وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم حياة

التحري الجزيئي عن بعض جينات *Van* المسؤولة عن مقاومة مضاد الفانكومايسين في بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من عينات سريرية و بيئية

رسالة مقدمة

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

من الطالبة

زهراء ضياء صكبان

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى (2021)

بإشراف

أ.د. صبا جاسم جواد الزبيدي

1446ه **2025م**

الخلاصة Abstract

تعد بكتريا الإشريشيا القولونية *Escherichia coli* أحد أسباب الأكثر شيوعاً للعدوى البكتيرية ، و هي ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية ، و يرجع ذلك لامتلاكها عوامل ضراوة تساعدها على الالتصاق و تطور العدوى و التسبب في إمراضية الكائنات الحية الدقيقة ، هدفت هذه الدراسة الى التحري الجزيئي عن بعض جينات *Van* المسؤولة عن مقاومة مضاد الفانكومايسين في بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من عينات سريرية و بيئية . شملت الدراسة جمع (140) عينة سريرية تضمنت (93) عينة أدرار لمرضى يعانون من التهابات المسالك البولية و (21) عينة أدرار مرضى الفشل الكلوي و (15) عينة من مسحات الجروح و (11) عينة من مسحات حروق من مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى بلدروز العام ،كما وتم جمع (71) عينة ماء من مختبر الصحة العامة قسم الاغذية في محافظة ديالى لفترة من (1 كانون الأول 2023 ولغاية 30 اذار 2024) . تم تشخيص العزلات البكتيرية بالطرائق الزرعية و المجهرية و الاختبارات الكيموحيوية فضلاً عن جهازVitek، إذ أظهرت نتائج الزرع على وسط MacConkey agar و وسط Eosin Methylene Blue (EMB) و وسط HI Chrome *E.coli* agar، إن 44 عزلة بكتيرية تعود لبكتريا *E.coli* بحيث شملت (38 عزلة سريرية و 6 عزلات ماء) .

أوضحت نتائج فحص الحساسية ل 44 عزلة بكتريا *E.coli* ل 11 مضاد حيوي هي Gentamicin ، Amikacin ، Amoxicillin ، Ampicillin ،Vancomycin ، Meropenem ، Cefoxitin ، Cefotaxime ، Norfloxacin ،Ciprofloxacin (Imipenem) كانت اعلى نسبة مقاومة لمضاد Vancomycin إذ بلغت نسبة مقاومة 38(100%) عزلة سريرية 6(100%) عزلات ماء يليه مضاد Ampicillin 33(86.84%) عزلة سريرية 6(100%) عزلات ماء ، Amoxicillin 33(86.84%)عزلة سريرية 5(83.33%) عزلات ماء ، Cefotaxime 32(84.21%) عزلة سريرية 4(66.66%) عزلات ماء ، Norfloxacin 19(50%) عزلة سريرية 2(33.33%) عزلة ماء ،

Cefoxitin عزلة ماء، (%33.33)2 عزلة سريرية (%44.73)17 Ciprofloxacin Gentamicin عزلة مقاومة لعينات ماء، عزلة سريرية بينما لم تظهر اي (%34.21)13 Amikacin ، عزلة ماء (%16.66)1 عزلات سريرية (%21.05)8 عزلات سريرية بينما لم تظهر أي عزلة مقاومة لعينات ماء ، أما بالنسبة للمضادين Meropenem و Imipenem لم تظهر اي عزلة مقاومة للعزلات السريرية و الماء . تضمنت الدراسة أيضاً الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة Virulence Factors ل 25 عزلة بكتريا *E.coli* ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية اذ تم الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي و انزيمات البيتا-لاكتاميز المعدنية و انزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف ، إذ بينت نتائج تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة أطباق المعايرة Micro Titter plate، إن 25 عزلة بكتريا *E.coli* قادرة على تكوين الأغشية الحيوية و بدرجات متفاوتة منها 6(24%) عزلات سريرية مكونة للأغشية الحيوية المتوسطة و 13(52%) عزلة سريرية مكونة للأغشية الحيوية الضعيفة و 4(16%) عزلات ماء مكونة للأغشية الحيوية القوية و 2(8%) عزلة ماء مكونة للأغشية الحيوية المتوسطة . وان 1(4%) عزلة سريرية و 2(8%) عزلة ماء مكونة لأنزيمات البيتا-لاكتاميز المعدنية . و5(20%) عزلات سريرية و 1(4%) عزلة ماء مكونة لأنزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف .

اظهرت نتائج الكشف الجزيئي باستخدام جين *16SrRNA* ل 11 عزلة بكتيرية (3,4,5,8,11) عزلة سريرية و (20,21,22,23,24,25) عزلة ماء حيث كانت جميع العزلات حاملة لجين *16SrRNA* بنسبة (100%) و بعدها ارسلت نتائج PCR ل (8) عزلات (3,4,5,8,11) عزلة سريرية و (20,21,22) عزلة ماء الى المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية National Centre for Biotechnology Information (NCBI) لغرض عمل تسلسل للعزلات إذ ظهرت (3) عزلات جديدة عزلتين من إدرار ذات Accession number (PP977164) و (PP977166) و عزلة من ماء ذات Accession number (PP977172) تم تسجيلها في مركز (NCBI) بعدها تم عمل شجرة تطورية للعزلات المسجلة . بينما أظهرت نتائج الكشف

الجزيئي لبكتريا *E.coli* لجينات *Van* ل 25 عزلة بكتريا *E.coli* إنَّ نسبة ظهور جين *Van A* 9(36%)عزلات إذ ظهر في (7) عزلات سريرية و (2) عزلة ماء و *Van B* 4(16%) عزلات إذ ظهر (2) عزلة سريرية و (2) عزلة ماء و *Van C* لم تظهر أي حاملة لهذا الجين

1 . المقدمة Introduction

الاشريشيا القولونية (*E.coli*) *Escherichia coli* هي عصيات سالبة لصبغة كرام تنتمي إلى عائلة Enterobacteriacea ، بكتريا *E.coli* هي بكتيريا متعايشة في أمعاء الإنسان يمكن أن تسبب سلالات معينة من بكتريا *E.coli* عدوى لدى البشر، بما في ذلك التهابات المسالك البولية و قد تؤثر هذه العدوى على المثانة (التهاب المثانة) أو تتقدم إلى الكلى (التهاب الحويضة والكلية). و في الحالات الشديدة، يمكن للبكتيريا أن تصل إلى مجرى الدم مسببة تسمم الدم Septicemia ، و اضطرابات معوية وغير معوية لدى الإنسان والحيوان في جميع أنحاء العالم (Kasangaو آخرون ،2023 ؛ Ilsby وآخرون ، 2024) .

تم تحديد مجموعة واسعة من عوامل الضراوة في جميع سلالات بكتريا *E.coli* اذ تشمل هذه عوامل الضراوة الرئيسية الزغابات و الأغشية الحيوية و الانزيمات والسموم وغيرها (Elfeky وآخرون ، 2024) .

تعدُّ بكتريا *E.coli* مؤشرًا بكتيريًا مهمًا لجودة المياه، إذ يشكل تلوث الممرض ببكتريا *E.coli* في المياه مصدر قلق صحي كبير في جميع أنحاء العالم، وهو السبب وراء أمراض معدية مميتة محتملة، بما في ذلك أمراض الإسهال (Liوآخرون ،2023).

إن انتشار مقاومة المضادات الحيوية بين البكتيريا هو السبب وراء مئات الآلاف من الوفيات كل عام. والمشكلة الأكثر خطورة هي العدد المتزايد باستمرار من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة بشكل شائع، بما في ذلك مضاد الملاذ الأخير (الفانكومايسين). والسرعة التي يمكن أن تنتشر بها جينات المقاومة في جميع أنحاء العالم تؤكد الارتفاع ، و هذه تعدُّ مشكلة تؤثر على الصحة العامة على نطاق عالمي (Urban-chmied و آخرون ،2024). تحدث مقاومة مضادات البيتا لاكتام بين البكتيريا المعوية من خلال آليات مختلفة. إحدى آليات المقاومة الأساسية هي من خلال تعطيل المضادات الحيوية بواسطة انزيمات البيتا-لاكتاميز . تعد البكتيريا المعوية المنتجة لانزيمات البيتا-لاكتاميز أخطر التهديدات وأكثرها خطورة على العالم

(Bush و Bradford ،2020). إذ تقوم انزيمات البيتا-لاكتاميز (السيفالوسبورينات ذات الطيف الواسع، والكاربابينيمات) بتحليل المضادات الحيوية البيتا لاكتام، يتم تصنيف العديد من إنزيمات البيتا-لاكتاميز إلى فئات مختلفة بناءً على تسلسل الأحماض الأمينية، وملف المثبط، والاختلاف في مواقعها النشطة (باستخدام السيرين أو تتطلب أيونات Zn^{+2}) للتحلل المائي (Zenebe وآخرون ،2023) . تستخدم بكتريا *E.coli* مجموعة متنوعة من الاستراتيجيات للبقاء والاستمرار في البيئة، إذ إن تكوين الأغشية الحيوية متبوعًا بتغليف *E.coli* في مصفوفة معقدة يمكن أن يزيد من مقاومة المضادات الحيوية ، وهذا يؤدي إلى صعوبة القضاء والسيطرة عليها نظراً لأن سلالات بكتريا *E.coli* المقاومة للمضادات المتعددة أصبحت شائعة ويمكنها تكوين أغشية حيوية (Milton وآخرون ،2023) .

