استخدام تقنية الـ Real time (PCR) للكشف الجزيئي لجينات hlyA و vfhly في بكتيريا *Vibrio cholerae* و *Vibrio fluvialis* المعزولة من الأسماك

***خديجة صادق جعفر الحسيني **عذراء عوده حسين الجبوري **منال بادي صالح التميمي**

* قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة . العراق

** قسم علوم الحياة ، كلية العلوم، جامعة ذي قار، ذي قار . العراق

الخلاصة

في هذه الدراسة تم عزل وتشخيص بكتيريا الضمات *Vibrio* spp. من الاسماك الطازجة والمجمدة وهي الصبور *Tenualosa ilisha* والكارب الفضي *Hypophthalmichthys molitrix* والبني *Barbus sharpeyi* والشانك *Spondyliosoma cantharus*، إذ جمعت 210 سمكة من اسواق محافظة البصرة (سوق البصرة الكبير والعشار والتنومة وخمسة ميل) بينما جمعت 150 سمكة من الكارب الفضي والبني والشانك من اسواق محافظة الناصرية (السوق الكبير وسوق هرج)، استمرت عملية جمع العينات للفترة من 6/2/ ولغاية 2013/11/30. وجُلبت الأسماك إلى المختبر وأخذت العينات منها بعد فرمها كاملة وزرعت مباشرة على الأوساط الزرعية (آلاكار المغذي, أكار الدم, أكار الماكونكي، الوسط الانتقائي (ثيوسلفات– سترات –السكروز الصفراوية الصلب TCBS) ثم حُضنت الأطباق هوائياً في درجة حرارة 37م لمدة 18–24 ساعة. بعد فترة الحضن تم تشخيص 30 عزله من بكتيريا الضمات وشُخص الجنس بالاعتماد على شكل المستعمرات والخلايا تحت المجهر وفحص أنزيم الكاتليز وأنزيم الاوكسيديز وفحص الحركة بعدها شخصت الأنواع بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية. واستعمل نظام API20E التاكيدي، اذ تم تشخيص نوعين من بكتيريا *Vibrio* هي *Vibrio cholera* و *Vibrio fluvialis* ولوحظ وجود هذه البكتريا في الاسماك الطازجة اكثر من وجودها في الاسماك المجمدة. اوضحت النتائج باستخدام تقنية (Real time(PCR لاجل الكشف عن الجينات المسوؤلة عن انزيم hemolysin في *Vibrio* spp. ان (27) عزلة من *Vibrio cholera* و(3) عـزلات من *Vibrio fluvialis* تمتلك هذا الانزيم المحلل لكريات الدم الحمراء والذي يُعد من التوكسينات التي تمتلكها انواع *Vibrio* spp. ولها دور في حدوث الامراض.

***البحث مستل** من رسالة الماجستير للباحث الثالث / **كلمات مفتاحية** : اسماك الكارب ، البكتريا الضمية *Vibrio* spp.

المقدمة

وصفت بكتيريا الضمات بانها بكتيريا سالبة لصبغة كرام ذات شكل يشبه الضمة محبة للملوحة لاهوائية اختيارية وتمتلك سوط واحد في احد أقطابها، وتكون موجبة لاختبار(الاوكسيديز والكاتاليز) وغير مكونة للابواغ، ولها القدرة على تخمير سكريات الكلوكوز والمانيتول والسكروز والمانوز والمالتوز والتريهالوز مع انتاجها غاز وغير قادرة على تخمير الارابينوز (Collee et al., 1996)، لها القابلية على النمو على أوساط زرعية اعتيادية وانتخابية تحت ظروف هوائية ولا هوائية (Sleigh and Timbury , 1994تحتل محاصيل الخضر مكانة

اما بكتيريا *Vibrio fluvialis* فترجع الى القسم الخامس حسب تصنيف Furniss *et al.*, Bergys Manual (1977)، وتشترك في كون أفرادها ذات شكل عصوي منحني متحركة عن طريق سياطها القطبية وهي محبة للملوحة وسالبة لصبغة كرام (1998) ,.Dulcic *et al*، ومن ضمن متطلباتها الاخرى احتياجها لملح كلوريد الصوديوم وكونها موجبة لانزيم الاوكسيديز وإيجابية لفحص النترات ولها قدرة على تخمر D–الجلوكوز والكربوهيدرات الأخرى مع إنتاج الحامض والغاز ؛ ويتم عزل بكتيريا عائلة.spp *Vibrio* من المياه وبراز الحيوانات وبراز الإنسان ومن قنوات الصرف الصحي والمنتجات البحرية (1977) Furniss *et al.,*. وأن تقنية Real time (PCR) تقنية حديثة وسريعة وحساسة وذات خصوصية عالية، ففي عدة دراسات كانت هذه التقنية تستعمل للكشف عن الامراضية في الإنسان والحيوان (Halse *et al*., 2006; Qvarnstrom *et al*., 2006; Ward and Bej, 2006; Wolf *et al*., 2007). وفي بعض الدراسات يتم اختيار الجينات المحللة للدم وهذه الجينات من شأنها ان تكشف عن انواع الضمات فالجين hly جين الهيمولايسن الذي يعتبر من عوامل الضراوة عرف على نطاق واسع في الضمات اذ ان السموم التي تفرزها البكتيريا تقوم بتحلل دموي وبالتالي يؤثر على عمل الخلية للمضيف فتسبب تفجي للخلية من خلال تعزيز النفاذية والأنشطة النزفية (Miyoshi *et al*., 2002; Goutam *et al*., 2012). وان هذه التقنية بالإضافة الى ما ذكر فهي تساهم في رصد الأمراض الوبائية بما فيها التلوث بالضمات وبوقت قياسي ودقة عالية وبعيداً عن الالتباس والشك وبالتالي تُساهم في تحسين الصحة العامة (Aridgides *et al*., 2004; Bauer and Rorvik, 2007).

