بررسی آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیرهای گاو عرضه شده در منطقه‌ی اهواز و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها

علی فضل آرا*[1]، مهدی زارعی[1]، احمد موالی زاده[2]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲. دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *a.fazlara@scu.ac.ir*

تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۷/۱۰ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۵/۱۱/٤

چکیده

جهت مطالعه حاضر در طی مدت ۶ ماه تعداد ۱۵۰ نمونه شیر خام گاو عرضه شده در منطقه‌ی اهواز تهیه و در شرایط سرما به آزمایشگاه منتقل شد. مقدار ۲۵ میلی لیتر از هر نمونه شیر به داخل ۲۲۵ میلی لیتر از محیط غنی سازی Tris-Buffered Peptone Water با pH معادل ۸ افزوده گشته و به مدت ۳ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱، نسبت به انجام کشت خطی بر روی محیط کشت اختصاصی آگار CIN اقدام و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس کلونی‌های مشکوک به یرسینیا انتخاب و پس از انجام برخی آزمایش‌های بیوشیمیایی اولیه در مرحله بعد جهت تشخیص قطعی از پرایمرهای اختصاصی ژن کروموزومی 16s rRNA استفاده شد. در این تحقیق *یرسینیا انتروکولیتیکا* از ۳۶ نمونه (۲۴ درصد) جدا شد. نهایتاً جدایه‌های تایید شده جهت ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی، بر روی محیط جامد کشت سطحی داده شد. نتایج تست سنجش حساسیت نشان داد که صد در صد جدایه‌ها به سیپروفلوکسین حساس بودند. پس از آن به ترتیب (۹۷/۰۵درصد) به جنتامایسین، (۹۱/۱۷ درصد) به تتراسایکلین، (۸۵/۲۹ درصد) به سفتازیدیم، (۸۲/۳۵ درصد) به نالیدیکسیک اسید، (۷۹/۴۱ درصد) به کانامایسین، (۶۷/۶۴ درصد) به تری متوپریم سولفامتاکسازول، (۱۷/۶۴ درصد) به آموکسی سیلین و (۱۴/۷۰درصد) به سفالوتین حساس بوند. همچنین در هیچ کدام از جدایه‌ها حساسیت به اریترومایسین مشاهده نشد که نشان دهنده‌ی بیشترین مقاومت جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* به این آنتی بیوتیک می‌باشد.

واژگان کلیدی: *یرسینیا انتروکولیتیکا*، شیر خام، PCR.

مقدمه

افزایش روزافزون جمعیت، مسئله‌ی تأمین غذای کافی و سالم یکی از مسائل مهم کشورهای مختلف دنیا به شمار می‌رود. علاوه بر مسئله‌ی کمبود مواد غذایی، عدم رعایت اصول بهداشتی در مراحل مختلف تهیه تا مصرف این مواد نیز موجب کاهش بیشتر مواد غذایی می‌گردد؛ بنابراین نه‌تنها تهیه غذا و فراورده‌های خوراکی ازنظر کمیت، بلکه فراهم آوردن مواد غذایی سالم و بهداشتی نیز دارای اهمیت فراوان است. میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا یکی از عوامل مهم آلودگی و به خطر افتادن امنیت مواد غذایی مصرف‌کنندگان بوده که توجه و کنترل مداوم مواد غذایی ازاین‌جهت می‌تواند بهداشت مواد غذایی را بهبود ببخشد. در تحقیق حاضر میکروارگانیسمی بیماری‌زا و شایع در مواد غذایی به نام *یرسینیا انتروکولیتیکا* مورد بررسی قرارگرفته است. یرسینیا باکتری میله‌ای مستقیم یا کوکوباسیل، گرم منفی، غیراسپور زا، بی‌هوازی اختیاری بوده که در خانواده‌ی انتروباکتریاسه قرار دارد (Garrity et al., 2005). از میان ۱۵ گونه شناخته‌شده عموماً سه گونه برای انسان بیماری‌زا تشخیص داده‌شده است که *یرسینیا پستیس* عامل طاعون، *یرسینیا سودوتوبرکلوزیس* عامل عفونت‌های روده‌ای و ورم غدد لنفاوی مزانتر و همچنین *یرسینیا انتروکولیتیکا* که عامل عفونت‌های روده‌ای غذازاد بوده و در بهداشت مواد غذایی مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد (Barton, 2011). از ویژگی‌های این باکتری که اهمیت شناسایی آن را در مواد غذایی دوچندان

می‌کند، قابلیت تحمل و حتی رشد در دماهای یخچالی تا صفر درجه سانتی‌گراد و یا حتی زیر صفر درجه سانتیگراد (Zadernowska, 2014) و همچنین تحمل دامنه‌ی گسترده‌ای از pH بین ۵ تا ۹/۶ است که ریسک آلودگی به این باکتری را در گروه زیادی از مواد غذایی بالابرده است.(Barton, 2011). انسان با مصرف انواع مواد غذایی مانند گوشت خوک (Martínez et al., 2011)، گوشت نشخوارکنندگان و محصولات آن‌ها (Fukushima et al., 1997) ماکیان (Dallal et al., 2010) سبزیجات Xanthopoulos et al., 2010)و محصولات لبنی (Yusel and Ulosoy., 2006) و غذاهای آماده (Xanthopoulos et al., 2010) در معرض آلودگی به این باکتری و احیاناً بروز مسمومیت غذایی یرسینیوز می‌باشد. با وجود آن‌که در موارد حاد *یرسینیا انتروکولیتیکا* ممکن است باعث باکتریمی و عفونت منجر به مرگ شود اما انتروکولیت رایج‌ترین بروز را دارد و عمدتاً در کودکان کم سن دیده می‌شود که حساس‌ترین گروه در برابر این باکتری می‌باشند(Rosner et al., 2010)، انقباضات شکمی، استفراغ و خونریزی نیز ممکن است وجود داشته باشد (Huovinen et al., 2010). بر اساس بررسی منابع یرسنیوزیس سهم قابل توجهی از مسمومیت‌های غذایی را در سالیان گذشته داشته است به‌طوری که در تحقیقات اخیر سومین عامل مهم مسمومیت غذایی در اروپا بعد از کمپیلو باکتر و سالمونلا می‌باشد (Yehualaeshet et al., 2013). فراوانی مورد اشاره در کنار قابلیت رشد در دماهای یخچالی، این باکتری را واجد موقعیت ویژه‌ای می‌کند که توجه هر چه بیشتر به آن موجب بهبود ایمنی مواد غذایی می‌شود. با توجه به توضیحات فوق و نظر به آنکه تاکنون در ایران شناسایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در سنجش کیفیت بهداشتی مواد غذایی موردتوجه نبوده است و اخیرا بررسی آلودگی به این باکتری در مواد غذایی مختلف آغاز گردیده است، خلأ کمبود اطلاعات از میزان شیوع و پراکندگی آن در مواد غذایی مختلف به‌خصوص مواد غذایی خام با منشأ دامی محسوس می‌باشد. لذا هدف از اجرای طرح حاضر بررسی میزان حضور *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر خام در منطقه اهواز است تا وضعیت روشن‌تری ازنظر میزان آلودگی شیر خام در این منطقه به این باکتری ارائه نماید.

