P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (3) :18-23

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

دراسة جزيئية لعامل الضراوة (Fim H) لبكتيريا *E. Coli* المسببة لخمج المجاري البولية للمرضى في مستشفى الرمادي التعليمي

حسن هلال رشيد* ليث مصلح نجيب**

*وزارة الصحة – دائرة صحة الانبار
**جامعة الانبار- كلية العلوم

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢
DOI: 10.37652/juaps.2015.127581

الكلمات المفتاحية:
عامل الضراوة (Fim H) ،
E. Coli ،
خمج المجاري البولية ،
مستشفى الرمادي التعليمي.

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة للكشف الجزيئي لعامل الضراوه (Fim H) لبكتيريا *E. coli* المسببة لخمج المجاري البولية، شملت الدراسة (١٠) عزلات من العزلات الأكثر مقاومة من مجموع (١٠٦) عزله من بكتيريا *E. coli* ، تم جمعها من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الرمادي التعليمي، اذ تم استخلاص الدنا البلازميدي والجينومي لكافة العزلات كلا على حده، وبالتالي تم قياس نقاوة وتركيز الدنا المعزول لكل حالة بواسطة الترحيل الكهربائي للتأكد من سلامة الدنا المعزول ثم تم دراسة عامل الضراوة (Fim H) لهذه العزلات. واظهرت النتائج وجود الجين في جميع العزلات لعينات الدنا الكروموسومي فيما بينت النتائج عدم وجود الجين في جميع العزلات لعينات الدنا البلازميدي.

المقدمة

تعد اخماج المجاري البولية أحد اهم الامراض الشائعة والمتكررة الحدوث عالميا ومحليا، فهي تصيب نسبة كبيرة من المجتمع البشري تقدر بالملايين(١). ففي كثير من دول العالم تاتي هذه الاخماج في المرتبة الثانية بعد اخماج القناة التنفسية العليا(٢). في حين تاتي اخماج المجاري البولية في العراق لتحتل المرتبة الأولى من الاخماج الجرثومية وبنسبة ٢٣%(٣).

يحدث خمج المجرى البولي في مختلف الاعمار ولكلا الجنسين ولكن نسبة حدوثه لدى الاناث اكثر مما هو عليه لدى الذكور نظرا لقصر الاحليل لدى الانثى وقربة من فتحة الشرج إضافة الى النشاط الهرموني (٤). ان غالبية اخماج المجاري البولية عبارة عن حالات طارئة يتم معالجتها بفترة قصيرة ويطلق على هذا النوع من الاخماج بالخمج الحاد (Acute Infection) الا ان الخطورة تكمن في تحول الخمج الحاد الى الخمج المزمن (Chronic Infection) الذي يصعب التخلص منه(٥).

تعتمد امراضية بكتريا *E. coli* الممرضة للمجرى البولي على عدد واسع من محددات الضراوه، اذ تعد عملية الالتصاق (Adhesion)

* Corresponding author at: Continuous Education Center, Mustansiriyah University, , Baghdad, Iraq;

لبكتيريا (UPEC) مع انسجة الثوي في موضع الإصابة الخطوة الأولى المهمة والضرورية ومفتاح نشوة الإصابة لخمج المجرى البولي وتتوسط الاهداب بصورة أساسية عملية ربط هذه البكتيريا مع المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا الظهارية ومن ثم تؤسس لعوامل الضراوه واستيطان القناه البولية ويتحكم في عملية التصاق بكتريا *E. coli* مع سطوح الخلايا الظهارية البولية للثوي ثلاثة عوامل هي (اللواصق البكتيريه ومستقبلات الثوي واليات دفاع الثوي) (٦)، تعد اللواصق (Adhesion) من اهم عوامل الضراوه في الاخماج التي تصيب الجهاز البولي. ان التصاق البكتريا باسطح الانسجة الحية البشرية تشكل الخطوة الأولى في تمركز البكتريا ومن ثم تكاثرها واحداث الإصابة (٧). وتعد ظاهرة التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية ظاهرة مهمة تحدد ضراوة البكتريا فإصابة القناة البولية تحدث نتيجة قدرة البكتريا على الالتصاق واستعمار الاحليل والمثانة (٨) والالتصاق يكون مهما لحدوث إصابة القناة البولية اذا كانت سليمة من الناحية التشريحية ويعد الالتصاق في الـ *E. coli* الأكثر شيوعا والمسبب لحالة الـ (Bacteriuria) واحداث التهاب المجاري البولية (٩).

