جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية – كلية التربية
قسم علوم الحياة

التحري المظهري و الجزيئي عن إنتاج إنزيم الهيمولايسين في بكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج المسالك البولية و المعوية وتأثير أشعة كاما عليها

رسالة مُقدمة إلى عمادة كُلية التربية – جامعة القادسية
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير
في علوم الحياة/ أحياء مجهرية

من قبل
رائد رزاق عجيمي

إشراف
أ.م . علي عبد رحيم الناشي

1439 هـ

2017 م

بِسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ﴿١﴾ خَلَقَ

الْإِنسَانَ مِنْ عَلَقٍ ﴿٢﴾ اقْرَأْ وَرَبُّكَ

الْأَكْرَمُ ﴿٣﴾ الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ﴿٤﴾ عَلَّمَ

الْإِنسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ﴿٥﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة العلق (1-5)

إقرار المشرف

أشــهد ان هذه الرسالة الموسومة بـــ(**التحري المظهري و الجزيئي عن إنتاج إنزيم الهيمولايسن في بكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج المسالك البولية والمعوية وتأثير أشعة كاما عليها**) التي قدمها طالب الماجستير (رائد رزاق عجيمي) أعدت بإشرافي في كلية التربية – جامعة القادسية، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة/ أحياء مجهرية.

التوقيع:

الاسم: علي عبد رحيم الناشي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: 24 / 12 / 2017

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناء على التوصيات المتوافرة، أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: د. احمد جاسم حسن

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: 24 /12/ 2017

إقرار المقوم اللغوي

أشـــهد ان هذه الرسالة الموسومة بـــ (**التحري المظهري و الجزيئي عن إنتاج إنزيم الهيمولايسن في بكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج المسالك البولية والمعوية وتأثير أشعة كاما عليها**) لطالب الماجستير (رائد رزاق عجيمي) سليمة من الناحية اللغوية بعد مراجعتي لها.

التوقيع:

الاسم: د. كريم مهدي المسعودي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: 24 /12/ 2017

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين في ادناه بأننا أطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (**التحري المظهري و الجزيئي عن إنتاج إنزيم الهيمولايسن في بكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج المسالك البولية والمعوية وتأثير أشعة كاما عليها**) المقدمة من طالب الماجستير (رائد رزاق عجيمي) وناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها، بتاريخ 6 / 12 / 2017 فوجدناها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / أحياء المجهرية بتقدير (امتياز).

رئيس اللجنة

التوقيع:

الاسم: أ. د. زياد متعب فجة

العنوان: جامعة القادسية / كلية التقانات الأحيائية

التاريخ: 21/12/ 2017

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: أ. م . د. فراس سرحان عبد

العنوان: جامعة القادسية / كلية العلوم

التاريخ: 21/12/ 2017

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: أ. م. د. حيدر شخير عبيس

العنوان: جامعة القاسم الخضراء/ كلية التقانات الأحيائية

التاريخ: 21/12/ 2017

عضو اللجنة والمشرف

التوقيع:

الاسم: أ. م. علي عبد رحيم الناشي

العنوان: جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ: 21/12/ 2017

مصادقة عمادة كلية التربية – جامعة القادسية

التوقيع:

الاسم: خالد جواد العادلي

المنصب: عميد كلية التربية

اللقب العلمي: أستاذ دكتور

التاريخ: 24/12/ 2017

الإهـــــداء

إلى ...منبع الطيبة والوفـــــــــــاء
روح جدتي..اكراماً وامتناناً

إلى ...مثلي الأعلى و سندي في الحياة
أبي ...عرفانـاً وإحساناً

إلى ...قرة عيني و ينبوع الحنـــــان
أمـــي... وَفـــــــاءً

إلى ...إخوتي ..... أخواتـــــــــي
...حُـــــباً واعتــزازاً

رائد ...

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين ، وأفضل الصلاة وأتم التسليم على خاتم الأنبياء والمرسلين سيدنا محمد وعلى آل بيته الطيبين الطاهرين .

لا يسعني وأنا أنتهي من إعداد دراستي إلا أن أتقدم بخالص شكري وامتناني وعميق احترامي وتقديري إلى أستاذي الفاضل علي عبد الرحيم الناشي لاقتراحه موضوع البحث وتوجيهاته السديدة ودعمه المستمر طيلة مدة الدراسة .

وأتقدم بالشكر والتقدير إلى عمادة كلية التربية/ جامعة القادسية وإلى السيد رئيس قسم علوم الحياة الأستاذ المساعد الدكتور احمد جاسم حسن وإلى أعضاء الهيئة التدريسية لجهودهم المستمرة في توفير متطلبات طلبة الدراسات العليا وعميق شكري وامتناني إلى زملائي وإخوتي طلبة الدراسات العليا ولاسيما الأخ العزيز سيف لطيف شاكر.

ويسعدني أن أتقدم بوافر الشكر والامتنان إلى الدكتور مرتضى شاكر/كلية التربية وإلى الدكتورة جنان ناظم والدكتورة صبا كليف/كلية الطب البيطري على مساعدتهم لي من خلال توفير بعض متطلبات الدراسة.

كما أتقدم بجزيل شكري وامتناني إلى كافة منتسبي مستشفى النسائية والأطفال / مختبر الأحياء المجهرية لما قدموه من تسهيلات ومساعدات كبيرة أثناء مدة البحث وأخص منهم بالذكر التقني الاختصاص الأستاذ أنمار حميد حبيب و البايلوجية أسيل يوسف والبكتريولوجية هيفاء كاظم أمنياتي لهما بالموفقية .

كذلك ابدي اعتزازي وتقديري العميق إلى عائلتي لصبرهم ومساعدتهم لي طوال مدة الدراسة واخص بالشكر والديه العزيزين لتشجيعهما ودعمهما المتواصل وتحملهما معي عناء هذا الجهد وتوفيرهما لي كل ما يمكن أن يساعدني في الوصول إلى هذه المرحلة جزاهما الله عني خير الجزاء، والى كل من ذكرني بالدعاء و فاتني أن اذكرهم متمنياً للجميع الموفقية والنجاح والله ولي التوفيق.

الباحث

الخلاصة

شملت الدراسة 400 عينة جمعت من المرضى المصابين بأخماج الأقنية البولية والمعوية تضمنت 200 عينة إدرار و200 عينة إسهال من مستشفيات مدينة الديوانية ، للفترة من 2016-11-1 إلى 2017-4-1 . إذ جاءت هذه الدراسة لتسليط الضوء على عزلات E.coli المحللة للدم من خلال التحري مظهرياً وجزيئاً عن إنزيم الهيمولايسن قبل وبعد التطفير ومعرفة مدى تأثير أشعة كاما (كوبلت-60) على جين hlyA من خلال إمكانية حدوث طفرات وراثية فيه وعلى مقاومة هذه العزلات للمضادات الحيوية قيد الدراسة.

شخصت 40 عزلة من بكتريا اشريشيا القولون اعتماداً على إنتاجها إنزيم الهيمولايسين على أكار الدم الحاوي على 5 % من دم الأغنام والإنسان بفصائله الأربع ، بواقع 30 (39.47%) عزلة من الإدرار و10 (12.5%) عزلات من الإسهال ، واعُتمدت هذه العزلات أساساً لدراسة إهداف البحث، وأثبتت هذه الدراسة أن فصيلة الدم AB يفضل أستخدامها للتحري عن إنزيم الهيمولايسن مقارنة بفصائل الدم الأخرى ، ثم تم التحري جينياً عن جين hlyA المشفر لإنزيم الهيمولايسن قبل وبعد التطفير باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وثبت أن جين hlyA موجود في جميع عزلات بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم قيد الدراسة والمعزولة من الإدرار والإسهال بنسبة (100%).

حلل تسلسل الحمض النووي لجين hlyA في بكتريا E.coli المطفرة بأشعة كاما وبوقتين (10 و15) دقيقة وبينت النتائج أن هناك 11 طفرة وراثية في DNA لجين hlyA حدثت هذه الطفرات في تسلسل القواعد النيتروجينية وكانت جميعها من نوع الاستبدال بنوعيها المكافئ و غير المكافئ وكانت نسبة التطابق 99 % مع الجين الأصلي. عند تحليل نتائج الترجمة الاحماض الأمينية للجين hlyA مع نتائج الترجمة للحامض الأميني الأصلي حسب موقع NCBI وجد أن الطفرات النقطية الحاصلة بالجين غيرت في مسار ترجمة البروتين حيث تم تحول الحامض الأميني Asparagine (Asp) D الى الحامض الأميني Glutamine (Glu) G

ولغرض تحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness تناولت هذه الدراسة تحليل علاقات النشوء والتطور بين اثنين من عزلات بكتريا E.coli المحللة للدم التي إحداهما مصدرها الإدرار والاخرى الإسهال غير المُطفرات بأشعة كاما والعزلة العالمية وكذلك ما بين أثنين من عزلات E.coli المحللة للدم المعزولة من الإدرار ومثلهما المعزولة من الإسهال المُطفرات بأشعة كاما والعزلة العالمية باستخدام تتابع جين hlyA، استخدم تحليل الترتيب الجيني المتعدد

وشجرة العلاقة الوراثية الجينية بواسطة برنامج (MEGA6) عبر الإنترنيت اعتمادا على ناتج 360bp للجين hlyA نتيجة تفاعل الـPCR ، ومن خلال مخطط تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis للجين hlyA ، بينت نتائج الدراسة الشجرة الوراثية الجينية للجين ان عزلات E.coli غير المطفرة كانت متطابقة تماماً مع العزلة العالمية E.coli التي تحمل الرقم التسلسلي (CP009107.1) بينما كانت عزلات E.coli المطفرة بأشعة كاما غير متطابقة مع العزلة العالمية التي تحمل الرقم التسلسلي (CP009107.1).

اختبرت حساسية عزلات بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم اتجاه 15 مضاداً حيوياً قبل وبعد التشعيع بأشعة كاما وبينت النتائج قبل التشعيع أن جميع العزلات كانت مقاومة بنسبة (100%) لمضاد Ampicillin بينما ابدت هذه العزلات مقاومة أقل لكل من المضادات Ticarcillin بنسبة87.5% و Cefotaxime و Ceftriaxone بنسبة 52.5 % لكل منهما، Aztreonam بنسبة 57.5 % و Amikacin بنسبة 17.5 % و Gentamicin بنسبة 12.5 %و Doxycycline بنسبة42.5 % و Nalidixic acid بنسبة 40 %، Chloramphenicol بنسبة 20 % و Trimethoprim بنسبة 62.5 %. وأظهرت هذه العزلات حساسية عالية بنسبة (100%) لكل من المضادات Meropenem, Imipenem, Ciprofloxacin Nitrofurantoin ، أما بعد التشعيع إذ ظهر تأثير واضح للإشعاع على مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية من خلال زيادة حساسية البكتريا أتجاه جميع المضادات الحيوية قيد الدراسة.

أظهرت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة مظهرياً التي تمتلكها عزلات E.coli والمعزولة من الإدرار والإسهال فكانت منتجة لكل من الغشاء الحيوي بنسبة (83.33%) و (80%) والبكتريوسين بنسبة (60%) و (30%) و المحفظة بنسبة (36.66%) و (40%) ونسبة إنتاجها لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (46.66%) و (80%) جميعها على التوالي.

من ذلك نستنتج ان بكتريا E.coli تلعب دورٌ مهمٌ في احداث الإصابة بالمسالك البولية و المعوية من خلال إنتاجها إنزيم الهيمولايسن قبل وبعد التطفير كما أظهرت أشعة كاما فاعلية عالية في احداث تغيرات في تسلسل القواعد النيتروجينية لجين hlyA من خلال حدوث الطفرات الوراثية فيه وتأثيرها على المضادات الحيوية قيد الدراسة في كلا مصدري العزل.

قائمة المحتويات

التسلسل	العنوان	الصفحة
	الخلاصة	I
	قائمة المحتويات	III
	قائمة الجداول	VIII
	قائمة الأشكال	IX
	قائمة المختصرات	X
	قائمة الملاحق	XI
	الفصل الأول	
.1	المقدمة Interdection	1
	الفصل الثاني	
.2	استعراض المراجع Literature Revivew	4
.1.2	العائلة المعوية Enterobacteriaceae	4
.2.2	التصنيف الحديث لبكتريا اِشريشيا القولون Modern taxonomy of E.coli	5
.1.2.2	بكتريا اشريشيا القولون Escherichia coli	5
.2.2.2	الوبائية Epidemiology	7
.3.2.2	الأمراضية Pathogenicity	7
.4.2.2	فسلجة بكتريا اشريشيا القولون Physiology of E.coli Bacteria	8
.5.2.2	المحتوى الوراثي لبكتريا الايشريشيا القولون Genetic conttent of E.coli	9
.3.2	اشريشيا القولون المسببة لأخماج الأقنية البولية UropathogenicE.coli (UPEC)	11
.1.3.2	أخماج الأقنية البولية Urinary Tract Infections	12
.4.2	بكتريا اشريشيا القولون المسببة للإسهال Diarrheagenic E.coli	14
.1.4.2	اشريشيا القولون المعوية الممرضة Enteropathogenic E.coli (EPEC)	15
.2.4.2	اشريشيا القولون الغازية للأمعاء Enteroinvasive E.coli (EIEC)	15
.3.4.2	اشريشيا القولون النزفية للأمعاء Enterohemorrhagic E.coli (EHEC)	16
.4.4.2	اشريشيا القولون الأمعائية التكتلية Enterioaggative E.coli (EAEC)	17
.5.4.2	اشريشيا القولون ذات الالتصاق المنتشر Diffusely Adhering E.coli (DAEC)	17
.6.4.2	ايشريشيا القولون السامة للأمعاء Enterotoxigenic E.coli (ETEC)	18
.7.4.2	الأخماج المعوية Intestinal Infections	18
.5.2	الأنزيم المحلل للدم (الهيمولايسن) Hemolysis Enzyme	20
.6.2	المضادات الحياتية Antibiotics	22
.1.6.2	مجموعة مضادات البيتالاكتام Beta-Lactam Antibiotic Group	23
.1.1.6.2	البنسيلينات Penicillins	23
.2.1.6.2	السيفالوسبورينات Cephalosporins	24
.3.1.6.2	الكاربينيمات Carbapenems	24
.4.1.6.2	المونوبكتام Monobactam	24
.2.6.2	مجموعة مضادات الأمينوكلايكوسايد Aminoglycoside Antibiotics Group	25
.3.6.2	مجموعة مضادات التتراسايكلين Tetracycline Antibiotcs Group	25

قائمة المحتويات

.4.6.2	مجموعة مضادات الكوينولينات Quinolones Antibiotics Group	25
.5.6.2	مضاد التراي ميثوبرايم Trimethethoprim Antibiotic Group	26
.6.6.2	مضاد الكلورامفنكول Chloramphenicol Antibiotic	26
.7.6.2	مضاد النايتروفيوراشين Nitrofuranation Antibiotic	26
.7.2	عوامل الضراة Virulenec Factors	27
.1.7.2	الغشاء الحيوي Biofilm	27
.2.7.2	البكتريوسين Bacteriocin	28
.3.7.2	المحفظة Capsule	28
.4.7.2	إنزيمات البيتالاكاميز واسعة الطيف Extended Spectrum β-Lactamase Enzymes (ESBLs)	29
.8.2	التطفير Mutagenesis	30
.1.8.2	المطفرات الكيميائية Chemical Mutation	30
.2.8.2	المطفرات الفيزيائية Physical Mutation	30
.3.8.2	أشعة كاما Gamma Raya	31
.4.8.2	التطفير بواسطة أشعة كاما Mutagenesis by Gamma Raya	31
	الفصل الثالث	
.3	المواد وطرائق العمل Materials and Methods	32
.1.3	الأجهزة والمستلزمات Instruments and Equipments	32
.1.1.3	الأجهزة المستعملة Instruments	32
.2.1.3	المستلزمات والأدوات المختبرية Equipments and Tools	33
.3.1.3	المواد الكيمياوية والحيوية Chemical and biological Substance	33
.4.1.3	الأوساط الزرعية الجاهزة Culture Media Ready	34
.5.1.3	الصبغات والكواشف The Reagents and Stains	35
.1.5.1.3	الكواشف The Reagents	35
.6.1.3	المضادات الحياتية Antibiotics	36
.7.1.3	البادئ Primer	37
.8.1.3	العدد المختبرية The Laboratory Kits	37
.9.1.3	المواد المتفرقة الأخرى Other Materials Miscellaneous	38
.2.3	طرائق العمل Methods	38
.1.2.3	التعقيم Sterilization	38
.2.2.3	تحضير الأوساط الزرعية Preparation of Culture Media	38
.1.2.2.3	وسط الدم الأساس Blood Base Media	38
.2.2.2.3	وسط اليوريا الأساس Urea Base Media	39
.3.2.3	تحضير المحاليل Preparation of solutions	39
.1.3.2.3	المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline Solution	39
.2.3.2.3	محلول ثابت العكورة القياسي (محلول ماكفرلاند 0.5) McFarland Standard	39
.3.3.2.3	المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solution	39
.4.2.3	تحضير الكواشف Preparation of Reagents	40

قائمة المحتويات

.1.4.2.3	كاشف الأوكسديز Oxidase Reagent	40
.2.4.2.3	كاشف احمر المثيل Methyl Red Reagent	40
.3.4.2.3	كاشف فوكس بروسكور Voges-Proskauer reagent	40
.5.2.3	العينات السريرية Clinical Samples	42
.1.5.2.3	جمع العينات السريرية Collection of Clinical Samples	42
.2.5.2.3	الفحص المباشر للعينات Samples of Direct Examination	42
.3.5.2.3	زرع العينات Samples Culture	42
.4.5.2.3	تشخيص العزلات البكتيرية Diagnosis of bacterial isolates	43
.1.4.5.2.3	التشخيص المظهري Morphological Diagnosis	43
.2.4.5.2.3	التشخيص المجهري Microscopic Diagnosis	43
.5.5.2.3	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests	43
.1.5.5.2.3	فحص الاندول Indol Test	43
.2.5.5.2.3	فحص المثيل الأحمر Methyl Red Test	43
.3.5.5.2.3	فحص الأوكسديز Oxidase Test	44
.4.5.5.2.3	فحص الكاتاليز Catalase Test	44
.5.5.5.2.3	فحص قابلية البكتريا على الحركة Motility Test	44
.6.5.5.2.3	اختبار انزيم اليوريز Urease Test	44
.7.5.5.2.3	اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test	44
.8.5.5.2.3	اختبار فوكس – بروسكور Voges – Proskaur Test	45
.9.5.5.2.3	اختبار النمو على اكار الحديد ثلاثي السكر Triple Sugar Iron (TSI)	45
.6.2.3	تشخيص بنظام API-20E API20E identification system	45
.7.2.3	حفظ العزلات البكتيرية Maintenance of Isolates Bacterial	45
.8.2.3	اختبار حساسية عزلات اشيريشيا القولون للمضادات الحياتية Antibiotic Susceptibility Testing of the Escherichia coli isolates	46
.9.2.3	الكشف عن بعض عوامل الضراوة Detection of some virulence factor	46
.1.9.2.3	الكشف عن انتاج الانزيم الحال للدم Detection of Hemolysin Production	46
.2.9.2.3	الكشف عن تكون الغشاء الحيوي Detection of biofilm formation	47
.3.9.2.3	الكشف عن انتاج البكتريوسين Detection of bacteriocin Production	47
.4.9.2.3	الكشف عن وجود المحفظة البكتيرية Detection of capsuleProduction	48
.5.9.2.3	الكشف عن انتاج انزيمات البيتالاكتمايز واسعة الطيف Detection Extended Spectrum β-Lactamases (ESβLs)Production	48
.3.3	التطفير Mutagenesis	49
.1.3.3	مصدر التطفير Source of Mutagenesis	49
.2.3.3	تطفير العزلات البكتيرية Mutagenesis of Bacterial Isolates	49
.3.3.3	السلامة المختبرية Laboratory Safety	50
.4.3	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)	50
.1.4.3	استخلاص الدنا الكلي DNA Extraction Whole	50
.2.4.3	تقدير تركيز و نقاوةDNA Estimation DNA Concentration and Purity	51

قائمة المحتويات

.3.4.3	تحضير مزيج سلسلة تفاعل البلمرة PCR Master mixture	52
.4.4.3	برمجة جهاز الدورات الحرارية Thermocycler PCR Program	52
.5.4.3	الترحيل الكهربائي الهلامي Agarose Gel Electrophoresis	53
.5.3	طريقة تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA hlyA Sequencer Method	54
.6.3	التحليل الاحصائي Statistical Analysis	54
	الفصل الرابع	
.4	النتائج والمناقشة Results and Discussion	55
.1.4	العزل Isolation	55
.2.4	توزيع العزلات حسب الجنس Distribution of isolates according to sex	56
.3.4	التشخيص البكتيري Bacterial Identification	57
.1.3.4	توزيع العزلات حسب مصدر العزل Distribution of isolates according to source of isolate	58
.2.3.4	نظام التشخيص Analytic Profile Indext Enterobacteriaceae (API20E)	59
.3.3.4	إعداد ونسب بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال وتوزيها حسب الجنس	60
.4.3.4	الصفات السريرية للعينات Clinical characteristics of samples	61
.4.4	التحري عن انزيم الهيمولايسن الذي تنتجه بكتريا E.coli على اكار الدم (الإنسان و الأغنام) Screening of producing hemolysin on blood agar (human and sheep)	62
.1.4.4	تقنية تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA Sequencing Technique of hlyA genes	67
.2.4.4	تحليل الشجرة الوراثية لبكتريا E.coli وفق التسلسل التتابعي لجين hlyA	77
.5.4	أختبار حساسية بكتريا E.coli للمضادات الحياتية Sensitive Test of E.coli to Antibiotics	79
.1.5.4	تأثير اشعة كاما على مقاومة بكتريا E.coli للمضادات الحياتية Effect of Gamma–ray on E.coli bacteria for antibiotic	82
.6.4	التحري المظهري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا اشريشيا القولون Phenotype Detection of Some Virulence Factor for E.coli	86
.1.6.4	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation	86
.2.6.4	إنتاج البكتريوسين Bacteriocin Production	87
.3.6.4	إنتاج المحفظة Capsule Production	87
.4.6.4	التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Detection of ESβLs	88
	الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations	
.5	الاستنتاجات Conclusions	89
.1.5	التوصيات Recommendations	90
	المصادر References	
	المصادر العربية	91
	المصادر الأنكليزية	92
	الملاحق Appendices	118
	الخلاصةالأنكليزية Summary	

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1-3	الأجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة.	32
2-3	المستلزمات والأدوات المستعملة في الدراسة	33
3-3	المواد الكيماوية والحيوية المستعملة بالدراسة.	33
4-3	الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة.	34
5-3	الصبغات المستعملة في الدراسة.	35
6-3	الكواشف المستعملة في الدراسة.	35
7-3	أقراص المستعملة في اختبار الحساسية الدوائية مع أقطار التثبيط القياسية وفق ما جاء في (CLSI, 2014).	36
8-3	البادئ المستخدم في الدراسة .	37
9-3	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة .	37
10-3	المواد الأخرى المستعملة في الدراسة.	38
11-3	بعض خصائص العنصر المشع (coblet-60).	49
12-3	المكونات اللازمة للتفاعل PCR لجين hlyA المستعمل في الدراسة.	52
13-3	برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل لتضخيم جين hlyA.	52
1-4	توزيع عينات الإدرار والإسهال حسب نتيجة الزرع البكتيري.	55
2-4	توزيع العزلات البكتيرية المعزولة من الإدرار والإسهال حسب الجنس	56
3-4	اختبارات الكيموحيوية للبكتريا المعزولة من الإدرار والإسهال.	58
4-4	إعداد ونسب البكتريا المعزولة من مصدري العزل .	59
5-4	إعداد ونسب بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال وتوزيعها حسب الجنس.	61
6-4	اعداد ونسب عزلات E.coli حسب نمط الهيمولايسن المنتج و نوع الدم المُحلل.	63
7-4	عزلات E.coli المحللة لفصائل الدم البشري والمعزولة من أخماج الأقنية البولية والمعوية.	64
8-4	يمثل نوع وموقع الطفرة الوراثية في جين hlyA .	76
9-4	الأرقام التسلسلية لعزلات بكتريا E.coli المسجلة في NCBI	77
10-4	عدد العزلات والنسب المئوية لمقاومة بكتريا E.coli للمضادات الحيوية.	81
11-4	تأثير أشعة كاما على مقاومة عزلات E.coli للمضادات الحيوية قبل وبعد التشعيع.	82
12-4	نسب عوامل الضراوة المنتجة من قبل بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال.	88

قائمة الإشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1-3	مخطط منوال الدراسة	41
1-4	يمثل صور الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز والحاوي على نتائج فحص الـ PCR الخاص بالتحري عن جين الضراوة hlyA gene في جرثومة Escherichia coli المعزولة من الإدرار والشكل (A) يمثل عينات غير المُطفرة (السيطرة) وشكل (B) يمثل عينات مُطفرة بوقت 10 دقائق والشكل (C) يمثل عينات مُطفرة بوقت 15 دقيقة وبفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير لمدة 60 دقيقة حيث يمثل M: Marker 2000-100bp و الارقام من (1-10) تمثل العزلات الموجبة للفحص بناتج طولة 360bp.	65
2-4	يمثل صور الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز والحاوي على نتائج فحص الـ PCR الخاص بالتحري عن جين الضراوة hlyA gene في جرثومة Escherichia coli المعزولة من الإسهال ويمثل شكل (A) عينات غير المُطفرة (سيطرة) وشكل (B) عينات مُطفرة بوقت 10 دقيقة وشكل (C) عينات مُطفرة بوقت 15 دقيقة وبفولتية 100 وفرق جهد (80) أمبير ولمدة 60 دقيقة حيث يمثل M: Marker 2000-100bp و الأرقام من (1-5) تمثل العزلات الموجبة للفحص بناتج طولة 360bp.	66
3-4	نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA في بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال مقارنة مع الجين الأصلي لبكتريا Escherichia coli (CP009107.1) A- يمثل عزلة E.coli سيطرة معزولة من الإدرار ، B– يمثل عزلة E.coli سيطرة معزولة من الإسهال	69
4-4	نتائج تحليل ترجمة الاحماض الأمينة لجين hlyA لبكتريا E.coli مقارنة مع الحامض الأميني للعزلة القياسية (AKN56576.1) A- يمثل عزلة E.coli سيطرة معزولة من الإدرار، B– يمثل عزلة E.coli سيطرة معزولة من الإسهال.	70
5-4	نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA في بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار المُطفرة بالأشعة بوقت (10و15) دقائق المقارنة مع الجين الأصلي لبكتريا Escherichia coli (CP009107.1).	72
6-4	نتائج تحليل ترجمة الاحماض الأمينية لجين hlyA لبكتريا E.coli معزولة من الإدرار المُطفرة بوقت (10 و 15) دقيقة مقارنة مع الحامض الأميني للعزلة العالمية (AKN56576.1)	73
7-4	نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA في بكتريا E.coli المعزولة من الإسهال المُطفرة بالأشعة بوقت (10و15) دقائق المقارنة مع الجين الأصلي لبكتريا Escherichia coli (CP009107.1)	75

8-4	نتائج تحليل ترجمة الاحماض الأمينية لجين hlyA لبكتريا E.coli معزولة من الإسهال المُطفرة بوقت (10و15) دقيقة مقارنة مع الحامض الأميني للعزلة العالمية (AKN56576.1)	75
9-4	يمثل تحليل متعددة اصطفاف تتابع القواعد الجينية باستخدام برنامج (MEGA6) لناتج فحص تفاعل تسلسل البلمرة PCR لجين hlyA في جرثومة Escherichia coli .	78
10-4	يمثل تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لعزلات بكتريا E.coli ومقارنتها مع العزلة العالمية E.coli (CP009107.1)	78
11-4	يظهر تأثير أشعة كاما على مقاومة عزلات E.coli للمضادات قبل وبعد التشعيع .	85

قائمة المختصرات

API 20E	Analytic Profile Indext 20 Enterobacteriaceae
WHO	World Health Organization
ROS	Reactive Oxygen Species
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
hlyA	Hemolysin A Gene
hlyB	Hemolysin B Gene
hlyC	Hemolysin C Gene
hlyD	Hemolysin D Gene
PCR	Polymerase Chain Reaction
EBB	Elution Buffer
EDTA	Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid
LPS	Lipopolysaccharide
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
TBE	Tris-Borate-EDTA
EMB	Eosin Methylene Blue
DEC	Diarrheagenic E .coli
EPEC	Enteropathogenic E.coli
EIEC	Enteroinvasive E.coli
EHEC	Enterohemorrhagic E.coli
EAEC	Enteroaggregative E.coli
ETEC	Enterotoxigenic E.coli
DAEC	Diffusely Adhering E.coli
UTIs	Urinary Tract Infections
U.V	Ultra Violet

UPEC	**Uropathogenic E.coli**
Bp	**Base pair**
Kbp	**Kilo base pair**
NCBI	**National Community Biological Information**
IS	**Insertion Sequences**
BAP	**Biofilm Associated Proteins**
CFU	**Colony Forming Unit**
CLSI	**Clinical and Laboratory Standards Institute**
A/E lesion	**Attaching and Effacing lesion**
ATP	**Adenosine Triphsphate**
PAIs	**Pathogenicity associated islands**
tra	**Transfer gene**
Mop	**Mobilization protein**
Fim H	**Fimbrial subelements**
LEE	**Locus of Enterocyte Effacement**
OMPs	**Outer Membrane Proteins**
HC	**Hemorrhagic Colitis**
HUS	**Hemolytic-Uremic Syndrome**
Stx	**Shiga toxin**
VT	**Verotoxin**
HEp-2	**Hepatoerythoropoietic porphyria-2**
LTs	**Heat labile enterotoxins**
STs	**Heat stable enterotoxins**
DHFR	**Dihydrofolate reductase**
AmpC	**Ampicillin resistance gene class C**
5-BU	**5-Bromo uracil**
EES	**Ethyl Ethane Sulphate**
C0-60	**Cobult-60**
TSI	**Triple Sugar Iron**
BLAST	**Basic Local Alignment Search Tool**
MEGA6	**Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6**
dATP	**Deoxy Adenosine Triphosphate**
dCTP	**Deoxy Cytidine Triphosphate**
dGTP	**Deoxy Guanosine Triphosphate**
dTTP	**Deoxy Thymidine Triphosphate**

قائمة الملاحق

رقم الملحق	عنوان الملحق
1	استمارة جمع المعلومات المرضى.
2	النظير المشع لأشعة كاما (كوبلت-60).
3	نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا E.coli على وفق نظامAPI 20 E System.
4	جدول نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا E. coli باستخدام نظام API 20E .
5	الصفات السريرية للعينات.
6	استمارة معلومات تسجيل عزلات بكتريا اشريشيا القولون في بنك الجينات.
7	مقاومة عزلات بكتريا اشريشيا القولون للمضادات الحيوية المستعملة في الدراسة.

الخلاصـــة

Summary

الفصـل الاول
المقدمــة
Introduction

الفصـل الثانـي

استعراض المـراجـع

Literature Review

الفصل الثالث
المواد وطرائق العمل
Material & Methods

الفصـــل الرابـــع
النتـــائـــج والمنـــاقشـــة
Results & Discussion

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusion & Recommendation

المصـــــــادر

References

الملاحق

Appendices

1. المقــدمـــــة Introduction

تعد بكتريا اشريشيا القولون Escherichia coli واحدة من أكثر أنواع العائلة المعوية أهميةً ويكون موطنها الطبيعي في القناة الهضمية للإنسان مما يجعلها أن تكون قادرة على إصابة الجسم بشكل انتهازي عندما تتوفر الفرصة لذلك وتسبب أمراضاً عديدة (Brooks et al., 2004) و تضم هذه البكتريا سلالات مسببة لأمراض داخل الأمعاء وسلالات إخرى قادرة على احداث الإصابة خارج الأمعاء (Kaper et al., 2004). كما تتواجد هذه البكتريا في أمعاء الحيوانات وتنتشر في بيئات مختلفة وتسبب تلوث الماء والحليب والغذاء ولذلك تعد مؤشراً على التلوث البرازي للماء (Fecal contamination) (Brook et al., 2010).

إذ تعد بكتريا E.coli المسبب الرئيسي لـ90% من أخماج الأقنية البولية، ومن النمط المتكرر الحدوث وبشكل خاص عند النساء، وتأتـي بالمرتبة الثانيـة بعـد أمراض الجهاز التنفســي ضمـن الأخماج المتعلقة بالمجتمع (Community–acquired infections) فـي حين تكون فـي صدارة قائمة الأخماج المكتسبة مـن المستشفيات (Nosocomial infections) (Todar, 2008).

يعد الإسهال واحداً من الأمراض المهمة المتسببة عن بكتريا اشريشيا القولون وكما تعد هذه البكتريا واحدة من أكثر المسببات شيوعاً للأمراض والوفيات في الأطفال الذين يعانون من الإسهال في جميع انحاء العالم وخاصة البلدان النامية (Nweze, 2009). ولا يزال مرض الإسهال يمثل مشكلة صحية في جميع انحاء العالم، فقد أشارت منظمة الصحة العالمية (WHO) في تقاريرها إلى ازدياد حالات الوفيات في العالم بسبب الإصابة بأخماج الإسهال والأقنية البولية وإن الفئات الأكثر تأثراً هم الأطفال دون سن الخامسة من العمر(Alrifai et al., 2009).

إذ تمتلك البكتريا E.coli عوامل ضراوة عديدة وأهمها إنتاجها لإنزيم الهيمولايسن Haemolysin الذي يلعب دوراً مهما في إمراضيتها (Dhakal & Mulvey, 2012). و تكون معظم سلالات بكتريا E.coli المرضية منتجة لإنزيم الهيمولايسن المحلل للدم (Brook et al., 2007). إذ يعمل هذا الإنزيم على تكوين ثقوب بجدار الخلايا وتحلل لكريات الدم الحمراء، وهذا يساعد على اطلاق المواد الغذائية المهمة كالحديد الذي يكون له دور في نمو الخلايا البكتيرية و أنتشارها (Wiles et al., 2008). وتستطيع بكتريا اشريشيا القولون من إنتاج عدة أنواع من الهيمولايسن أهمها الفا-هيمولايسن وهو بروتين يفرز خارج الخلية ويقوم بتكوين ثقوب في الجدار الخلوي ويسمى هذا النوع بالتحليل الدموي من نوع (α-Hemolysis) والبيتا-هيمولايسن وهو بروتين مرتبط بالخلية يقوم بتحليل أغشية الخلية البكتيرية ويسمى هذا النوع بالتحليل الدموي من

نوع (β-hemolysis) (Han et al., 2010). ويفرز هذا الإنزيم من قبل سلالات بكتريا E.coli وخاصة السلالات التي تصيب الجهاز البولي، ويمكن لبعض سلالاتها المتواجدة بالأمعاء من إنتاج هذا الإنزيم ويعتبر من عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا، وتوجد أربع جينات تشفر لهذا الإنزيم هي (hlyA, hlyB, hlyC, hlyD) وتكون محمولة على البلازميد أو الكروموسوم والتي تكتسب خلال النقل الجيني الأفقي (Horizontal gene transfer) (Burgos & Beutin, 2010).

لقد كان لاكتشاف المضادات الحياتية اثراً كبيراً في انخفاض معدلات الإصابة بأخماج المسالك البولية والإسهال، وقد وجد إن فرط استخدام مضادات حياتية معينة بشكل عشوائي وبدون أتباع نظام صحـــي يؤدي إلى ظهور سلالات مـــن البكتريا المقاومة للمضادات الحياتية وعادة تنتشر صفة المقاومة بشكل طردي مع الزيادة في استخدام هذه المضادات، الأمر الذي جعل علاج هذه الإمراض ينطوي على صعوبات كبيرة ، لذا وجب اختيار المضاد الحيوي الملائم للعلاج إلا يتم عشوائياً وإنما يعتمد على إجراء اختبارات الحساسية الدوائية على البكتريا المعزولة لمعرفة المضاد المناسب للقضاء عليها (Hamedi et al., 2009).

تعد بكتريا E.coli واحدة من الكائنات بدائية النواة المهمة التي تستخدم في الدراسات العلمية وذلك لامتلاكها مجموعة مهمة من الصفات مثل انخفاض زمن الجيل لها وسهولة زراعتها وسرعة نموها بغية الحصول على نتائج مهمة عن الخصائص الوراثية والأيضية لخلايا كائنات الحية (Kappke et al., 2005). لذلك استخدمت الخلايا البكتيرية كمستشعر حيوي لمعرفة تأثير أشعة كاما بايلوجيا على بكتريا اشريشيا القولونية التي تتواجد في أمعاء الإنسان والحيوانات ، و يكون تأثير الأشعة على الكائنات الحية بشكل مباشر أو غير مباشر على الجزيئات المهمة أو العضيات مثل الحامض النووي DNA و الغشاء السايتوبلازمي (Chirinos et al., 2002). وتعمل الأشعة المؤينة على توليد الطفرات من خلال التفاعل ما بين الجذور الحرة المتفاعلة Reactive oxygen species (ROS) مع الأحماض النووية DNA وRNA وهذا التفاعل يؤدي إلى تضرر الأحماض النووية والنيوكلوتيدات عن طريق الحذف والاستبدال والإضافة في الطفرة النقطية (Suzuki et al., 2008).

تعد أخماج المسالك البولية والإسهال من الأمراض الخطيرة و واسعة الأنتشار في العراق كما في غيره من دول العالم الاخرى، وخاصة في فصل الصيف وأصبحت هذه الأخماج من الأسباب المهمة لحدوث الوفيات عند الأطفال(Tannok, 2004). وبسبب أهمية وخطورة بكتريا E.coli خاصة على الأطفال حديثي الولادة ، وتزايد حالات الإصابة بها وإمكانية أنتشار وباء الإصابة الناتــج عن استهلاك الأغذية الملوثــة فضلاً عن إن خطورة المرض وعدم توافر العلاج

قد كان دافعاً لتركيز الأبحـاث في العالم حـول تحسين كفاءة الكشف الجزيئي باستخدام تقنيات متطورة وسريعة مع تقليل الوقت والجهد، لذا فأن التقنيـات الجزيئية الحديثـة وفـرت أفضـل الوسائل التشخيصية ومنها تقنية تفاعـلات التضاعف البلمرة لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) لما تمتاز به هذه التقنية من الخصوصية والسرعة العالية في التحري عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة في عزلات بكتريا E.coli المعزولة من العينات السريرية (الإدرار و الإسهال) بالإضافة إلى تقنية الـSequencing التي لها أهمية كبيرة في تحليل التسلسل التتابعي للجينوم البكتيري والكشف عن الطفرات الوراثية فضلاً عن ايجاد القرابة الوراثية بين العزلات البكتيرية (Shaheen et al., 2009).

لخطورة بكتريا اشريشيا القولون E.coli في احداث الأخماج البولية والمعوية وصعوبة تمييزها عن بكتريا القولون المتعايشة ، وقلة الدراسات المتوفرة عن جين hlyA في بكتريا E.coli المسببة للإسهال من الناحية الجينية ولذلك ارتأينا القيام بهذه الدراسة التي هدفت للتحري عن جين hlyA المسؤول عن إنزيم الهيمولايسن الذي يعتبر أحد عوامل الضراوة لبكتريا E.coli جزيئياً بواسطة تقنية التفاعل السلسلة لإنزيم بلمرة الدنا (PCR) والكشف عن تأثير الإشعاع على جين hlyA وعلى مقاومة المضادات الحياتية وتم ذلك من خلال إتباع الخطوات التالية .

1. عزل و تشخيص بكتريا E.coli المحللة للدم من عينات الإدرار و الإسهال.
2. الكشف الجزيئي عن جين hlyA المسؤول عن تحلل الدم باستخدام تقنية الـ (PCR).
3. تطفير بكتريا E.coli المحللة للدم بأشعة كاما (كوبلت -60).
4. الكشف عن الطفرات الوراثية في جين hlyA باستعمال تقنية الـ Sequencing.
5. دراسة حساسية عزلات بكتريا الاشريشيا القولون للمضادات الحيوية المختلفة وتأثير أشعة كاما على استجابة البكتريا للمضادات الحيوية.
6. الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة مثل الغشاء الحيوي والبكتريوسين والمحفظة وإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف.

2. استعراض المراجع Literature Review

1.2.العائلة المعوية Enterobacteriaceae

تعد العائلة المعوية من أكبر المجاميع البكتيرية أهميةً وانتشاراً وهي من العصيات السالبة لصبغة اكرام ، حيث يكون الموطن الطبيعي لها القناة المعوية للإنسان والحيوان ، وهي واسعة الانتشار في الطبيعة حيث توجد في بيئات مختلفة مثل التربة والمياه (Ryan et al., 2010). وتعتبر من أهم العوائل البكتيرية وذلك لدورها في مجالات الطب والصحة العامة والوراثة الجزيئية و الأمراضية والتنظيم الوظيفي (Garrity et al., 2005). إذ تضم هذه العائلة 44 جنساً وأكثر من 176 نوعاً (Brenner et al., 2004). وتقسم هذه العائلة إلى مجموعة من الأجناس المخمرة لسكر اللاكتوز مثل Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Citrobacter وأجناس غير مخمرة لسكر اللاكتوز مثل Proteus, Yersinia, Shigella, Salmonella (Paterson , 2006). ويتميز إفراد هذه العائلة من خلال نموها على أوساط زرعية اعتيادية ولا تحتاج الى أوساط زرعية معقدة ويمكن أن تنمو على أوساط زرعية تفريقية مثل Eosin methylene blue, XLDagar, MacConkey (Brooks et al., 2010). وأجناس هذه العائلة تسبب إصابات سريرية مختلفة إذ عزلت من البراز ،الإدرار، الحروق ، القشع ، السائل ألشوكي ، الجروح ، والدم إلى جانب الغذاء والماء الملوثين (Pitout & Laupland, 2008). ومن الإصابات التي تسببها إفراد هذه العائلة الالتهابات المعوية والتهابات المسالك البولية وهما الأكثر شيوعاً تليها الالتهابات الرئوية وإصابات الجهاز العصبي ومجرى الدم (Abbott, 2011).

تملك إفراد العائلة المعوية العديد من عوامل الضراوة التي تكون السبب الرئيسي في إحداث الإصابات مثل الهيمولايسن Hemolysin و البكتريوسين Bacteriocin ، كذلك تركيب الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة اكرام يكون عاملاً مهماً في ضراوتها إذ يحتوي على طبقة رقيقة من Peptidoglycan وطبقة البروتينات الدهنية وعديد السكريد الدهني والدهون المسفرة فضلاً عن وجود الغلاف الخارجي الذي يعمل بنفاذية اختيارية إذ يحمي الجرثومة من المضادات الحياتية والإنزيمات الحالة (Melnyk et al., 2015).

تتميز أجناس هذه العائلة بكونها بكتريا عصوية الشكل وسالبة لصبغة اكرام ، وتتحرك بواسطة أسواط محيطية أو غير متحركة وبعضها يحتوي على كبسولة Capsule ، هوائية أو لاهوائية اختيارية Faculitative anaerobic، وتختزل النترات إلى نتريت (ماعدا بعض

السلالات التابعة للجنس Erwine) وتكون موجبة لاختبار الكاتليز Catalase وسالبة لاختبار الأوكسديز Oxidase، ولا تكون سبورات (Cabral, 2010).

2.2. التصنيف الحديث لبكتريا اشريشيا القولون Modern Taxonomy of E.coli

تندرج بكتريا E.coli مع أربع أنواع إخرى هي (E.vulneris, E.albertii, E.hermanii, E.fergusonii) ضمن جنس الاشريشيا وينتمي هذا جنس بجانب 43 جنساً بكتيرياً أخر إلى العائلة المعوية التي تعود إلى رتبة Entrobactriales العائدة بجانب 13 رتبة إخرى إلى صنف Gamma Proteobacteria التي تكون ضمن شعبة Proteobacteria المتضمنة في حقل Bacteria من مملكة Eubacteria (Garrity et al., 2005). وتصنف بكتريا Escherichia coli حسب ما اورده (Tchaptchet & Hansen, 2011) كما يأتي:

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family :Enterobacteriace

Genes: Escherichia

Species: Coli

1.2.2. بكتريا اشريشيا القولون Escherichia coli

تعد هذه البكتريا من العصيات السالبة لصبغة اكرام و الأكثر أهميةً وشيوعاً بين إفراد العائلة المعوية التي تستوطن القناة المعوية للإنسان والحيوانات ذات الدم الحار (Tchaptchet & Hansan, 2011). وتكون هذه بكتريا من النبيب الطبيعي ولكن بعض سلالتها يمكن أن تكون مرضية وتسبب أخماج الجهاز الهضمي و أخماج الأقنية البولية (Reddy, 2010). ولقد وصفت هذه البكتريا لأول مرة من قبل العالم الألماني Theoder Echerich عام 1885 وأطلق عليها آنذاك Bacterium coli ، والأن يطلق عليها E.coli (CDC, 2012). وتعد من البكتريا المفيدة للمضيف من خلال إنتاجها الفيتامينات في الأمعاء مثل فيتامين (K2) (Huang et al., 2012).

