نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هجدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۱،
پیاپی ۴۴ : ۶۲-۵۱

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* و شناسایی عوامل حدت آن در حیوانات خانگی و صاحبان آن‌ها در شهرستان اصفهان

سایه وهابی [۱]، علی شریف‌زاده*[۲]

۱-دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲-دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۷

چکیده

حیوانات خانگی مانند سگ و گربه منابع بالقوه آلودگی های قابل انتقال از جمله *یرسینیا انتروکولیتیکا* به انسان به خصوص کودکان می باشند. دستگاه گوارش این حیوانات، آلودگی ها را در خود نگاه داشته و میتوانند به عنوان یک ناقل برای صاحبان خود محسوب شوند. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی آلودگی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در سگ ها و گربه های به ظاهر سالم و صاحبان آنها در شهرستان اصفهان انجام گردید. بدین منظور، سواب‌های مدفوعی از ۱۱۵ سگ و گربه به ظاهر سالم و صاحبان آن ها اخذ و با استفاده از روش‌های کشت و مولکولی آلودگی *یرسینیایی* به همراه حضور ژن‌های حدت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، آلودگی *یرسینیا انتروکولیتیکا* را در ۳۲٪ سگ ها، ۴٪ گربه‌ها، ۲۴٪ صاحبان سگ و ۴٪ صاحبان گربه نشان داد.

ارتباط معنی‌داری بین سن، بیماری و نحوه نگهداری با شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در سگ‌ها مشاهده شد هم چنین میزان آلودگی صاحبان سگ و گربه با آلودگی سگ و گربه‌ها ارتباط مستقیمی داشت. نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین حساسیت و مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین بود. حیوانات آلوده ممکن است منبع اصلی عفونت محسوب گردد. این نتایج می تواند در برنامه های پیشگیری و کنترلی مفید واقع گردد

کلمات کلیدی: *یرسینیا انتروکولیتیکا*، ژن حدت، سگ، گربه، انسان

*نویسنده مسئول: علی شریف زاده

آدرس: دپارتمان میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

پست الکترونیک: sharifzadeh@iaushk.ac.ir

مقدمه

از مهم ترین عوامل بیماری‌زا که از طریق دستگاه گوارش حیوانات خانگی (سگ و گربه) به انسان منتقل می شود، می توان به *سالمونلا، کمپیلوباکتر ژژونی، یرسینیا انتروکولیتیکا، کریپتوسپوریدیوم، استرونژیلوئیدس، استرکورالیس و اکینوکوکوس* اشاره نمود (9). از آن جا که با اینگونه حیوانات خانگی مشابه اعضای خانواده ارتباط مشترک برقرار می شود لذا این گونه از حیوانات می توانند به عنوان مخزن در برخی از آلودگی ها نقش ایفا نمایند. در بسیاری از نقاط دنیا، حیوانات خانگی نقش مستقیمی در انتقال بیماریهای مشترک دارند. هر چند تعداد دقیق آلودگی هایی که از طریق حیواناتی مانند سگ و گربه به انسان منتقل می شود دقیقا معلوم نیست ولی تخمین زده می شود ۷۰ نوع آلودگی بدین طریق به انسان منتقل می گردد(۲۰). حیوانات خانگی از جمله سگ و گربه به عنوان منبع برخی از آلودگی ها از جمله *یرسینیا* مطرح هستند. *یرسینیا انتروکولیکا* و *یرسینیا سودوتوبرکلوزیس* دو عامل مهم در آلودگی انسانی محسوب می گردند (8). این دو عامل طیف میزبانی وسیعی دارند که شامل خوک، سگ، پرندگان و حیوانات حیات وحش می شود. مطالعات بسیاری نشان دادند که خوک و سگ به عنوان مهمترین عوامل انتقال *یرسینیا انتروکولیتیکا* به انسان شناخته می‌شوند (10). *یرسینیا انتروکولیتیکا* باکتری سرمادوست و هوازی_ بی هوازی اختیاری است که غالبا در عفونت های ناشی از مواد غذایی موجود می باشد و مطالعات اپیدمیولوژیک انطباق شیوع بیماری ناشی از این باکتری و مصرف چنین غذاهای آلوده ای را آشکار می سازد(۱۲). شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در کشورهای پیشرفته به خصوص در فصول سرد بیشتر است که علت شیوع فصلی این آلودگی را می توان سرمادوست بودن این پاتوژن دانست (3). *یرسینیا انتروکولیتیکا* هم چنین می تواند از طریق تماس مستقیم یا غیرمستقیم با حیوان آلوده نیز علاوه بر خوردن مواد غذایی و یا آب آلوده به انسان منتقل شود. به خصوص در کودکان، به علت نشستن دست بعد از تماس با حیوانات ناقل، عامل بیماری با حمله به مخاط روده، آن را نفوذپذیر نموده و پس از مستقر شدن در عقده‌های لنفاوی ایلئوسکال و مزانتر، باعث التهاب عقده‌های لنفاوی می‌شود (۱۴). *یرسینیا*های بیماری‌زا، باکتری‌های داخل سلولی اختیاری اند که عوامل حدت آنها در کروموزوم و پلاسمید رمز می‌شود. بسیاری از این عوامل حدت جهت زنده ماندن و تکثیر *یرسینیا*ها داخل ماکروفاژها مورد نیازند. *یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و یرسینیا انتروکولیتیکا* کمتر از *یرسینیا پستیس* بیماری‌زا بوده و به ندرت موجب عفونت عمومی میشوند(5). مکانیسم بیماری‌زایی در بیماری های روده‌ای که به وسیله *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *سودوتوبرکلوزیس* ایجاد می‌گردند، به طور کامل شناخته نشده است ولی اتصال به سطوح مخاطی و متعاقب آن تهاجم باکتریایی به وسیله عواملی مانند پروتئین های تهاجمی که تمایلی برای چسبیدن به انتگرین های سطح سلولی دارند انجام می گیرد. به محض ورود به مخاط، باکتری به وسیله ماکروفاژها بلعیده می‌شود. این باکتری‌ها توان زنده ماندن در ماکروفاژها را داشته و توسط آنها به گره‌های لنفاوی انتقال می یابند. تکثیر در گره های لنفاوی با گسترش ضایعات نکروتیک و ترشحات نوتروفیلی همراه است. بقای *یرسینیا سودو توبرکلوزیس و انتروکولیتیکا* با پروتئین های ضد فاگوسیتی که به وسیله آنها ترشح می گردد، افزایش می یابد. این پروتئین ها با عملکرد طبیعی نوتروفیل های میزبان در تعارض است.

