

فسلجية ومرضية جرثومة *Yersinia enterocolitica* المعزولة من بعض

منتجات الحليب في محافظة نينوى

اميرة محمود الراوي¹ نوال عزيز خليل²

¹كلية العلوم جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

²فرع الاحياء المجهرية كلية الطب البيطري جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص

تضمنت الدراسة عزل جرثومة *Yersinia enterocolitica* اذ جمعت 197 عينة تضمنت 85 عينة من المتلجبات اللبنية و 112 عينة حليب خام توزعت الى 59 عينة حليب خام للابقار و 53 عينة حليب خام للجاموس . وتبين ان العدد الكلي لجرثومة *Y. enterocolitica* بلغ 37 عزلة بنسبة 18.78 % ، وكانت نسبة عزل الجرثومة 8.6 % في عينات المتلجبات اللبنية، أما نسبة عزلها من عينات الحليب الخام للابقار والجاموس فقد بلغت 5.58 % و 4.56 % على التوالي . كما شملت الدراسة التحري عن عوامل الضراوة التي تمتلكها الجرثومة كإنتاجها لبعض انزيمات الضراوة وقدرتها على الالتصاق وأظهرت النتائج ايجابية جميع العزلات لإنتاج انزيم اليوريز وإيجابية بعض منها لإنتاج انزيمات *Lecithinase* و *Lipase* و *DNase* و *Protease*، كما أبدت الجرثومة قدرة واضحة على الالتصاق بالخلايا الظهارية القموية ، وعند محاولة تنميط عزلات الجرثومة حيويًا أظهرت الدراسة ان العزلات تقع ضمن 4 أنماط حيوية اعتماداً على قدرتها على تخمير بعض السكريات وإنتاج الاندول واستخدامها للسترات ، وكان النمط الحيوي الاول *Biotype I* الأكثر سيادة بين عزلات الجرثومة من عينات المصادر البشرية والغذائية .

المقدمة :

تتلوث العديد من الاغذية ومنها الحليب ومنتجاته مثل المتلجبات اللبنية بالعديد من الجراثيم ومن ضمنها جرثومة *Y. enterocolitica* التي ينطوي تحت لوائها عدة أنماط مصلية القليل منها يتسبب بأمراضية الانسان وبعد النمط المصلي الحيوي الرابع 3 : 4/O النوع الشائع لمرض *Yersiniosis* تنتقل عن طريق تلوث الاغذية وعن طريق التماس المباشر وغير المباشر مع الحيوانات المصابة بوصفها من الجراثيم التي تصيب الانسان والحيوان (Jani , 2003) . وتكمن السمة الخطرة لجرثومة *Y. enterocolitica* في قابليتها على العيش والتكاثر في الاغذية المبردة لكونها من الجراثيم الاليفة للبرودة *Psychrotrophic* إذ تمتلك القدرة على النمو في درجات حرارة بين (0-4) °م لذلك تشكل المتلجبات اللبنية والحليب الخام والاجبان نسبة عالية من بين الاغذية المسببة لحالات *Yersiniosis* (Schiemann, 1989) وقد اشار عدد من الباحثين الى حدوث حالات التسمم الغذائي الناجم عن تناول المتلجبات اللبنية والحليب الخام الملوثة بجرثومة *Y. enterocolitica* لقدرتها على إنتاج السموم المعوية الثابتة بالحرارة والتي تحطم الطبقة الطلائية للأمعاء وتسبب طرح كميات كبيرة من السوائل والأملاح في التجويف المعوي مسبباً الإسهال (Schiemann, 1989).

لذلك ارتأينا أن تولي دراستنا اهتماماً بها لتصب أهداف البحث في عزل جرثومة *Y. enterocolitica* من المتلجبات اللبنية وتشخيصها باعتماد الاختبارات المظهرية والكيموحيوية ومحاولة تنميط الجرثومة حيويًا *Biotyping* وإظهار العلاقة بين الانماط الحيوية المعزولة ودراسة بعض الصفات المتعلقة بأمراضية الجرثومة مثل عوامل الضراوة التي تمتلكها، كقدرتها على الالتصاق بالخلايا الطلائية وإنتاج المادة المخاطية

المواد وطرائق العمل :

العينات :

جمعت 85 عينة من متلج لبنني بصورة عشوائية من مناطق مختلفة في مدينة الموصل. وضعت العينات في قناني زجاجية معقمة ، ثم نقلت الى المختبر وأدخلت حمام مائي بدرجة 40 °م مدة (10) دقائق ثم أجريت عليها الاختبارات البكتريولوجية اللاحقة قيد الدراسة (El-Sherbini et al., 1999) .