كما ذكرت (2003),OHara *et al.* بان نظام API 20E يمتلك دقة تحديد نسبتها 90% لبكتيريا *V. parahaemolyticus* ، وبنسبة 50% و60% بالنسبة لكل من بكتيريا *V. cholerae* و*V. vulnificus* على التوالي.

لهذه الأسباب استخدمت التقنيات الجزيئية للكشف عن انواع وصفات أكثر وبسهوله (Lyon, 2001; Panicker *et al.*, 2004; Panicker and Bej, 2005) . كذلك فان العلاقة بين hemolysin و hlyA لها أهمية كبيرة لدراسة أمراضية الضمات وتطوير اللقاح، والعديد من اللقاحات المرشحة والتي استعملت من السلالات عن طريق توليد حذف او أدراج طفرة في هذا الموضع لذلك من المهم ان توضح البروتينات المشفرة بواسطة hlyA وتحديدها بشكل جيد (Robert and Bohumil, 1990) .

تبلور الهدف من هذه الدراسة بما يلي:

1- جمع عينات الاسماك من اسواق محافظة البصرة ومحافظة ذي قار. وعزل بكتيريا الكوليرا منها.

2- تشخيصها وفق الفحوصات المجهرية والكيموحيوية الخاصة بالكشف عن بكتيريا *Vibrio cholera*, *Vibrio fluvialis*.

3- تأكيد التشخيص باستعمال عدة APi20E التي تحتوي على 20 اختبار كيموحيوي والمعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO).

4- الكشف عن أهم الجينات التي تحدد جنس البكتيريا باستخدام تقنية (Real-Time(PCR.

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات :

جمعت 360 عينة من الاسماك، منها 210 عينة من أربعة أسواق من محافظة البصرة و150 عينة من اسواق محافظة الناصرية، للمدة الممتدة من 6/2/ ولغاية 2013/11/30، اذ جمعت عينات اسماك الصبور من اسواق محافظة البصرة كالأتي : 12من سوق البصرة الكبير و16 من سوق العشار و20 من سوق التنومه و9 من سوق خمسة ميل، بينما جمعت اسماك الكارب كالأتي : 10 من سوق البصرة الكبير و13 من سوق العشار و8 من سوق التنومه و17 من سوق خمسة ميل، في حين ان ما تم جمعه من عينات من اسماك الشانك هي 9 من سوق البصرة الكبيرو17 من سوق العشار و19 من سوق التنومه و10 من سوق خمسة ميل، وكانت العينات المجموعة من سمك البني

14 من سوق البصرة الكبير و8 من سوق العشار و19 من سوق التنومه و9 من سوق خمسة ميل. أما من اسواق محافظة الناصرية فكان عدد عينات اسماك الكارب كالأتي: 15 من سوق هرج و20 من السوق الكبير ومن اسماك الشانك كان عدد العينات 30 من سوق هرج و25 من السوق الكبير، ومن سمك البني25 من سوق هرج و35 من السوق الكبير. ونُقلت عينات الاسماك محفوظة بالثلج الى المختبر وبعد تحضير العينة وذلك بفرم السمكة كاملة بفرمة كهربائية اؤخذت النماذج ووضعت في ماء البيتون القاعدي المضاعف لغرض التنشيط ويكون الرقم الهيدروجيني (8) وحُضنت بدرجة حرارة 37م لمدة (6–8) ساعة.(Collee *et al.*, 1996; Holt *et al.*,1994). زرعت العينات مباشرة على الأوساط الزرعية (وسط آلاكار لمغذي والدم والمكونكي وTCBS) ، ثم حُضنت الأطباق هوائياً في درجة حرارة 37م لمدة 18–24 ساعة، إذ لوحظت صفات وأشكال المستعمرات النامية بأجراء الفحص التشخيصي المجهري.

2- الفحوصات المجهرية

نقل جزء من المستعمرات النقية النامية على وسط CBS وبعمر 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 كرام (1998),Dulcic *et al.* .

