رهیافت‌های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۲ شماره ۳ بهار ۱۴۰۳
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد

نجمه مولوی*[۱]، منوچهر مومنی شهرکی ۲، حسین خدابنده ی شهرکی ۱

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

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

یرسینیا انتروکولیتیکا یک باکتری گرم منفی می‌باشد که متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است. این باکتری یک باکتری پاتوژن غذایی است که به طور عمده توسط گوشت، شیر و آب آلوده منتقل می‌شود. گوشت قرمز به شکل غیر بهداشتی از منابع عمده انتقال عفونت به *یرسینیا انتروکولیتیکا* به انسان می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف بررسی فراوانی ژن‌های حدت و ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت در ایزوله های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت قرمز عرضه شده به بازار شهرکرد انجام شد. تعداد ۳۸۴ نمونه از گوشت قرمز به شکل تصادفی از فروشگاه های عرضه گوشت در شهرستان شهرکرد اخذ و به منظور شناسایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* به روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی بررسی شدند. سویه‌های میکروبی جدا شده به منظور بررسی توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت بررسی شدند و ژن‌های حدت با آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۳۸۴ نمونه گوشت قرمز از در ۶۵ نمونه (۱۶/۹۲ درصد) *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد. آلودگی در گوشت گاو (۲۷/۶۹ درصد)، در گوشت گوسفند (۳۳/۸۴ درصد) و در گوشت گوساله (۳۸/۶۴ درصد) گزارش گردید. ۳۵ ایزوله (۵۳/۸۵ درصد) واکنش بیوفیلم قوی، ۲۰ ایزوله (۳۰/۷۷ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط و ۱۰ ایزوله (۱۵/۳۸ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف را نشان دادند. فراوانی ژن‌های *ail،inv* *yadA, yst A* و *vir F* به ترتیب: ۸۳ درصد، ۴۱/۵۳ درصد، ۴۳ درصد، ۳۳/۸۴ درصد و ۲۹/۲۳ درصد گزارش شد. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین ژن‌های حدت و واکنش بیوفیلم قوی مشاهده گردید. با توجه به اهمیت گوشت قرمز در انتقال *یرسینیا انتروکولیتیکا* به انسان رعایت اصول بهداشتی و عدم مصرف گوشت آلوده، به کارگیری آزمون PCR به منظور شناسایی دقیق آلودگی در مواد غذایی توصیه می‌شود.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت:۱۴۰۳/۱۱/۱
پذیرش:۱۴۰۳/۱۱/۲۲
چاپ:۱۴۰۳/۱۱/۲۳
DOI:

کلمات کلیدی: ژن‌های حدت، گوشت قرمز، *یرسینیا انتروکولیتیکا*

* نویسنده مسئول: *Email*
Molavinajmeh15@gmail.com

مقدمه

جنس یرسینیا در خانواده انتروباکتریاسه طبقه بندی شده است. باکتری‌های این جنس بی‌هوازی اختیاری میله ای شکل و گرم منفی هستند و ممکن است متحرک یا غیر متحرک باشند. در این جنس ۱۱ گونه و ۵ بیوواریته تشخیص داده شده است. گونه *یرسینیا انتروکولیتیکا* از بیشترین اهمیت در مواد غذایی بر خوردار است. این باکتری سومین عامل ایجاد کننده اسهال بعد از سالمونلا و کمپیلو باکتر در انسان می‌باشد. این ارگانیسم در دمای کمتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد متحرک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غیر متحرک می باشد. این ارگانیسم یکی از باکتری‌های بیماری زای سرمادوست می‌باشد. رشد یرسینیاها در دامنه حرارتی ۲ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است و درجه حرارت اپتی‌مم رشد آن‌ها بین ۴۲ تا ۴۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.. رشد این باکتری‌ها در شیر دردمای ۲-۰ درجه سانتی‌گراد پس از ۲۰ روز و هم‌چنین در گوشت خوک و جوجه در دمای ۱-۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردیده است. *یرسینیا انتروکولیتیکا* پس از ۳-۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد از بین می‌رود. این ارگانیسم در مقابل انجماد نسبتا مقاوم است. سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* در دمای ۶۲/۸ درجه سانتی‌گراد در شیر به مدت ۱۷-۱ ثانیه مقاومت می نمایند. این گونه به‌طور گسترده ای درخاک، دریاچه های اب شیرین، چاه و رودخانه ها وجود دارد.. این باکتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد یک انتروتوکسین پایدار در مقابل حرارت تولید می‌کند. که در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۱۰ دقیقه تحمل می‌کند (۱). در سال ۱۸۹۴ الکساندر یرسین باکتری شناس فرانسوی، این باکتری را در یک بیماری همه گیر شده در هنگ کنگ جدا نمود و به احترام پاستور آن را *پاستورلا پستیس* نامید. هم زمان با این کشف، دانشمند ژاپنی کیتازاتو نیز به این باکتری دست یافت ولی یرسین قبل از او به انتشار کشف خود دست زد و این افتخار را نصیب خود کرد (۲). بعدها به علت داشتن خواص بیوشیمیایی مشترک مانند تخمیر قند گلوکز، نیترات مثبت بودن، متحرک بودن، تحمل املاح صفراوی و شباهت ژنتیکی با خانواده‌ی انتروباکتریاسه این جنس در خانواده‌ی انتروباکتریاسه طبقه بندی شد. یرسینیاها باکتری‌های کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری میله‌ای گرم منفی، هستند. بنابراین طبقه‌بندی آن‌ها در خانواده انتروباکتریاسه تائید می‌گردد. در ابتدا این باکتری را *باکتریوم انتروکولیتیکوم* نامیدند. علت انتخاب نام انتروکولیتیکا به این دلیل است که این‌گونه در رابطه با روده و کولون می‌باشد (۲). *یرسینیا انتروکولیتیکا* از جوندگان و حیواناتی مانند گاو، گوسفند، خوک، سگ و گربه و آب‌های آلوده توسط آن‌ها، به دست آمده است. این باکتری احتمالاً از طریق خوردن غذا، آب و تماس با وسایل آلوده به انسان منتقل می‌شود. ارتباط بیماری در نتیجه خوردن غذای آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* کاملاً مشخص شده است. تمام مواد غذایی نگهداری شده در محل سرد (یخچال)، در محل تولید یا در منزل امکان ایجاد بیماری را دارا می‌باشد (۴).

