



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

**التوصيف الجزئي لعزلات الاشريشيا القولونية متعددة المقاومة
المعزولة من الأطفال العراقيين المصابين بالتهابات المجاري
البولية**

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من الطالبة

آيات مجيد زيدان الزهيري

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2008

بإشراف

أ.م. د علي جعفر سليم

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا ﴾

صدق الله العلي العظيم

﴿سورة طه من الآية 114﴾

إقرار المشرف

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة (التوصيف الجزيئي لعزلات الاشريشيا القولونية متعددة المقاومة المعزولة من الأطفال العراقيين المصابين بالتهابات المجاري البولية) التي قدمتها طالبة الماجستير (آيات مجيد زيدان) قد جرت تحت إشرافي في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع:

الاسم : أ.م. د علي جعفر سليم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ / / 2021 م

بناءً على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : ذكرى عطا ابراهيم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

رئيس قسم علوم الحياة

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

التاريخ : / / 2021 م

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (التوصيف الجزيئي لعزلات الاشريشيا القولونية متعددة المقاومة المعزولة من الأطفال العراقيين المصابين بالتهابات المجاري البولية) التي قدمتها طالبة الماجستير (آيات مجيد زيدان) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:

اللقب العلمي:

التاريخ:

التوقيع:

الاسم:

اللقب العلمي:

التاريخ:

إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (التوصيف الجزيئي لعزلات الاشريشيا القولونية متعددة المقاومة المعزولة من الأطفال العراقيين المصابين بالتهابات المجاري البولية) التي قدمتها طالبة الماجستير (آيات مجيد زيدان) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم :

اللقب العلمي :

التاريخ : / / 2021

الإهداء

إلى الرحمة المهداة سيدنا محمد صل الله عليه وآله وسلم
إلى روح أُمي الغالية.... التي فارقتنا بجسدها، ولكن روحها ما زالت تُرْفرف في
سما ع حياتي رحمة الله عليها

إلى أبي المبجل..... مثال التفاني والإخلاص..... أبي الحبيب أطل الله في عمره،
وأمدّه بالصحة والعافية.

إلى زوجي وشريك الحياة، الروح التي سكنت روحي أيام

إلى إخوتي سندي وعضدي ومشاطري أفراحي وأحزاني ومن هم اقرب أليّ من
روحي إلى من شاركني حزن ألام وبهم استمد عزتي وإصراري

إلى روحي وفُرّة عيني ونبض فؤادي ولدي العزيزين، يزن و آن

أهديكم جميعا بحثي هذا

الشكر والعرفان

الحمد لله وكفى والصلاة والسلام على نبيه المصطفى وعلى اله وأصحابه أهل الصدق والوفاء وبعد

فعلينا دائماً أن نشكر ونقدر من قدّموا لنا المساعدة ومدّوا لنا يد العون عند حاجتنا لمن يقف إلى جانبنا، وعلينا أن نبوح لهم دوماً عن فرحنا بوجودهم وتقديرنا لمساندتهم.

من أجل ذلك تتسابق الكلمات وتنزاحم العبارات لتنظّم عقد الشكر الذي لا يستحقّه إلا أهله، إليك يا من كان له قدم السبق في ركب العلم والتّعليم، إليك يا من بذلت ولم تنتظر العطاء، إليك أهدي عبارات الشكر والعرفان لاستاذي الفاضل الأستاذ المساعد الدكتور علي جعفر سليم المشرف على الرسالة.

الى العقول التي تلوح في سماننا دوماً نجوم برّاقة لا يخفت بريقها عنّا لحظةً واحدةً، نترقّب إضاءتها بقلوب ولهانة، ونسعد بلمعانها في سماننا كلّ ساعة، فاستحقت وبكل فخر أن ترفع اسمها عالياً أساتذتي الأجلاء

كما أشكر أساتذتي في كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى لما ابدوا من ملحوظات وتوجيهات وارشادات أسأل المولى عز وجل لكل هؤلاء التوفيق في الدنيا والآخرة. ولا يفوتني ان اتقدم بشكري الى الدكتور مهذب مهيب والى رئاسة قسم علوم الحياة.

كما أتقدم بالشكر الجزيل ، لكل الجهود المخلصة التي أسهمت في تقديم نصيحة أو عون ، وأخص منهم الدكتورة سري التي كانت خير رفيق . فجزى الله الجميع عني خير الجزاء . كما أتقدم بالشكر والعرفان لجميع العاملين في مستشفى الطفل المركزي في بغداد وخصوصا شعبة الأحياء المجهرية وكذلك كادر مختبر الشمس في ديالى وأخص بالذكر منهم الأستاذ محمد الصادق

الطالبة

الخلاصة

تعد التهابات المجاري البولية من الامراض الشائعة، لكن في بعض الاحيان من الممكن ان تتعقد وتتطور الالصابة، ومن المحتمل ان تؤدي الى الوفاة . تعد بكتريا *Escherichia coli* السبب الاكثر شيوعا في اصابات المجاري البولية وبالاخص عند الرضع والاطفال. هدفت الدراسة الحالية عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* من الاطفال الراقدين في المستشفى دون سن 12 عام وتحديد المقاومة للمضادات بالاضافة الى الكشف الجيني عن بكتريا Uropathogenic *E.coli* وجينات المقاومة.

تم جمع 200 عينة ادرار للمدة من شهر تموز لغاية شهر كانون الاول 2020 من مستشفى الطفل المركزي في بغداد من الرضع والاطفال وزرعت على الاوساط الزرعية الاختيارية والتفريقية لغرض العزل الاولي لبكتريا *E.coli* ، واجريت الفحوصات والاختبارات الكيموحيوية وتم التشخيص التاكيدي بواسطة جهاز الفايترك، أجريت فحص الحساسية للمضادات لـ 25 مضاد حيوي بطريقة الاقراص والفايترك بالاضافة الى دراسة قابلية العزلات على انتاج الغشاء الحيوي بطريقة اطباق الكونغو الاحمر واطباق المعايرة بينما تم عزل الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين من البكتريا لغرض الكشف عن الجين التشخيصي *papE* لبكتريا UPEC وجينات المقاومة CITM و *tetA* و *tetB* و *sul1* و *sul2* و *sul3* بواسطة جهاز تفاعل تسلسل البلمرة.

أظهرت النتائج ان نسبة (64%) 62/40 من العزلات تعود لبكتريا *E.coli* (32 أنث و 8 ذكور)، وكانت العزلات ذات مقاومة متباينة للمضادات الحيوية ، اذ سجلت أعلى مقاومة لمضاد Sulfamethoxazoleampicillin و أقل نسبة مقاومة كانت لمضاد Tigecycline و اغلب عزلات بكتريا *E.coli* قيد الدراسة أبدت صفة تعدد المقاومة MDR حيث بلغت النسبة (77.5%) وعزلات UPEC بلغت (93%)، من ناحية اخرى اظهرت العزلات القابلية على تكوين الغشاء الحيوي بالطريقتين حيث بلغت النسبة بطريقة الكونغو الاحمر (57%) بينما نسبة (62.5%) كانت لها القابلية بطريقة اطباق المعايرة، بينما كانت عزلات UPEC المكونة للغشاء بطريقة الكونغو (55%) ونسبة (26.6%) بطريقة اطباق المعايرة.

وقد اظهرت نتائج الكشف عن جين التشخيصي *papE* لبكتريا Uropathogenic *E.coli* ان نسبة (37.5%) كانت حاملة لهذا الجين بينما بلغت نسبة جينات المقاومة CITM و *tetA* و *tetB* و *sul1* و *sul2* لبكتريا *E.coli* نسبة وجودها (5%) و (45%) و (12.5%)

و(35%) و (40%) على التوالي ، في حين لم يظهر جين *sul3* في اي عزلة من العزلات المحلية السريرية.

اظهرت هذه الدراسة ان بكتريا *E.coli* وبالاخص UPEC المعزولة من الاطفال كانت ذات مقاومة عالية للمضادات ولها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي بالاضافة الى وجود جينات المقاومة التي من الممكن ان تنتقل بين البكتريا وتنتشر المقاومة للمضادات .

المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
الفصل الاول : المقدمة		
1	المقدمة Introduction	1
الفصل الثاني استعراض المراجع		
3	استعراض المراجع Literature Review	2
3	الخصائص العامة لبكتريا الاشريشيا القولونية General Characteristics of <i>Escherichia coli</i>	1.2
4	الامراضية Pathogenicity	2.2
4	تسمم الدم أو الانتان Septicemia	1.2.2
5	السحايا Meningitis	2.2.2
5	الاسهال <i>E. coli</i> -associated diarrheal diseases	3.2.2
6	التهاب المجاري البولية Urinary tract infection	4.2.2
9	مضادات الحياة Antibiotic	3.2
10	بيتا لاكتام β -Lactam Antibiotic	1.3.2
10	البنسلينات Penicillins	1.1.3.2
10	السيفالوسبورينات Cephalosporins	2.1.3.2
12	كارباينيم Carbapenems	3.1.3.2
12	مونوبكتام Monobactams	4.1.3.2
12	الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides	2.3.2
13	كوينولونات Quinolones	3.3.2
13	مركبات السلفا Sulfonamides	4.3.2
13	تتراسايكلينات Tetracyclines	5.3.2
14	مقاومة بكتريا الاشريشيا القولونية للمضادات الحيوية <i>E.coli</i> antibiotics	4.2

	resistance	
16	Limiting drug uptake الحد من امتصاص المضاد 1.4.2	1.4.2
16	Modifying drug target تغيير الموقع الهدف 2.4.2	2.4.2
17	Inactivating the drug تعطيل المضاد	3.4.2
17	Drug efflux مضخات الدفع	4.4.2
19	Biofilm الغشاء الحيوي	5.2
20	Polymerase chain reaction (PCR) تفاعل تسلسل البلمرة	6.2
21	Genomic of Escherichia coli نبذة عن جينوم الاشريشيا القولونية	7.2
22	<i>Uropathogenic E.coli</i> جينوم بكتريا	1.7.2
22	Genes Responsible for Antibiotic Resistances جينات مقاومة المضادات الحيوية	2.7.2
24	Sequencing تسلسل القواعد النتروجينية	8.2
الفصل الثالث مواد وطرق العمل		
25	Material and Methods المواد و طرائق العمل	3
25	Materials المواد	1.3
25	Equipment and Apparatus الاجهزة و المعدات	1.1.3
28	Culture media الاوساط الزرعية	3.1.3
28	Antibiotic المضادات الحيوية	4.1.3
29	Kit العدة المختبرية	5.1.3
30	Primers البادئات	6.1.3
31	Methods طرائق العمل	2.3
31	Sterilization التعقيم	1.2.3
31	Sterilization by using Autoclave التعقيم بواسطة المؤصدة	1.1.2.3
31	Sterilization by using hot air oven التعقيم بواسطة فرن الهواء الساخن	2.1.2.3
31	Preparation of reagents and solution تحضير الكواشف والمحاليل	2.2.3

31	Catalase reagent كاشف الكاتاليز	1.2.2.3
31	Oxidase reagent كاشف الأوكسيديز	2.2.2.3
31	Preparation of crystal violet solution تحضير محلول صبغة البنفسج البلوري	3.2.2.3
31	Preparation of Culture Media تحضير الاوساط الزرعية	3.2.3
31	Preparation of Ready-made media تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة	1.3.2.3
32	Preparation of synthetic media تحضير الاوساط الزرعية التركيبية	2.3.2.3
32	Blood Agar وسط أكار الدم	1.2.3.2.3
32	Urea agar base media وسط اكار اليوريا الاساس	2.2.3.2.3
32	Peptone Water وسط ماء الببتون	3.2.3.2.3
33	Specimens Collection جمع العينات	3.3
33	Identification of bacterial isolate تشخيص العزلات البكتيرية	4.3
33	Morphological Examinations الفحوصات المظهرية	1.4.3
33	Microscopic Examinations الفحوصات المجهرية	2.4.3
33	Biochemical Tests الفحوصات الكيموحيوية	3.4.3
33	Oxidase test اختبار انزيم الأوكسيديز	1.3.4.3
34	Catalase Test اختبار انزيم الكاتاليز	2.3.4.3
34	Urease production test اختبار إنتاج إنزيم اليوريز	3.3.4.3
34	Indole Production Test اختبار إنتاج الاندول	4.3.4.3
34	Methyl red test اختبار المثيل الاحمر	5.3.4.3
34	Voges-proskauer test اختبار فوكس – بروسكاور	6.3.4.5
35	Citrate utilization test اختبار استهلاك السترات	7.3.4.3
35	Vitek 2 compact system تشخيص العزلات باستخدام جهاز الفايترك	4.4.3
35	Preservation Of Bacterial Isolate حفظ العزلات و ادامتها	5.3
35	Short-term Preservation الحفظ على المدى القصير	1.5.3
35	Med-term Preservation الحفظ على المدى المتوسط	2.5.3
35	Long-term Preservation الحفظ على المدى الطويل	3.5.3
36	Antibiotic susceptibility test اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية	6.3
36	فحص الحساسية باستخدام جهاز الفايترك	1.6.3
37	فحص الحساسية بالاطباق	2.6.3

37	Detection of ESBL الكشف عن قابلية انتاج انزيمات البيتا-لاكتيميز Production	7.3
37	Biofilm Formation تكوين الغشاء الحيوي	8.3
37	Congo-red Methods أطباق الكونغو الاحمر	1.8.3
38	Micro-titer Plate أطباق المعايرة	2.8.3
39	Genomic DNA أستخلاص وتقدير تركيز الحامض النووي البكتيري extraction and estimate concentration	9.3
40	DNA Concentration قياس تركيز الدنا	1.9.3
40	Polymerase Chain Reaction تفاعل البلمرة المتسلسل	10.3
40	Primers Preparation تحضير البادئات	1.10.3
41	PCR Mixture 2.10.3 تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل Preparation	2.10.3
42	Agarose gel electrophoresis الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز	11.3
43	DNA Sequencing التحليل التتابعي للجينات	12.3
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة		
44	Results and Discussion النتائج والمناقشة	4
44	Isolation of <i>Escherichia coli</i> عزل بكتريا الاشريشيا القولونية	1.4
46	Identifiction of <i>E.coli</i> by تشخيص البكتريا بواسطة الطرق التقليدية traditional methods	1.1.4
47	Identifiction of <i>E.coli</i> by Vitek تشخيص البكتريا بواسطة جهاز الفايترك 2 compact system	2.1.4
48	Molecular Identification for التشخيص الجزيئي للبكتريا Uropathogenic <i>E.coli</i>	2.4
48	<i>E.coli</i> استخلاص الحامض النووي DNA من بكتريا	1.2.4
48	<i>pap E</i> التشخيص الجزيئي لبكتريا <i>E.coli</i> باستخدام جين	2.2.4
50	Antibiotic Susceptibility Test فحص الحساسية للمضادات الحيوية	3.4
56	Multi Drug Resistance المقاومة المتعددة للمضادات	1.3.4
58	Dendogram مخطط التحليل التجميعي للمضادات الحياتية لنتائج اختبار <i>E.coli</i> حساسية بكتريا	2.3.4
60	Biofilm formation الكشف عن قابلية انتاج الغشاء الحيوي	4.4

60	Congo-red method (CRA) أطباق الكونغو الاحمر	1.4.4
61	Micro-titer Plate methods اطباق المعايرة	2.4.4
63	الكشف الجزيئي عن جين CITM في بكتريا <i>E.coli</i>	1.5.4
65	الكشف الجزيئي عن جين <i>tet A</i> و <i>tetB</i> في بكتريا <i>E.coli</i>	2.5.4
69	الكشف الجزيئي عن جينات <i>sul</i> في بكتريا <i>E.coli</i>	3.5.4
74	المخطط التجميعي لوجود الجينات في بكتريا <i>E.coli</i>	6.4
76	المخطط التجميعي لوجود الجينات في بكتريا UPEC	1.6.4
78	تحليل الحامض النووي للجينات المقاومة	1.7.4
79	الاستنتاجات	
80	التوصيات	
81	المصادر	
105	الملاحق	

الصفحة	الموضوع	التسلسل
25	الاجهزة المستخدمة في الدراسة الحالية	1-3
26	المعدات المستخدمة في الدراسة الحالية	2-3
26	المواد الكيميائية والحيوية المستخدمة في الدراسة	3-3
28	الايوساط الزراعية الجاهزة و المحضرة التي تم استعمالها في الدراسة	4-3
29	اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية	5-3
29	العدة المختبرية المستخدمة في اجراء الدراسة الحالية	6-3
30	تتابعات البودائ المستخدمة في الدراسة و حجم النواتج بعد الاكثار	7-3
36	المضادات المستخدمة في اجراء الدراسة الحالية في جهاز الفايترك	8-3
41	المكونات اللازمة لتفاعل البلمرة المتسلسل للجينات المستخدمة في الدراسة	9-3
42	برنامج جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)	10-3
47	الخصائص الزراعية والكيموحيوية لبكتريا <i>E.coli</i>	1-4
52	يوضح نسب مقاومة المضادات للعزلات <i>E.coli</i>	2-4
54	نتائج مقاومة لبكتريا UPEC	3-4
62	قابلية بكتريا <i>E.coli</i> على تكوين الاغشية الحيوية باستعمال اطباق المعايرة الدقيقة	4-4
73	يوضح توزيع الجينات في بكتريا <i>E.coli</i>	5-4
80	التغيرات في القواعد النيتروجينية	6-4

الاشكال

الصفحة	الموضوع	تسلسل
7	يوضح مكان الاصابة بالاشيريشا القولونية في الجهاز البولي	1-2
9	عوامل الضراوة التي تملكها الاشيريشيا القولونية وتساعد على غزو الجهاز البولي	2-2
14	آلية عمل كل مجموعة من مجاميع المضادات الحيوية	3-2
15	مقاومة UPEC للمضادات الحيوية المستخدمة في علاج التهاب المجاري البولية	4-2
18	اليات مقاومة لدى البكتريا	5-2
20	مراحل تكوين الغشاء الحيوي	6-2
21	يوضح خطوات تفاعل تسلسل البلمرة	7-2
44	نسبة النمو البكتيري الموجب والسالب من مجموع عينات الادرار المزروعة من المرضى	1-4
45	نسبة الاجناس البكتيرية من مجموع النمو الموجب	2-4
49	الترحيل الكهربائي لجين <i>papE</i> في بكتريا <i>E.coli</i>	3-4
56	يوضح عدد المضادات التي قاومتها بكتريا <i>E.coli</i>	4-4
59	مخطط التحليل التجميعي Dendogram لنتائج اختبار حساسية بكتريا <i>E.coli</i> للمضادات الحيوية و باستعمال برنامج Past	5-4
64	الترحيل الكهربائي للجين CTIM في عينات بكتريا <i>E.coli</i>	6-4
66	الترحيل الكهربائي لجين <i>tetA</i> في عينات بكتريا <i>E.coli</i>	7-4
67	الترحيل الكهربائي للجين <i>tetB</i> في عينات بكتريا <i>E.coli</i>	8-4
70	الترحيل الكهربائي لجين <i>sul1</i> في عينات بكتريا <i>E.coli</i>	9-4
71	الترحيل الكهربائي لجين <i>sul2</i> في عينات بكتريا <i>E.coli</i>	10-4
72	الترحيل الكهربائي لجين <i>sul3</i> في عينات بكتريا <i>E.coli</i>	11-4
75	المخطط التجميعي Dendogram لنتائج وجود الجينات في بكتريا <i>E.coli</i> و باستعمال برنامج Past	12-4
78	المخطط التجميعي لوجود الجينات في بكتريا UPEC	13-4
81	يوضح التحليل التتابعي لجين <i>tetA</i> للعزلات 7 ، 32 ، 38	14-4

المختصرات

Abbreviation	key
β -lactamase	Beta Lactamase
DNA	Deoxyribos enucleic acid
E.coli	Escherichia coli
EMB	Eosin-Methylene Blue Agar
LPS	Lipopolysaccharide
μ g	Microgram
μ L	Microlitter
MDR	Multidrug Resistance
LPS	Lipopolysaccharide
OMP	Outer Membrane Protein
PBP	Penicillin-Binding Proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
TBE	Tris-Boric Acid EDTA
UTI	Urinary Tract Infection
WHO	WHO World Health Organization

1. المقدمة Introduction

تعد بكتريا الإشريشيا القولونية *Escherichia coli* سببا رئيسياً لاصابات الجهاز البولي، وهي عبارة عن عصيات سالبة لصبغة كرام تصنف ضمن العائلة المعوية Enterobacteraceae لوجودها ضمن النبيت الطبيعي للأمعاء الغليظة (Jang وآخرون , 2017). يمكن ان تسبب مجموعة واسعة من الامراض المعدية الحادة و المزمنة ، منها داخل الامعاء (كحالات الاسهال diarrhoea) او خارج الامعاء مثل (التهاب المسالك البولية Urinary tract infection، تسمم الدم Septicemia ، ذات الرئة Pneumonia ، السحايا Meningitis (Bolocan وآخرون , 2016).

تشكل نسبة الاصابة بالتهاب المجاري البولية بسبب الإشريشيا القولونية (90%) من مجموع الاصابات حول العالم حسب منظمة الصحة العالمية (World Health Organization Dhahi, 2020). تمتلك هذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة virulence factors مما يجعلها خطراً على كبار السن والاطفال والاشخاص ضعيفي المناعة immune compromised patients اذ تعد السبب الرئيسي في التهابات المجاري البولية للرضع والاطفال ومن الضروري التركيز عليه في علم الامراض الاطفال الوبائية في البلدان النامية وغالبا ماتكون الاصابة في الجهاز البولي العلوي (Yun وآخرون , 2017; Loconsole وآخرون , 2020).

تعد بكتريا (UPEC) *Uropathogenic Escherichia coli* من اكثر السلالات شيوعا في التهابات الجهاز البولي اذ تقدر نسبة الاصابات (50-90%) من مجموع الاصابات ، اذ تؤثر على حالة التعايش للبكتريا commensal status الطبيعية في الامعاء intestinal flora وبالإضافة للاستراتيجيات وعوامل الضراوة المختلفة التي تمتلكها كونها مرتبطة بالمرضية الجهاز البولي يطلق عليها (UPEC) *Uropathogenic Escherichia coli* (Shah وآخرون , 2019).

ان ظهور سلالات المقاومة المتعددة للمضادات Multidrug resistance (MDR) ضمن UPEC يؤدي الى زيادة خطر انتشار مقاومة المضادات ويجعلها مشكلة عالمية وتحدياً للرعاية الصحية من خلال الحد من الخيارات المضادة للميكروبات التي يمكن استخدامها في علاج العدوى البكتيرية وانتشارها في البلدان النامية بسبب الاستخدام الخاطئ والعشوائي للمضادات في علاج UPEC مثل الامينوكلايكوسيدات aminoglycosides والفلوروكينولونات

fluoroquinolones وسيفالوسبورينات cephalosporins (Tabasi وآخرون , 2015; Homles, وآخرون 2016; Marston , وآخرون 2016; Kot وآخرون, 2019).

كما ان قابلية انتاجها للغشاء الحيوي Biofilm يزيد من مقاومة البكتريا للمضادات و يعتبر كآلية تساعد بكتريا *E. coli* على البقاء في ظروف غير ملائمة للنمو ، كما ان تكوين الغشاء الحيوي له دور مهم في حدوث المرض وسبب فشل العلاج ، لا سيما في بعض الإصابات المرتبطة بالأجهزة واستخدام القسطرة البولية Catheter مثل المرضى الذين يعانون من التهابات المسالك البولية على المدى الطويل (Poursina وآخرون, 2018).

من هنا جاءت الدراسة لتهدف الى

- 1- عزل وتشخيص الاشريشيا القولونية *E.coli* من أطفال عراقيين مصابين بالتهابات المجاري البولية Urinary tract infection الراقيين والمراجعين للمستشفيات العراقية وتحديد مقاومتها المتعددة مظهريا وجينيا .
- 2- إجراء اختبار فحص الحساسية Sensitivity test لمجاميع مختلفة من المضادات الحيوية وتحديد البكتريا ذات المقاومة المتعددة.
- 3- إجراء اختبار قابلية البكتريا *E.coli* على إنتاج الغشاء الحيوي biofilm .
- 4-الكشف الجيني عن جينات المقاومة (CITM و *tetA* و *tetB* و *sul1* و *sul2* و *sul3*) لدى البكتريا *E.coli* وتحليل تسلسل القواعد النتروجينية لهذه الجينات.

2. أستعراض المراجع Literature Review

1.2 الخصائص العامة لبكتريا الاشريشيا القولونية

General Characteristics of *Escherichia coli*

بكتريا سالبة لصبغة كرام Gram negative عصوية الشكل Rod shaped هوائية أو لاهوائية اختيارية Facultative anaerobic غير مكونة للسبورات تنمو في الاوساط الاعتيادية اذ تنمو بالاوساط التي تحتوي على كلوكوز وتنتج مستعمرات دائرية محدبة ذات حواف مميزة مخمرة للالكتوز اذ تنتج مستعمرات وردية على وسط MacCankay agar ومستعمرات ذات لون اخضر معدني لامع مميز Green metallic على وسط Eosin Methylene blue agar موجبة لكل من اختبار الكتاليز Catalase والاندول Indole الذي يعد الاختبار الأفضل الذي يميزها عن افراد العائلة المعوية الأخرى كما أنها موجبة لاختبار المثيل الاحمر Methyl red ، لها القابلية على اختزال النترات nitrate إلى النتريت nitrite لغرض إنتاج طاقة ، سالبة لاختبار الاوكسيداز Oxidase واستهلاك السترات وفحص Vogas Pruskour لا تنتج كبريتيد الهيدروجين على وسط Kligler Iron agar تتحرك بواسطة الأسواط من نوع Peritrichous ودرجة الحرارة المثلى لنموها 37 م° اذ تنمو بسرعة وذلك لسرعة انقسامها ويبلغ زمن الجيل لها 20 دقيقة (Bourgeois و آخرون , 2016: Riedel و آخرون, 2019).

تصنيف الاشريشيا القولونية (Faner , آخرون 2017)

Domain: Bacteria

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacterales

Family: Enterobacteriaceae

Genus : *Escherichia*

Species: *coli*

تعد هذه البكتريا ضمن النبيت الطبيعي Normal Flora للجهاز المعوي للانسان والحيوان بعلاقة تكافلية (Dicks وآخرون , 2018) اذ تحافظ على الاستقرار الذاتي homeostasis و

تستعمر القناة الهضمية لحديثي الولادة خلال الساعات الاولى بعد الولادة وتنتقل له عبر الاشخاص الذين ذو اتصال مباشر بالطفل كالام والممرضات وتلتصق ببطانة الامعاء الغليظة وتستقر هناك اذ تكون غير ممرضة (Wassenaar, 2016) بالرغم من ذلك فأنها انتهازية من السهولة ان تتحرك وتسبب الامراض للانسان وتترك الامعاء (مكانها الاصلي) وتنتقل الى اعضاء الجسم الاخرى خصوصا عند ضعف مناعة المضيف (Liu و آخرون , 2020; Dadi وآخرون 2020).

تمتلك *E.coli* العديد من المستضدات Antigens على سطحها والتي من الممكن ان تحفز الجهاز المناعي activate immune system وتتضمن O-Antigen يكون جزء من طبقة متعدد السكريد الشحمي الذي يحيط بالبكتريا Lipopolysaccharide layer و K-Antigen الذي يمثل المحفظة Capsule وبالإضافة الى H-Antigen الذي يمثل السوط Flagellar (Merino وآخرون , 2016; Liu وآخرون , 2020)

2.2 الامراضية Pathogenicity

تواجد الاشريشيا القولونية في كل مكان في التربة في المياه، بالإضافة لكونها ضمن النبيت الطبيعي للامعاء في الانسان والحيوانات الا أنها من الممكن ان تسبب العديد من الامراض داخل وخارج الامعاء اذ تمتلك العديد من عوامل الضراوة بالإضافة لها القابلية على اكتساب جينات الذيفانات المعوية عن طريق العاثيات Transduction via Bacteriophage او البلازميدات Plasmids أو أكتساب الجينات من الاجناس البكتيرية الممرضة الاخرى عن طريق الاقتران البكتيري Bacterial conjugation اذ تقسم الى عدة اقسام اعتمادا على عوامل الضراوة التي تملكها البكتريا (Kabiru وآخرون , 2015; Nair وآخرون , 2019).

من الامراض الشائعة التي تسببها الاشريشيا القولونية:-

1.2.2 تسسم الدم أو الانتان Septicemia

تحدث الإصابة بتسمم الدم عندما تكون دفاعات المضيف غير كافية ، لذا قد تصل البكتريا إلى مجرى الدم ويسبب التسمم وقد تصل الى الاعضاء الحيوية الاخرى ، الاطفال حديثي الولادة هم الاكثر تعرضا للتسمم وتكون اصابتهم شديدة كونهم يفتقرون للجسام المضادة (Capasso IgM وآخرون , 2014). تعد نسبة الإصابة بتسمم الدم بسبب بكتريا *E.coli* بعد الإصابة بالتهاب المجاري البولية التي تكون اكثر شيوعاً وغالبا ماتكون السلالة المسؤولة عن التسمم *E.coli* O25/ST131 (Jawitz وآخرون , 2019).

2.2.2 السحايا Meningitis

تعد بكتريا *E.coli* هي في مقدمة أسباب التهاب السحايا لدى الرضع و تكون نسبة الوفيات عالية (Kim , 2016) . وجد مايقارب (80%) من *E.coli* المعزولة من حالات التهاب السحايا لديها المستضد K1 capsular and O-lipopolysaccharide الذي يعد من اهم عوامل الضراوة في حدوث الاصابة كما يعتمد على المستوى العالي للحمل البكتريا Bacterial load وغزوها لحاجز الدم -الدماغ , بالاضافة الى عوامل الضراوة الاخرى التي تمتلكها البكتريا مما يجعلها تصل للجهاز العصبي المركزي و يزيد من خطورة الاصابة (Herold وآخرون , 2019).

3.2.2 الاسهال *E. coli*-associated diarrheal diseases

تعد بكتريا *E.coli* من المسببات الشائعة لحدوث الاسهال اذ تلتصق الاشريشيا القولونية بخلايا الطلائية للأمعاء الدقيقة والغليضة وتنتج الذيفانات المعوية Enterotoxins التي تسبب حالات الاسهال المختلفة (Jawitz وآخرون , 2019). فيما يلي الجوانب السريرية لأمراض الإسهال ونوع الاشريشيا القولونية المسببة له:-

-اشريشيا القولون الممرضة للأمعاء (EPEC) Enteropathogenic *E coli*

تعد من اهم مسببات الاسهال لدى الرضع خصوصا في البلدان النامية اذ تلتصق بالخلايا المخاطية للتجويف المعوي بواسطة حزمة من Pilus التي يتم التشفير عنها بواسطة عاملين احدهما بلازميدي والآخر كروموسومي الاعراض تشمل اسهال مائي حاد وتقيؤ وحمى (Rojas-Lopez وآخرون , 2018; Scaletsky, 2019)

-اشريشيا القولون الغازية للأمعاء (EIEC) Enteroinvasive *E coli*

يحدث بصورة شائعة في الاطفال في البلدان النامية والاشخاص المسافرين لهذه البلدان تسبب الاسهال الشبيه بالذنتري، تكون هذه السلالة غير مخمرة للاكتوزاو تتأخر في تخميره non-lactose fermenter وغير متحركة non-motile وتسبب المرض كونها تغزو الخلايا الطلائية للأمعاء (Pasqua وآخرون, 2017)

-اشريشيا القولون النزفية للأمعاء (EHEC) Enterohemorrhagic *E coli*

تسبب الاسهال الدموي ومتلازمة انحلال الدم Hemolytic Uremic Syndrome كونها تمتلك سم شابه لسم الشغلية الزحارية Shiga-like toxins او تدعى O157:H7 (Ameer وآخرون , 2020) فور دخولها للجسم تنتج السم مما يؤدي إلى فقدان الأيونات

وكمية هائلة من الماء. ويعمل هذا السم أيضا كعامل نقل للخلايا والايغاز مناعي يؤدي إلى انتاج عوامل الالتهاب ينتج عن ذلك تنخر البطانة الداخلية للاوعية الدقيقة في الكلى والامعاء الدقيقة ومن الممكن ان تصل الى الاعضاء الاخرى كالجهاز العصبي المركزي ، والبنكرياس ، والهيكل العظمي ، بالاضافة الى عضلة القلب (Fatima و Aziz , 2020).

-أشريشيا القولون المعوية التكتلية (Enteraggative *E coli* (EAEC)

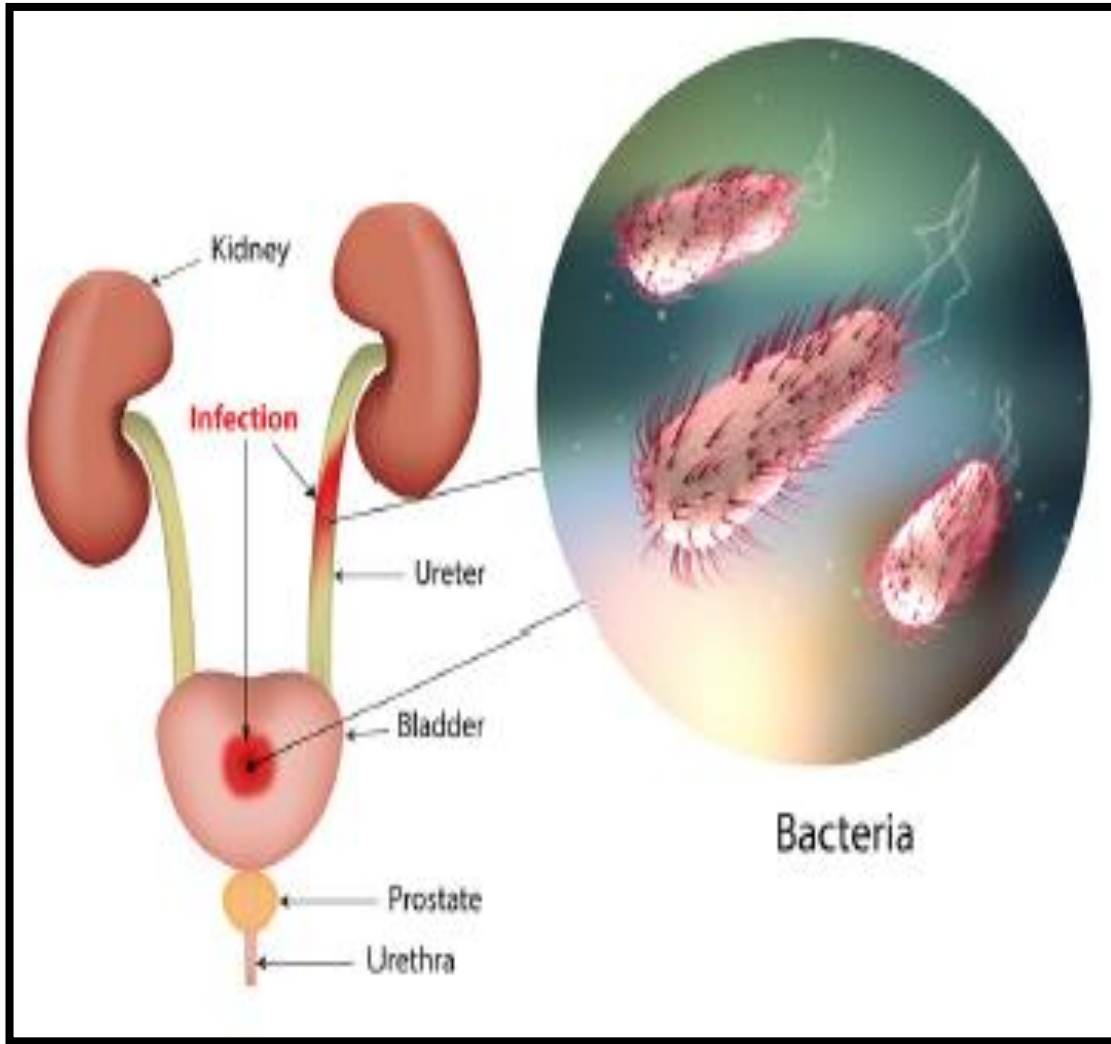
تسبب الاسهال الحاد (أقل من 14 يوم) للبالغين في البلدان النامية ولها علاقة بتسمم الغذاء واسهال المسافرين مميزاتها تنتج ذيفان معوي يدمر ويحطم الخلايا المعوية (Jawitz وآخرون , 2019).

