العلاج بكوكتيل الفاجات ضد إشيريشيا كولاي الممرضه

مقدمة من

أيه ماهر ربيع أحمد

للحصول علي درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم

في

الميكروبيولوجي

قسم النبات

كلية العلوم

جامعة الفيوم

2025

العلاج بكوكتيل الفاجات ضد إشيريشيا كولاي الممرضه

مقدمة من

أيه ماهر ربيع أحمد
بكالوريوس العلوم في النبات والكيمياء - 2016
ماجستير العلوم في الميكروبيولوجي - 2021

للحصول على درجة دكتوراه الفلسفة فى العلوم
(نبات - ميكروبيولوجى)

لجنة الإشراف العلمى :

د/ رضا محمد طه (المشرف الرئيس)

أستاذ مساعد الفيروسات - قسم النبات- كلية العلوم- جامعة الفيوم.

أ.د/ خالد عبد الفتاح الدجدج

أستاذ الفيروسات - قسم الميكروبيولوجي - كلية الزراعه - جامعة عين شمس.

د/ أماني محمد رياض

أستاذ الميكروبيولوجى المساعد - قسم النبات - كلية العلوم- جامعة الفيوم.

الملخص العربي

يمثل الإرتفاع العالمي للبكتيريا المقاومه للمضادات الحيوية تهديدا كبيرا و خاصة بكتيريا القولون ايشيريشا كولاي الممرضه حيث تُصنَّف على أنها البكتيريا الإشريكية القولونية المنتجة للسموم الشيجية، والتي تسبب النزف المعوي ومتلازمة انحلال الدم اليوريمي و التهاب القولوني النزفي لدى البشر، وقد ارتبطت بالعديد من حالات تفشي الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء في الدول الناميه. وتزداد مقاومة هذه البكتريا للأدوية المتعددة بشكل كبير في الآونة الأخيرة. مما يدعو بالضرورة إلى الحاجة لتطوير استيراتيجيات علاجيه ووقائيه جديده للسيطره على عدوى بكتيريا ايشيريشا كولاي الممرضه O157 و يعتبر استخدام البكتريوفاجات (الفيروسات البكتيرية) أحد البدائل الفعالة للسيطرة علي العدوي البكتيريه.

تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتوصيف استخدام أنواع معينة من البكتيربوفاج واستخدامها كعامل بيولوجي للسيطرة على بكتيريا اشيرشيا كولاي الممرضه و المقاومه للمضادات الحيوية

أجريت الدراسة على النحو التالي :

تم تجميع 80 عينة (براز وبول) من مرضي الجهاز الهضمي من مستشفي الفيوم الجامعي ومستشفي الفيوم العام لعزل بكتيريا الايكولاي الممرضه . تم استخدام الوسط الغذائي السوربيتول ماكونكي آجار لعزل وتنقية عزلات بكتيريا الايكولاي الممرضه . تم الحصول على 37 عزله ايكولاي ممرضه من اجمالي 80عينه وتم التاكد من عزلات الايكولاي من خلال الفحص الظاهري بالنمو على الأطباق و الفحص المجهرى بإستخدام صبغة جرام والاختبارات البيوكيميائيه حيث أوضحت النتائج وجود خلايا بكتيرية عصوية الشكل سالبة لصبغة جرام تحت الميكر وسكوب الضوئي.

تم اختبارحساسية عزلات الايكولاي لسبعة عشر نوع من المضادات الحيوية. تم التعرف على عزلة البكتيريا (ES13) وهي أكثر عزله مقاومه للمضادات الحيويه وراثيا باستخدام جين (16S rRNA) بواسطة تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل(بي سي أر) وأظهرت درجة عالية من التشابه مع *Escherichia coli* 0157 بنسبة 99.3٪ وتم إدراجها إلى الجين بنك تحت رقم الوصول (PP838722.1). تم عزل اربع فاجات متخصصه لبكتيريا الايكولاي الممرضه سلالة (O157) من محطات الصرف الصحي المختلفه بالفيوم , مصر بإستخدام اختبار البقعه وتم تسميه هذه الفاجات كالتالىØ1EC0157, Ø2EC0157, Ø3EC0157, Ø4EC0157

تم تحديد الخواص المورفولوجيه للبلاكات والتي ظهرت خلال إنماء الفاجات فكانت البلاكات للفاج الاول عبارة عن بلاكات غير منتظمة وواضحة يتراوح قطرها من 1 إلى 2 مم. وعلى النقيض من ذلك، أنتج الفاج الثاني بلاكات شفافة ودائرية يبلغ قطرها 1 مم. وأنتج الفاج الثالث بلاكات شفافة ودائرية يبلغ قطرها 2 مم. وأخيرًا، أنتج الفاج الرابع بلاكات دائرية ذات مركز شفاف محاط بمنطقة هالة عكرة

يبلغ قطرها من 4 إلى 5 مم.

