https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 2322-5173
12rd Year, Vol. 12, No. 47, Autumn 2023 pp. 63-76
Received: 20.09.2023 Accepted: 07.11.2023

(Research Paper)

Virulence Genes and Antibiotic Resistance Pattern of *Yersinia Entrocolitica* Isolated from Raw Milk and Traditional Cheeses*

Frough Salimi
MSc, Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
foroogh.salimi222@gmail.com

Mojtaba Bonyadian *
Professor, Department of Health and Food Quality Control, Institute of Zoonoses Research, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
boniadian@sku.ac.ir

Hamdallah Moshtaghi
Professor, Department of Health and Food Quality Control, Institute of Zoonoses Research, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
moshtaghi@sku.ac.ir

Abstract

Introduction: Pathogenic microorganisms are one of the important factors in contaminating and endangering the safety of foods for consumers, and continuous control of foods in terms of the presence of pathogenic microorganisms can guarantee the health of foods. *Yersinia entrocolitica* is a foodborne pathogenic bacterium. Raw milk and fresh traditional cheese may be contaminated with this bacterium. Generally, Iranians tend to consume traditional and homemade foods more than industrial products. This issue is especially relevant to milk products such as cheese, butter, and local cream. The purpose of this study was to determine the contamination of raw milk and traditional cheeses produced in Chaharmahal and Bakhtiari province with *Yersinia entrocolotica*.

Materials and Methods: A total, of 100 raw milk and 50 traditional cheese samples were obtained randomly from dairy plants and milk collection stations, as well as retail shops. The initial enrichment of the samples was performed in the TSB medium. Then, 100 microliters of the medium was centrifuged and 25 microliters of its sediment was cultured on the special medium of Cefsoludin Irgazan Novobiocin agar (CIN) with supplement (containing Cefsoludin 7.5 mg,

* Corresponding Author

2322-5181/ © 2023 The Authors

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

Salimi F., Bonyadian M., and Moshtaghi H. Virulence Genes and Antibiotic Resistance Pattern of *Yersinia Entrocolitica* Isolated from Raw Milk and Traditional Cheeses. *Journal of Microbial Biology*, 2023; 12 (47): 63-76.
http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562

Irgasan 0.2 mg and Novobiocin 1.25 mg). Suspicious colonies (red colonies) were identified on the CIN agar and biochemical tests including IMViC, Ureas, and H2S production.

DNA extraction was performed by boiling method and polymerase chain reaction (PCR) was performed for the identification of *Ali* and *Yst* genes using specific primers (Table 1).

Table 1. Characteristics of Primers Used to Identify *Yersinia Enterocolitica* Genes

Primers	Sequence (5”-3)	Product length (bp)	Annealing T
Ail	F: GTT TAT CAA TTG CGT CTG TTA ATG TGT ACG R: CTA TCG AGT TTG GAG TAT TCA TAT GAA GCG	454	64°c
Yst	F: AAT GCT GTC TTC ATT TGG AGC R: ATC CCA ATC ACT ACTGAC TTC	145	54°c

Antibiotic resistance test was performed by the disk diffusion method on Muller-Hinton agar according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Resistance of *Yersinia enterocolitica* isolates to 7 commonly used antibiotics in treatment including cefixime (5µg), gentamicin (10µg), tryptoprim (5µg), ciprofloxacin (5µg), amoxicillin (10µg), tetracycline (30µg), and sulfamethoxazole (300µg).

Research Findings: Out of 100 samples of raw milk and 50 samples of traditional cheese, 20 samples (13.3%) suspected *Yersinia enterocolitica* bacteria were isolated. of these, 14 samples (14%) were related to raw milk samples and 6 samples (12%) were related to traditional cheese samples. The results of the PCR test showed that 5 isolates (3.3%) were *Y. enterocolitica* bacteria, 4 isolates (4%) related to raw milk, and 1 isolate (2%) related to traditional cheese. In addition, in the evaluation of virulence genes, it was found that out of 4 raw milk isolates, 1 isolate carried the *Yst* gene, 2 isolates carried the *Ail* gene, and 1 isolate had both genes. Also, 1 isolate of *Y. enterocolitica* isolated from traditional cheeses carried the *Ail* gene (Table 2).

Table 2. Percentage of Contamination of Raw Milk and Traditional Cheese with *Yersinia entrocolitica*, (%)

Samples	No	Suspected isolates	Confirmed by PCR	Isolates carried *yst* gene	Isolates carried *ail* gene	Isolates carried *yst* and *ail* genes
Raw milk	100	14(14)	4(4)	1(25)	2(50)	1(25)
Cheese	50	6(12)	1(2)	0	1(100)	0
Total	150	20(13.3)	5(3.3)	1(20)	3(60)	1(20)

The results of antibiogram tests on *Yersinia enterocolitica* isolates showed the highest resistance to Gentamicin, Trimethoprim, Ciprofloxacin, and Sulfamethoxazole antibiotics, and moderate resistance to cefixime and amoxicillin (Table 3).

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562

Table 3. Antibiotic Resistance Pattern of *Yersinia Entrocolitica* Isolated from Raw Milk and Traditional Cheese

Antibiotics	Resistance Pattern %		
	Resistance	Semi Resistance	Susceptible
Cefixime	0	66.67	33.33
Gentamicin	100	0	0
Trimethoprim	100	0	0
Ciprofloxacin	100	0	0
Amoxicillin	0	66.67	33.33
Tetracycline	66.67	0	33.33
Sulfametoxazole	100	0	0

Discussion and Conclusion: In general, the results of the present study and other studies in Iran and the world show that raw milk and traditional cheeses, contaminated with *Yersinia enterocolitica*, which carry virulence genes and are resistant to some common antibiotics, can endanger the health of consumers.

