

(Brief Report)

چکیده

زمینه و هدف: جنس ویبریو شامل باکتری‌های میله‌ای گرم منفی، اکسیداز مثبت هستند که به طور وسیع در آب‌های سطحی و دریاهای تمام دنیا یافت می‌شوند. بعضی از گونه‌های این جنس در بیماری‌های گوارشی و خارج از دستگاه گوارشی نقش دارند و در هنگام وقوع بلایای طبیعی مثل سیل، بیماری‌های ناشی از آن زیاد می‌شود. ویبریوکلا عامل بیماری وبا می‌باشد. در این مطالعه نمونه‌های آب برداشت شده از آب‌های سطحی استان گلستان از نظر وجود ویبریوکلا بررسی شد.

دوش بردی: برای تشخیص اولیه این گونه از محیط‌های آب پیتونه قلبایی و TCBS استفاده گردید و با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی (اکسیداز، لیزین دکریوکسیلاز، اورنیتین دکریوکسیلاز، آرژنین دی‌هیدرولاز، رشد در ۰ درصد، ۱ درصد، ۳ درصد، ۶ درصد نمک و سایر آزمون‌های بیوشیمیایی شامل ONPG، VP، سیمون سترات، بایل اسکولین، اندول، CAMP، استرینگ تست) و نیز آنتی‌سرم‌های ویبریوکلا تشخیص نهایی انجام شد.

یافته‌ها: از مجموع ۵۴ نمونه برداشت شده، ۴۲ مورد ویبریو جدا شد که ۳۵ مورد (۸۴/۲ درصد) *V.cholerae non-01*، ۲ مورد (۲/۶۳ درصد) *V.mimicus* و ۵ مورد (۱۳/۱ درصد) *V.cholerae 01* بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ویبریو کلرا در ۹ درصد نمونه‌های برداشت شده از آب‌های سطحی استان گلستان وجود دارد.

کلید واژه‌ها: ویبریوکلا - آب‌های سطحی - بیوتایپ - سروتایپ

احمد هلاکو

کارشناس ارشد میکروبیولوژی و عضو هیأت علمی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه

دکتر نور امیرمظفری

دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران

هما فروهش تهرانی

کارشناس ارشد میکروبیولوژی و عضو هیأت علمی گروه
میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران

محمود خرماهی

کارشناس میکروبیولوژی دانشگاه تهران

نویسنده مسؤل: احمد هلاکو

پست الکترونیکی: ahmadhalako@yahoo.com

نشانی: خوزستان، ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی

گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۶۹۲-۵۲۲۴۰۴۰ (داخلی ۲۱۳)

نمابر: ۵۲۳۱۰۶۸

وصول مقاله: ۸۴/۷/۱۷

اصلاح نهایی: ۸۵/۶/۱۸

پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۲۸

مقدمه

سویه V.cholerae 01 عامل گاستروانتریت های خود به خود محدود شونده هستند (۷).

ما هر ساله در فصل تابستان شاهد شیوع بیماری وبا در بعضی از نقاط کشورمان می باشیم. ایزدی و همکاران در سال های ۱۳۸۰ لغایت ۱۳۸۳ بیش از ۹۰ مورد بیماری وبا را در جنوب شرقی ایران گزارش کردند (۸). با توجه به این که عامل این بیماری از طریق آب های آلوده به انسان منتقل می شود، لذا تحقیق حاضر به انتشار ویبریوکلرا در آب های سطحی استان گلستان می پردازد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، ۵۴ نمونه از آب های سطحی دریاچه سد گلستان، رودخانه گرگان و شاخه های آن در فصل بهار و تابستان ۱۳۸۰ برداشت شد (شکل ۱).



شکل ۱: نقشه استان گلستان و مکان های نمونه برداری که به صورت نقطه سیاه مشخص شده است.

