وزارة التعليم والبحث العلمي
جامعة ديالى – كلية العلوم
قسم علوم الحياة
الدراسة الصباحية

الكشف عن جيني الضراوه *fimH* ، *papC* لبكتريا الاشريكية القولونية في عينة من المرضى المصابين بأخماج الجروح

بحث تخرج مقدم إلى
مجلس قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى
وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم الحياة

من قبل

هاني عطية محمد

منتهى سالم عبود **نور علي فالح**

بأشراف

م. رغد إبراهيم أحمد

2019 م – 1440 هـ

الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ(٤)عَلَّمَ الْإِنسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ(٥)

صدق الله العليُّ العظيم

من سورة العلق

الإهداء

إلى من خلقنا فسوانا... الرحمن الرحيم

إلى معلم الإنسانية ونبراس الهدى... نبي الرحمة محمد(صلى الله عليه وإله وسلم)

إلى التي ترتاح رؤيتها لنفسي ، وبسط الله الجنة تحت أقدامها... والدتي الحبيبة

إلى من نحت في صخر الحياة ليمدني درب العلم والمعرفة ، و يذلل كلامه كل مصاعب الدنيا وهمومها ... والدي الحبيب

إلى من لهم الفضل بعد الله تعالى ؛و من ساندانا ووجهانا ولم يدخر جهداً في تعليمنا ... أساتذتي الأعزاء

إلى الذين كانوا لي خير سند وعون لنا... أخواني وأخواتي

إلى من علمنا ولم يبخل علينا في مشروعنا ... ست رغد

إلى كل من أحبنا وتمنى لنا الخير ... إلى زملائي وزميلاتي

نهدي إليكم ثمرة جهدنا المتواضع

الباحثون

إقرار المشرف وترشيح رئاسة قسم علوم الحياة

اشهد بان إعداد هذا البحث الموسوم بـ(**الكشف عن جينات *fimH* ، *papC* العائدة لبكتريا الاشريكية القولونية في عينة من المرضى المصابين بأخماج الجروح في مستشفى بعقوبة التعليمي)** قد جرى تحت أشرافي في كلية العلوم/ قسم علوم الحياة / جامعة ديالى، وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم الحياة .

التوقيع :

الاسم: م. رغد إبراهيم احمد

المرتبة العلمية: مدرس

قسم علوم الحياة كلية العلوم /جامعة ديالى

التاريخ: / /2019

..... بناء على التوصيات المتوافرة أرشح هذا البحث للمناقشة

التوقيع :

الاسم: أ.د. إبراهيم هادي محمد

رئيس قسم علوم الحياة

كلية العلوم /جامعة ديالى

التاريخ: / /2019

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة ، اطلعنا على هذا البحث الموسوم بـ(**الكشف عن جينات *fimH*، *papC* العائدة لبكتريا الاشريكية القولونية في عينة من المرضى المصابين بأخماج الجروح في مستشفى بعقوبة التعليمي)** الذي قدمه كل من الطلبة **(هاني عطية محمد ، منتهى سالم عبود ، نور علي فالح)** في محتوياته وفيما لها علاقة به، ونعتقد بأنهم جديرين بالقبول لنيل درجة البكالوريوس في علوم الحياة بتقدير ( ).

رئيس اللجنة

التوقيع:

الاسم:

المرتبة العلمية:

التاريخ: / /2019

عضو اللجنة **عضو مشرف**

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ: / /2019

التوقيع :

الاسم : **م. رغد إبراهيم احمد**

المرتبة العلمية : **مدرس مساعد**

التاريخ : / /2019

مصادقة رئاسة قسم علوم الحياة \ كلية العلوم

التوقيع :

الاسم : **أ.د. إبراهيم هادي محمد**

المرتبة العلمية : **أستاذ مساعد**

التاريخ : / /2019

الخلاصة Abstract

جمعت 14عينة من مستشفى بعقوبة التعليمي في مدينة بعقوبة للفترة ما بين الأول من شهر تشرين الثاني 2018 لغاية 31 من كانون الأول 2019 ، تضمنت العينات بالغين مصابين بأخماج الجروح فقط وعزلت العينات في مختبرات المستشفى للأحياء المجهرية ، ونقلت العزلات من المستشفى إلى مختبر تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR في قسم علوم الحياة – كلية العلوم جامعة ديالى ، حيث تم استخلاص الحمض النووي DNA من 14 عزلة ،كما بينت نتائج الدراسة إلى أن العزلات مقاومة للمضادات الخمسة (Ampicillin, Cefixime, Cefotaxime, Cefoxitin, Tetracycline) بالنسب التالية على التوالي (100% ، 85.7%، 85.7% ، 100% ، 100%) بينما كانت حساسة لكل من (Imipenem, Amikacin) بالنسب التالية على التوالي (78.6%،92.95%) ومتوسطة في مضاد (Gentamycin) بنسبة(42.9%) ، وتم الكشف عن وجود جينات بكتريا *E.coli* (*fimH* , *papC*) باستخدام جهاز البلمرة المتسلسلة PCR وذلك عن طريق استخدام بوادئ متخصصة لها وتم الترحيل كهربائياً حيث ان حجومها على التوالي 468 و200 زوج قاعدي . تراوحت تراكيز الحامض النووي المستخلص من عزلات بكتريا *E.coli* بين 600-700 نانوغرام لكل مايكروليتر, فقد وجد نسبة وجود الجينن *fimH* 7(50%)، *papC* 2(14%) المميزين لضراوة بكتريا *E.coli* .

الكلمات المفتاحية : *Escherichia coli* ،أخماج الجروح ، الترحيل الكهربائي ، بعقوبة

المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
1. المقدمة Introduction	**1**
2.1 أهداف البحث	1
2. استعراض المراجع Literature review	**2**
1.2 بكتريا *Escherichia coli*	2
2.2 التصنيف Classification	2
3.2 الوبائية	2
4.2 الإمراضية	3
5.2 العلاجات	3
6.2 تفاعل البلمرة المتسلسل	3
7.2 مبدأ عمل جهاز PCR	4
8.2 الترحيل الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis	5
9.2 الدراسات المقارنة	5
3. المواد وطرائق العمل Material and Methods	**6**
1.3 المواد والأجهزة	6
2.3 طرائق العمل	9

4. النتائج والمناقشة Result and Findings	**15**
1.4 نتائج العينات المشخصة	15
2.4 التحري عن مقاومة عزلات بكتريا الاشريكية القولونية للمضادات الحياتية	15
3.4 التشخيص الجزيئي لجينات بكتريا الاشريكية القولونية *E.coli*	17
5. الاستنتاجات والتوصيات	**19**
1.5 الاستنتاجات	19
2.5 التوصيات	19
6. المصادر Resources	**20**

1. المقدمة Introduction :

تعد بكتريا *Escherichia coli* والتي يرمز لها اختصاراً بـ *E.coli* حيث تعود إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae **(NCBI , 2019)** ولها شكل عصوي Rod وسالبة لصبغة غرام Gram negative ، تعيش بهيئة فلورا طبيعية Normal flora وهي جراثيم متعايشة Commensalsفي أمعاء الإنسان والحيوان،
كما توجد في التربة، والمياه، والمواد الغذائية، وتتحول إلى جراثيم انتهازية ،Opportumstic وتسبب أمراضاً للإنسان كالإسهال ، Diarrheaوالتهاب المجاري البولية، والتهاب السحايا ،Meningitisوالتهاب الحويصلة الصفراوية (Guentzel, 1996 ; ناجي , 2008) والتي تتضمن مجموعة من اشهر اجناس البكتريا المسببة للأمراض كـ(*Escherichia* الاشريكية، *Shigella* الشيكيلا، *Salmonella* السالمونيلا، *Enterobacter* بكتريا الامعاء، *Klebsiella* الكبسيلا، *Serratia* السيراشيا، *Proteus* المتقلبة، وغيرها) **(Brooks *et al,* 2013)**. وتعد الاصابة ببكتريا ***E.coli*** من الجروح أمراً نادراً للغاية يعود بالأساس إلى تلوث العدد الجراحية إذ تستعمر بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* بشكل طبيعي الجلد بعد اول تنظيف الجرح إلا ان تلوث المنطقة ببكتريا ***E.coli*** لا يمنع من الاصابة بخمج الجروح **(Renvall *et al,* 1980)**

