دراسة جزيئية للتحري عن جين عامل الالتصاق *Fim (H)* في بكتريا *Escherichia coli* الممرضة للمسالك البولية في الاطفال دون عمر 5 سنوات

د. ألهام سعيد عبد الكريم علي فاضل أحمد

جامعة بغداد / كلية التربية للعلوم الصرفة والتطبيقية / قسم علوم الحياة

الملخص

تضمنت الدراسة عزل بكتريا *Escherichia coli* من عينات سريرية لاطفال مصابين بالتهاب المجاري البولية ، وقد تم الحصول على (72) عزلة من بكتريا *E. coli* من اطفال مصابين بالتهاب المجاري البولية الذين تتراوح اعمارهم دون عمر (5) سنوات ومن كلا الجنسين من مستشفى (ابن البلدي للاطفال، والامامين الكاظمين عليهما السلام التعليمي ومستشفى العلوية للاطفال) وللمدة من 2014/11/1 لغاية 2015 /2/28 .

اعتمد التشخيص البكتيري على المواصفات المجهرية والزراعية والفحوصات الكيمو–حيوية والتشخيص النهائي والدقيق للعزلات بوساطة استعمال الفحص بنظام (API 20 E).

بينت نتائج الدراسة ان نسبة اخماج المسالك البولية في الاناث هي (54.2 %) 39 عزلة ، وفي الذكور (45.8%) 33 عزلة.

واختبرت حساسية جميع العزلات للمضادات الحيوية وفق طريقة (Kerby Bauer) اذ اظهرت جميع العزلات مقاومة 100% لمضادي Ampicillin و Ceftazidime في حين، كانت نسب المقاومة للمضاد Trimethoprim، Amikacin، Aztreoname، Tobramycin، gentamycin ، Pipracillin83.3% ،81.9% ، 72.22% ، 70.8%، 68.5%، 65.5 على التوالي، وكانت نسبة مقاومة 0% لمضادي، Impenem، Meropenem .

تم التشخيص الجزيئي لجينات عوامل الالتصاق *Fim* من خلالاستخلاص الـ DNA البكتيري بوساطة(Geneaid Kit) ومن ثم اخضاع الـ DNA لاختبار البلمرة التضاعفي التسلسلي (PCR) .

الكلمات المفتاحية :بكتيريا القولون – عوامل الضراوة – مقاومة المضادات الحيوية

المقدمة

تشكل اخماج المجاري البولية واحدة من أكثر الأمراض شيوعاً حيث يصلب بها الملايين من البشر كل عام وتكون الإصابة شائعة لدى الاطفال تؤدي غالباً الى مضاعفات غير محمودة نتيجة التجاهل او سوء التشخيص المختبري [1] وتعد الأحياء المجهرية وخاصة بكتريا *Escherichia coli* المسؤولة عن حوالي 85- 90 % من مجموع الإصابات [2] .تزداد فرصة الإصابة لدى الاطفال نتيجة كون الجهاز المناعي غير مكتمل التكوين لذلك يكون اكثر عرضة للإصابة خاصة حديثي الولادة يتعرض للإصابة أما من البيئة الخارجية او من خلال المراحل الجنينية عن طريق المشيمة [3] .

تمتلك بكتريا *E.coli* العديد من عوامل الضراوة التي تساهم في عملية غزو الأنسجة واستعمار الخلايا الطلائية للجهاز البولي وأهم هذه العوامل هي اللواصق (adhesion) حيث تشكل اللواصق الخطوة الأولى للإصابة والمساهمة في تمركز البكتريا وتكاثرها [4] .بعض انواع البكتريا تمتلك لاصق واحد والبعض الآخر تعبر عن العديد من اللواصق وتنتجها في مراحل مختلفة من عملية الإصابة وتزيد كل هذه اللواصق من ضراوة البكتريا ويعد اللاصق *(Fim H)* الذي تمتلكه بكتريا *E.coli*العامل الأول للإصابة حيث يمتلك مستقبلات على سطوح خلايا المضيف تسهل الغزو والاستعمار [5] .تتألف *(Fim H)* من تراكيب شعرية بطول (1) مايكروليتر وقطرها حوالي (7) مايكروليتر ، تبرز من السطح الخارجي للبكتريا [6] ويوجد هذا النمط من العضيات اللاصقة في العديد من انواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام .

الهدف من الدراسة :

الهدف من هذه الدراسة هو لتحديد الجين *(Fim H)* في بكتريا *E.coli*المعزولة من أطفال دون (5) سنوات مصابين بالتهاب المجاري البولية ، وتم استخدام طريقة (PCR) لهذا الغرض .

المواد وطرائق العمل :

1- عزل وتشخيص البكتريا : تم جمع (110) عزلة بكتيرية من حالات مرضية لاصابة اطفال بالتهاب المجاري البولية دون عمر (5) سنوات للفترة من 2014/11/1 الى

2015/2/28 ، وتم جمع العزلات من (مستشفى م. الامامين الكاظمين (ع) ، العلوية للاطفال وابن البلدي) .

2- تشخيص العزلات : تم تشخيص العزلات البكتيرية باستخدام الاوساط الزرعية التقليدية منها Macconkey agar و Blood agar ، وتم اجراء الفحوصات الكيمو-حيوية ومن ثم اجري التشخيص النهائي للعزلات باستعمال عدة التشخيص (ApI 20 E) [7] .

3- اختبار الحساسية للمضادات الحيوية : تم اجراء اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية وذلك وفق طريقة (Kerby Bauer) وذلك باستخدام اقراص المضادات الحيوية وتم قراءة النتائج اعتماداً على مناطق التثبيط حول اقراص المضادات الحيوية وتم تفسير النتائج بناءاً على ما جاء في [8]، علماً ان الاقراص هي Ceftazidime , gentamycin , Tobramycin , Meropenem , Impenem , Amikacin , Ampicillin , Trimethoprim , Aztreoname , Pipracillin .

4- عزل DNA البكتيري : تم استعمال عدة استخلاص خاصة لاستخلاص DNA البكتيري (Geneaid Biotech kit system, UK) وحسب تعليمات الشركة المصنعة .

5- تم استخدام البوادئ المذكورة في جدول (1) اعتماداً على [9] .

6- تم اجراء عملية الـ PCR للـ DNA البكتيري المستخلص باستخدام البرنامج المذكور في جدول(2) [10] .

جدول (1)

البوادئ المستخدمة لتحديد جين Fim (H)

Fim (H)	(5 ' – 3 ') F:	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG	508 bp
	R:	GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	

جدول (2)

يبين البرنامج المستخدم في عملية PCR

المرحلة	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
1. مرحلة المسخ الاولي للـــDNA	94	5 دقائق	دورة واحدة
2. مسخ الـــــ DNA	94	1 دقيقة	30 مرة
3. الالتحام	60	1 دقيقة	
4. الاستطالة	72	1 دقيقة	
5. مرحلة الاستطالة النهائية	72	7 دقائق	دورة واحدة

النتائج والمناقشة :

تم الحصول على (72) عزلة لبكتريا *E.coli*واظهرت نتائج الاختبارات المجهرية والكيمو – حيوية بان البكتريا عبارة عن عصيات سالبة لصبغة غرام ، موجبة لاختبار الاندول ، موجبة لاختبار احمر المثيل ، سالبة لاختبار الفوكس بروسكاور ، سالبة لاختبار السترات ، سالبة لاختبار اليوريز ، موجبة لاختبار الاندول وكذلك لانتاج احمر المثيل . وتم تأكيد التشخيص باستخدام نظامApI 20 E .

