Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 35, No. 5, Dec. – Jan. 2013, Pages: 46-55

The Effect of Temperature in Invasive Properties of *Yersinia* Species Isolated from Human and Non-Human Sources

Mohammad Mahdi Soltan Dallal[1,2], Roonak Bakhtiari[2], Farzaneh Amin Harati[2], Mohammad Kazem Sharifi Yazdi[3,4]*

[1]Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Zoonosis Research Centre, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Department of Medical Laboratory Sciences, School of Para Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 14 Mar, 2013 Accepted: 16 May, 2013

Abstract

Background and Objectives: Diarrhea is one of the most important causes of children mortality in developing countries. Gastroenteritis causes mortality in children younger than five years old annually; meanwhile, *Yersinia* species are one of the main agents causing diarrhea. In this study the effect of temperature on invasive property of *Yersinia* species were investigated by using HEP-2 cell culture.

Materials and Methods: In total 50 *Yersinia* species from French and Iranian surceases including *Yersinia enterocolitica* (n=30), *Yersinia intermedia*(n=14),*Yersinia frederiksenii* (n=2),*Yersinia kristensenii* (n=1) and *Yersinia aldovae* (n=1),were used. The activity of mentioned *Yersinia* species was determined on HEP-2 cells at 22C and 37 C, by using HEP-2 cell culture.

Results: Only 10 tested *Yersinia* species were showed property invasive at 22C. and *Yersinia enterocolitica* was the most invasive strain(20%).The results showed that environmental species are also capable of causing diseases .The comparison results, of isolates from French with Iran ,showed that in general European isolates were more virulent than Iranian isolates. In addition the environmental species of Iran were not capable of causing diseases .The antibiotic susceptibility testing of isolates showed that nearly 88% of all isolates were sensitive to tested antibiotics, regardless of isolate sources

Conclusion: Environmental species are capable of having invasive property which is temperature dependent.

Keywords: *Yersinia*, Invasive, HEP-2 Cell Culture, Diarrhea

*Corresponding author:
E-mail: mksharifiy@yahoo.co.uk

مقاله پژوهشی

تاثیر درجه حرارت در بیان خاصیت تهاجمی ایزوله های انسانی و غیر انسانی گونه های مختلف یرسینیا

محمد مهدی سلطان دلال: مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی ،دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
روناک بختیاری: بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی ،دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
فرزانه امین هراتی: بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی ،دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
محمدکاظم شریفی یزدی: مرکز تحقیقات بیماریهای مشترک انسان ودام (زئونوز)، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: mksharifiy@yahoo.co.uk

دریافت: ۹۱/۱۲/۲۴ پذیرش: ۹۲/۲/۲۶

چکیده

زمینه و اهداف: اسهال یکی از مهمترین علل مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه است. بیماری های روده ای سالانه سبب مرگ بسیاری از کودکان زیر ۵ سال می گردد و گونه های یرسینیا یکی از عوامل ایجاد کننده اسهال در کودکان می‌باشد. در این مطالعه با استفاده از کشت سلولی Hep-2تاثیردرجه حرارت بر خصوصیت تهاجمی تعدادی از سویه های گونه های یرسینیا مورد بررسی قرار گرفت.

موادوروش‌ها: ۵۰ سویه یرسینیا با منشاء ایران و فرانسه شامل ۳۰ سویه یرسینیا انتروکلی تیکا، ۱۴ سویه یرسینیا اینترمدیا ۳ سویه یرسینیا فردریکسنی، ۲ سویه یرسینیا کریستنسنی و ۱ سویه یرسینیا آلدوه به منظور تعیین خاصیت تهاجمی به سلول های Hep-2 در دو دمای ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از کشت سلولی Hep-2 مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته‌ها: تنها ۱۰ سویه از گونه های مختلف یرسینیا فقط در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد دارای خاصیت تهاجمی بودند. بیشترین تهاجم ناشی از سویه های یرسینیا انتروکلی تیکا به میزان ۷ سویه (۲۰٪) بود. نتایج بدست آمده نشان داد که سویه های محیطی قابلیت بیماریزایی را دارند. همچنین مقایسه ویرولانس میان ایزوله های ایران و فرانسه، نشان می دهد سویه های منبع اروپا از توان بیماریزایی بیشتری برخوردار بودند. بعلاوه سویه های محیطی ایران هیچکدام قابلیت بیماری زایی را ندارند. تعیین الگوی مقاومت انتی بیوتیکی بدست آمده گویای این مطلب است که سویه های یرسینیا صرف نظر از منشاء آنها، به اکثر آنتی بیوتیک های بکاررفته حداقل حساسیت ۸۸٪ را نشان دادند.

نتیجه گیری: یافته های بدست آمده نشان داد که ایزوله های محیطی یرسینیا، دارای خاصیت تهاجمی بوده و این خاصیت تهاجمی وابسته به درجه حرارت می باشد.

کلید واژه‌ها: یرسینیا، تهاجمی، کشت سلولی Hep-2، اسهال

مقدمه

امروزه اسهال بعنوان یکی از مشکلات حاد جوامع مختلف انسانی بویژه در کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه می‌باشد. بررسی‌های مقایسه‌ای بین جوامع پیشرفته اقتصادی که دارای استانداردهای بهداشتی بالا هستند با جوامع فقیر آشکارا نشان می-دهد که بسیاری از این قبیل بیماری‌ها معلول عدم گسترش فرهنگ بهزیستی در میان آحاد مردم، محرومیت از منابع آب آشامیدنی بهداشتی و روش‌های نامناسب تهیه و نگهداری غذا و از طرفی کافی نبودن امکانات بهداشتی و درمانی و مسایل عدیده دیگر می-باشد (۱). اسهال توسط عوامل مختلف میکروبی و انگلی ایجاد شده و یرسینیا انتروکلی تیکا نیز هم ردیف با باکتری‌های پاتوژن