3- الفحوصات الكيموحيوية

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

أ- **فحص الأوكسيديز:** 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، ودل ظهور اللون البنفسجي على ايجابية الفحص.

ب- **فحص قابلية البكتريا على أنتاج الاندول** : اجري الفحص بتلقيح وسط ماء البيتون بالعزلات البكتيرية وحضنت الأنابيب بدرجة 37° م لمدة 24 ساعة، بعد ذلك أضيفت قطرة من كاشف كوفاكس Kovac's reagent، والدليل على ايجابية الفحص هو ظهور حلقة حمراء.

ج- اختبار المثيل الأحمر: تم تلقيح وسط أحمر المثيل فوكس بروسكاور بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 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: لقح وسط المثيل فوكس بروسكاور بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم 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: 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: تم تلقيح الأنابيب الحاوية على أكار اليوريا بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة، وكان تغير لون الوسط إلى اللون الوردي دلالة على إنتاجية البكتريا لأنزيم اليوريز.

و- اختبار قابلية البكتريا على الحركة و تخمر سكر المانيتول: 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 لمدة 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 وH_2S: تم تلقيح وسط اكار كليكلر الحديد المائل بالعزلات البكتيرية وذلك بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضن بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة ، بعدها تم التحري عن وجود H_2S إذ يتكون راسب أسود في قعر الأنبوبة وCO_2 من خلال ظهور الفقاعات الغازية ويعدّ دليلاً على تحررCO_2، وتغير لون الوسط إلى اللون الأصفر دليل على تخمير سكر الكلوكوز واللاكتوز. وتم تأكيد التشخيص باستعمال عدة API 20E التي تحتوي على 20 اختبار كيموحيوي والمعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO).

3- طريقة التشخيص باستخدام فحص Real-Time (PCR)

تم أجراء فحص Real-Time PCR وذلك للتشخيص التأكيدي لجرثومتي الـ *Vibrio cholera* و *Vibrio fluvialis* المعزولة من الأسماك وذلك باستعمال البادئات التي صممت في هذه الدراسة. وكما يأتي اذ يتكون الفحص من عدة خطوات :-

3-1 استخلاص الحمض النووي الجرثومي Bacterial DNA Extraction: تم أجراء استخلاص للحمض النووي الجرثومي وذلك باستعمال عدة الـ (PrestoTM Mini gDNA Bacteria Kit. Geneaid. USA) وتم أجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة كالأتي:- زرعت العزلات الجرثومية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ وحُضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة.

1. تم نقل 1مل من النمو الجرثومي إلى أنابيب معقمة سعة 1.5 مل ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000rpm لمدة دقيقة وبعدها تم التخلص من السائل الطافي. وتم إضافة 180مايكروليترمن محلول GT Buffer على الخلايا البكتيرية ومزجت جيداً بواسطة جهاز المازج ومن ثم إضيف 20 مايكروليترمن أنزيم Proteinase K ومن ثم حُضنت العينات بدرجة حرارة 56 م لمدة 10 دقائق. ثم اضيف 200 مايكروليترمن محلول GB Buffer ومُزج بواسطة المازج ومن ثم حُضنت الأنابيب بدرجة حرارة 70 م لمدة 10 دقائق. بعد ذلك إضيف الكحول الاثيلي المطلق Absolute ethanol 96 % إلى جميع العينات ومُزجت جيداً بواسطة المازج. ثم تم نقل المزيج إلى أنابيب خاصة تحتوي على فلتر لاستخلاص الحمض النووي المجهز مع العدة GD Column الموضوعة داخل أنابيب جامعةtube collection سعة 2 مل ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 rpm لمدة دقيقتين ومن ثم تم التخلص من الراسب. بعد ذلك تم إضافة 400 مايكروليترمن محلول W1 Buffer ومن ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 rpm لمدة دقيقة ومن ثم تم التخلص من الراسب.
2. بعد ذلك تم إضافة 600 مايكروليترمن محلول W2 Buffer ومن ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 rpm لمدة دقيقة ومن ثم تم التخلص من الراسب.
3. وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 rpm لمدة دقيقتين لتجفيف إلـ GD filter Column من الكحول ومن ثم تم التخلص من الراسب.

4. تم نقل إلـ GD filter Column الحاوية على الحمض النووي في أنابيب معقمة سعة 1.5مل ومن ثم إضافة 50 مايكروليترمن محلول الـ TE Buffer لإذابة الحمض النووي ومن ثم حُضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة وبعدها وضعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 rpmلمدة دقيقة لجمع الحمض النووي وبعدها نقل إلى الحفظ بدرجة حرارة −20 تحت الصفر في الثلاجة لحين الاستعمال في فحص الـ (PCR) Real−Time.

3 .2 فحص الحمض النووي المستخلص DNA Profile

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من العزلات الجرثومية وذلك باستخدام جهاز Nanodrop Spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الأحماض النووية اذ يتم الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي (ng \ µl) DNA وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260\28) وتم استخدام الجهاز على النحو التالي :−

بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA.

