



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة بغداد  
كلية التربية للعلوم الصرفة/إبن الهيثم  
قسم علوم الحياة

## الكشف المظهري والجزئي لأنظمة الدفع Efflux Pumps في بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / إبن الهيثم - جامعة بغداد  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة/ الأحياء المجهرية

من قبل

زهراء حميد علوان السعدي

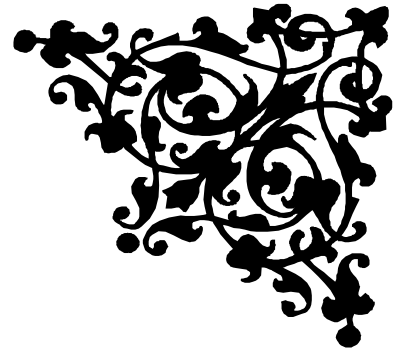
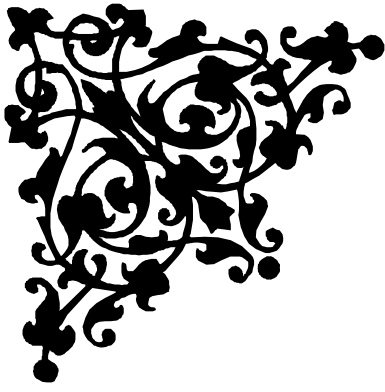
بكالوريوس في علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/ إبن الهيثم - جامعة بغداد 2010-2011

باشراف

أ.د. رنا مجاهد عبد الله الشويخ

اذار 2019 م

ربيع الاول 1440 هـ



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

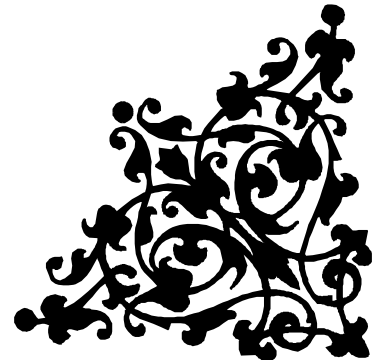
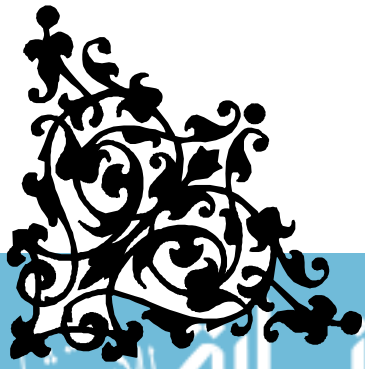
(( إِنَّا فَتَحْنَا لَكَ فَتْحًا مُّبِينًا <sup>(1)</sup> لِيَغْفِرَ لَكَ اللَّهُ مَا

تَقَدَّمَ مِنْ ذَنْبِكَ وَمَا تَأَخَّرَ وَيُتِمَّ نِعْمَتَهُ عَلَيْكَ

وَيَهْدِيكَ صِرَاطًا مُسْتَقِيمًا <sup>(2)</sup> ))

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة الفتح الآية ( 1-2 )



## الاهداء

الى روح والدي الشهيد السعيد... تغمده الله برحمته

الى سندي و مصدر قوتي ..... امي الغالية

الى رفيق دربي ... زوجي الغالي

الى من افتخر بها ... مشرفتي الدكتورة رنا مجاهد عبد الله الشويخ

اهدي ثمرة جهدي المتواضع

زهراء

## الشكر والتقدير

الحمد والشكر لله رب العالمين والصلاة والسلام على رسول رب العالمين محمد الصادق الامين وعلى اله وصحبه الطيبين الطاهرين.  
يطيب لي وقد اشرفت على اتمام رسالتي بإذن الله ان اتقدم بجزيل شكري وامتناني الى استاذتي الفاضلة الاستاذة الدكتورة رنا مجاهد عبد الله الشويخ لتفضلها علي باقتراح موضوع البحث والاشراف عليه ولتوجيهاتها النيرة وارشاداتها السديدة التي قدمتها طوال مدة البحث وكتابة الرسالة فكانت خير مثال يحتذى به في البحث العلمي .

كما اتوجه بجزيل الشكر الى عمادة كلية التربية ابن الهيثم والى رئاسة قسم علوم الحياة المتمثلة بالدكتور ثامر عبد الشهيد محسن لما ابدوه من مساعدة واهتمام فجزاهم الله عنا خير الجزاء .

واخيرا اتوجه بالشكر والامتنان الى زملائي وزميلاتي من طلبة الدراسات العليا لاسيما م.م. عمر سنان الزيدي ولكل من ساعدني بكلمة او فعل مقصود او غير مقصود فجزاهم الله خير الجزاء .

زهراء حميد

## اقرار المشرف

اشهد ان رسالة الماجستير الموسومة ب ( الكشف المظهري والجزيئي عن انظمة الدفع **Efflux Pumps** في بكتريا **Escherichia coli** المعزولة من اصابات المسالك البولية ) قد اعدتها الطالبة ( زهراء حميد علوان ) وبإشرافي في قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة \ ابن الهيثم ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة \ أحياء مجهرية .



التوقيع :

المشرف: د. رنا مجاهد عبد الله الشويخ

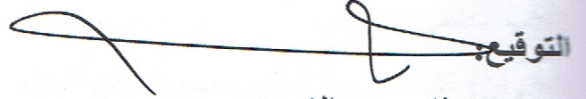
اللقب العلمي: استاذ

العنوان: قسم علوم الحياة \ كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم \ جامعة بغداد

التاريخ: 2019 / 6 / 9

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة الى التوصية اعلاه احيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها



الاسم: د. ثامر عبد الشهيد محسن

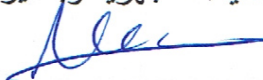
اللقب العلمي: استاذ مساعد

العنوان: قسم علوم الحياة \ كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم \ جامعة بغداد

التاريخ: 2019 / 6 / 1

## اقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه ، نشهد اننا اطلعنا على الرسالة الموسومة ( الكشف المظهري والجزئي عن انظمة الدفع Efflux Pumps في بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية ) المقدمة من قبل الطالبة ( زهراء حميد علوان ) وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة \ احياء مجهرية . وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونجد انها جديرة بالقبول لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية وبتقدير ( . )

التوقيع: 


الاسم: د. عذراء حميد حسون

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ابن الهيثم

التاريخ: 2019 / 6 / 9

(عضوا)

التوقيع: 

الاسم: د. محسن هاشم رسن

اللقب العلمي: استاذ

العنوان: جامعة النهرين/كلية التقنيات الاحيائية

التاريخ: 2019 / 6 / 9

(رئيس اللجنة)

التوقيع: 

الاسم: د. رنا مجاهد عبد الله

اللقب العلمي: استاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ابن الهيثم

التاريخ: 2019 / 6 / 9

(عضوا \ مشرفا)

التوقيع: 

الاسم: د. محمود ابراهيم اسماعيل


اللقب العلمي: مدرس

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ابن الهيثم

التاريخ: 2019 / 6 / 9

(عضوا)

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة/ ابن الهيثم

التوقيع: 

الاسم: د. حسن احمد حسن

اللقب العلمي: استاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم/جامعة بغداد

التاريخ: 2019 / 6 / 13

## الخلاصة

تهدف هذه الدراسة الى الكشف عن أنظمة الدفق التي تمتلكها بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية وعلاقتها بالمقاومة للمضادات الحيوية. اذ جمعت 100 عينة سريرية من بول المرضى الذين يعانون من اصابات المسالك البولية وتحت اشراف الطبيب المختص من عدة مستشفيات في بغداد شملت ( مستشفى مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي، مستشفى الطفل المركزي التعليمي ومستشفى بغداد التعليمي والمختبرات التعليمية ومستشفى حماية الطفل التعليمي في مدينة الطب)، للمدة من 2018/7/10 ولغاية 2018/10/1.

شخصت العزلات البكتيرية بالطرائق التقليدية، وبعدها تم تأكيد تشخيصها بالكشف الجزيئي عن الجين التشخيصي *16SrRNA* بتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) إذ تم الحصول على 50 عزلة سريرية تعود للنوع *E. coli*.

اظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية ان بكتريا *E. coli* كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (multidrug resistance (MDR) فكانت 50 (100%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي carbenicillin ، 49 (98%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي erythromycin ، 47 (94%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي rifampin ، 44 (88%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي ceftazidime ، 38 (76%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي cefotaxime ، 37 (74%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي novobiocin ، 33 (66%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي tetracycline ، 26 (52%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي





ciprofloxacin، 15 (30%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي gentamicin و عزلتان (4%) مقاومة للمضاد الحيوي nitrofurantoin.

اظهرت النتائج ان 45 (90%) عزلة بكتيرية كانت مكونة للغشاء الحيوي biofilm وبدرجات مختلفة، فكانت عزلتان (4%) مكونة للغشاء الحيوي بدرجة قوية strong adherent، 6 (12%) عزلات بكتيرية مكونة للغشاء الحيوي بدرجة متوسطة moderately adherent و 37 (74%) عزلة مكونة للغشاء الحيوي بدرجة ضعيفة weakly adherent.

اظهرت نتائج الكشف المظهري phenotype عن مضخات الدفع efflux pumps ان 35 (70%) عزلة بكتيرية كانت تمتلك مضخات الدفع.

تم اجراء الكشف الجزيئي molecular للجينين *acrA* و *acrB* المشفرة عن بروتيني مضخة الدفع، فقد بينت النتائج ان عدد العزلات البكتيرية التي تمتلك كل من الجينين *acrA* و *acrB* 50 (100%) عزلة لكل منهما. و اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي ان الوزن الجزيئي للجينين *acrA* و *acrB* 107 زوج قاعدة و 105 زوج قاعدة على التوالي.

بينت نتائج التحليل المتتابعي للدنا التابع للعزلات البكتيرية E27 و E40 بالنسبة للجين التشخيصي *16SrRNA* انها كانت بنسبة (100%) تعود الى بكتريا *E. coli* كما هو موجود في بنك الجينات الامريكي national center for biotechnology information.





## المحتويات

الصفحة	العنوان	ت
I	الخلاصة	
III	قائمة المحتويات	
VIII	قائمة الجداول	
IX	قائمة الاشكال	
XI	قائمة الملاحق	
XII	قائمة المختصرات	
الفصل الاول / المقدمة واستعراض المراجع		
1	المقدمة واستعراض المراجع Introduction and literature review	.1
1	المقدمة Introduction	1.1
4	استعراض المراجع Literature review	2.1
4	العائلة المعوية Enterobacteriaceae	1.2.1
4	بكتريا <i>Escherichia coli</i>	2.2.1
5	تصنيف بكتريا <i>E. coli</i> Classification of <i>E. coli</i>	1.2.2.1
6	الصفات العامة لبكتريا <i>E. coli</i> Characterization of <i>E. coli</i>	2.2.2.1
7	انواع بكتريا <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> Types	3.2.2.1
8	وبائية بكتريا <i>E. coli</i> Epidemiology of <i>E. coli</i>	4.2.2.1
9	عوامل ضراوة بكتريا <i>E. coli</i> Virulence factors	5.2.2.1
11	قابلية بكتريا <i>E. coli</i> على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm production	1.5.2.2.1
13	امراضية بكتريا <i>E. coli</i> Pathogenicity of <i>E. coli</i>	6.2.2.1
15	مقاومة بكتريا <i>E. coli</i> للمضادات الحيوية <i>E. coli</i> antimicrobial resistance	7.2.2.1
18	مضخات الدفع Efflux pumps	8.2.2.1
19	تصنيف انظمة الدفع Classification of efflux pumps	1.8.2.2.1
24	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymeres Chain Reaction (PCR)	9.2.2.1



## المحتويات

الفصل الثاني / المواد وطرائق العمل			
26	Materials and methods	المواد و طرائق العمل	.2
26	Materials	المواد	1.2
26	Laboratory equipments	الاجهزة المختبرية	1.1.2
27	Chemical materials	المواد الكيميائية	2.1.2
28	Ready- made culture media	الايوساط الزرعية الجاهزة	3.1.2
29	Solutions, stains and reagents	المحاليل، الصبغات والكواشف	4.1.2
30	Antibiotics	المضادات الحيوية	5.1.2
31	Kits	العدد المختبرية	6.1.2
32	Primers	تسلسلات البودائ	7.1.2
32	Other materials	المواد الاخرى	8.1.2
33	Methods	طرائق العمل	2.2
33	Sterilization	التعقيم	1.2.2
34	Preparation of culture media	تحضير الاوساط الزرعية	2.2.2
34	Ready-made cutler media preparation	تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة	1.2.2.2
34	Laboratory culture media	الايوساط الزرعية التركيبية	2.2.2.2
34	Urea agar	وسط اكار اليوريا	1.2.2.2.2
35	Blood agar	وسط أكار الدم	2.2.2.2.2
35	Hekton enteric agar	وسط اكار الهكتون المعوي	3.2.2.2.2
36	Preparation of Solution	تحضير المحاليل	3.2.2
36	Macfarland	محلول العكورة ماكفرلاند	1.3.2.2
36	Crystal violate solution	محلول صبغة البنفسج البلوري 1%	2.3.2.2
37	Tris Borate EDTA buffe (TBE)	محلول دارئ الترحيل	3.3.2.2
37	Ethidium bromide الخاص بالكشف المظهري لمضخات الدفق	محلول صبغة بروميد الايثيديوم	4.3.2.2
37	Phosphate buffer saline (PBS)	محلول دارئ الفوسفات الملحي	5.3.2.2

## المحتويات

37	Primers solutions	محاليل البوادئ	6.3.2.2
38	Reagents preparation	تحضير الكواشف	4.2.2
38	Oxidase reagent	كاشف الاوكسيدز	1.4.2.2
38	Catalase reagent	كاشف الكتاليز	2.4.2.2
39	Bacterial isolates	العزلات البكتيرية	5.2.2
39	Bacterial samples collection	جمع العينات البكتيرية	1.5.2.2
39	Cultural identification	التشخيص المزرعي	2.5.2.2
40	Microscopic identification	التشخيص المجهرى	3.5.2.2
40	Biochemical identification	التشخيص الكيموحيوي	4.5.2.2
40	Oxidase test	اختبار الاوكسيدز	1.4.5.2.2
40	Catalase test	اختبار الكتاليز	2.4.5.2.2
41	Indole test	اختبار الاندول	3.4.5.2.2
41	Methyl red test	اختبار المثل الاحمر	4.4.5.2.2
41	Voges- Proskauer	اختبار فوكس - بروسكاور	5.4.5.2.2
42	Citrate utilization	اختبار استهلاك السترات	6.4.5.2.2
42	Urease test	اختبار اليوريز	7.4.5.2.2
42	Hemolysin production test	اختبار انتاج الهيمولايسين	8.4.5.2.2
43	Preservation of bacterial isolates	حفظ العزلات البكتيرية وادامتها	6.2.2
43	Short-term preservation	الحفظ قصير المدى	1.6.2.2
43	Long-term preservation	الحفظ طويل المدى	2.6.2.2
43	Antibiotic resistance test	اختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية	7.2.2
44	Biofilm formation test	اختبار قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي	8.2.2
46	Morphological detection of efflux pumps	الكشف المظهري عن مضخات الدفع	9.2.2
47	Genomic DNA extraction	استخلاص الحامض النووي المجيني	10.2.2
47	Preparation of agarose gel	تحضير هلام الاكاروز	11.2.2
47	(Extracted DNA)	التحري عن الحامض النووي المجيني المستخلص	12.2.2

## المحتويات

48	Polymerase Chain Reaction (PCR)	تفاعل البلمرة المتسلسل	13.2.2
50		التحري عن وجود حزم الدنا المضخم	14.2.2
51	DNA Sequencing	التحليل التتابعي للجينات	15.2.2
الفصل الثالث / النتائج والمناقشة			
52	Results and discussion	النتائج والمناقشة	.3
52	<i>Escherichia coli</i>	عزل بكتريا	1.3
52	Morphological identification	التشخيص المظهري	1.1.3
55	Microscopic identification	التشخيص المجهرى	2.1.3
55	Biochemical identification	التشخيص الكيموحيوي	3.1.3
56	Genetic identification	التشخيص الجزيئي	4.1.3
61	Antimicrobial resistance	مقاومة بكتريا <i>E. coli</i> للمضادات الحيوية	2.3
69	Resistance profile (antibiotype)	انماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتريا <i>E. coli</i>	3.3
71	Biofilm formation	تكوين الغشاء الحيوي	4.3
75	Phenotypic detection of efflux pump	الكشف المظهري عن مضخات الدفع	5.3
78	Genotypic detection of efflux pump	الكشف الجزيئي عن مضخات الدفع في بكتريا <i>E. coli</i>	6.3
79		الكشف الجزيئي عن الجين <i>acrA</i> باستعمال تقنية PCR	1.6.3
80		الكشف الجزيئي عن الجين <i>acrB</i> باستعمال تقنية PCR	2.6.3
84	DNA sequencing	التحليل التتابعي	7.3
88	Conclusions	الاستنتاجات	
89	Recommendations	التوصيات	
90		المصادر العربية	
92		المصادر الاجنبية	
106		الملاحق	

## المحتويات

### قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	الجدول
22	انظمة الدفع والمضادات الحيوية التي يتم نقلها خارج بكتريا <i>E. coli</i> .	1-1
32	تسلسلات البودئ المستعملة في الدراسة	7-2
49	مكونات وحجوم مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	9-2
49	الظروف المثلى لأجراء تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	10-2
58	نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا <i>E. coli</i>	1-3
70	انماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتيريا <i>E. coli</i>	2-3
77	نتائج الكشف المظهري عن مضخات الدفع efflux pumps في بكتريا <i>E. coli</i> باستعمال تراكيز مختلفة من صبغة بروميد الايثيديوم ethidium bromid في وسط اكار التريبتون صويا Trypic Soy agar	3-3
83	النسبة المئوية لجيني مضخات الدفع <i>acrA</i> و <i>acrB</i> الموجودة في بكتريا <i>E. coli</i>	4-3
84	العلاقة بين الكشف المظهري والكشف الجيني عن مضخات الدفع efflux pumps والقابلية على تكوين الغشاء الحيوي biofilm في بكتريا <i>E. coli</i>	5-3

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	الشكل
12	مراحل تكوين الغشاء الحيوي في البكتريا	1-1
24	شكل نظام الدفع (AcrAB-TolC) في بكتريا <i>E. coli</i>	2-1
54	الشكل المظهري لمستعمرات بكتريا <i>E. coli</i> على عدة اوساط تشخيصية	1-3
59	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Product للجين <i>16SrRNA</i> (727 زوج قاعدة ) لعزلات بكتريا <i>E. coli</i> في 1.5% اكاروز agaros و فرق جهد 100 فولت لمدة 80 دقيقة	2-3
62	النسبة المئوية لمقاومة بكتريا <i>E. coli</i> لمضادات حيوية مختلفة باستعمال طريقة kirby-baure بعد تتميتها على وسط وسط اكار مولر - هنتون	3-3
73	انتاج الغشاء الحيوي biofilm من قبل عزلات بكتريا <i>E. coli</i> بطريقة الصفيحة العيارية ذات 96 حفرة	4-3
74	النسبة المئوية لقابلية بكتريا <i>E. coli</i> على انتاج الغشاء الحيوي biofilm	5-3
76	عزلات بكتريا <i>E. coli</i> الغير متألفة في تراكيز مختلفة من صبغة بروميد الايثيديوم تحت الاشعة فوق البنفسجية في تجربة الكشف المظهري عن مضخات الدفع بطريقة العجلة الخشبية ethedum bromide –agar cartwheel method (EtBr CW)	6-3
80	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Product للجين <i>acrA</i> (107 زوج قاعدة ) لعزلات بكتريا <i>E. coli</i> في 1.5% اكاروز agaros و فرق جهد 100 فولت لمدة 80 دقيقة	7-3
81	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Product للجين <i>acrB</i> (105 زوج قاعدة ) لعزلات بكتريا <i>E. coli</i> في 1.5% اكاروز agaros و فرق جهد 100 فولت لمدة 80 دقيقة	8-3
86	التحليل التتابعي للجين <i>16SrRNA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> للعزلة E27	9-3
87	التحليل التتابعي للجين <i>acrA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> للعزلة E27	10-3
87	التحليل التتابعي للجين <i>acrB</i> لبكتريا <i>E. coli</i> للعزلة E27	11-3

قائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	الملحق
106	مقاومة عزلات بكتريا <i>E. coli</i> للمضادات الحيوية Antibiotics	1
108	بعض عوامل الضراوة لبكتريا <i>E. coli</i> التي تشمل ( القابلية علة تكوين الغشاء الحيوي Biofilm ، انتاج انزيم الهيموليسين Hemolysin و انتاج انزيم اليوريا Urease)	2
112	العلاقة بين الكشف المظهري والكشف الجيني عن مضخات الدفع Efflux Pumps والقابلية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm في بكتريا <i>E. coli</i>	3
114	نتائج قياس نقاوة DNA في جهاز نانو دروب Nano Drop	4
116	التحليل التتابعي للجين <i>16srRNA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> للعزلة E27	A-5
117	التحليل التتابعي للجين <i>acrA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> للعزلة E27	B-5
117	التحليل التتابعي للجين <i>acrB</i> لبكتريا <i>E. coli</i> للعزلة E27	C-5
117	التحليل التتابعي للجين <i>16srRNA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E27	A-6
118	التحليل التتابعي للجين <i>acrA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E27	B-6
118	التحليل التتابعي للجين <i>acrB</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E27	C-6
119	التحليل التتابعي للجين <i>16srRNA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E40	A-7
120	التحليل التتابعي للجين <i>acrA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E43	B-7
120	التحليل التتابعي للجين <i>acrB</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E8	C-7
121	التحليل التتابعي للجين <i>16srRNA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E40	A-8
121	التحليل التتابعي للجين <i>acrA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E43	B-8
121	التحليل التتابعي للجين <i>acrB</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E8	C-8
122	التحليل التتابعي للجين <i>16srRNA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E40	A-9
123	التحليل التتابعي للجين <i>acrA</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E43	B-9
123	التحليل التتابعي للجين <i>acrB</i> لبكتريا <i>E. coli</i> في العزلة E8	C-9



## المحتويات

### قائمة المختصرات

Abbreviation	key
$\mu\text{g} / \text{ml}$	Microgram / Milileter
<i>16SrRNA</i>	16 Svedberg Ribosomal Ribonucleic Acid
ABC	ATP-Binding Cassete Family
<i>acrA</i>	Acriflavine A
<i>acrB</i>	Acriflavine B
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Barium Chloride
<i>bp</i>	Base Pair
CLSI	Clinical And Laboratory Standards Institute
CNF	Cytotoxic Necrotizing Factor
CusCFBA	Copper Transporting Efflux System
Cml	Chloramphenicol Transporting Efflux System
ddH <sub>2</sub> o	Deionized Sterile Distal Water
DEC	Diarrhegenic <i>E. Coli</i>
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
dNTP	Deoxy Nucleotide Triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELISA	Immunosorbent Linked Enzyme Assay
EMB	Eosin Methylene Blue
KOH	Potassium Hydroxide
LPS	Lipopolysaccharide
MATE	Multidrug And Toxic Efflux Family
MDR	Multiple Drug Resistance
Mdt	Multidrug Transport
MFS	Major Facilitator Super Family
MR-VP	Methyl Red-Voges Proskauer
NCBI	National Center For Biotechnology Information
ODc	Optical Density Control
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDR	Pandrug Resistance
RND	Resistance - Nodulation - Division Family
SMR	Multidrug Resistance Family
TBE Buffer	Tris Borate EDTA Buffer
Tet	Tetracycline Transporting Efflux System
Tris	Trihydroxymethylglycine

## المحتويات

UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i>
UTI	Urinary Tract Infection
UV Light	Ultra Violet Light
VP1	Alpha – Naphthol
VP2	Potassium Hydroxide
WHO	World Health Organization
XDR	Extremely Drug Resistance
$\beta$ -Lactamase	Beta-Lactamase

# الفصل الاول

المقدمة واستعراض المراجع

## 1. المقدمة واستعراض المراجع Introduction and literature review

### 1.1 المقدمة Introduction:

بكتريا *Escherichia coli* هي احدى افراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae السالبة لصبغة كرام، عصوية الشكل، متحركة او غير متحركة، هوائية او لا هوائية اختيارية facultative anaerobic، مخمرة لسكر اللاكتوز lactose واغلبها مخمرة لسكر الرامنوز ramenose وسكر السوربيتول Sorbitole، منتجة لإنزيم  $\beta$ -glucoronidase، درجة الحرارة المثلى لنموها (36-37) م (Wanger et al., 2017 ; )، موجبة لأختبار الكتاليز catalase وسالبة لأختبار الاوكسيداز oxidase، منتجة للاندول indole وغير مستهلكة للسترات citrate، موجبة لأختبار المثيل الاحمر methyl red وسالبة لأختبار الفوكس بروسكاور Vogase-Proskauer (Hemraj et al., 2013).

تعيش بصورة طبيعية في امعاء الانسان والحيوان وهي في الوقت نفسه بكتريا انتهازية opportunistic pathogens، مسببة للعديد من الامراض مثل الاسهال diarrhea، التهاب السحايا meningitis، تسمم الدم sepsis، تجرثم الدم bacteremia وتعد من اكثر الانواع البكتيرية المسببة لاصابات المسالك البولية urinary tract infections شيوعا، اذ تسبب حوالي (90%) من اصابات المسالك البولية في العالم، وتكون اكثر شيوعا في مرحلة الطفولة (Hadi et al., 2014)؛ شويخ وجاسم، (2016).

تعود امراضية هذه البكتريا الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة، ومن هذه العوامل هي امتلاكها لمخربات الحديد siderophores، عامل التخر السمي cytotoxic necrotizing factor، colisin،

وامتلاكها للتراكيب السطحية مثل الاسواط flagella والمحفظة capsule والسكريات المتعددة الدهنية (LPS) lipopolysaccharides، التي تمنح البكتريا صفات مستضدة وذلك بإنتاجها للمستضد السوطي H (flagellar antigen H) والمستضد الجسمي O (somatic antigen O) والمستضد المحفظي K (capsular antigen K). ايضا تمتلك الاهداب (fimbreae او pilli) التي تساعد على الالتصاق في انسجة المضيف فتمنحها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي biofilm (Terlizz et al., 2017; Zowawi et al., 2015).

تتميز بكتريا *E. coli* بامتلاكها صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multidrug Resistance (MDR) (Laird, 2016). اذ تمتاز بمقاومتها العالية للمضادات الحيوية نتيجة امتلاكها انزيمات المقاومة مثل انزيمات البيتا لكتاميز  $\beta$ -lactamases التي تمنح المقاومة لمضادات البيتا لكتام  $\beta$ -lactams، والانزيمات التي تمنح المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسايد aminoglycosides ولمضادات الكينولونات quinolones. كما تمتلك هذه البكتريا اليات اخرى تمنحها المقاومة للمضادات الحيوية مثل تغيير نفاذية الغشاء الخلوي، تغيير في الموقع الهدف، تثبيط تصنيع البروتينات وامتلاك البكتريا لمضخات الدفع efflux pumps، اذ تمنح البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية مثل مجاميع macrolides ومضادات novobiocin و rifamycin (Kapoor et al., 2017). وتقسم مضخات الدفع على خمس عوائل هي عائلة Major Facilitator Super Family (MFS)، عائلة Small Multidrug Resistance Family (SMR)، عائلة Multidrug and Toxic Efflux Family (MATE)، عائلة ATP-Binding Cassete Family (ABC) وعائلة Resistance - Nodulation - (RND) و Division Family بضمنها النظام (AcrAB-ToIC) الذي يكون اكثر شيوعا في بكتريا *E. coli*، اذ

يتكون من ثلاثة بروتينات هي بروتين الغشاء الداخلي AcrB الذي يشفر عنه الجين *acrB* والبروتينات المنتشرة في الفراغ البلازمي AcrA التي يشفر عنها الجين *acrA* فضلا عن القناة ToIC التي تقع في الغشاء الخارجي (Anes et al., 2015).

نظرا لأهمية بكتريا *E. coli* الطبية وعلاقتها باصابات المسالك البولية ومقاومتها للمضادات الحيوية جاءت هذه الدراسة للكشف عن أنظمة الدفع التي تمتلكها بكتريا *E. coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية وعلاقتها بالمقاومة للمضادات الحيوية وحسب محاور الدراسة الآتية:

- 1- عزل وتشخيص بكتريا *E. coli* من بول المرضى الذين يعانون من اصابات المسالك البولية بالطرائق الزرعية و الكيموحيوية والجزئية باستعمال الجين التشخيصي *16SrRNA*.
- 2- اجراء اختبار فحص الحساسية sensitivity test لمجاميع مختلفة من المضادات الحيوية
- 3- اجراء اختبار قابلية البكتريا على انتاج الغشاء الحيوي biofilm .
- 4- اجراء الكشف المظهري phenotype عن مضخات الدفع efflux pumps .
- 5- الكشف الجزيئي genotype عن جيني مضخة الدفع *acrA* و *acrB* باستعمال تقانة PCR.
- 6- اجراء التحليل التتابعي للدنا DNA sequencing للجين التشخيصي *16SrRNA* و جيني المقاومة *acrB* و *acrA* .

## 2.1 استعراض المراجع Literature review

### 1.2.1 العائلة المعوية Enterobacteriaceae

تضم العائلة المعوية مجموعة كبيرة ومتباينة من الانواع البكتيرية التي تعيش في امعاء الانسان والحيوان بصورة طبيعية. تكون افرادها عصوية الشكل، سالبة لصبغة كرام، هوائية او لا هوائية اختيارية facultative anaerobic، يمكن لأفرادها ان تسبب العديد من الامراض للإنسان والحيوان منها اصابات الجروح، الاصابات المكتسبة في المستشفيات nosocomial infections، اصابات الجهاز التنفسي respiratory infections، اصابات الجهاز البولي urinary tract infections و اصابات الجهاز التناسلي genital infections (Oliveira et al., 2017). وتمتلك عوامل ضراوة مختلفة كالسموم والانزيمات، ايضا تخمر مجموعة واسعة من الكربوهيدرات ومعظم افرادها مخمرة لسكر اللاكتوز Lactose، كما انها تكون سالبة لاختبار الاوكسيداز oxidase، موجبة لاختبار الكتاليز catalase، لها القابلية على اختزال النترات nitrate الى النتريت nitrite لغرض انتاج الطاقة، معظمها تتحرك بوساطة الاسواط flagella، غير مكونة للأبواغ ودرجة الحرارة المثلى لنموها 37م (Jawetz et al., 2016).

