DOI: 10.22055/IVJ.2022.306197.2402

تعیین فراوانی آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در سگ‌های خانگی شهرستان اهواز

بهمن مصلی‌نژاد[1*]، داریوش غریبی[2]، رضا آویزه[1] و امین حیدری[3]

[1] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[2] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[3] دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۱۴۰۰/۶/۳۱ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵

چکیده

یرسینیا انتروکولیتیکا، یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود که از دستگاه گوارش حیوانات خانگی (سگ‌ها و گربه‌ها) به انسان منتقل می‌شود. این باکتری موجب انتروکولیت در انسان می‌گردد. مطالعه حاضر بر روی ۱۰۰ قلاده سگ (۵۰ قلاده سالم از نظر بالینی و ۵۰ قلاده مبتلا به اسهال)، ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز صورت گرفت. تمامی مشخصات سگ‌ها، از قبیل سن، جنس، نژاد، وضعیت دستگاه گوارش به لحاظ وجود اسهال و مشخصات اسهال (از نظر حضور خون)، سابقه مصرف گوشت خام و منشاء سگ ثبت گردید. سپس، نمونه مدفوع با استفاده از دستکش و سوآب استریل از ناحیه رکتوم حیوان اخذ گردید. نمونه‌ها جهت کشت مستقیم و نیز کشت به صورت غنی‌سازی شده (در پپتون واتر بافره و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) مورد بررسی قرار گرفتند. در مواردی که پرگنه‌های رشد کرده، مشکوک به *یرسینیا* بودند، آزمایشات اولیه (کاتالاز، اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم) انجام شد و سپس با تست‌های بیوشیمایی، تفریق صورت گرفت. جدایه‌های احتمالی *یرسینیا انتروکولیتیکا*، به‌روش PCR و با استفاده از ژن *foxA* جهت شناسایی باکتری، و ژن *ail* جهت تعیین حدت آن (بیماری‌زا بودن) بررسی شدند. نتایج حاصل از کشت مستقیم، شامل ۳ جدایه مشکوک از ۱۰۰ نمونه اخذ شده (۱ نمونه از سگ‌های سالم و ۲ نمونه از حیوانات اسهالی) بودند. همچنین نتایج کشت غنی شده، ۶ جدایه مشکوک از ۱۰۰ نمونه (۳ نمونه از سگ‌های سالم و ۳ نمونه از موارد اسهالی) بودند. در نهایت، از ۹ جدایه مشکوک به *یرسینیا*، تنها یک جدایه از نظر *یرسینیا انتروکولیتیکا* تأیید شد که از نظر حضور ژن حدت *ail*، منفی بود. نمونه مثبت، متعلق به یک قلاده سگ از نژاد پیت بول‌تریر ۱۰ ماهه، نر و سالم بود که از گوشت خام تغذیه کرده و متعلق به سگ‌های وارداتی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که سگ‌های این منطقه را نمی‌توان به عنوان یک مخزن بالقوه، جهت انتقال باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* دانست. بررسی‌های بیش‌تر جهت روشن شدن وضعیت بیماری، با تأکید بیش‌تر بر سگ‌های وارداتی و روستایی، ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: اهواز، سگ، فراوانی، *یرسینیا انتروکولیتیکا*، بیماری مشترک

مقدمه

در بسیاری از مناطق دنیا، نقش حیوانات خانگی، در انتقال بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان، کاملاً شناخته شده است. بیش از ۷۰ عامل بیماری‌زای قابل انتقال به انسان، در سگ‌ها و گربه‌ها شناخته شده است. *سالمونلا*

*نویسنده مسئول : بهمن مصلی‌نژاد، استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: bmosallanejad@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

انتریکا، *کمپیلوباکتر ژژونی*، *شیگلا*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *ایشرشیاکولی*، از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای باکتریایی محسوب می‌شوند که از دستگاه گوارش سگ‌ها و گربه‌ها به انسان منتقل می‌شوند (Torres et al, 2001; Greene et al, 2012).

باکتری‌های *یرسینیا* به صورت کوکوباسیل، متحرک، گرم منفی و در اندازه ۳- ۱ × ۱- ۰/۵ میکرومتر هستند. سه مورد از گونه‌های مهم *یرسینیا* که سگ‌ها و گربه‌ها را آلوده می‌کنند شامل *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *یرسینیا پسودوتوبرکلوزیس* و *یرسینیا پستیس* می‌باشند. *یرسینیا انتروکولیتیکا*، موجب انتروکولیت در انسان می‌گردد. اگر چه خوک، مخزن عمده *یرسینیا* محسوب می‌شود، در شرایطی که حیوانات، از گوشت خام آلوده تغذیه کرده باشند، خطر انتقال عفونت، از حیوانات خانگی به انسان (به ویژه کودکان) نیز وجود دارد (Greene et al, 2012; Hetem et al, 2013). یرسینیوز، سومین بیماری باکتریایی مشترک بین انسان و حیوان در کشور آلمان و دیگر کشورهای اتحادیه اروپا محسوب می‌شود (Stamm et al, 2013).

