خطاهای تشخیصی در باکتری شناسی – ۲

Yersinia enterocolitica

بابک ولی زاده
دکترای علوم آزمایشگاهی*،**
Babak_Valizadeh@hotmail.com

فاطمه زاهدی مطلق*، زهره دودانگه*، سپیده کنعانی*
کارشناسان میکرب شناسی
آزمایشگاه بهار*
بخش باکتری شناسی برنامه ارزیابی خارجی کیفیت EQAP**
کمیته میکرب شناسی و مقاومت های میکربی آزمایشگاه مرجع سلامت **

در این مقاله تلاش شده است که به اختصار تعدادی از خطاهای رایج و نکات کلیدی در باکتری شناسی تشخیصی مطرح گردد. موجب سپاس خواهد بود اگر خوانندگان این مطلب دیدگاه‌های تکمیلی، پیشنهادی و انتقادی خود را از طریق پست الکترونیک به اطلاع برسانند. این مقاله بدنبال مقاله ۱ در ارتباط با *Salmonella* Typhi منتشر شده است. مقاله ۱ در شماره ۸ نشریه آوای آزمایشگاه در وب سایت نشریه به نشانی www.avayeazmayeshgah.ir قابل دسترسی است.

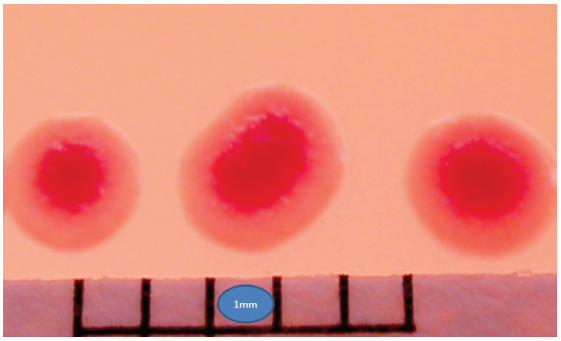
- در سال ۱۳۹۱ برای اولین بار در برنامه های کنترل کیفیت خارجی EQAP & EQAS در بخش باکتری شناسی ***Yersinia enterocolitica*** برای آزمایشگاه‌ها ارسال شد. نتایج بدست آمده در دوره سیزدهم برنامه EQAP نشان داد که شناسایی نادرست این باکتری می‌تواند یکی از خطاهای تشخیصی در آزمایشگاه باشد.
- بیشترین خطای گزارش شده در دوره سیزدهم برنامه EQAP ***E.coli*** و ***Shigella*** بود. ۳۸ ٪ آزمایشگاه‌ها به اشتباه ***E.coli*** و ***Shigella*** را که قابل انتظارترین خطا نیز می‌باشد، گزارش کردند.
- ***Yersinia enterocolitica*** در سگ، گربه، جوندگان، **خوک**، گوسفند و گاو وجود دارد و از طریق آب، شیر و پنیر، غذا و سبزیجات آلوده به انسان منتقل می‌شود و از عوامل عفونت‌های گوارشی به ویژه در کودکان است. باکتری از مدفوع اسهالی یا خونی جدا می‌شود. این باکتری تمایل تهاجم به موکوس دستگاه گوارش و درگیر کردن غدد لنفاوی دستگاه گوارش را دارد. عفونت‌های گوارشی به اشکال بالینی **Enterocolitis** همراه با تب، دردهای شکمی و اسهال، **Terminal Ileitis**، **Enteric fever** و **Acute Mesenteric Lymphadenitis** با علائم شبیه به آپاندیسیت یا **Pseudoappendicular syndrome** بروز می‌کند. معمولا باکتریمی همراه با عفونت های گوارشی ایجاد نمی‌شود. دوره نهفتگی در عفونت‌های گوارشی ۷-۲ روز است و علائم بیماری می‌تواند از یک روز تا ۴ هفته ادامه یابد. این باکتری با توجه به رشد بهتر در سرما می تواند در فصل‌های پاییز و زمستان اسهال ایجاد کند.
- در بیماران تالاسمی که افزایش بار آهن دارند سپتی سمی دیده می‌شود. عفونت‌های خارج گوارشی مانند آرتریت نیز دیده می‌شود. در موارد نادر به علت توان رشد باکتری در دمای یخچال و ایجاد توکسین در درون کیسه‌های بانک خون آلوده، علائم شبیه شوک سپتیک ایجاد می شود. این خون‌ها از اهداکنندگان بدون علامت در مرحله باکتریمی تهیه شده است. **تصویر ۱**

