

بررسی تأثیر pH و درجه حرارت محیط بر نشانگرهای ویروالانس گونه‌های

یرسینیا

دکتر محمد مهدی سلطان دلال^۱، سونیا سید امیری^۱، دکتر محمد کاظم شریفی یزدی^{۲*}

۱. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. بخش میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات زئونوز (بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: یرسینیا/انتروکلی تیکا یک باکتری گرم منفی است که سویه‌هایی از آن در ایجاد اسهال در انسان دخیل هستند. با توجه به نقش نشانگرهای ویروالانس در بیماری‌زایی و عدم اطلاع کافی در خصوص تأثیر فاکتورهای محیطی مانند pH و دما بر این نشانگرها در گونه‌های یرسینیا، این مطالعه با هدف تعیین اثر pH و دما بر نشانگرهای ویروالانس یرسینیا انجام شده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی و در طی دو مرحله روی ۱۲ سویه‌ی ویروالان و ۷ سویه‌ی غیرویروالان یرسینیا از گونه‌های انتروکلی تیکا، اینترمدیا، کریستنسنی و فردریکسنی که از منابع مختلف جدا شده بودند، انجام شد. در مرحله‌ی اول مطالعه، تأثیر pH و دما بر رشد باکتری و در مرحله‌ی دوم، تأثیر pH و دما بر مارکرهای ویروالانس با استفاده از تست‌های اتواگلوتیناسیون، وابستگی به کلسیم، کریستال ویوله، استفاده از سالیسین-اسکولین، تهاجم سلولی Hep-2 و RPMI-1640 بررسی شد.

یافته‌ها: pH و دما، هر یک به طور مستقل، بر میزان رشد باکتری‌ها مؤثر بودند، درحالی‌که تأثیر متقابل بر یکدیگر نداشتند. در ضمن، ویروالان و غیر ویروالان بودن سویه، بر میزان رشد مؤثر بود. نتایج نشان داد که دما بر ویروالانس مؤثر بوده درحالی‌که pH، تأثیری بر کاهش ویروالانس در باکتری نداشت. همچنین، ۳ آزمون کریستال ویوله، RPMI-1640 و تهاجم سلولی جهت نشان دادن خاصیت ویروالانس سویه‌های یرسینیا، همخوانی بیشتری داشتند. در ضمن، تعدادی از سویه‌ها توانسته بودند در تمامی سطوح تیماری، ویروالانس خود را حفظ کنند که این مسأله ممکن است به علت پایداری پلاسمید ویروالانس این سویه‌ها باشد. **نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده نشان داد که بر رشد باکتری، pH و دما، ولی بر ویروالانس باکتری، تنها دما تأثیر دارد.

واژگان کلیدی: یرسینیا/انتروکلی تیکا، ویروالانس، pH، دما

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Soltan Dallal MM, Seyed Amiri S, Sharifi Yazdi MK. The effect of pH and environmental temperature on the virulence factors of *Yersinia* spp. *Pejouhandeh* 2014;19(5):235-243.

مقدمه

یکی از معضلاتی که هم‌اکنون برخی از کشورها با آن درگیرند، شیوع بیماری‌های عفونی نظیر اسهال به دلیل استفاده از مواد غذایی آلوده می‌باشد. این امر هنگامی اتفاق می‌افتد که صنایع غذایی از نظر بسته‌بندی و افزودن مواد نگهدارنده، بسیار پیشرفت کرده است. شاید یکی از دلایل ظهور بیماری‌هایی نظیر یرسینیوز (Yersiniosis) نیز، همین

علت باشد (۱، ۲). در جایی که این باکتری در کنار فلور مواد غذایی جایی برای ظهور ندارد، استفاده از روش‌هایی نظیر سرماگذاری، قلیایی کردن مواد غذایی و افزودن مواد نگهدارنده باعث می‌شود فلور مواد غذایی از بین رفته و در عوض، باکتری‌های سرمادوستی نظیر یرسینیا، محیط را برای رشد و تکثیر خود مناسب ببینند (۳-۵).

در مطالعه‌ای که توسط Noble و همکارانش در سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۸۵ در کانادا انجام گرفت، محققین در طی ۴۲ ماه، ۲۱۵ نمونه‌ی مدفوع را جمع‌آوری کرده و به وسیله‌ی تکنیک غنی‌سازی در سرما و کشت، آنها را از لحاظ حضور گونه‌های یرسینیا مورد بررسی قرار دادند. از بین نمونه‌های

* نویسنده مسؤوّل مکاتبات: دکتر محمد کاظم شریفی یزدی؛ مرکز تحقیقات بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان، دانشگاه علوم پزشکی تهران؛ تلفن: ۰۲۱) ۸۸۹۹۷۰۴۹؛ پست الکترونیک: mksharifi@tums.ac.ir

و نشان دادند که تمامی ۸۰ سویه‌ی *یرسینیا انتروکلی‌تیکا* جدا شده، نسبت به جذب کونگورد و واکنش اتواگلوتیناسیون، مثبت، در حالی که تمام سویه‌های *یرسینیا کریستسنسی* جداسازی شده، نسبت به تمام مارکرهای ویروالانس انجام گرفته، منفی می‌باشند (۶). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Prpic و همکارانش در سال ۱۹۸۵ در استرالیا انجام گرفت، تعداد ۱۳۶ نمونه ایزوله *یرسینیا* شامل ۱۱۲ عدد سوش *یرسینیا انتروکلی‌تیکا*، ۱۲ عدد سوش *یرسینیا فردریکسنسی*، ۸ عدد سوش *یرسینیا اینترمدیا* و ۵ عدد سوش *یرسینیا کریستسنسی*، از لحاظ حضور فاکتورهای ویروالانس مانند جذب کونگو رد، اتواگلوتیناسیون و وابستگی به کلسیم، مورد آزمایش قرار گرفتند (۲۰).