باکتری *یرسینیا*، از مدفوع حیوانات مختلف اهلی و وحشی و نیز از محیط جداسازی شده است و دارای انتشار جهانی است. به شکل غیرمعمول، این باکتری در محیط‌های کشت با درجه حرارت پایین، تکثیر پیدا می‌کند و در محیط‌های آزمایشگاهی و غذاهای داخل یخچال رشد می‌کند. *یرسینیا*، دارای بیوتیپ و سروتیپ‌های مختلفی است؛ به نحوی که بیوتیپ‌های بیماری‌زا در سگ‌ها عبارتند از B_1، B_2، B_3، B_4 و B_5 همراه با سروتیپ‌های $O:_3$، $O:_{5/27}$، $O:_8$ و $O:_9$. بیوتیپ A_1، در سگ‌ها غیربیماری‌زا است، اما گاهی موجب بیماری در انسان می‌شود. میزان شیوع عفونت ناشی از *یرسینیا انتروکولیتیکا*، در ماه‌های سرد بیش‌تر است. این باکتری از طریق تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت، موجب بیماری می‌شود. یکی از فاکتورهای حدت، درجه حرارت پایین محیط بوده و افراد بیش‌تر از طریق غذا یا محیط آلوده، مبتلا می‌شوند. به نظر می‌رسد که انسان میزبان غیر معمول برای این ارگانیسم باشد (Fredriksson-Ahomaa et al, 2000; Simonova et al, 2007; Byun et al, 2011).

از آن جایی که *یرسینیا انتروکولیتیکا* از مدفوع سگ‌ها و گربه‌های سالم جداسازی شده است، تصور می‌شود که این باکتری به صورت کومنسال موجود باشد. جداسازی باکتری از صاحبان سگ و گربه، که در تماس با حیوانات خود بوده‌اند، بیش‌تر گزارش شده است. *یرسینیا* همچنین از مدفوع سگ‌های جوان مبتلا به بیماری‌های گوارشی، جداسازی شده است. علایم با یک تاریخچه اسهال همراه با افزایش تعداد دفع، تنسموس، حضور خون و موکوس شروع می‌شود. مرگ ناگهانی ناشی از میوکاردیت، در یک توله سگ نژاد روتوایلر ۴ ماهه، آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا*، گزارش شده است. در کالبدگشایی از حیوان مبتلا، هپاتیت گرانولوماتوز چند کانونی نیز آشکار بود (Wibbelt and Kelly, 2001; Kich et al, 2020).

از آن جا که موارد عفونت‌های ناشی از *یرسینیا* در انسان، با منشأ حیوانی، در حال افزایش است؛ تعیین شیوع این عوامل بیماری‌زا، در حیواناتی که در تماس بسته با انسان زندگی می‌کنند، بسیار حائز اهمیت است. سگ‌های آلوده ممکن است بدون علایم باشند، ولی باکتری را از خود دفع نمایند و گاهی هم علایم اسهال در آن‌ها دیده می‌شود. شدت بیماری بستگی به تعداد ارگانیسم‌های خورده شده توسط میزبان، میزان در معرض قرار گرفتن‌های قبلی و پیشرفت آنتی‌بادی محافظ در بدن دارد. روش معمول برای تشخیص باکتری، تهیه سوآب از نمونه مدفوع است. تشخیص از طریق بیوپسی و کشت بافت برای *یرسینیا سودوتوبرکلوزیس* و کشت مدفوع برای *یرسینیا انتروکولیتیکا* امکان‌پذیر است. تست‌های سرولوژیک، نیز جهت تشخیص کمک‌کننده هستند. تکنیک مولکولی نظیر PCR، از دقت بالاتری برخوردار است (Jourdan et al, 2000; Greene et al, 2012).

از آن جا که تا کنون مطالعه‌ای بر روی *یرسینیا* در سگ‌های خانگی منطقه اهواز، صورت نگرفته بود، هدف از انجام

مطالعه حاضر، بررسی حضور این باکتری در سگ‌های منطقه، تأثیر فاکتورهای خطر نظیر سن، جنس، نژاد، مصرف گوشت خام، وضعیت دستگاه گوارش (از لحاظ اسهالی بودن) و نیز بررسی وجود ژن‌های حدت *ail* و *foxA* ، در نمونه‌های مثبت *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود.

مواد و روش کار

در تحقیق حاضر، ضمن کسب اجازه از صاحب حیوان و با استفاده از سوآب استریل (به صورت چرخشی)، نمونه-ها از مدفوع تازه ۱۰۰ قلاده سگ، اخذ شد. سگ‌های مورد مطالعه (۵۰ قلاده سالم و ۵۰ قلاده اسهالی)، از بین موارد ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، انتخاب شدند. جهت جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا*، از دو سوآب و به شکل هم‌زمان استفاده گردید. یک سوآب برای کشت و جداسازی باکتری و نمونه دیگر به منظور استخراج DNA، به کار برده شد. نمونه‌های اخذ شده، در لوله قرار داده شدند و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده منقل گردید. نمونه‌گیری، در بازه زمانی شهریور تا بهمن ماه ۱۳۹۷ (۶ ماه) صورت گرفت.