طريقة العمل

جمعت (٢٠٠) عينة بول من المرضى الراقدين والمراجعين للعيادة الاستشارية البولية لمستشفى الرمادي التعليمي ومن كلا الجنسين

وللفترة من اذار ٢٠١٥ لغاية شهر اب ٢٠١٥ وذلك من الدفق المتوسط للبول وكذلك استعملت القثطرة وارتشاق ادرار المثانة وعينة كيس الادرار من المرضى الذين لا يستطيعون التبول وباستعمال انابيب بلاستيكية معقمة ومن ثم استعمال الطرق القياسية في معاملة العينات ونقلها وزرعها وحضنها وفحصها من اجل عزل العامل المسبب للخمج وتشخيصه واجراء فحص الحساسية الدوائية [١٠].

الفحص المجهري

تم اجراء الفحص المجهري المباشر لكل عينة قبل اجراء عملية الزرع على الأوساط الزرعية

وذلك بأخذ قطرة بول ووضعها على الشريحة وتغطيتها بغطاء الشريحة قبل اجراء الطرد المركزي وفحصها تحت المجهر الضوئي وذلك لمشاهدة كريات الدم البيضاء الميتة او الخلايا البكتيرية التي تزيد على 10^5 خلية لكل مل من البول وكذلك اجراء الفحص المجهري بأخذ قطرة من راسب البول بعد الطرد المركزي لمشاهدة الخلايا القيحية (Pus Cell) وكل عينة خالية من هذه الخلايا تعد سالبة وتهمل قبل الزرع.

زرع عينات الادرار

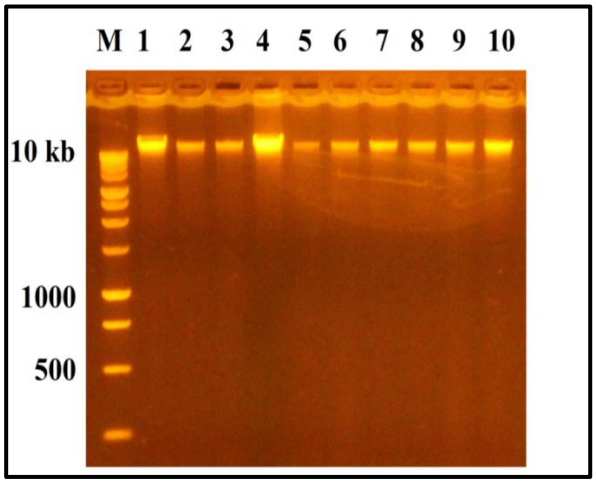
زرعت عينات الادرار هوائيا بعد جمعها على وسط اكار الدم (Blood Agar) ووسط الماكونكي (MacC Agar) للتفريق بين العزلات الموجبة النمو والعزلات السالبة النمو حيث تم الزرع بطريقة العروة المعايرة كميا وباستخدام عروة تنقل حوالي 0.01 مل من الادرار. عقمت العروة باللهب وتركت لتبرد دون ملامسة شيء غمست العروة عاموديا في العينة وذلك للسماح للادرار بالالتصاق بعدها لقحت الأوساط الزرعية بتخطيط العروة على سطح الاكار بعدها تقلب الاطباق وتحضن في ظروف هوائية بدرجة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة في النتائج الموجبة للنمو يتم اختيار المستعمرات المفردة من الأوساط الزرعية الأولى ويعاد زرعها مرة ثانية على اطباق جديدة من الوسط الزرعي نفسه لحين الحصول على عزلات نقية من تلك البكتريا بعدها نقلت هذه المستعمرات الى وسط الاكار المغذي ثم حضنت بدرجة 37 درجة مئوية لحين اجراء الاختبارات اللازمة مع مراعاة تجديدها شهريا وبالطريقة نفسها[١١].

التشخيص

شخصت العزلات البكتيرية مظهريا وفق شكل وحجم وقطر وارتفاع ولون المستعمرة إضافة الى عمل مسحات من المستعمرات على شرائح زجاجية صبغت بصبغة كرام وذلك لغرض التفريق بين البكتريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة للصبغة [١٢]. بعد ذلك تم اجراء الفحوصات الكيمياوية واستخدم نظام (Api20 E) لتشخيص العائلة المعوية وأخيرا استخدم جهاز الفايتك (Vitik 2) الذي اعطى تشخيصا نهائيا للعزلات البكتيرية.

