جامعة القادسية
كلية التربيـــة
قسم علوم الحياة

دراسة الانواع البكتيرية المرافقة لحالات الاسهال لدى الاطفال

بحث تقدمت به
أمال مطر هاشم
رواء رحمن مكذل

مقدم الى كلية التربية وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس
في علـــــــوم الحيـــــــاة

بأشراف
د. رنـا صالح الطويـل

٢٠١٨م

بسم الله الرحمن الرحيم

وعنده مفاتيح الغيث لايعلمها الاهو ويعلم ما في البر والبحر وما

تسقط من ورقه الايعلمها ولا حبة في ظلمات الارض

ولا رطب ولا يابس الا في كتاب مبين

صدق الله العلي العظيم

الانعام (٢٩)

الاهداء

الهي لايطيب الليل الابشكرك ولا يطيب النهار الابطاعتك ولاتطيب الحظات الابذكرك

((الله جل جلاله))

الى من بلغ الرساله وادى الامان .. ونصح الامه .. الى نبي الرحمه ونور العالمين

((سيدنا محمد صلى الله عليه واله وسلم))

الى من كلله الله باللهيبه والوقار.. الى من علمني العطاء دون انتظار..

الى من احمل اسمه بكل افتخار ..

الى شمس العلم المضيئه على مر الزمان

((اساتذتي))

الشكر والتقدير

((رب اوزعني ان اشكر نعمتك التي انعمت علي وعلى والدي وان اعمل صالحا ترضاه وادخلني برحمتك في عبادك الصالحين)

سورة النمل (١٩)

الحمد الله رب العلمين حمدا يوافي نعمه ويكافى مزيده والشكر لله على ماوهبني من صبر وهدى وتوفيق تخطيت به الصعاب لانجاز هذا العمل والصلاة والسلام على الرحمه المهداة والنعمه المسداة نبينا محمد (ص) وعلى اله وصحبه وسلم

بشعور غامر بالتقدير والوفاء نتقدم بالشكر الخالص مقرونا بجزيل العرفان والامتنان الى كل من تفضل واثرى جوانب البحث سواء براي اوتوجيه اونصيحة اوساهم بجزء يسير وفي المقدمه الدكتوره (رنا صالح الطويل) على ماتفضلت به علينا من الاشراف والتوجيه على مالمسته من حسن خلقها وتواضعها ومناقشتها لنا بادب وحرصها الشديد على تنمية قدرات البحث واهتمامها الدائم فمهما كتبنا لن نستطيع ان نوافي حقها مع الشكر والامتنان فجزاها الله خير الجزاء ووفقها الله لفعل الخير دائما وابدا .

الخلاصة

تهدف الدراسة الى عزل المسببات البكتيرية من حالات الاسهال لدى الاطفال في مدينة الديوانية وفحص الحساسية الدوائية لهذه المسببات. جمعت عينات البراز من مجموعة من الاطفال في مستشفى النسائية والاطفال التعليمي. وبعد زرع العينات وتشخيص البكتريا تم الحصول على سبعة عزلات تعود الى Escherichia coli و Salmonella sp. و Shigella sp. وعند اجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية اظهرت معظم عزلات بكتريا القولون مقاومة لكل من المضادات تتراسايكلين وامبيسيلين و اريثرومايسين. اما بكتريا الشيجلا فقد كانت مقاومة لنفس هذه المضادات اضافة الى الكلورامفينيكول. في حين كانت السالمونيلا مقاومة للمضادين اريثرومايسين وتتراسايكلين فقط.

المقدمة

الاسهال هو زيادة في عدد مرات التبرز مع زيادة ميوعة البراز و نقص في تناسق البراز عن الحالة الطبيعية. ووفقا لمنظمة الصحة العالمية يصنف الاسهال الى اربعة انواع اعتمادا على الاعراض السريرية و كل منها تعكس امراضية مختلفة و هي: الاسهال المائي والاسهال الزحاري والاسهال المستمر والاسهال المزمن (WHO، ٢٠١٣).

تعد حالات الاسهال سبب مهم للامراضية و الوفيات بين الاطفال في الدول النامية. ففي كل سنة هناك تقريبا ١,٥ مليار حالة اسهال حول العالم و ٤ مليون وفاة في الاطفال بعمر اقل من خمس سنوات (Vargas واخرون،٢٠٠٤).

