جداسازی، شناسایی و تعیین بیوتیپ *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا از شیرهای پاستوریزه

شهرام حنیفیان*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: hanifian@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۱/۴/۶)

چکیده

به منظور بررسی وجود سویه‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر پاستوریزه، طی سال ۱۳۹۰ تعداد ۲۴۲ نمونه شیر پاستوریزه عرضه شده در تبریز جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در محیط PSBB غنی‌سازی شد و از ژن‌های *ail* و *virF* به عنوان توالی‌های هدف برای ردیابی سویه‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه‌های غنی شده استفاده گردید. از نمونه‌های مثبت در آزمایش PCR در محیط CIN آگار و MacConkey آگار کشت داده شد و پرگنه‌های مشکوک با duplex-PCR تأیید گردید. جهت تعیین بیوتیپ *یرسینیا انتروکولیتیکا*، جدایه باکتری به وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین شمارش تعداد باکتری‌های شاخص بهداشتی و آزمون کیفی فسفاتاز قلیایی (ALP) بر روی نمونه‌های شیر پاستوریزه انجام یافت. *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا در ٦/٦١٪ (١٦ نمونه) از نمونه‌های شیر پاستوریزه با روش *ail*-PCR ردیابی گردید. در حالی که ٤/١٣٪ (١٠ نمونه) از نمونه‌ها با روش *virF*-PCR مثبت تشخیص داده شد. از بین نمونه‌های مثبت در آزمایش PCR، فقط ٠/٤١٪ (١ نمونه) به وسیله کشت جداسازی و با duplex-PCR تأیید گردید. بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی، جدایه *یرسینیا انتروکولیتیکا* از نوع بیوتیپ ٤ تعیین گردید. طبق نتایج مطالعه، ١١/٥٧٪ (٢٨ نمونه) از نمونه‌های شیر پاستوریزه ALP مثبت بودند و تعداد باکتری‌های شاخص بهداشتی در این نمونه‌ها در قیاس با نمونه‌های ALP منفی تفاوت معنی‌دار ($p<0/01$) نشان داد. با توجه به حساسیت زیاد *یرسینیا انتروکولیتیکا* نسبت به حرارت پاستوریزاسیون، لذا آلودگی ثانویه می‌تواند دلیل اصلی حضور *یرسینیا انتروکولیتیکای* زنده در شیر پاستوریزه باشد.

واژه‌های کلیدی: شیر پاستوریزه، *یرسینیا انتروکولیتیکا*، PCR، *Ail*، *VirF*

مقدمه

یرسینیا انتروکولیتیکا به عنوان عضوی از خانواده آنتروباکتریایسه، یک باکتری گرم منفی، میله‌ای کوتاه، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور است. از لحاظ ابعاد سلولی کوچک‌تر از سایر اعضای خانواده آنتروباکتریاسه است و از این لحاظ بیشتر به اعضای خانواده پاستورلاسه شباهت دارد. در صورتی که *یرسینیا انتروکولیتیکا* در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس رشد نماید، به صورت اشکال متنوع و متشکل از سلول‌های کروی و میله‌ای شکل دیده شود (Weagant and Feng, 2001).

یرسینیا انتروکولیتیکا پراکندگی زیادی در طبیعت دارد و به طور معمول از آب‌های سطحی (آب رودخانه‌ها و دریاچه‌ها)، خاک و فضولات دامی جداسازی شده است. لوله گوارشی حیوانات اهلی و وحشی نظیر خوک، گاو، سگ، جوندگان و پرندگان به عنوان مخزن باکتری محسوب می‌گردند (Robins-Browne and Hartland, 2003; Hanifian and Khani, 2012a). مطالعات متعدد نشان می‌دهند، مهم‌ترین مخزن *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا لوله گوارشی خوک است (Hudson et al., 2008). *یرسینیا انتروکولیتیکا* از مواد غذایی مختلف جداسازی شده است و ارتباط بین بیماری انسان و مصرف غذا و آب آلوده کاملاً به اثبات رسیده است (Weagant and Feng, 2001). گوشت گاو، گوشت ماکیان، شیر خام و فرآورده‌های غیرپاستوریزه آن (Hanifian and Karim, 2006)، توفو (لخته شیر سویا) و آب غیرکلرینه می‌توانند به عنوان منبع بالقوه‌ای برای آلودگی انسان باشند (Weagant and Feng, 2001; Thisted Lambertz and Danielsson-Tham, 2005).

یرسینیا انتروکولیتیکا عامل یرسینیوزیس در انسان است و علایم آن از اسهال ملایم و محدود شونده تا لنفادنیت مزانتریک که ممکن است به آپاندیسیت منتهی شود، متغیر است (Grant et al., 1998). شدت علایم بالینی این عفونت تا حدود زیادی به سن، وضعیت جسمانی فرد مبتلا، وجود یا عدم وجود بیماری‌های زمینه‌ای (underlying diseases) و همچنین سروتیپ باکتری بستگی دارد. گاستروآنتریت معمول‌ترین علامت بالینی یرسینیوزیس است که اغلب در اطفال و کودکان زیر ۵ سال مشاهده می‌گردد (Robins-Browne and Hartland, 2003). در کودکان بالای ۵ سال و در افراد بالغ یرسینیوزیس حاد به شکل سندرم شبه‌آپاندیسیت بروز می‌یابد و اغلب به اشتباه آپاندیسیت تشخیص داده می‌شود. عفونت با *یرسینیا انتروکولیتیکا* گاهی اوقات عوارض مزمن خارج روده‌ای نظیر آرتریت، اریتمانودوزوم (erythema nodosum)، التهاب عنبیه، گلومرونفریت و میوکاردیت ایجاد می‌کند (Weagant et al., 1998).

