التنميط المصلي والكشف الجزيئي لبعض جينات المقاومة لجرثومة الإشيريشيا القولونية المعزولة من الأطفال المصابين بأخماج المجاري البولية في مدينة الناصرية

وداد سمير جعاز*، سعد سلمان هميم**
*** قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ذي قار**
**** قسم التحليلات المرضية / كلية العلوم / جامعة ذي قار**

الخلاصة :

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص الجراثيم الهوائية المسببة لاخماج المجاري البولية حيث جمعت 500 عينة إدرار من أطفال مرضى يعانون من أخماج المجاري البولية من مستشفى محمد الموسوي ومستشفى بنت الهدى للولادة والأطفال في مدينة الناصرية وللفترة من شهر ايلول (2014) ولغاية شهر حزيران (2015). بلغ عدد العزلات الموجبة للزرع الجرثومي 306 (61.20%) عزلة توزعت إلى العزلات السالبة لملون جرام وبلغت 192عزلة (62.75%) أما الجراثيم الموجبة لملون جرام فقد بلغت 114عزلة (37.25%).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن المسببات الجرثومية الأكثر شيوعا في الاخماج البولية المعزولة من المرضى هي الاشريشيات القولونية *Escherichia coli* حيث كان عددها 75 عزلة وبنسبة مئوية بلغت (39.06%) من مجموع العزلات السالبة لملون جرام. أخضعت 50 عزلة من جراثيم *E.coli* لتفاعلاتإنزيم سلسلةالبلمرة (PCR) للدنا المعزول باستخدام البادئات النوعية للموروثات(O6وO15 وO16 و O25 و *16SrRNA*) أظهرت النتائج إن 36 عزلة (72 %) حاوية على 57 نمط مصلي و14(36%) لم تحتوي الأنماط المذكورة، وتوزعت الأنماط أعلاه 23 (40.35 %) و18 (31.57 %) و7(12.28%) و(15.78%) و(100%) على التوالي. تم الكشف عن البادئات النوعية للموروثات المقاومة لبعض من المضادات الحياتية للأنماط الجرثومية للاشيريشيا القولونية *CITM*(و*tet(A)* و*aac3-IV* و*Sul1* و*dfrA1*). أظهرت نتائج الدراسة الحالية أظهرت نتائج الدراسة الحالية نتائج موجبة لـ 25 عزلة (50.08%) و23 (46%) و19 (38%) و17 (34%) و5 (10%) على التوالي. أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود تفاوت في نسبة الجينات المقاومة لجراثيم *E.coli*للمضادات الحياتية.

الكلمات المفتاحية: ***Escherichia coli*, Urinary tract infections, Serogroups**

- البحث مستل من رسالة ماجستير

المقدمة

تعد أخماج المجاري البولية (Urinary tract infections) (UTIs) من المشاكل الصحية الهامة والشائعة في مجتمعات الدول النامية والمتقدمة وتشكل النسبة الكبرى منها المسببات المرضية الجرثومية وخصوصا عند الأطفال و الأشخاص المصابين بالعجز الكلوي. يقدر عدد المصابين باخماج المجاري البولية بـ 250 مليون مصاب كل سنة (Ahmad *et al.*, 2015). تعتبر (UTIs) من المشاكل الطبية التي تعاني منها معظم دول العالم (AL-karawyi *et al.*, 2013). وبصورة عامة يتعرض الأطفال الذكور للإصابة بـ UTIs بنسبة تقارب (20%) والإناث بنسبة (80%) Jonathan *et al.*, 2009).

إن المجاري البولية هو المكان الأكثر شيوعا لحصول العدوى عند الأطفال. وتعد أخماج المجرى البولي سبب للإصابة بالأمراض الحادة والحالات المرضية المزمنة، والقصور الكلوي في مرحلة البلوغ (Barakat, 2012). تحدث أخماج المجرى البولي نتيجة استيطان الأحياء المجهرية الخارجية (Exogenous microorganisms) لمنطقة حول الإحليل (Peri urethral area) حيث إن عملية الالتصاق هي الخطوة الأولى والمحفزة لإحداث الإصابة و تبدأ من خلالها الجراثيم بعد إن تلتصق بالتضاعف وصولا إلى تكوين مستعمرات دقيقة ومن ثم الاستيطان Colonization تعتمد قدرة العزلة الجرثومية في الالتصاق على مدى تشبع وتركيز المستقبلات ضمن أغشية الخلايا الطلائية (Epithelial cells) (Brook *et al.*, 2013).

تعتبر جراثيم الاشيريشيات القولونية المسبب الرئيسي لاخماج المجاري البولية Urinary tract infections (UTIs) تعد من أكثر الأنواع الجراثيم شيوعاً في أمراضية الإنسان على الرغم من كونها من النبيت الطبيعي لأمعاء الإنسان والحيوان (Ahmad, 2015).تعتمد أمراضية هذه الجراثيم كمسبب لاخماج المجرى البولي على عدد واسع من محددات الضراوة، إذ تعد أهم جرثومة مسؤولة عن أخماج المجرى البولي وهي عبارة عن نسيلة (Clone) لمستعمرات منتقاة من النبيت الطبيعي للأمعاء التي تمتلك عوامل الضراوةVirulence factors (VFs)المختلفة بما يمكنها من أستيطان وغزو القناة البولية وإحداث الاخماجتحتوي *E.coli* على ثلاثة أنواع من المستضدات السطحية الخاصة بتصنيف النوع(Amanda *et al.*, 2007).

هدف الدراسة Aim of the study

نظرا لأهمية تشخيص المسببات الجرثومية لاخماج المجاري البولية خاصة السلالات المرضية لجراثيم الاشيريشيات القولونية فقد اتبعت الدراسة الخطوات الاتية:

- عزل وتشخيص الأنواع الجرثومية الهوائية السالبة و الموجبة لملون جرام المسببة لاخماج المجاري البولية عند الأطفال .
- التشخيص الجزيئي لبعض الأنماط المصلية لجراثيم UPEC .
- الكشف الجزيئي لعدد من جينات المقاومة للمضادات الحياتية للجراثيم المعزولة.
- **طرائق العمل**

1- عزل وتشخيص المسببات الجرثومية لاخماج المجاري البولية

جمعت 500 عينة إدرار من أطفال تتراوح أعمارهم من شهرين حتى عمر 14سنة من كلا الجنسين من المصابين بخمج المجاري البولية في مستشفى محمد الموسوي ومستشفى بنت الهدى للولادة والأطفال في مدينة الناصرية للفترة من شهر أيلول 2014 إلى حزيران 2015. زرعت العينات بطريقة التخطيط على الوسط الاغنائي أكار الدم والوسط ا لتفريقي أكار الماكونكي،ثمخضعت العزلات للتشخيص بأتباع التشخيص المظهري والكيموحيوي ونظام API 20E Kit وAPi Staph Kit وحفظت العزلات باستخدام وسط الاكار المائل ووسط نقيع القلب والدماغ المضاف اليها لكليسرول بنسبة 15%.

