

FOOD-BORNE INFECTIONS CAUSED BY ENTEROPATHOGENIC YERSINIA - INCIDENCE, SURVEILLANCE, MICROBIOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS

Prof. Hristo Najdenski, DVM, DSci
The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences

Abstract

Yersinia enterocolitica and *Y. pseudotuberculosis* are the causative agents of foodborne zoonosis called yersiniosis. In 2011 it was the fourth most commonly reported zoonosis in EU, nevertheless the tendency of decreasing five-year trend (2007-2011). Yersiniosis is reported and described in different animal species, e.g. wild animals and birds. Both enteropathogenic bacterial agents are ubiquitous and easily adaptable to the environment, what is an important precondition for infection of a wide variety of animals and contamination of water, soil, feed, vegetables, etc. Considering the growing public health concern for human pathogenic biotypes and serotypes of *Yersinia*, as well as the role of slaughter pigs as major reservoir for the foodborne transmission of *Y. enterocolitica*, essential microbiological experimental findings and epidemiological data are presented. Molecular approaches for detection and identification are discussed too.

Nevertheless the abundance of protocols for isolation and detection of pathogenic yersiniae (in general difficult and time consuming), the data regarding the quantitative contamination levels are still scanty. Additionally, with the emergence of quantitative microbiological risk assessment, there is a growing need for faster and reliable quantitative data on contamination level at different food matrices.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, food-borne infection, microbiological risk assessment

ХРАНИТЕЛНИ ИНФЕКЦИИ ПРИЧИНЯВАНИ ОТ ЕНТЕРОПАТОГЕННИ ЙЕРСИНИИ – РАЗПРОСТРАНЕНИЕ, НАДЗОР, МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ

Проф. д-р Христо Найденски, дмн
Институт по микробиология „Стефан Ангелов” – Българска академия на науките

Резюме

Yersinia enterocolitica и *Y. pseudotuberculosis* са причинители на хранителна зоонозна инфекция наречена йерсиниоза. Тя е четвъртата най-често докладвана зооноза в ЕС през 2011 г., независимо от тенденцията за намаляване през периода 2007-2011. Йерсиниозата е доказана и описана при различни видове животни, включително и при диви животни и птици. Двата ентеропатогенни бактериални вида са убиквитерно разпространени в околната среда и се адаптират лесно към различните условия в нея, което е важна предпоставка за заразяване на широк кръг гостоприемници и контаминиране на водата, почвата, фуражите, зеленчуците и др. Във връзка с нарастващото значение и безпокойство за общественото здраве на патогенните за хора биотипове и серотипове *Yersinia*, както и ролята на свинете за месо като главен резервоар за разпространението на *Y. enterocolitica*, се представят основни микробиологични експериментални резултати и епидемиологични данни. Обсъждат се и молекулярни подходи за доказване и идентификация на тези патогени.

Въпреки изобилието от методи за изолиране и доказване на патогенни йерсинии (като цяло трудни за изпълнение и бавни), данните за количествена оценка на бактериалната контаминация са все още недостатъчни. Освен това, успоредно с необходимостта от количествена микробиологична оценка на риска, има и нарастваща необходимост по-бързи и надеждни количествени данни за степента на контаминация на различни хранителни продукти.

Ключови думи: *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, хранителни инфекции, микробиологична оценка на риска

Обща характеристика на род *Yersinia*

Родът *Yersinia* е наименован в чест на френския учен Alexandre Yersin, който открива чумния бактерий *Yersinia pestis* по време на голямата чумна епидемия в Хонг Конг през 1894 г. (Bottone, 1977). През 1944 г. Van Loghem предлага един нов род *Yersinia* да бъде отделен от рода *Pasteurella*, но това става едва през 1974 г., когато окончателно този род е разграничен от род *Pasteurella* и е отнесен към семейство *Enterobacteriaceae* (Carniel, 2003). Днес родът *Yersinia* обединява 15 вида (Souza et al., 2010), като само три от тях имат значение за човешката и животинска патология - *Y. pestis*, причинител на чумата при хора, камили, гризачи и др., и ентеропатогенните *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, причиняващи съвкупност от заболявания с общото название “йерсиниоза” (Bottone, 1977). *Yersinia ruckeri* е патогенна за риби (De Grandis et al., 1988), а останалите 11 вида (*Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. aleksiciae*, *Y. similis*, *Y. massiliensis* и *Y. entomophaga*) са проучени по-слабо поради отсъствието на класическите вирулентни маркери за род *Yersinia* (въпреки че някои от тях се изолират често от хора и животни) и са определени като непатогенни (Sprague and Neubauer, 2005; Sprague et al., 2008; Merhej et al., 2008; Hurst et al., 2011).

Yersinia pseudotuberculosis е изолиран за първи път през 1883 г. от Malassez и Vignal след инокулиране на морско свинче с клиничен материал от пациент, с признаци на заболяване подобно на туберкулоза (Bottone, 1977). *Yersinia enterocolitica* е описан за първи път от Schleifstein и Coleman през 1939 г. като атипична “*Pasteurella pseudotuberculosis*”, но проучванията сочат, че този хетерогенен вид е изолиран още през 1923 г. в САЩ и включва няколко сходни вида, определени като “*Y. enterocolitica* подобни” (Brenner et al. 1980; Mollaret, 1995).

В таксономично отношение видът *Y. pseudotuberculosis* е в много близко генетично родство с вида *Y. pestis*. Посредством ДНК-ДНК хибридизация е установено над 90% сходство между тях (Bercovier et al., 1980) и 48% сходство на останалите видове с тези два вида (Brenner et al. 1980). Биоинформационният анализ на *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* показва съдържание на G+C 48,5±1,5%, респективно 46,6±0,5% (Brenner et al., 1976).

