Archive of SID

فراوانی ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از تخم‌مرغ‌های بومی مصرفی در شهرستان اراک

رفیع سهرابی[۱]، محسن پناهی درچه [۱]، الهه تاج بخش [۲]

۱.گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران (نویسنده مسئول)*

۲.گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳.گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد ، شهرکرد، ایران

چکیده

تخم مرغ از منابع عمده انتقال عفونت به انسان بوده و آلودگی آن‌ها با اجرامی نظیر *یرسینیا انتروکولیتیکا* می‌تواند برای انسان عوارض زیان باری داشته باشد. تحقیق حاضر با هدف شناسایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در تخم مرغ بومی به دو روش کشت و PCR انجام شد. در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵ تعداد ۴۰۰ نمونه تخم مرغ بومی به شکل تصادفی از فروشگاه‌های عرضه تخم مرغ در شهرستان اراک اخذ و به منظور شناسایی گونه *یرسینیا انتروکولیتیکا* به روش باکتری شناسی آزمایش شد. سویه‌های میکروبی جدا شده جهت تعیین *یرسینیا انتروکولیتیکا* تحت آزمایش PCR قرار گرفت. از مجموع ۴۰۰ نمونه تخم مرغ بومی در ۴۸ مورد (۱۲٪) به روش میکروبی *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد که در آزمون PCR از ۴۸ مورد جداسازی شده به روش کشت ۸ مورد از نظر سروتیپ O۳ مثبت گزارش گردیدند.

کلید واژگان: *یرسینیا انتروکولیتیکا*، تخم مرغ، اراک، ویرولانس، PCR.

* bahar.vet@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یرسینیا انتروکولیتیکا[1] باسیل کوتاه، گرم منفی و بدون اسپور، سرمادوست و متحرک می‌باشد (۱). در نمونه‌های ترشحات عفونی (رنگ آمیزی به روش وایسون) این باکتری بیماری‌زا به صورت باکتری دو قطبی به رنگ آبی پر رنگ و مرکز آن به رنگ آبی روشن دیده می‌شود که نمایی شبیه سنجاق قفلی دارد. این باکتری در خانواده انتروباکتریاسه قرار دارد (۲). مهم‌ترین گونه‌های این جنس شامل: *یرسینیا پستیس*[2]، *یرسینیا پسودوتوبرکلوزیس*[3] و *یرسینیا انتروکولیتیکا* می‌باشد. رشد این باکتری در دامنه حرارتی ۴۵-۲ °C مشاهده شده است و درجه حرارت بهینه رشد آن بین ۲۲-۲۹ °C می‌باشد (۳,۱). این باکتری پس از ۳min-۱ در دمای ۶۰°C از بین می‌رود ولی در مقابل انجماد نسبتاً مقاوم است (۴). میزان عفونت‌های ناشی از *یرسینیا* در سال‌های اخیر رو به افزایش است. گرچه *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیش از ۶۰ سال است شناخته شده ولی تنها طی دو دهه اخیر به عنوان عامل بیماری در انسان و سپس دام معرفی گردیده است. در اپیدمیولوژی این باکتری همه راه‌های ممکن از آب شرب گرفته تا انواع فرآورده‌های دامی اعم از شیر و سایر محصولات لبنی تا انواع اغذیه با منشا دامی و گیاهی به عنوان منبع این باکتری برشمرده شده است. به عبارت دیگر این میکروارگانیسم ممکن است در هر یک از مواد یاد شده موجود بوده و از آن طریق به انسان سرایت نماید. در طی ۲۰ سال گذشته *یرسینیا انتروکولیتیکا* را به عنوان یکی از عوامل مهم گاستروآنتریت‌های حاد شناخته‌اند که این ارگانیسم مسئول ایجاد علائم کلینیکی متعددی از جمله سندرم شبه آپاندیسیت می‌باشد. هم‌چنین ممکن است منجر به بیماری‌های پلی آرتریت، التهاب روده‌ای- معده‌ای، اسهال‌های خود به خود محدود شونده‌ی کودکان و نوجوانان، لنفادنیت مزانتر، سوراخ شدن روده، باکتریمی، التهاب پرده‌ی صفاق و سپتی سمی گردد (۶, ۵). این باکتری عفونت‌زا از خاک، زمین آلوده، آب، شیر و گوشت مرغ جداسازی شده است. در دمای ۲۵ °C یک انتروتوکسین پایدار در مقابل حرارت تولید می‌کند که دمای ۱۰۰ °C را ۱۰min تحمل می‌کند. این باکتری از مواد غذایی مانند شیر، سبزی‌ها و گوشت‌های بسته بندی شده در خلاء جدا شده است (۴).