نتائج فحص حساسية العزلات للمضادات الحيوية :

اظهرت جميع العزلات مقاومة 100% لمضادي Ampicillin وCeftazidime في حين، كانت نسب المقاومة للمضاد Trimethoprim، Amikacin، Aztreoname، Tobramycin، gentamycin ، Pipracillin83.3% ،81.9% ، 72.22% ، 70.8% ، 68.5% ، 65.5 على التوالي ، وكانت نسبة المقاومة 0% لمضادي ، Impenem ، Meropenem،جدول (3) يبين نسب مقامة البكتريا للمضادات الحيوية .

وتتفق نتائجنا مع نتائج الباحث [11]اذ وجد ان مقاومة البكتريا لمضاد CAZ كانت 100% ، وتتفق مع نتائج نفس الباحث اذ وجد ان مقاومة البكتريا لمضاد TOBكانت 64.3% واتفقت نتائج الباحث [11] مع نتائج دراستنا اذ وجد ان مقاومة البكتريا لمضاد MEM كانت 3% الا انها لم تتفق مع نتائج نفس الباحث في مقاومة البكتريا لمضاد TMP اذ وجد كانت 29.6% واختلفت ايضاً مع نتائج دراستنا في مقاومة البكتريا

لمضادي ATM اذ كانت نتائج الباحث 14.3% ولم تتفق مع الباحث [11] في ان مقاومة البكتريا لمضاد PRL كانت 89.7% . واتفقت نتائج دراستنا مع نتائج الباحث [12] اذ وجد ان مقاومة البكتريا لمضاد IPM كانت 0% ولا تتفقمع نتائج نفس الباحث اذ وجد ان مقاومة البكتريا لمضاد AK كانت 33.4 في حين وجد الباحث [11] ان مقاومة البكتريا لمضاد AK كانت 94.3% . كانت نتائج دراستنا تتفق مع دراسة الباحث [13]اذ وجد ان المقاومة لمضاد AM كانت نسبة المقاومة له هي 93.2% وتتفق مع نتائج الباحث نفسه لمضاد CN اذ كانت نسبة المقاومة 61.4 .

ويعود ذلك التفاوت في النتائج لاختلاف الانظمة المتبعة في تناول واستعمال مضادات الحياة ، اذ ان الاساءة في استعمال المضادات وتناول كميات كبيرة من نفس المضاد ولفترة طويلة وبدون تغير حث البكتريا على مقاومتها[16]،و الاستخدام الواسع للمضادات في مجالات مختلفة لاسيما عند الاطفال مثل معالجة التهاب اللوزتين والتهاب الاذن الوسطى وبوجه عام التهابات الجهاز التنفسي و الاستخدام المفرط دون ارشادات الطبيب وعدم اكمال دورات العلاج اللازمة والتوقف عن تناول المضادات عند ظهور علامات التحسن على المريض كلها اسباب أدت الى ظهور مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية[14,15] .

الجدول (3)