با توجه به مهمترین راه انتقال *یرسینیا* که از طریق مواد غذایی می‌باشد و اینکه ویروالانس *یرسینیا* تحت فاکتورهای محیطی قرار دارد (۲۱، ۱۵، ۱۴) و نظر به اهمیت فاکتورهای محیطی در بروز برخی خصوصیات بیماری‌زایی میکروارگانیسم‌ها، هدف از انجام این مطالعه، تعیین تأثیر pH و دما بر نشانگرهای ویروالانس در بیماری‌زایی گونه‌های مختلف *یرسینیا* بوده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، از نوع تجربی بوده و طی دو مرحله، روی ۱۹ سویه‌ی *یرسینیا* از گونه‌های *انتروکلی‌تیکا* (۱۴)، *اینترمدیا* (۲)، *کریستسنسی* (۲) و *فردریکسنسی* (۱) که از منابع مختلف مانند شیر خام ایران ۳ نمونه (۱۵/۸)، مدفوع ایران ۳ نمونه (۱۵/۸)، سبزی‌های ایران ۲ نمونه (۱۰/۵)، مدفوع فرانسه ۵ نمونه (۲۶/۳) و آب فرانسه ۶ نمونه (۳۱/۶) جدا شده بودند، انجام شد. در مرحله‌ی اول مطالعه، تأثیر pH و دما بر رشد باکتری و در مرحله‌ی دوم، تأثیر pH و دما بر نشانگرهای ویروالانس با استفاده از تست‌های اتواگلوتیناسیون، وابستگی به کلسیم، کریستال ویوله، استفاده از سالیسین-اسکولین، تهاجم سلولی Hep-2 و RPMI-1640 بررسی شد. در کلیه‌ی مراحل آزمایش، از باکتری *E. coli* جدا شده از انسان، به عنوان شاهد استفاده گردید.

تست کریستال ویوله. ابتدا سویه‌هایی که جهت تست ویروالانس در نظر گرفته شده بودند (سویه‌های اولیه و سویه‌های تحت تیمار pH و دما)، در محیط TSB به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس با استفاده از استاندارد مک فارلند و سرم فیزیولوژی، رقتی از باکتری به میزان 10^3 cfu/ml تهیه و مقدار ۰/۱

جمع‌آوری شده، تعداد ۱۳۲ مورد از نظر وجود گونه‌ی *یرسینیا* مثبت بودند که از این تعداد، ۸۰ سویه *یرسینیا انتروکلی‌تیکا*، ۴۲ سویه *یرسینیا فردریکسنسی*، ۸ سویه *یرسینیا اینترمدیا* و ۲ سویه *یرسینیا کریستسنسی* گزارش گردید (۶).

ویروالانس (virulence)، به معنای شدت درجه‌ی بیماری‌زایی در یک گونه از باکتری بوده و به عنوان نرخ مرگ و میر و یا توانایی ارگانیزم برای حمله به بافت‌های میزبان به کار می‌رود. میکروارگانیزم‌های پاتوژن روده‌ای، با یکی از دو مکانیسم تهاجم و یا سم‌زایی (invasive and toxigenic) بیماری ایجاد می‌کنند (۷). به طور کلی، قدرت تهاجم به توانایی ارگانیزم‌های پاتوژن جهت نفوذ در بافت‌های بدن، اطلاق می‌شود. البته باید توجه داشت که هر تهاجمی، موجب بیماری‌زایی نشده و بیماری‌زایی نیز فقط از طریق تهاجم حاصل نمی‌شود. تهاجم و بیماری‌زایی در بیشتر باکتری‌ها بر پایه‌ی وجود پذیرنده‌هایی در سطح برخی از سلول‌های حیوانی و سطح باکتری‌ها بوده و این ارگانیزم‌های بیماری‌زا، از طریق همین پذیرنده‌ها به سطح سلول‌های میزبان متصل شده و بیماری‌زایی خود را نمایان می‌سازند (۹، ۸). از طرفی، *یرسینیا انتروکلی‌تیکا* قابلیت تولید سم مقاوم به حرارت (heat-stable enterotoxin-ST) همانند *شریشیا کلی* دارد که به دو زیرگروه ST1 و ST2 تقسیم می‌شود. بررسی‌های قبلی ما نشان داده است که این سم قادر است در روده‌ی بچه موش، گوانیلات سیکلاز را فعال نموده و موجب افزایش تجمع گوانین ۳ و ۵ مونوفسفات حلقوی شود (۱۰).

یرسینیا در انسان عموماً در ارتباط با بیماری‌های گاستروانتریت همانند انتریت است که شایع‌ترین علائم بالینی آن شامل تب، دردهای شکمی و اسهال است (۱۱). بیماری‌زایی *یرسینیا انتروکلی‌تیکا* تحت کنترل چند ژن کروموزومی و پلاسمیدی با سایز ۴۲-۴۴ مگادالتون است. با از دست رفتن پلاسمید، ویروالانس نیز از بین می‌رود (۱۲، ۱۳). گونه‌های مختلفی شامل انواع بیماری‌زا و غیربیماری‌زا، از مواد غذایی نظیر شیر خام، آب آشامیدنی کلرده‌ی نشده، سبزی‌های تازه و گوشت خام یا نیم‌پز و صدف‌های خام جدا شده است (۱۴-۱۶). خوک، به عنوان مهمترین منبع این باکتری در طبیعت مطرح است و به همین علت، بیماری‌های ناشی از این ارگانیزم را زئونوز (Zoonosis) می‌دانند (۱۷-۱۹).