مواد و روش‌کار

جمع‌آوری نمونه‌ها

برای تحقیق حاضر ۱۵۰ عدد نمونه شیر خام گاو متفاوت از یکدیگر از مناطق مختلف منطقه اهواز جمع‌آوری شد. در هر نوبت نمونه‌گیری نمونه‌ها در فالکون های ۴۵ سی‌سی در یونولیت‌های حاوی یخ قرارگرفته و به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل می‌شد.

آماده‌سازی و کشت نمونه‌ها

۲۵ سی‌سی از هرکدام از نمونه‌های شیر به محیط غنی‌سازی تریس بافر پپتون واتر[1] که پس از بیرون آمدن از یخچال به دمای محیط رسیده بود، افزوده شد و به مدت ۳ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ نسبت به انجام کشت خطی بر روی محیط کشت اختصاصی سفسولودین ایرگاسان نووبیوسین[2]حاوی ساپلمنت (لیوفیلیکم، ایتالیا) اقدام و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد(Hanifian and Khani, 2012; Yusel and Ulosoy., 2006) سپس ۳ تا ۵ عدد از کلونی‌های قرمز با مرکز تیره و حاشیه‌ی شفاف با قطر حدود ۰/۵ تا ۲ میلی‌متر به‌عنوان پرگنه‌های مشکوک به یرسینیا انتخاب گشته و نسبت به تهیه‌ی کشت خالص بر روی TSA[3](مرک، آلمان) اقدام گشت. از آنجاکه در مراحل بعدی باید آزمایش های میکروبی مختلف تشخیص تفریقی بر روی این کلونی های مشکوک استخراج‌شده

1 .Tris-Buffered Peptone Water(TPW)
2. Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin(CIN)
3 . Tripticase Soy Agar (TSA)

از محیط اختصاصی انجام می‌گرفت، انجام کشت خطی بر روی TSA جهت افزایش حجم باکتری و داشتن ذخیره‌ی کافی برای آزمایش‌های بیوشیمیایی ضروری بود. سپس رنگ‌آمیزی گرم جهت مشاهده‌ی باسیل‌های کوچک گرم منفی انجام گشت (Moyes et al., 2009). پس از تائید در مرحله رنگ‌آمیزی گرم، بر روی باکتری‌های مشکوک آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام گرفت. این آزمایش‌ها شامل کشت روی محیط‌های سیترات (مرک، آلمان)، اوره (مرک، آلمان)، کلیگر آیرون آگار[1](مرک، آلمان) و SIM (مرک، اسپانیا) بود. آزمایش سیترات با توجه به عدم تجزیه‌ی سیترات توسط *یرسینیا انتروکولیتیکا* صورت پذیرفت. پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، محیط بدون تغییر رنگ(سبزرنگ) مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا* درنظر گرفته می شد. همچنین محیط اوره جهت سنجش فعالیت اوره آزی *یرسینیا انتروکولیتیکا* به‌کار گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد مشاهده‌ی فعالیت اوره آزی با صورتی شدن محیط همراه بوده و در غیر این صورت بدون تغییر رنگ و یا به رنگ زرد باقی می‌ماند. از محیط کلیگر آیرون آگار جهت تفریق باکتری‌های غیر تخمیرکننده‌ی لاکتوز و همچنین بدون توانایی تولید گاز از سایر باکتری‌ها استفاده شد. نتیجتا باکتری‌هایی که توانایی تخمیر لاکتوز را نداشته و گاز تولید نمی‌کردند سطح شیب‌دار این محیط را قرمز و عمق زردرنگ ایجاد می‌نمایند. سایر رنگ‌ها و ترکیبات رنگی نشان‌دهنده‌ی باکتری‌های متفرقه بود. برای این آزمایش دو مرحله کشت عمقی و سطحی مورداستفاده قرار گرفت. نتیجه‌ی این آزمایش بین ۱۸ تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح و نگهداری در ۳۰ درجه سانتیگراد قرائت شد. دلیل این امر امکان به دست آمدن نتایج کاذبی در خارج از این بازه‌ی زمانی بود. همچنین جهت سنجش تحرک یرسینیا از محیط SIM استفاده شد. در این آزمایش، باکتری پس از کشت در دمای اتاق قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت باکتری‌هایی که در دمای اتاق از محور اصلی کشت خارج‌شده و حالت کدورت و پراکنده شدن را پیدا کردند را متحرک و آن دسته که این ویژگی را نشان ندادند غیرمتحرک در نظر گرفته - شدند. ازآنجایی‌که *یرسینیا انتروکولیتیکا* در دمای اتاق متحرک و در دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد غیر متحرک می‌باشد (Zadernowska, 2014) باکتری‌هایی که مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند از سایر باکتری های متفرقه تفکیک داده شدند. باکتری‌هایی که در مرحله آزمایش‌های بیوشیمیایی، ویژگی‌های مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا* را از خود نشان دادند، جهت تاییدنهایی مورد سنجش مولکولی و PCR قرار گرفتند.

روش PCR

استخراج DNA

:در این تحقیق جهت جداسازی DNA از روش جوشانیدن استفاده شد. بدین‌صورت که مقدار زیادی از کلونی هر ایزوله، به‌وسیله‌ی آنس سوزنی در میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد تا کاملاً هموژن شود. سپس این میکروتیوب ها در آب جوش به مدت ده دقیقه قرار داده شدند. متعاقب آن میکروتیوب ها با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در مرحله بعد ۶۰ تا ۷۰ میکرولیتر از مایع رویی یا سطحی توسط سمپلر برداشته شد و به میکروتیوب استریل دیگری انتقال یافت. پس از برچسب‌گذاری، میکروتیوب حاوی DNA به فریزر منفی ۲۰ انتقال داده شده و تا زمان انجام PCR نگهداری می شد.