نقوم بتصفير ركيزة المقياس مرتين وذلك بوضع 2مايكروليتر منddH_2O باستعمال مايكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وأجراء التصفير وبعدها نقوم بتنظيف الركيزة باستعمال ورق نشاف خاص بالجهاز. يوضع 1مايكروليترمن كل عينة من الـ DNA المستخلص على ركيزة مقياس الجهاز ومن ثم ضغط زر ok لبدء عملية قياس تركيز الـ DNA ومن ثم نقوم بالتنظيف مرة أخرى لقياس العينة الأخرى.

تم تحديد نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية باستخدام جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260 − 280 nm) حيث ان الحمض النووي DNA المستخلص يعد نقياً عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3 .3 تحضير مزيج تفاعل Real Time− (PCR) Master Mix

تم تحضير مزيج تفاعل Real Time−PCR باستعمال عدة الـ AccuPower® 2x GreenStarTMqPCR Master Mix المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة, كما في جدول رقم (3−8) :−

جدول (1): تحضير مزيج Master Mix وحسب تعليمات الشركة .

PCR master mix	Volume
2X Green star master mix	25 µl
DNA template	5 µl
Forward primer 10 pmol	1.5 µl
Reverse primer 10 pmol	1.5 µl
DEPC water	17 µl
Total	50 µl

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل Real-Time PCR التي ذكرت في الجدول أعلاه إلى أنابيب بيضاء معقمة حجم 0.2 مل خاصة بجهاز Real-Time PCR ومن ثم نقلت جميع الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000 rpm لمدة ثلاثة دقائق وثم وضعت في جهاز Real-Time PCR.

4. 3 ظروف الدورات الحرارية : تم تطبيق الدورات الحرارية لفحص Real-Time PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة AccuPower® 2x GreenStarTMqPCR Master Mix وكذلك من خلال حساب درجة TM البادئات وذلك باستخدام جهاز MiniOpticon Real-Time PCR system BioRad. USA كما في الجداول أدناه:-

جدول (2): جين gene (hlyA) الخاص بجرثومة *Vibrio cholerae*

Step	Condition	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C 3 min	1
Denaturation	95 °C 10 sec	45
Extension/Annealing	58 °C 30 sec	
Detection (Scan)		
Melt curve	65-95 °C	0.5 sec

جدول (3): جين gene (vfhly) الخاص بجرثومة *Vibrio fluvialis*

Step	Condition	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C 3 min	1
Denaturation	95 °C 10 sec	45
Extension/Annealing	56 °C 30 sec	
Detection (Scan)		
Melt curve	65-95 °C	0.5 sec

5.3 تحليل نتائج فحص Real-Time PCR

تم تحليل نتائج فحص Real-Time (PCR) وذلك من خلال منحني التضخم Amplification plot المعتمد على رقم خط جهد العتبة Throushold cycler number (CT) value حيث تكون العينة موجبة عندما تتجاوز خط العتبة، وكذلك تم تحديد خصوصية الفحص للعينات الموجبة من خلال منحنى الانصهار melt peak حيث تكون العينات موجبة أذا كان ظهورها في نفس درجة الانصهار(Tm) والتي تتراوح في التضخم الحقيقي للجين 80-90 م°.

النتائج والمناقشة

جمعت 360 عينة من الاسماك، منها 210 عينة من أربعة أسواق من محافظة البصرة و150 عينة من اسواق محافظة الناصرية، وكما مبين في جدول (1) و جدول (2).

جدول (1) : توزيع الأسماك المجموعة من اسواق محافظة البصرة

نوع الاسماك	مصدر الاسماك	اعداد الاسماك		هيئة الاسماك
الصبور	سوق البصرة الكبير	12	6	طازج
			6	مجمد
	العشار	16	8	طازج
			8	مجمد
	التنومة	20	10	طازج
			10	مجمد
	خمسة ميل	9	5	طازج
			4	مجمد
الكارب	سوق البصرة الكبير	10	5	طازج
			5	مجمد
	العشار	13	7	طازج
			6	مجمد
	التنومة	8	4	طازج
			4	مجمد
	خمسة ميل	17	9	طازج
			8	مجمد
الشانك	سوق البصرة الكبير	9	5	طازج
			4	مجمد
	العشار	17	9	طازج
			8	مجمد
	التنومة	19	10	طازج
			9	مجمد
	خمسة ميل	10	5	طازج
			5	مجمد
البني	سوق البصرة الكبير	14	7	طازج
			7	مجمد
	العشار	8	4	طازج
			4	مجمد
	التنومة	19	10	طازج
			9	مجمد
	خمسة ميل	9	5	طازج
			4	مجمد
المجموع		210		

