enterotoxin)، و السموم المعوية الثابتة بالحرارة (heat-stable enterotoxin)، ما يمكنها من التهرب من دفاعات المضيف، ويتسبب أيضاً في تلف المضيف (Levinson, 2016). بالإضافة إلى التسبب في الأنواع البسيطة من الإسهال، يمكن لهذه السلالات أن تسبب إسهالاً دمويًا (bloody diarrhea) او ما يعرف بـ "التهاب القولون النزفي" (hemorrhagic colitis)، وقد يتطور مستوى الإصابة لدى بعض المرضى (خاصة الأطفال الصغار وكبار السن) الى مضاعفات سريرية أكثر خطورة تُعرف بإسم متلازمة انحلال الدم اليوريمية (hemolytic uremic syndrome) (Arenas-Hernández *et al.*, 2012).

ويمكن أن تسبب هذه السلالات في بعض الحالات إسهالاً حاداً، مما يؤدي الى فقدان السوائل بشكل كبير و حدوث جفاف الشديد، اذ ترتبط تلك السلالات بظاهرة الأمعاء الدقيقة باستخدام مجموعة واسعة من المواد اللاصقة، المعروفة بإسم عوامل الاستعمار (Colonization factors) (Torres, 2017).

1-1-1-3-2 التهاب السحايا / تسمم الدم | Meningitis|Septicemia

تسمم الدم / التهاب السحايا، يتم تعريفه بأنه نمو العامل الممرض في الدم أو السائل النخاعي (cerebrospinal fluid) (Hallmaier-Wacker *et al.*, 2022). في ستينيات القرن العشرين، تم تشخيص بكتريا *E.coli* على انها السبب الأكثر شيوعاً لتسمم الدم البكتيري، بالإضافة الى تسبب بكتريا *E.coli* تسمم الدم لدى حديثي الولادة وإنهًا تسبب أيضاً الإلتهاب الرئوي، التهاب المرارة، التهاب الأذن الصغرى، التهاب الصفاق، التهاب وتنخر في الانسجة الخلوية، التهاب العظم والتهاب المفاصل (Bodilsen *et al.*, 2018 ; Ferrieri & Wallen, 2018).

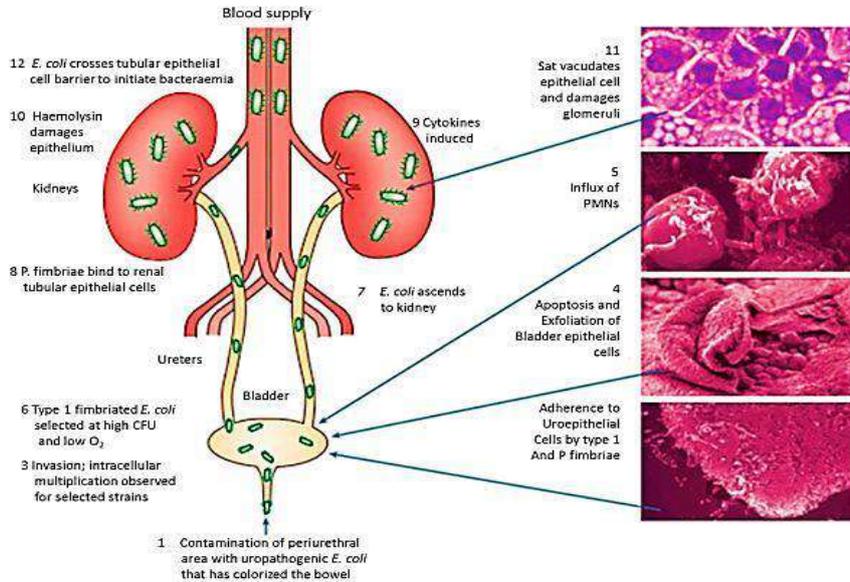
1-1-1-3-3 إصابة المسالك البولية | Urinary tract infection

تعد اصابات المسالك البولية ثاني أكثر أنواع الاصابات انتشاراً (بعد اصابات الجهاز التنفسي)، وتشير اصابات المسالك البولية (UTI) إلى وجود ونمو وتكاثر مسببات الأمراض الميكروبية داخل أي عضو يشكل الجهاز البولي، بما في ذلك الكليتين والحالبين والمثانة الواحدة والإحليل، اذ تسبب بكتريا *E.coli* ما يقارب 80-85% من حالات الإصابة و50% من الاصابات المكتسبة في المستشفيات، تزيد نسبة الإصابة عند النساء بنسبة كبيرة ما يقارب 60 -

84%، وان ما لا يقل عن 40 إلى 50% من النساء سيعانين من إصابة واحدة على الأقل خلال حياتهن (Okojie & Omorokpe, 2018).

و تعد سلالة (UPEC) المسبب الرئيسي لهذا النوع من الاصابات لما تمتلكه من قدرة وعوامل ضراوة وسرعة انقسامها خلال الاصابات البشرية، تمكنها من الانتقال من الجهاز الهضمي الى المنطقة المحيطة بالإحليل ثم الإحليل، والمثانة، والحالب، والكلى وقد تصل الى مجرى الدم (Sojo-Dorado *et al.*, 2022).

يبدأ التهاب المسالك البولية السفلية، كما مبين في الشكل (1-1)، بإستعمار البكتيريا للمنطقة المحيطة بالإحليل عن طريق التلوث البرازي من الجهاز الهضمي، ثم يليه تسلل البكتيريا عبر مجرى البول إلى المثانة و الالتصاق بسطح المثانة والتفاعل مع نظام الدفاع عن ظهارة المثانة، ثم الأجتياح (الغزو) والتضاعف عن طريق تكوين مستعمرات بكتيرية داخل الخلايا في المثانة والتواجد في مجرى البول الأساسي و تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm)؛ مما يسبب التهاب المثانة. قد يتطور التهاب المثانة الذي لم يتم علاجه إلى التهاب المسالك البولية العلوي، الذي يسمى التهاب الحويضة والكلية (pyelonephritis)، عندما تصعد البكتيريا إلى الحالب وتدخل إحدى الكليتين أو كليتهما، ويتطور التهاب الحويضة والكلية؛ ويؤدي الى استعمار الكلى وتلف الأنسجة المضيفة مع زيادة خطر تسمم الدم (bacteremia) في بعض الحالات (Terlizzi *et al.*, 2017 ; Guiral Vilalta, 2018 ; Forsyth *et al.*, 2018).



الشكل (1-1) : يوضح مراحل إصابة المسالك البولية : الانتشار، الصعود الى تجويف المثانة، الالتصاق، الاجتياح والتضاعف داخل الخلية وتكوين المستعمرات، الانتقال الى الكليتين والحالب، التسبب في تسمم وتحلل الدم (Glover *et al.*, 2014).

1-1-1-4 مقاومة بكتريا *E.coli* للمضادات الحياتية**Antimicrobial resistance of *E.coli***

عَرّف واكسمان (S. A. Waksman) مصطلح "المضاد الحيوي" وهو مادة او مركب تنتجها الكائنات الحية الدقيقة، ولها القدرة على تثبيط نمو وتدمير البكتيريا والكائنات الحية الدقيقة الأخرى (Mohr, 2016)، وهي عبارة عن نواتج ايفية ثانوية طبيعية او مصنعة، تنتجها الأحياء المجهرية في طور الثبات (stationary phase)، وتستهدف الأحياء المجهرية الأخرى، وقد تكون ذات طيف واسع او محدود حيث يكون تأثيرها قاتل او مثبط للأحياء الأخرى (Ali and Ratcliffe, 2018).

وتعرف مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية (Antimicrobial Resistance (AMR) على أنها القدرة على الاستمرار والنمو في بيئة محددة مع الأخذ في الاعتبار متغيرات مختلفة مثل: درجة الحرارة، وظروف الرقم الهيدروجيني وكذلك تركيز المضادات الحياتية (Dadgostar, 2019). تعدّ المضادات الحياتية ضرورية للوقاية من الالتهابات البكتيرية وعلاجها، ومع ذلك، فإنّ استخدام المضادات الحياتية يمكن أن يسبب ظهور وانتشار مقاومة لتلك المضادات في البكتريا الممرضة (Kaesbohrer et al., 2012).

تشير التقارير إلى أن أكثر من 700 ألف شخص يموتون سنوياً في جميع أنحاء العالم بسبب الاصابات الناتجة عن الممرضات المقاومة للمضادات الحياتية، ومن المتوقع أن يصل هذا العدد إلى 10 ملايين بحلول عام 2050م ما لم يتم تنفيذ سياسات وإجراءات لمعالجتها، وفيما يتعلق ببكتريا *E.coli*، فمن المتوقع أن يفقد أكثر من ثلاثة ملايين شخص حياتهم بحلول عام 2050م بسبب سلالات بكتريا *E.coli* المقاومة للمضادات الحيوية، اذ تتمتع بعض أنواع البكتريا بالآليات الفطرية للمقاومة، وكذلك قدرتها على اكتساب آليات مقاومة جديدة (O'Neill, 2016 ; Da Silva & Domingues, 2016).

بعض المضادات الحياتية تتحلل بسهولة، مثل البنسلينات (penicillins)، في حين أن بعضها الآخر يكون أكثر ثباتاً، مثل الفلوروكينولونات (fluoroquinolones) والتتراسيكلينات (tetracyclines)؛ مما يسمح لها بالبقاء لفترة أطول في البيئة والانتشار بشكل أكبر والتراكم بتراكيز عالية (Larsson, 2014).

ولمقاومة المضادات الحياتية عدة انماط :

1. المقاومة للأدوية المتعددة (MDR) Multidrug resistant : وتعرف على أنها عدم الحساسية المكتسبة لعامل واحد على الأقل من ثلاثة فئات أو أكثر من المضادات الحيوية.

2. المقاومة للأدوية على نطاق واسع (XDR) Extensively drug-resistant : وتعرف على أنها عدم الحساسية لعامل واحد على الأقل في جميع فئات المضادات الحيوية باستثناء إثنين أو أقل (أي ان العزلات البكتيرية تظل عرضة لفئتين أو إثنين فقط من المضادات الحيوية).

3. المقاومة للأدوية الشاملة (PDR) Pandrug-resistant : وتعرف على أنها عدم الحساسية لجميع العوامل في جميع فئات المضادات الحيوية (Basak et al., 2016)

تمثل بكتريا *E. coli* أيضاً مستودعاً رئيسياً لجينات المقاومة التي قد تكون مسؤولة عن فشل العلاجات المستخدمة، لقد تم تشخيص أعداد كبيرة و متزايدة من جينات المقاومة في عزلات بكتريا *E. coli* خلال العقود الماضية، اذ تعمل بكتريا *E. coli* كمتبرع ومستقبل لجينات المقاومة، وبالتالي، يمكنها اكتساب جينات المقاومة من البكتيريا الأخرى، و يمكنها أيضاً نقل جينات المقاومة الخاصة بها إلى البكتيريا الأخرى (Poirel et al., 2020). ويمكن ان تحصل البكتريا على مقاومة للمضادات الحيوية المتعددة عن طريق العناصر الوراثية المتنقلة مثل: البلازميدات (plasmids) والجينات القافزة (transposons) (Rasheed et al., 2014).

يمكن أن تؤدي مقاومة بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية إلى جعل علاج التهابات المسالك البولية المعقدة أكثر صعوبة (Shankar & Balasubramaniam, 2014).

تستخدم البكتيريا استراتيجيتين وراثيتين رئيسيتين لمقاومة المضادات الحيوية :

1. الطفرات في الجينات المرتبطة بآلية عمل المضاد الحيوي، تتم بواسطة إحدى الآليات الآتية:

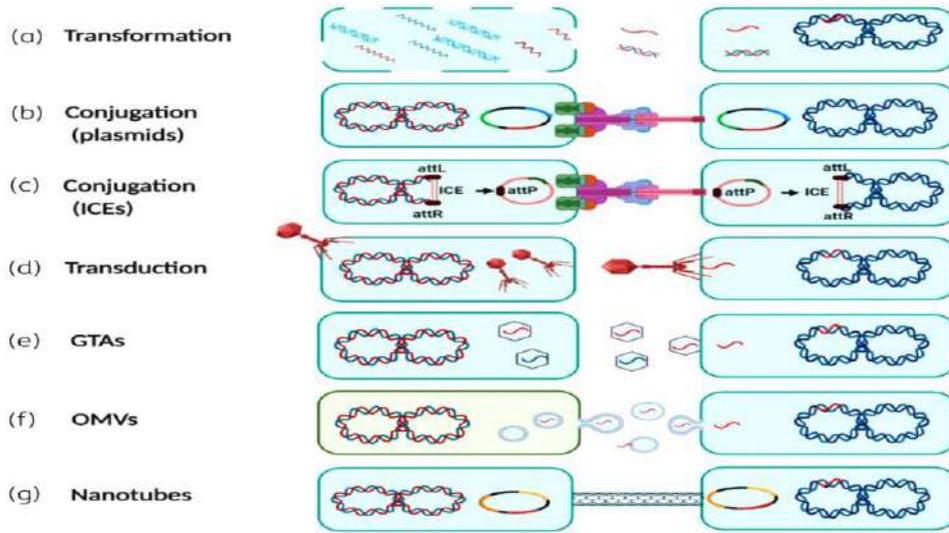
- أ. تحويرات (تغييرات) في هدف المضاد الحيوي (مما يقلل من تقبل الدواء).
- ب. تقليل امتصاص الدواء عن طريق إجراء تغييرات في نفاذية الخلايا البكتيرية.
- ج. الإفراط في التعبير عن آليات التدفق لقتل الجزيء الضار من الخلية البكتيرية.

2. اكتساب تشفير (DNA) لجينات مقاومة عن طريق نقل الجينات الأفقي horizontal gene transfer (HGT)، وتكتسب البكتيريا المادة الوراثية الخارجية عن طريق ثلاث آليات، كما في الشكل (1-2):

أ. التحول (Transformation): الدمج الطبيعي للحمض النووي، وهي الطريقة التقليدية لـ HGT، عدد قليل من الأنواع البكتيرية فقط لها القدرة على دمج الحمض النووي بهذه الطريقة لاكتساب الجينات المشفرة لآليات المقاومة.

ب. النقل (Transduction): يتم إدخال الحمض النووي المكتسب إلى البكتيريا عن طريق العاثيات (phages)، وهي طريقة شائعة لنقل المواد الوراثية في المختبر.

ج. الاقتران (Conjugation): هو الاستراتيجية الأكثر شيوعاً لنشر آليات مقاومة المضادات الحيوية في البكتيريا، ويحدث بعد الاتصال من خلية إلى أخرى بواسطة الشعرة (pilus) التي تنتجها الخلية المانحة التي ترتبط بالخلايا (Manson *et al.*, 2010 ; Brolund, 2014 ; Munita & Arias, 2016)



شكل رقم (1-2) تمثيل تخطيطي للآليات الرئيسية لـ HGT في البكتيريا (Liu *et al.*, 2022).

تظهر البكتيريا عدداً من آليات المقاومة للمضادات الحيوية بعد انتقال جينات المقاومة إليها وكما يلي :

1-1-1-4-1 الحد من امتصاص العلاجات Limiting drugs absorption

هناك اختلاف طبيعي في قدرة البكتيريا على الحد من امتصاص العوامل المضادة للميكروبات، إذ يوفر هيكل ووظائف طبقة lipopolysaccharide (LPS) في البكتيريا سالبة الكرام حاجزاً أمام أنواع معينة من الجزيئات، وهذا يمنح تلك البكتيريا مقاومة فطرية

لمجموعات معينة من المضادات الحيوية (Blair *et al.*, 2014). وايضاً توجد قنوات تدعى بورين (porin channels) التي تسمح بالوصول للجزيئات المحبة للماء ولأجل منح البكتيريا المقاومة ضد المضادات الحيوية تعمل البكتيريا على مسارين رئيسيين عن طريقهما تحد من امتصاص الدواء هما: خفض أعداد القنوات، و إحداث طفرات تؤدي الى زيادة انتقائية (selectivity) القنوات، وفي بعض الأحيان توقف إنتاج بعض القنوات بالكامل (Kumar & Schweizer, 2005).

Modification of drug targets

2-4-1-1-1 تغيير موقع الهدف للعلاج

هناك مكونات متعددة في الخلية البكتيرية قد تكون أهدافاً للعوامل المضادة للميكروبات، وهناك عدد مماثل من الأهداف التي يمكن للبكتيريا تعديلها، لتمكين مقاومة ذلك العلاج. إحدى آليات مقاومة العلاج المستخدمة هي عن طريق التغييرات في تركيب او إعداد البروتينات المرتبطة بالبنسلين (penicillin-binding proteins (PBPs) و PBPs عبارة عن إنزيمات ببتيدية تشارك في بناء peptidoglycan في جدار الخلية، يؤثر التغيير في عدد PBPs سواء في الزيادة او النقصان الى انخفاض في قدرة الارتباط الطبيعي للأدوية التي يمكن أن ترتبط بالمواقع المستهدفة (Reygaert, 2009 ; Beceiro *et al.*, 2013). تعمل الببتيدات السكرية (glycopeptides) (مثل الفانكوميسين vancomycin) أيضاً عن طريق تثبيط تخليق جدار الخلية، وتعمل الببتيدات الحلقية الدهنية (Cycle lipopeptides) (مثل الدابتومايسين daptomycin) عن طريق إزالة استقطاب (depolarizing) غشاء الخلية (Randall *et al.*, 2013).

Drug inactivation

3-4-1-1-1 تعطيل الدواء

هناك طريقتان رئيسيتان تقوم بهما البكتيريا بتعطيل الأدوية : الاول : عن طريق التحلل الفعلي للدواء : باستخدام الانزيمات مثل (β -lactamases) عبارة عن مجموعة كبيرة جداً من إنزيمات التحلل المائي للدواء وتجعلها مقاومة لبعض المضادات الحيوية مثل البنسلينات والسيفالوسبورينات (Kumar *et al.*, 2013). والثاني : عن طريق نقل مجموعة كيميائية إلى الدواء : وهي الأكثر شيوعاً مثل نقل مجموعات الأسيتيل (acetyl) والفوسفوريل (phosphoryl) والأدينيل (adenyl)، ويعد نقل مجموعة الأسيتيل (acetyl) هو الآلية الأكثر استخداماً، ومن المعروف أنه يستخدم ضد الأمينوغليكوزيدات aminoglycosides، والكلورامفينيكول chloramphenicol،

والستربتوگرامين streptogramins، والفلوروكينولونات fluoroquinolones من المعروف ان الفسفرة تستخدم بشكل أساسي ضد الأمينوغليكوزيدات aminoglycosides (Schwarz *et al.*, 2004).

Production of enzymes

4-4-1-1-1 انتاج الانزيمات

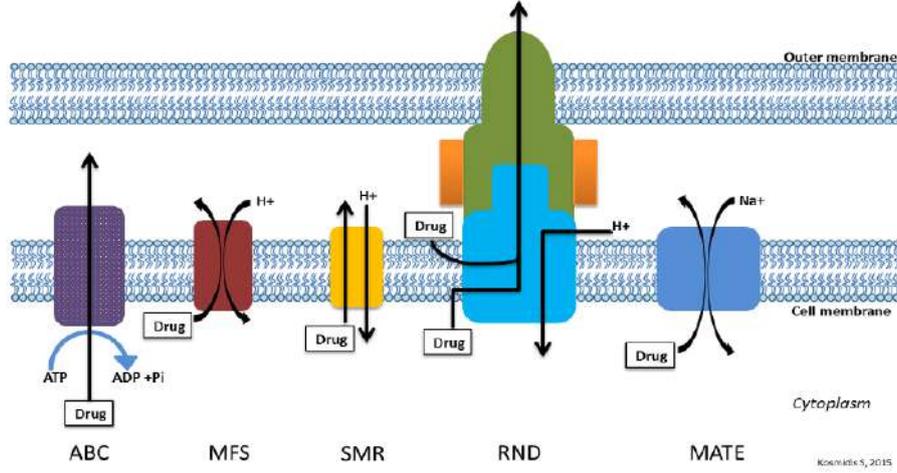
المجموعة الأكثر استخداماً من المضادات الحياتية في هذا المجال هي أدوية β -lactam، اذ يشترك جميع أعضاء هذه المجموعة الدوائية في بنية أساسية محددة تتكون من حلقة بيتا لاكتام رباعية الجوانب، اذ تحدث مقاومة أدوية β -lactam عن طريق التحلل المائي للدواء بوساطة إنزيمات β -lactamase (Pfeifer *et al.*, 2010 ; Bush & Bradford, 2016).

تعمل إنزيمات β -lactamase (التي كانت تسمى في الأصل البنسليناز penicillinases والسيفالوسبوريناز cephalosporinases) على تعطيل أدوية β -lactam عن طريق التحلل المائي لموقع معين في بنية حلقة β -lactam، مما يؤدي إلى فتح الحلقة وبالتالي فإنّ الأدوية ذات الحلقة المفتوحة غير قادرة على الارتباط ببروتينات PBP المستهدفة. ويعد إنتاج β -lactamase هو آلية المقاومة الأكثر شيوعاً التي تستخدمها البكتيريا سالبة الكرام ضد أدوية β -lactam، والبنسلين penicillin والسيفالوسبورين cephalosporin من الجيل الاول (Bush and Jacoby, 2010).

Efflux pumps

1-1-1-4-5 مضخات الدفع

تمتلك البكتيريا جينات مشفرة كروموسومياً لمضخات الدفع Efflux pumps، تعمل مضخات الدفع في المقام الأول على تخليص الخلية البكتيرية من المواد السامة، والعديد من هذه المضخات ستنتقل مجموعة كبيرة ومتنوعة من المركبات، معظم عائلات مضخات الدفع هذه عبارة عن مضخات إحادية المكون تتنقل المواد substrates عبر الغشاء السيتوبلازمي، الشكل (1-3) (Villagra *et al.*, 2012 ; Jo *et al.*, 2017).



شكل رقم (1-3) يوضح مضخات الدفع Drug efflux pumps (Reygaert, 2018).

1-1-1-5 العلاجات المستخدمة وآليات العلاج

Treatment mechanisms and drugs used

1-5-1-1-1 العلاجات المستخدمة :

يعد العلاج الروتيني لإصابات المسالك البولية المعتمد على المضادات الحيوية فعالاً لعدة حالات من الاصابات، ومع ذلك، لا تزال اصابات المسالك البولية المزمنة تمثل المشكلة الصحية الأكثر أهمية. تعاطي المضادات الحيوية المستمر واستعمالها بدون توصيف يعدّ من أهم الأسباب للتطور السريع لمقاومة الأدوية لسلاطات من البكتريا المسببة لأمراض المسالك البولية (Giancola *et al.*, 2017 ; Terlizzi *et al.*, 2017).

في الوقت الحالي، تعدّ تريميثوبريم (TMP) trimethoprim، سلفاميثوكسازول (SMX) sulfamethoxazole، كوترينوكسازول (TMP/SMX) Co-trimoxazole، وسيبروفلوكساسين ciprofloxacin، الأمبيسيلين ampicillin، والجيل الثاني و الثالث من السيفالوسبورينات cephalosporins، التي تنتمي إلى مجموعة المضادات الحيوية - لاكتام lactam antibiotics، هي الأكثر استخداماً أثناء علاج التهاب المسالك البولية والموصى بها طبياً ضد عزلات UPEC. بالإضافة إلى ذلك، تعدّ الكاربابينيمات carbapenems (هي من مجموعة lactam antibiotics بالإضافة الى البنسلينات penicillins والسيفالوسبورينات cephalosporins)، مثل: إيميبيزيم imipenem، إرتابينيم ertapenem، أميكاسين amikacin، ونيتروفورانتوين nitrofurantoin، أفضل المضادات الحيوية المستخدمة

(Idil *et al.*, 2016 ; Bartoletti *et al.*, 2016 ; Zalewska- UPECs لسلاطات Piątek & Piątek, 2020)

على الرغم من فعالية العديد من الأنظمة العلاجية، فإنَّ علاج اصابات المسالك البولية أصبح صعبا بشكل متزايد بسبب الظهور العالمي لسلاطات (UPECs) المقاومة للمضادات الحياتية وانخفاض فعالية العلاجات الفموية (Bartoletti *et al.*, 2016). اذ لوحظ زيادة في معدلات مقاومة سلاطات (UPEC) للأمبيسيلين ampicillin، الكوتريموكسازول، cotrimoxazole، السيفالوسبورينات cephalosporins، الأموكسيسيلين amoxicillin، الكلافولانيت clavulanate، حمض الناليديكسيك nalidixic acid، السيفرادين cefradine، أمينوبنسليين aminopenicillins، والسيفوروكسيم cefuroxime، وكذلك للأميكاسين amikacin والسبيروفلوكساسين .

(Saha *et al.*, 2015 ; Idil *et al.*, 2016 ; Terlizzi *et al.*, 2017).

إنَّ العدد المتزايد من سلاطات (UPECs) المقاومة لـ (TMP) يحد من استخدامه كعلاج فعال بشكل مفرد أو بالاشتراك مع (SMX)، وكذلك يتم تقليل الاستخدام العلاجي للفلوروكينولونات fluoroquinolones (والمستخدمة بشكل خاص لعلاج التهاب الحويضة والكلية pyelonephritis و التهاب المثانة الحاد acute cystitis) بسبب الزيادة الكبيرة في مقاومة UPECs (Zowawi *et al.*, 2015; Idil *et al.*, 2016).

يستخدم السبيروفلوكساسين Ciprofloxacin وحمض الناليديكسيك nalidixic acid بشكل متزايد في علاج التهابات المسالك البولية، و يُستخدم الليفوفلوكساسين levofloxacin (الذي يعد من الفلوروكينولونات fluoroquinolones) بشكل شائع في علاج التهاب الحويضة والكلية الحاد. كذلك يستخدم جاتيفلوكساسين Gatifloxacin (الذي يعد من الفلوروكينولونات fluoroquinolones) ضد طيف واسع من نشاط البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام وكذلك البكتيريا اللاهوائية، كما أن لـ Gatifloxacin نشاط ضد الميكوبلازما Mycoplasma والكلاميديا Chlamydia spp بشكل فعال (Lee *et al.*, 2006 ; Binesh *et al.*, 2018 ; Cao *et al.*, 2021)

Treatment mechanisms

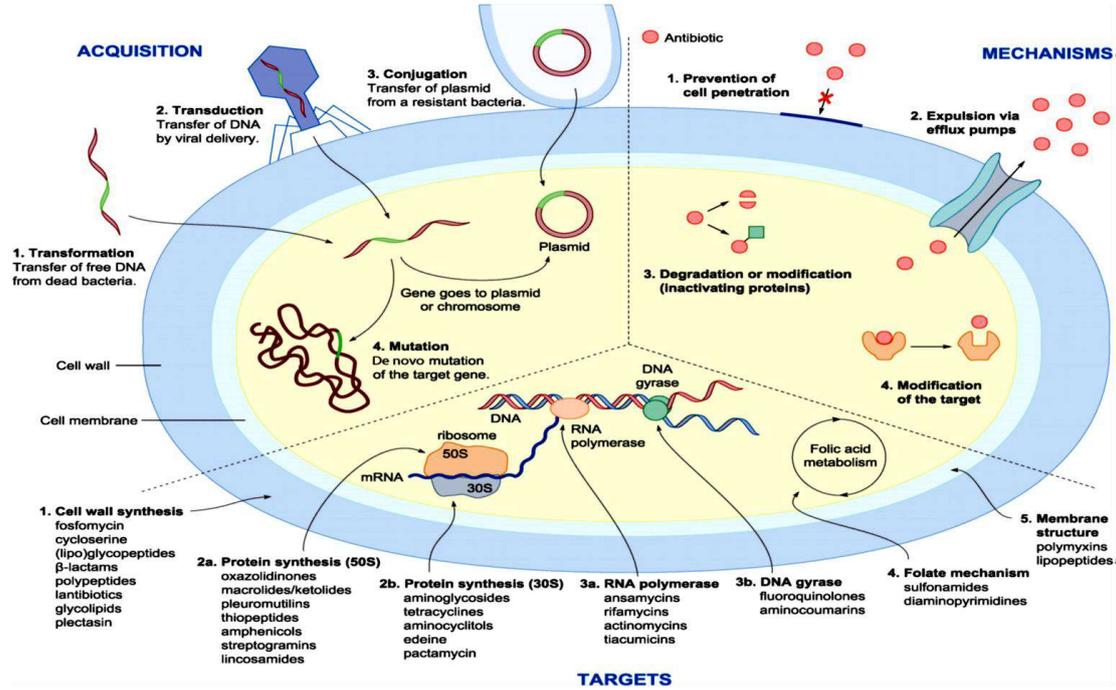
2-5-1-1-1 آليات العلاج :

يتم تصنيف الأدوية المضادة للميكروبات إلى مجموعات حسب نوع النشاط المضاد للميكروبات، كما موضح في الجدول (1-1)، وتشمل هذه المجموعات (Reygaert, 2017).

1. الأدوية التي تمنع تصنيع جدار الخلية البكتيرية (Inhibit bacterial cell wall synthesis)
2. الأدوية التي تزيل استقطاب غشاء الخلية (Depolarize the cell membrane)
3. الأدوية التي تمنع تصنيع البروتين البكتيري (Inhibit bacterial protein synthesis)
4. الأدوية التي تثبط تصنيع الحمض النووي البكتيري (Inhibit bacterial nucleic acid synthesis)
5. الأدوية التي تمنع المسارات الأيضية البكتيرية (Inhibit bacterial metabolic pathways)

الجدول رقم (1-1) يبين آليات عمل الادوية وبعض مجموعات المضادات الحياتية المستخدمة للعلاج (Reygaert, 2017)

مجموعة المضادات الحياتية Antimicrobial Groups	آلية عمل الدواء Mechanism of Action
β-Lactams Carbapenems Cephalosporins Monobactams Penicillins Glycopeptides	تثبيط تصنيع جدار الخلية Inhibit Cell Wall Synthesis
Lipopeptides	إزالة استقطاب غشاء الخلية Depolarize Cell Membrane
Bind to 30S Ribosomal Subunit Aminoglycosides Tetracyclines Bind to 50S Ribosomal Subunit Chloramphenicol Lincosamides Macrolides Oxazolidinones Streptogramins	تثبيط تصنيع البروتين Inhibit Protein Synthesis
Quinolones Fluoroquinolones	تثبيط تصنيع الحمض النووي Inhibit Nucleic Acid Synthesis
Sulfonamides Trimethoprim	تثبيط المسارات الأيضية Inhibit Metabolic Pathways



شكل رقم (1-4) الأهداف الرئيسية للمضادات الحيوية، والآليات ومسارات اكتساب المقاومة (Chellat *et al.*, 2016).

1-1-1-5-2-1 الأدوية التي تمنع تصنيع جدار الخلية البكتيرية

Drugs that inhibit bacterial cell wall synthesis

أحد أهم المكونات الرئيسية لجدار الخلية هي طبقة الببتيدوغليكان (peptidoglycan) والتي هي عبارة عن مصفوفة بوليمر متشابكة تساهمياً تتكون من β -(1-4) (peptide-linked N-acetyl hexamine). تعد القوة الميكانيكية التي توفرها هذه الطبقة من جدار الخلية أمراً بالغ الأهمية لقدرة البكتيريا للحفاظ على السلامة الهيكلية للبكتيريا والبقاء في الظروف البيئية التي يمكن أن تغير الضغط الأسموزي السائد (Kohanski *et al.*, 2010).

للمضادات الحيوية من فئة البيتا لاکتام القدرة على تحطيم جدار الخلية إذ تمتلك حلقة β -lactam في بنيتها الجزيئية التي ترتبط تساهمياً ببروتينات ربط البنسلين (penicillin binding proteins (PBPs). وإن هذه (PBPs) تحفز cross-linking أو transpeptidation لطبقة الببتيدوغليكان في جدران الخلايا البكتيرية، والتي يتم إعادة تشكيلها باستمرار بواسطة البكتيريا. عندما يتم تعطيل PBPs بواسطة المضادات الحيوية β -lactam، فإن الإنزيمات البكتيرية تحلل cross-linking لطبقة الببتيدوغليكان أثناء عملية إعادة تشكيل جدار الخلية، والتي تؤدي إلى تحطيم جدار الخلية (Sykes & Papich, 2021).

تُعد أدوية بيتا لاكتام β -lactam، من بين أول مضادات الميكروبات التي تم اكتشافها. ومن أدوية بيتا لاكتام β -lactam (السيفالوسبورينات cephalosporins من الجيل الثاني والثالث والرابع) (Davis *et al.*, 2013 ; Shepherd & Pottinger, 2013).

أما الكاربابينيمات carbapenem هي أعضاء قوية في عائلة لاكتام من مضادات الميكروبات التي ترتبط هيكلها بالبنسلينات وهي مضادات حيوية تستخدم ضد الالتهابات الشديدة الناجمة عن البكتيريا المنتجة لـ β -lactamases، مثل إيميبينيم imipenem، وإرتابينيم ertapenem وغيرها (Patel & Bonomo, 2013).

عمل الكاربابينيمات carbapenem أولاً عن طريق اختراق جدار الخلية البكتيرية، ثم الارتباط بالإنزيمات بروتينات ربط البنسلين (PBPs)، وكذلك تثبيط إنزيم peptidase أثناء عملية transpeptidation الذي يعتبر الهدف الرئيسي للكاربابينيمات أثناء تصنيع جدار الخلية البكتيرية والذي يمنع التصنيع الحيوي للبيبتيدوغلايكان peptidoglycan، وبالتالي يؤدي إلى موت الخلايا عن طريق التحلل الذاتي داخل الخلية البكتيرية (Codjoe & Donkor, 2017).

2-2-1-1-5-2-1 الأدوية التي تزيل استقطاب غشاء الخلية

Depolarize the cell membrane

أحد أهداف المضادات الحيوية أن تكون فعالة ضد البكتيريا المقاومة هو غشاء الخلية البكتيرية (Teixeira *et al.*, 2012). وان أحد الأسباب التي تجعل الغشاء البكتيري هدفاً للمضادات الحيوية هو أن الدهون الأنيونية مكشوفة على سطح الأغشية البكتيرية لهذا السبب فإن العديد من المضادات الحيوية كاتيونية بحيث يكون لديها انتقائية أكبر للأغشية البكتيرية (Alves & Olívia Pereira, 2014).

تحتوي الأسطح الداخلية لكل من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام على حمض الدهني lipoteichoic acid (LTA) والسكريات الدهنية lipopolysaccharide (LPS)، والتي تحمل شحنات سالبة صافية إلى السطح البكتيري، مما يتيح الانجذاب الكهروستاتيكي الأولي إلى المضادات الحيوية الكاتيونية (Lyu *et al.*, 2016 ; Gagnon *et al.*, 2017).

1-1-1-1-2-3 الأدوية التي تمنع تصنيع البروتين البكتيري

Drugs that inhibit bacterial protein synthesis

تصنيع البروتين هو عملية أساسية في جميع الخلايا، إذ يقوم الريبوسوم بهذه المهمة عن طريق ترجمة المعلومات الوراثية المشفرة في الرنا المرسال (mRNAs) إلى بروتينات (Schmeing & Ramakrishnan, 2009).

وتحتوي الريبوسومات لكل من بدائية النواة وحقيقية النواة على وحدتين فرعيتين بأحجام مختلفة. تتحد الوحدات الفرعية S50 و S30 لريبوسوم بدائيات النواة (الريبوسوم البكتيري) لتشكل معاً الريبوسوم S70 (بناءً على معدلات الترسيب الخاصة بكل منهما أثناء الطرد المركزي الفائق) (Schmeing, 2013). يمكن تقسيم عملية تصنيع البروتين إلى أربع خطوات رئيسية: البدء (initiation)، الاستطالة (elongation)، الإنهاء (termination)، وإعادة تدوير الريبوسوم (ribosome recycling) (Wilson, 2014).

تستهدف بعض المضادات الحيوية الوحدة الفرعية (30S) مثل: التتراسيكلين tetracyclines و الامينوكلايكوسايدز Aminoglycosides، إذ يرتبطان بالمواقع المتداخلة لمراكز فك التشفير (decoding center)، وبالتالي يمنع الترجمة عن طريق منع ربط aa-tRNA بالموقع A (Jenner et al., 2013 ; Polikanov et al., 2014).

بينما تستهدف بعض المضادات الحيوية الوحدة الفرعية (50S)، مثل: الكلورامفينيكول Chloramphenicol و الماكروليدات Macrolides، ترتبط بمركز الببتيديل ترانسفيراز Peptidyl Transferase Center حيث مكان تكوين الرابطة الببتيدية وبالتالي يمنع الترجمة بسبب الارتباط بالموقع A للوحدة الفرعية (Marks et al., 2016).

1-1-1-1-2-4 الأدوية التي تمنع المسارات الأيضية البكتيرية

Drugs that inhibit bacterial metabolic pathways

تعمل هذه النوعية من الأدوية على تثبيط مجموعة محدودة من العمليات الخلوية الضرورية أثناء النمو اللوغاريتمي للبكتيريا، إذ تقوم البكتيريا الممرضة بإعادة برمجة شبكتها الأيضية وموازنة عمليات التصنيع الحيوي للـ ATP لدعم النمو والبقاء (Brown et al., 2008 ; Murima et al., 2014).

تستهدف هذه الفئة من الادوية تعطيل المسارات الايضية مثل تثبيط انتاج حامض الفوليك (folic acid)، والذي يعد ضروري لعمليات التصنيع الحيوي داخل البكتريا (Maynard *et al.*, 2018) إنّ حمض الفوليك folic acid عبارة عن وحدات أحادية الكربون تشارك في التصنيع الحيوي للبيورينات purines، الثيميدين thymidine، الجلايسين glycine، الميثيونين methionine وحمض البانتوثينيك pantothenic acid في كل من بدائيات وحقيقيات النواة (Kompis *et al.*, 2005).

وتعدّ ادوية السلفوناميدات Sulfonamides والتريميثوبريم Trimethoprim من الادوية المهمة في تثبيط المسارات الايضية، ولا سيما تثبيط تصنيع حامض الفوليك، ومن الأمثلة على الأدوية المشتقة من السلفوناميدات : السلفاميثازين sulfamethazine، والسلفاديازين sulfadiazine، والسلفاميثوكسازول sulfamethoxazole وكذلك Co-trimethoprim (Sköld & Swedberg, 2017 ; Ovung & Bhattacharyya , 2021).

1-1-1-5-2-5-1-1 الأدوية التي تثبط تصنيع الحمض النووي البكتيري

inhibit bacterial nucleic acid synthesis

تمنع هذه الفئة من المضادات الحياتية تصنيع الحمض النووي (DNA) للبكتيريا عن طريق تعطيل انزيمات نوع توبوزوميراز من النوع الثاني topoisomerase type II (اي تثبيط النشاط التحفيزي لـ DNA gyrase و topoisomerase IV)، هذان الإنزيمان يلعبان دوراً رئيسياً في تنظيم عملية اللف الفائق للكروموسومات المطلوب لتصنيع الحمض النووي (DNA)، ترتبط هذه المضادات الحياتية بمواقع ربط الانزيم المستهدفة لـ DNA gyrase و topoisomerase IV (Aldred *et al.*, 2013).

إن الاختلاف في الإنزيمات التي تساهم في تصنيع الأحماض النووية [الحمض النووي الريبوزي (DNA) والحمض النووي الرايبوي (RNA)] بين الخلايا حقيقية النواة وبدائية النواة يساعد على تحقيق هدف المضادات الحياتية عن طريق الانتقائية السمية للعلاج ، والذي بدوره يساهم في تطوير المضادات الحياتية، ويمكن تقسم هذه المضادات الى :

1. مثبطات الحمض النووي الرايبوي (RNA).
2. مثبطات الحمض النووي الريبوزي (DNA) (Ullah & Ali, 2017).

