

شیوع آنتروکولیت یرسینیایی در دیسانتری کودکان

دکتر محمد مهدی سلطان دلال، استادیار بخش میکروشناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

محسن چیت ساز، کارشناس ارشد میکروشناسی

PREVALENCE OF YERSINIA ENTEROCOLITIS IN PEDIATRIC DYSENTERY

ABSTRACT

Yersinia enterocolitica causes a wide spectrum of human diseases including gastroenteritis which is the most frequent of its manifestation. Other diseases and clinical syndromes resulting from *Yersinia enterocolitica* are septicemia, mesenteric lymphadenitis, appendicitis, exudative pharyngitis, reactive arthritis, nodosum erythema and rarely Reiter's syndrom. In many countries such as western European, Scandinavian and North American countries, Australia and Japan the role of *Yersinia enterocolitica* particularly the 0:3, 0:8, and 0:9 serotypes in human diseases have been clearly identified.

In spite of significant development in the field of separating *Yersinia enterocolitica* from feces as well as from the environmental specimens during the last decade, there has been only one documented report of isolating *Yersinia enterocolitica* in Iran in 1977. Thus we decided to test 300 samples of feces within five months. In this method, CIN Agar as a selective and special medium and Mac conkey agar as classic medium were used. Also cold enrichment method in PBS (PH = 7.8) was used. In order to determine importance of *Yersinia enterocolitica*, we separated other pathogens of intestine such as salmonella, shigella and enteropathogenic *E.coli*. The achieved results from abundance points of view are as follows:

17 strains of EPEC (5.66 %), 9 strains of shigella (3 %), 8 strains of *Yersinia enterocolitica* (2.66 %) and 6 strains of salmonella (2 %).

چکیده

یرسینیا آنتروکولیتیکا طیف وسیعی از بیماریهای انسانی را باعث می شود که گاستروآنتریت به عنوان وسیعترین تظاهر آن می باشد. دیگر بیماریها و سندرمهای کلینیکی عبارتند از: سپتیسمی، لنفادنیت مزانتریک، آپاندیسیت، فارنژیت اگزوداتیو، آرتریت واکنشی، اریتم ندوزوم و بندرت سندرم رایتز. در بسیاری از کشورهای اروپای غربی اسکاندیناوی، آمریکای شمالی، استرالیا و ژاپن نقش یرسینیا آنتروکولیتیکا بویژه سروتیپهای ۳، ۸، ۹

در بیماریهای انسانی بخوبی به اثبات رسیده است.

با توجه به پیشرفتهای زیادی که در زمینه جداسازی یرسینیا آنتروکولیتیکا از مدفوع و نمونه های محیطی در ده سال اخیر به عمل آمده است و گزارش رسمی تنها یک مورد مستند ایزولاسیون یرسینیا آنتروکولیتیکا در ایران در سال ۱۹۷۷، تصمیم گرفتیم که طی یک دوره پنج ماهه، ۳۰۰ نمونه مدفوع را مورد آزمایش قرار دهیم. در این روش سین (CIN) آگار به عنوان یک محیط اختصاصی و محیط مک کانگی آگار به عنوان یک محیط کلاسیک و همچنین

می‌شد. از این نمونه برای جداسازی اشریشیا کلی آنتروپاتوژنیک و سالمونلا و شیگلا استفاده می‌شد.

ب - روش کار: روش کلی برای جداسازی یرسینیا آنتروکولیتیکا از نمونه‌های مدفوع و استفاده از تکنیک غنی‌سازی توسط سرما به همراه محیط اختصاصی سین‌آگار بوده است.

محلولهای حاوی نمونه‌ها که در ۴ درجه نگهداری می‌شدند، در پایان هفته اول و هفته چهارم روی محیطهای سین آگار و مک کانگی آگار به صورت خطی کشت داده شده و در دمای ۲۵ درجه گذاشته می‌شدند که و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بازبینی می‌شدند.

