عزل وتشخيص بكتريا الكوليرا المسببة لوباء الكوليرا لعام 2007 في العراق بالطريقة السريعة والمتضمنة (Immunochromatographic one step rapid visual test) ومقارنتها بالطرائق البكتريولوجية التقليدية .

*زياد حافظ عبود** *كفاح احمد جاسم** *كريمة حسون حمادي**

استلام البحث 4، ايار، 2008
قبول النشر 7، اذار ، 2010

الخلاصة:
اجريت هذه الدراسة للتحري عن بكتريا الكوليرا بانماطها المصلية المسببة لوباء الكوليرا عام (2007) وبالطريقة السريعة المتضمنة (rapid visual test crystal V.C) التي استخدمت لاول مرة في القطر لتشخيص بكتريا الكوليرا ومقارنتها بالطرائق البكتريولوجية التقليدية .
اذ يعد مرض الكوليرا من الامراض الوبائية الخطيرة التي تؤدي الى الوفاة بنسبة 50-70%عند الحالات الشديدة لدى المرضى غير المعالجين .
جمع لهذا الغرض (100) نموذج براز من المرضى المصابين بالكوليرا من (13) مستشفى في محافظة بغداد للفترة مابين بداية شهر اب لنهاية شهر كانون الاول . اذ شخصت البكتريا بالطريقتين الاولى الطريقة السريعة بواسطة الغشاء النايتروسليلوزي المشبع بالاجسام المضادة لبكتريا الكوليرا . و مقارنتها مع نتائج الطريقة الثانية المعتمدة على الصفات الزرعية لبكتريا الكوليرا على مختلف الاوساط الزرعية كذلك شخصت البكتريا بالفحوص الكيمو حيوية باستخدام نظام Api20E اضافة الى ذلك استخدام المصول التشخيصية لتحديد الانماط المصلية وتحت المصلية من(monovalent & polyvalent).
كما و درست علاقة اشهر السنة التي ظهر بها الوباء بعدد الاصابات .
اظهرت النتائج الى امكانية عزل وتشخيص (78) عزلة ثابعة للنمط المصلي O1 بالطريقة السريعة (Rapid visual test(crystalV.C وعند اجراء الفحوص البكتريولوجية على (78) عزلة كانت جميعها تابعة لبكتريا الكوليرا للنمط المصلي O1 ووصولاً للنمط تحت المصلي فقد اظهرت ان جميع العزلات (78) كانت تابعة للنمط تحت المصلي (Inaba) . كما واظهرت النتائج بان اكثر الاصابات ظهرت في شهر ايلول (26) يلي شهر تشرين الاول (22) .

الكلمات المفتاحية:مرض الهيضة، اجسام مضادة احادية السلالة، فحص الكوليرا بالطريقة السريعة، النمط الحيوي الطوري، النمط الحيوي التقليدي.

المقدمة:

يعد مرض الكوليرا من الامراض الوبائية والمتوطنة في لكثير من دول العالم ولاسيما الدول النامية وقد امتد هذا المرض عبر التاريخ في ثمانية هجمات وبائية منذ عام 1817 وحتى يومنا هذا . والذي يحدث نتيجة الاصابة ببكتريا الكوليرا vibrio cholerae بانماطها الحيوية الطور (Eltor) والتقليدية (classical) وبانماطها المصلية (O1&O139) وتحت المصلية subserotype (Ogawa,Inaba). اذ تتصف هذه البكتريا بكونها عصيات قصيرة منحنية او بشكل الحرف S او الضمة comma وتكون سالبة لصبغة گرام غير مكونة للابواغ والمحفظة وتكون محبة للقاعدية اذ يترواح الرقم الهيدروجيني لنموها بين 8.4-9.6 ولاتقاوم ضمات الكوليرا الحموضة. تنتمي هذه البكتريا لعائلة vibrionacaea التي تمتاز بامتلاكها لانزيم الاوكسيديز (oxidase) والذي يعد المفتاح الاول لتشخيص بكتريا الكوليرا.[1]
تشير المصادر العلمية بان الهجمات الوبائية الستة لوباء الكوليرا كانت سببة النمط الحيوي التقليدي الذي استبدل بالنمط الحيوي الطور في الوباء السابع للكوليرا . وفي عام (1992 – 1993) وهذه الفترة هي بداية ظهور الوباء الثامن والذي سببة النمط المصلي الجديد (O139) من بكتريا الكوليرا والذي سبب حدوث وبائيات شديدة بالمرض في جنوب شرق افريقيا كالهند والبنغال وامتد هذا المرض الى مناطق اخرى من العالم [2] تمتلك بكتريا الكوليرا العديد من عوامل الضراوة (الامراضية) التي تؤهلها للاصابة بمرض الكوليرا ومن اهم هذه العوامل هي افراز ذيفان

