شناسایی ژن‌های حدت در سروتیپ O:3 باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت بوقلمون به روش PCR در شهرکرد

عطیه حداد سامانی[1]، الهه تاج‌بخش[1]، مریم رئیسی[2*]

۱. دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *maryam_r335 @yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۶

چکیده

امروزه روش‌های مبتنی بر PCR، به‌منظور تشخیص سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* و بررسی ژن‌های حدت پلاسمیدی و کروموزومی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش قادر به ارائه یک توصیف سریع و قابل اطمینان است. در این مطالعه ۳۰۰ نمونه گوشت بوقلمون به‌طور تصادفی از فروشگاه‌های عرضه کننده فراورده‌های گوشتی در شهرستان شهرکرد جمع آوری شد. نمونه‌ها با استفاده از آزمون PCR شناسایی شدند و سپس ردیابی ژن‌های حدت در جدایه‌ها صورت پذیرفت. بر اساس نتایج، ۵۵ جدایه سروتیپ O:3 شناسایی شد که شیوع ژن‌های حدت شامل *yadA*(۳۲/۷۲٪)، *inv*(۱۰۰٪)، *ail*(۳۸/۱۸٪)، *ystA*(۴۰٪) و *virF*(۲۷/۲۷٪) بود. با توجه به افزایش روزمره مصرف گوشت بوقلمون در سطح کشور و احتمال انتقال *یرسینیا انتروکولیتیکا* به انسان، رعایت دقیق اصول نگهداری و عدم مصرف گوشت بوقلمون به‌صورت غیربهداشتی و به‌کارگیری آزمون PCR جهت شناسایی مستقیم آلودگی در مواد غذایی به‌عنوان یک روش سریع، دقیق و اختصاصی توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: آزمون PCR، ژن‌های حدت، گوشت بوقلمون، *یرسینیا انتروکولیتیکا*

مقدمه

بیماری‌های زیادی از طریق غذا قابل انتقال هستند و این مهم در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته نگرانی‌های زیادی را در امر بهداشت عمومی به وجود آورده است (Schlundt, et al., 2002). *یرسینیا انتروکولیتیکا* یک باکتری گرم منفی متعلق به جنس یرسینیا و خانواده انتروباکتریاسه است. جنس یرسینیا دارای ۱۲ گونه است که *یرسینیا پستیس*، *سودوتوبرکلوزیس* و *انتروکولیتیکا* سه جنس بیماری‌زا در انسان به شمار می‌روند. *یرسینیا انتروکولیتیکا* به‌طور گسترده‌ای در سراسر محیط توزیع شده و از شیر خام، آب آلوده و فاضلاب، خاک، غذاهای دریایی، انسان و بسیاری از حیوانات خونگرم، مانند مرغ و خوک جدا شده است. سروتیپ‌های O:3، O5,27، O8 و O9 *یرسینیا انتروکولیتیکا* به‌عنوان شایع‌ترین سروتیپ‌های عامل بیماری در انسان شناخته شده‌اند (Wannet et al., 2001). مشاهده شیوع بالای بیماری‌های دستگاه گوارش از جمله موارد منجر به مرگ مربوط به *یرسینیوز* در بسیاری از کشورهای در حال توسعه از جمله بنگلادش (Butler et al., 1984)، عراق (Kanan et al., 2009)، ایران (Soltan-Dallal et al., 2004) و نیجریه (Okwori et al., 2009) نشان می‌دهد مشکلات اساسی ایمنی مواد غذایی در کشورهایی با درآمد کم و متوسط شیوع بیشتری دارد (Okwori et al., 2009). هدف از انجام آزمون‌های فنوتیپی (مورفولوژی، رنگ و پیگمان کلنی، رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، آزمون‌های بیوشیمیایی شامل محیط‌های قندی و آزمایش‌های افتراقی) شناسایی و تایپینگ زیر گونه‌های بیماری‌زا یرسینیا است. *یرسینیا انتروکولیتیکا* عمدتاً به بیوتیپ 1A که غیربیماری‌زا است (Bottone et al., 1997) و بیوتیپ‌های بیماری‌زا 1B، 2، 3، 4 و 5 *یرسینیا سودوتوبرکلوزیس* تقسیم می‌شوند. به‌طور کلی طبقه‌بندی سرولوژی و بیوشیمیایی وقت‌گیر است و معمولاً در آزمایشگاه در دسترس نیستند. آزمون‌های فنوتیپی شامل رشد

