# دراسة وبائية وبكتريولوجية لوباء الكوليرا عام 2007

وسن سامي حميد ازهار عمران ابتسام حبيب كفاح احمد رواء بهلول لقاء هادي


## الخلاصة

اجريت هذه الدراسة للتحري عن عزلات بكتريا الكوليرا بانماطها المصلية وتحت المصلية المسببة لوباء الكوليرا عام 2007 وبالطرائق الحديثة ,ويعد مرض الكوليرا من الامراض الوبائية الخطيرة واسعة النتشار في انحاء العالم , اذ تؤدي الحالات الشديدة غير المعالجة الى وفاة المرضى المصابين بهذا المرض .

جمعت لهذا الغرض (6500) نموذج براز من المرضى المصابين بالكوليرا من (11) محافظة في العراق للفترة من 19-8-2007 لغاية 26-12-2007 اذ شخصت البكتريا اعتمادا على صفاتها الزرعية على مختلف الاوساط المستخدمة كذلك باستخدام الفحوص الكيموحيوية التفريقية لهذه البكتريا كما تم توكيد التشخيص باستخدام جهاز Mini api لتشخيص بكتريا الكوليرا خلال اربعة ساعات فقط اضافة الى استخدام المصول التشخيصية لتحديد الانماط المصلية وتحت المصلية من monovalent & polyvalent.

كما واجري فحص الحساسية الدوائية لعزلات بكتريا الكوليرا المسببة للوباءبالطرق التقليدية وكذلك باستخدام جهاز Mini api ايضا والمستخدم ة لاول مرة في تحديد حساسية بكتريا الكوليرا للمضادات الحيوية وخلال اربع ساعات ووصولا للتنميط الحيوي كذلك استخدمت بعض الفحوصات الكيموحيويه لتحديد عزلات بكتريا الكوليرا المسببه للوباء تابعة للنمط الحيوي الطور (Eltor )او التقليدي( Classical).

اشارت النتائج الى امكانية عزل وتشخيص(4646 ) عزلة تابعة للنمط المصلي O1 وكانت جميعها تابعة للنمط تحت المصلي Inaba وعند اجراء بعض الفحوصات الكيموحيوية على عزلات بكتريا الكوليرا اظهرت جميعها انها تابعة للنمط الحيوي الطور Eltor.

كما واظهرت النتائج بأن جميع عزلات بكتريا الكوليرا كانت مقاومة للمضاد الحيوي Trimethoprim-sulphamethoxazole والمضاد التشخيصي O129 وبنسبة 100% في حين اظهرت بقية المضادات الحيوية المستخدمة حساية بنسبة 100%.

## Abstract

This study was conducted to detect serotype and subserotype of Vibrio cholerae isolates causing cholera epidemic in 2007 in Iraq. As one of the most epidemiological dangerous and wide spread disease in the world , chronic cases of such disease when untreated fastly lead to the death of patients . for this purpose (6500 ) fecal samples , were collected from patients suffered of watery diarrhea (cholera) in (11) governorates of Iraq . The period from 19-8-2007 to 26-12-2007 . Mini api (Rapid ID 32 E) kits system were used for bacterial identification (V.cholerae) during four hours only . In addition to that diagnostic serotyping have been also used to detect the serotype and sub serotype from polyvalent & monovalent . Also Mini api (Rapid ATB E ) kits system were used for bacterial sensitivity test for first time in Iraq through (4) hours till biotypes.Some biochemical test were applied to investigate whether the isolates belonged to the results showed Eltor or Classical biotypes. The results appeared 4646 isolates, all of them belonged to (01) serotype & Inaba sub serotype, and some biochemical tests proved all these isolates returned to Eltor biotype.

All strains were resist to Trimthoprim – sulphamethoxazole & 0129 disc ( 100% ) . While another antibiotics were sensitive to V.cholerae (100% ) .


