تحقیقی

مارکرهای ویرولانس در *یرسینیاهای* آتیپیک جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال

دکتر محمدمهدی سلطان دلال*[۱و۲]، زهرا وفائی[۳]، دکتر عباس رحیمی فروشانی[٤]، دکتر محمدتقی حقی آشتیانی[٥]
دکتر محمدکاظم شریفی یزدی[٦و۷]، مرتضی کاوان[۳]، روناک بختیاری[۳]، دکتر بهرام نیک منش[۸]

۱- استاد بخش میکروب‌شناسی 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. ٤- استاد، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ٥- استاد، آزمایشگاه بیمارستان مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ٦- استاد، مرکز تحقیقات زئونوز (بیماری‌های مشترک بین و 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 مارکرهای ویرولانس در گونه های آتیپیک یرسینیا در ایجاد بیماری، این مطالعه به منظور تعیین مارکرهای ویرولانس در یرسینیاهای آتیپیک جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی مقطعی روی نمونه مدفوعی ۳۸٤ کودک صفر تا ١٤ 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 فلیایی با pH=۷/۲ به مدت ۲۱ روز سرماگذاری شدند و در روزهای ۷، ١٤ و ۲۱ بر روی محیط افتراقی- انتخابی CIN و MaC کشت داده شدند. برای افتراق گونه‌های یرسینیای آتیپیک از سایر یرسینیاهای تیپیک از تخمیر قندهای مختلف استفاده شد. از تست‌های فنوتایپینگ مانند اتوآگلوتیناسیون، جذب کونگو رد، اتصال به کریستال ویوله و رشد وابسته به کلسیم برای تعیین مارکرهای ویرولانس سوش‌های آتیپیک استفاده شد.*

یافته ها : *٤ نمونه (۱/۰٤ درصد) آلوده به یرسینیا شامل یک سویه یرسینیا فردریکسنی، یک سویه یرسینیا کریستنسنی و ۲ سویه یرسینیا انتروکلی تیکا بودند. از میان چهار نمونه جداسازی شده فقط دو ایزوله از لحاظ مارکرهای ویرولانس مثبت بودند.*

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

کلید واژه‌ها : *یرسینیا انتروکلی تیکا ، یرسینیاهای آتیپیک ، مارکرهای ویرولانس ، 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 میکربیولوژی مواد غذایی/ بخش میکروب‌شناسی غذایی، تلفن و نمابر ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱

وصول مقاله : ۱۳۹۳/۱۲/۲ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٤/٤/۲۱ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/٥/۱۷

Archive of SID

مقدمه

بیماری‌های اسهالی از شایع ترین عوامل مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه هستند (۱). اسهال عفونی عوامل متعددی دارد؛ اما مهم‌ترین عوامل باکتریال ایجادکننده اسهال التهابی عبارت از *اشریشیاکلی، سالمونلا، شیگلا، ویبریو و کمپیلوباکتر* هستند (۲).

جنس *یرسینیا* از خانواده انتروباکتریاسه شامل سه گونه پاتوژن انسانی به نام‌های *یرسینیا انتروکلی‌تیکا، یرسینیا پستیس و یرسینیا سودوتوبرکلوزیس* است و سایر گونه‌ها فرصت‌طلب بوده و شامل *یرسینیا اینترمدیا، یرسینیا فردریکسنی، یرسینیا کریستنسنی* هستند(۳).

گونه‌های مختلف جنس *یرسینیا* به وسیله اتصال و نفوذ به سلول‌های ایلئوم 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 موادغذایی در انسان است (۵). گونه‌های مختلف این باکتری از موادی مانند گوشت خوک، گاو، گوسفند (۶)، شیر خام و انواع سبزی ها (۷)، بستنی و آب آلوده (۸) جدا شده است. خوک مهم‌ترین مخزن سویه‌های ویرولان این باکتری است (۹).

www.SID.ir

یرسینیا انتروکلی تیکا را از لحاظ بیوشیمیایی سوش تیپیک می‌نامند و سوش‌های مشابه *یرسینیا انتروکلی تیکا* (*Y.enterocolitica* - Like strains) را که شامل ۳ گونه اخیر *یرسینیا اینترمدیا، یرسینیا فردریکسنی و یرسینیا کریستنسنی* است را سوش‌های آتیپیک *یرسینیا* می نامند (۱۰). *یرسینیا اینترمدیا، یرسینیا فردریکسنی، یرسینیا کریستنسنی* حدود ۲۰ درصد کل گونه‌های *یرسینیا* را به خود اختصاص می‌دهند (۱۱).