1-1-1-1-2-5-1-5-1-1-1 مثبطات الحمض النووي الريبي (RNA) :

يتداخل هذا النوع من المضادات مع تصنيع الحمض النووي الريبي (RNA) و انزيم RNA polymerase، مثلاً ريفامبين rifampin (وهو مثال معروف لعائلة الريفاميسين rifamycins)، يثبط (RNAP) RNA polymerase عن طريق الارتباط بوحدته الفرعية (β) وبالتالي يمنع النسخ بعد تكوين رابطة فوسفوديستر (phosphodiester) bond ثنائية أو ثالثة في بداية عملية النسخ، ومن الجدير بالذكر أن ريفامبين rifampin يمنع مسار عملية الاستطالة في اثناء النسخ بمجرد أن يصل حجمها إلى 2-3 نيوكليوتيدات، مثل هذا الوضع يمنع نسخ الجينات، مما يؤثر على الوظيفة الطبيعية للبكتيريا، مما يؤدي إلى موت الخلايا (Adams *et al.*, 2021). لا ترتبط اختلافات نشاط مضادات الميكروبات في هذه الفئة من المضادات بالبكتيريا إيجابية الكرام وسالبة الكرام بموقع الارتباط الخاص بها على RNA polymerase ولكنها ترجع إلى عوامل أخرى على سبيل المثال مضخات الدفع (efflux pumps) في *E. coli* (Mosaei & Zenkin, 2020).

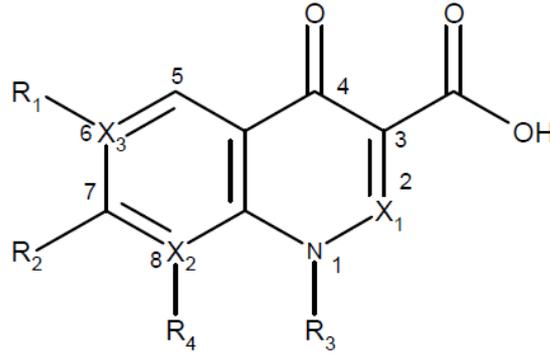
1-1-1-1-2-5-1-5-1-1-1 مثبطات الحمض النووي الريبوزي (DNA) :

مثل جميع عمليات البلمرة البيولوجية الأخرى يتم تصنيع الحمض النووي DNA أيضاً عن طريق مراحل البدء والاستطالة والأنهاء، لذلك تستهدف هذه الأدوية المضادة للبكتيريا واحدة من هذه العمليات لمنع تصنيع الحمض النووي DNA (Ullah & Ali, 2017). ومن أهم المضادات التي تستهدف تثبيط تصنيع DNA هي الكينولونات (Quinolones).

Quinolones

1- 2 الكينولونات

الكينولونات (Quinolones) هي عائلة من المضادات الحيوية تم اكتشافها في الستينات، وتتكون بنيتها الأساسية من هيكل ثنائية الحلقة، والأحماض الكربوكسيلية، ومجموعات الكيتو في الموضعين 3 و4 على التوالي (كما موضح في الشكل (1-5)، وهي ضرورية لنشاطها الدوائي. ويعدّ حامض الناليديكسيك Nalidixic acid اول مضادات هذه المجموعة (الجيل الاول)، اذ تمت الموافقة على استخدامه كعلاج لحالات التهابات المسالك البولية (UTIs) التي تسببها البكتيريا سالبة الكرام في تلك الفترة، لاحقاً ازدادت الحاجة إلى تطوير علاجات جديدة للإسهال والتهابات المسالك البولية الناجمة عن مقاومة بكتريا *E. coli*، واتجه الباحثين إلى تحسين نشاط وسمية الكينولونات (Pham *et al.*, 2019).



الشكل (1-5) يبين تركيب الكينولونات (Uivarosi , 2013)

أدى التحسين المستمر للكينولونات إلى استبدال ذرة الفلور بالكربون 6 (C-6) من الكينولون، مما ينتج الفلوروكينولون Fluoroquinolone، كان الفلوروكينولون الأول هو فلوميكين Flumequine، وكذلك دمج حلقة البيبرازين piperazine ring في الموقع C-7، و شكلت إضافة C-7 هذه جنباً إلى جنب مع الفلور C-6 (الجيل الثاني) من الكينولونات، بدأت فئة الكينولون من الجيل الثاني باستخدام النورفلوكساسين norfloxacin، الذي أثبت فعاليته في علاج التهابات الجهاز البولي التناسلي والجهاز الهضمي، ومع ذلك، كان السيبروفلوكساسين ciprofloxacin هو الكينولون الأول الذي أظهر نشاطاً أكثر فعالية لدى مرضى السرطان وعلاج الخط الثاني للكوليرا، فضلاً عن استخدامه سريريّاً ضد مجموعة من اصابات المسالك البولية و في علاج التهابات العظام والتهاب البروستات وتسمم الدم، وايضاً الليفوفلوكساسين levofloxacin، أنتج هذا الجهد في الكيمياء الطبية مجموعة واسعة من الجيل الأحدث من الفلوروكينولون (الجيلين الثالث والرابع) التي تتمتع بأطياف نشاط أوسع وفعالية أكبر وانتشار أقل للمقاومة؛ سبارفلوكساسين Sparfloxacin وموكسيفلوكساسين moxifloxacin، هما المركبان الأكثر شهرة في الجيلين الثالث والرابع، على التوالي، والتروفافلوكساسين trovafloxacin و الجريبافلوكساسين grepafloxacin التي تعد اقل كفاءة من الفئات الأخرى (Ahuja *et al.*, 2012 ; Bonev & Brown , 2019 ; Bush *et al.*, 2020).

1-2-1 الخواص الكيميائية للكينولونات :

حصلت تغييرات كبيرة عن طريق ربط ذرة الفلور في الموضع 6 (الفلوروكينولونات) وحلقة البيبرازين في الموضع رقم 7. واستناداً إلى بنيتها الكيميائية، يمكن تقسيم هذه المشتقات على أربع فئات:

1. Naphtyridine ويشمل : (حمض الناليديكسيك nalidixic acid، إنوكساسين enoxacin، جيميفلوكساسين gemifloxacin و توسوفلوكساسين tosofloxacin).

2. Cinnoline ويشمل : (سينوكساسين cinoxacin).

3. Pyridopyrimidine ويشمل : (حمض بيبيميديك pipemidic acid و حمض بيروميديك piromidic acid).

4. 4-Quinolone ويشمل : (حمض الأوكسولينيك oxolinic acid، فلوميكوين flumequine، نورفلوكساسين norfloxacin، سيبروفلوكساسين ciprofloxacin، أوفلوكساسين ofloxacin، ليفوفلوكساسين levofloxacin، سبارفلوكساسين sparfloxacin، وغيرها). استناداً إلى الطيف المضاد للميكروبات والخصائص الدوائية، تم التعرف على أربعة أجيال من الكينولونات (Pham *et al.*, 2019 ; Măciucă *et al.*, 2020)

1-2-2 آلية عمل الكينولونات :

لقد تم تفضيل استخدام الكينولونات كمضادات حيوية لأكثر من خمسة عقود بسبب فعاليتها العالية ونطاق نشاطها الواسع وتوافرها البيولوجي وتركيباتها الملائمة، فضلاً عن انخفاض معدلات حدوث آثار جانبية أثناء الاستخدام في إصابات الجهاز الهضمي، و الجهاز العصبي المركزي (Pham *et al.*, 2019).

يمكن أن تستهدف الكينولونات اثنين من الإنزيمات البكتيرية الأساسية (DNA gyrase و topoisomerase IV)، وكلاهما يحتوي على أربع وحدات فرعية وحدتين من *GyrA* و *GyrB* لأنزيم DNA gyrase و وحدتين من *ParC* و *ParE* لأنزيم topoisomerase IV ; يمكن للإنزيمات نقل منطقة واحدة من شريط DNA المزدوج إلى منطقة أخرى، ومن ثمّ يسمح للكينولونات بتشكيل معقدات انزيمية مع DNA، تمنع هذه المعقدات حركة شوكة التضاعف (replication forks) وعملية النسخ (transcription)، و بالتالي تمنع نمو البكتيريا (Tang & Zhao, 2023).

تلتقط الكينولونات انزيمي DNA gyrase و DNA topoisomerase IV مما يؤدي إلى كسر الحمض النووي، ومن جانب آخر، يحفز تجزئة الكروموسوم التراكم المفرط للمركبات المرتبطة بأنواع الأوكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species (ROS) شديدة السمية والتي تعد الأسباب الرئيسية لموت الخلايا البكتيرية (Drlica *et al.*, 2009).

يسبب كسر الحمض النووي المزدوج (DNA double-strand break (DSB) تلفاً مميتاً للحمض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين، اذ تساهم الكينولونات في DSB عن طريق الارتباط بالموقع النشط لأنزيمات topoisomerase type II بعد انقسام الحمض النووي لتشكيل معقد إنزيم – الكينولون quinolone-enzyme complex الذي يعطل إعادة اتصال الحمض النووي المتحلل (Wohlkonig *et al.*, 2010).

إنّ لمركبات الكينولون وضعين لتأثير الدواء القاتل، التفسير المفرط للـ DNA، وتراكم انواع ROS السامة بشكل كبير، في حالات معينة يمكن ان يعاد تضاعف DNA مجدداً في الخلية البكتيرية بعد ازالة تأثير الدواء، وان هذا النوع من التثبيط لا يعني بالضرورة قتل الخلايا بسرعة، اذ يمكن للإنزيمات بعد إزالة تأثير الدواء ان تغيير طوبولوجيا الحمض النووي عن طريق تقليل DSBs، وعبور الأزواج الآخر (أو منطقة اخرى من نفس الأزواج)، ثم إصلاح الكسر (Drlica & Zhao , 2021).

يشير وجود أنماط متعددة لتأثير الدواء القاتل إلى أن تركيز الدواء وزمن الوصول هما عاملان مهمان ويجب أخذهما في الاعتبار، مثلاً عندما يتباطأ ايض الخلية أثناء الجوع أو طور الثبات، فإنّ ادوية مثل سيبروفلوكساسين ciprofloxacin تكون قاتلة لأعداد كبيرة من البكتيريا عن طريق تحفيز تجزئة الكروموسوم بشكل اكبر (Liu *et al.*, 2012).

1-2-2-1 انزيم Topoisomerase IV :

يتم تصنيف إنزيمات (topoisomerase) إلى نوعين رئيسيين، النوع الأول (type I) والنوع الثاني (type II) من topoisomerase، بناءً على قدرتها على تقطيع أحد أو كلا شريطي الحمض النووي (DNA)، على وفق التماثلات وآليات التفاعل، يمكن تقسيم التوبويزوميراز من النوع الثاني إلى مجموعتين فرعيتين: النوع IIA (تشمل topoisomerase IV و DNAgyrase) والنوع IIB (ويشمل topoisomerase VI و topoisomerase VIII) (Dasgupta *et al.*, 2020).

انزيم topoisomerase IV تم اكتشافه في بكتريا *E.coli* عام (1990) م، عبارة عن مركب متغاير (~ 308 كيلو دالتون، يتكون من وحدتين فرعيتين ParC (84 ~ كيلو دالتون) ووحدتين فرعيتين ParE (70 ~ كيلو دالتون)، التي يمكن أن تخفف الالتفاف الفائق، بطريقة تعتمد على (ATP/Mg²⁺) السطح الخارجي للإنزيم مشحون بشحنة موجبة، مما يسهم في ربط الحمض النووي . تم اكتشاف جينات topoisomerase IV عن طريق عيوب في تقسيم

الحمض النووي، مما يشير إلى أن topoisomerase IV كان مشاركاً في عملية قطع وفصل الكروموسومات، وقد تم دعم ذلك عن طريق نظام النسخ المتماثل في المختبر والذي أظهر أن الانزيم كان فعالاً للغاية في فك ارتباط الكروموسومات البنيوية (daughter chromosomes) التي تمت مضاعفتها (McKie *et al.*, 2021).

يعد topoisomerase IV جزءاً من نظام متعدد البروتينات مطلوب لفصل الكروموسوم بكفاءة، ويعمل أيضاً على تكوين معقدات مع مركبات أخرى لتعزيز صيانة هيكل الكروموسوم (Kumar *et al.*, 2017). يقوم topoisomerase IV بفصل الحمض النووي، ويرخي اللفائف الفائقة الإيجابية والسلبية في وجود (ATP)، و يُظهر تفضيلاً قوياً لإرخاء الملفات الفائقة الإيجابية، ولكن المهمة الرئيسية هي فك الكروموسومات البنيوية المتشابكة (Hirsch & Klostermeier, 2021).

يعتبر topoisomerase IV أيضاً أكثر نشاطاً بحوالي مئة مرة في بكتريا *E. coli* من DNA gyrase، بالمقابل فإنّ DNA gyrase يعد ضروري لنشاط topoisomerase IV، وإنّ نشاط الانزيمين معاً يكون افضل من نشاط كل انزيم لوحده (Bush *et al.*, 2015).

1-2-2-2-1 انزيم DNA gyrase :

تستهدف الكينولونات quinolones أنواع التوبوزوميراز topoisomerase البكتيرية (topoisomerase IV و DNA gyrase)، ووظيفة هذه الانزيمات تعديل الحالة الحلزونية الفائقة للكروموسوم البكتيري، وتزيل الالتفاف الفائق الإيجابي الذي يتراكم قبل شوكات النسخ ومعقدات النسخ، وتزيل التشابكات والعقد من الجينوم، وينظم كل من topoisomerase IV و DNA gyrase طوبولوجيا الحمض النووي عن طريق تمرير حلزون مزدوج سليم عن طريق فاصل عابر الذي يتم توليده في جزء ثاني من الحمض النووي. وللحفاظ على السلامة الجينومية أثناء قطع الحمض النووي، تشكل الإنزيمات روابط تساهمية بين بقايا tyrosine في الموقع النشط وأطراف DNA-5' المولدة حديثاً (Bush *et al.*, 2020 ; Dalvie & Osheroff , 2021 ; Dauda *et al.*, 2023).

انزيم DNA gyrase يتميز بقدرته على إدخال لفائف فائقة سلبية في وجود (ATP) في الحمض النووي المزدوج المغلق تساهمياً، اذ يستخدم DNA gyrase أيضاً التحلل المائي للـ ATP لإرخاء اللف الفائق الموجب لـ DNA، في تفاعل يعادل إدخال اللفائف الفائقة السلبية، لقد ثبت أنّ DNA gyrase قادر على عمل تفاعلات الأنهاء والتفكيك في وجود (ATP) أيضاً، علاوة على ذلك يمكن لـ DNA gyrase أن

يخفف الالتفاف الفائق السالب في التفاعل بشكل مسـتقل عن ATP (Bush et al., 2017).

إنزيم DNA gyrase هو المسؤول عن جميع العمليات في البكتيريا التي تتطلب اللف الفائق السلبـي، بما في ذلك ضغط الكروموسوم chromosome compaction، وإعادة التركيب recombination، كما أنه المسؤول أيضاً عن حل الملفات الفائقة الإيجابية غير المرغوب فيها قبل شوكلات النسخ أو قبل بوليميريز الحمض النووي الريبـي (RNA polymerase) أثناء النسخ (Dorman & Dorman, 2016 ; Seol & Neuman, 2016).

1-2-2-2-1 الوحدات الفرعية (*GyrA* & *GyrB*)

DNA gyrase A & DNA gyrase B

1-2-2-2-1-1 الخصائص العامة والتركيب :

إنّ DNA gyrase هو إنزيم بكتيري أساسي، مما جعله هدفاً ناجحاً للعديد من المضادات الحياتية. يتكون DNA gyrase في *E. coli* من وحدتين فرعيتين من *GyrA* (97 كيلو دالتون) ووحدين فرعيتين من *GyrB* (90 كيلو دالتون) مشفرة بوساطة جينات (*gyrA* و *gyrB*)، على التوالي، ويتم تنظيمهما على شكل [heterotetramer A2B2]. ويتم التحكم في نسخ جينات *gyrA* و *gyrB* نفسها عن طريق مستوى اللف الفائق في نظام الاسترجاع ذاتي التنظيم، (Dorman & Dorman, 2016 ; Bush et al., 2017) يمكن تقسيم كل من وحدتي *GyrA* و *GyrB* الفرعيتين إلى نطاقين، N-terminal domain (NTD) و C-terminal domain (CTD) (Baker et al., 2011).

1-1-1-2-2-2-1 تركيب *GyrA* :

يتكون *GyrA* من نطاق طرفي N-terminal domain NTD بقدره 59 كيلو دالتون مسؤول عن تكسر الحمض النووي، و 35 كيلو دالتون C-terminal domain CTD الذي يغلف الحمض النووي. ويمكن تقسيم نطاق 59 كيلو دالتون أيضاً إلى نطاقات البرج tower او الكتف shoulder، والحلزونات المجنحة winged-helix، ونطاق الملف اللولبي-coiled coil (Bush et al., 2017). يعد نطاق 35 كيلو دالتون ضرورياً لقدرة DNA gyrase على تكوين الالتفاف الفائق السلبـي للحمض النووي DNA ويحول حذفه إنزيم DNA gyrase إلى إنزيم تقليدي (DNA-relaxing) مثل توبو IV (Bush et al., 2015).

بشكل عام، الوحدة الفرعية (A) تشارك في التفاعلات مع الحمض النووي، وتحتوي على التايروسين (tyrosine) في الموقع النشط المسؤول عن كسر وإعادة ربط شريط الحمض النووي المزدوج، وتحتوي الوحدة الفرعية (B) على الموقع النشط ATPase المسؤول عن توفير طاقة كافية للالتفاف الفائق للحمض النووي (Kumar *et al.*, 2023).

1-2-2-2-1-1-2 تركيب Gyr B :

تتضمن *GyrB* في بكتريا *E.coli* على N-terminal domain (NTD) 43 كيلو دالتون و C-terminal domain (CTD) 47 كيلو دالتون، الأول مسؤول عن ربط ATP والتحلل المائي بينما يتفاعل الأخير مع *GyrA* و DNA، ويمكن تقسيم نطاق *GyrB* البالغ 47 كيلو دالتون الى نطاقين فرعيين، نطاق (TOPRIM) وذيل (tail) (Fu *et al.*, 2009 ; Schoeffler *et al.*, 2010).

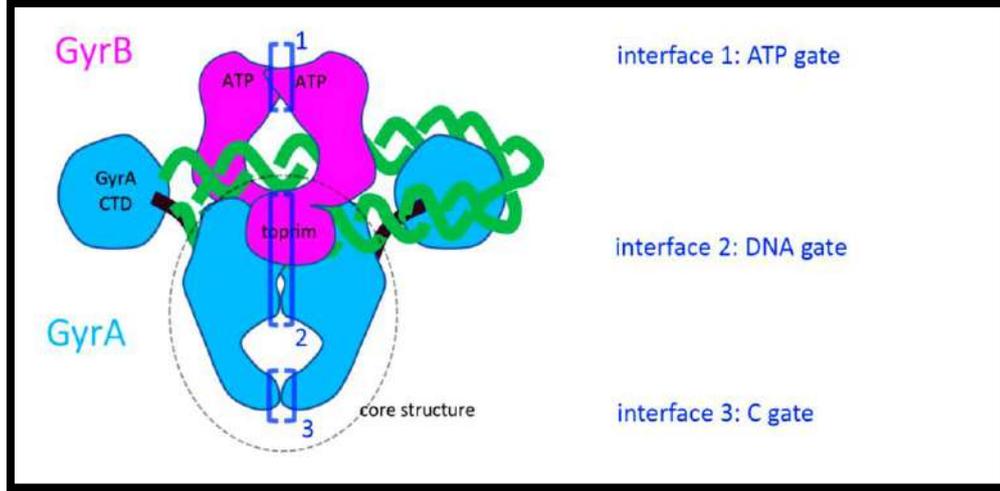
أول بنية لنطاق gyrase تم تحديدها كانت بنية N-terminal (43-kDa) domain لـ *GyrB*، الهيكل عبارة عن (dimer)، يتكون كل مونومر من موقع ربط ATP للطرف N (الأحماض الأمينية من 2 إلى 220) وجزء للطرف C) يشكل جدران تجويف مركزي $\sim 20\text{Å}$ ، ومن المحتمل أن يكون كبيراً بما يكفي لاستيعاب مزدوج الحمض النووي (Piton *et al.*, 2010).

يحتوي الجزء الطرفي (N) على بقايا متضمنة في الاتصالات dimer (الأحماض الأمينية 2 إلى 15) اثنان من تلك البقايا تتفاعل مع ATP. يُبطن التجويف المركزي الذي يتكون من الجزء الطرفي (C) ببقايا أرجينين arginine موجبة الشحنة. كشفت دراسات الطفرات أن واحداً على الأقل من هذه البقايا مهم لربط الحمض النووي (Bush *et al.*, 2017).

تم تحديد بنية النطاق الطرفي (C) من *GyrB* في *E.coli*، وقد تبين أيضاً أن هذه الهياكل عبارة عن dimers تشكل بنية تشبه السلطعون (crab-like) مع نطاقات TOPRIM الكروية التي تشكل الجسم (body) ونطاقات الذيل الممتدة للخارج لتبدو تشبه المخلب (claw-like). ترتبط النطاقات بمنطقة حلقة حلزونية. يحتوي نطاق TOPRIM على ثلاث بقايا حمضية مسؤولة عن ربط أيون المغنسيوم الضروري لتفاعل الانقسام والارتباط cleavage – relegation (Piton *et al.*, 2010 ; Bush *et al.*, 2017).

يحتوي الغلاف الجزيئي لـ *gyrB* على شكل "الشرغوف" (tadpole)، مع هيكل نطاق ATPase لـ *gyrB* في رأس هذا المغلف والباقي يتكون من طية TOPRIM ونطاقات الذيل الفرعية، كشف التحقيق بواسطة الطرد المركزي الفائق التحليلي أن *gyrB* وعلى عكس *gyrA*،

هو في الغالب مونومر (monomer) في المحلول، تم تأكيد ذلك عن طريق بيانات SAXS و cryo-EM، والتي تشير ضمناً إلى أن نطاقات ATPase لـ *gyrB* متموضعة فوق الموقع النشط لانقسام الحمض النووي بزواوية تتراوح بين (60 و 105) درجة، وبالتالي فإن *gyrB* يقع فوق *gyrA* في المعقد، تشير البيانات أيضاً إلى أن نطاق ATPase يميل بزواوية (15 إلى 20) درجة باتجاه أحد نطاقات محطة C في *gyrA*، كما موضح في الشكل (1-6) (Costenaro *et al.*, 2007 ; Baker *et al.*, 2011 ; Papillon *et al.*, 2013).



الشكل (1-6) يبين التركيب الهيكلي للـ DNA Gyrase (*GyrA – GyrB*) (Germe *et al.*, 2024).

1-2-2-3 آلية تثبيط الانزيم من قبل الكوينولونات واستهداف المواقع الفعالة لـ *gyrA* و *gyrB* :

تستهدف فئة الفلوروكينولونات fluoroquinolone النوع الثاني من انزيمات التوبوزوميراز وهي *gyrase* و *topoisomerase IV*، حيث تقوم هذه الإنزيمات بالنقاط جزء من الحمض النووي وتثنيه وتقسيمه (Bush *et al.*, 2020).

لبدء تفاعل انقسام الحمض النووي، تعمل بقايا التايروسين tyrosine في الموقع النشط على هيكل DNA ؛ مما يولد رابطة تساهمية بين الإنزيم و 5-terminal phosphate المنشأ حديثاً من الحمض النووي المكسور (Chen *et al.*, 2013 ; Adams *et al.*, 2019) و يُعرف المركب المتكون من هذه العملية بإسم "معقد الانقسام" cleavage complex (Gibson *et al.*, 2018 ; Collins *et al.*, 2024).

تعمل الفلوروكينولونات على تثبيت معقد الانقسام عن طريق إدخالها في روابط القابلة للامتداد او (المقصية) scissile bonds المكسورة على كلا شريطي الحمض النووي (جزء دواء واحد لكل شريط DNA)، وبالتالي تثبيط ربط الحمض النووي وزيادة مستويات انقسام DNA (Basarab , 2018 ; Collins *et al.*, 2024).

عندما تقترب شوكلات النسخ ومعقدات النسخ من معقدات (الدواء - gyrase و topoisomerase IV) المستقرة يصبح من غير الممكن إعادة ربط الحمض النووي المقطوع بواسطة تلك الإنزيمات، ومن ثم يتم تحويله إلى فواصل كروموسومية مستمرة (McKie *et al.*, 2021). وعليه إذا لم تتمكن عمليات إعادة تركيب الحمض النووي وإصلاحه من حل انقطاعات الحمض النووي هذه، فإنّ البكتيريا تبدأ مسارات موت الخلايا (Maslowska *et al.*, 2019).

نظراً لأنّ الفلوروكينولونات تضعف ربط topoisomerase IV/gyrase، فإنّها تمنع أيضاً تحفيز الإنزيم وتسلب الخلية الوظائف الأساسية لإنزيمات النوع الثاني topoisomerase II، وبالتالي فإنّ انخفاض نشاط الإنزيمات يؤثر على عمليات الحمض النووي المتعددة، بما في ذلك تكرار الحمض النووي وفصل الكروموسوم الابن، مما يبطئ نمو الخلايا ويمكن أن يؤدي إلى موت البكتيريا تدريجياً (Collins *et al.*, 2024).

على وفق ما تحدده الدراسات الهيكلية والكيميائية الحياتية، فإنّ قناة الارتباط الرئيسية بين الفلوروكينولونات و topoisomerase IV / gyrase هي جسر أيوني مائي ومعدني، يبدأ الجسر C3/C4 بحمض الكيتو (keto acid) من الفلوروكينولون، الذي يخلب chelates أيون معدن ثنائي التكافؤ Mg^{+2} غير محفز يتم تنسيقه بواسطة أربع جزيئات ماء (Blower *et al.*, 2016 ; Aldred *et al.*, 2012)، يرتبط اثنان من جزيئات الماء هذه برابطة هيدروجينية مع السيرين serine (تم تحديده في الأصل باسم Ser83 في *GyrA* لبكتيريا *E. coli*) وبقايا حمضية مكونة من أربعة أحماض أمينية وبقايا حمضية مثل Asp87 (Spencer & Panda, 2023) وعلى الرغم من أن هذا الجسر الأيوني المائي المعدني يعدّ سمة عالمية لتفاعلات الفلوروكينولون - topoisomerase IV/gyrase، إلا أن استخدام الجسر يختلف من إنزيم إلى إنزيم ومن نوع إلى آخر، ويمكن للجسر أن يلعب أدواراً مهمة في ربط الفلوروكينولون أو تحديد موضعه (Aldred *et al.*, 2014 ; Gibson *et al.*, 2018 ; Collins *et al.*, 2024). على سبيل المثال، يتفاعل سيبروفلوكساسين مع (*gyrA*) عن طريق روابط الهيدروجين مع بقايا Lys42 و Asp87 و Arg91، و تعد القدرة على إنشاء روابط هيدروجينية واتصالات كارهة للماء من العوامل الحاسمة التي تحدد ما إذا كانت ligand مناسبة لموقع الربط. ونظراً لأن Asp و Glu لهما سلاسل جانبية مشحونة بشحنة سالبة، فإنّ استبدال Asp بـ Glu له تأثير أقل وضوحاً على ارتباط السيبروفلوكساسين، مقارنة بالارتباط الوثيق لذرة الفلور من سيبروفلوكساسين مع Asp87 مما يعزز فرضية ارتباط الدواء بتلك المواقع الفعالة وان حدوث طفرات كهذه من شأنها تعزيز مقاومة الدواء. وكذلك الحال يتفاعل حمض الناليديكسيك مع *gyrA* عن طريق روابط الهيدروجين مع بقايا Arg91

Gln94 وتفاعل كاره للماء مع بقايا Asp87 و Phe96 و Ser111 عن طريق روابط هيدروجينية أضعف من بقايا Arg و Gln (Pazhani *et al.*, 2011 ; Mehla & Ramana, 2016)

يوجد داخل جين (*gyrB*) الخاص ببكتريا *E.coli* موقعان لارتباط الكوينولونات هما Asp426 و Lys447، وكما هو الحال في بقايا الأحماض الأمينية في (*gyrA*) التي لها سلاسل جانبية مشحونة بنفس الشحنة فإن استبدال الأسبرجين Asp ب Asn او استبدال Lys ب Glu يمنح البكتريا مقاومة للأدوية التي ترتبط ب Asp و Lys (Finstad , 2022).

يقترح أحد النماذج لجيب الربط كمناطق رئيسية Asp-426 و Lys-447 من *gyrB*، حيث تتفاعل مع الهيكل الفوسفوري للحمض النووي من جهة ومجموعة C-7 من السيبروفلوكساسين، ويشير هذا الاقتراح إلى أن جزيء المضاد الحيوي يعمل كعامل مضمن؛ مما يثبط الإنزيم. ولذلك فإن أي طفرات في منطقة ترميز الجيروسكوب تؤدي إلى تغيرات هيكلية، مما قد يؤثر على استقرار المركب ونشاط جزيء الكوينولون (Heddle & Maxwell, 2002 ; Vernon, 2019)

في العقود الأخيرة، تمت دراسة مثبطات ATPase لـ DNA gyrase و topoisomerase IV على نطاق واسع من قبل العديد من شركات الأدوية (Barančoková *et al.*, 2018)

تمتلك جميع فئات مثبطات (ATP) تفاعلات متماثلة في مواقع الارتباط كونها تحتوي على نموذج مانح ومستقبل لرابطة الهيدروجين الذي يتفاعل مع Asp73 (باستخدام ترقيم الإشريرية القولونية *GyrB*) وجزيء الماء المرتبط به، وجزء عطري يشكل تفاعل الكاتيون مع بقايا الأرجنين (Durcik *et al.*, 2019).

تم تطوير العديد من العلاجات من مطلع الخمسينات ولغاية اليوم التي تثبط نشاط ATPase للوحدة الفرعية *GyrB* مثل نوفوبيوسين novobiocin، الذي يثبط بشكل عكسي DNA gyrase، وبدرجة أقل، topoisomerase IV، عن طريق حجب موقع ATPase؛ ومن ثم يمنع ربط ATP، والتمثيل الغذائي وإطلاق ADP، وباقي الإجراءات المرتبطة بالدورة التحفيزية لنشاط DNA gyrase (Grossman *et al.*, 2023).

في السنوات الماضية، ازداد الاهتمام بتصميم مثبطات جزيئية صغيرة (ATP-DNA gyrase)، تم تصنيع مجموعة واسعة من الروابط الجديدة ذات الوزن الجزيئي المنخفض التي تتنافس مع ارتباط ATP بـ *GyrB*، وأظهرت أنها تظهر نشاطاً مضاداً للبكتيريا. تتمتع المركبات المضادة للبكتيريا التي تستهدف موقع ربط ATP لـ *GyrB*

بكفاءة كبيرة بسبب وجودها فقط في الخلايا البكتيرية ; (Collin *et al.*, 2011 ; Tomašić & Peterlin Masic , 2014).

يُعتقد أن بعض الادوية تشارك كمستقبل ومانحة لذرة الهيدروجين للرابطة الهيدروجينية في موقع (Asp73) النشط وجزء الماء المرتبط بإحكام في الموقع النشط للإنزيم، في حين أن بعض الآخر يمتلك العديد من الأجزاء العطرية التي يمكن أن تمتد خارج جيب ربط ATP وتشكل تفاعلات π -cation إضافية مع بقايا (Arg136) المحفوظة والمترجمة عند مدخل جيب ربط ATP، أو يمكن أن تشارك في تفاعلات رابطة الهيدروجين مع (Arg76) على مقربة من بقايا الأرجينين الأولى، ويعتقد إنَّ التيروسين (tyrosine) الكاره للماء يعمل كرابط للأحماض الأمينية والذي يمكن أن يمتد إلى منطقة أكثر انفتاحاً وكارهة للماء في جيب ربط حلقة الريبوز وقد يشارك في تفاعلات الرابطة الهيدروجينية بين مجموعة OH الفينولية وواحدة من مجموعتي الأرجينين (Arg76 و Arg136) في موقع الربط (Cotman *et al.*, 2017).



الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods



Materials and Methods

2- المواد وطرائق العمل

1-2 المواد والأجهزة المستعملة

Equipment and instruments

1-1-2 الأدوات والمعدات

استعملت الأدوات والمعدات في الدراسة الحالية كما في الجدول 1-2:

الجدول 1-2 الأدوات والمعدات والشركات المصنعة لها

الشركة المصنعة	المنشأ	المعدات		ت
Labtech	Korea	Autoclave	المؤصدة	1
AFCO	Jordan	Petridish	أطباق للوسط الزرعي لنمو البكتريا	2
AFCO	Jordan	Plastic test tubes 10ml	أنابيب اختبار بلاستيكية	3
Eppendorf	Germany	Micro tubes and Tips	أنابيب صغيرة واطراف	4
Applied Biosystem	USA	Thermo cycler (PCR)	جهاز التدوير الحراري (تفاعل البلمرة المتسلسل)	5
Cocord	lebanon	Refrigerator	ثلاجة	6
Concord	Lebanon	Freezer(-20°C)	جهاز التجميد(مجدة)	7
Cleaver scientific	England	Gel electrophoresis	جهاز الترحيل الكهربائي	8
GFL	Germany	Water distilator	جهاز التقطير	9
Sigma	Germany	Centrifuge	جهاز الطرد المركز	10
Thermo scientific	USA	Cool micro centrifuge	جهاز الطرد المركزي المبرد	11
Labnique	USA	Vortex mixer	جهاز المازج	12
Thermo scientific	USA	DNA Nano drop one	جهاز قياس تركيز الدنا	13
Binder	Germany	Incubator	حاضنة	14
Memmert	Germany	Water Bath	حمام مائي	15
Boekel	USA	Test Tube and micro tubes Racks	حوامل الانابيب التجريبية والانابيب الميكروية	16
RONGTA	China	Urine container	عبوة لجمع الإدرار	17
Biobase	China	Laminer Air flow unit (Hood)	كابينة الزرع	18

Canon	England	Digital camera	كاميرا رقمية	19
Vitalmed	China	Tongs	كماشات	20
Dragonlab	USA	Micropipettes	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة	21
Novel	India	Light microscope	مجهر ضوئي	22
AFCO	Jordan	Sterilize Cotton Swabs with Wooden Sticks	مسحات قطنية معقمة مع عيدان خشبية	23
Labtech	korea	Magnetic and Hot plate stirrer	مسخن حراري ممغنط	24
Syngene	England	UV trans illuminator	مصدر للأشعة فوق البنفسجية	25
Hirschman	Germany	Class slides ,cover slides,Flasks and Beakers	معدات زجاجية	26
Medentra	England	Forceps	ملاقط	27
Hanchen	Germany	Sensitive electric balance	ميزان حساس الكتروني	28
Himedia	India	Inoculating metal loop	ناقل معدني	29
Whatman	England	Filter paper	ورق ترشيح	30

Chemicals materials

2-1-2 المواد الكيميائية

استعملت المواد الكيميائية والمحاليل في هذه الدراسة كما في الجدول 2-2

الجدول 2-2 المواد الكيميائية او المحاليل والشركات المصنعة لها :

الشركة المصنعة	المنشأ	المادة الكيميائية	ت
Bioneer	Korea	100 bp DNA ladder (DNA marker)	الدليل الجيني للدنا
Voulis	Greece	Deionize water	ماء منزوع الايونات
Himedia	India	Mc farland 1tube 0.5 solution	محلول ماكفرلاند
SRL	India	Microscope immersion oil	زيت غمر عدسات المجهر
Bioneer	Korea	Nuclease-free water	ماء خالي من انزيمات النيوكليز
aculife	India	Sterilised water for injection	ماء معقم جاهز للحقن
Marliju	Korea	Agarose	الاكاروز
Alkafeel	Iraq	Ethanol 70 %	كحول اثيلي
Bioneer	Korea	Absolute ethanol 99 %	كحول اثيلي مطلق
BDH	England	Glycerol	كليسيرول
London medicals	India	Saline solution Normal	محلول ملحي

culture media

3-1-2 الأوساط الزرعية

استعملت الأوساط الزرعية في هذه الدراسة كما في الجدول 3-2

الجدول 3-2 الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة

ت	الوسط الزراعي	المنشأ	الشركة المصنعة
1	وسط اكار ايوسين مثلين الازرق Eosin mythelene blue	England	Oxiod
2	وسط اكار الحديد كليجلر Kligler iron agar	India	Himedia
3	وسط اكار مولر هنتون Muller hinton agar	England	Oxiod
4	وسط اكار الماكونكي MacConkey agar	India	Himedia
5	وسط اكار الدم Blood agar	England	Oxiod
6	وسط اكار المغذي Nutrient agar	England	Oxiod
7	وسط مرق نقيع الدماغ والقلب infusion broth Brain Heart	India	Himedia

Solutions and reagent

4-1-2 المحاليل والكواشف

استعملت المحاليل والصبغات والكواشف في هذه الدراسة كما في الجدول 4-2

الجدول 4-2 المحاليل والصبغات و الكواشف المستعملة في الدراسة

ت	الصبغات والكواشف والمحاليل	المنشأ	الشركة المصنعة
1	كاشف كوفاتس Kovac's reagent(TDA reagent)	France	Biomerieux
2	صبغة الاثيديوم برومايد Ethidium bromide	USA	Sigma
3	كاشف الكاتالاز Catalase reagent	England	BDH
4	كاشف المثيل الاحمر Methyl red reagent	India	Himedia
5	كاشف فوكس-بروسكاو Voges-Proskauer (VP) reagent (VP1-VP2)	France	Biomerieux
6	محلول التحميل Loading dye	Korea	Bioneer
7	محلول دارئ الترحيل الكهربائي Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)	Korea	Marliju

Antibiotics

5-1-2 المضادات الحيوية

استعملت اقراص المضادات الحيوية في هذه الدراسة كما في جدول 5-2

الجدول 5-2 اقراص المضادات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة

المنشأ	الشركة المصنعة	تركيز المضاد الحيوي مايكروغرام/القرص	الرمز	المضاد الحيوي	ت
Turkey	Bioanalyse	NA	30mcg	Naldixic acid	1
		CIP	5mcg	Ciprofloxacin	2
		LEV	5mcg	Levofloxacin	3
		GAT	5mcg	Gatifloxacin	4
		AK	30mcg	Amikacin	5
		AMP	10mcg	Ampicillin	6
		TE	30mcg	Tetracyclin	7
		CTR	30mcg	Ceftriaxone	8
		COT	25mcg	Co-Trimethoprim	9
		IMP	10mcg	Impenem	10

Kits

6-1-2 العدد المختبرية

استعملت العدد المختبرية (Kits) في هذه الدراسة كما في الجدول 6-2

الجدول 6-2 العدد المختبرية Kits المستعملة في التجربة

الشركة المصنعة	المنشأ	المكونات	العدة (Kits)	ت
Geneaid	Korea	<ul style="list-style-type: none"> • GT buffer 30ml • GB buffer 40ml • W1 buffer 45ml • Wash buffer 25ml+100 Ethanol • protinase k 11mg • Elution Buffer 30ml • GD column 100pcs • 2 ml collection tubes 200pcs 	عدة استخلاص الحمض النووي Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit	1
Bioneer	Korea	<ul style="list-style-type: none"> • Top DNA polymerase 1U • dNTPS (dATP-dCTP-dGTP-dTTP) • Reaction buffer with 1.5mm Mgcl2 • Stabilizer and tracking dye 	PCR Accupower Premix (96 tubes)	2
Biolab Diagnostics	India	<ul style="list-style-type: none"> • Crystal violet 100ml • Acetone Alcohol 100ml • Iodine 100ml • Safranin 100ml 	Gram's stain Kit	3

Primer sequence

7-1-2 تسلسلات البوادي

استعملت تسلسلات البوادي في هذه الدراسة كما في الجدول 7-2

الجدول 7-2 تسلسلات البوادي (Primer sequence) المستعملة في التجربة

المصدر	الناتج (زوج قاعدي)	تتابع البادئ (5' - 3') Primer sequence		الجين	ت
أ.د حسن محمود موسى / في الدراسة الحالية 2023	998	F	ATATCGGCGACACGGATGAC	<i>gyr B</i> (القطعة الاولى) Segment 1	1
		R	TGCCAGCAGTTCGTTTCATCT		
	971	F	GTCGTTTCCGTGAAAGTGCC	<i>gyr B</i> (القطعة الثانية) Segment 2	2
		R	CTGCCGTGCTGTTCTTTGTC		

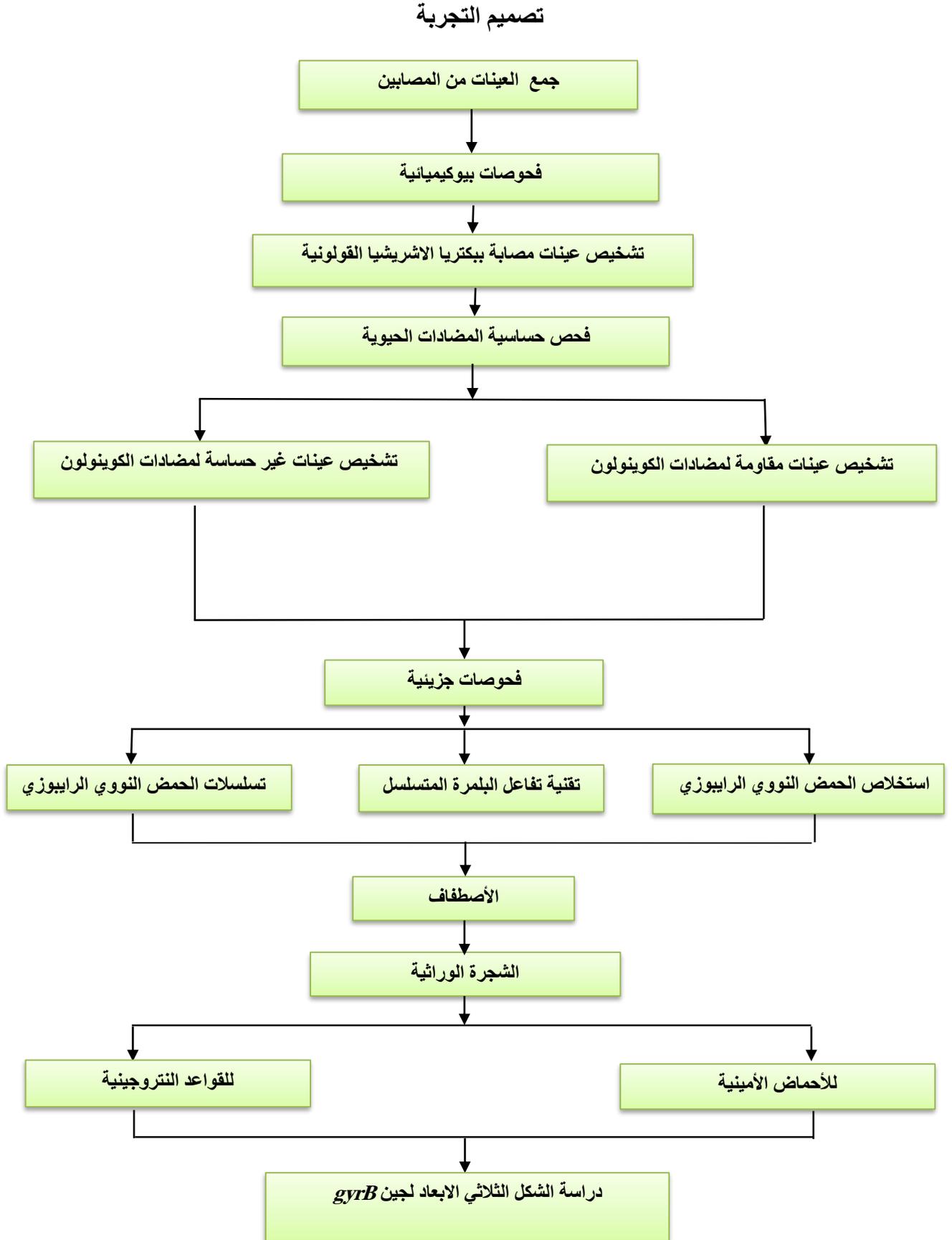
Programs and Websites

8-1-2 البرامج والمواقع

استعملت البرامج والمواقع في هذه الدراسة كما في الجدول 8-2

الجدول 8-2 البرامج والمواقع الالكترونية (Programs and Websites) المستعملة في التجربة

الاستخدام	البرنامج او الموقع	ت
لعمل اصطفاف Alignment للعينات	Mega 11	1
تحديد تشابه التسلسلات والشجرة الوراثية	Nucleotide blast	2
ترجمة النيوكليوتيدات الى احماض امينية	blastx	3
بناء نموذج ثلاثي الأبعاد لتسلسل البروتين	Phyre2	4
لصنع صورة البروتين مع بعض الإجراءات	UCSF Chimera	5
للإلتحام الجزيئي بين المضادات المقترحة والبروتين	1- click docking	6
للأحصاء	SPSS	7



Methods

2-2 طرق العمل

Samples collection

1-2-2 جمع العينات

تم جمع 223 عينة إدرار من المصابين بالتهابات المسالك البولية (ذكور واث) والذين تراوحت اعمارهم بين 6-77 سنة من المترددين على المستشفيات الحكومية والاهلية والعيادات الخاصة في محافظة كربلاء المقدسة [مستشفى مدينة الامام الحسين (ع) الطبية التعليمي، مستشفى الامام الحسن المجتبي(ع)، مستشفى النسائية والتوليد التعليمي، مستشفى كربلاء التعليمي للأطفال ومستشفى الامام الحجة (ع)] وتحت اشراف اطباء مختصين للفترة من 2023/8/3 الى 2023/11/25. تم جمع العينات، اذ تم استعمال حاويات خاصة للجمع (انبوبة بلاستيكية ذات غطاء) وتم زرعها مباشرة على الاوساط الزرعية (Vandepitte *et al.*, 2003).