Key words: Raw Milk, Traditional Cheese, *Yersinia Entrocolitica*, Virulence Genes, Antibiotic Resistanc.

زیست‌شناسی میکروبی
سال دوازدهم، شماره ۴۷، پاییز ۱۴۰۲، صفحه ۶۳- ۷۶
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۶

مقاله پژوهشی

الگوی ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداشده از شیر خام و پنیرهای سنتی*

فروغ سلیمی: کارشناسی ارشد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران fooogh.salimi222@gmail.com
مجتبی بنیادیان *: استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، پژوهشکده بیماری‌های مشترک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران boniadian@sku.ac.ir
حمداله مشتاقی: استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، پژوهشکده بیماری‌های مشترک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران moshtaghi@sku.ac.ir

چکیده

مقدمه: *یرسینیا انتروکولیتیکا* باکتری بیماری‌زای غذازاد است. شیر خام و پنیر سنتی ممکن است به این باکتری آلوده شوند. هدف این مطالعه، ارزیابی آلودگی شیر خام و پنیرهای سنتی در استان چهارمحال و بختیاری به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام و ۵۰ نمونه پنیر سنتی از کارخانجات فرآورده‌های لبنی و مراکز جمع‌آوری شیر و مغازه‌های عرضه‌کنندهٔ پنیر سنتی به‌طور تصادفی در پاییز ۱۴۰۰ اخذ شد. برای جداسازی باکتری غنی‌سازی اولیه در محیط تریپتی‌کیز سوی براث (TSB) انجام شد. سپس از محیط سفسولودین ایرگازان نوبیوسین (CIN) برای شناسایی پرگنه‌های مشکوک استفاده شد. آزمون‌های بیوشیمیایی شامل اندول، متیل رد، وگس‌پروسکوئر، سیترات، اوره‌آز و همچنین تولید H_2S روی پرگنه‌های مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا* انجام شد. برای تشخیص ژن‌های حدت *Ail* و *Yst* از آزمون PCR استفاده شد. تعیین مقاومت میکروبی جدایه‌ها به روش دیسک انتشاری روی محیط مولرهینتون آگار انجام شد.

نتایج: براساس نتایج، از ۱۰۰ نمونه شیر خام، ۴ نمونه (۴ درصد) و از ۵۰ نمونه پنیر سنتی تازه، ۱ نمونه (۲ درصد) آلوده به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند. در بین ۵ جدایه، ۱ جدایه حامل ژن Yst، ۳ جدایه حامل ژن Ail و ۱ جدایه واجد هر دو ژن بودند. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* نشان دادند بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تریمتوپریم، سیپروفلوکساسین و سولفامتوکسازول داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان دادند شیرهای خام و پنیرهای سنتی، آلوده به *باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا* واجد ژن‌های حدت بودند که در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم بودند و می‌توانند سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید کنند.

واژه‌های کلیدی: شیر خام، پنیر سنتی، *یرسینیا انتروکولیتیکا*، ژن‌های حدت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2023 The Authors
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

سلیمی، ف.؛ بنیادیان، م. و مشتاقی، ح. الگوی ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداشده از شیر خام و پنیرهای سنتی. *زیست‌شناسی میکروبی* ۱۴۰۲، ۱۲ (۴۷): ۷۶-۶۳. http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562

مقدمه

میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا یکی از عوامل مهم آلودگی و به خطر انداختن امنیت مواد غذایی مصرف‌کنندگان هستند؛ به همین دلیل، کنترل مداوم مواد غذایی می‌تواند بهداشت موادغذایی را بهبود بخشد (۱). *یرسینیا انتروکولیتیکا*[1] یکی از باکتری‌های مهم منتقله ازطریق مواد غذایی است. *یرسینیا* باکتری میله‌ای مستقیم یا کوکوباسیل، گرم منفی، غیرهاگ‌زا، سرماگرا و بی‌هوازی اختیاری است که در خانوادهٔ *انتروباکتریاسه* قرار دارد و از میان ۱۵ گونه شناخته‌شدهٔ آن، عموماً ۳ گونه برای انسان بیماری‌زا است (۲، ۳). *یرسینیا پستیس*[2] عامل طاعون، *یرسینیا توبرکلوزیس*[3] عامل عفونت‌های روده‌ای و ورم غدد لنفاوی مزانتر و همچنین *یرسینیا انتروکولیتیکا* عامل عفونت‌های روده‌ای غذازاد هستند (۲). میزان عفونت‌های ناشی از گونه *انتروکولیتیکا* در سال‌های اخیر رو به افزایش است و این باکتری از نیمهٔ دوم دهه هفتاد، به دفعات از اختلالات گوارشی انسان جدا شده است (۴).

رشد *یرسینیا انتروکولیتیکا* در دامنه دمایی منفی ۲ تا ۴۵ درجه‌سانتی‌گراد مشاهده شده است و دمای بهینهٔ رشد آن بین ۲۵ تا ۲۹ درجه سانتی‌گراد است. از ویژگی‌های دیگر این باکتری که اهمیت شناسایی آن را در مواد غذایی دوچندان می‌کند، قابلیت تحمل و حتی رشد در دماهای یخچالی تا صفر درجه سانتی‌گراد یا حتی زیر صفر درجه سانتی‌گراد است (۵).

