جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التباين الوراثي الجزيئي لبكتريا *E. coli* المعزولة من مصادر سريرية ومياه الشرب

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

نور جميل عبدالله

بكالوريوس علوم حياة / جامعة ديالى (2008)

بإشراف

أ. د . هادي رحمن رشيد الطائي

١٤٤٢هـ ٢٠٢٠ م

بسم الله الرحمن الرحيم

قَالُواْ سُبْحَانَكَ لاَ عِلْمَ لَنَا إِلاَّ مَا
عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

صدق الله العظيم

سورة البقرة (٣٢)

إقرار لجنة المشرفين وترشيح لجنة الدراسات العليا

نشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (التباين الوراثي الجزيئي لبكتيريا *E. coli* المعزولة من مصادر سريرية ومياه الشرب) التي قدمتها طالبة الماجستير (**نور جميل عبدالله**) قد أجريت بإشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع :

المشرف : د. هادي رحمن رشيد الطائي

اللقب العلمي: استاذ

كلية العلوم / جامعة ديالى

التاريخ / / ٢٠٢٠

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المقدمة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الأسم : د. إبراهيم هادي محمد

اللقب العلمي :استاذ

رئيس لجنة الدراسات العليا – رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ / / ٢٠٢٠

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة ، أننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (**التباين الوراثي الجزيئي لبكتيريا *E.coli* المعزولة من مصادر سريرية ومياه الشرب**) التي قدمتها طالبة الماجستير (**نور جميل عبدالله**) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ (٥ / ١٠ / ٢٠٢٠) ونعتقد انها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة وبتقدير (**امتياز**) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : **د. لمى عبدالهادي زويني**

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : / / ٢٠٢٠

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : **د. علي جعفر سليم**

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠٢٠

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : **د. عصام حامد حميد**

المرتبة العلمية : مدرس

التاريخ : / / ٢٠٢٠

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الاسم : **د. هادي رحمن رشيد الطائي**

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ : / / ٢٠٢٠

مصادقة عمادة كلية العلوم.

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع :

الاسم : **د. تحسين حسين مبارك**

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : / / ٢٠٢٠م

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **(التباين الوراثي الجزيئي لبكتيريا *E coli* المعزولة من مصادر سريرية ومياه الشرب)** التـــي قدمتها طالبة الماجستير **(نور جميل عبدالله)** قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية ، وصُحّحَ ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية، وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع :

الاسم : د. لؤي صيهود فواز التميمي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠٢٠

إقرار المقوم العلمي

أشُهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (**التباين الوراثي الجزيئي لبكتيريا *E. coli* المعزولة من مصادر سريرية ومياه الشرب**) التي قدمتها طالبة الماجستير (**نور جميل عبدالله**) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع :

الاسم : د. هند حسين عبيد

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠٢٠

الاهداء

الى من أشرقت الأرض بنور وجهه ... واطمأنت القلوب بذكره... وطابت الحياه بولادته ... الى سيدنا وعظيم ألامه ... نبي الرحمة ... الصادق الأمين...

سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم

الى من أثلج قلبي أيام الظمأ .... و أنار دربي أيام الظلام .....**والدي الغالي .**

الى من جعل الله الجنة تحت قدميها...وعنوان المحبة ..... **والدتي الغالية .**

الى من ساندني بفعل وشجعني بقول ...وكان لي رفيق درب ... **زوجي الغالي .**

الى ربيع حياتي .....وزهور أملي ..... **ولدي غيث وطفلي الذي لم يبصر النور بعد.**

الى نور عيني .... وزهرة حياتي ..... **أخي الغالي وأخواتي الغاليات.**

الى أروع المعاني واصدق المشاعر..... **زملائي الأعزاء**

الى كل من ساعدني ولو بكلمة ..... **اهدي ثمرة جهدي المتواضع**

نور

شكر وتقدير

أشكر **الله تعالى** وأحمده هو المنعم والمتفضل قبل كل شيء .... أشكره ان حقق لي ما أصبو اليه في اَكمال هذا الموضوع .

أقدم الشكر والثناء الى من عمل فأجاد... وعلم فأفاد... وغرس فأحسن ... أستاذي ومشرفي الفاضل **الأستاذ الدكتور هادي رحمن رشيد الطائي** .

كما لا يسعني في هذا المقام الا ان أتقدم بالشكر الجزيل...**لعمادة كلية العلوم و لأساتذتي في قسم علوم الحياة**... داعيا المولى عز وجل ان يحفظهم ويسدد خطاهم .

وأعترف بالجميل والشكر الجزيل الى **جميع زملائي** (الى من جمعتني بهم هذه الدراسة المباركة) **...** واخص بالذكر(**شيماء مجيد ، هادي علي ،زهير حسن ،علي حسن ،عبدالله سعد ،أغادير سرمد)** لما أبدوه لي من مساعدة بالقول والفعل .

واتوجه بالشكر والتقدير **الى منتسبي مختبر الصحة العامة ومستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي ...** لما أبدوه من تسهيل وتعاون معي .

كما وأتوجه بالشكر والتقدير الفائق الى مدير زراعة ديالى **الدكتور حسين خضير العزاوي** .والشكر الخاص الى **الدكتور حسين علي سالم و الأستاذ أسعد غناوي عزيز . وكافة موظفين شعبة التربة والمياه في مديرية زراعة ديالى .**

كما أوجه شكري وتقديري الى **عائلتي** والى كل من كأن سنداً وعوناً لي في أتمام هذه الرسالة ، وألتمس العذر ممن فاتني أن أشكرهم .

نور

الخلاصة

شملت الدراسة جمع (180) عينة سريرية تضمنت (67) عينة من الادرار urine ، (90)عينة مسحات الجروح (Swab wounds) و(23) عينة مسحات حروق (Swab burns) من مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي .كما وتم جمع (110) عينة بيئية (مياه) المرسلة الى مختبر الصحة العامة لغرض الفحص ، للمدة من (22 أيلول ولغاية 28 تشرين الثاني) ،2019.

أوضحت نتائج فحص الحساسية ل(12) مضاد حيوي (تنتمي الى (9) مجاميع من المضادات الحيوية) هي (Tetracycline, Imipenem, Doxycycline, Aztreonam, Levofloxacin, Cefuroxime, Trimethoprim-sulfamethoxazole Azithromycin, Ampicillin-sulbactam , Cefoxitin , Cefpodoxime, Ticarcillin- clavulanate) أن اعلى نسبة مقاومة من العزلات كانت لمضاد (Cefpodoxime) وبنسبة (95%) (19 عزلة سريرية) وبنسبة (70%) (14 عزلة ماء)، ونسبة المقاومة لمضاد (Aztreonam) بنسبة (90%) (18 عزلة سريرية) وبنسبة (80%) (16 عزلة ماء)، ونسبة المقاومة لمضاد (Trimethoprim- sulfamethoxazole) بنسبة (80%) (16 عزلة سريرية) وبنسبة (55%)(11 عزلة ماء)، في حين كانت المقاومة لكل من المضادين (Tetracycline) بنسبة (70%) (14 عزلة سريرية) وبنسبة (65%) (13 عزلة ماء) و(Doxycycline) بنسبة (75%) (15 عزلة سريرية) وبنسبة (70%) (14 عزلة ماء)، و كانت المقاومة لكل من المضادين (Cefuroxime) بنسبة (75%) (15 عزلة سريرية) وبنسبة (45%) (9 عزلات ماء) و(Cefoxitin) بنسبة (40%) (8 عزلات سريرية) وبنسبة (45%) (9 عزلات ماء)، ونسبة المقاومة لمضاد (Azithromycin) بنسبة (65%) (13 عزلة سريرية) وبنسبة (60%) (12 عزلة ماء)، ونسبة المقاومة لمضاد Levofloxacin بنسبة (45%) (9 عزلات سريرية) وبنسبة (50%) (10 عزلات ماء) ، وكانت المقاومة لكل من المضادين (Ticarcillin-clavulanate) بنسبة (45%) (9 عزلات سريرية) وبنسبة (25%) (5 عزلات ماء) و(Ampicillin-sulbactam) بنسبة (10%) (2 عزلتان سريرية) وبنسبة (15%) (3 عزلات ماء)، ونسبة المقاومة لمضاد(Imipenem) بنسبة (25%) (5 عزلات سريرية) وبنسبة (30%) (6 عزلات ماء).

اظهرت العزلات مقاومة متعددة للمضادات ،إذ كانت (7) عزلات سريرية و(9) عزلات ماء مقاومة لـــ (7) مجاميع او اكثر من مجاميع المضادات الحيوية التي استخدمت في الدراسة Extensively drug resistant (XDR) و(13) عزلة سريرية و(4)عزلة ماء كانت مقاومة لـــ (3) مجاميع او اكثر من مجاميع المضادات الحيوية التي استخدمت في الدراسة Multidrug resistant (MDR).

كما تضمنت الدراسة الكشف المظهري لبعض عوامل الضراوة (Virulence factors)مثل تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) والنصاب الحسي (Quorum sensing) . وتم الكشف عن الغشاء الحيوي بطريقتين هما (طريقة الانبوب Tube Method وطريقة Micro Titer Plate) وكانت عدد العزلات المكونة للغشاء الحيوي بطريقة الانبوب(Tube Method)هي (8)عزلات سريرية بنسبة (40%) و(15) عزلة ماء بنسبة (75%) في حين كانت عدد العزلات المكونة للغشاء الحيوي بطريقة (Micro Titer Plate) هي (17) عزلة سريرية بنسبة (85%) و(20) عزلة ماء بنسبة (100%)، واظهرت العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوي بالمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (MDR) ان جميع العزلات السريرية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) هي مكونة للغشاء الحيوي وبنسبة (100%)،في حين كانت اغلب عزلات الماء المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) هي مكونة للغشاء الحيوي (13 عزلة) وبنسبة (65%) .اما عدد العزلات المنتجة لل Acyl-homoserine lactone (AHL) هي (6) عزلات سريرية وبنسبة (30%) و(15) عزلة ماء وبنسبة (75%).

تضمنت الدراسة ايضا الكشف عن انواع من انزيمات البيتا- لاكتاميز (β- Lactamase)المنتجة من قبل بكتيريا *E coli* شملت (انزيمات بيتا – لاكتاميز المعدنية (MβL) وانزيمات واسعة الطيف (ESβLs) وانزيمات من نوع(Amp-C-) وكانت نتائجها كالاتي (انزيمات بيتا – لاكتاميز المعدنية (MβL) أن (11) عزلة سريرية منتجة للأنزيمات بنسبة (55%) و (6) عزلات ماء وبنسبة (30%) منتجة للأنزيمات ، انزيمات واسعة الطيف (ESβLs) فكانت (2) عزلة سريرية منتجة للأنزيمات بنسبة (10%) وعزلة ماء واحدة وبنسبة (5%)منتجة للأنزيمات ، وانزيمات من نوع (Amp-C)امتلكت (10) عزلات سريرية بنسبة (50%) و(9) عزلات ماء وبنسبة (45%) منتجة للأنزيمات من نوع (Amp-C).

شملت الدراسة ايضا التنميط الجيني للعزلات ذات المقاومة المتعددة بثلاث أنظمة تصنيفية مختلفة وهي (نظام التنميط (ERIC-PCR) ، نظام التنميط (BOX-PCR) و نظام التنميط

(RAPD-PCR)) لا يجاد العلاقة بين (20) سلالة مرضية لبكتيريا *E coli* (10 عزلات سريرية و10 عزلات ماء) كانت من بين (40) عزلة والتي امتازت بأنها اكثر مقاومة للمضادات وامتلاكها لعوامل ضراوة وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) .أوضحت نتائج التنميط الجيني باستعمال الأنظمة التصنيفية الثلاث أن هناك عدة مجاميع من العزلات والذي يدل على التنوع الوراثي لها .

كانت نتائج التنميط باستخدام تقنية (ERIC –PCR) والتي صنفت الى مجموعتين رئيسيتن هي : المجموعة (A) والمجموعة (B) ،فكانت النسبة الأكبر للمجموعة (B) بنسبة 80% (8 عزلات سريرية و8 عزلات ماء) من مجموع العزلات، بينما كانت نسبة المجموعة (A) هي (10%)من العزلات السريرية تضمنت عزلة واحدة وبنسبة (20%) من عزلات الماء وتشمل عزلتان ،وكانت عزلة واحدة من العزلات السريرية هي خارج المجموعة (out group) (A) والمجموعة (B). اما نتائج التنميط باستخدام تقنية (BOX –PCR) والتي صنفت ايضا الى مجموعتين رئيسيتن هي : المجموعة (A) والمجموعة (B) ،فكانت النسبة الاكبر للمجموعة (B) للعزلات السريرية وبنسبة 80%(8 عزلات سريرية) ضمن مجموعتين فرعيتين هما (B1 و2 B)، وبنسبة (20%) (عزلتان سريرية) من العزلات السريرية للمجموعة (A). في حين كانت النسبة الاكبر من عزلات المياه للمجموعة (A) وبنسبة 60% (6 عزلات ماء) كانت ضمن مجموعتين فرعيتين هما (A2, A1) وبنسبة 40% (4 عزلات ماء) للمجموعة (B) والتي تضمنت مجموعتين فرعيتين ايضا هما (B1 و2 B). ان نتائج التنميط باستخدام تقنية (RAPD-PCR) وكانت ضمن مجموعتين رئيسيتين هما المجموعة (A) والمجموعة (B)، فكانت النسبة الاكبر للمجموعة (B) للعزلات السريرية وبنسبة (80%) (8 عزلات سريرية) ضمن مجموعتين فرعيتين هما (B1 و2 B)، وبنسبة (10%) (عزلة واحدة سريرية) من العزلات السريرية للمجموعة (A) وكانت عزلة واحدة من العزلات السريرية هي خارج المجموعة (out group) (A) والمجموعة (B) . في حين كانت النسبة الاكبر من عزلات الماء للمجموعة A وبنسبة (60%) (6 عزلات ماء) كانت ضمن مجموعتين فرعيتين هما (A1) ,A2وبنسبة (30%) (3 عزلات ماء) للمجموعة (B) ضمن مجموعتين فرعيتين ايضا هما (B1 و2 B) ، في حين كانت عزلة واحدة من عزلات الماء هي خارج المجموعة (out group) (A) والمجموعة(B) .

كما أن الدراسة الحالية تشير الى أن هناك ارتباط بين الأنظمة الجينية من خلال توزيع العزلات في كل نمط ومجموعة .

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
I	الخلاصة	
IIV	قائمة المحتويات	
IX	قائمة الجداول	
X	قائمة الاشكال	
XI	قائمة مختصرات	
XII	قائمة الملاحق	
1	الفصل الاول - المقدمةIntroduction	1
4	الفصل الثاني - استعراض المراجع Literature Review	2
4	العائلة المعوية Enterobacteraceae	1-2
4	بكتيريا الاشيريشيا القولونية *Escherichia coli*	2-2
4	الصفات العامة لبكتيريا الاشيريشيا القولونية *Escherichia coli*	1-2-2
7	جينوم بكتيريا الاشيريشيا القولونية *Escherichia coli*	2-2-2
8	الامراضية والوبائيـــةPathogenicity and Epidemiological	3-2-2
10	عوامل الضراوة Virulence factors	3-2
10	الغشاء الحيوي Biofilm	1-3-2
11	النصاب الحسي Quorum sensing	2-3-2
13	إنتاج الهيمولاسين Hemolysin	3-3-2
13	المضادات الحيوية Antibiotics	4-2
14	اصناف المضادات الحيوية	1-4-2
15	مقاومة المضادات الحيوية الميكروبية Antimicrobial resistant (AMR)	2-4-2
16	انزيمات البيتا – لاكتاميز β- lactamases	3-4-2
19	المـــــياه The water	5-2
19	مواصفات المياه The water specification	1-5-2
19	طـرق الكشـف عن تلوث المياه Methods for detecting water Pollution	2-5-2
21	التنميط البكتيري Bacterial typing	6-2
21	طرائق التنميط المظهري Phenotypic methods	1-6-2

21	طرائق التنميط الجيني Genotypic methods	2-6-2
22	طرائق التنميط باستخدام تفاعل سلسلة انزيم البلمرة العشوائي Randomly amplified polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)	1-2-6-2
23	طرائق التنميط باستخدام (ERIC-PCR)	2-2-6-2
23	طرائق التنميط باستخدام ال BOX- PCR	3-2-6-2
24	الفصل الثالث - المواد وطرائق العمل Materials and Methods	3
24	المواد المستعملة في الدراسة	1-3
24	الأجهزة	1-1-3
25	المواد الكيمياوية والحيوية	2-1-3
26	الكواشف	3-1-3
27	العدة المختبرية	4-1-3
28	الأوساط الزراعية	5–1-3
29	المضادات الحيوية	6-1-3
30	البادئات Primers	7-1-3
30	طرائق العملMethods	2-3
30	طرق التعقيم Sterilization Methods	1-2-3
30	تحضير الاوساط الزرعية	2-2-3
31	تحضير الاوساط التركيبية	1-2-2-3
31	وسط اكار الدم الاساس	1
31	وسط اكار اليوريا	2
31	وسط اختبار الاندول	3
31	تحضير المحاليل Solutions preparation	2-2-2-3
31	تحضير محلول صبغة البنفسج البلوري Preparation of violet Solution	1
32	تحضير محلول اثيلين ثنائي أمين رباعي حامض ألخليك Ethylene Diamine Tetra Acitic Acid (EDTA)	2
32	تحضير محلول كلوريد الحديديك ($FeCl_3$10%) في محلول حامض الهيدروكلوريك (HCl 4M)	3
32	تحضير محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH	4
32	تحضير محلول هيدروكسيد أمين Hydroxylamine(2 M)	5
32	حفظ وإدامة العزلات البكتيرية	3-2-3
32	الحفظ قصير الأمدShort time preservation	1-3-2-3
33	الحفظ طويل الأمد Long time preservation	2-3-2-3
32	جمع العينات Samples collection	4-2-3

5-2-3	عزل وتشخيص بكتيريا *E coli* Isolation and Identification	32
1-5-2-3	زرع العزلات السريرية	32
2-5-2-3	زرع عزلات الماء	32
3-5-2-3	الزرع على الوسط التفريقي Eosin Methylene Blue (EMB)	34
4-5-2-3	الفحص المجهري Microscopic examination	34
5-5-2-3	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	34
-1	اختبار إنزيم الأوكسيديز Oxidase test	35
-2	إختبار إنزيم الكاتاليز Catalase test	35
-3	إختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease production test	35
-4	إختبار وسط أكار كلغلر الحديد Kligler Iron Agar (KIA)	35
-5	اختبارات IMVIC Tests	36
6-2-3	تأكيد التشخيص بأستخدام Vitek 2 system	36
7-2-3	حساسية العزلات للمضادات الحياتية Antibiotic susceptibility	37
1-7-2-3	طريقة الاقراص Disk method	38
2-7-2-3	تحديد التركيز المثبط الادنى للمضاد Minimum inhibitory concentration (MIC)	39
8-2-3	تحديد بعض عوامل الضراوة	40
1-8-2-3	إختبار تحلل الدم Haemolysis test	40
2-8-2-3	الكشف عن تشكيل الغشاء الحيوي Biofilm formation	40
1-2-8-2-3	الكشف بطريقة الانبوب Tube method (TM)	40
2-2-8-2-3	الكشف بطريقة ال Micro Titer Plate method (MTP)	41
3-8-2-3	الكشف عن قدرة البكتريا لانتاج Acyl-homoserine lactone Quorum sensing (AHL) بالطريقة اللونية Colorimetric method	42
9-2-3	الكشف عن قدرة بكتريا ال *E coli* لانتاج انزيمات البيتا-لاكتاميز Beta-lactamase	43
1-9-2-3	الانزيمات البيتا-لاكتاميز المعدنية Metallo-beta-lactamase (MβLs)	44
2-9-2-3	الانزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف Extended spectrum Beta-lactamase (ESβLs)	44
3-9-2-3	الانزيمات البيتا-لاكتاميز من نوع Amp-C-	45
10-2-3	الدراسة الجزيئية (الكشف عن التنوع الجيني)	45
1-10-2-3	استخلاص الحمض النووي الجيني Extraction of Genomic DNA	45

46	concentration and purity of قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA	2-10-2-3
46	(Polymerase Chain Reaction) PCR تفاعل ال	3-10-2-3
46	Primers Preparation تحضير البادئات	1-3-10-2-3
47	تفاعلات الPCR	2-3-10-2-3
47	الترحيل الكهربائي ل DNA على هلام الاكاروز	3-3-10-2-3
48	Results and Discussion الفصل الرابع- النتائج والمناقشة	4
48	Isolation and Identification of *E coli* عزل وتشخيص البكتيريا	1-4
48	الاختبارات التشخيصية للعزلات	1-1-4
49	الصفات الزرعية التشخيصية	1-1-1-4
50	Microscopy Examination الفحص المجهري	2-1-1-4
50	Biochemical tests الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للعزلات	3-1-1-4
50	تشخيص نظام Vitek 2 التأكيدي	4-1-1-4
51	Isolation Result نتائج العزل	2-4
51	Clinical Isolates العزلات السريرية	1-2-4
52	Water Isolates عزلات الماء	2-2-4
53	Sensitivity اختبار حساسية بكتريا *E coli* للمضادات الحيوية Antibiotics	3-4
55	Sensitivity اختبار حساسية بكتيريا *E coli* للمضادات الحيوية Antibiotics للعزلات السريرية	1-3-4
57	Sensitivity اختبار حساسية بكتيريا *E coli* للمضادات الحيوية Antibiotics لعزلات الماء	2-3-4
59	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *E coli*	4-4
59	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *E coli* للعزلات السريرية	1-4-4
60	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *E coli* لعزلات الماء	2-4-4
60	Minimum inhibitory التركيز المثبط الادنى للمضاد concentration (MIC)	5-4
61	Virulence factors عوامل الضراوة	6-4
61	Biofilm الغشاء الحيوي	1-6-4
61	Tube Method الكشف عن الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب	1-1-6-4
62	Micro Titer Plate الكشف عن الغشاء الحيوي بطريقة	2-1-6-4
63	العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوية والمقاومة المتعددة للمضادMDR	3-1-6-4
63	Quorum sensing النصاب الحسي	2-6-4

3-6-4	العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوي و انتاج Acyl-homoserine Quorum sensing lactone (AHL)	63
7-4	اختبار انتاج انزيمات البيتا- لاكتاميز β- Lactamase من قبل بكتيريا *E coli*	64
1-7-4	انتاج انزيمات البيتا- لاكتاميز المعدنية Metallo-β- Lactamase(MβLS)	65
2-7-4	انتاج انزيمات البيتا- لاكتاميز واسعة الطيف Extended (ESBLs) spectrum Beta-lactamase	65
3-7-4	انزيمات البيتا- لاكتاميز من نوع Amp-C-	66
4-7-4	العلاقة بين انتاج انزيمات البيتا – لاكتاميز من نوع Amp-C- والعزلات المتعددة المقاومة MDR لبكتيريا *E coli*	66
8-4	انظمة التنميط الجيني	67
1-8-4	استخلاص الحمض النووي (DNA) للعزلات قيد الدراسة	67
2-8-4	نظام التنميط ERIC-PCR	68
1-2-8-4	العزلات السريرية Clinical Isolates	68
2-2-8-4	عزلات الماء Water Isolates	69
3-8-4	نظام التنميط BOX-PCR	70
1-3-8-4	العزلات السريرية Clinical Isolates	70
2-3-8-4	عزلات الماء Water Isolates	72
4-8-4	نظام التنميط RAPD-PCR	74
1-4-8-4	العزلات السريرية Clinical Isolates	74
2-4-8-4	عزلات الماء Water Isolates	75
	الاستنتاجات والتوصياتConclusions&Recommendation	79
	المصادر العربية Arabic References	81
	المصادر الأجنبية English References	82

قائمة الجداول

رقم الجدول	الموضوع	الصفحة
(1-3)	الأجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة	24
(2-3)	المواد الكيمياوية والحيوية المستخدمة في الدراسة.	25
(3-3)	الكواشف المستخدمة في الدراسة	26
(4-3)	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة	27
(5-3)	الاوساط الزرعية والتشخيصية المستخدمة في الدراسة	28
(6-3)	اقراص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	29
(7-3)	اقراص مضادات الحيوية المستخدمة في الكشف عن انزيمات البيتا– لاكتاميز	29
(8-3)	البادئات Primers المستخدمة بالدراسة	30
(9-3)	قراءة نتائج اختبار وسط اكار الكلغلر الحديد	33
(10-3)	اعداد خليط تفاعل الـــ PCR	45
(11-3)	برنامج التفاعل الحراري PCR	46
(1-4)	الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *E coli*	50
(2-4)	اختبارات IMVic لبكتيريا *E coli* .	50
(3-4)	عدد والنسبة المئوية للعـــــزلات السريرية	52
(4-4)	يوضح عدد العينات و العزلات	53
(5-4)	مجاميع المضادات الحيوية والمضادات الحيوية ونسبة المقاومة من قبل بكتيريا *E coli* للعزلات السريرية	55
(6-4)	مجاميع المضادات الحيوية والمضادات الحيوية ونسبة المقاومة من قبل بكتيريا *E coli* للعزلات المياه	57
(7-4)	المقاومة المتعددة للعزلات السريرية	59
(8-4)	المقاومة المتعددة للعزلات البيئية	60
(9-4)	قيم التركيز المثبط الادنى (MIC)	62
(10-4)	العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوية والمقاومة المتعددة للمضادMDR	63
(11-4)	العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوي و انتاج Acyl-homoserine Quorum sensing lactone (AHL)	66
(12-4)	العلاقة بين انتاج انزيمات البيتا – لاكتاميز من نوع Amp-C- والعزلات المتعددة المقاومة MDR لبكتيريا ال *E coli*	69
(13-4)	تركيز الحمض النووي (DNA) للعزلات قيد الدراسة	71

(14-4)	عدد العزلات لبكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط ERIC-PCR ونسبها بحسب كل صنف	71
(15-4)	عدد العزلات لبكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط BOX-PCR ونسبها بحسب كل صنف	74
(16-4)	عدد العزلات لبكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط RAPD- PCR ونسبها بحسب كل صنف	79

قائمة الأشكال

رقم الشكل	الموضوع	الصفحة
(1-4)	نسبة النمو البكتيري الموجب والسالب من مجموع العينات	48
(2-4)	شكل بكتيريا ال *E coli* على الوسط الزرعي اكار الماكونكي و على وسط أزرق المثيلين Eosin Methylene Blue (EMB)	49
(3-4)	نسبة المقاومة للمضادات الحيوية قيد الدراسة	52
(4-4)	الحزم الناتجة من تفاعل ERIC-PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*	66
(5-4)	التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط ERIC-PCR للعزلات البيئية (المياه)	66
(6-4)	الحزم الناتجة من تفاعل ERIC-PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*	68
(7-4)	التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط BOX-PCR للعزلات السريرية	68
(8-4)	الحزم الناتجة من تفاعل BOX-PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*	70
(9-4)	التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط BOX-PCR للعزلات البيئية (المياه)	70
(10-4)	الحزم الناتجة من تفاعل BOX-PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*	72
(11-4)	التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط RAPD- PCR للعزلات السريرية	72
(12-4)	الحزم الناتجة من تفاعل RAPD- PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*	74
(13-4)	التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط RAPD-PCR للعزلات البيئية (المياه)	74
(14-4)	الحزم الناتجة من تفاعل RAPD- PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*	76

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
AHL	Acyl-homoserine lactone
AIP	Auto inducer peptide
Amp-C-	Ampler molecular plasmid class
β-lactamase	Beta- Lactamase
CLSI	Clinical and Labaratory Standards Institute
E coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acitic Acid
EMB	Eosin Methylene Blue Agar
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ESβLs	Extended Spectrum βeta Lactamase
KIA	Kligler Iron Agar
LPS	Lipopolysaccharide
MβLs	Metallo-beta-lactamase
Mg	Microgram
µL	Microlitter
MDR	Multidrug Resistance
MIC	Minimum inhibitory concentration
MR	Methyl red test
MTP	Micro Titer Plate method
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDR	Pand drug resistant
QS	Quorum sensing
RAPD	Randomly amplified polymorphic
TM	Tube method
UTI	Urinary Tract Infection
VP	Voges-Proskauer Test
WHO	World Health Organization
XDR	Extensively drug resistant

قائمة الملاحق

رقم الملحق	الموضوع	الصفحة
1	استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى	112
2	اختبار الحساسية للعزلات السريرية	113
3	اختبار الحساسية للعزلات البيئية	114
4	الغشاء الحيوي للعزلات السريرية	115
5	النصاب الحسي للعزلات السريرية	116
6	الغشاء الحيوي للعزلات البيئية	117
7	النصاب الحسي للعزلات البيئية	118
8	انزيمات البيتا-لاكتاميز للعزلات السريرية	119
9	انزيمات البيتا-لاكتاميز للعزلات البيئية	120
10	نتيجة التشخيص الجرثومي بواسطة جهاز VITEK 2	121
11	نتائج الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *E coli* بجهاز VITEK 2	122

الفصل الأول

المقدمـــــة

Introduction

1 - المقدمـــــة (Introduction)

الإشريشيا القولونية *Escherichia coli* هي بكتيريا سالبة لصبغة غرام (Gram negative) ،عصوية الشكل (Rod shaped) ، هوائية (Aerobic) أو لاهوائية اختيارية (Facultative anaerobic)، تنتمي الى العائلة المعوية (*Enterobacteraceae*) وتلعب الإشريشيا القولونية (*E coli*) دورًا مهمًا كعضو من جراثيم (Microbes) الأمعاء. بما في ذلك السلالات المسببة للأمراض والتي تتضمن أنماط مختلفة من الإسهال القولونية(*Diarrheagenic E coli*) والإشريشيا القولونية (*E coli*) المسببة للأمراض خارج الأمعاء والتي تسبب المرض خارج الجهاز الهضمي ،مثل التهابات المسالك البولية Urinary tract infection (UTI) (Kaper واخرون ، 2004 , Ardhami وRanjbar ، 2016).

ان بعض سلالات بكتيريا *E coli* ممكن ان تسبب العديد من الامراض وذلك من خلال امتلاكها عوامل ضراوة تساعدها في ذلك والتي قد تكون من عوامل الخطر أو الوفاه للمسنين أو الاطفال أو الذين يعانون ضعف مناعة (Farrokh واخرون ، 2013).

تستخدم بكتيريا *E coli* كمؤشرات حيوية مثل استخدامها كمصدر للتلوث البرازي في العينات البيئية واذ تعد سلالات مختلفة من بكتيريا *E coli* خاصة بالمضيف الموجودة فيه ، حيث يدل وجود هذه السلالات (التي تعد موطنها هي امعاء الانسان والحيوان) في الماء دليل على التلوث البرازي الناتج من الانسان او الحيوان وبالتالي تسبب التلوث البيئي (Environmental Pollution) .

يعد تلوث الماء بالبكتيريا من المشاكل التي تواجه مستهلكين الماء. وان الطريقة الوحيدة للتأكد من وجود أو خلو الماء من البكتيريا عن طريق فحص نماذج المياه وتحديد نوع البكتيريا الموجودة فيه (Berendonk واخرون ،2015 ; Montealegre واخرون ،2018). استخدمت بكتيريا *E coli* مجموعة من الوسائل للبقاء والاستمرار في البيئة .ومن هذه الوسائل هي تكوين الأغشية الحيوية Biofilms ،وان تكوينها الغشاء الحيوي يمكن أن تعزز المقاومة للمضادات الحيوية مما ينتج عنه صعوبة استئصال هذه الكائنات الحية ومكافحتها (Salyers واخرون ، 2004 ، Yu واخرون ،2014).

وبالرغم من توفر مضادات حيوية Antibiotics لعلاج العديد من الامراض التي يكون سببها البكتيريا الا ان هناك بعض الانواع البكتيرية اصبحت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية ،حيث استخدمت البكتيريا طرق عديدة لاكتساب صفة المقاومة ،ومن اهم هذه الطرق هي اكتساب جينات مقاومة بطريقة نقل الجينات الافقي (Horizontal gene transfer). إذ أظهرت الدراسات السابقة أن مستويات مقاومة المضادات الحيوية من قبل بكتيريا *E coli* آخذت في الازدياد ، فضلاً عن ذلك ، هناك احتمال كبير للارتباط بين وجود عوامل الضراوة (Virulence factor) ومقاومة المضادات الحيوية (Assumpção واخرون ،2015).

يلاحظ ان البكتيريا الموجودة في القولون البشري يمكن ان تنقل جينات المقاومة فيما بينها حيث يصبح هذا النوع من النقل مشكلة كبيرة عندما تتحول البكتيريا الى مسببات مرضية (Manges واخرون ، 2001). تمتلك بكتيريا *E coli* درجة عالية من التنوع الجيني والمظهري إذ يوضح تسلسل الجينوم Genome sequencing للعديد من عزلات البكتيريا كونها واحدة من اكثر الانواع البكتيرية تنوعا اذ ان(20%) فقط من الجينات في الخلية البكتيرية هي مشتركة في كل السلالات (Strains)(Lukjancenko واخرون، 2010).

تم استخدام التنميط المظهري (Phenotyping) لتمييز بكتيريا *E coli* لعدة سنوات، ومع ذلك ، فإن هذه الأساليب تستغرق وقتًا طويلاً بشكل عام جعلت التطورات في تقنيات الجزيئية الطرق الاكثر سهولة في تشخيص دقيق للعزلات التي تعتبر أكثر تمييزية مقارنة بالطرق المظهرية (Phenotypic method). استخدمت العديد من الدراسات طرقا جزيئية مختلفة لتميز وتحديد السلالات البكتيرية ومن هذه الطرائق هي تحديد تسلسل 16 S (rRNA) الذي يستخدم لتحديد الانواع البكتيرية وتحديد تطورها ومع ذلك اظهرت بعض الانواع البكتيرية درجة عالية من التشابه في ما بينها في التسلسل الجيني لها ، ولذلك استخدمت تقنيات جزيئية بديلة مثل (Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)) و (multilocus sequence analysis) (MLSA) و (Enterobacterial Repetitive Intergenic Concsensus (ERIC)) . كان لبعض هذه الطرائق قوة تميزية للتفريق بين العزلات وثيقة الصلة من البيئات المتماثلة (Jarocki واخرون ، 2016). إذ استخدمت تقنية (RAPD– PCR) بادئات عشوائية لتضخيم مجموعة من المواقع الموزعة بشكل عشوائي في جينوم بكتيريا *E coli* وبالتالي تودي الى الكشف عن تطور العلامات الجينية. لقد أثارت بساطة تقنية RAPD وقابليتها للتطبيق و قلة التكلفة اهتمامات العديد من العلماء. (Welsh و McClelland ، 1990).اما (ERIC PCR–) هي تقنية تنميط الجيني تتميز بكونها بسيط وفعالة من حيث التمييز بين سلالات مختلفة من بكتيريا *E coli* (Behzadi واخرون ، 2015). نظرًا لأن تسلسلات (BOX) المتكررة تتخلل جميع أنحاء الجينوم ، فإن (BOX-PCR) هي طريقة قادرة على مسح العديد من مناطق DNA المتناثرة في الجينوم البكتيري. وقد ثبت أن لديها قوة تمايز متشابهة أو حتى أفضل من السلالة (Van belkum وHermans، 2001).