Sterilization of culture media

2-2-2 تعقيم الاوساط الزرعية

عُقت جميع الاوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة بجهاز المؤصدة Autoclave بدرجة 121م وتحت ضغط 15 باوند/انج لمدة 15 دقيقة، وهذا جاء حسب التعليمات المثبتة على العلبة للشركة المصنعة ثم تم صبها في اطباق معقمة لتجنب التلوث بالإضافة الى انّ جميع الزجاجيات (glassware) عقت بفرن كهربائي في درجة 180 م لمدة ساعتين (Brown & Smith, 2017).

Preparation of culture media

3-2-2 تحضير الاوساط الزرعية

تم تحضير الاوساط حسب تعليمات الشركة المصنعة وبعد تعقيمها تم صبها في اطباق معقمة لتجنب تلوثها.

Blood agar

1-3-2-2 وسط اكار الدم

تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة، وذلك بإذابة 40غرام من اكار الدم في (1لتر) من الماء المقطر، وتم غليه؛ لكي يذوب تماما، ثم عقم بوساطة المؤصدة Autoclave وترك ليبرد بدرجة 45-50م بعدها اضيف له 7% من الدم (دم الاغنام)، وتم مزجه تماما مع الوسط، وتم صبه في اطباق Petri dishes واستخدم لتحديد قدرة البكتريا على تحلل الدم وايضاً لتنشيط نمو بكتريا *E. coli* قبل فحص API 20E (Hashim, 2020).

MacConkey agar

2-3-2-2 وسط اكار الماكونكي

تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة، وذلك بإذابة 52 غرام في 1 لتر من الماء المقطر، وتم غليه لكي يذوب تماماً، ثم عقم بوساطة المؤصدة Autoclave وترك ليبرد بدرجة 45-50م بعداً تم صبه في اطباق Petri dishes وهو يعتبر وسط انتقائي للبكتريا السالبة لصبغة غرام ووسطاً تفريقياً (يفرق هذا الوسط بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز اذ تظهر المستعمرات المخمرة بلون وردي)، واستخدم لدراسة الصفات المظهرية لبكتريا *E.coli*، ولتنشيط البكتريا قبل عملية استخلاص الحمض الريبوزي منقوص الاوكسجين (Basavaraju & Gunashree, 2022).

3-3-2-2 وسط اكار الأيوسين مثيلين الازرق (Eosin Methylene Blue Agar(EMB)

تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة، وذلك بإذابة 37.5 غرام في 1 لتر من الماء المقطر، وتم غليه، لكي يذوب تماماً ثم عقم بوساطة المؤصدة Autoclave وترك ليبرد بدرجة 50م، بعدها يتم رج الوسط من اجل اكسدة صبغة المثيلين الازرق(لاستعادة اللون الازرق)، ثم صبه في اطباق Petri dishes، واستخدم لتمييز بكتريا *E.coli* من اعضاء العائلة المعوية (Erjavec, 2023).

4-3-2-2 وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain-Heart Infusion Broth (BHI)

تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة، وذلك بإذابة 37 غرام في 1 لتر من الماء المقطر وتم غليه لكي يذوب تماماً ثم عقم بوساطة المؤصدة Autoclave وترك ليبرد بدرجة 45-50م، بعدها بدأ توزيعه داخل انابيب اختبار ذات غطاء واطافة الكليسيروول اليه، اذ استخدم لحفظ الطويل الأمد للعزلات البكتيرية (Babapour et al., 2016).

Nutrient Agar

5-3-2-2 وسط الاكار المغذي

تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة، وذلك بإذابة 23 غرام في 1 لتر من الماء المقطر، وتم غليه لكي يذوب تماماً ثم عقم بوساطة المؤصدة (Autoclave) وترك ليبرد بدرجة 45-50م بعداً تم صبه بأنابيب اختبار بصورة مائلة، حيث تم استخدامه لإدامة حيوية البكتريا المخزونة، والحفاظ على صفاتها الفسيولوجية لفترات (حفظ قصير الامد) (Basavaraju & Gunashree, 2022).

Reagents and solutions preparation 4-2-2 تحضير الكواشف والمحاليل

Reagents preparation 1-4-2-2 تحضير الكواشف

Oxidase reagent 1-1-4-2-2 كاشف الاوكسيديز

حضر الكاشف بإضافة 0.5 غرام من مادة (Diamine Tetra methyl p-phenylen) في 50 مل من الماء المقطر في قنينة معقمة ومعتمة. استخدم هذا الكاشف لمعرفة قدرة البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيديز (Hemraj *et al.*, 2013).

Catalase reagent 2-1-4-2-2 كاشف الكتاليز

حضر هذا الكاشف المتكون من بيروكسيد الهيدروجين (بتركيز 3%) من المحلول الاصلي (بتركيز 30%) وحفظ في قنينة معتمة، استخدم هذا الكاشف للكشف عن قابلية البكتريا لإنتاج انزيم الكتاليز (Tadesse & Alem, 2006).

Solution preparation 2-4-2-2 تحضير المحاليل

Tris Borate EDTA buffer(TBE) 1-2-4-2-2 محلول دارئ الترحيل

تم تحضير المحلول بحسب تعليمات الشركة المصنعة Marliju بأضافة 10 مل من المحلول (تركيز 10X) الى 90 مل ماء مقطر للحصول على تركيز (1X) من الدارئ ويحفظ في قنينة زجاجية معتمة ويحفظ في درجة 4 م° لحين الاستخدام.

Primers solutions 2-2-4-2-2 محاليل البوادي

حضرت محاليل البوادي على وفق التعليمات الشركة المصنعة Bioneer اذ تم إضافة 150 مايكروليتر من الماء المقطر منزوع الأيونات (Deionize water) الى البرايمر (برايمر الشركة المصنعة) للحصول على تركيز 100 بيكومول/ مايكروليتر اذ تم تحضير كل بادئ بصورة منفصلة عن البوادي الأخرى. بعدها تم اخذ 10 مايكروليتر من المحلول الذي تركيزه 100 بيكومول/مايكروليتر، واضيف له 90 مايكروليتر من الماء المقطر منزوع الأيونات ، وتم مزجه بوساطة جهاز Vortex، وحفظ بدرجة حرارة (-20) م° لحين استعماله.

McFarland 3-2-4-2-2 محلول العكورة ماكفرلاند

حضر هذا المحلول مختبريا كما يأتي :

- **المحلول (أ) :** اذيب 1.175 غرام من كلوريد الباريوم المائي $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ في 100 ملليتر من الماء المقطر المعقم.
- **المحلول (ب) :** اضيف 1 ملليتر من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 الى 99 ملليتر من الماء المقطر.

اضيف 0,5 ملليتر من المحلول (أ) الى 99.5 ملليتر من المحلول (ب) للحصول على عكورة بتركيز (1.5×10^8) خلية/ملليتر، ومزجت جيدا في قنينة زجاجية معتمة ومحكمة الغلق لمنع تبخرها وحفظت في مكان مظلم لحين الاستعمال (Vandepitte *et al.*, 2003).

Culturing method

5-2-2 طريقة الزرع

تم زراعة البكتريا على الاوساط الزرعية بطريقة التخطيط (streaking) ثم وضعت في الحاضنة بدرجة 37م (Carroll *et al.*, 2015).

Culture identification

6-2-2 التشخيص المزرعي

تم دراسة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية للعزلة البكتيرية بعد تنقيتها على الاوساط الزرعية (ماكونكي اكار، الايوسين مثيلين الازرق ووسط اكار الدم)، وتم دراسة كل من الحجم والشكل والقوام واللون (Wagner *et al.*, 2017).

Morphological test

1-6-2-2 الفحص المظهري

من أجل التعرف على شكل وترتيب الكائنات الحية الدقيقة باستخدام تقنية صبغة جرام (Gram stain Technique)، وتم وفقا لتعليمات الشركة المصنعة:-

1. تم وضع قليل من الماء المقطر فوق الشريحة (slide).
2. أخذنا مسحة بسيطة من البكتريا باستعمال الناقل المعدني فوق الماء المقطر بالشريحة.
3. نشرت (spreading) العينة البكتيرية باستعمال الناقل المعدني (loop) على الشريحة.
4. جففت العينة باستعمال هواء ساخن وثبتتها بالهيب (Heat fixation) باستخدام مصباح بنزن.
5. تم اضافة صبغة Crystal violet للعينة، وتركها لمدة دقيقة، ثم شطفها بالماء المقطر.
6. اضيف محلول Iodine (مثبت للون) للعينة، وتركه لمدة دقيقة واحدة بعدها يشطف بالماء المقطر.

7. تم غسل العينة بواسطة محلول الكحول او الأسييتون لإزالة اللون (Decolorizer) لمدة 20-30 ثانية.

8. تم إضافة صبغة Safranin (counter dye)، وتركها لمدة دقيقة ثم شطفها بالماء المقطر.

عندما تحتفظ الكائنات الحية الدقيقة بصبغة Crystal violet، فإنها تظهر باللون الأرجواني تحت الفحص المجهرى. عادةً ما يتم تصنيف هذه الكائنات الحية الدقيقة التي تحتفظ بالصبغة على أنها بكتيريا إيجابية الكرام. ومن ناحية أخرى، يُشار إلى الكائنات الحية الدقيقة التي لا تحتفظ بالصبغة البنفسجية البلورية بعد خطوة إزالة اللون (Decolorizer) باسم البكتيريا سالبة الكرام، ثم فحصت تحت المجهر الضوئي لرؤية شكل الخلايا وترتيبها والوانها تبعاً لتفاعلها مع صبغة غرام. (Levinson,2016)

Biochemical identification

2-6-2-2 التشخيص الكيموحيوي

Oxidase test

1-2-6-2-2 اختبار الاوكسيديز

تم نقل مستعمرة نامية على وسط الماكونكي بعد حضن 24 ساعة، ووضعت على ورقة ترشيع filter paper بواسطة عيدان خشبية wooden stick، وتم إضافة قطرة من كاشف الاوكسيديز المحضر مسبقاً. يعد تغير اللون الى الارجواني خلال 30-60 ثانية دليل على انتاج انزيم Cytochrome c Oxidase في البكتريا (Biswas & Rather, 2019).

Catalase test

2-2-6-2-2 اختبار الكتاليز

نقلت مستعمرة نامية على وسط اكار الماكونكي عمرها 24 ساعة على شريحة زجاجية معقمة وجافة بواسطة عيدان خشبية Wooden sticks معقمة، ثم اضيفت فوقها قطرة واحدة من كاشف الكتاليز بتركيز 3% يعد ظهور الفقاعات على سطح الشريحة الزجاجية دليل على انتاج انزيم الكتاليز (Hemraj et al., 2013).

3-2-6-2-2 اختبار API 20E

Analytical Profile Index 20 Enterobacteriaceae

هو نظام لتحديد البكتيريا المعوية. يحتوي كل نظام على 20 اختباراً كيميائياً مصغراً. وقاعدة بيانات يتضمن نظام API test من 20 اخدوداً صغيراً (Wells) يحتوي على مواد مجففة، تم حقن هذه الاخاديد بمعلق بكتيري بواسطة ماصة بلاستيكية

(Plastic transfer pipettes) أثناء الحضنة، ينتج الأيض الغذائي تغيرات في اللون تكون إما تلقائية (مباشرة بعد الحضان) أو يتم الكشف عنها عن طريق إضافة الكواشف بعد الحضان، وتتم قراءة التفاعلات بعد 18-24 ساعة من الحضان بدرجة 37 م° وحسب جدول القراءة التي يتم التعرف عليها عن طريق الرجوع إلى فهرست نظام API 20E تم تشخيص 60 عزلة على أنها بكتيريا *E. coli* (Jasim, 2020).

7-2-2 حفظ العزلات البكتيرية Preservation of bacterial isolates

1-7-2-2 الحفظ قصير المدى Short term preservation

تم زرع البكتيريا داخل الأنابيب بطريقة التخطيط والتي تحتوي على وسط الأكار المغذي Nutrient agar (الذي تم صبه بطريقة مائلة Slant)، وحضنت الأنابيب بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة، حيث تم تجديد العزلات شهرياً (MacFaddin , 2000).

2-7-2-2 الحفظ طويل المدى Long term preservation

هي وسيلة للحفاظ على العزلات على المدى الطويل عن طريق إضافة 15 مل من الكليسيروول إلى 85 مل من مرق نقيع الدماغ والقلب والذي تم توزيعه بعد ذلك عبر أنابيب معقمة، وبعد تركها لتبرد إلى درجة حرارة الغرفة، تم زراعة الأنابيب بمستعمرات من البكتيريا، وتم تخزينها عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة يليها تخزينها في درجة حرارة (-20) م°، مع العلم أن العزلات يمكن أن تعيش لمدة 6 - 8 أشهر تقريباً (MacFaddin , 2000).

8-2-2 اختبار حساسية المضادات الحيوية Antibiotics sensitivity test

تم اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية المختارة حسب الجداول القياسية في CLSI,2023 باستخدام طريقة Kirby-Bauer وكما يلي:-

1. تم نقل 3-5 من المستعمرات التي تم تنميتها على وسط أكار ماكونكي MacConkey agar لمدة 24 ساعة إلى أنبوبة تحتوي على 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline، وضبطت عكورة المحلول لتكون متوافقة مع عكورة محلول ماكفرلاند القياسي والذي يعادل (1.5 x 10⁸) خلية/مليلتر.
2. أدخلت المسحة القطنية المعقمة في الأنبوبة الحاوية على العالق البكتيري، وتم تدويرها وضغطها على الجدار الداخلي للأنبوبة؛ لإزالة اللقاح الزائد، بعد ذلك مرّرت المسحة

- على أطباق تحتوي على وسط أكار مولر- هنتون Muller Hinton agar عدة مرات وباتجاهات مختلفة للحصول على نمو متجانس.
3. تم وضع أقراص المضادات الحيوية بتوزيع متساوٍ ومنتظم على سطح الوسط المزروع بالبكتريا (خمسة أقراص لكل طبق)، بعدها تم ضغط الأقراص بلطف باستخدام الملقط المعقم، ثم وضعت الأطباق في حاضنة درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة.
4. باستخدام المسطرة، تم تسجيل نتائج قطر مناطق التثبيط حول الأقراص بالملمتر. قورنت النتائج مع الجداول القياسية (CLSI,2023).

9-2-2 استخلاص الحمض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين DNA Extraction

تم استعمال العدة الخاصة المجهزة من قبل شركة Geneaid الكورية لأستخلاص DNA، ثم تم استعمال جهاز قياس تركيز الدنا (DNA Nanodrop) لقياس نقاوة وتركيز الحمض النووي اذ تم:-

1. تحضير العينة (sample preparation): نقلت خلايا بكتيرية ما يقارب 1×10^9 الى انبوبة microcentrifuge قياس 1.5 مل ثم تم وضعها في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة (xg16000)، بعدها تم التخلص من الراشح الطاف، وتم اضافة 180 مايكروليتر من GT Buffer وتم إعادة تعليق المحلول بواسطة جهاز vortex او باستعمال ماصة (Pipette) وتم إضافة 20 مايكروليتر من محلول Protienase K (لهضم وتحطيم الروابط البيبتيدية للبروتينات) وحضنها في 6م° لمدة 10 دقائق على الاقل (خلال الحضانة تقلب العينة كل 3 دقائق).
2. التحلل (Lysis): تم إضافة 200 مايكروليتر من GB Buffer الى العينة، وخلطها بواسطة جهاز vortex لمدة 10 ثواني، وحضنت في الحاضنة بدرجة 70م° لمدة 10 دقائق، ثم إضافة 5 مايكروليتر من RNase A، ورجت بجهاز vortex وتركت في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
3. ربط الدنا (DNA Binding): اضيف 200 مايكرو ليتر من الايثانول المطلق الى العينة، ورجت بقوة باستعمال vortex ونقلت العينة الى انبوبة GD Column ووضعت داخل انبوبة اخرى حجم 2مل (collection tube) ووضعت في جهاز الطرد المركزي (x g 16000) لمدة دقيقتين، ثم تم التخلص من الراشح الموجود في الانبوبة ذات حجم 2مل ونضعها مرة اخرى (او استعمال انبوبة جديدة) وبداخلها انبوبة GD column.

4. الغسل (Wash): تم إضافة 400 مايكرو ليتر من محلول الغسل الاول W1 buffer الى انبوبة GD Column وتم وضعها في جهاز الطرد المركزي (16000 xg) لمدة 30 ثانية وتم التخلص من المحلول، ثم اضيف 600 مل من محلول الغسل الثاني Wash Buffer (بعد اضافة 100 مل ايثانول مطلق) الى GD Column وبعدها وضع في جهاز الطرد المركزي (16000 xg) لمدة 30 ثانية ايضا، وتم التخلص من المحلول الموجود في الانبوبة الجامعة (collection tube)، ونضع انبوبة GD column من جديد داخل الانبوبة (حجم 2مل) وباستعمال الطرد المركزي (centrifuge) لمدة 3 دقائق (16000 xg) لغرض تجفيف القالب (column matrix) الموجود داخل انبوبة GD column.

5. الاسترداد (Elution): تم نقل انبوبة GD column الجافة الى انبوبة (1.5 مل microcentrifuge tube) واطيف 100 مايكرو ليتر من Elution Buffer، وتم تركه لمدة 3 دقائق، وبعدها وضع في جهاز الطرد المركزي (16000 x g) لمدة 30 ثانية لاستخلاص الدنا النقي.

6. تم قياس تركيز DNA ونقاوته باستخدام جهاز DNA Nanodrop، اذ كانت نسبة نقاوة DNA (A260/A280) تتراوح بين (1.8-2) وكانت نسبة (A260/A230) تتراوح بين (2.2-2) وتركيز DNA تتراوح بين (20-50 نانو غرام/مايكرو ليتر).

10-2-2 تفاعل التضخيم لجين *gyrB* Amplification Reaction for *gyrB*

استعملت عُدّة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR Premix kit) لتضخيم جين *gyrB* حيث كان حجم التفاعل الكلي هو 20 مايكرو ليتر. يتألف من 5 مايكرو ليتر من مستخلص الحمض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين و1 مايكرو ليتر بتركيز 10 بكمول/مايكرو ليتر لكل من البوادىء (Reverse+Forward)، ثم إضافة 13 مايكرو ليتر من (Nuclease free water) ، بعدها وضع داخل جهاز Thermocycler، كما موضح في الجدول (2-9).

الجدول رقم (9-2) يبين المراحل ودرجة الحرارة وتوقيت كل مرحلة اثناء عملية تضخيم الجين

عدد الدورات	المرحلة	درجة الحرارة	الوقت
1	التحلل او التمسخ الاولي Initial denaturation	95°	5 دقيقة
35	التحلل او التمسخ Denaturation	95°	20 ثانية
	الالتحام او التلدن Annealing	55°	20 ثانية
	الاستطالة Elongation	72°	45 ثانية
1	التمدد النهائي Final extension	72°	5 دقيقة

11-2-2 الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis

المحاليل التالية أُعدت على وفق الوصف الذي قدمه (Sambrook & Rusell, 2001). اذ إنّ صبغة الأيثيديوم برومايد (florescent dye) استخدمت لرؤية وتصوير الحمض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين بعد تعرضه للأشعة فوق البنفسجية. وكان تركيزها (10ملغ/مل)، وهو متوفر تجارياً، ويحفظ في عبوة زجاجية معتمة. كذلك صبغة (DNA loading dye) متوفرة تجارياً.

طريق العمل:

1. تم تحضير جل الاكاروز بوساطة اذابة 1.5 غرام من مسحوق الاكاروز لكل 100مل من محلول TBE Buffer 1X و pH = 8، وتم وضعها داخل دورق مخروطي على صفيحة ساخنة (Hot plate) لحين الغليان بعدها ترك المحلول لكي يبرد عند درجة 50م.
2. اضيف 0.8 مايكروليتر من صبغة الايثيديوم برومايد للمحلول.
3. تم تثبيت مشط (comb) بلاستيكي في نهاية ووسط صفيحة خاصة (Tray) لعمل حفر او اخاديد (wells).
4. تم صب المحلول بلطف داخل الصفيحة Tray ثم تصلب بدرجة حرارة الغرفة بعد تركه لمدة زمنية من 15-30 دقيقة.
5. ازيل المشط بلطف من الصفيحة، وتم تثبيت الصفيحة ووضعها داخل حجرة جهاز Gel electrophoresis اذ كانت الحجرة تحتوي على محلول TBE buffer (40 مل) و Deionize water (360 مل) بالاعتماد على حجم الحجرة.

6. تم وضع 5 مايكروليتر من ناتج PCR لكل عينة في انبوبة Eppendorf مع اضافة 1 مايكروليتر من loading dye بعدها وضعت داخل الحفر الموجودة في جل الاكاروز
7. فولتية الجهاز تم تثبيتها على 60 فولت (4 فولت / سم) اذ ان المسافة بين قطب الكاثود (Cathode) و الأنود (Anode) هي 15 سم.
8. في النهاية وبعد الترحيل الكهربائي لمدة ساعة، تم نقل جل الاكاروز الى جهاز Ultraviolet Trans-illuminator (320 – 336 نانوميتر) للكشف عن الحزمة (Band)، وتم تصوير الجل بوساطة كاميرا رقمية بعد ظهور الحزم.

DNA Sequencing

12-2-2 التحليل التسلسلي للحمض النووي

تم إجراء تسلسل العينات بوساطة شركة Macrogen /كوريا الجنوبية، وتم عرض نتيجة التسلسل باستخدام برنامج MEGA11، لمعرفة تسلسل وعدد القواعد النتروجينية والأحماض الأمينية. وعن طريقه دراسة الروابط الوراثية بين الأنواع وفهم التنوع الجيني عن طريق مقارنة تسلسل العزلات المحلية مع بعضها البعض ومع العزلات العالمية، ونتيجة لهذه المعلومات الوراثية تم انشاء الشجرة الوراثية باستخدام طريقة Neighbor joining (Tamura *et al.*, 2021). كذلك استخدمت الأداة BLAST لمقارنة التسلسلات البيولوجية سواء الأحماض النووية بوساطة الأداة BLASTn وتم ترجمتها الى بروتينات بوساطة الأداة BLASTx، حيث إن الأداة تميز بين مناطق متشابهة بين تسلسلات العزلات المحلية (query) وقاعدة بيانات كبيرة للتسلسلات العالمية (sbjct) في بنك الجينات العالمي (Genbank) وايجاد مناطق تطابق قصيرة او اصطفاف التسلسلات الكاملة (Johnson *et al.*, 2008). بعدها تم استخدام برنامج Weblogo وهو تطبيق مصمم لجعل عملية إنشاء الشعارات المتسلسلة سهلة وواضحة، يقوم بإنشاء شعارات متسلسلة وتمثيلات رسومية للأنماط ضمن اصطفافات تسلسلية متعددة. توفر شعارات التسلسل وصفاً أكثر ثراءً ودقة لتشابه التسلسل من التسلسلات الأخرى، ويمكن أن تكشف بسرعة عن ميزات مهمة للاصطفاف يصعب إدراكها (Crooks *et al.*, 2004).

3D structural of *gyrB* gene

13-2-2 الشكل الثلاثي لجين *gyrB*

باستخدام برنامج Phyre 2 تم بناء نماذج ثلاثية الأبعاد لتسلسلات الأحماض الأمينية لجميع العزلات السريرية ولفحص تأثير الطفرات لشكل البروتين الخاص (et al., 2015) (Kelley)، بعدها تم عرض الشكل الثلاثي للجين (البروتين) بوساطة برنامج UCSF

Chimera إذ استخدم لعرض صور وهياكل جزيئية عالية الجودة للشكل الثلاثي الأبعاد لجين *gyrB* وتوضيح أماكن الإرساء الجزيئي للمواد المقترحة ligand بالارتباط به، كذلك استخدم لعمل اصطفاف للتسلسلات بالشكل الثلاثي الأبعاد ومطابقة العزلات المحلية مع بعضها البعض ومع العزلات العالمية لنفس الجين (Pettersen *et al.*, 2021).

Molecular Docking

14-2-2 الإرساء (الالتحام الجزيئي) الجزيئي

الإرساء الجزيئي تم بواسطة برنامج 1-click docking، إذ يعمل البرنامج بالتنبؤ بربط المادة المستخدمة للربط ligand والفتها affinity مع البروتين (جين *gyrB*) وفهم عملية حدوث الإرساء الجزيئي والأحماض الأمينية المرتبطة والأواصر الكيميائية، كما اقترحت مركبات ومواد للربط مع الجين وتنبيطه وبالإستعانة بقاعدة البيانات للمركبات الكيميائية (Pubchem) (Kim *et al.*, 2016 ; Mohammad *et al.*, 2021).

Statistic analysis

15-2-2 التحليل الاحصائي

تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS V.21، وتم استخدام مربع كاي Chi-Squared لبيان العلاقة بين حدوث الطفرات في التسلسلات الجينية للأحماض الأمينية للعزلات السريرية المحلية وبيان مقاومتها لمضادات الكوينولون احصائياً .



الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and

Discussion



Results and Discussion

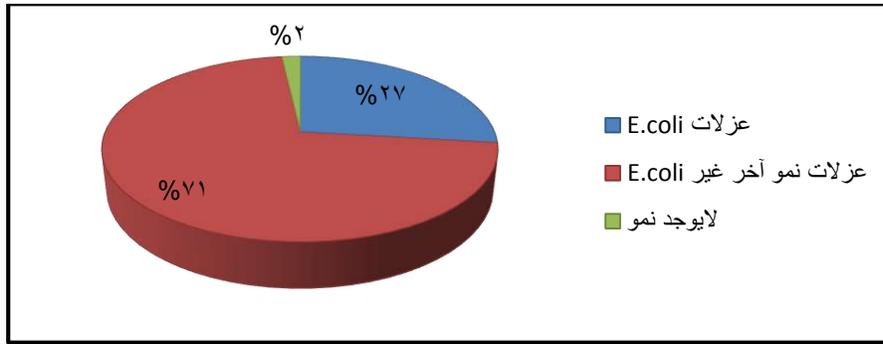
3- النتائج والمناقشة

Isolation and Identification of bacteria

3-1 عزل وتشخيص البكتريا

3-1-1 عزل بكتريا *Escherichia coli*

من مجموع 223 عينة وبعد إجراء الفحوصات المظهرية والمجهريّة والكيموحيوية، تم الحصول على 60 (27%) عزلة من بكتريا *E.coli* وباقي العزلات أي 163 (73%) عزلة اهملت اما لأنها خارج الخطة المعدة لهذا البحث او لم يحدث لها نمو بعد استزراعها في الاوساط الزرعية، كما في الشكل (3-1).



الشكل (3-1) يبين النسبة المئوية بين عزلات *E.coli* النامية وبقية العزلات الاخرى والغير نامية

شملت الدراسة كلا الجنسين حيث كانت نسبة الإناث (75%)، بينما الذكور (25%) وهذه النتائج تتوافق مع *Akhtar et al.* (2021)، حيث اوضح إن معدل انتشار التهاب المسالك البولية أعلى لدى النساء مقارنة بالرجال في جميع الفئات العمرية، وفي الشابات النشاطات جنسياً، يتراوح معدل الإصابة بالتهاب المسالك البولية من 0.5 إلى 0.7 لكل شخص في السنة.

الجدول (3-1) عدد العينات المستهدفة في الدراسة وجنس المرضى والفئات العمرية

المجموع	الجنس		الفئة العمرية	
	ذكور	اناث		
7	2	5	17-6	1
15	3	12	29-18	2
14	3	11	41-30	3
10	2	8	53-42	4
8	3	6	65-54	5
5	2	3	77-66	6
60	15	45	المجموع	

بأماكن بكتيريا *E.coli* الانتقال بسهولة من منطقة الشرج الى المسالك البولية والمثانة و تكون اكثر شيوعاً في الإناث منها في الذكور بحوالي 14 مرة (Levinson, 2016)؛ ويعزى ذلك إلى قصر مجرى البول الأنثوي وقرب الإحليل من فتحة الشرج، مما يسهل على البكتيريا استعمار هذه المنطقة (Al-Mashhady & Al-Janabi, 2020).

Phynotypic examination

2-1-3 الفحص المظهري

ظهرت مستعمرات وردية ذات حافة حادة (bright pink colonies) على وسط MacConkey agar، ومستعمرات خضراء معدنية لامعة (green metallic sheen) على وسط الايوسين مثيلين الازرق (EMB)؛ ويعزى ظهور هذه النتائج الى تخمر سكر اللاكتوز في وسط MacConkey agar لأن الوسط يحتوي على صبغة البنفسج البلورية (crystal violet) و املاح الصفراء (bile salts) التي تسمح للبكتيريا السالبة لصبغة جرام بالنمو بينما، لا تسمح للبكتيريا الموجبة لصبغة جرام بالنمو؛ لذا يعدّ وسطاً انتقائياً (selective media) وتفريقياً (differential media) (Basavaraju & Gunashree, 2022).

إنّ ظهور المستعمرات باللون الاخضر المعدني اللامع على وسط (EMB) هو بسبب احتواء الوسط على صبغة المثيلين الزرقاء ونتيجة لتخمر سكر اللاكتوز والكلوكوز الموجود في الوسط حيث يتم انتاج احماض عضوية قوية؛ لذا يعدّ الوسط انتقائياً وتفريقياً ايضاً. وبالنسبة لوسط اجار الدم (blood agar)، في الدراسة الحالية اظهرت 6 عزلات انحلالاً واضحاً للدم (Beta-hemolysis)، بينما اظهرت بعضها انحلالاً ضعيفاً، والبعض الآخر لم تظهر اي انحلال على وسط (blood agar).

أظهرت الدراسات إنّ 50% من البكتيريا المسببة لـ UPEC لديها القدرة على إنتاج إنزيم Hemolysin. ومن أهم الطرق للكشف عن قدرة البكتيريا على إنتاج هذا الإنزيم هو تحلل وسط أجار الدم (Erjavec, 2023).

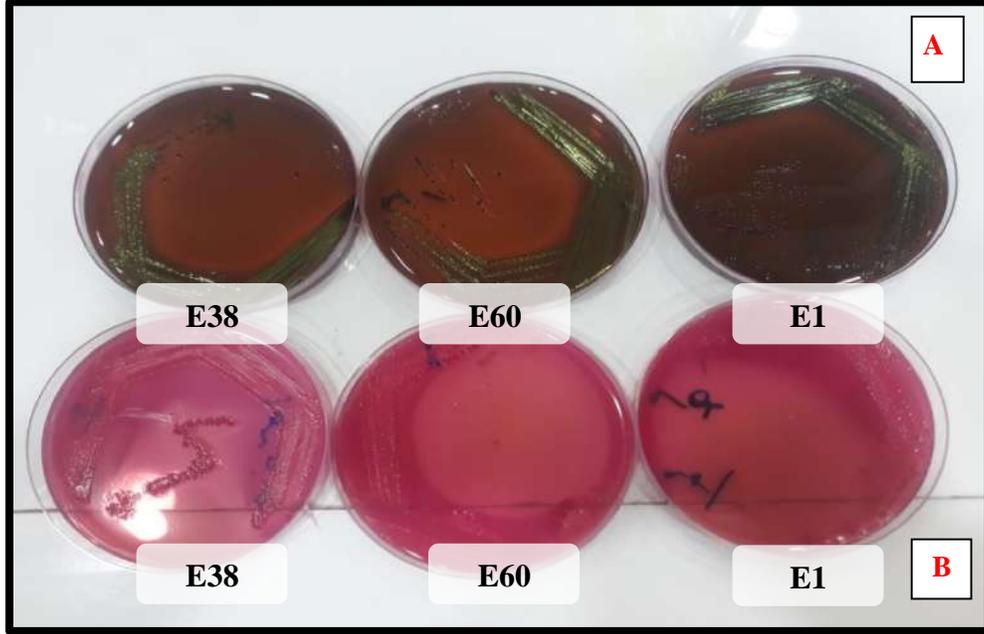
إن بعض السلالات المعزولة من الحالات المرضية تظهر انحلالاً وخاصةً المقاومة منها؛ بسبب ما تمتلكه من عوامل ضراوة، في حين إنّ بعضها قد لا تظهر انحلالاً واضحاً للدم على اجار الدم، اما تلك التي يتم عزلها من الأشخاص الطبيعيين لا تظهر انحلال الدم في الوسط؛ لافتقارها

لعوامل الضراوة (Basavaraju & Gunashree, 2022)؛ وهذه النتائج متوافقة مع نتائج كل من الباحثين (Mamatha *et al.*, 2023 ; Abu-Sini *et al.*, 2023; Cardiliya *et al.*, 2023).

وعلى وفق نتائج الدراسة التي اجريت من قبل Aghemwenhio وآخرون، (2017) بلغت نسبة بكتريا *E.coli* المعزولة من التهاب المسالك البولية والمحللة للدم 25.7%. إن وجود السلالات المحللة للدم هو عامل ضراوة مهم للإصابة وهو احد اسباب عدم فعالية معظم المضادات الحيوية المستخدمة لعلاج التهاب المسالك البولية.

تنمو خلايا بكتريا *E.coli* على المواد الصلبة أو في اوساط نمو سائلة وتحت ظروف المختبر المسيطر عليها، بحد ادنى من المتطلبات التي تشمل الجلوكوز كمصدر للكربون والطاقة، وأملاح الأمونيوم كمصدر للنيتروجين، والأملاح الأخرى، وبعض العناصر النزرة، و لأن لها متطلبات غذائية بسيطة، فيمكن زراعتها بسهولة على اوساط شائعة، مثل أكار المغذيات (nutrient agar) وأكار المكونكي وأكار EMB (Elbing & Brent , 2019 ; Bonnet *et al.*, 2020)، كما موضح في الشكل (2-3).