Noble و همکارانش، نشانگرهای ویروالانس شامل رشد وابسته به کلسیم، اتواگلوتیناسیون، جذب کونگورد و اتصال به کریستال ویوله را بر این گونه‌های جداسازی شده بررسی کرده

ویروولانس فقط در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اتواگلوتیناسیون دارند و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، چنین رویدادی دیده نمی‌شود. در ضمن، سویه‌های غیر ویروولان، در هیچ‌یک از دو دما، اتواگلوتیناسیون نمی‌دهند (۲۵).

تست سالیسین و اسکولین. سویه‌های مورد آزمایش، به صورت سطحی و عمقی توسط آنس سوزنی، روی محیط اسکولین آگار کشت داده می‌شوند. همچنین، سویه‌ها به محیط سالیسین اضافه شده و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری می‌شوند. سویه‌های ویروولان معمولاً سالیسین و اسکولین منفی هستند. یعنی هیچ تغییر رنگی روی محیط مذکور دیده نمی‌شود، درحالی‌که سویه‌های غیر ویروولان، عموماً مثبت بوده و محیط سالیسین را بعد از سپری شدن مدت انکوباسیون، به رنگ زرد در می‌آورند. همچنین، با استفاده از اسکولین روی محیط اسکولین آگار، باعث آزاد شدن آهن موجود در محیط و ایجاد رسوب سیاه‌رنگ می‌شوند (۲۶).

کشت سلولی Hep-2. این روش برای بررسی تماس بین سلول‌های Hep-2 و باکتری‌ها و همچنین به حداقل رساندن باکتری‌های خارج سلولی آزمایش، طی دو مرحله‌ی متوالی، انجام گردید.

الف) مرحله‌ی عفونی نمودن سلول‌های Hep-2 ابتدا محیط کشت سلول‌های Hep-2 موجود در لوله‌های درپیچ‌دار (leighton tube) را که قبلاً تهیه شده بودند، خالی کرده و سلول‌ها با ۱/۵ میلی‌لیتر Earle's salt گرم، شستشو داده شدند. پس از چند دقیقه، آن را خالی نموده و به آن ۱/۵ میلی‌لیتر محیط مخصوص این مرحله (Infection medium) که در واقع همان MEM بدون آنتی‌بیوتیک حاوی باکتری است، اضافه گردید. سپس لوله‌ها به طور افقی به مدت ۳ ساعت در اتوکلاو ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به این ترتیب در طول ۳ ساعت، باکتری‌های مهاجم، با استفاده از قدرت تهاجمی خود، وارد سلول‌ها می‌شوند. پس از ۲ ساعت، محیط کشت سلولی که در اثر رشد باکتری‌ها، زرد رنگ شده (تغییر pH محیط)، دور ریخته و سلول‌ها چندین بار (۵ یا ۶ بار) با Earle's salt گرم، به آرامی شستشو داده شدند.

ب) مرحله رشد داخلی سلولی. پس از شستشوی سلول‌های Hep-2 با Earle's salt، یک بار دیگر سلول‌ها با ۱/۵ میلی‌لیتر محیط مخصوص مرحله‌ی ۲ یعنی محیط رشد داخلی سلول گرم، شستشو داده شده و پس از اضافه کردن ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط فوق به سلول‌های Hep-2، لوله‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به طور افقی

میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق، روی محیط BHIA پخش گردید. برای هر سویه، دو پلیت در نظر گرفته شد که یکی در دمای ۳۷ و دیگری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های بنفش، مثبت و کلنی‌های بدون رنگ، منفی در نظر گرفته می‌شدند (۲۲).

تست RPMI-1640 آگار. ابتدا سوش‌ها در محیط TSB همانند شرایط فوق، آماده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق، به کمک آنس استریل، روی محیط RPMI-1640 آگار و TSA پخش شده و سپس پلیت‌ها در دمای ۲۵ یا ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، نگهداری شدند. در محیط TSA که به عنوان شاهد به کار رفت، تمامی سویه‌های ویروولان و غیر ویروولان، کلنی‌هایی به یک اندازه (۲-۳ mm) تولید می‌کنند. در حالی‌که در محیط RPMI-1640 آگار، سویه‌های ویروولان، کلنی‌های نوک سوزنی و سویه‌های غیر ویروولان، کلنی‌های بزرگ (تقریباً هم‌اندازه‌ی کلنی‌های شکل گرفته در محیط TSA) تشکیل می‌دهند (۲۳).

تست وابستگی به کلسیم. همانند روش فوق، سوش‌ها در محیط TSB آماده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق، روی محیط BHI آگار و BHIO آگار به صورت سطحی کشت داده و سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، نگهداری شدند. سویه‌های ویروولان، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور منیزیم، به علت داشتن پلاسمید ویروولانس، در محیط فاقد کلسیم (محیط BHIO)، کلنی‌های نوک سوزنی تشکیل می‌دهند. این در حالی است که همین سویه‌ها در همان دما ولی روی محیط BHIA، به علت وجود کلسیم، کلنی‌ها بزرگ تشکیل می‌دهند. همچنین، سویه‌های غیر ویروولان، روی دو محیط BHIA و BHIO، کلنی‌های بزرگ و مشابه تشکیل می‌دهند که ناشی از عدم وابستگی رشد سلول‌های غیر ویروولان به کلسیم می‌باشد (۲۴).