يرتبط استخدام المضادات الحيوية بتغييرات كبيرة في تكوين ميكروبات الأمعاء، مما يؤدي إلى ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية. إنَّ الفانكومايسين هو مضاد حيوي يستخدم لعلاج الالتهابات البكتيرية ،إذ تحتوي البكتيريا سالبة لصبغة كرام ، والتي تقاوم الفانكومايسين بطبيعتها بسبب بنية جدار الخلية، على جينات مقاومة للفانكومايسين يمكن نقلها أفقيًا إلى أنواع بكتيرية أخرى (Luqman وآخرون ،2024) . يتطلب ظهور سلالات جديدة من بكتريا *E.coli* تطوير طرق تشخيصية مبتكرة. تتيح التقنيات الحديثة استخدام بادئات rRNA لتضخيم جين *16SrRNA* لتقييم الطفرات واكتشاف السلالة وتحليل مقاومة المضادات الحيوية. تساعد تقنية الترحيل الكهربائي الهلامي في تصور الجين المضخم، مما يسهل التعرف السريع عليه (Ullah وآخرون ،2023).

الهدف من الدراسة :

نظراً لقلة الدراسات حول انتشار جينات مقاومة Vancomycin في بكتريا *E.coli* جاءت هذه الدراسة للتحري الجزيئي عن بعض جينات *Van* المسؤولة عن مقاومة مضاد Vancomycin في بكتريا *E.coli* المعزولة من عينات سريرية و بيئية في محافظة ديالى و قد اتبعت الخطوات الآتية:

1- عزل بكتريا *E.coli* من التهابات المسالك البولية و الجروح و الحروق و مرضى المصابين بالفشل الكلوي و عزل بكتريا *E.coli* من عينات مياه من مختبر الصحة العامة قسم الأغذية في محافظة ديالى

2- تشخيص بكتريا *E.coli* زرعياً و مجهرياً و اختبارات كيموحيوية و التأكيد باستخدام جهاز Vitek.

3- فحص الحساسية الدوائية للعزلات السريرية و عزلات الماء بطريقة Kirby-Bauer لمجاميع مختلفة من مضادات حيوية و تحديد البكتريا ذات مقاومة المتعددة .

4- الكشف المظهري عن قدرة بكتريا *E.coli* لإنتاج انزيمات البيتا-لاكتاميز المعدنية و إنزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف فضلاً عن قدرتها على إنتاج الأغشية الحيوية .

5- الكشف عن بكتريا *E.coli* باستخدام جين *16SrRNA* و عمل تسلسل للعزلات و بناء شجرة تطورية للعزلات الجديدة .

6 - الكشف الجزيئي عن جينات *Van A* و *Van B* و *Van C* للعزلات السريرية و عزلات الماء.

2. استعراض المراجع Literature review

1.2 العائلة المعوية *Enterobacteriacea*

تضم العائلة المعوية Enterobacteriacea العديد من البكتريا السالبة لصبغة كرام التي تعيش كنبيب طبيعي Normal flora في أمعاء الإنسان و الحيوان، تشمل هذه العائلة على عدة أنواع من بكتريا منها *Escherichia , salmonella, Klebsiella, Shigella, Proteus* (Riedel و آخرون ،2019) . وهذه العائلة تتألف من عصيات سالبة لصبغة كرام لا هوائية اختيارية Facultative anaerobic ، غير مكونة للسبورات موجبة لفحص الكتاليز وسالبة للاوكسيديز وتعمل على تحويل النترات الى نتريت (Fusco وآخرون ،2023). يمكن لأفراد هذه العائلة أن تسبب العديد من الامراض للإنسان والحيوان مثل التهابات الجروح والعدوى المكتسبة من المستشفيات Nosocomial infection و التهابات الجهاز التنفسي Respiratory tract infections و التهابات المسالك البولية Urinary tract infections ، درجة الحرارة المثلى لنموها 37مْ و لديها مجموعة واسعة من عوامل ضراوة مثل السموم و الانزيمات و المحفظة و الغشاء الحيوي (Oliveria و آخرون ،2017) .

2.2 الخصائص العامة لبكتريا الاشريشيا القولونية General characteristics of *Escherichia coli*

الإشريشيا القولونية (*E.coli*) *Escherichia coli* هي بكتيريا سالبة لصبغة كرام من عائلة Enterobacteriacea و التي تعيش في أمعاء الإنسان بشكل غير ضار(Bonten و آخرون ،2021). وعلى الرغم من أن بكتريا *E.coli* هي بكتيريا متعايشة غير ضارة، إلا أن بعض السلالات مسببة للأمراض بشكل واضح وهي العامل المسبب لأمراض معوية وخارج معوية ، مثل التهابات المسالك البولية Urinary tract infections والتهاب الصفاق peritonitis وتسمم الدم Spitecemia والإسهال Diarrhea والتهاب السحايا Meningitis عند الاطفال

حديثي الولادة (Gaibani وآخرون ،2024) . تنمو بكتريا *E.coli* على الأوساط الاعتيادية ، إذ تكون مخمرة لسكر اللاكتوز وعند زراعتها على وسط ماكونكي MacConkey agar تظهر لون وردي ، أما عند زراعتها على وسط أيوسين أزرق المثيلين Eosin Methylene Blue (EMB) تظهر بريق معدني أخضر ، و تظهر بلون أخضر مزرق على وسط HiChrome *E.coli* agar (Wanger و آخرون ، 2017 ؛ Salfinger و آخرون ،2015) . تكون موجبة لفحص الاندول Indol ويعدُّ من أفضل الاختبارات الذي يميزها و أيضاً موجبة للكتاليز Catalase و سالبة للاوكسيديز Oxidase و اختبار فوكس بروسكاور Vogue's pruskaue ، درجة حرارة المثلى لنموها 37 مْ (Bourgeois و آخرون ، 2016) .

3.2 تصنيف بكتريا *E.coli* Classification of

في عام 1885 اكتشف العالم الألماني Theodor بكتيريا موجودة في الجهاز الهضمي، و التي تم عزلها من براز الأطفال حديثي الولادة والأطفال الصغار. والتي تنتمي هذه البكتريا إلى عائلة Enterobacteriacea تم تسمية هذه البكتيريا باسم *Escherichia coli* على اسم مكتشفها الأصلي Theodor Escherich (Yu و آخرون ، 2021) .تنمو بكتريا *E.coli* كنبيب طبيعي في الجهاز الهضمي وتعدُّ انتهازية مسببة للأمراض لأنها يمكن أن تسبب الإسهال ، وفي هذه الحالة يطلق عليها اسم(DEC) Diarrhea *E. coli* المسببة للإسهال والتهابات المسالك البولية التي يسببها النوع المسمى (UPEC) Uropathogenic *E.coli* المسببة للأمراض البولية و تكون مسؤولة عن حوالي 90% من عدوى المسالك البولية (Levinson و آخرون ،2018) .