تنمو بكتريا *E.coli* في درجات حرارة تتراوح من 10 درجات مئوية إلى 40 درجة مئوية، على الرغم من أن درجة الحرارة المثلى لمعظم السلالات هي 37 درجة مئوية، إلا أن بعض سلالات المختبرات يمكن أن تتكاثر عند درجات حرارة تصل إلى 49 درجة مئوية، و تعيش بكتريا *E.coli* عند درجة حموضة 4.5-9.5 ولكن لوحظ الحد الأقصى للنمو عند 7.0، أي درجة حموضة محايدة. أيضاً، تختلف متطلبات الرقم الهيدروجيني باختلاف السلالة. (Fotadar *et al.*, 2005 ; Basavaraju & Gunashree , 2022)



الشكل (3-2) زراعة بكتريا *E. coli* : (A) على وسط EMB مع مستعمرات خضراء معدنية براقه Green
 (B) على وسط الماكونكي حيث تكونت مستعمرات وردية Bright pink colonies metallic sheen

Microscopic identification

3-1-3 التشخيص المجهرى

تم اعداد مسحة من المستعمرة النامية عمرها 24 ساعة على وسط ماكونكي وتم تلويئها باستخدام صبغة جرام (Gram stain) حيث ظهرت البكتريا بأشكال عصوية قصيرة وكانت سالبة لصبغة جرام؛ وهذه النتائج تتفق مع جاء به Abou-Dobara وآخرون، (2022).

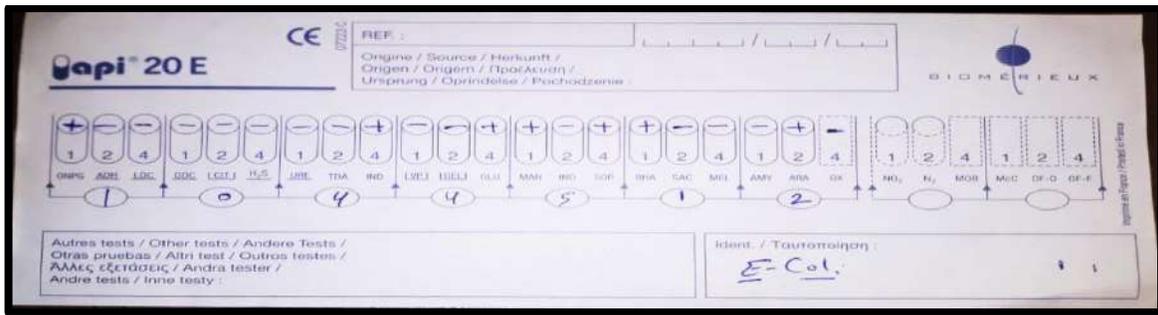
Biochemical identification

4-1-3 التشخيص الكيموحيوي

تم تأكيد تشخيص البكتيريا المعزولة بوساطة نظام API20E وبالتالي تم تشخيص 60 عزلة على أنها بكتيريا *Escherichia coli*، بينما تم استبعاد العزلات السلبية، كما موضح في الشكل (3-3) والشكل (3-4). كما تم إجراء اختبار الأوكسيديز واختبار الكاتاليز على العزلات وجميعها أعطت نتائج سلبية لأختبار الاوكسيديز وايجابية لاختبار الكاتاليز، وهذا يتوافق مع نتائج Aberkane وآخرون (2023)، اذ لم يكن هناك تحول في اللون إلى اللون الارجواني في اختبار الاوكسيديز.



الشكل (3-3) نتيجة اختبار API 20E على عزلة سريرية لتشخيص بكتريا *E.coli* بعد حضنها 24 ساعة وإضافة الكواشف الخاصة بها.



الشكل (3-4) جدول القراءة الخاص باختبار API 20E الذي اثبت أنها بكتريا *E.coli* بعد الرجوع الى فهرس الخاص بالاختبار

يستخدم اختبار الأوكسيديز مركب tetramethyl-p phenylenediamine، والذي يكون في الحالة المؤكسدة (النتيجة الموجبة) ارجوانياً، وشفافاً في الحالة المختزلة (النتيجة السالبة)؛ مما يعني أن البكتيريا لا تحتوي على انزيم سيتوكروم أوكسيديز (cytochrome c oxidase)، لذا يمكنها استخدام الأوكسجين لإنتاج الطاقة عن طريق تحويل O_2 إلى H_2O أو H_2O_2 بوساطة سلسلة نقل الإلكترون. حيث تظهر بكتريا *E.coli* نتائج سالبة لهذا الاختبار، بينما في اختبار الكاتاليز (Catalase test)، تطلبه الخلايا المنتجة لبيروكسيد الهيدروجين وجذور الأوكسجين، وتتكون فقاعات في تفاعل الأوكسجين؛ وهذا ما يظهر عند إجراء هذا الاختبار لبكتريا *E.coli* (نتيجة إيجابية) (Shoaib et al., 2020).

ويعد اختبار الاندول (Indole) مفيد في التعرف على البكتيريا التي لديها القدرة على إنتاج إنزيم التربتوفاناز، اذ يقوم هذا الإنزيم بتحويل حمض التربتوفان الأميني (tryptophane amino acid) إلى غاز الإندول؛ ومن ثمّ يمكن فحص الغاز عن طريق إضافة كواشف مختلفة مثل كاشف إيرليك (Ehrlich's reagent) أو كاشف كوفاتش (Kovac's reagent) يتفاعل غاز الإندول مع

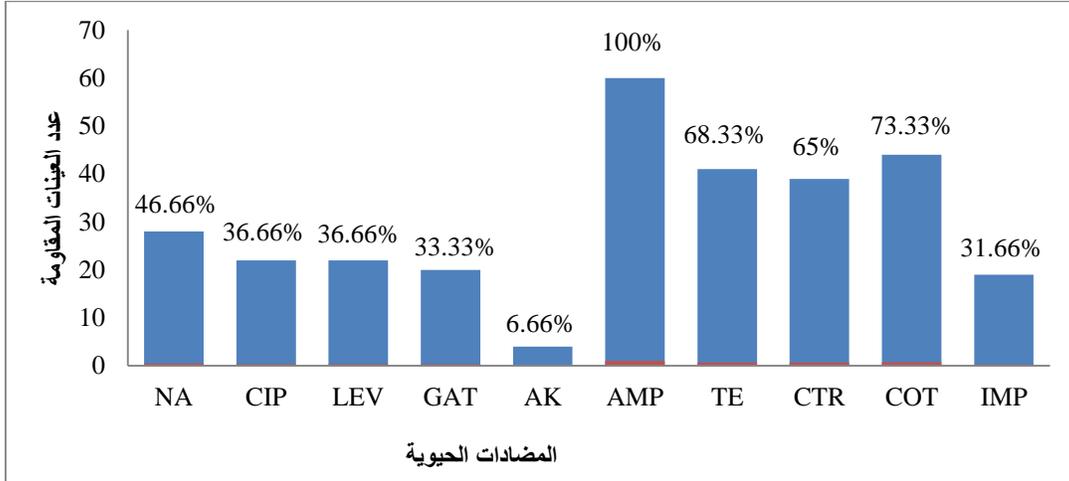
الكاشف وتتشكل صبغة روزيندول (Rosindole) ذات اللون الأحمر؛ مما يشير إلى نتيجة اختبار إيجابية (MacFaddin , 2000).

ويساعد اختبار اليورياز urease في التعرف على الكائنات الحية الدقيقة التي لها القدرة على إنتاج إنزيم اليورياز urease، حيث ينتمي هذا الإنزيم إلى عائلات إنزيمات الأמידوهيدرولاز amidohydrolases والفوسفودوستيراز phosphoesterases. اليورياز يسبب التحلل المائي لليوريا لتنتج أمونيا وثاني أكسيد الكربون ، وبالتالي سيؤدي تكوين الأمونيا إلى تغيير الرقم الهيدروجيني (PH) للوسط إلى القلوية، وسيغير اللون أيضاً إلى اللون الوردي عند الرقم الهيدروجيني 8,1 و التغيير في اللون خلال 30 دقيقة يشير إلى نتيجة إيجابية (Brink, 2010).

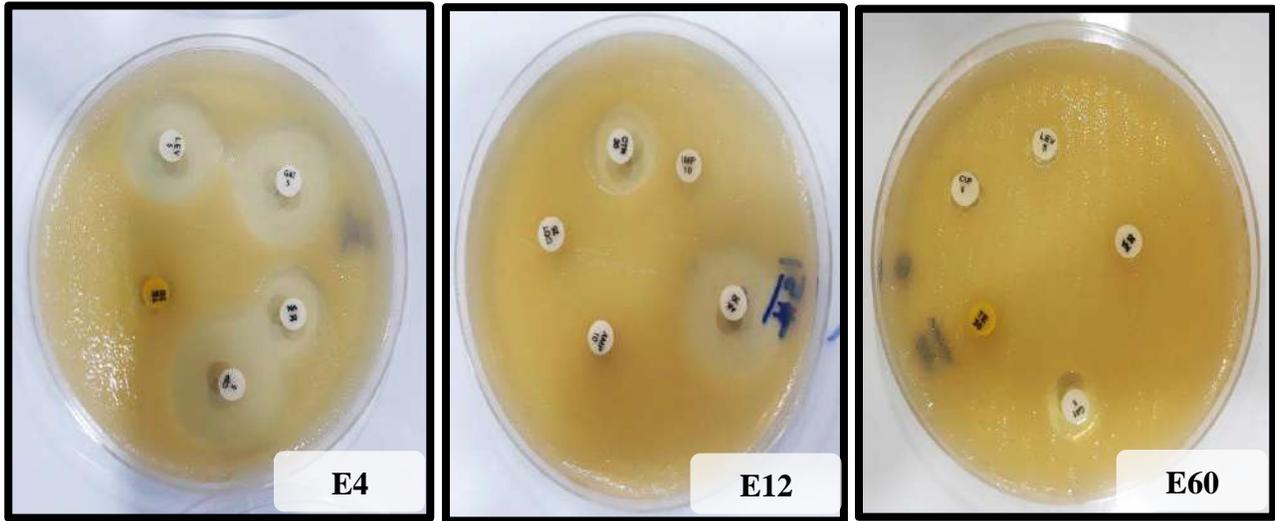
Antimicrobial resistance

2-3 مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية

تم اختبار 60 عزلة من بكتيريا *E. coli* على 10 اقراص من أنواع مختلفة من المضادات الحيوية باستخدام طريقة الانتشار القرصي (disc diffusion method)، وتبين أن العزلات لديها مستويات متفاوتة من المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة. وأظهرت الدراسة أن مقاومة العزلات للمضادات الحيوية من نوع الكينولونات Quinolones والتي تشمل (Nalidixic acid (NA)، Ciprofloxacin (CIP)، Levofloxacin (LEV) و Gatifloxacin (GAT) هي 28 (46.66%)، 22 (36.66%)، 22 (36.66%) و 20 (33.33%) على التوالي. وكانت مقاومة مضاد Amikacin (AK) (التابع لعائلة aminoglycoside) و Tetracycline (TE) (التابع لعائلة Tetracyclines) هي 4 (6.66%) و 41 (68.33%). وبلغت مقاومة مضاد Co-trimoxazole (COT) (التابع لعائلة Sulfonamides) 44 (73.33%). أما بالنسبة لمضادات عائلة بيتا لاكتام (Beta lactam) التي تشمل Ceftriaxone (CTR) و Imipenem (IMP) و Ampicillin (AMP) بلغت 39 (65%) و 19 (31.66%) و 60 (100%) على التوالي، كما موضح في الشكل (3-5) والشكل (3-6).



الشكل (3-5) عدد العينات والنسبة المئوية للمقاومة لبكتريا *E. coli* لمضادات الحيوية مختلفة بعد تنميتها على Muller Hinton agar وسط



الشكل (3-6) يبين اختبار بكتريا *E. coli* ومقاومتها للمضادات الحيوية بعد حضنها لمدة (18) ساعة على Muller Hinton agar وسط

أظهرت جميع عزلات *E. coli* مقاومة متعددة لمجموعة مختلفة من المضادات الحيوية، حيث كانت ثلاث عزلات مقاومة لنوعين من المضادات الحيوية، بينما أظهرت أربعة عزلات أخرى مقاومة لثلاثة أنواع من المضادات الحيوية، وأظهرت 15 عزلة مقاومة لأربعة أنواع من المضادات الحيوية، وكانت عزلتان مقاومة لخمسة أنواع من المضادات الحيوية، وكانت عزلتان مقاومة لثمانية أنواع من المضادات الحيوية، بينما أظهرت 16 عزلة مقاومة لتسعة أنواع من المضادات الحيوية، وأظهرت 14 عزلة مقاومة لنوع واحد من المضادات الحيوية، وكانت ثلاث عزلات مقاومة لجميع

المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة التي كانت 10 مضادات حيوية، وعزلة واحدة مقاومة لسبعة انواع من المضادات الحيوية، وكانت اربعة عزلات متوسطة المقاومة لنوع واحد من المضادات الحيوية، كما موضح في الشكل (3-2).

الجدول (3-2) يمثل عدد العزلات ومقاومتها للمضادات الحيوية

رقم العزلة	IMP	COT	CTR	TET	AMP	AK	GAT	LEV	CIP	NA	عدد المضادات التي تمت مقاومتها
E1	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	3
E2	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	3
E3	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E4	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E5	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E6	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E7	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	2
E8	S	R	R	S	R	S	S	S	S	I	3
E9	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E10	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R	4
E11	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E12	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E13	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E14	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	3
E15	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E16	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4
E17	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4
E18	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R	4
E19	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	5
E20	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E21	S	R	R	R	R	S	S	S	S	I	4
E22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	10
E23	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E24	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E25	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E26	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E27	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E28	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E29	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4
E30	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E31	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	7
E32	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
E33	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E34	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	2
E35	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1
E36	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4

2	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	E37
1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	E38
1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	E39
9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	E40
1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	E41
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E42
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E43
5	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E44
8	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	E45
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E46
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E47
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E48
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E49
10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E50
9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	E51
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E52
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	E53
9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	E54
9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	E55
9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	E56
8	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	E57
9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	E58
9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	E59
10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E60
	28	22	22	20	4	60	41	39	44	19	عدد العينات المقاومة

أظهرت بعض الدراسات ومنها المحلية التي قدمها Abdul-Husin *et al* (2021) إنَّ معدلات مقاومة بكتريا *E.coli* بسبب البلازميدات وبالتحديد وجود جين qnrS لمضادات الكينولونات مثل (levofloxacin، ciprofloxacin، nalidixic acid و gatifloxacin) على التوالي بلغت 36%، 26.3%، 37.5% و 25%، إذ بيَّن أنَّ الانتشار العالي لجينات (qnr) في البلازميدات يعزز من مقاومة البكتريا لمضادات الكوينولونات. وايضاً تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل إليها الباحث Sabir *et al.* (2014) في دولة باكستان إذ كان معدل مقاومة بكتريا *E.coli* للبنسلين بنسبة 100% و tetracyclin بنسبة 69.4% و Imipenem بنسبة 43.3% بينما كانت مقاومة البكتريا لمضاد Amikacin بنسبة 12.7%، على الرغم من أن دراسته لا تشير إلى أن البنسلين لا يستخدم لعلاج التهابات المسالك البولية التي تسببها بكتريا *E.coli* في أي جزء من العالم، إلا أن العديد من الدراسات الحديثة وجدت أن عددًا من البكتيريا عرضة لهذا المضاد

الحيوي وخاصة في الدول الاوربية، كما اوضح إنَّ مضاد الاميكاسين لايزال من الممكن استخدامه لعلاج UTI.

وتوافقت دراسة أجراها الباحث Hameed (2016) لعينات للبكتريا معزولة من المصابين بالتهابات المسالك البولية مع الدراسة الحالية، اذ تبين إنَّ نسبة مقاومة البكتريا لمضاد-Co trimoxazole هي 75.86% حيث كان هذا المضاد من اكثر المضادات فعالية من المضادات الأخرى المستخدمة في دراسته.

وايضاً اتفقت مع الدراسة التي أجراها Bullens وآخرون، (2022) وكانت نسبة المقاومة للمضاد الحيوي Ceftriaxone هي 66.7%، اذ أكدت الدراسة إنَّه من الضروري زيادة الوعي للحد من انتشار مسببات الامراض المقاومة لإلتهاب المسالك البولية.

بينما لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي توصل إليها Olorunmola et al. (2013) اذ كانت نسبة مقاومة العزلات البكتيرية لهذه المضادات هي 67.2% لمضاد nalidixic acid و65.7% لمضاد ciprofloxacin، وبينَّ إنَّ المستوى العالي لمقاومة الفلوروكينولونات يحد من خيارات العلاج الفعال لمرضى المسالك البولية، بينما كانت مقاومة tetracyclin بنسبة 96.4%.

ولم تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج Chua&Stewardson (2019)، وكانت نسبة مقاومة البكتريا لمضاد ceftriaxone هي 89%، اذ اوضحا إنَّ انتاج انزيم البيتا لاكتيميز هو الآلية الأكثر شيوعاً لمقاومة هذا المضاد. ولم تتفق نتائج هذه الدراسة ايضاً مع نتائج الدراسة المحلية التي توصل إليها Abbas وآخرون، (2019) حيث بلغت مقاومة البكتريا لمضاد co-trimoxazole بنسبة 14.2%، إنَّ وجود طفرات في جين folA الذي يشفر لأنزيم Dihydrofolate reductase التي بدورها تمنح مقاومة لهذا المضاد الحيوي وتقلل التقارب (affinity) بين الانزيم ومضاد co-trimoxazole ومع ذلك فإنَّ نشاط الانزيم يبقى فعالاً لتخليق حمض الفوليك والحفاظ على استمرارية وبقاء البكتريا (Tamer, 2014). ولم تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به Nirangan & Malini (2014)، وكانت نسبة مقاومة البكتريا لمضاد amikacin بلغت 33.4%.

وفي دراسة اجريت من قبل Михалко et al. (2018) لم تتفق ايضاً مع الدراسة الحالية اذ كانت بكتريا *E.coli* شديدة الحساسية لمضادات levofloxacin و gatifloxacin بنسبة 93.18% لكليهما عند الاطفال وانخفضت الى 80% عند البالغين، كما اوضح إنَّ البنسلينات ليست

مناسبة لعلاج التهابات المسالك البولية؛ بسبب قلة حساسية البكتيريا لها. إنَّ *gatifloxacin* و *levofloxacin* لهما نشاط واسع ضد العديد من المسببات المرضية الإيجابية والسلبية لصبغة جرام وبعض الممرضات اللاهوائية؛ بسبب التركيب الكيميائي للمضادين. (Schultz , 2012 ; Sitovs *et al.*, 2021)

ولم تتفق الدراسة مع الدراسة التي أجراها (Jalil & AlAtbee, 2022) حيث بلغت مقاومة البكتيريا لمضاد *imipenem* 2.4 % وكانت نسبة المقاومة عالية بالنسبة لمضاد *ampicillin* بلغت 86.6%.

من أهم أسباب مقاومة المضادات الحيوية هو الاستخدام المفرط لها والبروتوكولات غير الصحيحة في بعض المؤسسات الصحية وخصوصاً في الدول النامية، حيث يؤدي الاستخدام المتزايد للعلاجات إلى حدوث طفرات جينية في البكتيريا تمكنها من زيادة المقاومة لهذه العلاجات. (Ching & Zaman , 2020).

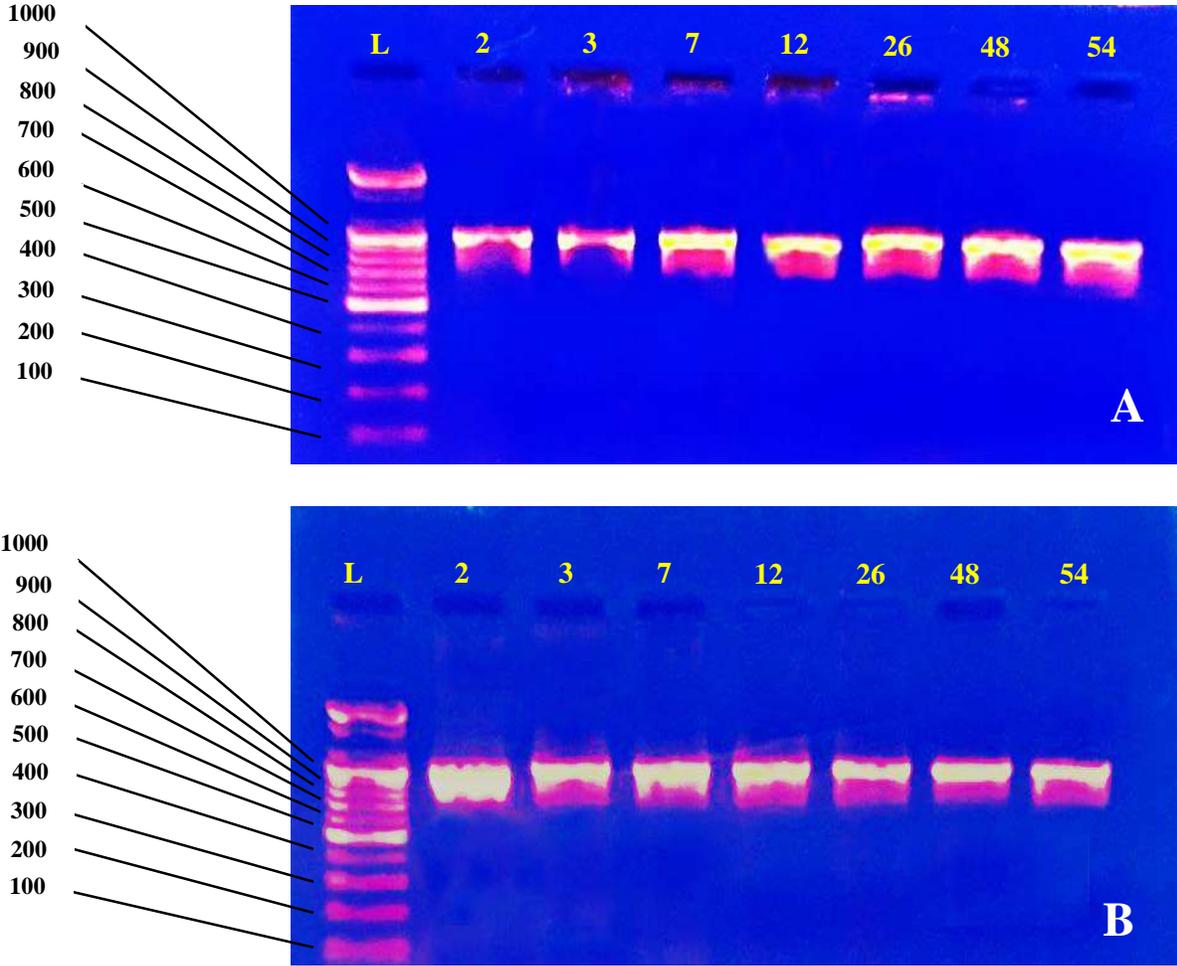
إن التغيرات التي قد تتعرض لها هذه البكتيريا ستسمح لها بالبقاء وتزيد من احتمال التسبب في طفرات أخرى. اذ عند زيادة الجرعات، تتراكم كميات اكبر من الكينولونات في المثانة، على سبيل المثال، يمكن أن يتراكم مضاد *levofloxacin* في المثانة بما يصل إلى 400 ميكروغرام/ مل بعد تناول الجرعة الدوائية، ولكن يمكن أن يتراكم مضاد *ciprofloxacin* في الجهاز الهضمي بما يصل إلى 2 ملجم لكل غرام من البراز. لذلك فإن استخدام المضادات الحيوية بجرعات عالية ؛ قد يؤدي إلى تطوير عزلات إضافية ذات طفرات متعددة مرتبطة بالمقاومة (Becnel *et al.*, 2009).

3-3 تفاعل تضخيم جين *gyrB* لبكتيريا (*E.coli*)

Amplification Reaction of *Escherichia coli gyrB*

تم اجراء تقنية PCR على 40 عزلة من البكتيريا (22 عزلة مقاومة لمضادات الكوينولون و18 عزلة حساسة لمضادات الكوينولون)، اذ إنَّ البرايمرات صممت للدراسة الحالية، بشكل يقسم الجين الكلي الى قطعتين، لتسهيل ايجاد توالياته بطريقة Sanger وتم تحديد طول القطعة الاولى Segment 1 (998 زوج قاعدة base pair) والقطعة الثانية Segment 2 (971 زوج قاعدة). وأظهرت النتائج إنَّ جين *gyrB* موجود في جميع عزلات البكتيريا بنسبة 100%، وتمت مقارنته مع

الحزم المتضاعفة والدليل الحجمي DNA ladder باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي (Gel Electrophoresis)، الشكل (7-3).



الشكل (7-3) الترحيل الكهربائي لجل الاكاروز لـ : (A) القطعة الاولى من جين لبكتريا *E. coli gyrB*، (B) القطعة الثانية من جين *gyrB* لبكتريا *E. coli*. الناتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام اشعة UV في 1.5% اكاروز وفرق جهد 60 فولت لمدة ساعة حيث إن (L) يمثل الدليل الحجمي (DNA Ladder) (2000-100 زوج قاعدة) والارقام (2،3،7،12،26،48،54) تمثل عزلات من بكتريا *E. coli* (E.S54S1، E.S48S1 AH، E.S26S1 AH-R، E.S12S1 AH-R، E.S7S1 AH، E.S3S1 AH-R، E.S2S1 AH) و (E.S48S2، E.S26S2 AH-R، E.S12S2 AH-R، E.S7S2 AH، E.S3S2 AH-R، E.S2S2 AH) للقطعة الاولى و (E.S54S2 AH-R، AH) للقطعة الثانية.

DNA sequencing analysis

4-3 التحليل التسلسلي لجين *gyrB*

تم اجراء اختبار تسلسل الحمض النووي ل 80 قطعة لجين *gyrB* (40 عزلة بكتريا) ، وتم اجراء الإصطفاف (Alignment) لجميع العزلات السريرية المحلية من بكتريا *E. coli* وبعدها تم Alignment مع عدد من عينات اخرى لدول عالم مختلفة عن طريق بنك الجينات العالمي

(GenBank) باستخدام برنامج BLAST Nucleotide في موقع (NCBI) National Center for Biotechnology Information، حيث أظهرت أكثر العزلات تطابق تام بنسبة 100% كما موضح في الشكل (8-3) وبعضها كانت نسبة التطابق 99% كما موضح في الشكل (9-3). كما أظهرت أكثر العزلات تطابق تام بنسبة 100% مع العزلات العالمية فيما يتعلق بالأحماض الأمينية كما في الشكل (10-3) وبعضها أظهر نسبة تطابق 99%، كما في الشكل (11-3) وأجريت بواسطة برنامج BLASTx.

Escherichia coli strain NMBU_W06E18 chromosome, complete genome				
Sequence ID: CP047609.1 Length: 5248629 Number of Matches: 1				
Range 1: 4205970 to 4206879 GenBank Graphics				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1681 bits(910)	0.0	910/910(100%)	0/910(0%)	Plus/Minus
Query 1		GTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCAACC		60
Sbjct 4206879		GTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCAACC		4206820
Query 61		ATTCACGCCGATAAATCTGTCTCCGTACAGGATGATGGGCGCGGCAATCCGACCCGGTATT		120
Sbjct 4206819		ATTCACGCCGATAAATCTGTCTCCGTACAGGATGATGGGCGCGGCAATCCGACCCGGTATT		4206760
Query 121		CACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGT		180
Sbjct 4206759		CACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGT		4206700
Query 181		AAATTTGACGATAAATCCTATAAAGTGTCCGGCGGTTCTGCACGGCGTTGGTGTTCGGTA		240
Sbjct 4206699		AAATTTGACGATAAATCCTATAAAGTGTCCGGCGGTTCTGCACGGCGTTGGTGTTCGGTA		4206640
Query 241		GTA AACGCCCTGTGCGCAAAAACCTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTACCGT		300
Sbjct 4206639		GTA AACGCCCTGTGCGCAAAAACCTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTACCGT		4206580
Query 301		CAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCTCCGCTGGCGGTACCGGCAGACTGAAAAA		360
Sbjct 4206579		CAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCTCCGCTGGCGGTACCGGCAGACTGAAAAA		4206520
Query 361		ACCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAGCCTCGAAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTC		420
Sbjct 4206519		ACCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAGCCTCGAAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTC		4206460
Query 421		GAATATGAAATTCGGCGAAACGCTTGCCTGAGTTGTCTGTTCCCTCAACTCCGGCGTTCC		480
Sbjct 4206459		GAATATGAAATTCGGCGAAACGCTTGCCTGAGTTGTCTGTTCCCTCAACTCCGGCGTTCC		4206400
Query 481		ATTCGTCTGCGCGACAAGCGCGACGGTAAAGAAAGACCCTTCCACTATGAAGGCGGCATC		540
Sbjct 4206399		ATTCGTCTGCGCGACAAGCGCGACGGTAAAGAAAGACCCTTCCACTATGAAGGCGGCATC		4206340
Query 541		AAGGCGTTTCGTTGAAATATCTGAAACAAGAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTAC		600
Sbjct 4206339		AAGGCGTTTCGTTGAAATATCTGAAACAAGAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTAC		4206280
Query 601		TTCTCCACCGAAAAAGATGGTATCGGCGTTCGAAAGTGGCGTTGCAAGTGAACGATGGCTTC		660
Sbjct 4206279		TTCTCCACCGAAAAAGATGGTATCGGCGTTCGAAAGTGGCGTTGCAAGTGAACGATGGCTTC		4206220
Query 661		CAGGAAAAACATCTACTGCTTTACCAACAACATTCGCAAGCGTGACGGCGGTACTCACCTG		720
Sbjct 4206219		CAGGAAAAACATCTACTGCTTTACCAACAACATTCGCAAGCGTGACGGCGGTACTCACCTG		4206160
Query 721		GCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGTACCCGTAATGCCTACATGGACAAAAGAGGCTAC		780
Sbjct 4206159		GCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGTACCCGTAATGCCTACATGGACAAAAGAGGCTAC		4206100
Query 781		AGCAAAAAGCCAAAAGTCAGCGCCACCAGGTGACGATGCGCGTGAAGGCCCTGATTGCGGTC		840
Sbjct 4206099		AGCAAAAAGCCAAAAGTCAGCGCCACCAGGTGACGATGCGCGTGAAGGCCCTGATTGCGGTC		4206040
Query 841		GTTTCCGTGAAAGTGCAGGACCCGAAATTCCTCTCCAGACCAAAGACAAAACCTGGTTTCT		900
Sbjct 4206039		GTTTCCGTGAAAGTGCAGGACCCGAAATTCCTCTCCAGACCAAAGACAAAACCTGGTTTCT		4205980
Query 901		TCTGAGGTGA 910		
Sbjct 4205979		TCTGAGGTGA 4205970		

الشكل (3-8) الاصطاف (Alignment) لنوكليوتيدات جين gyrB للقطعة الاولى من العزلة المحلية (Query) E.S6S1 لبيكتريا E.coli AH-R بواسطة nucleotide BLAST الذي يبين تطابق تام بنسبة 100% مع عزلات عالمية (Sbjct).

Escherichia coli strain AH01 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP055251.1](#) Length: 4886157 Number of Matches: 1

Range 1: 4631392 to 4632264 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1596 bits(864)	0.0	870/873(99%)	0/873(0%)	Plus/Minus
Query 1	GCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCACCATTACGCGCGAT	60		
Sbjct 4632264	GCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCACCATTACGCGCGAT	4632205		
Query 61	AACTCTGTCTCCGTACAGGATGATGGGCGCGCATTCCGACCGGTATTACCCGGAAGAG	120		
Sbjct 4632204	AACTCTGTCTCCGTACAGGATGATGGGCGCGCATTCCGACCGGTATTACCCGGAAGAG	4632145		
Query 121	GGCGTATCGGCGGCGGAAGTATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTTGACGAT	180		
Sbjct 4632144	GGCGTATCGGCGGCGGAAGTATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTTGACGAT	4632085		
Query 181	AACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTCGGTTGTAACGCCCTG	240		
Sbjct 4632084	AACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTCGGTTGTAACGCCCTG	4632025		
Query 241	TCGCAAAAACCTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTACCCGTAGATCTACGAA	300		
Sbjct 4632024	TCGCAAAAACCTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTACCCGTAGATCTACGAA	4631965		
Query 301	CACGGTGTACCGCAGGCTCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACCGGCACCATG	360		
Sbjct 4631964	CACGGTGTACCGCAGGCTCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACCGGCACCATG	4631905		
Query 361	GTGCGTTTCTGGCCAGCCTCGAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAATATGAAATT	420		
Sbjct 4631904	GTGCGTTTCTGGCCAGCCTCGAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAATATGAAATT	4631845		
Query 421	CTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGCGC	480		
Sbjct 4631844	CTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGCGC	4631785		
Query 481	GACAAGCGTGACGGCAAAGAAGACCCTTCCACTATGAAGCGGCATCAAGGCGTTCGTT	540		
Sbjct 4631784	GACAAGCGTGACGGCAAAGAAGACCCTTCCACTATGAAGCGGCATCAAGGCGTTCGTT	4631725		
Query 541	GAATATCTGAACAAGAACAACAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACCGAA	600		
Sbjct 4631724	GAATATCTGAACAAGAACAACAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACCGAA	4631665		
Query 601	AAAGACGGTATTGGCGTCGAAAGTGGCGTTGCAGTGGAAACGATGGCTTCCAGGAAAACATC	660		
Sbjct 4631664	AAAGACGGTATTGGCGTCGAAAGTGGCGTTGCAGTGGAAACGATGGCTTCCAGGAAAACATC	4631605		
Query 661	TACTGCTTTACCAACAACATTCCGACGCTGACGGCGGTAACCTGACAGGCTTCCGT	720		
Sbjct 4631604	TACTGCTTTACCAACAACATTCCGACGCTGACGGCGGTAACCTGACAGGCTTCCGT	4631545		
Query 721	GCGGCGATGACCCGTACCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAGAGGCC	780		
Sbjct 4631544	GCGGCGATGACCCGTACCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAGAGGCC	4631485		
Query 781	AAAGTTAGCGCCACCAGGCGTACGATGCGCGTGAAGCCTGATTGCGGTCGTTTCCGTGAAA	840		
Sbjct 4631484	AAAGTTAGCGCCACCAGGCGTACGATGCGCGTGAAGCCTGATTGCGGTCGTTTCCGTGAAA	4631425		
Query 841	ATGCCGGACCCGAAATTCTCTCCAGACCAA	873		
Sbjct 4631424	GTGCCGGACCCGAAATTCTCTCCAGACCAA	4631392		

الشكل (3-9) الاصطفايف (Alignment) لنيوكليوتيدات جين *gyrB* للقطعة الاولى من العزلة المحلية (Query) لعزلات عالمية (Sbjct). حيث إن الاستبدال في قاعدة نتروجينية واحدة (الادينين بدل الجوانين) في موقعين مختلفين و(الكوانين بدل الادينين) في موقع واحد

DNA gyrase subunit B [Escherichia coli]
 Sequence ID: [STL19681.1](#) Length: 649 Number of Matches: 1

Range 1: 43 to 345 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
602 bits(1552)	0.0	Compositional matrix adjust.	303/303(100%)	303/303(100%)	0/303(0%)	+1
Query 1	VVDNAIDEALAGHCKEIIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPTGIHPEEGVSAAEVIMTVLHAGG				180	
Sbjct 43	VVDNAIDEALAGHCKEIIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPTGIHPEEGVSAAEVIMTVLHAGG				102	
Query 181	KFDDNSYKvs gg lhgv g svvNALSQKLELVIQREGKIHRQIYEHGVPQAPLAVTGETEK				360	
Sbjct 103	KFDDNSYKvsGGLHG V SVVNALSQKLELVIQREGKIHRQIYEHGVPQAPLAVTGETEK				162	
Query 361	TGTMRFWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLRELSFLNSGVSIRLRDKRDGKEDHFHYEGGI				540	
Sbjct 163	TGTMRFWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLRELSFLNSGVSIRLRDKRDGKEDHFHYEGGI				222	
Query 541	KAFVEYLNKNTPIHPNIFYFSTEKDGIGVEVALQWNDGFQENIYCF TNNIPQRDGGTHL				720	
Sbjct 223	KAFVEYLNKNTPIHPNIFYFSTEKDGIGVEVALQWNDGFQENIYCF TNNIPQRDGGTHL				282	
Query 721	AGFRAAMTRTLNAYMDKEGYSKAKVSATGDDAREGLIAVSVKVPDPKFS SQT KDKLVS				900	
Sbjct 283	AGFRAAMTRTLNAYMDKEGYSKAKVSATGDDAREGLIAVSVKVPDPKFS SQT KDKLVS				342	
Query 901	SEV 909					
Sbjct 343	SEV 345					

الشكل (3-10) اصطفاف تسلسل الببتيدات (Polypeptide sequence alignment) للقطعة الاولى من العزلة المحلية (Query) E.S1S1 AH من بكتريا *E. coli*، يبين تطابق تام بنسبة 100% مع عزلات عالمية (Sbjct).

