Archive of SID

مقاله پژوهشی

بررسی میزان شیوع آئرومونـاس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا در کودکان مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به مراکز بهداشتی و درمانی شهرستان همدان

سیما کاظمی* ، دکتر محمدیوسف علیخانی** ، دکتر محمدرضا عربستانی*** ، دکتر ایرج صدیقی****
سحر راستیانی* ، حامد فرهادی کهن*

دریافت: ۹۴/۴/۱۷ پذیرش: ۹۴/۹/۱۴

چکیده:

مقدمه و هدف: اسهال به عنوان یکی از شایع ترین عوامل بیماری و مرگ ومیر در همه ی گروه های سنی به ویژه کودکان، افراد مسن و بیماران دچار نقص ایمنی میباشد. مطالعات مختلفی ارتباط بین اسهال حاد کودکان با دو باکتری آئرومونـاس هیـدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا را گزارش کرده اند. بهمین منظور این مطالعه با هدف بررسی شیوع این دو باکتری و تعیـین حـساسیت آن ها به آنتی بیوتیک های رایج و تعیین میزان شیوع ژن های ویرولانس در این باکتریها در همدان انجام شد.

روش کار: در این مطالعه توصیفی ۱۲۰ نمونه ی مدفوع جمع آوری شده از کودکان زیـر ۱۰ سـال مبـتلا بـه اسـهال حـاد از نظـر آئرومونـاس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین هویت این دو باکتری با روش های بیوشیمیایی و واکـنش PCR بـا اسـتفاده از ژن 16S rRNA انجـام گردیـد و همچنـین بررسـی شـیوع ژن هـای ویـرولانس earA و hyl بـرای آئرومونـاس هیدروفیلا و ژن های ویرولانس ail و ystB برای یرسینیا انتروکولیتیکا با استفاده از PCR انجام شـد. حـساسیت آنتـی بیوتیکی باکتریهای ایزوله شده با روش دیسک دیفیوژن انجام گردید.

نتایج: از ۱۲۰ نمونـه آزمـایش شـده، تعـداد ۲ مـورد (۱/۷٪) آئرومونـاس هیـدروفیلا و ۳ مـورد (۲/۵٪) یرسـینیا انتروکولیتیکـا جداسازی شد. همه ایزوله های آئرومونـاس هیدروفیلا به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، جنتامایسین، مـروپنم و آمیکاسین و ۵۰ درصد از ایزوله ها به سفتریاکسون و آزیترومایسین حساس بودند. همه‌ی ایزوله هاآئرومونـاس هیـدروفیلا بـه اریترومایسین مقاوم بودند. صد درصد ایزوله های یرسینیا انتروکولیتیکا به آنتـی بیوتیـک هـای کلرامفنیکـل، کوتریموکـسازول و مروپنم حساس و ۳۳/۳ در صد از سویه ها به جنتامایسین و آمیکاسین و ۶۶/۶ درصد از سویه ها به سفتریاکسون حساس بودنـد. در حالی که این سویه ها به اریترومایسین و آزیترومایسین مقاوم بودند.شیوع ژن های aerA و hyl در آئرومونـاس هیدروفیلا به ترتیب ۱۰۰ و ۵۰ درصد و شیوع هر دو ژن ail وystB در یرسینیا انتروکولیتیکا ۶۶/۶ درصد گزارش گردید.

نتیجه نهایی: شناسایی و بررسی آئرومونـاس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا در اسهال کودکان دارای اهمیت اتیولوژیکی بوده و بایستی وجود این باکتری ها در نمونه های اسهال مد نظر قرار گیرند.

کلید واژه ها: آئرومونـاس هیدروفیلا / اسهال / مقاومت آنتی بیوتیکی / یرسینیا انتروکولیتیکا

مقدمه:

بیماری اسهال یکی از مهم ترین عوامل مرگ ومیر در کـشورهای توسـعه یافتـه و در حـال توسـعه بـه ویـژه در کودکان است. وقوع موارد مرگ و میر به ویژه در کودکـان زیر ۵ سال قابل توجه می باشد (۱). در کشور ما ایران نیـز اسهال دومین عامل مرگ و میر کودکان به شمار مـی رود (۲). بیماری اسهال به وسیله ی ویروس ها، بـاکتری هـا و عفونت های انگلی ایجاد می شود، افرادی که دچـار نقـص سیستم ایمنی و سوء تغذیه هستند مستعد ابـتلا بـه ایـن بیماری می باشـند (۳). عفونـت هـای باکتریـایی مـسئول

* کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** استاد گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (alikhani@umsha.ac.ir)
*** استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** استاد گروه کودکان دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

www.SID.ir

Archive of SID

۴۰-۲۰٪ اسهال ها می باشند عوامل متعددی نظیر سن، جنس، محل زندگی، شرایط اقلیمی و منابع تغذیه ای در میزان شیوع عوامل بیماریزای روده ای از جمله باکتریها اهمیت بسزایی دارند. مهم ترین باکتری های ایجاد کننده اسهال شامل، کمپیلوباکتر ژژونی، اشریشیا کلی، گونه های سالمونلا و شیگلا، ویبریوکلرا، یرسینیا انترکولیتیکا، گونه های آئرومونـاس (خصوصا هیدروفیلا)، گونه های پلزیومونـاس می باشند. در دهه ی اخیر شیوع گونه های آئرومونـاس به عنوان عامل ایجاد کننده ی گاستروانتریت همانند شیگلا یا کمپیلوباکتر و گاهی حتی بیشتر از آنها گزارش شده اند (۷-۴). گونه های آئرومونـاس جزء باکتریهای‌گرم منفی، بیهوازی اختیاری، متحرک در شرایط مزوفیل و غیر متحرک در شرایط ساکروفیلیک می باشند (۸). این باکتری به عنوان یک میکروب فرصت طلب در طیف وسیعی از میزبانان از جمله انسان، حیوانات آبزی و خاکزی ایجاد بیماری می کند (۹). یرسینیا یک باکتری بیماریزای گرم منفی، میله ای کوتاه، بی هوازی اختیاری، فاقد اسپور و سرما دوست می باشد. این باکتری در دامنه حرارتی ۴۵-۲ درجه سلسیوس رشد می کند (۱۰). میزان جداسازی این ارگانیسم با استفاده از روشهای غنی سازی مثل به کارگیری روش سرما (Cold enrichment) و یا استفاده از KOH به شدت تقویت میشود (۱۱). پاتوژنسیته عفونت آئرومونـاس هیدروفیلا شامل چندین فاکتور ویرولانس میباشد (۱۲). آئرولیزین یا بتاهمولیزین سیتوتوکسیک/ سیتولیتیک که توسط ژن aer کد می شود، شایعترین انتروتوکسین این باکتری می باشد که به صورت یک توکسین تشکیل دهنده ی منفذ عمل می کند (۱۳). ژن ail در یرسینیا یک فاکتور جدید ورود در سلول را کد می کند که در بیماریزایی این بیماری نقش مهمی دارد (۱۴). به دلیل این که شناسایی گونه های آئرومونـاس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا در بروز اسهال در آزمایشگاه ها بصورت روتین معمولاً صورت نمی گیرد و به عنوان عامل مهمی در ایجاد اسهال های حاد و خونی به آنها توجهی نمی شود، به همین علت در کشور ما، گزارش های ناشی از وجود این باکتری در بروز اسهال به مراتب بسیار کمتر از کشور های پیشرفته است.

هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع آئرومونـاس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا در بروز اسهال های حاد در کودکان مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی شهر همدان و همچنین بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی این ایزوله ها می باشد.

روش کار:

در این مطالعه ی توصیفی کودکان ۱ تا ۱۰ سال مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی شهر همدان طی مدت ۱۶ ماه (خرداد ۱۳۹۲ تا شهریور ۱۳۹۳) مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۱۲۰ نمونه ی مدفوع اسهالی به وسیله ی سواپ های پنبه ای که درون لوله آزمایش حاوی محیط کشت انتقالی carry blair و مقدار نیم گرم از هر نمونه در داخل ۵ میلی لیتر از محلول PSBB (PeptoneSorbitol Bile Broth) به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان ارسال گردید. برای شناسایی آئرومونـاس هیدروفیلا سوآپ محتوی نمونه را بر روی محیطهای بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند و ۱۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین (ABA)، و مک کانگی آگار تلقیح و همچنین نمونه های قرار گرفته در داخل PSBB به منظور شناسایی یرسینیا انتروکولیتیکا، که به مدت ۲ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرارداده شده بودند، در روز چهاردهم به خوبی مخلوط گردید و سپس نیم میلی لیتر از آبگوشت به ۴/۵ میلی لیتر پتاس (KOH) ۰/۲۵٪ منتقل و به مدت چند ثانیه بهم زده شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از آن بر روی محیط CIN و مک کانگی آگار کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند (۱۵). تست های تشخیصی به منظور شناسایی آئرومونـاس هیدروفیلا شامل اکسیداز،تولید گاز از گلوکز، هیدرولیز اسکولین، لیزین دکربوکسیلاز (LDC)، اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC)، آرژنین دکربوکسیلاز و اندول انجام گردید و همچنین از تست های تشخیصی اکسیداز، SIM، سیترات، متیل رد و وژپرسکویر، اوره، تخمیر قندهای مانیتول، مانوز، رامنوز و سوربیتول برای تشخیص یرسینیا انتروکولیتیکا استفاده گردید. در مرحله بعد از ژن 16S rRNA جهت ردیابی گونه های آئرومونـاس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا، وانواع ژنهای ویرولانس دراین دوگونه که برای آئرومونـاس هیدروفیلا شامل ژنهایaerA، hyl (۱۶) و برای یرسینیا انتروکولیتیکا شامل ژن های ail و ystB (۱۷) در این مطالعه استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه درجدول۱ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

