مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۱ شماره ۲ زمستان ۱۳۸۶، ۱۰-۵

بررسی روشهای تشخیصی یرسینیا انترو کلی تیکا

دکتر محمدمهدی سلطان دلال[۱]*، دکتر محمدرضا خرمی زاده[۲]، فریبا متین[۳]، دکتر سعید اشراقی[٤]، صدیقه جدیدی[۵]، آذر برهمه[۶]، روناک بختیاری[۷]، فاطمه صابرپور[۸]، سیده زهرا روحانی رانکوهی[۹]

چکیده

زمینه و هدف: *یرسینیا انتروکلی تیکا یک باکتری گرم منفی است که سویه هایی از آن در ایجاد بیماری در انسان دخیل هستند . جهت افتراق انواع بیماریزای این باکتری از غیر بیماریزا، از تستهایی از قبیل جذب کنگو رد، کریستال ویوله و تست وابستگی به کلسیم استفاده می شود. این تستها بر مبنای وجود پلاسمید ۷۵-۷۰ کیلو دالتونی است، که به علت عدم پایداری پلاسمید گاهاً نتایج منفی کاذب حاصل می شود. لذا راه اندازی روشی بر مبنای وجود ژنهای کروموزومی عامل بیماریزایی که پایدار هستند، می تواند این مشکل را برطرف نماید. این بررسی با هدف مقایسه روشهای تشخیصی معمولی و مولکولی در شناسایی سویه های بیماریزای یرسینیا انتر و کلی تیکا انجام شده است .*

روش بررسی: *در این بررسی از ۱۳ سوش میکربی شامل ۳ سوش از گونه های شیگلا فلکسنری، سالمونلا تایفی، وپروتئوس میرابلیس و۱۰ سوش یرسینیا آنتروکلی تیکا شامل ۴ سوش از منابع محیطی آب و ۵ سوش از نمونه مدفوع انسانی و یک سوش کنترل استفاده گردید. در این بررسی جهت تشخیص سریع و دقیق یرسینیا آنتروکلی تیکا، روش **PCR** با هدف قراردادن ژن کروموزومی**ail** به کار برده شده است.*

یافته ها: *نتایج تمامی واکنشهای بیوشیمیایی مانند قابلیت تخمیر قند گلوکز بدون تولید گاز، حرکت مثبت در ۲۵ درجه سانتیگراد و منفی در ۳۷ درجه سانتیگراد، اوره مثبت، **ODC** مثبت، **ONPG** مثبت، تخمیر لاکتوز منفی و تستهای **LDC , ADH , SH2** منفی، موید یرسینیاانتروکلی تیکا بودن سویه های مورد بررسی بوده است.*

*نتایج حاصل از**PCR** ژنوم باکتریهای مورد استفاده پس از ژل الکتروفورز محصولات **PCR** به دست آمده از سوشهای مورد استفاده در مجموع ٤ سوش یرسینیا آنتروکلی تیکا انسانی، **PCR** مثبت داشتند . در حالی که هیچ باندی در الکتروفورز نمونه های شیگلا، سالمونلا، پروتئوس و یرسینیاهای محیطی مشاهده نگردید، علاوه بر این با نمونه بدون **DNA** هیچ باندی دیده نشد که نمایانگر عدم آلودگی است.*

نتیجه گیری: *نتایج به دست آمده نشان داد که اغلب سویه های بیماریزای یرسینیا آنتروکلی تیکا ی انسانی مورد مطالعه دارای ژن **ail** هستند.*

واژه های کلیدی : *یرسینیا انتر و کلی تیکا، بیماریزایی، **PCR**، ژن **ail***

* نویسنده مسئول :
دکتر محمد مهدی سلطان دلال؛ دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
email:
Soltan D @ sina. tums .ac. ir

- دریافت مقاله : آذر ماه ۱۳۸۶ - پذیرش مقاله : بهمن ماه ۱۳۸۶

مقدمه

یرسینیا انتروکلی تیکا یکی از باکتریهای روده ای است که انتشار وسیعی در محیط و مواد غذایی دارد (۱).

