

## A Child Patient with Enteric Fever Due to Salmonella Paratyphi C in Neyshabor

Received: 10 May 2016 Revised: 22 August 2016 Accepted: 5 September 2016

### ABSTRACT

Maryam Asghar Heydari<sup>3</sup>  
Mohammad Salehi<sup>1,2\*</sup>  
Masoud Mobini<sup>3</sup>  
Mahmud Gholami<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Research Center for HIV/AIDS, HTLV and Viral Hepatitis, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran.

<sup>2</sup>Medical Diagnostic Laboratory of Neyshabour, Center of Medical, Pathological and Genetic Diagnostic Services, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad Branch, Mashhad, Iran.

<sup>3</sup>MSc in Microbiology, young researchers and elite clup, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.

<sup>4</sup>MSc in Microbiology, Isfahan university, Isfahan, Iran.

### \*Corresponding Author:

Mohammad Salehi  
Tel: (+98)9358428423  
email: mohammadsalehi73@gmail.com

**Background:** Enteric fever causes by Salmonella enteric and in 600 thousand of cases leading to death. We aimed to report a severe case of salmonellosis in a child.

**Case presentation:** The patient was a male 4 month old child who referred to ACECR (Academic Center for Education, Culture and Research) with 2 days history of fever, vomiting and diarrhea. Interviewing, blood analyze, blood and stool culture have done. Stool culture and biochemical tests confirmed the Salmonella Paratyphi C. Patient and his family hadn't any history related to salmonellosis.

**Conclusion:** This report showed infection must be transmitted by a nonmember of family asymptomatic carrier. Treatment has done by oral suspension of 100 mg/ml Cefexcime. Stool exam has showed the normal flora after 20 days.

**Keywords:** enteric fever, salmonella paratyphi C, child, Iran

## گزارش کودک مبتلا به تب روده‌ای ناشی از سالمونلا پاراتایفی C در نیشابور

تاریخ دریافت: ۲۱ اردیبهشت ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح: ۱ شهریور ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۱۵ شهریور ۱۳۹۵

## چکیده

مریم اصغر حیدری<sup>۳</sup>محمد صالحی<sup>۱</sup> و<sup>۲</sup>\*مسعود مبینی<sup>۳</sup>محمود غلامی<sup>۴</sup>

**مقدمه:** سالمونلا انتریکا عامل عفونت تب روده‌ای می‌باشد که سالانه حدود ۶۰۰ هزار نفر در اثر آن می‌میرند. هدف از این مطالعه معرفی موردی شدید از سالمونلوزیس در یک کودک ساکن نیشابور می‌باشد.

**گزارش بیمار:** بیمار کودک چهارماهه‌ای با جنسیت مذکر بود که با علائم دو روز سابقه تب، استفراغ و اسهال آبکی به آزمایشگاه جهاد دانشگاهی نیشابور ارجاع داده شد. مصاحبه، آنالیز خون و کشت خون و مدفوع برای بیمار انجام شد. کشت نمونه مدفوع و انجام تست‌های بیوشیمیایی، سالمونلا پاراتایفی گروه C را تأیید کرد. نوزاد و خانواده هیچ‌یک سوابق مربوط به انتقال بیماری را نداشتند.

**نتیجه‌گیری:** این گزارش نشان می‌دهد که احتمالاً باید عفونت سالمونلوزیس از ناقلین بدون علامت غیر اعضای خانواده به نوزاد انتقال یافته باشد. درمان با سفکسیم ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت سوسپانسیون خوراکی انجام شد. آنالیز مدفوع ۲۰ روز بعد از شروع درمان فلور طبیعی را نشان داد.