تمتلك بكتريا *E.coli* طيفاً واسعاً من العلاجات **(CLSI, 2018)** إلا أن ذلك لا يمنع من ظهور المقاومة الدوائية المتعددة نتيجة الاستخدام الخاطئ للمضادات الحياتية **(Abass *et al,* 2014)** ، يمثل تفاعل البلمرة المتسلسل هي تقنية تستخدم في علم الأحياء الجزيئية لتضخيم نسخة مفردة أو عدة نسخ لقطعة DNA لمختلف أنظمة الأحجام مولدة الالاف إلى ملايين من النسخ لتتابع DNA مخصص . وتم تطويره عام 1983م على يد كارلي موليس Kary Mullis. **(Bartlett and Stirling, 2003)**

ويعد وجود *fimH* و*papC* محددين مهمين لهما جاذبية عالية لمستقبلات المسالك البولية وبالتالي يزيد من قابلية استعمار *E.coli* للبيئات المماثلة **(Sokurenko *et al,* 2004)** وتكوين البايوفلم كما في القناة الهضمية **(Beloin *et al,* 2008)**؛ **(Alwan & Khwen, 2017)**.

1.2 هدف البحث : دراسة مقاومة بكتريا الاشريكية القولونية للمضادات الحيويه المعزولة من أخماج الجروح والكشف عن جينات *fimH* و*papC* باستخدام تقنية PCR والترحيل الكهربائي Electrophorese Gel .

2. استعراض المراجع Resources Interview :

1.2 بكتريا *Escherichia coli* :

تعد بكتريا *Escherichia coli* والتي يرمز لها اختصاراً بـ *E.coli* أحد أنواع العائلة المعوية Enterobacteriaceae **(NCBI , 2019)** ولها شكل عصوي Rod وسالبة لصبغة غرام Gram negative ، تعيش بهيئة فلورا طبيعية Normal flora في القناة الهضمية للبشر والحيوانات والتي تتضمن مجموعة من اشهر اجناس البكتريا المسببة للأمراض كـ(*Escherichia* الاشريكية، *Shigella* الشيكيلا، *Salmonella* السالمونيلا، *Enterobacter* بكتريا الامعاء، *Klebsiella* الكبسيلا، *Serratia* السيراشيا، *Proteus* المتقلبة، وغيرها) **(Brooks *et al,* 2013)**، تصيب البكتريا مختلف اعضاء الجسم ولكنها تقتصر بشكل شائع على التهابات المجاري البولية (UTI) **(Abe *et al,* 2008)** وتكوينها لالتهابات الجهاز الهضمي (WHO, 2019) وبشكل نادر للغاية من أخماج الجروح ومن العمليات الجراحية **(Yadav *et al,* 2012)**. يرمز اختصاراً لبكتريا *E.coli* المسببة للأمراض خارج المعي وهي مجموعة واسعة من سلالات بكتريا *E.coli* المسببة للإصابات خارج المعدة والأمعاء ومنها التي تسبب الإصابات في المسالك البولية فتختصر بـ(UPEC) والمسببة لخمج الدم بـ(SAPE) والالتهابات نتيجة الولادة الحديثة بـ(NMEC) **(AL-Sayigh *et al,* 2013)** وهناك أيضاً سلالات اخرى عديدة لنفس البكتريا تسبب التهابات مختلفة لا يمكن حصرها في مجموعات **(NCBI, 2019)** .

2.2 التصنيف Classification : تم تصنيف البكتريا بالاعتماد على المصدر (NCBI , 2019)

الحياة	Life
المجال: البكتريا	Domain: Bacteria
الصنف : المتقلبات	Phylum: Proteobacteria
الصف: متقلبات غاما	Class: Gammaproteobacteria
الرتبة: المعوية	Order: Enterobacterales
العائلة : المعوية	Family: Enterobacteriaceae
الجنس : الاشريكية	Genus: *Escherichia*
الاشريكية القولونية	*Escherichia coli*

3.2 الوبائية :

تعد الاصابة ببكتريا ***E.coli*** من الجروح أمراً نادراً للغاية يعود بالأساس إلى تلوث العدد الجراحية إذ تستعمر بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* بشكل طبيعي الجلد بعد اول تنظيف الجرح إلا ان تلوث المنطقة ببكتريا ***E.coli*** لا يمنع من الاصابة بخمج الجروح **(Renvall *et al,* 1980)** على عكس التهابات

المسالك البولية UTI فإنها تعد واحدة من أكثر الاصابات الشائعة والتي يتأثر بها البشر (**Abe *et al,* 2008**) ، وتشكل حوالي 90% من التهابات المسالك البولية تسببها بكتريا *E.coli* (**AL-Sayigh *et al,* 2013**) وحيث أنها أيضاً تشكل حوالي 40% من المسببات الشائعة داخل المستشفى (**Salman *et al,* 2013**) ، حيث تزداد عوامل الخطورة نتيجة لتقدم العمر وبجنس الإناث وحدوث قسطرة المثانة ، ووجود أنابيب فغر الكلية Nephrostomy ، ووجود المضادات الحيوية سابقاً ، مرض السكري ، الانسداد الميكانيكي والوضع التشريحي الغير الطبيعي المحفز على ركود البول (كالأضرار الحاصلة في أعصاب المثانة ، الإنجاب ، حصى الكلى)، حيث ترفع هذه المسببات الخطورة الى مستوى عالٍ في النساء نتيجة ضيق المسافة بين فتحتي المخرج Anus والاحليل البولي Urethra وأن الاحليل الصغير يؤدي الى تفريغ المثانة (**Foxman & Brown, 2003**).

4.2 الامراضية :

يبدأ ظهور ألتهاب الجرح بالتصاق البكتريا على السطح الخارجي لخلايا الطبقة الطلائية epithelial layers كما هو الحال في التهاب المسالك البولية ، من خلال وجود روابط بين البكتريا على هيئة بروتينات صغيرة تقع على قمة أهلاب البكتريا التي ترتبط ببقايا كاربوهيدراتية في جدار خلية المضيف والتي تعمل كمستقبلات ، حيث يسمح للبكتريا بالاستقرار على سطح الطبقة ومقاومة مناعة الجسم ، بصورة عامة فأن سلالات البكتريا تنتج أنواع مختلفة من عوامل الالتصاق Adhesions تشمل الاهلاب من نوع Type1 fimbriae وأمثالها والتي هي ضرورية للتعرف والتعلق بمستقبلات الخلايا الطلائية (**Oliveria *et al,* 2011**)، من بين عوامل الالتصاق للـ UPEC ، تعد كلاً من *fimH* و*papC* محددين مهمين لهما جاذبية عالية لمستقبلات المسالك البولية وبالتالي يزيد من قابلية استعمار *E.coli* للبيئات المماثلة (**Sokurenko *et al,* 2004**) وتكوين البايوفلم كما في القناة الهضمية (**Beloin *et al,* 2008**) والمسالك البولية (**Alwan & Khwen, 2017**).