الهدف من الدراسة Aim of study

نظرًا لقلة الدراسات في تنميط بكتيريا *E coli* في محافظة ديالى لذا جاءت الدراسة لتسلط الضوء على التنميط الجزيئي لبكتيريا *E coli* المعزولة من عينات سريرية مختلفة وكذلك من الماء فضلاً عن معرفة مقاومتها للمضادات الحيوية المختلفة وامتلاكها لعوامل ضراوة معينة وقد اتبعت الخطوات الأتية لتحقيق الهدف:

1 – عزل وتشخيص بكتيريا *E coli* المسببة لالتهابات المجاري البولية و الجروح والحروق للمرضى الراقدين وغير الراقدين في مستشفيات مدينة بعقوبة.

2 – عزل وتشخيص بكتيريا *E coli* من الماء التي تم استلامها من مختبر الصحة العامة - قسم الاغذية في محافظة ديالى .

3 - الكشف عن مقاومة العزلات السريرية وعزلات الماء للمضادات الحيوية من مجاميع المضادات المختلفة والكشف عن قدرة هذه العزلات المقاومة لإنتاج انزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف lactamases (ESBL) (extended-spectrum β- والمعدنية (Metallo β- lactamases(MBLS) ونوع (Amp-C-) .

4 - تحديد بعض عوامل الضراوة مثل تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) والنصاب الحسي (Quorum sensing) وتحديد العلاقة بين هذه العوامل ومقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية .

5 - دراسة التنوع الوراثي الجزيئي لبكتيريا *E coli* باستخدام تقنية تفاعل سلسلة انزيم البلمرة العشوائي (Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR)) و استخدم تقنية ((ERIC –PCR) Enterobacterial Repetitive Intergenic Concsensus) وتقنية (BOX-PCR) .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

2- استعراض المراجع Literature Review

2-1 العائلة المعوية Enterobacteraceae

هي عائلة كبيرة (Heterogeneous) سالبة لصبغة كرام (Gram negative) ،تمتاز بكونها تضم اجناس عصوية الشكل ،موطنها الطبيعي هو الامعاء للإنسان والحيوان .تضم هذه العائلة اجناس عديدة منها (Escherichia، Salmonella، Shigella، Enterobacter ، Klebsiella ، Proteus واجناس اخرى) .وبعض من هذه الاجناس مثل Escherichia تكون جزء من الاحياء المجهرية الطبيعية المعوية Enter Microbiota Normal ونادرا ما تسبب الامراض ،لكن اجناس أخرى مثل *Salmonella* و *Shigella* هي احياء مجهرية ممرضة (Brooks وآخرون ، 2010).

تمثل هذه العائلة اجناس هوائية (aerobic) أو لاهوائية اختيارية (Facultative anaerobic) ،وهي من المجموعات الاكثر شيوعا كمسببات مرضية مع بكتيريا Streptococcus وStaphylococcus (والتي يتم تشخيصها بالمختبرات من النماذج السريرية).وان تصنيف هذه المجموعة معقد ويتغير بسرعة مع تقدم التقنيات الحيوية التطورية مثل تهجين الحمض النووي (Nucleic acid hybridization) وتسلسل الحمض النووي(Nucleic acid sequencing) (Bennett واخرون ، 2015).

2-2 بكتيريا الاشيريشيا القولونية *Escherichia coli*

2-2-1 الصفات العامة لبكتيريا الاشيريشيا القولونية *Escherichia coli*

هي بكتريا سالبة لصبغة كرام (Gram negative) تنتمي الى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) تتميز بكونها عصيات قصيرة ،غير مكونة للأبواغ ،هوائية (aerobic) أو لاهوائية اختيارية (Facultative anaerobic) حيث تستطيع النمو بوجود الاوكسجين وغيابه ،غير ضارة ، موطنها الطبيعي في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان ومع ذلك هناك بعض السلالات التابعة لها اصبحت ممرضة بانحرافها عن مكانها الطبيعي إذ تكيفت لتسبب الامراض لدى الافراد الاصحاء بامتلاكها صفات ضراوة virulence traits (Kaper واخرون ،2004).

تصنيف الاشيريشيا القولونية (Faner وآخرون ،2017).

Domain: Bacteria

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacterales

Family: Enterobacteriaceae

Genus : Escherichia

Species: coli

ان الخلية البكتيرية النموذجية لبكتيريا *E coli* طولها حوالي (0.2)مايكرومتر وقطرها (0.25 -1.0) مايكرومتر، وجدار الخلية(Cell wall) يتكون من طبقة رقيقة من Peptidoglycan وغشاء خارجي Outer membrane لذلك خلال التصبيغ بصبغة كرام تأخذ اللون الوردي تحت المجهر (Yu واخرون ،2014).

كما وتتميز بان تغذيتها من نوع (Chemoheterotrophic) اذ تستخدم المواد الكيميائية الموجود في الوسط كمصدر للكاربون والطاقة ،كما وانها تخمر العديد من الركائز substrates في الظروف اللاهوائية وانتاج Lactate, Ethanol وAcetate (Madiganو Martinko , 2006).

سلالات بكتيريا *E coli* التي تمتلك أسواط هي متحركة ،وان السوط من نوع Peritrichous إذ يلتصق ويوثر على الزغابات الدقيقة الموجودة بالأمعاء الدقيقة (Darnton وآخرون, 2007).

ان درجة النمو المثالية لها هي(37 م°) لكن بعض سلالاتها تستطيع النمو في درة حرارة تصل الى (49 م°)، كما وانها تنمو في اوساط زرعيه متنوعة مثل MacCankay agar و Trypto soy broth أوأي وسط يحتوي على الكلوكوز (glucose) وكلوريد الصوديوم والمغنسيوم (Mg) و الكبريتات والماءH_2O (Fotadar واخرون ، 2005).

كما وانها تظهر مستعمرات بلون وردي على وسط MacCankay agar وبلون أخضر معدني لماع على وسط Eosin Methylene blue (EMB) ،كما تكون سالبة لفحص الاوكسديز oxidase واليوريز urease واستهلاك السترات والفوكس بروكساور ،ولا تنتج غاز(H_2S) في وسط Kligler Iron agar ،ولكنها تكون موجبة لفحص الكاتاليز (catalase) وتكون مخمرة لسكر اللاكتوز (Lactose Fermentation) واختبار المثيل الاحمر واختبار الاندول والذي هو اختبار يميزها عن (90%) من بقية افراد العائلة المعوية

(Kodaka واخرون ،2004). ان بكتيريا *E coli* المسببة للالتهاب المسالك البولية Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) و الإسهال Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) تقسم الى ست انواع إعتمادا على صفات وعوامل الضراوة والية عمل تلك العوامل (Doughari واخرون ،2011) وهي:-

1- إشريشيا القولون الغازية للأمعاء *EnteroInvasive E coli* (EIEC) .

2- إشريشيا القولون النزفية للأمعاء *Enterohemorrhagic E coli* (EHEC) .

3- إشريشيا القولون الممرضة للأمعاء *EnteroPathogenic E coli* (EPEC) .

4- إشريشيا القولون الامعائية التكتلية *Enteroaggregative E coli* (EAEC).

5- إشريشيا القولون ذات الالتصاق المنتشر *Diffusely adhering E coli* (DAEC) .

6- إشريشيا القولون السامة للأمعاء *Enter toxigenic E coli* (ETEC) .

تستعمر بكتيريا *E coli* في الجهاز الهضمي (The Digestive System) للطفل حديث الولادة خلال (40) ساعة من الاصابة بها بعد الولادة من خلال وصولها بالطعام او الماء او من الافراد الذين يتعاملون مع الطفل ، إذ تلتصق البكتيريا بمخاط الامعاء الغليظة (Large intestine)،وتمتاز بكونها غير ممرضة ،اي ان العناصر الوراثية المكتسبة لا تشفر لعوامل ضراوة وتعيش البكتريا بصورة تعايشيه في الامعاء (Intestine) (Wassenaar ، 2016).

تعتبر بكتيريا *E coli* من اكثر الكائنات الحية المستخدمة في دراسة الكائنات بدائية النواة(prokaryotic)على نطاق واسع .كما وانها من الكائنات الحية المهمة في مجال التكنولوجيا الحيوية (Biotechnology) وعلم الاحياء المجهرية (Microbiology) ،إذ تستغرق مالا يزيد عن (20) دقيقة للتكاثر (Bourgeois واخرون ، 2016).

كما وتصنف سلالاتها والمسببة للأمراض اعتمادا على العناصر التي يمكن ان تثير استجابة مناعية في جسم المضيف ،ومن هذه العناصر هي O antigen (الذي هو جزء من طبقة عديد السكريات الشحمية lipopolysaccharide layer)، K antigen (الذي يمثل المحفظة capsule) ،و H antigen (والذي هو السوط flagella) (Wang واخرون ،2003).

2-2-2 جينوم بكتيريا الاشيريشيا القولونية (*Escherichia coli*)

تتطور سلالات جديدة من بكتيريا *E coli* خلال العمليات الجينية الطبيعية مثل الطفرةMutation ، gene duplication ،ونقل الجينات الافقي (Horizontal gene transfer) . ان حوالي (18%) من جينوم السلالات التابعة لبكتيريا *E coli* والمستخدمة لأغراض المختبرية تظهر بعض منها ضارة للمضيف (Jarocki وآخرون ،2016).

وتتميز بكتيريا *E coli* بان لها القدرة على نقل الحمض النووي عن طريق عملية الاقتران البكتيري (bacterial conjugation) (يكون عن طريق بلازميدات اقترانيه تحتويها هذه البكتيريا)، والتي تسمح للمادة الوراثية بالانتقال افقيا من خلال نقل الجينات الافقي (Horizontal gene transfer)،او عملية (Transduction) والتي تستعمل الفايروسات البكتيرية أو ما يدعى بالعاثي البكتيري (Bacteriophage) بانتشار الجينات المشفرة للبكتيريا ال *E coli* (Nair وآخرون ،2019).

أول تسلسل DNA كامل لجينوم بكتيريا ال *E coli* (DNA sequence) هو لسلالة K-12 (المشتقة من سلالة MG1655) في عام 1997،وهو حلقي(circular)،يبلغ طول جزيئة (DNA) حوالي (4.6) مليون زوج قاعدي والتي تحتوي على (4288) جين التي تشفر لبروتينات (Dame وTark-Dame ، 2016).

كما لوحظ ان الجينوم يحتوي على عدد كبير من العناصر الجينية المنقولة (transposable genetic elements) مثل البلازميدات (Plasmids) والترانسبوزونات (Trasposons) ،والعناصر المكررة (repeat elements).ان حوالي (20%)من تسلسل الجينوم الكامل موجود في كل واحدة من عزلات *E coli* ،بينما يكمن الاختلاف بين العزلات في حوالي 80% من مجموع الجينوم (Meier-kolthoff وآخرون ، 2013).

ان جينوم البكتيريا يحتوي ما بين (4000-5500) جين ،ولكن العدد الكلي للجينات المختلفة بين كل عزلات البكتيريا قد يتجاوز(16000) جين ، وسبب التنوع الكبير في جينات عزلات بكتيريا *E coli* يعود الى عملية نقل الجين الافقي (Horizontal gene transfer) (Zhaxybayeva and Doolittle ،2011). يتم تسمية الجينات بأسماء مختصرة مكونة من ثلاثة احرف بصورة مائلة مع رمز مشتقة من وظيفتها ،فمثلا تم تسمية الجين (*rec* A)بعد معرفة دوره في عملية اعادة التركيب المتماثل (Homologous recombination) ،كما وتم تسمية البروتينات التي تشفر لها جينات (*rec* A ب Rec A) (Hayashi وآخرون ،2006 ; Cass واخرون ، 2016).

3-2-2 الأمراضية والوبائـيـــة (Pathogenicity and Epidemiology)

يمكن ان تسبب سلالات ضارية (virulent strains) لبكتيريا *E coli* امراض مختلفة للإنسان ومنها الالتهاب المعدي المعوي(gastroenteritis) والتهاب السحايا في الاطفال حديثي الولادة (neonatal meningitis) .وفي حلات نادرة ،هناك سلالات تكون مسؤولة عن متلازمة انحلال الدم اليوريمي (hemolytic-uremic) syndrome، التهاب الصفاق (peritonitis) , (mastitis) , تسمم الدم (septicemia) والالتهاب الرئوي الجرثومي (gram negative pneumonia) (Tauschek وآخرون ، 2002). من الامراض التي تسببها بعض سلالات بكتيريا *E coli* التسمم الغذائي (Food poisoning) ،الاسهال (Diarrhea) واصابات المسالك البولية Urinary tract infection (UTI) حيث ان حوالي (80-90%) من اصابات المسالك البولية في العالم هي سببها ال *E coli* (Foxman ، 2010).

كما ان سلالات معينة من بكتيريا *E coli* مثل (O157: H7 و O104: H4 و O121 و O26 و O103 و O111 و O145 و 104: H21) لها القدرة على انتاج سموم(Toxins) التي من المحتمل ان تكون قاتلة ،كما يمكن ان ينتج التسمم الغذائي(Food poisoning) عند تناول الاطعمة الملوثة بها (Wong واخرون ،2000).

غالبا ما يحدث انتقال بكتيريا *E coli* الممرضة عن طريق انتقال البراز من خلال الفم ، ومن الطرق الشائعة ايضا لانتقالها هي تحضير الطعام الغير صحي ، ري المحاصيل بالمياه الملوثة او بمياه الصرف الصحي كذلك التماس المباشر مع الحيوانات (Evans واخرون ،2007)

ان التهاب المسالك البولية Urinary tract infection (UTI)الناتج عن بكتيريا *E coli* تصيب النساء اكثر بأربعة عشر مرة من الرجال وذلك لامتلاك النساء مجرى بولي اقصر عن ما موجود في الرجال . إذ تستوطن البكتيريا الاحليل وتنتشر الى ان تصل المثانة Bladder والكلى Kidneys (يسبب التهاب الحويضة والكلى Pyelonephritis) . إذ تنتج البكتيريا المسببة لأمراض الجهاز البولي (α – β –hemolysin) والتي تحلل خلايا المسالك البولية (Nicolle ، 2008).

كما ان البكتيريا المسببة لأمراض المسالك البولية (Urinary tract diseases) لها القدرة على التهرب من خلايا المناعة الذاتية (Innate immune cells) بوسطة غزوها للخلايا السطحية لتشكل تجمعات بكتيرية داخل الخلية ، والتي تساهم في تكوين الاغشية الحيوية(Biofilms) . وبالرغم من كونها نادرة الحدوث الا انها في حالات معينية قد تدخل البكتريا الى المسالك البولية العلوية (The upper Urinary tract)(الكلى

Kidneys، المثانةBladder او الحالب Ureter) من مجرى الدم (Blood stream)(Ehrlich وآخرون ، 2005) .

قد تسبب البكتريا التهاب السحايا للأطفال حديثي الولادة (neonatal meningitis)من خلال انتقال البكتيريا المنتجة للمستضد (Antigen-K1-) عن طريق الام اثناء الولادة وتستعمر امعاء الطفل .وان سلالات *Enter toxigenic E coli* (ETEC) تكون السبب في اسهال المسافرين ، (Croxen وFinlay ، 2010).

تسبب سلالات *Entero Invasive E coli* (EIEC) 20% من حالات الاصابة بالإسهال الدموي (Jafari وآخرون ، 2012). كما وتسبب بكتيريا *E coli* العديد من الامراض ومن ضمنها الاصابات المكتسبة من المستشفيات(Nosocomial infections) عند تواجد المرضى فيها (Kandekar وSekaran ، 2015).

ونتيجة قدرة بكتيريا ال *E coli* على التنافس مع غيرها من الاحياء المجهرية الموجودة في القناه الهضمية ،تتمكن من الالتصاق بالخلايا الظهارية المبطنة للأمعاء وتستعمر القولون (Colon)،وبالتالي تسبب الاصابة ،وتقوم بإفراز سموم (Toxins)والتي تمتص من قبل الخلايا المبطنة للأمعاء وثم بعد ذلك تنتقل الى مجرى الدم مسببة التسمم الدموي (Septicemias) (Kohler وDobrindt ،2011).

3-2 عوامل الضراوة (Virulence factors)

الضراوة هي قدرة الكائن الممرض على احداث الاصابة ، وهي مقياس للامراضية وتمتلك بكتيريا *E coli* العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من احداث المرض ومن اهم هذه العوامل هي المحفظة(Capsule) ، الغشاء الحيوي ، الهيمولايسين Hemolysin،الانزيمات ،السموم Toxins ، وغيرها . وهنا يعود سبب قدرة بعض سلالات ال *E coli* لمجابهة الجهاز المناعي في الجسم واحداث الاصابة ويشفر لهذه العوامل جينات معينة تكون موجودة على الجزر الامراضية Pathogenic Islands (Farrokh واخرون ، 2013). وقد تم تحديد التسلسلات الجينية (Genetic sequencing) للجينات التي تشفر لعوامل الضراوة المختلفة في الاحياء المجهرية (Pallecchi واخرون ، 2007).

1-3-2 الغشاء الحيوي (Biofilm)

يعرف الغشاء الحيوي Biofilm بانه تجمعات من الاحياء المجهرية احادية الخلية التي تلتصق بالسطوح ، وهو معقد متعدد السكريات خارج خلوية (Extracellular poly saccharide) وبروتينات ودهون واحماض نووية مغمورة ضمن مصفوفة غروية Slimy matrix (Aggarwal واخرون ، 2016). عادة ما توجد الاغشية الحيوية على الاسطح الصلبة او الركائز الصلبة التي تكون مغمورة في محلول مائي ، حيث يمكن ان

تتشكل بشكل عائم على الاسطح السائلة وكذلك اسطح الاوراق . واذا حصل وان توفر مواد كافية للنمو ، فسوف ينمو الغشاء الحيوي بسرعة ليصبح مرئيا (بالعين المجردة). وان التعاون والتنافس للبكتيريا داخل الاغشية الحيوية يعتمد بشكل كبير على الانواع المختلفة الموجودة (Capoor وآخرون ، 2017)

قد تتشكل الاغشية الحيوية (Biofilms) على الاسطح الحية وغير الحية ومن الممكن ان تكون سائدة في البيئات الطبيعية والصناعية والمستشفيات . كما يمكن ان تتشكل في اسنان الانسان والحيوان ، حيث قد تسبب تسوس الاسنان وامراض اللثة (Karatan وWatnick ، 2009).

تعد الاغشية الحيوية Biofilms انظمة بيولوجية قد تشمل نوعا واحدا او مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة إذ يمكن لبكتيريا الاغشية الحيوية ان تشترك في العناصر الغذائية وزيادة قدرتها لمقاومة الظروف الخارجية مثل الجفاف ، المضادات الحيوية وخلايا الجهاز المناعي للمضيف (Tajbakhsh وآخرون ، 2016).

يبدأ تشكل الغشاء الحيوي عندما تتحرك البكتيريا ملتصقة بالأسطح ، خلال مدة استعمار البكتيريا على السطح تكون قادرة على التواصل مع البكتيريا الاخرى من خلال منتجات عملية النصاب الحسي Quorum sensing(QS) مثل Acyl-homoserine lactone (AHL) إذ بمجرد استعمارها من قبل البكتيريا تنمو الاغشية الحيوية من خلال انقسام خلاياها وان طبقة عديد السكريات خارج خلوية (poly matrix Extracellular saccharide) تحيط بالبكتيريا المكونة الغشاء الحيوي وبالإضافة الى السكريات فقد تحتوي هذه الطبقة على مواد من البيئة المحيطة بها بما في ذلك المعادن ، جزيئات التربة ومكونات الدم (مثل كريات الدم الحمر) (Tasneem وآخرون ، 2018) .

وان المرحلة النهائية لتشكيل الاغشية الحيوية هي المرحلة التي يتغير فيها الغشاء الحيوي في الشكل والحجم . وان مراحل تطور الغشاء الحيوي تسمح لها بمقاومة المضادات الحيوية . وقد اثبت ان عملية النصاب الحسي (Quorum sensing) لها دور كبير في تشكيل الغشاء الحيوي في عدة انواع بكتيرية (Chua وآخرون ، 2015).

وتم اكتشاف مجموعة واسعة من الالتهابات الميكروبية بالجسم يعود سببها الى الاغشية الحيوية والتي تضمنت التهاب المهبل الجرثومي (Bacterial Vaginitis) والتهابات المسالك البولية UTI والتهاب الاذن الوسطى والتهاب اللثة والعدسات اللاصقة (Vyas وWong ، 2016) .

2-3-2 النصاب الحسي (Quorum sensing)

يعرف النصاب الحسي (Quorum sensing) بانه القدرة على تحديد كثافة واستجابة مجموعة من الخلايا عن طريق جينات تنظيمية (Regulatory genes) حيث يتيح النصاب الحسي (Quorum sensing)للبكتيريا لتقيد التعبير الجيني (gene expression) لجينات محددة لينتج عنها انماط مظهرية اكثر فائدة . وان بعض انواع البكتيريا تستخدم النصاب الحسي لتنسيق التعبير الجيني وفقا لكثافتها (Ali وآخرون ، 2018) .

ومن اكثر الكائنات الحية التي تستخدم النصاب الحسي هي البكتيريا إذ تستخدمه لتنظيم بعض التعبيرات التنميط المظهري والتي بدورها تنسق سلوكياتها ومن هذه الانماط المظهرية الشائعة هي تشكيل الاغشية الحيوية (Biofilms) . ولكي تستخدم البكتيريا النصاب الحسي يجب ان تقوم بإفراز جزيئات الاشارة (Signaling molecules) (لتنظيم النسخ الجيني) ومحفز ذاتي (Auto inducer) للكشف عن التغيير في تركيز جزيئات الاشارة .والتي عادة ما يتم افرازها بمستويات قليلة ، وفي حالات اخرى قد يتجاوز تركيزها مستوى العتبة مما يؤدي الى تغيرات في التعبيرات الجينية (Qin وآخرون ، 2017).

ويمكن ان يحدث النصاب الحسي ضمن النوع البكتيري الواحد او بين الانواع المختلفة . تستخدمه البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، ولكن هناك بعض الاختلافات الرئيسية في الياتهم (Wang وآخرون، 2018).اذا تستخدم البكتيريا الموجبة لصبغة كرام الببتيد كمحفز ذاتي ((Auto inducer peptide (AIP) وعندما تكتشف البكتيريا الموجبة تركيزا مرتفعا من (AIP) في بيئتها فتعمل لربطه مع مستقبلات لتنشيط عوامل استنساخ الفوسفات الكيناز (kinase phosphorylates transcription factor)الذي ينضم نسخ الجين او قد يتم نقل (AIP) الى (Cytosol) ، ويرتبط مباشرة بعامل النسخ لبدء النسخ . اما البكتيريا السالبة لصبغة كرام فأنها تنتج ((N-acyl-homoserine lactones(AHL))كجزيئة اشارة وعادة لا تحتاج ال (AHL) الى معالجة اضافية حيث ترتبط مباشرة بعوامل النسخ لتنظيم التعبير الجيني (Rutherford وBassler ، 2012) . لاتنتج بكتيريا *E coli* اشارات ((N-acyl-homoserine lactones(AHL) كما هو مألوف في الاجناس البكتيرية السالبة لصبغة كرام الاخرى ، ومع ذلك لديها مستقبلات Receptors تقوم بالكشف عن (AHL) المنتجة من بكتيريا اخرى (Fraune وآخرون ، 2017).

يساهم النصاب الحسي (Quorum sensing) في تكوين التجمعات الميكروبية. مثلا هناك أدلة متزايدة على أن النصاب الحسي(Quorum sensing) يسيطر على العمليات الفسيولوجية الرئيسية في الأمعاء وقد يؤثر على عوامل الضراوة (Virulence factors) لمسببات الأمراض ،حيث الأنواع البكتيرية المعوية تنتج

وتستجيب للمحفزات الذاتية (self-Inducibles)(Papenfort وBassler ، 2016 ; Kim وآخرون ، 2017).

3-3-2 إنتاج الهيمولاسين (Hemolysin)

الهيمولاسين هو أحد عوامل الضراوة التي تمتلكها العديد من الأنواع البكتيرية . وهو انزيم دهني بروتيني تسبب في انحلال خلايا الدم الحمراء عن طريق تدمير غشاء الخلية ،وان العديد من الهيمولايسين المنتج من قبل البكتيريا الممرضة يسبب بتدمير الخلايا الدم الحمر اثناء الاصابة (Stipcevc وآخرون ،2005).

العديد من البكتيريا المنتجة للهيمولايسين يمكن الكشف عنها مختبريا من خلال قابليتها لتحلل خلايا الدم الحمر على وسط اكار الدم Blood agar بالإضافة الى طرق الكشف الجيني (Askari وآخرون ، 2016).

وليست خلايا الدم الحمر هي الخلايا الوحيدة التي تتأثر بالهيمولاسين وانما هناك أثار على الانواع الاخرى من خلايا الدم ،إذ يكون الهيمولايسين المنتج من قبل بكتيريا *E coli* سام للخلايا الوحيدة (monocytes) والخلايا اللمفاوية (Lymphocytes وMacrophages) وبالتالي يسبب تحللها وموتها (Zhang وآخرون ،2016).

من طرق التحلل لخلايا الدم الحمر بفعل الهيمولايسين هي طريقة تشكيل مسام في غشاء الخلية (في الطبقة المزدوجة الدهون الفسفورية (phosphate lipid bilayers)،او طريقة التحلل المائي (Hydrolyzing) لغشاء خلايا الدم الحمراء(Chalmeau واخرون ،2011).

كما ويعمل الهيمولاسين على تحرير هيموغلوبين الدم عن طريق تحطيم الغشاء الحيوي لخلايا الدم الحمر وبالتالي يكون مصدرا للحديد الذي تحتاجه الخلايا البكتيرية في ايضها ،وهذا ما يعرف بالتحلل الدموي (Hemolysis) (Sritharan ، 2006).

4-2 المضادات الحيوية (Antibiotics)

تعرف المضادات بكونها نوع من المواد المضادة للميكروبات كالبكتيريا ،وتستخدم على نطاق واسع في العلاج والوقاية من العدوى (Gualerzi واخرون ، 2013).

وتعمل المضادات اما على قتل (Bactericides)وتثبيط النمو البكتيري (Bacteriostatic) ،،وقد تكون مادة كيميائية يتم تصنيعها أو منتج طبيعي (نواتج ايضية) لبعض الكائنات مثل الفطريات التي تنتج مضادات البنسيلين (Gould ، 2016).وقد ادى الاستخدام المفرط للمضادات الى تطور بعض الانواع البكتيرية المقاومة ،اذ يجب استعماله وفقا لتعليمات طبية او الحاجة الى اخذه وذلك لتجنب والحد من ظهور مقاومة المضادات الميكروبية (Le Page وآخرون ، 2019).

هناك اساس جزيئي لتولد مقاومة للمضادات من قبل البكتيريا ،والتي ينتج عنها تغيرات دائميه في المحتوى الوراثي للميكروب ، مثل الطفرات واكتساب جينات مقاومة من سلالات مقاومة عن طريق عملية الاقتران Conjugation (والتي تسمح بنقل جينات عوامل الضراوة والبلازميد)،او عن طريق العاثيات (Phages) والترانسبوزانات (Transposons) (Roy واخرون ، 2011).يمكن اعطاء المضادات الحيوية كأجراء وقائي ويقتصر على هذا على الاشخاص المعرضين لخطر الاصابة بالأمراض مثل الاشخاص الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي (خاصة في حالات فايروس نقص المناعة HIV للوقاية من الالتهاب الرئوي)،أو الاشخاص الذين يتناولون ادوية مثبطة للمناعة ومرضى السرطان والذين يخضعون للجراحة (Flowers وآخرون ،2013) . وفيما يخص صفة المقاومة للمضادات الحيوية فقد قل وبشكل ملحوظ استعمال مضادات ذات حلقة البيتا-لاكتام (β -Lactam) في علاج التهاب المسالك البولية بسبب زيادة المقاومة لها من قبل سلالات ال *E coli* فقد ازدادت السلالات التي تنتج انزيمات البيتا–لاكتاميز(β-Lactamases) الى اكثر من 34% (Hussain ، 2015).

1-4-2 اصناف المضادات الحيوية

تم تقسيم المضادات الحيوية وفقا للجزء المتأثر من الخلية البكتيرية من قبل المضاد الى عدة اقسام (Leach واخرون ،2007 ; Collignon وآخرون ، 2018).

1 - مضادات تعمل على تثبيط عملية صنع البروتين(Inhibition of protein synthesis)

مثل : (Aminoglycosides , Macrolide , Tetracycline) وتعمل (Aminoglycosides)على الوحدة البنائية الصغيرة (30S ribosomal) في الحامض النووي الرايبي (rRNA) البكتيري ، مثل (Tobramycin، Gentamycin) . كما يقوم مضاد Tetracycline بتثبيط تصنيع البروتين عن طريق الربط مع الوحدة الفرعية (30S)من الريبوسوم ، وبالتالي إضعاف تفاعل الريبوسوم مع الحمض الريبي النووي النقال(tRNA).كما ويقوم مضاد (Chloramphenicol) بحجب(50S ribosomal) من التفاعل مع(peptidyltransferase) .

2 – مضادات تؤثر على تخليق الجدار الخلوي(Cell wall synthesis)

وتضم مجموعة كبيرة من المضادات الحيوية ولكن اهمها مجموعة بيتا- لاكتام (β– lactams) ،اذا تقوم البنسلينات (Penicillins) والتي هي من ضمن مجموعة مضادات البيتا -لاكتام بتثبيط تخليق الجدار الخلوي وذلك من خلال منع تجميع مكونات الجدار الخلوي من خلال تداخلها بالعمليات الحيوية للجدار الخلوي . اما مضادات السيفالسبورينات (Cephalosporins) ،والتي هي ايضا من ضمن مجموعة مضادات البيتا –لاكتام، فتؤثر على طبقة (Peptidoglycan) إذ تقوم تثبيط الروابط المتعامدة في هذه الطبقة المكونة للجدار الخلوي البكتيري يستهدف جدار الخلية البكتيرية عن طريق الارتباط بنهاية (D-alanyl-D-alanine) من طبقة

(Peptidoglycan) ، وبالتالي منع الترابط ومن هذه المضادات هي (Impenem،Aztreoname ، Ampicillin ، Pipracillin، Meropenem).

3 – مضادات تؤثر على تخليق الاحماض النووية (Nucleic acid synthesis)

مثل (Rifampin) حيث تؤدي الى موت الخلية البكتيرية من خلال تثبيط تصنيع الاحماض النووية .

4 – مضادات تؤثر على تركيب الغشاء السيتوبلازمي البكتيري (membrane structure bacterial)

مثل (Polymyxins) والتي تعطل بناء طبقة الفوسفوليبد (phosphate lipid)الخاصة بالخلية.

5 –مضادات تعمل على تثبيط المسارات الأيضية (Inhibition of a metabolic pathways)

مثل مضادات (sulfonamides) والتي تمنع الخطوات الرئيسة لتخليق حامض الفوليك في البكتيريا والذي يعتبر عامل مساعد (cofactor) في عملية التخليق الحيوي للنيوكولتيدات (nucleotides) .

2-4-2 مقاومة المضادات الحيوية (Antibiotics resistant)

ان مقاومة المضادات الحيوية الميكروبية يقصد بها قدرة الميكروب على مقاومة تأثير الدواء ،وان مصطلح (Antimicrobial resistant (AMR)) هو مجموعة فرعية من مجموعة المضادات الحيوية المقاومة Antibiotic resistant للأحياء المجهرية (CDC،2017 ; Cassir وآخرون ،2014).

وقد يصبح من الصعوبة معالجة البكتيريا المقاومة، وقد تتطلب احيانا ادوية بديلة أو جرعات اعلى من المضاد الحيوي .وقد تكون هناك اثار جانبية للوسائل البديلة كزيادة كلفة أو ثمن الدواء البديل أو الجرعات الاعلى من المضاد قد تكون سمية .وان مقاومة البكتيريا الى مضادات ميكروبية متعددة تدعى (Multidrug resistant) (MDR) ،او مقاومتها لنطاق واسع من المضادات فتدعى حينها ب Extensively drug resistant(XDR) ، اما مقاومتها لكل مجاميع المضادات فتدعى حينها (Pandrug resistant(PDR)) (Holmes وآخرون ، 2016).

وان البكتيريا قد تنتج جينات مقاومة بواسطة بلازميد الذي ينتقل عن طريق عملية نقل الجينات الافقي (Horizontal gene transfer)أو عن طريق انتاجها لأنزيمات البيتا- لاكتاميز (β- lactamases)أو قد يحدث بسبب طفرات ،وعلى الرغم من ان الطفرات قد تحدث بصورة نادرة حيث يكون معدل الطفرات التلقائية (Spontaneous mutation) قليل جدا مقارنة بالتكاثر الكروموسومي ،الا ان المعدل العالي لتكاثر البكتيري يساهم في تغيير مقاومتها (Levin ،2000).

ومن ضمن البكتيريا السالبة لصبغة كرام التي اظهرت مقاومة اكثر للمضادات الحيوية هي بكتيريا *E coli* ،حيث فسر العلماء هذا نتيجة حدوث طفرات وايضا انتاجها لأنزيمات البيتا لاكتاميز (beta-lactamases) والتي هي انزيمات تجعلها مقاومة لمجموعة واسعة من مضادات الحيوية البيتا- لاكتام (Kumarasamy وآخرون ،2016).

وقد اشار الباحثون (Hassell وآخرون ،2019 ; Xian-Zhi و Hiroshi ، 2009 ; Le Page وآخرون ، 2019)أن من اهم الاليات المقاومة للمضادات الحيوية من قبل البكتيريا هي :

1 – تعطيل المضاد أو تعديله (Drug inactivation or modification)مثل التعطيل الأنزيمي لمضاد (penicillin G) من خلال انتاج انزيمات البيتا- لاكتاميز (β- lactamases) أو الانزيمات الواقية (The protective enzymes) التي تقوم بإضافة مجموعة(acetyl) او مجموعة فوسفات الى موقع معين من المضاد الحيوي وبالتالي تقلل من قدرتها على الارتباط بالرايبوسومات البكتيرية وتعطيل تخليق البروتين .

2 - توليد المقاومة من خلال تغيير الموقع المستهدف (Targat site)او موقع الربط (Binding site)في البكتيريا وبالتالي تغيير الشكل المطابق للمواد مثل بعض الانواع البكتيرية التي تستخدم بروتينات لحماية الرايبوسومات (Ribosomes) من المضادات الحيوية(Antibiotic) التي تستهدف الرايبوسومات لتثبيط تصنيع البروتين اذا تعمل هذه البروتينات على الارتباط بالرايبوسوم البكتيري لحمايته وبالتالي تغير الشكل المطابق للمضاد المستعمل وعليه يسمح هذا للرايبوسومات بالاستمرار لتصنيع البروتينات الاساسية للخلية ومنع المضاد الحيوي من الارتباط بها لتثبيط تصنيع البروتين .

3- الية المقاومة (Mechanism of Resistance) من خلال تغيير بعض مسارات التمثيل الغذائي Metabolism للبكتيريا والتي تسمح لها بمقاومة المضاد .

4- التقليل من تراكم الدواء عن طريق تقليل نفاذية الدواء (Drug permeability) أو زيادة التدفق (Efflux pump)(ضخ Pumping) الدواء عبر سطح الخلية .

