جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

الكشف الجزيئي عن بعض جينات الألتصاق في

Uropathogenic *Escherichia coli*

رسالة مقدَّمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

اسراء احمد عباس

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى (2009– 2010)

بإشراف

أ.م.د علي جعفر سليم

1444هـ **2023م**

1- المقدمــة Introduction

تحظى التهابات المسالك البولية Urinary tract infections بإهتمام الباحثين والعاملين في المجال الطبي فهي تعد من اكثر الامراض شيوعا وانتشارا وثاني اكثر انواع الاصابات شيوعاً بعد اصابات الجهاز التنفسي (Zare وآخرون ، 2018 ; Jalil و Al Atbee ، 2022) ضمن الاصابات المتعلقة بالمجتمع بينما تحتل المرتبة الاولى بالنسبة للاصابات المتعلقة بالمستشفيات ويشكل حوالي 40% من الاصابات المكتسبة في المستشفيات ويصاب بها نسبة كبيرة من افراد المجتمع (Hamad Edham ، 2017 ; Venkataraman وYadav ، 2022) .

بكتريا *Escherichi coli* من اكثر المسببات المرضية شيوعا في اصابات المجاري البولية وتعد من اهم افراد العائلة المعوية (Pant واخرون ،2015)، تتواجد ضمن النبيت الطبيعي داخل جسم الانسان وفي الوقت نفسه تكون بكتريا انتهازية Opportunistic pathogens وبذلك تسبب العديد من الامراض مثل الاسهال Diarrhea ، تسمم الدم Sepsis والتهاب السحايا Meningitis وتعتبر من اكثر الانواع البكتيرية المهمة والاكثر تسببا لالتهابات المسالك البولية UTI اذ تسبب حوالي 90% من اصابات المسالك البولية في العالم(Zalewska و Piątek، 2020) .

بكتريا Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) المسبب الرئيسي لالتهابات المسالك البولية وهي مسؤولة عن 80% من الحالات سواء كانت مجتمعية 70-95% أو مكتسبة من المستشفى 50% (Demirci وآخرون ، 2019) وبالاضافة الى عوامل الضراوة التي تمتلكها يطلق عليها Uropathogenic *Escherichia coli* لكونها مرتبطة بامراضية الجهاز البولي (Shah واخرون، 2019).

تمتلك بكتريا *E.coli* المسببة لالتهابات المسالك البولية مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة virulence factors (VFs) والتي تسمح لها بالتسبب بالمرض (Malekzadegan وآخرون ، 2018) ، ومن هذه العوامل الاهداب fimbria التي تمكن البكتريا من الالتصاق ببطانة الخلايا الظهارية للقناة البولية والغزو فهذه البكتريا تمتلك القدرة على التجمع والبقاء داخل القناة البولية للمضيف لمدة طويلة ومقاومة المضادات الحيوية وتجعلها قادرة على التسبب باصابات متكررة للمسالك

البولية (Epp،2010) ، والغشاء الحيوي والمحفظة والبكتريوسين والتي تمكنها من غزو المسالك البولية واحداث الخمج (Cheesbrough ، 2012) بالاضافة الى افراز مجموعة من السموم منها انزيم الهيمولايسين وعامل التنخر السام للخلايا والتي تسبب اضرار في انسجة المضيف وتسهل انتشار البكتريا (Agarwal واخرون ، 2012). ومعظم عوامل الضراوة التي تشفر لجينات الضراوة توجد على البلازميدات او الكروموسومات (Dadi وآخرون ، 2020).

تمتلك البكتريا المسببة لالتهاب المسالك البولية القدرة على مقاومة المضادات الحيوية مما ينشأ عن ذلك ظهور سلالات متعددة المقاومة والتي تؤدي الى حدوث الالتهابات ، وعلى الرغم من توفر المضادات الحيوية لعلاج الكثير من الامراض التي يكون سببها البكتريا الا انه توجد بعض الانواع من البكتريا اصبحت مقاومة للعديد من المضادات اذ تعد صفة المقاومة المتعددة للمضادات من اهم المشاكل الصحية والاقتصادية والتي زادت تدريجيا في جميع دول العالم وبالاخص تلك المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام وهذا الامر دفع الباحثين الى التحري عن مضادات جديدة للتغلب على السلالات البكتيرية المقاومة ، والاصابة بالبكتريا المقاومة تؤدي الى طول فترة العلاج وزيادة خطر الاصابة (Basak واخرون ، 2016). وصفة المقاومة للمضادات تنتقل عن طريق انتقال الجين الافقي والذي تتوسطه بصورة رئيسة البلازميدات والجينات القافزة (Wellington واخرون ، 2013).