یرسینیا انتروکولیتیکا از گوشت خوک، گاو، مرغ، ماهی، صدف و هم چنین سبزیجات (از جمله کاهو، اسفناج، شاهی و کاسنی) جدا شده است. *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ارتباط با گوشت خوک می‌باشد. سروتیپ O:3 در خوک معمول می-باشد (۸-۵).

فاکتورهای بیماری‌زای یرسینیا پروتئین‌هایی هستند که موجب اتصال و داخل شدن این باکتری به سلول‌های اپیتلیال می‌شوند. *یرسینیا انتروکولیتیکا* پروتئین ۱۰۸ کیلو دالتونی را بیان می‌کند که موجب می‌شود *یرسینیا انتروکولیتیکا* توانایی تهاجم به سلول‌های میزبان را داشته باشد (۲). این پروتئین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به تعداد زیاد بیان می‌شود و احتمالا مهم‌ترین فاکتور تهاجم به پلاک های پیر می‌باشد. این باکتری هم چنین پروتئین‌های ۱۵ کیلو دالتونی را بیان می‌کند. که به باکتری اجازه ورود به سلول‌های میزبان را می-دهد. پروتئین‌های تولید شده توسط این باکتری از جنس فیبریل هستند که توسط پلاسمید کد می‌شوند و با اتصال به فیبرونکتین وکلاژن به *یرسینیا انتروکولیتیکا* امکان تهاجم به اپیتلیوم روده را می‌دهد. این باکتری از مواد غذایی مانند: شیر، سبزیجات، گوشت‌های بسته بندی شده در خلاء و فراوردهای دریایی جدا شده است. در نمونه‌های ترشحات عفونی (رنگ-آمیزی به روش وایسون) این باکتری بیماری‌زا به صورت باکتری دو قطبی به رنگ آبی پررنگ و مرکز آن به رنگ آبی روشن دیده می‌شود که نمایی شبیه سنجاق قفلی دارد. مهم-ترین انواع بیماری‌زای این باکتری شامل: *پرسینیا* پستیس، *پرسینیا* پسود و *توبرکلوریس* و *پرسینیاانترکولیتیکا* می‌باشد (۴).

اولین مرحله عفونت *یرسینیا انتروکولیتیکا* در روده کوچک اتصال به سلول‌های M پلاک‌های پیر است. دراین مرحله چندین ژن حائز اهمیت می‌باشند. یکی از آن‌ها ژنی به نام *inv* می‌باشد که پروتئین سطحی به نام Invasion را کد می‌کند. علت نامگذاری این ژن این است که که سلول‌های تولید کننده Invasion می‌توانند به سلول‌های کشت بافت متصل شده و آن را مورد تهاجم قرار دهند. هم چنین بررسی‌های اتصال و تهاجم به سلول‌های کشت بافت به وسیله‌ی لوکوس دیگری به نام *ail* (لوکوس اتصال و تهاجم) شناسایی شده است. ژن *inv* به طور ترجیحی در ۲۰ درجه سانتی گراد بیان می گردد. اما در ۳۷ درجه سانتی گراد بیان نمی‌شود. نقش اصلی این پروتئین محافظت باکتری در برابر کشته شدن توسط کمپلمان است. اثبات شده که ژن *yadA* (چسبنده A یرسینیا) مهم‌ترین شاخص بیماری‌زایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در مرحله اولیه عفونت ریه می‌باشد. فعالیت‌های *yadA* به شرح زیر است (۱۰-۸).

بیماری‌های منتقله از راه غذا یکی از مشکلات بسیار مهم در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشند. از آن‌جا که در شهرستان شهرکرد تا کنون تحقیقی در زمینه جداسازی سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* از گوشت قرمز، تعیین فراوانی فاکتورهای حدت این سویه ها و ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت صورت نگرفته است در این

تحقیق بر آن شدیم تا میزان آلودگی به این باکتری را برآورد کنیم و ضمن تعیین میزان شیوع سروتیپ O3 فاکتورهای حدت و ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت را در این سویه ها بررسی شد.