## المقدمة

يعد مرض الكوليرا (الهيضة)والذي تسببه أنماط مصلية وتحت مصلية من بكتريا الكوليرا من الامراض الوبائية والمتوطنة في كثير من دول العالم ولاسيما الدول النامية وقد امتد هذا المرض عبر التأريخ في سبع هجمات وبائية منذ عام 1816-1817 وحتى يومنا هذا, أذ ان الاوبئة الست الاولى كانت متسببة عن النمط الحيوي التقليدي والذي أستبدل منذ عام 1960 بالنمط الحيوي الطور والذي كان سببا لحدوث الوباء السابع ( Winn *et al*.,2006 ; Janda.,1998) . وفي عام 1992 الى 1993 حدث الوباء الثامن للكوليرا والذي كان بسبب النمط المصلي 0139 التابعة للنمط الحيوي الطور (Farugque *etal*.,2003; Albert, 1997) . ويعد

الماء الملوث غير الصالح للشرب من الوسائل المهمة لأنتقال مرض الكوليرا الوبائي فضلا عن مجموعة من الاغذية الملوثة بفضلات الاشخاص المصابين بالمرض (Harvey and Pamela, 2007) .

أستخدمت المضادات الحيوية في علاج مرض الكوليرا لامتلاكها التأثيرات الواسعة في الحد من الاسهال الشديد والمتكرر والسيطرة على مسبباته بيد ان الاستخدام العشوائي الواسع للمضادات الحيوية يمكن ان يزيد من خطورة الموضوع وذلك بظهور عزلات من بكتريا الكوليرا مقاومة لبعض المضادات الحيوية شائعة الاستخدام في علاج مرض الكوليرا.

جاءت هذه الدراسة لتهدف الى عزل وتشخيص مسببات مرض الكوليرا بانماطها المصلية وتحت المصلية المسببة لوباء الكوليرا لعام 2007 باستخدام الطرائق الحديثة والجديدة والسريعة لتشخيص هذه البكتريا المسببة للأوبئة في العراق وبأستخدام تقنية Mini api وكذلك لتحديد حساسية المضادات الحيوية المثلى لعلاج هذا المرض وبالطرائق الحديثة كما وتم تحديد توزيع الاصابة بمرض الكوليرا حسب محافظات القطر المشمولة بالاصابات التي سببت الوباء.