Archive of SID

www.SID.ir

وابسته به کلسیم در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (Kaneko et al., 1987)، اتصال قرمز کنگو (Thoerner et al., 2003)، آزمون پیرازین‌آمیداز، آزمون آگلوتیناسیون و آزمایش مقاومت در برابر سرم (Thoerner, 2003; Weynants et al., 1996; and Nakajima,1992) ارزش پیش‌بینی بیماری‌زایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* را محدود کرده‌اند و نتایج این آزمون‌ها غالباً مبهم و غیرقابل اعتماد هستند چون حضور و بیان آن‌ها به ژن‌های حدت بستگی دارد و پلاسمید حدت PYV بسته به شرایط کشت می‌تواند به‌راحتی از بین برود (Thoerner et al., 2003)؛ بنابراین، تمایز سویه‌های بیماری‌زا تنها بر بیان و یا تشخیص پلاسمید حدت متکی نیست، بلکه به تشخیص فاکتورهای بیماری‌زایی کروموزومی نیز بستگی دارد. تشخیص بیماری‌زایی و عفونت‌های ناشی از *یرسینیا انتروکولیتیکا* در جداسازی باکتری از غذا و نمونه‌های بالینی است (Thoerner et al., 2003). یکی از روش‌های سریع برای تشخیص گونه‌های بیماری‌زای یرسینیا، تکنیک PCR است (Fenwick et al., 1991). در مطالعات دیگر، از روش PCR برای تشخیص *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *سودوتوبرکلوزیس* و همچنین افتراق بین این دو گونه استفاده شده است (Nakajima et al., 1992; and Weynants, 1996). در حال حاضر، اطلاعات مربوط به شیوع گونه‌های *یرسینیا* در غذاها در ایران محدود است؛ بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی ژن‌های حدت در سروتیپ O:3 باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت بوقلمون به روش PCR در شهرکرد انجام گرفت.

روش کار

نمونه‌گیری و جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا*

این مطالعه مقطعی طی بهمن‌ماه ۱۳۹۱ تا خرداد ۱۳۹۲ در چهار منطقه شمال، جنوب، شرق و غرب شهرستان شهرکرد انجام گرفت. در این مطالعه تعداد ۳۰۰ نمونه گوشت بوقلمون به میزان ۲۵ گرم، از فروشگاه‌های عرضه کننده گوشت اخذ شد و نمونه‌ها تحت شرایط سترون به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند. سپس نمونه‌ها به محیط سالین بافر فسفات (Phosphate Buffered Saline یا PBS) که حاوی قند سوربیتول و املاح صفراوی با PH=۷/۲ بود، انتقال داده شدند. محیط‌های کشت حاوی نمونه‌ها به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند و در روز ۲۱ پس از انتقال به محیط KOH (۰/۲۵ درصد) به مدت ۳۰ ثانیه، بر روی محیط‌های انتخابی سفزولودین ایرگاسان نووبیوسین آگار (Cefsulodin-irgasan-novobiocin Agar یا CIN آگار) همراه ساپلمنت (مرک، آلمان) و مک کانکی آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. پس از طی مدت ۳۶ ساعت نگه‌داری و خالص نمودن در دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس بر روی پرگنه‌های مشکوک به رنگ قرمز با مرکز تیره‌تر و حاشیه‌های شفاف (مشخصات پرگنه‌ها روی محیط CIN آگار)، آزمون‌های افتراقی مانند لیزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، اوره، سیترات، حرکت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تخمیر قندها انجام شد (شاکریان، ۱۳۹۰).

آزمون PCR جهت تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا*

آزمایش PCR به‌منظور تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در حضور زوج پرایمرهای طراحی شده زیر در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۱ میکرولیتر dNTP (سینا ژن، ایران)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$، ۲ میکرولیتر پرایمرهای F و R، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلی‌مراز (سینا ژن، ایران) و ۳۲/۷ میکرولیتر آب مقطر بود با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۶ دقیقه،۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۹ درجه ۷۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۸۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۷ دقیقه انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده باند ۳۶۱ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن این آزمون بود (Thoerner et al., 2003).