**کلید واژه‌ها:** تب روده‌ای، سالمونلا پاراتایفی C، کودک، ایران

<sup>۱</sup>گروه پژوهشی ایدز، HTLV و هیپاتیت‌های ویروسی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران.  
<sup>۲</sup>کارشناس ارشد زیست‌شناسی- میکروبیولوژی، آزمایشگاه تشخیص طبی نیشابور، مرکز خدمات تخصصی تشخیص طبی، آسیب‌شناسی و ژنتیک، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران.  
<sup>۳</sup>کارشناس ارشد میکروبیولوژی، باشگاه پژوهشگران و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران.  
<sup>۴</sup>کارشناس ارشد زیست‌شناسی- میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

## \* نویسنده مسئول:

محمد صالحی

تلفن: (+۹۸)۹۳۵۸۴۲۸۴۲۳

پست الکترونیک:

mohammadsalehi73@gmail.com

## مقدمه

بیماری می‌میرند [۲]. عامل ایجاد کننده بیماری، یک باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و تاژک دار است که در خانواده انتروباکتریاسه قرار دارد [۳]. علی‌رغم کاهش شیوع این بیماری در کشورهای توسعه‌یافته هنوز این بیماری یکی از معضلات اساسی بهداشتی در کشورهای درحال توسعه و از جمله ایران می‌باشد که در

تب روده‌ای یک عفونت سیستمیک توسط باکتری‌های جنس سالمونلا می‌باشد که علت مهم بیماری و مرگ در ایالات متحده آمریکا و اروپا در قرن ۱۹ می‌باشد [۱]. سالانه بالغ بر ۱۶ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند و بیش از ۶۰۰ هزار نفر در اثر این

سوم معمولاً مثبت هستند. انتقال طولانی عفونت معمولاً در کودکان دیده می‌شود و برای درمان عفونت معمولاً از فلوروکینولون‌ها استفاده می‌شود [۸].

سفالوسپورین‌های نسل سوم و دیگر آنتی بیوتیک‌ها از جمله آموکسی سیلین، کلرافنیکل، آمپی سیلین، آزیترومایسین و تری متوپریم سولفامتوکسازول به صوت گسترده‌ای در بالغین با عفونت شدید به عنوان داروی جایگزین می‌تواند تجویز شود. باین وجود اکثر سویه‌های سالمونلا در حال حاضر به این آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند و منجر به پاسخ بالینی ضعیفی می‌شوند [۹]. مرگ ناشی از سالمونلوزیس خیلی رایج نیست و معمولاً در کودکان یا افراد مسن و دارای سیستم ایمنی ضعیف رخ می‌دهد [۶]. تاکنون موردی از سالمونلوزیس در نیشابور گزارش داده نشده است و با توجه به جستجوهای انجام گرفته از طریق اینترنت نویسندگان مدعی‌اند که این گزارش برای بار نخست ارائه شده است. در گزارشات قبلی انتقال سالمونلا توسط لاک‌پشت در دختر بچه شش ساله و ۱۱ مورد در مطالعه فرناندز، سفر به خارج کشور در زن ۲۵ ساله و مرد ۳۰ ساله به اثبات رسید. [۱۲-۱۰، ۶]

هدف از این گزارش معرفی مورد شدیدی از سالمونلوزیس در یک کودک ساکن نیشابور که به آزمایشگاه مرکز جهاد دانشگاهی نیشابور مراجعه کرده بود، می‌باشد.