استخلاص الدنا الجينومي

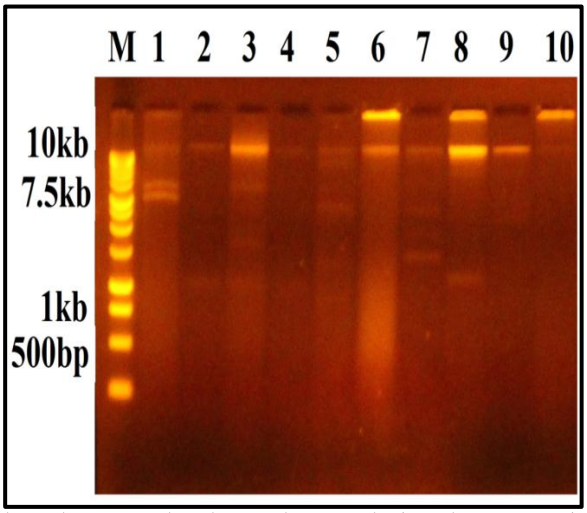
عزل الدنا الجينومي لبكتيريا *E. coli* باستخدام العدة المحضرة من شركة بروميكا (Wizard Genomic DNA Purification) الشكل (١).



الشكل (١): نتيجة الترحيل الكهربائي للدنا الجينومي المستخلص من ١٠ عزلات. تظهر النتيجة نجاح عملية الأستخلاص لكل العينات. كان تركيز الأكاروز المستخدم ١% والفولتية ٧فولت لكل ١سم طول، ووقت الترحيل ساعة ونصف ، وقد تم استخدام بروميد الأثيديوم لتصبيغ الدنا

استخلاص الدنا البلازميدي

عزل الدنا البلازميدي لبكتريا *E. coli* باستخدام العدة المحضرة من شركة بروميكا (Pure Yiled Minprer System) شكل (٢).



الشكل(٢) نتيجة الترحيل الكهربائي لعينات الدنا البلازميدي المستخلص من ١٠ عزلات . يوضح الشكل احتواء العزلات ٤و٩و١٠ على بلازميد

واحد والعزلات ٢و٦و٨ على بلازميدين اما العزلات ١و٣و٥و٧ فقد احتوت على ٣ بلازميدات. كان تركيز الأكاروز المستخدم ١% والفولتية ٧فولت لكل ١سم طول، ووقت الترحيل ساعة ونصف، وقد تم استخدام بروميد الأثيديوم لتصبيغ الدنا.

الترحيل الكهربائي

تتم عملية الترحيل الكهربائي بعد إتمام عملية استخلاص الدنا الجينومي والبلازميدي للكشف عن نوعية الدنا المستخلص وظهور البلازميدات كما يتم استخدام هذه التقنية في الكشف عن نتيجة تضاعف البلمرة المتسلسل.

قياس تركيز الدنا

تم قياس تركيز الدنا المستخلص (البلازميدي والجينومي) باستخدام جهاز المطياف الضوئي النانوني (Nano Drop) حيث يتم إضافة (١) مايكروليتر من عينة الدنا الى الجهاز وتعرض نتائج الفحص على شاشة الحاسبة المرتبطة به. يتم حساب التركيز والنقاوة اعتماد على قياس الطيف الضوئي الممتص عند ثلاث درجات وهي ٢٣٠ و ٢٦٠ و ٢٨٠ نانوميتر وعند هذه الدرجات تكون اعلى امتصاص للدنا والرنا والبروتين على التوالي.

البوادئ

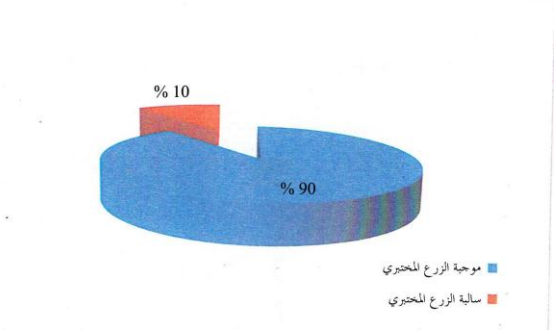
تم تحضير التفاعل باستخدام بوادئ متخصصة تم تصميمها لهذا الغرض تم اذابة البوادئ المجففة بالماء الخالي من انزيمات التقطيع للوصول الى تركيز ١٠٠ بيكومول لكل مايكروليتر كمحلول خزن ومن ثم تم تحضير محلول العمل بتركيز (١٠) بيكومول لكل مايكروليتر وذلك بإضافة (١٠) مايكروليتر من محلول الخزن الى ٩٠ مايكروليتر من الماء.

