

مارک‌های ویروالانس در یرسینیاهای آتپیک جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال

دکتر محمد مهدی سلطان دلال*^۱، زهرا وفائی^۲، دکتر عباس رحیمی فروشانی^۳، دکتر محمد تقی حقی آشتیانی^۴

دکتر محمد کاظم شریفی یزدی^۵، مرتضی کاوان^۶، روناک بختیاری^۷، دکتر بهرام نیک منش^۸

۱- استاد بخش میکروبی شناسی پزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۲- استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۳- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۴- استاد، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۵- استاد، آزمایشگاه بیمارستان مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۶- استاد، مرکز تحقیقات زئونوز (بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۷- استاد، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۸- استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: یرسینیا باسیلی است که در ایجاد اسهال‌های ناشی از مصرف آب و غذای آلوده اهمیت دارد. با توجه به عدم اطلاع کافی در خصوص نقش مارک‌های ویروالانس در گونه‌های آتپیک یرسینیا در ایجاد بیماری، این مطالعه به منظور تعیین مارک‌های ویروالانس در یرسینیاهای آتپیک جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی مقطعی روی نمونه مدفوعی ۲۸۴ کودک صفر تا ۱۴ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران طی مرداد ۱۳۹۰ تا مرداد ۱۳۹۱ انجام شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، برای غنی‌سازی در سرما در محیط بافر قلیایی با pH=۷/۲ به مدت ۲۱ روز سرماگذاری شدند و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بر روی محیط افتراقی-انتخابی CIN و Mac کشت داده شدند. برای افتراق گونه‌های یرسینیای آتپیک از سایر یرسینیاهای تپیک از تخمیر قندهای مختلف استفاده شد. از تست‌های فنوتایپینگ مانند اتواگلوتیناسیون، جذب کونگو رد، اتصال به کریستال ویوله و رشد وابسته به کلسیم برای تعیین مارک‌های ویروالانس سوش‌های آتپیک استفاده شد.

یافته‌ها: ۴ نمونه (۱/۰۴ درصد) آلوده به یرسینیا شامل یک سویه یرسینیا فردریکسنی، یک سویه یرسینیا کریستسنی و ۲ سویه یرسینیا انتروکلی تیکا بودند. از میان چهار نمونه جدا سازی شده فقط دو ایزوله از لحاظ مارک‌های ویروالانس مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصله نشان داد از مارک‌های فنوتیپی می‌توان برای بررسی خاصیت فنوتیپی ایزوله‌های یرسینیا استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: یرسینیا انتروکلی تیکا، یرسینیاهای آتپیک، مارک‌های ویروالانس، اسهال

* نویسنده مسؤول: دکتر محمد مهدی سلطان دلال، پست الکترونیکی msoltandallal@gmail.com

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی / بخش میکروبی شناسی

غذایی، تلفن و نمابر ۰۲۱-۸۸۹۹۲۹۷۱

وصول مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۲، اصلاح نهایی: ۱۳۹۴/۴/۲۱، پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۵/۱۷

مقدمه

گونه‌های مختلف جنس یرسینیا به وسیله اتصال و نفوذ به سلول‌های ایلنوم روده و تهاجم به موکوس آن ناحیه و در نهایت تکثیر در بافت‌های لنفاوی می‌توانند باعث گاستروانتریت شوند (۴). یرسینیا انتروکلی تیکا، سالمونلا و کمپیلوباکتر از شایع‌ترین علل بیماری‌های منتقله از راه مواد غذایی در انسان است (۵). گونه‌های مختلف این باکتری از موادی مانند گوشت خوک، گاو، گوسفند (۶)، شیر خام و انواع سبزی‌ها (۷)، بستنی و آب آلوده (۸) جدا شده است. خوک مهم‌ترین مخزن سویه‌های ویروالانس این باکتری است (۹).

بیماری‌های اسهالی از شایع‌ترین عوامل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه هستند (۱). اسهال عفونی عوامل متعددی دارد؛ اما مهم‌ترین عوامل باکتریال ایجاد کننده اسهال التهابی عبارت از اشریشیا کلی، سالمونلا، شیگلا، ویبریو و کمپیلوباکتر هستند (۲). جنس یرسینیا از خانواده انتروباکتریاسه شامل سه گونه پاتوژن انسانی به نام‌های یرسینیا انتروکلی تیکا، یرسینیا پستیس و یرسینیا سودوتوبرکلوزیس است و سایر گونه‌ها فرصت طلب بوده و شامل یرسینیا اینترمدیا، یرسینیا فردریکسنی، یرسینیا کریستسنی هستند (۳).

