جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

التنميط الجزيئي لبكتريا *Escherichia coli* متعددة المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من مرضى التهابات المسالك البولية ودراسة تأثير المعزز الحيوي *Lactobacillus spp* على تثبيطها

اطروحة دكتوراه

مقدمة الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة

من قبل الطالبة

هديل جليل ابراهيم خلف

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2010

ماجستير احياء مجهرية / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2018

بإشراف

أ . د . صبا جاسم جواد الزبيدي

1444 هـ **2023 م**

`Republic of Iraq

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

Diyala University

College of Education for Pure Sciences

Biology Department

Molecular genotyping of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from with urinary tract infection patients and studying the effect of probiotic *Lactobacillus spp* on their inhibition

A Dissertation Submitted to the Council of college of Education for Pure Science ,University of Diyala In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy In Biology

by

Hadeel Jalil Ibrahim

Bachelor of Life Sciences / College of Education for Pure Sciences / University of Diyala 2010

MSc. in Microbiology / College of Education for Pure Sciences / University of Diyala 2018

Prof. Dr

Saba Jasim Jawad Al-Zubaidi

2023 **1444**

1 . المقدمة Introduction

تعد الاشريشيا القولونية *Escherichia coli* أحد افراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae لوجودها ضمن النبيت الطبيعي Normal flora للأمعاء الغليظة (Jang واخرون ،2017) . هي بكتريا سالبة لصبغة غرام ، لاهوائية اختيارية Facultative anaerobic ، غير مكونة للسبورات ، مكونة للمحفظة ، متحركة بواسطة الاسواط ، ويمكنها البقاء على قيد الحياة في البيئة لفترات طويلة (Sora واخرون ،2021) . تعيش بصورة طبيعية في امعاء الانسان والحيوان ، وتعتبر في نفس الوقت بكتريا انتهازية Opportunistic pathogens ، اذ تسبب العديد من الأمراض مثل التهاب السحايا Meningitis ، تجرثم الدم bacteremia ، الاسهال diarrhea ، تسمم الدم Sepsis وتعد من اكثر الانواع البكتيرية شيوعا المسببة لالتهابات المسالك البولية Urinary tract infections (شويخ وجاسم ، 2016) .

تعد الاشريشيا القولونية المسببة للأمراض البولية (UPEC) Uropathogenic *E. coli* مسؤولة عن 80% من حالات التهاب المسالك البولية في جميع انحاء العالم (Korbel واخرون ،2017) . اما عدوى المسالك البولية فتعد اكثر شيوعا اثناء الحمل بسبب مجموعة متنوعة من التغيرات التي تحدث لجسم الانثى وخاصة منطقة المسالك البولية (Ahmed و Yosry ،2021). تعد ايضا هذه البكتريا المسبب الرئيسي في التهابات المسالك البولية للأطفال والرضع حيث غالبا ما تكون الاصابة في الجهاز البولي العلوي (Yun واخرون ،2017 ; Locoasole واخرون ،2020).

ان سبب امراضية هذه البكتريا يعود الى امتلاكها الكثير من عوامل الضراوة التي تحملها بما في ذلك الالتصاق ، السموم Toxins (مثل الهيمولايسين) والمحفظة Capsule ، أنظمة

امتصاص الحديد التي يتم تشفيرها على الجزر المسببة للأمراض Pathogenicity islands (PAIs) الموجودة على الكروموسومات او البلازميدات (Dadi واخرون ،2020) . بالإضافة الى امتلاكها الاسواط Flagella والسكريات المتعددة الدهنية(LPS)Lipopolysaccharide التي تعطي للبكتريا صفات مستضدة وذلك عن طريق انتاجها المستضد المحفظي K (Capsular antigen K) والمستضد السوطي H (Flagellar antigen H) والمستضد الجسمي O (Somatic antigen O)) تمتلك ايضا الاهداب (pilli او fimbareae) التي تقوم بمساعدتها على الالتصاق بأنسجة المضيف فتعطيها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm (Terlizz واخرون ،2017) .

ان مقاومة المضادات الحيوية هي واحدة من المشاكل الصحية الرئيسة المسؤولة عن الاف الوفيات في جميع انحاء العالم (Adzitey، 2020) . حيث يقدر البعض انه سيؤدي الى 10 ملايين حالة وفاة سنويا بحلول عام 2050 (Bengsston-Palme واخرون ،2018 ; Praveen Kumarrery واخرون ،2020). اذ ان اكتشاف المضادات الحيوية كان له الاثر الكبير في انخفاض معدلات الاخماج المختلفة الا ان استعمال هذه المضادات بشكل عشوائي ادى الى اكتشاف سلالات بكتيرية مقاومة لمضاد واحد او اكثر(Abdomaleki واخرون ،2019) .