يضم جنس *Escherichia* خمسة أنواع (*E.coli*،*E.blattae*، *E.vuneris* ، *E.hermanii*،*E.fergosonii*) تختلف فيما بينها ببعض التفاعلات الكيموحيوية و يعد نوع *E.coli* أكثر الأنواع شيوعاً في إمراضية الإنسان سان (Olowe و آخرون ،2017) .و يمكن تصنيف بكتريا *E.coli* بحسب ما جاء في (Faner و اخرون ، 2017) :

Domain: Bacteria

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Order: Enterobacterales

Class: Gammaproteobacteria

Family: Enterobacteriacea

Genus: *Escherichia*

Species: *coli*

4.2 وبائية بكتريا *E.coli* Epidemiology of

تمثل بكتريا *E.coli* أحد الأسباب الأكثر شيوعًا للعدوى البكتيرية، وهي مسؤولة عن (70-90%) من التهابات المسالك البولية الحادة التي تصيب المجتمع و 50% من التهابات المكتسبة من المستشفيات. يتم وصف المضادات الحيوية البيتا لاكتام والفلوروكينولونات على نطاق واسع لعلاج كل من العدوى المجتمعية Community infection و عدوى المستشفيات Nosocomial infection التي تسببها بكتيريا *E.coli* (Núñez-Samudio وآخرون ،2021) . وإنَّ لعدد المتزايد من الاصابات الناجمة عن بكتريا المقاومة للأدوية المتعددة Multidrug resistance (MDR) يشكل مصدر قلق كبير للصحة العامة في جميع انحاء العالم. و قد شكل ظهور مقاومة مضادات الميكروبات تحديات كبيرة لعلاج مجموعة واسعة من الأمراض المعدية (Dadashi و آخرون ، 2022). أفادت دراسة التي أجريت في محافظة النجف ، إذ تم

الحصول على (100) عزلة تعود لبكتريا *E.coli* من مجموع (380) عينة سريرية مختلفة (الرماحي ، 2023) .

غالبًا ما تُستخدم بكتريا *E.coli* كمؤشر على تلوث مياه الشرب بالبراز، ويمكن أن يؤدي شرب المياه الملوثة ببكتريا *E.coli* إلى مضاعفات خطيرة بما في ذلك الإسهال والتهاب الأمعاء والوفاة في بعض الحالات تنتشر البكتيريا المقاومة لمضادات الميكروبات على نطاق واسع في المياه البيئية، وتعد بكتريا *E.coli* مستودعًا مثيرًا للقلق لمقاومة مضادات الميكروبات نظرًا لوفرة وجودها في مثل هذه البيئات ذات المخاطر العالية للانتقال من البيئة إلى الإنسان (Mahmoud و آخرون،2020). بينت دراسة التي أجريت في محافظة بغداد وذلك بعزل بكتريا *E.coli* من مياه نهر دجلة إذ كانت عزلات بكتريا *E.coli* مقاومة لمضاد Vancomycin (Al-Kareem ،2023) . وأيضاً أفاد مجموعة من الباحثين بعزل بكتريا *E.coli* من إمدادات مياه الشرب في ايرلندا إذ بلغت نسبة وجود بكتريا *E.coli* في مياه (26%) (Daly وآخرون ،2023).

5.2 تلوث مياه Water pollution

إن مياه الشرب الآمنة أمر بالغ الأهمية للصحة العامة، إذ يمكن أن تؤدي المياه الملوثة إلى الإصابة بأمراض مختلفة منقولة بالمياه، بما في ذلك الإسهال (Olanrewaju وآخرون ،2024). لتحسين الجودة الميكروبية لمياه الشرب، أثبتت التدخلات مثل الترشيح والتطهير وخطط سلامة المياه فعاليتها(Sköld واخرون ،2022). فضلاً عن ، تلعب محطات معالجة المياه دورًا حيويًا في ضمان سلامة مياه الشرب، وتتكون من وحدات مختلفة، مثل الترسيب والتخثر والترشيح والتطهير، والتي تعمل معًا لإزالة الملوثات والمسببات للأمراض من المياه (Daraei وآخرون، 2023 ؛ Alkhadra وآخرون ،2022) . ومع ذلك، يمكن المساس بفعالية محطات معالجة المياه في منع الأمراض المنقولة بالمياه إذا كانت هناك حواجز ميكروبية غير كافية أو إذا لم تتم إدارة عملية المعالجة بشكل صحيح (Vucinic وآخرون ،2022) .

أحد المخاوف المحددة في محطات معالجة المياه هو وجود عزلات بكتيرية حاملة لجينات مقاومة لمضادات الميكروبات .و يمكن أن تشكل هذه الجينات خطرًا على الصحة العامة لأنها تساهم في انتشار مقاومة المضادات الحيوية (Lu و آخرون ،2018) . قدرت منظمة الصحة العالمية أن 80% من جميع الأمراض في العالم يمكن أن يعزى إلى عدم كفاية إمدادات مياه الشرب وسوء الصرف الصحي ،و في حالة الأمراض المنقولة عن طريق المياه، يحدث تفشي بكتريا *E.coli* بسبب استهلاك المياه الملوثة كما ورد من نظام إمدادات المياه العامة (Al-Kareem ،2023).

قد يرتبط انتشار مقاومة الفانكومايسين في بكتريا *E.coli* في مياه النهر بمخلفات مضادات الميكروبات لأن وجود المضادات الحيوية في البيئة المائية يستخدم على نطاق واسع للوقاية من العدوى أو علاجها، وخاصة في الانسان والطب البيطري وتربية الأحياء المائية والزراعة (Kümmerer، 2009). يتم إطلاق مضادات الميكروبات في الماء والتربة من خلال الإدرار والبراز أو تصريف النفايات مثل النفايات المنزلية. فضلاً عن ذلك، يمكن إطلاق العديد من المواد الكيميائية بما في ذلك المضادات الحيوية في الماء في شكل مياه الصرف الصحي الصناعية(Polianciue وآخرون ،2020) .

6.2 الإمراضيه Pathogenicity

بكتريا *E.coli* تعد السبب الأكثر شيوعا للإصابة بالأمراض و خاصة التهابات المسالك البولية ، إذ يمكن أن تصل حوالي 90% من إصابات المسالك البولية إلى مجرى الدم و تسبب تسمم الدم و تتطور الإصابة لتشمل المثانة و الكلى لأنها تمتلك عوامل ضراوة تسهل الالتصاق و غزو البكتريا (Zeadan و آخرون ،2022) .

و تسبب بكتريا *E.coli* العديد من الأمراض الشائعة منها:

1.6.2 السحايا Meningitis

يرتبط التهاب السحايا الجرثومي بارتفاع معدلات الوفيات والأمراض وتتراوح معدلات الوفيات بين 15_10 %، و لاسيما في فترة حديثي الولادة. تظل بكتريا *E.coli* المسببة للأمراض خارج الأمعاء واحدة من أكثر مسببات الأمراض البكتيرية شيوعًا والتي تسبب التهابات خارج الأمعاء بما في ذلك التهاب السحايا عند الأطفال حديثي الولادة Meningitis. يُعرَّف التهاب السحايا المبكر بأنه تطور التهاب السحايا الجرثومي في غضون 3 أيام من الولادة، بينما يُعرَّف التهاب السحايا المتأخر بأنه تطور التهاب السحايا الجرثومي بعد أكثر من 3 أيام من الولادة (Liu و آخرون ،2021).

2.6.2 الإسهال Diarrhea

ما يزال مرض الإسهال Diarrhea مشكلة صحية كبيرة ويعدُّ سبباً مهماً للأمراض و الوفيات لاسيما عند الأطفال دون سن الخامسة (Mare و آخرون ،2021). من بين جميع أنماط أمراض بكتريا *E.coli* المسببة للإسهال، تعد *E.coli* المسببة للأمراض المعوية Enteropathogenic *E.coli* (EPEC) من النمط المرضي الرئيسي المنتشر بشكل كبير في المجتمع والمستشفيات (Liu وآخرون ،2023) .

يتم تقسيم سلالات Diarrhea *E.coli* (DEC) على خمس مجموعات فرعية رئيسة وفقاً لخصائصها المسببة للأمراض :

1.2.6.2 الإشريشيا القولونية المعوية المسببة للتسمم المعوي Enter toxigenic *E.coli* (ETEC)

تعد السبب الرئيس لإسهال المسافرين و تسبب أيضاً الإسهال عند الرضع الذين يعانون من سوء التغذية، تزيد سلالات ETEC من إفراز السوائل عن طريق إنتاج السموم قابلة للحرارة و مستقرة بالحرارة (Khalil و آخرون ، 2018 ؛ Alia و آخرون ،2022).

2.2.6.2 الإشريشيا القولونية المعوية الغازية Enter invasive *E.coli* (EIEC)

ترتبط ارتباطاً وثيقا بأنواع *Shigella* من حيث الكيمياء الحيوية و الوراثية و القدرة على التسبب في الأمراض و على غرار *Shigella* تسبب *E.coli* المعوية الغازية ايضا الديزنتري Dizentry عند الأنسان (Geurtsen و آخرون ، 2022) .

3.2.6.2 الإشريشيا القولونية المعوية المتجمعة Enter aggregative *E.coli* (EAEC)

تشكل نمط التصاق متجمع عند نموها على خط الخلايا تعد بكتيريا *E.coli* المعوية المتجمعة واحدة من الأسباب الرئيسة للإسهال الحاد والمزمن عند الاطفال و البالغين (Moxley، 2022 ؛Joffre و Iniguez، 2020).