همچنین تحمل دامنه وسیعی از pH بین ۵ تا ۹/۶ را دارد که خطر آلودگی را در گروه زیادی از مواد غذایی بالا برده است. انسان با مصرف انواع مواد غذایی مانند گوشت خوک، گوشت نشخوارکنندگان و محصولات آنها، ماکیان، سبزیجات، محصولات لبنی و غذاهای آماده در معرض آلودگی به این باکتری است (۲).

علاوه بر التهاب دستگاه گوارش، با آپاندیسیت کاذب، التهاب غدد لنفاوی مزانتریک، التهاب ناحیه انتهایی روده باریک، تورم مفاصل، التهاب صفاق، دمل‌های ناحیه گردن و کولون، التهاب کیسه صفرا نیز در ارتباط است (۶). شیوع این بیماری به‌صورت فصلی است و کمترین میزان آن در ماه‌های فصل بهار و بیشترین میزان آن در پاییز است. نشانه‌های بیماری التهاب روده‌ای – معده‌ای چند روز پس از مصرف غذای آلوده ظاهر می‌شود که مهم‌ترین علائم شامل دل‌درد و اسهال است. ظاهراً کودکان حساس‌تر از بزرگسالان هستند و این ارگانیسم ممکن است تا ۴۰ روز پس از بیماری در مدفوع وجود داشته باشد (۶). *یرسینیا انتروکولیتیکا* براساس تنوع آنتی‌ژنی در دیواره سلولی لیپوپلی‌ساکاریدی خود به بیش از ۵۰ سروتیپ مختلف تقسیم می‌شود (۷). ژن‌های متفاوتی در حدت این باکتری دخیل هستند: ژن *Rfbc* مسئول القای عملکرد بیگانه‌خواری در جریان عفونت است. ژن *Ail* در مقاومت باکتری نسبت به دفاع سلول‌های ایمنی در سرم میزبان نقش دارد. ژن *YadA* در اتصال گونه‌های *یرسینیا* به فیبرونکتین نقش دارد. همچنین ژن *YstA* تولید انتروتوکسین را در سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* کد می‌کند و ژن *VirF* به‌عنوان کلیدی برای رونویسی ژن *YadA* و نیز برای بیان برخی از ژن‌های پلاسمیدی در *یرسینیا انتروکولیتیکا* لازم است (۸). *یرسینیا* در اثر پاستوریزاسیون شیر از بین می‌رود و وجود آن در شیر و فرآورده‌های پاستوریزه شیر به‌دلیل پاستوریزاسیون ناقص یا آلودگی بعد از پاستوریزاسیون است.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562

عادت‌های غذایی در ایران نسبت به کشورهای توسعه‌یافته متفاوت است. درواقع عموماً ایرانیان تمایل دارند غذاهای سنتی و خانگی را بیشتر از محصولات تولیدشده به روش صنعتی مصرف کنند. این مسئله به‌ویژه در رابطه با مصرف فرآورده‌های شیر مانند پنیر، کره و خامهٔ محلی مصداق دارد؛ بنابراین، تحقیقات مرتبط با پایش *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیماری‌زا در فرآورده‌های لبنی ضروری به نظر می‌رسد. بر همین اساس، مطالعه حاضر طراحی شد تا میزان آلودگی شیرهای خام و پنیرهای سنتی به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* و همچنین وجود ژن‌های حدت در آنها ارزیابی شوند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام و ۵۰ نمونه پنیر سنتی تازه از کارخانجات فرآورده‌های لبنی و ایستگاه‌های جمع‌آوری شیر سطح استان چهارمحال و بختیاری و مراکز عرضه‌کنندهٔ پنیر سنتی به‌طور تصادفی طی سه ماه پاییز سال ۱۴۰۰ اخذ شد.

جداسازی و شناسایی باکتری *یرسینیا*

برای جداسازی باکتری، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر شیر خام در ۹۰ میلی‌لیتر محیط TSB و برای پنیر، ۲۵ گرم پنیر در ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط TSB وارد شد و پس از مخلوط‌کردن برای مدت ۲۰ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط سانتریفیوژ شد و از رسوب آن به میزان ۲۵ میکرولیتر روی محیط اختصاصی سفسولودین ایرگازان نووبیوسین (CIN) آگار همراه با ساپلیمنت (حاوی ترکیبات سفسولودین ۷/۵ میلی‌گرم، ایرگاسان ۲/۰ میلی‌گرم و نووبیوسین ۱/۲۵ میلی‌گرم) به‌صورت سطحی کشت داده شد. پلیت‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس کلنی‌های رشدکرده که دارای رنگ قرمز تیره بودند، انتخاب و آزمون‌های تکمیلی برای تشخیص باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* روی آنها انجام شد (۹). آزمون‌های تکمیلی انجام‌شده برای تشخیص باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* شامل IMViC (ایندول، متیل رد، وگس پروسکویر و سیمون سیترات)، اوره‌آز و همچنین H_2S بودند (۱۰). سپس جدایه‌های باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* توسط آزمون PCR برای شناسایی ژن‌های حدت ارزیابی شدند.

استخراج DNA و آزمون PCR

برای استخراج DNA باکتری از روش جوشانیدن استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری در محیط TSB با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل وارد میکروتیوب شد و پس از مخلوط‌کردن، به مدت ۲۰ دقیقه لوله در بن‌ماری جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس میکروتیوب‌ها از بن‌ماری، خارج و سریعاً برای مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. پس از خنک‌شدن، میکروتیوب‌ها با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند تا رسوب تشکیل شود. سپس مایع رویی که حاوی DNA باکتری بود، به میکروتیوب استریل جدیدی منتقل شد.