روش کار

جداسازی باکتری از گوشت

در این تحقیق به منظور جستجوی *یرسینیا انتروکولیتیکا* درگوشت قرمزعرضه شده در سطح شهرستان به روش خوشه ای- تصادفی شهرستان شهرکرد نمونه گیری صورت گرفت. نمونه ها شامل ۳۸۴ نمونه ی گوشت کاو، گوسفند و یز می-باشد که در شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید..

جهت تشخیص میکروبی *یرسینیا انتروکولیتیکا* از گوشت قرمز، ۲۵ گرم نمونه گوشت، با تیغ بیستوری در شرایط کاملا استریل به لایه های بسیار نازک بریده شد و سپس به ۲۲۵ سی سی فسفات بافر سالین با pH=۷/۲ اضافه و به مدت دو هفته در دمای یخچال سرماگذاری شد. روز چهاردهم یک سی سی از سوسپانسیون غنی شده با ۹ سی سی پتاس ۲۵٪ با یک همزن برقی به مدت ۳۰ ثانیه کاملا مخلوط گردید و سپس یک لوپ از این مخلوط بر روی محیط کشت انتخابی-افتراقی CINagar (cefsulodin-Irgasan Novobiocin) کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه انکوبه شد. پس از انجام رنگ آمیزی گرم روی کلنی‌های مشکوک و مشاهده باسیل‌های کوچک گرم منفی در آن‌ها، آزمایش‌های افتراقی جهت تعیین بیوتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا* صورت گرفت. در محیط CIN agar کلنی باکتری‌های یرسینیا به رنگ قرمز پر رنگ و به قطر ۴-۲ میلی متر مشاهده می‌گردند (۱۱).

بررسی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت

به‌منظور بررسی تولید بیوفیلم توسط باکتری از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سطوح را داشته باشند در انتها باقی مانده و به رنگ بنفش دیده می‌شوند و باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سطوح را نداشته باشند، از سطح حذف می‌شوند. جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال ویوله در ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. ایزوله‌هایی که OD مساوی یا بالاتر از ۰/۳ داشته باشند به عنوان بیوفیلم قوی، در صورتی‌که OD بین ۰/۲ تا ۰/۲۹۹ داشته باشند به‌عنوان بیوفیلم متوسط، درصورتی‌کهOD بین ۰/۱ تا ۰/۱۹۹ دارا باشند به عنوان بیوفیلم ضعیف و در صورتی‌که OD کمتر از ۰/۱ داشته باشند بیوفیلم منفی نظر گرفته می‌شوند (۱۲)

آزمایش PCR جهت تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا*

جهت تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر روی تمامی نمونه هایی که از نظر کشت مثبت تشخیص داده می-شوند، در حضور زوج پرایمر های طراحی شده زیر واکنش PCRانجام می‌شود. مشاهده باند ۳۶۱ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن این تست می‌باشد (۱۳)

Y.ent: ACCTTTGTGATTGACGTTACTCGC
Y.ent: CAAGTCGACATCGTTTACAGCG

آزمایش PCR جهت تعیین سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا*

آزمایش PCR جهت تشخیص سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا* با استفاده از زوج پرایمرهای Yer-F و Yer-R انجام شد (۱۴).

جدول (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت سروتیپ O:3 *ی‌رسینیا انتروکولیتیکا*

ژن	توالی پرایمر	اندازه ی محصول جفت باز
rfbC	Yer O3-F:CGCATCTGGGACACTAATTCG Yer O3-R:ACGAATTCCATCAAAACCACC	۴۰۵

آزمایش PCR جهت ردیابی حضور ژن‌های حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

به منظور ردیابی حضور ژن‌های حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از نمونه های گوشت قرمز، آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول انجام می‌شود..

جدول (۲): توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

ژن	پرایمر	توالی پرایمر (۵′−۳′)	اندازه ی محصول جفت باز
inv	*Yc1* *Yc2*	CTGTGGGGAGAGTG GGGAAGTTTGG GAACTGCTTGAATC CCTGAAAACCG	۵۷۰
ail	*Ail1* *Ail2*	ACTCGATGATAACT GGGGAG CCCCCAGTAATCCA TAAAGG	۱۷۰
yst A	*Pr2a* *Pr2c*	AATGCTGTCTTCAT TTGGAGCA ATCCCAATCACTAT GACTTC	۱۴۵
virf	*Virf1* *Virf2*	TCATGGCAGAACAG CAGTCAG ACTCATCTTACCAT TAAGAAG	۵۹۰
yadA	yadA1 yadA2	CTTCAGATACTGGT GTGCGCTGT ATGCCTGACTAGGA GCGATATCC	۸۴۹

یافته ها

در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و تست‌های بیوشیمیایی از مجموع ۳۸۴ نمونه گوشت قرمز از در ۶۵ نمونه (۱۶/۹۲ درصد) *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد. در محیط CIN agar کلنی باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* به رنگ قرمز پر رنگ و به قطر ۴-۲ میلی متر مشاهده گردید. آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت گاو (۲۷/۶۹ درصد)، در گوشت گوسفند (۳۳/۸۴ درصد) و در گوشت گوساله (۳۸/۶۴ درصد) گزارش گردید. که در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین نوع گوشت و آلودگی با *یرسینیا انتروکولیتیکا* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید.