تست اتواگلوتیناسیون. ابتدا سویه‌های مورد نظر، روی محیط TSA به طور مستقیم کشت داده شده و به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و یک لوله‌ی دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری و سپس سویه‌ها از نظر اتواگلوتیناسیون، مورد بررسی قرار گرفتند. در لوله‌های مثبت، مایع رویی کاملاً شفاف است ولی در انتهای لوله قطعات دلمه (فولکوله) وجود دارد که حتی با تکان دادن، در محیط حل نمی‌شوند. اما در لوله‌های منفی، مایع رویی کدر بوده و ظاهر دلمه وجود ندارد. سویه‌های

میزان رشد در pH های ۵ و ۹، کمتر و کاملاً مشابه هم بود. این روند در مورد سویه‌های ویروالان و غیر ویروالان، به طور کاملاً یکسان، مشاهده شد. تأثیر دماهای ۴، ۲۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بر میزان رشد، کاملاً متفاوت از یکدیگر بود و هر یک تأثیر خاصی روی میزان رشد داشت. اثر دما بر میزان رشد باکتری‌ها نشان داد که بیشترین میزان رشد در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و کمترین آن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفته است. سویه‌های ویروالان نیز بیشترین رشد را در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد از خود نشان دادند و به ترتیب این میزان در دماهای ۲۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، کاهش یافت. همین روند رشد، در مورد سویه‌های غیرویروالان نیز مشاهده شد. در مرحله‌ی دوم مطالعه، از هفت تست ویروالانس استفاده شد. نتایج تست کریستال ویوله و RPMI-1640 نشان‌دهنده‌ی ۱۲ سویه‌ی مثبت و ۷ سویه‌ی منفی بود. برعکس، در تست وابستگی به کلسیم، ۷ سویه‌ی مثبت و در تست اتواگلوتیناسیون، تنها یک سویه‌ی مثبت، مشخص گردید. در تست سالیسین-اسکولین، ۱۰ تست مثبت و سرانجام در تست تهاجم سلولی Hep-2، ۱۲ سویه‌ی مثبت، مشخص گردید. قدرت تهاجم به سلول در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی شد. تمامی سویه‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، منفی ولی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مثبت بودند (جدول ۱).

قرار داده شدند. در طول این مدت، باکتری‌های مهاجم که در مرحله‌ی اول وارد سلول‌های Hep-2 شده بودند، به طور داخل سلولی شروع به تکثیر نموده و فضای سلولی را پر می‌کنند. بهتر است هر یک ساعت، تغییر رنگ محیط که نشانه‌ی رشد باکتری‌های خارج سلولی است، کنترل و در صورت تغییر رنگ محیط، مجدداً سلول‌ها سه مرتبه با ۱/۵ میلی‌لیتر Earle's salt گرم شستشو داده شده و پس از آن، ۱/۵ میلی‌لیتر محیط رشد داخل سلولی، به سلول‌ها اضافه گردد. پس از سپری شدن ۴ ساعت، محیط کشت سلولی دور ریخته شد و سلول‌ها سه بار با PBS (Dublecco's) گرم به آرامی شسته و به این ترتیب، لامل حاوی سلول‌های Hep-2 آماده‌ی رنگ‌آمیزی شدند (۲۷).

بررسی میکروسکوپی لام‌های تهیه شده. لام‌ها با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰، زیر میکروسکپ بررسی شدند. چنانچه در سلول‌های Hep-2 در ۲۰ الی ۳۰ میدان دید، بیش از ۱۰ باکتری در هر میدان مشاهده شده گردد، یرسینیا انتروکلی‌تیکا مثبت در نظر گرفته می‌شود.

یافته‌ها

این مطالعه طی دو مرحله انجام گرفته است. مرحله‌ی اول شامل تأثیر pH و دماهای مختلف روی گونه‌های مختلف یرسینیا بود. بیشترین میزان رشد در pH=۷ مشاهده شد.

جدول ۱. بررسی میزان پراکندگی گونه‌های ویروالانس یرسینیا بر حسب نوع نمونه.

گونه یرسینیا								
سویه‌های غیر بومی ایران			سویه‌های بومی ایران				منبع جداسازی	
Y.f	Y.k	Y.i	Y.e	Y.f	Y.k	Y.i		Y.e
-	-	-	۳	-	-	-	۳	مدفوع انسان
-	۱	۱	۱	-	-	-	-	آب
-	-	-	-	-	-	-	-	سبزیجات
-	-	-	-	-	-	-	۳	شیر

Yersinia intermedia (Y.i), *Yersinia kristensenii* (Y.k), *Yersinia frederiksenii* (Y.f), *Yersinia enterocolitica* (Y.e)

عده‌ای نیز توانسته بودند ویروالانس خود را حفظ نمایند. جدول ۳، نشان‌دهنده‌ی سویه‌های بومی و غیربومی ویروالان تحت تیمارهای مختلف pH و دما بوده و وضعیت پایداری ویروالانس این سویه‌ها را نشان می‌دهد. اصطلاح ویروالانس کاملاً مثبت، نمایانگر سویه‌هایی است که ویروالانس خود را کاملاً حفظ کرده و اصطلاح ویروالانس کاملاً منفی، نشان‌دهنده‌ی سویه‌هایی است که ویروالانس خود را کاملاً از دست داده‌اند. در میان آزمون‌های انجام شده، سه آزمون

گونه‌های ویروالان جدا شده از مدفوع، چه بومی و چه غیر بومی، مربوط به *Y. enterocolitica* بود. همچنین، نمونه‌های شیر بومی ایران نیز از گونه‌ی انتروکلی‌تیکا بود. در حالی که گونه‌های غیربومی ویروالان از منبع آب، به سه گونه‌ی اینترمدیا، انتروکلی‌تیکا و کریستنسنی مربوط بود (جدول ۲). همانطور که پیش از این توضیح داده شد، تعدادی از سویه‌هایی که تحت تیمارهای مختلف pH و دما قرار گرفته بودند به طور کامل ویروالانس خود را از دست داده بودند ولی

کلی که به عنوان کنترل استفاده شده بود، منفی بودند. این نتیجه، اختصاصی بودن این آزمون‌ها را نسبت به سوش‌های یرسینیا نشان می‌دهد.