یرسینیا پستیس بیشتر از دو یرسینیای بیماری‌زای دیگر، قدرت تهاجمی داشته و عوامل بیماری‌زای بیشتری دارد(۱۶). این عوامل شامل پروتئین کپسولی ضد فاگوسیتی و فعال کننده پلاسمینوژن است که به گسترش عفونت کمک می‌کند. اندوتوکسین که با اندوتوکسین‌های تولید شده به وسیله دیگر اعضای انتروباکتریاسه مشابهت دارد و در پاتوژنز بیماری دخیل است (4). سروتیپ های بیماری زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* دارای ژن *ail* هستند که برای اتصال و حمله به سلول‌های میزبانی ضروری است (۱۱). از آن جا که آلودگی *یرسینیا انتروکولیتیکا*، بین انسان و حیوان مشترک بوده و این باکتری از مهمترین عوامل بروز گاستروانتریت می باشد شناسایی و استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی جدید بر علیه این باکتری ضروری است. در سال های اخیر گزارش‌هایی از مقاومت دارویی سویه‌های این باکتری در سطح جهان ارائه شده است (۱). بر اساس نتایج محققین در مورد نتیجه تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی *یرسینیاانتروکولیتیکا* جداشده از گوشت ماکیان مشخص گردید که همه باکتری‌های جداشده به آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، کلاوولانیک اسید و سفازولین مقاومت داشتد (۱۳). به هر حال با توجه به اهمیت این باکتری به خصوص در بهداشت عمومی، این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* و عوامل حدت آن در حیوانات خانگی و صاحبان آن ها در شهرستان اصفهان انجام گردید.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر در درمانگاه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مستقر در شهرستان اصفهان انجام شد. نمونه گیری به روش تصادفی از ۱۱۵ سگ و گربه خانگی و صاحبان آن ها (۲۵ سگ خانگی، ۲۵ گربه خانگی، ۵۰ نفر صاحبان آن ها و۱۵ نفر افرادی که با سگ و گربه خانگی در تماس نبودند) ترجیح تحقیق برآن بود که حیوان و یا انسان مورد نظر، در یک ماه گذشته سابقه استفاده از آنتی بیوتیک را نداشته باشد. از هر نمونه حیوانی یا انسانی، ۲ سواپ مدفوعی اخذ گردید. یکی از سواب ها در میکروتیوب حاوی سرم فیزیولوژی برای بررسی مستقیم مولکولی و دیگری در محیط کشت انتقالی آب پپتونه جهت بررسی میکروبی قرار گرفت. سواب قرار گرفته در محیط انتقالی آب پپتونه ، سپس به محیط کشت CIN Agarکه محیط کشت اختصاصی بود منتقل و به صورت خطی کشت گردید. متعاقب رشد باکتری ها در سطح پلیت، آزمون های رنگ آمیزی گرم، کشت در محیط مک کانکی، کاتالاز، اوره و... نیز انجام و در نهایت در مورد جدایه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی آنتی بیوگرام صورت می گرفت. آزمون آنتی بیوگرام با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمپی-سیلین، تتراسایکلین، آزیترومایسین، جنتامایسین، سفالوتین، سفالکسین، نالیدیک اسید، سیپروفلوکساسین و آموکسی‌سیلین در محیط مولر هینتون آگار در مورد *یرسینیا*های جداسازی شده صورت پذیرفت. در روش مولکولی نیز در مورد سواب‌های مدفوعی اخذ شده،DNA مورد نیاز جهت آزمون مولکولی توسط کیت استخراج شرکت سیناژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت آماده و تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری گردید. در آزمون مولکولی از آغازگرهای اختصاصی جنس یرسینیا ، گونه ی انتروکولیتیکا و عوامل حدت آن استفاده گردید.