ایران نشده و مشخص نیست ایزوله‌های بومی ایران مشابه ایزوله‌های سایر نقاط جهان همان خواص بیماری‌زایی را داشته باشند. لذا هدف از این مطالعه تعیین وضعیت عوامل ویروالانس و بیماری‌زایی از یرسینیا‌های آنتیبیوتیک جدا شده از نمونه اسهال کودکان در مقایسه با سویه‌های استاندارد بود.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی مقطعی روی ۳۸۴ کودک صفر تا ۱۴ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران طی دوره یک‌ساله از مرداد ۱۳۹۰ تا مرداد ۱۳۹۱ انجام شد.

پس از کامل کردن پرسشنامه مربوط به بیمار، در بیمارستان یک سوپ از نمونه مدفوع کودک بیمار تهیه و در محیط ترانسپورت کری بلر قرار داده شد و در عرض کمتر از ۴۸ ساعت به آزمایشگاه تخصصی یرسینیا در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل شد.

روش کلی برای جداسازی گونه‌های یرسینیا، نمونه مدفوع و استفاده از تکنیک غنی‌سازی توسط سرما به همراه محیط اختصاصی سین آگار بود (۱۵).

پس از انتقال محیط کری بلر، سوپ برای غنی‌سازی در سرما در محیط بافر قلبایی با $pH=7/2$ قرار داده شده و به مدت ۲۱ روز در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از پایان هر هفته یک کشت خطی بر روی محیط سین آگار و مک کانکی آگار انجام شد و پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند و سپس پلیت‌ها از لحاظ حضور کلنی‌های یرسینیا بررسی شدند.

کلنی‌های مشکوک بر روی سین آگار بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون عبارت از کلنی‌های ریز، گرد صورتی تا قرمز رنگ، وجود هاله صورتی شفاف اطراف کلنی بود. تجربیات به دست آمده نشان می‌دهد که هاله شفاف را پس از گذشت ۴۸ ساعت به خوبی می‌توان مشاهده کرد. روی محیط مک کانکی آگار کلنی‌هایی مشکوک تلقی شدند که دارای مشخصات گرد، بی‌رنگ (لاکتوز منفی) و بعد از ۲۴ ساعت، کوچک (در حدود یک میلی‌متر) بودند. در مرحله بعد، جدایه‌های مشکوک در محیط‌های افتراقی (ساخت مرکب) کلیگلر آبیرون آگار (KIA)، SIM، اوره، سیمون سترات، VP، MR، اورنیتین، لیزین، آرژنین برده شدند. همه محیط‌ها به استثنای SIM در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرماگذاری شدند. در مورد SIM دو لوله تلقیح شد؛ یکی در حرارت آزمایشگاه (۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد) و دیگری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در این مرحله نمونه‌هایی که در محیط کلیگلر آبیرون آگار قرار داده شدند؛ دارای واکنش‌های گلوکز مثبت، لاکتوز و ایجاد گاز و سولفید هیدروژن منفی بودند.

یرسینیا اتروکلکی تیکا را از لحاظ بیوشیمیایی سوش تیپیک می‌نامند و سوش‌های مشابه یرسینیا اتروکلکی تیکا (*Y. enterocolitica* - Like strains) را که شامل ۳ گونه اخیر یرسینیا/ایترومدیا، یرسینیا فردریکسنی و یرسینیا کریستسنی است را سوش‌های آنتیبیوتیک یرسینیا می‌نامند (۱۰). یرسینیا/ایترومدیا، یرسینیا فردریکسنی، یرسینیا کریستسنی حدود ۲۰ درصد کل گونه‌های یرسینیا را به خود اختصاص می‌دهند (۱۱).