5.2 العلاجات : تستعمل المضادات التالية للعلاج من بكتريا *E.coli* من خلال البنسلينات ، ومحددات ارتباط بيتا لاكتميز β-Lactamase ومجموعة واسعة من مضادات السيفيبيم بضمنها (مجاميع السيفالوسبورينات Cephalosporins الاجيال من 1 الى 4) والمونوبكتام Monobactam منها Aztreonam ومضادات الكاربينيم Caebapenem ومضادات الامينوكلايكوسايدات Aminoglycosides و Macrolides والتتراسايكلينات والكوانليونات والفلوروكوانليونات و Folate Pathway Antagonists بالإضافة إلى فنيكولات وفسوفومايسين Fosfomycins ونايتروفيورنس Nitrofurans (**CLSI, 2018**).

6.2 تفاعل البلمرة المتسلسل : هي تقنية تستخدم في علم الأحياء الجزيئية لتضخيم نسخة مفردة أو عدة نسخ لقطعة DNA لمختلف أنظمة الأحجام مولدة الالاف إلى ملايين من النسخ لتتابع DNA مخصص . وتم تطويره عام 1983م على يد كارلي موليس Kary Mullis. (Bartlett and Stirling, 2003) والذي كان موظفاً في مجموعة كيتوس Cetus corp. وكان الحائز على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993م ، حيث تعد

من أسهل وأرخص الطرق وأكثرها موثوقية لتكرار قطعة مركزة من DNA. حيث يعد مفهوماً يمكن تطبيقه على العديد من المجالات في علم الأحياء الحديث والعلوم الأخرى ذات الصلة **(Learn.Genetics, 2018)** ومن المحتمل أن يكون تفاعل البلمرة المتسلسل هو الأكثر استخداماً في علم الأحياء الجزيئية ، حيث تستخدم التقنية في البحوث الطبية والطب الجنائي وعلم الآثار الجزيئي **(Saiki, 1988)** .

7.2 مبدأ عمل جهاز PCR :

يعتمد المبدأ على تضخيم PCR لمنطقة على شريط DNA (DNA الهدف) . معظم طرائق عمل PCR هي تضخيم قطعة DNA ما بين 0.1 إلى 10 الالاف زوج قاعدي Kbp ، بالرغم من أن بعض التقنيات تسمح بتضخيم حتى 40 ألف زوج قاعدي من حيث الحجم **(Cheng *et al,* 1994)** وتعتمد ناتج التضخيم بعدد المرات على المادة الخاضعة الموجودة في التفاعل والتي تصبح الغاية كبرنامج تفاعلي **(Carr and Morre, 2012)**.

أساس عمل PCR يتطلب عدة مكونات وكواشف **(Sambrook and Russel, 2001)** بضمنها :

1- قالب DNA والذي يحتوي على المنطقة DNA الهدف للتضخيم .

2- أنزيم بلمرة DNA وهو أنزيم يبلمر أشرطة الدنا الجديدة وهي ؛ أنزيم البلمرة *Taq* بوليمريز المقاوم للحرارة والذي يستخدم عادة (NCBI2, 2018) والذي يكون من السهل بقاءه سليماً خلال عملية تمسيخ Denaturation الـ DNA بالحرارة العالية .

3- يستخدم بادئين للـDNA والذي يتضاد (يتمم) أحدهما الأخر من النهاية 3' لدنا الهدف (يمكن أرتباط أنزيم بلمرة DNA ويستطيل من منطقة الشريط الثنائي للـDNA ؛ حيث بوجودها لا يمكن البدء بنسخ ثنائي لموقع واحد حيثما يتواجد أنزيم البلمرة للتأصر) (learn.Genetics, 2018) حيث يتم تحديد البوادئ المخصصة والتي تتم لموقع الدنا الهدف قبل البدء بالتضاعف ، وعادة ما تكون متخصصة للمختبر أو تشترى من المزودين التجار للمواد البايوكيمياوية .

4- ديوكسينيوكليوساید ثلاثي الفوسفات dNTP (يحتوي النيوكليويد على مجموعة ثلاثية) والتي تمثل الأحجار الاساسية لبناء شريط دنا جديد من خلال تكوينه بأنزيم البلمرة .

5- يتم التزود بمحلول منظم وهو مادة كيميائية مناسبة لتغير الظروف لكي نحصل على الفعالية المثلى والاستقرارية الأمثل لأنزيم بلمرة DNA .

6- تستخدم كيتونات ثنائية التكافؤ وعادة ما تكون المغنيسيوم Mg الاكثر شيوعاً والمنغنيز Mn لتطفير DNA بواسطة PCR. حيث تسبب الزيادة العالية للمنغنيز إلى زيادة معدل الخلل خلال بناء DNA. (Pavlov, 2014) .

7- تستخدم أيضاً كيتونات أحادية التكافؤ وعادة ما يكون أيون البوتاسيوم K.

8.2 الترحيل الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis : هي طريقة لفصل أو تحليل الجزيئات الكبيرة (الدنا ، الرنا أو البروتينات) وقطعها والتي تستند على شحنتها الكهربائية وحجمها . وتستخدم أيضاً في مختبرات الكيمياء السريرية لفصل البروتينات بشحنتها أو/و بحجمها (IEF أكاروز ، مستقلة الحجم بصورة أساسية) وفي الكيمياء الحياتية والأحياء الجزيئي لفصل مجاميع مخلوطة لقطع الدنا والرنا بالطول ، لتقدير حجم قطع الدنا أو الرنا أو لفصل البروتينات بالشحنة . (Kryndushkin *et.al*, 2003)

3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods :

1.3 المواد :

1.1.3 الأجهزة و المستلزمات المختبرية :

الأجهزة والمستلزمات المختبرية	الشركة المصنعة/ المنشأ
حجرة الأمان (BSC – ll)	Kimo,24700Montpon, France
الحاضنة Incubator	Memmert, Germany
الفرن الكهربائي Oven	Memmert, Germany
جهاز النبذ المركزي المبرد Cooling Centrifuge	Sigma 1-13,Harz, Germany
جهاز النبذ المركزي المبرد عالي السرعة High Speed Cold centrifuge	Memmert, Germany
جهاز الرج الكهربائي Vortex mixer	Sigma 1-13,Harz, Germany
مقياس الأُس الهيدروجيني pH meter	Biomax ,Desaga , Heidelberg, Germany
الميزان الحساس Sensitive balance	Sartorius ,Germany
ثلاجة Refrigerator	Diora, Turkey
جهاز القطرة النانوية Nanodrop specrophotometer	Thermo, U.S.A
جهاز البلمرة التسلسلي Thermal Cycle	Eppendorf, Germany
جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis set	Helena, U.S.A
مصدر الأشعة فوق البنفسجية UV- transilluminator	Herolab, Germany
جهاز تصوير الهلام Gel documentation	Herolab, Germany
ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipettes	Brand, Germany
المازج المغناطيسي Magnetic stirrer	China
جهاز ماء منزوع الايونات DdH_2O	Lab.Tech, N.Korea
زجاجات ذات غطاء حلزوني Screw-capped	Schott, Germany
الدوارق Flasks	Schott, Germany
أطباق بلاستيكية Disposable Petri dishes	Al-Hani, USA
جهاز التقطير Distiller	Fisons, Japan

2.1.3 المواد الكيميائية المستعملة :

المادة	الشركة المصنعة
كحول الأيثانول (100%) Ethanol	Promega (USA)
اكاروز Agarose	Promega (USA)
صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide	Promega (USA)

المادة	الشركة المصنعة
محلول بفر TBE-buffer (10x)	Promega (USA)
صبغة التحميل Loading dye	Promega (USA)
DNA Ladder 100bp/1000bp	Promega (USA)

3.1.3 العدة التشخيصية The diagnostic kits :

العدة	أسمها والمنشأ
Extraction DNA	WisPrep™ gDNA Mini Kit (Cell/Tissue) ,Wizbiosolutions, N.Korea
Master Mix PCR	Accupower PCR primer kit, Biodeer, USA