Морфология, културални особености, патогенност

Патогенните представители на род *Yersinia* са Грам-отрицателни, факултативни анаероби, къси прави пръчици до кокоподобни бактерии, които

проявяват полиморфизъм, а при отделни щамове и биполярно оцветяване. Йерсиниите са неспорообразуващи бактерии, с възможност за растеж между 0°C и 40°C при температурен оптимум 25°-28°C (Lake et al., 2004). Те издържат на рН интервал от 4 до 10, с оптимум 7,2-7,4 и не са взискателни към хранителните среди. Върху обичайните за семейство *Enterobacteriaceae* среди образуват гладки, кръгли, блестящи, полупрозрачни колонии с диаметър 1 мм след 24 часово култивиране на 37°C върху MacConkey агар и около 3 мм след 48 часово култивиране на 25°C (Carniel, 1993). Йерсиниите не са устойчиви на високи температури - при нагряване от 60°C до 80°C загиват за 15-30 минути, а при варене само за няколко секунди. Lake и сътр. (2004) доказват, че бактериите от вида *Y. enterocolitica* са чувствителни на топлина - наблюдава се 90 % редуция в броя на бактериалните клетки при инкубиране на 55°C за 2 мин, на 60°C за 0.5 мин и на 65°C за 2 секунди. И двата патогенни вида йерсинии са устойчиви към ниски температури и преживяват при температури от -15°C до -20°C. Слънчевите лъчи им действат пагубно. Установено е, че под действието на пряка слънчева светлина загиват за 30 минути, а под действието на рехавя светлина загиват в интервала от 6 до 8 часа. Бързо умират и при изсушаване (Голубева и сътр. 1985).

Всички щамове *Y. pseudotuberculosis* са потенциално патогенни за хора и животни, за разлика от *Y. enterocolitica*, при които биотип 1В, биотип 4 (серотип О:3), биотип 2 или 3 (серотип О:5-5,27) и биотип 2 (О:9) са причинители на инфекции при хора и животни. *Yersinia ruckeri* е патогенна за риби, причинявайки заболяването “червена уста” (De Grandis et al., 1988; Tobback et al., 2007).

Всички серотипове, съставляващи вида *Y. enterocolitica*, се подразделят на три групи, отличаващи се по своята степен на патогенност и място на изолиране. Първата група серотипове О:4,32, О:8, О:13, О:18, О:20 и О:21 са наречени “Американски”, тъй като са изолирани в Америка. Те са силно патогенни и летални за мишки след интравенозно инжектиране и предизвикват тежко протичащи и често летални инфекции при хора (Bottone, 1999). Втората група серотипове О:3, О:5,27 и О:9 са умерено до слабо патогенни за мишки, предизвиквайки най-голямата част от случаите на йерсиниоза при хора и животни. Те са открити за първи път в Европа, а след това и в други части на света и се означават като “Европейски”. Останалите серотипове (3-та група, т.н. environmental, биотип 1А) са непатогенни за мишки (поради липса на класическите фактори на вирулентността) и се изолират от различни източници на околната среда – вода, почва, зеленчуци, плодове и др. През

последните години обаче се появяват все повече данни за *Y. enterocolitica* биотип 1А като етиологичен агент за заболявания при хора (McNally et al., 2007).

Източници на инфекция и разпространение

Бактериите от род *Yersinia* са убиквитерно разпространени микроорганизми, като по-голямата част от изолатите са от околната среда, храни и безсимптомни носители. *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и други видове на род *Yersinia* са често срещани в околната среда и могат да бъдат изолирани от голям брой почвени и водни проби (Kapperud, 1991; Bottone, 1999). Независимо от това, по-голямата част от изолираните щамове не притежават характерните маркери за вирулентност и биват определяни като непатогенни. Доказано е, че *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* са в състояние да се развиват в редица водни и почвени системи, фуражи и др., като ниските температури (1-4°C) не са лимитиращ фактор за тяхното оцеляване и размножаване (Chao et al., 1988; Karapinar and Gonul, 1991). Неотдавна бе експериментално потвърдена и възможността за образуване на биофилми при *Y. enterocolitica* (Kim et al., 2008). Установено бе, че условия които индуцират образуването на флагели (стайна температура и ниски солеви концентрации) са фактор за образуването на биофилми и повишават преживяемостта на *Y. enterocolitica* в различни екологични ниши.

Редица автори съобщават, че разпространението на йерсиниите постоянно нараства (Hurwell, 1981; Schiemann, 1989), като важен източник на инфекция се посочва нетретираната прясна вода (Ostroff et al., 1994; Tauхе et al., 1987). В редица случаи, водните източници са причина за локални епидемични взривове (Aber et al., 1982; Tacket et al., 1985). От питейна вода е изолирана *Y. enterocolitica* 4/O:3 в Онтарио, Канада (Thompson and Gravel, 1986), както и 1B/O:8 в САЩ (Tacket et al., 1985), причинили редица различни по тежест случаи на гастроентерит.

Значително широко е и разпространението в природата на псевдотуберкулозните бактерии, които са също устойчиви във външната среда. Човекът и животните се заразяват алиментарно от контаминирани хранителни продукти и фуражи, водоизточници и други, или при директен контакт със заразени домашни и диви животни (Fukushima et al., 1988; Nowgesic et al., 1999; Nuorti et al., 2004; Jalava et al., 2004; Jalava et al., 2006). Важна роля за тяхното широко разпространение в различни географски ширини играят и прелетните птици (Fukushima and Gomyoda, 1991; Niskanen et al., 2003).