روش انجام PCR

آزمایش PCR در حضور زوج پرایمرهای 16SrRNA باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* (جدول۱) در حجم‌های

1. Kligler Iron Agar (KIA)

۲۵ میکرولیتر که شامل ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۲۰ میکرولیتر مستر میکس حاوی ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمر هایF و R، ۱۲/۵میکرولیتر از مستر پایه[1] و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، انجام شد. ضمنا به عنوان تهیه نمونه کنترل مثبت به جای ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده‌ی باکتری مشکوک، ۵ میکرولیتر از DNA باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* تأیید شده توسط سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران به ۲۰ میکرولیتر مستر میکس اضافه گردید و برای تهیه نمونه کنترل منفی نیز به جای ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده ی باکتری مشکوک، ۵ میکرولیتر آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر از مسترمیکس اضافه گردید و درون دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفتند (جدول۲).

برنامه حرارتیPCR

برای تنظیم برنامه PCR از دستگاه ترمال سایکلر (Bioer، چین) استفاده شد. برنامه تکثیر ژن شامل سه بخش بود، بخش اول دناتوره شدن(Denaturing) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد که طی آن دو رشته DNA از هم باز می شوند که به مدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد، بخش دوم شامل ۳۵ سیکل بود که هر سیکل ۳ مرحله داشت: مرحله اول دناتوره شدن(Denaturing) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله دوم اتصال پرایمرها (Annealing) مرحله مهم و حساسی می باشد که طی آن آغازگرها به توالی مکمل خود در نمونه DNA الگو می چسپند، دمای این مرحله بسته به محتوای نوکلئوتیدی پرایمرها متغیر می باشدکه در مورد پرایمرهای این تحقیق دمای Annealing جهت اتصال پرایمرها به ژن دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه در نظر گرفته شد، مرحله سوم سنتز (Extension) بود که در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد و آنزیم Taq در این مرحله با اضافه نمودن نوکلئوتیدها به انتهای آغازگرها، با توجه به ردیف نوکلئوتیدی DNA الگو، باعث تکثیر قطعه مورد نظر شد که در این مطالعه به مدت یک دقیقه در نظر گرفته شد. بخش سوم Final Extension بود که در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد تا در طی آن قطعاتی که به طور کامل سنتز نشده اند، کامل گردند که در این‌جا ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. محصولات PCR مربوط به تکثیر 16SrRNA با الکتروفورز در ژل آگارز بررسی شد. در صورت فراهم بودن شرایط مناسب وتکثیر موفق، قطعه ای به طول bp330 مربوط به ژن 16SrRNA تکثیر می‌یافت. بررسی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز برای بررسی و مشاهده محصول PCR از ژل آگارز (سیناژن- ایران) ۱/۵ درصد استفاده گردید. پس از شفاف شدن آگارز و رسیدن دمای محلول به حدود ۵۰ درجه سانتی گراد، Safe Stain (سیناژن- ایران) به مقدار ۲/۵ میکرولیتر در ۱۰۰میلی‌لیتر به آگارز اضافه گردید پس از برداشتن شانه‌های مخصوص، چاهک‌های ژل به وجود آمد و آماده‌ی بارگذاری گردید. ژل در تانک مخصوص الکتروفورز گذاشته شده و تانک تا حدی که لایه ی نازکی از بافر روی ژل پوشانیده شود به وسیله‌ی TAE 1X[2] پر شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصولPCR در هرکدام از چاهک‌های ایجاد شده در ژل بارگذاری شده، همچنین جهت اطمینان از صحت طول قطعات تکثیرشده، در یک یا دو چاهک نیز لدر یا مارکر مولکولی ۱۰۰bp (سیناژن- ایران) به حجم ۳ میکرولیتر اضافه گشت. پس از پایان الکتروفورز، باندهای تفکیک‌شده ژل در دستگاه ترانس لومیناتور (KIAGEN- ایران) قرارداده شده و با تابش نور UV بر روی ژل، قطعات تکثیرشده‌ی DNA از نظر صحت طول قطعه، با مارکر مولکولی و همچنین کنترل مثبت مورد مقایسه قرار گرفتند.

1. Master mix ampliqon(taq 2x master mix red)

2 . Tris Acetate EDTA

. جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص *یرسینیا انتروکولیتیکا* (Ye et al., 2014)

پرایمر	توالی	اندازه محصول
پیشرو	AAT ACC GCA TAA CGT CTT CG	bp۳۳۰
معکوس	CTT CTT CTG CGA GTA ACG TC	

جدول ۲- اجزای واکنش PCR

اجزای واکنش PCR
۵ میکرولیتر DNA استخراج شده از باکتری مشکوک
۰/۵ میکرولیتر پرایمر F
۰/۵ میکرولیتر پرایمر R
۱۲/۵ میکرولیتر مستر پایه
۶/۵ میکرولیتر اب مقطر استریل
حجم کل: ۲۵ میکرولیتر

آنتی بیوگرام

در این تحقیق برای سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها از روش دیسک دیفیوژن آگار و مطابق با استانداردهای توصیه‌شده‌ی موسسه استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی CLSI استفاده شد (Bryan et al., 2013). بدین منظور از محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. ابتدا نسبت به تهیه ۰/۵ مک فارلند اقدام شد (McFarland,1907). سپس به‌وسیله‌ی لوپ استریل، پرگنه‌هایی از کشت خالص ۲۴ ساعته هر یک از جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل تلقیح شده و با مقایسه سوسپانسیون باکتریایی حاصل با لوله‌ی کدورت ۰/۵ مک فارلند، مقدار کدورت موردنیاز تشخیص داده می شد. با کمک سواب، به‌طور کامل همه‌ی سطح محیط مولر هینتون آگار در داخل پلیت کشت داده می شد. اندکی پس از خشک شدن سطح محیط کشت، دیسک‌های آنتی بیوتیکی (شرکت پادتن طب-ایران) با پنس استریل بافاصله‌ی ۱/۵ سانتی‌متر از دیواره‌ی پلیت و ۲/۴ سانتی‌متر از یکدیگر در محیط گذاشته می شد. در این تحقیق برای هر جدایه مجموعاً از ده نوع دیسکت آنتی‌بیوتیک در دو پلیت ده سانتی‌متری (هر پلیت ۵ دیسکت) استفاده شد (در هرپلیت پنج دیسک). پس از قرار دادن دیسک‌های آنتی بیوتیکی، پلیت ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوباتور گذاری شده و پس از ۲۴ ساعت نتایج حاصله مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