تم فحص أربع عزلات لفاجات الايكولاي منقاه بواسطة المجهر الالكتروني النافذ ثلاثة من الفاجات القولونية لها رأس وذيل، بينما أظهرت واحدة رأسًا فقط. أشارت النتائج إلى أن الفاج الاول يقع تصنيفيا ضمن عائلة السيبوفيردي ، وتتميز برأس سداسي يبلغ قطره 64.2 نانومتر وذيل طويل غير قابل للانكماش يمتد 157.3 نانومتر. في المقابل، كان الفاج الثاني ذا رأس عشريني السطوح بقطر 35 نانومتر وذيل قابل للانكماش يبلغ طوله 132.2 نانومتر و كان الفاج الثالث له رأس مكعب يبلغ قطره 61 نانومتر وذيل قابل للانكماش ممدود يبلغ طوله 139 نانومتر. تم تصنيف الفاج الاول والثالث ضمن عائلة الميوفيردى ، بينما تم تصنيف الفاج الرابع ضمن عائلة البودوفيردي.

تم تحضير كوكتيل من الفاجات عن طريق خلط كمية متساوية من كل محلول كوليفاج نقي عند 10^{10} بلاكه لكل مللي

تم تعريض عزلات الفاجات الأربعه و كوكتيل الفاجات لدرجات مختلفة من الأس الهيدروجيني (3-12). وقد وجد أن نشاط Ø1EC0157 و Ø4EC0157 و Ø3EC0157 قد تم تثبيطه تمامًا في ظروف حمضية للغاية 3 وقلوية11و12 . لوحظ أقصى نشاط عند درجة حموضة تساوي 7. وكما لوحظت نتائج مماثلة لـ Ø2EC0157 باستثناء أنه عند درجة الحموضة = 4 لم يكن هناك نشاط يمكن اكتشافه. أظهر الفاج كوكتيل أعلى مستوى من الاستقرار والنشاط الكلي عبر مستويات الأس الهيدروجيني. حقق أقصى نشاط عند درجة الحموضة 7 يليه عن كثب درجة الحموضة = 8 ودرجة الحموضة = 6. وظل النشاط قويًا عند درجة الحموضة = 9 ودرجة الحموضة = 10، مما يشير إلى أن الكوكتيل أكثر مرونة في مواجهة تقلبات الأس الهيدروجيني مقارنة بالفاجات الفردية. ومع ذلك، وكما هو الحال مع الفاجات الفردية، كانت غير نشطة عند درجة الحموضة = 3، ودرجة الحموضة = 11، ودرجة الحموضة = 12.

وجد أن الفاجات القولونية المعزولة وكوكتيل الفاجات يتحملان درجات الحرارة العالية للغاية، ومع ذلك، فقد Ø2EC0157 وØ3EC0157 قدرتهعلى العدوى عند درجة حرارة 70 درجة مئوية. في حين فقد Ø1EC0157 وØ4EC0157 قدرته على العدوى عند درجة حرارة 80 درجة مئوية. كما أظهر كوكتيل الفاجات أعلى قدر من الاستقرار والقدرة على التكيف بين المعالجات المختبرة؛ فقد فقدت قدرتها على العدوى عند درجة حرارة 90 درجة مئوية.

أظهرت الفاجات القولونية المعزولة والفاج كوكتيل مستوى عال من المقاومه عبر جميع تركيزات كلوريد الصوديوم المختبرة (0.5٪، 5٪، 10٪، و 15٪). بالنسبة لـ Ø1EC0157 و Ø2EC0157 و Ø4EC0157. لكن Ø3EC0157 أظهر تثبيطًا كاملاً عند 15٪، مما يدل على أن

الفاجات الفردية باستثناء Ø3EC0157 والخليط لديها مقاومة غير عادية لمستويات كلوريد الصوديوم الأعلى.