تعتبر بكتريا الاشريشيا القولونية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية(MDR) Multidrug resistant bacterium ، لأنها تتمتع بقدرة عالية على مقاومة العديد من المضادات الحيوية وبطرائق مختلفة بما في ذلك الانزيمات مثل انزيمات البيتالاكتاميز β-lactamase اذ تقوم بكسر حلقة البيتالاكتام الموجودة في مضادات السيفالوسبورينات والبنسلينات ولذا يصبح المضاد غير فعال اذ تشفر لهذه الانزيمات جينات محمولة على البلازميد او الكروموسوم (Run واخرون ،2019) .

تم اجراء الكثير من الدراسات خاصة فيما يتعلق بالعوامل الوراثية التي تسيطر على انتاجها ، اذ يتميز البلازميد بقدرته على التضاعف بشكل ذاتي ومتزامن مع DNA الكروموسومي بالإضافة الى الانتقال ما بين الانواع البكتيرية عن طريق الاقتران البكتيري Conjugation bacterial وهذا يفسر سبب انتشار مقاومة المضادات الحيوية (Depelteau واخرون ،2019) . كذلك الانزيمات الاخرى التي تمنحها مقاومة لمضادات الكوينولونات quinolones ومضادات الامينوكلايكوسايد aminoglycosides ، بالاضافة الى امتلاكها طرق اخرى لمقاومة المضادات الحيوية مثل تثبيط تصنيع البروتينات ، امتلاك البكتريا لمضخات الدفق efflux pumps ، تغير نفاذية الغشاء الخلوي ، والتغير في موقع الهدف ، اذ تمنح البكتريا مقاومة لمجاميع من المضادات الحيوية مثل مضادات rifampicin و novobiocin ومجاميع macrolides (Kapoor واخرون ،2017) . اذ تقسم مضخات الدفق الى خمسة عوائل هي عائلة Small Multidrug Resistance Family (SMR) ، عائلة ATP-Binding Cassete Family (ABC) ، عائلة Major Facilitator Super Family (MFS) ، عائلة Multidrug and Toxic Efflux Family (MATE) ، عائلة Resistance- Nodulation – Division Family (RND) ، ويكون النظام (AcrAB-Tolc) اكثر شيوعا في بكتريا *E. coli* ، الذي يتكون من ثلاثة بروتينات وهي البروتينات المنتشرة في الفراغ البلازمي AcrA الذي يشفر عنها الجين *acr*A ، وبروتين الغشاء الداخلي AcrB الذي يشفر عنها الجين *acr*B بالاضافة الى القناة TolC الموجودة في الغشاء الخارجي(Bhandol واخرون ،2020) .

ان التشخيص لا يمكن ان يتم بالاعتماد على الطرق التقليدية فقط التي احيانا قد تعطي نتائج ايجابية خاطئة وبسبب خطورة واهمية بكتريا *E . coli* على الانسان فضلا عن تزايد حالات

الاصابة بها وعدم وجود العلاج وخطورة الأمراض التي تسببها قد يكون هذا دافعا لتزايد تركيز الابحاث في العالم حول تقليل الوقت والجهد وتحسين كفاءة التشخيص ، لذ فان التقانات الحديثة الجزيئية وان كانت محدودة الاستعمال في دول العالم الثالث الا انها قد وفرت احسن الوسائل التشخيصية ومنها تقانات Sequencing و PCR و MLST و RAPD لما تمتاز به هذه التقانات بالسرعة العالية والخصوصية للكشف عن السلالات البكتيرية في العينات السريرية المختلفة خاصة عند حدوث الاوبئة عن طريق الكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة والجينات التشخيصية بالاضافة الى امكانية الاعتماد على هذه العوامل في الدراسات التشخيصية كمؤشرات جزيئية وتقوية المعلومات الوبائية عند الكشف عن هذه البكتريا التي تكون طرائق التشخيص المختبري التقليدية عاجزة للكشف عنها خاصة عندما تكون اعداد العينات كبير (Kosecka–Strojek وآخرون ، 2019 ; Francherri وآخرون ،2020) .