خطرناک دیگر همچون شیگلا، سالمونلا، اشریشیاکلی در ایجاد گاستروآنتریت‌های باکتریال نقش عمده‌ای را بازی می‌کند. گرچه این ارگانیسم‌ها بیماری‌های مشابه‌ای ایجاد می‌کنند ولیکن آنها از طریق مکانیسم‌های مختلفی سلول‌های میزبان را درگیر می‌کنند (۵-۲). در مورد یرسینیا خصوصیتی که باید بسیار مورد توجه قرار گیرد تحمل و رشد آن در شرایط سرما و گسترش اقلیمی و فصلی آن متناسب با دما می‌باشد. گزارشات متعددی وجود دارد که حیوانات را به عنوان مخازن اصلی این ارگانیسم ذکر می‌نمایند. لذا می‌توان بیماری‌های ناشی از این ارگانیسم را بیماریهای مشترک انسان و دام (زئونوز) Zoonosis در نظر گرفت (۷و۶). برخی از محققان نیز آب را به عنوان اصلی ترین راه انتقال این ارگانیسم می‌دانند، لذا به احتمال زیاد عفونت‌های یرسینیایی اکثراً توسط آب‌های آلوده پراکنده می‌شوند (۹و۸). اگرچه اکثر سویه‌هایی که تا به امروز به عنوان سویه‌های پاتوژن انسانی جدا و معرفی می‌شوند کمتر از منابع آبی جدا شده‌اند. بدلیل انتقال مدفوع – دهانی و همچنین نقش یرسینیا انتروکلی تیکا در مسمومیت‌های غذایی، مقاومت و رشد در سرما، شناسائی این باکتری در مراحل بررسی مخازن و روش‌های انتقال عفونت بسیار اهمیت دارد(۱۲-۱۰) بطور کلی عفونت‌های ایجاد شده توسط انواع یرسینیا به غیر از یرسینیا پستیس را یرسینیوز Yersiniosis می‌گویند که یک بیماری مشترک بین انسان و دام است. یرسینیا انتروکلی تیکا در طیف وسیعی از منابع و مخازن از جمله آب، سبزیجات خام، شیر، خاک، ماهی، گاو، سگ حضور دارد که توسط روش‌های معمول آزمایشگاهی میکروبی به سختی قابل جداسازی می‌باشد و انجام مراحل ویژه و غنی‌سازی جهت جداسازی آن از منابع مختلف موردنیاز می‌باشد (۱۵-۱۳). بطور کلی باکتری‌های مولد اسهال را از نظر مکانیسم عمل به دو دسته تقسیم می شوند (۱۶):

۱- باکتری‌های مهاجم (Invasives): که باعث کولیت و آنتروکولیت حاد می‌شوند. بجز شیگلا دیسانتری انتروتوکسینی در نزد سوش‌های مهاجم مشخص نشده است. در این گروه سالمونلا، شیگلا، یرسینیا انتروکلی تیکا و بعضی از تیپ‌های E.coli قرار دارند.

۲- باکتری‌های توکسین زا (Toxinogenic): در این مورد اسهال در اثر تکثیر و افزایش باکتری‌ها در روده ایجاد می‌شود و یا اینکه باکتری‌ها بر روی سطح سلول‌های اپی تلیال روده کوچک تولید توکسینی می‌کنند که باعث ترشح آب و الکترولیت بوسیله سلول‌های روده می‌شوند. در این گروه ویبریو وبا و اشریشیاکلی آنتروتوکسینوژن قرار دارند. در این تحقیق گونه‌های مختلف یرسینیا از نظر تهاجم به سلول‌های Hep-2 مورد بررسی قرار گرفتند. نحوه تهاجم این گونه‌ها به سلول‌های Hep-2 مانند سایر باکتری‌های پاتوژن مهاجم است. این ویژگی حتی در محیط‌های کشت کهنه هم دیده می‌شود و همانند توانائی حرکت یکی از ویژگی‌های حساس، به حرارت است . هدف این مطالعه بررسی تاثیر درجه حرارت در بیان خاصیت تهاجمی ایزوله های انسانی و غیر انسانی گونه های مختلف یرسینیا بوده است.

موادوروش‌ها

نوع مطالعه: این مطالعه از نوع توصیفی که در طی سال ۱۳۹۰ انجام شد.

بطور کلی در این مطالعه ۵۰ سویه یرسینیا (۲۸ سویه از انستیتوپاستور فرانسه، ۲۲ سویه از ایران) در دو دمای 22^{o} درجه و 37^{o} مورد آزمایش قرار گرفتند. این سوش‌ها از نظر منبع جمع-آوری شامل ایزوله های انسانی و غیر انسانی بوده است.

تمامی ایزوله ها ی انسانی (اسهال) و محیطی (آب و شیر) از نظر تایید یرسینیا و تعیین گونه‌های مختلف آن با تست های بیوشیمیایی و قندی نظیر تست های اکسیداز و ONPG و سپس بر روی محیط های افتراقی TSI، SIM، سیمون سیترات، اوره آز، MRVP، لیزین ایرون آگار، آرژنین دهیدرولاز ، اورنتین دکربوکسیلاز، قند های مانیتول، ساکارز، سوربیتول، گزیلوز، رامنوز، رافینوز، آلفا متیل گلوکوزید انجام شد (۱۱).

روش اجرا:

سلول (Hep-2) human epidermoid cancer cells

سلول Hep-2 که سلول های کارسینومای اپی تلیال حنجره انسان می‌باشد از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

۱- طرز تهیه محلول ها و محیط های موردنیاز

۱- ساخت محیط Minimum Essential Medium (MEM) پایه: به ۹/۶۵ گرم از پودر MEM، یک لیتر آب مقطر سرد افزوده و بعد از انحلال کامل پودر، محلول را اتوکلاو نموده، بعداً به میزان ۹۰ میلی لیتر در شیشه‌های درپیچ دار تقسیم کرده و در ۲۰- درجه نگهداری نموده و سپس برحسب احتیاج از آن، محیط‌های لازم تهیه شدند.

۲- ساخت بیکربنات ۱۰٪: ۱۰ گرم پودر بیکربنات را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و با فیلتر میلی پور با منافذ ۰/۲۲ میلی میکرون فیلتر نموده و پس از کنترل از نظر استریل بودن بر روی محیط بلاد آگار و در لوله‌های در پیچ دار تا موقع استفاده در یخچال ۴ درجه نگهداری شدند.

۳- محلول تریپسین: ۱ گرم پودر تریپسین را در ۵۰۰ میلی لیتر محیط MEM اتوکلاو شده یا آب مقطر حل کرده و با فیلتر میلی پور با منافذ ۰/۲۲ میلی میکرون فیلتر نموده و پس از کنترل از نظر استریل بودن بر روی محیط بلاد آگار، در لوله‌های درپیچ دار ریخته و در فریزر با دمای ۲۰- درجه درجه نگهداری شدند.

۴- محلول گلوتامین ۱۰٪: ۱۰ گرم از پودر گلوتامین را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و بعد از فیلتر کردن و پس از کنترل از نظر استریل بودن بر روی محیط بلاد آگار محلول استریل را در لوله‌های درپیچ دار ریخته و در فریزر با دمای ۲۰ درجه نگهداری شد.