4.1.3 المضادات المستخدمة Antibiotics :

ت	المضاد الحياتي	الرمز	التركيز µg/disk	قطر منطقة التثبيط بالمليمتر (*)		
				مقاوم R	متوسط الحساسية I	حساس S
1	Amikacin	AK	30	≤ 14	16 - 15	≥ 17
2	Ampicillin	AMP	10	≤ 13	16 - 14	≥ 17
3	Cefixime	CFM	5	≤ 15	18 - 16	≥ 19
4	Cefotaxime	CTX	30	≤ 22	25 - 23	≥ 26
5	Cefoxitin	FOX	30	≤ 14	17 - 15	≥ 18
6	Gentamycin	GM	10	≤ 12	14 - 13	≥ 15
7	Imipenem	IMP	10	≤ 19	22 - 20	≥ 23
8	Tetracycline	TET	30	≤ 11	14 - 12	≥ 15

5.1.3 الاوساط المستخدمة Media :

ت	الوسط	الشركة المصنعة والمنشأ والحجم و طريقة التحضير
1	آكار الدم Blood agar	Saluca Dutch technology in life science, Netherlands يحفظ بحامضية 7.4 ± 0.2 ، الحجم 500 غرام ، يذاب 28 غرام في 1000 مل من الماء المقطر ويغلى حتى ذوبان الوسط ويعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م ضغط 15 باوند لمدة 15 دقيقة ويخلط جيداً قبل الصب .

(*) تم استخدام المضادات الحيوية المصنعة من شركة Bioanalysis ، تركيا . وتمت معايرة أقطار الحساسية لها طبقاً للمصدر(CLSI , 2018).

ت	الوسط	الشركة المصنعة والمنشأ والحجم و طريقة التحضير
2	وسط ماكونكي **MacConkey agar**	HiMedia, India الحجم 500 غرام ، يذاب 49.53 غرام في 1000 مل من الماء المقطر ويغلى حتى ذوبان الوسط ويعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م ضغط 15 باوند لمدة 15 دقيقة ويخلط جيداً قبل الصب .
2	وسط غذائي **Nutrient broth**	MAST Group, USA الحجم 500 غرام ، يذاب 8 غرام في 900 مل من الماء المقطر ومن ثم يكمل الحجم حتى 1000 مل من الماء القطر ويغلى حتى ذوبان الوسط ويعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م ضغط 15 باوند لمدة 15 دقيقة ويخلط جيداً قبل الصب .
3	أكار مولر هانتون **Muller Hinton**	HIMEDIA ref M173-500G , India الحجم 500 غرام ، يذاب 38 غرام في 1000 مل من الماء المقطر ويغلى حتى ذوبان الوسط ويعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م ضغط 15 باوند لمدة 15 دقيقة ويخلط جيداً قبل الصب .

2.3 طرائق العمل Methods :

1.2.3 جمع العينات Specimen collection :

جمعت اربعة عشر عينة داخل مستشفى بعقوبة التعليمي للفترة ما بين الاول من شهر تشرين الثاني 2018 لغاية 31 من كانون الاول 2019 ، تضمنت العينات بالغين مصابين بأخماج الجروح فقط وعزلت العينات في مختبرات المستشفى للأحياء المجهرية ، ونقلت العزلات من المستشفى إلى مختبر تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR في قسم علوم الحياة – كلية العلوم جامعة ديالى ، حيث تم استخلاص الحمض النووي DNA من 14 عزلة وتم الكشف عن الجينات بكتريا *E.coli* عن طريق الترحيل الكهربائي .

2.2.3 تحضير الأوساط الغذائية :

لقد تم تحضير الأوساط الغذائية الجاهزة حسب تعليمات الشركة المنتجة لها وكما هي مذكورة في (5.1.3)

3.2.3 اختبار حساسية المضادات الحيوية Antibiotic Sensitivity Test :

تم استخدام طريقة Bauer & Kerby القياسية لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية (Vandepitteet *et. al*, 1991) وكما يأتي :

1- بعد نمو عزلات الزوائف الزنجارية في بيئة غذائية مناسبة يتم بواسطة إبرة الحقن المعدنية Wire loop عزل مستعمرة أو مستعمرتين منفصلة وحقنها في أنبوبة تحتوي على 3 – 5 مل محلول فسيولوجي متعادل أو ماء مقطر معقم .
2- يتم قياس درجة العكارة turbidity للعينة التي تم حقنها تحت ضوء جيد مع عكارة عينة الضابطturbidity of stander ولتسهيل المقارنة توضع ورقة بيضاء تحت الأنابيب .
3- بواسطة مسحة معقمة Sterile swab يتم اخذ مسحة من المحقون المعد وتخطيط المسحة على طبق Mueller Hinton agar يتم تخطيط على كامل سطح الطبق بثلاثة اتجاهات.
4- بواسطة ملقط forceps معقم يتم وضع أقراص المضاد الحيوي وتثبيتها على سطح الطبق .
5- يجب أن يبعد قرص المضاد الحيوي 15 ملم عن نهاية حافة الطبق و25 ملم بين كل قرص وأخر .
6- يتم ترك الطبق لمدة 30 دقيقة حتى يتم انتشار المضاد الحيوي من القرص في البيئة وتحضن الأطباق في حاضنة هوائية تحت 35 – 37 ° م لمدة 16 – 18 ساعة .
7- بعد عملية الحضن يتم مشاهدة مناطق التثبيط وقياسها وكتابة نتائج التثبيط لكل مضاد حيوي .عدت البكتيريا حساسة(S) أو مقاومة (R) أو متوسطة (I) حسب المواصفات القياسية الواردة في (NCCLs , 2017) .

3.2.3 التشخيص الجزيئي :

1.3.2.3 استخلاص DNA :

مكونات التحضير للعدة **(كما ذكرت لمنتج شركة Wizbiosolutions, N.Korea):**

ت	اسم المحلول / المادة	التحضير لـ14 عزلة
1	منظم GT1	3.63 مل
2	منظم GT2	3.63 مل
3	منظم W1	7.84 مل
4	منظم W2	2.24 مل
5	منظم الشطف	1.4 مل
6	Proteinase K	6.16 ملغ
7	اعمدة التدوير	14 عمود
8	اعمدة الجمع	14 عمود

خطوات الاستخلاص :

1- **قبل البدء** : يضاف مذاب الايثانول إلى المحلول المنظم W2 قبل الاستخدام الاولي (يلاحظ الحجم في العلبة) ، ومن ثم تذاب كل مكونات Proteinase K في μl 100 من D.W ، اذا كان الراسب قد تشكل في منظم GT1 فيذاب بالحضن عند درجة حرارة 56°م قبل الاستخدام .

2- **تحضير البكتريا** : توضع خلايا البكتريا سالبة الغرام مطردة مركزياً (بعدد أقل من 2×10^9) لمدة 10د حيث ان لكل 5000 × غرام (7500 دورة بالدقيقة) ومن ثم تزال المكونات الطافية والمعلقة في الحامل البكتيري pellet في μl 180 من منظم GT1 .

3- **خطوة التحليل** : يضاف μl 1 من منظم GT2 و μl 20 من Proteinase K للعينة ويخلط بالخلاط المدوار vortex ، ثم يحضن عند 56 م لمدة 10د ، خلال التحضين تضاف الانبوبة كل 5 دقائق .

4- **خطوة الارتباط** : يضاف μl 200 من محلول الايثانول بتركيز 100% إلى عينة التحليل ويخلط بعناية بالخلاط المدوار ، يوضع الخليط بالتطابق على عمود التدوير ويطرد مركزياً لمدة دقيقة واحدة عند سرعة 13000 دورة بالدقيقة، لاحقاً يهمل من الخليط ما تدفق خارج عمود التدوير ويعاد وضعها داخله.