جمعت 112 عينة من حليب الخام للابقار والجاموس في مدينة الموصل توزعت الى 59 عينة من حليب الابقار و 53 عينة من حليب الجاموس حيث لقح 25 سم³ من كل عينة في 225 سم³ في أنابيب وسط TBW Tris Buffer Peptone water (Greenwood and Hooper, 1989)

طرائق العمل :

عينات المتلجبات اللبنية :

حضنت الانابيب بدرجة 4 °م ولمدة 14 و 21 يوم مع مراعاة التلقيح على الوسط الانتخابي Cefsulodin Irgasan Novobiocin (CIN) كل اسبوع (Hussein et al., 2001) .

حضر وسط Thioglycolate broth ووزع في أنابيب ولقح بالبكتريا وحضنت بدرجة 25 °م لمدة 3-5 أيام .

حضر وسط مرق Bile Salt – Oxalate – Sorbse Brothc BOS (المحضر كما ورد في (Jennifer , 1998) .

عينات الحليب الخام :

تم اعتماد الطريقة الموصوفة من الباحث Swaminathan وآخرين (1982) في عزل جرثومة *Y. enterocolitica* من عينات الحليب الخام حيث تم :

48 ساعة بعد انتهاء التحضين كشف عن تحمل الجرثومة لمديات PH مختلفة (Adams et al., 1999).

تحمل درجات حرارية مختلفة :

لقت اطباق الوسط الانتخابي CIN بالبكتريا وحضنت الاطباق في درجات حرارة (4، 25، 37، 44، 55) م لمدة 24 ساعة 5 أيام مع مراعاة فحصها يومياً للتأكد من نمو الجرثومة.

تأثير المعاملة الحرارية في جرثومة *Y. enterocolitica* :

حضر انبوبان من N. Broth لقت كل منهما بمستعمرة فنية للجرثومة . ترك الأنبوب الأول سيطرة فيما عرض الأنبوب الثاني لدرجة حرارة 60 م لمدة (30) دقيقة بعدها لقت حملة لوب من كلا الأنبوبين الى اطباق الوسط الانتخابي للجرثومة CIN وحضنت الاطباق في 25 م لمدة 24 ساعة بعد انتهاء مدة التحضين سجلت النتائج لملاحظة تأثير المعاملة الحرارية في نمو الجرثومة (Bronfin, 2003).

الكشف عن عوامل الضراوة :

إنتاج المادة المخاطية :

لقت وسط مرق Trypticase soy broth داخل قناني صغيرة معقمة بمستعمرات فنية نقية من جرثومة *Y. enterocolitica* وتركت قنينة أخرى بدون تلقيح للمقارنة . حضنت القناني بدرجة 25 م لمدة 24 ساعة ، بعد انتهاء مدة التحضين أملت محتويات القناني وأضيفت بضع قطرات من صيغة السفرانين مع تدوير القناني لاصطبغ الجدران الخارجية للقنينة . وضعت القناني بشكل مقلوب على ورقة الترشيح للتخلص من الصبغة الزائدة ، اصطبغ جدران القنينة بعد دليلاً على قدرة الجرثومة على إنتاج المادة المخاطية (Iriate et al., 1993).

اختبارات الالتصاق :

عزل الخلايا الطلائية وتحضير المعلق الجرثومي :

جمعت الخلايا الطلائية الحرشية من فم الانسان باستخدام ماسحة قطنية معقمة حيث مسحت الطبقة الطلائية للتجفيف الفمي ثم غسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفيت المنظم (PBS) ذي الدالة الحامضية (7.0) ثلاث مرات باستخدام طرد مركزي مبرد وبسرعة 3000 دورة بالدقيقة ولمدة 5 دقائق ، علق الراسب الحاوي على الخلايا الطلائية بمحلول (PBS) المعقم ، ورشح خلال ورقة ترشيح. تم ضغط الورقة على سطح غطاء شريحة نظيف لنقل الخلايا اليه وتركه ليحفظ في الهواء لمدة 15 دقيقة . حضر معلق من الجرثومة اعتماداً على (Hagman et al., 1999) لإضافته الى غطاء الشريحة الحاوي على الخلايا الطلائية المحضرة لإجراء اختبار الالتصاق.

النتائج والمناقشة :

عزل جرثومة *Y. enterocolitica* :

خلال مدة الدراسة جمعت (85) عينة من عينات المتلجات اللبنية و (112) عينة من عينات الحليب الخام للابقار والجاموس ، بلغت نسبة عزل الجرثومة من عينات المتلجات اللبنية 8.6 % وقد يعزى السبب في ذلك الى ان جرثومة *Y. enterocolitica* من الجراثيم المحبة للبرودة Psychrotrophic حيث تفضل النمو بدرجات حرارية منخفضة (4 م) (Goverd et al., 1994)، فضلاً عن مقاومتها لمدى من درجات

- أخذ 25 سم³ من كل عينة من عينات الحليب سواء كان حليب بقر او حليب جاموس ، بعد رج العينة جيداً لمجانستها لقت 225 سم³ من وسط Tris Buffered Peptone Water (TPW) وحضنت بدرجة 4 م لمدة (7 و 14 و 21) يوماً مع مراعاة التلقيح على الاوساط الانتخابية كل اسبوع .

