



الجمهورية العربية السورية
جامعة حماة
كلية الطب البيطري
قسم الصحة العامة والطب الوقائي

دراسة تأثير استخدام العاثيات الجرثومية في جراثيم الإشريكية القولونية المسببة لإسهال العجول وفي صحة حيوانات التجارب

رسالة اعدت بهدف نيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية

اختصاص الصحة العامة والطب الوقائي

إعداد طالب الدراسات العليا

عاصم خضر الباكير

المشرف المشارك
د. أشرف الصالح

مدرس علم الأحياء الدقيقة

قسم الأحياء الدقيقة

المشرف العلمي
أ.م.د. ماهر صالح

أستاذ صحة الحيوان

قسم الصحة العامة والطب الوقائي

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان	التسلسل
الفهرس		
I	فهرس المحتويات	
V	قائمة الجداول	
VI	قائمة الأشكال	
VII	قائمة المخططات	
VIII	قائمة الصور	
IX	قائمة المختصرات	
الملخص		
XIII	الملخص باللغة العربية	
XVI	الملخص باللغة الأنكليزية	
الفصل الأول:		
1	المقدمة	1-1
4	أهداف الدراسة	2-1
الفصل الثاني: الدراسة المرجعية		
5	الإسهال	1-2
5	تصنيف الإسهال	2-2
6	آليات حدوث الإسهال	3-2
7	الأهمية الصحية للإسهال	4-2
8	جراثيم الإشريكية القولونية	5-2

10	الإشريكية القولونية المذيقة للأمعاء	1-5-2
13	الإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء	2-5-2
15	الإشريكية القولونية المنزفة للأمعاء	3-5-2
20	الإشريكية القولونية المخترقة للأمعاء	4-5-2
21	الإشريكية القولونية المتجمعة بالأمعاء	5-5-2
21	الإسهال العصوي عند العجول	6-2
24	مقاومة جراثيم الإشريكية القولونية المسببة لإسهال العجول للمضادات الحيوية	7-2
27	العائيات الجرثومية	8-2
30	العائيات التي تصيب جراثيم الإشريكية القولونية	1-8-2
37	دورة حياة العائيات الجرثومية	2-8-2
40	العلاج بالعائيات	9-2
45	التأزر بين العائيات والمضادات الحيوية	10-2
46	الآليات المحتملة للتأزر بين العائيات والمضادات الحيوية	11-2
46	أنماط التأزر التقليدية المرتبطة بالتغيرات في شكل الخلية وزيادة تضاعف العائيات	1-11-2
48	التأزر بين العائيات المعتدلة والمضادات الحيوية	2-11-2
50	إعادة التحسس للمضادات الحيوية بواسطة العائيات	3-11-2
53	استقرار العائيات	12-2
الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل		
60	المواد	1-3
60	العينات	1-1-3
60	الأجهزة المستخدمة	2-1-3
61	الأوساط المزرعية	3-1-3
62	طرائق البحث	2-3

62	عزل جراثيم الإشريكية القولونية	1-2-3
62	دراسة الخواص المزرعية والشكلية والتلويحية	2-2-3
62	تنقية العزلات وحفظها	3-2-3
63	دراسة الخواص الكيمياحيوية	4-2-3
64	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	5-2-3
65	الكشف عن بعض عوامل الفوعة	6-2-3
68	جمع العينات لعزل العاثيات	7-2-3
68	تجهيز جراثيم الـ E.coli كثوي مضيع	8-2-3
68	إغناء عينات العاثية الجرثومية	9-2-3
69	عزل عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية	10-2-3
69	تنقية العاثية الجرثومية	11-2-3
70	معايرة العاثيات الجرثومية في المحلول	12-2-3
71	حفظ عينات العاثيات الجرثومية	13-2-3
71	دراسة ثباتية العاثية للتغير بقيم الـ pH	14-2-3
72	دراسة ثباتية العاثية للتغير في درجات الحرارة	15-2-3
72	دراسة ثباتية العاثية للأشعة فوق البنفسجية	16-2-3
73	دراسة التأثير التآزري للعاثية الجرثومية مع المضادات الحيوية على جراثيم (EHEC)	17-2-3
74	دراسة فعالية العلاج بالعاثيات داخل الجسم الحي	18-2-3
79	التحليل الإحصائي	19-2-3
الفصل الرابع: النتائج		
80	عزل وتشخيص جراثيم الإشريكية القولونية	1-4
81	حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية	2-4
84	الكشف عن جينات عوامل الفوعة	3-4

86	انتشار عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية	4-4
86	ثباتية العاثية للتغير بقيم الـpH	5-4
87	ثباتية العاثية للتغير في درجات الحرارة	6-4
90	ثباتية العاثية للتعرض للأشعة فوق بنفسجية	7-4
91	تأثير تآزر عاثيات الإشريكية القولونية مع المضادات الحيوية	8-4
100	تأثير المعالجة بالعاثيات داخل الجسم الحي	9-4
101	تأثير المعالجة بالعاثيات على بروتينات الطور الحاد	1-9-4
109	تأثير العلاج بالعاثيات على تعداد جراثيم الـEHEC في الروث	2-9-4
102	تأثير العلاج بالعاثيات على تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية في الروث	3-9-4
الفصل الخامس: المناقشة		
116	عزل جراثيم الإشريكية القولونية من حالات إسهال العجول	1-5
117	حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية	2-5
119	الكشف عن جينات عوامل الفوعة	3-5
121	انتشار عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية	4-5
123	ثباتية العاثية للتغير بقيم الـpH	5-5
124	ثباتية العاثية للتغير في درجات الحرارة	6-5
127	تأثير الأشعة فوق بنفسجية على عاثيات الجراثيم	7-5
129	تآزر عاثيات الإشريكية القولونية مع المضادات الحيوية	8-5
133	دراسة استخدام العاثيات كعلاج داخل الجسم الحي	9-5
140	محددات الدراسة	10-5
الفصل السادس: الاستنتاجات والتوصيات		
143	الاستنتاجات	1-6
145	التوصيات	2-6

الفصل السابع: المصادر		
146	المراجع العربية	1-7
147	المراجع الأجنبية	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	التسلسل
60	الأجهزة المستخدمة في الاختبارات	1-3
61	الأوساط المزرعية المستخدمة في الاختبارات	2-3
63	تفسير نتائج الأختبارات الكيمياحيوية للعديدة Hi25™ Enterobacteriaceae Identification Kit (KB003) Strep 1	3-3
64	تفسير نتائج الأختبارات الكيمياحيوية للعديدة Hi25™ Enterobacteriaceae Identification Kit (KB003) Strep 2	4-3
65	أقرص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية لجراثيم الإشريكية القولونية	5-3
66	تسلسل البرايمرات المستخدمة للكشف عن جينات الفوعة في الإشريكية القولونية	6-3
66	مكونات مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل	7-3
67	برمجة المدور الحراري من أجل تفاعل البوليميراز المتسلسل	8-3
67	مكونات دائرة الرحلان (Tris-Borate-EDTA Buffer) TBE	9-3
81	نتائج الاختبارات الكيمياحيوية للإشريكية القولونية المعزولة عن اسهال العجول	1-4
82	نتائج اختبار حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية	2-4
83	توزيع نمط فئة مقاومة المضادات الحيوية لعزلات الإشريكية القولونية	3-4
84	نسبة انتشار جينات الفوعة في عزولات الإشريكية القولونية المعزولة عن العجول المصابة بالإسهال	4-4

86	نسبة انتشار عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية في البيئة	5-4
92	نتائج تآزر عاثيات الجراثيم مع المضاد الحيوي الستربتومايسين	6-4
95	نتائج تآزر عاثيات الجراثيم مع المضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين	7-4
98	نتائج تآزر عاثيات الجراثيم مع المضاد الحيوي النيومايسين	8-4
103	تركيز (CRP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة mg/dl	9-4
106	تركيز (HP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة mg/dl	10-4
108	تركيز (CP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة U/L	11-4
111	تعداد جراثيم الإشريكية القولونية في روث الأرناب Log_{10} CFU/g	12-4
114	تعداد عاثيات الإشريكية القولونية في روث الأرناب Log_{10} PFU/g	13-4

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
29	تركيب العاثية الجرثومية	1-2
30	عائلات رتبة Caudovirales	2-2
38	دورة حياة العاثيات الجرثومية	3-2
53	بعض آليات التآزر بين المضادات الحيوية والعاثيات	4-2
73	طريقة رقعة الشطرنج على طبق ميكروتايتلر لحساب تأثير التآزر	1-3

قائمة المخططات

الصفحة	العنوان	التسلسل
83	نتائج اختبار حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية	1-4
85	نسبة انتشار ذراري الإشريكية القولونية في العجول المصابة بالإسهال	2-4
87	تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد تعريضها لدرجات حموضة مختلفة	3-4
88	تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد حفظها بالتبريد لفترات مختلفة	4-4
89	تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد حفظها بالتجميد لفترات مختلفة	5-4
90	تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد تعريضها لدرجات حرارة مختلفة	6-4
91	تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد تعريضها لأشعة UV لفترات مختلفة	7-4
93	المخطط الحراري لتعداد الإشريكية القولونية بعد 24 ساعة من التأزر للمضاد الحيوي الستربتومايسين وعاثيات الإشريكية القولونية	8-4
94	تعداد عاثيات الجراثيم عند تطبيق التأزر مع المضاد الحيوي الستربتومايسين على جراثيم الإشريكية القولونية	9-4
96	المخطط الحراري لتعداد الإشريكية القولونية بعد 24 ساعة من التأزر للمضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين وعاثيات الإشريكية القولونية	10-4
97	تعداد عاثيات الجراثيم عند تطبيق التأزر مع المضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين على جراثيم الإشريكية القولونية	11-4
99	المخطط الحراري لتعداد الإشريكية القولونية بعد 24 ساعة من التأزر للمضاد الحيوي النيومايسين وعاثيات الإشريكية القولونية	12-4
100	تعداد عاثيات الجراثيم عند تطبيق التأزر مع المضاد الحيوي النيومايسين على جراثيم الإشريكية القولونية	13-4
102	تركيز (CRP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة mg/dl	14-4
105	تركيز (HP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة mg/dl	15-4
107	تركيز (CP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة U/L	16-4

110	تعداد جراثيم الـ EHEC في الروث لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة Log10 CFU/g	17-4
113	تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية في الروث لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة Log10 PFU/g	18-4

قائمة الصور

الصفحة	العنوان	التسلسل
71	طريقة صب الطبقة الثانية في طريقة تقنية الآغار المزدوج	1-3
80	جراثيم الإشريكية القولونية على منبت EMB و ماكونكي	1-4
81	صبغة غرام والاختبارات الكيمياحيوية لجراثيم الإشريكية القولونية	2-4
85	نتائج الرحلان الكهربائي على هلام الأجاروز لنواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد	3-4
86	لوحدات التحلل الناتجة عن العاثيات بطريقة الآغار المزدوج	4-4
110	تعداد جراثيم EHEC على وسط ماكونكي سوربيتول	5-4

قائمة المختصرات

المختصر	الاسم الكامل
A/E	Attaching and Effacing
ADP	Adenosine Diphosphate
a-EPEC	atypical EPEC
APEC	Avian Pathogenic E. coli
ARP	Actin-Related Protein
ARP2/3	Actin-Related Protein 2/3
ATP	Adenosine Triphosphate
AWaRe	Access, Watch, Reserve
bcsA	bacterial cellulose synthesis gene A
BFP	Bundle-Forming Pili
bfp	bundle-forming pilus
BleG	Biofilm and adherence gene
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CD77	Cluster of Differentiation 77
Cdc42	Cell division control protein 42
CF	Colonization Factor
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CRP	C-Reactive Protein
CP	Cerulplasmin
cGMP	Cyclic Guanosine Monophosphate
Cif	Cycle-Inhibiting Factor
csg	Curli specific genes
csgA	curli-specific gene A

EAEC	Enterοaggregative E. coli
eae	Intimin gene
EAF	EPEC Adherence Factor
Eha	Enterohemorrhagic E. coli autotransporter
EHEC	Enterohemorrhagic E. coli
EIEC	Enteroinvasive E. coli
EPEC	Enteropathogenic E. coli
EspA/B/D	EPEC Secreted Protein A/B/D
EspF	E. coli secreted protein F
EspF/H/J	EPEC Secreted Protein F/H/J
EspJ	E. coli secreted protein J
ETEC	Enterotoxigenic E. coli
FDA	Food and Drug Administration
fimA	fimbriae gene A
Gb3	Globotriaosylceramide
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GM1	Monosialotetrahexosylganglioside
GTP	Guanosine Triphosphate
HC	Hemorrhagic Colitis
HUS	Hemolytic Uremic Syndrome
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
LA	Localized Adherence
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
lfp	long polar fimbriae gene
lifA/efa1	lymphocyte inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Heat-Labile Toxin

MAP	Mitochondrial-Associated Protein
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NAG	N-Acetylgalactosamine
Nck	Nck adaptor protein
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NleA (espI)	Non-LEE-encoded effector A
NleB	Non-LEE encoded effector B
NleE	Non-LEE encoded effector E
NleF	Non-LEE-encoded effector F
NleH	Non-LEE encoded effector H
NLRP3	NLR Family Pyrin Domain Containing 3
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
OMP	Outer Membrane Protein
OMV	Outer Membrane Vesicle
ORF	Open Reading Frame
PAI	Pathogenicity Island
PAS	Phage-Antibiotic Synergy
PBP	Penicillin-Binding Protein
pO157	Plasmid O157
PFU	Plaque-Forming Unit
RBP	Receptor-Binding Protein
rRNA	Ribosomal RNA
Saa	STEC autoagglutinating adhesin
Sab	STEC autoagglutinating adhesin B
SdiA	Suppressor of Division Inhibitor A
SLT	Shiga-Like Toxin
ST	Heat-Stable Toxin

STEC	Shiga Toxin-Producing E. coli
stx	Shiga toxin gene
stx1	Shiga toxin type 1 gene
stx2	Shiga toxin type 2 gene
stx2a	Shiga toxin type 2 subtype a
stx2c	Shiga toxin type 2 subtype c
stx2d	Shiga toxin type 2 subtype d
Stx	Shiga Toxin
T1SS	Type I Secretion System
T2SS	Type II Secretion System
T3SS	Type III Secretion System
T4P	Type IV Pili
t-EPEC	typical EPEC
tir	translocated intimin receptor
tPAS	Temperate Phage-Antibiotic Synergy
ToxB	Toxin B gene
VT	Verotoxin
WHO	World Health Organization
XDR	Extensively Drug-Resistant
ZO-1	Zonula Occludens-1

ملخص البحث

ABSTRACT

المخلص

هدفت هذه الدراسة لعزل جراثيم الإشريكية القولونية الممرضة من حالات الإسهال عند العجول في محافظة حماة، ومحاولة توظيف عاثيات الجراثيم المعزولة من البيئة المحيطة في علاج حالات الإسهال المسببة بهذه الجراثيم، إذ أجريت هذه الدراسة في مخبر كلية الطب البيطري التابعة لجامعة حماة في الفترة الواقعة ما بين 2024 /4/2 و 2025/11/15 وأجريت الدراسة على خمس مراحل:

المرحلة الأولى:

تم جمع عينات الدراسة من العجول المصابة بالإسهال كمسحات شرجية حيث بلغ تعدادها 60 مسحة، وتم زراعة الجراثيم على المنابت التمييزية والانتقائية ماكونكي و EMB، وتم إجراء الاختبارات الكيمياءحيوية لتشخيص جراثيم الإشريكية القولونية باستخدام العتيدة Hi25™ Enterobacteriaceae Identification Kit (KB003)، ثم تم إجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة كيربي باور.

المرحلة الثانية:

تم الكشف عن الجينات المسؤولة عن عوامل الفوعة (K99, Sta, eae, Stx₁, Stx₂) وذلك للكشف عن الأنماط الممرضة للإشريكية القولونية المعزولة من روث العجول المصابة بالإسهال.

المرحلة الثالثة:

تم جمع عينات من البيئة (أرضية الحظائر، المستنقعات، التربة) لعزل عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية، إذ تم عزلها باستخدام طريقة صب الآغار المزدوج، كما تم الكشف عن تأثير ظروف الحفظ والإجهاد الفيزيائية والكيميائية على ثباتية عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية.

المرحلة الرابعة:

تم استخدام طريقة رقعة الشطرنج للكشف عن التآزر بين عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية والمضادات الحيوية (الستربتومايسين، الأوكسي تتراسكلين، النيومايسين) وحساب مؤشر التركيز القاتل الكسري .FBIC

المرحلة الخامسة:

تم إجراء دراسة علاج الإصابة بالإشريكية القولونية المنزفة للأعضاء EHEC داخل الجسم الحي بعائيات الجراثيم وبالمشاركة بين المضاد الحيوي النيومايسين وعائيات الجراثيم بالمقارنة مع العلاج بالمعززات الحيوية عند الأرناب، وتم قياس المؤشرات التالية (البروتين التفاعلي-C، السيروبلازمين، الهابتوغلوبين، تعداد EHEC في الروث، تعداد العائيات في الروث) وبلغت مدة التجربة 15 يوم.

أظهرت نتائج هذه الدراسة الكشف عن 53 عزولة من الإشريكية القولونية وبنسبة 88.33%، كما أظهرت النتائج مقاومة واسعة للمضادات الحيوية حيث بلغت أعلى نسبة مقاومة للمضاد الحيوي بنسلين ج يليه الأموكسيسلين، بينما كانت أعلى نسبة حساسية للمضاد الحيوي سيفتي فيور ويلييه السيبروفلوكساسين، ودراسة فئات المقاومة للمضادات الحيوية تبين أن نسبة جراثيم الإشريكية القولونية ذات المقاومة المتعددة للأدوية MDR بلغت نسبتها 92.45% من العزولات.

وبالكشف عن جينات الفوعة المميزة للذراري الممرضة للإشريكية القولونية تبين انتشار ETEC بنسبة 16.98% و EPEC بنسبة 13.21% و EHEC بنسبة 13.21% و STEC بنسبة 32.07%، وتم الكشف عن وجود ذراري هجينة للإشريكية القولونية تحمل جينات فوعة تنتمي لأكثر من ذرية بلغت نسبتها 5.66%، في حين أن نسبة 18.87% من جراثيم الإشريكية القولونية المعزولة لم تحمل أي من جينات الفوعة المدروسة.

كما أظهرت النتائج انتشار عائيات جراثيم الإشريكية القولونية بنسبة 100% في أرضيات الحظائر وبنسبة 75% من المستنقعات وبنسبة 48.33% في عينات التربة. ودراسة ثباتية العائيات تبين ثبات معيار عائيات الإشريكية القولونية بالتبريد بدرجة حرارة 4 م لمدة تصل إلى 6 أشهر في حين أظهرت النتائج ثبات معيار العائيات عند الحفظ بالتجميد لمدة 3 أشهر وانخفاض بشكل معنوي عند 6 أشهر، كما ساعد إضافة الغليسيرول بتركيز 20% على الحفاظ على معيار العائيات دون انخفاض، وقد أظهر تقييم تعريض العائيات للإجهاد الحراري بالتسخين ثبات معيارها عند درجة حرارة 45م وانخفاض بدرجة حرارة 55م وتم تعطيل العائيات بشكل كامل عند درجة حرارة 100م لمدة 5 دقائق، كما تفاوت تأثير تعريض عائيات جراثيم الإشريكية القولونية لأشعة UV لفترات مختلفة حيث انخفضت أعداد عائيات الإشريكية القولونية بازدياد فترة التعرض وتم تعطيل العائيات بعد دقيقتين من تعرضها لأشعة UV، كما وأشارت

نتائج تقييم حساسية عاثيات الإشريكية القولونية للتغير في قيم pH إلى انخفاض ملحوظ في الظروف الحامضية والقلوية الطرفية وأبدت ثباتاً في درجة الحموضة المتراوححة بين (5 - 8).

كما أظهرت النتائج فعالية العاثيات في خفض التركيز القاتل الأدنى للمضادات الحيوية لكل من الستربتومايسين والأوكسي تتراسكلين والنيومايسين، حيث بلغ التركيز القاتل الأدنى لمزيج المضاد الحيوي الستربتومايسين $40 \mu\text{g/ml}$ والعاثيات $6 \log_{10}$ PFU/ml، بينما بلغ التركيز القاتل الأدنى للمضاد الحيوي الستربتومايسين منفرداً $250 \mu\text{g/ml}$ ، وكذلك بلغ التركيز القاتل الأدنى لمزيج المضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين $40 \mu\text{g/ml}$ والعاثيات $6 \log_{10}$ PFU/ml، بينما بلغ التركيز القاتل الأدنى للمضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين منفرداً $250 \mu\text{g/ml}$ ، وقد بلغ التركيز القاتل الأدنى لمزيج المضاد الحيوي النيومايسين $10 \mu\text{g/ml}$ والعاثيات $6 \log_{10}$ PFU/ml، بينما بلغ التركيز القاتل الأدنى للمضاد الحيوي النيومايسين منفرداً $200 \mu\text{g/ml}$.

أظهرت الدراسة تفوق واضح للعلاج التشاركي بالمضاد الحيوي النيومايسين مع العاثيات داخل الجسم الحي في حيوانات التجارب (الأرانب) في القضاء على عدوى الإشريكية القولونية المنزفة للأمعاء، والحد من الالتهاب الجهازى، ومنع نفوق الحيوانات، مقارنة باستخدام المعززات الحيوية أو باستخدام العاثيات المنفردة. حيث نجح العلاج التآزري (عاثيات + مضاد حيوي) في القضاء التام على الجراثيم من الروث بحلول اليوم العاشر، مع انخفاض أسرع وأكبر في تعداد الجراثيم مقارنة بالعلاج بالعاثيات وحدها أو بالمعززات الحيوية، كما خفض العلاج التآزري مستويات بروتينات الطور الحاد (CRP, HP, CP) المرتبطة بالالتهاب بشكل أسرع وأكثر فعالية، وعادت إلى مستوياتها الطبيعية في وقت أقصر، مما يشير إلى تحكم أفضل في الالتهاب، كما سجلت المجموعة المعالجة تآزرياً معدل نفوق صفري (0%)، مقارنة بمعدل 37.5% في المجموعة المصابة غير المعالجة، و 16.66% في المجموعات المعالجة بالعاثيات وحدها أو بالمعززات الحيوية. كما أدى إعطاء العاثيات (بمفردها أو مع المضاد الحيوي) إلى زيادة كبيرة ولفترة أطول في تعداد العاثيات في الروث، مما يدل على تكاثرها النشط داخل العائل الجرثومي.

نستنتج من هذه الدراسة إمكانية استخدام عاثيات الجراثيم كعلاج واعد في مكافحة العدوى الجرثومية المقاومة للمضادات الحيوية والاستغناء الكلي أو الجزئي عن المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: العاثيات، الإشريكية القولونية، المضادات الحيوية، العجول، الإسهال

Abstract

This study aimed to isolate pathogenic *Escherichia coli* from diarrheal cases in calves in Hama governorate and to explore the potential use of bacteriophages isolated from the surrounding environment in treating this pathogen. The study was conducted in the laboratories of the Faculty of Veterinary Medicine at Hama University during the period from April 2, 2024, to November 15, 2025. It was carried out in five phases:

Phase One:

Study samples were collected from diarrheic calves as rectal swabs, totaling 60 swabs. The bacteria were cultured on MacConkey and EMB selective and differential media. Biochemical tests were performed to identify *Escherichia coli* using the Hi25™ Enterobacteriaceae Identification Kit (KB003). Subsequently, antibiotic susceptibility testing was conducted using the Kirby-Bauer method.

Phase Two:

Detection of genes responsible for virulence factors (K99, Sta, eae, Stx1, Stx2) was conducted to identify pathogenic *E. coli* pathotypes isolated from calf diarrhea.

Phase Three:

Samples were collected from the environment (barn floors, swamps, soil) for the isolation of *E. coli* bacteriophages, which were isolated using the double agar overlay method. The impact of preservation conditions and physical/chemical stress on the stability of the *E. coli* bacteriophages was also investigated.

Phase Four:

The checkerboard method was used to detect synergy between *E. coli*

bacteriophages and antibiotics (streptomycin, oxytetracycline, neomycin), and the Fractional Bactericidal Concentration Index (FBIC) was calculated.

Phase Five:

An in vivo study was conducted to treat Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) infection in rabbits using bacteriophage therapy, combination therapy (antibiotics + bacteriophages), and probiotic treatment in comparison. The following parameters were measured over a period of 15 days: C-reactive protein (CRP), ceruloplasmin, haptoglobin, EHEC count in feces, and bacteriophage count in feces.

results :

this study revealed the detection of 53 E. coli isolates, representing a rate of 88.33%. The findings also indicated widespread antibiotic resistance, with the highest resistance rates observed against Penicillin G, followed by Amoxicillin. In contrast, the highest susceptibility was to Ceftiofur, followed by Ciprofloxacin. Analysis of antibiotic resistance patterns showed that 92.45% of the E. coli isolates were Multidrug-Resistant (MDR).

Detection of virulence genes characteristic of pathogenic E. coli strains showed the prevalence of ETEC at 16.98%, EPEC at 13.21%, EHEC at 13.21%, and STEC at 32.07%. Hybrid E. coli strains carrying virulence genes belonging to more than one pathotype were detected at a rate of 5.66%, while 18.87% of the isolated E. coli strains did not carry any of the studied virulence genes.

The results also showed a 100% prevalence of E. coli bacteriophages in barn floor samples, 75% in swamp samples, and 48.33% in soil samples. Evaluation of E. coli bacteriophage stability indicated stability under refrigeration at 4°C for up to 6 months, while stability after freezing was maintained for 3 months but decreased significantly at 6 months. The addition of 20% glycerol aided in preserving phage titer. Assessment of thermal stress on phages showed stability

of the titer at 45°C, a decrease at 55°C, and complete inactivation at 100°C for 5 minutes. Exposure of E. coli phages to UV light for varying durations showed a decrease in phage numbers with increased exposure time, with complete inactivation occurring after 2 minutes of UV exposure. Results evaluating the sensitivity of E. coli phages to pH changes indicated a significant decrease under extreme acidic and alkaline conditions, with stability observed in the pH range of 5-8.

Furthermore, the results demonstrated the efficacy of phages in lowering the Minimum Inhibitory Concentration (MBC) of the antibiotics streptomycin, oxytetracycline, and neomycin. The MBC for the combination of streptomycin (40 µg/ml) and phages (6 log₁₀ PFU/ml) was achieved, compared to an MBC of 250 µg/ml for streptomycin alone. Similarly, the MBC for the combination of oxytetracycline (40 µg/ml) and phages (6 log₁₀ PFU/ml) was achieved, versus 250 µg/ml for oxytetracycline alone. The MBC for the combination of neomycin (10 µg/ml) and phages (6 log₁₀ PFU/ml) was achieved, compared to 200 µg/ml for neomycin alone.

The study demonstrated a clear superiority of combination therapy (neomycin antibiotic + phages) in vivo in experimental animals (rabbits) in eliminating Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) infection, reducing systemic inflammation, and preventing animal mortality, compared to using probiotics or phages alone. Synergistic therapy (phages + antibiotic) succeeded in completely eliminating bacteria from feces by day 10, with a faster and greater reduction in bacterial count compared to phage monotherapy or probiotic treatment. Additionally, synergistic therapy reduced levels of acute-phase proteins (CRP, HP, CP) associated with inflammation faster and more effectively, returning them to normal levels in a shorter time, indicating better control of inflammation. The group receiving combination therapy recorded a zero mortality rate (0%), compared to 37.5% in the infected untreated group, and 16.66% in groups

treated with phages alone or probiotics. Furthermore, administration of phages (alone or with antibiotics) led to a significant and prolonged increase in phage titer in feces, indicating their active replication within the bacterial host.

We conclude from this study the potential for using bacteriophages as a promising therapeutic agent in combating antibiotic-resistant bacterial infections, allowing for the partial or complete replacement of antibiotics.

Key words: Bacteriophage, E. coli, Antibiotic, Calves, Diarrhea.

الفصل الأول

المقدمة، والأهداف

*Introduction, &
Objectives*

المقدمة:

يشكل الإسهال في العجول حديثة الولادة إحدى أكبر المشكلات الصحية والاقتصادية التي تواجهها قطاعات الإنتاج الحيواني على مستوى العالم (Fouad *et al.*, 2024)، حيث تمثل نسبة النفوق بين العجول المصابة بالإسهال خلال الأسابيع الأولى بعد الولادة ما يقارب 57% من إجمالي النفوق، وبشكل خاص خلال الأسبوع الثالث بعد الولادة (Mohamed *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2023). إذ يؤدي الشكل الحاد منه إلى نفوق أعداد كبيرة بسبب التجفاف وإنتان وحماض الدم وفقد الشوارد الهامة أما الشكل تحت الحاد فيستمر الإسهال عدة أيام مؤدياً إلى نقص الوزن، فضلاً عن الخسائر الناجمة عن التأخر في النمو إلى جانب تكاليف المعالجة، كما إن بعض هذه الأخماج يمكن أن تنتقل إلى الإنسان و تشكل خطراً على الصحة العامة (Bierlein and Gross, 2025). تستخدم المضادات الحيوية في العلاج كخيار علاجي أول على الرغم من تعدد المسببات المرضية، إذ تعد فيروسات الروتا والكورونا وجراثيم الإشريكية القولونية الممرضة وجراثيم السلمونيلة وطفيلي البوغيات الخفية من أهم مسببات الإسهال في العجول حديثة الولادة (Sedky *et al.*, 2025).

عندما اكتشفت المضادات الحيوية واختبرت ضد أغلب الإصابات الجرثومية المعدية كانت فعالة بدرجة كبيرة (Rajat *et al.*, 2012; Cengiz and Adigüzel, 2020) وأصبحت من أهم وسائل التدبير اللازمة في الحالات الطبية المعقدة (Munita and Arias, 2016)، لكن بمرور الوقت ازدادت مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية وأصبحت مشكلة صحية كبرى نتيجة الممارسات الخاطئة والاستخدام العشوائي والمفرط، لذا صنفت منظمة الصحة العالمية مقاومة المضادات الحيوية كواحدة من أهم ثلاثة تهديدات للصحة العامة في القرن الحادي والعشرين (WHO, 2021)، إذ تتمثل الزيادة المقلقة للعدوى التي تسببها الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية في عدم الاستجابة للعلاج، والتي تُسهم في حدوث حوالي 2.8 مليون إصابة معقدة في الولايات المتحدة وحدها (CDC, 2019). وفي عام 2014 أعلنت منظمة الصحة العالمية (WHO) عن اقتراب عصر ما بعد المضادات الحيوية، حيث تصبح المضادات عديمة الفعالية، وقد يكون مصيراً محتملاً للقرن الحادي والعشرين (WHO, 2014). ويُوصف عصر ما

بعد المضادات الحيوية بأنه فترة تفشل فيها المضادات الحيوية في استهداف الجراثيم متعددة المقاومة، وبعد خمس سنوات في 2019 أشارت مراكز السيطرة على الأمراض والوقاية منها (CDC) في تقريرها عن تهديدات مقاومة المضادات الحيوية أن عصر ما بعد المضادات قد بدأ بالفعل (CDC, 2019). وتستمر الجهود العالمية في مواجهة هذا التهديد. كما أنه في عام 2017، أطلقت منظمة الصحة العالمية مبادرة "AWaRe" بهدف زيادة نسبة استخدام المضادات الحيوية "المتاحة" الآمنة والفعالة إلى 60% على الأقل عالمياً، مع تقليل استخدام المضادات الحيوية الأكثر فعالية والتي تشكل "ملاذأً أخيراً"، وذلك لاحتواء انتشار المقاومة (WHO, 2024).

بين تقرير صادر عن لجنة بريطانية، أن الوفيات السنوية بسبب العدوى الجرثومية المقاومة للمضادات الحيوية قد تصل إلى 10 ملايين حالة بحلول عام 2050، بتكلفة اقتصادية تبلغ حوالي 3 تريليونات دولار (O'Neill, 2014). كما دعت الحاجة الملحة لمضادات ميكروبية جديدة من قبل منظمة الصحة العالمية، التي حددت البحث والتطوير للمركبات ذات آليات عمل جديدة والمركبات التي تستهدف آليات مقاومة المضادات الحيوية كمجالات مهمة للابتكار في قائمتها لعام 2024 لمسببات الأمراض الجرثومية ذات الأولوية (WHO, 2024). وعلى الرغم من هذه الجهود، نادراً ما يتم العثور على فئات جديدة من المضادات الحيوية. وبالفعل، تشير التقارير إلى أنه من بين المضادات الحيوية الجديدة الاثني عشر التي تم طرحها في الأسواق بين عامي 2017 و2022، واحد فقط مثل فئة جديدة (Butler et al., 2022). كما أنه لم يتوقف البحث عن بديل لاستخدام المضادات الحيوية التقليدية لمواجهة هذه المشكلة المتزايدة، حيث جُربت بدائل عديدة للمضادات الحيوية التقليدية: مثل العلاج بالأجسام المضادة، والبيبتيدات المضادة للميكروبات، والبروبيوتيك، وربط المعادن، وتحفيز تطوير مضادات جديدة (Oechslin, 2018; Czaplewski et al., 2016). وعلى الرغم من الآمال المعقودة عليها، إلا أن جميع هذه الأساليب محدودة بسبب عدم قدرة العامل المضاد للميكروبات على التغير أو التكيف في الوقت الفعلي. بمعنى، إذا ظهرت مقاومة، يصبح العامل غير فعال خاصة مع الاستثمار الكبير في الوقت والأموال اللازمين لإطلاق أدوية جديدة، إذ أن قدرة الجراثيم على التحور السريع والتطور حول هذه الأساليب هي أكبر ميزة لها وحقيقة بيولوجية تُنبئ الاستثمار في صناعة المضادات. على النقيض، فإن العاثيات (الفاجات

الجرثومية) قادرة على التطور والتكيف مثل الجراثيم، بالإضافة إلى أنها الكيان التكاثري الأكثر عددًا على الأرض (تقدّر بحوالي 10^{31} جسيمًا) (Keen, 2015).

العائية الجرثومية هي فيروس له القدرة على إصابة الجراثيم وقتلها من دون إحداث أي تأثير سلبي في الخلايا البشرية أو الحيوانية (Principi et al., 2019). إن تكيف العائيات وعددها الهائل يجعلها أكبر مستودع للمعلومات المضادة للجراثيم متاحة للطب الحديث. كما استُخدمت العائيات لعقود في علاج العدوى الجرثومية في أوروبا الشرقية، وأظهرت دراسات علاجية حديثة في الولايات المتحدة والمملكة المتحدة نجاحًا سريريًا (McCallin et al., 2019.; Hesse and Adhya, 2019). إذ تم استخدام العلاج بالعائيات منذ عشرينيات القرن الماضي في الاتحاد السوفيتي ولا تزال تستخدم حالياً في العديد من دول العالم، وتعتبر العائيات آمنة بشكل عام من قبل إدارة الغذاء والدواء (FDA)، حيث نتناول ملايين الجسيمات منها يوميًا في الطعام والماء (FDA, 2006). كما أشارت دراسات عدة إلى إمكانية استخدام العلاج بالعائيات عوضاً عن المضادات الحيوية في جراثيم الإشريكية القولونية المنتجة لذيفان الشيغا من دون التحريض على إفرازه (Cho et al., 2026)، هذه الخصائص تجعل العائيات بديلاً محتملاً أفضل من استخدام المركبات الكيميائية للعلاج.

ونظراً لأهمية الموضوع وتعدد مسبباته والخسائر الاقتصادية التي يسببها الإسهال المسبب بجراثيم الإشريكية القولونية عند الحيوانات ومقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية سيتم إجراء هذه الدراسة كمساهمة في البحث عن بديل محتمل للمضادات الحيوية.

أهداف الدراسة

بناءً على ما تقدم فإن الدراسة الحالية تهدف إلى:

- 1- عزل جراثيم الإشريكية القولونية من حالات الإسهال عند العجول وتصنيفها.
- 2- الكشف عن بعض عوامل الفوعة في جراثيم الإشريكية القولونية.
- 3- عزل العاثيات الجرثومية من مصادر بيئية مختلفة.
- 4- تأثير العاثيات الجرثومية على عزولات جراثيم الإشريكية القولونية ودراسة تأثير مشاركتها مع المضادات الحيوية.
- 5- دراسة المؤشرات الصحية لتأثير العاثيات على حيوانات التجارب المصابة بالإسهال المسبب بالإشريكية القولونية.
- 6- مقارنة استخدام العاثيات في علاج الإسهال المسبب بالإشريكية القولونية مقارنة ببعض المعززات الحيوية.

الفصل الثاني

الدراسة المرجعية

LITERATURE
REVIEW

الدراسة المرجعية

2-1. الإسهال:

يعرف الإسهال بأنه طرح غير طبيعي للروث الحاوي على تركيز مفرط من الماء وقلة من المادة الجافة، ويكون على شكل نوبات متكررة وبكميات كبيرة ومتزايدة خلال اليوم، إذ أن الزيادة في حركة الأمعاء تقلل من وقت العبور المعوي للروث (Intestinal transit time) مما يؤدي إلى قلة امتصاص الماء، وبالتالي يكون الروث ليناً أو مائياً في قوامه (Ngwenyama, 2026) وقد يحتوي الروث في حالات الإسهال على دم أو مخاط ويكون ذا رائحة كريهة ولون غير طبيعي، وذلك بحسب شدة الإصابة والمسبب المرضي (Jergens and Suchodolski, 2022).

كما يعرف الإسهال بأنه عرض سريري ملازم لكثير من أمراض الجهاز الهضمي والنواتج عن اضطرابات حادة نتيجة لفشل بطانة الأمعاء في امتصاص السوائل أو زيادة إفرازها أو كليهما مما يؤدي إلى اختلال التوازن بين الامتصاص والإفراز، ومن ثم فقدان الكهارل والشوارد الهامة الضرورية للحفاظ على وظائف الجسم المختلفة (Akinci and Albay, 2026).

2-2. تصنيف الإسهال:

يصنف الإسهال علمياً حسب مدته إلى:

2-2-1. الإسهال الحاد: يتميز هذا النوع من الإسهال بحدوثه شكل نوبات حادة ومتكررة خلال مدة قصيرة، ويكون الروث في حالات الإسهال الحاد مائياً في قوامه مما يؤدي إلى حدوث الإنكاز الشديد ومن ثم الغيبوبة والنفوق (Thomason, 2025).

2-2-2. الإسهال المزمن: يحدث نتيجة تحول الإسهال الحاد إلى الشكل المزمن والذي قد يستمر لعدة أسابيع أو أشهر، و يكون على شكل نوبات راجعة (Recurrent episodic) محدثاً بذلك انخفاضاً تدريجياً وملحوظاً في وزن الحيوان ومن ثم نحوله (Emaciation) (Thomason, 2025).

2-3-3. آليات حدوث الإسهال:

أشار (Radostits *et al.*, 2007) إلى أن هناك عدة آليات لحدوث الإسهال و كما يأتي:

2-3-2. الإسهال التناضحي (Osmotic diarrhea):

ينتج التأثير التناضحي عندما تعمل المواد المهضومة الموجودة داخل جوف المعي على زيادة الضغط التناضحي فوق المستوى الطبيعي وعلى طول الأمعاء مما يؤدي إلى حدوث حركة تناضحية للسوائل إلى جوف المعي ومن ثم تجمعها، ونتيجة لسوء الهضم يحدث الإسهال كما في حالات التخمة (Overfeeding) أو تناول بعض الأعلاف العسرة الهضم (Indigestible feeds) وفي حالات العلاج بالمسهلات الملحية (Saline purgatives). أما في حالات الإصابات الفيروسية مثل الإصابة بفيروسات الروتا والكورونا وجراثيم ETEC أو الإصابة بالأوالي المعوية كما في داء البوغيات الخفية يحدث الإسهال التناضحي نتيجة لحدوث قصراً بالزغابات المعوية والتصاقها ببعضها البعض، كما أن بعضاً من هذه الزغابات تبدأ بالاضمحلال، وبذلك تقل قابلية الأمعاء على الامتصاص.

2-3-2. الإسهال النَّضحي (Exudative diarrhea):

يحدث هذا النوع من الإسهال في حالات التهاب الأمعاء الحاد أو المزمن أو نتيجة لتتخر بطانة الأمعاء مما يؤدي إلى غزارة في إفراز السوائل فضلاً عن نواتج الالتهاب المتضمنة فقدان بروتينات المصل (Serum Proteins) وقلة في امتصاص السوائل والكهارل، ويلاحظ الإسهال التناضحي في حالات التسمم بالزرنينخ وعند الإصابة بمرض الإسهال الفيروسي البقري (Bovine viral diarrhea) و بدء السالمونيلا (Salmonellosis).

2-3-3. الإسهال الإفرازي (Secretory diarrhea):

ينتج الإسهال الإفرازي عن زيادة في إفراز السوائل وبكميات كبيرة تفوق قدرة الأمعاء على الامتصاص وقد تكون الزغابات المعوية سليمة وقابليتها على الامتصاص طبيعية، ويسبب هذا النوع من الإسهال جرثومة الإشريكية القولونية المذيبة للأمعاء، إذ تلتصق هذه الجراثيم بالخلايا الظهارية للأمعاء، ثم يحدث التجرثم وإفراز الذايفان المعوي الذي يفعل إنزيم الأديلات سيكلاز مؤدياً بذلك إلى زيادة في إفراز السوائل

والناتج عن زيادة الأدينوزين احادي الفوسفات الحلقي (Cyclic adenosine monophosphate) وبالتالي حدوث الإسهال الشديد في الحيوانات الرضيعة.

2-4. الأهمية الصحية للإسهال:

تبرز أهمية الإسهال لما يسببه من مشاكل صحية وخسائر اقتصادية كبيرة في مختلف أنحاء العالم، وأحد الأسباب الرئيسية لارتفاع نسبة النفوق في الحيوانات حديثة الولادة، وذلك لما يسببه من ضعف عام، وانخفاض في حيوية الحيوان واعتلال صحته مما يجعله عرضة للإصابة بالأمراض الأخرى التي قد تؤدي إلى نفوقه، فضلاً عن تكاليف العناية والعلاج (Bierlein and Gross, 2025). ومن مسببات الإسهال الحاد في العجول الحديثة الولادة الإصابة بجراثيم الإشريكية القولونية المولدة للذيفان المعوي أو فيروسات الروتا وفيروسات الكورونا (Radostits *et al.*, 2007)

وجد كل من (Aref *et al.*, 2018) أن هناك تردداً مرتفعاً لجراثيم الإشريكية القولونية الممرضة في كل من العجول المصابة بالإسهال والعجول السليمة ظاهرياً، وأكدوا دور هذه الحيوانات كمستودع لجراثيم الإشريكية القولونية الممرضة المحتمل نقل الإصابة للإنسان. كما اكتشفوا وجود نمط هجين جديد من الإشريكية القولونية المنتجة للسموم المعوية (ETEC-STEC) الذي يسبب الإسهال في العجول ويشكل تهديداً محتملاً للصحة العامة، وفي دراسة (Han *et al.*, 2017) وجدوا أن الإسهال في العجول الصغيرة بسبب الإشريكية القولونية هو مرض خطير يؤثر على الحيوية وزيادة الوزن وإنتاج الحليب، مما يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة.

كما أوضحت دراسة أجريت على 1280 عجل أن الإسهال من أكثر الأعراض المرضية شيوعاً، وتصل نسبتي حدوثه (Incidence rate) وإمراضيته (Morbidity rate) إلى 52.97% و 90.5% على التوالي، بينما كانت نسبة النفوق 87.77% (Razzaque *et al.*, 2009)

كما أشار (Trzebiatowski *et al.*, 2025) إلى أن الإسهال يشكل ما يقرب 48.2% من الحالات المرضية التي تصيب العجول خلال الأسابيع الأولى من العمر ، أظهرت دراسة (Parlatir *et al.*, 2025) في مزارع أبقار الألبان في تركيا، بيانات مسحية شملت 115 مزرعة من سبع مناطق

جغرافية. وأظهرت النتائج أن نسبة انتشار الإسهال في العجول بنسبة 26.81% ومعدل النفوق الناجم عن الإسهال بنسبة 15.58%. بالإضافة إلى ذلك، وُجد أن الإسهال يتسبب في انخفاض زيادة الوزن بنسبة 11-30%. كما أظهرت الدراسات أن العجول المصابة بالإسهال تعاني من الجفاف وفقدان الشهية وصعوبة في الوقوف (Trefz *et al.*, 2017) وفي حالات الإسهال الشديد، قد تظهر على العجول أعراض الرنح (عدم التوازن)، وحموضة الدم، وتجرثم الدم، واضطراب نظم القلب، ونقص حجم الدم، مما قد يؤدي إلى النفوق (Naylor, 2009) وتُعالج العجول المصابة بالإسهال عادةً بالمضادات الحيوية، مما يساهم في تطور مقاومة المضادات الحيوية (Stilwell and Carvalho, 2011). كما تواجه العجول التي تنجو من نوبة الإسهال الأولية عدة عواقب تشمل انخفاضاً في زيادة الوزن كما يبلغ متوسط الخسارة الناتجة عن الإسهال 36 دولارًا كنديًا لكل عجل (Pardon *et al.*, 2013).

2-5. جراثيم الإشريكية القولونية:

يعد الباحث الألماني Teoder Escherich عام 1885 أول من عزل هذا النوع من الجراثيم من براز طفل رضيع كجراثيم قولون متعايشة (*Bacterium coli commune*) حيث تستوطن الأمعاء بعد الولادة، وفي عام 1945 وجد Bray بأن سلالة من الـ *E.coli* كانت مسبباً لإسهال الأطفال الرضع في انكلترا واصبحت تعرف بالإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) (Bray, 1945; Robins-Browne and Hartland, 2002).

تعود جراثيم *E.coli* إلى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* التي تضم عدداً كبيراً من الأجناس الجرثومية ذات الصلة فيما بينها وجنس الإشريكية قريب الصلة من الناحية الوراثية مع باقي الأجناس ولا سيما *Shigella* ويضم خمسة أنواع هي: *E.coli* و *E.blattae* و *E.hermanii* و *E.fergusonii* و *E.vuneris* المختلفة عن بعضها في بعض التفاعلات الكيميائية، وإن النوع *E.coli* هو الأكثر شيوعاً وأهمية في إمرضية الإنسان والحيوان (Basavaraju and Gunashree, 2022). وتعتبر الإشريكية القولونية نوعاً واسع الانتشار حيث توجد هذه الجراثيم بأعداد وافرة في أمعاء الإنسان والحيوان إذ أن أعدادها قد تصل إلى 10^9 خلية لكل غرام في عينة البراز، وبالتالي فهي تواجد في مياه الصرف

الصحي ، وفي كل المياه الطبيعية والتراب الملوثة ببراز مصدره الإنسان و الحيوانات (Rahman *et al.*, 2017).

وتتصف الإشريكية القولونية بأنها عصيات قصيرة صغيرة أبعادها (0.5-0.7 μm x 1-3 μm)، وتوجد منفردة في العادة، أو بشكل سلاسل قصيرة، متحركة بواسطة أشعار محيطية (Pretrichous flagella)، سلبية الغرام، لا هوائية مخيرة (Facultative anaerobic)، غير متبوعة وبعض سلالاتها تمتلك محفظة ، درجة حرارة نموها المثلى (37م)، كما أنها تستطيع النمو في درجة حرارة تتراوح بين (15 - 45 م)، كما أن هناك بعض الأنماط المصلية التابعة لها تتحمل درجات حرارة (55م) مدة (60) دقيقة، ويتراوح عمر جيل الإشريكية القولونية (وقت التضاعف) Generation time في الظروف المثالية بين (12 - 15) دقيقة، وعلى الرغم من حيويتها الكبيرة سواء كانت في المزرعة أم في الوسط الخارجي فهي حساسة للحرارة (تموت خلال ساعة بدرجة حرارة 56م) وتتميز هذه الجراثيم بقدرتها على النمو بحرارة (44 - 45) م في أوساط الزرع، مخمرة للاكتوز منتجة حمض وغاز. وتكون مستعمراتها ملساء محدبة قليلاً ورطبة مع حافة كاملة وغير مخاطية ويكون لون المستعمرة على وسط الماكونكي وردياً لماًعاً، أما على وسط EMB Agar فتكون ذات تآلق معدني مخضر (Green metallic sheen) .

كما أنها إيجابية الكاتلاز وسلبية الأوكسيداز واليورياز وإن 99% منها منتجة للإندول، وإيجابية أحمر الميثيل وسلبية لاختبار فوكس بروسكاور ولا تستطيع استخدام السيترات كمصدر وحيد للكربون (Basavaraju and Gunashree, 2022)

في حين أن معظم سلالات الإشريكية غير ممرضة، إلا أن بعضها شديدة الإمراضية حيث تم ربط الـ E.coli H7:O157 بخطر الوفاة بسبب إمرضيتها مثل (التهاب القولون النزفي Hemorrhagic HC colitis ، متلازمة انحلال الدم اليوريمية Haemolytic Uremic Syndrome HuS) وأمراض الإسهال وإنتان الدم (Bruyand *et al.*, 2018).

وقسمت الإشريكية القولونية المسببة للإسهال استناداً إلى صفاتها وعوامل الفوعة وآلية الإصابة والأعراض السريرية والأنماط المصلية إلى عدة أنماط مرضية ومنها:

2-5-1. الإشريكية القولونية المذيقة للأمعاء (ETEC):

يُعد النمط الممرض ETEC للإشريكية القولونية، الذي يفرز ذيفانات معوية في الأمعاء الدقيقة ، أحد مسببات إسهال المسافرين وأحد أهم مسببات الإسهال عند الأطفال في الدول النامية. كما تعد ETEC أيضاً ممرضاً حيوانياً يسبب أمراض إسهال حادة في الماشية والدواجن (Bin *et al.*, 2018). بشكل عام، العاملان الرئيسيان للفوعة في ETEC اللذان يؤديان إلى الإسهال هما عوامل الاستيطان (colonization factors) و الذيفانات المعوية (enterotoxins) (Bhakat *et al.*, 2020).

تلتصق ETEC أولاً بالخلايا الظهارية للأمعاء الدقيقة عبر تراكيب سطحية ثم تفرز الذيفانات المعوية. يلعب الاستيطان دوراً أساسياً في الخطوة الأولية لآلية إمراضية ETEC، حيث تتفاعل ETEC مع خلايا الأمعاء الدقيقة الظهارية عبر جينات متنوعة ل عوامل الاستيطان (CFs) المشفرة على البلازميدات والتي تشفر تراكيب هيدبية وغير هيدبية وشبيهة بالألياف (Hazen *et al.*, 2017). من بين العديد من عوامل الاستيطان، تُعد CFA/I و CFA/II و CFA/IV العوامل الرئيسية لتسهيل استيطان ETEC وتم اكتشافها بشكل كبير في ETEC المعزولة من عينات الإسهال. تشمل التراكيب البروتينية الهيدبية وغير الهيدبية الأخرى مستضدات سطح القولون (CS) مثل CS1-CS6 ، وهديبات الالتصاق (جين fim) ، و الهديبات المشتركة للإشريكية القولونية (جين ecpA) (Rasko *et al.*, 2019) ، والبروتينات الناقلة الذاتية مثل مجموعة بروتينات Etp، و EatA ، تعزز السياط (flagella) عملية الاستيطان لـ ETEC على الخلايا الظهارية المعوية للمضيف (Kumar *et al.*, 2018) ، يعد EtpA الذي تفرزه ETEC بروتين سكري يحتوي على N-أسيتيل غالاكتوزامين (NAG) (Mirhoseini *et al.*, 2018).

أكثر عوامل الفوعة بروزاً وفعالية في ETEC هو إفراز الذيفانات المعوية إذ تفرز نوعان من الذيفانات المعوية، الذيفانات الثابتة حرارياً (STs) والذيفانات العطوبة حرارياً (LTs) ، وتنشط إنتاج النوكليوتيدات الحلقية (cyclic nucleotides) ، مما يساهم في فقدان الماء والأملاح والسوائل المعوية، مسببة إسهال إفرازي عند البشر والحيوانات. قد تُعبر سلالات ETEC عن LTs أو STs أو مزيج من كلا الذيفانين

(Turunen *et al.*, 2020). تقع الجينات المشفرة للذيفانات المعوية على كل من البلازميدات والكروموسوم من أصل عاثي، والتي يمكن نقلها بين الأنماط الممرضة المختلفة للإشريكية القولونية. يتم تصنيع بروتين أولي مكون من 72 حمض أميني، يُطلق منه منطقة مكونة من 18-19 حمض أميني كشكل نشط للذيفان الثابت حرارياً. إذ تنقسم هذه الذيفانات إلى STI و STII المشفرة بواسطة جينات *estA* و *estB* على التوالي الموجودة على البلازميدات. بالنسبة للعائل، يتم تصنيف STI إلى نوعين فرعيين STp (18 aa) و STh (19 aa)، يوجدان بشكل رئيسي في سلالات ETEC الخنزيرية والبشرية على التوالي. ومع ذلك، تم اكتشاف كلا النوعين الفرعيين في ETEC المعزولة من البشر (Wang *et al.*, 2019). تحاكي بنية هذه الذيفانات الوظيفة البيولوجية للبيتيدات، بما في ذلك الغوانيلين (guanylin) و يوروغوانيلين (uroguanylin)، وترتبط بمستقبل غوانيلات سيكلاز C (guanylate cyclase C receptor)، وتزيد من تركيز أحادي فوسفات الغوانوزين الحلقي (cGMP) داخل الخلية عبر تحلل ثلاثي فوسفات الغوانوزين (GTP)، حيث يؤدي زيادة تركيز cGMP إلى تنشيط بروتين كيناز الذي يقوم بفسفرة قناة نقل الأيونات عبر الغشاء (CFTR)، إذ تثبط قناة CFTR المنشطة تبادل الأيونات وامتصاص الصوديوم، مما يساهم في إطلاق الماء والملح إلى لمعة الأمعاء وبالتالي فقدان السوائل، مما يؤدي إلى الإسهال المائي والإفرازي (Vidal *et al.*, 2019; Duan *et al.*, 2019)، تعد قناة التصدير المفترضة لإفراز ST هي بروتين غشاء خارجي مشفر بواسطة جين *tolC*. يعبر جين عامل الالتصاق *EtpA* الموجود على بلازميد عن بروتين لبناء هيكل جسر جزئي بين الجراثيم والخلية المضيفة. كما إنه من دون التعبير عن جينات *tolC* و *EtpA* لا يتم توصيل ST إلى الخلايا المستهدفة. تم اعتبار هذه الجينات أيضاً من عوامل الفوعة الرئيسية لـ ETEC (Rodrigues *et al.*, 2020)، كما أن هناك آلية أخرى لإحداث ST للإسهال هي تعديل الوصلات للخلايا الظهارية المعوية، مما يؤدي إلى زيادة النفاذية عن طريق تثبيط التعبير عن البروتينات وإعاقة سلامة الوصلات بين الخلايا. بالإضافة إلى ذلك، تؤدي ذيفانات ST التي تتوسط الاستجابات المناعية الفطرية إلى إفراز كيموكينات وسيتوكينات مثل IL-6 و IL-8 (Turunen *et al.*, 2020).

كما أنه هناك ذيفان آخر تفرزه ETEC بعد استيطان الأمعاء الدقيقة هو الذيفان العطوب حرارياً (LT) تم تحديد نوعين من LTI ، و النوع LTII . يُصنف النوع LTI أيضاً إلى نوعين فرعيين LTh و LTp ، يرتبط LT II بشكل رئيسي بالسلالات المعزولة من الحيوانات وأحياناً من البشر (Rodrigues *et al.*, 2020). يتم تصنيع LT في البداية كذيفان كامل (holotoxin) في الحيز المحيط بالغشاء (periplasm) ثم يتم إطلاقه عبر نظامي إفراز، نظام إفراز من النوع الثاني (T2SS) و الحويصلات الغشائية الخارجية (OMV) ، كما تفرز ETEC بشكل رئيسي ذيفان LT من خلال نظام OMV حيث تتكون ذيفانات ST و LT من وحدة فرعية واحدة A ذات نشاط إنزيمي ووحدة فرعية B خماسية ترتبط بمستقبل الغانغليوزيد GM1 (GM1 ganglioside receptor) على سطح الخلية المضيفة (Subramenium *et al.*, 2019). تشبه بنية وآلية إمراضية LT تلك الخاصة بذيفان ضمة الكوليرا بنسبة تقارب (80%). بعد الإفراز والنقل إلى الخلية المضيفة تحفز الوحدة الفرعية A عامل أدينوزين ثنائي فوسفات ريبوزيل (ADP-ribosylation factor) وتثبط نشاط GTPase الخاص بوحدة GS ، مما يؤدي إلى تنشيط أدينيلات سيكلاز (adenylate cyclase) وزيادة تركيزات أحادي فوسفات الأدينوزين الحلقي (cAMP) داخل الخلية. تساهم المستويات الأعلى من cAMP في تنشيط قناة أيونات CFTR ، يليها إفراز الماء والشوارد، مما يؤدي إلى الإسهال المائي (von Mentzer *et al.*, 2021).

ومن أنماطها المصلية الشائعة (O128, O115, O167, O159, O149, O148, O147, O141,) (Rodas *et al.*, 2011). (O139, O101, O80, O78, O63, O27, O25, O20, O15, O8, O6).

2-5-2. الإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء *E. coli* Enteropathogenic (EPEC):

تعد من المسببات الرئيسية الأكثر شيوعاً في الإصابة بالإسهال الحاد عند الإنسان والحيوان وتزداد خطورتها عند حديثي الولادة، وتمتلك هذه المجموعة عدداً من عوامل الفوعة التي تسبب إمرضيتها وأهمها وجود بلازميدات كبيرة وبأوزان جزيئية تتراوح ما بين 50 – 70 ميكادالتون تدعى EPEC adherence factor (EAF) تحتوي جينات تشفر عن الحزم المكونة للأهداب (BFP) Bundle – Forming Pili المسؤولة عن الالتصاق الموضعي Localized Adherence (LA) بالخلايا المعوية (*Moreira et al., 2006*).

من الناحية المرضية، تنتمي EPEC إلى مسببات أمراض الالتصاق والمسح (A/E)، تقع الجينات الرئيسية المشفرة لعوامل الفوعة لـ EPEC على جزيرة إمرضية كروموسومية (PAI) تحتوي على 41 إطار قراءة مفتوح (ORFs) وعلى بلازميد ممرض يُسمى موقع مسح الخلايا المعوية (LEE) وعامل التصاق (EAF) EPEC (*Hernandes et al., 2009*). يتم تعديل التعبير الجيني لـ LEE بواسطة الجين المنظم المشفر (LEE-encoded regulator gene)، الموجود في الجزء الأول من LEE، كما توجد جزيرة إمرضية أخرى لـ EPEC تسمى جزيرة EspC، والتي تشفر جين ذيفان معوي ذاتي النقل من نوع سيرين بروتياز (serine protease autotransporter) وهذا هو الذيفان الوحيد الذي تفرزه EPEC، والذي يمكن أن يؤدي إلى نخر الخلايا الظهارية (*Ochoa et al., 2008*). فيما يتعلق بوجود بلازميد EAF أو غيابه، يتم تصنيف EPEC إلى نموذجية (t-EPEC) ذات جينات فوعة كاملة و غير نموذجية (a-EPEC) لا تحتوي على EAF لحزم هدييات النوع الرابع (bfp) (*Serapio-Palacios and Finlay, 2020*)، تقع عوامل الفوعة الأكثر بروزاً لـ EPEC في كل من السلالات النموذجية وغير النموذجية على جزيرة LEE هذه الجزيرة الإمرضية هي جهاز إفراز من النوع الثالث (T3SS) يتكون من بروتينات النقل EspA و EspB و EspD (بروتينات تفرزها EPEC)، والبروتينات الفعالة Map، EspF، EspG، EspH، EspZ، والبروتينات المشاركة في الالتصاق،

والعناصر التنظيمية (Xu *et al.*, 2017). تبدأ عملية الالتصاق والمسح (A/E) بتفاعل بين بروتين الغشاء الخارجي الإنتيمين (intimin) والمستقبل المنقول للإنتيمين تير (Tir) المشفر بواسطة جينات eae و tir على التوالي (Zheng *et al.*, 2021). قبل التعبير عن جهاز T3SS بعد ارتباط مستقر بتفاعل الإنتيمين-تير وحقن البروتينات الفعالة، تلتصق EPEC بسطح الخلايا المضيفة (الالتصاق الأولي) باستخدام تراكيب تشبه الهديبات (pili) (Platenkamp and Mellies, 2018) تتوسط هديبات النوع الرابع (bfp) في a-EPEC وعامل تثبيت للمفاويات (lifA/efa1) في t-EPEC الالتصاق الأولي بالخلايا المعوية الموجودة في الأمعاء الدقيقة، باعتبارها الخطوة الأولى لـ A/E بعد تكوين مستعمرات موضعية. يُعد جهاز T3SS آلة حقن معقدة على المستوى النانوي الجزيئي تتضمن أكثر من 20 بروتيناً رئيسياً وتتكون من ثلاث زوائد خارج خلوية (Pollock, 2019). ولتكوين الغشاء الحيوي، تحتاج الجراثيم إلى تراكيب لدعم هذه الهديبات المجددة المميزة، وهديبات النوع الأول، والسليولوز المشفر في EPEC بواسطة جينات csgA ، fimA ، و bcsA على التوالي (Ruano-Gallego *et al.*, 2021).

الخطوة التالية في إمرضية EPEC هي نقل البروتينات الفعالة والبروتينات الخاصة بـ LEE و Nie إلى الخلية المضيفة عبر جهاز T3SS، بالإضافة إلى الالتصاق وتكوين دعامة الأكتين، يثبط تير (Tir) إشارات NF- κ B كآلية لتجنب المناعة في إمرضية EPEC (Deborah Chen and Frankel, 2005) يشترك البروتين المرتبط بالميتوكوندريا (MAP) في تسلسل Trp-xxx-Glu الذي يمنح نشاط محفز تبادل الغوانين نوكليوثيد (GEF) لـ GTPase يحفز GEF عامل Cdc42 ويساهم في تكوين الزوائد الخيطية (filopodia) في موقع ارتباط الجراثيم. يعطل MAP أيضاً وظيفة غشاء الميتوكوندريا، مما يساهم في موت الخلية المضيفة، كما أن هناك بروتين فعال بارز آخر هو NieA المعروف أيضاً باسم espi ، وله العديد من الأدوار، مثل إتمام تنشيط مجمع المستقبل NLRP3 الالتهابي (inflammasome) ، وإعاقة الوصلات المحكمة (tight junctions) بين الخلايا، وتنشيط إفراز السيتوكينات من الخلية المضيفة (Donnenberg and Finlay, 2013).