5- **خطوة الغسل** : يضاف μl 500 من منظم W1 الى عمود التدوير ويطرد مركزياً لمدة دقيقة واحدة عند سرعة 13000 دورة بالدقيقة ، لاحقاً يهمل من الخليط ما تدفق خارج عمود التدوير ويعاد وضعها داخله. ومن ثم يضاف μl 700 من منظم W2 (يكون الايثانول مضاف) في عمود التدوير ويطرد مركزياً لمدة دقيقة واحدة عند سرعة 13000 دورة بالدقيقة ، يهمل من الخليط ما تدفق خارج عمود التدوير ويعاد وضعها داخله ويطرد مركزياً لمدة دقيقتين بسرعة 13000 دورة بالدقيقة .

6- **خطوة الشطف** : يربط عمود التدوير مع انبوبة بسعة 1.5 مل ، ويضاف بنحو 50~100 مايكروليتر من منظم الشطف ويحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة ومن ثم يطرد مركزياً لمدة دقيقة واحدة بسرعة 13000 دورة بالدقيقة ، واخيراً يهمل عمود التدوير ويشطف بالدنا المنقى للاستخدام في خطوة تحضير الـPCR ، الدنا المشطوف يحزن بدرجة حرارة −20°م لعدة ايام ، −70°م لفترة خزن طويلة للغاية .

2.3.2.3 تحضير البادئات Primers Preparation :

جُهِـزت البادئـات مـن قبـل شـركة Wizbiosolutions علـى شـكل مسـحوق مجفـف ومجمد(lyophilized). أُذيبت هذه البادئات بالماء المقطر خالي الايونات Deionized distilled water لتحضير محلول التخزين الذي يكون بتركيز(100 بيكومول/مايكروليتر) وتحفظ عند −20 م لحين الاستعمال، استعملت هذه البادئات بتحضير محلول (working solution) وذلك بأخذ (10 مايكروليتر) من محلول التخزين (stock solution) وأضافته إلى 90مايكروليتر من الماء المقطر خالي الايونات(ddH_2O) للحصول على تركيز (10 بيكومول/مايكروليتر) من محلول (working solution) الجدول (1.3) أسماء وتتابعات البوادئ المستعملة .

الجدول (1.3) تتابعات البوادئ للجينات المستعملة

Target	Primer	Sequence	Source
fimH **(465bp)**	**F**	**5'GCCAAACGAGTTATTACCCTGTT'3**	**Salman *et.al*, 2013**
	R	**5'CCTTGATAAACAAAAGTCACGCC'3**	
PapC **(200bp)**	**F**	**5'GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA'3**	**Abdul-Ghaffar & Abu-Risha, 2017**
	R	**5'ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA'3**	

3.3.2.3 تحضير وسط تفاعل البلمرة المتسلسل PCR :

مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل والكميات التي تم مزجها موضحة في الجدول (2.3)

الجدول (2.3) مكونات وسط التفاعل المستعملة لتضاعف الدناDNA

Volume	Components
5 µl	**DNA template**
1.5 µl	**Forward primer (10pmol)**
15 µl	**Reveres primer (10pmol)**
12 µl	**ddH_2O**
20 µl	**Total volume**

وضـعت مكونـات التفاعـل المـذكورة أعـلاه فـي الأنابيـب الموجـودة فـي العـدة القياسـية (Accupower PCR primer kit) والتي تحتوي على جميع المكونات الاخرى اللازمة لأجراء التفاعل وهـي(Stabilizer, Mgcl2, KCL, dNNTPs, Tris-Hcl PH 9.0,Tag DNA Polymerase tracing dye PCR,) وجميع أنابيب التفاعل مزجت بواسطة Vortex وبسرعة rpm3000 ولمدة 3 دقائق وبعد ذلك وضعت في جهاز PCR Thermocycler وباستعمال النظام Convential PCR thermocycler system والخاص بكل جين.

الجدول (3.3) ظروف جهاز PCR

Gene	Initial denaturation	denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	Hold
fimH	95C° for 1min.	95C° for 30 min.	56C°for 30min	72 C° for 1 min.	72 C° for 10min.	- 4 C° forever.
	1 cycle	30 cycles			1 cycle	–
papC	95C° for 1min.	95C° for 30 min.	56C°for 30min	72 C° for 1 min.	72 C° for 10min.	- 4 C° forever.
	1 cycle	30 cycles			1 cycle	–

4.3.2.3 تحضير هلام الاكاروز :

حضر هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وذلك بإذابة 0.7 غرام من مسحوق الاكاروز في 50 مل من محلول (1X TBE buffer). سُخن المحلول حتى الغليان وتم مجانسة المحلول حتى يتحول إلى شكل رائق، وبعدها ترك ليبرد بدرجة حرارة 50 م، يُضاف1 مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم 0.3mg/ml للمحلول ويمزج بشكل جيد؛ وذلك برج المحلول برفق. يصب الخليط في لوح التحميل (Tray) والذي يكون مثبتاً به مسبقا المشط (Combo) الخاص بتكون الحفر اللازمة لتحميل عينات الدنا، ويترك في درجة حرارة الغرفة ليتصلب لمدة 45 دقيقة، ينقل الهلام المتصلب إلى حوض الترحيل (Gel tank) ويرفع المشط بهدوء، وتوضع تحت حوض الترحيل صفيحة سوداء معتمة لظهور الحفر بشكل واضح و يملئ حوض الترحيل بمحلول 1X TBE (buffer) حتى تغطي الهلام. توضع عينات الدنا في الحفر بواسطة ماصة دقيقة (Micropipette) وبحجم 10 ماكروليتر من كل عينة مع مراعاة عدم خروج العينة من سطح الحفرة ويوضع الدليل الحجمي DNA (ladder) في الحفرة المخصصة له على أحد جانبي الهلام وبحجم 7 مايكروليتر ويمزج مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل، بعدها تجرى عملية الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بإيصال أقطاب التيار الكهربائي ويجهز بقدرة 65 فولت ويتم الترحيل باتجاه القطب الموجب وبعد 45 دقيقة وعند وصول الصبغة الزرقاء إلى ما قبل نهاية الهلام يتم إيقاف الترحيل ونُقل الهلام إلى جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV Trans-illuminator وعلى طول موجي 320 نانومتر لرؤية حزم الدنا وتقدير حجمه الجزيئي بالمقارنة مع الدليل الحجمي وصوّر الهلام باستعمال جهاز التصوير(**Sambrook and Russel, 2001**).

4.2.3 التحليل الإحصائي : تم إجراء الجدول التكراري مع الرسم لنتائج المضادات الحياتية التي تم الحصول عليها من اقطار التثبيط وتحويلها الى فئات معيارية ومن ثم تحليلها باستخدام برنامجي SPSS الاصدار 22 وحزمة Microsoft Office Excel 2010 .

