جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

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

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

نور جميل عبدالله

بكالوريوس علوم حياة / جامعة ديالى (2008)

بإشراف

أ. د . هادي رحمن رشيد الطائي

1442هـ **2020 م**

1 - المقدمـــــة (Introduction)

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

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

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

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

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

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

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

الهدف من الدراسة Aim of study

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

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

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

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

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

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

الخلاصة

الإشريشيا القولونية (*Escherichia coli(E. coli*) موطنها الطبيعي في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان ،ومع ذلك هناك بعض السلالات التابعة لها اصبحت ممرضة ،ممكن ان تسبب امراض مختلفة للإنسان، من الامراض التي تسببها بعض سلالات بكتيريا *E coli* التسمم الغذائي Food poisoning ،الاسهال Diarrhea واصابات المسالك البولية Urinary tract infection (UTI) ،أن بعض السلالات تظهر مقاومة نتيجة لسوء استخدام المضادات الحيوية .

شملت الدراسة جمع 180 عينة سريرية تضمنت 67 عينة من الادرار urine ، 90 عينة مسحات الجروح (Swab wounds) و23 عينة مسحات حروق (Swab burns) من مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي .كما وتم جمع 110 عينة بيئية (مياه) المرسلة الى مختبر الصحة العامة لغرض الفحص ،للفترة من 22أيلول ولغاية 28 تشرين الثاني ، 2019 .

أظهرت نتائج الزرع البكتيري على وسط أكار الماكونكي MacConkey agar ووسط أكار الأيوسين الازرق المثيلين Eosin Methylene Blue (EMB) والفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests والتشخيصالتأكيدي بنظام الفايتك 2 (Vitek compact system 2) ان 40 عزلة تعود لبكتيريا *E .coli* (تضمنت 20 عزلة سريرية و 20 عزلة مياه).

أوضحت نتائج فحص الحساسية ل12 مضاد حيوي (تنتمي الى (9) مجاميع من المضادات الحيوية) هي Tetracycline, , Imipenem, Doxycycline, Aztreonam Levofloxacin, Cefuroxime,) Trimethoprim- sulfamethoxazole , Azithromycin, Ampicillin-sulbactam, Cefoxitin, , Ticarcillin- clavulanate, Cefpodoxime,) أن اعلى نسبة مقاومة من العزلات كانت لمضاد Cefpodoxime والذي ينتمي الى مجموعة Cephems(ORAL) وبنسبة 95% (19 عزلة سريرية) وبنسبة 70% (14 عزلة مياه)، ونسبة المقاومة لمضاد Aztreonam والذي ينتمي الى مجموعة Monocyclin بنسبة 90% (18 عزلة سريرية) وبنسبة 80% (16 عزلة مياه)، ونسبة المقاومة لمضاد Trimethoprim- sulfamethoxazole والذي ينتمي الى مجموعة Folatepathwa -yantiagonists بنسبة 80% (16 عزلة سريرية) وبنسبة 55% (11 عزلة مياه)، في حين كانت المقاومة لكل من المضادين Tetracycline بنسبة 70% (14 عزلة سريرية) وبنسبة 65% (13 عزلة مياه)) وDoxycycline بنسبة 75% (15 عزلة سريرية) وبنسبة 70% (14 عزلة مياه))واللذان ينتميان الى مجموعة Tetracyclines، و كانت المقاومة لكل من المضادين Cefuroxime بنسبة 75% (15 عزلة سريرية) وبنسبة 45% (9 عزلات مياه) وCefoxitin بنسبة 40% (8 عزلات سريرية) وبنسبة 45% (9 عزلات مياه) واللذان ينتميان الى