4.2.6.2 الإشريشيا القولونية المسببة للأمراض المعوية Enter pathogenic *E.coli* (EPEC)

تلتصق سلالات بكتريا *E.coli* المسببة للأمراض المعوية بغشاء الخلايا المعوية من خلال عملية تسمى الالتصاق الموضعي local adhesion ، تنقسم سلالات بكتريا *E.coli* المسببة للأمراض المعوية على مجموعتين بناءً على وجود الأهداب Bundle Forming Pili(BFP) المجموعة الأولى هي (EPEC) النموذجية التي تحتوي على(BFP) بينما المجموعة الثانية هي (EPEC) غير النموذجية التي لا تحتوي على (BFP) (Mare و آخرون، 2021 ؛ Silva و آخرون ،2020)

5.2.6.2 الإشريشيا القولونية المنتجة لسموم شيغا Shiga toxin producing *E.coli* (STEC)

تلتصق بكتيريا *E.coli* المنتجة لسموم شيغا والتي يكون مستودعها الرئيسي هو اللحوم النيئة بغشاء القولون المخاطي و تسبب الإسهال عن طريق انتاج سموم فيروتوكسين (Verotoxin) (Kholdi و آخرون ، 2021 ؛ Castro و آخرون ،2019).

3.6.2 التهابات المسالك البولية Urinary tract infection (UTI)

تعد التهابات المسالك البولية واحدة من أكثر أنواع العدوى البكتيرية شيوعًا في جميع أنحاء العالم وتعدُّ سببًا رئيساً للأمراض ، إن معدل تكرار الإصابة المرتفع لدى الأفراد المعرضين للإصابة يجعل العلاج صعبًا ، إذ يعد أحد أقوى عوامل الخطر للإصابة بالتهاب المسالك البولية هو الإصابة السابقة بالتهاب المسالك البولية (Russell و آخرون ، 2023) . تعد بكتريا *E.coli* أكثر الأنواع شيوعاً للإصابة بالتهابات المسالك البولية (UPEC) Uropathogenic *E.coli*، وهي مسببة للأمراض سالبة لصبغة كرام منتشرة في كل مكان (Bunduki و آخرون ،2021) .

تبدأ العدوى عندما تدخل البكتيريا الموجودة في الأمعاء مجرى البول وتستعمر الخلايا الظهارية ثم تهاجر في النهاية إلى الأعلى لاستعمار المثانة (Whelan و آخرون ،2023) . يؤدي مجرى البول وظيفة الدفاع عن النفس وعادة ما يمنع التهابات المسالك البولية يمكن للغشاء المخاطي الإحليلي والخلايا الظهارية مقاومة غزو البكتيريا المسببة للأمراض، والحفاظ على التوازن بين مجرى البول والبكتيريا (Zhou و آخرون،2023) . ومع ذلك، عندما تكون مسببات الأمراض من البكتيريا قوية جدًا، أو يعاني الجسم من ضرر خارجي، يختل هذا التوازن، وتتعرض وظيفة الدفاع في الجسم للخطر. بعد ذلك، تحدث سلسلة من التفاعلات الالتهابية في المسالك البولية، مثل التهاب مجرى البول، والتهاب المثانة، والتهاب الحويضة والكلية (Hannan وآخرون، 2012) .

يتم تصنيف التهابات المسالك البولية إلى نوعين و هي التهابات المسالك البولية المعقدة Complicated UTI و يتم تعريفها من خلال وجود أعراض جهازية أو من خلال قابلية المضيف لمسار مرضي معقد، وتشمل الأعراض الجهازية الحمى وأعراض أخرى تشير إلى التهابات الأنسجة مثل التهاب الحويضة والكلية أو التهاب البروستات ، تحدث التهابات المسالك البولية المعقدة في المرضى الذين يعانون من خلل هيكلي أو وظيفي في المسالك البولية التناسلية أو من خلال عدوى قسطرة الإدرار (Zhang و آخرون ، 2021) .و التهابات المسالك البولية غير

معقدة Uncomplicated UTI يتم تصنيف التهابات المسالك البولية على أنها غير معقدة (التهابات المسالك البولية / التهاب المثانة الحاد) عندما تحدث لدى النساء الأصحاء من دون وجود تشوهات بنيوية أو وظيفية في المسالك البولية، أو أمراض مصاحبة معقدة، أو الحمل (Fromer و آخرون ،2024) . التهابات المسالك البولية غير المعقدة عادة ما تكون محدودة ذاتيا، ولكن عادة ما يتم علاجها بالمضادات الحيوية لأن هذا العلاج يؤدي إلى حل أسرع للأعراض ومن المرجح أن يزيل البكتيريا في الإدرار (Piontek وآخرون ،2023) .

4.6.2 التهابات الجروح و الحروق Burns and Wounds infections

يعمل الجلد كحاجز حاسم ضد البيئة والغزو الميكروبي إذ يقوم بمجموعة متنوعة من المهام الدفاعية الحرجة. ومع ذلك، بمجرد تعرض سلامة البنية التشريحية الطبيعية للجلد للخطر، تتدهور آلية الحماية المحددة للجلد، مما يستلزم تطبيق حماية إضافية على الجلد المصاب (Gruppuso وآخرون ،2021 ؛ Tamer و آخرون ، 2021). تعد إصابات الحروق من أكثر أشكال الصدمات شيوعًا وتدميرًا .حيث يعاني مرضى الحروق من استعداد فريد للإصابة بعدوى مختلفة مرتبطة بضعف المقاومة بسبب تعطل سلامة جلد ميكانيكياً ، يتم استبدال حاجز الجلد ببيئة غنية بالبروتين والأوعية الدموية توفر مكانًا مناسبًا للاستعمار الميكروبي وانتشاره بواسطة واحد أو أكثر من الكائنات الحية الدقيقة في أي مكان وتصبح في وضع أفضل للتسبب في تلف الأنسجة المعقمة للمضيف (Fatema و آخرون ، 2021) .

يتم تنسيق عمليات التئام الجروح في الجلد المصاب بشكل كبير، مع تعيين خلايا جلدية مختلفة وجزيئات نشطة لإغلاق المنطقة المصابة بسرعة واستعادة الأنسجة التالفة (Hassan وآخرون ،2019; Yazarlu و آخرون، 2021) . ومع ذلك، فإن إفرازات الجروح تعرض الجلد التالف لخطر استعمار الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض، بما في ذلك البكتيريا سالبة لصبغة كرام، مثل *Klebsiella* ،*Escherichia coli* *Pseodomonas auroginosa*،

pneumoniae ، *Acinobacter baumannii* (Hassan وآخرون،2021؛ Zhou وآخرون ،2019).

7.2 عوامل الضراوة Virulence Factors

عوامل الضراوة هي مكونات أساسية تمكن البكتيريا من إحداث العدوى والتغلب على دفاعات المضيف والتسبب في المرض (Abdu Lateef و آخرون ،2023). هناك عوامل ضراوة مختلفة تشارك في التسبب في إمراضيه الكائنات الحية الدقيقة ، ومن بينها يمكننا أن نذكر عوامل الضراوة الفعالة في تكوين الأغشية الحيوية ،و المحفظة، والالتصاق و انتاج السموم (Karam و آخرون ،2018) .التصاق البكتيريا bacterial adhesion هو الخطوة الأولى في تطور العدوى المرتبطة بالمادة الحيوية، إذ إن التصاق البكتيريا بأنسجة وخلايا وجزيئات مضيفها هي الخطوة الأولى في العدوى التي لا تشارك فيها المواد الحيوية ، و إن الالتصاق البكتيري هو المرحلة الأولى من تكوين الأغشية الحيوية Biofilm و بمجرد تكوين الأغشية الحيوية الناضجة، تظهر مقاومة عالية للعوامل المضادة للميكروبات ويصعب القضاء عليها. الخلايا الملتصقة الأولية غير مستقرة وأسهل في الإزالة، لذلك من الضروري التركيز على انفصالها في المرحلة المبكرة من تكوين الأغشية الحيوية (Moriarty و آخرون ،2011 ؛ Yu و Shi ، 2021).

