عزل وتشخيص بكتيريا *Vibrio fluvialis*من أسماك الكارب والشانك في مدينة الناصرية ودراسة مدى حساسيتها لمضادي Ciprofloxacin وAmoxycillin

***خديجة صادق جعفر ** منال بادي صالح **باحث عذراء عوده حسين**

جامعة البصرة, كلية الزراعة, قسم علوم الأغذية. جامعة ذي قار, كلية العلوم, قسم علوم الحياة.*

***جامعة ذي قار, كلية العلوم, قسم علوم الحياة.*

الخلاصة

تم التحري عن بكتريا *Vibrio fluvialis* في 150 عينة مأخوذة من سمك الكارب والشانك من محافظة ذي قار للفترة من 2\6 الى 30/11/ 2013 و تم التشخيص للعينات باستخدام الفحوصات المجهرية، الكيموحيوية التقليدية وأكد التشخيص نظام APi20E أظهرت نتائج التشخيص ثلاث عزلات تعود لبكتريا Vibrio *fluvialis* , وبينت نتائج أختبار الحساسية الدوائية لمضاد Amoxycillin مقاومة عالية , بينما كانت نتائج الحساسية الدوائية لمضاد Ciprofloxacin حساسية عالية تجاهه.

المقدمة

بكتريا *Vibrio fluvialis* هي احد أجناس الضمات والتي تعود الى عائلة (vibrionaceae) والتي ترجع الى القسم الخامس حسب تصنيف Bergys Manual (Holt *et al*., 1994)، وتشترك في كون أفرادها ذات شكل عصوي منحني متحركة عن طريق سياطها القطبية وهي محبة للملوحة سالبة لصبغة كرام (Collee *et al*., 1996). ومن ضمن متطلباتها أنها تحتاج الى كلوريد الصوديوم وموجبة الى أوكسيديز ، إيجابية لفحص النترات لها القدرة على تخمر D-الجلوكوز والكربوهيدرات الأخرى، مع إنتاج حامض والغاز؛ لديها 50٪ جوانين زائد السايتوسين في الحمض النووي؛ ويتم العزل من المياه وبراز الحيوانات، براز الإنسان، والصرف الصحي، والمنتجات البحرية (Holt *et al*., 1994) .

بكتريا الضمات هي أحد أهم أسباب الإسهال الدموي تماما مثل الكوليرا ويسبب عدوى الجرح مع تسمم الدم الابتدائي في الأفراد immunocomprised من البلدان المتقدمة كذلك البلدان المتخلفة، وخاصة في المناطق الفقيرة مع الصرف الصحي (Lee *et al*., 1981; Tacket *et al*., 1982).

وضعت هذه البكتريا ضمن مجموعة ((Heiberg group(III) (Hug *et al*., 1980) .كما تم عزلها من إصابات الجروح في هاواي 1977 وفي فلوريدا عام 1977 (Klontz & Desenclos, 1990)

وكذلك عزلت من المياه البحرية في نيويورك من قبل (Albert *et al* .,1991)، وعزلت من شخص مصاب بالإسهال نتيجة لتناوله المحار في الولايات المتحدة (Hickman-Brenner *et al*., 1984) .

وشخصت البكتريا لأول مرة في البحرين عام 1975وعزلت من مريض مصاب بالإسهال وسميت مبدئيا بمجموعة ضمات Fi (Furniss et al., 1977).

كما تم عزلها في بنغلاديش من جروح الرضع والبالغين إذ بلغ عدد الحالات المسجلة أكثر من 500 حالة للفترة 1976لغاية نوفمبر 1977 وكانت نسبة الإصابة 50% منهم في أطفال دون سن الخامسة من العمر والإعراض كانت 100% إسهال و97% تقيؤ و75% الآم في لبطن 35% حمى، كما وجدت كريات دم حمراء في خروج 75%من الحالات.

نظرا لأهمية الأسماك كمصدر غذائي مهم والتي يعتمد عليها في كثير من دول العالم وبشكل متزايد في سد الفجوة الغذائية فهي توفر نسبة عالية من البروتين الحيواني فضلا عن احتواءها على الفيتامينات مثل فيتامينات Aو D ، لذا أصبح من الضروري معرفة الأسباب التي تؤدي الى حدوث خلل في هذا المورد المهم وحمايته من

الأمراض الجرثومية ، والأسماك كغيرها من الأحياء تتعرض للعديد من الإصابات الجرثومية باعتبار أن البيئة المائية هي أحدى الوسائل المهمة في نقل هذه الإصابات(Abdulla, 2003).