یرسینیا انتروکولیتیکا بدلیل قابلیت رشد و تکثیر در دماهای پایین‌تر از ٤ درجه سلسیوس (Hanifian, 2009) از سایر باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای متمایز می‌گردد. زمان تقسیم سلولی آن در دمای مطلوب (۲۹–۲٦ درجه سلسیوس) حدود ۳٤ دقیقه است و این مقدار در ۷ درجه سلسیوس به ۵ ساعت افزایش پیدا می‌کند. این باکتری می‌تواند در گوشت پخته گاو و خوک در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در طی ۲٤ ساعت و یا در ۷ درجه سلسیوس و مدت ۱۰ روز به بیش از یک میلیون برابر تعداد اولیه خود برسد (Robins-Browne and Hartland, 2003). *یرسینیا انتروکولیتیکا* نسبت به

انجماد مقاوم است و می‌تواند متعاقب انجماد و رفع انجماد مکرر مواد غذایی، بقای خود را برای مدت زمان طولانی حفظ نماید (Robins-Browne and Hartland, 2003). در مطالعاتی که جهت ارزیابی بقای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در مواد غذایی تلقیح شده انجام گرفته است، نتایج حاکی از بقای بهتر و طولانی‌تر این باکتری در دمای یخچال و دمای اتاق در مقایسه با دمای بینابینی می‌باشد (Hanifian and Khani, 2012b). همچنین *یرسینیا انتروکولیتیکا* در غذاهای حرارت دیده‌ای که در شرایط سرد نگه‌داری می‌شوند به مدت طولانی‌تری باقی می‌ماند. به نظر می‌رسد، دلیل این حالت دسترسی بیشتر باکتری به مواد مغذی در غذاهای پخته و نیز از بین رفتن میکروارگانیسم‌های سرماگرای رقیب و سویه‌های غیربیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* باشد (Robins-Browne and Hartland, 2003).

در ایران مطالعاتی در ارتباط با وجود *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر پاستوریزه انجام یافته است (Soltan-Dallal et al., 2004; Sharifzadeh et al., 2005). هر چند یافته‌های این مطالعات حاکی از عدم وجود *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه‌های شیر پاستوریزه می‌باشد؛ اما با توجه به میانگین شیوع ۷/۶۲ درصدی *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا در شیرهای خام منطقه آذربایجان‌شرقی (Hanifian and Khani, 2012a)، در صورت عدم پاستوریزاسیون موثر و یا آلودگی ثانویه، احتمال وجود این باکتری در شیرهای پاستوریزه وجود خواهد داشت. لذا در این مطالعه، تلفیقی از روش‌های کشت و PCR که در مقایسه با بکارگیری انفرادی هر یک از این روش‌ها، حساسیت بسیار بیشتری در یافتن ارگانیسم‌ها دارند، برای ردیابی سویه‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر پاستوریزه استفاده گردید. همچنین نمونه‌های شیر پاستوریزه از نظر غیرفعال شدن آنزیم فسفاتاز قلیایی (ALP) متعاقب فرآیند پاستوریزاسیون و نیز تعداد باکتری‌های شاخص بهداشتی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- روش نمونه‌گیری

تعداد ۲۴۲ نمونه شیر پاستوریزه از بخش‌های مختلف شهر تبریز طی یک دوره ۱۰ ماهه (از اردیبهشت تا بهمن ماه سال ۱۳۹۰) از محصولات ۱۵ کارخانه مختلف تولید کننده شیر پاستوریزه جمع‌آوری و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل شد. با هدف بررسی کفایت فرایند پاستوریزاسیون در شیر پاستوریزه، آزمایش ALP کیفی (Lactognost, Germany) بر روی نمونه‌ها صورت پذیرفت (Anzabi and Hanifian, 2012). سپس آزمایش‌های مربوط به جستجوی *یرسینیا انتروکولیتیکا* و همچنین شمارش باکتری‌های شاخص بهداشتی بر روی نمونه‌های شیر پاستوریزه انجام گرفت.

- نحوه غنی‌سازی نمونه‌ها

ابتدا نمونه‌های شیر پاستوریزه به طور کامل مخلوط و یکنواخت گردید. سپس مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط غنی‌کننده PSBB (Peptone Sorbitol Bile Broth) به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ روز در دمای ۱۰ درجه سلسیوس غنی‌سازی گردید (Weagant et al., 1998).

- آماده‌سازی نمونه‌های غنی‌شده برای آزمایش PCR و کشت

در انتهای دوره غنی‌سازی، دو مقدار ۱ میلی‌لیتری از نمونه غنی‌شده به دو تیوب ۲ میلی‌لیتری انتقال یافت.

تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با شتاب g× ۱۶۰۹۹ رسوب داده شد (Hanifian and Khani, 2012a). رسوب تیوب اول برای استخراج DNA استفاده گردید و رسوب تیوب دوم در ۲۰۰ میکرولیتر فسفات بافر حل شد و پس از افزودن گلیسرول (۱۰ درصد) استریل، در ۷۰- درجه سلسیوس نگه‌داری گردید تا در صورت مثبت شدن نتایج آزمایش PCR مرحله اول، برای آزمایش کشت مورد استفاده قرار گیرد (Hanifian and Khani, 2012a).

- انتخاب پرایمر

ژن کروموزومی *ail* و ژن پلاسمیدی *virF* در مطالعات متعدد برای ردیابی و شناسایی سویه‌های حاد *یرسینیا انتروکولیتیکا* مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Thisted Lambertz and Danielsson-Tham, 2005; Fredriksson-Ahomaa, et al., 2007; Hudson et al., 2008; Hanifian and Khani, 2012b). در این مطالعه نیز برای ردیابی و شناسایی سویه‌های حاد و بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در آزمایش PCR، ژن‌های *ail* و *virF* به عنوان توالی هدف انتخاب شدند. برای این منظور از پرایمرهای با مشخصات مندرج در جدول (۱) استفاده گردید.