۵- تهیه محلول آنتی بیوتیک: پودر Penestrep (مخلوطی از استرپتومایسین و پنی سیلین) در ویال‌های مخصوص بصورت لئوفیلیزه موجود بود که برای تهیه محلول آنتی بیوتیک ۲۰ میلی لیتر محیط پایه MEM به پودر اضافه نموده، باتوجه به اینکه آنتی بیوتیک U ۱۰۰۰۰ بود، بنابراین غلظت ۵۰۰ واحد در هر میلی لیتر، از آن تهیه شد.

۶- تهیه محیط MEM کامل: (محیط پایه + سرم گاوی + آنتی بیوتیک).
برای کشت سلول‌های Hep-2محیط MEM ۱۰٪ مورد نیاز است، لذا برای تهیه آن به ۹۰ میلی لیتر از محیط MEM مایع، ۱۰ میلی لیتر سرم گاوی غیرفعال شده ۱۰٪ اضافه نموده، سپس ۲ میلی لیتر از محلول بیکربنات سدیم ۱۰٪ و ۱ سی سی محلول Penestrep و ۲ سی سی گلوتامین ۱۰٪ اضافه نموده، ولی باید قبل از استفاده برای اطمینان از استریل بودن آن آزمایش انجام گیرد (استفاده از محیط بلاد آگار، عدم ایجاد هرگونه کلنی بر روی محیط نشانه استریل بودن محیط می‌باشد). درصورت لزوم به همین ترتیب می‌توان محیط‌های MEM، ۵۰٪ و ۲٪ برای پاساژ و تعویض محیط کشت سلولی تهیه نمود.

۷- تهیه محیط MEM بدون آنتی بیوتیک: Infection Medium
این محیط در مرحله عفونی نمودن سلول‌های Hep-2و نیز برای تهیه سوسپانسیون میکربی جهت تلقیح به سلول‌های HEP-2 مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای تهیه آن به هر ۹۰ میلی لیتر از محیط MEM پایه ۱۰ سی سی سرم گاوی غیرفعال شده ۱۰٪ افزوده و ۲ سی سی از محلول بیکربنات سدیم و ۲ میلی لیتر از محلول گلوتامین نیز به آن اضافه کرده و دیگر آنتی بیوتیکی به محیط اضافه نمی‌شود.

۸- تهیه محیط مخصوص رشد داخل سلولی باکتری:
Intercellular growth medium این محیط باید همیشه تازه تهیه گردد برای تهیه این محیط به ۷۸ میلی لیتر از محیط MEM پایه ۱۰ سی سی از سرم گاوی غیرفعال شده؛ ۲ سی سی از محلول آنتی بیوتیک و ۱۰ سی سی از محلول لیزوزیم با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر اضافه می‌شود. در اینجا نیز قبل از استفاده از محیط برای اطمینان از استریل بودن آن باید کشتی از آن بر روی محیط بلاد آگار تهیه گردد.

۹- تهیه محلول‌ها و رنگ‌های تشخیصی Diagnostic Reagents
۱- رنگ گیمسا (Gimsa Stain): ۱ گرم رنگ گیمسا را در ۶۶ میلی لیتر گلیسرول حل کرده و به مدت ۲-۱ ساعت در ^{o}۶۰-۵۵ درجه سانتیگراد بروی بن ماری حرارت داده و سپس ۶۶ میلی لیتر متانول خالص به آن اضافه نموده و در هنگام رنگ آمیزی رنگ غلیظ را به نسبت یک به ده رقیق می شود.
۲- تهیه محلول‌های رنگ زدا و آبگیری کننده
Decolorizing and Dehydration Reagents با استفاده از استن و گزیلول خالص محلول‌های زیر تهیه می‌شود:
a) محلول استن – گزیلول به نسبت ۵۰ + ۵۰
b) محلول استن – گزیلول به نسبت ۶۷ + ۳۳
c) گزیلول خالص

۲- روش تهیه کشت سلولی Hep-2
ابتدا محیط کشت را خالی کرده و با ۵-۴ سی سی محلول Dulbecco's PBS سلول‌ها را شسته و ۲ سی سی تریپسین به آن اضافه کرده و ۳-۲ دقیقه سلول‌ها را در مجاورت تریپسین قرار داده، تریپسین ارتباط بین دیواره سلول‌ها را از بین برده و باعث می‌شود که سلول‌ها از هم جدا شوند. پس از خالی نمودن تریپسین، فلاسک را به مدت ۱۵ دقیقه در اتو ^{o}۳۷ درجه قرار داده تا سلول‌ها از هم جدا شدند. بعد از این مرحله، ۵ سی سی محیط کشت MEM کامل (MEM پایه همراه با سرم FCS، گلوتامین، آنتی بیوتیک) به آن اضافه کرده و به کمک سرنگ با پی‌پت‌های استریلی سلول‌ها را پاساژ داده و بصورت شناور در آورده، و سپس زیر میکروسکپ به مشاهده سلول ها پرداخته شد.

۳- روش تهیه غلظت مناسب باکتری برای آلوده نمودن سلول‌های Hep-2
روش کار مطابق روش Roblin (۱۷) می‌باشد، بدین ترتیب که در محیط BHI مایع یک کشت ۲۰-۱۸ ساعته از باکتری مورد نظر در ^{o}۲۲ درجه تهیه نموده و بعد تمام سوسپانسیون میکروبی را در لوله‌های سانتریفوژ ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ دور در دمای ^{o}۱۸ درجه سانتریفوژ نموده و سپس مایع رویی را دور ریخته و به رسوب میکروبی ته لوله به اندازه کافی Earle's Salt ریخته و به هم زده و دوباره سانتریفوژ نموده و این عمل را سه بار تکرار نموده که بدین ترتیب متابولیت‌ها و سموم میکروبی حاصله از محیط عمل خارج گردد. (جلوگیری از عمل سیتوتوکسیک باکتری روی سلول‌های Hep-2) سپس مقداری محیط MEM بدون آنتی بیوتیک (محیط مرحله عفونی) را در لوله کووت دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و بوسیله یک آنس مقداری از باکتری شسته شده به آن اضافه نموده بطوریکه سوسپانسیون میکروبی حاصله کدورت مشخصی داشته باشد. برای اینکار دستگاه اسپکتروفتومتر را روی طول موج ۶۲۵ نانومتر تنظیم نموده و با استفاده از لوله بلانک که حاوی محیط MEM بدون آنتی بیوتیک است دستگاه را روی صفر تنظیم نموده بعد کووت حاوی سوسپانسیون میکروبی را در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده. در شرایطی که سوسپانسیون میکربی ۷۰٪ نور را عبور دهد غلظت میکربی مناسب را خواهیم داشت ،که در این حالت حدود ۱×۱۰^{۸} باکتری در سوسپانسیون وجود دارد و در غیر اینصورت باید سوسپانسیون میکربی را غلیظ‌تر یا رقیق نمود. بدین ترتیب غلظت میکربی مناسب برای آلوده نمودن سلول‌های Hep-2تهیه گردید.