5 – تعطيل عمل المضاد الحيوي من خلال عملية الاكسدة(Oxidation)أو الاختزال (Reduction). وان عملية تعطيل المضاد الحيوي بعملية الاكسدة هي نادرة الحدوث من قبل بعض البكتيريا الممرضة الا ان هناك بعض الامثلة وهي اكسدة المضاد الحيوي(tetracycline) بفعل انزيم (TetX) .

3-4-2 انزيمات البيتا – لاكتاميز (β- lactamases)

تستخدم مجموعة مضادات البيتا – لاكتام (β- lactam) لعلاج مجموعة متنوعة من الالتهابات البكتيرية ،ومع ذلك، كانت هناك مقاومة متزايدة لهذه المضادات .ويعود السبب في ذلك الى عدة اليات اتبعتها البكتيريا المقاومة ومن اهمها هي قدرتها على انتاج انزيمات البيتا – لاكتاميز (β- lactamases)(Keshri وآخرون ، 2018).

وتعرف انزيمات البيتا – لاكتاميز β- lactamases على انها انزيمات تنتجها البكتيريا لتوفر لها مقاومة متعددة للمضادات الحيوية البيتا – لاكتام β- lactam مثل (penicillins، cephalosporins ، carbapenems، cephamycins).إذ توفر الانزيمات طريقة لكسر الهيكل المضاد الحيوي .وان مضادات البيتا - لاكتام (β- lactam) تمتاز بان لها عنصر مشترك في تركيبها حيث تتكون من حلقة من

اربع ذرات تعرف حلقة (β- lactam) ومن خلال التحلل المائي (Hydrolysis) ،يقوم الانزيم بكسر هذه الحلقة والذي يقود الى تعطيل الخصائص جزيئية المضاد للبكتيريا وبالتالي تولد المقاومة له (Jacoby و Munoz-price، 2005).

وان انتشار انزيمات البيتا – لاكتاميز (β- lactamases) ادى الى الحد من استخدام مضادات البيتا - لاكتام β- lactam ،وذلك لان استخدام هذه المضادات وبتزايد المقاومة لها ادت لتسبب في حالات فشل علاجية خطيرة وبالتالي قاد هذا الى الاستخدام الاجباري لطيف اوسع واكثر تكلفة من المضادات (Shapiro، 2017).

وان انتاج هذه الانزيمات تعتبر من الطرق الشائعة لتطور مقاومة المضادات الحيوية من قبل البكتيريا السالبة لصبغة كرام . ومن اهم انواع انزيمات البيتا-لاكتاميز هي الواسعة الطيف (ESBL) β- lactamases extended-spectrum و انزيمات البيتا–لاكتاميز المعدنية(β– Metallo Lactamases (MBL) وانزيمات من نوع (Amp-C- β- lactamases)، وتعتبر انزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف (ESBL)) extended- spectrum β– lactamases)وانزيمات البيتا –لاكتاميز من نوع Amp-C- من اكثر الانزيمات التي لها نشاط واسع في الالتهابات الجرثومية . (Lahiri وآخرون ، 2016).

وتعرف انزيمات البيتا-لاكتاميز الواسعة الطيف (ESBL) بانها انزيمات لها القدرة على تحليل البنسلينات (penicillins) الجيل الاول والثاني ومن الجيل الثالث السيفوسبورينات (cephalosporins و aztreonam)(ولكن ليس cephamycins).كما ويمكن تحضيرها خارج الجسم الحي (*In vitro*)بواسطة مثبطات البيتا – لاكتاميز مثل (clavulanic acid) .وبسبب زيادة الاصابة بالعدوى بأنواع بكتيريا التابعة للعائلة المعوية (*Enterobacteraceae*)لذلك زادت المقاومة من قبل هذه العائلة لأنزيمات البيتا-لاكتاميز الواسعة الطيف(ESBL). وان وبائية هذه الانزيمات اصبحت اوسع وايجادها في اماكن متعددة ومختلفة مثل المستشفيات وفي التربة والمياه. (Kue واخرون ،2007).

وتشفر لهذا النوع من الانزيمات جينات كروموسوميه او بلازميدية بكتيرية .ومن اهم الجينات المشفر لها هي (*bla TEM1* و *bla* SHV و *bla* TEM2) (Arora و Bal ، 2005).

وان انزيم (TEM-1)وهو من انزيمات البيتا-لاكتاميز الواسعة الطيف (ESBL) الاكثر شيوعا المنتجة من قبل البكتيريا .حيث ان حوالي 90% من مقاومة الامبسلين (Apenicillin)من قبل بكتيريا ال(*E coli* و *Klebsiella pneumonia*)(Ruiz، 2018).

اما انزيم (SHV-1)وهو من انزيمات البيتا-لاكتاميز الواسعة الطيف (ESBL) ايضا مسؤول عن ما يصل الى (20%) من مقاومة الامبسلين (Apenicillin) بواسطة بلازميد .ويشارك (68%)من الاحماض الامينية مع انزيمات (TEM-1) (Oliveira واخرون ،2019).

اما انزيمات (CTX-M) وهو احدى انزيمات البيتا-لاكتاميز الواسعة الطيف (ESBL) ،وهي لا ترتبط ارتباط وثيق بكل من انزيمي (TEM-1) و (SHV-1) .تم تسميتها بهذا الاسم بسبب نشاطها الاكبر ضد مضاد السيفوتاكيم Cefotaxime اكثر من غيرها من الانزيمات البيتا-لاكتاميز الواسعة الطيف (ESBL)(Hudson وآخرون ، 2014).

انزيمات البيتا – لاكتاميز من نوع (Amp-C-) والتي تنتمي الى الصنف الجزيئي – C -ضمن تصنيف Ambler´s ،ويشفر لها بواسطة كروموسوم وبلازميد .ولاتثبط بواسطة مثبطات البيتا- لاكتاميز مثل (clavulanic acid) . وهي انزيمات تعمل على تحلل كل من(Cephamycins وCarbapenems) (Arora وBal ، 2005).ويتم التشفير لهذا النوع من الانزيمات بواسطة جينات كروموسوميه للعديد من البكتيريا السالبة لصبغة كرام مثل (Pseudomonas، Proteus، Acinetobacter، Citrobacter ، Enterobacter و *E coli*) .الا انه يمكن ان تشفر لهذا النوع من الانزيمات جينات بلازميدية (Nordmann واخرون ،2019).

والنوع الاخر من انزيمات البيتا– لاكتاميز هي انزيمات البيتا– لاكتاميز المعدنية ((MBLS) β– lactamases Mettalo) التي تمتاز بان لها القدرة على مقاومة مضاد البيتا- لاكتام(Imipenem) والجينات التي تشفر لها تكون مرتبطة بالانتكرونات (Integrons)، وفي بعض الاحيان بلازميد لجينات المشفرة ومن اهم الجينات هي(*bla IMP* و *bla VIM*).وان تنوع الاحماض الامينية في انزيم IMP يصل الى (15%) بينما في انزيم (VIM) يصل الى (10%)فقط .ويعتبر انزيم (VIM) من اكثر انزيمات البيتا– لاكتاميز المعدنية (MBLS) انتشارا ،حيث وجد اكثر من 40 نوع منه تم اكتشافها لحد الان (Makena واخرون ، 2016).

اما انزيم (NBM-1) من انزيمات البيتا– لاكتاميز المعدنية (MBLS) وصف لاول مرة في نيودلهي عام 2009 في كل من بكتيريا(*E coli* و*Klebsiella pneumonia*)(Walsh وآخرون ،2011).

5-2 المـــــياه (The water)

1-5-2 مواصفات المياه (The water specification)

إن الماء يتركب من الأوكسجين (Oxygen) والهيدروجين (Hydrogen) حيث أن كل ذرة من الأوكسجين تتحد مع ذرتين من الهيدروجين مشكلة جزئية واحدة من الماء يرمز له بـ H_2O. وهذه لا تتغير في أشكال الماء المختلفة الصلبة والسائلة والغازية. تتصف المياه الصالحة للشرب بنظافتها وخلوها من مواد الضارة أو الاحياء المجهرية الممرضة . تحتوي العديد من مصادر المياه التي يستخدمها البشر على بعض ناقلات الامراض وعوامل تؤدي إلى المرض أو تسبب مشاكل صحية (Ahmed وآخرون ،2017).

هناك مجموعة متنوعة من العناصر النادرة موجوده تقريبا في جميع المياه الصالحة للشرب، وبعض منها تلعب دورا في التمثيل الغذائي ؛ على سبيل المثال (كلوريد الصوديوم) ملح الطعام ، وكلوريد البوتاسيوم وعناصر أخرى مثل الكلسيوم والمغنسيوم والفلور . كانت مفيدة في تركيزات منخفضه، يمكن ان تسبب مشاكل الاسنان عندما تكون موجودة عند مستويات مرتفعة. فالمياه أساسيه للنمو والحفاظ على اجسادنا، كما أنها تشارك في عدد من العمليات البيولوجية. وتلوث المياه يهدد صحة الإنسان. (Wen ، 2018).

من المؤكد أن نقاوة مياه الشرب وتأمين وصوله إلى الناس له عامل كبير في الحفاظ على الصحة، وتلافي انتشار الأمراض ومن اهم مواصفاته المياه هي :

1 - أن يكون عديم اللون وعديم الرائحة.

2 - أن يكون خاليا من الجراثيم والميكروبات.

3 - ألا تزيد فيه نسبة المواد الذائبة عن حد معين.

4 - ألا يكون له تأثير سيء على الصحة. (Cabanas وآخرون ، 2019).

2-5-2 طرق الكشـف عن تلوث المياه Methods for detecting water Pollution

وكما هو معروف ان الماء هو سر الحياه ،لذلك من الضروري الكشف الدوري للتأكد من عدم تلوثه بواسطة الاحياء المجهرية والممرضة منها بشكل خاص لما لها من تأثير خطر على حياه الانسان . ان التحليل البكتريولوجي للماء هي طريقة لتقدير اعداد البكتيريا الموجودة في الماء ،وتحديد نوع البكتيريا ، والذي يمثل جانب من جودة الماء . ويجب التأكد وبشكل دوري من المياه صالحة للاستهلاك البشري ،إذ ان مستويات البكتيرية يجب ان تكون بالحد الادنى بالمياه المستخدمة للاستحمام او الاستخدامات المنزلية بينما يجب ان تكون خاليا تماما من البكتيريا بالنسبة للمياه المستخدمة للشرب (Goel ، 2006).

وان الصفة المشتركة لجميع الفحوصات الروتينية للماء هي التحليل الاساسي بوجود مسببات الامراض التي قد تسبب القلق ،ومن اكثر مسببات المرضية الموجودة في الماء هي البكتيريا والتي تشكل مستويات مرتفعة منها مثل بكتيريا ال(*Salmonella typhi* و *E coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Vibrio cholera*) التي توجد بشكل شائع في أمعاء الانسان والحيوان والتي وجود بعض الانواع منها في الماء دليل على التلوث البرازي (Leclerc وآخرون ، 2001).

وهناك طرق عديدة للكشف عن تلوث الماء ومن اهم هذه الطرق هي طريقة العد المباشر للطبق (Direct plate count) وطريقة الانابيب (Tubes method) وطريقة ترشيح الغشاء (Membrane filtration) ومن اهم الاوساط الزرعية المستخدمة في الكشف عن التلوث الماء هي وسط Violet red bile agar (VRBA) المستخدم بطريقة ترشيح الغشاء والذي يحتوي على املاح الصفراء التي تعزز نمو البكتيريا السالبة لصبغة كرام ،ووسط (mEnd agar)والمستخدم لطريقة العد المباشر للطبق ووسط

مرق الماكونكي (MacConkay broth) والذي يستخدم مع طريقة الانابيب والذي يستخدم كوسط اختياري للبكتيريا السالبة لصبغة كرام ويمنع نمو البكتيريا الموجبة لصبغة كرام ،وبصورة عامة تحتوي هذه الاوساط الزرعية على سكر اللاكتوز (Lactose) والتي يتم تخميرها بواسطة البكتيريا التي تخمر سكر اللاكتوز إذ تنتج مستعمرات بلون محدد بينما التي لا تخمر سكر اللاكتوز تنتج مستعمرات عديمة اللون (Canencia واخرون ، 2016).

وتتم طريقة ترشيح الغشاء (Membrane filtration) والتي تستخدم بشكل ملحوظ في المختبرات من خلال اجراء تخافيف متسلسلة لعينات الماء ثم ترشح من خلال مرشحات غشائية وبعد ذلك تنقل هذه المرشحات الى اطباق تحتوي وسط مغذي وتحضن ثم تعد المستعمرات البكتيرية. اما طريقة العد المباشر للطبق تتم من خلال عد المستعمرات البكتيرية النامية على وسط مغذي . ومن اهم الاوساط المستخدمة لهذه الطريقة هي وسط اكار الماكونكي (Furusawa وآخرون ، 2008).

كما يمكن اختبار النشاط الميكروبي للماء من خلال القياس الكمي لادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) ،حيث ان جزيئات ال (ATP) توجد في و حول الخلايا الحية لذلك تعطي قياس مباشر للتركيز الحيوي والصحي للماء .وتتم قياس وجود ال ATP من خلال الضوء الناتج من تفاعل ال ATP مع انزيم (firefly luciferase) بجهاز (Luminometer) .اذا تتناسب كمية الضوء طرديا مع كمية الطاقة البيولوجية الموجودة في عينة الماء (Hanaor و Sorrell ، 2014).

6-2 التنميط البكتيري (Bacterial typing)

لما كانت العدوى هي السبب الرئيسي للمرض عبر التاريخ ونتيجة زيادة المخاوف من تفشي الامراض وزيادة قدرة المسببات المرضية للمقاومة لأغلب الادوية من خلال امتلاكها اليات ضراوة مختلفة ساعدتها بذلك ، لذلك اصبح من الضروري استخدم طرق لمعرفة وتحديد المسبب المرضي .إذ استخدمت طرق التنميط البكتيري لغرض تشخيص نوع البكتيريا وبالتالي تحديد العامل المسبب للمرض والعلاج المناسب له . وهناك العديد من المصادر لتحديد والتشخيص البكتيري(Cheah واخرون ،2015). ومن هذه الطرائق هي التنميط المظهري (Phenotypic) و التنميط الجيني (Genotypic).

1-6-2 طرائق التنميط المظهري (Phenotypic methods)

يعد التنميط المظهري أداة مهمة للتمييز بين سلالات بكتيريا *E coli* ، إذ يتم تحديد السلالة البكتيرية بطرق تقليدية مظهرية وذلك لسهولة العمل بها وقلة تكلفتها .وان تشخيص البكتيريا من خلال شكل وحجم المستعمرات وكذلك تحديد الخصائص الكيموحيوية (Biochemical)، إذ لاتزال هذه الطرق من الاساليب المهمة في تحديد

الانواع البكتيرية (Bou وآخرون ،2011). وتشمل طرق التشخيص المظهري الميزات المجهرية ،والخصائص المظهرية للمستعمرات البكتيرية النامية وقدرتها على انحلال الدم من عدمه ، ومتطلبات النمو محددة . وتشمل طرق التنميط المظهري باستخدام الاختبارات الكيموحيوية (Biochemical test) مثل (اختبار الكاتاليز Catalase test ،اختبار الاوكسيديز Oxidase test ،الاندول Indol ،اختبار المثيل الاحمر Methyl red test ، اختبار فوكس-بروكساور Voges- proksouer ، تخمر السكريات وغيرها من الاختبارات الاخرى) .وتجدر الاشارة الى انه لتحقيق هدف التشخيص المظهري يجب ان تتم في ظروف معينة مثل درجة الحرارة وفترة الحضن (MacFaddin وآخرون ،2000).

2-6-2 طرائق التنميط الجيني (Genotypic methods)

في السنوات الأخيرة ، استخدمت طرق التنميط الجيني المختلفة ، إذ ظهرت الحاجة لهذه الطرق بسبب عدم التوافق بين الخصائص المظهرية للعزلات والسلالات البكتيرية ،يمثل التنميط المظهري جزء مهم لمتابعة الوبائية التي تسببها الاحياء المجهرية الا انها تفتقر الى القوة التميزية ،بالمقابل قدمت التقنيات الجزيئية تحسنا كبيرا ويمكن ان تكون مكملة للنتائج المظهرية لتحديد أفضل فهم للتنوع البكتيري (Berendonk واخرون ، 2015).

1-2-6-2 طرائق التنميط باستخدام تفاعل سلسلة انزيم البلمرة العشوائي Randomly amplified polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)

اصبحت تقنية التفاعل البلمرة المتسلسل للحمض النووي المتعدد الأشكال العشوائية (RAPD-PCR) كثيرة الاستخدام في علم البيولوجي الجزيئي حيث تطوير عدة فحوصات جينية جديدة تقوم على التضخيم الانتقائي للحمض النووي (Chen واخرون ، 2019).

الاستخدام المتزايد يرجع في المقام الأول إلى بساطتها الواضحة واحتمالية عالية للنجاح. وبسبب الحاجة إلى معلومات تسلسل الحمض النووي . حيث استخدمت تقنية(RAPD– PCR) بادئات عشوائية لتضخيم مجموعة من المواقع الموزعة بشكل عشوائي في أي جينوم وبالتالي تودي الى الكشف عن تطور العلامات الجينية. لقد أسرت بساطة تقنية (RAPD) وقابليتها للتطبيق اهتمامات العديد من العلماء. ربما كان السبب الرئيس لنجاح تحليل (RAPD) الكبير هو نجاحها في تضخيم عدد كبير من التسلسلات الجينية التي تتطلب كميات صغيرة من الحمض النووي دون متطلبات الاستنساخ والتسلسل أو أي شكل آخر من أشكال التوصيف الجزيئي للجينوم

الأنواع المعنية ، اثبتت دراسات عديدة ان تحليل(RAPD) لجينوم بكتيريا *E coli* أعلى قدرة تمييزية لسلالاتها (Marialouis و Santhanam، 2016).

ان مبدأ تقنية (RAPD –PCR)هو استخدامها النوكليوتيدات القصيرة (oligonucleotides) (10 قواعد نتروجينيه) من تسلسلات عشوائية كتمهيد لتضخيم كميات من الحمض النووي الجيني الكلي تحت درجات حرارة التلدين (annealing)المنخفضة بواسطة (PCR). ويتم فصل منتجات التضخيم بشكل عام على جل الاكاروزمع إيثيديوم ببروميد (Darkazanli وآخرون ،2018).

وبسبب البساطة والتكلفة المنخفضة لتقنية (RAPD) ، فقد وجدت مجموعة واسعة من تطبيقات في العديد من مجالات علم الأحياء. حيث يتم استخدام التقنية في رسم الخرائط الجينية(Genetic Mapping) والتطور الوراثي (Evolutionary Genetics) (Paran و Michelmore، 2005).

يستخدم (RAPD- PCR) ، بادئات (Primers) قصيرة تتكون من تسلسلات عشوائية (Random sequences) يتراوح (من 8 إلى 15) نيوكليوتيدات (nucleotides). يتم إنشاء أنماط معقدة من منتجات تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) في مناطق مختلفة في جينوم الكائن الحي. يعاني (RAPD)من ضعف التكاثر مختبريا إلى حد كبير بسبب متطلبات ظروف تضخيم (PCR) ،بما في ذلك الانخفاض السريع في درجة الحرارة لجهاز التدوير الحراري (Thermal cycler) لتفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) (Cordeiro وآخرون ، 2019) . أستخدام (RAPD- PCR) بنجاح لتنميط السلالات بين كل من البكتيريا والفطريات (Ercan وآخرون ، 2012).

2-2-6-2 طرائق التنميط باستخدام (ERIC-PCR)

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase Chain Reaction

(ERIC –PCR) هي تقنية تنميط الجيني تتميز بكونها بسيط ، قليلة التكلفة وفعالة من حيث التمييز بين أنواع مختلفة من السلالات. يتم من خلال هذه التقنية التعرف على تسلسلات (ERIC) في الجينومات البكتيرية ، بما في ذلك أفراد العائلة المعوية مثل *E coli*. علاوة على ذلك، هناك أعداد مختلفة من نسخ تسلسل ERIC بين الأنواع البكتيرية. من المثير للاهتمام أن هناك تنوع كبير في عدد النسخ بين سلالات مختلفة من هذا التنوع يثير عمليات التطور بين السلالات البكتيرية داخل أنواع معينة *E coli* (Behzadi وآخرون ، 2015).

تختلف تسلسلات ال (ERIC) في بكتيريا *E coli*،التي تسمى بوحدات متكررة بين الجينات (intergenic repetitive units)، عن معظم التكرارات البكتيرية الأخرى في توزيعها عبر مجموعة أوسع من الأنواع. اذ تم وصف تسلسل (ERIC) لأول مرة في(*E coli* و *Salmonella typhimurium*) ، وأجناس آخرى من بكتيريا العائلة المعوية (*Enterobacteraceae*) ، وكذلك *Vibrio cholerae* (Chiu واخرون ، 2005).

. تسلسل (ERIC) هو تسلسل متناظر (palindrome)غير كاملة (incomplete) تتكون من 127 زوج قاعدي . بالإضافة إلى ذلك ، تم وصف التسلسلات الأقصر الناتجة عن عمليات الحذف الداخلية ، بالإضافة إلى التسلسلات الأطول بسبب عمليات الإدراج (Seifi وآخرون ، 2016).

تم العثور على تسلسلات (ERIC) فقط في المناطق الجينية ، على ما يبدو فقط داخل المناطق المنسوخة. يتغاير عدد نسخ تسلسل (ERIC) بين الأنواع البكتيرية فقد يتراوح بين (30-150) نسخة فقد تم تقديره مبدئيًا من خلال الاستقراء أنه قد يكون هناك حوالي(30) نسخة (*E coli* K-12)، كما ان هناك بعض الانواع البكتيرية لا تحتوي على مثل هذه العناصر (Wei واخرون ، 2004).

في حين تبين ان جينوم(*Photorhabdusn luminescens*)قد تحتوي على اكثر من (700) نسخة وان التغاير في عدد النسخ هذا يشير الى المناطق بين الجينات التي تحتوي على تسلسلات ال ERIC في سلالة مقارنة بالأخرى ،وبالتالي يسهل عملية المقارنة (Codjoe وآخرون ،2019).

توفر تسلسلات (ERIC) امكانية دراسة تطور البكتيريا كونها تسلسلات طويلة واكثر فائدة و اغناءا بالمعلومات من حيث الاختبارات لدراسة المقارنة بين الاجناس والانواع البكتيرية فضلا عن تواجدها في مدى واسع من الانواع البكتيرية ، تسلسلات (ERIC) لا يعرف عنها الا القليل من حيث نشؤها وتطورها أو وظيفتها، في حيث اثبت بعض الباحثين ان هذه التسلسلات المتكررة تعمل كمناطق ارتباط (Binding site) للعديد من الانزيمات مثل انزيم (DNA Polymeras) و انزيم (DNA gyrase) (Blanco وآخرون ، 2017).

3-2-6-2 طرائق التنميط باستخدام ال (BOX- PCR)

(BOX) هي عناصر متكررة (repetitive elements) من مجموعات مختلفة تتكون من ثلاث تتابعات فرعية (subunit sequences) . هذه التتابعات الثلاثة هي(boxA و boxB و boxC)طولها هي(59 و 45 و50) نيوكليوتيدات على التوالي .(Mishra وآخرون ، 2015).

(BOX-PCR)هي التقنية الأكثر استخدامًا نظرًا لبساطتها وكفاءتها وانخفاض تكلفتها. خاص مع (repetitive extragenic palindromic-PCR (rep-PCR يستخدم بادئ ال Fajardo-Cavazos)BOX-A1R و Nicholson ، 2006).

(BOX-PCR) هو تحليل لبصمات الحمض النووي (fingerprinting analysis) والذي تم تحديده أول مرة في الكائنات الدقيقة الموجبة لصبغة غرام(Gram-positive) في بكتيريا العقد الرئوية *Streptococcus pneumoniae* على عكس تسلسلات (ERIC) التي تم تحديدها في البكتيريا السالبة لصبغة غرام (Gram-negative) (Fardsanei واخرون ، 2016).نظرًا لأن تسلسلات BOX المتكررة تتخلل جميع أنحاء الجينوم ، فإن BOX-PCR هي طريقة قادرة على مسح العديد من مناطق DNA المتناثرة في الجينوم البكتيري. وقد ثبت أن لديها قوة تمايز متشابهة أو حتى أفضل من السلالة ، بالإضافة إلى أنها أسهل في الأداء من تقنيات (ribosomal intergenic spacer analysis(RISA) ، (restriction fragment (RFLP)) length polymorphism) ، (amplified fragment length polymorphism(AFLP)) وتقنيات أخرى(Cherif وآخرون ، 2003).

يتم فصل قطع الحمض النووي في تقنية (BOX-PCR) عن طريق الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (agarose)، على الرغم من أنه أقل تكرارًا بشكل عام. الا انها لا تتأثر أنماط BOX-PCR بعمر السلالة المزروعة و المراد تحليلها ايضا تتصف بالقدرة على معرفة البصمات التي يتم تحليها بسهولة من خلال عدة طرق بمساعدة الكومبيوتر.. هذه الميزات تجعل(BOX-PCR)أداة مستخدمة بكثرة في دراسات الجغرافيا الحيوية(Biogeography) في بيئات الأحياء المجهرية (Lazzi وآخرون ، 2004). هذه التقنية لا تأخذ وقتا كبير لكن العائق الأكثر أهمية أنها تحلل جزءا من الجينوم وقوتها التمييزية عادة تكون اقل من نظام(RAPD) (Bouchet واخرون ، 2008).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3- المواد وطرائق العمل (Materials and Methods)

3-1 المواد المستعملة في الدراسة

3-1-1 الأجهزة

استخدمت الأجهزة المبينة في الجدول (3-1).

الجدول (3-1): الأجهزة المستخدمة في الدراسة

اسم الجهاز	الشركة المصنعة (المنشأ)
براد (ثلاجة) Refrigerator	Concord(Germany)
جهاز الأشعة فوق البنفسجي Gel documentation	U.V. product (USA)
جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis apparatus	Bioneer(Korea)
جهاز التدوير الحراري Thermal cycler	Bioneer (Germany)
جهاز التقطير Distillator	GFL(Germany)
جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Fanem(Brazil)
جهاز فايتك Vitek 2	Biomeriux (France)
جهاز قياس تركيز DNA Nanodrop instrument	Bioneer (Korea)
حاضنة Incubator	Selecta (Spain)
حمام مائي Water bath	GFL(Germany)
مازج Vortex	Bioneer(Korea)
فرن موجي Microwave	Shownic(China)
فرن كهربائي Oven	Gallen Khamp(England)
كابينة زرع Hood	Gallen Khamp(England)
كاميرا رقمية Digital Camera	Nikon (Japan)
مجهر ضوئي Microscope	Olympus(Japan)
مرشحات دقيقة Millipore filters	Sartorius(Germany)
مقياس الرقم الهيدروجيني pH meter	Orient(USA)
مؤصدة Autoclave	Hirayama(Japan)
ميزان حساس Sensitive balance	Kevn(Germany)

جهاز طرد مركزي صغير Eppendroff bench centrifuge	Hermle(Germany)
قارئ الصفيحة المايكروية Microplate Reader	Kevn(Germany)
Deep freeze	Tekoa(Spain)

2.1.3 المواد الكيمياوية والحيوية (Chemical and Biological materials)

استخدمت المواد الكيمياوية والحيوية المذكورة في الجدول (3-2).

الجدول (3-2): المواد الكيمياوية والحيوية المستخدمة في الدراسة.

اسم المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
اثيلين ثنائي أمين رباعي حامض ألخليك Ethylene Diamine Tetra Acitic Acid (EDTA)	BDH	England
كحول الايثانول Ethanol %95	BDH	England
الاكاروز Agarose	Bio Basic INC	*Canada*
كلوريد الصوديوم Sodium chloride	BDH	England
كلوكوز Glucose	BDH	England
كليسيرول Glycerol	BDH	England
ماء مقطر خالي من الايونات Deionized Distilled water	Bioneer	Korea
هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide	BDH	England
بيروكسيد الصوديوم	B.B.H	England
ماء خالي من النيوكليز Nuclease Free Water	Promega	USA
صبغة بروميد الأثيديوم Ethidium bromide dye	Promega	UK
صبغة التحميل Loading dye	Promega	UK
Hydroxylamine (2M)	BDH	England
كلوريد الحديد FeCl2	BDH	England
كلوريد الهايدروجين HCl	BDH	England
محلول اليوريا 40%	BDH	England

الدم Human Blood	مصرف الدم	بعقوبة

3-1-3 الكواشف (Reagents)

استخدمت الكواشف المذكورة في الجدول (3-3).

الجدول (3-3) : الكواشف المستخدمة في الدراسة

الكاشف	الشركة المصنعة	المنشأ
كاشف كوفاكس Kovac's Indol Reagent	Bio Mérieux	France
N,N,N,N-tertamethyl Para-ethylene diamine hydrochloride الأوكسيديز	BDH	UK
صبغة المثيل الاحمر Methyl red staining	BDH	UK
كاشف– فوكس بروسكاور Voges–Proskouer Reagent والذي يتضمن: المحلول الأول: VP1 (40%) هيدروكسيد البوتاسيوم في الماء المقطر. المحلول الثاني : VP2 (5%) الفا نيفثانول في كحول اثيلي مطلق	BDH	UK
كاشف انزيم الكاتاليز Catalase reagent	BDH	UK
محلول مكفرلاند القياسي (ثابت العكورة) 1.5×10^8	Bio Mérieux	France

3-1-4العدة المختبرية

استخدمت العدة المذكورة في الجدول (3-4).

الجدول(3-4) : العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة

العدة	الشركة المصنعة	المنشأ
عدة صبغة كرام Gram stain والتي تتضمن الاتي أ- البلور البنفسجي Crystal violet ب- أيودين Iodine ج- أسيتون Acetone د- سفرانين Safranin	B.D.H	UK
عدة استخلاص الدنا DNA Extraction kit	ABIO pure	USA
عدة جهاز تشخيص البكتريا Vitek 2 kit 1 - شريط VITEK2 2– Normal saline (0.5%) 3- وسط زرعي (الاكار المغذي) - 4- Plastic piece for carrying tubes 5- VITEK2 GN card 6- رجاج Vortex 7- VITEK2 Densicheck 8 -ماسحة قطنية Swabs cotton	Biomeriux	France
ماستر مكس Master Mix	Promega	USA

3 –1– 5 الأوساط الزرعية Culture media

استخدمت الاوساط الزرعية والتشخيصية المذكورة في الجدول (3–5).

الجدول (3–5) الاوساط الزرعية والتشخيصية المستخدمة في الدراسة

الوسط الزرعي	الشركة المصنعة والمنشأ	الاستخدام	المصدر
وسط اكار الماكونكي MacConkey agar	Himedia (India)	استعمل في عملية العزل الاولي (جمع العينات السريرية) لبكتيريا *E coli* والكشف عن قابليتها لتخمير سكر اللاكتوز	(Forbes واخرون , 2007).
وسط اكار اساس الدم Blood base agar	Himedia(India)	استعمل لاختبار قابلية بكتيريا *E coli* على تحليل الدم ومعرفة نوع التحلل الدموي	(Forbes واخرون , 2007) .
وسط مرق صويا تربتون Tryptone Soya broth	Oxoid (England)	استعمل للكشف عن الغشاء الحيوي المتكون بواسطة بكتيريا*E coli*	(Ranjith واخرون ،2017).
وسط اليوريا الاساس Urea agar base	Himedia (India)	استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا عن انتاج انزيم اليوريز	(Atlasو Snyder، 2015).
وسط سترات السايمون Simmon Citrate agar	Himedia(India)	استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا لاستهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون	(Hemraj واخرون ، 2013)
وسط MR/VP	Oxoid (England)	استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على تخمر السكر وكذلك للكشف عن قابلية البكتريا لإنتاج الاسيتوين	(Hemraj واخرون ، 2013).
وسط اكار مولر هنتون Muller-Hinton agar	Oxoid (England)	استعمل لأجراء اختبارات الحساسية بكتيريا *E coli* للمضادات الحيوية وللكشف عن انزيمات بيتا – لاكتاميز	(MacFaddin ، 2000)
وسط الاكارالمغذي Nutrient agar	Oxoid(England)	استعمل هذا الوسط لتنشيط العزلات وحفظ قصير الامد	(MacFaddin ، 2000)
وسط مرق الماكونكي MacConkey broth	Himedia (India)	استعمل للكشف عن تلوث عينات الماء ببكتيريا السالبة لصبغة غرام	(Gambero واخرون ،2016)
مرق نقيع القلب والدماغ Brain-heart infusion broth	Oxoid (England)	استعمل للحفظ طويل الامد للعزلات البكتيرية بعد اضافة كليسيرول لكل 85 ملليتر من الوسط يضاف 15ملليتر من الكليسرول	(MacFaddin ، 2000).
وسط كليغلر Kligler's iron agar	Merseyside (U.K)	استعمل للكشف عن قابلية البكتريا لتخمير السكريات الثنائية اللاكتوز والكلوكوز وانتاج غاز H2S	(Forbes واخرون , 2007).
وسط الأيوسين مثيلين الازرق Eosin Methylene Blue	Himedia (India)	استعمل كوسط تفريقي لتميز عزلات *E coli* عن الانواع البكتيرية الاخرى للعائلة المعوية حيث تظهر مستعمرات بكتريا *E coli* بلون اخضر لماع معدني ،ا	(Forbes واخرون , 2007).
وسط ماء الببتون Pepton water	Himedia (India)	استعمل لاختبار قدرة العزلات على استهلاك حامض التربتوفان من خلال انتاجها لأنزيم التربتوفانيز الذي يحلل التربتوفان الى مكوناته الايضية و محررا الاندول	(Hemraj واخرون ، 2013).

6-1-3 المضادات الحيوية (Antibiotics)

استخدمت أقراص المضادات الحيوية في اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (CLSI , 2019) المذكورة في الجدول(3–6)

الجدول(3-6) : أقراص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز µg/disc	المنشأ
Imipenem	IMI	10	UK
Tetracycline	TE	30	UK
Doxycycline	DOX	30	UK
Aztreonam	ATM	30	UK
Levofloxacin	LVX	5	UK
Cefpodoxime	CPO	10	UK
Trimethoprim-sulfamethoxazole	STX	1.25/ 23.75	UK
Azithromycin	AZM	15	UK
Ampicillin-sulbactam	AMS	10/10	UK
Ticarcillin-clavulanate	TCC	75/10	UK
Cefoxitin	FOX	30	UK
Cefuroxime	CFX	30	UK

2–استخدمت المضادات الحيوية و المذكورة في الجدول(3–7) في الكشف عن انزيمات البيتا–لاكتاميز.

الجدول(3-7): أقراص مضادات الحيوية المستخدمة في الكشف عن انزيمات البيتا–لاكتاميز

المضاد	الرمز	التركيز µg/disc	نوع الانزيمات
Amoxicillin\Clavulinic acid	AMC-30-	20\10	**ESβL انزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف**
Cefotaxime	CTX	30	
Piperacillin	PRL	100	
Cefixime	CFM-5-	5	
Cefoxitin	FOX	30	**أنزيمات Amp -C-**
Imipenem	IMI	30	**انزيمات البيتا- لاكتاميز المعدنية**

7-1-3 البادئات Primers

استخدمت البادئات المذكورة في الجدول(3–8).