صورت عدم درمان و یا درمان دیر هنگام باعث ایجاد عوارض ناگواری می‌گردد که مهم‌ترین آن‌ها خونریزی روده و پارگی روده می‌باشد [۴ و ۵]. انسان‌ها مخزن اصلی باکتری هستند [۲]. سالمونلا یک باسیل متحرک، گرم منفی، بدون اسپور می‌باشد که بر اساس آنتی ژن سوماتیک (O) بیش از ۲۳۰۰ سرووار یا سروتایپ دارد و همچنین دارای شش سرگروه A، C1، B، C2، D و E می‌باشد. اگرچه هر یک از سروتایپ‌ها، می‌توانند سندروم‌های مربوط به سالمونلا را ایجاد کنند ولی هر سروتایپ تمایل بیشتری به یک نوع سندرم خاص نسبت به سروتایپ دیگر دارد. به احتمال زیاد سالمونلا تایفی و پاراتایفی علت تب روده‌ای و حالت ناقل مزمن آن هستند. سه گونه مهم سالمونلا که در گروه پاراتیفونید قرار می‌گیرند شامل سالمونلا پاراتایفی A، سالمونلا پاراتایفی B (سالمونلا اسکات مولری) و سالمونلا پاراتایفی C (سالمونلا هیرشفدی) می‌باشند [۳ و ۶]. انتقال این بیماری از طریق جذب غذا یا آب آلوده به مدفوع فردی بیمار یا سالم ولی ناقل صورت می‌گیرد [۷]. تشخیص تب روده‌ای از طریق جداسازی میکروارگانیسم از نمونه خون، مدفوع یا مغز استخوان ثابت می‌شود. در طی هفته اول بیماری کشت خون در ۹۰ درصد بیماران مثبت می‌باشد اما مثبت شدگی تست طی دو هفته کاهش می‌یابد به طوری که در هفته سوم به کمتر از ۵۰ درصد می‌رسد. کشت مدفوع معمولاً در طی هفته اول منفی و طی هفته

## جدول ۲: آنالیز مدفوع

سوم	اول	week
C سالمونلا پاراتایفی	منفی	Culture on first week
دیده نشد	دیده نشد	Protozoa cyst
دیده نشد	دیده نشد	Ova of parasite
۱-۲	۱-۲	RBC
۲۵-۳۰	۵-۶	WBC
منفی	منفی	Yeast
منفی	منفی	Undigested food
منفی	منفی	Mucus
منفی	منفی	Fat
نرمال	نرمال	Color
نرمال	نرمال	Consistency

## جدول ۱: آنالیز خون

کشت خون پس از ۲۰ روز	Positive
CRP	۷۵/۴ mg/L
CPK	۲۵۲ U/L
LDH	۳۰۵ U/L
SGPT	۵۸ U/L
SGOT	۵۷ U/L
K+	۴/۴ meq/L
Na+	۱۳۳ meq/L
Platelets	۲۶۸ mm <sup>3</sup>
ESR mm/h	۲۹ mm/h
Neu%	۷۳/۶
WBC	۸/۱۲ mm <sup>3</sup>
Hb	۱۴/۱ g/DL

جدول ۳: آنالیز بیوشیمیایی رو نمونه کشت شده

Gram	TSI	SH <sub>2</sub>	Lysin	Citrate	Motility	Urea	Malonat	MR	VP	Indol
-	A/A	+	+	+	+	-	-	+	-	-

جدول ۴: آنالیز مدفوع روز بیستم پس از شروع درمان

Consisten- cy	Color	Fat	Mucus	Undigest- ed food	Yeast	WBC	RBC	Ova of parasite	Proto- zoa cyst	culture
نرمال	نرمال	منفی	منفی	منفی	منفی	۱-۲	۰-۱	دیده نشد	دیده نشد	فلور نرمال