۴- روش کشت سلولی
روش کشت سلولی ترکیبی از دو روش کار Calabi (۱۸) و Mehalman (۱۹) می‌باشد که در این روش برای بررسی بهتر برخورد بین سلول‌هایHep-2 و باکتری و همچنین به حداقل رساندن باکتری‌های خارج سلولی آزمایش در دو مرحله متوالی به شرح زیر انجام داده می شود.
الف: مرحله عفونی نمودن سلول‌های Infection Stage Hep-2
ابتدا محیط کشت سلول‌های Hep-2 موجود در لوله‌های در پیچ دار Leighton Tube را که قبلاً تهیه شده خالی کرده و سلول‌ها را با ۱/۵ سی سی Earle's Salt گرم شستشو داده و پس از چند دقیقه آنرا خالی کرده و به آن ۱/۵ سی سی محیط مخصوص این مرحله (Infection Medium) که درواقع همان MEM بدون آنتی بیوتیک حاوی باکتری است اضافه نموده و سپس لوله‌ها را بطور افقی به مدت ۳ ساعت محیط کشت سلولی را که در اثر رشد باکتری‌های

زرد رنگ شده (تغییر PH محیط) دور ریخته و سلول‌ها را چندین بار ۶-۵ بار با Earle's Salt گرم به آرامی شستشو داده می شوند.

ب: مرحله رشد داخل سلولی Intracellular Growth Stage

پس از شستشوی سلول‌های Hep-2با Earle's Salt یکبار دیگر سلول‌ها را با ۱/۵ سی سی محیط مخصوص مرحله دوم یعنی محیط رشد داخل سلولی گرم شسته و بعد ۱/۵ سی سی از محیط فوق را به سلولها Hep-2 اضافه نموده و لوله‌ها را بطور افقی به مدت ۴ ساعت در 37^{o} درجه قرار داده می شوند (در سری دوم آزمایش دمای این مرحله 22^{o} می‌باشد) در طول این مدت باکتری-های مهاجم که در مرحله اول وارد سلول‌های Hep-2 شده‌اند بطور داخل سلولی شروع به تکثیر نموده و فضای سلولی را پر می‌نمایند. بهتر است هر ساعت تغییر رنگ محیط که نشانه رشد باکتری‌های خارج سلولی است کنترل شود و درصورت تغییر رنگ محیط مجدداً سلول‌ها را به بار و هر بار بوسیله ۱/۵ سی سی Earle's Salt گرم شسته و سپس به سلول‌ها ۱/۵ سی سی محیط رشد داخل سلولی اضافه شوند. پس از پایان ۴ ساعت محیط کشت سلولی را دور ریخته و سلول‌ها را به بار با Dulbecco' PBS گرم به آرامی شسته و بدین ترتیب لامل حاوی سلول‌های Hep-2 ماده رنگ‌آمیزی می‌شود (۲۰).

۵- روش رنگ آمیزی سلول‌های Hep-2

برای رنگ‌آمیزی از روش رنگ آمیزی ساده استفاده می شود. در این روش فقط از یک محلول رنگی برای رنگ‌آمیزی استفاده می-شود. و بدین وسیله می‌توان به تهاجم باکتری به سلول‌ها پی برد و عناصر باکتریایی موجود در کشت سلولی را مورد آزمایش قرار داد. در این روش کلیه میکروب‌ها و سلول‌های موجود در گسترش به یک رنگ دیده خواهد شد.

پس از شستشوی سلول‌های Hep-2 با محلول PBS گرم به سلول‌ها ۱ سی سی متانول اضافه کرده و بعد از ۵ دقیقه آهسته لوله Leighton حاوی لامل را تکان داده بطوریکه لامل از جای خود جدا گردد و در متانول شناور شود و به آرامی لامل را به سمت دهانه لوله هدایت می شوند و بوسیله یک پنس کوچک لامل را به سمت دهانه لوله هدایت نموده و بوسیله یک پنس کوچک لامل را برداشته و در ظرف مخصوص رنگ آمیزی قرارداده و روی لامل به اندازه کافی رنگ گیمسا ۱۰: ۱ رقیق شده اضافه نموده و بعد از ۲۰ دقیقه رنگ گیمسا را توسط آب مقطر شسته و پس از ۲۰-۱۰ ثانیه بوسیله پنس لامل را به ترتیب و سریع در محلول‌های استن – گزیلل (۵۰ + ۵۰)، استن – گزیلل (۶۷ + ۳۳) و گزیلل خالص وارد نموده و لامل را بعد از خنک شدن توسط Entellan بر روی لام هماسیتیمترفیکس نموده، بطوری که سطحی که دارای سلول-هاست به طرف بالا باشد مجدداً بر روی این سطح (سطح بالایی که حاوی سلول است) لامل مخصوص آنرا توسط Entellan فیکس نموده بدین ترتیب نمونه آماده است و می‌توان بررسی‌های میکروسکوپی را روی آن انجام داد.

۶- بررسی میزان تهاجم باکتری ها:

لام‌ها با بزرگنمائی ۱۰۰ زیر میکروسکوپ بررسی شدند. اگر تعداد باکتری‌های داخل سلول Hep-2 در ۲۰ الی ۳۰ میدان دید، بین ۱۰ الی ۳۰ بود یک + ، و اگر بین ۳۰-۷۰ بود برابر با ++ و اگر بین ۷۰ -۱۰۰ برابر با +++ در نظر گرفته می شود.

۷- تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

در مرحله بعد به پیشنهاد سازمان Clinical and laboratory standard institute (CLSI) جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی از روش تعیین حساسیت با دیسک استفاده شد (۲۰). در این روش ابتدا پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار (pH=۷/۲ تا ۷/۴)، سوسپانسیون میکروبی استاندارد با غلظت نیم مک فارلند تهیه می شود. ۱۵ دقیقه پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مزبور، دیسک های جنتامایسین (۱۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، کوتریموکسازول (۱/۲۵ µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، کلی ستین (۱۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، آموکسی سیلین (۳۰ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، استرپتومایسین (۱۰ µg) را به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی متر از یکدیگر، بر روی محیط مزبور قرار می گیرند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، با استفاده از خط کش، هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و با استانداردهای جهانی (CLSI) مقایسه شده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، نمونه های مورد نظر را بصورت مقاوم (R)، نیمه حساس (I) و حساس (S) گزارش داده می شود.

