

مرض الكوليرا في العراق والتحصين عن بعض عوامل الضراوة لضمات الكوليرا المعزولة محليا من حالات الاسهال

آمنة نعمة الثويني *

نورالايمن فاضل البياتي **

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٥/٩/٧

الخلاصة

اجريت الدراسة خلال الفترة من 1/6/2003 ولغاية 1/3/2004 واستهدفت :-
اجراء مسح احصائي عن مرض الكوليرا في العراق للفترة من 1980 ولغاية 2003 وتبين ان مرض
الكوليرا متوطن في العراق وأن أعلى عدد للاصابات سجل في عامي 1998-1999 ويزداد انتشار المرض
خلال الحروب وفي الأجواء الحارة الرطبة .
اجراء دراسة بكتريولوجية استخدمت فيها الأوساط الانتقائية والاختبارات الكيموحيوية والفحوص
المصلية ونظام *Api* أمكن عن طريق هذه الاختبارات تشخيص 9 عزلات بكتيرية فقط تعود الى النوع *Vibrio*
cholerae , ثمانية (8) من هذه العزلات (88.8%) تعود الى النمط المصلي O1 وعزلة واحدة تعود للنمط
المصلي غير الملز *NAG* وبنسبة (11.1%).
التحصين عن بعض الفعاليات الحيوية لعزلات ضمات الكوليرا كانتاج الهيموليسين وانتاج انزيم اليوريز
و انزيمات البروتيز الخارجية (الجلوتينيز) والفوسفولايبيز , وامتلاك البكتريا لعامل الاستيطان الاول المقاوم
لسكر المانوز وأظهرت النتائج ما يلي :
ان جميع العزلات منتجة للهيموليسين من نوع الفا (*α-hemolysin*) في حين لم تنتج أيا منها الهيموليسين من
نوع بيتا (*β-hemolysin*) , كما تبين عدم قدرة أيا من هذه العزلات على انتاج اليوريز , وظهر أن (7) فقط
من هذه العزلات وبنسبة (77.7%) قادرة على انتاج أنزيمات البروتيز الخارجية , و (6) عزلات (66.6%)
تملك القدرة على انتاج انزيم الفوسفولايبيز , و(4) عزلات (44.4%) تمتلك عامل الاستيطان الأول المقاوم
لسكر المانوز.

المقدمة

بشكل اسهال مميت يتميز المرض بهجوم
مفاجيء حاد مصحوب باسهال مائي غزير شبيه
بماء الرز *rice water stool* يستمر طوال فترة
الاصابة [1] ويعد الماء والغذاء الملوثان
بالضمات *Vibrio cholerae* المصدران
الأساسيان لانتشار المرض [2], وكان يعتقد سابقا
بان الانسان هو المستودع *reservoir* الوحيد
لهذه البكتريا [3,4]. الا ان الدراسات الحديثة
اكدت بان المستودع لهذه البكتريا هو البيئة
المائية [5]. كما ان اول من اكتشف علاقة الماء

مرض الكوليرا (الهيضة) Cholera:

يعد مرض الكوليرا *Cholera* (الهيضة)
من الامراض الخطيرة الواسعة الانتشار في العالم
لكونه من امراض الاسهال البائية و المتوطنة في
كثير من دول العالم ولاسيما في البلدان النامية. اذ
يكون ذا حدة مرضية عالية واحيانا يكون

* استاذ مساعد معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا/جامعة بغداد.
** دكتوراه معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد

بانتشار وباء الكوليرا هو *John Snow* عام 1849 في لندن [2,3,6].

ضعف المناعة _ فقد تزامن حدوث مثل هذه الأمراض الوبائية في تلك الفترات.

وبناء على ما تقدم فقد تم اجراء مسح لانتشار مرض الكوليرا في العراق لأكثر من عقدين من الزمن وتوصيف البكتريا *V. Cholerae* المعزولة محليا والتحري عن بعض العوامل والفعاليات الحيوية التي تزيد من ضراوة البكتريا في احداث المرض و التحري عن عامل الاستيطان الاول المقاوم لسكر المانوز.

طرائق العمل:

1. المسح الاحصائي :

تم اجراء المسح الاحصائي و ذلك بالاعتماد على المعلومات (الارقام) الاحصائية المسجلة عن مرض الكوليرا في السجلات الاحصائية لمركز السيطرة على الامراض الانتقالية في مدينة بغداد و الدراسات السابقة بهذا الخصوص .

2. التشخيص Identification :

تم اجراء هذه الدراسة للفترة من 2003/6/1 الى 2004/3/1 وتم فيها الحصول على 9 عزلات بكتيرية معزولة عزلا أوليا من حالات الاسهال في مختبر الصحة العامة المركزي في محافظة بغداد و شخصت بكتريا ضمات الكوليرا بالاعتماد على (Cruickshank etal, 1975^[12]; Harrigan etal, 1976^[13]; Old, 1996^[14]); المستخدمة من قبلهم وكما يأتي :

الفحص المجهرى باستخدام صبغة غرام

. Gram stain

الصفات الزرعية للمستعمرات :

درست الصفات المظهرية لمستعمرات البكتريا المعزولة بعد تنميتها على الاوساط (Nutrient agar, Blood agar, MacConkey agar & TCBS agar) وشملت هذه الصفات شكل المستعمرة وحجمها ولونها وحوافها ونوع التحلل الذي احدثته على وسط الدم الصلب.