### 2.2.1 بكتريا Escherichia coli

تعد من اهم افراد العائلة المعوية، وتتمو كنببت طبيعي normal flora في الجهاز الهضمي، كما انها تعد من البكتريا الانتهازية الممرضة opportunistic pathogen، اذ تسبب الاسهال diarrheal diseases فتسمى (DEC) Diarrheagenic E. coli فضلا عن العديد من الامراض خارج مواطنها الطبيعية منها التهاب السحايا للأطفال حديثي الولادة neonatal meningitis، تسمم الدم sepsis،



واصابات المسالك البولية urinary tract infection فتسمى بكتريا Uropathogenic *E.coli* (UPEC)، اذ تسبب حوالي 90% من اصابات المسالك البولية، و يمكن ان تنتقل بسهولة من منطقة الشرج الى المسالك البولية والمثانة التي تكون اكثر شيوعا في الاناث منها في الذكور بحوالي 14 مرة بسبب قصر الاحليل في الإناث (Levinson, 2016).

## Classification of *E. coli*

### 1.2.2.1 تصنيف بكتريا *E. coli*

شخصت بكتريا *E. coli* لأول مرة من قبل العالم الالمانى Theodore Escherich في عام (1885) م خلال دراسته على البكتريا الطبيعية في الامعاء في براز الاطفال الرضع كبكتريا متعايشة تستوطن الامعاء مباشرة بعد الولادة. وفي عام (1945) م وجد العالم Bray ان سلالة من بكتريا *E. coli* كانت السبب الرئيس لإسهال الاطفال الرضع في انكلترا واطلق عليها Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) (Bray, 1945).

يكون جنس *Escherichia* قريب الصلة من اجناس العائلة المعوية الاخرى لاسيما جنس *Shigella*، ويضم هذا الجنس خمسة انواع (*E. coli*، *E. blattae*، *E. hermanii*، *E. fergusonii*، *E. vuneris*) تختلف فيما بينها ببعض التفاعلات الكيموحيوية. ويعد النوع *E. coli* الاكثر اهمية وشيوعا في امراضية الانسان (Olowe et al., 2017).

صنفت بكتريا *E. coli* في مصنف العالم برجي Bergey's manual ضمن العائلة المعوية وكالاتي:

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Escherichia*

Species: *coli* (Garrity *et al.*, 2005).

### 2.2.2.1 الصفات العامة لبكتريا *E. coli*      Characterization of *E. coli*

هي عبارة عن عصيات سالبة لصبغة كرام، متحركة بوساطة الاسواط المحيضية peritrichous flagella التي تحيط بكامل الجسم وغير مكونة للأبواغ. مستعمراتها ملساء ناعمة ومحدبة قليلا، رطبة، غير مخاطية او مخاطية عند امتلاكها لتركييب المحفظة capsule، ذات حافة حادة كاملة، وردية لماعة على وسط اكار المكوني MacConkey agar ، خضراء معدنية لماعة green metallic sheen على وسط الايوسين مثيلين الازرق Eosin Methylene Blue (EMB) agar، وايضا تكون مستعمرات وردية على وسط اكار الكروماجين اورينتيشن Cromagar Orientation، غير مخمرة لسكر السليلوبايوز cellulobios واكثر من 80% منها مخمرة لسكر الرامنوز ramenose، واكثر من 90% منها مخمرة لسكر السوربتول sorbetole. كما انها غير محللة للجيلاتين gelatin وغير منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H<sub>2</sub>S في وسط ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar iron agar (TSI)، معظمها منتجة لأنزيم β-glucoronidase (GUD)، ولا تنمو بوجود سيانيد البوتاسيوم (KCN)، وتنمو في اس هيدروجيني

يتراوح بين (4.4 - 9)، ودرجة الحرارة المثلى لنموها هي (36 - 37) م (Jawetz *et al.*, 2016;) كما انها تكون موجبة لاختبار الكاتاليز catalase وسالبة لاختبار الاوكسيداز oxidase واليورييز urease وموجبة لإختبار الاندول indole الذي يعد الاختبار الافضل الذي يميزها عن افراد العائلة المعوية الاخرى. فضلا عن انها غير مستهلكة للسترات citrate كمصدر وحيد للكربون، كما انها موجبة لاختبار المثل الاحمر methyl red وسالبة لاختبار الفوكس بروسكاور Vogase-Proskauer (Hemraj *et al.*, 2013).

### *E. coli* Types

### 3.2.2.1 انواع بكتريا *E. coli*

تقسم بكتريا Diarrheagenic *E. coli* (DEC) المسببة للإسهال على ستة انواع بالاعتماد على

صفاتها وعوامل ضراوة محددة والية عمل تلك العوامل:

- اشريشيا القولون النزفية للأمعاء او المنتجة للسموم الشبيهة بسموم الشيكلا

Shiga-Toxin Producing *E. coli* (STEC) or Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

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

- اشريشيا القولون السامة للأمعاء Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

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

- اشريشيا القولون الأمعائية التكتلية Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

- اشريشيا القولون المنتشرة بالالتصاق Diffusely Adhering *E. coli* (DAEC)

(Malema *et al.*, 2018; Rivas *et al.*, 2015).

**Epidemiology of *E. coli*****4.2.2.1 وبائية بكتريا *E. coli***

تمثل بكتريا *E. coli* الجزء الرئيس من بين افراد العائلة المعوية التي تغزو الأمعاء بعد الولادة وتتعايش فيها بصورة طبيعية، في حين ان لبعض سلالاتها القابلية الانتهازية لإصابة العائل بالأمراض بعد توافر الظروف المثلى للنمو (Gharajalar and Sofiani, 2017).

ان الإصابة باصابات المسالك البولية من الامراض الاكثر شيوعا، كما ان هذه البكتريا تعد المسؤول الرئيس عن حوالي 90% من حالات اصابات المسالك البولية للفئات العمرية ما بين (30 - 39) سنة وما بين (60 - 69) سنة، فضلا عن ان نسبة الإصابة في الاناث اكبر منها في الذكور للفئات العمرية ما بين (10 - 19) سنة، كما انها تعد من المشاكل الرئيسة في اصابات المستشفيات وذلك لتسببها بالعدوى لأشخاص في دور النقاها (Hadi et al., 2017).

تختلف نسبة الإصابة ببكتريا المسالك البولية (UPEC) بين شخص واخر وتكون اكثر شيوعا في مرحلة الطفولة، كما تزداد نسبة الإصابة بها عند استعمال انابيب القسطرة البولية catheters التي تصل الى المثانة عبر الاحليل، اذ تساعد في ادخال البكتريا الى الاحليل. كما تختلف نسبة انتشار الإصابة باختلاف الظروف الجغرافية والصحية اذ تزداد نسبة الإصابة في الظروف الصحية الرديئة وسوء التغذية. ان الإصابة باصابات المسالك البولية تحدث في حوالي نصف سكان العالم، ويأتي بالمرتبة الثانية بعد اصابات الجهاز التنفسي في المجتمعات الفقيرة، اذ تحدث حوالي 150 مليون إصابة في العالم في كل عام. وان وجود ما لا يقل عن  $10^5$  خلية بكتيرية / مليلتر من البول دليل على حدوث الإصابة (Jawetz et al., 2016).

### 5.2.2.1 عوامل ضراوة بكتريا *E. coli* Virulence factors

تمتلك بكتريا *E. coli* العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من قابليتها على الاصابة بالأمراض اهمها اصابات المسالك البولية، ومن هذه العوامل هو القدرة على تحليل كريات الدم الحمر وذلك لامتلاكها الانزيم الحال للدم hemolysin الذي يكون على عدة انواع حسب شكل التحلل هي (الفا ، بيتا ، كاما)، اذ ان النوع الاول الفاهيمولاسين  $\alpha$ -hemolysin يمنح البكتريا القدرة على تحلل كريات الدم الحمراء للإنسان تحللا جزئيا، والنوع الثاني بيتاهيمولاسين  $\beta$ -hemolysin فيمنح البكتريا القدرة على تحلل كريات الدم الحمراء تحللا كاملا، اما النوع الثالث وهو كاماهيمولاسين  $\gamma$ -hemolysin فيمنح البكتريا القدرة على تحلل كريات الدم الحمر للحيوانات الاخرى وليس الانسان. وتمتلك البكتريا ايضا عامل التخر السمي cytotoxic necrotizing factor الذي يعمل على تحليل كريات الدم الحمراء (Jawetz *et al.*, 2016).

من عوامل الضراوة الاخرى هي امتلاك البكتريا للتراكيب السطحية مثل السموم الداخلية endotoxins التي تتكون من lipopolysaccharide (LPS) الذي يحتوي على المستضد الجسمي O (somatic antigen O)، فتمنح البكتريا القدرة على التوطن على خلايا المضيف بالأخص بطانة المثانة وتمكنها ايضا من التغلب على مناعة المضيف، ولبعضها القابلية على انتاج المحفظة capsule المتعددة السكريات التي تحتوي على المستضد المحفظي (capsular antigen K)، وايضا تمتلك تراكيب سطحية اخرى هي الاسواط flagella التي تستعمل كوسائل للحركة في الانواع المتحركة وايضا تحتوي هذه التراكيب على المستضد السوطي H (flagellar antigen H)، اذ ان هذه المستضدات تمنح البكتريا القدرة على التغلب على الجهاز المناعي للمضيف. كما تمتلك ايضا الياف كورلي curli fibers التي تمتلك صفة فيزيائية وكيميائية تسهل عملية انتاج الغشاء الحيوي biofilm بوساطة البكتريا. تمتلك البكتريا ايضا

الحويصلات الموجودة في الغشاء الخارجي outer-membrane vesicles التي ترتبط مع السموم البكتيرية، الانزيمات وعوامل الالتصاق، اذ تعمل بمثابة نظام تسهيل يسهل ارسالها الى خلايا العائل. وهناك ايضا بروتينات الغشاء الخارجي (OMPs) outer-membrane proteins، السموم المفردة toxins، والافراز كلها تعمل على زيادة قدرة البكتريا على الاصابة (Terlizzi *et al.*, 2017). وتعد الاهداب Fimbriae or Pilli بأنواعها الثلاث (P-fimbrial، S-fimbrial و F- Fimbrial) و النوع (Type1 Pilli) الذي يعد من اهم العوامل التي تساعد البكتريا على الالتصاق على انسجة العائل، مانحة اياها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي ومن ثم زيادة قابليتها على اكتساب صفة المقاومة للمضادات الحيوية (Spaulding *et al.*, 2017; Neamati *et al.*, 2015).

هذا فضلا عن امتلاكها البكتريوسين bacteriocin الذي يدعى colicin الذي يقتل الاجناس البكتيرية الاخرى وبالتالي يساهم في حماية البكتريا، وسموم cyclomodulins التي تعد من السموم المثبطة للحامض النووي الجينومي DNA في الخلايا التابعة للأجناس البكتيرية الاخرى، وتمتلك ايضا السموم الثابتة بالحرارة Enteraggative heat-stable toxin1 (EAST1) التي تفرزها بكتريا EAEC، السموم المعوية الثابتة بالحرارة ETEC heat-stable enterotoxin والسموم المعوية المتكتلة بالحرارة ETEC heat-labile enterotoxin التي تفرزها بكتريا ETEC، السموم المشفرة بالبلازميد Plasmid-encoded toxin (Pet) التي تكون سامة لكريات الدم الحمراء وللخلايا المعوية، السموم الشبيهة بسموم الشيكلا Shigella enterotoxin1 (ShET1)، والسموم الحوصلية vacuolating autotransporter، كذلك تمتلك انزيمات الكاربينيميز carbapenemase التي تمنح البكتريا صفة المقاومة لمضادات الكاربينيم carbapenems و البيتا لكتاميز  $\beta$ -lactamases التي

تشمل cephalosporines و penicillins التي تمنح البكتريا صفة المقاومة لمضادات البييتالاكتام  $\beta$ -lactam، و انزيمات acetyltransferase، adenytransferase و phosphotransferase التي تمنح البكتريا المقاومة لمضادات aminoglycosides (Zowawi et al., 2015)، وتمتلك ايضا مخربات الحديد siderophores التي تساعد البكتريا على النمو في بيئة قليلة الحديد (Terlizzi et al., 2017).

### 1.5.2.2.1 قابلية بكتريا *E. coli* على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm production

الغشاء الحيوي عبارة عن تجمع الخلايا البكتيرية والتصاقها بالأسطح الصلبة، وتكون محاطة بمادة بينية خارج خلوية extracellular matrix التي تكون عبارة عن سكريات متعددة وبروتينات الدنا من الاحياء المجهرية، وتساعد هذه المادة الخارج خلوية في تثبيت الغشاء الحيوي، ويساهم هذا الغشاء في عمليات اصابة المضيف ويزيد من قابلية البكتريا على مقاومة المضادات الحيوية، كما يوفر الحماية للخلايا من الاليات الدفاعية للجسم منها خلايا البلعمة Macrophages (Soto, 2013). عملية تكوين الغشاء الحيوي تمر بعدة مراحل وكالاتي:

1- الالتصاق العكسي reversible attachment على الاسطح: مرحلة وصول الخلايا والتصاقها بالأسطح، تتم هذه المرحلة بواسطة الاسواط flagella و عوامل الجذب الكيميائية chemotaxis للبكتريا.

2- الالتصاق غير العكسي irreversible attachment على الاسطح: مرحلة ثبات الخلايا وقلة

استطالتها، يتوسط هذه المرحلة النوع الاول من الاهداب type1pilli، الياف كورلي curli fbres

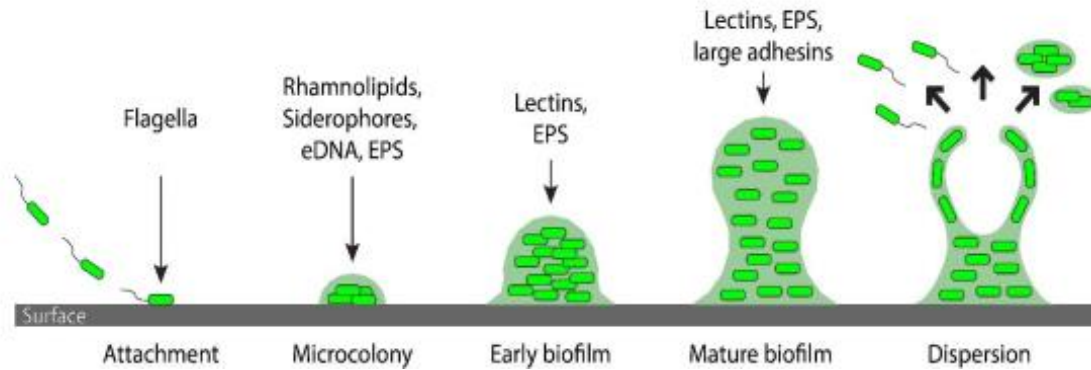
ونوع من المستضدات يدعى antigen 43.



3- مرحلة تكوين المادة الخارج خلوية external matrix، اذ تنتج البكتريا السكريات المتعددة لتسهل عملية تجمع والتصاق الخلايا على الاسطح، وتتكون هذه المادة من السليلوز cellulose، متعدد الكلوكوز الاميني polyglucosamine و حامض الكولونك colonic acid فضلا عن العديد من المواد كالأحماض النووية والبروتينات وغيرها.

4- مرحلة اكتساب الغشاء الحيوي للتركيب الثلاثي الاسطح three-dimensional structure وهذه تشمل تكون مستعمرات بكتيرية مطمورة في العديد من المواد كالمغذيات والماء والنواتج الايضية.

5- الانفصال deattachment: مرحلة نضج الغشاء الحيوي و انفصاله ليبدأ العملية من جديد على اسطح اخرى (Soto, 2014). كما في الشكل (1-1)



الشكل (1-1): مراحل تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *E. coli*: الالتصاق attachment، تكوين مستعمرات بكتيرية صغيرة، تكوين المادة الخارج خلوية external matrix وتكوين غشاء حيوي اولي، اكتساب الغشاء الحيوي للتركيب الثلاثي الاسطح three-dimensional structure وتكوين غشاء حيوي ناضج، الانفصال deattachment. (Silva et al., 2017).

اشارت الدراسات الى ان الغشاء الحيوي يكون مسؤولا عن 80% من الاصابات البكتيرية للمسالك البولية في الانسان، ويمكن تثبيط الغشاء الحيوي باستعمال مواد عديدة قد تكون مستخلصات نباتية او مواد كيميائية، اذ يظهر تأثيرها في نظام نقل الاشارات الكيميائية بين الخلايا البكتيرية والذي يدعى بنظام quorum sensing (QS). تزداد صفة المقاومة للمضادات الحيوية في البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي نتيجة لعدم قدرة المضادات الحيوية على اختراق الغشاء الحيوي، تفعيل الجينات المشفرة عن نظام (QS) وتأثير مضخات الدفع efflux pumps المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية (Tajbakhsh *et al.*, 2018 ; Poursina *et al.*, 2016).

### 6.2.2.1 امراضية بكتريا *E. coli* Pathogenicity of *E. coli*

لهذه البكتريا القدرة على احداث العديد من الامراض داخل الامعاء وخارجها ومن هذه الامراض :

#### 1- الامراض المعوية او الاسهال Enteric or diarrheal diseases :

في لحظة الالتصاق تنتج البكتريا السموم المعوية enterotoxins، ويوجد ثلاثة انواع من هذه السموم، اثنان منها تسبب الاسهال المائي watery diarrhea هما السموم المتكتلة بالحرارة heat-labile toxin (LT) الشبيهة بسموم بكتريا الكوليرا *Vibrio cholerae* والسموم الثابتة بالحرارة heat-stable toxin (ST). اما السموم الشبيهة بسموم بكتريا *Shigella* التي تدعى shiga toxins فتسبب الاسهال الدموي bloody diarrhea ويمكن ان تسبب البكتريا نفسها وليس سمومها الاسهال الدموي وذلك بعد انغرازها في بطانة الامعاء مسببة مرض يدعى بالديزنتري dysentery (Levinson, 2016).

## 2- التهاب السحايا ا تسمم الدم Menengitis\Septicemia:

مرض التهاب السحايا عند الاطفال الرضع تسببه بكتريا *E. coli* التي تمتلك نوعا متخصصا من المستضدات المحفظية يدعى K1. اما تسمم الدم فتسببه بكتريا *E. coli* التي تمتلك السموم الداخلية endotoxin والتي تتكون من (LPS)، وتكون الاصابة اكثر شيوعا في الاطفال الرضع بسبب فقدانهم الجسم المضاد من نوع (IgM) Immunoglobulin M، وقد يحدث كإصابة ثانية نتيجة الاصابة باصابات المسالك البولية (Soltani *et al.*, 2018; Jawetz *et al.*, 2016).

## 3- اصابات المسالك البولية Urinary tract infection

تعد من اهم واكثر الامراض شيوعا، اذ تحدث نتيجة الاصابة بالبكتريا و تكاثرها في الجهاز البولي، الذي يتكون من المسالك البولية السفلى (الاحليل والمثانة ) والمسالك البولية العليا (الحالبين والكليتين)، يبدأ الالتهاب عادة بالمسالك البولية السفلى فيسمى بالتهاب المثانة cystitis والتهاب الاحليل urethritis، الذي يحدث بعد تجرثم البول بالبكتريا asymptomatic bacteriuria ويكون بدون اعراض، والتهاب المسالك البولية المرتبط بالقسطرة catheter-associated urinary tract infection. ويمكن ان يتطور الى المسالك البولية العليا مسببا التهاب الحالبين واصابات الكلى وحويض الكلى phylonephritis، وتعد الاصابة ببكتريا *E. coli* المسببة لاصابات المسالك البولية المصدر الرئيس للإصابة بتجرثم الدم bacteremia (Forsyth *et al.*, 2018; Foxman, 2014).

تعد بكتريا *E. coli* من اكثر افراد العائلة المعوية المسببة لاصابات المسالك البولية اذ تشكل حوالي 90% من اصابات المسالك البولية (Jawetz *et al.*, 2016)، فضلا عن انواع اخرى من البكتريا التي

تسبب اصابات المسالك البولية هي (*Proteus mirabilis*، *Staphylococcus saprophyticus*)،  
*Pseudomonas spp.*، *Klebsiella pneumoniae*، *Serratia spp.*، *Enterobacter spp.*  
*(Streptococcus group B)* (Foxman, 2014; Mirzarazi, 2013).

### 7.2.2.1 مقاومة بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية *E. coli* antimicrobial resistance

المضادات الحيوية عبارة عن نواتج ايفية ثانوية طبيعية او مصنعة، تنتج من قبل الاحياء المجهرية في الطور الثابت ولها القدرة على تثبيط الاحياء المجهرية الاخرى دون التأثير في خلايا جسم المضيف، يمتلك بعضها طيفا محدودا narrow spectrum antibiotics اي تكون محددة بنوع معين او مجموعة محددة من الاحياء المجهرية، والبعض الاخر يمتلك طيفا واسعا broad spectrum antibiotics اي تعمل على مختلف مجاميع الاحياء المجهرية. البعض منها يكون ذا تأثير قاتل bactericidal والبعض الاخر يكون ذا تأثير مثبط bacteriostatic تم اكتشافها اولا من قبل العالم الكسندر Alexander Fleming في عام (1928) م بعد اكتشافه لعقار البنسلين penicillin بالصدفة، لكن هذا العقار بقي حتى قام العالمان Ernst Chain و Haward Flory باستخلاصه، وفي عام (1941) م انتشر بشكل واسع (المرجاني، 2011 ; Ali et al., 2018).

تعد صفة المقاومة للمضادات الحيوية التي تمتلكها البكتريا احدى اهم المشاكل الصحية والاقتصادية في العالم، الامر الذي دفع الباحثين الى التحري عن مضادات جديدة للتغلب على السلالات البكتيرية المقاومة. اذ تؤدي الاصابة بالبكتريا المقاومة الى طول مدة العلاج وزيادة خطورة الاصابة. وهناك عدة انماط من المقاومة للمضادات الحيوية منها extensively-drug ، multi-drug resistant (MDR)

resistant (XDR) و Pan-Drug Resistant (PDR)، المقاومة من نوع (MDR) تعني ان البكتريا تكون مقاومة على الاقل لواحد من بين ثلاث مضادات حيوية، والمقاومة من نوع (XDR) تعني ان البكتريا مقاومة لأثنين او كل المضادات الحيوية المأخوذة، اما المقاومة من نوع (PDR) فتعني ان البكتريا تكون مقاومة لجميع المضادات الحيوية ( Basak *et al.*, 2016 ).

صفة المقاومة هذه تكون اما فطرية innate او مكتسبة acquired، تكتسبها اما عن طريق الطفرات في الجينات (طفرات كروموسومية chromosomal mutations)، او تكتسبها عن طريق انتقال المادة الوراثية من بكتريا الى اخرى بعدة طرائق، اما عن طريق الاقتران البكتيري conjugation ويتم فيها انتقال المادة الوراثية بين خلية واخرى مباشرة مثل البلازميدات plasmids و الجينات القافزة transposons، او عن طريق التحول transformation ويتم فيها اخذ الجينوم البكتيري المتحرر من البكتريا الميتة، او عن طريق الحث transduction ويتم فيها انتقال المعلومات الوراثية بين الخلايا البكتيرية بوساطة العاثيات bacteriophages (Laird, 2016). وقد ادت الطفرات الى زيادة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية فكانت سابقا مقاومة لما يقارب ال 70% من التتراسايكلين tetracycline، الستربتومايسين streptomycin، والسلفيزوكسازول sulfisoxazole، لكن بعد حصول الطفرات وانتقال بلازميدات المقاومة لها اصبحت مقاومة ايضا الى الامبسلين ampicillin، الكنامايسين kanamycin و التيكارسيلين ticarcillin (Afzal, 2017; Shariff *et al.*, 2013). تظهر البكتريا عددا من اليات المقاومة للمضادات الحيوية بعد انتقال جينات المقاومة اليها وهي كالاتي:

**1- تغيير في موقع الهدف Target modification**

تؤثر هذه الآلية في بناء الاحماض النووية nucleic acids فتزيد من مقاومة البكتريا لمضادات الفلوروكينولونات fluoroquinolones مثل السبروفلوكساسين ciprofloxacin والريفاميسين rifamycin، فضلا عن تأثيرها في الريبوسومات ribosomes محدثة خلا في صنع البروتين مما يؤدي الى زيادة مقاومة البكتريا لمضادات الارثروميسين erythromycin والريفاميسين rifamycin (Kotsyuba *et al.*, 2014).

**2- تغيير في نفاذية الغشاء الخلوي Alteration of cell membrane permeability**

نتيجة لتغير طبيعة البروتين في الغشاء الخلوي تتغير ثقبوب الغشاء الخلوي او انظمة النقل فيه membrane transport system، مما يؤثر في عمل المضاد الحيوي ويجعل منه غير قادر على عبور انظمة النقل في الغشاء، ونتيجة لهذه التغيرات تمنح هذه الآلية مقاومة البكتريا لمضادات التتراسايكلين tetracycline والكينولونات quinolones مثل السبروفلوكساسين ciprofloxacin وبعض انواع الامينوكلايكوسايد aminoglycoside مثل الجنتاميسين gentamicin (Kapoor *et al.*, 2017). فضلا عن المضاد الحيوي nitrofurantoin ومضادات السلفاناميد sulfonamides (الشويخ، 2016).

**3- انتاج الانزيمات Production of enzymes**

تؤثر هذه الآلية في بناء الجدار الخلوي، اذ يتم تحطيم حلقة البيتالاكتام  $\beta$ -lactam ring الموجودة في مضادات البنسلينات penicillins والسيفالوسبورينات cephalosporins بوساطة انزيمات البيتالاكتاميز  $\beta$ -lactamases مؤديا الى اكتساب البكتريا المقاومة لهذه المضادات،

فضلا عن دور الانزيمات في تحطيم مضادات الامينوكلايكوسايد aminoglycosides، الكلورامفينيكول chloramphenicol، الكلايكوبتايد glycopeptide والكينولينات quinolones التي تنتج انزيمات topoisomerase المثبطة لتضاعف الدنا ( Kotsyuba *et al.*, 2014).

#### 4- تغيير المسالك الايضية Alteration of metabolic pathways

تستعمل البكتريا حامض الفوليك folic acid الذي تحصل عليه من البيئة جاهزا، محدثة تغييرا في المسالك الايضية لها، مما يتيح لها اكتساب المقاومة لمضادات التراميثوبريم trimethoprim ومضادات السلفا sulfonamides ( Kapoor *et al.*, 2017). فضلا عن امتلاكها الى مضخات الدفع efflux pumps التي تضخ المواد الضارة خارج البكتريا وتسمح لها بالبقاء في بيئة غير ملائمة ( Paltansing, 2015).

#### 8.2.2.1 مضخات الدفع Efflux pumps

عبارة عن ناقلات بروتينية تقع في الغشاء الخلوي، تؤدي دورا هاما في نقل المواد المختلفة وطرحها خارج الخلية للتخلص من التأثير الضار لها، لذا تعد وسيلة مهمة لمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية. اذ تعمل هذه الناقلات على نقل مواد كثيرة خارج الخلية مثل المواد السامة المحبة للماء hydrophilic، الكارهة للماء hydrophobic او amphipathic substances، فضلا عن الاصباغ مثل الصبغة الحمراء المصفرة acriflavine و صبغة البنفسج البلورية crystal violet و صبغة بروميد الاثيديوم ethidium bromide، المعقمات disinfectants، المطهرات antiseptics، الحوامض الدهنية fatty acids، العناصر الثقيلة heavy metals، المذيبات العضوية organic solvents والمضادات الحيوية

antibiotics مثل مضادات البيتالاكتام  $\beta$ -lactams، الماكروليدات macrolides، التتراسايكلين tetracycline، الكلورامفينيكول chlramphenicol و النوفوبايوسين novobiocin ( Zhi Li *et al.*, 2015 ; Venter *et al.*, 2016).

### 1.8.2.2.1 تصنيف انظمة الدفع Classification of efflux pumps

صنفت مضخات الدفع بالاعتماد على ثلاثة معايير وكلاتي :

#### 1- بالاعتماد على خصوصيتها للمواد المنقولة substrate specificity

تكون اما مضخات دفع عامة general efflux pumps لها القدرة على طرح مواد ذات تراكيب كيميائية مختلفة خارج الخلية البكتيرية، كما في مضخات الدفع المتعددة في البكتريا ذات القدرة على طرح مضادات تعود لأصناف مختلفة في التركيب الكيميائي، لذا فهي تساهم في المقاومة المتعددة للمضادات (Alav *et al.*, 2018). او مضخات دفع متخصصة specific efflux pumps التي تكون متخصصة بنقل مواد معينة وطرحها خارج الخلية، كما في المضخات المتخصصة في دفع نوع واحد من المضادات الحيوية (Anes *et al.*, 2015).

#### 2- بالاعتماد على مصدر الطاقة Source of Energy

تشمل المضخات التي تعتمد على المصدر الكيميائي للطاقة لإنجاز وظائفها، اي التي تعتمد على النقل الفعال active transport في طرح المواد خارجا، وهي تشمل صنفين رئيسيين هما مضخات الدفع التي تعتمد على مصادر الطاقة الاولية primary active transporters التي تستعمل الطاقة الناتجة عن التحلل المائي لجزيئة (ATP) adenosine triphosphate،



ومضخات الدفع التي تعتمد على مصادر الطاقة الثانوية secondary active transporters التي تعتمد على تدرج أيون الصوديوم (Na+) كمصدر للطاقة في عملية طرح المواد خارج الخلية (Delmar et al., 2014).

### 3- بالاعتماد على المنشأ الوراثي (Phylogenic Relationship):

تصنف هذه المضخات على صنفين رئيسيين طبقاً للمنشأ الوراثي، هما مضخات الدفع الكروموسومية chromosomal efflux pumps، أي تحمل الجينات المشفرة لها على كروموسوم الخلية، وتمنح الخلايا صفة المقاومة الطبيعية أو الذاتية intrinsic resistance، فتسمح للبكتريا البقاء في بيئة معينة كما في البيئة ذات التركيز العالي للمضادات الحيوية، وهذه تتواجد في الخلايا حقيقة النواة وبدائية النواة، و مضخات الدفع البلازميدية plasmid efflux pumps وتحمل الجينات المشفرة لها على عناصر وراثية محمولة مثل البلازميدات plasmids أو الجينات القافزة transposons أو على integrons، تمنح الخلايا صفة المقاومة المكتسبة acquired resistance وتواجدها يكون في الخلايا بدائية النواة، لاسيما الخلايا البكتيرية (Puzari and Chetia, 2017). كما في أنظمة الدفع من عائلة (MFS) والتي تشمل أنظمة الدفع (TetA/B/E، CmlA، Flo) ونظام الدفع OqxAB-ToIC الذي ينتمي إلى عائلة الدفع RND.