عفونت ناشی از یرسینیا انتروکلی تیکا شامل طیف وسیعی از علائم است و از گاستروانتریت خود محدود شونده، تا گرفتاریهای جدی تر از قبیل آرتریت راکتیو را شامل می شود (۳و۲).

از میان ۷۰-۶۰ سروتایپ یرسینیا انتروکلی تیکای شناخته شده تنها تعداد کمی از آنها از جمله سروتایپهای**O:5/27 , O:8 , O:9 , O:3** با بیماری در انسان ارتباط دارند، و از آنجایی که این باکتری به عنوان یک پاتوژن منتقله از طریق مواد غذایی از نظر

[۱] استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] کارشناس ارشد گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۴] دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵] کارشناس ارشد گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۶] کارشناس گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۷] کارشناس گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۸] کارشناس ارشد گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۹] کارشناس گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

اقتصادی و بهداشت عمومی حائز اهمیت است، توانایی تشخیص سویه های بیماریزا از غیر بیماریزا اهمیت زیادی در کنترل این پاتوژن در مواد غذایی دارد (۵ و۴).

روشهای سنتی تشخیص یرسینیا انتروکلی تیکا قادر به تفکیک انواع بیماریزا و غیر بیماری زا از یکدیگر نیست (۶). با توجه به اینکه **PCR** یک روش تشخیصی مناسب در شناسایی میکروبهای مختلف از جمله یرسینیا انتر و کلی تیکا در غذا و حیوانات است، با به کارگیری این روش با هدف قرار دادن ژنهای دخیل در بیماریزایی می توان انواع بیماریزا را از غیربیماریزا شناسایی نمود (۸ و۷).

یکی از ژنهای کروموزومی مسئول بیماریزایی ژن **ail (attachment invasion locus)** است. پروتئین حاصل از آن یعنی پروتئین **Ail** در اتصال و نفوذ به سلول و مقاومت به خاصیت ضدمیکروبی سرم دخالت دارد و توالی کامل آن تنها در سویه های بیماریزا یافت می شود (۸ و۹). در این تحقیق به بررسی کارایی**PCR** با هدف قرار دادن ژن کروموزومی**ail** در تشخیص یرسینیا انتروکلی تیکای بیماریزا پرداخته شده است .

روش بررسی

در این بررسی از ۱۳ سوش میکروبی شامل ۳ سوش از گونه های شیگلا فلکسنری، سالمونلا تایفی، و پروتئوس میرابیلیس و ۱۰ سوش یرسینیا انتروکلی تیکا شامل **4** سوش از منابع محیطی آب رودخانه های مناطق کن و جاجرود با سروتایپهای **0:6/30**، **0:7/13**، **0:7/8/19**، **0:7/13** و ۵ سوش ازنمونه های مدفوع کودکان مبتلا به گاسترو آنتریت با سروتایپهای **0:5**، **0:1/2/3**، **0:21**، **0:8**، **0:9** که قبلاً جدا شده بود و ۱ سوش یرسینیا آنتروکلی تیکا با سروتایپ **0:9** به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

تمامی سوشهای یرسینیا از نظر واکنشهای اکسیداز، اندول، اوره، تخمیر گلوکز، تخمیر لاکتوز، تولید گاز، حرکت در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد **SH2 , ODC , ONPG LDC , ADH** مورد ارزیابی قرار گرفتند.

کلیه سوشهای یرسینیایی مورد مطالعه ابتدا در محیط **BHI** براث به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند، سپس یک لوپ از محیط مایع کدر شده بر روی محیط**CIN** آگار انتقال داده شد. سایر سوشها بر روی محیط**BHI** براث و در مرحله بعد بر روی محیط هکتون آگار کشت داده شد.

