جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم

دراسة بكتريولوجية و جزيئية لبكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اصابات المجاري البولية لمخيمات النازحين والتحري عن عاثياتها البكتيرية

رسالة
مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة
زمن عطيه صباح
بكالوريوس علوم الحياة/جامعة ديالى (2015)

إشراف
أ.د. هادي رحمن رشيد الطائي

1439هـ 2018 م

المقدمة Introduction

تُعد اخماج المسالك البولية Urinary tract infection من أكثر الامراض انتشاراً لاسيما عند الاطفال ، فهي تُعد من المشاكل التي تأتي بالمرتبة الثانية بعد أمراض الجهاز التنفسي ضمن الامراض المكتسبة بالمجتمع (Community–acquired infections) في حين تحتل الاصابة بالتهاب المجاري البولية المرتبة الاولى ضمن الامراض المكتسبة من المستشفيات(Nosocomial infections) لذا فقد ازدادت الدراسات حول العوامل المسببة لهذه الالتهابات لاسيما البكتيرية منها (DeRee and Vanden, 1987 ; Todar , 2008). وأن مجمل ألامراض الناتجة من استيطان الاحياء المجهرية في الكلية والمثانة واختراق انسجة المسالك البولية تُعرف بأخماج المسالك البولية Urinary tract infections (Rachel *et al.*,2013). وتعد بكتريا اشيريكيا القولون *Escherichia coli* من الانواع البكتيرية المهمة والاكثر شيوعآ في أحداث الاصابة باخماج المسالك البولية، ونسبة تواجدها في هذه الاصابة تقدر بحوالي 60–90% مقارنةً بتواجد بقية المسببات المرضية ،تمتلك البكتريا المسببة لاصابات المسالك البولية العديد من عوامل الضراوة منها وجود الأخمال fimbria والتي تُمكنها من الألتصاق في البطانة الطلائية للقناة البولية، والغشاء الحيوي (Biofilm) والبكتريوسن (Bacteriocin) والمحفظة (Capsule) وخالبات الحديد (Siderophores) التي تمكنها من غزو السبيل البولي واحداث الخمج ، وفي معظم الحالات ترافق الخلايا القيحية (Pus cells) حالات الاصابة بالتهاب المجاري البولية(Cheesbrough, 2012).

تعرف الاخمال من النوع الاول Fimbriae type 1 بانها تراكيب خيطية تغطي سطح الخلايا البكتيرية ، وهذه الاخمال يشفر لها بوساطة جين يدعى gene (*fim* H) وان قمة الاهداب (*fim* H) تتواسط عملية الالتصاق بـ glycoprotein على سطوح خلايا المضيف ، ويوجد هذا العامل بنسبة (80 – 90 %) من الخلايا البكتيرية الممرضة وغير الممرضة (احمد،2016) .

يشفر لعامل الضراوة الكوليسين Colicin جين يدعى *col* E1 هي مواد ذات طبيعة بروتينية تمتلك فعالية ميكروبية قاتلة او مثبطة لنمو الانواع البكتيرية المختلفة القريبة من الكائن المنتج (AL–Charrakh *et al.*,2011). وينتج من معظم الخلايا البكتيرية ، ويمكن ان يسبب مشاكل طبية كالتحسس لدى الافراد وهو ذو طيف واسع الفعالية ضد البكتريا السالبة و الموجبة لملون غرام (Sarika *et al.*,2010) .

تشتق الاخمال P من أخمال النوع الاول بواسطة غرس بروتين جديد لاستبدال نطاق ارتباط المانوز mannose-binding domain لاخمال النوع الاول والذي يمكن ان يزود ميكانيكية تكميلية للالتصاق، أو يلعب دوراً في تجميع البكتريا (Todar, 2008). تشفر هذه الاخمال بواسطة جينات (*pap*) pyelonephritis-associated pili وهي سائدة بشكل كبير بين عزلات بكتريا اشيريكيا القولون الممّرضة خارج الامعاء وخاصةً *Uropathogenic E.coli* المسببة لخمج حوض الكلية (Mulvey, 2002) .

كان لأكتشاف المضادات الحيوية أثر كبير في انخفاض متوسط الاصابة بالتهابات المجاري البولية ، ولكن نتيجة للاستعمال المفرط للمضادات الحيوية وبشكل عشوائي وقطع العلاج بعد ملاحظة علامات التحسن على المريض ظهرت ولا تزال تظهر سلالات بكتيرية مقاومة للمضادات ، وتنتشر صفات المقاومة البكتيرية بشكل طردي مع زيادة استعمال المضادات ، مما جعل علاج الامراض يواجه صعوبة كبيرة ، لذا وجب اختبار المضاد الحيوي الملائم للعلاج وإلا يتم العلاج عشوائياً وانما يعتمد على اجراء اختبارات الحساسية الدوائية على الجرثومة المعزولة لمعرفة المضاد الحيوي الملائم للقضاء عليها (Hamedi *et al.*, 2009) . نتيجة لزياده مقاومة سلالات *E.coli* للمضادات الحيوية تم استخدام بدائل حيوية تتضمن العاثيات ، ببتيدات وبروتينات مضاده للبكتريا ، البكتريا النافعة probiotic (Lu and Koeris, 2011).

تعرف العاثيات (bacteriophages) بانها فيروسات تغزو البكتيريا وتُعد من اكثر الكائنات الحية شيوعآ على سطح الارض توجد منها المليارات في امعاء الانسان وتساعده في مكافحة البكتريا الضاره فيه(Mathur *et al.,* 2003) . لقد تم اعتماد عاثيات الكولي فاج كدليل لتلوث المياه بالفيروسات المعوية وذلك للتشابه الكبير بين هذه العاثيات والفيروسات المعوية من حيث الحجم، الشكل، التركيب الجيني ومقاومتها للظروف البيئية والمعقمات المستخدمة في تعقيم المياه، وان عملية التحري عن عاثيات الكولي فاج غير مكلفة وتمتاز بسهولتها ودقتها وتستغرق الفترة الزمنية لعزلها بين 4-12 ساعة (Grabow,2001).