تمامی مشخصات سگ‌ها، از قبیل سن، جنس، نژاد، وضعیت دستگاه گوارش به لحاظ وجود اسهال و مشخصات اسهال (از نظر حضور خون)، سابقه مصرف گوشت خام و منشاء سگ ثبت گردید. حیوانات، به ۲ گروه سنی کم‌تر از ۱ سال (۶۵ قلاده) و بالاتر از ۱ سال (۳۵ مورد) تقسیم‌بندی شدند. تعداد ۴۷ قلاده سگ، نر و ۵۳ مورد ماده بودند. نژاد سگ‌های مورد مطالعه شامل مخلوط (۴۰ قلاده)، ترير (۱۷)، سیبرین هاسکی (۶)، ژرمن‌شفرد (۹)، اشپیتز (۵)، پیت بول (۱۰)، شیتزو (۷) و سایر نژادها (۶) قلاده بودند. تعداد ۵۰ قلاده سگ واجد اسهال و ۵۰ قلاده از نظر بالینی سالم (غیر اسهالی) بودند. از نظر تغذیه، ۶۷ درصد از سگ‌ها از گوشت پخته و مابقی (۳۳ درصد) از گوشت خام تغذیه کرده بودند. از نظر خاستگاه (وارداتی بودن)، ۲۵ درصد از آن‌ها وارداتی و ۷۵ درصد غیر وارداتی بودند. نمونه‌برداری تنها از سگ‌هایی صورت گرفت که در ۱ ماه اخیر، آنتی‌بیوتیک در آن‌ها تجویز نشده بود.

جهت کشت، جداسازی و تعیین هویت باکتری، یکی از نمونه‌های اخذ شده، جهت غنی‌سازی باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا*، در محیط پپتون واتر بافره[1]قرار داده شد (به مدت ۳ هفته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). پس از گذشت این زمان، یک لوپ کامل از محیط برداشته شد و به صورت کشت چهار منطقه‌ای، در محیط کشت سالمونلا- شیگلا- آگار، قرار داده شد. نمونه دوم نیز به طور مستقیم در همان زمان نمونه‌گیری، بر روی محیط کشت سالمونلا- شیگلا- آگار، کشت داده شد. محیط‌های کشت داده شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و برای مدت حداقل ۲۴ ساعت انکوبه گردید. متعاقب رشد باکتری‌ها در سطح پلیت، از هر پلیت ۳ تا ۴ کلونی لاکتوز منفی، مشکوک به *یرسینا* برداشته شد و مجدداً در محیط سالمونلا- شیگلا- آگار، کشت داده شد. نمونه‌های مشکوک به *یرسینیا* پس از بررسی توسط رنگ‌آمیزی گرم و انجام آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز، در محیط‌های TSI[2]و KIA[3]کشت داده شدند و بر اساس واکنش در این دو محیط، جهت تأیید بیش‌تر نمونه مشکوک، در محیط‌های LD[4]، PD[5]، SC[6]، SIM[7]، MR-VP[8]و اوره کشت داده شدند و در نهایت جدایه‌های احتمالی *یرسینیا انتروکولیتیکا*، با استفاده از تکنیک PCR،

1 Buffered Peptone Water
2 Triple Sugar Iron Agar
3 Kligler Iron Agar
4 Lysine Decarboxylase Broth
5 Phenylalanine Deaminase Agar
6 Simmons Citrate Agar
7 Sulfide-Indol-Motility
8 Methyl Red-Voges Proskauer

مورد بررسی نهایی قرار گرفتند. تمام مراحل فوق برای نمونه‌های غنی‌سازی شده، در محیط پپتون واتر بافره انجام گردید.

جهت استخراج DNA جدایه‌های مشکوک به *یرسینیا*، از روش جوشاندن استفاده شد. به طور خلاصه یک یا بخشی از پرگنه خالص باکتری از روی محیط آگار مغذی برداشته شده و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حل‌گردید. مخلوط حاصل، توسط دستگاه ترموبلاک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تعلیق به دست آمده، به مدت ۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی با سمپلر برداشته شده و در میکروتیوب‌های استریل برای انجام PCR در دمای منفی۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این تحقیق، ایزوله‌های مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا*، با استفاده از ژن *foxA* که اختصاصی و حفاظت شده *یرسینیا انتروکولیتیکا* بوده و نیز ژن *ail* مربوط به بیماری‌زا بودن جدایه‌ها (حدت)، مورد بررسی قرار گرفتند. مخلوط PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر کدام از ژن‌ها تهیه شد که شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر از هر کدامیک از پرایمرها (۱۰ میکرومولار)، ۴ میکرولیتر DNA الگو و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر بود (Lambertz et al, 2005). توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق، به شرح زیر آورده شده است (Table 1).

چرخه دمایی واکنش PCR برای ژن‌های *foxA* و *ail*، در جدایه‌های مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در جدول زیر آورده شده است (Table 2). سپس جهت بررسی و مشاهده محصولات PCR، از ژل آگارز یک درصد استفاده گردید.

با توجه به مثبت شدن تنها ۱ نمونه، امکان بررسی نتایج از نظر آماری فراهم نگردید.

Table 1. Nucleotide sequence of primer, target gene and product size to detect *Y. enterocolitica* (Huang et al, 2010)

Gene	Genus and Species	Accession number	Sequence	Size (bp)
foxA	*Y. enterocolitica*	X60447.1	F: CTCTGCGGAAGATAACTATG R: ATCCGGGAATAAACTTGGCGTA	1532
ail	*Y.* enterocolitica	M29945.1	F: GGTTATTGTATTAGTATTGTT R: CAGGTGGGTTTTCACTATCTG	585

Table 2: Temperature and number of cycles to complete the *foxA* and *ail* genes specific to *Y. enterocolitica* respectively

Cycles	Temperature (˚C)	Time	Number
Primary denaturation	94/94	5/5 (min)	1/1
Secondary denaturation	94/94	15/15 (sec)	
Anealing	58/57	30/30 (sec)	30/30
Extention	72/72	60/30 (sec)	30/30
Final extention	72/72	10 (min)	1/1