یافته‌ها

بطور کلی بر روی ۳۰ سویه یرسینیا انتروکلی تیکا، ۱۴ سویه یرسینیا اینترمدیا، ۳ سویه یرسینیا فردریکسنی، ۲ سویه یرسینیا کریستنسنی و ۱ سویه یرسینیا آلدوه آزمایش تهاجم سلولی به سلول های Hep-2 در دو دمای ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گرفت. بررسی کشت سلولی Hep-2، نشان داد که تنها ۱۰ سوش از گونه های مختلف یرسینیا فقط در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد دارای خاصیت تهاجمی بودند. بیشترین تهاجم ناشی از سوش های یرسینیا انتروکلی تیکا به میزان ۷ سوش بود (۲۰٪) (جدول۱). نتایج بدست آمده نشان داد که سوش های محیطی قابلیت بیماریزایی را دارند (جدول۲). همچنین مقایسه ویرولانس میان ایزوله های ایران و فرانسه، نشان می دهد سوش های منبع اروپا از توان بیشتر برای بیماریزایی برخوردارند. بعلاوه سوش های کلینیکی ایران هیچکدام قابلیت بیماری زایی را ندارند (جدول۳).

روش کشت سلولی Hep-2 در مورد گونه‌های مختلف ۵ سوش یرسینیا یکبار در دمای ۲۲ درجه و یکبار در دمای ۳۷ درجه صورت گرفت. قدرت تهاجمی یرسینیا در کشت سلولی Hep-2 پس از انکوباسیون ۳ و ۷ ساعته نشان داد که فضای داخل سلولی Hep-2 توسط توده عظیمی از باکتری‌ها اشغال شده است. بدین-صورت که در مرحله اولیه انکوباسیون ۳ ساعته (مرحله عفونی) یرسینیا با استفاده از قدرت تهاجمی خود وارد سلول‌های Hep-2 شده (تصویر ۱) و پس از طی یک مرحله انکوباسیون ۴ ساعته دیگر (مرحله رشد داخل سلولی) باکتری‌های موجود در داخل

سلول‌ها بطور داخل سلولی تکثیر و ازدیاد پیدا کرده و سیتوپلاسم سلول‌های Hep-2 را پر کردند (تصویر۲).

بطور کلی در ۲۸ سوشی که از فرانسه جدا شدند ۷ سوش محیطی و یک سوش کلینیکی مهاجم بودند. درحالیکه در ۲۲ سوش ایرانی فقط ۲ سوش محیطی مهاجم بودند. ۲ سوش یرسینیا آنتروکلی تیکا از ایزوله های محیطی فرانسه، از بیشترین قدرت تهاجمی (۳+) برخوردار بودند. بطوری که قسمت بزرگی از فضای داخل سلولی را اشغال کردند. در حالیکه سایر سوش ها از نظر میزان تهاجم علامت + و یا ++ بودند، چرا که از تکثیر داخل سلولی بالایی برخوردار نبودند و کمتر از نیمی از فضای سیتوپلاسمی را اشغال کرده بودند. همچنین هیچکدام از مطالعه سوش‌های مورد مطالعه فعالیت تهاجمی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد را از خود نشان ندادند. در خصوص الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، بررسی ما نشان داد که سوش های یرسینیا به اغلب آنتی بیوتیک ها حساسیت نشان دادند. بطوریکه از ۱۲ آنتی بیوتیک بررسی شده، به ۱۰ آنتی بیوتیک حساسیت بالای ۸۸٪ نشان دادند و تنها ۲ آنتی بیوتیک آمپی سیلین و سفالوتین بر روی گونه های مختلف یرسینیا بی اثر بودند. همچنین رشد باکتری در دمای ۲۲و ۳۷ درجه سانتی گراد، تاثیری در افزایش و یا کاهش حساسیت نداشته است (جدول۴).

جدول ۱: توزیع فراوانی نسبی و مطلق گونه‌های مهاجم یرسینیا

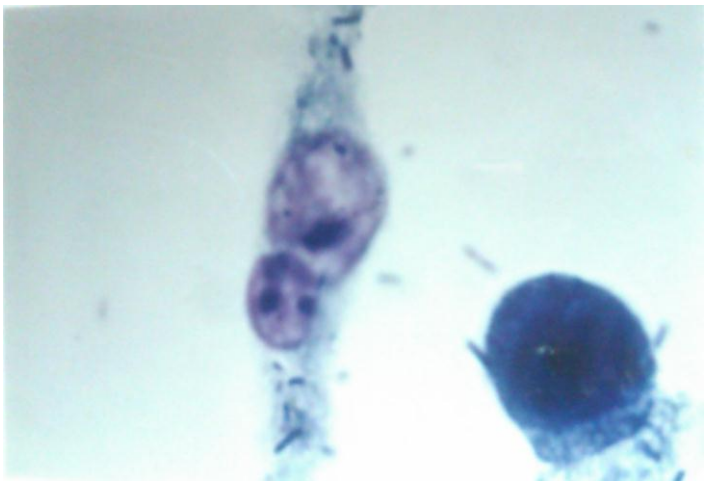
گونه یرسینیا	تعداد(مهاجم)	درصد
یرسینیا انتروکلی تیکا	(۷)۳۰	۲۳/۳
یرسینیا اینتر مدیا	(۱)۱۴	۷/۱
یرسینیا فردریکسنی	(۱)۳	۳۳/۳
یرسینیا کریستنسنی	(۱)۲	۵۰/۰
یرسینیا آلدوه	(۰)۱	۰/۰