کریستال ویوله، RPMI-1640 و ته‌اجم سلولی، جهت نشان دادن خاصیت ویروالانس سویه‌های یرسینیا، همخوانی بیشتری دارند. همچنین، تمامی آزمون‌ها در خصوص سویه‌ی /شیریشیا

جدول ۲. نتایج حاصل از تست‌های ویروالانس در گونه‌های یرسینیا.*

سویه	نوع گونه (تعداد سویه)	منبع جداسازی	کریستال ویوله	RPMI-1640	وابستگی به کلسیم	اتواگلو تیناسیون	سالیسین / اسکولین سلولی	ته‌اجم سلولی
۱	<i>Y. enterocolitica</i> (۱۴)	نمونه‌های شیر ایران (۳) نمونه‌های مدفوع ایران (۳) نمونه‌های سبزیجات ایران (۱) نمونه‌های آب فرانسه (۳) نمونه‌های مدفوع فرانسه (۴)	+(۱۰) -(۴)	+(۱۰) -(۴)	+(۶) -(۸)	+(۰) -(۱۴)	+/+(۶) -(۸)	+(۱۰) -(۴)
۲	<i>Y. frederiksenii</i> (۱)	نمونه‌های سبزیجات ایران	-(۱)	-(۱)	-(۱)	-(۱)	+/+(۱)	-(۱)
۳	<i>Y. intermedia</i> (۲)	نمونه‌های آب فرانسه	+(۱) -(۱)	+(۱) -(۱)	+(۱) -(۱)	+(۱) -(۱)	+/+(۲) -(۱)	+(۱) -(۱)
۴	<i>Y. kristensenii</i> (۲)	نمونه‌های آب فرانسه	+(۱) -(۱)	+(۱) -(۱)	-(۲) -(۲)	-(۲)	+/(۱) +/+(۱)	+(۱) -(۱)
۵	<i>E. coli</i> (۱)	عفونت انسانی	-	-	-	-	-/-	-

* اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده‌ی تعداد است.

جدول ۳. مقایسه‌ی سویه‌های ویروالانس بومی و غیر بومی از نظر پایداری ویروالانس.

مکان جداسازی	سویه‌های بومی ایران		سویه‌های غیر بومی ایران	
	ویروالانس کاملاً مثبت	ویروالانس کاملاً منفی	ویروالانس کاملاً مثبت	ویروالانس کاملاً منفی
تعداد	۳	۲	۲	۲
درصد فراوانی	٪۲۵	٪۱۶/۶۷	٪۱۶/۶۷	٪۱۶/۶۷

بحث

در این مطالعه تلاش شد بررسی نسبتاً جامعی در ارتباط با تأثیرات pH و دما بر قدرت بیماری‌زایی یرسینیا /انتروکلی‌تیکا صورت گیرد. برای رسیدن به این هدف، مجموعه‌ای از عوامل در نظر گرفته شدند تا عمومیت این مطالعه بیشتر شود. در همین راستا، علاوه بر سویه‌ی یرسینیا /انتروکلی‌تیکا، از سایر گونه‌های یرسینیا نظیر *Y. frederiksenii*، *Y. intermedia* و *Y. kristensenii* استفاده گردید. همچنین تلاش شد این سویه‌ها از منابع مختلفی انتخاب شوند. به همین منظور، در کنار سویه‌های کلینیکی و محیطی جدا شده از نمونه‌های شیر، سبزی‌ها و مدفوع در ایران، از سویه‌های محیطی و کلینیکی سانتر بین‌المللی یرسینیا در فرانسه نیز استفاده شد.

جهت بررسی تأثیر دما و pH بر ویروالانس سویه‌های یرسینیا، ابتدا لازم بود سویه‌های ویروالانس یرسینیا مشخص شوند. برای همین منظور، از هفت تست کریستال ویوله، RPMI آگار، وابستگی به کلسیم، اتواگلو تیناسیون، سالیسین-

اسکولین و ته‌اجم سلولی Hep-2 استفاده گردید. بررسی‌های به عمل آمده نشان داد که از هفت تست ویروالانس به‌کار رفته در این مطالعه، سه تست کریستال ویوله، RPMI آگار و ته‌اجم سلولی Hep-2، بیشترین دقت و بازده را دارند.

بر اساس مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف، سویه‌هایی از یرسینیا /انتروکلی‌تیکا ویروالانس که توانایی بیمار کردن موش‌ها را در شرایط *in vivo* دارند، هنگامی که تحت شرایط آزمایشگاهی کشت و نگهداری شوند، تعدادی از شاخص‌های ویروالانس خود را از دست می‌دهند. این در حالی است که هنوز قدرت حمله به رده‌های سلولی را دارا بوده و چنانچه تحت شرایطی به حیوانات آزمایشگاهی تلقیح شوند، در بسیاری از موارد قادرند در حیوان مورد آزمایش، باعث ایجاد بیماری شوند (۲۹،۲۸). همچنین محققین بر این باورند که عوامل و شاخص‌های متعددی در ویروالانس یرسینیا انتروکلی‌تیکا مؤثر است که تعدادی از آنها تحت کنترل پلاسمید ویروالانس و تعداد دیگری، تحت کنترل کروموزوم