جدول (١) جين عامل الضراوة (Fim H) الذي تمت دراسته وتسلسل البوادئ الخاصة به وحجم القطع الناتجة من التضاعف ودرجة الحرارة المستخدمة في تقنية تضاعف البلمرة التسلسلي

Gene	Seq.	Size	Tm
fimH	TGCAGAACGG ATAAGCCGTGG	509	65
	GCAGTCACCT GCCCTCCGGTA		

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج عزل البكتريا من (٢٠٠) عينة ادرار من مرضى يعانون من اخماج القناة البولية من الراقدين والمراجعين لمستشفى الرمادي التعليمي خلال الفترة الممتدة من شهر اذار ٢٠١٥ لغاية شهر اب ٢٠١٥ ان عدد العينات الموجبة التي أعطت نموا بعد زرعها هوائيا على الوسط الزرعي (Blood Ager) والوسط الزرعي (MacC onkey Agar) كان ١٨٠ عينة بنسبة ٩٠% وبلغ عدد العينات السالبة والتي لم تعط نموا ٢٠ عينة بنسبة ١٠% شكل (٣) ويعزى السبب الى كون الإصابة فايروسية اوفطرية او تدرنية (TB) كونها تحتاج الى تقنية خاصة واوساط زرعية مناسبة لعزلها [١٣]. تبين من هذه الدراسة سيادة بكتريا الـ *E. coli* كمسبب رئيسي لخمج المجاري البولية حيث بلغ عدد العزلات (١٠٦) عزلة بنسبة ٥٩% وهذه النتيجة تتفق مع الدراسة التي توصل اليها الباحث [١٤] ، اذ شكلت الـ *E. coli* نسبة عزل ٥٣.٧%، وقد يكون سبب الإصابة العالية بجرثومة الـ *E. coli* عائدا الى مقاومتها العالية للمضادات الحيوية وامتلاكها عوامل ضراوه تمكنها من احداث الخمج.



شكل (٣) النسب المئوية للعزلات النامية وغير النامية للبكتريا المعزولة من حالات التهاب المجاري البولية

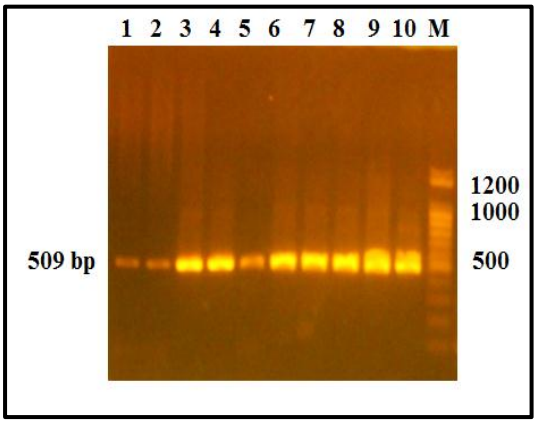
دراسة عامل الالتصاق (Fim H) Type I Fimbriae

تعتبر عوامل الالتصاق من عوامل الضراوة المؤثرة والمهمة في احداث الإصابة البكتيرية حيث تعمل هذه العوامل على إضفاء صفة الالتصاق بالأنسجة الحية الى الخلايا البكتيرية الممرضة. ويعتبر عامل الالتصاق (Type I Fimbriae) من اهم عوامل الضراوة لبكتيريا E. coli التي تصيب المجاري البولية، حيث يساعد هذا العامل الخلايا البكتيرية على الالتصاق بالجدار الداخلي للمثانة وتكوين المستعمرات (١٥)، عامل الضراوة (Type I Fimbriae) يشفر له اوبرون مكون من تسع جينات(fim A , fim B, fim C , fim D , fim E , fim F , fim I , Fim G , fim H) واغلب هذه الجينات معروفة الوظيفة والعمل.الجين (Fim H) يكون مسؤولا عن عملية الالتصاق وهو الجين الذي تمت دراسته في هذا البحث، اذ تم استهدافه ببادئ متخصص من خلال تقنية تضاعف البلمرة المتسلسل حيث كانت العزلات الموجبة

