

بررسی فراوانی عوامل ویرال و باکتریال در مدفوع کودکان مبتلا به اسهال در شهر شیراز

پروین حسن‌زاده^۱ و فرحانه آل یاسین^۲

خلاصه

در این تحقیق تعداد ۲۲۰ نمونه مدفوع اسهالی کودکان مراجعه کننده به بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سنین ۳ الی ۱۲ ماهه و ۱۰۰ نمونه مدفوع کودکان سالم در همان سنین از نظر ویروس و باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. از میکروسکپ الکترونی جهت تشخیص ویروس روتا و از روش‌های معمول باکتریولوژیک نیز جهت جدا کردن عوامل باکتریایی استفاده گردید. از مجموع نمونه‌های مورد مطالعه در ۱۱/۴٪ موارد (۲۵ مورد) روتاویروس دیده شد و بیشترین تعداد عامل باکتریایی متعلق به خانواده اتریباکتریاسه بود که در این خانواده گونه‌های اشریشیا کلی ۳۰٪ (۶۶ مورد)، کلبسیلا ۹/۵٪ (۲۱ مورد)، پروتئوس ۲/۲٪ (۵ مورد)، شیگلا ۱/۸٪ (۴ مورد) سالمونلا ۱۴٪ (۲۱ مورد)، عوامل باکتریایی مخلوط ۱۵/۴۵٪ (۳۴ مورد) و عوامل غیر باکتریایی - غیر ویروسی ۱۴/۶٪ (۳۲ مورد) را به خود اختصاص دادند. آدنوویروس نیز در ۰/۹٪ (۲ مورد) نمونه‌های اسهالی مشاهده گردید. بیشترین میزان فراوانی روتاویروس در کودکان سنین بین ۷ الی ۹ ماهه در ماه‌های آبان و اردیبهشت دیده شد در حالی که بیشترین شیوع عوامل باکتریایی در کودکان سنین بین ۳ الی ۷ ماهه دیده شد.

واژه‌های کلیدی: عوامل ویرال، اسهال، کودکان، شیراز

۱- مری، بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، ۲- مری، بخش میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی

مقدمه

اسهال مسأله جدی مناطق گرمسیری در سراسر دنیا است که سبب بیماری و مرگ و میر کودکان می‌گردد (۳، ۵، ۱۱، ۱۲، ۱۳). حدس زده می‌شود که بیش از چهار میلیون کودک زیر یک سال هر ساله در اثر اسهال عفونی از بین می‌روند (۱۱). در سال ۱۹۷۵ حدود ۵۰۰ میلیون مورد اسهال در کودکان آسیا، افریقا و آمریکای لاتین اتفاق افتاد که منجر به مرگ ۵ تا ۱۸ میلیون نفر در آن سال گردید (۱۵).

در مطالعات گذشته اگرچه اشریشیا کلی، سالمونلا، پروتئوس، کلیسیلا و شیگلا از مدفوع کودکان اسهالی جدا گردیده، ولی عامل ویروسی مانند روتاویروس مورد توجه نبوده است (۳) و به دلیل عدم تشخیص عامل ویروسی، تجویز کورکوران آنتی‌بیوتیک تنها راه چاره به حساب می‌آید.

روتاویروس به خانواده رتوویروس‌ها تعلق دارد و دارای لایه دوجداره بیست وجهی به قطر ۶۰ الی ۷۵ نانومتر می‌باشد. ذره ویروسی شامل یازده قطعه RNA دو رشته‌ای (وزن مولکولی کل $10^6 \times 10^6$) و دارای RNA پلیمرز وابسته به RNA می‌باشد. روتاویروس عامل اصلی اسهال در نوزادان و کودکان در هر دو شکل بومی و همه‌گیر به شمار رفته و علائمی نظیر اسهال، تب، درد شکمی و استفراغ ایجاد می‌کند که منجر به از دست دادن آب بدن می‌شود. بالغین ممکن است به ویروس آلوده شوند اما به ندرت دارای علائم بوده و به ندرت در مدفوع آنها ویروس مشاهده می‌شود. در هر حال همه‌گیری‌های شدید بیماری در بالغین نیز رخ داده است. روتاویروس‌ها تنها عامل مهم التهاب معده‌ای - روده‌ای در کودکان هستند. حدود ۵۰ الی ۶۰ درصد از عوامل التهاب معده‌ای - روده‌ای حاد در کودکان بستری شده در دنیا به وسیله روتاویروس‌ها ایجاد می‌شوند. عفونت‌های روتاویروس معمولاً در طول زمستان بیشتر هستند. طول مدت بیماری بین ۵ روز الی ۳ هفته و معمولاً ۸ روز می‌باشد. بیشتر کودکان ۵ روز بعد از شروع علائم اگر به بیمارستان مراجعه کنند، بهبود می‌یابند. عفونت‌ها در کودکان سنین ۶ ماهه تا ۱۲ ساله شایع‌تر بوده و به نظر می‌رسد انتقال از طریق مدفوعی - دهانی صورت می‌گیرد (۹، ۱۴، ۱۵).

