عزل بكتريا *Vibrio cholerae* وتشخيص أنماطها الحيوية والمصلية وتحت المصلية من المرضى باستخدام Api 20 E والطريقة السريعة Rapid 20 E .

كفاح أحمد جاسم مختبر الصحة العامة المركزي

عزل بكتريا *Vibrio cholerae* وتشخيص انماطها الحيوية والمصلية وتحت المصلية المسببة لمرض الكوليرا من المرضى باستخدام Api 20 E والطريقة السريعة Rapid 20 E.

-:Abstract

This study was conducted to detect sertypes and subserotype of *V.cholerae* isolates causing cholera as one of the most epidemiological dengerous and wide spread disease in the world, chronic cases of such disease when untreated fastly lead to the death of patients. For this purpose (265) fecal samples were collected from patients suffered of watery diarrhea (cholera) in (11) governarates of Iraq for the period from April to November 2000. Api 20 E and Rapid 20 E Kits systems were used for bacterial identification. In addition to that sertyping have been also used to detect the serotype and subserotype of polyvalent (01) and monovalent (Ogawa and Inaba). Some biochemical tests were applied to investigate whether the isolates belonged to the results showed biotype Eltor or Classical biotype that (212) isolates were obtaned, (149) of them belonged to endemic biotype (01), (87) to Ogawa, (62) to Inaba and (63) were Non-01 types of *Vibrio chloerae*.

الخلاصة:-

أجريت الدراسة للتحري عن عزلات بكتريا الكوليرا بأنماطها المصلية وتحت المصلية المسببة لمرض الكوليرا والذي يعد من الأمراض الخطيرة واسعة الانتشار في أنحاء العالم، وتؤدي الحالات الشديدة إلى وفاة المرضى المصابين بهذا المرض.

جُمعت لهذا الغرض (265) نموذج براز من المرضى المصابين بالإسهال الكوليري من (١١) من محافظات العراق للفترة من نيسان لغاية تشرين الثاني عام 2000. استخدم نظام Api 20E ونظام Rapid 20 E الذي يستخدم لاول مرة في العراق لتشخيص ضمات الكوليرا معطياً النتيجة خلال أربع ساعات فقط، إضافة إلى استخدام المصول التشخيصية

لتحديد الأنماط المصلية وتحت المصلية من (01) Polyvalent و Monvalent (Ogawa) و (Indaba)، ووصولاً للتنميط الحيوي فقد استخدمت بعض الفحوصات الكيموحيوية لتحديد كون العزلات تابعة للنمط الحيوي الطور (Eltor) أو النمط التقليدي (Classical).

أشارت النتائج إلى إمكانية عزل وتشخيص (212) عزلة تابعة لأنماط مصلية مختلفة من بكتريا *V. cholerae* كان منها (149) عزلة تابعة للنمط المصلي (01) بتحت أنماطه المصلية Ogawa (87)،(62) Inaba، (63) للنمط المصلي Non-01.

المقدمة:

تعد الاصابة بمرض الكوليرا (الهيضة) والذي تسببه أنماط مصلية وتحت مصلية من بكتريا *V. cholerae* من الأمراض الوبائية والمتوطنة الخطيرة في كثير من دول العالم ولا سيما في البلدان النامية إذ تستوطن بكتريا الكوليرا في مناطق عديدة من العالم فهي متوطنة في جنوب شرق آسيا كالهند والسنغال، وتنتقل إلى مناطق أخرى من العالم بشكل متقطع ولاسيما في المناطق الحارة مسببة مرض الكوليرا المعروف منذ قديم الزمان والذي سبب هلاكات بشرية هائلة عبر التاريخ ولا يزال احدى المشكلات العالمية الخطيرة منذ عام ١٨١٧ وحتى يومنا هذا (3). وأشير ان الهجمات الوبائية السبعة للكوليرا سببتها بداية ضمات الكوليرا التابعة للنمط الحيوي التقليدي (Classical) ثم استبدلت بالنمط الحيوي الطور (Eltor) (٢). يعد النمط المصلي (01) متمثلا بتحت أنماطه المصلية Ogawa و Inaba من اكثر المسببات الشائعة للإصابة بمرض الكوليرا لما أحدثه من هجمات وبائية كثيرة في مناطق متعددة من العالم وتوطنه في مناطق اخرى. ومن المسببات الأخرى لهذا المرض النمط المصلي Non-01 والذي أدى الى تسبب هجمات وبائية مسبباً إصابات شديدة بالإسهال المائي الشبيه بالإسهال الكوليري (9).