TABLE 5. Clinical spectrum of *Y. enterocolitica* infections

Gastrointestinal
Enterocolitis, especially in young children; concomitant bacteremia may also be present
Pseudoappendicitis syndrome (children older than 5 years; adults)
Acute mesenteric lymphadenitis
Terminal Ileitis
Septicemia
Especially in immunosuppressed individuals and those in iron overload or being treated with desferrioxamine
Transfusion related
Metastatic infections following septicemia
Focal abscesses in the liver, kidneys, spleen, and lungs
Cutaneous manifestations, including cellulitis, pyomyositis, pustules, and bullous lesions
Pneumonia, cavitary pneumonia
Meningitis
Panophthalmitis
Endocarditis, infected mycotic aneurysm
Osteomyelitis
Postinfection sequelae (associated with HLA-B27 antigen)
Arthritis
Myocarditis
Glomerulonephritis
Erythema nodosum
Pharyngitis

- باکتری برروی محیط بلاد آگار بدون همولیز است. در رنگ آمیزی گرم بسته به حرارت و محیطی که باکتری در آن رشد یافته است اشکال مشاهده شده متغیر است و هر دو شکل کوکوباسیلی و باسیلی مشاهده می‌شود. باکتری در دمای **۳۷-۳۵** درجه غیرمتحرک و در دمای**۳۰-۲۲** درجه به دلیل ایجاد فلاژل متحرک است.

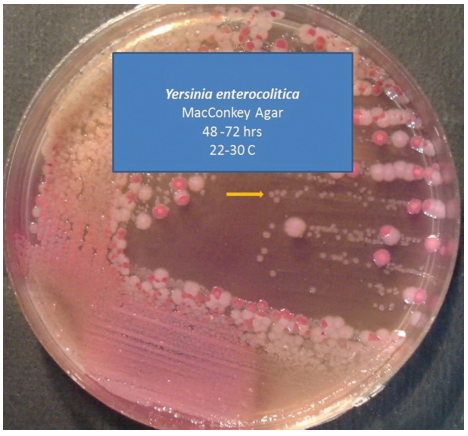
- این باکتری در دمای ۳۰-۲۲ درجه بهتر رشد می‌کند و تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی-آنزیمی آن سریع‌تر، شدیدتر و بیشتر مثبت می‌شود. باکتری در مواد غذایی در زمان نگهداری در دمای یخچال می‌تواند رشد کند. از توانایی رشد در سرما و غنی‌سازی در دمای ۱۰-۴ درجه برای جداسازی باکتری از مواد غذایی، آب و نمونه‌های محیطی استفاده می‌شود. برای نمونه های کشت مدفوع که در خواست بررسی از نظر *Yersinia enterocolitica* را دارند، به علت تعداد کم باکتری در کشت‌های متعارف ممکن است میکرو ارگانیسم جدا نشود و برای حصول اطمینان بیشتر همراه با کشت‌های متعارف اولیه می‌توان از سالین استفاده کرد و لوله حاوی سالین را پس از بردن مدفوع در آن در یخچال قرار داد و تا سه هفته بصورت هفتگی ساب کالچر انجام داد. در کتب و مقالات میکرب شناسی تشخیصی روش‌های غنی سازی مختلفی توضیح داده شده است. روش فوق برای نمونه‌های انسانی ساده‌ترین است.
- محیط انتخابی- افتراقی برای جداسازی باکتری از نمونه‌های بشدت آلوده، نمونه های محیطی، در موارد جداسازی از موادغذایی و سبزیجات آلوده و در مواردی که تعداد میکروارگانیسم در نمونه‌های بالینی کم باشد، محیط **CIN Agar – Cefsulodin-irgasan-novobiocin agar** است. باکتری پس از **۴۸** ساعت در دمای **۳۰-۲۲ درجه**، بر روی این محیط کلنی‌هایی به شکل چشم گاو **bull's-eye** با مرکز بزرگ قرمز رنگ و حاشیه شفاف ایجاد می‌کند. رنگ محیط CIN agar صورتی - قرمز است. آئروموناس‌ها هم بر روی CIN agar این شکل کلنی را ایجاد می‌کنند ولی با اکسیداز مثبت از یرسینیا جدا می شوند. در مطالعات تجربی انجام شده محیط انتخابی- افتراقی CIN agar می‌تواند تا CFU/ml ۱۰ از باکتری را جدا کند. با توجه به امکان رشد باکتری‌هایی چون انتروباکتر و سراشیا و ایجاد انواعی از کلنی‌های قرمز رنگ به علت تخمیر مانیتول موجود در محیط، انجام آزمون‌های شناسایی و تاییدی لازم است. **تصویر ۲**