Домашни и диви животни

Yersinia enterocolitica и *Y. pseudotuberculosis* са причинители на зооантропоноза, при която различни видове животни се явяват резервоар и източник на инфекция за други домашни животни и хора, както и за контаминиране на околната среда. Редица домашни и диви животни, както и птиците могат да бъдат източник на инфекция с *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, замърсявайки със своите екскременти почвата, водата, плодовете, зеленчуците и др. (Aleksic et al., 1995).

Проведени са редица изследвания, имащи за цел изолирането на причинителя от различни диви и селскостопански животни (Shayegany et al., 1986; Suzuki et al., 1995; Collins, 1996). При скрининг на фекални проби от различни животни (бозайници, птици, влечуги, безгръбначни) са изолирани редица патогенни за човека щамове *Y. enterocolitica* от био/серотиповете 1B/O:3, 4/O:3, 4/O:5,27 (Kechagia et al., 2007).

Доказано е, че свинете са важен резервоар и преносител на *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Robins-Browne, 2001, Hudson et al., 2008) в различните географски региони на света, вкл. и Европа. В широко мащабно проучване върху разпространението на патогенни *Y. enterocolitica* в САЩ сред угоени свине в 17 ферми от различни щати, е било установено тяхното наличие във фецеса при 12,76% от изследваните 2600 проби. В някои от фермите обаче, разпространението достига до 46,7%, което налага допълнителни епидемиологични проучвания за разкриване на причините и свързаните фактори за това високо рисково разпространение (Bhaduri et al., 2005). Gurtler и сътр. (2005) установяват наличие на този патоген в прасета за угояване и в Германия, вариращо в границите 0%-65%. По-нови епизоотологични данни за Германия потвърждават наличието на този патоген в 67% от изследваните тонзили на свине (Bucher et al., 2008). Тези автори изолират непатогенни щамове *Y. enterocolitica* от говеда, овце, пуйки и коне. За периода 1995-1999 носителството на *Y. enterocolitica* 4/O:3 сред прасета за угояване във Финландия се увеличава от 33% до 64% (Korte et al., 2004), като най-силно е колонизирането на тонзилите, фаринкса, гастроинтестиналния тракт и фецеса (Kot et al., 2007). *Yersinia enterocolitica* се доказва нерядко и в свине за месо и продуктите от тях в Англия, Норвегия, Швеция, Швейцария, Полша, Естония, Латвия, Русия, Италия, Гърция и др. (Johannessen et al., 2000; Fredriksson-Ahomaa, et al., 2007; Grahek-Ogden et al. 2007; Platt-Samoraj et al., 2006; Kuehni-Boghenbor et al., 2006; Martinez et al., 2009; Milnes et al., 2008), пилета бройлери в Швеция и др. (Lindblad et al., 2006).

Домашните кучета и котки също са естествен резервоар на тази инфекция. Въпреки сравнително малкия брой случаи на изолиране на *Y. enterocolitica* 4/O:3 от кучета и котки, те се приемат като безсимптомни носители (Fredriksson-Ahomaa et al., 2001; Bucher et al., 2008). Животните екскретират чрез изпражненията и контаминират околната среда в продължение на няколко седмици след експериментална или естествена инфекция (Fenwick et al., 1994). Най-силно патогенният за хора био/серотип на *Y. enterocolitica* 1B/O:8 е широко разпространен сред дребните планински гризачи в Япония, както и сред чакали и диви зайци у нас (Hayashidani et al., 1995; Nikolova et al., 2001). Доказаните високи титри на анти-*Yersinia* антитела в кръвни серуми от говеда, овце и кози в Германия, са показателни за възможната роля на тези видове като резервоари на инфекцията (Nikolaou et al., 2005).

За *Y. pseudotuberculosis* се приема, че паразитира по всички бозайници (зайци, овце, кози, говеда, котки и гризачи) и редица домашни и диви птици (кокошки, пуйки, прелетни, водоплаващи), влечуги и др. (Tsubokura, 1989; Hubbert 1972; Chiesa et al., 1993; Aleksic and Vockemuhl, 1999; Kot et al., 2007). Основен естествен резервоар на вида и източник на инфекцията са дивите гризачи. Освен тях, гостоприемници са и дивите птици, преживните животни и др., които допринасят за възникването, запазването и разпространението на естествените огнища на псевдотуберкулозата (Slee et al., 1988). Slee and Button (1990) установяват, че вида *Y. pseudotuberculosis* серотип O:3 е широко разпространен в Австралия ентеропатоген, засягащ множество видове като котки, бизони, елени, антилопи, овце, кози, зайци, и др. Свинете са важен резервоар и за *Y. pseudotuberculosis* като се приема, че те са безсимптомни носители (Laukkanen et al., 2008; Niskanen et al., 2002; 2008). При изследвания върху гризачи, Toma (1986) установява, че серотип O:3 е по-често срещания, отколкото серотиповете O:1 и O:2.