توالی آغازگرهای ژن‌های اختصاصی جنس، گونه و عوامل حدت یرسینیا در جدول ۱ آمده است. همچنین از DNA استخراج شده جدایه‌های مشکوک به‌عنوان

DNA الگو، از DNA جنس یرسینیا در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی واحد شهر کرد به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. مخلوط واکنش PCR برای تکثیر این ژن ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دوازده و نیم میکرولیتر مستر میکس ، نیم میکرولیتر از هر پرایمر(10mM) ،۹/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و دو میکرولیتر از هر نمونه DNA انجام پذیرفت. (۱۱). در تمام واکنش های PCR از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان استفاده گردید.

برنامه‌های حرارتی در مورد ژن‌های مختلف متفاوت بود. در مورد ژن اختصاصی جنس و گونه، یک سیکل ۹۴ درجه به مدت ۶ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، ۶۱ درجه به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت. درمورد ژن‌های حدت نیز مشابه برنامه قبلی با این تفاوت که از ۳۳ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۵۰ ثانیه، ۵۶ درجه یک دقیقه و ۷۲ درجه در ۷۰ ثانیه استفاده گردید. در مورد ژن‌های حدت *VirF* و *YstA* برنامه حرارتی در قالب ۳۳ سیکل تکراری ۹۴ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه تنظیم گردیده بود. مخلوط واکنش PCR برای تکثیر این ژن‌ها نیز در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. برای بررسی و مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید.

جدول ۱- توالی پرایمر های اختصاصی جنس یرسینیا، گونه انتروکولیتیکا و عوامل حدت

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر	پهنای باند
ompF	227Fmod	F: GTC TGG GCT TTG CTG GTC R: GCG TCG TAT TTA GCA CCA ACG	428 bp
16SrRNA	entr1,entr2	F: AAT ACC GCA TAA CGT CTT CG R: CTT CTT CTG CGA GTA ACG TC	330 bp
Ail	Ail1,Ail2	F: ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG R: CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG	170 bp
yadA	yadA1,yadA2	F: CTT CAG ATA CTG GTG TGC GCT GT R: ATG CCT GAC TAG GAG CGA TAT CC	849 bp
Inv	**yc1,yc2**	F: CTT CAG ATA CTG GTG TGC GCT GT R: ATG CCT GAC TAG GAG CGA TAT CC	570 bp
ystA	Pr2a,pr2c	F: AAT GCT GTC TTC ATT TGG AGC A R: ATC CCA ATC ACT ATG ACT TC	145 bp
Virf	virf1,virf2	F: TCA TGG CAG AAC AGC AGT CAG R: ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAG	590 bp

در این پژوهش به منظور تجزیه وتحلیل آماری از نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

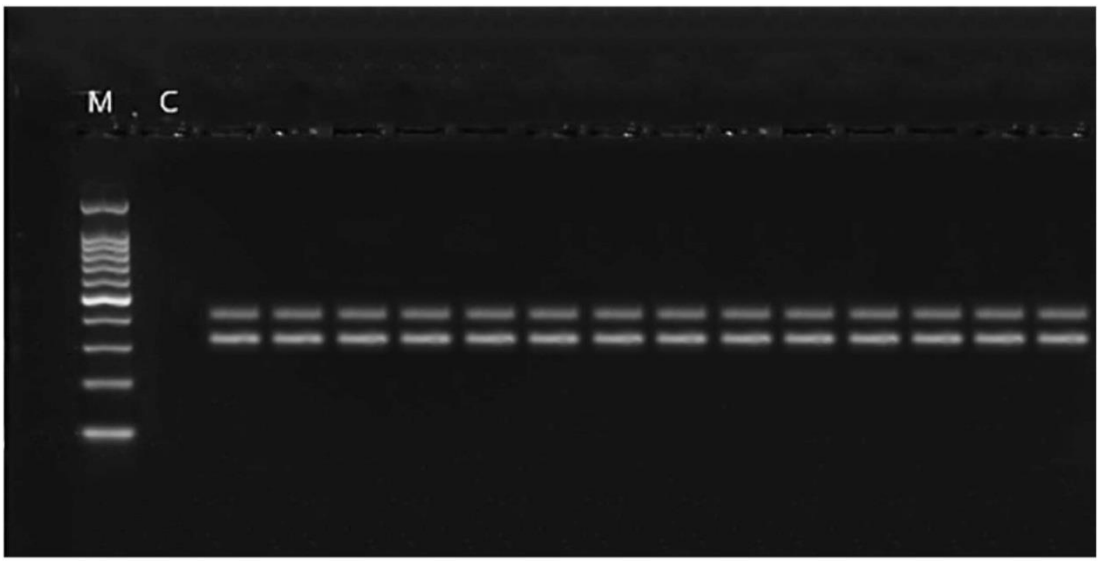
نتایج

در این تحقیق، مجموعاً تعداد ۱۴ جدایه *یرسینیا انتروکولیتیکا* بعد از کشت و PCR جداسازی گردید (جدول۲) .