آزمون PCR توسط پرایمرهای تهیه‌شده از شرکت روبین طب گستر انجام شد. خصوصیات پرایمرهای استفاده‌شده برای شناسایی ژن‌های حدت باکتری *یرسینیا* انتروکولیتیکا در جدول ۱ آورده شده‌اند (۹).

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562

جدول ۱- خصوصیات پرایمرهای استفاده‌شده برای شناسایی ژن‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

Table 1- Characteristics of primers used to identify *Yersinia enterocolitica* genes

Primers	Sequence (5”-3)	Product length (bp)	Annealing T
Ail	F: GTT TAT CAA TTG CGT CTG TTA ATG TGT ACG R: CTA TCG AGT TTG GAG TAT TCA TAT GAA GCG	454	64°c
Yst	F: AAT GCT GTC TTC ATT TGG AGC R: ATC CCA ATC ACT ACTGAC TTC	145	54°c

آزمایش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده (۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۲۱ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، (بافر 1x، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، Taq 2.5U) و ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای رفت و برگشت (F و R) (غلظت نهایی ۱۰۰ پیکومول) انجام شد. برای کنترل مثبت، ۲ میکرولیتر از DNA باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* تهیه‌شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران استفاده شد و برای کنترل منفی ۲ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد. برای انجام PCR از دستگاه ترمال سایکلر (Mj Mini ساخت کمپانی BIO-RAD آمریکا) استفاده شد. برنامه حرارتی شامل دناتوره‌شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوره‌شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها (دمای این مرحله با توجه به محتوای نوکلئوتیدی پرایمرها متغیر است که دربارهٔ پرایمر Ail، ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و برای پرایمر Yst، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه)، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه به تعداد ۳۰ سیکل و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۹). الکتروفورز محصول PCR توسط ژل آگارز ۲ درصد محصول شرکت کالازیست و رنگ Safe stain محصول شرکت سیناکلون در حضور بافر TAE در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد.

آزمون آنتی‌بیوگرام

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک انتشاری و مطابق با دستور کار مؤسسه استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی CLSI[۴] انجام شد. سنجش مقاومت جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* به ۷ آنتی‌بیوتیک متداول در درمان انجام شد. این ۷ آنتی‌بیوتیک شامل سفکسیم (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تریپتوپریم (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکسین (۵ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) و سولفامتاکسازول (۳۰۰ میکروگرم) بودند. برای انجام این آزمون از جدایه‌های *یرسینیا* رقت با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. سپس در کنار شعله به‌وسیلهٔ یک سوآب استریل از لوله‌های مربوط به هر نمونه روی پلیت ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط مولر هینتون آگار به‌صورت چمنی کشت داده شد. در مرحله بعد در کنار شعله و به‌وسیلهٔ یک پنس استریل، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله ۱/۵سانتی‌متر از دیواره پلیت و ۲/۴ سانتی‌متر از یکدیگر در سطح محیط مولرهینتون آگار قرار گرفت و سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این زمان

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562

به‌وسیلهٔ کولیس قطر هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و با جدول CLSI مقایسه و میزان حساسیت یا مقاومت هریک از جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین شد (۱۱). نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌ها توسط نرم‌افزار Sigma stat 4 به روش آمار توصیفی در قالب جدول ارائه شدند.

نتایج

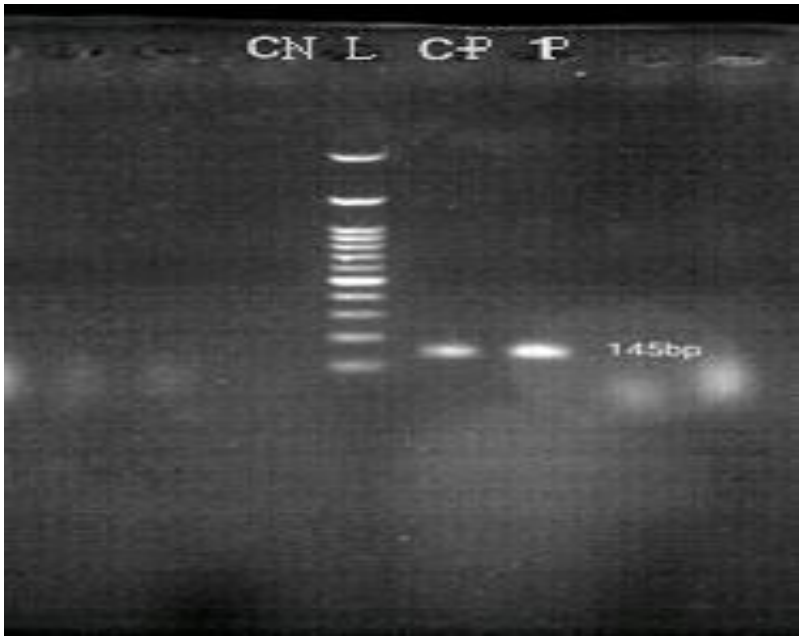
از بین ۱۰۰ نمونه شیر خام جمع‌آوری‌شده از کارخانجات فرآورده‌های لبنی و ایستگاه‌های جمع‌آوری شیر سطح استان و ۵۰ نمونه پنیر سنتی تازه جمع‌آوری‌شده از مراکز عرضه‌کنندهٔ پنیر سنتی و انجام آزمون‌های میکروبی در مجموع از ۲۰ نمونه (۱۳/۳ درصد)، پرگنه‌های مشکوک به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شدند. از این تعداد ۱۴ نمونه (۱۴ درصد) مربوط به نمونه‌های شیر خام و تعداد ۶ نمونه (۱۲ درصد) مربوط به نمونه‌های پنیر سنتی بودند (جدول ۲). نتایج آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *Yst* و *Ail* نشان دادند ۵ جدایه (۳/۳ درصد) باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* بوده‌اند که ۴ جدایه (۴ درصد) مربوط به شیر خام و ۱ جدایه (۲ درصد) مربوط به پنیر سنتی بودند (تصویر ۴-۱). همچنین در ارزیابی ژن‌های حدت باکتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *Yst* و *Ail* مشخص شد که از ۴ جدایه مربوط به شیر خام، ۱ جدایه واجد ژن *Yst*، ۲ جدایه واجد ژن *Ail* و ۱ جدایه واجد هر دو ژن بودند. همچنین ۱ جدایه *یرسینیا انتروکولیتیکا* از پنیرهای سنتی واجد ژن *Ail* بود (جدول ۲) و (تصویر ۱ و ۲).