یرسینیا فردریکسنی، یرسینیا اینترمدیا و یرسینیا کریستنسنی 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 انتروکلی تیکا*، ۴۲ سویه *یرسینیا فردریکسنی*، ۸ سویه *یرسینیا اینترمدیا* و ۲ سویه *یرسینیا کریستنسنی* گزارش گردید و سپس مارکرهای ویرولانس (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 انتروکلی تیکای* جدا شده نسبت به جذب کونگورد و واکنش اتوآگلوتیناسیون مثبت بودند. در حالی که تمام سویه‌های *یرسینیا کریستنسنی* جداسازی شده نسبت به تمام مارکرهای ویرولانس 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 انتروکلی تیکا*، ۱۲عدد سوش *یرسینیا فردریکسنی*، ۸ عدد سوش *یرسینیا اینترمدیا* و ۵ عدد سوش *یرسینیا کریستنسنی* از لحاظ حضور عوامل ویرولانس مانند جذب کونگو رد، اتوآگلوتیناسیون، وابستگی به کلسیم مورد آزمایش قرار گرفت (۱۳). نتایج به‌دست آمده بیانگر آن بود که بعضی گونه‌های *یرسینیاهای* آتیپیک به‌علت داشتن مارکرهای ویرولانس مانند رشد وابسته به کلسیم، اتوآگلوتیناسیون، جذب کونگورد و اتصال به کریستال ویوله که باعث افتراق این گونه‌ها از *یرسینیا انتروکلی تیکا* شده و می توانند ایجاد علایم و بیماری‌های مختلف مانند گاستروانتریت کنند (۱۲و۱۳). نتایج Falcão و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد ایزوله‌های *یرسینیا انتروکلی تیکا* با منشاء انسانی و حیوانی برخلاف ایزوله‌های غذایی، مرتبط با تست‌های ویرولانس هستند (۱۴).

با وجودیکه در تحقیقات قبلی شاهد حضور گونه‌های آتیپیک *یرسینیا* در ایران بودیم (۱۵)؛ ولی تاکنون بررسی در این زمینه در 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 ویرولانس و بیماری‌زایی از *یرسینیاهای* آتیپیک 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 سواپ 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 گونه های *یرسینیا*، نمونه مدفوع و استفاده از تکنیک غنی‌سازی توسط سرما به همراه محیط اختصاصی سین آگار بود (۱۵).

پس از انتقال محیط کری بلر، سواپ برای غنی‌سازی در سرما در محیط بافر قلیایی با pH=۷/۲ 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 سانتی گراد 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 می دهد که هاله شفاف را پس از گذشت ۴۸ ساعت به خوبی می توان 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 مرک) کلیگلرآیرون آگار (KIA)، SIM، اوره، سیمون سیترات، MR، VP، اورنیتین، لیزین، آرژنین برده شدند. همه محیط‌ها به استثنای SIM در ۳۷ درجه سانتی گراد 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 آیرون آگار قرار داده شدند؛ دارای واکنش‌های گلوکز مثبت، لاکتوز و ایجاد گاز و سولفید هیدروژن منفی بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

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	+	−	−	−
ملوبیوز	−	−	−	−
رافینوز	−	−	−	−
سوکروز	+	−	+	+
سویه ایزوله شده	*Y.frederikseni*	*Y.kristensenii*	*Y.enterocolitica*	*Y.enterocolitica*

تست سیمون سیترات *یرسینیا* منفی؛ اما از لحاظ تست‌های اوره و اورنیتین دکربوکسیلاز و دیسک ONPG مثبت بود. گونه‌های *یرسینیا* در محیط SIM در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد غیرمتحرک ولی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد دارای حرکت هستند. برای تأیید و افتراق گونه‌های *یرسینیای* آتیپیک از گونه *یرسینیای* تیپیک از تخمیر قندهای مختلف مانند ملوبیوز، رافینوز، رامنوز و سوکروز استفاده شد. *یرسینیا فردریکسنی* به وسیله تخمیر رامنوز از *یرسینیا انتروکلی تیکا* قابل افتراق است. *یرسینیا اینترمدیا* هم توسط تخمیر قند ملوبیوز از *یرسینیا انتروکلی 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 ویرولانس ۴ سویه جدا شده از بیماران با شماره (۱۰۶-۱۱۹-۱۸۰-۳۵۶) و ۸ سویه از مجموعه انستیتوپاستور پاریس فرانسه با رفرنس‌های *Y.enterocolitica* 846 0:18، *Y.enterocolitica* 161 0:8، *Y.kristensenii* 1647، *Y.intermedia* 103، *Y.intermedia* 7231، *Y.intermedia* 1476، *Y.frederiksenii* 7210 و *Y.frederiksenii* 7142 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* می توان گفت هر چهار سویه جداشده، از طریق سرماگذاری و استفاده از بافر فسفات سالین به‌دست آمدند. در این بین، ۲ سویه *یرسینیا انتروکلی تیکا*، یک سویه *یرسینیا فردریکسنی* و یک سویه *یرسینیا کریستنسنی* جداسازی گردید.