در بین غذاهای مختلف، مواد غذایی با منشا دامی مهمترین عامل انتقال این میکروارگانیسم به شمار می‌روند که علت آن پروتئین حیوانی است که به عقیده برخی محققین موجب تشدید مقاومت *یرسینیا انتروکولیتیکا* در مقابل عوامل خارجی می‌شود. پژوهشگران در طی سالیان درازی معتقد بودند که لاشه خوک تنها منبع مهم این آلودگی می‌باشد. اما تحقیقات بعدی و جدا شدن این میکروارگانیسم‌ها از لاشه سایر دام‌های کشتاری و نیز لاشه طیور و حتی گوشت‌های تازه بسته بندی شده در خلاء وجود این باکتری در شیر، بستنی و برخی از اغذیه‌های دریایی و نیز آب آشامیدنی ثابت کرد خطر آلودگی و انتشار این عفونت غذایی تنها از جانب گوشت خوک نمی‌باشد. دسته‌ای از مواد غذایی مانند شیر و بعضی از مشتقات آن، گوشت، هویج، گوجه فرنگی، کاهو و چغندر محیط بسیار مناسبی برای رشد و تکثیر این باکتری هستند. مطالعات سرولوژیکی نشان می‌دهد افرادی که به هر نحوی با دام‌ها و گوشت سروکار دارند در مقایسه با سایر افراد به نسبت بیشتری به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* مبتلا می‌شوند (۱). متداول‌ترین واریته‌های سری *یرسینیا انتروکولیتیکا* در عفونت‌های انسانی O۳، O۵، O۸، O۹ می‌باشند. در بسیاری از کشورهای اروپای غربی، اسکاندیناوی، آمریکای شمالی، استرالیا و ژاپن نقش *یرسینیا انتروکولیتیکا* به ویژه سروتیپ O۳ این باکتری در ایجاد بیماری‌های انسانی به خوبی به اثبات رسیده است (۴).

تخم مرغ یک ماده غذایی بی‌نظیر و سرشار از پروتئین، مواد معدنی و ویتامین‌های مورد نیاز بدن است که کمبود برخی از آن‌ها موجب بروز بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های ذهنی، پوستی و چشمی می‌شود. خواص تغذیه‌ای موجود در تخم مرغ، این ماده غذایی را در هرم

[1] *Yersinia Entrocolitica*
[2] *Yersinia pestis*
[3] *Yersinia pseudotuberculosis*

www.SID.ir

Archive of SID

غذایی که معرف الگوی مناسب مصرف مواد غذایی در هر کشور است در گروه گوشت، حبوبات و مغزها قرار داده است. تخم مرغ از محصولاتی است که به طور طبیعی توسط ویژگی‌های درونی‌اش محافظت می‌شود، کوتیکول، پوسته‌ی آهکی و غشای داخلی تخم مرغ از جمله موانع نفوذ میکرورگانیسم‌ها می‌باشند. کوتیکول از جنس پروتئین است و ضخامتی در حدود ۰/۰۱ mm در سطح پوسته دارد. در صورت حضور این لایه امکان نفوذ باکتری از پوسته به درون تخم مرغ وجود ندارد ولی این لایه از طریق شستشو و به مرور زمان از بین می‌رود. با توجه به این‌که فرآورده‌های طیور یکی از منابع اصلی انتقال این باکتری به انسان می‌باشد لذا مطالعه حاضر با هدف ردیابی ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* در تخم مرغ‌های بومی عرضه شده به بازار شهرستان اراک طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵ به مدت ۴ ماه در سطح فروشگاه‌های عرضه تخم مرغ در شهرستان اراک روی ۴۰۰ نمونه تخم مرغ بومی انجام گرفت. نمونه‌گیری به روش خوشه‌ای تصادفی از چهار منطقه شمال، جنوب، شرق و غرب تهیه شد. نمونه‌های مربوطه به آزمایشگاه مواد غذایی پاستور اراک انتقال داده شد.

به منظور جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* از نمونه‌های مورد مطالعه، از پوسته و زرده هر نمونه در محیط آبگوشت غنی کننده یرسینیا[1] (ساخت شرکت هایمدیا)[2] کشت و به مدت ۴۸ h در دمای ۲۹ °C انکوباسیون گردید. در مرحله بعد از محیط غنی کننده مایع، باکتری در محیط جامد انتخابی *یرسینیا*[3] به همراه مکمل‌های آنتی بیوتیکی کشت و به مدت ۲۴ h در گرمخانه ۳۷ °C قرارگرفت. پس از گذشت ۲۴ h، پرگنه‌های قرمز با مرکز تیره‌تر و حاشیه شفاف با قطر حدود ۲-۰/۵ cm به عنوان پرگنه‌های مشکوک به *یرسینیا* انتخاب گردید. پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم روی پرگنه‌های مشکوک و مشاهده باسیل‌های کوچک گرم منفی در آن‌ها، آزمایش‌های تفریقی نظیر حرکت MR-VP، اوره، تخمیر قندهای سوکروز، رامنوز، لاکتوز و سلوبیوز جهت تایید *یرسینیا انتروکولیتیکا* انجام شد (۸).