موفقیت در ایزولاسیون یرسینیا آنتروکولیتیکا در درجه اول مبتنی بر بررسی کامل و دقیق پلیتهای رشد کرده می‌باشد. کلنیهای مشکوک بر روی سین آگار بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون عبارت بودند از: کلنیهای ریز (pin point)، گرد صورتی تا قرمز رنگ، وجود هاله شفاف اطراف کلنی تجزیهات به دست آمده نشان می‌دهد که هاله شفاف و بی‌رنگ را پس از گذشت ۴۸ ساعت بخوبی می‌توان مشاهده کرد. روی محیط مک کانگی آگار کلنیهای مشکوک تلقی می‌شدند که دارای مشخصات گرد، بی‌رنگ (لاکتوز منفی) و بعد از ۲۴ ساعت، کوچک (در حدود یک میلیمتر) باشند.

در مرحله بعد، ایزوله‌های مشکوک در محیطهای افتراقی کلیگر (KIA, SIM)، اوره و سیمون سیترات برده می‌شدند. همه این محیطها به استثناء SIM در ۳۷ درجه و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرماگذاری می‌شدند، در مورد SIM، دو لوله تلقیح می‌شد، یکی در حرارت آزمایشگاه (۲۲ درجه - ۲۵ درجه) و دیگری در ۳۷ قرار داده می‌شد.

در این مرحله نمونه‌هایی که در محیط کلیگر (KIA) قرار داشته‌اند، دارای واکنشهای گلوکز مثبت، لاکتوز منفی و گاز منفی، بوده‌اند و در محیط SIM، حرکت در ۳۷ درجه منفی در ۲۵ درجه مثبت اندول منفی، SH2 منفی، اوره مثبت و سیمون سیترات منفی بوده‌اند و به عنوان کلنی‌های مشکوک تلقی شده‌اند.

در مرحله نهایی تشخیص، با استفاده از سیستم API-20E بود. از ارگانیزم مشکوک در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونی تهیه نموده (از محیط کلیگر ۲۴ ساعته) و در کیت‌های API تلقیح کردیم. سپس کیتها را در حرارت ۲۵ درجه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری نموده و پاسخ واکنشها را یادداشت کردیم. سپس ارزش عددی واکنشهای مثبت به طریقی که در دستورالعمل این سیستم آمده، با هم جمع کردیم تا کد مربوط به هر یک از نمونه‌ها به دست آید. کدهای به دست آمده را با کتابچه راهنمای کد سیستم API مطابقت دادیم تا با کتری تعیین هویت شود. جهت سرو تا پیننگ به علت عدم دسترسی به آنتی سرم، سوشهای جدا شده را به انسیتو پاستور پاریس ارسال نمودیم، نتایج آن در جدول ۳ مشخص شده است. جهت جداسازی سایر ارگانیزمها، نمونه‌های اسهالی در محیط ترانسپورت یا به طور مستقیم به آزمایشگاه انتقال داده می‌شدند. سپس بلافاصله روی محیط اندو (Endo) آگار جهت جداسازی

تکنیک غنی سازی توسط سرما (cold enrichment) در تامپون فسفات (PBS) (PH=7.8) استفاده شد. همچنین برای تعیین اهمیت آنتروکولیتیکا اقدام به جداسازی سایر پاتوژنهای روده‌ای نظیر سالمونلا، شیگلا و اشریشیا کلی آنتروپاتوژنیک نمودیم. نتایج به دست آمده به ترتیب فراوانی به شرح زیر می‌باشند:

اشریشیا کلی آنتروپاتوژن ۱۷ سویه (۵/۶۶ درصد)، شیگلا ۹ سویه (۳ درصد)، یرسینیا آنتروکولیتیکا ۸ سویه (۲/۶۶ درصد)، سالمونلا ۶ سویه (۲ درصد).