DNA gyrase subunit B [Escherichia coli]
 Sequence ID: [STL19681.1](#) Length: 649 Number of Matches: 1

Range 1: 47 to 337 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
574 bits(1480)	0.0	Compositional matrix adjust.	288/291(99%)	290/291(99%)	0/291(0%)	+1
Query 1	AIDEALAGHCKEIIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPTGIHPEEGVSAAEVIMTVLHAGGK FDD				180	
Sbjct 47	AIDEALAGHCKEIIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPTGIHPEEGVSAAEVIMTVLHAGGK FDD				106	
Query 181	NSYKvs gg lhgv g svvNALSQKLELVIQREGKIHRQIYEHGVPQAPLAVTGETEK TGTM				360	
Sbjct 107	NSYKvsGGLHG V SVVNALSQKLELVIQREGKIHRQIYEHGVPQAPLAVTGETEK TGTM				166	
Query 361	VRFWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLRELSFLNSGVSIRLRDKRDGKEDHFHYEGGI KAFV				540	
Sbjct 167	VRFWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLRELSFLNSGVSIRLRDKRDGKEDHFHYEGGI KAFV				226	
Query 541	EYLNKNTPIHPNIFYFSTEKDGIGVEVALQWNDGFQENIYCF TNNIPQRDGGTHLAGFR				720	
Sbjct 227	EYLNKNTPIHPNIFYFSTEKDGIGVEVALQWNDGFQENIYCF TNNIPQRDGGTHLAGFR				286	
Query 721	AAMTRTLNAYMDKEGYS K AKVSATGDDA E ESL L IAVSVKMPDPKFS SQT K 873					
Sbjct 287	AAMTRTLNAYMDKEGYS K AKVSATGDDA E EGL L IAVSVKMPDPKFS SQT K 337					

الشكل (3-11) اصطفاف تسلسل الببتيدات (Polypeptide sequence alignment) للقطعة الاولى من العزلة المحلية (Query) E.S1S1 AH من بكتريا *E. coli*، يبين تطابق بنسبة 99% مع عزلات عالمية (Sbjct)؛ وهو دليل على تغير الحامض الأميني (الارجنين بدل اللايسين) و (السيرين بدل الجلایسين) و (المثيونين بدل الفالين)

Escherichia coli strain HS1496 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP142382.1](#) Length: 5227706 Number of Matches: 1

Range 1: 4596 to 5484 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1642 bits(889)	0.0	889/889(100%)	0/889(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCCGAAATTCTCCTCACAGACCAAAGACAAACTGGTTTCTTCTGAGGTGAAATCGGCCG			60
Sbjct 4596	ACCCGAAATTCTCCTCACAGACCAAAGACAAACTGGTTTCTTCTGAGGTGAAATCGGCCG			4655
Query 61	TTGAACAGCAGATGAACGAACTGCTGGCGGAATACCTGCTGGAAAACCCAACCGACGCGA			120
Sbjct 4656	TTGAACAGCAGATGAACGAACTGCTGGCGGAATACCTGCTGGAAAACCCAACCGACGCGA			4715
Query 121	AAATCGTGGTTGGCAAATATCGATGCTGCCCGTGCCCGTGAAGCGGCGCTCGCGCGC			180
Sbjct 4716	AAATCGTGGTTGGCAAATATCGATGCTGCCCGTGCCCGTGAAGCGGCGCTCGCGCGC			4775
Query 181	GTGAAATGACTCGCCGTAAAGGTGCGCTCGACTTAGCGGGCTGCCGGGCAAATGGCAG			240
Sbjct 4776	GTGAAATGACTCGCCGTAAAGGTGCGCTCGACTTAGCGGGCTGCCGGGCAAATGGCAG			4835
Query 241	ACTGCCAGGAACGCGACCCAGCGCTTCCGAACTATACCTAGTGGAAGGGGACTCCGCGG			300
Sbjct 4836	ACTGCCAGGAACGCGACCCAGCGCTTCCGAACTATACCTAGTGGAAGGGGACTCCGCGG			4895
Query 301	GCGGCTCTGCGAAGCAGGGGCGTAACCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTA			360
Sbjct 4896	GCGGCTCTGCGAAGCAGGGGCGTAACCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTA			4955
Query 361	AAATCCTCAACGTCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAAGATGCTCTCTCTCAGGAAAGTGGCGA			420
Sbjct 4956	AAATCCTCAACGTCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAAGATGCTCTCTCTCAGGAAAGTGGCGA			5015
Query 421	CGTTATCACCGCGCTTGGTTGTGGTATCGGTCGTGACGAGTACAACCCGGACAAACTGC			480
Sbjct 5016	CGTTATCACCGCGCTTGGTTGTGGTATCGGTCGTGACGAGTACAACCCGGACAAACTGC			5075
Query 481	GTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACATTCGTACGC			540
Sbjct 5076	GTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACATTCGTACGC			5135
Query 541	TGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTCTACA			600
Sbjct 5136	TGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTCTACA			5195
Query 601	TCGCTCAGCCGCCGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACG			660
Sbjct 5196	TCGCTCAGCCGCCGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACG			5255
Query 661	ACGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATCGCGCTGGATGGCGCAACGCTGCACACCA			720
Sbjct 5256	ACGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATCGCGCTGGATGGCGCAACGCTGCACACCA			5315
Query 721	ACGCCAGTGCACCGGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGAGTACAACG			780
Sbjct 5316	ACGCCAGTGCACCGGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGAGTACAACG			5375
Query 781	CGACGCAGAAAATGATCAACCGCATGGAGCGTCGTTATCCGAAAGCAATGCTGAAAGAGC			840
Sbjct 5376	CGACGCAGAAAATGATCAACCGCATGGAGCGTCGTTATCCGAAAGCAATGCTGAAAGAGC			5435
Query 841	TTATCTATCAGCCGACGCTGACGGAAACCGACCTTTCTGACGAGCAAAC			889
Sbjct 5436	TTATCTATCAGCCGACGCTGACGGAAACCGACCTTTCTGACGAGCAAAC			5484

الشكل (12-3) الاصطاف (Alignment) لنوكليوتيدات جين *gyrB* للقطعة الثانية من العزلة المحلية (Query) E.S3S2 AH-R لبكتريا *E. coli* بواسطة Nucleotide BLAST الذي يبين تطابق تام بنسبة 100% مع عزلات عالمية (Sbjct).

Escherichia coli strain NMBU_W06E18 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP047609.1](#) Length: 5248629 Number of Matches: 1

Range 1: 4205135 to 4206004 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1596 bits(864)	0.0	868/870(99%)	0/870(0%)	Plus/Minus
Query 1	CCAGACCAAAGACAAACTGGTTTCTTCTGAGGTGAAATCGGCGGTTGAACAGCAGATGAA	60		
Sbjct 4206004	CCAGACCAAAGACAAACTGGTTTCTTCTGAGGTGAAATCGGCGGTTGAACAGCAGATGAA	4205945		
Query 61	CGAACTGCTGGCGGAATACCTGCTGGAACA	40		
Sbjct 4205944	CGAACTGCTGGCGGAATACCTGCTGGA	4205885		
Query 121	AATTATCGATGCTGCCCGTGC	40		
Sbjct 4205884	AATTATCGATGCTGCCCGTGC	4205825		
Query 181	TAAAGGTGCGCTCGACTTAGCGGGCTGCCGGGCAA	40		
Sbjct 4205824	TAAAGGTGCGCTCGACTTAGCGGGCTGCCGGGCAA	4205765		
Query 241	TCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTGGTGGAAAGGGACTCCGCGGGCGGCTCTGCGAAGCA	40		
Sbjct 4205764	TCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTGGTGGAAAGGGACTCCGCGGGCGGCTCTGCGAAGCA	4205705		
Query 301	GGGGCGTAACCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAAATCCTCAACGTTGA	40		
Sbjct 4205704	GGGGCGTAACCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAAATCCTCAACGTTGA	4205645		
Query 361	GAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACCGCGCT	40		
Sbjct 4205644	GAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACCGCGCT	4205585		
Query 421	TGGCTGTGGTATTGGTCGTGACGAGTACAACCCGGACAAACTGCGTTATCACAGCATCAT	40		
Sbjct 4205584	TGGCTGTGGTATTGGTCGTGACGAGTACAACCCGGACAAACTGCGTTATCACAGCATCAT	4205525		
Query 481	CATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACATTCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTT	40		
Sbjct 4205524	CATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACATTCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTT	4205465		
Query 541	CTATCGTCAGATGCCGAAATCGTTGAACGCGGTCACGCTTACATCGCTCAGCCGCGCT	40		
Sbjct 4205464	CTATCGTCAGATGCCGAAATCGTTGAACGCGGTCACGCTTACATCGCTCAGCCGCGCT	4205405		
Query 601	GTACAAAGTGAAGAAAGGCAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGAAGCGATGGATCA	40		
Sbjct 4205404	GTACAAAGTGAAGAAAGGCAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGAAGCGATGGATCA	4205345		
Query 661	GTACCAGATCTCTATCGCGCTGGACGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGGC	40		
Sbjct 4205344	GTACCAGATCTCTATCGCGCTGGACGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGGC	4205285		
Query 721	ATTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGAGTACAACGCGACGCAGAAAATGAT	40		
Sbjct 4205284	ATTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGAGTACAACGCGACGCAGAAAATGAT	4205225		
Query 781	CAACCGCATGGAGCGTTCGTTATCCGAAAGCAATGCTGAAAGAGCTTATCTATCAGCCGAC	40		
Sbjct 4205224	CAACCGCATGGAGCGTTCGTTATCCGAAAGCAATGCTGAAAGAGCTTATCTATCAGCCGAC	4205165		
Query 841	GCTGACGGAAACTGACCTCTCTGATGAGCA	870		
Sbjct 4205164	GCTGACGGAAACTGACCTCTCTGATGAGCA	4205135		

الشكل (3-13) الاصطفاف (Alignment) لنوكليوتيدات جين *gyrB* للقطعة الثانية من العزلة المحلية (Query) لـ *E. coli* E.S6S2 AH-R ليكتريا *E. coli* بواسطة Nucleotide BLAST الذي يبين تطابق بنسبة 99% مع تسلسلات لعزلات عالمية (Sbjct). حيث ان الاستبدال في قاعدة نتروجينية واحدة (السايتوسين بدل الادنين) و (الثايمين بدل الادنين)

DNA gyrase subunit B, partial [Escherichia coli]
 Sequence ID: [WP_116991682.1](#) Length: 513 Number of Matches: 1

Range 1: 39 to 333 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
577 bits(1486)	0.0	Compositional matrix adjust.	295/295(100%)	295/295(100%)	0/295(0%)	+3
Query 3	PKFSSQTKDKLVSSSEVKS	SAVEQQMNELLAEYLL	ENPTDAKIVVGKIIDA	aararearrar	182	
Sbjct 39	PKFSSQTKDKLVSSSEVKS	SAVEQQMNELLAEYLL	ENPTDAKIVVGKIIDA	AARAREARRAR	98	
Query 183	eMTRRRGALDLAGLPGKL	ADQCQERDPALSEL	YLVGDSAGGSAKQGR	NRKNQAILPLKGG	362	
Sbjct 99	eMTRRRGALDLAGLPGKL	ADQCQERDPALSEL	YLVGDSAGGSAKQGR	NRKNQAILPLKGG	158	
Query 363	ILNVEKARFDKMLSSQ	EVATLITALGCGIGR	DEYNPDKLRYHSII	IMTDADVDGSHIRTL	542	
Sbjct 159	ILNVEKARFDKMLSSQ	EVATLITALGCGIGR	DEYNPDKLRYHSII	IMTDADVDGSHIRTL	218	
Query 543	LLTFFYRQMP	EIVERGHVYIAQPPLY	KVKKGKQEQYIKD	EAMDQYQISIALD	GATLHTN	722
Sbjct 219	LLTFFYRQMP	EIVERGHVYIAQPPLY	KVKKGKQEQYIKD	EAMDQYQISIALD	GATLHTN	278
Query 723	ASAPALAGEALEKLV	SEYNATQKMINRM	MERRYPKAMKELI	YQPTLTETDLSDEQ	887	
Sbjct 279	ASAPALAGEALEKLV	SEYNATQKMINRM	MERRYPKAMKELI	YQPTLTETDLSDEQ	333	

الشكل (3-14) اصطفاف تسلسل الببتيدات (Polypeptide sequence alignment) للقطعة الثانية من العزلة المحلية (Query) E.S3S2 AH-R من بكتريا *E. coli* بواسطة BLASTx، يبين تطابق تام بنسبة 100% مع عزلات عالمية (Sbjct).

DNA gyrase subunit B, partial [Escherichia coli]
 Sequence ID: [WP_116991682.1](#) Length: 513 Number of Matches: 1

Range 1: 44 to 332 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame	
557 bits(1435)	0.0	Compositional matrix adjust.	287/289(99%)	288/289(99%)	0/289(0%)	+2	
Query 2	QTKDKLVSSSEVKS	SAVEQQMNELLAEYLL	EHP	IANI	IVVGKIIDA	aararearrareMTRR	181
Sbjct 44	QTKDKLVSSSEVKS	SAVEQQMNELLAEYLL	E+PT	IAI	IVVGKIIDA	AARAREARRAREMTRR	103
Query 182	KGALDLAGLPGKL	ADQCQERDPALSEL	YLVGDSAGGSAKQGR	NRKNQAILPLKGG	ILNVE	361	
Sbjct 104	KGALDLAGLPGKL	ADQCQERDPALSEL	YLVGDSAGGSAKQGR	NRKNQAILPLKGG	ILNVE	163	
Query 362	KARFDKMLSSQ	EVATLITALGCGIGR	DEYNPDKLRYHSII	IMTDADVDGSHIRTL	LLLTFF	541	
Sbjct 164	KARFDKMLSSQ	EVATLITALGCGIGR	DEYNPDKLRYHSII	IMTDADVDGSHIRTL	LLLTFF	223	
Query 542	YRQMP	EIVERGHVYIAQPPLY	KVKKGKQEQYIKD	EAMDQYQISIALD	GATLHTNASAPA	721	
Sbjct 224	YRQMP	EIVERGHVYIAQPPLY	KVKKGKQEQYIKD	EAMDQYQISIALD	GATLHTNASAPA	283	
Query 722	LAGEALEKLV	SEYNATQKMINRM	MERRYPKAMKELI	YQPTLTETDLSDE	868		
Sbjct 284	LAGEALEKLV	SEYNATQKMINRM	MERRYPKAMKELI	YQPTLTETDLSDE	332		

الشكل (3-15) اصطفاف تسلسل الببتيدات (Polypeptide sequence alignment) للقطعة الثانية من العزلة المحلية (Query) E.S60S2 AH-R من بكتريا *E. coli* بواسطة BLASTx، يبين تطابق بنسبة 99% مع عزلات عالمية (Sbjct). وهو دليل على تغير الحامض الأميني (الهستدين بدل الاسبارجين) والاسباراجين بدل اللايسين

الجدول (3-3) يمثل مقارنة بالتطابق بين تسلسلات العزلات المحلية لجين *gyrB* مع التسلسلات الدولية المتطابقة الموجودة في GenBank. للقطعة الاولى للجين *gyrB*

القيمة المتوقعة E-value	التطابقات Identities %	المصدر Reference	المنشأ Source	ارقام انضمام العزلات العالمية وتطابقها مع العزلات المحلية BLAST match Accession No.	ارقام انضمام العزلات المحلية وتسجيلها في بنك الجينات Local isolated sequence accession no.	العزلات المحلية Local isolated	ت No.
0	99.66%	Yin ,2020	CHINA	CP055251.1	PP240829	E.S1S1 AH	1
0	99.78%	Hej ,2020	CHINA	CP051219.1	PP240830	E.S2S1 AH	2
0	99.76%	Braun ,2023	GERMANY	CP139794.1	PP240831	E.S3S1 AH-R	3
0	98.73%	Sharon <i>et al.</i> , 2020	USA	CP054236.1	PP240832	E.S4S1 AH	4
0	100%	Sugawara <i>et al.</i> , 2020	JAPAN	AP023237.1	PP240833	E.S5S1 AH-R	5
0	99.77%	Stephen <i>et al.</i> , 2020	USA	CP054371.1	PP240834	E.S6S1 AH-R	6
0	100%	Shropshire <i>et al.</i> , 2022	USA	CP103739.1	PP240835	E.S7S1 AH	7
0	99.66%	Yin., 2020	CHINA	CP055251.1	PP240836	E.S8S1 AH	8
0	100%	Finton <i>et al.</i> , 2020	NORWAY	CP047609.1	PP240837	E.S11S1 AH-R	9
0	100%	Hergert <i>et al.</i> , 2023	USA	CP137935.1	PP240838	E.S12S1 AH-R	10
0	100%	Mesial <i>et al.</i> , 2020	NORWAY	CP043406.1	PP240839	E.S13S1 AH	11
0	99.77%	Nuguyen <i>et al.</i> , 2020	USA	CP054236.1	PP240840	E.15S1 AH	12
0	99.43%	Yin ,2020	CHINA	CP055251.1	PP240841	E.S17S1 AH	13
0	100%	Leclerc ,2023	FRANCE	OY754377.1	PP240842	E.S19S1 AH	14
0	100%	Yin ,2020	CHINA	CP055251.1	PP240843	E.S20S1 AH	15
0	100%	Sugawara <i>et al.</i> , 2020	MYANMAR	AP023237.1	PP240844	E.S22S1 AH-R	16
0	100%	Finton <i>et al.</i> , 2020	NORWAY	CP043406.1	PP240845	E.S23S1 AH	17
0	100%	Pocellato <i>et al.</i> , 2020	NORWAY	CP047609.1	PP240846	E.S24S1 AH-R	18
0	100%	Hergert <i>et al.</i> , 2023	USA	CP137935.1	PP240847	E.S26S1 AH-R	19
0	100%	Braun., 2023	GERMANY	CP139794.1	PP240848	E.S27S1 AH-R	20
0	99.77%	Yin, 2020	CHINA	CP055251.1	PP240849	E.S28S1 AH	21
0	100%	Wright <i>et al.</i> , 2020	USA	CP054454.1	PP240850	E.S29S1 AH	22
0	100%	Braun ,2023	GERMANY	CP139794.1	PP240851	E.S31S1 AH-R	23
0	100%	Tanimoto <i>et al.</i> , 2018	GERMANY	AP139794.1	PP240852	E.S32S1 AH-R	24
0	100%	Finton <i>et al.</i> , 2020	NORWAY	CP043406.1	PP240853	E.S33S1 AH	25
0	100%	Patel <i>et al.</i> , 2018	USA	CP027579.1	PP240854	E.S38S1 AH	26

0	100%	Li <i>et al.</i> , 2020	CHINA	CP053730.1	PP240855	E.S39S1 AH	27
0	99.89%	Kang <i>et al.</i> , 2024	CANADA	CP136993.2	PP240856	E.S40S1 AH-R	28
0	99.67%	Naithan <i>et al.</i> , 2020	IRELAND	CP026939.2	PP240857	E.S41S1 AH	29
0	100%	Sugawara <i>et al.</i> , 2020	JAPAN	AP023237.1	PP240858	E.S45S1 AH-R	30
0	100%	Lu ,2020	CHINA	CP047662.1	PP240859	E.S48S1 AH	31
0	99.44%	Yin ,2020	CHINA	CP055251.1	PP240860	E.S50S1 AH-R	32
0	100%	Tanimoto & Nishikawa (2018)	JAPAN	AP018784.2	PP240861	E.S54S1 AH-R	33
0	99.66%	Kang <i>et al.</i> , 2023	CANADA	CP136993.2	PP240862	E.S55S1 AH-R	34
0	99.66%	Shgawara <i>et al.</i> , 2020	JAPAN	AP023237.1	PP240863	E.S56S1 AH-R	35
0	100%	Stephens <i>et al.</i> , 2020	USA	CP054363.1	PP240864	E.S57S1 AH-R	36
0	100%	Shropshire ,2022	USA	CP103739.1	PP240865	E.S58S1 AH-R	37
0	100%	Shgawara <i>et al.</i> , 2020	JAPAN	AP023237.1	PP240866	E.S59S1 AH-R	38
0	100%	Finton <i>et al.</i> , 2020	NORWAY	CP047609.1	PP240867	E.S60S1 AH-R	39

الجدول (3-4) يمثل مقارنة بالتطابق بين تسلسلات العزلات المحلية لجين *gyrB* مع التسلسلات الدولية المتطابقة الموجودة في GenBank. للقطعة الثانية للجين *gyrB*

القيمة المتوقعة E-value	التطابقات Identities %	المصدر Reference	المنشأ Source	ارقام انضمام العزلات العالمية وتطابقها مع العزلات المحلية BLAST match Accession No.	ارقام انضمام العزلات المحلية وتسجيلها في بنك الجينات Local isolated sequence accession no.	العزلات المحلية Local isolated	ت .No
0	100%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240868	E.S2S1 AH	1
0	100%	Jiang <i>et al.</i> ,2024	CHINA	CP142382.1	PP240869	E.S3S2 AH-R	2
0	99.77%	Sharon <i>et al.</i> ,2020	USA	CP054236.1	PP240870	E.S4S2 AH	3
0	100%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240871	E.S5S2 AH-R	4
0	100%	Stephen <i>et al.</i> ,2020	USA	CP054371.1	PP240872	E.S6S2 AH-R	5
0	100%	Wen <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP123963.1	PP240873	E.S7S2 AH	6
0	99.89%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240874	E.S8S2 AH	7
0	100%	Finton <i>et al.</i> ,2020	NORWAY	CP047609.1	PP240875	E.S11S2 AH-R	8
0	100%	Wen <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP123963.1	PP240876	E.S12S2 AH-R	9

0	99.88%	Stephen <i>et al.</i> ,2020	USA	CP055158.1	PP240877	E.S13S2 AH	10
0	100%	Sharon <i>et al.</i> ,2020	USA	CP054236.1	PP240878	E.15S2 AH	11
0	99.63%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240879	E.S17S2 AH	12
0	100%	Campos-Madueno <i>et al.</i> ,2024	Switzerland	CP145634.1	PP240880	E.S19S2 AH	13
0	99.87%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240881	E.S20S2 AH	14
0	100%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240882	E.S22S1 AH-R	15
0	100%	Stephen <i>et al.</i> ,2020	USA	CP055158.1	PP240883	E.S23S2 AH	16
0	100%	Finton <i>et al.</i> ,2020	NORWAY	CP047609.1	PP240884	E.S24S2 AH-R	17
0	99.36%	Yin.,2020	CHINA	CP055256.1	PP240885	E.S26S2 AH-R	18
0	99.65%	Jiang <i>et al.</i> ,2024	CHINA	CP142382.1	PP240886	E.S27S2 AH-R	19
0	99.77%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240887	E.S28S2 AH	20
0	99.88%	Stephen <i>et al.</i> ,2020	USA	CP054454.1	PP240888	E.S29S2 AH	21
0	100%	Jiang <i>et al.</i> ,2024	CHINA	CP142382.1	PP240889	E.S31S2 AH-R	22
0	99.88%	Jiang <i>et al.</i> ,2024	CHINA	AP139794.1	PP240890	E.S32S2 AH-R	23
0	100%	Stephen <i>et al.</i> ,2020	USA	CP055158.1	PP240891	E.S33S2 AH	24
0	100%	Patel <i>et al.</i> ,2018	USA	CP027579.1	PP240892	E.S38S2 AH	25
0	99.88%	Wen <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP123963.1	PP240893	E.S39S2 AH	26
0	100%	Nguyen <i>et al.</i> ,2020	IRELAND	CP026939.2	PP240894	E.S41S2 AH	27
0	100%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240895	E.S45S2 AH-R	28
0	100%	Tyson <i>et al.</i> ,2019	USA	CP043750.1	PP240896	E.S48S2 AH	29
0	100%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240897	E.S50S2 AH-R	30
0	100%	Jiang <i>et al.</i> ,2024	CHINA	CP142382.1	PP240898	E.S54S2 AH-R	31
0	100%	Wen <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP123963.1	PP240899	E.S55S2 AH-R	32
0	100%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240900	E.S56S2 AH-R	33
0	99.78%	Desloges <i>et al.</i> ,2019	Canada	CP041304.1	PP240901	E.S57S2 AH-R	34
0	100%	Wen <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP123963.1	PP240902	E.S58S2 AH-R	35
0	99.89%	Li <i>et al.</i> ,2023	CHINA	CP142580.1	PP240903	E.S59S2 AH-R	36
0	99.77%	Finton <i>et al.</i> ,2020	NORWAY	CP047609.1	PP240904	E.S60S2 AH-R	37

يعد رقم الإنضمام (accession number)، التطابق (identities) والقيمة المتوقعة (E.value) عناصر إخراج مهمة لبرنامج BLAST الخاص بـ NCBI الذي يكشف عن معلومات حول التشابه بين تسلسل عزلات الدراسة والتسلسلات الموجودة في قواعد البيانات، إذ تقوم قاعدة بيانات التسلسل، مثل GenBank، بتعيين معرف فريد للسجل يسمى رقم الانضمام. يتم استخدامه لتحديد تسلسل قاعدة بيانات معينة. يتكون رقم الانضمام عادةً من مجموعة من الحروف والأرقام، ويعمل بمثابة اتصال بسجل التسلسل الكامل، الذي يحتوي على حقائق حول تاريخ التسلسل والغرض منه والمعلومات الأخرى ذات الصلة، ويشار إلى عدد الوحدات البنائية المتطابقة في الإصطاف بين تسلسل query والتسلسل المطابق sbjct من قاعدة البيانات بالهويات التعريفية (Identities). حيث يعبر عن درجة التشابه بين التسلسلات. تتم الإشارة إلى قدر أكبر من التشابه بين التسلسلات عن طريق قيم هوية أعلى؛ مما يزيد من احتمال أن تكون مرتبطة أو تشترك في الأصل، أيضاً يتم تقديم تقدير لاحتمال حدوث الاصطاف بين تسلسل query والتسلسل المطابق sbjct من قاعدة البيانات بواسطة القيمة E، المعروفة أيضاً بالقيمة المتوقعة. وبعبارة أخرى، فإنه يمثل احتمال أن يكون التشابه الملحوظ نتيجة الصدفة البحتة وليس علاقة بيولوجية فعلية. تشير القيمة E المنخفضة إلى احتمالية أعلى للارتباط أو سلف مشترك بين التسلسلات؛ لأنها تظهر أن التشابه الملحوظ من غير المرجح أن يكون نتيجة للصدفة. غالباً ما تشير القيم الإلكترونية المنخفضة إلى تطابقات ذات معنى أكبر. يتم استخدام القيمة الإلكترونية بشكل متكرر كعتبة لتقييم مدى ملاءمة المطابقة (Madden,2003).

في عام 1997م، تم نشر الجينوم الكامل لإحدى سلالات بكتيريا *E.coli* (سلالة K12 وتحديداً النسخة MG1655) بواسطة مجلة Science، مما يجعلها واحدة من أولى الأنواع التي تم تسلسل جينومها بالكامل. تحتوي بكتيريا *E.coli* على جزيء DNA دائري يحتوي على 4288 جيناً مشفراً للبروتين (مرتبة في 2584 operons)، وسبعة operons لتشغيل RNA الريباسي (rRNA)، و86 operons) للحمض النووي الريبسي الناقل (tRNA) (Basavaraju & Gunashree , 2022).

تشير التقديرات إلى أن الجينوم الأساسي لبكتيريا *E.coli* يحتوي على أقل من 1500 جين، في حين أنه يحتوي على جينوم ضخم يضم أكثر من 22000 جين (NandaKafle et al., 2017). وهناك 27621 مجموعة من جينومات بكتيريا *E.coli* وتسلسلات توضيحية متاحة حتى

الآن، ويتكون كل جينوم من 4000 إلى 5500 جين. و يتم ترتيب جينوم بكتريا *E.coli* ككل بشكل ملحوظ من حيث اتجاه التضاعف و oligonucleotides التي قد تشارك في التضاعف وإعادة التركيب. (Basavaraju & Gunashree, 2022) ، ووجد أن كثافة التشفير في جينوم بكتريا *E.coli* عالية للغاية ، حيث يبلغ متوسط المسافة بين الجينات 118 زوجاً قاعدياً فقط. تسهم العديد من العوامل في زيادة كثافة الجينات، على سبيل المثال، تفتقر الجينات البكتيرية إلى الإنترونات في جميع أنحاء الجينوم، وان الجينات المتجاورة تكون قريبة من بعضها بعض، أي أنه لا يوجد العديد من مقاطع DNA الكبيرة غير المشفرة بين الجينات. وايضاً وجود العديد من العناصر الجينية القابلة للانتقال، وغيرها. (Morozova et al., 2022)

تعدّ بكتريا *E.coli* نموذجاً ممتازاً لدراسة الخصائص العامة للبروتين البكتيري، بسبب ديناميكياتها في ظل المواقف الفسيولوجية المختلفة، ونطاقها الديناميكي للتعبير، وتغيراتها. وفقاً لبيانات التسلسل الجينومي لبكتريا *E.coli*، فإنّ هناك 4364 ORFs، ويعرف إطار القراءة المفتوح (Open Reading Frames (ORFs)، على أنه طريقة لقراءة وتقسيم تسلسل النوكليوتيدات في جزيء الحمض نووي (DNA أو RNA) إلى مجموعات متتالية وغير متداخلة من النوكليوتيدات الثلاثية التي تسمى كودونات. إنّ إطار القراءة يملك قابلية أن يُترجم إلى ناتج جيني (بروتين أو RNA غير مشفر وظيفياً)، وهو مفهوم يُعرّف على أنه امتداد مستمر من الكودونات يبدأ عادة بكودون بداية (AUG) الذي يشفر للحامض الأميني methionine، وينتهي بكودون توقف (UAA أو UAG أو UGA) ويُستخدم كوسيلة للتنبؤ الأولي بالجينات في السلالات البكتيرية. (Couso & Patraquim, 2017; Basavaraju & Gunashree, 2022)

تم استخدام بروتين بكتريا *E.coli* كمعيار لتقييم التقنيات والمنهجيات الجديدة والتحقق من صحتها في المختبرات في السنوات الأخيرة، بما في ذلك protein pre-fractionation، enrichment، والترحيل الكهربائي للهلام ثنائي الأبعاد two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)، وتحديد البروتين، وقياس طيف الكتلة الحيوية (MS)، بالمقارنة مع بروتينات الكائنات الحية الأخرى مثل النباتات والحيوانات، فإنّ بروتينات بكتريا *E.coli* أصغر بكثير ولديها تعديل قليل للبروتين، ومن ثمّ توفر نموذجاً ممتازاً لمختلف الاحتياجات البحثية. يتم تعزيز استخدام بروتين بكتريا *E.coli* كنموذج عن طريق وجود قواعد بيانات عامة مثل-SWISS PROT و NCBI التي تحتوي على معلومات غنية عن البروتينات والجينات المقابلة لبكتيريا

بكتريا *E.coli* ووجود خرائط لبكتريا *E.coli*، والتي تعتمد على كمية كبيرة من البيانات البيوكيميائية والبيولوجية (Weiner & Li, 2008).

5-3 اصطفاف التسلسلات المتعدد لجين *gyrB* *gyrB* multiple Sequence Alignment

تمت تعيين تسلسلات الاصطفاف لجميع العينات عن طريق استخدام برنامج MEGA11 واستخدام اختيار ClustalW، وبذلك تضمن العينات عزلات سريرية محلية مع تسلسلات عالمية مقابلة وهي تنتمي إلى عزلات مختلفة. بالإضافة إلى ذلك، كانت بعض عزلات الدراسة الحالية مطابقة تماماً مع العزلات العالمية، في حين اختلفت بعض العزلات مع بعض العزلات العالمية في واحدة أو أكثر من القواعد النيتروجينية. ومن ثم كل تسلسلات جزيئات DNA للعزلات السريرية المحلية تم ترجمتها إلى تسلسلات أحماض أمينية مقابلة لها باستخدام برنامج BLASTx، وتم عمل اصطفاف للتسلسلات سوياً وتمت مطابقتها أيضاً مع عزلات عالمية حيث كانت بعض عزلات الدراسة الحالية متشابهة تماماً مع العزلات العالمية، في حين اختلفت بعض العزلات مع بعض العزلات العالمية في واحدة أو أكثر من الأحماض الأمينية.

لغرض تحديد الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية في تسلسل DNA محدد في الجينوم، يجب أولاً العثور على التسلسل في ذلك الجينوم، والذي يمكن تحقيقه عن طريق اصطفاف التسلسل (sequence alignment) بمقابل تسلسل مرجعي محدد مسبقاً Reference sequence (Wattam et al., 2014).

وبما أن الجينات والجينومات ليست متشابهة في الطول، فإنَّ الإصطفافات العالمية (global alignment) ليست خياراً مفضلاً، ولهذا السبب، يتم استخدام أداة الاصطفاف المحلية (local alignment) (BLAST) للعثور على التسلسل الصحيح في الجينوم. حيث أنَّها الأداة الأكثر استخداماً للإصطفافات المحلية، وتحتوي على جميع الوظائف اللازمة لذلك (Boström et al., 2017).

يتم استخدام أداة (BLAST) لتشغيل Megablast، وهو مناسب للتسلسلات المتشابهة إلى حد كبير (حوالي 95% sequence identity).

وتكون عملية الاصطفاف المحلية (alignment local) الأولى في كثير من الحالات كافية لاستدعاء الطفرة، حيث أن معظم النيوكليوتيدات تكون قابلة للمقارنة بين التسلسلات بشكل مباشر عن طريق الاصطفاف (Alignment)، ومع ذلك، هناك بعض الحالات التي تتطلب استخراج الاصطفاف الشامل قبل الاستعلام عن الطفرة، على سبيل المثال، إذا كانت هناك طفرات في نهاية التسلسل الذي تم اصطفافه، فقد ينتهي الأمر بعدم تضمينها في محاذاة BLAST، وبالمثل، إذا كانت هناك منطقة كبيرة غير متطابقة، أو عمليات إدراج أو حذف كبيرة، في التسلسلات المصطفة، فسوف يميل BLAST إلى تقسيم المحاذاة إلى ضربتين (hits)، واحدة على كل جانب من المنطقة غير المتطابقة؛ قد تؤدي كلتا الحالتين إلى فقدان الطفرات في أثناء الاستعلام عن الطفرات، وربما حتى في تغييرات الإطارات المفقودة التي تؤدي إلى تسلسل حمض أميني مختلف تماماً بعد الترجمة؛ لهذه الأسباب، يتم استخدام اصطفاف BLAST فقط للعثور على المنطقة الصحيحة في الجينوم، التي يتم بعد ذلك استخراجها لاصطفافات عالمية لاحقاً (Johnson *et al.*, 2008 ; Boström *et al.*, 2017).

SER → ASN

GLU → LYS



Species/Abvry	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47																																																																																														
1. E.coli complete genome	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
2. E.coli USA e2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
3. E.coli unifrd kingdom s2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
4. E.coli Switzerland S2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
5. E.coli Sudan S2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
6. E.coli Netherland S2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
7. E.coli France S2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
8. E.coli Canada S2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
9. E.coli Bulgaria S2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
10. E.coli Belgium S2	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
11. E.S66S2 AH-R	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
12. E.S48S2 AH	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
13. E.S46S2 AH-R	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
14. E.S41S2 AH	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
15. E.S38S2 AH	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P	L	Y	K	V	K	K	G	K	Q	E	Q	Y	I	K	D	E	A	M	D	Q	Y	Q	S	I	A	L	D	G	A	T	L	H	T	N	A
16. E.S38S2 AH	G	D	S	A	G	G	S	A	K	Q	G	R	R	R	K	N	Q	A	I	L	P	L	K	G	K	I	L	N	V	E	K	A	R	F	D	K	M	L	S	S	Q	E	V	A	L	I	T	A	L	G	C	G	I	G	R	D	E	Y	N	P	D	K	L	R	Y	H	S	I	I	V	T	D	A	D	V	D	G	S	H	I	R	T	L	L	L	F	F	Y	R	Q	M	P	E	I	V	E	R	G	H	V	Y	I	A	Q	P	P																																			

6-3 توليد شعار التسلسل

Sequence logo generation

تُعرف شعارات التسلسل على أنها تصوير رسومي للأنماط التي تظهر في اصطافات تسلسلية متعددة يتم إنتاجها باستخدام برنامج WebLogo، إذ يمكن لشعارات التسلسل أن تكشف بسرعة عن جوانب مهمة من الاصطافات التي قد يكون من الصعب تمييزها، كما أنها توفر تمثيلاً أعمق وأكثر دقة لتشابه التسلسل من التسلسلات المتفق عليها، يتم تكديس الحروف لإنشاء كل شعار، إذ يمثل ارتفاع الرموز داخل المكسد (Stack) التردد النسبي للحمض الأميني المطابق في ذلك المكان، بينما يوضح الارتفاع الإجمالي لكل رمز حفظ التسلسل في ذلك الموقع ويقاس بالبت (BIT) (Crooks *et al.*, 2004)

جميع الطفرات التي ظهرت في الدراسة الحالية هي طفرة استبدال قاعدة نتروجينية بقاعدة أخرى أدت إلى استبدال الأحماض الأمينية، وبالنسبة لتسلسل الأحماض الأمينية في جين *gyrB* لبكتريا *E.coli* (Bhatnagar & Wong, 2019). أظهرت نتائج العزلات المحلية في الموقع (129) إن جميعها تحتوي على الحامض الأميني Lysine(K)، باستثناء العزلة رقم (E.S41S1 AH) أظهرت وجود الحامض الأميني Glutamine(Q) بدلاً عن Lysine(K) ولم يتسبب بمقاومة للكويبولونات.

أما في الموقع (151) كانت جميع العزلات تحتوي على Glutamine(Q) ما عدا العزلة (E.S15S1 AH)، إذ استبدل Glutamine(Q) بالحامض الأميني Histidine(H) وهي عزلة غير مقاومة لمضادات الكويبولون.

وفي العزلة (E.S28S1 AH) لوحظ وجود الحامض الأميني Threonine(T) بدلاً عن الحامض الأميني Serine(S) في الموقع (172)، وإن العزلة البكتيرية كانت غير مقاومة لمضادات الكويبولونات.

لوحظ أن العزلات (E.S4S1AH-R/E.S38S1 AH/E.S29S1 AH/E.S15S1 AH) في الموقع (185) غير مقاومة لمضادات الكويبولون، وكذلك وجود الحامض الأميني Aspartic acid (D) بدلاً من الحامض الأميني Glutamic acid(E)؛ مما يدل على حدوث طفرة في هذا الموقع.

أما في الموقع (191) للعزلة (E.S17S1 AH)، لوحظ وجود Methionine (M) بدلاً عن Leucine(L)، وهي من العزلات غير المقاومة.

في حين أن Proline(P) موجود في العزلة غير المقاومة لمضادات الكويبولون (E.S8S1 AH) بينما كانت جميع العزلات تحتوي على الحامض الأميني Arginine(R) في الموقع (204).

كذلك لوحظ حدوث طفرة في الموقع (248) للعزلة المقاومة لمضادات الكوينولون (E.S4S1AH-R)، كانت جميع العزلات تحتوي على الحامض الأميني Aspartic acid(D) إذ استبدل بالحامض الأميني Histidine(H) لهذه العزلة، ونفس العزلة حدثت طفرة في الموقع (301) ، فوجد Arginine(R) بدلاً عن Glycine(G) الموجود في جميع العزلات، كذلك في الموقع (253) لنفس العزلة وللعزلة غير المقاومة (E.S8S1 AH) وجد الحامض الأميني Glutamate(Q) بدل الحامض الأميني Glutamic acid(E).

ولوحظ أنّ في الموقع (374) تحتوي جميع العزلات على الحامض الأميني Lysine(K)، بينما تحتوي العزلة (E.S27S2 AH-R) على Therionine (T) في نفس الموقع وهي من العينات المقاومة.

وحدثت طفرة سببت تغير في الحامض الأميني Serine(S)، حيث استبدل بالحامض الأميني Asparagine(N) للعزلة المقاومة (E.S57S2 AH-R) في الموقع (492).

أما الموقع (550) في العزلتين (E.S13S2 AH و E.S28S2AH) وهي من العزلات غير المقاومة، لوحظ وجود الحامض الأميني Lysine (K) بدلاً عن Glutamic acid(E).

وبالنسبة للموقع (596) للعزلة المحلية المقاومة (E.S26S2 AH-R) وجد أنّ الحامض الأميني Arginine(R) الموجود في جميع العزلات استبدل بالحامض الأميني Serine(S).

تحتوي أيضاً جميع العزلات المحلية على الحامض الأميني Methionine في الموقع (597) باستثناء العزلة رقم (E.S26S2 AH-R) لوحظ حدوث طفرة في هذا الموقع بوجود Leucine(L) بدل الحامض الأميني Methionin (M).

أما باقي العزلات المحلية الغير المذكورة اعلاه لا توجد طفرات في القواعد النيتروجينية او وجود طفرات استبدال لم تؤدي لتغيير الحمض الاميني لوجود عدة كودونات لنفس الحمض الاميني، كما موضح في الشكل (24-3) والشكل (25-3).





الشكل (3-24) يوضح تمثيل التسلسلات للعزلات المحلية للقطعة الأولى لجين *gyrB* بواسطة برنامج Weblogo لتوضيح التناقيات او التغيرات في الأحماض الأمينية





الشكل (3-25) يوضح تمثيل التسلسلات للعزلات المحلية للقطعة الثانية لجين *gyrB* بواسطة برنامج Weblogo لتوضيح التطابقات او التغيرات في الأحماض الأمينية

ركزت بعض الدراسات على الطفرات الموجهة نحو موقع الحامض الأميني Lys103 وLys110 في الوحدة الفرعية (*GyrB*) لـ (*E. coli* DNA gyrase)، حيث ألغت الطفرات في Lys103 الأنشطة المعتمدة على ATP مثل اللف الفائق والتحلل المائي للطاقة (ATP)، في حين قللت طفرات Lys110 من تقارب ربط ATP (Tamura & Gellert, 1990).

تطور البكتيريا سالبة الكرام آليات لمقاومة الكينولونات، ومن أهمها الطفرات النقطية تحدث تغييرات مفردة في جيناتها، تدعى منطقة تحديد مقاومة الكينولون Quinolone Resistance Determining Region (QRDR)، داخل هذه المنطقة توجد مجموعة من الجينات المسؤولة عن تشفير الوحدات الفرعية لإنزيمات DNA gyrase (*gyrA* و *gyrB*) وإنزيمات topoisomerase IV (*parE* و *parC*)، وتعد الطفرات في *gyrB* او *parE* أقل شيوعاً ولها تأثير طفيف، ويعتقد أن جينات

gyrA و *parC* تخضع لطفرات نقطية في كثير من الأحيان؛ مما يسبب استبدال الأحماض الأمينية (Feng *et al.*, 2020 ; topoisomerase IV في Ser80 و DNA gyrase في Asp87 و Ser83 Finstad , 2022).