PCR : این تکنیک جهت شناسایی یک قطعه ۲۵۰ بازی، روی ژن کروموزومی**ail** بکار گرفته شد. **DNA** به روش**Becunano/1994** (۱۰) جداسازی و تا زمان انجام **PCR** در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. **PCR** در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر در لوله های اپندورف نیم میلی لیتری با ترکیب : آب دیونیزه دوبار تقطیر به میزان ۳۵ میکرو لیتر، بافر**PCP(10X)** به میزان ۵ میکرولیتر، **dNTPs(10mM)** یک میکرولیتر، پرایمرهای فرادست با سکانس **5'- GAA CTC GAT GAT ACC TGG GGA – 3'** و فرودست با سکانس **5'-CTG CCC CGT ATG CCA TTG-3'** از ذخیره **(20pm)** هر یک، یک میکرولیتر، **DNA** استخراج شده (با غلظت تقریبی یک میکروگرم بر میکرولیتر) به میزان ۵ میکرولیتر و آنزیم **Taq** پلیمراز (۵ یونیت بر میکرولیتر) به میزان ۰/۲ میکرولیتر با برنامه: ۹۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۶۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه، و ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه در ۳۶ سیکل انجام گرفت. محصول **PCR** با استفاده از الکتروفورزژل آگارز شناسایی گردید.

در واکنش **PCR** به عنوان کنترل مثبت از سوش یرسینیا انتروکلی تیکا سروتایپ **O:9** و به عنوان کنترل منفی از آب دیونیزه دوبار تقطیر استفاده شد.

جهت شناسایی باند ایجاد شده از سایز مارکر شماره ۸ و ۹ شرکت **Roche** استفاده شد . علاوه بر این جهت کنترل ویژگی، **DNA** شیگلا، سالمونلا و پروتئوس مورد استفاده قرار گرفت.

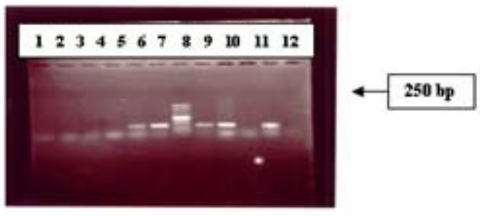
یافته ها

- نتایج حاصل از واکنشهای بیوشیمیایی

نتایج تمامی واکنشهای بیوشیمیایی انجام شده بر روی سوشهای یرسینیا انتروکلی تیکا موید آنها بود. به عبارتی قابلیت تخمیر قند گلوکز بدون تولید گاز، حرکت مثبت در ۲۵ درجه سانتیگراد و منفی در ۳۷ درجه سانتیگراد، اوره مثبت، **ODC** مثبت، **ONPG** مثبت، تخمیر لاکتوز منفی و تستهای **LDC , ADH , SH2** , منفی بودند.

- نتایج حاصل ازPCR ژنوم باکتریهای مورد استفاده

پس از ژل الکتروفورز محصولات **PCR** به دست آمده از سوشهای مورد استفاده در مجموع فقط ۴ سوش با منشاء انسانی **PCR** مشابه با سوش کنترل مثبت داشتند، در حالی که هیچ باندی در الکتروفورز نمونه های شیگلا، سالمونلا، پروتئوس و یرسینیاهای محیطی مشاهده نگردید، علاوه بر این با نمونه بدون **DNA** هیچ باندی دیده نشد که نمایانگر عدم آلودگی است. شکل ۱ باندهای حاصل از موارد مثبت را نشان می دهد.



شکل ۱ : ژل حاصل از الکتروفورز محصولات **PCR**
(نتایج **PCR** زنوم باکتریهای یرسینیایی)

۱- یرسینیا انتروکلی تیکا **O:7/13** (نمونه محیطی)
۲- یرسینیا انتروکلی تیکا **O:6/30** (نمونه محیطی)
۳- یرسینیا انتروکلی تیکا **O:7/8/19** (نمونه محیطی)
۴- یرسینیا انتروکلی تیکا **O:5** (نمونه انسانی)
۵- یرسینیا انتروکلی تیکا **O:1/2/3** (نمونه انسانی)
۶- یرسینیا انتروکلی تیکا **O:21** (نمونه انسانی)
۷- سایز مارکر **VIII**
۸- یرسینیا انتروکلی تیکا **O:8** (نمونه انسانی)
۹- یرسینیا انتروکلی تیکا **O:9** (نمونه انسانی)
۱۰-یرسینیا انتروکلی تیکا **O:7/13** (نمونه محیطی)
۱۱- کنترل مثبت (سوش**O:9**)
۱۲- کنترل منفی (آب دوبار تقطیر)