یرسینیا فردریکسنی، یرسینیا/ایترومدیا و یرسینیا کریستسنی باکتری‌هایی هستند که اخیراً توزیع جهانی یافته و از منابع محیطی، حیوانی و انسانی جدا شده‌اند. در مطالعه‌ای که توسط Noble و همکاران در سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۸۵ در کانادا انجام شد؛ محققین در طی این ۴۲ ماه، ۲۱۵ نمونه مدفوع را جمع‌آوری کرده و به وسیله تکنیک غنی‌سازی در سرما و کشت، آنها را از لحاظ حضور گونه‌های یرسینیا مورد بررسی قرار دادند. از تعداد جمع‌آوری شده ۱۳۲ عدد از لحاظ گونه یرسینیا مثبت بودند که از این تعداد ۸۰ سویه یرسینیا اتروکلکی تیکا، ۴۲ سویه یرسینیا فردریکسنی، ۸ سویه یرسینیا/ایترومدیا و ۲ سویه یرسینیا کریستسنی گزارش گردید و سپس مارکرهای ویروالانس (رشد وابسته به کلسیم، اتوآگلوتیناسیون، جذب کونگورد و اتصال به کریستال ویوله) را بر روی این گونه‌های جداسازی شده بررسی کردند که تمام ۸۰ سویه یرسینیا اتروکلکی تیکای جدا شده نسبت به جذب کونگورد و واکنش اتوآگلوتیناسیون مثبت بودند. در حالی که تمام سویه‌های یرسینیا کریستسنی جداسازی شده نسبت به تمام مارکرهای ویروالانس انجام گرفته منفی بودند (۱۲). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Prpic و همکاران در سال ۱۹۸۵ در استرالیا انجام شد؛ تعداد ۱۳۶ ایزوله یرسینیا که شامل ۱۱۲ عدد سوش یرسینیا اتروکلکی تیکا، ۱۲ عدد سوش یرسینیا فردریکسنی، ۸ عدد سوش یرسینیا/ایترومدیا و ۵ عدد سوش یرسینیا کریستسنی از لحاظ حضور عوامل ویروالانس مانند جذب کونگورد، اتوآگلوتیناسیون، وابستگی به کلسیم مورد آزمایش قرار گرفت (۱۳). نتایج به دست آمده بیانگر آن بود که بعضی گونه‌های یرسینیا‌های آنتیبیوتیک به علت داشتن مارکرهای ویروالانس مانند رشد وابسته به کلسیم، اتوآگلوتیناسیون، جذب کونگورد و اتصال به کریستال ویوله که باعث افتراق این گونه‌ها از یرسینیا اتروکلکی تیکا شده و می‌تواند ایجاد علائم و بیماری‌های مختلف مانند گاستروانتریت کنند (۱۲ و ۱۳). نتایج Falcão و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد ایزوله‌های یرسینیا اتروکلکی تیکا با منشاء انسانی و حیوانی برخلاف ایزوله‌های غذایی، مرتبط با تست‌های ویروالانس هستند (۱۴).

با وجودیکه در تحقیقات قبلی شاهد حضور گونه‌های آنتیبیوتیک یرسینیا در ایران بودیم (۱۵)؛ ولی تاکنون بررسی در این زمینه در

جدول ۱: تعیین سویه سوش‌های جداسازی شده با استفاده از تخمیر قند (شماره‌های مربوط به بیماران)

تست	شماره مربوط به بیماران			
	۱۰۶	۱۱۹	۱۸۰	۳۵۶
رامنوز	+	-	-	-
ملویوز	-	-	-	-
رافینوز	-	-	-	-
سوکروز	+	-	+	+
سویه ایزوله شده	<i>Y.frederikseni</i>	<i>Y.kristensenii</i>	<i>Y.enterocolitica</i>	<i>Y.enterocolitica</i>

یرسینوز در ایران در جدول‌های ۲ و ۳ آمده است.

بحث

در این مطالعه علاوه بر اثبات حضور یرسینیا، با شیوع نسبی ۱/۰۴ درصد، برای اولین مرتبه در ایران نشان داده شد که برخی از گونه‌های یرسینیاهای آتیبیک ایران نیز توانایی تولید عوامل ویروالانس که موجب گاستروانتریت می‌شوند را دارا هستند.

برای تخمین فراوانی گاستروانتریت ناشی از یرسینیا در بچه‌ها، Marks و همکاران در مونترال ۶۳۶۴ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت را بررسی کردند و ۱۸۱ مورد (۲/۸ درصد) یرسینیا ایتروکلکی تیکا جدا شد. همچنین میانه سنی برای کودکان مبتلا به یرسینیا ایتروکلکی تیکا ۲۴ ماه به دست آمد (۱۶).

