تشخیص مولکولی باکتری های ایجاد کننده اسهال در کودکان مبتلا به اسهال در شهرستان شهرکرد

زینب مرضات[۱]، محمد رجبی[۱]، پیام رازقی تهرانی*[۲]

۱.- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.-

۲. گروه تکوین، دانشکده ی علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: drpayamrazeghi@gmail.com

چکیده

اسهال یکی از شایع ترین بیماری‌ها در کودکان به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشد و دومین عامل مرگ و میر بعد از عفونت های تنفسی است. برآورده می شود سالانه ۵-۳ میلیون از موارد این بیماری در سراسر جهان به مرگ منجر می شود. وقوع موارد مرگ و میر به ویژه در کودکان زیر ۵ سال قابل توجه می باشد. در این تحقیق نمونه های اسهال ۶۰ کودک مبتلا به اسهال در طی فصول تابستان و پاییز ۱۳۹۸ که به بیمارستان های هاجر و امام علی (ع) شهرستان شهرکرد، مراجعه کرده بودند از نظر عوامل باکتریایی نظیر *اشریشیا کلی، کمپیلوباکتر ژژونی، کمپیلوباکتر کلی، سالمونلا انتریتیدیس و یرسینیا انتروکولیتیکا* به روش مولکولی، در حضور پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. فراوان‌ترین ژن مورد بررسی ژن مربوط به *16srRNA اشریشیا کلی* بود. به طوری که در ۱۵ نمونه (۲۵٪) این ژن شناسایی گردید. از ۱۵ نمونه مورد بررسی که از نظر توالی ژن *16srRNA اشریشیا* کلی مثبت تشخیص داده شدند، توالی ژن *ipaH* که مربوط به باکتری های *اشریشیا کلی* ایجاد کننده اسهال بود در ۲ نمونه (۱۳/۳۳٪) مشاهده گردید. توالی ژن *hipo* که مربوط به *کمپیلوباکتر ژژونی* بود در ۱ نمونه (۱/۶۶٪) و توالی ژن *asp* که مربوط به *کمپیلوباکتر کلی* بود در هیچ نمونه ایی مشاهده نگردید. آلودگی به *سالمونلا انتریتیدیس* در ۵ نمونه (۸/۳۳٪) مشاهده گردید. فراوانی ژن *ail* که مربوط به آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود در ۱ نمونه (۱٪/۶۶) گزارش گردید.

اطلاعات در مورد میزان شیوع باکتری های عامل اسهال می تواند در کنترل و مدیریت صحیح بیماری اسهال در نوزادان و کودکان موثر باشد. لذا لازم است تحقیقات وسیعی در طی فصول مختلف سال و هم چنین در کلیه شهرستان های استان چهارمحال و بختیاری صورت گیرد.

واژه های کلیدی: پاتوژن های عامل اسهال، تشخیص مولکولی، کودکان، شهرکرد

مقدمه:

اسهال یکی از مشکلات عمده دنیا به خصوص در کشورهای در حال توسعه است که همه ساله موجب زیان های جبران ناپذیر اقتصادی و تلفات انسانی می گردد. عوامل گوناگونی از قبیل تراکم جمعیت، فقر، عدم دسترسی به امکانات بهداشتی، سوء تغذیه و شرایط اجتماعی و رفتاری در این امر دخیل هستند. به علاوه شرایط سنی، سیستم ایمنی، جنسیت و وزن زمان تولد نقش مهمی در ابتلا کودکان به اسهال ایفا می کند. اسهال یکی از بیماریهای شایع وکشنده کودکان در کشورهای در حال توسعه است و سالانه ۵ تا ۱۰ میلیون کودک در اثر این بیماری از بین می روند(۳-۱). شیوع اسهال در کودکان روستایی بالاتر از کودکان شهری می باشد. استفاده از آب های آلوده و ناتوانی کودکان در شستشوی صحیح و مجاورت منازل با زباله ها عوامل دیگری در ایجاد اسهال کودکان می باشد (۴). اسهال به مدفوع آبکی به جای مدفوع قوام یافته یا نرم و افزایش وزن مدفوع روزانه اطلاق می شود که حد بالای طبیعی آن در جوامع صنعتی ۲۰۰ گرم است و با تکرر دفع مدفوع (بیش از سه حرکت روده ای در روز) همراه است (۵). در نتیجه این بیماری زمان کافی برای باز جذب آب و الکترولیت ها در روده باقی نمی ماند و موجب از دست رفتن شدید آب بدن می شود (۵) .