تعرف المعززات الحيوية Probiotics بانه عبارة عن كائنات حية دقيقة توفر فوائد صحية عند تناولها بكميات مناسبة (Saud واخرون ،2020) . اذ يؤدي البروبايوتك دورا رئيسا في تنظيم الجهاز المناعي للمضيف عن طريق تحفيز انتاج السايتوكين Cytokine والنشاط الخلوي وكذلك تثبيط مستعمرات مسببات الامراض (Hager واخرون ،2019) . بالإضافة الى ذلك تعزى الخصائص العلاجية للبروبايوتك (المعززات الحيوية) الى انتاج مجموعة متنوعة من العوامل المضادة للبكتريا مثل الاحماض الدهنية قصيرة السلسلة ، والاحماض العضوية (مثل الاحماض اللبنية ، والفورميك formic ، البروبيونيك ، والايثانول ، بيروكسيد الهيدروجين والبكتيريوسين (Karacaer واخرون ،2017) .

ونظرا لتزايد الأهمية الطبية لبكتريا *E.coli* وعلاقتها بالتهابات المسالك البولية بالاضافة الى مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية فقد هدفت هذه الدراسة لغرض الكشف عن بعض جينات مضخات الدفق التي تمتلكها هذه البكتريا والمعزولة من اصابات المسالك البولية واختبار تأثير بعض المضادات الحيوية وايضا الكشف عن بعض عوامل الضراوة واختبار تأثير المعزز الحيوي عليها عن طريق الخطوات التالية :-

1 – عزل بكتريا *E.coli* من عينات الادرار للمرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية

2 – تشخيص البكتريا مجهريا وزرعيا واجراء الاختبارات الكيموحيوية وتأكيد التشخيص باستعمال جهاز الفايتك .

3- اختبار الحساسية للمضادات الحيوية وتحديد البكتريا متعددة المقاومة بالاضافة الى تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى MIC للمضادين Ampicillin و Ciprofloxacin

4 – الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة مثل (مضخات الدفق ، الغشاء الحيوي ، انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ، وانزيمات البيتالاكتاميز المعدنية) .

5- التشخيص الجزيئي لبكتريا Uropathogenic *E.coli* باستخدام *pap*E gene

6- الكشف الجيني عن بعض جينات مضخات الدفق (*acr*A و *acr*B و *Tol*C و *mar*A و *mdf*A) Uropathogenic *E.coli*.

7- التنميط الجيني للعزلات ذات المقاومة المتعددة باستخدام تحليل تسلسل متعدد المواقع MLST لبكتريا Uropathogenic *E.coli*.

8- الكشف المظهري عن تأثير المعزز الحيوي *Lactobacillus spp* Probiotic على مضخات الدفق

Summary

Escherichia coli is one of the main causes of urinary tract infection, and it is highly resistant to antibiotics, due to the many virulence factors that enable it to cause severe and chronic urinary tract infection in humans. This study aimed to investigate the efflux pumps that It contains *E.coli* bacteria isolated from urinary tract infections (UTIs) and their relationship to resistance to different antibiotics and testing the effect of probiotics on it . As 200 clinical samples were collected from the urine of patients suffering from urinary tract infections of both gender and of both ages, under the supervision of specialized doctors from a number of Baquba hospitals, which included (Baquba Teaching Hospital, Al-Batoul Maternity Hospital, and from educational laboratories) during the period from 1/15/2022 to 4/30/2022.

The first bacterial isolates were diagnosed by culturing them on different culture media such as MacConkey agar medium and Eosin Methylene Blue (EMB) medium, then they were diagnosed using traditional chemical methods, and their diagnosis was confirmed using the VITEK2 Compact system, where the results showed that 50 clinical isolates with a percentage of (55, 5%) , it is due to *E.coli* bacteria. The results of diagnosing *E. coli* using the diagnostic gene *pap*E showed that only 26 isolates were carriers of this gene, which is the diagnostic gene for Uropathogenic *E.coli* (UPEC) .

The results of the antibiotic sensitivity test for all bacterial isolates of *E.coli* bacteria under study for 12 antibiotics showed that they had multidrug resistance (MDR) , so all bacterial isolates were (50) isolates with a rate of (100%) were resistant to both Ampicillin and Clavulanic acid / Amoxicillin antibiotics, and 49 (98%) isolates resistant to both the antibiotics Amikacin and Gentamycin , 45 (90%) isolates resistant to the

antibiotic Cefotaxime, and 6 (12%) Meropenem-resistant , 27 (54%) isolates resistant to both Ciprofloxacin and Norfloxacin antibiotics, 48 (96%) isolates resistant to both Tetracyclin and Ceftazidime, and 25 (50%) isolates resistant to Levofloxacin antibiotic , and 41 isolates with a rate of (82%), were resistant to the antibiotic Cefepime .