به دنبال تحقیقی که طی یک سال از تیرماه ۱۳۷۶ تا خرداد ۱۳۷۷ در اسلامشهر انجام شد؛ از ۱۶۰۰ نمونه سواب از مدفوع کودکان زیر ۵ سال، ۲۳۵ سویه از باکتری‌های بیماری‌زا جدا گردید که بیشترین میزان جداسازی مربوط به اشریشیا کلی با ۱۰۹ سویه (۶/۸ درصد) و کمترین میزان جداسازی مربوط به یرسینیا با ۱۱ سویه (۰/۷ درصد) بود. اگرچه یرسینیا یک باکتری سرماگراست و معمولاً در کشورهای سردسیر گزارش می‌شود؛ ولی نتایج این تحقیق نشان داد علی‌رغم گرمسیر بودن کشور ایران، حضور یرسینیا ایتروکلکی تیکا و حتی گونه‌های آتیبیک و مثبت بودن آنها در خصوص داشتن عوامل بیماری‌زا از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۷).

در مطالعه انجام شده توسط Ray و همکاران در مینه‌سوتا، ۴۸ درصد کل یرسینیاهای جدا شده در طول سال بین ماه‌های آبان تا اسفند روی داده بود؛ لذا بر اهمیت توجه به یرسینیا به عنوان یکی از علل مهم اسهال‌های التهابی کودکان در فصل سرد سال تاکید شد (۱۸). لذا به نظر می‌رسد بیشترین فراوانی یرسینیا در فصول سرد سال روی می‌دهد که نشان می‌دهد طبق نتایج مطالعه حاضر که جداسازی در فصول سرد سال انجام شد؛ با نتایج قبلی هم‌خوانی دارد. در مجموع پایین بودن شیوع جنس یرسینیا را در این مطالعه به چند عامل می‌توان نسبت داد. یکی از آن موارد انجام بخشی از تحقیق در فصل تابستان است. چنان که مطالعات دیگر نیز حداکثر شیوع این میکروارگانیزم را در فصل سرد سال و به خصوص پاییز و زمستان ذکر نموده‌اند (۱۹ و ۲۰).

تست سیمون سترات یرسینیا منفی؛ اما از لحاظ تست‌های اوره و اورنیتین دکربوکسیلاز و دیسک ONPG مثبت بود. گونه‌های یرسینیا در محیط SIM در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غیرمتحرک ولی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد دارای حرکت هستند. برای تأیید و افتراق گونه‌های یرسینیای آتیبیک از گونه یرسینیای تیبیک از تخمیر قندهای مختلف مانند ملویوز، رافینوز، رامنوز و سوکروز استفاده شد. یرسینیا فردریکسنی به وسیله تخمیر رامنوز از یرسینیا ایتروکلکی تیکا قابل افتراق است. یرسینیا ایتروکلکی هم توسط تخمیر قند ملویوز از یرسینیا ایتروکلکی تیکا مجزا می‌شود و یرسینیا کریستنسنی نیز با تست عدم تخمیر سوکروز قابل شناسایی است. سپس براساس نتایج دیگر مطالعات (۱۴-۱۲) از تست‌های فنوتایپینگ مانند اتوآگلوتیناسیون، جذب کونگو رد، اتصال به کریستال ویوله و رشد وابسته به کلسیم برای تعیین مارکرهای ویروالانس ۴ سویه جدا شده از بیماران با شماره (۱۰۶-۱۱۹-۱۸۰-۳۵۶) و ۸ سویه از مجموعه انستیتو پاستور پاریس فرانسه با رفرنس‌های *Y.enterocolitica* 161 0:8، *Y.enterocolitica* 846 0:18، *Y.kristensenii* 7231، *Y.intermedia* 103، *Y.kristensenii* 1647، *Y.kristensenii* 7142، *Y.frederiksenii* و *Y.frederiksenii* 7210، 1476 استفاده گردید.

یافته‌ها

از مجموع ۳۸۴ نمونه مورد بررسی، ۴ گونه (۱/۰۴ درصد) یرسینیا جداسازی گردید. در این بین ۳ ایزوله یرسینیا در فصل پاییز و یک ایزوله در فصل بهار جداسازی شد.

در بررسی نحوه جداسازی یرسینیا می‌توان گفت هر چهار سویه جدا شده، از طریق سرماگذاری و استفاده از بافر فسفات سالین به دست آمدند. در این بین، ۲ سویه یرسینیا ایتروکلکی تیکا، یک سویه یرسینیا فردریکسنی و یک سویه یرسینیا کریستنسنی جداسازی گردید.