Y. entF: 5'-
ACCTTTGTGATTGACGTTACTCGC -3'
Y. entR: 5'-
CAAGTCGACATCGTTTACAGCG -3'
Accesion No: FN561632

آزمایش PCR جهت ردیابی ژن‌های حدت در سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا*

به‌منظور ردیابی ژن‌های حدت در باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* در جدایه‌های یرسینیا، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA ژنومی جدایه‌ها را با استفاده از روش جوشاندن (Boiling)، استخراج و آزمایش PCR روی DNA تخلیص شده انجام گرفت:

ردیابی ژن‌های *ail* ، *inv*، *yadA*، *virF* و *ystA* در جدایه‌ها با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام گرفت. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده (در ژن‌های *virF* و *ystA* ۴ میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۱ میکرولیتر dNTP (در ژن‌های *virF* و *ystA* ۲ میکرولیتر) (سینا ژن، ایران)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$، ۳ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلی‌مراز (سینا ژن، ایران) و ۳۰/۷ میکرولیتر (در ژن‌های *virF* و *ystA* ۳۲/۷ میکرولیتر) آب مقطر تنظیم و برای ژن‌های *ail* ، *inv*، *yadA* با برنامه‌ی حرارتی ۹۵ درجه ۴ دقیقه یک سیکل، ۳۳ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۵۰ ثانیه، ۵۶ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۷۰ ثانیه و برای ژن‌های *virF* و *ystA* با برنامه حرارتی ۹۴ درجه ۶ دقیقه یک سیکل، ۳۳ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد (Thoerner et al., 2003).

بعد از انجام آزمایش‌های PCR، محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویربردار از ژل (یووی تک، انگلستان) مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های حدت در سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا* (Thoerner et al., 2003)

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر (۳'-۵')	اندازه محصول (bp)
inv	*Yc1*	CTGTGGGGAGAGTGGGGAAGTTTGG	۵۷۰
	Yc2	GAACTGCTTGAATCCCTGAAAACCG	
ail	*Ail1*	ACTCGATGATAACTGGGGAG	۱۷۰
	Ail2	CCCCCAGTAATCCATAAAGG	
ystA	*Pr2a*	AATGCTGTCTTCATTTGGAGCA	۱۴۵
	Pr2c	ATCCCAATCACTATGACTTC	
virf	*Virf1*	TCATGGCAGAACAGCAGTCAG	۵۹۰
	Virf2	ACTCATCTTACCATTAAGAAG	
yadA	yadA1	CTTCAGATACTGGTGTGCGCTGT	۸۴۹
	yadA2	ATGCCTGACTAGGAGCGATATCC	

نتایج

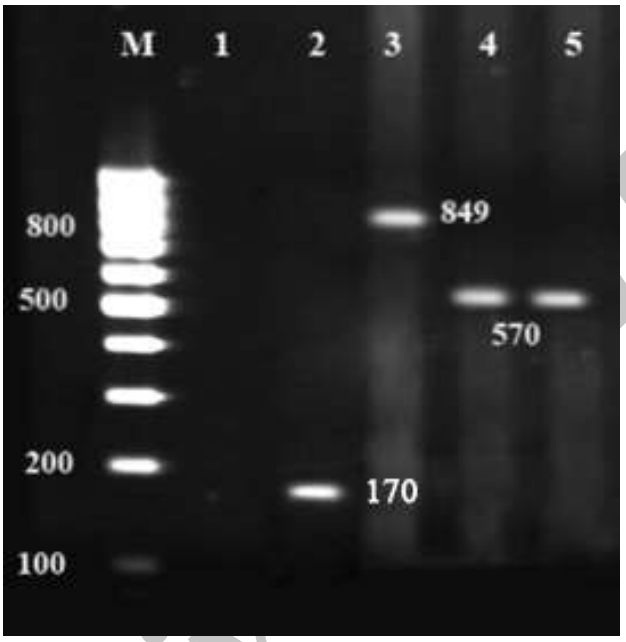
همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است از مجموع ۳۰۰ نمونه مورد مطالعه در ۵۵ مورد *یرسینیا انتروکولیتیکا* از گوشت بوقلمون جدا شد و با انجام آزمایش PCR وجود قطعی آلودگی به اثبات رسید. در این بررسی ژن‌های *inv* (۱۰۰٪) و *virF* (۲۷/۲۷٪) به ترتیب با بیشترین و کمترین فراوانی یافت شدند. الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن‌های *ail*، *inv*، *yadA*، *virF* و *ystA* در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند.