تضم العائلة المعوية عدداً كبيراً من الأجناس البكتيرية ذات الصلة فيما بينها، و جنس الإشريشيا Escherichia يكون قريب الصلة من الناحية الوراثية مع باقي الأجناس ولاسيما جنس Shigella ويضم هذا الجنس خمسة أنواع هي : E.albertii الذي عزل من أمعاء الصراصر بينما النوعان E.vulneris, E.hermanii فعزلا من إصابات في الإنسان ونوع

E.fergusonii فعزل من براز الإنسان ، و إن النـوع E.coli هو الأكثر أهميةً وشيوعاً في أمراضية الإنسان (Forbes et al., 2002) .

تستطيع بكتريا E.coli من النمو على الأوساط الاعتيادية مثل وسط Nutrient agar وتكون مستعمراتها رطبة بيضاء أو رمادية اللون كبيرة وسميكة أما على وسط Blood agar فان العديد من سلالاتها تكون محللة للدم، ويكون لون مستعمرتها على وسط MacConkey agar أحمرا أو ورديا لماعاً نتيجة تخمر سكر اللاكتوز، و تنمو على الأوساط التفريقية مثل وسط Eosin Methylene Agar (EMB) إذ تعطي بريقاً معدنياً أخضر لماعاً يسمى Green metallic sheen (Kumar, 2016).

وتوصف بكتريا E.coli بأنها غير مكونة للسبورات Nonsporing و معظم سلالتها متحركة بشكل مفرد أو بشكل أزواج بواسطة أسواط Peritricous flagella تحيط بسطح الخلية البكتيرية وتكون هوائية أو لاهوائية اختيارية ، وموجبة لاختبارات الاندول والمثيل الأحمر وسالبة لاختبارات الفوكس بروسيكاور والسترات ومخمرة لسكريات اللاكتوز والكلوكوز والمالتوز والمانيتول وتنتج حامضاً وغازاً، ولا تنتج غاز H_2S ولا تحلل اليوريز، وإن أكثر من 90% من بكتريا الايشريشيا القولون تكون منتجة لإنزيمات β-glucuronidase (Gupte, 2010).

تعد هذه البكتريا من الممرضات الانتهازية التي تكون لها القابلية على احداث أخماج عديدة منها الإسهال للأطفال الرضع diarrhea in infants و أخماج المسالك البولية Urinary Tract Infections (UTI) و أخماج السحايا Meningitis و أخماج الجروح Wound infections وذات الرئة Pneumonia وتعفن الدم Septicemia وعدوى المستشفيات Nosocomial Infection (Todar, 2008) .

تحوي هذه البكتريا على ثلاث أنواع من المستضدات المصلية تتمثل بالمستضد الجسمي O (Somatic antigen O) وهو عبارة عن عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) الذي يوجد في جدار الخلية البكتيرية ويكون هذا المستضد ثابتاً بالحرارة ويوجد في بكتريا العائلة المعوية، والمستضد السوطي H (Flagella antigen H) والذي يمثل المستضد البروتيني و يتواجد في الأنواع المتحركة من البكتريا E.coli، ومستضد المحفظة K (Capsule antigen K) المتكون من متعدد السكري ويوجد في الأنواع الحاوية على المحفظة و الأهلاب (Harvey et al., 2007). وتقسم بكتريا E.coli الممرضة إلى المسببة للإسهال Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) والمسببة للأخماج الأقنية البولية Uropathogenic Escherichia coli (UTI) (Kaper et al., 2004).

2.2.2. الوبائية Epidemiology

تتواجد بكتريا الايشريشيا القولون في القناة الهضمية للأطفال بعد الولادة مباشرة ضمن النبيب الطبيعي في الأمعاء ، لكن بعض سلالات E.coli لها القابلية أن تصبح انتهازية وتسبب إمراض مختلفة خاصة عند انتقالها من الأمعاء إلى أماكن إخرى من الجسم خاصة الأخماج البولية أو أي عضو في التجويف البطني عندما تتوفر ظروف مناسبة للإصابة مثل ضعف مناعة الجسم، وكذلك تتواجد في أمعاء الحيوانات (Brooks et al., 2010). وتعد بكتريا E.coli مصدراً لحدوث إصابات المستشفيات خاصة في الأطفال ذوي المناعة الضعيفة والذين يعانون من سوء التغذية مما يؤدي إلى تناولهم مضادات حيوية بكثرة وهذا يسبب ظهور سلالات من البكتريا مقاومة للمضادات الحيوية (Korzeniewsk et al., 2013).

أن فشل العلاج بسبب مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية خاصة المضادات الحيوية ذات الاختيار الأول في علاج الأخماج كالسيفالوسبورينات الجيل الثالث يؤدي إلى تكرار الإصابة وبالتالي تزداد الأمراض وترفع معدل الوفيات (Barber et al., 2013). وأن من أهم أسباب مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية هو اكتساب سلالات البكتريا محددات المقاومة والتوسع في اكتساب المقاومة الموجودة مسبقاً في بكتريا E.coli (Costa et al., 2013). وتعد بكتريا اشريشيا القولون واحدة من أكثر المسببات شيوعا للأمراض والوفيات للأطفال الذين يعانون من الإسهال في جميع أنحاء العالم (Enayat et al., 2011). وكذلك فأنها من أكثر أنواع البكتريا المسؤولة عن احداث أخماج المسالك البولية التناسلية لاسيما عند النساء الحوامل ، إذ تصل نسبة الاصابة بها 90% (Brooks et al., 2016).

3.2.2. الأمراضية Pathogenicity

من الاسباب المهمة التي تجعل بكتريا القولون ممرضة هي امتلاكها لعوامل أمراضية متعددة أهما احتواء جدارها الخلوي على متعدد السكريد الدهني (Lukasiewicz et al., 2010) وإفرازها لنوعين من السموم الداخلية هما الذيفان الثابت بدرجة الحرارة(Heat Stable Toxin) غير مستضدي الأصل و الذيفان المتغير بالحرارة (Heat Labile Toxin) مستضدي الأصل (Hung et al., 2013). كما تنتج الإنزيم المحلل للدم الهيمولايسن الذي يكون له الدور الرئيسي في إمراضيتها ، وتمتلك هذه البكتريا أيضاً مخامل طويلة تمكنها من الالتصاق بالخلايا الطلائية البولية وكذلك امتلاكها أسواط محيطية تمكنها من الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء، وتكون هذه البكتريا قادرة على النمو والتكاثر داخل المضيف بالإضافة إلى عدم تأثرها بالنظام المناعي ومقاومة عملية البلعمة (Allen et al., 2012). وعندما تكون دفاعات المضيف غير

كافية فأن هذه البكتريا تصل المجرى الدموي وتسبب التعفن الدموي، وكما تعد بكتريا E.coli من المسببات المهمة للالتهاب السحايا في الأطفال (Al-Gosha'ah, 2005). ويؤدي تواجد بكتريا E.coli بالقرب من الأجناس الممرضة بالأمعاء إلى انتقال البلازميدات حاملة لجينات الذيفانات المعوية أو عوامل الغزو إليها، وبذلك تصبح ضارية (virulent) وقادرة على أحداث الإسهال المائي أو الدموي الالتـهابي خاصة في الأطفال الرضع وفي البلدان النامية (Ozerol, 2005).

4.2.2. فسلجة بكتريا اشريشيا القولون Physiology of E.coli bacteria

تعد بكتريا E.coli واحدة من أفضل الأحياء المجهرية التي درست من الناحية الوراثية و الفسلجية (Welch, 2006).تقوم بكتريا E.coli بتخمير سكريات مختلفة منها Glucose, Lactose, Mannitol, Maltose بالإضافة إلى سكريات عديدة اخرى ولكنها لا تقوم بتخمير Sucrose، وتقوم هذه البكتريا بإنتاج حامض وغاز نتيجة تخمرها للكلوكوز و الكربوهيدرات، وتنمو هذه البكتريا في مدى واسع من درجة حرارة تتراوح بين 10-40 مْ وتنمو بدرجة حرارة المثلى 37مْ (Kumar, 2016). كما تستطيع النمو في مدى من pH يتراوح 5.5-8.7 وأفضل نمو لها عند pH 7.0 وبعض سلالاتها تستطيع النمو في pH 2.0 كما في حالة أرتفاع حامضية المعدة التي تحفز تعبير مجموعة من الجينات المهمة في البقاء و الأمراضية (Waterman & Small, 1996). تختلف السلالات المرضية لبكتريا E.coli عن السلالات المتعايشة من حيث القدرة الأيضية فالمتعايشة تخمر سكر Sorbitol في حين بعض السلالات المرضية مثل O157:H7 لا تخمر هذا السكر ومعظم السلالات المسببة للإسهال لا تستخدم D-serine كمصدر للكاربون والنيتروجين بينما تستخدمه السلالات المسببة لأخماج المسالك البولية وكذلك السلالات المتعايشة البرازية (Roesch et al., 2003). و كذلك من الصفات التي تميز السلالات المرضية عن السلالات المتعايشة البرازية هي قدرة المرضية على استهلاك Ferric iron عن طريق مجموعة واسعة من المواد الكلابية، إذ أنها تحتوي على مجموعة من الأنظمة المتعددة الجينات (Multiple gene system) تكيف البكتريا لمواقع تكون فيها مصادر الحديد قليلة نتيجة نشاطات المضاد البكتيري في المضيف (Torres et al., 2001) أن أنظمة أخذ الحديد المعززة للأمراضية مثل (Aerobactin) غالباً ما تشفر عن طريق الجزر المرضية (Pathogenicity islands) الموجودة على الكروموسومات أو البلازميدات ، يعد أيض بكتريا E.coli من المواضيع التي تم دراستها جيداً (Braun & Braun, 2002). إذ تحصل بكتريا E.coli على Ferric iron بواسطة مركبات كلابية مثل (Enterobactin, Yersinabactin, Heme, Citrate, Aerobactin) وهي بروتينات غشاء عالية التخصص تأخذ Ferric iron عبر الغشاء

الخارجي ثم تعبر الغشاء السايتوبلازمي عن طريق أنظمة نقل الشريط الرابط للادينوسين ثلاثي الفوسفات binding cassette transport system (ATP)(Welch, 2006). وتتصف بكتريا E.coli بقدراتها الواسعة والمتعددة لإبراز نشاطاتها الوظيفية المتعددة لغرض التأقلم مع الظروف الخارجية خاصة عندما توجد في بيئات خارج موطنها الطبيعي (Todar, 2002). كما أن الطراز البري من هذه البكتريا لا يحتاج إلى أي عوامل نمو خاصة بهدف إسناد فعاليتها الأيضية المتنوعة عندما توجد في ظروف مختلفة، إذ تستطيع سلالاتها من استخدام جزيئات سكر الكلوكوز وحدها لتكوين جزيئات بنائية كبيرة تسد بها احتياجات الهيكل الخلوي للبكتريا سواء في الظروف الهوائية أو اللاهوائية من خلال تخميرها لسكر الكلوكوز وتوليدها نواتج مكونه من مزيج من الغازات و الحوامض (Prigent et al., 2001). كذلك تكون قادرة على النمو باستخدام عملية التنفس اللاهوائي Anaerobic respiration من خلال استهلاكها مركبات النتريت NO_2 والنترات NO_3 و الفيوماريت وتعمل هذه المركبات كمستقبلات نهائية للإلكترونات لأجراء عملية تبادل الإلكترونات المطلوبة لهذا النوع من التنفس(Roos & Klemm, 2006).

5.2.2. المحتوى الوراثي لبكتريا الايشريشيا القولون Genetic Content of E.coli

تتميز بكتريا E.coli باحتوائها على كروموسوم منفرد مرصوف إلى تركيب مدمج يسمى بالنيوكلويد(Nucleoid) وقد تحتوي على بلازميد حلقي، وعلى جينوم يبلغ حجمه 4600 كيلو زوج قاعدي ويكون ذو تسلسل معلوم بشكل كامل وتحتوي تقريباً 4300 سلسلة تشفير كاملة Potential Coding Sequence وحوالي 1800بروتين معروف فيها، كما أن 70% من الكروموسوم يتكون من جينات مفردة التشفير Monocistronic و 6% يتكون من جينات متعددة التشفير Polycistronic، وتمتلك 70% من إطارات التشفير المفتوح المسلسلة غير معروفة الوظائف ، ويبلغ طول الكروموسوم في بكتريا اشريشيا القولون 1.5µµ ويحتوي على 4000 مورث تقريباً (Reed,2005).

يقدر المحتوى الوراثي من القواعد النيتروجينية G-C في الجينات المركزية (Core genes) لبكتريا E.coli من سلالة K-12 بحوالي 50-52 %، كما تحتوي على 1100 جين تقع أغلبها ضمن قطع DNA كبيرة ذات احجام مختلفة تتراوح من (4-100) كيلو زوج قاعدي (Hacker et al.,1997). وهذه الجينات غالباً ما تنتظم سوية في تجمعات كبيرة تدعى بالجزر الأمراضية Pathogenicity associated islands (PAIs) وهي عبارة عن مجاميع كبيرة من الجينات التي يتراوح حجمها ما بين Kbp (10-200) ومن سمات هذه الجزر أنها تضم الكثير من جينات الضراوة ، وتوجد في جينوم السلالات المرضية فقط ، ويرمز لجزر الأمراضية في بكتريا

E.coli المشفرة للألفا-هيمولايسين والشعيرات واللواصق بـ $PAI\ I_{53}$، بينما يرمز لتلك التي تشفر للألفا-هيمولايسين وشعيرات P بـ $PAI\ I_{196}$ (Brooks et al., 2007).

تتميز بكتريا E.coli باحتوائها على البلازميدات Plasmids وهي عبارة عن عناصر وراثية توجد بشكل مستقل خارج الكروموسوم ، ولها القدرة على التضاعف الذاتي والتوارث بثبات بشكل قطع منفصلة عن الكروموسوم ، وتوجد البلازميدات في كائنات بدائية وحقيقة النواة مثل البكتريا و الفطريات والخمائر (Boundless, 2014). حيث تم التعرف على البلازميدات لأول مرة في البكتريا المعوية قبل اكتشافها بالبكتريا الاخرى ، وتعد البلازميدات من العناصر الوراثية التي يتم استخدامها بكثرة في الهندسة الوراثية (Selimovic et al., 2007) .

تختلف البلازميدات عن الكروموسومات في البكتريا من خلال قدرة بعضها على الانتقال بين الانواع البكتيرية وهذا ما يفسر انتشار بعض الصفات المشفرة بلازميدياً كصفة المقاومة للمضادات الحياتية وغيرها (Schito, 2006). على الرغم من ذلك أن بعض جينات المقاومة للمضادات الحياتية تكون محمولة على الكرموسوم البكتيري ، وتكون صغيرة نسبيا مقارنتها بالكروموسوم الخلية (Blake et al., 2011).

تشفر البلازميدات إلى فعاليات خلوية مختلفة، ويمكن إن تحمل مختلف جينات الضراوة للبكتريا مثل إنتاج الهيمولايسن ومقاومة المضادات الحيوية وتخمير السكريات ومقاومة المعادن الثقيلة، وهنالك أنواع إخرى من البلازميدات تكون صفاتها المظهرية غير معروفة لحد الأن لذلك تسمى بالبلازميدات الخفية Cryptic plasmid (Warsha, 2007).

تصنف البلازميدات تبعاً لقابليتها على الانتقال إلى الخلايا البكتيرية الاخرى إلى: البلازميدات الانتقالية Transmissible وهي تحتوي على مجموعة من المورثات الناقلة Transfer geneمثل tra وmob التي تحفز على عملية الاقتران (Conjugation) (Nicholl, 2008) و البلازميدات غير الانتقالية Non-transmissible فهي لا تحتوي على مورثات الانتقال مثل tra ولذلك فالبكتريا الحاوية على هذه البلازميدات تكون غير قادرة على بدء عملية الاقتران، وأوزانها الجزيئية تكون واطئة ولكن يمكن نقلها بواسطة البلازميدات الاقترانيةConjugative plasmid التي تكون موجودة في الخلية نفسها أوعن طريق العاثيات Bacteriophage (Ellen et al., 2008) . وكما تصنف البلازميدات حسب الوظيفة إلى خمسة أصناف هي:

- بلازميدات الخصوبة Fertility(F)Plasmids هي البلازميدات الحاوية على المورثات tra وتكون لها القابلة على الانتقال وتعبير عن الأهلاب الجنسية Sex Pilli.
- بلازميدات المقاومة Resistance(R)Plasmids هذه البلازميدات تحتوي على مورثات تشفر لمقاومة للمضادات الحيوية.
- بلازميدات الضراوة Virulence plasmids تقوم بتحويل البكتريا غير الممرضة إلى بكتريا ممرضة، وتوجد ضمن العائلة المعوية وتترافق مع جينات المقاومة وتشفر لعوامل ضراوة متعددة مثل عوامل الالتصاق أو سموم كما في بكتريا E.coli (Brown, 2010)
- بلازميدات الهاضمة Degradative plasmids تقوم بهضم المواد غير الاعتيادية مثل Toluene, Salicylic acid.
- بلازميدات الكولسين Collcin plasmids التي تتضمن جينات تشفر لإنتاج بروتين البكتريوسين الذي يعمل على قتل الخلايا البكتيرية الاخرى (Gerdes et al., 1986).

فضلاً عن ذلك قد توجد عناصر وراثية إخرى تسمى بالجينات القافزة أو العناصر المتنقلة Transposons وهي عبارة عن تسلسل قصير من الحمض النووي DNA قادرة على الانتقال إلى مواقع عديدة ضمن الجينوم Genome و يمكن أن تنتقل من البلازميد إلى الكروموسوم أو بالعكس أو تنتقل داخل الكروموسوم نفسه من موقع إلى أخر وهذه العناصر عادة تحمل الجينات المقاومة للمضادات الحيوية (Guilfoile, 2007). وتحتوي على جزء قصير يتراوح طوله bp (200-750) يطلق عليه عناصر الحشر Insertion elements أو تعاقبات الإدخال Insertion sequence (Is) إذ تتضمن فقط الجينات التي تشفر إلى إنتاج الإنزيمات التي تحتاجها في عملية انتقالها (Brooks et al., 2007). وتعد هذا العناصر مصدراً للطفرات والأمراض من خلال إعادة ترتيب أو تركيب القطعة المتنقلة (Chen et al., 2005).

3.2. اشريشيا القولون المسببة لأخماج الأقنية البولية Uropathogenic E.coli (UPEC)

تعد هذه البكتريا المسبب الرئيسي لـ90% من إصابات القناة البولية UTI إذ تنتقل هذه البكتريا من الأمعاء أو المنطقة الشرجية إلى المنطقة البولية وتصعد إلى المثانة وتصيب الإناث أكثر من الذكور بسبب قصر إحليل الإناث (Todar, 2008). كما أن عزلات بكتريا E.coli الممرضة للـUTI ليست عزلات عشوائية من الفلورا البرازية إذ تكون هناك اختلافات كثيرة ما بين هذين النمطين أهمها الانعزال الوراثي ما بين العزلات الممرضة وغير الممرضة ، واحتواء الممرضة على جينات ضراوة متخصصة والتي غالبا ما تكتسب والتي تفتقر لها العزلات غير الممرضة (Zhang & Foxman, 2003). وتنتج سلالات UPEC عادة حاملات الحديد

Sidrophores الذي له دور ضروري في استهلاك البكتريا للحديد أثناء أو بعد الاستعمار، وتنتج كذلك هذه السلالة الهيمولايسن الذي يكون ساماً خلوياً مسبباً ثقوب أو ثغور في جدار خلايا المضيف (Forbes et al., 2007). وتسبب هذه البكتريا أمراضاً مختلفة منها الإصابات المعوية وإصابات المسالك البولية والتهاب السحايا والفشل كلوي (Heaton & Jones, 2008).

1.3.2.أخماج المسالك البولية Urinary Tract Infections

تعد أخماج المسالك البولية من الأخماج المعدية ذات الأهمية الطبية ، إذ تحدث الإصابة بهذه الأخماج نتيجة نمو الكثير من المايكروبات في القناة البولية وهذه الأخماج من الأخماج البكتيرية شاعة الإصابة بها بين البشر(Anvarinejad et al., 2011). ومن المايكروبات التي تسبب هذه الأخماج مثل البكتريا والفطريات والطفيليات (David et al., 2010). وتأتي بكتريا E.coli بالمرتبة الأولى في أخماج الأقنية البولية حيث تنتقل هذه البكتريا من المجرى البولي إلى المثانة مسببة بذلك التهاب المثانة وثم إلى الكلية والحالب مسببة التهاب الحويضة والكلية ، ويعد التهاب الحويضة والكلية أكثر خطورة من التهاب المثانة (Foster, 2008). وتأتي هذه الأخماج بالمرتبة الثانية من بين الأخماج البكتيرية الأخرى في المجتمع الطبي وتكون ذات انتشار واسع (Kolawole et al., 2010). إذ يبلغ عدد المصابين بأخماج الأقنية البولية سنوياً حوالي 150 مليون شخص (Stapleton, 2003). تتألف القناة البولية من الأعضاء التي تجمع الإدرار وتخزنه وتطرحه إلى الخارج الجسم وتشمل الكليتين Kidneys، المثانة Bladder، الحالبين Ureters ، الإحليل Urethra (Okonko et al., 2009). وقد يكون الادرار طبيعياً و معقماً و خالياً من الجراثيم عند خروجه من الكلية لكنه يتلوث إثناء مروره في الإحليل بعدد من الفلورا الموجودة على الجلد ومن ثم تبدأ البكتريا تتجمع داخل الإحليل (Kawamura-Sato et al., 2010). بالإضافة إلى حامضية الإدرار الطبيعي يكون لها دور في منع نمو الجراثيم ، وكذلك التدفق السريع للإدرار خلال التبول تعمل على إزالة الجراثيم (Anderson et al., 2003). لكن من جهة إخرى إذ يعتبر الإدرار وسطاً جيداً لنمو أنواع مختلفة من البكتريا لما يحتويه من إملاح ومواد عضوية فضلاً عن عوامل إخرى تحدد حدوث الإصابة كضراوة الممرضات (Lane et al., 2007). وهناك عدة عوامل تعمل على زيادة خطورة أخماج الأقنية البولية وهي الحمل، مرض السكري Diabetes، تعدد العلاقات الجنسية، تضخم غدد البروستات عند الرجال، استخدام أنبوبة الإدرار، كثرة تناول المضادات الحيوية (Ngwai et al., 2011). وعندما تصل البكتريا إلى المثانة وتتضاعف بالإدرار فأنها تسبب أخماج الأقنية البولية وأكثرها شيوعاً هو خمج المثانة Cystitis والذي يتميز بانعدام القدرة على التبول أو تكراره يصاحبه ألم في منطقة العانة

(Ngwai et al., 2011). وكذلك التغيرات التي تحصل في الأس الهيدروجيني والتغير في الضغط التناضحي (الأزموزية) وتركيز اليوريا في الإدرار يكون لها تأثيرات خاصة في التهاب المسالك البولية ، كما يؤدي تراكم السموم البولية في الإدرار إلى تثبيط الفعاليات المستضدة لخلايا الدم البيض والخلايا البلعمية ، وهذه الحالات كلها تشجع النمو الميكروبي المسبب لالتهاب المسالك البولية (Khan et al., 2006). وتعتمد شدة الإصابة بأخماج الأقنية البولية على عوامل الضراوة Virulence factor التي تمتلكها البكتريا المسببة وحساسية المضيف (Santo et al., 2006). يعتبر الفحص المجهري والزرع المختبري للإدرار الوسطي من الاختبارات التشخيصية المهمة للكشف عن أخماج الأقنية البولية (UTI)، إذ يعد وجود البكتريا بالإدرار حوالي 10^5 وحدة تكوين المستعمرة/ملليتر (CFU/ml) ضروري جداً لتشخيص UTI (Chung et al., 2010).

إذ تكون أخماج المسالك البولية في الإنسان من الأخماج الأكثر تكراراً ، حيث تصيب الإفراد في المجتمع والمرضى في المستشفيات وتصيب الإناث بشكل أكبر من الذكور(Piatti et al., 2008 ; Todar, 2008) وتكون نسبتها في الإناث إلى الذكور هي 1-30 علماً أن حالات الإصابة بأخماج الأقنية البولية تزداد مع تقدم العمر وقد أثبتت الدراسات أن الإناث اللواتي يعانين من أخماج الأقنية البولية بشكل متكرر تكون لديهن الخلايا الطلائية البولية Uroepithelial cells تحتوي على مستقبلات بكتريا الايشريشيا القولون E.coli receptors أكثر من الإناث الاخريات، إذ تمتلك بكتريا UPEC الأهلاب من النوع الأول Type 1 Fimbriae (Fim H) التي تمكنها من الالتصاق بمستقبلات الخلايا الطلائية Epithelial cells receptors وتمنع استبعادها خلال التبول من المثانة البولية (Chamberlain, 2009). و يمكن لهذه البكتريا أن تصل للمثانة بسهولة نتيجة عرض وقصر طول الإحليل Urethra عند الإناث ، وقربه من فتحة الشرج ومن ثم تنتقل البكتريا بسهولة من المستقيم إلى الإحليل وتحدث الإصابة (Kolawole et al., 2010).

كما أن خمج المسالك البولية شائع جداً في الرجال المسنين الذين يعانون من تضخم غدة البروستات Prostatitis أو الاشخاص الذين يعانون من انسداد المسالك البولية نتيجة وجود بعض العوائق الفيزيائية مثل القثطرة البولية والحصى (Nester et al., 2004). بشكل عام الرجال يكونون عرضة للإصابة بأخماج الأقنية البولية عندما تصل أعمارهم (70) سنة نتيجة معاناتهم من البلية الجرثومية و أخماج البروستات (Chamberlain, 2009).

إن من أهم الأعراض التي يعاني منها المصابون بأخماج الأقنية البولية UTIs هي :

الشعور بالحرقة إثناء التبول ، ألم في الظهر أو أسفل البطن ، رائحة غير اعتيادية في الإدرار، الشعور بالحاجة للتبول بالرغم من وجود كميات قليلة من الإدرار، و يكون الإدرار مغبراً أو دموياً أو معتماً وكذلك القشعريرة والحمى (Okonko et al., 2009 ; Lane & Takhar, 2011).

وهناك طرائق مختلفة لدخول البكتريا الممرضة إلى الأقنية البولية وهي :

1_ المسلك التصاعدي Ascending Route

هو مسلك شائع جداً وخاصة عند الإناث في حالة استخدام القثطرة ، إذ تكون الأغلبية العظمى من UTI صاعدة في منشأها بسبب استيطان الممرضات بالمنطقة المحيطة بالإحليل لكي تتمكن من الوصول إلى المثانة (Usein et al., 2011) .

2_ المسلك التنازلي Descending Route

ويتضمن مسلكان هما المسلك الدموي والمسلك اللمفاوي (Forbes et al., 2007).

- **المسلك الدموي:** تكون الإصابة التي تحدث عن طريق مجرى الدم نادرة الحدوث وذلك نتيجة تحطم البكتريا التي تصل إلى المجرى الدموي بعملية البلعمة الخلوية (Chamberlain, 2009) لكنها قد تحصل في الأطفال الرضع من خلال انتقال البكتريا من مجرى الدم إلى الكلية محدثة أخماج الأقنية البولية (Kaufman & Fairchild, 2004).
- **المسلك اللمفاوي:** إن حدوث الإصابة عن طريق هذا المسلك نادرة ، وتحصل عن طريق انتقال البكتريا بواسطة الأقنية اللمفاوية للقولون والمستقيم وإحداث أخماج الأقنية البولية (Tanagho & Jack, 2000).

3-المسلك المباشر Direct Route

هو انتقال المايكروبات المرضية بشكل مباشر إلى المثانة كما هو في حالة وجود الناسور بين المثانة والقولون (Tanagho & Macaninch,1995).

4.2. بكتريا اشريشيا القولون المسببة للإسهال Diarrheagenic E .coli

تسبب هذه البكتريا العديد من إصابات الجهاز الهضمي على أساس ما تمتلكه من عوامل ضراوة ومستضدات مختلفة (H وO) وإعراض سريرية (Gillespie & Hawkey, 2006). وتتواجد هذه البكتريا بشكل كبير في الأطفال المصابين بالإسهال الوبائي و المتوطن (Kaper et al., 2004). وتصنف هذه البكتريا على أساس صفاتها الوراثية والمظهرية إلى ستة مجاميع مرضية (Santona et al., 2013). وهي:

1.4.2. اشريشيا القولون المعوية الممرضة Enteropathogenic E.coli (EPEC)

تُعرف هذه البكتريا على إنها المسبب الرئيسي لإسهال الأطفال الرضع في الدول النامية و المتقدمة (Yatsuyanagi et al., 2002). وتأتي بالمرتبة الثانية كمسبب لحالات الإسهال بعد فايروس روتا إذ تبلغ نسبتها 8.8% أما فايروس روتا فشكل نسبة 25.4% (Margarita et al., 2012). و تعزى ميكانيكية إمراضيتها إلى امتلاكها عوامل الضراوة وأهمها تكوين أفة التصاق وتخريب الزغابات المعوية Attaching and effecting Lesion (A\E) المشفرة بواسطة مجموعة من الجينات الكروموسومية التي تقع في جزء كروموسومي يدعى موقع تخريب الخلية المعوية Locus of enterocyte effacement (LEE) (Trabulsi et al., 2002). ويؤدي تكوينLesion (A/E) إلى انخفاض في القابلية الامتصاصية للطبقة المخاطية المعوية وبالتالي يؤدي إلى تعطيل التوازن الإلكتروليتي وبالتالي حدوث الإسهال (Clarke et al., 2003). وتنتج بعض سلالات هذه البكتريا إنزيم الهيمولايسن المشفر من قبل جين hlyA المحمول بلازميدياً (Burgos & Beutin, 2010). وتقدر الجرعة الممرضة من EPEC بمليون خلية تقريباً (Feng et al., 2014). لقد كانت هذه البكتريا تشخص على أساس الأنماط المصلية (serotype O and H) أما في الوقت الحاضر فيتم تشخيصها على أساس ما تمتلكه من عوامل الضراوة التي تبديها (Welch, 2006) وتضم بكتريا EPEC عدداً من المجاميع المصلية المعزولة من الإنسان ومن أهمها (O111:H9,O88:H25,O126:O111,O111:H8, O142:H4,O157:H8,O157:H45,039:NM) (Jensen et al., 2007).

2.4.2. اشريشيا القولون الغازية للأمعاء Enteroinvasive E.coli (EIEC)

تصيب بكتريا EIEC الأطفال دون سنة الخامسة من العمر بعد وصول الجرعة إلى منطقة القولون (Ryan & Ray, 2004). وتكـون سلالة EIEC متماثلة كيموحيوياً وامراضياً مع بكتريا الشيكلا وتتميز بكونها غير مخمرة للاكتوز وغير متحركة وكلاهما يسببان متلازمة الإسهال الحاد والتهاب القولون (Nataro & Kaper,1998). ولقد وجد أن نسبة اشريشيا القولون الغازية للأمعاء والمرافقة لحالات الإسهال الحاد 5.8% ، ولها القدرة على اجتياح الطبقة الطلائية المبطنة للأمعاء الغليظة وفي موضع الاصابة تعمل على التضاعف في سايتوبلازم الخلية المضيف وتنتقل إلى الخلايا الاخرى المجاورة فتسبب تقرحاً وتنخراً وبالتالي يؤدي إلى ظهور إعراض الإسهال المصحوب ببراز دموي ومخاطي وألم في البطن (Perry et al., 2010). وتعتمد قابلية الاجتياح على وجـود بلازميد كبير يبلغ وزنه الجزيئي (140) ميكا دالتـون يشفر لبعض البروتينـات خارج الغشاء Outer Membrane Proteins (OMPs)

الضروريــة للاجتياح (Hartman et al., 2003). وتعزى أمراضية هذه السلالة إلى قدرتها على الاجتياح وتدمير الأنسجة المستعمرة كما تكون محددات الاجتياح الكروموسومية و البلازميدية الموجودة في Shigella spp هي نفسها موجودة ايضاً في EIEC (Manu et al., 2011). ويعد الانسان المصاب الخازن الوحيد لها وليس لها مضيف أخر، وتختلف عن بكتريا Shigella spp من حيث الجرعة الممرضة إذ تبلغ الجرعة الممرضة لـEIEC بمليون خلية أما الجرعة الممرضة لبكتريا Shigella spp تقدر بـ10إلى بعض المئات من الخلايا(Feng et al., 2014). وتقدر حالات الاصابة بالبكتريا EIEC بـ150 مليون حالة سنوياً بينما تقدر حالات الوفاة في الدول النامية في كل سنة بمليون حالة وفاة (Parsot, 2005) وتعد من الممرضات ذات الانتشار الواسع والمسؤولة عن كثير من الوفيات في الدول النامية ، إذ يعد التشخيص المبكر وتناول المضاد الحيوي المناسب من الطرائق المهمة للحد من الجفاف عند الأطفال (Pavankumar & Sankaran, 2008). ومــن مجاميـعهــا المصليـة المهمة هي O167,O164,O152,O144, O143, O136, O124, O112, O29, O28 ويعد النمط O124 أكثرها شيوعا في إحداث الإصابة (Hitchins et al ., 1998).

3.4.2. اشريشيا القولون النزفية للأمعاء Enterohemorrhagic E.coli (EHEC)

عُرفت EHEC لأول مرة في عام 1982 على أنها المسبب الرئيسي للقولون النزفي (Hemorrhagic Colitis) (HC) والإسهال الدموي والمتلازمة اليوريمية الحالة للدم (Hemolytic-Uremic Syndrome) (HUS) المميتة، وتحدث الإصابة بهذه البكتريا عند تناول الأغذية الملوثة مثل الهمبركر الملوث وغير المطبوخ بشكل جيد حيث كانت الإعراض إسهالاً دموياً لذا سميت الحالة بـالقولون النزفي(Muto et al.,2008). وقد أظهرت نتائج التشخيص أن المسبب لهذه الإمراض هي إحدى سلالات بكتريا E.coli من النــمط O157:H7 (Ozeki, 2003). وقد يتضاعف الإسهال الدموي مسبباً أمراضاً للجهاز البولي منها متلازمة حال الدم اليوريمي (HUS) والتي تعد السبب الأول في الفشل الكلوي الحاد عند الأطفال (Willshaw et al., 2001) وتعزى أمراضية بكتريا EHEC إلى إنتاجها سموماً تدعى Shiga toxin (Stx) أو Verotoxin (VT) تكون مشفرة عن عاثي بكتري في كروموسوم EHEC ومن أنواعها التي تم تشخيصها بكثرة في الإصابات البشرية هما Stx1 و Stx2 المشفران عن طريق جينات Stx1 و Stx2 على التوالي (Wani et al., 2006). وكما تحتوي هذه البكتريا EHEC على جين (hlyA) المحمول على بلازميد و يشفر لإنزيم الهيمولايسن المعوي من نوع A (Enterohemolysin A) وكذلك تحتوي على جين (eaeA) المحمول على الكرموسوم

ويشفر للمادة البروتينية اللاصقة Intimin، ويستخدم هذا الجين بالإضافة إلى الجينات (Stx1,Stx2,hlyA) في التشخيص الجزيئي لبكتريا EHEC (Wani et al., 2006).

4.4.2. اشريشيا القولون الأمعائية التكتلية Enteroaggregative E.coli (EAEC)

تستوطن هذه البكتريا في القناة المعوية للأطفال الرضع بعد ولادتهم بساعات وبذلك تكون متعايشة مع المضيف (Kaper et al., 2004). وتسبب الإسهال الحاد عند الأطفال و البالغين من خلال التصاقها بخلايا HEP_2 وتكوين طبقة لزجة على سطح الطبقة المخاطية للأمعاء (Kaur et al., 2010) تعزى إمراضيتها إلى امتلاكها عوامل ضراوة منها الالتصاق و إنتاج الذيفان المعوي الثابت بدرجة الحرارة ولا تنتج الذيفان الحساس بالحرارة وكذلك إفرازها بروتين الـdipersin ذو وزن جزيئي يتراوح 2-10 كيلو دالتون ويكون له دوراً كبيراً في إمراضيتها إذ أن إفرازه يساعد على انتشارها على الطبقة الطلائية للأمعاء، وتكون غير قادرة على غزو مجرى الدم (Nishi et al., 2003). و تسبب هذه البكتريا حالات إسهال المسافرين ويطلق عليها تسمية إخرى هي اشريشيا القولون المعوية الملتصقة Enteroadherent E.coli (EAEC) لقدرتها على الالتصاق على أسطح الخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء بهيئة مجاميع (Aggregative pattern) وتسبب بواسطة إنزيم الهيمولايسن الذي تنتجه تنخراً دموياً في أطراف الزغابات وحصول التهاب في الطبقة تحت المخاطية (Weintraub, 2007). وإن كل عوامل الضراوة لسلالات هذه البكتريا تكون تحت سيطرة جينات يشفر لها بلازميد كبير، وتضم عدداً من المجاميع المصلية هي : O162, O142, O127, O111, O68 , O51 , O44, O17, O6 ,O4 , O3 O85, O78, O77, O75 , O73 (Neto et al., 2003).

5.4.2.اشريشيا القولون ذات الالتصاق المنتشر Diffusely Adhering E.coli (DAEC)

تتميز سلالة DAEC بامتلاكها نمط من الالتصاق المنتشر Diffusely Adherent الذي بواسطته تتمكن البكتريا أن تغطي كل سطح الخلية وبشكل منتظم و يمكن تميز هذه السلالة من خلال التصاقها بخلايا HEP-2 وحدوث الإسهال المائي عند الأطفال الرضع (Servinn, 2005) وتتميز هذه السلالة بامتلاكها إهداباً تعرف بـ F1845 التي تشفر من قبل خمسة جينات تكون محمولة على بلازميد pSLM862 ومنها يستخدم الجين daaC في اوبيرون التشفير كمجس تشخيصي لسلالات DAEC ، كما إن هذه السلالة لا تنتج الذيفانات المعوية و لا تمتلك عواملاً كتلك الموجودة في سلالة EPEC ، وتكون غير قادرة على اختراق الخلايا الطلائية (Welch, 2006).

6.4.2. اشريشيا القولون السامة للأمعاء Enterotoxigenic E.coli (ETEC)

توصف هذه السلالة بأنها المسببة لإسهال الأطفال الرضع في الأقطار النامية وكذلك تسبب إسهال المسافرين (Travele's diarrhea) (Clavijo et al., 2010). ويتميز المصاب بهذه السلالة بإسهال مائي (Watery diarrhea) مع وجود حمى ، وتحدث الإصابة بـ ETEC من خلال استعمال المياه الملوثة وصنفت هذه الإصابة في الولايات المتحدة ضمن الأمراض المتقطعة المنتقلة بالماء، وكذلك تحدث من خلال تناول الأجبان الطرية والخضراوات الملوثة ، وتسبب ETEC الإسهال في كل من الانسان والحيوان وتقدر نسبة إصابة الإنسان بهذه السلالة تبعاً لمنظمة الصحة العالمية في عام 1991 بحوالي 600 مليون حالة و800.00 حالة وفاة في العالم وخاصة الأطفال دون سن الخمس سنوات، أما بالحيوانات فأنها تسبب حالات الإسهال خاصة العجول الوليدة والخنازير فأنها تؤثر على الجانب الاقتصادي (Welch, 2006). وتعزى أمراضية هذه السلالة الى إنتاجها سموماً معوية عديدة منها السموم المعوية المستقرة بالحرارة (STs) والسموم المعوية المتغيرة بالحرارة (LTs) وهذه السموم تشفر من قبل جينات st, lt على التوالي (Wani et al., 2006). والأنماط المصلية العائدة للمجموعة ETEC هي O8, O6, O115, O167, O159, O101 , O80 , O78 , O63 , O27 , O25 O20,O15, O153,O149, O148 , O147,O141, O139, O128 (Blanco et al., 1993).

7.4.2. الأخماج المعوية Intestinal Infections

يعد خمج الإسهال من الأخماج واسعة الانتشار والخطيرة في مختلف دول العالم وخاصة الدول النامية، ويعد هو السبب الرئيس في موت الأطفال الرضع نتيجة فقدان كميات كبيرة من سوائل الجسم الذي يؤدي إلى حدوث الجفاف ومن ثم الموت وفي بعض الأحيان يؤدي إلى حالة من سوء التغذية وخاصة عند الأطفال الذين يعانون من الإصابة بالخمج بشكل متكرر (Pokharel et al., 2009). بشكل عام قد يكون الإسهال مائياً أو دموياً، فالإسهال المائي يتضمن الإسهال الإفرازي الناتج عن زيادة تركيز السموم المعوية التي تفرزها الممرضات داخل الخلية، وهذا يسبب خللاً في الية الامتصاص وإفراز الماء داخل الخلية (Marya, 2006). والإسهال الإزموزي يحدث بسبب تناول مواداً لا يمكن امتصاصها عبر الغشاء البلازمي (اختياري النفاذية) للخلية المعوية وبقاء هذه المواد داخل الامعاء تسبب أرتفاع الضغط الإزموزي وهذا يؤدي إلى اختلال التوازن بين داخل الخلية وخارجها فتقوم الخلية بإفراز الماء للوصول إلى حالة الاستقرار (Ryan & Ray, 2004). أما الإسهال الدموي يشمل الإسهال الالتهابي الذي يحدث نتيجة غزو الممرضات للطبقة المخاطية للأمعاء الغليظة وإفرازها للسموم الخلوية أما

الإسهال الغير الالتهابي يكون ناتج عن تأثير سموم خلوية فقط تفرزها بعض البكتريا مثل سلالة EHEC (Gates, 2003) وقد يصل متوسط عدد حالات الإسهال سنويا بين الأطفال دون سن 5 سنوات في المناطق النامية إلى (3.2-4.8) مليون حالة تحدث خلال السنة الأولى من العمر و تتناقص تدريجيا إلى (1.4) مليون حالة سنويا في عمر 4 سنوات، وأن أعلى معدلات الوفيات تحدث في السنة الأولى من عمر الطفل (Kosek et al., 2003). إن الاهتمام في مجالات التغذية والتعليم والصرف الصحي والمعالجة المبكرة للجفاف عن طريق الفم قد خفضت من شدة الإصابة من (4.6) مليون في عام 1982 إلى (1.5–2.5) مليون شخص في عام 2010 ، و إن انتشار البكتريا المعوية تختلف من منطقة إلى إخرى ، وتعتمد على الظروف الصحية و الاقتصادية والاجتماعية، وهذا يمثل 30-40% من الإصابات، و15- 30% من الأسباب تعود إلى تدهور الواقع الصحي في المستشفيات (Black et al., 2010; O'Ryan et al., 2010).

تعد سلالات E.coli من نوع (EPEC) و (ETEC) من أكثر مسببات الإسهال (DuPont, 2009) يعتقد أن حدوث الإسهال يتم عن طريق التصاق البكتريا بالخلايا الظهارية للأمعاء الدقيقة أو من خلال سوء امتصاص الكربوهيدرات والفيتامينات والبروتينات والدهون والكالسيوم في منطقتي الصائم واللفائفي وتضرر الزغابات المبطنة للأمعاء (Rosenshin, 2002). إضافة إلى ذلك هناك عومل إخرى قد تساعد على حدوث الإسهال كقلة الوزن وتلوث الغذاء وسوء التغذية والكبح المناعي (WHO, 2003). وللحد من الإصابة بالإسهال هناك عوامل تساعد على ذلك مثل الإرواء الفموي والرضاع الطبيعية والتغذية الجيدة وصحة الطفل بشكل عام قد تساعد في الحد من الوفيات بسبب الإسهال (Pawlowski et al., 2009). لمعرفة المسبب الرئيسي للإسهال يتطلب استخدام طرائق صحيحة بالتشخيص السريري والمختبري لاختلاف مسبباته وقد أثبتت الكثير من الأبحاث أن البكتريا السالبة لصبغة اكرام من المسببات الرئيسية للإسهال وخاصة أجناس التابعة للعائلة المعوية (Bennett, 2009). حيث تم عزل وتشخيص أنواع مختلفة من الممرضات المسببة للإسهال وقد وجد أن بكتريا E.coli لها دور مهم في حدوث الإسهال (Nweze, 2009). ومن الصعب التميز ما بين اشريشيا القولون الممرضة والمسببة للإسهال عن تلك المتعايشة الغير ممرضة باستخدام طرق التشخيص التقليدية لذلك تم استعملت التقنيات الجزيئية ومنها تقنية الـPCR في تحديد الجينات المشفرة لعوامل الضراوة في العزلات البكتيرية (Bischoff et al., 2005).