نتایج

نتایج حاصل از کشت نمونه‌های اخذ شده در محیط‌های کشت SS، TSI و KIA

در بررسی نمونه‌های اخذ شده در محیط کشت SS، نتایج شامل ۴۰۰ پرگنه مشکوک (پرگنه‌های لاکتوز منفی و H_2S منفی) از ۱۰۰ نمونه بود که این پرگنه‌ها سپس در محیط‌های TSI و KIA کشت داده شدند. در بررسی نمونه‌ها در محیط‌های کشت TSI و KIA، نتایج شامل ۲۷ پرگنه مشکوک به *یرسینیا* (پرگنه‌ها در محیط TSI اسید/ اسید و در محیط KIA قلیا/ اسید) بود.

نتایج حاصل از کشت نمونه‌های اخذ شده در محیط‌های کشت افتراقی

در بررسی نمونه‌های اخذ شده در محیط‌های کشت افتراقی که شامل محیط‌های LD، PD، SC، MR-VP، SIM و اوره بودند، نتایج حاکی از حضور سه جدایه مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا* از ۱۰۰ نمونه (۱ نمونه از سگ‌های سالم و ۲ نمونه از حیوانات اسهالی) بود که در بررسی با PCR اختصاصی بر اساس ژن *foxA* تنها یک جدایه از نظر *یرسینیا انتروکولیتیکا* تأیید شد.

نتایج حاصل از کشت و جداسازی باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* در محیط کشت غنی شده (پپتون واتر)

نمونه‌های اخذ شده بعد از انتقال به آزمایشگاه، در محیط کشت پپتون واتر قرار داده شدند و به مدت ۳ هفته در انکوباتور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نتایج حاصل، پس از کشت در محیط‌های افتراقی، شامل ۶ نمونه مشکوک به *یرسینیا انتروکولیتیکا* از ۱۰۰ نمونه بود (۳ نمونه از سگ‌های سالم و ۳ نمونه از موارد اسهالی)؛ که در این مورد نیز در بررسی با PCR اختصاصی بر اساس ژن *foxA* تنها یک جدایه و همان نمونه‌ای که در کشت مستقیم مثبت بود، از نظر *یرسینیا انتروکولیتیکا* مثبت واقع شد.

در مجموع، با بررسی ایزوله‌های مشکوک حاصل از کشت مستقیم و کشت غنی‌سازی شده و نیز نمونه‌های بررسی شده به وسیله PCR، با بهره بردن از پرایمر طراحی شده ژن *foxA*، مشخص گردید که تنها یک درصد (یک نمونه از ۱۰۰ مورد) از جمعیت سگ‌های سالم، مثبت بود (Figure 1). با بررسی تاریخچه، مشخص گردید که نمونه مثبت از گروه سگ‌های سالم (بدون اسهال) و نژاد پیت بول بوده، که از غذای خام تغذیه کرده است؛ همچنین سگ آلوده، جزو سگ‌های وارداتی بود.

بررسی نمونه‌ها جهت ردیابی باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر اساس ژن *ail*

با بررسی نمونه‌ها به وسیله PCR، با بهره بردن از پرایمر طراحی شده ژن *ail*، مشخص گردید که نمونه مثبت برای ژن *foxA*، فاقد ژن *ail* بود، ضمناً نمونه مثبت جزو سویه‌های غیرپاتوژن باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود (Figure 2).

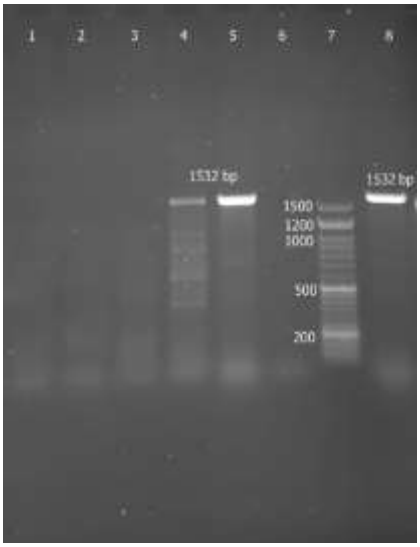

Figure 1: Molecular confirmation and detection of *Y. enterocolinic* by PCR. Amplification of *foxA* gene in *Y. enterocolinica*. No. 1, 2 and 3 of suspected specimens lack *foxA* gene, No. 4: *Y. enterocolinica* isolate containing *foxA* gene, No. 5 and 8: Positive control No. 6: Negative control and No. 7: molecular marker bp50.

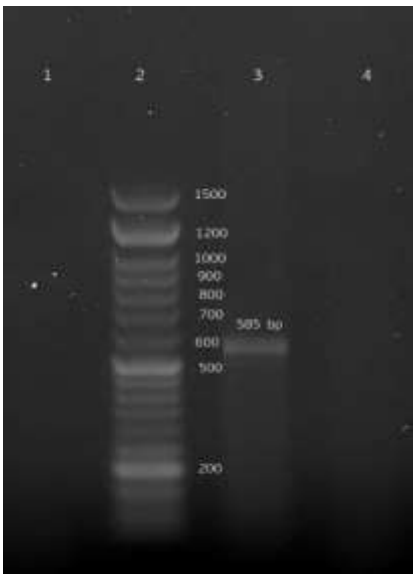

Figure 2: Identification of virulence genes of *ail* by PCR. Amplification of *ail* gene in *Y. enterocolinica*. No 1: *Y. enterocolinica* isolate without *ail* gene. No. 2: bp50 molecular marker. No. 3: positive control with *ail* gene and No. 4: negative control.