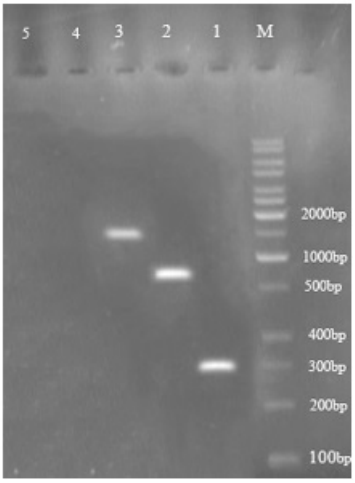
جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت جداسازی و شناسائی آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا

ژن	توالی پرایمر	اندازه (bp)
16S rRNA (Aeromonas)	F5′-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3′ R5′-TACCAGGGTATCTAATCC-3′	۳۰۰
aerA	F5′-TGTCGGGGATGACATGAACGTG-3′ R5′-CAAGTTCCAGTCCCACTTCA-3′	۷۲۰
hly	F5′-GGATCCATGATGAATAGAATA-3′ R5′-AAGCTTTTATTGAACCGGAAC-3′	۱۴۷۰
16S rRNA (Yersinia)	F5′-ATACCGCATAACGTCTTCG-3′ R5′-TTCTTCTGCGAGTAACGTC-3′	۳۲۸
ail	F5′-TAATGTGTACGCTGCGAG-3′ R5′-GACGTCTTACTTGCACTG-3′	۳۵۱
ystB	F5′-GTACATTAGGCCAAGAGACG-3′ F5′-GCAACATACCTCACAACACC-3′	۱۴۶

استخراج DNA از ایزوله های آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا با روش ذیل انجام گرفت: تعداد سه یا چهار کلونی از ایزوله ی تازه کشت داده شده ۲۴ ساعته در یک میکروتیوب استریل حاوی ۶۰µl بافر لیز کننده (NaOH ۰/۰۵ N، ۰/۲۵٪ سدیم دودسیل سولفات - SDS) حل گردید و سپس ورتکس گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ °C داخل بن ماری حرارت داده شد. بعد از حرارت دهی، ۵۴۰ µl بافر TE 1X (۵۰mM TrisHCl، ۱ mM EDTA، pH=۸) به میکروتیوب افزوده شد تا مواد تجزیه ی شده ی سلولی را رقیق سازد. در نهایت، میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید تا مواد تجزیه شده ی سلولی ته نشین گردد. محلول رویی به یک میکروتیوب استریل دیگر انتقال داده شده و این محلول برای انجام آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفته و یا برای استفاده بعدی در فریزر (۲۰ °C-) قرار داده شد (۱۸).

برای انجام آزمون PCR از مستر میکس (PCR 2X Taq premix Mastermix) تهیه شده از شرکت آریا طوس استفاده گردید. واکنش PCR برای ژن های مورد نظر با حجم نهایی ۲۰میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA الگو، ۱میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۰میکرولیتر مسترمیکس و ۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر با استفاده از دستگاه ترموسیکلر Biorad و با شرایط دمائی تکثیر بسته به نوع ژنهای مورد مطالعه به شرح زیر انجام گرفت.

ژن های آئروموناس هیدروفیلا: به منظور تکثیر ژن 16S rRNA، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ °C به‌مدت۳دقیقه، و ۳۰ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن دمای۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن انتهائی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه (۱۹). جهت تکثیر ژن های earA و hyl ، دناتوراسیون اولیه در دمای۹۴ °C به مدت ۳ دقیقه، و سپس ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال برای ژن earA در ۵۳ °C و برای ژن hyl در دمای ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن انتهائی۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه (۱۶) (شکل ۱).



