

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

Mohammad Mahdi Soltan Dallal^{1,2}, Roonak Bakhtiari², Farzaneh Amin Harati², Mohammad Kazem Sharifi Yazdi^{3,4*}

¹Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Zoonosis Research Centre, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Department 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 و دام (زئونوز)، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، نویسنده رابط:

E-mail: mksharifi@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 می باشد. در این مطالعه با استفاده از کشت سلولی Hep-2 تاثیر درجه حرارت بر خصوصیت تهاجمی تعدادی از سویه های گونه های یرسینیا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: ۵۰ سویه یرسینیا با منشاء ایران و فرانسه شامل ۳۰ سویه یرسینیا انتروکلی تیکا، ۱۴ سویه یرسینیا ایترمدیا 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.

یافته ها: 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 آنتی 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 واژه ها: یرسینیا، تهاجمی، کشت سلولی Hep-2، اسهال

مقدمه

بهبودی در میان آحاد مردم، محرومیت از منابع آب آشامیدنی بهداشتی و روش های 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 باکتری های پاتوژن

امروزه اسهال بعنوان یکی از مشکلات حاد جوامع مختلف انسانی بویژه در کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه می باشد. بررسی های مقایسه ای بین جوامع پیشرفته اقتصادی که دارای استانداردهای بهداشتی بالا هستند با جوامع فقیر آشکارا نشان می - دهد که بسیاری از این قبیل بیماری ها معلول عدم گسترش فرهنگ

مواد و روش‌ها

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 انستیتو پاستور فرانسه، ۲۲ سویه از ایران) در دو دمای ۲۲° درجه و ۳۷° مورد آزمایش قرار گرفتند. این سوش‌ها از نظر منبع جمع-آوری شامل ایزوله های انسانی و غیر انسانی بوده است.

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

روش اجرا:

سلول Hep-2 (human epidermoid cancer cells)

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

۱- طرز تهیه محلول ها و محیط های مورد نیاز

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 شیشه های در پیچ دار تقسیم کرده و در ۲۰- درجه نگهداری نموده و سپس برحسب احتیاج از آن، محیط های 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 لوله های 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 لوله های در پیچ 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 لوله های در پیچ 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 ویال های مخصوص بصورت لئوفیلز 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.

خطرناک دیگر همچون شیگلا، سالمونلا، اشریشیاکلی در ایجاد گاستروآتریت های باکتریال نقش عمده ای را بازی می کند. گرچه این ارگانسیم ها بیماری های مشابه ای ایجاد می کنند ولیکن آنها از طریق مکانیسم های مختلفی سلول های میزبان را درگیر می کنند (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 می باشد. گزارشات متعددی وجود دارد که حیوانات را به عنوان مخازن اصلی این ارگانسیم ذکر می نمایند. لذا می توان بیماری های ناشی از این ارگانسیم را بیماری های مشترک انسان و دام (زئونوز) Zoonosis در نظر گرفت (۷و۶). برخی از محققان نیز آب را به عنوان اصلی ترین راه انتقال این ارگانسیم می دانند، لذا به احتمال زیاد عفونت های یرسینیایی اکثراً توسط آب های آلوده پراکنده می شوند (۹و۸). اگرچه اکثر سویه هایی که تا به امروز به عنوان سویه های پاتوژن انسانی جدا و معرفی می-شوند کمتر از منابع آبی جدا شده اند. بدلیل انتقال مدفوع - دهانی و همچنین نقش یرسینیا انتروکلی تیکا در مسمومیت های غذایی، مقاومت و رشد در سرما، شناسائی این باکتری در مراحل بررسی مخازن و روش های انتقال عفونت بسیار اهمیت دارد (۱۲-۱۰) بطور کلی عفونت های ایجاد شده توسط انواع یرسینیا به غیر از یرسینیا پستیس را یرسینوز Yersiniosis می گویند 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 روش های معمول آزمایشگاهی میکروبی به سختی قابل جداسازی می باشد و انجام مراحل ویژه و غنی سازی جهت جداسازی آن از منابع مختلف مورد نیاز می باشد (۱۵-۱۳). بطور کلی باکتری های مولد اسهال را از نظر مکانیسم عمل به دو دسته تقسیم می شوند (۱۶):

۱- باکتری های مهاجم (Invasives): که باعث کولیت و آنتروکولیت حاد می شوند. بجز شیگلا دیسانتری انتروتوکسینی در نزد سوش های مهاجم مشخص نشده است. در این گروه سالمونلا، شیگلا، یرسینیا انتروکلی تیکا و بعضی از تیپ های E.coli قرار دارند.