- لقت 25 سم³ من عينة الحليب في 225 سم³ من وسط Phosphate Buffer Saline Sorbitol Bilesall (PBSSB) وحضنت بدرجة 4 م لمدة 3-4 أسابيع .

- لقت 25 سم³ من عينة الحليب في 225 سم³ من وسط BOS وحضنت بدرجة 25 م لمدة 3-5 أيام .

بعد انتهاء مدة التحضين أخذت حملة لوب من الانابيب الموجبة ولقت على الوسط الانتخابي CIN وحضنت الاطباق بدرجة 25 م لمدة 24 ساعة (Hughes and Jensen, 1981 : Aulisio et al., 1980).

التشخيص :

لغرض تشخيص جرثومة *Y. enterocolitica* حضرت مسحات من المستعمرات النموذجية لهذه الجرثومة التي تبدو بشكل عين الثور (Bull eye) على الوسط الانتخابي CIN ولوحظ شكل ولون المستعمرات وموصافاتها . صبغت الاغشية بصيغة كرام وفحصت مجهرياً لملاحظة شكل الخلايا الجرثومية وطبيعة اصطبغها (Koneman et al., 1997).

الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية لجرثومة *Y. enterocolitica* :

أجريت اختبارات الاوكسيداز الكاتاليز اختزال النترات استهلاك السترات المثيل الاحمر فوكس بروسكار فحص البوريز تحلل الاسكولين تخمر السكريات النمو على وسط (KIA) إزاحة مجموعة الكاربوكسيل من الاحماض الامينية (الارجنين ، اللايسين والاورنثين) اختبار فحص الحركة باستخدام وسط (SIM Koneman et al., 1997).

الكشف عن إنتاج الإنزيمات :

أجريت الاختبارات إنتاج انزيم الليستينيز والليباز والبروتيز و DNase كما ورد في (Macfaddin, 1985).

التتميط الحيوي :

تم اعتماد طريقة (Mehlmann et al., 1978) لتتميط عزلات الجرثومة من مصادرها السريرية والغذائية حيويّاً بالاعتماد على تخمر سكريات المليبايوز والرامنوز والرافنوز والسكرروز واستخدام السترات مصدراً للكربون وبالاعتماد على إنتاجها للاندول واختبار والفوكس بروسكاور.

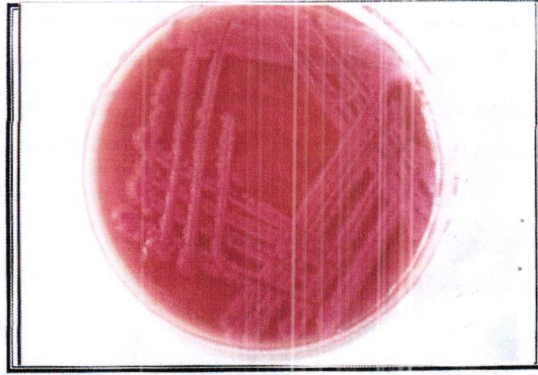
الاختبارات الفسلجية :

تحمل الملوحة :

استخدم وسط Nutrient broth المضاف له كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 5.0 % و 7.0 % كما جاء في (Koneman et al., 1997).

النمو في مديات pH مختلفة :

استخدم وسط المغذي Nutrient broth حيث ضبط الاس الهيدروجيني على (9,7,5,4) لقت أنابيب الوسط وحضنت بدرجة 25 م لمدة 24 -



صورة (1) مستعمرات جرثومة *Y. enterocolitica* على وسط CIN المستورد، حيث تظهر المستعمرات بشكل عين الثور (Bull eye).

الاختبارات الكيموحيوية :

أبدت عزلات جرثومة *Y. enterocolitica* تبايناً في تفاعلاتها الكيموحيوية كما هو موضح في الجدول (1) حيث أظهرت جميع العزلات قدرتها على إنتاج انزيم الكاتاليز منتجاً غاز الاوكسجين O_2 من تحطيم بيروكسيد الهيدروجين بدلالة ظهور فقاعات دالة على ايجابية هذا الفحص وإنتاج هذا الانزيم يؤكد دوره في حماية الجرثومة من تأثير سمية بيروكسيد الهيدروجين أثناء تضاعفها داخل الخلية ، ولم تظهر القدرة على إنتاج انزيم الاوكسيداز بدلالة عدم تكون اللون البنفسجي الغامق بعد إضافة كاشف الاوكسيداز وهذا جاء متفقاً مع ما ذكره الباحث (Jennifer, 1998).

في حين أظهرت بعض العزلات قدرة واضحة على تحليل الاسكولين من خلال تحول لون الوسط من اللون الاصفر الى اللون الاسود نتيجة تحليل الاسكولين الى الاسكوليتين Asculitin وتفاعله مع ايونات الحديد Fe وهذا مطابق لما ذكره (Weagant et al., 2001).

