دراسة مايكروبايولوجية لبكتريا *Escherichia coli* O157 : H7 المعزولة من الأسهال الدموي عند الأطفال دون سن العاشرة

هيثم عزت باقر, أشواق باسم الهاشمي*, آمنة نعمة الثويني*

مختبر الصحة العام المركزي– وزارة الصحة. بغداد ، العراق.

** معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية. بغداد, العراق.*

الخلاصة

350 عينة براز لأطفال يعانون من أعراض الأسهال الدموي من المراجعين و الراقدين لمستشفى أطفال العلوية خلال الفترة الممتدة من بداية حزيران 2001 و الى نهاية تشرين الأول 2001 ممن كانت أعمارهم دون سن العاشرة لغرض التحري عن بكتريا *E.coli* O157 : H7 و التي تعد من المسببات الرئيسية لهذا النوع من الأسهال .

أعتمد في تشخيص البكتريا المعزولة و تفريقها عن باقي أجناس العائلة المعوية Enterobacteriace الصفات المظهرية على الوسط Sorbitol MacConkey (SMAC) و الأختبارات الكيموحيوية الروتينية , أما باقي الأختبارات الكيموحيوية فقد اجريت بأستخدام نظام API 20Eللتشخيص و قد تم تحضير الوسط الأنتقائي Sorbitol Macconkey (SMAC) مختبرياً من المواد الأولية المتوفرة لغرض أستخدامه في الدراسة , كما تم تأكيد تشخيص العزلات ذات المواصفات الكيموحيوية المطابقة لبكتريا EHEC .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية عائدية (4) حالات موجبة عائدة لبكتريا *Escherichia.coli* O157:H7 و بنسبة (1.14%). درست حساسية العزلات قيد الدراسة لمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج, اذ بينت النتائج أن جميع العزلات كانت حساسة لكل من الجنتمايسين , حامض النالدكسك , الكلوروفينكول و التوبرومايسين. ومقاومة لكل من أموكسيسلين و التراي مثيبريم.

MICROBIOLOGICAL STUDY OF *Escherichia coli* O157 : H7 ISOLATED FROM BLOODY DIARRHOEA IN CHILDREN UNDER TEN YEARS OLD

Abstract

This study enrolled 350 infants and young children , less than 10 years of age with bloody diarrhoea seeking medical advance at Al-Alwia children hospital through a period from the 1st of Jula 2001 till the end of October 2001 . The shape of bacteria on sorbitol macConkey, Routine Biochmical testes and Api 20E system were dependent in the diagnosis and identification of bacteria from the other members of Enterobacteracea family.

The preparation of local-made selective media for isolation of this bacteria was preformed in our labs.

Escherichia coli belong to the serotype O157:H7 was isolated from 4 patients (1.14%). The susceptability to antimicrobial agent was tested against *E.coli* O157:H7. All isolates were sensitive to Gentamicin , nalidixic acid, chloramphenical and Tobramycin , but resistant to Amoxcillin and Trimethoprim .

المقدمة

يبقى الأسهال الدموي واحداً من الأسباب الرئيسة المهمة لحالات الوفيات خاصة عند الرضع والأطفال في البلدان النامية و تشترك العديد من الميكروبات في أحداث و تطور أعراض الأسهال الدموي منها البكتريا المرضية و الطفيليات[1].

تشكل بكتريا *E.coli* O157 أهمية كبيرة في الوقت الحاضر من خلال كونها أحد المسببات الرئيسة لحدوث حالات الأسهال الدموي و متلازمة الحال اليوريمي Hemolytic Uremic Syndromعند الأطفال و الذي يؤدي بصورة مباشرة الى ارتفاع نسبة الوفيات في الكثير من بلدان العالم .