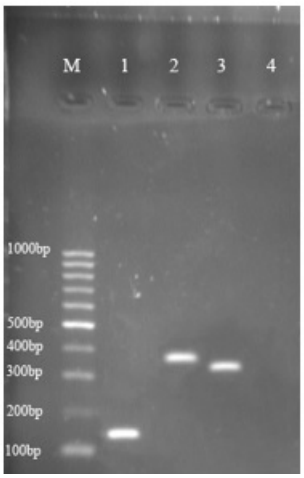
شکل ۱: الکتروفورز سه ژن 16S rRNA ، aer A و hyl آئروموناس هیدروفیلا

ستون M: مارکر، ستون ۱: باند 300-bp برای ژن 16S rRNA ، ستون ۲ : باند 720-bp برای ژن aer A ، ستون ۳: باند 1470-bp برای ژن hyl ستون ۴: کنترل منفی

ژن های یرسینیا انتروکولیتیکا: به منظور تکثیر ژن 16S rRNA، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۳ دقیقه، و ۳۰ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال۵۵ °C به مدت ۶۰ ثانیه ، طویل شدن در دمای ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن انتهائی۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه (۲۰). جهت تکثیر ژن های ail و ystB، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، و سپس ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال برای ژن ail در ۵۷°C و برای ژن yatB در دمای ۶۱ °C به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن انتهائی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه (۱۷) (شکل ۲). برای بررسی محصولات PCR، از ژل آگارز ۱٪ و رنگ سایبر سیف (سیناژن،ایران) استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: الکتروفورز سه ژن 16S rRNA ، ail و yst B یرسینیا انتروکولیتیکا

ستون M: مارکر، ستون ۱: باند 146-bp برای ژن yst B ، ستون ۲ : باند 351-bp برای ژن ail ، ستون ۳: باند 328-bp برای ژن 16S rRNA ستون ۴: کنترل منفی

تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، سفتریاکسون، جنتامایسین، آمیکایسین، آزیترومایسین، اریترومایسین و مروپنم (تهیه شده ازشرکت Himedia) با روش دیسک دیفیوژن آگار وتوصیه های CLSI انجام گردید (۲۱). در این مطالعه از اشریشیا کلی ATCC 25192 به عنوان سویه کنترل استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها: اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون مجذور کای (با در نظر گرفتن سطح معنی داری $P\leq 0.05$) تجزیه و تحلیل شد.

نتایج:

از ۱۲۰ نمونه ی مدفوع کودکان زیر ۱۰ سال مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی شهر همدان، با آزمایش های بیوشیمیایی و انجام PCR با استفاده از ژن هدف مربوط به باکتری های مورد مطالعه، تعداد ۲ مورد (۱/۷ درصد) آئروموناس هیدروفیلا و ۳ مورد (۲/۵درصد) یرسینیا انتروکولیتیکا جداسازی گردید. همه ی ایزوله های آئروموناس هیدروفیلا به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، جنتامایسین، مروپنم و آمیکاسین و ۵۰ درصد از ایزوله ها به سفتریاکسون و آزیترومایسین حساس بودند و همه‌ی ایزوله ها به اریترومایسین مقاوم بودند. همه ی ایزوله های یرسینیا انتروکولیتیکا به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، کوتریموکسازول و مروپنم حساس و۳۳/۳درصد از سویه ها به جنتامایسین و آمیکاسین و ۶۶/۶ درصد از سویه ها به سفتریاکسون حساس بودند. در حالی که این سویه ها به اریترومایسین و آزیترومایسین مقاوم بودند (جدول ۲). شیوع ژن های aerA و hyl در آئروموناس هیدروفیلا به ترتیب (۱۰۰٪) ۱ و (۵۰٪) ۲ و وجود همزمان هر دو ژن در (۵۰ ٪)۱ سویه گزارش گردید و همچنین شیوع هر دو ژن *ail* و *ystB* در یرسینیا انتروکولیتیکا برابر (۶۶/۷٪) ۲ و وجود همزمان هر دو ژن در (۳۳/۳ ٪) ۱ سویه گزارش گردید.

بحث:

اسهال حاد یکی از مشکلات عمده بهداشتی در سلامت کودکان محسوب میگردد. عامل ایجاد اسهال بر حسب مناطق جغرافیائی، شرایط آب و هوائی و سطح بهداشت جوامع متفاوت بوده و مطالعات مختلف نشان میدهند که در مناطق گرمسیری و در فصول گرم سال باکتریهائی مانند اشریشیا کلی، سالمونلا، شیگلا و ویبریو عامل اصلی اسهال باکتریائی به شمار می آیند.