4.2.2 التهاب المجاري البولية Urinary tract infection

تعد الاشريشيا القولونية السبب الاكثر شيوعا في التهاب المجاري البولية مايقارب 90% من اصابات الجهاز البولي أهم علامته تتضمن: كثرة التبول polyuria والبول الدموي hematuria والالم عند التبول ومن الممكن ان تصل مجرى الدم وتسبب تسمم الدم وتتطورالاصابة لتشمل المثانة Bladder والكلى Kidney، كونها تمتلك عوامل الضراوة التي تسهل عملية التصاق وغزو الخلايا Adhereing and Colonization منها المستضدات الخاصة بالغشاء O-Antigen وتدعى (UPEC) Uropahogenic *E.coli* تنتج الهيمولايسن اذ يسهل غزو الأنسجة مسببة Pyelonephritis تمتلك مستضدات خاصة K-Antigen و P fimbriae الذي يرتبط بمجموعة الدم P antigen (Parikumsil وآخرون , 2017; Bahzadi وآخرون , 2020).

وتتضمن اصابة هذه البكتريا للمجاري البولية العديد من المراحل اذ تغزو UPEC المناطق المحيطة بالاحليل والمهبل بعد ذلك تصعد الى المثانة اذ تبدأ بالتكاثر على شكل خلايا مفردة Planktonic في الادرار وتلتصق بالخلايا الطلانية المحيطة بالمثانة وتكون الغشاء الحيوي Biofilm لحمايتها من الجهاز المناعي للمضيف وتكون مجتمعات بكتيرية تدعى Intracellular Bacterial Communities IBC (في داخل المثانة) تبدأ بتغييرات بشكل البكتريا يجعلها اكثر ضراوة وتنقل من الخلايا المصابة الى الخلايا المجاورة لتنتشر الاصابة يقوم الجهاز المناعي بالتخلص على بعض من المجتمعات البكتيرية (IBC) وذلك بتأكل الخلايا المحيطة بالمثانة Facet cells واخراجها مع الادرار لكن البكتريا المتبقية من الممكن ان تنمو وتكون الغشاء الحيوي مما يجعلها مقاومة لأليات الجهاز المناعي وتتحكم بكتريا UPEC بتكوين

الغشاء الحيوي اذ من الممكن ان تتحرر من الغشاء الحيوي وتتحول الى الشكل المتحرك Motile form وتنتقل من تجويف المثانة Bladder lumen صعودا الى أن تغزو الكلى مسببة Pyelonephritis وتسبب الضرر لانسجة المضيف الشكل (1-2) بعدها من الممكن أن تنتقل UPEC الى مجرى الدم وبالتالي الإصابة بتسمم الدم. اذ تقدر نسبة (15-23%) من التهاب المجاري البولية المتسببة في حدوث تسمم الدم (McLellan و Hunstad , 2016 ; Spaulding و Hultgren , 2016 ; Terlizzi وآخرون , 2017 ; Asadi وآخرون , 2019).



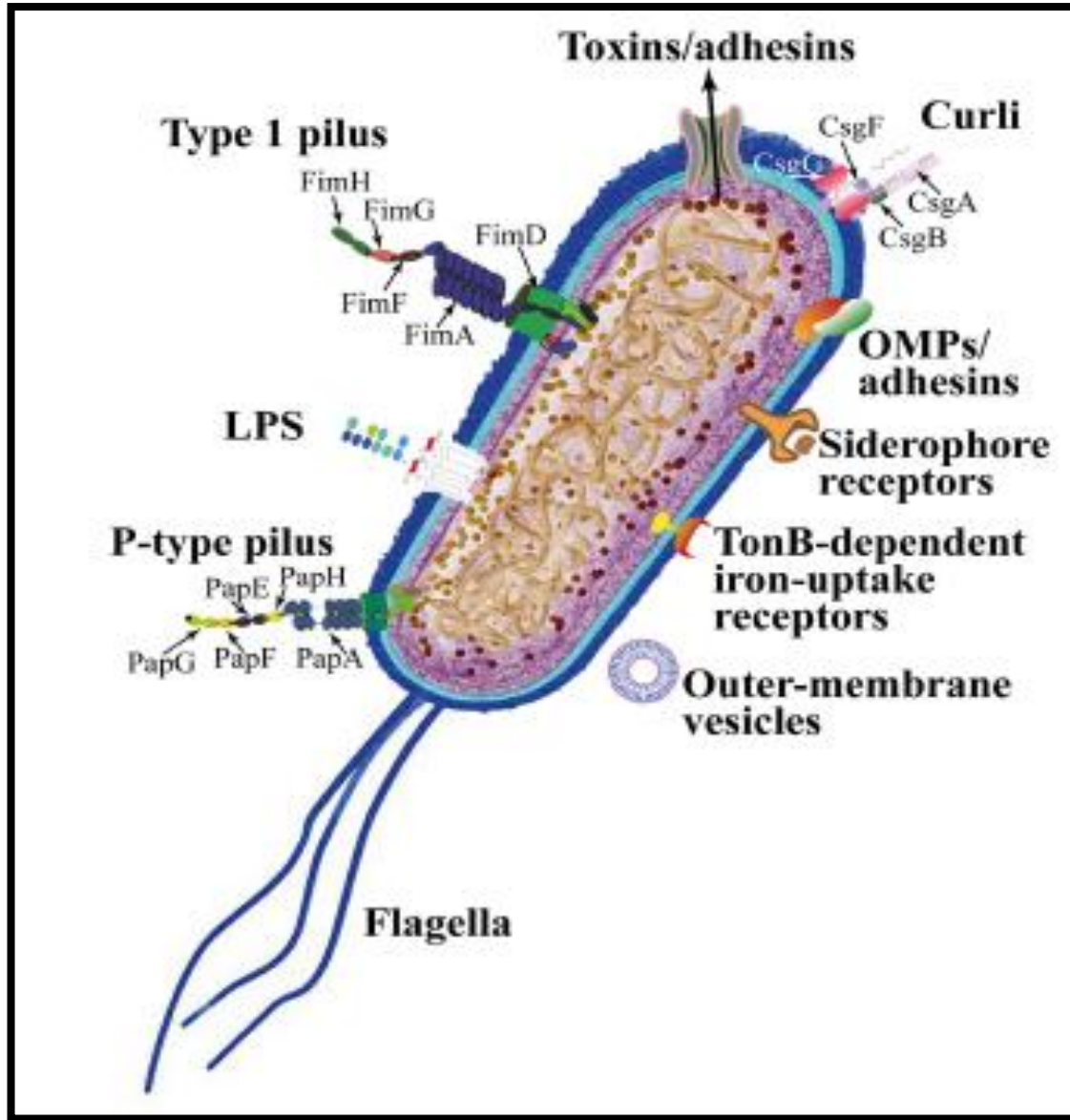
شكل (1-2) يوضح مكان الإصابة بالاشيريشا القولونية في الجهاز البولي (Terlizzi وآخرون , 2017) بعد غزوها للمثانة مباشرة تبدأ بانتاج عوامل الضراوة على سطحها والتي تلعب دور كبير في شدة الامراضية والاصابة تشمل طبقة السكريد الشحمي lipopolysaccharide ذات الطبيعة الكاره للماء اذ تلعب دورا هاما في حمايتها من المناعة الفطرية innate immunity والمتخصصة adaptive immunity لجسم المضيف وتجعلها مقاومة للجسام المضادة ذات

الافلة الواطنة للماء hydrophobic antibodies بالإضافة الى المحفظة (الكبسولة) polysaccharide capsule الاسواط flagella المسؤولة عن الحركة له تأثير كبير بشدة الاعراض وتكرار الاصابة خصوصا عند النساء كما ان له دور في مساعدتها على الالتصاق بالخلايا وغزوها Adherence and colonization أضافة الى ذلك فله دور ديناميكي داخل الغشاء الحيوي Biofilm اذ يساعد على نضج وانتشار الغشاء الحيوي (Nakamura وآخرون , 2016 ; O'Brien وآخرون , 2016).

هناك العديد من حوصيلات الغشاء الخارجي outer-membrane vesicles وشعيرات الالتصاق و pili عوامل الالتصاق الغير شعيرية, non-pilus adhesins , بروتينات الغشاء الخارجي (OMP) Outer Membrane Proteins تبقى بشكل جزيئات مرتبطة بالجدار الخارجي في البكتريا السالبة لصبغة كرام وتتكون خلال جميع مراحل نموها تعد كوسيلة ذكية لحماية السموم البكتيرية ونظام فعال لتوصيلها للخلية المضيفة (Terlizzi وآخرون , 2017)

من ناحية اخرى افرازها للسموم والانزيمات مثل الهيمولايسين alpha-hemolysin وارتباطه بضرر وتخدش الكلى من خلال تحفيزه لايون الكالسيوم Ca^{+2} وتدفعه على الخلايا الطلائية في النبيبات مما يعزز صعودها نحو الحالبان والخلايا البرنكيمية للكلى وبالتالي يعطل التدفق العادي للادرار اما بالنسبة لنظام مستقبلات الحديد TonB-dependent iron-uptake receptors وبضمنها حاملات الحديد Siderophore receptors وهي عبارة عن جزيئات صغيرة لها القابلية على سحب والتقاط ايونات الحديد Fe^{+3} أهمها yersiniabactin و salmochelin و aerobactin (Nagamatsu وآخرون , 2015 ; Aguiniga وآخرون , 2016).

UPEC تمتلك اوبرون يدعى *fim* Operon اذ يشفر للنوع الاول من شعيرات الالتصاق Type 1 pili او Type 1 fimbriae لها القابلية على التلازن مع الدم hemagglutination وحساسية لسكر المانوز mannose-sensitive لها دور مهم في المراحل المبكرة من الالتصاق بسطح الخلية المضيفة بالإضافة الى عملية تكوين الغشاء الحيوي (Flores-Mireles وآخرون , 2015 ; Tewawong وآخرون , 2020)، شكل (2-2).



شكل (2-2): عوامل الضراوة التي تملكها الاشيريشيا القولونية وتساعد على غزو الجهاز البولي (Terlizzi وآخرون, 2017).

3.2 مضادات الحياة Antibiotic

هي مركبات عضوية تنتجها كائنات مجهرية ذات تأثير سام لكائنات مجهرية أخرى ، ويمكن للتركيزات المنخفضة أن تحول دون نمو ، أو أن تكون قاتلة إلى الكائنات المجهرية الأخرى غير أن هذا تم وتطور هذا التعريف في العصر الحديث ليشمل مضادات الميكروبات التي تنتج أيضا جزئيا أو كليا من خلال الوسائل الاصطناعية (Singh ، وآخرون 2018). وبصورة عامة فانها عبارة عن مواد كيميائية تمنع النمو البكتيري عن طريق ايقاف تكاثر البكتريا أي مثبطة لنمو البكتريا bacteriostatic أو عن طريق قتل البكتريا bactericidal (Shukuri و Dugassa , 2017)، شكل (2-3). وهناك عدة طرق لتصنيف المضادات الحيوية ولكن التقسيم الشائع هو

بالاعتماد على التركيب الجزيئي والية العمل و طيف الفعالية عموما المضادات ضمن المجموعة الواحدة تتشارك نمط مماثل من الفعالية والسمية والآثار الجانبية (Kapoor , وآخرون 2017 ; Sakoulas , وآخرون 2019) وابرزها:

1.3.2 بيتا لاكتام β -Lactam Antibiotic

تشمل مجموعة واسعة من المضادات التي تمتاز بامتلاكها حلقة البيتا لاكتام شديدة الفعالية وهي تتداخل مع البروتينات الضرورية لتكوين جدار الخلايا البكتيرية ، وفي هذه العملية إما أن تقتل أو تثبط نموها اذ تتداخل مع تكوين طبقة peptidoglycan والذي يؤدي الى تحلل وموت الخلايا (Etebu و Ariekpar 2016) وتقسم الى أربعة مجاميع:-

1.1.3.2 البنسلينات Penicillins

تضم مجموعة واسعة من المضادات الحيوية وتكون اما طبيعية مثل Penicillin G (يعد أول مضاد أنتج بين هذه المجموعة من المضادات الحيوية ، وفي الواقع اول مضاد من بين جميع المضادات الحيوية) ومضاد Penicillin V (Boundless , 2016) أو شبه مصنعة تحوي حلقة بيتا لاكتام لكن بسلاسل جانبية مختلفة تضم البنسلينات واسعة الطيف Extended Spectrum Penicillins ، وتشمل مجموعة مضادات Carboxy Penicillins مثل Carbencillin و Ticarcillin و ampicillin و carbenicillin و Amoxicillin بالإضافة الى مجموعة مضادات UreidoPencillins التي تشتمل على Azlocillin و Mezlocillin و Piperacillin هذه السلاسل الجانبية التي تمتاز بالقدرة على تجنب القابلية التحليلية لبعض الإنزيمات (الشويخ ، 2016 ; Chaudhr , وآخرون 2019).

2.1.3.2 السيفالوسبورينات Cephalosporins

وتشمل مجموعة من المضادات ذات الاستخدام الواسع بسبب فائدتها السريرية في عدد من حالات الأمراض المعدية اذ تستخدم كخط علاج اول وتقسم الى عدة اجيال اعتمادا على فعاليتها المضادة للميكروبات و تركيبها الكيميائي (MacDougall , وآخرون 2017).

• سيفالوسبورينات الجيل الاول First Generation Cephalosporins

يضم Cephazolin و Cephalixin ، وهذه العوامل معروفة بفعاليتها للمكورات العنقودية الذهبية الحساسة للميثيسيلين methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ، والمكورة العقدية streptococci وبعض من العصيات السالبة لصبغة كرام (Chaudhr ,

وآخرون 2019). يستخدم Cephazolin في لالتهابات القدم المصابة بالسكري (Berbari , وآخرون 2015; Nicolle , وآخرون 2019) ، كما تم فحص السيفازولين كعامل خط أول لعلاج التهابات المناطق الحرجة ، بما في ذلك حالات تسمم الدم (Kusumoto , وآخرون 2017).

● سيفالوسبورينات الجيل الثاني Second Generation Cephalosporins

يضم كل من Cefotetan و Cefmetazole و Cefuroxime تمتاز بكونها ذات فعالية جيدة ضد بعض البكتيريا السالبة بالإضافة الى البكتيريا اللاهوائية لذا يتم استخدامه بشكل وقائي في العديد من العمليات الجراحية ، كما يستخدم في علاج التهابات الجهاز البولي البولي والالتهاب الرئوي (Baddour , وآخرون 2015; McDanel , وآخرون 2017; Eljaaly , وآخرون 2018)

● سيفالوسبورينات الجيل الثالث Third Generation Cephalosporins

هو أكثر الاجيال وصفا و اول جيل يعد ذات مدى فعالية واسع ضد العديد من المكروبات الممرضة ويشمل Ceftriaxone و Ceftazidme و Ceftazidme/avibactam و Cefdinir و Cefotaxime و Cefpodoxime و Cefixime تكون أكثر ثباتا ضد انزيمات البيلاكتيميز المنتجة من قبل البكتيريا السالبة لصبغة كرام مما يعطيها فعالية جيدة ضد العصيات السالبة لصبغة كرام مع ذلك فان هذا الجيل يتحلل بواسطة انزيمات extended- (ESBL) spectrum -lactamases ، والبكتيريا المنتجة للـ AmpC والكاربابينيمز carbapenemase تستخدم كعلاج ضد التهاب الدماغ البكتيري داخل المستشفى أو زرع الكبد (Taplitz , وآخرون 2018 ; Nicolle , وآخرون 2019). أو كعلاج للخط الأول لمعظم الإصابات ، بما في ذلك الأمراض التي تنتقل عن طريق الاتصال الجنسي السيلان و الكلاميديا و الزهري (Kalil , وآخرون 2016 ; Shane , وآخرون 2017) .

● سيفالوسبورينات الجيل الرابع Fourth Generation Cephalosporins

يضم مضاد Cefepime و هو من المضادات المهمة و المستخدمة حديثا في المجالات الطبية المختلفة لكونه ذات مدى فعالية واسعة اذ يستخدم افراد العائلة المعوية مثل الاصابات الشديدة داخل البطن، والتهاب القولون والتهاب السحايا/التهاب البطين (Tunkel , وآخرون 2017).

● سيفالوسبورينات الجيل الخامس Fifth Generation Cephalosporins

مثل مضاد Ceftobiprole يستخدم عادة للبكتريا الذهبية العنقودية المقاومة للميثيسيلين Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) و المكورات العنقية و يعطى بالحقن لعلاج اصابات الجلد و الانسجة الرخوة وكعلاج مناسب لحالات التهاب الغدد الصماء الضموري (Destache ;2018, Co and Merck , وآخرون 2019).

3.1.3.2 كارباينيم Carbapenems

هذه المجموعة تحتل مكانا هاما في علاج الاصابات البكتيرية الصعبة وذلك لأنها لها القابلية على مقاومة التحلل بواسطة انزيمات البيتا لاكتاماتيز، تعد هذه المجموعة واسعة الطيف لفعاليتها المضادة لكل من بكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، تضم Imipenem يكون فعال ضد البكتريا الممرضة الهوائية واللاهوائية ، وعادة ما يؤخذ عن طريق الفم، Meropenem يستخدم ضد العصيات السالبة لصبغة كرام الغير مخمرة لسكر اللاكتوز وكذلك العدوى المكتسبة (Arikekpar و Etebu , 2016).

4.1.3.2 مونوبكتام Monobactams

تعد قاتلة للبكتريا وتضم مضاد Azteronam يمتاز بكونه ذات كفاءة عالية في علاج الإصابات الناجمة عن البكتيريا السالبة لصبغة كرام لا سيما في علاج السحايا والمثانة والكلى اذ يستخدم بديلا لعلاج المرضى الذين يعانون من حساسية ضد البنسلين (El-Shorbagi و Chaudhary , 2016).

2.3.2 الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides

تعد من المضادات القاتلة للبكتريا ، اذ تعمل على تثبيط بناء البروتين من خلال تداخلها مع عمل رايبوسومات الخلية البكتيرية ذات فعالية واسعة ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام تشمل مجموعة من المضادات منها Streptomycin , Gentamycin , Amikacin , Neomycin , Tobramycin , Sisomycin , Kanamycin , اذ تتشابه هذه المضادات فيما بينها من اذ خصائصها السمية و العلاجية و آلية عملها لكن تختلف عن بعضها في الفعالية ضد الميكروبات كما تؤخذ هذه المضادات عن طريق العضل لكونها قليلة الامتصاص من قبل القناة الهضمية و تزداد فعاليتها في المحيط القاعدي (Krause ; 2015, Larson , وآخرون 2016).

3.3.2 كوينولونات

Quinolones

تعد من بين أنجح المضادات الحيوية في الآونة الأخيرة في البداية تم عزلها من الكائنات الحية كنتاج ثانوي في عملية انتاج Chloroquine و بعد ذلك صنعت من قبل الكيميائيين كعوامل مضادة للميكروبات تعمل على تثبيط تصنيع ال DNA البكتيري و ذلك من خلال تثبيط عمل انزيم DNA gyrase و DNA topoisomerase IV بالتالي يؤدي الى وقف بناء DNA و موت الخلية البكتيرية واتضح أنها طريقة فعالة جدا لقتل البكتيريا (Bush , وآخرون 2020).

تستخدم لعلاج الالتهابات البكتيرية المتنوعة التي تسببها كل من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، وتقسم الى عدة اجيال بالاعتماد على فعاليتها تشمل مضادات عدة منها Nalidixic acid و Norfloxacin و Ciprofloxacin و Levofloxacin و Ofloxacin (Gillespie , Correia ;2016 , وآخرون 2017 ; Drlica , وآخرون 2019)

4.3.2 مركبات السلفا

Sulfonamides

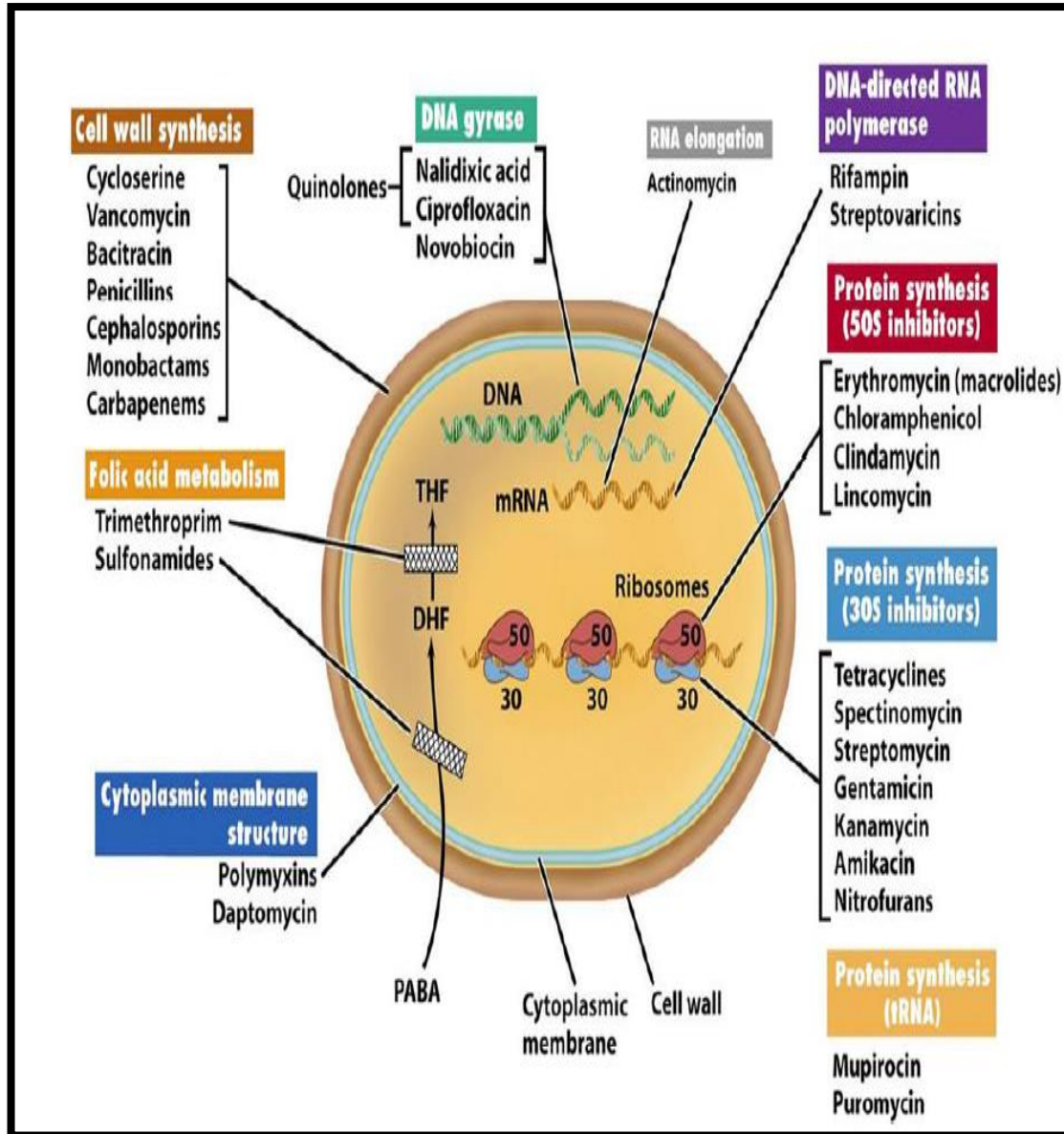
عبارة عن مضادات قاتلة للبكتيريا وذلك كونها تتداخل مع تكوين حامض الفوليك في الكائنات الحية لذا لا تستخدم كثيرا بسبب تأثيرها السمي على الانسان اذا ما استخدمت بافراط (Yousef , وآخرون 2018)

والواقع أن مركبات السلفا تشكل فئة هامة من العقاقير ، اذ تمتلك أنواع عديدة من العوامل الدوائية مضادات للبكتيريا ، ومضادات السمنة ، ومضادات للسرطان ، ومضادات لأمراض الغدة الدرقية، مثبطات فيروس نقص المناعة البشرية واهمها sulfamethoxazole (Supuran , 2017).

5.3.2 تتراسايكلينات

Tetracyclines

تضم العديد من المضادات مثل Tetracycline و Doxycycline و Minocycline تكون واسعة النطاق اذ تتداخل مع عملية صنع البروتين عن طريق ارتباطها مع الوحدة الريبوسومية 30 S التي تمنع ارتباط الحامض النووي الريبوزي الناقل tRNA- ويمكن استخدامها لعلاج العدوى المختلفة. على الرغم من أنها تعد عموما أدوية غير سمية نسبيا فإنها تنتج عددا كبيرا من الآثار الجانبية اذا ما استخدمت لفترات طويلة جدا (Abdel-Gelil و Mansour , 2019).



شكل (2-3) آلية عمل كل مجموعة من مجاميع المضادات الحيوية (Bitrus , 2018)

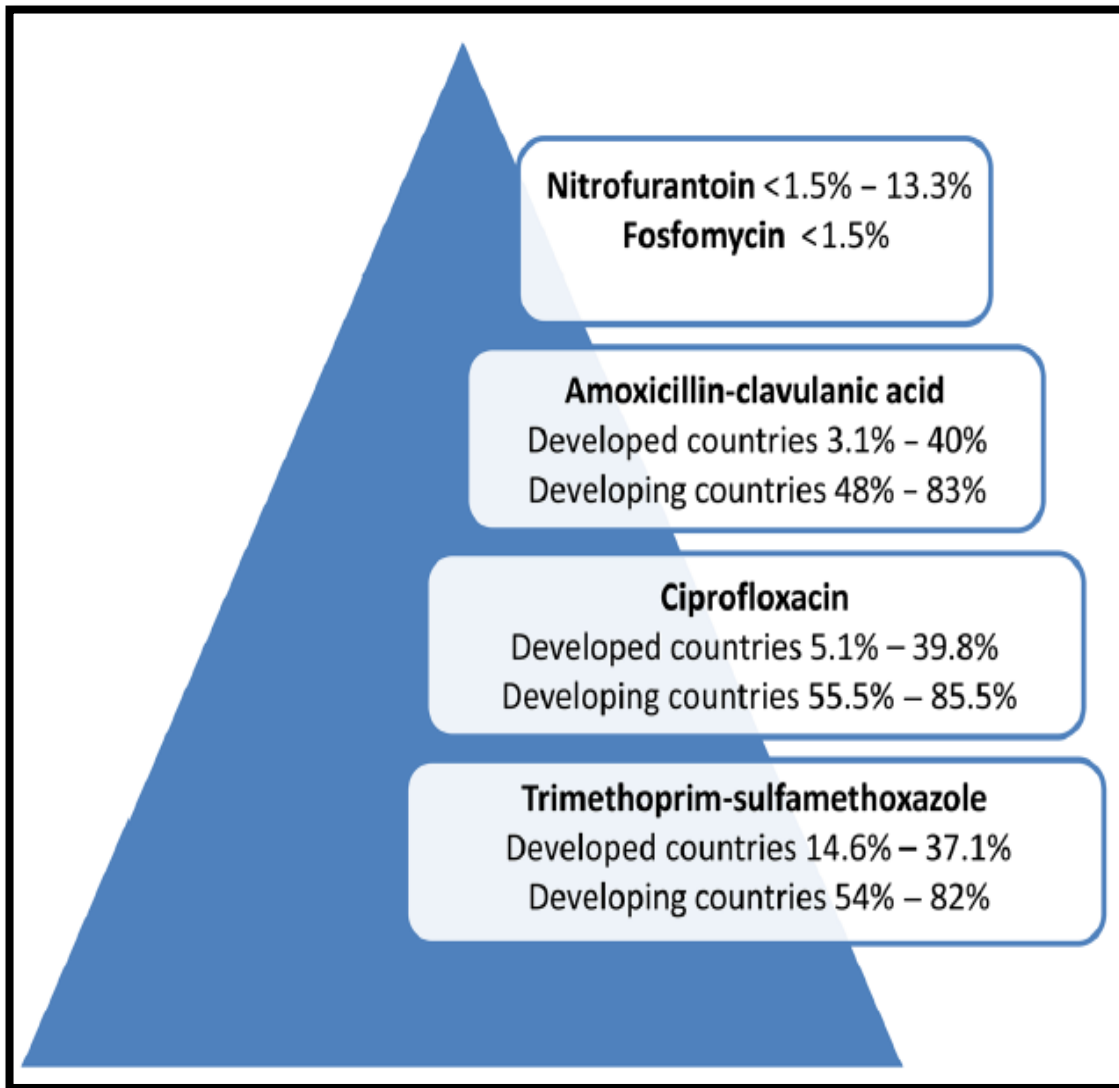
4.2 مقاومة بكتريا الاشريشيا القولونية للمضادات الحيوية *E.coli* antibiotics resistance

أن مقاومة مضادات الميكروبات هو قدرة الكائن الحي على مقاومة عمل المضاد الحيوي للميكروبات الذي كان يعارض و يعيق نموه في السابق بصورة عامة هناك أربع آليات عامة لمقاومة الميكروبات تستخدمها البكتريا وتشمل الحد من امتصاص المضاد ، تغيير الموقع الذي يستهدفه المضاد ، أو تعطيل عمل المضاد ، أو مضخات الدفع وقد تكون هذه الآليات موجودة

على الكروموسوم البكتيري وتحدث بشكل طبيعي في جميع السلالات او مكتسبة عن طريق البلازميد (Mehrad , وآخرون 2015 ; Pachori و آخرون , 2019).

يتم التعبير عن جينات المقاومة الكروموسومية (عادة على مستوى منخفض) أو يتم تحفيزها عن طريق المضادات الميكروبية وتستخدم البكتيريا السالبة لصبغة كرام هذه الآليات الأربع على نطاق واسع وهي قادرة جداً على نقل عناصر المقاومة الأفقي للجينات horizontal gene transfer (Reygaert , 2016).

أن خطر انتشار سلالة UPEC ذات المقاومة المتعددة (MDR) يزداد خصوصاً في البلدان النامية نتيجة الاستخدام العشوائي للمضادات في علاج الاصابات الميكروبية ، شكل (4-2) (Kot , 2019).



شكل (4-2): مقاومة UPEC للمضادات الحيوية المستخدمة في علاج التهاب المجاري البولية (Kot , 2019).

من اهم اليات المقاومة في *E.coli* :-

1.4.2 الحد من امتصاص المضاد Limiting drug uptake

البكتريا السالبة لصبغة كرام لها ميزة اضافية ضد المضادات الحيوية بسبب بنية ووظائف جدار الخلايا، متعدد السكر الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) الذي يوفر حاجزا طبيعيا لجزيئات معينة وعادة ما يكون كاره للماء وبالتالي تقلل من عبور المضادات المحبة للماء مثل بيتا-لاكتام، لذا تدخل هذه المضادات بواسطة بروتينات ناقلة موجودة على الجدار الخارجي للبكتريا وتسمى Outer Membrane Proteins (OMP)، أهمها في *E. coli* هي OmpF و OmpC اما المضادات الاخرى قد تستخدم قنوات او فتحات على الجدار تسمى Porins مثل chloramphenicol, fluoroquinolones and tetracycline او قد تدخل الى داخل الخلايا عن طريق التغلغل في طبقة LPS مثل aminoglycosides and macrolides بصورة عامة هناك آليتان رئيسيتان تستخدمان من قبل البكتريا للحد او تقليل من إمكانية دخول المضادات عن طريق Porins وهي اما خفض عددها أو تغيير شحنتها داخل القنوات وبالتالي تقلل من ألفة ارتباطها مع المضاد في بكتريا *E.coli* فإن إنتاج او تكوين Porins قد يخفض بشكل كبير أو حتى يوقف ، أو قد ينتج نوع جديد مختلف بدلا من القديم (Blair , وآخرون 2015; Reygaert , 2016).

2.4.2 تغيير الموقع الهدف Modifying drug target

تستخدم البكتيريا السالبة لصبغة كرام هذه الآلية ضد العديد من المضادات منها بيتا لاكتام ، الأمينوكلايكوسيدات ، كوينولونات ، المضاد المركب Trimethoprim/sulfamethoxazole ، بالإضافة الى ذلك فانها قادرة على إنتاج بروتينات الرابطة للبنسلين (PBP) المقاومة لبعض عقاقير البيتا لاكتام تشارك هذه البروتينات في صنع جدار خلية peptidoglycan من ناحية اخرى البنسلين يرتبط مع هذه البروتينات وبالتالي تمنع تكوين طبقات peptidoglycan لذا فإن *E. coli* تنتج انواع عديدة من هذه البروتينات تختلف عن البروتينات الأصلية ، بينما سالالات اخرى انتجت بروتينات ذات ألفة قليلة للارتباط بالبنسلين (Reygaert , 2016).