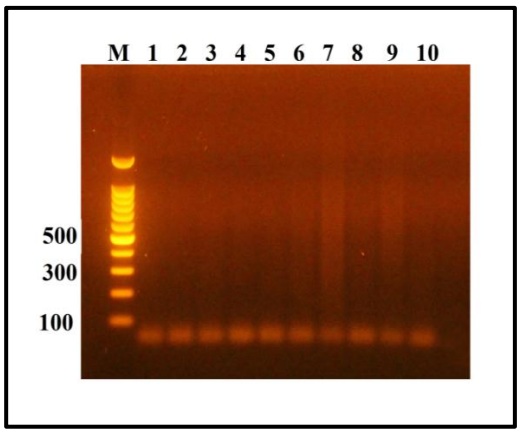
والحاملة لهذا الجين هي التي تظهر حزما ذات وزن جزيئي (٥٠٩) زوج قاعدي يشفر الجين (Fim H) لبروتين يعمل على الالتصاق بمجسات الكلايكوبروتين الحاوية على سكر المانوز والموجودة على سطح الخلايا الداخلية للمثانة يعرف ذلك البروتون الناتج (Uroplakins) .(١٦)

أعطت جميع العزلات التي تمت دراستها نتيجة موجبة لهذا الجين حيث أظهرت نتيجة الترحيل الكهربائي لنتائج التضاعف وجود حزمة ذات حجم (٥٠٩) زوج قاعدي لكل العزلات مما يعني احتواء جميع العزلات على جين الالتصاق (FimH) شكل(٤).

أشار [١٧] الى أهمية ودور عامل الالتصاق (Fim H) في عملية احداث الإصابة ببكتيريا *E. coli* التي تصيب المجاري البولية، كما أشار [١٨] الى ظهور هذا الجين بنسبة تصل الى اكثر من ٨٠% في عزلات الـ *E. coli* التي تسبب التهاب المجاري البولية واكد دور عملية الالتصاق في حماية البكتيريا من المضادات الحيوية وزيادة ضراوتها. وأشارت [١٩] الى إمكانية اعتماد هذا الجين كهدف في تشخيص بكتيريا الـ *E. coli* المسببة لالتهاب المجاري البولية وذلك لاعتباره واحد من اهم الجينات وأكثرها شيوعا لدى هذا النوع من الممرضات. بالنسبة للدنا البلازميدي فان النتائج لم تظهر وجود أي نتيجة موجبة عند استخدام البادئ الخاص بجين (FimH) الشكل (٥) وهذا يتطابق مع الدراسات التي تشير الى ان جينات الالتصاق الخاصة بالـ *E. coli* عادة ما تكون محمولة على الكروموسوم.[٢٠]



الشكل (٤): نتيجة الترحيل الكهربائي لنتيجة تضاعف البلمرة التسلسلي لجين fim H لعينات الدنا الكروموسومي. تظهر الصورة وجود الجين في جميع العزلات. كان تركيز الأكاروز المستخدم ١% والفولتية ٧فولت لكل ١سم طول، ووقت الترحيل ساعة ونصف، وقد تم استخدام بروميد الأثيديوم لتصبيغ الدنا.



الشكل (٥): نتيجة الترحيل الكهربائي لنتيجة تضاعف البلمرة التسلسلي لجين fim H لعينات الدنا البلازميدي. تظهر الصورة عدم وجود الجين في جميع العزلات. كان تركيز الأكاروز المستخدم ١%والفولتية ٧فولت لكل ١سم طول، ووقت الترحيل ساعة ونصف، وقد تم استخدام بروميد الأثيديوم لتصبيغ الدنا.

References

1. Karkkainnen , Ulla- Maija- (2000). Viralence - associted characteristic of *Echerichia coli* in Urinary tract infection of Adult. Ph. A. Thesis, Kupion University. Finland.
2. Al-Ibadi, J.C.I. (2002). *Sensitivity, Specificity and Predictive Value of Pyuria as A Reliable Diagnostic Test for Urinary Tract Infection.* M. Sc. Thesis, College of Medicine, University of Baghdad .
3. El-Hemidawi, T.F.H. (2005). *Hemolytic Activity of Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infectios and its Resistance to Antibiotics.* Ph. D. Thesis. Al-Mustansyria University
4. Davidison, A.M.; A.D. cumming and C.D. Swainson. (2002) . Disease of the kiolney and system. In: Davidisin's principle and practice of medicine. (7thed.), C.R.W. Davidon ; A.B. Bbouchier & C. Haslett *eds), P: 611-653, Chrichill. Livingston. London
5. Al – Muhammadi , Ruqaia Kaptan Taha (2010) . Bacteriological study of Urinary Tract infection in Diabetic and Non Diabetic Women. thesis of

pyelonephritis. Urologic elinics of north America. 35 (1)