*وزارة الصحة/ مختبر الصحة العامة المركزي

الكوليرا cholera toxin الذي يدعى (choleragen) ويرمز له (CT) والذي تفرزه الانماط المصلية (O1 وO139) من هذه البكتريا والذي تحدث امراضية البكتريا نتيجة لافرازة[3].
تنتقل بكتريا الكوليرا عن طريق الماء والغذاء الملوثين ا ضافة لبعض العوامل الاخرى ومنها الحشرات فبعد تناول الاطعمة والمياه الملوثة يحدث الاسهال والتقيء بعد فترة (40-12) ساعة وهذه تتمثل بالاعراض السريرية والتي تكون مصحوبة بمغص حاد بحيث يكون الاسهال مائي شديد ومتكرر ويكون لون البراز ابيض يشبه ماء الرز rice watery مصحوباً بفقدان سوائل الجسم الغني بالاملاح تحدث الوفاة بنسبة (50-70) % للمرضى غير المعالجين بحيث يكون فقدان السوائل والاملاح بشكل متكرر يؤدي الى تركيز نسبة البروتين في الدم مع زيادة حامضية محدثاً الجفاف[4] .

جاءت هذه الدراسة لتهدف الى:

1- عزل وتشخيص بكتريا الكوليرا بانماطها المصلية المسببة لوباء الكوليرا 2007 في العراق باستخدام الطرائق الجديدة والسريعة والتي يجري الفحص فيها خلال (20-15) دقيقة معطيا النتيجة الموجبة اوالسالبة والتي استخدمت لاول مرة في القطر وبالطريقة المتضمنة.
Immunochromatographic one step Rapid visual test.(CrystalV.C
2- مقارنتها مع الفحوص البكتريولوجية التقليدية من زرع النماذج على الاوساط الزرعية المختلفة بالاضافة لاجراء الفحوص الكيموحيوية باستخدام نظام Api 20 E والطرق المصلية باستخدام الامصال المضادة من , monovalent polyvalent(O139,Inaba, Ogawa) .
3- دراسة علاقة اشهر السنة بالاصابة بوباء الكوليرا لعام 2007وتوزيع الاصابات حسب مستشفيات بغداد المشمولة بالدراسة والمتضمنة (مستشفى ابن الخطيب , مستشفى اطفال العلوية , ومستشفى الشهيد الصدر العام , مستشفى الامام علي (ع) , مستشفى فاطمة الزهراء (ع) للنساء والاطفال , مستشفى الكاظمية التعليمية , دائرة مدينة الطب / مديرية المختبرات التعليمية , مستشفى ابو غريب العام) .

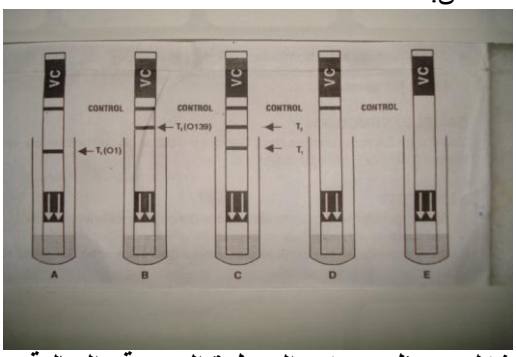
المواد وطرائق العمل:

تم جمع (100) نموذج براز من المرضى المشتبه اصابتهم بمرض الكوليرا والمحالين من اطباءفي مستشفيات بغداد للفترة مابين (شهر اب و لغاية شهر كانون الثاني لسنة2007). اذ نقلت نماذج البراز الى مختبر الصحة العامة المركزي في بغداد بواسطة حاويات بلاستيكية نظيفة ذات غطاء محكم حيث تمت معاملة النماذج بطريقتين:-