آلودگی نمونه‌های شیرخام گاو عرضه شده در سطح شهر اهواز به *یرسینیا انتروکولیتیکا*

در تحقیق حاضر از ۱۵۰ نمونه ی شیر خام گاو عرضه شده در سطح شهر اهواز نمونه گیری به عمل آمد که پس از انجام کشت میکروبی و تست های بیوشیمیایی از حدود ۱۸۰۰ کلنی، در مجموع ۱۹۱ کلنی که معادل ۱۰/۶۱ درصد کلنی‌های مورد آزمایش بوده مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا* تشخیص داده شدند. این ۱۹۱ کلنی مربوط به ۵۱ نمونه مختلف و معادل ۳۴ درصد کل نمونه‌ها بودند که جهت تایید نهایی به مرحله‌ی PCR وارد شدند. پس از انجام PCR برای موارد مشکوک، ۷۷ کلنی معادل ۴/۲۷ درصد کل کلنی‌های مورد آزمایش، به عنوان *یرسینیا انتروکولیتیکا* تایید شدند (شکل ۱). این ۷۷ کلنی از ۳۶ نمونه‌ی مختلف که ۲۴ درصد کل نمونه‌ها را شامل می‌شد به‌دست آمد (جدول ۳) و از ۷۷ جدایه‌ی *یرسینیا انتروکولیتیکا* فوق الذکر، ۵۲، ۲۳ و ۲ جدایه معادل ۶۷/۵، ۲۹/۹ و ۲/۶

درصد کل جدایه‌ها به ترتیب در روزهای ۲۱، ۱۴ و ۷ غنی سازی نمونه‌های شیر خام در محیط غنی کننده تریس بافرپپتون واتر جداشدند (جدول ۴).

جدول ۳- موارد *یرسینیا انتروکولیتیکا* مثبت در روش کشت میکروبی و PCR

تعداد نمونه ی کل	روش کشت		روش PCR	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱۵۰	۵۱	۳۴	۳۶	۲۴

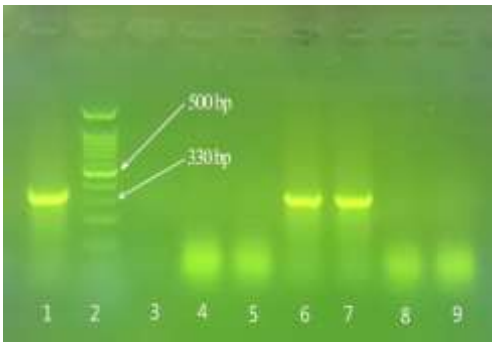
جدول ۴- وضعیت جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در روزهای مختلف کشت میکروبی

تعداد جدایه‌ها	روز هفت	روز چهاردهم		روز بیست و یکم	
	درصد	عدد	درصد	عدد	درصد
۷۷ عدد	۲/۶	۲۳	۲۹/۹	۵۲	۶۷/۵

شایان ذکر است که در مطالعه حاضر۴۶ نمونه معادل ۳۰/۶۶ درصد نمونه‌گیری‌ها در فصل سرد (زمستان) انجام گرفت و از ۲۹ نمونه معادل ۶۳/۰۴ درصد کل نمونه‌های بررسی شده در فصل سرد، *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد. به همین ترتیب ۱۰۴ نمونه معادل ۶۹/۳۳ درصد نمونه‌گیری‌ها نیز در فصل گرم (بهار و تابستان) صورت گرفت و ۷ نمونه معادل ۶/۷۳ درصد از کل نمونه‌های بررسی شده در فصل گرم آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند (جدول ۵).

جدول ۵- وضعیت جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در فصول سرد و گرم

فصول نمونه گیری	تعداد و درصد نمونه در فصل		تعداد و درصد جداسازی در فصل	
سرد	۴۶	۳۰/۶۶	۲۹	۶۳/۰۴
گرم	۱۰۴	۶۹/۳۳	۷	۶/۷۳



شکل۱. الکتروفورز محصول PCR و آشکار شدن باندهای اختصاصی *یرسینیا انتروکولیتیکا* به همراه باندهای کنترل مثبت و منفی. ستون اول کنترل مثبت، ستون سوم کنترل منفی، ستون دوم مارکر مولکولی bp۱۰۰، همچنین ستون‌های ۶ و ۷ واجد ژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* با وزن مولکولی bp۳۳۰، بقیه‌ی ستون‌ها ژن‌های غیر اختصاصی

جدول ۶- درصد جدایه های حساس، حساس نسبی و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها

آنتی‌بیوتیک‌ها	درصد جدایه‌های حساس	درصد جدایه‌های با حساسیت نسبی	درصد جدایه‌های مقاوم
سیپروفلوکسین	٪۱۰۰	-	-
جنتامایسین	٪۹۷/۰۵	-	٪۲/۹۴
تتراسایکلین	٪۹۱/۱۷	-	٪۸/۸۲
سفتازیدیم	٪۸۵/۲۹	٪۲/۹۴	٪۱۱/۷۶
نالیدیکسیک اسید	٪۸۲/۳۵	-	٪۱۷/۶۴
کانامایسین	٪۷۹/۴۱	٪۸/۸۲	٪۱۱/۷۶
تری متوپریم سولفامتاکسازول	٪۶۷/۶۴	٪۸/۸۲	٪۲۳/۵۲
آموکسی‌سیلین	٪۱۷/۶۴	-	٪۸۲/۳۵
سفالوتین	٪۱۴/۷	٪۵/۸۸	٪۷۹/۴۱
اریترومایسین	-	٪۲/۹۴	٪۹۷/۰۵

سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا*(آنتی‌بیوگرام)

سنجش حساسیت جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر روی ۱۰ آنتی‌بیوتیک مختلف انجام گرفت. این ۱۰ آنتی بیوتیک شامل نالیدیکسیک اسید[1]، سفالوتین[2]، سفتازیدیم[3]، آموکسی سیلین[4]، کانامایسین[5]، سیپروفلوکسین[6]، اریترومایسین[7]، جنتامایسین[8]، تتراسایکلین[9] و تریمتوپریم سولفامتاکسازول[10] بودند. نتایج آزمایش سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی در جدول ۶ قابل مشاهده می‌باشد. لازم به ذکر است که بررسی میزان حساسیت، مقاومت و حساسیت نسبی جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها توسط جدول CLSI صورت گرفت.