جدول (۳): فراوانی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه های گوشت قرمز

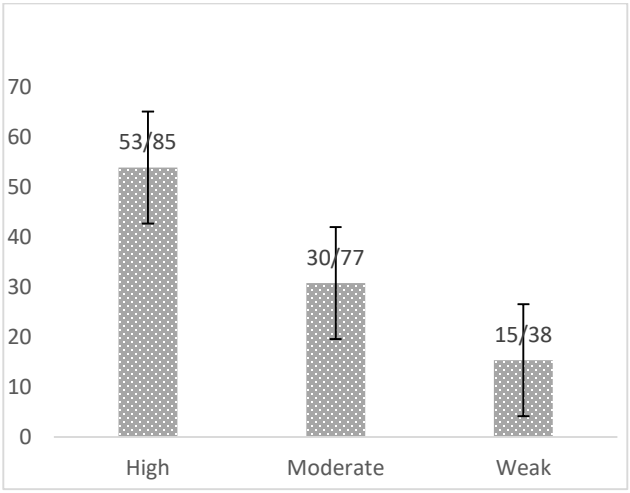
نوع نمونه	تعداد نمونه اخذ شده	تعداد موارد مثبت	درصد
گوشت گاو	۱۲۸	۱۸	۲۷/۶۹
گوشت گوسفند	۱۲۸	۲۲	۳۳/۸۴
گوشت گوساله	۱۲۸	۲۵	۳۸/۶۴
مجموع	۳۸۴	۶۵	۱۶/۹۲

تایید ایزوله ها با روش PCR

در آزمون PCR تمامی نمونه های مثبت شده در کشت در حضور پرایمر اختصاصی طراحی شده مورد بررسی قرار گرفتند که در تمامی موارد باند ۳۷۲ جفت بازی مشاهده گردید. سروتیپ **O:3** در ۳۰ ایزوله (۴۶/۱۵ درصد) از نمونه ها با داشتن باند ۴۰۵ جفت بازی مثبت گزارشدند.

نتایج مربوط به آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

روش میکروتیتر پلیت به‌منظور بررسی تشکیل بیوفیلم ۶۵ ایزوله *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از نمونه های گوشت قرمز استفاده شد، که براساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. ۳۵ ایزوله (۵۳/۸۵ درصد) واکنش بیوفیلم قوی، ۲۰ ایزوله (۳۰/۷۷ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط و ۱۰ ایزوله (۱۵/۳۸ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف را نشان دادند. واکنش بیوفیلم منفی در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها مشاهده نگردید.



نمودار (۱): نتایج مربوط به آزمایش بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

ردیابی ژن‌های حدت

بیشترین فراوانی مربوط به ژن *inv* (۸۳ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به ژن *virF* (۲۹/۲۳ درصد) بود. نتایج در جدول (۴) نشان داده شده است.

جدول (۴) فراوانی ژن‌های حدت در ایزوله های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

ژن	*inv*	*ail*	*stA*	*adA*	*virF*
تعداد	۵۴	۲۷	۲۸	۲۲	۱۹
درصد	۸۳	۴۱/۳	۴۳	۳۳/۴	۲۹/۳

فراوانی ژن‌های *inv*، *ail*، *yadA, yst A* و *vir F* در ایزوله هایی که بیوفیلم قوی تولید می‌کردند به ترتیب: ۵۹/۲۵ درصد، ۷۷/۷۷ درصد، ۸۲/۱۴ درصد، ۸۷/۵ درصد و ۸۷/۹۴ درصد گزارش گردید و در ایزوله هایی که بیوفیلم متوسط تولید می‌کردند به ترتیب: ۲۹/۶۲ درصد، ۱۸/۵۱ درصد، ۲۸/۱۴ درصد، ۹/۳۷ درصد و ۲۱/۰۵ درصد گزارش گردید. هم‌چنین در ایزوله هایی که بیوفیلم ضعیف تولید می‌کردند به ترتیب: ۹/۲۵ درصد، ۳/۷۰ درصد، ۳/۵۷ درصد، ۳/۱۲ درصد و ۵/۲۶ درصد گزارش گردید.

جدول (۵): فراوانی ژن‌های حدت در ایزوله های *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر اساس واکنش بیوفیلم

ژن‌های ویرولانس	واکنش بیوفیلم		
	قوی	متوسط	ضعیف
Inv	۳۲	۱۶	۵
	۵/۲۵۹	۲/۶۲۹	/۲۵۹
Ail	۲۱	۵	۱
	۷/۷۷۷	۱/۵۱۸	/۷۰۳
ystA	۲۳	۴	۱
	۸/۱۴۲	۱/۲۸۴	/۵۷۳
yadA	۲۸	۳	۱
	۸۷/۵	۹/۳۷	/۱۲۳
virF	۱۵	۴	۱
	۸/۹۴۷	۲/۰۵۱	/۲۶۵