5.2. الإنزيم المحلل للدم (الهيمولايسن) Hemolysis Enzyme

يعد إنزيم الهيمولايسن مادة محللة خلوية مكونة للثقوب ويعمل كعامل ضراوة مهم في بكتريا الايشريشيا القولون المعوية وخارج المعوية (Burgos & Beutin, 2010). أو هو بروتين سام يحلل الخلايا بتكوين ثقوب بجدار الخلية الهدف ويؤثر على كريات الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء والخلايا الكلوية الأنبوبية (Russo et al., 2005). ويعد هذا الإنزيم من العوامل الضراوة المهمة في احداث الأخماج البكتيرية ، تنتجه بعض أنواع البكتريا لتحليل كريات الدم الحمراء ، ويكون له تركيب جزيئي مختلف بحسب نوع البكتريا ، وتوجد ثلاثة أنواع للهيمولايسن هما النوع الأول الفا-هيمولايسن وهو إنزيم يفرز خارج الخلية البكتيرية خلال الطور اللوغاريتمي ويكون التحلل فيه جزئياً والنوع الثاني بيتا-هيمولايسن هو إنزيم مرتبط بالخلية ويكون التحلل فيه كاملاً، وفعالية هذا النوع لا يمكن فصلها عن الفعاليات الأيضية للخلية (Brooks et al., 2016). أما النوع الثالث فهو كاما-هيمولايسن إذ يقوم هذا الإنزيم بتحطيم جدار الخلية ، وهناك أنواع إخرى من البكتريا لا تظهر تحللاً حول المستعمرة وتسمى هذه الأنواع بالبكتريا غير المحللة للدم (Han et al., 2010). وكذلك تنتج بكتريا E.coli إنزيم الأنتيروهيمولايسن وهو سم خلوي تنتجه البكتريا خلال الطور اللوغاريتمي من النمو ويتجمع داخل الخلية (Jurgens et al., 2002). ويكون إنزيم الفا-هيمولايسن Alpha-haemolysin النوع الأكثر شيوعاً في انتاجه من قبل بكتريا E.coli وهو يكون غير مرتبط بالخلية بشكل محدد (Martine et al., 2000). وأشار Smith وأخرون (2008) إن الفا-هيمولايسن يكون ثابتاً حرارياً أما بيتا-هيمولايسن فهو غير ثابت حرارياً في سلالات UPEC .

اشارت الدراسات إن حوالي 50% من بكتريا UPEC المسببة لأخماج الأقنية البولية تكون منتجة لإنزيم الهيمولايسن، بينما تكون نسبة بكتريا DEC المنتجة للهيمولايسن 10% فقط (Slavchev et al., 2009). و من أهم الطرائق المستخدمة في الكشف عن قابلية البكتريا في إفراز هذا الإنزيم من خلال التحلل على وسط الدم الأساس (Badouei et al., 2016). وإنتاج الهيمولايسن يرتبط بإمراضية بكتريا اشريشيا القولون وخصوصاً في الإصابات الحادة ، كما أن فعالية إنزيم الهيمولايسن ليست محددة بكريات الدم الحمراء فقط لكون الفا-هيمولايسن المفرز من قبل E.coli يحلل أيضاً الخلايا اللمفاوية (Lymphocytes) بينما بيتا-هيمولايسن يثبط البلعمة (Phagocytosis) والانجذاب الكيميائي (Chemotaxis) لخلايا كريات الدم البيضاء المتعادلة (Neutrophils) (Sharma et al., 2007).

إن عملية إفراز إنزيم الهيمولايسن من قبل بكتريا E.coli تتم بطريقتين الأولى بتجمع إنزيم الهيمولايسن في الغشاء السايتوبلازمي البكتيري وهذه العملية تتطلب طاقة وجين hlyB والثانية تحرر إنزيم الهيمولايسن من الغشاء الخارجي إلى المحيط وهذه العملية تتطلب حرارة وجين hlyD ولا تتطلب طاقة (Hacker & Hughes,1985).

تتم عملية السيطرة على تصنيع وإنتاج إنزيم الهيمولايسن من قبل سلالات بكتريا E.coli بمحددات وراثية تقع أما على بلازميد قابل للانتقال (Transmissible Plasmid) أو على كروموسوم، والمحددات الوراثية تكون متشابهة مع بعضها تركيبياً و وظيفياً (Muller et al., 1983) وتقع المحددات الوراثية المسؤولة عن إفراز الالفا-هيمولايسن في سلالات (UPEC) أما على الكروموسوم وخاصة سلالات O4 , O6 , J96 أو تقع على البلازميدات التي تكون قادرة على الانتقال خلال عملية الاقتران، أما المحددات الوراثية المسؤولة عن إفراز الالفا-هيمولايسن وإنزيم الأنتيروهيمولايسن Enterohemolysin في سلالات بكتريا (DEC) تقع على البلازميدات خاصة في سلالات بكتريا ETEC, STEC, EPEC, EHEC (Burgos & Beutin,2010) والمحددات الوراثية تتمثل بالجينات المشفرة لإنزيم الهيمولايسن وإنتاجه وهي hlyA, hlyB, hlyC, hlyD, (Seidenberg et al., 2012). ويشفر جين hlyA لإنزيم الهيمولايسن نفسه داخل سايتوبلازم الخلية البكتيرية المنتجة له (Johanson,1991). ويكون جين hlyA ذي وزن جزيئي 110 كيلو دالتون ويشفر هذا الجين عن ذيفان يكون نادراً من نوعه في بكتريا اشريشيا القولون ويشارك في عملية إنتاجه بروتين الغشاء الخارجي Tolc، أما جين hlyC فيقوم بإنضاج جين hlyA عن طريق إضافة مجموعة الاسيل Acylates له بعد ترجمته، بينما الجينينhlyB, hlyD فيعملان على انتقال hlyA من خلال المسامات في الغشاء البكتيري إلى الخارج (Slavchev et al., 2009). إن حدوث طفرة وراثية في جين hlyB يؤدي إلى بقاء إنزيم الهيمولايسن في الفراغ البريبلازمي داخل الخلية البكتيرية وبالتالي ينتج عنه سلالات غير محللة للدم ، بينما يؤدي حدوث طفرة في الجين hlyD إلى تجمع إنزيم الهيمولايسن على سطح الخلية وبتالي تتكون مناطق تحلل صغيرة تحيط بالمستعمرة عند زراعتها على وسط أساس الدم (Oropeza et al.,1989) و يحتاج إنزيم الهيمولايسن عند إفرازه في وسط النمو أو البيئة الخارجية إلى أيون الكالسيوم Ca^{+2} من أجل التنشيط والارتباط بأغشية الخلايا (Boehm et al.,1990).

أما الية عمل إنزيم الهيمولايسن في إحداث الأمراضية تكون إما بصورة مباشرة من خلال تحلل كريات الدم الحمراء وهذا يسبب تحرر الهيموغلوبين الذي يعد ضرورياً للنمو وتكاثر

البكتريا ، أو من خلال التداخل مع العمليات الدفاعية داخل الجسم ، ويتميز إنزيم الهيمولايسن بمدى واسع من التأثيرات فهو يهاجم الخلايا المناعية للمضيف لكن لا يحفز تحللها ولكنه يمنعها من أداء وظائفها (Goni & Ostolaza, 1998).

من سمات إنزيم الهيمولايسن التي تنتجه سلالات بكتريا E.coli المعزولة من مصادر مختلفة يكون حساساً للحرارة Heat Liable، وله تأثير مستضدي متشابه وليس متماثل بالخصائص الفيزيائية، حامضياً، وبروتيني القوام وله وزن جزيئي يتراوح ما بين (58000-120.000) دالتون، ويكون فعالاً جداً عند pH 7-8، وتزداد فعاليته عند وجود أيون الكالسيوم Ca^{+2} (Sanchez et al., 2011).

يعود إنزيم الالفا-هيمولايسن التي تنتجه بكتريا E.coli إلى مجموعة من السموم ذات خصوصية واسعة في خلايا المضيف، إذ يؤثر هذا الإنزيم على أنواع مختلفة من الخلايا مثل كريات الدم الحمراء للخيول والخنازير والأرانب والإنسان والدجاج والأغنام والخلايا المولدة لألياف الأجنة والخلايا المولدة للألياف في الفئران (Aitziber et al., 2001).

6.2. المضادات الحياتية Antibiotics

المضادات الحياتية هي عبارة عن مركبات كيميائية تنتجها الأحياء المجهرية وتعمل على منع نمو الأحياء المجهرية انتقائياً من خلال القتل أو التثبيط (Coumes-Florens et al., 2011). وهناك نوعان من المقاومة للمضادات الحيوية هما المقاومة الطبيعية Natural resistance وهي تكون ذات أصل وراثي مشفر بواسطة جينات محمولة على الكروموسومات أو البلازميدات أو المقاومة المكتسبة Acquired resistance وهي تكون ناتجة عن اكتساب البكتريا لبلازميدات تحمل جينات تشفر للمقاومة أو حدوث طفرة في الجينات المحمولة على الكروموسومات فتشفر لنواتج مقاومة وقد تعزى المقاومة إلى العناصر القافزة Transposable elements التي تحول العزلة الحساسة إلى عزلة مقاومة للمضادات (Odumosu et al., 2013).

يمكن إن تقسم المضادات الحياتية على أساس طيف فعاليتها إلى مضادات واسعة الطيف Broad spectrum antibiotic وتكون فعالة على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة اكرام مثل مضاد Gentamycin ، والمضادات ضيقة الطيف Narrow spectrum antibiotic وهذه تعمل على أنواع محددة من البكتريا مثل مضاد Penicillin (Tortora et al, 2010).

صنفت المضادات الحياتية المستعملة في علاج اصابات العائلة المعوية اعتماداً على تركيبها (CLSI, 2014). إلى:

1.6.2. مجموعة مضادات البيتا لاكتام Beta-Lactams Antibiotics Group

تعد هذه المضادات الحياتية من المضادات ذات أهمية كبيرة من بين المضادات الأخرى، وتكون واسعة الطيف ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام المسببة للعديد من الأخماج (Ehmann & Lahiri, 2014). ويكون لها تأثير قاتل للبكتريا الموجبة أكثر من السالبة لان البكتريا السالبة تحتوي ضمن تركيبها على غشاء خارجي يعرقل وصول المضاد الحيوي إلى الهدف (Brooks et al., 2007). وامتلاك هذه المضادات حلقة البيتالاكتام وهي الجزء الذي جعلها أكثر أهمية وفعالية ضد البكتريا فهي تعمل على تثبيط بناء الجدار الخلوي للبكتريا من خلال ارتباط المضادات الحيوية ببروتينات خاصة ضمن تركيب غشاء الخلية تسمى Penicillin binding Proteins (PBPS) إذ تعمل على تثبيط عمل إنزيم Transpeptidase والذي يعمل على تكوين سلاسل ببتيدية التي تربط بين الطبقات المكونة لطبقة Peptidoglycan التي تشكل من مكونات الجدار الخلوي البكتيري (Zervosen et al., 2012). حيث أدى استعمال مضادات البيتالاكتام بشكل شائع إلى ظهور بكتريا مقاومة لهذه المضادات وخاصة البكتريا السالبة لصبغة كرام (Sarojamma & Ramakrishna, 2011) تكتسب E.coli مقاومتها لمضادات البيتالاكتام بوساطة بلازميد يشفر لإنتاج إنزيمات بيتالاكتاميز نوع TEM (TEM-type ß-lactamases) كما تمتلك اشيريشيا القولون اليات إخرى لمقاومة هذه المضادات تشمل اكتسابها لإنزيم (AmpC-type Cephalosporinase) وفرط إنتاج إنزيمات كروموسومية وتغير موقع الهدف وتغيرات في قنوات بورين (Porin channel) (Kaye et al., 2004). تتميز هذه المضادات بعدم سُميتها لخلايا الإنسان (Forbes et al., 2007). وتقسم هذه المضادات إلى:

1.1.6.2. البنسلينات Penicillins

هي من أول المضادات الحيوية التي تم استعمالها وكانت ذات فعالية عالية ضد العديد من الأمراض البكتيرية، ولا تزال تستعمل بمديات واسعة بالرغم من مقاومة الكثير من البكتريا لها إذ تعمل على تثبيط بناء الجدار الخلوي من خلال تحطيمها البروتين عن طريق ارتباطها بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين PBPs المهم في نمو وبناء الخلية البكتيرية (Stephan & Timothy, 2010). مقاومة معظم سلالات بكتريا E.coli لمضادات البيتالاكتام من مجموعة البنسلينات تكون مشفرة الكروموسومياً من قبل جين AmpC التكويني ذي الحفاز الضعيف وكابته الأستنساخي الذي يشفر لإنزيمات البيتالاكتاميز (AmpC Beta-lactamases) بمستوى منخفض يحلل حلقة البيتا لاكتام في البنسلينات و السيفالوسبورينات الأجيال الأولى

(Mameri & Nordmann, 2007) وبعض السلالات الطافرة تقاوم هذه المضادات من خلال إنتاجها إنزيم Penicillinase الذي يحول البنسلين إلى Penicilloic acid وبالتالي يؤدي إلى فشل العلاج بهذه المضادات (Forbes et al., 2007).

2.1.6.2. السيفالوسبورينات Cephalosporins

تتكون هذه المضادات من حلقة البيتالاكتام التي تكون مرتبطة مع حلقة Dihydrothiazine وتكون نواة تسمى 7-amino cephalosporinic acid وترتبط بالنواة سلاسل جانبية تنتج عنها مشتقات مختلفة من السيفالوسبورينات، وهي ذات فعالية واسعة الطيف تعمل على تحطيم الجدار الخلوي البكتيري (Jacob, 2015). تكتسب بكتريا E.coli مقاومتها للسيفالوسبورينات من خلال إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وتعد هذه الإنزيمات من أهم اليات المقاومة في العائلة المعوية لمضادات السيفالوسبورينات واسعة الطيف (Geser et al., 2012). وتتشابه السيفالوسبورينات مع البنسلينات في إلية عملها لذلك غالبا ما تعطى هذه المضادات للمرضى الذين لديهم حساسية من البنسلينات (Prescott et al., 2005). وتقسم هذه المضادات على أساس تركيبها الكيميائي ونوع السلسلة الجانبية وفعاليتها ضد المايكروبات وطبيعة مقاومتها لإنزيمات البيتالاكتاميز إلى عدة أجيال (Brooks et al ., 2007).

3.1.6.2. الكاربابينيمات Carbapenems

تضم مجموعة من المضادات أهمها Imipenem وMeropenem بالإضافة إلى مجموعة جديدة والتي تشمل Faropenem الذي يعطى عن طريق الفم (Dalhoff et al., 2003). وتمتلك هذه المضادات فعالية واسعة ضد الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة اكرام والجراثيم اللاهوائية (Shah, 2008). يعد مضاد Imipenem من المضادات واسعة الطيف ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام (Turnidge et al., 2002). ويستعمل هذا المضاد لعلاج الأمراض التي تسببها البكتريا المعوية وذلك بسبب استقراريته ضد إنزيمات (AmpC) و (ESβLs) المنتجة من بعض إفراد هذه العائلة (Jiang et al., 2012).

4.1.6.2. المونوباكتام Monobactam

تضم مضاد Aztreonam وهو أول مضاد في هذه المجموعة وله فعالية قاتلة ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام وخاصة إفراد العائلة المعوية ، وهذا المضاد يشابه مضاد Ceftazidime في فعاليته ضد بكتريا السالبة، ولكن ليس له فعالية ضد البكتريا الموجبة والبكتريا اللاهوائية (Brooks et al., 2007). كما يكون هذا المضاد مفيداً للأشخاص الذين يعانون من حساسية من

السيفالوسبورينات و البنسلينات، ويستعمل في علاج الأخماج البولية والتسمم الدموي (Oermann et al., 2010).

2.6.2. مجموعة مضادات الأمينوكلايكوسايد Aminoglycoside Antibiotics Group

هي مجموعة من المضادات الحياتية المهمة والمستعملة لعلاج الأخماج التي تسببها البكتريا السالبة والموجبة لصبغة اكرام وهي واسعة الطيف مثل مضادات Gentamycin, Amikacin, Tobramycin, Streptomycin, Kanamycin وتكون هذه المضادات متشابهة في الصفات الكيميائية والسمية والدوائية (Robert- Dagil et al., 2013) وتساهم البلازميدات والعناصر الطافرة في منح بكتريا E.coli المقاومة ضد الامينوكلايكوسايدات التي تقوم بتثبيط بناء البروتين من خلال ارتباطها بشكل غير رجعي بالوحدة الرايبوسومية 30S وبالتالي يؤدي إلى توقف مرحلة استطالة السلسلة الببتيدية وثم موت الخلية (Wassef et al., 2010). ويكون لهذه المضادات أثاراً جانبية مضرة في حالة استعمالها في العلاج لفترات طويلة إذ تؤثر على العصب الثامن وتؤدي إلى الصم (Ototoxicity) بالإضافة إلى سميتها على الكلى (Quiros et al., 2010).

3.6.2. مجوعة مضادات التتراسايكلين Tetracycline Antibiotics Group

تعد هذه المضادات من مثبطات تخليق البروتين من خلال تثبيط ارتباط Amino acyl tRNA بالوحدة الرايبوسومية 30S وبعد ارتباطها بالوحدة الرايبوسومية 30S تؤدي إلى توقف مرحلة الاستطالة أثناء عملية تصنيع البروتين (Paterson, 2006). وتشفر بعض البلازميدات في بكتريا E.coli صفة المقاومة لهذه المضادات المتمثلة بتحوير الغشاء البكتيري بواسطة بروتين مشفر من قبل جين tet مانعاً دخول المضاد عبر الغشاء (Daini et al., 2011). وتكون هذه المضادات واسعة الطيْف، فهي تثبط عملية صنع البروتينات في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Forbes et al ., 2007 ; Brooks et al., 2007).

4.6.2. مجموعة مضادات الكوينولينات Quinolones Antibiotics Group

تعمل هذه المضادات على تثبيط بناء DNA البكتيري من خلال تداخلها مع عمل إنزيمات DNA gyrases و Topoisomerase أو من خلال تثبيط عملية اللف الفائق لشريطي الدنا DNA (Hall et al., 2011). ومن أهم مضادات هذه المجموعة هو مضاد Nalidixic acid هو من كوينولينات الجيل الأول (Hall et al., 2011) والمضاد Ciprofloxacin هو من كوينولينات الجيل الثاني هو من المضادات شائعة الاستعمال في علاج أخماج الأقنية البولية

والتناسلية، ويتميز مضاد Ciprofloxacin بسمية قليلة وفعالية عالية وبالإضافة إلى استعماله كعلاج وقائي قبل إجراء العمليات الجراحية (Remy et al., 2012) ويختلف Nalidixic acid عن Ciprofloxacin بوجود ذرة فلورF في تركيبه ، ويكون أقل فعالية منه (Brook et al., 2007) تعزى مقاومة E.coli للكوينولونات إلى وجود الجينات البلازميدية (qnr) وكذلك إلى الطفرات الكروموسومية التي تحدث تغيرات في إنزيمات الهدف DNA gyrases و Topoisomerase II أو تراكم المضاد (Paterson, 2006).

5.6.2. مضاد التراي ميثوبرايم Trimethoprim Antibiotic

يقوم هذا المضاد بتثبيط عمل إنزيم (Dihydrofolate reductase) (DHFR)، و يكون له دوراً مهماً في صنع حامض الفوليك Folaic acid المهم في صناعة الأحماض النووية في البكتريا، ويستعمل هذا المضاد في علاج أخماج الأقنية البولية (Brook et al., 2007). وتكون مقاومة هذا المضاد بتحوير في إنزيم الهدف Dihydrofolate reductase من خلال تشفير جينات dfr التي تقع أما على الكروموسوم أو البلازميد (Kumar et al., 2012).

6.6.2. مضاد الكلورامفينيكول Chloramphenicol Antibiotic

ينتمي هذا المضاد إلى مجموعة Glycoprotein ويعمل ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، لكنه قليل الاستعمال وذلك نتيجة سميته مقارنة مع المضادات الحيوية التابعة لمجموعة (B-lactam) (Forbes et al., 2007). إذ تقاوم بكتريا E.coli هذه المضاد من خلال بلازميدات تشفر لصفة المقاومة التي قد تكون إنزيمية من خلال إنزيم Chloramphenicol acetyltransferase الذي يقوم بتحويل المضاد إلى شكل غير فعال وغير قادر على الارتباط بالرايبوسوم أو غير إنزيمية بواسطة جين flo أو جين cmhA اللذين يشفران لمضخات الدفق، ويرتبط هذا المضاد بالوحدة الرايبوسومية 50S لتثبيط مرحلة الاستطالة خلال بناء البروتين بواسطة تثبيط أنزيم Peptidyltransferase (Bischoff et al., 2005).

7.6.2. مضاد النيتروفيوانتين Nitrofurantoin Antibiotic

يستعمل هذا المضاد في علاج الأخماج البولية و المعوية ، يؤثر على عملية بناء البروتين من خلال الأضرار التي يسببها وبشكل مباشر على شريط DNA (Brooks et al., 2007) ويكون فعالاً ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة اكرام وتزداد فعاليته عند pH 5.5 (Katzung, 2001).

7.2.عوامل الضراوة Virulence Factors

تعرف الضراوة Virulenceعلى أنها مقياسٌ لدرجة الأمراضية والتي تعني القابلية النوعية للبكتريا على إحداث الأخماج ويعود ذلك إلى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة والتي بعضها تقع ضمن التركيب الخلوي وبعضها الأخر يفرز إلى خارج الجسم (Brooks et al., 2010) وتمتلك بكتريا E.coli العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على إحداث الأخماج المختلفة مثل إنتاجها السموم الخارجية Endotoxin مثل إنزيم الهيمولايسن الذي حيث يؤثر على أغشية الخلايا ويحللها ومن الخلايا التي تكون هدفاً لهذا الإنزيم هي كريات الدم الحمراء للإنسان و الحيوانات وكذلك يؤثر على خلايا الدم البيض ، وكذلك إنتاجها السموم المعوية Enterotoxin مثل إنزيم الشيكا Shiga toxin والذي يؤثر على تصنيع بروتينات الخلايا الطلائية المعوية المهمة في عملية الأيض (Tomita & Kamio,1997) .

1.7.2. الغشاء الحيوي Biofilm

يعرف الغشاء الحيوي على انه عبارة عن طبقة من السكريات المتعددة والأحماض النووية والبروتينات، و تقوم العديد من البكتريا التي تعود إلى نفس النوع بتكوينه لحماية نفسها عند شعورها بالخطر إذ تقوم بالالتصاق على السطح (Vuotto et al., 2014). و تكون معظم البكتريا السالبة لصبغة كرام قادرة على إنتاج الغشاء الحيوي ومنها E.coli وهو من أهم عوامل الضراوة في البكتريا الممرضة لما يقوم به من حماية لها كتحمل المعادن الثقيلة ومقاومة المطهرات والمضادات الحياتية (Abidi et al., 2013). وتظهر البكتريا التي تمتلك أغشية حيوية مقاومة عالية للعوامل المضادة للجراثيم وللجهاز المناعي للمضيف بالإضافة إلى ذلك يكون له دوراً كبيراً في تطور الأخماج المرضية وتقليل نفاذ الدواء مما يزيد من مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية وهذا يفضي إلى تحول الخمج الحاد إلى المزمن (Niemirowicz et al., 2014). و قد وجد أن سمك الغشاء الحيوي الذي تنتجه بكتريا E.coli يختلف تبعاً لطبيعة إنتاج البكتريا والظروف البيئية المحيطة مثل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة وفضلاً عن نوع الإصابة التي تسببها البكتريا ، كما في بكتريا UPEC التي تسبب التهاب البروستات إذ تكون لها القدرة كبيرة على إنتاج غشاء حيوي سميك أكثر من تلك التي تسبب التهاب حويض الكلية والمثانة (Al-Chalabi et al., 2010). وتقوم البكتريا إثناء الإصابة بإنتاج بروتينات مرتبطة بالغشاء الحيوي Biofilm Associated Proteins (BAP) وعند وجود هذه البروتينات يسهل تكوين الغشاء الحيوي المرتبط ببقاء البكتريا مدة أطول في جسم المريض، كما يعد وجود الأهلاب والأسواط ومتعدد السكريد من العوامل المهمة في إنتاج الغشاء الحيوي (Vuotto et al., 2014)

2.7.2. البكتريوسين Bacteriocin

البكتريوسينات هي مواد بروتينية ذات أوزان جزيئية عالية تفرزها البكتريا خلال الطور اللوغاريتمي من النمو البكتيري و تستعملها ضد السلالات القريبة الصلة بها أو ضد سلالات مختلفة (Todar, 2002). ويكون للبكتريوسين تسميات مختلفة تبعاً للبكتريا المنتجة له، ويسمى البكتريوسين الذي تنتجه E.coli بالـColicin (Hammami et al., 2010). ويعد إنتاج البكتريوسين خاصية مهمة في بكتريا العائلة المعوية وضمن جنس الايشريشيا يكون إنتاج البكتريوسين مرتبط تقريباً بشكل خاص بسلالاتE.coli(David et al., 2010). وتنتج E.coli نوعين من البكتريوسينات ويصنفان على أساس وزنهما الجزيئي هما الكولوسين Colicin و وزنه الجزيئي 25-80 كيلو دالتون والمايكروسين Microcin و وزنه الجزيئي 10 كيلو دالتون (Zihler et al., 2009). الكولوسين يشبه المايكروسين بعدة صفات لكن عند المقارنة بينهما فأن إنتاج المايكروسين لا يؤدي إلى قتل السلالة المنتجة له ولا يسبب ضرراً لـ DNA، وتقريباً كل الكولوسين مشفر بلازميدياً بينما المايكروسين يكون مشفراً كروموسومياً (Budic et al., 2011). يتأثر إنتاج البكتريوسين بعدة عوامل بيئية وكيميائية وفيزيائية إذ لوحظ أقصى نشاط له عند pH 7.0 ودرجة حرارة 30-37 مْ و NaCl 15% (Sarika et al., 2010).ويشفر للبكتريوسين من قبل ثلاثة جينات عنقودية الشكل محمولة على البلازميدات وأولها جين البكتريوسين (Bacteriocin gene)، ثم جين يشفر لبروتين المناعة (Immunity gene) الذي يمنع تأثير البكتريا بالكولوسين الذي تنتجه، فضلاً عن جين التحلل (Lysine gene) الذي يشفر لبروتين محلل يساعد على تحرير الكولوسين من البكتريا المنتجة له، وينتقل الكولوسين بشكل نشط عبر غشاء الخلية إلى البيئة الخارجية ترتبط جزيئات الكولوسين بمستقبلات خاصة بسطح الخلية الهدف وعندما يدخل الكولوسين الخلية الهدف يؤدي الى موتها نتيجة تكون قنوات في الغشاء السايتوبلازمي و تثبيط تصنيع البروتينات أو تضرر الـDNA (Gordon & O'Brien, 2006) ويكون تأثير البكتريوسين على الخلايا البكتيرية الحساسة قاتلاً أو مثبطاً للنمو (Sarika et al., 2010).

3.7.2. المحفظة Capsule

تعد المحفظة الخط الدفاعي الأول في البكتريا والتي تتكون من سكريات متعددة تحيط بالخلية البكتيرية، وتعد أحد عوامل الضراوة المهمة في إحداث الأمراض وتكفي الكميات القلية منها لمقاومة العوامل المناعية لجسم المضيف (Evrard et al., 2010). أوهي وحدات من متعدد السكريد تتجمع بهيئة طبقة متماسكة تحيط بالخلية البكتيرية، وتصنع العديد من أنواع

البكتريا كميات كبيرة من مواد خارج خلوية مؤلفة من متعدد السكريد ويطلق عليها مصطلح الكبسولة أو المادة المخاطية (Slim layer) عندما تكون غير منتظمة (Brook et al., 2007) وتقع المحفظة في البكتريا السالبة لصبغة اكرام إلى الخارج من الغشاء الخارجي وتعمل على حماية البكتريا من دفاعات المضيف غير المتخصصة وخاصة فعل المتمم وعملية البلعمة (Wilson et al., 2007). ولا يمكن إزالة المحفظة بالغسل عندما تكون منتظمة وملتصقة بالخلية وتسمى بالمحفظة أما إذا كانت غير منتظمة فيمكن إزالتها بسهولة وعندها تسمى بالطبقة اللزجة ، أما الـGlycocalyx وهي شبكة من متعددة السكريات خارجة من سطح الخلية ويمكن أن تحيط بها عدة خلايا وفي الوقت نفسه تغطي المحفظة والطبقة اللزجة (Prescott et al., 1990). وتكون أكثر انتشاراً بين سلالات بكتريا E.coli التي تسبب التهابات المسالك البولية والبروستات ، وتمتلك بكتريا E.coli أكثر من مائة مستضد محفظي حساس لحرارة و للمستضد المحفظي ثلاث أنواع النوع الأول (L) الذي يتحطم بدرجة حرارة 100مْ ويعمل هذه المستضد كغلاف ومحفظة ، النوع الثاني (A) الذي يتحطم بدرجة حرارة 121 مْ ويعمل كمحفظة فقط ، والنوع الثالث (B) الذي يتحطم بدرجة حرارة 100مْ ويعمل كغلاف فقط (Tiba et al., 2008).

4.7.2. إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

Extended Spectrum β-Lactamase Enzymes (ESBLs)

يعد إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف إحدى اليات المقاومة المهمة للخلية الجرثومية وتكون هذه الإنزيمات متنوعة ومعقدة وسريعة التطور و شكلت تهديداً للكثير من المضادات الحياتية (Shaikh et al., 2015). وإن تعرض الخلية الجرثومية بشكل مستمر وعشوائي للمضادات البيتالاكتام يؤدي إلى إنتاجها إنزيمات البيتالاكتاميز بشكل مستمر وبالتالي إلى حدوث طفرات وراثية في الجينات المشفرة لها مما سبب في ظهور جينات مقاومة مشفرة لإنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف التي تمنح صفة المقاومة للخلية الجرثومية تجاه الكثير من مجاميع المضادات البيتالاكتاميز مثل البنسلينات والسيفالوسبورينات (Rezai et al., 2014). إن زيادة المقاومة لمضادات البيتالاكتاميز خاصة الحديثة منها هو بفعل الجينات المشفرة لإنزيمات البيتالاكتاميز والتي تكون محمولة على البلازميد مما سهل انتقالها بين العديد من الانواع البكتيرية إذ أدى إلى انتشار صفة المقاومة (Brouwer et al., 2014). في البكتريا السالبة تنتج هذه الإنزيمات إلى الفسحة البروتوبلازمية إي مرتبط بالخلية بينما في البكتريا الموجبة تتحرر هذه الإنزيمات إلى خارج الخلية وتقوم هذه الإنزيمات بتحطيم أصرة الأمايدAmide bondالمتواجدة في حلقة البيتالاكتام للمضاد الحيوي وجاعلة منها جزيئات غير فعالة بايلوجيا ، وتشفر لهذه

الإنزيمات جينات bla genes قد تكون محمولة على بلازميد أو كروموسوم (Al-Jubori et al., 2012).

8.2. التطفير Mutagenesis

تتعرض جميع الخلايا الحية إلى عوامل فيزيائية وكيميائية التي لها القابلية على احداث تغير في التركيب الأولي لجزيئة DNA، والتغيرات التي تحصل في المادة الوراثية قد تكون مميتة للخلية أو تؤدي إلى تغيرات ليست في صالح الخلية ، ومن جهة إخرى تمثل رافداً مهماً في عملية تطوير الأنواع ، وتطلق على التغيرات التي تحصل في النمط الجيني القابلة للتوارث بالطفرات (Mutations) وهذه التغيرات إذا لم تصحح سوف تؤدي إلى حدوث طفرات ، بينما لا تؤدي هذه التغيرات إلى حدوث تغيير في تسلسل الأحماض الأمينية للبتيد أو تسبب تغير في تسلسل الأحماض الأمينية لكن لا تغير في الموقع الفعال (active site) (المرجاني ، 2011)

وتصنف الطفرات حسب طبيعة حدوثها إلى :

1-الطفرات التلقائية Spontaneous Mutation

وهي طفرات تحدث بشكل طبيعي أو تلقائي دون التعرض إلى عوامل مسببة للطفرة .

2- الطفرات المستحدثة Induced Mutation

وهي الطفرات التي تحدث نتيجة تعرض الخلايا إلى عوامل مطفرة فيزيائية أو كيميائية .

1.8.2. المطفرات الكيميائية Chemical Mutation

تشمل مواد كيميائية مثل حامض النتروز و صبغة الأكردين و 5-Bromo uracil (5BU) و Mitomycin-C و Ethyl Ethane Sulphate (EES) (Kumer,2016).

2.8.2. المطفرات الفيزيائية Physical Mutation

A. الأشعة فوق البنفسجية UV light

تؤثر هذه الأشعة بشكل مباشر أو غير مباشر ويكون الضرر الرئيسي لهذه الأشعة هو أحداث ازدواج ما بين البرميدينات المتجاورة في جزئية DNA وخاصة ازدواج الثايمين (Thymine Dimers) وبالتالي يؤدي إلى تشوه سلسلة DNA وحدوث خلل أثناء التضاعف ، أما التأثير غير المباشر ينتج عن تحلل جزيئات الماء المحيطة وإنتاجها للجذور وتأثيرها على المادة الوراثية.

B. الأشعة المؤينة Ioning Radiation

تشمل اشعة كاما واشعة X واشعة بيتا ، ويكون لها تأثيرات مباشرة مثل كسر الكروموسوم أو تأثيرات غير مباشرة مثل تحويل مكونات السيتوبلازم غير الفعالة إلى مكونات فعالة محدثة للتطفير (المرجاني ، 2011).

3.8.2. أشعة كاما Gamma Raya

هي من أنواع الأشعة الكهرومغناطيسية و تشبه الموجات الضوئية ما عدا أن الطول الموجي لها أقل بكثير من الطول الموجي للضوء وتحمل طاقة عالية جداً تندفع بسرعة الضوء ولها قدرة فائقة على اختراق أي جسم يعترض طريقها ولا يمنعها سوى الواح سميكة من الرصاص و من أهم مصادر هذه الاشعة المؤينة مصدران هما كوبلت-60 (C0-60) و السيزيوم 137وكلاهما يصدر خلال انحلاله أشعة كاما القادرة على اختراق المواد إلى عماق كافية لتحقيق أهداف التشعيع (Atiyeh et al., 2007).

4.8.2. التطفير بوساطة أشعة كاما Mutagenesis by Gamma Ray

تكون جزيئية الـ DNA الهدف الخلوي الرئيس لأشعة كاما ، تحدث أشعة كاما الطفرات في البكتريا نتيجة تكون ذرات متهيجة في تركيب جزئية الـDNA فيؤدي إلى حصول ارتباطات وتغيرات غير طبيعية لهذه الجزيئة (Drake,1970). فقد ثبت في دراسة Teoule واخرين (1977) انه يتم تحوير القاعدة النايتروجينية ثايمين Thymine في سلسلة النيوكليوتيدات المتعددة لجزئية الـ DNA بوساطة أشعة كاما ، نتيجة هذه التغيرات يحصل تغير في المعلومات الوراثية خلال عمليات التضاعف والاستنساخ نتيجة للتغير في القواعد النايتروجينية البيورينية والبيرميدينية تؤدي إلى حدوث تغير في تسلسل الاحماض الامينية للبروتينات فتقل فعالية البروتين (Coggle,1973). وإن حدوث الطفرة يكون بصورة عشوائية وانه من غير الممكن التنبؤ أي مورث سوف يتأثر (Carpenter,1977). يؤثر الاشعاع في الكائنات الحية من خلال امتصاص الجزئيات الخلوية لطاقة الاشعاع بصورة مباشرة تؤدي إلى ضررها ذلك عن طريق كسر الاواصر بين الجزيئات، إذ تعمل الاشعة على تدمير غلاف الخلية الجرثومية وتحرير المحتويات الخلوية إلى الخارج عن طريق كسر الاواصر بين السكريات الامينية N-acetyl muramic acid و N-acetylglucose amine ضمن طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan للجدار الخلوي (Mitchel,1976). ونتيجة لكسر الاواصر تتكون مركبات مثارة غير مستقرة مثل كسر اواصر الهيدروجين والاواصر الفوسفاتية لشريطي الـDNA أو التأثير على القواعد النايتروجينية (Sapora et al., 1977).

3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3.الأجهزة والمستلزمات Instruments and Equipments

1.1.3. الأجهزة المستعملة Instruments

جدول 3-1 الأجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة.

التسلسل	اسم الجهاز	الشركة المصنعة
1	ثلاجة (براد) Refrigerator	Sharp Inc-Japan
2	جهاز PCR Thermal cycler	ABI-USA
3	جهاز الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet trans illuminator	UV products-USA
4	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis apparatus	Bio-Rad-Italy
5	جهاز التقطير Distillate	Memert-Germany
6	جهاز النبذ المركزي Eppendorf bench centrifuge	Japan-optimal
7	جهاز النبذ المركزي المبرد Colling centrifuge	Sanyo-UK
8	حاضنة هزازة Shaker Incubator	Selecta-Germany
9	حاضنة اعتيادية Incubator	Selecta-Spain
10	حمام مائي Water Bath	GFL-Germany
11	خلاط منضدي Vortex	Clay Adams-Germany
12	كابينة الزرع المختبرية Laminar Air Flow	Ishtar-Iraq
13	فرن كهربائي Oven	Gallen-Kamp
14	كاميرا رقمية Digital camera	Sony-Japan
15	مؤصدة Autoclave	Hiryama-Japan
16	جهاز قياس الطيف الضوئي Spectrophotometer	Hitachi-Japan
17	مجهر ضوئي Microscope	Olympus-England
18	صفيحة حرارية مع محرك مغناطيسي Hot plate with stirrer	Sartorius-Germany
19	مقياس الرقم الهيدروجيني pH-meter E150	Metrohm , AG-Swiss
20	ميزان حساس Sensitive Balance	Mettler-Swiss
21	قرص (كوبلت-60) Disk cobult-60	AEA Techndgize, USA
22	جهاز القطرة النانوية Nano drop	Biogroup-UK

2.1.3. المستلزمات و الأدوات المختبرية Equipments and Tools

استعملت المستلزمات والأدوات الأتية كما موضحة بالجدول (3-2)

جدول 3-2 المستلزمات والأدوات المستعملة في الدراسة .

ت	الأدوات المستعملة	الشركة والمنشأ
1	اطباق بلاستيكية Plastic Petri dishes	AFMA-Jordan
2	دوارق زجاجية بأحجام مختلفة Glass flasks	
3	مسحات معقمة Disposable swabs	
4	اسطوانات زجاجية Glass cylinder	
5	كؤوس زجاجية Glass cylinder	
6	انابيب بلاستيكية دقيقة Plastic test tubes	Bioneer-Korea
7	شرائح زجاجية Slides	Slibrand-China
8	كفوف وكمامات	
9	عروة ناقل Loop Full	KD SURGICALS-INDIA
10	مرشحات دقيقة 0.45, 0.22 Filter papers	Slamed-German
11	ماصات دقيقة بإحجام مختلفة Micropipettes	

3.1.3. المواد الكيماوية والحيوية Chemical and Biological Substance

استعملت المواد الكيماوية والحيوية الموضحة في الجدول (3-3)

جدول 3-3 المواد الكيماوية والحيوية المستعملة في الدراسة.

ت	اسم المادة	الشركة المجهزة والمنشأ
1	أسيتون Acetone	BDH-England
2	كلوكوز Glucose	
3	اكاروز Agarose	
4	الفا- نفثول α-Naphthol	
5	بيبتون Pepton	
6	تربتون Trypton	
7	ترس حامض الهيدروكلوريك Tris-HCL	
8	ترس قاعدي Tris-base	
9	محلول الترحيل TBE	
10	ماء منزوع الأيونات PCR water	
11	المثيل الأحمر Red Methyl	

12	يوريا Urea	
13	كحول اثيلي مطلق Absolute Ethanol 99%	
14	مسحوق الاكار Agar	
15	كحول ايزوميل Isoamyl Alcohol	
16	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH2PO4	Promega-USA
17	كلوريد الصوديوم Sodium chloride	
18	كلوريد الكالسيوم Calcium chloride	
19	كلوريد المغنيسيوم Magnesium chloride	
20	خلاصة الخميرة Yeast extract	
21	كليسرول Glycerol	Fluke-Germany
22	هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide	
23	فينول Phenol	

4.1.3. الأوساط الزرعية الجاهزة Ready Culture Media

جدول 3-4 الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة .

ت	أسم الوسط	الغرض من استعماله	الشركة (المنشأ)
1	وسط الدم الأساس Blood base medium	اضيف له الدم بمقدار 5% وأستعمل للتحري عن قابلية البكتريا على تحليل الدم	Oxoid-England
2	نقيع القلب الدماغ السائل Brain heart infusion broth	استعمل لغرض تنشيط البكتريا قبل إجراء فحص الحساسية الدوائية	
5	وسط مولر-هنتون Muller-Hinton medium	استعمل لغرض إجراء فحص الحساسية الدوائية	
6	وسط الماكونكي MacConkey medium	أستعمل للتفريق بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز	
7	وسط مرق الصويا تربتك Tryptic Soy broth	استعمل لغرض حفظ البكتريا بعد إضافة الكليسرول بنسبة 15%.	
8	وسط تربتك صويا الصلب Tryptic Soy agar	استعمل للكشف عن إنتاج البكتريوسين	
9	المغذي السائل Nutrient broth	استعمل لغرض تنمية و تنشيط البكتريا وتحضير العوالق البكتيرية المختلفة	
10	وسط المغذي Nutrient medium	استعمل هذا الوسط لغرض تنمية وتنقية العزلات البكتيرية	
13	وسط سترات سايمون Simmon citrate medium	استعمل لمعرفة قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون	

14	وسط أيوسين مثيلين الأزرق Eosin methylene blue	أستعمل للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين البريق المعدني المخضر	Himedia -india
15	وسط كليكلر الحديد Kliglers iron medium	استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على تخمير السكريات وانتاج غاز H_2S	
16	وسط احمر المثيل– فوكس بروسكور MR/VP	استعمل لغرض الكشف عن التحلل الكلي و الجزئي لسكر الكلوكوز	
17	وسط الحركة Motility medium	استعمل لغرض معرفة قدرة البكتريا على الحركة	
18	ماء الببتون Peptone water	استعمل لغرض الكشف عن انتاج جذر الاندول	

5.1.3. الصبغات والكواشف The Stains and Reagents

جدول 3-5 الصبغات المستعملة في الدراسة .

ت	أسم الصبغة	الشركة-المنشأ
1	محاليل صبغة اكرام Gram Stain	Institute of Sera-Iraq
2	صبغة التحميل Loading dye	Bioneer-Korea
3	صبغة البنفسجي البلوري Crystal Violet	Himedia-India
4	الحبر الهندي Indian ink	BDH-England
5	صبغة بروميد الأثيديوم Ethidium Bromide	Bioneer-Korea

1.5.1.3. الكواشف The Reagents

جدول 3-6 الكواشف المستعملة في الدراسة.

ت	اسم الكاشف	الغرض من الاستعمال	المنشأ
1	بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 3%	للكشف عن إنتاج إنزيم الكاتليز	China
2	N,N,N,N-tetra-Methyl-P- Phenylen Diamine Dihydro Chloride	للكشف عن إنتاج إنزيم الأوكسديز	China
3	فوكس بروسكور يتألف من مركبين VIP1 الفا نفثول وماء مقطر.VIP2 هيدروكسيد البوتاسيوم وكحول مطلق	يستعمل للكشف عن التحليل الجزئي لسكر الكلوكوز و انتاج Acetyl methylcarbino	India
4	كاشف أحمر المثيل Methyl reagent (Ethanol 95%,Methyl red)	يستعمل للكشف التحليل الكلي لسكر الكلوكوز وإنتاج الأحماض lactic, succinic,acetic,formic acids	India
5	كاشف كوافاكس يتألفPara-dimethyl amino benzaldehyd وIsoamyl alcohol	للكشف عن الاندول من الحامض الأميني التربتوفان	India

6.1.3.المضادات الحياتية Antibiotics

جدول 3-7 أقراص المستعملة في اختبار الحساسية الدوائية مع أقطار التثبيط القياسية وفق ما جاء في (CLSI, 2014).

مجاميع المضادات	اسم المضاد	الرمز	تركيز القرص µg/ml	المقاومة	الحساسية
Aminopenicillin	Ampicillin	Am	24	≤13	≥17
Ureidopencillin	Ticarcillin	TI	75	≤14	≥20
Cephalosporin III	Cefotaxime	CTX	30	≤22	≥26
	Ceftriaxone	CTR	30	≤19	≥23
Monobactams	Aztreonam	AT	30	≤17	≥21
Fluoroquinolones	Nalidixic acid	NA	30	≤13	≥19
	Ciprofloxacin	CIP	5	≤15	≥21
Phenicols	Chloramphenicol	C	30	≤12	≥18
tetracyclines	Doxycycline	DO	30	≤10	≥14
Aminoglycosides	Amikacin	AK	10	≤14	≥17
	Gentamicin	GM	10	≤12	≥15
Carbapenems	Imipenem	IPM	10	≤19	≥23
	Meropenem	MEM	10	≤19	≥23
Nitrofurans	Nitrofurantoin	NIT	300	≤14	≥17
folate pathway inhibitors	Trimethoprim	TM	30	≤10	≥16

7.1.3. البادئ Primer

تم استخدام بادئ خاص بجين إنزيم الهيمولايسن الحال للدم وذلك باستخدام موقع NCBI-Genbank وبرنامج تصميم البادئات Primer3plus وتم تجهيز هذا البادئ عن طريق شركة Bioneer في كوريا. كما في جدول البادئ (3-8).