من الممرضات الاكثر شيوعا حول العالم المسؤولة عن الاسهال الحاد هي البكتريا (Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Salmonella spp, Vibrio cholerae, Yersinia enterocolitica و ,Aeromonas spp) والطفيليات المعوية مثلGiardia sp

Cryptosporidium sppو , Entamoebahistolytica و Blatidium coli. بالاضافة الى الفايروسات مثل Adenovirus, Norwalk virus وRotavirus (Stephan واخرون، ٢٠٠٩).

ان الطريق الشائع للاصابة بهذه الممرضات من خلال تناول الاطعمة والاشربة الملوثة بالبراز. وتشمل الاغذية الملوثة الشائعة البيض الخام و اللحم الخام ومنتجات الدواجن والاطعمة البحرية والاطعمة غير المطبوخة جيدا والخضروات الطازجة والطماطم.

ان الاعراض الشائعة لهذه الاصابات هي الاسهال والتقيؤ والغثيان والام البطن والغائط الدموي او المخاطي، وتشنجات وكذلك اعراض خاصة بالعدوى المعنية (Pandy واخرون، ٢٠١١).

تؤثر العوامل البيئية في توزيع وتنوع وشدة المرض، فالاسهال كما في امراض اخرى خاصة بالانسان يرتبط بتغير الموسم وطبيعة الطقس المحلي وعوامل بيئية اخرى. هذه العوامل تسهل انتشار المرض لان لها علاقة بالعوامل الممرضة والنواقل التي لها عوامل بيئية معينة مثالية لنموها وبقاءها وكذلك انتقالها (Kosek واخرون، ٢٠٠٣).

ان الاصابات الحادة بالاسهال بين الاطفال ترتبط بشدة بعوامل خطر تشمل سوء عمليات الصرف الصحي و النظافة وتجهيزات المياه غير الجيدة والفقر وسوء التغذية (Rebecca واخرون، ٢٠١٢). بعض عوامل الخطر هذه تتغير تبعا لعمر او فطام الطفل، وتقترن الرضاعة الصناعية بشدة بحالات الاسهال لدى الاطفال بعمر شهر الى ستة اشهر (Woldemicael واخرون،٢٠٠١)، ويؤدي سوء التغذية الى نقص في مناعة الجسم التي تقترن بالاسهال (Sally واخرون، ٢٠٠٦).

بحسب منظمة الصحة العالمية فان الاسهال يعد السبب الثاني المؤدي الى وفيات الاطفال دون سن الخامسة، اذ انه مسؤول عن قتل حوالي ٧٦٠,٠٠٠ طفل كل سنة (WHO، ٢٠١٣). عالميا هناك تقريبا ١,٧ مليار حالة اسهال سنويا بين الطفال دون الخامسة.

لقد اصبحت مقاومة المضادات الحيوية بين البكتريا المعوية السالبة لصبغة غرام ذات اهتمام عالمي مع تزايد سريع في اعداد الاحياء المقاومة للعديد من الادوية (Kosek واخرون، ٢٠٠٣).

العوامل المسببة الرئيسية للاسهال: رغم انه بعض حالات الاسهال تعود الى خلل في عمليات الايض او تهيج كيميائي او خلل عضوي الا ان الغالبية العظمى منها تسببها ممرضات معدية (Woldemicael واخرون،٢٠٠٠).

يعد الاسهال الناجم عن العدوى البكتيرية المعوية الاكثر انتشارا حول العالم وبالاخص في الدول الاستوائية والدول النامية حيث تسبب مشكلة حقيقية بين الاطفال والبالغين وكذلك الرضع. الاحياء الدقيقة المسببة متنوعة جدا وتضم: E.coli و Salmonella و Shigella و Campylobacter و Yersinia و Vibrio spp. و Clostridium difficile (WHO/UNICEF، ٢٠٠٩).

في الدول النامية تكون الاصابة بالبكتريا المعوية والطفيليات اكثر شيوعا من الفايروسات وترتفع في اشهر الصيف.

تعد بكتريا E. coli هي السائدة ضمن فلورا القولون، اذ تستوطن هذه البكتريا القناة المعدية المعوية لحديث الولادة خلال الساعات الاولى لحياته. عادة تبقى بكتريا القولون غير ضارة

للامعاء، ولكن في الاشخاص الذين يعانون من كبح المناعة او عندما تنتهك الحواجز المعدية المعوية فيمكن حتى للسلالات الطبيعية غير الممرضة ان تحدث اصابة.