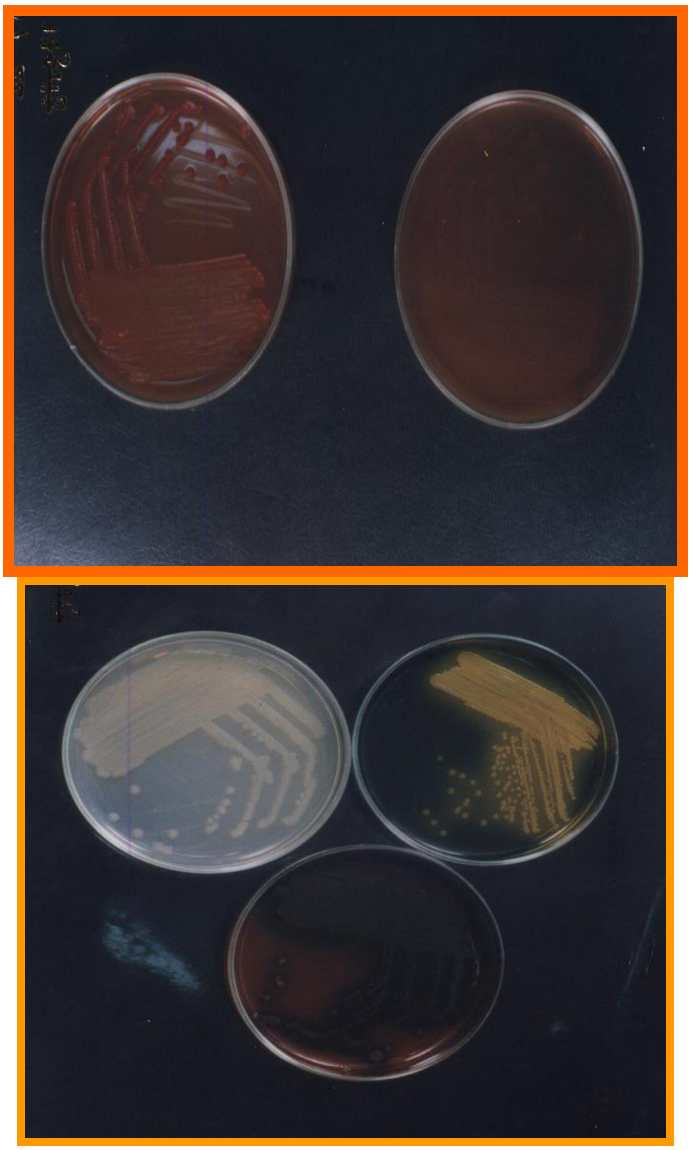
## المواد وطرائق العمل

تم جمع ( 6500 ) نموذج براز مرضى من (11) محافظات القطر (بغداد–ديالى – صلاح الدين – الانبار – سليمانية – أربيل– كركوك – نينوى – البصرة – واسط – دهوك) للفترة من 2007-8-19 لغاية 2007-12-26 وحسب توصيات منظمة الصحة العالمية نقلت النماذج الى مختبر الصحة العامة المركزي على الوسط الناقل Cary and Blaire الذي استخدم لأول مرة في نقل بكتريا الكوليرا الموجودة في الخروج والذي يحتفظ ببقاء البكتريا حية لمدة 30 يوما أذ استبدل عن الوسط الناقل sea salt water والذي لايتعدى بقاء البكتريا فيه عن (3) أيام فقط. وفي المختبر تم نقل جزء من كل نموذج الى الوسط الزرعي الاغنائي Alkaline peptone water وحضن بحرارة 37 م لمدة 6-4 ساعات تحت ظروف هوائية . وبعد انتهاء فترة الحضن نقل جزء من النمو البكتيري وخطط عل سطح أطباق بتري حاوية على أوساط زرعية تفريقية كوسط الماكونكي وأنتخابية كوسط TCBS وأغنائية و تشخيصية كوسط Blood agar حضنت بعدها بحرارة 37 م لمدة 24 ساعة وفقا لتعليمات منظمة الصحة العالمية (Forbes *etal*.,2007;WHO,1997) . وبعد تنقية البكتريا شخصت بتقنية Mini api بنوع خاص من الاشرطة ( Rapid ID 32 E ) والذي يتضمن 30 فحصا وقد تم استخدامه كأحدى الطرائق السريعة والدقيقة لتشخيص هذه البكتريا المسببة لوباء الكوليرا وتم حضن هذه الاشرطة بحرارة 37م لمدة 4 ساعات , كما وتم تشخيص العزلات مصليا بنوعين من المصول المضادة Polyvalent and Monovalent وحددت الانماط الحيوية للنمط المصلي O1 بالاعتماد على التفاعلات الكيموحيوية من تحلل الدم وتفاعل الفوكس بروس كاور ودراسة حساسية عزلات بكتريا الكوليرا للمضاد الحيوي(u 50) polymexin B . كما وتم تحديد حساسية بكتريا الكوليرا للمضادات الحيوية وبأستخدام جهاز Mini api نوع خاص من الاشرطة ( Rapid ATB E ) والمتضمنة 30 مضاد حيويا أذ حضنت بحرارة 37 م ولمدة 4 ساعات .