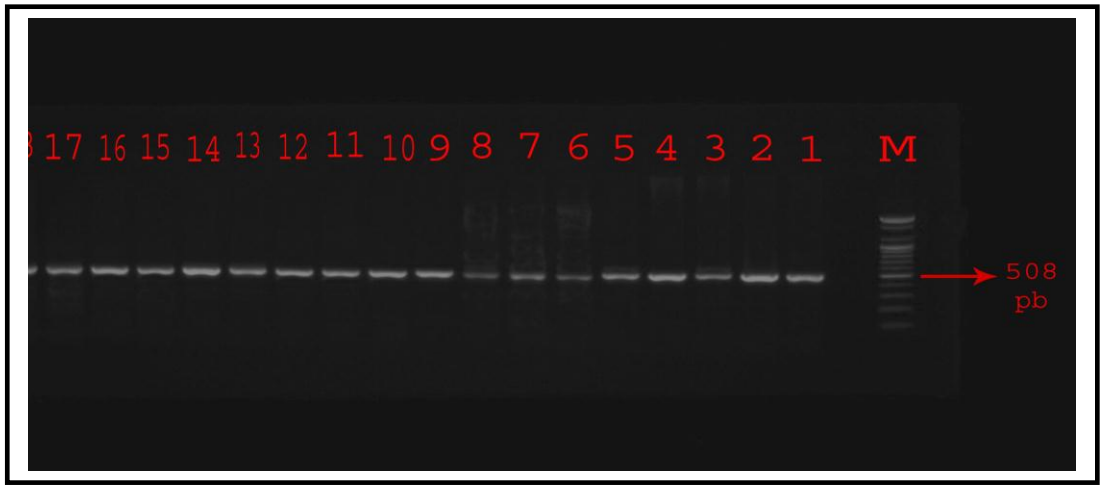
ت	اسم المضاد	رمزه	نسبة المقاومة
1	Ceftazidime	CAZ	%100
2	gentamycin	CN	%68.5
3	Tobramycin	TOB	%70.8
4	Meropenem	MEM	%0
5	Impenem	IPM	%0
6	Amikacin	Ak	%81.9
7	Ampicillin	AM	%100
8	Trimethoprim	TMP	% 83.3
9	Aztreoname	ATM	%72.22
10	Pipracillin	PRL	65.5

التحري عن جينات *Fim(H)*

اجريت تفاعلات الكوثرة لعزلات *E.coli* للكشف عن الجين المسؤول عن التعبير عن *Fim(H)* حسب ما جاء في [16] .

اظهرت النتائج ان جميع عزلات بكتريا *E.coli* قد اعطت نتيجة موجبة لجين Fim (H) وبنسبة 100% ، في حين وجد[9] في الدراسة التي اجريت على بكتريا الاشيريشيا القولون ان (71%) من العزلات فقط تمتلك الجين المشفر للـــ *Fim(H)* .

شكل (1)



الترحيل الكهربائي لناتج كوثرة جين *(Fim H)* على هلام الاكاروز بنسبة1% لمدة ساعة ونصف وبفرق جهد 70 فولت .

وكانت نتيجة هذه الدراسة متطابقة مع دراسة[10] التي وجد ان نسبة تواجد جين Fim (H) هو 90% من مجموع العينات المعزولة من الاطفال المصابين بالتهاب المجاري البولية كذلك تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده [19]من ان 100% من العزلات تحتوي على جين *Fim (H)*المستهدف .

حيث ان *(Fim H)* يعد احد العوامل المسؤولة عن قابلية البكتريا على الالتصاق بسطوح الخلايا الظهارية والاغشية المخاطية لخلايا المضيف من الخطوات الضرورية والاساس في الاستعمار البكتيري فيتم ارتباط الشعيرات بالمستقبلات الخاصة التي توجد على سطوح الخلايا الظهارية للمجاري البولية لانها عامل محدد وخطر للارتباط مع الخلايا الظهارية البولية مما يسهل تواجد بكتريا الـــــ *E.coli* في الانسجة غير المعوية .