جدول (2) : توزيع الأسماك المجموعة من اسواق محافظة الناصرية

نوع الاسماك	مصدر الاسماك	اعداد الاسماك		هيئة الاسماك
الكارب	السوق الكبير	20	10	طازج
			10	مجمد
	سوق هرج	15	8	طازج
			7	مجمد
الشانك	السوق الكبير	25	12	طازج
			13	مجمد
	سوق هرج	30	15	طازج
			15	مجمد
البني	السوق الكبير	35	18	طازج
			17	مجمد
	سوق هرج	25	13	طازج
			12	مجمد
المجموع				150

1- الفحوصات المظهرية: لوحظ ظهور المستعمرات البكتيرية بلون اصفر على وسط TCBS(Lythgoe and Lythgoe (1971 كما ظهرت تلك المستعمرات تحت المجهر عصوية الشكل او ما يشبه الضمة وتمتلك سوطاً في احد أقطابها مما يعطيها صفة القدرة على الحركة.

2- الفحوصات الكيموحيوية :كما بينت الاختبارات الكيموحيوية ان هذه البكتريا أنتجت قاعدة / حامض في اختبارKIA، و أنها موجبة لاختبار الاوكسيديز وسالبة لاختبار الاندول واختبار فوكس بروسكاور واليوريز، ومتحركة ومحللة للدم من نوع بيتا عند زرعها على اكار الدم (1996) Collee *et al.*,

جدول (3) الاختبارات البايوكيميائية

نوع العزلة	KIA	H_2S	Gas.	Ox.	Mo.	G. S	L.F	Cit	ARA	VP
Vibrio cholera	+	–	–	+	+	–	–	+	–	+
Vibrio fluvialis	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–

3- فحص API 20E التأكيدي: بعد أجراء فحص API 20E ، أظهرت نتائج الاختبار ان البكتيريا هي *Vibrio fluvialis* وهذا ما كان مطابق للاختبارات الكيموحيوية وكما في جدول (4).

جدول (4) : الفحوصات البايوكيميائية باستعمال عدة API 20E

Test	Reaction Enzymes	Results
ADH	Arginine dihydrolase	+
ONP	G Beta – glactosides	+
LDC	Lysine decaboxylase	–
CIT	utilization Citrate	–
ODC	Ornithin decaboxylase	–
H_2S	production H_2S	–
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	+

4 نتائج التشخيص بفحص Real-Time(PCR)

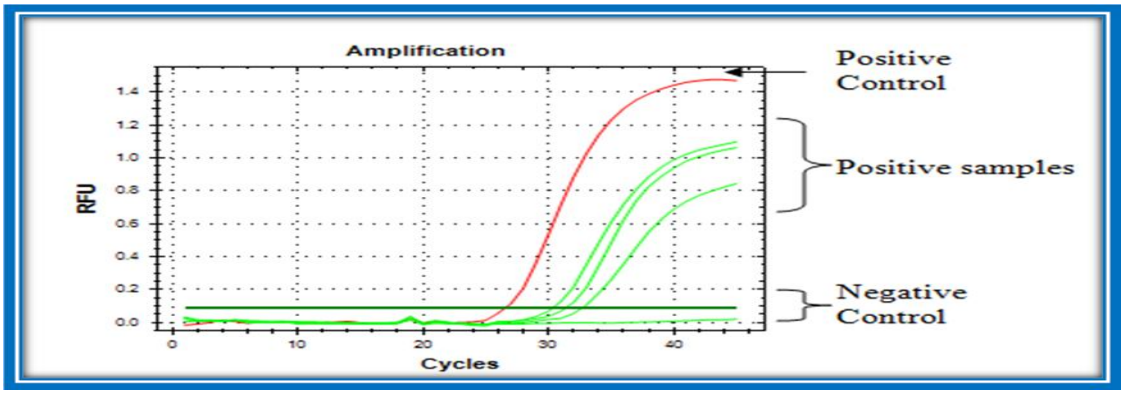
4 . 1 نتائج تشخيص جرثومة *Vibrio fluvialis* and *Vibrio cholerae*

يظهر من النتائج الموضحة في جدول (5) بان عدد العزلات الكلي التي اعطت نتائج موجبة بعد فحصها بالاختبارات الزرعية والكيمياوية وطقم الـ API 20E هو 30 عزلة ، منها 27 عزلة موجبة من *Vibrio cholerae* و3 عزلات موجبة من *Vibrio fluvialis*. بينما أظهرت نتائج فحص Real