جدول ۲- فراوانی آلودگی شیر خام و پنیرهای سنتی به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* و ژن‌های حدت آنها (درصد)

Table 2- The frequency of contamination of raw milk and traditional cheeses with Yersinia enterocolitica bacteria and their virulence genes (%)

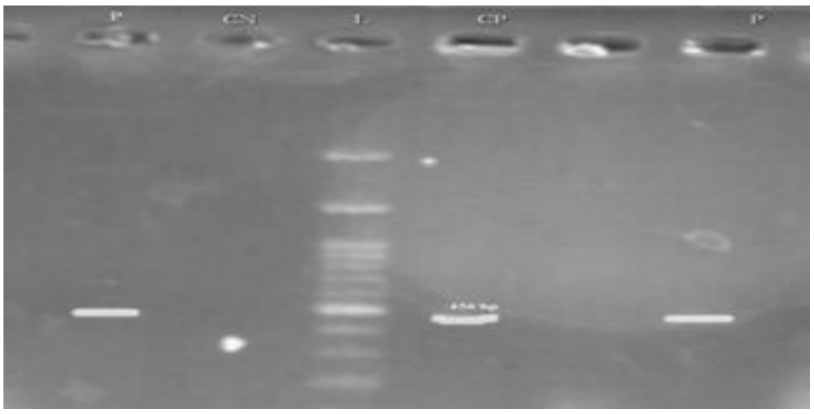
ماده غذایی	تعداد نمونه	جدایه‌های مشکوک به یرسینیا انتروکولیتیکا در آزمون‌های میکروبی	جدایه‌های یرسینیا انتروکولیتیکا در آزمون PCR	جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* واجد ژن yst	جدایه‌های یرسینیا انتروکولیتیکا واجد ژن ail	جدایه‌های یرسینیا انتروکولیتیکا واجد ژن‌های yst و ail
شیرخام	۱۰۰	۱۴ (۱۴)	۴ (۴)	۱ (۲۵)	۲ (۵۰)	۲۵ (۱۰)
پنیر سنتی	۵۰	۶ (۱۲)	۱ (۲)	۰	۱ (۱۰۰)	۰
جمع	۱۵۰	۲۰ (۳/۱۳)	۵ (۳/۳)	۱ (۲۰)	۳ (۶۰)	۱(۲۰)

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562



تصویر ۱- ژن تکثیریافته *Yst* با وزن مولکولی ۱۴۵ جفت‌بازی مربوط به گونه *یرسینیا انتروکولیتیکا* CN:کنترل منفی، CP: کنترل مثبت، P: نمونه مثبت، L: مارکر ۱۰۰جفت‌بازی

Fig 1 - Amplified *Yst* gene with a molecular weight of 145 bp related to *Yersinia enterocolitica* CN: negative control, CP: positive control, P: positive sample, L: marker 100 bp



تصویر ۲- ژن تکثیریافته *Ali* با وزن مولکولی ۴۵۴ جفت‌بازی مربوط به گونه *یرسینیا انتروکولیتیکا* P: نمونه‌های مثبت، CP: کنترل مثبت، CN: کنترل منفی، ستون L: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی

Fig 2- Amplified *Ali* gene with a molecular weight of 454 bp related to *Yersinia enterocolitica* P: positive samples, CP: positive control, CN: negative control, column L: marker 100 bp

سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

نتایج به‌دست‌آمده از آزمون ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* نشان دادند بیشترین مقاومت به میزان ۱۰۰ درصد به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تریمتوپریم، سیپروفلوکساسین و سولفامتوکسازول وجود داشت (جدول ۳).

جدول ۳- آزمون آنتی‌بیوگرام جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* از شیر خام و پنیرهای سنتی

Table 3- Antibiogram test of *Yersinia enterocolitica* isolates from raw milk and traditional cheeses

آنتی‌بیوتیک	الگوی مقاومت (درصد)		
	مقاوم	نیمه‌مقاوم	حساس
Cefixime	۰	۶۶/۶۷	۳۳/۳۳
Gentamicin	۱۰۰	۰	۰
Trimethoprim	۱۰۰	۰	۰
Ciprofloxacin	۱۰۰	۰	۰
Amoxicillin	۰	۶۶/۶۷	۳۳/۳۳
Tetracycline	۶۶/۶۷	۰	۳۳/۳۳
Sulfametoxazole	۱۰۰	۰	۰

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت حضور باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر و فرآورده‌های آن ازنظر بهداشت عمومی، میزان آلودگی به این باکتری در شیر خام و فرآوده‌های آن در ایران و جهان درخور توجه قرار گرفته و بررسی‌های متعددی نیز در این زمینه انجام شده است.