بينما الامينوكلايكوسيدات التي تستهدف وحدة الرايبوسوم S30 في موقع A فإن البكتيريا قادرة على تعديل وحدة الرايبوسوم وذلك عن طريق أكتسابها البلازميدات التي تحمل انزيم قادر على تعديل بنية الحمض النووي وهو 16S rRNA methyltransferase مما يقلل من قدرة المضاد على الارتباط به هناك انواع عديدة من هذا الانزيم وقد تم تحديد العديد من هذه الانزيمات والتي تشفر عن طريق جينات مختلفة أهمها armA و rmtB وغالبا ما تمتلك

البكتيريا العديد من هذه الجينات في وقت واحد. وغالبا ما تعطي هذه الجينات مقاومة كبيرة amikacin و gentamicin و tobramycin من بين الامينوكلايكوسيدات (Passarelli-Araujo , وآخرون 2019)

من المعروف ان الكوينولونات تتداخل اثناء تضاعف الدنا عن طريق منع إما gyrase DNA أو topoisomerase IV في العمل لذا شائعاً ما تحدث طفرات في الجين المشفر لها على الكروموسوم GyrA subunit of gyrase أو في جين *parC* هذه الطفرات تقلل من قدرة المضاد على الارتباط بالانزيمات، هذه الالية تستخدم ضد ciprofloxacin و norfloxacin او تكون مقاومة عن طريق بلازميدات تحمل جينات مقاومة الكينولون (*qnr*) (and Hooper , Jacoby 2015).

المضاد المركب Trimethoprim/sulfamethoxazole TMP/SXT هو حاليا خيار شائع لعلاج التهاب المجاري البولية وكلا هذين العقارين يستهدفان الإنزيمات في المسار البكتيري في انتاج حامض الفوليك لذا فان المقاومة لهذه المضادات تكون عن طريق حدوث طفرة كروموسومية (عادة ماتكون نقطية) في جينات *dhfr* أو *dhps* (Reygaert , 2016).

3.4.2 تعطيل المضاد Inactivating the drug

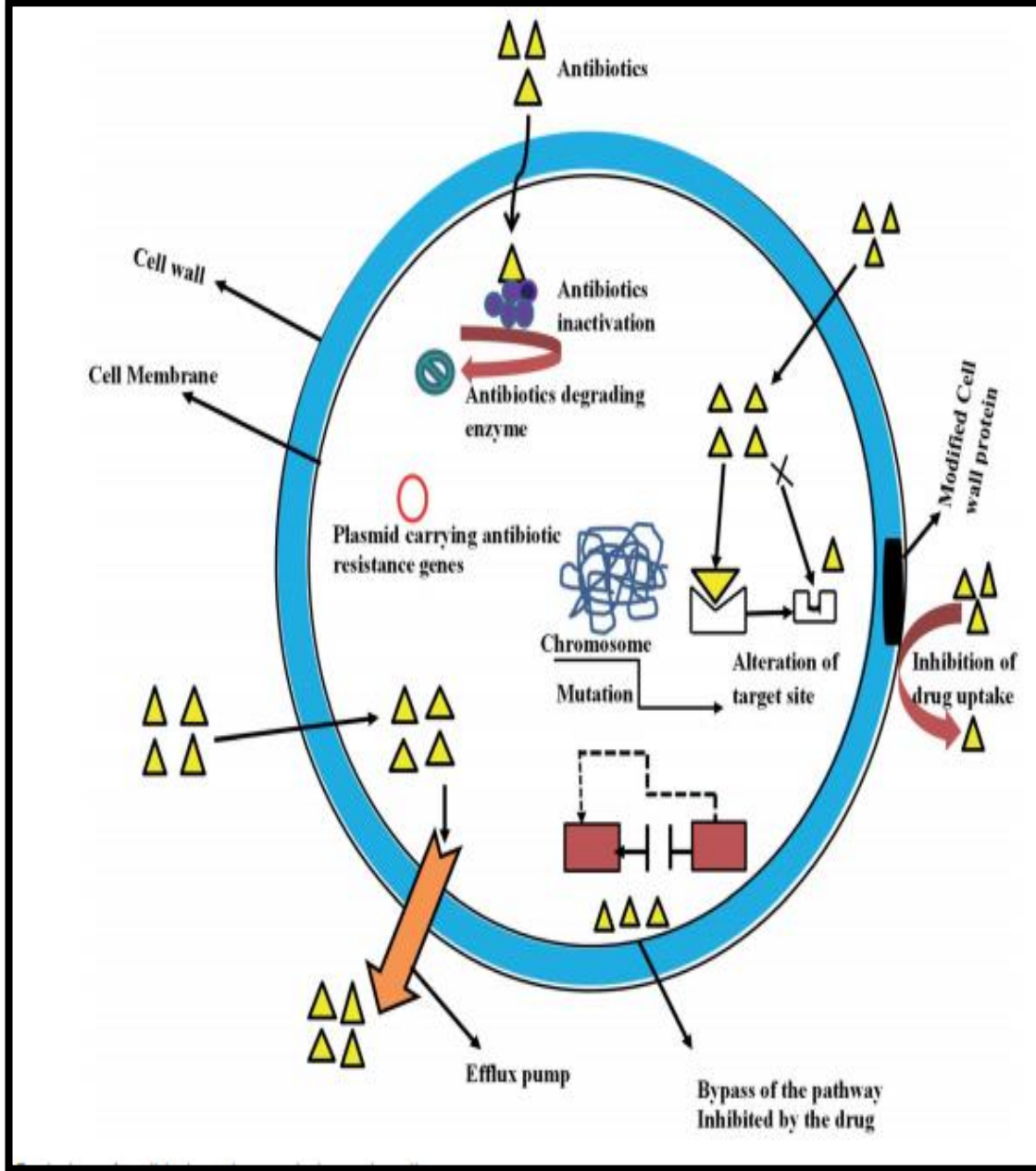
ويتم تعطيل المضادات بإحدى طريقتين: بالتحلل الفعلي للمضاد أو بألية نقل مجموعة كيميائية إليه تستخدم البكتيريا السالبة لصبغة كرام هذه الالية ضد البيتا لاكتام والأمينوكلايكوسيدات على سبيل المثال تقوم انزيمات البيتا لاكتاميز β -lactamase enzymes (*bla* genes) بتحليل مضادات البيتا لاكتام، اذ تنتج بكتريا UPEC العديد منها (Adamus-Białek وآخرون , 2018) بالإضافة الى مقاومتها للجيل الثالث والرابع من السيفالوسبورينات عن طريق حدوث طفرات في الجينات التي تشفر للانزيمات *bla*_{TEM-1} و *bla*_{TEM-2} و *bla*_{SHV-1} (Kot , 2019).

يتم تعطيل الأمينوكلايكوسيدات معطلة بشكل بنقل واحدة من ثلاث مجموعات كيميائية صغيرة الى المضاد بواسطة انزيمات acetyltransferases تشفر عن طريق جين *aac* و phosphotransferases يشفر بواسطة *aph* (Blair وآخرون , 2015 ; Reygaert , 2016).

4.4.2 مضخات الدفق Drug efflux

تستخدم البكتيريا هذه الالية للتخلص من المواد السامة إلى خارج الخلية اذ تشفر عن طريق جينات على الكروموسوم تحفز بمختلف المحفزات البيئية والعديد من هذه المضخات قادرة على

نقل مجموعة متنوعة من المواد ، كما توصف بأنها مضخات دفع متعددة تقسم مضخات الدفع الى خمس مجاميع موجودة جميعها في *E. coli* من المعروف أنها تساهم في مقاومتها للمضادات المختلفة كمثل على ذلك NorE pumps تستخدم ضد كويولونات اما كل من EmrAB-TolC and MdfA pumps ضد تتراسايكلينات (Blair , وآخرون 2014)



شكل (5-2) اليات مقاومة لدى البكتريا (Ndagi و آخرون 2020)

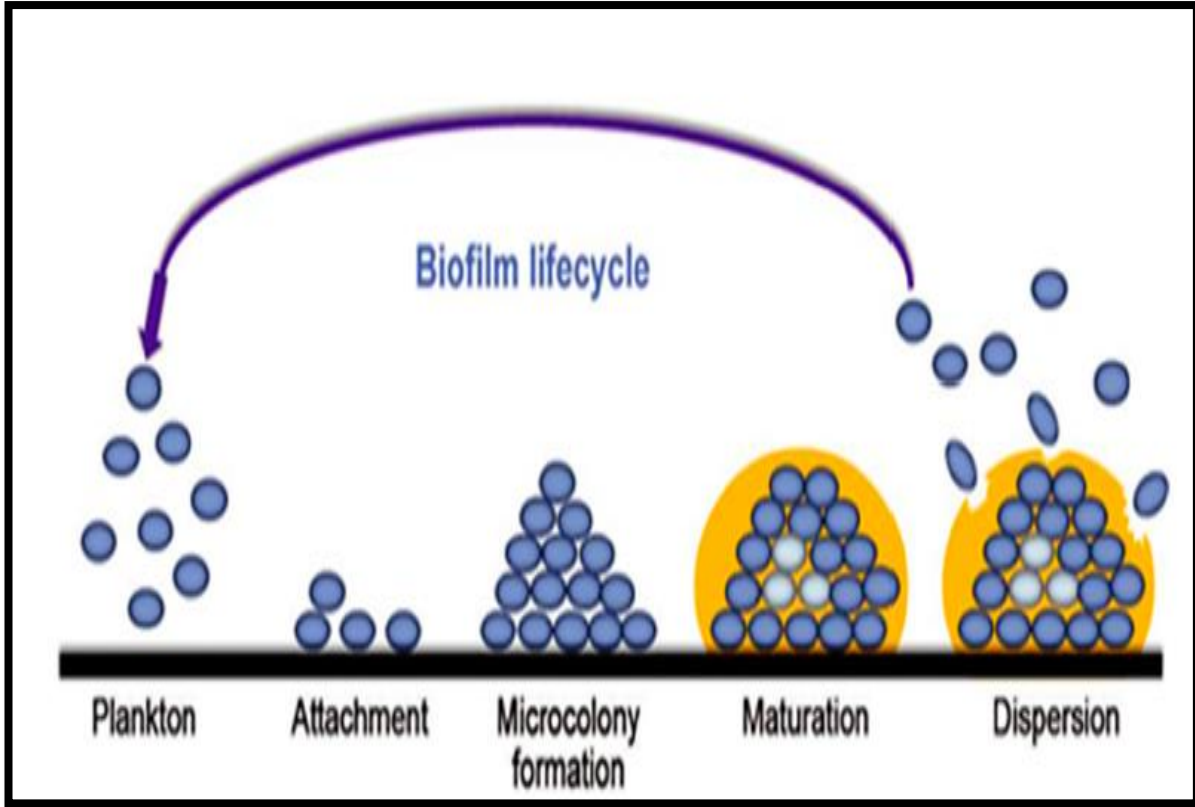
5.2 الغشاء الحيوي Biofilm

هو عبارة عن تجمعات مغلقة مصفوفة من البكتيريا ملتصقة مع بعضها بالاسطح الصلبة في البيئة الرطبة بمادة محاطة بمادة بينية خارج خلوية extracellular matrix التي تكون عبارة عن سكريات متعددة تساعد هذه المادة الخارج خلوية في تثبيت الغشاء الحيوي وتعد كغشاء واقى وتنظم في داخلها بروتينات وانزيمات و teichoic acids وحامض نووري extracellular DNA ، يوفر الحماية للخلايا من الاليات الدفاعية للجسم منها خلايا البلعمة Macrophage وتعد إحدى الاستراتيجيات البكتيرية المسببة للأمراض من أجل البقاء في المجاري البولية وتجنب تأثيرات المضادات الحيوية اذ تكون البكتيريا اكثر مقاومة للمضادات داخل الغشاء الحيوي (Robino , وآخرون 2018 ; Spyridon , وآخرون 2019).

تشير الدراسات إلى أن الغشاء الحيوي مسؤول عن (65%) من عدوى المستشفيات و(80%) من جميع عن الإصابات الجرثومية بصورة عامة يمكن أن تنمو الأنواع البكتيرية إما على شكل خلايا مفردة planktonic أو على شكل تجمعات داخل الغشاء الحيوي يكون متميز من الناحية الفسيولوجية اذ إن التعبير الجيني والنشاط الأيضي يختلفان اختلافاً كبيراً بين أشكال النمو البكتيري المفرد والغشاء الحيوي اذ ويصعب القضاء الغشاء الحيوي ، كما لا يقتصر تكوين الغشاء الحيوي على نوع بكتيري واحد وانما يمتد يشمل الانواع البكتيرية المختلفة اذ يمكن ان تتواجد داخل الغشاء الحيوي الواحد اكثر من نوع واحد من البكتيريا وتتواصل فيما بينها عن طريق اطلاق جزيئات معينة عبر مسار الاشارات الكيميائية يتم من خلالها تفعيل جينات المقاومة او اطلاق انزيمات وبروتينات معينة تدعى هذه الاشارات تدعى ب-Quorum sensing (Kose and Yapar , 2017 ; She , وآخرون 2019).

تكوين الغشاء الحيوي له دور كبير في اصابة المجاري البولية وصعوبة علاجها خصوصاً للمرضى الذين يستخدمون قسطرة بولية أو أي أجهزة صناعية أخرى اذ توفر ظروف ملائمة لتكوين الغشاء الحيوي على سطوحها ونظراً لصعوبة علاجها كونها ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية فإن هناك حاجة ملحة إلى استكشاف عوامل علاجية بديلة لمكافحة الاصابات التي تنشأ بصفة خاصة بسبب *E. coli* (Mittal , وآخرون 2015 ; Sturbelle , وآخرون 2015).

تمر عملية بناء الغشاء الحيوي بمراحل مختلفة شكل (2-6).



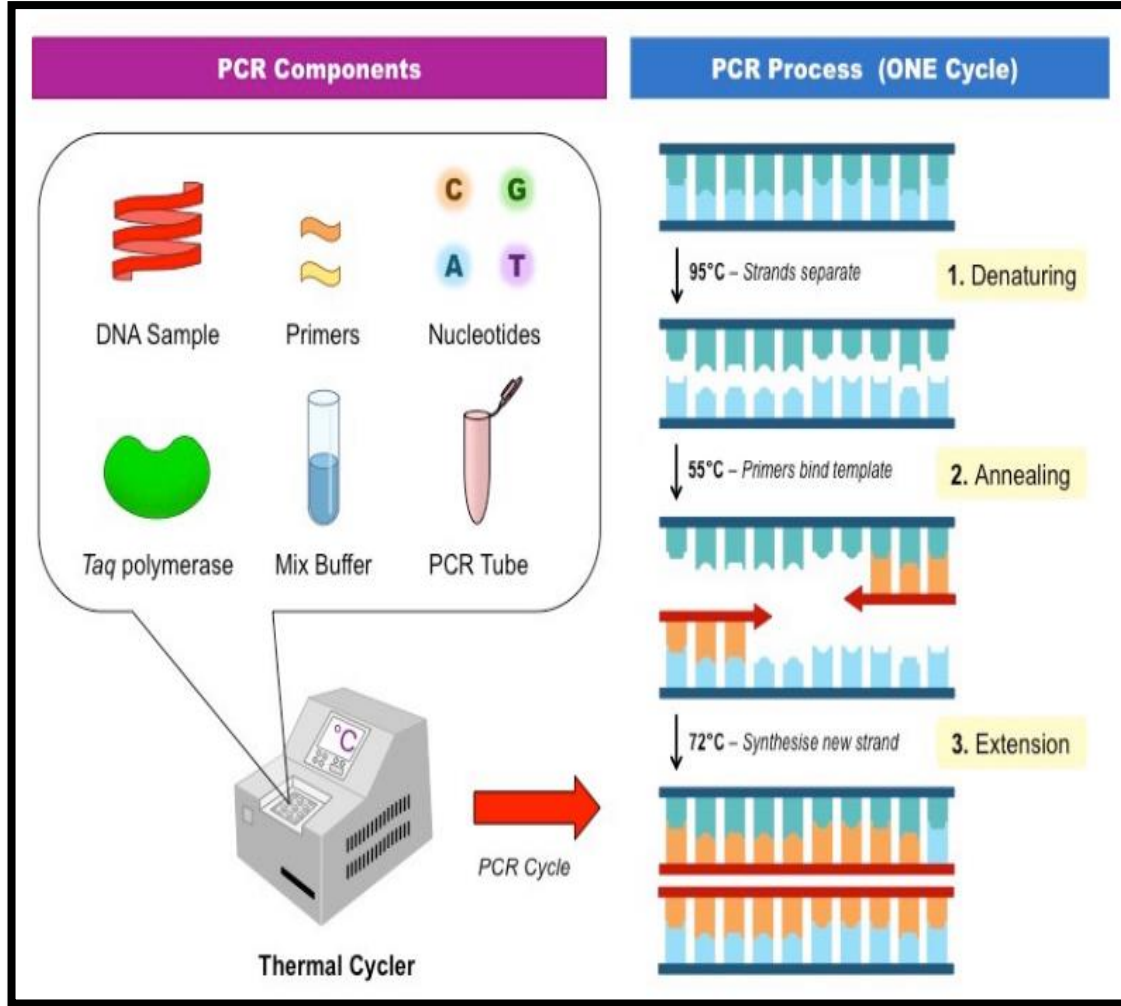
شكل (2-6) مراحل تكوين الغشاء الحيوي (Santos وآخرون، 2018).

6.2 تفاعل تسلسل البلمرة Polymerase chain reaction (PCR)

تم اختراعها من قبل العالم Kary Mullis في عام 1983 مبدأ عملها على استخدام انزيم مضاعفة الحمض النووي (DNA polymerase) خارج الجسم الحي وبهذا من الممكن أن تولد عشرات المليارات من النسخ من جزء معين من الحمض النووي المستخلص (جين معين أو تسلسل معين) (Karim , وآخرون 2019). ويتم تفاعل البلمرة المتسلسل في جهاز خاص يدعى Thermal cycler وهو عبارة عن جهاز مغلق من الممكن التحكم بدرجات الحرارة بداخله وفق برنامج خاص لكل تفاعل بسرعة ودقة ، من 0 إلى 100 درجة مئوية اذ يتيح الجهاز برمجة مدة وتعاقب دورات خطوات درجة الحرارة كل دورة تشمل ثلاث فترات من بضع عشرات من الثوان (Quan , وآخرون 2018 ; Karim , وآخرون 2019).

المرحلة الاولى هي المسخ وتسمى Denaturation هو فصل بين شريطي المزدوجة للحمض النووي الريبوزي منقوص الأوكسجين ، الخطوة الثانية هي الارتباط Annealing أي ارتباط البادئات مع شريطي الحمض النووي ،الخطوة الثالثة التمدد أو الاستطالة Elongation تتم بدرجة حرارة 72 درجة مئوية ، تسمى درجة حرارة التمدد شكل (2-7) ، تم استخدام PCR في

جميع مجالات علم الأحياء الجزيئي ، مما ساعد الباحثين على استنساخ وتسلسل الجينات للكشف عن الطفرات وجينات المقاومة وقد أصبح مؤخرا طريقة لكشف العوامل الميكروبية microorganisms المسببة لمرض معين (Ehtisham , وآخرون 2016; Houssin , وآخرون 2016; Yung , وآخرون 2017; Liu , وآخرون 2019)



شكل (7-2) يوضح خطوات تفاعل تسلسل البلمرة (2016, Sastry and Bhat)

7.2 نبذة عن جينوم الاشريشيا القولونية Genomic of Escherichia coli

تحتوي بكتريا *E.coli* على جينوم كبير حوالي 5.1 مليون زوج قاعدي يكون بهيئة كروموسوم دائري تبلغ نسبة الساييتوسين والكوانين (G + C) 50.1% بالإضافة الى وجود عناصر وراثية خارج الكروموسومات يسمى البلازميدات Plasmids , مجموع الجينات في البكتريا تشفر ل4805 بروتين والتي بضمنها المستضدات , عوامل الضراوة , عوامل مقاومة المضادات الحيوية ونظام الافراز (Dunne وآخرون 2017).

1.7.2 جينوم بكتريا *Uropathogenic E.coli*

تقسم بكتريا *Uropathogenic E.coli* الى اربعة انواع رئيسية A) Phylogroups و B1 و B2 و D) بالاعتماد على جزر الامراضية الجينية genomic Pathogenicity Islands (PAI) وتعد الانواع (B2 و D) اكثر الانواع المتسببة عن التهاب المجاري البولية (Asadi وآخرون , 2019). كما تمتاز بالتنوع المظهري والجيني هذا التنوع مهم حتى تتمكن من التعايش والتكيف من أجل إصابة الجهاز البولي بالاضافة الى التنوع لها القابلية على اكتساب الجينات من مصدر خارجي منها اكتساب الجينات الافقي horizontal gene transfer فعلى سبيل المثال تمتلك UPEC بروتينات Adhesins تساعد على الالتصاق بالخلايا الطلائية بطريقة تمكنها على التغلب على التدفق المستمر للسوائل وسموم خاصة لغزو وتضاعف البكتريا (Lo وآخرون , 2015). كما ان الخطوة الحاسمة والمهمة في الالتصاق واصابة الخلايا الطلائية للمسالك البولية تتم بواسطة شعيرات الالتصاق P fimbriae و Type-1 fimbriae الجينات التي تشفر لهذه البروتينات تقع على اوبرون يدعى pap operon يشمل عدة وحدات فرعية (pap A, C, D, E, F, G تكون مسؤولة عن النمو النهائي لشعيرات الالتصاق ونضجها واتمام عملية التصاقها بخلايا المضيف بينما الجينات التنظيمية (pap H, B, I) تقع في منطقة الحفز الرئيسية (Dhahi, 2020).

2.7.2 جينات مقاومة المضادات الحيوية Genes Responsible for Antibiotic Resistances

مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic Resistance تتم بطرق مختلفة اما تكون على جينات كروموسومية او جينات محمولة على البلازميد او بواسطة جينات مكتسبة عن طريق النقل الافقي او العمودي للجينات transformation, conjugation, and transduction (Rehman وآخرون, 2017 ; Amer وآخرون, 2018). التحليل الجيني لبكتريا UPEC المعزولة من مختلف المستشفيات حول العالم ثبت ان جين TEM-1 موجود تقريبا في كل السلالات (Adamus-Białek وآخرون, 2018).

مقاومة مضاد الامبسلين ampicillin وهومن مضاد شبه مصنع ضمن مجموعة بيتا لاكتام تقع على عدة جينات منها *AmpC* الذي يشفر لانزيمات AmpC enzymes والتي لها القابلية على تحطيم وتحلل جميع مضادات البيتلاكتام بصورة واسعة وعادة ما تكون هذه الجينات محمولة على كروموسوم البكتريا السالبة لصبغة كرام الا ان تم اكتشاف الجينات المشفرة لهذه الانزيمات

محمولة على البلازميد أيضا في اواخر الثمانينات والتي لها القابلية على الانتقال من بكتريا لآخرى مما ادى الى انتشار مقاومة المضادات ضمن هذه المجموعة في الاونة الاخيرة، جين *AmpC* يكون محمول على الكروموسوم في بكتريا *E.coli* لكن بتركيز منخفضة واذا انتقلت الجينات المحمولة على البلازميد الى البكتريا يؤدي الى التعبير عنها بتركيز عالية وبالتالي ازدياد المقاومة للبيالاكتام (Hoseini وآخرون ، 2017 ; Li وآخرون ، 2019).

مقاومة مضاد التتراسايكلين tetracycline تكون مرتبطة ببروتينات متعددة تدعى بال Tet proteins وتشمل (Tet proteins A, B, C, L and M) موجودة على الجهة الداخلية للغشاء وتبادل مع البروتون يحفز دخول المضاد tetracycline-Mg²⁺ الى داخل سايتوسول الخلية مما يؤدي الى تحفيز مضخات الدفع Efflux pumps وبالتالي الى مقاومة المضاد وعادة ما يتم انتقال جينات *tet genes* بين بكتريا سالبة والموجبة لضبغة كرام عن طريق النقل الافقي للجينات horizontal gene transfer (Igwe وآخرون , 2015)، من بينها جين *tet A* يعد ضمن مضخات الدفع Efflux genes بينما جينات (*tet S*, *tet O*, *tet M*) تصنف ضمن جينات الحماية الرايبوسومية ribosomal protection genes (Zibandeh وآخرون , 2016).

مقاومة السلفوناميدات Sulfonamide في *E. coli* يمكن أن تنشأ إما بسبب الطفرات الكروموسومية للجين *fulP* المشفر لانزيم DHPS dihydropteroate synthase أو على نحو أكثر أكتساب على بديل الجينات التي تشفر للانزيم DHPS مثل *sul1*, *sul2* and *sul3* على الرغم من التشابه بين الجين *fulP* والجينات البديلة *sul1*, *sul2* and *sul3* على مستوى تسلسل القواعد النتروجينية بنسبة 50% الا انها تم تصنيفها بصورة منفصلة عن الكروموسوم اذ تكون محمولة على العوامل الانتقالية transferable mobile elements (Adnan وآخرون , 2017). البلازميد الذي يحمل جينات *sul* ممكن أن ينتشر بين البكتيريا من نفس النوع أو من أنواع مختلفة اما عن طريق الاقتران Conjugation أو التحول Transformation وبالتالي نشر جينات *sul1* اذ يكون الجين محمول بشكل قطع Fragment على الانتكروونات نوع الاول class 1 integrons على نفس الموقع مع جينات المقاومة الاخرى وبالتالي تساهم في نشر جينات المقاومة الاخرى *sul2* و *sul3* كما ان تنوع العناصر الجينية المتنقلة والجينات المقاومة المجاورة ل *sul3* أقل بكثير من تلك المجاورة ل *sul1* و *sul2* ، وخاصة تلك الموجودة في الكروموسومات ، مما يقلل من إمكانية انتقال الجين *sul3* (Jiang وآخرون , 2019).

8.2 تسلسل القواعد النتروجينية Nitrogenous base Sequencing

هو ترتيب القواعد النتروجينية في سلاسل النيوكليوتيدات المتعددة التي تحوي على المعلومات الوراثية والخصائص الكيموحيوية للكائنات الحية وبالتالي فإن القدرة على معرفة أو استنتاج هذه التسلسلات ضرورة مهمة للبحوث البيولوجية (Chain و Heather، 2016). بصورة ادق في تحديد تسلسل القواعد النتروجينية في عينة الـ DNA أو RNA ، مرت عملية تحديد القواعد النتروجينية بعدة مراحل للتطور وهناك عدة طرق منها القديمة وتدعى طريقة سانكر Sanger sequencing او first generation sequencing التي طورها العالم سانكر عام 1975 التي تعتمد على طريقة انهاء التفاعل the chain-termination method بأضافة نيوكليوتيدات معلمة والطريقة الحديثة تدعى ب next generation sequencing او second generation sequencing ، من مميزاتها انها اقل تكلفة من الطريقة القديمة واسرع اذ من الممكن ان تطعي نتائج التسلسل خلال يوم واحد كما انها اكثر دقة ، الا من المعوقات بالرغم من كونها ارخص ثماناً مقارنة بالطريقة القديمة الا انها تعد الشريحة الواحدة قد تصل سعرها الى \$100000 بالاضافة الى ان تحليل وتفسير النتائج يستغرق وقتا (Grada و Weinbrecht ، 2013).

3. المواد و طرائق العمل Material and Methods

1.3 المواد Materials

1.1.3 الاجهزة و المعدات Equipment and Apparatus

استعملت الاجهزة و المعدات في الدراسة الحالية كما موضح في الجدول (1-3) و (2-3).

جدول (1-3): الاجهزة المستخدمة في الدراسة الحالية

الشركة المصنعة والمنشأ	الجهاز
Bio Tek (USA)	جهاز الاليزا ELISA
Thermo / USA	الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis
Gallenkamp (England)	جهاز التقطير Distiller
Major Science (Taiwan)	جهاز تصوير الهلام Gel Imaging System
Biomerieux (France)	جهاز الفايترك Vitek 2 compact System
Fisher Scientific (USA)	الطرد المركزي Centrifugation
My Fugene (China)	جهاز نبذ مركزي دقيق Microspin centrifuge
Biomerieux (France)	جهاز قياس الكثافة DensesChekTM Plus
Memmert (Germany)	الحاضنة Incubator
China	حمام مائي Water Bath
Quality Lab System England	دوارة Vortex
GOSONIC (China)	فرن موجي Microwave Oven
Hirayama (Japan)	المؤصدة Autocleave
Olympus (Japan)	مجهر ضوئي Light Microscope
Herolab (Germany)	مصدر الأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator
Promega (USA)	مقياس التآلق الكمي Quantus Fluorometer
Biomerieux (France)	مقياس الكثافة DensiCHEK Plus
BioRad (USA)	مدور كهربائي Thermal Cycler
Mettler (Switzerland)	ميزان حساس Balance

الجدول (2-3): المعدات المستخدمة في الدراسة الحالية

المعدات	الشركة والمنشأ
اطباق بلاستيكية Petridish	Al-Hani (USA)
اطباق معايرة Microtiter plate	AFMA (Jordan)
ابندورف قياسات مختلفة Eppendroff	JET BIOFIL (Singapore)
انابيب اختبار Test Tube	Superestar (India)
انابيب كان Can tube	Biomerieux (France)
شرائح زجاجية وغطاء الشريحة Slides and cover slip	Super star (India)
ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipettes	Brand (Germany)
مرشحات دقيقة Millipore filter	Gallenkamp (England)
مسحات قطنية مع وسط ناقل Transport media swabs	Netherlands (Biozek)
مسحات قطنية معقمة Sterilized cotton swabs	Sterelline (England)
الناقل الزراعي القياسي Standard Wire Loop	Hi-Media (India)
هود Laminer flow Hood	Nuva (Turkey)

2.1.3 المواد الكيميائية و الحيوية Chemical and Biological Materials

استعملت المواد الكيميائية و الحيوية في اجراء الدراسة الحالية كما موضح في الجدول (3-3).

جدول (3-3): المواد الكيميائية والحيوية المستخدمة في الدراسة

المادة	الشركة المصنعة والمنشأ
أكاروز Agarose	Promega (USA)
الدم البشري Human Blood	مصرف الدم / مستشفى الطفل المركزي -بغداد- العراق
بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide	Oxoid (England)
زيت العدسات Seder Oil	BDH (England)
سكر الكلوكوز Glucose	Barcelona (Spain)

Barcelona (Spain)	سكروز Surose
Promega (USA)	صبغة التحميل Loading dye
Promega (USA)	صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide
BDH (England)	صبغة كرام Gram stain
BDH (England)	صبغة الكونغو الاحمر Congo red
BDH (England)	صبغة الميثيل الاحمر Methyl red staining
Promega (USA)	صبغة Quanty flour
BDH (England)	كاشف فوكاس بروسكاور Voges-Proskauer Reagent
BDH (England)	كاشف كوفاكس Kovac's Indol Reagent
ROMIL pure chemistry (UK)	كحول ايثيلي مطلق Absolute ethanol (99%)
Baker (Germany)	كحول ايثيلي Ethanol alcohol (95%)
BDH (England)	كحول ايثيلي Ethanol(70%)
ROMIL pure chemistry (UK)	كحول ايزوبروبانول Isopropanol
BDH (England)	كلوريد الصوديوم Sodium Chloride
BDH (England)	كليسيرول Glycerol
Bioneer (Korea)	ماء مقطر لا ايوني المعقم Deionized sterile D.W
Promega (USA)	محلول بفر Tries-borate buffer 10X(TBE)
Promega (USA)	محلول بفر Tris acetate EDTA TAE 40X
BDH (England)	محلول دارىء الفوسفات الملحي Buffer Phosphate Saline BPS
Biomerieux (France)	محلول ملحي Normal saline (0.5%)
UK	مسحوق البلور البنفسجي Crystal Violet Powder

3.1.3 الاوساط الزرعية Culture media

استخدمت الاوساط الزرعية في الدراسة الحالية كما موضح في الجدول (3-4).

جدول (3-4) الاوساط الزرعية الجاهزة و المحضرة التي تم استعمالها في الدراسة

الوسط	الشركة المصنعة والمنشأ
أكار الدم الاساس Blood base agar	Hi-Media (India)
اكار سترات السايمون Simmon Citrate agar	Hi-Media (India)
أكار الماكونكي MacConkey Agar	Hi-Media (India)
أكار المغذي Nutrient agar	Oxoid (England)
اكار الايوسين المثل الازرق Eosin Methylene Blue	Hi-Media (India)
أكار مولر هنتون Muller-Hinton agar	Oxoid (England)
اكار اليوريا الاساس Urea agar base	Hi-Media (India)
اكار MR/VP	Oxoid (England)
أكار نقيع القلب و الدماغ Brain-heart infusion agar	Oxoid (England)
مرق نقيع القلب و الدماغ Brain-heart infusion broth	Oxoid (England)
المرق المغذي Nutrient broth	Oxoid (England)
ماء البيبتون	Hi-Media (India)

4.1.3 المضادات الحيوية Antibiotic

استخدمت اقراص المضادات الحيوية التي ليست ضمن قائمة المضادات في جهاز الفايترك في الدراسة الحالية كما موضح (3-5).

جدول (5-3): اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية

المنشأ	قياس قطر التثبيط /مليمتر بالاعتماد على (CLSI,2019)			تركيز المضاد لكل قرص µg/disk	الرمز	المضاد الحيوي
	حساسية S	متوسطة I	مقاومة R			
UK	≥ 20	15–19	≤ 14	75/10µg	TCC	Ticarcillin/ clavulanate
UK	≥ 21	18–20	≤ 17	30µg	ATM	Aztreonam
UK	≥ 15	13–14	≤ 12	10µg	TB	Tobramycin
UK	≥ 13	-	≤ 12	15µg	AZM	Azithromycin
UK	≥ 15	-	12–14	30 µg	TE	Tetracycline
UK	≥ 15	-	11–13	30 µg	DOX	Doxycycline
UK	≥ 17	-	13–16	300 µg	S	Sulfonamides
UK	≥ 18	-	3–17	30 µg	C	Chloramphenicol
UK	≥ 21	18–20	≤ 17	10µg	CPD	Cefpodoxime

5.1.3 العدة المختبرية Kit

استخدمت العدة المختبرية في اجراء الدراسة الحالية حسب الجدول (6-3).