از نقاط مورد نظر برای گرفتن نمونه ۲-۳ متر داخل آب و از عمق ۳۰ سانتی متری به وسیله شیشه دهان گشاد و استریل نمونه برداشت شده سپس در کوتاه ترین زمان در آزمایشگاه در شرایط استریل ۱۰ سی سی از نمونه را با پیت استریل به لوله آزمایش منتقل کرده، لوله آزمایش به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می شد. محلول رویی دور ریخته می شد و سپس ۱-۲ سی سی نمونه آب در لوله آزمایش می ماند که یک سی سی از محلول زیرین لوله آزمایش را به ۹ سی سی محیط آب پپتون قلیایی با ۱ درصد نمک منتقل و بعد از ۴-۶ ساعت روی محیط TCBS اگار کشت و محیط TCBS در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت

ویبریوکلرا عامل وبای آسیایی می باشد که قرن ها یکی از ویران کننده ترین بیماری ها محسوب می شد. این باکتری ساکن آب های محیطی و مهم ترین راه انتقال آن به انسان آب های آلوده است (۳-۱).

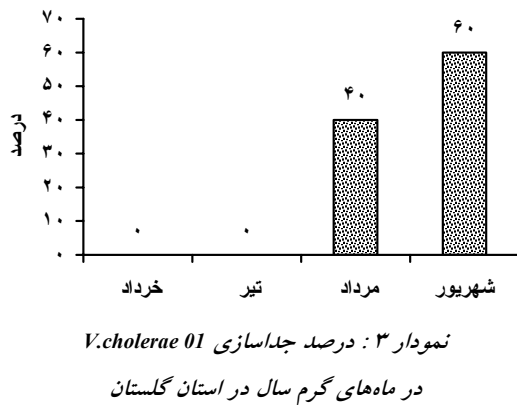
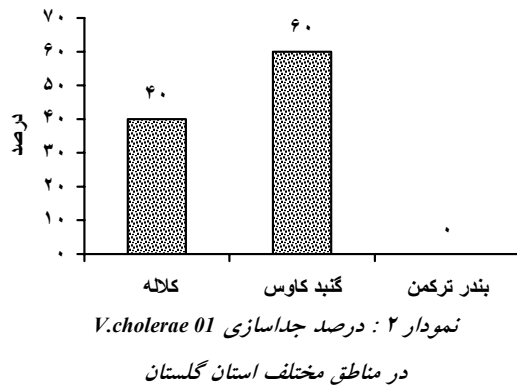
V.cholerae 01 شامل دو بیوگروپ کلاسیک و التور می باشد. بیوگروپ کلاسیک از اپیدمی وبا در کشور هندوستان جدا می شود (۱). همچنین بیماری وبا در بسیاری از نقاط هندوستان به صورت اندمیک وجود دارد و عامل آن نیز ویبریوکلرا 01 بیوتیپ التور و سروتیپ اوگاو می باشد (۴). شدت بیماری هایی که به وسیله بیوگروپ کلاسیک و بیوگروپ التور ایجاد می شوند، متغیر است. حدود ۷۵ درصد عفونت های بیوگروپ التور و حدود ۶۰ درصد از عفونت های بیوگروپ کلاسیک بدون علامت هستند. بیماری ایجاد شده توسط بیوگروپ کلاسیک در ۳۰ درصد موارد عفونت ملایم و در ۱۰ درصد موارد عفونت شدید گزارش گردیده است. در حالی که التور، ۲۳ درصد بیماری خفیف و فقط ۲ درصد بیماری شدید تولید می کند (۳).

سویه های V.cholerae 01 می توانند به یکی از این سه سروگروپ Hikojima ogawa Inaba تقسیم بندی شوند. این سروگروپ ها در مطالعات اپیدمیولوژی حائز اهمیت هستند. عامل پاندمی وبا در جنوب شرقی آسیا در سال ۱۹۶۱ سروگروپ ogawa بود. عامل وبای اندمیک که از خلیج و دریاچه های ایالات متحده وجود دارد سروگروپ Inaba می باشد (۱).

در کشورهایی که وبا به صورت اندمیک وجود دارد ارگانسیم را به وسیله روش هایی مانند حرکت در زیر میکروسکوپ زمینه سیاه (dark field) و استرینگ تست (string test) تشخیص می دهند. در کشورهایی که بیماری نادر می باشد، از آزمون های بیوشیمیایی و سرولوژیک برای تشخیص استفاده می کنند (۵ و ۶).

non-01 V.cholerae ارگانسیم هایی هستند که از نظر خصوصیات بیوشیمیایی از V.cholerae غیر قابل تشخیص هستند، اما در آنتی سرم 01 اگلوتینه نمی شوند. این ارگانسیم ها کلراتوکسین تولید نکرده و عامل بیماری اپیدمیک نیستند (۱).