جدول ۲: توزیع فراوانی سوش‌های مهاجم یرسینیا جدا شده بر حسب منبع نمونه گیری

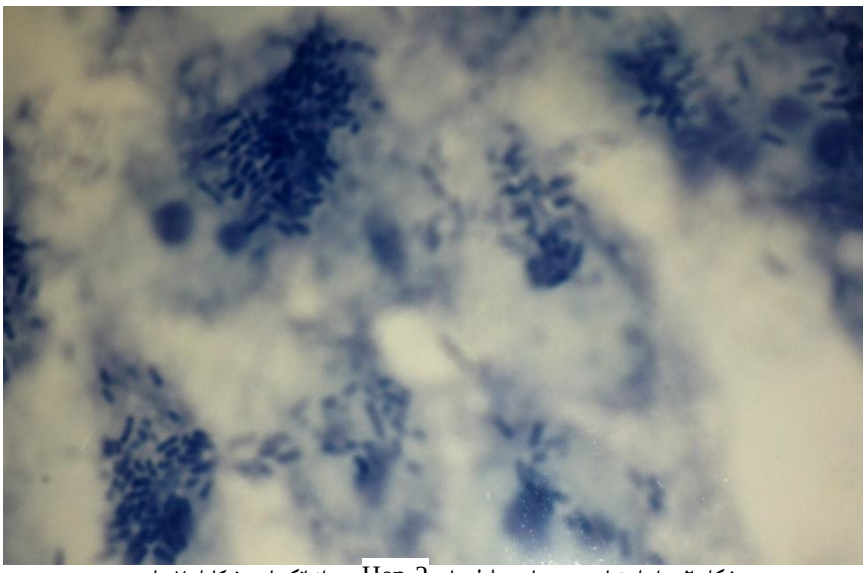
نوع نمونه /گونه یرسینیا	اسهال کودکان		آب		شیر	
	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد
یرسینیا انتروکلی تیکا	(۱)۱۴	۷/۱	(۳)۱۲	۲۵	(۲)۴	۵۰
یرسینیا اینتر مدیا	(۰)۲	۰	(۱)۱۲	۸/۳	–	–
یرسینیا فردریکسنی	(۰)۱	۰	(۱)۲	۵۰	–	–
یرسینیا کریستنسنی	–	–	(۱)۲	۵۰/۰	–	–
یرسینیا آلدوه	(۰)۱	۰	–	–	–	–

جدول ۳: توزیع فراوانی سوش‌های مهاجم یرسینیا جدا شده ایران درمقایسه با فرانسه

نوع نمونه/گونه یرسینیا	فرانسه				ایران			
	محیطی (آب)		کلینیکی (اسهال کودکان)		محیطی (آب و شیر)		کلینیکی (اسهال کودکان)	
	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد
یرسینیا انتروکلی تیکا	(۴)۸	۵۰	(۱)۱۰	۱۰	(۲)۸	۲۵	(۰)۴	۰
یرسینیا اینتر مدیا	(۱)۴	۲۵	(۰)۱	۰	(۰)۸	۰	(۰)۱	۰
یرسینیا فردریکسنی	(۱)۲	۵۰	–	–	–	–	(۰)۱	۰
یرسینیا کریستنسنی	(۱)۲	۵۰	–	–	–	–	–	–
یرسینیا آلدوه	–	–	/۱		–	–	–	–



شکل ۱: مراحل تهاجم یرسینیا به سلول های Hep-2 پس از انکوباسیون ۳ ساعته



شکل ۲: مراحل تهاجم یرسینیا به سلول های Hep-2 پس از انکوباسیون کامل ۷ ساعته

جدول ۴: الگوی مقاومت میکروبی ایزوله های مختلف گونه های یرسینیا

ردیف	آنتی بیوتیک	ی. انتروکلی تیکا تعداد=۳۰ S* / I / R	ی. فردریکسنی تعداد=۳ S / I / R	ی.اینتر مدیا تعداد=۱۴ S / I / R	ی.کریستنسنی تعداد=۲ S / I / R	ی.آلدوه تعداد=۱ S / I / R
۱	آمپی سیلین ۱۰mcg	۳۰/۰/۰	۳/۰/۰	۱۴/۰/۰	۲/۰/۰	۱/۰/۰
۲	تریمتوپریم ۵mcg	۱/۰/۲۹	۰/۰/۳	۰/۰/۱۴	۰/۰/۲	۰/۰/۱
۳	کلرافنیکل ۳۰mcg	۰/۱/۲۹	۰/۰/۳	۰/۰/۱۴	۰/۰/۲	۰/۰/۱
۴	تتراسکلین ۳۰mcg	۳/۲/۲۵	۰/۰/۳	۱/۰/۱۳	۰/۰/۲	۰/۰/۱
۵	استرپتوماسین ۱۰mcg	۵/۱۰/۱۵	۱/۱/۱	۰/۰/۱۴	۰/۲/۰	۰/۰/۱
۶	سفالوتین ۳۰mcg	۲۹/۰/۱	۳/۰/۰	۱۴/۰/۰	۲/۰/۰	۱/۰/۰
۷	سیپروفلوکساسین ۵mcg	۰/۰/۳۰	۰/۰/۳	۰/۰/۱۴	۰/۰/۲	۰/۰/۱
۸	سفوتاکسیم ۳۰mcg	۰/۲/۲۸	۰/۰/۳	۰/۰/۱۴	۰/۰/۲	۰/۰/۱
۹	نالیدیکسیک اسید ۳۰mcg	۴/۰/۲۶	۱/۰/۲	۰/۱/۱۳	۲/۰/۰	۰/۱/۰
۱۰	جنتامایسین ۱۰mcg	۰/۱/۲۹	۰/۰/۳	۰/۰/۱۴	۰/۰/۲	۰/۰/۱
۱۱	کوتریموکسازول	۴/۲/۲۴	۰/۱/۲	۲/۰/۱۲	۰/۰/۲	۰/۰/۱
۱۲	کانامایسین	۰/۰/۳۰	۰/۰/۳	۰/۲/۱۲	۰/۰/۲	۰/۰/۱

,(Sensitive (S), Resistance (R * (Intermediate (I

بحث

استفاده از روش کشت سلول جهت بررسی خاصیت تهاجمی باکتری ها از دیرباز متداول است. در سال ۱۹۶۴ Labrec با استفاده از تکنیک کشت سلولی هلا ۵ ساعته (مرحله عفونی ۳ ساعته و مرحله رشد داخل سلولی ۲ ساعته) توانستند سوش‌های ویرولان شیگلا را از سوش‌های غیر ویرولان تشخیص دهند بدین ترتیب که سوش‌های ویرولان در مرحله اولیه انکوباسیون ۳ ساعته (مرحله عفونی) با استفاده از قدرت تهاجمی خود وارد سلول‌های هلا شده و پس از طی یک مرحله بانکوباسیون ۲ ساعته دیگر (مرحله رشد داخل سلولی) باکتری‌ها در داخل سلول‌ها تکثیر و ازدیاد پیدا می‌کنند و پس از رنگ آمیزی نمودن لام‌ها، مشاهده می-شود که بیشتر فضای داخل سلول‌های هلا را توده‌های باکتری اشغال می‌نماید (۲۱). در این مطالعه مشخص گردید که سوش‌های با منشاء فرانسه بیشتر از سوش های ایران مهاجم بودند، بطوریکه ۱۰٪ سوش های جداشده از نمونه های بالینی قدرت تهاجم به