توفر الأغشية الحيوية طريقة حماية إضافية يمكن من خلالها للخلايا البكتيرية المغلقة تجنب التأثير الضار للعوامل المضادة للميكروبات إلى جانب الظروف البيئية القاسية (Zhang و آخرون ، 2021). تعد المحفظة Capsule البكتيرية واحدة من أكثر الهياكل الخلوية الخارجية. فهي تحمي البكتريا من صعوبات متعددة مثل الجفاف ، وخلايا المناعة لدى المضيف مثل الخلايا البلعمية macrophages، وقد تفسر قدرتها على حماية الخلية بسبب كونها عاملًا مهمًا في الإصابة بالأمراض (Haudiquet وآخرون، 2024) . و تلعب العديد من المركبات السامة أو البروتينات التي تفرزها سلالات *E.coli* دورًا مهمًا كعوامل ضراوة، اذ تمتلك السموم القدرة على

تعطيل سلسلة إشارات الخلية المضيفة والتأثير على الاستجابات الالتهابية (Parvez و Rohman، 2018) .

1.7.2 إنزيمات بيتا لاكتاميز (β-lactamase) Beta-lactamase

إنزيمات البيتا-لاكتاميز هي إنزيمات متحللة تستهدف حلقة البيتا لاكتام وهي ضرورية لنشاط المضادات الحيوية البيتا لاكتام ، تصنف انزيمات البيتا-لاكتاميز إلى أربع مجموعات A,B,C,D بناءً على تسلسل الأحماض الأمينية الخاصة بها. تسمى انزيمات البيتا-لاكتاميز الفئة A,C,D بـ سيرين-بيتا-لاكتاميز Serine β-lactamase (SβLs) لأنها تحتوي على بقايا سيرين في مواقعها النشطة للتحفيز (kang و آخرون ،2024). أحد عوامل المقاومة الأساسية التي يتم من خلالها إبطال فعالية المضادات الحيوية بيتا لاكتام هو من خلال عمل إنزيمات البيتا-لاكتاميز (β-lactamase). تقوم إنزيمات البيتا-لاكتاميز بتحليل حلقة بيتا لاكتام عن طريق تعطيل الرابطة amide النشطة لحلقة بيتا لاكتام (β-lactam) الموجودة في هذه المضادات الحيوية، وبالتالي يثبط نشاط المضاد الحيوي (Nwokebu وآخرون ،2024).

تنتج العديد من البكتيريا سالبة لصبغة كرام بشكل طبيعي إنزيمات البيتا-لاكتاميز المشفرة بوساطة الجينات الكروموسومية (Alfei و Schito،2022). أي يمكن تشفيرها كروموسوميًا أو اكتسابها عبر العناصر الجينية المتحركة مثل البلازميدات والعناصر المنقولة بين أنواع البكتيريا. تعمل العناصر الجينية المتحركة كناقلات في نقل جينات انزيمات البيتا-لاكتاميز والجينات المقاومة للمضادات الحيوية غير البيتا لاكتام بين أنواع البكتيريا، مما يؤدي إلى خيارات علاجية محدودة لعلاج الالتهابات (Owusu و آخرون ،2023).

1.1.7.2 إنزيمات البيتا-لاكتاميز المعدنية Metallo β-lactamase (MβLs)

هي مجموعة من الإنزيمات المتحللة المهمة سريريًا والتي تنتمي إلى الفئة الجزيئية B -β lactamase أو المجموعة 3 وفقًا للتصنيف الوظيفي Bush-Jacoby-Medeiros

(Nagshetty وآخرون ،2021) . إن إنزيمات MβLs هي إنزيمات تنتجها البكتيريا وتمنحها مقاومة لمعظم المضادات الحيوية بيتا لاكتام، بما في ذلك الكاربابينيمات، التي تتمتع بأوسع طيف من النشاط. وتشكل آلية المقاومة هذه خطراً كبيرًا للصحة العامة ، لأنها تقلل بشكل كبير من خيارات العلاج للعدوى البكتيرية الشديدة. إن تطوير مثبطات فعالة ضد إنزيمات MβLs أمر بالغ الأهمية لاستعادة قابلية البكتيريا لمضادات بيتا لاكتام (Denakpo و آخرون ،2023) . الطريقة الواعدة لاستهداف آلية عمل MβLs بشكل انتقائي هي عن طريق استخدام الأيونات المعدنية مخلبية EDTA التي تزيل أيونات الزنك Zn^{+2} الأساسية من الموقع النشط لإنزيم MβLs (Peters و آخرون ،2023).

2.1.7.2 إنزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف Extended spectrum β-lactamase (ESβLs)

إن إنزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف هي عبارة عن مجموعة من إنزيمات البيتا-لاكتاميز التي تعمل على تعطيل إنزيمات بيتا-لاكتاميز ولاسيما إنزيمات oxymino- β-lactams و monobactams ، ويتم منعها بوساطة مثبطات البيتا-لاكتاميز ، مثل حمض كلافولانيك Clavulanic acid . وهي مشفرة على البلازميدات ويمكن نقلها بسهولة من كائن حي إلى آخر . يتم تصنيف إنزيمات البيتا-لاكتاميز وفقًا لتصنيف أمبلر إلى فئتين A,D (Hosu و آخرون ،2021).

إن إنزيمات ESβLs هي إنزيمات قادرة على تحليل الجيل الثالث من السيفالوسبورينات . ويتم تثبيط إنزيمات ESβLs بواسطة حمض الكلافولانيك Clavulanic acid وقد ارتبطت ارتباطًا وثيقًا بمقاومة فئات أخرى من العوامل المضادة للبكتيريا. تصبح الكائنات الحية التي تنتج هذه الإنزيمات مقاومة للمضادات المتعددة، مما يحد من خيارات علاج العدوى (Chanu و آخرون ، 2023). تنتقل إنزيمات ESβLs بسهولة عن طريق البلازميد بين افراد العائلة المعوية

ومن المضادات الحيوية المستخدمة لعلاج العدوى التي تسببها البكتريا المنتجة لأنزيمات ESβLs هي Colistin و Tigecycline (Teklu و آخرون ،2019) .

2.7.2 الغشاء الحيوي Biofilm

الأغشية الحيوية عبارة عن مجموعة من الخلايا الميكروبية الملتصقة بسطح حيوي أو غير حيوي ومحاطة بمواد بوليميرية خارج الخلية Extracellular polymeric substances (EPS) منتجة ذاتيًا ومكونة من الحامض النووي خارج الخلية extracellular (eDNA) DNA والسكريات المتعددة والبروتينات ، إن إنتاج الأغشية الحيوية هو آلية المقاومة الأساسية ضد العوامل المضادة للميكروبات، مما يؤدي إلى معدلات كبيرة من الإصابة بالأمراض والوفيات بسبب الأمراض المعدية (Jeong و آخرون ،2024) . تساعد المادة البوليميرية خارج الخلية للأغشية الحيوية أيضًا البكتيريا المسببة للأمراض على التهرب من الجهاز المناعي التكيفي والفطري للمضيف (Garg و آخرون ، 2023) .

تعتمد قدرة عائلة Enterobacteriaceae على مهاجمة الظهارة البولية والبقاء فيها على العديد من عوامل الضراوة منها قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية . تعد البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية سببًا شائعًا لالتهابات المسالك البولية المتكررة والشديدة وهي عمومًا بكتيريا مقاومة للأدوية المتعددة (Assouma وآخرون ،2023) . من الآليات التي تساعد في تطور البكتيريا *E.coli* وتساعد في بقائها في المسالك البولية، وتعيق القضاء عليها، تكوين الأغشية الحيوية. يصعب علاج هذه العدوى وتعمل كمستودع لمقاومة المضادات الحيوية (Zhao وآخرون ،2020).

إن تكوين الأغشية الحيوية هو نتيجة لظروف ضغوط مختلفة إذ تعمل الأغشية الحيوية كآلية دفاعية تعمل على تعزيز معدل بقاء الكائنات الحية الدقيقة. وتلعب دورًا مهمًا في تطور الأمراض الميكروبية واستمرارها فضلاً عن وصفها أساسًا للتبادلات الجينية. إذ تعمل كدرع يحمي المجتمع الميكروبي من العوامل المضادة للميكروبات مثل المضادات الحيوية والمواد الحافظة

والمطهرات الكيميائية والمعالجة الحرارية وما إلى ذلك والتي تستخدم تقليديًا في صناعة الأغذية، مما يجعلها قوية ويصعب القضاء عليها(Bhardwaj و آخرون، 2021) .

يحدث تكوين الغشاء الحيوية على مراحل : في بداية سوف تلتصق الخلايا العوالقية Planktonic بالسطح المعني ، ثم تبدأ الخلايا في تكوين مستعمرات دقيقة ، و بعدها تحدث التفاعلات بين المجموعات الفرعية و تتشكل الهياكل دقيقة و الطبقات واقية، و من ثم تنضج الأغشية الحيوية و تتشكل المستعمرات دقيقة ، و تتشكل القنوات وتسمح بتراكم الخلايا ، و في النهاية تتحرر الخلايا العوالقية من المستعمرات الدقيقة (Ciarolla وآخرون،2022) .