درصد جداسازی *V.cholerae* 01 در ماه‌های گرم سال در این استان در نمودار ۳ نشان داده شده است. بیشترین درصد جداسازی در فصل شهریور به میزان ۶۰ درصد بوده است.



بحث

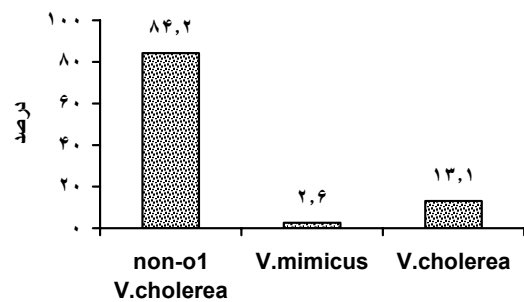
جنس ویبریو شامل ۳۶ گونه است که ۱۲ گونه آن برای انسان بیماری‌زاست. گونه‌های بیماری‌زا این جنس بیشتر در کشورهایمانند ایالات متحده و ژاپن که فرآورده‌های غذایی دریایی زیاد مصرف می‌کنند، گزارش شده است (۳). در خصوص فراوانی گونه‌های جنس ویبریو و بیماری‌زایی آنها در ایران، مطالعه گسترده‌ای صورت نگرفته است. فقط در مورد گونه ویبریوکلرا مطالعاتی انجام شده است که در فصل گرما (تابستان) انتشار آن زیاد می‌شود (۸).

اکثر ویبریوها نمک‌دوست بوده و فقط گونه‌های *V.cholerae*، *V.mimicus* و *V.cholerae* non-01 قادر به رشد در آب‌های شیرین هستند (۳ و ۱). به همین دلیل در هنگام کشت بعضی از نمونه‌های آب برداشت شده از آب‌های سطحی استان گلستان روی محیط TCBS هیچ نوع کلنی ایجاد نمی‌کردند.

قرار داده می‌شد. کلنی‌های زرد یا سبز رشد کرده در محیط TCBS اگر را روی محیط کلیگلرایرون اگر (KIA) کشت داده و کلنی‌هایی که روی محیط KIA، واکنش اسید/قلیا نشان می‌دادند، به وسیله آزمون اکسیداز آزمایش می‌شد. از این مرحله به بعد آزمون‌های افتراقی روی کلنی‌های اکسیداز مثبت انجام می‌شد. سپس آزمون‌های لیزین دکربوکسیلاز (LDC) اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) و ارژنین دی هیدرولاز (AOH)، VP، ONPG، سیمون سترات، بایل اسکولین، اندول، رشد در غلظت ۰ درصد، ۱ درصد، ۳ درصد، ۶ درصد نمک، رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ درجه سانتی‌گراد، آزمون CAMP، آزمون استرینگ (string test) و آزمون آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم پلی‌والانت *V.cholerae* 01 و آزمون آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم‌های gawa و Inaba انجام شد.

یافته‌ها

از مجموع ۵۴ نمونه برداشت شده از آب‌های سطحی استان گلستان ۴۲ مورد ویبریو جدا شد. از ۴۲ مورد ویبریو جدا شده، ۳۵ مورد (۸۴/۲ درصد) *V.cholerae* non-01، ۲ مورد (۲/۶۳ درصد) *V.mimicus* و ۵ مورد (۱۳/۱ درصد) *V.cholerae* جدا شد (نمودار ۱).



نمودار ۱: درصد جداسازی گونه‌های ویبریوکلرا از آب‌های سطحی استان گلستان

۵ مورد *V.cholerae* با آنتی‌سرم‌های *ogawa* و *Inaba* به طور جداگانه تست شدند. هر ۵ سویه جدا شده *V.cholerae* 01 سرگروپ *ogawa* بود. ۳ مورد از ویبریوکلرا جدا شده مربوط به شهرستان گنبد کاووس و ۲ مورد آن از شهرستان کلاله بود (نمودار ۲).