هنالك جينات يمكن أن تشفر لنقل أكثر من مادة مختلفة في التركيب الكيميائي عبر مضخة دفع واحدة، وهذه تسمى بمضخات الدفع المتعددة multidrug resistance efflux pumps، وهي بذلك تمنح البكتريا صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Blair et al., 2014). وهناك خمس عوائل من أنظمة الدفع في بدائية النواة (Zhang et al., 2016) هي :

- 1- عائلة Major Facilitator Super Family (MFS).
- 2- عائلة Small Multidrug Resistance Family (SMR).
- 3- عائلة Multidrug and Toxic Efflux Family (MATE).
- 4- عائلة ATP-Binding Cassete Family (ABC).
- 5- عائلة Resistance - Nodulation - Division Family (RND).

تعتمد مضخات الدفع ضمن عائلة الدفع (ABC) على تحلل جزيئة (ATP) كمصدر للطاقة، اما العوامل الاخرى فتعتمد على الطاقة الباعثة للبروتون (PMF) Proton motive Force كمصدر للطاقة. ومن اشهر العوامل واكثرها انتشارا هي عائلة RND التي تسود في البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل (*Proteus spp.*, *Klapiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*) (Delmar et al., 2014).

اكتشفت مضخات الدفع لأول مرة كآلية من آليات المقاومة ضد التتراسايكلين tetracycline في بكتريا *E. coli* (Blanco et al., 2016). تنقسم العائلة RND على ثلاثة اقسام على اساس مكوناتها وتشمل مضخات الدفع ذات المكون الواحد التي تتمثل بالبروتين AcrB المتواجد في الغشاء الداخلي inner membrane للخلية، والذي يشفر عنه جين يدعى *acrB*، والذي ينقل المضادات المحبة للماء، ومضخات ذات مكونين التي تتمثل ببروتين AcrB في الغشاء الداخلي والبروتينات الدهنية AcrA المتواجد في الفراغ البلازمي periplasmic space والتي يشفر عنها جين يدعى *acrA*، ومضخات ذات ثلاثة مكونات tripartite التي تتمثل ببروتين AcrB في الغشاء الداخلي و بروتينات AcrA في الفراغ البلازمي وقناة بروتينية شبيهة بالقمع تدعى Toic المتواجدة في الغشاء الخارجي outer membrane للخلية، والتي تنقل

اغلب المضادات المحبة للماء (Abdelhamid and Abozahra, 2017 ; Hayashi *et al.*, 2016). وايضا تقسم عائلة مضخات الدفع RND في بكتريا *E.coli* على عائلتين ثانويتين بالاعتماد على المواد التي تنقلها:

1- **Hydrophobic and Amphiphilic Efflux RND (HAE-RND)**: وهي مضخات

الدفع التي تنقل المواد السامة والضارة المتعادلة و الكارهة للماء وتشمل البروتينات AcrAB ،

MdtEF، MdtC ، AcrAD ،MdtAB ، AcrEF.

2- **Heavy Metal Efflux RND (HME-RND)**: وهي المضخات التي تنقل العناصر الثقيلة

وتشمل نظام واحد هو copper- transporting efflux system (CusCFBA) (Delmar *et al.*)

(al.,2014). يوضح الجدول (1-1) أمثلة مضخات الدفع الموجودة في بكتريا *E.coli*.

جدول (1-1): انظمة الدفع والمضادات الحيوية التي يتم نقلها خارج بكتريا *E. coli*.

نوع المضاد الحيوي المثبط	نظام الدفع Efflux System	عائلة نظام الدفع Family
Nal	EmrAB-TolC	MFS
Tc, Km, Fos	Bcr	
...Tc, Rif, Cmp, Ery, Neo, Fq	MdfA	
Fos	MdtG	
Fq	MdtH	
Cmp	MdtL	
Cmp, Fq	MdtM	
Cmp, Fq, Fos, Tmp	NorE	MATE
Tc	EmrE	SMR

Nal, Fos	MdtJK	
Ery	MacAB-TolC	ABC
Fq, $\beta$ -lactams, Tc, Cmp, Nov, ... Ery, Fus, Ri, 3rdGC	AcrAB-TolC1	RND
Fq, $\beta$ -lactams, Tc, Cmp, Nov, ...Ery, Fus, Rif, 3rdGC	AcrEF-TolC <sup>2</sup>	
AGs, Ery, PolyB	AcrD <sup>2</sup> -AcrA-TolC	
Fos	CusAB-? <sup>2</sup>	
Fq	MdtABC-TolC <sup>2</sup>	
Ery	MdtEF-TolC <sup>2</sup>	

**Nal:** nalidixic acid; **Tc:** tetracycline + glycylyclines; **Km:** kanamycin; **Fos:** fosfomycin; **Rif:** rifampicin; **Cmp:** chloramphenicol; **Ery:** erythromycin; **Neo:** neomycin; **Tmp:** trimethoprim; **Fq:** (fluoro)quinolones; **Nov:** novobiocin; **Fus:** fusidic acid; **AGs:** aminoglycosides; **PolyB:** polymyxin B; **Tmp:** trimethoprim; **Sulf:** sulfamethoxazole; **3rdGC:** cefepime, cefpirome (Lai *et al.*, 2016; Zhi li *et al.*, 2016).

يتواجد نظام الدفع (MexAB-OprM) من عائلة RND في بكتريا

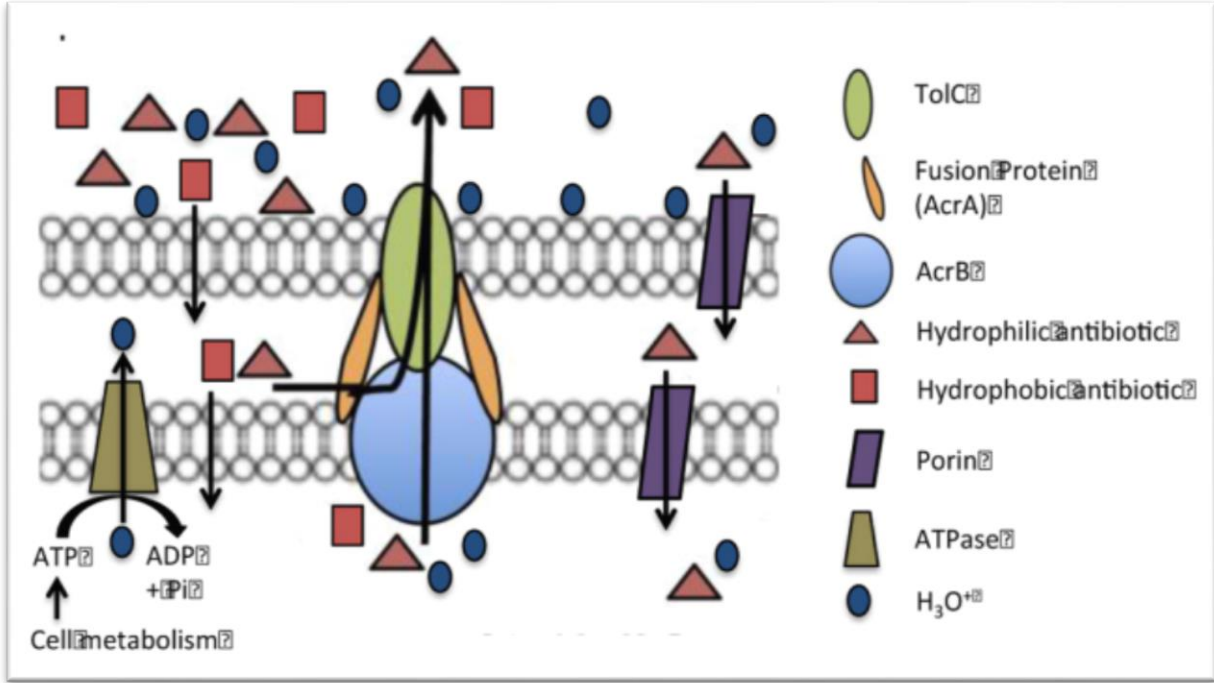
*Pseudomonas aeruginosa*، ونظام الدفع AdeABC فيتواجد في بكتريا *Acinetobacter*

*baumannii*، ويعد نظام الدفع (AcrAB-TolC) في بكتريا *E.coli* الاكثر شيوعا بالنسبة لأنظمة الدفع

الاخري، اذ تنمو في وسط يحتوي على كمية قليلة من المغذيات او عندما تنمو في طور الثبات stationary

كما في الشكل (1-2) الذي يوضح شكل نظام الدفع (AcrAB-TolC)، و يتواجد ايضا في

بكتريا *Salmonella ssp.* و *Klebsiella ssp.* (Anes *etal.*, 2015).



الشكل (1-2): نظام الدفع (AcrAB-TolC) في بكتريا *E. coli* المتكون من البروتين الموجود في الغشاء الداخلي AcrB والبروتينات الموجودة في الفراغ البلازمي AcrA والقناة Toic في الغشاء الخارجي (Amaral et al., 2014).

### 9.2.2.1 تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymeres Chain Reaction

هي عملية تضاعف المادة الوراثية كما ونوعا ملايين المرات بالطرائق الانزيمية وخارج الجسم الحي *In vitro* بزمان قصير جدا. ولإجراء العملية يلزم توفر انزيم البلمرة Taq polymerase، البادئات primers، القواعد النيتروجينية nitrogen bases منقوصة الاوكسجين ثلاثية الفوسفات (dntp)، وقالب الدنا DNA template وجهاز التدوير الحراري thermocycler (الخفاجي، 2008، Ravi et al., 2014). ويمكن استغلال هذه التقنية في التشخيص الجيني للكائنات الحية ومنها افراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae باستعمال البادئات الخاصة بالجين *16SrRNA*، اذ تستعمل بشكل واسع في

تشخيص الكائنات الحية ومنها الاحياء المجهرية، اذ تسهل تشخيص المكروبات التي يمكن تنميتها بالطرائق الزراعية التقليدية والتي تكون صعبة النمو والتشخيص بالطرائق التقليدية ، وتستعمل ايضا بشكل كبير في التعرف على التنوع الميكروبي في البيئة.

تقوم هذه التقنية على اساس ان كل المكروبات تمتلك تسلسلات *16SrRNA* المتكون من تسع مناطق متغيرة (V1-V9) hyper variable regions تتكون من تغيرات منها ما يكون على مستوى الجنس ومنها ما يكون على مستوى النوع، ويتم مضاعفة التسلسلات النيوكليوتيدية للمناطق الثابتة من *16SrRNA* فتستعمل تقنية PCR لتصنيف المكروبات الى اجناس وايضا تستعمل لتصنيف المكروبات من انواع متعددة تعود للجنس نفسه، و تتبادل هذه المناطق مع المناطق الثابتة conserved regions التي تستعمل لتصنيف مجاميع واسعة من المكروبات. فضلا عن ان العديد من البكتريا تمتلك جين *16SrRNA* متطابق بنسبة 99% كما هو الحال في تشابه التسلسلات الجينية للجين التشخيصي لكل من بكتريا *E. coli* و بكتريا *Shigella spp.* ( Jenkins et al., 2014 ; Khalaf and Al-kafaji, 2014 ).

(2012).

# الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

## 2. المواد وطرائق العمل Materials and methods

## 1.2 المواد Materials

## 1.1.2 الاجهزة المختبرية Laboratory equipments

جدول 2-1: الاجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة

التسلسل	الاجهزة المختبرية	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	ثلاجة	refrigerator Kelon (Korea)
2	جهاز الاليزا	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) Biorad (US)
3	جهاز الترحيل الكهربائي	electrophoresis system Optima (Japan)
4	جهاز التقطير	water distillator GFL (Germany)
5	جهاز الطرد المركزي	bench centrifuge Daiham (South Korea)
6	جهاز المازج	vortex FAWEM (Brazil)
7	جهاز تصوير الهلام	gel documentation unit ATTO (Japan)
8	جهاز التدوير الحراري	PCR thermal cycler Bioneer (Korea)
9	جهاز قياس تركيز الدنا	DNA nano drop AcT Gen (Taiwan)
10	حاضنة	incubator Mennert (Germany)
11	حمام مائي	water bath Daiham (South Korea)
12	فرن كهربائي	electreic hot air oven DLTG (China)
13	كابينة الزرع	laminar air flow (hood) Labtech (Korea)
14	كاميرا رقمية	digital camera ATTO (Japan)
15	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة	micropipettes Brand-W(Germany)



Kruss (Germany)	light microscope	مجهر ضوئي	16
Stuart (UK)	hot plate and magnetic stiror	مسخن حراري ممغنط	17
Major science (Taiwan)	ultraviolet transilluminator	مصدر للأشعة فوق البنفسجية	18
Martini (USA)	pH meter	مقياس الرقم الهيدروجيني	19
Webco (Germany)	autoclave	مؤصدة	20
Denver (Germany)	sensitive electric balance	ميزان كهربائي حساس	21

## 2.1.2 المواد الكيميائية Chemical materials

جدول 2-2: المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	المادة الكيميائية	التسلسل	
BiobasicINK (Canada)	agarose	الاكاروز	1
BDH (England)	hydrogen peroxide	بيروكسيد الهيدروجين	2
DIFCO (England)	tetramethyl-p-phenyldiamine dihydrochloride	ثلاثي مثيل-فوسفات-ثنائي امين الفنيلين ثنائي كلوريد الهيدروجيني	3
BDH (England)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	حامض الكبريتيك المركز	4
BDH (Englan)	seder oil	زيت العدسات	5
BDH (England)	ethanol (70%)	كحول اثيلي	6
Bioneer (Korea)	absolute ethanol (99%)	كحول اثيلي مطلق	7

BDH (England)	BaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	كلوريد الباريوم المائي	8
BDH (England)	NaCl	كلوريد الصوديوم	9
BDH (England)	glycerol	كليسيرول	10
Bioneer (Korea)	deionized sterile distal water	ماء مقطر لا أيوني	11
Fluka (Switzerland)	crystal violet powder	مسحوق البنفسج البلوري	12
CDH (UK)	urea	يوريا	13

### 3.1.2 الاوساط الزرعية الجاهزة Ready- made culture media

جدول 2-3: الاوساط الزرعية المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	الوسط الزراعي	التسلسل
Himedia (India)	وسط احمر المثيل-فوكس بروسكاور Methyl Red-Voges -Proskauer	1
Himadia (India)	Blood Agar Base	2
CROMagar (France)	Chromagar Orientation	3
(Holland)	MacConkey Agar	4
Himedia (India)	Urea Agar Base	5
Oxoid (England)	Eosin Methylelen Blue Agar	6
Oxoid (England)	Trypton Soy Agar	7
Himadia (India)	Simmon Citrat Agar	8
Oxoid (England)	Muller-Hinton Agar	9

Oxoid (England)	Hekton Enteric Agar	وسط اكار الهكتون المعوي	10
Oxoid (England)	Nutrient Agar	وسط الاكار المغذي	11
Himedia (India)	Pepton Water	وسط ماء الببتون	12
Oxoid (England)	Brain-Heart Infusion Broth	وسط مرق نقيع القلب والدماغ	13

#### 4.1.2 المحاليل، الصبغات والكواشف Solutions, stains and reagents

جدول 2-4: الصبغات والكواشف والمحاليل المستعملة في الدراسة

التسلسل	الصبغات والكواشف والمحاليل	(المنشأ) الشركة المصنعة
1	محلول التحميل loading dye	Geneaid (Thailand)
2	صبغة بروميد الاثيديوم ethidium bromide	Biobasic INK (Canada)
3	كاشف احمر المثيل methyl red reagent	Himedia (India)
4	كاشف كوفاكس Kovac`s Regent	Vac and Seralnst (Iraq)
5	كاشف فوكس- بروسكاور Voges-Proskauer (VP1-VP2)	Vac and Seralnst (Iraq)
6	محاليل صبغة كرام صبغة البنفسج البلوري صبغة السفرائين الايودين الكحول الايثيلي crystal violet stain safranin stain iodine ethanol %96	Switzerland
7	محلول دارئ الترحيل الكهربائي Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)	Biobasic INC (USA)
8	محلول دارئ الفوسفات الملح phosphate buffer saline	Chemical Point (Germany)
9	محلول ملحي فسلجي normal saline solution	Schuchard (German)

## 5.2.1 المضادات الحيوية Antibiotics

جدول 2-5: اقراص المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	تركيز المضاد مايكروغرام/القرص	الرمز	المضاد الحيوي	التسلسل
Bioanalyse (Turkey)	25	PY	Carbenicillin	1
	30	CTX	Cefotaxime	2
	30	CAZ	Ceftazidime	3
	10	CIP	Ciprofloxacin	4
	10	E	Erythromycin	5
	10	CN	Gentamicin	6
	300	F	Nitrofurantoin	7
	30	NV	Novobiocin	8
	5	RA	Rifampin	9
	10	TE	Tetracycline	10

## 6.1.2 العدد المختبرية Kits

جدول 2-6: العدد المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	المكونات	العدة	التسلسل
Geneaid (Thailand)	-GT Buffer 30 ml -GB Buffer 40 ml -W1 Buffer 45 ml -Wash Buffer 100 ml with Ethanol -Elution Buffer 30 ml -Proteinase K 1.1 with Deionized Sterile Distal Water -GD Columns 100 pcs -2ml Collection Tubes 100 pcs	عدة استخلاص الحمض النووي المجيني Mini Genomic الدنا Kit	1
Bioneer (Korea)	الدنا Ladder	الدليل الحجمي (100-2000) زوج قاعدة	2
Bioneer (Korea)	-Top DNA Polymerase 1U -dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) -Rreaction Buffer, With 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> KCl <sub>2</sub> 30mM -Tris-HCl (pH 9.0) 10mM -Stabilizer and Tracking Dye (Laodding Dye) - Standard 96 PCR tubes	PCR @AccuPower PreMix	3

## 7.1.2 تسلسلات البوادئ Primer sequences

جدول 2-7 تسلسلات البوادئ المستعملة في الدراسة

المصدر	الناتج (زوج قاعدي)	تتابع البادئ (5'-3')	الجين	التسلسل
(Maleki <i>et al.</i> , 2017)	727	F CGAGTGGCGGACGGGTG AGT	16SrRNA	1
		R TCGACATCGTTTACGGC GTGGA		
(Maleki <i>et al.</i> , 2017)	107	F CTCTCAGGCAGCTTAGC CCTAA	acrA	2
		R TGCAGAGGTTTCAGTTTTG ACTGTT		
(Maleki <i>et al.</i> , 2017)	105	F GGTCGATTCCGTTCTCCG TTA	acrB	3
		R CTACCTGGAAGTAAACG TCATTGGT		

## 8.1.2 المواد الاخرى Other materials

جدول 2-8: المواد الاخرى المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	الاداة	التسلسل
Biozek(Switzerland)	petri dishes	أطباق بترى 1
AFMA (Jordan)	microtiter 96 wells plates	أطباق معايرة تحتوي على 96 حفرة 2
Geneaid (Korea)	eppendorf tubes	أنابيب أبندورف 3
-----	tubes, beakers, flasks	أنابيب، بيكرات، فلاسكات 4
AFCO (Jordan)	cotton swabs	مسحات قطنية 5

Girenier (China)	transporter swabs	مسحات قطنية مع وسط نقل	6
Himedia (India)	loop	ناقل	7
AFCO (Jordan)	millipore filter (0.22)	وحدات ترشيح دقيقة	8

## 2.2 طرائق العمل Methods

### 1.2.2 التعقيم Sterilization

تم تعقيم الاوساط الزرعية والمحاليل باستعمال طريقتان بحسب Brown and Smith (2017)

وكالاتي :

#### 1.1.2.2 التعقيم بالحرارة

عقمت جميع الاوساط الزرعية الجاهزة والتركيبية وأغلب المحاليل المستعملة في هذه الدراسة، والتي لا

تتأثر بالحرارة، بجهاز المؤصدة autoclave بدرجة حرارة 121°م وتحت ضغط 15 باوند/أنج<sup>2</sup> لمدة

15دقيقة، أما الزجاجيات فقد تم تعقيمها بالفرن الكهربائي oven عند درجة حرارة 180م لمدة ساعتين.

#### 2.1.2.2 التعقيم بالترشيح

تم تعقيم قسم من المحاليل التي تتأثر طبيعتها بالحرارة مثل السكريات واليوريا وبعض الصبغات،

باستعمال وحدات الترشيح الدقيقة millipore filters ذات قطر 0.22 مايكرومتر.

## 2.2.2 تحضير الاوساط الزرعية Preparation of culture media

### 1.2.2.2 تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة Ready-made cutler media preparation

حضرت الاوساط الزرعية الجاهزة وهي (وسط اكار الكروم اورنتيشن chromagar Orientation وسط اكار المكونكي MacConkey agar ، وسط الايوسين مثلين الازرق Eosine Methyiene Blue ، وسط احمر المثيل - فوكس بروسكاور Methyl Red-Voges Proskauer، وسط اكار السيمون ستريت Simmon's Citrate agar ، وسط ماء الببتون Peptone Water، وسط الاكار المغذي Nutrient agar، وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain-Heart Infusion Broth، وسط اكار تربتون الصويا Trypton Soy agar ووسط اكار مولر- هنتون Muller-Hinton agar ) بحسب تعليمات الشركة المصنعة لها والتي كانت مثبتة على العبوة الخاصة بكل وسط، عقت المؤصدة بدرجة حرارة 121م<sup>2</sup> وضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> لمدة 15 دقيقة، بعدها صبت الاوساط الزرعية في أطباق بتري وأنابيب معقمة وحضنت بدرجة حرارة 37م<sup>2</sup> لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها، بعدها حفظت في الثلاجة بدرجة 4م<sup>2</sup> لحين الاستخدام.

### 2.2.2.2 الاوساط الزرعية التركيبية Laboratory culture media

#### 1.2.2.2.2 وسط اكار اليوريا Urea agar

تم تحضير هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة و ذلك بإذابة 24 غرام من وسط اساس اكار اليوريا في 950 ملليتر من الماء المقطر المعقم ثم عقم الوسط بالمؤصدة، ثم ترك ليبرد إلى درجة حرارة



50م°، ثم أضيف 50 مليلتر من محلول اليوريا 40% ( المحضر بإذابة 40 غرام من اليوريا في 100 مليلتر من الماء المقطر ثم عقم باستعمال وحدات الترشيح Millipore filter ذات القطر 0.22 مايكروليتر)، ثم صب الوسط في انابيب معقمة وحفظ بدرجة 4م لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريا (Tille, 2017).

### 2.2.2.2 وسط أكار الدم Blood agar

حضر وسط اساس أكار الدم Blood agar base حسب تعليمات الشركة المصنعة وعقم بالمؤصدة ثم برد إلى درجة حرارة 50 م°، بعدها أضيف إليه الدم بنسبة 5% ومزج بلطف ثم صب في اطباق بتري معقمة وترك ليتصلب. استعمل هذا الوسط للتحري عن انتاج انزيم الهيموليسين hemolysin من قبل العزلات قيد الدراسة (Forbes et al., 2007).

### 3.2.2.2.2 وسط اكار الهكتون المعوي Hekton enteric agar

حضر هذا الوسط بعد تعقيم الماء المقطر بالمؤصدة ثم برد الى درجة حرارة 50 م°، بعدها اضيف اليه الوسط تحت الظروف المعقمة ومزج جيدا، ثم صب في اطباق بتري معقمة وترك ليتصلب. استعمل هذا الوسط للتفريق بين بكتريا *E. coli* وباقي اجناس العائلة المعوية (Brown and Smith, 2017).

## 3.2.2 تحضير المحاليل Preparation of solution

### 1.3.2.2 محلول العكورة ماكفرلاند McFarland

حضر هذا المحلول مختبريا كما يأتي :

**المحلول (أ):** اذيب 1.175 غرام من كلوريد الباريوم المائي  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  في 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم.

**المحلول (ب):** اضيف 1 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز  $H_2SO_4$  الى 99 مليلتر من الماء المقطر.

اضيف 0.5 مليلتر من المحلول (أ) الى 99.5 مليلتر من المحلول (ب) للحصول على عكارة

بتركيز (  $10^8 \times 1.5$  ) خلية/مليلتر، ومزجت جيدا في قنينة زجاجية معتمة ومحكمة الغلق

لمنع تبخرها وحفظت في مكان مظلم لحين الاستعمال (Vandepitte *et al.*, 2003).

### 2.3.2.2 محلول صبغة البنفسج البلوري 1% Crystal violate solution

حضر هذا المحلول بإذابة 1غم من مسحوق البنفسج البلوري Crystal violate powder في

100 مليلتر من الماء المقطر ثم رشح المحلول باستعمال وحدات الترشيح الدقيقة ذات قطر نفاذية

0.22 مايكروميتر وحفظ في الثلجة لحين الاستعمال. استعمل هذا المحلول في الكشف عن تكوين الغشاء

الحيوي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة (Christensen *et al.*, 1985).

### 3.3.2.2 محلول دارئ الترحيل (TBE) Tris Borate EDTA buffer

حضر هذا المحلول بحسب تعليمات الشركة المصنعة Biobasic بإضافة 10 مليلتر من دارئ TBE بتركيز 10x الى 90 مليلتر من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز 1x من الدارئ في قنينة زجاجية معقمة ثم حفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4م لحين الاستعمال.

### 4.3.2.2 محلول صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide الخاص بالكشف

#### المظهري لمضخات الدفق

حضر محلول خزين تركيزه 5 ملغرام/مليلتر، بأذابة 5 ملغرام من مسحوق صبغة بروميد الايثيديوم في 1 مليلتر من الماء المقطر المعقم ، بعدها حضر خمس تراكيز (5 ، 10 ، 15 ، 20 ، 25) مايكروغرام/مليلتر (Martins *et al.*, 2011).

### 5.3.2.2 محلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS) Phosphate buffer saline

حضر هذا المحلول حسب تعليمات الشركة المصنعة بأذابة 9.86 غرام في 1000 مليلتر من الماء المقطر للحصول على الرقم الهيدروجيني 7.2 . استعمل هذا المحلول في تجربة الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي من قبل العزلات قيد الدراسة .

### 6.3.2.2 محاليل البوادي Primers solutions

حضرت محاليل البوادي وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة bioneer، و ذلك باستعمال الماء المقطر اللأأيوني المعقم من اجل الحصول على تركيز 100 بيكومول/مايكروليتر، اذ تم تحضير محلول كل بادئ

على نحو منفصل فكان كل منها ذا تركيز 10 بيكومول/مايكروليتر، اذ تم اخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين stock solution لكل بادئ واضيف الى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللأأيوني، ثم مزج جيداً بجهاز المازج vortex وحفظ في درجة حرارة -20م لحين الاستعمال، في حين حفظت المحاليل الخزينة للبودئ في درجة حرارة -20 م مع مراعات مزج المحاليل جيداً بعد اخراجها من الثلج بجهاز المازج لغرض مجانستها قبل الاستعمال.

## 4.2.2 تحضير الكواشف Reagents preparation

### 1.4.2.2 كاشف الاوكسيدز Oxidase reagent

حضر هذا الكاشف وذلك بإذابة 1غرام من مادة tetramethyl-P-phenylenediamine dihydrochloride في 100 مللتر من الماء المقطر المعقم وحفظ في قنينة زجاجية معتمة ، استعمل هذا الكاشف للكشف عن قابلية البكتيريا على انتاج انزيم الاوكسيدز (Tadesse and Alem, 2006).

### 2.4.2.2 كاشف الكتاليز Catalase reagent

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

## 5.2.2 العزلات البكتيرية Bacterial isolates

### 1.5.2.2 جمع العينات البكتيرية Bacterial sample collection

جمعت 100 عينة بول من المرضى الذين يعانون من اعراض اصابات المسالك البولية وتحت اشراف الطبيب المختص، من مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد شملت (مستشفى مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي ، مستشفى الطفل المركزي التعليمي ومستشفى بغداد التعليمي والمختبرات التعليمية ومستشفى حماية الطفل التعليمي في مدينة الطب) ، للفترة من 2018/7/10 ولغاية 2018/10/1. اذ استعملت حاويات الجمع countainers لجمع العينة من منتصف البول في الصباح الباكر لجميع المرضى، ثم زرعت العينات وذلك باخذ 100 مايكروليتر من البول وزرعها على عدة اوساط تفريقية ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة. بعدها نبذت العينات مركزيا بجهاز النبذ المركزي centrifuge بسرعة 200 دورة/الدقيقة لمدة 5 دقائق، ثم مزج الراسب بجهاز المازج لمدة نصف دقيقة، بعدها وضعت قطرة من الراسب على الشريحة الزجاجية وفحصت تحت المجهر الضوئي باستخدام قوة تكبير 40×، يعد وجود 10 خلايا دم بيض او اكثر في حقل المجهر فضلا عن وجود ما بين 50-200 مستعمرة نقية نامية في الطبق نتيجة موجبة.

### 2.5.2.2 التشخيص المزرعي Cultural identification

درست الصفات المظهرية للمستعمرات المعزولة بعد زراعة العزلات البكتيرية وتنقيتها على اوساط زرعية مختلفة (وسط اكار المكونكي، وسط الايوسين مثلين الازرق، وسط اكار الهكتون المعوي، وسط اكار الدم ووسط اكار الكروم اورينتيشن) وشملت الدراسة كل من الشكل والحجم والقوام واللون والحافات والارتفاعات للمستعمرات البكتيرية المعزولة (Wanger et al., 2017).

### 3.5.2.2 Microscopic identification المجهري

حضرت مسحات من العزلات البكتيرية التي تم تنميتها على وسط اكار المكوني MacConkey عمرها 18-24 ساعة، بتقانة كرام، ثم فحصت تحت المجهر الضوئي لرؤية شكل الخلايا وترتيبها والوانها تبعا لتفاعلها مع صبغة كرام (Levinson, 2016).

### 4.5.2.2 Biochemical identification الكيموحيوي

#### 1.4.5.2.2 Oxidase test اختبار الاوكسديز

نقلت مستعمرة نامية على وسط اكار المكوني عمرها 24 ساعة على ورقة ترشيح filter paper بوساطة عيدان خشبية wooden sticks معقمة، ثم اضيف اليها قطرة من كاشف الاوكسديز المحضر مسبقاً وفقاً للفقرة (1.4.2.3). يعد تغير اللون الى الارجواني في (30-60) ثانية دليل على انتاج انزيم الاوكسديز oxidase (Hemraj et al., 2013).