برای تعیین گونه یرسینیاهای جدا شده ایران از تخمیر قندهایی مانند رامنوز، ملویوز، رافینوز و سوکروز استفاده گردید (جدول یک).

نتایج تست‌های ویروالانس ۸ سویه یرسینیا از مجموعه انستیتو پاستور پاریس فرانسه و ۴ سویه جدا شده از کودکان مبتلا به

جدول ۲: نتایج تست‌های فنوتایپینگ (مارک‌های ویرولان‌س) از مجموعه انستیتو یاستور یاریس

تست	دما (درجه سانتی‌گراد)	Y.e 846 o:18	Y.e 161 o:8	Y.k 1647	Y.k 103	Y.i 7231	Y.i 1476	Y.f 7210	Y.f 7142
کونگورد	۳۷	Crb -	Crb +	Crb -	Crb -	Crb -	Crb -	Crb -	Crb -
	۲۷	Crb -	Crb +	Crb -	Crb -	Crb -	Crb -	Crb -	Crb -
کریستال ویوله	۳۷	*	**	*	*	*	*	*	*
	۲۷	*	**	*	*	*	*	*	*
اتواگلوتیناسیون	۳۷	-	+	-	-	-	-	-	-
	۲۷	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد وابسته به کلسیم (پلاد)	۳۷	+	+	+	+	+	+	+	+
	۲۷	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد وابسته به کلسیم (اکزالات کلسیم)	۳۷	+	-	+	+	+	+	+	+
	۲۷	+	+	+	+	+	+	+	+

* کلنی‌های بدون رنگ، ** کلنی‌های بنفش رنگ

جدول ۳: نتایج تست‌های فنوتایپینگ (مارک‌های ویرولان‌س) بر سینه‌های جدا شده از ایران

تست	دما (درجه سانتی‌گراد)	۱۰۶	۱۱۹	۱۸۰	۳۵۶
کونگورد	۳۷	Crb +	Crb -	Crb -	Crb +
	۲۷	Crb +	Crb -	Crb -	Crb +
کریستال ویوله	۳۷	**	*	*	**
	۲۷	**	*	*	**
اتواگلوتیناسیون	۳۷	+	-	-	+
	۲۷	-	-	-	-
رشد وابسته به کلسیم (پلاد)	۳۷	+	+	+	+
	۲۷	+	+	+	+
رشد وابسته به کلسیم (اکزالات کلسیم)	۳۷	-	+	+	-
	۲۷	+	+	+	+

* کلنی‌های بدون رنگ، ** کلنی‌های بنفش رنگ

سویه‌های ویرولان: Y. enterocolitica 161 0:8، نمونه بیمار شماره ۱۰۶ و ۳۵۶

مشهود بود (۲۳ و ۲۴).

در بررسی آب‌های سطحی و آشامیدنی کن حدود ۲۲ سویه از مجموع ۳۷ ایزوله، متعلق به *یرسینیا انتروکلی تیکا* و مابقی مربوط به *یرسینیا فردریکسنی* و *یرسینیا اینترمدیا* بود. با توجه به این که تمامی ایزوله‌های *یرسینیا* از آب چاه و قنات‌های منطقه کن که به عنوان آب شرب مصرف می‌شوند؛ به دست آمده بود و همچنین با نتایج این تحقیق که برخی سویه‌های آنتیپیک توانایی بیماری‌زایی دارند؛ می‌تواند خط‌بطلانی بر این تفکر باشد که گونه‌های آنتیپیک *یرسینیا* صرفاً غیربیماری‌زا هستند (۲۵). مطالعات انجام گرفته توسط محققین حاکی از آن است که تعدادی از سویه‌های *یرسینیا*‌های آنتیپیک به علت داشتن مارک‌های ویرولان‌س مانند رشد وابسته به کلسیم، اتواگلوتیناسیون، جذب کونگورد و اتصال به کریستال ویوله می‌توانند علائم و بیماری‌های مختلف مانند گاستروانتریت را ایجاد نمایند (۲۶).