بحث

در مطالعه حاضر، که با استفاده از دو روش کشت و PCR، بر روی ۱۰۰ نمونه مدفوع (۵۰ قلاده سگ اسهالی و ۵۰ مورد سالم) از سگ‌های ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی اهواز، صورت گرفت؛ تنها یک جدایه مثبت از *یرسینیا انتروکولیتیکا* شناسایی گردید (۱ درصد). نمونه گزارش شده فاقد علایم اسهال و از سگ‌های وارداتی بود. مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا*، در سگ‌های خانگی شهرستان اهواز و بررسی فاکتورهای خطر شامل سن، جنس، نژاد، وضعیت دستگاه گوارش، منشاء سگ‌ها (از نظر وارداتی بودن) و نوع تغذیه صورت گرفت. واردات سگ‌ها از دیگر کشورها، از جمله کشورهای اروپایی در سال‌های اخیر افزایش یافته است و این امر می‌تواند تعداد حیوانات حامل را در کشور (از طریق تغذیه با گوشت خام خوک آلوده) افزایش دهد. در مطالعه حاضر نیز تنها نمونه مثبت، متعلق به یک قلاده سگ پیت بول وارداتی بود.

بیش از ۶۰ سال است که باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* شناسایی شده است. آلوده شدن انسان با *یرسینیا*، گاها از طریق ارتباط مستقیم یا غیرمستقیم با حیوانات آلوده رخ می‌دهد. این باکتری از دستگاه گوارش بسیاری از حیوانات نظیر جوندگان، سگ، گربه، گاو، گوسفند، خوک و دیگر حیوانات نظیر آهو، راکون و اسب جداسازی شده است؛ لذا می‌بایست از دادن گوشت خام به حیوانات اجتناب شود (Sabina et al, 2011; Tan et al, 2014; Joutsen et al, 2016; Kameyama et al, 2016). *یرسینیا* یکی از ۵ باکتری اصلی مسبب بیماری‌های دستگاه گوارش در انسان است. علاوه بر خوک، حیوانات همراه انسان به ویژه سگ‌ها و گربه‌ها، مکرراً منبع *یرسینیا انتروکولیتیکا* شناخته شده‌اند (Nesbakken et al, 2003; Stamm et al, 2013).

در مطالعه‌ای که توسط Hashemi و همکاران در سال ۲۰۱۶ و با استفاده از روش Multiplex PCR، جهت بررسی آلودگی به *یرسینیا* و *سالمونلا* در سگ‌ها و گربه‌های به ظاهر سالم تهران انجام شد، نتایج نشان داد که شیوع *یرسینیا* در سگ‌ها ۲۲ درصد و در گربه‌ها ۸ درصد بود. نتایج نشان داد که غذای آلوده در این حیوانات، ممکن است مهم‌ترین منبع آلوگی باشد. در مطالعه همکاران فوق، گونه‌های مختلف *یرسینیا* به صورت کلی بررسی شده بود؛ اما در مطالعه حاضر، تنها *یرسینیا انتروکولیتیکا* بررسی گردید و این می‌تواند دلیل احتمالی اختلاف نتایج بین دو تحقیق باشد.

در مطالعه Stamm و همکاران در سال ۲۰۱۳ تعداد ۴۳۲۵ نمونه مدفوع سگ و ۲۶۲۴ نمونه مدفوع گربه، جمع-آوری و از لحاظ آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بررسی گردید، که نتایج به ترتیب نشان‌دهنده شیوع آلودگی ۴/۶ و ۰/۳ درصدی در سگ و گربه بوده است. تفاوت نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر، ممکن است به عللی نظیر تعداد نمونه مورد بررسی، منطقه جغرافیایی و شرایط تغذیه‌ای متفاوت برگردد.

در یک مطالعه دیگر، که شیوع *یرسینیا* را در سگ‌ها بررسی کردند، نمونه‌هایی از معده، دئودنوم، ژژنوم، ایلئوم، سکوم، قولون و محتویات رکتوم، غدد لنفاوی مزانتریک، کبد، صفرا، طحال و کلیه‌ها اخذ گردید. نتایج حاصل از کشت مستقیم و غنی‌سازی شده نشان داد که تعداد ۷۰ نمونه از ۲۵۲ مورد، آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند. همچنین از نظر آلودگی، تفاوت معنی‌داری بین سگ‌های زیر ۱ سال و بالای ۱ سال مشاهده گردید؛ به نحوی که آلودگی در سگ‌های زیر ۱ سال، بیش‌تر بود و نیز شیوع آلودگی در فصول زمستان و بهار، بیش‌تر از تابستان و پاییز بود که نشان‌دهنده ارتباط بین شیوع و دمای محیط می‌باشد (Fukushima et al, 1984). در مطالعه حاضر، که در یک بازه زمانی ۶ ماه صورت گرفت، امکان بررسی اثر فصل فراهم نشد. به دلیل این که شناسایی گونه *یرسینیا انتروکولیتیکا* در بروز اسهال، به صورت معمول در آزمایشگاه‌ها صورت نمی‌گیرد و به عنوان عامل مهمی در

ایجاد اسهال‌های حاد و خونی به آن‌ها توجه نمی‌شود؛ لذا در کشور ما، گزارش‌های ناشی از وجود این باکتری در بروز اسهال، به مراتب بسیار کم‌تر از کشورهای دیگر است.