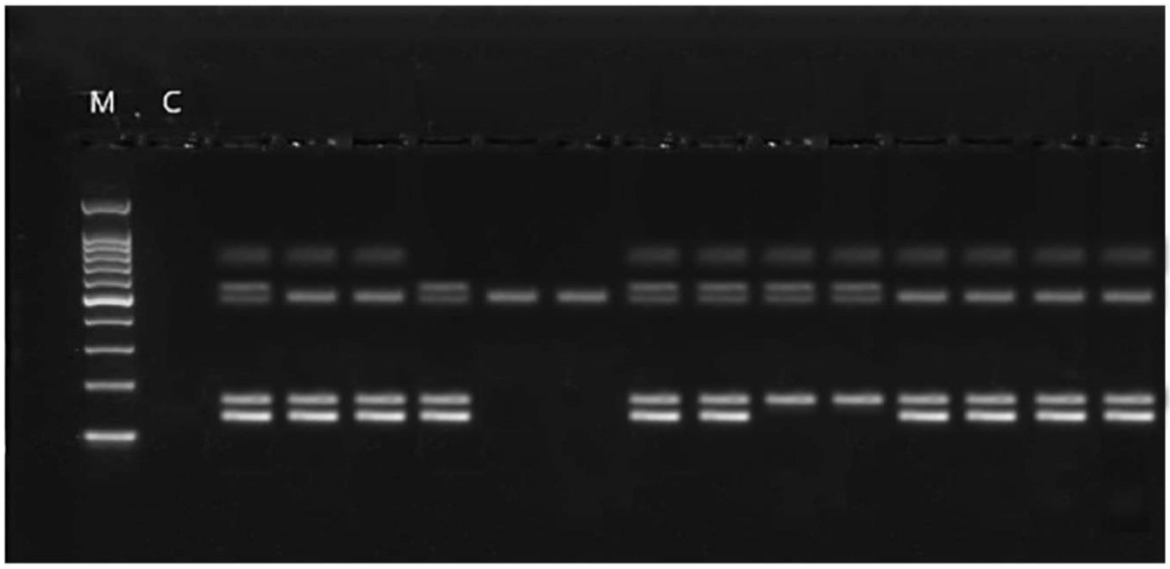
جدول ۲- فراوانی آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در انواع نمونه ها

نوع نمونه	روش کشت (درصد موارد مثبت)	روش مولکولی (درصد موارد مثبت)
سگ	۸(۳۲٪)	۸(۳۲٪)
گربه	۱ (۴٪)	۱(۴٪)
صاحب سگ	۴ (۱۶٪)	۴ (۱۶٪)
صاحب گربه	۱ (۴٪)	۱ (۴٪)
افراد بدون تماس با سگ یا گربه	۰	۰

بیشترین درصد جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه‌های مدفوع سگ با ۳۲ درصد و کمترین درصد جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه های مدفوع گربه و صاحبان آن ها با فراوانی ۴ درصد تعیین گردید. در نمونه های مدفوع انسانی بدون تماس با حیوان خانگی هیچ آلودگی یرسینیایی مشاهده نگردید. (باند ۴۲۸ جفت بازی جنس یرسینیا و باند ۳۳۰ جفت بازی گونه انترولیتیکا در تصویر شماره ۱). نتایج کشت و PCR در مورد همه نمونه‌ها کاملا همخوان بود به شکلی که کلیه نمونه‌های مثبت در روش کشت، در روش PCR نیز مثبت و کلیه نمونه‌های مثبت در روش PCR در روش کشت نیز مثبت گزارش گردید. درصد ژن های حدت *یرسینیا انتروکولیتیکا* در سگ به تفکیک ژن حدت *inv* ۱۰۰درصد ، آلودگی هم زمان به ژن های حدت *inv* با *ail* و *ystA* ۷۵ درصد، آلودگی هم زمان *virF* با *ail* و *ystA* در ۵۰ درصد و آلودگی هم زمان *yadA* با *ail* و *ystA* در ۶۲ درصد از موارد آلودگی تشخیص داده شدند (باند ۱۷۰ جفت بازی ژن *ail*، باند ۸۴۹ جفت بازی ژن *yadA*، باند ۵۷۰ جفت بازی ژن *inv* ، باند۱۴۵ جفت بازی ژن *ystA* و باند ۵۹۰ جفت بازی ژن *virF* در تصویر شماره ۲). در جدایه های یرسینیایی گربه، آلودگی هم‌زمان به ژن های حدت*ail*، *virF*، *yadA* و *inv* تشخیص داده شد. جدایه های یرسینیایی صاحبان سگ نیز آلودگی هم‌زمان به ژن های حدت*ail*، *ystA*، *yadA* و *inv* را نشان دادند. (جدول ۳).