تمتلك هذه البكتريا صفات كيموحيوية مميزة تسهل من عملية تشخيصها حيث أنها غير قادرة على تخمير سكر السوربتول-د(D-Sorbitol) والذي يميزها عن باقي أنواع بكتريا الأشريشيا القولونية [2]. فضلا عن ذلك فهي تمتلك عدداً من عوامل الضراوة و التي تلعب دوراً كبيراً في أمراضيتها، من أهمها هو قدرتها على أفراز الذيفانات الخلوية التي تكون سامة للخلايا الطبيعية لكلية القرود الخضر (Vero cells) وامعاء الفئران الرضع [3] تنقل بكتريا *E.coli* Enterohemorragic عن طريق تناول الغذاء الملوث و بخاصة لحوم الأبقار و منتجاتها, أذ تعد الأبقار السليمة الخازن الرئيسي لهذة البكتريا. و قد لوحظ أرتفاع معدل الأصابات في المناطق الريفية نتيجة التماس المباشر مع الأبقار أو برازها الحاوي على البكتريا[4] .

أستهدفت هذة الدراسة عزل و تشخيص هذة البكتريا كيموحيوياً و مصلياً بأعتبارها من المسببات المكتشفة حديثاً و التي أكتسبت أهمية خاصة من خلال المضاعفات التي قد تسببها , كذلك تم في هذة الدراسة تحضير الوسط الزرعي الأنتقائي SMAC Sorbitol MacConkey في المختبر من المواد الأولية المتوفرة في الاسواق المحلية.

المواد و طرائق العمل

أولاً : جمع النماذج

جمعت عينات البرازمن 350 طفلاً يعانون من أعراض الأسهال الدموي و ممن كانت أعمارهم دون سن العاشرة من الراقدين و المراجعين لمستشفى أطفال العلوية في بغداد للفترة من 2001/6/1 ولغاية 2001/10/1 .

ثانياً : زرع النماذج

أ . تحضير الوسط الزرعي الأنتقائي

حضر الوسط الزرعي الأنتقائي Sorbitol MacConkey SMAC في المختبر من المواد التالية [5] :

Pepton (oxoid)	20 gm
A-Sorbitol (oxoid)	10 gm
Bile – Salt (oxoid)	1.5 gm
Nacl (Fluka)	5gm
Crystal Violet (oxoid)	0.01gm
Agar (Fluke)	15gm
Neutral red (Fluka)	0.03gm

حيث ذوبت المواد في لتر واحد من الماء المقطر, ثم عدل الأس الهيدروجيني الى pH7 و عقمت بجهاز الموصدة بدرجة 121^{O} م وضغط (1.5 جو) ولمدة 15 دقيقة , تركت لتبرد في جو الغرفة الى 45 ^{0}م ثم اضيف الى الوزن مقدار 5 غرام/لتر من سكر الرامينوز(Rhaminose), أذيب السكر بالماء المقطر و عقم بطريقة الترشيح و أضيف الى الوسط الزرعي المحضر. واضيف ايضا مقدار 0.05 ملغرام/لتر من المضاد الحيوي Cexfixime(أذيب بمقدار من الماء المقطر حتى يتجانس ثم عقم بالطريقة نفسها), مزج جيداً و صب في اطباق بتري معقمة.

ب. تقييم الوسط الزرعي SMAC

قيم الوسط SMAC المحضر مختبرياً بأخذ عزلات بكتريا E.coli مشخصة مسبقاً على أنها مخمرة لسكر السوربتول على وفق نظام التشخيص Api 20E وزرعت على أطباق الوسط SMAC ووسط الماكونكي التقليدي التجاري , حضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة 37م .

جـ . العزل و التشخيص :

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل الباحث .Johnson,*etal*[6] و كما يلي :

1 .زرع البراز مباشرة على الوسط الزرعي SMAC وحضنت الاطباق بدرجة حرارة (37م) و لمدة 24 ساعة فحص الوسط المزروع بعد أنتهاء مدة الحضن لملاحظة المستعمرات البكتيرية النامية و أختيرت المستعمرات شاحبة اللون , و التي هي غير مخمرة لسكر السوربتول و من ثم أعادة زرعها على وسط الماكونكي التقليدي .

2 . شخصت المستعمرات النامية مبدئياً على أساس تخمرها لسكر اللاكتوز و بعد ذلك شخصت بأستخدام الأختبارات الكيموحيوية التقليدية لبكتريا *E.coli* و نظام التشخيص Api 20 E فضلاً عن الفحوص الأتية و التي أجريت حسب [7] .