شیوع این ویروس هم در کشورهای توسعه یافته مانند استرالیا، اروپا، آمریکای شمالی و هم در کشورهای در حال توسعه مانند آفریقا و آسیا گزارش شده است (۱۵). ویروس روتا بسیار مسری است و انتقال آن در جامعه حساس به سرعت اتفاق می‌افتد. مکان‌های پرجمعیت و تماس نزدیک اشخاص از عواملی هستند که میزان عفونت را افزایش می‌دهند. بنابراین

جدا کردن بیمار اسهالی حاد از آلوده شدن خانواده جلوگیری کرده و انتقال را کاهش می‌دهد.

Paver و همکارانش در سال ۱۹۷۳، Flewett و همکارانش در سال ۱۹۷۴، گروه Bishop در سال ۱۹۷۴ و Woode و Dennis در سال ۱۹۷۴ از میکروسکپ الکترونی برای تشخیص ذرات ویروسی استفاده کرده‌اند که به سرعت این روش مورد تأیید قرار گرفت (۶، ۱۵).

اسهال در همه جا، اعم از جامعه شهری و روستایی و یا در افراد بستری در بیمارستان دیده می‌شود و محدود به مکان خاصی نمی‌گردد. ولی به طور مسلم تعداد این بیماران در بین افراد بستری در بیمارستان فراوان‌تر است و این ناشی از وضعیت مساعدتر این بیماران در ابتلاء به اسهال به علت ضعف آنها از یک طرف و وجود باکتری‌های مقاوم در محیط بیمارستان از طرف دیگر است.

با توجه به اهمیت اسهال و خطر مرگ در کودکان، این بررسی خصوصاً پیرامون عامل ویروسی در شیراز و طی یک سال صورت گرفته است.

مواد و روش کار

نمونه‌های مدفوع از بیمارستان‌های نمازی، حجازی و دستغیب در ماه‌های آبان، آذر، اسفند، فروردین و اردیبهشت جمع‌آوری گردیدند. جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی، یک گرم از هر نمونه ابتدا در ۵ میلی‌لیتر Phosphate Buffered Saline (PBS) حل می‌گردید. سپس محلول روی هر نمونه بعد از دو بار سانتریفوژ کردن در دورهای $1000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه و $10000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه، در ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردید. ۲۵ میکرولیتر از نمونه بر روی قطعات آگار حاوی گاما گلوبولین (حجم مساوی از ۴٪ آگار و گاما گلوبولین $\frac{1}{3375}$ رقیق شده در PBS ۰/۱٪ سدیم ازاید) قرار داده و بلافاصله گریدهای مخصوص میکروسکپ الکترونی روی آگار قرار داده می‌شد. بعد از نگهداری در حرارت اطاق به مدت ۳۰ دقیقه، گریدها در محلول ۳ درصد اسید فسفوتنگستیک یا مولیدات آمونیوم با $pH=2/3$ به مدت ۳۰ دقیقه جهت رنگ آمیزی قرار می‌گرفتند و بعد از خشک شدن گریدها با میکروسکوپ الکترونی رؤیت می‌گردیدند (۷، ۸).