بر رشد و ویروالانس باکتری نشان داد که یرسینیا قادر است محدوده‌ی دمایی بین ۴ تا ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد را به خوبی تحمل نماید، ولی بهترین دمای رشد برای این باکتری، در محدوده‌ی ۲۵ تا ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داشت. همچنین این ارگانیزم، نسبت به سرما مقاومت خوبی از خود نشان می‌دهد، به نحوی که یکی از راه‌های مهم جداسازی آن، غنی‌سازی در سرما می‌باشد (۵، ۳۰، ۳۱). محققین معتقدند درجه‌ی بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشای یرسینیا /*انتروکلی‌تیکا* مهم‌ترین فاکتور مؤثر در سازش این باکتری به محیط‌های سرد می‌باشد (۳۱). نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، مطالب بالا را تأیید می‌کند، هر چند از آنجا که هدف اصلی این مطالعه، بررسی تأثیر pH و دما بر ویروالانس باکتری بود، ناگزیر مدت انکوباسیون در این مطالعه، یکسان در نظر گرفته نشد. اما نتایج نشان داد که دما بر میزان رشد، کاملاً مؤثر بوده به نحوی که دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای رشد یرسینیا مناسب‌تر از دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بوده و باکتری در این دما، در شرایط بهینه (*optimum*) رشد خود از نظر دمایی قرار دارد. همچنین، افزایش جمعیت یرسینیا در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، مؤید سرمادوست بودن این باکتری است، به نحوی که در این دما (البته بدون در نظر گرفتن مدت انکوباسیون) بیشترین میزان رشد را می‌توان مشاهده کرد.

مطالعات متعددی بیانگر توانایی رشد و بقای یرسینیا /*انتروکلی‌تیکا* در pH های شدید بوده و نشان می‌دهند که این باکتری در pH=۹/۶ تا pH=۴/۶ قادر به رشد است و در pH=۷/۲ در بهترین و سریع‌ترین شرایط رشد قرار دارد. البته، pH های به شدت اسیدی یا قلیایی، به طور فزاینده‌ای اثر مهاری بر رشد باکتری داشته و باعث طولانی‌تر شدن lag فاز و در نتیجه، کاهش سرعت رشد می‌شود (۳۱، ۳۲). بهترین pH برای رشد باکتری، pH=۷ می‌باشد به نحوی که در این pH، بیشترین مقدار رشد میکروبی مشاهده می‌شود. همچنین، تأثیر این pH در هر سه دمای ۴، ۲۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد یکسان است. به عبارت دیگر، بیشترین میزان رشد در این سه دما، مربوط به pH=۷ می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد تأثیر pH های ۵ و ۹ روی رشد باکتری تقریباً مشابه بوده و این دو pH نسبت به pH=۷، اثر مهاری بر رشد داشته و جمعیت باکتریایی در این دو pH به طور محسوسی، کمتر از pH=۷ می‌باشد. لازم به ذکر است میزان رشد در pH=۹ در دو دمای ۲۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، بیشتر از pH=۵ در هر یک از این دو دما است. این

باکتری هستند. با این وجود، اهمیت تمامی آنها به یک اندازه نیست. بر این اساس، تست‌های مختلف آزمایشگاهی برای تشخیص این شاخص‌ها و در نتیجه، تشخیص ویروالانس باکتری، ابداع شده است (۲۶-۲۲). در همین ارتباط، مشخص شده است که سوش‌های مثبت از نظر حمله به سلول‌های Hep-2، دارای خاصیت اتواگلوتیناسیون و وابستگی به کلسیم در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشند. همچنین، مشاهده شده است که با کاهش خاصیت ویروالانس که ممکن است با نگهداری سویه در محیط‌های مصنوعی حاصل شود، تست‌های اتواگلوتیناسیون و وابستگی به کلسیم، منفی می‌شود، درحالی‌که باکتری هنوز قادر به تهاجم به سلول‌های Hep-2 می‌باشد. بر همین اساس، رویداد ویروالانس در این باکتری، پیچیده بوده و تحت عوامل مختلفی کنترل می‌شود (۲۴، ۲۵، ۲۷).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تست اتواگلوتیناسیون در تمامی موارد (به جز یک سویه از *Y. enterocolitica* به صورت مثبت کاذب) علی‌رغم اینکه از روش‌های متعددی استفاده گردید، منفی می‌باشد. همچنین، تست وابستگی به کلسیم نیز حساسیت سه تست انتخابی کریستال ویوله، RPMI آگار و تهاجم سلولی را نداشت. دلیل این مسأله را با توجه به مطالعات سایر محققین، شاید بتوان در نگهداری سویه‌ها روی محیط‌های مصنوعی دانست که موجب از بین رفتن تعدادی از شاخص‌های ویروالانس باکتری شده است. در این میان، تست سالیسین-اسکولین در مقایسه با دو تست اتواگلوتیناسیون و وابستگی به کلسیم، از حساسیت بیشتری برخوردار بوده و در ۶۳٪ موارد، با سه تست انتخابی ما تطابق دارد، اما از آنجا که در حدود ۳۷٪ نتایج آن، با تست‌های انتخابی ما تفاوت داشت، ترجیحاً در استفاده از آن دچار محدودیت شدیم. لازم به ذکر است این تست در مورد سویه‌های ویروالانی که تست اتواگلوتیناسیون آنها منفی است، از حساسیت و کاربرد بیشتری برخوردار است (۲۶).

با توجه به مطالب فوق، از بین ۱۹ سویه‌ای که مورد آزمون‌های مختلف ویروالانس قرار گرفتند، ۷ سویه غیر ویروالان و ۱۲ سویه، ویروالان تشخیص داده شد. از بین ۱۲ سویه‌ی ویروالان، تعداد ۶ سویه متعلق به سویه‌های بومی و مابقی، متعلق به سویه‌های غیربومی بود. همچنین، سویه‌های بومی ویروالان، از منابعی نظیر شیر و مدفوع جدا شده بودند در حالی که سویه‌های ویروالان غیربومی، از منشأ آب و مدفوع بودند.