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژن های جنس(*ompF*) و گونه (*16SrRNA*) *یرسینیا انتروکولیتیکا*: ستون M :مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون C :کنترل منفی، ستونهای بعدی : قطعه 428 جفت بازی مربوط به جنس *یرسینیا* و قطعه ۳۳۰جفت بازی گونه *انتروکولیتیکا*



شکل ۲- تصویر الکتروفورز ژن های حدت(ail, yadA, ystA, virf, inv) یرسینیا انتروکولیتیکا: ستونM :مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستونC :کنترل منفی، ستون های بعدی : قطعات ۱٤٥ جفت بازی مربوط به ژن ystA ، ۱۷۰جفت بازی مربوط به ژنail ، ۵۷۰ جفت بازی مربوط به ژنinv ، ۵۹۰ جفت بازی مربوط به ژنvirf و۸٤۹ جفت بازی مربوط به ژن yadA

جدول ۳- درصد فراوانی ژن های حدت درجدایه های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

ژن‌های حدت	سگ	گربه	انسان صاحب سگ	انسان صاحب گربه
Ail	٪۷۵	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
ystA	٪۷۵	–	٪۱۰۰	–
virF	٪۵۰	٪۱۰۰	–	٪۱۰۰
yadA	٪۶۲	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
Inv	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای محیطی و میزبانی در سگ های مورد مطالعه، بین فاکتورهای سن، نوع نگهداری، وضعیت بیماری گوارشی و میزان آلودگی، اختلاف آماری معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین اختلاف آماری معنی داری بین میزان آلودگی گربه ها وصاحبان آنها به *یرسینیا انتروکولیتیکا* نیز مشاهده گردید (P<۰/۰۵). نتایج آنتی بیوگرام نیز نشان داد که بیشترین حساسیت و مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین بود(جدول ۳).

جدول ٤- نتایج حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

آنتی بیوتیک	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاوم
جنتامایسین	۱۱ (۷۸/۵۸)	۳ (۲۱/۴۲)	۰
آزیترومایسین	۸ (۵۶/۲۵)	۱ (۱۱/۱۱)	۵(٪۳۲/۶۴)
نالیدیکسیک اسید	۳ (۸/۳۴)	۹ (۷۵)	۲ (۱۶/۶۶)
تتراسایکلین	۵ (۱۰۰)	۰	۰
سیپروفلوکساسین	۶ (۴۲/۸)	۲ (۱۴/۴)	۶ (۴۲/۸)

بحث

اسهال شایع ترین علت مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه است. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی سالانه ۱۲میلیون مرگ کودک و ۵ میلیون موارد مرتبط با بیماری اسهال گزارش شده است. هر چند مجموعه ای از عوامل در ایجاد اسهال عفونی نقش ایفا می کنند ولی *سالمونلا،شیگلا، اشریشیا کلی و یرسینیا انتروکولیتیکا* بیشترین سهم را دارند(۱۸). *یرسینیوز* سومین بیماری باکتریال زئونوز در آلمان و برخی دیگر از کشورهای اتحادیه اروپا است. *یرسینیا* یکی از پنج باکتری اصلی عامل بیماری های معدی روده ای در انسان می باشد(۱۷). طبق نتایج مطالعه ی حاضر، *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ۳۲ درصد سگ های فاقد نشانه بالینی، ۴ درصد گربه ها، ۱۶ درصد صاحبان سگ و ۴ درصد صاحبان گربه یافت شد. *یرسینیا انتروکولیتیکا* می تواند باعث بیماری در انسان و حیوانات شود. نشانه درمانگاهی غالب در انسان به ویژه کودکان، اسهال می باشد (۲). غذاهای حیوانی آلوده می تواند منبع عفونت برای حیوانات باشد و به همین جهت عدم تغذیه حیوانات با گوشت خام در مورد این حیوانات توصیه می گردد.

سگ و گربه آلوده نیز می توانند منابع بالقوه ای برای انتقال آلودگی به انسان به ویژه کودکان باشند. انتقال آلودگی به انسان به خصوص از طریق تماس مستقیم و عدم رعایت اصول بهداشتی می باشد.

در تحقیقات اروپایی شیوع بین ۳۱/۱-۵ درصدی برای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در مدفوع سگ گزارش گردیده است (۶). استام و همکاران نیز در سال۲۰۱۳ فراوانی آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* را در سگ ۴/۶٪ و در گربه ۰/۸٪ تعیین نمودند (۱۷). بنابراین فراوانی آلودگی در تحقیق حاضر هم در مورد نمونه های سگ هم نمونه های گربه با نتایج سایر محققین همخوان است. به عنوان یک یافته، در این تحقیق آلودگی در افرادی که در تماس با حیوانات خانگی نبودند گزارش نگردید و این در حالی است که ۳۲٪ صاحبان سگ و ۸٪ صاحبان گربه آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند و جالب توجه است که حتی الگوی ژن های حدت در بین سگ و گربه و صاحبان آن ها نیز مشترک بود. پر واضح است که افرادی که بیشتر در تماس با حیوانات آلوده می باشند بیشتر در معرض ابتلا به عفونت نیز می باشند و به همین جهت لازم است تلاش های آموزشی هدفمندی به خصوص برای افرادی که بیشتر در معرض خطر هستند برنامه ریزی گردد. نگهداری از سگ و گربه به عنوان حیوانات خانگی مسئولیت بسیار مهمی است. حفظ حقوق حیوان، مراقبت های بهداشتی و معاینه منظم توسط دامپزشک از مواردی است که لازم است به آن توجه شود و غفلت از هرکدام از این موارد می تواند عواقب خطرناکی را بخصوص در مورد افرادی که با آن ها در تماسند ایجاد نماید(۲۱). در بسیاری از نقاط دیگر جهان، صاحبان حیوانات خانگی نقش مستقیمی در انتقال بیماری های زئونوز دارند که از سگ و گربه به انسان منتقل شده و در میزبان دوم بیماری شدیدتری ایجاد می کنند. شاید بتوان شدت بیشتر بیماری در میزبان دوم را در این تحقیق با حضور همه ژن های حدت در نمونه های انسانی مرتبط دانست. البته لازم به ذکر است اثبات این مطلب که همان *یرسینیای انتروکولیتیکای* جدا شده از سگ و گربه، در صاحب حیوان نیز یافت شده است نیاز به آزمایشات مولکولی دقیق تر می باشد.