به منظور تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر روی تمامی نمونه‌هایی که از نظر کشت مثبت تشخیص داده شده بودند در حضور زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱) واکنش PCR انجام گرفت. برای نیل به این هدف، باکتری‌های جدا شده در مرحله قبل به مدت یک شب در محیط مایع لوریا برتانی[4] ساخت شرکت مرک آلمان[5] در دمای ۳۷ °C کشت و DNA ژنومی باکتری‌های رشد یافته با استفاده از کیت استخراج DNA[6] استخراج و در دمای ۲۰ °C- قرار گرفت.

به منظور تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا* واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ µl متشکل از ۲/۵ µl بافر با غلظت ۱۰ برابر[7]، ۱۰۰ µ mol dNTP Mix (۱۰mmol)، ۱/۵ mmol کلرید منیزیم[8]، ۱ µ mol از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز[9] (فرمنتاس- لیتوانی) و ۲ µl DNA مربوط به هر نمونه صورت گرفت. برنامه حرارتی جهت تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا* شامل یک سیکل ۹۴ °C به مدت ۵ s، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ °C به مدت ۶۰s، ۵۷ °C به مدت ۶۰s و ۷۲°C به مدت ۶ min انجام شد. مشاهده باند ۳۶۱ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن این تست است.

به منظور تشخیص سروتیپ O:3 واکنش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای Yer-F و Yer-R نشان داده شده در جدول (۱) و در حجم ۲۵ µl متشکل از ۲/۵ µl بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۰۰ µ mol dNTP Mix (۱۰mmol)، ۱/۵ mmol کلرید منیزیم، ۱ µ mol از زوج پرایمرهای F و

[1] Yersinia Enrichment Broth
[2] Himedia
[3] Yersinia Selective Agar
[4] Luria berthani broth
[5] Merck
[6] DNA genomic purification kit
[7] PCR buffer 10X
[8] $MgCl_2$
[9] Taq DNA Polymerase

www.SID.ir

Archive of SID

R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز و ۱ µl DNA مربوط به هر نمونه صورت گرفت. برنامه حرارتی برای ردیابی سروتیپ O:۳ به صورت یک سیکل ۹۵ °C به مدت ۶min، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ °C به مدت ۶۰s ، ۵۹ °C به مدت ۷۰s و ۷۲ °C به مدت ۸۰s و یک سیکل انتهایی ۷۲ °C به مدت ۷ min انجام شد . مشاهده باند ۴۰۵ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن این تست می‌باشد.

به منظور ردیابی حضور ژن‌های حدت در ایزوله‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* از روش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱) استفاده شد. برای این منظور واکنش PCR در حجم ۵۰ µl متشکل از ۵ µl بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۵۰ µ mol dNTP mix، ۲ mmol $MgCl_2$، ۱ µ mol از زوج پرایمرهای yer-F,R، ۱/۵ واحد آنزیم (فرمنتاس- لیتوانی) Taq DNA و ۱ µl از DNA هر نمونه با برنامه حرارتی ۹۵ °C به مدت ۶ min ، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ °C به مدت ۶۰s ، ۵۹ °C به مدت ۷۰s و ۷۲ °C به مدت ۸۰s و یک سیکل انتهایی ۷۲ °C به مدت ۷ min انجام شد .

جدول (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص قطعی و ردیابی ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

Gene	Primer name	Primer sequence (5′-3′)	Size of product (bp)
16 srRNA	Y.ent F Y.ent R	ACCTTTGTGATTGACGTTACTCGC CAAGTCGACATCGTTTACAGCG	۳۶۱
rFbC	Yer O3-F Yer O3- R	CGCATCTGGGACACTAATTCG ACGAATTCCATCAAAACCACC	۴۰۵
yadA	yadA1 yadA2	CTTCAGATACTGGTGTCGCTGT ATGCCTGACTAGAGCGATATCC	۸۴۹
inv	Yc1 Yc2	CTGTGGGGAGAGTGGGGAAGTTTGG GAACTGCTTGAATCCCTGAAAACCG	۵۷۰
ail	Ail1 Ail2	ACTCGATGATAACTGGGGAG CCCCCAGTAATCCATAAAGG	۱۷۰
ystA	Pr2a Pr2c	AATGCTGTCTTCATTTGGAGCA ATCCCAATCACTATGACTTC	۱۴۵
virf	Virf1 Virf2	TCATGGCAGAACAGCAGTCAG ACTCATCTTACCATTAAGAAG	۵۹۰