بكتريا *E.coli* لها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي لامتلاكها العديد من العوامل التي تمكنها من تكوين الغشاء مثل احتواءها على وسائل الحركة وانتاجها للسيليلوز اللذين يلعبان دور هام في التصاق الخلايا بالسطوح غير الحية وهذه الاغشية هي عبارة عن تجمع من خلايا بكتيرية تلتصق بالاسطح الصلبة ولها دور في اصابة المضيف وتزيد من قدرة البكتريا على مقاومة المضادات وتحمي الخلايا من الأليات الدفاعية لجسم المضيف كما تساعد البكتريا على البقاء في الظروف غير الملائمة للنمو(Soto، 2014).

أهداف الدراسة

هدفت الدراسة الحالية الى عزل بكتريا *Escherichia coli* والكشف الجزيئي عن جينات الألتصاق ، وقد اتبعت الخطوات التالية لإجراء البحث :

1- عزل وتشخيص بكتريا *Escherichia coli* المسببة لالتهاب المجاري البولية Urinary tract infection من عينات الادرار من كلا الجنسين ولجميع الفئات العمرية بالطرائق الزرعية والكيموحيوية والجزيئية باستعمال الجين التشخيصي *papE* .

2- الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها عزلات بكتريا *Escherichia coli* التي تساعد البكتريا على الخمج.

3- اجراء اختبار فحص الحساسية لعزلات بكتريا *Escherichia coli* لبعض المضادات الحيوية وايجاد التحليل التجميعي لنتائج مقاومة العزلات المدروسة تجاه المضادات الحيوية .

4- اجراء إختبار قابلية بكتريا *E.coli* على انتاج الغشاء الحيوي بطريقة احمر الكونغو وطريقة الصفيحة العيارية والمقارنة بينهما .

5- الكشف الجيني عن بعض جينات الألتصاق التي شملت (*fimH,papC,afa,sfa*) .

الخلاصة

جُمعت في هذه الدراسة 150 عينة ادرار من مرضى يعانون من التهابات المسالك البولية من كلا الجنسين وبمختلف الاعمار للفترة من تشرين الاول 2021 لغاية كانون الثاني 2022 من المختبرات الاهلية في محافظة ديالى ووحدة الابحاث وتصنيع البدائل – الكلية التقنية الصحية والطبية في محافظة بغداد.

شُخصت العزلات البكتيرية بالطرائق الزرعية والمجهرية و الاختبارات الكيموحيوية اذ أظهرت نتائج الزرع البكتيري على وسط أكار الماكونكي ووسط أكار الأيوسين أزرق المثيلين والاختبارات الكيموحيوية ان 73 عزلة تعود لبكتريا الاشيريشيا القولونية ومن خلال الكشف عن الجين التشخيصي *papE* بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسلPolymerase Chain Reaction حيث تم تشخيص 22 عزلة تعود لبكتريا Uropathogenic *Escherichia coli*.

اختبرت حساسية جميع العزلات للمضادات الحيوية وفق طريقة Kerby Bauer ، واظهرت النتائج ان (79.45%) منها مقاومة لـ Ampicillin، Amoxicillin-clavulanate (73.97%) ، Trimethoprim - Sulfamethoxazole (57.53%) Tetracycline (52.05%) ، Cefotaxime (41.09%)، Norfloxacin(38.35%) ، Azithromycin (28,76%)، Gentamicin(16.43%) ، Chloramphenicol (9.58%)، Piperacillin_Tazobactam (2.73%) ، لم تظهر اي عزلة مقاومة لكل من Meropeneme وNitrofurantoin.

وابدت اغلب العزلات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية بنسبة (76.71%) بضمنها عزلات Uropathogenic *Escherichia coli*والتي بلغت مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية (86.36%) ، من جانب اخر اوضحت نتائج الكشف عن بعض عوامل الضراوة ومنها قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي وبطريقتين اذ بلغت النسبة بطريقة اطباق الكونغو الاحمر(72.60%) اما بطريقة اطباق المعايرة كانت النسبة (83.56%) ، بينما كانت عزلات Uropathogenic *Escherichia coli*المكونة للغشاء بطريقة الكونغو (72.72%) وبلغت النسبة بطريقة اطباق المعايرة (90.90%). كما تم الكشف عن قابلية العزلات على انتاج انزيم الهيمولايسين وكانت عزلات *Escherichia coli* منتجة لهذا الانزيم بنسبة (89.04 %) وعزلات Uropathogenic *Escherichia coli* بنسبة (90,90%) ، وايضا تم الكشف