الجدول (3-8) البادئات المستخدمة بالدراسة

Primer	تسلسل البادئ (3' – 5')	المصدر
ERIC	F:ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC R:AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	(Ardhami وRanjbar ، 2016).
BOX	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	(Gambero واخرون ،2017)
RAPD	(AAGAGCCCGT)	(Nielsen واخرون ،2014)

2-3 طرائق العمل Methods

1-2-3 طرق التعقيم Sterilization Methods

استعملت عدة طرق للتعقيم وحسب ما ورد في (2008, Rao) ، ومن هذه الطرق هي :

ا- التعقيم بالحرارة الرطبة

استخدمت هذه الطريقة لتعقيم الاوساط الزرعية وبعض المحاليل وذلك باستعمال المؤصدة لمدة (15) دقيقة وبدرجة حرارة (121م°) وضغط (15) باوند / انج .

ب- التعقيم باستعمال مرشحات دقيقة بأقطار مختلفة (0.45, 0.22) مايكرومتر استخدمت هذه الطريقة لتعقيم المواد التي تتأثر بالحرارة .

ج- التعقيم بالحرارة الجافة باستخدام الفرن (oven) لمدة (2)ساعة بدرجة حرارة (180 م°) وذلك لتعقيم الزجاجيات .

2-2-3 تحضير الاوساط الزرعية Media preparation

تم تحضير الاوساط الزرعية المذكورة في الجدول (3-5) حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العلبة وعقم بطريقة التعقيم بالحرارة الرطبة .

3-2-2-1- تحضير الاوساط الزرعية التركيبية Synthetic media

1 - وسط اكار الدم الاساس Blood agar base media

حضر وسط أكار الدم حسب ما مذكور في تعليمات الشركة وعقم بالمؤصدة ثم برد إلى درجة حرارة 45° م ومن ثم أضيف إليه الدم بنسبة 5% ومزج مزج خفيف ثم صب في الإطباق، وترك ليتصلب (Forbes واخرون , 2007).

2 - وسط أكار اليوريا الاساس Urea agar base media

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 وعقم بالمؤصدة وتم تبريده إلى درجة حرارة 45° م. ثم أضيف 50 مليلتر من محلول 40% من اليوريا المعقمة باستعمال مرشحات دقيقة بقطر 0.45 مايكروميتر، ثم صب في انابيب عاديه بشكل مائل وحفظ في درجة حرارة 4° م. الغرض من هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات على إنتاج إنزيم اليوريز (Atlasو Snyder، 2015).

3- وسط اختبار الاندول Indol test media

تم تحضر هذا الوسط بإذابة 20 غرام من ماء الببتون و5 غرام من كلوريد الصوديوم في 950 مليلتر من الماء المقطر، عُدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 وأكمل الحجم إلى 1 لتر وعُقم بالمؤصدة، ثم صب في أنابيب بواقع 5 مليلتر لكل أنبوب، وحفظ في درجة حرارة 4° م، استعمل هذا الوسط لاختبار قدرة العزلات على استهلاك حامض التربتوفان من خلال انتاجها لانزيم التربتوفانيز الذي يحلل التربتوفان الى مكوناته الايضية ومحررا الاندول (Hemraj واخرون ، 2013).

3-2-2-2 تحضير المحاليل Solutions preparation

1 – تحضير محلول صبغة البنفسج البلوري Preparation of violet Solution

حضر المحلول بإضافة (0.1) غرام من مسحوق البنفسج البلوري في(10) ملليترمن الماء المقطر وعقم بواسطة وحدات الترشيح الدقيق ثم حفظ في درجة حرارة (4 م°)، استعمل في التحري عن قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation (Babapour وآخرون ، 2016).

2- تحضير محلول اثيلين ثنائي أمين رباعي حامض ألخليك Ethylene Diamine Tetra Acitic Acid (EDTA)

حضر المحلول بإضافة (18.6) غرام من مسحوق (EDTA) في (50) ملليتر من الماء المقطر وتم تعديل pH باستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH الى (8) ثم أكمل الحجم الى (100) ملليتر بالماء المقطر(Bhalerao واخرون ،2010).

3- تحضير محلول كلوريد الحديديك ($FeCl_3$10%) في محلول حامض الهيدروكلوريك (4M HCl)

تم تحضير(HCl 4M) بإضافة (3.33) ملليتر من HCl الى (6.66) ملليتر من الماء المقطر ،ثم تم تحضير كلوريد الحديديك ($FeCl_3$10%) من خلال أذابة 1 غرام من ($FeCl_3$)في القليل من (HCl) ،ثم اكمل الحجم الى (10) ملليتر بنفس الحامض .استخدم هذا المحلول في الكشف عن(AHL) Acyl homoserine lactone (Baldiris واخرون ،2016).

4- تحضير محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH(3.5 M)

تم تحضيره من خلال إذابة (1.4)غرام من هيدروكسيد الصوديوم في (10) ملليتر من الماء المقطر ، استخدم هذا المحلول في الكشف عن(AHL)Acyl homoserine lactone (Baldiris واخرون ،2016).

5- تحضير محلول هيدروكسيد أمين Hydroxylamine(2 M)(NH_2OH)

تم تحضيره من خلال إذابة (1.3)غرام من (NH_2OH)في (20) ملليتر من الماء المقطر ،استخدم هذا المحلول في الكشف عن(AHL)Acyl homoserine lactone (Baldiris واخرون ،2016).

3-2-3 حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

3-2-3-1 الحفظ قصير الأمد (Short time preservation)

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الاكار المغذي المائل بالعزلات البكتيرية ، ثم حضنت بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة وبعدها حفظت الانابيب المزروعة بدرجة حرارة (4 م°) لحين استعمالها ولمدة شهر اما عملية الادامة فتتم بشكل دوري شهري وذلك من خلال تنشيطها على وسط الاكار المغذي ثم اعادة زرعها على وسط الاكار المغذي المائل(MacFaddin ، 2000) .

2-3-2-3 الحفظ طويل الأمد (Long time preservation)

حضر الوسط المستخدم في الحفظ طويل الامد من خلال اضافة (15)ملليتر من الكليسيرول الى (85) ملليتر من وسط مرق نقيع الدماغ والقلب ، وتم توزيعه على انابيب اختبار ذات غطاء محكم لا تتلف بالحرارة وتم تعقيمها بالمؤصدة ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة المختبر بعدها لقحت بمستعمرة بكتيرية نقية نامية على وسط الاكار المغذي ثم حضنت بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة ثم بعدها حفظت هذه الانابيب بدرجة حرارة -20 علما ان هذه العزلات قادرة على البقاء (من 6 الى 8) شهور (MacFaddin ، 2000) .

4-2-3 جمع العينات Samples collection

خلال المدة من (22 ايلول ولغاية 28 تشرين الثاني) تم جمع (180)عينة سريرية من مصادر متعددة (ادرار ،مسحات جروح ،مسحات حروق) ومن كلا الجنسين وبأعمار مختلفة من مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي وزرعها على وسط الماكونكي اكار ،وجمع (110)عينة بيئية (ماء) من مختبر الصحة العامة- قسم الاغذية في محافظة ديالى ،إذ يتم استلام العينات من قبل موظف تسليم العينات ثم زرعها على وسط مرق الماكونكي للتأكد من ان العينات ملوثة ببكتريا السالبة لصبغة كرام ثم بعد ذلك زرع العينات الملوثة على وسط اكار الماكونكي .

5-2-3 عزل وتشخيص بكتيريا *E coli* (Isolation and Identification)

تم عزل وتشخيص العزلات البكتيرية من خلال تنميتها على الاوساط الزرعية الملائمة لنموها ودراسة الصفات المظهرية للمستعمرات والخلايا البكتيرية واجراء الفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية .

1-5-2-3 زرع العزلات السريرية

تم تخطيط العزلات البكتيرية على وسط اكار الماكونكي وذلك لتشخيص بكتيريا *E coli* مظهريا (Forbes واخرون , 2007).

2-5-2-3 زرع العزلات البيئية (ماء)

تم زرع عينات الماء في وسط مرق الماكونكي وذلك لتشخيص وجود البكتريا السالبة لصبغة كرام وذلك باخذ (1) مل من عينة الماء واضافتها الى 10 مل من الوسط المعقم وحضنت لمدة 24ساعة بدرجة حرارة 37م°،إذ تعد النتيجة موجبة عند حدوث تخمر وتغير لون الوسط من اللون الارجواني الى اللون الاصفر (البلو والنعمان ،2018).

3-5-2-3 الزرع على الوسط التفريقي Eosin Methylene Blue (EMB)

يتم من خلال زرع العزلات النقية المأخوذة من التشخيص الاولي على وسط اكار الماكونكي الى وسط اكار الايوسين ازرق المثلين والذي هو من الاوساط التفريقية المهمة لبكتيريا *E coli* ،اذا ان نمو هذه البكتيريا يعطي مستعمرات ذات بريق اخضر معدني (Forbes وآخرون , 2007).

4-5-2-3 الفحص المجهري (Microscopic examination)

تم اجراء الفحص المجهري من خلال اخذ مسحة من مستعمرات كل عزلة بكتيرية ومزجت مع قطرة من الماء المقطر المعقم على شريحة زجاجية ثم صبغت بصبغة كرام وفحصت بالمجهر الضوئي باستعمال عدسة زيتية بقوة تكبير (X100) لملاحظة استجابة الخلايا البكتيرية للصبغة وشكلها وترتيبها (MacFaddin ، 2000) .

5-5-2-3 الاختبارات الكيموحيوية (Biochemical tests)

1-اختبار إنزيم الأوكسيديز (Oxidase test)

يتم اخذ مستعمرة من المزروع البكتيري النامي على وسط المكاونكي اكار بواسطة اعواد خشبية ووضعها على ورق الترشيح نظيفة ومعقمة ثم نضيف لها قطرات من كاشف الاوكسديز، ان ظهور اللون البنفسجي خلال (10) ثواني بعد عملية المزج على ورقة الترشيح يعني ان النتيجة موجبة ، استعمل هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم الاوكسديز(Tadesseو Alem ، 2006) .

2-إختبار إنزيم الكاتاليز (Catalase test)

يتم اخذ مستعمرة من المزروع البكتيري النامي على وسط الماكونكي اكار بواسطة عود خشبي ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة يضاف لها قطرات من كاشف بيروكسيد الهايدروجين H_2O_2 باستعمال ماصة باستور ، يستعمل هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا في انتاج انزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء ويحرر غاز الاوكسجين بشكل فقاعات هوائية اذا يعد ظهور الفقاعات بعد ثواني من المزج على الشريحة دليل على ايجابية الفحص(Atlasو Snyder ، 2015).

3-إختبار إنتاج إنزيم اليوريز (Urease production test)

لقح وسط اكار اليوريا المائل بالمستعمرات البكتيرية بطريقة التخطيط والطعن وحضن بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة. حيث تكون ايجابية الفحص من خلال تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي ، اي تحلل اليوريا من خلال افراز انزيم اليوريز بواسطة البكتريا. (Atlasو Snyder ، 2015).

4-إختبار وسط أكار كلغلر الحديد (Kligler Iron Agar (KIA))

لقح وسط اكار ثنائي السكر الحديدي المائل بطريقة التخطيط والطعن بالبكتريا ثم حضنت بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة، يكون هذا الفحص موجب من خلال تغير لون الوسط من الاحمر الى الاصفر حيث يدل على تخمر السكريات الثنائية (الكلوكوز واللاكتوز) وايضا قابلية البكتريا على انتاج الغازات اذا تتكون فقاعات غازية في اسفل الوسط او على الجوانب ، ويدل تكوين راسب اسود على وجود غاز كبريتيد الهايدروجين H_2S وتقرا النتائج كما في الجدول (3-9).

الجدول(3-9) قراءة نتائج اختبار وسط اكار الكلغلر الحديد (Forbes وآخرون , 2007).

لون المائل	لون القعر	النتيجة
احمر	اصفر	تخمر الكلوكوز فقط
اصفر	اصفر	تخمر الكلوكوز واللاكتوز
احمر	احمر	لا يوجد تخمر

5- اختبارات Imvic Tests (Hemraj وآخرون ، 2013).

*إختبار إنتاج الأندول Indol production test

يتم هذا الاختبار من خلال تلقيح الانابيب الحاوية على وسط ماء الببتون بالبكتريا ثم تحضن هذه الانابيب بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة ثم بعد الحضن يتم اضافة(10) قطرات من كاشف كوفاكس على السطح الداخلي للأنبوبة ، إذ يدل ظهور حلقة بلون احمر بعد ثواني من اضافة الكاشف على ايجابية الاختبار اي تكون حلقة الاندول ، علما ان الاندول هواحد نواتج الايض للحامض الاميني التربتوفان وذلك لامتلاك البكتريا انزيم التربتوفاينيز .

*إختبار المثيل الأحمر(Methyl red test)

يتم هذا الاختبار من خلال تلقيح الانابيب الحاوية على وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفات بالمستعمرات البكتيرية المراد اختبارها وتحضن لمدة (24-48) ساعة بدرجة حرارة (37 م°) ثم بعد الحضن يتم اضافة قطرات من كاشف المثيل الاحمر بواسطة ماصة باستور وان ايجابية الفحص يكون من خلال ظهور اللون الاحمر بعد اضافة الكاشف ، إذ يدل على قدرة البكتريا على انتاج كميات كبيرة من احماض lactic وFormic نتيجة ايض الكلوكوز ، اما النتيجة السالبة للفحص فتدل من خلال بقاء اللون الاصفر اي عدم قدرة البكتريا على انتاج الاحماض المذكورة اعلاه بكميات كافية لخفض ال pH الى (4.5) .

***إختبار فوكس – بروسكاور (Voges - proskauer test)**

يتم هذا الاختبار من خلال تلقيح الانابيب الحاوية على وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفات بالمستعمرات البكتيرية المراد اختبارها وتحضن لمدة (24-48) ساعة بدرجة حرارة (37 م°) ثم بعد الحضن يتم اضافة كاشف فوكس – بروسكاور (vp1)بمقدار (1مل) ثم يتبعه 3مل من (VP2) ورج الانبوبة بلطف لمزج الخليط ويترك لمدة (15) دقيقة إذ يدل تغير اللون الاصفر الى اللون الاحمر – الوردي دليل على ايجابية الفحص حيث يستخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا في انتاج اسيتوين (Acetoin) كناتج لتخمر السكريات .

***إختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test)**

يتم هذا الاختبار من خلال تلقيح وسط اكار السايمون ستريت المائل بالبكتريا المراد اختبارها بطريقة التخطيط والطعن وتحضن لمدة(24-48) ساعة بدرجة حرارة (37 م°) وان ايجابية الاختبار تكون من خلال تغير الوسط من الاخضر الى الازرق حيث يدل على قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون وعلى استهلاك املاح الامونيوم كمصدر للنيتروجين وانتاج عدد من المركبات القاعدية .

6-2-3 تأكيد التشخيص بأستخدام (Vitek 2 system)

تم استخدام نظام الفايتك لتاكيد تشخيص ال *E coli* من خلال مجموعة تشخيصية خاصة بالجهاز ،وهذا تطلب بطاقة تشخيص خاصة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام والتي تحتوي (64)حفرة تحتوي مؤشر لوني مجفف ،حيث تحدث التفاعلات الكيمو حيوية ،سجل الجهاز هذه التغيرات اللونية التي تحدث نتيجة نمو البكتريا ووفقا لتعليمات(BioMerieux guidance)، والنتيجة كما هي مذكورة بالملحق (10)(Pincus , 2011).

7-2-3 حساسية العزلات للمضادات الحياتية (Antibiotic susceptibility)

1-7-2-3 طريقة الاقراص (Disk method)

اجري هذا الاختبار بالاعتماد على توصيات CLSI (2019) ، (Kirby-Bauer method) (Vandepitte واخرون ،2003) . وعلى النحو الآتي :

* تم تحضير العالق البكتيري من اخذ مستعمرة بكتيرية النشطة والنامية على وسط الاكار المغذي لتلقيح 10 مل من المحلول الملحي الفسلجي ، حيث تم الحصول على عكوره مساوية لعكوره محلول ماكفرلاند القياسي (1.5×10^8) خلية / مل

* تم غمر مسحة قطنية (Cotton swab) معقمة بالعالق البكتيري ثم نشر اللقاح على اطباق بتري قطرها (15 سم) حاوية على وسط اكار المولر هنتون والمحضر وفق الفقرة للحصول على نمو متجانس وتركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5) دقائق لغرض امتصاص المزروع البكتيري وجفاف الوسط .

*وزعت اقراص المضادات الحياتية والبالغة عددها (12) مضاد مذكورة في الجدول (3-6) على سطح الوسط الزرعي بمعدل (12) مضاد لكل طبق بتري كبير (قطره 15 سم) وبواسطة ملقط معقم ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة، بعدها سجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط (بالملمترات) حول كل قرص بواسطة مسطرة ، وتم مقارنة النتائج بالرجوع الى الجداول القياسية الخاصة بكل نوع من المضادات الحياتية CLSI (2019) حيث حدد كون العزلة حساسة (S) او مقاومة (R) او معتدلة (I) .

3-2-7-2 تحديد التركيز المثبط الادنى للمضاد(Minimum inhibitory concentration) (MIC)

تم تحديد (MIC) لكل العزلات (Boer وآخرون ،2015)على النحو الاتي :

* تم تنمية العزلات على الاكار المغذي بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة .

*نقلت (2-4) مستعمرة من طبق الاكار المغذي الى 5 مل من المحلول الفسلجي الملحي وتكوين عالق وقورنت النتيجة مع ثابت العكورة القياسي ماكفرلاند (1.5×10^8) خلية / مل

* تم تحضير تخافيف متسلسلة (2 , 4 , 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024) ميكروغرام /مليلتر من مسحوق المضاد الحيوي (Cefpodoxime) عن طريق اضافة نسب مختلفة من محلول (Stock Solution) الى اكار مولر هنتون بعد تعقيمه بالمؤصدة وتركه ليبرد الى (45 م°) وصبها بأطباق نظيفة ومعقمة وتركها للتصلب وحفظها لحين الاستعمال .

*غمرت مسحة قطنية في العالق البكتيري المحضر ونشره على اطباق مولر هنتون المحضرة اعلاه مع التراكيز مختلفة من المضاد الحيوي (Cefpodoxime) .

* ترك الاطباق لمدة (5) دقائق بدرجة حرارة الغرفة لتجف ثم حضنت لمدة (18-24) ساعة وبدرجة حرارة (37م°).

*تم قياس ال (MIC) والذي هو اقل تركيز يمنع نمو البكتريا بعد الحضن .

8-2-3 تحديد بعض عوامل الضراوة

1-8-2-3إختبار تحلل الدم (Haemolysis test)

تم زرع العزلات البكتيرية على وسط اكار الدم ،ثم حضنت بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة ، يلاحظ نوعين من التحلل للمستعمرات هما

ا- مستعمرة محاطة بمنطقة تحلل ذات لون اخضر يدل على التحلل من نوع ألفا α–haemolysis

ب-مستعمرة محاطة بمنطقة تحلل ذات لون شفاف يدل على التحلل من نوع بيتا β- haemolysis

ج- مستعمرة غير محاطة بمنطقة تحلل يدل على التحلل من نوع كاما ϒ –haemolysis

(Atlas وSnyder ، 2015).

2-8-2-3 الكشف عن تشكيل الغشاء الحيوي (Biofilm formation)

1-2-8-2-3 الكشف بطريقة الانبوب ((Tube method (TM)

تم زرع العزلات البكتيرية على الاكار المغذي وبدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة ، نقلت (2-4) من المستعمرات البكتيرية وزرعها في وسط (trypto soy broth) مع (1%) من (glucose) وحضنت بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة ، وبعد الحضن افرغ الانبوب وتم غسلة بالماء المقطر ثم ترك الانبوب ليجف ، ثم تم اضافة 5مل من صبغة (Crystal Violate) بتركيز(0.5%) لكل انبوب ولمدة (10-15)دقيقة وبعدها غسلت بالماء المقطر وتركت بالمقلوب لتجف ، حيث تكون النتيجة موجبة بوجود حلقة مرئية على جدران الانبوب و بالأسفل وتم قراءة النتائج ب(+) عند وجود حلقة مرئية و(-) عدم وجود حلقة مرئية (Ibrahim واخرون ،2014) .

2-2-8-2-3 الكشف بطريقة Micro Titer Plate method (MTP)

تمت هذه الطريقة بالخطوات الاتية

* تم زرع العزلات البكتيرية على الاكار المغذي بدرجة حرارة (37م°) ولمدة (24) ساعة .

* نقلت (2-4) من المستعمرات البكتيرية وزرعها في مرق المغذي وقورنت عكورتها بالمحلول ثابت العكورة القياسي ماكفرلاند(1.5×10^8) خلية / مل

* نقل 200 مايكرو ليتر من العالق البكتيري الى لوحة البوليسترين (التي تحتوي على 96 حفرة مسطحة القاع كما تم وضع مرق المغذي بدون مزروع بكتيري كعنصر سيطرة سالب Negative Control وتم تغطية الصفيحة ، وتم حضنها لمدة (24) ساعة وبدرجة حرارة (37 م°).

*بعد الحضن تم ازيل غطاء الصفيحة وافرغ العالق البكتيري برفق وغسل كل حفرة ثلاث مرات بمحلول ملحي معقم (0.9%) كلوريد الصوديوم .

* تم اضافت (200) مايكرو ليتر من كحول المثيل (الميثانول) ولمدة (10) دقائق وذلك لتثبيت الخلايا الملتصقة بجدران الحفر.

* تم اضافة (200) مايكروليتر من صبغة (Crystal Violate) بتركيز (0.5%) لكل حفرة ولمدة (15) دقيقة وذلك لتصبيغ الاغشية الحيوية .

* بعد ذلك ازيلت الصبغة بالغسل من (2-3) مرات بالماء المقطر

*اضيف (200)مايكرو ليتر من كحول الايثانول 95% لكل حفرة ولمدة (10) دقائق وذلك لازالت الصبغة الملتصقة في الخلايا .

* قرأت الامتصاصية الضوئية لجميع الحفر بجهاز قارئ الصفيحة المايكروية عند طول موجي (630)نانومتر وذلك حسب ما ورد في (Shrestha وآخرون،2019).

وتمت مقارنة الامتصاصية الضوئية للحفر المزروعة مع حفر السيطرة وحسب الآتي :

ODC > ODI ضعيف

ODC< ODI< 2.ODC متوسط

ODI> 2.ODC قوي

(Optical density of tested isolates = ODI)

(Optical density of control = ODC)

3-8-2-3الكشف عن قدرة البكتريا لانتاج Acyl-homoserine lactone (AHL) بالطريقة اللونية Colorimetric method

حسب ما ورد في (Baldiris واخرون،2016) وكالآتي :

* تم زرع العزلات البكتيرية على الاكار المغذي لمدة (24) ساعة وبدرجة حرارة (37 م°) .

*نقلت (2-4) من المستعمرات البكتيرية وزرعها في مرق مغذي ثم حضنت لمدة (24) ساعة وبدرجة حرارة (37 م°).

* بعد الحضن تم نقل 1.5 مل من المزروع البكتيري الى انابيب ابندروف صغيرة Ependroff tubes نظيف ومعقم وادخل الى الطرد المركزي بسرعة (10000) دورة لمدة (15) دقيقة . ثم نقل العالق الى انبوب صغير جديد واهمل الانبوب الذي يحتوي على الراسب ، ثم ادخل الانبوب الصغير الجديد الذي يحتوي على العالق بجهاز الطرد المركزي وبسرعة (10000) دورة لمدة (15) دقيقة ايضاً.

* ثم نقل العالق الى انبوب صغير واهمل الراسب وتم اضافة اثل استيت (Ethylacetate) ولمدة (10) دقائق وبدرجة حرارة (40- 42 م°).

* بعدها نقل العالق الى لوحة البوليسترين (التي تحتوي على 96 حفرة) وبمقدار (40) مايكروليتر ولكل عزلة وعمل مكررات من كل عزلة عدد 2 كما تم وضع مرق المغذي بدون مزروع بكتيري كعنصر سيطرة سالب (Negative Control) .

* تم اضافة (50) مايكرو ليتر من محلول (1:1) (NaoH) : hydroxylamine الى كل حفرة

* تم اضافة (50) مايكرو ليتر من محلول (1:1) (كلوريد الحديد 10 % في كلوريد الهايدروجين 4M : كحول الايثانول 95%) .

* قرأت الامتصاصية الضوئية لجميع الحفر بجهاز قارئ الصفيحة المايكروية عند طول موجي (630) نانومتر ، وتمت مقارنة الامتصاصية الضوئية للحفر المزروعة مع حفر السيطرة وعبر عنها ب(+) وجود AHL (-) عدم وجودAHL وحسب الآتي :

ODc =0.98

AHL وجود (+) ODc <ODi

. AHLعدم وجود (-) ODc >ODi

3-2-9الكشف عن قدرة بكتريا ال *E coli* لانتاج انزيمات البيتا-لاكتاميز Beta-lactamase

3-2-9-1 انزيمات البيتا-لاكتاميز المعدنية (Metallo-beta-lactamase(MβLs))

* تم تحضير العالق البكتيري من أخذ مستعمرة بكتيرية النشطة والنامية على وسط الاكار المغذي لتلقيح (10) مل من المحلول الملحي الفسلجي ، إذ تم الحصول على عكوره مساوية لعكوره محلول ماكفرلاند القياسي (1.5×10^8) خلية / مل .

*تم غمر مسحة قطنية (Cotton swab) معقمة بالعالق البكتيري ثم نشر اللقاح على اطباق بتري قطرها (8 سم) حاوية على وسط اكار المولر هنتون والمحضر مسبقا للحصول على نمو متجانس وتركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5 دقائق) لغرض امتصاص المزروع البكتيري وجفاف الوسط .

*وضع قرصين من المضاد الحيوي (Imipenem) والمذكور تركيزه والشركة المصنعة بالجدول (3-7) في وسط طبق مولر هنتون وبمسافة(2 سم) بين القرصين .

*تم اضافة (5) مايكروليتر من محلول (EDTA)(بتركيز 5M وتم تعديل ال pH الى 8بواسطة اضافة NaOH) الى احد القرصين المضاد الحيوي (Imipenem).

*حضنت الاطباق لمدة (18-24) ساعة وبدرجة حرارة(37 م°) .

*لوحظت منطقة التثبط ،تكون النتيجة موجبة (اي ان البكتريا منتجة لأنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية)عند زيادة منطقة التثبيط عن (7 ملليمتر) حول قرص المضاد مع ال(EDTA) مقارنة مع قرص Imipenem لوحده (Aghamiri واخرون ، 2014).

2-9-2-3 انزيمات البيتا- لاكتاميز واسعة الطيف Extended spectrum Beta-lactamase (ESβLs)

تم استخدام طريقة الاقراص المدمجة (Combined disk method) وحسب ما ورد في (. Pitout و Laupland ،2008).

* تم تحضير العالق البكتيري من اخذ مستعمرة بكتيرية النشطة والنامية على وسط الاكار المغذي لتلقيح 10مل من المحلول الملحي الفسلجي ، حيث تم الحصول على عكوره مساوية لعكوره محلول ماكفرلاند القياسي(1.5×10^8 خلية / مل .

* تم غمر مسحة قطنية (Cotton swab)معقمة بالعالق البكتيري ثم نشر اللقاح على اطباق بتري قطرها (8 سم) حاوية على وسط اكار المولر هنتون والمحضر مسبقا للحصول على نمو متجانس وتركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5) دقائق لغرض امتصاص المزروع البكتيري وجفاف الوسط .

* وضع قرص المضاد الحيوي (Amoxicillin\Clavulinic acid) والمذكور تركيزه والشركة المصنعة بالجدول (3-7) في وسط طبق مولر هنتون ووضعت اقراص المضادات الحيوية (Cefotaxime، Piperacillin، Cefixime) حوله وعلى بعد (2سم) من مركز القرص .

*حضنت الاطباق لمدة (18-24) ساعة وبدرجة حرارة (37 م°).

*لوحظ مناطق التثبيط ،حيث اذا اندمج كل من الاقراص (Cefotaxime، Piperacillin، Cefixime) مع قرص المضاد الحيوي (Amoxicillin\Clavulinic acid) تكون النتيجة موجبة .

3-9-2-3 انزيمات البيتا-لاكتاميز من نوع(Amp-C-)

*تم تحضير العالق البكتيري من أخذ مستعمرة بكتيرية النشطة والنامية على وسط الاكار المغذي لتلقيح 10 مل من المحلول الملحي الفسلجي ، إذ تم الحصول على عكوره مساوية لعكوره محلول ماكفرلاند القياسي (1.5×10^8 خلية / مل .

*تم غمر مسحة قطنية (Cotton swab) معقمة بالعالق البكتيري ثم نشر اللقاح على اطباق بتري قطرها (8 سم) حاوية على وسط اكار المولر هنتون والمحضر مسبقا للحصول على نمو متجانس وتركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5) دقائق لغرض امتصاص المزروع البكتيري وجفاف الوسط .

*وضع قرص المضاد الحيوي (Cefoxitin) والمذكور تركيزه والشركة المصنعة بالجدول (3-7) في وسط طبق مولر هنتون .

*حضنت الاطباق لمدة (4 ايام) وبدرجة حرارة (28 م°) .

*لوحظت منطقة التثبيط حول القرص حيث تكون النتيجة موجبة عندما لا يوجد تثبيط حول القرص وحسب ما ورد في (الحسن والطائي ،2009) .

3-2-10 الدراسة الجزيئية (الكشف عن التنوع الجيني)

3-2-10-1 استخلاص الحامض النووي الجينومي (Extraction of Genomic DNA)

تم استخلاص الحمض النووي الجيني للبكتيريا للعزلات السريرية والبيئية وفقا لبروتوكول الشركة ABIOpure المصنعة (Extraction of DNA kit) على النحو الآتي :

*تم نقل مستعمرة واحدة نامية على وسط الاكار المغذي لمدة (24) ساعة وبدرجة حرارة (37 م°) الى وسط مرق مغذي وحضنت لمدة (24-48) ساعة بدرجة حرارة (37 م°) وبعد الحضن تم سحب (1400) مايكروليتر من المزروع البكتيري ونقلها الى انابيب صغيرة (Ependroff tubes) ثم ادخلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة(13000 دورة / دقيقة) لمدة (2 دقيقة) وذلك لترسيب الخلايا البكتيرية ، بعدها تم التخلص من العالق واخذ الراسب (Pellet).

*اضيف (200) ميكرو لتر من (CL Buffer) الى كل عينة ومزجها جيدا .

*لهضم البروتين وتحلل الخلايا ، تمت إضافة (20) ميكرو لتر من محلول(Proteinase K) ، ثم تم خلط الأنبوب باستخدام (vortex) ووضعت بالحمام المائي (water bath) في (56 م°) لمدة (30 دقيقة) .

* بعدها تمت إضافة (200) ميكرو لتر من (BL Buffer) إلى كل عينة ثم خلط الأنبوب بقوة باستخدام (vortex) ووضعت بالحمام المائي (water bath) في (70 م°) لمدة(30) دقيقة .

* تمت اضافة (200) ميكرولتر من الإيثانول Absolute ethanol (99%) بدرجة حرارة الغرفة ، ثم تم خلط العينة جيدًا باستخدام (vortex).

* تم نقل جميع المخاليط إلى العمود المصغر (Mini-column) بعناية ، ثم اجري الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة عند (6000 دورة / دقيقة) ، وثم استبدال أنبوب التجميع (collection tube) بآخر جديد.

*بعد ها تم اضافة (600)مايكروليتر من(BW Buffer) الى العمود المصغر(Mini-column) ، ثم تمت عملية الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة (6000 دورة / دقيقة)وتم استبدال أنبوب التجميع (collection tube) بأخرى جديدة.

*بعدها تمت اضافة(700)مايكرو ليتر من(TW Buffer) الى العمود المصغر(Mini-column) ، ثم تمت عملية الطرد المركزي لمدة (2 دقيقة) بسرعة (13000 دورة / دقيقة) ، ثم التخلص من محتويات أنبوب التجميع(collection tube) واعادة ادخال العمود المصغر(Mini-column) فيه.

* ثم يتم اجراء الطرد المركزي لمدة (3 دقيقة) بسرعة (13000 دورة /دقيقة) (وذلك للتخلص من الايثانول) ،وتم استبدال أنبوب التجميع(collection tube) بأخرى جديدة.

* ثم تمت اضافة (80 مايكروليتر) من (AE Buffer) وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5 دقائق) وبعدها ادخل الى جهاز الطرد المركزي لمدة (2 دقيقة) بسرعة (13000 دورة / دقيقة)، حيث يعمل ال (AE) على معادلة الشحنة.

*ثم بعد ذلك نقل محتوى انبوب التجميع (collection tube) الى انبوب صغير (حجم 1.5مل) (Ependroff tube) ثم تم قياس التركيز والنقاوة للحامض النووي المستخلص .

2-10-2-3 قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي (concentration and purity of DNA)

تم استخدام جهاز القياس الكمي (Quantus Florometer) وجهاز المطياف(Spectrophotometer) لقياس التركيز والنقاوة للحمض النووي (DNA) على التوالي ،وذلك من اجل الكشف عن جودة العينات ،حيث تم اخذ (1) مايكروليتر من الحمض النوويDNA وخلطت مع (199) مايكروليترمن صبغة (QuantyFlour) وتركت لمدة (5) دقائق بدرجة حرارة الغرفة ،ثم تم قياس تركيز الحمض النووي (DNA)

3-10-2-3 تفاعل ال PCR (Polymerase Chain Reaction)

1-3-10-2-3 تحضير البادئات (Primers Preparation)

تم اعداد تركيز البادئات التي استعملت لكل من (ERIC، BOX وRAPD) وكما موضحة بالجدول (3-8) وذلك بحلها بالماء الخالي من انزيم النيوكليز (Free nuclease water) وبدرجة حرارة الغرفة وبحسب تعليمات الشركة المصنعة لها ،ولاستعمالها تم اخذ 10مايكروليتر من المحلول المخزون (stock solution) ووضعة في انبوب صغير(Ependroff tube) ثم تم اضافة (90) مايكرو ليتر من الماء الخالي من انزيم النيوكليز(Free nuclease water) ليكون الحجم النهائي 100 مايكروليتر والذي اخذ منه بمقدار (1مايكروليتر) لكل عينة كماورد في (Ruppe وآخرون ،2009) .

2-3-10-2-3 انواع تفاعلات الـــ PCR

تم إ عداد الخليط من المحاليل و بالحجوم المبينة في الجدول (3-10) ادناه

الجدول (3-10) اعداد خليط تفاعل الـ PCR

ت	المحاليل	حجم خليط التفاعل للأنبوبة الواحدة (مايكرو ليترµL)		
		ERIC	BOX	RAPD
1	ماسترمكس PCR Master Mix 2x	10	10	10
2	البادئprimer	2	1	1
3	قالب الدنا DNA template	3	3	3
4	الماء الخالي من انزيم النيوكليز Free nuclease water	5	6	6
	الحجم النهائي	20	20	20

تم خلط المكونات في الانابيب الصغيرة بواسطة جهاز المازج Vortex ثم تم وضعها في جهاز ال PCR وحسب البرنامج الخاص بكل طريقة تنميط والموضح في الجدول (3-11).