كما أظهرت النتائج ايجابية جميع عزلات الجرثومة لاختبار اختزال النترات وتحولها الى نترت من خلال تكوين اللون الاحمر بعد اضافة α -naphthyl amine و Sulfanilic acid.

تمكنت عزلات الجرثومة من نزع مجموعة الكربوكسيل من الحامض الاميني الاورنثين فضلاً عن عدم قدرتها تجاه الحامض الاميني الارجنين واللايسين وجاءت هذه النتائج مطابقة لدراسة الباحث (Nakao et al., 1995).

اختبرت قدرة الجرثومة على تخمر عدد من السكريات وإنتاج الحامض بدون غاز بدليل تغير لون الوسط من اللون الاحمر الى الاصفر مثل تخمر السكر والمانتول والمالتوز والسوربيتول والفركتوز والسليبيوز فيما لم تخمر السالسين وأعطت تفاعلاً متبايناً مع المليبيوز والرافنوز والبراموز.

الحرارة تتقارب بين (0-44) °م والى مدى واسعة من الاس الهيدروجيني تتقارب بين 5-9 (Robins- Brown, 1997) كما ان تلوث الاغذية بهذه الجرثومة قد يرتبط بتلوث البيئة المصنعة بها تلك الاغذية فضلاً عن استخدام بعض المكونات اللازمة في تحضير المتلجات اللبنية مثل الماء والحليب والشكولاته والفواكه والاصباغ والعطور التي قد تسهم في تلوثها بالجرثومة ، كما ان خزن المتلجات اللبنية لمدة طويلة وبدرجات حرارية منخفضة جداً تسهم في توفير فرصة ملائمة لنمو الجرثومة (Schiemann et al, 1989). كما أن هناك حالات تفشى بهذه الجرثومة بين الاطفال الذين يستهلكون كميات كبيرة من المتلجات اللبنية خاصة في فصل الصيف ، أما الباحث El-Sharbini وجماعته (1999) فقد تمكنوا من عزلها من المتلجات اللبنية بنسبة عالية بلغت 26.25 % والذي اوعزها الى قلة النظافة وعدم الدقة في خزن المنتج فضلاً عن التلوث من مصادر مختلفة .

أما بالنسبة لعينات الحليب الخام فقد تم عزل الجرثومة بنسبة 5.58 % من حليب الابقار و 4.56 % من حليب الجاموس ، يرتبط تلوث الحليب الخام بدرجة كبيرة بعدم إتباع الطرائق الصحية بدءاً من عملية الحلب ونظافة الحلابين فضلاً عن أن الحليب من الاغذية التي تحفظ في درجات حرارية منخفضة مما يوفر بيئة جيدة لنمو الجرثومة .

النمو على الاوساط الانتخابية الصلبة :

أظهر الوسط CIN كفاءة عالية ونمواً متميزاً للجرثومة بظهور مستعمرات شبيهة بعين الثور Bulls eye ذات مركز احمر غامق محاط بهالة شفافة وهذا يعزى الى تخمر المانيتول الموجود في الوسط مما يتسبب في تغير الدالة الحامضية ويسمح بتغيير لون الدليل صبغة الاحمر المتعادل Neutral Red للوسط فيعطي اللون الاحمر للمستعمرة كما في (الصورة 1) ، فضلاً عن أن الوسط غني بالجلاتين والكازين اللذين يزودان الوسط بالنيتروجين والاحماض الامينية مع وجود مستخلص الخميرة Yeast extract الذي يعد مصدراً للفيتامينات التي تحتاجها الجرثومة لنموها اضافة الى احتواء الوسط على املاح كلوريد الصوديوم (0.1%) Sodium deoxycholate (0.5%) حيث يعملان على تثبيط نمو الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وبعض من الجراثيم السالبة لصبغة كرام في حين ان مادتي الصوديوم بايروفيت وكبريتات المغنسيوم يحفزان الجرثومة على النمو (Jang et al., 2000) فضلاً عن وجود معززات النمو الذي يعزز نمو الجرثومة والاركسان يعمل كمطهر (Raphael et al., 2003 ; Maria and Hannu, 2003).

الفحص المجهرى :

ظهرت خلايا جرثومة *Y. enterocolitica* عصوية، قصيرة ، سالبة لصبغة كرام ، لها نهايات مستديرة ، غير مكونة للسبورات وهذا مطابق لما ذكره الباحثون (Koneman et al., 1997).