بحث

باکتری یرسینیا انتروکلی تیکا یکی از عوامل مهم بیماریزای دستگاه گوارش است و عفونت با این باکتری اغلب باعث انتروکولیت می شود. هر چند در اغلب مواقع علائم می تواند به صورت یک شکم درد خود محدود شونده باشد ولی اشکال خارج روده ای شامل آبسه های طحال، کوله سیستیت و سپتی سمی با ۵۰ درصد مرگ و میر در افراد دارای نقص ایمنی گزارش شده است (۱۱،۴).

این باکتری امروزه به عنوان یک پاتوژن منتقله از طریق مواد غذایی برای انسان حائز اهمیت است. از طرف دیگر از میان ۷۰-۶۰ سروتایپ شناخته شده تنها تعداد اندکی سروتایپ در ایجاد بیماری در انسان دخیل هستند. لذا تفکیک انواع بیماریزا از غیر بیماریزا جهت کنترل این پاتوژن در موادغذایی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۲،۱۳).

جهت تفکیک انواع بیماریزا از غیربیماریزا تاکنون روشهایی پیشنهاد شده است، در این راستا صرف نظر از روشهای **in vitro** (کریستال ویوله، کنگو رد، وابستگی به کلسیم) و روشهای **in vivo** (بررسی

ویرولانس با ایجاد کونژوکتیویت در خوکچه هندی **(Sereny test)** و تزریق آنتروتوکسین باکتری به موش بالغ و موش شیر خوار و بررسی تغیرات ایجاد شده)، که مشکل و طولانی بودن آن محرز است، جهت بررسی بیماریزایی یرسینیا انتروکلی تیکا پیشنهاد شده است (۱۵،۱۴،۹).

بدیهی است که این تستها براساس فاکتورهای بیماریزای یرسینیا انتروکلی تیکا است . فاکتورهای بیماریزای این باکتری به دو دسته پلاسمیدی و کروموزومی تقسیم می شوند. تستهایی از قبیل جذب کریستال ویوله و کنگو رد و وابستگی به کلسیم از جمله تستهایی هستند که براساس وجود پلاسمید ۴۵-۴۰ مگا دالتونی عامل بیماریزای یرسینیا کلی تیکا استوار است. در بررسی که **Bhaduir** در سال ۱۹۸۶ انجام داد، کلیه نمونه های دارای پلاسمید مذکور جذب کریستال ویوله مثبت داشتند و جذب کریستال ویوله برای سویه های فاقد این پلاسمید منفی بود(۱۶). بررسی دیگری که در سال ۱۹۹۱ توسط **Bhaduri** انجام شد، جذب کنگو رد مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی نیز نشان نهایی حاوی پلاسمید در محیط حاوی کنگو رد با جذب کنگو رد کلنی های قرمز ایجاد نمودند و سویه هایی که فاقد پلاسمید مذکور بودند، کلنی های روشن (سفید یا نارنجی) در سایز بزرگتر ایجاد نمودند(۱۷). همچنین در این بررسی نشان داده شد بر روی محیط **BHI** با غلظت پایین کلسیم، سویه های حاوی پلاسمید، کلنی های سفید یا نارنجی روشن در سایز کوچک و استرینهای فاقد پلاسمید، همچنین کلنی ها را در سایز بزرگ ایجاد می کنند .

اشکال اینگونه تستها چه بررسی مستقیم پلاسمید و چه بررسی آن از طریق جذب کریستال ویوله و کنگو رد و یا تست وابستگی به کلسیم، آن است که پلاسمید در کشتهای مکرر از بین می رود و پاسخ شبیه سویه های غیربیماریزا می شود(۷).

در بررسی های انجام یافته نشان داده شده که ژن پلاسمید در کشتهای مکرر از بین رفته و خصوصیات بیماریزایی باکتری پس از مدتی قابل شناسایی نیستند، در حالیکه خصوصیاتی که مرتبط با ژن کروموزومی هستند حتی پس از گذشت زمان و کشتهای مکرر از بین نرفته و پایدار باقی می مانند.