جدول (6-3): العدة المختبرية المستخدمة في اجراء الدراسة الحالية

العدة	الشركة والمنشأ
الدليل الحجمي (DNA Ladder (100-1500bp)	Bioneer (Korea)
عدة استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين Wizard genomic DNA Purification kit	Promega /USA
GoTag Green Master Mix	Promega /USA
عدة تشخيص بكتريا سالبة لصبغة كرام VITEK® 2 GN	Biomerieux (France)
عدة فحص حساسية للمضادات لبكتريا سالبة لصبغة كرام VITEK® 2 AST-GN	Biomerieux (France)

6.1.3 البادئات Primers

تم استخدام البادئات الخاصة بالكشف عن جينات المقاومة المضادات الحيوية في بكتريا *E.coli* بالإضافة الى استخدام البادئ الخاص بتشخيص الاشريشيا القولون *uropathogenic E.coli* باستخدام جين *papE* وتم تجهيز تلك البادئات عن طريق شركة Alpha DNA في كندا كما موضح في الجدول (7-3).

جدول (7-3): تتابعات البوادئ المستخدمة في الدراسة و حجم النواتج بعد الاكثار

البادئ	التتابع	حجم الناتج	المصدر
<i>papE</i>	F- GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT R- AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	326	Obeed و Dhahi, 2020
<i>tetA</i>	F-GGTTCACTCGAACGACGTCA R-CTGTCCGACAAGTTGCATGA	577	Momtaz وآخرون 2012,
<i>tetB</i>	F- CCTCAGCTTCTCAACGCGTG R- GCACCTTGCTGATGACTCTT	634	
CITM	F- TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R- TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	Sa´enz وآخرون , 2004
SUL1	F- TGGTGACGGTGTTCGGCATTG R- GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	789	
SUL2	F- CGGCATCGTCAACATAACC R- GTGTGCGGATGAAGTCAG	722	
SUL3	F- CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTGCG R- CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	763	

2.3 طرائق العمل Methods

1.2.3 التعقيم Sterilization

1.1.2.3 Sterilization by using Autoclave

عقمت الاوساط الزرعية في الجدول (3-4) بطريقة التعقيم بالحرارة الرطبة بواسطة المؤصدة Autocleave على درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج و لمدة 15 دقيقة (Tille , 2015).

2.1.2.3 Sterilization by using hot air oven

عقمت الزجاجيات وجفت بواسطة الفرن الحراري بدرجة حرارة 180 م° لمدة ساعة واحدة (Tille , 2015).

2.2.3 تحضير الكواشف والمحاليل Preparation of reagents and solution

1.2.2.3 كاشف الكاتاليز Catalase reagent

يتكون هذه الكاشف من (3%) بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) الذي تم تحضيره بإضافة 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين ذو تركيز (30%) الى 9 مل من الماء المقطر ثم حفظ الكاشف في قنينة معتمدة ، تم استعمال الكاشف للتحري عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج انزيم الكاتاليز (Forbes وآخرون , 2007).

2.2.2.3 كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent

مجهز من قبل الشركة بقناني معتمدة تم استخدام هذه العدة بشكل مباشر لغرض الكشف عن قابلية العزلات على انتاج انزيم الاوكسيديز.

3.2.2.3 تحضير محلول صبغة البنفسج البلوري Preparation of crystal violet solution

حضر المحلول بإضافة 0.2 غم من مسحوق البنفسج البلوري في 10 مل من الماء المقطر وعقم بواسطة وحدات الترشيح الدقيقة ثم حفظ في درجة حرارة 4 م° استعمل في التحري عن قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation (Babapour وآخرون , 2016).

3.2.3 تحضير الاوساط الزرعية Preparation of Culture Media

1.3.2.3 تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة Preparation of Ready-made media

حضرت جميع الاوساط الزرعية الجاهزة التي تشمل اكار الماكونكي MacConkey agar ، اكار MR/VP ، الاكار المغذي Nutrient agar ، اكار المولر هنتون Muller-Hinton

agar، اكارنقيع القلب و الدماغ Brain heart infusion agar ، مرق نقيع القلب و الدماغ Brain heart infusion broth ، المرق المغذي Nutrient broth ، مرق مولر-هنتون Muller-Hinton broth و اكار سترات السايمون Simmon Citrate agar حسب تعليمات الشركة المصنعة لها و المثبتة على العبوة إذ تم إذابة المكونات في الماء المقطر Distilled Water (D.W) ، و ضبطت درجة الحموضة إلى 7.2 ، ثم تحريكها دورياً لإذابة جميع المكونات تماماً ، و عقمت بالمؤصدة Autoclave ، ثم تركت لتبرد بعد ذلك تم توزيعها في أطباق بتري المعقمة ، و وضعت في الحاضنة عند 37 م° لمدة 24 ساعة لضمان التعقيم ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

2.3.2.3 تحضير الاوساط الزرعية التركيبية Preparation of synthetic media

1.2.3.2.3 وسط أكار الدم Blood Agar

حضر وسط أكار الدم الأساس وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة ، ثم عقم بالمؤصدة و برد الوسط الى 45 م° ثم أضيف له 5% من الدم البشري المعقم و مزج جيداً الى ان تجانس و وزع في أطباق بتري معقمة و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة ، و استخدم هذا الوسط لزراعة العينات و للكشف عن العزلات المنتجة لأنزيم الهيمولايسين (Hemolysin Vandipitte) وآخرون , 2003).

2.2.3.2.3 وسط اكار اليوريا الاساس Urea agar base media

حضر وسط اكار اليوريا الاساس وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة ثم عقم بالمؤصدة وترك ليبرد بدرجة حرارة 45 م° و اضيف اليه 50 مل من محلول 40 % من اليوريا المعقمة باستخدام مرشحات دقيقة معقمة Millipore filter وزع في أطباق بتري معقمة و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة، و استخدم هذا الوسط لزراعة العينات و للكشف عن قابلية العزلات لانتاج انزيم اليوريز (Urease Atlas و Snyder, 2015).

3.2.3.2.3 وسط ماء الببتون Peptone Water

تم تحضير هذا الوسط بإذابة 20 غم من مادة التربتون و 5 غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 950 مل من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 1 لتر و عقم بالمؤصدة ثم صب في أنابيب اختبار 5مل لكل أنبوب وحفظ في درجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال هذا الوسط لاختبار قدرة العزلات على استهلاك حامض التربتوفان من خلال انتاجها لانزيم التربتوفانيز الذي يحلل

التربتوفان الى مكوناته الايضية ومحرر الاندول أذ تظهر النتيجة الموجبة بشكل حلقة حمراء بعد اضافة الكاشف Kovac's Indol Reagent (2013, Hemraj).

3.3 جمع العينات Specimens Collection :

تم جمع 200 عينة ادرار من اطفال عراقيين تحت عمر 12 سنة تحت الاشراف الطبي المختص للمدة تراوحت بين تموز لغاية شهر كانون الاول 2020 من مستشفى الطفل المركزي في بغداد شملت المرضى الراقدين والمراجعين للمستشفى ثم زرعت على اوساط اكار الماكونكي ، وسط أكار الدم ، ثم وسط اكار ايوسين المثل الازرق بعد التأكد من عدم تناول المضادات الحيوية لمدة لا تقل عن ثلاثة ايام لغرض العزل و التشخيص الاولي للبكتيريا.

4.3 تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates

1.4.3 الفحوصات المظهرية Morphological Examinations

تم دراسة الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية النامية على وسط أكار الدم Blood agar وسط أكار الماكونكي MacConkey agar ، لغرض التأكد زرعت على وسط ايوسين المثل الازرق Eosin Methylene Blue شخصت الصفات المزرعية من شكل المستعمرات وحجمها و لونها إذ تكون العزلات النامية على وسط الماكونكي وردية اللون وذلك لقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز Lactose Fermenter كما تظهر باللون الاخضر المعدني اللامع على وسط ايوسين المثل الازرق الذي يعتبر لون مميز للأشريشيا القولونية وهو من الاوساط التفريقية المهمة .

2.4.3 الفحوصات المجهرية Microscopic Examinations

تم الفحص المجهرى للعزلات البكتيرية عن طريق عمل مسحة Smears على شريحة زجاجية نظيفة Clean Slide وصبغت بصبغة كرام و من ثم فحصت بالمجهر الضوئي بأستخدام العدسة الزيتية لملاحظة تفاعلها مع الصبغة فضلا عن شكل و ترتيب الخلايا (Brooks وآخرون, 2007).

3.4.3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

اجريت الفحوصات الكيموحيوية من اجل تشخيص عزلات بكتيريا *E.coli* شملت:

1.3.4.3 اختبار انزيم الاوكسيديز Oxidase test

اخذت مستعمرة بكتيرية مفردة و بعمر 18-24 ساعة بواسطة عود خشبي معقم ووضعت على ورق الترشيح ثم نضع قطرتين من كاشف الاوكسيديز فوقها ، تعد النتيجة موجبة في حالة تغير اللون الى الازرق غامق (Procop وآخرون, 2017).

2.3.4.3 اختبار انزيم الكاتاليز Catalase Test

أخذت مستعمرة بكتيرية مفردة وبعمر 18-24 ساعة ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة ، ثم أضيف لها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين (3%) الفقرة (1.2.2.3) ، ان ظهور فقاعات هوائية دليل على ايجابية التفاعل (Cappuccino و Welsh , 2018).

3.3.4.3 اختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease production test

لحق وسط أكار اليوريا المائل بالعزلات البكتيرية بطريقة التخطيط والطعن ثم حضنت بدرجة حرارة 37° و لمدة 24 ساعة ، ان تغير لون الوسط الى اللون الوردي دليل على ايجابية الاختبار و مقدرة البكتيريا على انتاج انزيم اليوريز (Bott , 2014).

4.3.4.3 اختبار أنتاج الاندول Indole Production Test

لقتح الانابيب الحاوية على وسط ماء البيبتون بالبكتيريا ثم حضنت بدرجة حرارة 37° و لمدة 24 ساعة بعد الحضانة أضيف كاشف كوفاكس على الجدران الداخلية للانبوبة أضيف ظهور حلقة بلون أحمر في طبقة الكحول بعد ثواني من إضافة الكاشف على إيجابية الاختبار ، أي تكون حلقة الأندول ، وهذا يحدث نتيجة تفاعل الكاشف مع الأندول المتحرر ، علم ان الأندول يعد أحد نواتج أيض الحامض الأميني التربتوفان نتيجة لامتلاك البكتيريا لإنزيم Tryptophanase (Benson, 2002).

5.3.4.3 اختبار المثيل الاحمر Methyl red test

لقتح الأنابيب الحاوية على وسط ماء البيبتون والكلوكوز والفوسفات بالعزلات النقية وحضنت بدرجة حرارة 37° و لمدة 24 ساعة بعد ذلك أضيف 5 قطرات من كاشف المثيل الاحمر ان ظهور اللون الأحمر يعد دليلا على النتيجة الموجبة ، أي ان البكتيريا قادرة على انتاج كمية كبيرة من أحماض الفورميك Formic أو اللاكتيك Lactic نتيجة أيض الكلوكوز ، أما بقاء اللون الاصفر يعني عدم قدرة البكتيريا على إنتاج الأحماض الكافية لخفض الاس الهيدروجيني الى درجة الحمضية 4.5 (Forbes وآخرون , 2007).

6.3.4.3 اختبار فوكس – بروسكاور Voges-proskauer test

لقتح الانابيب الحاوية على وسط ماء البيبتون والكلوكوز والمستعمرات البكتيرية النقية وحضنت بدرجة حرارة 37° و لمدة 24 ساعة ثم أضيف كاشف بروسكاور مع رج الانبوبة بلطف تغير اللون الى اللون الاحمر بعد مرور 15 دقيقة تدل على ايجابية التفاعل ويستعمل هذا

الإختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج أستيل مثيل كاربينول (أستيون Acetoin) كناتج نهائي لتخمير السكريات (Collee وآخرون , 1996).

7.3.4.3 اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

لحق وسط سترات السايمون Simmon citrate agar المائل بالعزلات البكتيرية بطريقة الطعن والتخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37°م و لمدة 24 ساعة ان تغير لون الوسط الى اللون الازرق يدل على ايجابية التفاعل أي قابلية البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون واملاح الامونيوم كمصدر للنيتروجين (Forbes وآخرون , 2007).

4.4.3 تشخيص العزلات باستخدام جهاز الفايك Vitek 2 compact system

لغرض التشخيص التاكيدي لعزلات *E.coli* تم تشخيصها باستخدام جهاز الفايك أذ استخدمت مسحة معقمة لنقل عدد كاف من المستعمرات البكتيرية ونقلها الى انبوبة can tube تحوي 3 ملي لتر من المحلول الملحي المعقم وتم ضبط العكورة مع عكورة القياسية لمكفر لاند باستخدام جهاز DensesChek™ Plus بعد ذلك استخدم المعلق البكتيري لتشخيص البكتريا باستخدام كاسيت الخاص بجهاز الفايك VITEK® 2 GN .

5.3 حفظ العزلات و ادامتها Preservation Of Bacterial Isolate

حفظت العزلات البكتيرية كما ورد في Cheesbrough (2012) كما يلي:

1.5.3 الحفظ على المدى القصير Short-term Preservation

تم الحفاظ على العزلات البكتيرية النقية لفترة قصيرة كحد أقصى مدة أسبوع وذلك بزرعها على سطح أكار الماكونكي أو أكار المغذي ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة ، و بعدها حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 ° م.

2.5.3 الحفظ على المدى المتوسط Med-term Preservation

تم الحفاظ على العزلات النقية وذلك بتنميتها على وسط الأكار المغذي المائل (Nutrient agar slant) وحضنت عند 37 °م و لمدة 24 ساعة ، لف غطاء الانابيب بشريط Parafilm و حفظت الانابيب في درجة حرارة 4 °م لمدة ثلاثة أشهر.

3.5.3 الحفظ على المدى الطويل Long-term Preservation

تم الحفاظ على العزلات لأطول فترة ممكنة أذ لقحت الانابيب الحاوية على مرق نقيع القلب الدماغ المضاف له 15% كليسيرول بمستعمرات العزلات البكتيرية النقية و حضنت لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37 °م ولف غطاء الانابيب بصورة محكمة بشريط Parafilm و حفظت الانابيب في درجة -20 °م.

6.3 اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test

1.6.3 فحص الحساسية باستخدام جهاز الفايترك

تم تحديد القابلية للتأثر بالعوامل المضادة للميكروبات التالية (اعتماداً على نوع البكتيريا) بعد تشخيص بكتريا *E.coli* باستخدام الكاسيت الخاص بفحص الحساسية بجهاز الفايترك VITEK® AST-GN 2 جدول (8-3). وحسب الطريقة المذكورة في الفقرة السابقة 4.4.3.

جدول (8-3): المضادات المستخدمة في اجراء الدراسة الحالية في جهاز الفايترك

Antibiotic	Code	MIC interpretive criteria µg/ml		
		S	I	R
Ampicillin	AMP	≤ 8	16	≥ 32
Piperacillin/Tazobactam	TZP	≤ 8	64	≥ 128
Cefazolin	CFZ	≤ 4	16	≥ 32
Ceftazidime	CAZ	≤ 4	16	≥ 32
Cefoxitin	CFX	≤ 4	16	≥ 32
Ceftriaxone	CFT	≤ 4	16	≥ 32
Cefepime	FEP	≤ 1	-	≥ 2
Ertapenem	ETP	≤ 1	2	≥ 4
Imipenem	IPM	≤ 1	2	≥ 4
Amikacin	AK	≤ 8	32	≥ 64
Gentamicin	GN	≤ 1	32	≥ 64
Ciprofloxacin	CIP	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacin	LEV	≤ 2	4	≥ 8
Nitrofurantoin	NIT	≤ 32	64	≥ 128
Trimethoprim/sulfamethoxazole	SXT	≤ 2/38	-	≥ 4/76

لقد تم تحديد نقطة الفاصل لكل مضاد للميكروبات المستخدمة وفقاً لـ (CLSI , 2019).

2.6 فحص الحساسية بالاطباق

تم اجراء فحص الحساسية للمضادات التي ليست ضمن جهاز الفايترك للعزلات البكتيرية قيد الدراسة باستعمال طريقة Kirby-Bauer -disk diffusion methods وفقاً لما جاء في WHO (2003) كما يأتي:

- 1- نقلت (3-5) مستعمرات من العزلة البكتيرية النامية على وسط الاكار المغذي بعد 18 ساعة الى انبوبة اختبار حاوية على (3) مل من المحلول الملحي الفسلجي وقورنت الكثافة مع محلول ثابت العكورة القياسي ماكفرلاند باستخدام جهاز DensiCHEK
- 2- ادخلت المسحة القطنية المعقمة داخل الانبوبة الحاوية على العالق البكتيري وتم تدويرها و ضغطها على الجدار الداخلي للانبوبة لإزالة اللقاح الزائد، ثم زرعت على وسط اكار مولر هنتون بطريقة التخطيط المستمر تتضمن زرع ثلاث مرات في كل مرة يحرك الطبق ليتوزع العالق البكتيري بشكل متساوي في جميع الاتجاهات
- 3- وضعت اقراص المضادات الحيوية على وسط اكار مولر هنتون الملقح باستعمال ملقط معقم و ضغطت بلطف و حضنت بدرجة حرارة 37 م° و لمدة 24 ساعة. بعد الحضان سجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط Inhibition zone بالملم حول كل قرص ثم قورنت بالجداول القياسية الواردة في حسب (CLSI , 2019).

7.3 الكشف عن قابلية انتاج انزيمات البيتا-لاكتيميز Detection of ESBL Production

تم الكشف السريع عن انتاج انزيمات البيتا-لاكتيميز واسعة الطيف باستخدام جهاز الفايترك Vitek 2 compact system.

8.3 تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation

1.8.3 أطباق الكونغو الاحمر Congo-red Methods

تعتبر مؤشراً نوعياً للكشف عن الكائنات الحية المجهرية المنتجة، يتم تحضير الوسط الكونغو بخلط (0.8) غم صبغة الكونغو Congo-red و (36) غم سكروز و (37) غم من وسط مزيج القلب والدماغ الصلب ويعقم بالاولوتوكليف ويصب بالاطباق بعد تلقيح الوسط الزراعي توضع الاطباق بالحاضنة بدرجة 37C° لمدة 24 ساعة. المستعمرات ذات اللون الاسود المتلالي يعني انتاج قوي اما اللون الاحمر غير منتجة (Sahra, 2019).

2.8.3 أطباق المعايرة Micro-titer Plate

الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي باستعمال طريقة اطباق المعايرة Tissue Culture Plate كما جاء في Kerkeni وآخرون , (2016) حسب الخطوات التالية:

1- حضر العالق البكتيري باستخدام وسط مولر هنتون Muller-Hinton اذ خففت العزلة و قورنت بالمحلول القياسي McFarland باستخدام جهاز DensiCHEK

2- نقل 1 مايكروليتر من العالق البكتيري الى الحفر في طبق المعايرة الحاوية على 199 مايكروليتر من وسط مولر هنتون الحاوي على 1 % سكر الكلوكوز ، تم عمل ثلاث مكررات لكل عينة . في حين تم وضع 200 مايكروليتر من وسط مولر هنتون على 1 % سكر الكلوكوز خالية من البكتيريا في ثلاث حفر (اعتبرت كسيطرة سالبة تستعمل للمقارنة).

3- تم حضن طبق المعايرة في درجة حرارة 37 °م و لمدة 24 ساعة.

4- تم التخلص من الخلايا البكتيرية غير الملتصقة عن طريق غسلها مرتين بمحلول داري الفوسفات الملحي (PBS) ثم تترك لتجف لمدة ساعة في درجة حرارة 60 °م.

5-تم تصيبغ باضافة 150 مايكروليتر من صبغة البنفسج البلوري المحضرة بتركيز 2 % لكل حفرة وتركزت ايضاً لمدة 15 دقيقة. بعد ذلك تم التخلص من الصبغة بغسل الحفر بمحلول الفوسفات الملحي مرتين للتخلص من الصبغة وتركزت لتجف.

6-تم اضافة 150 مايكروليتر من الايثانول (95 %) للخلايا الملتصقة و المصبغة بصبغة البنفسج البلوري.

7-بعد مدة 5-10 دقائق تم قياس الامتصاصية على طول موجي 570 نانوميتر باستعمال جهاز الاليزا ثم حددت كفاءة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي من خلال مقارنة القراءات التي تم الحصول عليها مع المعادلات الآتية:

•تعد العزلة غزيرة التكوين للغشاء (انتاجية قوية) اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من اربعة اضعاف معدل السيطرة ($OD > 4 \times OD$)

•تعد العزلة غير مكونة للغشاء الحيوي (غير منتجة) اذا كان معدل الكثافة الضوئية لمعامل السيطرة اكبر أو يساوي معدل الكثافة الضوئية للعزلة ($OD_c \geq OD$).

•تعد العزلة ضعيفة التكوين للغشاء (أنتاج ضعيف) اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من معدل الكثافة الضوئية للسيطرة أو مساوياً أو اصغر من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$).

• تعد العزلة متوسطة التكوين للغشاء الحيوي (أنتاج متوسط) اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من ضعفين الكثافة الضوئية للسيطرة أو أصغر أو يساوي اربعة اضعاف السيطرة $(2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c)$.

9.3 أستخلاص وتقدير تركيز الحامض النووي البكتيري Genomic DNA extraction and estimate concentration

استخلص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA من بكتيريا *E.coli* وذلك باستخدام العدة المختبرية Wizard genomic DNA Purification kit المذكورة في جدول (3-6)، و تم اجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة المثبتة في طريقة العمل و كالآتي:

1-نقلت المستعمرات النامية على وسط اكار المكانونكي MacConkey agar و حضنت عند 37 م° و لمدة 24 ساعة الى وسط المرق المغذي Nutrient Broth و حضنت أيضا عند درجة حرارة 37 م° و لمدة 24 ساعة لغرض التنشيط و بعد الحضانة تم سحب 1.5 مل من المزروع البكتيري ونقلها الى انابيب ابندروف Ependroff tubes ، ثم ادخلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 1300 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين و ذلك لترسيب الخلايا البكتيرية ، بعد ذلك تم التخلص من العالق و اخذ الراسب Pellet .

2-اضيف 200 مايكروليتر من بفر CL Buffer الى كل عينة و مُزجت جيداً بواسطة المازج Vortex لمدة 5 ثانية.

3-اضيف 20 مايكروليتر من Proteinase K الى 200 مايكروليتر الى الراسب والبفرو مُزجت جيداً باستخدام المازج Vortex و وضعت في حمام مائي هزاز Water Bath بدرجة حرارة 56 م° لمدة 30 دقيقة ، وذلك لهضم البروتين و تحلل الخلايا . وحتى نحصل نتيجة افضل وتحلل أكثر على حضنت لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 70 م°.

4-تمت اضافة 200 مايكروليتر من البفر BL Buffer الى كل عينة ، ثم مزجت جيداً باستخدام المازج ووضعت في حمام مائي هزاز Water Bath بدرجة حرارة 70 م° لمدة 30 دقيقة.

5-اضيف 200 مايكروليتر من الايثانول المطلق Absolute ethanol ، ثم تم مزجها باستخدام المازج.

6-وضع العمود الصغير Mini-column في انابيب الجمع Collection tubes سعة 2مل و نقلت لها جميع المكونات، ثم نبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة (لمدة دقيقة واحدة) ونقلت المحتويات الى انابيب جمع جديدة وتنقل الفلاتر الى أنابيب جديدة.

- 7- تم اضافة 600 مايكروليتر من بفر BW Buffer ، ثم نبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة (لمدة دقيقة واحدة) ، ونقلت الاعمدة الى انابيب جديدة Collection tubes .
- 8- أُضيف 700 مايكروليتر من بفر TW Buffer الى الاعمدة الصغيرة Mini-column ، ثم تمت عملية الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة (لمدة دقيقة واحدة) ، تم التخلص من محتويات انبوب التجميع و اعادة ادخال العمود المصغر فيه.
- 9- اجري الطرد المركزي مرة ثانية بسرعة 13000 دورة/دقيقة (لمدة دقيقة واحدة) ، و ذلك للتخلص من الايثانول و تجفيف الاعمدة ، ثم استبدلت انابيب الجمع بأخرى جديدة.
- 10- أُضيف 100 مايكروليتر من بفر AE Buffer و ترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة ، وبعدها نبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة (لمدة 5 دقائق) ، أذ يعمل AE Buffer على معادلة الشحنة.
- 11- نُقلت محتويات انابيب التجميع الى انابيب ابندروف صغيرة سعة 1.5 مل و حُفظت بدرجة حرارة - 20 م° تم تقدير تركيز الحامض النووي لكل عذلة لغرض تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل.

1.9.3 قياس تركيز الدنا DNA Concentration

أُستخدم مقياس النألق الكمي Quantus Fluorometer للكشف عن تركيز الحامض النووي المستخلص من الفقرة 9.3 وذلك باضافة 1 مايكروليتر من DNA الى 199 مايكروليتر من صبغة QuantyFlour المخففة. و تحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق ، ثم تم الكشف عن قيم تركيز الحمض النووي DNA.

10.3 تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

1.10.3 تحضير البادئات Primers Prepartion

حضرت البوادئ المستخدمة في هذه الدراسة و المجهزة من شركة (Alpha DNA) الموضحة تتابعاتها و حجم نواتجها في الجدول (3-7) ، من خلال اذابتها بالماء المقطر خالي الايونات (ddH₂O) Deionized distilled water للحصول على تركيز 100 بيكامول/مايكروليتر و حفظت المحاليل بدرجة حرارة - 20 م° و حضر محلول العمل لكل بادئ بشكل منفصل بتركيز 10 بيكامول/مايكروليتر و ذلك بإخذ 10 مايكروليتر من محلول كل بادئ خزين Stock و اضيف له 90 مايكروليتر من ماء مقطر خالي الايونات Deionized distilled water تم مزجه بواسطة المازج و حفظت محاليل البادئات بدرجة حرارة - 20 م° مع مراعاة مزج محلول البادئ بعد اخراجه من الثلج باستعمال المازج لمجانسته.

2.10.3 تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Mixture Preparation

تم تحضير مزيج التفاعل حسب تعليمات الشركة المصنعة Bioneer بإضافة الحجم و التركيز المطلوب لكل من المكونات اللازمة لتحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل Master Mix المبينة في الجدول (3-9) بعد ذلك مزجت المكونات جيداً بواسطة المازج Vortex و بسرعة 3000 دورة/دقيقة (لمدة ثلاث دقائق) و وضعت بجهاز المدور الحراري لتفاعل البلمرة المتسلسل Thermal Cycler ، أذ تمت برمجة الجهاز لتوفير الظروف المثلى لإجراء خطوات التضاعف للجينات المستخدمة في الدراسة كما مبين في الجدول (3-10).

جدول (3-9): المكونات اللازمة لتفاعل البلمرة المتسلسل للجينات المستخدمة في الدراسة

ت	المكونات	الحجم
1	Master Mix	12.5 مايكروليتر
2	البادئ الأمامي	1 مايكروليتر (بيكامول/مايكروليتر)
3	البادئ الخلفي	1 مايكروليتر (بيكامول/مايكروليتر)
4	قالب الـ DNA	3 مايكروليتر
5	ماء منزوع الأيونات	7.5 مايكروليتر
الحجم النهائي		25 مايكروليتر

جدول (10-3) برنامج جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

الخطوات	الدورات	<i>papE</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	CITM	SUL1	SUL2	SUL3
المسخ الاولي	1X	5min. at 95C°	5min. at 95C°	5min. at 95C°	5min. at 95C°	5min. at 95C°	5min. at 95C°	5min. at 95C°
المسخ	30X	1min. at 94C°	30sec. at 95C°	30sec. at 95C°	30sec. at 95C°	30sec. at 95C°	30sec. at 95C°	30sec. at 95C°
اعادة الارتباط	30X	1.5min. at 52C°	30sec. at 57C°	30sec. at 56C°	30sec. at 56C°	30sec. at 63C°	30sec. at 50C°	30sec. at 51C°
الاستطالة	30X	3min. at 72C°	30sec. at 72C°	30sec. at 72C°	30sec. at 72C°	30sec. at 72C°	30sec. at 72C°	30sec. at 72C°
الاستطالة النهائية	1X	7min. at 72C°	7min. at 72C°	7min. at 72C°	7min. at 72C°	7min. at 72C°	7min. at 72C°	7min. at 72C°
Hold	1X	10min. at 10C°	10min. at 10C°	10min. at 10C°	10min. at 10C°	10min. at 10C°	10min. at 10C°	10min. at 10C°

11.3 الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis

استعملت هذه الطريقة لفصل جزيئات DNA المختلفة بالحجم أذ يتم الفصل على اساس الوزن واجري الترحيل الكهربائي كما يأتي:

1. اذيب 1.5 غم من هلام الاكاروز Agarose في 100 مل من درائ TBE Buffer بتركيز 1X.

2. سخن حتى يذوب تماماً ، بعدها ترك ليبرد لدرجة حرارة 50-60 م° أضيف له 1 مايكروليتر من صبغة برومايد الاثيديوم Ethidium Bromide ذات تركيز (10 ملغم/مل)

3. سكب المحلول في صفيحة اسناد الاكاروز Agarose وثبت المشط Comb بهدوء في الصفيحة وذلك لمنع حدوث فقاعات هوائية وترك بدرجة حرارة الغرفة ليتصلب لمدة 30 دقيقة.
4. رفع المشط بهدوء من الاكاروز المتصلب وثبتت الصفيحة في وحدة الترحيل الكهربائي المتمثلة بالحوض المستعمل للترحيل الكهربائي وملئ الحوض بمحلول TBE (1X) حتى يغطي سطح هلام الاكاروز بالكامل.
5. تم تحميل العينات مباشرة في الحفر بنقل 5 مايكروليتر من ناتج تفاعل تسلسل البلمرة PCR (PCR Product)، و نقل 5 مايكروليتر من DNA ladder بعدها مرر التيار الكهربائي بفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.
6. ينتقل DNA من الكاثود الى الأنود كونه ذو شحنة سالبة ، ثم فحص الهلام باستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator بعدها صورت بكاميرا تتميز بدقة عالية.

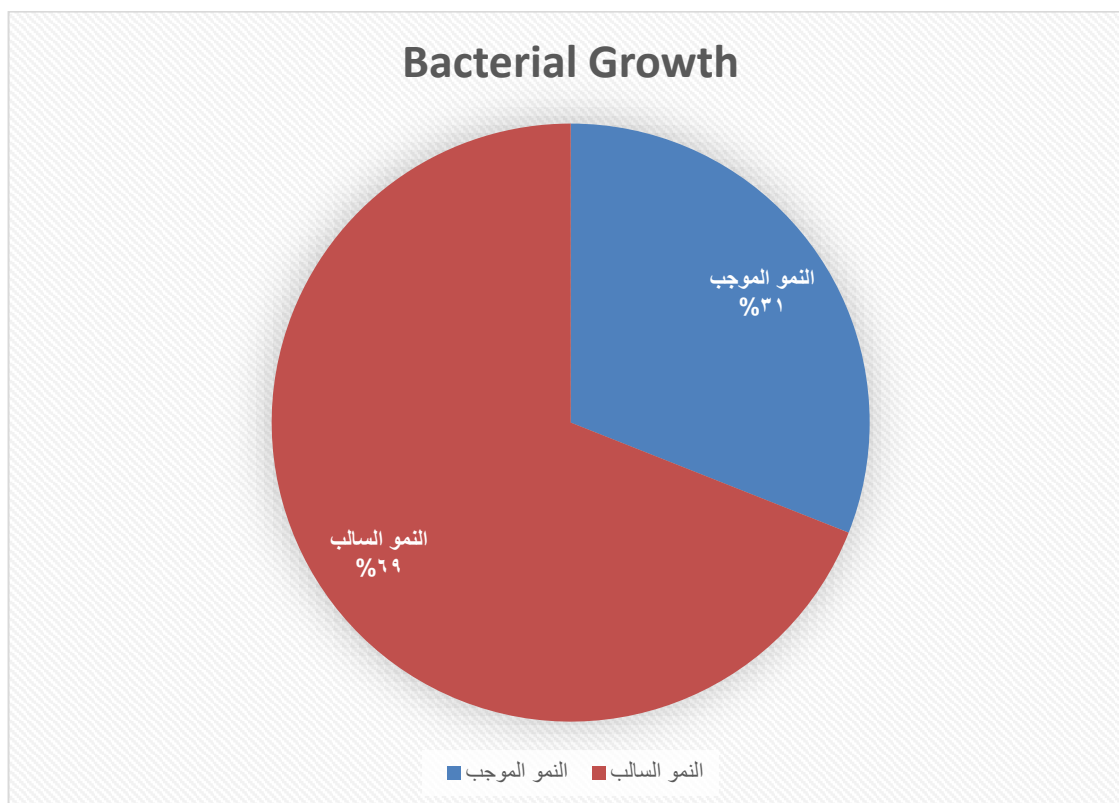
12.3 التحليل التتابعي للجينات DNA Sequencing

أُرسلت ناتج ال PCR لتسلسل Sanger باستخدام ABI3730XL ، automated DNA sequencer، بواسطة شركة . Macrogen Corporation-Korea تم استلام النتائج عبر البريد الالكتروني تم تحليلها باستخدام برامج جينية geneious software .