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion :

1.4 نتائج العينات المشخصة :

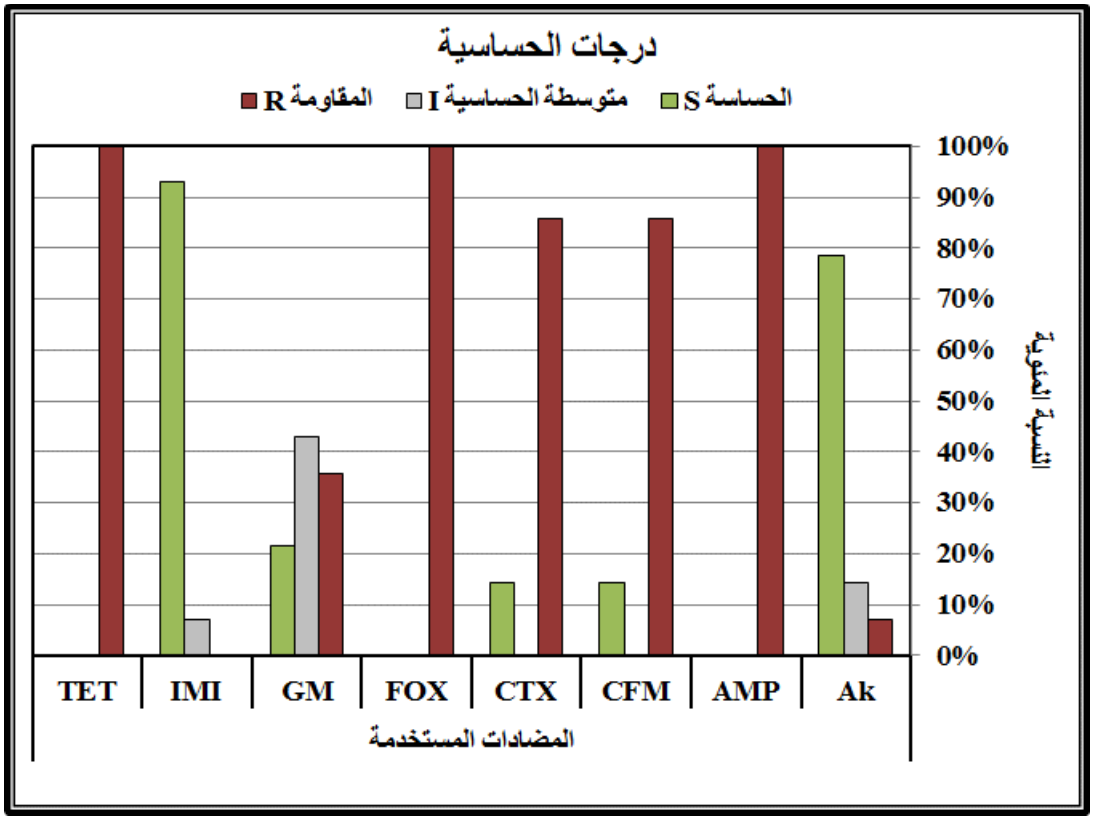
أظهرت الدراسة الحالية عائدية 14(0.04%) عزلة إلى بكتريا *E. coli* من أصل 350 عينة ولا يوافق دراسة **(Yadav *et al,* 2012)** حيث بلغت نسبة عزلات *E.coli* (37.5%) بمجموع 313 من اصل 1088 عينة لكن يوافق دراسة **(Al-Taai *et al,* 2018)** 15(0.04%) لكن في عينات UPEC ، من خلال دراسة الصفات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيموحيوية ، كما وأظهرت المستعمرات النامية على وسط الماكونكي MacConkey agar ووسط آكار الدم Blood agar حيث وافقت نتائج دراسة **(Al-Taai *et al,* 2018)** للفحوصات المختبرية.

2.4 التحري عن مقاومة عزلات بكتريا الاشريكية القولونية للمضادات الحياتية :

تم التحري عن تأثير المضادات الحياتية لعزلات بكتريا *E.coli* البالغ عددها 14 عزلة باستخدام أقراص فحص الحساسية الدوائية للمضادات الحياتية الثمانية المذكورة كما هو موضح في الجدول(1.4) حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن العزلات مقاومة للمضادات الخمسة (Ampicillin, Cefixime, Cefotaxime, Cefoxitin, Tetracycline) بينما كانت حساسة لكل من (Imipenem, Amikacin) ومتفاوتة في مضاد (Gentamycin) ويتمثل الشكل (2) درجات الحساسية لكل من عزلات بكتريا الاشريكية القولونية لنفس المضادات الحياتية التي أنف ذكرها .

الجدول (1.4): التكرارات والنسب المئوية لعزلات الجروح الخاصة ببكتريا *E.coli* مصنفة حسب المضادات ودرجة حساسيتها (حساسة S، متوسطة I، مقاومة R).

ت	المضاد الحياتي	الاحصاءات	درجات الحساسية			الكلي
			حساسة (S)	متوسطة (I)	مقاومة (R)	
1	Amikacin	التكرار	11	2	1	14
		النسبة %	78.6	14.3	7.1	100
2	Ampicillin	التكرار	0	0	14	14
		النسبة %	0	0	100	100
3	Cefixime	التكرار	2	0	12	14
		النسبة %	14.3	0	85.7	100
4	Cefotaxime	التكرار	2	0	12	14
		النسبة %	14.3	0	85.7	100
5	Gentamycin	التكرار	3	6	5	14
		النسبة %	21.4	42.9	35.7	100
6	Cefoxitin	التكرار	0	0	14	14
		النسبة %	0	0	100	100
7	Imipenem	التكرار	13	1	0	14
		النسبة %	92.9	7.1	0	100
8	Tetracycline	التكرار	0	0	14	14
		النسبة %	0	0	100	100



الشكل (1.4): الاشرطة البيانية التي تمثل درجات الحساسية للمضادات الحياتية الثمانية مع عزلات بكتريا *E.coli*

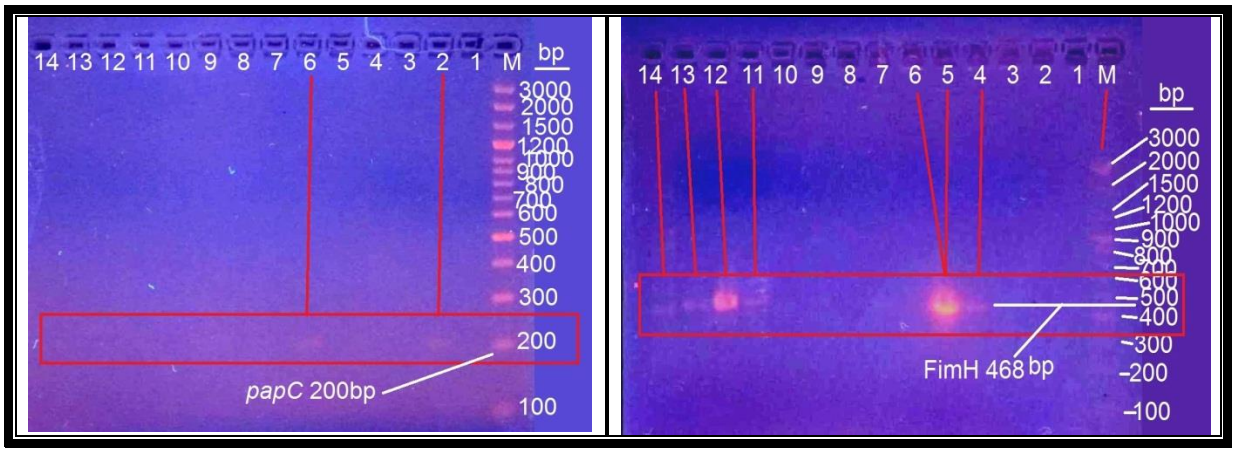
وبالمقارنة مع نتائج الجدول (1.4) فإنها تخالف دراسة في الهند تعود إلى **(Yadav *et al*, 2012)** في مضاد Amikacin حيث بلغت نسبة الحساسية (48.2%) وكون 22% من العزلات هي واسعة الطيف لمجموعة البيتالاكتميز ESBL والتي تختصر إلى extended-spectrum β-lactamases والتي تشمل البنسلينات والسيفالوسبورينات ، أما بالمقارنة مع نتائج الحساسية لعزلات بكتريا الاشريكية القولونية المعزولة من عينات الأدرار UPEC في العراق ، فنتائج **(Abass *et al*, 2014)** وافقت أيضاً فيما يخص بعض مقاومة مضادات مجموعة السيفالوسبورينات إشارة منه الى Cloxacillin التي لم تتطرق إليها نتائج الدراسة لكنه يقع ضمن المجموعة التي بعض المضادات مثل Cefoxitin و Cefixime يقعان ضمنها ، فيما وافقت نتائج **(Salman *et al*, 2013)** الى المقاومة العالية للمضاد Cefotaxime بنسبة (78%) ومجموعة مضادات السيفالوسبورينات أيضاً ، ووافقت ايضاً نتائج دراسة **(Al-Taai *et al*, 2018)** في مقاومة مضاد البنسلين بنسبة (93.3%) وCefixime بنسبة (80%) وImipenem بنسبة (0%) وGentamicin بنسبة (0%)، إلا أنها خالفت في مقاومة مضاد Cefoxitin بنسبة (26.7%) تؤكد هذه الأبحاث إلى أن مجموع العزلات المعزولة تعود الى ESBL واختلاف النسب يعود إلى المقاومة المتعددة للمضادات Muti-drag resistance وإلى المنطقة الجغرافية والازمنة واسباب حصول الاصابة المختلفة .