يوجد داخل جين *gyrB* الخاص ببكتريا *E.coli* موقعان مهمان لتحديد مقاومة الكينولونات وهما (Asp426 و Lys447)، إذ تحدث الطفرات في منطقة تحديد مقاومة الكينولون (QRDR). تمنح طفرة في النقطة الأولى Asn → Asp426 مقاومة اما للكينولونات القديمة مثل (حمض الناليديكسيك) أو للفلوروكينولونات الجديدة (سيبروفلوكساسين)، في حين أن طفرة النقطة الثانية Glu → Lys447 تمنح مقاومة لحمض الناليديكسيك، وزيادة القابلية لمقاومة الفلوروكينولونات في الاجيال الأحدث (Gómez *et al.*, 2004).

إن تواتر الطفرات في جينات *gyrB* و *parE* أقل بكثير في السلالات السريرية المقاومة للكينولون مقارنة بالطفرات في *gyrA* أو *parC*، لكن من الواضح أنَّ الطفرات في جينات *gyrB* و *parE* تزيد المقاومة في جينات *gyrA* (Azargun *et al.*, 2020). ترتبط الطفرات في Asp426 بمقاومة جميع الكينولونات، التي يبدو أنَّها تقع في المنطقة التي تتصل فيها الأدوية بالإيزوميرات (Wohlkonig *et al.*, 2010) ومع ذلك، فإنَّ الطفرات الأخرى في هذا الجين مثل: (Lys447→Glu) ترتبط فقط بمقاومة حمض الناليديكسيك، وزيادة الحساسية للفلوروكينولونات الأخرى (Mashayekhi *et al.*, 2014 ; Azargun *et al.*, 2020).

أشارت بعض الدراسات إلى امكانية تولد طفرات في *gyrA* تؤثر على زيادة الحساسية لمقاومة الكينولونات في *E.coli* عند حدوث طفرات في *gyrB* او *parE*، على سبيل المثال، فإنَّ الطفرات داخل QRDR لجين *parE* في الموضع (Ser-458→Ala) يمكن أن ترتبط أيضاً بمقاومة الكينولون (Azargun *et al.*, 2020). بينما اشارت دراسات اخرى أن طفرات (Ser80 → Ile) و (Glu84 → Val) هي الطفرات الأكثر شيوعاً في *ParC* لبكتريا *E.coli* المعزولة من مرضى التهاب المسالك البولية، علاوة على ذلك، تم تحديد طفرات (Ser359→Ala) و (Ser367→Thr) و (Gly385→Cys) في *gyrB* في عزلة واحدة من *E.coli*. وقد أظهرت الدراسات السابقة أن DNA gyrase أكثر حساسية للكينولونات من topoisomerase IV (Azargun *et al.*, 2019).

في الواقع، يعدّ DNA gyrase هو الإنزيم الأكثر حساسية في البكتيريا سالبة الكرام، كما أن topoisomerase IV هو الهدف الثانوي للكينولونات في هذه الكائنات الحية الدقيقة، (Hooper & Jacoby, 2015).

على الرغم من ان الطفرات لأنزيمات DNA gyrase تعد من اكثر اسباب مقاومة المضادات الحيوية إلا أن هناك عدة أسباب اخرى محتملة لحدوث المقاومة، بما في ذلك المقاومة البكتيرية لمضخات الدفع الطبيعية (efflux pumps)، تمتلك البكتيريا جينات مشفرة كروموسومياً لمضخات الدفع. تعمل مضخات الدفع في المقام الأول على تخلص الخلية البكتيرية من المواد السامة، والعديد من هذه المضخات ستنتقل مجموعة كبيرة ومتنوعة من المركبات، معظم عائلات مضخات الدفع هذه عبارة عن مضخات أحادية المكون تنقل substrates عبر الغشاء السيتوبلازمي (Villagra *et al.*, 2012 ; Jo *et al.*, 2017).

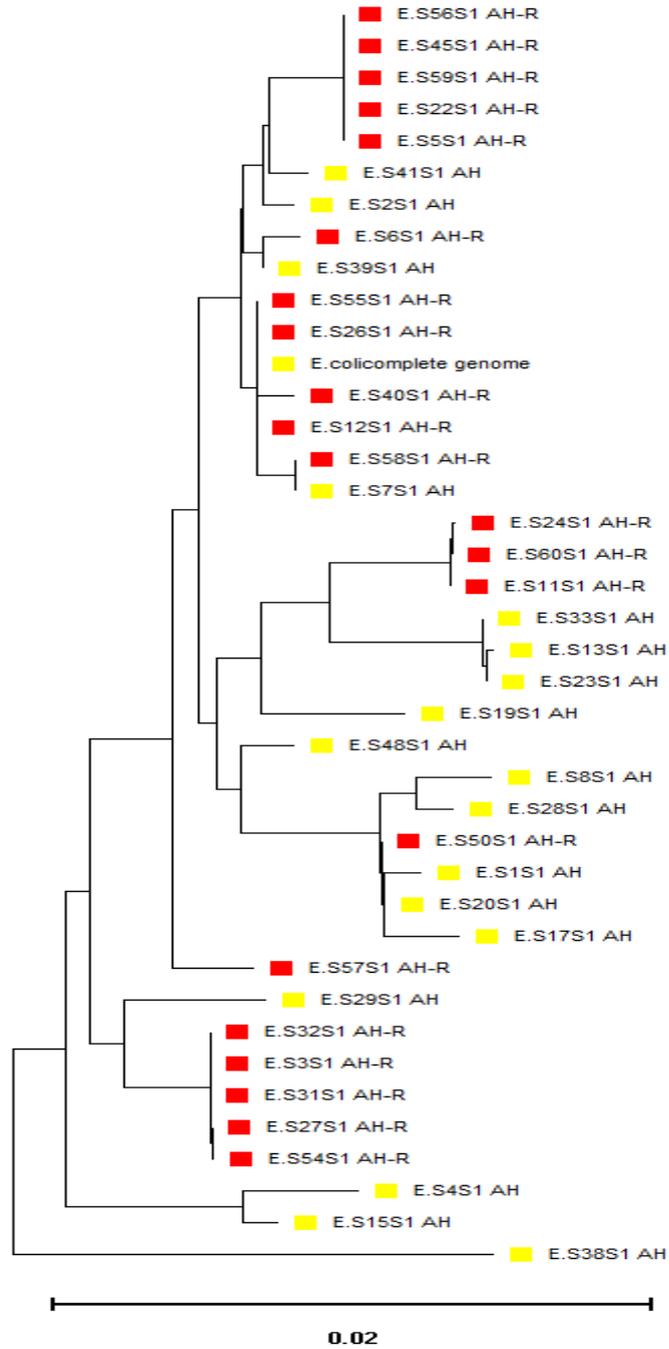
اما السبب الآخر لمقاومة الكينولون يمكن أن يعزى إلى البلازميدات، حيث أظهرت النتائج الحديثة أن مقاومة الكينولون بواسطة البلازميد plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) قد تكون السبب الرئيسي لمقاومة البكتيريا للكينولونات (Badamchi *et al.*, 2019).

Phylogenetic Analysis of *gyrB* gene

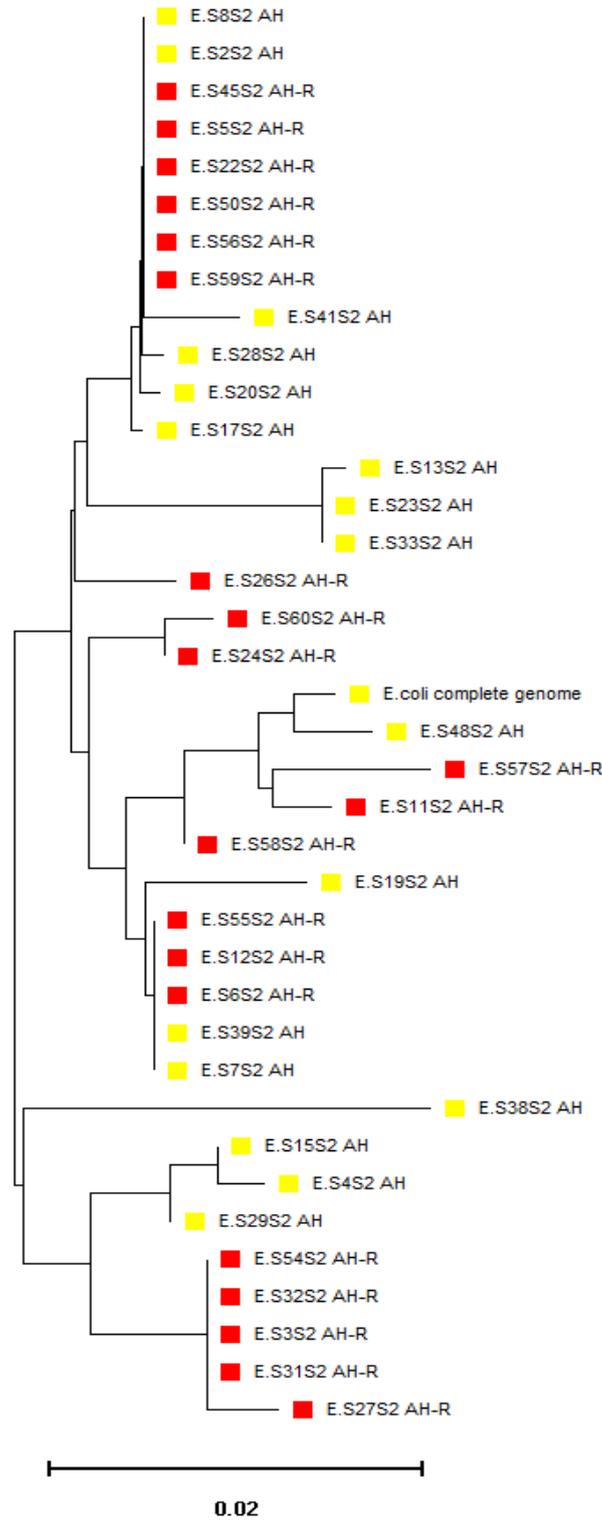
7-3 تحليل الشجرة الوراثية للجين *gyrB*

تم إجراء تحليل الشجرة الوراثية للعزلات السريرية المحلية وعلاقتها مع بعضها البعض وتم رسم الشجرة بمقياس (Scale length = 0.02) كما موضح في الشكل (3-26) للقطعة الاولى من DNA والشكل (3-28) للقطعة الثانية من DNA. كذلك تم عمل الشجرة الوراثية للعينات المحلية ومقارنتها مع العزلات العالمية لإيجاد العلاقة بينهما بطريقة الانضمام المجاور (Neighbor joining) كما موضح في الشكل (3-27) للقطعة الثانية من DNA والشكل (3-29) للقطعة الثانية من DNA.

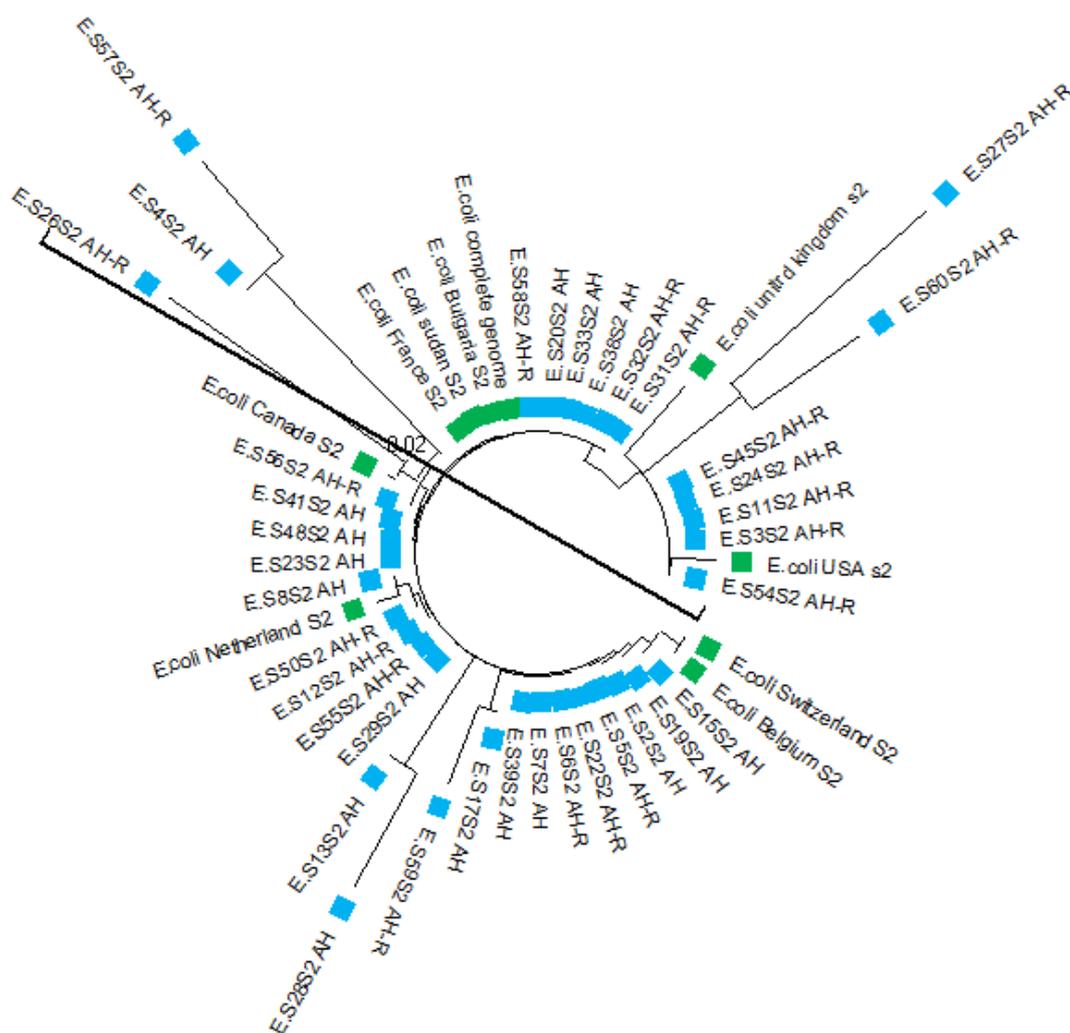
يوضح الشكل (3-27) و الشكل (3-29) علاقة العينات المحلية التي تشمل العزلات السريرية المقاومة وغير المقاومة للمضادات الحيوية الكينولون مع بعضها البعض ومقارنتها بالعينات العالمية حيث أنها موزعة بشكل تقريبي مع العينات العالمية وهذا يدل على وجود تقارب في الصفات الوراثية كما أن بعض العزلات المحلية القليلة متباعدة مما يدل على وجود فروق معنوية في الصفات الوراثية .



الشكل (26-3) الشجرة الوراثية لبكتريا *E.coli* بطريقة Neighbor joining للقطعة الاولى من جين *gyrB* : تبين علاقة العزلات المحلية مع بعضها، اذ يمثل اللون الاحمر (■) العزلات المقاومة لمضادات الكوينولون واللون الاصفر (■) يمثل العزلات الحساسة لمضادات الكوينولون



الشكل (3-28) الشجرة الوراثية لبكتريا *E. coli* بطريقة Neighbor joining للقطعة الثانية من جين *gyrB* : تبين علاقة العزلات المحلية مع بعضها، اذ يمثل اللون الاحمر (■) العزلات المقاومة لمضادات الكوينولون واللون الاصفر (■) يمثل العزلات الحساسة لمضادات الكوينولون



الشكل (3-29) الشجرة الوراثية لبكتريا *E. coli* بطريقة Neighbor joining للقطعة الثانية من جين *gyrB* : تبين علاقة العزلات المحلية والعالمية اذ يمثل اللون الازرق (■) العزلات المحلية بينما يمثل اللون الاخضر (■) العزلات العالمية.

وفقاً لدراسات phylogenetic studies، تم تصنيف سلالات بكتريا *E.coli* إلى أربع مجموعات phylogenetic رئيسية (A، B1، B2 و D) اعتماداً على امراضيتها ومقاومتها للمضادات الحيوية، وبتوسع الابحاث الحديثة اظهرت أن هناك اكثر من سبعة مجموعات وراثية (A، B1، B2 و D، بالإضافة الى C، E و F) جميعها تنتمي الى بكتريا *E.coli*، في حين ان المجموعة الثامنة تدعى بـ Clade I، وكذلك توجد مجموعات تعرف بـ II، III، IV و V (Ahumada-Santos *et al.*, 2020).

تنتمي غالبية السلالات التي تسبب التهابات خارج الأمعاء إلى المجموعة التطورية phylogenetic (B2)، في حين أن السلالات التي تنتمي إلى المجموعتين phylogenetic (A و B1) من المعروف أن لديها إمكانات إمراضية منخفضة خارج الأمعاء.

واظهرت دراسة اجريت من قبل (Katongole *et al.*, 2019)، ان سلالات بكتريا *E.coli* التي تنتمي إلى مجموعات phylogenetic مختلفة بسمات ظاهرية وجينية متنوعة يعتقد أنها تدعم التعايش في بيئات مختلفة.

ولغرض تحديد مجموعات سلالات بكتريا *E.coli*، تم وصف عدة طرق، من بينها الاختبارات المعتمدة على تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction، وكتابة التسلسل متعدد المواقع (MLST) multi-locus sequence typing، وتسلسل *16S rRNA* gene (Logue *et al.*, 2017).

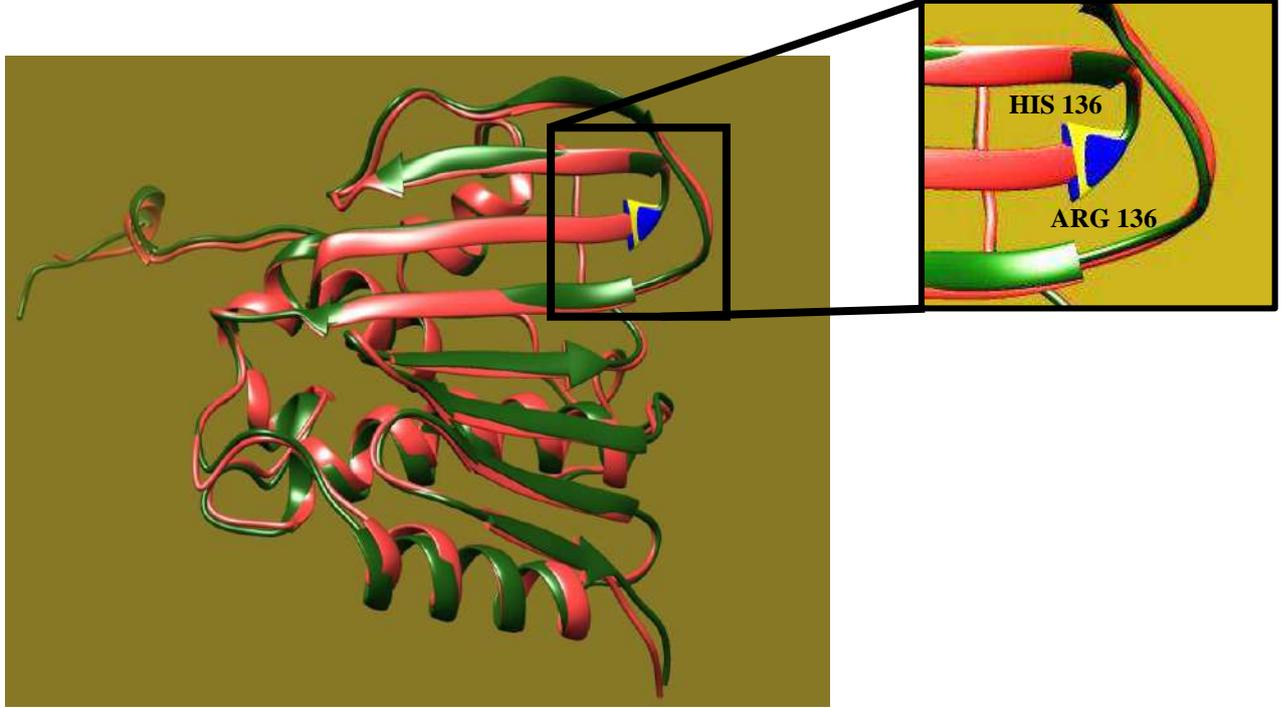
اما لتحديد المجموعات العرقية الأربعة الأصلية المختلفة (A، B1، B2 و D)، يتم استخدام طريقة (Clermont Triplex PCR phylogroup)، ومع ذلك، فقد كشفت الأبحاث أن هذه الطريقة يمكن أن تؤكد فقط 80-85% من جميع مجموعات السلالات (Basavaraju & Gunashree, 2022).

اما لتحديد المجموعات السبعة و Clade I اقترحت الدراسات استخدام تقنية quadruplex PCR، واستخدام تقنية PCR method للكشف عن II، III، IV و V (Iranpour *et al.*, 2015).

8-3 الشكل الثلاثي لجين *gyrB* Three dimensional Structure of *gyrB* protein

تم إجراء التكوين ثلاثي الأبعاد لجين *gyrB* بواسطة برنامج Phyre2 اعتماداً على (Kelley *et al.*, 2015) للعزلات السريرية لبكتيريا *E.coli* وتسلسلاتها الدولية المقابلة لـ (Gross

البروتينية التشابه بين العزلة المحلية مع العزلة الدولية وتوضح اختلاف موضع الأحماض الأمينية بين العزلة المحلية (Argenine بدلاً عن Histidine) في العزلة الدولية كما هو موضح في الشكل (3-30).



الشكل (3-30): التركيب ثلاثي الأبعاد لجين *gyrB* للعزلة السريرية المحلية (E.S1S1 AH) (اللون الأخضر) ومطابقتها مع عزلة دولية (اللون الأحمر) باستخدام UCSF Chimera بين موضع الاختلاف بين العزلة المحلية والدولية في الموقع 136، إذ يمثل اللون الأزرق في العزلة المحلية Argenine بدلاً عن Histidine باللون الأصفر في العزلة الدولية.

9-3 تحديد جيب ربط ATP في جين *gyrB*

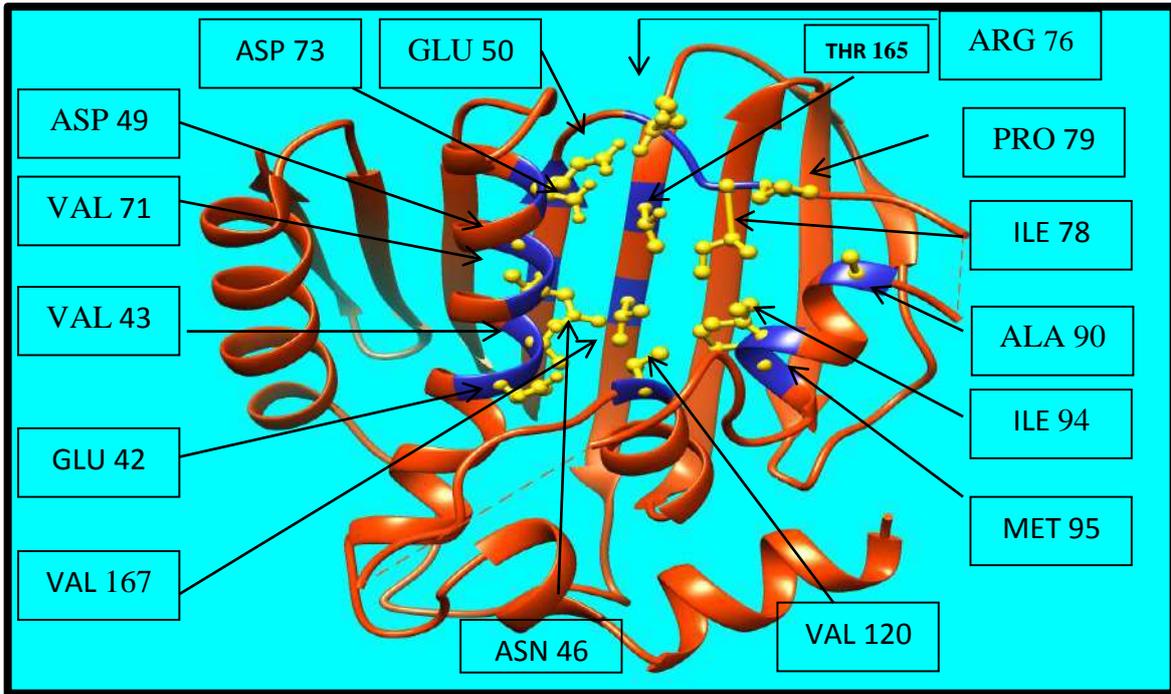
Determination *gyrB* gene ATP binding pocket

يعد جيب ربط ATP في الوحدة الفرعية *gyrB* لبكتريا *E.coli* موقعاً مهماً، يلعب هذا الجيب دوراً محورياً في تحفيز التحلل المائي لـ ATP، وهو أمر ضروري لوظيفة إنزيم جيراز الحمض النووي، يقع جيب ربط ATP في *gyrB* في المنطقة النهائية N من البروتين، ويتشكل عن طريق مزيج من التفاعلات الهيدروفوبية والكهروستاتيكية.

يبطن الجيب بقايا أمينية كارهة للماء تتفاعل مع المناطق غير القطبية من ATP، بينما تساعد البقايا الموجبة الشحنة على استقرار مجموعات الفوسفات سالبة الشحنة، كما موضح في الشكل (3-31)، و تُعد العديد من بقايا الأحماض الأمينية داخل هذا الجيب ضرورية لتحفيز الإنزيم سواء في المختبر أو في

الجسم الحي. على وجه التحديد، تم تحديد بقايا من الأحماض الأمينية بوصفها حاسمة لوظيفة الإنزيم، بما في ذلك D73، G77، I78، E42، N46، E50، R76، P79، K103، V167، V47، M95، وطفرة مقاومة مضاد Novobiocin المعروفة عند R136. بالإضافة إلى ذلك، يتم حفظ بقايا T165 بشكل كبير في جميع وحدات انزيمات Topoisomerase II، إذ يؤثر استبدالها بشكل كبير على نشاط الإنزيم وV120، تؤدي إزالة هذه البقايا الكارهة للماء لطفرة V120A إلى زيادة الألفة لـ ATP، بينما تقلل السلسلة الجانبية الأكبر الكارهة للماء V120M من الألفة وبالتالي عدم تضاعف DNA البكتريا (Lafitte et al., 2002 ; Gross et al., 2003).

يمكن أن تؤثر الطفرات في جيب ربط ATP في *gyrB* على نشاط الإنزيم ووظيفته، على سبيل المثال، يمكن أن تؤدي الطفرات التي تغير التفاعلات الهيدروفوبية داخل الجيب إلى تقليل قدرة الإنزيم على ربط وتحلل ATP؛ مما يؤدي إلى انخفاض نشاطه.



الشكل (3-31) يوضح منطقة ATP binding pocket لجين *gyrB* لبكتريا *E. coli* والأحماض الأمينية المكونة لها بواسطة برنامج USC Chimera (Gross et al., 2003).

Molecular Docking

10-3 الرسو الجزيئي

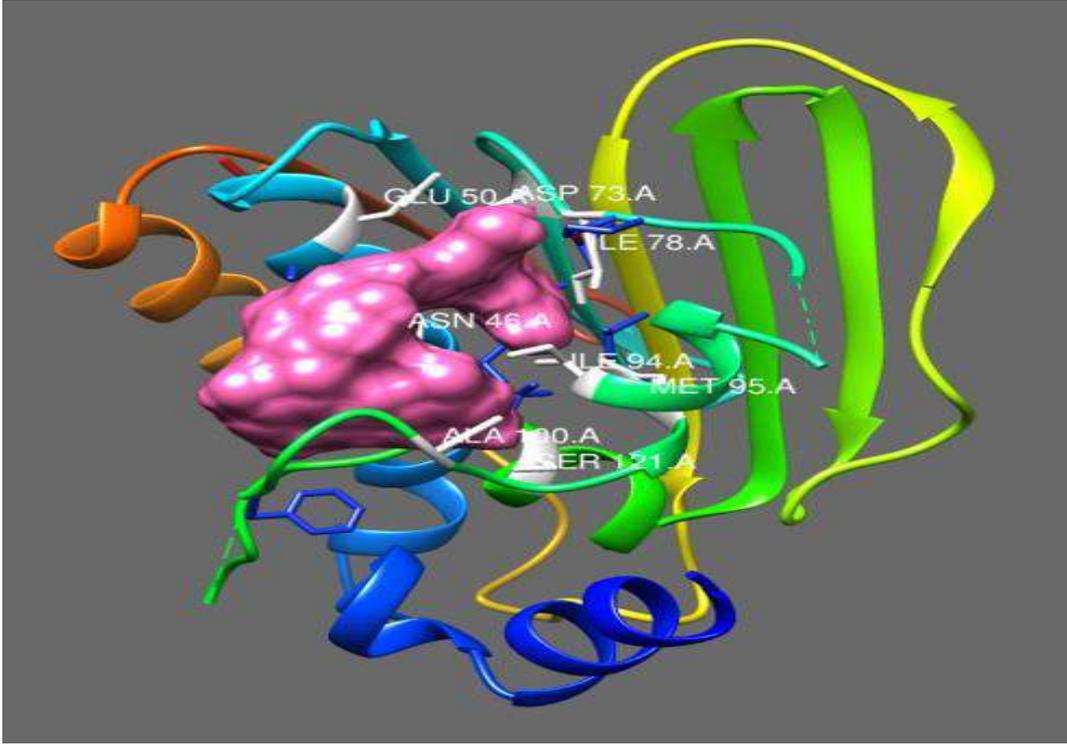
استنادًا إلى درجة الرسو (صافي الطاقة الحرة ΔG)، تم ترتيب المركبات الكيميائية المقترحة في الدراسة، إذ تم ترتيب أفضل المركبات بناءً على درجة الارتباط بالارتباط بـ ATP Active pocket لجين *gyrB* وتثبيت عمله، كما في الجدول (3-5).

الجدول (3-5) يبين بعض المركبات الكيميائية المقترحة للارتباط بـ ATP binding pocket لجين *gyrB*

درجة الرسو Docking score Kcal / Mol	المعرف الكيميائي الدولي	العلاج Drug	ت
	International Chemical Identifier (InChIKey)		
-9.9	DRZQFGYIIYNNEC-UHFFFAOYSA-N	Dieckol	1
-9.6	PEFASEPMJYRQBW-HKWQTAEVSA-N	Robinin	2
-8.9	OXGUCUVFOIWWQJ-HQBVPOQASA-N	Quercitrin	3
-8.8	QYSXJUFSXHHAJI-YRZJJWOYSA-N	Vitamin D3	4
-8.7	MECHNRXZTMCUDQ-RKHKHRCZSA-N	Vitamin D2	5
-8.7	DCYOADKBABEMIQ-OWMUPTOHSAN	Myricitrin	6
-8.7	KYQZWONCHDNPDQ-QNDFHXLGSA-N	Daidzin	7
-8.6	IKGXIBQEEMLURG-NVPNHPEKSA-N	Rutin	8
-8.6	DFPMSGMNTNDNHN-ZPHOTFPESA-N	naringin	9
-8.6	ZCVMWBYGMWKGHF-UHFFFAOYSA-N	ketotifen	10
-8.6	IKGXIBQEEMLURG-NVPNHPEKSA-N	Rutoside	11
-8.5	JJCFRYNCJDLXIK-UHFFFAOYSA-N	Cyproheptadine	12
-8.5	NMGVHLDIHNFGQB-OTCPXFHUSA-N	Xanthorhamnin	13
-8.5	AZELSOYQOIUPBZ-UHFFFAOYSA-N	Dalbergin	14
-8.4	GZSOSUNBTXMUFQ-YFAPSIMESA-N	Diosmin	15
-8.4	SOSLMHZOJATCCP-AEIZVZFYSAN	Afzelin	16
-8.4	MNAYRSRTNMVAPR-UHFFFAOYSA-N	Cascaroside	17
-8.3	QUQPHWDTPGMPEX-QJBIFVCTSAN	Hesperidin	18
-8.3	IKIIZLYTISPENI-ZFORQUDYSAN	Baicalin	19
-8.3	OVSQVDMCBVZWGM-DTGCRPNFSA-N	Hyperin	20
-8.2	ZCOLJUOHXJRHDI-CMWLGVBASAN	Genistin	21
-8.2	QYSPLQLAKJAUJT-UHFFFAOYSA-N	Piroxicam	22
-8.2	DGQLVPJVFQOEV-UHFFFAOYSA-N	Carmine	23
-8.1	FJAQNRBDVKIHK-LFLQOBSNSAN	Clorobiocin	24
-8.1	XUCIJNAGGSZNT-QJHSLDZJXSAN	Amygdalin	25
-8.1	NNYBQONXHNTVIJ-UHFFFAOYSA-N	Etodolac	26
-8.1	DTTVUKLWJFJOHO-FUCRAMRQSAN	Frangulin A	27
-8	VEVZSMAEJFVWIL-UHFFFAOYSA-O	Cyanidin	28
-8	OFWYIUYPVHYPQNX-JXFKEZNVSAN	Phaseollidin	29
-7.9	RTIXKCRFFJGDFG-UHFFFAOYSA-N	Chrysin	30
-7.9	TYNLGDBUJLVSMU-UHFFFAOYSA-N	Diacerein	31
-7.9	REFJWTPEDVJJIY-UHFFFAOYSA-N	Quercetin	32
-7.9	FXNFHKRTJBSTCS-UHFFFAOYSA-N	Baicalein	33
-7.9	IKMDFBPHZJCSN-UHFFFAOYSA-N	Myricetin	34
-7.9	XFDQJKDGGOEYPI-UHFFFAOYSA-O	Peonidin	35
-7.9	YTMFRMLVZQOBDR-WUJWULDRSAN	Flavan-4-ol	36
-7.9	LKZDFKLGDSGEO-UJECXLDQSAN	Sophoraflavonolside	37
-7.9	PCZZRBGISTUIOA-UHFFFAOYSA-N	Eckol	38
-7.9	RJKFOVLPORLFTN-LEKSSAKUSAN	Lutin	39
-7.9	YDQWDHRMZQUTBA-UHFFFAOYSA-N	Emodine	40

أظهر المركب Dieckol نشاطاً جيداً ضد بكتريا *E.coli* وأظهر أعلى طاقة ربط (-9.9) كيلو كالوري/مول من بين المركبات المختبرة كما موضح بالشكل (32-3)، بينما أظهر المركب Robinin نشاطاً جيداً ضد بكتريا *E.coli* واطهر طاقة ربط (-9.6) كيلو كالوري/مول.

في الآونة الأخيرة، تم استخدام التطبيقات الحاسوبية على نطاق واسع للتنبؤ بالتفاعلات الجزيئية على الأنظمة البيولوجية لدراسة التعرف الجزيئي أو تصميم مركبات نشطة بيولوجياً أكثر فعالية. يعد الالتحام الجزيئي والديناميكيات الجزيئية نوعين من الطرق الحاسوبية الحديثة التي يمكن أن توفر التفاعلات الجزيئية بين البروتينات والأدوية وكيفية تثبيت التفاعل؛ ركزت هذه الطرق على معقدات البروتين والدواء (Ligands) لدراسة كيفية ارتباط الأدوية بمستقبلات البروتين، وهو أمر مهم جداً لاكتشاف أو تطوير مركبات نشطة بيولوجياً جديدة في مكافحة الأمراض، علاوة على ذلك، يتم أيضاً تطوير طرق لتحديد بصمات تفاعل البروتين وLigand، والتي تُظهر قوة تطور التفاعل (Wee & Wang, 2017)



الشكل (32-3) يمثل ارتباط المركب الكيميائي Dieckol بـ ATP active pocket للـ *gyrB*

ثم باستخدام الأداة Property calculator الموجودة على منصة Mcule لمعرفة الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمركبات المهمة لحركية الدواء داخل جسم الانسان واخضاعها لقاعدة ليبينسكي (Lipinski's rule of five)، و هي مبدأ توجيهي أساس في اكتشاف الأدوية لتقييم التشابه الدوائي

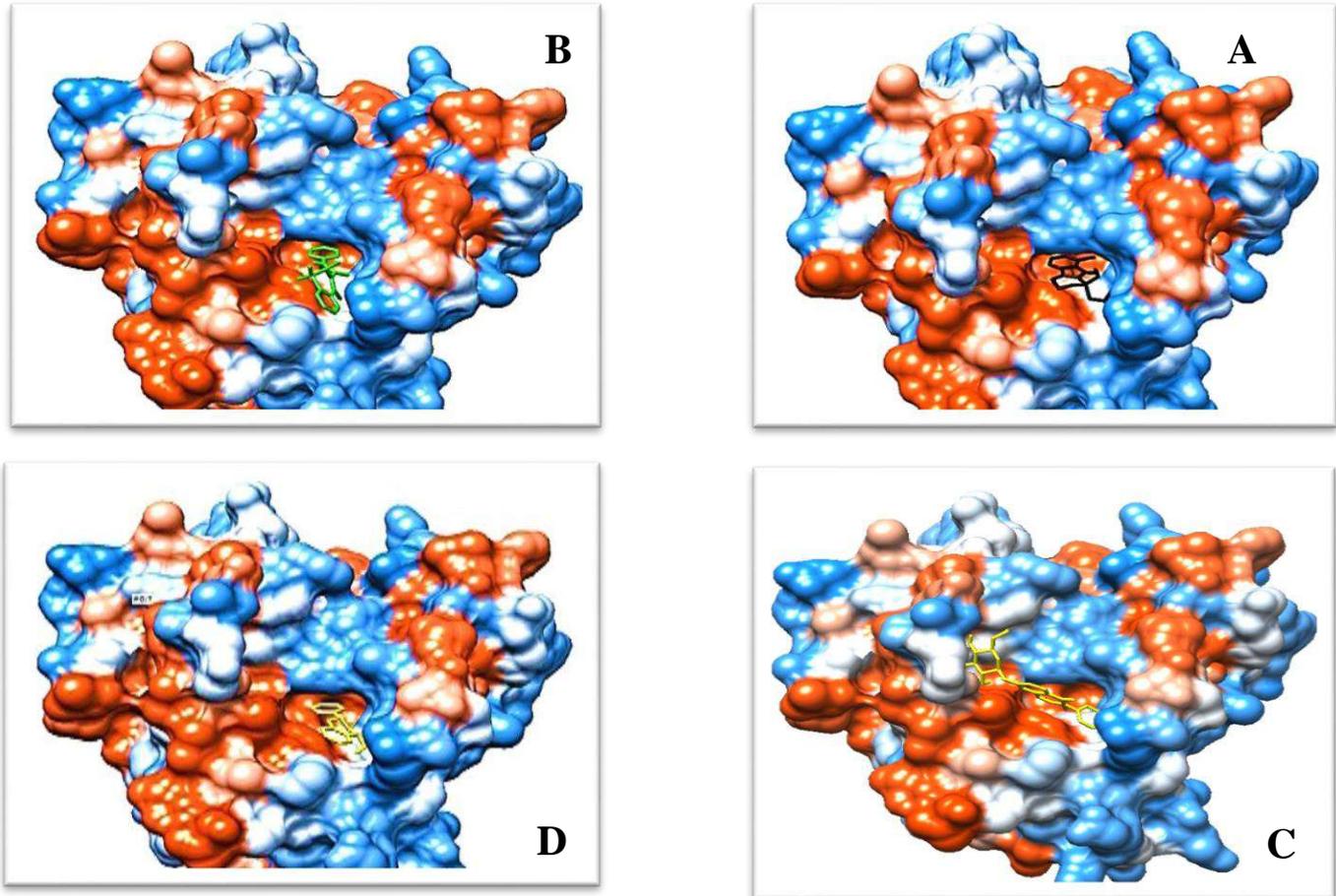
والتنبؤ بالتوافر البيولوجي للمركب عن طريق الفم. و تركز هذه القاعدة على خصائص جزيئية محددة مهمة للحركية الدوائية للدواء، بما في ذلك الامتصاص والتوزيع والتمثيل الغذائي والإفراز، كما في الجدول (3-6).