#### 2.4.5.2.2 Catalase test اختبار الكتاليز

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

### 3.4.5.2.2 اختبار الاندول Indole test

اجري هذا الاختبار من خلال تلقيح انابيب الاختبار الحاوية على وسط ماء البيتون pepton water بالمستعمرات البكتيرية، ثم حضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م°، بعدها أضيف للوسط 1-2 قطرة من كاشف كوفاكس kovac's reagent. يعد ظهور حلقة حمراء اللون على سطح الوسط دليل على ايجابية الاختبار (Forbes et al., 2007).

### 4.4.5.2.2 اختبار المثيل الاحمر Methyl red test

لقتح الانابيب الحاوية على وسط المثيل الاحمر- فوكس بروسكاور (MR-VP) بالمستعمرات البكتيرية، ثم حضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م°، ثم اضيف لكل انبوبة 4-5 قطرات من كاشف المثيل الاحمر methyl red reagent. يعد تحول لون الوسط الى الاحمر دليل على ايجابية الاختبار (Hemraj et al., 2013).

### 5.4.5.2.2 اختبار فوكس - بروسكاور Voges- Proskauer test

لقتح الانابيب الحاوية على وسط المثيل الاحمر- فوكس بروسكاور (MR-VP) بالمستعمرات البكتيرية، ثم حضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م°، ثم اضيف لكل انبوبة 10 قطرات من المحلول الاول (VP1) الالفا - نفثول alpha - naphthol ثم 5 قطرات من المحلول الثاني (VP2) هيدروكسيد البوتاسيوم KOH ثم رجت الانابيب جيدا، ولوحظت النتائج بعد 5 دقائق، ثم سجلت النتائج بعد نصف ساعة. ظهر اللون الاحمر دليل على ايجابية الاختبار (Brown and Smith, 2017).

### 6.4.5.2.2 اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

زرع وسط السيمون ستريت بمستعمرات بكتيرية تم تنميتها على وسط المكونكي، بطريقة التخطيط، وحضن عند درجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة. يعد تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق مع ظهور نمو بكتيري دلالة على النتيجة الموجبة. استعمل هذا الاختبار لغرض معرفة قابلية العزلات البكتيرية على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون والطاقة وعلى استهلاك أملاح الامونيوم كمصدر للنيتروجين ( Brown and Smith, 2017).

### 7.4.5.2.2 اختبار اليوريز Urease test

تم تلقيح الانابيب الحاوية على وسط اكار اليوريا الذي تم تحضيره وفقاً للفقرة (2.2.2.3) من خلال التخطيط على سطح الوسط المائل، ثم حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م°، يعد تحول لون الوسط الى اللون الوردي دليل على ايجابية الاختبار. اجري هذا الاختبار للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز (Tille, 2017).

### 8.4.5.2.2 اختبار انتاج الهيموليسين Hemolysin production test

زرعت العزلات البكتيرية على الاطباق الحاوية على وسط اكار الدم Blood agar، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة، ثم قرئت النتائج بملاحظة نوع التحلل ( الفا ، بيتا ، كما ) (Tille, 2017).



## 6.2.2 حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها Preservation of bacterial isolates

### 1.6.2.2 الحفظ قصير المدى Short-term preservation

زرعت الانابيب الحاوية على وسط الاكار المغذي Nutrient agar بطريقة التخطيط و بصورة مائلة slant بالعزلات البكتيرية بطريقة التخطيط، وحضنت الانابيب بدرجة 37م لمدة 24 ساعة، وجددت العزلات شهريا (Harley and Prescottte, 2002).

### 2.6.2.2 الحفظ طويل المدى Long-term preservation

لقت الانابيب الحاوية على 5 مليلتر من وسط مرق نقيع القلب والدماغ المحضر مسبقا وفقا للفقرة (1.2.2.3) والمضاف اليه 15% كليسيروول بعزلات بكتريا *E. coli*، ثم حضنت هذه الانابيب بدرجة 37م لمدة 24 ساعة، بعدها حفظت الانابيب في درجة -20م لحين الاستعمال (WH, 2003).

## 7.2.2 اختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Antibiotic resistance test

اختبرت حساسية بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية باستعمال طريقة kirby-baure بحسب ما جاء في ( Vandepitte *et al.* (2003) وكالاتي :

1- نقلت (3-5) من المستعمرات التي تم تمييزها على وسط اكار المكونكي بعمر 24 ساعة الى انبوبة تحوي على 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي normal saline، وضبطت عكارة المحلول مع عكارة محلول ماكفرلاند 0.5 المحضر مسبقا وفقاً للفقرة (1.3.2.3) والذي يعادل  $(10^8 \times 1.5)$  خلية/مليلتر.

2- ادخلت المسحة القطنية المعقمة في الانبوبة الحاوية على العالق البكتيري وتم تدويرها وضغطها على الجدار الداخلي للانبوبة لإزالة اللقاح الزائد وبعد ذلك مررت على اطباق حاوية على وسط اكار مولر- هنتون عدة مرات وباتجاهات مختلفة للحصول على نمو متجانس.

3- وضعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط المزروع وعلى ابعاد متساوية وضغطت الاقراص بلطف باستعمال الملقط المعقم وبعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.

4- سجلت نتائج اقطار مناطق التثبيط حول الاقراص بالملتر وذلك باستعمال المسطرة، ثم قورنت النتائج بجداول قياسية (CLSI, 2017).

## 8.2.2 اختبار قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation test

تم الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي باستعمال طريقة الصفيحة العيانية microtiter plate المعقمة

ذات (96) حفرة حسب ما جاء في *Fusco et al.* (2017) مع اجراء بعض التحويلات وكالاتي:

1- لقع وسط مرق نقيع القلب والدماغ بالمستعمرات البكتيرية، بعدها حضن لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37°م.

2- وضع في حفر العمود الاول لطبق المعايرة 200 مايكروليتر من نقيع القلب والدماغ غير الحاوي على البكتيريا (سيطرة سالبة).

- 3- وضع في الحفر الثلاثة الاولى للعمود الثاني 200 مايكروليتر من وسط مرق نقيع القلب والدماغ الملحق بالعزلة البكتيرية الاولى (ثلاث مكررات لكل عزلة)، بعدها اتبعت الطريقة نفسها لكل عزلة الى العمود الاخير.
- 4- حضنت اطباق المعايرة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م، وبعد الحضانة تم التخلص من محتوى الحفر ثم غسلت بمحلول دارئ الفوسفات الملحي المحضر مسبقاً وفقاً للفقرة (5.3.2.3).
- 5- اضيف 200 مايكروليتر من صبغة البنفسج البلوري crystal violate بتركيز 1% المحضر مسبقاً وفقاً للفقرة (3.3.2.3) لمدة 45 دقيقة، ثم ازيلت الصبغة بغسلها بالماء المقطر المعقم وترك الطبق ليحفظ بدرجة حرارة الغرفة لمدة 45 دقيقة.
- 6- اضيف 200 مايكروليتر من كحول الايثانول بتركيز 99%.
- 7- قيست الكثافة الضوئية ( OD ) باستخدام جهاز الاليزا ELISA وعند طول موجي 630 نانومتر.
- 8- تم تحديد كفاءة العزلات في انتاج الغشاء الحيوي بمقارنة القراءات وفقاً للمعادلات الآتية:
- أ- تعد العزلة غير مكونة للغشاء الحيوي non-adherent اذا كان معدل الكثافة الضوئية للسيطرة اكبر او يساوي معدل الكثافة الضوئية للعزلة ( $OD_c \geq OD$ ).
- ب- تعد العزلة ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي weakly adherent اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من معدل الكثافة الضوئية للسيطرة او يساوي او اصغر من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة ( $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ ).

ت- تعد العزلة متوسطة التكوين للغشاء الحيوي moderately adherent اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة او تساوي او اصغر من اربعة اضعاف السيطرة ( $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ ).

ث- تعد العزلة شديدة التكوين للغشاء الحيوي strong adherent اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من اربعة اضعاف معدل السيطرة ( $OD > 4 \times OD$ ).

## 9.2.2 الكشف المظهري عن مضخات الدفق Morphological detection of efflux pump

حضرت التخافيف العشرية للعزلات البكتيرية كافة باستعمال محلول الملح الفسلجي المعقم وقورنت عكارته مع محلول ثابت العكورة القياسي (ماكفرلاند). اجري هذا الكشف على العزلات البكتيرية التي تمتلك صفة المقاومة للمضادات الحيوية والتي لها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي biofilm، باعتماد الطريقة المحورة عن طريقة العجلة الخشبية EtBr-agar cartwheel method، باستعمال وسط اكار تربتون الصويا و صبغة بروميد الاثيديوم بتراكيز مختلفة حسب ما جاء في *Martins et al.* (2013) وكما يأتي:

1- حضرت تراكيز مختلفة من صبغة بروميد الاثيديوم (5، 10، 15، 20، 25) مايكروغرام /مليلتر،

بإضافة كميات مختلفة من الصبغة أعلاه الى وسط اكار تربتون الصويا بعد تعقيمه وتبريده قليلا.

2- رجت الأوساط جيدا وبعد تعقيمها صبت في أطباق معقمة تم تقسيمها مسبقا بصورة شعاعية،

وحفظت في درجة حرارة الثلاجة لحين الاستعمال.

3- مررت المسحات القطنية المعقمة على العالق البكتيري المخفف، ثم ضغطت على الجدار الداخلي

للتخلص من المزروع الزائد، ثم زرعت بشكل خط شعاعي من حافة الطبق الى مركزه لكل عزلة

ولكل تركيز، بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° ولمدة 16 ساعة.

4- اختبرت العزلات البكتيرية وذلك باستعمال مصدر للاشعة فوق البنفسجية لملاحظة شدة التألق.

## 10.2.2 استخلاص الحامض النووي المجيني Genomic DNA extraction

استعملت العدة المجهزة من قبل شركة Geneaid لغرض استخلاص الحامض النووي المجيني الدنا، اذ تم الاستخلاص بحسب البروتوكول المرفق، واستعمل جهاز قياس تركيز الدنا DNA nano drop لقياس نقاوة وتركيز الحامض النووي المجيني الدنا.

## 11.2.2 تحضير هلام الاكاروز Preparation of agarose gel

حضر بحسب طريقة Sambrook and Russell (2001) وكالاتي:

1- اذيب 1.5 غرام من هلام الاكاروز في 100 مليلتر من محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1x

وباستخدام الصفيحة الحرارية لمدة 15 دقيقة وبدرجة حرارة 60 م°

2- ترك الهلام ليبرد الى درجة حرارة 50 م° وبعدها اضيف 5 مايكروليتر من صبغة بروميد الايثيديوم

ومزجت جيدا مع الهلام.

3- صب هلام الاكاروز في قالب الترحيل (Tray) بعد تثبيت الامشاط فيه، بعدها ترك ليتصلب في

درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. ثم ازيلت الامشاط من الهلام بعناية للحصول على الحفر.

## 12.2.2 التحري عن الحامض النووي المجيني المستخلص Extracted DNA

1- مزج 5 مايكروليتر من عينة الدنا مع 0.5 مايكروليتر من محلول التحميل loading dye،

بعدها نقل المزيج الى الحفر الموجودة في هلام الاكاروز تركيزه 1.5%.

2- نقل القالب الى حوض جهاز الترحيل الكهربائي tank الحاوي على دارئ TBE بتركيز 1x، اذ غمر سطح الهلام بمحلول الدارئ، ورحلت عينات الدنا بإمرارها على فرق جهد قدره 100 فولت ولمدة ساعتين.

3- حددت مواقع حزم الدنا المستخلص باستعمال مصدر للاشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 320 نانوميتر، ثم صور الهلام لغرض التأكد من وجود الدنا ( Sambrook and Russell, 2001).

### 13.2.2 تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction

حضر مزيج هذا التفاعل باستعمال عدة PCR PreMix®AccuPower وبحسب تعليمات الشركة المصنعة وكالاتي:

1- حضر مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل في انابيب (PCR) المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل مع اضافة المكونات الاخرى لمزيج التفاعل كما في جدول (9-2).

2- اغلقت الانابيب ومزجت بجهاز المازج لمدة 5 ثوان.

3- نقلت الانابيب الى جهاز التدوير الحراري thermocycler لتفاعل البلمرة المتسلسل لغرض اجراء عمليات تضخيم الدنا amplification على وفق الظروف الحرارية المثلى للدورات Thermo Cycling Conditions (Sambrook and Russell, 2001). واجري تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال جهاز التدوير الحراري بعد ان تمت برمجته حسب التفاعل المبين في الجدول 10-2 (Maleki et al., 2017).

الجدول 2-9: مكونات وحجوم مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

التسلسل	المكونات	الحجم بالميكروليتر
1	محلول PreMix®AccuPower	5
2	مستخلص الدنا المستعمل كقالب Template DNA	3
3	البادئ الامامي Forward Primer	1.5
4	البادئ العكسي Reversed Primer	1.5
5	الماء اللاأيوني الخالي من الانزيم Deionized Nuclease Free Water	14
6	الحجم النهائي Total volume	25

الجدول 2-10: الظروف المثلى لإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

التسلسل	المرحلة	درجة الحرارة المثوية (م)	الوقت	عدد الدورات
1	مرحلة المسخ الاولي Initial DNA Denaturation	95	5 دقائق	دورة واحدة
2	مسخ ال الدنا DNA Denaturation	95	30 ثانية	30 دورة

	30 ثانية	<i>16srRNA</i>	<i>acrA/acrB</i>	الارتباط Annealing	3
		60	52		
	45 ثانية	72		الاستطالة Extention	4
دورة واحدة	5 دقائق	72		مرحلة الاستطالة النهائية Final Extention	5

### 14.2.2 التحري عن وجود حزم الدنا المضخم

1- نقل 5 مايكرو لتر من الدنا المضخم (ناتج تفاعل PCR) الى الحفر في هلام الاكاروز تركيزه 1.5% .

2- نقل 4 مايكرو لتر من الدليل الحجمي DNA ladder حجمه 100-2000 زوج قاعدة في الحفرة الاولى لقياس حجم الدنا المضخم ، وذلك بمقارنة حجم الجين المضخم مع حجوم الدليل الحجمي.

3 - غمر سطح الهلام بالدارئ TBE buffer بتركيز 1x، ورحلت عينات الدنا بإمرارها على فرق جهد قدره 100 فولت ولمدة 80 دقيقة، بعدها تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية UV-transiluminator وبطول موجي قدره 260 نانوميتر، و صور بجهاز تصوير الهلام gel documentation unit، لتحديد الحزم وقياس اوزانها الجزيئية عند مقارنتها مع مواقع الحزم التابعة الى الدليل الحجمي ladder ذات الأوزان الجزيئية المعروفة 100-2000 زوج قاعدة.



## 15.2.2 التحليل التتابعي للجينات DNA sequencing

ارسلت عينات الدنا للجينات *acrA*, *acrB*, *16srRNA* مع البوادئ (F +R) الى شركة  
Macrogen Inc (South Korea Geumchen, Seoul)، وتم تحليل النتائج وفقا لبرنامج  
DNASTAR lasergene EditSeq، المتوفر على موقع NCBI لمعرفة تسلسل وعدد القواعد  
النيتروجينية.

# الفصل الثالث

## النتائج والمناقشة

### 3. النتائج والمناقشة Results and discussion

#### 1.3 عزل بكتريا *Escherichia coli*

جمعت 100 عينة بول من المرضى الذين يعانون من اصابات المسالك البولية urinary tract infections (UTIs) من مستشفى الامامين الكاظمين (ع) التعليمي، مستشفى الطفل المركزي التعليمي ومستشفى بغداد التعليمي ، مستشفى حماية الاطفال التعليمي والمختبرات التعليمية في مدينة الطب ، للمدة من 2018/7/10 الى 2018/10/1، وبعد اجراء الفحوصات المظهرية، المجهرية، البايوكيميائية والجزئية تم الحصول على 50 عزلة تعود الى بكتريا *E. coli* كما موضح في الجدول (3-1)

#### 1.1.3 التشخيص المظهري Morphological identification

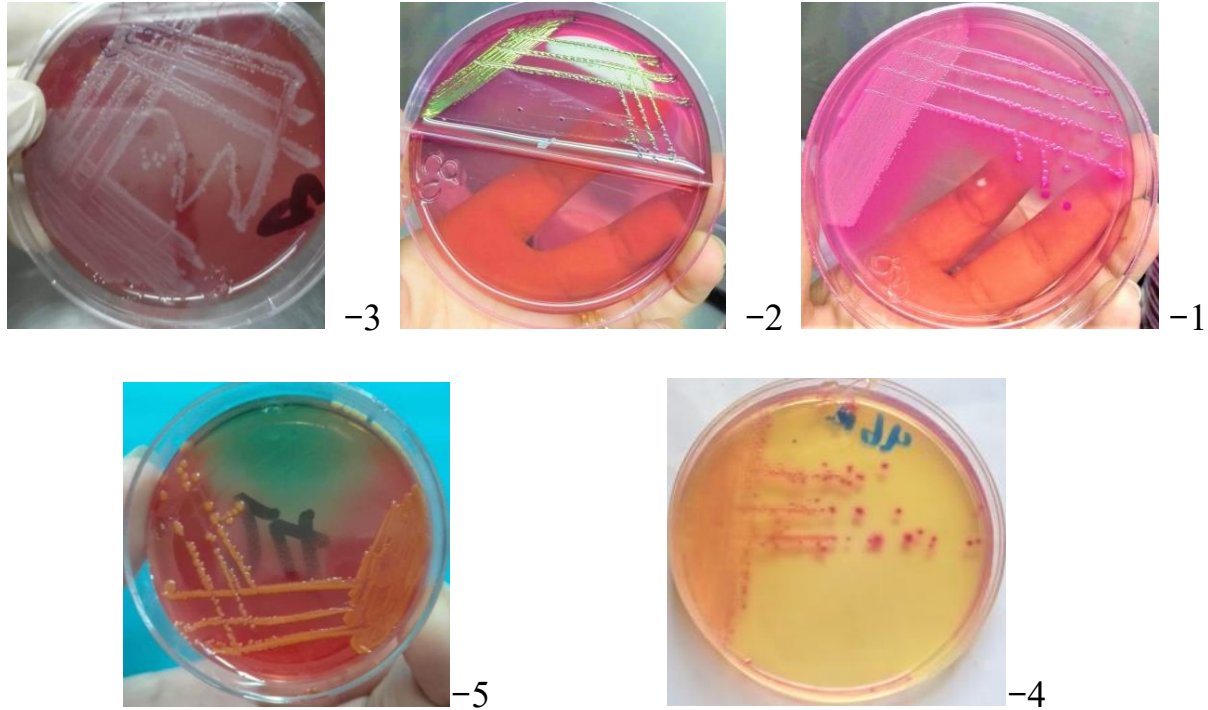
شخصت عزلات بكتريا *E. coli* مبدئياً بالاعتماد على الصفات المظهرية وذلك بعد تمييزها على كل من وسط اكار المكونكي MacConkey agar ، وسط اكار الايوسين مثلين الازرق Eosin Methyline (EMB) Blue agar ، وسط اكار الدم Blood agar وسط اكار الكروماجين Chromagar Orientation ووسط اكار الهكتون المعوي Hekton Enteric agar. اوضحت النتائج ان البكتريا كانت مخمرة لسكر اللاكتوز فأعطت مستعمرات وردية، ناعمة ولماعة وذات حافة حادة على وسط اكار المكونكي التفريقي الذي يحتوي على املاح الصفراء وصبغة البنفسج البلورية crystal violet التي تسمح بنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام بضمنها العائلة المعوية وتثبط نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام. واعطت العزلات مستعمرات خضراء معدنية لماعة على وسط اكار الايوسين مثلين الازرق وهذه الصفة من الصفات المميزة لبكتريا *E. coli* عن غيرها من افراد العائلة المعوية، نتيجة لاحتواء الوسط على صبغات الايوسين والمثليين

الازرق التي تترسب في الوسط الحامضي بعد ارتباطها مع بعضها فتعطي لمعاناً اخضر معدنياً مما يدل على ان البكتريا انتجت الحوامض العضوية نتيجة لتخميرها سكريات اللاكتوز والسكروز. اما وسط اكار الكروماجين فان البكتريا تنتج انزيمات  $\beta$ -glucuronidases تعمل على تحليل المولد اللوني المترافق chromagenic conjugate او ما يسمى  $\beta$ -glucuronid chromagenic substrate فتحرر الحامل اللوني chromophore فتعطي بذلك اللون الوردي للمستعمرات البكتيرية. وكانت المستعمرات التي تم تمييزها على وسط اكار الدم اغلبها غير محللة للدم ما عدا ثلاثة عزلات (6%) كانت محللة للدم تحلل كامل من نوع بيتا  $\beta$ -hemolysis مما يدل على انتاج انزيم الهيمولايسين hemolysin كما موضح في الشكل (1-3) و الملحق (2).

عند تنمية المستعمرات البكتيرية على وسط اكار الهكتون المعوي وجد انها اظهرت مستعمرات صفراء الى برتقالية اللون نتيجة لكونها بكتريا مخمرة لسكر اللاكتوز، اذ يعد هذا الوسط من الاوساط التفريقية التي تفرق بين البكتريا السالبة لصبغة كرام المخمرة لسكر اللاكتوز وغير المخمرة لسكر اللاكتوز، كذلك يفرق بين كل من بكتريا *Salmonella* و بكتريا *Shigella*. وهذا يتفق مع ما جاء في (Wanger et al., 2017; ) (Jawetz et al., 2016; Sharmin et al., 2010).

اظهرت النتائج التي توصل اليها الباحث Bhattacharyya et al. (2015) في الهند ان نسبة عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية المحللة للدم كانت (10%)، كما اشار الى ان البكتيريا كانت متغايرة في انتاج انزيم الهيمولايسين hemolysin لذا فإنها كانت ضعيفة الضراوة. وبينت الدراسة التي اجراها الباحث Sharmin et al. (2010) ان معظم العزلات البكتيرية اظهرت مستعمرات

وردية على وسط اكار الكروماجين و مستعمرات بيضاء صغيرة حادة الحواف على وسط اكار الدم في حين ان (%72) منها اظهرت مستعمرات وردية على وسط اكار المكونكي.



الشكل (1-3): الشكل المظهري لمستعمرات بكتريا *E. coli* على عدة اوساط تشخيصية وهي (1- مستعمرات وردية على وسط اكار المكونكي MacConkey agar، 2- مستعمرات خضراء معدنية لماعة على وسط اكار الايوسين مثيلين الازرق Eosin Methylene Blue agar، 3- مستعمرات بيضاء حليبية غير محللة للدم على وسط اكار الدم Blood agar، 4- مستعمرات وردية على وسط اكار الكروم اورنتيشن Chromagar orientation 5- مستعمرات برتقالية على وسط اكار الهكتون المعوي Hekton Enteric agar).

### 2.1.3 Microscopic identification التشخيص المجهرى

تم اجراء التصبغ بصبغة كرام Gram's stain وذلك عن طريق تحضير مسحة من المستعمرة النامية على وسط اكار المكوني عمرها (18-24) ساعة، ظهرت خلايا البكتريا عصوية قصيرة سالبة لصبغة كرام وغير مكونة للأبواغ non spore forming، وهذه النتائج تتفق مع ما جاء في Levinson (2016).

### 3.1.3 Biochemical identification التشخيص الكيموحيوي

تم اجراء الاختبارات الكيموحيوية biochemical على جميع العزلات، فكانت جميعها موجبة لاختبار الكتاليز catalase test، اذ ان بكتريا *E. coli* قد عملت على تحليل الكاشف بيروكسيد الهيدروجين الى ماء و أوكسجين . وكانت البكتريا سالبة لاختبار الاوكسديز oxidase test من خلال عدم تحول لون المستعمرات الى الارجواني عند اضافة الكاشف، اذ ان البكتريا لا تمتلك انزيم cytochrom oxidase كمستقبل للهيدروجين، وسالبة لاختبار اليوريز urease test لعدم تحول لون الوسط الامر الذي يؤكد ان البكتريا غير مستهلكة لليوريا لعدم امتلاكها انزيم اليوريز urease.

اما نتائج اختبارات مجموعة ال IMViC فكانت البكتريا موجبة لكل من اختبار الاندول indole test نتيجة لظهور حلقة حمراء على سطح الوسط في طبقة الكحول الايزوميلي isoamyl alcohol نتيجة لتحلل الحامض الاميني التربتوفان triptophane بواسطة انزيم tryptophase، ويعد هذا الكشف مهماً في التفريق بين بكتريا *E. coli* وافراد العائلة المعوية الاخرى وذلك بعد الكشف عنه باستعمال كاشف كوفاكس Kovac's reagent، و موجبة لاختبار المثل الاحمر methyl red test نتيجة لوجود الحامض الناتج

من استهلاك وتخمير البكتريا لسكر الكلوكوز glucose و الببتوز peptose مما ادى انتاج الحامض وتغير الاس الهيدروجيني للوسط مما ادى الى تحول لون الوسط الى اللون الاحمر.

كانت البكتريا ايضا سالبة لاختبار الفوكس-بروسكاور Voges-Proskauer نتيجة ظهور اللون الاصفر الى البني للوسط السائل الذي يعود سببه الى عدم تحويل البكتريا لسكر الكلوكوز glucoe الى استايل مثيل كاربونيل acetylmethylcarbinol (الاستون Acetone)، مما يؤدي الى عدم تفاعل الكاشفين (VP1) alphanaphthol و (VP2) potassium hydroxide مع الاستون Acetone الناتج، وكانت سالبة لاختبار السترات Citrate الذي يدل على عدم استعمال البكتريا للسترات كمصدر وحيد للكربون نتيجة لعدم امتلاكها لأنزيم citrate permease، فكانت النتيجة عدم تغير لون الوسط للون الاخضر المزرق، لعدم انتاج حامض الستريك citric acid وعدم تغير الاس الهيدروجيني pH، وهذا يتوافق مع ما جاء في كل من ( Tille, 2017; Brown and Smith, 2017; Sharmin *et al.*, ) (2010).

### 4.1.3 التشخيص الجزيئي Molecular identification

اخضعت جميع العزلات البكتيرية الى التشخيص الجزيئي وذلك باستعمال تقانة PCR، بالاعتماد على الجين التشخيصي *16SrRNA* الذي يتميز بكونه جيناً ثابتاً و قليل التغيرات لمدة طويلة في النوع البكتيري، واطهرت النتائج ان التسلسل الخاص بالجين التشخيصي الخاص ببكتريا *E. coli* موجود في جميع العزلات وبنسبة (100%)، وبالمقارنة مع الحزم المتضاعفة والدليل الحجمي DNA ladder وجد ان الحزم

النتيجة كانت ذات وزن جزيئي 727 زوج قاعدة كما موضح في الشكل (A2-3) و (B2-3) والملاحظ (A 5) و (A 6).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسة المحلية التي توصل اليها الباحثان جعاز وهميم (2016) اذ بلغت نسبة امتلاك العزلات البكتيرية للجين *16SrRNA* (100%)، كما تتفق الدراسة الحالية ايضا مع الدراسة التي توصل اليها الباحث *Maleki et al.* (2017) في ايران والدراسة التي توصل اليها الباحث *Lai et al.* (2016) في ماليزيا، اذ تم التشخيص الجزيئي لجميع العزلات البكتيرية باستعمال الجين التشخيصي *16SrRNA*. وايضا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي اجراها الباحث *Jenkins et al.* (2012) التي اظهرت ان جميع عزلات بكتريا *E. coli* كانت تمتلك للجين التشخيصي *16SrRNA*.

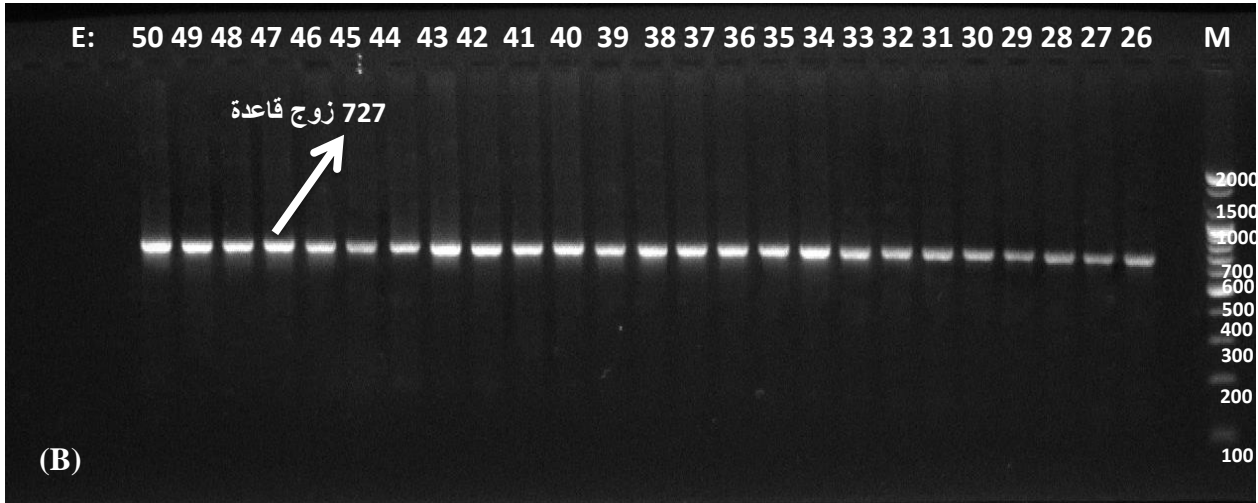
تعد هذه الطريقة من اسرع وادق الطرائق في تشخيص البكتريا واكثرها حساسية في تشخيص الممرضات، ويحتوي هذا الجين على المناطق الثابتة *conserved regions* التي تتداخل مع المناطق المتغيرة *variable regions* البالغ عددها 9 مناطق متغايرة التي يستفاد منها في تحديد هوية الجنس والنوع البكتيري وذلك لكون الجين التشخيصي *16SrRNA* موجودا في كل الانواع البكتيرية، كما انه قليل التغيرات او ان التغيير العشوائي في التسلسل الجيني يكون ضئيل جدا على مر الزمن زوج قاعدة من هذا الجين تكون كافية جدا للأغراض التعليمية والبحثية (Suardana, 2014; Srinivasan et al., 2015).



جدول (1-3): نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا *E. coli* .