به منظور تخمین فراوانی اسهال های ناشی از یرسینیا انتروکولیتیکا و آئروموناس هیدروفیلا مطالعاتی انجام شده است بطوری که در مطالعه ای که در عراق توسط ال فتلاوی و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت، از ۱۱۰ نمونه ی اسهالی (۲۰/۹ درصد) ۲۳ مورد آئروموناس هیدروفیلا شناسایی شد (۱۹). در مطالعه اکیار و همکاران در ترکیه در سال ۲۰۱۲ با جمع آوری ۱۳۱۹۴ نمونه ی اسهالی در طی ۵ سال،

جدول ۲: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در دو باکتری آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا

	کلرامفنیکل تعداد (درصد)	کوتریموکسازول تعداد (درصد)	سفتریاکسون تعداد (درصد)	جنتامایسین تعداد (درصد)	مروپنم تعداد (درصد)	آمیکاسین تعداد (درصد)	اریترومایسین تعداد (درصد)	آزیترومایسین تعداد (درصد)
آئروموناس هیدروفیلا	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)	۱ (۵۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)	۰ (۰)	۱ (۵۰)
یرسینیا انتروکولیتیکا	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۶۶/۶)	۱ (۳۳/۳)	۳ (۱۰۰)	۱ (۳۳/۳)	۰ (۰)	۰ (۰)

www.SID.ir

Archive of SID

۲۷ مورد آئروموناس هیدروفیلا را شناسایی کردند (۲۲). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ توسط اصلانی و همکاران در ایران بر روی کودکان زیر ۶ سال انجام شد، میزان شیوع ائروموناس هیدروفیلا ۳/۴ درصد گزارش گردید (۲۳). شیوع آئروموناس در کودکان مبتلا به اسهال از نیجریه ۴/۴ درصد، آمریکا ۷ درصد، استرالیا ۱۰ درصد، لیبی ۱۴/۶ درصد گزارش شده است و در بیشتر این گزارشات آئروموناس از افراد سالم جدا نگردیده است در مجموع، شیوع آئروموناس از ۱ تا ۲۷ درصد گزارش شده است (۲۶-۲۴). در مطالعه ما میزان شیوع آئروموناس هیدروفیلا ۱/۷ درصد گزارش گردید که در مقایسه با مطالعات فوق پائین تر بوده که با توجه به زمان انجام مطالعات و مواردی چون افزایش سطح بهداشت در طی زمان قابل توجیه می باشد.

در مطالعه ای در چین ، ۵۲ نمونه ی مثبت یرسینیا انتروکولیتیکا را از ۷۰۰ نمونه ی اسهالی کودکان کمتر از ۴ سال برابر با ۷/۴ درصد در سال ۲۰۰۷ شناسایی کردند (۲۷). در مطالعه ای که در ایران توسط دکتر سلطان دلال و همکارانش در سال ۲۰۰۸ انجام گردید توانستند از ۵۰۰ نمونه ی اسهالی کودکان زیر ۱۴ سال شش سویه (۱/۲ درصد) از یرسینیا انتروکولیتیکا سروتایپ O:3 را جداسازی نمایند (۲۸). در مطالعه ی دیگری در ایران از ۵۴۴ مورد نمونه ی اسهالی در کودکان کمتر از ۴ سال ۷ مورد (۵/۲ ٪) یرسینیا انتروکولیتیکا گزارش گردیده است (۲۹). میزان شیوع یرسینیا انتروکولیتیکا در مطالعه حاضر برابر با ۲/۵ درصد گزارش شده است که به نظر میرسد میزان جداسازی پایین این باکتری در این مطالعه احتمالا در ارتباط با دلایلی مانند: حجم نمونه ی پایین و همچنین انجام بخشی از این مطالعه در فصل تابستان می باشد زیرا جداسازی یرسینیا انتروکولیتیکا در فصول سرد سال بیشتر گزارش می گردد.

در مطالعه ای که در عراق انجام گردید شیوع ژن های aerA و hyl از ۲۳ ایزوله ی آئروموناس هیدروفیلا به ترتیب ۷۲٪ و ۸۰٪ گزارش گردید (۱۹). در مطالعه دیگری در مالزی شیوع ژن های ائرولیزین و همولیزین از ۸۵ ایزوله ی آئروموناس هیدروفیلا به ترتیب ۲۰/۳۸ و ۲۰/۳۸ درصد نشان داده شد (۳۰) و همچنین شیوع ژن ystB در یرسینیا انتروکولیتیکا در مطالعه ای که در چین انجام شد ۸۱/۲۵ درصد گزارش گردید (۳۱). در مطالعه دیگری میزان جداسازی ژن ail برابر با ۴۰/۱ درصد، در حالی که ژن ystB برابر با ۲۶/۲ درصد در ایزوله های خوکی یرسینیا انتروکولیتیکا گزارش گردیده است (۳۲). در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن های aerA و hyl در آئروموناس هیدروفیلا به ترتیب ۱۰۰ و ۵۰ درصد و شیوع هر دو ژن ail و ystB در یرسینیا انتروکولیتیکا ۶۶/۶ درصد گزارش گردید. نتایج بدست آمده تنوع ژنتیکی را در سویه های ایزوله شده در نقاط مختلف جهان نشان می دهد. بنابراین انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه با تعداد بیشتری ایزوله و استفاده از روشهای تایپینگ پیشنهاد می گردد.

در بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری آئروموناس هیدروفیلا مشخص گردید که ۱۰۰ درصد سویه ها به کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، جنتامایسین، مروپنم، آمیکاسین و پلی میکسین حساس اند و همه ی ایزوله ها به اریترومایسین مقاوم هستند. در مطالعه ای که در ایران صورت گرفته است میزان شیوع آئروموناس ۴/۵ درصد و حساسیت آنتی بیوتیکی در مورد این باکتری نشان داد که ۱۰۰ درصد سویه ها به آمپی سیلین مقاوم و ۱۰۰ درصد آنها به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و سفتی زوکسیم حساس می باشند اما حساسیت به سایر آنتی بیوتیک ها متغیر بود (۳۳). در هند، شیوع آئروموناس ۱۶/۷ درصد گزارش گردید، که همه ی ایزوله ها به آنتی بیوتیک های بتالاکتام (بجز کارباپنم) مقاوم بودند (۳۴). همه ی ایزوله های یرسینیا انتروکولیتیکا به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، کوتریموکسازول و مروپنم حساس و ۳۳/۳ در صد از سویه ها به جنتامایسین و آمیکاسین و ۶۶/۶ درصد از سویه ها به سفتریاکسون حساس بودند. در حالی که این سویه ها به اریترومایسین و آزیترومایسین مقاوم بودند. در مطالعه سلطان دلال و همکاران در ایران همه ی ایزوله های یرسینیا انتروکولیتیکا به کوتریموکسازول، کلرامفنیکل، آمیکاسین، حساس بوده اند (۲۸) و در مطالعه ی در نیجریه همه ی سویه های یرسینیا انتروکولیتیکا به جنتامایسین حساس بودند (۳۵). در مطالعه‌ای که در ترکیه انجام شده است، همه‌ی سویه های یرسینیا انتروکولیتیکا نسبت به ایمی پنم و کلرامفنیکل حساس و نسبت به جنتامایسین مقاوم بودند (۳۶). اکثر مطالعاتی که در زمینه ی حساسیت های آنتی بیوتیکی در

www.SID.ir

Archive of SID

سایر نقاط جهان انجام شده است، نتایجی نزدیک و مشابه به این مطالعه داشته اند.

نتیجه نهایی :

با توجه بـه اینکـه اتیولـوژی اسـهال حـاد در منـاطق مختلف جغرافیائی متفاوت می باشد به نظر می رسد که در مواردی که کشت مـدفوع در محـیط هـای کـشت روتـین منفـی گـزارش مـی گـردد بایـد جداسـازی دو بـاکتری آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا انتروکولیتیکا (خصوصا در فصول سرد سال) که از عوامل ایجاد کننـده ی اسـهال در کودکان هستند مد نظر قرار گیرند.

سپاسگزاری :

ایـن مقالـــه برگرفتـه از طـرح تحقیقـاتی مـصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد. نویسندگان بر خود لازم مـی داننـد از زحمـات مرکـز پـژوهش دانـشجویان قدردانی نمایند. ضمناً منافع شخصی نویسندگان بـا نتـایج این مطالعه ارتباطی نداشته است.