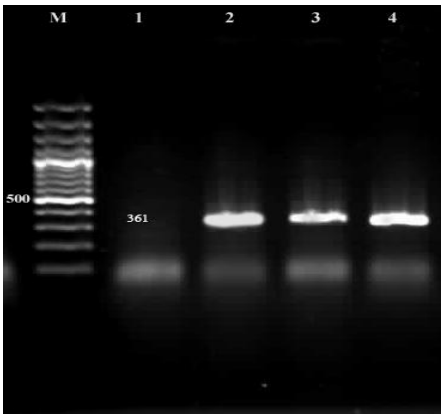
www.SID.ir

Archive of SID

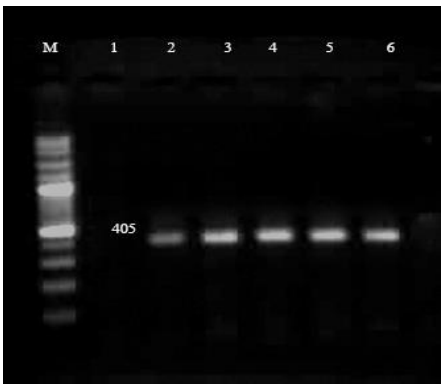
در هر مرحله ۲۰ µ mol از محصول PCR روی ژل ٪ ۱/۵ آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰v الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویربردار ژل[1] قرائت گردید.

نتایج

در این تحقیق که به منظور تشخیص سروتیپ O۳ و ردیابی ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از تخم مرغ‌های بومی عرضه شده در سطح فروشگاه‌های عرضه تخم مرغ شهرستان اراک صورت گرفت، با استفاده از روش‌های میکروبی و بیوشیمیایی از مجموع ۴۰۰ نمونه تخم مرغ بومی در ۴۸ مورد (٪ ۱۲) *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد. آزمون MR این باکتری مثبت می‌باشد ولی آزمون‌های VP و اوره *یرسینیا انتروکولیتیکا* منفی می‌باشد. هم‌چنین باکتری توانایی تخمیر قندهای سوکروز و سلوبیوز را دارا می‌باشد اما قادر به تخمیر قندهای لاکتوز و رامنوز نمی‌باشد. پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی در آزمون PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی تمامی موارد مثبت تشخیص داده شدند که در ۸ نمونه (٪ ۱۶/۶۶) سروتیپ O۳ گزارش گردید. نتایج در شکل‌های (۱ و ۲) نشان داده شده است.



شکل (۱): ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن srRNA ۱۶. ستون M : مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز.
ستون ۱ : کنترل منفی، ستون‌های ۴-۲ : نمونه‌های مثبت واجد باند ۳۶۱ جفت باز



شکل (۲): ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن *rfbC* . ستون M : مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز.
ستون ۱ : کنترل منفی ، ستون‌های ۶-۲ : نمونه‌های مثبت واجد باند ۴۰۵ جفت باز

[1] Uvitech.U.K.

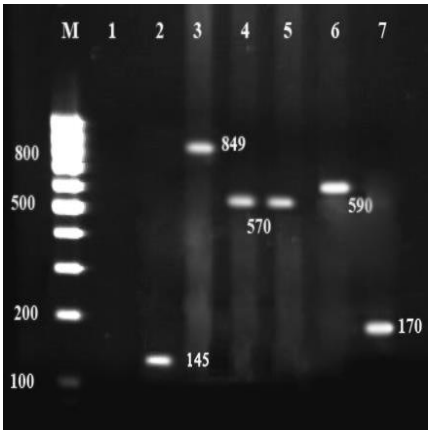
www.SID.ir

Archive of SID

در بررسی ژن‌های ویرولانس در نمونه‌های مثبت از نظر سروتیپ O۳ ژن *inv* در ۸ نمونه (٪۱۰۰)، ژن *ail* در ۴ نمونه (٪۵۰)، ژن *yad A* در ۳ نمونه (٪۳۷/۵)، *vir F* در ۲ نمونه (٪۲۵) و ژن *yst A* در ۲ نمونه (٪۲۵) گزارش گردید. نتایج در جدول (۲) و شکل (۳) نشان داده شده است.