همچنین انتشار ویريوکلرا در فصل تابستان و بعد از بارندگی بیشتر می‌شود، این باکتری در دمای بالا به سرعت رشد می‌کند (۸).

Sano و همکاران از آب‌های دریایی از اکا در ژاپن، ویريوکلرا جدا کردند که همه آنها بیوتیپ التور و سروتیپ اوگاوا بودند (۱۱).

در پاییز ۱۳۸۳ ایزدی و همکاران ۶۱ مورد ویريوکلرا از آب‌های سطحی و رودخانه‌ها جدا کردند که همه آنها بیوتیپ التور و سروتیپ اوگاوا بودند (۸).

مطالعه‌ای که توسط junudson و همکارانش در مناطق اندمیک V.cholerae انجام شد، نشان داد که میزان مبتلایان به وبا و همچنین میزان جداسازی این باکتری از محیط‌های آبی (ماه‌های آگوست و سپتامبر) بیشتر از ماه‌های دیگر است. یعنی جداسازی این ارگانیزم با درجه حرارت رابطه مستقیمی دارد. همچنین این ارگانیزم بعد از بارندگی در فصل تابستان بیشتر جدا می‌شود (۱۲).

با توجه به مطالعه محققان کشورهای هند و مالزی جداسازی این ارگانیزم در ماه‌هایی که درجه حرارت هوای آن بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد است و بعد از بارندگی افزایش می‌یابد. چون این نمونه‌ها نیز بعد از بارندگی و سیل در استان گلستان برداشت شده بودند و همچنین درجه حرارت استان گلستان در فصل تابستان بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد است، بنابراین عواملی که ذکر شد در جداسازی این ارگانیزم تاثیر مثبت دارند.

معمولاً بعد از بارندگی و سیل، لاشه‌های حیوانات مختلف در دریاچه سد گلستان و رودخانه گرگان دیده می‌شوند و با توجه به این که دانشمندان اروپایی از حیوانات اهلی این باکتری را جدا کردند پس این عامل نیز در انتشار V.cholerae در آب‌های سطحی استان گلستان تاثیر داشته است.

نتیجه‌گیری

از نمونه‌های برداشت شده در خرداد و تیرماه ویريوکلرا جدا نشد. تمامی ویريوکلراهای جدا شده مربوط به مرداد و شهریور ماه بودند. از ۵ مورد ویريوکلرا جدا شده، ۲ مورد در مرداد و ۳ مورد در شهریور ماه جدا شدند (نمودار ۳). در کل

non-01 V.cholerae سویه‌هایی هستند که از نظر بیوشیمیایی شبیه به V.cholerae بود ولی قادر نیستند آنتی‌سرم 01 را الگوتینه کنند. اسهال، خون، زخم و عفونت گوش جداسازی شده است (۲).

در ایالات متحده Kape و همکاران این ارگانیزم را از آب، رسوبات و حیوانات دریایی، همچنین از گیاه‌خواران غرب کلرادو خصوصاً گاوها و خوک‌ها جدا کردند (۲).

در مطالعه‌ای که در کشور هلند روی حیوانات اهلی انجام شد، این ارگانیزم از بز، گاو و گوسفند جدا گردید (۶).

Thomson و همکاران در سال ۱۹۹۸ نمونه‌های آب از دریاچه‌ها، فاضلاب‌ها و آب‌های آشامیدنی شهر Vellore در جنوب هند را مورد مطالعه قرار دادند که از ۱۰۰ درصد نمونه‌های گرفته شده از دریاچه‌ها و از ۸۷ درصد نمونه‌های فاضلاب‌ها و از ۴۱ درصد نمونه‌های آب آشامیدنی non-01 V.cholerae جدا شد (۹).

در ایالات متحده موارد زیادی از بیماری گاستروانتریت non-01 V.cholerae در اواخر تابستان و قبل از این که درجه حرارت هوا کم شود، گزارش شده است که در این زمان (اواخر تابستان) سویه‌های non-01 V.cholerae در محیط‌های آب افزایش می‌یابند و رابطه مستقیمی بین درجه حرارت آب و میزان (تراکم) این ارگانیزم وجود دارد. مطالعه مشابهی نیز در کشور دانمارک نشان می‌دهد که درجه حرارت آب یکی از عوامل مهم در جداسازی این ارگانیزم است (۷).