- فحص السيلّبوز (Cellobiose test)

– فحص سيانيد البوتاسيوم (KCN test)

– فحص وسط تحلل الدم (Enterohemolysin test)

– فحص 4-Methumbilifery B-D (MUG test) glucuronide -

3 . الأختبارات المصلية :

شخصت البكتريا على أنها *E.coli* O157 بأستخدام مصول مناسبة خاصة من شركة Well Colex و ذلك حسب طريقة الباحث [8].

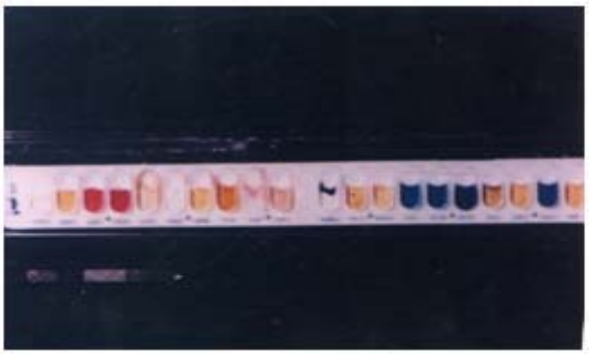
ثالثاً : أختبار حساسية البكتريا لمضادات الحيوية :

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل الباحث [9] Vandepitte,*etal.* و المأخوذة عن الطريقة[10] Bauer,*etal* في أختبار حساسية العزلات لعدد من المضادات الحيوية التي أستخدمت في المستشفى أثناء فترة الدراسة و المتوفرة في السوق المحلية و التي تتضمن الأموكسيلين , التراي مثيبريم , الجنتمايسين , التوبرومايسين , الستربتومايسين , وحامض النالدكسك .

النتائج

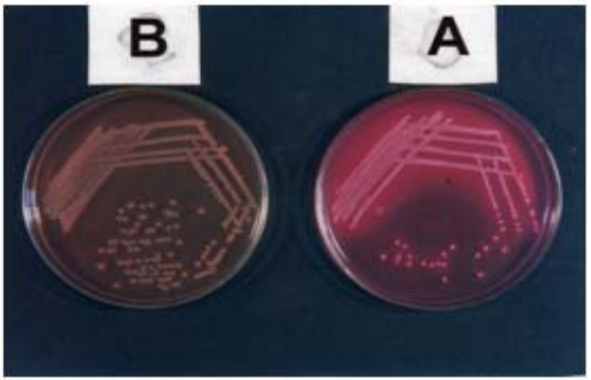
أولاً : العزل و التشخيص

بعد زرع بكتريا *E.coli* مشخصة على أنها غير مخمرة لسكر السوربتول – د وفق نظام التشخيص Api 20 E شكل(1) .



شكل (1) الأختبارات الكيموحيوية للعزلة المحلية *E.coli* O157 وبأستخدام نظام التشخيص Api 20E

دلت نتائج تقييم الوسط على أمكانية أستخدامة كوسط أنتقائي للتفريق بين البكتريا المخمرة و غير المخمرة لسكر السوربتول شكل (2) .



شكل (2) الطراز المظهري لمستعمرات بكتريا *E.coli* O157

أ. على الوسط الماكونكي التقليدي ب. على الوسط السوربتول ماكونكي.

تم عزل بكتريا *E.coli* O157 من 4 مرضى من أصل 350 طفلاً يعانون من أعراض الأسهال الدموي و بنسبة (1.14%) حيث ظهرت المستعمرات النامية على الوسط SMAC شاحبة اللون ملساء و صغيرة الحجم مما يشير الى أحتمال عائديتها لجنس *E.coli* النمط المصلي O157.

أ . الأختبارات الكيموحيوية :

– فحص السيليبوز Celloboise test :

تبين أن جميع عزلات بكتريا *E.coli* غير مخمرة لسكر السيليبوز.