الجدول 1 : الاختبارات الكيموحيوية لجرثومة *Y. enterocolitica*

المعزولة من الدراسة

النتيجة	الاختبارات
-	Oxidase test الاوكسيديز
+	Catalase test الكاتاليز
+	Motility test الحركة في 25 م
-	الحركة في 37 م
+	Nitrate Reduction اختزال النترات
V	Esculin Hydrolysis test تحليل الاسكولين
V	DNase Production إنتاج انزيم Dnase
K/A	Kligler Iron Agar test اختبار KIA
-	H ₂ S Production إنتاج H ₂ S
V	Indol Production إنتاج الاندول
+	Methyl Red test الميثيل الاحمر
V	Voges-Proshauer test الفوكس بروسكاور
V	Citrate Utilization test استهلاك السترات
+	Ornithin decarboxylase test الاورنثين
-	Lysine decarboxylase test اللايسين
-	Arginin decarboxylase test الارجنين
+	(Sorbitol) السوربيتول
-	(Lactose) اللاكتوز
+	(Sucrose) السكروز
+	(Mannitol) المانيتول
-	(Salicin) السالسين
V	(Melibiose) الميليبيوز
V	(Raffinose) الرافينوز
V	(Rhaminose) الرامينوز
+	(Glucose) الكلوكون
+	(Maltose) المالتوز
+	(Fructose) الفركتوز
+	(Celibiose) السليبيابوز

(+) نتيجة موجبة (-) نتيجة سالبة V (Variable) K/A (Alkaline/Acid)

وأظهرت النتائج قابلية الجرثومة على الحركة بدرجة 25 م بدلالة ظهور النمو على جانبي خط الطعن في حين لامتلاك هذه القابلية عند درجة 37 م وهذه النتيجة مطابقة لنتائج العديد من الدراسات التي قام بها الباحثون (Vinayak et al., 2004; Young et al., 2000).

الكشف عن انزيمات جرثومة *Y. enterocolitica* :

أوضحت نتائج اختبار قدرة الجرثومة على إنتاج بعض الانزيمات مثل انزيم Lecithinase ان بعض عزلات جرثومة *Y. enterocolitica* منتجة لهذا الانزيم بدلالة ظهور مناطق شاحبة ومعتمة حول المستعمرات النامية والتي تكمن وظيفته في تحطيم الدهون المفسفرة في أغشية الخلايا مما يؤدي الى تحللها وموت النسيج وهذا ما أكدته (Toora et al., 1989).

أظهرت العزلات نفسها ايجابية لانتاجها انزيم اللايباز بظهور لون ازرق مخضر في مواقع تحليل الدهن بعد إضافة كبريتات النحاس وهذا مطابق لما ذكره (Stathopoulos et al., 2000)، حيث ان عمل هذا الانزيم يتركز بتحطيم الدهون وتحرير الاحماض الدهنية ويساهم في إمراضية الجرثومة فضلاً عن استخدامها كمصدر غذائي.

وأظهرت نتائج الدراسة ان جميع عزلات الجرثومة كانت ايجابية لاختبار انزيم اليوريز الذي يحطم اليوريا الى الامونيا وثاني اوكسيد الكربون مما يزيد قاعدية الوسط ومعادلة حامضية المعدة. كما أظهرت نتائج الاختبارات التشخيصية ان بعض عزلات الجرثومة كانت موجبة لاختبار البروتينيز حيث ظهرت مناطق رافقة حول المستعمرات النامية مما يدل على قابلية الجرثومة لإنتاجها انزيم البروتينيز الذي بعد عاملاً من عوامل الضراوة حيث يعمل على تحليل المادة البروتينية في الانسجة وهدم الكلوبيولين المناعي ومكونات المنعم (Sandkvist, 2001) C₃b.

التميط الحيوي لعزلات جرثومة *Y. enterocolitica* :

يوضح الجدول (2) الانماط الحيوية لعزلات جرثومة *Y. enterocolitica* وقد اعتمدت عدة مخططات لتحديد الانماط الحيوية للجرثومة وفي دراستنا تم الاعتماد على طريقة الباحثين (Melhman et al., 1978) باستخدام اختبار استهلاك السترات وإنتاج الاندول و VP وتخمر سكريات السكروز والرافنوز والرامنوز والميبايوز وأظهرت النتائج ان عزلات الجرثومة توزعت على 4 أنماط حيوية وظهر أن أعلى عدد للعزلات تقع ضمن النمط الحيوي الاول Biotype 1، وقد يعزى ذلك الى ان أغلب عزلات الجرثومة لاتخمر سكر الميليبيوز والرامنوز والرافينوز ولا تستخدم السترات مصدراً للكربون والطاقة أما إنتاجها للاندول وتخمرها للسكروز فقد كان متغيراً.