2-البادئات المستخدمة في التشخيص الجزيئي للأنماط المصلية.

البادئات المستخدمة لتشخيص الأنواع المصلية لجراثيم (UPEC)مجهزة من شركة(Coralville, IDT.USA)(Momtaz) *et al*., 2013.كمافيجدولرقم (1).

جدول (1): تسلسل البادئات المستخدمة لتشخيص الانواع المصلية.

عدد الدورات	Denaturation Anneling Extension	حجم الناتج (pb)	تسلسل البادئ		اسم البادئ	النوع
30	95 °C / 5 min 95 °C / 30 s 55 °C / 1 min 72 °C / 1 min 72˚C/ 5 min	783	wl-14646 GATGACGATGTGATTTTGGCTAAC	F	*wzx*	O6
			wl-14647 TCTGGGTTTGCTGTGTATGAGGC	R		
30	94˚C/ 3 min 94˚C/ 30 sec 55˚C/ 30 sec 72˚C/ 1 min 72˚C/10 min	183	wl-14672 CTTGTTAGAGTCATTGGTGTATCG	F	*wzy*	O15
			wl-14673 ATAAAACGAGCAAGCACCACACC	R		
30	95 °C / 5 min 95 °C / 30 s 55 °C / 1 min 72 °C / 1 min 72˚C/ 5 min	302	wl-14654 GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG	F	*wzx*	O16
			wl-14655 TTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG	R		
30	94˚C/ 3 min 94˚C/ 30 sec 55˚C/ 30 sec 72˚C/ 1 min 72˚C/10 min	230	wl-14666 GAGATCCGTCTTTTATTTGTTCGC	F	*wzy*	O25
			wl-14667 TTCTGGATACCTAACGCAATACCC	R		
35	94˚C/ 3 min 94˚C/ 30 sec 55˚C/ 30 sec 72˚C/ 1 min 72˚C/10 min	919	wl-3110 AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	F		*16Sr RNA*
			wl-3111 CCGTCAATTCATTTGAGTTT	R		

2- البادئات المستخدمة في التشخيص الجزيئي لجينات المقاومة.

يوضح جدول (2) البادئات المستخدمة لتشخيص جينات المقاومة UPEC مجهزة من شركة(Van Momtaz *et al*., 2013 ; Momtaz*et al*., 2012*et al*., 2008 ;).

جدول (2): البادئات المستخدمة في تشخيص الجينات المقاومة.

اسم البادئ	تسلسل البادئ		حجم الناتج (pb)	Denaturation Anneling Extension	عدد الدورات
sul1	TTCGGCATTCTGAATCTCAC	F	822	95˚C/15 min 94˚C/ 30sec 58˚C/1 min 72˚C/10 min 72˚C/ 1 min	35
	ATGATCTAACCCTCGGTCTC	R			
aac(3)-IV	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT	F	286	95˚C/15 min 94˚C/ 30sec 58˚C/1 min 72˚C/10 min 72˚C/ 1 min	30
	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	R			
CITM	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	F	698	95˚C/15 min 94˚C/ 30sec 58˚C/1 min 72˚C/10 min 72˚C/ 1 min	30
	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	R			
tet(A)	GGTTCACTCGAACGACGTCA	F	577	95˚C/ 3 min 94˚C/ 30sec 57˚C/1 min 72˚C/1 min 72˚C/ 10 min	35
	CTGTCCGACAAGTTGCATGA	R			
dfrA1	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC	F	367	92˚C/1 min 50˚C/ 30sec 72˚C/1 min 72˚C/ 10 min	35
	GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	R			

- *sul1*:Sulfonamide, *aac(3)-IV*:Gentamicin,*CITM*:Beta-lactams,*tet(A)*:Tetracycline, *dfrA1*: Trimethoprim.

3- اختبار التفاعل السلسلي لانزيم بلمرة الدنا Polymerase Chain Reaction Assay

- **تحضير البادئات Primers Preparation**

حضرت البادئات اعتمادا على تعليمات الشركة المصنعة لها بإذابة المنتج المجفد بمحلول منظم TE1X بعد نبذ البادئ مركزيا بعناية. تم تخفيف البادئ بالـ TE للحصول على العدد النهائي المطلوب من البيكومولات اعتمادا على التعليمات الخاصة لكل من البادئ (primer) والـ Master mixSiraj*et al*., 2011)(Dormanesh *et al*., 2014;.

- **استخلاص الدنا الكلي Whole Genomic Extraction**

استخلص الدنا الكلي لجراثيم UPEC تبعا لعدة الاستخلاص المنتجة من الشركة المجهزة لاستخدامه في التشخيص الجزيئي للعزلات بوساطة التفاعل السلسلي لإنزيم بلمرة الدنا (PCR) (IDT.Coralville, USA).

- **التحليل الإحصائي**

تم تحليل نتائج الدراسة إحصائيا باستعمال البرنامج الإحصائي (SPSS) الإصدار 22. واستخدمت اختبارات التكرار واختبار مربع كاي عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$).