چنانچه در بررسی که توسط **Burton** در سال ۱۹۹۵ انجام شد از ۴۵ مورد یرسینیا انتروکلی تیکای بیماریزا همه موارد توسط متد **PCR** که از ژن کروموزومی **ail** به عنوان هدف استفاده شده بود، شناسایی شدند ولی در استفاده از ژن پلاسمیدی **yadA** تنها ۳۹ مورد جواب مثبت داشتند(۱۸).

همچنین در بررسی **Thisted Lambertz** در سال ۱۹۹۱، از ۹ سویه یرسینیا انتروکلی تیکای بیماریزا که توسط متد **PCR** با استفاده از ژن کروموزومی **ail** به عنوان هدف شناسایی شده بود، تنها ۴ مورد با به کارگیری ژن پلاسمیدی **virF** شناسایی شدند(۷).

بنابراین بررسی فاکتور بیماریزای ثابت یعنی کروموزوم باکتری در مقایسه با پلاسمید ارجحیت دارد . ژنهای مختلف کروموزومی توسط باکتری شناسان در متد **PCR** به عنوان هدف مورد استفاده قرار گرفته اند. به طورمثال ژن **ail** توسط **Thisted Lambertz, Burton, Harnett, Jourdan** به کار برده شده است (۲۰،۱۹،۱۸،۷). از ژن **rfbc** جهت تشخیص سروتایپ **O:3** استفاده شده است (۲۱) و ژن **yst** نیز برای خاصیت توکسین زایی باکتری مورد استفاده قرار گرفته است (۲۲). ژن **ail** پروتئین **Ail** را کد می کند، که در چسبیدن و تهاجم باکتری نقش دارد و همچنین سبب مقاومت سرمی می شود . این ژن تنها در سویه های بیماریزای یرسینیا انتروکلی تیکا

وجود دارد . لذا جهت تحقیق حاضر این ژن به عنوان هدف مورد استفاده قرار گرفت(۱۵،۹).

با توجه به نتایج حاصل از **PCR** مشاهده شد که سویه های بیماریزای یرسینیا انتروکلی تیکا یعنی سروتایپهای **O:1/2/3, O:21 , O:8 , O:9** تشکیل باند مربوط را در ژل الکتروفورز دادند و **PCR** آنها مثبت شد و سروتایپ **O:5** دارای **PCR** منفی بود، ضمن اینکه هیچ یک از یرسینیا انتروکلی تیکاهای غیربیماریزا تشکیل باند فوق را ندادند. همچنین هیچ یک از سه باکتری مورد استفاده به عنوان کنترل (شیگلا، سالمونلا و پروتئوس) **PCR** مثبت نداشتند .

نتایج فوق کاملاً منطبق بر نتایج حاصل از کار **Burton** در سال ۱۹۹۵ است (۱۸). به طوری که در بررسی آنها نیز سروتایپهای **O:1/2/3 , O:8 , O:9 , O:21** دارای **PCR** مثبت و سروتایپهای **O:7/8 , O:5** دارای **PCR** منفی بودند. نتایج این بررسی ها نشان می دهد که حضور ژن **ail** تنها در سویه های بیماریزای یرسینیا انتروکلی تیکا مشاهده می شود.

تشکر و قدردانی

لازم میدانیم از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند و کلیه هزینه های این طرح را بعهده گرفتند، تشکر و قدردانی نماییم .

ضمناً این مقاله بخشی از پایان نامه خانم فریبا متین دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبشناسی است.

منابع

1) de Boer E. Isolation of Yersinia enterocolitica from foods (Review). Int J Food Microbiol. 1992 Oct; 17(2): 75-84.

2) Bottone EJ. Yersinia enterocolitica: the charisma continues. Clin Microbial Rev. 1997 Apr; 10(2): 257-276.

3) Dequeker J, Jamar R, Walravens M. HLA-B27 arthritis and Yersinia enterocolitica infection. J Rheumatol. 1980 Sep-Oct; 7(5):706-10.