وقد قسمت EPEC إلى مجموعتين بحسب المجاميع المصلية وهما :

المجموعة الأولى (EPEC1): لها القدرة عن التعبير عن المستضد H6 ومن أنماطها المصلية الواسعة الانتشار O142, O127, O125, O119, O55.

المجموعة الثانية (EPEC2): لها القدرة عن التعبير عن المستضد H2 وتضم المجاميع المصلية O111, O114, O126, O128 (Donnenberg and Whittam, 2001). وتمتلك المجموعتان كل من LEE و EAF الذي يشفر عن الشعيرات المكونة للحزم وتظهر التصاقا من النوع الموقعي LA (Geurtsen *et al.*, 2022).

2-5-3. الإشريكية القولونية المنزفة للأعضاء E.Coli Enterohemorrhagic (EHEC):

عرفت EHEC لأول مرة كمسبب للإسهال الدموي وحالات الإصابة بالمتلازمة اليوريمية الحالة للدم Hemolytic-Uremic Syndrome (HUS) للإنسان عام 1982 حيث سجلت حالتين وبأئيتين تميزت بإسهال دموي مع حمى قليلة وألم في البطن وهي أعراض التهاب القولون النزفي Hemorrhagic Colitis (HC) والذي اقترن بتناول همبرغر غير مطبوخ بشكل جيد في أحد مطاعم الوجبات السريعة (Rily *et al.*, 1983) وقد بينت نتائج التشخيص أن المسبب لهذه الحالات هي إحدى سلالات جراثيم E.coli من O157:H7 (Bettelheim, 2003). وفي نفس العام سجل أيضاً حالات إصابة متفرقة بمتلازمة HUS مع احتواء براز المصابين على ذيفان خلوي وعلى جراثيم إشريكية قولونية منتجة لذيفان خلوي Cytotoxin وكانت السلالة E.coli O157:H7 هي المسبب لهذه الحالات (Karmali *et al.*, 1983).

الأنماط المصلية EHEC هي المجموعة فرعية من سلالات STEC التي تحتوي على عوامل فوعة خاصة بالالتصاق والارتباط المشفرة بواسطة جزيرة الأمراض LEE تشارك بروتينات الالتصاق في استيطان وتكوين الغشاء الحيوي لـ EHEC على الأسطح (Schwidder *et al.*, 2019).

الخطوة الأولى في التصاق EHEC بالخلايا الظهارية المعوية هي الالتصاق الأولي، إذ أظهرت الدراسات الحديثة أن التلامس الأولي والالتصاق بين EHEC والخلية المضيفة يتم من خلال التفاعل بين هديبات الإشريكية القولونية القطبية الطويلة (long polar fimbriae) المشفرة على (جين lfp) والبروتينات الغشائية خارج الخلية في الخلية المضيفة، بما في ذلك فيبرونيكتين و كولاجين IV و لامينين (Huang *et al.*, 2021) ثم يتم الالتصاق ويحدث تأثير A/E عبر تفاعلات الإنتيمين (المشفر بواسطة جين eae) وبروتينات المستقبل في غشاء الخلية المضيفة، والتي تتكون من تير يتم حقه عبر T3SS و نوكلين و مستقبلات بيتا-1 انتغرين ($\beta 1$ -integrins) تختلف آلية الأمراض A/E في EHEC عنها في EPEC حيث يتم تكوين الدعامة وإعادة ترتيب الأكتين من خلال آلية مستقلة عن Nck إذ يتم تحري إعادة ترتيب هيكل الأكتين الخلوي بينما يرتبط معقد تير-الإنتيمين ببروتين EspF عبر بروتين متماثل لمستقبلات الركيزة للأنسولين (insulin receptor substrate) ويتم تنشيط N-WASP و ARP2/3 لتجميع الأكتين عبر التفاعل مع EspF المرض. تُعرف الهديبات المجددة (المشفرة بواسطة جينات csg) بعوامل الالتصاق والاستيطان. يتم تسهيل الاستيطان والمستعمرات المجهرية وتكوين الغشاء الحيوي عبر التفاعل مع سطح الخلية المضيفة (Barnett, 2013). تشارك بعض البروتينات مثل هديبات النوع الأول، وF9، وهديبات الإشريكية القولونية الرابطة للامينين (E. coli laminin-binding fimbriae) في الالتصاق بالخلية المضيفة، كما تساهم الناقلات الذاتية (Autotransporters) بما في ذلك بروتينات Eha و Saa و Sab التي تطلقها EHEC في تكوين الغشاء الحيوي والالتصاق (Garcia-Heredia *et al.*, 2016). علاوة على ذلك، قد يكون الجين البلازميدي المسمى ToxB، الموجود على بلازميد pO157، ذو علاقة في الالتصاق في النمط المصلي O157:H7 وسلالات EHEC الأخرى. ومن الجدير بالذكر أن ظروفًا بيئية محددة مثل درجة الحموضة ودرجة الحرارة ومحدودية المغذيات تحفز نسخ جينات الالتصاق والتعبير عنها من خلال بعض أنظمة الإشارات (Karpman and Ståhl, 2014). تفرز الأنماط المصلية EHEC ضعف عدد البروتينات الفعالة التي تفرزها EPEC في الخلية المضيفة عبر جهاز T3SS كما تساهم أيضًا بالاستجابات الالتهابية للمضيف التي يحرضها A/E والاستيطان وتكوين الغشاء الحيوي في أعراض

اضطرابات الجهاز الهضمي. يُعتبر NleF ، كبروتين فعال غير مرتبط بـLEE ، عامل فوعة بارز بسبب مقاومته للاستجابة الالتهابية للمضيف وتثبيط موت الخلايا. حيث تبين مؤخرًا أن العديد من المؤثرات غير المرتبطة بـ LEE مثل NleB و NleE و BleG و NleH و EspJ تتوسط بقاء EHEC وتكوين الغشاء الحيوي (Krüger et al., 2015,; Warr et al., 2021).

تم اكتشاف الذيفان الخلوي من قبل (Konowalchuk et al., 1977) عندما وجد أن بعض سلالات الإشريكية القولونية ذات العلاقة بأمراض الإسهال تنتج ذيفاناً يسبب تأثيرات أمراضية خلوية Cytopathic effects على خلايا تسمى خلايا الفيرو Vero cells وهي عبارة عن خلايا لمزرعة نسيجية Tissue culture لكلية القرد الأخضر الأفريقي African green monkey kidney لذا أطلق عليه ذيفان فيرو Verotoxin (VT). ثم درس تأثير الذيفان السام Cytotoxic على خلايا الهيلا Hela cells والذي تم تعديله Neutralization مع المضاد المصلي النوعي لذيفان الشيغا Shigatoxin (Stx) المنتج من جراثيم *Shigella dysenteriae* type 1 لذا أطلق عليه مصطلح آخر وهو الذيفان الشبيه بالشيغا Shiga-like toxin (SLT) أو المصطلح المرادف له وهو ذيفان الشيغا (Nataro and Kaper ,1998,; Wani et al.,2004)

يعتبر ذيفان شبيه الشيغا (Slf) أو فيروتوكسين (verotoxin) المشفر بواسطة جينات stx المحمولة على الجينوم بواسطة عاثيات معتدلة، عامل الفوعة الرئيسي في الأنماط المصلية EHEC والتي تنتمي إلى مجموعة الإشريكية القولونية المنتجة لذيفان الشيغا (STEC) وهو المسؤول عن المظاهر المرضية التي تؤدي إلى أعراض مرضية محددة تظهر أثناء عدوى EHEC، مثل HUS والفشل الكلوي (Joseph et al., 2020, Pakbin et al., 2020). حيث يتم إنتاج Stx بواسطة STEC في السبيل المعدي المعوي ويدخل لاحقاً إلى مجرى الدم، إذ يمكن أن يسبب ضرراً جهازياً (Nguyen and Sperandio, 2012) وتكون الكليتان معرضتان بشكل خاص لتأثيرات Stx بسبب الانتشار المرتفع لمستقبلات Stx فيهما (Trachtman et al., 2012)

تمثل معاملة عدوى STEC تحديًا فريدًا في علاج الأمراض المعدية، فبينما يُعد العلاج الكيميائي المضاد للميكروبات نهجًا شائعًا وفعالًا في كثير من الأحيان للعديد من الأخماج الجرثومية، إلا أنه عادةً ما يتم تجنب استخدامه في عدوى STEC (Kim et al., 2016; Kimmitt et al., 2000)، ينبع هذا النهج من العلاقة المعقدة بين العلاج بالمضادات الحيوية، وإنتاج Stx ، إذ أن الجينات المسؤولة عن ترميز Stx في STEC ليست جينات جرثومية أصلية، بل تحملها عاثيات معتدلة وغالباً من نوع لامدا (lambdoid prophages) مدمجة في الجينوم الجرثومي (O'Brien et al., 1984). ترتبط دورة حياة هذه العاثيات المدمجة ارتباطاً وثيقاً باستجابة الإجهاد الجرثومي، وتحديدًا استجابة SOS ، والتي يمكن أن تحفزها ضغوطات بيئية مختلفة، بما في ذلك المضادات الحيوية (Kim et al., 2016; Kimmitt et al., 2000) لذلك يوصى بعدم إعطاء الصادات في حالات HUS.

استجابة SOS الجرثومية هي نظام عالي الحفظ لإصلاح تلف الحمض النووي، يتم توسطه بشكل أساسي بواسطة بروتين RecA (Memar et al., 2020). حيث أنه عندما يتلف الحمض النووي الجرثومي أو يتم تثبيط تضاعفه، يتم تنشيط RecA ويسهل الانشطار الذاتي لكابت النسخ LexA ، مما يؤدي إلى إزالة كبت جينات استجابة SOS ، بما في ذلك تلك المشاركة في إصلاح الحمض النووي والطفرة (Michel, 2005). بالإضافة إلى ذلك، يؤدي الانشطار الذاتي لـ LexA أيضاً إلى إزالة كبت العاثيات المدمجة المشفرة لـ Stx (Licznarska et al., 2016). تُعد المضادات الحيوية، وخاصة العوامل التي تتلف الحمض النووي مثل الفلوروكينولونات، محفزات قوية لاستجابة SOS (Kimmitt et al., 2000). عند استخدامها لعلاج عدوى STEC ، تحفز المضادات الحيوية استجابة SOS بشكل غير مقصود، مما يؤدي إلى العديد من النتائج المثيرة للقلق. أولاً، يؤدي تحريض العاثيات المدمجة المشفرة لـ Stx إلى زيادة نسخ جينات stx ، وبالتالي زيادة إنتاج stx (Zhang et al., 2000). ثانياً، يؤدي تحريض الدورة الحالة لهذه العاثيات المدمجة إلى حل الخلية الجرثومية، مما يؤدي إلى إطلاق

Stx الذي تراكم داخل الخلايا إلى البيئة المحيطة (Wagner *et al.*, 2002). تم إثبات خطر تطور HUS بعد العلاج بالمضادات الحيوية لعدوى STEC في كل من الدراسات المخبرية والملاحظات السريرية (Wong *et al.*, 2012,; Freedman *et al.*, 2016). نظرًا للعواقب الوخيمة المحتملة لـ HUS، تظل التوصية العامة هي تجنب استخدام المضادات الحيوية في حالات عدوى STEC المؤكدة أو المشتبه بها (Tarr and Freedman, 2022).

يخلق تجنب العلاج بالمضادات الحيوية في عدوى STEC تحديًا علاجيًا كبيرًا. لأنه من دون وسائل فعالة للسيطرة المباشرة على STEC، فإن استراتيجيات التدبير الحالي لعدوى STEC هي داعمة إلى حد كبير، حيث تركز على الحفاظ على توازن السوائل والكهارل ومراقبة المضاعفات (Freedman *et al.*, 2016).

يشمل STX مجموعتين فرعيتين، stx_1 و stx_2 ، وأنواع فرعية مختلفة. وترتبط سلالات EHEC الإيجابية لـ stx_2a و stx_2c و stx_2d ارتباطًا وثيقًا بـ HC و HUS مقارنة بمجموعات stx الفرعية والأنواع الفرعية الأخرى (Gyles, 2007,; Ferdous *et al.*, 2016). يعد ذيفان الشيغا هو ذيفان من نوع AB5، حيث يتم شق الوحدة الفرعية A داخل الخلايا إلى جزأين A1 و A2، عن طريق اختزال رابطة ثنائي الكبريتيد، مما يطلق الجزء A1 إلى السيتوبلازم. يمارس تأثيره السام للخلايا عن طريق نزع الأدينين (deadenylating) إنزيميًا للموقع 4324 من rRNA 28s الخاص بوحدة الريبوسوم s60، مما يؤدي إلى تثبيط تخليق البروتين وموت الخلية (Melton-Celsa, 2014)، كما يحفز جزء A1 من stx إنتاج السيتوكينات وينشط مسارات موت الخلايا المبرمج (apoptosis)، يعتبر تثبيط ترجمة البروتين وتعديل الاستجابة المناعية مسؤولين بشكل رئيسي عن إمراضية الوحدة الفرعية A لذيفان الشيغا. تحتاج أجزاء الوحدة الفرعية A إلى ارتباط غير تساهمي مع وحدات فرعية B خماسية متجانسة (homopentameric) لدخول الخلية المستهدفة وإحداث التأثير السام للخلايا. ترتبط الوحدات الفرعية B لذيفانات الشيغا بشكل محدد بمجموعة الكربوهيدرات من غليكوسفينغوليبيد غلوبوتريوسيلسيراميد Gb3

أو CD77 ، وهو جزيء مستقبل محدد يوجد على سطح الخلايا الظهارية الكلوية وخلايا بانايث المعوية. بعد ارتباط المستقبل وتكوين معقد Gb3-stx ، تشكل الذيفانات الملتصقة عنقوداً، وتكوّن انغلاقات غشائية (invaginations) ، وتكوّن حفراً بلعمية (endocytic pits) عند الغشاء البلازمي للخلية (Mauro and Koudelka, 2011). تنفصل هذه الانغلاقات عن الغشاء البلازمي لتكوين نواقل ذيفانية داخل خلوية. يتم نقل النواقل البلعمية داخل الخلية من الجسيم الأولي (early endosome) إلى جهاز جولجي ثم الشبكة الإندوبلازمية قبل أن يخرج stx من معقد Gb3-stx لممارسة تأثيره السام للخلايا. يتم نقل ذيفانات Stx إلى الخلايا سلبية الـ Gb3 عن طريق العدلات (neutrophil transmigration) و الابتلاع الخلوي الدقيق (micropinocytosis) ويكون النقل عبر الخلايا بشكل مستقل عن Gb3 (Gb3-independent transcytosis) داخل الخلايا سلبية الـ Gb3 ، تحفز ذيفانات stx استجابة التهابية فقط ولا تمنع تخليق البروتين (Smith et al., 2014).

2-5-4. الإشريكية القولونية الغازية للأععاء (EIEC):

تكون إمرضيتها قريبة الشبه بأمراضية *Shigella dysentery* المسببة للزحار العصوي (Bacillary dysentery) في كل من ميكانيكية الإصابة والأعراض السريرية وتمتاز بقدرتها على غزو واختراق الخلايا الطلائية المبطنة للأععاء الغليظة مسببة موت الخلايا مع إسهال شبيه بالزحار (Dysentery-like diarrhea) وتعتمد قابلية الغزو في كل منهما على وجود بلازميد كبير بحجم 140 MDa يشفر بعض البروتينات خارج الغشاء (Outer membrane proteins) (OMPs) الضرورية للغزو (Pakbin et al., 2021) ومن أنماطها المصلية (O167, O164, O152, O144, O143, O136,) وبعده النمط O124 من أكثرها شيوعاً (Geurtsen et al., 2022).

2-5-5. الإشريكية القولونية المتجمعة بالأمعاء *E.coli* Enteroadherent (EAEC) : (EAEC)

تسبب حالات الإسهال المستمر عند الأطفال وإسهال السفر ويطلق عليها الإشريكية القولونية الملتصقة بالأمعاء *E.coli* Enteroadherent (EAEC) لقدرتها على الالتصاق على سطوح الخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء بنمط متجمع (Aggregative pattern)، كما إنها تنتج ذيفاناً معوياً ثابتاً بالحرارة يدعى (Enteroadherent heat stable toxin) (EAST₁) (Pakbin *et al.*, 2021). وتضم عدداً من المجاميع المصلية هي : (O127, O85, O78, O77, O75, O73, O162, O142, O68,) (Vila *et al.*,2000 ; Neto *et al.*, 2003) (O51, O44, O17, O6, O4, O3).

2-6. الإسهال العصوي عند العجول *Collibacillosis in diarrheic Calves*

تناولت العديد من الأبحاث دراسة انتشار مرض إسهال العجول وعزل وتحديد المسببات المرضية وفي حين أن الإشريكية القولونية هي أحد أهم المسببات لإسهال العجول فقد بين (ابراهيم، 2012) في بحث للكشف عن عوامل الفوعة لذراري الإشريكية القولونية المعزولة من إسهال العجول في كل من محطات الأبقار مسكنة وجورين ودير الزور أن 6% من العزولات كانت تمتلك جينات STa و K99 كما وجد 14% من ذراري الإشريكية القولونية تحمل جينات Stx₁ و Stx₂ ووجد أن 1.33% من ذراري الإشريكية القولونية تحمل جينات eaeA ، وفي دراسة (الطويل والداود، 2023) تم الكشف عن الإشريكية القولونية K99 من العجول المصابة بالإسهال بنسبة 1.04% في ريفي إديلب وحلب، وفي العراق في بغداد قام كل من (Yousif and Hussein, 2015) بدراسة التتميط المصلي لعزلات الإشريكية القولونية من العجول المصابة بالإسهال ووجدوا أن 4 عزلات (11.42%) كانت تنتمي إلى النمط المصلي O157:H7 في 35 عجلًا مصابًا بالإسهال و28 عجلًا سليمًا .

كما قام (Emad, 2001) بعزل جراثيم الإشريكية القولونية من 220 عينة من أصل 355 مسحة من عجول مصابة بالإسهال في مصر، ووجد أن مستضد K99 كان موجودًا في 31 عينة (13.96%) وفي

دراسة (Galal *et al.*, 2013) تم الكشف عن 9 سلالات من الإشريكية القولونية من العجول المصابة بالإسهال في دلتا مصر والتي تنتمي إلى الأنماط المصلية O119، O86، O78، O55، O25 و O158، بالإضافة إلى عزلة واحدة غير مصنفة. و في دراسة (Dawod *et al.*, 2016) فقد تم عزل 27 سلالة من الإشريكية القولونية من عجول مصابة بالإسهال في مصر في محافظة دمياط. وكانت 24 منها إيجابية لجينات ذيفان الشيغا Shiga toxin (stx₁) 88.89% وتتنتمي إلى الأنماط المصلية O128:H2، O111:H2، O26:H11، O45:H7 و O91:H2. وكانت 14 منها إيجابية لجينات ذيفان الشيغا stx₂ 51.85% وتتنتمي إلى الأنماط المصلية O111:H2، O26:H11 و O91:H2. وفي دراسة (El-Shehedi *et al.*, 2013) تم إجراء التتميط المصلي لعزلات الإشريكية القولونية الممرضة المعزولة من العجول المصابة بالإسهال في مواقع مختلفة بمحافظة القليوبية في مصر، ووجدوا 8 مجموعات مصلية مختلفة و 5 عزلات غير مصنفة. كانت الأنماط المصلية الأكثر انتشارًا هي O55، O111، O26، O153، O8، O18، O86 و O157. وفي السودان قام (Ellaithi, 2004) بجمع 100 عينة من عجول مصابة بالإسهال بعمر من 1-3 أسابيع، ووجد 81 عزلة من الإشريكية القولونية الممرضة حيث تم تغطية مناطق مختلفة. وبالتتميط المصلي، تم تصنيف العزلات إلى المجموعات المصلية O4، O8، O9، O21، O88، و O153 كما أن 4 من هذه العزلات غير مصنفة. وفي دراسة (Cengiz and Adiguzel *et al.*, 2020) في تركيا تم الكشف عن بعض أنماط الإشريكية القولونية المسببة لإسهال العجول تبين وجود جين stx₁ بنسبة 3.03%، وجين stx₂ 9.09%، وجين sta بنسبة 21.21%، وجين eae بنسبة 15.15%، كما بين أن أنماط الإشريكية القولونية الممرضة المسببة لإسهال العجول هي ETEC بنسبة 51.5% و EHEC بنسبة 6.1% و EPEC بنسبة 15.2% ونمط هجين STEC/EHEC بنسبة 12.1%.

كما قام (Taghadosi *et al.*, 2018) في كيرمان، إيران بتحديد الأنماط المصلية للإشريكية القولونية المنتجة لذيفان الشيغا (STEC) المعزولة من البشر والعجول والماعز المصابين بالإسهال، حيث تم تحديد المجموعتين المصليتين O26 و O91. أما (Salvadori *et al.*, 2003) فقد قامو بعزل

الإشريكية القولونية من عجول مصابة بالإسهال في منطقة الوسط الغربي من البرازيل، حيث كانت (21.2%) تنتمي إلى الأنماط المصلية O11، O26، O111، O118، وO153. بالنسبة لمستضد H (الوسط)، تم فحص السلالات من الأنماط المصلية O26، O111، وO118 وتم تحديد أنواعها المصلية على النحو التالي: O26:NM؛ O111:NM؛ O118:H14 و O118:H16. وبالكشف عن جينات الفوعة بيّنت النتائج أن نسبة جينات Stx_1 9.7% و Stx_2 بنسبة 6.3% أما جين Hly_{α} فقد بلغت نسبته 9.7% وجين $ehxA$ بنسبة 6.8% كما بلغت نسبة جين عوامل النخر الخلوي السام النوع 1 (cnf_1) بنسبة 0.5% والنوع cnf_2 بنسبة 4.4% وبلغت نسبة جينات الذيفانات المعوية $It-II$ بنسبة 8.3% و sta بنسبة 3.9% كما أظهرت النتائج إنتاج جينات الأهداب اللاصقة F5 و F7 بنسب 7.3% و 4.8% على التوالي من سلالات الإشريكية القولونية المختبرة، بينما احتوت 3.4% على جين الإنتيمين eae . وفي دراسة (Cabrerá-gonzález *et al.*, 2024) في البيرو وجد أن نسبة 83.15% من عزولات جراثيم الإشريكية القولونية تحمل جينات Sta و 1.05% تحمل جين stx_2 ونسبة 21.05% تحمل جين eae ، ودراسة الأنماط الممرضة لجراثيم الإشريكية القولونية وجد أن نسبة وجود EAEC بلغ 4.21% ونسبة ETEC 3.15% ونسبة STEC 1.05%، كما وجد عدة أنماط هجينة للإشريكية القولونية حيث بلغ نسبة EAEC/ETEC 44.21% ونسبة STEC/EAEC 3.15% ونسبة EPEC/ETEC 2.10% ونسبة STEC/EAEC/ETEC 21.05% ونسبة EPEC/EAEC/ETEC 6.31% ونسبة EPEC/STEC/EAEC/ETEC 7.36%. في حين أن (Nguyen *et al.*, 2010) قاموا بعزل الإشريكية القولونية الممرضة من العجول المصابة بالإسهال في فيتنام، ووجدوا أنها تنتمي فقط إلى أربعة أنماط مصلية من بين 60 عزولة شملت 21 عزولة O15 و 9 عزولات O20 و 20 عزولة O103 و 10 عزولات O157. واثنان من سلالات O157 تنتمي إلى النمط المصلي O157:H7 وتحمل جينات سموم الشيغا والانتيمين. وفي دراسة (Umpiérrez *et al.*, 2021) في الأروغواي للكشف عن جينات الفوعة للإشريكية القولونية المسببة لإسهال العجول أظهرت نسبة انتشار الجراثيم التي تحمل جين K99 4%، ونسبة انتشار الجراثيم التي تحمل جين Sta بلغت 5.4%، في حين بلغت نسبة الجراثيم التي تحمل جين Stx_1 6% وبلغت نسبة الجراثيم التي

تحمل جين Stx_2 2% وبلغت نسبة الجراثيم التي تحمل جين eae 8.1% ودراسة الأنماط المرضية لجراثيم الإشريكية القولونية بلغت نسبة جراثيم ETEC 4.4% ونسبة جراثيم STEC 5.2% و نسبة جراثيم EHEC 4% ونسبة جراثيم EPEC 2.8%.

2-7. مقاومة جراثيم الإشريكية القولونية المسببة لإسهال العجول للمضادات الحيوية:

كان لاكتشاف المضادات الحيوية أثر كبير في انخفاض معدل الإصابة الجرثومية ولكن التوسع في استخدام المضادات الحيوية والاستخدام الخاطيء له وبشكل متكرر أدى إلى ظهور سلالات جديدة مقاومة له، وطبقاً لتقارير منظمة الصحة العالمية لعام 1997 فإن هنالك مشكلة عالمية تتمثل بازدياد الإصابات بالمسببات المرضية وبشكل أوبئة فضلاً عن كون هذه المسببات المرضية تحمل مقاومة للعديد من الأدوية حتى أن بعض السلالات أظهرت مقاومة لمعظم المضادات الحيوية المعروفة وتعرف بالمضادات الحيوية ذات المقاومة الموسعة للأدوية (Extensively Drug-Resistant) XDR.

حيث إن الأساس الجزيئي لنشوء مقاومة قد ينتج عن التغييرات في المحتوى الوراثي عن طريق آليات عديدة ومنها الطفرات واكتساب جينات المقاومة من عزولات أو سلالات مقاومة والتي تنتقل عن طريق الاقتران أو عن طريق العاثيات أو عن طريق الينقولات (Transposons) (Normark and Normark, 2002).

يعد الاقتران الجرثومي من أكثر الطرق شيوعاً لانتقال بلازميدات المقاومة والوقوع وبصورة سريعة والذي يعتمد على وجود البلازميدات الاقترانية Conjugative plasmids أو النواقل الوراثية الاقترانية Conjugative transposons (Wang et al., 2026)، ومن هذه البلازميدات هو بلازميد R (R plasmid) إذ يحصل الاقتران بتكرار عال بين سلالات من نفس النوع أو الأنواع المتقاربة حيث سجلت إحدى الدراسات عزل جراثيم *E.coli*/O157:H7 من أطفال مصابين بالإسهال تمتلك نوعين من بلازميدات R المشفرة لمقاومة التتراسكلين Tet R- Plasmids بحجم 50 و 95 Kbp ويعتقد أن

اصل هذه البلازميدات هي جراثيم *Salmonella* لتمامل جين *tet* في كل منها والذي يؤدي بالنتيجة إلى انتشار سلالات الجراثيم المقاومة للأدوية Drug-resistant bacteria (Makino *et al.*, 1999).

إن نشوء وتطور المقاومة للمضادات الحيوية ما هو الا نتيجة لسوء وكثرة استعمال هذه المضادات، كذلك الاستخدام غير السريري للمضادات والذي يلعب دوراً كبيراً في انتشار المقاومة فضلاً عن أن ما يقارب نصف المضادات الحيوية المنتجة في الدول الصناعية تستعمل لأغراض إنتاجية وفي تدعيم الأغذية للحيوانات المنتجة إذ تستخدم لأغراض العلاج أو الوقاية من الإصابات أو لتحفيز نمو الحيوان ولزيادة الإنتاج وبالتالي يمكن انتقال الجراثيم المقاومة إلى الإنسان عن طريق السلسلة الغذائية أو بالتلامس المباشر مع الحيوانات الحاملة للجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية (Bergogne- Berezin, 1997).

وقد تناولت العديد من الدراسات حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية حيث قام (Dawod *et al.*, 2016) بعزل 27 سلالة من الإشريكية القولونية من عجول مصابة بالإسهال في مصر إذ أظهرت نتائج اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية أن العزلات كانت شديدة الحساسية للسيبروفلوكساسين والسيوفوتاكسيم، ومتوسطة الحساسية للجنتاميسين، بينما أظهرت مقاومة لحمض الناليديكسيك والإريثروميسين . في حين قام (Khalifa *et al.*, 2019) بفحص حساسية سلالات الإشريكية القولونية من النوع O26 المعزولة من إسهال العجول في مصر تجاه الإثروفلوكساسين، السبكتينومايسين، والنيومايسين. وجدوا أن العزلات كانت حساسة بشكل متوسط للإثروفلوكساسين، الأموكسيسيلين، السبكتينومايسين، والنيومايسين، بينما كانت حساسة بشكل معتدل للسيوفوتاكسيم والتتراسيكلين. كما أظهرت عزولات الإشريكية القولونية المأخوذة من مزارع الأبقار في مصر في دراسة (Hakim *et al.*, 2017) مقاومة عالية للمضادات الحيوية من مجموعة البيتا-لاكتام بنسبة تزيد عن 60%، تليها مقاومة لمجموعة السلفا بنسبة 50%، ومجموعة الأمينوغليكوزيدات بنسبة 42.8%، بينما كانت العزلات حساسة للكينولونات، التريميثوبريم-سلفاميثوكسازول، التتراسيكلين بنسبة 100%، والسيفالوسبورينات بنسبة 71.4%. وفي دراسة (Abubaker *et al.*, 2015) لاختبار حساسية 150 عزلة من الإشريكية القولونية ضد 10 مضادات حيوية مستخدمة لعلاج الإسهال في العجول بالسودان. أظهرت العزلات حساسية عالية للجنتاميسين، الأمبيسيلين، السيبروفلوكساسين، السلفاميثوكسازول-تريميثوبريم،

السيفالوثين، الكاناميسين، الكلورامفينيكول، والتتراسيكلين، ولكنها كانت مقاومة للإريثرومايسين ومقاومة عالية للبنسلين. وقام (Badouei et al., 2014) بعزل سلالات الإشريكية القولونية من عجول مصابة بالإسهال في إيران، وأظهرت هذه العزلات حساسية الفلوميكوبين، الفورازوليدون، والسيفترياكسون، بينما كانت مقاومة للأموكسيسيلين-كلافولانات، بالإضافة إلى وجود مقاومة ملحوظة للدوكسيسيكليين واللينكوسبيكتين. كما أظهرت دراسة (Shahrani et al., 2014) على سلالات الإشريكية القولونية المعزولة من عجول مصابة بالإسهال في إيران أن جميع العزلات تبدي مقاومة تامة للبنسلين (100%)، الستربتوميسين (98.25%)، والتتراسيكلين (98%). بينما حصل (Naderi et al., 2016) على 170 عزولة من الإشريكية القولونية من عجول مصابة بالإسهال في جنوب شرقي إيران كانت جميعها مقاومة بنسبة 100% للبنسلين والسلفاميثوكسازول، بالإضافة إلى مقاومة بنسبة 73.5% للتتراسيكلين، و60% للستربتوميسين، و56.5% للتريميثوبريم-سلفاميثوكسازول، و53.5% للكاناميسين. كما قام (Bok et al., 2015) بعزل الإشريكية القولونية من عجول مصابة بالإسهال في بولندا وأظهرت العزلات أعلى معدل مقاومة للنيوميسين بنسبة 51% وأدنى معدل مقاومة للنورفلوكساسين بنسبة 0.7%. أما بالنسبة لعزلات الأبقار، فقد أظهرت أعلى معدل مقاومة للنيوميسين بنسبة 24.6% وأدنى معدل مقاومة للسيفتازيديم بنسبة 0.8%، كما وجدت الدراسات أن الحيوانات التي تعيش في الحظائر كانت أكثر عرضة لحمل سلالات مقاومة مقارنة بالحيوانات التي تعيش في المراعي. بينما أفاد (Islam et al., 2015) بأن أنماط مقاومة العزلات المأخوذة من عجول مصابة بالإسهال في بنغلادش مقاومة بنسبة 100% للأوكساسيلين، الريفامبيسين، والبنسلين، بالإضافة إلى مقاومة تزيد عن 80% للإريثرومايسين. ووجدوا أن حوالي 59.65% و61.4% من العزلات كانت مقاومة للأموكسيسيلين والتتراسيكلين على التوالي، بينما كانت جميع العزلات حساسة للسيفوروكسيم. وفي دراسة (Scaria et al., 2010) على 61 سلالة من الإشريكية القولونية من عينات مأخوذة من عجول مصابة بالإسهال في 3 مزارع في الولايات المتحدة، وجدوا أن جميع سلالات الإشريكية القولونية كانت مقاومة للستربتوميسين. كما أن 95% من السلالات كانت مقاومة للتتراسيكلين، و91% كانت مقاومة للكاناميسين، و47% كانت مقاومة للأمبيسيلين، ولكن جميعها كانت حساسة للأميكاسين، والسيبروفلوكساسين، وحمض الناليديكسيك. و أشار (Srivani et al.,)

(2017) إلى انتشار الإشريكية القولونية المرتبط بإسهال عجول الجاموس في الهند كان بنسبة 85.04% منها 35% كانت من سلالات الإشريكية القولونية المنتجة لسم الشيغا. وأظهرت العزلات مقاومة عالية للنتراسيكلين بنسبة 63.21% والأمبيسيلين بنسبة 48.11%، بينما كانت حساسة للكلورامفينيكول والجنتاميسين بنسبة 96.33% كما أظهرت العزلات المنتجة لسم الشيغا مقاومة للأدوية بنسبة 69.8%. كما تم عزل 160 سلالة من الإشريكية القولونية، وبفحص مقاومتها للمضادات الحيوية تبين أن العزلات الأكثر شيوعاً كانت مقاومة للأمبيسيلين، الستربتومييسين، والنتراسيكلين. كما أظهرت بعض السلالات مقاومة للسفتيفيور وتم الكشف عن وجود بلازميدات من مجموعة FIB المسؤولة عن هذه المقاومة (Kmet' and Bujňáková, 2018).

وفي دراسة (Li et al., 2018) في الصين تبين أن سلالات الإشريكية القولونية أظهرت مقاومة بدرجات متفاوتة لـ 19 نوعاً من المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام، خاصةً النتراسيكلين، السيفرادين، الدوكسيسيكلين، الكاربينيسيلين، الأمبيسيلين، السيبروفلوكساسين، والنورفلوكساسين، حيث كانت نسبة المقاومة لهذه المضادات تزيد عن 40%، وكانت مقاومة النتراسيكلين هي الأكثر شيوعاً بنسبة 53.7% ولم تُظهر أي سلالة مقاومة للنيومايسين أو البوليميكسين B. أما (Pasayo et al., 2019) في الأرجنتين فقد أشاروا إلى أن ثلاث عزلات من الإشريكية القولونية (D157، D151-5، وD242) أظهرت مقاومة لـ 24 مضاداً حيويًا مختلفًا، أشهرها الأموكسيسيلين-كلافولانات، الإريثرومايسين، الكلوكساسيلين، الريفامبيسين، والتيلميكوسين.

2-8. العاثيات الجرثومية:

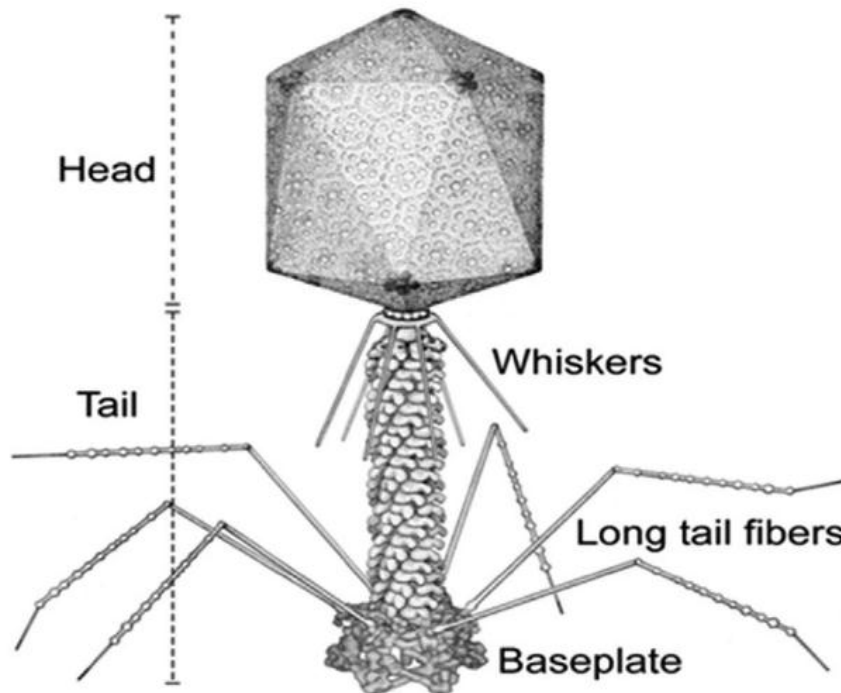
يسمى الفيروس الذي يصيب الجراثيم بالعاثية الجرثومية Bacteriophage. إن أول من لاحظ أن للعاثيات تأثير مضاد للجراثيم هو الكيميائي البريطاني H.Hankin عام 1896 حيث حاول إرنست هانبري هانكين حساب عدد جراثيم ضمة الهيضة (Vibrio cholera) في كل مليتر مكعب من مياه نهر الغانغ ونهر جمنا في الهند عند دخولها وخروجها من مدينة أجرا، إذ لاحظ هانكين أن عدد الجراثيم عند دخول المياه كان 100,000 وحدة معدية في المليتر المكعب، بينما انخفض عند الخروج إلى 90

وحدة معدية (Kazhal and Iftimovich, 1968). وذكر هانكين أن هناك تأثيراً مطهراً للمياه في هذين النهرين ضد مجموعة واسعة من الجراثيم، وخاصة جراثيم ضمات الكوليرا. واعتقد هانكين آنذاك أن سبب هذه الظاهرة هو مواد كيميائية متطايرة، لكنه لم يجد تفسيراً لها (Adhya and Merril, 2006). إلا أن العالم Fredrick Twort يعد أول من وصف منطقة التحلل الشفافة المرتبطة بعدوى العاثيات للجراثيم المصابة عام 1915، بينما يعتبر العالم Felix d'Herelle هو أول من صاغ فكرة استخدام العاثيات كعلاج ضد الجراثيم وحدد سبب ومصير منطقة التحلل، واقترح فيليكس ديريل في معهد باستور في فرنسا استخدام العاثيات خلال الحرب العالمية الأولى لعلاج الجنود المصابين بالزحار. وأول من استخدم العاثيات كعلاج سريري في مستشفى الأطفال في باريس 1919 (Lin *et al.*, 2017.; Chanishvili,) (2012).

تتكون العاثية الجرثومية من رأس سداسي الاضلاع حاوي على حمض نووي DNA أو RNA قد يكون مفرد أو مزدوج السلسلة ومحاط بغلاف بروتيني يدعى Capsid، وينتهي هيكل العاثية الجرثومية بألياف الذيل التي تكون أشبه بالمحقن وبواسطته يتم الارتباط بالمستقبلات المتواجدة على سطح الخلية الجرثومية المضيفة له (Broncano-Lavado *et al.*, 2021; Riedel *et al.*, 2019).

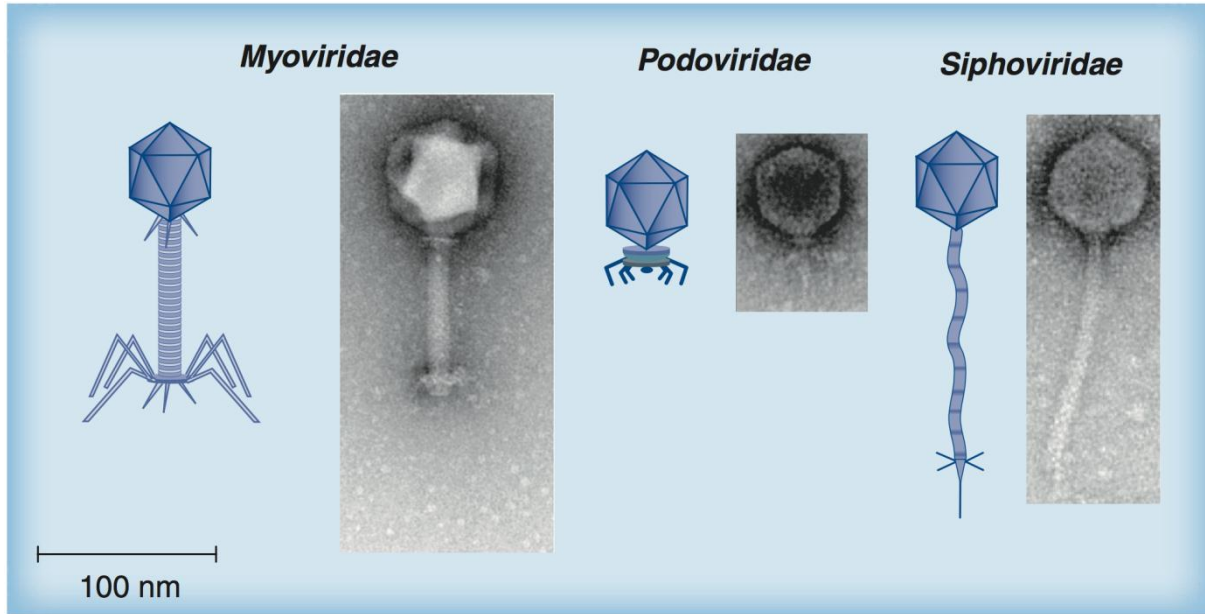
تُعد العاثية الجرثومية من أكثر الكائنات وفرةً في المحيط الحيوي وتتطلب مضيفاً جرثومياً من أجل تكاثرها. وهي منتشرة على نطاق واسع في بيئات متنوعة، بما في ذلك المحيطات والتربة. يُقدّر أن مياه البحر تحتوي على حوالي 10^7 جسيم عاثية لكل مليلتر، بينما تحتوي التربة على حوالي 10^8 - 10^9 جسيم عاثية مختلف لكل غرام (Hatfull *et al.*, 2022). يُقدّر أن العدد الإجمالي لجسيمات العاثيات في المحيط الحيوي يتجاوز 10^{31} ، مما يفوق عدد الجراثيم بعامل يقارب العشرة أضعاف (Mushegian *et al.*, 2020). وقد استخدم العلماء تفاعلات العاثيات الجرثومية مع المضيف الجرثومي كأدوات لفهم البيولوجيا الجزيئية الأساسية، وإحداث إعادة التركيب الجيني، ونقل الجينات الأفقي، وكيفية تأثير العاثية في تطور الجراثيم (Torriero-Smith *et al.*, 2026).

تراوح طول معظم العاثيات الجرثومية بين 24 و 200 نانومتر. تُعتبر العاثية T4 من أكبر أنواع العاثيات الجرثومية، حيث يبلغ طولها حوالي 200 نانومتر وعرضها يتراوح بين 80 و 100 نانومتر (انظر الشكل رقم (1-2)). جميع العاثيات الجرثومية تحتوي على هيكل رأسي يختلف في الحجم والشكل. فبعض الرؤوس تكون عشرونية الوجوه، في حين أن بعضها الآخر يتخذ شكلاً خيطياً حيث يعمل الرأس على حماية الحمض النووي ويعمل كغلاف واقٍ له. ويتصل بالرأس ذيل العاثية وهو أنبوب مجوف يمر منه الحمض النووي أثناء عملية الإعداد. يتميز ذيل العاثية T4 بوجود غلاف انقباضي ينقبض أثناء إدخال الحمض النووي في الجراثيم، وفي نهاية الذيل تحتوي بعض العاثيات الجرثومية مثل T4 على صفيحة قاعدية مع ألياف ذيل مرتبطة بها، حيث تسهم الصفيحة القاعدية وألياف الذيل في التصاق العاثية بسطح الخلية الجرثومية. ومع ذلك، لا تحتوي جميع العاثيات الجرثومية على صفائح قاعدية أو ألياف ذيل (Nikulina *et al.*, 2025).



الشكل رقم (1-2): تركيب العاثية الجرثومية (Nobrega *et al.*, 2018)

تم تحديد أكثر من 5000 تصنيف مورفولوجي متميز عبر المجهر الإلكتروني النافذ، يشكل هذا التنوع الهيكلي الواسع تحديًا كبيرًا للتصنيف (Mushegian *et al.*, 2020)، بناءً على الجينوم والشكل الظاهري، تبذل اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات (ICTV) جهودًا منذ عام 1966 لتصنيف العاثيات تصنيفًا منهجيًا (Ackermann, 2009; King *et al.*, 2011). تنتمي الغالبية العظمى (حوالي 96%) من العاثيات المرصودة إلى فئة العاثيات الذيلية رتبة Caudovirales، المشتقة من الكلمة اللاتينية cauda بمعنى ذيل، والتي تحمل الحمض النووي ثنائي السلسلة (dsDNA) كمادة وراثية. وتشمل العائلات ضمن هذه الرتبة عائلة Myoviridae التي تتميز بذيل قابض مستقيم، وعائلة Podoviridae ذات الذيل القصير، وعائلة Siphoviridae ذات الذيل غير القابض والمرن الشكل رقم (2-2) (Ackermann, 2007)



الشكل رقم (2-2) عائلات رتبة Caudovirales (Ackermann, 2007)

2-8-1. العاثيات التي تصيب جراثيم الإشريكية القولونية (coliphages):

يتفاوت مدى عائل العاثيات تفاوتًا كبيرًا، إذ يقتصر أحيانًا على سلالة واحدة أو بضع سلالات فقط ضمن نوع جرثومي واحد، وأحيانًا أخرى يتسع ليشمل العديد من الأنواع (de Jonge *et al.*, 2019). قد تكون هذه النطاقات العائلية نتيجةً لحوالي ثلاثة مليارات سنة من التطور الجرثومي لتفادي الإصابة

بالعاثيات، تزامناً مع تطور مشترك للعاثيات لتتمكن من إصابة عوائلها الجرثومية بنجاح (Strathdee *et al.*, 2023). ومع ذلك، يتأثر طيف أوباء العاثية بعدة عوامل، منها خصائص العاثية نفسها، والسمات المحددة للجراثيم المضيفة، والظروف البيئية أثناء العدوى (Hyman and Abedon, 2010). تتحدد خصوصية العاثية بناءً على نتائج كل مرحلة من مراحل العدوى، بدءاً من التعرف على الجراثيم والالتصاق بها، مروراً بحقن المادة الوراثية، ثم التضاعف داخل الخلية، وأخيراً تحلل الخلية الجرثومية (Holtappels *et al.*, 2023).

العاثيات التي تصيب الإشريكية القولونية (*E. coli*) تُسمى (coliphages) (Zbikowska *et al.*, 2020) تنتمي إلى عدة مجموعات متنوعة وقد تختلف من حيث التركيب والبنية الجينية ودورة الحياة. إذ أنه هناك العديد من الأنواع التي تستهدف *E. coli* بشكل خاص، وقد تم تصنيفها حسب عائلاتها وخصائصها الهيكلية والوظيفية (Sillankorva and Pires, 2015). فيما يلي بعض الأنواع الرئيسية للعاثيات التي تصيب *E. coli*:

2-8-1-1 عائلة Myoviridae:

عاثيات هذه العائلة تتميز بذيل طويل متقلص، وأن فعاليتها عالية ضد *E. coli* أشهر العاثيات التي تنتمي لهذه العائلة هي:

2-8-1-1-1 العاثية (T4) :

تعد من أكثر العاثيات دراسة وهي تستهدف *E. coli* بشكل خاص وتتميز بدورة تكاثر حالة سريعة، حيث تقوم بتدمير الخلية الجرثومية بعد التكاثر داخلها. وتتكون من رأس عشروني الوجوه (icosahedral head) ويحتوي جينوم T4 على DNA مضاعف الطاق وطوله حوالي 169,000 زوج قاعدي ويحتوي على حوالي 200 جين مختلف، كما أنها تمتلك عنق طويل قابل للتقلص وأشواكاً تساعدها في الالتصاق بجدار الجراثيم وحقن الحمض النووي داخل الخلية كما أنها تتعرف على مستقبلات LPS و OmpC في غلاف الخلية الجرثومية. (Matthews and Kutter, 2009,; Islam *et al.*, 2019)

2-8-1-1-2. العائية (T2):

مشابهة في بنيتها لعائية T4، لكنها تختلف في بعض خصائص الجينات كما تتكون من رأس عشروني الوجوه يحتوي على المادة الوراثية (DNA)، وعنق طويل يدعمه غلاف بروتيني يساعده على حقن الحمض النووي في الخلية المضيفة. كما تحتوي العائية على أقدام تستخدم للالتصاق بالجراثيم، يحتوي جينوم T2 على DNA مضاعف الطاق يبلغ طوله حوالي 170,000 زوج قاعدي، ويشمل مجموعة من الجينات التي تتحكم في التفاعل مع الخلايا المضيفة وآلية تكاثر الفيروس (Hershey and Chase, 1952). و تتعرف على مستقبلات بروتين OmpF بشكل أساسي الموجود على الغشاء الخارجي للجراثيم، وقد تستخدم بروتين Ttr أيضاً. في بعض السلالات الجرثومية، قد يكون جزيء LPS ضرورياً للمساعدة في عملية الارتكاز. (Kirigo et al., 2025).

2-8-1-1-3. العائية (T6):

نوع آخر من العائيات في نفس السلسلة T- even Phage، لها هيكل مشابه للعائيات الأخرى من نفس الفئة، حيث تحتوي على رأس عشروني الوجوه يحتوي على الحمض النووي (DNA) مضاعف الطاق يبلغ طوله حوالي 168,000 زوج قاعدي وعنق طويل وألياف تساعد في الالتصاق بسطح الجراثيم. تعتمد العائية T6 بشكل أساسي على بروتين Tsx كمستقبل للارتباط بجدار الخلية الجرثومية، بينما يؤدي جزيء LPS دوراً مساعداً (Górski et al., 2019.; Silas et al., 2025).

2-8-1-1-4. العائية CEV1:

عائية عالية النوعية لـ E. coli O157:H7 تتبع دورة حالة، وتمتلك رأس عشروني الوجوه وذيل متقلص كما تحتوي على الحمض النووي (DNA) مضاعف الطاق يبلغ طوله حوالي 175,000 زوج قاعدي كما أنها تتعرف على مستقبلات بروتين الغشاء الخارجي OmpA (Guan et al., 2020).

2-1-8-2 عائلة Siphoviridae

تتميز عاثيات هذه العائلة بذيل طويل غير متقلص عادة ما يكون ليفياً ومخططاً بشكل عرضي، مع ألياف طرفية قصيرة، وتعتبر من أكثر العائلات انتشاراً بين العاثيات التي تصيب *E. coli*. أهم الأمثلة هي:

2-1-8-2 العاثية Lambda (λ):

واحدة من أشهر العاثيات التي تصيب *E. coli*. لها القدرة على التبديل بين الدورة الحالة (Lytic cycle) والدورة الاستذائية (Lysogenic cycle)، ذات حمض نووي DNA مضاعف الطاق بطول حوالي 48500 زوج قاعدي وهي قادرة على نقل المواد الجينية بين الخلايا الجرثومية، وهذا يتيح تعديل جينات *E. coli* لزيادة فاعليتها في تطبيقات الهندسة الوراثية، حيث يمكن استخدام الجراثيم المعدلة لتطوير أدوية أو لقاحات كما أنها أحد أهم العاثيات التي تحمل جينات ذيفان الشيغا مما يعطي الفوعة لجراثيم STEC و كما أنها تتعرف على مستقبلات Lamb في جدار الخلية الجرثومية (Rawson *et al.*, 2025.; Xiao *et al.*, 2023).

2-2-1-8-2 العاثية T5:

تستهدف العاثية T5 جراثيم *E. coli* بشكل خاص. تتميز بدورة تكاثر حالة سريعة، حيث تقوم بتدمير الخلية الجرثومية بعد التكاثر داخلها. تتكون من رأس عشروني الوجوه (icosahedral head) يبلغ قطره حوالي 90 نانومتر ويحتوي جينوم T5 على DNA مضاعف الطاق وطوله حوالي 121,750 زوجاً قاعدياً، ويحتوي على حوالي 168 جيناً مختلفاً. كما أنها تمتلك ذيلاً طويلاً ومرناً غير قابل للتقلص يبلغ طوله حوالي 160 نانومتر، وأليفاً ذيلية تساعدها في الالتصاق بجدار الجراثيم وحقن الحمض النووي داخل الخلية. تتعرف العاثية T5 بشكل رئيسي على مستقبل ناقل الحديد FhuA وهو الموجود في الغشاء الخارجي للخلية الجرثومية، حيث يرتبط به البروتين المسؤول عن الالتصاق. كما تمتلك أليفاً ذيلية جانبية ترتبط بجزيئات عديد السكاريد الدهني (LPS) على سطح الجراثيم. آلية حقن الحمض النووي

فريدة أيضاً، حيث تتم على خطوتين: يتم أولاً نقل جزء صغير من الجينوم يسمى قطعة النقل الأولى، وبعد التعبير عن جينات معينة، يدخل باقي الجينوم إلى الخلية (Linares *et al.*, 2023).

2-8-1-3 عائلة Podoviridae

تتميز عاثيات هذه العائلة بذيل قصير وغير متقلص، كما أنها فعالة في إصابة *E. coli* وأشهر الأمثلة لها :

2-8-1-3-1 العاثية T7:

تتميز العاثية T7 بدورة تكاثر حالة سريعة جداً، تتكون من رأس عشروني الوجوه يبلغ قطره حوالي 60 نانومتر . يحتوي جينوم T7 على DNA مزدوج الشريط ويبلغ طوله حوالي 40,000 زوج قاعدي كما أنها تمتلك ذيلًا قصيرًا (بطول 17 نانومتر) تحيط به ستة ألياف قصيرة تساعدها في الالتصاق بجدار الجراثيم وحقن الحمض النووي داخل الخلية . تتعرف العاثية T7 بشكل رئيسي على جزيئات عديد السكاريد الدهني (LPS) على سطح الخلية الجرثومية، حيث يعمل كمستقبل أساسي لها . وتتميز آلية حقن الحمض النووي فيها بأنها عملية تدرجية (stepwise) وليست دفعة واحدة. وتعتبر من أكثر العاثيات سرعة في التكاثر داخل *E. coli* (Adhya and Bhatnagar, 2006)

2-8-1-3-2 العاثية T3:

تعد العاثية T3 من العاثيات شديدة القرابة للعاثية T7، وهي تستهدف جراثيم الإشريكية القولونية، تتميز برأس عشروني الأوجه وذيل قصير وألياف ذيلية تساعدها في الالتصاق بجدار الجراثيم. يحتوي جينوم T3 على DNA مضاعف الطاق ويبلغ طوله حوالي 38,208 زوجاً قاعدياً ، تتشابه العاثية T3 مع T7 في العديد من الخصائص، إلا أن الفرق الرئيسي بينهما يكمن في خصوصية العائل؛ فعلى عكس T7 التي لا تستطيع إصابة الجراثيم الحاملة للبلازميد (F-plasmid) F ، فإن العاثية T3 لديها القدرة على إصابة كل من الخلايا الحاملة للبلازميد F وغير حاملة له . كما تنتج العاثية T3 بوليميراز RNA الخاص بها ، وقد وجد هذا الإنزيم استخداماً واسعاً في نواقل التعبير الجيني التجارية . يُعتقد أن T3

نتجت عن عملية إعادة تركيب تطورية بين عاثية شبيهة بـ T7 وعاثية تستخدم اليرسينية (*Yersinia*) كمضيف (Römer and Behrens, 2006 ; Sillankorva and Pires, 2015).

2-8-1-4 عائلة Microviridae:

تتميز هذه العائلة بعائيات صغيرة الحجم وذات بنية بسيطة، لكنها فعالة في إصابة *E. coli*. ومن أشهر أمثلتها:

2-8-1-4-1 العاثية ΦX174 :

هذا النوع من العائيات يحمل حمض نووي حلقي مفرد الطاق (CsshDNA) ويُعتبر واحدًا من أولى العائيات التي تمت دراستها، تستهدف هذه العاثية جراثيم الإشريكية القولونية (*E. coli*) وهي تتبع دورة حياة حالة وتُستخدم بشكل واسع في الأبحاث البيولوجية.

يتكون الجينوم الخاص بالعاثية ΦX174 من 5,386 قاعدة آزوتية ويحتوي على 11 جينًا. يتكون الفيروس من غلاف بروتيني ويتميز بقدرته على التكيف والتطور، كما أنه ترتبط بجزيئات عديد السكاريد الدهني (LPS) على سطح الجراثيم كمستقبل (Sullivan and Miller, 2001.; Grose and Casjens, 2014).

2-8-1-5 عائلة Inoviridae:

تحتوي هذه العائلة على عائيات خيطية الشكل، ومن أشهر الأمثلة:

2-8-1-5-1 العاثية M13:

عاثية خيطية (filamentous bacteriophage)، تحتوي على DNA مفرد الطاق كجينوم ويبلغ طوله حوالي 6400 قاعدة آزوتية. دورة تكاثر العاثية M13 مميزة لكونها غير مدمرة للجراثيم، حيث يعتمد M13 على مستقبلات محددة (F pili) الموجودة على سطح *E. coli* لتدخل الخلية و تتكاثر العاثية عن طريق خروج النسخ الجديدة منها إلى خارج الخلية المضيفة دون إحداث ضرر مباشر أو قتل الخلية. يتم

هذا عبر إدخال الجينوم الفيروسي إلى الخلية المضيفة، حيث يتم نسخه وترجمته إلى بروتينات فيروسية، تتجمع الجينات والبروتينات لتكوين فيروسات جديدة، والتي تغادر الخلية عبر الغشاء الخلوي. لذا يمكن أن تستمر الخلية المصابة في التكاثر. (Greenwood and Day, 1965)

على الرغم من أن M13 غير مخصص تقليدياً لمكافحة E. coli نظراً لأنه لا يقتل الجراثيم مباشرة، إلا أن هناك عدة تطبيقات يمكن فيها استخدام M13 للسيطرة على E. coli بطرق غير مباشرة، إذ أنه يمكن استخدام M13 كناقل للجينات، حيث يساهم في تعديل خصائص E. coli عبر إدخال جينات تعبير عن بروتينات معينة قد تساعد في منع نمو الجراثيم في بيئات معينة أو تعزيز استجابتها لبعض الأدوية (Kehoe and Kay, 2005). كما أن بعض الدراسات بدأت في استكشاف إمكانية استخدام العائثة M13 لتحويل سلالات معينة من E. coli، خاصة المسببة للأمراض، لجعلها أقل فوعة أو أكثر استجابة للعلاجات (Sidhu and Koide, 2009). أو يمكن استخدامها في التطبيقات النانوية إذ تم استخدام M13 في تعديل سطح الجرثوم ليعبر عن بروتينات أو ببتيدات معينة قادرة على الارتباط مع جزيئات مستهدفة. هذه التقنية لها دور في تطوير مضادات جرثومية جديدة، حيث يمكن أن تساعد في اكتشاف مركبات ترتبط بالجراثيم وتثبط نموها (Deng and Perham, 2002).

2-8-1-6 عائلة Leviviridae

تحتوي هذه العائلة على عائيات تحتوي على RNA كمادة وراثية بدلاً من الـ DNA، ومن الأمثلة عليها:

2-8-1-6-1 العائثة MS2:

تعتبر من أشهر العائيات التي تحتوي على RNA وتستهدف E. coli، يحتوي على RNA مفرد الطاق كجينوم، إيجابي الاستقطاب، ما يعني أن RNA العائثة يمكن ترجمته مباشرة إلى بروتينات داخل الخلية. إن جينوم MS2 بسيط نسبياً، ويحتوي على 3569 قاعدة آزوتية، ويشفر فقط لأربع بروتينات: بروتين الغلاف، وبروتين النسخ، وبروتين الالتصاق، وبروتين التضفير. يمكن للعائثة MS2 إصابة جراثيم E.coli والعديد من الجراثيم الأخرى التي تحتوي على تراكيب شعيرية تُعرف بـ F pili، وهي مستقبلات

على سطح الجراثيم التي يستخدمها الفيروس لدخول الخلية. بسبب خصائصه البسيطة وسرعة التكاثر (Bradley, 1967).

2-8-2. دورة حياة العاثيات الجرثومية:

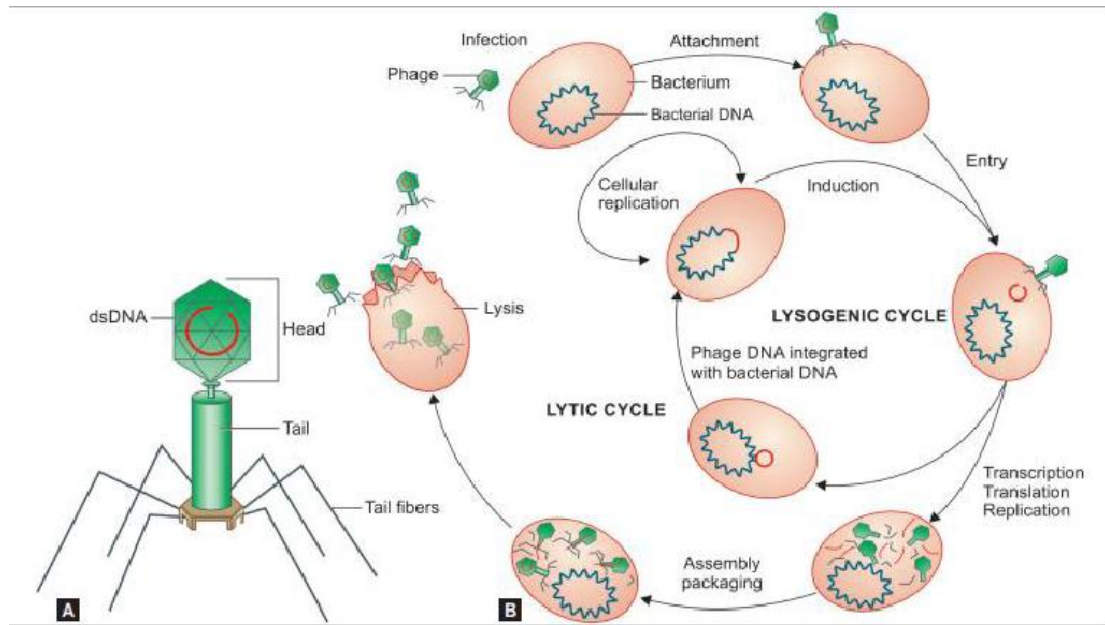
2-8-2-1. الدورة الحالة (المذبية) Lytic Cycle:

وتسمى أيضاً الدورة الضارية ، إذ أنه عندما يصيب فيروس عاثية جراثيم مضيئة يتكاثر بسرعة، إذ يمكن إكمال الدورة كاملة في غضون 30-40 دقيقة. يعد الفيروس العاثية متطفلاً يعتمد على المضيف للتكاثر، فبمجرد دخول الجينوم الفيروسي إلى الخلية المضيئة له سيتم التعبير عن جيناته المشفرة في سيتوبلازم الخلية الجرثومية، وبعد إنتاج الفيروونات الجديدة ستبدأ جينات العاثيات بالتعبير لإنتاج نوعين من البروتينات (Holins و Endolysine) لقتل وتحليل الخلية الجرثومية المضيئة من خلال تآزر هذين النوعين من البروتينات على شكل منظومة Holine-lysin system المسؤولة عن إنهاء دورة العدوى بالعاثية في نقطة زمنية محددة وتعمل بشكل متزامن ودقيق جداً، ويشارك إنزيم Holine بإحداث ثقب في الغشاء السيتوبلازمي بينما يساعد إنزيم Endolysine على الوصول إلى الببتيدوغليكان الجرثومي وإلى باقي مكونات الجدار الخلوي ليحدث التمزق وتطلق بعدها العاثيات الوليدة وتصيب خلايا جرثومية أخرى مجاورة (Cisek et al., 2017). وتتأثر الدورة العاثية بعدة عوامل مثل درجة الحرارة والعناصر اللازمة لتتسخه والإضاءة والظروف البيئية الأخرى. (Jassim and Limoges, 2017;) (Broncano-Lavado et al.,2021).

