



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة ديالى  
كلية التربية للعلوم الصرفة

## التحري عن طفيلي الاميبا الحالة للنسيج وبكتريا الاشريشيا القولونية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية المرتبطة مع الاسهال الحاد لدى الاطفال في مدينة بعقوبة

أطروحة دكتوراه مقدمة إلى  
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

طالب الدكتوراه

علي شاكر محمود العزي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2009  
ماجستير علوم الحياة/احياء مجهرية/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2019

بإشراف

أ. د. هادي رحمن رشيد الطائي

أ.م.د. علي جعفر سليم

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



**Investigation of *Entamoeba histolytica* and  
multidrug resistance *Escherichia coli*  
associated with acute diarrhoea among children  
in Baquba city**

This thesis was submitted to the Council of the College of  
Education for Pure Sciences—University of Diyala. It is part of  
the requirements for obtaining a doctoral degree In Biology  
Philosophy.

**By**

**Ali Shakir Mahmood Al-Ezee**

B.Sc. / Biology/college of education for pure science  
/ University Of Diyala /2009

M.Sc. / Microbiology/college of education for pure science  
/University Of Diyala /2019

**Supervised by**

**Asst. Prof.**  
**Dr. Ali Jaffar Saleem,**

**Prof**  
**Dr. Hadi R. Rasheed Al-Taai**

2024 A.D.

1446 A.H.

## 1- المقدمة Introduction

يعد الإسهال الحاد (Acute diarrhea) سبباً رئيسياً مهماً للأمراض والوفيات لدى الأطفال دون سن الخامسة (Li وآخرون، 2021). وهناك عدة أسباب للإسهال التي قد تكون ناجمة عن أمراض معوية أو خارج الأمعاء أو أمراض جهازية كامنة (Sathiyasekaran وآخرون، 2023). إذ تشكل أمراض الإسهال (Diarrhea) مجتمعة تحديًا خطيرًا للصحة العامة على مستوى العالم، خاصة أنها السبب الرئيسي لوفاة الأطفال بعد أمراض الجهاز التنفسي. ويعد الكشف الدقيق وفي الوقت المناسب عن مسببات هذه الأمراض أمرًا بالغ الأهمية (Ugboko وآخرون، 2020). ويعرف الإسهال (Diarrhea) بأنه زيادة محتوى الماء في البراز بسبب اختلال في الأداء الطبيعي للعمليات الفسيولوجية للأمعاء الدقيقة والغليظة المسؤولة عن امتصاص الأيونات المختلفة والمواد الأخرى (Nemeth و Pflieger، 2022). إذ يتسبب الإسهال الحاد في فقدان الكثير من الماء والأملاح من الجسم مما يؤدي إلى الجفاف الشديد والوفاة خلال فترة قصيرة من الزمن أو يعرض الأطفال لسوء التغذية ويجعلهم أكثر عرضة للإصابة بأمراض أخرى يعد مرض الإسهال السبب الرئيسي الثالث لوفاة الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 1 و59 شهرًا. وفي كل عام يقتل الإسهال حوالي 443832 طفلًا دون سن الخامسة، فضلًا عن 50851 طفلًا تتراوح أعمارهم بين 5 و9 سنوات. (WHO، 2024). تسبب الإسهال في وفاة ما يقرب من مليوني طفل في عام 2013 ويمثل ما يقرب من ثلث مجموع وفيات الأطفال دون سن الخامسة في جميع أنحاء العالم (Vakili وآخرون، 2015). وتعد الطفيليات والبكتيريا المعوية من العوامل المسببة المهمة المسؤولة عن الإسهال المستمر عند الرضع والأطفال بسبب ارتفاع معدل حدوثها في كل من المستشفيات والمجتمع (Abdulqader وآخرون، 2022).

وتجدر الإشارة إلى أن الطفيليات المعوية ابرز الأسباب شيوعًا للإسهال لدى الأطفال وهي منتشرة عالميًا تقريبًا مع معدلات انتشار عالية في البلدان النامية (Hussein، 2022). إذ يعد الإصابة بداء Amebiasis من المشكلات الصحية الرئيسية التي تسببها *Entamoeba histolytica*، وهي

أكثر الطفيليات المعوية شيوعاً وتنتشر في جميع أنحاء العالم جميعاً. من خلال تناول الطعام أو شرب ماء ملوثين (Dhubyan Mohammed، 2022).

وترتبط *Diarrheagenic Escherichia coli* (DEC) بتكرار حالات العدوى المنقولة بالمياه وتشكل مخاطر صحية على الأفراد الذين يستخدمون المياه للاستخدامات المختلفة. إذ يمكن استخدام الكشف عن أنماط DEC المرضية في مياه الشرب مؤشراً على التلوث بالبراز (Tariq وآخرون، 2021). وتعد أحد مسببات الأمراض المعوية المهمة التي تسبب مجموعة واسعة من أمراض الجهاز الهضمي، وهناك العديد من السلالات المسببة للأمراض المرتبطة بالإسهال، وهي *E. coli* enterohemorrhagic (EHEC)، *E. coli* enterotoxigenic (ETEC)، *E. coli* enteropathogenic (EPEC)، *E. coli* enteroaggregative (EAEC)، *E. coli* enteroinvasive (Yu وآخرون، 2020).