بحث

میزان آلودگی شیر خام به *یرسینیا انتروکولیتیکا*

در تحقیق حاضر مشخص شد که از میان ۱۵۰ نمونه‌ی شیر خام گاو جمع‌آوری‌شده از سطح شهر اهواز ۳۶ نمونه (۲۴ درصد) آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند. این مقدار جداسازی بسیار بیشتر از گزارش‌های پیشین از میزان موارد تائید شده آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ایران بوده است. در سال ۱۳۷۵ از میان ۳۰۰ نمونه مدفوع ۲/۶۶ درصد، در سال ۱۳۸۶ از میان ۱۲۰ نمونه گوشت قرمز و ۱۲۰ نمونه گوشت مرغ، به ترتیب ۱۳/۳ درصد و ۱۵/۸ درصد آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* گزارش‌شده است (Soltan-Dallal et al., 2004)

همچنین در تحقیقی که ممتاز و همکاران روی فرآورده‌های لبنی خام و پاستوریزه انجام دادند از میان ۴۰۰ نمونه‌ی جمع‌آوری‌شده از فرآورده‌های لبنی عرضه‌شده در سطح استان‌های خوزستان، چهارمحال بختیاری و فارس، ۶ نمونه معادل با (۱/۵ درصد) با روش باکتری‌شناسی آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند که در این میان ۳ باکتری (۵ درصد) از شیر خام گاو، ۲ باکتری (۱۰ درصد) از نمونه بستنی سنتی و ۱ باکتری (۳/۳ درصد) از نمونه پنیر محلی جدا شد (ممتاز و همکاران، ۱۳۹۱). در تحقیقی دیگری که در ورامین ایران صورت گرفت از مجموع ۴۴۶ نمونه‌ی شیر خام جمع‌آوری‌شده در بالک تانک در خلال سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰، گونه‌های مختلف یرسینیا در ۲۹ عدد (۶/۵ درصد) از این نمونه‌ها یافت شد. از این ۲۹ عدد

1. Nalidixic acid(NA)
2. Cephalothin(CF)
3. Ceftazidime(CAZ)
4. Amoxicillin(AMX)
5. Kanamycin(K)
6. Ciprofloxacin(CIP)
7. Erythromycin(E)
8. Gentamicin(GM)
9. Tetracycline(TE)
10. Trimethoperim Sulfametaxasole(SXT)

۲۳ عدد از شیر گاو، ۵ عدد شیر گوسفند و ۱ عدد نیز از شیر بز جداسازی شد. بیشترین گونه‌ی جداشده *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود که ۶۵/۵ درصد جدایه‌ها و ۴/۲۲ درصد کل نمونه‌ها را شامل می‌شد (Jamali et al., 2015). در مطالعه‌ای در استان چهارمحال بختیاری فراوانی حضور *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه‌های شیر خام، ۳ درصد و در نمونه‌های شیر پاستوریزه، ۱ درصد گزارش شد (Sharifzadeh et al., 2004). حنیفیان و همکاران (2012) نیز جهت تعیین شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا ، ۵۵۴ نمونه شامل ۳۵۴ شیرخام و ۲۰۰ نمونه پنیر سنتی جمع آوری شده از مناطق مختلف آذربایجان شرقی در طی سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰ را مورد آزمایش قرار دادند و نتیجتا در ۸/۶۶ درصد از کل نمونه‌ها که شامل ۷/۶۲ درصد از نمونه‌های شیر خام و ۱۰/۵ درصد پنیرهای حاصل از شیرخام بود، ژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیماری‌زا توسط روش PCR شناسایی شد .این تحقیق برتری و قدرت بیشتر شناسایی توسط PCR پس از یک دوره پیش غنی‌سازی را در مقایسه با روش رایج کشت نشان داد.علاوه بر آن گزارش‌هایی از اقصی نقاط دنیا نیز وجود دارد که موافق نتایج تحقیقات صورت گرفته در ایران می‌باشد. دیویدسون و همکاران (1989) حضور *لیستریا منوسیتوژنز*، *کمپیلو باکترژژونی* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* را در فصول سرد و گرم سال کانادا در شیر خام بررسی کردند. از میان ۲۵۶ نمونه شیر خام که از دو ماه سرد سال و دو ماه گرم سال جمع‌آوری شد، ۲/۷ درصد *یرسینیا انتروکولیتیکا* از نمونه‌ها شناسایی شد. درصد کم جداسازی عوامل فوق در این تحقیق مانع هرگونه نتیجه‌گیری قطعی در مورد تأثیر فصول بر تغییرات جمعیت پاتوژن‌ها شد با این وجود جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در فصول سرد سال محتمل‌تر اعلام شد. همچنین در طی دوره‌ی یک‌ساله در ترکیه از ۷۵۰ نمونه‌ی غذایی جمع‌آوری‌شده از سطح فروشگاه‌ها که هر ۱۵۰ عدد از این نمونه‌ها مربوط به یک گروه غذایی شامل پنیر فتا، شیر خام، بستنی، ران مرغ و گوشت تکه شده بودند، جهت بررسی حضور گونه‌های یرسینیا تحقیقی به عمل آمد. نتیجتاً ۵۷ نمونه (۷/۶ درصد) ازلحاظ گونه‌های مختلف یرسینیا مثبت بودند و ۱۸ عدد از آن‌ها (۲/۴ درصد از کل) نیز *یرسینیا انتروکولیتیکای* بیماری‌زا تشخیص داده شدند. این جدایه های بیماری‌زا به ترتیب در پنیرفتا، بستنی، ران مرغ، گوشت تکه شده و شیر خام: ۶، ۴، ۲، ۴ و ۲ عدد گزارش شد (Guven et al., 2010). همچنین از ۵۰ نمونه‌ی شیر خام جمع‌آوری‌شده از فروشگاه‌های شهر Beni-Suef تنها ۱ نمونه (۲ درصد) آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود (El-Kholy., 1990). با این وجود تحقیق‌های مختلفی مشابه با تحقیق حاضر، شیوع بالای این باکتری در شیر خام گاو را گزارش نموده است. در کشور فرانسه تحقیقی جهت جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* از شیر خام عرضه‌شده در فروشگاه‌ها انجام گرفت. به‌منظور جداسازی از سه روش غنی‌سازی در یخچال در دمای ۴ درجه، غنی‌سازی در محیط راپاپورت اصلاح‌شده[1] و غنی‌سازی در محیط سنتتیک حاوی ساکاروز، آمینومتان، سدیم آزاید وآمپی‌سیلین استفاده شد. در این مطالعه از ۷۵ نمونه‌ی جمع‌آوری‌شده ۶۱ نمونه (۸۱/۳۳ درصد) از نمونه‌های آزمایش‌شده واجد *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود (Vidon and Delmas, 1981) در کشور مراکش از مجموع ۲۲۷ نمونه‌ی شیر خام و محصولات لبنی، گونه‌های مختلف یرسینیا از ۱۱ عدد از ۳۰ نمونه‌ی شیر خام (۳۶/۶ درصد)، یک عدد از ۲۰ نمونه شیر پاستوریزه (۵ درصد)، ۱۵ عدد از ۶۳ نمونه‌ی شیرهای سنتی تخمیری (۲۳/۸ درصد)، ۷ عدد از ۹۴ نمونه‌ی پنیر (۷/۴ درصد) و یک عدد از ۲۰ نمونه‌ی بستنی (۵ درصد) جداسازی شد. شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در تمام نمونه‌ها ۶/۶ درصد گزارش شد