جدول ۱: نام ژن، نام و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و اندازه توالی هدف در آزمایش PCR جهت ردیابی و شناسایی سویه‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا*

نام ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه توالی (bp)	منبع
ail	9 A	5′-GTT TAT CAA TTG CGT CTG TTA ATG TGT ACG-3′	٤٥٤	Thisted Lambertz and Danielsson-Tham
	10 A	5′-CTA TCG AGT TTG GAG TAT TCA TAT GAA GCG-3′		
virF	11 A	5′-AAG GTT GTT GAG CAT TCA CAA GAT GG-3′	٧٠٠	Thisted Lambertz and Danielsson-Tham
	12 A	5′-TTT GAG TGA AAT AAG ACT GAC TCG AGA ACC-3′		

- ردیابی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه‌های غنی‌شده با روش PCR

برای استخراج DNA از روش Vishnubhatla et al., 2000 استفاده شد و DNA استخراج شده در ۵۰ میکرولیتر آب یون‌زدایی شده (deionized) عاری از DNA/RNA حل گردید. مخلوط واکنش در آزمایش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ×۲ (Fermentas, Germany)، ٦۰ پیکومول از هر جفت پرایمر (Eurofins, Germany) و ۲۵ نانوگرم DNA الگو بود که با افزودن آب یون‌زدایی شده عاری از DNA/RNA (CinnaGen, Iran) به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. از سویه استاندارد *یرسینیا انتروکولیتیکا* (DSM 11502) (DSM, Germany) به عنوان کنترل مثبت واکنش PCR و از نمونه حاوی آب یون‌زدایی شده عاری از DNA/RNA به جای DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. واکنش PCR با دستگاه ترمال‌سایکلر (Eppendorf AG, Germany) و طی مراحل دمایی و زمانی زیر انجام گرفت: یک مرحله دمایی ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ٤ دقیقه برای دناتوراسیون مقدماتی (initial denaturation) آغاز گردید. سپس ۳۵ سیکل متوالی شامل ۹٤ درجه

سلسیوس بـه مـدت ۳۰ ثانیـه جهـت دناتوراسـیون، ٦۰ درجـه سلسـیوس بـه مـدت ۱ دقیقـه بـرای چسـبیدن پرایمرها (annealing) و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقـه جهـت توسـعه (extension) تـوالی هـدف و در نهایت یک مرحله دمایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقـه بـرای توسـعه نهـایی (final extension) اعمـال گردید (Thisted Lambertz and Danielsson- Tham, 2005). محصـــول PCR (بانـــد ٤٥٤ bp ژن *ail* و bp ۷۰۰ ژن *virF*) متعاقب الکتروفورز ژل آگارز (۱ درصد) (Invitrogen, USA) و رنگ‌آمیزی بـا اتیـدیوم بروماید (۰/۵ میلـی‌گـرم در میلـی‌لیتـر) (Merck, Germany) ارزیابی گردید.

- جداسازی و شناسایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* با روش کشت

نمونه‌های غنی شده‌ای که در آزمایش PCR مرحله اول واجد حداقل یکی از ژن‌های *ail* یا *virF* تشخیص داده شدند، از نمونه ذخیره شده مربوطه (که در در ۷۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شده بود) متعاقب تیمار قلیایی (پتاس ۰/۵ درصد به مدت ۵ ثانیه) در محیط CIN (cefsulodin irgasan novobiocin) آگار حاوی مکمل آنتی‌بیوتیکی CIN (Merck, Germany) و همچنین مک‌کانکی آگار (Merck, Germany) کشت داده شد (Hanifian and Khani, 2012b). محیط‌ها در ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در محیط CIN آگار پرگنه‌های با قطر ۲-۱ میلی‌متر، با رنگ قرمز تیره در مرکز پرگنه و دارای حاشیه مشخص (red bull's eye) و پرگنه‌های با قطر ۲-۱ میلی‌متر و بی‌رنگ در مک‌کانکی آگار انتخاب گردید (Weagant and Feng, 2001). پرگنه‌های انتخاب شده در محیط BHI آگار (Merck, Germany) به صورت خطی کشت داده شد تا ضمن ارزیابی خالص بودن کشت، باکتری در محیط عمومی احیا شده و نتایج دقیقی در آزمون‌های بیوشیمیایی با هدف تعیین بیوتیپ *یرسینیا انتروکولیتیکا* ایجاد نماید (Weagant and Feng, 2001). به منظور تأیید بیماریزا بودن جدایه‌های به دست آمده، تعداد ۲ پرگنه از محیط BHI آگار برای استخراج DNA و بررسی وجود ژن‌های عامل ویرولانت *ail* و *virF* استفاده گردید. پرگنه‌های تأیید شده با روش PCR برای تعیین بیوتیپ باکتری تحت آزمایش‌های بیوشیمیایی معینی (جدول ۲) قرار گرفت.

- تعیین بیوتیپ جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

از آن جایی که *یرسینیا انتروکولیتیکاهای* بیماری‌زا به بیوتیپ‌های خاصی تعلق دارند، بنابراین برای تعیین بیوتیپ جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا*، آزمون‌های بیوشیمیایی مندرج در جدول (۲) که بر گرفته از روش Wauters می‌باشد، بر روی جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* انجام گرفت و نتایج بدست آمده با جدول مربوطه مقایسه گردید (Weagant and Feng, 2001).