جدول 3-8 البادئ المستخدم في الدراسة.

Primer	Sequence		Amplicon
hlyA- E.coli	F	GGAGTTAGTGCAGCCTCCAG	360bp
	R	ACCACTCTGACTGCGATCAG	

البادئ الأمامي F: Forword : البادئ العكسي R: Revers

8.1.3. العُدد المختبرية The Laboratory Kits

جدول 3-9 العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة .

ت	العُدد	الشركة (المنشأ)
1	**عدة تشخيص API 20E System** الذي يضم اشرطة الفحص فضلا عن API Suspension Medium, وكذلك يضم كواشف الأتية Mineral Oil, Incubation Boxes James,VP1,VP2,TDA	BioMerieux (France)
2	**عدة استخلاص DNA الجينومي DNA Genomic Extraction Kit وتضم المحاليل التالية لأجراء الفحص** GT Buffer 30 ml, GB Buffer 40 ml, W1 Buffer 45 ml, Wash Buffer 100, Elution Buffer 30 ml, GD Colum 100pcs, 2ml collection tubes 100 pcs	Geneaid (Thailand)
3	**عدة مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR** **AccuPower® PCR PreMix وتشمل مكوناتها** - Taq DNA polymerase 1U -dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) each: 250µM - Tris-HCl (pH 9.0) 10mM - KCl 30mM - MgCl2 1.5m	Bioneer (Korea)

9.1.3. المواد المتفرقة الأخرى Other Materials Miscellaneous

جدول 3-10المواد الاخرى المستعملة بالدراسة.

المادة	المصدر المجهز
دم بشري بفصائله الأربع	مستشفى النسائية و الأطفال
دم الأغنام	كلية الطب البيطري / جامعة القادسية

2.3. طرائق العمل Methods

1.2.3. التعقيم Sterilization

عقمت جميع الأوساط الزرعية ومعظم المحاليل المستعملة بهذه الدراسة بالمؤصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند/ انج^2 لمدة 15دقيقة ، بينما الزجاجيات عقمت بالفرن الكهربائي عند حرارة 180مْ لمدة ساعتين ، أما المحاليل التي تتأثر بالحرارة فعقمت باستخدام المرشحات الغشائية Millipore filters ذات فتحات قطرها 0,22µm ملي ما يكرون (Greenwood, 2012).

2.2.3. تحضير الأوساط الزرعية Preparation of Culture Media

حُضرت الاوساط الزرعة الجاهزة المبينة في جدول 3-4 وفق تعليمات الشركة الخاصة بكل وسط ، و ضبط الأس الهيدروجيني لها وعقمت تبعاً لنوع الوسط الزرعي بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م^o لمدة 15 دقيقة ، ثم حضنت الأوساط الزراعية بعد صبها في الإطباق أو الأنابيب وبحسب متطلبات التجربة في درجة 37 م^o مدة 24 ساعة للتأكد من عدم وجود تلوث ثم يتم حفظها في الثلاجة عند درجة 4 م^o لحين الاستعمال .

فيما حضرت الأوساط الزرعية التركيبة كما يأتي :

1.2.2.3. وسط الدم الأساس Blood Base Media

حُضر وسط الدم الأساس بحسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 37.5 غم من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر، وثم عقم بالمؤصدة ثم يترك ليبرد إلى درجة حرارة 45-50مْ، وبعدها أضيف له الدم المغسول بنسبة 5% ومزج بلطف ثم صب في الإطباق، وترك ليتصلب وحفظ بالثلاجة بدرجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال، ويستخدم لعزل البكتريا المنتجة لإنزيم Hemolysin الحال للدم (Cheesbrough, 2006) .

2.2.2.3. وسط اليوريا الأساس Urea Base Media

حُضر هذا الوسط بإذابة 2.5 غم من وسط اليوريا الأساس في 95 مليليتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة وفيما بعد برد إلى درجة حرارة 45 مْ ، وأضيف إليه 5 مليليتر من محلول اليوريا المعقم بواسطة المرشحات الدقيقة ، ثم صب بصورة مائلة (Slant) بأنابيب معقمة ذات أغطية محكمة وحفظ بدرجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال ، واستعمل هذا الوسط للتحري عن إنتاج إنزيم اليوريز من قبل البكتريا (Forbes et al., 2007).

3.2.3. تحضير المحاليل Preparation of Solutions

1.3.2.3. المحلول الملحي الفسلجي Normal saline solution

حُضر هذا المحلول وفق ما جاء في (Forbes et al., 2002) بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى 100مل، ثم عقم بالمؤصدة وبعد ذلك حفظ بالثلاجة عند درجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال .

2.3.2.3. محلول ثابت العكورة القياسي (محلول ماكفرلاند 0.5) McFarland Standard

يحضر هذا المحلول من

A. إذابة 1.175 غم من كلوريد الباريوم $BaCl_2$ في 100مل من الماء المقطر.

B. إضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 إلى 99 مل من الماء المقطر، وبعدها يتم إضافة 0.5 مل من محلول (A) إلى 9.95 مل من المحلول (B) ، ثم يمزج جيداً ويوضع في علبة زجاجية معقمة ، ومحكمة الغلق لمنع حدوث عملية التبخر وثم يحفظ في مكان مظلم لحين الاستعمال (Vandepitt, 2003).

3.3.2.3. المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solution

حُضرت المحاليل الترحيل الكهربائي حسب ما ورد في (Sambrook & Russel, 2001).

- **محول TBE Tris base-Boric acid-EDTA**

حُضر بتركيز نهائي 0.089 مولار ترس قاعدي، و0.089 مولار من حامض البوريك و0.002 مولار من EDTA، وأكمل الحجم إلى 1 لتر من الماء المقطر، وضبط pH إلى 8، وعقم بالمؤصدة و حفظ بدرجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال في الترحيل الكهربائي.

- **محلول صبغة بروميد الأثيديوم Ethidium Bromide Solution**

حُضر بإذابة 0.05 من صبغة بروميد الأثيديوم في 9 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 10مل بالماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم/مل ، وحفظ بحرارة 4 مْ بالظلام لحين الاستعمال .

- **محلول EDTA Ethylene diamine tetra acetic acid**

حُضر هذا المحلول بإذابة 18.6 غم من مادة EDTA إلى 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم، وضبط الأس الهيدروجيني إلى 8 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH وعقم بالمؤصدة (Bhalerao et al., 2010).

4.2.3. تحضير الكواشف Preparation of Reagents

1.4.2.3. كاشف الأوكسديز Oxidase Reagent

حُضر بأذبة 1 غم من كاشف N,N,N,N, Tetra methyl-P-phenylene diamine dihydrochloride في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 ملليتر من الماء المقطر، ويستخدم للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسديز (Macfaddin, 2000).

2.4.2.3. كاشف أحمر المثيل Methyl Red Reagent

حُضر بإذابة 0.1 غم من مسحوق أحمر المثيل في 300 مل من كحول الأثيلي 95 % ثم أضيف 200 مل من الماء المقطر، ثم حفظ في قنينة معتمة في درجة حرارة 4 مº ويستخدم للكشف عن قابلية البكتريا على تخمير السكر الكلوكوز (Brown, 2007).

3.4.2.3. كاشف فوكس بروسكور Voges-Proskauer Reagent

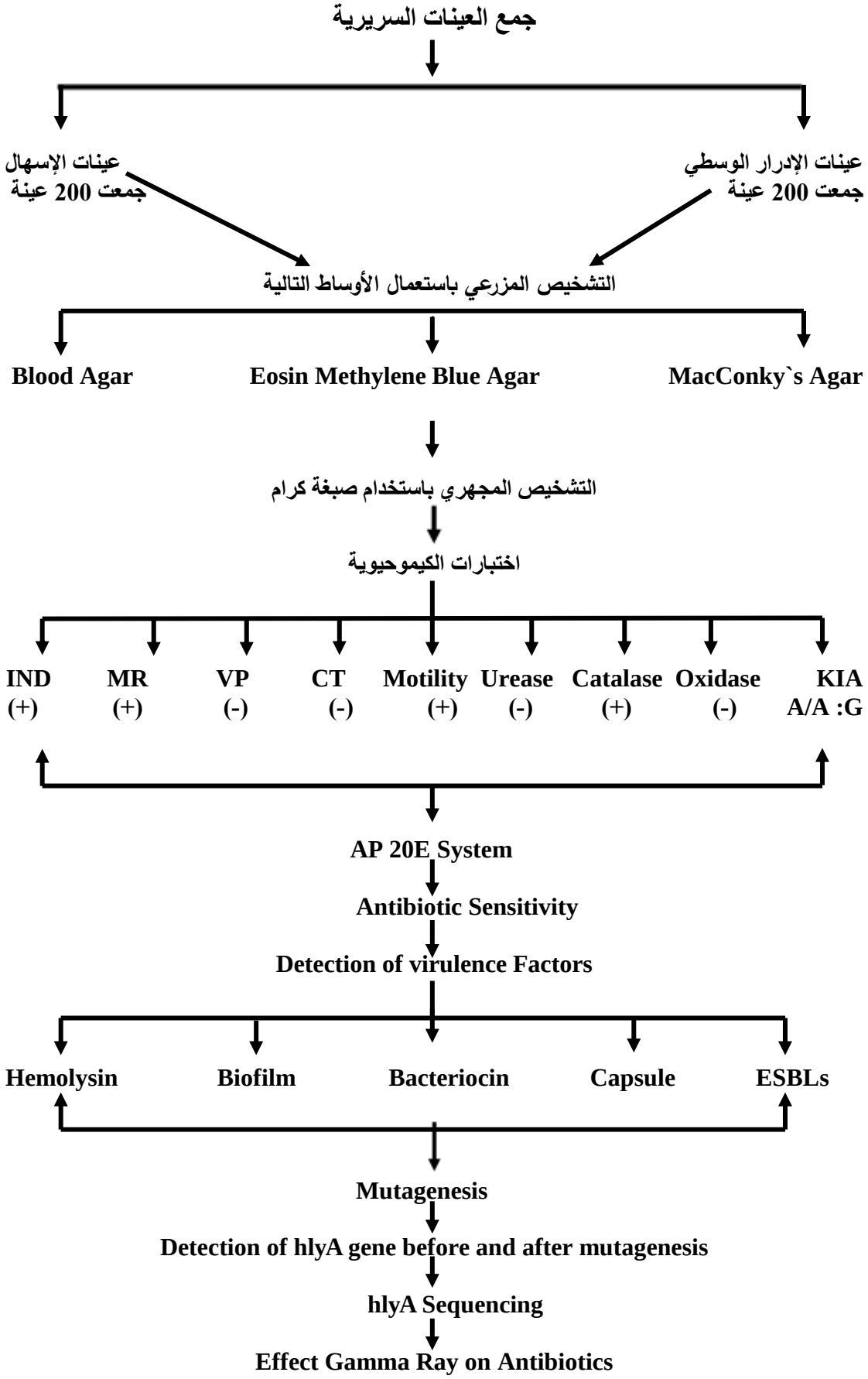
يتكوّن هذا الكاشف من محلولين هما:

المحلول الأول: هيدروكسيد البوتاسيوم KOH 40% .

حُضر بأذبة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مليلتر من الماء المقطر.

المحلول الثاني: الفا- نفثول 5%

حُضر بإذابة 5 غرامات من ألفا-نفثول (α-Naphthol) في 100 مليلتر من الكحول الأثيلي (Wistrich, 2003).



شكل 3-1 مخطط منوال الدراسة

5.2.3. العينات السريرية Clinical Samples

1.5.2.3. جمع العينات السريرية Collection of Clinical Samples

جمعت عينات سريرية مختلفة من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفيات الديوانية التعليمي والنسائية والأطفال والحسين (ع) للأطفال في محافظة القادسية للفترة الممتدة من 2016/11/1 الى 2017/4/1، ومن وحدة فحص الطفيليات مع تسجيل معلومات طبية تخص المريض باستمارة تتضمن (الاسم، الجنس، العمر) ملحق (1) والعينات السريرية التي جمعت هي:

A. عينات الإدرار Urine Samples

جمعت (200) عينة من الإدرار الوسطي Midstream urine من الأشخاص الذين لديهم أعراض التهاب المسالك البولية ولكلا الجنسين بواقع 120 عينة من الإناث و 80 عينة من الذكور وبأعمار مختلفة من المراجعين للمستشفيات نفسها المذكورة في الفقرة اعلاه ، إذ تم جمع العينات باستعمال قناني بلاستيكية معقمة ونقلت مباشرة إلى مختبر الأحياء المجهرية لزراعتها.

B. عينات الإسهال Diarrhea Samples

جمعت (200) عينة إسهال من الأطفال ممن كانت أعمارهم أقل من سنتين الراقدين في ردهات وطوارئ مستشفى النسائية والأطفال ومستشفى الحسين (ع) للأطفال ولكلا الجنسين بواقع 113عينة من الذكور و 87عينة من الإناث في محافظة القادسية، إذ جمعت العينات بقناني بلاستيكية معقمة و نقلت فوراً لمختبر الأحياء المجهرية لزراعتها.

2.5.2.3. الفحص المباشر للعينات Direct Examination of Samples

تم جمع عينات الإدرار الوسطي في قناني بلاستيكية معقمة لكل مريض بعد أن تم توجيه كل منهم بغسل المنطقة التناسلية بواسطة الماء والصابون لتجنب التلوث بالفلورا الطبيعية الموجودة في هذه المنطقة، وتم إجراء عملية الطرد المركزي لحوالي (5) مل من الإدرار و نبذ الراشح ثم أخذ حوالي (0.1) مل من الراسب ووضع على شريحة زجاجية نظيفة ثم وضع فوقها غطاء الشريحة، أما بالنسبة لعينات الإسهال أخذت شريحة زجاجية نظيفة ووضع عليها مسحة من عينة براز مزجت مع محلول الملحي الفسلجي (0.1) مل ثم فحصت هذه العينات مجهرياً للتحري عن خلايا الدم البيض White blood cells و كريات الدم الحمر Red blood cells.

3.5.2.3. زرع العينات Samples Culture

زرعت عينات (الادرار الوسطي والإسهال) مباشرة بعد الجمع على أوساط (وسط الدم الأساس و وسط الماكونكي و وسط الأيوسين مثيلين الأزرق) بطريقة التخطيط وحضنت الإطباق

لمدة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 مº وبعدها جرى ملاحظة النمو وتمييز البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز والتحري عن اشريشيا القولون المحللة للدم.

4.5.2.3. تشخيص العزلات البكتيرية Diagnosis of Bacterial Isolates

1.4.5.2.3. التشخيص المظهري Morphological Diagnosis

درست الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية المعزولة بعد تنميتها في أوساط زرعية مختلفة وشملت الدراسة (الشكل والحجم واللون والحافات والارتفاعات للمستعمرات) .

2.4.5.2.3. التشخيص المجهري Microscopical Diagnosis

أخذت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط الاكار المغذي بوساطة عروة ناقل معقم (Loop full) ووضعت على شريحة زجاجية مع بضع قطرات ماء معقمة ثم فرشت الخلايا وتركت لتجف ، وثبتت بإمرارها على اللهب ثلاث مرات بصورة سريعة وصبغت بصبغة كرام، وتم ملاحظة شكل ولون وتجمع الخلايا بفحصها تحت المجهر الضوئي باستعمال العدسة الزيتية (Brown, 2007).

5.5.2.3. الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests

أجريت هذه الاختبارات على وفق الطريقة التي بينها(Goldman & Lorrence, 2009).

1.5.5.2.3. فحص الاندول Indol Test

استُعمل هذا الاختبار للكشف عن البكتريا التي تفرز إنزيم Tryptophanase الذي يحلل الحامض الأميني التربتوفان Tryptophan إلى حامض البيروفيك Pyruvic acid وأمونيا NH_3 والإندول وهذا من خلال تنمية البكتيريا في وسط ماء الببتون وحضنت لمدة 18-24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مº ثم أضيف للوسط1-2 قطرة من كاشف Kovac's Indol تظهر حلقة وردية أو حمراء اللون، وهذا دليل على وجود الإنزيم، أمّا إذا ظهرت حلقة صفراء، فهذا يعني إن هذا النوع من البكتريا لا يفرز الإنزيم المذكور.

2.5.5.2.3. فحص المثيل الأحمر Methyl Red Test

استعمل هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج كميات كبيرة من حامض الأكتيك أو الفورميك نتيجة أيض الكلوكوز إذ لقح وسط (MR-VP) بمستعمرات البكتيرية وحضنت مدة 18-24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مº ثم أضيف إلى الوسط 2-3 قطرة من كاشف المثيل الأحمر، أن تغير لون الوسط إلى الأحمر يدل على إيجابية الفحص .

3.5.5.2.3. فحص الأوكسديز Oxidase Test

نقلت مستعمرة مفردة نامية بعمر 18 ساعة على وسط المغذي الصلب و وضعت على ورق ترشيح ثم أضيفت إليها قطرة من كاشف الأوكسديز، أن تكوّن لون بنفسجي غامق في 30-60 ثانية دليل على إيجابية الاختبار.

4.5.5.2.3. فحص الكاتاليز Catalase Test

نقلت مستعمرة مفردة نامية على وسط المغذي الصلب بوساطة ناقل معقم إلى شريحة زجاجية نظيفة ثم أضيف إليها قطرة من محلول كاشف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 3% وتعد ظهور فقاعات غازية دلالة على ايجابية الفحص، استعمل هذا الفحص للتحري عن امتلاك العزلة لإنزيم الكاتاليز والذي يحفز على تحرر الأوكسجين من بيروكسيد الهيدروجين.

5.5.5.2.3. فحص قابلية البكتريا على الحركة Motility Test

لقح وسط الحركة (Motility media) بالبكتيريا بشكل طعنه (Stab) ثم حضن الوسط لمدة 18-24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ، يدل انتشار النمو حول مكان الطعنة على إن البكتيريا متحركة، إما إذا كان النمو في مكان الطعنة فقط فيعني إن البكتيريا غير متحركة.

6.5.5.2.3. اختبار إنزيم اليوريز Urease Test

زرعت العزلة البكتيرية على وسط اليوريا المائل وحضنت عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة، يعد تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي دلالة على إفراز العزلة البكتيرية لإنزيم اليوريز، الذي يحلل اليوريا إلى الأمونيا NH_3 وغاز ثاني أوكسيد الكربون CO_2 والماء H_2O وبسبب وجود الأمونياNH_3 يتحول لون الوسط من اللون الأصفر إلى اللون الوردي.

7.5.5.2.3. اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط سيمون ستريت بالعزلة البكتيرية وحضن عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة، يعد تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق مع ظهور نمو بكتيري دلالة على النتيجة الموجبة، استخدم هذا الاختبار لغرض معرفة قابلية العزلة البكتيرية على استهلاك السترات كمصدر للكاربون والطاقة وعلى استهلاك أملاح الامونيوم كمصدر للنيتروجين.

8.5.5.2.3. اختبار فوكس– بروسكور Voges-Proskaur Test

لقح الوسط (MR-VP Medium) بالعزلة البكتيرية وحضن عند درجة حرارة 37مº ولمدة48 ساعة ثم أضيف بعد ذلك 5% من المحلول الأول الفا- نفثول ، و 4% من المحلول الثاني هيدروكسيد البوتاسيوم KOH إلى الوسط مع الرج ، وأن تغير لون الوسط إلى اللون الوردي خلال 2-5 دقائق دلالة على إيجابية الفحص ، يجرى هذا الفحص لمعرفة قدرة العزلة البكتيرية على تكوين الأسيتون كناتج لتخمير السكريات.

9.5.5.2.3.اختبار النمو على وسط الحديد ثلاثي السكر Triple Sugar Iron Test (TSI)

تم نقل كمية من النمو البكتيري بوساطة إبرة معقمة إلى السطح المائل لوسط (TSI) تم طعن السطح المائل للوسط ونشر جزء من البكتريا على سطح الوسط المائل ، وحضن الوسط عند درجة حرارة 37مº ولمدة 24 ساعة ، وأن تغير لون الوسط من الأحمر إلى أصفر دليل على تخمر الكلوكوز واللاكتوز، وظهور الفقاعات الغازية دلالة على تكوين غاز ثنائي أوكسيد الكاربون نتيجة لتخمر الكلوكوز وظهور اللون الاسود دلالة على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S .

6.2.3. تشخيص بنظام API-20E API20E Identification System

استعمل نظام API-20E وذلك لغرض تشخيص بكتريا المعزولة على إنها بكتريا اشريشيا القولون، ويتألف هذا النظام من شريط حاوي على حفر تمثل 20 تفاعلاً كيموحيوياً موزعة في أنابيب دقيقة مفردة ، إذ يتم اولاً تعليق المستعمرة البكتيرية المعزولة والنامية على أكار الماكونكي في أنبوب اختبار حاوي 5 مليليتر من المحلول الملحي الفسلجي ومزجت جيداً وقورنت مع أنبوبة ماكفرلاند 0.5 ، ثم نعمل على تلقيح الشريط بواسطة ماصة باستور معقمة إذ تملئ بعض الحفر تماماً بالعالق البكتيري ويتم إضافة الزيت لبعض الحفر لتوفير الظروف اللاهوائية و إذ تم حضن الشريط عند درجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة وبعد إضافة الكواشف إلى أنابيب معينة وتفسر النتائج للتمكن من معرفة نوع العزلة البكتيرية المراد اختبارها (Benson, 2002).

7.2.3. حفظ العزلات البكتيرية Maintenance of Bacteria Isolates

A. الحفظ قصير الأمد Short Term Maintenance

حفظت عزلات بكتريا E.coli المشخصة على وسط أكار المغذي المائل بعد تلقيحه، وحضنه في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، ثم حفظت في درجة حرارة 4 مْ ، وتكرر عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات وتجنب حدوث التلوث (Thomas, 2007) .

B. الحفظ طويل الأمد Long Term Maintenance

لغرض حفظ العزلات لمدة طويلة تم استعمال وسط تربتك صويا السائل وأضيف إليه الكليسرول Glycerol بنسبة 15% ثم لقحت الأنابيب الحاوية على 5 مل من الوسط بالمزروع البكتيري ثم أحيطت سدادة الأنابيب بواسطة شريط شمعي لاصق (Parafilm) و حفظت بدرجة -20مْ (Stukus,1997).

8.2.3. اختبار حساسية عزلات اشيريشيا القولون للمضادات الحياتية

Antibiotic Susceptibility Testing of the Escherichia coli isolates

أجري اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحياتية وفق طريقة انتشار الأقراص (Disc diffusion method) على وسط مولر- هنتون الصلب اتجاه 15 مضاداً حيوياً قبل وبعد التشعيع بأشعة كاما، بحسب ما ورد في (CLSI, 2014) وكالاتي :

1. حُضر عالق جرثومي من العزلات الجرثومية قيد الدارسة بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة نامية على وسط أكار الماكونكي إلى 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي ثم قورنت عكورة العالق مع عكورة محلول ثابت العكرة القياسي الذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا مقداره 1.5×10^8 خلية / مليلتر.
2. بوساطة مسحة قطنية معقمة نشر مقدار 0.1 مليلتر من العالق الجرثومي إلى سطح الأطباق الحاوية على وسط اكار مولر- هنتون ثم تُركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق لتجف.
3. نقلت أقراص المضادات الحياتية بواسطة ملقط معقم إلى الأطباق بواقع 7-8 أقرص في كل طبق وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 18-24 ساعة.
4. قرئت النتائج بملاحظة مناطق التثبيط المتكونة حول أقراص المضادات الحياتية، وعدت البكتريا حساسة أو مقاومة وفق المواصفات القياسية الواردة في CLSI (2014) .

9.2.3. الكشف عن بعض عوامل الضراوة Detection of Some Virulence Factors

1.9.2.3.الكشف عن إنتاج الإنزيم الحال للدم Detection of Hemolysin Production

تم التحري عن قابلية بكتريا اشريشيا القولون على إنتاج إنزيم الهيمولايسن، وتحديد قدرة هذا الإنزيم على تحليل أربعة أنواع من فصائل دم الإنسان (O,AB,B,A) ودم الأغنام تبعاً لما ورد في (Kayser et al.,2005) وكما يلي :

1. أجريت عملية النبذ المركزي لـ5 ملليتر من عينات الدم المسحوبة آنياً باستخدام أنابيب بلاستيكية معقمة حاوية على مانع تخثر الدم (3% سترات الصوديوم) للتخلص من البلازما والحصول على راسب كريات الدم الحمراء.
2. غسلت الخلايا ثلاث مرات بالمحلول الملحي الفسلجي المعقم Normal saline، بعد ذلك جرى ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بعد كل غسلة.
3. استعمل راسب كريات الدم الحمراء بنسبة 5% لتحضير وسط الدم الزرعي، زرعت العينات بطريقة التخطيط على وسط الدم المحضر وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ وأن التحلل من نوع ألفا يظهر مناطق تحلل جزئي حول المستعمرة ، بينما التحلل من نوع بيتا يظهر مناطق تحلل كلي حول المستعمرة وبشكل هالة شفافة وهذا يدل على ايجابية الاختبار ومع ذلك أظهرت بعض العزلات عدم قدرتها على التحلل.

2.9.2.3. الكشف عن تكون الغشاء الحيوي Detection of Biofilm Formation

استعملت طريقة الأنابيب Tube Method في الكشف عن قابلية البكتريا على تكوين الأغشية الحيوية كما في الخطوات التالية :

1. إذ لقحت أنابيب زجاجية حاوية على وسط Tryptic soy broth المضاف اليه سكر الكلوكوز بتركيز1% بالبكتريا النامية وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة .
2. بعد الانتهاء من الحضن أزيل الوسط من الأنابيب وغسلت بمحلول الفوسفات الملحي المنظم ثم جففت وصبغت بصبغة البنفسجي البلوري بتركيز1% لمدة ثلاث دقائق.
3. فرغت الأنابيب من الصبغة الزائدة وغسلت بالماء المقطر الخالي من الأيونات بعدها قلبت هذه الأنابيب لتجف إذ يلاحظ تكون الأغشية الحيوية في قعر الأنابيب والجدران الداخلية بشكل طبقة بنفسجية (Hassan et al., 2011).

3.9.2.3. الكشف عن إنتاج البكتريوسين Detection of Bacteriocin Production

استعملت طريقة أقراص الأكار (Cup disc) وفق الطريقة التي ذكرها (القصاب والخفاجي،1992) وكالآتي :-

1. زرعت البكتريا المنماة مسبقاً على وسط نقيع القلب والدماغ السائل وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط (TSA) وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة.
2. بعد حضن الأطباق عملت أقراص باستعمال الثاقب الفليني في هذا الوسط و وضعت على الاكار المغذي المنشور عليه 0.1 مل من مزروع البكتيري كل عزلة قيد الدراسة ، بعد مقارنتها بمحلول ماكفرلاند القياسي.

3. حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة ، وتسجل النتيجة الموجبة من خلال وجود منطقة التثبيط حول قرص الأكار الذي يحتوي على السلالة المنتجة.

4.9.2.3. الكشف عن وجود المحفظة البكتيرية Detection of Capsule Production

استعملت طريقة الحبر الهندي Indian ink method في التصبيغ وفق ما ذكر في (Atlas et al., 1995) وكالآتي:

1. أخذت مستعمرة نامية بعمر 24 ساعة من النمو البكتيري ومزجت مع قطرة صغيرة من المحلول الملحي الفسلجي بواسطة عود خشبي (Stick) على شريحة زجاجية نظيفة.
2. أضيفت للشريحة قطرة من الحبر الهندي ومزجت ثم ووضع فوقها غطاء الشريحة لينتشر السائل بهيئة طبقة خفيفة أسفل الغطاء الزجاجي.
3. فحصت الشريحة الزجاجية تحت العدسة الزيتية، وتظهر المحفظة بشكل هالة شفافة حول الخلية البكتيرية غير مصبوغة بصبغة الحبر الهندي في حال كون البكتريا مكونه لها.

5.9.2.3. الكشف عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتمايز واسعة الطيف

Detection of Extended Spectrum β-Lactamases Production

استعملت طريقة الأقراص المتاخمة (Disc approximation) للكشف عن إنزيم البيتالاكتاميز واسع الطيف وذلك وفق ما ذكر في (Batchoun et al., 2009) .كالآتي:

1. حُضر عالق جرثومي للعزلات قيد الدراسة بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة من وسط الاكار المغذي إلى 5 مليليتر من المحلول الفسلجي ثم قورنت عكورة العالق مع عكورة المحلول ماكفرلاند القياسي الذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا مقداره 1.5×10^8 خلية / مليلتر.
2. نشر 0.1 مليلتر من العالق بواسطة مسحة قطنية معقمة إلى اسطح الأطباق الحاوية على وسط مولر- هنتون الصلب ثم تترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق لتجف.
3. وضع قرص المضاد الحيوي (Augmentin) (30 µg / Disc) في وسط الطبق الزرعي الملقح، بعد ذلك رتبت أقراص المضادات الحيوية Aztreonam, Cefotaxime, Ceftriaxone على أن تكون المسافة بينهما 3 سم .
4. حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18-24 ساعة.
5. وبملاحظة مناطق التثبيط فأن حدوث زيادة في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وبين قرص واحد أو أكثر من الأقراص المذكورة دليل على أن النتيجة موجبة أي البكتريا منتجة للإنزيم.

3.3. التطفير Mutagenesis

1.3.3. مصدر التطفير Source of Mutagenesis

استعمل النظير المشع (كوبلت– 60) coblet-60 كمصدر لأشعة كاما في التطفير الموجود في كلية التربية قسم الفيزياء/ جامعة القادسية ، والمخصص للدراسة الأكاديمية والمعلمة من الهيئة العراقية للسيطرة على المصادر المشعة، كما في الملحق (2).

جدول 3-11 بعض خصائص العنصر المشع (coblet-60).

النظير المشع	الشكل الفيزيائي	تاريخ الإنتاج	معدل الجرعة	الشركة المصنعة	الاستخدام
coblet-60	صلب	2009	1 Gy	AEA Techndgize, USA	في التجارب العلمية

2.3.3. تطفير العزلات البكتيرية Mutagenesis of Bacterial Isolates

لقحت أنبوبة اختبار تحتوي (5) مل من المرق المغذي المعقم بمستعمرة فتية واحدة من بكتريا E.coli وحضنت بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة بحاضنة هزازة بسرعة 200 دورة بالدقيقة، ثم نبذت مركزياً Centrifuged بسرعة 800 دورة /الدقيقة لمدة 15 دقيقة ، وبعدها يتم تعليقها في محلول ملحي معقم ثم تنقل أنبوبة الاختبار إلى جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer لضبط معدل الكثافة الضوئية عند 0.05 وبطول موجي 600 نانومتر وهذا ما يعادل 1×10^7 وحدة مكونة للمستعمرة (CFU) لكل مليلتر (Trampuz et al., 2006).

ثم أخذ (1) مل من العالق البكتيري إلى ثلاث أنابيب أختبار اثنتان منهما تعرضتا لأشعة كاما (coblet-60) بجرعة (1Gy) وبوقتين مختلفين (10 و15) دقيقة و وضعت الأنبوبة على بعد (30سم) من النظير المشع، أما الأنبوبة الاخرى تكون غير مشعة للسيطرة (Al-Sudany et al., 2010 ; Phillips et al.,1967) . وبعد ذلك يتم التحري جينياً عن جين hlyA والطفرات الوراثية التي قد تحدث فيه نتيجة التعرض لأشعة كاما، ويتبع ذلك اخذ (0.1) مل من المزروع البكتيري في الأنبوبة المشعة وينشر على وسط مولر-هنتون لاختبار حساسيتها للمضادات الحيوية بعد تعرضها للأشعة ، بعد التشعيع تغلق الأنبوبة برقائق الالمنيوم وتنقل الى المختبر وتترك في الظلام .

3.3.3. السلامة المختبرية Laboratory Safety

أخذت اقصى درجات الحذر عند اجراء التجربة نظراً لخطورة المواد و العزلات البكتيرية التي تم تعريضها للأشعة ، و بالتعامل مع النظير المشع إذ حفظ بقوالب من رصاص وتم العمل بغرفة خاصة ومعزولة تماماً وتجنب التعرض للأشعة لفترات طويلة ، وبعد إجراء التجربة تم التخلص من العزلات المعرضة لأشعة بشكل تام من خلال تعقيمها بالمؤصدة وحرقها بالمحرقة بشكل كامل لضمان عدم تسرب العزلات للبيئة.

4.3. تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

أجري هذا التفاعل للكشف عن جين hlyA المشفر لإنزيم الهيمولايسن قبل وبعد التطفير والذي يعد أحد عوامل الضراوة لبكتريا E.coli المحللة للدم المعزولة من أخماج الأقنية البولية والمعوية ، باستعمال بادئ جين المستخدم في الدراسة hlyA والمصمم ببرنامج تصميم البادئات.

1.4.3. استخلاص الدنا الكلي Whole DNA Extraction

استخلص الدنا الكلي لبكتريا E.coli وذلك باستعمال عدة استخلاص Wizard Genomic Extraction Kit المنتجة من قبل شركة (Promega-USA) لاستخدامه في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لتعليمات المرفقة مع عدة الاستخلاص .

1. نقل 1 مليلتر من مزروع البكتيري المنمى بعمر 24 ساعة على وسط Brian heart infusion broth إلى أنابيب أبندروف (1.5مل) ورسبت الخلايا البكتيرية بجهاز النبذ المركزي لمدة دقيقة وبسرعة 14000-16000دورة/ دقيقة وسحب العالق بواسطة ماصة وترك الراسب.
2. أُضيف 200 مايكرولتر من دارئ GT ومزجت المحتويات جيداً بواسطة المازج لمدة 5 ثوان.
3. حضنت عند درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق لتحليل الخلايا بشكل تام ثم تترك لتبرد.
4. أضيف 200 مايكرولتر من دارئ GB ومزجت المحتويات جيداً بواسطة المازج لمدة 10 ثواني و حضنت الأنابيب بدرجة 70 مْ لمدة 10 دقائق بحمام مائي و تُرج الأنابيب ثلاث مرات في أثناء فترة الحضن (كل 3 دقائق) إلى أن يصبح المحلول رائق.
5. أُضيف 200 مايكرولتر من إيثانول المطلق Absolute ethanol %99 وخلط المزيج بقوة .
6. تَّم وضع عامود GD filter colum في أُنبوبة الجمع Collection tube سعة2 مل ونقل له جميع الخليط.
7. نبذت الأنابيب مركزياً لمدة دقيقتين بسرعة 14000-16000 دورة/دقيقة بعدها نُقلت المحتويات إلى أنبوبة جمع جديدة (أهملت الأنابيب الجمع وتنقل الفلاتر إلى أنابيب جديدة).

8. أُضيفت 400 مايكروليتر من دارئ W1 إلى عمود GD.

9. طردت الأنابيب مركزياً بسرعة 16000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية ثم وضع GD في أنبوبة الجمع (تهمل أنابيب الجمع وتنقل إلى أنابيب جديدة).

10. أضيف 600 مايكرولتر من دارئ Wash buffer إلى عمود GD لتخلص من الدهون داخل العمود ووضعت الأنابيب في جهاز النبذ المركزي بسرعة 16000دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية

11. ثم التخلص من الراسب وإعادته إلى الطرد المركزي لمدة ثلاث دقائق بسرعة 16000 دورة /دقيقة لتجفيف العمود.

12. تم نقل الأعمدة الحاوية على الحامض النووي إلى أنابيب أبندروف معقمة وأضيف 100 مايكروليتر من دارئ الإذابة Elution Buffer المسخن مسبقاً يضاف الى مركز الأنبوبة ثم يترك لمدة 5 دقائق لإذابة ثم طردت مركزياً لمدة 30 ثانية بسرعة 16000 دورة/ دقيقة.

13. يحفظ بعد ذلك بدرجة حرارة -20مْ.

2.4.3. تقدير تركيز ونقاوة DNA

Estimation Concentration and Purity of DNA

تم قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA باستعمال جهاز مطياف القطرة النانوية Nano drop Spectrophotometer وذلك بإضافة 1 مايكرو ليتر من DNA المستخلص إلى الجهاز لتقدير التركيز بالنانو كرام / مايكرو ليتر (ng/µl) والنقاوة تقدر من خلال الامتصاصية (OD) عند الطولين الموجيين 260 / 280 نانومتر ، لتحديد فيما إذ كانت العينة ملوثة بالبروتينات أو بالحامض النووي الرايبوسومي RNA ، وأن الامتصاصية المقبولة على الطولين الموجيين 260 / 280 لتركيز DNA النقي تكون 1.8-2 نانومتر كما في الخطوات التالية :

1. تشغيل جهاز مطياف القطرة النانوية ثم اختيار برنامج قياس الحمض النووي DNA.

2. تصفير ركيزة المقياس وذلك بوضع 2 مايكروليتر من Free Nuclease Water على سطح ركيزة المقياس باستعمال مايكروبايبيت معقمة وإجراء التصفير ثم تنظف الركيزة باستعمال ورق نشاف.

3. نأخذ 1مايكروليتر من DNA المستخلص لكل عينة توضع على ركيزة المقياس ويشغل الجهاز و تقرأ النتيجة ثم تنظف الركيزة لقياس العينة التالية (Sambrook & Russel, 2001).

3.4.3. تحضير مزيج سلسلة تفاعل البلمرة PCR Master mixture

حُضر مزيج الـPCR حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك باستعمال العدة AccuPower PCR PreMix Kit ® كالآتي :

1. حضر مزيج تفاعل الـPCR في الأنابيب الموجودة في العدة القياسية والتي تحتوي على جميع المكونات الازمة لأجراء التفاعل كما في الجدول التالي (3-12).

جدول 3-12 المكونات اللازمة للتفاعل PCR لجين hlyA المستعمل في الدراسة.

PCR Master mix	Volume (µL)	Concentration
DNA template	5	1-150 ng/µl
Forward primer	1.5	10pmol
Reveres primer	1.5	10pmol
PCR water	12	1X
Total volume	20	-

2. تمزج جميع أنابيب التفاعل بواسطة جهاز المازج الدوار ولمدة 5 ثوان.
3. توضع أنابيب التفاعل في جهاز المضخم الحراري (PCR Thermo cycler) لأجراء عملية تضخيم الـDNA (DNA Implication) ، وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية لبكتريا E.coli والمتمثلة بعمليات فصل شريط الـ DNA Denaturation و ارتباط البادئات مع الشريط المنفصل Annealing وتطويل سلسلة الـ Extension DNA .

4.4.3. برمجة جهاز الدورات الحرارية Thermocycler PCR Program

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال جهاز Thermocycler PCR وتم برمجة الجهاز كما بالجدول (3-13).

جدول 3-13 برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل لتضخيم جين hlyA.

PCR step	Temperature (Cº)	Time	repeat
Initial Denaturation	95	5min	1
Denaturation	95	30Sec	30Cycle
Annealing	58	30Sec	
Extension	72	2min	
Final extension	72	10min	1
Hold	4	Forever	-

5.4.3.الترحيل الكهربائي الهلامي Agarose Gel Electrophoresis

حضر هلام الاكاروز حسب طريقة Lee و جماعته (2012) وكالآتي:

1. حضر الاكاروز بتركيز 1% لترحيل نواتج الـ PCR بينما حضر بتركيز 0.8 % لترحيل الدنا باستعمال دوارق زجاجية مقاومة للحرارة (Erlenmeyer flask) ثم يضاف المحلول المنظم (TBE buffer) بتركيز (0.5X) إلى هلام الاكاروز ويمزج جيدا من خلال تدوير الدورق.
2. ذوب الاكاروز مع المحلول المنظم بالتسخين في الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة لمدة 30 دقيقة ويخرج الدورق من الصفيحة ويهز لكي تمزج محتوياته جيداً وتكرر العملية لحين ذوبان الاكاروز بشكل كامل .
3. يترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ثم تضاف صبغة بروميد الأثيديوم (Ethidium Bromide) إلى المزيج ليصبح التركيز النهائي في هلام الاكاروز 0.5 مايكرو كرام / مليلتر.
4. يصُبَّ الهلام في القالب Tray بعد غلق حافتي القالب ووضع المشط Comb المكون للحفر في حافة القالب ويترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة وبعد التصلب يزال المشط وتفتح فتحتي القالب ويوضع الهلام في حوض الترحيل الكهربائي .
5. أضيفت صبغة التحميل إلى نماذج الـDNA المراد فصلها بواقع جزء واحد من الصبغة إلى كل خمسة اجزاء من DNA، إذ تعمل الصبغة على جعل حزم الصبغة مرئية وتثقل الـDNA في حفر الهلام.
6. أستعمل سلم القياس DNA Ladder بحجم (100-2000) زوج قاعدي بالحفرة الأولى لقياس حجم الـDNA المضخم .
7. أضيف المحلول TBE buffer بتركيز0.5X إلى هلام الاكاروز وبعد ذلك يغلق غطاء جهاز الترحيل ثم يتم إيصال أقطاب حوض الترحيل بمجهز الطاقة وتشغيل جهاز الترحيل باستعمال تيار 100 فولت و80 أمبير لمدة ساعة واحدة.
8. بعد انتهاء عملية الترحيل يتم فحص هلام الاكاروز الحاوي على ناتج PCR باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V light Source لتحديد حزم الباندات وقياس الأوزان الجزيئية عند مقارنتها بالقيم القياسية للدنا القياسي DNA marker.

5.3. طريقة تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA hlyA Sequencer Method

أرسلت نواتج DNA لجين hlyA مع البوادئ Primer F, Primer R إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية لأجراء تسلسل الـDNA باستخدام جهاز (AB DNA sequencing system). ثم تم قراءة النتائج حسب برنامج BLAS (Basic Local Alignment Search Tool) المتوفر على موقع NCBI (National Center for Biotechnology Information) لمعرفة عدد ونوع الطفرات الوراثية في جين hlyA، ثم بعد ذلك تم اجراء تحليل الشجرة الوراثية باستخدام برنامج (MEGA6) لبيان التغيرات الوراثية بين عزلات بكتريا E.coli والعزلة القياسية، وفي النهاية تم تسجيل العزلات في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank Submission.

6.3. التحليل الاحصائي Statistical Analysis

حللت نتائج الدراسة الحالية إحصائياً باستخدام البرنامج الإحصائي (Prism SAS Institute ,Inc. USA Graph Pad) الاصدار السادس حيث جرى تطبيق أختبار مربع كاي Chi-square test لهذا الغرض كما جرى اعتماد مجال الثقة Confidence interval مساوياً إلى 95% وقيمة مستوى الاحتمالية أقل من 0.05 (Levesque, 2007).

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4. العزل Isolation

ظهرت نتائج الزرع المعنوي لعينات الإدرار والإسهال فكانت على التوالي أن 160 (80%) و185(92.5%) ذات نمو بكتيري معنوي عالي أكثر من نصف العينات لأن البكتريا تعد المسبب الأول للأخماج البولية والمعوية أكثر من الفايروسات والطفيليات والفطريات أما الاختلاف بالنسب فربما يعود إلى طريقة الزرع والظروف المختبرية وإلى طبيعة العينة، ونتائج هذه الدراسة تتفق مع نتائج دراسة Heijer وجماعته (2010) الذين وجدوا أن نسبة النمو البكتيري المعنوي للإدرار (81%) لكنها لا تتفق مع دارسة Al-Hamdani & Abas (2013) إذ بلغت نسبة النمو البكتيري المعنوي للإدرار (44.77%) في دراستهما ، كما تتفق هذه نتائج مع ما توصل إليه Ali وجماعته (2009) الذين وجدوا أن معظم مسببات الإسهال عند الأطفال ناتجة عن وجود البكتريا بنسب عالية واختلفت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه Al-Hasnawi (2014) إذ بلغت نسبة النمو البكتيري للإسهال (60%).

أما نتائج الزرع غير المعنوي لعينات الإدرار والإسهال فكانت على توالي 40 (20%) و20 (7.5%) وهذا قد يعود لأسباب مختلفة منها تعاطي المرضى للمضادات الحيوية قبل أخذ العينة مما يؤدي إلى عدم ظهور البكتريا في العينة أو قد يكون المرض ناتجاً عن وجود أحياء مجهرية إخرى مثل الفايروسات أو طفيليات أو فطريات أو البكتريا اللاهوائية وهذه لا تنمو إلا بوجود أوساط زرعية خاصة بها، وقد بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود اختلافات معنوية ما بين الزرع المعنوي وغير المعنوي لعينات الإدرار و الإسهال عند مستوى احتمالية 0.05، كما في جدول (4-1).

جدول 4-1 توزيع عينات الإدرار والإسهال حسب نتيجة الزرع البكتيري.