جدول (۲): ژن‌های حدت باکتری از نظر سروتیپ O۳

PCR	No Positive Samples
inv	۸ (٪۱۰۰)
ail	۴ (٪۵۰)
yad A	۳ (٪۳/۵)
vir F	۲ (٪۲۵)
yst A	۲ (٪۲۵)



شکل (۳): ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به نمونه‌های مورد بررسی.

ستون M : مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA ، ستون ۱ کنترل منفی. ستون‌های ۷-۲ : نمونه‌های مورد مطالعه قطعات ژنی. قطعه ۱۴۵ جفت بازی مربوط به ژن *ystA* ، قطعه ۱۷۰ جفت بازی مربوط به ژن *ail* ، قطعه ۵۷۰ جفت بازی مربوط به ژن *inv* ، قطعه ۵۹۰ جفت بازی مربوط به ژن *virF*، قطعه ۸۴۹ جفت بازی مربوط به *yadA*

بحث

یرسینیا انتروکولیتیکا یک عامل بیماری‌زای گرم منفی رایج منتقله از طریق مواد غذایی است که در آب، فرآورده‌های لبنی و گوشت پیدا می‌شود. این پاتوژن یکی از رایج‌ترین عوامل التهاب دستگاه گوارش ناشی از مواد غذایی در غرب و اروپای شمالی است. همچنین دارای بروز فزاینده‌ای در ایالات متحده و کانادا است (۱۵). شیوع بیماری‌های منتقله از مواد غذایی تقریبا با تمام سروتیپ‌های بیماری‌زا همراه است. سروتیپ O۸ خاصیت ذاتی عفونی فاجعه باری برای انسان به همراه دارد در حالی‌که O۹ و O۳ مرتبط با موارد خفیف‌تر هستند (۱۶,۱۵). در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و شیمیایی از مجموع ۴۰۰ نمونه تخم مرغ بومی در ۴۸ مورد (٪۱۲) *یرسینیا انتروکولیتیکا* تشخیص داده شد که تمامی نمونه‌ها درآزمون

www.SID.ir

Archive of SID

PCR نیز مثبت تشخیص داده شدند. از ۴۸ مورد جداسازی شده به روش کشت، ۸ نمونه (۱۶/۶۶٪) سروتیپ O۳ گزارش گردیدند.

پیشرفت‌های اخیر از حساسیت در واکنش خاص PCR سنجشی است برای تشخیص ارگانیسم‌های *یرسینیا* که همراه با افزایش توانایی مطالعه محققان در رابطه با این ارگانیسم در نمونه‌های تازه و ثابت که تا حد زیادی بهبود یافته است. زیرا *یرسینیا انتروکولیتیکا* یک پاتوژن شایع مواد غذایی است و در طیف وسیعی از بیماری‌های دستگاه گوارش نقش دارد. توسعه استفاده از روش PCR می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد که نمونه‌های مثبت *یرسینیا انتروکولیتیکا* را به بیوگروپ‌های ویژه‌ای نسبت دهد که می‌تواند دلالت بر تشخیص‌های معنی‌دار بالینی، تحقیقات میکروبیولوژی و مطالعات اپیدمیولوژیکی باشد (۱۸,۱۷).

در بررسی انجام شده توسط اردوگرول[1] و همکاران (۲۰۰۴) در ترکیه که بر روی تخم بلدرچین صورت گرفت، باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* از محتویات تخم بلدرچین جدا نگردید (۱۹). که در تحقیق حاضر نیز تمامی موارد متعلق به پوسته تخم مرغ می‌باشد. در صورتی که در تحقیق دیگر انجام شده توسط فاویر[2] و همکاران (۲۰۰۵) که در آرژانتین صورت گرفت، آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در پوسته‌های تخم مرغ ۲/۰۲۷٪ گزارش گردید (۲۰). کلیدری و همکاران (۱۳۸۵) توانستند از پوسته تخم مرغ، گونه‌های مختلف *باسیلوس* و *استافیلوکوکوس* جدا کنند که فراوانی باکتری *باسیلوس سرئوس*[3] ۴۴/۱۵٪، *باسیلوس سوبتیلیس*[4] ۶۴/۱۶٪، *باسیلوس پلی میکزا*[5] ۷/۴٪، *باسیلوس کوآگلنس*[6] ۲/۵٪، *استافیلوکوکوس اورئوس*[7] ۵/۷٪ و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیوکوس*[8] ۱۰٪ گزارش گردید. در این تحقیق فراوانی *استافیلوکوکوس ساپروفیتیوکوس* در زرده و کیسه زرده به ترتیب ۳/۳٪ و ۶/۶٪ گزارش گردید. به این ترتیب مشخص گردید که منشا اصلی آلودگی باکتریایی زرده و ایجاد عفونت کیسه زرده، آلودگی پوسته تخم مرغ می‌باشد (۷).