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

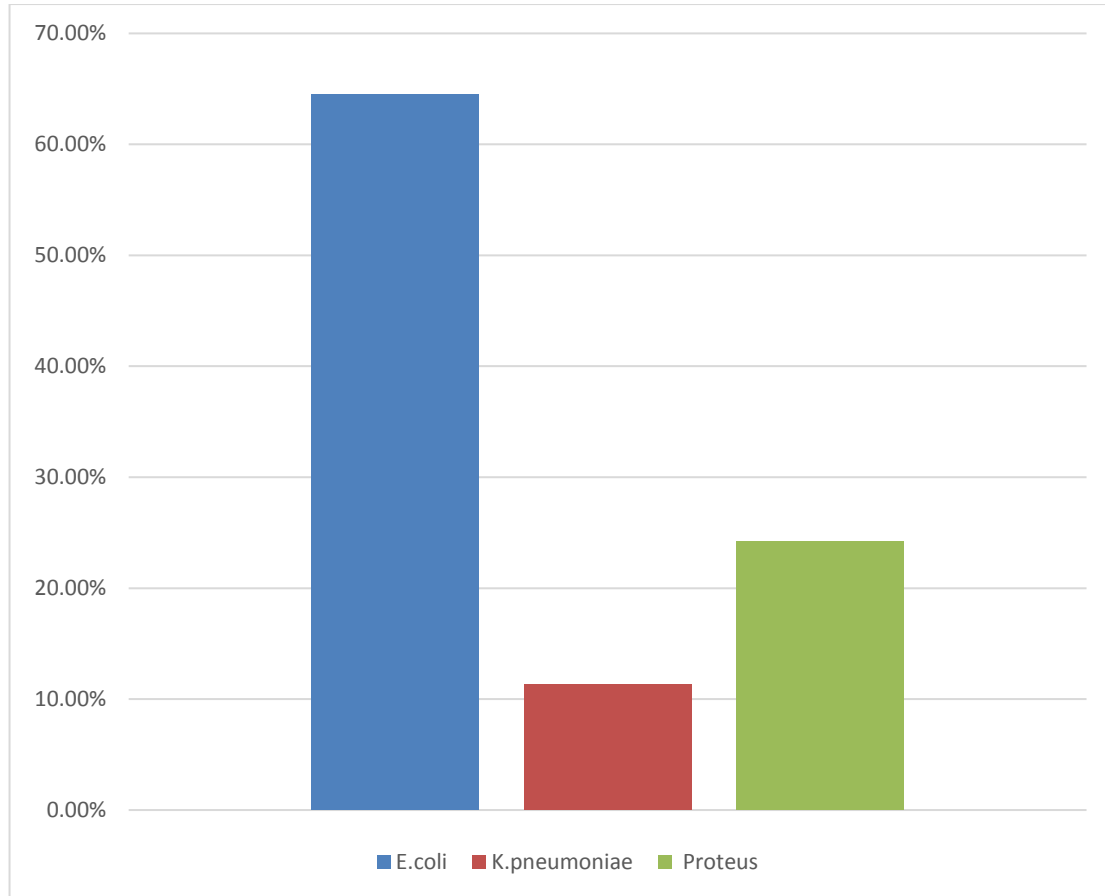
1.4 عزل بكتريا الاشريشيا القولونية *Isolation of Escherichia coli*

تم جمع 200 عينة ادرار من اطفال من اعمار مختلفة دون 12 سنة محتمل اصابتهم بالتهاب المجاري البولية (107 اناث و 93 ذكور)، منها 62 (31%) عينة ادرار كانت موجبة للنمو البكتيري على وسط المكانوكي شكل (1-4).



شكل (1-4): نسبة النمو البكتيري الموجب والسالب من مجموع عينات الادرار المزروعة من المرضى.

اظهرت نتائج هذه الدراسة *Escherichia coli* هي البكتريا السالبة لصبغة كرام الاكثر انتشارا لدى الاطفال المصابين اذ بلغت بنسبة 64% (62/40) ومن كلا الجنسين بنسبة 40/32 في عينات الادرار للاناث (80%) و 40/8 (20%) للذكور، تليها *Proteus sp* و *Klebsiella sp* بنسبة 24% (62/15) و 11% (62/7) على التوالي للمدة ما بين شهر تموز لغاية شهر كانون الاول 2020 من مستشفى الطفل المركزي في بغداد، شكل (2-4).



شكل (4-2): نسبة الاجناس البكتيرية من مجموع النمو الموجب

كانت النسب مختلفة بالنسبة لاعمار الاطفال فقد تراوحت نسبة الاصابة عند الرضع (30%) 40 / 12 بينما كانت (70%) 40/28 عند الاطفال الاكبر سنأً لحد عمر 12 سنة.

التهاب المجاري البولية هي الاصابة الاكثر شيوعا عند الاطفال ويقدر نسبة 30% من الرضع يعاني من تكرار الاصابة بعد مرور مدة من 6 الى 12 شهر بعد الاصابة الاولى كما أن الاعراض تكون مختلفة بين الرضع والاطفال الاكبر سنأً (Stein وآخرون , 2015). ربما يعود سبب اصابة الاطفال بالتهاب المجاري البولية دون سنتين الى وجود عيوب خلقية في الكلى او في الجهاز البولي (Okarska وآخرون , 2017). بالاضافة هنالك اسباب تزيد من خطورة تكرار الاصابة مثل حالة الارتجاع المثاني الحالبي vesicoureteric reflux والاختلال الوظيفي للمثانة-الامعاء bladder–bowel dysfunction (Keren وآخرون , 2015). لاتوجد اعراض معينة عند الاصابة لكن اهم مايميزها هو ارتفاع درجات الحرارة عند عمر اقل من سنتين اما بعد عمر السنتين تشمل الالم بالبطن والحاجة الملحة للتدرر والادرار المتقطع ويكون الادرار غامق وذو رائحة كريهة (Leung وآخرون , 2019; Kaufman وآخرون , 2019).

في دراسة اجريت في العراق 2012 كان الهدف منها تحديد نسبة الاصابة بالتهاب المجاري البولية والنسب المئوية العمرية للاطفال دون سن 12 عام شملت الدراسة 100 طفل مصاب بالتهاب المجاري البولية كانت نسبة الاصابة عند الذكور اكثر من الاناث عند الفئة العمرية الاصغر من 3 سنوات والمسبب الرئيسي هو بكتريا *E.coli* (Abdul-Mohammed وآخرون, 2012).

دراسة اخرى في اربيل العراق في 2015 للتحري عن انتشار اصابات المجاري البولية عند الرضع والاطفال ، شملت 300 طفل يعانون من اعراض الاصابة فقط 130 منهم كان موجب للزرع البكتيري وأذ بلغت نسبة الاصابة للاناث (70%) 130/91 وللذكور (30%) 130/39 والمسبب الرئيسي للاصابة هو بكتريا *E.coli* بنسبة (36.9%) 130/48 (Saeed وآخرون , 2015).

1.1.4 تشخيص البكتريا Identification of *E.coli* by traditional methods

تم التشخيص بالاعتماد على الصفات المظهرية Morphological characteristics أذ استخدم وسط اكار الدم Blood agar (انتجت مستعمرات رمادية اللون غير محللة للدم) ووسط اكار الماكونكي MacConkey agar لزراعة عينات الادرار الحاوي على صبغة الكريستال البنفسجية وأملاح الصفراء التي تثبط نمو أفراد بكتريا العائلة المعوية الموجبة لصبغة غرام بينما تسمح للعصوية السالبة لصبغة غرام بالنمو، أذ تنمو على شكل مستعمرات وردية وذلك لقابليتها على تخمير اللاكتوز ثم نميت على وسط الميثيلين الازرق Eosin Methylene blue لغرض تنقيتها أذ انتجت مستعمرات ذات اللون اخضر معدني لماع على وسط الميثيلين الازرق والذي يعد مميز لبكتريا *E.coli* ، وكما تم تشخيصها بالاعتماد على الخصائص الزرعية و الاختبارات الكيموحيوية وظهرت العزلات نتيجة موجبة لفحص الكتاليز والاندرول والمثيل الاحمر وسالبة لفحص الاوكسيديز واستهلاك السترات، في فحص اختبار الكتاليز اظهرت جميع العزلات القدرة على تحطيم البيروكسيد H_2O_2 وتحويله الى غاز الاوكسجين O_2 وماء H_2O ، جدول (1-4).

جدول (1-4): الخصائص الزرعية والكيموحيوية لبكتريا *E.coli*

النتيجة	الاختبار	ت
غير محللة للدم Non haemolytic	النمو على اكار الدم Blood agar	1
مخمرة لسكر اللاكتوز وذلك لانتاجها مستعمرات وردية اللون	النمو على اكار المكانوكي MacConkey agar	2
مستعمرات ذات بريق اخضر معدني لماع	النمو على وسط المثيل الازرق Eosin Methylene blue	3
-Ve	استجابة الخلايا لصبغة كرام Gram stain	4
عصيات Rods	شكل الخلايا و تجمعها على الشريحة	5
-Ve	انتاج انزيم الاوكسيديز Oxidase	6
+ Ve	انتاج انزيم الكاتاليز Catalase	7
+ Ve	فحص الاندول Indole	8
-Ve	فحص استهلاك السترات Citrate utilization	9
+ Ve	فحص المثيل الاحمر Methyl red	10
-Ve	فحص فوكس بروسكاور - Voges proskauer test	11
+ Ve	فحص اليوريز Urease	12
-ve سالبة ، +ve موجبة		

2.1.4 تشخيص البكتريا بواسطة جهاز الفايك Identification of *E.coli* by

Vitek 2 compact system

تم التشخيص النهائي باستخدام جهاز الفايك الذي يعد من احدث وادق التقنيات المستخدمة في تشخيص البكتريا خلال مدة 6 ساعات وبالتالي يعد اسرع من الطرق التقليدية للتشخيص، أذ تعد طريقة عملية ومبرمجة وذات كلفة اقل مقارنة بطرق التشخيص الجزيئي Molecular diagnostics (Hogan وآخرون , 2019).

تشير العديد من الدراسات ان معظم اصابات المجاري البولية عند الاطفال تتسبب بها العصيات السالبة لصبغة كرام والتي هي جزء من النبيت الطبيعي للامعاء أذ تعبر من فتحة المخرج صعوداً الى الجهاز البولي. تعد بكتريا *E.coli* مسؤولة عن معظم الاصابات أذ تقدر نسبة الاصابة بها من 80-90 % عند الاطفال وبالاخص سلالة Uropathogenic *E.coli* وذلك لامتلاكها خصائص معينة مثل شعيرات الالتصاق fimbriae تمكنها من الالتصاق على سطح الخلايا الطلائية وكما انها تمتلك اليات تمكنها من التغلب على مناعة المضيف (Leung وآخرون, 2019, Tullus, 2018).

2.4. التشخيص الجزيئي للبكتريا Molecular Identification for Uropathogenic *E.coli*

1.2.4 استخلاص الحامض النووي DNA من بكتريا *E.coli*

استخلص الحامض النووي DNA من عزلات بكتريا *E.coli* باستخدام عدة الاستخلاص المجهزة من قبل شركة Promega ، تم تحديد تركيز الحامض النووي باستخدام جهاز Quantus Fluorometer و كانت نتائج تراكيز الحامض النووي المستخلص متغيرة تتراوح بين (50-100) نانوغرام/مايكروليتر.

كمية تركيز الحامض النووي يعتمد على عوامل عدة منها نقاوة المزرعة البكتيرية Purity of colonies ، طرق الزرع Culturing methods، و نوع عدة الاستخلاص Extraction Kit ، كل هذه لها تأثير على جودة و خصائص الحامض النووي ، و تشير معظم الطرق العملية و الجزيئية الى سهولة و ملائمة الاستخلاص للبكتريا السالبة لصبغة كرام مقارنة بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام وذلك للفرق في سمك طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan وهذا ينطبق على مجموعات الاستخلاص الجاهزة الحديثة (Knudsen وآخرون ، 2016).

2.2.4 التشخيص الجزيئي لبكتريا *E.coli* باستخدام جين *pap E*

بينت نتائج الكشف الجيني عن وجود جين *papE* في العزلات قيد الدراسة من مجموع 40 عزلة من بكتريا *E.coli* فقط 40/15 (37.5%) تحمل جين *papE* وهو جين تشخيصي لسلالة Uropathogenic *E.coli* ، جين *papE* وفقا للبادئ المستخدم جدول (3-7)، يمتلك حجم 326 زوج قاعدة عند المقارنة مع الدليل الحجمي DNA Ladder ذي الحزم المعروفة الأحجام

تعد بروتينات الالتصاق الموجود على سطح البكتيريا Adhesins من اهم عوامل الضراوة لبكتيريا UPEC وتشمل شعيرات الالتصاق P fimbriae تكون مرتبطة بالتهاب النفرونات Pyelonephritis وتشفر بواسطة جين *pap* تعني Pyelonephritis-Associated Pili مما يسمح للبكتيريا بغزو سطح الخلايا الطلائية وعزو المسالك البولية التي عادة ماتكون خالية من المكروبات (Yazdi وآخرون ، 2018).

دراسة اجريت في مصر قام بها الباحثون Khairy وآخرون (2019) ، أذ اظهرت النتائج التي اجريت على 173 عزلة من سلالتين مختلفة من بكتيريا UPEC و diarrheagenic (DEC) *E.coli* ان (16.5%) من UPEC كانت تحمل جين *papE* في حين سلالة DEC لم تكن تحمل الجين وهذا يؤكد كون الجين تشخيصي لـ UPEC

وفي دراسة اخرى اجريت في العراق 2020 شملت 45 عينة ادرار للتحري عن بكتيريا UPEC باستخدام جهاز تفاعل تسلسل البلمرة عن وجود جين *pap E* وُجِد أن نسبة 45/29 (64%) من العزلات كانت حاملة للجين (Obeed and Dhahi , 2020).

هناك تفاوت بين نسب الدراسة الحالية والدراسات الاخرى ويعود ذلك لاسباب عدة منها طبيعة وحجم العينة والمنطقة الجغرافية ووقت جمع العينات وغيرها من الظروف المحيطة بالتجربة.

3.4 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic Susceptibility Test

تم دراسة المضادات الحيوية على 40 عزلة من بكتيريا *E.coli* لـ 25 مضاد حيوي وباستخدام جهاز الفايترك و طريقة الاقراص Kirby-Bauer وقورنت النتائج حسب ما جاء في (CLSI , 2019).

أظهرت العزلات مدى واسع ومختلف من المقاومة لكل مضاد حيوي فقد كانت المضادات التي تستهدف صنع جدار الخلية الاكثر مقاومة من قبل العزلات البكتيرية قيد الدراسة أذ كانت المقاومة الاكبر لمضاد Ampicillin بنسبة (97.5%) ، Sulfamethoxazole بنسبة (85%) ، Cefazolin و Ceftazidime بنسبة (82.5%) ، Ceftriaxone و Cefepime بنسبة (80%) ، Tobramycin بنسبة (75%) ، Cefpodoxime بنسبة (70%) ، Trimethoprim / Sulfamethoxazole بنسبة (65%) ، Doxycycline و Ciprofloxacin بنسبة (60%) ، Tetracycline و Levofloxacin بنسبة (57.5%) ، Azithromycin بنسبة (55%) ، Azteronam بنسبة (52.5%) بينما كانت المضادات التالية

أكثر فعالية ضد البكتيريا أذ أظهرت نسبة الحساسية لمضاد Chloramphenicol و Tigecycline بنسبة (95%)، Etrapanem و Imipenem بنسبة (92.5%) ، Amikacin بنسبة (90%)، Ticarcillin/Clavulanic acid بنسبة (87.5%)، Nitrofurantoin بنسبة (85%)، Piperacillin/Tazobactam بنسبة (80%)، Cefoxitin بنسبة (77.5%)، Gentamycin بنسبة (75%)، نسبة مقاومة المضادات لجميع العزلات البكتيرية في جدول (2-4)، نسبة المقاومة لبكتيريا UPEC في جدول (3-4)، نسبة مقاومة العزلات لكل عزلة على حدة في ملحق (3).

في الدراسة الحالية سبب مقاومة المضادات الحيوية لبكتيريا *E.coli* المعزولة من الاطفال دون سن 12 عام وبالاتماد على نتائج الفايتهك هو انتاجها لانزيمات بيتا لاكتيميز واسعة الطيف Extended spectrum beta-lactmase أذ بلغت العزلات المنتجة نسبة 40/28 (70%) هذه الانزيمات لها القدرة على تحليل البنسلينات والسيفالوسبورينات وذلك بكسر حلقة البيتا لاكتام ويصبح المضاد غير فعال ، تكون جينات المقاومة محمولة إما على الكروموسومات أو على البلازميدات في العديد من نواع الجراثيم والذي يؤدي إلى مقاومة متعددة لمضادات الحياة المختلفة (Abdallah و Mahdi, 2016).

اما سبب مقاومتها للامينوكلايكوسيدات هو لأحتوائها على جينات المقاومة لهذه المجموعة وتشمل *tob* و *gen* و *net* و *ami* أذ تقوم بتنشيط صنع البروتين وذلك بمنع ارتباط الحامض النووي الرايبوزي الناقل tRNA من الارتباط بوحدة الرايبوسوم الصغيرة 30sRNA.

جدول (2-4): يوضح نسب مقاومة المضادات للعزلات *E. coli*

Antibiotic class according to mode of action	Antibiotic	Percentage		
		S	I	R
Inhibit cell wall synthesis	Ampicillin	2.5%	-	97.5%
	Piperacillin/Tazobactam	80%	5%	15%
	Cefazolin	12.5%	5%	82.5%
	Ceftazidime	17.5%	-	82.5%
	Cefpodoxime	30%	-	70%
	Cefoxitin	77.5%	7.5%	15%
	Ceftriaxone	20%	-	80%
	Cefepime	20%	-	80%
	Etrapanem	92.5%	-	7.5%
	Imipenem	92.5%	-	7.5%
	Azteronam	45%	-	55%
	Ticarcillin/Clavulanic acid	87.5%	-	12.5%
Inhibit protein synthesis	Amikacin	90%	2.5%	7.5%
	Gentamycin	75%	2.5%	22.5%
	Tobramycin	25%	-	75%
	Tetracycline	42.5%	-	57.5%
	Azithromycin	47.5%	-	52.5%
	Doxycycline	40%	-	60%
	Chloramphenicol	95%	-	5%
	Tigecycline	95%	2.5%	2.5%
Inhibit DNA synthesis	Ciprofloxacin	40%	-	60%
	Levofloxacin	42.5%	-	57.5%
	Nitrofurantoin	85%	-	15%
	Sulfamethoxazole	15%	-	85%
Inhibit folic acid synthesis	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	35%	-	65%

S: Sensitive, I: Intermediate, R: Resistance

جدول (3-4): نتائج مقاومة لبكتريا UPEC

Antibiotic class according to mode of action	Antibiotic	Percentage		
		S	I	R
Inhibit cell wall synthesis	Ampicillin	6.7%	-	93.3%
	Piperacillin/Tazobactam	80%	13.3%	6.7%
	Cefazolin	26.6%	6.7%	66.7%
	Ceftazidime	26.6%	-	73.4%
	Cefpodoxime	33.3%	-	66.7%
	Cefoxitin	73.4%	13.3%	13.3%
	Ceftriaxone	33.3%	-	66.7%
	Cefepime	33.3%	-	66.7%
	Etrapanem	93.3%	-	6.7%
	Imipenem	93.3%	-	6.7%
	Azteronam	46.7%	-	53.3%
	Ticarcillin/Clavulanic acid	93.3%	-	6.7%
Inhibit protein synthesis	Amikacin	93.3%	-	6.7%
	Gentamycin	75%	2.5%	22.5%
	Tobramycin	25%	-	75%
	Tetracycline	42.5%	-	57.5%
	Azithromycin	46.7%	-	53.3%
	Doxycycline	46.7%	-	53.3%
	Chloramphenicol	93.3%	-	6.7%
	Tigecycline	93.3%	-	6.7%
Inhibit DNA synthesis	Ciprofloxacin	53.3%	-	46.7%
	Levofloxacin	46.7%	-	53.3%
	Nitrofurantoin	86.7%	-	13.3%
	Sulfamethoxazole	10%	-	80%
Inhibit folic acid synthesis	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	40%	-	60%

S: Sensitive, I: Intermediate, R: Resistance

نتائج الدراسة الحالية كانت مقارنة للنتائج التي توصل اليها الباحث Dawood (2020) في محافظة ديالى أذ شملت الدراسة 100 عزلة من بكتريا *E.coli* للكشف عن قابليتها على مقاومة المضادات الحيوية اظهرت النتائج ان نسبة 22% من العزلات كانت ذات مقاومة متعددة بينما بلغت نسبة المقاومة ل Ampicillin كانت 100% ، يرجح الباحث سبب المقاومة استخدام المضادات للعلاج على المدى الطويل (Al-Daghistani , 2017). ان سبب مقاومة التتراسايكلين في بكتريا *E.coli* وجود مضخة الدفع efflux pumps من نوع major facilitator super family (MFS) مضخات الدفع تقوم بطرد مضاد تتراسايكلين الى الخارج ولا يطرد Minocycline، أذ البروتين الذي يشفر من جين tetB فقط له القابلية على طرد المضادين خارج الخلية البكتيرية (Nouri و Hamid , 2017).

دراسة اجريت في ايران عام 2018 شملت 100 عزلة من بكتريا *E.coli* تم جمعها من ادرار مرضى مصابين بالتهاب مجاري بولية للتحري عن البكتريا ذات المقاومة المتعددة وانتاج الغشاء الحيوي أذ كانت نسبة (73%) ذات مقاومة متعددة ولوحظت أعلى مقاومة تجاه الأمبيسلين و (80%) منها كانت منتجة للغشاء الحيوي (Poursina , وآخرون 2018). دراسة اجريت في النرويج 2018 على مرضى اناث اعمارهن اقل من 16 سنة مصابين بالتهاب مجاري بولية للكشف عن قابلية انتاج انزيم البييتالاكتيميز شملت 88 عزلة من بكتريا *E.coli* أذ كانت النسبة العالية من العزلات منتجة لانزيم البييتالاكتيميز (Bollestad , وآخرون 2018).

دراسة اخرى اجريت في مصر عام 2020 شملت 150 عينة ادرار (88 اناث و 62 ذكور) بالغين للتحري عن الاصابات البكتيرية ومقاومتها للمضادات أذ كانت اعلى نسبة اصابة ببكتريا الاشريشيا القولونية *E.coli* أذ بلغت (33%) واطهرت مدى واسع من مقاومة للمضادات الحيوية والنسبة الاعلى كانت لمضاد امبنيم أذ بلغت (80%) (Fatima , وآخرون 2020). وكانت نتائج الدراسة الحالية مقارنة الى ما توصلت اليه نتائج الدراسة التي قام بها Dadi وآخرون (2020) في اثيوبيا، أذ اظهرت نتائج الدراسة ان بكتريا UPEC كانت كانت حساسة لل Imipenem (100%) في حين كانت مقاومة Ampicillin (86.5%) و Ceftriaxone (80.5%) و Tetracycline (80%) و Trimethoprim-Sulfamethoxazole (68.5%) و Gentamycin (20%) و Chloramphenicol (16.5%). سبب المقاومة لل Ceftriaxone كونه علاج يوصف في اصابات المجاري البولية يمكن أن يكون بسبب انتقال المقاومة السلالات/العزلة بين المرضى في المستشفيات وعدم الاستجابة للعلاج.

الدراسات المحلية كانت مقارنة لما توصلت اليه الدراسة الحالية أذ اظهرت نتائج دراسة في زاخو قام بها الباحثون Polse وآخرون عام 2016 شملت 106 عزلة بكتيرية من بكتريا UPEC ان نسبة المقاومة لكل من Penicillin و Ampicillin و Aztreonam (100%) بينما كانت حساسة لكل من Imipenem و Meropenem بنسبة (100%). في حين دراسة اخرى اجريت في اربيل قام بها الباحثون Mohammad وآخرون في (2018) وشملت 60 عزلة من بكتريا UPEC كانت ذات مقاومة متعددة بنسبة (100%) أذ كانت مقاومة لكل من Amikacin و Amoxicillin و Ampicillin و Chloramphenicol و Tetracycline و Erythromycin و Ciprofloxacin و Nalidixic acid و Penicillin و Trimethoprim بنسبة تراوحت (28-96%).

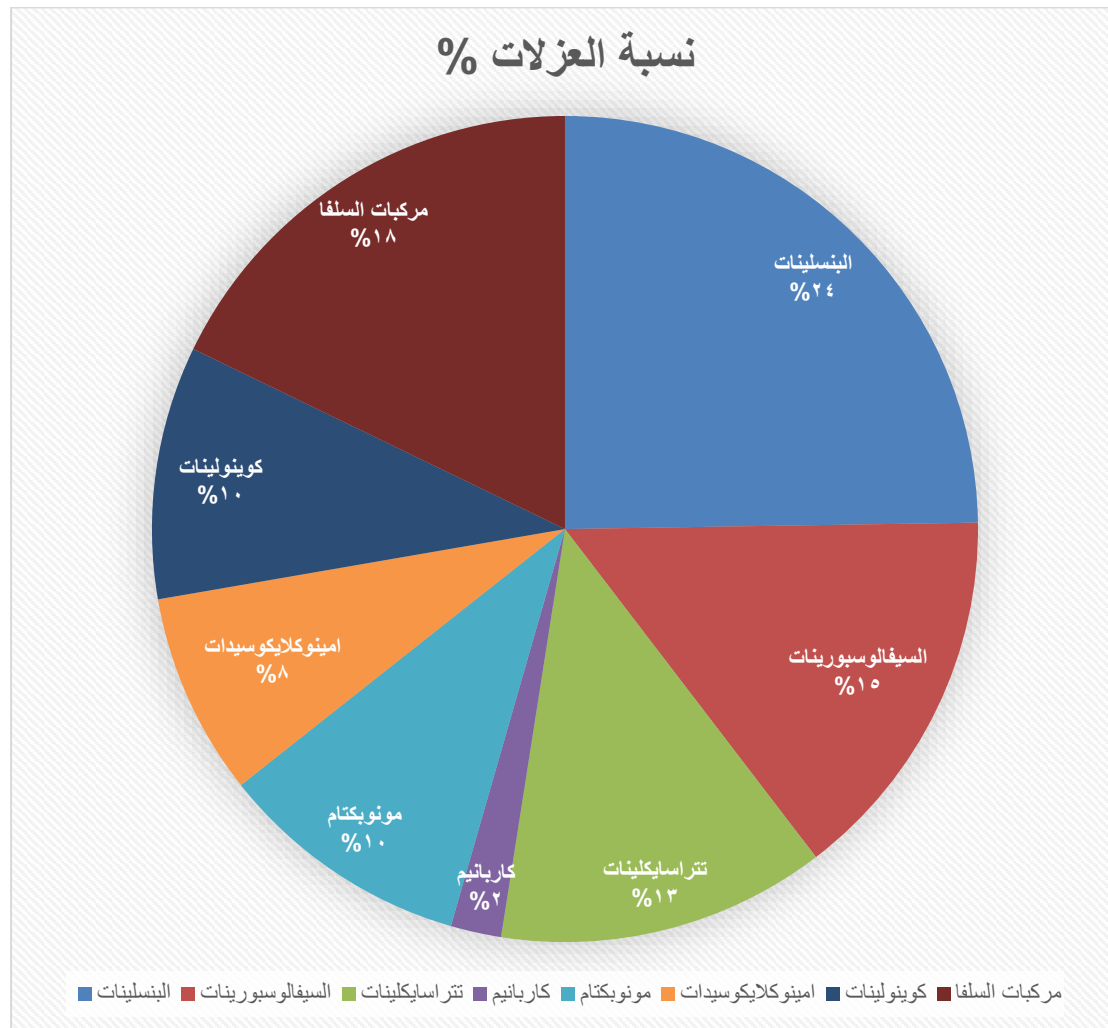
دراسة اخرى اجريت في ايران عام 2018 قام بها الباحثان Raeispour و Ranjbar شملت 60 سلالة من بكتريا UPEC تم دراسة مقاومة المضادات بطريقة الاقراص توصلت النتائج ان كل العزلات مقاومة للمضاد Cefepime وبنسبة (74%) لمضاد Cephalothin في حين كانت حساسة بنسبة (100%) Imipenem و Vancomycin و Doxycycline .

نتائج الدراسات حول العالم كانت مقارنة نوعا ما للدراسة الحالية أذ اظهرت دراسة اجريت في الارجننتين قام بها الباحثون Delpech وآخرون (2018) امتدت من الفترة 2011-2015 شملت 767 عزلة من UPEC العزلات أذ كانت مقاومة لل Ampicillin (80.5%) و Ciprofloxacin (42.8%) و TMS (37.6%) في حين لم تسجل مقاومة لل Carbapenems. من ناحية أخرى دراسة في منغوليا قام بها الباحثون Munkhdelger وآخرون عام 2017 شملت 148 عزلة من بكتريا UPEC، للتحري عن مقاومة المضادات، كانت البكتريا مقاومة عالية لل ampicillin بنسبة (78.4%) في حين كانت حساسة لل Imipenem و Nitrofurantoin (98%) و (94.6%) على التوالي وكانت نسبة العزلات ذات المقاومة المتعددة (93.9%). اتفقت العديد من الدراسات مع نتائج الدراسة الحالية من أذ المقاومة العالية ل Ampicillin وانخفاض المقاومة ل Nitrofurantoin وقد يعود السبب الى استخدام الاخير في علاج التهابات المجاري البولية ويعود السبب الى قلة استخدامه في علاج اصابات الجهاز البولي بينما كان العلاج السابق يستخدم الجيل الثالث من سيفالوسبورينات و Fluoroquinolones الذي ادى بدوره الى ارتفاع المقاومة للمضادات Ampicillin و Ciprofloxacin و Ceftazidime.

1.3.4 المقاومة المتعددة للمضادات Multi Drug Resistance

في الدراسة الحالية كانت نسبة عزلات *E.coli* ذات المقاومة المتعددة للمضادات 40/31 (77.5%) اما بقية العزلات فكانت مقاومة لاقل من ثلاث من المضادات الحيوية.

اما بالنسبة لسلالات UPEC نسبة العزلات ذات المقاومة المتعددة كانت (93%) أذ عدد المضادات المقاومة لها ما بين 3 مضادات الى 16 مضاد.



شكل (4-4): يوضح نسب المضادات التي قاومتها بكتريا *E.coli*

ان المقاومة المتعددة للمضادات هي قابلية البكتريا على مقاومة مضاد واحد او اكثر في ثلاث مجاميع من المضادات الحيوية أن مقاومة المضادات الحيوية مشكلة عالمية ، وبالتالي فإن جهود العلماء تهدف إلى تطوير مضادات حيوية جديدة أو تعديل المضادات الحيوية الموجودة لمكافحة مسببات الأمراض المقاومة (Despoina وآخرون, 2019 ; Breijyeh وآخرون, 2020). وقد

أدى سوء استخدام المضادات الحيوية واستهلاكها بصورة غير ملائمة إلى ازدياد البكتيريا المقاومة للميكروبات في جميع أنحاء العالم وبالتالي فإن النتيجة الأكثر خطورة هو المقاومة لمضادات الميكروبات في حالة UPEC أدت إلى زيادة كبيرة في الوفيات بسبب فشل الاستجابة للعلاج الناتج عن مقاومة المضادات تكون جينات المقاومة إما محمولة على الكروموسوم أو على البلازميد من ناحية أخرى تكتسب بكتيريا UPEC جينات المقاومة عن طريق طفرات الحمض النووي DNA mutations أو آليات النقل الأفقي horizontal transfer mechanisms بين سلالات UPEC (Jahandeh وآخرون, 2015). بالإضافة الطريقة المتبعة في علاج إصابات بكتيريا E.coli الذي يشمل العلاج التجريبي وبدوره أدى إلى الانتخاب selection في البكتيريا وانتشار المقاومة المتعددة بين الأنواع البكتيرية (Munkhdelger وآخرون, 2017).

دراسة في تايلند قام بها الباحثين Tewawong وآخرون (2020) للكشف عن قابلية UPEC على مقاومة المضادات المتعددة، أظهرت النتائج على 208 عزلة من UPEC أن 208/129 (62%) كانت multi drug resistance

أن علاج إصابات الجهاز البولي يشكل تحدياً واضح بسبب انتشار المقاومة المتعددة للمضادات حسب دراسة أجراها الباحث Kot (2019)، في بولندا أذ أن نسبة مقاومة للمضادات amoxicillin-clavulanate و ciprofloxacin و trimethoprim-sulfamethoxazole في عزلات UPEC في البلدان النامية تتراوح بين (50-80%) بينما النسبة تختلف في البلدان المتقدمة أذ تتراوح (3-40%)، هذا الارتفاع في مقاومة المضادات ناتج عن التوافر الغير مسموح للمضادات واستخدامها دون ضوابط لاسيما في البلدان النامية.

في الدراسة الحالية كانت بكتيريا E.coli ذات مقاومة عالية لل ampicillin و cefazolin و ceftazidime و ceftriaxone و tobramycin و Sulfamethoxazole وهذه النتائج مقارنة للنتائج التي توصل إليها الباحثون Ali وآخرون (2016) في باكستان كشفت أن (59%) من سلالات UPEC تكون مقاومة لا يقل عن ثلاثة مضادات الحيوية المعزولة من إصابات مختلفة بينما انتشار سلالات UPEC في مستشفيات الهند وصلت إلى (82.6%) حسب ما جاء في (Ranjini وآخرون, 2015).

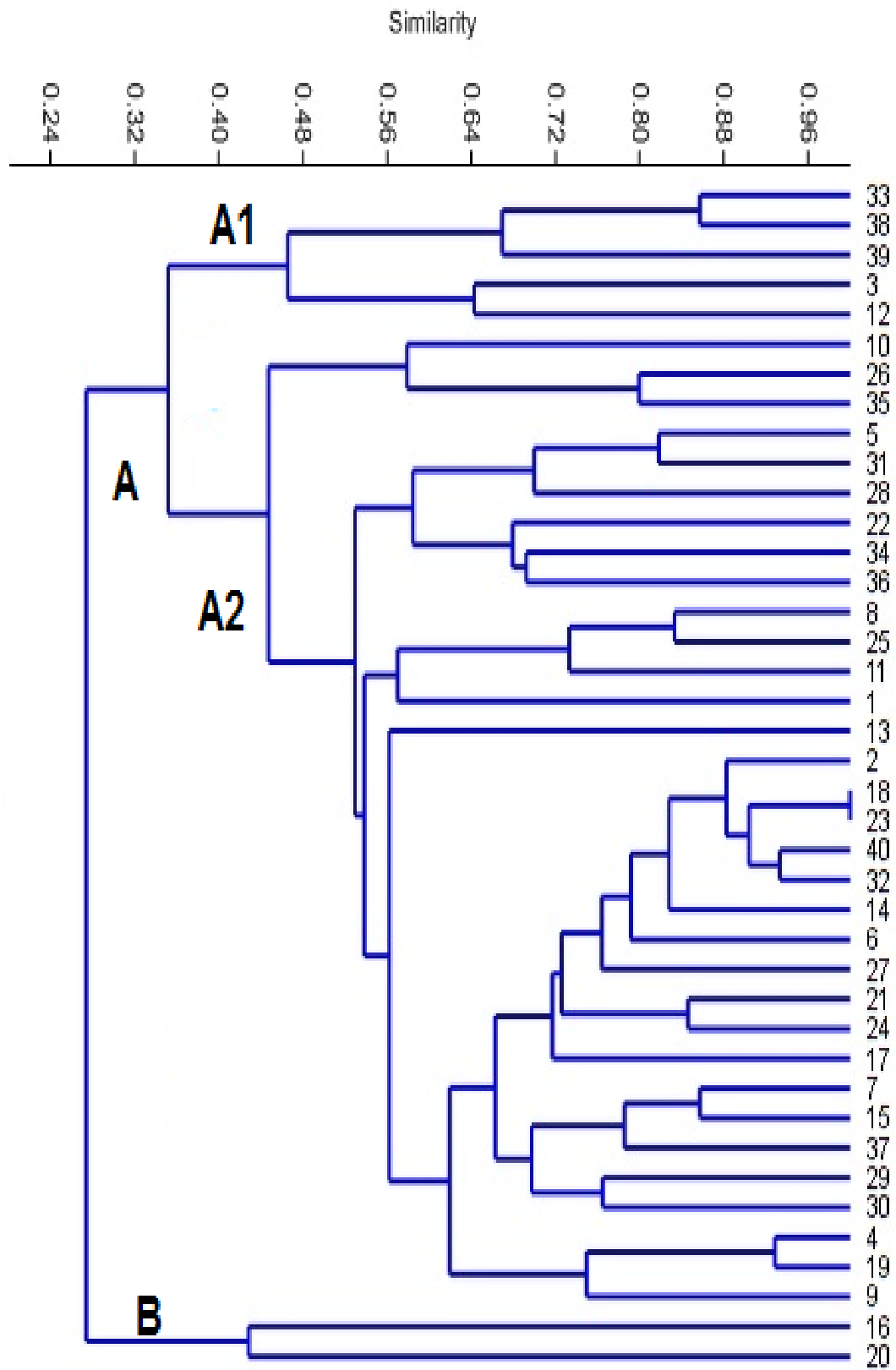
2.3.4 مخطط التحليل التجميعي Dendogram للمضادات الحيوية لنتائج اختبار حساسية بكتريا E.coli

اظهر مخطط التحليل التجميعي Dedogram لمقاومة المضادات الحيوية في الدراسة الحالية كما في الشكل (4-5)، وجود مجموعتين رئيسية هما (A و B) اذ ان المجموعة A شملت 38 عزلة و تقسم الى A1 التي تضم 5 عزلات و A2 التي تضم 33 عزلة.