مصدر العزلة	عدد العينات الكلي	نتيجة الزرع	العدد	النسبة المئوية (%)	X^2	P value
الإدرار	200	النمو المعنوي	160	80	144*	0
		النمو غير المعنوي	40	20		
الإسهال	200	النمو المعنوي	185	92.5	289*	0
		النمو غير المعنوي	15	7.5		

*** وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05**

2.4. توزيع العزلات حسب الجنس Distribution of isolates according to sex

توزعت نسبة الزرع المعنوي للإدرار 160 على 102 (63.75 %) عزلة من الإناث و 58 (36.25%) عزلة من الذكور ، هذه النتائج تدل على أن الإناث أكثر عرضة للإصابة بالأخماج البولية من الذكور وهذا قد يعود لأسباب عدة منها الاختلافات الفسلجية بين الجنسين إذ تصاب الإناث مرة واحدة على الأقل في مرحلة ما من مراحل حياتهن، كما يعد تكرار الاصابة امراً شائعاً بسبب الطبيعة التشريحية للإناث من حيث قصر الإحليل وقربه من فتحة المستقيم والعلاقات الجنسية (Nicolle, 2008). أما في الذكور فتكون نسبة الاصابة منخفضة بسبب إفرازات غدة البروستات التي تعمل كمواد مطهرة ومضادة للجراثيم وبهذا تقلل من نسبة إصابة الجهاز البولي الذكري (Westwood et al., 2005).

هذه النتائج تتوافق مع Linhares وجماعته (2013) الذين وجدا أن الإناث أكثر عرضة للإصابة مقارنة بالذكور، ومع ما توصل إليه Ebraheem & Alwendawi (2015) إذ كانت نسبة الاصابة في الإناث (62%) وفي الذكور (38%)، ولا تتوافق مع ما توصلت إليه Nanakali & Ahmed (2015) إذ كانت نسبة الإصابة في الإناث (73%) و في الذكور (26%).

كما توزعت نسبة الزرع المعنوي للإسهال 185على 110 (59.45%) عزلة من الذكور و 75 (40.54%) عزلة من الإناث، قد تعزى أرتفاع نسبة الإصابة بالإسهال إلى تزايد الاعتماد على الرضاعة الصناعية في تغذية الطفل وعدم تكامل الجهاز المناعي (Khan et al., 2004).

اتفقت هذه النتائج ما توصل إليه المخزومي (2010) إذ بلغت نسبة إصابة الذكور (59%) والإناث (41%) و كذلك مع Al-Hasnawi (2014) إذ بلغت نسبة إصابة الذكور (63.3%) والإناث (36.7%) واختلفت مع Shamkhi وجماعته (2011) إذ بلغت نسبة إصابة الذكور (48.61%) والإناث (51.38%). إذ أظهرت النتائج الإحصائية وجود اختلاف معنوي بين الجنسين في عينات الإدرار والإسهال عند مستوى احتمالية 0.05 كما في جدول(4-2).

جدول 4-2 توزيع العزلات البكتيرية المعزولة من الإدرار والإسهال حسب الجنس.

مصدر العزلة	العدد العزلات الكلي	الجنس	العدد	النسبة المئوية (%)	X^2	P value
الإدرار	160	الإناث	102	63.75	24.2*	0
		الذكور	58	36.25		
الإسهال	185	الذكور	110	59.45	13.24*	0
		الإناث	75	40.54		

*** وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05**

3.4. التشخيص البكتيري Bacterial Identification

تم التشخيص بالاعتماد على الفحوصات المظهرية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية كما في جدول (4-3)، وبوصفه تشخيصاً اولياً إذ أعتمد شكل وقوام المستعمرة وهيأتها فضلاً عن قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز على وسط الماكونكي ، اتصفت عزلات بكتريا E.coli قيد الدراسة عند تنميتها على وسط الماكونكي بكون مستعمراتها صغيرة دائرية الشكل مرتفعة ذات حافة ملساء وجافة ذات لون وردي كونها مخمرة لسكر اللاكتوز ويعد وسط الماكونكي من الأوساط الانتقائية لاحتوائه على صبغة البنفسج البلوري وإملاح الصفراء لذلك لا تنمو عليه كل من البكتريا الموجبة والخمائر (Setia et al., 2009). واتسمت بكتريا اشريشيا القولون عند زراعتها على الوسط الزرعي أيوسين مثيلين الأزرق بمستعمرات ذات لون براق أخضر معدني، أما على وسط أكار الدم فأظهرت بعض سلالاتها قدرتها على تحليل الدم و كذلك أظهرت بكتريا E.coli نمو منتشر حول منطقة الطعن وهذا دليل على أن البكتريا متحركة، ولوحظ عند فحصها بالمجهر الضوئي و تصبيغها بصبغة كرام أنها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام (Chees, 2012) وبالنسبة للاختبارات الكيموحيوية فكانت سالبة للاختبارات الأوكسديز واليوريز وتحلل الجيلاتين واستهلاك السترات والفوكس بروسكور ولا تنتج غاز H_2S. وموجبة للاختبارات الكاتاليز وأحمر المثيل و إنتاج حلقة الاندول ومخمرة لسكر الكلوكوز واللاكتوز مع إنتاج حامض وغاز (Reddy, 2010).

كذلك شخصت البكتريا الاخرى المرافقة لـE.coli وهي Klebsiella spp إذ تميزت مستعمراتها على وسط الماكونكي دائرية كبيرة الحجم ،ذات حافات منتظمة وردية اللون وتكون ذات قوام مخاطي بسبب امتلاكها للمحفظة (Magesh et al., 2011). أما بكتريا المكورات العنقودية فقد أظهرت صفات مظهرية متمثلة بمستعمرات دائرية كبيرة نسبياً ومرتفعة قليلاً على وسط الدم الأساس ، في حين شخصت بكتريا Proteus spp بالاعتماد على ظاهرة الأنثيال (Swarming) وكانت مستعمراتها صفراء شاحبة على وسط الماكونكي لعدم تخمرها لسكر اللاكتوز أما بكتريا Pseudomonas spp فتميزت بلون مستعمراتها الأخضر نتيجة إفرازها صبغة Pyocyanin وتكون دائرية ملساء وغير مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط أكار الماكونكي، وكانت مستعمرات بكتريا Enterobacter spp صغيرة الحجم وشبه مخاطية وذات لون وردي بسبب تخمرها لسكر اللاكتوز على وسط الماكونكي، وأعطت بكتريا Citrobacter spp مستعمرات دائرية وردية اللون على وسط الماكونكي نتيجة تخمرها سكر اللاكتوز (Anthony et al., 2014).

جدول 4-3 اختبارات الكيموحيوية للبكتريا المعزولة من الإدرار والإسهال .

الاختبارات / العزلات	صبغة كرام	الكاتليز	الأوكسيديز	اختبارات IMVC				الحركة	اليوريز	اختبار (TSI) و انتاج H_2S	تخمير اللاكتوز	تخمر المانتول
				I	MR	VP	C					
E.coli	_	+	_	+	+	_	_	+	_	A/A -H_2S +gas	+	+
Klebsiella .spp	_	+	_	_	_	+	+	_	+	A/A - H_2S +gas	+	+
Staphylococcus. spp	+	+	_	/	/	/	/	_	_	A/A - H_2S - gas	_	+
Proteus. spp	_	+	_	+-	+	_	_	+	+	K/A + H_2S +gas	_	_
Pseudomonas. spp	_	+	+	_	_	_	+	+	+	K/K -H_2S -gas	_	_
Enterobacter. spp	_	+	_	_	+	+	+	+	_	A/A -H_2S +gas	+	+
Citrobacter .spp	_	+	_	+	+	_	+	+	_	A/A -H_2S +gas	+	+

K/K: لا يوجد تخمر
A/A : مخمرة لسكر الكلوكوز واللاكتوز
K/ A: مخمرة لسكر الكلوكوز
/ : تدل على عدم اجراء الفحص

1.3.4. توزيع العزلات حسب مصدر العزل

Distribution of isolates according to source of isolation

بلغ العدد الكلي للعزلات التي مصدرها الإدرار160 عزلة توزعت على 76 عزلة E.coli وبنسبة (47.5%)، ثم تليها 24 عزلة Klebsiella spp وبنسبة (15%)، 22 عزلة Staphylococcus spp وبنسبة (13.75%)، 18 عزلة Proteus spp وبنسبة (11.25%)، 12عزلة Pseudomonas spp وبنسبة (7.5%) ، 8 عزلة Enterobacter spp وبنسبة (5%)، كما بلغ العدد الكلي للعزلات التي مصدرها الإسهال 185 عزلة توزعت على 80 عزلة E.coli وبنسبة (43.24%) تليها 38 عزلة Klebsiella spp وبنسبة (20.54%)، 33 عزلة Proteus spp وبنسبة (17.83%) ، 28 عزلة Pseudomonas spp وبنسبة (15.13%) ، 6 عزلة Citrobacter spp وبنسبة (3.24 %) كما في جدول (4-4) ويعزى الاختلاف في نسب التواجد البكتيري إلى ظروف العزل وحجم ونوع العينة وطبيعة الظروف

البيئية في المستشفى ، إذ بينت النتائج وجود اختلاف معنوي ذي دلالة إحصائية ما بين العزلات البكتيرية المعزولة من مصدري العزل عند مستوى احتمالية 0.05 كما في الجدول (4-4).

وتتفق النتائج عزل الإدرار مع ما توصل إليه ياسين (2014) حيث بلغت نسبة E.coli (49.36%) و Klebsiella spp (20.25%) وStaphylococcus spp (9.5%) و Proteus spp (14.55%) و Pseudomonas spp (6.32%) وكما تتفق مع Ibrahim (2015) إذ بلغت نسبة بكتريا Enterobacter spp (6 %)، وأما نتائج عزل الإسهال فهي قريبة لما توصل إليه اسماعيل (2009) إذ بلغت نسبة بكتريا E.coli (45.79%) و Klebsiella spp (12.61%) وProteus spp (13.08%) كما اتفقت مع ما جاء به Al-Hasnawi (2014) إذ بلغت نسبة بكتريا Pseudomonas spp (7.4%) و Citrobacter spp (5.5 %) .

جدول 4-4 إعداد ونسبب البكتريا المعزولة من مصدري العزل .

البكتريا المعزولة	مصدر العزل		العدد الكلي
	الإدرار	الإسهال	
E. coli	(% 47.5)76	(% 43.24)80	(% 45.2) 156
Klebsiella. spp	(% 15) 24	(% 20.54) 38	(% 17.97)62
Staphylococcus.spp	(% 13.75) 22	(% 0) 0	(% 6.37) 22
Proteus. spp	(% 11.25)18	(% 17.83) 33	(% 14.78) 51
Pseudomonas. spp	(% 7.5) 12	(% 15.13) 28	(% 11.59) 40
Enterobacter.spp	(% 5) 8	(% 0) 0	(% 2.3) 8
Citrobacter. spp	(% 0) 0	(% 3.24) 6	(% 1.73) 6
العدد الكلي	(% 46.37) 160	(% 53.62) 185	(% 100) 345
X2	193.63*	214.7*	371.23*
P value	0	0	0

*** وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05**

2.3.4. نظام التشخيص (API 20E)

Analytic Profile Indext 20 Enterobacteriaceae

لتأكيد تشخيص عزلات E.coli المحللة للدم ولإكمال الاختبارات الكيموحيوية المهمة استعمل نظام API 20E، وأن العديد من الباحثين أكدوا على ضرورة استعمال هذا النظام التشخيصي، لتأكيد نتائج الاختبارات الكيموحيوية (Turton et al., 2008). وجاءت النتائج مؤكدة لنتائج الفحوصات الكيموحيوية إذ بلغ عدد عزلات E.coli المحللة للدم بعد التشخيص بواسطة API 20E 30 عزلة مصدرها الإدرار و 10 عزلات مصدرها الإسهال كما في الملحق (3 و4).

3.3.4. إعداد ونسب بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال وتوزيها حسب الجنس

إذ بلغت عزلات الـE.coli المشخصة والمعزولة من عينات الإدرار و الإسهال 156 (45.2%) عزلة بواقع 76 (47.5 %) عزلة من الإدرار و80 (43.24 %) عزلة من الإسهال، ويفسر أرتفاع نسبة الإصابة بهذه البكتريا بفعل امتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على إصابة أخماج الأقنية البولية والمعوية أهمها إنزيم الهيمولايسن الذي يعمل كعامل سام خلوي من خلال تكوينه ثقوباً في أغشية خلايا المضيف وهذا يؤدي إلى تحرر الحديد و الهيموغلوبين والمكونات الضرورية الاخرى للنمو البكتيري إلى خارج الخلية ، بالإضافة إلى قدرته على تحليل الخلايا اللمفاوية وتثبيط عملية البلعمة والانجذاب الكيمياوي لخلايا الدم البيض (Raksha et al., 2003). وقدرة هذه البكتريا على الالتصاق بجدران الخلايا الطلائية للمسالك البولية عبر بروزات بروتينية تدعى الأهلاب Fimbriae ، فضلاً عن امتلاكها أسواط محيطية تساعدها على الاستيطان والتي لها دور مهم في التصاق خلايا بكتريا E.coli بالخلايا الظاهرية للأمعاء وبدء الإصابة (Müller et al., 2007).

توافقت نتائج عزل بكتريا اشريشيا القولون من الإدرار مع دراسة AL-karawyi وجماعته (2014) إذ بلغت نسبة عزلات E.coli (46.2 %) ومع دراسة حسن (2017) التي حصلت على نسبة (41.66 %) ولكنها لا تتفق مع توصل إليه الباحث AL-Nuimi (2013) الذي حصل على نسبة (68.18 %) ، وجاءت نتائج عزل بكتريا اشريشيا القولون من الإسهال مشابهة لما توصل إليه Shamkhi وجماعته (2011) إذ شكلت نسبة E.coli (44.6 %) ومع ما توصل إليه Al-Dulaimi و جماعته (2015) إذ شكلت نسبة E.coli (44.8 %) ولا تتفق مع ما توصل إليه Al-Hilali (2010) إذ شكلت نسبة E.coli (81.6 %).

توزعت عزلات بكتريا اشريشيا القولون المعزولة من الإدرار حسب الجنس على 55 (72.36%) عزلة من الإناث و21 (27.63%) عزلة من الذكور ، بينما توزعت عزلات بكتريا اشريشيا القولون المعزولة من الإسهال على 47 (58.75 %) عزلة من الذكور و 33 (41.25%) عزلة من الإناث ، وربما يعزى هذا الاختلاف في النسبة المئوية لعزل بكتريا اشريشيا القولون إلى الاختلاف في عدد العينات والفترة الزمنية لإنجاز البحث والظروف البيئية المختلفة لمواقع هذه الدراسة .

لقد بينت النتائج الإحصائية وجد اختلاف معنوي ذو دلالة إحصائية ما بين الجنسين المصابَين ببكتريا E.coli في مصدري العزل عند مستوى احتمالية 0.05 كما في الجدول (4-5).

هذه النتائج تتفق مع ما توصلت إليه Hadi (2008) إذ بلغت نسبة الإصابة ببكتريا E.coli المسببة للأخماج البولية في الإناث (73.9%) وفي الذكور (26.1%) وكذلك تتفق مع AL-karawyi وجماعته (2014) إذ بلغت نسبة الإصابة في الإناث (76%) وفي الذكور(23%) وهذه النتائج مخالفة لما توصل إليه منديل (2016) إذ بلغت نسبة الإصابة الإناث (22.24%) وفي الذكور (13.95%) ، ولكنها تتفق مع نتائج أحمد (2009) إذ كانت نسبة الإصابة ببكتريا E.coli المسببة للإسهال في الذكور (51.61%) والإناث (33.06%) ولا تتفق مع ما توصل إليه Al-Oebady (2017) إذ كانت نسبة الإصابة في الذكور (37.4%) وفي الإناث (62.6%) .

جدول 4-5 إعداد ونسب بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال وتوزيعها حسب الجنس.

مصدر العزلة	الجنس		عدد بكتريا E.coli الكلي	X2	P value
	الإناث	الذكور			
الإدرار	(% 72.36) 55	(% 27.63) 21	(% 47.5) 76	30.42*	0
الإسهال	(% 41.25) 33	(% 58.75) 47	(% 43.24) 80	4.9*	0.027
المجموع الكلي	(% 56.4) 88	(% 43.58) 68	(% 100) 156	29.53*	0

*** وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05**

4.3.4. الصفات السريرية للعينات Clinical Characteristics of Samples

أظهرت النتائج احتواء جميع عينات الإدرار والإسهال التي تم عزل بكتريا E.coli المحللة للدم منها على كميات من الدم تتراوح ما بين (القليلة والمتوسطة والمرتفعة)، وكانت نسبة خلايا الدم البيض أكثر تواجداً من كريات الدم الحمراء في العينات وهذا قد يعود إلى إنتاج هذه البكتريا لإنزيم الهيمولايسن الذي يؤثر على الخلايا المبطنة للأوعية الدموية مسبباً تلفها، فضلاً عن احتواء العينات على المواد المخاطية و القطرات الدهنية ، وتم ملاحظة ذلك بالمجهر الضوئي، كما إن لكل عينة لوناً خاصاً ورائحة، يمكن اعتمادهما في معرفة نوع الإصابة، وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل إليه المخزومي (2010) إذ وجد احتواء بعض العينات على كميات من الدم تتراوح ما بين (القليلة والمتوسطة والمرتفعة)، كما في الملحق (5).

4.4. التحري عن إنتاج إنزيم الهيمولايسن على أكار الدم (الإنسان والأغنام)

Screening of producing hemolysin on blood agar (human and sheep)

أُختبرت قابلية عزلات E.coli على إنتاج إنزيم الهيمولايسن وذلك من خلال تنميتها على أوساط الدم الأساس الحاوية على فصائل الدم البشري الأربعة (A,B,AB,O) ودم الأغنام ، إذ وجد أن 40 (25.64 %) عزلة من مجموع 156 عزلة E.coli مصدرها الإدرار والإسهال قادرة على إنتاج إنزيم الهيمولايسن على أوساط أكار الدم الإنسان والأغنام، توزعت على 30 (39.47%) عزلة من مجموع 76 عزلة E.coli معزولة من الإدرار ، وعلى 10 (12.5%) عزلة من مجموع 80 عزلة E.coli معزولة من الإسهال، وأظهرت هذه العزلات تحللاً دموياً جزئياً من نوع α-hemolysis من خلال ظهور منطقة خضراء حول المستعمرة على وسط دم الأغنام ، بينما أظهرت هذه العزلات تحللاً دموياً كاملاً من نوع β-hemolysis من خلال ظهور هالة شفافة حول المستعمرة على وسط دم الإنسان.

إذ أظهرت النتائج الإحصائية وجود اختلاف معنوي ما بين بكتريا E.coli المنتجة للإنزيم الهيمولايسن في كلا مصدري العزل عند مستوى احتمالية 0.05 كما في جدول (4-6).

هناك عدة أسباب تفسر الاختلافات في نسب إنتاج إنزيم الهيمولايسن من قبل بكتريا E.coli أهمها مصدر الدم ونوع الفصيلة الدم ، نوع الهيمولايسن المنتج، مصدر البكتريا، وطريقة التحري عن قدرة البكتريا على الإنتاج إنزيم الهيمولايسن.

تتوافق هذه النتائج مع نتائج Nanakali & Ahmed (2015) إذ شكلت نسبة بكتريا E.coli المحللة للدم المعزولة من الإدرار (38.5%) وتتفق أيضاً مع نتائج Alhason (2010) التي حصلت على نسبة (40.4%) وجاءت هذه الدراسة متقاربة لما توصل إليه Al-Mohana (2004) إذ شكلت نسبة بكتريا E.coli المحللة للدم المعزولة من الإسهال (14.9%) و مع Ibrahim وجماعته (2014) إذ شكلت نسبة E.coli المحللة للدم (20%) ولكنها اختلفت مع ما جاء به AL-Shuwaikh وجماعته (2015) إذ شكلت نسبة E.coli المحللة للدم (50%).

أظهرت هذه الدراسة قدرة بكتريا E.coli على إنتاج إنزيم الهيمولايسن على وسط دم الأغنام والنتائج التي حصل عليها مشابهة للنتائج التي تم الحصول عليها على وسط دم الإنسان، وهذا يدل على أن المستقبلات الموجودة في كريات الدم الحمراء للإنسان متطابقة مع مستقبلات كريات الدم الحمراء للأغنام وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه Lucia وجماعته (2005) الذين وجدوا أن بكتريا E.coli لها القدرة على تحليل كريات الدم الحمراء لأنواع مختلفة من الثديات.

جدول 4-6 إعداد ونسب عزلات E.coli حسب نمط الهيمولايسن المنتج و نوع الدم المُحلل.

مصدر العزلة	عدد بكتريا E.coli الكلي	عدد عزلات E.coli المنتجة للهيمولايسن	نمط الهيمولايسن المنتج	عدد البكتريا المحللة حسب نوع الدم	
				الأغنام	الإنسان
الإدرار	76	(% 39.47) 30	β-hemolysis	(% 0) 0	(% 39.47) 30
			α-hemolysis	(% 39.47) 30	(% 0) 0
			No-hemolysis	(% 60.52) 46	(% 60.52) 46
الإسهال	80	(% 12.5) 10	β-hemolysis	(% 0) 0	(% 12.5) 10
			α-hemolysis	(% 12.5) 10	(% 0) 0
			No-hemolysis	(% 87.5) 70	(% 87.5) 70
X2	8.855*				
P value	0.003				

*** وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05**

لقد استعملت فصائل دم الإنسان الأربع لمعرفة قدرة البكتريا التحللية للدم المعزولة من أخماج المسالك البولية والمعوية ، وأظهرت النتائج أن أعلى نسبة تحلل كانت في فصيلة الدم AB إذ بلغ عدد العزلات المحللة لها على التوالي 12 (40 %) و 5 (50 %) ، تليها فصيلة الدم A إذ بلغت عدد العزلات المحللة لها 10 (33.3 %) و 2 (20 %) على التوالي ، ثم تأتي بعدها فصيلة الدم B وكانت عدد العزلات المحللة لها 6 (20 %) و 2 (20 %)على التوالي ، وشكلت فصيلة الدم O أقل الفصائل تحللاً إذ بلغ عدد العزلات المحللة لها 2 (6.6 %) و 1 (10 %) على التوالي. لقد وجد في هذه الدراسة اختلاف معنوي ذي دلالة إحصائية ما بين عزلات بكتريا اشريشيا القولون المحللة للفصائل الدموية في مصدري العزل عند مستوى احتمالية 0.05 كما في جدول (4-7) .

يستنتج من هذه النتائج أن فصيلة الدم AB هي أفضل فصيلة دم بشري تستخدم للتحري عن نشاط إنزيم الهيمولايسن وذلك لاحتوائها على مستقبلات أقل تخصصاً مقارنة بفصائل الدم الأخرى وهذا يتفق مع ما أورده الموسوي (2006) إذ ذكرت في دراستها بأن فصيلة الدم AB أفضل الفصائل الدموية التي تستعمل للتحري عن الهيمولايسن . كما في جدول (4-7).

جدول 4-7 عزلات E.coli المحللة لفصائل الدم البشري والمعزولة من أخماج المسالك البولية والمعوية.

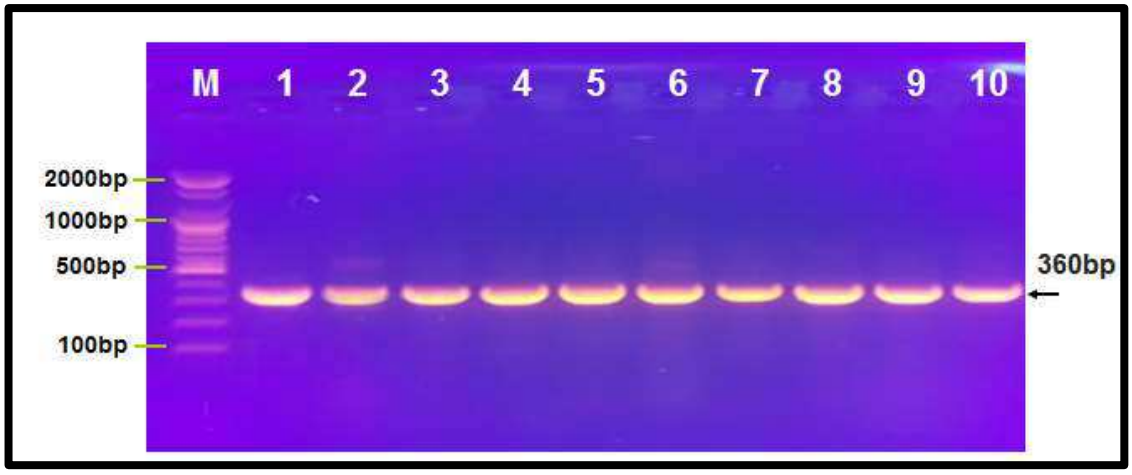
فصائل الدم البشري	عدد عزلات الإدرار المحللة لفصائل الدم		عدد عزلات الإسهال المحللة لفصائل الدم	
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
فصيلة الدم AB	12	% 40	5	% 50
فصيلة الدم A	10	% 33.3	2	% 20
فصيلة الدم B	6	% 20	2	% 20
فصيلة الدم O	2	% 6.6	1	% 10
العدد الكلي	30		10	
X^2	10.48*		4.8	
P value	0.015		0.187	

*** وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05**

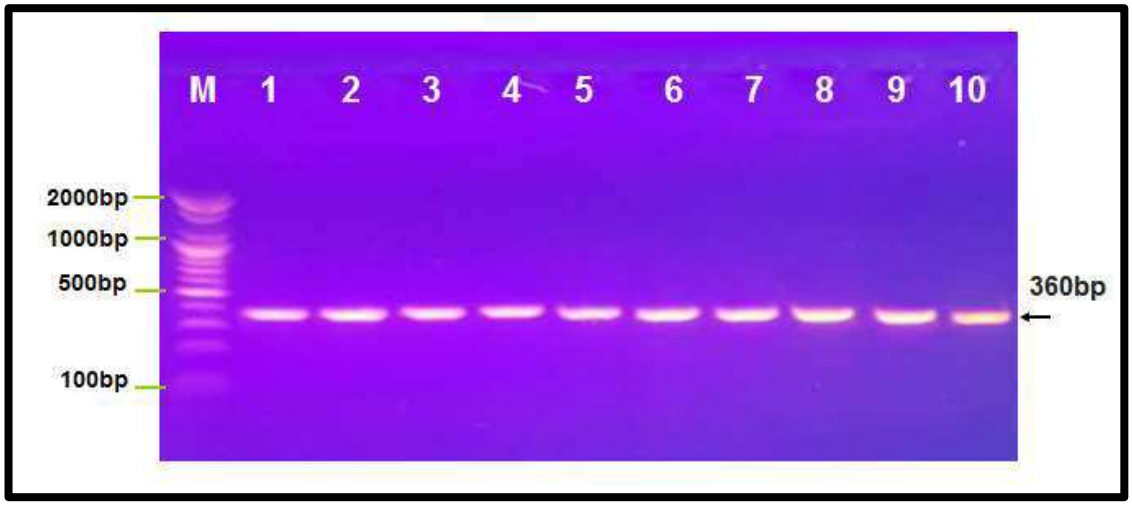
أما من الناحية الجينية فتم التحري جزيئياً عن إنزيم الهيمولايسن المنتج من قبل بكتريا اشريشيا القولون قبل وبعد التطفير باستعمال بادئ Primer خاص بجين hlyA لغرض الكشف عن العزلات التي تمتلك هذا الجين بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، وبعد انتهاء التفاعل تم ترحيل ناتج التضاعف على هلام الاكاروز Agarose بتركيز (1%) ثم فحص هلام الاكاروز تحت الأشعة فوق البنفسجية .

إذ تم انتخاب 15 عزلة من بكتريا E.coli المحللة للدم توزعت على 10 عزلات مصدرها الإدرار و 5 عزلات من الإسهال للتحري عن جين hlyA المشفر لإنتاج إنزيم الهيمولايسن، وأظهرت نواتج التضخيم للجين hlyA بعد الترحيل على هلام الاكاروز (1%) وصبغه بصبغة الأثيديوم بروماید وتعريضه للأشعة فوق البنفسجية امتلاك جميع عزلات بكتريا E.coli قيد الدراسة جين hlyA بنسبة 100% وكان حجم جين hlyA للبكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال 360pb كما في الشكل (1 ، 2) .

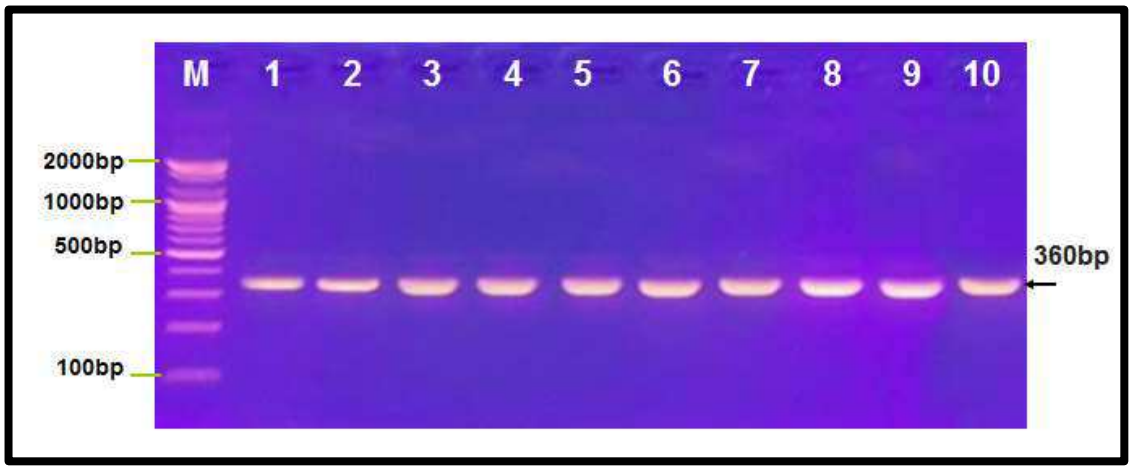
A



B

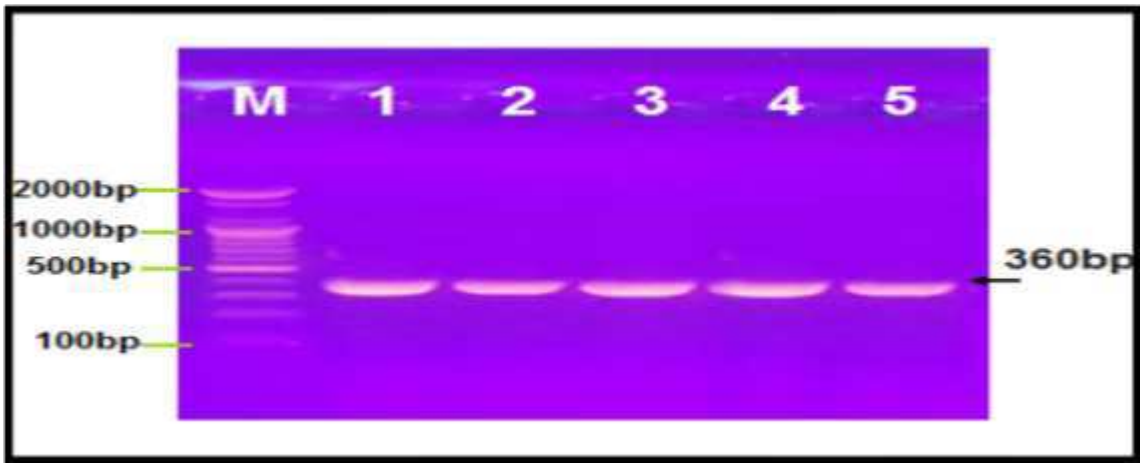


C

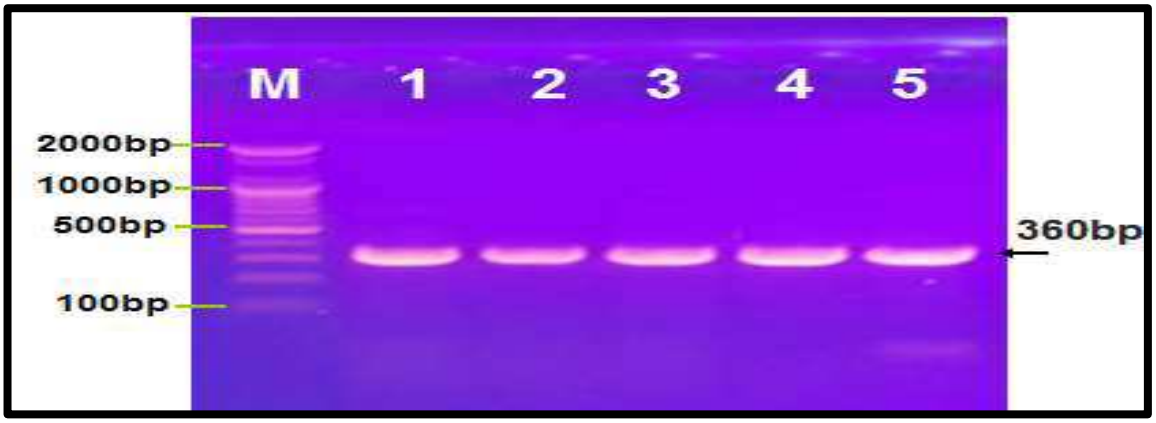


الشكل 4-1: يمثل صور الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز والحاوي على نتائج فحص الـ PCR الخاص بالتحري عن جين الضراوة hlyA gene في جرثومة Escherichia coli المعزولة من الإدرار و الشكل (A) يمثل عينات غير مُطفرة (سيطرة) وشكل (B) يمثل عينات مُطفرة بوقت 10 دقائق والشكل (C) يمثل عينات مُطفرة بوقت 15 دقيقة وبفولتية (100) وفرق جهد (80) امبير لمدة 60 دقيقة حيث يمثل M: Marker 2000-100bp و الارقام من (1-10) تمثل العزلات الموجبة للفحص بناتج طولة 360bp.

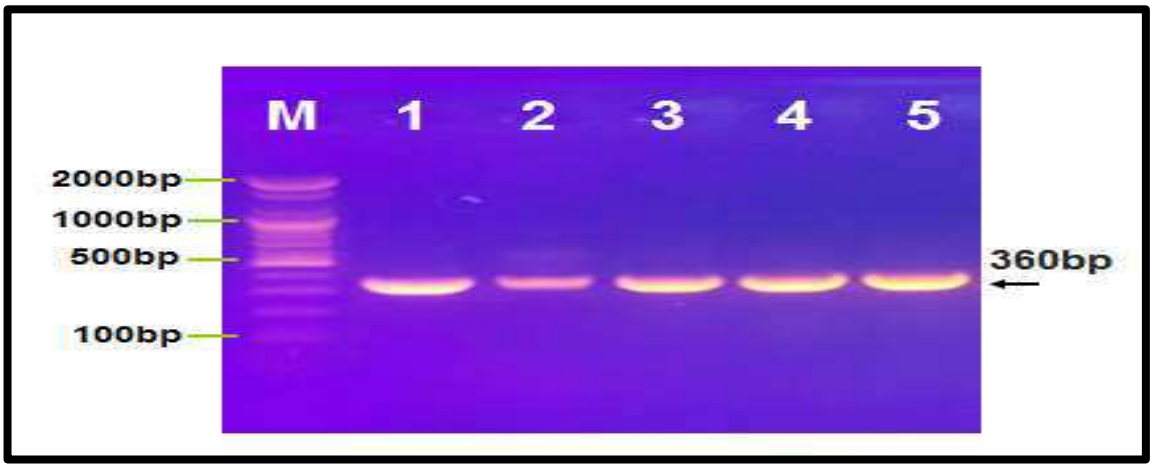
A



B



C



شكل 4-2 : يمثل صور الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز والحاوي على نتائج فحص الـ PCR الخاص بالتحري عن جين الضراوة hlyA gene في جرثومة Escherichia coli المعزولة من الإسهال ويمثل شكل (A) عينات غير مُطفرة (سيطرة) وشكل (B) عينات مُطفرة بوقت 10 دقيقة وشكل (C) عينات مُطفرة بوقت 15 دقيقة وبفولتية 100 وفرق جهد (80) أمبير ولمدة 60 دقيقة حيث يمثل M: Marker 2000-100bp و الأرقام من (1-5) تمثل العزلات الموجبة للفحص بناتج طولة 360bp.

يعد هذا الإنزيم من عوامل الضراوة المهمة التي تمتلكها بكتريا اشريشيا القولون والذي يفرز الى خارج الخلية ويساعدها على الغزو والانتشار بسبب تأثيراته السمية على الخلايا حقيقة النواة إذ يقوم بتحليل مجموعة الدهون الفوسفاتية Phospholipids التي تعد من المكونات الأساسية لأغشية الخلايا حقيقة النواة (Marchant & Banat, 2012). ولهذا الجين hlyA دورٌ مهمٌ في الالتهابات المعوية والبولية الحادة التي تصيب الإنسان والتي تسببها اشريشيا القولون الممرضة (Aldick et al., 2007). ويكون إنزيم الفا-هيمولايسن الذي تنتجه بكتريا E.coli المرضية مشفراً من قبل جينات تسمى جينات الفا-هيمولايسن وهو بروتين دهني يعمل على تحلل كريات الدم الحمراء للمضيف (Wiles & Mulvey, 2013). ويعزز إفراز البكتريا للهيمولايسن الموت المبرمج للخلايا الظهارية للمضيف، وربما يزيد من قدرة هذه البكتريا من الوصول إلى الانسجة الكامنة واستمرار تواجد بكتريا E.coliالممرضة داخل منطقة الإصابة (Wiles et al., 2008)

جاءت نتائج هذه الدراسة متقاربة مع دراسة الحسني (2014) إذ بلغت نسبة جين hlyA في عزلات الإدرار 90% ، لقلة الدراسات من الناحية الجينية الخاصة بكشف جين hlyA في بكتريا المعوية خاصة في العراق جاءت هذه الدراسة مخالفة لما جاء به Katouli (2010) إذ بلغت نسبة جين hlyA بالإسهال (12%) و مخالفة لما توصل إليه Marrs (2002) إذ كانت نسبة جين hlyA في عزلات الإدرار (48%) بينما كانت نسبة جين hlyA في عزلات الإسهال (15%).

1.4.4. تقنية تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA

Sequencing technique of hlyA genes

أن التطور الكبير في علم الأحياء الجزيئي أدى إلى استعمال العديد من التقنيات الحديثة والمتطورة والسريعة في مجال كشف الطفرات والعلاقات الوراثية بين العزلات البكتيرية ، ومن اهم هذه التقنيات هي Sequencing technique تعد هذا التقنية إحدى طرائق التنميط الجيني Genotyping التي لها أهمية كبيرة في الكشف عن الطفرات الوراثية وتعتمد هذه التقنية على التسلسلات المتكررة في جينوم البكتريا (Ranjbar et al., 2014).

استعملت هذه التقنية للتحري عن الطفرات الوراثية في جين hlyA في عزلات بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال بعد تعريضها لأشعة كاما (كوبلت–60) من خلال تحليل التسلسل التتابعي للقواعد النيتروجينية وتحليل الأحماض الأمينة للجين ، إذ انتخبت ثلاث عزلات من الإدرار ومثلها من الإسهال ، الأولى غير مُطفرة بالأشعة سيطرة (Control)، والثانية مُطفرة بالأشعة بالوقت الأول 10 دقائق ، والثالثة مُطفرة بالأشعة بالوقت الثاني 15 دقيقة.

حلل التسلسل التتابعي لجين hlyA في عزلات بكتريا اشريشيا القولون المعزولة من الإدرار والإسهال باستعمال برنامج BLAST و قورنت مع التسلسل التتابعي للجين الأصلي للعزلة القياسية Escherichia coli التي تحمل الرقم التسلسلي (CP009107.1) الموجودة في موقع العالمي للجينات NCBI.

أظهرت نتائج التحليل التتابعي لجين hlyA لعزلتين بكتريا اشريشيا القولون أحدهما معزولة من الإدرار والاخرى من الإسهال غير المُطفرات بأشعة كاما (سيطرة) كانت متماثلة بنسبة (100%) مع جين العزلة القياسية التي تحمل التسلسل (CP009107.1) إذ لا يوجد تغير في تسلسل القواعد النيتروجينية كما في شكل (4-3). أما نتائج تحليل الاحماض الأمينية للجين فجاءت مطابقة لنتائج التحليل التتابعي لجين hlyA اي لا يوجد تغير في تسلسل الاحماض الأمينية للجين عند مقارنتها مع نتائج الاحماض الأمينية لجين العزلة القياسية (AKN56576.1) كما في شكل (4-4)

Escherichia coli urine isolate control (hlyA) gene aligned with NCBI-BLAST Escherichia coli (CP009107.1):

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
673 bits(364)	**0.0**	**364/364(100%)**	**0/364(0%)**	**Plus/Minus**

```
Query  1      GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95030  GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  94971

Query  61     GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94970  GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  94911

Query  121    GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94910  GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  94851

Query  181    TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94850  TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  94791

Query  241    GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94790  GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  94731

Query  301    GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94730  GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  94671

Query  361    AAGG  364
              ||||
Sbjct  94670  AAGG  94667
```

A

Escherichia coli Diarrhea isolate control (hlyA) gene aligned with NCBI-BLAST Escherichia coli (CP009107.1):

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
673 bits(364)	0.0	364/364(100%)	0/364(0%)	Plus/Minus

```
Query  1      GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95030  GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  94971

Query  61     GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94970  GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  94911

Query  121    GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94910  GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  94851

Query  181    TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94850  TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  94791

Query  241    GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94790  GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  94731

Query  301    GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94730  GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  94671

Query  361    AAGG  364
              ||||
Sbjct  94670  AAGG  94667
```

B

شكل 4-3 نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA في بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال مقارنة مع الجين الأصلي لبكتريا (CP009107.1) Escherichia coli . A- يمثل عزلة E.coli سيطرة معزولة من الإدرار، B– يمثل عزلة E.coli سيطرة معزولة من الإسهال.

Escherichia coli urine isolate control (hlyA) gene

Identities: 121/121(100%) Frame +1

```
Query  1    GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILDASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  180

Sbjct  51   GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILDASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  110

Query  181  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  360

Sbjct  111  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  170

Query  361  K  363

Sbjct  171  K  171
```

A

Escherichia coli Diarrhea isolate control (hlyA) gene

Identities: 121/121(100%) Frame +1

```
Query  1    GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILDASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  180

Sbjct  51   GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILDASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  110

Query  181  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  360

Sbjct  111  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  170

Query  361  K  363

Sbjct  171  K  171
```

B

شكل 4-4 نتائج تحليل ترجمة الاحماض الأمينة لجين hlyA لبكتريا E.coli مقارنة مع الحامض الأميني للعزلة القياسية (AKN56576.1) A- يمثل عزلة E.coli سيطرة معزولة من الإدرار، B– يمثل عزلة E.coli سيطرة معزولة من الإسهال.

أما في العزلات المُطفرة بأشعة كاما فبينت نتائج التحليل التتابعي حدوث طفرات وراثية في جين hlyA لعزلات بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار و الإسهال ، واحدثت هذه الطفرات تغيراً في تسلسل القواعد النيتروجينية لجين hlyA وكانت جميع هذه الطفرات من نوع الاستبدال substitution بنوعيها المكافئ Transition والغير مكافئ Transversion إذ كانت عدد الطفرات التي حدثت في عزلات الإدرار ثلاث طفرات في العزلة EU المعرضة للوقت الأول و أربع طفرات في العزلة EU المعرضة للوقت الثاني ، بينما كانت عدد طفرات التي حدثت في عزلات الإسهال طفرة واحدة في العزلة ED المعرضة للوقت الأول و ثلاث طفرات في العزلة ED المعرضة للوقت الثاني. وعند تحليل نتائج ترجمة الأحماض الأمينة للجين hlyA مع نتائج الترجمة للحامض الأميني الاصلي وجد هناك تأثير للطفرات الحاصلة في الجين على ترجمة الأحماض الأمين حيث حصل تغيير طفيف في مسار ترجمة البروتين حيث تم تحول الحامض الأميني Asparagine (Asp) D الى الحامض الأميني Glutamine (Glu) G .

إذ بينت نتائج تحليل الجين hlyA للعزلة EU المُطفرة بوقت 10 دقائق حصول استبدال القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة الكوانين في الموقع (948902) عند الثمالة Subjct 94910 في حين استبدلت القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة النيتروجينية الأدنين في الموقع (94756) عند الثمالة Subjct 94790 وكما استبدلت القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة النيتروجينية السايتوسين في الموقع (94704) عند الثمالة Subjct 94730 وكانت نسبة التطابق مع الجين الأصلي للعزلة العالمية في بيانات NCBI 99 % كما في شكل (4-5) وجدول (4-8).