براساس آزمون کای دو بین واکنش بیوفیلم قوی و ژن-های *inv, ail, virF, yst A* و*yadA* رابطه آماری معنادار آماری گزارش گردید (p-value<0.05)

بحث

میکروب‌ها تغییرات مطلوب و نامطلوب در مواد غذایی پدید می آورند. تغییرات نامطلوب سبب آلودگی مواد غذایی و در نهایت فساد مواد غذایی می‌گردد. فساد عبارت است از هر نوع تغییر در طعم، بو، بافت یا ظاهر ماده غذایی که آن را نامطبوع و بدمزه می‌کند. فساد مواد غذایی مسئله اکولوژیک است. بسیاری از مواد غذایی تحت شرایطی که آلودگی با انواع میکروب‌ها را فراهم می‌سازد تهیه یا تولید می‌شود و رشد انواع میکروب‌ها به ترکیب مادۀ غذایی و شرایط انبار کردن بستگی دارد. میکروب‌هایی که قادر به رشد هستند ویژگی-های متابولیکی غذا را تغییر داده و طعم، بو، بافت و ظاهر فرآورده را دگرگون می‌سازند. فرآورده های حیوانی دارای میکروب‌های درونی بوده و هم‌چنین توسط محیط و انسان آلودگی پیدا می‌کنند**.** هرگاه حیوان به طرز بهداشتی ذبح گردد بخش درونی گوشت آن عاری از میکروب است. سطح بدن حیوان که در معرض هوا قرار می‌گیرد به وسیله ی میکروب‌های پوست و روده، وسایل کشتن و هوای کشتارگاه آلوده می‌گردد. گوشت ماهی و مرغ نیز با انواع میکروب‌ها پوشیده شده به خصوص هنگامی‌که آن را تمیز کرده و بر روی تخته آلوده خرد می کنند آلودگی آن افزایش پیدا می-کند. میکروب‌های مختلفی درون گوشت قادر به رشد هستند

یک دسته ازاین باکتری‌ها *یرسینیا انتروکولیتیکا* می‌باشد (۴). *یرسینیا انتروکولیتیکا* یک پاتوژن گرم منفی رایج منتقله از طریق مواد غذایی که در آب، فرآورده های لبنی و گوشت یافت می‌گردد. این پاتوژن یکی از رایج‌ترین عوامل التهاب دستگاه گوارش ناشی از مواد غذایی در غرب و اروپای شمالی است و دارای بروز فزاینده ای در ایالات متحده و کانادا است. شیوع بیماری‌های منتقله از مواد غذایی توسط *یرسینیا انتروکولیتیکا* تقریباً با تمام سروتیپ‌های بیماری‌زا همراه است. سروتیپ O:8 خاصیت ذاتی عفونی فاجعه باری برای انسان به همراه دارد در حالی‌که سروتیپ‌های O:3, O:9 مرتبط با موارد خفیف‌تر هستند (۳-۱).

مطالعه ی حاضر برآوردی از شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت قرمز، شناسایی سویه های تولید کننده ی بیوفیلم و بررسی حضور ژن‌های حدت این باکتری و ارتباط بین توانایی تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت در این باکتری بود. با توجه به این که مسئله بهداشت غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است مشابه چنین تحقیقی در کشورهای مختلف و هم‌چنین در ایران صورت گرفته است و محققین توانسته اند باکتری‌های مختلفی که از طریق مواد غذایی انتقال می یابند همانند یرسینیا، سالمونلا و *کمپیلو باکترژژونی* را از مواد غذایی جدا نمایند (۸).

یافته‌های دیگر محققان حاکی از آن است که *یرسینیا انتروکولیتیکا* شایع‌ترین گونه ی یرسینیا در گوشت قرمز و مرغ است. سویه های پاتوژن یرسینیا حامل پلاسمید ۷۰ کیلو جفت بازی هستند که pYVنامیده می‌شود. و باعث کد شدن ژن‌های ***virF, yadA, tccC, ysa*** می‌گردد. یا این که با دارا بودن ژن‌های کروموزومی ***inv, ail, yst*** بیماری‌زایی خود را اعمال می‌کنند (۱۴).

بعضی از سویه های پاتوژن فاقد پلاسمید ویرولانس می-باشند، این دسته از باکتری‌ها با دارا بودن ژن *ystA* باعث کد شدن انتروتوکسین مقاوم به حرارت می‌گردند. درکشت‌های سلولی مشخص گردیده که این ژن در تهاجم باکتری به سلول‌های پستانداران نقش دارد. از طرف دیگر محققین نشان داده ند که علت اسهال در عفونت‌های ناشی از *یرسینیا انتروکولیتیکا* وجود ژن *yst* می باشد (۹)

در این تحقیق و تحقیقات مشابه ژن‌های *ail*، *yst* و *inv* که ژن‌های کروموزومی هستند و در تمامی سویه های پاتوژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* وجود دارند مورد بررسی قرار گرفتند. 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 از طرف دیگر به باکتری این امکان را می‌دهد که از دسترس سیستم کمپلمان و سایر اجزای سیستم ایمنی فرار کند (۱۳). با توجه به اهمیت این ژن‌ها در ویرولانس باکتری در این تحقیق بر آن شدیم تا به فراوانی این ژن‌ها بپردازیم.