الجدول (3-6) يبين المركبات الكيميائية الأكثر ملاءمة لتناولها عن طريق الفم

ت	اسم المركب	الروابط الهيدروجينية المانحة H- bond donor	الروابط الهيدروجينية المستقبلة H-bond Acceptors	الوزن الجزيئي M.W	Logp	No. of rotatable bonds	Total score
1	Dieckol	0	0	0	0	1	1
2	Robinin	0	0	0	1	1	2
3	Quercitrin	0	0	1	1	1	3
4	Vitamin D3	1	1	1	0	1	4
5	Vitamin D2	1	1	1	0	1	5
6	Myricitrin	0	0	1	1	1	6
7	Daidzin	1	1	1	1	1	7
8	Rutin	0	0	0	1	1	8
9	naringin	0	0	0	1	1	9
10	ketotifen	1	1	1	1	1	10
11	Rutoside	0	0	0	1	1	11
12	Cyproheptadine	1	1	1	1	1	12
13	Xanthorhamnin	0	0	0	1	1	13
14	Dalbergin	1	1	1	1	1	14
15	Diosmin	0	0	0	1	1	15
16	Afzelin	0	1	1	1	1	16
17	Cascaroside	0	0	0	1	1	17
18	Hesperidin	0	0	0	1	1	18
19	Baicalin	0	0	1	1	1	19
20	Hyperin	0	0	1	1	1	20
21	Genistin	0	1	1	1	1	21
22	Piroxicam	1	1	1	1	1	22
23	Carmine	0	0	1	1	1	23
24	Clorobiocin	1	0	0	0	0	24
25	Amygdalin	0	0	1	1	1	25
26	Etodolac	1	1	1	1	1	26
27	Frangulin A	1	1	1	1	1	27
28	Cyanidin	1	1	1	1	1	28
29	Phaseollidin	1	1	1	1	1	29
30	Chrysin	1	1	1	1	1	30
31	Diacerein	1	1	1	1	1	31
32	Quercetin	1	1	1	1	1	32
33	Baicalein	1	1	1	1	1	33
34	Myricetin	0	1	1	1	1	34
35	Peonidin	1	1	1	1	1	35
36	Flavan-4-ol	1	1	1	1	1	36
37	Sophoraflavonolside	0	0	0	1	1	37
38	Eckol	0	1	1	1	1	38
39	Lutin	1	1	1	1	1	39
40	Emodine	1	1	1	1	1	40
41	Aurone	1	1	1	1	1	41

في دراستنا الحالية، أظهرت بعض المركبات الكيميائية المقترحة ملاءمة للإعطاء عن طريق الفم؛ وأهمها هو Daidzin، وهو مكون طبيعي من فول الصويا، هو شكل جليكوسيدي (glycoside) من الفلافونويد دايدزين، كما تم الإبلاغ عن أنّ له نشاط مضاد للسرطان في المراحل المبكرة من تطور سرطان البروستاتا ويقلل من خطر الإصابة بسرطان الثدي بعد انقطاع الطمث، يمكنه أيضاً تثبيط نشاط التيلوميراز (Telomerase) عن طريق الارتباط الهيدروجيني بالقواعد النيتروجينية أيضاً؛ يتمتع Daidzin بطاقة إرساء أقل على بروتينات مستقبلات التيروزين كيناز، مما يشير إلى تقارب ارتباط أعلى لـ Daidzin مقارنة بالمركبات الأخرى (Zubair et al., 2021).

ثم باستخدام برنامج 1-click docking وبرنامج UCSF Chimera تم تشكيل التراكيب ثلاثية الأبعاد لأرتباط بعض المركبات المقترحة في الجدول (3-5) ذات درجة الرسو الجزيئي العالي بجين *gyrB* كما موضح في الشكل (3-3).



الشكل (3-3) يوضح الرسو الجزيئي لبعض المركبات الكيميائية وATP Active pocket في جين *gyrB* لبكتريا *E. coli* /A - Chrysin /B - Diadzin /C - Piroxicam /D - Flavon-4-ol

Statistical analysis

1-3 التحليل الاحصائي

تم اجراء التحليل الاحصائي لمعرفة العلاقة بين الطفرات الحاصلة في الاحماض الامينية لجين *gyrB* وعلاقتها بمقاومة مضادات الكوينولون جدول (3-7)

الجدول (3-7) يبين احصائياً علاقة الطفرات للعزلات المقاومة التابعة لأنزيم *gyrB* بالمقاومة للمضادات الحيوية العائدة لعائلة الكوينولونات

P-Value	Chi-Squared	المضاد الحيوي	الطفرة والموقع
0.2715	1.2091	Nalidixic acid	Serine (492)
0.1889	1.726	Ciprofloxacin	↓
0.2381	1.3919	Levofloxacin	↓
0.1694	1.8881	Gatifloxacin	Asparagine
0.2715	1.2011	Nalidixic acid	Lysine (374)
0.3229	1.726	Ciprofloxacin	↓
0.2420	1.3919	Levofloxacin	↓
0.1694	1.8881	Gatifloxacin	Therionine
0.4329	0.6151	Nalidixic acid	Aspartic acid (248)
0.5593	0.341	Ciprofloxacin	↓
0.6066	0.2652	Levofloxacin	↓
0.5356	0.3831	Gatifloxacin	Histidine
0.2715	1.2091	Nalidixic acid	Arginine (596)
0.3229	1.726	Ciprofloxacin	↓
0.2420	1.3919	Levofloxacin	↓
0.1694	1.8881	Gatifloxacin	Serine
0.4329	0.6415	Nalidixic acid	Methionine (597)
0.2049	0.4231	Ciprofloxacin	↓
0.6061	0.2652	Levofloxacin	↓
0.5356	0.3831	Gatifloxacin	Leucine
0.3324	0.5213	Nalidixic acid	Glycine (301)
0.2147	0.2674	Ciprofloxacin	↓
0.6001	0.4464	Levofloxacin	↓
0.6342	0.6971	Gatifloxacin	Arginine

بينت نتائج الجدول (3-7) عدم وجود علاقة معنوية بين الطفرات الحاصلة في الاحماض الامينية لجين *gyrB* وبين مقاومة مضادات الكوينولون بالرغم من حصول طفرات في مواقع مختلفة من جين *gyrB*.



الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations



Conclusions

1-4 الاستنتاجات :

نستنتج من الدراسة الحالية ما يلي :

1. الكوينولونات المستخدمة في هذه التجربة ذات درجة مقاومة متفاوتة والمضاد الحيوي Nalidixic acid الأكثر مقاومة من قبل بكتريا *E.coli*.
2. معظم العزلات البكتيرية كانت ذات مقاومة متوسطة لمضادات Tetracyclin و Co- trimoxazole و Ceftriaxone.
3. أكثر العزلات حساسة لمضادات (Amikacin و Imipenem) التي تُعد من أكثر المضادات فعالية لتنشيط بكتريا *E.coli*.
4. افضل برنامج استخدم للدراسة ومعرفة التسلسلات والشجرة الوراثية هو MEGA11 .
5. توجد طفرات في جين *gyrB* في السلالات العراقية ولكن لا توجد في السلالات العالمية، مثل طفرة في الموقع 129 ، 151 ، 172 ، 185 ، 191 ، 204 ، 248 و 550.
6. عدم وجود طفرات في منطقة (QRDR) للعزلات السريرية المحلية وبالتحديد الأحماض الأمينية Asp426 و Lys447 في جين *gyrB* التي تسبب مقاومة البكتريا لمضادات الكوينولونات.
7. يبقى مستوى الاحماض الامينية في منطقة ATP binding pocket ثابتاً لجميع العزلات المحلية، وعدم وجود طفرة، حيث يبقى الشكل الثلاثي الابعاد للجيب ثابتاً .
8. تعد مركبات (Diadzin و Ketotifen و Cyproheptadin و Dalbergin و Piroxicam و Etodolac و Frangulin A و Chrysin و Quercetin و Myricetin و Peonidin و Flavan-4-ol و Lutin و Emodine و Aurone و Phaseollidine و Baicalein مركبات واعدة من المحتمل أن تتصف بالتأثير المثبط للـ ATP binding pocket في جين *gyrB* لبكتريا *E.coli* .

Recommendation

4 - 2 التوصيات :

بالاعتماد على النتائج نوصي بما يلي :

1. استخدام أكثر من مضاد حيوي ودمجها ودراسة تأثيرها على جين *gyrB*.
2. استخدام بعض المركبات النانوية ودمجها مع مضادات الكوينولون ودراسة تأثيرها على جين *gyrB*.
3. التوسع في دراسة مقاومة بكتريا *E.coli* للمضاد الحيوي Amikacin؛ كونه أظهر حساسية عالية من قبل البكتريا.
4. دراسة جينات اخرى قد تكون مرتبطة بمقاومة المضادات الحيوية.
5. بالنظر لقلة المصادر المتوفرة لتسلسلات الأحماض الأمينية لجين *gyrA* و جين *gyrB* في العراق ينصح بدراسة وعمل قاعدة بيانات بخصوص العزلات المحلية لجينات بكتريا *E.coli*.
6. دراسة الشكل الثلاثي الابعاد للأهداف الدوائية ومحاولة استنباط مركبات قادرة على تثبيط هذه الاهداف للوصول الى مركبات لها القابلية على العمل كعلاجات مضادة للبكتريا، واستخدام برنامج MOE (Molecular Operating Environment).



المصادر

References



- Abbas**, H. H., Saleem, A. J., & Kadom, H. A. (2019). Prevalence of resistance *E. coli* against trimethoprim and sulfmethoxazole in patients with UTI. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(3), 778-782.
- Abdul-Husin**, F. (2021). Plasmid-Mediated Mechanism of Quinolone Resistance on *E.coli* Isolates from Different Clinical Samples. *Archives of Razi Institute*, 76(3), 561.
- Aberkane**, C., Messai, A., Messai, C. R., & Boussaada, T. (2023). Antimicrobial resistance pattern of avian pathogenic *Escherichia coli* with detection of extended-spectrum β -lactamase-producing isolates in broilers in east Algeria. *Veterinary world*, 16(3), 449.
- Abou-Dobara**, M. I., Kamel, M. A., El-Sayed, A. K., & El-Zahed, M. M. (2024). Antibacterial activity of extracellular biosynthesized iron oxide nanoparticles against locally isolated β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Egypt. *Discover Applied Sciences*, 6(3), 113.
- Abu-Sini**, M. K., Maharmah, R. A., Abulebdah, D. H., & Al-Sabi, M. N. (2023, January). Isolation and identification of coliform bacteria and multidrug-resistant *Escherichia coli* from water intended for drug compounding in community pharmacies in Jordan. In *Healthcare* (Vol. 11, No. 3, p. 299). MDPI.
- Adams**, C. C., Gordon, C. M., Jones, V. F., Kauffman, L. H., Lambropoulou, S., Millett, K. C.,... & Sazdanovic, R. (2019). *Knots, Low-Dimensional Topology and Applications*.

- Adams, R. A., Leon, G., Miller, N. M., Reyes, S. P., Thantrong, C. H., Thokkadam, A. M.,... & Brynildsen, M. P. (2021).** Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure. *The Journal of antibiotics*, 74(11), 786-798.
- Aghemwenhio, I. S., Timilehin, A. A., & Alpheus, G. A. (2017).** Susceptibility of beta-haemolytic *Escherichia coli* to commonly used antibiotics in selected hospitals in Delta State, Southern Nigeria. *Arc Clin Microbiol*, 8(2), 36.
- Ahuja, S. D., Ashkin, D., Avendano, M., Banerjee, R., Bauer, M., Bayona, J. N.,... & Yim, J. J. (2012).** Multidrug resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9,153 patients.
- Ahumada-Santos, Y. P., Báez-Flores, M. E., Díaz-Camacho, S. P., de Jesús Uribe-Beltrán, M., Eslava-Campos, C. A., Parra-Unda, J. R., & Delgado-Vargas, F. (2020).** Association of phylogenetic distribution and presence of integrons with multidrug resistance in *Escherichia coli* clinical isolates from children with diarrhoea. *Journal of Infection and Public Health*, 13(5), 767-772.
- Akhtar, A., Ahmad Hassali, M. A., Zainal, H., Ali, I., & Khan, A. H. (2021).** A cross-sectional assessment of urinary tract infections among geriatric patients: prevalence, medication regimen complexity, and factors associated with treatment outcomes. *Frontiers in public health*, 9, 657199.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014).** Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574.
- Aldred, K. J., McPherson, S. A., Turnbough Jr, C. L., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2013).** Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic acids research*, 41(8), 4628-4639.

- Aldred, K. J., McPherson, S. A., Wang, P., Kerns, R. J., Graves, D. E., Turnbough Jr, C. L., & Osheroff, N. (2012).** Drug interactions with *Bacillus anthracis* topoisomerase IV: biochemical basis for quinolone action and resistance. *Biochemistry*, *51*(1), 370-381.
- Alegbeleye, O. O., Singleton, I., & Sant'Ana, A. S. (2018).** Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food microbiology*, *73*, 177-208.
- Ali, J., Rafiq, Q. A., & Ratcliffe, E. (2018).** Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future science OA*, *4*(4), FSO290.
- Al-Mashhady, F. R., & Al-Janabi, B. A. H. (2020).** Antimicrobial effect of gold and silver nanoparticles on MDR *E.coli* and molecular detection of aminoglycoside modifying enzymes-producing MDR *E. coli* isolated from UTI patient.
- Alves, D., & Olívia Pereira, M. (2014).** Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling*, *30*(4), 483-499.
- Arenas-Hernández, M. M., Martínez-Laguna, Y., & Torres, A. G. (2012).** Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. *Current gastroenterology reports*, *14*, 386-394.
- Azargun, R., Barhaghi, M. H. S., Kafil, H. S., Oskouee, M. A., Sadeghi, V., Memar, M. Y., & Ghotaslou, R. (2019).** Frequency of DNA gyrase and topoisomerase IV mutations and plasmid-mediated quinolone resistance genes among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections in Azerbaijan, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *17*, 39-43
- Azargun, R., Gholizadeh, P., Sadeghi, V., Hosainzadegan, H., Tarhriz, V., Memar, M. Y.,... & Eyvazi, S. (2020).** Molecular mechanisms associated with

quinolone resistance in Enterobacteriaceae: review and update. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 114(10), 770-781.

Babapour, E., Haddadi, A., Mirnejad, R., Angaji, S. A., & Amirmozafari, N. (2016). Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(6), 528-533.

Badamchi, A., Javadinia, S., Farahani, R., Solgi, H., & Tabatabaei, A. (2019). Molecular detection of plasmid-mediated quinolone resistant genes in uropathogenic *E.coli* from tertiary referral hospital in Tehran, Iran. *Archives of Pharmacology and Therapeutics*, 1(1), 19-24

Baker, N. M., Weigand, S., Maar-Mathias, S., & Mondragon, A. (2011). Solution structures of DNA-bound gyrase. *Nucleic acids research*, 39(2), 755-766.

Barančoková, M., Kikelj, D., & Ilaš, J. (2018). Recent progress in the discovery and development of DNA gyrase B inhibitors. *Future medicinal chemistry*, 10(10), 1207-1227.

Bartoletti, R., Cai, T., Wagenlehner, F. M., Naber, K., & Johansen, T. E. B. (2016). Treatment of urinary tract infections and antibiotic stewardship. *European Urology Supplements*, 15(4), 81-87.

Basak, S., Singh, P., & Rajurkar, M. (2016). Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: a study. *Journal of pathogens*, 2016.

Basarab, G. S. (2018). Four ways to skin a cat: inhibition of bacterial topoisomerases leading to the clinic. *Antibacterials: Volume I*, 165-188.

Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2022). *Escherichia coli*: an overview of main characteristics. *Escherichia coli-Old and New Insights*.

Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 185-230.

- Becnel Boyd, L.,** Maynard, M. J., Morgan-Linnell, S. K., Horton, L. B., Sucgang, R., Hamill, R. J.,... & Zechiedrich, L. (2009). Relationships among ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, and norfloxacin MICs for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(1), 229-234.
- Bhatnagar, K., & Wong, A.** (2019). The mutational landscape of quinolone resistance in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 14(11), e0224650.
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P.** (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International journal of nephrology*, 2012.
- Binesh, E., Mirzaii, M., Asadi, F., Zolfaghari, P., Nikkheslat, N., & Sohrabi, M. B.** (2018). Comparison of the effect of ciprofloxacin and nalidixic acid in the infection of different parts of the urinary tract. *Int J Health Stud*, 4(2), 35-38.
- Biswas, I., & Rather, P. N.** (2019). *Acinetobacter baumannii* (Vol. 8). Springer.
- Blair, J. M., Richmond, G. E., & Piddock, L. J.** (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future microbiology*, 9(10), 1165-1177.
- Blower, T. R., Williamson, B. H., Kerns, R. J., & Berger, J. M.** (2016). Crystal structure and stability of gyrase–fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(7), 1706-1713.
- Bodilsen, J., Brouwer, M. C., Kjærgaard, N., Sirks, M. J., van der Ende, A., Nielsen, H.,... & DASGIB Study Group.** (2018). Community-acquired meningitis in adults caused by *Escherichia coli* in Denmark and The Netherlands. *Journal of Infection*, 77(1), 25-29.

- Bonev, B. B., & Brown, N. M. (Eds.). (2019).** *Bacterial resistance to antibiotics: from molecules to man.* John Wiley & Sons.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020).** Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, *34*, 100622.
- Bonten, M., Johnson, J. R., van den Biggelaar, A. H., Georgalis, L., Geurtsen, J., de Palacios, P. I.,... & Poolman, J. T. (2021).** Epidemiology of Escherichia coli bacteremia: a systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases*, *72*(7), 1211-1219.
- Brenner, D. J., & Farmer Iii, J. J. (2015).** Enterobacteriaceae. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-24.
- Brink, B. (2010).** Urease test protocol. American society for microbiology, 1-7.
- Brolund, A. (2014).** Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infection ecology & epidemiology*, *4*(1), 24555.
- Brown, S. A., Palmer, K. L., & Whiteley, M. (2008).** Revisiting the host as a growth medium. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(9), 657-666.
- Brown, A. E., & Smith, H. (2017).** Benson's microbiological applications, laboratory manual in general microbiology (14th ed., Concise version). McGraw-Hill Education.
- Bullens, M., de Cerqueira Melo, A., Raziq, S., Lee, J., Khalid, G. G., Khan, S. N.,... & Williams, A. (2022).** Antibiotic resistance in patients with urinary tract infections in Pakistan. *Public Health Action*, *12*(1), 48-52.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).** β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *6*(8).

- Bush**, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969-976.
- Bush**, N. (2017). *The role of DNA gyrase in illegitimate recombination* (Doctoral dissertation, University of East Anglia).
- Bush**, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules*, 25(23), 5662.
- Bush**, N. G., Evans-Roberts, K., & Maxwell, A. (2015). DNA topoisomerases. *EcoSal Plus*, 6(2), 10-1128.
- Cao**, D., Shen, Y., Huang, Y., Chen, B., Chen, Z., Ai, J.,... & Wei, Q. (2021). Levofloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of urinary tract infections: Evidence-based analysis. *Frontiers in pharmacology*, 12, 658095.
- Cardiliya**, A. P., Chandrasekar, M. J. N., & Nanjan, M. J. (2023). Incidence of biofilms among the multidrug resistant E. coli, isolated from urinary tract infections in the Nilgiris district, South India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 1809-1818.
- Carroll**, K. C., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2015). *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E*. McGraw Hill Professional.
- Chellat**, M. F., Raguž, L., & Riedl, R. (2016). Targeting antibiotic resistance. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(23), 6600-6626.
- Chen**, S. H., Chan, N. L., & Hsieh, T. S. (2013). New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*, 82, 139-170.

- Ching, C., & Zaman, M. H. (2020).** Development and selection of low-level multi-drug resistance over an extended range of sub-inhibitory ciprofloxacin concentrations in *Escherichia coli*. *Scientific reports*, *10*(1), 8754
- Chua, K. Y., & Stewardson, A. J. (2019).** Individual and community predictors of urinary ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* isolates, Victoria, Australia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *8*, 1-11.
- Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017).** Carbapenem resistance: a review. *Medical Sciences*, *6*(1), 1.
- Collin, F., Karkare, S., & Maxwell, A. (2011).** Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, *92*, 479-497.
- Collins, J. A., Oviatt, A. A., Chan, P. F., & Osheroff, N. (2024).** Target-Mediated Fluoroquinolone Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Actions of Ciprofloxacin against Gyrase and Topoisomerase IV. *ACS Infectious Diseases*.
- Costenaro, L., Grossmann, J. G., Ebel, C., & Maxwell, A. (2007).** Modular structure of the full-length DNA gyrase B subunit revealed by small-angle X-ray scattering. *Structure*, *15*(3), 329-339.
- Cotman, A. E., Trampuž, M., Brvar, M., Kikelj, D., Ilaš, J., Peterlin- Mašič, L.,... & Frlan, R. (2017).** Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Tyrosine- Based DNA Gyrase B Inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, *350*(8), 1700087.
- Couso, J. P., & Patraquim, P. (2017).** Classification and function of small open reading frames. *Nature reviews Molecular cell biology*, *18*(9), 575-589.
- Crooks, G.E., Hon, G.C., Chandonia, J., & Brenner, S.E. (2004).** WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*, *14* 6, 1188-90.

- Da Silva, G. J., & Domingues, S. (2016).** Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 4(3), 29.
- Dadgostar, P. (2019).** Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and drug resistance*, 3903-3910.
- Dalvie, E. D., & Osheroff, N. (2021).** DNA Recognition/Processing| DNA Topoisomerases: Type II.
- Dasgupta, T., Ferdous, S., & Tse-Dinh, Y. C. (2020).** Mechanism of type IA topoisomerases. *Molecules*, 25(20), 4769.
- Dauda, S. E., Collins, J. A., Byl, J. A. W., Lu, Y., Yalowich, J. C., Mitton-Fry, M. J., & Osheroff, N. (2023).** Actions of a Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitor against *Neisseria gonorrhoeae* Gyrase and Topoisomerase IV: Enhancement of Double-Stranded DNA Breaks. *International journal of molecular sciences*, 24(15), 12107.
- Davis, T. K., McKee, R., Schnadower, D., & Tarr, P. I. (2013).** Treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Infectious Disease Clinics*, 27(3), 577-597.
- Dicks, L. M. T., Geldenhuys, J., Mikkelsen, L. S., Brandsborg, E., & Marcotte, H. (2018).** Our gut microbiota: a long walk to homeostasis. *Beneficial microbes*, 9(1), 3-20.
- Dorman, C. J., & Dorman, M. J. (2016).** DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophysical reviews*, 8, 209-220.

- Drlica, K., & Zhao, X.** (2021). Bacterial death from treatment with fluoroquinolones and other lethal stressors. *Expert review of anti-infective therapy*, 19(5), 601-618.
- Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., & Zhao, X.** (2009). Quinolones: action and resistance updated. *Current topics in medicinal chemistry*, 9(11), 981-998.
- Durcik, M., Tomašič, T., Zidar, N., Zega, A., Kikelj, D., Mašič, L. P., & Ilaš, J.** (2019). ATP-competitive DNA gyrase and topoisomerase IV inhibitors as antibacterial agents. *Expert opinion on therapeutic patents*, 29(3), 171-180.
- Elbing, K. L., & Brent, R.** (2019). Recipes and tools for culture of *Escherichia coli*. *Current protocols in molecular biology*, 125(1), e83.
- Enrico, E. M.** (2019). *Defining the Interplay Between Bacterial Pore-Forming Toxins and Host Proteases* (Doctoral dissertation, The University of Utah).
- Erjavec, M. S. (Ed.).** (2023). *Escherichia coli: old and new insights*. BoD—Books on Demand.
- Feng, Z., Liu, D., Liu, Z., Liang, Y., Wang, Y., Liu, Q.,... & Cui, Y.** (2020). Cloning and functional characterization of putative *Escherichia coli* ABC multidrug efflux transporter YddA. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 982.
- Ferrieri, P., & Wallen, L. D.** (2018). Newborn sepsis and meningitis. In *Avery's Diseases of the Newborn* (pp. 553-565). Elsevier.
- Finstad, S. M.** (2022). Occurrence of quinolone resistant *Escherichia coli* in Norwegian dairy cattle

- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015).** Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, *13*(5), 269-284.
- Forsyth, V. S., Armbruster, C. E., Smith, S. N., Pirani, A., Springman, A. C., Walters, M. S.,... & Mobley, H. L. (2018).** Rapid growth of uropathogenic *Escherichia coli* during human urinary tract infection. *MBio*, *9*(2), e00186-18.
- Fotadar, U., Zaveloff, P., & Terracio, L. (2005).** Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, *45*(5), 403-404.
- Fu, G., Wu, J., Liu, W., Zhu, D., Hu, Y., Deng, J.,... & Wang, D. C. (2009).** Crystal structure of DNA gyrase B' domain sheds lights on the mechanism for T-segment navigation. *Nucleic acids research*, *37*(17), 5908-5916.
- Gagnon, M. C., Strandberg, E., Grau-Campistany, A., Wadhvani, P., Reichert, J., Bürck, J.,... & Ulrich, A. S. (2017).** Influence of the length and charge on the activity of α -helical amphipathic antimicrobial peptides. *Biochemistry*, *56*(11), 1680-1695.
- Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., & González-Pedrajo, B. (2016).** Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *6*, 129.
- Germe, T., Bush, N. G., Baskerville, V., Saman, D., Benesch, J., & Maxwell, A. (2024).** Rapid, DNA-induced interface swapping by DNA gyrase. *eLife*, *12*.
- Giancola, S. E., Mahoney, M. V., Hogan, M. D., Raux, B. R., McCoy, C., & Hirsch, E. B. (2017).** Assessment of fosfomycin for complicated or multidrug-resistant urinary tract infections: patient characteristics and outcomes. *Chemotherapy*, *62*(2), 100-104.

- Gibson, E. G., Ashley, R. E., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2018).** Bacterial type II topoisomerases and target-mediated drug resistance. *Antimicrobial resistance in the 21st century*, 507-529.
- Glover, M., Moreira, C. G., Sperandio, V., & Zimmern, P. (2014).** Recurrent urinary tract infections in healthy and nonpregnant women. *Urological Science*, 25(1), 1-8.
- Gómez, P. J., de los Ríos, J. G., Mendoza, A. R., de Pedro Ramonet, P., Albiach, R. G., & Sainz, M. R. (2004).** Molecular basis of quinolone resistance in *Escherichia coli* from wild birds. *Canadian journal of veterinary research*, 68(3), 229
- Gross, C. H., Parsons, J. D., Grossman, T. H., Charifson, P. S., Bellon, S., Jernee, J.,... & Raybuck, S. A. (2003).** Active-site residues of *Escherichia coli* DNA gyrase required in coupling ATP hydrolysis to DNA supercoiling and amino acid substitutions leading to novobiocin resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(3), 1037-1046.
- Grossman, S., Fishwick, C. W., & McPhillie, M. J. (2023).** Developments in Non-Intercalating Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Allosteric and ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *Pharmaceuticals*, 16(2), 261.
- Guiral Vilalta, E. (2018).** *Interplay of virulence, antibiotic resistance and epidemiology in Escherichia coli clinical isolates* (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
- Hameed, E. A. B. (2016).** Multi-drug resistant of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. *University of Aden Journal of Natural and Applied Sciences*, 20(1), 221-226.

- Hashim**, A. I. (2020). Cytotoxic effects of silver nanoparticles prepared from *Escherichia coli* culture filtrates on vero cell line (Doctoral dissertation, M. Sc. Thesis. Mustansiriyah University).
- Heddle**, J., & Maxwell, A. (2002). Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1805-1815.
- Hemraj**, V., Diksha, S., & Avneet, G. (2013). A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare journal of life science*, 1(1), 1-7.
- Hirsch**, J., & Klostermeier, D. (2021). What makes a type IIA topoisomerase a gyrase or a Topo IV?. *Nucleic Acids Research*, 49(11), 6027-6042.
- Hooper**, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York academy of sciences*, 1354(1), 12-31
- Idil**, N., Candan, E., Rad, A., & Aksöz, N. (2016). High trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection. *Minerva Biotechnologica*, 28(3).
- Iranpour**, D., Hassanpour, M., Ansari, H., Tajbakhsh, S., Khamisipour, G., & Najafi, A. (2015). Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *BioMed research international*, 2015.
- Jalil**, M. B., & Al Atbee, M. Y. N. (2022). The prevalence of multiple drug resistance *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infections. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(9), e24619.
- Jasim**, Saade. (2020). The API-20E test. *110*(10), 3812-3813.
- Jenner**, L., Starosta, A. L., Terry, D. S., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M.,... & Yusupova, G. (2013). Structural basis for potent inhibitory activity of the

antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(10), 3812-3816.

Jo, I., Hong, S., Lee, M., Song, S., Kim, J. S., Mitra, A. K.,... & Ha, N. C. (2017). Stoichiometry and mechanistic implications of the MacAB-TolC tripartite efflux pump. *Biochemical and biophysical research communications*, 494(3-4), 668-673.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, 36(2), 5-9.

Kaesbohrer, A., Schroeter, A., Tenhagen, B. A., Alt, K., Guerra, B., & Appel, B. (2012). Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses and public health*, 59, 158-165.

Katongole, P., Bulwadda Kisawuzi, D., Kyobe Bbosa, H., Patrick Kateete, D., & Florence Najjuka, C. (2019). Phylogenetic groups and antimicrobial susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates from patients at Mulago National Referral Hospital, Kampala, Uganda. *F1000Research*, 8, 1828.

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.

Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A.,... & Bryant, S. H. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1202-D1213.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-435.

- Kompis, I. M., Islam, K., & Then, R. L.** (2005). DNA and RNA synthesis: antifolates. *Chemical reviews*, 105(2), 593-620.
- Kudinha, T., Kong, F., Johnson, J. R., Andrew, S. D., Anderson, P., & Gilbert, G. L.** (2012). Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 78(4), 1198-1202.
- Kumar, A., & Schweizer, H. P.** (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1486-1513.
- Kumar, S., Mukherjee, M. M., & Varela, M. F.** (2013). Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *International journal of bacteriology*, 2013.
- Kumar, R., Nurse, P., Bahng, S., Lee, C. M., & Mariani, K. J.** (2017). The MukB–topoisomerase IV interaction is required for proper chromosome compaction. *Journal of Biological Chemistry*, 292(41), 16921-16932.
- Kumar, V.** (2021). Introduction to ribosome factory, origin, and evolution of translation. In *Emerging concepts in ribosome structure, biogenesis, and function* (pp. 1-13). Academic Press.
- Kumar, A., Prasun, C., Rathi, E., Nair, M. S., & Kini, S. G.** (2023). Identification of potential DNA gyrase inhibitors: virtual screening, extra-precision docking and molecular dynamics simulation study. *Chemical Papers*, 77(11), 6717-6727.
- Lafitte, D., Lamour, V., Tsvetkov, P. O., Makarov, A. A., Klich, M., Deprez, P.,... & Gilli, R.** (2002). DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry*, 41(23), 7217-7223.

- Larsson, D. J.** (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala journal of medical sciences*, 119(2), 108-112.
- Lee, S. D., Lee, S. J., Hwang, T. K., Yoon, D. K., Lee, K. S., Sung, L. H.,... & Cho, Y. H.** (2006). Efficacy and safety of gatifloxacin for urinary tract infection in nonspecialized Korean urologic practice. *International journal of antimicrobial agents*, 28, 108-112.
- Levinson, W.** (2016). Review of Medical Microbiology and Immunology. 14th ed. McGraw-Hill education, Inc. PP 821.
- Levinson, W. E.** (2018). *Review of medical microbiology and immunology*. McGraw-Hill Education.
- Lindstedt, B. A., Finton, M. D., Porcellato, D., & Brandal, L. T.** (2018). High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. *BMC infectious diseases*, 18, 1-12.
- Liu, Y., Liu, X., Qu, Y., Wang, X., Li, L., & Zhao, X.** (2012). Inhibitors of reactive oxygen species accumulation delay and/or reduce the lethality of several antistaphylococcal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(11), 6048-6050.
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q.,... & Widmalm, G.** (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS microbiology reviews*, 44(6), 655-683.
- Liu, G., Thomsen, L. E., & Olsen, J. E.** (2022). Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: a mini-review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), 556-567.

- Logue**, C. M., Wannemuehler, Y., Nicholson, B. A., Doetkott, C., Barbieri, N. L., & Nolan, L. K. (2017). Comparative analysis of phylogenetic assignment of human and avian ExPEC and fecal commensal *Escherichia coli* using the (previous and revised) Clermont phylogenetic typing methods and its impact on avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) classification. *Frontiers in microbiology*, 8, 283.
- Lyu**, Y., Yang, Y., Lyu, X., Dong, N., & Shan, A. (2016). Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. *Scientific reports*, 6(1), 27258.
- MacFaddin**, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria, Williams and Wilkins. *Philadelphia, PA*, 113(7).
- Măciucă**, A. M., Munteanu, A. C., & Uivarosi, V. (2020). Quinolone complexes with lanthanide ions: An insight into their analytical applications and biological activity. *Molecules*, 25(6), 1347.
- Madden**, T. (2003). The BLAST sequence analysis tool. *The NCBI handbook*.
- Mainil**, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152(1-2), 2-12.
- Mamatha**, S. P., Kharate, A., Sarita, R. D., Jagannath, B., Rao, B. S. C., Mukartal, S. Y.,... & Ganachari, J. (2023). Isolation and identification and antibiogram of *E. coli* from faecal samples of calves
- Mann**, R., Mediati, D. G., Duggin, I. G., Harry, E. J., & Bottomley, A. L. (2017). Metabolic adaptations of uropathogenic *E.coli* in the urinary tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 241.
- Manson**, J. M., Hancock, L. E., & Gilmore, M. S. (2010). Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule,

antimicrobial resistance, and other traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12269-12274.

Marks, J., Kannan, K., Roncase, E. J., Klepacki, D., Kefi, A., Orelle, C.,... & Mankin, A. S. (2016). Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), 12150-12155.

Mashayekhi, F., Moghny, M., Faramarzpoo, M., Yahaghi, E., Khodaverdi Darian, E., Tarhriz, V., & Dormanesh, B. (2014). Molecular characterization and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 12(2), 32-40

Maslowska, K. H., Makiela- Dzbenska, K., & Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: a complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and molecular mutagenesis*, 60(4), 368-384.

Maynard, C., Cummins, I., Green, J., & Weinkove, D. (2018). A bacterial route for folic acid supplementation. *BMC biology*, 16, 1-10.

McKie, S. J., Neuman, K. C., & Maxwell, A. (2021). DNA topoisomerases: Advances in understanding of cellular roles and multi- protein complexes via structure- function analysis. *BioEssays*, 43(4), 2000286.

Mehla, K., & Ramana, J. (2016). Structural signature of Ser83Leu and Asp87Asn mutations in DNA gyrase from enterotoxigenic *Escherichia coli* and impact on quinolone resistance. *Gene*, 576(1), 28-35.

Михалко, Я. О. (2018). Antimicrobial susceptibility patterns of escherichia coli in children and adults with urinary tract infections.

Miajlovic, H., & Smith, S. G. (2014). Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS microbiology letters*, 354(1), 1-9.

- Mohammad**, T., Mathur, Y., & Hassan, M. I. (2021). InstaDock: A single-click graphical user interface for molecular docking-based virtual high-throughput screening. *Briefings in Bioinformatics*, 22(4), bbaa279.
- Mohr**, K. I. (2016). History of antibiotics research. *How to Overcome the Antibiotic Crisis: Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives*, 237-272.
- Morozova**, O. V., Andreeva, I. S., Zhirakovskiy, V. Y., Pechurkina, N. I., Puchkova, L. I., Saranina, I. V.,... & Kamynina, T. P. (2022). Antibiotic resistance and cold-adaptive enzymes of antarctic culturable bacteria from King George Island. *Polar Science*, 31, 100756.
- Mosaei**, H., & Zenkin, N. (2020). Inhibition of RNA polymerase by rifampicin and rifamycin-like molecules. *EcoSal Plus*, 9(1), 10-1128.
- Munita**, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 481-511.
- Murima**, P., McKinney, J. D., & Pethe, K. (2014). Targeting bacterial central metabolism for drug development. *Chemistry & biology*, 21(11), 1423-1432.
- NandaKafle**, G., Seale, T., Flint, T., Nepal, M., Venter, S. N., & Brözel, V. S. (2017). Distribution of diverse *Escherichia coli* between cattle and pasture. *Microbes and environments*, 32(3), 226-233.
- Niranjan**, V., & Malini, A. (2014). Antimicrobial resistance pattern in *Escherichia coli* causing urinary tract infection among inpatients. *Indian Journal of Medical Research*, 139(6), 945-948.
- Okojie**, R. O., & Omorokpe, V. O. (2018). A survey on urinary tract infection associated with two most common uropathogenic bacteria. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 19(3).
- Olorunmola**, F. O., Kolawole, D. O., & Lamikanra, A. (2013). Antibiotic resistance and virulence properties in *Escherichia coli* strains from cases of urinary tract infections. *African journal of infectious diseases*, 7(1), 1-7.

- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
- Ovung, A., & Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: Structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical reviews*, *13*(2), 259-272.
- Papillon, J., Menetret, J. F., Batische, C., Helye, R., Schultz, P., Potier, N., & Lamour, V. (2013). Structural insight into negative DNA supercoiling by DNA gyrase, a bacterial type 2A DNA topoisomerase. *Nucleic acids research*, *41*(16), 7815-7827.
- Patel, G., & Bonomo, R. A. (2013). "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Frontiers in microbiology*, *4*, 48.
- Pazhani, G. P., Chakraborty, S., Fujihara, K., Yamasaki, S., Ghosh, A., Nair, G. B., & Ramamurthy, T. (2011). QRDR mutations, efflux system & antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from an outbreak of diarrhoea in Ahmedabad, India. *Indian Journal of Medical Research*, *134*(2), 214-223.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I.,... & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein science*, *30*(1), 70-82.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of medical microbiology*, *300*(6), 371-379.
- Pham, T. D., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. (2019). Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*, *10*(10), 1719-1739.

- Pichon, C., Héchard, C., Du Merle, L., Chaudray, C., Bonne, I., Guadagnini, S.,... & Le Bouguéneq, C. (2009).** Uropathogenic *Escherichia coli* AL511 requires flagellum to enter renal collecting duct cells. *Cellular microbiology*, *11*(4), 616-628.
- Pires, S. M., Fischer-Walker, C. L., Lanata, C. F., Devleesschauwer, B., Hall, A. J., Kirk, M. D.,... & Angulo, F. J. (2015).** Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PloS one*, *10*(12), e0142927.
- Piton, J., Petrella, S., Delarue, M., André-Leroux, G., Jarlier, V., Aubry, A., & Mayer, C. (2010).** Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. *PLoS one*, *5*(8), e12245.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2020).** Antimicrobial *Escherichia coli* Resistance in. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, 289.
- Polikanov, Y. S., Osterman, I. A., Szal, T., Tashlitsky, V. N., Serebryakova, M. V., Kusocek, P.,... & Sergiev, P. V. (2014).** Amicoumacin a inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome. *Molecular cell*, *56*(4), 531-540.
- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2020).** *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Jones & Bartlett Learning.
- Ramírez-Larrota, J. S., & Eckhard, U. (2022).** An introduction to bacterial biofilms and their proteases, and their roles in host infection and immune evasion. *Biomolecules*, *12*(2), 306.