الفحوص الكيموحيوية : لغرض تأكيد

الفحص المجهرى اجريت الفحوص الكيموحيوية

ان مرض الكوليرا تسببه انواع وأنماط مصلية مختلفة من بكتريا *V. cholerae* [7] وهذه البكتريا تعود الى جنس *Vibrio* التابعة الى عائلة الضمات *Vibrionaceae* [5] التي تتشابه مع العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* في بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية حيث ان كلاهما سالبة لصبغة الغرام ومنتجة لأنزيم *Catalase* ولكونهما من الممرضات المعوية المسببة للاسهال ويمكن التمييز بينهما عن طريق اجراء اختبار *Oxidase* الذي يكون موجبا للضمات وسالبا بالنسبة للبكتريا المعوية [1,4,5]. ان الموطن الطبيعي للضمات هي المياه العذبة والمالحة اعتمادا على نوع البكتريا .

تسببت جرثومة *V. cholerae* في سبعة اوبئة من عام 1817 كان النمط التقليدي *Classical V. cholerae O1* هو المتسبب بالوبئة الستة الاولى حيث تم عزلها منذ الوباء الثالث [9] بينما كان المتسبب في الوباء السابع الذي انتشر في عام 1960 عبر اسيا والشرق الاوسط واوربا وافريقيا هو النمط الحيوي الطور *El-tor V. cholerae O1* ، ومنذ ذلك الحين بدا النمط التقليدي *Classical V. cholerae O1* بالانحسار واخذ النمط الحيوي الطور في الانتشار وقد انتقل الوباء الى العراق وايران عن طريق التجارة عام 1965-1966 [10]. ينتشر الكوليرا غالبا خلال اشهر الصيف نتيجة لتأثر عملية نمو وتضاعف الضمات (تكاثرها) باجواء البيئة المحيطة او لتداخل الفصول في سلوكيات الانسان الذي يكون اكثر اتصالا بالماء خلال فصل الصيف، وبعد ان يصاب الانسان يصيح وسيلة لنشر المرض [1] كما ان الاصابة بدون ظهور اعراض *Asymptomatic* يكون وسيلة لنشر المرض اذ يطرح الشخص المصاب سواء الذي ظهر عليه الاعراض او لم يظهر (الحامل للمرض) في البراز حوالي $10^6 - 10^8$ جرثومة/ غم من البراز [11].

وخلال ما يقرب الثلاث عقود الأخيرة نتيجة للظروف التي مر بها العراق من حروب وحصار امتد لأكثر من عشر سنوات وما لحقه من تدمير في شبكات الصرف الصحي وشبكات المياه وظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية نتيجة للاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية فضلا عن

التشخيص بنظام Api 20E :

النتائج والمناقشة

١. المسح الاحصائي :

لكون مرض الكوليرا من اخطر امراض الاسهال والذي يعد من الامراض الوبائية والمتوطنة في مناطق عديدة من العالم وخاصة في دول قارة اسيا (جنوب وشرق القارة) ومنها العراق حيث يكثر مسبب المرض في المناطق ذات الرطوبة العالية ومنها الانهار والمسطحات المائية وكذلك في المناطق الكثيفة بالسكان. وفي ظل الاحداث الجسيمة التي مر بها العراق خلال العقود الاخيرة حيث تزامن حدوث مثل هذه الامراض الوبائية في تلك الفترة. اذ كان لشحة المياه الصالحة للشرب وعدم كفاءة تعقيمها لقلة مواد ووسائل التعقيم بسبب الحصار الاقتصادي فضلا عن تدمير البنية التحتية لبلدنا نتيجة للحروب الطاحنة التي مر بها ومن ضمنها تدمير شبكات الصرف الصحي وشبكات مياه الشرب وللأعمال التخريبية التي لحقت بها خاصة خلال وبعد الحرب الأخيرة فضلا عن ضعف المناعة ، لكل هذه الأسباب والعوامل التي كان لها الأثر الملحوظ في انتشار مرض الكوليرا من جديد في معظم محافظات العراق وأن مئات الأطفال والتي تقل أعمارهم عن عشر سنوات كانوا هم الأكثر عرضة للإصابة بهذا المرض إضافة للفئات العمرية الأخرى ومن كلا الجنسين الذكور والاناث [16,15].

لذا تم اجراء هذه الدراسة لمعرفة مدى انتشار المرض في العراق وفق ما سجل من معلومات في احصائيات مركز السيطرة على الامراض الانتقالية عن مرض الكوليرا في العراق والدراسات السابقة بهذا الخصوص من عام 1980 ولغاية عام 2003 والمبين في الجدول والشكل (1). واستنادا على المعلومات المسجلة تبين ان مرض الكوليرا مرض متوطن في العراق حيث تم عزل مسبب المرض ودراسته من قبل عدد من الباحثين على مدى الاعوام السابقة (الكرخي، 2001^[16] ; جابك، 2000^[17] ; دياب، 2001^[18] ; القريشي، 2001^[19] ، Amili ، 2001^[20] ; Yousif, 1993 ; (Al - 2001).

تم استخدام نظام *Api 20E* وذلك لتأكيد تشخيص البكتريا المعزولة ، واستعمل هذا النظام استنادا الى ما ورد عن شركة (*bioMerieux*) الفرنسية، وهو عبارة عن نظام كيموحيوي لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة الغرام ويشمل 20 فصصا كيموحيويا . اذ يتالف هذا النظام من شريط يحوي على ركائز فحص مجففة (*dehydrate test substances*) في انابيب دقيقة مفردة حيث يعاد تعليقها (*reconstitution*) من خلال اضافة كمية مناسبة من عالق البكتريا المراد دراستها . وبعد حضن الشريط في درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة دونت النتائج وفسرت بالاعتماد على (*Api 20E analytic profile index*) . وتم اجراء هذا الاختبار في مختبر الصحة العامة المركزي.