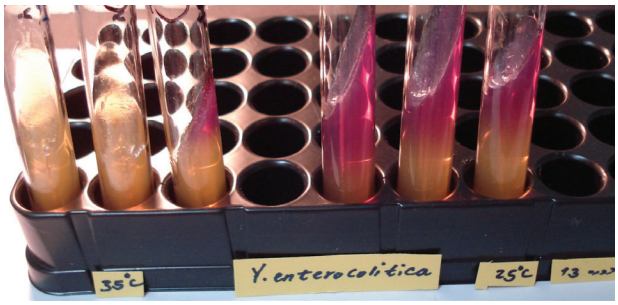
- **هرچند که محیط انتخابی و افتراقی CIN agar بر محیط MacConkey Agar در جداسازی *Yersinia enterocolitica* از نمونه‌های مدفوع کاملا برتری دارد ولی با توجه به هزینه تهیه محیط پایه و مواد افزودنی به آن و نیمه عمر محیط های تهیه شده و در خواست‌های کم بررسی مدفوع از نظر یرسینیا، در حال حاضر استفاده از CIN agar در سطح آزمایشگاه های تشخیص طبی ایران مرسوم نیست و معمولا در مطالعات پژوهشی و اپیدمیولوژیک مراکز دانشگاهی و تحقیقاتی استفاده می‌شود.**

باید توجه داشت که در موارد حاد بیماری که تعداد باکتری در نمونه مدفوع زیاد است، در صورتی که بیمار آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده باشد، *Yersinia enterocolitica* بر روی محیط‌های معمولی مانند MacConkey Agar مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها قابل جداسازی و شناسایی است و به این دلیل این باکتری در برنامه‌های کنترل کیفیت خارجی EQAP & EQAS در سال ۱۳۹۱ ارسال شد.