به عنوان نتیجه دیگر در این تحقیق، بین رده های سنی و آلودگی *یرسینیا*یی ارتباط آماری معنی داری وجود داشت و در سن کمتر از یک سال فراوانی آلودگی

بیشتر بود. اکثر سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از سگ‌های کمتر از ۱ سال بودند و تعداد کمی از جدایه‌ها در نمونه‌های سگ‌های مسن‌تر (۲۵ درصد) یافت شد. نتایج این یافته نیز با نتایج سایر محققین همخوان است به شکلی که همسو با این نتایج، استام و همکاران نیز سگ های جوان را بیشتر از سگ‌های مسن مستعد ابتلا به *یرسینیا انتروکولیتیکا* دانستند. این احتمالاً نشان‌دهنده حساسیت بالاتر حیوانات جوان به میکروارگانیسم‌های انتروپاتوژن مختلف است (۱۷).

سویه های بیماریزای *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده در این تحقیق دارای ژن های حدت کروموزومی و پلاسمیدی بودند که البته در این بررسی تنها ژن حدت *inv* در تمام نمونه ها وجود داشت و درصد فراوانی بقیه ژن های حدت در نمونه های مختلف متفاوت بود.

بنابراین برای ایجاد بیماری وجود تمام ژن های حدت ضروری نبوده و برحسب نوع سروتیپ باکتری میتواند روند بیماریزایی تفاوت داشته باشد(۱۹). *یرسینیا انتروکولیتیکا* های جدا شده در این تحقیق غالبا دارای دو ویژگی بودند. ابتدا توانایی نفوذ این باکتری به دیواره روده که تصور می شود توسط ژن ها حدت پلاسمیدی کنترل می گردد. ژن های *virF* و *yadA* نیز از جمله ژن های پلاسمیدی *یرسینیا انتروکولیتیکا* می باشند. ژن *virF* نقش تنظیمی در پلاسمید حدت داشته هر چند ممکن است در کشت های مکرر از بین برود و ژن *yadA* که توانایی اتصال باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* را به سطوح سلولی میزبان افزایش داده و هم چنین به باکتری این امکان را می دهد که از دسترس سیستم کمپلمان و اجزای سیستم ایمنی فرار کند(7). دوم تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت که توسط ژن های کروموزومی *ystA*,*ystB* و *ystC* کنترل می گردد(۱۵). در مطالعه‌ی جوتسن و همکاران (۲۰۲۰)، نیز شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* واجد ژن *ail* در ۴۰۶ نمونه مدفوع گوسفند زیر ۱ سال ، شیوع ۱۱ درصدی *یرسینیا انتروکولیتیکا* دارای ژن *ail* را در گوسفندان زیر ۱ سال نشان دادند و نتیجه گرفتند که که گوسفندان جوان می توانند حامل باکتری *یرسینیا انتروکولینیکا* در مدفوع خود در محیط کشتارگاه بوده و مدفوع آنها به عنوان منبعی برای آلودگی لاشه در طول کشتار باشد(۱۰). Zheng و همکاران نیز در بررسی ۱۶۰ نمونه انسانی فراوانی ژن های حدت *inv*,*ail*,*ystA*,*yadA* و *virF* را به ترتیب ۹۳، ۹۴، ۱۰۰، ۸۹ و ۸۲٪ گزارش نمودند(۲۳). نتایج مطالعه توانایی *یرسینیاانتروکولیتیکا* برای تشکیل بیوفیلم در مواد غذایی با منشا حیوانی نیز نشان داد که از ۳۳۰ نمونه انتخاب شده از مواد غذایی تنها ۷ مورد از نظر *یرسینیاانتروکولیتیکا* مثبت بوده که همگی جزء بیوتیپ *A1* بوده و هیچکدام ژن‌های حدت *ail* و *ystA* را نداشتند اما ۵ مورد دارای ژن حدت *ystB* بودند (۲۲). به هر حال به نظر می رسد اختلاف در شیوع ژن های حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از موارد مختلف می تواند به دلیل گوناگونی موقعیت جغرافیایی، فصل نمونه گیری، گونه حیوانی و ...باشد. هم چنین در تحقیق حاضر بیشترین حساسیت و مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین بود. در مطالعه‌ای در تهران نیز جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیش‌ترین مقاومت را نسبت به سفالوتین و آمپی سیلین نشان دادند(۱۷). اختلاف نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *یرسینیا انتروکولیتیکای* این تحقیق در مقایسه با مطالعات دیگر نشان می‌دهد که الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند تحت تأثیر منطقه‌ی جغرافیایی، بیماری‌های باکتریایی شایع در منطقه، فرهنگ استفاده از دارو و به