مواد و روش ها:

در این مطالعه بروی ۶۰ نفر کودک مبتلا به اسهال در طی فصول تابستان و پاییز ۱۳۹۸ که به بیمارستان های هاجر و امام علی (ع) شهرستان شهرکرد، مراجعه کرده بودند از نظر عوامل باکتریایی نظیر های *اشریشیا کلی، کمپیلوباکتر ژژونی، کمپیلوباکتر کلی، سالمونلا انتریتیدیس و یرسینیا انتروکولیتیکا* به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های اسهالی در ظرف استریل حاوی مواد بازی جمع آوری گردید. استخراج DNA از نمونه‌های مدفوع از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (DNP^{TM}) استفاده نمودیم. جهت ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز و دستگاه بایوفتومتر استفاده نمودیم. به منظور ردیابی ژن‌های مورد نظر شامل *16srRNA/اشریشیا کلی* و *ipaH* در نمونه های مثبت از نظرتوالی ژن *16srRNA /اشریشیا کلی* و ژن‌های *asp* و*hipo* *کمپیلو باکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* و ژن *ail* *یرسینیا انتروکولیتیکا* و ژن های *سالمونلا انتریتیدیس* از پرایمرهای اختصاصی هر باکتری که در جدول ۱ آورده شده استفاده نمودیم.

Primer	Sequence (5'–3')	Annealing (0C)	Size of product (bp)	Reference
E. coli (16srRNA)	GAAGCTTGCTTCTTTGCT GAGCCCGGGGATTTCACAT	45	544	
E. coli (ipaH)	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	62	600	
C.jejuni (*hipo)*	GAC TTC GTG CAG ATA TGG ATG CTT´ GCT ATA ACT ATC CGA AGA AGC CAT CA	65	344	
C. coli (*asp*)	´GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G ´ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG	57	500	
s. enteritidis S1, S4	GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC	56	250	
y. enterocoiica (ail)	TTAATGTGTACGCTGGGAGTG GGAGTATTCATATGAAGCGTC	62	425	

جدول (۱) توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن های *16srRNA/شریشیا کلی*، *ipaH/شریشیا کلی* عامل اسهال، *hipo*، *asp کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کلی*، *S1, S4 سالمونلا انتریتیدیس*، *ail یرسینیا انتروکولیتیکا*.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرلیتر و باتوجه برنامه حرارتی که برای هر ژن به صورت زیر می باشد.

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴˚C	۳۰s	۱
Cycle	Denaturation	۹۴˚C	۴۵s	۴۰
	Annealing	۴۵˚C	۳۰s	
	Extention	۷۲˚C	۴۵s	
Final extention		۷۲˚C	۱۰Min	۱

جدول (۱-۲): برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA/شریشیا کلی*(۶).

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴˚C	۶۰S	۱
Cycle	Denaturation	۹۵˚C	۶۰S	۳۵
	Annealing	۶۲˚C	۳۰s	
	Extention	۷۲˚C	۶۰S	
Final extention		۷۲˚C	۷Min	۱

جدول (۲-۳): برنامه دمایی برای تکثیر ژن*ipaH*

(۴۸)

جدول (۱-۳): برنامه دمایی برای تکثیر ژن *ipaH*(۷)

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴˚C	۲Min	۱
Cycle	Denaturation	۹۴˚C	۶۰S	۴۰
	Annealing	۶۵˚C	۸۰S	
	Extention	۷۲˚C	۶۰S	
Final extention		**۷۲˚C**	**۵Min**	۱

جدول(۱-۴): برنامه دمایی برای تکثیر ژن *های asp* و*hipo*(۸)

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴˚C	۴۵S	۱
Cycle	Denaturation	۹۴˚C	۴۵s	۳۶
	Annealing	۶۲˚C	۴۵S	
	Extention	۷۲˚C	۴۵s	
Final extention		**۷۲˚C**	**۷Min**	۱

جدول (۱-۵): برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *ail یرسینیا انتروکولیتیکا* (۹)ه

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴˚C	۶۰S	۱
Cycle	Denaturation	۹۴˚C	۶۰S	۳۵
	Annealing	۵۶˚C	۳۰S	
	Extention	۷۲˚C	۶۰S	
Final extention		**۷۲˚C**	**۱۰Min**	۱

جدول (۱-۶): برنامه حرارتی برای تکثیر ژن مورد *نظر سالمونلا انتریتیدیس*(۱۰)