الطريقة الاولى :- طريقة **Immunochromatographic one step rapid**

Visual test (crystal(V.C)

تم اخذ (200-150) مايكروليتر من سائل البراز في انبوبة اختبار نظيفة ثم وضع الشريط (Dipstick) في داخل الانبوبة والشريط عبارة عن غشاء نايتروسيليلوزي مغطى ومشبع باجسام مضادة احادية السلالة (monoclonal-Ab)من الانماط المصلية O1 و O139 من بكتريا الكوليرا. وعند وجود بكتريا الكوليرا بانماطها المصلية O1 اوO139 في نموذج البراز المفحوص او كلاهما فسوف تظهر حزمة بلون احمر قرمزي على الغشاءنتيجة تفاعل بين اضداد بكتريا الكوليرا المشبعة على الغشاء وبين المستضدات الموجودة في نموذج البراز اي يحدث تفاعل (Ab-Ag) وان ظهور الحزمة دلالة على ايجابية الفحص اي احتواء نموذج البراز على بكتريا الكوليرا بانماطها المصلية O1 او O139 او كلاهما . وعند عدم ظهور الحزمة دلالة على سلبية الفحص .
وهذا دليل على ان النموذج خالي من بكتريا الكوليرا وتقرا نتيجة الفحص خلال ((15-20 دقيقة بحيث لا تتعدى (30) دقيقة .
[7,5,4] ويوضح الشكل (1) طرقة استخدام الغشاء النايتروسيليلوزي المشبع بالاجسام المضادة وكيفية ظهور الحزم التي تبين ايجابية وسلبية الفحص.



شكل (1) ظهورحزم السيطرة الموجبة والسالبة للفحص نتيجة تفاعل(Ag-Ab).

T1-الحزمة الخاصة للنمط المصليO1
T2-الحزمة الخاصة للنمط المصليO139
C-الحزمة الخاصة للControl

الطريقة الثانية:-

تجرى هذه الطريقة وذلك لمقارنة النتائج التي تم الحصول عليها من الطريقة الاولى (السريعة) وبين هذه الطريقة والتي تتم باخذ نماذج البراز والتي عوملت بالطرائق البكتريولوجية المتضمنة نفل جزء من نماذج البراز الى الوسط الاغنائي

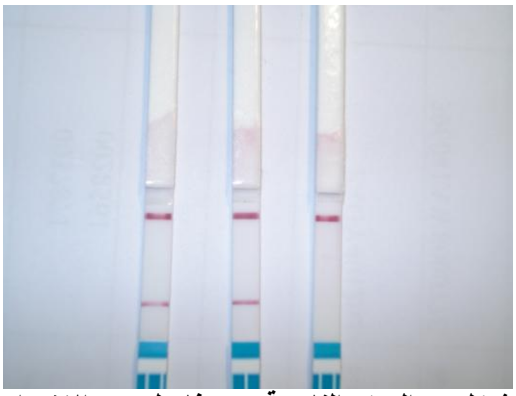
(Alkaline peptone water)اذ حضنت بدرجة 37 م لمدة (6-4) ساعات.
بعدها زرعت ا لنماذج على الاوساط الزرعية الانتخابية كوسط (TCBS agar) والتفريقية كوسط (macconkey agar) والاغنائية والتشخيصية على وسط (Blood agar) اذ تم حضنها بحرارة 37 م° لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء فترة الحضن اجرايت الفحوص الكيموحيوية لبيان نوع وجنس العزلات وذلك بنظام Api 20 E ولتأكيد التشخيص ووصولا الى النمط المصلي تم استخدام المصول المضادة التشخيصية من (monovalent &polyvalent). والمنتجة من قبل شركة Difco الانكليزية[8].
تم توزيع الاصابات بمرض الكوليرا المسبب لوباء الكوليرا لعام 2007 حسب اشهر السنة المشمولة بالدراسة من مستشفيات محافظة بغداد .