مقدمه

بیماریهای اسهالی بخش عمده‌ای از بیماریهای عفونی کودکان را در بر می‌گیرند. این بیماریها علاوه بر تعداد زیاد مبتلایان که موجب ضررهای اقتصادی و مشکلات اجتماعی فراوانی می‌شوند، تلفات زیادی را بویژه در کشورهای در حال توسعه باعث می‌گردند. بررسیهای مقایسه‌ای بین جوامع پیشرفته اقتصادی و دارای استانداردهای بهداشتی بالا و جوامع فقیر بوضوح نشان می‌دهد که بسیاری از این قبیل بیماریها معلول عدم گسترش فرهنگ بهداشتی در میان آحاد مردم، و محرومیت از منابع کافی آب آشامیدنی بهداشتی و روشهای نامناسب تهیه و نگهداری غذا و از طرفی کافی نبودن امکانات بهداشتی و درمانی و مسائل عدیده دیگر است. یک بخش از این سلسله مشکلات را عدم آگاهی و شناخت کامل نسبت به بعضی از میکروارگانیزمهای بیماریزا و نیز تشخیص درست و به موقع آنها تشکیل می‌دهد. یرسینیا آنتروکولیتیکا را در این دسته می‌توان نام برد. در مناطقی مثل کشورهای اروپای شمالی و غربی (اسکاندیناویا، بلژیک، هلند، فرانسه، آلمان غربی، دانمارک و ...) ایالات متحده امریکا، کانادا، استرالیا، ژاپن و در تعدادی از کشورهای دیگر نقش این میکروارگانیزم به عنوان یکی از عوامل اولیه بیماریزای انسانی بخوبی به اثبات رسیده است. (۶، ۸، ۱۰، ۲۰) لذا به منظور بررسی در تعیین جایگاه و اهمیت یرسینیا آنتروکولیتیکا در اسهال کودکان و مقایسه با سایر عوامل پاتوژن روده‌ای نظیر اشریشیا کلی‌های آنتروپاتوژنیک، سالمونلا و شیگلا، بررسی اخیر انجام گرفت.

نمونه گیری و روش بررسی

الف - نمونه گیری: نمونه گیری از ۳۰۰ کودک مبتلا به اسهال در سنین صفر تا ۱۲ سال و فاصله زمانی از اول اردیبهشت تا نیمه شهریور ماه که به بیمارستان مرکز طبی کودکان مراجعه کرده بودند، انجام گرفت (جدول شماره ۱). اکثر نمونه‌ها به صورت نمونه مستقیم مدفوع بودند و در مواردی که امکان نمونه گیری مستقیم وجود نداشت، از سوآب رکتال استفاده می‌شد. نمونه‌ها طی روش پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی (۱۱) در محل بیمارستان به PBS انتقال داده می‌شدند (۱-۰/۵ گرم مدفوع در ۵ میلی لیتر PBS)، همچنین یک سوآب اضافی از نمونه مدفوع یا به طور مستقیم از کودک بیمار گرفته شده و در محیط ترانسپورت کاری بلر قرار داده

علامه شایع بالینی در بیشتر بیماران شامل اسهال، درد شکم و تب در حدود ۳۹-۳۸ درجه بود و با درصد کمتر استفراغ، سردرد و بی اشتها و وجود داشت. گاهی اوقات اسهال همراه با بلغم بود و خون وجود نداشت.

نتایج بطور آشکار نشان می‌دهد که برسیبیا آنتروکولیتیکا به عنوان یکی از پاتوژنهای روده‌ای در ایران وجود دارد و قابل جداسازی از نمونه مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت ناشی از این ارگانیزم است. هرچند که برسیبیا آنتروکولیتیکا از نظر جایگاه در مقایسه با ۳ ارگانیزم دیگر مطالعه شده با ۲/۶۶ درصد در مرتبه سوم قرار دارد، با این حال با توجه به انسیدانس فصلی برسیبیا آنتروکولیتیکا که در فصول سرد سال شیوع بیشتری دارد (۱۲) و سایرگونه‌ها کاهش چشم‌گیری خواهند داشت، می‌توان انتظار داشت که در فصول پائیز و زمستان درصد ایزولاسیون به میزان قابل توجهی بالاتر از مقدار کنونی باشد و علاوه بر این، در نظر داشتن عوارض جانبی برسیبیا آنتروکولیتیکا اهمیت ایزولاسیون آن را بیشتر و جدی‌تر می‌نماید.