تتدرج الدورة الحالة أو "الفيروسات العاثية الضارية" ضمن فئة "العوامل الطبيعية للتحكم في المكروبات"، إذ أنها الكائنات البيولوجية الأكثر وفرة على كوكب الأرض. يتم استغلال هذه الفيروسات في مجالات متنوعة من البيوتكنولوجيا، بما في ذلك الكشف السريع عن الجراثيم ومعالجة الأغذية والتطبيقات العلاجية، وإزالة الأغشية الحيوية الجرثومية (Cherkashina et al., 2025).

2-2-8-2. الدورة المعتدلة (الاستذابية) Lysogenic Cycle:

ويطلق على هذه العاثيات بالعاثيات المعتدلة إذ أنه بعد دخولها إلى الخلايا الجرثومية يتم دمج DNA العاثية بالجينوم الجرثومي فيطلق عليه طليعة العاثية Prophage، ويستطيع هذا النوع من العاثيات أن يتصرف وكأنه جزء من كروموزوم الخلية الجرثومية ويتضاعف معها ويرتبط تكرار الحمض النووي للعاثية مع تكرار الحمض النووي للخلية المضيفة له، وفي بعض الأحيان يمنح الحمض النووي للعاثية خصائص ومميزات جديدة للجراثيم وتبقى العاثيات من هذا النوع مندمجة مع الجينوم الجرثومي، لكن عندما تخرج من الجينوم تكمل دورة حياتها كعاثية حرة في السيتوبلازم ثم تطلق بواسطة التحلل الشكل رقم (2-3) (Riedel et al., 2019).



الشكل رقم (2-3): دورة حياة العاثيات الجرثومية (Sastry and Bhat, 2021)

2-2-8-3. مراحل الإصابة بالعاثيات الجرثومية Bacteriophage infection

:stage

(1) الادمصاص **Adsorption**: هي المرحلة الأولى من دورة العاثيات والأكثر تحديداً إذ تلامس العاثية الخلية الجرثومية عن طريق الاصطدام العشوائي بينهما وبمساعدة ألياف الذيل تتفاعل

المستقبلات الموجودة على سطح الخلية الجرثومية المتمثلة بـ Teichoic acid و Lipopolysaccharide و Pili في الجراثيم سلبية الغرام مع مواقع الارتباط الموجودة لدى العائى.

(2) **الاختراق Penetration:** عادة يتم اختراق الفيروسات للخلية بعدة طرق، إما عن طريق البلعمة Phagocytosis إذ يحصل فيها التهام خلوي داخلي للفيروس Endocytosis بواسطة مستقبلات خاصة بالخلية المضيفة مما يؤدي إلى امتصاص جزيئات الفيروس من قبل سيتوبلازما المضيف أو قد يحصل الاختراق بواسطة اندماج للأغشية لكن في فيروسات العائيات يتم بواسطة حقن الحمض النووي الخاص بالعائية بالخلية الجرثومية بمساعدة إنزيم اللايزوزيم Lysozyme الموجود على طرف ذيل العائية وتبقى العائيات الفارغة من المادة النووية ملتصقة بالخارج بجدار الخلية الجرثومية.

(3) **التخليق Biosynthesis:** فيها يتم تخليق كل مكونات الفاج داخل الخلية الجرثومية مثل بروتينات الكابسيد Capsid والحمض النووي والإنزيمات اللازمة بواسطة السيطرة الجينية للحمض النووي الخاص بالعائية على الخلية الجرثومية المضيفة.

(4) **النضج والتجميع Maturation and assembly:**

تأتي هذه المرحلة بعد تخليق مكونات العائية إذ تبدأ مكوناته كبروتينات الرأس Capsid والذيل و DNA بالتجمع لتشكيل فيروسات جديدة معدية ثم تنضج إما في السيتوبلازم أو في أغشية جهاز غولجي والشبكة الإندوبلازمية.

(5) **الإطلاق Relase:** يتحلل الجدار الجرثومي للخلية المصابة بواسطة إنزيمات تطلقها العائية في

السيتوبلازم فتحرر العائيات الوليدة، كما إن هذه الإنزيمات Endolysis و Muralytic enzyme تدعم بإنزيم منشط يدعى Holine يساعدها بعبور الغشاء السيتوبلازمي. إن المدة التي تفصل دخول الحمض النووي للعائية وظهور أول جسيم فاج معدي داخل الخلية الجرثومية المضيفة تدعى بفترة Eclipse phage مدتها حوالي 15-30 دقيقة وخلال هذه المدة لا يمكن الكشف عن العائية الجرثومية داخل الجرثوم (Cisek *et al.*, 2017 ; Brown and Smith, 2015,; Sastry and Bhat, 2021).

2-9. العلاج بالعائيات:

نشر أول استخدام موثق للعلاج بالعائيات كورقة بحثية في عام 1921 من قبل بروينوغوي ومايسين (Abedon,2025). في ذلك الوقت، كان العلاج بالعائيات مقبولاً على نطاق واسع لعلاج أخماج الجروح والسلمونية عند الطيور التي تسببها السلمونية غاليناروم (Abedon et al., 2011). ومع ذلك، أدى اكتشاف البنسلين ونجاحه الملحوظ في علاج العدوى الجرثومية والحاجة إلى العلاج السريع والواسع الطيف خلال الحرب العالمية الثانية إلى اعتماد المضادات الحيوية على نطاق واسع كخيار علاجي أول وانخفاض الاهتمام بالعلاج بالعائيات وتطبيقاتها (Sulakvelidze, 2005). واجه العلاج بالعائيات قيوداً بسبب استهدافه الجرثومي عالي النوعية مقارنة بالمضادات الحيوية واسعة الطيف، بالإضافة إلى الفهم المحدود لآليات عمله في ذلك الوقت (Cisek et al., 2017). وبالتالي، تم التخلي عن العلاج بالعائيات الجرثومية إلى حد كبير في معظم أنحاء العالم، باستثناء عدد قليل من دول أوروبا الشرقية مثل جورجيا وبولندا وروسيا، حيث ظل مستخدماً كعلاج مضاد للجراثيم (Nikolich and Filippov, 2020).

ونظراً لأن المضادات الحيوية فقدت الكثير من فعاليتها ضد الجراثيم فقد يكون للعلاج بالعائيات دور رئيسي في مكافحة السلالات الجرثومية المقاومة (Papaianni et al.,2020) لأن العائيات وفيرة في البيئة وتقوم أعداد الجراثيم بحوالي 10 أضعاف ويقدر أنها تدمر ما يقارب 50% من الجراثيم كل 48 ساعة (Lauman and Dennis,2021).

كما يقدم العلاج بالعائيات عدة مزايا، تشمل نوعية عالية تسمح بالقضاء على الجراثيم الممرضة من دون الإضرار بالجراثيم الطبيعية (الميكروبيوم)، والقدرة على التكاثف الذاتي في موقع العدوى، ولكن يوجد عدة قيود للاستخدام التطبيقي للعائيات إذ تشمل هذه القيود الاحتمالية العالية لتطور آليات المقاومة في الجراثيم المستهدفة، وكذلك تطور ردود الفعل المناعية بعد إعطاء مستحضرات العائيات، والتي يمكن أن تسبب إما تفاعلات حساسية أو تكوين أجسام مضادة محددة تعطل الجسيمات الفيروسية العائية، مما يقلل أو يُلغي الفعالية العلاجية (Abedon, 2025).

ومن الجدير بالذكر أنه في عام 2014 أدرج المعهد الوطني للأمراض المعدية العلاج بالعاثيات كواحدة من سبع طرائق لمعالجة الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية (Reardon,2014) وقد تم وصف العلاج بالعاثيات أول مرة لجنس الزوائف المقاومة للمضادات الحيوية في عام 2015 (Broncano-) (Lavado et al.,2021).

يؤدي النقص بالمضادات الحيوية الجديدة ذات الفعالية في السوق إلى إيجاد علاجات بديلة كالعلاج بالعاثيات في محاولة للتخلص من مسببات الأمراض المقاومة للأدوية المتعددة وتجنباً لحدوث أزمة طبية عالمية كبرى، في حين نشرت منظمة الصحة العالمية قائمة من المسببات المرضية ذات الأولوية الحاسمة لبحث وتطوير علاجات جديدة مضادة لها وشملت هذه القائمة على *A.baumannii* و *P.aeruginosa* وأجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae المقاومة للكاربينيم والمنتجة لإنزيمات البيتا لكتاماز (WHO, 2017; Alanis,2005).

ترتبط الشعبية المتزايدة للاستراتيجيات القائمة على العاثيات بآلية عملها الفريدة. على عكس المضادات الحيوية، فإن نشاط العاثية شديد النوعية ويتطلب الارتباط غير العكسي لبروتينات ربط البنى المشفرة بالعاثية receptor-binding proteins (RBPs) بتراكيب جرثومية فريدة ونوعية (أي مستقبلات)، هذه المستقبلات متنوعة، ولكنها عادة ما تكون عديد السكاريد الشحمي (LPS)، أو السياط، أو الأهداب من النوع الرابع type 4 pili (T4P)، أو المحفظة، أو بروتينات الغشاء الخارجي لعاثيات الجراثيم سلبية الغرام، والسياط، أو حمض التيكويك، أو البيبتيدوغليكان للعاثيات التي تصيب الجراثيم موجبة الغرام، تؤدي التغيرات التوافقية في جسيم العاثية عند ارتباط المستقبل إلى بدء نقل المادة الجينية للعاثية إلى الخلية المضيفة (Bertozzi Silva et al., 2016).

بالنسبة للعاثيات الحالة إلزامياً (أو الضارية)، يتبع حقن الجينوم تضاعف الحمض النووي والتعبير عن البروتينات المشفرة بالعاثية، والتي تتجمع لتشكيل ذرية جسيمات العاثية التي يتم إطلاقها في النهاية من الخلية من خلال عمل بروتينات التحلل المشفرة بالعاثية (Salmond and Fineran, 2015). تتطلب هذه العملية عادةً الاستيلاء على آليات التكاثر الجرثومية مثل بوليميراز الحمض النووي الريبوزي

والريبوسومات (Nechaev and Severinov, 2003 ; Gerovac et al., 2024). ومع ذلك، تنتج مجموعات معينة من العاثيات بوليميراز الحمض النووي الريبوزي الخاص بها، مما قد يقلل من اعتماد العاثية على آلية النسخ الجرثومي لإنتاج بروتينات العاثية المبكرة أو خلال جميع مراحل التعبير الجيني للعاثية (Matsui et al., 2017; Drobysheva et al., 2021). بالنسبة للعاثيات المستديرة (المعتدلة)، قد يؤدي حقن الجينوم إلى بدء الدورة الحالة، أو قد يفتح الطريق لحالة من السكون الخلوي حيث يتضاعف جينوم العاثية جنبًا إلى جنب مع الجينوم الجرثومي كعنصر كروموسومي مدمج أو بلازميد عاثوي دون إنتاج ذرية أو التسبب في تحلل الخلية (Salmond and Fineran, 2015). في هذه الحالة، قد تزيد بعض العاثيات المعتدلة من فوعة الجراثيم من خلال عملية تسمى التحول الاستدائي lysogenic conversion ، أو قد تحمي العائل المتولد بالاندماج حديث التكوين من العدوى الثانوية بعاثيات أخرى عبر آليات إقصائية متنوعة (Shi et al., 2020; Bucher and Czyz, 2024; Leavitt et al., 2024; Monteiro et al., 2019). على الرغم من أن الطبيعة الاندماجية للعاثيات المعتدلة تشكل تحديات علاجية، إلا أنها وفيرة في الطبيعة (Touchon et al., 2016) وتظهر إمكانات كعوامل علاجية لمسببات الأمراض السريرية، وذلك من خلال استخدام الهندسة الوراثية لجينوم العاثية مما يجعلها احتياطيًا غير مستغل كعامل مضاد للميكروبات. ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من البحث لتطوير استراتيجيات للعاثيات المعتدلة تضاهي سلامة وفعالية العاثيات الضارية (Monteiro et al., 2019; Lauman and Dennis, 2023).

على الرغم من أن آلية العمل الفريدة للعاثيات تجعلها جذابة لمحاربة مسببات الأمراض متعددة المقاومة، إلا أن الجراثيم قد طورت ترسانة من أنظمة الدفاع المضادة للعاثيات التي تستهدف مكونات أو عمليات العاثية الغازية (Antine et al., 2024). ويمكن أن تنشأ مقاومة العاثيات بسرعة من خلال عمليات طفورية أو تنظيمية تقلل من توفر المستقبلات (Supina et al., 2025). بينما تشكل مقاومة العاثيات تحديًا للعلاج بالعاثيات، فإنه من المفيد استخدام مزيج مكون من عاثيات متعددة تستهدف مستقبلات مختلفة (Yang et al., 2020; Kim et al., 2022) في تقليل مقاومة العاثيات بوساطة المستقبلات (Kim et al., 2024a). بالإضافة إلى ذلك، يمكن استغلال طفرة المستقبلات ذات الوظائف الخلوية

المهمة لتوجيه الأنماط الجرثومية نحو حالات من انخفاض الفوعة (Supina et al., 2025)، أو انخفاض التكاثر اللوغاريتمي (Zulk et al., 2022)، أو زيادة الحساسية لمضادات الجراثيم (Gao et al., 2022,; Ruest et al., 2023).

كما أجريت العديد من الدراسات على عاثيات ومنتجات مشتقة من العاثيات في تجارب سريرية لعلاج مسببات أمراض أولوية بما في ذلك المكورة العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* ذات المقاومة المتعددة للأدوية وأظهرت نتائج واعدة في علاج هذين المسببين المرضيين (Butler et al., 2022).

حيث أنه في دراسة (Smith et al., 1987) قام بعلاج الإسهال الشديد في العجول المسبب بالإشريكية القولونية بنجاح باستخدام جرعة واحدة من العاثيات تقدر بـ 10^5 PFU حيث استمر الإسهال لمدة 12-20 ساعة فقط قبل الشفاء التام، إذ تكاثرت العاثيات بسرعة في جراثيم الأمعاء الدقيقة المصابة، حيث وصلت أعدادها إلى $(10^9 - 10^{10})$ (g/PFU) في الروث خلال 24 ساعة من العلاج، مما أدى إلى انخفاض حاد في أعداد جراثيم *E. coli*.

كما بينت نتائج (Smith et al., 2022) في دراسته على العجول المصابة بالإسهال المسبب بالإشريكية القولونية أن العجول المصابة التي تلقت العلاج بعاثيات تم عزلها وإكثارها من أرضية حظائر مزارع العجول أظهرت تحسناً ملحوظاً وانخفاضاً في أعراض الإسهال بشكل أسرع مقارنة بمجموعة التحكم، كما لوحظ انخفاض واضح في تركيز جراثيم الإشريكية القولونية في أمعاء العجول المعالجة، كما لم يظهر العلاج بالعاثيات تأثير سلبي على توازن الميكروبات المعوية، مما يشير إلى أن العاثيات كانت فعالة بشكل انتقائي ضد الإشريكية القولونية من دون الإضرار بالجراثيم المفيدة.

أشارت دراسة (Chen et al., 2026) إلى عزل ثلاث عاثيات متخصصة تستهدف جراثيم ETEC K88، المسبب الرئيسي للإسهال في الخنازير الصغيرة. أظهرت هذه العاثيات في المختبر استقراراً عالية تجاه الظروف المعوية المخبرية وفعالية كبيرة في القضاء على الجراثيم وتفكيك الأغشية الحيوية التي تنتجها. ولتقييم فعاليتها في الجسم الحي، تم إضافة مسحوق مجفف لهذه العاثيات إلى علائق

الخنزير المفطومة بجرعات مختلفة، ثم تم إجراء عدوى تجريبية بـ ETEC K88 ، حيث أظهرت النتائج أن إضافة العائيات إلى العلف خففت بشكل ملحوظ من أعراض الإسهال وخفضت درجة حرارة الخنازير. كما حسنت هذه الإضافة من سلامة الحاجز المعوي عن طريق زيادة طول الزغابات المعوية وتقليل مؤشرات النفاذية المعوية في الدم. وعلى المستوى الجزيئي، خففت العائيات من حدة الالتهابات من خلال تثبيط مسار الإشارات TLR4/NF-κB ، مما أدى إلى انخفاض إفراز السيتوكينات الالتهابية.

أما في دراسة (Zou *et al.*, 2024) على الفئران المصابة بالإسهال المسبب بـ ETEC لوحظ انخفاض في درجات الإسهال لدى الفئران التي تلقت علاجًا بالعائيات، كما أظهرت الفئران المعالجة زيادة في مستويات Occludin، Claudin-1، و ZO-1، مما يشير إلى تحسين وظيفة الحاجز المعوي، وتم ملاحظة انخفاض في مستويات TNF-α و IL-1β في المصل، مع تثبيط مسار TLR-4/NF-κB مما يشير إلى تخفيف الالتهاب كما تحسنت حالة الصورة النسيجية المعوية بشكل ملحوظ في الفئران المعالجة بالعائيات. كما أظهرت دراسة (Lee *et al.*, 2021) لمعالجة العجول المصابة بالإسهال المسبب بالإشريكية القولونية EHEC بالعائيات الجرثومية عن طريق التحاميل الشرجية تقليل نسبة العجول التي أظهرت أعراض الإسهال إلى 20% في المجموعة المعالجة بالعائيات مقارنة بالمجموعة غير المعالجة التي استمر الإسهال فيها حيث تم تقليل عدد جراثيم الإشريكية القولونية في الروث.

وفي دراسة (Huff *et al.*, 2004) لتقييم فعالية العلاج بالعائيات الجرثومية، والمضاد الحيوي إنروفلوكساسين، بالإضافة إلى استخدامهما معاً في علاج داء القولونيات (Colibacillosis) في دجاج التسمين. تم عدوى الطيور بعترة ممرضة من جراثيم الإشريكية القولونية عن طريق الحقن في الكيس الهوائي. أظهرت النتائج أن معدل النفوق في المجموعة غير المعالجة بلغ 68%، بينما انخفض بشكل ملحوظ إلى 15% في المجموعة المعالجة بحقنة واحدة من العائيات، وإلى 3% فقط في المجموعة المعالجة بالإنروفلوكساسين في ماء الشرب. وكان التأثير الأبرز في المجموعة التي تلقت العلاج المركب (عائيات + إنروفلوكساسين) حيث لم تسجل أي حالة نفوق، مما يشير إلى وجود تأثير تآزري واضح. كما لوحظ انخفاض في شدة آفات التهاب الأكياس الهوائية في الطيور المعالجة. كما قارنت دراسة

(Xie *et al.*, 2005) فعالية المضاد الحيوي (الكلورامفينيكول) والعلاج الفموي بالعائيات (معزولة من مياه الصرف الصحي) ضد الإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء في دجاج بعمر 20 يومًا. لم يُلاحظ إسهال في الطيور التي تلقت العائيات، بينما كانت هناك معدلات إسهال بنسبة 12.4% في الطيور التي تلقت المضاد الحيوي و 25.2% في المجموعة الضابطة. بلغ معدل النفوق 14.8% في المجموعة الضابطة، بينما كان معدل النفوق في مجموعة المضاد الحيوي 7% و 3% في المجموعة المعالجة بالعائيات. علاوة على ذلك، أخبر الباحثون عن زيادة في الوزن في الدجاج الذي تلقى العائيات. إذ أن للعلاج بالعائيات نوعية عالية دون التأثير على الجراثيم المفيدة، وهو أمر مهم جدًا للحفاظ على توازن بيئي دقيق مناسب للأمعاء. أيضًا، أظهر العلاج بالعائيات عن طريق التلقيح داخل الرغامى (intratracheal inoculation) انخفاضًا في شدة العدوى ومنع الوفيات الناجمة عن عدوى الإشريكية القولونية الممرضة للطيور (APEC) (Tawakol *et al.*, 2019).

2-10. التآزر بين العائيات والمضادات الحيوية (PAS) Phage-Antibiotic

Synergy

قد تكون العائيات فعالة في علاج مسببات الأمراض متعددة المقاومة بشكل أكبر عند استخدامها مجتمعة مع المضادات الحيوية (Segall *et al.*, 2019). حيث أنه أثناء إجراء الفحص الروتيني لحساسية المضادات الحيوية بطريقة انتشار القرص لعينة بول، لاحظ Comeau وآخرون (2007) لويحات عائية تنمو على طبق جراثيم الإشريكية القولونية *Escherichia coli* المسببة لعدوى المسالك البولية، إذ لاحظ الباحثون أن اللويحات كانت أكبر بشكل ملحوظ في المناطق التي تحتوي على كميات أقل من MIC من الأزترونام والسيفيكسيم، مما يشير إلى وجود تفاعل تآزري بين هذه المضادات الحيوية من فئة بيتا-لاكتام والعائيات داخل العينة. في ذلك العمل، تم صياغة مصطلح التآزر بين العائيات والمضادات الحيوية (PAS) لوصف ظاهرة زيادة إنتاج العائيات بسبب فعل المضاد الحيوي عند مستويات أقل من MIC. منذ ذلك الحين، أصبح التآزر بين العائيات والمضادات الحيوية مجالًا هامًا في أبحاث العائيات إذ

أنتج عدة نجاحات سريرية (Nir-Paz *et al.*, 2019.; Doern, 2014 ,; Lauman and Dennis,) (2023).

على الرغم من أن الوصف المبكر للتآزر بين العاثيات والمضادات الحيوية تركزت على التعديل المباشر لنمو العاثية بواسطة المضادات الحيوية (Comeau *et al.*, 2007)، فإن الاهتمام المتزايد في الديناميكيات التطورية المعقدة لتفاعلات العاثية مع المضيف قد وسع آليات التآزر بين العاثيات والمضادات الحيوية ليشمل أنماطاً جديدة من التآزر (Segall *et al.*, 2019). على الرغم من هذه التقدمات، توجد فجوات معرفية تحيط آليات التآزر والتضاد (Kim *et al.*, 2025)، وتمنع إلى حد كبير التنبؤ القائم على الأنماط العاثية-المضاد الحيوي الفعالة من دون فحص تجريبي مسبق، حيث يمكن أن تكون التفاعلات بين العاثية والمضاد الحيوي تآزرية أو إضافية أو مضادة. ولتسهيل تحديد هذه الأنماط، طور Gu Liu وآخرون (2020) طريقة جديدة عالية الإنتاجية لفحص تفاعلات العاثية والمضاد الحيوي باستخدام قراءات لوحات الميكروتايتز في الوقت الحقيقي بالطريقة التي تعرف باسم رقعة الشطرنج.

2-11. الآليات المحتملة للتآزر بين العاثيات والمضادات الحيوية

2-11-1. أنماط التآزر التقليدية المرتبطة بالتغيرات في شكل الخلية وزيادة تضاعف

العاثية:

ثبت أن كلاً من الفلوروكوينولونات المثبطة لتضاعف الحمض النووي (Bos *et al.*, 2015) والبيتا-لاكتامات المثبطة لتصنيع جدار الخلية يحفز استجابة SOS في المكورة العنقودية الذهبية *S. aureus* والإشريكية القولونية *E. coli* (Miller *et al.*, 2004 ,; Maiques *et al.*, 2006)، ولكن آليات التحريض تختلف قليلاً بين المضادات الحيوية. إذ تسبب الفلوروكوينولونات مباشرة تلفاً في الحمض النووي مضاعف الطاق مما يحفز استجابة SOS (Bush *et al.*, 2020.; Halawa *et al.*, 2024) بينما تؤدي مضادات البيتا-لاكتام فعاليتها المضادة للجراثيم أساساً من خلال تثبيط إنزيمات بروتينات ربط البنسلين (Penicillin-Binding Proteins - PBPs)، التي تعمل كترانسبيبتيداز ضروري

للتشابك النهائي وتخليق جدار الخلية الجرثومية (الببتييدوغليكان) وكما تؤدي عدة بروتينات PBP بما في ذلك PBP1 في *Bacillus subtilis* و PBP3 في *E. coli* دوراً في انقسام الخلية (*Sauvage et al., 2008*)، وقد ثبت أن تعطيل PBP3 في *E. coli* يحفز استجابة SOS (*Miller et al., 2004*) ومن الجدير بالذكر أن التريميثوبريم، الذي يسبب تلف الحمض النووي من خلال تثبيط إنزيم ديهيدروفولات ريدكتاز، قد يحرض أيضاً استجابة SOS مما يؤدي إلى استطالة الخلية و تكون الخيوط في بعض الجراثيم (*Sangurdekar et al., 2011*).

أن الخلايا الخيطية توفر فرصة أكبر لحدوث التفاعلات بين العائية والجراثيم في الحيز المكاني نظراً لزيادة مساحة سطحها (*Kim et al., 2018*). حيث وجد (*Kamal and Dennis, 2015*) أن التراكيز أقل من MIC من السيبروفلوكساسين أو التتراسيكلين أو الميروبينيم تسببت على التوالي في تكون خيوط أو استطالة أو تكتل للخلايا في سلالاتي *Burkholderia* K56-2 و *Burkholderia* *cenocepacia* C6433 ، وفي اختبارات حجم اللويحات، لوحظ تأزر بين العائيتين KS14 و KS12 وجميع المضادات الحيوية الثلاثة، مما يشير إلى أن التغيرات المورفولوجية للخلية التي تحفز استطالة الخلايا تتوافق مع زيادة النشاط العائوي. وتكهن الباحثون بأن تكون الخيوط والاستطالة الخلوية قد يعززان احتمالية تفاعلات العائية مع المستقبلات، بينما قد يسهل تكتل الخلايا وصولاً أفضل للعائيات إلى الخلايا المجاورة. وقد تم إظهار دعم تجريبي إضافي لهذه الفرضية من قبل (*Davis et al., 2021*) أثناء دراسة العائية E79 المرتبطة بعديد السكاريد الشحمي LPS والجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) ، إذ أظهرت صور المجهر الإلكتروني النافذ زيادة في العائيات المرتبطة بالخلية من 2 عائية لكل خلية إلى 5 عائية/خلية بعد نمو PAO1 في تراكيز محفزة لتكون الخيوط من أزترونام ، مما يدعم زيادة الالتصاق بالخلايا الخيطية. وكما تم تأكيد دور الاستطالة الخلوية في التأزر بين العائيات والمضادات الحيوية لعائيات *Escherichia coli* T5 و HK620 (*Bulssico et al., 2023*) باستخدام الفحص المجهر الإلكتروني المتقاطع لتصور تفاعلات العائية مع المضيف، وجد الباحثون أن النسبة المئوية للخلايا التي تحتوي على عائية HK620 واحدة على الأقل ملتصقة ارتفعت من 34.2% في المزرعة غير المعالجة إلى 48.4% و 63% عند تعريض المزارع لتراكيز أقل من

MIC من السيبروفلوكساسين و السيفاليكسين على التوالي. علاوة على ذلك، لاحظ الباحثون عدم تجانس مورفولوجي داخل المزارع المعالجة بالمضادات الحيوية ووجدوا أن الخلايا الممتدة ارتبطت بجسيمات عائية بنسبة 58.4% أو 67.2% من الوقت في مزارع المعالجة بالسيبروفلوكساسين أو السيفاليكسين، بينما ارتبطت 37.7% أو 46.5% فقط من الخلايا ذات الشكل الطبيعي بوحدة أو أكثر من الجسيمات العائية تحت كل حالة مضاد حيوي على التوالي. وبيّن حساب عدد العائيات لكل وحدة مساحة سطح لاحقاً إلى أن زيادة حجم الخلية في الخلايا الخيطية حفزت زيادة الالتصاق. كما تتبع الباحثون توطين الحمض النووي للعائية الموسوم بالبروتين الفلوري الأخضر GFP في الخلايا الممتدة ووجدوا أن عدد البؤر الموسومة بالفلورسنت زاد بشكل متناسب مع طول الخلية، واستناداً إلى هذه النتيجة، اقترح الباحثون أن زيادة حجم القفزة مرتبط بزيادة أعداد المصانع الفيروسية في الخلايا الممتدة. بشكل عام، تظهر هذه الدراسات أن زيادة إنتاج العائية على مستوى الخلية الواحدة خلال زيادة حجم القفزة أو من خلال تسريع التحلل تمثل آليات أساسية للتأزر بين العائيات والمضادات الحيوية. ومع ذلك، فإن التغيرات المورفولوجية أو التنظيمية المحددة التي تكمن وراء هذه الآلية من زيادة إنتاج العائية متنوعة وتتطلب مزيداً من الدراسة.

2-11-2. التأزر بين العائيات المعتدلة والمضادات الحيوية- Temperate Phage

: (tPAS) Antibiotic Synergy

بعد حقن العائية مادتها الوراثية في مضيف جرثومي، قد تشارك العائيات المعتدلة في تحلل الخلية و من خلال عمل البروتينات العائية المعبر عنها، قد تندمج في كروموسوم المضيف الجرثومي، مُدخلة في حالة سكون قابلة للانعكاس تُعرف بالاندماجية (Salmond and Fineran, 2015). يتحكم المفتاح التحولي بين الدورة الحالة والدورة الاستذابية في مجموعة من العمليات التنظيمية التي تتأثر بالنمو الجرثومي أو الظروف البيئية أو إشارات أخرى (Aframian et al., 2022,;Brady et al., 2021). بينما يمكن أن يؤدي تحريض استجابة SOS الناتج عن التعرض للمضاد الحيوي إلى تكون الخيوط الخلوية، أما بالنسبة للعائيات الكامنة الموجودة في الجينوم الجرثومي فيشير تحريض استجابة SOS إلى

تهديد لبقاء الخلية مما يحفز الاستئصال وبدء دورة التحلل، مما يمكن في النهاية من تحلل الخلية بفعل العاثية (Aframian *et al.*, 2022). في السنوات الأخيرة، أظهر الباحثون أن القابلية الفريدة للعوائل المتولدة بالاندماج للمواد الكيميائية المحرصة لـ SOS تمثل فرصة للتآزر بين العاثيات المعتدلة والمضادات الحيوية (tPAS) (Al-Anany *et al.*, 2024)

صاغ مصطلح tPAS لأول مرة من قبل (Al-Anany *et al.*, 2021)، الذين لاحظوا نشاطاً تآزرياً بين العاثية المعتدلة لجراثيم *E. coli* HK97 والفلوروكوينولون المحرض لـ SOS، السيروفلوكساسين. أظهرت الدراسة للأساس الآلي لهذا التآزر أن 98% من الجراثيم الناجية بعد التعرض لـ HK97 كانت نتائجهم إيجابية لاندماج عاثية HK97 في كروموسوم المضيف، بينما كانت 32% فقط من المستعمرات المعزولة من العلاجات المشتركة لـ HK97 مع MIC 1/2 من السيروفلوكساسين هي جراثيم إيجابية لاندماج العاثية. كما أظهرت تجارب إضافية أن تحريض استجابة SOS في الجراثيم الحاملة لـ HK97 المدمجة بواسطة السيروفلوكساسين تسبب في التأثيرات التآزرية الملاحظة. منذ ذلك الحين، تم إثبات هذه الآلية من التآزر بين العاثيات والمضادات الحيوية لمجموعة من المضادات الحيوية الأخرى بما في ذلك حمض الناليديكسيك، وحمض الأوكسولينيك، والليفوفلوكساسين، والميتومايسين C، والتريميثوبريم (Al-Anany *et al.*, 2024).

لاحقاً اكتشف الباحثون آلية ثانية متميزة لـ tPAS، حيث تعزز مثبطات تخليق البروتين التكاثر التحليلي للعاثيات المعتدلة بشكل مستقل عن تنشيط SOS (Al-Anany *et al.*, 2024) بشكل مشابه لنتائجهم الأصلية، ووجد الباحثون أن معالجة *E. coli* بـ HK97 والجنتاميسين أقل من MIC قللت عدد الجراثيم المتكاثرة مع الاندماج بشكل كبير من 92% في مجموعات التحكم بالعاثية وحدها إلى 2%. ومع ذلك، لم يكن هذا الانخفاض ناتجاً عن تحريض العاثية حيث أن معالجة الجراثيم المتكاثرة مع الاندماج لـ HK97 بالجنتاميسين عند التركيز المثبط الأدنى (MIC) أو MIC 1/2 لم يحفز إنتاج العاثية، إذ أظهر تقييم تواتر الاندماج عبر الزمن أن العلاج بالمضاد الحيوي قلل الاندماجية في نقاط زمنية أبكر من عملهم السابق. اقترح هذا التغيير الزمني أن الجنتاميسين يحرض طلائع العاثيات إلى بدء دورة حالة خلال

فترة اتخاذ القرار الحرجة بين التحلل والاندماج التي تحدث بين حقن الجينوم وتشكيل الجراثيم الجديدة الحاوية على العائثة المعتدلة المستقرة. تم إثبات هذه الآلية للعديد من مثبطات تخليق البروتين، مثل الجنتاميسين، والتتراسيكلين، والأزيثرومايسين، ويُفترض أن هذه المجموعة من المضادات الحيوية تقلل التعبير عن البروتينات العائثة المطلوبة لكبح النمو التحللي خلال المراحل المبكرة من العدوى العائثية (Al-Anany *et al.*, 2021).

2-11-3. إعادة التحسس للمضادات الحيوية بوساطة العائثة:

تُعتبر طفرة المستقبلات آلية شائعة لمقاومة العائثة على نطاق واسع (Gordillo Altamirano and Barr, 2021)، وقد ثبت حدوثها في المختبر للعائثات التي تتعرف على مجموعة من المستقبلات المختلفة (Fu *et al.*, 2025; Ruest *et al.*, 2023; Supina *et al.*, 2025). على الرغم من أن فقدان المستقبل يمنع عدوى العائثة، إلا أنه يوفر أيضًا فرصة فريدة للتأثير بشكل كبير على المسار التطوري لمسبب المرض أو توجيهه نحو نمط ظاهري مفيد علاجيًا (Gordillo Altamirano and Barr, 2021). في سياق التآزر بين العائثات والمضادات الحيوية، قد يعزز الاستخدام الاستراتيجي للعائثات التي تتعرف على الترايبس التي تمنح مقاومة لمضادات المكروبات تفضيلات تطويرية تعزز نشاط الأدوية غير الفعالة (Ruest *et al.*, 2023; Feng *et al.*, 2024)، وبالفعل، اكتسبت هذه الاستراتيجية اهتمامًا كبيرًا (North and Brown, 2021; Fujiki *et al.*, 2023). على الرغم من ندرة تحديد الآليات الدقيقة، فإن الدراسات تشير إلى أن التعديلات التي تسببها العائثة على مضخات الطرد أو نفاذية الغشاء هي العوامل المحركة لإعادة التحسس.

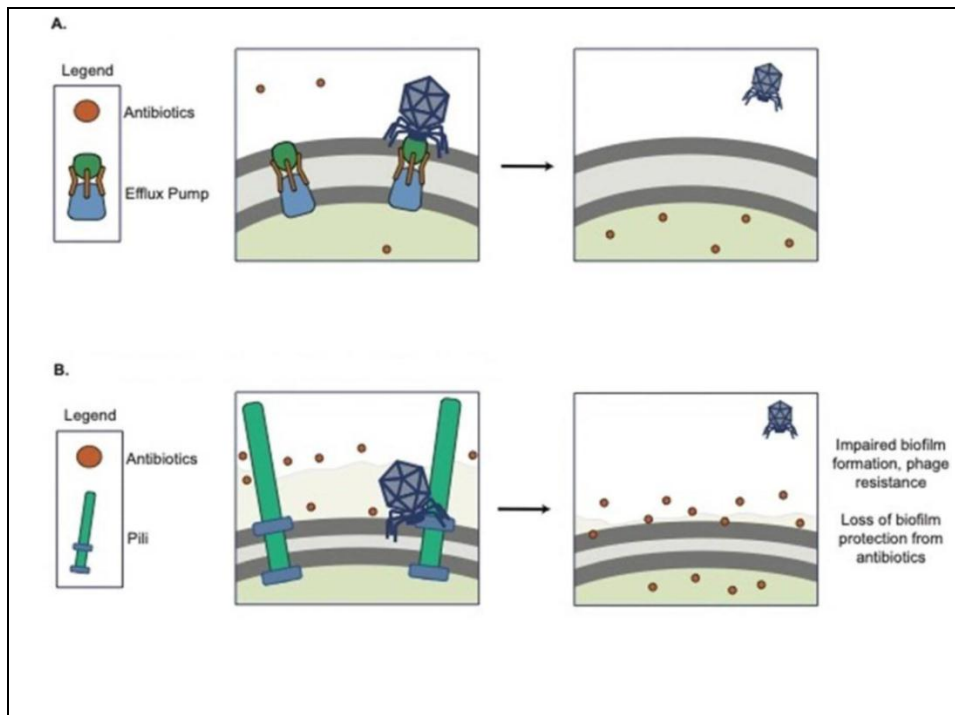
يتم تحقيق الدفاع الأساسي ضد العائثة عن طريق طفرة أو إخفاء مستقبلات العائثة (Labrie *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2022)، ويمكن أن يكون لتعديلات جدار الخلية الجرثومية ومستقبلاتها تأثير مباشر على مقاومة المضادات الحيوية إذا كان مستقبل العائثة له دور في آليات مقاومة المضادات الحيوية. وقد اقترح تآزر العائثات المرتبطة بنظام الطرد لأول مرة عند اكتشاف العائثة OMK01، التي ترتبط ببروتين مسام الغشاء الخارجي OprM خلال إصابة *P. aeruginosa* إذ يشكل OprM قناة

الغشاء الخارجي لنظامي طرد متعدد الأدوية MexXY-OprM و MexAB-OprM ، ووجد الباحثون أن الطفرات التلقائية المقاومة للعائثية في *P. aeruginosa* الناشئة تحت ضغط OMK01 كانت أكثر حساسية للسيبروفلوكساسين، والتتراسيكلين، والسيفتازيديم، والإريثرومايسين، على الأرجح بسبب انخفاض قدرة طرد الدواء عبر التغير أو ازالة مضخات الطرد (Chan *et al.*, 2016) الشكل رقم (2-4-a). دعمت هذه النتائج الملحوظة لاحقاً دراسات داخل الجسم الحي وجدت أن العزلات الجرثومية المعالجة بالعائثية أو بالعائثية والإريثرومايسين كانت أكثر حساسية للإريثرومايسين بالمقارنة مع المجموعة غير المعالجة أو المعالجة بالمضاد الحيوي فقط (Gurney *et al.*, 2020). كما أظهر Westra وآخرون (2015) أن الزائفة الزنجارية PA14 طورت مقاومة لعائثية DMS3vir تحت ظروف الإجهاد من خلال فقدان الأهداب Pilus مما يمكن أن يضعف تكوين الغشاء الحيوي، وبالتالي قد يقلل من تحمل المضادات الحيوية (Secor *et al.*, 2015.; Yan and Bassler, 2019.) الشكل رقم (2-4-b)، كما تم الإبلاغ عن أمثلة للتحسس المضاد للمكروبات بوساطة العائثية لعائثيات أخرى مرتبطة بـ MexXY-OprM في *P. aeruginosa* (Koderi Valappil *et al.*, 2021) وللعائثيات المرتبطة بـ TolC في *E. coli* (Burmeister *et al.*, 2020) ، مما يشير إلى أن العائثيات التي تتعرف على مكونات نظام الطرد يمكن أن تتأزر مع المضادات الحيوية التي تطردها هذه الأنظمة المحددة. بالإضافة إلى ذلك، لوحظ إعادة التحسس للمضادات الحيوية المستهدفة للغشاء بوساطة العائثيات التي تتعرف على تراكيب الغلاف الخلوي مثل LPS (Ruest *et al.*, 2023) وعديد السكاريد المحفظي (Gordillo Altamirano and Barr, 2021.; Wang *et al.*, 2021) مما يفترض زيادة نفاذية الغشاء أو إمكانية الوصول إلى الهدف الدوائي كآلية تطورية محتملة للتأزر بين العائثيات والمضادات الحيوية. تم افتراض هذه الآلية مؤخراً في *B. cenocepacia* ، التي تنتج LPS معدلاً يمنح مستويات عالية من مقاومة فطرية للمضادات الحيوية لبعض الأدوية المخلة بالغشاء مثل البوليبيكسين و كوليسيتين (Ruest *et al.*, 2023) (Sabnis *et al.*, 2021.; Rhodes and Schweizer, 2016). كما وجد (Ruest *et al.*, 2023) أن العزلات المقاومة للعائثية لـ *B. cenocepacia* K56-2 التي تم الحصول عليها من العدوى بالعائثيات الملتصقة بـ LPS KS9 أو KS5 أو JG068 أظهرت درجات متفاوتة من تغيير LPS كانت

هذه السلالات أكثر قابلية للتأثر بالكوليسيتين بالمقارنة مع المجموعة الضابطة، مما يرسم صلة بين التعديلات التي تسببها العائثة على LPS وحساسية الكوليسيتين. في دراسة أخرى، وجد أن مقاومة عائثة *Acinetobacter baumannii* Phab24، التي يُعتقد أنها تستخدم عديد السكاريد المحفظي كمستقبل أساسي، تنشأ خلال طفرات في *gtr9*، وهو غليكوزيل ترانسفيراز مرتبط بتخليق المحفظة (Wang *et al.*, 2021). بشكل مشابه للطفرات في LPS التي درسها (Ruest *et al.*, 2023)، كانت طفرات المحفظة *gtr9* أكثر حساسية للكوليسيتين من نظيراتها في المجموعة الضابطة، واقترح الباحثون أن فقدان عديد السكاريد المحفظي في *A. baumannii* يحسن وصول الكوليسيتين إلى الغشاء الخارجي من خلال تقليل الحاجز الذي قد يعيق نشاط الكوليسيتين (Wang *et al.*, 2021). أكد (Gordillo Altamiran *et al.*, 2022) هذا النموذج الخاص بزيادة حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية في بكتيريا *A. baumannii*، حيث طبقوه على مضادين حيويين يعملان على جدار الخلية هما سيفتازيديم وإيميبينيم، ففي تجربة أجريت على الفئران المصابة بعدوى في الدم (تجرثم الدم)، تم عزل سلالات من الجراثيم أصبحت مقاومة للعائثة \emptyset FG02 وقد أظهرت هذه السلالات عودة واضحة لحساسيتها تجاه كل من المضادين الحيويين المذكورين، وكذلك تجاه العائثة الأخرى \emptyset LK01 حيث كشفت التحاليل الجينية لهذه السلالات عن وجود طفرات في الجينات المسؤولة عن إنتاج المحفظة الجرثومية وإفرازها، وكذلك في الجينات المرتبطة بتخليق السكريات. وهذا يشير بقوة إلى أن فقدان الجراثيم لمستقبلاتها (التي كانت العائثة تستخدمها لدخولها) هو العامل الرئيسي الذي أدى إلى زيادة حساسيتها للمضادات الحيوية. وفي الآونة الأخيرة، وُجد أن إعادة التحسس بوساطة العائثة يحدث خلال العلاجات بمزيج العائثات لـ MDR *P. aeruginosa* في الفئران (Ashworth *et al.*, 2024).

وجد (Qin *et al.*, 2024) أن تحضين *Klebsiella pneumoniae* مع العائثة H5 وحدها أنتجت طفرات مقاومة للعائثة ذات نشاط استقلابي وقدرة تنافسية متزايدة بالمقارنة مع المجموعة الضابطة غير المعالجة. هذه الطفرات، التي نشأت خلال طفرات مغلوطة في *wcaJ*، وهو جين مشارك في إنتاج المحفظة، كانت أكثر حساسية للسيفتازيديم.

يعتقد أن في كل من هذه الأمثلة ما يدل على علاقة مباشرة بين فقدان مستقبل العائية والحساسية للمضاد الحيوي، فإن حالات عدم التجانس الطفري استجابة لعدوى العائية تشير إلى أن التحسس قد يحدث أيضًا بشكل غير مباشر وفقًا لذلك، افترض الباحثون أن الطفرات منحت على الأرجح مقاومة تجاه العائية، بينما قد ترتبط زيادة القابلية للتأثر بالدواء بانخفاض طرد المضاد الحيوي. تشير هذه الأمثلة معًا إلى أن تطبيق العائيات التي تستهدف التراكيب المعززة للطرد أو المحددة للدخول يمثل نمطًا جديدًا واعدًا من التآزر بين العائيات والمضادات الحيوية.



الشكل رقم (2-4): يظهر الشكل بعض آليات التآزر بين المضادات الحيوية والعائيات (a) تزيد مقاومة الجراثيم للعائية OMKO من قابلية الجراثيم للمضادات الحيوية عن طريق تغيير مضخات الطرد. .
(b) تضعف مقاومة الجراثيم للعائية DMS3vir من التصاق الجراثيم وتشكيل الغشاء الحيوي بسبب فقدان الأهداب.

2-12. استقرار العائيات:

على الرغم من أن فعالية العلاج بالعائيات (phage therapy) قد أثبتت كبدل واعد للمضادات الحيوية التقليدية في العديد من الدراسات، إلا أنه لا تزال هناك تحديات رئيسية يجب مراعاتها، وعلى رأسها ثبات العائيات (phage stability) فمن أجل التطبيق الناجح للعلاج بالعائيات، سواء في السياقات السريرية

أو الصناعية، من الضروري دراسة ومعالجة العديد من العوامل المحددة لثباتها قبل الاستخدام (Suh *et al.*, 2022).

يمكن للظروف البيئية مثل درجة الحرارة ودرجة pH في التطبيقات السريرية والصناعية بالإضافة إلى الملوحة والأشعة فوق البنفسجية (UV) خاصة في البيئات الصناعية، أن تؤثر بشكل كبير في قابلية العائيات للبقاء (Makky *et al.*, 2023). إذ يمكن لهذه العوامل أن تتداخل مع ثبات القفيصة (capsid) والحفاظ على المادة الوراثية، أو حتى أن تؤثر على عملية التعرف على العائل (host recognition) والامتزاز (adsorption) وحقن المادة الوراثية، مما يسبب تأثيراً عميقاً على نتيجة العدوى العائية (Mahony *et al.*, 2016; Qiu, 2012). قد يؤدي عدم ثبات العائية إلى فشل الجرعة العلاجية، واستبدال الجراثيم المستهدفة بأخرى مقاومة للعائيات، مما لا يحقق العلاج المطلوب (Oechslin, 2018). لذلك، يُعد فهم أداء العائيات تحت ظروف فيزيوكيميائية مختلفة أمراً بالغ الأهمية لتطوير بروتوكولات علاجية فعالة. ونظراً لأن كل عائية تمتلك ثباتاً فريداً، يجب تقييمها بشكل فردي قبل تطبيقها أو دمجها في مزيج (cocktail) علاجي.

2-12-1. درجة الحرارة

تعتبر درجة الحرارة عاملاً حاسماً في تحديد قابلية العائيات للبقاء، حيث تؤثر بشكل رئيسي على عمليات الالتصاق (adsorption)، والاختراق (penetration)، والتكاثر (replication)، ومدة الفترة الكامنة (latent period)، خاصة في العائيات المعتدلة (temperate phages).

عند درجات حرارة أقل من الدرجة المثلى، يقل اختراق المادة الوراثية للعائية داخل الخلايا الجرثومية العائلة مما يحد من عدد العائيات القادرة على الدخول في طور التكاثر. في المقابل، يمكن لدرجات الحرارة المرتفعة أن تطيل فترة الكمون للعائيات (Tey *et al.*, 2009)، إضافة إلى ذلك، تحدد درجة الحرارة مدى انتشار العائيات، وقابليتها للبقاء، وظروف حفظها. بشكل عام، تُعد قفيصة العائية بنية مقاومة للحرارة تحمي الحمض النووي (Sae-Ueng *et al.*, 2022) ومع ذلك، يمكن أن يحدث قذف

للحمض النووي من القفيصة قبل الوصول إلى درجات حرارة مرتفعة، مما ينتج فيروسات (virions) فارغة وغير قادرة على إحداث العدوى. كما تحمل العاثيات إنزيمات ضرورية لعدوى الخلية، وتتفاوت في ثباتها الحراري؛ فإذا كانت هذه الإنزيمات منخفضة الثبات، فقد تبقى الفيروسات الناضجة كاملة ولكنها غير قابلة للكشف بتقنية الأغار ذي الطبقة المزدوجة (double-layer agar) بسبب فقدان القدرة على العدوى (Swift *et al.*, 2015). المكونات الأخرى للعاثية مثل بروتينات الذيل (tail fibers)، وبروتينات ربط المستقبل (receptor-binding proteins)، وبروتينات الشويكات (spike proteins)، وغيرها من الجزيئات الهيكلية، تمتلك نقاط تشوه حراري مختلفة، مما يؤثر سلباً على ثبات العاثية أو يقلل على الأقل من قدرتها على العدوى (Latka *et al.*, 2017).

في معظم الدراسات، لوحظ أن ثبات العاثيات يكون مثالياً في مجال حراري يتراوح بين 37 و45 درجة مئوية، حيث يبدأ التأثير السلبي عندما تتجاوز الحرارة 45 درجة مئوية. بينما أظهرت بعض الدراسات قدرة تحمل حراري أعلى تصل إلى 60 درجة مئوية مع عدم وجود انخفاض أو انخفاض طفيف جداً في عيار العاثية (titer) مقارنة بالعاثيات المعرضة لدرجات حرارة منخفضة (Duarte *et al.*, 2025). اعتُبرت عاثية السلمونيلة SaFB14 مستقرة حتى 42 درجة مئوية لمدة 6 ساعات (Tang *et al.*, 2019)، بينما كانت عاثيتا *Acinetobacter baumannii* (vB_AbaS_TcUP2199) و *Staphylococcus epidermidis* (CUB-EPI_14) مستقرتين عند 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة، ولكنها تأثرت بدرجات حرارة أعلى من 37 درجة مئوية (Fanaei Pirlar *et al.*, 2022; *Mardiana et al.*, 2022) بينما، أظهرت عاثية *Vibrio harveyi* (vB_VhaS-R18L) انخفاضاً في العيار عند تعرضها لدرجات حرارة أعلى من 20 درجة مئوية لمدة 48 ساعة (Cai *et al.*, 2023).

كما لوحظ تفاوت في الثبات الحراري عند تعرض العاثيات لدرجات حرارة منخفضة. بشكل عام، بقي عيار معظم العاثيات مستقرًا عند الحفظ على 4 درجات مئوية. ومع ذلك، ظهرت اختلافات عندما انخفضت درجة حرارة الحفظ إلى -20 أو -80 درجة مئوية. إذ أظهرت عاثية الإشريكية القولونية Hy01 ثباتاً

لمدة 12 ساعة عند -20 درجة مئوية (Lee *et al.*, 2016) ، بينما كانت عاثية جراثيم Dickeya BF25/12 مستقرة لمدة تصل إلى عام واحد عند -80 درجة مئوية (Alic *et al.*, 2017) .

تتميز عاثيات جنس *Lactococcus spp* بمقاومة حرارية عالية، فقد عرض Buzrul وآخرون (2007) عشر عاثيات خاصة بهذا الجنس لدرجة حرارة 72 درجة مئوية (لمدة 15 دقيقة) و 90 درجة مئوية (لمدة 5 دقائق)، حيث تم تعطيل عاثيتين فقط عند 72 درجة مئوية، بينما تم تعطيل خمس منها عند 90 درجة مئوية. كما أظهر Atamer وآخرون (2008) أن حوالي 40% من عاثيات *Lactococcus lactis* المعزولة من منتجات ألبان بقيت حية بعد التعرض لـ 80 درجة مئوية لمدة 5 دقائق عندما كانت معلقة في الحليب. وفيما يتعلق بالتخزين طويل الأمد، ذكر Ackermann وآخرون (2004) إلى أن العاثيات المذنبة (tailed phages) كانت ذات مقاومة عالية، حيث يحتفظ بعضها بحيويته حتى بعد 10-12 سنة عند 4 درجات مئوية. وكانت العاثيات T4 و T5 و T7 وشبيهة T4 الخاصة بالشيغيلة (C16) الأكثر مقاومة بشكل استثنائي، حيث حافظت الأخيرة على نشاطها بعد 32 عاماً تحت الظروف نفسها. في المقابل، فإن بعض العاثيات المحتوية على دهون (lipid-containing phages) كانت غير مستقرة عند 4 درجات مئوية، ولكن يمكن تخزينها بنجاح عند -80 درجة مئوية أو في النيتروجين السائل. وقد اختبر (Jepson and March, 2004) تأثير وقت التخزين على عاثية λ في درجات حرارة مختلفة، فلم يجدوا عاثيات قابلة للحياة في عند 42 درجة مئوية بعد 84 يوماً، ولا عند 37 درجة مئوية بعد 120 يوماً، بينما لوحظ ثبات جيد للعاثية عند تخزينها لمدة تزيد عن 6 أشهر في 4 درجات مئوية. كما أنه يمكن تحسين البقاء بإضافة 5-10% غليسرين (Olson *et al.*, 2004) . وذكر Ackermann وآخرون (2004)، أن العاثيات المختلفة المجمدة مع إضافة 50% غليسرين يمكن أن تبقى لسنوات في أمبولات مفرغة من الهواء، كما هو الحال مع عاثيات Siphoviridae التي لم تفقد حيويتها بعد 21 عاماً. وفي الآونة الأخيرة، اقترح Golec وآخرون (2011) طريقة تخزين محتملة وفعالة للعاثيات المذنبة، تتمثل في إصابة الخلايا الجرثومية بالعاثيات ثم تجميدها، حيث لم يلاحظوا فقداناً كبيراً في العيارات عند الاسترداد بعد عدة أشهر مقارنة بالخلايا المصابة حديثاً.

نظراً لأن كل عاثية قد تظهر قابلية مختلفة لدرجات حرارة التجمد، يمكن إضافة عوامل حافظة (cryoprotectants) أثناء التخزين البارد لتحسين الثبات لعدة أشهر أو سنوات. وبالمثل، لدرجات الحرارة الأكثر دفئاً، قد يتحسن ثبات العاثيات عن طريق التغليف (encapsulation) (Kocer and Yildirim, 2024).

2-12-2. درجة الحموضة (pH)

من المعروف أن ثبات العاثية يعتمد أيضاً على حموضة أو قلوية البيئة المحيطة. إذ يمكن أن تؤثر التحولات في pH على نتيجة العدوى الفيروسية من خلال إخلال في كفاءة الارتباط (binding efficiency) و/أو إتلاف الإنزيمات الفيروسية (Sae-Ueng *et al.*, 2024). بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تلعب درجة الـ pH دوراً مهماً في ثبات العاثيات الحرة عن طريق تعطيل القفيصة أو إحداث تغييرات هيكلية أخرى (Roshal *et al.*, 2019)، يتطلب فهم إمكانية تطبيق عاثية معينة بنجاح معرفة قدرتها على تحمل التغيرات في درجة الـ pH لضمان تحقيق الهدف من استخدامها.

لوحظ أن فترات التحضين (incubation) المطولة تؤدي إلى هامش أضيق من تحمل درجة الـ pH، حيث تشير الدراسات إلى أن نطاق التحمل والمقاومة للظروف شديدة القلوية أو شديدة الحموضة يتناقص بزيادة فترة التحضين. بشكل عام، معظم العاثيات المعزولة مستقرة في مدى pH يتراوح بين 5 و9 لمدة ساعة واحدة، وبين 6 و8 لمدة 24 ساعة. ومع ذلك، كانت هناك اختلافات كبيرة في النتائج ناجمة عن الاختلافات المنهجية في درجة حرارة التحضين أو المحلول المعلق المستخدم (Duarte *et al.*, 2025) كما أشارت الدراسات إلى وجود بعض العاثيات القادرة على تحمل البيئات الأكثر حموضة، حيث كانت عاثية جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* (Mac-1) قادرة على البقاء مستقرة من دون انخفاض عيارها عند درجة الـ pH 5 لمدة 15 ساعة (Aqel *et al.*, 2024)، كما بقيت العاثيتان vB_AbaP_HB01 و vB_AbaM_HB02 قابلتين للحياة عند pH 4 لمدة يومين مع انخفاض طفيف في العيار أقل من $1 \log_{10}$ PFU/mL (Erol *et al.*, 2024).

كما أشار (Alexyuk *et al.*, 2025) في دراسته لتقييم ثبات عائيات الإشريكية القولونية تجاه درجة الحموضة (pH) أن العائيات المعزولة احتفظت بنشاطية تحليلية عالية، حيث لوحظت أعلى العيارات 10^8 PFU/ml عند درجة الحموضة المتعادلة 7 ودرجة pH القلوية 10، وعند درجة pH 4 لوحظ انخفاض معتدل في العيار إلى 10^7 PFU/ml وفسر الباحث سبب الانخفاض بتعطيل جزئي للجسيمات الفيروسية، لكن النشاطية التحليلية بقيت عند مستوى ذي أهمية علاجية. عند درجة pH 12 انخفض العيار إلى 10^4 PFU/ml، مما يشير إلى حدوث ضرر كبير للجسيمات الفيروسية تحت الظروف القلوية الشديدة. وعند قيمتي درجة الحموضة المتطرفتين 2 و 14 فُقدت النشاطية التحليلية تمامًا، وعُزي ذلك إلى تدمير الفقيصة أو تغيير طبيعة البروتينات.

كما اختبر (Jepson and March, 2004) نشاط عائية λ في مجال pH من 2 إلى 14، فوجدها مستقرة بدرجة عالية في مدى pH يتراوح بين 3 و 11 بعد 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة، من دون أي انخفاض معنوي في العيار. في حين لم تُلاحظ أي جسيمات قابلة للحياة عند درجة pH 11.8 - 14 أو عند درجة pH 2.

2-12-3. الأشعة فوق البنفسجية (UV) :

ينقسم طيف الأشعة فوق البنفسجية عادةً إلى UV-A (315-400) نانومتر UV-B (280-315) نانومتر و UV-C (100-280) نانومتر. إن جميع هذه الأطوال الموجية تسبب أنواعاً مختلفة من الضرر للحمض النووي (Rastogi *et al.*, 2010) ، وبالتالي تؤثر سلباً على العائيات بطرق متنوعة. إذ تباينت نتائج التعرض للأشعة فوق البنفسجية في الدراسات السابقة من التحلل الكلي للعائيات في دقائق إلى بقاءها في عيارات عالية حتى ساعات (Oduor *et al.*, 2020; Duarte *et al.*, 2018) .

في الدراسات التي قيمت تأثير أطوال موجية محددة، كان UV-C هو الأكثر تسبباً في انخفاض قابلية العائيات للبقاء، حيث أظهرت جميع العائيات انخفاضاً في العيار، وتم تعطيل 52% منها كلياً بعد دقائق (Meng *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2024) وعند تعرض العائيات للأشعة UV-B تم تعطيل

36.4% فقط منها كلياً خلال 30 دقيقة (Pham *et al.*, 2024) ، بينما أشارت دراسات إلى أن أقل تأثير كان للأشعة UV-A إذ لم يُسجل تعطيل كلي و 45.5% فقط من العاثيات أظهرت تغيرات في العيار (Liu *et al.*, 2021) . كما أفادت دراسة Selcuk وآخرون (2024) بانخفاض عيار العاثية TE باستمرار عند التعرض للأشعة UV-C من $16 \log_{10}$ PFU/mL إلى $4.2 \log_{10}$ PFU/mL بعد 120 دقيقة من التعرض. كما انخفض عيار العاثية ZCSS1 بالتقدم مع الزمن عند التعرض للأشعة UV-C بطول موجي 250 نانومتر وبعد 60 دقيقة لم تكن أي جسيمات عاثية قابلة للكشف (Tarakanov *et al.*, 2022). وعند تعرض العاثيات Psst1 و Psst2 و Psst4 للأشعة UV-C بطول موجي 253.7 نانومتر لمدة 140 دقيقة تم تعطيل كل من Psst1 و Psst2 كلياً بعد 80 دقيقة، بينما تم تعطيل Psst4 فقط بعد 140 دقيقة (Zhang *et al.*, 2024) . كما تأثرت العاثيات L541 و W41 و MLA23 و LBH01 بالأشعة UV-B أكثر من UV-A خلال ساعة واحدة من التعرض (Pham *et al.*, 2024). بينما انخفض عيار العاثية P421 ببطء عند تعرضها للأشعة UV-B خلال أول 30 دقيقة، ثم بدأ في الانخفاض بسرعة بعد ذلك، ولم تكن أي جسيمات عاثية قابلة للكشف بعد 80 دقيقة (Vu *et al.*, 2024) . وعند التعرض للأشعة UV-A لوحظ انخفاض قدره $2.1 \log_{10}$ PFU/mL للعاثية PHB09 بعد 60 دقيقة (Liu *et al.*, 2021) . وفي دراسة مختلفة، وُضعت العاثيتان Fifi044 و Fifi318 تحت جهاز محاكاة شمسي من الفئة ABB لمدة 6 ساعات، أظهرت العاثية Fifi044 انخفاضاً من $7.2 \log_{10}$ PFU/MI إلى $5.4 \log_{10}$ PFU/ML ، بينما انخفضت العاثية Fifi318 بمقدار $1 \log_{10}$ PFU/mL فقط خلال نفس الفترة (Kim *et al.*, 2024_b) . كذلك، عندما حُضنت العاثية AS-D تحت ضوء الشمس المباشر، سُجل انخفاض قدره $2.3 \log_{10}$ PFU/mL (Duarte *et al.*, 2018).