يعد سمك الكارب العادي (Cyprinus carpio) من الأسماك الواسعة الانتشار في أوربا واسيا وتنتمي الى عائلة الشبوطيات ومن هذه المناطق تم نقلها من قبل الإنسان الى أرجاء العالم (Jehan, 2001). أما سمكة الشانك Spondyliosoma cantharus فهي أيضا تعد من الاسماك البحرية التي تنتمي الى عائلة الشبوطيات (Lythgoe & Lythgoe, 1971; Miller & Loates, 1997; Dulcic et al., 1998) ، تهاجر هذه الاسماك وتبيض في الأنهر العراقية وخاصة شط العرب وجنوب الاهوار ويسمى بالانكليزية (black sea-bream) ، يتراوح حجم السمكة في شط العرب ب 20-25 سم طولا وبعرض 10-15سم ، ، تتميز اسماك الشانك بشكلها البيضاوي المضغوط وفكوكها التي تحتوي على 4-6 صفوف من الأسنان القوية في المقدمة والتي وجدت لتتلائم وتغذيتها على الأعشاب البحرية واللافقريات (Pawson, 1995).

الأسماك عموما وسطاً غذائياً مثالياً للعديد من المايكرو بات لارتفاع نسبة الرطوبة فيها واحتوائها على مركبات بروتينية وكربوهيدراتية فضلاً عن المعادن والأملاح وآسها الهيدروجيني يكون ملائماً لنمو العديد من الأحياء المجهرية التي تُسبب إحداث تغييرات غير مرغوبة فيه (Gram, 1992).

المواد وطرائق العمل

جمعت العينات من سوقين من أسواق مدينه الناصرية وهي (السوق الكبير , سوق هرج) في محافظة ذي قار مدينة الناصرية وتنقل مبرده الى المختبر وبعد تحضير العينة توضع في ماء البيتون القاعدي المضاعف ويكون PH (8.6) وتحضن بدرجة حرارة 37م لمدة (6-8) ساعة (Islam *et al*., 1994; Elliot *et al*., 2001) , بعد استنبات العينات في الأوساط الزرعية تم أجراء الفحص التشخيصي المجهري باستخدام الاختبارات الكيموحيوية التقليدية وأكد التشخيص باستخدام نظام Api20E .

1- الفحوصات المجهرية Microscopical Tests

تم نقل جزء من المستعمرات النقية النامية على وسط TCBSو بعمر 18-24 ساعة بوساطة عروة الناقل (Loop) إلى شريحة زجاجية وضع عليها قطرة من الماء المقطر، ونشرت على مساحة من سطح الشريحة وتم تثبيتها وصبغت بصبغة كرام . بعدها تم فحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي للتمييز بين شكل الخلايا وايجابيتها وسلبيتها لملون غرام (Finegold and Martin, 1982) . بعد ذلك يتم أجراء الفحوصات الكيموحيوية التقليدية وأكدت بنظام Api20E.

2- الفحوصات الكيموحيوية Bio Chemical Tests

لغرض تشخيص العزلات أجريت الفحوصات الكيموحيوية التالية وحسب ما جاء في (Koneman, *et al*., 1992; Betty, *et al*., 2007) وكالاتي:-

أ- فحص الأوكسيديز (Oxidase Test)

تم أجراء هذا الفحص بأخذ عينة من المزروع البكتيري النامي على وسط الاكار المغذي المحضر على أن تكون المستعمرات النامية بعمر 24 ساعة بوساطة عيدان خشبية معقمة على ورقة ترشيح مبللة بكاشف الأوكسيديز ، إن ظهور اللون البنفسجي دلالة على ايجابية الفحص .

ب- فحص قابلية البكتريا على أنتاج الاندول (Indole production Test)

اجري الفحص بتلقيح وسط ماء البيتون بالعزلات البكتيرية وحضنت الأنابيب بدرجة 37º م ولمدة 24 ساعة ، بعد ذلك أضيفت قطرة من كاشف كوفاكس Kovac's reagent ، ظهور حلقة حمراء دليل على ايجابية الفحص.