المصادر

1- Larcombe, J.(1999). Urinary tract infection in children. British. Med.J.,Vol.31(9), p:1173-1181 .
2- Hughes, G.R.(1983). Thrombosis ,abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant . BMJ, 287:1088-1089 .
3- Chang. S.L. , Shortliffe L.D. 2006 Pediatric urinary tract infection . Pediatr. Clin. N. Am ., 53(3) : 379- 400 .
4- Marild, S. Jodal U. 1998. Incidence rate of first-time symptomatic urinary tract infection in children under 6 years of age . Actapeadiatr; 87(5) : 549-52 .
5- Kaper, J.b.J.P. Nataro, and H.L. Mobley. 2004 Pathogenic *Escherichia coli* . Nat. Rev. Microbiol., 2(2) : 123-40 .
6- Dobrindt U (2005) (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol 295 357–371.
7- Hagan EC, Mobley HL (2007) Uropathogenic*Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. Infect Immun 75: 3941–3949.
8- Khosrow, T. A., (2013). Detected genes ST.LT Toxin for *Escherichia coli* bacteria isolated from stool and urine sample by multiplex PCR technique .Msc., Thesis,Genetic and Engineering and biotechnology institute ,Baghdad University.
9- Abed., Z.A. ; Khalid, a. Habib ; Zaid N. Abbas.,(2014). Genotypic study of two virolence factors fim(H) and kpsMTII in uropathogenic*Escherichia coli* isolates from children patients with urinary tract infection. J. Baghdad foe sci. , p: 1475-1480
10- Abass. S. K.; Mun,im R. Ali .;SawsanH.Authman.(2014). Isolation of Multi Antibiotics Resistance *Escherichia coli* from urinary tract infection and the Detection of *PapC*and *fimH*virulence genes by Polymerase chain reaction Technique.Diyala jour. For pure science. Vol: 10 No:1, January .
11- Al-Attar. Zid I. (2014). The prevalence and antimicrobial sensitivity of *EsblEscherichia coli* . in clinical isolates .Al-kindy collage medical journal 2014: vol:10 no:2 .
12- Shrooqrayes, SuhadFaisulHatim, and Ishraq Hassan . *(2010).* Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Escherichia coli* and *Klebsiellapneumoniae*among urinary tract infections. Al- Mustansiriya J. Sci Vol. 22, No 1, p: 43 – 50 .
13- IOANA MOŞ*, OTILIA MICLE, MIHAELA ZDRÂNCĂ, MARIANA MUREŞAN, LAURA VICAŞ. (2010) . ANTIBIOTIC SENSITIVITY

OF THE *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM INFECTED SKIN WOUNDS . farmacia, 2010, Vol.58, 5 .

14- الجبوري ، خلود كريم حسن . 2001 . دراسة عن البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية . رسالة ماجستير .. كلية العلوم . جامعة بغداد .

15- Fiscbach, M.A. and Walsh. C.T.(2009) . Antibiotic for emerging pathogens. Science 325(5944) : 1089-93 .

16- Al-Mayahie. S. Maseer . (2010) . Detection of FimbrialAdhesins of *Escherichia coli* Isolated from Pregnant and Non-Pregnant Women with Symptomatic Genital Tract Infection as a Risk Factor for Urinary Tract, and Neonatal Infections: a Comparison Study. Journal of Kerbala University , Vol. 8 No.4 Scientific . p:429 – 438 .

Molecular study to investigate the adhesion *Fim (H)* in the bacterium Escherichia coli urinary tract pathogens in children under the age of 5 years

ALIFadhelAhmed , dr. IlhamSaidAbdul Karim

Abstract

bacterial isolates collected from children patients with urinary tract infections in the age of under 5 years. Was obtained on 72 isolation of the bacterium Escherichia coli and the number of males 49 isolated females and the number is 61 bacterial isolates were Altejes using microscopic tests and bio - chemical, and tested the sensitivity of isolates to antibiotics in accordance with the method (Kerby Bauer) where isolates showed a high degree of sensitivity to antibiotics, Impenem where The resistance ratio (0% (and anti Pipracillin the resistance ratio (100%) while the resistance of bacteria to anti Ceftazidime ratio of 100% and resistance to anti-gentamycin and by 68.5% and resistance to anti Meropenem increased by 98.6% and counter-counter-Amikacin the percentage of resistance 81.9% and anti Ampicillin was resistance 100% and anti Trimethoprim rate was the proportion of resistance 83.3% and anti Aztreoname the resistance ratio 72.22% Tobramycin the percentage of resistance is 70.8%, and used the 72 bacterial isolates to detect the gene for virulence factor Fim (H), and the expression of isolates for virulence Fim factor (H) 100% where the PCR method was used to detect the presence of the gene in isolates intended

Keywords:*Escherichia coli* - virulence factors - antibiotic resistance