نمونه‌های مدفوع بر روی محیط‌های باکتریولوژی مانند EMB و SS کشت داده می‌شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد از کلتی‌های مشکوک جهت تشخیص نهایی، تست‌های بیوشیمیایی اختصاصی به عمل می‌آمد.

نتایج

در این بررسی نشان داده شد که بیشترین میزان شیوع روتاویروس در کودکان سنین ۷الی ۹ ماهه می باشد (جدول ۲). و بیشترین درصد عفونت به علت اشریشیا کلی بوده و بعد از آن سالمونلا درصد بعدی را به خود اختصاص می داد در حالی که شیگلا کمترین درصد عفونت را در این کودکان نشان داد.

جدول ۲: میزان فراوانی ویروس روتا در سنین مختلف کودکان مبتلا به اسهال در بررسی انجام شده در شهر شیراز

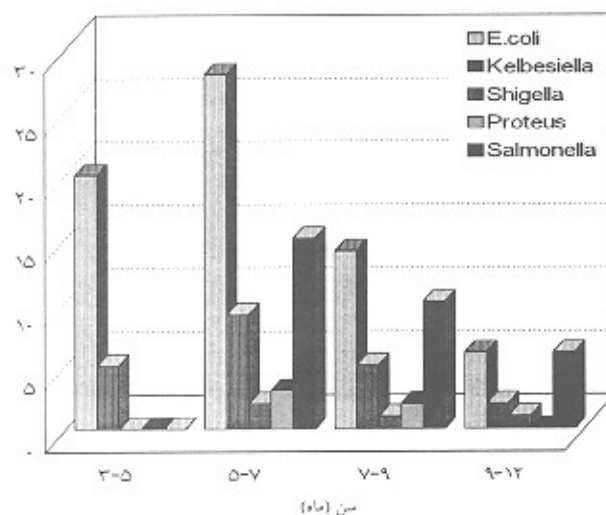
سن (ماه)	تعداد موارد در هر طبقه سنی	تعداد موارد مثبت	درصد در هر طبقه سنی	درصد کل
۳-۵	۵۳	۰	۰	۰
۵-۷	۶۶	۴	۶/۱	۱۶
۷-۹	۵۰	۱۳	۲۶	۵۲
۹-۱۱	۵۱	۸	۱۵/۷	۳۲
جمع	۲۲۰	۲۵	۱۱/۴	۱۱/۴

فراوانی عوامل باکتریایی اسهال در سنین مختلف کودکان نیز مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که بیشترین مورد را باکتری های اشریشیا کلی و سالمونلا به خود اختصاص می دادند (نمودار ۱). بیشترین میزان اسهال در این بررسی در ماه های آبان و اردیبهشت مشاهده گردید (جدول ۳).

در این بررسی ۲۲۰ نمونه اسهالی مورد بررسی ویروسی و باکتریایی قرار گرفتند که از میان آنها در ۲۵ مورد (۱۱/۴ درصد) روتاویروس با میکروسکپ الکترونی مشاهده گردید. هر چند که در تعداد کمی از نمونه ها آدنوویروس نیز دیده شد. در ۱۲۸ مورد (۵۸/۸ درصد) باکتری هایی چون اشریشیا کلی، کلبسیلا، پروتئوس، شیگلا و در ۳۴ مورد (۱۵/۴۵ درصد) عفونت باکتریایی مخلوط (اشریشیا کلی، سالمونلا، کلبسیلا و...) دیده شد و در ۳۲ مورد (۱۴/۶ درصد) عامل باکتریایی یا ویروسی مشاهده نگردید (جدول ۱).

جدول ۱: عوامل مؤثر در بروز اسهال کودکان در بررسی انجام شده در شهر شیراز

نوع میکروارگانیسم	تعداد موارد	درصد
اشریشیا کلی	۶۶	۳۰
کلبسیلا	۲۱	۹/۵
شیگلا	۴	۱/۸
پروتئوس	۵	۲/۲
سالمونلا	۳۱	۱۴
روتاویروس	۲۵	۱۱/۴
آدنوویروس	۲	۰/۹
عامل باکتریایی مخلوط	۳۴	۱۵/۴۵
عامل غیر باکتریایی - غیر ویروسی	۳۲	۱۴/۶
جمع	۲۲۰	۹۹/۸۵