أما في العزلة EU المُطفرة بوقت 15 دقيقة فقد استبدلت القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة النيتروجينية الكوانين في الموقع (94902) عند الثمالة Subjct 94910 واستبدلت القاعدة النيتروجينية السايتوسين بالقاعدة النيتروجينية الأدنين في الموقع (94839) عند الثمالة Subjct 94850 وكما استبدلت القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة النيتروجينية الأدنين في الموقع (94756) عند الثمالة Subjct 94790 بينما استبدلت القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة النيتروجينية السايتوسين في الموقع (94704) عند الثمالة Subjct 94730 وكانت نسبة التطابق مع الجين الأصلي للعزلة العالمية في بيانات NCBI 99 % كما في الشكل (4-5) وجدول (4-8)

أن الطفرات الوراثية في بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار احدث تغير في ترجمة الاحماض الأمينية للجين hlyA عند مقارنتها مع ترجمة الاحماض الأمينة لجين العزلة القياسية التي تحمل التسلسل (AKN56576.1) حيث حصل تغير في مسار ترجمة البروتين في موقعين مختلفين من العزلة العالمية في كلا الوقتين (10 و 15) دقيقة حيث تم تحول الحامض الأميني Asparagine (Asp) D الى الحامض الأميني Glutamine (Glu) G ، وأن هذه التغيرات قد تؤدي إلى زيادة في ضراوة جين hlyA كما في الشكل (4-6).

Escherichia coli urine isolate 10M Mutagenes (hlyA) gene aligned with NCBI-BLAST Escherichia coli (CP009107.1):

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
660 bits(357)	0.0	363/366(99%)	0/366(0%)	Plus/Minus

```
Query  1      GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95030  GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  94971

Query  61     GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94970  GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  94911

Query  121    GTTGCAGAGAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  180
              |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94910  GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  94851

Query  181    TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94850  TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  94791

Query  241    GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCAGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  300
              |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94790  GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  94731

Query  301    GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGCATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  360
              |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94730  GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  94671

Query  361    AAGGCA  366
              ||||||
Sbjct  94670  AAGGCA  9466
```

Escherichia coli **urine isolate 15M Mutagenes (*hlyA*) gene aligned with NCBI-BLAST *Escherichia coli* (CP009107.1):**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
651 bits(352)	0.0	360/364(99%)	0/364(0%)	Plus/Minus

```
Query  1      GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95030  GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  94971

Query  61     GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94970  GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  94911

Query  121    GTTGCAGAGAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  180
              |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94910  GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  94851

Query  181    TTTGAGAATGGATATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  240
              |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94850  TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  94791

Query  241    GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCAGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  300
              |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94790  GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  94731

Query  301    GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGCATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  360
              |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94730  GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  94671

Query  361    AAGG  364
              ||||
Sbjct  94670  AAGG  94667
```

شكل 4-5 نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA في بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار المُطفرة بالأشعة بوقت (10و15) دقائق المقارنة مع الجين الأصلي لبكتريا Escherichia coli (CP009107.1).

Escherichia coli urine isolate 10M Mutagenes (hlyA) gene

Identities: 120/122(98%) Frame +1

```
Query  1    GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILEASKQAMFEHVAEKFAARINEWEKEHGKNY  180

Sbjct  51   GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILDASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  110

Query  181  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  360

Sbjct  111  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  170

Query  361  KA  366

Sbjct  171  KA  172
```

Escherichia coli urine isolate 15M Mutagenes (hlyA) gene

Identities: 119/121(98%) Frame +1

```
Query  1    GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILEASKQAMFEHVAEKFAARINEWEKEHGKNY  180
Sbjct  51   GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILDASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  110
Query  181  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  360
Sbjct  111  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  170
Query  361  K  363
Sbjct  171  K  171
```

شكل 4-6 نتائج تحليل ترجمة الاحماض الأمينية لجين hlyA لبكتريا E.coli معزولة من الإدرار المُطفرة بوقت (10 و 15) دقيقة مقارنة مع الحامض الأميني للعزلة العالمية (AKN56576.1)

وأظهرت نتائج التحليل التسلسلي لجين hlyA للعزلة ED المعزولة من الإسهال والمُطفرة بوقت 10 دقائق حصول استبدال القاعدة النيتروجينية الأدنين بالقاعدة النيتروجينية الثايمين في موقع (94939) عند الثمالة Subjct 94970 وكانت نسبة التطابق مع الجين الأصلي للعزلة العالمية في بيانات NCBI 99 % كما في الشكل (4-7).

أما العزلة ED المُطفرة بوقت 15 دقائق فقد بينت نتائج التحليل التتابعي للجين hlyA حصول استبدال القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة النيتروجينية الكوانين في موقع (94902) عند الثمالة Subjct 94910 واستبدال القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة النيتروجينية الأدنين في موقع (94787) عند الثمالة Subjct 94790 واستبدال القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة النيتروجينية السايتوسين في الموقع (94704) عند الثمالة Subjct 94730 وكانت نسبة التطابق مع الجين الأصلي للعزلة العالمية في NCBI 99 % كما في الشكل (4-7) وجدول (4-8) .

احدثت الطفرات الوراثية في جين hlyA في عزلات E.coli المعزولة من الإسهال تغيير في تسلسل الاحماض الأمينية لجين في موقع واحد في الوقت 10 دقائق وموقعين بالوقت 15 دقيقة عند مقارنتها مع نتائج تحليل الحامض الأميني للعزلة القياسية ، إذ تم تحول الحامض الأميني Asparagine (Asp) D إلى الحامض الأميني Glutamine (Glu) G ، وقد يفسر ذلك بسبب الضراوة العالية التي تمتلكها عزلات E.coli المعزولة من الإسهال كما في شكل(4-8)

Escherichia coli **Diarrhea isolate 10M Mutagenes (*hlyA*) gene aligned with NCBI-BLAST *Escherichia coli* (CP009107.1):**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
667 bits(361)	0.0	363/364(99%)	0/364(0%)	Plus/Minus

```
Query  1      GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95030  GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  94971

Query  61     GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGATGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  120
              |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94970  GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  94911

Query  121    GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94910  GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  94851

Query  181    TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94850  TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  94791

Query  241    GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94790  GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  94731

Query  301    GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94730  GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  94671

Query  361    AAGG  364
              ||||
Sbjct  94670  AAGG  94667
```

Escherichia coli **Diarrhea isolate 15M Mutagenes (*hlyA*) gene aligned with NCBI-BLAST *Escherichia coli* (CP009107.1):**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
652 bits(353)	0.0	359/362(99%)	0/362(0%)	Plus/Minus

```
Query  1      GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95030  GGAGTTAGTGCAGCCTCCAGTGCATCCCTCATAGGGGCCCCGATAAGCATGCTGGTGAGT  94971

Query  61     GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94970  GCATTAACCGGTACGATATCTGGCATTCTGGAAGCATCAAAACAGGCTATGTTTGAGCAC  94911

Query  121    GTTGCAGAGAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  180
              |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94910  GTTGCAGATAAATTCGCTGCTCGGATCAATGAATGGGAAAAGGAGCATGGCAAAAATTAT  94851

Query  181    TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94850  TTTGAGAATGGCTATGACGCAAGACATGCTGCGTTTTTAGAAGACTCTCTGTCTTTGCTT  94791

Query  241    GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCAGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  300
              |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94790  GCTGATTTTTCTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCTGTCGCAATAACCCAGCAACATTGG  94731
```

```
Query  301    GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGCATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  360
              ||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94730  GATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGTATAACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGT  94671

Query  361    AA  362
              ||
Sbjct  94670  AA  94669
```

شكل 4-7 نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA في بكتريا E.coli المعزولة من الإسهال المُطفرة بالأشعة بوقت (10و15) دقائق المقارنة مع الجين الأصلي لبكتريا Escherichia coli (CP009107.1).

Escherichia coli Diarrhea isolate 10M Mutagenes (hlyA) gene

Identities: 121/122(99%) Frame +1

```
Query  1    GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILEASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  180

Sbjct  51   GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILDASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  110

Query  181  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  360

Sbjct  111  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  170

Query  361  KA  366

Sbjct  171  KA  172
```

Escherichia coli Diarrhea isolate 15M Mutagenes (hlyA) gene

Identities: 118/120(98%) Frame +1

```
Query  1    GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILEASKQAMFEHVAEKFAARINEWEKEHGKNY  180

Sbjct  51   GVSAASSASLIGAPISMLVSALTGTISGILDASKQAMFEHVADKFAARINEWEKEHGKNY  110

Query  181  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  360

Sbjct  111  FENGYDARHAAFLEDSLSLLADFSRQHAVERAVAITQQHWDEKIGELAGITRNADRSQSG  170
```

شكل4-8نتائج تحليل ترجمة الاحماض الأمينية لجين hlyA لبكتريا E.coli معزولة من الإسهال المُطفرة بوقت (10و15) دقيقة مقارنة مع الحامض الأميني للعزلة العالمية (AKN56576.1)

أظهرت نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA لعزلات بكتريا E.coli حدوث 11 طفرة وراثية منها 7 طفرات في عزلات الإدرار و4 طفرات في عزلات الإسهال ، كما جاءت نتائج تحليل الترجمة الاحماض الأمينية لجين hlyA في عزلات E.coli المُطفرة حدوث تحول الحامض الأميني Asparagine (Asp) D الى الحامض الأميني Glutamine (Glu) G في عزلات الإدرار أكثر من عزلات الإسهال، ونستدل من هذه النتائج أن عزلات بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار كانت أكثر تأثراً بأشعة كاما من خلال عدد الطفرات التي حدثت فيها مقارنة بعزلات الإسهال وهذا قد يعود إلى امتلاك عزلات E.coli المعزولة من الإسهال العديد من عوامل الضراوة ومقاومتها العالية للمضادات الحيوية أو إلى الظروف البيئة للعزلات.

وبينت النتائج أن نسبة حدوث الطفرات من نوع Transversion mutation جاءت أعلى من نسبة حدوث الطفرات من نوع Transition mutation وكانت نسبة استبدال القاعدة النيتروجينية الثايمين بالقاعدة الكوانين واستبدال القاعدة الثايمين بالقاعدة الأدنين أكثر الطفرات حدوثاً عند مقارنة العزلات المُطفرة مع العزلة القياسية وهذا قد يعود إلى تأثير أشعة كاما كما في الجدول (4-8). إن زيادة نسبة حدوث الطفرات الانتقالية والمستعرضة لها أثار مهمة في الدراسات الوبائية من خلال ما قد تحدثه من تغيرات في الجين التي قد تؤدي إلى زيادة فعالية هذه الجين وبالتالي زيادة ضراوة البكتريا وإحداثها للأمراض الوبائية (Martı´nez-Arias et al.,2001)

تجدر الإشارة إلى أن حدوث الطفرات الوراثية في الجينات تكون مهمة في دراسة وفهم الأساس الجزيئي للطفرات فهذه الطفرات يؤدي حدوثها في جين معين إلى إحداث تغييرات في بنية وعمل هذا الجين وكذلك يمكن أن تأثر على التعبير الجيني مما يؤدي إلى استبدال الأحماض الأمينية في البروتين ، واحياناً استبدال الأحماض الأمينية في منطقة معينة من البروتين لا يؤثر تأثيراً كبيراً في تكوين البروتين ووظيفته لأن الشفرة الوراثية تتكون من ثلاث قواعد نيتروجينية والتغير يحصل في قاعدة واحدة (Takahashi et al., 2013). فطفرات الاستبدال هي طفرات نقطية يؤدي حدوثها إلى إحداث تغير في قاعدة نيتروجينية واحدة في التسلسل التتابعي للجين ويتم نسخ هذا التغير أثناء النسخ المتماثل ليسبب تغيرات مستمرة في تسلسل القواعد النيتروجينية للجين وتشمل طفرات الاستبدال طفرة التحول Transversion فيتم فيها استبدال قاعدة بيورينية بقاعدة بريميدينية أو بالعكس أما طفرة الانتقال Transition وفيها يتم استبدال قاعدة بيورينية بقاعدة بيورينية أُخرى أو استبدال قاعدة بريميدينية بقاعدة بريميدينية أُخرى (Kumar,2016).

جدول 4-8 يمثل نوع وموقع الطفرة الوراثية في جين hlyA .

مصدر العزلة	رمز العزلة	الوقت	نوع طفرة الاستبدال	موقع الطفرة	الطفرة
الإدرار	EU	10	Transversion	948902	T-G
			Transversion	94756	T-A
			Transtion	94704	T-C
	EU	15	Transversion	94902	T-G
			Transtion	94839	C-A
			Transversion	94756	T-A
			Transtion	94704	T-C
الإسهال	ED	10	Transversion	94939	A-T
	ED	15	Transversion	94902	T-G
			Transversion	94787	T-A
			Transtion	94704	T-C

لقد تم تحليل جين hlyA لـ6 عزلات من بكتريا Escherichia coli المحللة للدم المُطفرة وغير المُطفرة والمعزولة من الإدرار والإسهال وتم أرسالها إلى موقع NCBI-Genbank لتسجيل هذه البكتريا في بيانات NCBI للحصول على الرقم التسلسلي الخاص بكل عزلة في الموقع العالمي للجينات كما الجدول (4-9) والملحق (6).

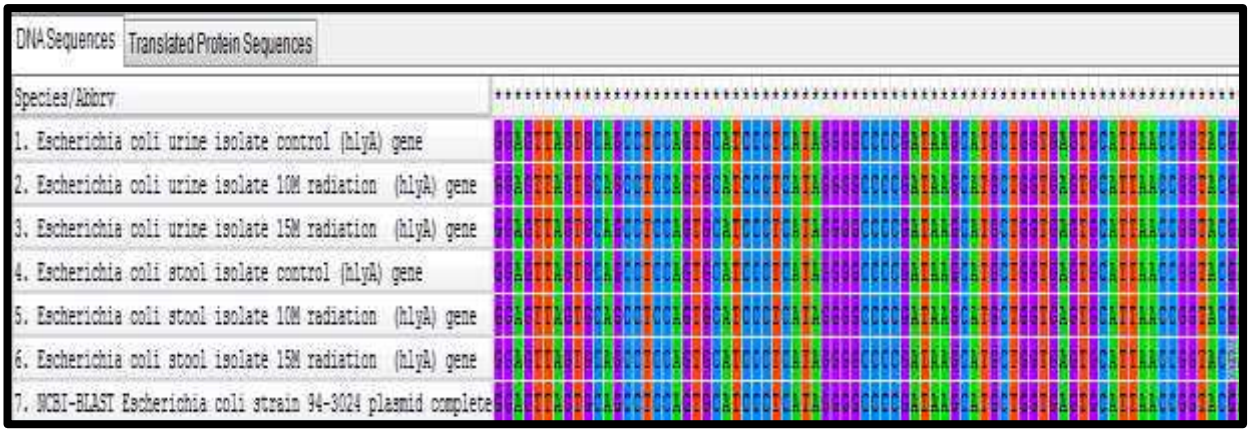
جدول 4-9 الأرقام التسلسلية لعزلات بكتريا E.coli المسجلة في NCBI.

ت	الرقم التسلسلي لعزلة	مصدر العزلة	رقم تسلسل العزلة	حالة العزلة
1	BankIt2048974 Seq1	الإدرار	MF983702	سيطرة
2	BankIt2048974 Seq2	الإدرار	MF983703	مُطفرة بـ10 دقائق
3	BankIt2048974 Seq3	الإدرار	MF983704	مُطفرة بـ15 دقيقة
4	BankIt2048974 Seq4	الإسهال	MF983705	سيطرة
5	BankIt2048974 Seq5	الإسهال	MF983706	مطفرة بـ10 دقائق
6	BankIt2048974 Seq6	الإسهال	MF983707	مطفرة بـ15 دقيقة

2.4.4. تحليل الشجرة الوراثية لبكتريا E.coli وفق التسلسل التتابعي لجين hlyA

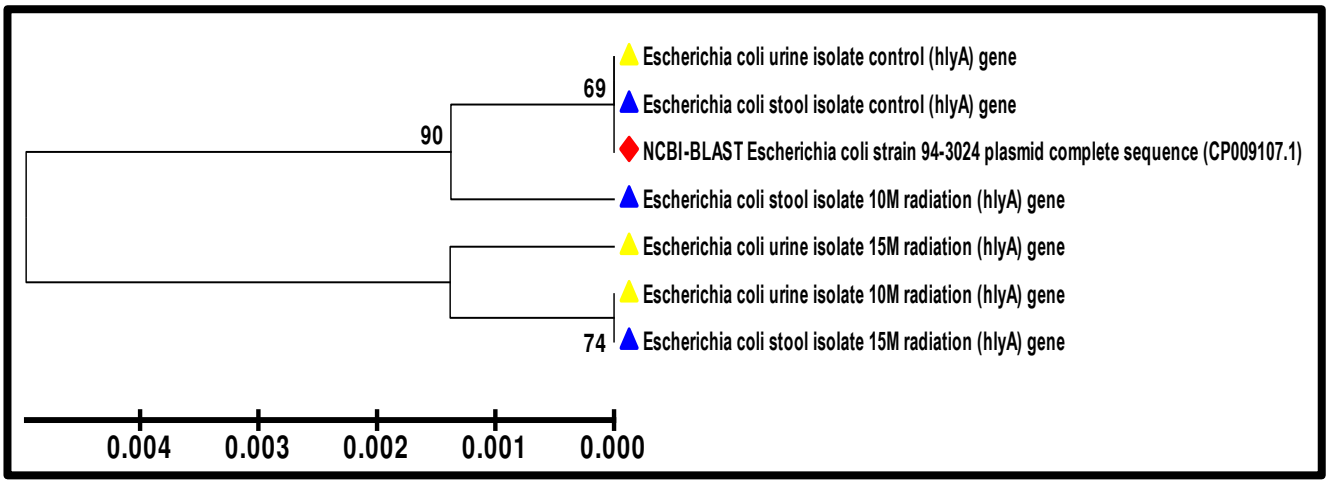
أن عملية Sequencing تعمل على التمييز بين السلالات البكتيرية على أساس محتواها الجيني وتعد إحدى الطرائق الجينية المهمة في مجال إيجاد القرابة الوراثية Genetic relatedness بين هذه السلالات (Ranjbar et al.,2014).

لغرض إيجاد القرابة الوراثية بين عزلات بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم والتي مصدرها الإدرار والإسهال المُطفرة وغير المُطفرة بأشعة كاما مع العزلة العالمية الأمريكية التي تحمل الرقم التسلسلي (CP009107.1)، تم تحديد التسلسل التتابعي للجين hlyA لعزلات بكتريا E.coli ومقارنتها مع التسلسل التتابعي للجين hlyA للعزلة العالمية ،وبعد ذلك تم تحليل الشجرة الوراثية لعزلات بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم و المعزولة من الإدرار والإسهال باستعمال برنامج (MEGA6) إذ تم استخدام تحليل الشجرة الوراثية من نوع (Test UPGMA tree) (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). كما في الشكل (4-9).



الشكل4- 9: يمثل تحليل متعددة اصطفاف تتابع القواعد الجينية باستخدام برنامج (MEGA6) لناتج فحص تفاعل تسلسل البلمرة PCR لجين hlyA في جرثومة Escherichia coli .

أظهر مخطط الشجرة الوراثية وجود تقارب وراثي ما بين عزلتين من بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم والمعزولة أحداهما من الإدرار والاخرى من الإسهال غير المُطفرتين بأشعة كاما قيد الدراسة مع العزلة العالمية التي تحمل الرقم التسلسلي (CP009107.1) ، بينما أظهر المخطط عدم وجود تقارب وراثي ما بين عزلات اشريشيا القولون المحللة للدم والمعزولة من الإدرار والإسهال والمطفرات بأشعة كاما بالوقتين (10 و15) دقيقة مع العزلة العالمية التي تحمل نفس الرقم التسلسلي اعلاه ، وهذه النتائج جاءت مطابقة لنتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين hlyA Sequencer والذي أظهر عدم وجود اختلاف ما بين العزلات غير المُطفرة بأشعة كاما والعزلة العالمية بينما كان الاختلاف واضح في تسلسل القواعد النيتروجينية لجين hlyA لعزلات اشريشيا القولون المحللة للدم المُطفرة بأشعة كاما من خلال حدوث الطفرات الوراثية مقارنة بالعزلة العالمية. كما في الشكل (4-10) .



الشكل 4-10: يمثل تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لعزلات بكتريا E.coli ومقارنتها مع العزلة العالمية E.coli (CP009107.1) .

5.4.اختبار حساسية بكتريا E.coli للمضادات الحياتية

Sensitive Test of E.coli to Antibiotics

استعملت طريقة أنتشار الأقراص (Disc diffusion method) على وسط مولر-هنتون لاختبار حساسية عزلات بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم والبالغة (40) عزلة والمعزولة من الإدرار والإسهال اتجاه 15 مضاداً حيوياً ، ولمعرفة نوع الاستجابة يتم قياس قطر منطقة التثبيط حول قرص المضاد الحياتي المستعمل ومقارنة النتائج مع ما ورد في (CLSI, 2014).

أظهرت نتائج مقاومة بكتريا E.coli لمجموعة مضادات البيتالاكتام β-lactam كما يلي مقاومة لمضاد Ampicillin بنسبة 100% مع تباين في نسب المقاومة لباقي المضادات الحيوية، وبنسبة 87.5% لمضاد Ticarcillin وبنسبة 52.5% لكل من المضادين ,Cefotaxime Ceftriaxone وبنسبة 57.5% لمضاد Aztreonam نلاحظ في هذه الدراسة أرتفاع نسبة مقاومة عزلات بكتريا اشريشيا القولون تجاه مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات والمونوبكتام ويعود ذلك إلى عدة أسباب أهمها قابلية بكتريا E.coli على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs التي تعمل على تحليل حلقة β-lactam (Zurfluh et al., 2015). وكما يعد إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز (B-lactamases) من أهم اليات المقاومة للمضادات الحياتية وباتت تشكل مشكلة تهدد القطاع الصحي بأنحاء واسعة من العالم وكذلك انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي وامتلاك هذه البكتريا مضخات الدفق (Chuma et al., 2013). وهذه الدراسة اتفقت مع ما توصل إليه Hassan (2015) إذ بلغت نسبة المقاومة للمضاد Ampicillin 100% وكما جاءت نتائج هذه الدراسة متقاربة مع دراسة Al-Hilali (2010) إذ بلغت نسبة المقاومة للمضاد Ticarcillin 86.4% وللمضادات Aztreonam, Ceftriaxone, Cefotaxime على التوالي 68.2% ،59.1% ،59.1%.

وأظهرت نتائج مقاومة بكتريا E.coli لمجموعة الأمينوكلايكوسيدية بنسبة 17.5% لمضاد Amikacin وبنسبة 12.5% لمضاد Gentamycin وتعود مقاومة بكتريا اشريشيا القولون لهذه المضادات إلى امتلاكها إنزيمات يشفر لها من قبل بلازميدات متنقلة تعمل على تحوير المضاد أو تغير موقع الهدف الذي يمثل الوحدة الرايبوسومية الصغيرة 30-Subunit (Zorn et al.,2005) وجاءت هذه النتائج متقاربة مع ما توصل إليه Al-Hamdani & Abas (2013) إذ بلغت نسبة المقاومة للمضادين Amikacin و Gentamicin 9.72 % ، 8.33 % على التوالي.

كما قاومت عزلات E.coli مضاد Doxycycline بنسبة 42.5% الذي يعود إلى مجموعة مضادات التتراسايكلين وتأتي مقاومة البكتريا لهذا المضاد نتيجة لفقدان بروتينات الغشاء الخارجي

البكتيري مما يقلل في نفاذية المضاد إلى داخل البكتريا (Katzung,2001). وهذه الدراسة لا تتفق مع ما توصل إليه Kadhim وجماعته (2011) إذ بلغت نسبة مقاومة مضاد Doxycycline (82.2 %) .

وأظهرت النتائج مقاومة بكتريا E.coli لمضاد Nalidixic acid بنسبة 40% الذي ينتمي إلى مجموعة مضادات الكوينولينات وربما تعود مقاومة هذا المضاد إلى إمكانية حدوث طفرة وراثية في إنزيم DNA gyrase وهذا يؤدي إلى حصول مقاومة لهذا المضاد (Fabrega et al., 2009) وتوافقت هذه النتائج مع دراسة Kawamura–Sato و جماعته (2010) إذ بلغت نسبة مقاومة عزلات هذه البكتريا اتجاه المضاد Nalidixic acid (36.2%).

وكانت نسبة مقاومة بكتريا E.coli للمضادين Trimethoprim و Chloramphenicol 62.5%، 20% على التوالي، وقد تعود مقاومة هذه البكتريا لمضاد Trimethoprim إلى وجود جينات يرمز لها dfrI تشفر للمقاومة والواقعة على بلازميد من نوع البلازميدات الاقترانية يرمز له PMDR157 (Ahmed et al., 2005). أما مقاومة بكتريا E.coli للمضاد Chloramphenicol ناتجة عن إفراز هذه البكتريا لإنزيم Chloramphenicol acetyl transferase الذي يكون تحت سيطرة بلازميد (Brooks et al., 2007). هذه النتائج تتوافق مع دراسة Hussein وجماعته (2012) إذ بلغت نسبة مقاومة العزلات للمضادين Trimethoprim و Chloramphenicol 68.5 % ،17.7 % على التوالي.

وكانت عزلات E.coli حساسة بنسبة 100% لمضادات Imipenem, Ciprofloxacin, Meropenem, Nitrofurantoin ويعود سبب أرتفاع نسبة الحساسية E.coli للمضادات الكاربابينيم بسبب ثبوتها ضد التحلل المائي بواسطة إنزيمات البيتالاكتاميز بالإضافة إلى قدرتها على النفاذ عبر الغشاء الخارجي للبكتريا (Hawkey & Munday, 2004). وهذه الدراسة تتفق مع Abbas (2015) إذ بلغت نسبة الحساسية للمضادين Imipenem و Meropenem 100% لكل منهما.

وتعود حساسية عزلات E.coli لمضاد Ciprofloxacin لكونه يمتلك طيفاً واسعاً من الفعالية ضد هذه البكتريا من خلال تأثيره على تصنيع الـDNA وقدرته العالية على اختراق الجدار الخلوي والنفوذ إلى داخل البكتريا (Anvarinejad et al., 2011). وهذا يتفق مع ما جاء به AL-Shuwaikh (2015) إذ بلغت نسبة حساسية بكتريا E.coli لهذا المضاد 100 % .

تعود حساسية بكتريا E.coli لمضاد Nitrofurantoin لكونه يؤثر على الإنزيمات المسؤولة عن بناء DNA وهو علاج فعال للأخماج البولية ويكون تركيزه عالي بالإدرار (Wallace et al.,2012). وهذه الدراسة اتفقت مع ما توصل إليه Al-Sayigh وجماعته (2013) إذ بلغت نسبة حساسية عزلات هذه البكتريا اتجاه مضاد Nitrofurantoin 100%.

وأظهرت النتائج الإحصائية وجود اختلاف معنوية عالية في استجابة بكتريا E.coli للمضادات الحياتية قيد الدراسة عند مستوى احتمالية 0.05 كما في الجدول (4-10) وملحق (7).

جدول 4-10 إعداد العزلات والنسب المئوية لمقاومة بكتريا E.coli للمضادات الحيوية.

اسم المضاد	الرمز	عزلات بكتريا Escherichia coli			
		المقاومة (R)		الحساسية (S)	
		العدد	النسبة (%)	العدد	النسبة (%)
Ampicillin	AM	40	100	-	-
Ticarcillin	TI	35	87.5	5	12.5
Cefotaxime	CTX	21	52.5	19	47.5
Ceftriaxone	CTR	21	52.5	19	47.5
Aztreonam	AT	23	57.5	17	42.5
Imipenem	IPM	-	-	40	100
Meropenem	MEM	-	-	40	100
Amikacin	AK	7	17.5	23	82.5
Gentamicin	GM	5	12.5	35	87.5
Doxycycline	DO	17	42.5	23	57.5
Nalidixic acid	NA	16	40	14	60
Ciprofloxacin	CIP	-	-	40	100
Trimethoprim	TM	25	62.5	15	37.5
Chloramphenicol	C	8	20	32	80
Nitrofurantoin	NIT	-	-	40	100
X^2	216.78				
P value	0				

*** وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05**

1.5.4. تأثير أشعة كاما على مقاومة بكتريا E.coli للمضادات الحياتية

Effect of Gamma–ray on E.coli bacteria for antibiotics

انتخبت 6 عزلات من بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم والمعزولة من الإدرار والإسهال والأكثر مقاومة للمضادات لمعرفة مدى تأثير أشعة كاما على طبيعة استجابة البكتريا للمضادات واستخدمت الجرعة 1Gy وبوقتين مختلفين (10،15) دقيقة .

ظهرت النتائج بعد التشعيع وجود زيادة في حساسية جميع العزلات للمضادات الحياتية، إذ تغيرت استجابة العزلات للمضادات حيث ان العزلات المقاومة للمضادات قبل التشعيع أصبحت حساسة لها بعد التشعيع مثل مضادات Ceftriaxone وTrimethoprim و Aztreonam ، أو كانت حساسة قبل التشعيع وأصبحت أكثر حساسية بعد التشعيع مثل مضادات Ciprofloxacin و Meropenem و Chloramphenicol، و بعض العزلات بقت مقاومة لبعض المضادات خاصة مضادات Ampicillin وTicarcillin بعد التشعيع، حيث كانت عزلات اشريشيا القولون المعرضة للإشعاع في وقت 15 دقيقة أكثر تأثراً بالأشعة من 10 دقائق لذلك فالتشعيع في وقت 15 دقيقة جعل العزلات أكثر حساسية من وقت 10 دقيقة فكلما زاد وقت التعرض لأشعة أصبحت العزلات أكثر حساسية للمضادات نتيجة التأثير القوي للأشعة ولما يحدثه الإشعاع من تغيير في تركيب الخلية الجرثومية وأن فقدان المقاومة للمضادات يتناسب طردياً مع زيادة الفترة الزمنية للتعرض لأشعة كاما التي تتعرض بها العزلات لهذ الأشعة . كما في جدول (4-11).

جدول 4-11 تأثير أشعة كاما على مقاومة عزلات E.coli للمضادات الحيوية قبل وبعد التشعيع.

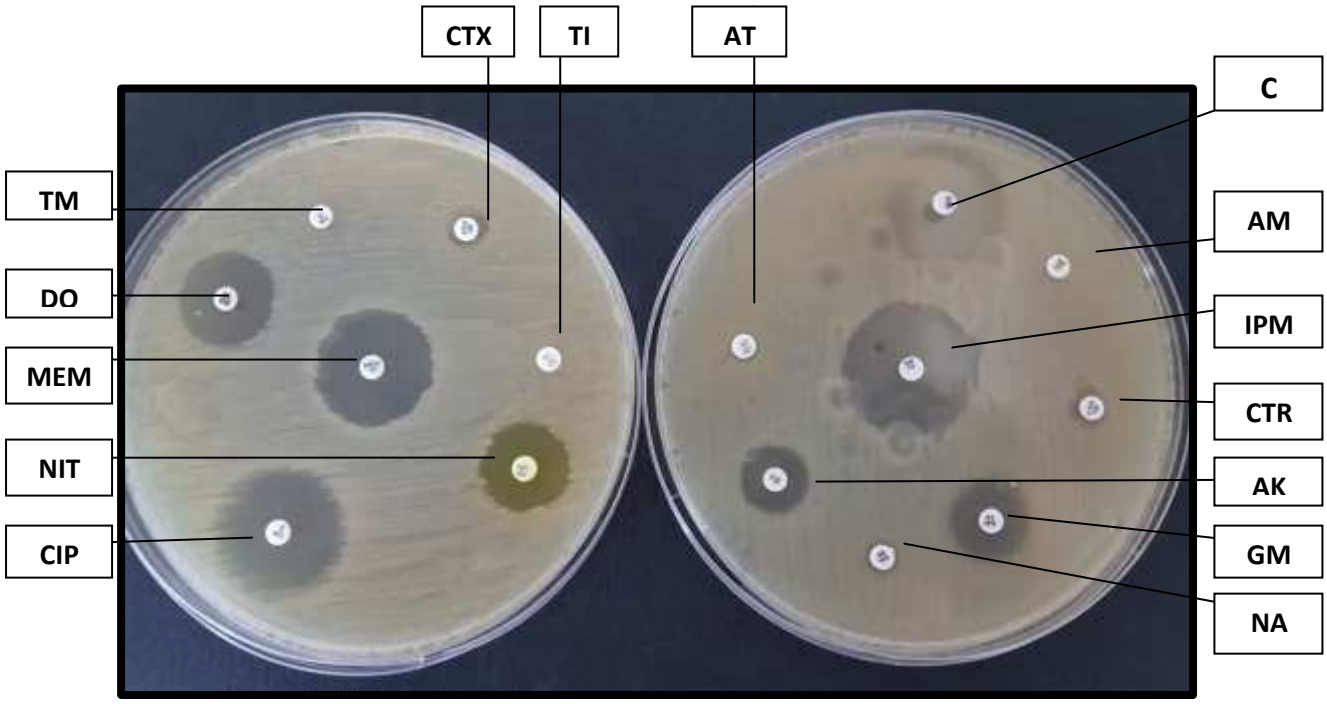
رمز العزلة	AM	TI	CTX	CTR	AT	IPM	MEM	AK	GM	DO	NA	CIP	TM	C	NIT
سيطرة EU10	R	R	R	R	R	S	S	S	s	S	R	S	R	S	S
10m	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
15m	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
سيطرة EU8	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
10m	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
15m	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
سيطرة EU7	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S
10m	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
15m	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S

سيطرة ES2	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S
10m	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
15m	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
سيطرة ES3	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S
10m	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
15m	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
سيطرة ES1	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
10M	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

EU عزلة E.coli معزولة من الإدرار. 10m دقيقة. R:مقاومة للمضادة.

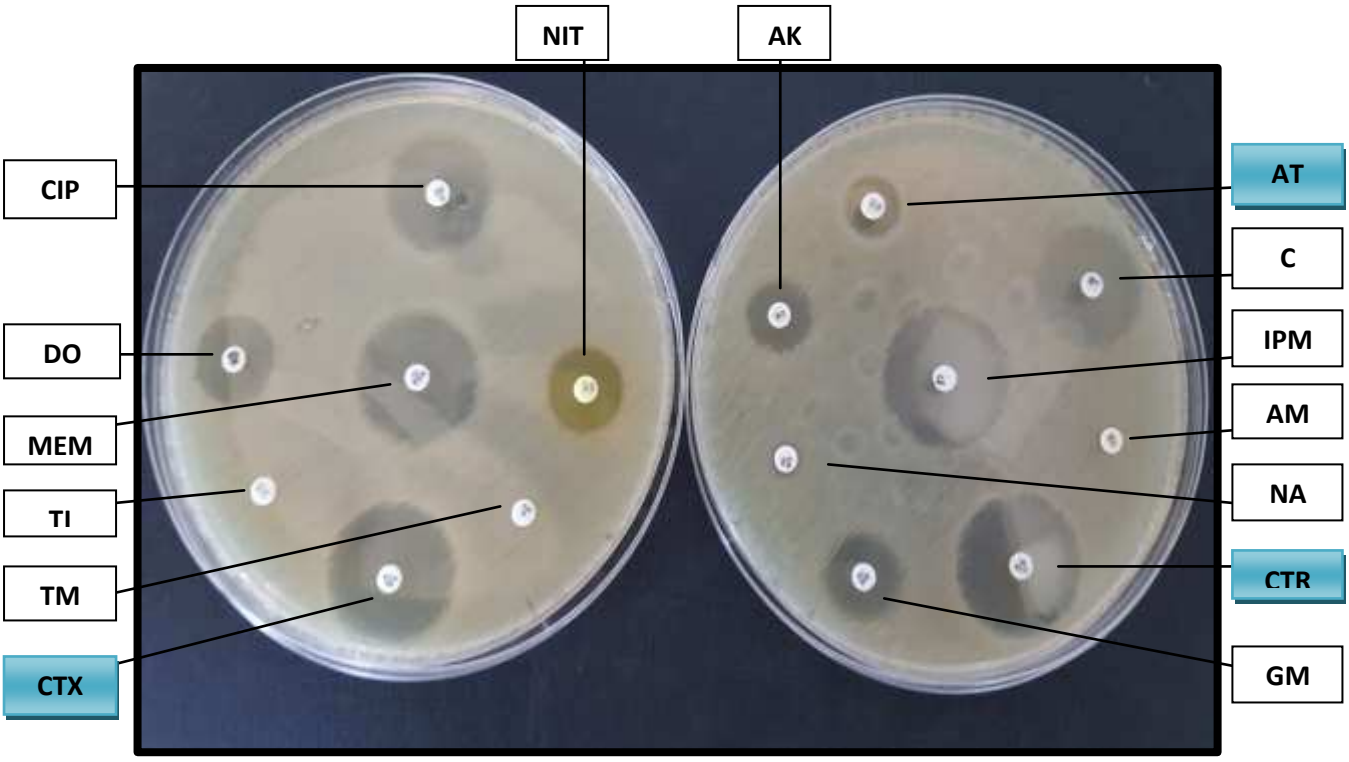
ED عزلة E.coli معزولة من الإسهال. 15m دقيقة. S:حساسة للمضادة

في الشكل (4-11) A,B,C يظهر أقطار مناطق التثبيط لعزلات بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم قبل وبعد التشعيع إذ ظهر تأثير أشعة كاما في وقت التعرض الأول (10) دقائق من خلال زيادة في أقطار مناطق التثبيط لمضادات Cefotaxime وCeftriaxone و Aztreonam بعد ما كانت مقاومة لها قبل التشعيع أصبحت البكتريا حساسة لها بعد التشعيع ، وحيث حصلت زيادة في أقطار المضادات الحيوية التي كانت البكتريا حساسة لها قبل التعرض لأشعة كاما، أما المضادات Ampicillin و Ticarcillin وTrimethoprim وNalidixic acid فبقيت مقاومة، أما بوقت التعرض الثاني (15) دقيقة فقد أصبحت البكتريا أكثر استجابة للمضادات حيث أظهرت حساسيتها لجميع المضادات المستعملة منها Ampicillin و Ticarcillin وTrimethoprim وNalidixic acid التي كانت مقاومة لهذه المضادات قبل التشعيع ، وكذلك حصلت بهذا الوقت زيادة واضحة في اقطار الحساسية المضادات جميعها مقارنة بالوقت الأول ، وهذا ربما يعود إلى تعرض بكتريا اشريشيا القولون إلى أشعة كاما الذي يكون تأثيرها واضح على البكتريا من خلال اختلاف استجابة بكتريا اشريشيا القولون للمضادات الحيوية قبل وبعد التشعيع .

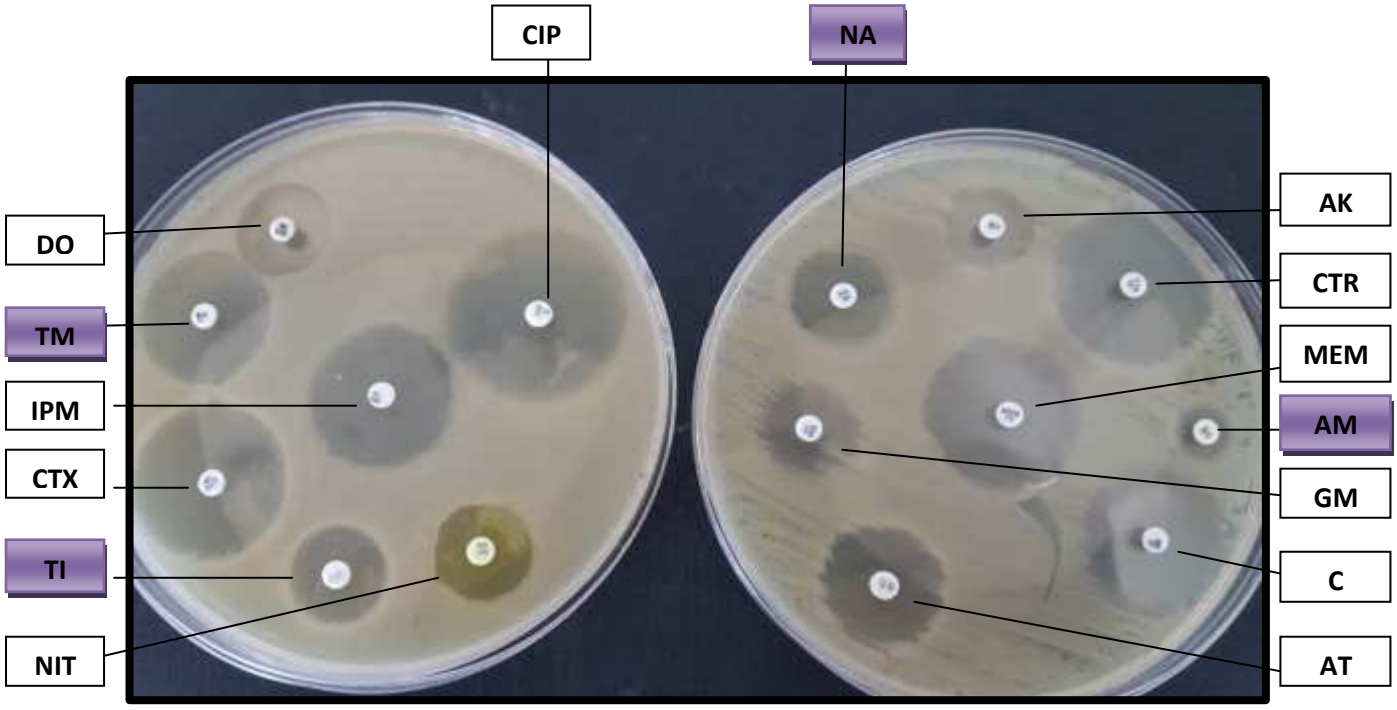


A _ عزلة بكتريا E.coli غير معرضة للأشعة (سيطرة).

: CIP , Amikacin **:AK** Nalidixic acid **:NA** ،Doxycycline **:DO** ، Ampicillin **:AM** **:CTX**، Ceftriaxone **:CTR** ،Aztreonam **:AT** ،Trimethoprim **:TM** ،Ciprofloxacin **: GM** Ticarcillin **:TI** ،Meropenem **:MEM** ، Imipenem **:IPM** ،Cefotaxime Chloramphenicol **: C** ، Nitrofurantoin **:NIT** Gentamycin



B _ عزلة بكتريا E.coli معرضة للأشعة بوقت 10 دقيقة.



C_ عزلة بكتريا E.coli معرضة للأشعة بوقت 15 دقيقة.

شكل 4-11 يظهر تأثير أشعة كاما على مقاومة عزلات E.coli للمضادات قبل وبعد التشعيع .

إذ كان لأشعة كاما تأثيراً واضحاً على استجابة بكتريا الاشريشيا القولون للمضادات الحياتية إذ تزداد حساسيتها لمضادات كلما أزداد وقت التعرض لهذ الأشعة ، لأن أشعة كاما تؤثر في تركيب أو تصنع الانزيمات الخلوية التي تثبط عمل المضادات الحيوية أو في تغيير نفاذية الغشاء الخلوي تجاه المضادات الحيوية مما يؤدي إلى دخول جزيئات المضادات الحيوية إلى داخل الخلية الجرثومية فتصبح حساسة تجاه المضاد الحيوي.

وكانت مجموعة مضادات البيتالاكتام β-lactam هي أكثر تأثراً بأشعة كاما بفعل تأثيرها على إنزيم (Pencillinase) إذ تعمل على تثبيط عمل هذا الإنزيم من خلال تكون الجذور الحرة (OH،H) التي تتفاعل مع الانزيم وتغير طبيعته (Samuni et al., 1980) .

أما مجاميع المضادات الكلايكوسيدية و التتراسايكلين و الكينولينات والمضادات Nitrofuranation وTrimethoprim وChloramphenicol إذ أزدادت أقطار حساسيتهما بعد التشعيع مقارنة بقبل التشعيع وهذا ربما يعود إلى زيادة نفاذية الغشاء الحيوي مما يسهل دخول المضادات إلى داخل الخلية البكتيرية، أو ربما نتيجة تأثر الجين المسؤول عن مقاومة هذه المضادات بأشعة كاما إذ تعمل على إحداث الضرر فيه وبالتالي قد تفقد البكتريا قدرتها على مقاومة هذه المضادات ، كما أن أشعة كاما تعمل على تغير في نفاذية غشاء الخلية الجرثومية . كما ثبت

أيضاً أن الاشعاع المؤين يعمل على تغير جهد الغشاء الخلوي للبكتريا بسبب إعادة ترتيب تركيب الجدار الخلوي مما يؤدي إلى زيادة نفاذية الغشاء للأيونات (Fomenko et al., 1983) .

وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه Al-Sarage (2007) إذ أظهرت عزلات بكتريا E.coli حساسيتها لجميع المضادات المستعملة بعد تعريضها لأشعة الليزر الدايودي، ونتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل إليه الطائي (2004) إذ أظهرت بكتريا Salmonella حساسيتها لبعض المضادات ومقاومتها للبعض الاخر بعد تعرضها لأشعة كاما.