در این مطالعه، شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* روی ۱۰۰ نمونه شیر خام، ۵۰ نمونه پنیر سنتی تازه از کارخانجات فرآورده‌های لبنی و ایستگاه‌های جمع‌آوری شیر و مراکز عرضه‌کنندهٔ پنیر سطح استان چهارمحال و بختیاری بررسی شد. براساس نتایج از میان ۱۰۰ نمونه شیر خام، ۴ نمونه (۴ درصد) و از میان ۵۰ نمونه پنیر سنتی تازه، ۱ نمونه (۲ درصد) آلوده به این باکتری بودند. مطالعات دیگر در ایران نیز نشان می‌دهند شیرهای تولیدی به این باکتری آلوده هستند. حنیفیان و همکاران در سال ۲۰۱۲، در آذربایجان شرقی برای تعیین شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر خام و پنیر سنتی مطالعه‌ای به روش PCR انجام دادند که نتایج بیان کردند ۸/۸۶ درصد کل نمونه‌ها شامل ۷/۶۲ درصد از نمونه‌های پنیر و ۱۰/۵ درصد شیرهای خام، آلوده به این باکتری بودند. این تحقیق برتری و قدرت بیشتر شناسایی این باکتری به‌وسیلهٔ روش PCR را پس از یک دورهٔ پیش غنی‌سازی در مقایسه با روش رایج کشت نشان داد (۳). جمالی و همکاران نیز در ورامین در سال ۲۰۱۵، شیوع گونه‌های *یرسینیا* در نمونه‌های شیر خام گوسفند و بز را بررسی کردند که از میان ۱۶۵ نمونه شیر خام، ۵ نمونه (۳ درصد) آلوده به گونه‌های *یرسینیا* بودند و از این تعداد، ۴ نمونه (۲/۴ درصد) آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* گزارش شدند. این مطالعه نشان داد علاوه بر شیر خام گاو، شیر خام گوسفند و بز نیز می‌تواند به این باکتری آلوده باشد (۱۲). همچنین شکرفروش و همکاران در سال ۱۳۹۱، میزان فراوانی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر خام در شهر بهشهر در سال ۱۳۷۵ را ۱/۶ درصد و در شیر خام آذربایجان شرقی در سال ۱۳۸۸ را ۴ درصد گزارش کردند (۱۳). فضل‌آرا و همکاران در سال ۱۳۹۵، آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیرهای گاو عرضه‌شده در منطقه اهواز و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها را بررسی کردند. نتایج

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562

مطالعه آنها نشان دادند میزان آلودگی شیر خام در این منطقه در فصول سرد سال (۶۳ درصد) به‌مراتب بیشتر از فصول گرم سال (۶/۷ درصد) بود (۸). مطالعه روی سایر فراورده‌های لبنی نیز نشان داده است این فراورده‌ها آلوده به باکتری *یرسینیا* هستند. ممتاز و همکاران در سال ۱۳۹۲، مطالعه‌ای روی فرآورده‌های لبنی خام و پاستوریزه انجام دادند که از میان ۴۰۰ نمونه جمع‌آوری‌شده از فرآورده‌های لبنی عرضه‌شده در سطح استان‌های خوزستان، چهارمحال و بختیاری و فارس، ۶ نمونه (۱/۵ درصد) آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند که در این میان، ۳ جدایه (۵ درصد) از شیر خام گاو، ۲ جدایه (۱۰ درصد) از بستنی سنتی و ۱ جدایه (۳/۳ درصد) از پنیر بودند (۱۴). مطالعه روی شیرهای خام تولیدی در استان تهران توسط شریفی یزدانی و همکاران در سال ۱۴۰۱ نیز نشان‌دهندهٔ آلودگی ۱/۱ درصدی به باکتری *یرسینیا* بوده است (۱۰).

مطالعات در سایر کشورها نیز نشان‌دهندهٔ آلودگی شیرهای خام و پنیرهای سنتی به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* است. وسنا[5] و همکاران در سال ۲۰۲۰ در شمال‌غربی کرواسی، وجود میکروارگانیسم‌های مختلف در شیر خام گاو را بررسی و گزارش کردند که ۱/۸ درصد از شیرهای خام گاو به *یرسینیا انتروکولیتیکا* آلوده بودند (۱۵). همچنین خالد[6] و همکاران در سال ۲۰۱۹ در بصره عراق، شیرهای گاو، گاومیش و گوسفند بازارهای بصره را ازنظر وجود *یرسینیا انتروکولیتیکا* بررسی کردند. نتایج نشان دادند ۸ درصد از نمونه‌های شیر گاو و گاو میش و ۴ درصد از نمونه‌های شیر گوسفند آلوده به این باکتری بودند (۱۶). نتایج مطالعه دیگری در القادسیه کشور عراق در سال ۲۰۱۴، روی شیوع *یرسینیا* در شیر خام گاو و پنیر محلی نشان دادند ۶۲ درصد شیرهای خام گاو و ۱۰/۳ درصد پنیرهای سنتی آلوده به این باکتری بودند (۱۷). تویاکوا[7] و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور قزاقستان، شیوع *یرسینیا* در شیرخام گاو، پنیر سنتی و پنیر پاستوریزه را بررسی و میزان آلودگی را به‌ترتیب ۲۰/۶، ۲۳/۵ و ۳/۲ درصد گزارش کردند (۱۸). لزلدی[8] و همکاران در سال ۲۰۱۲ طی مطالعه‌ای در مکزیکوسیتی، میزان شیوع *یرسینیا* در شیرخام گاو جمع‌آوری‌شده از گاوداری‌های مکزیکوسیتی را ۳۵ درصد گزارش کردند که۴۴/۳ درصد جدایه‌ها گونه *انتروکولیتیکا* بودند (۱۹). نتایج مطالعه‌ای در فرانسه در سال ۲۰۱۰ نشان دادند میزان آلودگی شیر خام گاو به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بسیار بالا و در حدود ۸۶ درصد بوده است (۲۰). گوون[9] و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ترکیه میزان آلودگی پنیر فتا، بستنی و شیر خام را به‌ترتیب، ۴، ۲ و ۶ درصد گزارش کردند (۲۱).