الاختبار	Test	النتائج	Result
النمو على وسط المكونكي	MacConkey agar	مستعمرات وردية مخمرة لسكر اللاكتوز	lactose fermenting
النمو على وسط الايوسين مثلين الازرق	EMB agar	مستعمرات خضراء معدنية لامعة	green metallic sheen
النمو على وسط اكار الدم	Blood agar	متغايرة variable	
النمو على وسط اكار الكروم	Chromagar orientation	مستعمرات وردية صغيرة	
النمو على وسط اكار الهكتون المعوي	Hekton Enteric agar	مستعمرات برتقالية صغيرة مخمرة لسكر اللاكتوز	
صبغة كرام	gram stain	-	
شكل الخلايا وتجمعها		عصيات rods	
انزيم الاوكسيديز	oxidase	-	
انزيم الكتاليز	catalase	+	
انزيم اليوريا	urease	-	
الاندول	Indole	+	
المثيل الاحمر	methyl red	+	
فوكس-بروسكاور	Voges-Proskauer	-	
السترات	citrate	-	
الجين التشخيصي	16SrRNA	+	

(+) اختبار موجب ، (-) اختبار سالب



الشكل (2-3): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *16SrRNA* (727 زوج قاعدة) لعزلات بكتريا *E. coli* في 1.5% اكاروز agaros وفرق جهد 100 فولت لمدة 80 دقيقة . المسار M يمثل الدليل الحجمي (100-2000 زوج قاعدة) ، المسارات (E: 25 - 1) في الشكل (A 2-3) والمسارات (E: 50 - 26) في الشكل (B 2-3) تمثل عزلات بكتريا *E. coli* التي تمتلك الجين *16SrRNA*

بعد التشخيص المظهري والكيموحيوي والجزئي تم الحصول على 50 (50%) عزلة بكتيرية تعود الى بكتريا *E. coli*. اذ تعد بكتريا *E. coli* المسبب الرئيس لاصابات المسالك البولية (UTIs)، اذ تصيب حوالي 90% من المرضى الذين يعانون من اصابات المسالك البولية ( UTIs ) في العالم (Levinson, 2016). تتوافق الدراسة الحالية مع الكثير من الدراسات المحلية والعالمية التي ذكرت ان بكتريا *E. coli* كانت من المسببات الرئيسية لاصابات المسالك البولية ومن بين الدراسات المحلية هي التي قام بها كل من شويخ وجاسم (2016) في مستشفيات مدينة بغداد والمناطق المحيطة بها، والدراسة المحلية التي قامت بها الباحثة البوصالح (2014) في مدينة القادسية، فكانت نسبة عزل البكتريا (41.6%) و(56%) من عينات البول على التوالي ، وكانت ايضا مقارنة للدراسة التي اجراها الباحثان Ponnusamy و Nagappan (2013) في الهند، و ايضا مقارنة للدراسة التي اجراها الباحث Hegazy *et al.* (2018) في مصر، فكانت نسبة بكتريا *E. coli* (54.7%) و(53.85%) من البكتريا المسببة لاصابات المسالك البولية على التوالي. بينما لم تتفق هذه الدراسة مع نتائج الدراسة التي توصل اليها الباحثان جعاز وهميم (2016) في مدينة القادسية، اذ بلغت نسبة العزلات البكتيرية المعزولة من اصابات المسالك البولية (39.06%).

ان هذا الاختلاف في نسبة الاصابة يعود الى الاختلاف في الظروف الجغرافية والصحية وعدد العينات فضلا عن تناول المضادات الحيوية قبل اخذ العينة (شويخ وجاسم، 2016). كما ان سبب النسبة العالية لبكتريا *E. coli* قد يكون بسبب تكيف البكتريا للعيش في بيئة المسالك البولية وتحملها للظروف البيئية غير الملائمة فضلا عن امتلاكها الى عوامل ضراوة كثيرة وقوية تزيد من قابليتها على احداث الاصابة منها امتلاكها لعوامل الالتصاق التي تمكن البكتريا من الخطوة الاولى من الاصابة وهي الالتصاق *adherence*، ونتاج المحفظة *capsule* والسموم *toxins* المحللة لأنسجة المضيف، واهم سبب في النسبة العالية لهذه

البكتريا في اصابات المسالك البولية هو انتقال البكتريا من فتحة المخرج التي تعد البيئة الطبيعية لها الى الفتحة البولية (Raeispour and Ranjbar, 2018).

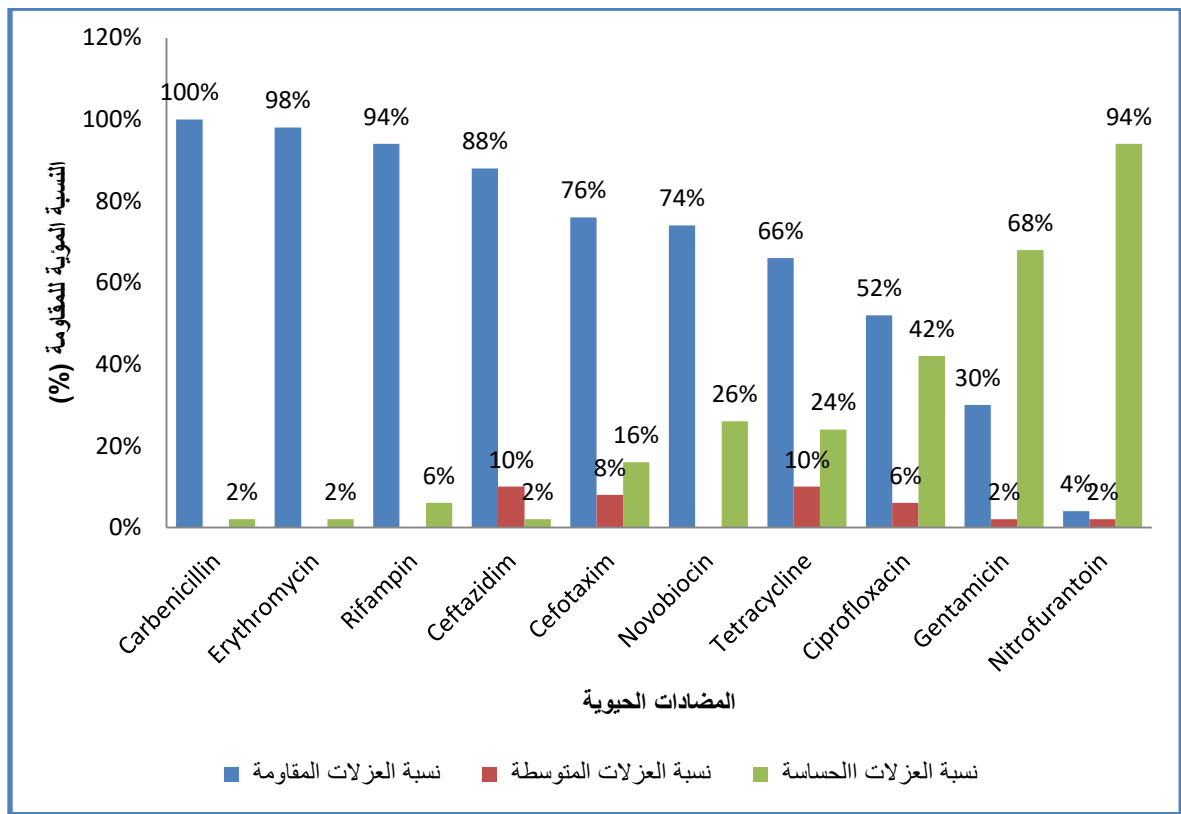
### 2.3 مقاومة بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية Antimicrobial resistance

اخذت حساسية العزلات البكتيرية لعشرة مضادات حيوية مختلفة وقد كانت البكتريا متباينة في مقاومتها لهذه المضادات المختبرة، اذ كانت جميع العزلات البكتيرية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية multi-drug resistance (MDR).

اظهرت النتائج ان 50 (100%) عزلة بكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي carbenicillin ، 49 (98%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي erythromycin ، 47 (94%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي rifampin ، 44 (88%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي ceftazidime ، 38 (76%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي cefotaxime ، 37 (74%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي novobiocin ، 33 (66%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي tetracycline ، 26 (52%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي ciprofloxacin ، 15 (30%) عزلة مقاومة للمضاد الحيوي gentamicin وعزلتان (4%) مقاومة للمضاد الحيوي nitrofurantoin ، كما موضح في الشكل (3-3) و الملحق (1).

تتفق نتائج هذه الدراسة بالنسبة للمضاد الحيوي carbenicillin مع الدراسات السابقة ومنها النتائج المحلية التي توصلت اليها الباحثة Ibrahim et al. (2014) التي بلغت فيها نسبة العزلات البكتيرية المقاومة للمضاد الحيوي carbenicillin (100%)، اذ بينت هذه الدراسة ان العديد من انزيمات البييتالاكتاميز  $\beta$ -lactamases التي يتم التحكم بها من قبل الجينات المحمولة على البلازميد plasmid في

البكتريا السالبة لصبغة كرام يمكنها ان تحلل كل من المضادات الحيوية الكاربينسلين carbenicillin والامبسلين ampicillin والسيفالوثين cephalothin وغيرها من المضادات الحيوية التابعة للمجموعة نفسها ، وايضا تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل اليها الباحث *Hinthong et al.* (2017) والتي بلغت فيها نسبة العزلات البكتيرية المقاومة لهذا المضاد الحيوي (92.2%).



الشكل (3-3): النسبة المئوية لمقاومة بكتريا *E. coli* لمضادات حيوية مختلفة باستعمال طريقة Kirby-Bauer بعد تنميتها على وسط وسط اكار مولر - هنتون.

بينما لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي توصل اليها الباحثان Kafilzadeh و Farsimadan (2016)، اذ كانت نسبة مقاومة العزلات البكتيرية لهذا المضاد الحيوي (42.8%)، وأشاروا الى ان البكتريا قد استعملت اليات عديدة في المقاومة لهذا المضاد الحيوي، كما اشاروا الى ان اسباب المقاومة العالية لأكثر

المضادات الحيوية تعود الى الاستعمال المفرط للمضادات الحيوية، الطفرات التي تشفر للإنزيمات فضلا عن انتقال المقاومة بواسطة البلازميد *plasmid*.

اما نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لمضادات الجيل الثالث من مجموعة السيفالوسبورينات *cephalosporins* التي تتضمن المضادين الحيويين *cefotaxime* و *ceftazidime* فتتفق مع الدراسة التي قام بها الباحث حران (2012) الذي وجد ان بكتريا *E. coli* كانت عالية المقاومة للمضادات الحيوية التابعة لمجموعة البييتالاكتام  $\beta$ -lactams، اذ كانت نسبة مقاومة البكتريا لهذين المضادين الحيويين (78.6%) و (76.6%) على التوالي. وايضا تتفق مع الدراسة التي توصل اليها الباحث *Suresh et al.* (2016) في الهند والتي بلغت فيها نسبة العزلات البكتيرية المقاومة لهذين المضادين الحيويين (98%) و (100%) على التوالي، وبينوا ان السبب الرئيس لهذه المقاومة العالية للبكتريا هو امتلاكها مضخات دفع كفاءة في طرح المضادات الحيوية خارج الخلية وازالة تأثيرها الضار بالخلية، و ان هذه الدراسة جاءت مقارنة لما توصل اليه الباحث *Hegazy et al.* (2018) في مصر التي بينت دراستهم ان نسبة عزلات بكتريا *E.coli* المقاومة للمضاد الحيوي *cefotaxime* (74.4%)، بينما لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسة الباحث *Hegazy et al.* (2018) بالنسبة للمضاد الحيوي *ceftazidime* اذ بلغت فيها نسبة مقاومة البكتريا له (64.3%).

اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث *Lee et al.* (2015) في كوريا الشمالية، والدراسة التي توصل اليها الباحثان *Kafilzadeh* و *Farsimadan* (2016) والدراسة التي توصل اليها الباحث *Maleki et al.* (2017) في ايران، اذ بلغت نسبة مقاومة البكتريا (6.8%) و (38.9%) و (26.1%) بالنسبة للمضاد الحيوي *ceftazidime* على التوالي و (15.5%) و (42.2%)

و(30%) بالنسبة للمضاد الحيوي cefotaxime على التوالي، وقد بينت دراستهم ان السبب في المقاومة لهذين المضادين الحيويين قد يعود الى ان البكتريا كانت تمتلك انظمة الدفع الطبيعية efflux pumps.

من اسباب مقاومة بكتريا *E. coli* لمضادات البيتالاكتام  $\beta$ -lactams هو انتاج انزيمات البيتالاكتاميز  $\beta$ -lactamases التي تتضمن انزيمات cephalosporinase و penicillinase، اذ تعمل هذه الانزيمات على تحطيم حلقة البيتالاكتام  $\beta$ -lactam فتثبط عمل المضادات الحيوية التابعة لمجاميع البنسلينات penicillins والسيفالوسبورينات cephalosporins، ايضا من اسباب المقاومة هو تغيير في نفاذية الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية و امتلاكها انظمة الدفع efflux pumps والاكثر شيوعا هو نظام الدفع AcrAB-ToIC التابع لعائلة RND الذي يكون اكثر شيوعا في بكتريا *E. coli* (Platansing, 2015 ; الشويخ، 2016).

تتفق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي السبروفلوكساسين ciprofloxacin التابع لمجموعة الكينولونات quinolones مع النتائج التي توصل اليها الباحث Tajbakhsh et al. (2016) في ايران، اذ كانت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (56.25%) وقد بين ان نسبة المقاومة للمضادات الحيوية بضمنها هذا المضاد الحيوي تكون اعلى في العزلات البكتيرية المنتجة للغشاء الحيوي biofilm منها في العزلات البكتيرية غير المكونة له، وايضا تتفق مع النتائج التي توصل اليها الباحث Rameriz-Castillo et al. (2018) في المكسيك، اذ كانت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (47.3%)، وقد بين ان المقاومة العالية للسبروفلوكساسين ciprofloxacin تعود الى ان هذه المجموعة من المضادات الحيوية كانت تمثل الاختيار الاول بالنسبة لعلاج اصابات المسالك البولية في المكسيك ما ادى الى استعمالها بشكل مفرط.

تتفق هذه الدراسة ايضا مع نتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث *Malekzadegan et al.* (2018) في ايران التي بينت ان نسبة (55.6%) من العزلات البكتيرية كانت مقاومة للمضاد الحيوي ciprofloxacin، فضلا عن انها بينت ان النسبة العالية للمقاومة تكون اعلى في العزلات البكتيرية المأخوذة من البول منها في العزلات البكتيرية المأخوذة من المواقع الاخرى من الجهاز البولي مثل الحالبان والكلى، وان هذا المضاد الحيوي يعد اكثر مضاد حيوي من مجموعة الكينولونات quinolones استعمالاً في علاج اصابات المسالك البولية، وان الاستعمال المفرط له ادى الى زيادة نسبة المقاومة بشكل ملحوظ في السنوات الاخيرة، وايضا تتفق مع نتائج الدراسة التي قام بها الباحث *Abdu et al.* (2018) في نيجيريا، اذ كانت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (46%)، وقد بين ان البكتريا كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. بينما لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصلت اليها الباحثة *Asadi* (2014)، اذ كانت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (21.7%).

من اسباب مقاومة بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية التابعة لمجموعة الكينولونات quinolones هي تغيير في الموقع الهدف، تقليل في نفاذية الغشاء الخارجي للبكتريا و امتلاكها لأنظمة الدفع efflux pumps التي تشمل (AcrAB-ToIC , MdfA , YhiV) (Paltansing, 2015). وتثبيط تصنيع ال DNA عن طريق تثبيط انزيم DNA gyrase او بفعل حدوث طفرات جينية فيه ( Zaman et al., 2017).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي جنتاميسين gentamicin التابع لمجموعة الامينوكلايكوسايدات aminoglycosides نتائج متوافقة مع النتائج التي توصل اليها الباحث *Suresh et al.* (2016) التي بينت ان نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد الحيوي كانت (37%)، وايضا



تتوافق مع النتائج التي توصل اليها الباحث Rameriz-Castillo *et al.* (2018) في المكسيك، اذ بلغت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (28.2%) وأشارت هذه الدراسة الى ان المضاد الحيوي gentamicin يعد الخيار الافضل في علاج اصابات المسالك البولية. بينما لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي توصلت اليها الباحثة Asadi (2014)، اذ بلغت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (11.7%) وقد بينت ان نسبة المقاومة هذه تعود الى ان بكتريا *E. coli* تمتلك عوامل ضراوة ضعيفة جدا لا تمكنها من مقاومة التأثير القاتل للمضادات الحيوية.

من اسباب مقاومة بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية التابعة لمجموعة الامينوكلايكوسايدات aminoglycosides هي امتلاك البكتريا لأنظمة الدفع التابعة للعائلة RND وتغيير في نفاذية الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية (Paltansing,2015). فضلا عن امتلاكها الانزيمات المحورة Aminoglycoside Modifying Enzymes (AMEs) مثل N-acetyl phosphotransferase و transferase (Zaman *et al.*, 2017).

تتفق نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي تتراسايكلين tetracycline مع النتائج التي توصل اليها الباحث Tajbakhsh *et al.* (2016) في ايران، اذ كانت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (75%) وقد بين هؤلاء الباحثين ان معظم العزلات البكتيرية المقاومة ل tetracycline كانت منتجة للغشاء الحيوي biofilm نتيجة لامتلاكها عوامل ضراوة قوية، وتتفق ايضا مع النتائج التي توصل اليها الباحثان Abdelhamid و Abozahra (2017) في مصر، اذ بلغت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (64.3%) وقد بين هذان الباحثان ان اهم عامل مسبب للمقاومة في بكتريا *E. coli* هو امتلاكها لمضخات الدفع وعند تثبيط هذه المضخات تسترجع البكتريا حساسيتها للمضادات الحيوية بشكل كبير. بينما

لم تتفق هذه الدراسة مع النتائج التي توصل اليها الباحث *Islam et al.* (2016) في بنغلادش وقد بينت ان نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (26.67%)، اذ كانت العزلات البكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية واسعة الطيف بينما كانت حساسة لهذا المضاد الحيوي.

من اسباب مقاومة عزلات بكتريا *E. coli* لمضادات التتراسايكلين tetracyclines هي تغيير في نفاذية الغشاء الخارجي وامتلاكها لأنظمة الدفع efflux pumps لاسيما مضخات الدفع التابعة للعائلة RND وتغيير في الموقع الهدف ( Kapoor, 2017).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية مقاومة عالية جدا للمضاد الحيوي erythromycin التابع لمجموعة الماكروليديات macrolides وهذه النتائج مقارنة للنتائج التي توصل اليها الباحثان Kibret و Abera (2011)، اذ كانت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (89.4) ، وايضا جاءت مقارنة للنتائج التي توصل اليها الباحثان Onuoha و Fatokun (2014)، والنتائج التي توصل اليها الباحث *Pricop et al.* (2015) التي بينت ان نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي كانت عالية جدا اذ بلغت (81.8%) و (100%) على التوالي. بينما لم تتفق الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل اليها الباحثان Kafilzadeh و Farsimadan (2016) في ايران، اذ بلغت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي (52.8%).

من اسباب مقاومة عزلات بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية التابعة لمجموعة الماكروليديات macrolides هي التحلل المائي hydrolysis الذي يعمل على تحلل المضاد الحيوي وتثبيط فعاليته، انتاج انزيمات Glogsylation و phosphorylation التي تثبط عمل المضاد الحيوي وامتلاك انظمة الدفع لاسيما مضخة الدفع AcerAB-ToIC فضلا عن تغيير في الموقع الهدف target alteration (Zaman et al., 2017).

جاءت نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للمضاد الحيوي novobiocin متقاربة مع النتائج التي توصل إليها الباحث Poongothai *et al.* (2012) التي اظهرت ان نسبة العزلات البكتيرية المقاومة لهذا المضاد الحيوي بلغت (92.1%)، ومتفقة مع النتائج التي توصل إليها الباحثان Kafilzadeh و Farsimadan (2016) في ايران، اذ بلغت نسبة مقاومة البكتيريا لهذا المضاد الحيوي (68.3%)، بينما اظهرت النتائج التي توصل إليها الباحثان Avşar و Berber (2014) ان نسبة عالية جدا من العزلات البكتيرية التابعة لبكتريا *E. coli* كانت مقاومة لهذا المضاد الحيوي والتي بلغت (100%). ومن اهم اسباب مقاومة بكتريا *E. coli* للمضاد الحيوي novobiocin هي امتلاكها لأنظمة الدفع efflux pumps فضلا عن انتقال صفة المقاومة إليها بوساطة البلازميدات plasmids، فضلا عن حصول الطفرات الوراثية العشوائية التي تحور من مكونات الخلية البكتيرية وتحولها الى بكتيريا مقاومة ( Blair *et al.*, 2014 ; Avsar and Berber, 2014).

يعد المضاد الحيوي nitrofurantoin من اقدم وافضل المضادات الحيوية التي يجب استعمالها في علاج المرضى المصابين باصابات المسالك البولية، وذلك للمقاومة الضعيفة التي اظهرتها العزلات البكتيرية التابعة لبكتريا *E. coli* لهذا المضاد الحيوي. جاءت هذه الدراسة متوافقة مع الكثير من الدراسات السابقة ومنها نتائج الدراسة التي توصل إليها الباحث Mittal *et al.* (2014) في الهند، ونتائج الدراسة التي توصل إليها الباحث Abujnah *et al.* (2015) في مصر، و نتائج الدراسة التي توصل إليها الباحث Tajbakhsh (2016) في ايران، بعد عزلهم للبكتيريا من المرضى الذين يعانون من اصابات المسالك البولية اظهرت نتائجهم ان نسبة مقاومة البكتيريا لهذا المضاد الحيوي كانت ضعيفة جدا اذ بلغت (6%) و (1.9%) و (6.25%) على التوالي. بينما اظهرت نتائج الدراسة التي توصل إليها الباحث Mishra *et al.* (2015) في

الهند، ونتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث *Abdu et al.* (2018) في السودان، ان نسبة مقاومة البكتريا للمضاد الحيوي nitrofurantoin بلغت (45.5%) و (22%) على التوالي. ومن اسباب مقاومة البكتريا لهذا المضاد الحيوي هو امتلاكها لأنظمة الدفع *efflux pumps*، قلة نفاذية الغشاء الخلوي، وحدوث الطفرات الكروموسومية ( Kapoor, 2017 ; Zaman et al., 2017 ).

### 3.3 انماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتيريا *E. coli*

#### Resistance profile (antibiotype)

اظهرت جميع عزلات بكتيريا *E. coli* مقاومة متعددة لمجموعة مضادات حيوية مختلفة، اذ كانت عزلتان من بكتيريا *E. coli* هي (E21-E9) مقاومة لثلاثة مضادات حيوية، ثلاثة عزلات بكتيرية هي (E39-E4-E1) كانت مقاومة ل 4 مضادات حيوية، 6 عزلات بكتيرية هي ( E28-E26 E25-E12 ) كانت مقاومة ل 5 مضادات حيوية، 9 عزلات بكتيرية هي ( E38-E33-E23-E22-E20-E17-E5 ) كانت مقاومة ل 6 مضادات حيوية، 8 عزلات بكتيرية هي (E43-E42-E34- E30 E16--E15- E14-) كانت مقاومة ل 7 مضادات حيوية، 13 عزلة بكتيرية هي (E11 E50-E46-E45- E37-E7-E6-E3) كانت مقاومة ل 8 مضادات حيوية، 8 عزلات بكتيرية هي (E47-E44-E36-E32-E27-E19-E8-E2) كانت مقاومة ل 9 مضادات حيوية و عزلة بكتيرية واحدة هي (E24) كانت مقاومة ل 10 مضادات حيوية، كما في الجدول (2-3).

الجدول (2-3): انماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتيريا *E. coli*

عدد العزلات (%)	F	CN	CIP	TE	NV	CTX	CAZ	RA	E	PY	Antibiotype
(%4) 2	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	.1
(%4) 2	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	.2
(%2) 1	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	.3
(%2) 1	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	.4
(%2) 1	S	R	S	S	R	R	S	R	S	R	.5
(%4) 2	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	.6
(%2) 1	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	.7
(%2) 1	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	.8
(%2) 1	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	.9
(%10) 5	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	.10
(%4) 2	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	.11
(%2) 1	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	.12
(%6) 3	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	.13
(%6) 3	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	.14
(%2) 1	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	.15
(%2) 1	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	.16
(%2) 1	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	.17
(%20) 10	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	.18
(%4) 2	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	.19
(%14) 7	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	.20
(%2) 1	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	.21
(%2) 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	.22

E: Erythromycin, PY: Carpenicillin, RA: Rifampin, NV: Novobiocin, CAZ: Ceftazidime, CTX: Cefotaxime, TE: Tetracycline, CN: Gentamicin , F: Nitrofurantoin, CIP: Ciprofloxacin .

تتفق هذه النتائج مع النتائج المحلية التي توصلت اليها الباحثة Ibrahim *et al.* (2014) والنتائج المحلية التي توصلت اليها الباحثة العبيدي (2017) التي اظهرت ان نسبة العزلات البكتيرية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية كانت ( 100%)، وايضا تتفق مع النتائج التي توصل اليها الباحث Ali *et al.* (2014) في باكستان والنتائج التي توصل اليها الباحث Gawad *et al.* (2018) في مصر، اذ كانت نسبة العزلات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية ( MDR ) ( 77.5%) و(96.77%) على التوالي وكان منها ما هو مقاوم لمضادين حيويين ومنها ما هو مقاوم لأكثر من ثلاثة مضادات حيوية. بينما لم تتفق النتائج الحالية مع النتائج التي توصل اليها الباحث Bhattacharyya *et al.* (2015) و النتائج التي توصل اليها الباحث Ramirez-Castillo *et al.* (2018) اذ كانت نسبة العزلات البكتيرية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية (21%) و (63.3%) على التوالي، اذ بين كل منهما ان البكتريا كانت مقاومة لمضادين حيويين فأكثر.

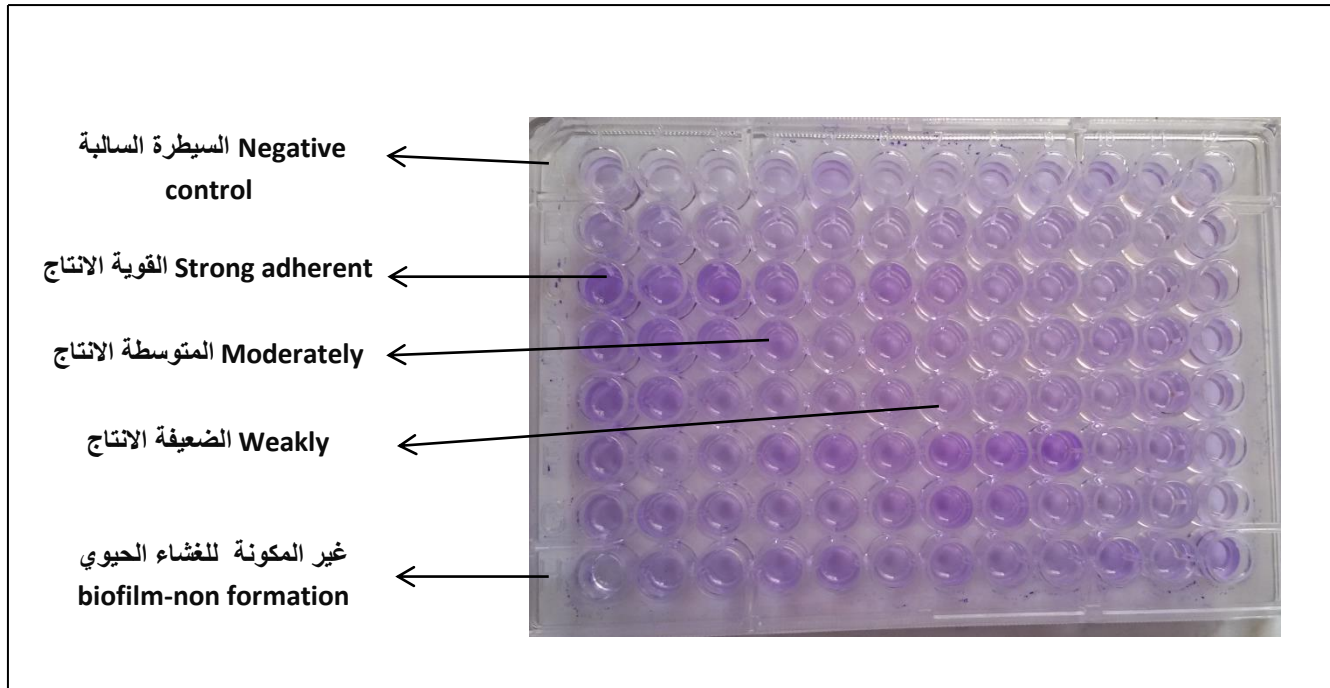
ان السبب الرئيس لهذه المشكلة الخطيرة يرجع الى الزيادة الكبيرة في مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية الواسعة الطيف نتيجة الاستعمال المفرط لهذه المضادات الحيوية (Gawad *et al.*, 2018)، وان مقاومة بكتريا *E. coli* المسببة لاصابات المسالك البولية تمثل خطرا كبيرا على الصحة العامة لأنها مقاومة لمختلف مجاميع المضادات الحيوية (Polse *et al.*, 2016).

### 4.3 تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

اجري الكشف عن قابلية بكتريا *E. coli* على تكوين الغشاء الحيوي biofilm باستعمال طريقة الصفيحة العياريّة microtiter plate method ذات ال 96 حفرة، واطهرت النتائج ان نسبة عالية من

عزلات بكتريا *E. coli* كانت منتجة للغشاء الحيوي. فكانت 45 (90%) عزلة بكتيرية تعود الى بكتريا *E. coli* لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي وبدرجات مختلفة وذلك بالمقارنة مع السيطرة السالبة، فكانت عزلتان (4%) منها لها القابلية على الانتاج القوي للغشاء الحيوي strong adherent، 6 (12%) عزلات بكتيرية لها القابلية على الانتاج المتوسط للغشاء الحيوي moderately adherent و 37 (74%) عزلة بكتيرية لها القابلية على الانتاج الضعيف للغشاء الحيوي weakly adherent كما موضح في الشكل (3-3) و (4) و الشكل (3-5) والملحق (2).