الغصد الثالث

المواد والطرائق

MATERIAL &

METHODS

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مخبر الأحياء الدقيقة ومخبر الدراسات العليا والبحث العلمي في كلية الطب البيطري بجامعة حماه في الفترة الواقعة ما بين 2024 /4/2 و 2025/11/15 واستخدمت فيها المواد الآتية:

3-1. المواد:

3-1-1. العينات:

جمعت العينات لإجراء الدراسة من مناطق مختلفة في محافظة حماة في الفترة ما بين 2024/4/2 إلى 2024/12/23 وبقوة 60 عينة على شكل مسحات شرجية من عجول مصابة بالإسهال تتراوح أعمارها من 1يوم إلى 6 أشهر ووضعت المسحات في الأنبوب الخاص حيث يحتوي على ماء البيتون ثم تم نقل العينات إلى المختبر في نفس اليوم لإجراء الاختبارات.

3-1-2. الأجهزة المستخدمة Apparatus using:

استخدمت في هذه الدراسة الأجهزة الموضحة في الجدول (3-1):

الجدول رقم (3-1): الأجهزة المستخدمة في الاختبارات

الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
Yamato (Japan)	Incubator	(1) حاضنة
Memmert (Germany)	Oven	(2) فرن حراري كهربائي
Labinco	Magnetic stirrer	(3) مقلاب مغناطيسي
Memmert (Germany)	Water bath	(4) حمام مائي
Nikon (Japan)	Microscope	(5) مجهر ضوئي
Sartorius (Japan)	Sensitive balance	(6) ميزان حساس
Techne	Thermo cycler	(7) المدور الحراري
	Refrigerator	(8) ثلاجة

Benchmate	Micropiptis	ماصات دقيقة	(9)
Yamato (Japan)	Autoclave	مؤسسة	(10)
Exelo (England)	Distiller	جهاز تقطير	(11)
Sanyo (Japan)	Laminar Flow	كبينة الزرع الجرثومي	(12)
Spectronic (USA)	Spectrophotometer	المطياف الضوئي	(13)
Kubota (Japan)	Centrifuge	متقلة	(14)

3-1-3. الأوساط المزرعية :

استخدمت في هذه الدراسة الأوساط المزرعية الموضحة في الجدول (2-3):

الجدول رقم (2-3): الأوساط المزرعية المستخدمة في الاختبارات

الشركة المصنعة	الاستخدام	اسم الوسط او المادة	ت
HiMedia (India)	لعزل الإشريكية القولونية	آغار ماكونكي	1.
HiMedia (India)	تعداد جراثيم (EHEC)	آغار ماكونكي سوربيتول	2.
HiMedia (India)	تنشيط العزولات الجرثومية	المرق المغذي	3.
HiMedia (India)	تنشيط العزولات الجرثومية	نقيع القلب والدماغ	4.
HiMedia (India)	تنقية الإشريكية القولونية	الآغار المغذي	5.
HiMedia (India)	وسط تكثير أولي	وسط ماء البيبتون	6.
HiMedia (India)	لعزل الإشريكية القولونية	وسط EMB	7.
HiMedia (India)	لاختبار الحساسية للمضادات الحيوية	وسط مولر هينتون	8.

3-2. طرائق البحث:

القسم الجرثومي:

3-2-1. عزل جراثيم الإشريكية القولونية:

زرعت العينات على وسط ماكونكي وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم اختيرت عدة مستعمرات مخمرة للاكتوز (تظهر بلون وردي) وزرعت على وسط EMB وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة واختيرت المستعمرات الخضراء ذات اللمعة المعدنية (Quinn *et al.*, 2011)

3-2-2. دراسة الخواص المزرعية والشكلية والتلوينية:

دُرست الخصائص المزرعية للمستعمرات على آغار الماكونكي وآغار EMB. كما تم دراسة الخصائص الشكلية والتلوينية للخلايا الجرثومية من خلال تلوينها بطريقة غرام (Macfaddin, 2000).

3-2-3. تنقية العزلات وحفظها:

نُقلت بعض العزلات النامية من أوساط الزرع إلى وسط الآغار المغذي بواسطة ناقل معقم وبشكل تخطيط Streaking ثم حضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة حيث تمت مرحلة التنقية بنقل العزلات المنقاة لثلاث مرات متتالية.

وبعد تنقية المستعمرات تمت المحافظة على العزلات الجرثومية في المرق المغذي إذ حضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة وبعدها حفظت في الثلجة إلى أن يتم إجراء الاختبارات عليها مع مراعاة تجديد الزرع كل (1-3) أشهر (Collee *et al.*, 1996).

3-2-4. دراسة الخواص الكيمياءحيوية:

تم استخدام العتيدة (KB003) Hi25™ Enterobacteriaceae Identification Kit لإجراء الاختبارات

الكيمياء حيوية وذلك باتباع تعليمات الشركة المصنعة:

إذ تم تنمية عزولات الإشريكية القولونية في وسط BHI Broth وحضنت عند 35-37°C لمدة 6 ساعات

حتى تصل العكارة إلى OD 0.1 عند 620 نانومتر، ثم تم تلقيح كل بئر بـ 50 ميكرو لتر من المعلق

الجرثومي المحضرة باستخدام طريقة التلقيح السطحي، وحضنت المساطر البيولوجية بدرجة حرارة 37 م° لمدة

24 ساعة، ثم أُضيفت الكواشف المرفقة للاختبارات التي تحتاج كواشف، وقورنت التغيرات اللونية في الآبار

مع جداول تفسير النتائج المرفق. جدول رقم (3-3)، جدول رقم (3-4).

جدول رقم (3-3) يظهر تفسير نتائج الاختبارات الكيمياءحيوية للعتيدة

Hi25™ Enterobacteriaceae Identification Kit (KB003) Strep 1

Strip I	Result Interpretation chart					
No	Test	Reagent to be added after incubation	Principle	Original colour of the medium	Positive reaction	Negative reaction
1	ONPG	—	Detects β -galactosidase activity	Colourless	Yellow	Colourless
2	Lysine utilization	—	Detects Lysine decarboxylation	Olive green to Light Purple	Purple / Dark Purple	Yellow
3	Ornithine utilization	—	Detects Ornithine decarboxylation	Olive green to Light Purple	Purple / Dark Purple	Yellow
4	Urease	—	Detects Urease activity	Orangish yellow	Pink	Orangish yellow
5	Phenylalanine Deamination	2-3 drops of TDA reagent	Detects Phenylalanine deamination activity	Colourless	Green	Colourless
6	Nitrate reduction	1-2 drops of sulphanic acid and 1-2 drops of N, N- Dimethyl-1-Naphthylamine	Detects Nitrate reduction	Colourless	Pinkish Red	Colourless
7	H ₂ S production	—	Detects H ₂ S production	Orangish yellow	Black	Orangish yellow
8	Citrate utilization	—	Detects capability of organism to utilize citrate as a sole carbon source	Green	Blue	Green
9	Voges Proskauer's	1-2 drops of Baritt reagent A and 1-2 drops of Baritt reagent B	Detects acetoin production	Colourless / Light Yellow	Pinkish red	Colourless/ slight copper
10	Methyl red	1-2 drops of Methyl red indicator	Detects acid production	Colourless	Red	Yellowish- orange
11	Indole	1-2 drops of Kovac's reagent	Detects deamination of tryptophan	Colourless	Pinkish Red	Colourless
12	Malonate utilization	—	Detects capability of organism to utilize sodium malonate as a sole carbon source	Light green	Blue	Light green

جدول رقم (3-4) يظهر تفسير نتائج الاختبارات الكيمياءحيوية للعتيدة

Hi25™ Enterobacteriaceae Identification Kit (KB003) Strep 2

Strip II		Result Interpretation chart			
No	Test	Principle	Original colour of the medium	Positive reaction	Negative reaction
13	Esculin hydrolysis	Esculin hydrolysis	Cream	Black	Cream
14	Arabinose	Arabinose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
15	Xylose	Xylose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
16	Adonitol	Adonitol utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
17	Rhamnose	Rhamnose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
18	Cellobiose	Cellobiose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
19	Melibiose	Melibiose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
20	Saccharose	Saccharose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
21	Raffinose	Raffinose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
22	Trehalose	Trehalose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
23	Glucose	Glucose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
24	Lactose	Lactose utilization	Pinkish Red / Red	Yellow	Red / Pink
25	Oxidase	Done on Oxidase disc separately. Detects cytochrome oxidase production.	Colourless	Deep purple within 10 seconds	White/ Purple after 60 seconds

3-2-5. اختبار الحساسية للمضادات الحيوية:

زُرعت جراثيم الإشريكية القولونية بطريقة النشر على آغار مولر - هنتون Muller- Hinton Agar

الخاص باختبار الحساسية للمضادات الحيوية، إذ تم تحضير معلق جرثومي بعبارة تقدر بـ 0.5 ماكفرلانند حيث غُمست ماسحة قطنية معقمة في معلق الجراثيم و استخدمت المسحة لزراعة السطح الجاف لطبق آغار مولر- هينتون وثُركت الأطباق الملقحة على سطح مستوٍ لمدة 3-5 دقائق لتجف، بعد ذلك، وُضعت أقراص الحساسية المنفردة Antibiotic Unidisc واستخدمت المضادات الحيوية المجهزة بالتراكيز والرموز التالية المبينة في الجدول رقم (3-5).

حُضن الوسط في درجة (37)°م لمدة (24) ساعة وتم تحديد درجة الحساسية أو المقاومة عن طريق قياس قطر منطقة التثبيط (الهالة) الصافية الظاهرة بوضوح حول كل قرص مضاد حيوي. وتم تفسير النتائج طبقاً للمعايير التي وضعها معهد المعايير السريرية والمخبرية (CLSI, 2025).

جدول رقم (3-5): أقرص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية لجراثيم الإشريكية القولونية

اسم المضاد الحيوي	الرمز	التركيز ($\mu\text{g}/\text{disc}$)
Ampicillin	Am	(10) μg
Ceftiofur	Cef	(30) μg
Ciprofloxacin	Cip	(5) μg
Enrofloxacin	Enr	(5) μg
Streptomycin	S	(10) μg
Gentamicin	Gen	(10) μg
Neomycin	N	(30) μg
Oxytetracycline	TE	(30) μg
Doxycycline	Do	(30) μg
penicillin G	P	(25) μg
Amoxicillin	Ax	(25) μg
Trimethoprim	Tm	(5) μg
Sulfamethoxazole	Su	(30) μg

3-2-6. الكشف عن بعض جينات الفوعة :

تم الكشف عن بعض عوامل الفوعة الجرثومية من خلال الكشف عن الجينات المسؤولة عنها باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد وفق ما يلي:

حضر قالب الـ DNA بنقل مستعمرة مفردة من العزولات النقية إلى 50 ميكروليتر من الماء المقطر ، ووضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 100م لمدة 10 دقائق، ونبذت الأنابيب من بسرعة 12000 G لمدة 10 دقائق ونقل السائل الطافي إلى أنابيب إندروف جديدة واستخدم هذا السائل كقالب DNA في تفاعل البوليميراز المتسلسل (Cengiz and Adiguzel, 2020). للكشف عن جينات الفوعة (, eae, sta, stx₁,stx₂,K99) وذلك باستخدام برايمرات نوعية من شركة (Macrogen, South Korea) لتضخيم تسلسل محدد من كل جين من جينات عوامل الفوعة حسب ما هو موضح بالجدول رقم (3-6).

جدول رقم (3-6): تسلسل البرايمرات المستخدمة للكشف عن جينات الفوعة في الإشريكية القولونية

Virulence factor		Primer sequence 5'-3'	Size of product (bp)	References
<i>k99 (f 5)</i>	F	TATTATCTTAGGTGGTATGG	314	(Cengiz & Adiguzel, 2020)
	R	GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTC		
<i>sta</i>	F	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGT A	190	
	R	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGT AA		
Intimin (eaeA)	F	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	425	
	R	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA		
<i>stx1</i>	F	TTCGCTCTGCAATAGGTA	555	
	R	TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT		
<i>stx2</i>	F	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC	118	
	R	AGGGGTCGATATCTCTGTCC		

كما وتم تحضير مزيج التفاعل كما هو موضح في الجدول رقم (3-7) وتم استخدام شواهد سلبية في كل مجموعة اختبار (الشاهد السلبي هو جميع مكونات التفاعل باستثناء قالب الـ DNA)

جدول رقم (3-7): مكونات مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل (Cengiz & Adiguzel, 2020)

المكونات	الحجم
PCR Buffer	2.5 µl
dNTPs	0.5µl
<i>Taq</i> polymerase	0.5µl
MgCl ₂	1.5µl
F primer (10 pmol/µl)	0.5 µl each one
R primer (10 pmol/µl)	0.5 µl each one
Template DNA (heated)	3 µl
RNase, Dnase free distilled water	12 µl
Total volume	25 µl

وتم اجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد باتتباع البرامج التالي الموضح في الجدول رقم (3-8):

الجدول رقم (3-8): برمجة المدور الحراري من أجل تفاعل البوليميراز المتسلسل

(Cengiz & Adiguzel, 2020)

Primary Denaturation (one cycle)	Amplification (30 cycles)			Final Extension
	Secondary Denaturation	Annealing	Extention	
94 C° 3 min	94 C° 30 sec	50 C° 45sec	72 C° 1.5 min	72 C° 10 min

وقد تم الكشف عن نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل بالرحلان الكهربائي في هلامة الآغاروز 2% والمضاف له صبغة الإثيديوم برومايد بتركيز 1 ميكروغرام /مل في دائرة TBE التي تم ذكر مكوناتها في الجدول رقم (3-9) ، وتم الرحلان لمدة 30 دقيقة وشدة 100 فولت، ثم نقلت هلامة الآغاروز إلى نظام التطهير بالأشعة فوق البنفسجية (UVipro Platinum) المزودة بكاميرا ومرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية وموصول بجهاز الحاسوب، وفحصت الصور من أجل وجود أنطقة الـ DNA (DNA Bands) ذات أطوال جزيئية مطابقة لكل جين من جينات عوامل الفوعة المختبرة حسب ما هو مذكور في الجدول رقم (3-6) وذلك مقارنة مع معلم الوزن الجزيئي (DNA Ladder).

جدول رقم (3-9) مكونات دائرة الرحلان TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer)

(قاسم وسكرية، 2012)

المادة	الكمية
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-base)	30.25 g
Boric acid	15.45 g
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	1.85 g
Water as	500 ml

القسم الفيروسي:

3-2-7. جمع العينات لعزل العاثيات:

جُمعت عينات لعزل فيروسات العاثيات الجرثومية من مصادر بيئية مختلفة (مستنقعات، أرضية الحظائر، التربة) ونقلت إلى المختبر حيث تم مزج العينات الصلبة ب 100 مل من ماء البيتون ورشح المزيج باستخدام ورق ترشيح ثم تم إجراء طرد مركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة من أجل التعجيل في تجميع الأجزاء الكبيرة ومن ثم التخلص منها، ثم أخذ الرائق ورشح بواسطة مرشحات جرثومية ذات مسام بحجم 0.45 ميكروميتر ، 0.22 ميكروميتر على التوالي .
ثم حُفظ السائل الخالي من الجراثيم في زجاجات معقمة كمصدر لعزل الفيروسات العاثية بدرجة حرارة 4 م حتى الاستخدام (Beaudoin *et al.*,2007).

3-2-8. تجهيز جراثيم الـ *E. coli* كثوي مضيف (Propagation hosts) من

أجل زيادة أعداد الفيروسات:

تم تنمية سلالات جراثيم الإشريكية القولونية المعزولة من حالات إسهال العجول على المرق المغذي (Nutrient Broth) وتم تحضين الأنابيب عند درجة حرارة 37 م في الحاضنة ، وتم استخدام هذه الجراثيم كوسط غذائي مضيف لتكاثر الفيروسات ومن أجل زيادة عدد العاثيات الجرثومية (Alexyuk *et al.*, 2022).

3-2-9. إغناء عينات العاثية الجرثومية:

تم تجهيز قوارير زجاجية سعة 250 مل تحتوي على 100 مل من وسط المرق المغذي المدعم ببنترات الكالسيوم 0.05% وتم تعقيمها باستخدام الموصدة حيث إن أيونات الكالسيوم (Ca^{++}) تزيد من ارتباط العاثيات بالخلايا الجرثومية مما يقلل عدد العاثيات الحرة كما يزيد من نفاذية غشاء الخلية الجرثومية مما يسهل عملية حقن الـ DNA (Zhang *et al.*,2020, Bonhivers and Letellier.,1995).

تم أخذ 1 مل عالق جراثيم (الإشريكية القولونية) في طور نموها اللوغاريتمي (18 ساعة) المحضرة في الفقرة (3-2-8) وخلطت مع 25 مل من عينات العاثية المحضر في الفقرة (3-2-7) لكل سلالة من الجراثيم كل على حدى ومزجها في القوارير، وتم تحضينها بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة مع التحريك المستمر للقوارير وبعد انتهاء التحضين تم تنقيتها بسرعة 10000 دورة بالدقيقة لمدة 10 دقائق وتم ترشيح الرائق الطافي باستخدام مرشحات غشائية ذات مسام بحجم 0.45 ميكروميتر ، 0.22 ميكروميتر على التوالي .
 وتم حفظ السائل في أنابيب معقمة لدراسة إمكانية تواجد الفيروسات العاثية (Alexyuk et al., 2022,)
 (Bonilla et al., 2016).

3-2-10. عزل عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية:

استخدمت طريقة الآغار المزدوج لعزل عاثيات الجراثيم إذ تم تحضير اطباق من الآغار المغذي المضاف له نترات الكالسيوم كطبقة رقيقة أولى في أطباق بيتري عقيمة، إذ مُزج 300 ميكرون من عينات رائق العاثيات و300 ميكرون من جراثيم الإشريكية القولونية لكل سلالة كل على حدى، ومُزجت لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 37م مع التحريك المستمر، ثم أُضيفت إلى 3مل من الآغار نصف الصلب المدعم بنترات الكالسيوم وصُبت كطبقة علوية فوق طبقة الآغار السفلي وتُركت حتى التصلب ثم حُضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة وعند انتهاء فترة الحضان تم ملاحظة مناطق تثبيط للنمو لويحات التحلل (Lytic zone or plaques) دلالة على وجود العاثية الجرثومية (Santos et al., 2009; Pallavali et al., 2017).
 وسجلت نسبة انتشار العاثيات في البيئة لكل سلالة.

3-2-11. تنقية العاثية الجرثومية:

تم تنقية 3 عزولات لعاثيات جراثيم الإشريكية القولونية النزفية المعوية EHEC كل على حدى وذلك لإجراء الاختبارات اللاحقة وفقاً لـ (Sjahriani et al., 2021) إذ يتم نقل اللويحات الفردية (single plaque) باستخدام الناقب الفليني إلى أنبوب معقم يحوي وسط المرق المغذي المدعم بنترات الكالسيوم المضاف له 1مل من جراثيم الإشريكية القولونية المحضر في الفقرة (3-2-8)، ولتحرير العاثيات تم رج الأنابيب

بواسطة المازج لمدة 30 ثانية ، وبعدها تم تحضين القوارير لمدة 48 ساعة عند 37 م ثم تم إجراء طرد مركزي بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقيقة من أجل التعجيل في تجميع الأجزاء الكبيرة ومن ثم التخلص منها، وأعيد التثقيل بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق ، وأخذ الرائق ويرشح بواسطة مرشحات جرثومية ذات مسام بحجم 0.45 ميكروميتر ، 0.22 ميكروميتر على التوالي ثم حفظ بدرجة حرارة 4 م. ثم استخدمت طريقة القطرة (Phage Spot Assay) بهدف التأكد من العاثيات ذات الدورة الضارية، إذ تم تحضير معلق جرثومي من جراثيم الإشريكية القولونية (EHEC) بتركيز يعادل 0.5 ماكفرلاند، ونُشر على آغار مولر-هينتون. ثم وُضعت 10 ميكرولترات من محلول العاثية على شكل قطرة مباشرة على سطح الآغار الملقح. تُركت الأطباق لـ 5 دقائق لامتصاص القطيرات، ثم قلبت وحضنت في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة. بعد انتهاء فترة الحضانة، تمت تنقية اللويحات الشفافة المتكونة بشكل كامل إن وُجدت (Pallavali *et al.*, 2017). ثم كررت هذه العملية عدة مرات بهدف الحصول على عاثيات نقية. وحفظت بدرجة حرارة 4 م.

3-2-12. معايرة العاثيات الجرثومية في المحلول:

تم استخدام طريقة الآغار المزدوج حيث أجريت سلسلة من التخفيفات العشرية وذلك بنقل 100 ميكروليتر من محلول العاثيات إلى 900 ميكروليتر من المرق المغذي ثم تم نقل 100 ميكروليتر من الأنبوب الثاني إلى الأنبوب الثالث وتكررت العملية حتى الحصول على عدة تخفيفات عشرية ، ثم تم مزج 300 ميكروليتر من كل محلول تخفيف مع 300 ميكروليتر من محلول جراثيم الإشريكية القولونية في الطور اللوغاريتمي (بعمر 18 ساعة) وتم التحريك لمدة 10 دقائق ثم أُضيفت إلى 3 مل من الآغار المغذي نصف الصلب الذي يصب فوق طبقة الآغار الأولى كما هو موضح في الصورة رقم (3-1) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ، وتم اختيار الأطباق التي تراوح فيها عدد اللويحات بين 100 - 200 لويحة (Pallavali *et al.*, 2017) وتم حساب معيار العاثية الجرثومية بوحدة plaque forming unit (PFU):

$$\text{PFU/ml} = \frac{N}{V \times D}$$

=N = عدد اللويحات ، =V = حجم العائثة المضاف ، =D = التخفيف

(Kropinski *et al.*, 2009)



صورة رقم (3-1): تظهر طريقة صب الطبقة الثانية في طريقة تقنية الآغار المزدوج

3-2-13. حفظ عينات العائثات الجرثومية:

تم حفظ محلول العائثات المعايير في أنابيب زجاجية معقمة ذات غطاء محكم عند درجة حرارة 4 م (Garbe, 2010) وسجل عليها تركيز عيار العائثي.

3-2-14. دراسة ثباتية العائثة للتغير بقيم الـ pH:

تم تقييم استقرار عائثات الجرثائم عند مستويات حموضة مختلفة وفقاً للخطوات التالية:

3-2-14-1. تحضير محاليل الأس الهيدروجيني (pH):

تم تحضير سلسلة من محاليل الملح المعقمة (0.85%) وضبطها عند قيم 3، 5، 7، 8، 10 (±0.05) باستخدام حمض الهيدروكلوريك (HCl 5 M) أو هيدروكسيد الصوديوم (NaOH 5 M).

3-2-14-2. تعريض العاثية لظروف الأس الهيدروجيني المتنوعة:

أضيف معلق العاثية المنقاة بتعداد $9.5 \log_{10}$ PFU/mL إلى كل محلول بتركيب 99:1 (محلول:عاثية) و حُضنت العينات عند 37°C لمدة ساعة واحدة (Bagiriska *et al.*, 2024).

3-2-15. دراسة ثباتية العاثية للتغير في درجات الحرارة:

3-2-15-1. تجميد الفيروسات عاثيات الجراثيم:

تم تخزين عاثيات الجراثيم بتجميدها بدرجة حرارة -20°C في وسط BPS وتم اختبار حفظها لفترات مختلفة (1 شهر، 3 أشهر، 6 أشهر، 6 أشهر بإضافة الغليسيرين بتركيز 20%) (Aşıhoğlu and Ayaz, 2023).

3-2-15-2. تبريد العاثيات:

تم تخزين العاثيات بوضعها في وسط BPS عند 4 درجات مئوية لمدة (7 يوماً، 30 يوماً، و 3 أشهر، 6 أشهر) (Alvi *et al.*, 2018).

3-2-15-3. تسخين الفيروسات:

تم دراسة تأثير التسخين عند 45 درجة مئوية (لمدة 1 ساعة) وعند 55 درجة مئوية (لمدة 1 ساعة) وعند 65 درجة مئوية (لمدة 1 ساعة) و عند 100 درجة مئوية لمدة (5 دقائق) على بقاء عاثيات الجراثيم وفعاليتها. (El-Tarabily *et al.*, 2019).

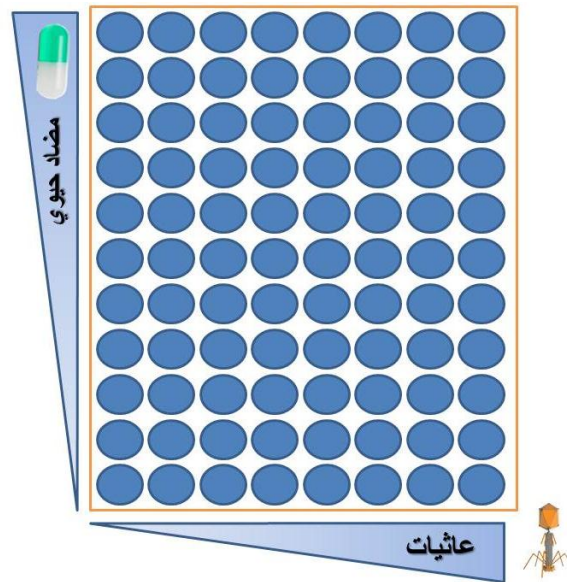
3-2-16. دراسة ثباتية العاثية للأشعة فوق البنفسجية (UV):

تم تعريض فيروسات العاثيات للأشعة فوق البنفسجية وذلك بوضع محلول العاثيات في طبق بيتري بطبقة رقيقة على مسافة 30 سم من مصباح UV-C لمدة (30 ثانية، 60 ثانية، 90 ثانية، 120 ثانية). (Jo *et al.*, 2023)

3-2-17. دراسة التأثير التآزري للعائية الجرثومية مع المضادات الحيوية على

جراثيم (EHEC):

تم اختبار 3 عزولات من عاثيات جراثيم EHEC باستخدام طريقة رقعة الشطرنج لدراسة التآزر حيث تم مزج عاثيات الإشريكية القولونية مع ثلاث مضادات حيوية كل على حدى وبتراكيز متزايدة لكل من العاثيات والمضادات الحيوية وتطبيقها على جراثيم الإشريكية القولونية بتعداد 10^6 CFU/mL باستخدام اطباق الميكروتايتز في وسط المرق المغذي (Alexyuk et al., 2025)، الشكل رقم (3-1) كما تم حساب تأثير التآزر وذلك بحساب تعداد جراثيم الإشريكية القولونية بعد حضانة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م° وذلك بإجراء سلسلة من التخفيفات العشرية ثم نشر على اطباق EMB لتعداد جراثيم الإشريكية القولونية (Cheesbrough, 1985)، كما تم تعداد عاثيات الجراثيم في الحفر حسب الطريقة الموضحة في الفقرة (2-3-12).



الشكل رقم (3-1): طريقة رقعة الشطرنج على طبق ميكروتايتز لحساب تأثير التآزر

Fractional Bactericidal Concentration Index (FBCI) كما تم حساب مؤشر التركيز القاتل الكسري وذلك بتطبيق المعادلة التالية:

$$FBCI = \frac{MBC_{A+Ph}}{MBC_A} + \frac{MBC_{Ph+A}}{MBC_{Ph}}$$

حيث أن:

- MBC_{A+Ph} : الحد الأدنى للتركيز القاتل (MBC) للمضاد الحيوي عند استخدامه مع العائثي.
- MBC_A : الحد الأدنى للتركيز القاتل (MBC) للمضاد الحيوي عند استخدامه وحده.
- MBC_{Ph+A} : الحد الأدنى للتركيز القاتل (MBC) للعائثية عند استخدامه مع المضاد الحيوي.
- MBC_{Ph} : الحد الأدنى للتركيز القاتل (MBC) للعائثية عند استخدامه وحده.

وتفسر النتيجة :

- $FBCI \leq 0.5$: تأثير تآزري (Synergy) في القتل الجرثومي.
- $0.5 < FBCI \leq 1$: تأثير إضافة (Additive) في القتل الجرثومي.
- $1 < FBCI \leq 2$: عدم تفاعل (No Interaction)
- $FBCI > 2$: تأثير مضاد (Antagonism)

(Moody, 2004)

3-2-18. دراسة فعالية العلاج بالعائثيات داخل الجسم الحي:

3-2-18-1. حساب الجرعة المعدية لنصف حيوانات التجارب ID_{50} :

3-2-18-1-1. حيوانات التجربة:

تم إجراء التجربة على أرانب محلية بعمر يتراوح بين (6-8) أسابيع وتم استخدام (30) أرنباً لغرض إجراء التجربة ، ووضعت في أقفاص معدنية نظيفة وهُيئت لها الظروف الطبيعية مع فرش الأرضية بالنشارة الخشبية الناعمة وتركت لمدة أسبوعين للتأقلم وقدم لها العلف الأخضر والمركز وبدرجة حرارة بين (15-22)م° وقبل البدء بالتجربة تم التأكد من خلوها من الأمراض عن طريق الفحص السريري.

3-2-18-2-1-2. تحضير العينة الجرثومية :

تم تنمية جراثيم EHEC على وسط ماكونكي سوربيتول لاختبار نموها عليه (Ritchie *et al.*, 2003)، كما تم تعريض الجراثيم بعد فرشها على طبق مولر هينتون على أشعة UV لمدة 20 ثانية لتبيان وجود مناطق تحلل دليل على وجود عاثية كامنة (Little and Mount, 1982).
ثم تم تنمية عزولة جرثومية نقية من الإشريكية القولونية النزفية المعوية (EHEC) على المرق المغذي لمدة 18 ساعة.

3-2-18-2-3. تحديد تركيز الجراثيم:

تم أخذ 1 مل من المزرعة الجرثومية وقياس الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند OD₆₀₀ بعد تصفير الجهاز باستخدام المرق المغذي الخالي من الجراثيم، كما تم حساب تعداد للجراثيم التي قيست امتصاصيتها باستخدام المعادلة التالية :

$$\text{CFU/ml} = \text{OD}_{600} \times \text{عامل التحويل}$$

حيث أن عامل التحويل للإشريكية القولونية تقريبا يساوي 8×10^8 خلية/مل لكل OD₆₀₀ (Koch, 1994)

بعد ذلك تم إجراء تخفيفات عشرية للعزولة الجرثومية في محلول (PBS) على تراكيز مختلفة (10^5 ، 10^6 ، 10^4 ، 10^3 ، 10^2 CFU/ml) إذ تم الحصول على التخفيف الأول حسب القاعدة $C_1 V_1 = C_2 V_2$.

3-2-18-2-3. عدوى الأرناب بجراثيم (EHEC):

تم تصويم الأرناب لمدة 12-18 ساعة قبل العدوى لتقليل محتوى المعدة وضمان وصول تركيز أفضل للجراثيم، كما تم إعطاء الأرناب 2 مل من محلول بيكربونات الصوديوم (3%) عن طريق الفم قبل 30 دقيقة من العدوى لتحبيد حمض المعدة وزيادة بقاء الجراثيم (Bishop *et al.*, 2014).

حيث قسمت الأرناب إلى 5 مجموعات تضم كل مجموعة 6 أرناب وتم عدوى كل مجموعة بجراثيم EHEC مغسولة ممزوج بـ 3 مل من الحليب منزوع الدسم وذلك باستخدام أنبوب التغذية المطاطي للتخفيفات العشرية التالية (10^2 ، 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 CFU/ml) لكل مجموعة على التوالي.

تمت مراقبة الحيوانات لفترة (7-15 يوم) وتسجيل اي علامات سريرية للمرض أو الوفاة.

ثم تم اتباع طريقة ريد ومينش لحساب الجرعة المعدية لنصف حيوانات التجربة وذلك حسب المعادلة التالية :

$$\text{ID}_{50} = A + \left(\frac{50\% - C}{B - C} \right) \times \log_{10} (D)$$

حيث إن :

A: الجرعة التي تسببت بنسبة عدوى أعلى من 50%

B: النسبة المئوية التراكمية الأعلى من 50%

C: النسبة المئوية التراكمية الأقل من 50%

D: عامل التخفيف (الفرق بين الجرعة الأعلى والأقل من 50%).

(Reed and Muench, 1938)

وتمت مراقبة الحيوانات لمدة 7 – 14 يوم ومراقبة الأعراض السريرية المميزة للمرض.

3-2-18-2. دراسة تأثير العلاج بعائيات جراثيم الإشريكية القولونية على الأرانب المصابة:

بعد تحديد الجرعة النصف معدية والتي بلغت 4.2×10^4 CFU/ml تم إجراء دراسة لتأثير مزيج ثلاث

عزولات من العائيات الجرثومية داخل الجسم الحي ودراسة تأثيرها في علاج الإسهال الناجم عن العدوى

بجراثيم الإشريكية القولونية، إذ تم إجراء التجربة على 38 أرنب وإجريت على الشكل التالي:

تم تقسيم الأرانب إلى 6 مجموعات كالاتي:

المجموعة الأولى: وتضم 6 أرانب وبقيت على حالها دون معالجة أو معاملة كمجموعة سيطرة.

المجموعة الثانية: وتضم 6 أرانب وجرعت مزيج العائيات الجرثومية بجرعة (10^9 PFU/ml).

المجموعة الثالثة: وتضم 8 أرانب وجرعت بجراثيم الإشريكية القولونية بجرعة (5×10^4 CFU/ml).

المجموعة الرابعة: وتضم 6 أرانب أصيبت بالإسهال نتيجة الإشريكية القولونية وعولجت بالعائيات بجرعة

(10^9 PFU/ml).

المجموعة الخامسة: تضم 6 أرانب أصيبت بالإسهال نتيجة الإشريكية القولونية وعولجت بالعائيات بجرعة

(10^7 PFU/ml) بالتآزر مع المضاد الحيوي (neomycin sulphate) بجرعة تحت علاجية 15000

.UI/Kg

المجموعة السادسة: وتضم 6 أرانب أصيبت بالإشريكية القولونية وعولجت بالمعززات الحيوية (Bio-Kult®).

حيث أعطيت العاثيات ممزوجة بالحليب منزوع الدسم وأعطيت بيكربونات الصوديوم 3% قبل العلاج الفموي بـ 30 دقيقة، مع مراعات إعطاء المجموعات الأخرى جرعات مماثلة من البيكربونات والحليب منزوع الدسم. وتمت مراقبة الحيوانات كما أنه قد تم العلاج مع أول ظهور للإسهال في نهاية اليوم الثاني بعد بداية التجربة وتم إجراء سحب عينات الدم في اليوم الثاني والثالث والخامس والسابع والعاشر والخامس عشر من بدء التجربة.

وقد أجري مسحات شرجية للحيوانات بعد ظهور الإسهال وأعيد تشخيصها للتأكد من العزلة المستخدمة بالتجربة.

3-2-18-3-1. مؤشرات الدراسة:

3-2-18-3-1-1. مستوى تركيز البروتين التفاعلي - C-reactive protein (CRP):

تم سحب عينات الدم من الوريد الأذني للأرناب وأجري الطرد المركزي عند 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق لفصل المصل وأجري قياس تركيز CRP باستخدام المناعة الضوئية (Immunoturbidimetry) حسب (Rifai *et al.*, 1999) إذ تعتمد هذه الطريقة على قياس التغير في عتامة (Turbidity) المحلول الناتج عن تكوين معقدات مناعية (Immune Complexes) بين CRP والأجسام المضادة، وكلما زاد تركيز CRP زادت العتامة، حيث تم استخدام كيت جاهز من شركة (AGAPPE DIAGNOSTICS) السويسرية واتبعت تعليمات الشركة المصنعة في تجهيز الاختبار وتم قياسها باستخدام مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) عند طول موجي 540 نانومتر.

3-2-18-3-2. قياس الهابتوغلوبين (Haptoglobin - HP)

تم اتباع طريقة (Dati *et al.*, 1996) إذ تعتمد على ارتباط الهابتوغلوبين بالهيموغلوبين الحر وتقدير

المعقد الناتج. إذ تمت إضافة كمية محددة من الهيموغلوبين البشري المحضر من شركة (Lee

Biosolutions) وبتركيز 0.5mg/ml إلى المصل. إذ يرتبط الهبتوغلوبين مع الهيموغلوبين الحر لتكوين

معقد HP-Hb.

ويتم قياس المعقد بقياس الامتصاص الضوئي على جهاز (Spectrophotometer) عند طول موجي 450 نانومتر. وتم حساب تركيز HP بناءً على كمية الهيموغلوبين المربوط.

3-1-3-18-2-3 قياس السيرولوبلازمين (Ceruloplasmin - CP):

تم اتباع طريقة (Dati et al., 1996) إذ تم قياس النشاط الإنزيمي للسيرولوبلازمين باستخدام ركيزة الفينيلين داي أمين (PDA). وتم خلط 50 ميكرو لتر من المصل مع 1 مل من ركيزة PDA في محلول أسيتات (pH 5.2). ثم تم احتضان الخليط عند 37°م لمدة 30 دقيقة. ثم إضافة 1 مل من حمض الكبريتيك M9 لإيقاف التفاعل وقياس الامتصاصية عند 540 نانومتر وتم حساب تركيز CP بناءً على كمية المنتج المؤكسد.

3-1-3-18-2-3 تعداد جراثيم الإشريكية القولونية في الروث:

تم جمع 1 غ من الروث ومزجه مع 9 مل من محلول PBS ومُزج المحلول جيداً لمدة 5 دقائق ثم أُجري سلسلة من التخفيف للعينات للحصول على التخفيف 10^{-2} وحتى 10^{-6} إذ أخذ 1 مل من العينة المستخلبة في محلول PBS ووضعها في 9 مل من ماء البيبتون الموضوع في الأنابيب الزجاجية ثم ينقل 1 مل من الأخير إلى الأنبوب التالي وهكذا حتى الوصول إلى عدة تخفيف عشرية وأهمل 1 مل الأخير منه، واستخدمت طريقة صب الأطباق (Pour plate) لعد المستعمرات حيث نقل 1 مل من كل تخفيف للعينة المستخدمة كلاقحة إلى طبق بتري معقم ثم صب عليه وسط Sorbitol MacConkey Agar (SMAC Agar) وحرك الطبق حركة رحوية لضمان التجانس؛ وترك الوسط ليتصلب ثم حُضن بدرجة الحرارة 37 م°، واختيرت الأطباق التي يتراوح عدد مستعمراتها بين 30-300 مستعمرة، وحُسب عدد المستعمرات النامية واستخرج العدد الكلي للجراثيم الملوثة للعينات من عدد المستعمرات في الأطباق مضروباً بمقلوب التخفيف

وقيسَ بوحدة CFU (وحدة مشكلة للمستعمرة الجرثومية Colony-forming unit) (Ritchie *et al.*, 2003).

3-2-18-3-1-5. تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية في الروث:

تم إجراء تعداد للعاثيات باستخدام طريقة الآغار مزدوج الطبقة للتخفيفات العشرية المحضرة في الفقرة (3-2-18-3-1-4) (Pallavali *et al.*, 2017).

3-2-19. التحليل الإحصائي:

تم استخدام برنامج Microsoft Excel 2019 وذلك لحساب النسب المئوية، المتوسط الحسابي والانحراف المعياري. وبرنامج padgraph prism لمعالجة البيانات وتشكيل المخططات وكما تم استخدام برنامج spss لحساب الفروق المعنوية بين المجموعات .

الفصل الرابع

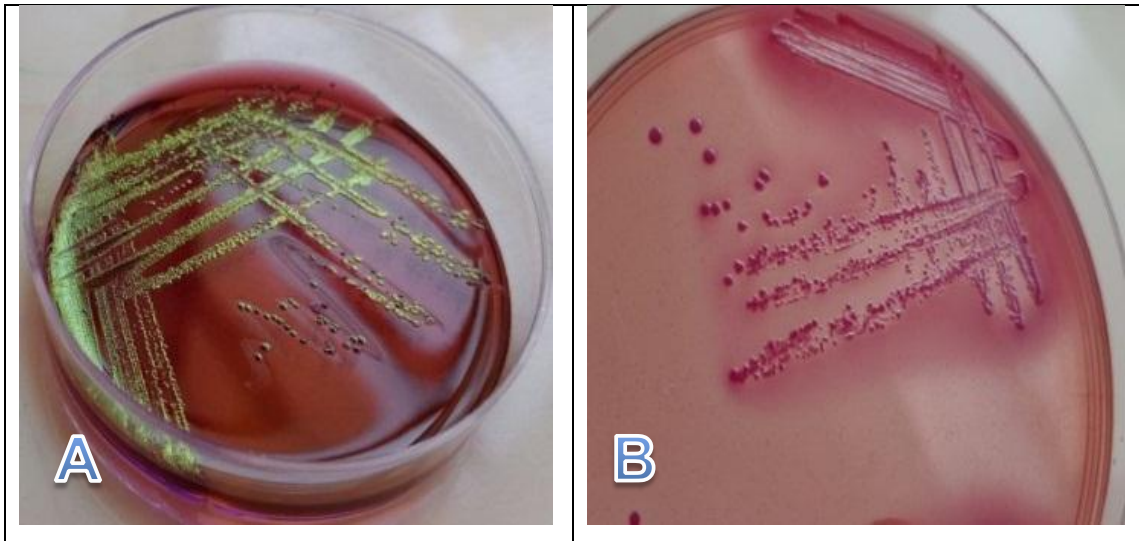
النتائج

RESULTS

النتائج

1-4. عزل وتشخيص جراثيم الإشريكية القولونية:

تم الكشف عن 53 عزولة من جراثيم الإشريكية القولونية بنسبة 88.33% معزولة عن 60 عجلاً مصاباً بالإسهال وذلك بالزرع الجرثومي على المنابت التمييزية والانتقائية الموضحة في الصورة رقم (1-4)، و باستخدام الاختبارات الكيمياحيوية وذلك باستخدام العتيدة Hi25™ Enterobacteriaceae و Identification Kit KB003 وكانت نتائج الاختبارات الكيمياحيوية لعزولات الإشريكية القولونية كما هو مذكور في الجدول (1-4) وموضح في الصورة رقم (2-4). في حين أنه لم يتم عزل الإشريكية القولونية من 7 حالات من العجول المصابة بالإسهال.



صورة رقم (1-4): (A) تظهر جراثيم الإشريكية القولونية على منبت EMB على شكل مستعمرات خضراء ذات لمعة معدنية مسودة ، (B): تظهر جراثيم الإشريكية القولونية على منبت ماكونكي على شكل مستعمرات وردية

الجدول رقم (4-1): نتائج الاختبارات الكيمياءحيوية للإشريكية القولونية المعزولة عن اسهال العجول

Gram Stain	Oxidase	Malonate	Indole	Methyl	Voges-	Citrate	H ₂ S	Nitrate	Phenylala	Urease	Ornithine	Lysine	ONPG
		Lactose	Glucose	Trehalos	Raffinos	Sacchar	Melibios	Cellobio	Rhamno	Adonitol	Xylose	Arabino	Escuin
-	-	+	+	+	d	d	+	-	+	-	+	+	-

+: Positive , - Negative, d: Different



صورة رقم (4-2): (A) تظهر جراثيم الإشريكية القولونية بصبغة غرام على شكل عصيات قصيرة سلبية الغرام ، (B): اختبار الأوكسيداز سلبى ، (C): تظهر نتائج الاختبارات الكيمياءحيوية باستخدام العتيدة (Hi25™ Enterobacteriaceae Identification Kit KB003)

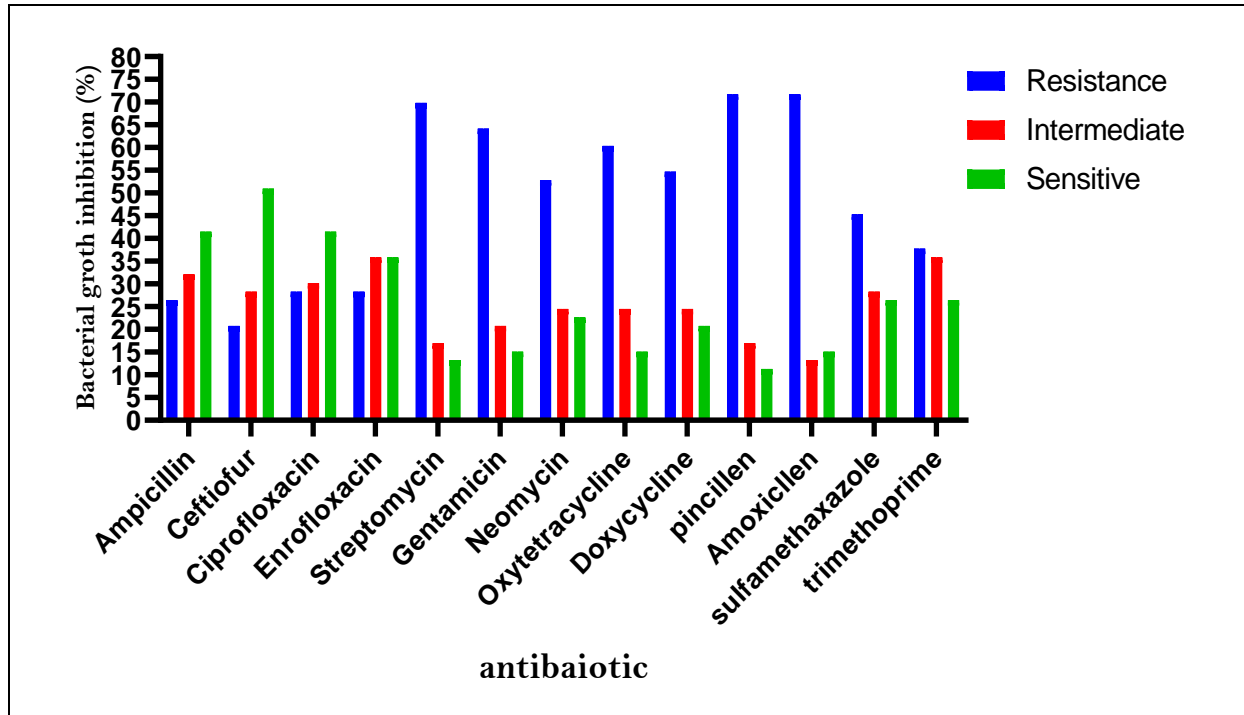
4-2. حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية:

أظهرت نتائج هذه الدراسة مقاومة واسعة للمضادات الحيوية حيث بلغت أعلى نسبة مقاومة للمضاد الحيوي بنسلين ج بنسبة 84.91% ويليه الأموكسيسيلين بنسبة 79.25%، بينما كانت أعلى نسبة حساسية للمضاد الحيوي سيفتي فيور بنسبة 71.70% ويليه السيبروفلوكساسين بنسبة 66.04%.

جدول (2-4)، مخطط (1-4). وبدراسة مقاومة عزولات الإشريكية القولونية حسب فئات المضادات الحيوية تبين أن 92.45% من ذراري الإشريكية القولونية المعزولة تنتمي إلى مجموعة الجراثيم ذات المقاومة المتعددة للأدوية (Multidrug-Resistant) MDR كما أنه بلغت ذراري STEC أعلى نسبة من مجموعة الجراثيم المقاومة المتعددة للأدوية MDR جدول رقم (3-4).

جدول رقم (2-4): نتائج اختبار حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية

مقاومة	متوسط الحساسية	حساسية	المضاد الحيوي
% 26.42	% 32.08	% 41.51	Ampicillin
% 7.55	% 20.75	% 71.70	Ceftiofur
% 16.98	% 16.98	% 66.04	Ciprofloxacin
% 28.30	% 35.85	% 35.85	Enrofloxacin
% 69.81	% 16.98	% 13.21	Streptomycin
% 64.15	% 20.75	% 15.09	Gentamycin
% 52.83	% 24.53	% 22.64	Neomycin
% 60.38	% 24.53	% 15.09	Oxytetracycline
% 54.72	% 24.53	% 20.75	Doxycycline
% 84.91	% 13.21	% 1.89	pincillin G
% 79.25	% 16.98	% 3.77	Amoxicillin
% 37.74	% 35.85	% 26.42	Trimethoprim
% 45.28	% 28.30	% 26.42	Sulfamethaxazole



مخطط رقم (1-4): نتائج اختبار حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية

جدول رقم (3-4): توزيع نمط فئة مقاومة المضادات الحيوية لعزلات الإشريكية القولونية

فئات المضادات المقاومة*	MDR		عدد عزولات النمط الجرثومي						
	(%)	n	EPEC	EPEC	EHEC	STEC	EPEC/ EPEC	EPEC/ EHEC	Unknown
β -lactamRs, QRs, AGRs, TETRs, FORs	16.98	9	2	1	2	3	0	0	1
β -lactamRs, , QRs, AGRs, TETRs	7.55	4	1	0	0	3	0	0	0
β -lactamRs, AGRs, TETRs	22.64	12	2	1	2	2	0	0	5
β -lactamRs, TETRs, QRs	1.89	1	1	0	0	0	0	0	0
β -lactamRs, AGRs, TETRs, FORs	26.42	14	2	3	1	4	1	1	2
QRs, AGRs, FORs	1.89	1	0	0	0	0	1	0	0
β -lactamRs, QRs, AGRs	3.77	2	0	1	0	1	0	0	0
β -lactamRs, QRs, AGRs, FORs	5.66	3	0	1	1	0	0	0	1
β -lactamRs, AGRs, FORs	3.77	2	0	0	1	1	0	0	0
QRs, AGRs, TETRs, FORs	1.89	1	0	0	0	1	0	0	0
	92.45	49	8	7	7	15	2	1	9

*العزلة التي أظهرت مقاومة لواحد من مضادات الميكروبات في مجموعة، اعتُبرت مقاومة لتلك المجموعة:

β -lactamRs : مقاومة بيتا-لاكتام، AGRs: مقاومة الأمينوغليكوزيدات، TETRs: مقاومة التتراسايكلين، QRs: مقاومة الكينولونات، FORs: مقاومة لمضادات حمض الفوليك

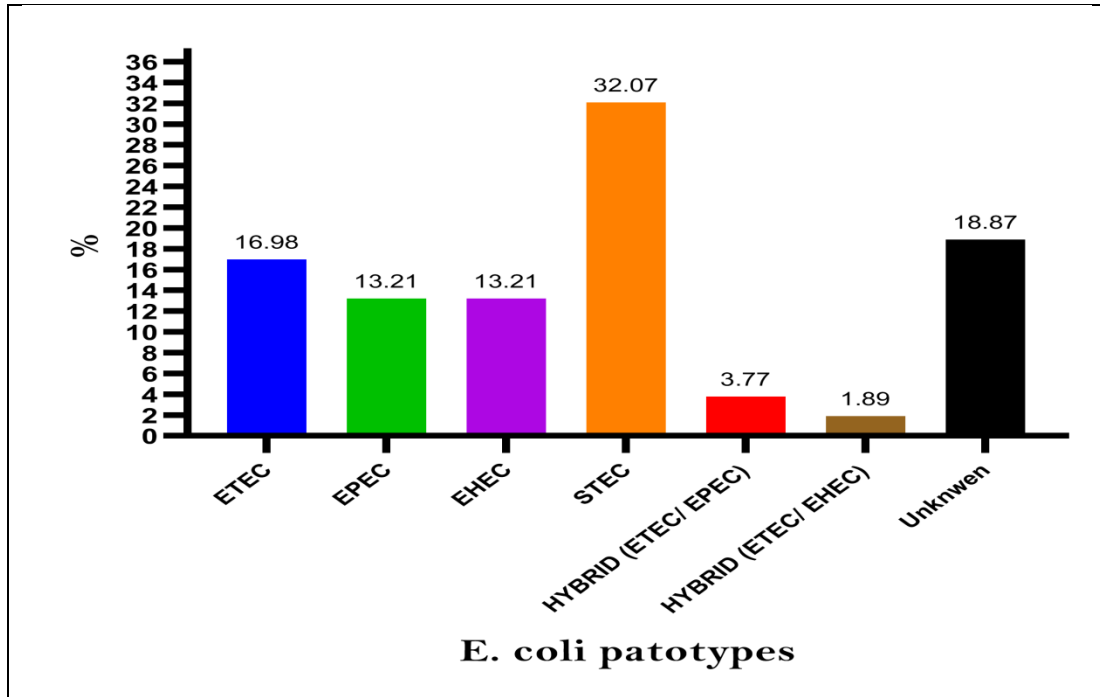
4-3. الكشف عن جينات عوامل الفوعة:

أظهرت نتائج الكشف عن جينات عوامل الفوعة في ذراري الإشريكية القولونية المعزولة عن إسهال العجول أنه تم الكشف عن جين Sta في 22.64% من العزولات كما وجد جين eae في 32.08%، كما وجد أن 35.85% من العزولات تحمل جين Stx₁ أما جين Stx₂ فقد وجد في 16.98% من العزولات، في حين أن جين K99 لم يتم الكشف عنه في أي من العزولات المدروسة، كما أن نسبة 18.87% من العزولات لم تحمل أي من الجينات المدروسة، إذ تظهر الصورة رقم (3-4) نتائج الرحلان الكهربائي والأطوال الجزيئية للجينات، وبدراسة جينات الفوعة المميزة للذري الممرضة للإشريكية القولونية تبين انتشار ETEC بنسبة 16.98% و EPEC بنسبة 13.21% و EHEC بنسبة 13.21% و STEC بنسبة 32.07%، وتم الكشف عن وجود ذراري هجينة للإشريكية القولونية تحمل جينات فوعة تعود لأكثر من ذرية بلغت نسبتها 1.89% تنتمي لـ ETEC/EHEC و 3.77% تنتمي لـ ETEC/EPEC، جدول رقم (4-4)، مخطط رقم (2-4).

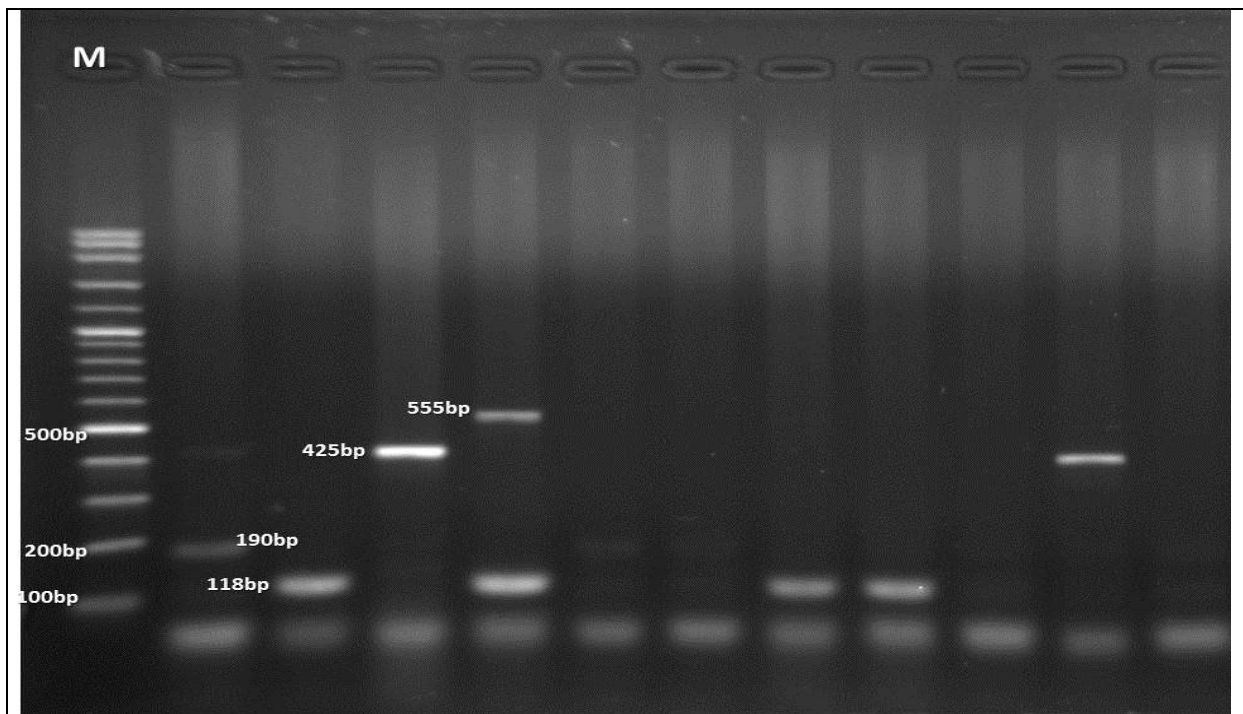
جدول رقم (4-4): نسبة انتشار جينات الفوعة في عزولات الإشريكية القولونية المعزولة عن العجول

المصابة بالإسهال

جين الفوعة	العدد=53	النسبة	النمط المرضي المحتمل
Sta	9	16.98%	ETEC
Sta, eae, stx2	1	1.89%	HYBRID(ETEC/EHEC)
Sta, eae	2	3.77%	HYBRID(ETEC/EPEC)
eae	7	13.21%	EPEC
eae, stx1	7	13.21%	EHEC
Stx1	8	15.09%	STEC
Stx2	5	9.43%	STEC
Stx1, Stx2	4	7.55%	STEC
Negative	10	18.87%	Unknown



مخطط رقم (4-2): نسبة انتشار ذراري الإشريكية القولونية الممرضة في العجول المصابة بالإسهال



صورة رقم (4-3): نتائج الرحلان الكهربائي على هلام الأجاروز لنواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد (multiplex PCR) للكشف عن الجينات stx_1 (555bp)، و stx_2 (118bp)، و $eaeA$ (425bp)، و sta (190bp) في سلالات جراثيم الإشريكية القولونية (*E. coli*) المختلفة. M: تمثل معلم الوزن الجزيئي (100bp).

4-4. انتشار عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية:

تظهر النتائج الموضحة في الجدول رقم (4-5) نسبة انتشار عاثيات ذراري الإشريكية القولونية في البيئة حيث تراوحت نسبة انتشار عاثيات ذراري جراثيم الإشريكية القولونية في أرضية حظائر الأبقار (55 - 80%) بينما تراوحت نسبتها في المستنقعات ما بين (30 - 55%) أما في عينات التربة فقد تراوحت نسبتها بين (20 - 35%) كما تظهر الصورة رقم (4-4) ظهور اللويحات الشفافة على أطباق الآغار المزدوج دليل على وجود العاثيات في مناطق هذه اللويحات.

الجدول رقم (4-5): نسبة انتشار عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية في البيئة

التربة	المستنقعات	أرضية الحظائر	
%25	%50	%75	ETEC
%35	%35	%70	EPEC
%20	%30	%55	EHEC
%25	%55	%80	STEC
%48.33	%75	%100	whole E.coli

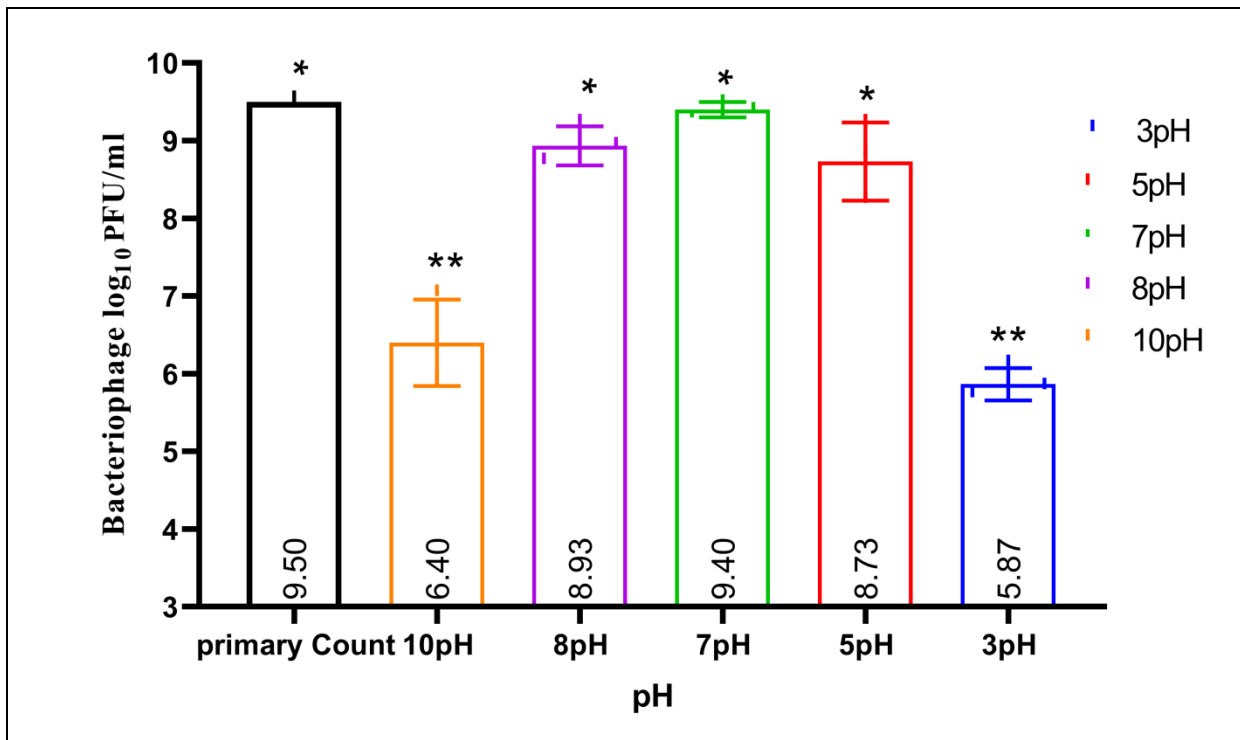


صورة رقم (4-4): تشير الأسهم إلى اللويحات على أطباق الآغار حيث أنها دليل على مكان تواجد العاثيات

4-5. ثباتية العاثية للتغير بـ pH:

أشارت نتائج تقييم ثباتية عاثيات الإشريكية القولونية للتغير في قيم pH إلى انخفاض ملحوظ في الظروف الحامضية والقلوية المتطرفة حيث بينت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) ما بين العاثيات المعرضة لدرجة pH 3 بالمقارنة مع التعداد الأولي للعاثيات كما لوحظ وجود فروق

معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) ما بين العاثيات المعرضة لدرجة pH 10 بالمقارنة مع التعداد الأولي للعاثيات في حين أن الظروف المعتدلة عند درجة pH 7 و الحامضية 5 و القلوية 8 لم تؤثر على سلامة عاثيات الإشريكية القولونية إذ لم يلاحظ فروق معنوية ما بين العاثيات المخزنة في محلول pH 5 و 7 و 8 مقارنة مع التعداد الأولي للعاثيات، حيث يظهر المخطط رقم (3-4) تأثير التغير في درجة pH على سلامة عاثيات الإشريكية القولونية.