ان الاصابة الناجمة عن بكتريا القولون المرضية قد تكون مقتصرة على السطوح المخاطية او يمكن ان تنتشر في كل الجسم. وهناك ثلاثة متلازمات سريرية تنتج عن الاصابة ببكتريا القولون الممرضة وهي اصابة القناة التناسلية و تسمم الدم وامراض الاسهال (Nataro و Kaper، ١٩٩٨).

تميز فئات بكتريا القولون المسببة للاسهال على اساس الميزات او الملامح المرضية اي عوامل الضراوة

Enterotoxigenic E. coli(ETEC) تسبب اسهال المسافرين. وتسبب اسهال لدى الرضع، وفي الاطفال في الدول النامية

Enteropathogenic E. coli(EPEC) نادرا ما تسبب مرضا لدى البالغين. تسبب مرض غالبا في الاطفال اقل من سنتين كما تسبب الاسهال المستمر

Enteroinvasive E. coli(EIEC) تسبب اسهال مخاطي دموي (دزنتري)

Enterohemorrhagic E. coli(EHEC) تسبب اسهال دموي والتهاب القولون النزفي الحاد

Enteroaggregative E. coli(EAEC) تسبب اسهال مائي عند الاطفال واسهال دائمي لدى الاطفال المصابين بفايروس نقص المناعة

تكون EIEC و EHEC غير موجودة (او ذات انتشار واطئ جدا) في بعض الدول النامية

الاعراض السريرية والتشخيص: ان التشخيص القطعي لانواع الاسهال غير ممكن، ويقسم الاسهال الى ثلاث انواع:

الاسهال الحاد: وجود ثلاث مرات او اكثر من الفقدان غير الطبيعي للغائط او غائط مائي خلال ٢٤ ساعة.

الزحار: وجود دم مرئي في الغائط

الاسهال المستمر: يبدأ اسهال حاد ويستمر لاكثر من ١٤ يوم

يجب ان يركز التشخيص السريري الاولي للمريض على تقيم شدة المرض ودرجة فقدان السوائل ومن ثم تحديد المسبب المحتمل في ضوء تاريخ المريض و الاعراض السريرية بما فيها صفات الغائط

تشمل اعراض الاسهال الحاد: ١- حمى وتكون موجودة بدأ لدى معظم الاطفال المصابين بفايروس روتا. ٢- غائط دموي يرافق الاصابة بالممرضات المنتجة للسموم الخلوية وليس

البكتريا المنتجة للسموم المعوية او العوامل الفايروسية. ٣- تقيئ عادة مع الاسهال الناتج عن الاصابة بالفايروسات او مع المرض الناجم عن اخذ السموم البكتيرية (مثل بكتريا المكورات الذهبية) كما انه عرض شائع في الكوليرا (WHO، ٢٠١٣).

وبالنظر لما مر سابقا فقد جاءت الدراسة الحالية للتحري عن بعض الانواع البكتيرية المرافقة لحالات الاسهال لدى الاطفال

المواد و طرق العمل

جمع العينات

جمعت (٢٥) عينة براز من الاطفال المراجعين والراقدين في مستشفى النسائية والاطفال التعليمي في الديوانية ووضعت بقناني معقمة ونقلت العينات الى المختبر لغرض زرعها.

تحضير الاوساط الزرعية

وسط اكار الدم Blood agar medium

تم وزن ٤٠غرام من مسحوق وسط الدم الأساس وأذيب في لتر من الماء المقطر ثم عقم بالموصدة بنفس الظروف المذكورة اعلاه. برد الوسط إلى درجة حرارة ٥٠°م تقريبا ثم أضيف حوالي ٥٠مل من الدم مع التحريك .صب الوسط في أطباق بتري ويترك ليتصلب .استخدم هذا الوسط للعزل الاولي للبكتريا ولتحديد قدرتها على حل الدم (MacFaddin،٢٠٠٠).

وسط ماكونكي MacConkey agar medium

حضر الوسط بحسب تعليمات المصنع. واستعمل للزرع الاولي لمعظم انواع البكتريا السالبة لصبغة جرام ولتفريق الانواع المخمرة للاكتوز من غير المخمرة. عقم الوسط بالموصدة (Collee *et al*., 1996).

وسط ماكونكي سوربيتول MacConkey Sorbitol agar medium

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم عقم بجهاز الموصدة. واستخدم الوسط لعزل بكتريا القولون الممرضة (Forbes واخرون، ٢٠٠٧).