- این باکتری **سوکروز** مثبت است و به دلیل **سوکروز** مثبت و اسیدی شدن شدید محیط **EMB**، باکتری می‌تواند کلنی‌هایی با **جلای فلزی** ایجاد کند. در صورت استفاده از EMB دو قندی در کشت اولیه، باکتری‌های **لاکتوز منفی** و **سوکروز مثبت** مانند ***Yersinia enterocolitica*** به اشتباه به عنوان غیر بیماری‌زا در نظر گرفته شده و تشخیص داده نمی‌شوند. بنابر این **در کشت مدفوع بهتر است که به جای محیط EMB از محیط تک قندی MacConkey Agar استفاده شود که فقط لاکتوز دارد و برای گرم مثبت‌های نمونه مدفوع مانند انتروکوک، مهاری‌تر است. رشد ضعیف انتروکوک‌ها که در تخمیر قندهای مختلف فعالند، در زمینه پلیت‌های EMB و در زیر تک کلنی مشکوک می‌توانند منجر به عدم خلوص تک کلنی مورد استفاده برای تست‌های تشخیصی و اشتباه در شناسایی می‌شود. *Yersinia enterocolitica*** بر روی محیط سه قندی **XLD** که لاکتوز، سوکروز و زایلوز دارد، کلنی‌های زرد رنگ مانند غیربیماری‌زاها ایجاد می‌کند.
- **بر روی محیط MacConkey باکتری *Yersinia enterocolitica* کلنی‌هایی کوچکتر از سایر گرم منفی‌های روده‌ای با قطر حدود ۲-۱ میلی متر، بی‌رنگ یا هم رنگ محیط ایجاد می‌کند. برای جداسازی اولیه از کشت مدفوع پلیت‌ها بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰-۲۲ درجه یا RT انکوبه می‌شوند. در مراحل بعدی و انجام تست های تشخیصی نیز این دما توصیه می‌شود. بر روی محیط MacConkey در دمای ۳۷-۳۵ درجه پس از ۲۴ ساعت کلنی‌ها ریز و سرسوزنی خواهند بود و ممکن است بررسی نشوند. توصیه می شود که از ابتدا دو پلیت MacConkey در دو دما استفاده شود یا در روشی امکان پذیرتر و بدون افزایش هزینه، تمام پلیت‌های MacConkey برای ۲۴ ساعت اول در دمای ۳۷-۳۵ درجه جهت بررسی شیگلا و سالمونلا و برای ۲۴ ساعت دوم در دمای ۳۰-۲۲ درجه یا RT برای بررسی موارد احتمالی *Yersinia enterocolitica* قرار داده شوند. تصویر ۳**



- به دلیل سوکروز مثبت باکتری، محیط **TSI** که دارای سه قند گلوکز و لاکتوز و سوکروز است به فرم **A/A** اسید-اسید و بدون گاز در می آید ولی محیط **KIA – Kligler Iron Agar** که دارای دو قند گلوکز و لاکتوز است به فرم **K/A** آلکالین-اسید و بدون گاز در می آید. با توجه به این مزیت محیط KIA برخی از مولفین این محیط را برای شناسایی اولیه بیماری زاهای گوارشی نسبت به TSI ارجح می دانند.
- در این باکتری **سیترات** منفی، **MR** مثبت، **اندول** متغیر (۵۰٪)، **H_2S** منفی، تولید **گاز** در **TSI** منفی، حرکت در ۳۷ درجه منفی و حرکت در دمای **۳۰-۲۲** درجه **مثبت** است. تست حرکت یکی از دلایل خطاهای تشخیصی برای این باکتری است. **تست اوره آگار** (۷۵٪) مثبت است که در بعضی از سوش‌ها کمی با تاخیر مثبت می‌شود. در حرارت**۳۰-۲۲** درجه تست اوره سریع‌تر و قوی‌تر مثبت می‌شود. یکی از دلایل خطاهای تشخیصی در بررسی انجام شده در برنامه EQAP گزارش منفی کاذب در تست اوره بوده است.
- تست **VP-Voges-Proskauer** در **۳۷** درجه **منفی** و در**۳۰-۲۲** درجه **مثبت** است. **لاکتوز** منفی و **ONPG** مثبت و **مانیتول** مثبت است. در محیط **CIN Agar** تخمیر قند مانیتول و اسیدی شدن محیط منجر به قرمز شدن کلنی‌ها می‌شود. در صورت استفاده از API برای تشخیص موارد مشکوک به یرسینیا بهتر است API در ۳۰-۲۲ درجه انکوبه شود.
- **Lysine decarboxylase** در این باکتری منفی است. در بعضی از سویه های این باکتری اگر از محیط **LIA – Lysine Iron Agar** استفاده شود، در حرارت **۳۷** درجه و طی ۲۴ ساعت به دلیل فعالیت ضعیف‌تر باکتری در این حرارت و مصرف گلوکز و تاخیر در آلکالینه کردن سطح، محیط به فرم **A/A** اسید- اسید در می آید. معمولا این واکنش در نگهداری طولانی‌تر، ۳ تلقیح عمقی در محیط به جای ۲ تلقیح عمقی و انکوباسیون در دمای ۳۰-۲۲ درجه به فرم قابل انتظار **K/A** در می‌آید. **تصویر ۴**