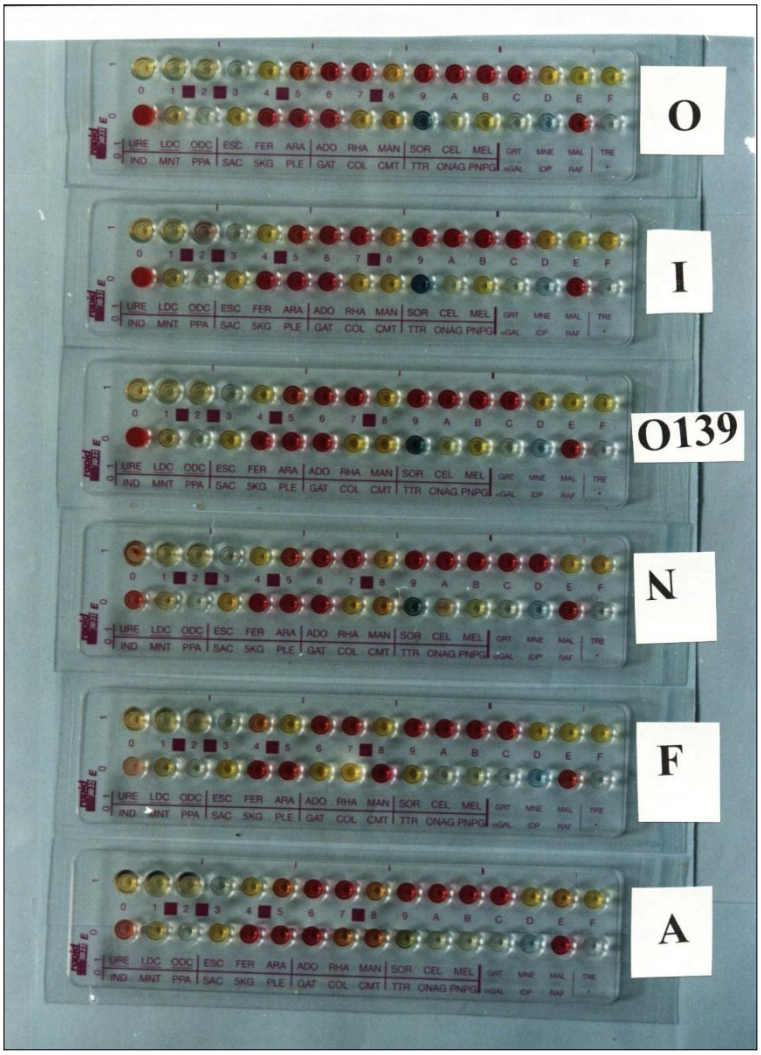
## النتائج والمناقشة

بعد ان تمت معاملة نماذج الخروج المستلمة من مستشفيات بغداد والمحافظات على الوسط الزرعي الناقل Cary & Blaire زرعت النماذج على الاوساط الزرعية الاغنائية والتفريقية والتشخيصية حيث شخصت العزلات بالاعتماد على صفاتها الشكلية على الاوساط الزرعية المختلفة( شكل-1) , اذ اظهرت العزلات على وسط TCBS لونا اصفر دلالة على تخمرها لسكر السكروز ( Forbes; et al .,2007) 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) (3أيام ادت الى اعطاء المستعمرات لونا ورديا دلالة على تخمرها لسكر اللاكتوز بصورة بطيئة Late lactose ferment . (Levinson&Jawetz ,2000) . اما على الوسط الزرعي blood agar قد اعطت المستعمرات تحللا كاملا للدم نتيجة لامتلاكها انزيم الهيمولايسين . (Harvey and Pamela, 2007)

شخصت العزلات توكيديا بجهاز Mini api وبنوع خاص من الاشرطة Rapid ID 32 E بعد حضانة (4) ساعات فقط (شكل-2)و (جدول-1) . أذ يعد التشخيص بهذه الطريقة من الطرائق الحديثة والسريعة الانجاز في تشخيص مرض الكوليرا خصوصا في أوقات حدوث الوباء أذ تعطي النتيجة خلال 4 ساعات وهذه ضرورية للوقوف على أعداد ونسب الاصابات لتحديد الموقف الوبائي للقطر وكذلك لأعطاء العلاج اللازم للسيطرة على انتشار الوباء .