جاءت هذه الدراسة لتهدف الى عزل وتشخيص الأنماط المصلية وتحت المصلية من بكتريا *V. choleare* المسببة لمرض الكوليرا باستخدام إحدى الطرائق الجديدة والسريعة لتشخيص أنواع الضمات المسببة للمرض في العراق وهي طريقة Rapid 20 E ومقارنتها مع طريقة Api 20 E، إضافة الى دراسة علاقة اشهر السنة بالإصابة بمرض الكوليرا، وتوزيع الإصابة بمختلف الضمات حسب محافظات العراق المشمولة بالدراسة.

المواد وطرائق العمل:-

تم جمع (265) نموذج براز مرضى الكوليرا من أحد عشر محافظة في العراق (بغداد، بابل، ديالى، كربلاء، نجف، ميسان، ذي قار، تأميم، ،نينوى، بصرة، واسط) للفترة من نيسان لغاية تشرين ثاني من عام 2000، إذ نقلت الى مختبر الصحة العامة المركزي في بغداد نماذج مستشفيات بغداد في حاويات بلاستيكية نظيفة ذات غطاء محكم الغلق فيما أرسلت الى المختبر المركزي نماذج المحافظات على الوسط الزرعي الناقل Sea salt water، وفي المختبر تم نقل جزء من كل نموذج الى الوسط الزرعي الاغنائي Alkaline peptone water وحضن بحرارة 37 °م لمدة (4-6) ساعات تحت ظروف هوائية. وبعد انتهاء فترة الحضن، نقل جزء من النمو البكتيري في وسط Alk-p.w وخطط (Streaking) على سطح أطباق بتري حاوية على أوساط زرعية تفريقية (وسط

الماكونكي) وانتخابية (وسط TCBS) وأغنائية وتشخيصية (وسط Blood) حضنت بعدها بحرارة 37 °م لمدة 24 ساعة وفقاً لتعليمات منظمة الصحة العالمية الواردة في (15)٠ وبعد تنقية البكتريا شُخصت بنظام Api 20 E كما وتم تشخيص عزلات بكتريا الكوليرا بنظام Rapid 20 E والذي أستخدم لأول مرة في العراق كإحدى الطرائق السريعة لتشخيص هذه البكتريا كما وتم تشخيص العزلات مصلياً بنوعين من المصول المضادة (Antisera) هي (01) Polyvalent و Monovalent (Inaba،Ogawa)، فيما حُددت الأنماط الحيوية للنمط المصلي (01) بالاعتماد على بعض التفاعلات الكيموحيوية من تحلل الدم وتفاعل الفوكس بروس كاور (VP) ودراسة حساسية العزلات للمضاد Polymexin B (50*u*).

النتائج والمناقشة:-

بعد ان تمت معاملة نماذج البراز المتمثلة بمجموعتين الاولى النماذج المستلمة من مستشفيات محافظة بغداد، والثانية النماذج المستلمة من محافظات العراق المشمولة بالدراسة على الوسط الزرعي النقل Sea salt water، زرعت النماذج من كلا المجموعتين على الاوساط الزرعية الاغنائية والتفريقية والتشخيصية. حيث شخصت العزلات بالاعتماد على صفاتها الشكلية على الاوساط الزرعية، إذ أظهرت العزلات على وسط TCBS لوناً اصفر دلالة على تخميرها لسكر السكروز (11)، فيما كانت العزلات شاحبة اللون على وسط الماكونكي بعد حضانة 24 ساعة لعدم قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز لكن عند اطالة فترة الحضن لمدة (2-6) أيام أدت إلى إعطاء المستعمرات لوناً ورديا كدلالة على تخميرها لسكر اللاكتوز بصورة بطيئة ومتأخرة (Late Lactose Ferment) وكما اشير الى ذلك (7) اما على الوسط الزرعي Blood agar فقد اعطت بعض المستعمرات من أنواع الضمات تحللاً كاملاً للدم نتيجة لامتلاكها أنزيم Haemolysin (6). وشخصت العزلات توكيدياً بنظام Api 20 E بعد حضانة ٢٤ ساعة وحسب الجدول التالي:-