1 . Modified Rappaport

(Hamama et al., 1992). یوسل و همکاران (۲۰۰۶) تعداد ۲۰۰ نمونه لبنیاتی شامل پنیر و شیر خام را از آنکارا جهت بررسی گونه‌های یرسینیا و *اشرشیاکلی* و همچنین کلی فرم‌ها جمع‌آوری کردند. از ۱۰۰ نمونه شیر خام، ۵۵ درصد آلوده به یرسینیا بودند. همچنین از ۱۰۰ نمونه پنیر نیز ۱۴ نمونه آلودگی یرسینایی داشتند. *یرسینیا انتروکولیتیکا* شایع‌ترین گونه یرسینا در این نمونه‌ها بود به‌طوری‌که از ۴۷/۳ درصد از نمونه‌های شیر خام آلوده و ۳۵/۷ درصد از نمونه‌های پنیر آلوده جدا شد. سایر گونه‌های یرسینیای جداشده شامل *یرسینیا فردریکسنی* (۳۱ درصد و ۲۱/۴ درصد) *یرسینیا کریستنسنی* (۱۲/۷ درصد و صفر درصد)، *یرسینیا اینترمدیا* (۷/۲ درصد و ۷/۱ درصد) و یرسینیاهای غیرمعمول (۱/۸ درصد و ۳۵/۷ درصد) به ترتیب در شیر خام و پنیر بودند (Yusel and Ulosoy., 2006). تفاوت در میزان شیوع در گزارش-های مختلف می‌تواند دلایل مختلفی از قبیل روش‌های متفاوت غنی سازی و جداسازی، محیط کشت‌های متفاوت به کاررفته و همچنین تفاوت فرهنگ و آداب و رسوم غذایی و نحوه فراوری غذا در هر منطقه داشته باشد. در تحقیق حاضر برخلاف اکثر گزارش‌های موجود در کشورمان آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* از شیوع بالاتری برخوردار بوده است. ازآنجایی‌که *یرسینیا انتروکولیتیکا* نرمال فلور دستگاه گوارشی گاو می‌باشد این شیوع بالا می‌تواند نشان‌دهنده‌ی آلودگی مدفوعی شیر خام و بی‌توجهی به کنترل‌های بهداشتی در منطقه از هنگام دوشش شیر خام تا انتقال آن به مراکز جمع‌آوری یا بازار مصرف باشد. کمبود دامداری‌های صنعتی در منطقه‌ی اهواز و دوشش شیر به شکل سنتی و دستی احتمالا می‌تواند عامل افزایش آلودگی شیرخام به مدفوع حیوانات و متعاقبا موجب شیوع بالاتر *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیر خام گردد. موافق با این فرضیه یوسل و همکاران درصد بالای شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در تحقیق خود را در شیوه‌های غیربهداشتی و سنتی جمع‌آوری شیرخام در ترکیه گزارش نمودند (Yusel and Ulosoy,2006). گفتنی است به دلیل ماهیت *یرسینیا انتروکولیتیکا* در رشد نمودن در دماهای یخچالی عملیات سرد کردن شیرهای جمع‌آوری‌شده پس از دوشش نیز تأثیر چندانی در بهبود کیفیت شیر خام اولیه از حیث *یرسینیا انتروکولیتیکا* نخواهد داشت. از سوی دیگر برخلاف گزارش‌هایی که شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در مناطق سردسیر را مورد توجه قرار داده بود با وجود اقلیم گرم منطقه‌ی مورد مطالعه، شیوع بالای آلودگی می تواند دلالت بر مقاومت دمایی سوش‌های خاصی از *یرسینیا انتروکولیتیکا* داشته باشد. موافق با این فرضیه پاگان و همکاران (1999) شش سویه‌ی *یرسینیا انتروکولیتیکا* را به مقدار ۱۰ باکتری در هر میلی لیتر تلقیح نمودند که پس از آزمایش مجدد آن‌ها بعد از پاستوریزاسیون به طور غیر منتظره‌ای سه سویه در برابر پاستوریزاسیون مقاوم بودند. با این حال در تحقیق حاضر نیز علی‌رغم جداسازی مستمر *یرسینیا انتروکولیتیکا* در طول مدت تحقیق، با پیشروی به سمت فصول گرم تعداد جدایه‌ها کاهش محسوسی داشت. عامل دیگر بالا بودن درصد شیوع در تحقیق فعلی را می‌توان عدم تفکیک سویه-های بیماری‌زا از غیر بیماری‌زا و گزارش آلودگی همه-ی سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* دانست. شایان توجه است با وجود آن که بر اساس گزارش‌های محققین، به نظر می‌رسد سویه‌های بیماری‌زا درصد بالایی از جدایه-های *یرسینیا انتروکولیتیکا* را شامل نمی‌شوند، اما از آنجایی که تحقیقات مختلف، غیربیماری‌زا بودن سویه-هایی از *یرسینیا انتروکولیتیکا* را که تا امروز بی خطر شناخته می‌شدند مورد چالش قرار داده است، از این رو بررسی فراوانی کلیه‌ی سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* نیز حایز اهمیت به نظر می‌رسد.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در تحقیق حاضر جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیشترین مقاومت را به اریترومایسین و به ترتیب در سطوح پایین‌تر به آموکسی‌سیلین و سفالوتین و تری متوپریم سولفامتاکسازول نشان دادند. به‌علاوه به ترتیب بیشترین حساسیت به سیپروفلوکسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، سفتازیدیم، نالیدیکسیک اسید، کانامایسین، تری متوپریم سولفامتاکسازول، آموکسی سیلین و سفالوتین اختصاص داشت. مشابه نتایج تحقیق حاضر در تحقیقی که یه و همکاران (2016) روی جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در اغذیه‌فروشی‌های خرد در چین انجام دادند از ۵۸ *یرسینیا انتروکولیتیکای* جداشده، همه‌ی جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* به کانامایسین و سولفانامیدها حساس بودند. اکثر سویه‌ها ژن بتالاکتاماز را بیان می‌کردند و حضور blaA و blaB به ترتیب در ۹۷ درصد و ۱۰۰ درصد جدایه ها مشاهده شد. همچنین بسیاری از جدایه ها به سفالوتین (۹۱/۴ درصد)، تری متوپریم سولفامتاکسازول (۷۹/۳ درصد) و آمپی‌سیلین (۹۱/۴ درصد) مقاوم بودند. همچنین در تحقیقاتی که بوناردی و همکاران(2013) در کشور ایتالیا روی خوک جهت جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *یرسینیا سودوتوبرکلوزیس* انجام دادند جدایه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* از سویه‌ی 4/O:3 را جهت سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی بررسی نمودند که حساسیت همه‌ی جدایه‌ها به آموکسی‌سیلین، کلاولانیک اسید، سفتازیدیم، ارتاپنم و موروپنم و جنتامایسین گزارش شد. همچنین حساسیت ۹۴/۵ درصد به سفاتوکسیم، ۸۹/۱ درصد به کانامایسین و ۷۸/۲ درصد به تتراسایکلین مشاهده شد. بیشترین مقاومت به ترتیب به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، سولفانامید (۹۸/۲ درصد) و استرپتومایسین (۷۸/۲ درصد) اختصاص داشت. اختلاف نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکای* این تحقیق در مقایسه با مطالعات دیگر نشان می‌دهد که الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی می‌تواند 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. چرا که احتمال حضور *یرسینیا انتروکولیتیکا* در محصولات خام و فراوری نشده‌ی لبنی و گوشتی بیشتر از محصولات پخته و فراوری شده است. علاوه بر این، احتمالا مقاومت سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا با یکدیگر* متفاوت بوده و این امر منجر به عدم تاثیر یکسان یک آنتی‌بیوتیک خاص بر روی سویه-های مختلف می‌گردد. در تحقیق حاضر جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیشترین مقاومت را به اریترومایسین نشان دادند. از آن‌جایی که ترکیبات آنتی‌بیوتیکی متنوعی برای جلوگیری از عفونت وتحریک رشد در دام‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توان مقاومت بالا به آنتی بیوتیک‌هایی از قبیل اریترومایسین را ناشی از مصرف بی رویه‌ی آن‌ها و ایجاد سویه‌های موتان باکتریایی به علت استفاده مداوم از این آنتی بیوتیک‌ها در گذشته یا حال در درمان بیماری‌های عفونی و نیز احتمالا استفاده از دوز نامناسب آنها در درمان دانست. از آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم در این تحقیق سولفامتوکسازول تریمتوپریم می-باشد که از دسته آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی است، گفته شده که ایجاد مقاومت در برابر سولفونامیدها زیاد است و انتقال مقاومت از طریق پلاسمید، رایج‌ترین روش است. باکتری‌هایی که به یک سولفونامید مقاوم شدند در برابر تمامی سولفونامیدها معمولا مقاومت پیدا می‌کنند[1]. باکتری‌های مقاوم از طرق مختلفی همچون افزایش تولید PABA[2]، کاهش نفوذپذیری دارو به داخل سلول باکتری، کاهش تمایل سولفونامید به آنزیم