اگرچه هیچکدام از سویه‌های جدا شده متعلق به سروتیپهای ۹ و ۳ که سروتیپهای غالب اروپا و آسیا و کانادا هستند، نمی‌باشد و حتی تعدادی از سویه‌ها به گونه‌های برسیبیا فردریکسنی و برسیبیا انترمیدیا و یا غیر قابل سروتایپ تعلق دارند، معهدا با توجه به علائم بالینی و عدم توفیق در جداسازی سایر عوامل پاتوژن باکتریایی و انگلی، می‌توان اسهالهای کودکان را مربوط به برسیبیاها جدا شده دانست (۷).

از آنجائیکه عمده‌ترین منابع آلودگی، حیواناتی مثل خوک، گاو و گوشت آنها، خرگوش و سگ و همچنین آبهای سطحی و آشامیدنی در تماس با مدفوع این حیوانات ناقل می‌باشند، (۱۸، ۱۵، ۳، ۲۲)، انتظار می‌رود که بیشترین میزان شیوع در نواحی روستایی بیلاقی و سردسیر باشد. نتایج این بررسی پیش بینی مذکور را مورد تأیید قرار می‌دهد و اغلب مریضهایی که کشت مدفوعشان برای برسیبیا آنتروکولیتیکا مثبت بود، مربوط به نواحی روستایی و بیلاقی بودند، و یا از آب تصفیه شده به طور صحیح استفاده نمی‌کردند. شاید به همین دلیل تمامی سروتایپهای به دست آمده مربوط به سویه‌هایی هستند که جدیداً قدرت بیماریزا بودن آنها گزارش شده است (۱، ۲، ۷).

همچنین نتایج بدست آمده می‌تواند شاهد و دلیلی برارزشمندی محیط سین آگار و تکنیک غنی سازی توسط سرما در جداسازی برسیبیا آنتروکولیتیکا از نمونه‌های مدفوع دانست، که توسط بسیاری از محققین نیز به اثبات رسیده است (۱۲، ۱۳، ۱۶).

بخش عمده دیگر این مطالعه به اشیریشیا کلی آنتروپاتوژنیک (EPEC) اختصاص داشت. در این بررسی از نمونه مدفوع ۱۷ کودک بیمار EPEC جدا شد. در تمام ۱۷ مورد کشت مدفوع در بیمارستان منفی گزارش شده بود و بررسی لام مستقیم جهت انگلها، به غیر از یک مورد که H.nana گزارش شده بود و مریض از اسهال مزمن و ضعف و کسالت طولانی مدت رنج می‌برد که ارتباط آن با