جدول (1) نتائج اختبارات Api 20 E

الاختبار	النتيجة
ARA	-
AMY	-
MEL	-
SAC	+
RHA	-
SOR	-
INO	-
MAN	+
GLU	+
GEL	+
VP	+
IND	+
TDA	-
URE	-
H_2S	-
CIT	+
ODC	+
LDH	+
ADH	-
ONPG	+

وكذلك شخصت العزلات البكتيرية بالطريقة السريعة خلال (4) ساعات حضن فقط بنظام Rapid 20 E والذي استخدم لأول مرة في العراق وتعد طريقة مختصرة للوقت في حالة الوبائيات لأعطاء العلاج اللازم ونسبة الاصابات وحسب الجدول الاتي:-

جدول (2) نتائج اختبارات Rapid 20 E

الاختبار	النتيجة
VP	+
IND	+
GLU	+
RAF	-
TRE	+
SAC	+
MEL	-
CEL	-
RHA	-
ADO	-
XYL	+
ARA	-
ESC	-
MNT	-
PPA	-
CIT	+
URE	-
ODC	+
LDC	+
ONPG	+

جدول (3) توزيع الإصابة بمرض الكوليرا حسب الأنماط المصلية:

النمط المصلي	العدد	النسبة المئوية
(01)	149	%70
Non-01	63	%30

جدول (4) تحت الانماط المصلية لعزلات النمط المصلي (01) البالغة (149) عزلة

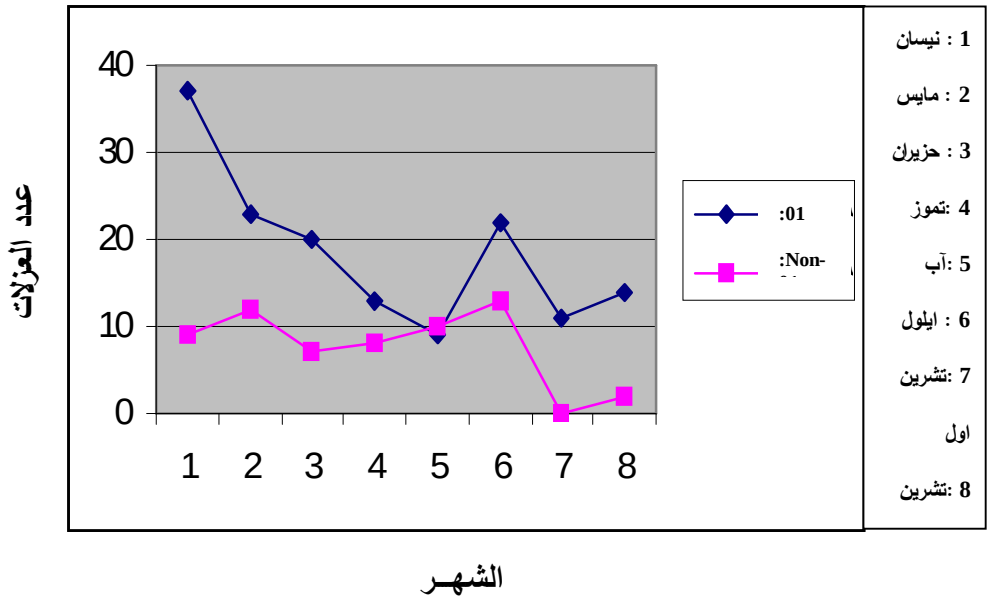
المجموع	عزلات النمط تحت المصلي			
	Inaba		Ogawa	
149	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد
	%42	62	%58	87

أن احتلال النمط المصلي (01) بتحت نمطيه المصليين Ogawa و Inaba أعلى نسبة قد يعود لكونه نمطاً متوطناً في محافظات العراق باعتباره واحد من أهم المسببات الرئيسية لمرض الكوليرا، وتتفق هذه النتيجة مع تلك التي توصل اليها بعض الباحثين (8,5).