سلول های Hep-2را داشتند، در حالیکه سوش های جداشده از نمونه های بالینی فاقد قدرت تهاجم بودند. همین وضعیت برای سوش های جداشده از نمونه های محیطی فرانسه (۵۰٪) نسبت به سوش های جداشده از نمونه های محیط ایران (۲۵٪) می باشد. این نتایج می تواند نگرانی هایی در خصوص نمونه های محیطی و غذایی که در ارتباط با انسان هستند ایجاد نماید. در سال ۱۹۷۰ Calabi با استفاده از تکنیک کشت سلولی هلا ۷ ساعته (مرحله عفونی ۳ ساعت و مرحله رشد داخل سلولی ۴ ساعته) قدرت تهاجمی سوش‌های مختلف شیگلا فلکسنری را مورد مطالعه و بررسی قرار داد. Calabi با تغییراتی در روش کشت سلولی از آن جمله تغییر در مقدار باکتری، تغییر در تعداد سلول‌های هلا و انتخاب یک روش رنگ آمیزی صحیح توانست بخوبی از تکنیک فوق استفاده نماید و سپس پیشنهاد نمود که از تهاجم سلولی شیگلا می‌توان برای تعیین ویرولانس سوش‌های شیگلا فلکسنری استفاده نمود (۱۸). در سال ۱۹۷۳ با استفاده از تکنیک کشت سلولی هلا قدرت تهاجمی سالمونلا تیفی موریوم را مورد بررسی قرار دادند و اظهار نمودند که بین مدل کشت سلولی و استفاده از مدل‌های حیوانی جهت بررسی تهاجم باکتری‌های روده‌ای ارتباط نزدیکی وجود دارد. در این مطالعه ۸ سوش سالمونلا که سلول-های هلا را مورد تهاجم قرار دادند. همچنین از توانایی نفوذ به روده خرگوش نیز برخوردار بودند (۲۲).

نتایج ما نشان داد که از ۸ سویه محیطی یرسینیا انتروکلی تیکا که از فرانسه جدا شده بود ۴ سویه خاصیت تهاجمی داشتند. در نمونه-های ایرانی نیز از ۴ سویه یرسینیا انتروکلی تیکا که از شیر جدا شده بودند ۲ سویه مهاجم تشخیص داده شدند. بطور کلی در ۲۸ سویه که از فرانسه جدا شدند ۷ سویه محیطی و یک سویه کلینیکی مهاجم بودند. درحالیکه در ۲۲ سویه ایرانی فقط ۲ سویه محیطی مهاجم بودند. ۲ سویه یرسینیا آنتروکلی تیکا از ایزوله های محیطی فرانسه، از بیشترین قدرت تهاجمی (۳+) برخوردار بودند، بطوری که قسمت بزرگی از فضای داخل سلولی را اشغال کردند. در حالیکه سایر سوش ها از نظر میزان تهاجم علامت + و یا ++ بودند، چرا که از تکثیر داخل سلولی بالایی برخوردار نبودند و کمتر از نیمی از فضای سیتوپلاسمی را اشغال کرده بودند. همچنین هیچکدام از مطالعه سوش‌های مورد مطالعه فعالیت تهاجمی در ۳۷ درجه سانتی گراد را از خود نشان ندادند. Small و همکاران در مطالعه ای در سال ۱۹۸۷ نشان دادند که میزان تهاجم باکتری‌ها در لاین‌های مختلف سلولی متفاوت بود. نتیجه گرفتند که احتمال دارد سلول‌های Hep-2 و سایر لاین‌های سلولی در ساختمان‌های سطحی با هم تفاوت داشته باشند. این اختلافات شامل اختلاف در نوع رسپتور یا اختلاف در دانسیته رسپتور برای باکتری‌های مهاجم باشد (۲۳).

در مطالعه‌ای قبلی ما که انجام گرفت نتیجه گرفته شد که یرسینیا انتروکلی تیکا از مکانیسم‌های چندی در بیماریزائی خود استفاده می‌کند. در این مطالعه مشخص شد که سروتیپ ۳: یرسینیا انتروکلی تیکا از قدرت بیماریزائی خیلی خفیف در عفونت‌های انسانی برخوردار است. از طرفی مشاهده گردید که سوش‌های سروتیپ ۳: بدون استثناء انتروتوکسین مقاوم به حرارت تولید می-کنند، ولی این انتروتوکسین در شرایط in vitro در دمای ۳۷ درجه تولید نمی‌شود. این وابستگی تولید توکسین به درجه حرارت۴ و ۲۵ درجه توسط ما منتشر شد (۲۴). اگر نقش توکسین در بیماریزائی یرسینیا انتروکلی تیکا مشخص شود می‌توان یرسینیا انتروکلی تیکا را همانند E.coli از نظر مکانیسم بیماریزایی به دو دسته تقسیم کرد. یک دسته باکتری‌هایی که به طور تهاجمی عمل می‌کنند و یک دسته باکتری‌هایی که تولید انتروتوکسین می‌کنند (۱۶). درمورد یرسینیا انتروکلی تیکا و گونه های دیگر آن نشان داده شده است که تغییرات قدرت بیماریزائی یرسینیا برحسب درجه حرارت نگاهداری می‌باشد. بطوریکه اگر یک سوش یرسینیا را که قبلاً در ۳۷ درجه کشت داده شده است به صفاق موشی تزریق کنند به سرعت دفع می‌شود. درحالیکه اگر سوش قبلاً فقط در ۲۵ درجه کشت داده شده باشد قادر به رشد در صفاق موش می‌باشد (۲۶و۲۵). مشاهدات ما در زمینه قدرت تهاجمی گونه‌های مختلف یرسینیا نشان داد که در سلول‌های Hep-2آلوده به یرسینیا تعداد باکتری‌های داخل سلولی پس از انکوباسیون ۳ ساعته به تعداد کم می‌باشد و به نظر می‌رسد که یرسینیا در مرحله انکوباسیون اولیه (مرحله عفونی) احتیاج به زمان انکوباسیون بیشتری دارد. از سوی دیگر به نظر می‌رسد که قدرت تهاجمی و مراحل آن در یرسینیا در مقایسه با شیگلا و اشریشیاکلی و سالمونلا متفاوت بوده و دیگر اینکه ممکن است این اختلاف در نتایج بتواند مربوط به سوش‌ها و یا اختلاف در روش کار باشد (۲۷و۲۶).