همان‌گونه که در قسمت نتایج بیان گردید، از مجموع ۳۸۴ نمونه گوشت قرمز از در ۶۵ نمونه (۱۶/۹۲ درصد) *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد. آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت گاو (۲۷/۶۹ درصد)، در گوشت گوسفند (۳۳/۸۴ درصد) و در گوشت گوساله (۳۸/۶۴ درصد) گزارش گردید. که در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین نوع گوشت و آلودگی با *یرسینیا انتروکولیتیکا* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید. وجود لایه ی لزج و چسبناک سطحی به صورت کپسول در سطح سلول باکتری باعث مقاوم شدن باکتری به فاگوسیتوز می‌گردد. وجود پلی ساکارید خارج سلولی توسط باکتری باعث تشکیل بیوفیلم می‌گردد. این ساختار در ایجاد عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها بسیار مؤثر است. بیوفیلم نه تنها میکروارگانیسم‌های تشکیل دهنده آن را از تیمار بهداشتی محافظت می‌کند بلکه محلی برای مبادله مواد ژنتیکی است. اصولا باکتری‌ها وقتی تشکیل بیوفیلم می‌دهند مقاومت آن‌ها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می‌شود و از طرف دیگر در بیوفیلم مواد را نگهداری و تغلیظ می‌کنند و از مواد متابولیکی یکدیگر مصرف مِی‌کنند. در یک بیوفیلم ممکن است جذب مواد آلی و تغذیه کمتر از زمانی باشد که باکتری‌ها آزاد هستند ولی پایداری ژنتیکی در آن‌ها بیشتر است و پلاسمیدها در بیوفیلم پایدارتر می‌باشند. بیوفیلم باکتری را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی بادی‌ها و سلول‌های فاگوسیتوز مقاوم می‌کند. بیوفیلم باکتریایی، جامعه ای از باکتری‌های چسبنده و رشد کننده بر سطوح جاندار یا بی جان محصور در یک ماتریکس پلی ساکاریدی می‌باشد. در طبیعت میکروارگانیسم‌ها اغلب در ارتباط نزدیکی با سطوح جامد رشد می‌کنند که این سطوح ممکن است بافت‌های نرم زنده و یا سطوح غیر زنده، مواد غوطه ور و یا ذرات خاک باشد. ارتباط و پیوستگی با سطوح جامد منجر به تشکیل بیوفیلم میکروبی می‌گردد. تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای ارگانیسم متشکله دارد از جمله حفاظت آن‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی کننده ها، حفظ و نگهداری محیط فیزیکی شیمیایی مناسب برای رشد و بقاء میکروارگانیسم، بنابراین آن‌ها قادرند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کرده و به حیات خود ادامه دهند. تصور می‌شود که تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای ارگانیسم‌های متشکله دارد از جمله حفاظت آن‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها هم‌چنین حفظ و نگهداری محیط فیزیکوشیمیایی مناسب برای رشد و بقا، بنابراین آن‌ها قادرند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کرده و به حیات خود ادامه دهند. با توجه به مقاومت آنتی بیوتیکی بیوفیلم باکتری-ها نسبت به حالت پلانکتونیک، این مسئله اهمیت بررسی و تشخیص بیوفیلم در عفونت ایجاد شده و لحاظ این مسئله را در درمان نشان می‌دهد (۱۲).

در این تحقیق در روش میکروتیتر پلیت از ۶۵ ایزوله *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از نمونه های گوشت قرمز استفاده واکنش بیوفیلم قوی در ۳۵ ایزوله (۵۳/۸۵ درصد)،

واکنش بیوفیلم متوسط در ۲۰ ایزوله (۳۰/۷۷ درصد) و واکنش بیوفیلم ضعیف در ۱۰ ایزوله (۱۵/۳۸ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده گردید. فراوانی ژن‌های *inv*،*ail*، *A ,yadA* و *yst* و *vir F* و در ایزوله هایی که بیوفیلم قوی تولید می‌کردند نسبت به ایزوله هایی که بیوفیلم متوسط و ضعیف تولید می-کردند بیشتر گزارش شد.