**( الشكل –1 ) نمو بكتريا الكوليرا على مختلف الاوساط الزرعية**
**( TCBS , MacConkey , Blood , Neutrient )**




**(الشكل-2) نتائج اختبارات Rapid ID 32 E لبكتريا الكوليرا**

**جدول (1) نتائج فحوصات نظام ( Rapid ID 32 E) لعزلات بكتريا الكوليرا**

| الاختبار | V. cholera (O1-Inaba) |
|---|---|
| URE | - |
| LDC | + or - |
| ODC | + or - |
| ESC | - |
| FER | + |
| ARA | - |
| ADO | - |
| RHA | - |
| MAN | + |
| SOR | - |
| CEL | - |
| MEL | - |
| GRT | - |
| MNE | + |
| MAL | + |
| TRE | + |
| IND | + |
| MNT | - |
| PPA | - |
| SAC | + |
| 5KG | - |
| PLE | - |
| GAT | - |
| COL | + |
| CNT | + |
| TTR | - |
| ONAG | + |
| PNPG | + |
| αGAL | - |
| IDP | + |
| RAF | - |
| OX | + |

**(+) : نتيجة موجبة**

**(−) : نتيجة سالبة**

تشير النتائج الواردة في جدول (2) ان جميع عزلات بكتريا الكوليرا المسببة لحدوث وباء 2007 كانت تابعة للنمط المصلي O1 والنمط تحت المصلي Inaba من بكتريا الكوليرا ويعود السبب في ذلك ان هذا النمط هو نمطا متوطنا في محافظات قطرنا بأعتباره واحد من اهم المسببات الرئيسية لمرض الكوليرا وتتفق هذه النتيجة مع ما جاء

في (Gupta et al.,2000) وعند توفر الظروف البيئية الملائمة لنمو هذه البكتريا فينشط ذلك النمط محدثا اصابات شديدة بالاسهال المائي الشديد والمتكرر والذي يعود لأعراض مرض الكوليرا في مناطق سبق حدوث الوباء فيها ( متوطنة ) او في مناطق تتعرض للوباء لأول مرة (وبائية ) وهذا ما حدث في وباء الكوليرا لعام 2007 اذ كانت جميع العزلات غير متوطنة والتي تم التعرض اليها لأول مرة .

وعند تنميط العزلات التابعة للنمط المصلي O1 حيويا اعتمدت بعض التفاعلات الكيموحيوية والتي ادت هذه العزلات الى تحلل كريات الدم الحمراء للأغنام تحللا كاملا وذلك لأمتلاكها لأنزيم الهيمولايسين (Alm et al .,1988) , وكانت جميع العزلات موجبة لاختبار الفوكس بروس كاور (Myrivk & Weiser ,1988) وعند اجراء فحص الحساسية الدوائية للمضاد polymexin B (50 u) فقد اعطت العزلات نتيجة سالبة اي انها مقاومة للمضاد بنسبة 100% (Tamayo *et al* .,1997). ومن مجمل هذه الاختبارات قد اظهرت النتائج ان جميع العزلات التابعة للنمط المصلي O1 من بكتريا الكوليرا تعود للنمط الحيوي الطور ( Eltor) ولم تظهر اي عزلة للنمط الحيوي التقليدي والذي اختفى منذ عام 1960 على الرغم من كونه شائعا في جنوب شرق اسيا كالهند لحد الان (Wilson *et al.*, 2005) .