13. Thwainui, Q.N,A. (2002). biology of cell wall defectivie microbes from persistent Pyria & persistent Hematuria patients, ph. D, thesis. Babylon University.
14. Al –Begat , Saad Taha Mutlk Hmidon (2007). Study of most commen aerobic bacteria causing lower urinary tract infection (UTI) in Ramadi general hospital . thesis , college of medicine – university of Al – Anbar .
15. Bahrani – Mougeot , F. k . Backles , E.l. , lockatell C.V ,Hebel , J.R. Johnson D.E , Tang , C.m and Donnenberg .M.C. (2002) . Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic E . coli virulence determinants . 45 : 1079 – 1093 .
16. Zhou G, et al., 2001. UroplakinIa is the urothelial receptor for uropathogenic Escherichia coli: evidence from in vitro FimH binding. Mulvey MA, 2002. Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli .
17. Victoria B. Rodriguez, Brian A. Kidd, GianlucaInterlandi, VeronikaTchesnokova, Evgeni V. Sokurenko, Wendy E. ThomasJBiol Chem. 2013
18. Karam MR Asadi, M Oloomi, M Habibi, S Bouzari.Iran J Microbiol. 2012 June; 4(2): 55–62.
19. DanaWillner, Serene Low, Jason A. Steen, Narelle George, Graeme R. Nimmo, Mark A. Schembri, Philip Hugenholtz.mBio. 2014 Mar-Apr; 5(2):. 15516th ed. ,W.B. Sauders Company : 1621-1657.

Master , college of Medicine – University of Al – Anbar .

6. Stapleton, Ann(2005).Novel Mechanism of p-Fimbriated *E.coli* Virulence in Pyelonephritis .J.am.soc.nephrol.16:3458-3460.
7. Al–khozai , Ziad M . (2009). Studying the adhesion properties of Pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus on contact lenses and the effect of radiation with electrons and positrons on its adhesion in the laboratory , Journal of Karbala university . vol7 , no1:34- 39 .
8. Malvey m.a. (2002).Adhesion and entery of uropathoginc E. coli .cell. microbiol.4:257.
9. Geerlings S.E.,Ruby Meiland ,Emiel C. Van Lith,Ellenc. Brouwer, Wim Gaastra and Andy i.m.Hoepelman(2002).Adherence of type-1 fimbriated Escherichia coli to uroepithelial cells (more in diabetic women than in control subjects).diebetic care,25:1405-1409.
10. MAcfaddin, J.E. (2000) individual biochemical test. In: Biochemical test for identification of medical bacteria (3rded) Macfaddin J. E. (ed.) p:27-439. Lionicott Williams & wilkins Co. Blatimore. U.S.A.
11. Brooks , g, f , Butal , j .s. and Morse , S.A. (2001) . " jawetz , melnick & abelbergs medical microbiology " . 22nd ed , lange medical books / McGraw – Hill inc , U.S.A .
12. Niocle, L.E. (feb 2008) Uncomplicated Urinary tract infection in adults including uncomplicated

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :18-23

MOLECULAR STUDY VIRULENCE FACTOR FIM H TO ESCHERICHIA COLI BACTERIA CASE URINARY TRACT INFECTION FOR THE PATIENT IN RAMADY TECHNIQUE HOSPITAL.

HASSAN H. RASHED LEITH M. NAJEEB

Abstract

This Study was carried out to determine the distribution Molecular Virulence Factor (Fim H) to *Escherichia coli* bacteria cases urinary tract infection.This Study included (10) Isolated more than resestance from (106) Isolated *Escherichia Coli* bacteria collected from the patient in Ramady technique hospital. Were chosen from each bacterial type for the sake of studying their genetics homogeneity. DNA was extracted from the Isolated of each of the following bacteria *E.Coli* this extracted DNA was used in multiplex P.C.R Technique by using (Fim H) gen. The virulence factor result found the gen samples chromosome DNA in all colony while result explained no (Fim H) gene in all plasmid DNA sample.