در مطالعه‌ای در آلمان مجموع ۱۵۱ ایزوله *یرسینیا انتروکولیتیکا* مورد مطالعه قرار گرفت. ۱۵۱ سویه‌ی *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از بدن انسان، جانوران و محیط زیست دارای حساسیت آنتی بیوتیکی به ۷۱ آنتی بیوتیک مورد آزمایش بوده‌اند و متعلق به بیوتیپ‌های 1A در ۲۲ نمونه، B (۱۳ نمونه)، بیوتیپ ۲(۱۲ نمونه)، بیوتیپ ۳ (۳۱ نمونه)، بیوتیپ ۴ (۶۳ نمونه) و بیوتیپ ۵ (۱۰ نمونه) بودند. در این تحقیق مشخص گردید که ۹۹٪ از سویه‌های *یرسینیا* مقاوم به آموکسی سیلین می‌باشند، نتایج این مطالعه نشان داد برخی از بتالاکتام‌ها در اغلب موارد یا به طور برجسته در بیوتیپ‌های خاص *یرسینیا* وجود دارند (۲۱).

در تحقیق انجام شده توسط نیسکانن[9] و همکاران (۲۰۰۳) در سوئد ۴۶۸ نمونه مدفوع از ۵۸ گونه مختلف از پرندگان مهاجر در سوئد جمع‌آوری شد. در مجموع ۱۲/۸٪ از گونه‌های *یرسینیا* از نمونه‌ها جداسازی شدند. ۵/۶٪ از رایج‌ترین گونه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* از کل نمونه‌ها جداسازی شدند. به علاوه، ۱۰ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از غازها مربوط بود به بیوسروتیپ O:۳/۳ که باعث بیماری‌های انسانی است. دو تا از گونه‌های بیماری‌زا حامل ژن *virf* در تمام پلاسمیدها بودند (۲۲).

در مطالعه‌ای در هلند PCR دوتایی برای ردیابی ژن‌های هدف *il۱۶srRNA, a* از *یرسینیا انتروکولیتیکا* مورد آزمایش قرار گرفت. برای شناسایی اختصاصی این باکتری، در محیط‌های خالص کشت داده شدند. آزمایش ارزیابی ۲۱۵

[1] Erdogul
[2] Favire
[3] Bacillus cereus
[4] Bacillus subtilis
[5] Bacillus polymexa
[6] Bacillus coagulans
[7] Staphylococcus aureus
[8] Staphylococcus saprophyticus
[9] Niskanen

www.SID.ir

Archive of SID

سویه بالینی *یرسینیا* و ۴۰ سویه از سایر گونه‌های باکتریایی انجام شد. در مدت زمان h ۴ آزمایش، این آزمایش روش‌های خاص، قابل اعتماد و ارزان قیمت جایگزین را که برای سنجش معمولی فنوتیپی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی برای تشخیص *یرسینیا انتروکولیتیکا* انجام می‌شود را ارائه می‌دهد. ویژگی آزمایش PCR دوتایی، جداسازی ژنوم DNA ۲۷ سروگروپ مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* از طریق این آزمایش بود (۲۳).

در مطالعه‌ی انجام شده توسط لمبرتز[1] و همکاران (۲۰۰۸) روش‌های رایجی برای مشخص کردن *یرسینیا انتروکولیتیکا* که به عنوان باکتری مواد غذایی است نشان داده شد که وقت‌گیر و ناکارآمد هستند. بنابراین آن‌ها برای مشخص کردن این عامل بیماری‌زا از روش PCR استفاده کردند. روش کامل شامل غنی سازی به مدت یک شب، استخراج DNA و انجام PCR بود. به علاوه این روش بر روی مواد غذایی آلوده شده مورد آزمایش قرار گرفت. در مجموع ۱۸ نمونه از مجموع ۱۲۵ نمونه از نظر حضور ژن *ail* مثبت بودند (۱۳).

مطالعه لمبرتز و تام[2] (۲۰۰۳) نشان داد که خوک‌ها به عنوان مخزن اصلی *یرسینیا انتروکولیتیکای* منتقله از غذا هستند. گوشت خوک را از یخچال و مغازه‌های محلی که توسط بیماران مبتلا به یرسینیوز خریداری شده بودند جمع‌آوری کردند و برای بررسی حضور گونه‌های یرسینیا مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها از مجموعه روش‌های کشت و PCR مرکب برای شناسایی ژن‌های حدت استفاده کردند (*yst, rfbC, ail, virf*). در مجموع ۱۱۸ نمونه از محصولات گوشت خوک (۹۱ نمونه خام و ۲۷ نمونه آماده به مصرف) جمع‌آوری شد. ٪۹/۸۹ گونه پاتوژن یرسینیا به روش PCR (۹ از ۹۱) در نمونه‌های گوشت خام خوک شناسایی شد اما در هیچ یک از محصولات آماده خوردن وجود نداشت (۲۴).