Хранителни продукти от животински и растителен произход

Според Mollaret (1995), инфекциите причинени от йерсинии в Белгия, Скандинавските страни и др. райони на Европа, заемат второ място след салмонелозите, като посочва, че контаминираните храни са основен източник за заразяване с тези микроорганизми. По данни на ЕФСА броят на потвърдените случаи на йерсиниоза през 2011 г. са 7017, което е с 3.5% повече, в сравнение с 2010 г. (EFSA, 2013). Йерсиниозата е четвърта по честота докладвана зооноза в ЕС, с общо разпространение от 1.63 на 100 000 човека, с отчетлива сезонност през зимните

месеци. Най-голям брой случаи са докладвани в Литва и Финландия (11.4 и 10.3 случая на 100 000 човека, респективно). Тенденция на намаляване на заболяемостта се отбелязва в 6 европейски страни – Дания, Германия, Литва, Словения, Испания и Швеция, докато статистически значимо е увеличението в Унгария, Румъния и Словакия. Броят на хоспитализираните пациенти през 2011 г. е повече от половината (55.2%) от потвърдените случаи на йерсиниоза. Най-висок е броят на докладваните хоспитализирани случаи в Литва (258 или 60% от всички хоспитализирани пациенти в ЕС. За България са докладвани само 4 случая, което съставлява 0.05 на 100 000. Сравнително нисък обаче е делът на потвърдените случаи (11%) спрямо всички хоспитализирани пациенти. Най-висок е делът на хоспитализираните пациенти – 80.9% в Румъния. През 2011 г. е докладван 1 смъртен случай (0.02%) от 4 918 потвърдени случая. Тези данни обаче следва да се интерпретират внимателно, предвид на това, че много от случаите не се регистрират, а от друга страна липсва проследяемост на пациентите след първоначалното вземане на проба. Относно видовото разпространение, *Y. enterocolitica* се изолира в 98.4% от потвърдените случаи, следвана от *Y. pseudotuberculosis* – 0.9%, а останалите 0.7% са други видове йерсинии (EFSA, 2013).

Основният път за инициране на инфекция с *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* е приемането на контаминирана вода и различни хранителни продукти. 75% от докладваните случаи на инфекция с *Y. enterocolitica* 4/O:3 в Швеция се свързват с консумацията на различни храни и напитки - готови и полуготови храни от животински и растителен произход (салати, цели и нарязани зеленчуци, сандвичи, мляко и млечни продукти, десерти, сирена и др.)(Hudson et al., 1992; Walker and Brooks, 1993; Tassinari et al., 1994). Независимо от това, изолирането на патогенни щамове *Y. enterocolitica* от хранителни продукти среща редица затруднения, като значително по-често се изолират непатогенни щамове, в сравнение с патогенните (De Boer, 1995; Velazquez et al., 1993; Logue et al., 1996). При изследване на 200 проби от сурова риба, 43 проби пилешко месо и 101 проби от салати, с помощта на гнездова ПВР и таргетен ген *yadA*, са получени 3 положителни резултата от последната група (Fredriksson-Ahoma et al., 2001). При аналогични изследвания Logue et al. (1996), установяват наличие на патогенни изолати *Y. enterocolitica* от биотипове 1A, 2, 4, серотип O:3 в 10% от шунковите колбаси, говеждо месо, свинско месо, салами и други продукти от свинско месо (Fredriksson-Ahoma and Korkeala, 2003; Lindblad et al., 2007). В редица клинични случаи източник на заразяване с *Y. enterocolitica* са и домашни продукти от

свинско месо - домашен колбас, наденички, свински субпродукти (Jones et al., 2003) и др. При изследване на причините довели до контаминиране на продуктите с *Y. enterocolitica* серотип O:3 в Белгия, Норвегия и Нова Зеландия, еднозначно е посочена връзката с използваното свинско месо (Tauxe et al., 1987; Ostroff et al., 1994; Borch et al., 1996; Satterthwaite et al., 1999).

Млякото и млечните продукти също са обект на изследвания, имащи за цел детекцията и изолирането на патогенни щамове *Y. enterocolitica* (Greenwood and Hooper, 1990a) и *Y. pseudotuberculosis* (Nowgesic et al., 1999). С изключение на няколко изолата от серотип O:5,27, всички останали изолати са определени като непатогенни (Ramesh et al., 2002). Greenwood and Hooper (1990b) доказват, че пастьоризацията на млякото убива йерсиниите, но заразяване е възможно след консумиране на вторично контаминирано мляко или консумация на неефективно пастьоризирано мляко или съответните млечни продукти. Особено тревожни са данните за зачестилите случаи на мастит при крави и кози, предизвикан от *Y. pseudotuberculosis* (Shwimmer et al., 2007; Sampimon, 2005). Масабни хранителни инфекции при хора, причинени от *Y. pseudotuberculosis* са описани във Финландия и Русия след консумация на марули и моркови (Jalava et al., 2006; Nuorti et al., 2004; Rimhanen-Finne, 2008).

Патогенеза и клинична картина на йерсиниозата

В случаите на орална инфекция, бактериите навлизат в гастроинтестиналния тракт, където преодоляват киселинната бариера на стомаха и преминават към тънките черва. Успешно колонизират лимфоидните структури, означавани като Пайерови плаки чрез взаимодействие с чревните М клетки (Grutzkau et al., 1990; Hanski et al., 1989; Clark et al., 1998). Направените от Hanski и сътр (1989) изследвания върху степента на колонизация на Пайеровите плаки от *Y. enterocolitica* серотип O:8 установяват, че последните се колонизират приблизително 1000 пъти повече в сравнение със съседни епителни повърхности. Колонизирането на Пайеровите плаки води до дисеминиране в подлежащите тъкани и органи, като мезентериалните лимфни възли (МЛВ), черен дроб и далак (Bouza et al., 1980; Marks et al., 1980). Следва инвазия към фагоцитиращите клетки и екстрацелуларно размножаване водещо до възпалителен процес.