در این مطالعه، نتایج مربوط به تأثیر دما و pH های مختلف

بین سویه‌هایی که به طور کامل ویروالانس خود را حفظ کرده بودند، ۳ سویه متعلق به منبع مدفوع انسان جدا شده در ایران و ۲ سویه‌ی دیگر، مربوط به نمونه‌ی جدا شده از آب فرانسه می‌باشد. همچنین، در بین سویه‌هایی که به طور کامل ویروالانس خود را از دست داده بودند، دو سویه متعلق به نمونه‌های شیر جدا شده در ایران و دو مورد مربوط به نمونه‌های جدا شده در فرانسه می‌باشد.

لازم به ذکر است که با وجود عدم تأثیر pH در تغییر ویروالانس، در یک مورد در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH=۷ (که شرایط بهینه‌ی رشد یرسینیا می‌باشد)، تعداد سویه‌هایی که ویروالانس خود را حفظ کرده بودند، بیشتر بود. البته برای تأیید بیشتر این مطلب، لازم است که سویه‌های بسیار بیشتری مورد بررسی قرار گیرند تا به طور مشخص در این مورد خاص (حفظ ویروالانس در pH و دمای بهینه) بتوان نتیجه‌گیری کرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، عوامل متعددی از جمله دمای محیط بر شاخص‌های ویروالانس یرسینیا/تتروکلی‌تیکا مؤثر است به طوری که سویه‌های ویروالان، به دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بسیار حساس بوده و در این دما نسبت به دماهای پایین‌تر، ویروالانس خود را به راحتی از دست می‌دهند. اما نباید فراموش کرد که دما، تنها عامل مؤثر بر تغییرات ویروالانس نیست. هرچند در این مطالعه، فقط تأثیر pH و دما بر ویروالانس یرسینیا مورد بررسی قرار گرفت، اما چون برخی سویه‌ها در هیچ سطح تیماری، ویروالانس خود را از دست ندادند، می‌توان نتیجه گرفت که این سویه دارای پلاسمید ویروالانس پایدارتری بوده و بنابراین عوامل ژنتیکی را نیز می‌توان در پایداری ویروالانس مؤثر دانست.

تشکر و قدردانی

این مقاله، نتیجه‌ی طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تهران، به شماره قرارداد ۲۰۳۵۷ مورخ ۹۱/۴/۱۶ می‌باشد. بدین‌وسیله، نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه جهت تقبل هزینه‌های طرح، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

در حالی است که در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، میزان رشد در pH=۵ بیشتر از pH=۹ است. باید توجه داشت که الگوی ارایه شده در مورد دما و pH در هر دو گروه از سویه‌های ویروالان و غیر ویروالان، مشابه است.

همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد، این مطالعه طی دو فاز انجام گرفت. به این ترتیب که در فاز اول، از ۱۹ سویه ویروالان و غیر ویروالان استفاده شد و اثرات دما و pH های مختلف روی این سویه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. در فاز دوم، فقط از ۱۲ سویه ویروالان استفاده شد و تأثیر pH و دما بر پایداری ویروالانس، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دما، روی پایداری ویروالانس کاملاً مؤثر است، درحالی‌که تغییرات pH بر پایداری ویروالانس، اثر قابل توجهی ندارد. این یافته، با نتایج حاصل از سایر مطالعات همخوانی دارد (۳۳،۳۲). مطالعات نشان می‌دهند، ویروالانس در یرسینیا/تتروکلی‌تیکا، یک رویداد پیچیده بوده و عوامل متعددی در ایجاد آن مؤثرند. همچنین، مشخص شده است که دما در ظهور شاخص‌های ویروالانس، بسیار مؤثر است. به عنوان مثال، پروتئین‌هایی تحت عنوان YOPs، فقط در دمای بالای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تولید می‌شوند و همراه با تولید این پروتئین‌ها، سلول با محدودیت شدید در رشد مواجه می‌گردد (۳۴). همچنین گزارش شده است که کشت سویه‌های ویروالان در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و نگهداری طولانی آنها، می‌تواند باعث از بین رفتن پلاسمید ویروالانس و در نتیجه، از بین رفتن ویروالانس باکتری شود (۳۱). بررسی دقیق‌تر نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان از دست رفتن ویروالانس، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد رخ می‌دهد. این مسأله در pH های به‌کار رفته در این دما، کاملاً مشابه است. همچنین، کمترین تأثیر در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بوده و دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نیز تقریباً مشابه دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد است. به عبارت دیگر، تعداد از دست دادن ویروالانس در دماهای ۴ و ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، به نسبت بالایی، مشابه است.

در حدود ۴۱٪ سویه‌ها توانسته بودند به طور کامل ویروالانس خود را حفظ کنند درحالی‌که ۳۳٪ سویه‌ها، به طور کامل، ویروالانس خود را از دست داده بودند. در این میان، ۲۴٪ سویه‌ها در برخی سطوح تیماری، ویروالانس خود را حفظ و در سایر سطوح، ویروالانس خود را از دست داده بودند. در

REFERENCES

1. Soltan Dallal MM, Sharifi Yazdi Mk, Mirzaei N, Kalantar E. Prevalence of Salmonella spp. in packed and unpacked red meat and chicken in south of Tehran. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(4): e9254.