جدول ۲: آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تعیین بیوتیپ *یرسینیا انتروکولیتیکا* [۱]

آزمون بیوشیمیایی	۱A	۱B	۲	۳	۴	۵	۶
لیپاز	+	+	−	−	−	−	−
اسکولین/سالیسین	−/+	−	−	−	−	−	−
ایندول	+	+	(+) [۲]	−	−	−	−
زایلوز	+	+	+	+	−	V [۳]	+
ترهالوز	+	+	+	+	+	−	+
پیرازین‌آمیداز	+	−	−	−	−	−	+
بتادی‌گلوکوزیداز	+	−	−	−	−	−	−
وژ-پروسکوئر	+	+	+	−/+	+	(+) [۲]	−

[۱] بر اساس روش Wauters؛ [۲] واکنش تأخیری؛ [۳] واکنش متغیر

- آزمایش‌های میکروبی نمونه‌های شیر پاستوریزه

با هدف بررسی وضعیت میکروبی نمونه‌های شیر پاستوریزه، شمارش باکتری‌های شاخص بهداشتی شامل باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم‌ها و انتروکوک‌ها انجام گرفت. ابتدا لوله‌های سریال رقت (10^{-1} تا 10^{-6}) با استفاده از آب پپتونه (Merck, Germany) ۰/۰۱ درصد تهیه گردید. جهت شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی از محیط پلیت کانت آگار (Merck, Germany) به صورت کشت مخلوط (pour-plate) در دمای ۳۲ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت و برای شمارش کلی‌فرم‌ها از محیط ویولت رد بایل آگار (Merck, Germany) در ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت (Hanifian and Khani, 2012b) استفاده گردید. هم‌چنین شمارش انتروکوک‌ها در محیط کانامایسین اسکولین آزاید آگار (Merck, Germany) در دمای ٤۲ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز در شرایط هوازی صورت پذیرفت (Domig et al., 2003).

- تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از شمارش گروه‌های مختلف باکتریایی ابتدا به مقیاس لگاریتمی تبدیل گردید و سپس آنالیزهای توصیفی (میانگین و انحراف معیار) بر روی داده‌های مزبور، انجام گرفت (SPSS, Version 17). تفاوت تعداد باکتری‌ها (مزوفیل‌های هوازی، کلی‌فرم‌ها و انتروکوک‌ها) در نمونه‌های شیر ALP مثبت و منفی با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan's test) در سطح احتمال ۱ درصد مقایسه گردید.

یافته‌ها

در جدول (۳) نتایج جستجوی *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا در شیر پاستوریزه با روش کشت و PCR نشان داده شده است. همچنین در این جدول به نتایج آزمون‌های میکروبی، ALP و نوع بیوتیپ *یرسینیا انتروکولیتیکا* اشاره شده است. از مجموع ۲٤۲ نمونه شیر پاستوریزه، *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا در ۱٦ نمونه (٦/٦۱٪) با استفاده از ژن ***ail*** و در ۱۰ نمونه (٤/۱۳٪) با بکارگیری ژن ***virF*** به عنوان توالی هدف ردیابی شد. از این تعداد، ۵ نمونه شیر پاستوریزه دارای نتیجه مثبت در آزمایش ALP بودند. بر اساس نتایج

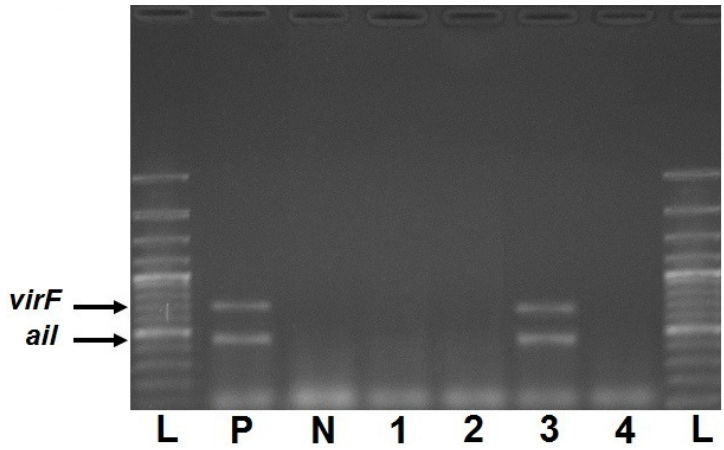
آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده بر روی جدایه *یرسینیا انتروکولیتیکا* و تطبیق آن با نتایج جدول (۲)، باکتری جداسازی شده از شیر پاستوریزه از نوع بیوتیپ ٤ تعیین گردید (جدول ۳).

جدول ۳: موارد مثبت *یرسینیا انتروکولیتیکا* در آزمایش PCR و نتایج سایر آزمون‌ها در نمونه‌های شیر پاستوریزه.

شماره نمونه	کشت	PCR		HIB (log cfu/ml)(*)			ALP	بیوتیپ
		Ail	*virF*	AMB	C	E		
۱۷	–	+	+	۳/۳۲	۰/۹۰	۱/۵۹	–	–
۲۲	–	+	+	٤/٦۸	۲/۲٦	۲/۱۹	+	–
۳۹	–	+	–	۵/۳۹	۰/٦۹	۱/۳٦	–	–
۵٤	–	+	+	٤/٤۱	۰/۳۰	۱/۲۰	–	–
۸٦	–	+	+	٤/٦٤	ND(**)	۰/۹۵	–	–
۱۰۱	–	+	+	۵/۱۳	۰/۳۰	۰/۹۰	–	–
۱۰۳	–	+	–	۳/۸۸	۰/٤۷	۰/۸۵	–	–
۱۱۸	–	+	–	٤/٤٤	۱/۹۲	۱/۹٤	+	–
۱۳۲	–	+	+	٤/۵۲	۰/٤۷	۱/۰٤	–	–
۱٤۷	–	+	–	۳/۵۰	۲/۳۰	۱/۹۹	+	–
۱٤۹	+	+	–	٤/٦۲	۲/۵۰	۲/۳٤	+	٤
۱٦۵	–	+	+	۳/۷۷	ND	ND	–	–
۱۷۷	–	+	+	٤/۳٤	۰/۳۰	۱/۰۰	–	–
۱۹۱	–	+	+	۵/٤۱	۲/۷۵	۲/۹۲	+	–
۲۰۸	–	+	+	٤/٦۸	۰/٦۹	۰/٦۰	–	–
۲۱۱	–	+	–	۳/۱۹	ND	۰/۳۰	–	–
کل	۱	۱٦	۱۰					