3.4 التشخيص الجزيئي لجينات بكتريا الاشريكية القولونية *E.coli* :

تراوحت تراكيز الحامض النووي المستخلص من عينات المصل (14 عينة) بين 50–150 نانوغرام لكل مايكروليتر. بالنسبة لجين *fimH* الوزن الجزيئي **468 زوج قاعدي** وبلغت حوالي 200 زوج قاعدي بالنسبة لجين *papC* . قد تم الكشف الجزيئي عن جينات *fimH* 6(42.8%) ، *papC* 2(14%) من خلال الكشف عن تتابعات خاصة كلا الجينين المميزين لبكتريا *E.coli* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستعمال برايمرات متخصصة ، إذ تعطي نواتج تفاعل حجوم 468 و200 زوج قاعدي على التوالي كما يلاحظ في الشكل (2.4)، وقد ثبت من خلال النتائج أن جميع العزل المستعملة في هذه الدراسة تنتمي إلى إن تضخيم التتابعات في جينات *fimH* ، *papC* الخاصين ببكتريا الاشريكية القولونية المستخدمين للكشف عن عوامل ضراوتها كما في دراسة **(Salman *et.al*, 2013)** ودراسة **(Al-Ganimi & Al-Khafaji, 2015)**.

جدول (4–2) التكرارات للنتائج الموجبه والسالبة بالنسبه للجينات *papC* و*fmH* الخاصة ببكتريا *E.coli* .

اسم الجين	النتيجة الموجبة (%)	النتيجة السالبة(%)	العدد الكلي
fmh H	(%42.8)6	(%57.1)8	(%100)14
pap C	(%14.2)2	(%71.4)10	(%100)14



الشكل (2.4): الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للتابعات المميزة في لجيني بكتريا الاشريكية القولونية *fimH* (على اليمين) الذي يبين قطعة حجمها 468 زوج قاعدي, M الدليل الحجمي (100) زوج قاعدي, العينات الموجبة (4,5, ,11,12,13,14) , تركيز الهلام 1.5, الفولتية 80 فولت لمدة 60 دقيقة. وجين *papC* (على اليسار) الذي يبين قطعة حجمها 200 زوج قاعدي, M الدليل الحجمي (100) زوج قاعدي, العينات الموجبة (2,6) , تركيز الهلام 1.5, الفولتية 80 فولت لمدة 60 دقيقة.

بالمقارنة مع نتائج الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا الاشريكية القولونية المعزولة من عينات الأدرار UPEC في العراق ، فنتائج دراسة (**Al-Ganimi & Al-Khafaji, 2015**) أشار إلى جين *papC* ذو 320bp لـ7 (12.5%) من العزلات وهذا يوافق نتائجنا ، أما دراسة (**Abass *et al*, 2014**) فقد أشار الى نفس الجين ذو 328bp لـ22 (79%) ولجين *fimH* ذو508 لـ20 (71%) من عزلات UPEC وهذا بالطبع يخالف نتائجنا ، وبالنسبة لدراسة (**Alwan & Khwen, 2017**) فكانت نتائجه عن *fimH* ذو 510bp لـ18(100%) من عزلات UPEC يخالف أيضاً نتائجنا لاختلاف البوادئ التابعة لترحيل الجين ، أما بالنسبة لدراسة (**Salman *et al*, 2013**) فكانت نتائجه عن *papC* ذو 200bp لـ5 (18.5%) من سلالة N27 لبكتريا UPEC ذلك لا يوافق لنتائج دراستنا نتيجة كون نسبة α-hemolysin هي أقل من التي حصلنا عليها بـ6(22.2%) من العزل بينما كانت نتائجنا جميعها 14(100%) فلا تصلح الدراسة للمقارنة ، وبالنسبة نتائج دراسة (**Al-Taai *et al*, 2018**) فقد أشاروا إلى أن جين *fimH* ذو 890bp موجود في 15 (100%) وهذا يخالف نتائجنا لاختلاف البادئ ذاته ، في حين أشار (**فرحان وآخرون ، 2012**) إلى أنواع مختلفة من كلا الجينين لم توافق دراستنا لاختلاف البوادئ ذاتها ، وأما بالنسبة لدراسة (**Abdul-Ghaffar & Abu-Risha, 2017**) فقد اشارا كلا منهما إلى أن *fimH* ذو 508bp لـ38 (88.4%) يخالف نتائجنا كون البوادئ مختلفة عن دراستنا و*papC* ذو 200bp لـ32(74%) فقد خالفت كون العزلات هي UPEC وأخيراً بالمقارنة مع دراسة (**Merza, 2017**) فقد بينت نتائج دراسته أن الجين *fimH* ذو 878bp لـ 23(100%) فقد خالفت نتائج دراستنا لاختلاف البوادئ أيضاً .

5. الاستنتاجات والتوصيات :

1.5 الاستنتاجات :

1- وجود جميع عزلاتنا مطابقة لعزلات UPEC مما يرجح وجود أخماج الجروح والتي تم عزل البكتريا منها نتيجة تلوث الجرح ببكتريا *E.coli* بالأدوات الجراحية الغير المعقمة وعدم العناية بالجرح .

2- أثبتت النتائج أن الجينات المبحوثة توافق لما هو موجود لبعض ابحاث المتعلقة ببكتريا UPEC مما يدل على إثبات صحة نتائجنا ووجود الجينات يدل على ضراوة البكتريا.

3- وجود المقاومة العالية لمجموعة البنسلينات والسيفالوسبورينات يدل على أن العزلات تعود الى مجموعة واسعة الطيف للبيتالاكتميز ESBL وأن الحساسية العالية لمضاد Imipenem تعود الى عدم تداول هذا المضاد خارج المستشفى لتفادي حدوث المقاومة الدوائية المتعددة .

2.5 التوصيات :

1- إجراء بحوث متعمقة ببكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج الجروح .

2- التوعية الصحية الفعالة من خلال النشر بين المستشفيات ودور المراكز الصحية في المدارس ودور الحضانة والإعلام والحرص على نظافة الادوات الجراحية من التلوث .

3- إجراء بحوث تتعلق بأنواع أخرى لعوامل ضراوة بكتريا *E.coli* لمختلف انواع الاصابة .

6. المصادر Resources :

1.6 المصادر العربية :

- **فرحان**، بديع مثنى؛ الجبوري، علي صالح، والعبيدي، اياد محمد علي (2012)، "التحري عن وجود الجين *fimH* والجين *papG* في كل من بكتريا *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية باستخدام تقنية التضاعف التسلسلي لأنزيم بلمرة الدنا"، مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة ، المجلد 6 ، العدد 3 ، ص 1–8.

2.6 المصادر الأجنبية :

- **Abass**, S.K; Ali, M.R. and Authman, S.H. (2014), "Isolation of Multi Antibiotics Resistance *Escherichia coli* from urinary tract infection and the Detection of *PapC* and *fimH* virulence genes by Polymerase chain reaction Technique", Diyala Journal of Pure Sciences, 10(1);112-127.