## معرفی مورد و روش کار

در تابستان ۹۴ کودکی چهار ماهه با جنسیت مذکر با سابقه دو روز تب مدام و طولانی، استفراغ و اسهال آبکی و گریه مداوم در آزمایشگاه مرکز جهاد دانشگاهی نیشابور پذیرش شد. پس از دریافت شرح حال، آنالیز خون و کشت مدفوع در هفته اول و سوم روی محیط غنی کننده سلنیت F و سپس محیط ایکس آل دی که یک محیط انتخابی می باشد، انجام شد و پس از ۲۴ ساعت مقداری از نمونه کلتی های تازه جهت انجام رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی (شامل: TSI، لیزین، سیترات، SIM، اوره آز، مالونات، متیل رد و VP) و تست حرکت برداشته شد. (جدول ۱، ۲ و ۳) پس از تأیید سالمونلا توسط تست های بیوشیمیایی، از آنتی سرم های مختلف گروه سالمونلا جهت تأیید گروه آن استفاده شد. برای تأیید توسط آنتی سرم بدین شکل عمل شد که مقداری از سوسپانسیون تهیه شده توسط کلتی میکروب و سرم فیزیولوژی را به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده و پس از سانتریفیوژ کردن، از رسوب آن مقداری برداشته شد و در مجاورت آنتی سرم های مختلف قرار داده شد به طوری که در معرض آنتی سرم C آگلوتینه مشاهده شد. بر اساس مصاحبه انجام شده بیمار و خانواده اش هیچ گونه سابقه سفر یا خوردن غذاهای مشکوک و همچنین داشتن حیوانات خانگی را نداشتند. شیر مادر تنها غذای نوزاد بود. آنالیز و کشت مدفوع در اعضای خانواده نوزاد نیز صورت گرفت که از ناقل بودن افراد خانواده اطمینان حاصل شود. هیچ یک از اعضای خانواده ناقل باکتری نبودند. فرم رضایت نامه توسط سرپرست نوزاد مکتوب شد.

Hb: هموگلوبین، WBC: شمارش سلول های سفید، Net%: درصد نوتروفیل، ESR: میزان رسوب اریتروسیت ها، Na: سدیم، K: پتاسیم، SGOT: گلوتامیک اگزالو استیک ترانس آمیناز، SGPT: گلوتامیک پیرویک ترانس آمیناز، LDH: لاکتات دهیدروژناز، CPK: کراتینین فسفاتاز، CRP: پروتئین فاز حاد C نتایج آنالیز خون در روز اول لوکوپنی و نوتروپنی را تأیید کرد (جدول ۱). نتایج کشت مدفوع روز دوم پس از پذیرش برای سالمونلا مثبت

شد و گروه آن نیز توسط آنتی سرم گروه C بر طبق روشی که قبلاً ذکر شد تأیید شد. بر اساس نتایج حاصل از آنتی بیوگرام باکتری جدا شده نسبت به کوتریموکسازول مقاوم و نسبت به کلرامفنیکل، سفتی زوکسیم، سیپروفلوکساسین، سفکسیم و جنتامایسین حساس بود و فقط نسبت به آموکسی سیلین حالت حدوسط (intermediate) داشت. نتایج آنالیز مدفوع روز دوم پس از پذیرش در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

درمان آنتی بیوتیکی بعد از اثبات سالمونلوزیس با سفکسیم ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به صورت سوسپانسیون خوراکی هر ۱۲ ساعت تا ۱۴ روز شروع شد. آنالیز مدفوع ۲۰ روز بعد از شروع درمان انجام شد. (جدول ۴)

## بحث و نتیجه گیری

عفونت های معده ای- روده ای حاد بسیار رایج اند و اسهال و استفراغ از علائم مهم آن به شمار می آید که هر فرد ممکن است سالی حداقل یک بار آن را تجربه کند. سالانه ۱۲۲ میلیون مورد عفونت معده ای- روده ای حاد در ایالات متحده اتفاق می افتد که انتقال انسان به انسان مسئول آن است. غذا و آب به عنوان منبع اصلی این نوع عفونت ها گزارش شده اند [۱]. ویروس ها، باکتری ها و تک سلولی ها علل شناخته شده اصلی عفونت های معده ای- روده ای هستند. در بین عفونت های معده ای- روده ای، عفونت سالمونلا تایفی و پاراتیفی در حال حاضر به خاطر بالا رفتن بهداشت، کم شدن جمعیت و بالا رفتن استانداردهای سلامت عموم در ارتباط با مدیریت پسماندهای خانگی و صنعتی در کشورهای توسعه یافته و برخی کشورهای در حال توسعه کمتر گزارش می شود [۱].