۲- باکتری های توکسین زا (Toxinogenic): در این مورد اسهال در اثر تکثیر و افزایش باکتری ها در روده ایجاد می شود و یا اینکه باکتری ها بر روی سطح سلول های اپی تلیال روده کوچک تولید توکسینی می کنند که باعث ترشح آب و الکترولیت بوسیله سلول-های روده می شوند. در این گروه ویبریو ویا و اشریشیاکلی آنتروتوکسینوز قرار دارند. در این تحقیق گونه های مختلف یرسینیا از نظر تهاجم به سلول های Hep-2 مورد بررسی قرار گرفتند. نحوه تهاجم این گونه ها به سلول های Hep-2 مانند سایر باکتری های پاتوژن مهاجم است. این ویژگی حتی در محیط های کشت کهنه هم دیده می شود و همانند توانائی حرکت یکی از ویژگی های حساس، به حرارت است. هدف این مطالعه بررسی تأثیر درجه حرارت در بیان خاصیت تهاجمی ایزوله های انسانی و غیر انسانی گونه های مختلف یرسینیا بوده است.

تریپسین، فلاسک را به مدت ۱۵ دقیقه در اتو 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 سلول‌ها پرداخته شد.

۳- روش تهیه غلظت مناسب باکتری برای آلوده نمودن سلول-های 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 ۲۳° درجه تهیه نموده و بعد تمام سوسپانسیون میکروبی را در لوله‌های سانتریفوژ ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ دور در دمای 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 میکروبی ۷۰٪ نور را عبور دهد غلظت میکروبی مناسب را خواهیم داشت، که در این حالت حدود $10^8 \times 1$ باکتری در سوسپانسیون وجود دارد و در غیر اینصورت باید سوسپانسیون میکروبی را غلیظ-تر یا رقیق نمود. بدین ترتیب غلظت میکروبی مناسب برای آلوده نمودن سلول‌های Hep-2 تهیه 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 سلول‌های Hep-2 و باکتری و همچنین به حداقل رساندن باکتری‌های خارج سلولی آزمایش در دو مرحله متوالی به شرح زیر انجام داده می‌شود.

الف: مرحله عفونی نمودن سلول‌های Hep-2 Infection Stage
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 در واقع 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

۶- تهیه محیط MEM کامل: (محیط پایه + سرم گاوی + آنتی بیوتیک).

برای کشت سلول‌های Hep-2 محیط 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 بلاذ آگار، عدم ایجاد هرگونه کلنی بر روی محیط نشانه استریل بودن محیط می‌باشد). در صورت 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-2 و نیز برای تهیه سوسپانسیون میکروبی 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 بلاذ 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 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 می‌شود.

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 ۴-۵ 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

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 هیتون آگار ($V/2=pH$) تا $7/4$ ، 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 جتتامایسین ($10 \mu g$)، تتراسایکلین ($30 \mu g$)، کوتریموکسازول ($1/25 \mu g$)، نالیدیکسیک اسید ($30 \mu g$)، سیپروفلوکساسین ($5 \mu g$)، سفوتاکسیم ($30 \mu g$)، ایمی پنم ($10 \mu g$)، کلی ستین ($10 \mu g$)، سفنازیدیم ($30 \mu g$)، آموکسی سیلین ($30 \mu g$)، کلرامفنیکل ($30 \mu g$)، استرپتومایسین ($10 \mu g$) را به فاصله حداقل $2/5$ سانتی متر از یکدیگر، بر روی محیط مزبور قرار می گیرند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37 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 اترولکی تیکا، ۱۴ سویه یرسینیا اینترمدیا، ۳ سویه یرسینیا فردریکسنی، ۲ سویه یرسینیا کریستسنی 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 اترولکی تیکا به میزان ۷ سوش بود (۲۰٪) (جدول ۱). نتایج بدست آمده نشان داد که سوش های محیطی قابلیت بیماریزایی را دارند (جدول ۲). همچنین مقایسه ویرولانسی 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 (جدول ۳). روش کشت سلولی Hep-2 در مورد گونه های 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 باکتری ها اشغال شده است. بدین صورت که در مرحله اولیه انکوباسیون ۳ ساعته (مرحله عفونی) یرسینیا با استفاده از قدرت تهاجمی خود وارد سلول های Hep-2 شده (تصویر ۱) و پس از طی یک مرحله انکوباسیون ۴ ساعته دیگر (مرحله رشد داخل سلولی) باکتری های موجود در داخل