نتایج آزمون‌های PCR مطالعه حاضر نشان دادند از بین ۵ جدایه *یرسینیا انتروکولیتیکا*، ۱ جدایه حامل ژن *Yst*، ۳ جدایه حامل ژن *Ail* و ۱ جدایه حامل هر دو ژن بودند. ژن *ail* در مقاومت باکتری نسبت به دفاع سلول‌های ایمنی در سرم میزبان نقش داشت و ژن *Yst* تولید آنتروتوکسین را به عهده دارد. این نتایج بیان می‌کنند جدایه‌های باکتری قابلیت ایجاد بیماری را در مصرف‌کننده داشتند. علوی و همکاران (۱۳۹۵) در شهرکرد، ژن‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی‌شده از شیر گوسفند و بز را شناسایی کردند. نتایج نشان دادند ۹ درصد نمونه‌ها آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بوده‌اند که ۴ جدایه حامل ژن *ail*، ۳ جدایه حامل ژن *yada* و ۲ جدایه حامل ژن‌های *VirF* و *YstA* بودند و ازنظر وجود ژن‌های حدت *Ail* و *Yst* جدایه‌های بیشتری نسبت به مطالعه حاضر واجد ژن‌های حدت

بودند. این نتایج نشان می‌دهند شیر گوسفند و بز نیز مانند شیر گاو می‌تواند منبع بالقوه‌ای برای آلودگی انسان به این باکتری باشد (۲۲). مطالعه روی نمونه‌های محیطی از کارخانجات لبنی نیز نشان داد ۳۰ درصد نمونه‌ها آلوده به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* بوده‌اند که ۲۴ درصد آنها ژن‌های حدت *Ail* و *Yst* را منتقل می‌کردند (۲۳).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تریمتوپریم، سیپروفلوکساسین و سولفامتوکسازول دارند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداشده از شیر و سایر فرآورده‌های لبنی نیز در سایر مطالعات گزارش شده است. فضل‌آرا و همکاران (۱۳۹۵) در شهر اهواز، بیشترین مقاومت *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداشده از شیرهای خام گاو را در برابر اریترومایسین به میزان ۹۷/۵ درصد به اریترومایسین گزارش کردند (۸). همچنین جمالی و همکاران (۲۰۱۵) در ورامین نشان دادند جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* از شیر خام بیشترین مقاومت را به میزان ۴۸/۳ درصد داشتند (۱۲). احمد و همکاران (۲۰۱۹) در کشور مصر، میزان آلودگی شیر خام و سایر فراورده‌های آن به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* را بررسی کردند و نشان دادند شیر خام، شیر پاستوریزه، فراورده‌های تخمیری شیر و پنیر آلوده به این باکتری بوده‌اند و جدایه‌های *یرسینیا* بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و کلرامفنیکل داشتند (۲۴). تفاوت‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف به‌دلیل وفور سویه‌های متفاوت و همچنین میزان متفاوت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در این مناطق است.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان دادند شیرهای خام و پنیرهای سنتی، آلوده به باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* واجد ژن‌های حدت بودند که در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم بودند و می‌توانند سلامت مصرف‌کنندگان را به خطر بیاندازند.

References

(1) Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Alphaproteobacteria class nov. In Don J. Brenner., Noel R. Krieg., James T., editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2th ed. New York: Springer; 2005: 1-13.

(2) Barton M. Pathogens in milk, Yersinia enterocolitic. 1th ed. Adelaide: 2011.

(3) Hanifian S, Khani S. Prevalence of virulent Yersinia enterocolitica in bulk raw milk and retail cheese in northern-west of Iran. *International Journal of Food Microbiology*. 2012 Apr 2; 155(1-2): 89-92. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.012

(4) Rahimi E, Sepehri S, Dehkordi FS, Shaygan S, Momtaz H. Prevalence of Yersinia species in traditional and commercial dairy products in Isfahan Province, Iran. Jundishapur *Journal of Microbiology*. 2014 Apr; 7(4). 10.5812/jjm.9249

(5) Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W, Łaniewska-Trokenheim Ł. Yersinia enterocolitica: a dangerous, but often ignored, foodborne pathogen. *Food Reviews International*. 2014 Jan 2; 30(1): 53-70. https://doi.org/10.1080/87559129.2013.853775