Установено е, че различните вирулентни фактори оказват определено въздействие върху патогенезата на инфекцията. По време на ранните етапи на колонизиране, приоритетно значение имат външно мембранните протеини Inv и YadA, които реализират адхерирането, колонизирането и проникването в интестиналния

епител (Isberg et al., 1987; Miller and Flkow, 1988; Pepe et al., 1995; Isberg et al., 1990). Плазмидно кодираните Yop протеини оказват въздействие при по-късни етапи на йерсиниозата, като противодействат на имунния отговор чрез предотвратяване на фагоцитозата от макрофагите и блокиране на продукцията на цитокини от макрофаги, епителни и ендотелни клетки (Gort and Miller, 2000). Earley и Miller (2006) доказват съществената роля за колонизирането на МЛВ при акутна инфекция с *Y. enterocolitica* на нов протеин SfpA, кодиран от хромозомния ген *sfpA*. Интересен е факта, че SfpA протеина има известни хомолози в *Salmonella enterica* серовар *Typhi*, *Escherichia coli* O157:H7, *Helicobacter pylori* (Tomb et al., 1997; Perna et al., 2001; Deng et al., 2003), но липсват хомолози при *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Предполага се, че основните функции на новооткрития протеин, имащи значение за колонизацията са сходни с тези на PorP1A и PorP1B порините на *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis* (Bauer et al., 2005, Massari et al., 2000). Деструктивните процеси в епителните клетки на гостоприемника, се изразяват предимно в нарушена абсорбционна способност и загуба на телесни течности, поради наблюдавания се диаричен синдром. Ролята на термостабилният ентеротоксин в патогенезата е все още не добре изяснена (Adams and Currie, 1998; Robins Browne et al., 1997). Предполага се, че за развитието на диария от съществено значение е хромозомно кодирания термостабилен ентеротоксин YST (Pal and Mors, 1978; Delor and Cornelis, 1992). Акутният гастроентерит се съпътства често от ентероколит с холероподобни прояви и се явява най-често срещаната форма на йерсиниозна инфекция. В повечето от случаите инфекцията протича като самоограничаваща се (Cover and Aber, 1989). Установено е и здраво заразноствство (Ефремова и Куюмджиев, 1975). Независимо от това, в определени случаи е възможно възникването на различни по тежест на протичане усложнения. Причина за повечето от тях са редица фактори, обусловени от гостоприемниковия статус - възраст, имуносупресия, хронични заболявания и др.

При деца на възраст до 5 години преобладават признаците на остър ентероколит (диария, кървави изпражнения, треска, абдоминални колики и повръщане) (Ehara et al., 2000). Продължителността на заболяването варира от 3 до 28 дни (Lee et al., 1990). При деца над 5 години, както и при юноши, йерсиниозата протича преобладаващо като терминален илеит и псевдоапендикуларен синдром, съпътстван от симптоми като треска, абдоминална болка и повръщане (Robins Browne et al., 1997). Често пъти подобна клинична картина може да доведе до погрешна диагноза (Chandler and Parisi, 1994). При по-продължително присъствие на йерсинии в гастроинтестиналния тракт се

увеличава възможността за развитие на некротизиращ ентероколит или гноен мезентериален аденит. При възрастни индивиди клиничната картина включва неспецифични абдоминални колики, с изразен диаричен синдром. Възпалението на гърлото е често срещано съпътстващо състояние (Tacket et al., 1984).

При генерализиране на инфекциозния процес, предизвикан от *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* настъпва сепсис, който се съпровожда с образуване на абцеси в черния дроб и далака (Rabson et al., 1975), пневмония (Sodervik et al., 1986), септични артрити (Spira and Kabins, 1976), менингити, панофталмити (Sonnernwirth, 1970) и др. Описани са и случаи на белодробни абцеси и остеомиелит (Sebes et al., 1976), ендокардит (Appelbaum et al., 1983) с възможна локализация в ендоваскуларната система на големите кръвоносни съдове, водеща до аневризъм. Септицемията не зависи от здравия статус на гостоприемника и може да възникне както при здрави, така и при имунокомпрометирани пациенти (Lenz et al., 1984) или такива със скрити заболявания (Foberg et al., 1986).

През 1997 г. Bottone (1997) описва случаи на септицемия, вследствие на кръвопреливане. Факторите обуславящи подобно развитие са способността на йерсиниите за размножаване при 4 °C, както и системите им за усвояване на желязо от кръвните клетки. Bottone (1999) детайлно анализира 27 от 49 случаи на бактеремия, вследствие на трансфузия за периода 1975-1994 година. Изолираните щамове принадлежат към серотиповете O:3, O:9 и O:5,27, които са доминиращи за европейския континент. В Австралия, Robins Browne (Robins Browne et al., 1997) описва случаи на йерсиниозна бактеремия, която се характеризира с леталност от 30% до 60%, но липсата на симптоми при някои кръвни донори, предполага нискостепенна бактеремия, протичаща без фатални последици.

Акутната йерсиниозна инфекция в голям брой случаи може да бъде съпътствана и от развитието на различни имунологични усложнения (реактивни артрити, еритема нодозум, глумеролонефрити, ендокардити, тироидити и др.) (Cover and Aber, 1989).

През последните години се налага ревизия на схващането, че *Y. pseudotuberculosis* е свързана предимно с животинската патология, след като в резултат на редица проучвания се доказва нейното значение за инфекциозната патология на човека. През 1950 година е описан епидемичен взрив в Русия, който е причинен от *Y. pseudotuberculosis* с характер на акутна инфекция и разнообразна симптоматика включваща кожни обриви, хиперемия и токсичен шок синдром. През 2007 е секвениран и генома на ангажирания щам IP31758 (Eppinger et al., 2007).