النتائج والمناقشة :

1- عزل وتشخيص المسببات الجرثومية لاخماج المجاري البولية

Isolation and diagnosis of bacterial UTIs

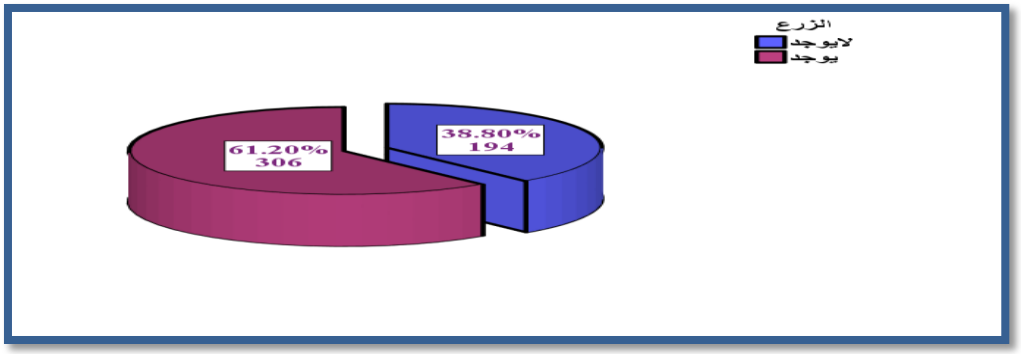
أظهرت نتائج الدراسة الحالية من مجموع (500) عينة إن 306 (61.20%) عزلة سجلت نموا موجبا للزرع الجرثومي بينما 194 عينة بنسبة (38.80%) لم تسجل إي نمو. أظهرت نتائج الاختبار الإحصائي لتحليل مربع كاي وجود فرق معنوي في ارتفاع نسبة الأطفال المصابين بالاخماج البولية الجرثومية شكل (1).

إن نتائج الدراسة الحالية كانت مقاربة لنتائج دراسات محلية مماثلة مثل دراسة كل من ياسين (2014) في كركوك و طعمة (2006) في كربلاء و الطائي (2010) في بغداد والـ AlKhateeb(2014) في اربيل حيث أظهرت الدراسات نموا موجبا للزرع الجرثومي و بنسب مئوية بلغت 65.8% و70% و72.4% و50% على التوالي. من جهة أخرى كانت نتائج دراسة محيميد (2011) في بابل أعلى نسبة من الدراسات أنفة الذكر حيث بلغت88.3%. وقد يفسر هذا الاختلاف في نسب توزيع الممرضات على أساس اختلاف مناطق الدراسة أو ربما يعود إلى العقاقير المستخدمة في العلاج والتي لها دور هام في توزيع وانتشار الجراثيم.

أظهرت نتائج الدراسة ارتفاع معدل الإصابة بالجراثيم السالبة لملون جرام لمرضى أخماج المجرى البولي من الأطفال مقارنة بالجراثيم الموجبة لملون جرام. فمن 306 عزلة كانت 192عزلة (61.20%) سالبة لملون جرام و114عزلة (38.80%) موجبة ويشير اختبار مربع كاي لوجود فروق ذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) كما في الشكل (2).

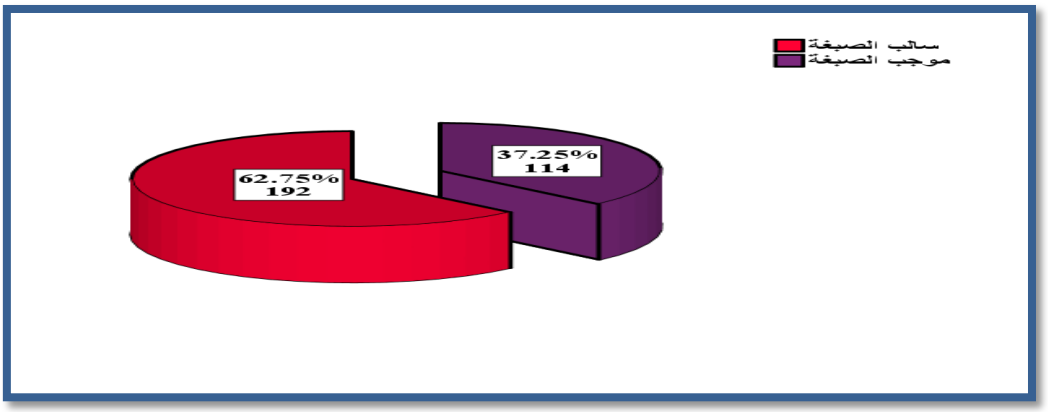
إن توزيع الجراثيم الذي سجلته الدراسة الحالية ينسجم مع ما توصلت له معظم الدراسات في تغلب الجراثيم السالبة في أخماج المجرى البولي المختلفة لاسيما أفراد العائلة المعوية، كما في نتائج الدراسة التي أجراها عبد الرحمن (2006)في مدينة بغداد حيث كانت نسبة عزلات الجراثيم السالبة (83.1 %).إن الفروق الأنفة الذكر في توزيع الممرضات البولية المعزولة من مرضى أخماج المجرى البولي كانت ذات دلالة معنوية حيث يعتقد إن القدرة التضادية في التغلب أو منع نمو أنواع

أخرى للجراثيم السالبة اكبر منه في الجراثيم الموجبة وخاصة جراثيم الإشيريشيا القولونية (آل سماعيل، 2008).



Test Statistics	
	العزلات
Chi-Square	25.088
Df	1
Asymp. Sig.	.000

شكل(1): نتائج الزرع الجرثومي ونسبها



Test Statistics	
	نوع العزلة حسب ملون جرام
Chi-Square	19.882
df	1
Asymp. Sig.	.000

شكل (2) : العزلات البكتيرية بحسب نسبها.

2- الممرضات البولية الجرثومية المعزولةIsolated bacterial Uropathogens

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن المسببات الجرثومية الأكثر شيوعا للاخماج البولية المعزولة من المرضى هي الاشريشيات القولونية *Escherichia coli* حيث بلغ عددها 75 عزلة وبنسبة مئوية بلغت (39.06%). تلتها عزلات المتقلبات *proteus mirabilis* و كلبسيلا الالتهاب الرئوي *Klebsiella pneumoniae* و*Serratia plymuthica* والتي بلغت إعدادها 32 (10.46%) و17(5.56%) و16(5.22%) على التوالي.

أما الجراثيم الموجبة لملون جرام فكانت المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المكورات العنقودية السالبة لإنزيم التخثر (CoNScoagulase-negative) staphylococciوبلغ عددها (19 عزلة (6.2%) و 18(5.88 %) على التوالي شكل (3).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية نسب عزل مقاربة للمسببات الجرثومية من مرضى أخماج المجاري البولية مقارنة مع نتائج دراسة طعمة (2006) في كربلاء للعزلات المسببة للاخماج مثل *E.coli* و*p.mirabilisK.pneumonia* حيث سجلت نسبة عزل بلغت 37 (66%) و 10(17.9%) و3 (5.4%) على التوالي. وسجلت دراسة مماثلة لـAbdulRazzaq (2013) في اربيل نسب عزل اعلى لجراثيم *E.coli* 54.55% على التوالي.