جاءت نسبة النمط المصلي Non-01 بعد النمط المصلي (01) والذي سبب حالات وبائية في كثير من دول العالم نتيجة تسببه لحالات موسمية من الإسهال الشديد المشابهة للإسهال الكوليري (cholera like disease) (12). ولدى تنميط العزلات التابعة للنمط المصلي (01) حيوياً بالاعتماد على بعض التفاعلات الكيموحيوية، فقد أدت هذه العزلات إلى تحلل كريات الدم الحمراء للأغنام تحللاً كاملاً لامتلاكها أنزيم Haemolysin (4)، وكانت العزلات موجبة لاختبار (Vp) من خلال عدة الـ Api 20 E بتغير اللون إلى اللون الوردي الغامق. (10)، وعند إجراء فحص الحساسية الدوائية للمضاد polymexin B (50*u*) فقد أعطت العزلات نتيجة سلبية أي إنها مقاومة لهذا المضاد (13). ومن هذه الاختبارات أظهرت النتائج بان جميع العزلات التابعة للنمط المصلي (01) وهي (149) عزلة تعود للنمط الحيوي الطور (Eltor) ولم تظهر أي عزلة للنمط الحيوي التقليدي (classical) والذي اختفى عام ١٩٦٠ على الرغم من كونه شائعا في جنوب شرق اسيا كالهند لحد الان (14).

يلاحظ في الشكل (1) ان معدل حالات الإصابة بمرض الكوليرا قد أزدادت في شهر نيسان ثم قلت تدريجيا في اشهر مايس، حزيران، تموز ثم آب، بعدها بدأت نسبة الإصابة بالارتفاع ثانية خلال شهر أيلول ثم لتنخفض خلال شهر تشرين اول وبارتفاع بسيط في نسبة الإصابة خلال شهر تشرين ثاني، حيث تشير زيادة نسبة الإصابة بمرض الكوليرا خلال شهري نيسان وايلول الى اعتدال درجات الحرارة وتوفر الرطوبة النسبية من خلال تساقط بسيط في الامطار مما تعد من العوامل المشجعة على نمو وتكاثر بكتريا *V.cholerae* ، وفي إحدى الدراسات المماثلة لوحظ ازدياد حالات الإصابة بمرض الكوليرا خلال الأشهر الدافئة من السنة (١).

شكل (١) علاقة اشهر السنة بالإصابة بمرض الكوليرا.



أشارت النتائج التي تم الحصول عليها جدول (5) والخاصة بتوزيع الإصابة بمسببات مرض الكوليرا في محافظات العراق ان أعلى نسبة للإصابات 67% قد سجلت في محافظة بابل، فيما كانت محافظات ميسان وذي قار وديالى ونينوى الأقل في نسب الإصابة بمختلف المسببات (0.5%-3%)، في حين أظهرت بقية المحافظات نسب متباينة في الإصابة. ويعود السبب في اختلاف نسب وأعداد الإصابة بمرض الكوليرا المتسبب عن أنواع الضمات الى الظروف البيئية الملائمة من رطوبة نسبية وارتفاع وانخفاض في درجات الحرارة الملائمة لنمو مثل تلك المسببات، وكذلك للظروف الصحية الرديئة كقلة توفر الماء الصالح للشرب جراء النقص في تعقيم شبكات تصفية المياه في تلك المحافظات فضلاً عن سوء التغذية وقلة المناعة، كما وان للجانب البكتريولوجي (في مختبرات المستشفيات) دوراً مهماً في عزل وتشخيص أنواع الضمات المسببة لمرض الكوليرا من محافظة لاخرى.

وأظهرت نتائج جدول (5) ان أعلى معدلات الإصابة بمرض الكوليرا كان ذلك المتسبب عن النمط المصلي (01) والمتوطن في العراق وسجلت أعلى الإصابات في محافظة بابل فيما لم تسجل أية إصابة في محافظة ديالى بالنمط المذكور. اما بالنسبة للنمط المصلي Non-01 والذي يعد متوطناً في اغلب محافظات العراق فقد سجلت أعلى الإصابات في محافظة البصرة تلتها محافظات واسط وبابل وبغداد وديالى، في حين لم تسجل أية إصابة في المحافظات الأخرى.