در یک تحقیق دیگر در کشور لهستان، توسط Syczylo و همکاران در سال ۲۰۱۸ شیوع آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا*، در حیوانات وحشی که برای شکار استفاده می‌شدند، بررسی گردید. نتایج نشان داد که از ۸۷۵ نمونه بررسی شده، ۲۱/۷ درصد، از نظر آلودگی به این باکتری مثبت بودند. این محققین بیان داشتند که *یرسینیا* یک باکتری شایع در حیوانات وحشی می‌باشد. هر چند نتایج تحقیق آن‌ها، با مطالعه حاضر تفاوت داشت، اما باید به نقش دیگر حیوانات، از جمله حیوانات حیات وحش، به عنوان مخزن *یرسینیا انتروکولیتیکا* توجه داشت.

Murphy و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشور ایرلند، شیوع آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* را در سگ بررسی نمودند. در تحقیق آن‌ها، ۲۱۶ نمونه، شامل ۱۴۴ نمونه از غدد بزاقی و ۷۲ نمونه سوآب از ناحیه رکتوم سگ‌ها اخذ گردید. نتایج نشان داد که از ۲۵ نمونه مثبت، ۲۴ مورد مربوط به غدد بزاقی و تنها ۱ نمونه مربوط به سوآب از رکتوم بود. تمامی نمونه‌ها، متعلق به بیوتیپ A_1 بودند. نتایج تحقیق آن‌ها برای اولین بار نشان داد که *یرسینیا انتروکولیتیکا* در غدد بزاقی سگ‌ها وجود دارد و حفره دهانی سگ می‌تواند یک منبع آلودگی برای انسان باشد. نتایج مطالعه محققین، از این نظر که آن‌ها نیز فقط ۱ مورد *یرسینیا انتروکولیتیکا* را در نمونه‌های مدفوع گزارش نمودند با نتایج مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد. اما نتایج تحقیق همکاران فوق، غدد بزاقی را در سگ، به عنوان یک منبع آلودگی برای *یرسینیا* معرفی نموده است که لازم است در مطالعات دیگر مورد بررسی قرار گیرد.

در مطالعه دیگر در کشور ژاپن بر روی ۷۰۴ قلاده سگ، شیوع آلودگی به *یرسینا انتروکولیتیکا* بررسی گردید. نتایج آن‌ها نشان داد که میزان آلودگی در سگ‌ها، ۶ درصد می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه محققین فوق مطابقت ندارد. علاوه بر تفاوت در تعداد سگ‌های مورد مطالعه (۱۰۰ قلاده سگ در مقابل ۷۰۴ مورد)، منطقه جغرافیای و نحوه نمونه‌گیری، می‌توان تکنیک تشخیصی را نیز بیان نمود که در مطالعه حاضر از دو روش PCR و کشت استفاده گردید؛ در حالی که در مطالعه آن‌ها، تنها از روش کشت مستقیم که حساسیت کم‌تری دارد، استفاده شد (Yanagawa et al, 1978). در مطالعه حاضر، ابتدا کشت باکتری انجام شد و در ادامه جهت تأیید تشخیص موارد مثبت، روش PCR به کار برده شد. بی‌شک، روش‌های مولکولی، دقیق‌ترین، سریع‌ترین و حساس‌ترین تکنیک‌های تشخیصی محسوب می‌شوند. به منظور تشخیص *یرسینیا*، اگر چه از روش‌های کشت رایج و بیوشیمیایی و نیز تست‌های سرولوژیکی استفاده می‌شود، اما این روش‌ها، زمان‌بر و طولانی است و درصد خطای آن بالا است. از طرف دیگر جداسازی مستقیم باکتری به ندرت موفقیت‌آمیز است؛ ضمن این که مراحل غنی‌سازی نیز هزینه‌بر است (Greene et al, 2012).

امروزه جهت شناسایی عوامل عفونی، استفاده از روش‌های مولکولی، بسیار رایج شده است. به طوری که ارزیابی‌ها، بر پایه روش PCR برای شناسایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه‌های غذا و موارد بالینی، در سطح وسیعی گسترش یافته است. روش‌های پایه‌ای که برای استخراج DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد، استفاده از فنل و کلروفرم است؛ اما این روش خالی از اشکال نیست. استفاده از فنل که ماده‌ای سمی و خطرناک است و کلروفرم که استنشاق آن خطرات زیادی را در پی دارد؛ لذا از روش‌های کم خطر و آسان‌تر، نظیر روش جوشاندن می‌توان استفاده کرد (Estrada et al, 2012)، ضمن این که در مورد باکتری‌های گرم منفی نظیر *یرسینیا انتروکولیتیکا*، دیواره سلولی نازکی دارند و با جوشاندن ساده نیز باکتری‌ها لیز و محتوای سلولی آن‌ها از جمله DNA آزاد می‌شوند (Tsang et al, 2013). در یک مطالعه که به منظور مقایسه بین روش‌های بیوشیمیایی، سرولوژیکی و مولکولی انجام گردید، از مجموع ۳۷۴۸ نمونه اخذ شده از گاو، خوک و طیور، ۵۲ سویه *یرسینیا* در روش‌های بیوشیمیایی و