النتائج والمناقشة :

بعد ان تمت معالجة نتائج البراز بطريقتين :-
الاولى هي الطريقة السريعة بواسطة الغشاء النايتروسليلوزي المشبع بالاجسام المضادة لبكتريا الكوليرا وبالنمطين المصليين O1 & O139 .
اظهرت النتائج الواردة في جدول(1)ان مجموعة الاصابات الموجبة كانت (78) اصابة اي بنسبة 75% من مجموع نماذج البراز الكلية (100) نموذج وكانت جميع الاصابات تابعة للنمط المصلي O1 من بكتريا الكوليرا ولا وجود لاي اصابة تابعة للنمط المصلي O139 من خلال الفحص المباشر لنموذج البراز .
ويوضح الشكل(2) الحزم الناتجة من تفاعل الاجسام المضادة المشبعة على الغشاء النايتروسليلوزي وبين المستضدات الموجودة في نموذج البراز اي حدوث تفاعل بين (Ab-Ag) ويكون المعقد (complex) فتظهر الحزم (control دلالة الفحص) والحزم T1 من بداية الفحص دلالة على وجود Ab-Ag الخاص ببكتريا الكوليرا التابعة للنمط المصلي (O1) واذ لم يظهر دلالة على عدم وجود Ag الخاص بهذا النمط في البراز واذا ظهر حزم T2 دلالة على وجود Ag الخاص بالنمط المصليO139 في البراز واذا لم يظهر دلالة على عدم وجود هذا Ag .

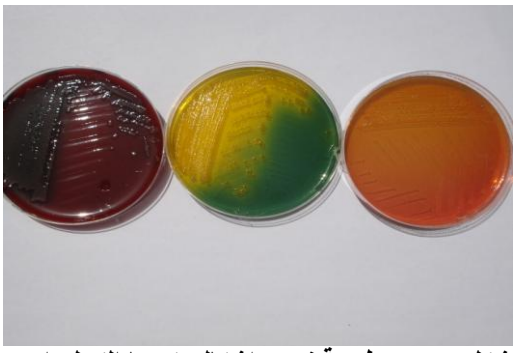
جدول (1) الاصابات الموجبة لبكتريا الكوليرا حسب النمط المصلي لها .

عدد النماذج الكلية	الحالات الموجبة لبكتريا الكوليرا	النسبة%	النمط المصلي	النمط تحت المصلي
100	78	75	O1	Inaba



شكل(2) الحزم الناتجة من تفاعل بين الاضداد الموجودة على الغشاء النايتروسليلوزي وبين المستضدات الموجودة في نموذج البراز.

وعند اجراء الطريقة الثانية والتي تعتمد على الطرائق البكترولوجية المتضمنة الزرع على الاوساط الزرعية المختلفة والطرق الكيموحيوية بنظام Api20E والتي اجريت لتأكيد نتائج الطريقة الاولى (السريعة).
يبين الشكل (3) اشكال بكتريا الكوليرا على الاوساط الزرعية المختلفة اذ اظهرت لوناً اصفر على وسط TCBSدلالة على تخمرها لسكر السكروز [9] ,كما واظهرت العزلات لونا شاحبا على وسط الماكونكي بعد حضانة 24 ساعة وذلك لعدم قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز.[10] اما على الوسط الزرعي التشخيصي ال Blood agar فقد اعطت المستعمرات البكترية تحللا كاملا للدم وذلك لامتلاكها لانزيم الهيمولايسين[11].
ووصولاً للنوع فقد شخصت بكتريا الكوليرا بنظام Api20E حيث يظهر الشكل (4) نتائج فحوصات هذا النظام لبكتريا الكوليرا .



شكل(3) . طبيعة نمو واشكال بكتريا الكوليرا على الاوساط الزرعية المختلفة.

A-الجهة اليمنى : بكتريا الكوليرا على وسط MacConkey agar
B-الجهة اليسرى : بكتريا الكوليرا على وسطBlood agar
C-الوسط: بكتريا الكوليرا على وسطTCBS agar

شكل (4).نتائج الفحوصات بنظام API 20 E لبكتريا الكوليرا

ولزيادة التأكيد ووصولاً للنمط المصلي شخصت بكتريا الكوليرا مصليا وبالطرائق السيرولوجية بنوع من المضادات المصلية من (monovalent,polyvalentO1) (O139) اذ ثبتت النتائج الواردة في جدول (1) بان جميع عزلات بكتريا الكوليرا المعزولة والمشخصة بهذه الدراسة كانت تابعة للنمط المصلي O1 وعدم عزل وتشخيص اي عزلة تابعة للنمط المصلي O139 من بكتريا الكوليرا .

