وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جـــامـعـــة ديـــــالـــــى
كـلـيـة التربـيـة للـعـلوم الصـرفـة
قـســـم عـــلـــوم الـحـيـــاة

الكشف الجزيئي عن جين *bla TEM* في بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من الأطفال الرضع المصابين بالتهاب المسالك البولية في مدينة بعقوبة

بحث مُقدَّم

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل

شهادة الدبلوم العالي في علوم الحياة

من قبل

ورود خالد محمد العبيدي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية الأساسية / جامعة ديالى 2010–2011

بإشراف

أ. د صبا جاسم جواد الزبيدي

1445 هـ 2023 م

Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences

Molecular detection of *bla* $_{TEM}$ gene in *Escherichia coli* isolated from infants with urinary tract infection in Baquba city

Report submitted to the Council

College of Education for Pure Sciences - University of Diyala as in partial fulfillment for the requirements of the degree of Higher diploma of Science in biology

By

Wrood Khaled Mohamad Al-Obaidi

B.Sc. / Biology/ College of Basic Education

/ Diyala University /2010-2011

Supervised by

Prof.Dr. Saba Jasim Jawad Al-Zubaidi

2023 A.C 1445 A.H

1 – المقدمة Introduction :

تعد عدوى إلتهابات المسالك البولية Urinary tract infections (UTI) مشكلة صحية شائعة في كل من المجتمعات والمستشفيات (Ahmed وآخرون ، 2019) . وبكتريا *Escherichia coli* هي واحدة من أهم أسباب إلتهابات المسالك البولية ، سواء كانت مكتسبة من المجتمع أم مكتسبة من المستشفى

(Demirci وآخرون ، 2019). إذ تشكل نسبة الاصابات بإلتهابات المسالك البولية بسببها بنسبة (90%) من مجموع الإصابات حول العالم حسب تقرير منظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO) (Dhahi ، 2020).

إن بكتريا Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) تعد من اكثر السلالات شيوعاً في إلتهابات المسالك البولية حيث تقدر نسبة الإصابات (50 – 90%) من مجموع الاصابات، اذ تؤثر على حالة تعايش البكتريا commensal status الطبيعية في الجهاز البولي وبالإضافة للاستراتيجيات وعوامل الضراوة المختلفة التي تمتلكها كونها مرتبطة بإمراضية الجهاز البولي يطلق عليها Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) (Shah وأخرون ، 2019).

إن ظهور سلالات بكتريا *E.coli* المقاومة المتعددة للمضادات Multidrug resistance (MDR) يؤدي الى زيادة خطر انتشار المقاومة للمضادات الحيوية مسببة مشكلة عالمية وتحدي للرعاية الصحية عن طريق الحد من الخيارات المضادة للميكروبات التي يمكن إستعمالها في علاج عدوى البكتريا وإنتشارها في بلدان العالم النامية بسبب الاستعمال الخاطئ والعشوائي للمضادات الحيوية أثناء فترة علاج *E.coli* مثل الأمينوكلايكوسيدات aminoglycosides والفلوروكينولينات fluoroquinolones وسيفالوسبورينات cephalosporins (Tabasi وأخرون ، 2015;

Homles، واخرون 2016 ؛ Kot وأخرون ، 2019). إن إنزيمات Extended spectrum Beta – lactamase (ESβLs) هي أنزيمات بيتالاكتام β-Lactam تكون مقاومة لمضادات البنسلينات وسيفالوسبورينات الجيل الأول والثاني والثالث منها، Azitronam، من خلال تحليل هذه المضادات ، ولكنها تثبط عن طريق مثبطات β-Lactamases inhibitor مثل clavulanic acid (Oliveira واخرون ،2017). إن إنزيمات البيتالاكتام واسعة الطيف ESBL تحتوي على السيرين في الجزء الفعال وحسب تصنيف Ambler الجزيئي Amblir's molecular class A فهي تعود الى صنف A لذلك فإن هذه الانزيمات تمتلك القابلية على تحليل مادة Oximino Cephalosporine – و تثبط بواسطة حوامض الكلافيولنك و التازوباكتام (Yan واخرون ، 2006) .