المجموعة A1 تقسم الى مجموعتين فرعية اخر هي المجموعة الاولى التي تتكون من عزلتين رقم 3 و 12 المعزولة من طفلين بعمر 3 سنوات و 4 سنوات وكان نمطها المظهري المشترك مقاومة لكل من مضاد ampicillin و cefazolin و ciprofloxacin و levofloxacin و sulfamethoxazole و trimethoprim/ sulfamethoxazole و azithromycin و cefpodoxime بينما تختلف في حساسيتها للمضادات Cefazolin و gentamicin و amikacin وحساسة لبقية المضادات المستخدمة في الدراسة الحالية، أما المجموعة الثانية قسمت الى مجاميع فرعية ثانية تضم العزلات 33 و 38 و 39 كانت مقاومة للمضادات tobramycin و sulfamethoxazole و azteronam و tetracycline و doxycycline و cefpodoxime تختلف في حساسيتها للمضادات ampicillin و azithromycin و cefazolin وحساسة لبقية المضادات .

المجموعة A2 تتكون مجموعتين رئيسية قسمت بدورها الى مجاميع فرعية تحوي على نسيلة واحدة Clone شملت عزلتين 18 و 23 ذات نمط مظهري مقاوم لكل المضادات ampicillin و cefazolin و ceftazidime و ceftriaxone و sulfamethoxazole و etrapenem و cefepime و ciprofloxacin و trimethoprim/sulfamethoxazole و aztreonam و levofloxacin و azithromycin و tetracycline و doxycycline و cefpodoxime.

المجموعة الفرعية التي شملت العزلات 10 و 26 و 35 كانت ذات نمط مظهري مشترك مقاوم المضادات ampicillin و piperacillin/tazobactam و cefoxitin و cefazoline و cefepime و imipenem و ceftazidime و ceftriaxone و etrapenem و cefpodoxime و tetracycline وتختلف في حساسيتها للمضادات التالية gentamicin و amikacin و trimethoprim/sulfamethoxazole و azteronam و tobramycin و Doxycycline و sulfamethoxazole و cefpodoxim و azithromycin و ticarcillin/clavulanic acid وحساسة لبقية المضادات.



شكل (5-4): مخطط التحليل التجميعي Dendrogram لنتائج اختبار حساسية بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية و باستعمال برنامج Past

المجموعة الفرعية الثانية التي قسمت بدورها الى مجاميع اصغر شملت العزلات 5 و 31 و 28 و 22 و 34 و 36 و 8 و 25 و 11 و 13 كانت ذات نمط مظهري المشترك في مقاومة المضادات التالية ampicillin و cefoxitin و cefazolin و ceftriaxone و ceftazidime و cefepime تختلف في حساسيتها للمضادات trimethoprim/sulfamethoxazole و ciprofloxacin و levofloxacin و nitrofurantoin و sulfamethoxazole و cefpodoxime و ticarcillin/clavulanic acid وحساسة لبقية المضادات. المجموعة الفرعية الثالثة شملت العزلات 2 و 40 و 32 و 14 و 6 و 27 و 21 و 24 و 17 و 7 و 15 و 37 و 29 و 30 و 4 و 19 و 9 ذات نمط مظهري مشترك في مقاومة المضادات التالية cefazolin و cefpodoxime و cefoxitin و ceftazidime و Doxycycline و cefepime ، تختلف في حساسيتها للمضادات التالية ampicillin و tetracycline و ceftriaxone و azithromycin و azteronam و ciprofloxacin و sulfamethoxazole و levofloxacin وحساسة لبقية المضادات. المجموعة B شملت العزلات 16 و 20 ذات نمط مظهري مقاومة للمضادات الاتية ampicillin و azteronam و sulfamethoxazole و cefpodoxime تختلف في حساسيتها للمضادات gentamycin و trimethoprim/sulfamethoxazole و azithromycin و cefazolin وحساسة لبقية المضادات.

4.4 الكشف عن قابلية انتاج الغشاء الحيوي Biofilm formation

تم استخدام طريقتين لمعرفة قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وهي طريقة أطباق الكونغو الاحمر Congo-red method وهي طريقة نوعية وطريقة أطباق المعايرة Tissue culture plate methods وهي طريقة كمية ونوعية

1.4.4 أطباق الكونغو الاحمر (CRA) Congo-red method

اظهرت 23 عزلة من مجموع 40 قيد الدراسة وبنسبة (57%) على انتاج الغشاء الحيوي أذ حولت الوسط للون الاسود مع وجود تلالى للمستعمرات strong biofilm producer، بينما كانت 17 عزلات غير منتجة بنسبة (43%) أذ نمت المستعمرات بلون احمر non-biofilm producer. كانت عزلات UPEC المنتجة للغشاء الحيوي بطريقة اطباق الكونغو (55%). تعد طريقة CRA بسيطة وسريعة لتحديد بصورة عامة فيما اذا كانت العزلات منتجة للغشاء الحيوي ام لا (Saxena وآخرون , 2014).

الغشاء الحيوي هو قابلية البكتيريا على تكوين المجتمعات البكتيرية والتي تلتصق على السطوح الصلبة ويتشكل الغشاء الحيوي من مادة خارجية تنتجها البكتيريا تتكون من بوليمر سكري متعدد extracellular polymeric matrix ، في بكتيريا UPEC تكوين الغشاء الحيوي من اهم العوامل التي تساعد على زيادة مقاومتها للمضادات الحيوية وتسهل التغلب على دفاعات الجهاز المناعي في المسالك البولية وبالتالي يطور من مقاومة المتعددة للمضادات في البكتيريا وتكرار الإصابة بالتهاب المجاري البولية (Mittal و Sharma , 2015 ; Hall و Mah , 2017).

دراسة في البرازيل في 2017 شملت 294 من احناس بكتيرية مختلفة منها 22 عزلة من بكتيريا *E.coli* استخدمت طريقة CRA لتحديد قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي كانت نسبة 22/11 (50%) منتجة للغشاء الحيوي (Chagas وآخرون , 2017). نتائج الدراسة الحالية مقارنة لنتائج الدراسة التي قام بها Tewawong وآخرون 2020 في تايلند للكشف عن قابلية UPEC على انتاج الغشاء الحيوي شملت الدراسة 208 عزلة وظهرت النتائج ان 54% من العزلات لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي بالإضافة الى هناك ترابط بين انتاج الغشاء الحيوي وبروتينات الالتصاق adhesins التي تشفر بواسطة *pap genes* .

2.4.4 اطباق المعايرة (TCP) Micro-plate methods

تم التحري عن قابلية عزلات *E.coli* على تكوين الغشاء الحيوي و باستعمال اطباق المعايرة الدقيقة Micro-titer Plate (MTP) ، هذا الاختبار هو اختبار كمي لاكتشاف إنتاج الأغشية الحيوية يعطي قيمة عددية للامتصاص على طول موجي 570 نانومتر باستخدام قارئ الاليزا ELISA Reader لتحديد كمية الأغشية الحيوية التي تشكلت عن طريق الالتصاق بأسطح اطباق المعايرة. يمثل الامتصاص سمك الغشاء الحيوي Biofilm المكون من العزلات. اظهرت النتائج في الدراسة الحالية ان عدد العزلات المنتجة للغشاء الحيوي بطريقة اطباق المعايرة كانت 25 عزلة وبنسبة (62.5%) منها 10 (25%) ذات انتاج قوي و 15 (37.5%) كانت ذات انتاج متوسط في حين 15 (37.5%) من العزلات كانت غير منتجة للغشاء الحيوي، من مجموع بكتيريا UPEC كانت 4 عزلات وبنسبة (26.7%) ذات انتاج قوي ، و 5 عزلات متوسطة الانتاج وبنسبة (33.3%) في حين 6 عزلات كانت ضعيفة التكوين او غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي بلغت نسبتها (40%)، ان الاختلاف النسبي في النتيجة بين طريقة الكونغو

الاحمر وطريقة اطباق المعاييرة و ارد كون الطريقة الاولى نوعية فقط تكشف اذا كانت العزلات منتجة ام لا بينما الطريقة الثانية فهي اكثر دقة كونها تحدد نوعية وكمية الانتاج.

جدول (4-4):قابلية بكتريا *E.coli* على تكوين الاغشية الحيوية باستعمال اطباق المعاييرة الدقيقة

العزلات	عدد العزلات	تكوين الاغشية الحيوية		
		غزيرة التكوين	متوسطة التكوين	ضعيفة التكوين
<i>E.coli</i>	40	40/10 %25	40/15 %37.5	40/15 %37.5
UPEC	15	15/4 %26.6	15/5 %33.3	15/6 %40

تعد طريقة اطباق المعاييرة الدقيقة مهمة جداً في دراسة المراحل المبكرة في تكوين الاغشية الحيوية و تصنيف الانتاجية القليلة و المتوسطة و العالية (Pedersen و آخرون , 2018) أن اصابات الجهاز البولي خصوصاً بالمكروبات التي تكون الغشاء الحيوي على القسطرة البولية Urinary Catheter للمرضى لها ارتباط عالي بعدوى المستشفيات وبالاخص عند المرضى الراقدين في المستشفى ، أذ يعد الغشاء الحيوي من عوامل الضراوة الاساسية المسؤول عن استمرار الاصابة في الجهاز البولي Genitourinary Tract، ان قابلية UPEC على تكوين الغشاء الحيوي على القسطرة البولية وكذلك ما بين الخلايا الطلائية تعد وسيلة فعالة لحمايتها من الظروف البيئية والمضادات الحيوية والاشعة فوق البنفسجية و كذلك الاكسدة البايولوجية والاكسدة المعدنية بالإضافة الى حمايتها من دفاعات الجهاز المناعي (Delcaru وآخرون , 2016 ; Eberly وآخرون , 2017).

ان طريقة الكشف المظهري للغشاء الحيوي بواسطة اطباق المعاييرة باستخدام جهاز الاليزا تعد من افضل الطرق المظهرية المستخدمة للكشف عن الغشاء الحيوي أذ تعتمد على مقدار امتصاصية الضوء وبالتالي فأن شدة الضوء مرتبط بتركيز الغشاء الحيوي (Abad وآخرون , 2019).

دراسة اجريت في ايران عام 2018 شملت 100 عزلة بكتيرية من UPEC للتحري عن قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي باستخدام طريقة TCP كانت نسبة (84%) من العزلات منتجة للغشاء الحيوي (Salehzadeh و Zamani , 2018). في حين دراسة اجريت في الهند قام الباحثون Karigoudar وآخرون عام 2019 شملت 100 عزلة من بكتريا *E.coli* معزولة من مرضى مصابون بالتهاب مجاري البولية اظهرت العزلات القدرة على الانتاج القوي للغشاء الحيوي بنسبة (69%) باستخدام طريقة اطباق المعايرة.

5.4 الكشف الجزيئي عن جينات المقاومة Molecular Identification for Resistance genes

تم التحري عن جينات المقاومة في العزلات قيد الدراسة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وشملت الكشف عن جينات المقاومة *CITM* و *tet A* و *tetB* و *sul1* و *sul2* و *sul3*

1.5.4 الكشف الجزيئي عن جين CITM في بكتريا *E.coli*

تم التحري عن وجود جين CITM واظهرت النتائج ان نسبة العزلات الحاملة للجين كانت 40/2 (5%) وهو الجين المسؤول عن مقاومة ampicillin ، لاتوجد اي عزلة من بكتريا UPEC حاملة لهذا الجين، شكل (4-6) يوضح الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لهذا الجين.

تفسيرا لوجود الاختلاف في هذه الدراسة بين الكشف المظهري لمقاومة الامبسلين أذ اظهرت نتائج هذه الدراسة نسبة مقاوم عالية الدراسة بلغت (97.5%) في الكشف المظهري بينما اظهرت نسبة منخفضة بلغت (5%) للكشف الجيني قد يعود السبب لوجود جين اخر او عدد من الجينات التي تشفر لمقاومة هذا المضاد بالإضافة الى الاليات الأخرى التي تلجا اليها البكتريا لمقاومة المضادات الحيوية.

ان ارتفاع نسبة العزلات التي تحمل جينات المقاومة يعود للانتخاب الحاصل في المادة الوراثية في البكتريا نتيجة التعرض المستمر لمضادات البيتا-لاكتام وبالاخص ampicillin، أذ يشفر جين CITM لانزيم β -lactamase AmpC والذي بدوره يسبب التحلل المائي وكسر حلقة البيتا-لاكتام β -lactams (Torkana وآخرون , 2016).

لاتتوافق نتائج الداسة الحالية مع دراسة اجريت في ايران قام بها الباحثان Torkan و Yousefi عام (2017) هدفت الى دراسة انتشار جينات المقاومة في 200 عزلة من بكتريا UPEC اظهرت النتائج ان نسبة (52.5%) من العزلات تحوي جين CITM. ودراسة اخرى قام بها الباحثون Bonyadian وآخرون (2019) شملت 114 عزلة من بكتريا *E.coli* معزولة من الخروج كانت نسب تواجد جينات المقاومة CITM (42.9%) وايضا لا تتوافق مع دراسة اخرى قام بها الباحثون Dehkord وآخرون (2020)، شملت 65 عزلة من بكتريا *E.coli* هدفت الدراسة الكشف عن نسبة انتشار جينات المقاومة أذ كانت نسبة العزلات التي تحمل جين CITM (88.63%)، ان سبب اختلاف النسب يعود الى اختلاف في عدد العزلات قيد الدراسة بالإضافة الى الاختلاف في اعمار المرضى. في حين دراسة شاملة اجريت في المكسيك قام بها الباحثون Pe´rez وآخرون (2020)، للكشف عن وجود جينات المقاومة المختلفة في 200 عزلة من بكتريا *E.coli* اظهرت النتائج نسبة العزلات التي تحمل جين CITM (14.5%) ، وفي نفس الدراسة اظهرت تكرار الاصابة غالبا مرتبط بوجود جين CITM.

2.5.4 الكشف الجزيئي عن جين *tet A* و *tetB* في بكتريا *E.coli*

أظهرت النتائج في الدراسة الحالية أن نسبة العزلات التي تحوي على جين *tet A* (45%) 40/18 في حين كانت النسبة وجود جين *tet A* في بكتريا UPEC (60%) 15/9 وهو احد الجينات المسؤول عن مقاومة tetracycline، شكل (4-7) يوضح الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لهذا الجين.

ان مجموع وجود كلا من جين *tetA* وجين *tetB* معا بلغ بنسبة 40/21 (57.5%) وهي نفس نسبة الطراز المظهري لمقاومة مضاد التتراسايكلين في البكتريا، النتائج في الدراسة الحالية لا تتوافق مع نتائج الدراسات في نيجيريا ففي دراسة قام بها الباحثون Olowe وآخرون (2013) شملت 203 عزلة من بكتريا *E.coli* معزولة من مصادر سريرية مختلفة شملت ادرار وخروج ودم وجروح ومسحة من عنق الرحم واعمار مختلفة تراوحت بين اقل من 10 سنوات ولغاية 80 سنة كانت نسبة وجود جين *tetA* (43.8%) في حين نسبة وجود جين *tetB* (32%) وارتفعت النسبة في دراسة اخرى في نيجيريا ايضا فقد بلغت النسبة التي توصل اليها الباحثون Igwe وآخرون (2015) التي شملت 86 عزلة من بكتريا *E.coli* المعزولة من مرضى يعانون من التهاب المجاري البولية والاسهال أذ بلغت نسبة وجود جين *tetA* وجين *tetB* 95% و 90.5% على التوالي يعود سبب الاختلاف لتعدد مصدر واختلاف المنطقة الجغرافية وايضا ربما يتم اعتماد مضاد تتراسايكلين في علاج بكتريا *E.coli* مما ادى الى ازدياد المقاومة لهذا المضاد، بينما تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي ادرت في ايران عام 2017 قام بها الباحثان Torkan و Yousefi عام (2017) هدفت الى دراسة انتشار جينات المقاومة في 200 عزلة من بكتريا UPEC اظهرت النتائج ان نسبة العزلات تحوي جين *tetA* كانت (46.5%).

وفي دراسة اخرى قام بها الباحثان Nouri و Hamidi (2020) للتحري عن انتشار جينات مقاومة التتراسايكلين في 50 عزلة من بكتريا *E.coli* من الجهاز البولي أذ وجدوا أن نسبة وجود جين *tetA* كانت 32% بينما جين *tetB* كانت 38%. ودراسة اخرى قام بها الباحثون Bonyadian وآخرون (2019) شملت 114 عزلة من بكتريا *E.coli* معزولة من الخروج للكشف عن نسب تواجد جينات المقاومة أذ كانت نسبة العزلات التي تحمل جين *tetA* (9.6%) وايقضا لا تتوافق مع دراسة اخرى قام بها الباحثون Dehkord وآخرون (2020)، شملت 65 عزلة من بكتريا *E.coli* هدفت الدراسة الكشف عن انتشار جينات المقاومة أذ كانت نسبة العزلات التي تحمل جين *tetA* (95.45%) ، ان سبب اختلاف النسب يعود الى اختلاف في عدد العزلات قيد الدراسة بالاضافة الى الاختلاف في اعمار المرضى.

دراسة شاملة اجريت في المكسيك قام بها الباحثون Monroy-Pérez وآخرون (2020)، للكشف عن وجود جينات المقاومة المختلفة في 200 عزلة من بكتريا *E.coli* اظهرت النتائج نسبة وجود جين *tetA* (56%).

تعد جينات المقاومة للـ tetracycline واسعة الانتشار في بكتريا السالبة لصبغة كرام ومن الممكن ان تتواجد في البكتريا المعزولة من الانسان والحيوان على حدٍ سواء، تشير الدراسات ان قدرة جين *tetA* على الانتشار بحرية أكثر من *tetB* وهذا يفسر نسبة وجوده اعلى من جين *tetB* (Skocková وآخرون ، 2012). تكون جينات *tet* المسؤولة عن مقاومة tetracycline محمولة على عناصر الجينية الانتقالية mobile genetic elements مثل plasmids و integrons و transposons والبلازميد الذي يحمل مقاومة tetracycline قد يحمل جينات مقاومة للمضادات الاخرى وعوامل الضراوة الاخرى وهذا يعطي ميزة انتقائية لأي جين يحمل على البلازميد مما يعزز ثبات السلالات الحاملة للبلازميد plasmid-bearing strains وتسمى هذه الظاهرة ب cross-selection مما ساهمت في انتشار البكتريا ذات مقاومة المتعددة خلال 40 سنة الاخيرة (Karami وآخرون، 2006).

ربما قد تكون هذه الدراسة هي الاولى للكشف الجزيئي عن جينات المقاومة للـ tetracycline في بكتريا *E. coli* المعزولة من الرضع والاطفال دون 12 سنة ويشفر كل من جين *tetA* و *tetB* لمضخة الدفع المعتمد على الطاقة من نوع energy-dependent efflux pump system ، وهي احدى اكثر الاليات شيوعا في مقاومة tetracycline في بكتيريا العائلة المعوية Enterobacteriaceae (Olowe وآخرون ، 2013).

3.5.4 الكشف الجزيئي عن جينات sul في بكتريا *E. coli*

نسبة العزلات التي تحوي على جين sul 1 كانت 40/14 (35%) بينما بلغت النسبة في بكتريا UPEC 15/8 (53.3%) هو احد الجينات المسؤولة عن مقاومة مجموعة المضادات sulfonamide، شكل (4-9) يوضح الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لهذا الجين.

بلغ مجموع وجود جينات *sul* مجتمعة في بكتريا *E.coli* 40/30 (75%) هذه النسبة مقارنة للنمط المظهري لمقاومة Sulfonamide أذ بلغت نسبة المقاومة (85%).

ان مركبات السلفوناميدات Sulfonamide قل استخدامها في معالجة الالتهابات والاضماج البكتيرية للانسان الا ان بعض دول اسيا لاتزال تستخدمه وذلك لكلفتها الواطئة ، تحدث مقاومة السلفوناميدات في المقام الأول من خلال اكتسابها الجين البديل الذي يشفر لانزيم *sul* dhydropteroate synthase ، الذي بدوره يكون مسؤولا عن انتاج بروتين ذو الفة قليلة للارتباط مع Sulfonamide ، وعاكس في مقاومة باقي مجاميع المضادات التي من الممكن ان تحمل باكثر من جين الا ان هذه المجموعة تكون المقاومة فقط في جينات *sul* وتشمل *sul1* و *sul2* و *sul3* (Ben وآخرون, 2017; Jiang وآخرون, 2019).

نتائج الدراسة الحالية مقارنة للنتائج التي اجريت في ايران عام 2017 قام بها الباحثان Torkan و Yousefi عام (2017) هدفت الى دراسة انتشار جينات المقاومة في 200 عزلة من بكتريا UPEC اظهرت النتائج ان نسبة العزلات التي تحوي جين *sul1* كانت (40%). ودراسة اخرى قام بها الباحثون Bonyadian وآخرون (2019) شملت 114 عزلة من بكتريا *E.coli* معزولة من الخروج للكشف عن تواجد جينات المقاومة أذ اظهرت الدراسة نسبة العزلات التي تحمل جين *sul1* و (7%) وايضا لا تتوافق مع دراسة اخرى قام بها الباحثون Dehkord وآخرون (2020)، شملت 65 عزلة من بكتريا *E.coli* للكشف عن انتشار جينات المقاومة أذ كانت نسبة العزلات التي تحمل جين *sul1* (72.72%)، ان سبب اختلاف النسب يعود الى اختلاف في عدد العزلات قيد الدراسة بالاضافة الى الاختلاف في اعمار المرضى.

ان مقاومة *E. coli* للمضادات الحيوية مثل Sulfonamide و Aminoglycosides المستخدمة في علاج اصابات الجهاز البولي التي غالبا ما تكون مرتبطة بوجود بلازميدات معينة فمثلا مقاومة Sulfonamide المسؤول عنها ثلاث جينات (*sul1* و *sul2* و *sul3*) يكون جين *sul1* موجود على بلازميدات الاقترانية الكبيرة large conjugative plasmids على العكس من جين *sul2* عادة ما يكون محمول على بلازميدات صغيرة غير اقترانية small nonconjugative plasmids بينما جين *sul3* هو اقل الجينات المعروفة كونه محمولا على البلازميد اقل شيوعا في بكتريا *E.coli* (Estrada وآخرون ، 2016 ; Adamus-Białek وآخرون ، 2018). لذلك نجد ان الجين *sul 2* كان اكثر انتشارا في العزلات المحلية قيد الدراسة

مما يشير الى اوجه التشابهات والاختلافات الوراثية للعزلات المحلية عن غيرها التي تم تشخيصها في دول اخرى.

دراسة شاملة في المكسيك قام بها الباحثون Pe'rez وآخرون (2020)، للكشف عن وعود جينات المقاومة المختلفة في 200 عزلة من بكتريا *E.coli* اظهرت *sul1* (35.5%) على التوالي.

جدول (4-5): يوضح توزيع الجينات في بكتريا *E.coli*

No	<i>papE</i>	<i>Sul1</i>	<i>sul 2</i>	<i>sul 3</i>	<i>CTIM</i>	<i>tet A</i>	<i>tet B</i>
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	+	-	+	-	-	+	-

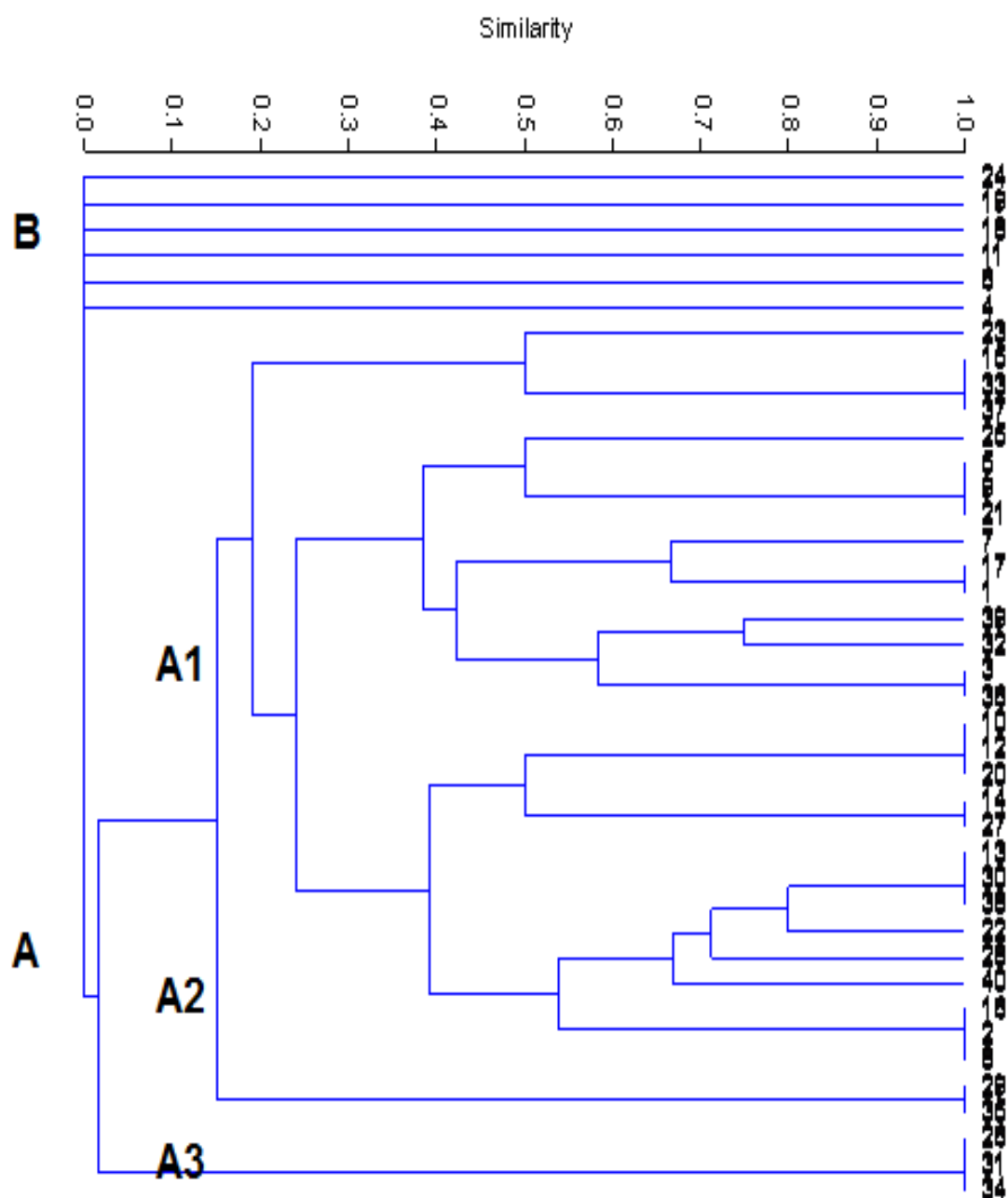
أذ (+): حاملة للجين ، (-): غير حاملة للجين

6.4 المخطط التجميعي لوجود الجينات في بكتريا *E.coli*

اظهر مخطط التحليل التجميعي Dedogram لوجود الجينات في الدراسة الحالية كما في الشكل (12-4) وجود مجموعتين رئيسية هي (A و B) اذ ان المجموعة A شملت 34 عزلة و تقسم الى ثلاث مجاميع فرعية رئيسية هي A1 التي تضم 30 عزلة و A2 التي تضم عزلتين و A3 تضم ثلاث عزلات.

المجموعة A1 تقسم الى مجاميع فرعية اخرى وتحتوي على 8 نساقل Clone تضم النسيلة الاولى العزلات 15 و 33 و 37 التي تحتوي على جين *tetA* فقط، النسيلة الثانية تضم العزلات 5 و 9 و 21 والتي تكون حاملة للجين *sul2* فقط، النسيلة الثالثة تضم العزلتين 1 و 17 التي تكون حاملة للجينات *sul2* و *sul1* معا، النسيلة الرابعة تضم العزلتين 3 و 36 التي تكون حاملة للجينات *sul2* و *sul1* ، النسيلة الخامسة تضم العزلات 10 و 12 و 20 التي تكون ضمن سلالة UPEC حاملة للجينات *papE* و *sul1* ، النسيلة السادسة تحوي عزلتين 14 و 27 ضمن سلالة UPEC ولا تحمل جينات المقاومة فقط جين *papE*، النسيلة السابعة تضم العزلات 13 و 30 و

38 ضمن سلالة UPEC حاملة للجينات التالية *papE* و *sul1* و *sul2* و *tetA* ، النسيلة الثامنة تضم العزلات 2 و 8 و 16 ضمن سلالة UPEC وحاملة للجينات *papE* و *tetA*.



شكل (4-12): المخطط التجميعي Dendrogram لنتائج وجود الجينات في بكتريا *E.coli* و باستعمال برنامج

Past

المجاميع الفرعية ضمن المجموعة A1 تضم 8 عزلات وهي عزلة 7 تكون حاملة للجينات للجينات *sul2* و *tetA* و *tetB* ، عزلة 22 ضمن سلالة UPEC وتكون حاملة للجين *papE* و *tetA* و *tetB* و *sul1* و *sul2*، عزلة 23 التي تكون حاملة للجينات CTIM و *tetA* ، تكون

حاملة فقط للجين 25 ضمن سلالة UPEC تكون حاملة للجين *papE* و *sul2* ، عزلة 28 ضمن سلالة UPEC وتكون حاملة للجين *papE* و *tetA* و *sul1* و *sul2* ، عزلة 32 التي تكون حاملة للجينات *tetA* و *sul1* و *sul2* ، عزلة 39 التي تكون حاملة للجينات *sul1* و *sul2* و CTIM و *tetA* ، واخيرا عزلة 40 التي تكون ضمن سلالة UPEC وحاملة للجينات *sul2* و *papE* و *tetA*.

المجموعة A2 تضم نسيلة واحدة تحوي عزلتين هي 29 و 35 التي تكون حاملة جين *sul1* فقط في حين المجموعة A3 ايضا تحوي نسيلة واحدة تتكون من ثلاث عزلات 26 و 31 و 34 تكون حاملة فقط للجين *tetB*

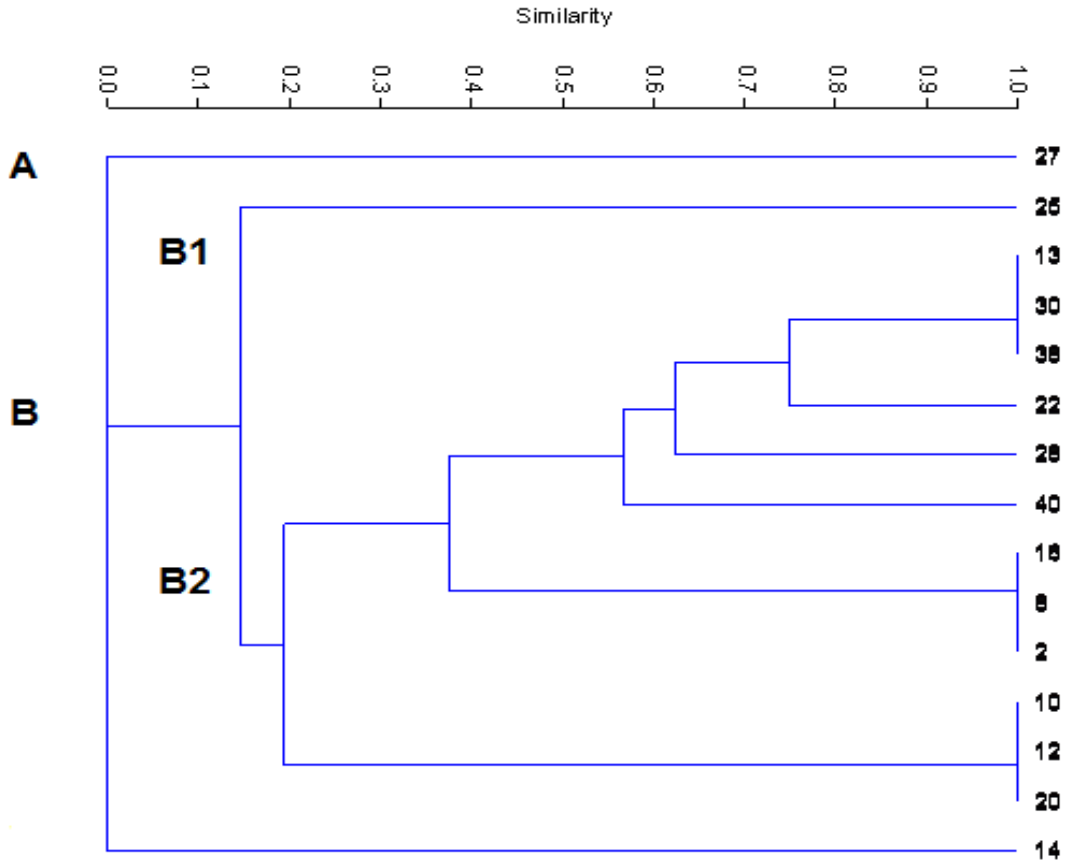
المجموعة B تضم 6 عزلات وهي 4 و 6 و 11 و 18 و 19 و 24 غير حاملة لاي جين من الجينات السبعة.