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

ب: مرحله رشد داخل سلولی Intracellular Growth Stage

پس از شستشوی سلول های Hep-2 با Earle's Salt یکبار دیگر سلول ها را با $1/5$ سی سی محیط مخصوص مرحله دوم یعنی محیط رشد داخل سلولی گرم شسته و بعد $1/5$ سی سی از محیط فوق را به سلول ها Hep-2 اضافه نموده و لوله ها را بطور افقی به مدت ۴ ساعت در 37° درجه قرار داده می شوند (در سری دوم آزمایش دمای این مرحله 22° می باشد) در طول این مدت باکتری های مهاجم که در مرحله اول وارد سلول های Hep-2 شده اند بطور داخل سلولی شروع به تکثیر نموده و فضای سلولی را پر می نمایند. بهتر است هر ساعت تغییر رنگ محیط که نشانه رشد باکتری های خارج سلولی است کنترل شود و در صورت تغییر رنگ محیط مجدداً سلول ها را به بار و هر بار بوسیله $1/5$ سی سی Earle's Salt گرم شسته و سپس به سلول ها $1/5$ سی سی محیط رشد داخل سلولی اضافه شوند. پس از پایان ۴ ساعت محیط کشت سلولی را دور ریخته و سلول ها را به بار با Dulbecco' PBS گرم به آرامی شسته و بدین ترتیب لامل حاوی سلول های Hep-2 ماده رنگ آمیزی می شود (۲۰).

۵- روش رنگ آمیزی سلول های Hep-2

برای رنگ آمیزی از روش رنگ آمیزی ساده استفاده می شود. در این روش فقط از یک محلول رنگی برای رنگ آمیزی استفاده می شود. و بدین وسیله می توان به تهاجم باکتری به سلول ها پی برد و عناصر باکتریایی موجود در کشت سلولی را مورد آزمایش قرار داد. در این روش کلیه میکروب ها و سلول های موجود در گسترش به یک رنگ دیده خواهد شد.

پس از شستشوی سلول های Hep-2 با محلول PBS گرم به سلول ها 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 قرارداد و روی لامل به اندازه کافی رنگ گیمسا ۱:۱۰ 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 محلول های استن - گزیل ($50 + 50$)، استن - گزیل ($67 + 33$) و گزیل خالص وارد نموده و لامل را بعد از خنک شدن توسط Entellan بر روی لام هماسیتیمتر فیکس 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 می توان بررسی های میکروسکوپی را روی آن انجام داد.

۶- بررسی میزان تهاجم باکتری ها:

لام ها با بزرگنمایی ۱۰۰ زیر میکروسکوپ بررسی شدند. اگر تعداد باکتری های داخل سلول Hep-2 در ۲۰ الی ۳۰ میدان دید، بین ۱۰

اشغال کرده بودند. همچنین هیچکدام از مطالعه سوش‌های مورد مطالعه فعالیت مهاجمی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد را از خود نشان ندادند. در خصوص الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بررسی ما نشان داد که سوش‌های یرسینیا به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند. بطوریکه از ۱۲ آنتی‌بیوتیک بررسی شده، به ۱۰ آنتی‌بیوتیک حساسیت بالای ۸۸٪ نشان دادند و تنها ۲ آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و سفالوتین بر روی گونه‌های مختلف یرسینیا بی‌اثر بودند. همچنین رشد باکتری در دمای ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تاثیری در افزایش و یا کاهش حساسیت نداشته است (جدول ۴).

سلول‌ها بطور داخل سلولی تکثیر و ازدیاد پیدا کرده و سیتوپلاسم سلول‌های Hep-2 را پر کردند (تصویر ۲).