- Randall, C. P.,** Mariner, K. R., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 637-639.
- Rasheed, M. U.,** Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., & Jamil, K. (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56, 341-346.
- Reygaert, W.** (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): molecular aspects of antimicrobial resistance and virulence. *Clinical Laboratory Science*, 22(2), 115.
- Reygaert, W. C.** (2017). Antimicrobial mechanisms of *Escherichia coli*. *Escherichia coli-Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*, 81-97.
- Reygaert, W. C.** (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482.
- Riedel, S.,** Morse, S.A., Mietzner, T., Miller, S. (2019). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology (28th ed.). McGraw Hill Education.
- Rivas, M.,** Chinen, I., & Guth, B. E. (2016). Enterohemorrhagic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*. *Escherichia coli in the Americas*, 97-123.
- Rolhion, N.,** & Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 13(10), 1277-1283.
- Sabir, S.,** Anjum, A. A., Ijaz, T., Ali, M. A., & Nawaz, M. (2014). Isolation and infections in a tertiary care hospital. *Pakistan journal of medical sciences*, 30(2), 389.

- Saha, S., Rahman, S., Hassan, F. N., Sarkar, S., Islam, K., Saha, P.,... & Hasan, S.** (2015). Antimicrobial resistance in uropathogen isolates from patients with urinary tract infections. *Biomedical Research and Therapy*, 2, 1-7.
- Schmeing, T. M.** (2013). Ribosome Structure. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (pp. 128–135). Academic Press.
- Schmeing, T. M., & Ramakrishnan, V.** (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, 461(7268), 1234-1242.
- Schoeffler, A. J., May, A. P., & Berger, J. M.** (2010). A domain insertion in Escherichia coli GyrB adopts a novel fold that plays a critical role in gyrase function. *Nucleic acids research*, 38(21), 7830-7844.
- Schulz, W. A.** (2011). Uropathogenic bacteria leave a mark. *Laboratory investigation*, 91(6), 816-818.
- Schultz C.** (2012). Gatifloxacin ophthalmic solution for treatment of bacterial conjunctivitis: safety, efficacy and patient perspective. *Ophthalmology and eye diseases*, 4, 65–70.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckert, A.** (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS microbiology reviews*, 28(5), 519-542.
- Seol, Y., & Neuman, K. C.** (2016). The dynamic interplay between DNA topoisomerases and DNA topology. *Biophysical reviews*, 8, 101-111.
- Shankar, P. R., & Balasubramaniam, R.** (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. *Australasian Medical Journal (Online)*, 7(5), 237.

- Shepherd, A. K., & Pottinger, P. S. (2013).** Management of urinary tract infections in the era of increasing antimicrobial resistance. *Medical Clinics*, 97(4), 737-757.
- Shoib, M., Muzammil, I., Hammad, M., Bhutta, Z. A., & Yaseen, I. (2020).** A mini-review on commonly used biochemical tests for identification of bacteria. *International Journal of Research Publications*, 54(1), 1-7.
- Sitovs, A., Sartini, I., & Giorgi, M. (2021).** Levofloxacin in veterinary medicine: a literature review. *Research in Veterinary Science*, 137, 111-126.
- Sköld, O. E., & Swedberg, G. (2017).** Sulfonamides and trimethoprim. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1*, 345-358.
- Sojo-Dorado, J., López-Hernández, I., Rosso-Fernandez, C., Morales, I. M., Palacios-Baena, Z. R., Hernández-Torres, A.,... & Toyas-Miazza, C. (2022).** Effectiveness of fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant *Escherichia coli* bacteremic urinary tract infections: a randomized clinical trial. *JAMA network open*, 5(1), e2137277-e2137277.
- Spencer, A. C., & Panda, S. S. (2023).** DNA Gyrase as a Target for Quinolones. *Biomedicines*, 11(2), 371.
- Su, Q., Guan, T., & Lv, H. (2016).** Siderophore biosynthesis coordinately modulated the virulence-associated interactive metabolome of uropathogenic *Escherichia coli* and human urine. *Scientific Reports*, 6(1), 24099.
- Sykes, J. E., & Papich, M. G. (2021).** Antibacterial drugs. In *Greene's infectious diseases of the dog and cat* (pp. 103-126). WB Saunders.
- Tadesse, A. and Alem, M. (2006).** Medical Bacteriology. EPHTI. PP. 433.

- Tamer, Y. T.** (2014). *Studying genetic and enzymatic constraints driving evolution of antibiotic resistance* (Doctoral dissertation).
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S.** (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tamura, J. K., & Gellert, M.** (1990). Characterization of the ATP binding site on Escherichia coli DNA gyrase. Affinity labeling of Lys-103 and Lys-110 of the B subunit by pyridoxal 5'-diphospho-5'-adenosine. *Journal of Biological Chemistry*, 265(34), 21342-21349.
- Tang, K., & Zhao, H.** (2023). Quinolone antibiotics: Resistance and therapy. *Infection and Drug Resistance*, 811-820.
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M.** (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in lipid research*, 51(2), 149-177.
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E.** (2017). UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in microbiology*, 8, 1566.
- Tomašić, T., & Peterlin Masic, L.** (2014). Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(1), 130-151.
- Torres, A. G.** (2017). *Escherichia coli* diseases in Latin America—a 'One Health' multidisciplinary approach. *Pathogens and disease*, 75(2), ftx012.
- Uivarosi, V.** (2013). Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. *Molecules*, 18(9), 11153-11197.

- Ullah, H., & Ali, S.** (2017). Classification of anti-bacterial agents and their functions. *Antibacterial agents*, 10, 1-16.
- Valvano, M. A.** (2022). Remodelling of the Gram-negative bacterial Kdo2-lipid A and its functional implications. *Microbiology*, 168(4), 001159.
- Van Hoek, A. H., van Veldhuizen, J. N., Friesema, I., Coipan, C., Rossen, J. W., Bergval, I. L., & Franz, E.** (2019). Comparative genomics reveals a lack of evidence for pigeons as a main source of stx2f-carrying *Escherichia coli* causing disease in humans and the common existence of hybrid Shiga toxin-producing and enteropathogenic *E.coli* pathotypes. *BMC genomics*, 20(1), 1-14.
- Vandepitte, J.** (2003). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization.
- Vernon, J. J.** (2019). Multidrug resistant *Clostridioides difficile*: the Presence of Antimicrobial Resistance Determinants in Historical and Contemporaneous Isolates, and the Impact of Fluoroquinolone Resistance Development on PCR Ribotype 027 Fitness (Doctoral dissertation, University of Leeds).
- Villagra, N. A., Fuentes, J. A., Jofré, M. R., Hidalgo, A. A., García, P., & Mora, G. C.** (2012). The carbon source influences the efflux pump-mediated antimicrobial resistance in clinically important Gram-negative bacteria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(4), 921-927.
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A., & Actor, J. K.** (2017). Microbiology and molecular diagnosis in pathology: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice.
- Weiner, J. H., & Li, L.** (2008). Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(9), 1698-1713.

- Wee, P., & Wang, Z.** (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, 9(5), 52.
- Wilson, D. N.** (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35-48.
- Wohlkonig, A., Chan, P. F., Fosberry, A. P., Homes, P., Huang, J., Kranz, M.,... & Bax, B. D.** (2010). Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nature structural & molecular biology*, 17(9), 1152-1153.
- Zalewska-Piątek, B., & Piątek, R.** (2020). Phage therapy as a novel strategy in the treatment of urinary tract infections caused by *E.coli*. *Antibiotics*, 9(6), 304.
- Zowawi, H. M., Harris, P. N., Roberts, M. J., Tambyah, P. A., Schembri, M. A., Pezzani, M. D.,... & Paterson, D. L.** (2015). The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. *Nature Reviews Urology*, 12(10), 570-584.
- Zubair, M. S., Anam, S., Maulana, S., & Arba, M.** (2021). In vitro and in silico studies of quercetin and daidzin as selective anticancer agents. *Indonesian Journal of Chemistry*, 21(2), 310-317.



الملاحق

Appendix



بعض العزلات السريرية المحلية التي تحتوي على طفرات وتم تسجيلها في بنك الجينات العالمي

GenBank

Send to:

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S15S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240840.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)
Go to:

LOCUS PP240840 854 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S15S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240840
 VERSION PP240840.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM Escherichia coli
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 854)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslahah in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

```
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
```

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..854
                        /organism="Escherichia coli"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /strain="E.S15S1"
                        /isolate="A"
                        /isolation_source="urine"
                        /db_xref="taxon:562"
                        /geo_loc_name="Iraq"
                        /collection_date="21-Sep-2023"
                        /collected_by="Ahmed"
     misc_feature      <1..854
                        /note="similar to DNA gyrase subunit B"
```

ORIGIN

```
1 gctatcgacg aagcgcctgc gggtcactgt aaagaatta tcgtaccat tcacgccgat
61 aactctgtct ctgtacagga tgacggggcg gccattccga ccggtattca cccggaagag
121 ggcgatcgg cggcgggaagt gatcatgacc gttctgcacg caggcggtaa atttgacgat
181 aactcctata aagtgtccgg cggctctgac gccgttgggt ttctgtagt aaacgccctg
241 tcgcaaaaaac tggagctggt tatccagcgc gagggtaaaa ttcaccgtca gatctacgaa
301 cacggtgtac cgcattgccc gctggcgggt accggcgaga ctgaaaaaac cggcactatg
361 gtgcgtttct ggccaagcct tgaaaccttc accaatgtga ccgaattcga atatgacatt
421 ctggcgaaac gtctgcgtga gttgtcgttc ctcaactccg gcgtttccat tcgtctgcgc
481 gacaagcgcg atggcaaga agaccacttc cactatgaag gcggcatcaa ggcattcgtt
541 gaatatctga acaagaacaa aacgccgatc caccogaata tcttctact ctccaccgaa
601 aaagacgata ttggcgtcga agtggcgttg cagtggaaac atggcttcca ggaaaaacatc
661 tactgcttta ccaacaacat tccgagcgt gacggcggta ctcacctggc aggcttccgt
721 gcggcgatga cccgcacct gaacgcctac atggacaaaag aaggctacag caaaaaagcc
781 aaagtcagcg ccaccggtga cgatgcgcgt gaaggcctga ttgcgctgt ttccgtgaaa
841 gtgccggacc cgaa
```

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S3S1 DNA gyrase subunit B-like gene partial sequence

GenBank: PP240831.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)
Go to:

LOCUS PP240831 818 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S3S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240831
 VERSION PP240831.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 818)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

```
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
```

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..818
                     /organism="Escherichia coli"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="E.S3S1"
                     /isolate="A"
                     /isolation_source="urine"
                     /db_xref="taxon:562"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2023"
                     /collected_by="Ahmed"
     misc_feature      <1..>818
                     /note="similar to DNA gyrase subunit B"
```

ORIGIN

```
1 agataacgct atcgacgaag cgctccgagg gtcactgtaa agaaattatc gtcaccattc
61 acgccgataa ctctgtctct gtacaggatg acgggcgcgg cattccgacc ggtattcacc
121 cggaaagagg cgtatcggcg gcggaagtga tcatgaccgt tctgcacgca ggcggtaaat
181 ttgacgataa ctccataaaa gtgtccggcg gtcctgacgg cgttgggtgt tcggtagtaa
241 acgccctgtc gcaaaaaactg gagctggtta tccagcgcga gggtaaaaatt caccgtcaga
301 tctacgaaca cgggtgtaccg caggccccgc tggcggttac cggcagact gaaaaaacg
361 gcaccatggt gcgtttctgg ccaagcctt aaaccttcac caatgtgacc gagttcgaat
421 atgaaattct gccgaaacgt ctgcgtgagt tgtcgttct caactccggc gtttccattc
481 gtctgcgcca taagcgcgac ggcaagaag accacttcca ctatgaaggc ggcacaaagg
541 cgttcggtga atatctgaac aagaacaaaa cccgatcca cccgaatc tctactttt
601 ccaccgaaaa agacggtatt ggcgtcgaag tggcgttgca gtggaacgat ggcctccagg
661 aaaaacatcta ctgctttacc aacaacattc cgcagcgtga cggcggctact cacctggcag
721 gtttccgtgc gccgatgacc cgtactctga acgcctacat ggacaaagaa ggctacagca
781 aaaaagccat aagtcagcgc caccggtgac gatgcgcg
```

//

GenBank

Send to:

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S13S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240839.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)[Go to:](#)

LOCUS PP240839 819 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S13S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240839
 VERSION PP240839.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 819)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..819
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S13S1"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="28-Sep-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc_feature <1..>819
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN

```

1 ttcacgccga caactctgtc tctgtacagg atgacgggcg cggcattccg accggtattc
61 acccggaaga gggcgtatcg gcggcgggaag tgatcatgac cgttctgcac gcaggcggta
121 aatttgacga taactcctat aaagtgtccg gcggtctgca cggcgttggg gtttcggtag
181 taaacgccct gtcgcaaaaa ctggagctgg ttatccagcg cgagggtaaa attcaccgtc
241 agatctacga acacgggtga ccgcaggctc cgctggcggt taccggcgag actgaaaaaa
301 ccggcaccat ggtgcgtttc tggccaagcc tcgaaacctt caccaatgtg accgagttcg
361 aatatgaaat tctggcgaaa cgtctgcgtg agttgtcgtt cctcaactcc ggcgtttcca
421 ttcgtctcgc cgacaagcgc gacggtaaaag aagaccactt ccactatgaa ggcggcatca
481 aggcgttctg tgaatatctg aacaagaaca aaacgccgat ccaccggaat atcttctact
541 tctccaccga aaaagatggg atcggcgtcg aagtggcgtt gcagtggaac gatggcttcc
601 aggaaaaaat ctactgcttt accaacaaca ttccacagcg tgacggcggg actcacctgg
661 caggcttccg tgcggcaatg acccgtaccg tgaacgccta catggacaaa gaaggctaca
721 gcaaaaaaag caaagtacgc gccaccgggt acgatgcgcg tgaaggcctg attgcggtcg
781 tttccgtgaa agtgcgggac ccgaaattct cctcccaga

```

//

GenBank

Send to:

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S17S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240841.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)Go to:

LOCUS PP240841 875 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S17S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240841
 VERSION PP240841.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 875)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology : Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..875
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S17S1"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="22-Sep-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc_feature <1..>875
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN
 1 ctatccgacg aagcgcctcg gggtcactgt aaagaaatta tcgtcaccat tcacgccgat
 61 aactctgtct ccgtacagga tgatgggctc ggcatccga cgggtattca cccggaagag
 121 ggcgtatcgg cggcggaaagt gatcatgacc gttctgcacg caggcggtaa atttgacgat
 181 aactcctata aagtgtccgg cgtctgcac ggcgttggtg tttcggttgt aaacgccctg
 241 tcgcaaaaac tggagctggt tatccagcgc gagggtaaaa ttcaccgta gatctacgaa
 301 caeggtgtac cgcaggctcc gctggcgggt actggcgaga ctgaaaaaac cggcaccatg
 361 gtgcgtttct ggcccagcct cgaaaccttc accaatgtga ccgagttcga atatgaaatt
 421 ctggcgaaac gtatcgtgta gttgtcgttc ctcaactccg gcgtttccat tcgtctcgc
 481 gacaagcgtg acggcaaaaga agaccacttc cactatgaag gcggcatcaa ggcgttcggt
 541 gaatatctga acaagaacaa aacccgatc caccggaata tcttctact ctccaccgaa
 601 aaagacggta ttggcgtcga agtggcgttg cagtggaaac atggcttcca ggaaaacatc
 661 tactgcttta caaacaacat tccgcagcgt gacggcgata ctcaactggc agccttccgt
 721 gcggcgatga cccgtaccct gaacgcctac atggacaaag aaggctacag caaaaaagcc
 781 aaagttagcg ccaccgggta cgatgcgcgt gaaggcctga ttccggtcgt ttccgtgaat
 841 agtccgggac ccgaaattct cctcctcaga ccaaa

GenBank ▾

Send to

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S8S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240836.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)Go to:

LOCUS PP240836 884 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S8S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240836
 VERSION PP240836.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 884)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..884
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S8S1"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="17-Sep-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc_feature <1..>884
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN

```

1 gtagataaacg ctatcgacga agcgcctcgc ggtcactgta aagaaattat cgtcaccatt
61 caccgccgata actctgtctc cgtacaggat gatgggcgcg gcattccgac cggatattcac
121 ccggaagagg gcgtatcggc ggcggaagt atcatgaccg ttctgcacgc aggcggtaaa
181 ttgacgata actcctataa agtgtccgc ggtctgcac gcgttggtgt ttcggtgta
241 aacgccctgt cgcaaaaact ggagctggtt atccagcgcg agggtaaaat tcaccgtcag
301 atctacgaac acggtgtacc gcaggctccg ctggcgggta ccggcgagac tgaaaaaac
361 ggcaccatgg tgcgtttctg gccagcctc gaaaccttca ccaatgtgac cgaattcgaa
421 tatgaaattc tggcgaaaac tctgcgtgag ttgtcgttcc tcaactccgg cgtttccatt
481 cctctgcgcg acaagcgtga cggcaaaaga gaccacttcc actatgaagg cggcatcaag
541 gcgttcggtg aatatctgaa caagaacaaa acgccgatcc acccgaatat ctctacttc
601 tccaccgaaa aagacggtat tggcgtccaa gtggcgttgc agtggaaacga tggcttcag
661 gaaaacatct actgctttac caacaacatt ccgcagcgtg acggcgggtac tcacctggca
721 ggcttcggtg cggcgatgac ccgtaccctg aacgcctaca tggacaaaga aggcctacagc
781 aaaaaagcca aagttagcgc caccggtgac gatgcgcgtg aaggcctgat tgcggctcgtt
841 tccgtgaaag tgcccggacc gaaattctcc tcccagacca aaga

```

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S4S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240832.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)Go to:

LOCUS PP240832 865 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S4S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240832
 VERSION PP240832.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM Escherichia coli
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 865)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..865
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S4S1"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="13-Sep-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc_feature <1..865
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN
 1 gctatcgacg aagcgctcgc gggtcactgt aaagaaatta tcgtcacatc tcacgccgat
 61 aactctgtct ctgtacagga tgacgggcgc ggcattccga ccggtattca cccggaagag
 121 ggcgtatcgg cggcggaaagt gatcatgacc gttctgcacg caggcggtaa atttgacgat
 181 aactcctata aagtgtccgg cggctcgcac ggcgttgggtg tttcggtagt aaacgccctg
 241 tcgcaaaaac tggagctggt tatccagcgc gagggtaaaa ttcaccgtca gatctacgaa
 301 cacggtgtac cgcaggcccc gctggcgggt accggcgaga ctgaaaaaac cggcactatg
 361 gtgcgtttct ggccaagcct tgaaaccttc accaatgtga ccgaattcga atatgacatt
 421 ctggcgaaac gtctgcgtga gttgtcgttc ctcaactccg gcgtttccat tcgcttgcgc
 481 gacaagcgcg atggcaaaaga agaccacttc cactatgaag gcggcatcaa ggcattcgtt
 541 gaatatctga acaagaacaa aaccccgatc caccggaata tcttctactt ctccaccgaa
 601 aaacacggta ttggcgtcca agtggcgttg cagtggaaac atggcttcca ggaaaacatc
 661 tactgcttta ccaacaacat tccgcagcgt gacggcggta ctcacctggc aggcttccgt
 721 gcggcgatga cccgcacct gaacgcctac atggacaaga aacgctacag caacaaaaac
 781 caaagtcagc gccacccggt gacgatgccc gtgaaaggcc tgattcgggt cgtttccgtg
 841 aaaagtcctt ggaccccgaa aattc

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S26S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240885.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)[Go to:](#)

LOCUS PP240885 824 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024

DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S26S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.

ACCESSION PP240885

VERSION PP240885.1

KEYWORDS UNVERIFIED.

SOURCE Escherichia coli

ORGANISM [Escherichia coli](#)

Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 824)

AUTHORS Abo Almaaly, A.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq

COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES: Location/Qualifiers

source 1..824
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S26S2"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="05-Nov-2023"
 /collected_by="Ahmed"

misc_feature <1..824
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN

```

1 ctggtttctt ctgaggtgaa atcggcggtt gaacagcaga tgaacgaact gctggcagaa
61 tacctgcttg aaaacccaac cgacgcgaaa atcgtggttg gcaaaattat cgatgctgcc
121 cgtgccctgt aagcggcgcg tcgcgcacgt gaaatgacct gccgtaaagg tgcgctcgac
181 tttagcggcc tgcggggcaa actggcagac tgcagggaac gcgatccggc gctttccgaa
241 ctgtacctgg tggaaagggg ctcgcggggc ggctctgca agcaggggag taaccgcaag
301 aaccaggcga ttctgccgct gaagggtaaa atcctcaacg tcgagaaaag cgccttcgat
361 aagatgctct ctctcagga agtggcgacg cttatcaccg cgcttggatg tggtatcggt
421 cgtgacgagt acaacccgga caaactcgct tatcacagca tcattatcat gaccgatgag
481 gacgtcgacg gctcgacat tcgtacgctg ctgttgacct tcttctatcg tcagatgccg
541 gaaatcgttg aacgcggtca cgtttacatc gctcagccgc cgctgtacaa agtgaagaaa
601 ggcaagcagg aacagtacat taaagacgac gaagcgatgg atcagtacca gatctctatc
661 gcgctggacg gcgcaacgct gcacaccaac gccagtgcac cggcattggc tggcgaagcg
721 tttagagaaac tgggtgtctga gtacaacgag acacagaaaa tgatcaactc gctatggagc
781 gtcgttatcc gaaagcaatg ctgaaagagc ttatctatca gccg

```

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S17S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240879.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)[Go to:](#)

LOCUS PP240879 805 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S17S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240879
 VERSION PP240879.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 805)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..805
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S17S2"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="30-Oct-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc feature <1..>805
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN

```

1 agcagatcga acgaactgct ggcaggaata cctgctggaa aacccaactg acgcgaaaat
61 cgtggttggc aaaattatcg atgctgcccc tgcccgtgaa gcggcgcgtc gcgcgcgtga
121 aatgaccgcg cgtaaagggt cgctcgactt agcggcctg ccgggcaaac tggcagactg
181 ccaggaacgc gatccggcgc tttccgaact gtacctggtg gaaggggact ccgcgggcgg
241 ctctgcgaag caggggcgta accgcaagaa ccaggcgatt ctgccgctga agggtaaaat
301 cctcaacgct gagaaagcgc gcttcgataa gatgctctct tctcaggaag tggcgacgct
361 tatcaccgcg cttggctgtg gtatcggtcg tgacgagtac aacccggaca aactgcgtta
421 tcacagcctc atcatcatga ccgatgcgga cgtcgacggc tcgcacattc gtacgctgct
481 gttgaccttc ttctatcgtc agatgccgga aatcgttgaa cgcggtcacg tctacatcgc
541 tcagccgccc ctgtacaaaag tgaagaaagg caagcaggaa cagtacatta aagaccgacga
601 agcgatggat cagtaccaga tctctatcgc gctggatggc gcaacgctgc acaccaacgc
661 cagcgcaccg gcattggctg gcgaagcgtt agagaaattg gtgtctgagt acaacgcgac
721 gcagaaaatg atcaaccgca tggagcgtcg ttatccgaaa gcaatgctga aagagcttat
781 ctatcagccc acgctgacgg aagcc

```

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S27S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240886.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)[Go to:](#)

LOCUS PP240886 860 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S27S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240886
 VERSION PP240886.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 860)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..860
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S27S2"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="06-Nov-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc_feature <1..>860
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN

```

1  ttcttctgag gtgaaatcgg cggttgaaca gcagatgaac gaactgctgg cggaaatcct
61  gctggaaaac tcaaccgacg cgaatatcgt ggttggcaca attatcgatg ctgccctgctc
121  ccgtgaaagcg gcgctgcgcg cgcgtgaaat gactcgcctg aaaggtgctc tcgacttagc
181  gggcctgccc ggcaaaactgg cagactgcca ggaacgcgac ccagcgcctt ccgaactata
241  cctagtggaa ggggactccg cgggcccgtc tgcgaagcag gggcgtaacg gcaagaacca
301  ggcgattctg ccgctgaagg gtaaaatcct caacgtcgag aaagcgcgct tcgataagat
361  gctctcttct caggaagtgg cgacgcttat caccgcctt ggttgggta tcggtcgtga
421  cgagtacaac ccggacaaac tgcgttatca cagcatcctc atcatgaccg atgcggacgt
481  gcacggctcg cacattcgta cgctgctggt gacctcttc tatcgtcaga tgccggaaat
541  cgttgaaact ggtaacgtct acatcgctca gccgccctg tacaaaagta agaaaagtaa
601  gcaggaaacg tacattaaag acgacgaagc gatggatcag taccagatct ctatcgcgct
661  ggatggcgca acgctgcaca ccaacgccag tgcaccggcg ctggctggcg aagcgttaga
721  gaaactggtg tctgagtaca acgcgacgca gaaaatgatc aaccgcatgg agcgtcgtta
781  tccgaaagca atgctgaaag agcttatcta tcagccgacg ctgacggaaa ccgacctttc
841  tgacgagcaa accgttacc
```

//

GenBank

Send to:

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S29S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240888.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)Go to:

LOCUS PP240888 805 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S29S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240888
 VERSION PP240888.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM Escherichia coli
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 805)
 AUTHORS Abo Almaaly,A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..805
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S29S2"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="08-Nov-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc_feature <1..805
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN
 1 gcggttgaac agcagatgaa cgaactgctg gcggaatacc tgctgaaaa cccaaccgac
 61 gcgaaaatcg tggctggcaa aattatcgat gctgcccgtg cccgtgaagc tgcgctcgc
 121 gcgctgaaa tgaccgccc taaagtgctg ctcgacttag ctggcctgcc gggcaaacg
 181 gcagactgcc aggaacgca tccggcgctt tccgaactgt acctgtgga aggggactcc
 241 gcgggcgct ctgcaagca gggcgtaac cgcaagaacc aggcgattct gccctgaag
 301 ggtaaaatcc tcaacgtcga gaaagcgcg ttcgataaga tgctctcttc tcagggaagt
 361 gcgacgctta tcaccgctg tggttgtgt atcggtcgtg acgagtacaa cccggacaaa
 421 ctgcgttatc acagcatcat catcatgacc gatgcccagc tcgacggctc gcacattcgt
 481 acgtgtcgtg tgacctctt ctatcgtcag atgccggaaa tcggtgaagc tggtcacgtc
 541 tacatcgtc agccgcccgt gtacaaagt aagaaaggta agcaggaaca gtacattaaa
 601 gacgacgaag cgatggatca gtaccagatc tctatcgcgc tggatggcgc aacgtgcac
 661 accaacgcca gtgcaccggc gctggctggc gaagcgttag agaaaactgt gctgagtac
 721 aacgcgacgc agaaaatgat caaccgcatg gacgctcgtt atccgaaagc aatgctgaaa
 781 gagcttatcc tatcagccga cgctg

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S28S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240887.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)[Go to:](#)

LOCUS PP240887 859 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S28S2 DNA gyrase subunit
 B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240887
 VERSION PP240887.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales;
 Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 859)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha
 in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation
 provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..859
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S28S2"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="07-Nov-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc_feature <1..>859
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN

```

1 gaggtgaaat cagcggttga acagcagatg aacgaactgc tggcagaata cctgctggaa
61 aacccaaccg acgcgaaaaat cgtggttggc aaaattatcg atgctgcccg tgcccgtgaa
121 gcggcgcgctc gcgcgcgtga aatgacccgc cgtaaagggtg cgctcgactt agcgggcctg
181 ccgggcaaac tggcagactg ccaggaacgc gatccggcgc tttccgaact gtacctgggtg
241 gaaggggact ccgcgggcgg cttctcgaag caggggcgta accgcaagaa ccaggcgatt
301 ctgccgctga agggtaaaat cctcaacgtc gagaaagcgc gcttcgataa gatgctctct
361 tctcaggaag tggcgcgctc tatcaccgcg cttggctgtg gtatcggtcg tgacgagtac
421 aacccggaca aactgcgtta tcacagcatc atcatcatga ccgatgcgga cgtcgacggc
481 tcgcacattc gtacgctgct gttgaccttc ttctatctgc agatgcggga aatcgttgaa
541 cgcggtcacg tctacatcgc tcagccgccc ctgtacaaag tgaagaaagg caagcaggaa
601 cagtacatta aagacgacaa agcgtatgat cagtaccaga tctctatcgc gctggatggc
661 gcaacgctgc acaccaacgc cagcgcaccg gcattggctg gtcgaagcgtt agagaaattg
721 gtgtctgagt acaacgcgac gcagaaaatg atcaaccgca tggagcgtcg ttatccgaaa
781 gcaatgctga aagagcttat ctatcagccc acgctgacgg aagccgacct ctctgatgag
841 cagaccgata cccgctggg

```

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S57S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240901.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)Go to:

LOCUS PP240901 889 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S57S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240901
 VERSION PP240901.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 889)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

```
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..889
                        /organism="Escherichia coli"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /strain="E.S57S2"
                        /isolate="A"
                        /isolation_source="urine"
                        /db_xref="taxon:562"
                        /geo_loc_name="Iraq"
                        /collection_date="21-Nov-2023"
                        /collected_by="Ahmed"
     misc_feature      <1..>889
                        /note="similar to DNA gyrase subunit B"
```

ORIGIN

```

1  gtttcttctg aggtgaaatc ggcgggtgaa cagcagatga acgaaactgct ggcggaatac
61  ctgctggaaa acccaaccga cgcgaaaatc gtggttggca aaattatcga tgctgccctg
121 gcccgtgaag ctgctgctcg cgcgctgtaa atgacccgcc gtaaaggctc gctcgactta
181 gcgggcctgc cgggcaaaact ggcgactgac caggaacgcg atccggcgtt tccgaaactg
241 tacctggtgg aaggggactc cgcgggcccgc tctgcgaagc agggggcgtaa cgcgaagaac
301 caggcgattc tgccgctgaa gggtaaaaatc ctcaactgct agaaagcgcg cttcgataag
361 atgctctctt ctcaggaagt ggcgacgctg atcaccgccc ttggttggtg tatcggctgt
421 gacgagtaca acccggacaa actgcgttat cacaacatca tcatcatgac cgatcgggac
481 gtcgacggct cgcacattcg tacgctgctg ttgaccttct tctatcgtca gatgccggaa
541 atcgttgaac gcggtcacgt ctacatcgtc cagccgcccg tgtacaaagt gaagaaaaggc
601 aagcaggaac agtacattaa agacgacgaa gcgatggatc agtaccagat ctctatcgcg
661 ctggacggcg caacgctgca caccaacgcc agcgcaccgg cattggctgg cgaagcgtta
721 gagaaactgg tgtctgagta caacgacgac cagaaaatga tcaaccgcat ggagcgtcgt
781 tatccgagag caatgctgag agagcttatt tatcagccga cgctgacgga agccgacctc
841 tctgatgagc agaccgttac ccgctgggtg aacgcgctgg tcagcgaac
```

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S41S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240857.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)
Go to:

LOCUS PP240857 910 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S41S1 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240857
 VERSION PP240857.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 910)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JAN-2024) Biology, University of Karbalaa, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbalaa, Karbalaa 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

```
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
```

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..910
                     /organism="Escherichia coli"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="E.S41S1"
                     /isolate="A"
                     /isolation_source="urine"
                     /db_xref="taxon:562"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="08-Oct-2023"
                     /collected_by="Ahmed"
     misc_feature      <1..>910
                     /note="similar to DNA gyrase subunit B"
```

```
ORIGIN
1  cgcacacatg ttattcgagg tggtagataa cgctatcgac gaagcgctcg cgggtcactg
61  taaagaaatt atcgtcacca ttacgcccga taactctgtc tctgtacagg atgacgggctg
121  cggcattccg accggatttc acccggaaaga gggcgtatcg gccgcggaag tgatcatgac
181  cgttctgcac gcaggcggtg aatttgaaga taactcctat aaagtgtccg gcggtctgca
241  cggcgttggg gtttcggtag taacgcccct gtcgcaacaa ctggagctgg ttatccagcg
301  cgagggtaaa attcaccgtc agatctacga acacgggtga ccgcaggccc cgctggcggt
361  taccggcgag actgaaaaaa ccggcaccat ggtgcgttcc tggcccagcc tcgaaacctt
421  caccaatgtg accgagttcg aatatgaaat tctggcgaac cgtctgctgt agttgtcgtt
481  cctcaactcc ggcgtttcca ttctgtctgc cgacaagcgc gacggcaaaag aagaccactt
541  ccaactatgaa ggcggcatca aggcgttctg tgaatatctg aacaagaaca aaacgccgat
601  ccacccgaat atcttctact tctccactga aaaagacggg attggcgtcg aagtggcgtt
661  gcagtggaac gatggcttcc aggaaaaaat ctactgcttt accaacaaca ttccgcagcg
721  tgacggcggt actcacctgg caggcttccg tgcggcgatg acccgtaccc tgaaccccta
781  catggacaaa gaaggctaca gcaaaaaagc caaagttagc gccaccgggt acgatgcgcg
841  tgaaggcctg attcggtctg tttccgtgaa agtgcgggac ccgaaattct cctcccagac
901  caaagacaaa
```

//

UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S8S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence

GenBank: PP240874.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)Go to:

LOCUS PP240874 870 bp DNA linear BCT 10-FEB-2024
 DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain E.S8S2 DNA gyrase subunit B-like gene, partial sequence.
 ACCESSION PP240874
 VERSION PP240874.1
 KEYWORDS UNVERIFIED.
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM *Escherichia coli*
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 870)
 AUTHORS Abo Almaaly, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-JAN-2024) Biology, University of Karbala, Almuslaha in Hussain Quarter, Karbala, Karbala 1985, Iraq
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..870
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="E.S8S2"
 /isolate="A"
 /isolation_source="urine"
 /db_xref="taxon:562"
 /geo_loc_name="Iraq"
 /collection_date="25-Oct-2023"
 /collected_by="Ahmed"
 misc_feature <1..870
 /note="similar to DNA gyrase subunit B"

ORIGIN
 1 ctggtttctt ctgaggtgaa atcaggcggg tgaacagcag atgaacgaac tgctggcaga
 61 atacctgctg gaaaacccaa ccgacgcgaa aatcgtggtt ggcaaaatta tcgatgctgc
 121 ccgtgcccgt gaagcggcgc gtcgcgcgcg tgaatgacc cgcgtaaaag gtgcgctcga
 181 cttagcgggc ctgccgggca aactggcaga ctgccaggaa cgcgatccgg cgtttccga
 241 actgtacctg gtggaagggg actccgaggg cggctctgcg aagcaggggc gtaaccgcaa
 301 gaaccaggcg attctgccgc tgaagggtaa aatcctcaac gtcgagaaaag cgcgctcga
 361 taagatgctc tcttctcagg aagtggcgac gcttatcacc gcgcttggct gtggtatcgg
 421 tcgtgacgag tacaaccggg acaaactgcg ttatcacagc atcatcatca tgaccgatgc
 481 ggacgtcgac ggctcgaca ttctgtacgt gctgttgacc ttctttatc gtcagatgcc
 541 ggaatcgtt gaacggggtc acgtctacat cgctcagccg ccgctgtaca aagtgaagaa
 601 aggcaagcag gaacagtaca ttaagacga cgaagcgatg gatcagatcc agatctctat
 661 cgcgctggat ggcgcaacgc tgcacaccaa cgcacgca cggcattgg ctggcgaagc
 721 gttagagaaa ttggtgtctg agtacaacgc gacgcagaaa atgatcaacc gcatggagcg
 781 tcgttatccg aaagcaatgc tgaagagct tatctatcag ccgacgctga cggaaaccga
 841 cctctctgat gacgagacc ttaccgctg

//

Summary

Summary

Urinary tract infection is one of the most common bacterial diseases, and women are usually more susceptible to it than men. *E.coli* bacteria are often the major cause of urinary tract infections. In this research, mutations in *E.coli* bacteria resistant to antibiotics (quinolones) in Karbala Governorate and changes in amino acids were studied, the three-dimensional shape of the *gyrB* gene for the DNAgyrase enzyme was studied, and the possibility of proposing compounds that can bind to the active sites of the enzyme and inhibit its work.

Two hundred and twenty-three (223) urine samples were collected from patients with urinary tract infections (males and females) aged between 6-77 years from those attending government and private hospitals and private clinics in the holy Karbala Governorate (Imam Hussein Medical City Teaching Hospital, Imam Hassan Al-Mujtaba Hospital, Obstetrics and Gynecology Teaching Hospital, Karbala Children's Teaching Hospital, and Imam Al-Hujjah Hospital) under the supervision of specialist doctors for the period from 3/8/2023 to 25/11/2023, and were directly cultured on culture media and incubated at 37°C for 24 hours .

It 60/223 (27%) *Escherichia coli* isolates were isolated and diagnosed from the total urine samples. The isolates were diagnosed based on morphological, microscopic and biochemical tests and using the API-20E system to confirm the diagnosis.

The susceptibility test of *E.coli* isolates showed that they were multi-resistant, and their resistance was varying, and their resistance was high to Ampicillin (AMP) 100%, Co-trimoxazole (COT) 73.33%, Tetracycline (TE) 68.33%, and Ceftriaxone (CTR) 65%, while to a lesser

Summary

extent to Nalidixic acid (NA) 46.66%, Ciprofloxacin (CIP) and Levofloxacin (LEV) 36.66%, Gatifloxacin (GAT) 33.33%, and Imipenem (IMP) 31.66%, and they were least resistant to Amikacin (AK) 6.66% .

All *E. coli* isolates showed multiple resistance to a variety of antibiotics, as one isolate was resistant to seven types of antibiotics (E31), two isolates were resistant to five types of antibiotics (E19 , E44), two isolates were resistant to eight types of antibiotics (E45 , E57), three isolates were resistant to two types of antibiotics (E7 , E34 , E37), three isolates were resistant to all antibiotics (E22 , E50 , E60), which were ten antibiotics used in this study, while four other isolates showed resistance to three types of antibiotics (E1 , E2 , E8 , E14), four isolates were moderately resistant to one type of antibiotic (E8 , E21 , E31 , E45), and 14 isolates showed resistance to one type of antibiotic. (E4 , E9 , E13 , E15 , E20 , E23 , E25 , E28 , E30 , E33 , E35 , E38 , E39 , E41), and 15 isolates resistant to four types of antibiotics (E10 , E16 , E17 , E18 , E21, E29 , E36 , E42 , E43 , E46 , E47 , E48 , E49 , E52 , E53), while 16 isolates showed resistance to nine types of antibiotics (E3 , E5 , E6 , E11, E12 , E24 , E26 , E27 , E32 , E40 , E51 , E54 , E55 , E56 , E58 , E59).

The *gyrB* gene of 40 *E. coli* isolates (from 60 isolated of *E. coli*) was doubled by conventional polymerase chain reaction, and the isolates showed that the percentage of the presence of the *gyrB* gene was 100%. DNA sequencing tests was performed for two parts of the *gyrB* gene for 40 bacterial isolates (80 segments of DNA), the first part was 998 base pairs long and the second part was 971 base pairs, and the results of the DNA sequencing tests showed no mutations related to resistance to the quinolones antibiotics used in this experiment .

Summary

The alignment sequences were assigned to all samples by using the MEGA11 program and using the ClustalW selection, and the phylogenetic tree analysis of the *gyrB* gene, thus including the samples of local clinical isolates with corresponding global sequences belonging to different isolates, and most of the results for the local isolates showed a 100% match with the global isolates. While some of them showed a 99% match.

The three-dimensional shape was studied and the ATP binding pocket in the *gyrB* gene was identified, and the results showed that there are some proposed chemical compounds that have the ability to bind to the amino acids present in the binding pocket and inhibit their action. Some of the proposed chemical compounds with high binding affinity to the gene were subjected to Lipinski's rule of five to determine the possibility of taking the drug orally.



University of Kerbala
College of Science
Department of Biology

**Molecular Detection of *Escherichia coli* isolated
from Urinary tract infections and resistant to
DNA synthesis inhibitors antibiotics.**

A thesis

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

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

By

Ahmed Abbas Ali Majed

B.Sc. Kerbala University . college of science . department of biology
2008

Supervised by

Assist Professor

Dr. Zuhair Hameed Abboud

Safar - 1446 A.H

Profesor

Dr. Hassan Mahmood Mousa

September - 2024 A.D