الفحص المصلي Serotyping :

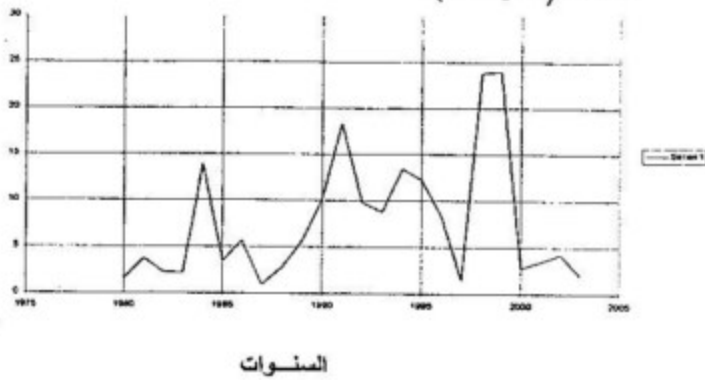
تم اجراء الاختبار باستخدام طريقة الشريحة الزجاجية في مختبر الصحة العامة المركزي وذلك باستعمال مصل الضمات متعدد التكافؤ (المضاعف) التابعة للنمط المصلي *O1* (*Polyvalent-O1*) حيث توضع قطرة من المصل المضاعف وقطرة من المصل الاحادي لكل من النمطين *Inaba* و *Ogawa* كل على حدة على سطح الشريحة الزجاجية ويمزج معها قطرة من المزروع البكتيري وتفحص تحت المجهر . حدوث التكتل (التلازن) في احدى القطرات دليل على تحديد الشكل المصلي.

3. التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا ضمات الكوليرا :

التحري عن الأتريزيمات المنتجة من قبل البكتريا :

تم التحري عن أنزيم *Urease* وأنزيم *Protease (gelatinase)* وأنزيم *Phospholipase* . تحري عن انتاج أنييمولابسين على وسط ثند الصلب. وكذلك تم التحري عن مستضدات عامل الاستيطان بطريقة تلاكزن كريات تم نحمر لانسان بوجود سكر امتوز [12,14].

للحاملين (*carriers*) وهو (5976) في عام 1999 (جدول ١).



شكل (١): رسم بياني لعدد الاصابات بمرض الكوليرا للفترة من عام ١٩٨٠ ولغاية ٢٠٠٣ في العراق.

كذلك ارتفع عدد الوفيات في السنوات الاخيرة من جراء الاصابة وذلك لعدم توفر العلاجات المناسبة للمرض ومقاومة البكتيريا لمعظم المضادات الحيوية التي كانت تستخدم في العلاج اذ ادى الاستخدام العشوائي لهذه المضادات ودونما تمييز وخاصة في الحالات البسيطة *mild* الى سرعة استهلاك المخزون منها وسرعة نشوء مقاومة لدى ضمامت الكوليرا ضدها لذا عند العلاج يجب اختيار المضاد الحيوي المناسب كما يجب النظر بعين الاعتبار الى الانماط المحلية المقاومة للمضادات اي اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية للبكتريا المعزولة قبل استخدام العلاج وعلى ضوء نتائج فحص الحساسية يصرف العلاج.

2. العزل والتشخيص:

اجريت هذه الدراسة للفترة من 2003/6/1 الى 2004/3/1 وتم فيها الحصول على 9 عزلات بكتيرية ، وبعد اجراء الفحوصات التشخيصية المجهرية والزرعية والكيموحيوية والمصلية في مختبر الصحة العامة المركزي في محافظة بغداد تم تأكيد عائدة العزلات الى جنس *Vibrio*. وظهرت البكتريا بشكل عصيات صغيرة منحنية *curved* او شبيهة بالضممة *comma-like* او بشكل حرف S ذات نهايات مستديرة او مدببة ، وتكون متحركة سريعة ونشطة لامتلاكها لسوط قطبي مفرد وتترتب بشكل مفرد او ازواج او سلاسل من البكتريا مكونة شكل حرف S، ويتحول الشكل المنحني او الضمي الى الشكل المستقيم عند

جدول (1) : عدد الاصابات والحاملين والوفيات بمرض الكوليرا من عام 1980 وحتى عام 2003 .

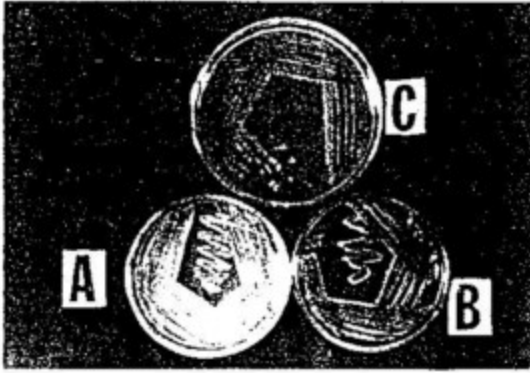
سنة	الاصابات	الحاملين	وفيات	سنة	الاصابات	الحاملين	وفيات
1980	*238	-	-	1992	976	347	-
1981	*370	-	-	1993	877	467	-
1982	*234	-	-	1994	1343	212	-
1983	*219	-	-	1995	1216	1	-
1984	*1402	-	-	1996	831	-	-
1985	*233	-	-	1997	*150	-	-
1986	*368	-	-	1998	*2376	1671	25
1987	*94	-	-	1999	2397	5976	34
1988	*382	-	-	2000	277	480	3
1989	*567	-	-	2001	354	250	6
1990	1027	613	-	2002	423	313	7
1991	1844	463	-	2003	195	2	30

* (الكرخي، 2001)