تظهر نتائج التحليل الإحصائي لاختبار التكرار ارتفاع نسبة وجود جراثيم الإشيريشيا القولونية قياسا بالجراثيم الأخرى وأظهرت نتائج اختبار مربع كاي وجود فروق معنوية في توزيع الممرضات الجرثومية بينما لم تظهر فروق معنوية بين الفئات العمرية للمصابين عند مستوى احتمالية (P≤0.05).

Test Statistics	
	التشخيص
Chi-Square	673.863
Df	32
Asymp. Sig.	.000

الشكل (3): أنواع العزلات المشخصة وإعدادها.

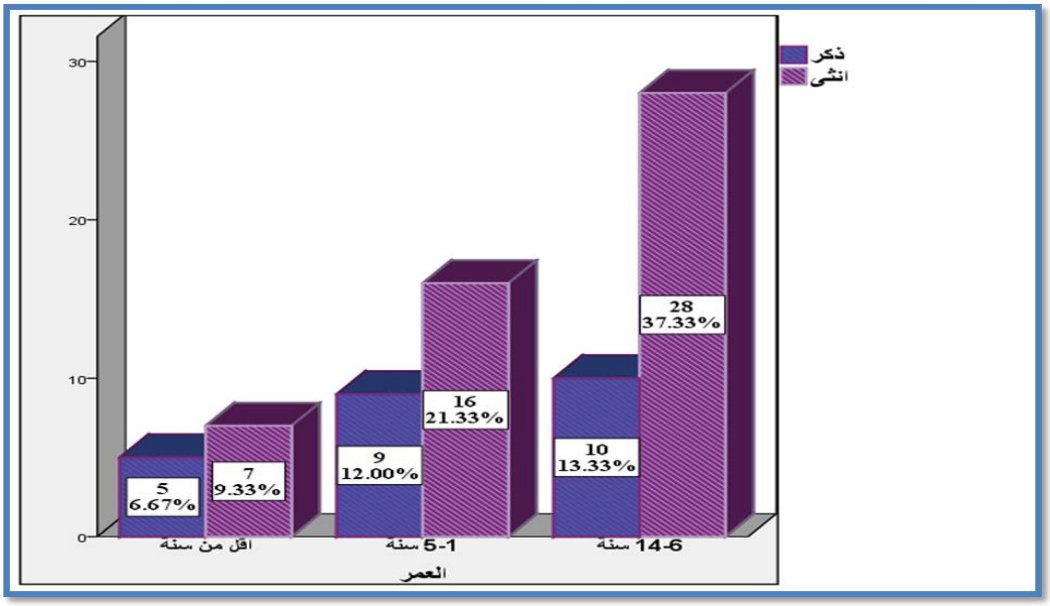
عند توزيع المرضى المصابين باخماج المجرى البولي بالنسبة لعزلات الاشيريشيا القولونية حسب الجنس , أظهرت نتائج الدراسة الحالية زيادة في عدد الإناث المصابات وبـ 51 مصابة (68.0%) مقارنة مع عدد الذكور المصابين والذين بلغوا 24 مصابا (32.0%).

يوضح الشكل (4) توزيع الأطفال المصابين بحسب الفئات العمرية إذ أظهرت النتائج إن الفئة العمرية (6-14) سنة قد سجلت اعلى نسبة من الإصابات وبـ 38 طفل (50.67%).وعند مقارنة النتائج الحالية نجد إن دراسة Saeed وجماعتها (2014) في مدينة اربيل سجلت نسبة إصابة اقل بلغت (40.0%).

من جهة أخرى سجل اقل عدد للاخماج في الفئة العمرية الأقل من سنة وبعدد إصابات بلغ 12 (16.0%). هذه النتائج تتفق مع دراسة Saeed وجماعتها (2014) إذ بلغت نسبة المصابين من الفئة العمرية سنة واقل (17.7%). سجلت الإناث النسبة الأعلى في الظهور من الاخماج لجميع الفئات العمرية نتائج الدراسة الحالية اعتمادا على توزيع الاخماج نسبة لأعمار وأجناس المصابين توافقت مع نتائج دراسة مشابهة في إيران إذ توزعت فيها نسب الإصابة بين الذكور والإناث إلى 36(37.5%) و60 (62.5%) على التوالي (Farshad *at el.*, 2012).

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لاختبار التكرار ارتفاعا معنويا في نسبة وجود جراثيم الإشيريشيات القولونية مقارنة بالجراثيم الأخرى، وأظهرت نتائج اختبار مربع كاي وجود فروق معنوية عند

مستوى احتمالية (P≤0.05) في توزيع الممرضات الجرثومية بينما لم تظهر فروق معنوية بين الفئات العمرية للمصابين.



Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.263	2	.532
N of Valid Cases	75		

شكل (4-6): توزيع عزلات *E.coli* بحسب الجنس والفئات العمرية للمضيف.

3- التشخيص الجزيئي باستخدام التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا

Molecular Identification using PCR

تم تشخيص جراثيم UPEC بالكشف عن وجود الجين التشخيصي 16sRNA و دراسة أربعة من الجينات التي تحدد الأنماط المصلية للمستضد O الموجودة على سطح الخلية الجرثومية UPEC هي عبارة عن سكريات دهنية متعددة (lipopolysaccharides) لها القابلية الكبيرة على التغير وهي من أكثر الهياكل المتغيرة على سطح الخلية التي توفر تنوع يعتمد عليه التصنيف المصلي للجراثيم الممرضة والذي تم الاعتماد عليه في تحديد أكثر من 180نمط من هذه الأنماط المصلية إن التشخيص والعلاج المبكرين يجنبنا حدوث مضاعفات عديدة منها ارتفاع ضغط الدموارتفاع بروتين البول الذي يؤدي بالتالي للإصابة بأمراض الكلى (renal disease) .(Rashki, 2014 ; Wang, 2012)

أ- تحديد الأنماط المصلية O بواسطة التفاعل السلسلي- المتعدد

O-Serotyping by Multiplex Polymerase Chain Reaction

إن عملية تحديد جينات الأنماط المصلية باستخدام تقنية التفاعل السلسلي لإنزيم بلمرة الدنا تعد من أفضل الطرق لتحديد UPEC المسببة لاخماج المجاري البولية لما تمتاز به هذه التقنية من حساسية ودقة عاليتين، حيث استخدمت الدراسة الحالية بادئات ذات تسلسلات خاصة بمجموعة من الأنماط المصلية O6 وO15 وO16 وO25 تبعا لأكثر التسلسلات الواردة في الدراسات والبحوث السابقة فيما يخص الأنماط المسببة للخمج البولي لغرض التحري وتفريق عزلات (UPEC) عن عزلات *E.coli* الأخرى .ترتبط بعض عوامل الضراوة بالأنماط المصلية لسلالاتها (Yamamoto 2007 ,).