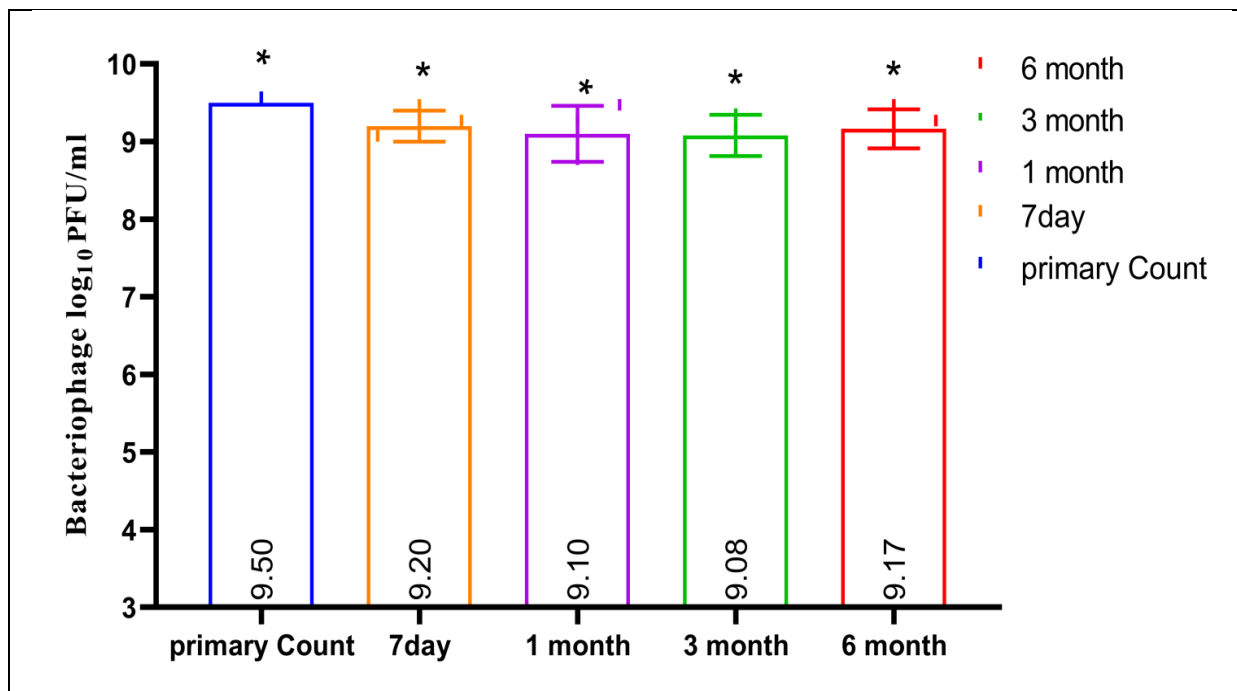


مخطط رقم (3-4): يظهر المخطط تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد تعريضها لدرجات حموضة مختلفة، حيث أشير إلى الفروق المعنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) بالاختلاف بالرمز (*)

4-6. ثباتية العاثية للتغير في درجات الحرارة:

4-6-1. تأثير التبريد:

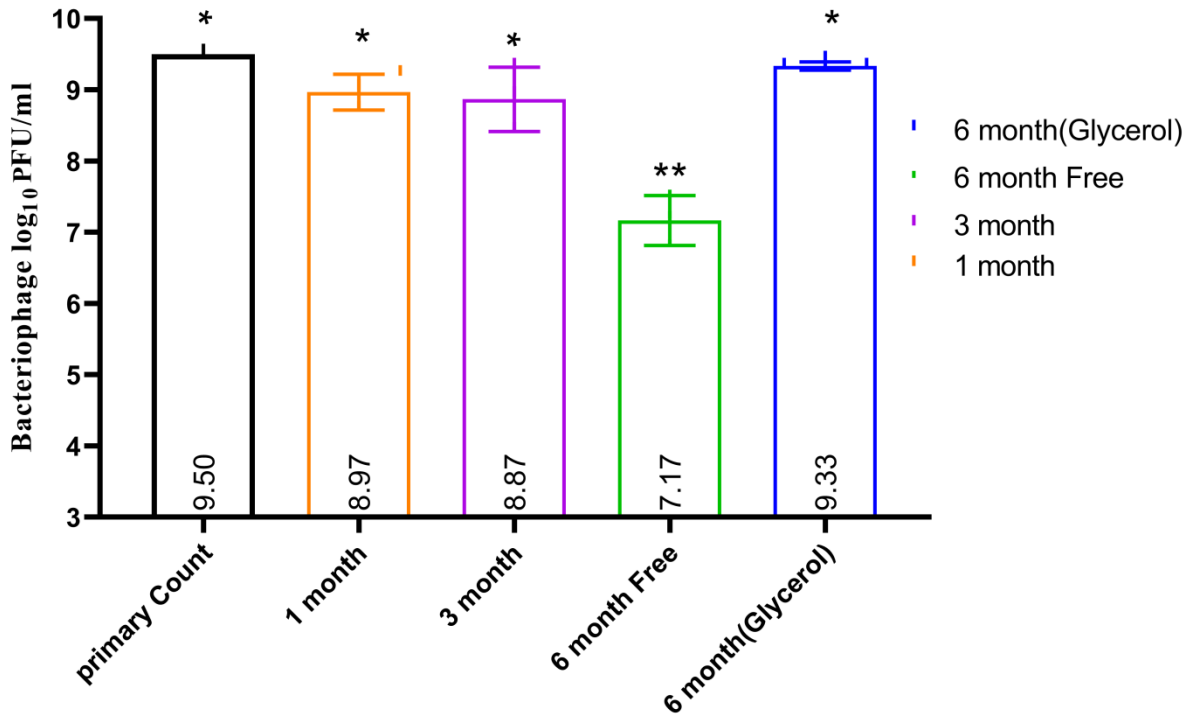
أشارت نتائج تقييم ثباتية عاثيات الإشريكية القولونية للحفاظ بالتبريد بدرجات حرارة 4 م° إلى ثبات معيار عاثيات الإشريكية القولونية خلال الفترات الزمنية المدروسة، إذ بينت الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية ما بين مجموعة العاثيات المحفوظة بالتبريد لمدة تصل إلى 6 أشهر بالمقارنة مع المعيار الأولي للعاثيات، كما هو موضح بالمخطط رقم (4-4).



مخطط رقم (4-4): يظهر المخطط تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد حفظها بالتبريد لفترات مختلفة، حيث أشير إلى الفروق المعنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) بالاختلاف بالرمز (*)

4-6-2. تأثير التجميد:

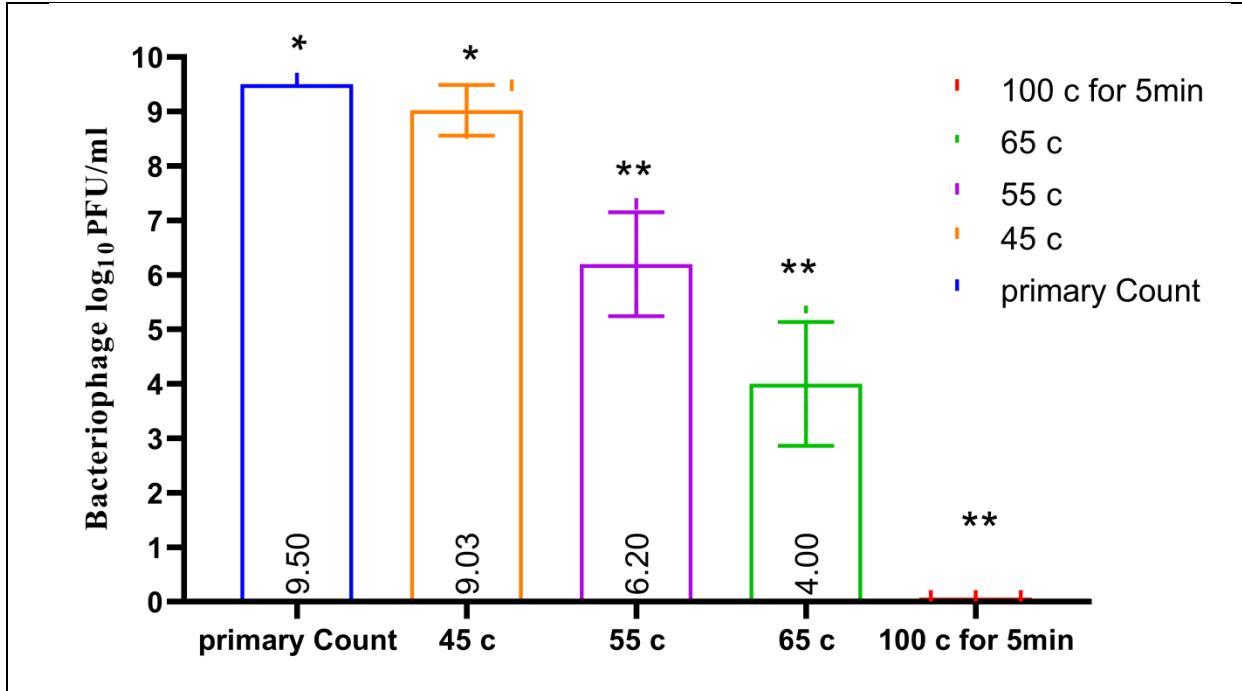
يظهر المخطط رقم (4-5) تأثير حفظ عاثيات الإشريكية القولونية بالتجميد لفترات مختلفة وكذلك تأثير حفظه بإضافة الغليسيرول حيث أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية عند حفظها بالتجميد لفترات (1 شهر، 3 أشهر) بالمقارنة مع التعداد الأولي للعاثيات بينما أشارت النتائج إلى انخفاض تعداد عاثيات الإشريكية القولونية عند حفظها بالتجميد لمدة 6 أشهر إذ أظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى ($P \leq 0.05$) ما بين العاثيات المحفوظة لمدة 6 أشهر بالمقارنة مع التعداد الأولي للعاثيات، كما بينت النتائج أن إضافة الغليسيرول بتركيز 20% إلى محلول الحفظ يؤدي إلى الحفاظ على سلامة العاثيات إذ تبين وجود فروق معنوية عند مستوى ($P \leq 0.05$) ما بين مجموعة العاثيات المحفوظة بإضافة الغليسيرول لمدة 6 أشهر بالمقارنة مع مجموعة العاثيات الغير مضاف لها ومحفوظة لنفس الفترة الزمنية.



مخطط رقم (4-5): يظهر المخطط تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد حفظها بالتجميد لفترات مختلفة ، حيث أشير إلى الفروق المعنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) بالاختلاف بالرمز (*)

4-6-3. تأثير التسخين:

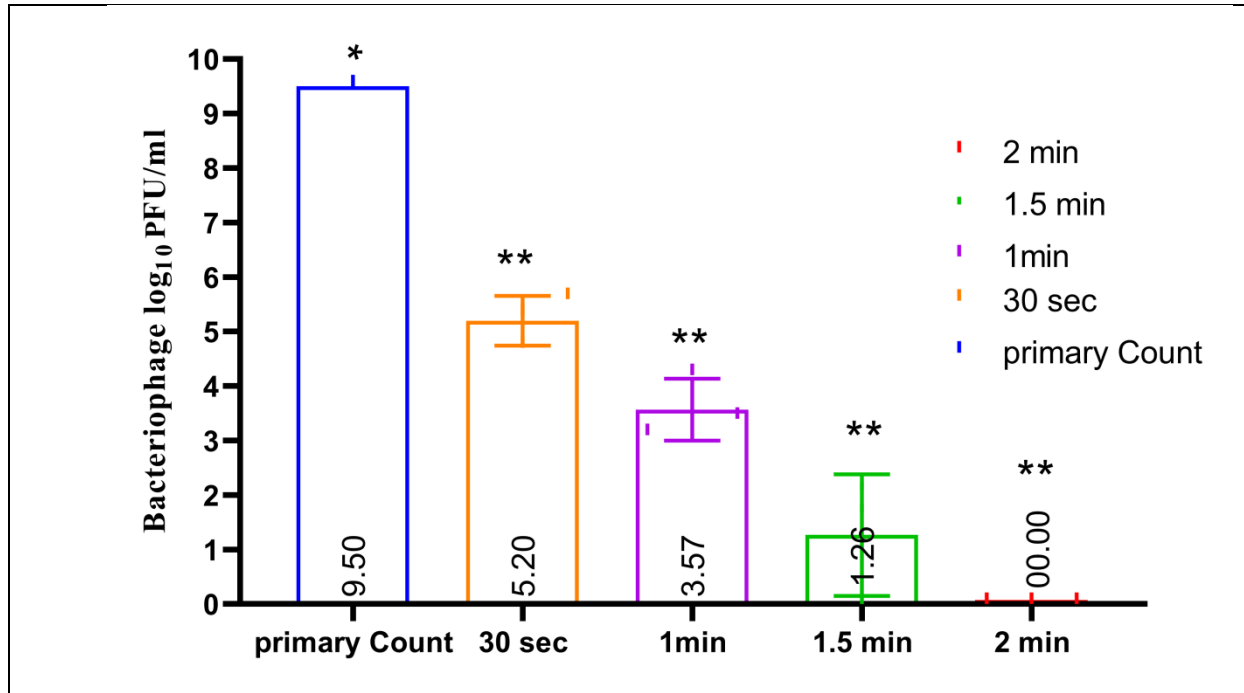
أشارت نتائج تقييم ثباتية عاثيات الإشريكية القولونية للتسخين بدرجات حرارة مختلفة إلى انخفاض تعداد عاثيات الإشريكية القولونية بارتفاع درجة الحرارة إلى 55 م° إذ بينت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) ما بين مجموعة العاثيات المعرضة لدرجة حرارة 55 م° والمعرضة لدرجة حرارة 65 م° والمعرضة لدرجة حرارة 100 م° مقارنة بالتعداد الأولي للعاثيات، في حين لم تلاحظ فروق معنوية ما بين تعداد عاثيات الإشريكية القولونية في المجموعة المعرضة لدرجة حرارة 45 م° بالمقارنة مع التعداد البدئي للعاثيات، كما هو موضح بالمخطط رقم (4-6).



مخطط رقم (4-6): يظهر المخطط تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد تعريضها لدرجات حرارة مختلفة، حيث أشير إلى الفروق المعنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) بالاختلاف بالرمز (*)

4-7. ثباتية العاثيات للتعرض للأشعة فوق بنفسجية:

يظهر المخطط رقم (4-7) نتائج تعريض عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية لأشعة UV لفترات مختلفة حيث انخفض تعداد عاثيات الإشريكية القولونية بازدياد فترة التعرض إذ بينت نتائج الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية عند مستوى ($P \leq 0.05$) ما بين مجموعات عاثيات الإشريكية القولونية المعرضة لأشعة UV والتعداد البدئي للعاثيات، كما أظهرت النتائج أن التعرض لأشعة UV لمدة دقيقتين يقضي على عاثيات الإشريكية القولونية المعرضة بشكل كامل.



مخطط رقم (4-7): يظهر المخطط تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد تعريضها لأشعة UV لفترات مختلفة، حيث أشير إلى الفروق المعنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) بالاختلاف بالرمز (*)

4-8. تأثير تآزر عاثيات الإشريكية القولونية مع المضادات الحيوية:

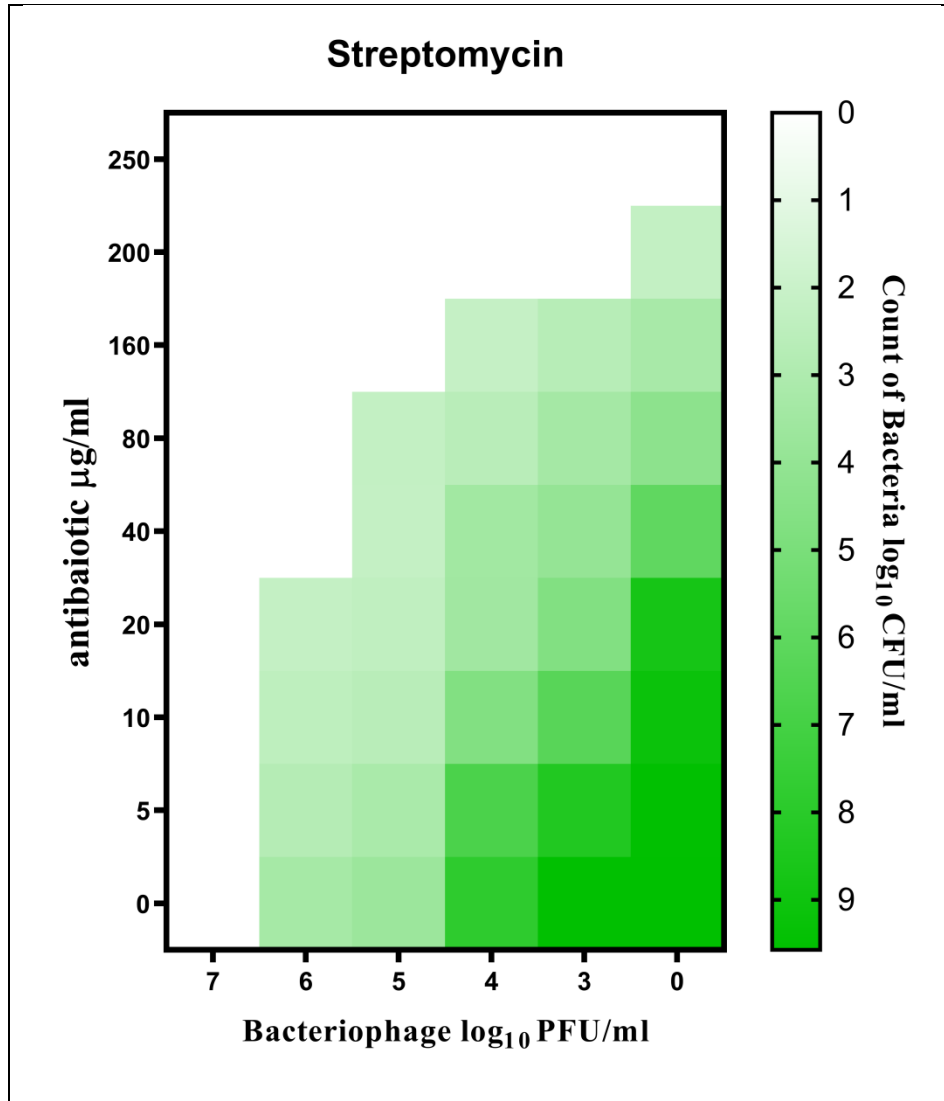
اظهرت نتائج هذه الدراسة وجود فعالية تآزرية ما بين المضادات الحيوية وعاثيات جراثيم الإشريكية القولونية حيث بلغ التركيز القاتل الأدنى في المزيج للمضاد الحيوي الستربتومايسين $40 \mu\text{g/ml}$ والعاثيات $6 \log_{10}/\text{ml}$ ، بينما بلغ التركيز القاتل الأدنى للمضاد الحيوي الستربتومايسين منفرداً $250 \mu\text{g/ml}$ ، وقد بلغ أعلى تعداد لعاثيات الإشريكية القولونية $14.85 \log_{10}/\text{ml}$ بالتآزر مع التركيز $20 \mu\text{g/ml}$ للمضاد الحيوي ستربتومايسين، بينما بلغ أقل تعداد لعاثيات الإشريكية القولونية $3.63 \log_{10}/\text{ml}$ بالتآزر مع التركيز $250 \mu\text{g/ml}$ للمضاد الحيوي ستربتومايسين كما هو موضح في الجدول رقم (4-6)، مخطط رقم (4-8)، مخطط رقم (4-9).

وبحساب مؤشر التركيز القاتل الكسري (FBIC) بلغ 0.26 مما يشير إلى تأثير تآزري قوي بين عاثيات الإشريكية القولونية والمضاد الحيوي الستربتومايسين تجاه جراثيم الإشريكية القولونية.

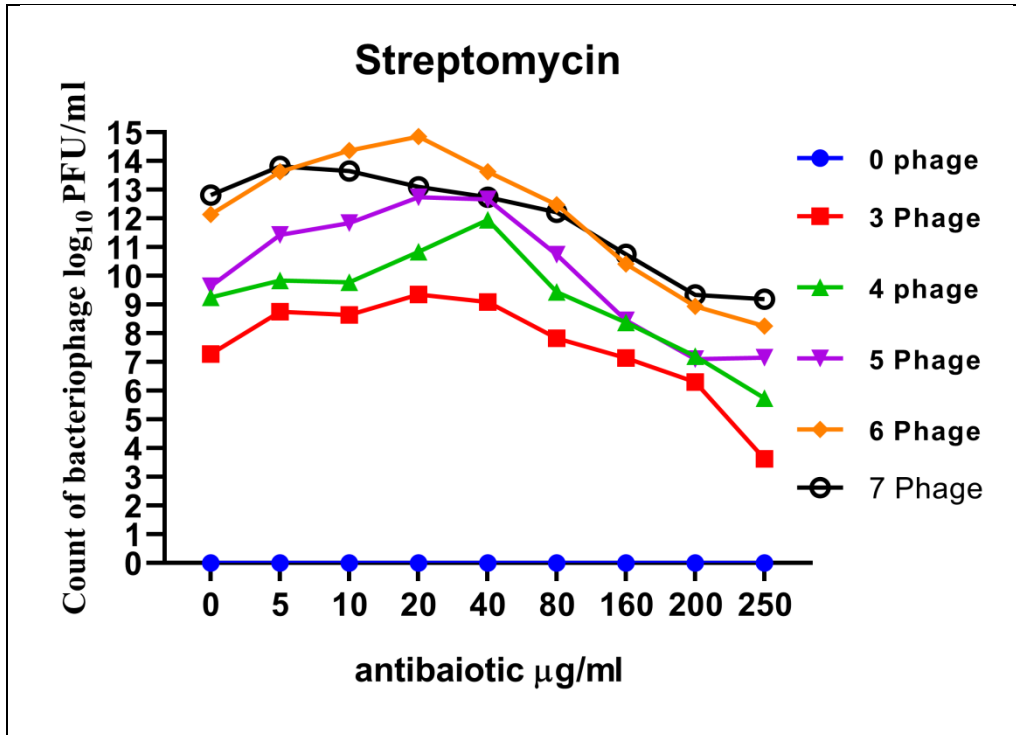
الجدول رقم (4-6): يظهر الجدول نتيجة تآزر عاثيات الجراثيم مع المضاد الحيوي ستربتومايسين باستخدام طريقة رقعة الشطرنج إذ يبين اللون الأزرق تعداد جراثيم الإشريكية القولونية واللون الأخضر

تعداد عاثيات الجراثيم

antibiotic $\mu\text{g/ml}$	250	0	0	0	0	0	0	
		0	3.63±1.2	5.74±1.4	7.15±2.3	8.25±2.6	9.2±3.5	
	200	2.25±0.8	0	0	0	0	0	
		0	6.31±2.1	7.21±2.8	7.11±2.7	8.94±3.4	9.35±2.8	
	160	3.23±1.7	2.68±0.7	2.14±0.9	0	0	0	
		0	7.14±2.3	8.38±3.5	8.46±3.1	10.42±2.8	10.75±2.3	
	80	4.26±2.2	3.35±2.1	2.61±1.1	2.24±0.6	0	0	
		0	7.83±2.4	9.45±3.4	10.74±2.7	12.48±3.3	12.22±3.4	
	40	5.94±2.7	3.95±1.8	3.47±1.5	2.21±1.2	0	0	
		0	9.1±3.2	11.96±4.2	12.67±3.8	13.63±2.9	12.74±3.1	
	20	8.73±2.8	4.67±2.2	3.51±1.8	2.33±0.8	2.18±1.1	0	
		0	9.36±3.7	10.85±2.8	12.74±4.2	14.85±3.9	13.1±2.8	
	10	9.15±3.3	6.73±2.7	4.68±2.6	2.59±1.5	2.42±0.4	0	
		0	8.64±3.8	9.78±3.2	11.85±3.7	14.37±4.7	13.65±3.5	
	5	9.52±3.2	8.31±3.3	6.73±2.9	3.17±2.1	2.75±0.8	0	
		0	8.75±3.6	9.85±2.1	11.43±3.5	13.63±3.2	13.82±3.2	
	0	9.57±3.7	9.53±3.8	7.82±3.7	3.71±1.8	3.34±1.4	0	
		0	7.28±3.2	9.26±2.6	9.64±2.8	12.14±2.9	12.82±2.9	
	A		0	3	4	5	6	7
	P	Count of bacteriophage \log_{10} PFU/ml						



مخطط رقم (4-8): تظهر الخريطة الحرارية تركيز جراثيم الإشريكية القولونية بعد 24 ساعة من الحضانة بدرجة حرارة 37م عند تآزر المضاد الحيوي ستربتومايسين وعاثيات الإشريكية القولونية



مخطط رقم (4-9): يظهر المخطط المتوسط الحسابي لتعداد عاثيات الجراثيم عند تطبيق التآزر مع

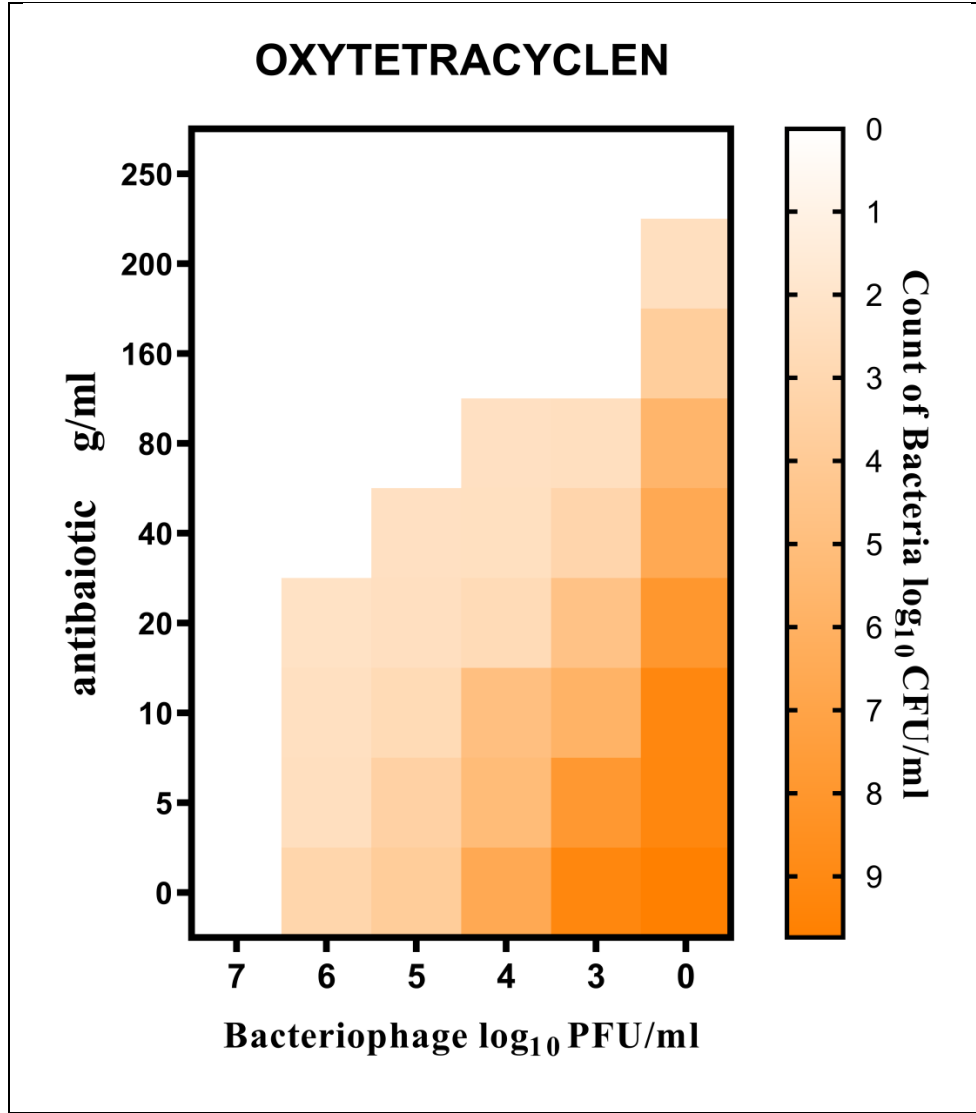
المضاد الحيوي الستربتومايسين على جراثيم الإشريكية القولونية

كما بلغ التركيز القاتل الأدنى في المزيج للمضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين $40\mu\text{g/ml}$ والعاثيات 6 \log_{10}/ml ، بينما بلغ التركيز القاتل الأدنى للمضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين منفرداً، $250\mu\text{g/ml}$ ، وقد بلغ أعلى تعداد لعاثيات الإشريكية القولونية $14.75\log_{10}/\text{ml}$ بالتآزر مع التركيز $10\mu\text{g/ml}$ للمضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين، بينما بلغ أقل تعداد لعاثيات الإشريكية القولونية $4.77\log_{10}/\text{ml}$ بالتآزر مع التركيز $250\mu\text{g/ml}$ للمضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين كما هو موضح في الجدول رقم (4-7)، المخطط رقم (4-10)، المخطط رقم (4-11).

وبحساب مؤشر التركيز القاتل الكسري بلغ 0.26 مما يشير إلى تأثير تآزري قوي بين عاثيات الإشريكية القولونية والمضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين تجاه جراثيم الإشريكية القولونية.

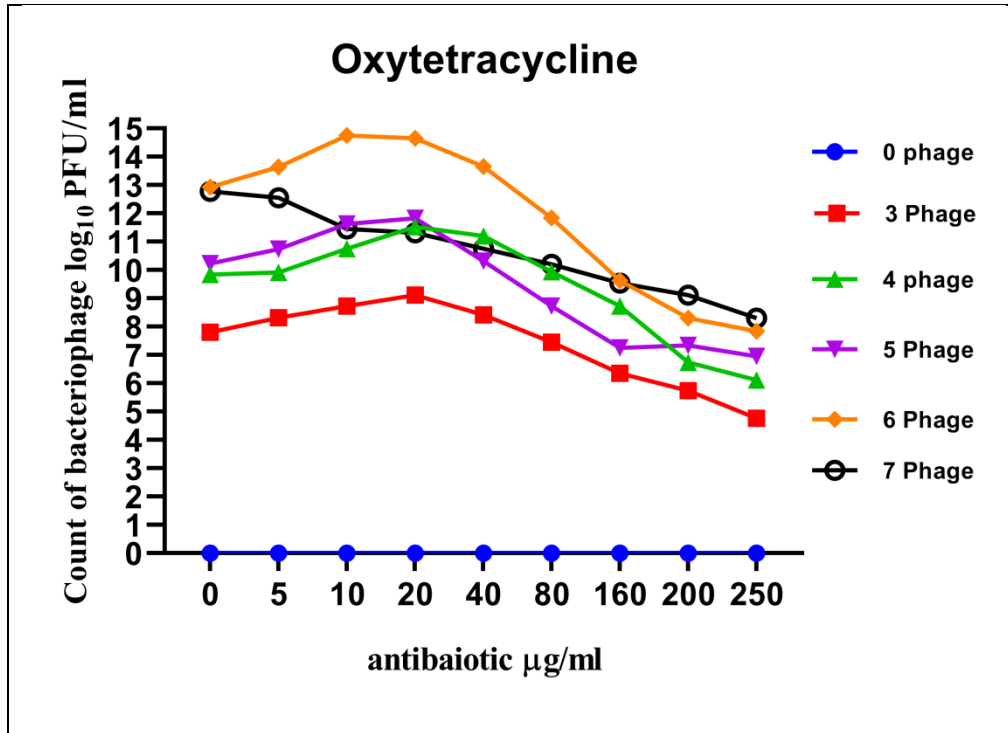
الجدول رقم (4-7): يظهر الجدول نتيجة تآزر عاثيات الجراثيم مع المضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين باستخدام طريقة رقعة الشطرنج إذ يبين اللون الأزرق تعداد جراثيم الإشريكية القولونية واللون الأخضر تعداد عاثيات الجراثيم

antibiotic $\mu\text{g/ml}$	250	0	0	0	0	0	0	
		0	4.77±1.7	6.12±1.9	6.95±1.4	7.84±2.1	8.31±2.8	
	200	2.43±0.6	0	0	0	0	0	
		0	5.74±1.5	6.74±2.1	7.35±2.8	8.31±2.6	9.12±2.2	
	160	3.75±1.2	0	0	0	0	0	
		0	6.36±2.7	8.73±2.2	7.25±2.6	9.63±3.2	9.54±2.7	
	80	5.62±2.1	2.43±1.4	2.32±0.8	0	0	0	
		0	7.46±2.3	9.95±3.5	8.73±2.6	11.85±3.6	10.21±2.6	
	40	6.54±1.9	3.16±1.6	2.37±1.2	2.31±0.9	0	0	
		0	8.42±2.8	11.21±4.2	10.32±3.2	13.65±4.2	10.76±3.1	
	20	7.95±3.1	4.61±2.3	2.74±1.8	2.38±1.6	2.2±0.6	0	
		0	9.12±3.3	11.53±3.7	11.83±2.8	14.65±4.1	11.32±2.6	
	10	9.12±3.6	5.8±2.8	4.84±2	2.75±1.2	2.35±0.7	0	
		0	8.73±2.9	10.75±2.3	11.63±4	14.75±3.6	11.46±3.5	
	5	9.18±3.2	7.84±3.6	5.12±2.1	3.47±1.3	2.41±1.2	0	
		0	8.32±2.6	9.92±3.2	10.74±3.5	13.64±3.8	12.56±3.6	
	0	9.73±3.5	9.17±3.8	6.53±2.5	3.82±1.6	3.14±1.5	0	
		0	7.82±2.5	9.84±2.2	10.23±3.8	12.93±4.3	12.78±3.7	
	A		0	3	4	5	6	7
	P	Count of bacteriophage \log_{10} PFU/ml						



مخطط رقم (4-10): تظهر الخريطة الحرارية تركيز جراثيم الإشريكية القولونية بعد 24 ساعة من

الحضن بدرجة حرارة 37م عند تأزر المضاد الحيوي أوكسي تتراسكلين وعائيات الإشريكية القولونية



مخطط رقم (4-11): يظهر المخطط المتوسط الحسابي لتعداد عاثيات الجراثيم عند تطبيق التآزر مع

المضاد الحيوي الأوكسي تتراسكلين على جراثيم الإشريكية القولونية

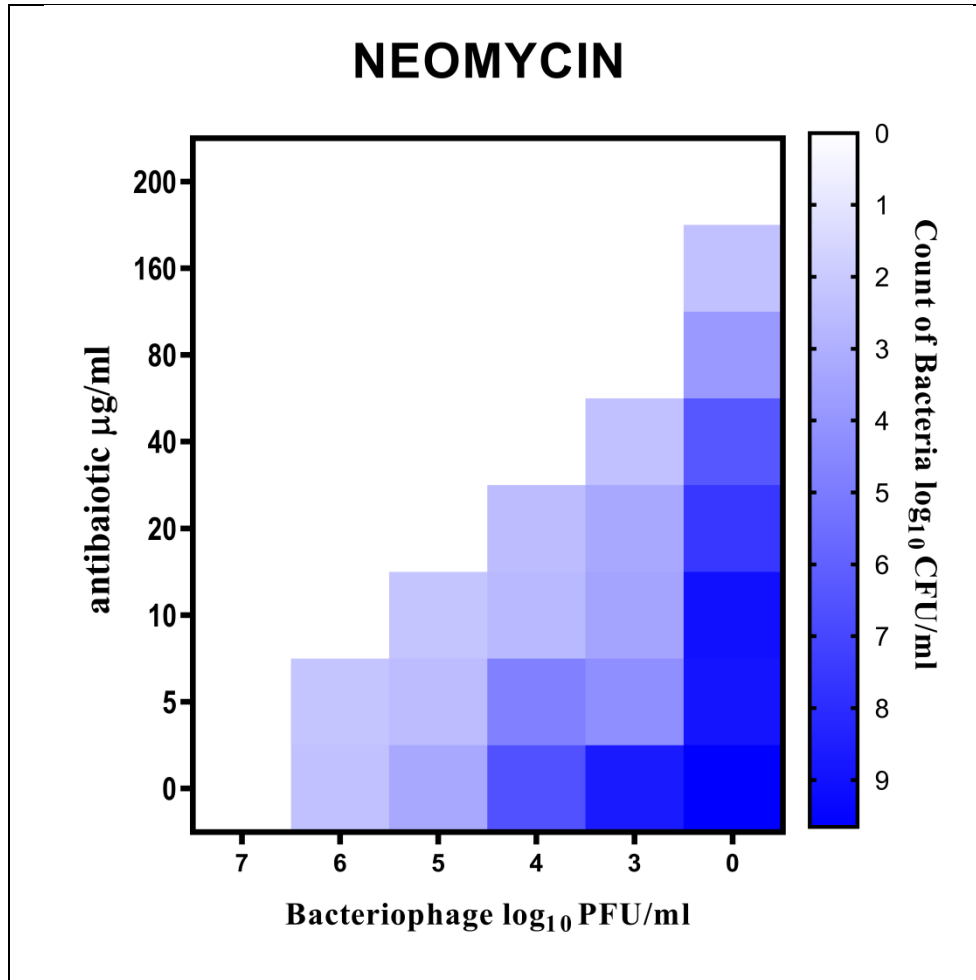
في حين بلغ التركيز القاتل الأدنى في المزيج للمضاد الحيوي النيومايسين $10\mu\text{g/ml}$ والعاثيات 6 \log_{10}/ml ، بينما بلغ التركيز القاتل الأدنى للمضاد الحيوي النيومايسين منفرداً $200\mu\text{g/ml}$ ، وقد بلغ أعلى تعداد لعاثيات الإشريكية القولونية $13.63\log_{10}/\text{ml}$ بالتآزر مع التركيز $10\mu\text{g/ml}$ للمضاد الحيوي النيومايسين، بينما بلغ أقل تعداد لعاثيات الإشريكية القولونية $4.56\log_{10}/\text{ml}$ بالتآزر مع التركيز $160\mu\text{g/ml}$ للمضاد الحيوي النيومايسين كما هو موضح في الجدول رقم (4-8)، المخطط رقم (4-12)، المخطط رقم (4-13).

وبحساب مؤشر التركيز القاتل الكسري بلغ 0.15 مما يشير إلى تأثير تآزري قوي بين عاثيات الإشريكية القولونية والمضاد الحيوي النيومايسين تجاه جراثيم الإشريكية القولونية.

الجدول رقم (4-8): يظهر الجدول نتيجة تآزر عاثيات الجراثيم مع المضاد الحيوي النيومايسين باستخدام طريقة رقعة الشطرنج إذ يبين اللون الأزرق تعداد جراثيم الإشريكية القولونية واللون الأخضر

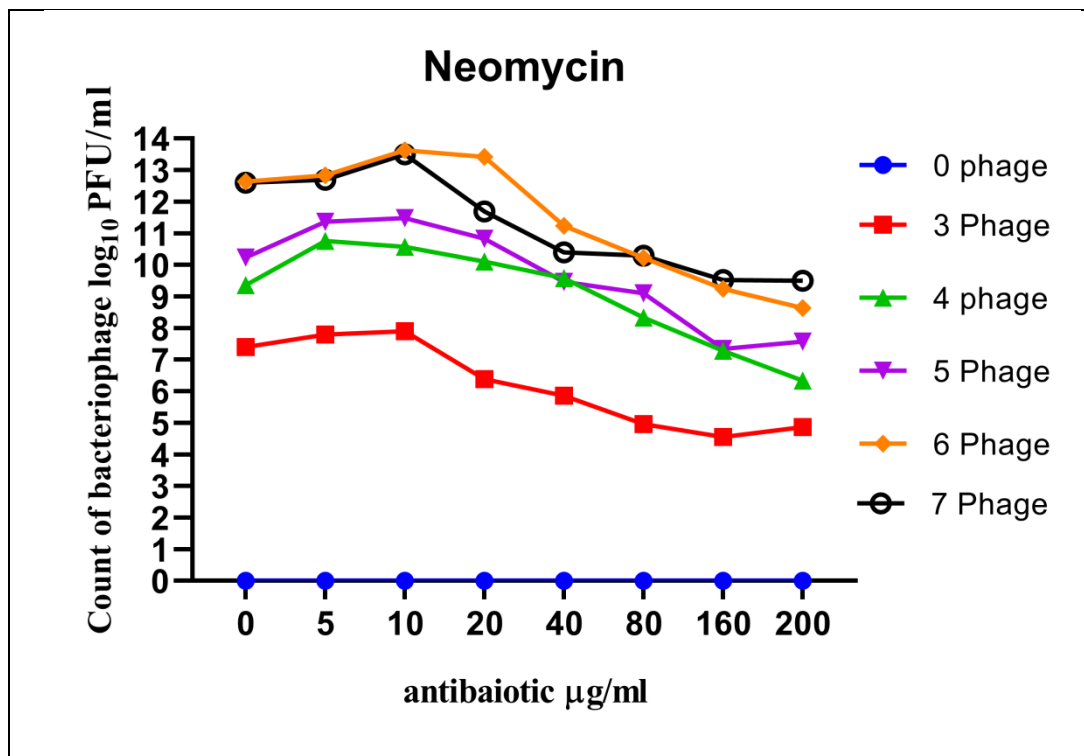
تعداد عاثيات الجراثيم

antibiotic $\mu\text{g/ml}$	200	0	0	0	0	0	0	
		0	4.87±2.1	6.34±2.8	7.58±2.4	8.64±3.5	9.5±3.8	
	160	2.32±0.6	0	0	0	0	0	
		0	4.56±2.6	7.29±3.1	7.34±3.5	9.24±3.6	9.53±2.8	
	80	3.86±0.8	0	0	0	0	0	
		0	4.97±2.4	8.34±2.3	9.11±3.3	10.23±3.7	10.3±3.7	
	40	6.35±1.2	2.31±0.7	0	0	0	0	
		0	5.86±2.8	9.58±3.5	9.47±3.5	11.24±3.2	10.4±3.4	
	20	7.56±2.1	3.28±1.8	2.5±1.4	0	0	0	
		0	6.39±3.6	10.11±4.2	10.83±4.1	13.42±4.1	11.7±4.2	
	10	9.01±2.5	3.43±1.8	2.63±1.1	2.21±1.2	0	0	
		0	7.9±3.2	10.58±4.2	11.37±3.2	13.63±4.3	13.5±3.7	
	5	8.86±2.5	4.21±2.3	4.76±2	2.53±1.4	2.22±0.7	0	
		0	7.8±2.5	10.76±3.9	11.37±3.7	12.84±3.5	12.7±3.5	
	0	9.65±3.1	8.64±3.1	6.56±2.4	3.28±1.7	2.32±0.6	0	
		0	7.4±3.2	9.36±4.1	10.24±3.2	12.64±3.7	12.6±3.8	
	A		0	3	4	5	6	7
	P		Count of bacteriophage \log_{10} PFU/ml					



مخطط رقم (4-12): تظهر الخريطة الحرارية تركيز جراثيم الإشريكية القولونية بعد 24 ساعة من

الحضن بدرجة حرارة 37م عند تآزر المضاد الحيوي النيومايسين وعاثيات الإشريكية القولونية.



مخطط رقم (4-13): يظهر المخطط المتوسط الحسابي لتعداد عاثيات الجراثيم عند تطبيق التآزر مع المضاد الحيوي النيومايسين على جراثيم الإشريكية القولونية.

4-9. تأثير المعالجة بالعاثيات داخل الجسم الحي:

أكدت الفحوصات الجرثومية لعينات المستقيم أن جميع العزولات من الحيوانات المصابة تنتمي إلى سلالة الإشريكية القولونية المستخدمة في العدوى التجريبية في هذه الدراسة.

وعند مراقبة الحيوانات ظهرت العلامات السريرية للمرض وبشكل رئيسي الإسهال لأول مرة في نهاية اليوم الثاني في 5 أرناب ثم 16 أرناب في بداية اليوم الثالث في مختلف المجموعات.

تراجعت العلامات السريرية تدريجياً في حيوانات المجموعة المصابة غير المعالجة (E) بداية من اليوم التاسع حتى اليوم 14، مع ملاحظة حدوث نفوق حيوانين في اليوم الخامس وحيوان في اليوم السادس.

أما في مجموعة العلاج بالعاثية (E+Ph) فقد بدأت أعراض الإسهال بالاختفاء بدءاً من اليوم السابع حتى اليوم العاشر مع ملاحظة حدوث نفوق لحيوان واحد في اليوم الرابع، وفي المجموعة (E+Ph&A) بدأ

الإسهال بالاختفاء في اليوم الخامس حتى اليوم السابع، وفي المجموعة (E+Pr) بدأ الإسهال بالاختفاء من اليوم الثامن وحتى اليوم الثاني عشر، مع ملاحظة حدوث نفوق لحيوان واحد في اليوم الخامس. وعند تشريح الأرنب النافقة تبين وجود احتقان شديد وتوذم في الأمعاء بشكل خاص في الأعور والقولون، وبهتان لون الكلى مع وجود نقط نزفية على سطح الكلية.

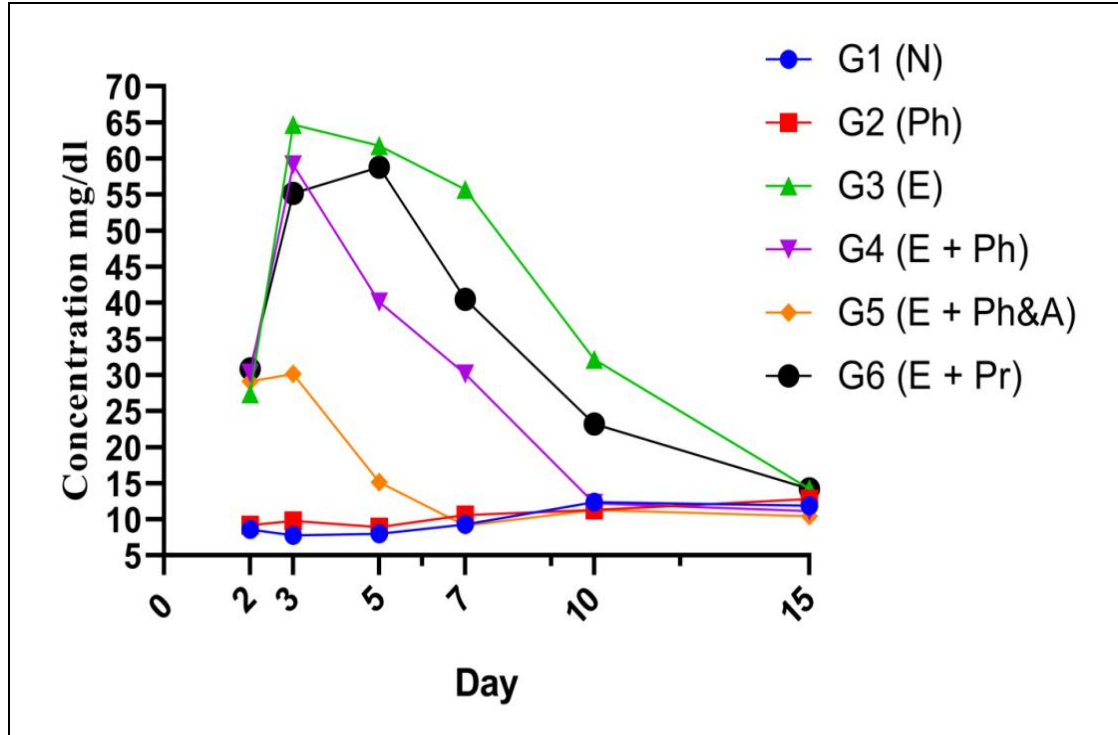
4-9-1. تأثير المعالجة بالعائيات على بروتينات الطور الحاد:

4-9-1-1. تأثير العلاج على الـ CRP:

أظهرت النتائج اختلافات واضحة في مستويات CRP بين المجموعات خلال فترة التجربة. حيث حافظت المجموعة الضابطة (N) والمجموعة المعالجة بالعائيات فقط (Ph) على مستويات CRP منخفضة ومستقرة تراوحت بين 7.8 و 12.8 مغ/دل طوال الدراسة، من دون وجود فروق معنوية بينهما، مما يشير إلى عدم تأثر حيوانات المجموعة (Ph) بالعائيات المجرعة لها. في المقابل، سجلت المجموعة المصابة بالإشريكية القولونية (E) ارتفاعاً حاداً ومستمرًا في CRP ، بلغ ذروته في اليوم الثالث 64.7 مغ/دل، مع فرق إحصائي معنوي ($p \leq 0.05$) مقارنة بالمجموعة الضابطة (N) في الأيام الثاني إلى العاشر. كما ارتفع معدل النفوق في هذه المجموعة إلى 37.5% في نهاية التجربة.

أما المجموعات المعالجة بعد العدوى، فقد أظهرت فعالية متفاوتة في الاستجابة. إذ خفّض العلاج المشترك بالعائيات والمضاد الحيوي النيومايسين (E+Ph&A) مستوى CRP بسرعة، حيث لم يظهر فرق معنوي مقارنة مع المجموعة الضابطة (N) بدءاً من اليوم السابع، ولم يظهر نفوق في هذه المجموعة، كما خفّض العلاج بالعائيات وحده (E+Ph) من شدة الارتفاع ولكنه استغرق حتى اليوم العاشر للعودة إلى المستوى الطبيعي، بينما أظهر العلاج بالمعززات الحيوية (E+Pr) فعالية متأخرة نسبياً، مع بقاء CRP مرتفعاً بشكل معنوي حتى اليوم العاشر. تبرز النتيجة الرئيسية أن العلاج التآزري (العائيات مع المضاد الحيوي) كان الأكثر فعالية في السيطرة على الالتهاب الجهازى الحاد وإعادة CRP إلى المستويات

الطبيعية في أقصر فترة، مقارنة بالعلاجات الأحادية الأخرى. كما هو موضح بالجدول رقم (4-9) والمخطط رقم (4-14).



مخطط رقم (4-14): مستوى تركيز (CRP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة mg/dl

(RESULTS)

جدول رقم (4-9): يظهر الجدول مستوى تركيز (CRP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة mg/dl

المجموعة الأولى (N)*	المجموعة الثانية (Ph)*	المجموعة الثالثة (E)*	المجموعة الرابعة (E + Ph)*	المجموعة الخامسة (E + Ph&A)*	المجموعة السادسة (E + Pr)*	
8.6 ^a ± 2.54	9.2 ^a ± 3.44	27.4 ^b ± 5.78	30.25 ^b ± 6.44	29.12 ^b ± 8.36	30.85 ^b ± 9.11	اليوم الثاني
7.8 ^a ± 3.26	9.8 ^a ± 4.21	64.7 ^b ± 8.95	59.15 ^b ± 9.15	30.18 ^c ± 7.25	55.2 ^b ± 7.12	اليوم الثالث
8 ^a ± 1.64	8.9 ^a ± 3.77	(2D) 61.8 ^b ± 7.45	(1D) 40.12 ^c ± 7.7	15.16 ^a ± 9.63	(1D) 58.8 ^b ± 7.45	اليوم الخامس
9.3 ^a ± 6.75	10.6 ^a ± 7.31	(1D) 55.7 ^b ± 8.11	30.18 ^c ± 8.58	9.17 ^a ± 6.11	40.51 ^c ± 6.81	اليوم السابع
12.4 ^a ± 4.42	11.3 ^a ± 5.47	32.16 ^b ± 9.42	12.22 ^a ± 5.31	11.31 ^a ± 6.12	23.21 ^c ± 8.39	اليوم العاشر
11.9 ^a ± 5.83	12.8 ^a ± 6.11	14.25 ^a ± 8.56	11.14 ^a ± 6.24	10.42 ^a ± 4.28	12.87 ^a ± 7.21	اليوم الخامس عشر
(0/6)0%	(0/6)0%	(3/8)37.5%	(1/6)16.66%	(0/6)0%	(1/6)16.66%	النفوق

* (N): Nothing دون معالجة أو معاملة، (Ph): Phage جرعت بالعائيات الجرثومية، (E): E.coli جرعت جراثيم الإشريكية القولونية

(E + Ph): E. coli + Phage جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بمزيج العائيات.

(E + Ph&A): E. coli + Phage+ Antibiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالعائيات بالتأزر مع المضاد الحيوي.

(E + Pr): E. coli + Probiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالمعزز الحيوي. (D): Dead عدد الحيوانات النافقة

تشير الأحرف a,b,c المختلفة إلى وجود فروق معنوية عند مستوى (p≤0.05) في الصف الواحد

4-9-1-2. تأثير العلاج على الـ HP:

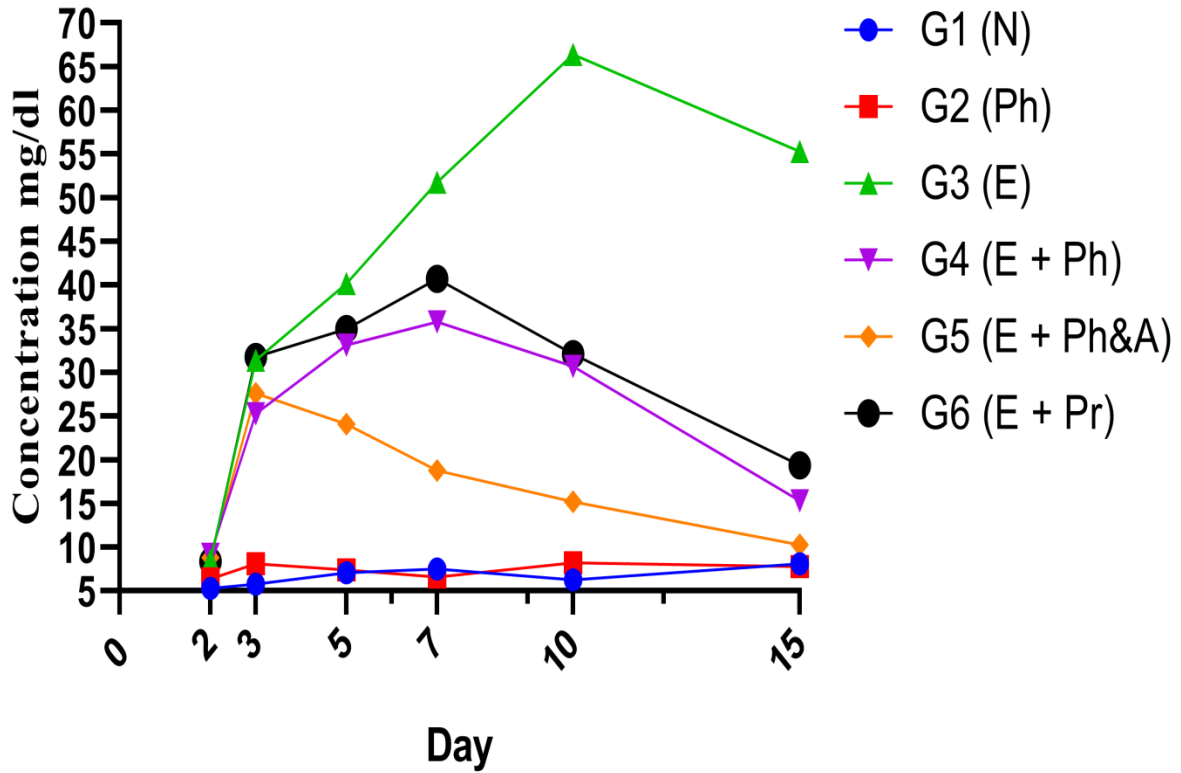
بيّنت نتائج قياس المستوى المصلي لبروتين الهابتوغلوبين - (HP) دلالة واضحة على شدة العدوى بجراثيم الإشريكية القولونية وفعالية التدخلات العلاجية المختلفة.

في المجموعة الضابطة (N) ومجموعة العائثة فقط (Ph)، حافظت مستويات HP على مستوى ثابت ومستقر طوال فترة الدراسة 5.3 - 8.1 مغ/دل، مما يؤكد عدم تعرض هاتين المجموعتين لأي تخفيف التهابي مرضي.

على النقيض تماماً، شهدت المجموعة المصابة غير المعالجة (E) ارتفاعاً مستمراً في مستويات HP إذ بدأ الارتفاع بشكل معنوي في اليوم الثالث (31.4 مغ/دل) بعد بدء التجربة، وتساعد بشكل حاد ليلبلغ ذروته في اليوم العاشر (66.4 مغ/دل)، لينخفض قليلاً بعدها إلى مستوى يعتبر مرتفع في اليوم الخامس عشر (55.3 مغ/دل). يعكس هذا المنحنى التصاعدي الحاد استجابة التهابية جهازية كبيرة، كما أظهرت جميع المجموعات المعالجة (E+Ph)، (E+Ph&A)، (E+Pr) فعالية ملحوظة في خفض هذا الارتفاع الحاد، وبدرجات متفاوتة. ومع تقدم الوقت برز التفوق الواضح للمجموعة المعالجة بالتأزري (E+Ph&A)، حيث انخفض منحنى HP لديها بشكل أسرع وأكثر حدة. كانت قيمها (18.8 مغ/دل في اليوم السابع، 15.2 مغ/دل في اليوم العاشر) الأقرب باستمرار إلى المستويات الطبيعية، مما يدل على السيطرة على الالتهاب.

مجموعة العائثة فقط (E+Ph) والمجموعة المعالجة بالمعززات الحيوية (E+Pr) أظهرتا فعالية متوسطة ومتأخرة نسبياً، حيث استمر منحنى HP عالياً حتى اليوم العاشر (30.7 و 32.1 مغ/دل على التوالي) قبل أن يبدأ بالانحدار نحو المستوى الطبيعي بحلول اليوم الخامس عشر.

ويظهر الجدول رقم (4-10)، والمخطط رقم (4-15) تأثير التدخلات العلاجية في تخفيف حدة الالتهاب مقارنة بالعدوى غير المعالجة.



مخطط رقم (4-15): مستوى تركيز (HP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة

mg/dl

(RESULTS)

جدول رقم (4-10): يظهر الجدول مستوى تركيز (HP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة mg/dl

المجموعة الأولى (N)*	المجموعة الثانية (Ph)*	المجموعة الثالثة (E)*	المجموعة الرابعة (E + Ph)*	المجموعة الخامسة (E + Ph&A)*	المجموعة السادسة (E + Pr)*	
5.3 ^a ± 1.32	6.4 ^a ± 3.65	8.5 ^a ± 6.75	9.2 ^a ± 5.26	8.8 ^a ± 7.11	8.4 ^a ± 6.12	اليوم الثاني
5.8 ^a ± 2.2	8.1 ^a ± 4.21	31.4 ^b ± 4.87	25.3 ^b ± 6.17	27.6 ^b ± 8.65	31.8 ^b ± 8.32	اليوم الثالث
7.1 ^a ± 2.67	7.4 ^a ± 5.77	(2D) 40.2 ^b ± 8.41	(1D)33.13 ^c ± 6.19	24.1 ^c ± 7.19	(1D) 35 ^b ± 9.54	اليوم الخامس
7.5 ^a ± 4.46	6.6 ^a ± 5.32	(1D) 51.8 ^b ± 8.35	35.8 ^c ± 7.16	18.8 ^c ± 9.16	40.7 ^c ± 8.3	اليوم السابع
6.3 ^a ± 4.21	8.2 ^a ± 7.43	66.4 ^b ± 10.24	30.7 ^c ± 5.19	15.2 ^a ± 7.72	32.1 ^a ± 9.32	اليوم العاشر
8.1 ^a ± 3.33	7.8 ^a ± 5.42	55.27 ^b ± 8.11	15.3 ^a ± 7.12	10.3 ^a ± 9.15	19.4 ^c ± 4.1	اليوم الخامس عشر
(0/6)0%	(0/6)0%	(3/8)37.5%	(1/6)16.66%	(0/6)0%	(1/6)16.66%	النفوق

* (N): Nothing دون معالجة أو معاملة، (Ph): Phage جرعت بالعائيات الجرثومية، (E): E.coli جرعت جراثيم الإشريكية القولونية

(E + Ph): E. coli + Phage جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بمزيج العائيات .

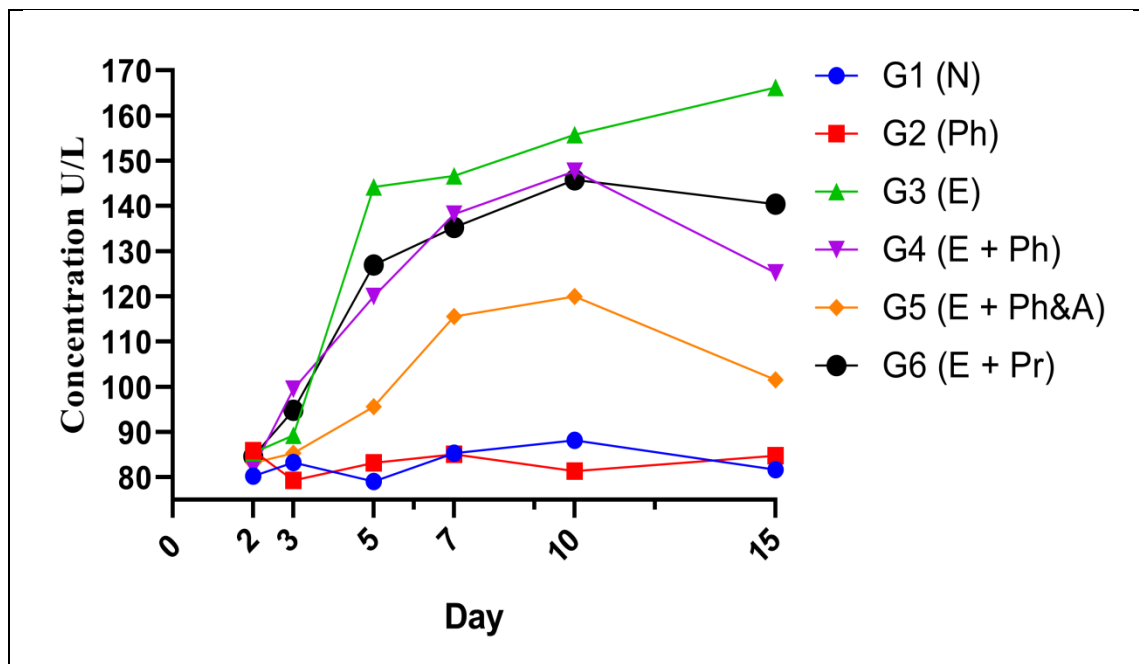
(E + Ph&A): E. coli + Phage+ Antibiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالعائيات بالتأزر مع المضاد الحيوي.