(*) HIB: باکتری‌های شاخص بهداشتی؛ AMB: باکتری‌های مزوفیل هوازی؛ C: کلی‌فرم؛ E: انتروکوک. (**) عدم ردیابی

از مجموع ۱٦ نمونه غنی‌سازی شده شیر پاستوریزه که در مرحله اول آزمایش PCR مثبت تشخیص داده شدند (جدول ۳)، *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا فقط از ۱ نمونه با روش کشت جداسازی و با duplex-PCR (با استفاده از ژن‌های ***ail*** و ***virF***) تأیید گردید (شکل ۱). از ۱۵ نمونه مثبت باقی‌مانده، *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا جداسازی نشد.



شکل ۱: ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی محصول PCR با اتیدیوم بروماید و مشاهده باندهای مربوط به ژن‌های *ail* (۴۵۴ bp) و *virF* (۷۰۰ bp) *یرسینیا انتروکولیتیکا*. L: DNA ladder با اندازه ۱۰۰ bp؛ P: شاهد مثبت؛ N: شاهد منفی؛ شماره‌های ۱، ۲ و ۴ نتایج منفی و شماره ۳: نتیجه مثبت.

نمونه‌های شیر پاستوریزه بر اساس نتیجه آزمایش ALP به دو دسته ALP مثبت و منفی تقسیم شدند. در جدول (٤) به تعداد و درصد نمونه‌ها و هم‌چنین به میانگین تعداد باکتری‌های شاخص بهداشتی در هر گروه اشاره شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، از مجموع ۲٤۲ نمونه شیر پاستوریزه ۲۸ نمونه (۱۱/۵۷٪) نتیجه مثبت در آزمون ALP نشان دادند. به علاوه تفاوت تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم‌ها و انتروکوک‌ها (باکتری‌های شاخص بهداشتی) در نمونه‌های ALP مثبت و منفی از نظر آماری (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan's test) معنی‌دار ($p<0/01$) بود.

جدول ۴: نتیجه آزمون ALP و تعداد (میانگین ± انحراف معیار) باکتری‌های شاخص بهداشتی در نمونه‌های شیر پاستوریزه

فسقاتاز قلیایی	تعداد	درصد	HIB (log cfu/ml) (*)		
			AMB	C	E
منفی	۲۱٤	۸۸/٤۳	۳/۱۱ ± ۰/۲٤[a]	۰/٦۰ ± ۰/۱۸[a]	۰/۷۷ ± ۰/۰٦[a]
مثبت	۲۸	۱۱/۵۷	۵/۵۵ ± ۰/۸۱[b]	۳/۲۱ ± ۰/۷۸[b]	۲/۳۷ ± ۰/۵٤[b]

(*) HIB: باکتری‌های شاخص بهداشتی؛ AMB: باکتری‌های مزوفیل هوازی؛ C: کلی‌فرم‌ها؛ E: انتروکوک‌ها.

a و b: حروف غیرمشترک در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($p<0/01$) بین میانگین تعداد گروه‌های باکتریایی است.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج جدول (۳) میزان شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا با روش کشت ۰/٤۱ درصد (۱ مورد از ۲٤۲ نمونه) برآورد گردید. در حالی که با روش PCR بر پایه ژن *ail*، *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا در ٦/٦۱ درصد (۱٦ مورد از ۲٤۲ نمونه) و با روش PCR بر پایه ژن *virF* در ٤/۱۳ درصد (۱۰ مورد از ۲٤۲ نمونه) از نمونه‌ها تشخیص داده شد. در مطالعات متعدد که با هدف تعیین میزان شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در مواد غذایی انجام یافته است، میزان

شیوع این باکتری با روش PCR به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از روش‌های کشت گزارش گردیده است (Skurnik et al., Fredriksson-Ahomaa et al., 2000; 2010; Hanifian and Khani, 2012a). در این مطالعه نیز نتایج به دست آمده نشان داد، در مقایسه با روش کشت متداول، روش *virF*-PCR با ۱۰ برابر حساسیت بیشتر و روش *ail*-PCR با ۱۶ برابر حساسیت بالاتر *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا را در نمونه‌های شیر پاستوریزه ردیابی نموده است. این موضوع بیانگر حساسیت بیشتر روش PCR در مقایسه با روش کشت جهت ردیابی *یرسینیا انتروکولیتیکا* می‌باشد. اما باید توجه داشت که روش PCR قادر به تفریق ارگانیسم-های زنده و مرده نمی‌باشد و این موضوع صحت نتایج مثبت در آزمون PCR را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* با استفاده از روش‌های کشت در محیط‌های انتخابی، در کنار زمان‌بر بودن از دقت عمل کمتری برخوردار است. به علاوه، در حال حاضر روش کشت جامعی وجود ندارد تا بتوان با بکارگیری آن تمامی سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* را جداسازی نمود. بنابراین در بررسی‌های به عمل آمده، شیوع کم *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه‌های غذایی می‌تواند در نتیجه حساسیت پایین روش‌های کشت باشد (Fredriksson-Ahomaa and Korkeala, 2003). در ایران، نتایج مطالعاتی که بر پایه کشت و با هدف تعیین میزان شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر خام و پاستوریزه انجام یافته است نشانگر شیوع بسیار کم این باکتری در شیر خام و عدم آلودگی در شیر پاستوریزه می‌باشد (Soltan-Dallal et al., 2004; Sharifzade et al., 2005).