ج- اختبار المثيل الأحمر (Methyl Red Test)

تم تلقيح وسط أحمر المثيل فوكس بروسكاور بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37ºم ولمدة 24 ساعة ثم أضيفت بعد ذلك (5) قطرات من كاشف المثيل الأحمر إلى الوسط ورجّ برفق حيث إن تغير لون الوسط إلى اللون الحمر دليل على ايجابية الفحص.

د- اختبار فوكس بروسكاور (Voges - Proskauer Test)

لقح وسط المثيل فوكس بروسكاور بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة 37 ºم ولمدة 24 ساعة بعد ذلك تمت إضافة 6 قطرات من الكاشف A و قطرتين من الكاشف B إلى النمو الحاصل في وسط MR-VP ومزج جيداً . أن ظهور اللون الوردي دليل على ايجابية الفحص .

ر- اختبار قابلية البكتريا على استغلال السترات كمصدر وحيد للكربون
(Citrate Utilization Test)

تم أجراء هذا الفحص بنقل جزء من المزروع البكتيري النامي على وسط الاكار المغذي وبعمر 24 ساعة ، بوساطة إبرة معقمة إلى وسط أكار سيمون ستريت المائل، وزرع بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة ، أن تغير لون الوسط من اللون الخضر إلى الأزرق هو دليل على ايجابية هذا الفحص .

ز- أختبار أنتاج أنزيم اليوريز (Urease Production Test)

تم تلقيح الأنابيب الحاوية على أكار اليوريا بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 °م و لمدة 24 ساعة ، أن تغير لون الوسط إلى اللون الوردي دلالة على إنتاجية البكتريا لأنزيم اليوريز .

و- اختبار قابلية البكتريا على الحركة و تخمر سكر المانيتول
(Motility and Mannitol Fermentation Test)

تم أجراء هذا الاختبار، وذلك بنقل جزء من المزروع البكتيري النامي على وسط الاكار المغذي وبعمر 24 ساعة بوساطة إبرة معقمة (Needle) إلى وسط اكار المانيتول شبه الصلب وزرع بطريقة الطعن وحضن بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة . تغير لون الوسط إلى الأصفر وانتشار النمو وظهوره بشكل تضبب حول منطقة الطعن يعطي ايجابية الفحص.

ي- اختبار تخمر السكريات وإنتاج CO_2 و H_2S
(Sugar Fermentation and CO2, H2S Production Test)

تم تلقيح وسط اكار كليكلر الحديد المائل بالعزلات البكتيرية وذلك بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضن بدرجة 37 ºم ولمدة 24 ساعة ، بعدها تم التحري عن وجود H_2S إذ يتكون راسب أسود في قعر الأنبوبة و CO_2 من خلال ظهور الفقاعات الغازية ويعدّ دليلا على تحرر CO_2 ،و تغير لون الوسط إلى اللون الأصفر دليل على تخمير سكر الكلوكوز واللاكتوز.

وتم تأكيد التشخيص باستخدام عدة API 20E التي تحتوي على 20 اختبار كيموحيوي والمعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO) .

3-اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية **Sensitivity Test**

وتم أجراء اختبار فحص الحساسية لبكتريا *Vibrio fluvialis* لبعض من المضادات الحيوية وبالاعتماد على طريقة Bauer and Kerby (1996) ومن أنواع المضادات التي استخدمت في هذا الاختبار هي, Ciprofloxacin, Amoxycillin.

حضر عالق بكتيري من العزلة المراد أجراء اختبار الحساسية لها للمضادات ، وذلك بنقل (4-5) مستعمرات منفردة ونقية بوساطة ناقل ميكروبي الى (5) مل من المحلول الملحي الفسلجي وقورنت عكارة العالق مع عكارة محلول ثابت العكرة القياسي (ماكفرلاند) الذي يعطي عددا تقريبيا (Cell/ml 10^8x1.5) . ثم بواسطة مسحة قطنية معقمة ونظيفة (Swabs) يتم نشر جزء من العالق البكتيري على سطح أطباق بتري الحاوية على وسط اكار مولر– هنتن ، ثم توزع أقراص المضادات الحيوية عليها بوساطة ملقط معقم . حضنت الأطباق بعدها بدرجة 37 °م ولمدة 24 ساعة ،وبعد انتهاء فترة الحضانة تم قياس مناطق التثبيط حول كل قرص وبالرجوع الى جداول قياسية بكل نوع من المضادات الحيوية ، وتم تحديد حساسة المضاد الحيوي، حسب ما جاء في (CLSI, 2007).