شخصت العزلات بتقنية التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا اعتمادا على وجود أو غياب تلك الجينات. من مجموع 75 عزلة تم تشخيص 50 عزلة جينيا كان 36 عزلة بنسبة (72.0%) حاوية على 57 نمط مصلي واحد أو أكثر و14(28.0%) عزلة لم تحتوي أي من هذه الأنماط المذكورة وتوزعت الأنماط (O6 وO15وO16 وO25) حيث بلغت أعدادها ونسبها منفردة 23(40.4%) و18(31.5%) و 7 (12.3%) و9 (15.8%) على التوالي.

إن UTIs تسببها في الغالب سلالات من جراثيم UPEC التي تنتمي إلى 14نوع من السلالات هي O1 وO2 و O4 و O6 وO7 و O8 و O15 و O16 و O18 و O21 و O22 و O25 وO75 وO83. ويتم الكشف عن سلالاتها في معظم الأحيان من عينات البول السريرية (Li *et al*., 2010*et al*., 2011;Emamghorashi). أظهرت نتائج الدراسة الحالية نسب انتشار للأنواع المصلية الأربعة (O6 وO15 و O16 وO25) كانت أعلى من نتائج Momtaz وجماعته (2013) حيث بلغت نسبها (10.56% و21.13% و 2.43% و26.01%) على التوالي. وفي دراسة مشابهة أخرى كما في دراسة Dormanesh وجماعته (2014) كانت الأعداد والنسب للأنماط المصلية (O6 وO15 وO25) هي 6(13.33%) و2(4.44%) و4 (17.77 %) على التوالي. ولم يشخص وجود النمط O16 من بين العزلات المدروسة.

أظهرت الدراسة الحالية نتائج التضخيم التي تم فحصها باستخدام تقنية PCR كمزيج ثلاثي متعدد (combination multiplex) للجينات O15 وO25 و16sRNA و نتائج تضخيم جينO6 وO16 تم فحصها كمزيج ثنائي. تشير الأبحاث إلى وجود السلالات الجرثومية UPEC غير عن السلالات التعايشية لموجودة في الأمعاء أو الجراثيم EPEC الموجودة في البراز (Lloyd, 2007). أظهرت نتائج اختبار مربع كاي وجود فروق إحصائية ذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) في تفاوت نسب ظهور الأنماط المصلية (شكل رقم 4 ورقم 5 وجدول رقم 3).

ب- الكشف عن بعض جينات المقاومة للمضادات الحياتية لعزلات UPEC

Detection of some antibiotic resistance genes in UPEC isolates

تم تشخيص بعض الجينات الجرثومية المسئولة عن المقاومة للمضادات الحياتية حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن عدد العزلات للجينات المقاومة (*sull* و *CITM* و *tet(A)* و *aac3-IV* و *dfrA1*) بلغ أعدادها ونسبها 17 (34.0%) و25 (50.0%) 19 (38.0%) و 23 (46.0%) و5 (10.0%) على التوالي (جدول4).

إن عدد العزلات التي تحوي جينات المقاومة للمضادات الحياتية (*sull* و *CITM* و *tet(A)* و *aac3-IV* و *dfrA1*) التي سجلتها الدراسة الحالية كانت اقل مما سجلتها نتائج Momtaz وجماعته (2013) حيث بلغت أعدادها ونسبها 45 (36.58%) و49 (39.83%) و53 (43.8%) و28 (22.76%) و27 (21.95%) على التوالي.

إن الاختلاف في نسب انتشار الجينات قد يعود لطبيعة المنطقة واختلاف طريقة التشخيص وتحديد المضاد الحياتي المناسب. فحصت العزلات موضوع الدراسة باستخدام تقنية PCR وسجلت نتائج تضخيم الجينات المقاومة التي تم فحصها كمزيج متعدد (combination multiplex) للـ *sull* و *aac3-IV* كما في (شكل رقم 5 وجدول رقم4). تظهر نتائج تضخيم الجينات المرحلة كهربائيا في هلام الاكاروز *CITM* و *dfrA1* و *tet(A)* و *sull* في (شكل رقم 6 ورقم 7).

جدول (3): أعداد ونسب الأنماط المصلية من عزلات UPEC.

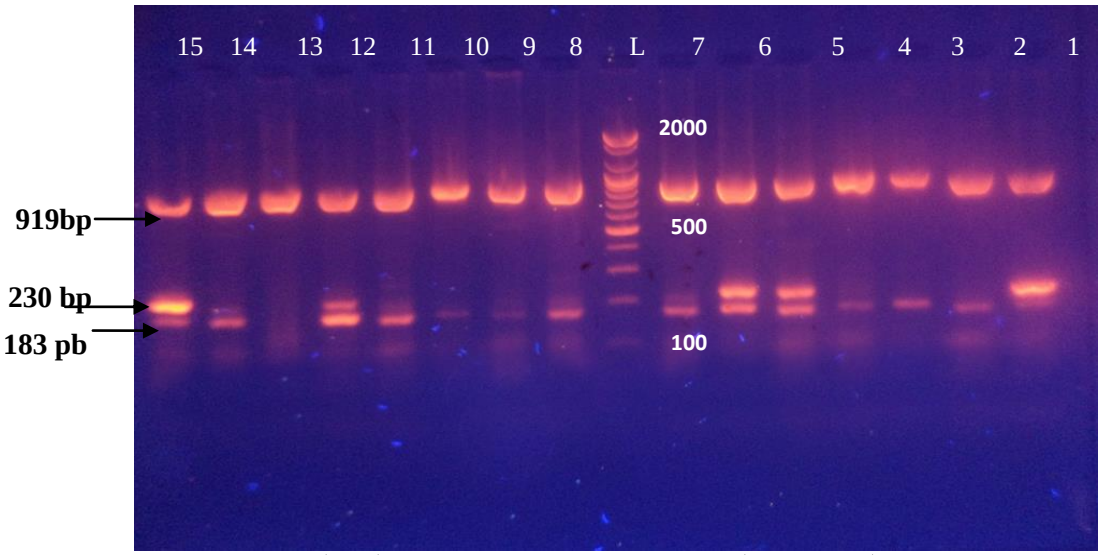
نوع النمط المصلي	التكرار	النسبة المئوية
O6	23	40.4
O15	18	31.6
O16	7	12.3
O25	9	15.8
Total	57	100.0

Test Statistics	
	الأنماط
Chi-Square	11.982
Df	3
Asymp. Sig.	.007

جدول (4): أعداد ونسب الجينات المقاومة للمضادات الحياتية.