الجدول (3-11) برنامج التفاعل الحراري لـ (PCR)

ت	مرحلة التفاعل	ERIC –PCR (Ardhami و Ranjbar ، 2016)			BOX– PCR (Gambero وآخرون، 2017)			RAPD –PCR (Nielsen وآخرون، 2014)		
		درجة الحرارة ºC	عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة ºC	عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة ºC	عدد الدورات	الوقت
1	مرحلة المسخ الأولي DNA Denaturation Initial	94	1	1دقيقة	95	1	5 دقائق	95	1	5 دقائق
2	مسخ ال DNA Denaturation	94	30	30 ثانية	94	35	1 دقيقة	94	35	1 دقيقة
3	الالتحام Annealing	52	30	35 ثانية	38	35	1 دقيقة	38	35	1 دقيقة
4	الإستطالة Extension	72	30	4 دقائق	72	35	2 دقيقة	72	35	2 دقيقة
5	مرحلة الإستطالة النهائية Final extension	72	1	5 دقائق	72	1	10 دقائق	72	1	10 دقائق

3-2-10-3-3 الترحيل الكهربائي ل DNA على هلام الاكاروز

تمت عملية الترحيل الكهربائي للحامض النووي حسب ما ورد (Green and Sambrook ،2012) وبالخطوات الاتية :

*تم تحضير هلام الاكاروز Agarose بتركيز (2%) اي بإذابة (2 غم) من الاكاروز في المحلول الدارئ (TBE 1X) ثم تم تسخينه باستخدام (Micro wave) الى درجة الغليان ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة (50-45) م°.

* ثم تم اضافة صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium bromide) بتركيز (10) ميكروغرام / مل .

*تم تحضير قالب الصب Tray الذي يحتوي على مشط لغرض عمل حفر والتي تكون معدة لتحميل العينات .

*ثم تم صب هلام الاكاروز في الصفيحة وتركت للتصلب لمدة (30) دقيقة .

*تم رفع المشط برفق بعد تصلب الاكاروز وحملت العينات المراد ترحيلها بالحفر المخصصة لها وبمقدار (10) مايكروليتر ، (7) مايكروليتر منها عينة ال (DNA) و (3) مايكروليتر من صبغة التحميل (Loading dye).

*ثم ثبت قالب الصب(Tray) في المكان المخصص له في وحدة الترحيل الكهربائي واغلق الخزان (Tank) بعد ملئ جهاز الترحيل بالمحلول الدارئ (TBE) .

*ثم تم تمرير تيار كهربائي بفرق جهد (100) فولت / سم ولمدة (90) دقيقة .

*تم فحص الهلام باستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية (UV.Transilluinator) وعند طول موجي (320) نانوميتر .

*قدرت الأحجام الجزيئية لنواتج التضاعف بالمقارنة مع مواقع الحزم ذات الأوزان الجزيئية المعروفة للدليل الحجمي DNA(DNA Ladder) والتي عدت كدليل حجمي قياسي.

الفصل الرابع

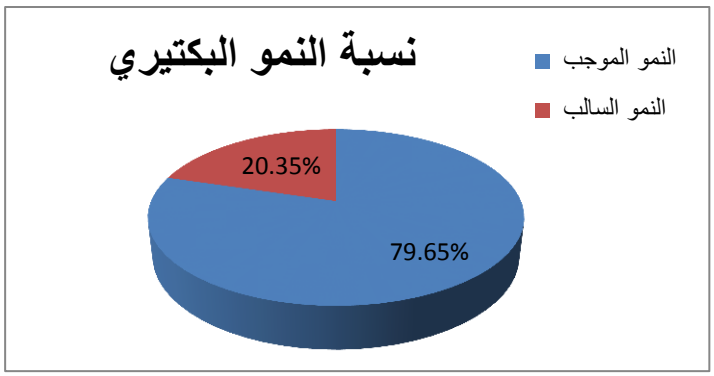
النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4 - النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4 عزل وتشخيص البكتيريا (Isolation and Identification of *E coli*)

تم جمع 290 عينة (180)عينة سريرية وبنسبة (62.06)% و (110) عينة ماء بنسبة (37.94%) للمدة من (22 ايلول ولغاية 28 تشرين الثاني)، 2019 . كان النمو الموجب فيها (231) عينة وبنسبة (79.65%) (منها 121 عينة سريرية بنسبة (67.22)% و (110) عينة ماء بنسبة (100)%). تم الحصول على (40)عزلة من بكتيريا *E coli* (20 عزلة سريرية و20 عزلة ماء)اذ تم تشخيص العزلات بالاختبارات المجهرية والزرعية والفحوصات الكيموحيوية وتأكيد التشخيص باستخدام جهاز الفايتك 2 .



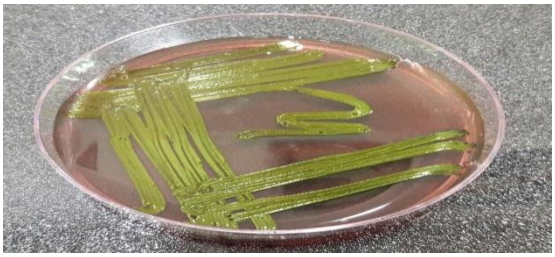
الشكل (4-1) النسبة المئوية للنمو البكتيري الموجب والسالب من مجموع العينات

1-1-4 الاختبارات التشخيصية للعزلات

1-1-1-4 الصفات الزرعية التشخيصية

تم تشخيص العزلات بالاعتماد على تنميها على الوسط الزرعي التفريقي (Differential Medium) وهو اكار الماكونكي الذي يحتوي على صبغة الكريستال البنفسجية واملاح الصفراء التي تثبط نمو البكتيريا الموجبة لصبغة كرام ويسمح بنمو البكتيريا السالبة لصبغة كرام والتي تظهر مستعمرات باللون الوردي كما ظهرت بالشكل (4-2 أ) وايضا كما تم تنميتها على الوسط الزرعي الاختياري (Selective Medium) وهو أكار الأيوسين أزرق المثيلين Eosin Methylene Blue (EMB) إذ تم اعادة زرع العزلات على هذا الوسط للتأكد من نقاوتها وظهرت جميع العزلات بالون اخضر لماع معدني(Greenish metallic sheen) كما تظهر بالشكل (4-2 ب) بسبب ترسب ازرق المثيل وصبغة الأيوسين في الوسط الحامضي بعد ارتباطهما مع بعض إذ ظهر اللون الاخضر الماع المعدني بنسبة (100%) اي لجميع العزلات .

أ



ب

الشكل (4-2) أ: بكتيريا ال *E coli* على الوسط الزرعي اكار الماكونكي .ب : بكتيريا ال *E coli* على الوسط الزرعي الأيوسين أزرق المثيلين Eosin Methylene Blue (EMB)

4-1-1-2 الفحص المجهري (Microscopy Examination)

أظهرت نتائج الفحص المجهري لعزلات لبكتيريا *E coli* بعد اجراء عملية التصبيغ بصبغة كرام لمسحة مأخوذة من مستعمرات نقية مزروعة على وسط الاكار المغذي بأن خلاياها سالبة لصبغة كرام، وذات شكل عصوي قصير، وغير مكونة للأبواغ (Harvey واخرون ، 2013).

4-1-1-3 الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للعزلات (Biochemical tests)

تم اجراء الاختبارات الكيموحيوية واختبارات IMVic للعزلات التي اظهرت صفات زرعيه ومجهرية مطابقة لصفات لبكتيريا *E coli* لتأكيد التشخيص، ويبين الجدول (4-1) الاختبارات الكيموحيوية والجدول (4-2) اختبارات (Imvic) التي اعتُمِدت لتشخيص عزلات بكتيريا ال (*E coli*) .

الجدول (4-1) الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *E coli* .

ت	الاختبار الكيموحيوي	*E coli*
1	اختبار الكاتاليز catalase	+
2	اختبار الاوكسيدز oxidase	_
3	تخمر اللاكتوز(LF) على وسط اكار الماكونكي	+
4	نمو على وسط (EMB)	+
5	اختبار النمو على وسط الكلغلر (KIA)	+(A\A)
6	اختبار اليوريز Urease	_

(+): نتيجة موجبة (–): نتيجة سالبة (A\A):انتاج الحامض في المائل والقعر

الجدول (4-2) اختبارات IMViC لبكتيريا *E coli* .

ت	الاختبار IMVic	*E coli*
1	اختبار الاندول Indol	+
2	اختبار المثيل الاحمر MR	+
3	اختبار فوكس-بروكساور VP	_
4	اختبار السترات Citrate	_

(+): نتيجة موجبة (–): نتيجة سالبة

4-1-1-4 تشخيص نظام Vitek 2 التأكيدي

الملحق(10) يوضح النتيجة التشخيصية في نظام التشخيص لإحدى العينات. إنّ التشخيص باستخدام نظام (Vitek 2) وفر امكانية الحصول على نتائج تأكيدية لتشخيص عزلات لبكتيريا(*E coli*) . إلا أنّ التشخيص بهذا النظام قد يحتاج الى الخبرة عند العمل بها (Turton وآخرون ، 2008).

2-4 نتائج العزل (Isolation Result)

1-2-4 العزلات السريرية (Clinical Isolates)

تم الحصول على (20) عزلة من البكتيريا (من مجموع 180 عينة سريرية) وبنسبة (11.11%) والتي تشمل {(67)عينة ادرار بنسبة (37.2%) ، 90 عينة جروح بنسبة (50%) و 23 عينة حروق بنسبة (12.8%) } من مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي . كانت النسبة الاكبر من عدد العينات السريرية للراقدين بمجموع (97) عينة (53.8%) بينما كانت عدد العينات من غير الراقدين هي 83 بنسبة (46.2%).كما كانت عدد عينات من الاناث هي (103)عينة بنسبة (57.2%)في حين كان عدد عينات الذكور (77)عينة بنسبة (42.8%). اظهرت النتائج ان النسبة الاكبر لعزلات بكتيريا *E coli* المعزولة من مصادر سريرية هي من عينات الادرار Urine .حيث بلغت (16) عزلة وبنسبة (80%) من مجموع 20 عزلة سريرية .بينما بلغت عزلات البكتيريا لمسحات الجروح (3)عزلات وبنسبة (15%) ، اما عزلات الحروق فكان عددها (1) بنسبة (5%) وكما موضحة بالجدول (4-3). أوضحت دراسة السوره ميري (2012)ان من مجموع (350) عينة سريرية تم الحصول على (100)عزلة لبكتيريا *E coli* وبنسبة (28.57%).كما بينت دراسة(Vranic و Uzunovic (2016) تم عزل 141عزلة لبكتيريا *E coli* بنسبة (25.36%) من مجموع (556) عينة ادرار . فيما أشارت دراسة Bessa وآخرون (2013) الى جمع (28) نوع من البكتريا من مجموع (217) من إصابات الجروح كان منها(6%) من بكتريا *E coli* . وكانت دراسة (النعيمي ،2018) التي أشارفيها أن النسبة الأكبر لعزل بكتيريا الـ *E coli* كانت من عينات الإدرار Urine إذ بلغت (34) عزلة (63.2%) من مجموع العينات والتي هي (152) ، وربما يعود ذلك إلى امتلاكها بعض عوامل الضراوة مثل إنتاج β– Haemolysin والغشاء الحيوي Biofilms ومقاومة مضادات البيتا_ لاكتام واسعة الطيف وبهذا يمكنها البقاء والتسبب بالعديد من الأمراض (Kukanur وآخرون، 2015).

الجدول (4-3) عدد والنسبة المئوية للعـــــزلات السريرية

ت	مصدر العزل	عدد العينات والنسبة المئوية %	عدد الاشخاص الراقدين والنسبة المئوية %	عدد الاشخاص الغير راقدين والنسبة المئوية %	الجنس		عدد العزلات والنسبة المئوية %
					عدد الذكور والنسبة المئوية %	عدد الاناث والنسبة المئوية %	
1	ادرار	67 (%37.2)	18 (%19.0)	49 (%59.1)	12 (%15.6)	55 (%53.4)	16 (%80)
2	جروح	90 (%50)	59 (%60.8)	31 (%37.3)	55 (%71.5)	35 (%34.0)	3 (%15)
3	حروق	23 (%12.8)	20 (%20.2)	3 (% 3.6)	10 (%12.9)	13 (%12.6)	1 (%5)
المجموع		180	97 (%53.8)	83 (%46.2)	77 (%42.8)	103 (%57.2)	20 (%11.11)

2-2-4 عزلات الماء Water Isolates

تم الحصول على (20)عزلة من البكتيريا *E coli* وبنسبة (18.18%) من مجموع عدد عينات الماء والبالغ (110)عينة ماء التي تم الحصول عليها من مختبر الصحة العامة في محافظة ديالى - قسم الاغذية. وكما موضحة بالجدول (4-4). في دراسة اجراءها الباحث Amer واخرون (2018)اظهرت أن (56) عزلة (35.7٪) من بكتيريا *E coli* من مجموع (93)عينة .. ويعود سبب الاختلاف في نسب *E coli* المعزولة إلى أسباب عدة منها الموقع الجغرافي ، والوعي الصحي لدى الافراد، وموسم أخذ العينات ، عدد العينات ، والحالة الاجتماعية ، والثقافية (Foxman ، 2014).

الجدول (4-4) يوضح عدد العينات و العزلات

مصدر العزل	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزلات %
سريري	180	20	%11.11
بيئي (ماء)	110	20	%18.18
المجموع	290	40	%13.79

3-4 اختبار حساسية بكتريا *E coli* للمضادات الحيوية(Sensitivity Antibiotics)

تم اجراء اختبار حساسية عزلات بكتيريا *E coli* للمضادات الحيوية ل (40) عزلة ، (20 سريري و20 ماء) بطريقة الاقراص (Kirby-Bauer) .حيث تم اجراء الاختبار على 12 مضاد حيوي شملت المضادات الاتية: (Tetracycline, , Imipenem, Doxycycline, Aztreonam Levofloxacin, Cefuroxime, Trimethoprim- sulfamethoxazole , Azithromycin, Ampicillin- sulbactam, Ticarcillin-clavulanate Cefoxitin, Cefpodoxime,)

ولمعرفة نوع الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر المحيطة بأقراص المضادات المستعملة ومقارنة النتائج بأقراص التثبيط القياسية الواردة في (CLSI . 2019).

1-3-4 اختبار حساسية بكتيريا *E coli* للمضادات الحيوية للعزلات السريرية

اظهرت النتائج كما في الملحق (2).وكان هناك تبايناً واضحاً في مدى أستجابة العزلات للمضادات المستعملة وكما موضح بالشكل (4-3) وكانت اعلى مقاومة لمضاد (Cefpodoxime) والذي ينتمي الى مجموعة (Cephems(ORAL)) وهي (19) عزلة وبنسبة (95%) وتلاه مضاد (Aztreonam) والذي ينتمي الى مجموعة (Monocyclin) وعددها (18) عزلة بنسبة (90%) ومضاد Trimethoprim-sulfamethoxazole (ينتمي الى مجموعة Folatepathwa-yantiagonists) فكانت عدد العزلات (16) وبنسبة (80%) ،اما كل من المضادين (Doxycycline) (والذي تنتمي الى مجموعة Tetracyclines) و (Cefuroxime) ينتمي الى مجموعة Cephems(Parenteral) including cephalosporins I,II III,IV كانت عدد العزلات المقاومة له هي (15) عزلة بنسبة (75%) و (14) عزلة مقاومة بنسبة(70%) لمضاد (Tetracycline) والذي ينتمي الى مجموعة (Tetracyclines) اما مضاد (Azithromycin) والذي ينتمي الى مجموعة (Macrolides) فكانت عدد العزلات المقاومة له هي (13) عزلة بنسبة(65%) . وثم كلا المضادين (Levofloxacin) ينتمي الى مجموعة Quinolones & Fluorquinolones و مضاد (Ticarcillin-clavulanate) الذي ينتمي الى مجموعة B-lactam combination agents كانت عدد العزلات المقاومة لهما هي (9) عزلات بنسبة (45%) .اما مضاد (Cefoxitin) ينتمي الى مجموعة Cephems parenteral) including cephalosporins I, II III,IV) ايضا كانت عدد العزلات المقاومة له (8) عزلات بنسبة(40%) . وكانت عدد العزلات المقاومة

لمضاد (Imipenem) (والذي ينتمي الى مجموعة carbapeneams) هي (5) عزلة سريرية بنسبة (25%)، اما النسبة المقاومة الاقل فكانت لمضاد(Ampicillin-sulbactam) والذي ينتمي الى مجموعة (B-lactam combination agents)هي تضمنت (2) عزلتان سريرية بنسبة (10%) . وكما موضحة بالجدول (4-5) .

وتظهر بكتيريا *E coli* مقاومة متعددة لأنواع مختلفة من المضادات الحيوية نتيجة لسوء استعمالها في علاج مختلف الأمراض ، إذ أصبح من المعروف جداً انتشار السلالات البكتيرية المتعددة المقاومة خصوصاً في المستشفيات ولاسيما مضادات البيتا لاكتام ضمن أفراد العائلة المعوية (Silva وآخرون، 2001). إن فحص الحساسية مهم في معرفة المضادات الحيوية المناسبة للعلاج فضلاً عن تقليل الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية والذي يعد أحد أهم الأسباب في ظهور المقاومة في البكتيريا. وفي الدراسة التي أجراها أحمد (2016) كانت نسبة المقاومة البكتيرية للمضاد (Imipenem)إذ بلغت النسبة 0%، وايضا الدراسة التي اجراها (النعيمي ، 2018) اظهرت أوطأ مقاومة كانت للمضاد (Imipenem) في حين جاءت دراسة (Raeispour و Ranjba ، 2018) التي تم إخضاع 60 عزلة *E coli* للاختبار حساسية المضادات وكانت معظم العزلات مقاومة (Imipenem) (100٪) . في حين كانت المقاومة لمضاد (Cefpodoxime) بنسبة (67%) ومضاد (Titracyline) بنسبة (50%) وفي دراسة Amin واخرون (2009) اظهرت اعلى مقاومة كانت لمضاد (Cefpodoxime) .

الجدول (4-5) مجاميع المضادات الحيوية والمضادات الحيوية ونسبة المقاومة من قبل بكتيريا *E coli* للعزلات السريرية

ت	مجاميع المضادات الحيوية	المضادات الحيوية للمجموعة	عدد العزلات المقاومة والنسبة المئوية
1	Cephems(ORAL)	Cefpodoxime	(19) عزلة وبنسبة (95%)
2	Monocyclin	Aztreonam	(18) عزلة بنسبة (90%)
3	Folatepathwa-yantiagonists	Trimethoprim-sulfamethoxazole	(16) وبنسبة (80%)
4	Tetracyclines	Tetracycline	(14) عزلةبنسبة (70%)
		Doxycycline	(15) عزلة بنسبة (75%)
5	Cephems(Parenteral) including cephalosporins I,II III,IV	Cefuroxime	(15) عزلةبنسبة (75%)
		Cefoxitin	(8) عزلات بنسبة(40%)
6	Macrolides	Azithromycin	(13) عزلة بنسبة(65%)
7	Quinolones& Fluorquinolones	Levofloxacin	(9) عزلات بنسبة (45%)
8	B-lactam combination agents	Ticarcillin-clavulanate	(9) عزلات بنسبة (45%)
		Ampicillin-sulbactam	(2) عزلتان بنسبة (10%)
9	Carbapeneams	Imipenem	(5) عزلات بنسبة(25%)

2-3-4 اختبار حساسية بكتيريا *E coli* للمضادات الحيوية لعزلات الماء

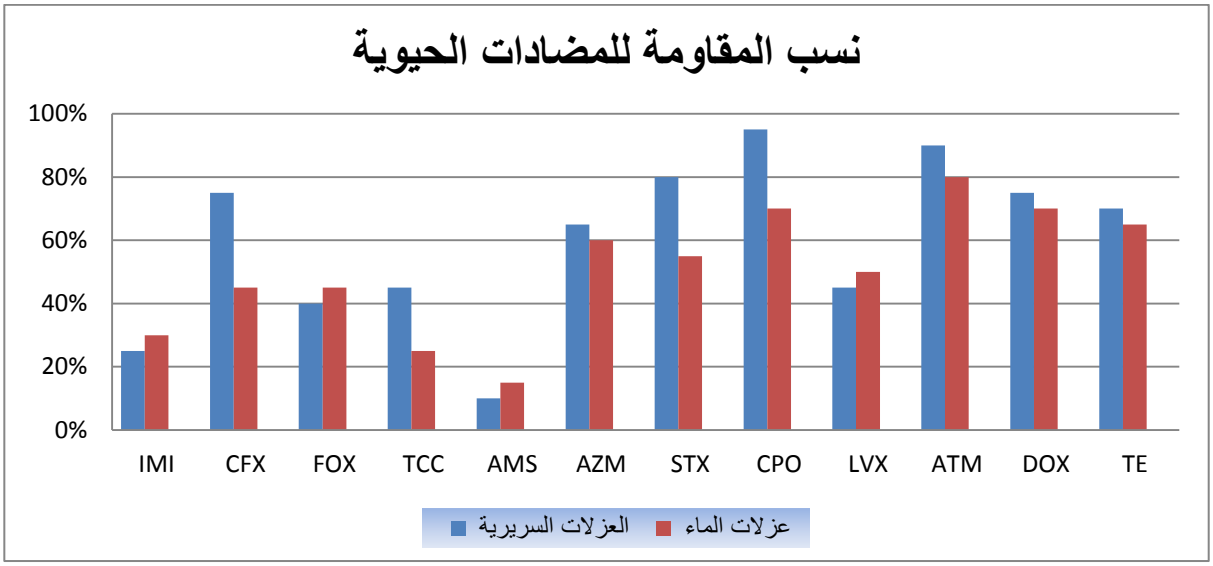
اظهرت النتائج كما موضحة في الملحق (3) وجود تبايناً واضحاً ايضا في مدى أستجابة العزلات للمضادات المستعملة وكما موضح بالشكل (4-3) وكانت اعلى مقاومة لمضاد (Aztreonam) والذي ينتمي الى مجموعة (Monocyclin) من قبل (16) عزلة ماء وبنسبة (80%) ثم وبنسبة (70%) ل (14)عزلة ماء لكلا المضادين (Cefpodoxime) والذي ينتمي الى مجموعة Cephems(ORAL) ومضاد

Doxycycline والذي تنتمي الى مجموعة (Tetracyclines)،اما مضاد(Tetracycline) (والذي تنتمي الى مجموعة Tetracyclines) فكانت عدد العزلات المقاومة له هي (13) عزلة ماء بنسبة (65%). اما مضاد (Azithromycin)والذي ينتمي الى مجموعة (Macrolides) فكانت عدد العزلات المقاومة له هي (12) عزلة وبنسبة (60%). ومضاد (Trimethoprim- sulfamethoxazole) (ينتمي الى مجموعة (Folatepathwa-yantiagonists) فكانت عدد العزلات (11) وبنسبة (55%)، وبنسبة (50%) ل (10)عزلة ماء لمضاد (Levofloxacin) والذي ينتمي الى مجموعة Quinolones & Fluorquinolones . في حين كانت عدد العزلات المقاومة لكلا المضادين (Cefoxitin) و مضاد (Cefuroxime) اللذان ينتميان الى مجموعة Cephems parenteral) including cephalosporins I, ll III,IV) هي (9)عزلات بنسبة (45%). وكانت عدد العزلات المقاومة لمضاد (Imipenem) (والذي ينتمي الى مجموعة carbapeneams) هي(6) عزلات بنسبة (30%). مضاد (Ticarcillin-clavulanate) ينتمي الى مجموعة (B-lactam combination agents) كانت عدد العزلات المقاومة له هي (5) عزلة بيئية بنسبة (25%).. اما النسبة المقاومة الاقل فكانت لمضاد (Ampicillin-sulbactam) والذي ينتمي الى مجموعة (B-lactam combination agents) هي (3) عزلات بنسبة (15%) وكما في الجدول (4-6).

وأظهرت دراسة Ibrahim (2014) نسبة اعلى لمقاومة مضاد (Imipenem) بنسبة (100%) .في حين جاءت دراسة (Hanberger واخرون ،2014) بأعلى نسبة مقاومة لمضاد (Tetracycline) بنسبة (87%) .وقد يعود السبب بوجود بكتيريا بمستوى عالي من المقاومة للمضادات الحيوية الى تلوث المياه بصورة عامة بمياه الصرف الصحي ،كما وأن ظهور العزلات المقاومة للمضادات في الماء مهدد للصحة العامة اذا ينتج عنها اكتساب عوامل الخطر من مصادر بيئية (Akturk واخرون ,2012).

الجدول (4-6) مجاميع المضادات الحيوية والمضادات الحيوية ونسبة المقاومة من قبل بكتيريا *E coli* لعزلات الماء

ت	مجاميع المضادات الحيوية	المضادات الحيوية للمجموعة	عدد العزلات المقاومة والنسبة المئوية
1	Cephems(ORAL)	Cefpodoxime	(14) عزلة وبنسبة (70%)
2	Monocyclin	Aztreonam	(16) عزلة بنسبة (80%)
3	Folatepathwa-yantiagonists	Trimethoprim-sulfamethoxazole	(11) وبنسبة (55%)
4	Tetracyclines	Tetracycline	(13) عزلةبنسبة (65%)
		Doxycycline	(14) عزلة بنسبة (70%)
5	Cephems(Parenteral) including cephalosporins I,II III,IV	Cefuroxime	(9) عزلةبنسبة (45%)
		Cefoxitin	(9) عزلات بنسبة(45%)
6	Macrolides	Azithromycin	(12) عزلة بنسبة(60%)
7	Quinolones& Fluorquinolones	Levofloxacin	(10) عزلات بنسبة (50%)
8	B-lactam combination agents	Ticarcillin-clavulanate	(5) عزلات بنسبة (25%)
		Ampicillin-sulbactam	(3) عزلات بنسبة (15%)
9	Carbapeneams	Imipenem	(6) عزلات بنسبة(30%)



الشكل (4-3) نسبة المقاومة للمضادات الحيوية قيد الدراسة.

IMI= Imipenem, CFX= Cefuroxime , FOX= Cefoxitin , TCC= Ticarcillin-clavulanate , AMS= Ampicillin-sulbactam , AZM= Azithromycin, STX= Trimethoprim-sulfamethoxazole , CPO= Cefpodoxime, LVX= Levofloxacin , ATM= Aztreonam, DOX= Doxycycline,TE=Tetracycline

4-4 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *E coli*

4-4-1 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *E coli* للعزلات السريرية

اذا اظهرت كل العزلات السريرية مقاومة متعددة للمضادات الحيوية المستخدمة بالدراسة وبنسبة (100%) .اذا اظهرت عزلة واحدة من العزلات السريرية مقاومة لكل مجاميع المضادات الحيوية المستخدمة وهي (9) مجاميع ،بينما اظهرت (2)عزلتان فقط مقاومة متعددة ل (8) مجاميع ، واظهرت (4) عزلات مقاومة متعددة ل (7) مجاميع، بينما اظهرت (4) عزلات اخرى مقاومة متعددة ل (6) مجاميع ،في حين اظهرت (3)عزلات مقاومة متعددة ل (5) مجاميع ،في حين اظهرت (6) عزلات مقاومة ل (4) مجاميع وكما موضحة بالجدول (4-7).

الجدول (4-7)المقاومة المتعددة للعزلات السريرية

ت	رقم العزلة	عدد مجاميع المضادات الحيوية المقاومة لها العزلات	نوع المقاومة
1	(142 / ادرار)	9	XDR
2	(133/ادرار)،(161 / ادرار)	8	XDR
3	(108 / ادرار)،(134 / ادرار)، (170/جروح) ،(175 / ادرار)	7	XDR
4	(29 / ادرار)،(107 / ادرار)، (171/ادرار) ،(172 / ادرار)	6	MDR
5	(58 / ادرار)، (92 / ادرار)، (96/جروح) ،	5	MDR
6	(33 / ادرار)،(162 / ادرار)، (169/حروق)،(173 / ادرار)، (1/ ادرار)،(176 / جروح)	4	MDR

Multidrug resistant (MDR), Extensively drug resistant (XDR)

4-4-2 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *E coli* لعزلات الماء

اما العزلات البيئية فقد اظهرت (13)عزلة من مجموع العزلات مقاومة متعددة والتي تضمنت (4) عزلات مقاومة متعددة ل (8) مجاميع ، (5)عزلات مقاومة متعددة ل (7) مجاميع ،و (4) عزلات مقاومة ل (5) مجاميع وكما موضحة بالجدول (4-8).

الجدول (4-8) المقاومة المتعددة للعزلات البيئية

ت	رقم العزلة	عدد مجاميع المضادات الحيوية المقاومة لها العزلات	نوع المقاومة
1	(80,16,3,1) مـــــــاء	8	XDR
2	(67,49,22,17,8) مـــــــاء	7	XDR
3	(34,107,80,45) مـــــــاء	5	MDR

أن صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية سادت في معظم عزلات بكتيريا ال *E coli* قيد الدراسة . وقد يعود السبب في ذلك نتيجة طفرة في الجين الكروموسومي في البكتيريا أو قد تكون صفة المقاومة المتعددة

محمولة على بلازميد كما وتعد صفة المقاومة المتعددة للعزلات البكتيرية و لأكثر من مضاد حيوي واحد من المشاكل الكبيرة والخطيرة من الناحية الطبية وذلك لصعوبة اختيار العلاج المناسب للمريض،. بينت نتائج الدراسة وجود مقاومة متعددة ضمن العزلات المحلية . كما إنَّ احد الأسباب الرئيسة لظهور المقاومة المتعددة هو الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية من دون الاعتماد على أجراء فحص الحساسية لها مما يزيد من فرص قابلية تكيف البكتيريا ومقاومتها للمضادات الحيوية المستعملة في العلاج وأشار Turner (2005) إن البكتيريا السالبة لصبغة غرام أغلب أجناسها تمتلك جيناً مشفراً .(β−Lactamase) كروموسومي وآخر بلازميدي وهذا ما يؤكد إمكانية انتقال المقاومة بين أجناس العائلة المعوية والانتقال قد يكون عن طريق الإقتران البكتيري ، إن إنتاج البكتريا لإنزيمات البيتا لاكتاميز يؤدي إلى كسر حلقة البيتا_لاكتام ، أو يضفي الأُلفة بين المضاد ومواقع الهدف ((Penicillin−binding proteins (PBPs) أو يغير من حاجز النفاذية وبما أن عزلات بكتيريا *E coli* سالبة لصبغة غرام فأن الغشاء الخارجي الذي يغلف الجدار الخلوي يحتوي على قنوات تدعى البورينات (Porins) تنشط فيها آلية تغير حاجز النفاذية الذي يمنع دخول جزيئات المضاد الحيوي الى داخل الخلية البكتيرية (Prats وآخرون، 2003).

5-4 التركيز المثبط الادنى للمضاد ((Minimum inhibitory concentration (MIC)

خضعت جميع العزلات السريرية والبيئية لاختبار التركيز المثبط الادنى (MIC) للمضاد Cefpodoxime(CPO) ،وتم تحديد ال(MIC) من خلال طريقة التخافيف المتسلسلة على وسط اكار المولر-هنتون .ويعرف ال (MIC) على انه التركيز الأمثل الذي يمكن للمضاد الحيوي في المصل ان يوفر اعلى حد للعلاج .اظهر الجدول (4-9) قيم ال(MIC) للمضاد(CPO)Cefpodoxime وتراوحت بين (32-512)ميكروغرام / مل .

جدول (4-9) قيم التركيز المثبط الادنى (MIC)

ت	العزلات السريرية	(CPO) ≤ 64 (s)/ ≥ 128.(R)(µg/ml)	عزلات الماء	(CPO) ≤ 64 (s)/ ≥ 128.(R)(µg/ml)
1	1 – ادرار	256	1 – ماء	32
2	29 – ادرار	512	3 – ماء	32
3	33 – ادرار	128	8 – ماء	512
4	58- ادرار	256	13- ماء	32
5	92- ادرار	32	16- ماء	256
6	96 – جروح	128	17 – ماء	32
7	107- ادرار	32	22- ماء	32
8	108- ادرار	128	33- ماء	256
9	133- ادرار	32	34- ماء	32
10	134- ادرار	512	45- ماء	256
11	142- ادرار	256	49- ماء	32
12	161 – ادرار	128	54 – ماء	32
13	162 – ادرار	256	67 – ماء	128
14	169 – حروق	256	80 – ماء	32
15	170- جروح	256	82- ماء	32
16	171 – ادرار	128	85 – ماء	128
17	172 – ادرار	512	87 – ماء	32
18	173 – ادرار	64	102 – ماء	512
19	175—ادرار	64	106—ماء	512
20	176- جروح	32	107- ماء	256

6-4 عوامل الضراوة (Virulence factors)

تم الكشف عن عدد من عوامل الضراوة لبكتيريا *E coli* . اذا تم الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة الانبوب وبطريقة Micro Titer Plate (MTP) والكشف عن النصاب الحسي (Quorum sensing) وانتاج انزيمات البيتا- لاكتاميز .

1-6-4 الغشاء الحيوي (Biofilm)

1-1-6-4 الكشف عن الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب (Tube Method)

تعتبر هذه الطريقة قياس نوعي (Qualitative assay) للكشف عن قدرة تكوين الأغشية الحيوية على أساس سمك وشدة الأغشية الحيوية المرتبطة بالجدار الداخلي لأنبوب الاختبار.

أظهرت النتائج أن 8 عزلات سريرية (40%) من مجموع (20) عزلة سريرية كانت مكونة للأغشية الحيوية وكما هي بالملحق (4). واوضحت دراسة (صباح ،2018) التي اظهرت النتائج فيها بان كل العزلات بكتيريا *E coli* كانت مكونة للغشاء الحيوي بطريقة الانبوب وبنسبة (100%) .في حين جاءت دراسة في القادسية (حسن ،2017) اذ كانت النتيجة ان (12) عزلة من بكتيريا *E coli* وبنسبة (60%) من مجموع (20) عزلة مكونة للغشاء الحيوي .

اما عزلات بكتيريا (*E coli*) من الماء فكانت (15) عزلة بنسبة (75%) كانت مكونة للأغشية الحيوية وكما هي بالملحق (6). وكانت نتيجة (Ibrahim واخرون ،2014) (10) عزلات من الماء كانت (5) عزلات مكونة الغشاء الحيوي .

2-1-6-4 الكشف عن الغشاء الحيوي بطريقة (Micro Titer Plate)

هذا الاختبار هو فحص كمي (Quantitative Assay) للكشف عن إنتاج الأغشية الحيوية. يعطي قيمة عددية للامتصاص على طول موجة مقداره 630 نانومتر باستخدام قارئ الصفيحة المايكروية لتحديد كمية الأغشية الحيوية التي تشكلها الالتصاق على أسطح ألواح الصفيحة . ويمثل الامتصاص سمك الغشاء الحيوي الذي تشكله العزلات .أظهرت النتائج أن (17) عزلة سريرية (85%) كانت مكونة للأغشية الحيوية وكما هي موضحة القيم بالملحق (4) . اما عزلات بكتيريا *E coli* من الماء فكانت كل العزلات وهي (20) عزلة بنسبة (100%) مكونة للأغشية الحيوية وكما هي موضحة القيم بالملحق (6) .