وقد وجد بان اعلى نسبة للاصابات سجلت خلال الاعوام 1998 - 1999 حيث بدأ عدد الاصابات بالارتفاع في عام 1998 وبشكل ملحوظ وبلغت ذروتها في عام 1999 وفي خلال نفس الفترة - في صيف 1998 ظهر وباء الكوليرا في طهران ، ايران تم فيها عزل 110 عزلة تعود الى نمط الطور *El-tor V.cholerae O1* والى النمط المصلي *Ogawa* [21] مما يدل على انتشار الوباء في كل من العراق وايران في نفس العام . ان اكثر الاعمار التي ظهرت فيها الاصابة بالكوليرا كانت في الاطفال بعمر 2-9 سنوات اما الاطفال الاصغر من سنتين هم اقل عرضة للمرض وذلك ربما للمناعة المكتسبة من الأم عن طريق الرضاعة [15] وان الاناث اكثر اصابة من الذكور [1]. لقد اشارت العديد من البحوث الى ان اكثر المصابين بالكوليرا كانوا من ذوي فصيلة الدم O حيث كانوا الاكثر تعرضا من افراد فصيلة الدم AB للاصابة [1,2]

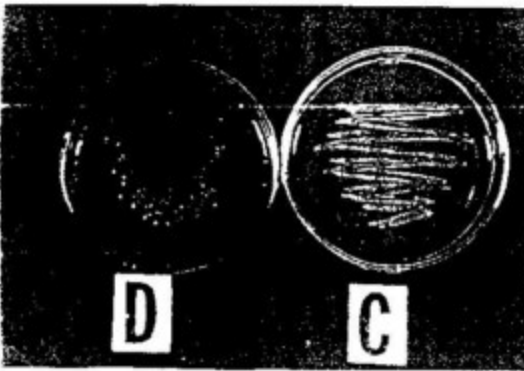
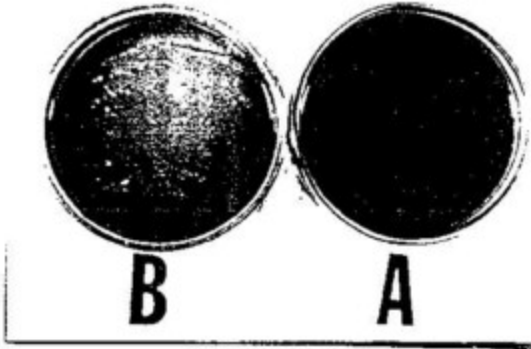
وحسب ما ورد في احصائيات مركز السيطرة على الامراض الانتقالية نلاحظ احد العلامات الخطرة للمرض الا وهي وجود اشخاص حاملين للمرض (اصابة مزمنة او اصابة بدون ظهور اعراض *Asymptomatic*) اذ يستمر الاشخاص الحاملين للمرض في طرح البكتريا في البراز على الرغم من عدم وجود اعراض سريرية اذ يطرح الشخص المصاب حوالي 10^7 - 10^8 جرثومة/غم من البراز [4] ، وقد سجل اعلى عدد

الأغاثائية الخاصة بضمات الكوليرا والمنشطة لها
[7,10,14].



شكل (2) : الطراز المظهري لمستعمرات بكتريا *V.cholerae*
على الأوساط الزرعية :

A. وسط المغذي الصلب. B. وسط الدم الصلب.
C. وسط الماكونكي الصلب.



شكل (3) : الطراز المظهري لمستعمرات بكتريا *V.cholerae*
على وسط TCBS .

A. وسط TCBS قبل الزرع. B. وسط
TCBS بعد زرعها وحضنها لمدة 24 ساعة.
C. الوسط بعد زرعها وحضنها لمدة 48 ساعة. D.
الوسط بعد زرعها وحضنها لمدة أكثر من 48 ساعة.

تكرار زرع البكتريا على الأوساط الزرعية لعدة
مرات *subculture* [7,22] تنمو البكتريا في مدى
واسع من درجات الحرارة يتراوح ما بين
(16-40) °م الا ان الدرجة المثلى لنموها هي 37
°م في حين انها تموت بدرجة 56 °م لمدة نصف
ساعة كما يتراوح الأس الهيدروجيني *pH* لنموها
ما بين (8.2-9.1) وهي حساسة للحموضة حيث
انها تقتل في *pH* أقل من 5 وتتميز بكونها مخمرة
لسكر *dextrose* ، *mannose* ، *sucrose* ،
glucose و *mannitol* ، *trehalose* بدون
انتاج غاز غير مخمرة لسكر *Lactose* او تخمره
ولكن ببطء وغير مخمرة لسكر *arabinose* ،
dulcitol او *inositol* كما تنمو على معظم
الأوساط الزرعية الاعتيادية والانتخابية
selective والأغاثائية *enriched* تحت ظروف
هوائية وهي الأفضل لنموها ويمكنها النمو في
ظروف لاهوائية (لاهوائية اختيارية *facultative*
anaerobic) كما تنمو في الأوساط الخالية من
ملح الطعام *NaCl* وبوجوده ويعتبر تركيز 3%
من *NaCl* هو الأمثل لنموها.