– فحص سيانيد البوتاسيوم KCN test :

دلت نتائج هذا الأختبار عائدية جميع عزلات بكتريا *E.coli* الى النمط O157 بأعطائها نتائج موجبة نتيجة نموها و تحملها لسيانيد البوتاسيوم.

– فحص تحليل وسط الدم (Enterohemolysin test) :

أتضح من الدراسة أن جميع عزلات بكتريا 0157 *E.coli* لها القدرة على أنتاج الهيمولايسين بتحليلها الوسط Sheep blood agar الصلب بعد مرور 24 ساعة على فترة الحضن.

– فحص 4-Methylubilfery B-D- (MUG test) glucuronide

أظهرت جميع العزلات نتائج سالبة تجاه هذا الفحص .

ب . أختبار تلازن الشريحة :

أثبتت نتائج أختبار تلازن الشريحة و بأستخدام مصول مناعية مضادة خاصة ببكتريا *E.coli* النمط المصلي O157 أن جميع العزلات عائدة الى بكتريا *E.coli* O157 : H7 .

ثانياً : أختبار حساسية البكتريا لمضادات الحيوية :

اظهرت نتائج أختبار حساسية البكتريا E.coli O157 : H7 المعزولة من حالات الأسهال الدموي عند الأطفال ,كون معظم العزلات حساسه لكل من الجنتماستين وحامض النالدسك والكلوروفينكول و التوبرومايسين. بينما أظهرت صفة المقاومة العالية للاموكسيسيلين و التراي مثيبريم , جدول(1).

جدول (1) حساسية العزلات قيد الدراسة لمضادات الحيوية المستعمله

Antibiotics	EHEC (n - 4)		
	R	I	S
Gentomycin	2	–	2
Amoxicillin	4	–	–
Nalidxic acid	–	1	3
Chloramphenicol	–	–	4
Tombramycin	–	–	4
Trimthoprime	4	–	–
Streptomycin	3	1	–
R : resistant , S : sensitive , I : intermediate			

المناقشة

سجلت التقارير في بداية الثمانينيات أنتشار و باء الأصابة ببكتريا *E.coli* O157 في مدينتي Michigan , Oregen نتيجة لتناول الهمبركر [11], ومنذ ذلك الوقت أكتسبت أهمية كبيرة كونها أحد المسببات الرئيسية لحالات الأسهال الدموي و متلازمة الحال اليوريمي عند الأطفال و الذي يؤدي بصورة مباشرة الى أرتفاع معدلات الوفيات في البلدان النامية.

برزت خلال السنوات الأخيرة العديد من الطرائق المختبرية لتشخيص هذه البكتريا بأعتبارها من الأنماط المصلية المكتسبة حديثاً و التي تمتلك بدورها عدداً من الصفات الكيموحيوية التي تميزها عن باقي أنواع الأشيرشيا القولونية و تسهل من عملية تشخيصها بكونها غير قادرة على تخمير سكر السوربيتول – د (D-Sorbitol) فضلا عن قدرتها على أفراز الذيفانات الخلوية التي تكون سامة للخلايا الطبيعية لكلية القرود الخضراء (Verocells).

حضر الوسط الزرعي الأنتقائي SMAC في المختبر من المواد الأولية المتوفرة في السوق المحلية و تحديد صلاحيتها على أساس تخمر أو عدم تخمر سكر السوربتول و ذلك بتنمية بكتريا *E.coli* مشخصة على أنها غير مخمرة لسكر السوربتول وفق نظام التشخيص API 20 E وكذلك عزلات E.coli مشخصة على أنها مخمرة لسكر السوربتول وفق نظام التشخيص نفسه .

دلت النتائج عائدية (4) عزلات فقط لبكتريا *E.coli* النمط المصلي *E.coli* O157 : H7 وبنسبة (% 1.1) و قد يعود السبب في قلة عزلها الى تأثيرها بنمط التوزيع الجغرافي بصورة مباشرة , حيث أكدت العديد من البحوث في العالم أنخفاض نسبة عزل هذه البكتريا في دول العالم الثالث و الشرق الأوسط و منها العراق و أنتشارها بصورة مميزة في الجزء الشمالي من الكرة الأرضية و ربما يعود ذلك الى العادات الأجتماعية السائدة في تحضير الأطعمة [12].