time(PCR) بأن عدد العزلات الموجبة الكلي كان 24 عزلة، 21 منها كانت لبكتيريا *Vibrio cholerae* أما العزلات الثلاث الأخرى فكانت لبكتيريا *Vibrio fluvialis*، وهذه النتائج كانت مطابقة لدراسة كورية قام بها (Jie *et al.*, 2013) أذا اعتمد على تقنية Real time(PCR) لدقتها وسرعتها كذلك شخص أكثر من نوع للضمات في نفس الوقت بأعتماد الجينات الخاصة لكل نوع فيما يخص الجينات hemolysin واستعمال البرايمر الخاص لكل نوع. ويتضح من الدراسة الحالية بأن الفحوصات الزرعية والكيمياوية وطقم الـ API 20E لاتعطي نتائج دقيقة وهذا ما تطابق مع دراسات أخرى, ففي دراسة أجريت في البنغال من قبل (Ansaruzzaman *et al.*, 1995) مفادها أن بكتيريا ضمات الكوليرا غير قادرة على تخمر السكروز ودراسة اخرى في تايوان قد أخطئوا فيها من التعرف على سلالة الكوليرا وشخصت على أنها *V. alginolyticus* و *V. mimicus* باستعمال طقم API 20E لكن هذه السلالة تم التعرف عليها بصوره صحيحة باستعمال التقنيات الجزيئية بما فيها PCR (Wei *et al.*, 2008).

جدول 5: العزلات الموجبة لبكتيريا *Vibrio fluvialis* و*Vibrio cholerae*

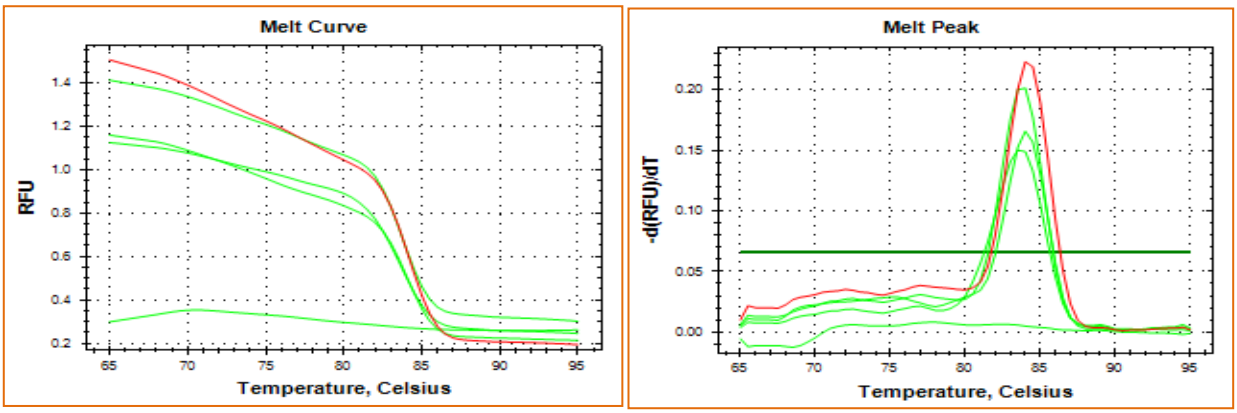
نوع البكتيريا	العدد الكلي	العزلات الموجبة = 24 العزلات السالبة = 6	النسبة المئوية
V.cholerae	**27**	**21**	**77.80**
V. fluvialis	**3**	**3**	**100**
العدد الكلي للعزلات الموجبة		24	**88.88**



شكل (1): يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص Real-Time (PCR) لجين vfhly للعزلات الموجبة لتشخيص *Vibrio fluvialis* .

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
B02	SYBR	Pos Ctrl	Vibrio fluviali	1.47	(+) Positive
D02	SYBR	Unkn	Vibrio fluviali	1.06	(+) Positive
D04	SYBR	Unkn	Vibrio fluviali	0.794	(+) Positive
F02	SYBR	Unkn	Vibrio fluviali	1.03	(+) Positive
H02	SYBR	Neg Ctrl	Vibrio fluviali	0.0141	

شكل (2) : يوضح التحليل النهائي endpoint لفحص Real-Time PCR لعزلات جرثومة *Vibrio fluvialis* , حيث يوضح العزلات الموجبة وعينـات السيطرة الموجبة والسالبة.

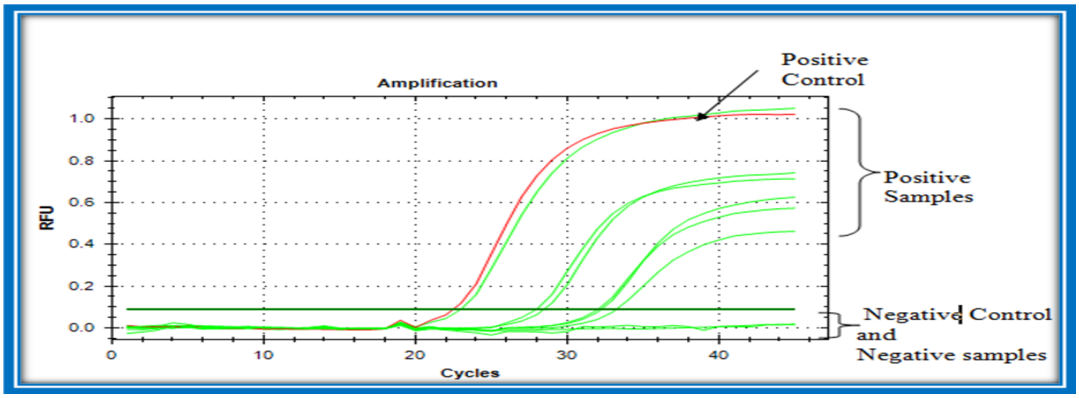


A B

شكل (3) : يوضح منحنى الانصهار Melt curve (A) وقمة الانصهار Melt peak (B)

لفحص Real-Time PCR اللذان يوضحان خصوصية تضخم جين لبيان

خصوصية تضخم جين vfhly للعزلات الموجبة لتشخيص ***Vibrio fluvialis*** .