از آنجایی که بیش از نیمی از نمونه‌های برداشت شده از دریاچه سد گلستان می‌باشد و این دریاچه بعد از سیل، مملو از اجساد و لاشه‌های حیوانات اهلی مانند گاو، گوسفند و پرندگان بود، طبیعتاً انتشار فراوان non-01 V.cholerae در این دریاچه موثر خواهد بود. همچنین زمان نمونه‌برداری تابستان بود و در این زمان با توجه به مطالعات دانشمندان آمریکایی تراکم non-01 V.cholerae در محیط‌های آبی افزایش می‌یابد.

Visser و همکارانش V.cholerae را از حیوانات اهلی مثل گوسفند و گاو میش که مبتلا به اسهال بودند، جدا کردند. همچنین از آب‌های سطحی نزدیک طویله حیوانات اهلی نیز این ارگانیزم جدا شد (۱۰).

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری کارکنان مرکز تحقیقاتی و آموزشی علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

۷۷ درصد نمونه‌های آب برداشت شده، آلوده به جنس ویبریو بود که از این میزان ۹ درصد *V.cholerae* 01 می‌باشد. بیوگروپ و سرگروپ 01 *V.cholerae* جدا شده التور و ogawa بود.

References

- 1) Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. Curved Gram-Negative Bacilli and Oxidase-Positive Fermenters: Campylobacteraceae and Vibrionaceae. In: Color atlas and text book of diagnostic microbiology. 5th Ed. Philadelphia. Lippincott. 1997; pp:339-352.
- 2) Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson L. Harrison's principles of internal medicine. 15th Ed. Vol 1. New York: McGraw- Hill. 2001; pp:980-986.
- 3) Murray PR, Baron EJ, Jorjensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 8th Ed. Washington DC: ASM Prss. 2005; pp: 706-714.
- 4) Sabeena F, Thirivikramji G, Radhakutty G, Indu P, Singh DV. *In vitro* susceptibility of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains associated with an outbreak of cholera in Kerala, Southern India. J Antimicrob Chemother. 2001;47(3):361-2.
- 5) Zwadyk P. Vibrionaceae. Joklik WK, Amos DB, Wilfert CM, eds. In: Zinsser microbiology. 19th Ed. Norwalk, CT: Appleton and Lange. 1991; pp: 566-575.
- 6) Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Darteville S, Guenole A, et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples (note). Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(3):476-8
- 7) Dalsgaard A, Forslund A, Hesselbjerg A, Bruun B. *Clinical manifestations and characterization of extra-intestinal Vibrio cholerae non-O1, non-O139 infections in Denmark*. Clin Microbiol Infect. 2000; 6(11):625-7.
- 8) Izadi S, Shakeri H, Roham P, Sheikhzadeh K. *Cholera outbreak in southeast of iran: routes of transmission in the situation of good primary health care services and poor individual hygienic practices*. Jpn J Infect Dis. 2006;59(3):174-8.
- 9) Thomson CJ, Jesudason MV, Balaji V, Malathi B, Mukundan U, Amyes SG. *The prevalence of Vibrio spp. in drinking water and environmental samples in Vellore South India*. Epidemiol Infect. 1998;121(1):67-76.
- 10) Visser IJ, Vellema P, van Dokkum H, Shimada T. *Isolation of Vibrio cholerae from diseased farm animals and surface water in The Netherlands*. Vet Rec. 1999;144(16):451-2.
- 11) Miyagi K, Nakano T, Yagi T, Hanafusa M, Imura S, Honda T, et al. *Survey of Vibrio cholerae O1 and its survival over the winter in marine water of Port of Osaka*. Epidemiol Infect. 2003; 131(1):613-9.
- 12) Jesudason MV, Balaji V, Mukundan U, Thomson CJ. *Ecological study of Vibrio cholerae in Vellore*. Epidemiol Infect. 2000; 24(2):201-6.