إذ تمتلك بعض أنواع *E. coli* بعض عوامل الضراوة التي تمكنها من التسبب في مجموعة واسعة من الالتهابات المعوية (Mann و Saeed، 2012). ويمكن أن تشكل بسهولة الغشاء الحيوي على سطح الناقلات الحية أو غير الحية أو في المناطق المصابة (Zhou وآخرون، 2022). يعد تكوين الغشاء الحيوي مفهوماً بيولوجياً مهماً، إذ يتولى حماية الخلايا الميكروبية من المؤثرات الخارجية (Floyd وآخرون، 2017).

سموم الهيمولايسين هو عامل الضراوة الرئيسي لسلالات *E. coli*. وتقوم البكتيريا بإفراز السموم إلى الدورة الدموية، ليؤدي إلى زيادة الكالسيوم داخل الخلايا ومن ثم تؤدي إلى تحلل بروتينات الهيكل الخلوي، ويؤثر في phosphatidylserine (PS) بالطبقة الخارجية لأغشية كريات الدم الحمراء (Strack وآخرون، 2019). إذ يعد عاملاً مهماً في هذه التسبب بالالتهاب ومن الممكن أن تختلف من مريض إلى آخر بسبب حدوث طفرات بـ isogenic hemolysin (Mirsepasi- Lauridsen وآخرون، 2020).

جرى استخدام مضادات البييتالاكتام على نطاق واسع كمواد علاجية على مدار السبعين عامًا الماضية، مما أدى إلى انتشار إنزيمات البييتالاكتاميز المقاومة لمضادات البييتالاكتام (Bush واخرون، 2020). ويعد تقييم مدى انتشار إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف بين عزلات *E. coli* أمرًا بالغ الأهمية نظرًا لتأثيره الكبير في اختيار مضادات المناسبة (Hassuna واخرون، 2020). ومن ثم أصبحت عملية اختيار العلاج المناسب تحديًا بسبب انتشار مقاومة العزلات البكتيرية المعوية التي تنتج إنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية ضد المضادات الحياتية التي تعد مصادر للعدوى المستشفيات فضلًا عن العدوى المكتسبة من المجتمع في جميع أنحاء العالم (Periasamy واخرون، 2020).

إن الأصل والأساس الجزيئي للمقاومة البكتيرية هو وجود جينات مقاومة للمضادات (Jian واخرون، 2021). إذ إن مقاومة البكتيريا لمضادات الحياتية وخاصة المستخدمة على نطاق واسع أدت إلى آليات دفاعية ضدها وهناك ارتباط وثيق بين استخدام تلك المضادات من قبل المرضى وبين زيادة معدلات المقاومة لها ، وتعد مقاومة المضادات المتعددة (MDR) Multidrug resistance هي مشكلة رئيسة في أنحاء العالم جميعًا ويشفر لها عن طريق جينات المقاومة Resistance genes التي يكون بعض منها محمولة على الأنتكروونات (Betteridge واخرون، 2011).

تحدد مجاميع phylogenetic العلاقات بين العناصر الانتقالية، لتعطي مفهوم التركيب ووظيفية البروتينات التي تهدف في توضيح العلاقات بين عوامل الضراوة البكتيرية وكيفية علاجها (Clarke واخرون، 2022). تعد Integrons مفاتيح رئيسة في مقاومة المضادات لأنها قد تكتسب وتعبّر عن مجموعة واسعة من جينات المقاومة. وغالبًا ما يتم تضمينها في البلازميدات والعناصر الانتقالية الترانسبوزونات، مما يسهل عملية النقل الأفقي للجينات إلى مجموعة متنوعة من العزلات البكتيرية. إذ يعد فهم أصل هذه العناصر أمرًا مهمًا للتحكم العملي في مقاومة المضادات الحيوية وللتحقق من كيفية تأثير النقل الأفقي للجينات بشكل خطير على حياة الإنسان (Schroeder واخرون، 2017). وتم التعرف على العديد من الأنواع المختلفة للأنتكروونات وتمييزها عن طريق

جيناتها مثل (*IntI*) ، الانتكروانات الصنف الاول في بيئة المستشفى ترتبط ارتباطاً وثيقاً بالمقاومة المتعددة لـ Enterobacteriaceae (Cury وآخرون، 2016).