یافته ها

در این بررسی از ۶۰ کودک مبتلا به اسهال ۱۵ مورد ژن *16srRNA اشریشیا کلی* جدا گردید که از این تعداد ۷ نفر مونث (۴۶/۷٪) و ۸ نفر مذکر (۵۳/۳٪) بودند .۲مورد ژن *ipaH اشریشیا کلی* مثبت گزارش شد که یک مورد مونث (۵۰٪) و یک مورد مذکر بودند. ۱مورد کمپیلو باکتر ژژونی مربوط به جنس مذکر (۱۰۰٪) جدا گردید و ۵ مورد *سالمونلا انتریتیدیس* که ۳ مورد مونث (۶۰٪) و ۲ مورد مذکر (۴۰٪) بودند. ۱ مورد *یرسینیا انتروکولیتیکا* مربوط به جنس مونث بود. از ۶۰ نمونه اسهالی ۵ نمونه مربوط به گروه سنی کمتر از یک سال (۸/۳۳٪) و ۲۰ نمونه در گرو سنی بین ۱-۵ سال (۵۰٪) و ۱۰ نمونه مربوط به گروه سنی ۱۲-۶ (۱۶/۶۶٪) و ۲ نمونه مربوط به گروه سنی بالای ۱۲ سال (۳/۳۳٪) قرار داشتند. از آن جا که نمونه گیری طی دو فصل تابستان و پاییز صورت گرفته است، فراوانی ژن های ژن های *16srRNA اشریشیا کلی*، *ipaH* سویه های ایجاد کننده اسهال *اشریشیا کلی*، *hipo* کمپیلو باکتر ژژونی، *asp* کمپیلوباکتر کولی، *S1, S4 سالمونلا*

انتریتیدیس و *ail* *یرسینیا انتروکولیتیکا*در طی فصل تابستان به ترتیب ۸۰٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۰٪، ۸۰٪ و ۰٪ و در طی فصل پاییز به ترتیب ۲۰٪، ۰٪، ۰٪، ۰٪، ۲۰٪ و ۱۰۰٪ گزارش شد.

بحث

در این بررسی از ۶۰ نمونه ۱۵ مورد ژن *16srRNA* *اشریشیا کلی* و ۲مورد (۱۳/۳۳٪) ژن *ipaH* *اشریشیا کلی* مثبت گزارش گردید در مطالعه ای که توسط جوادزاده و همکاران(۷۸-۱۳۷۷) شیوع سویه های مولد اسهال *اشریشیا کلی* درکودکان زیر ۶ سال در شهر زاهدان ۱۳٪ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما مشابه می باشد (۱۱). در مقابل Katia R.S Aranda و همکارن (۲۰۰۴) در یک مطالعه در برزیل تنها در ۱/۳٪ موارد اسهال کودکان ژن *ipaH* شناسایی گردید (۱۲). در این بررسی ۵ نمونه سالمونلا انتریتیدیس (۸/۳۳٪) جدا گردید در مطالعه سلطان دلال که بر روی ۳۱۰ نمونه اسهالی مربوط به کودکان زیر ۵ سال در بیمارستان مرکز طبی کودکان صورت گرفت. میزان آلودگی به پاتوژن های باکتریایی مختلف ۳۰/۳٪ و میزان آلودگی به به سروارهای مختلف جنس *سالمونلا* ۲/۶٪ گزارش شده است (۱۳). در این بررسی ۱ نمونه(۱/۶۶٪) ژن *ail* که مربوط به *یرسینیا انتروکولیتیکا مثبت گزارش گردید*. در مطالعه انجام شده توسط سلیمانی رهبر و همکاران در سال ۱۳۸۶ در کشت نمونه اسهالی ۸۰۰ کودک زیر ۱۰ سال در شهر قم در محیط کشت اختصاصی ۱۴مورد *یرسینیا انترو کولیتیکا* (۱٪/۷۵) جداسازی شد.(۱۴). در این مطالعه فقط ۱ مورد مثبت *کمپیلوباکتر ژژونی* در موارد اسهالی یافت شد (۱٪/۶۶) این مساله برخلاف انتظار بود زیرا در بسیاری مطالعات کمپیلوباکتر به ویژه در کشور های در حال توسعه به عنوان یکی از عوامل اصلی اسهال به ویژه در کودکان معرفی شده است. در مطالعه انجام شده توسط ایراجیان و همکاران که در سال ۱۳۸۶ بر روی مدفوع ۳۰۶ نفر از افراد مبتلا به اسهال مراجعه کننده به مراکز بهداشتی شهرستان سمنان ۳۸ مورد (۱۲/۴٪) از نظر *کمپیلو باکتر ژژونی* مثبت شدند (۵)

نتیجه گیری

اطلاعات در مورد میزان شیوع باکتری های عامل اسهال می تواند در کنترل و مدیریت صحیح بیماری اسهال در نوزادان و کودکان موثر باشد. لذا لازم است تحقیقات وسیعی در طی فصول مختلف سال و هم چنین در کلیه شهرستان های استان چهارمحال و بختیاری صورت گیرد. در این تحقیق *اشریشیا کلی* به عنوان شایع‌ترین پاتوژن عامل اسهال در شهرستان شهرکرد مشخص گردید.