**جدول (2) توزيع الاصابة بمرض الكوليرا حسب الانماط المصلية وتحت المصلية**

| النمط المصلي وتحت المصلي | العدد |
|---|---|
| *Vibrio cholerae (O1)* | *4646* |
| *Vibrio cholerae (Inaba)* | *4646* |

اشارت النتائج التي تم الحصول عليها (جدول –3) والخاصة بتوزيع الاصابات بوباء الكوليرا في محافظات القطر التي ظهرت فيها ان أعلى الاصابات كانت (3001) قد سجلت في محافظة كركوك فيما كانت محافظتي البصرة والانبار الاقل في اعداد الاصابة (1,2 ) على التوالي وتشير هذه النتائج بان وباء الكوليرا قد بدء في المناطق الشمالية أبتداءا من محافظة السليمانية ثم اربيل ومنه الى كركوك في حين كانت اعداد الاصابة بوباء الكوليرا (146) في محافظة بغداد . ويعود السبب في أختلاف أعداد الاصابة الى الظروف البيئية من رطوبة نسبية وأرتفاع وأنخفاض في درجات الحرارة الملائمة للنمو بكتريا الكوليرا وكذلك للظروف الصحية الرديئة كقلة توفر الماء الصالح للشرب جراء النقص في تعقيم شبكات تصفية المياه في تلك المحافظات وخضوع بعض المحافظات الشمالية لاستهلاك الماء عن طريق حفر الابار, فضلا عن سوء التغذية وقلة المناعة . كما وان للجانب البكتريولوجي (في مختبرات المستشفيات ) دورا مهما في عزل وتشخيص بكتريا الكوليرا من محافظة لأخرى .

**جدول (3) توزيع حالات الاصابة بوباء الكوليرا حسب المحافظات التي ظهر فيها الوباء**

| المحافظة | العدد |
|---|---|
| كركوك | 3001 |
| سليمانية | 1228 |
| اربيل | 243 |
| بغداد | 146 |
| صلاح الدين | 14 |
| ديالى | 15 |
| نينوى | 6 |
| الانبار | 2 |
| دهوك | 6 |
| البصرة | 1 |
| واسط | 4 |
| المجموع | 4646 |

ونظرا لاهمية فحص الحساسية الدوائية للمضادات الحيوية لبكتريا الكوليرا حيث تمتاز بأمكانيتها للحد من اعداد البكتريا وكمية الاسهال المتسببة عنها وتقلل مدته عند مرضى الكوليرا ولاهميتها في تحديد مصدر الاصابة بهذا المرض فقد اجري هذا الفحص بطريقة حديثة ومتطورة والتي تقرا اليا حيث تظهر النتيجة من على شاشة جهاز مزود بحاسوب وبواسطة اشرطة خاصة . أذ بينت النتائج في (جدول – 4) و(الشكل –3) نتائج حساسية بكتريا الكوليرا لثلاثين مضادا حيويا فلوحظ ان هذه البكتريا بنمطها المصلي Inaba تظهر حساسية لجميع المضادات الحيوية ومنها ,Ampicilline , Tetracycline في حين اظهرت عزلات هذه البكتريا مقاومة شديدة لهذين المضادين في وباء الكوليرا لعام 1999(2005, Alkarkhi). في حين جاءت دراسة( 1999,. *et al* Hofer) للنمط تحت المصلي Inaba والتي اظهرت مقاومة بنسبة 100% للمضاد الحيوي Tertracycline .

اما بالنسبة للمضاد الحيوي Trimethoprim-Sulphamethoxazole فبينت النتائج المدونة في جدول (4) ان بكتريا الكوليرا بنمطها المصلي Inaba المسببة لوباء 2007 اظهرت مقاومة بنسبة 100% وجاءت هذه الدراسة مخالفة لما جاء في ( 2005, Alkarkhi ; 1999,. *et al* Hofer).