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 آنترولکی تیکا از ایزوله‌های محیطی فرانسه، از بیشترین قدرت مهاجمی (۳+) برخوردار بودند. بطوری که قسمت بزرگی از فضای داخل سلولی را اشغال کردند. در حالی‌که سایر سوش‌ها از نظر میزان مهاجم علامت + و یا ++ بودند، چرا که از تکثیر داخل سلولی بالایی برخوردار نبودند و کمتر از نیمی از فضای سیتوپلاسمی را

جدول ۱: توزیع فراوانی نسبی و مطلق گونه‌های مهاجم یرسینیا

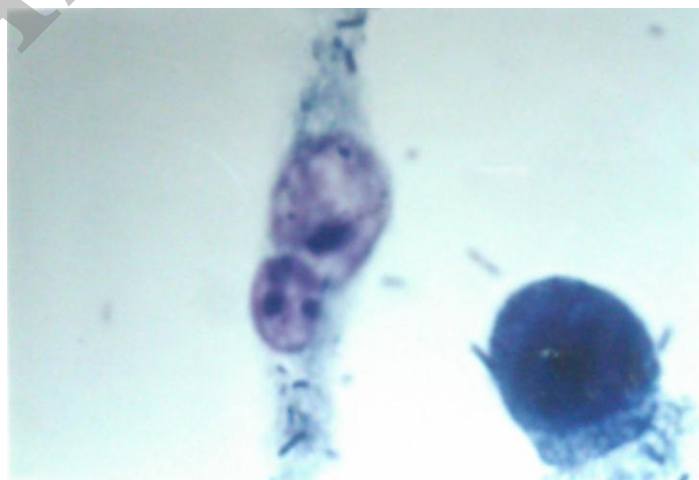
گونه یرسینیا	تعداد(مهاجم)	درصد
یرسینیا آنترولکی تیکا	۳۰ (۷)	۲۳/۳
یرسینیا اینتر مدیا	۱۴ (۱)	۷/۱
یرسینیا فردریکسنی	۳ (۱)	۳۳/۳
یرسینیا کریستسنی	۲ (۱)	۵۰/۰
یرسینیا آلدوه	۱ (۰)	۰/۰

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

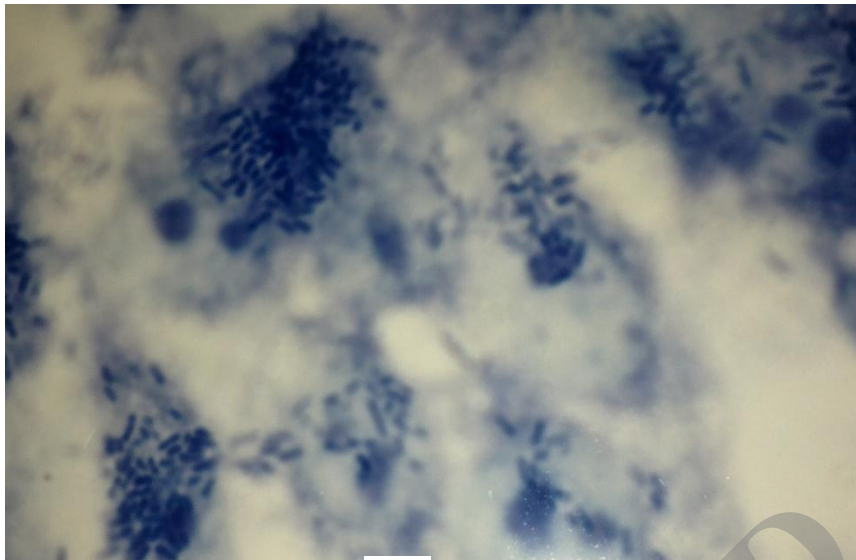
نوع نمونه / گونه یرسینیا	اسهال کودکان		آب		شیر	
	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد
یرسینیا آنترولکی تیکا	۱۴ (۱)	۷/۱	۱۲ (۳)	۲۵	۴ (۲)	۵۰
یرسینیا اینتر مدیا	۲ (۰)	-	۱۲ (۱)	۸/۳	-	-
یرسینیا فردریکسنی	۱ (۰)	-	۲ (۱)	۵۰	-	-
یرسینیا کریستسنی	-	-	۲ (۱)	۵۰/۰	-	-
یرسینیا آلدوه	۱ (۰)	-	-	-	-	-