Thoerner و همکاران درسال ۲۰۰۳ در مطالعه ایی که بر روی ۱۴۰ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از منابع مختلف انجام دادند، نشان دادند، بیوتیپ‌های **1B, 2, 3, 4** مربوط به انواع بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از انسان و حیوانات می‌باشند و بیوتیپ 1A در انواع غیربیماری‌زای انسانی *یرسینیا انتروکولیتیکا* مشاهده می‌شود. در این تحقیق از ۵۳ باکتری جدا شده از حیوانات ۴۶ مورد (۸۷ درصد) از خوک جدا شده بود که مربوط به بیوتیپ‌های بیماری‌زا بود. ۲ بیوتیپ از بز، ۴ بیوتیپ از سگ و ۵ بیوتیپ 1A از گاو و سگ جداشده بود. تحقیقات آن‌ها نشان داد، که سروتیپ‌های **O:3** و **O:9** شایع‌ترین سروتیپ‌ها در انواع بیماری‌زای انسانی می‌باشند. به طوری‌که از ۴۲ مورد *یرسینیا انتروکولیتیکای* انسانی ۱۶ مورد مربوط به سروتیپ **O:3**، ۱۱ مورد **O:9** و ۱۵ مورد سروتیپ‌های دیگر تشخیص داده شدند. جهت بررسی وجود ژن‌های ویرولانس مشخص گردید ۸۰ درصد از استرین‌های بیوتیپ 1A که با موارد غیر بیماری‌زای انسانی ارتباط دارند فقط از نظر ژن *inv* مثبت می‌باشند. در صورتی که در استرین های بیوتیپ ۲ در ۶۶ درصد موارد از نظر ژن‌های *ydA, ail* و *virF* مثبت می‌باشند. در بیوتیپ ۳، ۷۳ درصد موارد از نظر ژن در *virF* مثبت می‌باشند در صورتی‌که *yadA* در این نمونه ها منفی گزار ش گردید در استرین‌های بیوتیپ ۴، ۴۶ درصد موارد از نظر ژن‌های *ystB* و *ail* مثبت تشخیص داده شدند (۱۵).

در بررسی انجام شده توسط Zheng و همکاران در ۲۰۰۸ که بر روی ۱۶۰ نمونه *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از مدفوع انسانی صورت گرفت، فراوانی ژن‌های ***inv*, *virF, yadA,ystA,ail*** به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۴ درصد، ۸۹ درصد و ۸۲ درصد گزارش گردید (۱۴).

در مطالعه انجام شده توسط Waneet و همکاران که با هدف رد یابی ژن *ail* بر روی ۲۱۵ سویه بالینی یرسینیا و ۴۰ سویه از سایر گونه های باکتریایی انجام شد، ژن *ail* در بیوتیپ‌های بیمار زای 1B, 2, 3, 4,5 مشاهده گردید و بیوتیپ‌های 1A فاقد ژن *ail* بودند (۱۶).

در مطالعه ی انجام شده توسط Niskanen و همکاران درسال ۲۰۰۳ در سوئد که بر روی ۴۶۸ نمونه مدفوع از ۵۸ گونه ی مختلف از پرندگان مهاجر انجام شد، ۱۲/۸٪ از گونه های یرسینیا از نمونه ها جداسازی شدند. بیشترین گونه ی یرسینیای جدا شده *یرسینیا انتروکولیتیکا* با ۵/۶ درصد گزارش گردید. در این بررسی ۱۰ نمونه *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از غاز دارای سروتیپ ***O*:3** بودند که عامل بیماری های انسانی می‌باشند. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق و سایر تحقیقات می‌توان نتیجه

گرفت که وجود تمامی ژن‌های ویرولانس در سویه های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* ضروری نمی‌باشد به طوری‌که بعضی از این سویه ها ممکن است فاقد چندین ژن ویرولانس باشند و بیماری‌زایی خود را از طریق فاکتورهای ناشناخته دیگر اعمال نمایند (۱۷).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Thisted انجام شد نشان دادند که خوک‌ها به عنوان مخزن اصلی *یرسینیا انتروکولیتیکای* منتقله از غذا هستند. آن‌ها گوشت خوک را از یخچال و مغازه‌های محلی که توسط بیماران مبتلا به یرسینیوز خریداری شده بودند جمع آوری کردند و برای بررسی حضور گونه های 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٪) از گوشت‌های خام خوک گونه ی پاتوژن یرسینیا شناسایی شدو سروتیپ ***O*:3** *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ۶ مورد به روش *PCR* شناسایی شد (۱۸).

از نظر تئوری چنین به نظر می‌رسد که سویه های پاتوژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* باید واجد تمامی ژن‌های ویرولانس (کروموزمی و پلاسمیدی) باشند ولی تحقیقات مختلف نشان داد که تنها ژن *inv* در تمامی سویه های پاتوژن وجود دارد و بقیه ژن‌های ویرولانس به میزان کمتری وجود دارند یا اصلا وجود ندارند. بنابراین برای ایجاد بیماری‌زایی توسط این باکتری وجود تمامی ژن‌های ویرولانس ضروری نمی‌باشد و چگونگی ایجاد بیماری توسط این باکتری به بیوتیپ و سروتیپ این باکتری بستگی دارد. بنابراین این نکته بدیهی است که سویه های پاتوژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* دارای ژن‌های ویرولانس ناشناخته دیگر باشند که بر روی پلاسمید یا کروموزم واقع شده اند. استرین‌های بیوتیپ 1A که برای انسان بیماری‌زایی ندارند. ممکن است فاقد فاکتورهای ویرولانس باشند از این رو غیر بیماری زا می‌گردند. هر چند تحقیقات دیگر انجام شده توسط محققین دیگر نشان داده که بعضی از استرین‌های بیوتیپ 1A از نظر وجود ژن *ystB* مثبت هستند.

با توجه به نتایج به دست آمده که حاکی از حضور *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت قرمز می‌باشد و نیز از آن‌جایی که این باکتری به راحتی از طریق غذا قابل انتقال بوده و به راحتی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال رشد می‌کند. لذا توصیه می‌گردد که مسئولین بهداشتی کشور توجه خاصی به این مسئله مبذول داشته تا از خطرات بهداشتی و اقتصادی آن جلوگیری به عمل آید.