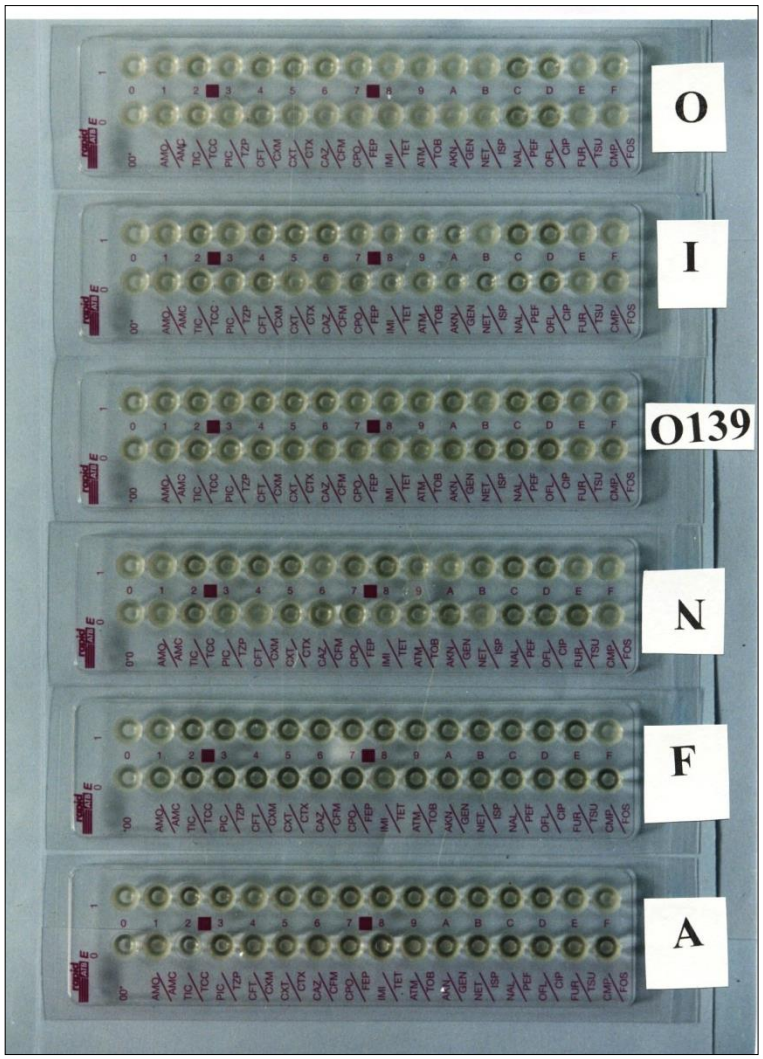
تشير محصلة نتائج هذه الدراسة ان عزلات الكوليرا المسببة للوباء كانت مقاومة للمضاد الحيوي -Trimethoprim sulphamethoxazole بنسبة 100% في حين اظهرت حساسية لبقية المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة ومنها مضاد Tetracycline,chloramphenicol,Gentamycin,Ciprofloxacin وهذا مخالف للأوبئة السابقة حيث كانت العزلات مقاومة للمضادات Gentamycin, Tetracycline,chloramphenicol Ampicillin, وحساسة للمضاد Trimethoprim-sulphamethoxazole.

مما يدل على ان بكتريا الكوليرا المسببة للوباء دخلت للقطر لأول مرة واظهرت اختلافا من حيث حساسيتها ومقاومتها للمضادات الحيوية شائعة الاستخدام في علاج مرض الكوليرا عن العزلة المتوطنة في القطر, كما واظهرت بكتريا الكوليرا مقاومة 100% للمضاد التشخيصي O129 وهذا مخالف لبكتريا الكوليرا المسببه للأوبئة السابقة والتي تظهر حساسية لهذا المضاد التشخيصي (Jean ,2003).