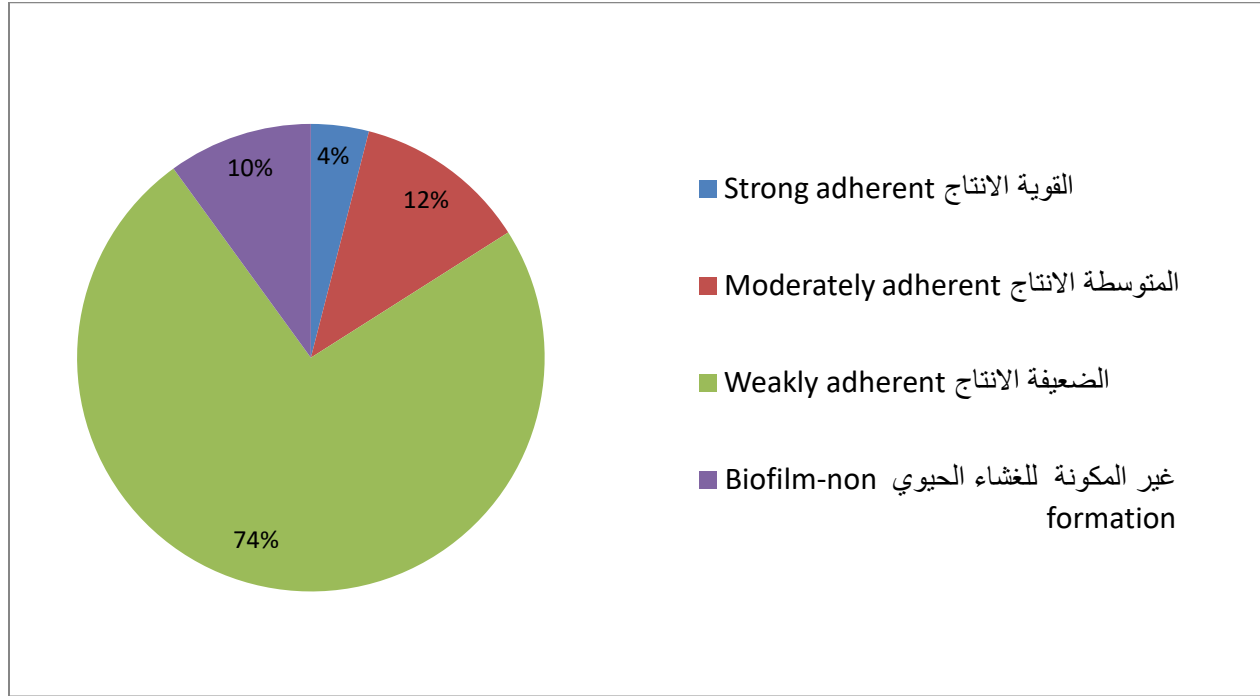
تتفق نتائج الدراسة الحالية في قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي مع النتائج التي توصل اليها الباحث Tajbakhsh (2016) والتي اظهرت ان نسبة العزلات البكتيرية التي لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي كانت (100%)، وتقارب ايضا نتائج الدراسة التي قام بها الباحث Gawad *et al.* (2018) في مصر، والنتائج التي توصل اليها الباحث poursina *et al.* (2018) في الهند، التي بلغت فيها نسبة العزلات البكتيرية التي لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي (76.5%) و (80%) على التوالي، اذ بينت هذه الدراسة ان الاشخاص المصابين باصابات المسالك البولية التي تسببها بكتريا *E. coli* المنتجة للغشاء الحيوي يكونوا اكثر عرضة للإصابة مجددا بالمرض بعد الشفاء منه. بينما اظهرت نتائج الدراسة التي توصل اليها الباحث Mishra *et al.* (2015) في الهند والنتائج التي توصل اليها الباحث Neupane *et al.* (2016) في النيبال ان نسبة العزلات البكتيرية التي لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي كانت (10%) و (39.6%) على التوالي.



الشكل (3-4): انتاج الغشاء الحيوي biofilm من قبل عزلات بكتريا *E. coli* بطريقة الصفحة العيارية ذات 96 حفرة .

تعد قابلية بكتريا *E. coli* على انتاج الغشاء الحيوي احد اهم عوامل ضراوة البكتريا التي تمنحها البكتريا المقاومة لأغلب المضادات الحيوية (Soto, 2013). عند تواجد البكتريا في البيئة السائلة وعند توافر الظروف البيئية سوف تتحول من بكتريا غير منتجة للغشاء الحيوي تعيش في البيئة السائلة الى بكتريا منتجة للغشاء الحيوي تعيش على السطوح الصلبة، اذ تعمل البكتريا عدة تحويرات وتغيرات لتلائم البيئة الجديدة ومنها التغيرات في التعبير عن الجزيئات السطحية مثل المستقبلات الموجودة على سطح الاسواط pili وعوامل الضراوة virulence factors والمخلفات الايضية مثل الحوامض والكاربوهيدرات والسموم وغيرها، فتتاح للبكتريا فرصة اكبر للبقاء في الظروف غير الملائمة (Soto, 2014).





الشكل (3-5): النسبة المئوية لقابلية بكتريا *E. coli* على انتاج الغشاء الحيوي biofilm.

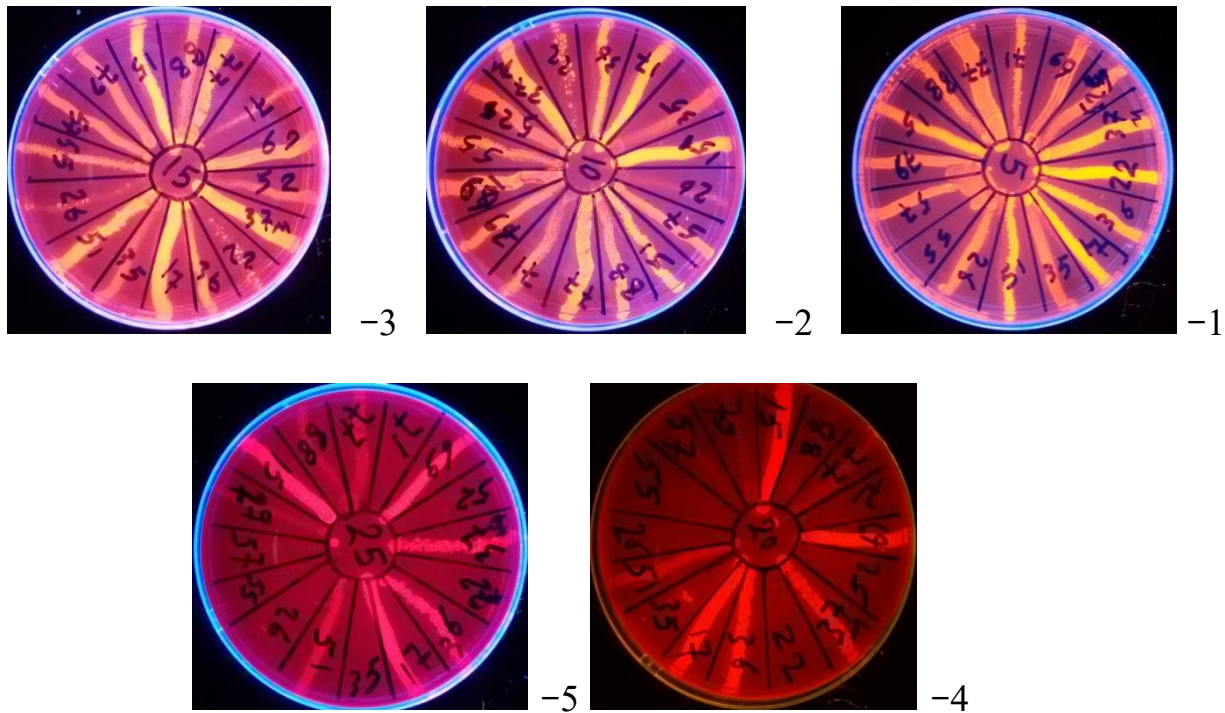
تعد البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي مقاومة للمضادات الحيوية بأكثر 1000 مرة من البكتريا غير المنتجة له، ويعود ذلك لعدة اسباب منها قلة انتشار المضاد الحيوي خلال المادة البينية اللزجة للغشاء الحيوي، انتقال جينات المقاومة في داخل بيئة الغشاء الحيوي بين الخلايا البكتيرية سواء بوساطة البلازميد plasmid ام الجينات القافزة transposons ام بفعل حدوث الطفرات العشوائية التي تؤدي الى زيادة مقاومة الخلايا للسموم والمضادات الحيوية، التعبير عن مضخات الدفع efflux pumps بشكل اكبر في الخلايا المكونة للغشاء الحيوي، تثبيت الغشاء الحيوي عن طريق تغير في تراكيز الايونات ions و الاس الهيدروجيني pH واخيرا وجود الخلايا المقيمة persister cell غير الفعالة ايضاً التي لها دور في الحفاظ على الخلايا البكتيرية المتواجدة تحت الغشاء الحيوي كآلية دفاعية ذاتية ميكانيكية (Soto, 2014).

## 5.3 الكشف المظهري عن مضخات الدفع

## Phenotypic detection of efflux pumps

اجري الكشف عن مضخات الدفع في 50 عزلة بكتيرية تعود لبكتريا *E. coli* باستعمال طريقة العجلة الخشبية (ethidium bromide – agar cartwheel method (EtBr CW) بالاعتماد على صبغة بروميد الايثيديوم كدليل للكشف المظهري. أظهرت النتائج ان 35 (70%) عزلة بكتيرية كانت موجبة للكشف المظهري كما موضح في الشكل (3-6) والجدول (3-3). وذلك بالاعتماد على اقل تركيز لم تظهر فيه العزلات تثلئاً تحت مصدر الاشعة فوق بنفسجية (UV) (Gressler *et al.*, 2014). تتقارب نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليها الباحث Gawad *et al.* (2018) في مصر التي اظهرت ان نسبة البكتريا الموجبة للكشف المظهري لمضخات الدفع كانت عالية جدا بنسبة (92%) و اشار الى ان مضخات الدفع efflux pumps كانت مسؤولة عن اكتساب البكتريا صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

بينما لم تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل اليها الباحث Suresh *et al.* (2016) في الهند، الذي بين ان حوالي (15%) من البكتريا السالبة لصبغة كرام كانت تمتلك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وهذه النسبة كانت ترجع الى امتلاك البكتريا لأنظمة الدفع efflux pumps، اذ بلغت نسبة بكتريا *E. coli* الموجبة للكشف المظهري لمضخات الدفع (27.90%)، اما النتائج التي توصل اليها الباحثان Helmy و Kashef (2017) التي بينت ان العزلات البكتيرية تمتلك انواعاً مختلفة من مضخات الدفع، اذ بلغت نسبة العزلات البكتيرية الموجبة للكشف المظهري عن مضخات الدفع (40.54%).



الشكل (3-6): عزلات بكتريا *E. coli* غير المتألقة في تراكيز مختلفة من صبغة بروميد الايثيديوم تحت الاشعة فوق البنفسجية في تجربة الكشف المظهري عن مضخات الدفق بطريقة العجلة الخشبية *ethidium bromide - agar* (1- cartwheel method (EtBr CW) - تثلئى عزلات بكتريا *E. coli* على وسط *trypton soy agar* الحاوي على (5 مايكروليتر/مليتر) من صبغة بروميد الايثيديوم. 2- تثلئى عزلات بكتريا *E. coli* على وسط *trypton soy agar* الحاوي على (10 مايكروليتر/مليتر) من صبغة بروميد الايثيديوم. 3- تثلئى عزلات بكتريا *E. coli* على وسط *trypton soy agar* الحاوي على (15 مايكروليتر/مليتر) من صبغة بروميد الايثيديوم. 4- تثلئى عزلات بكتريا *E. coli* على وسط *trypton soy agar* الحاوي على (20 مايكروليتر/مليتر) من صبغة بروميد الايثيديوم. 5- تثلئى عزلات بكتريا *E. coli* على وسط *tryptic soy agar* الحاوي على (25 مايكروليتر/مليتر) من صبغة بروميد الايثيديوم .

الجدول (3-3): نتائج الكشف المظهري عن مضخات الدفع efflux pumps في بكتريا *E. coli* باستعمال تراكيز مختلفة من صبغة بروميد الايثيديوم ethidium bromide في وسط اكار تربتون الصويا trypton soy agar

تراكيز صبغة بروميد الايثيديوم المستعملة (مايكروغرام/مليتر)					رقم العزلات
25	20	15	10	5	
-	+	-	-	+	E1
+	+	+	+	+	E4-E7-E11- E12-E13-E14- E15-E16-E17- E18-E19-E20- E21-E23-E25- E27-E30-E32- E36-E37- E41- E50
-	-	-	-	-	E3-E5-E10- E46
+	+	-	-	-	E6
-	-	+	+	-	E8
-	-	-	-	+	E9
+	-	+	+	+	E22
-	+	+	+	+	E24-E29
+	-	+	-	-	E26-E31-E39
-	-	+	-	-	E28-E35
-	+	-	+	+	E33-E42
+	-	+	+	-	E34
+	+	-	+	+	E38-E48
-	-	+	+	+	E40
-	-	-	+	+	E43
+	+	+	+	-	E44
+	+	+	-	-	E45
+	+	-	+	-	E47-E49

(+) النتيجة الموجبة (العزلات غير المتلثة) ، (-) النتيجة السالبة (العزلات المتلثة) ، E: *E. coli*

ان تعبير البكتريا عن مضخات الدفع يرتبط ارتباطا وثيقا بالمقاومة للمضادات الحيوية، كما ان مضخات الدفع تعد السبب الرئيسي لاكتساب البكتريا صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، أذ تعمل مضخات الدفع على طرد كميات كبيرة من المواد الكيميائية من ضمنها المضادات الحيوية خارج البكتريا اذ تقلل من تركيزها داخل الخلية ومن ثم تثبط عملها وفي الوقت نفسه تمنح البكتريا فرصة التعرض للطفرات العشوائية. من اكثر مضخات الدفع شيوعا في بكتريا *E. coli* هي مضخة الدفع AcrAB-ToIC التابعة لنظام الدفع من عائلة RND التي تعمل على طرد العديد من المواد الكيميائية فضلا عن المضادات الحيوية مثل مضادات ( novobiocin , doxycycline , chlortetracycline , tetracycline ) مضادات erythromycin , nafcillin , rifampin , doxorubicin , levofloxacin , carbenicillin , ( cefamandole , cephalothin, cephaloridin , oxacillin, linezolid , ciprofloxacin

(Sun *et al.*, 2014).

### 6.3 الكشف الجزيئي عن مضخة الدفع في بكتريا *E. coli* Genotypic detection

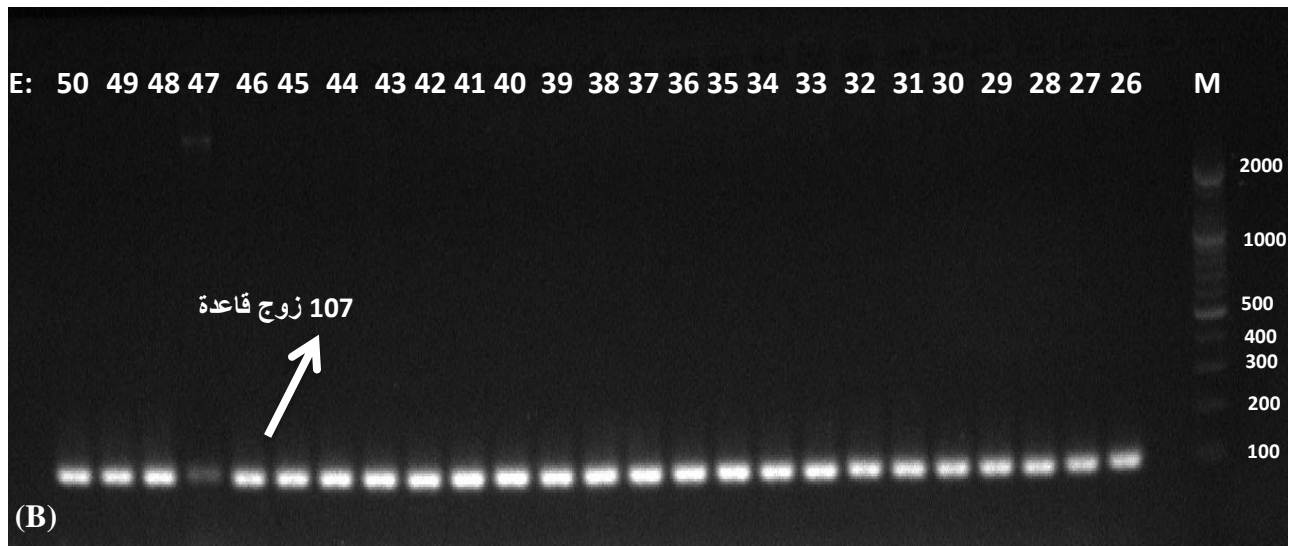
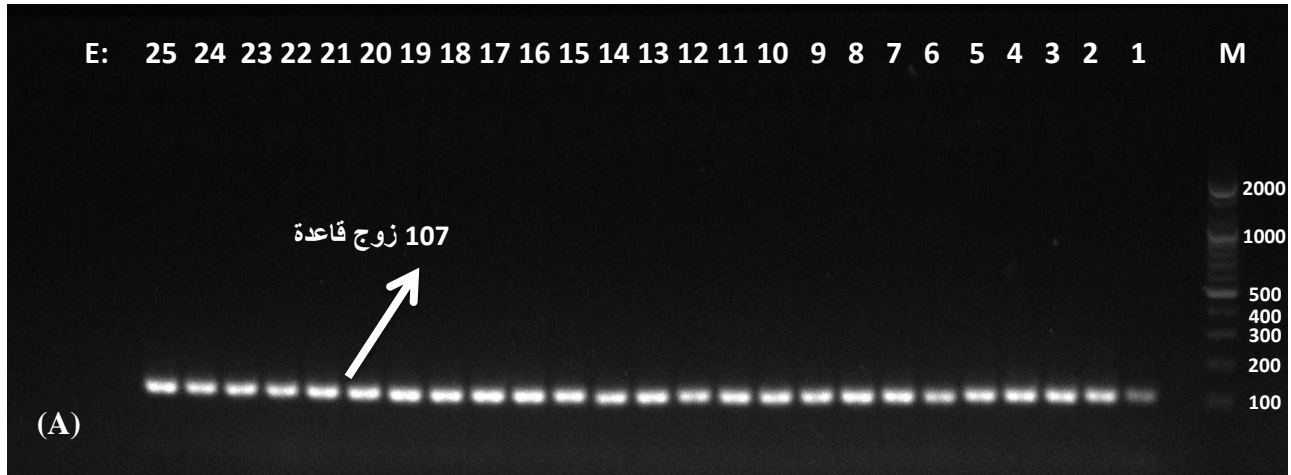
#### of efflux pump in *E. coli*

تم الكشف عن جيني مضخة الدفع *acrA* و *acrB* التي تشفر عن بروتينات *AcrA* و *AcrB* على التوالي ضمن مضخة الدفع AcrAB-ToIC في 50 عزلة بكتيرية تعود لبكتريا *E. coli*، وذلك بتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستعمال جهاز التدوير الحراري thermocycler للتأكد من وجودها في جميع العزلات البكتيرية

### 1.6.3 الكشف الجزيئي عن الجين *acrA* باستعمال تقانة PCR:

أظهرت نتائج الكشف الجزيئي عن الجين *acrA* الذي حجمه (107) زوج قاعدة بتقانة (PCR) واستعمال جهاز التدوير الحراري thermocycler ان 50 (100%) عزلة بكتيرية تمتلك الجين *acrA*، وبالمقارنة بين الحزم المتضاعفة والحزم التابعة الى الدليل الحجمي DNA ladder وجد ان الحزم الناتجة كانت ذات وزن جزيئي 107 زوج قاعدة، كما موضح في الشكل (A 7-3) و (B7-3).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي توصل اليها الباحث *Maleki et al.* (2017)، اذ بلغت نسبة العزلات البكتيرية التي تمتلك الجين *acrA* (95.5%)، وقد بين الباحث ان العزلات البكتيرية كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. بينما لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي توصل اليها الباحث *Gawad et al.* (2018) في مصر، اذ بلغت نسبة العزلات البكتيرية التي تمتلك هذا الجين (74.84%)، وقد بين ان هنالك علاقة وثيقة بين امتلاك البكتريا لمضخة الدفع AcrAB والمقاومة لمجاميع مختلفة من المضادات الحيوية، كما اشار الى ان هذا الجين يكون متواجد دائما مع الجين *acrB* في جميع العزلات البكتيرية.



الشكل (3-7): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين *acrA* (107 زوج قاعدة) لعزلات بكتريا *E. coli* في 1.5% اكاروز agaros وفرق جهد 100 فولت لمدة 80 دقيقة . المسار M يمثل الدليل الحجمي (100-2000 زوج قاعدة )، المسارات (E: 25 - 1) في الشكل (3- A7) والمسارات (E: 50 - 26) في الشكل (3- B7) تمثل عزلات بكتريا *E. coli* التي تمتلك الجين *acrA*.

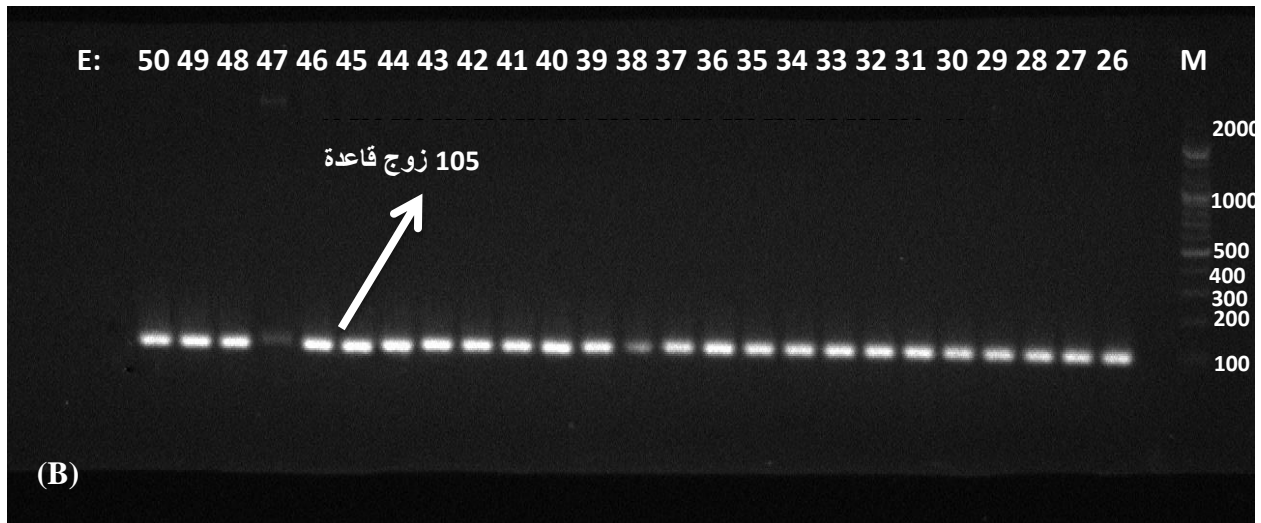
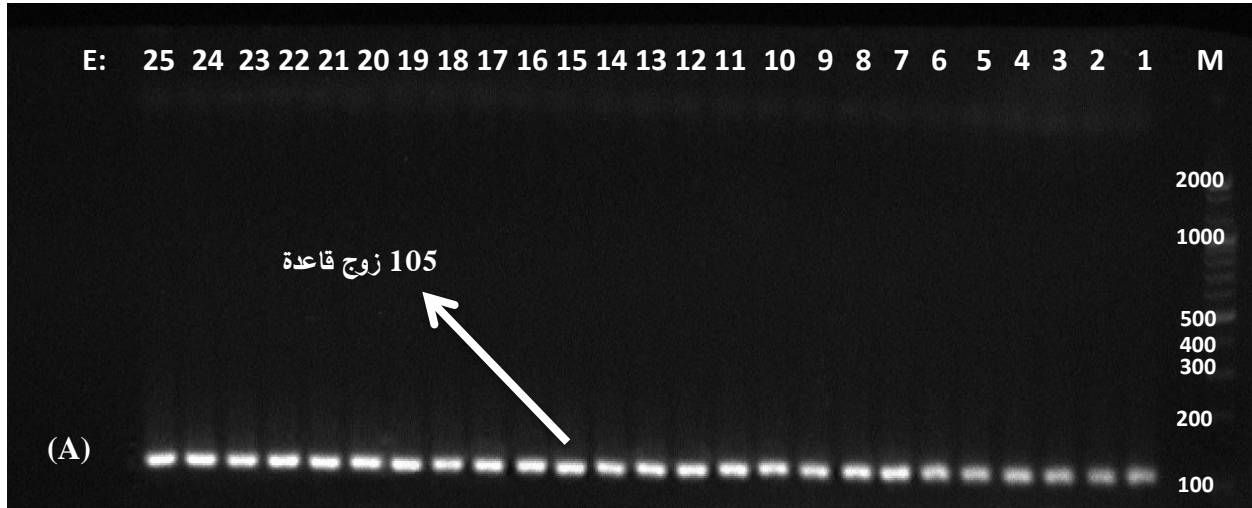
### 2.6.3 الكشف الجزيئي عن الجين *acrB* باستعمال تقانة PCR:

بينت نتائج الكشف الجزيئي عن الجين *acrB* الذي حجمه (105) زوج قاعدة بتقنية (PCR)

باستعمال جهاز التدوير الحراري thermocycler، ان جميع العزلات البكتيرية (100%) تمتلك الجين



وبالمقارنة بين الحزم المتضاعفة والحزم التابعة الى الدليل الحجمي DNA ladder وجد ان الحزم الناتجة كانت ذات وزن جزيئي 105 زوج قاعدة كما موضح في الشكل (A8-3) و (B8-3).



الشكل (8-3): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل للجين *acrB* (105 زوج قاعدة) لعزلات بكتريا *E. coli* في 1.5% اكاروز agaros وفرق جهد 100 فولت لمدة 80 دقيقة. المسار M يمثل الدليل الحجمي (100-2000 زوج قاعدة)، المسارات (E: 25 - 1) في الشكل (A 8 - 3) والمسارات (E: 50 - 26) في الشكل (B 8 - 3) تمثل عزلات بكتريا *E. coli* التي تمتلك الجين *acrB*.



كانت النتائج الحالية مقارنة الى النتائج التي توصل اليها الباحث Maleki *et al.* (2017) في ايران، اذ بلغت نسبة العزلات البكتيرية التي تمتلك الجين *acrB* (82.90%)، بينما لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي توصل اليها الباحث Kafilzadeh و Farsimadan (2016) في ايران، والنتائج التي توصل اليها الباحث Gawad *et al.* (2018) في مصر، اذ بلغت نسبة العزلات البكتيرية التي تمتلك هذا الجين (75%) و (74.84%) على التوالي. تتواجد هذه الجينات على الكروموسوم البكتيري bacterial chromosome وتعد منظمات بروتينية اي تنظم عمل البروتينات. يمكن لهذا النوع من المضخات ان تطرد كميات كبيرة من المواد الاخرى اضافة الى المضادات الحيوية مثل العناصر الثقيلة، المواد العضوية، نواتج المركبات النباتية و المخلفات الايضية للبكتريا ويمكن ان تمنح البكتريا المقاومة الطبيعية للمضادات الحيوية فضلا عن المقاومة المكتسبة للمضادات الحيوية (Blanco *et al.*, 2016).

قد تبين ان العزلات البكتيرية كانت تمتلك الجينين *acrA* و *acrB* معا وبالنسبة نفسها (100%) كما موضح في الجدول (3-4) وهذه ما يتوافق مع نتائج الباحث Gawad *et al.* (2018) التي اظهرت ان نسبة العزلات البكتيرية التي تمتلك هذين الجينين معا (74.84%).

الجدول (3-4): النسبة المئوية لجيني مضخة الدفق *acrA* و *acrB* الموجودة في بكتريا *E. coli*.

التسلسل	الجين Genes	عدد العزلات التي تمتلك الجين	النسبة المئوية لوجود الجين (%)
1	<i>acrA</i>	50	(%100)
2	<i>acrB</i>	50	(%100)

ان العلاقة بين قابلية بكتريا *E. coli* على تكوين الغشاء الحيوي biofilm وبين امتلاكها لمضخات الدفع efflux pumps تعود الى دور مضخات الدفع في تكوين الغشاء الحيوي ، كما ان الجينات المشفرة عن مضخة الدفع AcrAB-ToIC وجدت منظمة بشكل كبير تحت تأثير الغشاء الحيوي وخلال التعرض للعديد من المضادات الحيوية. فقد وجد في الدراسات السابقة ان العزلات البكتيرية الطافرة mutants التي تفقد الجينات المشفرة عن نظام الدفع من عائلة Proton Motive Force (PMF) ( *emrD* , *emrE* , ) تظهر قابلية ضعيفة جدا على تكوين الغشاء الحيوي اكثر من السلالات الابوية الاصلية، لذا فنظام الدفع (PMF) له دور كبير في تكوين الغشاء الحيوي ( Soto, 2013 ).

هذه الدراسة اظهرت ان معظم العزلات البكتيرية التي لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي كانت معظمها تمتلك الجينات المشفرة عن مضخة الدفع *acrA* و *acrB* فكانت 45 (90%) عزلة بكتيرية تمتلك جيني المقاومة *acrA* و *acrB* لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي biofilm، كما اظهرت النتائج ان 32 (64%) عزلة بكتيرية موجبة للكشف المظهري عن مضخات الدفع كانت لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي biofilm، بينما 2 (4%) عزلة بكتيرية كانت موجبة للكشف المظهري عن مضخات الدفع لا تمتلك القابلية على انتاج الغشاء الحيوي كما موضح في الجدول (3-5) والملحق (3).

الجدول (3-5): العلاقة بين الكشف المظهري والكشف الجزيئي عن مضخات الدفع efflux pumps والقابلية على تكوين الغشاء الحيوي biofilm في بكتريا *E. coli*

نتائج الاختبارات	الغشاء الحيوي - عدد العزلات (%)	الكشف المظهري عن مضخات الدفع عدد العزلات (%)	العلاقة بين العزلات الموجبة للكشف المظهري - امتلاك الغشاء الحيوي عدد العزلات (%)	العلاقة بين العزلات الموجبة للكشف الجزيئي عن مضخات الدفع عدد العزلات (%)	العلاقة بين العزلات الموجبة للكشف الجزيئي - امتلاك الغشاء الحيوي عدد العزلات (%)
النتيجة الموجبة	45 (90)	35 (70)	32 (64)	50 (100)	45 (90)
النتيجة السالبة	5 (10)	15 (30)	2 (4)	0 (0)	0 (0)

هناك علاقة كبيرة بين امتلاك البكتريا لمضخات الدفع و القابلية على انتاج الغشاء الحيوي، اذ بين

الباحث *Alva et al.* (2018) ان مضخات الدفع من عائلة RND و عائلة MFS كانت مسؤولة بدرجة كبيرة عن انتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *E. coli* بالمقارنة مع العائلات الاخرى لمضخات الدفع، كما بين هذا الباحث ان دور مضخة الدفع AcrAB خلال تكوين الغشاء الحيوي هي لمنع تراكم المواد السامة بضمنها المضادات الحيوية داخل الخلية.