نظراً لانتشار حالات الاسهال وخاصة لدى الأطفال في مدينة بعقوبة، وخطورة الإصابة واهميتها لكونها من الامراض واسعة الانتشار في المجتمع العراقي، ولغرض تشخيص مسببات هذه العدوى بدقة وتحديد مكامن خطورتها ومقاومتها للمضادات الحياتية تم استخدام التقنيات الجزيئية ولتحقيق هذا الهدف اتبعنا في هذه الدراسة عدة خطوات يمكن اجمالها بالاتي :

1. التحري عن الاميبا الحالة للنسيج المسببة للاسهال الحاد لدى الأطفال.
2. عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* من حالات الاسهال لدى الأطفال.
3. فحص الحساسية لمضادات حياتية مختلفة لبكتريا *E.coli* .
4. تحديد التحسس بالنصاب quorum sensing لبكتريا *E.coli* مظهرياً وجينياً
5. اجراء التنميط الجيني لبكتريا *E.coli* .
6. تحديد أصناف الانتكرون وتحديد gene cassette ورسم الخارطة الجينية للانتكروانات من خلال تحديد تسلسلات DNA.

## Summary

The study included the collection of 367 stool samples taken from patients hospitalized in Al-Batoul Hospital for Women, Obstetrics, and Children and private laboratories for the period from 11/15/2022 to 2/1/2023 for different age groups whose ages ranged between (less than 1 year - 7 years), males and females. There were 207 male samples and 160 female samples.

The samples were examined microscopically by direct and by the floating method to diagnose *Entamoeba histolytica*. Using a specialized primer, the *18S rRNA* gene, 52 samples were obtained, at a rate of 14.44%, belonging to the *E. histolytica*. To diagnose *E. coli*, samples were cultured on blood agar and MacConkey agar plates using the plotting method to distinguish between Gram-positive and Gram-negative bacteria. The samples were cultured on a methylene blue eosin medium to diagnose *E. coli* isolates that appeared bright metallic green. *E. coli* were detected based on biochemical tests, and their diagnosis was confirmed molecularly using the *trpA* gene, as 50 isolates were accurately and definitively diagnosed as *E. coli*.

The quorum sensing system was detected in *E. coli* by detecting (AHLs) signals using the quantitative screening method using the ELISA device, and it was 92%. As for the molecular detection of the *sdiA* gene, which is a receptor that exclusively detects (AHLs) signals, the gene was shown at 98%.

The results of the detection of virulence factors and the detection of biofilm formation by a quantitative method using an ELISA device showed that all isolates formed biofilms, and the percentage was 100%. 38 isolates and a percentage of 76% were strongly formed biofilm, and 12 isolates and a percentage of 24% were moderately severe. The isolates producing the hemolysin enzyme showed 32 isolates and a percentage of 64%. The results

of the detection of the production of broad-spectrum beta-lactamase enzymes showed 18%. As for the production of metal beta-lactamase enzymes, it was found that 23 isolates produced the enzyme at a percentage of 46%. The results of the *E. coli* sensitivity test for antibiotics (Ampicillin, Amoxicillin, Clavulanate, Ceftazidime, Cefotaxime, Aztreonam, Tobramycin Amikacin, Azithromycin, Doxycycline, Tigecycline, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Imipenem, Trimethoprim-sulfamethoxazole, Sulfonamides) showed that the resistance rates to these antibiotics were as follows (96%, 94%, 88%, 92%, 68%, 26%, 56%, 52%, 60%, 0%, 26%, 28%, 14%, 74%, 68%) respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) of Polymyxin B was determined. The values for the antibiotics ranged between 2-4. The number of resistant isolates was 24, at a rate of 48%. Therefore, the results showed that multiple resistance (MDR) was 96%, while multiple resistance (XDR) was 20%.

*E. coli* is divided into 8 phylogroups, namely A, B1, B2, C, D, E, F, and UP, based on the presence of 8 specific genes. The results showed that the highest group was group E, with 13 isolates, at a rate of (26%), followed by group C, which had 8 isolates at a rate of (16%). As for groups A, B2, and Up, there were 6 isolates, at a rate of (12%) for each. As for group B1, there were 5 isolates, at a rate of (10%), and the lowest group in each of D and F was 3 isolates, at a rate of (6%) for each. The results of the Integron detection showed that the percentage of isolates carrying the Integron class I was 66%. As for the Integron class II, its detection results were 18%. The Integron class III was 8%. All isolates belonging to group B2 were 100% Integron and thus represented the largest evolutionary groups carrying the first-class integron in the current study.

The genes of *qacEΔ1* and *sul1*, resistant to antibiotics, were detected in the structure Integron class I. The percentage of the *sul1* gene in the isolates carrying the Integron class I was only 67.64%. The percentage of the *qacEΔ1* gene was 85.29%. The molecular detection of the Integron class I



structure was done for regions involved in the structure Integron class I , which are (*gene cassette Class I, 5, CS, 3, CS, ORFend, Sul1B, and F12R-Orf513-lnk13*). The results of the molecular detection of the above regions showed that they were all present in all isolates.

Sequencing DNA analysis was performed for the Integron class I genes, *qacEΔ1* and *sul1*, for four isolates, and they were matched with the global isolates on the NCBI website. The Integron class I analysis and the locations of the *qacEΔ1* and *sul1* genes were determined by (99.59%, 99% and 100%) respectively.