1.Cross-resistance
2. Para amino benzoic acid

دی هیدروپتروات سنتتاز و افزایش تولید آنزیم با اثرات سولفونامیدها مقابله می‌کنند.

نتیجه‌گیری

شیوع بالای *یرسینیا انتروکولیتیکا* از نمونه‌های شیر خام در منطقه اهواز نشان داد که مصرف شیر خام می-تواند احتمالا با ریسک ابتلا به یرسینیوزیس ارتباط مستقیم داشته باشد. همچنین حضور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک این باکتری نیز احتمال بروز بیماری را می‌تواند افزایش دهد. از این رو بررسی میزان شیوع آلودگی *به یرسینیا انتروکولیتیکا* به منظور اطلاع از وضعیت اپیدمیولوژیکی این باکتری و توسعه استراتژی-های مناسب کنترلی و تعیین الگوی حساسیت آنتی-بیوتیکی آن‌ها برای جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و انتقال آنها به زنجیره غذایی انسان ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

هزینه‌های انجام مطالعه حاضر از طریق پژوهانه سال ۱۳۹۴ دانشگاه شهید چمران اهواز تامین شده است که بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می نماید.

منابع

۱. ممتاز، حسن ، ابراهیمی، ناهید و اکبری، فریبا. (۱۳۹۲). تعیین یرسینیا انتروکولیتیکا سروتیپ O:3 جدا شده از شیر و فراورده‌های آن. نشریه بیماری‌های مشترک انسان و دام، سال اول، شماره‌ی ۱، صفحه‌ی ۲۷ تا ۳۲.

2. Barton, M. 2011. Pathogens in milk - Yersinia enterocolitica. University of South Australia, Adelaide, SA, Australia (Doctoral dissertation, Academic Press).
3. Bonardi, S., Bassi, L., Brindani, F., D'Incau, M., Barco, L., Carra, E., and Pongolini, S. 2013. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of Salmonella enterica and Yersinia enterocolitica in pigs at slaughter in Italy. J. Food Microbiol. 163: 248-257.
4. Bryan,M., Finola, L., Marie Ann, C and Doris, M.2013. Clinical veterinary microbiology. Second edition. London, Mosby Elsevier. PP: 105-120.
5. Dallal, M.M.S., Doyle, M.P., Rezadehbashi, M., Dabiri, H., Sanaei, M., and Modarresi, S. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of Salmonella serotypes, Campylobacter and Yersinia spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. Food Control. 21: 388-392.
6. Dallal, M.M.S., Tabarraie, A., and Moez-Ardalan K. 2004. Comparison of four methods for isolation of Yersinia enterocolitica from raw and pasteurized milk from northern Iran. Int. J. Food Microbiol. 94: 87-91.
7. El-Kholy, A.M.1990. Incidence of Yersinia enterocolitica in raw milk in Beni-Suef city. Vet. Med. J. Giza. 38: 11-18.
8. Fukushima, H., Hoshina, K., Itogawa, H., and Gomyoda, M. 1997. Introduction into Japan of pathogenic Yersinia through imported pork, beef and fowl. Int. J. Food Microbiol. 35: 205-212.
9. Garrity, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T. 2005. Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer US. PP: 1-574.
10. Guven, A., Sezer, C., Aydin, B.D., Oral, N.B., and Vatansever, L. 2010. Incidence and pathogenicity of Yersinia enterocolitica isolates from foods in Turkey. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 16: 107-112.
11. Hamama, A., El Marrakchi, A., and El Othmani, F. 1992. Occurrence of Yersinia enterocolitica in milk and dairy products in Morocco. Int. J. Food Microbiol. 16: 69-77.
12. Hanifian, S., and Khani, S. 2012. Prevalence of virulent Yersinia enterocolitica in bulk raw milk and retail cheese in northern-west of Iran. Int. J. Food Microbiol. 155: 89-92.
13. Huovinen, E., Sihvonen, L.M., Virtanen, M.J., Haukka, K., Siitonen, A. and Kuusi, M. 2010. Symptoms and sources of Yersinia