(E + Pr): E. coli + Probiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالمعزز الحيوي. (D): Dead عدد الحيوانات النافقة

تشير الأحرف a,b,c المختلفة إلى وجود فروق معنوية عند مستوى (p≤0.05) في الصف الواحد

4-9-1-3 تأثير العلاج على الـ CP:

بيّنت البيانات الموضحة في الجدول رقم (4-11) والمخطط رقم (4-16) استجابة واضحة للعدوى بجراثيم الإشريكية القولونية بقيمة السيروبلازمين (CP)، مع اختلافات كبيرة في فعالية البروتوكولات العلاجية المطبقة. بينما حافظت المجموعة الضابطة (N) والمجموعة المعاملة بالعائثة دون عدوى (Ph) على مستويات مستقرة وطبيعية من CP تراوحت بين (79.1 و 88.2 وحدة دولية /لتر) طوال فترة الدراسة مما يؤكد عدم وجود أي التهاب مرضي في هاتين المجموعتين. في حين أظهرت المجموعة المصابة غير المعالجة (E) ارتفاعاً كبيراً ومستمرّاً في مستويات CP بدءاً من اليوم الخامس (144.2 وحدة/لتر) مع فرق إحصائي معنوي ($p \leq 0.05$) مقارنة بالمجموعة الضابطة (N). إذ استمر هذا الارتفاع التدريجي ليصل إلى ذروته في اليوم الخامس عشر (166.2 وحدة دولية/لتر) ومع تقدم العدوى، برز التفوق الواضح للعلاج التآزري (E+Ph&A) فعلى الرغم من ارتفاع مستوى تركيز CP في هذه المجموعة، إلا أنها كانت الأخفض بين المجموعات المصابة. في المقابل، أظهرت مجموعتي العلاج الأحادي العائثية فقط (E+Ph) والمعززات الحيوية (E+Pr) ارتفاعاً معنوياً في مستوى CP بلغ ذروته في اليوم العاشر 147.7 و 145.8 وحدة دولية/لتر على التوالي



مخطط رقم (4-16): تركيز (CP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة U/L

(RESULTS)

جدول رقم (4-11): يظهر الجدول مستوى تركيز (CP) لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات الزمنية المدروسة U/L

المجموعة الأولى (N)*	المجموعة الثانية (Ph)*	المجموعة الثالثة (E)*	المجموعة الرابعة (E + Ph)*	المجموعة الخامسة (E + Ph&A)*	المجموعة السادسة (E + Pr)*	
80.3 ^a ± 11.26	85.9 ^a ± 7.32	85.4 ^a ± 13.75	82.1 ^a ± 16.12	83.2 ^a ± 8.21	84.6 ^a ± 7.56	اليوم الثاني
83.8 ^a ± 8.63	79.3 ^a ± 9.43	89.3 ^a ± 11.67	99.5 ^a ± 24.32	85.3 ^a ± 12.4	94.8 ^a ± 19.21	اليوم الثالث
79.1 ^a ± 12.36	83.2 ^a ± 8.9	(2D) 144.2 ^b ± 17.56	(1D) 120 ^c ± 23.2	95.6 ^a ± 15.65	(1D) 127 ^c ± 16.9	اليوم الخامس
85.3 ^a ± 8.47	85.1 ^a ± 9.33	(1D) 146.7 ^b ± 22.53	138.2 ^b ± 18.32	115.5 ^c ± 17.3	135.3 ^b ± 23.11	اليوم السابع
88.2 ^a ± 9.32	81.4 ^a ± 6.72	155.8 ^b ± 15.25	147.7 ^b ± 23.2	120 ^c ± 14.95	145.8 ^b ± 24.76	اليوم العاشر
81.7 ^a ± 6.19	84.8 ^a ± 6.11	166.2 ^b ± 20.32	125.2 ^c ± 31.43	101.6 ^c ± 43.8	140.4 ^c ± 17.12	اليوم الخامس عشر
(0/6)0%	(0/6)0%	(3/8)37.5%	(1/6)16.66%	(0/6)0%	(1/6)16.66%	النفوق

* (N): Nothing دون معالجة أو معاملة، (Ph): Phage جرعت بالعائيات الجرثومية، (E): E.coli جرعت جراثيم الإشريكية القولونية

(E + Ph): E. coli + Phage جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بمزيج العائيات .

(E + Ph&A): E. coli + Phage+ Antibiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالعائيات بالتأزر مع المضاد الحيوي.

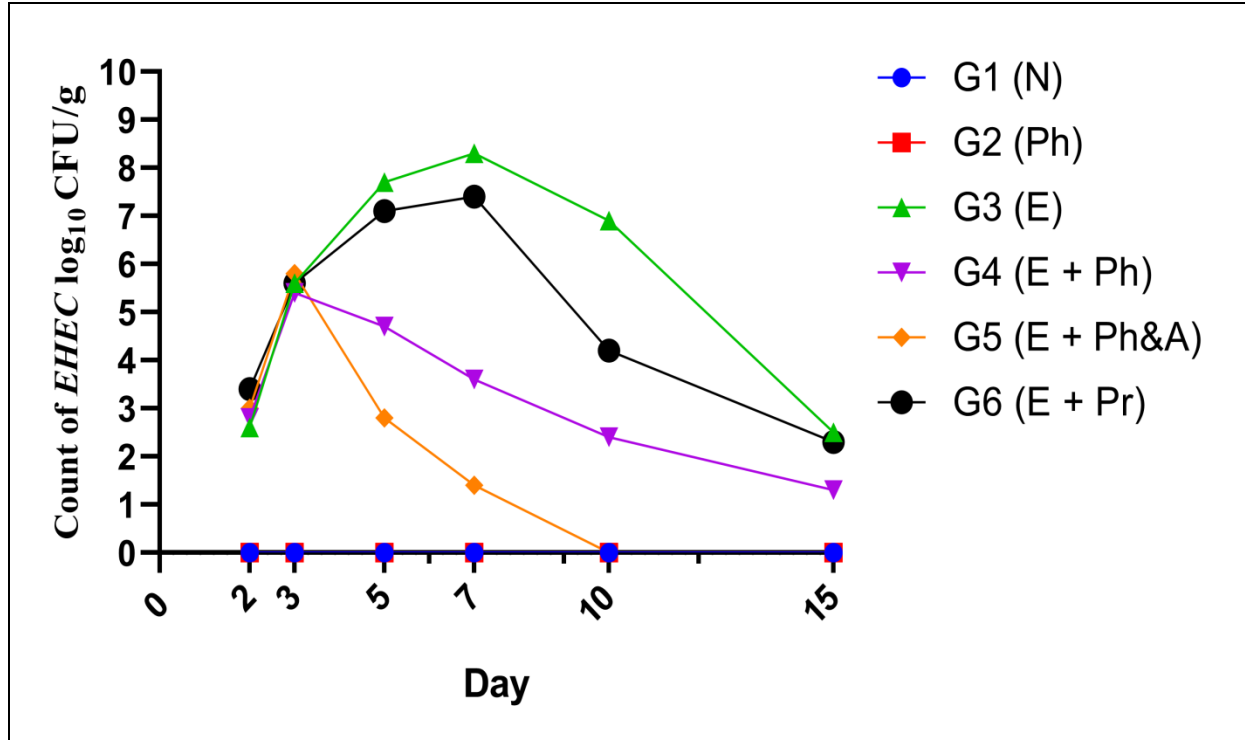
(E + Pr): E. coli + Probiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالمعزز الحيوي. (D): Dead عدد الحيوانات النافقة

تشير الأحرف a,b,c المختلفة إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) في الصف الواحد

4-9-2. تأثير العلاج بالعائيات على تعداد جراثيم الـ EHEC في الروث:

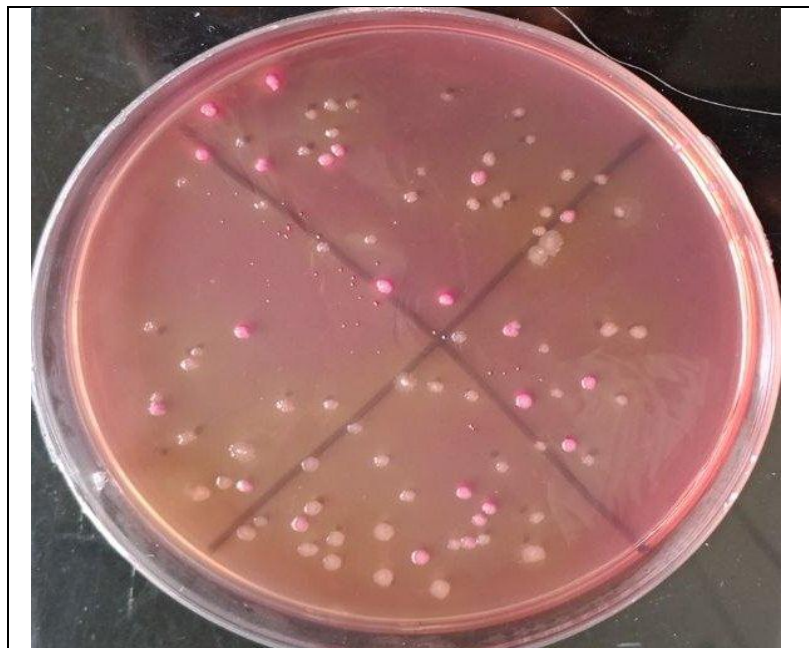
أظهرت النتائج الموضحة في الجدول رقم (4-12) ، والمخطط رقم (4-17) فعالية المعالجات المختلفة للسيطرة على العدوى المعوية للإشريكية القولونية من خلال مراقبة تعداد جراثيم الإشريكية القولونية EHEC على منبت SMCA في روث الأرناب كما هو موضح في الصورة رقم (4-5) إذ ظهرت اختلافات معنوية واضحة بين المجموعات منذ بداية التجربة. حيث سجلت المجموعات غير المصابة المجموعة الضابطة N ومجموعة العائية (Ph) صفراً (0) من الجراثيم طوال فترة المتابعة، في حين أظهرت مجموعة العدوى غير المعالجة (E) نمط من العدوى الحادة، إذ ارتفع التعداد بشكل ملحوظ من $3.4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ في اليوم الثاني إلى $8.3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ في اليوم السابع، مع وجود فرق معنوي عند مستوى ($p \leq 0.05$) مقارنة بالمجموعة الضابطة في كل الأيام، مما يعكس تكاثراً غير مسيطر عليه للجراثيم، وانتهى بأعلى معدل نفوق (37.5%) و في المجموعة المعالجة بالتأزري (E+Ph&A) أظهرت هذه المجموعة أقوى وأسرع استجابة، حيث أنه بعد ارتفاع أولي في اليوم الثالث $5.8 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ انخفض التعداد بسرعة، حيث تظهر فروق معنوية بالمقارنة مع المجموعة الضابطة بدءاً من اليوم السابع $1.4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ، ووصل إلى صفر في اليوم العاشر. هذا الارتباط بين انخفاض تعداد جراثيم الإشريكية القولونية إلى مستويات غير قابلة للكشف وعدم وجود نفوق (0%) يوضح الفعالية المتفوقة لهذا البروتوكول في استئصال العدوى. أما المجموعة المعالجة بالعائية فقط (E+Ph) أظهرت فعالية معتدلة ولكن متأخرة مقارنة بالتأزري. على الرغم من انخفاض التعداد في الأيام اللاحقة، إلا أنه استمر في إظهار فرق معنوي عند مستوى ($p \leq 0.05$) حتى اليوم العاشر $2.4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ، ولم يصل إلى مستوى عدم المعنوية إلا في اليوم الخامس عشر $1.3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ وقد ارتبط هذا بانخفاض معدل النفوق (16.66%) مقارنة بمجموعة العدوى (E) أما في المجموعة المعالجة بالمعزز الحيوي (E+Pr) أظهرت أقل فعالية بين العلاجات، حيث استمر التعداد مرتفعاً بشكل معنوي طوال فترة الدراسة، مع انخفاض بطيء فقط في الأيام المتأخرة. تشير هذه النتائج

إلى أن البروبيوتيك ساعد في تخفيف الحمل جزئياً ولكنه لم يتحكم بشكل فعال في الاستيطان الجرثومي، وقد ارتبط ذلك أيضاً بنفوق بنسبة (16.66%).



مخطط رقم (4-17): تعداد جراثيم EHEC في الروث لدى مجموعات التجربة وخلال الفترات

الزمنية المدروسة Log10 CFU/g



صورة رقم (4-5) تظهر تعداد جراثيم EHEC على وسط ماكونكي سوربيتول

(RESULTS)

جدول رقم (4-12): يظهر الجدول تعداد جراثيم الإشريكية القولونية في روث الأرانب Log_{10} CFU/g

المجموعة الأولى	المجموعة الثانية	المجموعة الثالثة	المجموعة الرابعة	المجموعة الخامسة	المجموعة السادسة	
(N)*	(Ph)*	(E)*	(E + Ph)*	(E + Ph&A)*	(E + Pr)*	
0 ^a	0 ^a	2.6 ^b ± 1.4	2.8 ^b ± 1.7	3 ^b ± 1.9	3.4 ^b ± 2.2	اليوم الثاني
0 ^a	0 ^a	5.6 ^b ± 3.2	5.4 ^b ± 2.4	5.8 ^b ± 2.5	5.6 ^b ± 2.7	اليوم الثالث
0 ^a	0 ^a	(2D) 7.7 ^b ± 3.5	(1D) 4.7 ^b ± 2.3	2.8 ^c ± 1.9	(1D) 7.1 ^b ± 3.6	اليوم الخامس
0 ^a	0 ^a	(1D) 8.3 ^b ± 2.7	3.6 ^c ± 2.1	1.4 ^a ± 2.1	7.4 ^b ± 3.1	اليوم السابع
0 ^a	0 ^a	6.9 ^b ± 3.9	2.4 ^c ± 1.9	0 ^a	4.2 ^c ± 2.7	اليوم العاشر
0 ^a	0 ^a	2.5 ^b ± 3.5	1.3 ^a ± 3.2	0 ^a	2.3 ^c ± 3.1	اليوم الخامس عشر
(0/6)0 ^a %	(0/6)0 ^a %	(3/8)37.5 ^b %	(1/6)16.66 ^c %	(0/6)0 ^a %	(1/6)16.66 ^c %	النفوق

* (N): Nothing دون معالجة أو معاملة، (Ph): Phage جرعت بالعائيات الجرثومية، (E): E.coli جرعت جراثيم الإشريكية القولونية

(E + Ph): E. coli + Phage جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بمزيج العائيات .

(E + Ph&A): E. coli + Phage+ Antibiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالعائيات بالتأزر مع المضاد الحيوي.

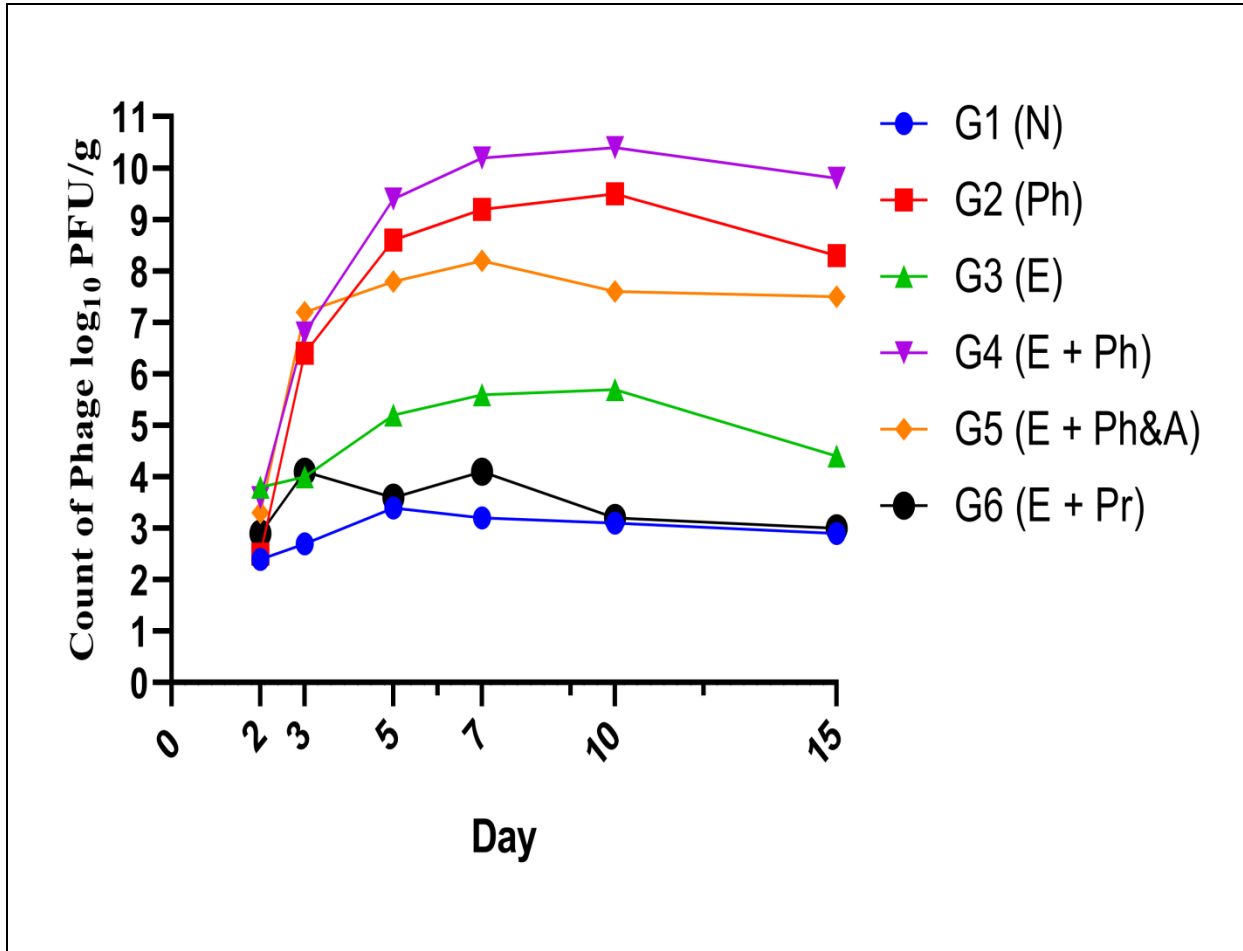
(E + Pr): E. coli + Probiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالمعزز الحيوي. (D): Dead عدد الحيوانات النافقة

تشير الأحرف a,b,c المختلفة إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) في الصف الواحد

4-9-3. تأثير العلاج بالعائيات على تعداد عائيات جراثيم الإشريكية القولونية في الروث:

بيّنت النتائج الموضحة في الجدول رقم (4-13) والمخطط رقم (4-18) تعداد العائيات في روث الأرناب خلال فترة الدراسة وباستخدام علاجات مختلفة، حيث احتفظت كل من المجموعة الضابطة (N) والمجموعة المعالجة بالمعزز الحيوي فقط (E+Pr) بمستويات منخفضة ومستقرة من العائيات \log_{10} PFU/g (بين 2.4 و 3.6)، من دون وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) بينهما طول فترة الدراسة. كما سجلت مجموعة العدوى غير المعالجة بالعائية (E) مستويات متوسطة من العائيات تراوحت بين \log_{10} PFU/g (3.8 و 5.7)، مع وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) مقارنة بالمجموعة الضابطة.

في حين أظهرت المجموعات المعالجة بالعائية (Ph, E+Ph, E+Ph&A) الثلاث ارتفاعاً كبيراً ومستمرّاً في تعداد العائيات بدءاً من اليوم الخامس، حيث وصل إلى مستويات مرتفعة مع فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) مقارنة بالمجموعة الضابطة في جميع الأيام اللاحقة. يشير هذا الارتفاع الحاد إلى حدوث تكاثر فعال للعائيات داخل المضيف الجرثومي. كما يلاحظ أن أعلى التعدادات سُجلت في المجموعتين اللتين تلقنا العائية كجزء من العلاج (E+Ph) و (E+Ph&A)، مما يؤكد نجاح استيطان وتضاعف العائية المطبق. لكن على الرغم من أن كل من مجموعتي E+Ph و E+Ph&A أظهرتا تعداداً للعائيات مرتفعاً إلا أن النتيجة النهائية كانت مختلفة. في مجموعة العائية وحدها (E+Ph)، حيث ترافق تكاثر العائية النشط بانخفاض معتدل في تعداد الجراثيم كما هو مبين في الجدول رقم (4-12) ومعدل نفوق معتدل. أما في مجموعة العلاج التآزري (E+Ph&A)، فقد ارتبط المستوى العالي من العائيات مع انخفاض أسرع لتعداد الجراثيم إلى مستوى منخفض.



طظ رقم (4-18): تعداد عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية في الروث لدى مجموعات التجربة وخلال

الفترات الزمنية المدروسة Log10 PFU/g

(RESULTS)

جدول رقم (4-13): يظهر الجدول تعداد عاثيات الإشريكية القولونية في روث الأرانب Log_{10} PFU/g

المجموعة الأولى (N)*	المجموعة الثانية (Ph)*	المجموعة الثالثة (E)*	المجموعة الرابعة (E + Ph)*	المجموعة الخامسة (E + Ph&A)*	المجموعة السادسة (E + Pr)*	
$2.4^a \pm 2.2$	$2.5^a \pm 2.8$	$3.8^b \pm 2.9$	$3.6^b \pm 2.7$	$3.3^b \pm 2.2$	$2.9^a \pm 2.1$	اليوم الثاني
$2.7^a \pm 2.4$	$6.4^b \pm 1.7$	$4^b \pm 2.7$	$6.5^b \pm 2.1$	$7.2^c \pm 2.7$	$4.1^b \pm 2.6$	اليوم الثالث
$3.4^a \pm 2.1$	$8.6^b \pm 3.8$	$5.2^c \pm 1.8$	$9.4^b \pm 3.8$	$7.8^b \pm 3.9$	$3.6^a \pm 3.2$	اليوم الخامس
$3.1^a \pm 2.9$	$9.2^b \pm 4.1$	$5.6^c \pm 3.1$	$10.2^b \pm 4.1$	$8.2^b \pm 4.1$	$4.1^a \pm 2.6$	اليوم السابع
$3.2^a \pm 3.5$	$9.5^b \pm 3.5$	$5.7^c \pm 3.8$	$10.4^b \pm 3.7$	$7.6^b \pm 3.9$	$3.2^a \pm 2.2$	اليوم العاشر
$2.9^a \pm 2.3$	$8.3^b \pm 4.1$	$4.4^c \pm 3.1$	$9.8^b \pm 4.6$	$7.5^b \pm 4.6$	$3^a \pm 2.1$	اليوم الخامس عشر
(0/6)0%	(0/6)0%	(3/8)37.5%	(1/6)16.66%	(0/6)0%	(1/6)16.66%	النفوق

* (N): Nothing دون معالجة أو معاملة، (Ph): Phage جرعت بالعاثيات الجرثومية، (E): E.coli جرعت جراثيم الإشريكية القولونية

(E + Ph): E. coli + Phage جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بمزيج العاثيات .

(E + Ph&A): E. coli + Phage+ Antibiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالعاثيات بالتآزر مع المضاد الحيوي.

(E + Pr): E. coli + Probiotic : جرعت جراثيم الإشريكية القولونية وعولجت بالمعزز الحيوي.

تشير الأحرف a,b,c المختلفة إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) في الصف الواحد

الفصل الخامس

المناقشة

DISCUSSION

المناقشة

اعتمد الطب البيطري لعقود على المضادات الحيوية كعامل أساسي في مكافحة والعلاج. إلا أن النمط السائد من الاستخدام المكثف وغير الرشيد للمضادات الحيوية، سواء لأغراض علاجية أو وقائية أو كمنشطات للنمو، أدى إلى تسارع وتيرة ظهور وانتشار سلالات جرثومية تحمل جينات المقاومة للمضادات الحيوية المتعددة MDR وتعد هذه الظاهرة تهديداً صحياً عالمياً حسب توصيف منظمة الصحة العالمية (WHO) ومنظمة الصحة الحيوانية (WOAH) إذ تنطوي هذه الأزمة على مخاطر جسيمة، منها تقويض فاعلية العلاجات المتاحة، وارتفاع معدلات الفشل العلاجي، وزيادة شدة وحدة الإصابات، ونقل الجينات المقاومة إلى الجراثيم التي تصيب الإنسان، مما يهدد الصحة العامة برمتها ويدفع نحو عصر "ما بعد المضادات الحيوية".

في هذا السياق الحرج، برزت الحاجة الملحة إلى استكشاف استراتيجيات علاجية بديلة وتكميلية تتسم بالفاعلية والاستدامة. ويحتل العلاج بالعائيات (Phage Therapy) مكانة متقدمة في هذا المضمار البحثي. و تقدم هذه الآلية عدداً من المزايا الجوهرية، أبرزها: النوعية العالية و المحافظة على الميكروبيوم الطبيعي للحيوان وتقليل الاضطرابات الثانوية. كما يمتاز هذا النوع من العلاج بالفاعلية ضد الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية وقلة السمية والآثار الجانبية.

على الرغم من هذه المزايا الواعدة، فإن التطبيق السريري الواسع للعلاج بالعائيات يواجه تحديات كبيرة، تشمل ضيق الطيف لبعض العائيات، واحتمالية تطور مقاومة الجراثيم للعائيات، وضرورة التحديد الدقيق للمسبب الجرثومي قبل العلاج، والتحديات التنظيمية المتعلقة بتصنيع وترخيص المستحضرات، بالتالي، فإن هذا البحث ينطلق من فرضية أن العلاج بالعائيات يمثل مدخلاً علمياً واعداً لإدارة أمراض الإسهال في ظل تنامي أزمة مقاومة المضادات الحيوية.

5-1. عزل جراثيم الإشريكية القولونية من حالات إسهال العجول:

تنتشر جراثيم الإشريكية القولونية بشكل كبير في حظائر تربية الأبقار، خاصة في الظروف التي لا تراعي أسس الرعاية الصحية والوقائية حيث تبدأ المشكلة مع تلوث البيئة المحيطة بالعجول (كالفرشة، والأعلاف، وأدوات الشرب) بروث حيوانات حاملة للمرض، أو من الأمهات نفسها. إذ تنتقل الجراثيم إلى العجل حديث الولادة - الذي يعاني من جهاز مناعي غير مكتمل - عن طريق الفم أثناء الرضاعة أو من خلال التعامل المباشر مع الأسطح الملوثة مما يؤدي إلى إصابة العجول بالعدوى والتسبب بالأمراض (Divers and peek, 2018). وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة ارتفاع نسبة جراثيم الإشريكية القولونية المعزولة من حالات إسهال العجول في محافظة حماة وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة نجد أنها متقاربة مع ما وجدته (ابراهيم، 2012) في دراسته للكشف عن عوامل الفوعة لذراحي الإشريكية القولونية المعزولة من إسهال العجول في كل من محطات الأبقار في مسكنة وجورين ودير الزور في سورية حيث بلغت نسبة عزل جراثيم الإشريكية القولونية من حالات إسهال العجول 90%، كما أنها متقاربة مع ما وجدته (Fard et al., 2005) في دراسته على حالات العجول المصابة بالإسهال الواردة إلى المشفى البيطري في طهران - إيران إذ بلغت نسبة عزل جراثيم الإشريكية القولونية 87.5% من حالات الإسهال، كما إن نتائج هذه الدراسة كانت أعلى مما وجدته (Abdulridha and Ibrahim, 2018) في دراسته حول عزل المسببات الجرثومية لإسهال العجول في العراق إذ بلغت نسبة عزل جراثيم الإشريكية القولونية 42.85% من مسببات إسهال العجول. وأعلى مما وجدته (Soliman et al., 2019) في دراسته حول تشخيص الإسهال الناجم عن الإشريكية القولونية في العجول في مصر إذ بلغت نسبة عزل جراثيم الإشريكية القولونية 32.5% من عجول الأبقار و 22.9% من عجول الجاموس، وأعلى مما وجدته (Tarekegn and Molla, 2017) في دراسته إذ وجد أنه بلغت نسبة انتشار جراثيم الإشريكية القولونية كمسبب لإسهال العجول في مزارع الألبان في أثيوبيا كانت 70.7%.

وقد يعزى الاختلاف في معدل عزل جراثيم الإشريكية القولونية في هذه الدراسة مقارنة بالدراسات السابقة إلى الاختلاف في نظام التربية والتغذية للعجول كما تلعب العوامل الاختلافات الجغرافية والمناخية (مثل

الرطوبة ودرجة الحرارة) التي تؤثر على بقاء الجراثيم ونموها دوراً هاماً في ارتفاع معدل الإصابة، وكذلك الفروق في الممارسات الإدارية والوقائية المتبعة بين المزارع. بالإضافة إلى ذلك، فإن التباين في المنهجيات المخبرية وتوقيت وأسلوب جمع العينات، وحتى الاختلافات في السلالات الجرثومية المنتشرة في كل منطقة، قد تلعب دوراً مهماً في تفسير هذا الاختلاف.

5-2. حساسية جراثيم الإشريكية القولونية للمضادات الحيوية:

إن الأساس الجزيئي لمقاومة المضادات الحيوية ينشأ من تعديلات المادة الوراثية للجراثيم، إما عبر طفرات جينية أو عبر اكتساب جينات مقاومة جاهزة من جراثيم أخرى. تحدث هذه العملية بواسطة آليات النقل الجيني الأفقي، مثل الاقتران الجرثومي، أو نقل الجينات عبر العاثيات أو النقل بواسطة العناصر الوراثية المتنقلة.

أما الدافع الرئيسي لتطور هذه المقاومة وانتشارها التي أشارت لها هذه الدراسة فقد يعزى إلى الاستخدام المكثف وغير الرشيد للمضادات الحيوية على نطاق عالمي. يتجلى هذا في الممارسات غير المنضبطة، بالإضافة إلى الاستخدام الواسع خارج الإطار العلاجي، خصوصاً في القطاع الزراعي والثروة الحيوانية. تُستخدم كميات هائلة من المضادات كمحفزات للنمو، ولأغراض وقائية جماعية في المزارع، مما يخلق ضغطاً انتقائياً مستمراً يسرع من ظهور السلالات المقاومة وانتشارها.

تشكل هذه السلالات خطراً مباشراً على الصحة العامة، حيث تنتقل إلى الإنسان عبر استهلاك الأغذية الملوثة (كاللحوم والمنتجات الحيوانية) أو عبر الاتصال المباشر بالحيوانات الحاملة لها، مما يقود إلى حالات عدوى يصعب علاجها ويزيد من معدلات المرض والوفاة. تؤكد هذه المشكلة على الحاجة الملحة لتبني استراتيجيات متكاملة تركز على الرقابة الصارمة لاستخدام المضادات الحيوية، وتطوير بدائل علاجية جديدة، وتعزيز نظم الترصد الوبائي العالمي لمقاومة المكروبات للأدوية (Normark and Bergogne- Berezin, 1997; Normark, 2002). وفي هذا السياق أظهرت نتائج هذه الدراسة أن جراثيم الإشريكية القولونية المسببة لإسهال العجول تمتلك مقاومة واسعة للمضادات الحيوية وبالنظر إلى

الدراسات السابقة نجد أن العديد من الدراسات أشارت الى مقاومة واسعة للإشريكية القولونية المعزولة من اسهال العجول ففي دراسة (Cengiz and Adiguzel,2020) في تركيا تبين أن أعلى معدلات المقاومة للمضادات الحيوية هو للأوكسيبتتراسكلين و تريمثوبريم- سلفاميثوكسازول و نيومايسين بنسبة 78.9% و 60.9% و 58.6% على التوالي ، بينما كانت أعلى معدلات الحساسية للسيفتيفيور و السيفوبيرازون و السيفوروكسيم بنسبة 92.5%، 90.2%، 90.2% على التوالي، كما أظهرت عزولات الإشريكية القولونية المأخوذة من مزارع الأبقار في مصر في دراسة (Hakim et al., 2017) مقاومة عالية للمضادات الحيوية من مجموعة البيتا-لاكتام بنسبة تزيد عن 60%، تليها مقاومة لمجموعة السلفا بنسبة 50%، ومجموعة الأمينوغليكوزيدات بنسبة 42.8%، بينما كانت العزلات حساسة للكينولونات، التريميثوبريم-سلفاميثوكسازول، التتراسيكلين بنسبة 100%، والسيفالوسبورينات بنسبة 71.4%. وفي دراسة (Paul et al., 2010) أشارو إلى أن عزلات الإشريكية القولونية المعزولة من عجول مصابة بالإسهال في بنغلادش كانت حساسة بدرجة كبيرة للإينورفلوكساسين والسيبروفلوكساسين، وكانت متوسطة الحساسية للسيفالكسين والأموكسيسيلين، بينما كانت مقاومة لحمض الناليديكسيك والإريثرومايسين. وفي دراسة (Bok et al., 2015) في غرب بولندا على جراثيم الإشريكية القولونية المعزولة من عجول مصابة بالإسهال وأظهرت العزلات أعلى معدل مقاومة للنيوميسين بنسبة 51% وأدنى معدل مقاومة للنورفلوكساسين بنسبة 0.7%. أما بالنسبة للعزولات من الأبقار، فقد أظهرت أعلى معدل مقاومة للنيوميسين بنسبة 24.6% وأدنى معدل مقاومة للسيفتازيديم بنسبة 0.8%. وفي دراسة (Li et al., 2018) في الصين وجدوا أن سلالات الإشريكية القولونية أظهرت مقاومة بدرجات متفاوتة لـ 19 نوعاً من المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام، خاصةً التتراسيكلين، السيفرادين، الدوكسيسيكلين، الكارنيسيلين، الأميسيلين، السيبروفلوكساسين، والنورفلوكساسين، حيث كانت نسبة المقاومة لهذه المضادات تزيد عن 40%، وكانت مقاومة التتراسيكلين هي الأكثر شيوعاً بنسبة 53.7% ولم تُظهر أي سلالة مقاومة للنيومايسين أو البوليميكسين B. وفي دراسة (Jia et al., 2022) في الصين بلغت أعلى نسبة مقاومة 100% لكل من البنسلين والأموكسيسيلين كما أظهرت جراثيم الإشريكية القولونية مقاومة

عالية للسيفالوسبورينات تجاوزت 50% لمعظم أصنافها. في حين أظهرت مقاومة متوسطة للتراسيكلين والفلوروكوينولونات تراوحت بين 29% و 48% كما أظهرت جراثيم الإشريكية القولونية حساسية عالية ل البوليميكسين ب بلغت 95% و الميروبينيم بلغت 90% والأميكاسين بلغت 81% .

يمكن أن يُعزى التباين بين نتائج هذه الدراسة والدراسات السابقة إلى الاختلافات في طرق العلاج والأدوية الشائعة الاستخدام لتدبير أمراض الحيوان في مناطق الدراسات المختلفة ومدى استخدامها في الأغراض الإنتاجية.

5-3. الكشف عن جينات عوامل الفوعة:

يتألف الجينوم الأساسي (Core Genome) للإشريكية القولونية من نحو 1700 مجموعة جينات محفوظة، في حين يُقدَّر حجم الجينوم الإجمالي (Pangenome) لهذا الكائن بما يقارب 16000 إلى 40000 مجموعة جينات (Kaas *et al.*, 2012). يعود التباين الواسع في الحجم الجينومي إلى الطبيعة الديناميكية والمرنة للمادة الوراثية في هذه الجراثيم حيث يؤدي تبادل العناصر الجينية المتقلة عبر الينقولات، والعاثيات، والبلازميدات، وعناصر الإدخال، والعناصر الوراثية القافزة، وجزر الفوعة، إلى جانب آليات التغير الجيني الأخرى كالطفرات، وإعادة الترتيب الكروموسومي، وحذف أو تضاعف المقاطع الجينية، إلى تشكيل تركيبات وراثية جديدة. تُسهم هذه الآليات مجتمعة في توليد تنوع جيني كبير وتسرع من ظهور سلالات ذات إمكانات ضارية. وعندما تستقر إحدى هذه التركيب الجينية التي تحمل جينات فوعة معينة وتنتقل بشكل مستقر، تتشكل منها أنماط مرضية متميزة (Kaper *et al.*, 2004)، مما يفسر ظهور انتشار واسع لجينات الفوعة في جراثيم الإشريكية القولونية في هذه الدراسة بشكل مفرد أو بشكل هجين، وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة نجد تفاوتاً في النسب إذ وجد (أبراهيم، 2012) في دراسته أن 6% من العزولات كانت تمتلك جين Sta و جين K99 كما وجد 14% من ذراري الإشريكية القولونية تحمل جينات Stx₁ و Stx₂ ووجد أن 1.33% من ذراري الإشريكية القولونية تحمل جين eaeA، كما وجد (Osman *et al.*, 2013) في دراسته في مصر أن 17.6% من

عزولات الإشريكية القولونية المعزولة عن حالات الإسهال في العجول كانت تمتلك جين *Sta* و 52.9% من العزولات تمتلك جين *K99* ووجد أن 5.9% من ذراري الإشريكية القولونية تحمل جين *eae* كما لم يوجد عزولات تحمل الجينات *Stx₁* و *Stx₂*. وفي دراسة (Ok et al.,2007) للكشف عن جينات الفوعة للإشريكية القولونية المعزولة عن إسهال العجول في تركيا بلغ نسبة جراثيم الإشريكية القولونية الحاملة للجين *Sta* 18.9% و *Stx₁* 13.5% و *Stx₂* 5.4% و *eae* 8.1%. وفي دراسة (Cengiz and Adiguzel et al.,2020) في تركيا تم الكشف عن بعض نمط الإشريكية القولونية المسببة لإسهال العجول تبين وجود جين *stx₁* بنسبة 3.03%، وجين *stx₂* 9.09%، وجين *sta* بنسبة 21.21%، وجين *eae* بنسبة 15.15%، كما بين أن أنماط الإشريكية القولونية الممرضة المسببة لإسهال العجول هي *ETEC* بنسبة 51.5% و *EHEC* بنسبة 6.1% و *EPEC* بنسبة 15.2% ونمط هجين *STEC/EHEC* بنسبة 12.1%. وفي دراسة (Cabrera-gonzález et al.,2024) في البيرو وجد أن نسبة 83.15% تحمل جينات *Sta* و 1.05% تحمل جين *stx₂* ونسبة 21.05% تحمل جين *eae*، وبدراسة نسب الأنماط المرضية المسببة لإسهال العجول وجد أن نسبة وجود *EAEC* بلغ 4.21% ونسبة *ETEC* 3.15% ونسبة *STEC* 1.05%، كما وجد عدة أنماط هجينة للإشريكية القولونية حيث بلغ نسبة *EAEC/ETEC* 44.21% ونسبة *STEC/EAEC* 3.15% ونسبة *EPEC/ETEC* 2.10% ونسبة *STEC/EAEC/ETEC* 21.05% ونسبة *EPEC/EAEC/ETEC* 6.31% ونسبة *EPEC/STEC/EAEC/ETEC* 7.36%، وفي دراسة (Nguyen et al.,2010) تم الكشف عن نسبة 13.3% لجين *stx₁* و نسبة 21.2% لجين *stx₂* ونسبة 16.8% للجينين *stx₁*، *stx₂* معاً في حين تم الكشف عن 0.6% فقط عن جين *sta* و 9.8% لجين *eae* ونسبة 6.7% لجينات *eae* و *stx* معاً في عزولات الإشريكية القولونية المأخوذة عن العجول المصابة بالإسهال في فيتنام. في دراسة (Umpiérrez et al., 2021) في الأروغواي للكشف عن جينات الفوعة للإشريكية القولونية المسببة لإسهال العجول أظهرت نسبة انتشار الجراثيم التي تحمل جين *K99* 4%، ونسبة انتشار الجراثيم التي تحمل جين *Sta* بلغت 5.4%، في حين بلغت نسبة الجراثيم التي تحمل جين *Stx₁* 6% وبلغت نسبة

الجراثيم التي تحمل جين Stx_2 2% وبلغت نسبة الجراثيم التي تحمل جين eae 8.1% وبدراسة الأنماط المرضية لجراثيم الإشريكية القولونية بلغت نسبة جراثيم ETEC 4.4% ونسبة جراثيم STEC 5.2% و نسبة جراثيم EHEC 4% ونسبة جراثيم EPEC 2.8%

يمكن أن يُعزى الانتشار الواسع لسلاسل الإشريكية القولونية الممرضة الملاحظ في هذه الدراسة إلى غياب التلقيح ضد الإشريكية القولونية في المنطقة الجغرافية التي أُجري فيها البحث، بالإضافة إلى وجود بعض من جينات الفوعة هذه في العاثيات والبلازميدات، مما يُسهّل الانتقال الجيني الأفقي وظهور السلالات الهجينة.

كما يمكن أن تُعزى الاختلافات الملاحظة بين نتائجنا وتلك الخاصة بالدراسات السابقة إلى التباين في المناطق الجغرافية، ووبائية السلالات الممرضة من الإشريكية القولونية، فضلاً عن اختلاف أنواع التربية والممارسات الغذائية.

5-4. انتشار عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية:

تحتل عاثيات الإشريكية القولونية (Coliphages) بانتشار واسع ومثير للاهتمام في بيئات متنوعة، بما في ذلك أرضية الحظائر، والمستنقعات، والتربة الزراعية. يعكس هذا الانتشار الواسع وجود مضيفه الجرثومي بكثافة في هذه البيئات، حيث تفرز الإشريكية القولونية بكميات كبيرة من خلال روث الحيوانات وبرزاز الإنسان، مما يخلق خزانات طبيعية غنية بالعاثيات التي تتطور وتتكاثر فيها (Sulakvelidze *et al.*, 2005)، وهذا ما أيدته الدراسة الحالية.

كشفت الصفة المظهرية للبقع التحليلية (اللويحات) في هذه الدراسة عن وجود هالات باهتة مما قد يدل على وجود عاثيات معتدلة و في بعض اللويحات وهالات شفافة تماماً واضحة وكبيرة في لويحات أخرى، مما قد يشير إلى وجود عاثيات ضارية وإلى قدرة هذه العاثيات على الانتشار (الانتشار الحيوي) ووجود إنزيمات تحلل جدار الجراثيم (الأندوليسينات) (Wojcicki *et al.*, 2021). ومن المعروف أن وجود

إنزيمات الأندوليسين القادرة على تحليل عديدات السكاريد الجرثومية يزيد من كفاءة العدوى العائية لأنها تعزز تدمير الجدران الجرثومية والأغشية الحيوية (Pires *et al.*, 2016).

كما أشارت النتائج إلى خصوصية العائيات حتى على مستوى السلالة في بعض الحالات، وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة نجد أنها متقاربة مع ما وجدته (Niu *et al.*, 2009) في أرضية الحظائر حيث بلغت نسبة عزل عائيات الإشريكية القولونية 94% ، وفي دراسة (Kouadio *et al.*, 2022) فقد تم عزل عائيات الإشريكية القولونية من مياه الصرف الصحي بنسبة بلغت 90% كما وجد (Martak *et al.*, 2020) أن 80% من المستنقعات تحتوي على عائيات الإشريكية القولونية، في حين وجد (Saeed *et al.*, 2019) أن نسبة انتشار عائيات الإشريكية القولونية في تربة مزارع الفروج بلغت 58.3% أما في تربة مزارع النياض فقد بلغت 66.6%.

وبما أن الإشريكية القولونية (*Escherichia coli*) من الجراثيم السائدة في أراضي حظائر الحيوانات، يشكل هذا التواجد بيئة مثالية لتكاثر العائية وانتشاره (McMinn *et al.*, 2020) ومع ذلك، فإن ديناميكية تفاعل العائية مع العائل الجرثومي في مثل هذه البيئات تتأثر بشدة بالظروف البيئية المحيطة. كما تلعب درجة pH الوسط دورًا محوريًا في تعديل استقرار العائية ونشاطها. إذ أظهرت الدراسات أن العديد من العائيات تظهر ثباتًا ملحوظًا في نطاق الأس الهيدروجيني القلوي. حيث وجد (Zhou *et al.*, 2023) أن العائيات القولونية احتفظت بقدرتها المعدية في ظل ظروف درجة pH واسعة لفترات طويلة، مما يدل على قدرتها على البقاء في بيئات مثل التربة المسمدة ، وقد يُعزى هذا الثبات إلى الطبيعة الهيكلية القوية للقفيفة الفيروسيّة، والتي توفر حماية للحمض النووي من التحلل. كما إن تواجد العائية في التربة الزراعية تتأثر بعوامل معقدة أخرى مثل استخدام مياه الري الملوثة أو الأسمدة العضوية (مثل السماد الطبيعي)، وخصائص التربة (الرطوبة، المحتوى العضوي)، والتي تتفاعل بدورها مع درجة الحموضة لتُشكّل المحصلة النهائية لاستقرار الفيروس وقدرته على إصابة مضيفه الجرثومي (Syngouna *et al.*, 2013).

5-5. ثباتية العاثية للتغير بـ قيم الـ pH:

إن من أهم المعايير لاختيار العاثيات لمكافحة الجراثيم الممرضة هو ثباتها أثناء التخزين، وكذلك تحت ظروف تطبيقها كعلاج (Duyvejonck *et al.*, 2021) في هذه الدراسة، تم تقييم ثبات عاثية الإشريكية القولونية عند التعرض لقيم الأس الهيدروجيني (pH) المختلفة لتحديد الظروف المثلى للحفاظ على حيويتها حيث تقدم نتائج هذه الدراسة رؤى حول تأثير الظروف الحامضية والقلوية المختلفة على تركيز العاثية.

تشير نتائج تقييم ثباتية العاثية عند درجات الـ pH المختلفة إلى أن الظروف المعتدلة هي الأكثر ملاءمة للحفاظ على سلامة عاثية الإشريكية القولونية وقدرتها على العدوى. هذه النتائج تتوافق مع الدراسات السابقة التي بيّنت عن أن العاثيات المختلفة تميل إلى الحفاظ على ثباتها في ظروف قريبة من التعادل، وهو عامل مهم لكل من التخزين والتطبيق في مكافحة البيولوجية للجراثيم الممرضة (Shahin *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2021).

في المقابل، أدت كل من الظروف الحمضية (pH 3) والقلوية (pH 10) إلى انخفاض ملحوظ في تركيز العاثية. ترتبط مستويات الأس الهيدروجيني المتطرفة هذه بتأثيرات ضارة على البنية الفيروسية، على الأرجح بسبب تغير طبيعة البروتينات أو تلف القفيصة (Capsid)، مما يقلل من قدرة العاثية على إصابة الجراثيم المضيفة بشكل فعال (Majewska *et al.*, 2023; Sada and Tessema, 2024). وبالتالي يمكن لهذه الظروف القاسية أن تضر بفعالية ووظيفة العاثية.

كما أشار (Alexyuk *et al.*, 2025) في دراسته لتقييم ثبات عاثيات الإشريكية القولونية تجاه درجة الحموضة (pH) أن العاثيات المعزولة احتفظت بنشاطية تحليلية عالية، حيث لوحظت أعلى العيارات 10^8 PFU/ml عند درجة الحموضة المتعادلة 7 ودرجة pH القلوية حتى 10، وعند درجة pH 4 لوحظ انخفاض معتدل في العيار إلى 10^7 PFU/ml وفسر الباحث سبب الانخفاض بتعطيل جزئي للجسيمات الفيروسية، لكن النشاط الحال للجراثيم بقي عند مستوى ذي أهمية علاجية. عند درجة pH 12 انخفض

العيار إلى 10^4 PFU/ml، مما يشير إلى حدوث ضرر كبير للجسيمات الفيروسية تحت الظروف القلوية الشديدة. وعند قيمتي درجة الحموضة المتطرفتين 2 و 14 فقدت النشاطية الحائلة تمامًا، وأعزي ذلك إلى تدمير القفيصة (الكابسيد) أو تغير طبيعة البروتينات.

وفي دراسة (Amarillas *et al.*, 2025) على عاثيات Multidrug-resistant *Escherichia coli* (Alux-21) المعزولة من روث الماشية، إذ تم قياس تعداد العاثية القابلة للحياة بوحدة PFU/ml بعد تعريضها لكل درجة حموضة مختلفة لمدة ساعة واحدة عند 37°C حيث أظهرت النتائج انخفاضاً في تعداد عاثيات الجراثيم في درجات الحموضة الطرفية مقارنة بتعداد العاثيات المحضنة بدرجة حموضة 7، كما أظهرت النتائج انخفاض في تعداد العاثيات المعرضة لدرجة حموضة 5 بمقدار $1.5 \log_{10}$ PFU/ml أما في درجة حموضة 3 كان الانخفاض أكبر بمقدار $3.5 \log_{10}$ PFU/ml أما في درجات الـ pH القلوية فقد كان الانخفاض في تعداد عاثيات الجراثيم في درجة حموضة 9 بمقدار $1.8 \log_{10}$ PFU/ml وفي درجة الـ pH 11 فقد كان الانخفاض بمقدار $4 \log_{10}$ PFU/ml مقارنة بتعداد العاثيات في درجة pH 7 الذي أبدى ثباتية وقد بلغ $8 \log_{10}$ PFU/ml.

5-6. ثباتية العاثية للتغير في درجات الحرارة:

لقد تمت دراسة العاثيات الجرثومية لأكثر من مائة عام، مما مكننا من فهم العديد من الجوانب البيولوجية الحديثة، ومع ذلك لا يتوفر ولا يُستخدم أي أسلوب مشترك لحفظها. وعلى الرغم من ذلك، فإن الدراسات المنشورة التي تركز على هذه المسألة قليلة. وربما يعود هذا إلى الطبيعة المتنوعة الكبيرة للعاثيات الجرثومية، مما قلل الجهود المبذولة في هذا الجانب من بيولوجيا العاثيات. وفي هذه الدراسة تم دراسة تأثير كل من الحفظ بالتبريد والتجميد، حيث أظهرت النتائج أن أفضل طريقة لحفظ العاثيات هي التبريد بدرجة حرارة 4°C وبمقارنة دراستنا مع الدراسات السابقة نجد أنها متوافقة مع ما وجدته (Aşhoğlu and Ayaz, 2023) في دراستها إذ تم الحفاظ على تعداد عاثيات جراثيم *E. Coli* (M8AEC16) H7:O157 من دون مواد واقية بشكل جيد عند $+4^\circ\text{C}$ مع انخفاض غير معنوي بمقدار

(0.78 log PFU/ml) بعد 6 أشهر ، كما أظهرت مجموعة العاثيات التي عرضت للتجميد بدرجة حرارة -85 م مع إضافة الغليسيرين انخفاض غير معنوي بمقدار (1.23 log PFU/ml) بعد 6 أشهر. كما أبلغ (Alvi *et al.*, 2018) في دراسته على تقييم الظروف المناسبة للتخزين طويل المدى للعاثية إذ استخدم 5 عاثيات مختلفة معزولة من مياه الصرف الصحي خاصة بجراثيم الإشريكية القولونية السلمونيلة والإنتيروبكتريا (JHP, RLP, RSP, SaPL, IttPL) وأشار إلى عدم وجود انخفاض في عيار أي من العاثيات الخمس بعد التخزين لمدة عام عند 4°، في حين لوحظ انخفاض كبير في العيار في درجتي التجميد (-20، -80) م. حيث أنه عند -20 م تراوحت نسبة الانخفاض بين 25% إلى 71% في حين أنه عند -80 م كانت الخسائر أكثر حدة تراوحت نسبة الانخفاض بين 45% إلى 100%. وفي دراسة (Phuong *et al.*, 2022) تبين أن حفظ عاثيات الجراثيم بدرجة حرارة 4 م أدى إلى الحفاظ على عاثيات جراثيم السلمونيلة بنسبة 88.7% في حين أخبر عن حفظ عاثيات الجراثيم بالتجميد بدرجة حرارة -20 م أدى إلى الحفاظ على عاثيات جراثيم السلمونيلة بنسبة 89.7% وبدرجة حرارة -80 م بنسبة 82.9%.

أن الحفاظ على البنية التركيبية والوظيفية للعاثيات يعتمد بشكل أساسي على تجنب الإجهادات الفيزيائية الناجمة عن التجميد العميق، وهو ما يفسر تفوق التخزين عند +4 م. فقد أظهرت الدراسات السابقة أن التجميد، وخاصة عند درجات حرارة منخفضة جداً مثل -80 م أو -196 م، قد يتسبب في تشكل بلورات جليدية داخلية تؤدي إلى ضرر ميكانيكي للقفيصة الفيروسيّة (Capsid) وإلى اضطراب في تكوين البروتينات الأساسية للفيروس. وفي هذا الإطار، أشار (Clark *et al.*, 1962) إلى أن عمليات التجميد وإعادة التذويب (freeze-thaw cycles) قد تؤدي إلى فقدان كبير في الفعالية الحيوية للعاثيات الذيلية، وهو ما يتوافق مع ما لاحظناه (Aşihoglu and Ayaz, 2023) من انخفاض في العيار عند -85 م.

علاوة على ذلك، فإن الاستقرار البنيوي للعاثيات عند +4 م يمكن تفسيره أيضاً من خلال الحفاظ على التوازن الديناميكي للطبقة المائية المحيطة بالجسيم الفيروسي، والتي تلعب دوراً حاسماً في استقرار

التفاعلات داخل القفيصة. ففي حين أن التجميد العميق قد يعطل هذه الطبقة المائية ويؤدي إلى تجفيف جزئي أو تغيير في توزيع الشحنات السطحية، فإن التبريد المعتدل يحافظ على البيئة المائية الثابتة حول الفيروس دون تعريضه لصدمة تجميد. وهذا ما أيدته دراسة (Ackermann *et al.*, 2004) التي أكدت أن العاثيات الذيلية غير المحتوية على دهون يمكن أن تحافظ على فعاليتها لسنوات عند تخزينها في وسط سائل بدرجة حرارة ثلاجة عادية، دون الحاجة إلى تجميد عميق، وقد ذكر (Weber-Dąbrowska *et al.*, 2016) أنه يمكن لبعض العاثيات أن تحافظ على عددها عند 4°م لمدة تصل إلى 30 سنة، كما بيّن (Merabishvili *et al.*, 2009) أن الحماية الأساسية من التبخر والتلوث كافية للحفاظ على العدد عند 4+°م، بينما قد تضيف مواد الحفظ الكيميائية مخاطر غير ضرورية أو تفاعلات جانبية مع المكونات الفيروسيّة.

يؤثر التعرض الحراري للعاثيات بشكل عميق ومتعدد الأوجه، بدءاً من التغيرات البنوية للبروتين والقفيصة الفيروسيّة، وصولاً إلى التأثير على المادة الوراثية (DNA أو RNA) ووظائفها. تتراوح استجابات العاثيات للحرارة من التثبيت المؤقت للنشاط عند درجات حرارة معينة إلى التعطيل الكامل والإبادة الحرارية عند تجاوز عتبات حرجة، وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة فعالية عاثيات جراثيم الإشريكية القولونية بعد تعريضها لإجهاد حراري بدرجات حرارة مختلفة، إذ انخفض تعداد عاثيات الإشريكية القولونية عند درجة الحرارة 55 م° وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما وجدته (Zhang *et al.*, 2025) عند استخدام خليط من عاثيتين لـ K. pneumonia (Kp7 + Kp11)، أدت المعالجة الحرارية بدرجة حرارة 50 م° لمدة 90 دقيقة أيضاً إلى انخفاض في عدد لويحات العاثيات (PFUs) مقارنة بالتعداد المبدئي، وقد أعزى الباحثون أن السبب هو خلل في مرحلة لاحقة من دورة العدوى، وهي حقن الحمض النووي. حيث أظهرت النتائج أن كمية الحمض النووي للعاثية التي دخلت الخلية الجرثومية انخفضت بشكل كبير بعد المعالجة الحرارية، حيث يؤدي الإجهاد الحراري إلى انخفاض في تركيز العديد من بروتينات الغلاف مما قد يؤثر على البروتينات الضرورية التي تعمل كـ "مستقبلات ثانوية" لبدء عملية حقن الحمض النووي، حتى لو بقي المستقبل الأساسي سليماً. كما أظهرت نتائج (Taj *et al.*, 2014) أن نطاق النشاط الحراري

للعائيات T4 ضد الإشريكية القولونية يتراوح بين 15°م و 41°م، مع ذروة الكفاءة عند 37°م. وتعمل العائيات بشكل ضعيف كلما ابتعد خارج هذا النطاق. وفي دراسة (Alexyuk *et al.*, 2025) أظهر اختبار الثبات الحراري لعائيات الإشريكية القولونية أن جميع العائيات المعزولة حافظت على عياراتها الحالة الأولية ضمن مدى درجات حرارة من درجة حرارة الغرفة حتى 50 درجة مئوية. كما أدى تجميد العينات دون مواد واقية من التجميد إلى انخفاض متوسط في عيار العائيات بمقدار رتبة واحدة (عشرة أضعاف)؛ ومع ذلك، بقيت النشاطية الحائلة عند مستوى مقبول. كما أشارت نتائج (Pope *et al.*, 2004) إلى زيادة إنتاج العائيات حتى درجات حرارة تقارب 39°م. هذه النتيجة متوافقة مع (Basdew and Laing, 2014) التي أشارت إلى أن ارتفاع درجة الحرارة يؤدي إلى تقليل بقاء ونشاط الفيروسات بسبب تغير في بنية البروتينات الفيروسية وإتلاف الحمض النووي. في حين أظهرت نتائج (El-Tarabily, 2019) أن العائيات (Ø1، Ø2، Ø3) الخاصة بالإشريكية القولونية *Escherichia coli* O157:H7 والعصوية الرقيقة *Bacillus subtilis* والسلمونيلة الملهبة للأمعاء *Salmonella enteritidis* على التوالي كانت حساسة لدرجات الحرارة المرتفعة بنسب متفاوتة إذ أن Ø1 كانت مقاومة للحرارة بشكل أكبر من Ø2، Ø3، حيث انخفضت قدرتها على البقاء والتكاثر مع زيادة درجة الحرارة وطول فترة التعريض، إذ أنها عند 45°م لمدة 15 دقيقة لم يظهر انخفاض معنوي في عدد اللويحات (PFU) للعائيات Ø1 و Ø2، بينما انخفضت بنسبة طفيفة ل Ø3، وعند 55°م لمدة 30 دقيقة انخفضت أعداد العائيات Ø2 بنسبة 72.18% و Ø3 بنسبة 45.3%، بينما انخفضت Ø1 بشكل أقل بنسبة 4% وعند 65°م لمدة 30 دقيقة انخفضت أعداد جميع العائيات بشكل ملحوظ خاصة Ø2 بنسبة 83.12% و Ø3 بنسبة 82.96% بينما انخفضت Ø1 بنسبة 22.9%. في حين أن الغليان 100°م أدى إلى تدمير كامل للعائيات بعد 5-10 دقائق.

5-7. تأثير الأشعة فوق بنفسجية على عائيات الجراثيم:

تبرز الأشعة فوق البنفسجية (UV) كأحد العوامل الأكثر انتشاراً وتأثيراً على الأنظمة البيولوجية الدقيقة. بينما تستخدم هذه الإشعاعات على نطاق واسع لأغراض التعقيم والتطهير لقدرتها المدمرة على

المكروبات، تم دراسة تأثير تحمل عاثيات الجراثيم للأشعة فوق البنفسجية وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة انخفاضاً ملحوظ بزيادة فترة التعرض للأشعة فوق البنفسجية وهذا ما يوافق دراسة (El-Tarabily, 2019) إذ أظهرت العاثيات ($\emptyset 1$ ، $\emptyset 2$ ، $\emptyset 3$) حساسية متفاوتة للمعالجة بالأشعة فوق البنفسجية (UV)، حيث كانت $\emptyset 1$ هي الأكثر مقاومة، بينما كانت $\emptyset 2$ هي الأكثر حساسية. إذ أنه عند 30 ثانية من التعرض للأشعة فوق البنفسجية، لم يظهر انخفاض معنوي في عدد اللويحات (PFU) للعاثية $\emptyset 1$ والعاثية $\emptyset 3$ ، في حين انخفضت $\emptyset 2$ بشكل حاد بنسبة 74.34%. أما عند 60 ثانية حافظت $\emptyset 1$ على مقاومة عالية، بينما تزايد فقدان $\emptyset 2$ إلى 81.19%، وانخفضت $\emptyset 3$ بشدة إلى 82.07%. وعند 120 ثانية، أصبحت العاثيتان $\emptyset 2$ و $\emptyset 3$ غير فعاليتين تماماً (فقدان 100%)، في حين انخفضت فعالية $\emptyset 1$ بنسبة 88.74% و عند 180 ثانية فما فوق، أدى التعرض للأشعة فوق البنفسجية إلى تدمير كامل لجميع العاثيات ($\emptyset 1$ ، $\emptyset 2$ ، $\emptyset 3$).

تُعد طبيعة المادة الوراثية العامل الأكثر أهمية في تحديد الحساسية للأشعة فوق البنفسجية، إذ تسبب الأشعة فوق البنفسجية تكون روابط تساهمية بين القواعد النيتروجينية المتجاورة في سلسلة الحمض النووي، تُعرف باسم ثنائيات البيريميدين (Pyrimidine Dimers)، وأكثرها شيوعاً ثنائيات الثايمين (Thymine Dimers) في الحمض النووي DNA (Rastogi et al., 2010). العاثيات ذات الحمض النووي DNA ثنائي السلسلة (dsDNA) هي الأكثر حساسية عموماً حيث يمتص DNA الأشعة فوق البنفسجية بقوة عند حوالي 260 نانومتر، مما يؤدي إلى تكوين ثنائيات الثايمين التي تشوه حلزون DNA وتعطل عمليات النسخ والترجمة (Sinha and Häder, 2002). هذا قد يفسر الحساسية العالية للعاثية $\emptyset 2$ في دراسة (El-Tarabily, 2019) أما العاثيات ذات الحمض النووي DNA مفرد الطاق (ssDNA) فقد تكون أقل حساسية قليلاً من dsDNA لأن بنيتها أحادية السلسلة قد تمنع تكون بعض أنواع الثنائيات، والعاثيات ذات الحمض النووي الريبوزي RNA غالباً ما تكون أكثر مقاومة إذ يمتص RNA الأشعة فوق البنفسجية بقوة أقل و نظراً لأن RNA عادة ما يكون مفرد الطاق، فإن تكون "ثنائيات اليوراسيل" أقل كفاءة أو استقراراً منه في DNA ثنائي السلسلة بالإضافة إلى ذلك، قد يكون

الضرر الناجم عن الأشعة فوق البنفسجية على RNA غير مباشر أكثر، مرتبطاً بتكوين أنواع الجذور المؤكسدة (ROS) التي تؤكسد القواعد (Kovacs and Kessler, 2018) كما تؤدي القفيصة البروتينية (Capsid) للعائثة دور درع وقائي للمادة الوراثية وتحدد سماكته، ومدى تجانسه، وطبيعة الطي البروتيني مدى نفاذية الأشعة فوق البنفسجية داخله (Bosshard *et al.*, 2010).