نمودار ۱: میزان فراوانی باکتری های عامل اسهال در سنین مختلف کودکان در بررسی انجام شده در شهر شیراز

جدول ۳: میزان فراوانی روتاویروس در نمونه‌های اسهالی در ماه‌های مختلف سال در بررسی انجام شده در شهر شیراز

ماهها	تعداد موارد در ماه	تعداد موارد	درصد در ماه	درصد کل
آبان	۵۰	۱۲	۲۴	۴۸
آذر	۴۰	۳	۷/۵	۱۲
اسفند	۲۰	۰	۰	۰
فروردین	۵۰	۲	۴	۸
اردیبهشت	۶۰	۸	۱۳/۳	۳۲
جمع	۲۲۰	۲۵	۱۱/۴	۱۱/۴

بحث

با توجه به اهمیت اسهال و عدم بررسی عوامل اسهال در کودکان توسط میکروسکوپ الکترونی در شیراز، لازم بود این موضوع مورد مطالعه قرار گیرد و حتی‌المقدور عوامل اسهال‌ها و میزان فراوانی آنها در این منطقه جغرافیایی شناخته شود تا درمان این بیماران با واقع‌بینی بیشتری صورت پذیرد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج حاصله از تحقیقات انجام شده توسط کبیری و همکارانش که با استفاده از روش‌هایی غیر از روش میکروسکوپ الکترونی نظیر ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) در شهر شیراز صورت گرفته است، مطابقت دارد (۱۰).

این بررسی میزان شیوع روتاویروس را ۱۱/۴ (۲۵ از ۲۲۰) در کودکان مبتلا به اسهال نشان داد. همچنین ۰/۱۹ درصد از نمونه‌ها آدنوویروس را نشان دادند که با نتایج به دست آمده در

تحقیقات دیگران برابری داشت (۴،۷). با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات دیگر چنین استنباط می‌شود که عمومی‌ترین عامل اسهال باکتریایی اشریشیا کلی و سالمونلا می‌باشد که در این بررسی به ترتیب ۶۶ و ۳۰ درصد گزارش شده است (۱،۱۱،۱۲،۱۵). در این تحقیق طول مدت اسهال در کودکان اسهالی با روتاویروس و عامل باکتریایی نیز مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که اختلافی بین کودکان عفونی با روتاویروس و آنهایی که به اشریشیا کلی سم‌زا مبتلا بودند، در از دست دادن مقدار آب و الکترولیت و با وجود تب مشاهده نشد ولی کودکان مبتلا به اسهال با عوامل باکتریایی طول مدت اسهال کوتاه‌تری نسبت به کودکان اسهالی با روتاویروس دارند. این مطلب را Echeverria و همکارانش در سال ۱۹۷۷ نیز نشان دادند. از طرف دیگر در این بررسی مشاهده گردید که اکثر کودکان مبتلا به اسهال با روتاویروس دچار استفراغ می‌شوند در حالی که علائم استفراغ در کودکان اسهالی با اشریشیا کلی مشاهده نگردید (۴).

با توجه به اینکه روتاویروس و عوامل مربوط به این ویروس عفونی تا سال ۱۹۷۳ ناشناخته بودند (۲)، بنابراین در این راستا، لازم بود تحقیقاتی انجام شود تا بتوان در رابطه با اسهال‌های حاد و مزمن در ایران اطلاعاتی بدست آورد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در کشورهای توسعه یافته با وجود در دسترس بودن آب سالم باز هم آلودگی‌های روتاویروسی باقیمانده و اقدامات بهداشتی، کافی به نظر نمی‌رسد. در نتیجه برای کاهش بیماری‌های روده‌ای (اسهال) و مرگ و میر حاصل از آن از واکسن استفاده می‌شود که توصیه می‌شود واکسن در شش ماهه اول زندگی تجویز گردد (۱).