- ***Yersinia enterocolitica*** شایع ترین گونه در میان یرسینیاهایی است که از دستگاه گوارش جدا می‌شوند. **سوکروز مثبت** ، **Ornithine decarboxylase مثبت**، **سوربیتول مثبت** و **VP مثبت** در دمای **۲۵** درجه این باکتری را از ***Yersinia pseudotuberculosis*** جدا می‌کند. باکتری *Yersinia pseudotuberculosis* از نظر شیوع جداسازی در بین یرسینیاهایی که از دستگاه گوارش و کشت مدفوع جدا می‌شوند در رتبه دوم قرار می گیرد. سایر گونه‌ها بندرت از دستگاه گوارش جدا می‌شوند. **تصویر ۵ و ۶**
- **۵ سرو گروه** بیماری‌زای **O:3, O:8, O:9, O:5,27 & O:1,2a,3**

TABLE 1. Characteristics differentiating *Y. enterocolitica* from closely related species

Test	Result[a] for:										
	Y. enterocolitica[b]	*Y. pseudotuberculosis*	*Y. pestis*	*Y. fredericksenii*	*Y. intermedia*	*Y. kristensenii*	*Y. mollaretii*	*Y. bercovieri*	*Y. aldovae*	*Y. rhodei*	*Y. ruckeri*
Fermentation											
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0
Rhamnose	0	+	0	+	+	0	0	0	+	0	0
Raffinose	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	v
Melibiose	0	+	v	0	+	0	0	0	0	v	0
Cellobiose	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0
Sorbose	v	0	0	+	+	+	+	0	0	ND	ND
Ornithine decarboxylase	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer (25°C)	+	0	0	+	+	0	0	0	+	0	0
Indole	v	0	0	+	+	v	0	0	0	0	0
Urease production	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility (25°C)	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+

[a] +, positive; 0, negative; v, variable; ND, not determined.
[b] Biotype 5 strains may vary in some reactions. See Table 2.

Table 6-23 Differentiation of Species Within the Genus *Yersinia*

BIOCHEMICAL TEST	*Y. PESTIS*	*Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*	*Y. ENTEROCOLITICA*	*Y. FREDERIKSENII*	*Y. INTERMEDIA*	*Y. KRISTENSENII*	*Y. ALDOVAE*	*Y. BERCOVIERI*	*Y. MOLLARETII*	*Y. ROHDEI*
Indole	−	−	V (50)	+	+	V (30)	−	−	−	−
Ornithine	−	−	+	+	+	+	V (40)	V (80)	V (80)	V (25)
Motility 25–28°C	−	+	+	+	+	+	+	+	+	NA
Fermentation of:										
Sucrose	−	−	+	+	+	−	V (20)	+	+	+
Rhamnose	−	V (70)	−	+	+	−	−	−	−	−
Cellobiose	−	−	V (75)	+	+	+	−	+	+	V (25)
Sorbitol	V(50)	−	+	+	+	+	V (60)	+	+	+
Melibiose	V(50)	V (70)	−	−	V (80)	−	−	−	−	V (50)

Data obtained from references 33, 496, and other sources. All tests were done at 25–28°C.
+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; V, 11–89% of strains positive; NA, results not available.

شایع‌ترین سـرو گروه‌های بیماری‌زای انسانی هستند. **۵ بیوتیپ** بیماری زا شـامل بیوتیپ‌های **۱B, ۲, ۳, ۴, & ۵** می‌باشـند. باید توجه داشت که برای بیماری‌زایی این باکتری عوامل بیماری‌زای گوناگونـی وجود دارد و برای شناسـایی و تایید وجود این عوامل روش‌های تشـخیصی متعددی شـامل مجموعه‌ای از روش‌های مولکولی، کشت سلولی، استفاده از خوکچه هندی **Sereny test** و .... در آزمایشگاه های مرجع انجام می شود.