8.2 مقاومة مضادات حيوية Antibiotic Resistance

يتم تعريف مقاومة المضادات الحيوية بأنها الحالة التي تكتسب فيها مسببات الأمراض القدرة على مقاومة عمل مضاد حيوي معين(Mardikasari و اخرون ، 2022) . ويمكن أن تسهم مقاومة مضادات الميكروبات في بكتيريا *E.coli* المتعايشة في زيادة مقاومة مضادات الميكروبات بين البكتيريا المسببة للأمراض من خلال النقل الأفقي لجينات المقاومة. و قد يؤدي هذا الانتقال المتبادل لجينات مقاومة مضادات الميكروبات من البكتيريا المتعايشة إلى البكتيريا المسببة للأمراض والعكس صحيح إلى عدوى مكتسبة من المجتمع أو المستشفى ناجمة عن مسببات الأمراض المقاومة، إذا اكتسبت هذه البكتيريا مادة وراثية إضافية تمكنها من أن تصبح مسببة للأمراض (Yamba و آخرون ،2024). في الآونة الأخيرة، أصبح انتشار جينات المقاومة مصدر قلق للصحة العامة ولاسيما بين أعضاء عائلة Enterobacteriaceae، إذ ترجع معظم الحالات المبلغ عنها إلى بكتيريا *E.coli*، كأسباب للعدوى المكتسبة من المجتمع والمستشفيات (Bitew وTsige،2020) .

هناك ثلاثة أنواع من مقاومة مضادات: المقاومة للمضادات المتعددة (MDR) Multidrug - resistance، والمقاومة للمضادات على نطاق واسع (XDR) Extensively

drug-resistant والمقاومة للمضادات الشاملة Pandrug-resistant (PDR) ، المقاومة للمضادات المتعددة MDR أي أن بكتيريا مقاومة لمضاد واحد على الأقل من ثلاث فئات من فئات مضادات الميكروبات ، أما المقاومة للمضادات على نطاق واسع XDR مقاومة لمضاد واحد على الأقل من جميع فئات مضادات الميكروبات باستثناء فئتين أو أقل، يشار إلى الكائنات الحية الدقيقة مقاومة للمضادات الشاملة لجميع العوامل من جميع فئات مضادات الميكروبات باسم PDR (Alkofide و آخرون ،2020) .

يمكن تقسيم مقاومة المضادات الحيوية على مقاومة طبيعية Natural resistance ومقاومة مكتسبة Acquired resistance . المقاومة الطبيعية هي جينات مشتركة وراثيًا في نفس النوع الميكروبي، يتم التعبير عنها بشكل طبيعي في وجود المضادات الحيوية أو غيابها، تحدث المقاومة طبيعية عندما تتعرض الكائنات الحية الدقيقة لتركيزات عالية من المضادات الحيوية، أما المقاومة المكتسبة هي جينات مقاومة للمضادات الحيوية الذي لا يوجد بشكل طبيعي في الكائنات الحية الدقيقة ولكنها اكتسبت ذلك من خلال النقل الأفقي للجينات Horizontal gene transfer و التحول Transformation بين الكائنات الحية الدقيقة (Chin وآخرون، 2023).

تلعب فعالية المضادات الحيوية القاتلة للبكتيريا Bactericidal والمضادة للبكتيريا Bacteriostatic دورًا رئيساً في توجيه استراتيجيات علاج العدوى البكتيرية . تعمل المضادات الحيوية القاتلة للبكتيريا Bactericidal عن طريق تحفيز موت الخلايا الميكروبية قد يحدث ذلك من خلال تعطيل الهياكل الخلوية، مثل جدران الخلايا، وغيرها من الوظائف الأيضية المهمة. على النقيض من ذلك، تمنع المضادات الحيوية المضادة للبكتيريا Bacteriostatic نمو الخلايا أو انقسامها دون التسبب في موت الخلايا على الفور. ومع ذلك، يمكن للمضادات الحيوية المضادة للبكتيريا أيضًا قتل البكتيريا بجرعات أعلى (Karlo وآخرون ،2024).

توجد العديد من الطرائق لتصنيف المضادات الحيوية إلا أن التقسيم الشائع هو الاعتماد على طيف الفعالية والتركيب الجزيئي وآلية العمل وإن المضادات الحيوية عموما ضمن المجموعة

الواحدة تشترك بنمط مماثل من الآثار الجانبية والفعالية والسمية (Sakoulas و آخرون ، 2019؛ Kappor وآخرون ،2017).

من فئات المضادات الحيوية ما يلي :

1.8.2 الكاربابينيمات Carbapenems

الكاربابينيمات هي مضادات حيوية واسعة الطيف من مجموعة بيتا لاكتام، مرتبطة هيكليًا بالبنسلين . تعمل على تحلل جدار الخلية عند بروتينات ربط البنسلين Protein Binding Penicillins (PBP) عبر حلقة بيتا لاكتام مثل Imipenem و Meropenen (Caliskan-Aydogan و Alocilja ،2023) .

2.8.2 الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides

الامينوكلايكوسيدات هي مضادات قاتلة للبكتيريا تمنع تخليق البروتين ولها طيف واسع مضاد للبكتيريا ونشاط قوي مضاد للبكتيريا مثل Amikacin و Gentamicin (Fu و آخرون ، 2021).

3.8.2 السيفالوسبورينات Cephalosporins

السيفالوسبورينات هي مضادات قاتلة للبكتيريا تعمل على تثبيط النمو من خلال تعطيل الارتباط المتبادل لسلاسل الببتيدوكلايكان في جدران الخلايا البكتيرية ، يتم تحفيز الخطوة الأخيرة لبناء طبقة الببتيدوكلايكان بوساطة بروتينات ربط البنسلين (PBP) مثل Cefotaxime و Cefoxitin (Lin وKück ،2022) .

4.8.2 فلوروكينولونات Fluoroquinolones

فلوروكينولونات هي مضادات حيوية واسعة النطاق تأثيرها قاتل على بكتريا تعمل على تثبيط تخليق الحمض النووي عن طريق تثبيط DNA gyrase وTopoisomerase IV ،

مثل Ciprofloxacin، Norfloxacin (Nainu و آخرون ، 2021) .

5.8.2 البنسلينات Penicillins

البنسلينات هي من مضادات حيوية بيتا لاكتام تعمل هذه المضادات على الارتباط بمستقبلات أي بروتينات ربط البنسلين (PBPs) وبعد الارتباط بالمستقبلات يمنع البنسلين تخليق الببتيدوكلايكان عن طريق منع نقل الببتيد ، وتضم مجموعة من مضادات مثل Amoxicillin و Ampicillin(Chaudhry و آخرون ،2019) .

6.8.2 الجليكوببتيد Glycopeptide

الجليكوببتيد هي مضادات حيوية تعمل على تثبيط تخليق جدار خلية البكتيرية و بالتالي تمنع هذه المضادات بناء الببتيدوكلايكان ، مثل مضاد Vancomycin (Baran و آخرون ، 2023).

9.2 اليات مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance mechanisms

لقد ثبت أن البكتيريا سالبة لصبغة كرام قادرة على اكتساب كل آليات المقاومة هذه بسبب مجموعة متنوعة من البروتينات والمسارات المختلفة (Reygaert، 2018). يمكن أن تحدث مقاومة مضادات الميكروبات بسبب العديد من الآليات كما في شكل (3-2) منها ما يأتي :

1.9.2 تعطيل المضادات الحيوية و تعديلها Antibiotic inactivation and modification

يعد تعطيل المضادات الحيوية وتعديلها أحد أكثر الطرائق شيوعًا التي تستخدمها البكتيريا سالبة لصبغة كرام للتهرب من عملها، وعادةً ما يتم ذلك عن طريق تجميع الإنزيمات التي تؤدي إلى تدمير المضادات الحيوية . يمكن أن تشمل آلية عمل هذه الإنزيمات إضعاف الموقع النشط للإنزيم ومنع الارتباط، على سبيل المثال، عمل تحلل المائي لـ β-lactamase على حلقة -β

lactam في المضادات الحيوية بيتا لاكتام (De Oliveriaو آخرون ،2020) . عندما يتم إجراء تعديلات على الأهداف البكتيرية، تنخفض كفاءة ارتباط المضادات الحيوية، وبالتالي تقليل تأثيرها المثبط. هناك العديد من مكونات البكتيريا سالبة لصبغة كرام التي تعد أهدافًا للمضادات الحيوية، فضلاً عن العديد من الأهداف التي يمكن تغييرها، مما يتيح مقاومة المضادات الحيوية. تشمل بعض هذه الأهداف بروتينات ربط البنسلين (PBPs) وإنزيمات تعديل الدهون A ، يمكن تغيير عدد أو بنية بروتينات ربط البنسلين، مما يؤثر على قدرة المضادات الحيوية على الارتباط بهدفها، أو تثبيط الارتباط تمامًا(Reygaert ، 2018).