enterocolitica infection: a case-control study. BMC Infectious Diseases. 10:11-23.
14. Jamali, H., Paydar, M.; and Radmehr, B., Ismail, S. 2015. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of Yersinia species and Yersinia enterocolitica isolated from raw milk in farm bulk tanks. J. Dairy Sci. 98: 798-803.
15. Mercado, E.C. and Ibañez, S.B. 1986. Isolation of Yersinia enterocolitica from raw cow milk in Argentina. Int. J. Food Microbiol. 3: 237-242.
16. Martinez, P.O., Fredriksson-Ahomaa, M., Pallotti, A., Rosmini, R., Houf, K., Korkeala, H. 2011. Variation in the prevalence of enteropathogenic Yersinia in slaughter pigs from Belgium, Italy, and Spain. Foodborne pathogens and disease. 8: 445-450.
17. McFarland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. J. Am. Med. Assoc. 49: 1176-1178.
18. Moyes, R.B., Reynolds, J., Breakwell, D.P. 2009. Differential staining of bacteria: gram stain. Current protocols in microbiology. PP: A-3C
19. Pagán, R., Mañas, P., Raso, J., and Trepat, F.J.S. 1999. Heat resistance of Yersinia enterocolitica grown at different temperatures and heated in different media. Int. J. Food Microbiol. 47: 59-66.
20. Rosner, B.M., Stark, K., and Werber, D. 2010. Epidemiology of reported Yersinia enterocolitica infections in Germany, 2001-2008. BMC Public Health. 10: 78-98.
21. Sharifzadeh, A., Akhavan, M., Zarasvandi, A., and Alagha, S. 2004. Isolation of Yersinia entrocolitica and Listeria monocytogenes from raw and pasteurized milks supplied at dairies in Chahar Mahal Bakhtiary province. Iran. J. Food Sci. Tech. 1:15-19.
22. Vidon, D.J., and Delmas, C.L. 1981. Incidence of Yersinia enterocolitica in raw milk in eastern France. J. App. Environ. Microbiol. 41: 355-359.
23. Xanthopoulos, V., Tzanetakis, N., and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2010. Occurrence and characterization of Aeromonashydrophila and Yersinia enterocolitica in minimally processed fresh vegetable salads. Food Control. 21: 393-398.
24. Yehualaeshet, T., and Graham, M., Montgomery, M., Habtemariam, T., Samuel, T., Abdela, W. 2013. Effects of temperature on the viability, growth and gene profile of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica inoculated in milk. Food Control. 34: 589-595.
25. Ye, Y.W., Ling, N., Han, Y.J., and Wu, Q.P. 2014. Detection and prevalence of pathogenic Yersinia enterocolitica in refrigerated and frozen dairy products by duplex PCR and dot hybridization targeting the virF and ail genes. J. Dairy Sci. 97: 6785-6791.
26. Yucel, N., and Ulusoy, H. 2006. A Turkey survey of hygiene indicator bacteria andYersinia enterocolitica in raw milk and cheese samples. Food Control. 17: 383-388.
27. Ye, Q., Wu, Q., Hu, H., Zhang, J., and Huang, H. 2016. Prevalence and characterization of Yersinia enterocolitica isolated from retail foods in China. Food Control. 61: 20-27.
28. Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., and Łaniewska-Trokenheim, Ł. 2014. Yersinia enterocolitica: a dangerous, but often ignored, foodborne pathogen. Int J. Food Rev. 30(1): 53-70.

Survey on contamination to *Yersinia entrocolotica* in cow milk distributed in Ahvaz area and evaluation of antibiotic resistance of isolates

Fazlara A*[1], Zarei M[1], Mavalizadeh A[2]

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

2. Graduated of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

Corresponding author: *a.fazlara@scu.ac.ir*

Received: 1 October 2016 Accepted: 23 January 2017

Abstract

Totally 150 samples of cow milk were collected in Ahvaz within 6 months. The collected samples were sent to the lab in cool conditions. The amount of 25 ml of each sample was added to 225 ml of Tris-Buffered Peptone Water with pH=8 as enrichment medium and stored at 4°C for three weeks. Then in 7th, 14th and 21th days of storage, one loopful equal to 10 µL of enriched broth were streaked out in plates of Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar contained supplement and incubated at 30°C for 24 hours. Then 3 to 5 colonies of typical bull's-eye appearance with 0.5-2 mm diameter with a deep red center and sharp border surrounded by a translucent zone were selected as suspect to *Yersinia enterocolitica* and cultured in TSA medium. After gram staining and observe gram negative rod and also implement some biochemical tests in next step due to absolute identification, specific primers for 16srRNA were used. Boiling method was used to extract DNA. The isolation of *Yersinia entroclitica* was confirmed from 36 samples (24%) of milks. The confirmed isolates due to antibiogram were spread out in agar culture and the antibiotic susceptibility was surveyed with utilization of antibiotic discs and CLSI tables. The results showed that the sensitivity to Ciprofloaxin, Gentamicin, Tetracycline, Ceftazidime, Nalidixic Acid, Kanamycin, Trimethoprim Sulfametaxazole, Amoxicillin and Cephalotin were 100%, 97.05%, 91.17%, 85.29%, 82.35%, 79.41%, 67,64%, 17.64% and 14.7% respectively. None of the isolates were susceptible to Erythromycin which shows that the isolates have the most resistance against this antibiotic.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, Raw Milk, PCR.