ترنر[3] و همکاران (۲۰۰۳) آزمایش PCR را برای تشخیص ژن حدت *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *یرسینیا پسودوتوبرکلوزیس* جدا شده از منابع مختلف توسعه دادند. آن‌ها نتایج ژنوتیپی PCR را با هم مقایسه کردند و ۵ ژن مرتبط با حدت از ۱۴۰ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* را در آزمایش‌های فنوتیپی از قبیل بیوتایپینگ و سروتایپینگ و خواص مرتبط با حدت پلاسمید از قبیل کلسیم وابسته به رشد در دمای ۳۷ °C و جذب کنگو قرمز مورد مقایسه قرار دادند.آن‌ها متوجه شدند بین اطلاعات بیوتیپی و ژنوتیپی ارتباط وجود دارد. حضور *ystB* در بیوتیپ ۱A مشخص شد و با این حال ۴۰ نمونه *یرسینیا پسودوتوبرکلوزیس* جدا و برای حضور *inv, yadA, IcrF* مورد آزمایش قرار گرفت. همه‌ی جدا شده‌ها *inv* مثبت بودند و ٪۸۸ از جدایه‌ها دارای ژن حدت پلاسمید *Icrf , yadA* بودند (۲۵).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر آزمایش‌های خاص و حساسی از PCR مرکب برای شناسایی و توصیف صفات اختصاصی گونه‌های پاتوژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* طراحی شد. این تکنیک به عنوان یک ابزار برای شناسایی و بررسی خصوصیات پاتوژن‌های جدا شده از غذا و بیمار مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. وجود *یرسینیا انتروکولیتیکا* در تخم مرغ امکان انتقال این میکروارگانیسم به محیط را نشان می‌دهد و مشخص می‌کند که مرغ‌ها یک منبع مهم این باکتری و یک منبع بالقوه عفونت برای انسان هستند. با این حال مطالعات محدود شده‌ای با توجه به شیوع و خصوصیات *یرسینیا انتروکولیتیکا* وجود دارد. این یافته‌ها این فرضیه را حمایت می‌کند که تخم مرغ یک منبع مهم

[1] Lambertz
[2] Lmbertez and Tham
[3] Thoerner

www.SID.ir

Archive of SID

عفونت‌های دستگاه گوارش ناشی از *یرسینیا انتروکولیتیکا* است و شاید یک مخزن عفونت در ایران باشد. لذا به نظر می‌رسد که کنترل *یرسینیا انتروکولیتیکا* در تخم مرغ برای مدیریت عفونت‌های دستگاه گوارش بسیار مهم باشد.

منابع

۱. ادیب فر پ . ۱۳۷۵. میکروب شناسی پزشکی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول، ۵۲۰-۵۲۴ .

۲. تاج بخش ح. ۱۳۶۸. باکتری شناسی عمومی، انتشارات دانشگاه تهران، ۶۸۹- ۶۹۲.

۳. رضویلر و. ۱۳۷۸. میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ۹۶ - ۱۰۳.

۴. رحیم زاده زراسوندی ع. ۱۳۸۲. جستجوی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر خام و پاستوریزه در استان چهارمحال و بختیاری، دانشکده دامپزشکی، پایان نامه برای دریافت درجه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ۸ - ۴۸.

۵. سلطان دلال م م، ایزدپور ف، خلیفه قلی م، خاتمی مقدم م، حجازی، س‌ح.۱۳۸۲. بررسی *یرسینیا* در گوشت‌های قرمز و مرغ عرضه شده در قصابی‌ها و مرغ فروشی‌های تحت نظارت دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۴۹-۵۶.

۶. قاضی عسگر ح.۱۳۷۳. میکروب شناسی هنری، تالیف دیویدسون، انتشارات اختر شمال، ۱۳۹- ۱۴۱.

۷. کلیدری غ، پورآخونددرزی، ح، هاشمی تبار غ. ۱۳۸۵. جداسازی و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری در تخم مرغ‌های قابل جوجه کشی، مجله تحقیقات دامپزشکی دانشگاه تهران، ص ۱۱۵- ۱۱۸.

8. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. Wolf. 1994: 234-236.