2.9.2 استخدام مسار التمثيل الغذائي البديل Using an alternative metabolic pathway

على عكس بعض التغييرات الحاصلة في البكتريا ، فإن توفر المسار البديل في الحصول على المغذيات يلغي الحاجة إلى إحداث مقاومة أي مضاد حيوي(Fatahi-Bafghi ، 2019) . فمثلاً يمكن للبكتريا تصنيع حامض الفوليك من البيئة بدلاً من تصنيعه بداخلها وبذلك تصبح مقاومة لمضادي Sulfonamide وTrimethoprim (Tanو آخرون ، 2020).

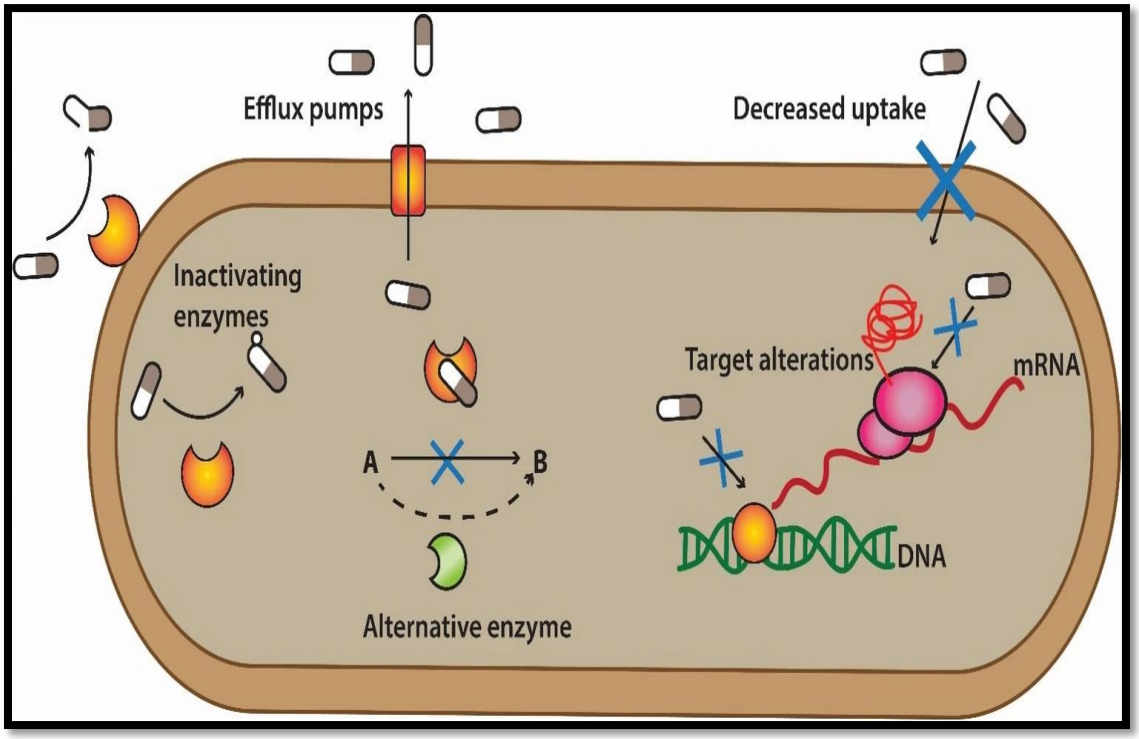
3.9.2 الحد من تدفق المضادات الحيوية limiting the flow of antibiotics

تتضمن آلية أخرى لمقاومة المضادات الحيوية تستخدمها أنواع مختلفة من البكتيريا سالبة لصبغة كرام المقاومة للمضادات المتعددة الحد من تدفق المضادات الحيوية إلى الخلية لمنع عملها، يجب أن تعبر العديد من المضادات الحيوية الغشاء المخاطي للوصول إلى محتويات الخلية لتحقيق تأثيراتها المضادة للميكروبات (Gauba و Rahman ، 2023) . ونتيجة لهذا، طورت العديد من البكتيريا سالبة لصبغة كرام هذه الآليات للحد من دخول المضادات الحيوية إلى الخلية عن طريق تقليل التدفق مثل تنظيم نفاذية الغشاء المخاطي وزيادة معدل التدفق ، هذه الآلية مهمة بشكل خاص في البكتيريا سالبة لصبغة كرام بسبب وجود العديد من الأهداف المضادة للمضادات الحيوية في الغشاء المخاطي. تتأثر الجزيئات المحبة للماء مثل البيتا-لاكتاميز والفلوروكينولونات والتتراسيكلين

بتغيرات نفاذية الغشاء المخاطي بسبب استخدامها الحيوي للبورينات لعبور الغشاء المخاطي والوصول إلى مواقع أهدافها (Munita وArias، 2016) .

4.9.2 تعطيل مفعول المضاد neutralize the effect of the antidote

تعمل البكتيريا على إبطال مفعول المضادات الحيوية بإحدى الطريقتين: اما عن طريق تدمير المضادات الحيوية ، أو عن طريق التغيير الكيميائي للمضادات الحيوية (Uddin وآخرون، 2021)



الشكل (3-1): اليات مقاومة مضادات حيوية في البكتريا (Mutuku وآخرون، 2022)

10.2 نبذة عن جينوم بكتريا *E.coli* About the *E. coli* genome

يتمتع الجينوم بقدرة عالية على التكيف، إذ يحمل وينقل العناصر الجينية المتنقلة مثل البلازميدات والعناصر المنقولة و تسلسلات الادخال و ناقلات، مما يحسن قدرته على التكيف والبقاء في البيئات المختلفة ، إذ تسهم هذه العناصر الجينية في مرونة جينوم بكتريا *E.coli*، فضلاً عن ذلك، يعمل النقل الجيني الأفقي Horizontal gene transport على تفضيل انتشار مقاومة

مضادات الميكروبات بين كل من بكتريا *E.coli* وغيرها من الكائنات الحية المتعايشة (Awosile و آخرون ، 2023) .إذ تم نشر أول تسلسل كامل لجينوم بكتريا *E.coli* سلالة K-12 *E.coli* في عام 1997 وتم أيضًا تسلسل آلاف عديدة من عزلات بكتريا *E.coli* من مجموعة واسعة من المصادر، وأن حجم جينوم بكتريا *E.coli* (الذي يشمل plasmid و Prophage) يتراوح حوالي من 4.6 مليون زوج قاعدة إلى حوالي 5.9 مليون زوج قاعدة (Robins-Browne و اخرون ،2016) .

يتكون الجينوم الأساسي لـ *E.coli*، إلى حد كبير، من الجينات التي تشفر البروتينات الأساسية Housekeeping المشاركة في التضاعف والنسخ والترجمة، وتلك التي تؤدي وظائف التمثيل الغذائي الأساسية (Leimbach وآخرون ،2013). كما يحتوي أيضًا على الجينات المشاركة في عمليات النقل، مثل مضخات التدفق Efflux pumps (Teelucksingh واخرون ،2020).ومن المثير للاهتمام أن المناطق التنظيمية للجينات الأساسية ثبت أنها تتأثر بمحتوى الجينات الإضافية لكل عينة في شكل طفرات تنظيمية تعويضية قابلة للإدارة تمكن من الحفاظ على السمات المكتسبة مثل مقاومة مضادات الميكروبات (McNally واخرون ،2016).

11.2 جين *16SrRNA*

التقنيات الجزيئية هي مجموعة كبيرة أخرى من طرائق التشخيص التي تعزز الكشف السريع والأكثر دقة عن الكائنات الحية الدقيقة وتحديد هويتها. تستخدم هذه التقنيات على نطاق واسع، وتتميز بالإنتاجية العالية والحساسية العالية . تعتمد معظم الطرق الجزيئية لتحديد هوية البكتيريا على تحليل الحامض النووي والتضخيم والتسلسل (Osińska و آخرون ،2023). يعد تسلسل جين *16SrRNA* أحد أكثر طرائق التشخيص حساسية والتي تُستخدم على نطاق واسع . جين *16SrRNA* شديد الخصوصية لكل نوع بكتيري، مما يجعله الهدف المثالي في تحديد هوية البكتيريا في هذه الطريقة يتم تضخيم جين *16SrRNA* ، ويتم تحديد تسلسلات النيوكليوتيدات الناتجة عن طريق المقارنة مع تلك المودعة في قواعد البيانات (Clifford و آخرون ،2012).