در مطالعه Prpic و همکاران در سال ۱۹۸۵ در استرالیا در ارتباط با عوامل ویرولان‌س در برخی از سویه‌های *یرسینیا*؛ از میان تست‌های اتواگلوتیناسیون، وابستگی به کلسیم و کنگورد در شرایط

از طرفی عادات و فرهنگ غذایی نیز تا حدودی می‌تواند توجیه‌کننده مسأله فوق باشد. عدم تمایل به مصرف غذای سرد و منع شرعی و قانونی گوشت خوک به عنوان یکی از منابع مهم جنس *یرسینیا* در کشورمان تا حدود زیادی از سرایت و ابتلا به این باکتری جلوگیری می‌نماید. اهمیت انتقال این باکتری از گوشت خوک با در نظر گرفتن عدم مصرف گوشت این حیوان در کشورهای اسلامی در مقایسه با آمریکا توسط Tauxe و همکاران در سال ۱۹۸۷ توجیه شده است (۲۱). گسترش مصرف غذاهای بیرون از خانه، می‌تواند یکی از دلایل افزایش طغیان‌های غذایی ناشی از این باکتری باشد. در تحقیقاتی که MacDonald و همکاران در ۲۰۱۲ در نروژ بر روی سالادهای آماده انجام دادند؛ در ۲۹/۷ درصد از نمونه‌ها *یرسینیا انتروکلی تیکا* جدا شد (۲۲).

در مطالعه Stolk-Engelaar و Hoogkamp-Korstanje و نیز در مطالعه Szyfres و Acha که بر روی بچه‌های سنین بین صفر تا ۱۵ سال انجام شد؛ بیشترین ابتلا به *یرسینیا* در بچه‌های زیر یک سال مشهود بود و آنتریت *یرسینیا* عمدتاً شامل بچه‌های زیر ۶ سال بود و انواع سخت و خارج روده‌ای *یرسینیا* در بچه‌های بالای ۶ سال

فاقد عامل ویرولانسی یرسینیا جلب نماید. لذا شاید از نظر کمی یرسینیا در مقایسه با سایر باکتری‌های پاتوژن، شیوع کمتری داشته باشد؛ لیکن وجود این عوامل ویرولانسی در صورت انتقال می‌تواند شیوع ایزوله‌های با پتانسیل بیشتر بیماری‌زایی را در جامعه منتشر نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که در موارد گاستروآنتریت کودکان، علاوه بر باکتری‌های رایج، به باکتری‌های دیگری که شیوع کمتری در ایجاد اسهال کودکان نقش دارند؛ بایستی توجه نمود. یرسینیا *انتروکلی تیکا* و سایر گونه‌های آنتیبیک آن مانند یرسینیا *فردریکسنی* و یرسینیا *کریستسنی* از جمله مواردی هستند که کمتر در ایران مورد توجه قرار گرفته است. به‌ویژه وجود مارکرهای مختلف ویرولانسی در گونه‌های آنتیبیک نشان‌دهنده نیاز توجه بیشتر به این باکتری به هنگام برخورد با اسهال کودکان است.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۲۰۱۸۳) دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران بود. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که از نظر مالی حامی این طرح تحقیقاتی بودند؛ کمال تشکر و سپاسگزاری خود را اعلام می‌داریم. همچنین از زحمات بی‌دریغ سرکار خانم کاشی کارشناس محترم بیمارستان مرکز طبی کودکان که در اجرای این طرح، ما را یاری نمودند؛ سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Velayati AA, Ghazi Saidi K, Travati MR. [A study of Salmonella, Shigella and Enteropathogenic Escherichia coli serotypes in acute gastroenteritis children under the age of five]. *Med J Islam Repub Iran*. 1987; 1(1): 22-31. [Article in Persian]
- Torres ME, Pirez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, et al. Etiology of childrens diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogenic and unusual isolates. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun; 39(6): 2134-9.
- Bercovier H, Mollaret H. Genus XIV: Yersinia. In: Krieg NR (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1984; pp: 498-506.
- Gierczy ski R. Evaluation of the usefulness of selected virulence markers for the identification of virulent Yersinia enterocolitica strains. I. Phenotypic markers associated with Plasmid pYV. *Med Dosw Mikrobiol*. 2000; 52(1): 25-34.
- Nathues C, Grüning P, Fruth A, Verspohl J, Blaha T, Kreienbrock L, Merle R. *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella enterica* and their simultaneous occurrence in German fattening pig herds and their environment. *J Food Prot*. 2013 Oct; 76(10): 1704-11. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-076.
- Pal M. *Zoonoses*. 2nd ed. India, Jaipur: Satyam Publishers. 2007; pp: 151-2.
- Bernardino-Varo L, Quiñones-Ramírez EI, Fernández FJ,