Archive of SID

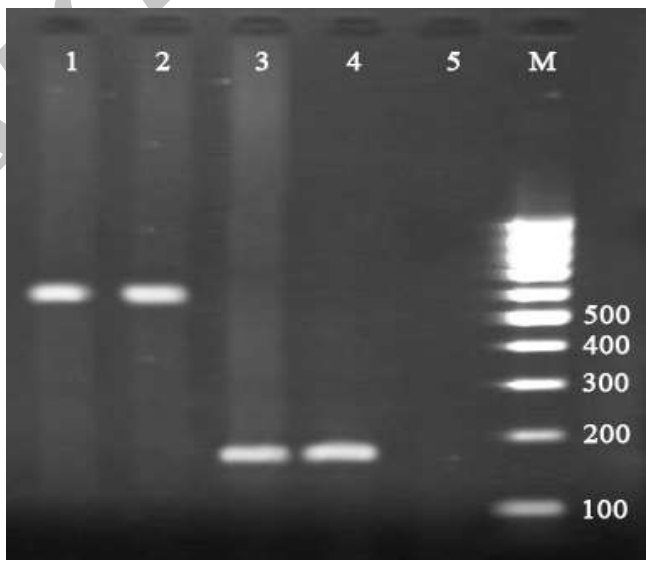
www.SID.ir

جدول ۲- شیوع ژن‌های حدت سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت بوقلمون

ژن	تعداد نمونه‌های مثبت (درصد)
yadA	۱۸ (٪۳۲/۷۲)
inv	۵۵ (٪۱۰۰)
ail	۲۱ (٪۳۸/۱۸)
ystA	۲۲ (٪۴۰)
virF	۱۵ (٪۲۷/۲۷)



شکل ۱- الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن‌های *ail*، *inv* و *yadA* جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت بوقلمون
ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: قطعه ۱۷۰ جفت بازی مربوط به ژن *ail*، ستون۳: قطعه ۸۴۹ جفت بازی مربوط به ژن *yadA*، ستون ۴ و ۵: قطعه ۵۷۰ جفت بازی مربوط به ژن *inv*



شکل ۲- الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن‌های *ystA* و *virF* جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت بوقلمون
ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱ و ۲: قطعه ۵۹۰ جفت بازی مربوط به ژن *virF*، ستون ۳ و ۴: قطعه ۱۴۵ جفت بازی مربوط به ژن *ystA*، ستون ۵: کنترل منفی

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

یرسینیا انتروکولیتیکا یک باکتری بیماری‌زا گرم منفی قابل انتقال از طریق مواد غذایی است که در آب، فرآورده‌های لبنی و گوشت یافت می‌شود. این باکتری یکی از شایع‌ترین عوامل التهاب دستگاه گوارش در غرب و اروپای شمالی است و دارای بروز فزاینده‌ای در ایالات متحده و کانادا است (Rahman, 2011 and 2006; ،Lamps 2007 ،Najdenski et al., Kwaga, 2006; ،Vazlerova).