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

نوع نمونه / گونه یرسینیا	محیطی (آب)		کلینیکی (اسهال کودکان)		فرانسه		ایران	
	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد	تعداد(مهاجم)	درصد
یرسینیا آنترولکی تیکا	۸ (۴)	۵۰	۱۰ (۱)	۱۰	۸ (۲)	۲۵	۴ (۰)	-
یرسینیا اینتر مدیا	۴ (۱)	۲۵	۱ (۰)	-	۸ (۰)	۰	۱ (۰)	-
یرسینیا فردریکسنی	۲ (۱)	۵۰	-	-	-	-	۱ (۰)	-
یرسینیا کریستسنی	۲ (۱)	۵۰	-	-	-	-	-	-
یرسینیا آلدوه	-	-	۱ /	-	-	-	-	-



شکل ۱: مراحل مهاجم یرسینیا به سلول‌های 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

آنتی بیوتیک	ی. انتروکلی تیکا تعداد=۳۰ R/I / %S	ی. فردریکسنی تعداد=۳ R/I / S	ی. ایتر مدیا تعداد=۱۴ R/I / S	ی. کریستسنی تعداد=۲ R/I / S	ی. آلدوه تعداد=۱ R/I / S
۱. آمپی سیلین ۱۰mcg	۳۰/۰/۰	۳۰/۰	۱۴/۰/۰	۲/۰/۰	۱/۰/۰
۲. تریمتوپریم ۵mcg	۱۰/۲۹	۰/۰/۳	۰/۰/۱۴	۰/۰/۲	۰/۰/۱
۳. کلرافینکل 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. سفونامیدیم 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

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

بحث

هلا شده و پس از طی یک مرحله بانکوباسیون ۲ ساعته دیگر (مرحله رشد داخل سلولی) باکتری ها در داخل سلول ها تکثیر و ازدیاد پیدا می کنند و پس از رنگ آمیزی نمودن لام ها، مشاهده می شود که بیشتر فضای داخل سلول های هلا را توده های باکتری اشغال می نماید (۲۱). در این مطالعه مشخص گردید که سوش های با منشأ فرانسه بیشتر از سوش های ایران مهاجم بودند، بطوریکه ۱۰٪ سوش های جدا شده از نمونه های بالینی قدرت تهاجم به

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 سوش های ویرولان شیگلا را از سوش های غیر ویرولان تشخیص دهند بدین ترتیب که سوش های ویرولان در مرحله اولیه انکوباسیون ۳ ساعته (مرحله عفونی) با استفاده از قدرت تهاجمی خود وارد سلول های

سروتیپ ۳: بدون استثنا انتروتوکسین مقاوم به حرارت تولید می‌کند، ولی این انتروتوکسین در شرایط *in vitro* در دمای ۳۷ درجه تولید نمی‌شود. این وابستگی تولید توکسین به درجه حرارت ۴ و ۲۵ درجه توسط ما منتشر شد (۲۴). اگر نقش توکسین در بیماریزایی 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). در مورد یرسینیا انتروکلی تیکا و گونه‌های دیگر آن نشان داده شده است که تغییرات قدرت بیماریزایی یرسینیا بر حسب 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 (۲۶ و ۲۵). مشاهدات ما در زمینه قدرت تهاجمی گونه‌های مختلف یرسینیا نشان داد که در سلول‌های Hep-2 آلوده 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 (۲۷ و ۲۶).

در مطالعه Small که بر روی توانایی تهاجم سوش‌های سالمونلا تیفی موریوم *E.coli*، یرسینیا پسودوتوبرکلوزیس و یرسینیا انتروکلی تیکا به سلول‌های اپی تلیال انجام شد مشخص گردید، که سالمونلا تیفی موریوم و یرسینیا توانایی زیادی برای نفوذ به سلول‌های 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 حالی که رشد داخل سلولی یرسینیا و سالمونلا در یک دوره طولانی هیچگونه آسیبی به طول‌های مولایر 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 حالی که یرسینیا و سالمونلا احتیاج به این کار ندارند (۲۳). در خصوص الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های یرسینیا، نتایج ما و دیگران نشان می‌دهد که سوش‌های این باکتری از حساسیت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف برخوردارند، لذا در صورت شناسایی یرسینیا انتروکلی تیکا و سایر گونه‌های آن در عفونت‌های روده‌ای، می‌توان به درمان موفقیت آمیزی امیدوار بود (۳۰-۲۸).