آزمایشگاهی، دو تست اول بهتر از کنگورد کاربرد داشتند (۱۳). همچنین در مطالعه Noble و همکاران طی سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۸۵ در کانادا (۱۲)، محققین به این نتیجه دست یافتند که از ۸۰ سویه یرسینیا *انتروکلی تیکا*ی جداسازی شده از لحاظ مارکرهای ویرولانسی، واکنش اتوآگلوتیناسیون ۸/۸ درصد و جذب کونگورد ۵ درصد مثبت بودند. در حالی که ۲ سویه یرسینیا *کریستسنی* جدا شده از لحاظ این مارکرهای ویرولانسی منفی بودند. از ۴۲ سویه یرسینیا *فردریکسنی* ایزوله شده ۷/۱ درصد از نظر جذب کونگورد مثبت و همگی از نظر واکنش اتوآگلوتیناسیون منفی بودند. همچنین در مطالعه Zheng و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ۱۶۰ یرسینیا *انتروکلی تیکا*ی جداسازی شده، ۸۹ درصد از سویه‌ها واکنش اتصال به کریستال یوله مثبت داشتند؛ ۸۷ درصد اتوآگلوتیناسیون، ۷۴ درصد در واکنش رشد وابسته به کلسیم و ۷۸ درصد از لحاظ جذب کونگورد مثبت گزارش شدند که نشان داد تمامی یرسینیا *انتروکلی تیکا*های جداسازی شده توانایی داشتن عوامل ویرولانسی را علی‌رغم ایجاد بیماری نخواهند داشت (۲۷). گزارشات این محققین نشان می‌دهد که برخی از سویه‌های یرسینیا توانایی داشتن مارکرهای ویرولانسی را برای ایجاد بیماری دارند که با نتایج حاصله از تحقیق ما مشابهت دارد.

یافته‌های ما نشان می‌دهد از ۸ ایزوله اروپایی تنها یک ایزوله دارای عامل ویرولانسی است؛ ولی از ۴ ایزوله ما، ۲ ایزوله یعنی ۵۰ درصد دارای عامل ویرولانسی است. این مطلب می‌تواند توجه ما را به انتقال این عوامل از طریق پدیده‌های ژنتیکی به سایر ایزوله‌های

- Vázquez-Salinas C. Prevalence of Yersinia enterocolitica in raw cow's milk collected from stables of Mexico City. *J Food Prot*. 2013 Apr; 76(4): 694-8. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-325
- Jay JM. *Modern Food Microbiology*. 6th ed. Maryland: Aspen Publishers, Inc. 2000; pp: 549-63.
- Rosner BM, Stark K, Höhle M, Werber D. Risk factors for sporadic Yersinia enterocolitica infections, Germany 2009-2010. *Epidemiol Infect*. 2012 Oct; 140(10): 1738-47. doi: 10.1017/S0950268811002664
- Shayegani M, DeForge I, McGlynn DM, Root T. Characteristics of Yersinia enterocolitica and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *J Clin Microbiol*. 1981 Sep; 14(3): 304-12.
- Loftus CG, Harewood GC, Cockerill FR 3rd, Murray JA. Clinical features of patients with novel Yersinia species. *Dig Dis Sci*. 2002 Dec; 47(12): 2805-10.
- Noble MA, Barteluk RL, Freeman HJ, Subramaniam R, Hudson JB. Clinical significance of virulence-related assay of Yersinia species. *J Clin Microbiol*. 1987 May; 25(5): 802-7.
- Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB. In vitro assessment of virulence in Yersinia enterocolitica and related species. *J Clin Microbiol*. 1985 Jul; 22(1): 105-10.
- Falcão JP, Falcão DP, Pitondo-Silva A, Malaspina AC, Brocchi M. Molecular typing and virulence markers of Yersinia

enterocolitica strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *J Med Microbiol.* 2006 Nov; 55(Pt 11): 1539-48.

15. Soltan Dallal MM, Vafaei Z, Haghi Ashtiani MT, Nikmanesh B, Rahimi Foroushani A. [Antibiotic susceptibility of *Yersinia* spp isolated from children with diarrhea]. *J Gorgan Uni Med Sci.* 2015; 17(1): 114-18. [Article in Persian]

16. Marks MI, Pai CH, Lafleur L, Lackman L, Hammerberg O. *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis: a prospective study of clinical, bacteriologic, and epidemiologic features. *J Pediatr.* 1980 Jan; 96(1): 26-31.