وسط XLD

استخدم الوسط لعزل وتفريق السالمونيلا والشيجيلا عن بقية العصيات المعوية السالبة لصبغة جرام. حضر الوسط حسب تعليمات المصنع ثم عقم بالموصدة (Forbes واخرون، ٢٠٠٧).

وسط مولرهنتون Muller-Hinton agar

استخدم وسط مولرهنتون لغرض اختبار حساسية عزلات البكتريا تجاه المضادات الحياتية. حضر الوسط تبعا لتعليمات المصنع .عقم الوسط بالموصدة بدرجة ١٢١°م مدة ١٥ دقيقة.

زرع العينات

زرعت كل عينة على الاوساط الزرعية اغار الدم والماكونكي و ماكونكي سوربيتول و XLD بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

شخصت الانواع البكتيرية باستعمال عدد من الاختبارات، شملت:

١-المظهر الخارجي للمستعمرة: مثل كونها محللة للدم على وسط اغار الدم و نوع التحلل، او هل ان البكتريا مخمرة للاكتوز او غير مخمرة على وسط الماكونكي. بالاضافة الى لون المستعمرة وقوامها وغيرها من الصفات الظاهرية.

٢- الصفات الدقيقة للخلايا البكتيرية: اذ تم تحضير مسحة من المستعمرة البكتيرية على شريحة زجاجية وصبغت بصبغة جرام لتميز البكتريا الموجبة و السالبة للصبغة، اضافة الى التعرف على شكل الخلية البكتيرية.

٣- مجموعة الاختبارات IMVIC test: وتشمل هذه اختبار انتاج الاندول وفحص الاحمر المثيلي وفحص فوكاس-بروسكاور وفحص استهلاك السترات لتميز الانواع المعوية.

٤- اختبار الكتالايز: تم نقل جزء صغير من المستعمرة المكورات بواسطة عود خشبي على شريحة زجاجية ثم اضيفت قطرة من بيرو كسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز ٣٪ . تم الاستدلال على النتيجة الموجبة لهذا الاختبار بظهور فقاعات من الأوكسجين (Forbes وآخرون ، ٢٠٠٧).

اختبار الحساسية للمضادات الحياتية

اجري الاختبار وفقا لطريقة Kirby-Bauer الانتشار بالأقراص تم اخذ جزء من المستعمرات البكتيرية بواسطة لوب معدني ثم نشرت المستعمرة على وسط مولرهنتون بشكل يغطي جميع الوسط في الطبق .بعدها وضعت أقراص المضادات الحياتية على سطح الوسط وحضنت الاطباق بدرجة ٣٧°م مدة ١٨-٢٤ ساعة .

استخدمت في هذا الاختبار المضادات الحياتية التالية:-

Erythromycin و Ciprofloxacin و Chloramphenicol و Tetracycline و Gentamycin و Ampicillin.

تم قياس وتسجيل أقطار مناطق التثبيط وتصنيف حساسية العزلات للمضادات المستخدمة على إنها حساسة (S) أو متوسطة الحساسية (I) أو مقاومة (R) (CLSI ,2013) .

النتائج والمناقشة

شملت الدراسة حالات الاسهال لدى الاطفال دون سن الخمس سنوات، و كانت ٧ عينات فقط من اصل ٢٢ عينة موجبة الزرع للبكتريا المرضية اي بنسبة ٣١,٨%، وقد يعود السبب الى ان المسبب فايروسي او احد الطفيليات او ربما بسبب تناول المضادات الحياتية قبيل اخذ العينات.

عزلت بكتريا E. coli من ٥ عينات و بكتريا Salmonella sp. و Shigella sp. من عينة واحدة لكل منهما.

يساهم الاسهال بشكل كبير في سوء التغذية وخلل النمو اكثر من انواع العدوى الاخرى، والاسهال الناجم عن بكتريا القولون ربما يكون اشد من ذلك الذي يسببه فايروس الروتا بهذا الخصوص. ان المدى المتنوع من بكتريا القولون المسببة للاسهال و مستضداتها يعني ان الاطفال ربما يتعرضون لاصابات متكررة من قبل الانواع المختلفة دون وجود حماية مناعية (Okeke،٢٠٠٩).