منابع

۱. بکائیان م، دبیر زاده م، صفاری م، نوری ع. (۱۳۷۸). جستجوی *کمپیلوباکتر* در کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان تخصصی اطفال زاهدان در سال ۷۷. طیب شرق. ۱: ۹-۷۳.

2. Mohammed Osman M., Nur hassan A. andi Holie M. 2012. Bacterial etiology of dirrhoeal diseases in children under 5 years old in Ombadda Hospital Sudan. Sudanise journal of public health. 7: 93-97.

۳. شریف م، نصراللهی م. (۱۳۷۹). شیوع اسهال ناشی از *اشرشیا کلی* انترپاتوژن در کودکان زیر یک سال مراجعه کننده به مراکز د رمانی ساری. مجله علوم پزشکی و خدمات درمانی قزوین. ۱۳: ۸-۶۳.

4. Mengistie B., Berhane Y. and Worku A. 2013. Prevalence of diarrhea and associated risk factors among children under-five years of age in Eastern Ethiopia: A cross-sectional study. Open Journal of Preventive Medicine. 3(7): 446-453.

۵) ایرجیان غ، جزایری مقدس ع، بهشتی ا، صالحیان ع، قدس ف، منعم م. (۱۳۸۶). فراوانی حضور *کمپیلوباکتر ژژونی* در مدفوع مبتلایان به اسهال مراجعه کننده به مراکز بهداشتی شهرستان سمنان ۱۳۸۶. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. ۱(۴): ۳۹-۳۵.

6. Sabat G., Rose P., Hickey WJ, and Harkin JM. 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli 16S rRNA* genes in soil. Applied Environmental Microbiology. (66) 2: 844–849.

i7. Aranda KR., Fabbricotti SH., Fagundes-Neto U. and Scaletsky IC. 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiology Letter. 267(2):145-150.

8. Persson S, Olsen KE. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Ca mpylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. Journal of Medical Microbiology. 54 (11): 43-1047.

9. Wannet WBJ., Reessink M., Brunings HA. and Maas HME. 2012. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. Journal of Clinical Microbiology. 39 (12): 4483–4486.

10. Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin, P, Salvat, G. and Colin P. (1999). Identification by a multiplex PCR based assay of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in applied microbiology*, 29(1): 1-6.

11. Javadzadeh M., Dabiri S. and Zangiabadi M. 2003. Role of Shigella, Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and *Entamoeba Histolytica* in causing dysentry in children and antibiotic sensitivity testing. Journal of Mazandaran University of Medical Scienses. 39(13): 29-35.

12. Katia RS A., and Sandra H. 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enterop athoge nic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin producing Escherichia coli strains in Brazilian

childreni. FEMS Microbiol Lett. 267(6): 145–150.

13. Soltan Dallal MM., Moezardalan K. 2004. Aeromonas spp associated with children's diarrhoea in Tehran: a case-control study. Annals of Tropical Paediatric. 24(1):45-51

14. Soleymani-Rahbar AA., Fayaz F., Zargarizadeh A. and Nikazman R .2007. Surveying the prevalence and pattern of antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* among diarrheal children attending health care centers in Qom. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2(3):143-147.

Molecular detection of bacteria causing diarrhea in children with diarrhea

Zeynab Marzat[1], Mohammad Rajabi[1], Payam Razeghi Tehrani[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Siences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Developmental Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran

***Corresponding author** drpayamrazeghi@gmail.com

Diarrhea is one of the most prevalent diseases in the children especially in the developing countries and is considered as the second cause of mortality following respiratory infections. It is estimated that 3-5 million cases of this disease result in death each year. Mortality rate especially in the children under 5 is significant. In this study 60 diarrhea samples of children who referred at Hajar and Imamali Hospitals of Shahrekord, at the present of specific primers for common bacterial pathogens such as *E. coli*, *C .jejuni*, *C. coli*, *S Enteritidis* and *Y. enterocolitica*, were tested. The most abundant studied gene was related to *16srRNA E.coli*, so that it was identified in 15 samples (25%). Out of 15 studied cases diagnosed as positive in respect of *16srRNA* gene sequence, *ipaH* gene related to *E.coli* bacteria resulting in diarrhea was observed in 2 samples (13.33%). *hipo* gene sequence related to *C. jejuni* was observed in 1sample and *asp* gene sequence related to *C. coli* wasn't observed in any samples. Redundancy of *ail gene* related to Information about the prevalence of diarrhea resulting bacteria can be effective on correct control and managing the diarrhea in the infants and children. Then it is necessary to do wide research in various seasons of the year and also in all towns of Chharmahal and Bakhtiary province.

Keywords: Bacteria, Children, Diarrhea, Molecular detection, Shahrekord.