أن السبب في اختلاف نتائج تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب (MT) عن طريقة Micro Titer Plate(MTP) قد يعود الى اختلاف الوسط الزرعي المستخدم لكل طريقة ،اذا استخدم وسط Trypto soy broth بطريقة الانبوب (MT) في حين استخدم وسط المرق المغذي (Nutrent broth) بطريقة Micro Titer Plate(MTP) ،او قد يعود سبب الاختلاف الى تركيز البكتيريا أو مدة الحضانة إذ تزيد كثافة الخلايا المكونة للغشاء الحيوي بزيادة فترة الحضانة (Wagner واخرون ، 2016).

3-1-6-4 العلاقة بين تكوين الاغشية الحيوية والمقاومة المتعددة للمضاد

أن بكتيريا *E coli* تمتلك أكثر من آلية مقاومة للمضادات الحيوية منها قد تكون قادرة على تكوين الغشاء الحيوي(Biofilm) (Prats وآخرون، 2003). ويوضح الجدول (4-10)العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوية والمقاومة المتعددة للمضاد MDR. اوضحت دراسة Ranjith واخرون (2017) (والتي اتفقت مع الدراسة الحالية) أن من أصل (12) عزلة *E coli* سريرية المعزولة من المرضى كانت (10) عزلات مقاومة لواحد أو أكثر من المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة كما تم اختبارها وكانت غالبية العزلات إيجابية لتكوين الأغشية الحيوية ،اذا يعود سبب تولد المقاومة المتعددة للبكتيريا هي قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي اذا تزيد من فرصة البكتيريا من اكتساب صفة المقاومة من بكتيريا اخرى تحمل جينات مقاومة .

الجدول (4-10)العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوية والمقاومة المتعددة للمضاد

عدد العزلات السريرية	عدد العزلات السريرية المكونة للغشاء الحيوي	عدد مجاميع المضادات المقاومة لها	عدد عزلات الماء	عدد عزلات الماء المكونة للغشاء الحيوي	عدد مجاميع المضادات المقاومة لها
1	1 (%100)	PDR(9)	4	4 (%100)	XDR(8)
2	2 (%100)	XDR(8)	5	5 (%100)	XDR(7)
4	4 (%100)	XDR(7)	3	3 (%100)	MDR(5)
4	3 (%75)	MDR(6)	1	1 (%100)	MDR(4)
3	2(%66.6)	MDR(5)	4	4 (%100)	(2)
6	5(%83.3)	MDR(4)	3	3 (%100)	(1)

2-6-4 النصاب الحسي (Quorum sensing)

هذا الاختبار هو فحص كمي (Quantitative Assay) للكشف عن انتاج (Acyl-homoserine lactone) (AHL) Quorum sensing بالطريقة اللونية (Colorimetric method) . يعطي قيمة عددية للامتصاص على طول موجة مقداره (630) نانومتر باستخدام قارئ الصفيحة المايكروية . أظهرت النتائج أن 6 عزلة

سريرية (30%) كانت منتجة لل (AHL) وكما هي موضحة القيم بالملحق رقم (5). اما عزلات بكتيريا *E coli* من الماء فكانت (15) عزلة (75%) منتجة (AHL).

3-6-4 العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوي و انتاج Acyl-homoserine lactone (AHL)

اذا اظهرت عزلات الماء المنتجة ((Acyl-homoserine lactone (AHL) قدرة على تكوين الغشاء الحيوي .في حين ليس كل العزلات السريرية المكونة للغشاء الحيوي كانت منتجة Acyl-homoserine lactone (AHL). ويوضح الجدول (4-11)العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوية و انتاج Acyl-homoserine lactone (AHL) .

الجدول (4-11)العلاقة بين تكوين الغشاء الحيوي و انتاج Acyl-homoserine lactone (AHL)

عدد العزلات السريرية المكونة للغشاء الحيوي بطريقة Micro Titer Plate	عدد العزلات السريرية المكونة للغشاء الحيوي بطريقة الانبوب	عدد العزلات السريرية المنتجة (AHL) Quorum sensing	عدد عزلات الماء المكونة للغشاء الحيوي بطريقة Micro Titer Plate	عدد عزلات الماء المكونة للغشاء الحيوي بطريقة الانبوب	عدد عزلات الماء المنتجة (AHL) Quorum sensing
(%85) 17	(%60) 12	(%30) 6	(%100) 20	(%75) 15	(%75) 15

7-4 انتاج انزيمات البيتا- لاكتاميز(β- Lactamase) من قبل بكتيريا *E coli*

1-7-4 انتاج انزيمات البيتا- لاكتاميز المعدنية Metallo-β- Lactamase(MβLS)

استخدم طريقة التآزر قرص مضاد الحيوي (Imipenem)و(EDTA) (Imipenem-EDTA synergy test) لتحديد انزيمات البيتا- لاكتاميز المعدنية المنتجة من قبل بكتيريا ال *E coli* . كانت النتيجة من (20) عزلة سريرية (11)عزلة (55%)كانت منتجة لأنزيمات البيتا- لاكتاميز المعدنية وكما موضحة بالمحلق (8). في حين من 20 عزلة ماء ظهرت (6%) عزلات (30%)منتجة وكما موضحة بالمحلق (9).

واظهرت دراسة (Hanberger) واخرون (2014) أن (70) عزلة من بكتيريا *E coli* من مجموع (212) عينة من مصادر مختلفة كانت منتجة لانزيمات البيتا – لاكتاميز المعدنية .

2-7-4 انتاج انزيمات البيتا- لاكتاميز واسعة الطيف (Extended spectrum Beta-lactamase) (ESBLs)

استعمل طريقة تأزر الاقراص المزدوجة (Double Disk Synergy test (DDST)) لتحديد انزيمات البيتا- لاكتاميز الواسعة الطيف(ESBLs)المنتجة من قبل بكتيريا ال *E coli* . كانت النتيجة من (20) عزلة سريرية (2)عزلتان فقط (10%)كانت منتجة لأنزيمات البيتا- لاكتاميز الواسعة الطيف(ESBLs) وكما موضحة بالمحلق (8).في حين من (20) عزلة ماء ظهرت عزلة واحدة فقط (5%)منتجة وكما موضحة بالمحلق (9)

وأظهرت دراسة (Grover) واخرون (2013) أن (105) عزلة من مجموع (262) عينة من بكتيريا *E coli* بنسبة (40 %) كانت منتجة لأنزيمات بيتا – لاكتاميز واسعة الطيف .وايضا في دراسة (Ben-Ami) واخرون (2009) اذا ظهرت (311) عزلة من بكتيريا(*E coli*) بنسبة (80.77%) منتجة لأنزيمات بيتا – لاكتاميز واسعة الطيف من مجموع (385) عينة .وفي دراسة(Marialouis وSanthanam 2016) اذ اظهرت (27) عزلة من مجموع (58) عزلة من بكتيريا(*E coli*) كانت ظاهرية إيجابية لأنزيمات (ESBL β-lactamase) . و دراسة Bollestad واخرون (2018) اظهرت (30)عزلة من بكتيريا(*E coli*) منتجة لأنزيمات بيتا – لاكتاميز واسعة الطيف من مجموع (88)عينة.

3-7-4 انزيمات البيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-)

استخدم المضاد الحيوي (Cefoxitin) بعد الحضن لمدة (4) ايام وبدرجة حرارة (28 م°) للكشف عن انزيمات البيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) المنتجة من قبل بكتيريا ال (*E coli*) . كانت النتيجة من (20) عزلة سريرية (10)عزلات (50%)كانت منتجة لأنزيمات البيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) وكما موضحة بالمحلق (8).اما عزلات الماء فظهرت (9)عزلات بنسبة (45%)منتجة لأنزيمات البيتا- لاكتاميز من نوع Amp-C- وكما موضحة بالمحلق (9).

وكانت نتيجة دراسة (Grover) واخرون (2013) هي (36) عزلة من مجموع (262) عينة من بكتيريا *E coli* بنسبة (14.8%) كانت منتجة لانزيمات بيتا – لاكتاميز من نوع Amp-C-. وايضا جاءت دراسة(Marialouis وSanthanam 2016) ا ظهرت (7) عزلات من مجموع 58 عزلة من بكتيريا *E coli* كانت إيجابية لإنتاج (AmpC β-lactamase).

4-7-4 العلاقة بين انتاج انزيمات البيتا – لاكتاميز من نوع Amp-C- والعزلات المتعددة المقاومة لبكتيريا *E coli*

اظهرت عزلات بكتيريا (*E coli*) المتعددة المقاومة للمضادات تحديات علاجية كبيرة عند المرضى وان من اهم احد الاسباب هو انتاجها لانزيم البيتا- لاكتاميز من نوع(Amp-C-). ويوضح الجدول (4-13) العلاقة بين انتاج انزيمات البيتا – لاكتاميز من نوع Amp-C- من قبل بكتيريا ال (*E coli*) والعزلات المتعددة المقاومة (MDR) لبكتيريا ال (*E coli*). أظهر تحليل عوامل الضراوة في دراسة (Ibrahim) واخرون (2014) أن (5) عزلات مائية من مجموع (10) عزلات تشكل الغشاء الحيوي و (7) عزلات مائية كانت منتجة لانزيمات (β-lactamase) و أظهرت اختبار حساسية المضادات الحيوية أن جميع العزلات المائية متعددة المقاومة.

الجدول (4-13) العلاقة بين انتاج انزيمات البيتا – لاكتاميز من نوع Amp-C- والعزلات المتعددة المقاومة لبكتيريا ال *E coli*

عدد العزلات السريرية	عدد العزلات السريرية المنتجة انزيمات البيتا – لاكتاميز من نوع Amp-C-	عدد مجاميع المضادات المقاومة لها	عدد عزلات الماء	عدد عزلات الماء المنتجة انزيمات البيتا – لاكتاميز من نوع Amp-C-	عدد مجاميع المضادات المقاومة لها
1	1 (%100)	PDR(9)	4	2 (%50)	XDR(8)
2	1 (%50)	XDR(8)	5	4 (%80)	XDR(7)
4	4 (%100)	XDR(7)	3	2 (%66.6)	MDR(5)
4	2 (%50)	MDR(6)	1	1 (%100)	MDR(4)
3	2(%66.6)	MDR(5)	4	0 (%0.0)	(2)
6	0(%0.0)	MDR(4)	3	0 (%0.0)	(1)

وجاءت دراسة (D'Angelo) واخرون (2016) ان انزيمات (ESBL β-lactamases) و (AmpC β- lactamases) هي أسباب متزايدة للمقاومة في العديد من مسببات الأمراض من بكتيريا السالبة لصبغة غرام. زيادة التجارة العالمية وحركة الناس بسرعة على مدى العشرين سنة الماضية، كان لذلك عواقب وخيمة على تطور وحركة جينات مقاومة المضادات الحيوية. هناك تعرض متزايد من السكان في جميع أنحاء العالم للبكتيريا المقاومة الناشئة. يمكن القول إن أهم تطور في العقدين الأخيرين في مجال مقاومة المضادات الحيوية هو ظهور وانتشار انزيمات بيتا-لاكتامز واسعة الطيف (extended-lactamases (ESBLs)) نتيجة لارتفاع معدلات إنتاجها بين بكتيريا العائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*) في البلدان الآسيوية هو أن هناك استخدامًا كبيرًا للمضادات الحيوية (Hawkey، 2015). إن الزيادة في مقاومة مضادات الميكروبات ومقاومة الأدوية المتعددة (MDR) بين عزلات *E coli* (وخصوصا عزلات *E coli* المنتجة انزيمات البيتا –

لاكتاميز الواسعة الطيف (ESBL) وانزيمات و(AmpC β- lactamases) تحد من خيارات العلاج لمرض التهاب المسالك البولية (Zykov واخرون ،2018).

8-4 انظمة التنميط الجيني

1-8-4 استخلاص الحمض النووي (DNA) للعزلات قيد الدراسة

تم استخلاص الحمض النووي ل (20) عزلة من مجموع (40) عزلة ،تضمنت (10)عزلات سريرية (متسلسلة من 1 الى 10) و10 عزلات ماء (متسلسلة من 11الى 20) وكما موضحة ارقام العزلات بالجدول (4-13) تم اختيارها حسب المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع(Amp-C-)، تم تحديد تركيز الحمض النووي بواسطة (Quantus Fluorometer) وكان التركيز الأمثل للحمض النووي في الدراسة الحالية بين (15-30) نانوجرام / مايكرو ليتر(ng/µl) لكل تفاعل كما هو موضح في الجدول (4-13). يتراوح نقاوة الحمض النووي بين (1.5 – 1.8) اعتمادًا على قياس امتصاص الحمض النووي بواسطة مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer). يشير هذا النطاق إلى كفاءة الطريقة المستخدمة لاستخلاص الحمض النووي. من المهم تحديد تركيز الحمض النووي ، الذي يمثل المتطلبات الأساسية لـ (PCR) ، ظهرت هذه الأهمية في الحصول على النتائج المثلى لعدة نسخ من قالب (DNA).

الجدول (4-13) تركيز الحمض النووي (DNA) للعزلات قيد الدراسة

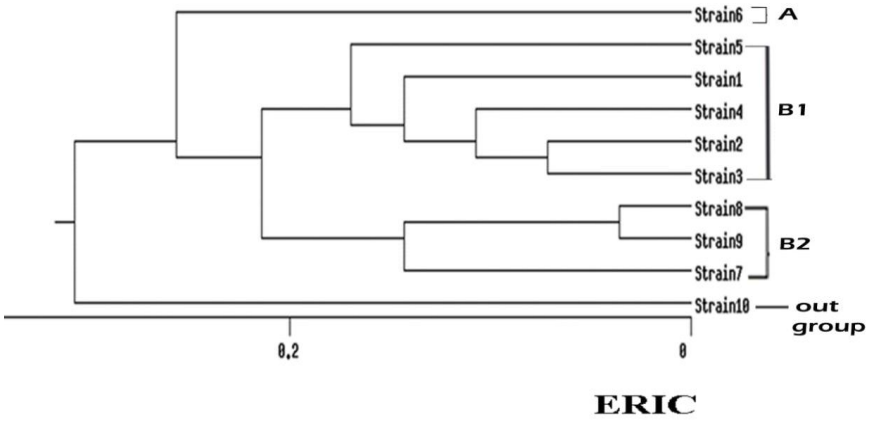
تسلسل العزلات السريرية	العزلات السريرية	التركيز (ng/µl)	تسلسل عزلات الماء	عزلات الماء	التركيز (ng/µl)
1	58- ادرار	20	11	1- مـــــاء	30
2	92- ادرار	25	12	3- مـــــاء	22
3	108- ادرار	22	13	8- مـــــاء	25
4	134- ادرار	25	14	17- مـــــاء	22
5	142- ادرار	23	15	22- مـــــاء	24
6	161- ادرار	20	16	34- مـــــاء	25
7	170- جروح	26	17	45- مـــــاء	19
8	171- ادرار	23	18	49- مـــــاء	20
9	172- ادرار	25	19	80- مـــــاء	15
10	175- ادرار	20	20	82- مـــــاء	25

2-8-4 نظام التنميط (ERIC-PCR)

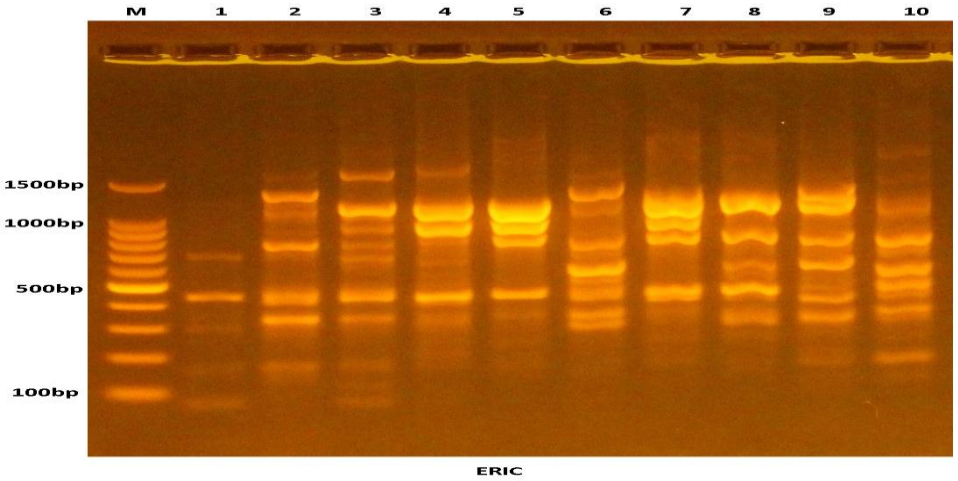
(ERIC –PCR) هي تقنية تنميط الجيني تتميز بكونها بسيطة ، قليلة التكلفة وفعالة من حيث التمييز بين أنواع مختلفة من السلالات البكتيرية . تسلسل (ERIC)هو تسلسل متناظر (palindrome)غير كاملة (incomplete)تتكون من(127) زوج قاعدي (Seifi واخرون ، 2016). صنفت العزلات اعتمادا على نظام تنميط (ERIC) وبحسب برنامج الأكسل وعلى أساس عدد الحزم التي تمتلكها إلى مجموعتين رئيسيتين هي: المجموعة (A) والمجموعة (B).

1-2-8-4 العزلات السريرية Clinical Isolates

امتازت المجموعة (A) والتي تضمنت عزلة واحدة و بنسبة (10%) من مجموع العزلات السريرية وهي (stain6). اظهرت عزلات هذه المجموعة امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (-Amp-C) . اما المجموعة (B) ضمت(8) عزلات بنسبة(80%) وتشمل المجموعة B (2) مجموعتان فرعية هي (B2,B1) والتي امتازت بكون كل عزلاتها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) ومكونة للغشاء الحيوي ومنتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (-Amp-C) . وتضم المجموعة (B1) (5) عزلات بنسبة (50%) وهي (stain1 ، stain2،stain3 ، stain4، stain5). اما المجموعة (B2) تضمنت (3) عزلات بنسبة (30%) وهي (stain7، stain8, stain9) .اما العزلة (stain10) فكانت خارج المجموعة (out group) . امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع Amp-C-.



الشكل (4-4)التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط ERIC-PCR للعزلات السريرية

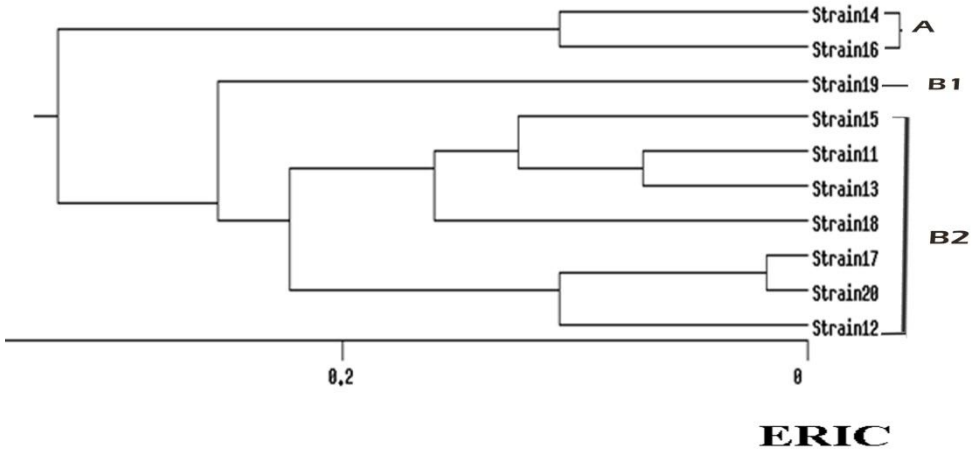


الشكل (4-5)الحزم الناتجة من تفاعل ERIC-PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*

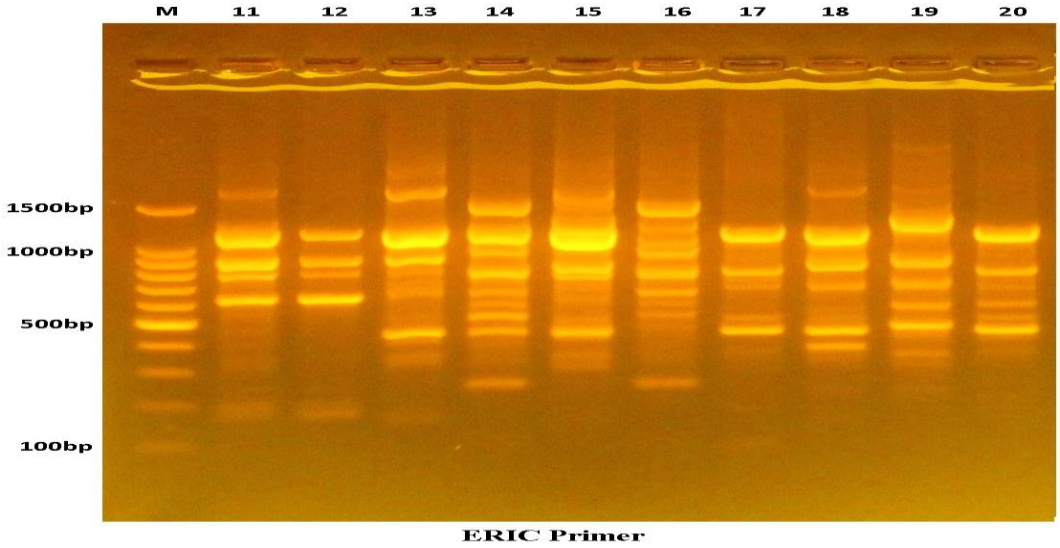
(والتي رحلت على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة 90 دقيقة M الدليل الحجمي ، 1500 bp - العزلات السريرية)

4-8-2-2 عزلات الماء Water Isolates

امتازت المجموعة (A) والتي تضمنت عزلتان و بنسبة (20%) وهي (stain14، stain16) اظهرت عزلات هذه المجموعة امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) . اما المجموعة (B) ضمت (8)عزلات بنسبة (80%) وتشمل المجموعة (B) مجموعتان فرعية هي (B2,B1) والتي امتازت بكون كل عزلاتها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) ومكونة للغشاء الحيوي ومنتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) باستثناء العزلة (stain19) التي كانت غير منتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) .تضم المجموعة (B1) عزلة واحدة بنسبة (10%) وهي (stain19). وتضم المجموعة (B2) (7) عزلات بنسبة (70%) وهي (stain11، stain13 ، stain 12، stain20، stain17, stain18, stain15) .



الشكل (4-6)التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط ERIC-PCR لعزلات الماء



الشكل (4-7)الحزم الناتجة من تفاعل ERIC-PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*

(والتي رحلت على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة 90 دقيقة M الدليل الحجمي ، 1500 bp – عزلات الماء)

إن العديد من الدراسات التي استعملت نظام (ERIC-PCR) كانت نتائجها مطابقة لنتائج تنميط عزلاتنا وبعضها تختلف في بعض الجزئيات كحجم الحزم أو عددها أو نسبة التشابه أو عدد الأنماط التي ظهرت ، وجزء من هذا الاختلاف قد ترجع أسبابه في بعض الأحيان إلى الاختلاف العددي للعزلات المستعملة قيد الدراسة . أشارت دراسة Sahilah وآخرون (2010) إلى تمييز بكتيريا (*E coli*) إلى (6) مجاميع (10)عزلات منفردة في (80%)من التشابه. وأوضح (Xia) وآخرون (2012) أن ثمانية عشر مجموعة كل منهما تحتوي

على (2 إلى 5) عزلات أظهرت نمط وراثي متشابه (Similar genotype). كما بينت (Alitheen) وآخرون (2009) العزلات نمطت جينياً بنظام (الـــ ERIC) إلى(27) من الأنماط المختلفة يمكن أن تُضم في (4) مجاميع مع تشابه من(56 %الى 86 %) . والحزم التي أنتجتها من (3 - 15) والحجم من (0.1 إلى 5.0) كيلوبايت . وفي دراسة (Wan) وآخرون (2011) أشار إلى أن (34) من بكتيريا *E coli* وضعت في (19) نمط وراثي بتقنية الـــ ERIC . وأوضحت Parbhu وآخرون (2010) أن التنميط الوراثي بالـــ ERIC لـــ (37 عزلة) من بكتريا الـــ *E coli* (22) منها وزعت في أربع مجموعات بينما الـــ (15) مجموعة المتبقية بينت أنماط وراثية فريدة من نوعها والحزم الناتجة عنها من (350 إلى 3000) زوج قاعدة. على الرغم من وجود قواسم مشتركة كعدد الحزم وحجمها بين نمط وآخر إلا أنه قد تختلف سلالة عن سلالة بوجود أو غياب حزم أُخرى ، (ERIC-PCR) يميز بدقة العزلات عن طريق عدد ومواقع قطع الحمض النووي المضاعفة ، والتي هي واضحة في المواد الهلامية Gels (Cheah وآخرون، 2015).

أما بالنسبة لمقاومة المضادات الحيوية يرجع ذلك على الأرجح إلى الضغط الانتقائي الناتج عن الاستعمال غير المنضبط وغير المناسب لهذه المضادات . ويعزز ذلك عدم وجود سياسة تحد من توافر المضادات الحيوية التي تباع دون وصفة طبية . كذلك انتشار المقاومة المتعددة(Multi resistant) بشكل عالي جداً في سلالات *E coli* . كما أن وجود أنماط متنوعة من النمط الجيني (ERIC) يدل على أن عزلات الـــ *E coli* لم تكن من نسيلة واحدة لذلك من المحتمل أن هناك انتقال أفقي للجينات التي تشفر للـــ (β-lactamase)عن طريق البلازميد وغيرها من جينات المقاومة للمضادات الحيوية (Adwan وآخرون، 2014).

الجدول (4-14)عدد العزلات لبكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط ERIC-PCR ونسبها بحسب كل صنف

ERIC		عدد العزلات السريرية	رقم العزلات السريرية	عدد عزلات الماء	رقم عزلات الماء
A	A	(%10) 1	6	(%20) 2	16,14
B	B1	(%50) 5	5,4,3,2,1	(%10) 1	19
	B2	(%30) 3	9,8,7	(%70) 7	20,18,17,15,13,12,11
Out group		(%10) 1	10	-------	--------
المجموع		(%100) 10	--------	(%100) 10	--------

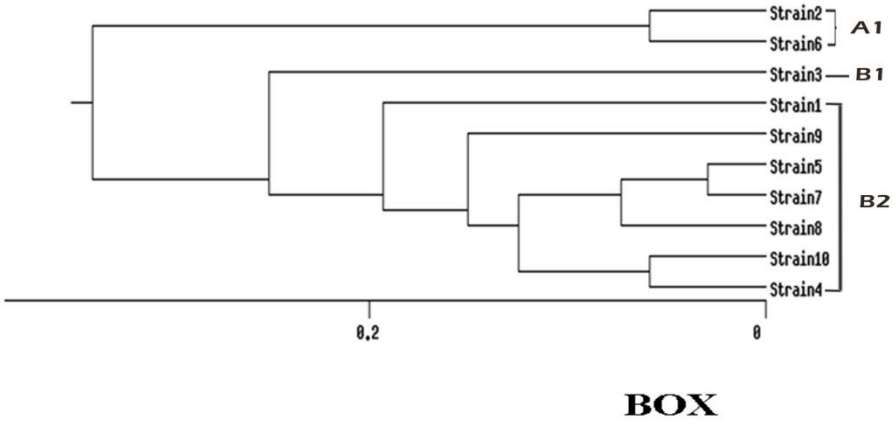
3-8-4 نظام التنميط (BOX-PCR)

(BOX-PCR) هي التقنية الأكثر استخدامًا نظرًا لبساطتها وكفاءتها وانخفاض تكلفتها. خاص مع (repetitive extragenic palindromic-PCR (rep-PCR ، (BOX-PCR) هو تحليل لبصمات الحمض النووي (fingerprinting analysis) (Fajardo-Cavazos وNicholson ، 2006).

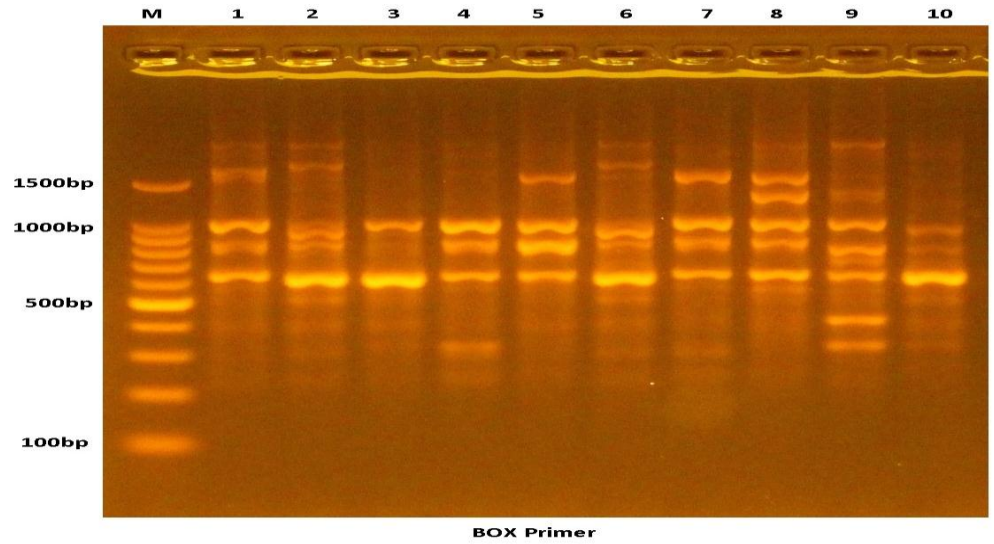
صنفت العزلات اعتمادا على نظام تنميط (BOX)حسب برنامج الأكسل وعلى أساس عدد الحزم التي تمتلكها إلى مجموعتين رئيسيتين هي: المجموعة (A) والمجموعة (B).

4-8-2-1 العزلات السريرية (Clinical Isolates)

امتازت المجموعة (A) والتي تضمنت عزلتان و بنسبة (20%) من مجموع العزلات السريرية وهي (stain2، stain6) اظهرت عزلات هذه المجموعة امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) . اما المجموعة (B) ضمت (8) عزلات بنسبة(80%) وتشمل المجموعة B (2) مجموعتان فرعية هي (B2, B1,) والتي امتازت بكون كل عزلاتها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) ومكونة للغشاء الحيوي ومنتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-).تضم المجموعة (B1) عزلة واحدة بنسبة (10%) وهي (stain3). وتضم المجموعة (B2) (7) عزلات بنسبة (70%) وهي (stain 4 ، stain5 ،stain7 ، stain8 ، stain1, stain10 stain 9,).



الشكل (4-8)التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط BOX-PCR للعزلات السريرية

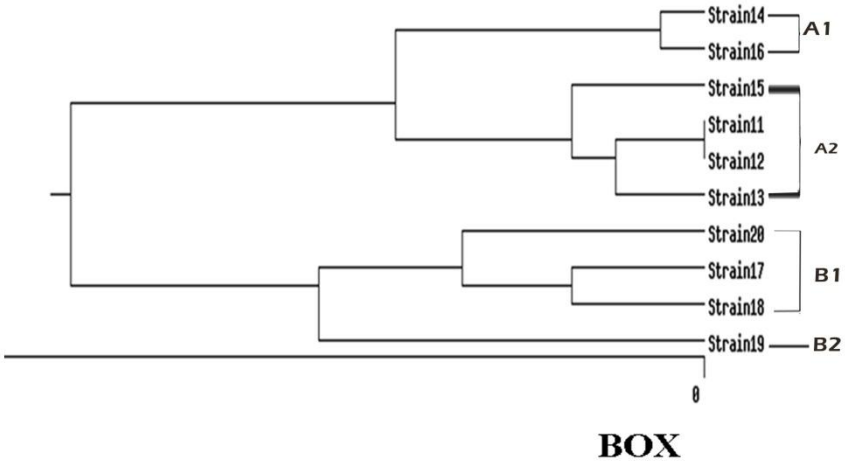


الشكل (4-9)الحزم الناتجة من تفاعل BOX-PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*

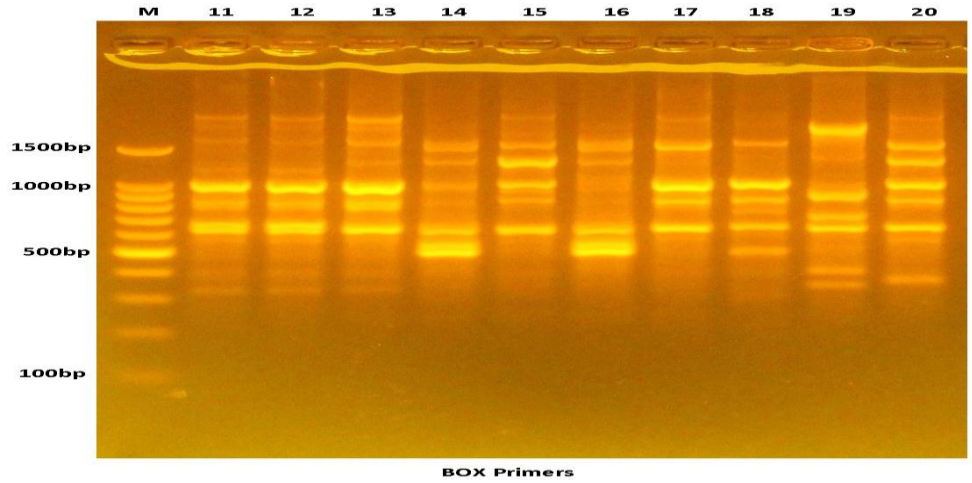
(والتي رحلت على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة 90 دقيقة M الدليل الحجمي ، 1500 bp - العزلات السريرية)

4-8-2-2 عزلات الماء Water Isolates

امتازت المجموعة (A) والتي تضمنت (6)عزلات و بنسبة (60%) وتشمل المجموعة (A) مجموعتان فرعية هي (A2,A1) تضم المجموعة (A1) عزلتان بنسبة (20%) وهي (stain14، stain16) وتضم المجموعة (A2) (4)عزلات بنسبة (40%) وهي (stain11، stain12، stain13، stain15). اظهرت عزلات هذه المجموعة امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع(-Amp-C) . اما المجموعة (B) ضمت (4)عزلات بنسبة (40%) وتشمل المجموعة (B) مجموعتان فرعية هي (B2,B1) والتي امتازت بكون كل عزلاتها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) ومكونة للغشاء الحيوي ومنتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع(-Amp-C) باستثناء العزلة (stain19) التي كانت غير منتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (-Amp-C).تضم المجموعة (B1) (3)عزلات بنسبة (30%) وهي (stain17، stain18، stain20). اما المجموعة (B2) تضم عزلة واحدة بنسبة (10%) وهي (stain19) .



الشكل (4-10)التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط BOX-PCR لعزلات الماء



الشكل (4-11)الحزم الناتجة من تفاعل BOX-PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*

(والتي رحلت على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة 90 دقيقة M الدليل الحجمي ، 1500 bp – عزلات الماء .