نظراً لانتشار اخماج المسالك البولية في المجتمع العراقي، وكما اشارت الى ذلك الدراسات المحلية، ولأهميتها كونها مرضاً منتشراً بين جميع الاعمار والافراد، ولكون التشخيص السريع والصحيح، يُعد خطوة مهمة في طريق العلاج والشفاء، تم استخدام التقنيات الجزيئية الحديثة وان كانت ماتزال

محدودة الاستخدام في دول العالم الثالث، إلا أنها وفرت أفضل الوسائل التشخيصية ومنها إستعمال الجين 16S rRNA الذي يعطي تشخيصاً على مستوى النوع بأستحدام تقنية تفاعل سلسلة انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR) لما تمتاز به هذه التقنية من الخصوصية والسرعة العالية للتحري عن سلالات *E.coli* في العينات السريرية، ولغرض زيادة أمكانية التشخيص المتكامل والدقيق وبكلفة ووقت اقل، والتي تُعد من التقنيات الأكثر رواجاً في جميع إنحاء العالم (Nazemi *et al.*, 2012).

وبناءاً على ذلك فقد أُجريت الدراسة الحالية بحسب الاهداف الآتية:

أ- عزل وتشخيص بكتريا اشيريكيا القولون من عينات الادرار وتوصيف العزلات باستخدام طرائق التشخيص التقليدية و التشخيص باستخدام VITEK 2 Compact وAPI20E وطرائق الجزيئية المعتمدة على PCR باستحدام جين 16S rRNAالتشخيصي.

ب- التحري عن جينات *fim* H و *col* E1 و*pap* المشفرة لعوامل الضراوة لبكتريا اشيريكيا القولون .

ت- معرفة تسلسل القواعد النيتروجينية في ناتج تفاعل PCR العائدة للجين 16S rRNA ومقارنتها مع تسلسل القواعد النيتروجينية العائدة للعزلات العالمية الموجودة في قاعدة البيانات NCBI .

ث- عزل العاثي البكتيري Coliphage ودراسة تأثيره على العزلات البكتيرية .

الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع 250 عينة ادرار للأطفال المقيمين في مخيم معسكر سعد للنازحين المشكوك باصابتهم بالتهاب المسالك البولية الذين اعمارهم دون (12) سنة ومن كلا الجنسين وللمدة من 5/9/2016 لغاية 15/11/2016 . تم اجراء الاختبارات الكيميائية والفيزيائية على عينات الادرار فأظهرت النتائج ان نسبة الحامضية والقاعدية للعينات كانت 94.8% و5.2% على التوالي ،ونسبة وجود الزلال 12.8% والعكورة 26.8% والكثافة النوعية الاعلى من 1025 كانت بنسبة 20%، كذلك تم اجراء فحص مجهري للعينات حيث اظهرت النتائج وجود خلايا قيحية، خلايا دم حمراء،كالسيوم،حامض اليوريك والبكتريا بنسبة 28%،40% ،16% ،21.6% ،16% على التوالي.

وقد تم الحصول على 15(37.5%) من بكتريا *E. coli* من اصل 40 عزلة اعطت نتيجة ايجابية عند زرعها على الاوساط الزرعية ، توزعت العينات بنسبة 60% للاناث و40% للذكور بعد اجراء التشخيص البكتيري المعتمد على المواصفات المجهرية و الزرعية والفحوصات الكيموحيوية ،وتمَّ تأكيد التشخيص بإستخدام نظام API 20 E وجهاز VITEK 2 compact، إضافة الى إجراء التشخيص الجزيئي بالكشف عن وجود الجين 16S rRNA في العزلات بإستخدام سلسلة تفاعل انزيم البلمرة PCR . وقد كشف التشخيص الجزيئي للعزلات وجود الجين 16S rRNA بنسبة 100% .

تم اجراء اختبار حساسية عزلات بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية بأستخدام جهاز VITEK 2 Compact اتجاه 18 مضاد حيوي مختلف و بلغت نسبة المقاومة للمضادات Ampicillin 93.3%، Augmentin 40%، Pipracillin/Tazobactam 20%, Cefuroxime 80% Cefoxitin, Cefuroxime Axetil 93.3%، Cefixime 80%,Ceftazidime 80% Impenem 0% Ertapenem 0% Meropenem, 0%Amikacin, Ceftriaxone100% Nitrofourantoin, 6.7% Fosfomycin20%, gentamycin,46.7% Ciprofloxacin,20% Trimethoprim/Sulfamethoxazole 73.3% .

تراوحت قيم المتوسط الحسابي للتركيز المثبط الأدنى MIC للمضادات المذكورة اعلاه 34.13 و14.80 و25.87 و44.00 و4.00 و56.00 و13.33 و 33.87 و0.25 و0.19 و 0.40 و6.13 و52.28 و6.13 و0.77 و38.40 و38.40 و180 مايكروغرام/مل على التوالي.

أُجري الكشف عن إنتاج العزلات البكتيرية لعوامل الضراوة حيث أظهرت جميع العزلات قدرتها على الالتصاق بالخلايا الطلائية للقناة البولية بنسبة 100% ، وقدرتها على انتاج Colicin بنسبة 60% ،كما أظهرت جميع العزلات قدرتها على انتاج الغشاء الحياتيBiofilm وبنسبة 100% .