نتایج به دست آمده این مطالعه نشان‌دهنده تفاوت حساسیت ژن‌های *ail* و *virF* در ردیابی *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زاست (جدول ۳). تصور بر این است، به دلیل ماهیت ناپایدار پلاسمید *یرسینیا انتروکولیتیکا* که طی تجدید کشت، تقسیم سلولی و همچنین نگه‌داری کشت در دماهای سرد به طور خود به خود حذف می‌گردد، لذا روش PCR بر پایه ژن‌های پلاسمیدی نظیر *virF* و *yad A* در مقایسه با روش‌های PCR بر پایه ژن‌های کروموزومی از جمله *ail* و *inv* از حساسیت کمتری برخوردار باشد (Hanifian and Khani, 2012b). لذا برای افزایش حساسیت روش جستجوی سویه‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* لازم است از روش‌های PCR بر پایه ردیابی ژن‌های کروموزومی استفاده نمود.

آن چه بیش از جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* از نمونه‌های غذایی و بالینی اهمیت دارد، تفریق سویه‌های حاد و بیماریزای این باکتری از انواع غیربیماریزاست. چرا که در بین بیوسروتیپ‌های متعدد *یرسینیا انتروکولیتیکا*، فقط تعداد محدودی در انسان بیماریزا هستند. متداول‌ترین بیوسروتیپ‌هایی که در سرتاسر جهان از موارد بیماری جداسازی شده‌اند شامل ٤/O:۳، ۲/O:۹، ۲/O:۵، ۲/O:۲۷ و ۱B/O:۸ می‌باشند (Hanifian and Khani, 2012a). با توجه به پراکندگی زیاد سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* در محیط‌های آبی، سطح گیاهان و روده برخی پستانداران، امکان جداسازی سویه‌های غیر حاد و فاقد قدرت بیماری‌زایی از مواد غذایی خام بسیار محتمل است (Robins-Browne and Hartland, 2003; Weagant et al., 1998). بنابراین تعیین بیماری‌زا بودن باکتری با آزمون‌هایی نظیر عدم

رشد *یرسینیا انتروکولیتیکا* در محیط کشت فاقد کلسیم، مقاومت بالا نسبت به سرم خون انسان، قابلیت ایجاد التهاب ملتحمه در خوکچه هندی و یا تأیید وجود ژن‌های عامل ویرولانس (Browne and Hartland, 2003) متعاقب جداسازی آن‌ها از مواد غذایی و یا نمونه‌های بالینی حائز اهمیت است. بر همین اساس، در مطالعه اخیر از ژن کروموزومی ***ail*** و ژن پلاسمیدی ***virF*** و ردیابی آن‌ها در نمونه‌های غنی شده، به عنوان آزمون غربالگری (screening test) جهت پیشگویی حضور یا عدم حضور *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماریزا در
نمونه‌های مورد آزمایش استفاده گردید. همچنین پرگنه‌های جدا شده با روش کشت از لحاظ وجود ژن‌های ***ail*** و ***virF*** مورد ارزیابی و شناسایی مجدد قرار گرفت (شکل ۱).

طبق نتایج مطالعه، تعداد ۲۸ نمونه (۱۱/۵۷٪) شیر پاستوریزه ALP مثبت بودند. مقایسه میانگین تعداد باکتری‌های شاخص بهداشتی بین نمونه‌های ALP مثبت و منفی نشان‌دهنده تفاوت ۲/٤٤، ۲/٦۱ و ۱/٦۰ واحد لگاریتمی به ترتیب بین باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم‌ها و انتروکوک‌ها می‌باشد. استاندارد ملی ایران (ISIRI No. 2406, 2008) حداکثر میزان مجاز تعداد مزوفیل‌های هوازی (شمارش کلی) و کلی‌فرم‌ها را به ترتیب $۷/۵\times۱۰^{٤}$ و ۱۰ عدد تعیین نموده است. با توجه به نتایج به دست آمده (جدول ۳ و جدول ٤)، تعداد این باکتری‌ها در نمونه‌های ALP مثبت بیش از حد مجاز است. همچنین بالا بودن تعداد باکتری‌های شاخص بهداشتی در برخی از نمونه‌های ALP منفی می‌تواند در نتیجه نگه‌داری شیرهای پاستوریزه در دماهای محیط در طی مدت زمان عرضه شیر باشد. در دمای محیط، شرایط برای رشد سریع‌تر باکتری‌های شاخص بهداشتی نظیر مزوفیل‌های هوازی، کلی‌فرم‌ها و انتروکوک‌ها فراهم می‌گردد.

با توجه به این که عدد D (D-value) *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ٦۸/۳ درجه سلسیوس ۰/۰۹ دقیقه (٥/٤ ثانیه) است، لذا این باکتری حتی در درجه حرارت‌های کمتر از دمای پاستوریزاسیون HTST (۷٦ درجه سلسیوس و مدت ۱۵ ثانیه) به سرعت غیرفعال می‌گردد. مطالعات تلقیحی انجام یافته نشان داد، فرایند حرارتی برابر با ٦۲/۵ درجه سلسیوس برای مدت ۱۵ ثانیه می‌تواند تعداد ۷ واحد لگاریتمی *یرسینیا انتروکولیتیکا* را به کمتر از ۰/۲ واحد لگاریتمی برساند (Pearce et al., 2012). در شیرهای پاستوریزه تولید شده در ایران که از دمای ۷٦ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه (Anzabi and Hanifian, 2012) استفاده می‌کنند، حتی در صورت عدم اعمال دقیق دما و زمان پاستوریزاسیون، *یرسینیا انتروکولیتیکا* غیرفعال می‌گردد. بنابراین در مطالعه حاضر، مهمترین دلیل حضور *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا در نمونه شیر پاستوریزه آلودگی ثانویه می‌باشد. اگر چه *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا در ۱٦ نمونه شیر پاستوریزه (اعم از ALP مثبت و منفی) ردیابی گردید، اما صرفاً در یک مورد باکتری زنده جداسازی شد. با توجه به این که در آزمایش PCR امکان تفریق زنده یا غیرزنده بودن ارگانیسم هدف میسر نمی‌باشد؛ لذا نتایج مثبت آزمایش PCR به ویژه در غذاهای فرآوری شده نظیر شیر پاستوریزه، مستلزم جداسازی و شناسایی ارگانیسم زنده با روش کشت می‌باشد (Anzabi and Hanifian,