الجدول 2 : نتائج اختبار التنميط الحيوي لعزلات جرثومة *Y. enterocolitica*

الاختبارات Tests				الانماط الحيوية Biotypes			
السترات Citrate test				VI	III	II	I
الاندول Indol test				+	+	-	-
تخمير الميليبيوز Melibiose fermentation				+	-	+	V
تخمير الرافنوز Raffinose fermentation				+	-	-	-
تخمير الرامينوز Rhaminose fermentation				+	-	-	-
تخمير السكروز Sucrose fermentation				+	+	+	V
الفوكس بروسكاور VP test				+	+	+	-
عدد العزلات				10	4	5	18
النسبة المئوية				% 27	% 9.5	% 13.5	% 48.6
العدد الكلي للعزلات				37			

الاختبارات الفسلجية :

النمو في درجات مختلفة للاس الهيدروجيني :

أوضحت النتائج قدرة جرثومة *Y. enterocolitica* للنمو في تراكيز مختلفة من الاس الهيدروجيني بدلالة حدوث تعكر في وسط المرق المغذي في مدىات pH قدرها 5 و 7 و 9 ، أما عند الاس الهيدروجيني 4 فلم تتمكن جميع عزلات الجرثومة من النمو فيها وهذا مطابق لما أشار اليه (Jang et al., 2000).

النمو في تراكيز مختلفة من ملح الطعام :

أوضحت النتائج قابلية الجرثومة للنمو بتركيز 5.0 % من ملح الطعام من خلال ظهور العكارة في الوسط الحاوي على هذا التركيز في حين لم يظهر نمو في الوسط الحاوي على 7.0 % من ملح الطعام وهذا ما اشار اليه العديد من الباحثين ان الجرثومة تتحمل 5.0 % من ملح الطعام (Lake et al., 2004).

النمو في درجات حرارية مختلفة :

أظهرت نتائج استخدام عدد من درجات حرارة التحضين لوسط CIN الانتخابي عدم ظهور نمو في درجة 55 °م في حين تمكنت الجرثومة من النمو عند تحضين الوسط الزرع الانتخابي في درجة حرارة 25 °م و 37 °م و 44 °م وهذا ماجاء مطابقاً لدراسة الباحث Saumya و Lucille (1988) حيث اثبت ان عدد الخلايا الجرثومية الحية تبقى بدون تغيير بدرجة 44 °م ومحفوظة ببلازميد الضراوة ولها القدرة على احداث التسمم الغذائي .

كما اوضحت النتائج ظهور نمو على الوسط الملقح بالجرثومة في درجة حرارة 4 °م بوصف ان هذه الجرثومة مقاومة للبرودة Psychrotrophic لذلك عزت من عينات المثلجات اللبنية وهذه النتائج جاءت مطابقة للعديد من الدراسات التي ذكرت بان المدى الحراري لنمو هذه الجرثومة تتقارب بين (0 - 44) °م لكن الجرثومة تنمو بصورة جيدة في درجة حرارة 28 - 30 °م (Weagant et al., 2001).

تأثير درجة حرارة البسترة :

اظهرت النتائج ان تعريض عزلات الجرثومة لدرجة حرارة 60 م لمدة 30 دقيقة ادى الى عدم ظهور مستعمراتها على الوسط الانتخابي ويعزى

ذلك الى عدم تحملها لهذه المعاملة الحرارية وهذا مطابقاً لما ذكره الباحث Lovett وجماعته (1982) لان الجرثومة تتعرض للهلاك عند هذه الدرجة الحرارية ، واعزى وجودها في الحليب المبستر الى حدوث تلوث بعد عملية البسترة نتيجة خزنه لمدة طويلة والى اعداد الجرثومة في الحليب الخام.

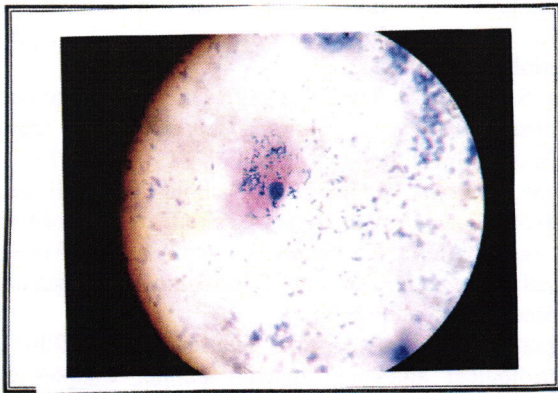
الكشف عن عوامل الضراوة :

اختبار انتاج المادة المخاطية :

أظهرت النتائج قابلية عزلات الجرثومة على انتاج المادة المخاطية من خلال قابليتها على الالتصاق بجدران القنينة الزجاجية وتكوين طبقة من النمو التي تصطبغ بصبغة السفرانين مقارنة مع قنينة السيطرة التي احتوت على الوسط الغذائي غير الملقح بالجرثومة (الصورة ، 2).

إن الطبقة المخاطية عبارة عن سكريات متعددة مع أحماض عضوية تحيط بالجرثومة ويزداد إنتاجها باستخدام اوساط معينة مثل وسط Trypticase soy والذي يحوي مواد غذائية محفزة لإنتاج المادة المخاطية مثل الكازئين وسكر الدكستروز إذ تعد مصدراً غذائياً مهماً يدخل للمسارات الابيضية لتخليق العديد من المركبات المنتجة من قبل الجراثيم ، وتعمل هذه الطبقة على حماية الخلايا الجرثومية من الجفاف والالتصاق بالسطوح المخاطية كما لها دور في حماية الجرثومة من عملية البلعمة والإصابة بالفيروسات البكتيرية، وهذا ما أشار اليه (Iriate et al., 1993).