Summary

The Prevalence of Bacterial and Viral Agents in Fecal Specimens of Children in Shiraz

P. Hassanzadeh, MSc.,¹ and F. Al-e-Yasin, MSc.²

1. Instructor, Biology Department, School of Science, 2. Instructor, Microbiology Department, Medical School, Shiraz University of Medical Sciences and Health Services, Shiraz, Iran

In the present study 220 diarrheal samples of children aged between 3-12 months and 100 samples from healthy individuals of the same age group referred to Shiraz university hospitals were investigated for bacterial and viral agents. Electron microscopy methods were used for the viral investigations, while conventional techniques of bacteriology were used for isolation of bacterial agents. The prevalence of rotavirus examined by electron microscopy was 25 cases (11.4%). Other pathogenic organisms were E. Coli 66 cases (30%), Kelbsiella 21 cases (9.5%), proteus 5 cases (2.2%), Shigella 4 cases (1.8%),

Salmonella 31 cases (14%), mixed bacterial agents 34 cases (15.45%) and non bacterial viral agents 32 cases (14.6%). The highest rate of rotavirus infection was seen in children aged between 7-9 months in Aban (October) and Ordibehesht (May), but the highest rate of bacterial infection was seen in children aged between 4-7 months.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2001; 8(1): 11-16

Key Words: Viral Agents, Diarrhoea, Children, Shiraz

References

1. Black RE, Merson MH, Huq I, Alim AR and Yunus M. Incidence and severity of rotavirus and Escherichia coli diarrhoea in Rural Bangladesh implications for vaccine development. *Lancet* 1981; 1(82/2): 141-143.
2. Coker AO, Dosunmu - Ogunbi O, Odugbemi T, Alabi SAAL and Macaulay SA. A study on the prevalence of rotavirus diarrhoeas in ohaozara Local government area, Imo state, Nigeria and the Lagos university teaching hospital, Lagos Nigeria. *East Afr Med J* 1987; 64(9): 586-589.
3. Echeverria P, Blacklow NR, Vollet JL, 3rd et al. Reovirus-like agent and enterotoxigenic Escherichia coli infections in pediatric diarrhea in the Philippines. *J Infect Dis* 1978; 138(3): 326-332.
4. Echeverria P, Ho MT, Blacklow NR, and et al. Relative importance of viruses and bacteria in the etiology of pediatric diarrhea in Taiwan. *J Infect Dis* 1977; 136(3): 383-390.
5. Echeverria P, Taylor DN, Leksomboon U, et al. Case-control study of endemic diarrheal disease in Thai children: *J Infect Dis* 1989; 159(3): 543-548.
6. Flewett TH, Bryden AS, Davies H and Robertson MJ. Diagnostic electron microscopy of faeces. *J Clin Pathol* 1974; 27(8): 608-614.
7. Flewett TH, Davies H, Bryden AS and Robertsson MJ. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J Clin Path* 1974; 27: 608-614.
8. Grauballe PC, Vestergaard BF, Meyling A and Genner J. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human and bovine rotavirus in stools: Comparison with electron-microscopy, immunoelectro osmophoresis, and fluorescent antibody techniques. *J Med Virol* 1981; 7(1): 29-40.
9. Haffejee TE. The epidemiology of rotavirus infections: a global perspective. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20(3): 275-286.
10. Kabiri M, Aleyassin F, Hooshman H, Alborzi A. Demonstration of rotavirus antigen in children with diarrhea by enzyme immunoassay in Shiraz. The sixth international congress of geographical medical Shiraz university of medical sciences and Hedjazi hospital, Shiraz, Iran. 1993.
11. Kain KC, Barteluk RL, Kelly MT, et al. Etiology of childhood diarrhea in Beijing China. *J of Clin Microbiol* 1991; 29(1): 90-95.
12. Molbak K, Wested N, Hejlyng N, et al. The etiology of early childhood diarrhea: A community study from Guinea-Bissau. *J Infect Dis* 1994; 169(3): 581-587.

13. Ogunsanya TI, Rotimi VO and Adenuga A. A study of the aetiological agents of childhood diarrhoea in Lagos, Nigeria. *J Med Microbiol* 1994; 40(1): 10-14.
14. Paje-Villar E, Co BG, Caradang EH, *et al.* Non-bacterial diarrhoea in children in the Philippines. *Ann Trop Med Parasitol* 1994; 88(1): 53-58.
15. Walker Smith J. Rotavirus gastroenteritis. *Arch Dis Child* 1978; 53(5): 355-362.