References

1. Phetsouvanh R, Midorikawa Y, Nakamura S. The seasonal variation in the microbial agents implicated in the etiology of diarrheal diseases among children in Lao People's Democratic Republic. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999;30(2):319-23.
2. Katouli M, Jaafari A, Farhoudi-Moghaddam A, Ketabi G. Aetiological studies of diarrhoeal diseases in infants and young children in Iran. J Trop Med Hyg 1990;93(1):22-7.
3. Abrami L, Fivaz M, Decroly E, Seidah NG, Jean F, Thomas G, et al. The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. J Biol Chem 1998;273(49):32656-61.
4. Alavandi S, Ananthan S, Kang G. Prevalence, in-vitro secretory activity, and cytotoxicity of Aeromonas species associated with childhood gastroenteritis in Chennai (Madras), India. Japanese J Med Sci Biol 1998;51(1):1-12.
5. Dodd HN, Pemberton JM. Construction of a physical and preliminary genetic map of Aerornonas hydrophila IMP636. Microbiology 1998;144(11):3087-96.
6. Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus Aeromonas: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. 1998: 1058-4838.
7. Pemberton JM, Kidd SP, Schmidt R. Secreted enzymes of Aeromonas. FEMS Microbiology Letters. 1997;152(1):1-10.
8. Kühn I, Allestam G, Huys G, Janssen P, Kersters K, Krovacek K, et al. Diversity, persistence, and virulence of Aeromonas strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. Appl Environ Microbiol 1997;63(7):2708-15.
9. Naharro G, Riano J, de Castro L, Alvarez S, Luengo J. Aeromonas: molecular detection of foodborne pathogens (Liu D. Ed.). North Ryde: CRC Press, 2009.
10. Sharifzadeh A, Akhavan M, Zarasvandi A, Alagha S. Paper: Isolation of Yersinia entrocolitica and Listeria monocytogenes from raw and pasteurlzed milks supplied at dairiesin Chaharmahal Bakhtiary province. Iranian J Food Sci Technol 2004;1(1):15-19 (Persian)
11. De Boer E. Isolation of Yersinia enterocolitica from foods. Int J Food Microbiol 1992; 17(2): 75-84.
12. Chopra A, Xu X-J, Ribardo D, Gonzalez M, Kuhl K, Peterson J, et al. The cytotoxic enterotoxin of Aeromonas hydrophila induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. Infect Immun 2000;68(5):2808-18.
13. Wilmsen H, Pattus F, Buckley J. Aerolysin, a hemolysin from Aeromonas hydrophila, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers. J Membrane Biol 1990;115(1):71-81.
14. Hinnebusch BJ, Jarrett CO, Callison JA, Gardner D, Buchanan SK, Plano GV. Role of the Yersinia pestis Ail protein in preventing a protective polymorphonuclear leukocyte response during bubonic plague. Infect Immunity 2011;79(12):4984-9.
15. Jiang G, Kang D-H, Fung DY. Enrichment procedures and plating media for isolation of Yersinia enterocolitica. J Food Protect 2000; 63(11): 1483-6.
16. Wang L, Wei Y, Yuan G, Dai M, Chen X. Molecular Characterization and Virulence Genes of Aeromonas hydrophila Isolated from the Chinese Giant Salamander (Andrias davidianus). Asian Herpetological Res 2012; 3(4): 303-9.
17. Thoerner P, Kingombe CB, Bögli-Stuber K, Bissig-Choisat B, Wassenaar T, Frey J, et al. PCR detection of virulence genes in Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis and investigation of virulence gene distribution. Appl Environ Microbiol 2003;69(3):1810-6.
18. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, De Backer E, Temmerman M, et al. Genotyping of Streptococcus agalactiae (group B streptococci) isolated from vaginal and rectal swabs of women at 35-37 weeks of pregnancy. BMC Infect Dis 2009;9(1):153.
19. Al-Fatlawy H, Al-Ammar M. Molecular study of aeromonas hydrophila isolated from stool samples in Najaf (Iraq). Int J Microbiol Res SSN. 2013:0975-5276.
20. Novoslavskij A, Kabasinskiene A, Korkeala H,