على سطح الخلايا الجرثومية تقابلها مستقبلات على سطح الخلايا المعوية للمضيف وهذا ما أكدته (Cornelis and Wolf-Watz, 1997).



الصورة (3) توضح التصاق جرثومة *Y. enterocolitica* على الخلايا الظهارية القموية للفران مصبوغة بصيغة كيمزا (1000X).

ولتفادي حالات التسمم الغذائي الناتج عن الجرثومة نوصي بمعاملة الحليب الخام حرارياً والحفاظ على النظافة العامة وإعتماد أساليب خزن مبردة وصحية فضلاً عن إدخال برنامج التحري عن الجرثومة في المؤسسات الصحية ذات العلاقة بصحة الغذاء للحد من مشكلة التسمم الغذائي الجرثومي.

Adams, M.R.; Little, C.L.; Easter, M.C. (1999). Modelling the effect of pH, Acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. J. Appli. Bact. 71 : 65-71.

Aulisio, C.C.G.; Mehlman, I.J. and Sanders, A.C. (1980). Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. Appl. Environ. Microbiol. 39 : 135-140.

Bronfin, D.R. (2003). *Yersinia enterocolitica* infection. File: // A : \ emedicin : copyright. Comp. inc. pp: 1-11.

Cornelis, G.R. and Wolf-Watz, H. (1997). The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic. J. Mol. Microbiol. 23 (5) : 861-870.

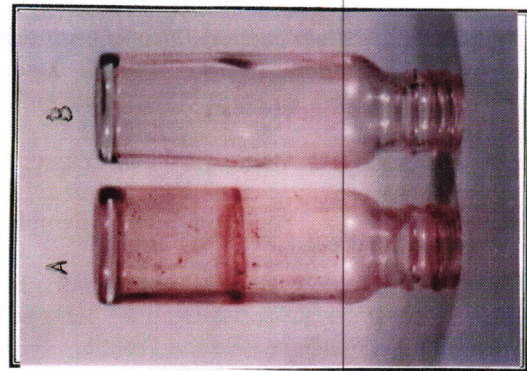
El-Sharbini, M.S.; Al-Agili, H.; El-Jali, M.; Aboshiwa and Koha, M. (1999). Isolation of *Yersinia enterocolitica* from cases of acute appendicitis and ice-cream. Lancet. 5 (1) : 130-135.

Goverd, R.L.; Kusters, J.G. and Huis, J.h. (1994). Growth rate and physiology of *Yersinia enterocolitica* influence of temperature and presence of the virulence plasmid. J. Appl. Bacteriol. 77 (1) : 77 : 96-104.

Greenwood, M.H. and Hooper, W.L. (1989). Improved methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* from milk and foods. Food Microbiol. 6 : 99-104.

Hagman, M.M.; Dale, J.B. and Stevens, D.L. (1999). Comparison of adherence and penetration of a human laryngeal epithelial cell line by group A. *streptococci* of various protein types. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 23 : 195-205.

Hughes, D. and Jensen, N. (1981). *Yersinia enterocolitica* in Raw goat's milk. Appl. Environ. Microbiol. 41 : 309-310.



الصورة (2) اختبار قدرة عزلات الجرثومة *Y. enterocolitica* على إنتاج المادة المخاطية (A). النتيجة الموجبة، (B). النتيجة السالبة.

اختبار الالتصاق :

تعد قابلية التصاق جرثومة ضرورية بوصفها الخطوة الأولى في حدوث الأمراض لذلك استهدفت دراستنا الحالية اختبار قدرة هذه الجرثومة على الالتصاق بالخلايا الظهارية بالتجويف الفموي للإنسان باعتبار أن الأمراض التي تسببها هذه الجرثومة ناجماً عن الغذاء الملوث . وقد أظهرت النتائج قابلية الجرثومة على الالتصاق (الصورة ، 3) . وهذا يدل على قابلية هذه الجرثومة على تكوين موقع لها ومن ثم اختراق الخلايا المعوية والتكاثر فيها والانتقال إلى الأنسجة الأخرى ، وهناك عوامل عدة لها دور في هذه العملية من خلال مستقبلات خاصة موجودة

المصادر :

Hussein, H.M.; Fenwick, S.G.; Lumsdon, J.S. (2001). A rapid and sensitive method for detection of *Yersinia enterocolitica* strains from clinical samples. Letters in Appli. Microbiol. 33 : 445-449.

Iriate, M. Vanooteghem, J.C. Delor . I.; Diaz , R.; Knutton, S. and Cornelis, G.R. (1993). The Myf fimbriae of *Yersinia enterocolitica* Mol. Microbiol. 9 : 507-520.