5-8. تآزر عائيات الإشريكية القولونية مع المضادات الحيوية:

يشكل الانتشار الواسع لتعدد المقاومة للأدوية بين الكائنات الدقيقة الممرضة إحدى المشكلات الرئيسية للطب البيطري ، ويكون معدل تطور المقاومة مرتفعاً بشكل خاص في تربية الحيوانات بسبب الاستخدام غير المنضبط للأدوية المضادة للجراثيم. بالإضافة إلى ذلك، يتفاقم خطر انتشار العدوى الجرثومية المقاومة بسبب انخفاض فعالية المضادات الحيوية المستخدمة عملياً، وكذلك التباطؤ الحاد في معدل تطوير المستحضرات المضادة للجراثيم الجديدة (Mellbye and Butler and Buss, 2006 ; Schuster, 2011).

شهدت العقود الأخيرة زيادة حادة في الاهتمام بالعائيات كبديل للعلاج بالمضادات الحيوية (Dedrick *et al.*, 2019). وبالنظر إلى مزايا وقيود العلاج بالعائيات، وكذلك استخدام المضادات الحيوية، تم اقتراح مفهوم العلاج المركب بالعائيات والمضادات الحيوية حيث أظهرت الأبحاث التي أجريت في هذا الاتجاه أن الاستخدام المتزامن للمضادات الحيوية والعائيات يؤدي إلى استئصال أكثر فعالية وسرعة للأشكال المقاومة للمضادات الحيوية من الجراثيم الممرضة مقارنة باستخدام إحدى هذه الطرق بمفردها (Kamal and Dennis, 2015). لذلك، في الدراسة الحالية أُجريت تجارب لتقييم التأثير التآزري للاستخدام المشترك لخليط قائم على العائيات المعزولة وثلاثة مضادات حيوية (ستربتومايسين، أوكسي تتراسكلين، نيومايسين) شائعة الاستخدام في الممارسة البيطرية وتظهر مستويات عالية من المقاومة بين سلالات الإشريكية القولونية المعزولة من إسهال العجول ، حيث تم تقييم التآزر بين العائيات والمضادات الحيوية باستخدام طريقة "رقعة الشطرنج" مع تحديد أقل تركيز قاتل (MBC)

وحساب التركيز القاتل الكسري (FBCI). حيث أظهرت النتائج إن الجمع بين عاثيات الإشريكية القولونية والمضادات الحيوية أدى إلى فعالية أكبر من استخدام العاثيات منفردة أو المضاد الحيوي منفرداً حيث أن تأزرهما معاً أدى إلى خفض التركيز القاتل الأدنى للمضاد الحيوي، كما لوحظ زيادة تعداد عاثيات الإشريكية القولونية مما يدل على أنها تتكاثر في موقع العدوى فتُحدد جرعتها ذاتياً وهذا ما أكدته (Payne *et al.*, 2000). وبالنظر إلى دراسات مشابهة نجد أن (Narulita *et al.*, 2020) ذكر في دراسته أن الجمع ما بين عاثيات الإشريكية القولونية والنتراسكلين، وكذلك الجمع ما بين العاثيات والأموكسيسيلين أدى إلى خفض التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية، وفي دراسة (Moradpour *et al.*, 2020) أظهر أن التآزر ما بين المضاد الحيوي الأمبسلين والعاثية بلغ أعلى تأثير تآزري عند تركيز $6 \mu\text{g/ml}$ من الأمبسلين مع العاثيات حيث بلغ مقدار تثبيط نمو جراثيم الإشريكية القولونية 95% مقارنة بـ 85% للعاثية بمفردها و 82% للمضاد الحيوي بمفرده كما أدى التآزر إلى تغيير حساسية الجرثوم باختبار الانتشار على الأطباق من مقاوم إلى حساس حيث زاد قطر منطقة التثبيط حول أقراص الأمبيسيلين من 12.6 مم إلى 27 مم، في دراسة مماثلة، أدى تطبيق العاثية ضد المكورة العنقودية الذهبية إلى زيادة بنسبة 10% في منطقة تثبيط السيبروفلوكساسين (Jo *et al.*, 2016) أما في دراسة (Shamsuzzaman *et al.*, 2025) فقد أدى التآزر بين العاثيات والكولستين إلى انخفاض في التركيز المثبط الأدنى تتراوح بين 4-8 أضعاف، كما أدى التآزر بين العاثيات والمضاد الحيوي الميروبينيم إلى انخفاض وسطي للتركيز المثبط الأدنى 4 أضعاف وكذلك التآزر مع المضاد الحيوي التيجيسيكلين. كما أظهرت نتائج (Alexyuk *et al.*, 2025) في دراستهم لتقييم التأثير التآزري للتفاعل بين عاثيات الإشريكية القولونية والمضادات الحيوية (الأمبسلين، الكولستين، الجنتاميسين) أنه من بين 15 تركيبة اختُبرت (3 مضادات حيوية \times 5 سلالات)، تم اكتشاف تأثير تآزري في 8 حالات (53.3%)، وتأثير إضافي في 4 حالات (26.7%)، وعدم تفاعل في 3 حالات (20%).

وقد أشارت الدراسات إلى أن التأثير التآزري بين عاثيات الجراثيم والمضادات الحيوية قد يعود إلى أن المضاد الحيوي يضعف الجدار الخلوي للجراثيم مما يسمح بدخول أكبر للعاثيات وقتل الخلية الجرثومية

أو أن المضاد الحيوي يؤدي إلى تثبيط تكاثر الجراثيم في الوقت الذي تتكاثر فيه العاثيات داخل الجراثيم وتقتلها وتطلق فيروسات جديدة أو أنه قد تؤدي المضادات الحيوية المثبطة لتخليق البروتين إلى منع الدخول في الدورة الاستجابية للعاثيات المستديية وإجبارها على الدخول في دورة حالة (*Supina and Dennis, 2025*).

كما ذكر (*Ruest et al., 2023*) أنه عند تطوير الجراثيم مقاومة ضد العاثية إما عن طريق تعديل المستقبلات السطحية التي ترتبط بها العاثية أو فقدانها، مثل عديدات السكاريد الشحمية LPS أو المحفظة ، قد تدفع هذه الطفرات الجراثيم إلى فقدان هذه المستقبلات أو تغيير في الجدار الخلوي التي غالبًا ما تكون مسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية مثل منع دخول الدواء أو طرده عبر مضخات التدفق مما يجعلها أكثر حساسية للمضاد الحيوي مجددًا. في حين ذكر (*Parab et al., 2025*) أن وجود المضاد الحيوي بتركيزات تحت مثبطة قد يحد من أنواع الطفرات التي يمكن للجراثيم أن تطورها لمقاومة العاثية حيث أنه عند إضافة الكلورامفينيكول أو الجنتاميسين إلى عاثية الإشريكية القولونية ϕX174، انخفض تطور مقاومة العاثية بشكل ملحوظ، لأن المضاد الحيوي منع انتشار أنواع معينة من الطفرات في LPS التي تمنح المقاومة.

وقد أظهرت دراسة (*Chan et al., 2016*) أن جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* التي طورت مقاومة للعاثية OMK01 التي ترتبط ببروتين OprM في جزء من مضختي MexXY-OprM و MexAB-OprM فقدت أو غيرت هذا البروتين، فأصبحت أكثر حساسية للمضاد الحيوي السيبروفلوكساسين والتتراسيكلين، كما هناك أيضًا عاثيات أخرى تستهدف بروتين TolC في جراثيم الإشريكية القولونية *E. coli* ، وهو مكون رئيسي في مضخات التدفق (*Burmeister et al., 2020*)

وأشار (*Qin et al., 2024*) أنه تحت الضغط المشترك من العاثية والمضاد الحيوي معًا، قد تختار الجراثيم طفرات تمنحها مقاومة ضد أحدهما، لكنها تضعفها بشدة في مواجهة الآخر أو تقلل من نشاطها

حيث أنه عند تعريض الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* للعائثة HS والمضاد الحيوي سيفتازيديم معاً، ظهرت طفرات في جينات مرتبطة بتصنيع المحفظة و LPS أدت إلى حساسية أعلى للمضاد ونمو أبطأ للجرثوم. إذ يتم تحقيق الدفاع الأساسي ضد العائثة عن طريق طفرة أو إخفاء مستقبلات العائثة حيث أنه غالباً ما تأتي تعديلات السطح بتكلفة ثابتة ولكن غير تكيفية ومتعددة المظاهر للجراثيم المضيفة ويمكن أن يكون لها تأثير مباشر على مقاومة المضادات الحيوية إذا كان مستقبل العائثة له دور في آليات مقاومة المضادات الحيوية.

حيث أنه يوجد علاقة مباشرة بين فقدان مستقبل العائثة والحساسية للمضاد الحيوي، فإن حالات عدم التجانس في الطفرات استجابة لعدوى العائثة تشير إلى أن التحسس قد يحدث أيضاً بشكل غير مباشر وفقاً لذلك، افترض الباحثون أن الطفرات منحت على الأرجح مقاومة تجاه العائثة HS، بينما قد ترتبط زيادة القابلية للتأثر بالدواء بانخفاض طرد المضاد الحيوي سيفتازيديم. تشير هذه الأمثلة معاً إلى أن تطبيق العائثات التي تستهدف التراكيب المعززة للطرد أو المحددة للدخول يمثل نمطاً جديداً واعدداً من التآزر بين العائثات والمضادات الحيوية.

أو يُعزى التأثير التآزري الملحوظ في هذه الدراسة إلى آليات عمل تكميلية، فالأمينوغليكوزيدات مثل الستربتوميسين والنيوميسين وكذلك الأوكسي تتراسكلين تثبط تخليق البروتين الجرثومي من خلال الارتباط بوحدة الريبوسوم S 30 مما يؤدي إلى توقف نمو الخلية والقضاء على الجراثيم، وبما أن جراثيم الإشريكية القولونية مقاومة لهذه المضادات الحيوية، فإنه عند تطبيقها بالتآزر مع العائثات، تعمل العائثات على قتل الجراثيم وتطبيق ضغط انتقائي يدفعها لتشكيل مقاومة تجاه هذه العائثات، وبشكل أساسي تكون مقاومة الجراثيم ضد العائثات بتعديل المستقبلات السطحية وتغيير في الجدار الخلوي الذي غالباً ما يكون مسؤولاً عن مقاومة المضادات الحيوية كمنع دخولها أو طردها عن طريق مضخات الطرد، وهذا يجعل الجراثيم أكثر حساسية تجاه المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة، وهذا ما يفسر انخفاض في عيار العائثة بزيادة تركيز المضاد الحيوي، مما يشير إلى أن الفعل القاتل للجراثيم هو للمضاد الحيوي في حال دخوله

للخلية الجرثومية مع العائثة في نفس الوقت، إذ يؤدي إلى توقيف الريبوزومات عن العمل وتثبيط تخليق البروتين للخلية الجرثومية أو العائثة.

5-9. دراسة استخدام العائثات كعلاج داخل الجسم الحي:

يعد التهاب الأمعاء الدقيقة والتهاب القولون نموذجان شائعان للعدوى تتم دراستهما لاستخدام العلاج بالعائثات. نظرًا لأن الالتهابات المسببة للإسهال تؤثر بشكل أساسي على تجويف الجهاز الهضمي، فإن هذه الدراسات تتيح التجربة باستخدام العائثات الفموية (من دون الحاجة إلى امتصاصها جهازياً)، مما يبسط إعطاء العلاج بالعائثات.

في هذه التجربة التي أُجريت على الأرانب المصابة بعدوى الإشريكية القولونية، حيث تم تقييم فعالية عدة علاجات بعد ظهور الإسهال كعرض رئيسي. شملت العلاجات المُختبرة: العائثات وحدها، والعائثات بالتآزر مع المضاد الحيوي، والمعززات الحيوية، بالإضافة إلى مجموعات ضابطة (سليمة ومصابة من دون علاج). وتم استخدام البروتينات الطورية الحادة (APPs) كمعلمات للكشف المبكر عن الإصابة بعدوى الإشريكية القولونية ومراقبة سير المرض والعلاج في حيوانات التجربة. وقد أحدثت الإصابة التجريبية للأرانب بجراثيم الإشريكية القولونية ارتفاعاً ملحوظاً في بروتينات الطور الحاد وبفترات مختلفة إذ تبين أن الأسرع في الارتفاع كان الـ CRP يليه الـ HP ثم يليه الـ CP وارتفاعاً في تعداد جراثيم الإشريكية القولونية EHEC في مجموعة العدوى غير المعالجة، مما يدل على شدة الاستجابة الالتهابية وتطور العدوى، وترافق ذلك مع معدل للنفوق بلغ أعلاه في مجموعة العدوى غير المعالجة. في المقابل، سجلت العلاجات المختلفة درجات متفاوتة من الفعالية في كبح هذه المؤشرات.

حيث أظهرت نتائج هذه الدراسة أن العلاج بالعائثات بالتآزر مع المضاد الحيوي (E + Ph&A) كان هذا النهج العلاجي الأكثر فعالية بشكل عام حيث أدى إلى انخفاض واضح وسريع في المؤشرات الالتهابية CRP و HP كما أظهر فعالية في السيطرة على المؤشر (CP) مقارنة بمجموعة العدوى غير المعالجة وبباقى المجموعات، وانخفاض كبير في تعداد جراثيم EHEC في الروث. كما أنه حقق معدل نفوق

صفري، مما يعكس قدرته العالية على السيطرة على العدوى ومنع تطورها القاتل. كما أظهر العلاج بالعائيات وحدها (E + Ph) فعالية واضحة ولكن أقل من النموذج التآزري، إذ أدى إلى خفض تعداد الجراثيم والمؤشرات الالتهابية مقارنة بالمجموعة غير المعالجة. ومع ذلك، كانت استجابته أبطأ وأقل اكتمالاً، وترافق مع حالات نفوق، أما العلاج بالمعززات الحيوية (E + Pr) أظهر تأثيراً علاجياً محدوداً ومتأخراً حيث لوحظ انخفاض طفيف في بعض المؤشرات الالتهابية مع تقدم الوقت، ولكنه كان أقل وضوحاً مقارنة بالعلاجين السابقين مع استمرار وجود تعداد جرثومي مرتفع نسبياً لفترة أطول كما لم يمنع حدوث بعض حالات النفوق ويشير هذا إلى دور محتمل للبروبيوتيك كعامل مساعد أو في حالات أقل شدة، وليس كعلاج أحادي ضد عدوى الإشريكية القولونية المنزفة للأمعاء في هذه التجربة.

إن استجابة الطور الحاد (APR) تمثل رد فعل مبكراً ومعقداً للغاية للكائن الحي تجاه أنواع مختلفة من الإصابات مثل العدوى الجرثومية أو الفيروسية أو الطفيلية، أو الصدمات الميكانيكية أو الحرارية، أو النخر الناتج عن الإقفار، أو النمو الخبيث (Cray, 2022). تعمل مجموعة من التغيرات في الكائن الحي بتناسق لتحديد العامل المسبب للالتهاب وتعزيز النئام الأنسجة التالفة (Jain et al., 2021).

وقد ربطت الأبحاث بين زيادة إنتاج بروتينات الطور الحاد وبين حالات العدوى والالتهابات الحادة في الجسم (Sheriff et al., 2021)، ووفقاً لـ Matson وآخرون (2012)، فإن الهابتوغلوبين (HP)، وهو أحد البروتينات الطورية الحادة، يتواجد في بلازما جميع الحيوانات وترتفع مستوياته استجابة للحالات الالتهابية، أما السيرولوبلازمين (CP) فهو بروتين سكري من نوع α_2 يُعد أحد أهم بروتينات الطور الحاد الإيجابية، يؤدي دوراً حيوياً كإنزيم فيروكسيداز، يتمتع بنشاط مضاد قوي للأكسدة يحمي أنسجة العائل من إطلاق مستقبلات الأكسجين السامة من الخلايا البلعمية في حالة الالتهاب (Bakhautdin et al.,

2014)

ترتفع التركيزات الدموية لبعض بروتينات الطور الحاد عند الإصابة بالتهاب، وتتراوح شدة هذا الارتفاع من حوالي 50% في حالة السيرولوبلازمين وبعض مكونات المتممة، إلى ما يصل إلى 1000 ضعف

في حالة البروتين التفاعلي C (CRP) و الأميلويد A المصلي (Eckersall, 2000). وترتبط التغيرات في تركيزات هذه البروتينات في الدم بشدة الاضطراب ومدى تلف الأنسجة في الحيوان المصاب؛ لذا يمكن أن يوفر قياسها معلومات تشخيصية وتنبؤية إذا تم ضبط التوقيت المناسب لأخذ العينات (Jain *et al.*, 2021).

وافقت نتائج هذه الدراسة ما بينه (Sproston and Ashworth, 2018) بأن بروتين CRP هو الأسرع والأكثر حدة في الاستجابة للالتهاب، حيث يبدأ مستواه في الارتفاع خلال 4-6 ساعات من بداية العدوى، ليصل إلى ذروته خلال 24-48 ساعة، نظراً لقصر عمر النصف لديه (حوالي 19 ساعة)، فإنه ينخفض بسرعة كبيرة بمجرد السيطرة أو انخفاض العدوى، مما يجعله مؤشراً ممتازاً لمراقبة فعالية العلاج، كما إن استجابة بروتينات الطور الحاد الأخرى تكون أبطأ. حيث يبدأ الهابتوغلوبين في الارتفاع بعد حوالي 24-48 ساعة ويصل إلى ذروته بعد عدة أيام (4-5 أيام)، بينما يعد السيروبلازمين ابطأ من الـ CRP و HP في الاستجابة، إذ يبدأ الارتفاع بعد حوالي 48 ساعة ولا يصل إلى ذروته إلا بعد 4 إلى 7 أيام، وغالباً ما يستغرق أسابيع ليعود إلى مستواه الطبيعي (Del Giudice and Gangestad, 2018). وقد أشار (Al-Ali *et al.*, 2025) إلى ارتفاع في كل من بروتينات الطور الحاد (CRP, CP, HP) عند إصابة الأرانب بالإشريكية القولونية O26 حيث بلغ CRP ذروته عند اليوم الثالث بعد العدوى التجريبية ثم بدأ بعدها بالانخفاض أما الـ HP فقد بلغ ذروته في اليوم الـ 11 بعد العدوى التجريبية أما الـ CP فقد بدأ بالارتفاع في اليوم الثالث وبلغ ذروته في اليوم 15 بعد الإصابة، كما وجد (Georgieva *et al.*, 2009) ارتفاع في كل من بروتينات الطور الحاد عند إصابة الأرانب بالإشريكية القولونية O15 حيث بلغ الـ HP ذروته في اليوم الـ 3 بعد العدوى التجريبية أما الـ CP فقد بدأ بالارتفاع بعد اليوم الثالث وبلغ ذروته في اليوم 11 بعد الإصابة. وفي دراسة (Peñailillo *et al.*, 2016) ارتفعت قيم CRP في المصل بشكل ملحوظ بعد 4 ساعات من الحقن الوريدي لعديد السكاريد الشحمي (LPS) المستخلص من جراثيم الإشريكية القولونية، وبجرعة $1\mu\text{g}/\text{kg}$ وظلت مرتفعة حتى 24 ساعة، كما أكد

(Petersen *et al.*, 2004) على أنه يمكن أن ترتفع بروتينات الطور الحاد بمقدار قد يصل حتى 1000 ضعف استجابة للإصابات والحالات الالتهابية والعدوى.

وبالنظر إلى الدراسات السابقة لاستخدام العاثيات في علاج الإصابات الجرثومية نجد أن نتائج هذه الدراسة متوافقة مع دراسة (Tanji *et al.*, 2005) لتحري الاستخدام العلاجي لخليط العاثيات في السيطرة على جراثيم الإشريكية القولونية O157:H7 في الجهاز الهضمي، تم اختيار ثلاث عاثيات، وهي SP15 و SP21 و SP22، من مجموعة مكونة من 26 عاثياً جُمعت من روث حيوانات المزرعة ومياه الصرف الصحي. تم إعطاء كوكتيل العاثيات (SP15-21-22) المعلق في محلول يحتوي على 0.25% كربونات الكالسيوم فموياً للفئران التي سبق إعطاؤها جراثيم الإشريكية القولونية O157:H7 قبل يومين، تم مراقبة تركيز الإشريكية القولونية والعاثية في البراز لمدة 9 أيام بعد إضافة العاثي، إذ تم الكشف عن عيار عالٍ من العاثية في الروث عندما أُعطي كوكتيل العاثيات يومياً. كما انخفض تركيز الإشريكية القولونية O157:H7 في الروث خلال فترة التجربة، حيث كان الإعطاء الفموي المتكرر لخليط SP15-21-22 فعالاً في القضاء على الإشريكية القولونية O157:H7 بسرعة في الجهاز الهضمي للفئران. كما وجد (Zhao *et al.*, 2017) في دراسته تقييم كفاءة العلاج بعاثية نوعية (ZRP1) في علاج عدوى الإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء α EPEC لدى الأرانب، ومقارنته بالمضاد الحيوي (سيبروفلوكساسين) من حيث الفعالية وتأثير كل منهما على التركيب الطبيعي للفلورا المعوية نجح كل من العلاج بالعاثية والمضاد الحيوي في تحسين الأعراض، وخفض المؤشرات الالتهابية ونسبة الجراثيم الممرضة مقارنة بالمجموعة غير المعالجة، مع تفوق المضاد الحيوي في تعزيز زيادة الوزن، وقد أظهر العلاج بالعاثية انتقائية عالية، حيث خفض مستويات الجراثيم المستهدفة في محتويات الأعور مع الحفاظ على التركيب الأصلي والتوازن الطبيعي للفلورا. وفي دراسة (Boydak *et al.*, 2025) استهدفت تقييم فعالية العاثيات في علاج إسهال الحملان الناتج عن عدوى الإشريكية القولونية، تم عزل عاثية نوعية (Φ IA-38) من مياه الصرف الصحي في مزرعة أغنام صغيرة، إذ أظهرت هذه العاثية فعالية تحليلية واسعة ضد سلالات متعددة من الجراثيم، كما تبين خلّو جينومها من أي جينات مرتبطة بالمقاومة

للمضادات الحيوية أو الفوعة، شملت التجربة توزيع 36 حملاً مصاباً بالإسهال إلى مجموعات مختلفة، حيث ركزت النتائج على المقارنة بين العلاج بالعائيات والعلاج التقليدي بالمضادات الحيوية (مزيج من البنسلين والستربتوميسين). أظهرت المجموعة التي عولجت بالعائيات بشكل علاجي (بعد الإصابة بيوم واحد) انخفاضاً ملحوظاً في أعداد جراثيم *E. coli* K99 في الروث، بشكل مماثل لفعالية العلاج بالمضادات الحيوية. من الناحية المناعية، لوحظ في اليوم السابع ارتفاع ملحوظ في مستوى الغلوبولين المناعي (IgM) في مجموعتي العائيات (العلاجية والوقائية) مقارنة بالمجموعات الأخرى. وفي اليوم العاشر، كانت مستويات الهابتوغلوبين (Hp)، في أدنى مستوياتها في المجموعة التي عولجت بالعائيات علاجياً، مما يشير إلى انحسار أقوى للالتهاب. كما لوحظت مستويات مرتفعة من الغلوبولين المناعي G (IgG) في المجموعة التي تلقت العائيات بشكل وقائي. في المقابل، استمرت مستويات بروتين المصل الأميلويد A (SAA) في الارتفاع طوال فترة القياس في المجموعة المعالجة بالمضادات الحيوية، مما يشير إلى استمرار استجابة التهابية أطول مقارنة بمجموعات العائيات.

كما قام (Jamalludeen *et al.*, 2009) بعدوى للخنازير عن طريق الفم بـ 10^{10} CFU من الإشريكية القولونية المذيغنة للأعضاء (ETEC) وبعد 24 ساعة قاموا بإعطاء مزيج من عائيتين بإجمالي 10^8 PFU/ml على ثلاث جرعات، تفصل بينها 6 ساعات. مقارنة بالمجموعة الضابطة التي لم تتلق العائيات، وبالتالي قلل الإعطاء الفموي للعائيات من تطور الإسهال وكمية ETEC في روث الخنازير.

وفي دراسة (Dissanayake *et al.*, 2019) لمقارنة فعالية مزيج من العائيات مع المضاد الحيوي أمبيسيلين في علاج عدوى الإشريكية القولونية O157:H7 في الفئران، إذ أظهرت نتائج الدراسة أن مزيج العائيات قلل أعداد الجراثيم الحية بنسبة 54%، بينما قللتها الأمبيسيلين بنسبة 79%، في حين لم تسبب أي تغيير ملحوظ في تنوع أو تركيب الميكروبيوم المعوي بينما سبب الأمبسلين اضطراباً كبيراً في الميكروبيوم، مع استعادة جزئية فقط بعد 10 أيام. كما أظهرت دراسة (Alomari *et al.*, 2021) لتقييم استخدام تحاميل تحتوي على معززات حيوية وعائيات متخصصة لمكافحة الإشريكية القولونية (*E. coli*) الممرضة في العجول الصغيرة المصابة بالإسهال. حيث قللت التحاميل المحتوية على المعززات الحيوية

والعاثيات من مدة الإسهال في العجول، وقضت عليه تمامًا في غضون 24-48 ساعة بعد الاستخدام، كما حفز العلاج تنشيط آليات المناعة في العجول، مما ترجم إلى استجابة نوعية وغير نوعية معززة وزيادة في مقاومة العدوى كما بقيت العاثيات فعالة ومستقرة في الروث لمدة تصل إلى أسبوعين بعد انتهاء العلاج.

وفي دراسة (Wang et al., 2022) لتقييم مدى سلامة وفعالية العلاج بكوكتيل العاثيات (PNJ1902 و PSD2001 و PSD2002) مقارنة بالمضاد الحيوي إنروفلوكساسين من حيث السيطرة على السموم الجرثومية والاستجابة الالتهابية في الفئران المصابة بـ E.coli O157:H7، تم قياس تركيز ذيفان شيغا في مصل دم الفئران على مدى 7 أيام بعد العلاج حيث أظهرت النتائج أن مجموعة العلاج بالعاثيات أطلقت كميات أقل بكثير من ذيفان شيغا مقارنة بمجموعة المضاد الحيوي. وبقياس مؤشرات الالتهاب أظهرت النتائج تفوقاً واضحاً للعلاج بالعاثيات إذ انخفضت مستويات IL-6، TNF- α و IL-1 β بشكل حاد بحلول اليوم الخامس وعادت إلى مستويات قريبة من مجموعة الشاهد السليمة، واستقرت عند هذه المستويات المنخفضة طوال فترة التجربة. وبالمقارنة في مجموعة المضاد الحيوي انخفضت مستويات هذه العوامل الالتهابية بشكل أبطأ بكثير، كما بقيت مرتفعة لفترة أطول مقارنة بمجموعة العاثيات.

أظهرت دراسة (Cho et al., 2026) أن العاثيات الضارية (JEP6، ELT3، ELT2) تمتلك قدرة فعالة على تثبيط الإشريكية القولونية المنتجة لذيفان شيغا (STEC) من النمط المصلي O157:H7، محققة انخفاضاً في الأعداد الجرثومية بحوالي $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ خلال ساعتين فقط. كما أن هذه العاثيات لم تحفز إنتاج ذيفان شيغا (Stx)، على النقيض تماماً من المضاد الحيوي. إذ استخدم الباحثون ثلاث تقنيات رئيسية متكاملة للكشف عن إفراز الذيفان. أولاً، باستخدام تقنية التفاعل البوليميراز المتسلسل للنسخ العكسي في الوقت الحقيقي (qRT-PCR)، وجدوا أن العاثيات لم تزد من التعبير الجيني لكل من جين stx_2 وجين *recA* (المؤشر الرئيسي لاستجابة SOS)، بينما زادهما السيبروفلوكساسين بشكل كبير. ثانياً، أكدت تقنية (Western Blot) هذه النتائج على مستوى البروتين، حيث لم تظهر العاثيات أي

زيادة في مستويات بروتين Stx مقارنة بالسيبروفلووكساسين الذي أظهر زيادة واضحة. ثالثاً، أظهرت اختبارات السمية على خلايا فيرو الكلوبية (Vero cells) أن السوائل الناتجة من المزارع المعالجة بالعائيات كانت منخفضة السمية بشكل أكبر من تلك المعالجة بالمضاد الحيوي، مما يؤكد أن السم المنتج (إن وجد) غير نشط بيولوجياً أو بكميات ضئيلة. وللمقارنة قام الباحثون بمعالجة الجراثيم بعائية معتدلة (phiV10) للمقارنة. تسببت العائيات المعتدلة في زيادة هائلة في التعبير الجيني لكل من *stx2* و *recA* (بحوالي 20 ضعفاً)، مما يؤكد أن العائيات المعتدلة (التي تدمج جيناتها مع الجراثيم) قد تحفز استجابة SOS والسم، بينما تتجنب العائيات شديدة الفوعة ذلك بفضل آليتها السريعة.

وتناولت دراسة (Howard-Varona et al., 2018) إمكانية استخدام العلاج بالعائيات للقضاء على جراثيم *E. coli* O157:H7 المنتجة لذيفان الشيغا مخبرياً، دون التسبب في زيادة إنتاج السموم المرتبط عادةً بالمضادات الحيوية. حيث تم اختبار ذلك بإضافة عائيتين من نوع *p000y* و *p000v* إلى مزارع جراثيم STEC، أظهرت النتائج انخفاضاً كبيراً في عدد نسخ جين *stx2a* بعد 7.5 ساعات من المعالجة. إذ زادت النسخ 8 أضعاف في العينات غير المعالجة، بالمقارنة انخفضت إلى 0.3 و 0.4 من قيمتها الأولية في العينات المعالجة بالعائيتين *p000y* و *p000v* على التوالي.

وقد يعزى تفسير هذه الظاهرة إلى آلية التحلل الخلوي الانفجاري (Explosive Cell Lysis). فالعائيات الضارية تقتل الجراثيم بسرعة فائقة من خلال إنزيماتها المحللة، مما يؤدي إلى تمزق عنيف وسريع لجدار الخلية الجرثومية. هذه السرعة الفائقة تمنع الجراثيم من تفعيل استجابة الإجهاد (SOS)، والتي تمثل المحفز الرئيسي لجينات السم.

تؤكد هذه النتائج مجتمعة أن العائيات الضارية تمثل بديلاً علاجياً واعداً لعدوى STEC، حيث تجمع بين الفعالية العالية في القضاء على الجراثيم وتجنب الخطر الرئيسي المرتبط بالمضادات الحيوية المتمثل في تحفيز إنتاج ذيفان شيغا وزيادة خطر المتلازمة الانحلالية البوريمية (HUS).

كما وقد أظهرت النتائج فعالية علاجية للمعززات الحيوية ولكنها متأخرة مقارنة بباقي المجموعات حيث تم في هذه الدراسة استخدام المعززات الحيوية كعلاج للمقارنة مع العائيات، حيث يُستخدم المعززات الحيوية بشكل فعال كإجراء روتيني، لتعزيز استعمار الأمعاء بالجراثيم النافعة ومنع تكاثر الممرضات من خلال المنافسة وإنتاج الأحماض مما يشكل وقاية من الممرضات. أما عند حدوث إصابة سريرية، فلا يمكن الاعتماد عليه وحده كعلاج وهذا ما أيدته هذه الدراسة؛ لأن الجراثيم الممرضة تكون قد تجاوزت العتبة الحرجة، في هذه الحالة، تُستخدم المعززات الحيوية فقط كعامل مساعد خلال العلاج أو بعده للمساعدة في إعادة التوازن الجرثومي لمنع الانتكاس (Velasco-Galilea *et al.*, 2020).

5-10. محددات الدراسة

تقدم هذه الدراسة رؤى قيّمة حول استخدام العائيات كبديل أو مكمل للمضادات الحيوية في مكافحة الإشريكية القولونية الممرضة. ومع ذلك، وكما هو الحال في أي بحث علمي، واجهت الدراسة عدداً من القيود التي ينبغي أخذها في الاعتبار عند تفسير النتائج وتعميمها، ولفتح آفاق للبحوث المستقبلية.

القيود التقنية والتجهيزية:

- **اقتصار دراسة عوامل الفوعة على المستوى الجيني:** اقتصر الكشف عن عوامل الفوعة في عزلات الإشريكية القولونية على تحديد وجود الجينات المسؤولة عنها (مثل *eae*، *stx*، إلخ) باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) بينما لم يتم تقييم التعبير الفعلي (Expression) لهذه الجينات على مستوى إنتاج البروتينات الوظيفية (مثل إنتاج الـ *ذيفانات* أو عوامل التصاق). إذ أن وجود الجين لا يضمن بالضرورة النشاط الوظيفي لنتاج التعبير عنه، مما يعني أن بعض العزلات المصنفة كممرضة بناءً على وجود الجين قد لا تكون كذلك فعلياً في الظروف الفسيولوجية.
- **نقص التوصيف الشكلي للعائيات:** لم يتوفر المجهر الإلكتروني النافذ (Transmission Electron Microscopy) خلال الدراسة. حيث يُعد هذا المجهر أداة أساسية لتحديد الشكل المورفولوجي للعائيات كعائلة الفيروسات مثل *Myoviridae*، *Siphoviridae*، أو *Podoviridae* والذي يرتبط غالباً بألية

عملها ونطاق عائلها. غياب هذا التوصيف يحد من التصنيف الدقيق للعائيات المعزولة ومعرفة خصائصها البنيوية.

- **غياب التحليل الجيني الكامل للعائيات:** لم يُجرَ تسلسل للحمض النووي (DNA Sequencing) للعائيات المعزولة. يعد هذا التحليل حاسماً لتحديد هوية العائية بدقة على مستوى السلالة، والكشف عن وجود أي جينات للدورة الكامنة للعائيات أو وجود جينات قد تحمل عوامل فوعة أو سميّة جرثومية محمولة على جينوم العائية، أو جينات مقاومة للمضادات الحيوية. حيث أن معرفة المحتوى الجيني أمر أساسي لتقييم السلامة المحتملة للعائيات قبل التفكير في استخدامها العلاجي.

القيود المتعلقة بنموذج الدراسة الحيوي:

- **عدم إجراء التجارب العلاجية على العجول:** بسبب القيود المادية واللوجستية، اقتصرت تجربة العلاج داخل الجسم الحي (in vivo) على حيوانات النموذج المختبري (الأرانب) المصابة بسلالة محددة من الإشريكية القولونية النزفية المعوية (EHEC) بينما تقدم نتائج الأرانب دليلاً مهماً على المبدأ والفعالية، إلا أن هناك فروقاً فيزيولوجية ومناعية بين الأرانب والعجول. قد تختلف فعالية العلاج التآزري (عائيات + مضاد حيوي) أو تأثيره الجانبي عند تطبيقه مباشرة على العجول أو الحيوانات الأخرى. لذلك، تكون النتائج أكثر استقراءً إلى النموذج الحيواني المستخدم وتحتاج إلى تأكيد في الحيوانات المستهدفة في دراسات مستقبلية.

القيود المتعلقة بتقييم السلامة على المدى الطويل:

ركز تقييم العلاج الحيوي على المؤشرات قصيرة المدى (معدل النفوق، تعداد الجرثيم، بروتينات الطور الحاد خلال أيام). إذ أن الدراسة لم تتضمن تقييماً للمخاطر المحتملة على المدى الطويل، مثل:

- احتمالية تطور مقاومة الجرثيم للعائيات المستخدمة.

- التأثير على الميكروبيوم الطبيعي للأمعاء (الفلورا المعوية) للحيوان بعد العلاج بالعائيات أو المزيج التآزري.
- إمكانية انتقال الجينات المقاومة للمضادات بين الجراثيم بمساعدة العائيات (الانتقال الأفقي للجينات).

ويبقى ملف السلامة على المدى الطويل والآثار والبيئية للعلاج بحاجة إلى استكشاف.

آثار هذه القيود على تفسير النتائج:

- قد تؤثر القيود التقنية على التوصيف الدقيق للعائيات "الواحدة" المستخدمة في الدراسة، مما يستدعي المزيد من البحث لضمان أمانها وفعاليتها المثلى قبل التطبيقات الواسعة.
 - تقيد النتائج المتعلقة بفعالية العلاج من حيث القابلية للتعميم المباشر على الحيوانات في الميدان، حيث توجد عوامل أكثر تعقيداً مثل المناعة، النظام الغذائي، والتعرض لأنماط مصلية أخرى من الجراثيم.
- لكن على الرغم من هذه القيود والمحددات، تبقى نتائج هذه الدراسة مساهمة مهمة في مجال العلاج البديل للمضادات الحيوية باستخدام العائيات، وتؤسس لقاعدة أدلة قوية على فعالية النهج التآزري بين العائيات والمضادات الحيوية، مما يفتح الباب أمام حلول مبتكرة لمشكلة مقاومة المضادات الحيوية في الطب البيطري.

الفصل السادس

الاستنتاجات والتوصيات

CONCLUSIONS

and

RECOMMENDATIONS

الاستنتاجات

1. انتشار عالي للإشريكية القولونية الممرضة في حالات العجول المصابة بالإسهال مما يؤكد دورها الرئيسي في إسهال العجول.
2. وجود تنوع جينات الضراوة بين عزلات جراثيم الإشريكية القولونية ووجود ذراري هجينة تحمل جينات متعددة، مما يشير إلى تعقيد التركيب الجيني للمسببات المرضية.
3. أبدت جراثيم الإشريكية القولونية مقاومة عالية للمضادات الحيوية الشائعة مع وجود نسبة كبيرة من العزلات متعددة المقاومة (MDR) ، مما يحد من خيارات العلاج التقليدية.
4. انتشار واسع للعائيات النوعية بالإشريكية القولونية في البيئة، خاصة في أرضية حظائر الأبقار، مما يجعلها مصدراً واعداً للعزلات النشطة بيولوجياً.
5. ثبات العائيات في ظروف تخزين مناسبة، حيث تحافظ على فعاليتها عند التبريد (4°م) ولمدة تصل إلى 6 أشهر، مما يدعم إمكانية استخدامها عملياً.
6. تأثير سلبي للظروف القاسية على العائيات، مثل القيم الطرفية لدرجة الحموضة 3 و 10 pH ودرجات الحرارة المرتفعة أكبر من 55م° والأشعة فوق البنفسجية، مما يحدد شروط تخزين ونقل مناسبة.
7. وجود تآزر قوي بين العائيات والمضادات الحيوية، حيث خفض التركيز المطلوب للمضادات الحيوية مثل الستربتومايسين والأوكسي تتراسكلين والنيومايسين بشكل كبير عند استخدامها مع العائيات، مما يعزز فعاليتها.

8. فعالية العلاج التآزري (عائيات + مضاد حيوي) في حيوانات التجارب، حيث حقق أعلى تحسن في المؤشرات الصحية (CRP, HP, CP) وأقل نسبة نفوق ، مقارنة بالعلاج بالعائيات فقط أو المعززات الحيوية وحدها.
9. قدرة العائيات على التكاثر النشط داخل الجسم الحي، حيث زاد تعدادها بشكل ملحوظ في المجموعات المعالجة، مما يدعم آلية عملها في القضاء على الجراثيم الممرضة.

التوصيات

1. وضع بروتوكولات مراقبة مقاومة المضادات الحيوية بشكل روتيني في المختبرات التشخيصية البيطرية، وتحديث طريقة العلاج بناءً على أنماط المقاومة المحلية.
2. إجراء دراسة طويلة الأمد لتقييم فعالية وأمان استخدام العاثيات على نطاق واسع في قطعان مختلفة، ومراقبة أي تطور محتمل لمقاومة الجراثيم للعاثيات مع مرور الوقت.
3. محاولة تطوير وتصنيع مستحضر محلي من العاثيات معزولة من البيئة المحلية ، يكون مستقرًا في ظروف التخزين العادية وملائماً للإعطاء عن طريق الفم مع العلف أو ماء الشرب.
4. دراسة التركيب الجيني والبروتيني للعاثيات الأكثر فعالية المعزولة محلياً، لتحديد آليات عملها وتطوير منتجات أكثر استقراراً وخصوصية ضد السلالات المنتشرة في المنطقة.
5. التشجيع على اعتماد العلاج التآزري (العاثيات + المضادات الحيوية) كبروتوكول أولي لعلاج الإسهال الناجم عن الإشريكية القولونية المقاومة في مزارع العجول، نظراً لفعاليتها المتفوقة في العلاج.
6. بحث إمكانية الجمع بين العاثيات والمعززات الحيوية لتعزيز فعالية العلاج وتحسين صحة القناة الهضمية بشكل شمولي.
7. دراسة انتشار جينات ضراوة أخرى في عزلات الإشريكية القولونية من مصادر بشرية وحيوانية أخرى، لفهم الوبائية المحلية بشكل أفضل وتقييم المخاطر المشتركة بين الإنسان والحيوان.
8. تجربة استخدام تقنيات جديدة لتحسين استقرار العاثيات أثناء التصنيع والتخزين والنقل، مثل التغليف أو استخدام المواد الحافظة الطبيعية، لضمان فعالية المستحضر حتى في الظروف الصعبة.

الفصل السابع

المصادر

REFERENCES

المراجع العربية

1. إبراهيم، سامر. كامل. (2012). الكشف عن عوامل الفوعة لذراري الإشراكية القولونية المعزولة من حالات إسهال العجول بطريقة تفاعل البوليميراز المتسلسل. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية - سلسلة العلوم البيولوجية، (6) 34 ، 51- 62 .
2. الطويل، حازم، الداود، فؤاد. (2023). التحري عن الإشراكية القولونية K99 والفيروسات العجالية المسببة للإسهال عند العجول الرضيعة في منطقة شمال غرب سوريا. مجلة بحوث جامعة إدلب، (1) 6 ، 245- 271.
3. قاسم، عصام؛ سكرية، شادي. (2012). الوراثة والهندسة الوراثية. منشورات جامعة دمشق - كلية العلوم.

المراجع الأجنبية**-A-**

- 1) Abdulridha. R. N and Ibrahim. O. M.S. (2018). Activity Of Bacterial Antibiotics Against Some Pathogenic Bacteria Isolated From Calves Diarrhoea In Baghdad (Part I). Iraqi Journal of Agricultural Sciences 49(5):248–254.
- 2) Abedon, S.T.; Kuhl, S.J.; Blasdel, B.G.; Kutter, E.M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1, 66–85.
- 3) Abedon, S. T. (2025). Phage therapy: Combating evolution of bacterial resistance to phages. *Viruses*, 17(8), 1094.
- 4) Abubaker, A., Ayis, E. I., Ali, A., Elgaddal, Y., & Almofti, A. (2015). Isolation, identification and enterotoxin detection of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea and their virulence characteristics. *Journal of Applied Industrial Sciences*, 3(4), 141–149.
- 5) Ackermann, H. W., Tremblay, D., & Moineau, S. (2004). Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsletter*, 38, 35–40.
- 6) Ackermann, H.–W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227–243.
- 7) Ackermann, H.–W. (2009). Phage classification and characterization. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions (pp. 127–140). Humana Press.
- 8) Adhya, S. L., & Bhatnagar, R. (2006). The T7 bacteriophage: A model system for the study of bacteriophage biology. *Annual Review of Microbiology*, 60, 91–109.

- 9) Adhya, S., and Merril, C. (2006). The road to phage therapy. *Nature* 443:754–755.
- 10) Aframian, N., Omer Bendori, S., Kabel, S., Guler, P., Stokar–Avihail, A., Manor, E., Msaeed, K., Lipsman, V., Grinberg, I., Mahagna, A., ... & Sorek, R. (2022). Dormant phages communicate via arbitration to control exit from lysogeny. *Nature Microbiology*, 7(1), 145–153.
- 11) Akinci, I. Y., & Albay, M. K. (2026). Evaluation of some acute phase proteins in calves naturally infected with cryptosporidiosis. *Veterinarski Arhiv*, 96 (2), 97–112.
- 12) Al Ali, A., Salama, S. M., Darwish, W. S., & Abdelazim, A. M. (2025). Acute phase proteins as potent early biomarkers for the detection of *Escherichia coli* infection in white New Zealand rabbits. *Open Veterinary Journal*, 15 (2), 977–982.
- 13) Al–Anany, A. M., Fatima, R., & Hynes, A. P. (2021). Temperate phage–antibiotic synergy eradicates bacteria through depletion of lysogens. *Cell Reports*, 35(7), 109172.
- 14) Al–Anany, A. M., Fatima, R., Nair, G., Mayol, J. T., & Hynes, A. P. (2024). Temperate phage–antibiotic synergy across antibiotic classes reveals new mechanism for preventing lysogeny. *mBio*, 15(1), e00504–24.
- 15) Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post–antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697–705.
- 16) Alexyuk, P., Bogoyavlenskiy, A., Alexyuk, M., Akanova, K., Moldakhanov, Y., & Berezin, V. (2022). Isolation and characterization of lytic bacteriophages active against clinical strains of *E. coli* and development of a phage antimicrobial cocktail. *Viruses*, 14 (11), 2381.

- 17) Alexyuk, P.G.; Bogoyavlenskiy, A.P.; Akanova, K.S.; Moldakhanov, Y.S.; Kerimov, T.T.; Sokolova, N.S.; Berezin, V.E.; Alexyuk, M.S.(2025). Isolation of Lytic Bacteriophages of *Escherichia coli* and Their Combined Use with Antibiotics Against the Causative Agents of Colibacillosis in Calves. *Vet. Sci.*, 12, 817.
- 18) Alic, S., Naglic, T., Tusek–Znidaric, M., Ravnikar, M., Rački, N., Peterka, M., & Dreo, T. (2017). Newly isolated bacteriophages from the Podoviridae, Siphoviridae, and Myoviridae families have variable effects on putative novel *Dickeya* spp. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1870.
- 19) Alomari, M. M. M., Dec, M., Nowaczek, A., Puchalski, A., Wernicki, A., Kowalski, C., & Urban–Chmiel, R. (2021). Therapeutic and prophylactic effect of the experimental bacteriophage treatment to control diarrhea caused by *E. coli* in newborn calves. *ACS Infectious Diseases*, 7(8), 2093–2101.
- 20) Alvi, I.A., Asif, M., Tabassum, R., Abbas, Z., Rehman, S., (2018). Storage of bacteriophages at 4°C leads to no loss in their titer after one year. *Pakistan J. Zool.* 50, 2395–2398.
- 21) Amarillas, L., León–Chan, R., López–Avenidaño, E., González–Balcázar, A., Padilla, J., Lightbourn–Rojas, L., & Estrada–Acosta, M. (2025). Isolation and characterization of a novel bacteriophage as a biological control agent against multidrug resistant *Escherichia coli* in compost and agricultural irrigation water. *F1000Research*, 13, 1521.
- 22) Antine, S.P.; Johnson, A.G.; Mooney, S.E.; Leavitt, A.; Mayer, M.L.; Yirmiya, E.; Amitai, G.; Sorek, R.; Kranzusch, P.J.(2024). Structural basis of Gabija anti–phage defence and viral immune evasion. *Nature*, 625, 360–365.

- 23) Aqel, M., Bukhari, S., Ullah, H., & Alotaibi, N. (2024). Evaluation of the bacteriophage MAC-1 potential to control *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilms. *JSM*, 53(5), 1043–1054.
- 24) Aref, N. E. M., Abdel-Raheem, A. R. A., Kamaly, H. F., & Hussien, S. Z. (2018). Clinical and sero-molecular characterization of *Escherichia coli* with an emphasis on hybrid strain in healthy and diarrheic neonatal calves in Egypt. *Open Veterinary Journal*, 8 (4), 351–359.
- 25) Ashworth, E. A., Wright, R. C. T., Shears, R. K., Wong, J. K. L., Hassan, A., Hall, J. P. J., Kadioğlu, A., & Fothergill, J. L. (2024). Exploiting lung adaptation and phage steering to clear pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in vivo. *Nature Communications*, 15(1), 1547.
- 26) Aşıhoğlu, N. F., & Ayaz, N. D. (2023). Comparison of various storage conditions for the stability of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage M8AEC16. *Journal of Independent Veterinary and Animal Research (JIVAR)*, 6(3), 96–101.
- 27) Atamer, Z., Dietrich, J., Müller-Merbach, M., Neve, H., Heller, K. J., & Hinrichs, J. (2008). Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *International Dairy Journal*, 19(4), 228–235.

-B-

- 28) Badouei, M. A., Lotfollahzadeh, S., Arman, M., & Haddadi, M. (2014). Prevalence and resistance profiles of Enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheic calves in Mashhad and Garmsar districts, Iran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 1(3), e22802.

- 29) Bagińska, N., Grygiel, I., Orwat, F., Harhala, M. A., Jędrusiak, A., Gębarowska, E., ... & Jończyk–Matysiak, E. (2024). Stability study in selected conditions and biofilm–reducing activity of phages active against drug–resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 14(1), 4285.
- 30) Bakhautdin, B., Goksoy Bakhautdin, E. and Fox, P.L. (2014). Ceruloplasmin has two nearly identical sites that bind myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 722–727.
- 31) Barnett Foster, D. (2013). Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence*, 4(4), 315–323.
- 32) Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2022). *Escherichia coli*: An overview of main characteristics. In *Escherichia Coli – Old and New Insights*. IntechOpen.
- 33) Basdew, I. H., & Laing, M. D. (2014). Stress sensitivity assays of bacteriophages associated with *Staphylococcus aureus*, causal organism of bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research*, 8(2), 200–210.
- 34) Beaudoin, R., DeCesaro, D., Durkee, D., & Barbaro, S. (2007). Isolation of a bacteriophage from sewage sludge and characterization of its bacterial host cell. *Rivier Academic Journal*, 3 (1), 1–8.
- 35) Bergogne –Berezin, E.(1997). Antibiotic resistance. *J.Med.Microbiol.* 46:461–464.
- 36) Bertozzi Silva, J.; Storms, Z.; Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol. Lett.*, 363.

- 37) Bettelheim, K.A.(2003). Non-O157 Verotoxin-Producing Escherichia coli: A Problem, Paradox, and Paradigm. Supplement . Food Safety Concerns of verotoxin – producing Escherichia coli. Exp. Biol. Med. 228:333–344.
- 38) Bhakat, D., Mondal, I., & Chatterjee, N. (2020). EatA, a non-classical virulence factor, of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) is modulated by the host factors during pathogenesis. International Journal of Infectious Diseases, 101, 3–4.
- 39) Bierlein, G. F., & Gross, J. J. (2025). Physiological changes during the evolution of diarrhea in preweaning calves prior to the onset of clinical signs. Journal of Dairy Science.1664685 (12) 2.
- 40) Bin, P., Tang, Z., Liu, S., Chen, S., Xia, Y., Liu, J., Wu, H., & Zhu, G. (2018). Intestinal microbiota mediates Enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrhea in piglets. BMC Veterinary Research, 14(1), 1–13.
- 41) Bishop, D. J., Thomas, C., Moore-Morris, T., Tonkonogi, M., Sahlin, K., & Mercier, J. (2010). Sodium bicarbonate ingestion prior to training improves mitochondrial adaptations in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299 (2), 1133–1141.
- 42) Bok, E., Mazurek, J., Stosik, M., Wojciech, M., & Baldy-Chudzik, K. (2015). Prevalence of virulence determinants and antimicrobial resistance among commensal Escherichia coli derived from dairy and beef cattle. Int J Environ Res Public Health. 12, 970–985.
- 43) Bonhivers, M., & Letellier, L. (1995). Calcium controls phage T5 infection at the level of the Escherichia coli cytoplasmic membrane. FEBS Letters, 374 (2), 169–173

- 44) Bonilla, N., Rojas, M. I., Netto Flores Cruz, G., Hung, S. H., Rohwer, F., & Barr, J. J. (2016). Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *PeerJ*, 4, e2261.
- 45) Bos, J., Zhang, Q., Vyawahare, S., Rogers, E., Rosenberg, S. M., & Austin, R. H. (2015). Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(1), 178–183.
- 46) Bosshard, F., Riedel, K., Schneider, T., Geiser, C., Bucheli, M., & Egli, T. (2010). Protein oxidation and aggregation in UVA-irradiated *Escherichia coli* cells as signs of accelerated cellular senescence. *Environmental Microbiology*, 12(11), 2931–2945
- 47) Boydak, İ. M., Karaca, İ. B., Van Den Hoven, R., & Onmaz, A. C. (2025). Prophylactic and therapeutic effects of isolated farm bacteriophages in lamb diarrhea induced by *Escherichia coli*. *Small Ruminant Research*, 248, 107502.
- 48) Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Journal of Bacteriology*, 93(5), 1732–1747.
- 49) Brady, A., Felipe-Ruiz, A., Gallego Del Sol, F., Marina, A., Quiles-Puchalt, N., & Penadés, J. R. (2021). Molecular basis of lysis-lysogeny decisions in Gram-positive phages. *Annual Review of Microbiology*, 75, 563–581.
- 50) Bray, J. (1945). Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli* neop-olitanum from summer diarrhea of infants. *J. Pathol. Bacteriol.* 57:239–247.
- 51) Broncano-Lavado, A.; Santamaría-Corral, G.; Esteban, J. and García-Quintanilla, M. (2021). Advances in bacteriophage therapy against relevant multidrug-resistant pathogens. *Antibiotics*, 10(6):1–23.

- 52) Brown, T. L., & Smith, G. P. (2015). *Bacteriophage: Genetics and molecular biology* (2nd ed.). Caister Academic Press.
- 53) Bruyand, M., Mariani–Kurkdjian, P., Gouali, M., de Valk, H., King, L.A., Hello, S.L., Bonacorsi, S. and Loirat, C. (2018). Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infection. *Med. Mal. Infect.*, 48(3): 167–174.
- 54) Bucher, M.J.; Czyz , D.M.(2024). Phage against the machine: The SIE–ence of superinfection exclusion. *Viruses*, 16, 1348.
- 55) Bulssico, J., Papukashvili, I., Espinosa, L., Gandon, S., & Ansaldi, M. (2023). Phage–antibiotic synergy: Cell filamentation is a key driver of successful phage predation. *PLoS Pathogens*, 19(9), e1011602.
- 56) Burmeister, A. R., Fortier, A., Roush, C., Lessing, A. J., Bender, R. G., Barahman, R., Grant, R., Chan, B. K., & Turner, P. E. (2020). Pleiotropy complicates a trade–off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117 (19), 11207–11216.
- 57) Bush, N. G., Diez–Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules*, 25(23), 5662.
- 58) Butler, M.S.; Buss, A.D. (2006). Natural Products—the Future Scaffolds for Novel Antibiotics? *Biochem. Pharmacol.*, 71, 919–929.
- 59) Butler, M.S.; Gigante, V.; Sati, H.; Paulin, S.; Al–Sulaiman, L.; Rex, J.H.; Fernandes, P.; Arias, C.A.; Paul, M.; Thwaites, G.E.(2022). Analysis of the Clinical Pipeline of Treatments for Drug–Resistant Bacterial Infections: Despite Progress, More Action Is Needed. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 66, e01991–21.

60) Buzrul, S., Öztürk, P., Alpas, H., & Akcelik, M. (2007). Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. *LWT – Food Science and Technology*, 40 (10), 1671–1677.

-C-

- 61) Cabrera–gonzález, M., Quilcate–pairazamán, . C., Alvarez–garcía, . W., Cabrera, . H., Tayca–saldaña, . A., Aliaga–tambo, . F., Rojas–valdez, . D. & Cueva–rodríguez, . M. (2024) Molecular identification of the most frequent pathotypes of *Escherichia coli* in calves with diarrhoea in the Cajamarca region of Peru. *Open Vet J.* 14, 2170–2180.
- 62) Cai, L., Tian, Y., Li, Z., Song, Y., Xu, J., Li, Y., ... & Jiang, Y. (2023). A broad–host–range lytic phage vB_VhaS–R18L as a candidate against vibriosis. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1191157.
- 63) CDC (Centers for Disease Control and Prevention).(2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
- 64) Cengiz, S., & Adigüzel, M. C. (2020). Determination of virulence factors and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from calf diarrhea, part of eastern Turkey. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 67, 365–371.
- 65) Chan, B. K., Sistro, M., Wertz, J. E., Kortright, K. E., Narayan, D., & Turner, P. E. (2016). Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6, 26717.
- 66) Chanishvili, N. (2012). Phage therapy—history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Advances in virus research*, 83, 3–40.

- 67) Cheesbrough, M. (1985). Medical Laboratory Manual for Tropical Countries. 1st ed. English Language Book Society, London. p 400–480.
- 68) Chen, Q.; Dharmaraj, T.; Cai, P.C.; Burgener, E.B.; Haddock, N.L.; Spakowitz, A.J.; Bollyky, P.L.(2022). Bacteriophage and Bacterial Susceptibility, Resistance, and Tolerance to Antibiotics. *Pharmaceutics*, 14, 1425.
- 69) Chen, J., Li, D., Xu, Y., Wang, J., Liu, J., Zhang, Y., & Wang, X. (2023). Establishment and application of multiplex droplet digital polymerase chain reaction assay for bovine enterovirus, bovine coronavirus, and bovine rotavirus. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1157900.
- 70) Chen, Y., Ding, M., Chen, X., Zou, T., Liu, Y., Chen, J., & You, J. (2026). Strategically isolated bacteriophages targeting ETEC K88 (F4) alleviate post-weaning diarrhea in piglets via modulation of gut microbiota and inflammatory responses. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 17 (11).
- 71) Cho, E., Kim, J., Won, T., Ryu, S., & Jeon, B. (2026). Virulent bacteriophages for controlling Shiga toxin-producing Escherichia coli without inducing toxin production. *The Journal of Infectious Diseases*, 233 (1), 87–95.
- 72) Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2017). Phage therapy in bacterial infections treatment: One hundred years after the discovery of bacteriophages. *Current Microbiology*, 73(3), 377–383.
- 73) Clark, W. A., Horneland, W., & Klein, A. G. (1962). Attempts to freeze some bacteriophages to ultralow temperatures. *Applied Microbiology*, 10(5), 463–465.

- 74) CLSI.(2025). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (35th ed). CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- 75) Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A.(1996). Practical medical microbiology. 14th ed. Churchill living stone. Inc. New York, USA.
- 76) Comeau, A. M., Tétart, F., Trojet, S. N., Prère, M.–F., & Krisch, H. M. (2007). Phage–antibiotic synergy (PAS): β –lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. PLoS ONE, 2(8), e799.
- 77) Cray, C. (2022). Acute Phase Proteins and the Acute Phase Response in Animals. In Clinical Biochemistry of Domestic Animals (7th ed., pp. 435–454). Academic Press.
- 78) Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, Foster .S, Gilmore BF, Hancock REW, Harper D, Henderson IR, Hilpert K, Jones BV,Kadioglu A, Knowles D, Ólafsdóttir S, Payne D, Projan S, Shaunak S,Silverman J, Thomas CM, Trust TJ, Warn P, Rex JH. (2016). Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. Lancet Infect Dis 16:239 –251.

-D-

- 79) Dati, F., Schumann, G., Thomas, L., Aguzzi, F., Baudner, S., Bienvenu, J., & Hyltoft–Petersen, P. (1996). Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP reference material (CRM 470). European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 34(6), 517–520.

- 80) Davis, C., McCutcheon, J., & Dennis, J. J. (2021). Aztreonam lysine increases the activity of phages E79 and phiKZ against *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Microorganisms*, 9(1), 152.
- 81) Dawod, E., Mohammed, G. M., & Helal, I. M. (2016). Some bacteriological and molecular studies on *Escherichia coli* as causative agent of calves enteritis at Damietta Governorate. *Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health*, 2(2), 195–210.
- 82) De Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., & Dutilh, B. E. (2019). Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. *Trends in Microbiology*, 27(1), 51–63.
- 83) Deborah Chen, H., & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: Unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 83–98.
- 84) Dedrick, R.M.; Guerrero–Bustamante, C.A.; Garlena, R.A.; Russell, D.A.; Ford, K.; Harris, K.; Gilmour, K.C.; Soothill, J.; Jacobs–Sera, D.; Schooley, R.T.; (2019). Engineered Bacteriophages for Treatment of a Patient with a Disseminated Drug Resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Med.*, 25, 730–733.
- 85) Del Giudice, M., & Gangestad, S. W. (2018). Rethinking IL–6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain, Behavior, and Immunity*, 70, 61–75.
- 86) Deng, L. W., & Perham, R. N. (2002). Deliberate Design of a Protein–Binding Peptide with Hairpin Structure. *Journal of Molecular Biology*, 319(2), 647–655.

- 87) Dissanayake U., Ukhanova M., Moye Z.D., Sulakvelidze A., Mai V. (2019). Bacteriophages Reduce Pathogenic Escherichia coli Counts in Mice Without Distorting Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* 10:1984.
- 88) Divers, T. J., & Peek, S. F. (Eds.). (2018). *Diseases of dairy cattle* (3rd ed.). Elsevier.
- 89) Doern, C. D. (2014). When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4124–4128.
- 90) Donnenberg, M. S. and Whittam, T. S. (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. *J. Clin. Invest.* 107:539–548.
- 91) Donnenberg, M.S., & Finlay, B.B. (2013). Combating enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) infections: The way forward. *Trends in Microbiology*, 21(6), 317–319.
- 92) Drobysheva, A.V.; Panafidina, S.A.; Kolesnik, M.V.; Klimuk, E.I.; Minakhin, L.; Yakunina, M.V.; Borukhov, S.; Nilsson, E.; Holmfeldt, K.; Yutin, N.; (2021). Structure and function of virion RNA polymerase of a crAss-like phage. *Nature*, 589, 306–309.
- 93) Duan, Q., Xia, P., Nandre, R., Zhang, W., & Zhu, G. (2019). Review of newly identified functions associated with the heat-labile toxin of enterotoxigenic Escherichia coli. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 292.
- 94) Duarte, J., Pereira, C., Moreirinha, C., Salvado, R., Lopes, A., & Almeida, A. (2018). New insights on phage efficacy to control *Aeromonas salmonicida* in aquaculture systems: An in vitro preliminary study. *Aquaculture*, 495, 970–982.