ذكرت دراسة (Mohapatra) وآخرون (2007) أنه تم اختبار كل طرق التنميط الجزيئي لسلالات بكتريا الـ *E coli* المعزولة من مصادر مختلفة لاختيار الطريقة الأمثل فكانت(BOX-PCR) بالمرتبة الثانية بعد طريقة (GTG) 5 -PCR). أشار (Rai) وآخرون (2015) إن طرائق التنميط (BOX–PCR)أبدت قوة تمييزية عالية من خلال توليد (127) من الحزم الواضحة تراوحت من (0.16 إلى 3.9) كيلوبايت بينما (ERIC–PCR)ولدت (61) من الحزم تراوحت من (0.56 إلى 3.9) كيلوبايت كما أوضحت الدراسة نفسها

أن طرائق التنميط التي تستغل العناصر المتكررة الموزعة على الجينوم هي أكثر فائدة لتقييم التنوع الجيني . وعلاوة على ذلك ، موقع هذه العناصر بالجوار من الجينات المشاركة في تنظيم مختلف جوانب البكتيريا ، التحول الجيني والفوعة تشير إلى أن العناصر قد تكون تشارك بشكل جيد في تنسيق السيطرة على التعبير الجيني (Van belkum و Hermans، 2001) .

الجدول (4-15)عدد العزلات لبكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط BOX-PCR ونسبها بحسب كل صنف

BOX		عدد العزلات السريرية	رقم العزلات السريرية	عدد عزلات الماء	رقم عزلات الماء
A	A1	(%20) 2	6,2	(%20) 2	16,14
	A2	-----	-----	(%40) 4	15,13,12,11
B	B1	(%10) 1	3	(%30) 3	20,18,17
	B2	(%70)7	10,9,8,7,5,4,1	(%10) 1	19
	المجموع	(%100) 10	-----	(%100) 10	------

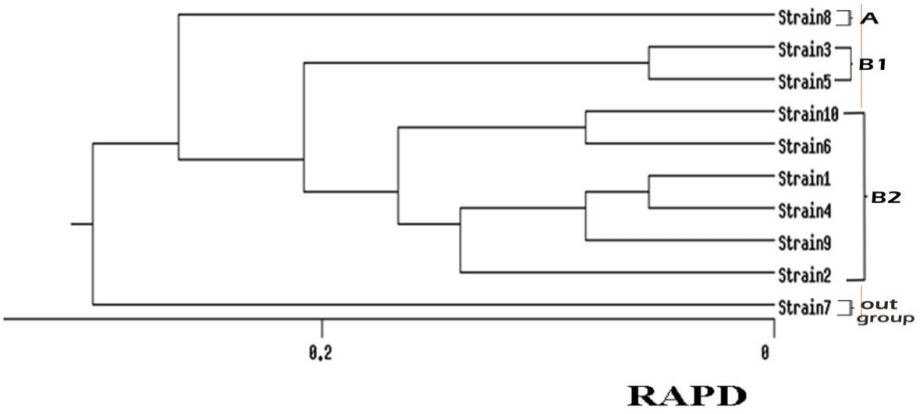
4-8-4 نظام التنميط (RAPD-PCR)

استخدمت تقنية(RAPD– PCR) بادئات عشوائية لتضخيم مجموعة من المواقع الموزعة بشكل عشوائي في أي جينوم وبالتالي تودي الى الكشف عن تطور العلامات الجينية (Marialouis و Santhanam، 2016).

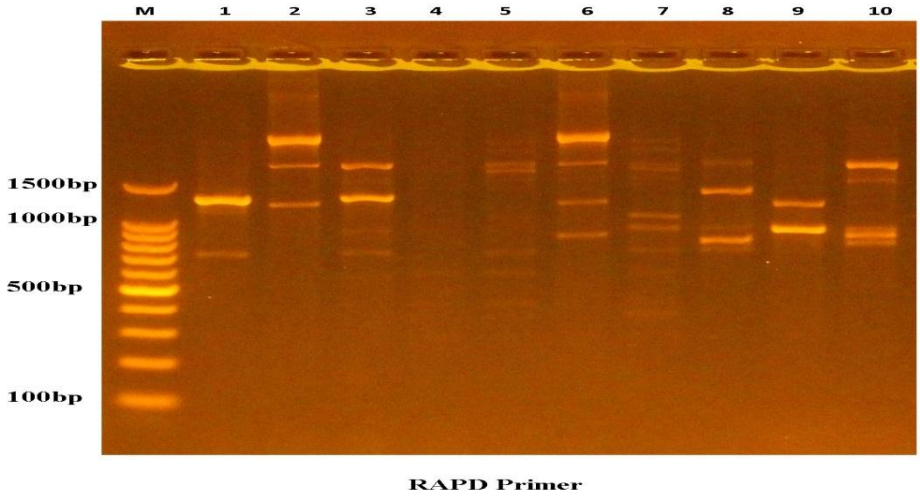
صنفت العزلات اعتمادا على نظام تنميط (RAPD) حسب برنامج الأكسل وعلى أساس عدد الحزم التي تمتلكها إلى مجموعتين رئيسيتين هي: المجموعة (A) والمجموعة (B).

4-8-2-1 العزلات السريرية (Clinical Isolates)

امتازت المجموعة (A) والتي تضمنت عزلة واحدة و بنسبة (10%) من مجموع العزلات السريرية وهي (stain8) .اظهرت عزلات هذه المجموعة امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) . اما المجموعة (B) ضمت (8)عزلات بنسبة(80%) وتشمل المجموعة (B) مجموعتان فرعية هي (B2,B1) والتي امتازت بكون كل عزلاتها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) ومكونة للغشاء الحيوي ومنتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) .تضم المجموعة (B1) عزلتان بنسبة (20%) وهما (stain3،stain5). وتضم المجموعة B2 (6) عزلات بنسبة (60%) وهي (stain1، stain2 stain4, stain6، stain10 stain9)، اما العزلة (stain7) فكانت خارج المجموعة (Out group) امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع(Amp-C-).



الشكل (4-12)التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط RAPD- PCR للعزلات السريرية



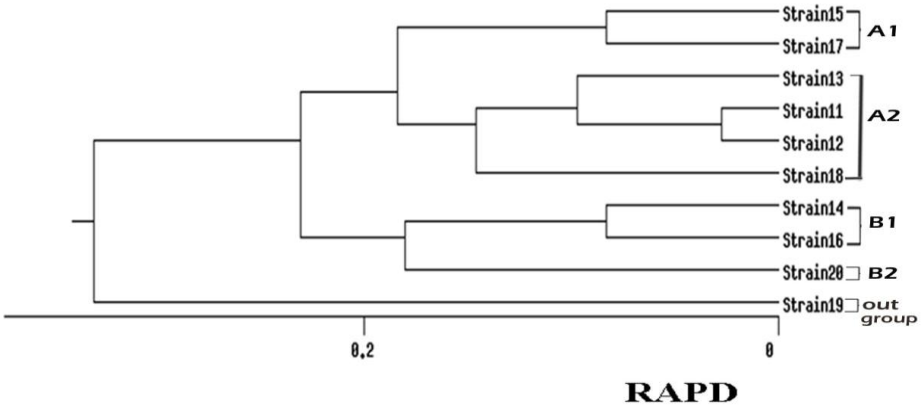
الشكل (4-13)الحزم الناتجة من تفاعل RAPD- PCR لعزلات بكتيريا ال *E coli*

(والتي رحلت على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة 90 دقيقة M الدليل الحجمي ، 1500 bp - العزلات السريرية)

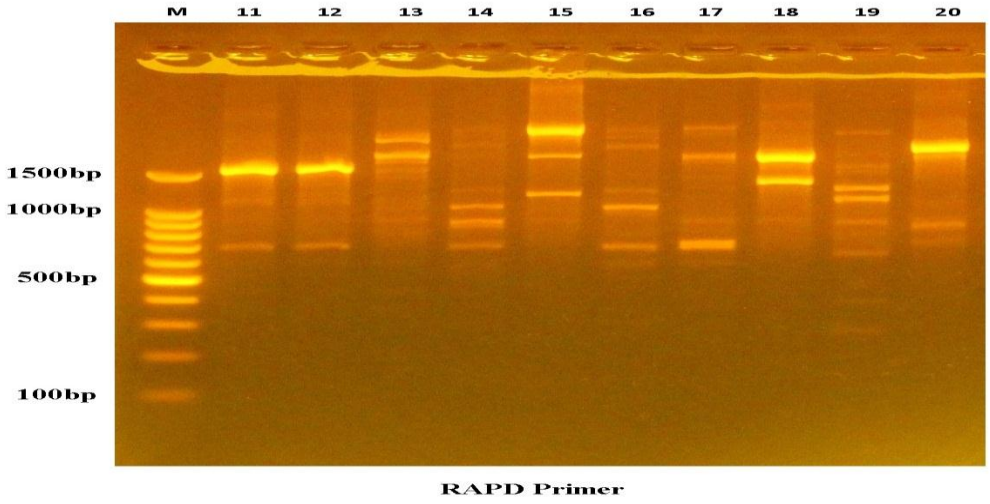
4-2-8-2 عزلات الماء Water Isolates

امتازت المجموعة (A) والتي تضمنت (6)عزلات بنسبة (60%) وتشمل المجموعة (A) مجوعتان فرعية هي (A1، A2) .اظهرت عزلات هذه المجموعة امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) تضم المجموعة (A1) عزلتان بنسبة (20%) وهي (stain15، stain17). وتضم المجموعة (A2) (4) عزلات بنسبة (40%) وهي (stain11 ، stain12، stain13، stain18) . اما المجموعة (B) ضمت (3)عزلات بنسبة (30%) وتشمل المجموعة B (2) مجموعتان فرعية هي (B2,B1) والتي امتازت بكون كل عزلاتها متعددة

المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) ومكونة للغشاء الحيوي ومنتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-) .تضم المجموعة (B1) عزلتان بنسبة (20%) وهي (stain14، stain16). وتضم المجموعة (B2) عزلة واحدة بنسبة (10%) وهي (stain20) .اما العزلة (stain19) فكانت خارج المجموعة والتي امتازت بامتلاكها لصفة المقاومة المتعددة (MDR) وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي ولكن غيرمنتجة لأنزيمات بيتا- لاكتاميز من نوع (Amp-C-).



الشكل (4-14)التنميط التشجيري لعزلات بكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط PCR -RAPD لعزلات الماء



الشكل (4-15)الحزم الناتجة من تفاعل PCR -RAPD لعزلات بكتيريا ال *E coli*

(والتي رحلت على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة 90 دقيقة M الدليل الحجمي ، 1500 bp – لعزلات الماء

(RAPD) هو معيار مفيد للغاية لاختيار سلالة متنوعة من بكتيريا *E coli* حيث أظهرت طريقة RAPD-PCR مستوى عالي من الدقة يسمح بتحديد الاستنساخ ، يوفر(RAPD) فحصًا محددًا وقابلًا للتكرار للتمييز

و فحص المستنسخات *E coli* وبالتالي ، فإنه يقدم نهج الفحص بأسعار معقولة وسريعة (Nielsen واخرون ،2014). وفي دراسة (Marialouis وSanthanam 2016) كشف التركيب الوراثي عن وجود 24 عزلة تنتمي لمجموعة (B2) تليها (19) عزلة للمجموعة (A) و (8)عزلات للمجموعة (B1) و(7) عزلات للمجموعة (D).

الجدول (4-16)عدد العزلات لبكتيريا ال *E coli* بحسب نظام تنميط RAPD- PCR ونسبها بحسب كل صنف

RAPD		عدد العزلات السريرية	رقم العزلات السريرية	عدد عزلات الماء	رقم عزلات الماء
A	A1	(%10) 1	8	(%20) 2	17,15
	A1	——	——	(%40) 4	18,13,12,11
B	B1	(%20) 2	5,3	(%20) 2	16,14
	B2	(%60) 6	10,9,6,4,2,1	(%10) 1	20
	Out group	(%10) 1	7	(%10) 1	19
المجموع		(%100) 10		(%100) 10	

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendation

الاستنتاجات (Conclusions)

١. وجود علاقة واضحة بين قدرة العزلات البكتيرية المعزولة من مصادر سريرية ومن الماء على تكوين الغشاء الحيوي ومقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية قيد الدراسة .
٢. كانت اغلب عزلات البكتيريا من مصادر السريرية ومن الماء منتجة لانزيمات البيتا- لاكتاميز .
٣. وجود علاقة بين انتاج Acyl-homoserine lactone (AHL) من قبل بكتيريا *E coli* وتكوين الغشاء الحيوي .
٤. أن وجود عزلات لبكتيريا *E coli* متعددة المقاومة للمضادات الحيوية في الماء يعتبر عامل مهدد للصحة العامة نتيجة لاكتساب عوامل الخطر من مصادر بيئية وبالتالي خطورة البكتيريا .
٥. أن الانظمة الجينية التي استعملت لتنميط عزلات بكتيريا *E coli* قيد الدراسة كانت ذات قدرة تميزية عالية للتنوع الجيني ، اظهرت نتائج التنميط الوراثي باستخدام نظام (ERIC- PCR)ان جميع العزلات السريرية والبيئية ذات انماط وراثية فريدة ومميزة . كما اظهر التنميط الوراثي باستخدام نظام (BOX- PCR) لنفس العزلات بانها ذات تنوع الجيني مختلف وكذلك الحال مع التنميط باستخدام نظام (RAPD – PCR).
٦. يعد نظام التنميط باستخدام نظام RAPD-PCR أفضل أنظمة التنميط التي استخدمت من حيث التكلفة.

التوصيات (Recommendation)

١. أجراء المزيد من الدراسات على بكتيريا *E coli* وعوامل الضراوة المتعلقة بأمراضيتها باستعمال التقنيات الجزيئية الحديثة مثل تقنية (Real Time PCR(RT-PCR)) .

٢. التحري الجزيئي عن الجزر الأمراضية (Pathogenic Islands) الموجودة في بكتيريا *E coli* وعلاقتها بعوامل الضراوة المختلفة .

٣. اجراء دراسة جزيئية موسعة عن العزلات البكتيرية المعزولة من مياه الأسالة ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والتحري الجزيئي عن طرق اكتسابها لهذه المقاومة.

٤. دراسة الانواع البكتيرية الاخرى والاحياء المجهرية غير البكتيريا مثل الفايروسات التي تسبب تلوث المياه .وتكثيف الدراسات على تلوث المياه والعمل على ايجاد الحلول المناسبة للتقليل من هذا التلوث .

٥. زيادة نشر الوعي الصحي بين مختلف فئات المجتمع في مجال النظافة والعناية بالصحة وعدم استعمال المضادات الحيوية الا بأشراف طبي.

٦. اجراء دراسات للكشف الجزيئي عن الجينات المسؤولة عن انتاج Acyl-homoserine lactone (AHL) .

المصـــــادر

References

المصادر العربية (Arabic References)

*القران الكريم . سورة البقرة .اية (32).

*أحمد، الاء ميسر.(2008). تأثير بكتيريا *L. acidophilus* على بكتيريا *E coli* المسبب لخمج المجاري البولية داخل وخارج الجسم الحي. رسالة ماجستير. جامعة بغداد ,كلية العلوم .

* البلو ، مصعب عبيد حمد . والنعمان ،اديبة يونس شريف .(2018).التحري عن تلوث مياه الشرب في الساحل الايمن من مدينة الموصل باستعمال طريقة الانابيب التخمرية المتعددة .**مجلة التربية والعلم** .مجلد 28.العدد 2.167-184 .

*الحسن ،محمود زكي . والطائي ،محمد ابراهيم .(2009).التحري عن بعض انواع انزيمات البيتا- لاكتاميز في بكتيريا *Rhizobium leguminosarum* .**مجلة التربية والعلم** .مجلد (22): العدد (2).

*حسن، ريام وسام .(2017).دراسة جزيئية للجينات المسؤولة عن انتاج الهيمولايسين في البكتيريا المسببة لاخماج المسالك البولية ومقاومتها لعوامل السيطرة .رسالة ماجستير .جامعة القادسية .كلية التربية .

*السورة ميري ،لارة محمود شفيق .(2012).دراسة الانماط المصلية وعوامل الضراوة لبكتيريا *Escherichia coli* المعزولة من حالات خمج المجاري البولية لدى النساء في محافظة ديالى .رسالة ماجستير .جامعة ديالى .كلية التربية .

*صباح ،زمن عطية .(2018). دراسة بكتريولوجية و جزيئية لبكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اصابات المجاري البولية لمخيمات النازحين والتحري عن عاثياتها البكتيرية .رسالة ماجستير .جامعة ديالى .كلية العلوم .

*النعيمي ،حسام احمد دايح .(2018).التباين الجزيئي لعزلات *Escherichia coli* من مصادر محلية مختلفة وعلاقته بالمقاومة للمضادات الحيوية .رسالة ماجستير .جامعة ديالى .كلية التربية .

English References المصادر الأجنبية

A

*Adwan,K.; Jarrar,N.; Abu-Hijleh,A.; Adwan,G. and Awwad,;E.(2014). Molecular characterization of *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections in Palestine. ***J. Med Microbiol***. 63: 229–234.

*Aghamiri, S., Amirmozafari,N., Mehrabadi,J.F., Fouladtan, B. and Kafil, H. S.(2014). Antibiotic Resistance Pattern and Evaluation of Metallo-Beta Lactamase Genes Including bla-IMP and bla-VIM Types in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients in Tehran Hospitals. ***ISRN Microbio***. 4 (1): 117–122.

*Aggarwal, S., Stewart, P.and Hozalski, R. (2016). Biofilm Cohesive Strength as a Basis for Biofilm Recalcitrance: Are Bacterial Biofilms Overdesigned?. ***Microbiol. Insights.*** 8 (2): 29–32.

*Ahmed, K., Chung, E.S., Song, J.Y. and Shahid, S.(2017). Effective design and planning specification of low impact development practices using Water Management Analysis Module (WMAM): Case of Malaysia. ***MDPI***. 9(3): 173.

*Akturk, S., Dincer, S. and Torogiu S.(2012). Determination of microbial quality and plasmid-mediated multidrug resistant bacteria in fountain drinking water sources in Turkey. ***J. Environ. Biol.*** 33:1127–1136.

*Ali, I., Alfarouk, K.O.. Reshkin, S. J.and Ibrahim, M. E. (2018). Doxycycline as Potential Anti-cancer Agent. *Anti-Cancer Agents* . ***Medicinal Chem***. **17** (12): 1617–1623.

*Alitheen ,Z.Y., Raha,N.S.R., Samuel,A. and Yeap,L.(2009). Random amplifed polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on Vibrio parahaemolyticus isolated from cockles in Padang, Indonesia. ***International Food. Rese***. *J*. 16: 141-150.

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

*Amin ,M., Mehdinejad ,M. and Pourdangchi ,Z. (2009). Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. ***Jundishapur. J.Microbiol***.2(3):118-123.

*Ardhami,M.A. and Ranjbar,R.(2016).Molecular typing of uropathogenic *E coli* strains by ERIC –PCR method. ***Medi.Bacteriol***.8(4):2291-2296.

*Arora ,S.and Bal, M.(2005). AmpC beta-lactamase producing bacterial isolates from Kolkata hospital. *Indian*. ***J. Med .Res***. 122: 224–233.

*Askari, B. M., Morabito, S ., Najafifar, A . and Mazandarani, E.(2016). Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin gene (EHEC-hlyA)-harboring isolates from cattle reveals a diverse origin and hybrid diarrheagenic strains. ***Infect. Genet. Evol.*** 39: 342-348.

***Assumpção** G.L.H., Cardozo M.V., Beraldo L.G., Maluta R.P., Silva J.T., Avila F.A.D., McIntosh, D.and Rigobelo, E.C.(2015). Antimicrobials resistance patterns and the presence of stx1, stx2 and eae in *Escherichia coli*. ***Rev. Bras. Saúde Prod. Anim*.** 16(2):308–316.

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

B

Baldiris**, R., Teherán, V., Montes, A. and Arzuza, O.(2016). Anti-biofilm activity of ibuprofen and diclofenac against some biofilm producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* uropathogens. ***Afri. J. Microbiol. Res.10:1675-1684.

Babapour**,E.,Haddadi,A.,Mirnejad ,R. and Amirmozafari ,*N.(2016).* Biofilm Formation in clinical isolates of nosocomial *Acintobacter baumannii* its relationship with multidrug resistance. ***Asian Pac.J.Biomed. 6(6):528-533.

Behzadi** .P, Ranjbar. R and Alavian, S.M.(2015). Nucleic Acid-Based Approaches for Detection of Viral Hepatitis. ***Jundishapur. J .Microbiol.8(1): e17449.

*Ben-Ami ,R., Rodriguez-Bano, J .and Arslan, H.(2009). A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. ***Clin .Infect .Dis***. 49(5):682–690.

*Bennett,J.E.,Dolin,R. and Blaser,M.J.(2015).*Douglas and Bennett´s prienciples and practice of infections Diseases* .8th ed.Elsevier.

*Bessa, LJ., Fazii, P., Di Giulio, M. and Cellini, L.(2013). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. Int Wound.

*Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. ***Nat. Revi. Microbiol***. 13: 310– 317.

*Bhalerao, D. S.;** Roushani, S.; Kinikar, A. G. and Akhter, I. (2010). Study of Metallo-beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pravara Rural Hospital. *Pravara. Med. Rev*. 2(3): 16-9.

*Blanco, A.E., Barz, M., Cavero, D., Icken, W. and Sharifi, A.R.(2017). Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates by chicken embryo lethality assay and ERIC-PCR. ***Avian Diseases***.10: 23-32.

*Boer, M ., Heuer, C., Hussein, H., and McDougall, S.(2015). Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobials against *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes* of bovine uterine origin. ***J. Dairy Sci***. 98:4427–4438.

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

*Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C. and Sáez-Nieto, J.A. .(2011) Valdezated Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de. microbiología. ***Enferm Infecc Microbiol Clin***. 29: 601-608.

*Bouchet, V.; Huot, H. and Goldstein R. (2008). Molecular genetic basis of ribotyping. ***Clin. Microbiol. Revi.*** 21(2): 262-273.

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

*Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner, T.A.and Adelberg,s.J. M.(2010). ***Medical Microbiology***. 25th ed. USA: McGraw-Hill Companies.

C

*Cabanas, M.L. Yan, C., Lalonde, R.J. and Heron, D.E.(2019). Which Dose Specification Should Be Used for NRG Radiation Therapy Trials: Dose-to-Medium or Dose-to-Water?. ***Practical Radiation Oncol***.10(2): e103-e110.

*Canencia, O. P., Dalugdug, M.D., Emano, A.M., Mendoza, R., Walag, A. M. P. (2016). Slaughter waste effluents and river catchment watershed contamination in Cagayan de Oro City, Philippines. ***Res .Gate.*** 9 (2): 2220-2263.

*Cass,J.A., Kuwada,N.J.,Traxler,B. and Wiggins,P.A.(2016). *Escherichia coli* Chromosomal Loci Segregate from Midcell with Universal. **Dynamics.*Biophys.J***.110:2597-2609

*Cassir, N., Rolain, J.M. and Brouqui, P. (2014). A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Front .Microbiol*. 5: 551.

*Carr, A.C. and Moore, S.D. (2012). Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting. ***PLoS. ONE.*** 7 (5): e37640.

*Capoor, M. N., Ruzicka, F., Schmitz, J. E., James, G. A., Machackova, T., Jancalek, R., Smrcka, M., Lipina, R.and Ahmed, F. S. (2017). Propionibacterium acnes biofilm is present in intervertebral discs of patients undergoing microdiscectomy. ***PLOS. ONE.*** 12 (4): e0174518.

*CDC.(2017). About Antimicrobial Resistance – Antibiotic/Antimicrobial Resistance.

*Chalmeau, J., Monina, N., Shin, J., Vieu, C.and Noireaux ,V. (2011). α-Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. ***Biochim. Biophys. Acta.*** 1808 (1): 271–278.

*Cheah,Y.K., Tay,L.W., Aida,A.A., Son, R., Nakaguchi,T. and Nishibuchi, M.(2015). Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from different food sources. ***Internat. Food .Rese. J.*** 22(1): 31–40.

*Chen, Y.C. Lai, Y.S., Shyu, D.J., Chang, Y.W. and Chen, Z.R.(2019). C-Terminal Part of Glutamate-Ammonia-Ligase Adenyltransferase Gene Identified by RAPD-HRM with 3H Primer for *E. Coli* Screening. ***Folia Biologica (Praha)*** .65: 88-100 .

*Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H.and Daffonchio, D. (2003).Genetic relationship in the Bacillus cereus group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. ***J. Appl. Microbiol.*** 94: 1108-1119.

*Chiu, C. H., Tang, P. Chu, C. Hu, S. Bao, Q. Yu, J. Chou, Y. Y. Wang, H. S. and Lee, Y.-S. (2005). The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. ***Nucleic Acids Res***. 33: 1690–1698.

*Chua, S.L., Hultqvist, L.D., Yuan, M., Rybtke, M., Nielsen, T.E, Givskov, M., Tolker-Nielsen ,T.and Yang, L. (2015). In vitro and in vivo generation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-dispersed cells via c-di-GMP manipulation. ***Nat .Protoc***. 10 (8): 1165–1180.

*CLSI (Clinical & Laboratory Standards institute).(2019). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing Seventeenth informational supple -ment. 27(1): 100-170.

*Codjoe, F.S., Brown, C.A., Smith, T.J., Miller, K. and Donkor, E.S .(2019). Genetic relatedness in carbapenem-resistant isolates from clinical specimens in Ghana using ERIC-PCR technique. ***PLoS One***. 14(9): e0222168.

*Collignon ,P., Beggs, J.J., Walsh, T.R . Gandra, S.and Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. ***Lancet Planet Health***. 2: e398-e405.

*Cordeiro, G., CUNHA, M.S. SILVA, C.R. and Jorge, I.R.(2019). Molecular identification of three species of Oncideres (Coleoptera: Cerambycidae) using RAPD markers. ***An. Acad. Bras. Ciênc***.91:1678-2690.

*Croxen, M. A.and Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. ***Nature Reviews. Microbiol.*** 8 (1): 26–38.

D

*Darnton, N.C., Turner, L., Rojevsky, S.and Berg, H.C. (2007). On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. ***J. Bacteriol.*** 189(5): 56–64.

*D'Angelo, R.G. , Johnson, J.K. , Bork, J.T. and Heil, E.L .(2016). Treatment options for extend- ed-spectrum β-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. ***Expert. Opin. Pharmacother***.17:953–967 .

*Dame, R.T.and Tark-Dame, M.(2016). Bacterial chromatin: converging views at different scales. ***Curr Opin Cell Biol***. 40: 60–65.

*Darkazanli, M., Kiseleva, I. and Darkazanli, K.(2018). Genetic Diversity of E. coli O157:H7 Isolated from Some Leafy Greens, Irrigated by Aleppo River, Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker. ***Russian. Agricultural. Scie .***44: 146–152.

*Doughari, HJ.; Ndakidemi, PA.; Human, IS. and Benade, S .(2011). Virulence factors and antibiotic susceptibility among verotoxic non O157: H7 *Escherichia coli* isolates obtained from water and wastewater samples in Cape Town, South Africa. ***Afri. J. Biotechnol***. 10(6): 60-68.

E

*Ehrlich, G., Hu, F., Shen, K., Stoodley, P.and Post, J. (2005). Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. ***Clin Orthop Relat Res*** (437): 4-20.

*Ercan F.S., Öztemiz, S., Özcan,S. and TUNÇBİLEK, A.Ş. (2012). Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in two Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species in Turkey. ***Turk Entomol Derg*** .36(2): 177-182.

*Evans, J.r., Doyle, J.and Dolores, G. (2007). *Escherichia Coli*. ***Medical Microbiology***, 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston.

F

*Fajardo-Cavazos ,P .and Nicholson,W.(2006). Bacillus endospores isolated from granite: close molecular relationships to globally distributed Bacillus spp. from endolithic and extreme environments. ***Appl Environ Microbiol***. 72:2856-2863.

*Faner, R., Sibila, O., Agustí, A., Bernasconi , E. and James, D. (2017). The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives. ***European. Respiratory. J.*** DOI: 10:1183-1399.

*Fardsanei, F., Nikkhahi, F., Bakhshi, B., Salehi, T. Z., Tamai, I. A. and Soltan, M. M.(2016). Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance,

plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. ***New. Microbes . New .Infec***. 14: 24–30.

Farrokh**, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H. and Raynaud, S. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*(STEC) and their significance in dairy production. ***Int .J. .Food .Microbiol. 162: 190-212.

Flowers,**C.R., Seidenfeld, J.,Bow, E.J.,Karten, C.,Gleason,C.,Hawley, D.K.,Kuderer, N.M., Langston ,A.A.,Marr, K.A., Rolston, K.V. and Ramsey,S.D. (2013). Antimicrobial prophylaxis and outpatient management of fever and neutropenia in adults treated for malignancy: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. ***J.Clin Oncol. 31 (6): 794–810.

***Forbes,** B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S.and Brawn,I.A.(2007). *Bailey and Scotts, Diagnostic Microbiology*. 12th ed. *Mosby* . USA .Inc St. Louis.

Fotadar** ,U., Zaveloff, P.and Terracio, L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. ***J. Basic. Microbiol. 45 (5): 403–404.

Foxman**, B.(2014).Urinary tract infection syndromes : occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. ***Infect Dis Clin North Am. 28:1–13.

Foxman**, B.(2010). The epidemiology of urinary tract infection. ***Na t. Rev. Urol. 7(2): 653-660.

*Fraune, S.,Bosch, T. C., Tholey, A. K. S., Schultze, A., Forêt, S.,Treitz, C.,Pietschke, C. (2017). Host modification of a bacterial quorum-sensing signal induces a phenotypic switch in bacterial symbionts. ***Proc. Nat. Acad. Scie.*** 114 (40): 8488–8497.

*Furusawa, T., Maki, N., Suzuki, S. (2008). Bacterial contamination of drinking water and nutritional quality of diet in the areas of the western Solomon Islands devastated . ***Tropical. Medi .Health.*** 36 (2): 65–74.

G

*Gambero, M. L., Blarasin, M. and Bettera, S. (2016). antibiotic resistance and molecular characteristics of *Escherichia coli* isolated from groundwater in an agroecosystem. ***J. Clin.Microbiol***. 36 (1), 211–215.

*Gambero, M. L., Blarasin, M. , Bettera, S.and Albo,J.G.(2017). Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from surface water and groundwater in a rural environment .***J.water.Health***.15(5):757-765.

*Green, M.R.and Sambrook, J.(2012). Molecular Cloning A Laboratory Manual.4th ed. New York: Cold Spring Harbor.

*Goel, P.K.(2006) .water pollution,causes, Effects and control .2nd ed . 14 1new Age international publishers.

*Gould, K. (2016). Antibiotics: From prehistory to the present day. ***J. Antimicrob. Chemother.*** 71 (3): 572–575.

*Grover , C. N., Sahni, B. A.K. and Bhattacharya, C.S.(2013). Therapeutic challenges of ESBLS and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. ***Med. j . armed. Cesindia***. 69:4-10.

*Gualerzi, C.O., Brand,i L., Fabbretti. A. and Pon, C.L. (2013). Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance. ***John. Wiley*** . Sons. p. 1. ISBN 978-3-527-33305-9.

H

*Hanberger, J. H.A., Garcia-Rodriguez, M. ,Gobernado, H. Goossens, L. E. Nilsson, and Struelens, M. J. (2014).Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. ***J. American Med. Association***. 281(1)*:* 67–71.

*Hanaor, D. A. H., Sorrell, C. C. (2014). Sand Supported Mixed-Phase TiO2 Photocatalysts for Water Decontamination Applications. ***Advanced Engineering Materials.*** 16 (2): 248–254.

*Hassell ,J.M., Ward, M.J.and Muloi, D.(2019). Clinically relevant antimicrobial resistance at the wildlife-livestock-human interface in Nairobi: an epidemiological study**. Lancet Planet Health***. 3: e259-e269.

*Harvey, R.A., Cornelissen, C.N. and Fisher, B.D. (2013). Lippincott's Illustrated Review Microbiology. 3d ed. Lippincott Williams and Wilkins Wolters Kluwer business. USA.

*Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K.and Choi, S. (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. ***Molecular Systems Biol***. 2.

*Hawkey, P.M .(2015). Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of global- ization. ***J. Hosp .Infect.***89:241–247 .

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

*Holmes, A.H.,Moore, L.S .P.,Sundsfjord, A., Steinbakk, M.,Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. ***Lancet***. 387: 176-187.

*Hudson, C.M., Bent, Z.W., Meagher, R.J. and Williams, K.P. (2014). Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. ***PLoS. ONE***. 9 (6): e99209.

*Hussain, T. (2015). Pakistan at the verge of potential epidemics by multi-drug resistant pathogenic bacteria. ***Adv. life sci.*** 2(2): 46-47.

I

*Ibrahim,I.A., Al-Shwaikh,R.M.and Ismaeil,I.(2014). Virulence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from Tigris River and children diarrhea. ***Infection.Drug. Resis***. 7 .317–322.

J

*Jacoby, G.A.and Munoz-Price, L.S. (2005). The new beta-lactamases. *N. Engl. J. Med*. 352 (4): 380–391.

*Jafari, A., Aslani, M.M. and Bouzari, S. (2012). *Escherichia coli*: a Brief Review of Diarrheagenic Pathotypes and their Role in Diarrheal Diseases in Iran. ***Iran J Microbiol.*** 4(3): 102-117.

*Jarocki,p., Podleśny,M., Komoń-Janczara,E., Piotr,J., Kucharska,J., Glibowska,A.and Targoński,Z.(2016). Comparison of various molecular methods for rapid differentiation of intestinal bifidobacteria at the species, subspecies and strain level. ***BMC. Microbiol***. 22(16): 159.

K

*Kandekar,C.S. and Sekaran,C.(2015).Virulence factors of *E.coli* and their association with drug resistance-A primitive study.*I.J.A.B.R.* 5(3): 273-276.

*Kaper, J.B., Nataro, J.P.and Mobley, L.T. (2004).Pathology *Escherichia coli*. ***Nat Rev Microbiol***.2: 123–140.

*Karatan ,E.and Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, materials that build and break bacterial biofilms. ***Microbiol . Mol. Biol. Rev.*** 73 (2): 310–347.

*Keshri, V., Panda ,A .,Levasseur, A., Rolain, J.M., Pontarotti, P.and Raoult, D.(2018). Phylogenomic analysis of β-lactamase in archaea and bacteria enables the identification of putative new members. ***Genome. Biol. Evol***. 10: 41106-41114.

*kim , E.M., Woo, H.M., Tian,T., Yilmaz , S .and Javidpour, P.(2017). Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E coli* . ***Elsevier Metabolic Engineering*** .44:325-363.

*Kohler,C.D. and Dobrindt , U.(2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? .***Int J Med Microbiol***. 301(8):642–647.

*Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A.,Walsh,T.R.,Bagaria ,J.,Butt,F. Balakrishnan, R.,Chaudhary, U.,Doumith, M.,Giske, C.G.and Irfan, S. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. ***Lancet. Infect. Dise***. 10 (9): 597–602.

*Kukanur,S.; Meundi,M.; Bajaj,A. and Kotigadde,S.(2015). Co-Relation between Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *E coli*, With Special Reference to Uropathogenic *E coli*. ***IOSR J. Dental . Medical Scie***. (IOSR-JDMS). 14 (3): 15-21.

*Kuo,K.C.,Shen,Y.H.and Hwang,K.P. (2007).Clinical implications and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in

children: a case-control retrospective study in a medical center in southern Taiwan. ***J. Microbiol. Immunol. Infect.*** 40(3): 248–254.