تب روده ای، شامل تب تیفوئید و پاراتیفوئید، نام رایج عفونت های ایجاد شده توسط سالمونلا انتریکا سروتایپ تایفی و پاراتیفی می باشد [۱۳]. علاوه بر غذا و آب آلوده، ناقلین بدون علامت و تماس با حیوانات نیز می توانند منجر به عفونت مخفی و به دنبال آن ظهور علائم بالینی باشند. روده باریک خزندگان مخازن اصلی سالمونلا می باشد به طوری که برخی گزارشات انتقال عفونت توسط

پیشگیری نه تنها در ارتباط با مورد این گزارش بلکه می تواند در انتقال بسیاری دیگر از عفونت ها نیز مفید واقع شود. بر اساس بررسی های صورت گرفته در این گزارش احتمالاً باید عفونت سالمونلوزیس از ناقلین بدون علامت (خارج از اعضای خانواده) به نوزاد انتقال یافته باشد. این مطالعه اولین مورد از گزارش سالمونلوزیس مرتبط با سالمونلا پاراتیفی C در نیشابور می باشد. بیمار پس از ۱۴ روز درمان با سفکسیم ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به صورت سوسپانسیون خوراکی هر ۱۲ ساعت تا ۱۴ روز بهبود یافت و آنالیز مدفوع پس از درمان فلور نرمال را نشان داد.

### تقدیر و تشکر

مؤلفین از ریاست محترم آزمایشگاه و جهاد دانشگاهی نیشابور تقدیر و تشکر به عمل می آورند که اجازه انجام این مطالعه را به ما دادند.

### منابع

1. Mushr DM, Musher BL. Contagious acute gastrointestinal infections. *N Engl J Med* 2004; 351:2417-2427
2. Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, et al. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol* 2004;186 (17): 5883-98.
3. Crump JA, Luby SP, Mintz ED: The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 2004, 82:346-353.
4. Amini N, Soleimani M, Ghalyanchi Langeroudi A, Majidzadeh K. A Polymerase Chain Reaction Method for Rapid Detection of *Salmonella typhi*. *Ann Mil Health Sci Res* 2010; 8 (3):159-165(Persian)
5. Connor BA, Schwartz E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *Lancet Infect Dis* 2005;5 (10): 623-8.
6. Chalkias, A, Anastasopoulos D, Tsiaglis S. Enteric fever due to *Salmonella Paratyphi A* in Greece: a case report. *Cases Journal* 2008; 1:403
7. Centers for Disease Control and Prevention: Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* associated with rodents purchased at retail pet stores – United States, December 2003 – October 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54:429-433. A report of an outbreak of salmonellosis related to pet hamsters.
8. Steffen R, de Bernardis C, Banos A: Travel epidemiology – a global perspective. *Int. J Antimicrob Agents* 2003; 21:89 – 95.
9. Huang DB, DuPont HL: Problem pathogens: Extraintestinal complications of *Salmonella enterica* serotype typhi infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:341-348. A review of the involvement of extraintestinal sites in typhoid fever.
10. Nagano N, Oana SH, Nagano Y, Arakawa Y. A severe *Salmonella enterica* serotype paratyphi B in-

لاک پشت را در کودکان گزارش داده اند. سالمونلوزیس ناشی از تماس مستقیم و غیرمستقیم با خزندگان در ایالات متحده حدود شش درصد برآورد شده است [۱۶-۱۴، ۱۰]. در این گزارش خانواده بیمار هیچ گونه حیوان خانگی و یا تماس با آن را نداشته اند.

عفونت معمولاً خود محدود شونده است و تا ۱۰ درصد از موارد در حال بهبودی، باکتری را تا سه ماه در مدفوع خود دفع می کنند. یک تا چهار درصد ناقلین طولانی مدت باقی مانده و باکتری را تا یک سال و حتی بیشتر دفع می کنند به طوری که ۲۵ درصد آن ها هیچ علامتی از خود نشان نمی دهند و معمولاً اکثر آن ها زنان، افراد مسن و افراد دارای التهاب کولون می باشند [۱۷]. فنت زیل و همکاران در گزارش خود موردی از تب روده ای را بدون هیچ گونه سابقه سفر گزارش دادند [۱۱]. در این گزارش نیز هیچ گونه سابقه سفر در بیمار و یا خانواده اش وجود نداشت.