17. Soltan-Dallal MM, Moezardalan K. Frequency of *Yersinia* species infection in paediatric acute diarrhoea in Tehran. *East Mediterr Health J.* 2004 Jan-Mar; 10(1-2): 152-8.

18. Ray SM, Ahuja SD, Blake PA, Farley MM, Samuel M, Fiorentino T, et al. Population-based surveillance for *Yersinia enterocolitica* infections in FoodNet sites, 1996-1999: higher risk of disease in infants and minority populations. *Clin Infect Dis.* 2004 Apr; 38 (Suppl 3): S181-9.

19. Lee LA, Taylor J, Carter GP, Quinn B, Farmer JJ, Tauxe RV. *Y. enterocolitica* 0:3 an emerging cause of pediatric gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 1991; 163(3): 660-3.

20. Laukkanen-Ninios R, Fredriksson-Ahomaa M, Maijala R, Korkeala H. High prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig cheeks. *Food Microbiol.* 2014 Oct; 43: 50-2. doi: 10.1016/

j.fm.2014.04.016

21. Tauxe RV, Vandepitte J, Wauters G, Martin SM, Goossens V, De Mol P, et al. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet.* 1987 May; 1(8542): 1129-32.

22. MacDonald E, Heier BT, Nygård K, Stalheim T, Cudjoe KS, Skjerdal T, et al. *Yersinia enterocolitica* outbreak associated with ready-to-eat salad mix, Norway, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012 Sep; 18(9): 1496-9. doi: 10.3201/eid1809.120087

23. Hoogkamp-Korstanje JA, Stolk-Engelaar VM. *Yersinia enterocolitica* infection in children. *Pediatr Infect Dis J.* 1995 Sep; 14(9): 771-5.

24. Acha NP, Szyfres B. *Zoonoses and Communicable Disease Common to Man and Animal.* 3rd ed. Washington, DC: Pan American Health Organization. 2003; pp: 122-32.

25. Soltan Dallal MM, Salmanian H. [The prevalence rate of *Yersinia enterocolitica* in surface water and drinking area kan (Tehran)]. *Iran J Infect Dis Trop Med.* 1996; 1(2): 44-50. [Article in Persian]

26. Sulakvelidze A. *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect.* 2000 Apr; 2(5): 497-513.

27. Zheng H, Sun Y, Mao Z, Jiang B. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Aug; 53(3): 368-74. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00436.x

Original Paper

Atypical *Yersinia* virulence markers isolated from children with diarrhea

Soltan Dallal MM (Ph.D)^{*1,2}, Vafaei Z (M.Sc)³, Rahimi Foroushani A (Ph.D)⁴
Haghi Ashtiani MT (M.D)⁵, Sharifi Yazdi MK (Ph.D)^{6,7}
Kavan M (M.Sc)³, Bakhtiari R (M.Sc)³, Nikmanesh B (Ph.D)⁸

¹Professor, Division of Medical Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ²Professor, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ³M.Sc in Medical Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁴Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁵Professor, Laboratory Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁶Professor, Zoonosis Research Centre, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁷Professor, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Para Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁸Assistant Professor, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Para Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Yersinia* is a gram-negative bacillus that cause diarrhea through consumption of contaminated food and water. This study was performed to identify the atypical *Yersinia* virulence markers isolated from children with diarrhea.

Methods: This descriptive cross-sectional study was done on 384 fecal samples of 0- 14 years old children admitted at children medical center from August 2011 to August of 2012. Fecal samples, for the enrichment, after 21 days of incubation in alkaline buffer with pH=7.2 at 4degree C, on days 7, 14 and 21 samples were cultured on CIN agar and Mac agar and then confirm the differentiation atypical *Yersinia* from other typical *Yersinia* species from fermentation of different sugars. Isolates were tested for marker of virulence including calcium dependence, auto agglutination, Congo red uptake and binding of crystal violet.

Results: Out of 384 stool samples, 4 (1.04%) were infected with *Yersinia* (*Yersinia frederikseni*, *Yersinia kristensenii* and *Yersinia enterocolitica*). Out of these three, only two samples in association was positive with virulence markers.

Conclusion: Phenotypic markers can be used to study the properties of phenotypic strains of *Yersinia*.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, Atypical *Yersinia*, Virulence marker, Diarrhea

* Corresponding Author: Soltan Dallal MM (Ph.D), E-mail: msoltandallal@gmail.com

Received 21 Feb 2015

Revised 12 July 2015

Accepted 8 Aug 2015