The value of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for the bacterial isolates of *E.coli* bacteria under study for Ampicillin and Ciprofloxacin, as the bacterial isolates showed resistance towards these two antibiotics by examining the sensitivity test using the method of disks, where the value of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for Ampicillin ranged (≥32) µg/ml, while for ciprofloxacin it was (≥4) µg/ml .

The ability of *E. coli* isolates to produce some virulence factors was investigated, and the results showed that 40 (80%) bacterial isolates had the ability to form biofilm in different degrees, including 19 (38%) isolates that formed biofilms with a strong adherent degree. And 8 (16%) bacterial isolates had the ability to produce a biofilm with a medium degree of adherent moderately, and 13 (26%) isolates formed a biofilm, but with a weak degree of adherent weakly, while 10 isolates (20%) were unable to form a biofilm.

The results of the phenotypic detection of the bacteria's ability to produce ESBL beta-spectrum extended beta-lactamase enzymes showed that out of a total of 50 isolates of multiple antibiotic-resistant *E.coli* bacteria, 28 (56%) was able to produce ESBL enzymes. The results of phenotypic detection of MBL metal beta-lactamase enzymes showed thatout of a total of 50 bacterial isolates from multiple antibiotic-resistant E.coli bacteria, 40 (80%) was able to produce MBL enzymes.

Summary

The results of phenotypic detection of the ability of bacteria to produce pump efflux showed that out of a total of 50 isolates, 43 (86%) of the bacterial isolates under study had pump efflux. As for the results of genetic detection of efflux pump genes (isolates that contain the *pap*E gene) , it showed that 19 (95%) bacterial isolates possessed the *mdf*A gene, 18 (90%) had the *Tol*C gene, 9 (45%) had the *mar*A gene, and 19 (95%) isolates possessed the *acr*B gene, in addition to 18 (90%) bacterial isolates possessing the *acr*A gene. The results indicated that there is a correlation between the efflux pump genes and the ability of bacteria to produce ESBL enzymes .

The Multilocus Sequence Typing (MLST) method was used for the purpose of studying the genetic diversity of E.coli bacteria with multiple antibiotic resistance MDR, as the house keeping genes were detected, which are seven genes *(adk, fum*C, *gyr*B, *Icd, mdh, pur*A, *rec*A) .

Four bacterial isolates were sent for the purpose of sequencing them. Three isolates of *E.coli* bacteria were subjected to sequencing analysis using the MLST method. The seven genes of three bacterial isolates were sequenced and then compared with what was recorded globally in the French Pasteur Center. The results after analyzing the nucleotide sequence showed the appearance of A bacterial isolate of *E. coli* was affiliated with sequences that were recorded in the Pasteur Center / France, while two new Iraqi bacterial isolates appeared, which is the isolate with symbol (1) and the one with symbol (3), while the fourth isolate was drawn an evolutionary tree for the seven genes and knowing the structure Triple 3D protein for each gene, as four Iraqi isolates were recorded with the seven housekeeping genes and were deposited in the NCBI Center with taxonomic code () for isolate No. (1), code () for isolate No. (2), and code () for isolate No. (3) and code (HNH1) For isolate No. (4), and this study is the first study that was conducted using the MLST method for *E.coli* bacteria that were

isolated from patients in Al-Batool Maternity Hospital in Diyala Governorate / Iraq

The results of the *Lactobacillus* probiotic against *E. coli* bacteria, showed that the probiotic had an inhibitory effect on *E. coli* bacteria at different concentrations (100, 50, 25)% and with inhibition diameters ranged between 4-11 mm for a concentration of 25% except for isolates E22 and E45, while the diameter of the inhibition zone for a concentration of 50% ranged between 13-17 mm, while the diameter of the zone of Inhibition in the full concentration of 100% of the probiotic between 17-20 mm, as it had a strong inhibitory effect on all bacterial isolates .

While the results of the effect of the probiotic on the efflux pumps in *E.coli* bacteria showed that the probiotic had a strong inhibitory effect on the efflux pumps at two different concentrations (25% and 50%), as in a concentration of 25% the effect of the probiotic on some bacterial isolates at a concentration of 15% of dye Ethidium bromide with Agar (TSA) Soy Trypticase medium. In the case of a concentration of 50% of the probiotic, it inhibited efflux pumps in all bacterial isolates .