سرولوژیکی و ۵۳ سویه در روش PCR ردیابی شد (Simonova et al, 2007). این نکته حاکی از دقت و حساسیت بیش‌تر روش PCR در مقایسه با دیگر روش‌های تشخیص است؛ ضمن این که امکان ردیابی باکتری، بدون نیاز به کشت را فراهم می‌کند. به همین دلیل در مطالعه حاضر، از روش PCR جهت تأیید تشخیص *یرسینیا انتروکولیتیکا* استفاده گردید. در شناسایی *یرسینیا انتروکولیتیکاهای* بیماری‌زا می‌توان از ردیابی ژن‌های حدت با منشأ پلاسمید یا کروموزوم استفاده کرد؛ ولی به دلیل ماهیت ناپایدار پلاسمیدهای این باکتری در طی تقسیم سلولی، تجدید کشت و نگهداری باکتری در دماهای پایین، امکان حذف خود به خودی پلاسمیدها وجود دارد. بنابراین در ردیابی‌ها، بررسی‌های مولکولی، شناسایی و نیز تعیین حدت این باکتری، روش‌های مولکولی مبتنی بر پلاسمید، حساسیت کم‌تری نسبت به ژن‌های کروموزومی دارند. ژن کروموزومی پذیرنده فروکسامین[1] در جذب آهن نقش دارد. این ژن در *یرسینیا انتروکولیتیکا*، پایدار و حفاظت شده و اختصاصی گونه می‌باشد و به همین خاطر در شناسایی مولکولی این باکتری، ژن هدف خوبی می‌باشد. ژن *ail*، پروتئین *ail* را کد می‌کند، که در چسبیدن، تهاجم و مقاومت باکتری به سرم نقش دارد. این ژن تنها در سویه‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* وجود دارد و نقش مهمی در حدت باکتری دارد. لذا در مطالعه حاضر، از ژن *foxA* برای شناسایی و تأیید مولکولی *یرسینیا انتروکولیتیکا* و از ژن *ail* برای بررسی بیماری‌زا بودن مورد استفاده قرار گرفت (Tsang et al, 2013; Kich et al, 2020). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از ۱۰۰ نمونه اخذ شده، تنها ۱ مورد مثبت بود که این نمونه نیز متعلق به سگ‌های وارداتی بود. بر اساس نتایج به دست آمده، سگ‌های این منطقه را نمی‌توان به عنوان یک مخزن بالقوه برای انتقال *یرسینیا انتروکولیتیکا* دانست. جهت روشن شدن بیش‌تر موضوع، مطالعات بیش‌تر با تأکید بیش‌تر بر سگ‌های وارداتی نیز ضروری به نظر می‌رسد. توجه به سگ‌های ولگرد و روستایی که در این مطالعه به آن‌ها پرداخته نشده است، نیز از این جنبه می‌تواند حائز اهمیت باشد. تأکید می‌گردد که باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* را به عنوان یک عامل بیماری‌زا که می‌تواند سلامت عمومی جامعه را تحت تأثیر قرار دهد، همواره مد نظر قرار داده و راه‌های انتقال آن را به ویژه در حیوانات همراه با انسان، بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز، ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

هزینه پایان‌نامه مزبور، در قالب پژوهانه، از دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

[1] Ferrioxamine receptor gene: *foxA*

منابع

Byun, J. W., Yoon, S. S., Lim, S. K., Lee, O. S., & Jung, B. Y. (2011). Hepatic Yersiniosis Caused by *Yersinia Enterocolitica* 4:O3 in an Adult Dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *23*, 376–378.

Estrada, C. S., del Carmen Velazquez, L., Favier, G. I., Di Genaro, M. S., & Escudero, M. E. (2012). Detection of *Yersinia* spp. in meat products by enrichment culture, immunomagnetic separation and nested PCR. *Food microbiology*, *30*(1), 157-63.

Fredriksson-Ahomaa, M., Korte, T., & Korkeala, H. (2000). Contamination of carcasses, offals, and the environment with yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse. *Journal of food protection*, *63*(1), 31-35.

Fukushima, H., Nakamura, R., Iitsuka, S., Tsubokura, M., Otsuki, K., & Kawaoka, Y. (1984). Prospective systematic study of *Yersinia spp*. in dogs. *Journal of clinical microbiology*, *19*(5), 616-622.

Greene, C. E., & Prescott, J. F. (2012). *Enteric bacterial infections*. In: *Infectious diseases of the Dog and Cat*. Greene. Vol. 1. (4th Edition). St. Louis Missouri, USA. Pp: 333-334.

Hashemi, S., Mahzounieh, M., & Ghorbani, M. (2016). Detection of *Yersinia* spp and *Salmonella* spp. in apparently healthy cats and dogs in Tehran, Iran, *Virology*, *12*, 23-28.

Hetem, D. J., Pekelharing, M., & Thijsen, S. F. T. (2013). Probable transmission of *Yersinia enterocolitica* from a pet dog with diarrhoea to a 1-year-old infant. *BMJ Case Report*, *16*, 1-3.

Huang, Y. (2010). Possible use of ail and foxA polymorphisms fordetecting pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *BMC Microbiology*, *10*, 211.

Jourdan, A. D., Johnson, S. C., & Wesley, I. V. (2000). Development of a Fluorogenic 5′ Nuclease PCR Assay for Detection of the *ail* Gene of Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9), 3750-3755.