برای تعیین گونه *یرسینیاهای* جداشده ایران از تخمیر قندهایی مانند رامنوز، ملوبیوز، رافینوز و سوکروز استفاده گردید (جدول یک).

نتایج تست‌های ویرولانس ۸ سویه *یرسینیا* از مجموعه انستیتوپاستور پاریس فرانسه و ۴ سویه جدا شده از کودکان مبتلا به یرسینیوز 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* آتیپیک ایران نیز توانایی تولید عوامل ویرولانس 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 (۲/۸درصد) *یرسینیا انتروکلی تیکا* جدا شد. همچنین میانه سنی برای کودکان مبتلا به *یرسینیا انتروکلی تیکا* ۲۴ ماه به‌دست آمد (۱۶).

به دنبال تحقیقی که طی یک‌سال از تیرماه ۱۳۷۶ تا خرداد ۱۳۷۷ در اسلامشهر انجام شد؛ از ۱۶۰۰ نمونه سواپ 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 انتروکلی تیکا* و حتی گونه‌های آتیپیک 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 به‌نظر 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 می توان نسبت داد. یکی از آن موارد انجام بخشی از تحقیق در فصل تابستان است. چنان که مطالعات دیگر نیز حداکثر شیوع این میکروارگانیسم را در فصل سرد سال و به خصوص پاییز و زمستان ذکر نموده‌اند (۱۹و۲۰).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ : نتایج تست‌های فنوتایپینگ (مارکرهای ویرولانس) از مجموعه انستیتو پاستور پاریس

تست	دما (درجه سانتی گراد)	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	*	**	*	*	*	*	*	*
اتوآگلوتیناسیون	۳۷	–	+	–	–	–	–	–	–
	۲۷	–	–	–	–	–	–	–	–
رشد وابسته به کلسیم (بلاد)	۳۷	+	+	+	+	+	+	+	+
	۲۷	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد وابسته به کلسیم (اگزالات کلسیم)	۳۷	+	–	+	+	+	+	+	+
	۲۷	+	+	+	+	+	+	+	+

* کلنی‌های بدون رنگ، ** کلنی‌های بنفش رنگ

جدول ۳ : نتایج تست‌های فنوتایپینگ (مارکرهای ویرولانس) پرسینیاهای جدا شده از ایران

تست	دما (درجه سانتی گراد)	۱۰۶	۱۱۹	۱۸۰	۳۵۶
کونگورد	۳۷	Crb +	Crb -	Crb -	Crb +
	۲۷	Crb +	Crb -	Crb -	Crb +
کریستال ویوله	۳۷	**	*	*	**
	۲۷	**	*	*	**
اتوآگلوتیناسیون	۳۷	+	–	–	+
	۲۷	–	–	–	–
رشد وابسته به کلسیم (بلاد)	۳۷	+	+	+	+
	۲۷	+	+	+	+
رشد وابسته به کلسیم (اگزالات کلسیم)	۳۷	–	+	+	–
	۲۷	+	+	+	+

* کلنی‌های بدون رنگ، ** کلنی‌های بنفش رنگ

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

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 می نماید. 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 ۲۹/۷درصد از نمونه‌ها *یرسینیا انتروکلی تیکا* جدا شد (۲۲).

در مطالعه Hoogkamp-Korstanje و Stolk-Engelaar و نیز در مطالعه Acha و Szyfres که بر روی بچه های سنین بین صفر تا ۱۵ سال انجام شد؛ بیشترین ابتلا به یرسینیوز در بچه های زیر یک سال مشهود بود و آنتریت *یرسینیا* عمدتاً شامل بچه های زیر ۶ سال بود و انواع سخت و خارج روده‌ای یرسینیوز در بچه‌های بالای ۶ سال مشهود بود (۲۳و۲۴).