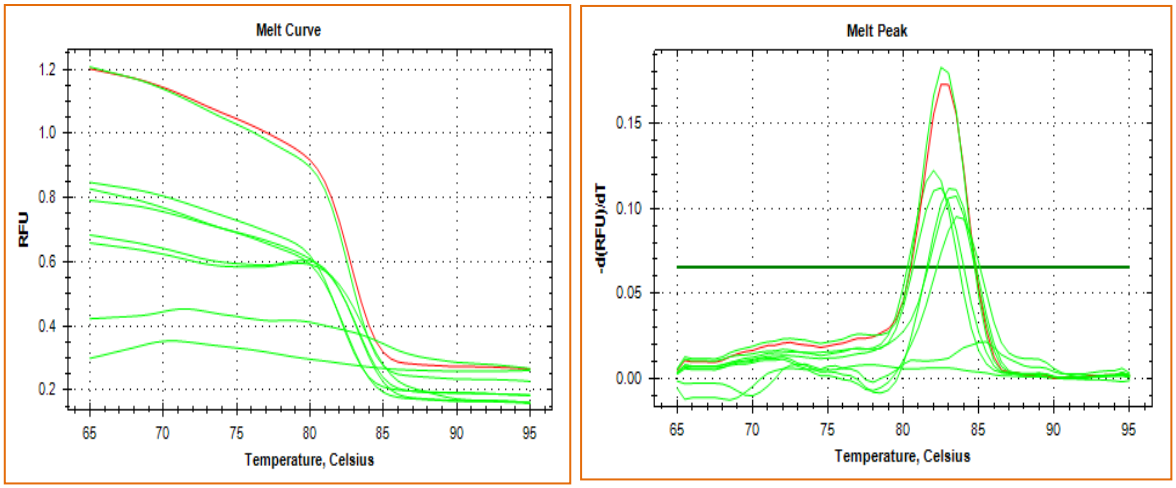


شكل (4) : يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR

لجين hlyA للعزلات الموجبة لتشخيص ***Vibrio cholerae*** .

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
C03	SYBR	Unkn	Vibrio cholerae	1.04	(+) Positive
F04	SYBR	Unkn	Vibrio cholerae	0.610	(+) Positive
B04	SYBR	Unkn	Vibrio cholerae	0.709	(+) Positive
A03	SYBR	Unkn	Vibrio cholerae	0.453	(+) Positive
G04	SYBR	Unkn	Vibrio cholerae	0.734	(+) Positive
A04	SYBR	Unkn	Vibrio cholerae	0.563	(+) Positive
E01	SYBR	Unkn		0.0168	
D03	SYBR	Pos Ctrl	Vibrio cholerae	1.02	(+) Positive
H02	SYBR	Neg Ctrl	Vibrio cholerae	0.0141	

شكل (5) : يوضح التحليل النهائي endpoint لفحص Real-Time PCR لعزلات جرثومة ***Vibrio cholerae*** , حيث يوضح العزلات الموجبة والسالبة وكذلك عينات السيطرة الموجبة والسالبة.



A B

شكل (6) : يوضح منحنى الانصهار (A)Melt curve , وقمة الانصار (B) Melt peak , لفحص Real-Time PCR اللذان يوضحان خصوصية تضخم جين لبيان خصوصية تضخم لجين hlyA للعزلات الموجبة لتشخيص *V. cholerae*.

المصادر

1.**Ansaruzzaman, M.;Rahman, M.; Kibriya, A.K.; Bhuiyan, N.A.; Islam, M.S. and Albert, M. J. (1995).** Isolation of sucrose late-fermenting and nonfermenting variants of *Vibrio cholerae* O139 Bengal: implications for diagnosis of cholera. J. Clin Micro. 33(5):1339-40.

2.**Aridgides, L.J.; Doblin, M.A.; Berke, T.; Dobbs, F.C.; Matson, D.O.; Drake, L.A. (2004).** Multiplex PCR allows simultaneous detection of pathogens in ships' ballast water. Mar Pollut Bull., 48:11-12.

3.**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.

4.Berge`s, L. ; Rodriguez-Villalobos, H. ; Deplano, A. and Struelens, M. (2007) . Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and E-test for detection of metallo-β-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa . J.Antimicrobial Chemother. , 50 : 812-813.