ویژه آنتی بیوتیک، همچنین نوع و نحوه فراوری و مصرف مواد غذایی قرار گیرد. علاوه بر این، احتمالا مقاومت سویه های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* با یکدیگر متفاوت بوده و این امر منجر به عدم تاثیر یکسان یک آنتی بیوتیک خاص بر روی سویه های مختلف می گردد. از آن جایی که ترکیبات آنتی بیوتیکی متنوعی برای جلوگیری از عفونت و تحریک رشد در دام ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، می توان مقاومت بالا به آنتی بیوتیک هایی از قبیل سیپروفلوکساسین را ناشی از مصرف بی رویه‌ی آنها و ایجاد سویه های موتان باکتریایی به علت استفاده مداوم از این آنتی بیوتیک ها در گذشته یا حال در درمان بیماری های عفونی و نیز احتمالا استفاده از دوز نامناسب آنها در درمان دانست. بنابراین بررسی *یرسینیا انتروکولیتیکای* مقاوم به آنتی بیوتیک به منظور درک ظهور آشکار این سویه‌ها و توسعه استراتژی های کنترلی مناسب و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آنها برای درمان موفقیت آمیز و جلوگیری از گسترش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و انتقال آنها به انسان ضروری می باشد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق احتمالا سگ و گربه می توانند منابع بالقوه ای برای انتقال برخی از عوامل باکتریایی قابل انتقال به انسان از جمله *یرسینیا* باشند. سویه *یرسینیا سودو توبرکلوزیزیس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* عوامل مهمی برای انسان می باشند. *یرسینیا انتروکولیتیکا* می توان باعث *برسینیوریوز* در انسان و حیوانات شود. با توجه به افزایش روزافزون تمایل افراد برای نگهداری سگ و گربه در منزل و به علت نزدیکی و وابستگی بسیار زیاد بین صاحبان و حیواناتشان ، افزایش زمینه اطلاعات در خصوص شیوع این گونه عفونت‌های باکتریایی قابل انتقال بین انسان و حیوان برای تعیین شدت بیماری و اقدامات پیشگیرانه در جهت بهبود سلامت عمومی مهم می‌باشد.

منابع

۱) بیضایی ح, قاسمی ب, میرزائی م, سنجرانی ق ، (۱۳۹۷)، مقایسه تأثیر داروهای ضد باکتریال جدید بر یرسینیا انتروکولیتیکا، *پژوهش در پزشکی*، شماره ۱، دوره ۴۲، صفحه ۱۵_۲۰

۲) هاشمی ش, محزونیه م, قربانی م، (۱۳۹۴)، *جداسازی یرسینیا و سالمونلا از سگ و گربه های به ظاهر سالم در تهران، ایران، زیست شناسی میکروارگانیسم ها*، شماره۱۶، دوره ۴، صفحه ۴۹ تا صفحه ۵۴.

3) Abdel-Haq,N.M.,Asmar,B., Abuhammour,W.M.,Brown,W.J. (2000), *Yersinia enterocolitica infection of children, Pediatrics infection disease*, **19**: 250-255.

4) Arrausi-Subiza, M., Gerrikagoitia,,X., Alvarez,V., Ibabe,,J.C., Barra,,M.(2016), *Prevalence of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis in wild boars in the Basque Country, northern Spain, Acta Veterinaria Scandinavica*, **58**: 26–34.

5) Bottone, E. J. (2015),*Yersinia* enterocolitica: revisitation of an enduring human pathogen, *Clinical Microbiology Newsletter*, **37**: 1–8.

6) Bucher, M., Meyer, C., Grötzbach, B., Wacheck, S., Stolle, A., Fredriksson-Ahomaa, M.(2008),*Epidemiological data on pathogenic Yersinia enterocolitica in Southern Germany during 2000–2006. Foodborne pathogens and disease*, **1:** 273-280.

7) Falcao, J. P.,Falcao, D. P.,Pitondo-Silva, A., Malaspina, A.C., Brocchi, M. (2006*). Molecular typing and*

virulence markers of Yersinia enterocolitica strains from human, animal and foodorigins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. Journal of Medical Microbiology, **55**: 1539 –1548.