- 95) Duarte, J., Pereira, C., Calado, R., & Almeida, A. (2025). Phage stability research: A systematic review bridging methodological gaps and paving the way for industrial and clinical applications. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*, 6(3): 189 – 200.
- 96) Duyvejonck, H., Merabishvili, M., Vaneechoutte, M., de Soir, S., Wright, R., Friman, V.-P., & Verbeken, G. (2021). Evaluation of the stability of bacteriophages in different solutions suitable for the production of magistral preparations in Belgium. *Viruses*, 13(5).

-E-

- 97) Eckersall, P. D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151 (7), 577–584.
- 98) Ellaithi, S. O. (2004). Characterization of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in the Sudan (Doctoral dissertation, Ph. D thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Khartoum, Sudan).
- 99) El-Shehedi, M., Mostafa, A., Eraqi, M., & Aisha, R. A. (2013). Characterization of *Escherichia coli* from diarrheic calves with special reference to plasmid profile. *The Journal of American Science*, 9(7), 54–59.
- 100) El-Tarabily, K. A. (2019). An innovative and safe study using a cocktail of bacteriophage viruses to ensure food quality and safety in the United Arab Emirates. *Ajman Journal of Studies and Research*, 18(1), 1–41.
- 101) Emad, E.Y. (2001): Neonatal diarrhea in calves with special aspects for biological preventive measures. Ph. D. thesis, infectious disease, Fact. Vet. Med. Zagazig. Universty, Egypt.

102) Erol, H. B., Kaskatepe, B., Yildiz, S., & Cetin, B. (2024). Characterization of two bacteriophages specific to *Acinetobacter baumannii* and their effects on catheters biofilm. *Cell Biochemistry and Function*, 42(2), e3966.

-F-

- 103) Fanaei Pirlar, R., Wagemans, J., Ponce Benavente, L., Lavigne, R., Trampuz, A., & Gonzalez Moreno, M. (2022). Novel bacteriophage specific against *Staphylococcus epidermidis* and with antibiofilm activity. *Viruses*, 14(6), 1340.
- 104) Fard, R.M.N.; Nezhad, G.B.; Salehi, T.Z. and Parvar, N.A. (2005). Evaluation of *ehxA*, *stx1*, and *stx2* virulence genes prevalence in cattle *Escherichia coli* isolates by multiplex PCR. *Archive of Razi Institute*, 60 (1): 55 – 66.
- 105) FDA(Food and Drug Administration). (2006). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; bacteriophage preparation. *Federal Register*, 71 (138), 47729–47730
- 106) Feng, L., Chen, H., Qian, C., Zhao, Y., Wang, W., Liu, Y., Xu, M., Cao, J., Zhou, T., & Wu, Q. (2024). Resistance, mechanism, and fitness cost of specific bacteriophages for *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere*, 9(3), e00553–23.
- 107) Ferdous, M., Friedrich, A. W., Grundmann, H., de Boer, R. F., Croughs, P. D., Islam, M. A., Kluytmans–van den Bergh, M. F., Kooistra–Smid, A. M., & Rossen, J. W. (2016). Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch

- regions using whole genome sequencing. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(7), 642.e1–642.e9.
- 108) Fouad, E. A., Ramadan, R. M., Mohamed, A. M., & Khalifa, M. M. (2024). Prevalence of bacteriological and parasitological causes of diarrheic calves in middle Egypt. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 14(2), 276–281.
- 109) Freedman, S. B., Xie, J., Neufeld, M. S., (2016). Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infection, antibiotics, and risk of developing hemolytic uremic syndrome: a meta–analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 62(10), 1251–1258.
- 110) Fu, Y., Yin, M., Cao, L., Lu, Y., Li, Y., & Zhang, L. (2025). Capsule mutations serve as a key strategy of phage resistance evolution of K54 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Communications Biology*, 8(1), 257.
- 111) Fujiki, J., Nakamura, K., Nakamura, T., & Iwano, H. (2023). Fitness trade–offs between phage and antibiotic sensitivity in phage–resistant variants: Molecular action and insights into clinical applications for phage therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 15628.

-G-

- 112) Galal, H. M., Hakim, A. S., & Dorgham, S. M. (2013). Phenotypic and virulence genes screening of *Escherichia coli* strains isolated from different sources in delta Egypt. *Life Science Journal*, 10(2), 352–361.
- 113) Gao, D.; Ji, H.; Wang, L.; Li, X.; Hu, D.; Zhao, J.; Wang, S.; Tao, P.; Li, X.; Qian, P. (2022). Fitness Trade–Offs in Phage Cocktail–Resistant *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Results in Increased Antibiotic Susceptibility and Reduced Virulence. *Microbiol. Spectr.*, 10, e02914–22.

- 114) Garbe, J., Wesche, A., Bunk, B., Kazmierczak, M., Selezska, K., Rohde, C., ... & Schobert, M. (2010). Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC microbiology*, 10(1), 301.
- 115) Garcia-Heredia, A., Garcia, S., Merino-Mascorro, J. A., Feng, P., & Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 59, 124–132.
- 116) Georgieva, T., Georgiev, I., Tanev, S., Vachkov, A., Petrov, V., Eckersall, P. D., Sotirov, L., Lazarov, L., Christov, T., & Nikolov, J. (2009). Variations of acute phase protein (haptoglobin, fibrinogen and ceruloplasmin) concentrations in weaning rabbits after experimental infection with *E. coli*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160 (3), 133–139.
- 117) Gerovac, M.; Chihara, K.; Wicke, L.; Bottcher, B.; Lavigne, R.; Vogel, J. (2024). Phage proteins target and co-opt host ribosomes immediately upon infection. *Nat. Microbiol.*, 9, 787–800.
- 118) Geurtsen, J., de Been, M., Weerdenburg, E., Zomer, A., McNally, A., & Poolman, J. (2022). Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 46(6), fuac031.
- 119) Golec, P., Dabrowski, K., Hejnowicz, M., Gozdek, A., Loš, J. M., Wegrzyn, G., Lobočka, M., & Loš, M. (2011). A reliable method for storage of tailed phages. *Journal of Microbiological Methods*. 21 (9).
- 120) Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2021). Unlocking the next generation of phage therapy: The key is in the receptors. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 115–123.

- 121) Gordillo Altamirano, F. L., Kostoulias, X., Subedi, D., Korneev, D., Peleg, A. Y., & Barr, J. J. (2022). Phage–antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. *eBioMedicine*, 80, 104045.
- 122) Górski, A., Międzybrodzki, R., & Borysowski, J. (2019). Phage Therapy: A Practical Approach to Bacterial Infections. *Advances in Virus Research*, 103, 107–138.
- 123) Greenwood, J., & Day, L. A. (1965). Filamentous Bacteriophage Life Cycle and Its Applications. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 35–40.
- 124) Grose, J. H., & Casjens, S. R. (2014). Understanding the origin and evolution of the Tectiviridae: Insights from the phiX174 and G4 genomes. *Virology*, 464–465, 153–162.
- 125) Gu Liu, C.; Green, S.I.; Min, L.; Clark, J.R.; Salazar, K.C.; Terwilliger, A.L.; Kaplan, H.B.; Trautner, B.W.; Ramig, R.F.; Maresso, A.W.(2020). Phage–Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry. *mBio*, 11, e01462–20.
- 126) Guan, Z., Wang, H., Zhang, X., Wu, Z., & Zhang, Y. (2020). Isolation and characterization of a novel bacteriophage CEv1 with potential therapeutic effects against *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–11.
- 127) Gurney, J., Pradier, L., Griffin, J. S., Gougat–Barbera, C., Chan, B. K., Turner, P. E., Kaltz, O., & Hochberg, M. E. (2020). Phage steering of antibiotic–resistance evolution in the bacterial pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2020(1), 148–157.
- 128) Gyles, C. (2007). Shiga toxin–producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Science*, 85(13_suppl), E45–E62.

-H-

- 129) Hakim, A. S., Omara, S. T., Syame, S. M., & Fouad, E. A. (2017). Serotyping, antibiotic susceptibility, and virulence genes screening of *Escherichia coli* isolates obtained from diarrheic buffalo calves in Egyptian farms. *Veterinary World*, 10(7), 769–775.
- 130) Halawa, E. M., Fadel, M., Al-Rabia, M. W., Behairy, A., Nouh, N. A., Abdo, M., Olga, R., Fericean, L., Atwa, A. M., El-Nablaway, M., & Batiha, G. E. (2024). Antibiotic action and resistance: Updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1305294.
- 131) Han, Z., Li, K., Shahzad, M., Zhang, H., Luo, H., Qiu, G., & Li, J. (2017). Analysis of the intestinal microbial community in healthy and diarrheal perinatal yaks by high-throughput sequencing. *Microb. Pathog.* 111, 60–70.
- 132) Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. *Annual Review of Medicine*, 73, 197–211.
- 133) Hazen, T. H., Michalski, J., Luo, Q., Shetty, A. C., Daugherty, S. C., Fleckenstein, J. M., & Rasko, D. A. (2017). Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli*. *Scientific Reports*, 7, 1–17.
- 134) Hernandez, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A., & Gomes, T. A. (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 297(2), 137–149.

- 135) Hershey, A. D., & Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 36(1), 39–56.
- 136) Hesse, S., & Adhya, S. (2019). Phage therapy in the twenty-first century: Facing the decline of the antibiotic era; is it finally time for the age of the phage? *Annual Review of Microbiology*, 73, 155–174
- 137) Holtappels, D., Alfenas-Zerbini, P., & Koskella, B. (2023). Drivers and consequences of bacteriophage host range. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(4), fuad041.
- 138) Howard-Varona, C., Vik, D. R., Solonenko, N. E., Li, Y. F., Gazitua, M. C., Chittick, L., Samiec, J. K., Jensen, A. E., Anderson, P., Howard-Varona, A., Kinkhabwala, A. A., Abedon, S. T., & Sullivan, M. B. (2018). Fighting shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 with virulent bacteriophages. *Antibiotics*, 7 (4), 101.
- 139) Huang, C.-R., Kuo, C.-J., Huang, C.-W., Chen, Y.-T., Liu, B.-Y., Lee, C.-T., Chen, P.-L., Chang, W.-T., Chen, Y.-W., & Lee, T.-M. (2021). Host CDK-1 and formin mediate microvillar effacement induced by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 12(1), 6746.
- 140) Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., and Donoghue, A. M. (2004). Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poultry science*, 83(12), 1944–1947.
- 141) Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217–248.

-I-

- 142) Islam, A. K. M. A., Rahman, M., Nahar, A., Khair, A., & Alam, M. M. (2015). Investigation of pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in selective area of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 13(1), 45–51.
- 143) Islam, M. Z., Fokine, A., Mahalingam, M., Zhang, Z., Garcia-Doval, C., van Raaij, M. J., Rossmann, M. G., & Rao, V. B. (2019). Molecular anatomy of the receptor binding module of a bacteriophage long tail fiber. *PLoS Pathogens*, 15(12), e1008193.

-J-

- 144) Jain, S., Gautam, V., & Naseem, S. (2021). Acute-phase proteins: As a diagnostic marker. *Journal of Laboratory Physicians*, 13(2), 89–95.
- 145) Jamalludeen, N., Johnson, R. P., Shewen, P. E., and Gyles, C. L. (2009). Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs. *Vet. Microbiol.* 136, 135–141.
- 146) Jassim, S. A., & Limoges, R. G. (2017). Bacteriophage biocontrol: A new strategy for the control of bacterial pathogens. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 9(2), 100–106.
- 147) Jepson, C. D., & March, J. B. (2004). Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, 22(19), 3413–1419.
- 148) Jergens, A. E., & Suchodolski, J. S. (2022). Current Concepts in the Diagnosis and Management of Acute and Chronic Diarrhea in Dogs.

- Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 52(2), 243–267.
- 149) Jia, Y., Mao, W., Liu, B., Zhang, S., Cao, J., & Xu, X. (2022). Study on the drug resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea and the distribution of virulence genes and antimicrobial resistance genes. *Frontiers in Microbiology*, 13, 992111.
- 150) Jo A, Ding T, Ahn J.(2016). Synergistic antimicrobial activity of bacteriophages and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Food Sci Biotechnol*, 25:935–940.
- 151) Jo, S. J., Kim, S. G., Park, J., Lee, Y. M., Giri, S. S., Lee, S. B., ... & Park, S. C. (2023). Optimizing the formulation of *Erwinia* bacteriophages for improved UV stability and adsorption on apple leaves. *Heliyon*, 9(11).
- 152) Joseph, A., Cointe, A., Mariani Kurkdjian, P., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: A narrative review. *Toxins*, 12(2), 67.
- 153) Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L., & Hultgren, S. J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 162–168.

-K-

- 154) Kaas, R. S., Friis, C., Ussery, D. W., & Aarestrup, F. M. (2012). Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics*, 13, 577.
- 155) Kamal, F.; Dennis, J.J.(2015). *Burkholderia cepacia* Complex Phage–Antibiotic Synergy (PAS): Antibiotics Stimulate Lytic Phage Activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 1132–1138.

- 156) Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140.
- 157) Karmali, M.A.; Steele, B.T.; Petric, M. and Lim, C.(1983). Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* .19:619–620.
- 158) Karpman, D., & Ståhl, A. L. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and the host response. *Microbiology Spectrum*, 2(5).
- 159) Kazhal, N., and Iftimovich, R. (1968). *From the History of Fight Against Bacteria and Viruses*. Nauchnoe Izdatelstvo, Buchares.
- 160) Keen .E.C. (2015). A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays* 37:6 –9.
- 161) Kehoe, J. W., & Kay, B. K. (2005). Filamentous Phage Display in the New Millennium. *Chemical Reviews*, 105(11), 4056–4072.
- 162) Khalifa, E., Nossair, M. A., Ayoub, M. A., & Hadad, G. A. (2019). Molecular characterization of diarrheagenic *E. coli* isolated from newly born calves and humans. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 60(1), 131–138.
- 163) Kim, J. C., Chui, L., Wang, Y., Shen, J., & Jeon, B. (2016). Expansion of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by use of bovine antibiotic growth promoters. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 802–809.
- 164) Kim, M., Jo, Y., Hwang, Y. J., Hong, H. W., Hong, S. S., Park, K., & Myung, H. (2018). Phage–Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (12), e02085–18.
- 165) Kim, H.; Kim, M.; Jee, S.–N.; Heu, S.; Ryu, S.(2022). Development of a bacteriophage cocktail against *Pectobacterium carotovorum* Subsp.

- carotovorum and its effects on *Pectobacterium* virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 88, e0076122.
- 166) Kim, M.K.; Chen, Q.; Echterhof, A.; Pennetzdorfer, N.; McBride, R.C.; Banaei, N.; Burgener, E.B.; Milla, C.E.; Bollyky, P.L. (2024_a). A blueprint for broadly effective bacteriophage–antibiotic cocktails against bacterial infections. *Nat. Commun.*, 15, 9987.
- 167) Kim, B., Lee, S. Y., Park, J., Song, S., & Kim, J. (2024_b). Bacteriophage cocktail comprising Fifi044 and Fifi318 for biocontrol of *Erwinia amylovora*. *Plant Pathology Journal*, 40(2), 160–170.
- 168) Kim, M. K., Suh, G. A., Cullen, G. D., Rodriguez, S. P., Dharmaraj, T., Chang, T. H. W., Li, Z., Chen, Q., Green, S. I., Lavigne, R., & Bollyky, P. L. (2025). Bacteriophage therapy for multidrug–resistant infections: Current technologies and therapeutic approaches. *Journal of Clinical Investigation*, 135(1), e187996.
- 169) Kimmitt, P. T., Harwood, C. R., & Barer, M. R. (2000). Toxin gene expression by Shiga toxin–producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerging Infectious Diseases*, 6(5), 458–465.
- 170) King, A. M. Q., Lefkowitz, E., Adams, M. J., & Carstens, E. B. (Eds.). (2011). *Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- 171) Kirigo, J., Huelgas-Méndez, D., Tomás, M., Benedik, M. J., García-Contreras, R., & Wood, T. K. (2025). Adsorption of phage T2 is inhibited due to inversion of cryptic prophage DNA by the serine recombinase PinQ. *Nucleic acids research*, 53(19), gkaf1041.

- 172) Kmet, V., & Bujňáková, D. (2018). Antimicrobial resistance Escherichia coli isolated from calves. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(4), 371–376.
- 173) Knezevic, P., Curcin, S., Aleksic, V., Petrusic, M., & Vlaski, L. (2013). Phage–antibiotic synergism: A possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 164(1), 55–60.
- 174) Kocer, A. G., & Yildirim, Z. (2024). Encapsulation of SE–P47 phage specific to *Salmonella Enteritidis* and evaluation of its stability. *Journal of Food Safety*, 44(1), e13103.
- 175) Koch, A. L. (1994). Measurement of bacterial growth: Optical density and colony forming units. *Journal of Microbiological Methods*, 20 (3), 217–230.
- 176) Koderi Valappil, S., Shetty, P., Deim, Z., Terhes, G., Urban, E., Váczi, S., Patai, R., Polgár, T., Pertics, B. Z., Schneider, G., & Schneider, G. (2021). Survival comes at a cost: A coevolution of phage and its host leads to phage resistance and antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistant strains. *Frontiers in Microbiology*, 12, 783722.
- 177) Konowalchuk, J.; Speirs, J.I. and Stavric, S.(1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:775–779.
- 178) Kouadio, K. K., Konan, K. M., Ouattara, D., & Traoré, O. (2022). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Escherichia coli* strains from sewage and lagoon waters in Côte d’Ivoire. *Virology Journal*, 19 (1), 77.

- 179) Kovacs, T., & Kessler, C. (2018). UV inactivation of common viral pathogens in water: A review. *Journal of Water and Health*, 16(2), 181–196.
- 180) Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and protocols, volume 1: Isolation, characterization, and interactions* (pp. 69–76). Humana Press.
- 181) Krüger, A., Lucchesi, P., Sanso, A. M., Etcheverría, A. I., Bustamante, A. V., Burgan, J., Fernández, L., Fernández, D., Leotta, G., & Friedrich, A. W. (2015). Genetic characterization of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated from animal, food, and clinical samples. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 74.
- 182) Kumar, P., Kuhlmann, F. M., Chakraborty, S., Bourgeois, A. L., Foulke–Abel, J., Tumala, B., Vickers, T. J., Sack, D. A., DeNearing, B., Harro, C. D., & Fleckenstein, J. M. (2018). Enterotoxigenic *Escherichia coli*–blood group A interactions intensify diarrheal severity. *Journal of Clinical Investigation*, 128(8), 3298–3311.

-L-

- 183) Labrie, S.J.; Samson, J.E.; Moineau, S.(2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol*, 8, 317–327.
- 184) Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska–Skrobek, G., Briers, Y., & Drulis–Kawa, Z. (2017). Bacteriophage–encoded virion–associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3103–3119.

- 185) Lauman, P., & Dennis, J. J. (2021). *Bacteriophages: Biology, technology, therapy*. Springer International Publishing.
- 186) Lauman, P.; Dennis, J.J.(2023). Synergistic Interactions among Burkholderia cepacia Complex–Targeting Phages Reveal a Novel Therapeutic Role for Lysogenization–Capable Phages. *Microbiol. Spectr.*, 11, e04430–22.
- 187) Leavitt, J.C.; Woodbury, B.M.; Gilcrease, E.B.; Bridges, C.M.; Teschke, C.M.; Casjens, S.R.(2024). Bacteriophage P22 SieA–mediated superinfection exclusion. *mBio*, 15, e02169–23.
- 188) Lee, H., Ku, H. J., Lee, D. H., Kim, Y. T., Shin, H., Ryu, S., & Lee, J. H. (2016). Characterization and genomic study of the novel bacteriophage HY01 infecting both *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a biocontrol agent in food. *PLoS One*, 11(12), e0168985.
- 189) Lee, J.–J., Kim, J., Park, J., & Choi, S. (2021). Therapeutic and prophylactic effect of experimental bacteriophage treatment to control diarrhea caused by *E. coli* in newborn calves. *ACS Infectious Diseases*, 7(8), 2093–2101.
- 190) Li, K., Wang, X. Q., Shahzad, M., Zhang, H., Zhao, X. D., Jiang, X., . & Li, J. K. (2018). Antibiotic resistance and screening of the resistant genes of *Escherichia coli* (*E.coli*) isolated from diarrheal yak calves in Sichuan Province, China. *Trop. Biomed.* 35, 478–486.
- 191) Licznarska, K., Nejman–Faleńczyk, B., Bloch, S., et al. (2016). Oxidative stress in Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 3578368.

- 192) Lin, D.M.; Koskella, B. and Lin, H.C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 8(3).
- 193) Linares, R., Arnaud, C. A., Effantin, G., Darnault, C., Epalle, N. H., Boeri Erba, E., ... & Breyton, C. (2023). Structural basis of bacteriophage T5 infection trigger and E. coli cell wall perforation. *Science Advances*, 9(12), eade9674.
- 194) Little, J. W., & Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29(1), 11–22.
- 195) Liu, Y., Liu, M., Hu, R., Bai, J., He, X., & Jin, Y. (2021). Isolation of the novel phage PHB09 and its potential use against the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Viruses*, 13(11), 2275.

-M-

- 196) Macfaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for Identification of medical bacteria*. 3rd ed. Lippin Cott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
- 197) Mahony, J., Alqarni, M., Stockdale, S., Spinelli, S., Feyereisen, M., Cambillau, C., & van Sinderen, D. (2016). Functional and structural dissection of the tape measure protein of lactococcal phage TP901–1. *Scientific Reports*, 6(1), 36667.
- 198) Maiques, E., Úbeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, Í., Novick, R. P., Barbé, J., & Penadés, J. R. (2006). β -lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2726–2729.

- 199) Majewska, J., Międzybrodzki, R., Szymczak, A., Borysowski, J., & Górski, A. (2023). Evolution of T4 phage virus in different selection pressures from non-bacterial factors. *Microbiology Spectrum*, 11(5), e01515-23
- 200) Makino, K., Yokoyama, K., Kubota, Y., Yutsudo, C. H., Kimura, S., Kurokawa, K., & Shinagawa, H. (1999). Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes & genetic systems*, 74(5), 227-239.
- 201) Makky, S., Abdelsattar, A. S., Habashy, M., Abdelhalim, A., El-Shibiny, A., & El-Sayed, A. (2023). Phage ZCSS1 from isolation to application against *Staphylococcus sciuri* and biofilm: A prospect of utilizing temperate phage and its products. *Gene Reports*, 32, 101792.
- 202) Mardiana, M., Teh, S. H., Lin, L. C., & Lin, N. T. (2022). Isolation and characterization of a novel siphoviridae phage, vB_AbaS_TCUP2199, infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Viruses*, 14(6), 1240.
- 203) Martak, D., Duperron, S., Boussekey, M., Le Bris, N., & Jacquet, S. (2020). High prevalence of human-associated *Escherichia coli* in low-anthropized wetlands: Sources and implications. *Frontiers in Microbiology*, 11, 552566.
- 204) Matson, K.D., Horrocks, N.P., Versteegh, M.A. and Tieleman, B.I. (2012). Baseline haptoglobin concentrations are repeatable and predictive of certain aspects of a subsequent experimentally-induced inflammatory response. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 162, 7-15.
- 205) Matsui, T.; Yoshikawa, G.; Mihara, T.; Chatchawankanphanich, O.; Kawasaki, T.; Nakano, M.; Fujie, M.; Ogata, H.; Yamada, T. (2017).

- Replications of two closely related groups of jumbo phages show different level of dependence on host-encoded RNA polymerase. *Front. Microbiol.*, 8, 1010.
- 206) Matthews, C. K., & Kutter, E. (2009). Bacteriophage T4. In *Bacteriophages: Biology and Applications* (pp. 60–95).
- 207) Mauro, S. A., & Koudelka, G. B. (2011). Shiga toxin: Expression, distribution, and its role in the environment. *Toxins*, 3(6), 608–625.
- 208) McCallin, S., Sacher, J. C., Zheng, J., & Chan, B. K. (2019). Current state of compassionate phage therapy. *Viruses*, 11 (4), 234–245.
- 209) McMinn, B. R., Korajkic, A., & Ashbolt, N. J. (2020). Bacteriophages as indicators of faecal pollution and viral water quality. In *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy* (pp. 1–39).
- 210) Mellbye, B.; Schuster, M. (2011). The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: A Proof of Concept. *mBio*, 2, e00131–11.
- 211) Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiology Spectrum*, 2(4).
- 212) Memar, M. Y., Yekani, M., Celenza, G., et al. (2020). The central role of the SOS DNA repair system in antibiotics resistance: a new target for a new infectious treatment strategy. *Life Sciences*, 262, 118562.
- 213) Meng, L. H., Ke, F., Zhang, Q. Y., & Gui, J. F. (2023). Biological and genomic characteristics of MaMV-DH01, a novel fresh-water myoviridae cyanophage strain. *Microbiology Spectrum*, 11(1), e0288822.
- 214) Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Van Parys, L., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., De Corte, P., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., De Vos, D., & Vaneechoutte, M. (2009). Quality-

- controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. PLOS ONE, 4(3), Article e4944.
- 215) Michel, B. (2005). After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. PLoS Biology, 3(7), e255.
- 216) Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. N. (2004). SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. Science, 305(5690), 1629–1631.
- 217) Mirhoseini, A., Amani, J., & Nazarian, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic Escherichia coli and vaccines against it. Microbial Pathogenesis, 117, 162–169.
- 218) Mohamed, F. F., Mansour, S. M. G., El-Araby, I. E., Magdy, M., & Ali, M. A. (2017). Molecular detection of enteric viruses from diarrheic calves in Egypt. Archives of Virology, 162(1), 129–137.
- 219) Monteiro, R.; Pires, D.P.; Costa, A.R.; Azeredo, J.(2019). Phage therapy: Going temperate? Trends Microbiol., 27, 368–378.
- 220) Moody, J. Synergism testing: Broth microdilution checkerboard and broth macrodilution method. In Clinical Microbiology Procedures Handbook; ASM Press: Washington, DC, USA, 2004; pp. 1–28.
- 221) Moradpour Z, Yousefi N, Sadeghi D, Ghasemian A.(2020). Synergistic bactericidal activity of a naturally isolated phage and ampicillin against urinary tract infecting Escherichia coli O157 . Iran J Basic Med Sci. 23:257–263.
- 222) Moreira, C. G.; Palmer, K.; Whiteley, M.; Sircili, M. P.; Trabulsi, L. R.; Castro, A.F.P. and Sperandio, V.(2006). Bundle-Forming Pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic Escherichia coli. J. Bacteriol. 188: 3952–3961.

- 223) Munita, J.M., and Arias, C.A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 4–2.
- 224) Mushegian, A. R. (2020). Are there 10^{31} virus particles on Earth, or more, or fewer? *Journal of Bacteriology*, 202 (11), e00052–20.

-N-

- 225) Naderi, Z., Ghanbarpour, R., & Sami, M. (2016). Antimicrobial resistance characteristics and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves in southeast of Iran. *International Journal of Enteric Pathogens*, 4(4), 1–7.
- 226) Narulita. E, AJI. G. P., Wahono. B, Murdiyah. S, Yulian. R.(2020). Synergism of Phage ϕ PT1b and Antibiotics for Reducing Infection of *Escherichia coli* , *Biogenesis*, 8, 22– 28.
- 227) Nataro, J. P. and Kaper, J. B .(1998) . Diarrhagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*11(1): 142–201.
- 228) Naylor, J. M. (2009). Neonatal calf diarrhea. *Food Animal Practice*, 70.
- 229) Nechaev, S.and Severinov, K.(2003). Bacteriophage–Induced Modifications of Host RNA Polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57, 301–322.
- 230) Neto, V.M.; Bando, S.Y.; Filho, C.A.M. and Gir n, J.A.(2003). Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cell .Microbiol.* 5:533–549.
- 231) Nguyen, T. D., Vo, T. T., & Vu–Khac, H. (2010). Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *Journal of Veterinary Science*, 12 (2), 159–164.

- 232) Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 90.
- 233) Ngwenyama, T. T. (2026). Fluid and electrolyte therapy in the patient with vomiting and diarrhea. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 56 (1), 279–297.
- 234) Nikolich, M. P., & Filippov, A. A. (2020). Bacteriophage therapy: Developments and directions. *Antibiotics*, 9(3), 135.
- 235) Nikulina, A. N., Nikulin, N. A., Suzina, N. E., & Zimin, A. A. (2025). Treatment of E. coli Infections with T4-Related Bacteriophages Belonging to Class Caudoviricetes: Selecting Phage on the Basis of Their Generalized Transduction Capability. *Viruses*, 17(5), 701.
- 236) Nir-Paz, R., Gelman, D., Khouri, A., Sisson, B. M., Fackler, J., Alkalay-Oren, S., Khalifa, L., Rimon, A., Yerushalmy, O., Bader, R., & Hazan, R. (2019). Successful treatment of antibiotic-resistant, poly-microbial bone infection with bacteriophages and antibiotics combination. *Clinical Infectious Diseases*, 69(11), 2015–2018.
- 237) Niu, Y. D., Stanford, K., Kropinski, A. M., Ackermann, H. W., Johnson, R. P., She, Y. M., & McAllister, T. A. (2009). Prevalence and impact of bacteriophages on the presence of Escherichia coli O157:H7 in feedlot cattle and their environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (5), 1271–1278.
- 238) Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J., Lavigne, R., Dutilh, B. E., & Brouns, S. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 760–773.

- 239) Normark, B.H. and Normark, S.(2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252,91–106.
- 240) North, O. I., & Brown, E. D. (2021). Phage–antibiotic combinations: A promising approach to constrain resistance evolution in bacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1496(1), 23–34.

-O-

- 241) O’Neill Commission .(2014). Review on Antimicrobial Resistance. Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance London.
- 242) O'Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W., & Formal, S. B. (1984). Shiga–like toxin–converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*, 226(4675), 694–696.
- 243) Ochoa, T. J., Barletta, F., Contreras, C., & Mercado, E. (2008). New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(9), 852–856.
- 244) Oduor, J. M. O., Kadija, E., Nyachio, A., Mureithi, M. W., & Skurnik, M. (2020). Bioprospecting *Staphylococcus* phages with therapeutic and bio–control potential. *Viruses*, 12(2), 133.
- 245) Oechslin, F.(2018). Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*, 10(7), 1–23.
- 246) Ok, M., Güler, L., Turgut, K., Ok, Ü., Sen, I., Gündüz, I. K., Birdane, M. F., & Güzelbekteş, H. (2007). The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of

- Escherichia coli strains by multiplex PCR. Zoonoses Public Health, 56 , 94–101.
- 247) Osman, K. M., Mustafa, A. M., Elhariri, M., & AbdElhamed, G. S. (2013). The distribution of Escherichia coli serovars, virulence genes, gene association and combinations and virulence genes encoding serotypes in pathogenic E. coli recovered from diarrhoeic calves, sheep and goat. Transboundary and Emerging Diseases, 60(1), 69–78.

-P-

- 248) Pakbin, B., Akhondzadeh Basit, A., Khanjari, A., Azimi, L., & Karimi, A. (2020). Differentiation of stx1A gene for detection of Escherichia coli serotype O157: H7 and Shigella dysenteriae type 1 in food samples using high resolution melting curve analysis. Food Science & Nutrition, 8(7), 3665–3672.
- 249) Pakbin, B., Bruck, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic Escherichia coli: A review. International Journal of Molecular Sciences, 22 (18), 9922.
- 250) Pallavali, R.R.; Degati, V.L.; Lomada, D.; Reddy, M.C. and Durbaka, V.R. P. (2017). Isolation and in vitro evaluation of bacteriophages against MDRbacterial isolates from septic wound infections. PloS one., 12(7), 1–16.
- 251) Pappaianni, M., Paris, D., Woo, A. C., & Borriello, G. (2020). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi–drug resistance. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 36(7), 1–13.
- 252) Parab, L., Dherbey, J. R., Rivera, N., Schwarz, M., Gallie, J., & Bertels, F. (2025). Chloramphenicol and gentamicin reduce the evolution of

- resistance to phage Φ X174 by suppressing a subset of *E. coli* LPS mutants. *PLoS Biology*, 23 (1), e3002952.
- 253) Pardon, B., Hostens, M., Duchateau, L., Dewulf, J., De Bleecker, K., & Deprez, P. (2013). Impact of respiratory disease, diarrhea, otitis and arthritis on mortality and carcass traits in white veal calves. *BMC veterinary research*, 9(1), 79.
- 254) Parlatir, Y., Tuncel, S., & Ayvazoğlu Demir, P. (2025). The Relationship of Neonatal Calf Diarrhea and Yield Losses with Managerial Factors in Dairy Cattle Farms. *Research Square*.
- 255) Pasayo, R. A. G., Sanz, M. E., Padola, N. L., & Moreira, A. R. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves in Argentina. *Open Veterinary Journal*, 9(1), 65–73.
- 256) Paul, S. K., Khan, M. S. R., Rashid, M. A., Hassan, J., & Mahmud, S. M. S. (2010). Isolation and characterization of *Escherichia coli* from buffalo calves in some selected areas of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 8(1), 23–26.
- 257) Payne, R. J., Phil, D., & Jansen, V. A. (2000). Phage therapy: The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 68 (3), 225–230
- 258) Peñallillo, A. K., Sepulveda, M. A., Palma, C. J., Espinoza, A., Aguilera, M., Burgos, R. A., Carretta, D., Islas, A., & Pérez, R. (2016). Haematological and blood biochemical changes induced by the administration of low doses of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in rabbits. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 48(3), 315–320.

- 259) Petersen, H.H., Nielsen, J.P. and Heegaard, P.M. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163–187.
- 260) Pham, N. Q. A., Vo, T. P., Pham, D. T. M., Tran, T. T., & Nguyen, T. A. (2024). Isolation and toxicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice and a collection of phages against the pathogen. *Malaysian Journal of Microbiology*, 20(1), 15–23.
- 261) Phuong, L. N. N., Anh, L. H., Huan, P. K. N., Loc, H. T., Trang, C. T. H., Mo, T. T. H., Xuan, N. H., & Ngu, N. T. (2022). The effect of different media and temperature conditions for *Salmonella* bacteriophage preservation. *Veterinary Integrative Sciences*, 20 (2), 489–498.
- 262) Pires, D.P.; Oliveira, H.; Melo, L.D.R.; Sillankorva, S.; Azeredo, J. (2016). Bacteriophage Encoded Depolymerases: Their Diversity and Biotechnological Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 2141–2151.
- 263) Platenkamp, A., & Mellies, J. L. (2018). Environment controls LEE regulation in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1694.
- 264) Pollock, G.L. (2019). Investigating the Molecular Mechanisms of Enteropathogenic *Escherichia coli* Pathogenesis. Ph.D. Thesis, University of Melbourne, Melbourne, Australia.
- 265) Pope, W. H., C. Haase–Pettingell, and J. King (2004). Protein folding failure sets high–temperature limit on growth of Phage P22 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(8): 4840–4847.

- 266) Principi, N.; Silvestri, E. and Esposito, S. (2019). Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in pharmacology*, 10(513).

-Q-

- 267) Qin, K., Shi, X., Yang, K., Xu, Q., Wang, F., Chen, S., Xu, T., Liu, J., Wen, W., Chen, R., Wang, X., Ni, H., Feng, X., Zhang, Y., & Tan, Y. (2024). Phage–antibiotic synergy suppresses resistance emergence of *Klebsiella pneumoniae* by altering the evolutionary fitness. *mBio*, 15 (2), e01393–24.
- 268) Qiu, X. (2012). Heat induced capsid disassembly and DNA release of bacteriophage λ . *PLoS One*, 7(7), e39793.
- 269) Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S., & Hartigan, P. J. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease* (2nd ed.). Wiley–Blackwell.

-R-

- 270) Radostits ,OM.; Gay, CC.; Hinchcliff, KW. and Constable, PD. (2007). Mastitis. In: *Veterinary Medicine: A Text book of disease of cattle, sheep, pigs, goats, and horses* 10th edition, Ballier, Tindall, London.P:674–762.
- 271) Rahman, M.A., Rahman, A.K.M., Islam, M.A. and Alam, M.M. (2017). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from milk, beef and chicken meat in Bangladesh. *Bangladesh J. Vet. Med.*, 15(2): 141–146.
- 272) Rajat, R.M.; Ninama, G.L.; Mistry, K.; Parmar, R., Patel, K. and Vegad, M.M. (2012). Antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*

- species isolated at a tertiary care hospital, Ahmadabad. *Natl J Med Res.*, 2(2), 156–159.
- 273) Rasko, D. A., Del Canto, F., Luo, Q., Fleckenstein, J. M., Vidal, R., & Hazen, T. H. (2019). Comparative genomic analysis and molecular examination of the diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from Chile. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), e0007828.
- 274) Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation–induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, 20 (1), 592–580.
- 275) Rawson, B., Yang, Q., Catalano, C. E., & Smith, D. E. (2025). Single–molecule measurements of bacteriophage lambda DNA packaging using purified terminase motor proteins and *E. coli* integration host factor. *Scientific Reports*, 15(1), 7093.
- 276) Razzaque, M. A., Abbas, S., Al–Mutawa, T., & Bedair, M. (2009). Mortality of pre–weaned calves in Kuwait's dairy herds, its causes and impact of interventions. *International Veterinary Medicine*, 5, 1–12.
- 277) Reardon, S. (2014). Phage therapy gets revitalized: The rise of antibiotic resistance rekindles interest in a century–old virus treatment. *Nature*, 510(7503), 15–16.
- 278) Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27 (3), 493–497.
- 279) Rhodes, K. A., & Schweizer, H. P. (2016). Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resistance Updates*, 28, 82–90.
- 280) Riedel, S.; Hobden, J.A.; Miller, S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A.; Detrick, B.; Mitchell, T.G.; Sakanari, J.A.; Hotez, P. and Mejia, R. (2019). *Medical Microbiology*. 28th ed . McGraw Hill, 821pp.

- 281) Rifai, N., Tracy, R. P., & Ridker, P. M. (1999). Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clinical Chemistry*, 45 (12), 2136–2141.
- 282) Riley, L.W.; Remis, R. S.; Helgerson, S. D.; McGee, H.B.; Wells, J.G.; Davis, B.R.; Hebert, R.J.; Olcott, E.S.; Johnson, L. M.; Hargrett, N.T.; Blake, P.A. and Cohen, M.L.(1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype O157:H7. *N. Eng. J. Med.* 308: 681–685.
- 283) Ritchie, J. M., Thorpe, C. M., Rogers, A. B., & Waldor, M. K. (2003). Critical roles for stx2, eae, and tir in enterohemorrhagic Escherichia coli-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits. *Infection and Immunity*, 71(12), 7129–7139.
- 284) Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L.(2002). Escherichia coli as a cause of diarrhea. *J. Gastro. Hepatol.* 17:467–475.
- 285) Rodas, C., Mamani, R., Blanco, J., Blanco, J. E., Wiklund, G., Svennerholm, A. M., ... & Iniguez, V. (2011). Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(2), 132–137.
- 286) Rodrigues, J. F., Lourenço, R. F., Maeda, D. L. N. F., de Jesus Cintra, M., Nakao, N., Mathias-Santos, C., Luiz, W. B., & de Souza Ferreira, L. C. (2020). Strain-specific transcriptional and posttranscriptional regulation of heat-labile toxin expression by enterotoxigenic Escherichia coli. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 455–465.
- 287) Römer, W., & Behrens, A. (2006). Molecular biology of bacteriophage T3 and its role in genetic engineering. *Bacteriophage T3: A model system for*

- studying bacteriophage biology. *Annual Review of Microbiology*, 60, 143–163.
- 288) Roshal, D., Konevtsova, O., Lošdorfer Božič, A., Podgornik, R., & Rochal, S. (2019). pH-induced morphological changes of proteinaceous viral shells. *Scientific Reports*, 9(1), 5341.
- 289) Ruano-Gallego, D., Sánchez-Garrido, J., Kozik, Z., Núñez-Berruero, E., Cepeda-Molero, M., Mullineaux-Sanders, C., Clark, J.N.-B., Slater, S.L., Wagner, N., Glegola-Madejska, I. (2021). Type III secretion system effectors form robust and flexible intracellular virulence networks. *Science*, 371(6534).
- 290) Ruest, M.K.; Supina, B.S.I.; Dennis, J.J.(2023). Bacteriophage steering of *Burkholderia cenocepacia* toward reduced virulence and increased antibiotic sensitivity. *J. Bacteriol.*, 205, e00196–23.

-S-

- 291) Sabnis, A., Hagart, K. L., Klöckner, A., Becce, M., Evans, L. E., Furniss, R. C. D., ... & Davies, J. C. (2021). Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *eLife*, 10, e65836.
- 292) Sada, T. S., & Tessema, F. S. (2024). Isolation and characterization of lytic bacteriophages from various sources in Addis Ababa against antimicrobial-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* strains and evaluation of their therapeutic potential. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 229.
- 293) Saeed, F., Iqbal, M., & Riaz, M. (2019). Occurrence of bacteriophages against *Escherichia coli* in poultry farm soils. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 29 (6), 1692–1699.

- 294) Sae-Ueng, U., Bhunchoth, A., Phironrit, N., Treetong, A., Saparpakorn, P., Chathirat, S., ... & Letellier, L. (2022). Thermosensitive C22 phage stiffness modulates the phage infectivity. *Scientific Reports*, 12(1), 13001.
- 295) Sae-Ueng, U., Bunsuwansakul, C., Showpanish, K., Khawneua, K., Chanklang, P., & Phironrit, N. (2024). Revealing bacteriophage capabilities: pH and NaCl concentration effects on RSJ2 phage infectivity and stiffness. *Journal of King Saud University – Science*, 36(8), 103344.
- 296) Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777–786.
- 297) Salvadori, M. R., Valadares, G. F., Leite, D. D. S., Blanco, J., & Yano, T. (2003). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(3), 230–235.
- 298) Sangurdekar, D. P., Zhang, Z., & Khodursky, A. B. (2011). The association of DNA damage response and nucleotide level modulation with the antibacterial mechanism of the anti-folate drug trimethoprim. *BMC Genomics*, 12(1), 583.
- 299) Santos, S.B.; Carvalho, C. M.; Sillankorva, S.; Nicolau, A.; Ferreira, E. C.; and Azeredo, J. (2009). The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC microbiology*, 9(1), 1–10.
- 300) Sastry, A. S., & Bhat, S. (2021). *Essentials of medical microbiology* (2nd ed.). Jaypee Brothers Medical Publishers.
- 301) Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 234–258.

- 302) Scaria, J., Warnick, L. D., Kaneene, J. B., May, K., Teng, C. H., & Chang, Y. F. (2010). Comparison of phenotypic and genotypic antimicrobial profiles in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from the same dairy cattle farms. *Molecular and Cellular Probes*, 24 (6), 325–345.
- 303) Schwidder, M., Heinisch, L., & Schmidt, H. (2019). Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin. *Toxins*, 11(9), 502.
- 304) Secor, P.R.; Sweere, J.M.; Michaels, L.A.; Malkovskiy, A.V.; Lazzareschi, D.; Katznelson, E.; Rajadas, J.; Birnbaum, M.E.; Arrigoni, A.; Braun, K.R.(2015). Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function. *Cell Host Microbe*, 18, 549–559.
- 305) Sedky, D., Ghazy, A. A., & Abou-Zeina, H. A. A. (2025). Advances in diagnosis of diseases causing diarrhea in newborn calves. *Veterinary Research Communications*, 49(1), 293–309.
- 306) Segall, A. M., Roach, D. R., & Strathdee, S. A. (2019). Stronger together? Perspectives on phage–antibiotic synergy in clinical applications of phage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 46–50.
- 307) Selcuk, E., Erdogan, B., & Ozbek, T. (2024). A preliminary biocontrol study: Isolation, characterization and genomic analysis of lytic phage TE against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Phytopathology*, 172(3), e13338.
- 308) Serapio-Palacios, A., & Finlay, B. B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 54, 67–76.

- 309) Shahin, K., Barazandeh, M., Zhang, L., Hedayatkah, A., Mansoorianfar, M., & Pang, H. (2021). Biodiversity of new lytic bacteriophages infecting *Shigella* spp. in freshwater environment. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- 310) Shahrani, M., Dehkordi, F. S., & Momtaz, H. (2014). Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. *Biological Research*, 47(1), 28.
- 311) Shamsuzzaman. M.d, Kim. S, Kim. J.(2025). Therapeutic potential of novel phages with antibiotic combinations against ESBL-producing and carbapenem-resistant *Escherichia Coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 43, 86–97.
- 312) Sheriff, A., Kayser, S., Brunner, P. and Vogt, B. (2021). C-reactive protein triggers cell death in ischemic cells. *Front. Immunol.* 12, 630430.
- 313) Shi, K.; Oakland, J.T.; Kurniawan, F.; Moeller, N.H.; Banerjee, S.; Aihara, H.(2020). Structural basis of superinfection exclusion by bacteriophage T4 Spackle. *Commun. Biol.*, 3, 691.
- 314) Sidhu, S. S., & Koide, A. (2009). Phage Display for Engineering and Analyzing Protein Interaction Interfaces. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(4), 497–506
- 315) Silas, S., Carion, H., Makarova, K. S., Sanchez Godinez, D., Haniyur, S., Volino, L., & Bondy-Denomy, J. (2025). Anti-restriction functions of injected phage proteins revealed by peeling back layers of bacterial immunity. *Nature Communications*, 16(1), 7828.
- 316) Sillankorva, S., & Pires, D. P. (2015). The potential of bacteriophages for the treatment of bacterial infections: An overview. *Viruses*, 7(5), 2715–2740.

- 317) Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(4), 225–236.
- 318) Sjahriani, T., Wasito, E. B., & Tyasningsih, W. (2021). Isolation and identification of *Escherichia coli* O157: H7 lytic bacteriophage from environment sewage. *International journal of food science*, 2021(1), 7383121.
- 319) Smith, H. W., Huggins, M. B., & Shaw, K. M. (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *Journal of General Microbiology*, 133, (5), 1111–1126.
- 320) Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W., IV. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 86, 145–197.
- 321) Smith, J., Jones, A., & Brown, L. (2022). Phage therapy for *Escherichia coli*-induced diarrhea in calves: A controlled trial. *Journal of Veterinary Microbiology*, 45(3), 202–210.
- 322) Soliman, S. M., Salib, F. A., & Hassan, R. A. (2019). Epidemiology and diagnosis of *Escherichia coli* calf scour. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*, 79 (1), 21–33.
- 323) Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 754.
- 324) Srivani, M., Reddy, Y. N., Subramanyam, K. V., Reddy, M. R., & Rao, T. S. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in diarrheic buffalo calves. *Veterinary World*, 10(7), 774–779.

- 325) Stilwell, G., & Carvalho, R. C. (2011). Clinical outcome of calves with failure of passive transfer as diagnosed by a commercially available IgG quick test kit. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(5), 524.
- 326) Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biologic mechanisms to future directions. *Cell*, 186(1), 17–31.
- 327) Subramenium, G. A., Sabui, S., Marchant, J. S., Said, H. M., & Subramanian, V. S. (2019). Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat labile enterotoxin inhibits intestinal ascorbic acid uptake via a cAMP–dependent NF- κ B–mediated pathway. *American Journal of Physiology–Gastrointestinal and Liver Physiology*, 316(1), G55–G63.
- 328) Suh, G. A., Lodise, T. P., Tamma, P. D., Knisely, J. M., Alexander, J., Aslam, S., & Antibacterial Resistance Leadership Group. (2022). Considerations for the use of phage therapy in clinical practice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(3), e02071–21.
- 329) Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659.
- 330) Sulakvelidze, A. (2005). Phage therapy: An attractive option for dealing with antibiotic–resistant bacterial infections. *Drug Discovery Today*, 10(12), 807–809.
- 331) Sullivan, M. B., & Miller, E. S. (2001). The bacteriophage phiX174 genome. *Current Opinion in Microbiology*, 4(6), 517–524.
- 332) Supina, B.S.I.; Dennis, J.J.(2025).The Current Landscape of Phage–Antibiotic Synergistic (PAS) Interactions.*Antibiotics*. 14, 545.
- 333) Supina, B.S.I.; McCutcheon, J.G.; Peskett, S.R.; Stothard, P.; Dennis, J.J. (2025).A flagella–dependent *Burkholderia jumbo* phage controls rice

- seedling rot and steers Burkholderia glumae toward reduced virulence in rice seedlings. *mBio*, 16, e02814–24.
- 334) Swift, S. M., Seal, B. S., Garrish, J. K., Oakley, B. B., Hiatt, K., Yeh, H. Y. & Donovan, D. M. (2015). A thermophilic phage endolysin fusion to a *Clostridium perfringens*-specific cell wall binding domain creates an anti-clostridium antimicrobial with improved thermostability. *Viruses*, 7(6), 3019–3034.
- 335) Syngouna, V. I., & Chrysikopoulos, C. V. (2013). Cotransport of viruses and clay particles in saturated porous media. *Water Research*, 47(14), 4992–5000.

-T-

- 336) Taghadosi, R., Shakibaie, M. R., Alizade, H., Hosseini-Nave, H., Askari, A., & Ghanbarpour, R. (2018). Serogroups, subtypes and virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from human, calves and goats in Kerman, Iran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 11(1), 60–67.
- 337) Taj, M. K., Ling, J. X., Bing, L. L., Qi, Z., Taj, I., Hassani, T. M., Samreen, Z., & Yunlin, W. (2014). Effect of dilution, temperature and pH on the lysis activity of T4 phage against *E. coli* BL21. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24 (4), 1252–1255.
- 338) Tang, F., Zhang, P., Zhang, Q., Xue, F., Ren, J., Sun, J., & Jiang, Y. (2019). Isolation and characterization of a broad-spectrum phage of multiple drug resistant *Salmonella* and its therapeutic utility in mice. *Microbial Pathogenesis*, 126, 193–198.

- 339) Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, Miyanaga K, Nakai Y, Unno H. (2005). Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng*, 100(3): 280–7.
- 340) Tarakanov, R. I., Lukianova, A. A., Evseev, P. V., Toshchakov, S. V., Kulikov, E. E., Ignatov, A. N., & Dzhililov, F. S. U. (2022). Bacteriophage control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean. *Plants*, 11(7), 938.
- 341) Tarekegn, Y., & Molla, F. W. (2017). The prevalence of *E. coli* from diarrheic calves and their antibiotic sensitivity test in selected dairy farms of Debre Zeit, Ethiopia. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, 6 (1), Article 555680.
- 342) Tarr, P. I., & Freedman, S. B. (2022). Why antibiotics should not be used to treat Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 38(1), 30–38.
- 343) Tawakol, M. M., Nabil, N. M., and Samy, A. (2019). Evaluation of bacteriophage efficacy in reducing the impact of single and mixed infections with *Escherichia coli* and infectious bronchitis in chickens. *Infection ecology and epidemiology*, 9(1), 1686822.
- 344) Tey, B. T., Ooi, S. T., Yong, K. C., Tan Ng, M. Y., Ling, T. C., & Tan, W. S. (2009). Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C–WSFFSNI–C) that interacts with hepatitis B core antigen. *Journal of African Biotechnology*, 8(2), 268–273.
- 345) Thomason, J. (2025). Diarrhea. In L. D. Keel & L. R. Drylewicz (Eds.), *The feline patient* (6th ed.). Wiley Online Library.

- 346) Torriero–Smith, N., Rogers, B. A., McDonald, M. J., & Barr, J. J. (2026). Harnessing ‘phage training’ to bolster the therapeutic potential of bacteriophages. *Current Opinion in Microbiology*, 89, 102696.
- 347) Touchon, M.; Bernheim, A.; Rocha, E.P.C. (2016). Genetic and life–history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *ISME J.*, 10, 2744–2754.
- 348) Trachtman, H., Austin, C., Lewinski, M., & Stahl, R. A. (2012). Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin–associated HUS. *Nature Reviews Nephrology*, 8(11), 658–669.
- 349) Tran, T. D., Ali, M. A., Lee, D., Felix, M.–A., & Luallen, R. J. (2022). Bacterial filamentation as a mechanism for cell–to–cell spread within an animal host. *Nature Communications*, 13(1), 693.
- 350) Trefz, F. M., Lorenz, I., Lorch, A., & Constable, P. D. (2017). Clinical signs, profound acidemia, hypoglycemia, and hypernatremia are predictive of mortality in 1,400 critically ill neonatal calves with diarrhea. *PloS one*, 12(8), e0182938.
- 351) Trzebiatowski, L., Wehrle, F., Freick, M., Donat, K., & Wehrend, A. (2025). Prenatal Factors Influencing Calf Morbidity and Mortality in Dairy Cattle: A Systematic Review of the Literature (2000–2024). *Animals*, 15(12), 1772.
- 352) Turunen, K., Antikainen, J., Laaveri, T., Kirveskari, J., Svennerholm, A.–M., & Kantele, A. (2020). Clinical aspects of heat–labile and heat–stable toxin–producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: A prospective study among Finnish travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 38, 101855.
- 353)

-U-

- 354) Umpiérrez, A., Ernst, D., Fernández, M., Oliver, M., Casaux, M. L., Caffarena, R. D., Schild, C., Giannitti, F., Fraga, M., & Zunino, P. (2021). Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(1), 34–38.

-V-

- 355) Velasco–Galilea, M., Piles, M., Viñas, M., Rafel, O., González–Rodríguez, O., Guivernau, M., & Sánchez, J. P. (2020). Effects of probiotic supplementation on growth performance, intestinal microbiota and morphology, and resistance to pathogenic *E. coli* in rabbits. *World Rabbit Science*, 28(2), 91–103.
- 356) Vidal, R. M., Muhsen, K., Tennant, S. M., Svennerholm, A.–M., Sow, S. O., Sur, D., Zaidi, A. K. M., Faruque, A. S. G., Saha, D., Adegbola, R., Hossain, M. J., Ochieng, J. B., Omore, R., Oundo, J. O., Breiman, R. F., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., ... Qadri, F. (2019). Colonization factors among enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from children with moderate–to–severe diarrhea and from matched controls in the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), e0007037.
- 357) Vila, J.; Vargas, M.; Henderson, I.R.; Gascon, J. and Nataro, J.P.(2000). Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler’s diarrhea strains. *J. Infect. Dis.* 182:1780–1783.
- 358) von Mentzer, A., Blackwell, G. A., Pickard, D., Boinett, C. J., Joffre, E., Page, A. J., Svennerholm, A.–M., Dougan, G., & Sjöling, Å. (2021).

Long-read-sequenced reference genomes of the seven major lineages of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) circulating in modern time. *Scientific Reports*, 11, 1–16.

- 359) Vu, N. T., Kim, H., Lee, S., Hwang, I. S., & Oh, C. S. (2024). Bacteriophage cocktail for biocontrol of soft rot disease caused by *Pectobacterium* species in Chinese cabbage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 11–15.

-W-

- 360) Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N., Acheson, D. W., Friedman, D. I., & Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 44(4), 957–970.
- 361) Wang, H., Zhong, Z., Luo, Y., Cox, E., & Devriendt, B. (2019). Heat-stable enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their impact on host immunity. *Toxins*, 11(1), 24.
- 362) Wang, X., Loh, B., Gordillo Altamirano, F., Yu, Y., Hua, X., & Leptihn, S. (2021). Colistin-phage combinations decrease antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* via changes in envelope architecture. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 2205–2219.
- 363) Wang, Y., Subedi, D., Li, J., Wu, J., Ren, J., Xue, F., ... & Tang, F. (2022). Phage cocktail targeting STEC O157: H7 has comparable efficacy and superior recovery compared with enrofloxacin in an enteric murine model. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e00232–22.
- 364) Wang, X., Feng, J., Zhang, Y., Qiu, Y., Yang, B., Liang, Y., ... & Ren, L. (2026). Comparative Genomic and Resistance Analysis of ST859–KL19

- and ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Diverse Capsular Serotypes. *Antibiotics*, 15(1), 40.
- 365) Wani, S.A.; Pandit, F.; Samanta, I.; Bhat, M.A. and Buchh, A.S.(2004). Molecular epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in India. *Curr. Sci.* 87(10): 1345 –1353.
- 366) Warr, A. R., Kuehl, C. J., & Waldor, M. K. (2021). Shiga toxin remodels the intestinal epithelial transcriptional response to Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLOS Pathogens*, 17(9), e1009290.
- 367) Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Żaczek, M., Łobočka, M., Lusiak-Szelachowska, M., & Górski, A. (2016). Phage therapy as a novel strategy in the treatment of urinary tract infections caused by *E. coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1177.
- 368) Westra, E.R.; van Houte, S.; Oyesiku-Blakemore, S.; Makin, B.; Broniewski, J.M.; Best, A.; Bondy-Denomy, J.; Davidson, A.; Boots, M.; Buckling, A.(2015). Parasite Exposure Drives Selective Evolution of Constitutive versus Inducible Defense. *Curr. Biol*, 25, 1043–1049.
- 369) WHO (World Health Organization).(2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 370) WHO (World Health Organization). (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO Press.
- 371) WHO (World Health Organization). (2021). Global antimicrobial resistance and use surveillance system report: 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341666>
- 372) WHO (World Health Organization) .(2024). Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance to Guide

- Research, Development and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance; World Health Organization: Geneva, Switzerland
- 373) Wojcicki, M.; Średnicka, P.; Błaziejak, S.; Gientka, I.; Kowalczyk, M.; Emanowicz, P.; Świder, O.; Sokołowska, B.; Juszczyk-Kubiak, E. (2021). Characterization and Genome Study of Novel Lytic Bacteriophages against Prevailing Saprophytic Bacterial Microflora of Minimally Processed Plant-Based Food Products. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 12460.
- 374) Wong, C. S., Mooney, J. C., Brandt, J. R., (2012). Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 55(1), 33–41.

-X-

- 375) Xiao, Y., Huang, P., Huang, Z., Liu, C., Zhang, J., & Huang, A. (2022). Influencing factors on the preservation of lytic bacteriophage vB_KpnS_IME279. *Biosafety and Health*, 4(5), 314–320.
- 376) Xiao, H., Tan, L., Tan, Z., Zhang, Y., Chen, W., Li, X., Song, J., Cheng, L., & Liu, H. (2023). Structure of the siphophage neck–Tail complex suggests that conserved tail tip proteins facilitate receptor binding and tail assembly. *PLoS Biology*, 21(7), e3002441.
- 377) Xie, H., Zhuang, X., Kong, J., Ma, G., & Zhang, H. (2005). Bacteriophage Esc–A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3–1 caused diarrhea in chickens. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51 (3), 159–163.
- 378) Xu, Y., Bai, X., Jin, Y., Hu, B., Wang, H., Sun, H., Fan, R., Fu, S., & Xiong, Y. (2017). High prevalence of virulence genes in specific

genotypes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 109.

-Y-

- 379) Yan, J.; Bassler, B.L.(2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe*, 26, 15–21.
- 380) Yang, Y.; Shen, W.; Zhong, Q.; Chen, Q.; He, X.; Baker, J.L.; Xiong, K.; Jin, X.; Wang, J.; Hu, F.(2020). Development of a Bacteriophage Cocktail to Constrain the Emergence of Phage-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.*, 11, 327.
- 381) Yousif, A., & Hussein, M. (2015). Prevalence and molecular detection of intimin (*eaeA*) virulence gene in *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Research Journal of Veterinary Practice*, 3(3), 47–53.

-Z-

- 382) Żbikowska, K., Michalczyk, M., and Dolka, B. (2020). The use of bacteriophages in the poultry industry. *Animals*, 10(5), 872.
- 383) Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K., & Acheson, D. W. K. (2000). Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 664–670.
- 384) Zhang, Y., Liang, Y., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, H., & Wang, H. (2020). Isolation and characterization of a novel *Escherichia coli* O157:H7-specific phage as a biocontrol agent. *Frontiers in Microbiology*, 11,(11).

- 385) Zhang, S., Zhang, C., Wu, J., Liu, Y., & Wang, T. (2024). Isolation, characterization and application of noble bacteriophages targeting potato common scab pathogen *Streptomyces stelliscabiei*. *Microbiological Research*, 283, 127699.
- 386) Zhang, F., Chen, H.-Z., Zheng, B., Huang, L., Xiang, Y., Zhang, J.-R., & Liu, J.-F. (2025). Heat stress induces phage tolerance in *Enterobacteriaceae*. *eLife*, 14, RP105703.
- 387) Zhao, J., Liu, Y., Xiao, C., He, S., Yao, H., & Bao, G. (2017). Efficacy of phage therapy in controlling rabbit colibacillosis and changes in cecal microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 8, 957.
- 388) Zheng, W., Pena, A., Ilangovan, A., Clark, J. N.-B., Frankel, G., Egelman, E. H., & Costa, T. R. (2021). Cryoelectron-microscopy structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system EspA filament. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(17), e2022826118.
- 389) Zhou, Y., Zhou, X., & Wang, Z. (2023). Persistence of F-specific coliphages in alkaline environments: Implications for environmental tracking and risk assessment. *Science of The Total Environment*, 858(Part 2), 159987
- 390) Zou, T., Chen, J., & You, J. (2024). Dietary bacteriophage administration alleviates enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal impairment through regulating intestinal inflammation and gut microbiota in a newly weaned mouse model. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(19), 10736.
- 391) Zulk, J.J.; Clark, J.R.; Ottinger, S.; Ballard, M.B.; Mejia, M.E.; Mercado-Evans, V.; Heckmann, E.R.; Sanchez, B.C.; Trautner, B.W.; Maresso,

A.W.(2022). Phage Resistance Accompanies Reduced Fitness of Uropathogenic Escherichia coli in the Urinary Environment. mSphere, 7, e00345-22.

Syrian Arab Republic
Hama University
Faculty of Vet. Med
Department of Public Health and Preventive Medicine



**Study of the Effect of Using Bacteriophages in *E.coli* that Cause
Diarrhea in Calves and in the Health of Experiment Animals**

**A Thesis is presented
by**

Dr. ASEEM KEDER ALBAKER

For

**The Degree of PHD in Veterinary Medical Science
(Public Health and Preventive Medicine)**

Supervised By

Assoc. Prof. MAHER SALEH

Dr. ASHRAF AL-SALEH

1447 H-2026AD