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

6.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.

7.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.

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

9.Goutam, C.; Gururaja, P.; Pazhani, D.; Dutta, S.; Guin, S.; Dutta, S.; Ghosh, H.; Izumiya and M. A. (2012). *Vibrio fluvialis* in Patients with Diarrhea, Kolkata, India.Emerging Infectious Diseases . 18 (11) : 1868-1871.

10.Halse, T.A.; Musser, K.A. and Limberger, R.J. (2006). A multiplexed real-time PCR assay for rapid detection of Chlamydia trachomatis and identification of serovar L-2, the major cause of lymphogranuloma venereum in New York. Mol Cell Probes ., 20(5):290-7.

11.Jie, Y. P.; Semi, J. J.; Young, K. M. and Park, S. K. (2013). Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction Assays for Simultaneous Detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemoly* and *Vibrio vulnificus* . Osong. Public. Health. Res. Perspect., 4 (3):133-139.

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

13.**Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Jawa, W.M. and Sachreckeber, P.C. (1992).** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. J.B. Lippincott company. Philadelphia.

14.**Lyon, W.J. (2001).** TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic sea water.Appl. Envir. Micro .67(10):4685-93.

15.**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.

16. **Miyoshi, S. ; Sonoda, Y. ; Wakiyama, H.; Rahman, M .M.; Tomochika , K. and Shinoda , S. (2002) .** An exocellular hemolysin-like Metalloprotease produced by *Vibrio fluvialis*: purification, characterization , and gene cloning . Microb Pathog.33:127-134.

17.**Panicker, G.; Myers, M.L. and Bej, A.K. (2004).** Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. Appl. Envi. Micro. 70(1):498-507.

18.Panicker, G. and Bej, A.K. (2005). Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting vvhA. Appl. Envi. Micro., 71(10):5702-9.

19.**Qvarnstrom, Y.; Visvesvara, G.S.; Sriram, R. and da Silva, A.J.(2006).** Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and Naegleria fowleri. J. Clin. Micro.44(10): 3589-9517.

20. Sleigh, J.D. and Timbury, M.G. (1994) . pH- Regulated Gene and Survival at External pH-Cellular and Molecular Bologyl (2nded.). P.1539 - 1546.ASM. Press, Washington.

21.Ward, L.N. and Bej, A.K.(2006). Detection *of Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. Appl.Envi. Micro. .72(3): 2031-42.

22.Wei, S.W.; Chern, L.L.; Wu, Y.C.; Wang, Y.L.; Lin, C.M. and Chiou, C.S. (2008). Foodborne disease outbreaks caused by sucrose-nonfermenting and beta-galactosidase-deficient variants of *Vibrio cholerae*. Int J Food Microbiol.122(1-2):148- 55.

Used PCR technology (Real Time) for discovering about the responsible genetic to gen hly and vfhly for Isolation and diagnosis *Vibrio cholerae* and *Vibrio fluvialis* bacteria from fish

***Al-Hussainy Khadeeja S. J. ** Al-Tememy Manal S. P ** AL-gboory Athra O. H.**

* Department of Food Science, Collage of Agriculture, University of Basrah, Basrah,Iraq

** Department of Life Sciences , Collage of Sciences, University of Dhi Qar, Dhi Qar, Iraq

Abstract:

In this study, there was isolating and identifying *Vibrios* bacteria that taken from multi-kinds of fresh and frozen fish,such as Suoboor *Tenualosa ilisha* , Silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, Beni *Barbus sharpey* and Shanak *Spondyliosoma cantharus*, we collected 210 fish from Basrah market (Big market in Basrah, Al-Ashar, Al- Tanoma and Khmsa meel) while we

collected 150 fish from Silver carp, Beni and Shanak from Nasiriyah market (Big market and Harj market)this collecting process of samples taken a period from 2-June to 30- November \2013.

These fish bring to laboratory and the samples takenfrom it and planted directly on agricultural medians. (nutrient agar, blood agar, MacConkey agar and selective media (Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose Agar TCBS) then the dishes were incubated aerobically at temperature 37c° for 18 – 24 hours. After the period of incubation, we were identifying 30 positive samples from *Vibrios* and this genus relianced to the shap of cultures and cell under microscope and by Catalase test ,Oxidase test and motion test afer that identifying the types relianced to biochemical tests and using certain API20E system, that indenting two kinds from *Vibrios* bacteria *Vibrio cholera* and *Vibrio fluvialis*. we confirmed that fresh fish including these bacteria more than frozen fish

Results clarified When we used PCR technology (Real Time) for discovering about the responsible genetic from hemolysim enzyme in *Vibrio* spp., that 27 samples from *Vibrio cholera* bacteria and 3 samples from *Vibrio fluvialis* bacteria have this Enzyme who analyzed red blood cell (RBC) which considered from Tocsins that belong to multi *Vibrio* spp. that assist to sick.

Part of Msc. thesis for the third researcher*