شیوع بیماری‌های منتقله از مواد غذایی توسط *یرسینیا انتروکولیتیکا* تقریباً با تمام سروتیپ‌های بیماری‌زا همراه است. سروتیپ O:8 خاصیت ذاتی عفونی فاجعه‌باری برای انسان به همراه دارد در حالی که سروتیپ‌های O:3 و O:9 مرتبط با موارد خفیف‌تر هستند (Fukushima and Bancerz et al., 2011 et al., 2011;). مطالعه‌ی حاضر برآوردی از شناسایی و بررسی حضور ژن‌های حدت این باکتری بود. با توجه به این که مسئله بهداشت مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است تاکنون مطالعه‌ای برای شناسایی ژن‌های حدت در سروتیپ O:3 باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت بوقلمون به روش PCR در ایران و کشورهای مختلف صورت نگرفته است ولی محققین توانسته‌اند باکتری‌های مختلفی که از طریق مواد غذایی انتقال می‌یابند همانند *یرسینیا*، *سالمونلا* و *کمپیلوباکترژژونی* را از مواد غذایی جدا نمایند (اشرفی، ۱۳۸۸). اغلب جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* از مواد غذایی یا موارد بالینی دارای دو ویژگی است. ابتدا توانایی نفوذ این باکتری به دیواره روده که تصور می‌شود توسط ژن‌های پلاسمید حدت ۷۰ کیلو بازی (pYV/pCD) کنترل می‌شود که در گونه‌های غیربیماری‌زا وجود ندارد. دوم اینکه تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت است که توسط ژن‌های کروموزومی (*ystA*، *ystB* و *ystC*) کنترل می‌شود (Sabina et al., 2011). این نکته شایان ذکر است که ژن‌های *virF* و *yadA* از جمله ژن‌های پلاسمیدی *یرسینیا انتروکولیتیکا* می‌باشند. مشخص گردیده ژن *virF* نقش تنظیمی در پلاسمید ویرولانس دارد اگرچه ممکن است این پلاسمید در اثر کشت‌های مکرر از بین برود. بیان ژن *yadA* در باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* توانایی اتصال باکتری به سطوح سلول میزبان را افزایش می‌دهد و از طرف دیگر به باکتری این امکان را می‌دهد که از دسترس سیستم کمپلمان و سایر اجزای سیستم ایمنی فرار کند (Juliana et al., 2006). با توجه به اهمیت این ژن‌ها در ویرولانس باکتری در مطالعه حاضر فراوانی حضور این ژن‌ها در *یرسینیا انتروکولیتیکا* بررسی شده است.

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Lambertz et al. (2005) انجام شد مشخص شد که خوک‌ها به‌عنوان مخزن اصلی *یرسینیا انتروکولیتیکا* منتقله از غذا هستند. این محققین 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. از مجموع ۱۱۸ نمونه از محصولات گوشت خوک (۹۱ نمونه خام و ۲۷ نمونه آماده به مصرف) در ۹ مورد (۹/۸۹٪) گونه‌ی پاتوژن یرسینیا شناسایی شد و سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ۶ مورد به روش PCR شناسایی شد.

مطالعه انجام شده دیگری نشان می‌دهد که سویه‌های پاتوژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* باید واجد تمامی ژن‌های ویرولانس (کروموزومی و پلاسمیدی) باشند؛ که در این بررسی تنها ژن *inv* در تمامی سویه‌های پاتوژن وجود دارد و بقیه ژن‌های ویرولانس به میزان کمتری وجود دارند یا اصلاً وجود ندارند؛ بنابراین برای ایجاد بیماری‌زایی توسط این باکتری وجود تمامی ژن‌های ویرولانس ضروری نیست و چگونگی ایجاد بیماری توسط این باکتری به بیوتیپ و سروتیپ این باکتری

Archive of SID

www.SID.ir

بستگی دارد (Warren et al., 2005). وجود *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت طیور نشانه حامل بودن گوشت به این میکروارگانیسم است و امکان توزیع این میکروارگانیسم به محیط زیست وجود دارد. این امر نشان می‌دهد که جوجه‌ها یک مخزن مهم باکتریایی و یک منبع بالقوه برای عفونت‌های انسانی محسوب می‌شوند.

در بررسی انجام شده توسط Zheng et al. (2008) که بر روی ۱۶۰ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از مدفوع انسانی صورت گرفت، فراوانی ژن‌های *inv* (۱۰۰٪)، *ail* (۹۴٪)، *ystA* (۹۳٪)، *yadA* (۸۹٪) و *virF* (۸۲٪) گزارش گردید که این میزان در بررسی ما شامل ژن‌های *inv* (۱۰۰٪)، *ail* (۳۸/۱۸٪)، *ystA* (۴۰٪)، *yadA* (۳۲/۷۲٪) و *virF* (۲۷/۲۷٪) بود که ژن‌های حدت در بررسی ما شیوع کمتری دارند و تنها ژن حدت *inv* (۱۰۰٪) در این بررسی و بررسی ما مطابقت دارند.

در مطالعه‌ای که توسط Lambertz et al. (2008) بر روی ۱۲۵سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* صورت گرفت، ۱۸ نمونه از مجموع ۱۲۵ نمونه از نظر حضور ژن *ail* مثبت بودند ولی در بررسی ما ژن *ail* در ۲۱ نمونه (۳۸/۱۸٪) یافت شد که شیوع این ژن در بررسی ما بیشتر است.