1.6.4 المخطط التجميعي لوجود الجينات في بكتريا UPEC

اظهر المخطط التجميعي شكل (4-13)، لوجود جينات المقاومة في بكتريا UPEC وجود مجموعتين رئيسية هي (A و B)، تحتوي مجموعة A عزلتين هي 14 و 27 التي لاتحمل اي جين من جينات المقاومة.

المجموعة B تقسم بدورها الى مجموعتين فرعية هي B1 تحتوي على نسيلتين النسيلة الاولى تضم العزلات 13 و 30 و 38 حاملة للجينات التالية *sul1* و *sul2* و *tetA* ، والنسيلة الثانية 2 و 8 و 16 حاملة للجين *tetA* اما المجاميع الفرعية ضمن B1 تضم العزلات 25 حاملة للجين *sul3* وعزلة 22 وتكون حاملة للجين *tetA* و *tetB* و *sul1* و *sul2* وعزلة 28 UPEC وتكون حاملة للجين *tetA* و *sul1* و *sul2* وعزلة 40 وحاملة للجينات *sul2* و *tetA*.

المجموعة الفرعية الثانية B2 تحوي نسيلة واحدة تضم 10 و 12 و 20 حاملة للجين *sul1* فقط



شكل (4-13): المخطط التجميعي لوجود الجينات في بكتريا UPEC

7.4 تجارب التحليل التتابعي DNA Sequencing

1.7.4 تحليل الحامض النووي للجينات المقاومة

حلل تسلسل الحمض النووي للجينات المقاومة و بينت النتائج لجين بالنسبة لجين CITM فحصت للعزلة 39 خمس طفرات الاولى نوع انتقال في الموقع 9345 تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الثايمين Thymine اذا تم تحويل الحامض الاميني Isoleucine الى الحامض الاميني Arginine، الطفرة الثانية من نوع استبدال حصلت في الموقع 9349 تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Arginine الى الحامض الاميني Glycine، الطفرة الثالثة حصلت في الموقع 9478 من نوع ابدال تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Isoleucine الى الحامض الاميني Valine، الطفرة الرابعة من نوع صامتة في الموقع 9603 من نوع ابدال تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية

الادنين Adenine اذا اعطت نفس الحامض الاميني Trypsin ، اما الطفرة الخامسة حصلت في الموقع 9604 من نوع ابدال تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Valine الى الحامض الاميني Phenylalanine ، اما العزلة 23 حصلت لها طفرتين الطفرة الاولى من نوع صامتة في الموقع 9603 من نوع ابدال تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine اذا اعطت نفس الحامض الاميني Trypsin ، اما الطفرة الثانية حصلت في الموقع 9604 من نوع ابدال تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Valine الى الحامض الاميني Phenylalanine.

اما بالنسبة لجين tetA ان العزلة 7 حصلت لها طفرتين الاولى استبدال للقاعدة النتروجينية الادنين Adenine بالقاعدة النتروجينية الكوانين Guanine عند الموقع 808540 و كانت الطفرة من نوع انتقال mutation Transition اذ تم تحويل الحامض الاميني Glycine الى الحامض الاميني Asparagine ، أما الطفرة الثانية استبدلت القاعدة النتروجينية الثايمين Thymine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine عند الموقع 808599 كانت الطفرة من نوع استبدال ايضا Transition mutation تم تحويل الحامض الاميني Arginine الى الحامض الاميني Asparagine ، اما العزلة 32 حصلت لها ثلاث طفرات، الاولى من نوع انتقال Transition mutation عند الموقع 808540 استبدال للقاعدة النتروجينية الادنين Adenine بالقاعدة النتروجينية الكوانين Guanine اذ تم تحويل الحامض الاميني Glycine الى الحامض الاميني Asparagine ، الطفرة الثانية من نوع استبدال Substitution mutation حصلت في الموقع 808744 تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Histidine الى الحامض الاميني Arginine ، الطفرة الثالثة من نوع استبدال ايضا Substitution mutation عند الموقع 808762 تم استبدال القاعدة النتروجينية لكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Asparagine الى الحامض الاميني Glycine ، اما العزلة 38 حصلت لها طفرة واحدة من نوع انتقال Transition mutation عند الموقع 808540 808540 استبدال للقاعدة النتروجينية الادنين Adenine بالقاعدة النتروجينية الكوانين Guanine اذ تم تحويل الحامض الاميني Glycine الى الحامض الاميني Asparagine.

(4-6): التغييرات في القواعد النيتروجينية

نوع الطفرة	التغاير في الاحماض الامينية	التغاير	التسلسل الطبيعي	الموقع	العينة
CITM (CP047012)					
انتقال	Arg > Ile	ATA	AGA	9345	39
ابديل	Gly > Arg	AGG	GGG	9349	39
ابديل	Val > Ile	ATT	GTT	9478	39
صامتة	Trp > Trp	ACA	ACG	9603	23,39
انتقال	Phe > Val	GTT	TTT	9604	23,39
tetA(CP073360)					
انتقال	Asp > Gly	GGC	GAC	808540	7,32,38
انتقال	Trp > Arg	AGG	TGG	808599	7
ابديل	Arg > His	CAC	CGC	808744	32
ابديل	Gly > Asp	GAC	GGC	808762	32
tetB(CP069657)					
انتقال	Gln > Lys	AAA	CAA	1937900	7
ابديل	Asp > Asn	AAT	GAT	1937981	7
ابديل	Ile > Val	GTT	ATT	1938053	7
ابديل	Arg > Gln	CAA	CGA	1938060	7
ابديل	Lys > Glu	GAA	AAA	1938176	31
sul1(CP074577)					
انتقال	Arg > Gly	GGA	CGA	131937	38
انتقال	His > Asp	GAC	CAC	131991	38
انتقال	Arg > Thr	ACG	AGG	132058	38
Sul2(CP073360)					
صامتة	Val > Val	GTT	GTA	804483	40
انتقال	Val > Pro	CCC	GTT	804669	40
ابديل	Ile > Leu	CTC	ATC	804673	40
صامتة	Thr > Thr	ACT	ACG	804746	7,40

اما بالنسبة لجين tetB فقد حصلت اربع طفرات للعزلة رقم 7 الاولى من نوع انتقال في الموقع 1937900 من نوع انتقال تم استبدال القاعدة النيتروجينية السايروسين Cytosine بالقاعدة النيتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Lysine الى الحامض الاميني Glycine ، اما الطفرة الثانية حصلت في الموقع 1937981 تم استبدال القاعدة النيتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النيتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Asparagine الى الحامض الاميني Aspartic acid ، اما الطفرة الثالثة حصلت في الموقع 1938053 تم استبدال القاعدة النيتروجينية الادنين Adenine بالقاعدة النيتروجينية السايروسين

Cytosine اذا تم تحويل الحامض الاميني Valine الى الحامض الاميني Isoleucine ، اما الطفرة الرابعة حصلت في الموقع 1938060 تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine اذا تم تحويل الحامض الاميني Glutamine الى الحامض الاميني Arginine ، اما العزلة 31 فقد حصلت لها طفرة واحدة في الموقع 1938176 استبدال القاعدة النتروجينية الادنين Adenine بالقاعدة النتروجينية الكوانين Guanine اذا تم تحويل الحامض الاميني Glutamic acid الى الحامض الاميني Lysine .

Sequence ID: CP073360.1 Length: 4876824 Number of Matches: 1
Range 1: 808408 to 808934

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
929 bits(503)	0.0()	519/527(98%)	0/527(0%)	Plus/Plus	
Query 16	CTGGCGCTGTATGCGTTGATGCAATTTGCCTGCGCACCTGTGCTGGGCGCGCTGTGCGAT	75			
Sbjct 808408	CTGGCGCTGTATGCGTTGATGCAATTTGCCTGCGCACCTGTGCTGGGCGCGCTGTGCGAT	808467			
Query 76	CGTTTCGGGCGGCGGCGGCTTCTGCTCGTCTGCTGGCCGGCGCTGCTGTCGACTACGCC	135			
Sbjct 808468	CGTTTCGGGCGGCGGCGGCTTCTGCTCGTCTGCTGGCCGGCGCTGCTGTCGACTACGCC	808527			
Query 136	ATCATGGCGACGGCGCCTTTCTTTGGGTCTCTATATCGGGCGGATCGTGGCCGGCATC	195			
Sbjct 808528	ATCATGGCGACGGCGCCTTTCTTTGGGTCTCTATATCGGGCGGATCGTGGCCGGCATC	808587			
Query 196	ACCGGGGCGACTGGGGCGGTAGCCGGCGCTTATATTGCCGATATCACTGATGGCGATGAG	255			
Sbjct 808588	ACCGGGGCGACTGGGGCGGTAGCCGGCGCTTATATTGCCGATATCACTGATGGCGATGAG	808647			
Query 256	CGCGCGCGGCACCTTCGGCTTCATGAGCGCCTGTTTCGGGTTCCGGGATGGTCGCGGGACCT	315			
Sbjct 808648	CGCGCGCGGCACCTTCGGCTTCATGAGCGCCTGTTTCGGGTTCCGGGATGGTCGCGGGACCT	808707			
Query 316	GTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGGTTTCTCCCCACGCTCCGTTCTTCGCGCGGCAGCC	375			
Sbjct 808708	GTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGGTTTCTCCCCACGCTCCGTTCTTCGCGCGGCAGCC	808767			
Query 376	TTGAACGGCCTCAATTTCTGACGGGCTGTTTCTTTTGC CGGAATCACACAAAGGCGAA	435			
Sbjct 808768	TTGAACGGCCTCAATTTCTGACGGGCTGTTTCTTTTGC CGGAGTCGCACAAAGGCGAA	808827			

شكل (4-14): يوضح التحليل التتابعي لجين *tetA* للعزلات 7 ، 32 ، 38 ،

اما جين *sul1* فقد حصلت ثلاث طفرات للعزلة 38 ، الطفرة الاولى حصلت في الموقع 131937 تم استبدال القاعدة النتروجينية السايروسين Cytosine بالقاعدة النتروجينية الكوانين Guanine اذا تم تحويل الحامض الاميني Glycine الى الحامض الاميني Arginine ، اما الطفرة الثانية فقد حصلت في الموقع 131991 تم استبدال القاعدة النتروجينية السايروسين Cytosine بالقاعدة النتروجينية الكوانين Guanine اذا تم تحويل الحامض الاميني Asparagine الى الحامض الاميني Histidine ، اما الطفرة الثالثة حصلت في الموقع 132058 تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية السايروسين Cytosine اذا تم تحويل الحامض الاميني Threonine الى الحامض الاميني Arginine.

بالنسبة لجين *sul2* فقد حصلت اربع طفرات للعزلة 40 الاولى في الموقع 804483 من نوع الصامت حيث تم استبدال القاعدة النتروجينية الادنين Adenine بالقاعدة النتروجينية الثايمين Thymine واعطت نفس الحامض الاميني Valine. الطفرة الثانية من نوع انتقال حصلت في الموقع 804669 حيث تغيرت الشفرة بالكامل من GTT الى CCC وبالتالي استبدال الحامض الاميني Proline الى الحامض الاميني Valine. الطفرة الثالثة حصلت في الموقع 804673 من نوع ابدال حيث استبدلت القاعدة النتروجينية الادنين Adenine بالقاعدة النتروجينية السايروسين Cytosine اذا تم تحويل الحامض الاميني leucine الى الحامض الاميني Isoleucine. الطفرة الرابعة كانت من النوع الصامت حصلت في الموقع 804746 تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الثايمين Thymine واعطت نفس الحامض الاميني Threonine. والعزلة 7 حدثت لها طفرة واحدة من النوع الصامت حصلت في الموقع 804746 تم استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الثايمين Thymine واعطت نفس الحامض الاميني Threonine ، ملحق (5، 6، 7، 8).

الاستنتاجات Conclusions

- 1- نسبة اصابات الاطفال دون سن 12 عام بالتهابات المجاري البولية عند الاناث اكثر من الذكور .
- 2- اظهرت العزلات البكتيرية *E.coli* التي تم دراستها مقاومة متباينة للمضادات الحيوية ، أعلى مقاومة
كانت لمضاد ampicillin و Sulfamethoxazole و إقل نسبة مقاومة كانت لمضاد Tigecycline ، و اغلب عزلات بكتريا *E.coli* قيد الدراسة أبدت صفة تعدد المقاومة MDR أذ بلغت النسبة (77.5%) ، مما يشكل تحديا علاجيا كبيرا خصوصا عند الاطفال.
- 3- عند الكشف عن قابلية بكتريا *E.coli* على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة اطباق المعايرة اظهرت النتائج ان نسبة (62.5%) من العزلات *E.coli* كانت لها القابلية على تكوين الغشاء سواء غزيرة التكوين او متوسطة التكوين للأغشية الحيوية بينما بلغت نسبة العزلات ضعيفة التكوين للأغشية الحيوية (37.5%).
- 4- اظهرت نتائج الكشف عن جين التشخيصي *papE* ان نسبة (37.5%) من العزلات *E.coli* قيد الدراسة كانت حاملة لهذا الجين
- 5- اظهرت نتائج الكشف عن جينات *sul* في عزلات *E.coli* المحلية ان الجين *sul 2* هو الاكثر انتشارا بينما لم يظهر الجين *sul 3* فيها.
- 6- اظهرت نتائج الكشف عن جين CITM المسؤول عن مقاومة الامبسلين وجوده بنسبة منخفضة جدا مقارنة بالكشف المظهري عن قدرة العزلات قيد الدراسة على مقاومة هذا المضاد مما يدل على وجود اليات اخرى في المقاومة لهذا المضاد
- 7- اظهرت نتائج الكشف عن جينات *tetA* و *tetB* المسؤولة عن مقاومة مضاد التتراسايكلين الى ارتفاع انتشار جين *tetA* مقارنة بجين *tetB* في العزلات قيد الدراسة.

التوصيات Recommendations

- 1- إجراء دراسات دورية لمعرفة ومتابعة تطور مقاومة بكتريا *E.coli* لمضادات الحياة الحديثة وخصوصا عند الاطفال الذين يعانون من عدوى المسالك البولية للحد من انتشار المقاومة.
- 2- دراسة جزيئية لعوامل الضراوة التي تملكها بكتريا UPEC
- 3- تحديد النمط الجيني لبكتريا *E.coli* التي تسبب اصابات المسالك البولية عند الاطفال في العراق
- 4- اجراء دراسة عن انتشار بكتريا UPEC المكتسبة عن طريق المستشفيات بين المرضى الراقدين
- 5- اجراء دراسة جزيئية للكشف عن انتشار جينات المقاومة للمضادات الحياتية الاخرى بين العزلات السريرية المحلية

المصادر العربية

-الشويخ ، رنا مجاهد (2016). المضادات الحيوية واستعمالاتها. دار دجلة للنشر والتوزيع ، عمان ، 112 صفحة.

المصادر الاجنبية

Abad, D.; Khameneh, E. and Vahedi, L. (2019). Identification phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and their antibiotics resistance. *BMC Res Notes.*, 12 (796).

Abdel-Gelil, O. and Mansour, S. (2019). Tetracycline and toxicity induced. *Gastroenterol Hepatol Open Access.*, 10(4):177–179.

Abdullah, R. M. and Mahdi, A. F. (2016). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical specimen by using 16S rDNA. *Iraq Acad, Sci. J.*, 10(1):45-49.

Abdul-Mohammed, H.; Mohammed, A.; Abdul-Raheem, R. (2012). The Frequency of Urinary Tract Infection According to the Age and Sex in some of Iraqi Children. *AL-Taqqani.*, (25)7.

Adamus-Bialek, W.; Baraniak, A.; Wawszczak, M.; Głuszek, S.; Gad, B.; Wróbel, K.; Bator, P.; Majchrzak, M. and Parniewski, P. (2018). The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Rep.*, 45:1055–1065.

Adnan, M.; Khan, H.; Kashif, J.; Ahmad, S.; Gohar, A.; Ali, A.; Khan, M.; Shah, S.; Hassan, M.; Irshad, M; Khan, N. and Rahman, S. (2017). Clonal expansion of sulfonamide resistant *Escherichia coli* isolates recovered from diarrheic calves, *Pak Vet J.*, 11(1):1-3.

Abrar, S.; Ain, N.U.; Liaqat, H.; Hussain, S.; Rasheed, F., and Riaz, S. (2019). Distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA} genes in Extended-spectrum- β -lactamase-producing Clinical isolates: A three-year

multi-center study from Lahore, Pakistan. *Antimicrobial resistance and infection control.*, 8 (80).

Aguiniga, L.; Yaggie, R.; Schaeffer, A. and Klumpp, D. (2016). Lipopolysaccharide domains modulate urovirulence. *Infect. Immun.*, 84, 3131–3140.

Al-Daghistani, H. (2017). Asymptomatic colonization of *Staphylococcus aureus* with intermediate resistance to vancomycin harboring vanB resistance gene. *Asian J Phar Clin Res.*, 10 (349).

Ali. I.; Rafeque, Z.; Ahmed, S.; Malik, S. and Dasti, J. (2016). Prevalence of multi-drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Potohar region of Pakistan. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 6:60–66.

Ameer, M.; Wasey, A. and Salen, P. (2020). Stat Pearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Oct 3, 2020. *Escherichia Coli (E Coli 0157 H7)*.

Amer, M.; Mekky, H.; Amer, A. and Fedawy, H. (2018). Antimicrobial resistance genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased broiler chickens in Egypt and their relationship with the phenotypic resistance characteristics. *Vet World.*, 11(8):1082-1088.

Asadi, M.; Habibi, M. and Bouzari S. (2019). Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Immunol.*, 108:56–67.

Atlas, R. and Snyder, J. (2015). *Reagents, Stians, and Media*. In R Atlas, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington: ASM Press.

Babapour, E.; Haddadi, A.; Mirnejad, R.; Angaji, S. and Amirmmozafaei, N. (2016). Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 6(6): 528-533.

Baddour, L.; Wilson, W.; Bayer, A.; Fowler, V.; Tleyjeh, I.; Rybak, M.; Barsic, B.; Lockhart, P.; Gewitz, M. and Levison, M. (2015). Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association. *Circulation.*, 132:1435–1486.

Behzadi, P.; Urbán, E. and Gajdács, M. (2020). Association between Biofilm-Production and Antibiotic Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): *An In Vitro Study. Dis.*, 8(17).

Ben, W.; Wang, J.; Pan, X. and Qiang, Z. (2017). Dissemination of antibiotic resistance genes and their potential removal by on-farm treatment processes in nine swine feedlots in Shandong Province, China. *Chem.*, 167: 262–268.

Benson, H.J. (2002). Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. 8th Ed. McGraw-Hill, New York, NY: 58-60.

Berbari, E.; Kanj, S.; Kowalski, T.; Darouiche, R.; Widmer, A.; Schmitt S.; Hendershot, E.; Holtom, P.; Huddleston, P. and Petermann G. (2015). 2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Native Vertebral Osteomyelitis in Adults. *Clin. Infect. Dis.*, 61:26-46.

Bitrus, A.; Olabode, M.; Abbas, M. and Dauda, G. (2018). Staphylococcus aureus: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanism. *Vet Sci Res Rev.*, 4 (10).

Blair, J.; Webber, M.; Baylay, A.; Ogbolu, D. and Piddock, A. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.*, 13:42-51

Blair, J.; Richmond, G. and Piddock, L. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.*, 9:1165-1177.

Bollestad, M.; Grude, N.; Solhaug, S.; Raffelsber, N.; Handal, N. and Nilsen, H.S. (2018). Clinical and bacteriological efficacy of pivmecillinam treatment for uncomplicated urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli*: a prospective, multicentre, observational cohort study. *J. Antimicrob. Chem.*, 73:2503–2509.

Bolocan, A.S.; Callanan, J.; Forde, A.; Ross, P. and Hill, C. (2016). Phage therapy targeting *Escherichia coli*-a story with no end? *FEMS Microbiol Lett.*, 363(22).

Bonyadian, M.; Barati, S. and Mahzounieh, M. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant in *Escherichia coli* isolates from patients with diarrhea. *Iranian J microbiol.*, 11(3), 220–224.

Bott, R. (2014). Brock Biology of Microorganisms. Igarss. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Boundless, A. (2016). Antibiotic Classifications. Boundless microbiology. -overview-of antimicrobial therapy classifications <https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless>.

Bourgeois, A.; Wierzba, T. and Walker, R. (2016). Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine.*, 34: 2880–2886.

Breijyeh, Z.; Jubeh, B. and Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Mol.*, 25(6):1340.

Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.C.; Morse, S.A. (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 24th Ed. McGraw-Hill Companies, New York.

Bush, N.; Diez-Santos, I.; Abbott, L. and Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Mol.*, 25(23):5662.

Capasso, L.; Borrelli, A.; Cerullo, J.; Pisanti, R.; Figliuolo, C.; Izzo, F.; Paccone, M.; Ferrara, T.; Lama, S. and Raimondi, F. (2014). Role of immunoglobulins in neonatal sepsis. *Transl Med UniS.*, 11:28-33.

Cappuccino, J. G. and Welsh, C.T. (2018). Microbiology: A Laboratory Manual. 11th ed. Pearson Education. England.

Chagas, G.; Melo, L.; Brasão, P.; Silvestre, S.; Guimarães, G. and Lima, A. (2017). Evaluation of biofilm formation by bacterial strains isolated from milking equipment and milk samples from cows with mastitis. *Universidade Estadual de Londrina Londrina*, 38(4):1887-1896.

Chaudhry, S. B.; Veve, M. P. and Wagner, J. L. (2019). Cephalosporins: A Focus on Side Chains and β -Lactam Cross-Reactivity. *Pharmacy (Basel, Switzerland)*, 7(3):103

Cheesbrough, M. (2012). District Laboratory Practice in Tropical Countries. Second edition update (part 2), Cambridge university press: India.

CLSI, (Clinical & Laboratory standards institute). (2019). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing seventeenth informational suppl.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Practical medical microbiology. 14th ed. Longman. Singapore publishers (pet) ltd. Singapore., 363-373.

- Correia, S.;** Poeta, P.; Hébraud, M.; Capelo, J.L. and Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: Where do we stand? *J. Med. Microbiol.*, 66:551–559.
- Dadi, B.;** Abebe, T.; Zhang, L.; Mihret, A.; Abebe, W. and Amogne, W. (2020). Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infec Dis.*, 20(108): 1-12.
- Dawood, W. S.** (2020). Molecular and susceptibility Study of Antibiotic Resistance Genes in *E. coli* Isolated from Selected Iraqi Patients. *Sys Rev Pharm.*, 11(9):214-223.
- Dehkordi, F.;** Tavakoli-Far, B.; Jafariaskari, S.; Momtaz, H.; Esmailzadeh, S.; Ranjbar, R. and Rabiei, M. (2020). Uropathogenic *Escherichia coli* in the high vaginal swab samples of fertile and infertile women: virulence factors, O-serogroups, and phenotyping and genotyping characterization of antibiotic resistance. *New Microb New Infec.*, 38(3).
- Delcaru, C.;** Alexandru, I; Podgoreanu, P.; Grosu, M.; Stavropoulos, E.; Chifiriuc, MC. and Lazar, V. (2016). Microbial Biofilms in Urinary Tract Infections and Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. *Pathogens.*, 5(4):65.
- Delpech, G.;** Allende, N.; Lissarrague, S.; Sparo, M. (2018). Antimicrobial Resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* from Elderly Patients at a General Hospital, Argentina. *Infect Dis J.*, 10: 79-87.
- Despoina, K.;** Elena, X.; Isaac, Y.; Andrew, S.; Drosos, E.; Apostolos, A.; Jeffrey, L. and Sotirios, T. (2019). Novel Antibiotics for Multidrug-Resistant Gram-Positive Microorganisms. *Microorganisms.*, 7(270).

- Destache**, C.J.; Guervil, D.J.; Kaye, K.S. (2019) Ceftaroline fosamil for the treatment of Gram-positive endocarditis: Capture study experience. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 53: 644–649.
- Dhahi**, M. (2020). Sequencing Analysis of Pyelonephritis-Associated Pili Gene of Uro-Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Iraqi Patients-Baghdad. *Biomed Pharma J.*, 13(2):1011-1019.
- Dicks**, L.; Geldenhuys, J.; Mikkelsen, L.; Marcotte, H. (2018) Our gut microbiota: a long walk to homeostasis. *Benef Microbes.*, 9: 3–20.
- Drlica**, K.; Zhao, X.; Malik, M.; Hiasa, H.; Mustaev, A.; Kerns, R. (2019). Fluoroquinolone Resistance. In *Bacterial Resistance to Antibiotics from Molecules to Man*; Bonev, B.B., Brown, N.M., Eds.; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA, pp. 125–161.
- Dugassa**, J. and Shukuri, N. (2017). Review on antibiotic resistance and its mechanism of development. *J. Heal. Med. Nurs.*, 3(1):1-17.
- Dunne**, K.; Chaudhuri, R.; Rossiter, A.; Beriotto, I.; Douglas, F.; Browning, D.; Squire, D.; Cunningham, A.; Cole, J.; Loman, N. and Henderson, I. (2017). Sequencing a piece of history: complete genome sequence of the original *Escherichia coli* strain. *Microbial Gen.*, 3(3).
- Eberly**, R.; Floyd, A.; Beebout, J.; Colling, J.; Fitzgerald, J.; Stratton, W.; Schmitz, E. and Hadjifrangiskou, M. (2017) Biofilm Formation by Uropathogenic *Escherichia coli* Is Favored under Oxygen Conditions That Mimic the Bladder Environment. *Int J Mol Sci.*, 18(10): 2077
- Ehtisham**, M.; Wani, F.; Wani, I.; Kaur, P. and Nissar, S. (2016). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bas Indian J Con. Den.*, 2(4):30-35.
- Eljaaly**, K.; Alshehri, S.; Erstad, B.L. (2018) Systematic Review and Meta-analysis of the Safety of Antistaphylococcal Penicillins Compared to Cefazolin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 62.
- El-Shorbagi**, A. and Chaudhary, S. (2019). Monobactams: A Unique Natural Scaffold of Four-Membered Ring Skeleton, Recent Development

to Clinically Overcome Infections by Multi drug Resistant Microbes. *Let Drug Des Dis.*,16(12).

Estrada, A.; Wright, L. and Anderson, C. (2016). Antibacterial antifolates: from development through resistance to the next generation. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 6(8).

Etebu, E. and Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *IJAMBR* 4 :90-101

Faner, R.; Sibila, O.; Agustí, A.; Bernasconi, E. and James, D. (2017). The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives. *Eur Respir J.* 49 (4).

Fatima, R. and Aziz, M. Enterohemorrhagic Escherichia Coli. 2021 Jan 22. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls.

Flores-Mireles, A.; Walker, J.; Caparon, M. and Hultgren, S. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev. Microbiol.*, 13(5):269–284.

Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A. S. (2007). Bailey and Scott, S. Diagnostic Microbiology, 12th ed. Mosby. inc, U.S.A.

Gillespie, S.H. (2016). The role of moxifloxacin in tuberculosis therapy. *ERR.*, 25:19–28.

Grada, A. and Weinbrecht, K. (2013). Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *J Inv Derm.*, 133.

Hall, C.W. and Mah, T.F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*, 41(3):276–301.

Heather, J. and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.*, 107: 1–8.

Hassan, R.; Tantawy, M.; Gouda, N.A; Elzayat, M.G; Gabra, S.; Nabil, A.; Diab, A.; EI_Hadidi, M.; Bakry, U.; Shoeb, M.R.; Elanany, M.; Shalaby,

L. and Sayed, A. (2020). Genotypic characterization of multiple drug resistant *Escherichia coli* isolates from a pediatric cancer hospital in Egypt. *Sci Rep.*, 10(4165).

Hemraj, V.; Diksh, S. and AVNEET, G. (2013). A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare.J.Life.Scie.* ,1(1).

Herold, R.; Schrotten, H.; Schwert, C. (2019). Virulence Factors of Meningitis-Causing Bacteria: Enabling Brain Entry across the Blood–Brain Barrier. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(5393).

Hogan, C.; Watz, N.; Budvytiene, I. and Banaei, N. (2019). Rapid antimicrobial susceptibility testing by VITEK®2 directly from blood cultures in patients with Gram-negative rod bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis.*,94(2):116-121

Holmes, A; Moore, L; Sundsfjord, A.; Steinbakk, M.; Regmi, S.; Karkey, A.; Guerin, P.; Piddock, L. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet.*, 387(10014):176-87.

Hooper, D.C. and Jacoby, G.A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* ,1354:12-31.

Hoseini, N.; Sedighi, I.; Mozaffari, N.; Amir, S. and Alikhani, M. (2017). Phenotypic and genotypic detection of ampc enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae*. *JKIMSU.*, 3(6):10-18.

Houssin, T.; Cramer, J.; Grojsman, R.; Bellahsene, L.; Colas, G.; Moulet , H.; Minnella, W.; Pannetier, C.; Leberre, M.; Plecis, A. and Chen, Y. (2016). Ultrafast, sensitive and large-volume on-chip real-time PCR for the molecular diagnosis of bacterial and viral infections. *Lab Chip.*, 16:1401–11.

Igwe, C.; Musa, A.; Olayinka, O.; Ehnimidu, J. and Onaolapo, J. (2015). Tetracycline Resistant Genes in *E. coli* Isolated from UTI and Diarrhea Patients in Zaria, Nigeria. *Clin Microbiol.*, 4(225).

- Jahandeh**, N.; Ranjbar, R.; Behzadi, P. and Behzadi, E. (2015). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes. *Cent European J Urol.*, 68(4):452-458.
- Jang**, J.; Hur, H.; Sadowsky, M.; Byappanahalli, M.; Yan, T. and Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J. App. Microbiol.*, 123: 570-581.
- Jiang**, H.; Cheng, H.; Liang, Y.; Yu, S.; Yu, T.; Fang, J. and Zhu, C. (2019). Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* Isolates from *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Fron microbiol.*, 10(1787).
- Kabiru**, L.; Bello, M.; Kabir, J.; Grande, L. and Morabito, S. (2015). Detection of Pathogenic *Escherichia coli* in Samples Collected at an Abattoir in Zaria, Nigeria and at Different Points in the Surrounding Environment. *Int. J. Environ. Res. Pub Heal.*, 12: 679-691.
- Kalil**, A.; Metersky, M.; Klompas, M.; Muscedere, J.; Sweeney, D.; Palmer, L.; Napolitano, L.; O’Grady, N.; Bartlett, J.; Carratala, J.; El Solh, A.; Ewig, S.; Fey, P.; File, T.; Restrepo, M.; Roberts, J.; Waterer, G.; Cruse, P.; Knight, S. and Brozek, J. (2016). Management of Adults with Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin. Infect. Dis.* 63:61–111.
- Karigoudar**, R.; Karigoudar, M.; Wavare, S. and Mangalgi, S. (2019). Detection of biofilm among uropathogenic *Escherichia coli* and its correlation with antibiotic resistance pattern. *J Lab Phys.*, 11(17).
- Karim**, K.; Madan, L.; Boldura, O.; Baltă, C. and Enany, S. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications, Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science, IntechOpen, eBook (PDF) ISBN: 978-1-78985-329-2.

- Karami**, N.; Nowrouzian, F.; Adlerberth, I. and Wold, A. (2006). Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* and Persistence in the Infantile Colonic Microbiota. *Antimicrob agent chem.*, 50(1):156-161.
- Kapoor**, G.; Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J anaes. Clin. Pharm.*, 33(3): 300–305.
- Kerkeni**, L.; Ruano, P.; Delgado, L.; Picco, S.; Villegas, L.; Tonelli, F.; Merlo, M.; Rigau, J.; Diaz, D. and Masuelli, M. (2016). We are IntechOpen, the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP. *Intech, tourism*, 13.
- Kim**, K.:(2016). Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7(1).
- Knudsen**, B.E.; Bergmark, L.; Munk, P.; Lukjancenko, O.; Prieme, A.; Aarestrup, F.; and Pamp, S. (2016). Impact of Sample Type and DNA Isolation Procedure on Genomic Inference of Microbiome Composition. *Appl Environ Sci.*, 1(5).
- Kose**, H. and Yapar, N. (2017). The comparison of various disinfectant efficacy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers. *Turk. J. Med. Sci.*, 47:1287-1294.
- Krause**, K.; Serio, A.; Kane, T. and Connolly, L. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.*, 6(6).
- Kudinha**, T. (2017). Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications chapter three. Published [popathogenic *Escherichia coli*. *Polish J microbiol.*, 68:403-415.

Kusumoto, F.; Schoenfeld, M.; Wilkoff, B.; Berul, C.; Birgersdotter-Green, U.; Carrillo, R.; Cha, Y.; Clancy, J.; Deharo, J.; Ellenbogen, K.; Hussein, A.; Kennergren, C.; Krahn, A.; Lee, R.; Love, C.; Madden, R.; Mazzetti, H.; Moore, J.; Parsonnet, J.; Patton, K.; Rozner, M.; Selzman, K.; Shoda, M.; Srivathsan, K.; Strathmore, N.; Swerdlow, C.; Tompkins, C. and Wazni, O. (2017) HRS expert consensus statement on cardiovascular implantable electronic device lead management and extraction. *Heart Rhythm.*,14:503–551.

Larson, D. (2015). Clinical chemistry: Fundamentals and Laboratory techniques, Elsevier Health Sciences, UK.

Leung, A.; Wong, A.; Leung, A. and Hon, K. (2019). Urinary Tract Infection in Children. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.*,13(1):2-18.

Li, M.; Liu, Q.; Teng, Y.; Ou, L.; Xi, Y.; Chen, S. and Duan, G. (2019). The resistance mechanism of Escherichia coli induced by ampicillin in laboratory. *Infect Drug Resis.*, 12:2853-2863.

Liu, B.; Furevi, A.; Perepelov, A.; Guo, X.; Cao, H.; Wang, Q.; Reeves, P.; Knirel, Y.; Wang, L. and Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of Escherichia coli O antigens. *FEMS Microbiol Rev.*, 44: 655–683.