8) Fukushima,.,Shimizu,S.,Inatsu,Y.(201 1)، *Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis detection in foods. Journal of pathogens*, **9**:1-9.
9) Hetem, D.J., Pekelharing, M., Thijsen, S.F.(2013), *Probable transmission of Yersinia enterocolitica from a pet dog with diarrhoea to a 1-year-old infant. Case Reports*, **16**: 2-46.
10) Huang, Y., Wang, X., Cui, Z., Yang, Y., Xiao, Y., Tang, L., Kan, B., Xu, J., Jing, H.(2010), *Possible use of ail and fox A polymorphisms for detecting pathogenic Yersinia enterocolitica. BMC microbiology*, **10**:1-10.
11) Joutsen, S., Johansson, P., Laukkanen-Ninios, R., Björkroth, J., Fredriksson-Ahomaa ,M.(2020*), Two copies of the ail gene found in Yersinia enterocolitica and Yersinia kristensenii. Veterinary Microbiology*, **1**:98-108.
12) Neubauer, H., Sprague, L.D., Scholz, H., Hensel, A. (2001),*Yersinia enterocolitica infections: 1. Impact on animal health. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, **114**:8-12.
13) Peng, Z., Zou, M., Li, M., Liu, D., Guan, W., Hao, Q., Xu, J., Zhang, S., Jing, H., Li, Y., Liu ,X. (2018), *Prevalence,antimicrobial resistance and phylogenetic characterization of Yersinia enterocolitica in retail poultry meat and swine feces in parts of China. Food Control*, **1**:121-128.
14) Robertson, J., Hopkins, J.(2005), *Yersinia enterocolitica, Pediatrics in review***, 26**: 228-235.
15) Sabina, Y., Rahman, A., Chandra Ray, R., Montet, D. (2011). *Yersinia enterocolitica: Mode of transmission,molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. Journal of Pathogens*, **1** :10-17.
16) Sharifi, Y.M., Soltan-Dallal, M.M., Zali, M.A., Bakhtiari, R.(2011), *Incidence and antibiotic susceptibilities of Yersinia enterocolitica and other Yersinia species recovered from meat and chicken in Tehran, Iran. African Journal of Microbiology Research*, **16:** 2649-2653.
17) Stamm, I., Hailer, M., Depner, B., Kopp, P.A., Rau, J. (2013),*Yersinia enterocolitica in diagnostic fecal samples from European dogs and cats: identification by Fourier transform infrared spectroscopy and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 887-893.
18) Torres, M.E., Pírez, M.C., Schelotto, F., Varela, G., Parodi, V., Allende, F., et al.(2001), *Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated pathogens and unusual isolates. Journal of Clinical Microbiology*, **39 :** 2134-2139.
19) Warren, S.M., and Young,G.M. (2005). *An amino ytermila secretion signal is requires for YPLA export by the Yas, YSC, and flagellar type III secrection systems of Yersinai enterocolitica biovar 1B. Journal of Bacteriology*, **17**: 6075 -6083.
20) Weese, J.S., Fulford, M.B.(2011), *Companion Animal Zoonoses. The Canadian veterinary Journal*, **53 :** 316-320.
21) William, A., Chaudharti S.U.R., Atsanda, N.N. (2002),*Prevalence of some diseases of dogs and cats at the State Government Veterinary Clinic in Maiduguri- Nigeria. International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, **22 :** 568- 569.

22) Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. (2017), *Prevalence, biofilm formation and virulence markers of Salmonella sp. and Yersinia enterocolitica in food of animal origin in Poland. LWT*, **1:**552-556.
23) Zheng, H., Sun.,Y.,Mao,Z.,Jiang,B. (2008). *Investigation of virulence gence in clinical isolates of Yersinia enterocolitica.Fems Immunology and Medical Microbiology*, **53**:368 -374.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 18, Issue 1, Spring & Summer 2022

Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* and its virulence factors in pets and their owners in Isfahan city

Vahhabi Sayeh[1] , Sharifzadeh Ali[2*]

1- Graduate of Veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine , , Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

2- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 31 October2022 *Accepted: 28 December2022*

Abstract

Pets such as dogs and cats are potential sources of transmissible infections such as Yersinia enterocolitica to humans, especially children.The gastrointestinal tract of these animals keeps the infection in them and can be considered as a carrier for their owners. This study was conducted with the aim of investigating the frequency of Yersinia enterocolitica infection in apparently healthy dogs and cats and their owners in Isfahan city. For this purpose, fecal swabs were collected from 115 apparently healthy dogs and cats and their owners, and Yersinia contamination and the presence of virulence genes were investigated using culture and molecular methods. The results obtained in the present study showed Yersinia enterocolitica infection in 32% of dogs, 4% of cats, 24% of dog owners and 4% of cat owners. A significant relationship was observed between age, disease and the way of keeping with the prevalence of Yersinia enterocolitica in dogs, and the level of infection of dog and cat owners was directly related to the infection of dogs and cats. Antibiogram results showed that the highest sensitivity and resistance were related to tetracycline and ciprofloxacin antibiotics, respectively.

Infected animals may be the main source of infection. These results can be useful in prevention and control programs.

Keywords: Yersinia enterocolitica, virulence gene, dog, cat, human

**Corresponding author: ali sharifzadeh*

Address: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord,Iran.

E. mail: sharifzadeh@iaushk.ac.ir