(6) Rosner BM, Stark K, Werber D. Epidemiology of reported Yersinia enterocolitica infections in Germany, 2001-2008. *BMC public health*. 2010 Dec; 10(1): 1-8. https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-337

(7) Bancerz-Kisiel A, Szczerba-Turek A, Lipczyńska K, Stenzel T, Szweda W. Bioserotypes and virulence markers of Yersinia enterocolitica Strains Isolated from Mallards (Anas platyrhynchos) and Pheasants (Phasianus colchicus). *Journal of food protection*. 2012 Dec 1; 75(12): 2219-22. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-214

(8) Fazlara A, Zarei M, MAVALIZADEH A. Survey on contamination to Yersinia entrocolotica in raw cow milk distributed in Ahvaz area and evaluation of antibiotic resistance of isolates. *Journal of Food Microbiology*. 2016 Oct 22; 3(3): 11-23. [In Persian].

(9) Thisted Lambert S, Danielsson-Tham ML. Identification and characterization of pathogenic Yersinia enterocolitica isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005 Jul; 71(7): 3674-81. https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3674-3681.2005

(10) Sharifi Yazdi S, Mobasseri B, Torabi Bonab P, Sharifi Yazdi S, Mirbagheri Z, Soltan Dallal MM. Prevalence and characteristics of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis from raw milk supplied in Tehran. *Journal of Nutrition and Food Security*. 2023 Feb 10; 8(1): 114-21. 10.18502/jnfs.v8i1.11776

(11) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 2018.

(12) Jamali H, Paydar M, Radmehr B, Ismail S. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of Yersinia species and Yersinia enterocolitica isolated from raw milk in farm bulk tanks. *Journal of dairy science*. 2015 Feb 1; 98(2): 798-803. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8853

(13) Shekarforoush SS, Karim G, Razavi Rohani SM, Kiaie SM, Rokni N, Abbasvali M. Study on the overview on foodborne bacteria in foodstuffs with animal origin in Iran; Part one: milk and dairy products. Food Hygiene. 2012 Aug 22; 2(2 (6)): 1-30. [In Persian].

(14) Momtaz H, Ebrahimi N, Akbari F. Detection of Yersinia enterocolitica serotype O: 3 isolated of milk and dairy products. *J Zoonoses Res*. 2013; 1: 27-32.

(15) Jaki Tkalec V, Furmeg S, Kiš M, Sokolović J, Benić M, Cvetnić L, et al. Detection of pathogenic bacteria in raw milk and dairy products with special regard to Yersinia enterocolitica. *Veterinarska stanica*. 2020 Jul 1; 51(5): 487-95. https://doi.org/10.46419/vs.51.5.9

(16) Khalid DM, Abbas BA. Prevalence, antibiotic susceptibility, and virulence factors of Yersinia enterocolitica isolated from raw milk in Basrah, Iraq. Bulgarian *Journal of Veterinary Medicine*. 2021 Mar 1; 24(1). 10.15547/bjvm.2019-0044

(17) Khadim KH. Rapid detection of Yersinia enterocolitica by using Real-Time PCR technique in some types of foods in Al-Qadisiya province. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*. 2015 Jun 28; 1: 34-38.

(18) Tuyakova T, Muafik M, Natalya K, Batyrzhan M, Gulnar B, Alina L. Assessing the prevalence of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica infections in milk and dairy products in different sales outlets. *Biology and Medicine*. 2014 Oct 1; 6(4): 1.

(19) Bernardino-Varo L, Quiñones-Ramírez EI, Fernández FJ, Vazquez-Salinas C. Prevalence of Yersinia enterocolitica in raw cow's milk collected from stables of Mexico City. *Journal of food protection*. 2013 Apr 1; 76(4): 694-8. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-325

(20) Huovinen E, Sihvonen LM, Virtanen MJ, Haukka K, Siitonen A, Kuusi M. Symptoms and sources of Yersinia enterocolitica-infection: a case-control study. *BMC infectious diseases*. 2010 Dec; 10(1): 1-9. https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-122

(21) Guven A, Sezer C, VATANSEVER L. Incidence and pathogenicity of Yersinia enterocolitica isolates from foods in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2010; 16(1). 10.9775/kvfd.2010. 2030

(22) Alavi SM, Rahimi E, Tajbakhsh E. Identification and characterization of the virulence genes in Yersinia enterocolitica strains isolated from sheep and goat milk in Shahrekord. *Journal of Microbial World*. 2017 Nov 22; 10(3): 256-62. [In Persian].

(23) Ahmed A, Diab H, Hendy B, Batiha G, Dandrawy M, El-Zamkan MA. Molecular Characterization of Y. enterocolitica Isolated from Dairy Environment with Special Reference to the Antimicrobial Activity of Milk Proteins Hydrolysates. *Journal of Advanced Veterinary Research*. 2022 Apr 2; 12(2): 118-27.

(24) Ahmed HA, Tahoun AB, Abou Elez RM, Abd El-Hamid MI, Abd Ellatif SS. Prevalence of Yersinia enterocolitica in milk and dairy products and the effects of storage temperatures on survival and virulence gene expression. *International dairy journal*. 2019 Jul 1; 94: 16-21. https://doi.org/10.1016/ j.idairyj. 2019. 02. 010

[1] *Yersinia entrocolitica*
[2] *Yersinia pestis*
[3] *Yersinia tuberculosis*
[4] Clinical and Laboratory Standards Institute
[5] Vesna
[6] Khalid
[7] Tuyakova
[8] Lzeldi
[9] Guven

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.139168.1562