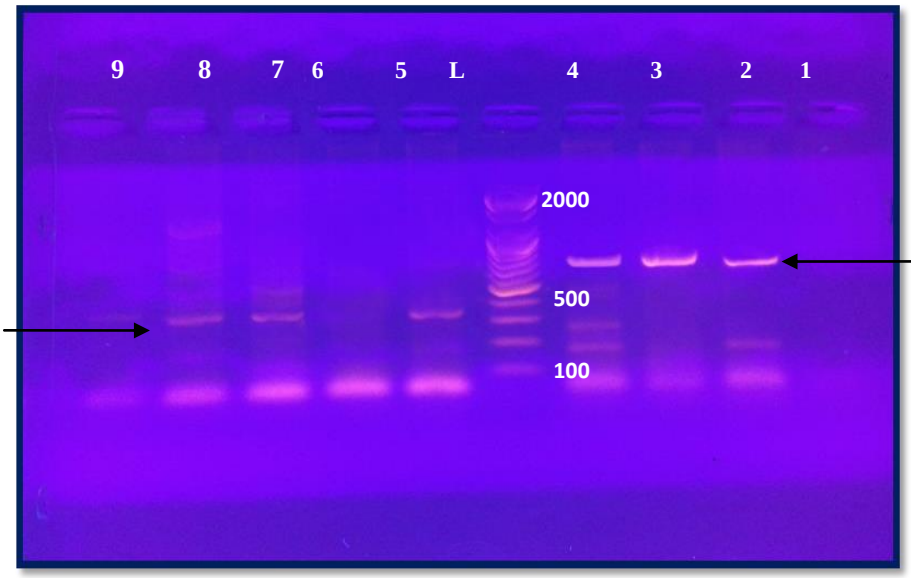
الجين المقاوم		
الجين المقاوم	التكرار	النسبة المئوية%
CITM	25	50.0
aac3-IV	19	38.0
tet(A)	23	46.0
dfrA1	5	10.0
Sul1	71	34.0

Test Statistics	
	الجين المقاوم
Chi-Square	13.753[a]
Df	4
Asymp. Sig.	.008



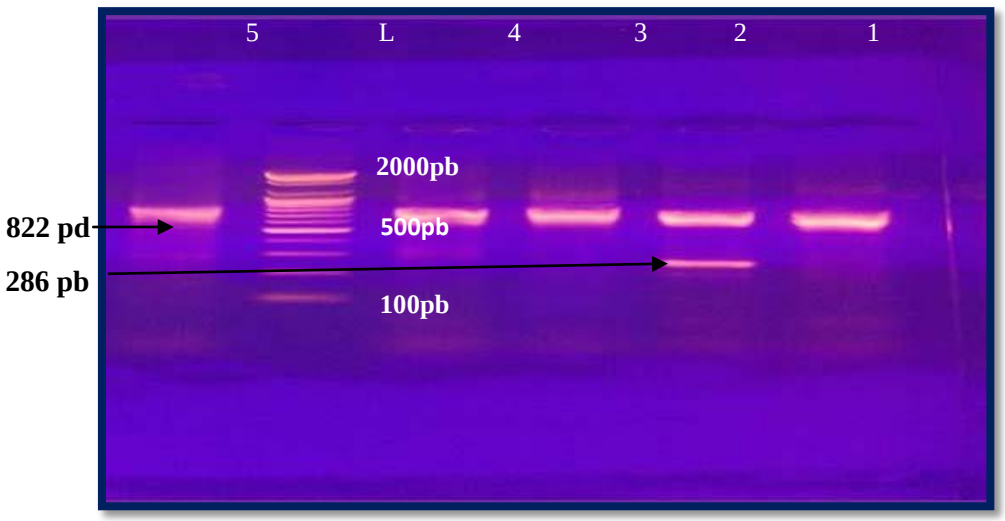
شكل (4-7): محتوى العزلات من الجينات O15 و O25 و *16SrRNA* المرحلة كهربائيا في هلام الاكاروز(1%) بفرق جهد 80 فولت لمدة ساعة ونصف بعد صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم وتعريضه للأشعة فوق البنفسجية .ظهرت حزم الجينات كالأتي:

- حزم الجين *16SrRNA* في جميع العزلات المؤشر وزنها919pb.
- النمط O15في العزلات المؤشر وزنهpb 183.
- النمط O25في العزلات المؤشر وزنه 230pb.
- المقياس (L) مثل المسار المؤشر وزنه (2000-100pb).



شكل (4-8): حزمتا الجينين O16, O6والمرحلة كهربائيا في هلام الاكاروز (1%) بفرق جهد80 فولت لمدة ساعة ونصف بعد صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم وتعريضه للأشعة فوق البنفسجية ظهرت الحزم الجينية