تم اختبار المدي العوائلي للكوليفاجات وكوكتيل الفاجات ضد 37 عزلة من الإشريشيا القولونية O157 التى تم عزلهم وأنواع بكتيرية أخرى، بما في ذلك ثلاث سلالات من المكورات العنقودية الذهبية، وسلالتين من السالمونيلا، وسلالة واحدة من الزائفة الزنجارية. تمكنت Ø1EC0157 من إصابة عشر عزلات من الإشريشيا القولونية O157 وسلالة واحدة من السالمونيلا. من ناحية أخرى، أصابت Ø2EC0157 إحدى عشر عزلة من الإشريكية القولونية O157 وسلالة واحدة من السالمونيلا، بينما أصابت Ø3EC0157 خمسة عشر عزلة من الإشريكية القولونية O157 . أظهرت Ø4EC0157 القدرة على إصابة أكبر عدد من عزلات الإشريكية القولونية O157 بين الكوليفاجات الأربعة، حيث وصلت إلى 23 عزلة. أصاب كوكتيل الفاجات جميع عزلات الإشريشيا القولونية المختبرة وسلالتين من السالمونيلا، وبالتالي أظهرت مدي العوائلي واسع.

تم تحديد فترات الكمون وأحجام الانفجارات للفاجات القولونية المنفجرة من الخلايا البكتيريه. أظهر Ø1EC0157 و Ø2EC0157 أقل أحجام انفجار (180 و 191 جزيء / خلية) مع فترات كامنة 53 و 79 دقيقة على التوالي. أظهرت الفاجات Ø3EC0157 و Ø4EC0157 أعلى أحجام انفجار 285 و 375 جزيء/ خلية مع فترات كامنة 49 و 27 دقيقة على التوالي.

تم التحقق من درجة التباين المورفولوجي لأربعة كوليفاجات DNA من خلال نسبة الامتصاص 280/260 من النانودروب والفصل الكهربائي للأجاروز. كشف التحليل باستخدام إنزيمات القصر EcoRI وHindIII وBamHI عن تنوع في أعداد الشظايا وكثافاتها بين أنماط الهلام لجينومات DNA الأربعة للكوليفات. وجد النهج 138 تعدد أشكال DNA وثلاثة أجزاء من العلامات الجينية، تمتد من 2 إلى 25 كيلوبايسبير.

تم معالجة سلالة *E. coli* O157 باستخدام Ø1EC0157 وØ2EC0157 وØ3EC0157 وØ4EC0157 عند مستويات تركيز مختلفة (1،0.1،0.01) وتم قياس التعكر البكتيري عند OD600 على مدار 12 ساعة. كان هناك انخفاض كبير في أعداد الخلايا الحيه لل *E. coli* O157 بعد معاملتها واصابتها بالفاجات عند أرقام مختلفه من مضاعفات الأصابه (MOI) مقارنة بأعداد الخلايا البكتيريه في المزارع االتي لم تتم معالجتها بالفاجات.

تم حفظ كوكتيل الفاجات عند ثلاث درجات حرارة مختلفة (4 درجات مئوية، ودرجة حرارة الغرفة، و-20 درجة مئوية). كانت هناك اختلافات كبيرة في فعالية حفظ كوكتيل الفاجات عبر درجات الحرارة المختلفة. في حين وفرت درجة حرارة -20 درجة مئوية استقرارًا معتدلاً خلال الأسابيع الأولى،

انخفض نشاط الكوكتيل بشكل كبير بعد اليوم الثامن والعشرون. كان الحفظ في درجة حرارة الغرفة هو الأقل فعالية، مع ملاحظة فقدان سريع للتركيز في وقت مبكر من اليوم الرابع عشر. وعلى العكس من ذلك، ثبت أن درجة حرارة أربعه هي حالة الحفظ المثلى، مما حافظ على أعلى قابلية بقاء الكوكتيل لأكثر من شهرين.

تم تحميل كوكتيل الفاجات مع ثلاثة مواد مختلفة: غذاء ملكات النحل، والسوربيتول، والتريهالوز، بنسبة 1:1 W :V. تم تعبئة التركيبات الثلاث في كبسولات طبيه عند 4 درجات مئوية وفحصها أسبوعيًا لتحديد قابليتها للبقاء .فقد وجد أن التريهالوز أفضل حماية، يليه السوربيتول يليه غذاء ملكات النحل. يشير هذا إلى أن التريهالوز هو الأكثر فعالية مما يجعله الخيار المفضل للتطبيقات التي تتطلب استقرارًا طويل الأمد.