.

.

.

مراجع

1- Alenizi D, Ringwood T, Redhwan, A, Bouraha B, Wren BW, Prentice M. All *Yersinia enterocolitica* are pathogenic: Virulence of phylogroup 1 *Y.*

strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. J Med Microbiol. 2006; 55 (2): 1539–1548.

9- Lambertz ST, Nilsson CH, Lindblad M. Real – time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food, Applied and Environmental Microbiology. 2008. 74(19):6060-6067

10- Thisted lambertz S, Danielsson TN, Idenrification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR. Appl Environ Microbiol. 2005; 71: 3674-3681.

11- Thoemer P, Kingombe C, Eissig CB. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberclosis* and investigation of virulence gene distribution. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 1810-1816.

12- Bottone EJ. *Yersina enterocolitica* overview and epidemiologic correlates, Microbes infect. 1999; 1(4): 323-30.

13- Aulisiso CC, Stanfield JT. Evaluation of virulence factor testing and Characteristics of pathogenicity in *Yersinia enterocolitica* infect. 1983; Immune. 40:300-335

14- Zheng, H, Sun Y. 2008, Investigation of virulence gence in slinical isolates of *Yersinia enterocolitica.* Med Microbiol. 2008; 53 (2): 368-374.

enterocolitica in a Galleria mellonella infection model. Microbiol. 2016; 162 (8): 1379-1387.

2- Altrock A, Seinige D, Kehrenberg C. *Yersinia enterocolitica* isolates from wild boars hunted in lower saxony, Germany. Appl and Environ Microbiol. 2015; 81(14): 4835–4840.

3- Bancerz KA, Lipczynska-Ilczuk K. Evaluation of the correlation between the mRNA expression Levels of *ystA* and *ymoA* genes in *Y. enterocolitica* strains with different enterotoxic properties. Pathogens. 2021; 10 (9): 1136. 1150.

4- Bancerz KA, Szczerba TA, Platt SA, Michalczyk M, Szweda W. Characterization of ail-positive *Yersinia enterocolitica* of different biotypes using HRMA. Int J Food Microbiol. 2018; 269: 46–51.

5- Bari ML, Hossain MA, Isshiki K. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in foods. J Pathogens. 2011; 54 (2): 1-12.

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

7- Fukushima H, Shimizu S, Inatsu Y. *Yersinia enterocolitica* and *Yersina pseudotuberculosis* detection in food. J path. 2011; 45 (4): 56-67.

8- Juliana P, Falcao DP, Andre PS, Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica*

15- Thoemer P, Kingombe C, Eissig-Choisa B. PCR Detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberclosis* and investingation of virulence gene distribution. Appl Environ Microb. 2003; 69: 1810-1816.
16- Wannet WJ, Ressinj M. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. J Clin Microbiol. 2001. 39(2): 4483-7786.
17- Niskanen T, waldnstrom J, Fredriksson M. Vir F positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. Appl Environmen Microbiol. 2003; 69: 4670-4675.
18- Thisted lS, Danielsson N. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR. Appl and Environmental Microbiology. 2005; 71: 3674-3681.

Relationship between biofilm production and virulence factors in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from red meat in Shahrekord city

Najma Molavi[1]*, Manouchehr Momeni[2], Hussein Khodabandeh[1]
1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Silences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: Molavinajmeh15@gmail.com

Abstract

Yersinia enterocolitica is a gram-negative bacterium that belongs to the Enterobacteriaceae family. This bacterium is a food pathogenic bacterium that is mainly transmitted by contaminated meat, milk and water. Unsanitary meat is one of the main sources of *Yersinia enterocolitica* infection to humans. The present study was conducted with the aim of investigating the frequency of virulence genes and the relationship between biofilm production and virulence factors in *Yersinia enterocolitica* isolates isolated from meat supplied to Shahrekord market. 384 samples of red meat were randomly collected from meat supply stores in Shahrekord city and analyzed by biochemical and molecular methods in order to identify *Yersinia enterocolitica*. The isolated microbial strains were investigated in order to investigate the biofilm production ability by microtiter plate method and the virulence genes were investigated by PCR test. From a total of 384 red meat samples, *Yersinia enterocolitica* was isolated from 65 samples (16.92%). Contamination was reported in beef (27.69%), mutton (33.84%) and veal (38.64%). 35 isolates (53.85%) showed strong biofilm reaction, 20 isolates (30.77%) showed moderate biofilm reaction and 10 isolates (15.38%) showed weak biofilm reaction. The frequencies of *inv*, *ail*, *yadA*, *ystA* and *virF* genes were reported as: 83%, 41.53%, 43% 33.84% and 29.23%, respectively. In the statistical analysis with Chi-square test, a significant relationship was observed between virulence genes and strong biofilm reaction. Considering the importance of red meat in the transmission of *Yersinia enterocolitica* to humans, it is recommended to follow the hygiene principles and not to consume contaminated meat, to use the PCR test in order to accurately identify the contamination in food.

Key words: Meat, Virulence genes, *Yersinia enterocolitica*,.