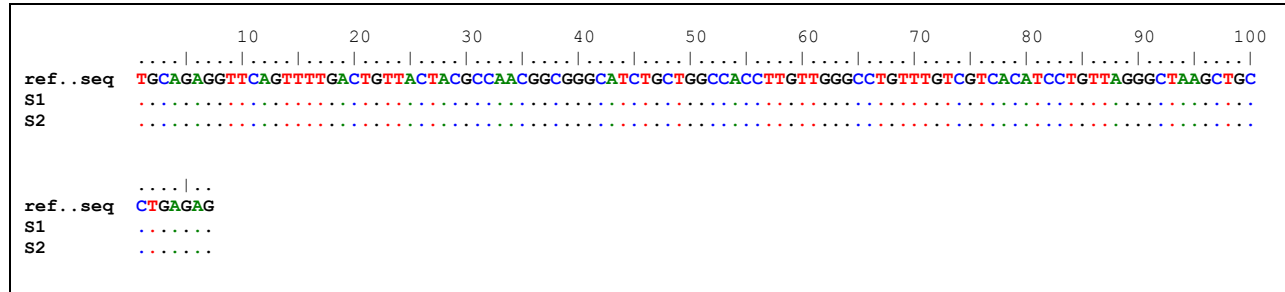
### 7.3 التحليل التتابعي DNA sequencing

تم تحليل الحمض النووي المجيني الدنا للبوادئ الخاصة بكل من الجين التشخيصي *16SrRNA* والجينين المشفرين عن مضخة الدفع *acrA* و *acrB* ، وذلك بعد اخذ 20 مايكروغرام /مايكروليتر من الدنا المضخم (PCR product) التابع الى العزلة E27 الخاص بكل من الجين التشخيصي *16SrRNA*، الجين *acrA*

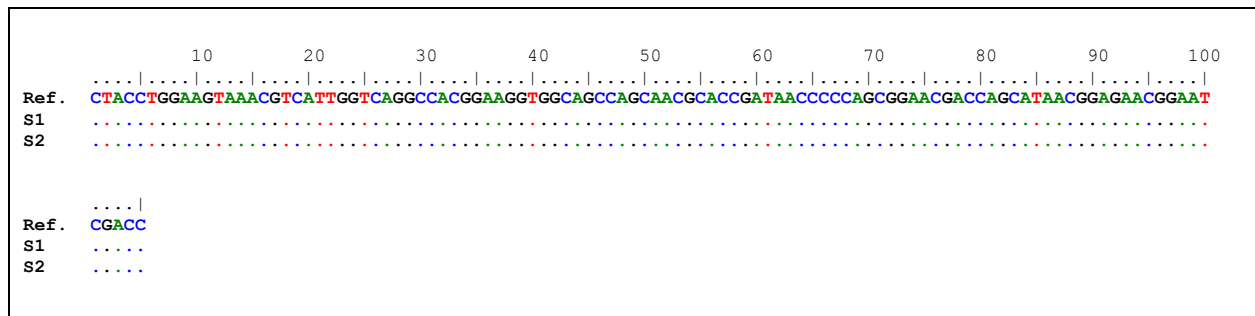
و الجين *acrB*، والدنا المضخم (PCR product) التابع الى العزلة E40 الخاص بالجين التشخيصي و *16SrRNA*، الدنا المضخم التابع الى العزلة E43 الخاص بالجين *acrA* والدنا المضخم التابع الى العزلة E8 الخاص بالجين *acrB*، وبعد تحليل النتائج في برنامج (DNASTAR lasergene EditSeq) المتوفر في الموقع العالمي لبنك الجينات الامريكي National Center for Biotechnology Information (NCBI)، وجد انها كانت (100%) تعود لبكتريا *E.coli* كانت كما هو موجودة في الموقع العالمي (NCBI)، كما وجد ان حجم حزم القواعد النيتروجينية الخاصة بالجينات *16SrRNA*، *acrA* و *acrB* (727، 107 و 105 ) زوج قاعدة على التوالي، كما في الاشكال (3-9)، (3-10) و (3-11) والملاحق (A , B , C:5)، (A , B , C :6 )، (A , B , C :7)، (A , B , C :8)، و (A , B , C :9)، وقد تم تسجيل البوادي الخاصة بالجينات *16SrRNA*، *acrA* و *acrB* في الموقع العالمي لبنك الجينات الامريكي (NCBI) ضمن التسلسلات LC458580 و LC458581، <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC458580> و LC458582 و <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC458581> على التوالي. تعد هذه الطريقة من احدث واهم الطرائق في التعرف على هوية البكتريا المرضية، كما يتم من خلال هذه الطريقة الكشف عن حدوث الطفرات الوراثية في جينات المقاومة والجينات الاخرى، وذلك من خلال التعرف على تسلسل القواعد النيتروجينية العائدة للجين (Srinivasan et al., 2015).



الشكل (3-9): التحليل التتابعي للجين *16srRNA* لبكتريا *E. coli* في العزلة E40



الشكل (3-10): التحليل التتابعي للجين *acrA* لبكتريا *E. coli* في العزلة E43.



الشكل (3-11): التحليل التتابعي للجين *acrB* لبكتريا *E. coli* للعزلة E8.

# الاستنتاجات والتوصيات

## الاستنتاجات

- 1- اظهرت جميع عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية مقاومة متعددة للمضادات الحيوية (MDR) multidrug resistance ، فكانت اعلى مقاومة للمضاد الحيوي carbenicilline بنسبة (100%) ، واقل مقاومة للمضاد الحيوي nitrofurantoin بنسبة (4%) .
- 2- بينت نتائج الدراسة الحالية ان (90%) من عزلات بكتريا *e. coli* لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي biofilm .
- 3- اظهرت عزلات بكتريا *E. coli* نتائج موجبة للكشف المظهري عن انظمة الدفع efflux pumps بنسبة (70%) .
- 4- بينت نتائج الدراسة الحالية ان معظم عزلات بكتريا *E. coli* كانت تمتلك جيني مضخة الدفع *acrA* و *acrB* التي تشفر عن بروتينات مضخة الدفع بنسبة (100%) لكل منهما .



## التوصيات

- 1- اجراء العديد من الدراسات للكشف عن اسباب زيادة مقاومة بكتريا *E. coli* المعزولة من اصابات المسالك البولية للمضادات الحيوية من خلال الكشف عن جينات المقاومة للمضادات الحيوية وبالأخص تلك التي تشفر عن انظمة الدفع *efflux pumps* الاخرى.
- 2- اجراء العديد من الدراسات عن مثبطات انظمة الدفع *efflux pump inhibitors*.
- 3- نشر الوعي الصحي بين المواطنين حول استعمال المضادات الحيوية بدون وصفة طبية، لمنع ظهور السلالات البكتيرية المقاومة لها.
- 4- دراسة الكشف المظهري والجيني عن انظمة الدفع في الاجناس المرضية الاخرى السالبة والموجبة لصبغة كرام.
- 5- دراسة التعبير الجيني *gene expression* لجينات المقاومة المشفرة عن بروتينات انظمة الدفع باعتماد تقانة *real time PCR*.

# المصادر

## المصادر العربية

البوصالح، رواء ماجد محمد. (2014). التحري عن عوامل الضراوة لبكتيريا اشيريشيا القولون المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية وقياس نمط بعض الحركات الخلوية لديهم . رسالة ماجستير . كلية العلوم اجامعة القادسية .صفحة 125.

جعاز، وداد سمير وهميم ، سعد سلمان. (2016). التتميط المصلي والكشف الجزيئي لبعض جينات المقاومة لجرثومة الإشيريشيا القولونية المعزولة من الأطفال المصابين بأخماج المجاري البولية في مدينة الناصرية . مجلة جامعة ذي قار . 11(3):11-30.

حران، عمر حسين. (2012). التحري عن جينات المقاومة لمضادات البيتاالاكتام من البكتريا المعزولة من بعض الاصابات السريرية في الديوانية . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة القادسية .

الخفاجي، زهرة محمود. (2008). التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزيئية) . دار طباعة . دمشق : صفحة 710.

شويخ، رحيم صبر و جاسم فرح علي حميد. (2016). انواع البكتريا المسببة لالتهابات المسالك البولية ومدى مقاومتها للمضادات الحيوية في بعض مستشفيات بغداد . مجلة القادسية للعلوم الصرفة . 21(4): 25-32.

الشويخ، رنا مجاهد عبد الله. (2016). المضادات الحيوية و استعمالاتها . دار دجلة .الاردن . صفحة 112.

العبيدي، نادية احمد هادي. (2017). عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا من المرضى المصابين بالتهاب

المسالك البولية وتحديد مقاومتها للمضادات الحيوية . مجلة جامعة ذي قار . 13-1.

المرجاني، محمد فرج. (2011). المضادات الحيوية : المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية . دار دجلة .

الاردن .صفحة 220.

المصادر الاجنبية

**Abdelhamid**, S. M. and Abozahra, R. R. (2017). Expression of the Fluoroquinolones Efflux Pump Genes *Acra* And *Mdfa* in Urinary *Escherichia coli* Isolates. *PJM*. 66(1):25-30.

**Abdu**, A. ; Kachallah, M. and Yusuf Bolus, D. (2018). Antibiotic Susceptibility Patterns of Uropathogenic *Escherichia coli* Among Patients with Urinary Tract Infections in a Tertiary Care Hospital in Maiduguri, North Eastern, Nigeria. *J. Biosci Biotechnol Discov*. 3: 14-24.

**Abujnah**, A. A. Zorgani, A. ; Sabri, M. A. M. ; El-Mohammady, H.; Khalek, R. A. and Ghenghesh, K. S. (2015). Multidrug Resistance and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Genes Among *Escherichia coli* from Patients with Urinary Tract Infections in Northwestern Libya. *Libyan J Med*. 10(1): 26412-3402.

**Afzal**, A. M. S. (2017). Antibiotic Resistance Pattern of *Escherichia coli* and *Klebsiella* Species in Pakistan: A Brief Overview. *J Microb. Biochem. Technol*. 9(6): 277-279.

**Alav**, I. ; Sutton, J. M. And Rahman, K. M. (2018). Role of Bacterial Efflux Pumps in Biofilm Formation. *J Antimicrob Chemother*. 1-18.

**Ali**, I. ; Kumar, N. ; Ahmed, S. and Dasti, J. I. (2014). Antibiotic Resistance in Uropathogenic *E. coli* Strains Isolated from Non-Hospitalized Patients in Pakistan. *J of Clin and Dia Res*. 8(9): 1-4.

**Ali**, J ; Rafq, Q. A. and Ratcliffe, E. (2018). Antimicrobial Resistance Mechanisms and Potential Synthetic Treatments. *Future Sci*. 4(4):1-6 .

**Amaral, L.;** Martins, A.; Spengler, G. and Molnar, J. (2014). Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria: What They Do, How They Do it, with What and How to Deal with Them. *Front Pharmacol.* 4(168):1-11.

**Anes, J.;** Mccusker, M. P.; Fanning, S. And Martins, M. (2015). The Ins and Outs of RND Efflux Pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 6:1-14.

**Asadi, S.;** Kargar, M.; Solhjoo, K.; Najaf, N. and Ghorbani-Dalini, S. (2014) . The Association of Virulence Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* with Antibiotic Resistance. *Jundishapur J Microbiol.* 7(5): 1-5.

**Avsar, C. and** Berber, I. (2014). Plasmid Profiling and Antibiotics Resisitance of *Escherichia coli* Strains Isolated from *Mytilus galloprovincialis* and Seawater. *J Coast Life Med.* 2(9): 689-693.

**Basak, S.;** Singh, P. and Rajurkar, M. (2016). Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. *Journal of Pathogens* . 1-5.

**Bhattacharyya, S.;** Sarfraz, A.; Ansari, M. A. A. and Jaiswal, N. ( 2015). Characterization and antibiogram of Uropathogenic *Escherichia coli* from a tertiary care hospital in Eastern India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 4(2): 701-705.

**Blair, J. M.;** Richmon, G. E. and Piddock, L. J. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-Negative Bacteria and Their Role in Antibiotic Resistance. *Future Microbiol.* 9(10): 1165–1177.

**Blanco, P.;** Hernando-Amado, S.; Reales-Calderon, J. A.; Corona, F.; Lira, F.; Alcalde-Rico, M.; Bernardini, M.; Sanchez, M. B. and Martinez, J. L. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More than Antibiotic Resistance Determinants . *Microorganisms.* 4(14):2-19.

**Bray, J.** (1945). Isolation of antigenically homogeneous strains of Bacteria *E. coli* neop-olitanum from summer diarrhea of infants. J Pathol Bacteriol. 57:239-247.

**Brown, A. E.** and Smith, H. R. (2017). Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology. 14<sup>th</sup>ed. McGraw-Hill Higher Education. New York. 438pp.

**Christensen, G. D.;** Simpson, W. A.; Younger, J. J.; Baddour, L. M.; Barrett, F. F.; Melton, D. M. and Beachey, E. H. (1985). Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for The Adherence of Staphylococci to Medical Devices. JCM. 22(6): 996-1006.

**CLSI.** (2017). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27<sup>th</sup>ed. CSLI Supplement M100.Wayne,PA:Clinical and Laboratory Standards Institute.32-41.

**Delmar, J. A.;** Su, C-C. and Yu, E. W. (2014). Bacterial Multidrug Efflux Transporters. Annu Rev Biophys. 43:93–117.

**Forbes, B. A.;** Saham, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 12<sup>th</sup>ed. Mosby, Inc., an anffilliate of Elsevier, Inc. 1031pp.

**Forsyth, V. S.** Armbruster, C. E.; Smith, S. N.; Pirani, A.; Springman, A.; Walters, M. S.; Nielubowicz, G. R.; Himpsl, S. D.; Snitkin, E. S.; Mobley, H. L. T. (2018). Rapid Growth of Uropathogenic *Escherichia coli* During Human Urinary Tract Infection. M bio. 9(2): 1-13.

**Foxman, B.** (2014). Urinary Tract Infection Syndromes Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors, and Disease Burden. Infect Dis Clin N Am. 28: 1–13.

**Fusco, A.; Coretti, L.; Savio, V.; Buommino, E.; Lembo, F. and Donnarumma, G. (2017).** Biofilm Formation and Immunomodulatory Activity of *Proteus mirabilis* Clinically Isolated Strains. Int J Mol Sci.18(2): 1-11.

**Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.; Chairman, J.; Boone, D. R.; Chairman, V.; Devos, P.; Goodfellow, M.; Rainey, F. A. and Schleifer, K-H. (2005).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol Two. Part B. 2<sup>nd</sup>ed. Springer. USA. PP 1106.

**Gawad, W. E.; Helmy, O. M.; Tawakkol, W. M. and Hashem, A. M. (2018).** Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, And Phylogenetic Grouping of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Egypt: The Role of Efflux Pump-Mediated Resistance. Jundishapur J. Microbiol. 11(2):1-7.

**Gharajalar, S. N. and Sofiani, V. H. (2017).** Patterns of Efflux Pump Genes Among Tetracycline Resistance Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates Obtained from Human Urinary Infections. Jundishapur J Microbiol. 1-5.

**Gressler, L. T.; Vargas, A. C. D.; Costa, M. M. D.; Pötter, L.; Silveira, B. P. D.; Sangioni, L. A. and Botton, S. D. A. (2014).** Genotypic and phenotypic detection of efflux pump in *Rhodococcus equi*. Brazilian J Microbiol. 45(2): 661-665.

**Hadi, O. M.; Al-Maliki, A. H.; Al-Zubaidy, M. S. M. and Nihmah, Y. K. (2014).** Prevalence of Uropathogenic *Escherichia coli* in Al-Hashymia District of Babylon Province. JUBPAS. 9(22): 2479-2488.

**Harly, J. P. and Prescott, L. M. (2002).** Laboratory Exercises in Microbiology. 5<sup>th</sup>ed. McGraw-Hill education , Inc . PP 466 .



**Hayashi, K.;** Nakashima, R.; Sakurai, K.; Kitagawa, K.; Yamasaki, S.; Nishino, K. and Yamaguchi, A. (2016). AcrB-AcrA Fusion Proteins That Act as Multidrug Efflux Transporters. *J Bacteriol.* 198(2):332–342.

**Hegazy, E. E. Alam El-Din, R. A.;** Amin, A. M.; Mahgoub, F. M. and El-Gamal, S. A. (2018). Microbiological Profile of Urinary Tract Infections with special Reference to Antibiotic Susceptibility Pattern of *Escherichia coli* Isolates. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 7(2): 911-920.

**Helmy, O. M. and Kashef, M. T. (2017).** Defferent Phenotypic and Molecular Mechanisims Associated with Multidrug Resistance in Gram-Negative Clinical Isolates from Egypt. *Infect Drug Resist.* 10: 479-498 .

**Hemraj, V.;** Diksha, S. and Avneet, G. (2013). A Review on Commonly Used Biochemical Test for Bacteria. *IJLS.* 1(1): 1-7.

**Hinthon, W.;** Pumipuntu, N.; Santajit, S.; Kulpeanprasit, S.; Buranasinsup, S.; Sookrung, N.; Chaicumpa, W.; Aiumurai, P. and Indrawattana, N. (2017). Detection and Drug Resistance Profile of *Escherichia coli* from Subclinical Mastitis Cows and Water Supply in Dairy Farms in Saraburi Province, Thailand. *Peer J.* 1-16.

**Ibrahim, I. A.;** Al-Shwaikh, R. M. and Ismaeil, M. I. (2014). Virulence and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Tigris River and Children Diarrhea. *Infect Drug Resist.* 7: 317- 322.

**Islam, M. A.;** Kabir, S. M. L. and Seel, S. M. L. (2016). Molecular Detection and Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Raw Milk Sold in Different Markets of Bangladesh. *Bangl J Vet Med.* 14 (2): 271-275.

**Jawetz, E.;** Melnick, J. A. and Adelberg, E. A. (2016). Review of Medical Microbiology 27<sup>th</sup>ed . McGraw-Hill education , Inc : 851pp.

**Jenkins, C.;** Ling, C. L.; Ciesielczuk, H. L.; Lockwood, J.; Hopkins, J. S. McHugh, T. D.; Gillespie, S. H. and Kibbler, C. C. (2012). Detection and Identification of Bacteria in Clinical Samples by *16srRNA* Gene Sequencing: Comparison of Two Different Approaches in Clinical Practice. J Med Microbiol. 61: 483–488.

**Kafilzadeh, F.** and Farsimadan, F. (2016). Investigating Multidrug Efflux Pumps in Relation to the Antibiotic Resistance Pattern in *Escherichia coli* Strains from Patients in Iran. Biomed Res. 27(4): 1130-1135.

**Kapoor, J.;** Saigal, S. and Elongavan, A. (2017). Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 33(3):300-305.

**Khalaf, T. T.** and Al-Khafaji, Z. M. (2014). Prevalence of *Oxalobacter formigenes* Among the Iraqi Populatio. J Pharm Pharm Sci. 3(7) : 165 – 177.

**Kibret, M.** and Abera, B. (2011). Antimicrobial Susceptibility Patterns of *E. coli* from Clinical Sources in Northeast Ethiopia. Afr Health Sci. 11(1): 40 – 45.

**Kotsyuba, K. R.;** Voronkova, O. S.; Vinnikov, A. I. and Shevchenko, T. M. (2014). Mechanisms of Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Family Representatives. Visn Dnìpropetr Unìv Ser Bìol Med. 5(1): 33-38.

**Lai, Y. M.;** Zaw, M. T.; Aung, T. S. and Lin, Z. (2016). Detection of Sequence Type 131 in Multi-Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Two Hospitals of Sabah. AJP. 10 (3): 421-424.

**Laird, E. D.** (2016). Characterization of Antibiotic Resistance Profiles of Surface Water Bacteria in an Urbanizing Watershed. Msc. Thesis. Texas A and M University . 59 PP.

**Lee, J. H.; Subhadra, B.; Son, Y-J.; Kim, D. H.; Park, H. S.; Kim, J. M.; Koo, S. H.; Oh, M. H.; Kim, H-J. and Choi, C. H.** (2015). Phylogenetic Group Distributions, Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Properties of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in South Korea. Lett Appl Microbiol. 62: 84-90.

**Levinson, W.** (2016). Review of Medical Microbiology and Immunology. 14<sup>th</sup>ed. McGraw-Hill education, Inc. PP 821.

**Maleki, D.; Jahromy, S. H.; Karizi, S. Z. and Eslami, P.** (2017). The Prevalence of *acrA* and *acrB* Genes Among Multiple-Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Patients with UTI in Milad Hospital, Tehran. Avicenna J Clin Microb Infec. 4(1): 1-7.

**Malekzadegan, Y.; Khashei, R.; Ebrahim-Saraie, H. S. and Jahanabadi, Z.** (2018). Distribution of Virulence Genes and Their Association with Antimicrobial Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Iranian Patients. BMC Infect Dis. 18(572):1-9.

**Malema, M. S.; Abia, A. L. K.; Tandlich, R.; Zuma, B.; Kahinda, J-M. M. and Ubomba-Jaswa, E.** (2018). Antibiotic-Resistant Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Rooftop Rainwater-Harvesting Tanks in the Eastern Cape, South Africa. Int J Environ Res. Public Health. 15(892): 1-14.

**Martins, M.;** Mccusker, M. P.; Viveiros, M.; Couto, I. ; Fanning, S.; Pages, J. M.; Amaral, L. (2013). A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. *Open Microbiol J.* 7: 72-82.

**Martins, M.;** Viveiros, M.; Couto, I.; Costa, S. S.; Pacheco, T.; Fanning, S.; Pages, G-M. and Amaral, L. (2011). Identification of Efflux Pump Mediated Multidrug resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method. *in vivo.* 25: 171-178.

**Mirzarazi, M.;** Rezatofghi, S. E.; Pourmahdi, M. and Mohajeri, M. R. (2013). Antibiotic Resistance of Isolated Gram Negative Bacteria from Urinary Tract Infections (UTIs) in Isfahan. *Jundishapur J Microbiol.* 6(8): 1-5.

**Mishra, S. K.;** Basukala, P.; Basukala, O.; Parajuli, K.; Pokhrel, B. M. and Rijal, B. P. (2015). Detection of Biofilm Production and Antibiotic Resistance Pattern in Clinical Isolates from Indwelling Medical Devices. *Springer.* 70: 128–134.

**Mittal, S.;** Sharma, M. and Chaudhary, U. (2014). Study of Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* and its Antibiotic Susceptibility Pattern. *Indian J Pathol Microbiol.* 57(1): 61-64.

**Neamati, F.;** Firoozeh, F.; Saffari, M. and Zibaei, M. (2015). Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Pattern in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Hospitalized Patients in Kashan, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 8(2): 1-6 .

**Neupane, S.;** Pant, N. D.; Khatiwada, S.; Chaudhary, R. and Banjara, M. R. (2016). Correlation Between Biofilm Formation and Resistance Toward Different Commonly Used Antibiotics Along with Extended Spectrum Beta Lactamase Production in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from the Patients Suspected of Urinary Tract Infections Visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. *ARIC.* 5(5): 1-5.

**Oliveira, R. V.;** Oliveira, M. C. and Pelli, A. (2017). Disease Infection by Enterobacteriaceae Family in Fishes: A Review. J Microbiol Exp. 4(5): 00128.

**Olowe, B. M.;** Oluyeye, J. O.; Famurewa, O.; Ogunniran, A. O. and Adelegan, O. (2017). Molecular Identification of *Escherichia coli* and New Emerging Enteropathogen, *Escherichia fergusonii*, from Drinking Water Sources in Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria. J Microbiol Res. 7(3) : 45-54.

**Onuoha, S. C. and Fatokun, K. (2014).** Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Urinary Tract Infection (UTI) Among Pregnant Women in Afikpo, Ebonyi State, Nigeria. AJLS. 2(2): 46-52.

**Paltansing, S. (2015).** Antimicrobial Resistance In Enterobacteriaceae : Characterization and Detection . Leiden University. 155pp.

**Polse, R.F.;** Yousif, S. Y. and Assafi, M. S. (2016). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Uropathogenic *E. coli* Among People in Zakho, Iraq. Int J Res Med Sci. 4(4): 1219-1223.

**Ponnusamy, P. and Nagappan, R. (2013).** Extended Spectrum Beta-Lactamase, Biofilm-producing Uropathogenic Pathogens and Their Antibiotic Susceptibility Patterns from Urinary Tract Infection- An Overview. Intl J Microbiol Res. 4(2): 101-118.

**Poongothai, P.;** Rajan, S. and Jegadeeshkumar, D. (2012). Emergence of Multidrug Resistant Strains of *E. coli* Isolated from Urinary Tract Infection in Namakkal. Int J Appl Biol Pharm Technol. 3(3): 218-223.

**Poursina, F.;** Sepehrpour, S. and Mobasherizadeh, S. (2018). Bioflm Formation in Nonmultidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Isfahan, Iran. Adv Biomed Res. 7(40): 1-5.

**Pricop, C.;** Suditu, N.; Vranceanu, R.; Puia, D.; Dimitriu, D. C. Ciuta, C.; Todosi, L. and Checherita, I. A. (2015). Multidrug Resistant Urinary Tract Infections in Moldova, Romania: Focusing on Uropathogens and Their Antibiotic Susceptibility. Can We Do More?. Nobel Med. 11(3): 42-49.

**Puzari, M. and Chetia, P. (2017).** RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-Negative Bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: A Major Issue Worldwide. World J Microbiol Biotechnol. 33(24): 1-8.

**Raeispour, M. and Ranjbar, R. (2018).** Antibiotic Resistance, Virulence Factors and Genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains. Antimicrob Resist Infect Control. 7(118):1-9.

**Ramírez-Castillo, F. Y.;** Moreno-Flores, A. C.; Avelar-González, F. J.; Márquez-Díaz, F.; Harel, J. and Guerrero-Barrera, A. L. (2018). An Evaluation of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates in Urinary Tract Infections from Aguascalientes, Mexico: Cross-Sectional Study. Ann Clin. Microbiol Antimicrob. 17(34):1-13.

**Ravi, I.;** Baunthiyal, M. and Saxena, J. (2014). Advances in Biotechnology. Springer. India. PP.259.

**Rivas, L.;** Mellor, G. E.; Gobius, K. and Fega, N. (2015). Detection and Typing Strategies for Pathogenic *Escherichia coli*. Springer. New York. 110pp.

**Sambrook, J. and Russell, D. (2001).** Molecular Cloning Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup>ed. Cold Spring Harbor, New York. USA. PP.1044.

**Shariff, A.;** Shenoy, M. S.; Yadav, T. and Radhakrishna, M. (2013). The Antibiotic Susceptibility Patterns of Uropathogenic *Escherichia coli*, with Special Reference to the Fluoroquinolones. J Of Clin And Dia Res. 7(6): 1027-1030.

**Sharmin**, S.; Alamgir, F. Begum, F. and Jaigirdar, K. H. (2010). Use of Chromogenic Agar Media for Identification of Uropathogen. Bangladesh J Med. Microbiol. 4 (1): 18-23.

**Silva**, D. P.; Schofield, M. C.; Parsek, M. R. and Tseng, B. S. (2017). An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. Pathogens. 6(51): 1-9.

**Soltani**, S.; Emamie, A. D.; Dastranj, M; Farahani, A.; Davoodabadi, A. and Mohajeri, p. (2018). Role of Toxins of Uropathogenic *Escherichia coli* in Development of Urinary Tract Infection. JPRI. 21(1): 1-11.

**Soto**, S. M. (2013). Role of Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of Bacteria Embedded in a Biofilm. Virulence. 4(3): 223-229.

**Soto**, S. M. (2014). Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. Advances in Biology. 13pp.

**Spaulding**, C. N.; Klein, R. D.; Ruer, S.; Kau, A. L.; Schreiber, H. L.; Cusumano, Z. T.; Dodson, K. W.; Pinkner, J. S.; Fremont, D. H.; Janetka, J. W.; Remaut, H.; Gordon, J. I. and Hultgren, S. J. (2017). Selective Depletion of Uropathogenic *E. coli* from the Gut by a *FimH* Antagonist. Nature. 546: 528-532 .

**Srinivasan**, R.; Karaoz, U.; Volegova, M.; MacKichan, J.; KatoMaeda, M.; Miller, S.; Nadarajan , R.; Brodie , E. L. and Lynch, S. V. (2015). Use of *16SrRNA* Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens . PLOS ONE. 10(2): 1-22.

**Suardana**, I. W. (2014). Analysis of Nucleotide Sequences of the *16SrRNA* Gene of Novel *Escherichia coli* Strains Isolated from Feces of Human and Bali Cattle. J Nucleic Acids : 1-7.



**Sun, J.;** Deng, Z. and Yan, A. (2014). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Mechanisms, Physiology and Pharmacological Exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* 453: 254–267.

**Suresh, M.;** Nithya, N.; Jayasree, P. and Kumar, M. P. (2016). Detection and Prevalence of Efflux Pump-Mediated Drug Resistance in Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria from North Kerala,India. *Asian J Pharm Clin Res.* 19(3): 324-327.

**Tadesse, A. and Alem, M.** (2006). *Medical Bacteriology.* EPHTI. PP. 433.

**Tajbakhsh, E.;** Ahmadi, P. Abedpour-Dehkordi, E.; Arbab-Soleimani, N. and Khamesipour, F. (2016). Biofilm Formation, Antimicrobial Susceptibility, Serogroups and Virulence Genes of Uropathogenic *E. coli* Isolated from Clinical Samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control.* 5(11): 1-8.

**Terlizzi, M. E.;** Gribaudo, G. and Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-Antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol.* 8(1566): 1-23.

**Tille, P.M.** (2017). *Baily And Scott's Diagnostic Microbiology.* 14<sup>th</sup>ed. Elsevier, Inc. China. 1115pp.

**Vandepitte, J.;** Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck, C. C. (2003). *Bacteriological Investigations.* In: World Health Organization .2<sup>nd</sup>ed. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, WHO, Geneva. 167pp .

**Venter, H.;** Mowla, R.; Ohene-Agyei, T. and Ma, S. (2015). RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Front. Microbiol.* 6(377): 1-11.