تم تصميم تجربة تطبيقية لاستخدام كوكتيل الفاجات (10^{10} جزيء/مل) كعامل تحكم حيوي ضد عدوى الإشيريشا القولونية O157 في نموذج الفئران الحيوانية. تم تقسيم ثلاثين فأرًا إلى خمس مجموعات على النحو التالي:

مجموعة الاصحاء: عملت مجموعه ضابطه سلبي، حيث تلقت 1 مل فقط من ببتون بفر عن طريق الفم.

مجموعة المرض: حيث تلقت 1 مل من المحلول البكتيري عن طريق الفم

مجموعة السيبروفلوكساسين: تم إعطاء كل فأر 640 ميكرولتر من سيبروفلوكساسين يوميًا.

مجموعة كوكتيل الفاجات : تم إعطاء كل فأر 1 مل من كوكتيل الفاجات.

مجموعة السيبروفلوكسيسن وكوكتيل الفاجات: تم إعطاء كل فأر مزيجًا من كوكتيل الفاجات والسيبروفلوكساسين.

كشفت نتائج تجربة الفئران عن تغييرات كبيرة في اعداد الخلايا البكتيريه لـ *E. coli* O157 عبر المجموعات المختلفه خلال فترة التجربة. أظهرت مجموعة المرض ارتفاعًا في عدد البكتيريا من اليوم الأول (7.30لوغاريتم خليه/مل) إلى اليوم الثالث (10.29 لوغاريتم خليه/مل)، ثم استقرت عند (9.12 لوغاريتم خليه/مل) في اليوم الخامس واليوم السابع. أظهرت مجموعة السيبروفلوكساسين انخفاضًا ثابتًا في عدد البكتيريا من اليوم الأول (7.36 لوغاريتم لوغاريتم خليه/مل) إلى اليوم السابع (2.74 لوغاريتم خليه/مل)، مما يدل على فعاليته في تقليل مستويات البكتيريا. أظهرت مجموعة كوكتيل الفاجات أيضًا انخفاضًا كبيرًا مشابهًا جدًا في انخفاض العدد البكتيري مثل السيبروفلوكساسين، حيث انخفض من (7.19 لوغاريتم خليه/مل) في اليوم الأول إلى (2.86 لوغاريتم خليه/مل) في اليوم السابع. أظهر الإعطاء التآزري للسيبروفلوكساسين وكوكتيل الفاجات في المجموعة الخامسة فعالية متفوقة، حيث انخفضت اعداد البكتيريا بشكل ملحوظ من (7.30لوغاريتم خليه/مل) في اليوم الأول إلى (لوغاريتم

خليه/مل1.84) في اليوم السابع. تشير النتائج السابقة إلى أن كلًا من السيبروفلوكساسين والفاج كوكتيل قللا بشكل فعال من عدد البكتيريا طوال مدة التجربة.

تم عمل الفحوصات لعينات دم الفئران. كانت المعايير التي تم فحصها هي خلايا الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء اللمفاوية، حيث خضعت عينات السيرولوجي للفحوصات التالية: الإنترلوكين -6، والإنزيمات الكبديه . كانت هناك تأثيرات مختلفة للعلاجات على معايير الدم في الفئران المصابة بـ E. coli. أظهر كوكتيل البكتيريا بمفرده تأثيرات محتملة مضادة للالتهابات وحماية الكبد، كما يتضح من انخفاض مستويات IL-6، وSGOT، وSGPT مقارنة بمجموعة الفئران المصابه.

في هذه الدراسة تم الحصول علي أربع فاجات متخصصه لبكتيريا اشيريشيا كولاي الممرضه O157 وتمت دراسة الخواص المورفولوجيه والبيولوجيه والجزيئية وتم عمل كوكتيل من الفاجات وقد ثبتت فاعلية الفاجات المفرده والفاج كوكتيل في المعمل وأيضا في التجربه المعمليه لفئران التجارب وأكدت الدراسه انه علاج فعال وأمن ضد بكتريا الايكولاي الممرضه O157المقاومه للعديد من المضادات الحيوية.