6.4. التحري المظهري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا اشريشيا القولون

Phenotype Detection of Some Virulence Factors for E.coli

1.6.4. تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation

تم التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي من قبل بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم والمعزولة من أخماج الأقنية البولية والمعوية باستعمال طريقة الأنابيب (Tubes Methods) وأظهرت النتائج أن نسبة إنتاج بكتريا E.coli للغشاء الحيوي كانت33 (82.5%) عزلة توزعت على25 (83.33%) عزلة مصدرها الإدرار و 8 (80%) عزلة مصدرها الإسهال ، ويعد إنتاج الغشاء الحيوي من عوامل الضراوة المهمة التي تمتلكها هذه البكتريا فهو يسمح للجراثيم البقاء فترة طويلة في موقع الإصابة (Hanna et al., 2003) تقوم البكتريا بأنتاج الغشاء الحيوي استجابة لمجموعة من العوامل أهمها نقص المغذيات و انخفاض الـpH وتوفير الحماية لها من دفاعات المضيف ويعد الغشاء الحيوي صفة مهمة لاستمرار الإصابة (Sharma et al., 2014). ويعطي إنتاج هذا الغشاء البكتريا الكثير من الخصائص أهمها مقاومة المضادات الحياتية و إمكانية التعبير عن العديد من عوامل الضراوة ومقاومة عملية الالتهام الخلوي من قبل الخلايا العدلة وغيرها من دفاعات المضيف وأن عملية الكشف عن إنتاج الغشاء الحيوي تعتمد على عدة عوامل منها الطريقة المستعملة في الكشف و وظروف الحضن ودرجة الحرارة (Soto et al., 2007).

وهذه النتائج اتفقت مع جاء في دراسة Al-Chalabi وجماعته (2010) إذ شكلت نسبة إنتاج الغشاء الحيوي من بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار (90.9%) ، وتتفق مع دراسة Jameel وجماعته (2015) إذ شكلت نسبة إنتاج الغشاء الحيوي بكتريا E.coli المعزولة من الإسهال (86.7%) و اختلفت مع دراسة AL-Shuwaikh (2015) إذ شكلت نسبة إنتاج الغشاء الحيوي من بكتريا E.coli المعزولة من الإسهال (41.66%) .

4 .2.6. إنتاج البكتريوسين Bacteriocin Production

تم التحري عن قابلية بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم والمعزولة من أخماج الأقنية البولية والمعوية على إنتاج البكتريوسين واستخدمت نفس العزلات كعزلات حساسة ضد العزلات الاخرى ، وأظهرت النتائج أن نسبة بكتريا E.coli المنتجة للبكتريوسين كانت 21 (52.5%) عزلة توزعت على 18(60%) عزلة من الإدرار و 3 (30%) عزلة من الإسهال ، ويعد البكتريوسين مضاداً للبكتريا إذ يعمل على قتل أو تثبيط الأنواع البكتيرية الأخرى القريبة أو المشابهة لها ، أن اختلاف نسب البكتريا المنتجة يعود إلى نفس العزلات المستخدمة في الاختبار قد تكون العزلة متحسسة لنوع معين من البكتريوسين لكن إظهار الفعالية القاتلة يعزى إلى افتقارها للمستقبلات الخاصة بنقله أو قد ينتج لكن بكميات قليلة لا تتمكن من قتل البكتريا الحساسة ، أو قد تتعرض البكتريا إلى طفرات وراثية وبتالي تفقد المستقبلات الخاصة بالبكتريوسين وبتالي تصبح عزلة الاختبار مقاومة ويعمل البكتريوسين على دعم نمو و تكاثر البكتريا في البيئات التي تتواجد بها (Cursino et al., 2002) .

جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع دراسة Ali (2012) إذ شكلت نسبة إنتاج البكتريوسين من قبل E.coli المعزولة من الإدرار (56.7%) وتتفق مع ما توصل إليه Smajs وجماعته (2010) الذي حصل على نسبة (54%) وكما تتفق مع ما جاء في دراسة عبيد (2016) إذ شكلت نسبة البكتريوسين من قبل عزلات E.coli المعزولة من الإسهال (21.42%).

4 .3.6. إنتاج المحفظة Capsule Production

أجري اختبار التحري عن امتلاك عزلات بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم للمحفظة من خلال الفحص المجهري وباستعمال طريقة التصبيغ بصبغة الحبر الهندي، وظهرت الخلايا بشكل عصيات محاطة بهالة، وأظهرت نتائج الفحص المجهري امتلاك 15 (37.5%) عزلة من E.coli للمحفظة توزعت على 11 (36.66%) عزلة معزولة من الإدرار وعلى 4 (40%) عزلة معزولة من الإسهال، تعد المحفظة واحدة من أهم عوامل الضراوة المهمة التي تمتلكها هذه البكتريا ويكون لها دور مهم في إمراضيتها من خلال التصاقها بسطوح الخلايا الطلائية وتقوم بحماية البكتريا من الجهاز المناعي للمضيف مثل مقاومة عملية البلعمة بواسطة خلايا العدلة وتثبيط هجرة البلاعم الكبيرة وبهذا يكون لها دوراً في بقاء البكتريا (Brooks et al., 2007).

وهذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه Aljanaby & Alfaham (2017) إذ بلغت نسبة إنتاج المحفظة في بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال على التوالي (32%، 33.3%).

4.6.4. التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

Detection of Extended Spectrum β-Lactamase Enzymes (ESBLs)

استعملت في هذه الدراسة طريقة الأقراص المتاخمة Disk approximation للتحري عن إنزيمات البيتالاكتمايز واسعة الطيف (ESBLs) وهي من الطرائق الدقيقة والسهلة وتعد النتيجة موجبة عند حدوث أتساع في منطقة التثبيط بين قرص المضاد المركزي Augmentin وبين أقراص المضادات (Cefotaxime ,Ceftriaxone, Aztreonam) وأظهرت بكتريا اشريشيا القولون المحللة للدم قابليتها على إنتاج هذا الإنزيمات إذ بلغت نسبة العزلات المنتجة 22 (55%) توزعت على 14 (46.66 %) عزلة معزولة من الإدرار و8 (80%) عزلة معزولة من الإسهال، وقد يعود سبب انتشار بكتريا E.coli المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف إلى الاستعمال العشوائي وغير الضروري لمضادات السيفالوسبورينات من الجيل الاول والثاني والثالث في حالات عديدة في المعالجة المختلفة بسبب توفر ورخص ثمن هذه المضادات، والاستعمال الخاطئ للمضادات من قبل المريض وبيعها بدون وصفة طبيب من قبل الصيدليات، وهذا أدى إلى قتل العزلات الحساسة فاسحة المجال أمام العزلات المقاومة في التكاثر والانتشار.

توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه Al-salamy (2012) إذ بلغت نسبة إنتاج إنزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف من بكتريا E.coli المعزولة من الإدرار (38.4%) ولا تتفق مع دراسة Al-Hilali (2010) إذ بلغت نسبة إنتاج هذه الإنزيم (13.63%) وكما تتفق مع بنو و عبد الكاظم (2016) إذ بلغت نسبة إنتاج إنزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف من بكتريا E.coli المعزولة من الإسهال (80.51%) ولا تتفق مع دراسة AL-Hilli (2010) الذي حصل على نسبة إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (43.9%) . وأظهرت النتائج الإحصائية لعوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا E.coli قيد الدراسة وجود اختلافات معنوية ما بين هذه العوامل في مصدري العزل عند مستوى احتمالية 0.05 .كما في الجدول (4-12).

جدول 4-12 إعداد ونسب عوامل الضراوة لبكتريا E.coli المعزولة من الإدرار والإسهال.

ت	عامل الضراوة	مصدر عزل بكتريا E.coli المحللة للدم		المجموع الكلي
		الإدرار	الإسهال	
1	الهيمولايسين Haemolysin	30 (39.47 %)	10 (12.5 %)	40 (25.64 %)
2	الغشاء الحيوي Biofilm	25 (83.33 %)	8 (80 %)	33 (82.5 %)
3	البكتريوسين Bacteriocin	18 (60 %)	3 (30 %)	21 (52.5 %)
4	المحفظة Capsule	11 (36.66 %)	4 (40 %)	15 (37.5 %)
5	انزيمات ESBLs	14 (46.66 %)	8 (80 %)	22 (55 %)
	X^2	20.168*	37.492*	49.139*
	P value	0.0005	0	0

*** توجد اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05**

5. الاستنتاجات Conclusions

بالاعتماد على نتائج هذه الدراسة استنتجنا ما يلي :-

1. شكلت بكتريا E.coli أعلى نسبة عزل من عينات الإدرار والإسهال .
2. أثبتت الدراسة أن الإناث أكثر عرضة للإصابة بأخماج الأقنية البولية مقارنة بالذكور ، أما في الأخماج المعوية فكان الذكور هم الأكثر عرضة للإصابة مقارنة بالإناث .
3. اتسمت عزلات E.coli المنتجة لإنزيم الهيمولايسن بقدرتها على تحليل دم الأغنام والإنسان وبفصائله الأربع وكانت فصيلة الدم AB أكثر الفصائل تحللاً.
4. قابلية بكتريا E.coli المعوية والمعزولة من الأطفال التي تكون أعمارهم أقل من سنتين على إنتاج إنزيم الهيمولايسن .
5. أظهرت جميع عزلات بكتريا اشريشيا القولون مقاومة عالية لمضاد Ampicillin وبنفس الوقت كانت جميعها حساسة لمضادات Imipenem و Meropenem و Ciprofloxacin و Nitrofurantoin وتباينت مقاومتها لبقية المضادات الأخرى .
6. ثُبت عملياً امكانية استعمال أشعة كاما (coblet-60) كمصدر لتطفير البكتريا والجرعة (1Gy) والوقت 15 دقيقة هما الأمثل لحدوث الطفرات الوراثية في البكتريا.
7. أثبتت الدراسة أن الطفرات الوراثية التي حدثت في جين hlyA كانت جميعها من نوع طفرات الاستبدال بنوعيها المكافئ والغير المكافئ.
8. كان لأشعة كاما تأثيراً واضحاً على مقاومة بكتريا E. coli للمضادات الحياتية من خلال زيادة نسبة حساسية العزلات اتجاه جميع المضادات قيد الدراسة مظهرياً.

1.5. التوصيات Recommendations

استكمالاً للدراسة والبحث حول كل الجوانب المتعلقة ببكتريا E.coli توصي الدراسة بما يلي :-

1. إتباع طرائق الوقاية الصحية المثلى ونشر الوعي الصحي بين فئات المجتمع والاهتمام بالنظافة العامة والحد من الاستعمال العشوائي للمضادات لتفادي ظهور عزلات أكثر مقاومة للمضادات .
2. إجراء مقارنة جزيئية ما بين بكتريا UPEC و بكتريا DEC من حيث امتلاكهما لعوامل الضراوة المختلفة .
3. استعمال تقنية Real-Time PCR لحساب التعبير الجيني Gene expression لجين hlyA لمعرفة مدى تأثير أشعة كاما على فعاليته قبل وبعد التطفير.
4. التحري جزيئياً عن إنزيم Enterohemolysin التي تمتلكه بكتريا اشريشيا القولون المعوية .
5. ضرورة إجراء العديد من الدراسات لجينات الضراوة التي تمتلكها بكتريا E.coli و تحليل تسلسلات الحمض النووي Sequencing لهذه الجينات من أجل الكشف عن الطفرات الوراثية فيها.

المصادر العربية

القصاب، عبد الجبار عمر والخفاجي ، زهرة محمود (1992) . تأثير الظروف المختلفة على فعالية تثبيط العصيات اللبنية المعوية تجاه البكتريا المعوية المسببة للإسهال . مجلة العلوم الزراعية العراقية. 3 (1) : 18-26.

الطائي، محمد صالح عبد الرحمن.(2004).عزل وتشخيص جرثومة السالمونيلا من عينات سريرية مختلفة من الانسان ودراسة امكانية توليد طفرات بتأثير اشعة كاما في المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية وتلك المسؤولة عن تخليق عوامل النمو.رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل.

المخزومي، مرام جبار محمد رضا.(2010). دراسة أهم مُسببات الإسهال الجرثومية عند الأطفال في مستشفى الزهراء (ع) التعليمي (للولادة والأطفال) في مدينة النجف الأشرف. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة.

المرجاني، محمد فرج.(2011). المضادات الحيوية - المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية. دار دجلة. عمان. الصفحة 1- 330 .

الموسوي، أزهار نوري حسين. (2006). العزل والتثبيت الوراثي للخمج البكتيري و الفطري في المسالك البولية وعلاقته بمرض السكري بين النساء الحوامل في محافظة القادسية. أطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة القادسية. العراق.

احمد، عامرة علي.(2009). دراسة مقاومة جراثيم Escherichia coli المعزولة من حالات الإسهال عند الأطفال للمضادات الحيوية المختلفة. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة 3 (1): 1991-8941 .

اسماعيل، جميلة راضي و عبد الرضا، حسين علي وعبيد، عدنان حمد .(2009). دراسة لأهم مسببات الاسهال البكتيرية الهوائية في الطفال في محافظة القادسية وحساسيتها لبعض المضادات الحيوية. المجلة الطبية البيطرية العراقية، 33 (1) :1-9.

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

بنو، الهام سعيد و عبد الكاظم، محمد حسن.(2016). دراسة بعض عوامل الضراوة لبكتريا Escherichia coli المعزولة من اغذية حيوانية المصدر وحالات سريرية في محافظة بابل. مجلة كلية التربية الأساسية. 22 (96) : 71-82.

عبيد، هند حسين.(2016). التحري عن انتاج البكتريوسين وتحفيز انتاجه بوساطة مستخلص نبات Brassica rapa.مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية 28(3): 23-248.

منديل، حيدر علي .(2016). التحري عن بعض عوامل الفوعة في جرثومة Escherichia coli الممرضة للمسالك البولية. مجلة جامعة الكوفة للأحياء. 2(3): 35-44.

ياسين، سليدا سعيد.(2014). دراسة إحصائية عن أخماج المجاري البولية في الأطفال دون سن الخامسة في مدينة كركوك. مجلة جامعة كركوك للدراسات العلمية. 9(2) :22-42.

المصادر الإنكليزية

Abbas, A.T.(2015). Detection of Integron CS Class1Type Metallo βeta-Lactamase Gene in Clinical Isolate of Escherichia coli at Thi-Qar , Iraq. Thi-Qar Medical Journal., 9(1):49-55.

Abbott, S. L. (2011). Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition (pp. 639-657). American Society of Microbiology.

Abidi, S. H., Sherwani, S. K., Siddiqui, T. R., Bashir, A., & Kazmi, S. U. (2013). Drug resistance profile and biofilm forming potential of Pseudomonas aeruginosa isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. BMC ophthalmology, 13(1), 57.

Ahmed, A. M., Kawamoto, H., Inouye, K., Hashiwata, Y., Sakaki, M., Seno, M., & Shimamoto, T. (2005). Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7 causing a family outbreak in Japan. Journal of medical microbiology, 54(9), 867-872.

Aitziber,L.C.,Goni, F.M. & Ostalaza, H.(2001). Glycophorin as a receptor for E.coli alpha-haemolysin in erythrocytes. J.Biological Chemistery,276(16) :12513-12519.

Al-Chalabi, R., Al–Ubaidy, A., & Al-Ibadi, M. (2010). Detection of Urovirulence Genes (eae, E-*hly,* α-hly) of Uropathogenic Escherichia coli by Specific PCR. Journal of Biotechnology Research Center, 4(1), 44-54.

Aldick, T., Bielaszewska, M., Zhang, W., Brockmeyer, J., Schmidt, H., Friedrich, A.W., Kim, K.M., Schmidt, M.A. & Karch, H. (2007). Hemolysin from shiga toxin- negativeO26 strains injures microvascular endothelium. Microbes Infect. 9: 282-290.

Al-Dulaimi, T.H., Aziz, H.W., Al-Marzoqi, A.H., Al-Aziz, S.A., & Mohsin, S.A.(2015). Molecular Characterization and Antibiotic Susceptibility of Diarrheagenic Escherichia coli from Children. Medical Journal of Babylon., 12(2):541-550.

Al-Gosha'ah, **F. A. S.(2005).**Studying the Effect of Inhibitory Substances Produced by Saccharomyces boulardii on Virulence Factors Of Some Enteric Bacteria. Degree of Doctorate College of Science Council, Al-Mustansiriyah.

Al-Hamdani, **M.A & Abas, I.J.(2013).** Study of plasmid profile and susceptibility patterns of Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection in Basra. J .Thi-Qar.Sci.4(1).31-39.

Al-Hasnawi, A.A.(2014). Comparison of biochemical tests , Api system , Vitek 2 system and PCR of the enteropathogenic bacteria isolated from children with persistent diarrhea. And the occurrence of virulence factors and antibiotic resistance in the isolates. M.Sc. Thesis. College of Science, University of Kufa.

Alhason, H.F.A.A.(2010). Characterization and Partial Purification of Hemolysin Produced by Uropathogenic Escherichia coli. M.Sc. Thesis. College of Medicine, Babylon University.

Al-Hilali , S.A.M. (2010) . Occurrence and molecular characterization of enteropathogenic Escherichia coli (EPCE) serotypes isolated from children with diarrhea in Najaf .M.Sc. Thesis. College of Science, University of Kufa.

Al-Hilli, Z.B.(2010). Dissemination of β-lactamases in Eschericha coli and Klebsiella spp. isolated from Merjan teaching hospital in Hilla city. MSc. Thesis. College of Science , University of Kufa.

Ali, C. I., Mahmood, A. R., Jafar , N. A . & Khorsheed ,S .(2009). Prevalence of enteropathogenic diarrhea in Children up to 2 years in Kirkuk province. Tikrit Medical Journal., 15(2):124-131.

Ali, J.A. (2012). Hemolysin and Bacteriocin Production of E.coli Isolated from Urinary tract infection. J. of Babylon University. pure and Applied Scinces., 20(5): 1448-1451.

Aljanaby, A.,& Alfaham, Q. (2017). Phenotypic and Molecular Characterization of some Virulence Factors in Multidrug Resistance Escherichia coli Isolated from Different Clinical Infections in Iraq. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology,.7: 65-78.

Al-Jubouri , A . S., Mahmood, Y. A.R. & AL-Salihi. S. Sh.(2012). Pathogenicity of Klebsiella pneumoniae isolated from diarrheal cases among children in Kirkuk city. Tikrit Journal of Pure Science .17 (4): 17-25.

AL-karawyi, A. M. A., AL-Jubouri, S. A., & Alasadiy, Y. D. (2014). Molecular detection of AmpC family genes encoding antibiotic resistance among Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection (UTI) in Najaf hospitals. Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences, 4(1):152-161.

Allen, W. J., Phan, G., & Waksman, G. (2012). Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. Current opinion in structural biology, 22(4), 500-506.

Al-Mohana, A. M. (2004). Prevalence and characterization of verotoxin producing Escherichia coli isolated from patients with diarrhea Baghdad and Najaf. Ph.D. Thesis. Al-Mustansiryia University.

AL-Nuimi, A.A.(2013). Molecular detection and production of microcin from Escherichia coli isolated from different clinical samples. M.Sc. Thesis. College of Medicine, Babylon University.

Al-Oebady, M.A.H.,(2017). Identification of E.coli O157:H7 in Intestinal and Urinary Tract Infection in Samawah City. J. of Babylon University/Pure and Applied Sciences.2(25):455-460.

Alrifai, S. B., Alsaadi, A., Mahmood, Y. A., Ali, A. A. & Al-Kaisi, L. A.(2009). Prevalence and etiology of nosocomial diarrhoea in children < 5 years in Tikrit teaching hospital. Eastern Mediterranean Health J., 15(5).

Al-salamy, A.K.(2012). Detection of extended spectrum-beta lactamase enzymes producing E. coli that isolated from urine. Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences., 3(1):55-66.

Al-Sarage, L.S.(2007). Effect of (805)nm Diode Laser on plasmid content and some Characteristics of Locally isolated Escherichia coli and Proteus mirabilis. M.Sc. Thesis. the Institute of Laser For Postgraduate Studies, University of Baghdad.

Al-Sayigh, H. A., Al-Hasson, H. F. A., & Ali, J. A.(2013). Effect of Some Antibiotics on Uropathogenic Escherichia coli and Detection of Some Virulence Factors. Medical J. of Babylon.3(10): 669-676.

AL-Shuwaikh, A. M., Ibrahim, I. A., & Al-Shuwaikh, R. M. (2015). Detection of E. coli and Rotavirus in Diarrhea among Children Under Five Years Old. Iraqi Journal of Biotechnology, 14(1), 85-92.

Al-Sudany, G. A. A. H., Majeed, W. Z., Jabbar, H., & Al-Aubeidi, A. R. A. (2010). Detection of gamma radiation effect induced by Cobelt-60 on Escherichia coli cells. Journal of Al-Nahrain university. Science, 13(3), 129-133.

Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. Science, 301(5629), 105-107.

Anthony D., Amanda J., Eshwar, M., Pavel, D., Wieslaw K., Zuzanna, D. & Stoyanka, R.(2014) . MicrobiologyOpen. Developing an international Pseudomonas aeruginosa reference panel. Black-well Publishing Ltd . 389: 23-46 **.**

Anvarinejad, M., Farshad, S., Alborzi, A., Ranjbar, R., Giammanco, G. M., & Japoni, A. (2011). Integron and genotype patterns of quinolones-resistant uropathogenic Escherichia coli. African Journal of Microbiology Research, 5(22), 3736-3770.

Atiyeh, B.S., Costagliola, M., Hayek, S.N. & Dibo S.A. (2007). Trends in Radiation Sterilization of Health Care Products :review of the literature". Burns : journal of the International Society for Burn Injuries 33 (2): 139-148.

Atlas, R., Parks, L., & Brown, A. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology., 1st ed. Mosby. USA.

Badouei, M. A., Morabito, S., Najafifar, A., & Mazandarani, E. (2016). Molecular characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli hemolysin gene (EHEC-hlyA)-harboring isolates from cattle reveals a diverse origin and hybrid diarrheagenic strains. Infection, Genetics and Evolution, 39, 342-348.

Barber, A. E., Norton, J. P., Spivak, A. M. & Mulvey, M. A. (2013). Urinary tract infections: current and emerging management strategies. Clin Infect Dis 57: 719–724.

Batchoun, R.G.; Swedan, S.F. and Shurman, A.M. (2009). Extended spectrum β-lactamases among Gram-negative bacterial isolates from clinical specimens in three major hospitals in Northern Jordan . J. Micro. Res. Article, ID 513874.

Bennett, W.E. (2009). Enteric infections and diagnostic testing. Curr.Opin. Gastrointerol. 25 (1): 1-7.

Benson, H.J.(2002). Microbiological application : Laboratory manual in general microbiology, 8th ed. McGraw –Hill Co., Inc., New York.

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

Bischoff, C., Luthy, J., Altwegg, M. & Baggi, F. (2005) . Rapid detection of DEC by real time PCR . J. Microbiol. Meth. 61, 335-341 .

Black, R. E., Cousens, S., Johnson, H. L., Lawn, J. E., Rudan, I., Bassani, D. G., ... & Eisele, T. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. The lancet, 375(9730), 1969-1987**.**

Blake, K.L.; Randall, C.P. and O'Neill, A.J. (2011). In vitro studies indicate a high resistance potential for the lantibiotic nisin in Staphylococcus aureus and define a genetic basis for nisin

resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55(5): 2362–2368.

Blake, K.L.; Randall, C.P. and O'Neill, A.J. (2011). In vitro studies indicate a high resistance potential for the antibiotic nosing in Staphylococcus aureus and define a genetic basis for nisin resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55(5): 2362–2368.

Blanco, J., Blanco, M., Gonzalez, E. A., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Garabal, J. I., & Jansen, W. H. (1993). Serotypes and colonization factors of enterotoxigenic Escherichia coli isolated in various countries. European journal of epidemiology, 9(5), 489-496.

Block, M. G., & Ouellette, A. (2012). Genetic identification of eleven aquatic bacteria using the 16S rDNA gene. Journal of Research Across the Disciplines, 1-46.

Boehm, D. F., Welch, R. A., & Snyder, I. S. (1990). Domains of Escherichia coli hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. Infection and immunity, 58(6), 1959-1964.

Boundless.(2014). Type of plasmid and their biological significance. Boundless microbiology.

Braun, V., & M. Braun.(2002). Iron transport and signaling in Escherichia coli. FEBS Lett. 529(1) : 78–85.

Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2004). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol.2, The Proteobacteria. Part B,The Gammaproteobacteria. Springer:610.

Brooks, G., Butel, J., Carroll, K. & Morse, S. (2007). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. McGraw-Hill. NewYork. U.S.A.

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S. & Morse, S.A. (2010). Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 25thed. McGraw - Hill. New York.

Brooks, E., Brooks, G., Butel, J. & Morse, S. (2004). Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 21sted. Appleton and Lange. California. USA.

Brooks, M., Adelberg , E.A., Brooks , G.F., Butel, J.S. & Morse, S.A. (2007). Medical Microbiology. 1.th ed . MC Graw-Hill company, New yourk.

Brooks, Melnick & delberg's .(2016). Medical Microbiology .27(Ed). American LANGE;470.

Brouwer, M.S.M., Bossers, A., Harders, F., Essen-Zandbergen, A.V., Mevius, D.J. & Smith, H.E. (2014). Complete genome of IncI1plasmids extended spectrum beta-lactamase genes . J. ASM. 2(4): 859-873 .

Brown , T.A.(2010). Vectors for Gene cloning plasmid and Bacteriophage " Gene cloning and DNA Analysis An Introduction. (6th.ed). Wiley-Blackewll.

Brown, A. (2007). Benson`s Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology. 10th ed. McGraw-Hill comp. Inc. USA., p. 102-263.

Budič, M., Rijavec, M., Petkovšek, Ž., & Žgur-Bertok, D. (2011). Escherichia coli bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. PLoS One, 6(12), e28769.

Burgos, Y.; & Beutin, L. (2010). Common origin of plasmid encoded alpha-hemolysin genes in Escherichia coli., BMC Microb.10:193.

Cabral, J. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. Int. J. Environ. Res. Public Health. 7:3657-3703.

Carpenter, P.L. (1977). Microbiology. 4th ed. W.B. Saunders Company, London.

Carrey, S., Copeland, M.F., Scotte, R., Tuson, H.H. & Weibel D.B.(2013). Flagellum density regulations Proteus mirabilis Swarmer Cell Notility in viscous environments. J.Bacteriol 195(2):368-377.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (2012). National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Escherichia coli. Enter for Disease Dynamics, Economica &Polisy,2015.

Chamberlain, N. (2009). Medical Microbiology. McGraw Hill companies, Sydney. Tornoto. p: 341-347.

Cheesbrough, M. (2006). District Laboratory Practice in Tropical Countries part 22nd ed. USA. Pp; 225-235.

Chen, J. M., Stenson, P. D., Cooper, D. N., & Férec, C. (2005). A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. Human genetics, 117(5), 411-427.

Chess, T.(2012). Microb.18thedition.McGrowHill.United States**.**

Chirinos, R. R., Vizeu, D. M., Destro, M. T., Franco, B. D., & Landgraf, M. (2002). Inactivation of Escherichia coli O157: H7 in hamburgers by gamma irradiation. Brazilian Journal of Microbiology, 33(1), 53-56.

Chuma, T., Miyasako, D., Dahshan, H., Takayama, T., Nakamoto, Y., Shahada, F., ... & Okamoto, K. (2013). Chronological change of resistance to β-lactams in Salmonella enterica serovar Infantis isolated from broilers in Japan. Frontiers in microbiology, 4. :113. 10.3389/ fmicb**.** 2013.00113.

Chung, A., Arianayagam, M., & Rashid, P. (2010) . Bacterial cystitis in women. Aust. Fam. Physician. 39: 295-298.

Clarke, S. C., haigh, R. D., Freestone, P. P. & Williams, P. H. (2003) . Virulence of enteropathogenic Escherichia coli, a global pathogen. Clin.Microbiol. Rev. 16 (3) : 365-378 .

Clavijo, A. P., Bai, J. & Gomez-Duarte, O. G. (2010). The Longus type IV pilus of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) mediates bacterial self-aggregation and protection from antimicrobial agents . J. Microb. pathog. 48 (6) : 230–238.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute .(2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-second information al supplement M100-S24. 34 (1): 58-172.

Coggle, J.E. (1973). Biological effect of radiation. Wykeham Publication Ltd., London.

Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. & Falkinham, J. O. (2004). Microbiological Method.8thed., P.76-287. Arnold Amember of The Hodder Headline Group.London.

Costa, E. V., da Cruz, P. E. O., de Lourenço, C. C., de Souza Moraes, V. R., de Lima Nogueira, P. C., & Salvador, M. J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of Annona salzmannii A. DC. (Annonaceae). Natural product research, 27(11), 1002-1006.

Coumes-Florens, **S., Brochier-Armanet, C., Guiseppi, A., Denizot, F. & Foglino, M. (2011).** A new highly conserved antibiotic sensing resistance pathway in Firmicutes involves an ABC transporter interplaying with a signal transduction system. PLoS one, 6(1): 151-159.

Cursino, L., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. Brazilian Journal of Microbiology, 33(3),:185-195.

Daini, O. A., Adegboyega, H. O., Odufuwa, K. T. & Ogbolu, D. O.(2011) . Incidence of multidrug resistance R- plasmids among Escherichia coli causing urinary tract infections : A case study from Nigeria . British J. App. Scien. Tech .,1(4):204-210 .

Dalhoff, A., Nasu, T. & Okamoto, K. (2003). Beta-lactamase stability of faropenem. Chemotherapy. Sep. 49 (5): 36-229.

David, Š., Micenková, L., Šmarda, J., Vrba, M., Ševčíková, A., Vališová, Z., & Woznicová, V. (2010). Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal Escherichia coli: colicin E1 is a potential virulence factor. BMC microbiology, 10(1), 270-288.

Dhakal ,B . K. & Mulvey . M . A.(2012). The UPEC Pore-Forming Toxin α-Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory, and Survival Pathways. Cell Host & Microbe,11(1):58-69.

Drake, J.W. (1970). The molecular basis of mutation. Hotden-Day, Inc., U.S.A.

DuPont, H. L. (2009). Clinical practice. Bacterial diarrhea. N Engl J. Med. 361: 1560-1569.

Ebraheem, A. A., & Alwendawi, S. A. (2015). Screening for in Vitro Biofilm Formation Ability of Locally Isolated Uropathogenic Escherichia coli (UPEC). Iraqi Journal of Science, 56(2B), 1310-1314.

Ehmann, D. E., & Lahiri, S. D. (2014). Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase/DNA gyrase. Current opinion in pharmacology, 18, 76-83.

Ellen, S., Soo-Young, K., Seong, G. & Kenneth, S. (2008). Newer β-lactamases: Clin Laboratory Implicati. 30(11):79-85.

Enayat, K., Sohili, F., Salimi, H., Soltan, D. & Mohammed, M.(2011).Frequency, antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of Escherichia coli pathotypees obtained from children with acute diaeehea. Medical Research .J. 4(1): 23-28.

Evrard, B., Balestrino, D., Dosgilbert, A., Bouya-Gachancard, J. L., Charbonnel, N., Forestier, C., & Tridon, A. (2010). Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and Klebsiella pneumoniae. Infection and immunity, 78(1), 210-219.

Fabrega, A., Madurga, S., Giralt, E. & Vila, J. (2009) . Mechanism of action of and resistance to quinolones . J. Soc. App. Mic. Bla. 2(1): 40-61.

Feng, P., Weagant, S. D., & Jinneman, K. (2014). BAM: diarrheagenic Escherichia coli**.**

Fomenko, B. S., Dovgii, I. E., & Akoev, I. G. (1983). The effect of ionizing radiation on tryptophan fluorescence of thymocyte and erythrocyte plasma membranes. International J. of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine, 44(3), 307-311.

Forbes, B. A., Daniel, F. S. & Alice, S. W. (2007). Bailey and scott's diagnostic microbiology.12th ed. Mosby Elsevier company. USA.

Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2002). Diagnostic microbiology. Bailey& Scott1s Diagnostic Microbiology, 11(1), 11-14.

Foster, R.T. (2008). Uncomplicated Urinary tract infection in women. Obstet. Ggnecol. Clin North Am.,35(2):235–248.

Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R. & Staley, J. R. (2005) . Bergey's Manual of systematic bacteriology, the proteobacteria , part B : the gamma proteobacteria 2nd ed. New York , Springer . 2 :607-624 .

Gates, R.H. (2003). Infectious disease screts. 2nd ed. Hanley&Belfus, United States. PP. 291-306.

Gerdes, K., Rasmussen, P. B., & Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 83(10), 3116-3120.

Geser, N., Stephan, R. & Hachler, H. (2012). Occurrence and characteristics of extendedspectrum ß-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk . BMC Veterin. Res. 8 (21) : 1 - 9 .

Gillespie, S. H. & Hawkey, P. M. (2006) . Principles and practice of clinical bacteriology 2nd. John Wiley and Sons Ltd. p.347-356.

Goldman, E. & Lorrence, H. G.(2009). Practicl Handbook of microbiology. 2scd Ed. Printed in the United States of America.

Goni, F. M., & Ostolaza, H. (1998). E.coli a-hemolysin: a membrane-active protein toxin. Brazilian journal of medical and biological research, 31(8), 1019-1034.

Gordon, D. M., & O'Brien, C. L. (2006). Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in Escherichia coli. Microbiology, 152(11), 3239-3244**.**

Greenwood, D. (Ed.). (2012). Medical Microbiology, With Studentconsult online access, 18: Medical Microbiology. Elsevier Health Sciences.

Guilfoile, G. (2007). Deadly disease and epidemics Antibiotic-Resistant Bacteria. Chelser House publisher, World Health organization. p:10-119.

Gupte, S. (2010). The Short Textbook of Medical Microbiology (Including Parasitology). 10th ed . India .p. 486.

Hacker, J., & Hughes, C. (1985). Genetics of Escherichia coli hemolysin. Current topics of microbiology and immunology, 118, 139-62.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Molecular microbiology, 23(6), 1089-1097.

Hadi, Z.J.(2008). Detection of extended-spectrum beta-lactamases of Escherichia coli and Klebsiella spp. isolated from patients with significant bacteriuria in Najaf. M.Sc. Thesis, College of Medicine. Kufa University.

Hall, M. M., Finnoff, J. T., & Smith, J. (2011). Musculoskeletal complications of fluoroquinolones: guidelines and precautions for usage in the athletic population. PM&R, 3(2), 132-142.

Hamedi, M., Japoni, A., Vazin, A., Davarpanah, M. A., Alborzi, A., & Rafaatpour, N. (2009). Multidrug-resistant bacteria isolated from intensive-care-unit patient samples. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 13(2), 118-122.

Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, C., Hamida, J. B., & Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. Bmc Microbiology, 10(1), 22.

Han, J. S., Jang, I.Y., Ryu, H.S. & Kim, W.Y.(2010). Similarity with the Yersinia pestis Plasmid PCRY and Integrative Conjugative Elements. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., pp. 401-406.

Hanna, A., Berg, M., Stout, V. & Razatos, A. (2003). Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic Escherichia coli. Applied Environmental Microbiology, 69 (8), pp: 4474-4481.

Hartman, A. B., Essiet, I. I., Isenbarger, D. W., & Lindler, L. E. (2003). Epidemiology of tetracycline resistance determinants in Shigella spp .and enteroinvasive Escherichia coli: characterization and dissemination of tet (A)-1. Journal of clinical microbiology, 41(3), 1023-1032.

Harvey, R., Champe, P. ; & Fisher, B. (2007). Lippincott's illustrated reviews: Microbiology. 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins:112.

Hassan, A. Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 15(4), 305-311.

Hassan, J. S. (2015). Antimicrobial Resistance Patterns of Escherichia Coli O157: H7 Isolated from Stool Sample of Children. Iraqi Journal of Medical Sciences, 13(3),259-264.

Hawkey, P. & Munday, C. (2004). Multiple resistance in Gram-negative bacteria. Lippincott Williams and Wilkins. Rev. Med. Microbiol. 15(2),51-61.

Heaton, J.C., & Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere . J. Appl. Microbiol. 104 (3): 613–626.

Heijer, C. D. J., Donker, G. A., Maes, J., & Stobberingh, E. E. (2010). Antibiotic susceptibility of unselected uropathogenic Escherichia coli from female Dutch general practice patients: a comparison of two surveys with a 5 year interval. Journal of antimicrobial chemotherapy, 65(10), 2128-2133.

Hitchins, A. D., Feng, P., Watkins, W. D., Rippey, S. R., & Chandler, L. A. (1998). Escherichia coli and the coliform bacteria in: U.S. Food and Drug Adiminstration (FDA) Bacteriological Analytical Manual, 8th ed ., Chapter4. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. Washington, U.S.A.

Huang, C. J., Lin, H., & Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 39(3), 383-399.

Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Crowley, J. R., Heuser, J., ... & Hultgren, S. J. (2013). Escherichia coli biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. MBio, 4(5), e00645-13.

Hussein, J.M., Jar-Allah, E. & Almohana, A.(2012). Survey of Antibiotic susceptibility of Escherichia coli Isolated from Patient with Significant Bacteriurea. Journal of Babylon University. pure and Applied Scinces., 22(1):267-278.

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

Ibrahim, I.AJ., Al- Shuwaikh, R.M. & Tawfeeq, M.S.(2015). Pathogenicity Study of a Number of Gram- Negative Bacilli Isolated from Clinical Samples. Diyala Journal for Pure Science.,11(4):48-57.

Jacob, J. (2015). beta-Lactamases and beta-lactam resistance in Escherichia coli. Antimicrobial agents and chemotherapy, 28(5), 703-705.

Jameel, Z.J., Al-Assie, A.H. & Badawy, A.S.(2015). Isolation and characterization of enteroaggregative Escherichia coli among the causes of bacterial diarrhea in children. Tikrit Journal of Pure Science., 20(4):30-37.

Jensen , C., Ethelberg, S., Olesen, B., Schiellerup, P., Olsen, K.E.P., Scheutz, F., Nelson, E.M., Neimann, J., Hogh, B., Gerner-Smidth, P., Molbak, K. & Krogfelt, K.A.(2007). Attaching and effacing Escherichia coli strain isolated from Danish children: Clinical significance and microbiological characteristics .Clin. Microbiol. Infect., 13(9):862-872 .

Jiang, M. J., Zhao, S. P., & Li, J. M. (2012). Resistance of-lactamaseproducing Klebsiella pneumoniae to Imipenem with Ompk36 loss. African Journal of Microbiology Research, 6(6), 1312-1317.

Johnson J. R. (1991) . Virulance Facters in Escherichia coli urinary tract infection . Cli. Microbiol . 4(1):80-128.

Jürgens, D., özal, M. & Kituni, N. (2002). Production and characterization of E.coli enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocytes membrane.Cell Biology. 26(2):175-186.

Kadhim, S.R., Hassan, A. M. & Shoukat, D.S.(2011). Antimicrobial susceptibility patterns against Escherichia coli and prevalence of extended–spectrum β-lactamases. Mustansiriya Medical Journal., 10(1):47-50.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic Escherichia coli. Nature reviews. Microbiology, 2(2), 123-140.

Kappke, J., Silva, E. R. D., Schelin, H. R., Paschuk, S. A., Pashchuk, A., Oliveira, A. D., ... & Souza, J. C. D. (2005). Evaluation of Escherichia coli cells damages induced by ultraviolet and proton beam radiation. Brazilian journal of physics, 35(3B), 805-807.

Katouli, M. (2010). Population structure of gut Escherichia coli tand its role in development of extraintestinal infections. Iranian Journal of Microbiology. 2(2): 59-72.

Katzung, B.G.(2001). "Basic & Clinical Pharmacology".8th ed.Lange Medical Books/ McGraw Hill.NewYork.p:222.

Kaufman, D., & Fairchild, K. D. (2004). Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. Clinical microbiology reviews, 17(3), 638-680.

Kaur, P., Chakraborti, A. & Asea, A.(2010). Enteroaggregative E.coli : an emerging enteric food borne pathogen. Interdiscipl. Perspect. Infect. Dis.5(2): 1-10.

Kawamura-Sato, K., Yoshida, R., Shibayama, K., & Ohta, M. (2010). Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance, and phylogenetic background of uropathogenic Escherichia coli strains isolated in Japan. Japanese journal of infectious diseases, 63(2), 113-115.

Kaye, K.S., Gold, H.S., Schwaber, M.J., Venkataraman, L., Qi, Y., De Girolami, P. C., Samore, M. H., Anderson, G., Rasheed, J. K. & Tenover, F. C. (2004). variety of beta-lactamases produced by amoxicillin- clavulanate resistant Escherichia coli isolated in the northeastern United States . Antimicrob. Agents Chemoth. 48 (5): 1520-1525 .

Kayser, F.H. ; Bienz, K.A. ; Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2005). Medical Microbiology . 9th. ed. Thieme Stuttgart . New York .

Khan, E. A., Reinhard, E., Fleming, R. W., & Bülthoff, H. H. (2006). Image-based material editing. ACM Transactions on Graphics (TOG), 25(3), 654-663.

Khan, M. H., Shah, S. H., Sarwar, G., Anwar, S., Bashir, G., Gul, N. & Beu, M. J.(2004). Factor effecting the frequency of infantile diarrhea. Gom. J. Med. Sci. 2 (1):6-8.

Kolawole, A. S., Kolawole, O. M., Kandaki-Olukemi, Y. T., Babatunde, S. K., Durowade, K. A., & Kolawole, C. F. (2010). Prevalence of urinary tract infections (UTI) among patients attending Dalhatu Araf Specialist Hospital, Lafia, Nasarawa state, Nigeria.

International journal of medicine and medical sciences, 1(5),163-167.

Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., & Harnisz, M. (2013). Antibiotic resistant Escherichia coli in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. Ecotoxicology and environmental safety, 91, 96-102.

Kosek, M., Bern, C., & Guerrant, R. L. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bulletin of the World Health Organization, 81(3), 197-204.

Kumar, N., Gupta, N., & Kishore, J. (2012). Kuppuswamy's socioeconomic scale: updating income ranges for the year 2012.

Kumer, S.(2016). Essentials of Microbiology.1E. The Health Sciences Publisher. New Delhi.

Lane, D., & Takhar, S. (2011). Diagnosis & management of urinary tract infection and pyelonephritis. Emergency medicine clinics of North America., 29(3):539-552.

Lane, M. C., Simms, A. N., & Mobley, H. L. (2007). Complex interplay between type1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of Uropathogenic Escherichia coli. Journal of bacteriology, 189(15), 5523-5533.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. Journal of visualized experiments: JoVE, (62).1- 6.

Levesque, R.(2007). SPSS Programming and Data Management , 4th ed . Chicago , pp:522**.**

Linhares, I., Raposo, T., Rodrigues, A., & Almeida, A. (2013). Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). BMC infectious diseases, 13(1), 19.

Lucia, M.L., Sandra, H., Antonio, J. Maria, A., Jone, M. & Isabel, C. (2005). Heterogeneity among strains of diffusely adherent E.coli isolate in Brazil. J.Clin. Microbiol. 43(4): 1968-1972.

Lukasiewicz, J., Jachymek, **W., Niedziela, T., Kenne, L. & Lugowski, C. (2010).** Structural analysis of the lipid A isolated from Hafnia alvei 32 and PCM 1192 lipopolysaccharides. J. of Lipid Research. 51(3), 564-574.

MacFaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3nd ed. the Williams and Wilkins. London.

Magesh, H., Kamatchi, C., Vaidyanathan, R., & Sumathi, G. (2011). Identification of plasmid-mediated quinolone resistance genes qnrA1, qnrB1 and aac (6')-1b-cr in a multiple drug-resistant isolate of Klebsiella pneumoniae from Chennai. Indian journal of medical microbiology, 29(3), 262.

Mammeri, H., & Nordmann, P. (2007). Extended-spectrum cephalosporinases in Enterobacteriaceae. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents), 6(1), 71-82.

Maniatis, T., Fritsch, E., & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning ; Alaboratory Manual. Cold spring Harbour Laboratory. NewYork.

Manu, D., Lupan, I., & Popescu, O. (2011). Mechanisms of Pathogenesis and Antibiotics Resistance In Escherichia coli. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 16(2):1-19.

Margarita, M., Arenas-Hernández, P., Martínez-Laguna, Y. & Torres, A. G.(2012). Clinical implications of Enteroadherent Escherichia coli. Curr. Gastroenterol. Rep. , Springer . 14 (5) : 386-394 .

Marrs, C. F., Zhang, L., Tallman, P., Manning, S. D., Somsel, P., Raz, P., … & Foxman, B. (2002). Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral Escherichia coli. J. of medical microbiology, 51(2), 138-142.

Martin, M., Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clinical microbiology reviews, 13(1), 16-34.

Martínez-Arias, R., Mateu, E., Bertranpetit, J., & Calafell, F. (2001). Profiles of accepted mutation: from neutrality in a pseudogene to disease-causing mutation on its homologous gene. Human genetics, 109(1), 7-10.

Marya, R.K. (2006). Pathophysiology. 1st ed. Author, India. PP. 65-66**.**

Melnyk, A.H., Wong,A. & Kassen,R.(2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. Centre for Advanced Research in Environmental Genomics**,** Department of biology, University of Ottawa, ON, Canada.

Mitchel, R.E. (1976). Ionizing radiation damage in Micrococ cus radiodurans cell wall : release of polysaccharide. Radiat. Res., 66(3): 158-169.

Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tschäpe, H., & Schmidt, M. A. (2007). Identification of unconventional intestinal pathogenic Escherichia coli isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. Applied and environmental microbiology, 73(10), 3380-3390.