**Wanger, A.;** Chavez, V.; Huang, R. S. P.; Wahed, A.; Actor, J. K. and Dasgupta, A. (2017). Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology. Elsevier Inc. All Rights Reserved. 300pp.

**WHO** (World Health Organization). (2003). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. 2<sup>nd</sup>ed. Geneva. Switzerland.

**Zaman, S. B.;** Hussain, M. A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K. T. and Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. Cureus. 9(6): 1-9.

**Zhang, C.;** Chen, X.; Stephanopoulos, G. and Too, H-P. (2016). Efflux Transporter Engineering Markedly Improves Amorphadiene Production in *Escherichia coli* . Biotechnology and Bioengineering. 9999: 1-9.

**Zhi Li, X.;** Elkins, C. A. and Zgurskaya, H. I. (2016). Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria Mechanisms, Regulation And Clinical Implications . International Publishing. Switzerland. 848pp.

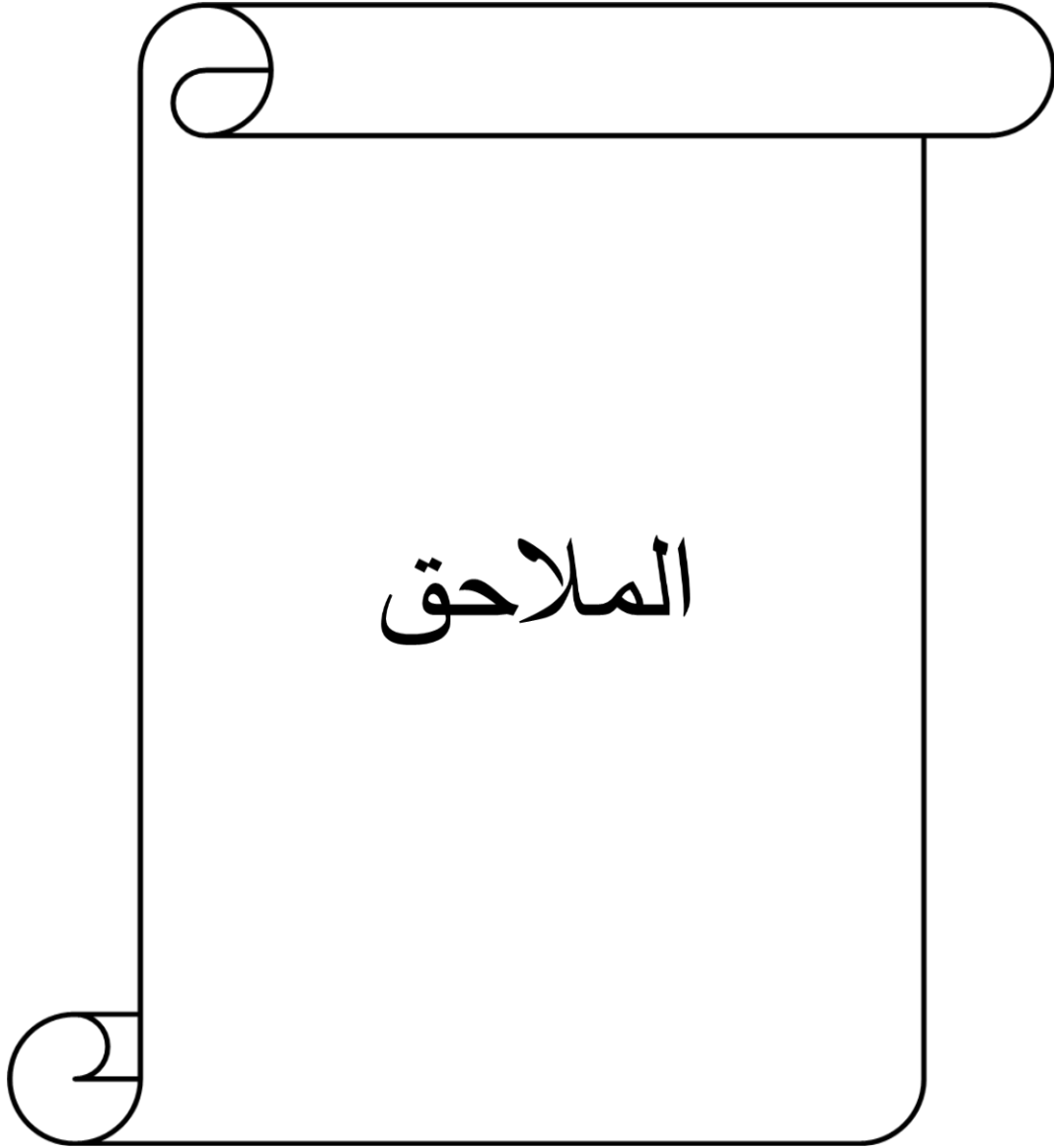
**Zowawi, H. M.;** Harris, P. N. A.; Roberts, M. J.; Tambyah, P. A.; Schembri, M. A.; Pezzani, M. D.; Williamson, D. A. and Paterson, D. L. (2015).The Emerging Threat of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria in Urology. Nat Rev Urol. 1-15.

مصادر الانترنت

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/LC458580>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/LC458581>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/LC458582>



الملحق (1) مقاومة عزلات بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية Antibiotics

F	CN	CIP	TE	NV	CTX	CAZ	RA	E	PY	رقم العزلة
S	S	S	I	R	I	I	R	R	R	E1
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E2
S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	E3
S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	E4
S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	E5
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E6
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E7
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E8
S	S	I	S	S	S	I	R	R	R	E9
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E10
S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	E11
S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	E12
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E13
S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	E14
S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	E15
S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	E16
S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	E17
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	E18
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E19
I	S	S	R	S	R	R	R	R	R	E20

## الملاحق

S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	E21
S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	E22
S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	E23
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E24
S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	E25
S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	E26
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E27
S	S	S	I	R	I	R	R	R	R	E28
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E29
S	S	S	R	R	I	R	R	R	R	E30
S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	E31
R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	E32
S	R	S	I	S	R	R	S	R	R	E33
S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	E34
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E35
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E36
S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	E37
S	S	I	R	R	I	I	R	R	R	E38
S	S	S	S	R	S	I	R	R	R	E39
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E40
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	E41
S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	E42
S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	E43

## الملاحق

S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E44
S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	E45
S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	E46
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E47
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E48
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	E49
S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	E50

PY: Carbenicilline ,E: Erythromycin , RA: Rifampicin , CAZ: Ceftazidime , CTX: Cefotaxim, NV: Novobiocin, TE: Tetracycline, CIP: Ciprofloxacin, CN: Gentamicin , F: Nitrofurantoin, R: Resistance ,S: Sensitive , I:Intermediate.

الملحق (2) بعض عوامل الضراوة لبكتريا *E. coli* التي تشمل ( القابلية على تكوين الغشاء الحيوي

Biofilm ، انتاج انزيم الهيموليسين Hemolysin و انتاج انزيم اليوريا Urease )

رقم العزلة	المصدر Sources	الجنس Sex	الغشاء الحيوي Biofilm	انتاج انزيم Hemolysin	انتاج انزيم Urease
E1	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	انثى	+	-	-
E2	المختبرات التعليمية /مدينة الطب	انثى	+++	-	-
E3	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	انثى	+	-	-
E4	المختبرات التعليمية /مدينة الطب	انثى	+	-	-
E5	المختبرات التعليمية /مدينة الطب	انثى	++	-	-
E6	مستشفى حماية	انثى	+	-	-

## الملاحق

				الاطفال/مدينة الطب	
-	-	+	انثى	المختبرات التعليمية مدينة الطب	E7
-	-	+	ذكر	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E8
-	-	+	انثى	مستشفى الطفل المركزي التعليمي	E9
-	-	+	انثى	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E10
-	-	-	ذكر	مستشفى بغداد التعليمي/مدينة الطب	E11
-	-	+	انثى	مستشفى بغداد التعليمي/مدينة الطب	E12
-	-	+	انثى	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E13
-	-	+	انثى	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E14
-	-	+	ذكر	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E15
-	-	+	ذكر	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E16
-	-	+	انثى	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E17
-	-	+	انثى	مستشفى الطفل المركزي التعليمي	E18
-	-	+	انثى	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E19

## الملاحق

-	-	+	انثى	مستشفى الطفل المركزي التعليمي	E20
-	-	-	انثى	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E21
-	-	+++	انثى	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E22
-	-	+	انثى	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E23
-	-	+	ذكر	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E24
-	$\beta+$	++	انثى	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E25
-	$\beta+$	+	انثى	مستشفى الطفل المركزي التعليمي	E26
-	-	+++	ذكر	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E27
-	-	+	انثى	مستشفى الطفل المركزي التعليمي	E28
-	-	+	انثى	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E29
-	-	++	ذكر	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E30
-	-	-	انثى	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E31
-	-	+	انثى	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E32
-	-	+	انثى	مدينة الامامين الكاظمين	E33



## الملاحق

				(ع) التعليمي	
-	-	+	انثى	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E34
-	-	+	انثى	مستشفى بغداد التعليمي/مدينة الطب	E35
-	-	+	انثى	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E36
-	-	+	ذكر	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E37
-	-	++	انثى	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E38
-	-	-	انثى	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E39
-	-	+	انثى	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E40
-	-	-	ذكر	مستشفى بغداد التعليمي/مدينة الطب	E41
-	-	++	ذكر	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E42
-	-	+	انثى	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E43
-	-	+	انثى	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E44
-	-	+	ذكر	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E45
-	$\beta+$	+	انثى	مدينة الامامين الكاظمين (ع) التعليمي	E46

## الملاحق

-	-	+	انثى	مستشفى بغداد التعليمي/مدينة الطب	E47
-	-	+	ذكر	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E48
-	-	+	انثى	المختبرات التعليمية/مدينة الطب	E49
-	-	+	انثى	مستشفى حماية الاطفال/مدينة الطب	E50

+ : النتيجة الموجبة ، - النتيجة السالبة ، الغشاء الحيوي ( + : ضعيفة القابلية على تكوين الغشاء الحيوي ، ++ : متوسطة القابلية على تكوين الغشاء الحيوي ، +++ : قوية القابلية على تكوين الغشاء الحيوي ) ،  $\beta$ + : محللة للدم من نوع بيتا  $\beta$ -Hemolysine

### الملحق (3) العلاقة بين الكشف المظهري والكشف الجيني عن مضخات الدفق Efflux Pumps

والقابلية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm في بكتريا *E. coli*

الكشف الجيني عن مضخات الدفق		الكشف المظهري عن مضخات الدفق	القابلية على تكوين الغشاء الحيوي	رقم العزلة
<i>acrB</i> gene	<i>acrA</i> gene			
+	+	+	+	E1
+	+	+	+	E2
+	+	-	+	E3
+	+	+	+	E4
+	+	-	+	E5
+	+	-	+	E6
+	+	+	+	E7
+	+	-	+	E8
+	+	+	+	E9
+	+	-	+	E10
+	+	+	-	E11
+	+	+	+	E12
+	+	+	+	E13

## الملاحق

+	+	+	+	E14
+	+	+	+	E15
+	+	+	+	E16
+	+	+	+	E17
+	+	+	+	E18
+	+	+	+	E19
+	+	+	+	E20
+	+	+	-	E21
+	+	+	+	E22
+	+	+	+	E23
+	+	+	+	E24
+	+	+	+	E25
+	+	-	+	E26
+	+	+	+	E27
+	+	-	+	E28
+	+	+	+	E29
+	+	+	+	E30
+	+	-	-	E31
+	+	+	+	E32
+	+	+	+	E33
+	+	-	+	E34
+	+	-	+	E35
+	+	+	+	E36
+	+	+	+	E37
+	+	+	+	E38
+	+	-	-	E39
+	+	+	+	E40
+	+	+	-	E41
+	+	+	+	E42
+	+	+	+	E43
+	+	-	+	E44
+	+	+	+	E45
+	+	-	+	E46
-	-	-	+	E47
+	+	+	+	E48
+	+	-	+	E49
+	+	+	+	E50

+ النتيجة الموجبة ، - النتيجة السالبة

الملحق (4) نتائج قياس نقاوة DNA في جهاز نانو دروب Nano Drop

Sample Type	Con(ng/ul)	260/280	Abs280	Abs260	رقم العزلة
dsDNA	56.1	1.74	1.24	1.958	E1
dsDNA	99.2	1.84	3.361	6.179	E2
dsDNA	86.5	1.88	2.245	4.225	E3
dsDNA	100.8	1.83	1.641	2.996	E4
dsDNA	55.8	1.73	0.264	0.457	E5
dsDNA	60.7	1.62	0.034	0.055	E6
dsDNA	75.6	1.69	0.137	0.232	E7
dsDNA	87.1	1.85	2.472	4.562	E8
dsDNA	99.9	1.78	1.992	3.538	E9
dsDNA	110.7	1.8	1.616	2.915	E10
dsDNA	84	1.79	1.428	2.559	E11
dsDNA	95	1.84	1.628	3	E12
dsDNA	87.8	1.9	1.738	3.295	E13
dsDNA	100.7	1.86	1.081	2.014	E14
dsDNA	98.8	1.85	2.254	4.176	E15
dsDNA	80.8	1.82	1.665	3.035	E16
dsDNA	63.6	1.85	2.499	4.631	E17
dsDNA	83.5	1.69	0.255	0.43	E18
dsDNA	86.3	1.76	0.983	1.726	E19
dsDNA	73.2	1.75	0.837	1.464	E20
dsDNA	56	1.72	0.651	1.12	E21
dsDNA	109.2	1.75	1.249	2.185	E22
dsDNA	78.7	1.72	0.917	1.574	E23
dsDNA	78.5	1.70	0.921	1.57	E24
dsDNA	81.4	1.73	0.939	1.629	E25
dsDNA	69.1	1.88	3.407	6.421	E26
dsDNA	86	1.78	2.47	4.399	E27
dsDNA	51	1.73	0.59	1.019	E28
dsDNA	68.3	1.73	0.788	1.366	E29
dsDNA	58.6	1.69	0.576	0.972	E30
dsDNA	66.6	1.72	0.541	0.932	E31
dsDNA	91.7	1.74	1.055	1.834	E32

## الملاحق

dsDNA	102	1.75	1.73	3.02	E33
dsDNA	89.8	1.75	3.101	5.417	E34
dsDNA	97.1	1.75	1.109	1.943	E35
dsDNA	59.1	1.63	0.198	0.322	E36
dsDNA	68.7	1.73	0.795	1.374	E37
dsDNA	63.4	1.73	0.733	1.268	E38
dsDNA	60.5	1.65	0.733	1.211	E39
dsDNA	71.4	1.69	0.348	0.587	E40
dsDNA	49.3	1.74	0.568	0.987	E41
dsDNA	71.4	1.73	0.826	1.428	E42
dsDNA	69.2	1.76	0.789	1.385	E43
dsDNA	86.5	1.73	1	1.731	E44
dsDNA	68.4	1.64	0.284	0.467	E45
dsDNA	70.6	1.72	0.821	1.412	E46
dsDNA	69.1	1.60	0.921	1.48	E47
dsDNA	96.9	1.66	0.348	0.579	E48
dsDNA	69.2	1.60	0.931	1.49	E49
dsDNA	96.6	1.72	1.124	1.933	E50

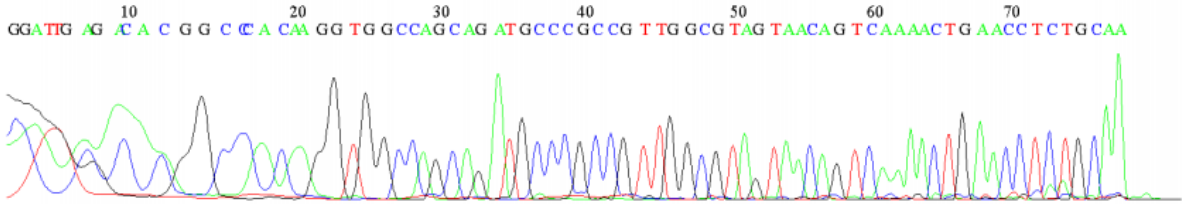
الملحق (A-5) التحليل التتابعي للجين *16srRNA* لبكتريا *E. coli* للعزلة E27 .

File: A1\_AF.ab1 Run Ended: 2018/12/5 0:24:18 Signal G:2734 A:4036 C:5494 T:4210  
Sample: A1\_AF Lane: 12 Base spacing: 16,19568 732 bases in 16326 scans Page 1 of 2

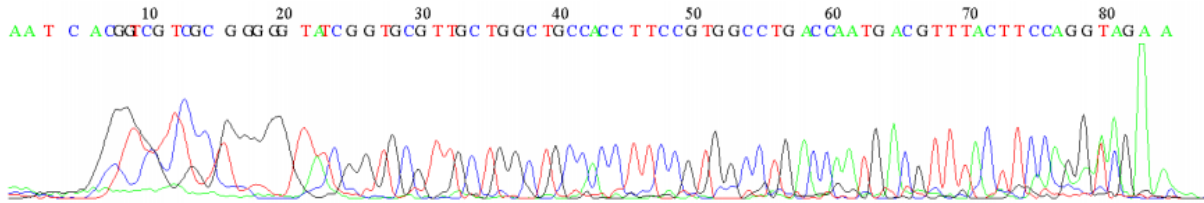


الملحق (B-5) التحليل التتابعي للجين *acrA* لبكتريا *E. coli* للعزلة E27 .

File: B1\_BF.ab1 Run Ended: 2018/12/4 18:11:48 Signal G:4756 A:5222 C:7271 T:4739  
Sample: B1\_BF Lane: 6 Base spacing: -13.4993105 78 bases in 1059 scans Page 1 of 1



الملحق (C-5) يوضح التحليل التتابعي للجين *acrB* لبكتريا *E. coli* للعزلة E27 .



الملحق (A-6) التسلسل التتابعي للجين *16SrRNA* لبكتريا *E. coli* في العزلة E27 .

Amplicon	Referring locus sequences (5' - 3')	length
16S rRNA DNA sequences	CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA CTGGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGG GCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTC ACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTC AGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAG AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATC CCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGG GGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGG CGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCGTAAACGATGTCCA* <sup>1</sup>	723 bp

الملحق (B-6) التسلسل التتابعي للجين *acrA* لبكتريا *E. coli* في العزلة E27 .

Amplicon	Referring locus sequences (5' - 3')	length
<i>acrA</i> DNA sequences	TGCAGAGGTTTCAGTTTTGACTGTTACTACGCCAACGGCGGGGCATCTGC TGGCCACCTTGTGGGCTGTTTGTTCGTCACATCCTGTTAGGGCTAAG CTGCCTGAGAG* <sup>1</sup>	107 bp

الملحق (C-6) التسلسل التتابعي للجين *acrB* لبكتريا *E. coli* في العزلة E27 .

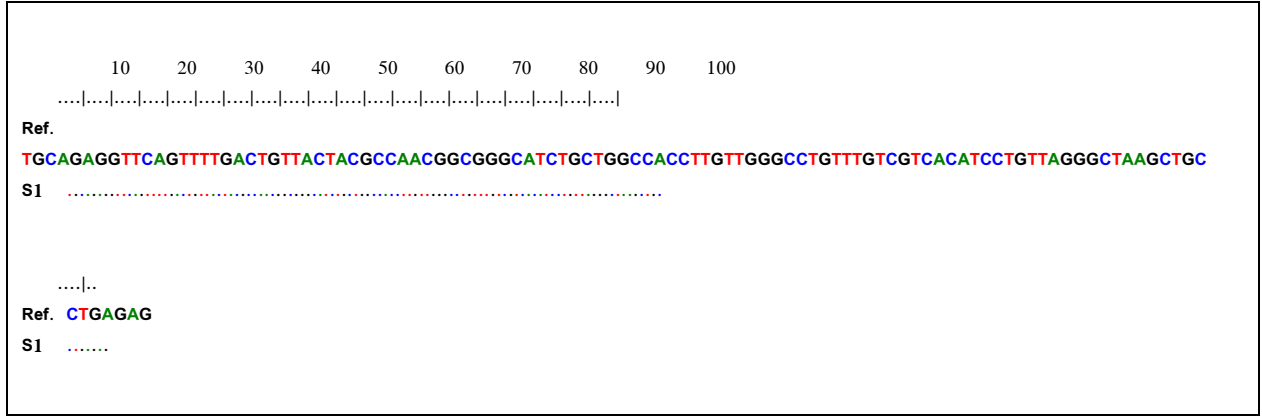
Amplicon	Referring locus sequences (5' - 3')	length
<i>acrA</i> DNA sequences	CTACCTGGAAGTAAACGTCATTTGGTCAGGCCACGGAAGGTGGCAGCCA GCAACGCACCCGATAACCCCCAGCGGAACGACCAGCATAACGGAGAACG GAATCGACC* <sup>1</sup>	105 bp



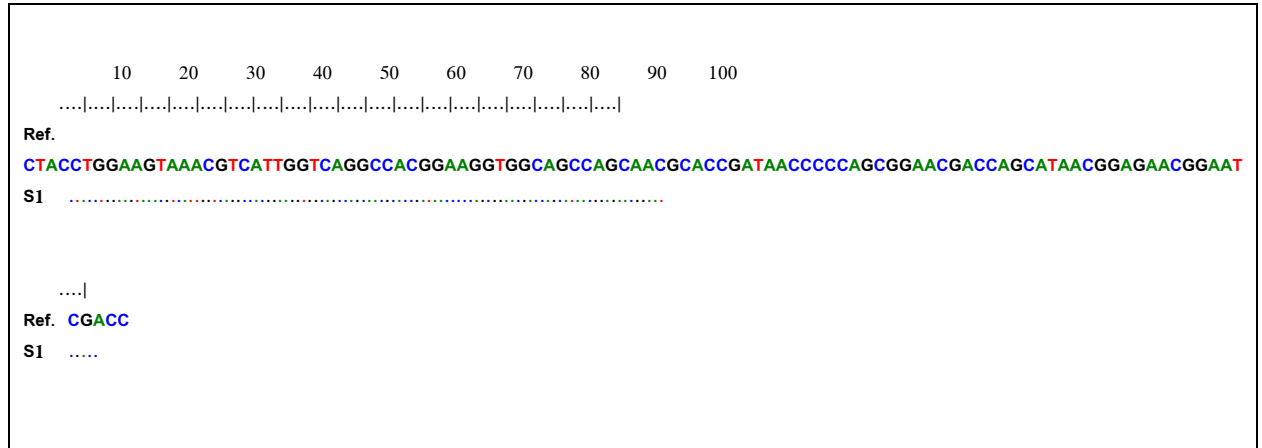
الملحق (A-7) التحليل التتابعي للجين *16srRNA* لبكتريا *E. coli* للعزلة E27 .

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
Ref.									
CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAG									
S1 .....									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
Ref.									
AGGGGGACCTTCGGGCCTTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA									
S1 .....									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
Ref.									
GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT									
S1 .....									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
Ref.									
GCCCGGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGA									
S1 .....									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
Ref.									
AGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGT									
S1 .....									
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
Ref.									
CAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATG									
S1 .....									
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
Ref.									
CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCT									
S1 .....									
710	720								
..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
Ref. GGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGA									
S1 .....									

الملحق ( B -7 ) التحليل التتابعي للجين *acrA* لبكتريا *E. coli* للعزلة E27 .



الملحق ( C-7 ) التحليل التتابعي للجين *acrB* لبكتريا *E. coli* للعزلة E27 .



الملحق (A-8) التحليل التتابعي للجين *16srRNA* لبكتريا *E. coli* في العزلة E40

Amplicon	Referring locus sequences (5' - 3')	length
16S rRNA DNA sequences	CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA CTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGG GCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTC ACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAG ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGGCGCAA GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAAGTACTTTC AGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTTGACGTTACCCGCGAGAAG AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATC CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGG GGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGG CGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCGTAAACGATGTCTGA* <sup>1</sup>	727 bp

الملحق (B-8) التحليل التتابعي للجين *acrA* لبكتريا *E. coli* في العزلة E43.

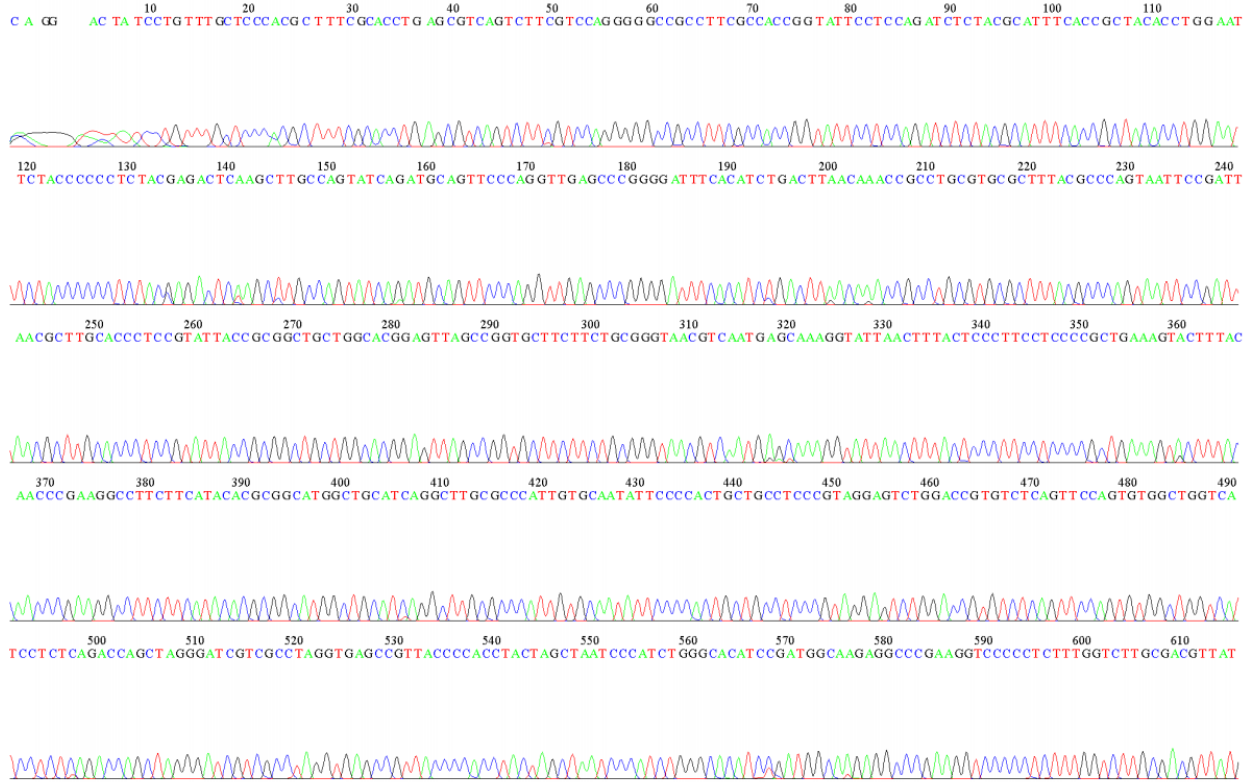
Amplicon	Referring locus sequences (5' - 3')	length
<i>acrA</i> DNA sequences	TGCAGAGGTTTCAGTTTTGACTGTTACTACGCCAACGGCGGGCATCTGC TGGCCACCTTGTGGGCCTGTTTGTGTCACATCCTGTTAGGGCTAAG CTGCCTGAGAG* <sup>1</sup>	107 bp

الملحق (C-8) يوضح التحليل التتابعي للجين *acrB* لبكتريا *E. coli* للعزلة E8.

Amplicon	Referring locus sequences (5' - 3')	length
<i>acrB</i> DNA sequences	CTACCTGGAAGTAAACGTCATTTGGTCAGGCCACGGAAGGTGGCAGCCA GCAACGCACCGATAACCCCCAGCGGAACGACCAGCATTAACGGAGAACC GAATCGACC* <sup>1</sup>	105 bp

الملحق (A-9) التحليل التتابعي للجين *16srRNA* لبكتريا *E. coli* في العزلة E40

File: s40\_SR.ab1 Run Ended: 2019/2/13 12:38:58 Signal G:1652 A:3647 C:6501 T:5528  
Sample: s40\_SR Lane: 34 Base spacing: 16.185286 1392 bases in 17040 scans Page 1 of 2





## Summary

---

This study aims at detecting the efflux pump possessed by *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and their relationship to resistance to antibiotics. one hundred of clinical samples were collected from urine of patients with Urinary Tract Infections (UTIs) from several hospitals in the Baghdad city (Alimameen Al-kadhimin Medical City, Central Child Teaching Hospital, Baghdad Teaching Hospital -Educational Laboratories - Child Protection Education Hospital in Medical City) during the period from 10\7\2018 to 1\10\2018 .

Bacterial isolates were identified by traditional methods, and their diagnosis was confirmed by molecular detection of the *16SrRNA* gene using PCR. 50 clinical isolates of *E. coli* were obtained.

The antibiotic susceptibility test showed that all isolates were Multidrug Resistance (MDR) , were high resistant to Carbenicillin 50(100%) , Erythromycin 49(98%), Rifampin 47(94%), Ceftazidime 44(88%), Cefotaxime 38(76%), Novobiocin 37(74%),Tetracycline 33(66%) ,Ciprofloxacin 26(52%), Gentamicin 15(30%) and Nitrofurantoin 2(4%) .

The prevalence of biofilm producer bacterial isolates was 45(90%) that 2(4%) produced strong, 6(12%) produced moderate and 37(74%) produced weakly biofilm.

The phenotypic detection of efflux pumps was appeared in 35(70%) of bacterial isolates.

The genotypic detection of efflux pump genes revealed that The frequency of the *acrA* and *acrB* genes were 50(100%) each of them, and the gel

## Summary

---

electrophoresis showed that the molecular weight of the gene was 107bas pair and 105 base pair to each of them.

The results of DNA sequencing analysis of *16SrRNA* gene from E27 and E40 isolates revealed that *E. coli* were (100%) similar to the the isolates in National Center for Biotechnology Information.

Ministry of Higher Education and Scientific Research  
University of Baghdad  
College of Education For Pure Science/Ibn Al-Haitham  
Department of Biology



# Phenotypic and molecular detection of *Escherichia coli* efflux pumps from UTI patients

A Thesis submitted  
To the Council of the College of Education For Pure Sciences/  
Ibn Al-Haitham / University of Baghdad as a partial  
fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in  
Biology / Microbiology

By

**Zahraa Hamid Alwan Al-Saadi**

Bachelor of Science in Biology / College of Education For Pure  
Sciences / Ibn Al-Haitham / University of Baghdad 2010-2011

Supervised By

**Prof Dr. Rana Mujahid Abdullah Al-Shwaikh**

**Rabi al-awwal 1440 A.H.**

**March 2019A.D**