وهذا ما يؤكد ويوثق نتائج الطريقة الاولى السريعة طريقة الغشاء الناتروسليلوزي المشبع بالاجسام المضادة لبكتريا الكوليرا .اذ اظهرت جميع العزلات المشخصة بالطريقة الاولى السريعة والتي كانت(78)عزلة تابعة لبكتريا الكوليرا بالنمط المصلي O1 تطابقا مع الطرائق البكتريولوجية عند استخدام الفحوص الكيموحيوية والمصول التشخيصية.

وعند الاستمرار بتشخيص بكتريا الكوليرا بالانماط تحت المصلية استخدمت المضادات المصلية monovalent (Inaba, ogawa,) التابعة للنمط المصلي O1 فبينت النتائج بان جميع العزلات التابعة للنمط المصلي O1 كانت جميعها تابعة للنمط تحت المصلي Inaba جدول (1) .

وهذا يشير ان وباء الكوليرا الذي حدث في قطرنا عام 2007 كان سببه النمط تحت المصلي Inaba من بكتريا الكوليرا . وهذا مخالف للاوبئة السابقة التي حدثت بين الاعوام (1998 – 2004) اذ كانت الاصابات تابعة للنمط تحت المصلي ogawa فضلا عن النمط تحت المصلي Inaba [12].

ان احتلال النمط المصلي O1 من بكتريا الكوليرا وبالنمط تحت المصلي (Inaba) باعلى الاصابات يعود لكون هذا النمط نمطاً متوطناً في قطرنا وباعتباره احد المسببات الرئيسية لمرض الكوليرا وتتفق هذه النتائج مع ماجاء في [14,13] .

ومن خلال جدول (2) نلاحظ ان توزيع الاصابات بوباء الكوليرا على اشهر السنة التي ظهر فيها الوباء ,يبين ان شهر ايلول كان الاكثر في نسب العزل (33%) وبعد اصابات (26) اصابة يليه شهر تشرين الاول بنسبة (28%) وبعدد (22) اصابة ثم بدأت الاصابات بالتناقص في اشهر تشرين الثاني وكانون الاول حيث انتهاء الوباء في هذا الشهر .

جدول (2) توزيع الاصابات بمرض الكوليرا حسب اشهر السنة التي ظهر بها الوباء

الشهر	العدد	النسبة%
اب	12	15
ايلول	26	33
تشرين اول	22	28
تشرين الثاني	13	17
كانون اول	5	7
المجموع	**78**	**%100**

ان ارتفاع الاصابات في اشهر ايلول وتشرين اول يعود لاعتدال درجات الحرارة وارتفاع بسيط في نسبة الرطوبة والتي تعد من العوامل المهمة والمشعة لنمو وتكاثر
بكتريا الكوليرا وجاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه الباحثين[16,15].

المصادر:

1. Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N. and Guisberg, H.S. 1990. Microbiology. 4th ed. Harber and Row. Publisher. New York
2. Guerrant, R.L.; Walker, D. H. and Weller, P.F.2000. Tropical Infections Diseases. Principle, Pathogens and Practic. 9th ed. Vol. 1, W.H.O. Churchill Living stone. London, Tokyo
3. Jean-Michel. 2003. Annual report of cholera and Vibrios. Microbiology. 1st ed. Churcill Livingston. Edinburgh.
4. World Health Organization. 2005. Cholera 2004. Wkly Epidemiol. Rec. 80:261-268.
5. Nato F., Boutonnier A.,Rajerison M.,Grosjean P., Dartevell S., Guenole A., Bhuiyan N.A., Sack D.A., Nair G.B., Fournier J.M.,Chanteaus.,2003.One-step immune-chromatographic tests for rapid deterction of Vibrio cholerae O1and O139 in stool samples

like Glycocompounds in human Milk that inhibit classical and EI Tor *Vibrio cholerae* cell Adherance (hemagglutination).

12. Alkarhi., Kefah, 2005. Bacterial & biochemistary study of some virulence factor produce by (V.cholerae.).Almostenseria unversuty goleg science.