تمتلك بكتريا *E. coli* القدرة على الإستعمار والتسبب في إلتهابات المسالك البولية بواسطة عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا ، ومنها عوامل الإلتصاق المشفرة بواسطة الجينات مثل *fimA* و *sfa* و *pap*) ، وكذلك السموم مثل Hemolysin المشفرة بواسطة جين *hlyA* ، والكبسولات المشفرة بواسطة الجين *kpsMII* المتواجدة في البلازميدات أو الكروموسومات إضافة الى إمتلاكها عوامل ضراوة اخرى (Dadi وآخرون ، 2020)

كذلك إن مدى قدرة البكتريا على إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm يعمل على زيادة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية وبهذا يعتبر آلية تساعد بكتريا *E. coli* على البقاء والنمو في الظروف الغير الملائمة ، كما إن تكوين الغشاء الحيوي يلعب دور مهم في حدوث الإصابة والسبب في فشل العلاج ، ولاسيما في بعض الإصابات المرضية المرتبطة بالأجهزة وإستخدام القسطرة البولية Catheter كالمرضى الذين يعانون من إلتهابات المسالك البولية لمدة طويلة (Poursina وأخرون ، 2018).

ولكثرة انتشار عدوى المسالك البولية ، وكون التشخيص السريع والصحيح والذي يعد خطوة جيدة في رحلة العلاج والشفاء من خلال إستخدام التقنيات الجزيئية الحديثة مثل تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chains Reaction technical (PCR) لشريطي الدنا DNA للتحري عن السلالات البكتيرية ومنها بكتريا *E. coli* من خلال الكشف الجزيئي عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة وتعزيز المعلومات الوبائية والمرضية والوراثية عند التحري عن السلالات البكتيرية لبكتريا *E.coli* وقد أُعتمدت عليها العديد من الدراسات والبحوث (Maniam وآخرون ، 2022 ؛ Badger-Emeka وآخرون ، 2022 ؛ Govindarajan وKandaswamy ، 2022).

لكثرة إنتشار الإصابات بإلتهابات المسالك البولية ببكتريا *E.coli* وخاصة لدى الأطفال الرضع وشدة مقاومتها للمضادات الحيوية جاءت هذه الدراسة لتهدف إلى الكشف الجزيئي عن جين bla_{TEM} *في بكتريا E.coli* المعزولة من الأطفال الرضع وكان ذلك عن طريق الخطوات الاتية :

1- عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* من الأطفال الرضع المصابين بإلتهابات المسالك البولية Urinary tract infection بإستخدام الطرق التقليدية والتشخيص بإستخدام جهاز الفايتك.

2- إجراء إختبار فحص الحساسية Sensitivity test لمجاميع مختلفة من المضادات الحيوية بطريقة طريقة الأقراص وتحديد البكتريا ذات المقاومة المتعددة.

3- إجراء اختبار قابلية بكتريا *E.coli* على إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة أطباق المعايرة وإنتاج أنزيمات البيتالاكتام واسعة الطيف وإنتاج أنزيمات البيتالاكتام المعدنية .

4-الكشف الجزيئي عن الجين المسؤول عن التشفير عن قابلية مقاومة مضادات البيتالاكتام شائعة الإستخدام.

Abstract

Escherichia coli is one of the most common bacterial strains that cause urinary tract infections, as it affects the coexistence of normal bacteria that reside in the intestine, in addition to the various virulence factors that it possesses and are associated with diseases of the urinary system. The current study aims to detect the bla $_{TEM}$ gene in *E.coli* isolated from infants with urinary tract infections. As (110) urine samples were collected from infants under the age of two years for a period ranging from the beginning of February to March 2023 from Al-Batoul Teaching Hospital in Baquba. After conducting cultural, phenotypic, microscopic, biochemical and molecular tests, the culture results showed that (60) samples were positive for growth, i.e. (54.5%), and that the percentage of infection of females with E. coli (60%) was higher compared to males (40%).

The sensitivity test, it was found that all isolates of E. coli showed complete resistance to Ampicillin and Ceftazidime (100%), followed by Cefepime (92.3%), Cefotaxime (92.3%) and Amoxicillinclavulanic acid (92.3%), while the lowest was shown. Level of resistance to Imipenem, Amoxicilin and Levofloxacin at a rate of (23.1%). On the other hand, Norfloxacin had a high level of sensitivity, which was measured at (69.2%).. The results of the current study showed that after conducting an antibiotic resistance test, *E.coli* bacteria were (13) isolates with a rate of (37.14%) multi-resistant to antibiotics In addition, all isolates produced broad-spectrum beta-lactam enzymes, while only (31.25%) were positive for the MBL test out of a total of (13) isolates.

. The biofilm formation, the results showed that all isolates of *E.coli* bacteria in the current study were biofilm-producing with a rate of (100%),

All isolates of *E. coli* bacteria were subjected to molecular diagnosis using the PCR technique, based on the diagnostic gene bla $_{TEM}$, as the results showed the presence of the gene in all isolates of *E. coli*, (100%).