النتائج والمناقشة

1- الفحوصات المجهرية والكيموحيوية

ظهرت المستعمرات البكتيرية صفراء اللون على وسط TCBS(Nishibuchi& Seidler,1983) . كما ظهرت تحت المجهر بأنها عصوية أو تشبه الضمة وتمتلك سوطا في احد أقطابها مما يعطيها صفتها على أنها متحركة ، كما بينت الاختبارات الكيموحيوية ان هذه البكتريا أنتجت قاعدة / حامض في اختبار KIA، و أنها موجبة لاختبار الاوكسيديز وسالبة لاختبار الاندول واختبار فوكس بروسكاور واليوريز ،ومتحركة ومحللة للدم من نوع بيتا عند زرعها على اكار الدم (Elliot *et al*., 2001) .

2- **فحص API 20E التأكيدي**

بعد أجراء فحص API 20E ، أظهرت نتائج الاختبار ان البكتريا هي *Vibrio fluvialis* وهذا ما كان مطابق للاختبارات الكيموحيوية وكما في الجدول رقم (1).

جدول(1) يوضح الفحوصات البايوكيميائية باستخدام عدةAPI 20E

Test	Reaction Enzymes	Results
ADH	Arginine dihydrolase	+
ONP	G Beta - glactosides	+
LDC	Lysine decaboxylase	-
CIT	utilization Citrate	-
ODC	Ornithin decaboxylase	-
H2S	production H2S	-
URE	Urease	-
TDA	Tryptophane Deaminase	-
IND	Indole production	-
NP	Acetone production	-
GEL	Glatinase	+

GLN	Glucose- fermentation	+
INO	Inositol fermentation	-
SOR	Sorbitol fermentation	+
RHA	Rhamnose fermentation	-
SAC	Sucrose fermentation	+
MEL	Melibinose fermentation	+
AMY	Amydgalin fermentation	+
ARA	Arabinose fermentation	+

3- أختبار فحص الحساسية للمضادين Amoxycillin و Ciprofloxacin

أظهرت النتائج ان العزلات الثلاث لبكتريا *Vibrio fluvialis* كانت مقاومة للمضاد Amoxycillin وبنسبة 75% ، بينما كانت غير مقاومة للمضاد Ciprofloxacin. وهذا ماتطابق مع Chandrasekaran *et al*.(1998). ودراسة أخرى من قبل Manjusha & Sarita, (2013) اذ كانت نسبة المقاومة مقاربة لدراستي وكانت 87% .

وكانت حساسة للمضاد Ciprofloxacin وبنسبة 100% أيضا، وهذا مطابق لدراسة في الهند من قبل Manjusha & Sarita ,(2011) . بينما أظهرت حساسية للمضاد Amoxycillin وبنسبة 25% وكما هو موضح في الجدول (2).

جدول (2): يوضح نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لبكتريا *Vibrio fluvialis*

ت	نوع المضاد	عدد العزلات المقاومة	عدد العزلات الحساسة
-1	(AM ^{30}) Amoxycillin	2	1
-2	(CIP^{5})Ciprofloxacin	0	3

المصادر الانكليزية:

Abdulla, R. K. (2003). Arabian Scientific Research Journal I: 16-20. Albert, M., Hossian , M.A.; Adam. K, et al. (1991). Afetal case associated with shigellosis and Vibrio fluvialis bacteria Diagn. *Microbiol Infect .Dis* .**14**: 509- 510.

Bauer, A. ; Kirby, W. ; Sherris, J. and Turtch, M. (1996). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Path*., **43**: 493-96.

Betty, A. , Daniel, F. and Alice, S. (2007). Diagnostic Microbiology. 12th ed. China. **24**:1031p.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute .(2007). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement, CLSI document M100-S17, Wayna.