Симптоматиката на причиняваните от *Y. pseudotuberculosis* инфекции се изразява предимно с развитие на гастроентерити, представени от самоограничаващи се мезентериални лимфаденити, наподобяващи апендицитни възпаления. Постинфекциозните усложнения включват развитие на еритема нодозум, реактивен артрит и др. (Bottone, 1999).

Преживяемост в месо и месни продукти

Основният път за инициране на инфекция с *Y. enterocolitica* е приемането на контаминирана вода и различни хранителни продукти. Класическите типове храни, чието контаминиране се регистрира най-често при епидемични взривове с *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* включват термично недостатъчно обработено месо, включително и с морски произход, непастьоризирано мляко и различни млечни продукти. През последните години към този списък се добавят и храни, считани в миналото за безопасни поради факта, че основните защитни фактори в хранителните продукти (сол, захар, консерванти и др.) се елиминират в резултат на определени процедури при тяхното приготвяне, съхранение, транспортиране и др. 75% от докладваните случаи на инфекция с *Y. enterocolitica* 4/O:3 в Швеция се свързват с консумацията на различни храни и напитки - готови и полуготови храни от животински и растителен произход (салати, цели и нарязани зеленчуци, сандвичи, мляко и млечни продукти, десерти, сирена и др.) (Hudson et al., 1994; Walker and Brooks, 1993; Tassinari et al., 1994). Независимо от това, изолирането на патогенни щамове *Y. enterocolitica* от хранителни продукти среща редица затруднения, като значително по-често се изолират непатогенни щамове, в сравнение с патогенните (De Boer, 1995; Velazquez et al., 1995; Logue et al., 1996).

За *Y. enterocolitica* е установена способност за преживяване и развитие при ниско кислородно съдържание и вакуум. Доказано е нарастване на бактериалния брой в мляно месо с 1 log при 1°C и с 3.5 log при 4°C след 14 дневно култивиране с атмосферен въздух, както и подтискане на растежа при култивиране на 1 и 4°C в среда с 20% CO₂ : 80% O₂. Растежът не се повлиява при култивиране на 10 °C и 15 °C в същата газова комбинация (Kleinlein and Untermann, 1990; Hudson et al., 1994). Освен това, вирулентността при 30% от изолатите не се повлиява след 30 дневно инкубиране на 4° C във вакуум и в атмосфера, наситена с CO₂ (Budnaruk and Draughon, 1998).

Толерансът, проявяван към рН стойностите на средата е в границите от 4 до 10. Устойчивостта към киселинност на средата се определя от природата на ацидуланта

(De Meyer and De Bever, 1995). Ниската температура и рН допринасят за по-слабата преживяемост (Little and Knochel, 1994). Възможен е растеж при концентрация на NaCl до 5%, а по-високите концентрации инхибират растежа (Wesselinova et al., 2007).

Посочените параметри на заобикалящата среда определят различната преживяемост на *Y. enterocolitica* и имат отношение към тяхната устойчивост, като налагат необходимостта от търсене на специални условия за съхранение и обработка на месните и други типове хранителни продукти, с цел намаляване на риска от инфекции за консуматора.

Преживяемост в мляко и млечни продукти

Известно е, че *Y. enterocolitica* притежава ясно изразен психрофилен физиологичен профил, като преживява в температурният диапазон от 0 °С до 44 °С. При пастеризация на млякото на 71.8 °С за 18 секунди се наблюдава понижение в преживяемостта с 99.9% (Robins Browne et al., 1997).

При изкуствено контаминиране на кисело мляко и сладолед с различен брой бактериални клетки, подробно е проследена преживяемостта при съхранение на различен температурен режим (4 °С, 9 °С, 23 °С), за срокове с различна продължителност (до 8 месеца). Установена е пряка зависимост между преживяемостта и комбинацията от температура и ниво на млечната биокомпонента. При температури под 10 °С бактериалните клетки запазват своята жизнениост за повече от 120 дни, докато при температури над 20 °С жизнеспособността се запазва между 30-60 дни. Същевременно се наблюдава инхибиращ ефект на коли-бактериите върху преживяемостта на *Y. enterocolitica* (Slavchev, 1986). Изследванията сочат и разлики в инхибиращия потенциал на млечната биокомпонента - щамове *Lactobacillus bulgaricus*, които са декстроза-отрицателни имат значително по-силен инхибиращ ефект в сравнение с лактоза-положителните щамове (Slavchev, 1983).

С цел проследяване на причините за намаляване броя на *Y. enterocolitica* в кисело мляко, е проследен процеса с домашно приготвени стартерни култури и с промишлените закваски YC 470 и IC 180 (Vodnaruk, 1998). Резултатите показват че понижаването на броя клетки на *Y. enterocolitica* при процес, използващ YC 470 и IC 180 е по-силно изразено, което се обяснява с повишената способност на *L. bulgaricus* да продуцира инхибиращи субстанции в промишлените стартерни култури, в сравнение с домашните закваски.

В тази връзка са и проведените изследвания върху преживяемостта на *Y. enterocolitica* при различни стойности на рН. Установено е, че йерсиниите имат оптимален растеж при стойности на рН 7.0 - 8.0 (Doyle, 1988, Cover and Aber, 1989), а Stern и сътр. (1980) доказват растеж на *Y. enterocolitica* при рН 4.6 и 9.6. По-късно Schiemann (1983) реизолира от кисело мляко с рН 4.0 жизнеспособни клетки 3 седмици след ферментацията. Ahmed и сътр. (1986) установяват че популацията на *Y. enterocolitica* намалява от 1×10^6 КОЕ/мл до 1×10^3 КОЕ/мл в процеса на производство на кисело мляко и съхранение за 5 дни при температура 5 °С, като най-вероятна причина за наблюдаваната редукция са ниските стойности на рН.