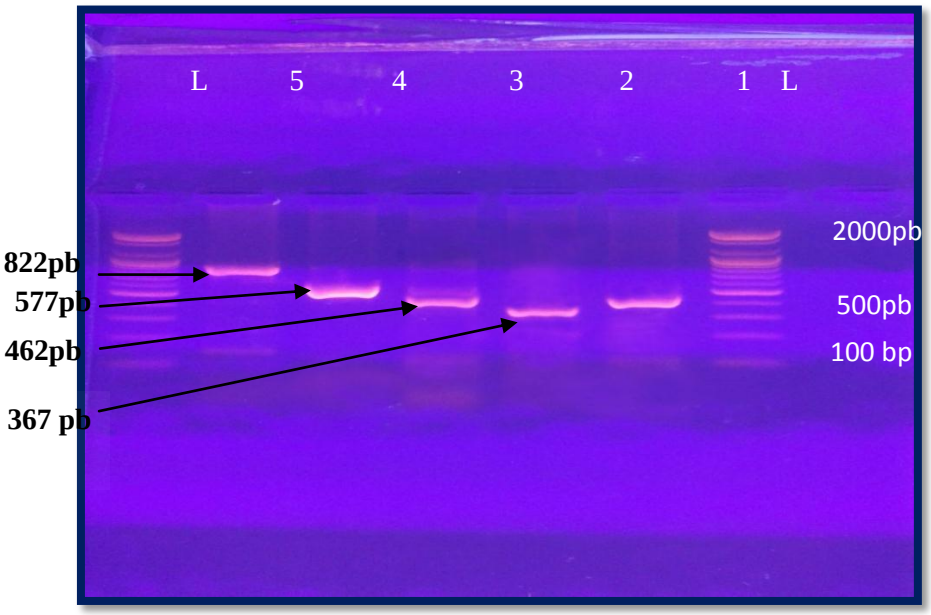
- النمطO6 عزلة رقم (4,3,2) المؤشر وزنه 783 pb.
- النمط O16 عزلة رقم (9,8,7,5)المؤشر وزنه 302pb.
- المقياس (L) مثل المسار المؤشر وزنه (2000-100pb).



شـــكل (4-9):حزمتـــا الجينـــين *aac(3)-IVsul1*, المـــرحلان كهربائيـــا فـــي هـــلام الاكـــاروز(1%) بفـــرق جهـــد 80 فولـــت لمـــدة ســـاعة ونصـــف

بعد صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم وتعريضه للأشعة فوق البنفسجية ظهرت الحزم كالأتي.

- الجين *sull* في العزلات (1-5) المؤشر وزنه822 pb.
- الجين *aac3-IV* في عزلة رقم (2) المؤشر وزنه 286pb .
- المقياس (L) مثل المسار المؤشر وزنه (2000-100pb).



شكل (4-10): حزم لثلاث جينات مقاومة إضافة للجين *sul1* المؤشر وزنه 822 pb والتي تم فحصها حسب مصدر كل جين والمرحلة كهربائيا في هلام الاكاروزبفرق جهد 80 فولت للجينات *CITM* و*dfrA1* و *tet(A)* و *sul1*في العزلات (1-5) على التوالي.

- الجين*CITM* في عزلة (1-3) المؤشر وزنه 462pb.
- الجين*dfrA1* في عزلة (2) المؤشر وزنه 367pb.
- الجين*tet(A)*في عزلة (4) المؤشر وزنه 577pb.
- المقياس (L) مثل المسار المؤشر وزنه (2000-100pb).

الاستنتاجات Conclusions

1. إن سلالات UPEC احد العوامل الرئيسية المسببة لخمج المجاري البولية في الأطفال في مدينة الناصرية.
2. النمط المصلي O6هو السائد بين أنماط UPEC المسببة لخمج المجاري البولية.
3. اكبر عدد من الجينات المقاومة للمضادات الحياتية موضوع الدراسة كان *CITM* للمضاد الحياتي Penicillinيليها مقاومة الجين *tet(A)* للمضاد الحياتي Tetracyclineمن بين الأنماط

المصلية لعزلات جراثيمUPEC. بينما كان أقل عدد للعزلات المقاومة للجين *dfrA* للمضاد الحياتي Trimethoprim.

التوصيات Recommendations

1. إجراء دراسات دورية منتظمة لتقييم الانتشار الجغرافي لعزلات جراثيم الإشيريشيا القولونية المسببة لاخماج المجاري البولية في الأطفال .

2.التأكيد على استخدام التقنيات الجزيئية الحديثة في تشخيص العزلات المرضية وتمييزها عن غيرها في المستشفيات باستخدام الطرق التقنية الحديثة المتبعة عالميا .

3.التأكيد على الاستخدام الأمثل للمضادات الحياتية وتحديد المقاومة بالتشخيص الجزيئي في المستشفيات والمختبرات الطبية.

4.إتباع طرق التعقيم المثلى وتجنب الاختلاط بين المرضى وكذلك الحد من الاستخدام المشترك للمواد لتفادي انتشار العزلات المقاومة للمضادات الحياتية.

5.على الجهات الصحية أن تأخذ بنظر الاعتبار المخاطر الصحية لجراثيم UPEC وإتباع الوسائل الإعلامية في التوعية والإرشاد.

المصادر باللغة العربية:

- **أل سماعيل, وجيهة عبد الكريم محمد.(2007).** البكتريا المسببة لالتهاب المسالك البولية، خاصة اشيريشيا كولاي ونمط مقاومتها للمضادات الحيوية في المملكة العربية السعودية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الملك سعود.
- **الطائي,هادي رحمن رشيد.(2010).** عزل *Proteus vulgaris* المنتجة لليوريز من اطفال مصابين بالتهابات المجاري البولية،مجلة ديالى للعلوم البحتة، المجلد (2)،العدد (6): 269-274.
- **طعمة، منير عبد الرسول.(2006).** دراسة في التهاب المجاري البولية عند الأطفال دون سن الخامسة من العمر في مستشفى الأطفال في كربلاء.رسالة ماجستير. كلية الطب ، جامعة بابل.
- **عبد الرحمن، محمود إبراهيم إسماعيل.(2006).** دراسة بعض الجوانب البكتيرية والمناعية لخمج المجرى البولي المزمن. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- **محيميد، شيماء جاسم. (2011).** المسببات الجرثومية المرافقة لخمج السبيل البولي في النساء الحوامل، مجلةجامعةبابل للعلومالصرفةوالتطبيقية. المجلد(19)،العدد (3): 921-925.
- **ياسين، سيلدا سعيد. (2014).** دراسة احصائية عن اخماج المجاري البولية في الاطفال دون سن الخامسة في مدينة كركوك. جامعة كركوك، كلية الطب البيطري، مجلة جامعة كركوك. المجلد (9)، العدد(2): 22-42.