www.SID.ir

Archive of SID

Malakauskas M. Prevalence of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis in slaughtered pigs within 5 months period in Lithuania. Vet Med Zoot 2010;51(73):30-5.
21. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45(4):493.
22. Akyar I, Can S. Rapid identification of Aeromonas species in stool samples with chromogenic media and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: an institutional experience. Turkish J Med Sci 2013;43(3):388-92.
23. Aslani M, Alikhani M. The role of Aeromonas hydrophila in diarrhea. Iranian J Public Health 2004;33(3):54-9.
24. Akinyemi K, Oyefolu A, Opere B, Otunba-Payne V, Oworu A. Escherichia coli in patients with acute gastroenteritis in Lagos, Nigeria. East African Med J 1998;75(9):512-5.
25. Ghenghesh KS, Bara F, Bukris B, El-Surmani A, Abeid SS. Characterization of virulence factors of Aeromonas isolated from children with and without diarrhoea in Tripoli, Libya. J Diarrhoeal Dis Res 1999:75-80.
26. Gluskin I, Batash D, Shoseyov D, Mor A, Kazak R, Azizi E, et al. A 15-year study of the role of Aeromonas spp. in gastroenteritis in hospitalised children. J Med Microbiol 1992; 37(5):315-8.
27. Sun H, Jiang B. Clinical isolation and characterization of Yersinia enterocolitica in China using real-time PCR and culture method. Digestion 2007;75:199-204.
28. Dalal MM, Akhi MT, Parto Azar AR. Study of Yersinia enterocolitica in acute children diarrhea under Fourteen years old. Med J Tabriz Univ Med Sci 2008;30(4):52-49. (Persian)
29. Yousefi Mashouf R, Sadri GH, Fallah M. Bacteriological study of acute diarrhea in children under ten years and serotyping isolates. Sci J Kurdistan Univ 2001; 6(21): 16-19. (Persian)
30. Yousr A, Napis S, Ali R, Rusul G, Radu S. Detection of aerolysin and hemolysin genes in Aeromonas spp. isolated from environmental and shellfish sources by polymerase chain reaction. ASEAN Food J 2007;14(2):115-22.
31. Wang X, Cui Z, Wang H, Tang L, Yang J, Gu L, et al. Pathogenic strains of Yersinia enterocolitica isolated from domestic dogs (Canis familiaris) belonging to farmers are of the same subtype as pathogenic Y. Entero-colitica strains isolated from humans and may be a source of human infection in Jiangsu Province, China. J Clin Microbiol 2010; 48(5): 1604-10.
32. Tadesse DA, Bahnson PB, Funk JA, Morrow WM, Abley MJ, Ponte VA, et al. Yersinia enterocolitica of porcine origin: carriage of virulence genes and genotypic diversity. Foodborne Pathogens Dis 2013;10(1):80-6.
33. Dalal MM, Ghalavand Z, Nikmanesh B. Investigation of Infection Rate to Intestinal Pathogens and Aeromonas Species in Medical Center, 2004-2005. ZUMS J 2005;13(52):37-42. (Persian)
34. Subashkumar R, Thayumanavan T, Vivekanandhan G, Lakshmanaperumalsamy P. Occurrence of Aeromonas hydrophila in acute gasteroenteritis among children. Indian J Med Res 2006;123(1):61.
35. Amasiani R, Agbo I, Ezeifeka G, Chah K. prevalence of Yersinia enterocolitica in human population and transmission vehicles in Anambra State, Nigeria. Int J Environ Sci Tech 2013; 2:877-85.
36. Guven A, Sezer C, Aydin BD, Oral NB, Vatansever L. Incidence and pathogenicity of Yersinia enterocolitica isolates from foods in Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010; 16: S107-12.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

Prevalence of Aeromonas Hydrophila and Yersinia Enterocolitica in Children with Acute Diarrhea Attending Health Centers in Hamadan

S. Kazemi, M.Sc.[*]; M.Y. Alikhani, Ph.D.[**]; M.R. Arabestani, Ph.D.[***]; I. Sedighi, M.D.[****]
S. Rastyani, M.Sc.[*]; H. Farhadi Kohan, M.Sc.[*]

Received: 8.7.2015 Accepted: 5.12.2015

Abstract

Introduction & Objective: Diarrhea is the most common cause of morbidity and mortality in all age groups, especially children, the elderly and immunocompromised patients. Various studies have been reported regarding the relationship between the children acute diarrhea and Aeromonashydrophila and Yersinia enterocolitica. This study aimed to investigate the prevalence of the bacteria and their sensitivity to common antibiotics and the prevalence of virulence genes in the bacteria in Hamadan, Iran.

Materials & Methods: In this study, 120 stool samples collected from children less than 10 years of age with acute diarrhea were examined for Aeromonashydrophila and Yersinia enterocolitica. Identification of the bacteria was performed by biochemical reactions and PCR using 16S rRNA genes. Moreover, the prevalence of virulence genes earA and hyl of Aeromonashydrophila and ail and ystB genes of Yersinia enterocolitica were investigated using PCR. Antibiotic susceptibility of isolated bacteria was performed by disk diffusion method.

Results: Out of 120 stool samples, 2 (1.7 %) Aeromonashydrophila and 3 (2.5%) Yersinia enterocolitica were isolated. All isolates of Aeromonashydrophila were sensitive to the chloramphenicol, co-trimoxazole, gentamicin, meropenem, amikacin and 50% of isolates were sensitive to the ceftriaxone and azithromycin. All Aeromonashydrophila isolates were resistant to erythromycin. All isolates of Yersinia enterocolitica were sensitive to the chloramphenicol, co-trimoxazole and meropenem. The 33.3% of the isolates were sensitive to gentamicin and amikacin and 66.6% of them were susceptible to ceftriaxone. However, all of Yersinia enterocolitica isolates were resistant to erythromycin and azithromycin. The prevalence aerA and hyl genes in Aeromonashydrophila were reported 100% and 50%, respectively. The prevalence of ail and ystB genes in Yersinia enterocolitica was reported as 66.6%.

Conclusions: Identification and analysis of Aeromonashydrophila and Yersinia enterocolitica in diarrhea of children has etiologic importance and presence of the bacteria in samples of diarrhea should be considered.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2015; 22 (4):338-345)

Keywords: Aeromonas Hydrophila / Antibiotic Resistance / Diarrhea
Yersinia Enterocolitica

---

* M.Sc. in Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
** Professor, Department of Microbiology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (alikhani@umsha.ac.ir)
*** Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
**** Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

www.SID.ir