4) Andersen JK, Sorensen R, Glensbjerg M. Aspects of the epidemiology of Yersinia enterocolitica: a review. Inter J Food. Microbiol. 1991 Jul; 13(3): 231-237.

5) Barbini de pederiva NB, Stefanini de Guzman AM. Isolation and survival of Yersinia enterocolitica in ice cream at different pH values, stored at -18°c. Braz J Microbiol. 2000; 31(3): 173-177.

6) Fredriksson Ahomaa M, Korkeala h. Low occurrence of pathogenic Yersinia enterocolitica in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. Clin Microbiol Rev. 2003 Apr; 16(2): 220-229.

7) Thisted Lambertz S, Ballagi-Pordany A, Nilsson A, Norberg P, Danielsson-Tham ML. A comparison between a PCR method and a conventional culture method for detecting pathogenic Yersinia enterocolitica in food. J Appl Bacteriol. 1996 Sep; 81(3): 303-308.

8) Thisted Lambertz S, Danielsson-Tham ML. Identification and characterization of pathogenic Yersinia enterocolitica isolates by PCR and pulsed-Field Gel Electrophoresis. Appl Environ Microbiol. 2005 Jul; 71(7): 3674-3681.

9) Wachtel MR, Miller VL. In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of Yersinia enterocolitica. Infec Immun. 1995 Jul; 63(7): 2541-2548.

10) Bascunana CR, Mattsson JG, Bölske G, Johansson KE. Characterization of the 16S rRNA genes from Mycoplasma sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. J Bacteriol. 1994 May; 176(9): 2577-2586.

11) Rabson AR, Hallett AF, Koornhof HJ. Generalized Yersinia enterocolitica infection. J Infect Dis. 1975 Apr; 131(4): 447–451.

12) Capita R, Alonso-Calleja C, Prieto M, Garcia-Fernandez MDC, Moreno B. Incidence and pathogenicity of Yersinia spp. isolates from poultry in Spain. Food Microbiol. 2002 Aug; 19(4): 295-301.

13) Bhaduri S. Enrichment, isolation, and virulence of freeze-stressed plasmid-bearing virulent strains of Yersinia enterocolitica on pork. J Food Prot. 2006 Aug; 69(8): 1983-1985.

14) Aulisio CC, Hill WE, Stanfield JT, Sellers RL. Evaluation of virulence factor testing and characteristics of pathogenicity in Yersinia enterocolitica. Infect Immun. 1983 April; 40(1): 330–335.

15) Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB. In vitro assessment of virulence in Yersinia enterocolitica and related species. J Clin Microbiol. 1985 Jul; 22(1): 105-10.

16) Bhaduri S. Conway LK, Lachinca RV. Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid-bearing clons of Yersinia enterocolitica. J Clin Microbiol. 1987 June; 25(6): 1039–1042.

17) Bhaduri S, Tumer-Jones C, Lachica RV. Convenient agarose medium for simultaneous determination of the low-calcium response and Congo red binding by virulent strains of Yersinia enterocolitica.J Clin Microbiol. 1991 Oct; 29(10): 2341-2344.

18) Burton W, Blais Wb , Phillipe LM. Comparative analysis of yadA and ail polymerase chain reaction methods for virulent Yersinia enterocolitica . Food control . 1995 Aug; 6(4): 211-214.
19) Harnett N, Lin YP, Krishnan C. Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica using the multiplex polymerase chain reaction. Epidemiol Infect. 1996; 117(1): 59-67.

20) Jourdan A, Johnson SC, Wesley IV. Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the ail gene of pathogenic Yersinia enterocolitica. Appl Envir Microbiol. 2000 Sep; 66(9): 3750-3755.

21) Weynants V, Jadot V, Denoel PA, Tibor A , Letesson JJ. Detection of Yersinia enterocolitica serogroup O:3 by a PCR method. J Clin Microbiol. 1996 May; 34(5): 1224-1227.

22) Ibrahim A, Liesack W, Stackebrandt E. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of Yersinia enterocolitica. J Clin Microbiol. 1992 Aug; 30(8): 1942-1947.