المصادر باللغة الأجنبية:

- **Abdul-Razzaq, G.M. (2013).** Pattern of antibiotic sensitivity and resistance of uropathogenes among pediatric patients with urinary tract infection. Iraq J. Pharm.; 13(1): 64-76.
- **Ahmad, W.; Jamshed, F. and Ahmad, W. (2015).** Frequency of *Escherichia coli* in patients with community acquired urinary tract infection and their resistance pattern against some commonly used antibacterials. J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad.; 27(2): 333-337.
- **AL-karawyi, A.M.; AL-Jubouri, S.A. and Alasadiy, Y.D. (2013).** Molecular Detection of AmpC Family Genes Encoding Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* isolated from Patients with Urinary Tract Infection (UTI) in Najaf Hospitals. Vet. Med. Sci.; 4(1): 152-161.
- **AlKhateeb, N.E.; Al-Azzawi, S. and Al-Tawil, N.G. (2014).** Association between UTI and urinary tract abnormalities: A case-control

study in Erbil City. Iraq. J. Ped. Uro.; 10: 1165-1169.

- **Amanda, A.P.; Theoklis, Z.; Patrick, H.C.; Dawei, X. and Ron, K. (2010).** Previous Antimicrobial Exposure Is Associated With Drug-Resistant Urinary Tract Infections in Children. Official J. A. A. Ped .; 125(4): 664-672.
- **Barakat, A.J. (2012).** Presentation of the child with renal disease and guidelines for referral to the pediatric nephrologist. Inte. J. Ped.:1- 5.
- **Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2013).** Medical Microbiology. 24th.ed. McGraw- Hill Companies, Inc., New York. Pp: 224-232.
- **Dormanesh, B.; Farhad, S.D.; Sahar, H.; Hassan, M.; Reza, M. ; Mohammad, J.H.; Emad, Y.; Vahideh, T and Ebrahim, K. D.(2014).** Virulence Factors and O-Serogroups Profiles of Uropathogenic*Escherichia coli* Isolated from Iranian Pediatric Patients. Iran Red Crescent Med. J. ; 16(2):e14627:1-7.
- **Emamghorashi, F.; Shohreh, F.; Mehdi, K.; Shadokht, R. and Maryam, H. (2011).** The Prevalence of O Serogroups of *Escherichia coli* strains causing acute urinary tract infection in children in Iran. Saudi. J. Kidney Dis., Transpl. ; 22(3): 597-601.
- **Farshad, S.; Mojtaba, A.; Ali, MT.; Reza, R.; Aziz, J.; Reza, M.Z. and Abdolvahab, A. (2011).** Molecular epidemiology of *Escherichia coli* strains isolated from children with community acquired urinary tract infections. Iran. African J. Mic.; 5(26): 4476-4483.
- **Jonathan, C.C.; Judy, M.S.; Gabrielle, J.W.; Alison, L.; Graham, J.R.; Steven, J.M.; Elisabeth, M.H.; Jonathan, R.C.; Noel, E.C.; Grahame, S., Les M.I.; Patrina, H.Y. C; Sana, H and Leslie, P.R. (2009).** Antibiotic Prophylaxis and Recurrent Urinary Tract Infection in Children. N. Engl. J. Med. ;361:1748-1759.
- **Li, D.; Chen, M.; Guo D.; Guo X.; Liu F.; Feng L and Wang L. (2010).** A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli*serogroups associated with urinary tract infections. J. Mic. Methods; 82 (1): 71-77.
- **Momtaz, H.; Azam, K.; Mahboobeh, M.; Farhad, S.D.; Reza, R.; Meysam, S. and Negar, S. (2013).** Uropathogenic*Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Clin. Mic. Anti.; 12(8):2-12.

- **Momtaz, H.;Rahimi, e. and Moshkelani S. (2012).** Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E.coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. VeterinarniMedicina, 57; (4): 193-197.
- **Rashki, A. and Abdi, H.A. (2014).** O-serotyping of *Escherichia coli* Strains isolated from Patients With Urinary Tract Infection in Southeast of Iran. Int. J. Enteric Pathogen.; 2(4):1-4.
- **Saeed, C.H.; AL-Otraqchi, K.I. and Mansoor, B.I.Y. (2015).** Prevalence of urinary tract infections and antibiotics susceptibility pattern among infants and young children in Erbil city. Zanco J. Med. Sci.; 19(1): 915-922.
- **Siraj, M.; Anup, K.; Anil, K.R. and Shipra, S. (2011).** Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences.Bio.med. Inf.; (10):370-371.
- **Vana, T.T.; Chin, J.; Chapman, T.andColoe, P.J. (2008).** Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. Int. J. Food Mic.; 124 :217-223.
- **Wang, C.H.; Fang, C.C.; Chen, N.C.; Liu, S.S.; Yu, P.H.; W., T.Y.; Chen, W.T.; Lee, C.C. and Chen, S.C. (2012).**Cranberry containing products for prevention of urinary tract infections in susceptible populations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.Arch Intern Med.; 9 (13): 988-996.
- **Yamamoto, S. (2007).** Molecular epidemiology of Uropathogenic *Escherichia coli*. J. Infect. Chemother.; 13(2):68-73.

Serotyping and molecular detection of some resistance genes of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection children in Nasiriyah City

Widad Sameer jaaz AL-Zirjawi*, Saad SalmanHamim**

* Biology Department,Education College For Pure Sciences
** Pathological analysis department-College of Science-University of Thi-Qar, Iraq

Abstract

Identification of Uropathogenic*Escherichia coli* (UPEC) from urinary tract infections and molecular detection of some serotypes and determine some of drug resistant genes. 500 urine samples were collected from Mohammed Al-Moussawi hospital and Bint-Alhuda hospital from urinary tract infection children in Nasiriyah City From September (2014) to June (2015).

The positive bacterial culture were 306(61.20%) isolate, distributed to gram negative with 192 isolate (75.62%) and gram positive with 114 isolates (25.37%). The highest percentage of gram negative bacteria represented by *Escherichia coli* with 75 isolate (39.06%).

Of a total of *E. coli* 50 isolates, were identifiy by convential polymerase chain reaction (PCR) for the isolated DNA by using specific primers for (O6, O15, O16, O25 and *16SrRNA*) genes results showed that 36 (72%) isolate represent 57 serotype and 14(36%) The serotype were distributed as 23(40.35%), 18(31.57%), 7(12.28%), 9(15.7%) and 50(100%) respectively.

The antibiotic resistant genes of *Escherichia coli* (*CITM*,*tet(A)*, *aac3-IV*, *Sul1*, *dfrA1*). The results of the present study showed appositive reaction with 25(50.08%), 23(46%), 19(38%), 17(34%), 5(10%) respectively.

The present study results some of *E.coli*Serogroups carry genes responsible for its resistance to most antibiotics.