Lo, Y.; Zhang, L.; Foxman, B. and Zöllner, S. (2015). Whole-genome sequencing of uropathogenic Escherichia coli reveals long evolutionary history of diversity and virulence. *Infect Genet Evol.*, 34:244-250.

Loconsole, D.; Giordano, M.; Centrone, F.; Accogli, M.; Casulli, D.; Robertis, A.; Morea, A.; Quarto, M.; Parisi, A.; Scavia, G. and Chironna, M. (2020). Epidemiology of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infections in Southern Italy after Implementation of Symptom-Based Surveillance of Bloody Diarrhea in the Pediatric Population. *Int. J. Environ. Res. Pub Heal.*,17(5137).

- MacDougall, C.** (2017). Penicillins, Cephalosporins, and Other β -Lactam Antibiotics. In: Brunton L.L., Hilal-Dandan R., Knollmann B.C., editors. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. McGraw-Hill Education; New York, NY, USA.
- Mackeen, A.; Packard, R.; Ota, E.; and Speer, L.** (2015) Antibiotic regimens for postpartum endometritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2.
- Marston, H.; Dixon, D.; Knisely, J.; Palmore, T.N. and Fauci, A.S.** (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA*, 316(11):1193–1204.
- McDanel, J.S.; Roghmann, M.C.; Perencevich, E.N.; Ohl, M.E.; Goto, M.; Livorsi, D.J.; Jones, M.; Albertson, J.P.; Nair, R.; O'Shea, A.M; Schweizer, M.** (2017). Comparative Effectiveness of Cefazolin Versus Nafcillin or Oxacillin for Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections Complicated by Bacteremia: A Nationwide Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.*, 65: 100–106.
- McLellan, L. and Hunstad, D.** (2016). Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. *Trends Mol Med.*, 22(11):946–957.
- Mehrad, B.; Clark, N.; Zhanel, G. and Lynch, J.P.** (2015). Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Chest.*, 147:1413-1421.
- Merck & Co.** (2018) Inc.: Syracuse, NY, USA.
- Merino, S.; Gonzalez, V. and Tomas, J.** (2016). The first sugar of the repeat ' units is essential for the Wzy polymerase activity and elongation of the O-antigen lipopolysaccharide. *Future Microbiol.*, 11:903–918.
- Mittal, S.; Sharma, M. and Chaudhary, U.** (2015) Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathog Glob Health.*, 109: 26– 29.

Momtaz, H.; Rahimi, E. and Moshkelani, S. (2012). Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E. Coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. *Veterinárni medicína.*, 57: 193-197.

Mohammad, K.; Ahmed, Z.; Mohammed, B. and Saeed, R. (2018). Determination the site of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated From Urinary Tract Infection. *Kur J Appl Res.*, 3(2) :6-12.

Monroy-Pérez, E.; Ceroón, A.; García Corte's, L.; Alonso, N.; Domínguez-Trejo, P.; HernándezJaimes, T.; Bustos-Martinez, J.; Hamdan-Partida, A.; Rojas Jimenez, E.; Vaca, S.; Vaca-Paniagua, F. and Paniagua-Contreras, G. (2020). Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic *E. coli* in Mexico. *PLoS ONE.*, 15(6).

Munkhdelger, Y.; Gunregjav, N.; Dorjpurev, A.; Nishi Juniichiro, N. and Jav Sarantuya, J. (2017). Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *J Infect Dev Ctries.*, 11(1):51-57.

Nakamura, Y.; Yamamoto, N.; Kino, Y.; Yamamoto, N.; Kamei, S.; Mori, H.; Kurokawa, K. and Nakashima N. (2016). Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 7263–7279.

Nagamatsu, K.; Hannan, T.; Guest, R.; Kostakioti, M.; Hadjifrangiskou, M.; Binkley, J.; Dodson, K.; Raivio, T. and Hultgren S. (2015). Dysregulation of *Escherichia coli* alpha-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112:871–880.

- Nair**, R. R.; Vasse, M.; Wielgoss, S.; Sun, L.; Yu, Y. N. and Velicer, G. J. (2019). Bacterial predator-prey coevolution accelerates genome evolution and selects on virulence associated prey defences. *Nature Comm.*, 10 (4301).
- Ndagi**, U.; Falaki, A.; Abdullahi, M.; Lawald, M. and Soliman, M. (2020). Antibiotic resistance: bioinformatics-based understanding as a functional strategy for drug design, *RSC Adv.*, 10: 18451–18468.
- Nicolle**, L.; Gupta, K.; Bradley, S.F.; Colgan, R.; DeMuri, G.P.; Drekonja, D.; Eckert, L.; Geerlings, S.; Koves, B.; Hooton, T.; Juthani-Mehta, M.; Knight, S.; Saint, S.; Schaeffer, A.; Trautner, B.; Wullt, B. and Siemieniuk, R. (2019). Clinical Practice Guideline for the Management of Asymptomatic Bacteriuria: 2019 Update by the Infectious Diseases Society of Americaa. *Clin. Infect. Dis.*, 58 (5).
- Nouri**, G. S. and Hamidi, S.V. (2017). Patterns of Efflux Pump Genes Among Tetracycline Resistance Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates Obtained From Human Urinary Infections, *Jundishapur J Microbiol.*, 10(2):40884.
- Obeed**, N. and Dhahi, M. (2020). The Role of Mutation and Gene Expression Level of marRAB operon in Multi Antibiotic Resistance uropathic *Escherichia coli* and 0157:H7 isolates from patients in Baghdad. *J. Pharm. Sci. Res.*, 12(3):365-374
- O'Brien**, V. P.; Hannan, T. J.; Nielsen, H. V., and Hultgren, S. J. (2016). Drug and vaccine development for the treatment and prevention of urinary tract infections. *Microbiol Spectr.*, 4(42).
- Okarska-Napierała**, M.; Wasilewska, A. and Kuchar, E. (2017). Urinary tract infection in children: Diagnosis, treatment, imaging - Comparison of current guidelines. *J Ped Urol.*, 13(10).

Olowe, O.; Idris, O. and Taiwo, S. (2013). Prevalence of *tet* genes mediating tetracycline resistance in *Escherichia coli* clinical isolates in Osun State, Nigeria. *Eur J Microbiol Immunol.*, 3(2):135-140.

Pachori, P.; Gothwal, R. and Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Gen dis.*, 6(2):109.

Parikumsil, N.; Prapasawat, W.; Siriphap, A.; Chonsin, K.; Theethakaew, C.; Sukolrattanamaetee, N.; Ratchatanapha, D.; Siripanichgon, K. and Suthienkul, O. (2017). Virulence factors and molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from paired urine and rectal swab samples of patients with urinary tract infection in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, 48 (5):1029-1041.

Pasqua, M.; Michelacci, V.; Di Martino, M.; Tozzoli, R.; Grossi, M; Colonna, B.; Morabito, S. and Prosseda G. (2017). The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Front Microbiol.*, 5(8):2390.

Passarelli-Araujo, H.; Palmeiro, J.; Moharana, K.; Pedrosa-Silva, F.; Dalla-Costa, L. and Venancio, T. (2019). Molecular epidemiology of 16S rRNA methyltransferase in Brazil: RmtG in *Klebsiella aerogenes* ST93 (CC4). *An Acad Bras Cienc.*, 91(1).

Pedersen, S.; Hoiby, N.; Espersen, F. and Koch, C.H. (2018). Role of alginate in infection with Muroid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. 47 (1):6-13.

Polse, R.; Yousif, S.; Assafi, M. (2016). Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of uropathogenic *E. coli* among people in Zakho, Iraq. *Int J Res Med Sci.*, 4:1219-1223.

Poursina, F.; Sepehrpour, S. and Mobasherizadeh, S. (2018). Biofilm Formation in Nonmultidrug-resistant *Escherichia coli* Isolated from

Patients with Urinary Tract Infection in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res.*, 27(7):40.

Procop, G.; Church, D.; Hall, G.; Janda,W.; Koneman, E.; Schreckenberger, P. and Woods, G.(2017). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th ed. Wolters Kluwer Health, Philadelphia.

Quan, P.; Sauzade, M. and Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review., 18(1271).

Raeispour, M. and Ranjbar, R. (2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *antimicrob Resist Infect Control.*, 7.

Ranjbar, R.; Behzadi, P.; and Behzadi, E. (2015). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes. *Cent European J Urol.*, 68(4):452-458.

Rehman, M.; Zhang, H.; Huang, S.; Iqbal, M.; Mehmood, K.; Luo, H. and Li, J. (2017). Characteristics of Integrins and Associated Gene Cassettes in Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Free-Ranging Food Animals in China. *J Food Sci.*, 82(8):1902-1907.

Reygaert , W. (2016). Antimicrobial Mechanisms of *Escherichia coli*. *Adv Clin Med Microbiol.*, 2:1-11

Ranjini, C.; Kasukurthi, L.; Madhumati, B. and Rajendran, R. (2015). Prevalence of multidrug resistance and extended spectrum beta-lactamases among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in a tertiary care hospital in South India: an alarming trend. *Communit Acquired Infect.*, 2(19).

Riedel, S.; Morse, S.; Mietzer, T. and, Miller, S. (2019). Entric Gram-Negative Rods (Enterobacteriaceae). In: Jawetz, Melinick and Adelbergs Medical Microbiology, 28th. Ed. A lange medical book.

- Rojas-Lopez, M.;** Monterio, R.; Pizza, M.; Desvaux, M. and Rosini, R. (2018). Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. *Front. Microbiol.*, 9(440).
- Robino, L.;** Gonzalez, M.; Radio, G.; Gomez, V. and Scavone, P. (2018). Fosfomycin trometamol activity on biofilm and intracellular bacterial communities produced by Uropathogenic *E. coli* isolated from patients with Urinary tract infection. *Int. J Infect Dis.*, 73: 3–398.
- Rubab, M. and Oh, D.** (2021). Molecular Detection of Antibiotic Resistance Genes in Shiga Toxin Producing *E. coli* Isolated from Different Sources. *Antibiotics.*, 10(344).
- Saeed, C.;** Kamal, I.; AL Otrachi, K. and Mansoor, I. (2015). Prevalence of urinary tract infections and antibiotics susceptibility pattern among infants and young children in Erbil city. *Zanco J. Med. Sci.*, 19 (1).
- Sahra, K.** (2019). The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents, Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods, Sahra Kirmusaoğlu, IntechOpen.
- Sakoulas, G.;** Geriak, M. and Nizet, V. (2019). Is a Reported Penicillin Allergy Sufficient Grounds to Forgo the Multidimensional Antimicrobial Benefits of β -Lactam Antibiotics?. *Clinic infect dis: office pub Infect Dis Soci America.*, 68(1):157–164.
- Sastry, A.S. and Bhat S.K.** (2016). Essentials of Medical Microbiology. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, India.
- Saxena, N.;** Maheshwari, D.; Dadhich, D. and Singh, S. (2014). Evaluation of Congo Red Agar for Detection of Biofilm Production by Various Clinical Candida Isolates. *J Evol Med Den Sci.*, 59 (3):1-6.
- Scaletsky, I.C.** (2019). Enteropathogenic *Escherichia coli*, The Universe of *Escherichia coli*, IntechOpen.

Shah, C.; Baral, R.; Bartaula, B. and Shrestha, L. (2019). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbio.*,19(204).

Shane, A.; Mody, R.; Crump, J.; Tarr, P.; Steiner, T.; Kotlo, K.; Langley, J.; Wanke, C.; Warren, C.; Cheng, A.C.; Cantey, J.; Pickering, L. (2017). Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin. Infect. Dis.*, 65: 1963–1973.

She, P.; Wang, Y.; Liu, Y.; Tan, F.; Chen, L.; Luo, Z. and Wu, Y. (2019). Effects of exogenous glucose on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *Microbiol open.*, 8(12):933.

Singh, P.; Verma, N.; Kumar, P. and Nagu, P. (2018). Review on a potential of antibiotics, *J Drug Del Therap.*, 8(5):35-40.

Skocková, A.; Cupáková, Š.; Karpíšková, R. and Janštová B. (2012). Detection of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* from raw cow's milk. *J Microbiol, Biotechnol Food Scil.*, 1: 777–784.

Spaulding, C. and Hultgren, S. (2016). Adhesive pili in UTI pathogenesis and drug development. *Pathogens.*, 5(18).

Stein, R.; Dogan, H.; Hoebeke, P.; Koc̣vara, R.; Nijman, R. and Radmayr, C. (2015). Urinary Tract Infections in Children: EAU/ESPU Guidelines. *EUR UROL.*, 67: 546–558.

Sturbelle, R.T; Avila, L.; Roos, T.; Borchardt, J.; de Cássia, D.; Conceição, R.; Dellagostin, O. and Leite, F. (2015). The role of

Subhadra, B.; Kim, D.; Kim, J.; Woo, K.; Sohn, K.; Kim, H.; Han, K.; Oh, M. and Choi, C. (2018). Complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli* isolate UPEC26-1. *Gen Genom.*,40(6):643-655.

quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. *Vet Microbiol.*, 18:245– 252

- Supuran, C.** (2017). Carbonic Anhydrase Inhibition and the Management of Hypoxic Tumors. *Metabolites.*, 7(3):48.
- Spyridon, A.; Nikolaos, C. and Gerrit, E.** (2019). A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Appl. Sci.*, 9(2801).
- Tabasi, M.; Karam, M.; Habibi, M.; Yekaninejad, M. and Bouzari, S.** (2015). Phenotypic assays to determine virulence factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern. *Osong pub health and Res pers.*, 6(4):261–268.
- Taplitz, R.; Kennedy, E.; Bow, E.; Crews, J.; Gleason, C.; Hawley, D.; Langston, A.; Nastoupil, L.; Rajotte, M.; Rolston, K.; Strasfeld, L. and Flowers, C.** (2018). Antimicrobial Prophylaxis for Adult Patients with Cancer-Related Immunosuppression: ASCO and IDSA Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.*, 36:3043–3054.
- Terlizzi, M.; Gribaudo, G. and Maffei, M.** (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front. Microbiol.*, 8(1566).
- Tewawong, N.; Kowaboot, S.; Pimainog, Y.; Watanagul, N.; Thongmee, T. and Poovorawan, Y.** (2020). Distribution of phylogenetic groups, adhesin genes, biofilm formation, and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Thailand. *PeerJ.* 8(10453).
- Till, P.** (2015). Baileyand Scotts Diagonstic Microbiology-E-book: Elsvier Health Sciences.
- Torkana, S.; Bahadoranianb, M.; Khamesipourc, F. and Anyanwud, M.** (2016). Detection of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from diarrhoiec dogs in Iran. *Arch Med Vet.*, 48: 181-190.

- Tunkel, A.;** Hasbun, R.; Bhimraj, A.; Byers, K.; Kaplan, S.; Scheld, W.; Beek, D.; Bleck, T.; Garton, H. and Zunt, J. (2017). Infectious Diseases Society of America's Clinical Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. *Clin Infect Dis.*, 64(6):34-65.
- Tullus, K.** (2019). Fifteen-minute consultation: why and how do children get urinary tract infections? Arch Dis Child Educ Pract Ed.
- Vandepitte, J.;** Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck, C. C. (2003). Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology. 2nd. World Health Organization Geneva. pp109- 120.
- Wassenaar, T.** (2016). Insights from 100 Years of Research with Probiotic *E. Coli*. *Eur J Microbiol Immunol.*, 6 (3): 147–161.
- WHO** (World Health Organization). (2003). Basic Laboratory procedures in clinical Bacteriology. 2nd ed. Geneva, Switzerland.
- Wook, Y.;** Mi-Kyung, L. and Wonyong, K. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli* ST131 in urinary tract infections in children. *Korean J Pediatr.*, 60:221-226.
- Yazdi, M.;** Bouzari, M.; Ghaemi, EA. (2018) Detection of *fim*, *pap*, *sfa* and *afa* Adhesin-Encoding Operons in *Escherichia coli* Strains Isolated from Urinary Tract Infections. *mljgoums.*, 12(5):10-15.
- Yousef, F.;** Mansour, O. and Herbali, J. (2018). Sulfonamides: Historical Discovery Development (Structure-Activity Relationship Notes). 1(1):1-15.
- Yousefi, A.** and Saam Torkan, S. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli* in the Urine Samples of Iranian Dogs: Antimicrobial Resistance Pattern and Distribution of Antibiotic Resistance Genes". *BioMed Res Int.*, 1-10.
- Yun, K.;** Lee, M.; Kim, W. and Lim, I. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli* ST131 in urinary tract infections in children. *Korean J Pediatr.*, 60(7):221-226.

Yung, H.; Tsongalis, G. and Lefferts, J. (2017). Development of HLA-B*57:01 Genotyping Real-Time PCR with Optimized Hydrolysis Probe Design. *J Mol Diagn.*,19:742–754.

Yuson, C.; Kumar, K.; Le, A.; Ahmadie, A.; Banovic, T.; Heddle, R.; Kette, F.; Smith, W.; Hissaria, P. (2019). Immediate Cephalosporin Allergy. *Intern. Med. J.*, 49(8):985-993.

Zamani, H. and Salehzadeh, A. (2018). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. *Turk J Med Sci.*, 48:162-167.

Zibandeh, S.; Sharifiyazdi, H.; Asasi, K. and Abdi-Hachesoo, B. (2016). Investigation of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from broiler chickens during a rearing period in Iran. *Veterinarski Arhiv*, 86(4);565-572.

ملحق (1): معلومات المرضى من ناحية الجنس والعمر

ت	العمر	الجنس
1	2 سنة	اثنى
2	يوم	ذكر
3	2 سنة	اثنى
4	5 سنوات	اثنى
5	12 سنة	اثنى
6	8 سنوات	ذكر
7	7 سنوات	اثنى
8	7 اشهر	اثنى
9	2 شهر	اثنى
10	6 اشهر	ذكر
11	5 سنوات	اثنى
12	4 سنوات	اثنى
13	11 سنوات	اثنى
14	7 سنوات	ذكر
15	9 لشهر	اثنى
16	8 سنوات	اثنى
17	6 سنوات	ذكر
18	سنة	اثنى
19	8 سنوات	اثنى
20	10 سنوات	اثنى
21	5 سنوات	اثنى
22	9 سنوات	اثنى
23	6 سنوات	اثنى
24	5 سنوات	اثنى
25	9 سنة	اثنى
26	2 سنة	اثنى
27	6 سنوات	ذكر
28	شهر	اثنى

29	8 سنوات	انثى
30	9 اشهر	انثى
31	10 سنوات	انثى
32	اسبوعين	انثى
33	11 شهر	انثى
34	3 سنوات	انثى
35	7 اشهر	انثى
36	3 اسبوع	انثى
37	10 سنوات	ذكر
38	سنة	انثى
39	9 سنة	ذكر
40	12 سنة	انثى

ملحق (2): تشخيص البكتريا بجهاز الفايثك

Identification Information		Card: GN		Lot Number: 2411143203		Expires: Jan 12, 2021 12:00 CST											
		Completed: Sep 12, 2020 03:09 CDT		Status: Final		Analysis Time: 4.60 hours											
Organism Origin		VITEK 2															
Selected Organism		98% Probability		Escherichia coli													
		Bionumber: 0405610570526611		Confidence: Excellent identification													
SRF Organism																	
Analysis Organisms and Tests to Separate:																	
Analysis Messages:																	
Contraindicating Typical Biopattern(s)																	
Escherichia coli dTAG(22),																	
Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

ملحق (3): فحص الحساسية للمضادات بواسطة الفايتهك

Identification Information		Analysis Time:	4.60 hours	Status:	Final
Selected Organism		98% Probability	Escherichia coli		
ID Analysis Messages		Bionumber:	0405610570526611		

Susceptibility Information		Analysis Time: 7.78 hours		Status: Final	
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
ESBL	POS	+	Imipenem	<= 0.25	S
Ampicillin	>= 32	R	Amikacin	8	S
Piperacillin/Tazobactam	8	S	Gentamicin	8	I
Cefazolin	>= 64	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Cefoxitin	<= 4	S	Levofloxacin	>= 8	R
Ceftazidime	16	R	Tigecycline	<= 0.5	S
Ceftriaxone	>= 64	R	Nitrofurantoin	<= 16	S
Cefepime	8	*R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R
Ertapenem	<= 0.5	S			

*= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE
	AMINOGLYCOSIDES	RESISTANT GEN TOB NET AMI

ملحق (4): مقاومة المضادات الحيوية لكل عزلات بكتريا *E.coli*

Bacterial code Antibiotic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Amp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TZP	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
CFZ	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
FOX	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S
CAZ	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
CRO	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
FEP	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
ETP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
AK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
GN	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
CIP	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R
LVX	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R
TG	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NIT	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TRI/SUL	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
ATM	R	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S
TOR	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
AZM	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S
TE	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S
DOX	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S
S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TCC	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
CPD	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S

Bacterial code Antibiotic	14	15	16	1 7	18	19	2 0	21	22	2 3	24	25	26
Amp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TZP	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	R
CFZ	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
FOX	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	I	R
CAZ	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
CRO	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
FEP	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
ETP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
AK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
GN	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	R	R
CIP	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S
LVX	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S
TG	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NIT	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TRI/SUL	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R
ATM	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R
TOR	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AZM	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S
TE	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R
DOX	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TCC	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CPD	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S

Bacterial code Antibiotic	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Amp	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R
TZP	R	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
CFZ	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R
FOX	R	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
CAZ	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R
CRO	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S
FEP	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S
ETP	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
AK	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S
GN	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R
CIP	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
LVX	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
TG	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R
NIT	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
TRI/SUL	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R
ATM	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R
TOR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
AZM	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S
TE	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R
DOX	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
C	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
TCC	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
CPD	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R

ملحق (5): يوضح التحليل التتابعي للجين *sul1*

\\

Escherichia coli strain EcPF5 plasmid p1, complete sequence

Sequence ID: [CP054237.1](#) Length: 131660 Number of Matches: 1Range 1: 42404 to 42844 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
809 bits(438)	0.0	440/441(99%)	0/441(0%)	Plus/Plus
CDS: Putative 1	1	A A I E M L R V G S D V V D V G P A A S		
Query	1	GCGGCGATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTCGGACCGGCCGCCAGC	60	
Sbjct	42404			42463
CDS:sulfonamide-resi	30	A A I E M L R V G S D V V D V G P A A S		
CDS: Putative 1	21	H P D A R P V S P A D E I R R I A P L L		
Query	61	CATCCGGACGCGAGGCCGTGATCGCCGGCCGATGAGATCAGACGTATTGCGCCGCTCTTA	120	
Sbjct	42464			42523
CDS:sulfonamide-resi	50	H P D A R P V S P A D E I R R I A P L L		
CDS: Putative 1	41	D A L S D Q M H R V S I D S F Q P E T Q		
Query	121	GACGCCCTGTCCGATCAGATGCACCGTGTTCATCGACAGCTTCAACCGGAAACCCAG	180	
Sbjct	42524			42583
CDS:sulfonamide-resi	70	D A L S D Q M H R V S I D S F Q P E T Q		
CDS: Putative 1	61	R Y A L K R G V G Y L N D I Q G F P D P		
Query	181	CGCTATGCGCTCAAGCGCGGCTGGGCTACCTGAACGATATCCAAGGATTTCCTGACCT	240	
Sbjct	42584			42643
CDS:sulfonamide-resi	90	R Y A L K R G V G Y L N D I Q G F P D P		
CDS: Putative 1	81	A L Y P D I A E A D C R L V V M H S A Q		
Query	241	GCGCTCTATCCCGATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGGTTATGCACTCAGCGCAG	300	
Sbjct	42644			42703
CDS:sulfonamide-resi	110	A L Y P D I A E A D C R L V V M H S A Q		
CDS: Putative 1	101	R D G I A T R T G H L R P E D A L D E I		
Query	301	CGGGATGGCATCGCCACCCGACCGGTACCTTCGACCCGAAGACGCGCTCGACGAGATT	360	
Sbjct	42704			42763
CDS:sulfonamide-resi	130	R D G I A T R T G H L R P E D A L D E I		
CDS: Putative 1	121	V R F F E A R V S A L R R S G V A A D R		
Query	361	GTGCGGTTCTTCGAGGCGGGGTTTCGCTTTCGACGAGCGGGGTCGCTGCCGACCGG	420	
Sbjct	42764			42823
CDS:sulfonamide-resi	150	V R F F E A R V S A L R R S G V A A D R		
CDS: Putative 1	141	L I L N P G M		
Query	421	CTCATCCTCAATCCGGGGATG	441	
Sbjct	42824	G.....	42844	
CDS:sulfonamide-resi	170	L I L P G M		

ملحق (6): يوضح التحليل التتابعي للجين tetA

Escherichia coli strain EcPF40 plasmid p1, complete sequence

Sequence ID: CP054215.1 Length: 89178 Number of Matches: 1

Range 1: 38969 to 39329 [GenBank](#) [Graphics](#)[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
645 bits(349)	0.0	357/361(99%)	0/361(0%)	Plus/Minus
CDS: Putative 1	1	G A S F G L G L I A G P I I G G F A G E		
Query	1	GGGGCAAGTTTGGGCTTGGTTAATAGCGGGCCTATTATTGGTGGTTTGCAGGAGAG	60	
Subjct	39329			39270
CDS:tetracycline eff	135	G A S F G L G L I A G P I I G G F A G E		
CDS: Putative 1	21	I S P H S P F F I A A L L N I V A F L V		
Query	61	ATTCACCGCATAGTCCCTTTTATCGCTGCGTTGCTAAATATTGCGCTTCCTTGTG	120	
Subjct	39269			39210
CDS:tetracycline eff	155	I S P H S P F F I A A L L N I V A F L V		
CDS: Putative 1	41	V M F W F R E T K N T R D N T D T E V G		
Query	121	GTTATGTTTGGTCCGTGAAACAAAAATACACGTGATAACAGATACCGAAGTAGGG	180	
Subjct	39209	C.....		39150
CDS:tetracycline eff	175	V M F W F R E T K N T R D N T D T E V G		
CDS: Putative 1	61	V E T Q S N S V Y I T L F K T M P I L L		
Query	181	GTTGAGACGCAATCGAATTCGGTATACATCACTTTATTTAAACGATGCCCATTTTGTG	240	
Subjct	39149			39090
CDS:tetracycline eff	195	V E T Q S N S V Y I T L F K T M P I L L		
CDS: Putative 1	81	I I Y F S A Q L I G Q I P A T V W V L F		
Query	241	ATTATTTATTTTCAGCGCAATTGATAGGCCAAATCCCGCAACGGTGTGGTGCTGTT	300	
Subjct	39089	A.....		39030
CDS:tetracycline eff	215	I I Y F S A Q L I G Q I P A T V W V L F		
CDS: Putative 1	101	T K N R F G W N S M M V G F S L A G L G		
Query	301	ACCAAAAAATCGTTTGGATGGAATAGCATGATGGTGGCTTTTCATTAGCGGGCCTTGGT	360	
Subjct	39029	...G.....T.....		38970
CDS:tetracycline eff	235	T E N R F G W N S M M V G F S L A G L G		
Query	361	C 361		
Subjct	38969	. 38969		

ملحق (7): يوضح التحليل التتابعي للجين *tetB*

Escherichia coli strain AH62 plasmid pAH62-3, complete sequence

Sequence ID: [CP055262.1](#) Length: 136694 Number of Matches: 2Range 1: 81549 to 81919 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
680 bits(368)	0.0	370/371(99%)	0/371(0%)	Plus/Plus
CDS: Putative 1	1	A P V L G A L S D R F G R R P V L L V S		
Query	1	CGCACCTGTGCTGGGCGCGTGTGCGATCGTTTCGGGCGGCGCCGGTCTTGCTCGTCTC		60
Subjct	81549			81608
CDS:tetracycline eff	60	A P V L G A L S D R F G R R P V L L V S		
CDS: Putative 1	21	L A G A A V D Y A I M A T A P F L W V L		
Query	61	GCTGGCCGGCGCTGCTGCGACTACGCCATCATGGCGACGGCGCCTTTCCTTTGGGTCT		120
Subjct	81609			81668
CDS:tetracycline eff	80	L A G A A V D Y A I M A T A P F L W V L		
CDS: Putative 1	41	Y I G R I V A G I T G A T G A V A G A Y		
Query	121	CTATATCGGGCGGATCGTGGCCGCGATCACCAGGGCGACAGGGCGGTAGCCGGCGCTTA		180
Subjct	81669	T.....		81728
CDS:tetracycline eff	100	Y I G R I V A G I T G A T G A V A G A Y		
CDS: Putative 1	61	I A D I T D G D E R A R H F G F M S A C		
Query	181	TATTGCCGATACACTGATGGCGATGAGCGCGCGGCACTTCGGCTTCATGAGCGCCTG		240
Subjct	81729			81788
CDS:tetracycline eff	120	I A D I T D G D E R A R H F G F M S A C		
CDS: Putative 1	81	F G F G M V A G P V L G G L M G G F S P		
Query	241	TTTCGGGTTCCGGATGGTCGCGGGACCTGTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGGTTTCTCCCC		300
Subjct	81789			81848
CDS:tetracycline eff	140	F G F G M V A G P V L G G L M G G F S P		
CDS: Putative 1	101	H A P F F A A A A L N G L N F L T G C F		
Query	301	CCACGCTCCGTTCTTCGCCGCGCAGCCTTGAACGGCCTCAATTCCTGACGGGCTGTT		360
Subjct	81849			81908
CDS:tetracycline eff	160	H A P F F A A A A L N G L N F L T G C F		
CDS: Putative 1	121	L L P		
Query	361	CCTTTTGCCGG 371		
Subjct	81909	 81919		
CDS:tetracycline eff	180	L L P		

ملحق (8): يوضح التحليل التتابعي للجين *CITM*

Escherichia coli strain AH62 plasmid pAH62-3, complete sequence

Sequence ID: [CP055262.1](#) Length: 136694 Number of Matches: 2Range 1: 81552 to 81922 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
680 bits(368)	0.0	370/371(99%)	0/371(0%)	Plus/Plus
CDS: Putative 1	1	P V L G A L S D R F G R R P V L L V S L		
Query	1	ACCTGTGCTGGGCGCGCTGTCGGATCGTTTCGGGCGGCGGCGGTCTTGCTCGTCTCGCT		60
Sbjct	81552			81611
CDS:tetracycline eff	61	P V L G A L S D R F G R R P V L L V S L		
CDS: Putative 1	21	A G A A V D Y A I M A T A P F L W V L Y		
Query	61	GGCCGGCGCTGCTGTCGACTACGCCATCATGGCGACGGCGCTTTCCTTTGGGTTCTCTA		120
Sbjct	81612			81671
CDS:tetracycline eff	81	A G A A V D Y A I M A T A P F L W V L Y		
CDS: Putative 1	41	I G R I V A G I T G A T G A V A G A Y I		
Query	121	TATCGGGCGGATCGTGGCCGGCATCACCGGGCGACTGGGGCGGTAGCCGGCGCTTATAT		180
Sbjct	81672			81731
CDS:tetracycline eff	101	I G R I V A G I T G A T G A V A G A Y I		
CDS: Putative 1	61	A D I T D G D E R A R H F G F M S A C F		
Query	181	TGCCGATATCACTGATGGCGATGAGCGCGCGGCACTTCGGCTTCATGAGCGCCTGTTT		240
Sbjct	81732			81791
CDS:tetracycline eff	121	A D I T D G D E R A R H F G F M S A C F		
CDS: Putative 1	81	G F G M V A G P V L G G L M G G F S P H		
Query	241	CGGGTTCCGGATGGTCGCGGGACCTGTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGGTTTCTCCCCCA		300
Sbjct	81792			81851
CDS:tetracycline eff	141	G F G M V A G P V L G G L M G G F S P H		
CDS: Putative 1	101	A P F F A A T A L N G L N F L T G C F L		
Query	301	CGCTCCGTTCTTCGCCGCGACAGCCTTGAACGGCCTCAATTTCTGACGGGCTGTTTCT		360
Sbjct	81852	G.....		81911
CDS:tetracycline eff	161	A P F F A A A A L N G L N F L T G C F L		
CDS: Putative 1	121	L P E		
Query	361	TTTGCCGGAGT	371	
Sbjct	81912		81922	
CDS:tetracycline eff	181	L P E		

Summary

Summary

Urinary tract infections (UTI) are common causes of morbidity and sometimes lead to significant mortality. *Escherichia coli* was the most common etiological agent of UTI especially in infant and children. The current study aimed to isolation and identification *E. coli* from hospitalized children under 12 years, detect antibiotic susceptibility pattern, in addition molecular identification for Urooathogenic *E.coli* and resistance genes.

Collection of 200 of urine samples from infant and children, then cultured in selective and differential media for primary isolation of *E.coli*, biochemical tests and final identification were done using Vitek 2 compact system. Antibiotic susceptibility for 25 antibiotics was done using disk diffusion methods and Vitek 2 compact system, in addition studying ability for biofilm formation using Congo-red agar method and tissue culture plate method, while DNA was isolated for molecular identification for identify gene *papE*, antibiotic resistance genes *tetA*, *tetB*, CITM, *sul1*, *sul2* and *sul3* were done using convention polymerase chain reaction.

The results were shown (64%) 40/62 of isolates belong to *E.coli* (32 female and 8 male), antibiotic resistance was varies, highly resistance was for ampicillin and sulfamethoxazole and less resistance for tigecycline while most isolates were multi drug resistance, from the other hand the percentage for ability biofilm formation using Congo-red agar methods was (57%) while percentage (62.5%) using tissue culture plate method, while biofilm formation ability for UPEC was (55%) in congo-red and (26.6%) using tissue culture plate methods.

The result for identification gene *papE* for Urooathogenic *E.coli* that percentage (37.5%) harbors this gene while percentage of resistance

Summary

genes CITM *tetA*, *tetB*, , *sul1* and *sul2* (5%), (45%), (12.5%), (35%) and (40%) respectively, while *sul3* gene not present in any isolates under study.

In conclusion, *E.coli* isolated from children was highly resistance to antibiotic and had the ability for biofilm formation in addition presence of resistance gene which possible transmitted among bacteria and spread antibiotic resistance.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology



**Molecular characterization of multi drug resistance
Escherichia coli isolated from Iraqi Children with
Urinary Tract infection**

A thesis

Submitted to the Council of College of Pure Science/Diyala University In
Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of
Science in Biology

By

Ayat Majeed Zeadan

B.Sc.Biology/ University of Diyala (2008)

Supervised by

Assistance Professor

Ali Jaafer Salem

2021 A.C

1442 A.H