- **Abdul-Ghaffar**, S.N. and Abu Risha, R.A. (2017), "Virulence Genes Profile of *Escherichia coli* Isolated from Urinary Catheterized and Non-Catheterized Patients", 58(2B);820-853.

- **Abe**, C.M; Salvador, F.A; Falsetti, I.N; Vieira, M.A; Blanco, J. and Blanco, J.E. (2008), " Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*", *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52; 397-406.

- **Al-Ganimi** A.K.A. and Al-Khafaji, J.K.T. (2015), "Some Virulence Factors Genes and Phylogenic Groups of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolated from Karbala Patients", *Karbala J. Med.* 9(1):2376-2385.

- **AL-Sayigh**, H; AL-Hasson, H. and Ali J. (2013), "*Effect of Some Antibiotics on Uropathogenic Escherichia coli and Detection of Some Virulence Factors*". 10 : 669-676.

- **Al-Taai**, H.R.R; Al-Jebouri, Z.A.S; Khalaf, B.H. and Mohammed, Y.Q. (2018), "Antibiotic resistance patterns and adhesion ability of uropathogenic *Escherichia coli* in children", *Iraqi Journal of Biotechnology*, 17(1);18-26.

- **Alwan**, A.H. and Khwen, N.N. (2017), "Detection of genes Responsible for Biofilms Formed by *Klebsiella pneumoniae* and *Esherichia coli* and their effect on innate immunity", AJPS, 17(1);192-203.

- **Baron**, E. J.; Peterson, L. R. and Finegold, S. M. (1994). "Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology", 9th ed., *The C.V. Mosby Company*, U.S.A.

- **Bartlett**, J. M. S. and Stirling, D. (2003). "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". PCR Protocols. Methods in Molecular Biology..226 (2nd.). 3–6.

- **Beloin**, C; Roux, A. and Ghigo, J. (2008), "*Escherichia coli biofilms*", Curr Top Microbiol Immunol. Author manuscript; available in PMC 2010 May 26. 322: 249–289.
- **Brooks**, G.F; Butel , J.S; Carroll, K.C. and Morse, S.A. (2013) ."*Jawetz , Melinick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology*" , 27th ed. A Large medical book.
- **Carr,** A.C. and Moore, S.D. (2012). Lucia, Alejandro, ed. "Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting". PLoS ONE. 7 (5): e37640.
- **Cheng**, S.; Fockler, C.; Barnes, W. M. and Higuchi, R. (1994). "Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA". Proceedings of the National Academy of Sciences. 91 (12): 5695–5699.
- **CLSI** - Clinical and Laboratory Standards Institute (2018) " Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing", 28th ed, M100, Replace 2017.
- **Collee**, J.G;Fraser, A.G; Marmino, B.P. and Simons, A. (1996), "*Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology*" .14th ed., *The Churchill Livingstone, Inc.* U.S.A.
- **Foxman**, B. and Brown, P. (2003), "Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs.", *Infect Dis Clin North Am.* 17: 227-241.
- **Kryndushkin** DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD and Kushnirov V.V. (2003) "Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104". Journal of Biological Chemistry. 278, 49, 9636–49643
- **learn.Genetics** (2018) University of Utah , URl: http://learn.genetics.utah.edu /content/labs/pcr/ .
- **MacFaddin**, J. F. (2000), "Biochemical tests for the identification of medical bacteria", 3rd, *The Williams and Williams and Wilkins Baltimor*, U.S.A.
- **Merza**, N.S. (2017), "Prevalence and Molecular Characterization of fimH Gene in Escherichia coli Isolates Recovered From Patients With Utis", *Medical Journal of Babylon*, 14(3);470-477.
- **NCBI** (2018), National Center for Biotechnology Information, NCBI:txid562, link: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/.
- **NCBI2** (2018), National Center for Biotechnology Information, "Polymerase Chain Reaction (PCR)" U.S. National Library of Medicine.

- **Oliveira**, F.A.; Paludo, K.S.; Arend, L.N.; Farah, S.M.; Pedrosa, F.O. and Souza, E.M. et al. (2011). "Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains." *Genet Mol Res.* 10(4):4114–25.

- **Pavlov**, A. R.; Pavlova, N. V.; Kozyavkin, S. A. and Slesarev, A. I. (2004). "Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications". Trends in Biotechnology. 22 (5): 253–260.

- **Renvall** S, Niinikoski J, Aho AJ. (1980), "Wound infections in abdominal surgery. A prospective study on 696 operations.", Acta Chir Scand. 146(1):25-30.

- **Saiki**, RK. (1988) "Amplification of a Short DNA Stretch by Repeated Cycles of In Vitro DNA Polymerization". American Association for the Advancement of Science.

- **Salman**, R.S; Ali, M.R. and Hussin, S.S. (2013), "A Multiplex PCR for Detection of hlyA, papC, and traT genes in multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from pregnant women", AJPS, 13(2): 129-138.

- **Sambrook** J. & Russel D.W. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3rd). Cold Spring Harbor, N.Y.: *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* ISBN 0-879-69576-5. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction

- **Sokurenko**, E.V.; Feldgarden, M.; Trintchina, E.; Weissman, S.J.; Avagyan, S. and Chattopadhyay, S. et al. (2004), "Selection footprint in the *fimH* adhesin shows pathoadaptive niche differentiation in *Escherichia coli*", Mol Biol Evol. 21(7):1373–83.

- **Vandepitte**, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, G. (1991) "Basic laboratory procedures in clinical bacteriology". WHO Switzerland.

- **WHO** (2019), World Health Organization , link : https://www.who.int/ar/news-room/fact-sheets/detail/e-coli

- **Yadav**, A; Sharma, M; Yadav, S; Chaudhary, U. (2012), "Resistance Pattern of *Escherichia coli* Isolates from Surgical Wound Infections", *Indian Medical Gazette*,:423-424.

Abstract

Fourteen wound Samples was collected from Baquba Teaching Hospital from 1st of Dec. 2018 till 31th Jan. 2019, This study have included Adults wound infections and those samples were isolated inside Hospital Labs of Microbiology, Later samples were transport from the Hospital to PCR Lab of Biology Department - College of Sciences, University of Diyala.,the E.coli sample were examinated its resisrtance and sensitive to antibiotics Results shows 5 Antibiotic have been resisted (Ampicillin, Cefixime, Cefotaxime, Cefoxitin, Tetracycline) as follows (100%, 85.7%, 85.7%, 100%, 100%) while there are 2 antibiotics have been sensitive (Imipenem, Amikacin) as follows (92.95%,78.6%) and intermediated in (Gentamycin) with (42.9%).

later DNAs were extracted from 14 of ns *E.coli* and then two genes were selected (*papC* , *fimH*) to identified causes of adhesion virulent factor using PCR device and its specific Primers, Gel electrophoresis done later. DNA concentrations that was extracted from *E.coli* isolates ranged between 49- 150 ng/µl. Molecular detection of *fimH* genes was 7(50%), *papC* was 2 (14%) characteristic of the virulence of *Escherichia coli*.

Keywords : *Escherichia coli*, Wound infections, Gel Electrophoresis, Baquba.

Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Diyala / Collage of Science
Department of Biology
Morning study

Determination of *fimH*, *papC* genes belongs *Escherichia coli* in the samples of Patients with Wound infection in Baquba Hospital Teaching

Graduation Research submitted to the Department Council of Biology / College of Science / University of Diyala as part of requirements for the degree of bachelor in Biology sciences

By

Hani Attia Mohammad

Muntaha Salim Aboud **Nour Ali Falih**

Supervised by

Lac . Raghad Ibrahim

2019 A.C – 1440 A.H.