از آنجایی که عفونت معمولاً خود محدود شونده است مرگ ممکن است فقط در کودکان یا افراد مسن و دارای سیستم ایمنی ضعیف رخ دهد [۸، ۶]. میانگین مرگ ناشی از سالمونلا حدود یک درصد می باشد [۱۷]. علائم تب روده ای در بالغین معمولاً با تب مداوم طولانی، برادیکاردی نسبی، هپاتواسپلنومگالی، لکه های رز، لوکوپنی و نوتروپنی می باشد [۸]. پس از یک دوره پنج تا ۱۲ روزه تب و بی حالی و اغلب همراه با سرفه گسترش می یابد. برخی از بیماران ممکن است در طی این دوره اسهال نیز داشته باشند. تب در چند روز اول هفته شدت گرفته و سپس در دامی ۳۹/۴ تا ۴۰ درجه سانتی گراد یا بالاتر ثابت باقی می ماند. پس از دو هفته علائم شدیدتری مانند اسهال خونی ممکن است مشاهده شود. به ندرت ممکن است علائمی مانند التهاب پانکراس، کوله سیستیت (Cholecystitis)، اندوکاردیت، پنومونی، آبسه های طحالی-کبدی و اریکیت (Orchitis) گزارش شود [۹].

کلرامفیکل در سال ۱۹۴۸ به عنوان تحولی در درمان تب تیفوئید گزارش شد. در دهه ۸۰ میلادی مقاومت به تمام داروهای خط اول سالمونلا تایفی (کلرامفیکل، تری متوپریم، سولفامتوکسازول و آمپی سیلین) گسترش یافت. حدود یک سوم از تمام ایزوله های سالمونلا تایفی به کینولون و نالیدیکسیک اسید مقاومند [۱۸]. سفالوسپورین های نسل سوم و آزیترومایسین داروهای بسیار مؤثری برای درمان تیفوئید می باشند [۱۷]. در این گزارش بیمار با سفکسیم ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به صورت سوسپانسیون خوراکی هر ۱۲ ساعت تا ۱۴ روز درمان شد. در پایان لازم است جهت پیشگیری از عفونت در نوزادان با توجه به واسطه ای بودن انتقال عفونت، قبل از آغوش گرفتن و یا لمس کردن نوزاد از تمیز بودن دست خود و افراد دیگر و همچنین محیط اطراف نوزاد مطمئن باشیم. این راه

- fection in a child related to a pet turtle, *Trachemys scriptaelegans*. *Jpn Infect Dis* 2006;59, 132-34
11. Fountzilias C, Virapongse A, Graham R. A case of typhoid fever with no travel history. *Arch Hell Med* 2012; 29(3):369-371
  12. Hernández E, Rodríguez JL, Herrera-León S, García I, de Castro V, Muniozguren N. Salmonella Paratyphi B var Java infections associated with exposure to turtles in Bizkaia, Spain, September 2010 to October 2011. *Euro Surveill* 2012;17(25):pii=20201. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20201>
  13. Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S: Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* 2005; 366:749-762. A comprehensive review of typhoid and paratyphoid fever.
  14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multi state outbreak of human Salmonella infections associated with exposure to turtles: United States, 2007-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008;57(3):69-72.
  15. Harris JR, Neil KP, Behraves CB, Sotir MJ, Angulo, FJ. Recent multistate outbreaks of human Salmonella infections acquired from turtles: a continuing public health challenge. *Clin Infect Dis* 2010;50(4):554-9.
  16. Stam F, Römkens TE, Hekker TA, Smulders YM. Turtle associated human salmonellosis. *Clin Infect Dis* 2003;37(11):e167-9.
  17. Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid fever. *N Engl J Med* 2002; 347:1770-1782
  18. Lynch MF, Blanton EM, Bulens S, Jetal. Typhoid fever in the United States, 1999-2006. *JAMA* 2009; 302:859-865