تظهر مستعمرات ضمات الكوليرا على وسط
المغذي الصلب *Nutrient agar* (وسط اعتيادي)
بعد حضانه لمدة 24 ساعة دائرية محدبة وملساء
بقطر 1-2 ملم وذات لون شفاف بينما تظهر
مستعمراتها على وسط الماكونكي الصلب
MacConkey agar (وسط تقريفي) بعد
حضانه 24 ساعة باهتة ويتحول الى اللون
الوردي بعد حضن لفترة طويلة لأنها تخمر سكر
lactose ببطء اما على وسط الدم الصلب *Blood*
agar (وسط اغاثائي) فتظهر مستعمراتها
داكنة اللون وقد تحلل الدم فارزة انزيم
haemolysin (شكل ٢) كما هو الحال في النمط
الحيوي الطور بينما لا يظهر النمط الحيوي
التقليدي ذلك لأنه لا يفرز هذا الأنزيم اما على
الأوساط الانتخابية مثل وسط *Thiosulfate*

Citrate- Bile salt-Sucrose TCBS
agar فتظهر مستعمراتها بعد حضن 24 ساعة
مسطحة *flat* صفراء اللون لتخميرها
لسكر *Sucrose* وبقطر 2-3 ملم و باستمرار
الحضانه يتحول لون المستعمرات الى
الأخضر لاستهلاك سكر *sucrose* (شكل ٣) ،
كما يعتبر وسط البيبتون القاعدي السائل
من *Alkaline peptone water*

٤. التشخيص بنظام *Api 20E* :

تم اجراء فحص *Api 20E* للعزلات في مختبر الصحة العامة المركزي. واكدت نتائج الفحص عائلية العزلات الى جنس *Vibrio* والى النوع *cholerae* (شكل ٤) .

٥. الفحوص المصلية :

تم اجراء الفحوص المصلية واطهرت النتائج عائلية 8 عزلات الى النمط المصلي O1 و عزلة واحدة تعود الى النمط المصلي غير الملزن *Non-agglutinin V.cholerae* (NAG) كما ظهر أن العزلات الثمانية من النمط المصلي O1 تعود الى النمط الحيوي الطور *El-tor biotype*. وهو النمط الحيوي المسبب لاغلب حالات الاسهال الكوليري في العراق والدول المجاورة فيما يعد النمط الحيوي التقليدي هو الشائع في جنوب شرق آسيا كاليهند [23]. وأشار ^(٢٢) *Cruckshank* وجماعته (1974) بان نمط الطور هو الاكثر شيوعا في احداث الإصابة لكنه أقل امراضية من النمط التقليدي اذ تبلغ نسبة الوفيات لنمط الطور 1% بينما تصل الى ١٠% في النمط التقليدي. وان عدد الحاملين لنمط الطور يفوق عدد الحاملين للنمط التقليدي كما ان نمط الطور أكثر مقاومة من النمط التقليدي للعوامل الكيميائية وأنه يبقى في الطبيعة وعند الأشخاص المصابين لفترة أطول [1,3].

شكل (4) : الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *V. cholerae*

باستخدام نظام *Api 20E* .

ومن خلال هذه النتائج نجد ان هذه الانماط المصلية والنمط الحيوي الطور منتشرة بدرجة كبيرة في معظم الدول التي يظهر فيها مرض

الكوليرا وخاصة في المتوطنة منها. كما نجد ان هذه الانماط هي الاكثر انتشارا في العراق [15,16,17,18,19,20] حيث تم عزل هذه الانماط ودراستها على مدى الاعوام السابقة، فقد وجد ان السلالات المعزولة من حالات الاسهال نتيجة الإصابة بمرض الكوليرا في مدغشقر عام 1999 وفي جزيرة *Comoros* عام 1998 [24] وفي ايران عام 1998 [21] وفي الهندوراس منذ عام 1991 [25] تعود جميعها الى النمط المصلي O1 والى النمط الحيوي الطور *El-tor*. كما كانت هي الاكثر انتشارا في حالات الإصابة التي حدثت في دول امريكا الجنوبية عام 1991، حيث انتشر الوباء في القارة [٦] وفي الهند وبنغلاديش [1] وفي دول القارة الافريقية في كينيا وزائير وغينيا واوغندا عام 1995-1994. [9]

ان النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية تتفق مع الدراسات في بلدان اخرى من العالم حول سيادة انتشار النمط المصلي O1 في حالات الإصابة بالكوليرا الا انه وجد ان النمط المصلي غير الملزن *Non-agglutinin V.cholerae* (NAG) هو الاكثر انتشارا في جنوب وشرق الهند عندما حصل فيها الوباء عامي 1992-1993 [28] وفي تايلند [27]. ان نتائج الدراسة الحالية تشير الى ان السلالات المعزولة من حالات الاسهال لها القدرة على احداث الإصابة ويعود ذلك الى قابلية البكتريا على انتاج سموم معوية كما ان هذه البكتريا تمتلك عوامل ضراوة متعددة تشترك في احداث الإصابة وقد تم التحري عن بعض هذه العوامل في هذه الدراسة .

معتمة نتيجة لترسب كلوريد الزئبق $HgCl_2$ مما يدل على ان بكتريا الكوليرا تنتج انزيمات *Protease* الخارجية بفعالية وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره كلا من (١٧) و(٢٩) جدول (2). ان بكتريا الكوليرا التي لها القابلية على انتاج انزيمات *Protease* الخارجية تكون عالية الضراوة وذلك لارتباط انتاج الانزيمات المحللة للبروتين مع فعالية انتاج السموم [30] لقد اشار ^[29]Young وجماعته (1982) الى ان هناك ثلاثة انواع من الانزيمات المحللة للبروتين تنتجها بكتريا الكوليرا حيث وجد ان النوع الاول قادر على تحفيز انتاج السم على الرغم من ان انتاجه قليل وهذا ينتشر بين الانواع البرية *wild type* لبكتريا الكوليرا . اما النوع الثاني فانه ينتج بكميات كبيرة ويلعب دورا مهما كعامل ضراوة من خلال قدرته على تحطيم الكلوبين المناعي *IgA* و تحطيم بروتينات انزيم *DNase* لبكتريا الكوليرا وبذلك يعطي قدرة للبكتريا على اختراق الطبقة المخاطية للأمعاء وبالتالي يساعد في استيطان اغشية الامعاء عند الاصابة ببكتريا الكوليرا، اما النوع الثالث فانه لم يحدد دوره بشكل واضح في امراضية البكتريا.