Изследвано е и влиянието на хидростатичното налягането върху преживяемостта на *Y. enterocolitica* в прясно мляко (De Lamo-Castellvi et al., 2005). В опита са включени щамове от различни серотипове (O:1, O:3, O:8 и O:9), като проби от мляко са инокулирани с 1.0×10^8 – 1.0×10^7 КОЕ/мл, инкубирани при 300 МРа, 400 МРа и 500 МРа за 10 мин след което са прехвърлени на 8 °С за 15 дни. Налягане от 400 МРа и 500 МРа оказват летален ефект върху всички серотипове. При налягане от 300 МРа най-висока бароустойчивост е отчетена при серотипове O:3 и O:9.

Конвенционални методи за детекция в месо и производните му продукти

Анализът на литературните данни показва, че свинете са единствените животни, използвани в хранителната индустрия, които са постоянен резервоар и преносител на патогенни за човека щамове *Y. enterocolitica* (Lake et al., 2004).

Независимо от честото и рутинно изолиране на *Y. enterocolitica* от устната кухина, тонзилите и от храносмилателната система на прасета, изолирането от свинско месо е трудно и не винаги успешно. Много често броят на бактериите в продукта е малък, като част от тях са живи но некултивируеми, поради което културалният метод е неефективен. Описани са и конкурентни взаимоотношения между търсения патоген и страничната микрофлора при култивиране в течна среда (Slavchev, 1983). Липсват и достатъчно надеждни и селективни хранителни среди. Ето защо редица автори прибегват до набогатителна стъпка, което допълнително забавя изследването (Logue et al., 1996; Bhaduri, 1997).

В момента съществуват няколко референтни метода за детекция, предложени от различни международни организации, основаващи се на класически микробиологични процедури. За съжаление, трябва да бъде отбелязана липсата на стандартна, общо възприета схема за детекция. Голяма част от страните са възприели методите,

предложени от Nordic Committee on Food Analysis (NMKL), както и от International Organization of Standardization (ISO). NMKL методите се базират на студено набогатяване на 4 °C за 21 дни, включително селективно набогатяване след 4-я ден и четирикратно субкултивиране върху селективна среда (*Yersinia* Selective Agar; CIN) (NMKL 117, 1996).

ISO методи са разработени и за изследване на хранителни и животински продукти. В основата на схемата са заложили две паралелни набогатявания - неселективно набогатяване за 48-72 часа и селективно набогатяване. Следващ етап е култивирането върху селективни среди. Задължително е третирането с KOH за редуциране на страничната микрофлора (ISO 10273-2003). В последните години се въвежда нов референтен NMKL метод, кореспондиращ със съществуващият ISO метод (NMKL 117, 2003). Методът е изцяло разработен за изолиране и доказване на патогенните серотипове O:3 и O:9 (спадат към групата "Европейски серотипове"), от всякакви разновидности хранителни продукти.

В САЩ се прилагат три схеми за детекция, поради липсата на универсална схема за изолиране на най-разпространените серотипове - O:3, O:8, O:5,27. Трите схеми се прилагат паралелно и включват комбинации от селективни и неселективни набогатителни култивирания.

У нас редица автори предлагат различни подобрени и ускорени методи за изолиране на патогенни йерсинии, както и схеми за тяхното идентифициране (Божкова, 1987; Павлов, 1989; Славчев, 1990).

Присъствието на патогенни йерсинии в продукти от свинско месо е слабо проучено (Lake et al., 2004). При проведено изследване на различни продукти от свинско месо (47 проби от свински наденици и 99 проби от свински филета), са отчетени положителни резултати в 15, респективно 26% от пробите (Johannessen et al., 2000). Въпреки изследваните други видове месо (говеждо, агнешко, пилешко и риба) (Fukushima, 1985; De Boer et al., 1995; Cox et al., 1990; Ibrahim et al., 1992), био/серотип 4/O:3 е изолиран неколккратно от говеждо и пилешко месо (Logue et al., 1996; Fukushima et al., 1997).

В научните направления са разработени редица тестови схеми, имащи за цел разграничаването на патогенните от непатогенните изолати, както и различни варианти за определяне на патогенния потенциал на отделните щамове. При сравнителен анализ на колекция от 100 щамове - включително 25 клинични изолати от епидемични взривове и 65 изолати от спорадични случаи, пиразинамидазният тест идентифицира 60 от 65

патогенни изолата, а теста базиран на салицин-ескулин хидролиза, отчита 100% чувствителност (Farmer et al., 1992).

Разработени са и тестове базирани на усвояваният от рYV положителните колонии конго-рот, както и на растежа при 36°C, детерминиран от концентрацията на Ca²⁺ в културалната среда.

Значителен успех при директната детекция, изолиране и подържане на плазмид-съдържащи щамове *Y. enterocolitica* от различни вируленти серотипове представлява описаната от Bhaduri и сътр. (1997a) схема включваща използване на комбинация от хранителни среди и базирана на фенотипни и биохимични белези, чието детектиране включва Конго-рот и тестове за зависимостта от Ca²⁺ в средата (Lcr). Метода успешно комбинира използването на модифициран триптиказен соев бульон, съдържащ жлъчни соли (0.2%), ВНІ със съответна модулирана калциева концентрация, както и среда съдържаща Конго-рот. Анализът включващ набогатяване на 12 °C с последващо прехвърляне върху селективни среди установява, че добавянето на Irgasan, като селектиращ агент има оптимален ефект ако бъде извършено 24 часа след първоначалното размножаване. Така става възможно отдиференцирането на плазмид положителни щамове, чрез вариране в температурата на инкубиране, като цялата схема е изпълнима за 48 часа (включително времето за инкубиране върху среда, съдържаща Конго-рот). Отчитането на пигментиран фенотип, на базата на Конго-рот съдържаща хранителна среда има съществено значение за отдиференцирането на плазмид положителни и плазмид отрицателни изолати (Pripic et al., 1983). Основните предимства се заключават във възможностите за рутинно приложение на метода.