2012). نتایج مطالعه نشان داد، نمونه شیر پاستوریزه‌ای که بیوتیپ ٤ *یرسینیا انتروکولیتیکا* از آن جداسازی و تأیید گردید، دارای نتیجه مثبت در آزمون ALP بود (جدول ٤).

انتروکوک‌ها دسته دیگر از باکتری‌های شاخص بهداشتی در مواد غذایی هستند. این باکتری‌ها گسترش زیادی در طبیعت دارند و جزو فلور طبیعی روده حیوانات خونگرم و خونسرد و حتی حشرات می‌باشند. انتروکوک‌ها از طریق مدفوع دام‌ها، آب و تجهیزات آلوده به شیر و فرآورده‌های آن راه پیدا می‌کنند. گزارشاتی در خصوص توانایی تحمل فرایند پاستوریزاسیون توسط انتروکوک‌ها ارائه شده است (Hartman et al., 2001). در این مطالعه، انتروکوک‌ها حتی در شیرهای پاستوریزه با ALP منفی ردیابی گردید که حاکی از توانایی تحمل فرایند پاستوریزاسیون توسط این باکتری‌هاست. با این تفاوت که میانگین تعداد آن‌ها در نمونه‌های ALP منفی ۰/۷۷ واحد لگاریتمی و در ALP مثبت ۲/۳۷ واحد لگاریتمی برآورد گردید (جدول ٤). تفاوت تعداد در نمونه‌های ALP مثبت و منفی، نتیجه اثر فرآیند پاستوریزاسیون در کاهش تعداد انتروکوک‌هاست. با ذکر این نکته که انتروکوک‌ها درجات متفاوتی از تحمل حرارتی را دارند. به این معنی که *انتروکوکوس فکالیس* (*Enterococcus faecalis*) حساس‌ترین گونه و *انتروکوکوس دورانس* (*Enterococcus durans*) مقاوم‌ترین گونه نسبت به حرارت می‌باشد (Hartman et al., 2001). با توجه به ویژگی فوق، می‌توان شمارش انتروکوک‌ها را در کنار سایر شاخص‌های بهداشتی (شمارش کلی و شمارش کلی‌فرم‌ها) به طور متداول در شیر و فرآورده‌های آن انجام داد.

با توجه به ردیابی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ٦/٦١ درصد از نمونه‌های شیر پاستوریزه با روش PCR و جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکای* زنده از ۰/٤١ درصد نمونه‌ها، این باکتری می‌تواند به عنوان خطر بالقوه در ارتباط با مصرف شیرهای پاستوریزه‌ای باشد که دچار آلودگی ثانویه شده‌اند و یا احتمالاً فرآیند پاستوریزاسیون به طور موثر بر روی آن‌ها اعمال نشده است. به ویژه آن که *یرسینیا انتروکولیتیکا* توانایی رشد و تزاید در طی مدت زمان نگه‌داری مواد غذایی در یخچال را دارد و این مسأله بر اهمیت موضوع و میزان مخاطره بهداشتی می‌افزاید. از آن جایی که حداقل توانایی بهترین روش‌های کشت برای ردیابی *یرسینیا انتروکولیتیکا*، وجود تعداد ۳ تا ٤ واحد لگاریتمی از باکتری زنده و فعال می‌باشد (Fredriksson-Ahomaa, et al., 2007)، لذا امکان حضور *یرسینیا انتروکولیتیکای* زنده در نمونه‌های شیر ممکن است بیش از میزانی باشد که این مطالعه به آن دست یافته است. به علاوه مثبت بودن ALP در ۱۱/۵۷ درصد از نمونه‌ها و بالا بودن تعداد باکتری‌های شاخص بهداشتی حاکی از عدم کنترل شرایط بهداشتی در طی بسته‌بندی و نگه‌داری شیر پاستوریزه و یا احتمالاً عدم پایش دقیق دما و یا زمان پاستوریزاسیون در برخی از کارخانجات شیر و فرآورده‌های آن می‌باشد. این موضوع منجر به بقای برخی میکروب‌های بیماری‌زا به ویژه متحملین گرما نظیر مایکوباکتریوم‌ها خواهد گردید (Anzabi and Hanifian, 2012). بنابراین اتخاذ تدابیر بهداشتی در ارتباط با جلوگیری از بروز آلودگی ثانویه به موازات

پایش دقیق دما و زمان پاستوریزاسیون در شیرهای پاستوریزه تولیدی، ضروری است.

سپاسگزاری

بخشی از بودجه این مطالعه توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تأمین شده است.