كما تم الكشف عن قابلية العزلات على انتاج انزيم *Phospholipase* وظهرت النتائج بان 6 عزلات فقط لها القدرة على انتاج هذا الانزيم وتم الاستدلال عليه من خلال ظهور هالة شفافة حول مناطق الزرع البكتيري على وسط مح البيض *Egg-yolk media* وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكرته الباحثة (١٧) و(٣١) (جدول 2) وعن قدرة بكتريا الكوليرا على افراز هذا الانزيم.

ان قدرة البكتريا على انتاج انزيم *Phospholipase* تزيد من ضراوتها وقابليتها على احداث المرض وذلك لارتباط افراز هذا الانزيم مع فعالية انتاج السموم واحداث الاسهال حيث يعمل *Phospholipase* على اطلاق *Arachidonic acid* من الدهون الفسفورية *Phospholipids* الموجودة في الغشاء الخلوي لخلايا الامعاء . يعد *Arachidonic acid* الحجر الاساس في عملية تصنيع البروستاغلاندين *Prostaglandin E2* (*PGE2*) - الذي يعمل على زيادة طرح السوائل من الخلايا المعوية الى تجويف الامعاء- ومن ثم احداث الاسهال المائي [4].

3- التحري عن بعض عوامل

الضراوة في بكتريا الكوليرا

V.cholerae

A-التحري عن قابلية العزلات على انتاج

الهيموليسين:

تم فحص قابلية العزلات على انتاج الهيموليسين وقد اظهرت النتائج بان جميع العزلات منتجة للهيموليسين من نوع الفا على وسط اكار الدم الحاوي على 7% من دم الانسان مما يعطي دليلا اكيدا على ان العزلات قيد الدراسة تعود الى النمط الحيوي *El.Tor* كما اظهرت الدراسة بان جميع العزلات غير قادرة على انتاج الهيموليسين من نوع بيتا β *hemolysis* المحلل للدم بشكل كامل جدول (2).

ان الهيموليسين المنتج من قبل بكتريا الكوليرا يساعد البكتريا في الحصول على الحديد الذي تحتاجه وهو من العوامل المساهمة في امراضية بكتريا الكوليرا كما ان سلالات بكتريا الكوليرا المنتجة للهيموليسين تكون فعالة في احداث المرض اكثر من السلالات غير المنتجة له. وتملك سلالات بكتريا الكوليرا النمط الحيوي *El.Tor* القدرة على انتاج الهيموليسين بينما يكون النمط الحيوي التقليدي غير قادر على انتاجه [4,7].

B-التحري عن قابلية العزلات على انتاج

انزيم اليوريز *Urease* و البروتيز *Protease*

و الفوسفولايبيز *Phospholipase* .

تم فحص قابلية العزلات على انتاج انزيم *Urease* وظهرت النتائج بان جميع العزلات غير منتجة لانزيم *Urease* وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره [14].

كما تم اختبار قابلية العزلات على انتاج انزيم *Protease* ووجد بان 7 عزلات فقط قادرة على انتاج هذه الانزيمات وتم الاستدلال على ذلك من خلال ظهور هالة شفافة حول مناطق الزرع البكتيري على وسط *Frazier's Gelatin Agar* بعد اضافة كاشف *Frazier* اليها حيث يظهر منضقة انتحرت شفافة والمنضقة غير المتحللة بيضاء

جدول (2) : نتائج التحري عن عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا الكوليرا والمرتبطة بامراضيتها.

رقم العزلة	النسبة المئوية	VP	نتائج فزيم الهيمولين		نتائج فزيم Urease	نتائج فزيم Phospholipase	نتائج فزيم (Protease)	CFA/I
			نوع الفل	نوع بيتا				
1	NAG	-	+	-	-	+	+	+
2	O1	+	+	-	-	+	+	+
3	O1	+	+	-	-	+	+	-
4	O1	+	+	-	-	+	+	-
5	O1	+	+	-	-	+	+	-
6	O1	+	+	-	-	+	+	-
7	O1	+	+	-	-	+	+	-
8	O1	+	+	-	-	+	+	-
9	O1	+	+	-	-	+	+	-
%		88.8	100	0	0	66.6	77.7	44.4

+ : نتيجة موجبة - : نتيجة سالبة % : النسبة المئوية

VP : فحص انتاج الأسيبتون Voges

Proskauer : عامل الاستيطان CFA/I

الأول

C. التحري عن عامل الاستيطان الأول

Colonization Factor Antigen/I

(CFA/I):

تم التحري عن وجود مستضدات CFA/I وقد بينت النتائج أن هناك 4 عزلات أظهرت نتيجة تلازن موجبة مع كريات الدم الحمر للانسان (من صنف A+) بوجود سكر المانوز و 5 عزلات أظهرت نتيجة تلازن سالبة (جدول (2)) وهذا يدل على أن بعض عزلات بكتريا الكوليرا تمتلك عامل الاستيطان الأول CFA/I المقاوم لسكر المانوز وهذا يتفق مع ما ذكره كلا من (٤) و(٣٢).