Jang, G.C.; Kang, D.H. and Fing, D.Y. (2000). Enrichment procedures and plating for isolation of *Yersinia enterocolitica*. J. Food Protect. 63: 1483-1486.

Jani , A.E. (2003). *Yersinia enterocolitica*. J. Medicine. 3 : 76-81.

Jennifer, L.J. (1998). USDA/FSIS. Microbiology Laboratory Guidebook. 3rd ed., USA. 9 : 1-28.

Koneman, E.W.; Alleen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C. (1997). "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. J. B. Lippincott-Raven publisher, Philadelphia, USA. pp. 664-668, 1330.

Lake, R.; Hudson, A. and Gressey, P. (2004). Risk profile *Yersinia enterocolitica* in pork. Report prepared as a part of New Zealand food safety. Authority Contract for Scientific Seerrices. 1-48.

Macfaddin, J.F. (1985). Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Maria, F.A. and Hannu, K. (2003). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical food and environmental samples. Vlin. Microhiol. 16 (2) : 220-229.

Mehlman, I.J.; Alulison, C.C. and Sanders, A.C. (1978). Probems in the recovery and identification *Yersinia* from food. J. Asso. Off. Anal. Chem. 61 : 761-771.

- Nakao, N.; Watanabett, N. and Takeda, T. (1995). Yst gene expression in *Yersinia enterocolitica* is positively regulated by a chromosomal region that is highly homologous to *Wscherichia coli* host factor 1 gene (hf9). *Microhiol.* 18 (5) : 859-65.
- Raphael, B.; Mamroud, E.; Aftalion, M. and Cohen , S. (2003). Development of selective Agar medium for isolation of *Yersinia Pestis*. *Appl. Environ. . Microhiol.* 67 (10) : 5787-5792.
- Robine-Brown, R.M. (1997). *Yersinia enterocolitica* In : Doyle, M.P. Beuchat , L.R. and Montville, T.J. (ed.). *Food . Microhiology, Fundamentals and Frontiers.* ASM Press. Washington D.C. pp. 192-215.
- Sandkvist, M. (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect. Immune.* 69 : 3523-3535.
- Saumya, R. and Lucille, K. (1988). Stability of the virulence plasmid in *Yersinia enterocolitica* at elevated temperatures. *Food . Microhiol.* 5 : 231-233.
- Schiemann, D.A. (1989). *Yersinia enterocolitica* in milk and *Yersinia pseudotuberculosis*. In : Doyle , M.P. (Ed). *Foodborn bacterial pathogens.* Marcel Dekker , New York. Pp. 601-672.
- Stathopoulos, C.; Hendrixson, D.R.; Thanassi, D.G.; Hultgren, S.J.; GemeIII, J.W.; CurtissIII, R. (2000). Secertion of virulence determinants by the general secretary pathway in gram-negative pathogens : an evolving story. *Microbes Infect.* 2 : 1061-1072.
- Swaminathan, B.; Harmon, N.C. and Mehlman, A. (1982). Review *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 151-183.
- Toora, S.; Singh, G. Tiwari. (1989). Drug resistance and lecithinase activity of *Yersinia enterocolitica* from buffalo milk. *Int. J. Food. . Microhiol.* 9 (3) : 167-171.
- Vinayak, K.; John, W.; Scott, A.; Nicholas, R. and Birgit, M. (2004). Gene array analysis of *Yersinia enterocolitica* FlhD and FihC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoy/ Phosphate. *Microbiol.* 150 : 2289-2300.
- Weagant, S.; Feng, P. and Stanfield, J.T. (2001). *Bacteriological analytical manual online.* Chapter 8, *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudo-tuberculosis* U.S. Food and Drug Adminstration. Center of food safety and Applied Nutrition.
- Young, G.M.; Badger, S.L. and Miller, V.L. (2000). Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica* *Infect. Immun.* 63: 4323-4326.

Physiology and Pathology of *Yersinia enterocolitica* isolated from some milk products in Ninevah Governorate

Amera M. Al-Rawi¹, Nawal Aziz Khalil²

¹Department of Biology , College of Science , University of Mosul , Mosul , Iraq

²Department of Microbiology , College of Veterinary medicine , University of Mosul , Mosul , Iraq

Abstract

The study was conducted to isolate *Yersinia enterocolitica*. A total of 197 samles were collected, from food sources including 85 samples of ice milk and 112 raw milk samples, 59 cowy milk and 53 buffalo milk samples. The total *Y. enterocolitica* strains were 37 (18.78 %). 8.6 % milk samples , 5.58 & and 4.56 % from cowy and buffalo raw milk respectively.

The study was also involved for the investigation of bacterial virulence factors such as enzymes and ability adhesion. The result showed that all strains have the ability to produce urease while some of them showed positive sult in production lecithinase, lipase, protease and DNase and showed ability to adhere to oral epithelial cells.

The study also detected four biotypes depending on its ability to ferment some sugars, production of indole and using citrate Biotype I was the most predominant among the strains from human and food sources.