يحتوي جين *16SrRNA* الموجود في جميع البكتيريا على مناطق متغيرة ومحفوظة توفر التعرف على معظم البكتيريا على مستوى الجنس أو النوع، ، اعتمادًا على المنطقة المستخدمة للتسلسل . تم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *16SrRNA* متبوعًا بتسلسل سانجر لتحديد العزلات التي يصعب التعرف عليها بالوسائل الظاهرية، يتم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *16SrRNA* مباشرة على العينات السريرية و البيئية ، وخاصة لتحديد البكتيريا التي يصعب زراعتها أو تلك التي أصبحت غير قابلة للزراعة عن طريق العلاج بالمضادات الحيوية (Fida و آخرون ، 2021).

12.2 جينات مقاومة الفانكومايسين في بكتريا Vancomycin Resistance Genes *E.coli*

تعد مجموعة glycopeptide واحدة من اقدم المضادات الحيوية و لكنها ما تزال مهمة للغاية فهي تستخدم ضد مسببات الأمراض (Fair و Tor،2014). تشمل هذه المجموعة مضاد الفانكومايسين Vancomycin، وهو مضاد حيوي جليكوببتيدي طبيعي، له تأثير مضاد للبكتيريا عن طريق الارتباط بالطرف الأميني D-Ala-D-Ala لسلسة الخماسي الببتيد لسلاسل الببتيدوكلايكان . وهذا يثبط تخليق الببتيدوكلايكان ويسبب اختلال التوازن بين التخليق والتحلل، مما يؤدي إلى تحلل الخلايا ،يستخدم الفانكومايسين كخط العلاج الأول لعلاج العدوى المكتسبة من المستشفيات (Wykes و آخرون ، 2023). هناك زيادة كبيرة وعالمية في اعداد البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية ، إلى جانب مقاومة المضادات الحيوية المتعددة ومقاومة البكتيريا المسببة للأمراض. ويمكن أن تنشأ مقاومة المضادات الحيوية من طفرات جينية أو انتقال أفقي بين البكتيريا . فضلاً عن ذلك ، يمكن الحفاظ على جينات المقاومة المكتسبة حديثا في مجموعات جديدة في غياب ضغط اختيار المضادات الحيوية (Çardak وآخرون ، 2016)

على الرغم من أن الفانكومايسين Vancomycin تم الكشف عنه في مقاومه البكتيريا موجبة لصبغة كرام، إلا أنه في الآونة الأخيرة، تم الكشف أيضًا عن مقاومة الفانكومايسين

وحساسيته في البكتيريا سالبة لصبغة كرام مثل بكتريا *E.coli* التي كانت ذات مقاومة مكتسبة من خلال عدم نفاذية غشاء الخلية. يرجع تطور هذه المقاومة إلى تكيفها مع البيئة الخارجية المحيطة (Nithiya وآخرون،2024). تعدل البكتيريا سالبة لصبغة كرام، السكريات الدهنية متعددة lipopolysaccharides(LIP) للحفاظ على استقرار الغشاء استجابة للإجهاد البيئي environmental stress. على سبيل المثال، تخضع الدهون Lipid A في *E.coli* وSalmonella إلى إضافة مجموعة للفوسفات عن طريق إضافة سكر خماسي منقوص الاوكسجين (أرابينوز ديوكسي) وفوسفوإيثانول امين Phosphoethanolamine عبر ناقلات فوسفوإيثانول امين الدهون Lipid A Phosphoethanolamine Transferas A و انزيمات نقل جليكوزيل Glycosyltransferase كانت هذه الإضافات مسؤولة عن مقاومة البروتينات المضاد للميكروبات الكاتيونية Cationic (Herrera و آخرون ، 2010) .

الإجهاد البارد Cold Stress يمكن أن يجعل بكتريا *E.coli* عرضة للفانكومايسين من خلال تغيير سلامة الغشاء الخارجي الناجم عن الطفرات. وقد وجد أن السكريات قليلة القطع Core Oligosaccharide لـ LPS هو سبب هذه القابلية للحساسية و لفهم الاجهاد البارد قام مجموعة من الباحثين بعمل دراسة حول مقاومة بكتريا *E.coli* لمضاد فانكومايسين في درجات الحرارة المنخفضة و قد أكد التعبير غير المتجانس لمجموعة مقاومة فانكومايسين *Enterococcus* VanHBX في *E.coli* أن آلية العمل كانت من خلال تثبيط تخليق الببتيدوكلايكان بحيث قاموا بفحص سلالات بكتريا *E.coli* التي أظهرت مقاومة للفانكومايسين في درجات الحرارة منخفضة و لاحظوا أن الطفرات في تخليق الغشاء الخارجي منعت نشاط الفانكومايسين و أكد التحليل الكيميائي لل LIP من سلالات حساسة و مقاومة للفانكومايسين أن المنع كان مرتبطاً بتقليصات في Core Oligosaccharide ل LIP (Stokes و آخرون ،2016) .

تم تحديد ستة أنماط جينية من البكتريا المعوية المقاومة للجليكوببتيد، بما في ذلك *Van* A وB وC وD و E و G في السنوات الأخيرة، وأهمها *Van A* و *Van B* (Moosavian و

آخرون ،2018) . جين *Van A* يكون مقاوم للفانكومايسين Vancomycin و التيكوبلانين Teicoplanin إذ تتحكم مجموعة جينية موجودة على ناقلات Tn1546 في مقاومة جين *Van A*. توجد هذه ناقلات عادة على البلازميدات، على الرغم من أنها قد توجد أيضًا على الكروموسومات البكتيرية (Selim ، 2022) . في حين أن جين *Van B* مقاوم للفانكومايسين وحساس للتيكوبلانين و مجموعات جينات *Van B* توجد عادةً على الكروموسوم البكتيري Tn1549-Tn5382 (Wardal و آخرون ،2023) . وعلى عكس مقاومة *Van A* و*Van B*، والتي يمكن اكتسابها ونقلها، تم العثور على نوع المقاومة في جين *Van C* ، يتميز هذا النوع من المقاومة بأنه مقاوم للفانكومايسين ولكنه حساس للتيكوبلانين ، تتحكم الجينات الموجودة على الكروموسوم البكتيري في هذا النوع من المقاومة، والتي لا يمكن أن تنتقل من فرد إلى آخر (Selim، 2022) .

13.2. تسلسلات القواعد النتروجينية Nitrogen bases sequences

تسلسل قواعد النتروجينية هو ترتيب القواعد النتروجينية في سلسلة من النيوكليوتيدات المتعددة والتي تحتوي على معلومات وراثية والخصائص كيموحيوية للكائنات الحية ، والقدرة على معرفة أو استنساخ هذه سلاسل الضرورية المهمة للبحوث البيولوجية (Heather و Chain،2016) . مرت عمليات تحديد القواعد النتروجينية بعدة مراحل منها الطريقة القديمة و التي تسمى طريقة سانجر التي قدمها سانجر في عام 1977 و هذه الطريقة تعتمد على إنهاء استطالة السلسلة، والتي تستخدم في تسلسل الحامض النووي بمساعدة البوليميراز polymerase والنوكليوتيدات الخاصة Special nucleotides (McCombie و آخرون ،2019) . أما الطريقة الثانية فهي طريقة تسلسل من الجيل التالي Next Generation Sequence (NGS) تسمح تقنية التسلسل من الجيل الثاني بالتسلسل السريع للجينوم بالكامل. بالنسبة لهذا الجيل من التسلسل، هناك عدة مجموعات وإمكانيات مختلفة للمعدات. تم تصميم هذه الأدوات والمجموعات لجعل الإجراءات فعالة من حيث التكلفة وتوفير الوقت كتقنيات تسلسل جديدة من الجيل الثاني (Eren وآخرون ،2022).

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

University of Diyala

College of Education

for Pure Sciences

Department of Life Sciences

Molecular investigation of some *Van* genes responsible for vancomycin resistance in *Escherichia coli* isolated from clinical and environmental samples

A thesis submitted

To the Council of the College of Education for Pure Sciences / University of Diyala as part of the requirements for obtaining a Master's degree in Life Sciences

By

Zahraa Deyaa Sagban

Bachelor of Life Sciences / College of Education for Pure Sciences / University of Diyala (2021)

Supervised By

Prof .Dr. Saba jassim Jawad Al-Zubaidi

2025A.D **1446A.H**