در مطالعه‌ای که توسط Amin Aske et al. (2013) در مصر بر روی ۴۶ نمونه شیر گاو ورم پستان تحت بالینی برای بررسی ژن *virF* انجام شد، با استفاده از روش PCR ژن *virF* در ۱۸ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* شناسایی شد که ژن *virF* مثبت فقط در (۵۵/۶٪) ۱۰ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* وجود داشت ولی در بررسی ما شیوع این ژن در ۱۵ نمونه (۲۷/۲۷٪) بود که نسبت به این بررسی از شیوع کمتری برخوردار است.

در مطالعه‌ای که توسط Peruzy et al. (2017) باهدف بررسی توزیع ژن‌های ویرولانس *yadA* ، *virF*، *inv*، *ystA*، *ystB*، *myfA*، *hreP* و *ymoA* در سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* با استفاده از روش SYBR Green real-time PCR که از ژن‌های هدف *یرسینیا انتروکولیتیکا* به‌عنوان کاوشگر خاص استفاده می‌شود تا بتوانند *یرسینیا انتروکولیتیکا* را در نمونه‌های مواد غذایی تشخیص دهند، انجام شد. در این بررسی در مجموع ۱۶۱ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* از ۸ کشور جدا شد که این سویه‌ها به بیوتیپ‌های 1A، ۲ (سروتیپ O:3، O:5 و O:9)، ۳ (سروتیپ O:3 و O:9) و ۴ (سروتیپ O:3) تقسیم بندی شدند که در این بررسی رایج‌ترین ژن حدت در *یرسینیا انتروکولیتیکا* ژن *ystA* است که این ژن به‌عنوان بهترین ژن هدف جهت بررسی بیوتیپ‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نظر گرفته می‌شود.

شناسایی و تعیین خصوصیات *یرسینیا انتروکلیتیکا* جدا شده از گوشت مرغ خام بر اساس تکنیک‌های مولکولی و بیولوژیکی توسط Momtaz et al. (2013) انجام شد. در این بررسی در مجموع ۷۲۰ نمونه گوشت مرغ به‌صورت تصادفی از کشتارگاه‌های غرب ایران جمع آوری شد و توسط روش کشت و PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. از این تعداد ۱۳۲ (۱۸/۳۳٪) نمونه برای *یرسینیا انتروکولیتیکا* با استفاده از هر دو روش (کشت و PCR) مثبت شد. جدایه‌ها شامل بیوتیپ 1A (۰٪)، 1B (۰٪)، ۲ (۱۸/۱۸٪)، ۳ (۵۲/۲۷٪)، ۴ (۱۷/۴۲٪) و ۵ (۱۲/۱۲٪) و سروتیپ‌ها شامل O:3 (۳۶/۸۴٪)، O:5,27 (۵۹/۸۴٪)، O:8 (۵/۳۰٪) و O:9 (۰٪) بود. از ۴۶ سروتیپ O:3 جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* شیوع ژن‌های حدت شامل *yadA* (۸۲/۶۰٪)، *inv*(۱۰۰٪)، *ail* (۹۵/۶۵٪)، *ystA* (۹۳/۴۷٪) و *virF* (۵۸/۶۹٪) بود. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که گوشت مرغ می‌تواند یکی از منابع بالقوه عفونت *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ایران باشد این بررسی مشابه بررسی ما ژن *inv* (۱۰۰٪) بیشترین شیوع را در بین سایر ژن‌های حدت در *یرسینیا انتروکولیتیکا* دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

در بررسی انجام شده دیگری توسط Alavi Aske et al. (2017) تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام (۸۴ نمونه شیر گوسفند و ۱۶ نمونه شیر بز) از مناطق مختلف شهرستان شهرکرد جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به روش میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند و سپس جدایه‌ها با استفاده از تکنیک PCR بررسی شدند. پس از آن ۵٪ سویه‌ها (شیر گوسفند) به‌عنوان بیوسروتیپ O:3 مثبت تأیید شدند که ژن *ail* در ۴ سویه، ژن *yadA* در ۳ سویه و ژن *virF* و *ystA* در ۲ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* یافت شد. در این بررسی ژن *ail* با ۴ سویه بیشترین شیوع را در بین سایر ژن‌ها دارد.