Müller, D., Hughes, C. O. L. I. N., & Goebel, W. E. R. N. E. R. (1983). Relationship between plasmid and chromosomal hemolysin determinantsof Escherichia coli. Journal of bacteriology, 153(2), 846-851.

Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. & Yolken, R.H.(1999). Manual Of Clinical Microbiology.(7th)ed. American Society Of Microbiology. Washington, U.S.A.

Muto, T., Matsumoto, Y., Yamada, M., Ishiguro, Y., Kitazume, H., Sasaki, K., & Toba, M. (2008). Outbreaks of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 infections among children with animal contact at a dairy farm in Yokohama City, Japan. Japanese journal of infectious diseases, 61(2), 161-162.

Nanakali, Z. G., & Ahmad, Z. F. (2015). Antibiotic resistance study and detection of virulence gene among Uropathogenic E.coli. Kirkuk University J. Scientific Studies, 10(3), 205-229

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. Clinical microbiology reviews, 11(1), 142-201.

Nester, E., Anderson, D., Roberts, C., Pearsall , N., & Nester, M. (2004). Microbiology.4th.ed.,McGraw-Hill-Comp. Inc.,USA.

Neto, V., Bando, S. Y., Moreira-Filho, C. A., & Girón, J. A. (2003). Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative Escherichia coli O111: H12. Cell. Microbial., 5(8), 533-547**.**

Ngwai, Y. B., Akpotu, M. O., Obidake, R. E., Sounyo, A. A., Onanuga, A., & Origbo, S. O. (2011). Antimicrobial susceptibility of Escherichia coli and other coliforms isolated from urine of asymptomatic students in Bayelsa State, Nigeria. African Journal of Microbiology Research, 5(3), 184-191.

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

Niemirowicz, K., Swiecicka, I., Wilczewska, A. Z., Misztalewska, I., Kalska-Szostko, B., Bienias, K., ... & Car, H. (2014). Gold-

functionalized magnetic nanoparticles restrict growth of Pseudomonas aeruginosa. International J. of nanomedicine, 9, 2217–2224.

Nishi, J., Sheikh, J., Mizuguchi, K., Luisi, B., Burland, V., Boutin, A., Rose, D. J., Blattner, F. R. & Nataro, J. P. (2003). The export of coat protein from enteroaggregative E.coli by a specific ATP binding cassette transporter system. J. Biol. Chem. 278(47): 45680-45689.

Nweze, E. I.(2009). Virulance properties of diarrheagenic E.coli and etiology of diarrhea in infant young children and other age groups Southeast Nigeria. Amer. J. Sci. 4(3): 173-179.

O'Ryan, M., Lucero, Y., O'Ryan-Soriano, M. A., & Ashkenazi, S. (2010). An update on management of severe acute infectious gastroenteritis in children. Expert review of anti-infective therapy, 8(6), 671-682.

Odumosu, B. T., Adeniyi, B. A., & Chandra, R. (2013). Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa from Southwest Nigeria. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, 12(1), 29.

Oermann, C. M., Retsch-Bogart, G. Z., Quittner, A. L., Gibson, R. L., McCoy, K. S., Montgomery, A. B., & Cooper, P. J. (2010). An 18-month study of the safety and efficacy of repeated courses of inhaled aztreonam lysine in cystic fibrosis. Pediatric pulmonology, 45(11), 1121-1134.

Okonko, I., Ijandipe, L., Ilusanya, O., Donbraye-Emmanuel, O. ; Ejembi, J., Udeze, A., Egun, O., Fowotade, A., & Nkang, A. (2009). Incidence of urinary tract infection (UTI) among pregnant women in Ibadan, South-Western Nigeria. African J. Biotech.8 (23):6649-6657.

Oropeza .W., Muller, E., kern , P., Meyemann, R., & Goebel, W . (1989). Synthesis inactivation and Iocalization of extracellular an intracellular Escherichia coli hemoiysin. J. Bacteriol., 171: 12783–2788 .

Ozeki, Y., Kurazono, T., Saito, A., Kishimoto, T., & Yamaguchi, M. (2003). A diffuse outbreak of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 related to the Japanese-style pickles in Saitama, Japan. Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, 77(7), 493-498.

Ozerol, I. H. (2005). The prevaleuce and molecular typing of enterotoxigenic Escherichia coli strains Isolated from diarrheaic stools in Malatya, Turkey. The New Microbiol. Jul; 28(3): 237-436.

Parsot, C. (2005). Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. FEMS microbiology letters, 252(1), 11-18.

Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. The American journal of medicine, 119(6), 20-28.

Pavankumar, A. R.& Sankaran, K.(2008). The need and new tools for surveillance of E.coli pathogens. F. Technol. Biotechnol. 46 (2), 342-355.

Pawlowski, S. W., Warren, C. A. & Guerrant, R.(2009). Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. Amr. Gastro. 136(6): 1874-1886.

Perry, N., Jenkins, C., Cheasty, T. & Wain, J.(2010). Diarrhoeagenic E.coli from routine diagnostic faecal samples in England and Wales. J.Med. Microbiol. 59:870-872.

Phillips, S. L., Person, S., & Jagger, J. (1967). Division delay induced in Escherichia coli by near-ultraviolet radiation. Journal of bacteriology, 94(1), 165-170.

Piatti, G., Mannini, A., Balistreri, M., & Schito, A. (2008). Virulence Factors in urinary Escherichia coli Strains: Phylogenetic Background and Quinolone and Fluoroquinolone Resistance. J. Clin. Microbiol. 46(2): 480-487.

Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. The Lancet infectious diseases, 8(3), 159-166.

Pokharel, M., Sherchand, J. B., Upreti, H. C., Katuwal, A.& Gauchan, P. (2009).A perspective study on the etiology of diarrhea in children less than 12 year of age attending Kanti childrens hospital. J. Nepal. Paediatr. Soc. 29 (1):10-19.

Prescott ,L.M., Harley,J.P., & Klein, D.A.(2005). Microbiology. 6th ed McGraw. Hill companies Inc. New york.

Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (1990). Microbiology. W. M. C. Brown publisher, New York.

Prigent, F.P., Combaret, C. & E. Brombacher (2001). Complex regulatory Network controls initial adhesion and biofilm formation in Escherichia coli. J. Bacteriol.;183(24):7213-7223.

Quiros, Y., Vicente-Vicente, L., Morales, A. I., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2010). An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. Toxicological Sciences, 119(2), 245-256.

Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravanakumar, A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus lactis isolated from marine environment. Adv J Food Sci Technol, 2(2), 138-144.

Ranjbar, R., Karami, A., Farshad, S., Giammanco, G. M., & Mammina, C. (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. The new microbiologica, 37(1), 1-15.

Reddy, K.R. (2010). Microbiology &Parasitology .4th ed. Paras Medical Puplisher. New Delhi.

Reed, J. L. (2005) . Model driven analysis of Escherichia coli metabolism UC San Diego Electronic Thesis and Dissertations . Schoolarship University of california . USA .

Remy, J. M., Tow-Keogh, C. A., McConnell, T. S., Dalton, J. M., & DeVito, J. A. (2012). Activity of delafloxacin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus: resistance selection and characterization. Journal of antimicrobial chemotherapy, 67(12), 2814-2820.

Rezai, **M.S., Salehifar, E., Rafiei, A., Langaee, T., Rafati, M., Shafahi, K. & Eslami, G. (2014) .** Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli among uropathogens of pediatrics in north of iran . Biomed Research International . 23: 4847-4861.

Robert-Dagil, R., O'shea, C., Nykjær, A., Bonvin, A. M., & Kragelund, B. B. (2013). Gentamicin Binds to the Megalin Receptor as a Competitive Inhibitor Using the Common Ligand Binding Motif of Complement Type Repeats insight from the NMR structure of the 10th complement type repeat domain alone and in complex with gentamicin. Journal of Biological Chemistry, 288(6), 4424-4435.

Roesch, P. L., Redford, P., Batchelet, S., Moritz, R. L., Pellett, S., Haugen, B. J., ... & Welch, R. A. (2003). Uropathogenic

Escherichia coli use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. Molecular microbiology, 49(1), 55-67.

Roger, M. & Ibrahim, B. (2012) . Biosurfactants: a sustainabl replacement for chemical surfactants . J. Academic . 34(9): 1597-1605.

Roos, V., & Klemm, P. (2006). Global gene expression profiling of the asymptomatic bacteriuria Escherichia coli strain 83972 in the human urinary tract. Infection and immunity, 74(6), 3565-3575.

Rosenshine, I.(2002). Interaction of enteroaggregative E.coli with host cell. In. stud. Cell. Biochem. 33:21-45.

Russo, T. A., Davidson, B. A., Genagon, S. A., Warholic, N. M., MacDonald, U., Pawlicki, P. D., ... & Knight, P. R. (2005). E. coli virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 289(2), L207-L216.

Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2004). Medical microbiology. McGraw Hill, 4, 370.

Ryan, K., Ray, C. G., Nafees, A., Drew,W. L. & James, P. (2010). Sherris Medical Microbiology.5 th.Ed. Hill publishing company New York.

Saidenberg, A., Guedes, N., Seixas, G., Allgayer, M., Assis, E., Silveira, L., Melville, P., & Benites, N. (2012). Asurvey of Escherichia coli virulence factors in Asymptomatic Free-Ranging Parrots. Inter. Schol. Res. ISRN Veterinary Science. 20(12):1-6.

Sambrook, J. & Russel, D.(2001). Detection of DNA on agarose gel. In:Sambrook J, Russel DW (eds) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 514–518.

Samuni, A., Kalkstein, A. & Czapski, G. (1980). Does oxygen enhance the radiation induced inactivation of penicillinase. Radiat. Res., 82(1): 65-73.

Sanchez, S., Bakas, L., Gratton, E., & Herlax, V. (2011). Alpha Hemolysin Induces an Increase of Erythrocytes Calcium: A Flim 2- Photon Phasor Analysis Approach. Org. Plosone. Argentina. 6:1-9.

Santo, E., Macedo, C., & Marin, J. (2006). Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli from auniversity hospital in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 48:185-188**.**

Santona, S., Diaz, N., Fiori, P. L., Francisco, M., Sidat, M. Cappuccine-lli, P. & Rappelli, P. (2013) . Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic Escherichia coli isolated in industrialized and devel-oping countries . J. Infect. Dev. Ctries . 7 (3) : 214 - 219 .

Sapora, O., Fielden, E.M. & Loverock, P.S. (1977). The application of rapid lysis techniques in radiobiology II. The time course of the repair of DNA fixed damage and single-strand breaks in Escherichia coli mutants. Radiat. Res., 72(3) : 308-316.

Sarika, A.R., Lipton, A. P. & Aishwarya, M.S.(2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of Lactobacillus rhamnosusGP1 under Different Culture Conditions .J. Food Science and Technology.2 (5).291-297.

Sarojamma, V. & Ramakrishna, V.(2011). Prevalence of ESBL-producing Klebsiella pneumonia isolate in Tertiary Cary hospital., Article ID. 318348. 5 page.

Schito, G. (2006). The importance of the development of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Infect. 12(1): 3-8.

Selimovic, B. M., Babic , T., kocic, B., stojanovic, P., Ristic, L. & Dinic, M. (2007) . Bacterial Plasmid . Acta medica Medianae ; 46 (4):61- 62.

Servin, A.L.(2005). Pathogenesis of Afa /Dr diffusely adhering E. coli. Clin. Microbiol. Rev. 18(2):264-292.

Setia, A., Bhandari, S. K., House, J. D., Nyachoti, M. C. & Krause, D. O. (2009). Development and in vitro evaluation of an E.coli probioticabl to inhibit the growth of pathogenic K88 Escherichia. coli . J. Anim. Sci. 5 (4) : 1-24.

Shah, P. (2008). Parenteral Carbapenems. Clin. Microbiol. Infect.14(1): 175-180.

Shaheen, H. I., Messih, I. A., Klena, J. D., Mansour, A., El-Wakkeel, Z., Wierzba, T. F., ... & Rozmajzl, P. J. (2009). Phenotypic and genotypic analysis of enterotoxigenic Escherichia coli in samples obtained from Egyptian children presenting to referral hospitals. Journal of clinical microbiology, 47(1), 189-197.

Shaikh, S. ; Fatima, J. ; Shakil, S. ; Rizvi, S.M.D. &Kamal, M.A. (2015) . Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamase: types, epidemiology and treatment . Saudi J. Biological Sciences . 22: 90-101 .

Shamki, J. A., Al-Charrakh, A. H., & Al-Khafaji, J. K. (2012). Detection of ESBLs in Enteropathogenic E.coli (EPEC) Isolates Associated with Infantile Diarrhea in Kut City. Med. J. Babylon, 9(2), 403-412.

Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S. & Gabrani, R. (2014) . Pseudomonas aeruginosa biofilm : potential therapeutic targets .J. Biologicals . 42(1): 1-7 .

Sharma, S., Bhat, G. & Shenoy, S. (2007). Virulence factors and drug resistance in E.coli isolates from extraintestinal infections. Indian .J. Med. Microbiol. 25(4): 369-373.

Slavchev, G., Pisareva, E., & Markova, N. (2009). Virulence of uropathogenic Escherichia coli . J. Cult. Coll .6 , 3-9.

Šmajs, D., Micenková, L., Šmarda, J., Vrba, M., Ševčíková, A., Vališová, Z., & Woznicová, V. (2010). Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal Escherichia coli: colicin E1 is a potential virulence factor. BMC microbiology, 10(1), 288.

Smith, Y. C., Rasmussen, S. B., Grande, K. K., Conran, R. M., & O'Brien, A. D. (2008). Hemolysin of uropathogenic Escherichia coli evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. Infection and immunity, 76(7), 2978-2990.

Soto, S. M., Smithson, A., Martinez, J. A., Horcajada, J. P., Mensa, J., & Vila, J. (2007). Biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli strains: relationship with prostatitis, urovirulenc factors and antimicrobial resistance. The Journal of urology, 177(1), 365-368.

Stapleton, A. (2003). Urinary tract infections in healthy women. Curr Treat Opt Infect Dis.5:43-51.

Stephen, H.G., & Timothy, D.M. (2010). Antibiotic Resistance protocols, (2nded).Humana press. New York, regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. J.Clin Microbiol., Rew.22:582-610.

Strateva, T. & Yordanov, D. (2009). Pseudomonas aeruginosa-a phenomenon of bacterial resistance . J. Medical Microbiology . 58:1133-1148 .

Stukus, P.E. (1997). Investigative Microbiology A laboratory Manual for General Microbiology. P-439-442.Harcourt Brace &Company.

Suzuki, T., Yamamoto, K., Harashima, H., & Kamiya, H. (2008). Base excision repair enzyme endonuclease III suppresses mutagenesis caused by 8-hydroxy-dGTP. DNA repair, 7(1), 88-94.

Takahashi, S., Kurimura, Y., Hashimoto, J., Uehara, T., Hiyama, Y., Iwasawa, A., ... & Tsukamoto, T. (2013). Antimicrobial susceptibility and penicillin-binding protein 1 and 2 mutations in Neisseria gonorrhoeae isolated from male urethritis in Sapporo, Japan. Journal of Infection and Chemotherapy, 19(1), 50-56.

Tanagho , E. A. & Jack , W.M.(2000). Smith's General Urology . 15th ed., Lange Medical Books, Mc Graw–Hill, Health Profession Divisions. 237- 246 P.

Tanagho, E.A. & Macaninch, J.W. (1995). Smiths General Urology .14th ed. Lange publication.

Tannok, G.W. (2004). Aspecial fondness for lactobacilli . Appl – Environ – Microbiol ., 70(6) : 3189 – 3194 .

Tchaptchet, S. & Hansen, J. (2011). The Yin and Yang of host-commensal mutualism. Gut Microbes.2: 347–352.

Teoule, R., Bert, C. & Bonice L,A. (1977). Thymine fragment damage retained in the DNA polynucleotide chain after Gamma irradiation in aerated solution. II. Radiat. Res., 72(2) : 190-200.

Thomas, L. (2007). Genetic methods for rapid detection of medically important nosocomial bacteria. Faculty of Medicine, Department of Medicine, The University of Sydney, Australia.

Tiba, M., Yano, T., & Leite, D. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 50(5):255-260.

Todar, K. (2002). Pathogenic E.coli. Todars online text book of bacteriology.

Todar, K. (2008). Todar's Textbook of Bacteriology. 1st ed ., Madison and Wisconsin .USA., 1- 6.

Tomita, T., & Kamio, Y. (1997). Molecular biology of the pore-forming cytolysins from Staphylococcus aureus, α-and γ-hemolysins and leukocidin. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 61(4), 565-572.

Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A. & Payne, S. M. (2001). Ton B dependent systems of uropathogenic Escherichia coli: Aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. Infect. Immun. 69 : 6179–6185 .

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2010). Microbial Mechanisms of Pathogenicity. Microbiology: an introduction 10th ed. San Francisco: Ed. Pearson

Trabulsi, L. R., Keller, R., & Gomes, T. A. T. (2002). Typical and Atypical Enteropathogenic Escherichia coli. Emerging infectious diseases, 8(5), 508-513.

Trampuz, A., Piper, K. E., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2006). Effect of gamma irradiation on viability and DNA of Staphylococcus epidermidis and Escherichia coli. Journal of medical microbiology, 55(9), 1271-1275.

Turnidge, J., Bell, J. & Biedenbach, D.J. (2002). Pathogen occurrence and antimicrobial resistance trends among urinary tract infection isolates in the Asia-Western. Int-J-Antimicrob-Agents; .20(1):7-10.

Turton, J. F., Baklan, H., Siu, L. K., Kaufmann, M. E., & Pitt, T. L. (2008). Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in Klebsiella sp. and comparison of isolates within these serotypes. FEMS microbiology letters, 284(2), 247-252.

Usein, C. R., Grigore, L. A., Georgescu, R. M., Bãltoiu, M. C., Condei, M., & Teleman, M. D. (2011). Phylogenetic background and extraintestinal virulence genotypes of Escherichia coli vaginal strains isolated from adult women. Rev Romana Med Lab. 2011; 19 (1): 37, 45.

Vandepitte, J. (2003). World Health Organization. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology.

Vandepitte, J., Verhaegen , J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P. & Heuck,C. C. (2003). Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology. 2nd ed. World Health Organization Geneva. PP. 109-120.

Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., & Varaldo, P. E. (2014). Antibiotic Resistanc Related to Biofilm Formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens, 3(3), 743–758.

Wallace, G. W., Davis, M. A., Semelka, R. C., & Fielding, J. R. (2012). Imaging the pregnant patient with abdominal pain. Abdominal Radiology, 37(5), 849-860.

Wani, S. A., Nabi, A., Fayaz, I., Ahmad, I., Nishikawa, Y., Qureshi, K., ... & Chowdhary, J. (2006). Investigation of diarrhoeic faecal samples for enterotoxigenic, Shiga toxin-producing and typical or

atypical enteropathogenic Escherichia coli in Kashmir, India. FEMS microbiology letters, 261(2), 238-244.

Warsha, A. (2007). Prevalence and genetic location of some resistant dihydrofolate reductase genes in South African Commensal, faecal isolates. Epidemiol. Infect., 115,255-267.

Wassef, M. A., El Sherif, R. H., El Shenoufy, A. E., & Ghaith, D. M.(2010). Phenotypic and genotypic patterns of aminoglycosides resistance in gram negative bacilli . J. Americ. Scien.,6 (9):781-786 .

Waterman, S. R. & Small, P. L. (1996) . Characterization of the acid resistance phenotype and rpoS alleles of shiga like toxin-producing Escherichia coli. Infect. Immun. 64 : 2808–2811.

Weintraub, A. (2007). Enteroaggregative Escherichia coli: epidemiology, virulence and detection. review. J. Med. Microbiol. 56 : 4–8 .

Welch, R. A. (2006). The genus Escherichia. In The prokaryotes(pp. 60-71). Springer New York.

Westwood, M. E., Whiting, P. F., Cooper, J., Watt, I. S., & Kleijnen, J. (2005). Further investigation of confirmed urinary tract infection (UTI) in children under five years: a systematic review. BMC pediatrics, 5(1), 2.

WHO, World Health Organization .(2003). Basic laboratory procedures in bacteria.Annu.Cell Der.Bio1.21:319-346.

Wiles, T. J., & Mulvey M. A. (2013). The RTX pore-forming toxin α-hemolysin of uropathogenic Escherichia coli: progress and perspectives**.** Future Microbiology, 8(1): 73-84.

Wiles, T. J., Kulesus,R. R. & Mulvey, M. A.(2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Exp. Mole. Path. 85(1):11– 19.

Wiles, T., Dhakal, B., Eto, D., & Mulvey, M. (2008a). Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. Mol. Biol. Cell. 19: 1427-1438.

Willshaw, G. A., Cheasty, T., Smith, H. R., O'brien, S. J., & Adak, G. K. (2001). Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) O157 and other VTEC from human infections in England and Wales: 1995-1998. Journal of medical microbiology, 50(2), 135-142.

Wilson, M., McNab, R. & Henderson, B.(2007). Bacterial Disease Mechanisms An introduction to Cellular Microbiology P.39-105. Comberg. University press.

Wistreich, G.A.(2003). Microbiology Laboratory, Fundamentals and Aplications, 2nd ed ., Prentice Hall, Pearson Education, Inc.,New Jersey.

Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyagima, Y., Amano, K. I. & Enomoto, K. (2002). Characterization of enteropathogenic and enteroa-ggregative Escherichia coli Isolated from diarrhoeal outbreaks. J. Clin.Microbiol. 40 (1) : 294-297.

Zervosen, A., Sauvage, E., Frère, J. M., Charlier, P., & Luxen, A. (2012). Development of new drugs for an old target—the penicillin binding proteins. J. Molecules, 17(11), 12478-12505.

Zhang, L. & Foxman, B. (2003). Molecular epidemiology of Escherichia coli mediated urinary tract infections. University of Michigan. 8:235- 244.

Zihler, A., Le Blay, G., De Wouters, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Lehner, A., ... & Stephan, R. (2009). In vitro inhibition activity of different bacteriocin-producing Escherichia coli against Salmonella strains isolated from clinical cases. Letters in applied microbiology, 49(1), 31-38.

Zorn,B.G., Catalan, A., Escudero, J.A. & Dominguez, L.(2005). Genetic basis for dissemination of armA. J. Antimicrob Chemother. 56:583-585.

Zurfluh, K., Glier, M., Hächler, H., & Stephan, R. (2015). Replicon typing of plasmids carrying bla CTX-M-15 among Enterobacteriaceae isolated at the environment, livestock and human interface. Science of the Total Environment, 521, 75-78.

الملاحق Appendix

ملحق (1) استمارة جمع معلومات المرضى .

1- اسم المريض :

2- الجنس:

3 - العمر:

4 - مكان جمع العينة:

5 - نوع العينة :

6 - رقم العينة:

7- تاريخ جمع العينة:

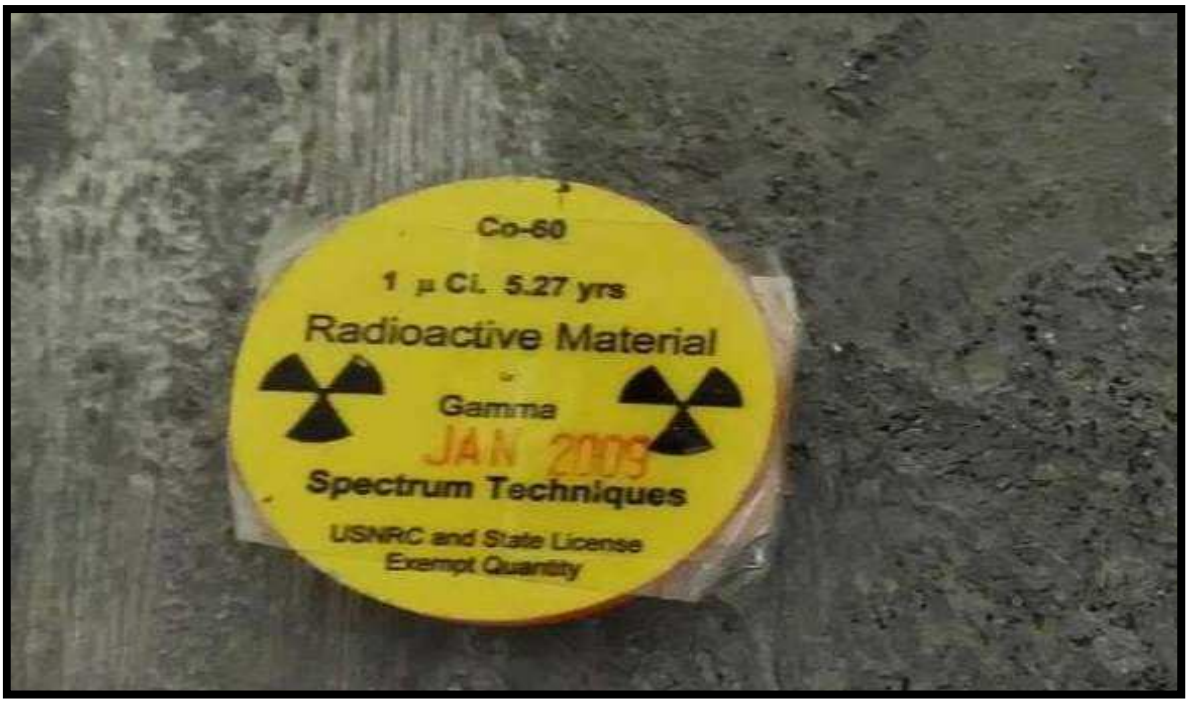
8- فترة رقود المريض في المستشفى :

9- عدد مرات الإصابة بأخماج الأقنية البولية والمعوية:

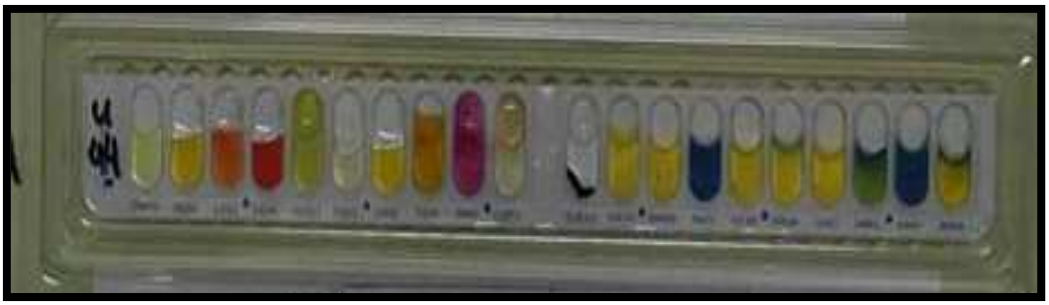
10 – نوع المضادات المتناولة سابقاً:

11- عدد خلايا الدم البيض:

12-عدد كريات الدم الحمراء:



ملحق (2) النظير المشع لأشعة كاما (كوبلت-60) .



A

B

ملحق (3) نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا E.coli على وفق نظامAPI 20 E System

A- يمثل عزلة بكتريا E.coli التي مصدرها الإدرار.

B- يمثل عزلة بكتريا E.coli التي مصدرها الإسهال .

ملحق (4) جدول نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا E. coli باستخدام نظام API 20E .

الاختبار	المادة الاساس	الانزيمات	النتيجة
ONPG	Ortho-nitrophenyl- galactoside	Beta-galactosidase	(+) اصفر
ADH	Arginine	Arginine dehydrolase	(+) اصفر
LDC	Lysine	Lysine decarboxylase	(+) برتقالي
ODC	Ornithine	Ornithine decarboxylase	(-) اصفر
CIT	Sodium Citrate	Citrate Utilization	(-) شاحب اخضر
H2S	Sodium thiosulphate	H2S production	(-) اللون عديم
URE	Urea	Urease	(-) اصفر
TDA	Tryptophane	Tryptophane deaminase	(-) اصفر
IND	Tryptophane	Indol production	(+) حمراء حلقة
VP	Sodium pyruvate	Acetoin production	(-) اللون عديم
GEL	Gelatin	Gelatinase	(-)الصبغة انتشار عدم السوداء
GIU	Glucose	Fermentation	(+) اصفر
MAN	Mannitol	Fermentation	(+) اصفر
INO	Inositol	Fermentation	(-) ازرق
SOR	Sorbitol	Fermentation	(+) اصفر
PHA	Rhamnose	Fermentation	اصفر (+)
SAC	Sucrose	Fermentation	(-) ازرق
NEL	Melibiose	Fermentation	اصفر (+)
AMY	Amygdalin	Fermentation	(-) ازرق
ABA	Arabinose	Fermentation	(+) اصفر

ملحق (5) الصفات السريرية للعينات.

مصدر العزلة	رمز العزلة	العمر	الجنس	عددRBC	عددWBC
الإدرار	EU1	20سنة	♀	6	20
	EU2	ست سنوات	♀	3	30
	EU3	23 سنة	♀	3	4
	EU4	17 سنة	♀	3	10
	EU5	25سنة	♂	5	15
	EU6	10سنوات	♀	6	10
	EU7	55 سنة	♂	20	10
	EU8	29 سنة	♀	7	4
	EU9	5 سنوات	♂	8	12

4	10	♀	34 سنة	EU10	
10	8	♀	13 سنة	EU11	
14	6	♂	19 سنة	EU12	
5	12	♂	3سنوات	EU13	
3	5	♂	40 سنة	EU14	
17	10	♀	سنتين	EU15	
6	2	♂	45 سنة	EU16	
12	3	♂	60سنة	EU17	
20	10	♀	30 سنة	EU18	
18	9	♀	22سنة	EU19	
20	10	♀	40سنة	EU20	
22	13	♀	70سنة	EU21	
4	7	♀	21سنة	EU22	
11	8	♀	25سنة	EU23	
10	6	♂	67سنة	EU24	
25	11	♀	23سنة	EU25	
8	10	♀	42سنة	EU26	
3	6	♂	58 سنة	EU27	
2	1	♂	40سنة	EU28	
10	6	♀	24سنة	EU29	
16	10	♀	28سنة	EU30	
13	20	♂	ثلاث اشهر	ED 1	الإسهال
15	10	♀	23 يوم	ED2	
8	12	♀	سنة وشهر	ED3	
10	10	♂	خمسة أشهر	ED4	
11	7	♂	عشرة أشهر	ED5	
18	9	♂	تسعة أشهر	ED6	
20	30	♀	سنة واحدة	ED7	
8	10	♀	سنة وشهرين	ED8	
5	19	♂	سبعة أشهر	ED9	
8	10	♂	2 أشهر	ED10	

♂ ذكر ♀ أنثى

ملحق (6)استمارة معلومات تسجيل العزلات بكتريا اشريشيا القولون في بنك الجينات

LOCUS Seq1 364 bp DNA linear BCT 19-SEP-2017
DEFINITION Escherichia coli strain IQ.URI-C (hlyA) gene, partial sequence.
ACCESSION Seq1
VERSION
SOURCE Escherichia coli
ORGANISM Escherichia coli
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 364)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Physiological and molecular study of Escherichia coli bacteria hemolytic isolated from urinary and intestinal tract infection and possibility of mutagenesis
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 364)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-SEP-2017) Microbiology, College of Education. University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia, Al-Qadisiyah 00964, Iraq
provided by the submitter.
Bankit Comment: ALT EMAIL:alialnashe995@gmail.com.
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:6.
Bankit Comment: TOTAL # OF SETS:6.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..364
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:562"
/note="[cultured bacterial source]"
BASE COUNT 101 a 72 c 98 g 93 t
ORIGIN
1 ggagttagtg cagcctccag tgcatccctc ataggggccc cgataagcat gctggtgagt
61 gcattaaccg gtacgatatc tggcattctg gaagcatcaa aacaggctat gtttgagcac
121 gttgcagata aattcgctgc tcggatcaat gaatgggaaa aggagcatgg caaaaattat
181 tttgagaatg gctatgacgc aagacatgct gcgtttttag aagactctct gtctttgctt
241 gctgattttt ctcgtcagca tgcagtagaa agagctgtcg caataaccca gcaacattgg
301 gatgagaaga tcggtgaact tgcaggtata acccgtaatg ctgatcgcag tcagagtggt
361 aagg
//
LOCUS Seq2 366 bp DNA linear BCT 19-SEP-2017
DEFINITION Escherichia coli strain IQ.URI-R10 (hlyA) gene, partial sequence.

ACCESSION Seq2
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Escherichia coli
ORGANISM Escherichia coli
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales;
Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 366)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Physiological and molecular study of Escherichia coli bacteria
hemolytic isolated from urinary and intestinal tract infection and
possibility of mutagenesis
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 366)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-SEP-2017) Microbiology, College of Education.
University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia, Al-Qadisiyah
00964, Iraq
provided by the submitter.
Bankit Comment: ALT EMAIL:alialnashe995@gmail.com.
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:6.
Bankit Comment: TOTAL # OF SETS:6.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..366
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:562"
/note="[cultured bacterial source]"
BASE COUNT 103 a 74 c 99 g 90 t
ORIGIN
1 ggagttagtg cagcctccag tgcatccctc ataggggccc cgataagcat gctggtgagt
61 gcattaaccg gtacgatatc tggcattctg gaagcatcaa aacaggctat gtttgagcac
121 gttgcagaga aattcgctgc tcggatcaat gaatgggaaa aggagcatgg caaaaattat
181 tttgagaatg gctatgacgc aagacatgct gcgtttttag aagactctct gtctttgctt
241 gctgattttt ctcgtcagca tgcagtagaa agagcagtcg caataaccca gcaacattgg
301 gatgagaaga tcggtgaact tgcaggcata acccgtaatg ctgatcgcag tcagagtggt
361 aaggca
//
LOCUS Seq3 364 bp DNA linear BCT 19-SEP-2017
DEFINITION Escherichia coli strain IQ.URI-R15 (hlyA) gene, partial sequence.
ACCESSION Seq3
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Escherichia coli
ORGANISM Escherichia coli

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales;
Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 364)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Physiological and molecular study of Escherichia coli bacteria hemolytic isolated from urinary and intestinal tract infection and possibility of mutagenesis
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 364)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-SEP-2017) Microbiology, College of Education. University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia, Al-Qadisiyah 00964, Iraq
provided by the submitter.
Bankit Comment: ALT EMAIL:alialnashe995@gmail.com.
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:6.
Bankit Comment: TOTAL # OF SETS:6.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..364
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:562"
/note="[cultured bacterial source]"
BASE COUNT 103 a 72 c 99 g 90 t
ORIGIN
1 ggagttagtg cagcctccag tgcatccctc ataggggccc cgataagcat gctggtgagt
61 gcattaaccg gtacgatatc tggcattctg gaagcatcaa aacaggctat gtttgagcac
121 gttgcagaga aattcgctgc tcggatcaat gaatgggaaa aggagcatgg caaaaattat
181 tttgagaatg gatatgacgc aagacatgct gcgtttttag aagactctct gtctttgctt
241 gctgattttt ctcgtcagca tgcagtagaa agagcagtcg caataaccca gcaacattgg
301 gatgagaaga tcggtgaact tgcaggcata acccgtaatg ctgatcgcag tcagagtggt
361 aagg
//
LOCUS Seq4 364 bp DNA linear BCT 19-SEP-2017
DEFINITION UNVERIFIED: Escherichia coli strain IQ.ST-C (hlyA) gene, partial sequence.
ACCESSION Seq4
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Escherichia coli
ORGANISM Escherichia coli
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales;
Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 364)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.

TITLE Physiological and molecular study of Escherichia coli bacteria hemolytic isolated from urinary and intestinal tract infection and possibility of mutagenesis
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 364)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-SEP-2017) Microbiology, College of Education. University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia, Al-Qadisiyah 00964, Iraq
provided by the submitter.
Bankit Comment: ALT EMAIL:alialnashe995@gmail.com.
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:6.
Bankit Comment: TOTAL # OF SETS:6.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..364
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:562"
/note="[cultured bacterial source]"
BASE COUNT 101 a 72 c 98 g 93 t
ORIGIN
1 ggagttagtg cagcctccag tgcatccctc ataggggccc cgataagcat gctggtgagt
61 gcattaaccg gtacgatatc tggcattctg gaagcatcaa aacaggctat gtttgagcac
121 gttgcagata aattcgctgc tcggatcaat gaatgggaaa aggagcatgg caaaaattat
181 tttgagaatg gctatgacgc aagacatgct gcgtttttag aagactctct gtctttgctt
241 gctgattttt ctcgtcagca tgcagtagaa agagctgtcg caataaccca gcaacattgg
301 gatgagaaga tcggtgaact tgcaggtata acccgtaatg ctgatcgcag tcagagtggt
361 aagg
//
LOCUS Seq5 364 bp DNA linear BCT 19-SEP-2017
DEFINITION : Escherichia coli strain IQ.ST-R10 (hlyA) gene, partial sequence.
ACCESSION Seq5
VERSION
KEYWORDS .
SOURCE Escherichia coli
ORGANISM Escherichia coli
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 364)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Physiological and molecular study of Escherichia coli bacteria hemolytic isolated from urinary and intestinal tract infection and possibility of mutagenesis
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 364)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-SEP-2017) Microbiology, College of Education.
University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia, Al-Qadisiyah
00964, Iraq
provided by the submitter.
Bankit Comment: ALT EMAIL:alialnashe995@gmail.com.
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:6.
Bankit Comment: TOTAL # OF SETS:6.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..364
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:562"
/note="[cultured bacterial source]"
BASE COUNT 100 a 72 c 98 g 94 t
ORIGIN
1 ggagttagtg cagcctccag tgcatccctc ataggggccc cgataagcat gctggtgagt
61 gcattaaccg gtacgatatc tggcattctg gatgcatcaa aacaggctat gtttgagcac
121 gttgcagata aattcgctgc tcggatcaat gaatgggaaa aggagcatgg caaaaattat
181 tttgagaatg gctatgacgc aagacatgct gcgtttttag aagactctct gtctttgctt
241 gctgattttt ctcgtcagca tgcagtagaa agagctgtcg caataaccca gcaacattgg
301 gatgagaaga tcggtgaact tgcaggtata acccgtaatg ctgatcgcag tcagagtggt
361 aagg
//
LOCUS Seq6 362 bp DNA linear BCT 19-SEP-2017
DEFINITION : Escherichia coli strain IQ.ST-R15 (hlyA) gene, partial
sequence.
ACCESSION Seq6
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Escherichia coli
ORGANISM Escherichia coli
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales;
Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 362)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Physiological and molecular study of Escherichia coli bacteria
hemolytic isolated from urinary and intestinal tract infection and
possibility of mutagenesis
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 362)
AUTHORS Ojaimi,R.R. and AlNashe,A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-SEP-2017) Microbiology, College of Education.

University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia, Al-Qadisiyah 00964, Iraq
provided by the submitter.
Bankit Comment: ALT EMAIL:alialnashe995@gmail.com.
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:6.
Bankit Comment: TOTAL # OF SETS:6.

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

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..362
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:562"
/note="[cultured bacterial source]"
BASE COUNT 102 a 73 c 97 g 90 t
ORIGIN
1 ggagttagtg cagcctccag tgcatccctc ataggggccc cgataagcat gctggtgagt
61 gcattaaccg gtacgatatc tggcattctg gaagcatcaa aacaggctat gtttgagcac
121 gttgcagaga aattcgctgc tcggatcaat gaatgggaaa aggagcatgg caaaaattat
181 tttgagaatg gctatgacgc aagacatgct gcgtttttag aagactctct gtctttgctt
241 gctgattttt ctcgtcagca tgcagtagaa agagcagtcg caataaccca gcaacattgg
301 gatgagaaga tcggtgaact tgcaggcata acccgtaatg ctgatcgcag tcagagtggt
361 aa
//

ملحق (7) مقاومة عزلات بكتريا اشريشيا القولون للمضادات الحيوية المستعملة في الدراسة.

مصدر العزلة	رمز العزلة	AM	TI	CTX	CRT	AT	IPM	MEM	AK	GM	DO	NA	CIP	TM	C	NIT
الإدرار	**EU1**	R	S	S	S	S	S	S	S	s	S	R	S	R	S	S
	EU2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
	EU3	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	EU4	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	EU5	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
	EU6	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
	EU7	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S
	EU8	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
	EU9	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
	EU10	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
	EU11	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S

	EU12	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
	EU13	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
	EU14	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
	EU15	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	EU16	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S
	EU17	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
	EU18	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	EU19	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S
	EU20	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S
	EU21	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	EU22	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	EU23	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
	EU24	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	EU25	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
	EU26	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S
	EU27	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
	EU28	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S
	EU29	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
	EU30	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
الإسهال	ES1	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	ES2	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
	ES3	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S
	ES4	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	ES5	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
	ES6	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S
	ES7	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	ES8	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
	ES9	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
	ES10	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S

EU عزلة E.coli معزولة من الإدرار. **R مقاومة**

EDعزلة E.coli معزولة من الإسهال. **S حساسية**

Summary

This study includes The collection 400 samples from patients with urinary tract and intestinal infections about 200 samples urine, 200 samples diarrhea from women's and children's hospitals, AL-Hussein (p) for children and Diwaniya Education, for the period from 1-11-2016 to 1-4-2017. Therefore, this study aims of isolating hemolysis E.coli through the molecular detection of the hemolysin gene and determining the effects of gamma (cobalt-60) radiation on this gene and resistance these of isolates to the antibiotics under study.

Forty isolates of E.coli are isolated depending on the production of hemolysin on blood agar containing 5% of sheep and human blood of four human blood groups, divided on 30 (39.47%) isolates from the urine and 10 (12.5%) isolates from diarrhea. Isolates are used as a basis for studying research objectives, The study showed that the AB blood type is preferably used for detecting hemolysis compared to other blood groups. Then this has been genetically encoded hlyA gene for screening of hemolysin before and after mutagenic using polymerase chain reaction (PCR) and proved that hlyA gene was present in all bacteria isolates E.coli blood hemolysis under study and isolated from urine and diarrhea (100%) .

The analysis of nucleotide sequence for hlyA genes of E.coli mutagenes in gamma rays and at two time 10 and 15 minutes was revealed. There are 11 mutations in the DNA of this gene occurred in the nitrogen base sequence which all include substitution type of Transtion and Transversion type. The percentage of identities 99 % with the original gene. DNA sequencing analysis of amino acid translation of hlyA genes reveals that most isolates display different point mutation as compared with NCBI data. Point mutation was detection in E.coli hlyA causes conversion of Asparagine to Glutamine .

For the sake of determining the genetic relationship, this study aims at analyzing phylogenetic relationships between two isolate of E.coli, One of which source is from the urine and the other of diarrhea non-mutagen to the gamma ray and E.coli global isolates as well as between two isolate of E.coli isolated from the urine and two of diarrhea mutagenes gamma rays with global isolation were analyzed using the hlyA gene sequence. The multiple sequence alignment analysis and neighbor joining phylogenetic tree analysis are performed by using (MEGA6) multiple sequence alignment online based analysis of 360bp hlyA gene was amplified by polymerase chain reaction. Phylogenetic analysis results of these gene sequences revealed that E.coli isolates non-mutagen were closely related to E.coli global isolates (CP009107.1). While E.coli isolates mutagenes gamma rays did not closely related to E.coli which bearing accession number (CP009107.1).

The antibiotic susceptibility test to 15 antibiotics by using disc diffusion method, before and after exposure to gamma rays results before the irradiation results show that all isolates are resistant 100% to Ampicillin , while these isolates show resistance to Ticarcillin (87.5%) , Cefotaxime and Ceftriaxone (52.5%) each of them, Aztreonam, (57.5%), Amikacin, (17.5%), Gentamicin (12.5%), Doxycycline (42.5%), Nalidixic acid, (40%), Chloramphenicol (20%), Trimethoprim (62.5%), These isolates showed high sensitivity (100%) For each of the antibiotics Meropenem, Imipenem, Ciprofloxacin Nitrofurantoin, after irradiation, the results show a clear effect of radiation on Resistance of bacteria to antibiotics by increasing the sensitivity of bacteria to the affect of all antibiotics under study.

The results of the phenotypic detection show some virulence factors found in E.coli isolated from urine and diarrhea. These isolates are produced for biofilm the percentage (83.33%) and (80%), the percentage of bactericine (60%) and (30%), The percentage of capsule was (36.66%) and (40%), and the

percentage of production wide-spectrum beta-lactamase enzymes was (46.66%) and (80%) all respectively .

We conclude that E.coli play an important role in the Urinary and Intestinal Infections by hemolysin Produced before and after mutagenic, efficiency gamma ray is high in change nitrogen bases sequencer for hlyA gene occurrence through mutation in and effect on antibiotics under study in isolated sources both.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
AL-Qadisiyah University/ College of Education
Department of Biology

Phenotype and Molecular Detection of Hemolysin Production in *E.coli* Isolated from Urinary and Intestinal Tract Infections and the Effect Gamma Ray on it

A Thesis
Submitted to The Dean of College of Education / AL-Qadisiya University in Partial Fulfillment of The Requirements For Degree of Master in Biology/ Microbiology

By

Raid Razzaq Ojaimi

Supervised by
Asst. prof. Ali Abed Al-Rheem Al-Nashi

1439 A. H. **2017 A. C.**