اظهرت نتائج مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا القولون ان ٤ عزلات كانت مقاومة لمضاد tetracycline و ٣ عزلات مقاومة للمضادي erythromycin و ampicillin في حين كانت عزلتين حساسة لمضاد ciprofloxacin و عزلة واحدة فقط حساسة لكل من gentamycin و chloramphenicol (جدول ١).

جدول (١) الحساسية الدوائية للبكتريا المعزولة

	E. coli (no.)	Salmonella sp.	Shigella sp.
Ampicillin	R (3)	I	R
Chloramphenicol	S (1)	S	R
Ciprofloxacin	S (2)	I	I
Erythromycin	R (3)	R	R
Gentamycin	S (1)	S	S
Tetracycline	R (4)	R	R

لقد سجلت مثل هذه المقاومة سابقا من قبل Omar (٢٠١٥)، حيث كانت ٧٧,٣% من عزلات E. coli مقاومة للتتراسايكلين و ٥٤,٥% مقاومة لمضاد اريثرومايسين و ٥٠% مقاومة للامبيسيلين.
كما ان نتائج حساسية بكتريا القولون لمضادي الجنتاميسين و الكلورامفينيكول جاءت مشابهة لما حصل عليه Omar (٢٠١٥) الا انها مخالفة لما توصل اليه Saeed و اخرون (٢٠١٥) اللذين ذكروا بان ٩٤% و١٠٠% من عزلات E. coli كانت حساسة لهذين المضادين على التوالي.

كانت عزلة Shigella مقاومة لكل من تتراسايكلين و امبيسيلين و اريثرومايسين و كلورامفينيكول في حين كانت حساسة للجنتامايسين. تباينت هذه النتائج مع نتائج Saeed و اخرون (٢٠١٥) اذ وجدوا ان الشيجيلا كانت حساسة لمعظم المضادات المستخدمة ومنها الجنتامايسين. في حين اتفقت نتائج هذه الدراسة مع مع دراسة Omar (٢٠١٥).

اما بالنسبة لبكتريا السالمونيلا فقد كانت مقاومة لمضادات اريثرومايسين و تتراسايكلين وحساسة للجنتامايسين و كلورامفينيكول. في دراسة سابقة كانت جميع عزلات السالمونيلا حساسة للجنتامايسين و كلورامفينيكول اضافة الى التتراسايكلين (Saeed و اخرون، ٢٠١٥).

ان حالات الاسهال بالاخص الشديدة منها و تحديدا تلك التي تصيب الاطفال دون سن الخامسة تحتاج الى المزيد من الدراسات المتخصصة لغرض تشخيص الانواع البكتيرية بشكل دقيق ليس على مستوى النوع فقط وانما لتحديد الانماط المصلية ذات العلاقة كما هو الحال مع بكتريا القولون المسببة للاسهال.

المصادر

CLSI (2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty third informational supplement. 33(1). M100-S23.

Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, and Simmons A (1996): Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology, 14th ed. Churchill Livingstone, New York.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (2007). Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby, USA.

Kosek et al. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies puplished between 1992 and 2000. Bull Word Health Organ. 81(3): 197-204.

MacFaddin, JF (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Nataro J and Kaper J (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. CMR, 11(1): 142-201.

Okiki IN (2009). Diarrheagenic Escherichia coli in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. J Infect Dev Ctries, 3(11): 817-42.

Omar M (2015) Prevalence of enteric bacteria associated with diarrhoea in children less than five years of age and their sensitivity to antibiotics in Unguja island Zanzibar. MSc. Thesis. University of Tanzania.

Pandey P et al. (2011). Travelers diarrhea in Nepal: an update on the pathogens and antibiotics resistance. JTM. 18(2): 102-8.

Rebecca O et al. (2012). Influence of enteric bacteria, parasite infections and maturational status on diarrhoea occurrence among 6-60 months old children. The lancet 346:122.

Saeed A et al. (2015). Microbial aetiology of acute diarrhoea in children under five years of age in Khartoum, Sudan. JMM, 64: 232-37.

Vargas M et al. (2004). Etiology of diarrhoea in children less than five years of age in Ifakara, Tanzania. Control study. JCM, 70(50): 76-92.

WHO (2013). Fact sheet No. 330. Diarrhoeal disease.

WHO/UNICEF. (2009). Final report-diarrhoea. Why children are still dying and what can be done.

Wolemicael G (2001). Diarrhoeal morbidity among children in Eritrea: Environmental and social-economic determinant health popul. Nutr, 19:83-90.