تعود قابلية البكتريا في استيطان الأنسجة المخاطية للجهاز الهضمي الى امتلاكها لعوامل الاستيطان التي تمكنها من الالتصاق بالخلايا الطلائية لهذه الأنسجة، وبذلك تعد مرحلة الالتصاق أحد العوامل المحددة في احداث

الاصابة [4] ، كما يعد وجود مستضد عامل الاستيطان الأول من عوامل الضراوة المباشرة اذ يتم من خلاله الارتباط الأولي للبكتريا في الأنسجة وبمساعدة عوامل الضراوة الأخرى تقوم البكتريا باحداث الضرر في موقع الاصابة ويظهر هذا بشكل واضح عند الاصابة بمرض الكوليرا [33].

ان التصاق بكتريا الكوليرا بالنسيج المخاطي لأمعاء المضيف يكون مشابه لتلازن كريات الدم الحمر للانسان بوجود المانوز وهذا يشير الى ان سكر المانوز له شكل مشابه لتركييب سطح الخلايا حقيقية النواة والذي يعمل كمستقبل لالتصاق بكتريا الكوليرا [32] وتوجد في كل خلية من خلايا النسيج المخاطي لامعاء المضيف اثنين من المستقبلات على الاقل لالتصاق بكتريا الكوليرا وهذه المستقبلات اما ان تكون من النوع الذي يتشبث بوجود سكر المانوز او الذي لا يتشبث بوجوده [34]. وبالإضافة الى عوامل الاستيطان المقاومة لسكر المانوز تمتلك بكتريا الكوليرا ما يسمى بالأهداب المنظمة لانتاج السم *Toxin Coregulated Pilus (TCP)* والذي يعد مهما في استيطان البكتريا لامعاء الانسان [1,2,7].

أكدت الدراسة الحالية أن مرض الكوليرا مرض متوطن في العراق وينتشر المرض خلال الحروب حيث تتعدم الشروط الصحية وفق مقاييس منظمة الصحة العالمية كما أن الماء والغذاء الملوث من اهم مصادر انتشار المرض كذلك تشير الدراسة الى وجود علاقة بين الشكل المصلي للبكتريا وانتشار الاصابة بها والى أهمية عوامل الضراوة في احداث الاصابة من حيث افراز الانزيمات وامتلاك عوامل الاستيطان واغلب هذه العوامل ان لم يكن جميعها مرتبطة بانتاج السم فضلا عن ازدياد عدد الاصابات والحاملين للمرض والوفيات في السنوات الأخيرة لظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج بشكل دائم .

شكر وتقدير :- لايسعني في النهاية الا ان اتقدم بالشكر والامتنان الى د.كفاح احمد الكرخي لما قدمته من تعاون وتسهيلات والى كل من شارك في انجاز هذا البحث ونشره.

المصادر

10. Ryan, K.J. (1984) *Vibrio & Compylobacter*. In: [Sherris, J.C.; Ryan, K.J.; Ray, C.G.; et al. (eds)] *Medical Microbiology: An introduction to infectious diseases*. Elsevier Science publishing co., Inc. pp.:258-63.
11. Sack, R.B. & Siddique, A.K. (1998) *Corpses & the spread of cholera*. *Lancet*. 352:1570.
12. Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P. & Swain, R.H.A. (1975) *Medical Microbiology*. (12th ed.) Vol. II London, New York.
13. Harrigan, W.F. & McCance, M.E. (1976) *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press Inc. London.
14. Old, D. C. (1996) *Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas, Compylobacter, Arcobacter, Helicobacter and Wolinella*. In: [Collee, J.G.; Frasel, A.G.; Marimon, B.P. & Simmons, A. (eds)] *Practical Medical Microbiology*. (14th ed.) Churchill, Living stone.
15. Yousife, T.I. (1993) *Epidemiological study of cholera outbreak in Baghdad 1991*. M.Sc thesis, College of Medicine, University of Baghdad.
16. الكرخي، كفاح احمد (2001). عزل وتشخيص السلالات النمطية وغير النمطية لبكتريا *Vibrio cholerae* من المرضى وحساسيتها للمضادات الحيوية. رسالة ماجستير. كلية العلوم - جامعة بغداد.
17. جابك، نغم عادل (2000). دراسة بعض الجوانب الوراثية لبكتريا *Vibrio cholerae* المعزولة من المرضى في محافظة بابل. رسالة ماجستير. كلية العلوم - جامعة بابل.
1. keusch, G.T.; Deresiewicz, R.L. & Walder, M.K. (2001) *Cholera & other Vibrioses*. In: *Harrison's principles of Internal Medicine* (15th ed.) McGraw-Hill companies, Inc. London.
2. Todar, K. (2002) *V. cholerae & Asiatic cholera* Bacteriology @UW-Madison
3. Sack, D.A. (1998) *Cholera & related illnesses caused by Vibrio species & Aeromonas*. In: [Gorbach, S.L.; Bartelst, J.G. & Blacklow, N.R. (eds)] *Infectious Diseases* (2nd ed) W.B. Saunders company, USA pp.:738-48.
4. Oliver, J.D. & Kaper, J.B. (1997) *Vibrio Species*. In: [Doyle, M.P.; Beuchat, L.R. & Montville, T.J. (eds)] *Food Microbiology: Fundamentals & Frontiers*. ASM press Washington D.C. USA pp.:228-260.
5. Holt, J.C.; Krieg, N.R.; Sneath, P. H.A.; Stahley, J.T. & Willia, S.T. (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. (9th ed.) Williams & Wilkins, Baltimore. USA
6. Shademani, R. (2002) *Drinking water and infectious disease - establishing the links*. *Bull. WHO* 80(11):916.
7. Jawetz, E.; Melnick, J.L. & Adelberg, E.A. (2001) *Vibrio, Compylobacter, Helicobacter and associated bacteria*. In: *Medical Microbiology* (22nd ed.) Norwale, Connecticut. Sanmatro. California. pp.:235-8.
8. Asnis, D.S.; Golub, R. & Bresciani, A. (1996) *Vibrio cholerae O1* isolated in the gall bladder of a patient present with cholecystitis. *Amer. J. Gasterol.* 91(10):2241-2.
9. Sanchez. J.L. & Taylor, D.N. (1997) *Cholera*. *Lancet*. 349:1825-30.