جدول (5) توزيع الإصابة بمسببات مرض الكوليرا على محافظات العراق المشمولة بالدراسة.

المحافظة	*Vibrio cholerae*				المجموع	
	(01)		(Non-01)			
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
بابل	70	%47	13	%20	83	%67
بصرة	24	%16	25	%40	49	%56
واسط	14	%9	16	%26	30	%35
بغداد	15	%10	7	%11	22	%21
كربلاء	16	%11	0	0	16	%11
تأميم	1	%0.5	0	0	1	%0.5
نجف	4	%3	0	0	4	%3
ديالى	0	%0	2	%3	2	%3
نينوى	1	%0.5	0	0	1	%0.5
ميسان	2	%1.5	0	0	2	%1.5
ذي قار	2	%1.5	0	0	2	%1.5

Reference:-

1- Blake-PA (1993). Epidemiology of Cholerae in the America-Gastroenterd. Clin. North. Am. 22 (3): 639-660.

2- Glass, R-I;J-V; Hug. M.I.; Hossain, K.M. and Khan, M-R. (1983) Phage types of Vibrio cholerae 01 Biotype Eltor isolated from patients and family contacts in Bangladesh: Epidemiologic Implications. J. infect-Dis- 148 (6): 998-1004.

3- Guerrant, R.L.; Walker,D.H. and weller,P.F. (2000). Tropical Infection Diseases, Prenciple, Pathogens and Practic. 9th ed. Vol. I, W.H-O. churchill Living stone. London, Tokyo.

4- Gunhild, J.; Sabchez, J. and Mari, A.S. (1989). Expressing and Detection of Different Biotype-associated cell-bound Haemagglutinins of Vibrio cholerae 01. General Microbiology. 135,111-120.

5- Gupta A, Jain, S. and Mahawal, B S. (2000). Out break. Of choleara in arid zone of Bikaner. Indian, J. Med. Res, Iio: 126-127.

6- Holmgren, J; svennerhom, AM. And Lindblad, M. (1983). Receptor-Like. Glyco compounds in human milk that inhibit classical and Eltor Vibrio cholearae cell adherence (hemagglutination) Infection and Immunity, 39 (1): 147-154.

7- Levinson, M. and Jawetz, E (2000). Medical Microbiology and Immunology. middle East Edition Appletion and Lange. Puplication, Libraivie duliban, california.

8- Malmone, f.; Coppo, A; Pazzani, C., Ismail, S.O.; Guerra, R; Procacci, P.; Rotigliana, G. and omar, K.H. (1986). Clonal spread of Multiple Resistand strain of Vibrio cholerae 01 in Somalia. J. Infect. Dis-153 (4): 802-803.

9- Matsushita, S; Noguchi Y; Yanagwa., Y; Igarashi, H; Morita, K;Wada; H; Watando N, Shibta, M; Kananori-M; Kudoh, Y. and Shimada. T. (1998). Sporadic diarrhea Caused by Vibrio cholrae Non-01 and characterstic of the Isolated Kansensh ogaku-zasshi 71 (12):1204-1209.

10- Myrivk, Q.N. and Weiser, R.S. (1988). Fundamental of Medical Bacteriology and Mycology.2 nd ed., Lea. And fibiger. Philadelphia.

11- Salim-M.V. (1992). Features of Vibrio choleare 01-Eltor, Inaba seotype, Isolated during the cholera epidemic in cartagenua (colombia). Euferm-infect-microbiol. Clin 10 (9): 523-530.
12- Singh, D.V.; Tikoo, N. and Sangal, S.C. (1996). Production of the new cholera toxin by enviromental isolates of Vibrio cholerae Non-01-J. Med. Microbiol. 45:31-34.
13- Tamayo, M; Koblavi, Greimno, F.; Gastaned a, E. and Crimont, P.A.D. (1997). Molecular epidemiology of Vibrio cholerae 01 isolates from colombia. J-med- Microbiol-46:611-616.
14- Wilson, G.; Miles, A. and Parker, M.T. (1983). Topley and wilson's. principles of bacteriology, Virology and Immunity-7 th ed Vol. 2. Edward Arnold. London.
15- World Health Organization(1997). Guide Iine for cholera control. WHO Regional office for the Eastern Mediterranean.