2. Soltan Dallal MM, Vahedi S, Zeraati H, Bakhtiari R, Salsali M, Norooz Babaei H, *et al.* The comparison of the prevalence rate of microbial contamination for packed and unpacked red meat and chicken's meat in retailers and department stores in south of Tehran. *J Yazd Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2007; 15(1): 35-43.
3. Andersen JK, Sørensen R, Glensbjerg M. Aspects of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. *Int J Food Microbiol* 1991; 13(3): 231-7.
4. Ananchaipattana C, Hosotani Y, Kawasaki S, Pongsawat S, Latiful BM, Isobe S, *et al.* Prevalence of foodborne pathogens in retailed foods in Thailand. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9(9): 835-40.
5. Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(2): 220-9.
6. Noble MA, Barteluk R, Freeman H, Subramaniam R, Hudson J. Clinical significance of virulence-related assay of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 1987; 25(5): 802-7.
7. Soltan Dallal MM. Bacterial diarrheal infections and mechanisms of their pathogenicity. *Nabz* 1995; 5(4): 48-52.
8. Uliczka F, Pisano F, Schaake J, Stolz T, Rohde M, Fruth A, *et al.* Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis. *PLoS Pathog* 2011; 7(7): e1002117. doi:10.1371/journal.ppat.1002117.
9. Heise T, Dersch P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(9): 3375-80.
10. Soltan Dallal MM, Gean JL. Production and purification of heat-stable (ST) enterotoxin of *Yersinia enterocolitica*. *Tehran Univ Med J* 1998; 56(1): 9-16.
11. Soltan-Dallal MM, Moezardalan K. Frequency of *Yersinia* species infection in paediatric acute diarrhoea in Tehran. *East Mediterr Health J* 2004; 10(1-2): 152-8.
12. Mäki M, Vesikari T, Rantala I, Sundqvist C, Grönroos P. Pathogenicity of 42-44 Mdal plasmid positive and negative *Yersinia pseudotuberculosis* I and *Yersinia enterocolitica* O:8 and O:9 studied in the guinea pig eye model (Serény test). *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*. 1983; 91(4): 241-4.
13. Miliotis MD, Morris JG Jr, Cianciosi S, Wright AC, Wood PK, Robins-Browne RM. Identification of a conjunctivitis-associated gene locus from the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1990; 58(8): 2470-7.
14. 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(1): 87-91.
15. Quaglio P, Aggazzotti G, Fabio A, Messi P, Mantovani G. Presence of bacteria belonging to the genus *Yersinia* in surface and ground water. *Ann Ig* 1989; 1(1-2): 157-64.
16. Määttä J, Lehto M, Kuisma R, Kymäläinen HR, Mäki M. Microbiological quality of fresh-cut carrots and process waters. *J Food Prot* 2013; 76(7): 1240-4.
17. Van Damme I, Berkvens D, De Zutter L. Effect of sampling and short isolation methodologies on the recovery of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig tonsils. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9(7): 600-6.
18. Fondrevez M, Labbé A, Houard E, Fravalo P, Madec F, Denis M. A simplified method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pig tonsils. *J Microbiol Methods* 2010; 83(2): 244-9.
19. Van Damme I, Habib I, De Zutter L. *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. *Food Microbiol* 2010; 27(1): 158-61.
20. Prpic JK, Robins-Browne R, Davey RB. *In vitro* assessment of virulence in *Yersinia enterocolitica* and related species. *J Clin Microbiol* 1985; 22(1): 105-10.
21. Campioni F, Falcão JP. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. *APMIS* 2014; 122(3): 215-22.
22. Madan L, Kaur H, Gupta LK, Sharma P. Are crystal violet binding and plasmid detection indicators of virulence in *Yersinia enterocolitica*? *Indian J Pathol Microbiol* 2005; 48(3): 423-4.
23. Mazigh D, Alonso JM, Mollaret HH. Simple method for demonstration of differential colony morphology of plasmid-associated virulent clones of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1983; 17(3): 555-7.
24. Falcão JP, Falcão DP, Pitondo-Silva A, Malaspina AC, Brocchi M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt 11): 1539-48.
25. Schütz M, Weiss EM, Schindler M, Hallström T, Zipfel PF, Linke D, *et al.* Trimer stability of YadA is critical for virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 2010; 78(6): 2677-90.
26. Farmer JJ 3rd, Carter GP, Miller VL, Falkow S, Wachsmuth IK. Pyrazinamidase, CR-MOX agar, salicin fermentation-esculin hydrolysis, and D-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1992; 30(10): 2589-94.

27. Grant T, Bennett-Wood V, Robins-Browne RM. Characterization of the interaction between *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and phagocytes and epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 1999; 67(9): 4367-75.
28. Schiemann DA, Devenish JA. Invasiveness and cytotoxicity as criteria in assessing *Yersinia* attenuation. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1988; (9): 10-6.
29. Igumbor EO, Ogbimi AO, Agbonlahor DE, Obi CL. Evaluation of the pathogenicity and virulence of *Yersinia* species isolated in Edo and Delta States of Nigeria. *East Afr Med J* 1993; 70(12): 803-6.
30. Soltan Dallal MM, Bakhtiari R, Amin Harati F, Sharifi Yazdi MK. The Effect of temperature in invasive properties of *Yersinia* species isolated from human and non-human sources. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2013; 35(5): 48-57.
31. Goverde RL, Kusters JG, Huis in 't Veld JH. Growth rate and physiology of *Yersinia enterocolitica*; influence of temperature and presence of the virulence plasmid. *J Appl Bacteriol* 1994; 77(1): 96-104.
32. Palonen E, Lindström M, Korkeala H. Adaptation of enteropathogenic *Yersinia* to low growth temperature. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36(1): 54-67.
33. Bhagat N, Viridi JS. Molecular and biochemical characterization of urease and survival of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A in acidic pH in vitro. *BMC Microbiol* 2009; 9: 262. doi: 10.1186/1471-2180-9-262.
34. Białas N, Kasperkiewicz K, Radziejewska-Lebrecht J, Skurnik M. Bacterial cell surface structures in *Yersinia enterocolitica*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012; 60(3): 199-209.