منابع

- Anzabi, Y. and Hanifian, S. (2012). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pasteurized milk by IS900 PCR and culture method. African Journal of Microbiology Research, 6: 1453-1456.
- Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp.: 1. Media for isolation and enumeration. International Journal of Food Microbiology, 88: 147-164.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Korte, T. and Korkeala, H. (2000). Contamination of carcasses, offals and the environment with *yad A*-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse. Journal of Food Protection, 63: 31-35.
- Fredriksson-Ahomaa, M. and Korkeala, H. (2003). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. Clinical Microbiology Reviews, 16: 220-229.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Hartmann, B., Scheu, P. and Stolle, A. (2007). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in meat using real-time PCR. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2: 202-208.
- Grant, T., Bennett-Wood, V., and Robins-Browne, R.M. (1998). Identification of virulenceassociated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. Infectious and Immunity, 66: 1113-1120.
- Hanifian, S. and Karim, G. (2006). A study on the effect of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on survival of *Yersinia enterocolitica* during manufacture and storage of Iranian white cheese. Iranian Journal of Veterinary Sciences, 3: 485-492 [In Farsi].
- Hanifian, S. (2009). The effect of inoculation levels of *Yersinia enterocolitica* on its survival in brined white cheese. Veterinary Journal of Islamic Azad University of Tabriz Branch, 3: 427-434 [In Farsi].
- Hanifian, S. and Khani, S. (2012a). Prevalence of virulent *Yersinia enterocolitica* in bulk raw milk and retail cheese in northern-west of Iran. International Journal of Food Microbiology, 155: 89-92.
- Hanifian, S. and Khani, S. (2012b). Fate of *Yersinia enterocolitica* during manufacture, ripening and storage of Lighvan cheese. International Journal of Food Microbiology, 156: 141-146.
- Hartman, P.A., Deibel, R.H. and Sieverding, L.M. (2001). Enterococci, In: Pouch Downes, F., Ito, K. (Editors.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3th Edition. American Public Health Association, Washington DC, pp. 83-87.
- Hudson, J., King, N., Cornelius, A., Bigwood, T., Thom, K. and Monson, S. (2008). Detection, isolation and enumeration of *Yersinia enterocolitica* from raw pork. International Journal of Food Microbiology, 123: 25-31.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2008). Microbiology of milk and milk products specifications. 2nd revision, ISIRI No. 2406 [In Farsi].

- Pearce, L.E., Smythe, B.W., Crawford, R.A., Oakley, E., Hathaway, S.C. and Shepherd, J.M. (2012). Pasteurization of milk: the heat inactivation kinetics of milk-borne dairy pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. Journal of Dairy Science, 95: 20-35.
- Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L. (2003). Yersinia species, In: Miliotis, D. M. and Bier, J. W. (Editors.), International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, Inc, pp. 143-144.
- Soltan-Dallal, M.M., Tabarraie, A. and MoezArdalan, K. (2004). Comparison of four methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw and pasteurized milk from northern Iran. International Journal of Food Microbiology, 94: 87-91.
- Sharifzade, A., Akhavan, M., Zarasvandi, A. and Al-Agha, S. (2005). Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* from raw and pasteurized milk of Chahar-Mahal-Bakhtiyari province. Iranian Food Science and Technology Journal, 1: 15-19 [In Farsi].
- Skurnik, M., Radström, P., Knutsson, R., Segerman, B., Hallanvuo, S., Thisted Lambertz, S., Korkeala, H. and Fredriksson-Ahomaa, M. (2010). Yersinia. In: Liu, D. (Editor), Molecular detection of foodborne pathogens. CRC Press, New York, pp. 501-513.
- Thisted Lambertz, S. and Danielsson-Tham, M.L. (2005). Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 71: 3674-3681.
- Vishnubhatla, A., Fung, D., Oberst, R., Hays, M., Nagaraja, T., and Flood, S. (2000). Rapid 5′-nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4131-4135.
- Weagant, S.D. and Feng, P. (2001). Yersinia, In: Pouch Downes, F. and Ito, K. (Editors.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3th Edition. American Public Health Association, Washington DC, pp. 421-428.
- Weagant, S.D., Feng, P. and Stanfield, J.T. (1998). *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, In: Jackson, G.J., Merker, R.I. and Bandler, R. (Editors.), Bacteriological analytical manual, 8th Edition. FDA publication, USA, pp. 156-170.

Isolation, identification and biotyping of virulent *Yersinia enterocolitica* from pasteurized milk

Hanifian, S.*

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author: hanifian@iaut.ac.ir
(Received: 2011/6/10 Accepted: 2012/6/26)

Abstract

In order to investigate the presence of virulent *Yersinia enterocolitica* in pasteurized milk, 242 samples were collected from Tabriz retails from 2011 to 2012. The samples were enriched in PSBB. Afterwards, *virF* and *ail* genes were exploited as target sequences for the detection of virulent *Y. enterocolitica*. PCR-positive samples were cultured on CIN agar and MacConkey agar. The selected isolates were confirmed by second-phase duplex PCR. For the biotyping of *Y. enterocolitica*, certain biochemical tests were performed on the isolate. The pasteurized milk samples were further analyzed for the enumeration of hygiene indicator bacteria and qualitative alkaline phosphatase (ALP) test. Virulent *Y. enterocolitica* were detected in 6.61% (16/242) of samples by *ail*-PCR, however, using *virF*-PCR 4.13% (10/242) of the samples were identified as positive. Among PCR-positive samples only 0.41% (1/242) were isolated by culture method and confirmed by second-phase duplex-PCR. Based on the biochemical assays, the isolated *Y. enterocolitica* was identified as biotype 4. Furthermore, 11.57% (28/242) of the samples were found positive for alkaline phosphatase test. The results revealed that the number of hygiene indicator bacteria in ALP-positive samples was significantly ($p<0.01$) higher than ALP-negative samples. Since *Y. enterocolitica* is very susceptible to pasteurization process, cross contamination could be the main reason for the presence of virulent *Y. enterocolitica* in the pasteurized milk.

Key words: Pasteurized milk, *Y. enterocolitica*, PCR, *Ail*, *VirF*