در مطالعه Small که بر روی توانایی تهاجم سوش‌های سالمونلاتیفی موریوم E.coli، یرسینیا پسودوتوبرکلوزیس و یرسینیا انتروکلی تیکا به سلول‌های اپی تلیال انجام شد مشخص گردید، که سالمونلاتیفی موریوم و یرسینیا توانایی زیادی برای نفوذ به سلول-های Hep-2 را دارند اما از رشد داخل سلولی بالایی برخوردار نیستند. E.coli از قدرت نفوذ ضعیفی برخوردار است اما رشد داخل سلولی خوبی دارد و در اثر رشد داخل سلولی E.coli سلول‌های Hep-2 آسیب می‌بینند. در حالیکه رشد داخل سلولی یرسینیا و سالمونلا در یک دوره طولانی هیچگونه آسیبی به طول-های منولایر نمی‌رساند. همچنین E.coli برای اینکه توانایی رشد داخل سلولی داشته باشند باید قبلاً به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار بگیرد. در حالیکه یرسینیا و سالمونلا احتیاج به این کار ندارند (۲۳). در خصوص الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های یرسینیا، نتایج ما و دیگران نشان می دهد که سویه های این باکتری از حساسیت بالایی نسبت به انتی بیوتیک‌های مختلف برخوردارند، لذا در صورت شناسایی یرسینیا آنتروکلی تیکا و سایر گونه های آن در عفونت های روده ای، می توان به درمان موفقیت آمیزی امیدوار بود (۳۰-۲۸).

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده نشان داد که ایزوله های محیطی یرسینیا، دارای خاصیت تهاجمی بوده و این خاصیت تهاجمی وابسته به درجه حرارت می باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی ازطرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۲۹۷۹مورخ ۱۳۹۰ می باشد، که بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تشکر و قدردانی می شود.

References

1. World Health Organization. 2004. Global burden of disease (GBD) 2002 estimates. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www. Who.int/topics /global_ burden_ of_ disease/en/.
2. Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ. Non – typhoial Salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect* 2001; **3**: 237 – 247.
3. Von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, Thiem VD, et al. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations and microbiology. *PLoS Med* 2006; **3**(9): 353.
4. Mitchell B, Cohen J, Nataro P. Prevalence of diarrhea genic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: A prospective controlled study. *J Pediatr* 2005; **146**: 54-61.
5. Soltan-Dallal MM, Moezardalan K. Frequency of *Yersinia* species infection in pediatric acute diarrhea in Tehran. East Mediator. *Health J* 2004; **10**(1-2): 152-158.
6. Ramirez EI, Vazquez-Salinas C. Isolation of Yersinia from raw meat (pork and chicken) and precooked meat (porcine tongues and sausages) collected from commercial establishments in Mexico City. *Food Protect* 2000, **63**(4): 542-544.
7. Soltan-Dallal MM, Doyle MP, Rezadehbashi M, Dabiri H, Sanaei M, Modarresi SH. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. Isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control* 2010 **21**: 388–392.
8. Krogulska B, Maleszewska J. Occurrence of bacteria of the *Yersinia* genus in surface water. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1992; **43**(3-4): 295-300.
9. Cheyne BM, Van Dyke MI, Anderson WB, Huck PM. The detection of *Yersinia enterocolitic*a in surface water by quantitative PCR amplification of the ail and yadA genes. *J Water Health* 2010; **8**(3): 487-499.
10. Fredriksson-Ahomaa M, Hannu Korkeala H. Low Occurrence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Clinical, Food, and Environmental Samples: a Methodological Problem. *Clin Microbiol Rev* 2003, **16**: 220-222.
11. Jiang GC, Kang DH. Enrichment procedures and plating media for isolation of *Yersinia enterocolitica*. *J Food Protect* 2000; **63**: 1483-1486.
12. Stern NJ, Pierson MD. *Yersinia enterocolitica*: a review of the psychotropic water and foodborne pathogen. *J Food Sci* 1979; **47**: 582- 588.
13. Ibraham A, Mac Rae IC. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from red meat and milk. *J Food Sci* 1991*;* **56**: 1524-1526.
14. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol* 2008; **123**: 121–129.
15. Soltan-Dallal MM, Tabarraie A, MoezArdalan K. Comparison of four methods for isolation of Yersinia enterocolitica from raw and pasteurized milk from northern Iran. *Int J Food Microbiol* 2004; **94**: 87–91.
16. Soltan Dallal MM. Bacterial diarrheal infections and mechanisms of their pathogenicity. *Nabz* 1995; **5**(4): 48-52.
17. Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR. Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae. *J Clin Microbiol* 1992; **30**(8): 1968–1971.
18. Calabi O. In vitro. Interaction of *Shigella Flexneri* with Leukocytes and Hela cells. *J Infect Dis* 1970; **122**(1): 1-9.
19. Mehlman I J, Eide E L, Sanders AC, Fishbein M. Aulisio C C G. Methodology for recognition of invasive potential of *Escherichia coli*. *Journal of' the Association of Official Analytical Chemists* 1977; **60**: 546- 562.
20. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2005). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. NCCLS documents M100 – SIS, 940 West Valley Road. Wayne, PA, 19087 USA.
21. Labrec E.H, Schneider H, Magnani T J, Formal S B. Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J Isacteriol* 1964; **88**: 1503-1518.
22. Giannella RA,Washington 0, Gemski P, Formal SB. Invasion of Hela cells by *S.typhimurium.* A model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J Infect Dis*1973; **128**: 69-75.
23. Small-PL, Isberg RR, Falkow S. Comparison of the ability of enter invasive *Escherichia coli, S. typhimurium*, *Y. pseudotuberculosia* and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within HEP-2 cells. *Infect-Immun* 1987; **55**(7): 1674-1679.
24. Soltan Dallal MM. Enterotoxin production by *Yersinia* species at 4 and 25°C. *Acta Med Iran* 1977; **35**(3, 4): 69-73.
25. SabinaY, Rahman A, Chandra Ray R, Montet D. *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, Pathogenesis of Infection. *J Pathog* 2011; 2011:429069. doi: 10.4061/2011/429069. Epub 2011 Sep 7.

26. Batzilla J, Heesemann J, Rakin A. The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. Int *J Med Microbiol* 2011; **301**(7): 556-561.
27. Di Biase AM, Tinari A, Pietrantoni A, Antonini G, Valenti P, Conte MP**,** et al. Effect of bovine lactoferricin on enter pathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2cells. *J Med Microbiol* 2004; **53**(Pt 5): 407-412.
28. Sharifi Yazdi M K, Soltan-Dallal M M, Zali MR, Avadisians S, Bakhtiari R. Incidence and antibiotic susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species recovered from meat and chicken in Tehran, Iran. *Afr J Microbiol Res* 2011; **5**(18): 2649-2653.
29. Maraki S, Georgiladakis A, Tselentis Y, Samonis G. A 5-year study of the bacterial pathogens associated with acute diarrhea on the island of Crete, Greece, and their resistance to antibiotics. *Eur J Epidemiol* 2003; **18**(1): 85-90.
30. Pham Jn, Bell SM, Hardy MJ, Martin L, Guiyoule A, Carniel E. Susceptibility to β-Mactam agents of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O3 isolated in various parts of the world. *J Med Microbiol* 1995; **43**(1): 9-13.