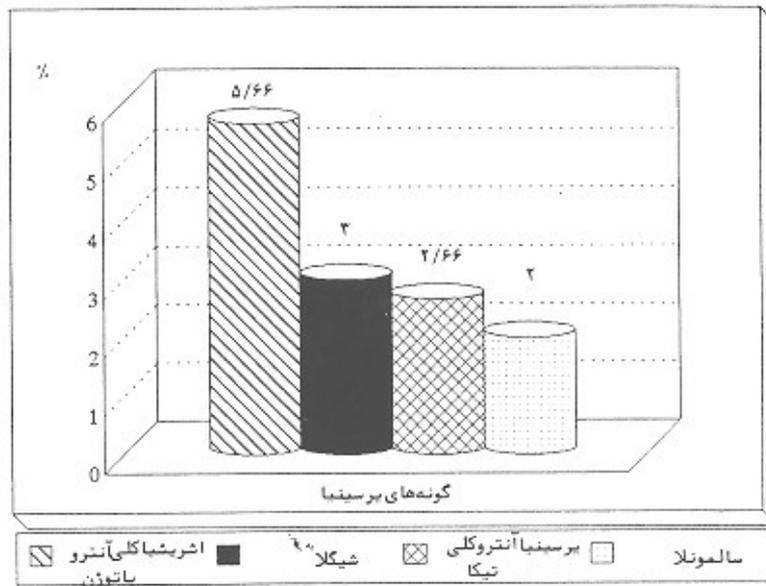
اشیریشیا کلی و محیط اس اس (SS) آگار جهت جداسازی سالمونلا و شیگلا کشت داده می‌شدند. همچنین از بویون سلینت F جهت تقویت در جداسازی سالمونلا استفاده می‌شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه در صورت وجود کلنی مشکوک (کلنیهای قرمز گاهی با جلای فلزی برای اشیریشیا کلی، کلنیهای بیرنگ برای شیگلا و کلنیهای بیرنگ گاهی با رسوب سیاه برای سالمونلا) آنها را بر روی محیطهای افتراقی کلیگلر، SIM، اوره و سیترات برده و محیطها در گرمخانه ۳۷ درجه به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گذاشته می‌شدند. سویه‌هایی که خصوصیتشان با اشیریشیا کلی، شیگلا و سالمونلا منطبق بود، به عنوان کلنی مشکوک سرولوژی می‌شدند.

نتایج

از مجموع ۳۰۰ نمونه آزمایش شده، تعداد ۱۷ سویه اشیریشیا کلی آنتروپاتوژنیک با فراوانی ۵/۶۶ درصد، ۹ سویه شیگلا با فراوانی ۳ درصد، ۸ سویه برسیبیا آنتروکولیتیکا با فراوانی ۲/۶۶ درصد و ۶ سویه سالمونلا با فراوانی ۲ درصد جدا شده‌اند. توزیع فراوانی عوامل بیماریزای روده‌ای در جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. در میان سروتیپهای به دست آمده در نزد اشیریشیا کلی، سروتیپهای B۶:۲۶ با ۴۸ درصد و B۱۴:۱۱۹ با ۱۸ درصد فراوان‌ترین سروتیپها بوده‌اند. در مورد شیگلا، بیشترین فراوانی مربوط به شیگلا فلکسنری تایپ ۲ با ۲۴/۴ درصد و در مرتبه بعد شیگلا سونتی با ۲۲/۲ درصد می‌باشد. بیشترین فراوانی سالمونلا مربوط به سالمونلاتینی موریوم با ۸۳/۳۴ درصد و در مرحله بعد سالمونلا هاوانا با ۱۶/۶۷ درصد بوده است. اما در مورد برسیبیا، هیچکدام از سروتیپها متعلق به سروتیپهای رایج ۹ و ۳ نبوده بلکه تماماً سروتیپهای محیطی از نمونه‌های اسهالی کودکان جدا شده‌اند. همچنین گونه‌های دیگر برسیبیا آنتیبیک مانند برسیبیا انترمیدیا و برسیبیا فردریکسنی از این نمونه‌ها جدا شده‌است (جدول شماره ۳).

بحث و نتیجه گیری

هدف اصلی این بررسی جداسازی برسیبیا آنتروکولیتیکا و پاسخ به این پرسش است که آیا برسیبیا آنتروکولیتیکا، بویزه سروتیپهای پاتوژنیک آن در ایران وجود دارند یا نه؟ با توجه به اینکه کودکان، حدود دو سوم بیشتر از بزرگسالان در معرض ابتلا به عفونت برسیبیا آنتروکولیتیکا قرار دارند آنها را جهت مطالعه انتخاب کردیم. تکنیک غنی سازی توسط سرما با توجه به سرما دوست (سایکروفیل) بودن باکتری و تعداد کم آن در نمونه‌های مدفوع در مقایسه با سایر باکتریهای روده‌ای و به عنوان روشی که بسیاری از محققین آن را در افزایش تعداد برسیبیا آنتروکولیتیکا و بازدهی ایزولاسیون مورد تأیید قرار داده‌اند، همراه با محیط اختصاصی سین آگار به کار گرفته شد. تعداد ۸ سویه برسیبیا آنتروکولیتیکا از کودکان مبتلا به اسهال ایزوله شدند. عوامل پاتوژن روده‌ای دیگر اعم از باکتریال یا انگلی نیز در این بیماران رد شده بود.