13. Gupta, A.; Jain, S. and Mahawal, B. 2000. Outbreak of cholera in aridzone of Bikaner. Indian. J. Med. Res. 110 : 126-127.

14. Malmone, F. ; Coppo, A . ; Pazzani, C. ; Ismail, S. O. ; Guerra, R. ; Procacci, P. ; Rotigliano, 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.

15. Horgan, S.E. ; Matheson, M.M. ; Borlace, L.M. and Dart , J.K. 1999. Use of a low nutrient culture medium for the identification of bacteria causing severe infection. J. Med-Microbiol. (48) : 701 – 709 .

16. Hoge, C.W.; Bodhidatta, L. ; Echererria, P. ; Dessuwan, M. and Kitoporka, P. 1996. Epidemiologic study of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in thailand : At the Advancing Edge of the Eighth Pandemic American J. of Epidimiology. 143 (3) : 263 – 268 .

.Clin.Diagn.Lab.*Immunol.*,10:476-478.

6. Bhuiyan N.A.,Qadri., Faruque A.S.G., MalekM.A., Salam M.A.,Nato F.,Fournier J.M., Chanteau S.,Sack D.A.,Nair G.B., 2003.Use of dipsticks for rapid diagnosis of cholera caused by vibrio choleraeO1 an O139 from rectal swabs. J. clin. Microbiol. ,41:3939-3941.

7. Kalluri p.,Naheed A.,Rahman S.,AnsaruzzamanM.,Faruque A.S.G.,Bird M.,Khatun F.,Bhuiyan N.A.,Nato F.,Fournier J.M.,Bopp C.,Breiman R.F.,Nair G.B.,Mintz E.D.2006. Evaluation of three rapid diagnostic test for cholera:does the skill level of the technician matter? Trop. med. Int. Heath11:49-55.

8. World Health Organization. 1997. Guide lines for cholera control. WHO Regional. Office for the Eastern Mediterranean.

9. Salim, M.V. 1992. Features of *Vibrio cholerae* O1. EItor, Inaba Serotype, Isolated during the cholera epidemic in Cartagenua (Colombia). Euferm. Infect. Microbiol. Clin. 10 (9) : 525 – 530.

10. Coill, D.; Kokko, G; Mandell, P. 2000. Text Book of Medicine 21st ed. W.B. Saunders Company Philadelphia. P1690-1693.

11. Holmgren, J.; Svennerholm, A.M. and Lindblad, M. 1983. Receptor

Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* causes Epidemic cholera 2007 in Iraq by Rapid Method (Immunochromatographic one step rapid visual test) and comparing it with the traditional Bacterlogical Methods

Zeyad H. Abood* ***Kifah A. Jassim**** ***Karima H. Hamadi****

*Ministry of health/ Center Public health Lab.(CPHL).

Abstract:

This study was for searching for Cholera Bacteria serotype which causes epidemiology Cholera in the 2007 in a fast method which contains (Rapid Visual Test) (Crystal V.C.) which was used for the first time in Iraq to diagnosis of Cholera Bacteria & compared with the traditional bacteriology method.

The Cholera disease is one of the most dangerous epidemiological diseases which lead to death with a percentage of (50 – 70) % in the severe cases for untreated patients .

For this purpose, 100 samples of stool from the patients from a (13) hospitals in Baghdad Governorate in the period from August to the end of December. The Cholera was diagnosis in two methods, 1st method was the fast method using the nitrocellulose which is coated with anti-body of Cholera Bacteria .The results was compared with the 2nd method which depends on the cultural characteristics of the cultural media, also the bacteria was diagnosis using the biochemical inspects by the system of API 20E in addition to the using of antisera to specify serotype& sub-serotype (Monovalent, Polyvalent(O1) .

Also, the relation between the disease & the months in the year in which the disease appear was studied. The results show the ability to isolate & identifecate (78) isolate for the serotype (01) in the fast method (Rapid Visual Test) (Crystal V-C) , & after the bacteriology inspects on these (78) isolate the all isolates were belongs for Cholera Bacteria of the serotype (01) till the sub-serotype , all the (78) isolates were belongs to the sub-serotype (Inaba). The results show, the most infection was in September (36) , & October (22).