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده نشان داد که ایزوله‌های محیطی یرسینیا، دارای خاصیت تهاجمی بوده و این خاصیت تهاجمی وابسته به درجه حرارت می‌باشد.

سلول‌های Hep-2 را داشتند، در حالی که سوش‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی فاقد قدرت تهاجم بودند. همین وضعیت برای سوش‌های جدا شده از نمونه‌های محیطی فرانسه (۵۰٪) نسبت به سوش‌های جدا شده از نمونه‌های محیطی ایران (۲۵٪) می‌باشد. این نتایج می‌تواند نگرانی‌هایی در خصوص نمونه‌های 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 و برولانس 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 سلول‌های هلا را مورد تهاجم قرار دادند. همچنین از توانایی نفوذ به روده خرگوش نیز برخوردار بودند (۲۲).

نتایج ما نشان داد که از ۸ سوش محیطی یرسینیا انتروکلی تیکا که از فرانسه جدا شده بود ۴ سوش خاصیت تهاجمی داشتند. در نمونه‌های ایرانی نیز از ۴ سوش یرسینیا انتروکلی تیکا که از شیر جدا شده بودند ۲ سوش مهاجم تشخیص داده شدند. بطور کلی در ۲۸ سوش که از فرانسه جدا شدند ۷ سوش محیطی و یک سوش کلینیکی مهاجم بودند. درحالی که در ۲۲ سوش ایرانی فقط ۲ سوش محیطی مهاجم بودند. ۲ سوش یرسینیا انتروکلی تیکا از ایزوله‌های محیطی فرانسه، از بیشترین قدرت تهاجمی (۳+) برخوردار بودند، بطوری که قسمت بزرگی از فضای داخل سلولی را اشغال کردند. در حالی که سایر سوش‌ها 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 مطالعه‌ای 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 بیماریزایی خود استفاده می‌کند. در این مطالعه مشخص شد که سروتیپ ۳: یرسینیا انتروکلی تیکا از قدرت بیماریزایی خیلی خفیف در عفونت‌های انسانی برخوردار است. از طرفی مشاهده گردید که سوش‌های

تشکر و قدردانی

۱۲۹۷۹ مورخ ۱۳۹۰ می باشد، که بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تشکر و قدردانی می شود.

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد

References

- 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/.
- Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ. Non – typhoidal Salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect* 2001; **3**: 237 – 247.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Krogulska B, Maleszewska J. Occurrence of bacteria of the *Yersinia* genus in surface water. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1992; **43**(3-4): 295-300.
- Cheyne BM, Van Dyke MI, Anderson WB, Huck PM. The detection of *Yersinia enterocolitica* in surface water by quantitative PCR amplification of the *ail* and *yadA* genes. *J Water Health* 2010; **8**(3): 487-499.
- 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.
- Jiang GC, Kang DH. Enrichment procedures and plating media for isolation of *Yersinia enterocolitica*. *J Food Protect* 2000; **63**: 1483-1486.
- Stern NJ, Pierson MD. *Yersinia enterocolitica*: a review of the psychotropic water and foodborne pathogen. *J Food Sci* 1979; **47**: 582- 588.
- Ibrahim A, Mac Rae IC. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from red meat and milk. *J Food Sci* 1991; **56**: 1524-1526.
- 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.
- 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.
- Soltan Dallal MM. Bacterial diarrheal infections and mechanisms of their pathogenicity. *Nabz* 1995; **5**(4): 48-52.
- 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.
- Calabi O. In vitro. Interaction of *Shigella Flexneri* with Leukocytes and Hela cells. *J Infect Dis* 1970; **122**(1): 1-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- Giannella RA, Washington O, 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.
- Small-PL, Isberg RR, Falkow S. Comparison of the ability of enter invasive *Escherichia coli*, *S. typhimurium*, *Y. pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within HEP-2 cells. *Infect-Immun* 1987; **55**(7): 1674-1679.
- Soltan Dallal MM. Enterotoxin production by *Yersinia* species at 4 and 25°C. *Acta Med Iran* 1977; **35**(3, 4): 69-73.
- Sabina Y, 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, Pietrantonio A, Antonini G, Valenti P, Conte MP, et al. Effect of bovine lactoferricin on enter pathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells. *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.

Archive of SID