نمودار شماره ۱: میزان شیوع چهار عامل بیاتوزن روده‌ای در ۳۰۰ کودک مبتلا به اسهال

مراجع

- Agbonlahor DE., Characteristics of yersinia intermedia like bacteria isolated from patients with diarrhea in Nigeria. J. Clin. Microbiol. 1986; 23:891.
- Chandler ND. et al . Radiological case of the month. yersinia enterocolitica masquerading as appendicitis. Arch. Pediatr. Adolesc. Med .1994; 148:527.
- Fantasia M.et al. Isolation of yersinia enterocolitica biotype 4 serogroup 0:3 from canine sources in Italy. J.clin. Microbiol. 1985; 22:314.
- Franzin L. et al. Isolation of yersinia from appendices of patients with acute appendicitis . Contrib. Microbiol Immunol. 1991; 12:282 .
- Haghighi L . The first successful isolation and identification of y. enterocolitica in Iran; contr. Microbiol .Immunol.1977; 5: 206.
- Leine R. Incidence of yersiniosis in Finland. Scand. J. infect. Dis. 1981; 13:309.
- Mollaret HH. Rapport du contre national des yersinia , Pasteurella et Francisella(annee 1985) , Bull. Epidem.Heb, 1986; 10: 38.
- Monte Boada RJ et al . Yersinia enterocolitica:Investigation in 1300 children under 5 years of age with acute diarrhea. Rev. Cubana. Med. Trop. 1990; 42:13.
- Morera MA. et al . Enteritis and erythema nodosum caused by yersinia enterocolitica serogroup 0:9 . Enferm. Infect. Microbiol. Clin. 1990; 8:530.
- Naqvi SH. et al. Presentation of yersinia enterocolitica enteritis in children . Pediatr. Infect. Dis. J .1993; 12:386.
- O.M.S ; Manuel pour l'etude au laboratoire des infections

intestinales aigues. 1987.

- Reina J, et al . Utility of different selective culture media for the isolation of yersinia enterocolitica from feces. 1994; 12:222.
- Schiemann DA . Synthesis of a selective agar medium for yersinia enterocolitica. can. J . Microbiol . 1979; 25:1298.
- Soltan Dallal MM . Contribution A l'etude de yersinia dans les eaux superficielles: Approche ecologique , Mise en evidence et Purification de L enterotoxine de y. enterocolitica. these . Doct. P.h. D , Nancy France , 1986.
- Soltan Dallal M.M , Harteman P. A study of atypical yersinia strains isolated from Moselle river . Iranian J. Publ . Health. 1988; 17:69.
- Soltesz L.V . et al . An effective selective medium for yersinia enterocolitica containing sodium oxalate. Acta. Path. Microbiol. Scan. Sect. B.1980; 88:11.
- Spira J.J , Kabins S.A . Yersinia enterocolitica septicemia with septic arthritis. Arch. Intern. Med. 1976; 136:1305.
- Soulias J. Infection a yersinia enterocolitica chez l'animal. bilan des connaissances actuelles, These Doct. Vet. Creteil, France 1976.
- Tacket co, et al . Yersinia enterocolitica pharyngitis . Ann . Inter. Med. 1983; 99 : 40.
- Toma S. et al . Survey on the incidence of yersinia enterocolitica infection in canada. App.Microbiol. 1974; 28:469.
- Toma S . et al . 0:13 a , 13b, a new pathogenic serotype of yersinia enterocolitica . J. Clin. Microbiol. 1984; 20:843.
- Zen-yoji H, Sakai S. Isolation of yersinia enterocolitica and yersinia pseudotuberculosis from swine, cattle and rats at an abattoir. Jpn. J. Microbiol. 1974; 18:103 .