يعد الباحث [13] أول من سلط الضوء على هذه البكتريا و الذي أكد بدوره أنها واحدة من أهم الأنماط المصلية المسؤولة عن أنتشار حالات الأسهال الدموي عند الأطفال في محافظة بغداد , حيث بلغت نسبة عزل النمط المصلي : *E.coli* O157 H7 (5 %) .

أن هذا التباين يعزى الى حساسية الطرق التي أتبعت في هذه الدراسة لتشخيص هذه البكتريا مقارنة مع الطريقة التي أستخدمها هذا الباحث و الذي أعتمد على طريقة الزرع على الوسط الصلب و الفحوص الكيموحيوية التقليدية بدون أستخدام نظام التشخيص API 20E . وقد شملت مراحل التشخيص خطوة أضافية تعزز النتائج التي تم الحصول عليها بوصفها خطوات تشخيصية تكميلية لهذه البكتريا منها التحري عن أفراز الذيفانات بأستعمال خلايا Vero Cells و أختبار نجريع صغار الفئران الرضع[3] .

المصادر Refrences

1. Well, J.G.; Davis, B.R.; Wachsmuth, I.K.; Riley, W.; Remis, R.S.; Sokolow, R.and morris .G.K. **1983,** *Laboratory investigation of hemorrhagic colitis out breaks associcated with arave Escherichia Serotype*.J.Clin . Microbiol.; 18:S 12 – S 20 .
2. Krishnan,C., Fitzgerald, V.A., Dakin, S. J. Behme, R.Parasitology . WHO , Geneva.
3. ALthwani, N.A.; Ashwaq, B.A., Haitham , A.B. ; **2003,** T*he effect of cytotoxins produced by Enteroheamorrhagic E.coliO157:H7 Isolated from bloody in children on suckling mice and vero cell.* J. Iraqi. Biotech. 2 (1): 128 – 141.
4. WHO, **1982,** *Diarrhoeal disease control program. Report of the second meeting of scientific working group on viral disease,*

microbiology, epidemiology, and vaccine. WHO, 3:1-23 .

5. WHO, **1991,** *Basic labrotory methods inmdical* . parasitology. WHO, Geneva.
6. Old, D.C. **1996,** *Vibiro, Aerromonas, Plesimonas, Campylobacter Arcobacter, Helicobacter, Wolinlla*. In:Cpllee, J.G. ; efal . Practical medical microbiology. 14th ed . Churchill Livingston .
7. Johnson, R.; McDonalds, L.and Gray, S. **1997,** *Improved detection andisolation of verotoxigenic Escherichia coli in mixed cultures.* P.P.108 .In 3rd International symoosium and work shop on shiga toxin (Vero Toxin) – producing Escherichia coli infections. lois joy Galler foundation for Hemolytic uremic Syndrome Inc. Melville , N.Y.
8. Sowers , E.G., Well S,J.G. , and strockbine . N.A. **1996,** *Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of Escherichis coli* .J.clin. Microbiol., 34:1286-1289.
9. Vandepitt, J.; EL-Nageh, M.M.; Tikhomirov, E. and selling, J.M. **1996,** *Guidelines for antimicrobial resistance surveillance*. WHO. Regional publication, Easterh Mediterranean series.
10. Bauer, A.W.; Kirby W.M,; sherries J.C.and Turk A. **1966,** *Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method*. American.J.Clin.Pathol.45:493-6 .
11. Konowalchuk, J. ; spears, J.I. and stavric, M. **1977,** v*ero response to cytotoxin of Escherichia coli.* Infect. Immun., 18:775-779.
12. Rierly, L.W.; Remis, R.S.; Helgerson, S.D.; Mc Geen, 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 avare Escherichia coli serotype .N.Engl* .J.Med., 308:681-685.
13. Al-Jeboori, Z.A., **1999,** *Isolation and Characterization of Enterohemorrhagic Escherichia coli from children in Baghdad* .M.SC .Thesis, AL-Nahrien college of Medicine, Al-Neh rien university.