Joutsen, S., Eklund, K. M., Laukkanen-Ninios, R., Stephan, R., & Fredriksson-Ahomaa, M. (2016). Sheep carrying pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotypes 2/O: 9 and 5/O: 3 in the feces at slaughter. *Veterinary microbiology*, *197*, 78-82.

Kameyama, M., Yabata, J., Obane, N., Otsuka, H., & Nomura, Y. (2016). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pet Djungarian hamsters in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science*, *78*(10), 1639-1641.

Kich, J. D., Souza, A. I. A., Montes, J., Meneguzzi, M., Costa, E. F., Coldebella, A., Corbellini, L. G., & Cardoso, M. (2020). Investigation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pig carcasses in Southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *40* (10), 781-790.

Lambertz, S. T., & Danielsson-Tham, M. L. (2005). Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(7), 3674-3681.

Murphy, B. P., Drummond, N., Ringwood, T., O'Sullivan, E., Buckley, J. F., Whyte, P., Prentice, M. B., & Fanning, S. (2010). First report: *Yersinia enterocolitica* recovered from canine tonsils. *Veterinary Microbiology*, *146*(3-4), 336-339.

Nesbakken, T., Eckner, K. F., Hoidal, H. K., & Rotterud, O. J. (2003). Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. *International Journal of Food Microbiology*, *80*(3), 231-240.

Sabina, Y., Rahman, A., Ray, R. C., & Montet, D. (2011). *Yersinia enterocolitica*: mode of transmission, molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. *Journal of pathogens*, *23*, 155-1159.

Simonova, J., Vazlerova, M., & Steinhauserova, I. (2007). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serotype O: 3 by biochemical, serological, and PCR methods. *Czech journal of food sciences*, *25*(4), 214.

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*(3), 887-893.

Syczylo, K., Platt-Samoraj, A., Bancerz-Kisiel, A., Szczerba-Turek, A., Pajdak-Czaus, J., Labuc, S., Procajlo, Z., Socha, P., Chuzhebayeva, G., & Szweda, W. (2018). The prevalence of *Yersinia enterocolitica* in game animals in Poland. *PloS one*, *13*(3), e0195136.

Tan, L. K., Ooi, P. T., & Thong, K. L. (2014). Prevalence of *Yersinia enterocolitica* from food and pigs in selected states of Malaysia. *Food Control*, *35*, 94-100.

Tsang, T. M., Wiese, J. S., Felek, S., Kronshage, M., & Krukonis, E. S. (2013). *Ail* proteins of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* have different cell binding and invasion activities. *PLoS One*, *8*(12), e83621.

Torres, M., Pırez, M., Schelotto, F., Varela, G., Parodi, V., Allende, F., Falconi, E., Dell'Acqua, L., Gaione, P., & Mendez, M. (2001). Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *Journal of clinical microbiology*, *39*(6), 2134-2139.

Wibbelt, G., & Kelly, D. F. (2001). Sudden death in a Rottweiler puppy with myocardial Yersiniosis. *European Journal of Veterinary Pathology*, *7*(3), 135-137.

Yanagawa Y., Maruyama T., & Sakai S. (1978). Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from apparently healthy dogs and cats. *Microbiology and Immunology*, *22* (10), 643- 646.

Received: 22.09.2021
Accepted: 24.01.2022

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.306197.2402

Detecting the frequency of *Yersinia enterocolitica* infection in companion dogs in Ahvaz

Bahman Mosallanejad[1*], Darioush Gharibi[2], Reza Avizeh[1] and Amin Heidari[3]

[1] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 22.09.2021 Accepted: 24.01.2022

Abstract

Yersinia enterocolitica is one of the most important pathogens transmitted through the digestive tract of pets (dogs and cats) to human. This bacterium is the causative agent of enterocolitis in human. The present study was performed on one hundred dogs (fifty clinically healthy and fifty affected to diarrhea) referred to Veterinary Hospital of Shahid Chamran University of Ahvaz. All characteristics of dogs such as age, gender, breed, gastrointestinal status for diarrhea and characteristic of diarrhea (heamorrhagic), history of raw meat consumption and dog origin were recorded. Then, two stool specimens were taken using sterile glove and swab of the rectum area. The samples were also examined for direct culture and enriched culture (in the buffered peptone water at temperature of 4° C). In cases that the grown colonies were suspected to *Yersinia*, initial tests (catalase, oxidase and gram staining) were performed and identified with biochemical tests. The probable isolates of *Yersinia enterocolitica* were recognized by PCR technique and then *foxA* gene was used to identify bacterium and determine the virulence with *ail* gene (pathogenicity). Three suspected isolates from one hundred samples (one case of healthy dogs and two cases of diarrheic animals) were included in the results of direct culture. Results of enriched culture were composed of six suspected isolates from one hundred cases (three out of healthy dogs and three other cases of diarrheic animals). Finally, out of the nine suspected isolates to *Yersinia*, only one sample was confirmed for *Yersinia enterocolitica* that was negative for *ail* virulence gene. The positive sample was belonged to a healthy, male and ten-months-old Pit bull terrier imported dog that was fed with raw meat. The results of this study showed that the dogs of this area cannot be considered as a potential reservoir for transmission of *Yersinia enterocolitica*. Further studies are necessary to determine the status of the disease, with more emphasis on the imported and rural dogs.

Key words: Ahvaz, Dog, Frequency, *Yersinia Enterocolitica*, Zoonotic disease

* **Corresponding Author**: Bahman Mosallanejad, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: bmosallanejad@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).