در مجموع نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه آن با سایر تحقیقات انجام شده در ایران و جهان نشان می‌دهد که اختلاف شیوع ژن‌های حدت در سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از موارد مختلف می‌تواند به دلیل گوناگونی موقعیت جغرافیایی، چگونگی و نوع روش بررسی، نوع و تعداد نمونه‌های اخذ شده، فصل سال و نمونه‌گیری موارد آلوده و غیر آلوده نسبت داد. لذا استفاده از روش مولکولی نظیر PCR جهت ردیابی سریع ژن‌های حدت در باکتری‌ها از جمله *یرسینیا انتروکولیتیکا* ضروری به نظر رسیده و نتایج حاصل از این کار می‌تواند در انتخاب دقیق آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان و جلوگیری از گسترش عفونت‌های انسانی کارگشا باشد.

منابع

۱. اشرفی، فاطمه. (۱۳۸۸). بررسی میزان آلودگی گوشت قرمز و مرغ عرضه شده در فروشگاه‌های مواد غذایی، شهرستان شمیران به باکتری یرسینیا. فصلنامه میکروب شناسی، دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۵۲-۴۹.

۲. شاکریان، امیر.، شریف زاده، علی.، آقانژاد، پیمان.، تاجمیر ریاحی، مهران.، صالحی، الهام. (۱۳۹۰). بررسی آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت گاو، گوسفند و طیور عرضه شده در سوپرمارکت‌های شهرستان شهرکرد. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۱۱-۱۵.

3. Alavi, S. M., Rahimi, E., Tajbakhsh, E. 2017. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in raw small ruminant milk in Shahrekord, Iran. Bulg J Vet Med. 2-7.

4. Amin Askr, A.A., Ahmed Abd El Aal, S.F., Amer, E.H. 2013. Prevalence of virulent *Yersinia enterocolitica* in subclinical mastitic cow milk in Sharkia Governorate. Life Sci J. 3:1285-1294.

5. Bancerz, A., Szczreba, A., platt, A. 2011. Isolation, Biotyping and serotping of *Yersinia entercoliica*. Bull Vet Inst Pulawy 55: 39-43.

6. Bottone, E. 1997. *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. Clin Microbiol Rev. 10:257–276.

7. Butler, T., Islam, M., Islam, M.R., Azad, A.K., Huq, M.I., Speelman, P., Roy, S.K. 1984. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and Y. intermedia from fatal cases of diarrhoeal illness in Bangladesh. Trans Royal Soc Tropic Med Hyg. 78:449–450.

8. Fenwick, S.G., and A., Murray. 1991. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction. Lancet. 337:496–497.

9. Fukushima, H., Shimizu, S., Inatsu, Y. 2011. *Yersinia enterocolitica* and *Yersina pseudotuberculosis* detection in food. J path. 10:2-9.

10. Juliana, P., Falcao, D.P., Pitondo-Silva, F.A., Malaspina, A.C., Brocchi, M. 2006. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and foodorigins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. J Med Microbiol. 55: 1539–1548.

11. Kanan, T.A., Abdulla, Z. A. 2009. Isolation of *Yersinia spp.* from cases of diarrhoea in Iraqi infants and children. East Mediterranean Health J. 15:276–284.

12. Kaneko, S., and T., Maruyama. 1987. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O3 biotype 3 strains. J Clin Microbiol. 25:454–455.