L

Lahiri**, S. D., Bradford, P. A., Nichols, W. W. and Alm, R. A. (2016). Structural and sequence analysis of class A beta-lactamases with respect to avibactam inhibition: impact of omega-loop variations. ***J. Antimicrob. Chemother. 71: 2848–2855 .

Lazzi**, C., Rossetti, L., Zago, M., Neviani, E. and Giraffa, G.(2004). Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. ***J. Appl. Microbiol. 94: 481-490.

Leach**, K.L. , Swaney, S.M., Colca J.R., McDonald, W.G., Blinn, J.R., Blinn, L.M., Thomasco, R.C., Gadwood, D., Shinabarger, L. and Xiong, A.S.(2007).The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. ***Mol. Cell. 26: 393–402.

Leclerc**,H.,Mossel , D.A.A., Edbery , S.C., and Struijk , C.B. (2001). Advances in the bacteriology of the coliform group : their stability as markers of microbial water safety . ***Annu .Rev . Microbial . 55: 201-234 .

Le Page**, S., Dubourg, G., Baron, S.A., Rolain, J.M.and Raoult, D.(2019). No global increase in resistance to antibiotics: a snapshot of resistance from 2001 to 2016 in Marseille, France. ***Eur J Clin. Microbiol .Infect. Dis. 38: 395-407.

*Levin ,B.R., Perrot, V.and Walker, N. (2000). Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. ***Genetics***. 154 (3): 985–997.

*Lukjancenko, O., Wassenaar,T.M. and Ussery, D.W. (2010). Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. ***Microbial. Ecol***. 60 (4): 708–720.

M

*MacFaddin, J.F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

*Marialouis, X. A. ,Santhanam, A.(2016). Antibiotic Resistance, Rapd- Pcr Typing of Multiple Drug Resistant Strains of *Escherichia Coli* From Urinary Tract Infection (UTI). ***J . Clin. Diagnostic Res***. 10(3): DC05-DC09.

*Madigan, M.T.and Martinko, J.M. (2006). *Brock Biology of microorganisms* .11th ed. Pearson.

*Meier-Kolthoff, J.P., Hahnke, R.L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V.and Fiebig, A. (2013). Complete genome sequence of DSM 30083(T), the type strain (U5/41(T)) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. ***Standards in Genomic Sciences***. 9: 2.

*Makena, A.,Düzgün, A. Ö.,Brem, J., McDonough, M.A., Rydzik, A. M., Abboud

, M. I., Saral, A.,Çiçek, A. Ç. and Sandalli, C. (2016). Comparison of Verona Integron-Borne Metallo-β-Lactamase (VIM) Variants Reveals Differences in Stability and Inhibition Profiles . ***Antimicrob. Agents . Chemother.*** 60 (3): 1377–1384.

Manges**, A. , Johnson, J., Foxman, B. ,O'Bryan, T.T., Fullerton, K.E.and Riley, L.W. (2001) Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multi-drug resistant *E. coli* clonal group, ***New Engl. J. Med. 345*:* 1055–1057.

Mishra**, R. K. Pandey, B. K. Pathak, N. and Zeeshan, M.(2015). BOXPCR- and ERIC-PCR-based genotyping and phylogenetic correlation among Fusarium oxysporum isolates associated with wilt disease in Psidium guajava L. *Biocatalysis* . ***Agricultural Biotechnol. 4:(1). 25–32.

Montealegre**, M.C., Roy, S., Böni, F., Hossain, M.I. and Caduff, L. (2018). Risk Factors for Detection, Survival, and Growth of Antibiotic-Resistant and Pathogenic *Escherichia coli* in Household Soils in Rural Bangladesh . ***Applied .Environmental. Microbiol. 84 (24): 8–18.

Mohapatra**,B.R., Broersma,K. and Mazumder,A.(2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds Authors. ***Microbiol Letters. 98–106.

N

*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 Communications***. 10: 4301.

*Nicolle, L.E. (2008). Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. ***Urol. Clin. North Am***. 35 (1): 1–12.

*Nielsen, K. L., Godfrey, P. A. , Stegger, M., Andersen, P.S. and Feldgarden, M. (2014). Selection of Unique *Escherichia coli* Clones by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD): Evaluation by Whole Genome Sequencing **. *J. Microbiol. Methods*** 5:101-103.

*Nordmann, P., Demord, A., Poirel, L. and D'Emidio, F.(2019). Detection rapide des entérobactéries productrices de ß-lactamases à spectre élargi. *Médecine et* .***Maladies Infectieuses***.*49(4):* S47.

O

* **Oliveira** , C., Amador, P., Prudêncio, C and Tomaz, C.T.(2019). ESBL and AmpC β-Lactamases in Clinical Strains of *Escherichia coli* from Serra da Estrela, Portugal .***MDPI* Medic**. 55 (6): 272.

P

*Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., Gamboa, H., Gotuzzo, E., Kronvall, G., Paradisi, F. and Rossolini, G. M. (2007). Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. ***Antimicrob Agents Chemother***. 51: 2720-2725.

* **Papenfort**, K. and Bassler, B.L.(2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. ***Nature .Reviews .Microbiol***.14: 576-588.

*Paran, I. and Michelmore, R.W.(2005). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. ***Theor. Appl. Genet***. 85: 985-993.

*Parbhu,V.;Isloor,S.Balu,M.;Suryanarayana ,V.V.S. and Rathnamma,D. (2010).Genotyping by ERIC-PCR of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis cases. *Indian*. ***J. Biotechnol***. 9: 298-301.

*Pincus, D. H. (2011). Microbial Identification Using the Biomérieux Vitek 2 System. bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA . 1: 1-32.

*Pitout, J.D.and Laupland, K.B.(2008). Extended-spectrum beta-lactamaseproducing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. ***Lancet. Infect***. Dis. 8:159–166.

*Prats, G, Miretis, B. and Miro, E. (2003).Cephalosporin Resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with salmonellosis . ***Emerg. Infect. Dis***. 9(10) : 1273-1280 .

Q

*Qin, X., Engwer, C ., Desai, S. and Vila-Sanjurjo, C.(2017). An investigation of the interactions between an E. coli bacterial quorum sensing biosensor and chitosan-based nanocapsules. ***Biointerfaces***.149:358-368.

R

*Raeispour, M. and Ranjba, R.(2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. ***Anti. Res. Infec. Control***. 7:118.

*Rai, p., Sharma, A., Saxena, p .,Sony, A.P, Chakdar, H, Kashiap, P.L, Srivastava , A.K. and Sharma, A.K. (2015). Comparison of molecular and doctrinal writing methods to assess the diversity of selected members of the genus Bacillus. ***ICAR - Nati9onal Office of Microbiological Important Organisms (NEMIM) India***. 84(2): 236-246.

*Ranjith,K., Arunasri,K., Reddy,G.S., Adicherla,H., Sharma,S.and Shivaji,S.(2017). Global gene expression in *Escherichia coli*, isolated from the diseased ocular surface of the human eye with a potential to form biofilm. ***Gut Pathog***,. *9:15.* .

*Rao, S. (2008). Sterilization and disinfection. (cited by www.Microrao.com) .

*Roy, C. P., Ingold, A., Vanegas, N., Martínez, E., Merlino, J. and Merkier, A.K. (2011). Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. ***Antimicrob Agents Chemother.*** 55: 3140-3149.

*Ruiz, J. (2018). Etymologia: TEM. ***Emerg. Infec. Dis.*** 24 (4): 709.

*Rutherford, S.T. and Bassler, B.L. (2012). Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold. **Spring.Harb. Perspect.Med***. 2 (11): a012427.

*Ruppe, E.; Hem, S.; Lath, S.; Gautier, V.; Ariey, F.; Sarthou, J.L., Monchy, D. and Arlet, G.(2009).CTX-M β-Lactamases in *Escherichia coli* from Community -acquired Urinary Tract Infections.***J. Emerg. Infect. Dis***. 15(5): 741-800.

S

*Sahilah, A. M.,Audrey, L. Y. Y.; Ong,S. L., Wan Sakeenah, W. N., Safyyah, S., Norrakiah, A. S., Aminah, A. and Azuhairi,A.A.(2010). DNA profling among egg and beef meat isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR) and random amplifed polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR). ***Internat .Food. Res.*** *J*. 17: 853-866.

*Salyers,A.A. ,Gupta, A. and Wang, Y. (2004). Human intestinal bacteria as for reservoirs antibiotic resistance genes. ***Trends. Microbiol***. 12 : 412–416.

*Seifi, K., Kazemian, H. and Heidari, H.(2016). Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumonia*e Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. ***Jundishapur. J. Microbiol.*** 9(1): e30682.

*Shapiro, A. B. (2017). Kinetics of sulbactam hydrolysis by β-lactamases, and kinetics of β-lactamase inhibition by sulbactam. ***Antimicrob. Agents Chemother.*** 61: e01612–17.

*Shrestha ,R., Khanal,S., Poudel, P., Khadayat, K., Ghaju,S. and. Marasini,P.B.(2019). Extended spectrum β-lactamase producing uropathogenic *Escherichia coli* and the correlation of biofilm with antibiotics resistance in Nepal. ***Ann Clin Microbiol Antimicrob***.18:(42).

*Silva, J, Gatica, R., Aguilar, G., Becerra, Z., Garza-Ramos, V., Velazquez, M. , Miranda, G. ; Leanos, B. ; Solorzano, F. and Chaniz, G. E.(2001). Outbreak of infection with extended , spectrum β-Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. ***J. Clin. Microbiol***. 39:3193-3196.

*Singhal,S.,Mathur,T.,Khan,S.,Upadhyay,D.J ,Chugh, S.and Gaind, R.(2005).Evaluation of methods for AmpC beta-lactamase in gram-negative clinical isolates from tertiary care hospitals. *Indian.* ***J .Med. Microbiol***. 23:120 – 124.

*Stipcevic, T., Piljac, T. and Isseroff,R.R. (2005). Di-rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* displays differential effects on human keratinocyte and fibroblast cultures. ***J. Dermatol. Sci***. 40 (2): 141–143.

*Sritharan, M. (2006). Iron and bacterial virulence. *Indian .**J .Med .Microbiol***. 24 (3): 163–164.

T

*Tadesse, A. and Alem, M. (2006). Medical Bacteriology. EPHTI. Gondar University.

* Tajbakhsh , E., Ahmadi, P., Abedpour-Dehkordi, E., Arbab-Soleimani, N . & Khamesipour, F. (2016). Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic E. coli isolated from clinical samples in Iran. ***Anti. Resi. Infec. Control***.5(11).

*Tasneem, U., Yasin, N., Nisa, I., Shah, F., Rasheed, U., Momin, F., Zaman, S.and Qasim, M.(2018). Biofilm producing bacteria: A serious threat to public health in developing countries. ***J. Food. Scie. Nutri***. 1 (2).

*Tauschek, M., Gorrell, R.and Robins-Browne,R.M. (2002). Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. ***PNAS***. 99 (10): 7066–7071.

*Turner, P.J. (2005). Extended-spectrum B-lactamase . ***clin. Infect. Dis***. (41): 273-275.

*Turton, J.F.; Hatice, B.; Siu, L.K.; Mary, E.K. and Tyrone, L. P. (2008). Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella sp.* and comparison of isolates within these serotypes. ***Fems. Microbiol. Lett.*** 284: 247–252.

V

*Van belkum, A. and Hermans, PW.(2001). BOX PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae*. ***Methods .Mol. Med***. 48:159-68.

*Vandepitte, J., Engback, K., Piot, P. and Heuck, G. (2003). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization. *Geneva, Switzerland*.

*Vranic, S. M. and Uzunovic, A.(2016). Antimicrobial Resistance of *ESCHERICHIA COLI* Strains Isolated from Urine at Outpatient Population : A singie Laboratory Experience. ***Mater Sociomed.*** 28(2): 121-124.

*Vyas, K.S.and Wong, L.K. (2016). Detection of Biofilm in Wounds as an Early Indicator for Risk for Tissue Infection and Wound Chronicity. ***Ann. Plast. Surg***. 76 (1): 127–131.

W

Wagner, S.,** Sommer, R., Hinsberger, S., Lu, C., Hartmann, R., W., Empting, M.and Titz, A. (2016). Novel strategies for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. ***J. Med. Chem. 59, 5929 − 5969.

Walsh**, T.R., Weeks, J., Livermore ,D.M. and Toleman, M.A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. ***Lancet. Infect. Dis. 11 (5): 355–362.

Wan**,L., Wang, Z., Yan, Q., Wang, X., Lei, Y.; Zuo, L., Cheng,Y., Ren,Y.and GUO,W.(2011). Genetic diversity of Escherichia coli isolated from commercial swine farms revealed by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) and repetitive extragenic palindrome PCR (REP-PCR) . ***Afri. J. Biotechnol. 10(51):10543-10550.

Wang**, D., Shi, J., Xiong, Y ., Hu, J., Lin, Z .and Qiu, Y.(2018). A QSAR-based mechanistic study on the combined toxicity of antibiotics and quorum sensing inhibitors against *Escherichia coli*. ***J. Hazardous .Materials.341: 438-447.

Wang**, L., Rothemund, D.and Reeves, P.R. (2003). Species-Wide Variation in the Escherichia coli Flagellin (H-Antigen) Gene. ***J. Bacteriol. 185 (9): 2396–2943.

*Wassenaar,T.M. (2016). Insights from 100 Years of Research with Probiotic E. Coli . ***Eur.J.Microbiol. Immunol***. 6 (3): 147–161.

*Wei, G., Pan, L. Du, H. Chen, J. and Zhao, L. (2004). ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. ***J. Microbiol. Methods***. 59:91–108.

*Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. ***Nucleic Acids Res***. 18: 7213-7218.

*Wen, X. (2018). Study on Design Specification of Water Allocation Projects' Information System. ***EPiC .Series . Engineering***. 3: 2318–2326.

*Wong, C.S., Jelacic, S.and Habeeb, R.L. (2000). The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. ***N Engl J Med.*** 42: 930–936.

X

*. Xian-Zhi, L. and Hiroshi, N. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. ***Drugs***. 69 (12): 1555–1623.

Y

*Yu, A.C., Loo, J.F., Yu, S., Kong, S.K.and Chan, T.F. (2014). Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. ***Applied Microbiol .Biotechnol***.98(2):55-62.

Z

*Zhang, L., Ni, C., Xu, W., Dai, T.and Yang, D. (2016) Intramacrophage Infection Reinforces the Virulence of Edwardsiella tarda. ***J. Bacteriol*** 198: 1534–1542.

*Zhaxybayeva, O.and Doolittle, W.F. (2011). Lateral gene transfer. ***Current Biol.*** 21 (7): 242-246.

*Zykov, I.N. , Samuelsen, J. L. , Småbrekke, L. , Andersson, D.I. and Sundsfjord, A.(2018). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fosfomycin and its activ- ity against extended-spectrum β-lactamase-, plasmid-mediated AmpC-, and carbapenemase-producing *Escherichia coli* in a murine urinary tract infection model**.** ***Antimicrob. Agents. Chemother***.62: e02560-17.

الملاحـــــق

Appendix

ملحق (1) إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

رقم العينة :

أسم المريض :

العمر:

الجنس :

نوع العينة :

تاريخ جمع العينة:

ملحق (2) اختبار الحساسية للعزلات السريرية

ت	رقم العزلة	IMI	TE	DOX	ATM	LVX	CPO	STX	AZM	AMS	TCC	FOX	CFX
١	1 – ادرار	I	I	I	R	I	R	S	S	S	S	R	R
٢	29 – ادرار	S	R	R	R	I	R	R	R	S	I	S	R
٣	33 – ادرار	I	R	R	R	I	R	S	S	S	I	R	R
٤	58- ادرار	R	R	R	I	I	I	R	R	S	R	I	S
٥	92- ادرار	I	I	S	R	S	R	R	R	S	S	I	R
٦	96 – جروح	S	R	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R
٧	107- ادرار	S	R	S	R	R	R	R	S	S	I	I	R
٨	108- ادرار	I	I	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R
٩	133- ادرار	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R
١٠	134- ادرار	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	R
١١	142- ادرار	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R
١٢	161 – ادرار	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R
١٣	162 – ادرار	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
١٤	169 – حروق	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
١٥	170- جروح	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
١٦	171 – ادرار	R	R	R	I	S	R	R	R	I	R	I	I
١٧	172 – ادرار	I	R	R	R	S	R	R	R	I	I	S	R
١٨	173 – ادرار	I	R	R	R	S	R	I	S	I	R	R	I
١٩	175ـــادرار	S	I	R	R	R	R	R	S	I	R	R	I
٢٠	176- جروح	I	R	R	R	I	R	I	S	S	I	R	I

S= sensitive, **R**= resistance, **I**= intermediate

ملحق (3) اختبار الحساسية لعزلات الماء

ت	رقم العزلة	IMI	TE	DOX	ATM	LVX	CPO	STX	AZM	AMS	TCC	FOX	CFX
١	1 – ماء	R	I	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R
٢	3 – ماء	R	S	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R
٣	8 – ماء	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
٤	13- ماء	I	I	R	I	I	I	S	S	S	I	S	I
٥	16- ماء	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	I
٦	17 – ماء	R	R	R	R	I	R	R	R	I	S	R	I
٧	22- ماء	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R
٨	33- ماء	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
٩	34- ماء	I	I	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S
١٠	45- ماء	I	R	R	R	I	R	R	S	I	R	I	I
١١	49- ماء	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R
١٢	54 – ماء	I	R	R	R	R	R	R	S	I	I	I	I
١٣	67 – ماء	S	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R
١٤	80 – ماء	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	S	R
١٥	82- ماء	I	I	S	R	R	R	I	R	I	I	R	R
١٦	85 – ماء	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
١٧	87 – ماء	S	R	I	S	S	I	S	S	S	S	R	S
١٨	102 – ماء	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
١٩	106—ماء	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R
٢٠	107- ماء	R	R	R	R	I	R	S	S	R	S	I	I

S= sensitive, **R**= resistance, **I**= intermediate

ملحق (4) الغشاء الحيوي لعزلات السريرية

الرقم على micro titer	رقم العزلة	مكرر ١	مكرر ٢	المتوسط الحسابي ODi	المقارنة	النتيجة	الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب
A 1,2	1 – ادرار	0.072	0.047	0.059	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
A 3,4	29 – ادرار	0.062	0.046	0.055	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
A 5,6	33 – ادرار	0.037	0.031	0.034	ODC > ODI	ضعيف	-
A 7,8	58- ادرار	0.063	0.044	0.053	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
A 9,10	92- ادرار	0.058	0.048	0.053	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
A 11,12	96 – جروح	0.038	0.037	0.037	ODC > ODI	ضعيف	-
B 1,2	107- ادرار	0.041	0.050	0.045	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
B 3,4	108- ادرار	0.042	0.044	0.043	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
B 5,6	133- ادرار	0.055	0.049	0.052	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
B 7,8	134- ادرار	0.046	0.076	0.061	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
B 9,10	142- ادرار	0.035	0.062	0.048	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
B 11,12	161 - ادرار	0.047	0.042	0.044	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
C 1,2	162 - ادرار	0.038	0.039	0.038	ODC > ODI	ضعيف	-
C3,4	169 – حروق	0.051	0.046	0.048	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
C5,6	170- جروح	0.046	0.061	0.053	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
C7,8	171 - ادرار	0.056	0.060	0.058	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
C 9,10	172 - ادرار	0.042	0.042	0.042	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
C 11,12	173- ادرار	0.072	0.093	0.082	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
D1,2	175-- ادرار	0.055	0.030	0.042	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
D3,4	176- جروح	0.062	0.067	0.064	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
D5,6	Control	0.040	0.042	0.041	2*0.041 =2.ODC	0.082	+/ مكونة للغشاء الحيوي -/ غير مكونة للغشاء الحيوي

ملحق (5) النصاب الحسي للعزلات السريرية

الرقم على micro titer	رقم العزلة	مكرر١	مكرر٢	المتوسط الحسابي ODi	المقارنة	النتيجة
A 1,2	1 – ادرار	0.80	0.77	0.78	ODc >ODi	_
A 3 ,4	29 - ادرار	1.33	1.39	1.36	ODc <ODi	+
A 5,6	33 - ادرار	0.88	0.82	0.85	ODc >ODi	_
A 7,8	58- ادرار	1.22	1.18	1.20	ODc <ODi	+
A 9,10	92- ادرار	0.99	0.97	0.98	ODc <ODi	+
A 11,12	96 – جروح	0.50	0.48	0.49	ODc >ODi	_
B 1,2	107- ادرار	0.90	0.92	0.91	ODc >ODi	_
B 3,4	108- ادرار	0.71	0.73	0.72	ODc >ODi	_
B 5,6	133- ادرار	1.51	1.54	1.52	ODc <ODi	+
B7,8	134- ادرار	1.51	1.53	1.52	ODc <ODi	+
B 9 ,10	142- ادرار	1.01	0.93	0.96	ODc >ODi	_
B 11,12	161 - ادرار	0.72	0.79	0.75	ODc >ODi	_
C 1,2	162 - ادرار	0.80	0.90	0.85	ODc >ODi	_
C 3,4	169 – حروق	1.32	1.40	1.36	ODc <ODi	+
C 5,6	170- جروح	0.75	0.73	0.74	ODc >ODi	_
C 7,8	171 - ادرار	0.72	0.84	0.78	ODc >ODi	_
C 9,10	172 - ادرار	1.05	0.90	0.97	ODc >ODi	_
C 11,12	173 - ادرار	0.76	0.72	0.74	ODc >ODi	_
D 1,2	175-- ادرار	0.51	0.49	0.50	ODc >ODi	_
D3,4	176- جروح	1.02	0.93	0.93	ODc >ODi	_
D 5,6	Control(ODc)	0.99	0.98	0.98	ODc=0.98	

ملحق (6) الغشاء الحيوي لعزلات الماء

الرقم على micro titer	رقم العزلة	مكرر١	مكرر٢	المتوسط الحسابي ODi	المقارنة	النتيجة	الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب
E 1,2	1 – ماء	0.049	0.063	0.056	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
E 3,4	3 – ماء	0.046	0.045	0.045	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
E 5,6	8 – ماء	0.053	0.078	0.065	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
E 7,8	13- ماء	0.038	0.048	0.043	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
E 9,10	16- ماء	0.047	0.041	0.044	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
E 11,12	17 – ماء	0.047	0.072	0.059	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
F 1,2	22- ماء	0.046	0.074	0.060	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
F 3,4	33- ماء	0.092	0.097	0.094	ODI> 2.ODC	قـوي	+
F 5,6	34- ماء	0.047	0.044	0.045	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
F 7,8	45- ماء	0.044	0.041	0.042	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
F 9,10	49- ماء	0.096	0.105	0.100	ODI> 2.ODC	قـوي	+
F 11,12	54 – ماء	0.080	0.076	0.078	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
G 1,2	67 – ماء	0.077	0.079	0.078	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
G 3,4	80 – ماء	0.054	0.054	0.054	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
G 5,6	82- ماء	0.045	0.043	0.044	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
G 7,8	85– ماء	0.048	0.047	0.047	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
G 9,10	87 – ماء	0.122	0.129	0.125	ODI> 2.ODC	قـوي	+
G 11,12	102 – ماء	0.067	0.054	0.060	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	+
H 1,2	106ـــماء	0.075	0.093	0.084	ODC<ODI<2.ODC	قـوي	+
H 3,4	107- ماء	0.080	0.080	0.080	ODC<ODI<2.ODC	متوسط	-
H 5,6	Control(ODc)	0.043	0.039	0.041	2*0.041 =2.ODC	0.082	+/ مكونة للغشاء الحيوي - / غير مكونة للغشاء الحيوي

ملحق (7) النصاب الحسي لعزلات الماء

رقم ال mirotiter	رقم العزلة	مكرر١	مكرر٢	المتوسط الحسابي ODi	المقارنة	النتيجة
E 1,2	1 – ماء	1.05	1.17	1.11	ODc <ODi	+
E 3,4	3 – ماء	1.30	1.29	1.29	ODc <ODi	+
E 5,6	8 – ماء	1.10	1.15	1.12	ODc <ODi	+
E 7,8	13- ماء	0.79	0.92	0.85	ODc >ODi	_
E 9,10	16- ماء	0.69	0.70	0.69	ODc >ODi	_
E11,12	17 – ماء	1.20	1.17	1.18	ODc <ODi	+
F 1,2	22- ماء	0.82	0.82	0.82	ODc >ODi	_
F 3,4	33- ماء	1.20	1.22	1.21	ODc <ODi	+
F 5,6	34- ماء	1.00	0.98	0.99	ODc <ODi	+
F 7,8	45- ماء	1.03	0.99	1.01	ODc <ODi	+
F 9,10	49- ماء	1.03	1.05	1.04	ODc <ODi	+
F 11,12	54 – ماء	0.74	0.83	0.76	ODc >ODi	_
G 1,2	67 – ماء	1.08	1.00	1.04	ODc <ODi	+
G 3,4	80 – ماء	1.01	1.00	1.00	ODc <ODi	+
G 5,6	82- ماء	1.12	1.08	1.10	ODc <ODi	+
G 7,8	85 – ماء	1.01	1.05	1.03	ODc <ODi	+
G 9,10	87 – ماء	1.32	1.34	1.33	ODc <ODi	+
G 11,12	102 – ماء	1.09	1.09	1.09	ODc <ODi	+
H 1,2	106ـــماء	1.04	1.08	1.06	ODc <ODi	+
H 3,4	107- ماء	0.76	0.74	0.75	ODc >ODi	_
H 5,6	Control(ODc)	0.98	0.98	0.98	ODc=0.98	

ملحق (8) انزيمات البيتا لاكتاميز للعزلات السريرية

ت	رقم العزلة	ESβLs	MβLs	AMP-C-
١	1 – ادرار	-	-	-
٢	29 – ادرار	-	-	-
٣	33 – ادرار	-	-	-
٤	58- ادرار	-	+	+
٥	92- ادرار	-	+	+
٦	96 – جروح	-	-	-
٧	107- ادرار	-	-	-
٨	108- ادرار	+	+	+
٩	133- ادرار	-	-	-
١٠	134- ادرار	+	+	+
١١	142- ادرار	-	+	+
١٢	161 – ادرار	-	+	+
١٣	162 – ادرار	-	-	-
١٤	169 – حروق	-	-	-
١٥	170- جروح	-	+	+
١٦	171 – ادرار	-	+	+
١٧	172 – ادرار	-	+	+
١٨	173 – ادرار	-	+	-
١٩	175—ادرار	-	+	+
٢٠	176- جروح	-	-	-

ملحق (9) انزيمات البيتا لاكتاميز لعزلات الماء

ت	رقم العزلة	ESβLs	MβLs	AMP-C-
١	1 – ماء	-	+	+
٢	3 – ماء	-	+	+
٣	8 – ماء	-	+	+
٤	13- ماء	-	-	-
٥	16- ماء	-	-	-
٦	17 – ماء	+	+	+
٧	22- ماء	-	-	+
٨	33- ماء	-	-	-
٩	34- ماء	-	-	+
١٠	45- ماء	-	-	+
١١	49- ماء	-	+	+
١٢	54 – ماء	-	-	-
١٣	67– ماء	-	-	-
١٤	80 – ماء	-	+	-
١٥	82- ماء	-	-	+
١٦	85 – ماء	-	-	-
١٧	87 – ماء	-	-	-
١٨	102 – ماء	-	-	-
١٩	106—ماء	-	-	-
٢٠	107- ماء	-	-	-

ملحق (10) التشخيص الجرثومي بواسطة جهاز VITEK 2

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Nov 5, 2019 11:16 GMT-06:00
Printed by: LabAdmin

Patient Name: taeba mahamad gasam (urine)
Isolate Group: 6252-2

Patient ID: 821178 z

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF4B8 (10140)
Card Type: AST-N326 Testing Instrument: 0000148FF4B8 (10140)

Bionumber: 0405610440506610

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410734103	**Expires:**	Nov 30, 2019 12:00 GMT-06:00
	Completed:	Nov 4, 2019 14:10 GMT-06:00	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	5.00 hours
Selected Organism	95% Probability		**Escherichia coli**			
	Bionumber:	0405610440506610			**Confidence:**	Very good identification

SRF Organism	
Analysis Organisms and Tests to Separate:	
Analysis Messages:	
Contraindicating Typical Biopattern(s)	
Escherichia coli	AGAL(88),PHOS(81),

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline: GLOBAL, 2013
AES Parameter Set Name: Global CLSItabanli+Phenotypic 2014

Therapeutic Interpretation Guideline: PHENOTYPIC 2013
AES Parameter Last Modified: Jun 3, 2015 14:43 GMT-06:00

Page 1 of 2

ملحق (11) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *E coli* بجهاز VITEK 2

Test type	Result	Test type	Result	Test type	Result	Test type	Result	Test type	Result	Test type	Result
APPA	-	ADO	-	PyrA	-	IARL	-	Dcel	-	BGAL	+
H2S	-	BNAG	-	AGLTp	-	dGLU	+	GGT	-	OFF	+
BGLU	-	dMAL	+	dMAN	+	dMNE	+	BXYL	-	BAlap	-
ProA	-	LIP	-	PLE	-	TyrA	+	URE	-	dSOR	+
SAC	+	dTAG	-	dTRE	+	CIT	-	MNT	-	5KG	+
ILATk	-	AGLU	-	SUCT	+	NAGA	-	AGAL	+	PHOS	-
GlyA	-	ODC	-	LDC	+	IHISa	-	CMT	+	BGUR	+
O129R	+	GGAA	-	IMLTA	-	ELLM	+	ILATa	-		

(+): نتيجة موجبة (−): نتيجة سالبة

Summary

The study included collection of 180 clinical samples, which included 67 samples of urine, 90 samples of swab wounds and 23 samples of swab burns from Baquba Teaching Hospital and Al Batoul Teaching Hospital. Also, 110 environmental samples (water) were collected from the Public Health Laboratory for the period from September 22 to November 28, 2019.

The results of the sensitivity test against 12 antibiotics (belonging to (9) groups of antibiotics) (Tetracycline, Imipenem, Doxycycline, Aztreonam Levofloxacin, Cefuroxime, Trimethoprim- sulfamethoxazole, Azithromycin, Ampicillin-sulbactam, Cefoxitin, Cefpodoxime, Ticarcillin- clavulanate),That the highest resistance rate of isolates was to Cefpodoxime, 95% (19 clinical isolates), 70% (14 water isolates), and the resistance to Aztreonam, 90% (18 Clinical isolates). 80% (16 water isolates), and trimethoprim-sulfamethoxazole 80% (16 clinical isolates) and 55% (11 water isolates), whereas resistance to both antibiotics were Tetracycline 70% (14 clinical isolates), 65% (13 water isolates)) and Doxycycline (75% (15 clinical isolates) and 70% (14 water isolates)), and resistance to both antibiotics were Cefuroxime 75% (15 isolates) Clinical) (45% (9 water isolates)) and Cefoxitin (40% (8 clinical isolates) and 45% (9 water isolates)), and resistance ratio Azithromycin by 65% (13 clinical isolates) and by 60% (12 water isolates), and the resistance level to the Levofloxacin (45% (9 clinical isolates) and by 50% (10 water isolates) Resistance to Ticarcillin-clavulanate (45% (9 clinical isolates) and 25% (5 water isolates) and Ampicillin-sulbactam (10% (2 clinical isolates) and 15% (3 water isolates), and Imipenem resistance rate, is 25% (5 clinical isolates) and 30% (6 water isolates).

In this investigation, antibiotic susceptibility testing of *E.coli* (7) clinical isolates and (9) water isolates, resistant to (7) groups or more of the antibiotic groups used in the study Extensively drug resistant (XDR), and (13) clinical isolates and (4) water isolates, resistant to (3) groups or more groups of antibiotics were multidrug resistant (MDR).

The study also included phenotypic detection of some virulence factors of *E coli* such as the formation of Biofilm and Quorum sensing. The biofilm was detected in two ways: (Tube Method and Micro Titer Plate). The number of isolates that formed the Biofilm using the Tube Method was 8 clinical isolates with a ratio of 40% and 15 water isolates at a rate of 75%, while the number of isolates forming the biofilm by Micro Titer Plate was 17 clinical isolates, at 85% and 20 water isolates, at 100%.The relationship between the formation of the biofilm with multiple resistance antibiotics

(MDR) showed that all clinical isolates that are resistant to MDR are formation of the biofilm and 100% of a total of 20 clinical isolates, while most of the- multiple resistance antibiotics (MDR) of water isolates were formation of the Biofilm,(13 water isolates) 65%. The number of isolates producing Acyl-homoserine lactone (AHL) Quorum sensing is 6 clinical isolates, at a rate of 30% and 15 water isolates at a rate of 75%.

The study also included detection of types of beta-lactamase (β-Lactamase) produced by *E coli* (metallo β-lactamase (MβL) and extended -spectrum ESBLs and Amp-C-type enzymes . The results were as follows (metallo β-lactamase (MβL) included 11(55%) isolates out of a total of 20 clinical isolates producing this enzymes , and 6(30%) water isolates producing metallo β-lactamase (MβL. .Whereas 2(10%) clinical isolates producing extended -spectrum enzymes(ESBLs) ,and one(5%) water isolate producing this enzyme . Ten (50%) out of 20 clinical isolates producing Amp-C enzymes and 9 (45%) water isolates producing Amp-C enzymes.

The study involved genotyping with three different taxonomic systems (ERIC-PCR profiling system, BOX-PCR profiling system and RAPD-PCR profiling system). The relationship between 20 pathogenic strains of *E coli* (10 clinical isolates and 10 environmental isolates (water)) was not found. Of the 40 isolates that were more resistant to antibiotics, possessing Virulence factors and producing beta-lactamase-type Amp-C. Genotyping results using the three taxonomic systems indicated that there are several groups of isolates, which indicates their genetic diversity.

The results of genotyping using the ERIC –PCR technique, which were classified into two main groups: group A and group B, the largest proportion of group B was 80% (8 clinical isolates and 8 water isolates) of the total isolates, while the proportion of group A was (10%) of Clinical isolates included one isolate and 20% of water isolates and included two isolates, and one of the clinical isolates was out group A and group B.

As for the results of genotyping using the BOX –PCR technique, which was also classified into two main groups: group A and group B, the largest percentage of group B was for clinical isolates and by 80% (8 clinical isolates) within two subgroups are B1 and 2B), and 20% (two isolates Clinical) of group A clinical isolates, whereas the largest percentage of group A water isolates was by 60% (6 water isolates) were within two subgroups (A1 A2) and 40% (4 water isolates) for group B which included two subgroups Also B1 and 2B.

The results of genotyping using the RAPD-PCR technique were within two main groups, group A and group B, so the largest percentage of group B was for clinical isolates and by 80% (8 clinical isolates) within two subgroups are B1) and 2B), and by 10% (one clinical isolate) Of the group A clinical isolates, one of the clinical group A and group B isolates was isolated. While the largest percentage of water isolates for group A and by 60% (6 water isolates) was within two subgroups (A1 (A2, and by 30% (3 water isolates) for group B also in two subgroups are B1) and 2B), in When one of the water isolates was outside group A and group B.

The current study indicates there is a correlation between the genetic systems was evident by the distribution of isolates in each pattern and group.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Diyala University
College of Science
Department of Biology

Molecular Genetic Variation of *E. coli* Isolated from Clinical and Drinking Water Sources

A thesis

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

By

Noor Jameel Abdalla

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

Supervised by

Prof. Dr. Hadi Rahman Rasheed Al-Taai

2020 A.C **1442 A.H**