در بررسی آب های 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 می شوند؛ به‌دست آمده بود و همچنین با نتایج این تحقیق که برخی سویه‌های آتیپیک توانایی بیماری‌زایی دارند؛ می‌تواند خط بطلانی بر این تفکر باشد که گونه‌های آتیپیک *یرسینیا* صرفاً غیربیماری‌زا هستند (۲۵). مطالعات انجام گرفته توسط محققین حاکی از آن است که تعدادی از سویه های *یرسینیاهای* آتیپیک به علت داشتن مارکرهای ویرولانس مانند رشد وابسته به کلسیم، اتوآگلوتیناسیون، جذب کونگورد و اتصال به کریستال ویوله می‌توانند علایم 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 کنگو رد در شرایط

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایشگاهی، دو تست اول بهتر از کنگو رد 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 انتروکلیتیکای* جداسازی شده از لحاظ مارکرهای ویرولانس، واکنش اتوآگلوتیناسیون ۸/۸ درصد و جذب کونگورد ۵ درصد مثبت بودند. در حالی که ۲ سویه *یرسینیا کریستنسنی* جدا شده از لحاظ این مارکرهای ویرولانس منفی بودند. از ۴۲ سویه یرسینیا فردریکسنی ایزوله شده ۷/۱ درصد از نظر جذب کونگو رد مثبت و همگی از نظر واکنش اتوآگلوتیناسیون منفی بودند. همچنین در مطالعه Zheng و همکاران در سال ۲۰۰۸ برروی ۱۶۰ *یرسینیا انتروکلیتیکای* جداسازی شده، ۸۹ درصد از سویه‌ها واکنش اتصال به کریستال ویوله مثبت داشتند؛ ۸۷ درصد اتواگلوتیناسیون، ۷۴درصد در واکنش رشد وابسته به کلسیم و ۷۸ درصد از لحاظ جذب کونگورد مثبت گزارش شدند که نشان داد تمامی *یرسینیا انتروکلیتیکاهای* جداسازی شده توانایی داشتن عوامل ویرولانس را علی‌رغم ایجاد بیماری نخواهند داشت (۲۷). گزارشات این محققین نشان می‌دهد که برخی از سویه‌های *یرسینیا* توانایی داشتن مارکرهای ویرولانس 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 ویرولانس است؛ ولی از ۴ ایزوله ما، ۲ ایزوله یعنی ۵۰درصد دارای عامل ویرولانس است. این مطلب می‌تواند توجه ما را به انتقال این عوامل از طریق پدیده‌های ژنتیکی به سایر ایزوله‌های فاقد عامل ویرولانس *یرسینیا* جلب نماید. لذا شاید از نظر کمی *یرسینیا* در مقایسه با سایر باکتری‌های پاتوژن، شیوع کمتری داشته باشد؛ لیکن وجود این عوامل ویرولانس 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 انتروکلیتیکا* و سایر گونه‌های آتیپیک آن مانند *یرسینیا فردریکسنی و یرسینیا کریستنسنی* از جمله مواردی هستند که کمتر در ایران مورد توجه قرار گرفته است. به‌ویژه وجود مارکرهای مختلف ویرولانس در گونه‌های آتیپیک 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

1. 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]

2. 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.

3. 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.

4. Gierczyński R. Evaluation of the usefulness of selected virulence markers for the identification of virulent Yersinia enterocolitica strains. I. Phenotypic markders associated with Plasmid pYV. Med Dosw Mikrobiol. 2000; 52(1): 25-34.

5. 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.

6. Pal M. Zoonoses. 2nd ed. India, Jaipur: Satyam Publishers. 2007; pp: 151-2.

7. Bernardino-Varo L, Quiñones-Ramírez EI, Fernández FJ, 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

8. Jay JM. Modern Food Microbiology. 6th ed. Maryland: Aspen Publishers, Inc. 2000; pp: 549-63.

9. 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

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. Falcão JP, Falcão DP, Pitondo-Silva A, Malaspina AC, Brocchi M. Molecular typing and virulence markers of Yersinia

Archive of SID
www.SID.ir

enterocolitica strains from human, animal and food originsisolated 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 ofdisease 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 Infec 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

Archive of SID

www.SID.ir

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]

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

Cite this article as: Soltan Dallal MM, Vafaei Z, Rahimi Foroushani A, Haghi Ashtiani MT, Sharifi Yazdi MK, Kavan M, Bakhtiari R, Nikmanesh B. [Atypical *Yersinia* virulence markers isolated from children with diarrhea]. J Gorgan Uni Med Sci. Summer 2016; 18(2): 120-126. [Article in Persian]

Archive of SID

www.SID.ir