**جدول (4) حساسية بكتريا الكوليرا للمضادات الحيوية**

| المضاد الحيوي | Vibrio cholera ( Inaba ) | |
|---|---|---|
| | Sensitive/Resistant | % |
| AMO | S | 100 |
| AMC | S | 100 |
| TIC | S | 100 |
| TCC | S | 100 |
| PIC | S | 100 |
| TZP | R | 100 |
| CFT | S | 100 |
| CXM | S | 100 |
| CXT | S | 100 |
| CTX | S | 100 |
| CAZ | S | 100 |
| CFM | S | 100 |
| CPO | S | 100 |
| FEP | R | 100 |
| IMI | S | 100 |
| TET | S | 100 |
| ATM | S | 100 |
| TOB | S | 100 |
| AKN | S | 100 |
| GEN | S | 100 |
| NET | S | 100 |
| ISP | S | 100 |
| NAL | S | 100 |
| PEF | S | 100 |
| OFL | S | 100 |
| CIP | S | 100 |
| FUR | S | 100 |
| TSU | R | 100 |
| CMP | S | 100 |
| FOR | S | 100 |

**S: Sensitive**
**R: Resist**




**( الشكل –3 ) : نتائج الحساسية الدوائية لانواع الضمات باشرطة**

**( Rapid ATB E ).**

## References

Albert, M.J. (1997). Rapid detection of *Vibrio cholerae* 0139 Bengal from stool specimens by PCR. J. of Clinical Microbiol. (35) : 1663-1665.

Alkarkhi, K A.(2005).Bacteriological and Biochemical Study of some virulence factor produce by Vibrio cholera locally isolated from cholera patients.Ph.D. Thesis . Science college .Almusranseria university .

Alm, R.A.; Stroener, U.H.; Manning, PA. (1988). Extracellular proteins of *Vibrio cholerae* nucleotide sequence of the structural gene (hly A) for the hemolysin of the hemolytic Eltor strain of (017) and characterization of the (hly) A mutation in the non-hemolytic classical strain 569 B. Mol. Microbiol. (2) : 481-488.

Farugque, S.M.; Chowdhury,N.; Kamruzzaman,M.; Ahmad,Q.; Farugque, A.; Salam, M.; Ramamurthy, T.; Nair, G.; Weintraub, A. and Sack, D.(2003). Reemergence of epidemic Vibrio cholerae 0139, Bangladesh. Emerg infect Dis. 0:1116-1122.

Forbes, B.; Sahm, D. and Weissfeld, A. (2007). Vibrio, Aeromonas Plesiomonas and Chromobacterium.ch,28.In Diagnostic microbiology, 12th(ed.):371-379. Mosby.USA.

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

Harvey, R and Pamela, C. (2007). Gastrointestinal gram negative rodes. In Illustrated reviews: Microbiology, 2nd(ed) : 121. Williams and Wilkins. USA

Hofer, E. ; Quintaes, BR. ; Dos, R. ; Rodriques, D. ; Seki, ML. ; Fietose, Is. And Ribier, O. H. (1999). The emergence of Multiple antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* Isolated from gastroenteritis patient in Ceara, Brazil . Rew. Soc. Bras. Med. Trop. 32 (2) : 151 – 156 .

Janda J. (1998).Vibrio,Aeromonas and Plesiomonas. In Microbiology and microbial infections, 9th(ed): 1073. Arnola.London

Jean-Michel (2003). Annual report of cholera and Vibrios. Microbiology. 1st ed. Churcill Livingston. Edinburgh .

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

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

Tamayo, M; Koblavi, Greimno,F.; Gastaned a, E. and Crimont, P.A.D. (1997) Molecular epidermiology of Vibrio cholera 01 isolates from Colombia. J-med-Microbiol-46:611-616.

Wilson. G.; Miles , A. and Parker , M.T. (2005). Topley and wilson's. principles of bacteriology, Virology and Immunity -10th ed hodder Arnold. London.

Winn,W.; Koneman, E.; Allen,S.; Procop, G.; Schreckenberger, P.; Janda,W.; Woods, G.(2006).

The families Vibrioanaceae and "aeromonadaceae,ch.8, In Konemans color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th(ed.): 409-428. Lippincott Williams & Wilkins. USA.

World Health Organization (1997). Guide Iine for cholera control.