9. Weynants V, Jadot V, Denoel PA, Tibor A, Letesson JJ. Detection of *Yersinia enterocolitica* serogoup O:3 by a PCR method. Journal of Clinical Mcrobial. 1996؛ 34: 1224-1227.

10. Simonova J, Vazlerova M, Stenhauserova I. Detection of pathogenic *Yersinia entrocolitica* serotype O:3 by biochemical, serological, and PCR methods. Czech Journal Food Science. 2007؛ 25: 214-220

11. Jayaro BM, Henning DR. Prevalence of food-born pathogens in bulk tank milk. Journal of Dairy Science. 2000؛ 84 : 215-262.

12. Collee JG, Duguw JP, Fraser AG. Practical Medical Microbiology. 3th edition. Longm an Singapore publishers (LTD). 1998: 266-267.

13. Lambertz ST, Nilsson C, Hallanou S, Lindblad M . Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersiniae enterocolitica* in food. Applied and Environmental Microbiology. 2008؛ 74: 6060-6067.

14. Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe pub. 1994: 234-235.

15. Lamps LW, Havens JM, Gilbtech LJ, Dube PH, Scott MA. Molecular biogouping of pathogenic yersinia entrocolitica development of a diagnostic PCR assay with histologic correlation. American Journal of Clinical Pathology. 2006؛ 125: 658-664.

16. Bottone EJ. *Yersinia entrocolitica* the charisma continues. Clinical Microbiology Reviews . 1997؛ 10(4): 257-276.

17. Havens JM, Montgomery E, geesnon JK. Pathogenic Y. enterocolitica DNA is detected in gastrointestinal malakoplakia. Modern Pathology. 2003؛ 16(8): 1200-1208.

18. Lamps LW, Madhusudhan KT, Greenson JK, Pierce RH, Massol NA, Chiles MC, Dean PJ, Scott MA. The Role of *Yersinia entrocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in ganulomatous appendicitis a histologic and molecular study. The American Journal of Surgical Pathology. 2001؛ 25(9): 508-515.

19. Erdogul Z. Listeria monocytogenes, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella enteritidis* in Quail Eggs. Turkey Journal Veterinary Animal Science. 2004؛ 28(15): 597-601.

20. Favier Gabriela I, Escudero María E, de Guzmán Ana María S. Genotypic and Phenotypic Characteristics of *Yersinia enterocolitica* Isolated from the Surface of Chicken Eggshells Obtained in Argentina. Journal of Food Protection. 2005; 68(14): 1812-1815.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Stock I, Wiedemann B. An in vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *yersinia enterocolitica* and definition of a database. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1999؛ 43: 37-45.

22. Niskanen T, Waldenstrom J, Fredriksson-Ahomaa M, Olsen B, Korkeala H. vir F-Positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *yersinia enterocolitica* found in migatory birds in Sweden. Applied and environmental Microbiology. 2003؛ 69(18): 4670-4675.

23. Wannet WJ, Reessink M, burnings HA, Maas HM. Detection of pathogenic Y.entrocolitica by a rapid and sensitive duplex PCR assay. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39(15): 4483-4486.

24. Thisted Lambertz S, Danielsson-Tham NL. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed- fieldgel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 2005؛ 71(12): 3674-3681.

25. Thoerner P, Bin kingombe CI, Bogil-stuber K, Bissig-Choisat B, Wassenaar T, M-Frey J, jemmi T. PCR detection of virulence genes in *yersinia enterocolitica* and *yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. Applied and Environmental Microbiology. 2003;(23)69: 1810-1816.

www.SID.ir

Archive of SID

The frequency of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from laying eggs consumed in the city of Arak

Rafie Sohrabi [1], Mohsen Panahi dorcheh[2], Elahe Tajbakhsh[3]

1. Department of Veterinary, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran (Correspond author)[*].
2. Department of Veterinary, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3.Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord , Iran.

Abstract

Eggs are one of the common sources of infection transmission to humans and their contamination with germs such as *Yerisina Entrocolitica* may be followed by side-effects of them. The present study is conducted to identify *Yersinia entrocolitica* in eggs based on two methods of culture and PCR. Within a period between January 2015 to May 2016, 400 eggs were bought randomly from egg stores in Arak County and they were tested to identify *Yersinia Entrocolitica* based on bacteriology method. The species of this pathogen were separated and put to PCR test in order to determine *Yersinia entrocolitica*. In all,48 out of 400 sampled eggs, (12%) *Yersinia entrocolitica* was separated based on bacteriology method which in PCR test, 8 out of 48 samples which were reported positive in terms of serotype O3.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, Egg, Arak, Virulence genes, PCR

[*] bahar.vet@gmail.com

www.SID.ir