26. Hoge, C.W.; Bodhidatta, L.; Echeverria, P.; Deesuwan, M. & Kitporaka, P. (1996) Epidemiologic study of *Vibrio cholerae* O1 & O139 in Thailand : At the Advancing edge of the Eighth Pandemic. *Amer. J. Epidemiol.* 143 (3) :263-8.
27. Levinson, W. & Jawetz, E. (2000) *Medical Microbiology & Immunology Examination & Board Review.* (6th ed.) McGraw-Hill companies, London, Inc. pp.:107-126.
28. Kimsey, H.H.; Nair, G.B.; Ghosh, A. & Walder, M.K. (1998) Diverse CTX ϕ s & evaluation of new pathogenic *Vibrio cholerae*. *Lancet.* 352:457-8.
29. Young, D.B. & Broadbent, D.A. (1982) Biochemical characterization of extracellular proteases from *V. cholerae*. *Infect. Immun.* 37:875-883.
30. Mekalanos, J.J. (1998) TCP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:730-4.
31. Fiore, A.E.; Michalski, J.M.; Russell, R.G.; Sears, C.L. & Kaper, J.B. (1997) Cloning, characterization & chromosomal mapping of a phospholipase produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 65:3112-7.
32. Hanne, L.F. & Finkelstein, R.A. (1982) Characterization and distribution of the hemagglutinin produced by *V. cholerae*. *Infect. Immun.* 36:209-214.
33. الزعاعك، علي عبد الرحمن (1994). البيولوجي الجزيئي لضراوة البكتيريا. مطبعة القيس. بغداد - العراق.
34. Mey, A.R. & Payne, S.M. (2003) Analysis of residues determining specificity of *V. cholerae* Ton B1 for its receptors. *J. Bacteriol.* 185:1195-120.
18. دياب، عبير احمد (2001). دراسة مقاومة ضمات الكوليرا غير المتلازنة المعزولة محليا من المرضى المصابين بالاسهال للمضادات الحيوية ودور البلازميدات فيها. رسالة ماجستير. كلية العلوم - جامعة بغداد.
19. القرشي، غادة محمد (2001). دراسة التفاعل المصلي التصالبي المعكوس بين جرثومتي *Compylobacter jejuni* وضمات الكوليرا غير المتلازنة (NAG) بواسطة اختبار التلازن الدموي المنفعل. رسالة ماجستير. كلية العلوم - جامعة بغداد.
20. Al-Amili, W.A. (2001) Isolation, identification and genetic exchange between *Vibrio cholerae* & *Pseudomonas aeruginosa*. M.Sc thesis, College of Medicine, University of Baghdad.
21. Pourshafie, R.; Grimont, F.; Saifi, M. & Grimont, P.A.D. (2000) Molecular Epidemiological study of *Vibrio cholerae* isolates from infected patients in Teheran, Iran. *J. Med. Microbiol.* 49:1085-90.
22. Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P. & Swain, R.H.A. (1974) *Medical Microbiology.* (12th ed.) Vol. I Microbial infections. Longman group limited pp.:334-9.
23. Wilson, G.; Miles, A. & Parker, M.T. (1983) Topley and Wilson's. principles of bacteriology, virology and immunity. (7th ed.) Vol. 2. Edward Arnold. London.
24. Duval, P.; Ribes, G.C.; Ranjalay, J.; Quilici, M.L. & Fournier, J.M. (1999) Cholera in Madagascar. *Lancet* 353:2068.
25. Dubon, J.M.; Palmer, C.J.; Ager, A.L.; Shor-posnor, G. & Baum, M.K. (1997) Emergence of multiple drug-resistant *V. cholerae* O1 in San Pedro Sula, Honduras. *Lancet* 349:924.

Cholerae disease in Iraq and the investigation of some virulence factors of *Vibrio Cholerae* locally isolated from diarrhea cases

* Amina N.AL -Thwani

** Noor Aleman AL- Biate

* Ass.Prof.Genetic Engineering and Biotechnology Institute for post-graduate studies ,Baghdad University

**Diploma, Genetic Engineering and Biotechnology Institute for post-graduate studies ,Baghdad University

Summary

The study was carried out during the period extending from the 1st of June 2003 till the 1st of March, 2004 and amid a survey on Cholera disease in Iraq , through the period starting from 1980 to 2003 , it was found that Cholera is endemic in Iraq , the highest incidence was recorded in 1998-1999, it increases during war and humid hot weather.

Bacteriological studies by using selective media, biochemical identification, serotyping and Api system, succeeded to identify a total of 9 isolates as members of *Vibrio cholerae* , eight of them (88.8%) belong to *V. cholerae* O1 serotype and one isolate (11.1%) to *V. cholerae* Non-O1 (NAG).

Some biological activities- like production of Hemolysin, Phospholipase, Urease and external proteases, and presence of Colonization Factor Antigen /I (CFA/I) were detected in this study and results showed that , all isolates (100%) were produced α -hemolysin, and did not produced urease, 7 isolates (77.7%) produced protease, 6 isolates (66.6%) produced phospholipase and 4 isolates (44.4%) had CFA/I.