Archive of SID

www.SID.ir

human sources in the Plateau State of Nigeria. Food Microbiol. 26:872–875.
21. Peruzy, M.F., Murru, N., Perugini, A.G., Capuano, F., Delibato, E., Mercogliano, R., Korkeala, H., Proroga ,Y.T. (2017). Evaluation of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains using SYBR Green real-time PCR. Food Microbiol. 65:231-235.
22. Rahman, A., Bonny, T.S., Stonsaovapak, S., Ananchaipattana, C. 2011. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological studies and outbreaks. J Path. 2011:1–11.
23. Schlundt, J. 2002. New directions in foodborne disease prevention. Int J Food Microbiol. 78:3–17.
24. Sabina, Y., Rahman, A., Chandra Ray, R., Montet, D. 2011. *Yersinia enterocolitica*: Mode of transmission,molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. J Path. 2011:1-10.
25. Soltan-Dallal, M.M., Moezardalan, K. 2004. Frequency of *Yersinia* species infection in paediatric acute diarrhoea in Tehran. East Mediterranean Health J. 10:152–158.
26. Thoerner, P., Bin Kingombe, C.I., Bogli-Stuber, K., Bissig-Choisat, B., Wassenaar, T.M., Frey, J., Jemmi, T. 2003. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. Appl Env Microbiol. 69:1810–1816.
27. Vazlerova, M., and I.,Steinhauserova. 2006. The comparison of the methods for the identification of pathogenic serotypes and biotypes of *Yersinia enterocolitica*: Microbiological methods and PCR. Czech J Food Sci. 24:217–222.
28. Wannet, W.J., Reesink, M., Brunings, H.A. Maas, H.M. 2001. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. J.Clin Microbiol. 39: 4483-4486.
29. Warren, S.M., and G.X., Young. 2005. An amino ytermila secretion signal is requires for YPLA export by the *Yas*, *YSC*, and flagellar type III secrection systems of
13. Kwaga, J., Iversen, J.O., Misra, V. 1992. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probes. J clin microbial. 10: 2668-2673.
14. Lambertz, S.T., Danielsson-Them, M.L. 2005. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. Appl Env Microbiol. 71: 3674-3681.
15. Lambertz, S.T., Nilsson, C., Hallanvuo, S., Lindblad, M. 2008. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. Appl Env Microbiol. 74: 6060-6067.
16. Lamps, L.W., Havens, J.M., Gilbrech, L.J., Dube, P.H., Scott, M.A. 2006. Molecular biogrouping of pathogenic *Yersinia enterocolitica*: development of a diagnostic PCR assay with histologic correlation. American J clin patjol. 125: 658-664.
17. Momtaz, H., Rahimian., D., Safarpoor Dehkordi, F. 2013. Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from raw chicken meat based on molecular and biological techniques. J App Poul Res. 22(1): 138-145.
18. Najdenski, H., lteman, I. and Carniel, E.2007. Efficient subtyping of pathogenic *Y. enterocolitica* strains by pulsed-fielddgel electerophoresis. Jour30-Nesbakken T, Iversen. lium B. pig herds free from human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Emerg Infect Dis. 13:1860-1864.
19. Nakajima, H., Inoue, M., Mori, T., Itoh K., Arakawa, E., Watanabe, H. 1992. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. J Clin Microbiol. 30:2484–2486.
20. Okwori, A., Martínez, P.O., Fredriksson Ahomaa, M., Agina, S.E., Korkeala, H. 2009. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 2/O:9 and *Yersinia pseudotuberculosis* 1/O:1 strains isolated from human and non-

Archive of SID

www.SID.ir

Yersinai enterocolitica biovar 1B. J Bacteriol. 17: 6075-6083.
30. Weynants, V., Jadot, V., Denoel, P.A., Tibor, A., Letesson, J.J. 1996. Detection of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 by a PCR method. J clin microbial. 34:1224–1227.
31. Zheng, H., and Y., Sun. 2008. Investigation of virulence gence in slinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. Med Microbiol. 53:368-374.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of virulence genes in serotype O:3 *Yersinia enterocolitica* isolated from turkey meat by PCR method in Shahrekord

Hadad A[1], Tajbakhsh E[1], Reisi M[2]*

1. Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2. Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

***Corresponding author:** *Maryam_r335@yahoo.com*

Received: 7 September 2017 Accepted: 7 November 2017

Abstract

Nowadays PCR-based methods are being used in order to detect *Yersinia enterocolitica* strains, plasmids and chromosomal virulence genes. In this study, 300 samples of turkey meat were collected randomly from retial market in Shahrekord. The isolates and the virulence genes of the isolates were detected using PCR method. According to the results, 55 serotypes O:3 were identified, and the prevalence of virulence genes were as follows: *yadA* (32.72%), *inv* (100%), *ail* (38.18%), *ystA* (40%), and *virF* (27.27%). Due to the increased consumption of turkey meat in the country and the possibility of *Y. enterocolitica* transfer to humans, it is recommended to carefully observe storage principles, avoid use of undercooked turkey meat and also applying PCR test for direct identification of contamination in food as a quick, accurate and specific technique is recommended.

Keywords: PCR method, Turkey meat, Virulence genes, *Yersinia enterocolitica*

Archive of SID

www.SID.ir