Collee.J.G.; Fraser, A.G.; Mermion, B.P. and Simmons, A. (1996). Mackie and MacCatney. Practical Medical Microbiology. P.425. (14th ed.). Churchill Linvingstone Philadelphia.

Dulcic, J., Skakelja, N., Kraljevic, M., and Cetinic, P. (1998). On the fecundity of the Black Sea bream, Spondyliosoma cantharus (L.), from the Adriatic Sea (Croatian coast). *Scientia Marina*., **62** (3): 289-294.

Elliot , E. l; Kaysnar , C .A. and Tamplin ,N.L.(2001).Vibrio cholerae , V. parahaemolyticus , V. vulnificus and other Vibrio spp. Bacteriological Analytical Manual online . chapter-9 Center for Food Safety and Applied Nutrition .

Finegold, S.M. and Martin, W.J. (1982). Diagnostic Microbiology. 6th ed. Mosby Company.

Furniss, A.L.; Lee, J.V.; Donovan, T.J. (1977). Group F, a new Vibrio? *Lancet*. **10**: 565-566.

Hickman –Brenner , F.w, Brenner , D.J, Steiger A.G. (1984). Vibrio fluvialis and Vibrio furniss isolated from stool sample of one patient . *J.Clin.Microbiol*. **20**: 125-127.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H. and Bergy. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Lippincott, Williams & Wilkins. *East Lansing. Mich.*

Hug ,M.I.; Alam A MJ , Brenner D.J. (1980). Isolation of Vibrio – like group Ef-6, from patients with dirrhea . *J Clin . Microbiol*. **11**: 621- 624.

Igbinosa, E.O.; Okoh, A.I. (2008). Emerging Vibrio species: An unending threat to public health in developing countries. *Res*. Microbiol., **159**: 495-506.

Islam , M . S. , Hasan , M..K., Miah, M. A., Yunis ,M.,Zaman , K,. and Albert,. M.J. (1994). Isolalation of Vibrio cholerae 0139 synonyin from aquatic environment in Bangladish : Application for disease transmission. *Appl. Inviron. Microbiol*. **60** :1684-1686.

Jehan, I. A. (2001). M. V. Sc. Thesis. Fac. *Med. Cario. Univ.*

Klontz , K. C .and Desenclos J.C. (1990). Clinical and epidemiogical feature of sporadic infection with Vibrio fluvialis in florida , U.S.A. *J- Diarrhoeal Dis . Res* .**8**: 24- 26.

Lee, J.V.; Shread, P.; Furniss, A.L. (1978). The taxonomy of group F organisms: relationships to Vibrio and Aeromonas. *J. Appl. Microbial*., 45.

Lee , J.V; Shread , P. , Furniss , A.L ;et al. (1981). Taxonomy and description of Vibrio fluvialis spnov(synonym Group's- Vibrios Group EF-6). *J. Clin . Microbiol* .**50** :73-94.

Lythgoe, J., and Lythgoe, G. (1971). Fishes of the sea: The coasted water of the British Isles, Northern Europe and the Mediterranean, A photographic guide in colour. *Blandford Press*, London, England.

Manjusha, S. and 1Sarita, G. B. (2011). Plasmid associated antibiotic resistance in Vibrios isolated from coastal waters of Kerala . *International Food Research Journal*. **18**(3): 1171-1181.

Manjusha, S. and Sarita, G. B. (2013). Characterization of plasmids from multiple antibiotic resistant Vibrios isolated from molluscan and crustacean of Kerala . *International Food Research Journal*. **20**(1): 77-86.

Miller, P. J., and Loates, M. J. (1997). Collins Pocket Guide: Fish of Britain and Europe. *Harper Collins Publishers*, London, England.

Nishibuchi, M., Seidler ,R.J. (1983). Medinm dependent production of extra cellular entrotoxins by non 01 Vibrio cholerae , Vibrio mimicus and Vibrio fluvialis. *Appl. Environ. Microbiol*. 228-231.

Pawson, M. G. (1995). Biogeographical identification of English Channel Fish and shellfish stocks. Fisheries Research Technical Report, *MAFF Direct Fisheries Research Lowestoft*, England .

Tacket CO, Hickman F, Pierce GV, Mendoza LF. (1982). Diarrhea associated with Vibrio fluvialis in the United States. *J Clin Microbiol*. **16** (5): 991-992.