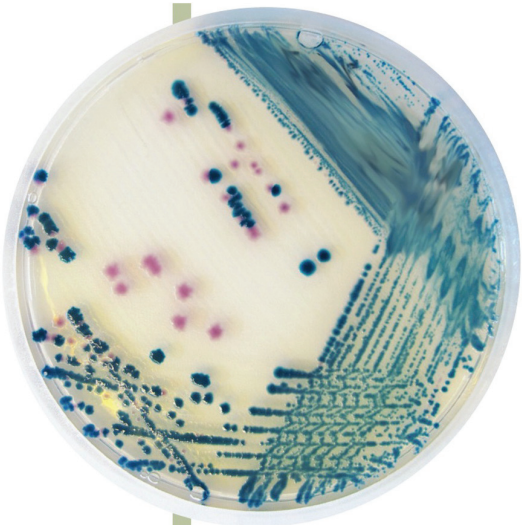
- بیوتیپ‌هـای بیمـاری‌زای ۱B, ۲, ۳, ۴, & ۵ برروی محیط بایل اسـکولین آگار، **اسـکولین منفی** و **بیوتیپ غیربیمـاری‌زای ۱A برروی این محیط ، اسـکولین مثبت اسـت**. بیوتیپ های ۱B, ۲, ۳, ۴, & ۵ می‌توانند بیماری زا باشند که با روش های دیگر باید شناسایی شوند. **تصویر ۷**

TABLE 2. Biochemical tests used to biogroup *Y. enterocolitica* strains[a]

Test	Biogroup reaction[b]					
	1A	1B[c]	2	3	4	5
Lipase activity	+	+	0	0	0	0
Salicin (acid production in 24 h)	+	0	0	0	0	0
Esculin hydrolysis (24 h)	+/0	0	0	0	0	0
Xylose (acid production)	+	+	+	+	0	v
Trehalose (acid production)	+	+	+	+	+	0
Indole production	+	+	v	0	0	0
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+ (+)
Voges-Proskauer test	+	+	+	+	+	+ (+)
Pyrazinamidase activity	+	0	0	0	0	0
Sorbose (acid production)	+	+	+	+	+	0
Inositol (acid production)	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	0

[a] Modified from reference 251.
[b] +, positive; 0, negative; (+), delayed positive; v, variable.
[c] Biogroup 1B is comprised mainly of strains isolated in the United States.

- سـوش‌های بیمـاری‌زا در محیـط **MR-VP** در دمای RT پس از **۴۸-۲۴** سـاعت کدورتی یکنواخـت ایجاد می‌کنند و در دمای **۳۷-۳۵** درجه ممکن است اتو آگلو تیناسیون دهند که در طول دیواره لوله و یا ته لوله جمع شود.این حالت نشانه احتمالی وجود پلاسمید بیماری‌زا است.
- سـوش‌های بیمـاری‌زا بـرروی محیـط **CHROMagar™** **Y.enterocolitica** کلنی‌هـای به رنگ بنفش مایل به ارغوانی سـیر می‌دهند که از انواع غیر بیماری‌زا و سـایر باکتری‌هایی که کلنی‌های آبی رنگ می‌دهند قابل تشخیص است. **تصویر ۸**



References:

1- BAILEY & SCOTT'S Diagnostic Microbiology , 12th edition, 2007

2- Isenberg, H.D; Clinical Microbiology Procedures Handbook, ASM , 2004

3- Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology , 6th edition, 2006

4- Mahon's Textbook of Diagnostic Microbiology, 4th edition, 2011

5- Murray, P.R.et al; Manual of Clinical Microbiology, ASM, 8th edition, 2003

6- Yersinia enterocolitica : The Charisma Continues , CMR , Apr. 1997, p. 257–276