Редица проучванията сочат, че CIN-агара е една от най-надеждните селективни хранителни среди за детекция на йерсинии (Head et al., 1982; Schiemann, 1983; Walker and Gillmour, 1986). Морфологията на coloniите, изолирани от месни продукти обаче не дава възможност за диференциране на непатогенните и патогенни щамове (Kapperud, 1991; Fredriksson-Ahomaa et al., 2003).

При култивиране в течна хранителна среда (Fredriksson-Ahomaa et al., 2003; Lake et al., 2004) е установено супресирание растежа на *Y. enterocolitica* O:3 в смесена култура с други *Yersinia*-подобни видове (Grant et al., 1998). Доказана е способността на щамове *Y. enterocolitica* биотип 1A, изолирани от хранителни продукти да подтискат растежа на щамове *Y. enterocolitica* от серотиповете O:3, O:9 и O:5, 27 (Strauch et al., 2001). Освен микробиологични тестове, конвенционалните методи за доказване включват и биохимични тестове. Изпълнението на тези схеми е трудоемък и бавен процес (3-4

дни). Един от най-разпространените в лабораторната практика биохимични китове за идентификация на *Yersinia* spp. е API 20 E. (Biomerieux, Vitek, Inc., Hazelwood). Този кит има за цел видовото определяне и не включва тестове, свързани с определяне на патогенния потенциал, което изисква още 5 допълнителни дни.

У нас нормативната база за микробиологична оценка на хранителните продукти, е регламентирана с Директива 93/43/ЕЕС от 14 юни 1993 относно хигиената на хранителните продукти и е трансформирана в Българското законодателство с Наредба № 5 от 25 май 2006 г. Регламентите (ЕО) 852/2004 и 853/2004 относно специфичните хигиенни правила за храните от животински произход се прилагат директно.

Доказване на *Yersinia enterocolitica* в месо и месни продукти чрез ПВР

В много от направените проучвания ясно се демонстрират предимствата на ПВР, спрямо класическата схема за доказване на патогенни щамове *Y. enterocolitica* в мляно месо (Fredriksson-Ahoma et al., 2003; Kapperud et al., 1993; Lantz, 1998a), в хомогенат от месни субпродукти (свински езици, черва и др.) (Fredriksson-Ahoma et al., 2000; Jourdan et al., 2000), в мляко и млечни продукти (Ramesh et al., 2002), както и във водни проби (Sandery et al., 1996; Johannessen et al., 2000). Воярале и сътр. (2001) анализират чрез ПВР 350 проби от мляно месо, събрани от различни географски райони на САЩ. Авторите доказват 38% положителни резултати, като същевременно стандартните методи за култивиране и идентификация не дават положителни резултати. Frederiksson-Ahoma et al. (1999) анализират 255 проби от мляно месо, като 25% от пробите дават положителен резултат при анализ с ПВР и само 2% са положителните проби след култивиране.

При изследване на 200 проби от сурова риба, 43 проби пилешко месо и 101 проби от салати, с помоща на гнездова ПВР и таргетен ген *yadA*, са получени 3 положителни резултата от последната група (Fredriksson-Ahoma et al., 2000). При аналогични изследвания Louge et al. (1996), установяват наличие на патогенни изолати *Y. enterocolitica* от биотипове 1А, 2, 4, серотип О:3 в 10% от шунковите колбаси, говеждо месо, салами и други продукти от свинско месо. В редица клинични случаи източник на заразяване с *Y. enterocolitica* са и домашни продукти от свинско месо - домашен колбас (Marjai et al., 1987), наденички, свински субпродукти (Lee et al., 1990) и др.

Едно от основните предимства на методите базирани на ПВР е независимостта им от фенотипната експресия, което позволява да бъдат идентифицирани и биохимично

нетипичните щамове *Y. enterocolitica*. Като пример могат да бъдат посочени сукроза-негативните щамове, определени в миналото като непатогенни и по тази причина същите не са изследвани и до днес (Anon, 2003). Получени са резултати, разкриващи патогенния потенциал на тези щамове, доказан посредством ПВР (Fredriksson-Ahoma et al., 2002).

При прилагане на даден метод в ограничен брой лабораторни звена, критериите за валидиране са различни от тези, възприети от рутинно работещите лаборатории. Понятието “стандартизиран метод” е изключително точно дефинирано, главно по отношение на възпроизводимостта (Malorny et al., 2003).

В общ практически план схемата за изследване с ПВР включва няколко етапа, а именно: предварителна обработка на пробите, набогатяване в бульон, анализ чрез ПВР, детекция на получените продукти. В много от случаите обаче се налага индивидуален подход и частични изменения на отделните етапи на реакцията. Възможно е използването на колонии, както от чисти, така и от смесени култури. Основна цел при прилагането на ПВР е директната детекция на патогена в контаминирания продукт, при което значително се съкращава времето за изследване, съпътствано в редица случаи с ограничения в практическото си приложение (Rossen et al., 1992). При директна детекция на патогена в хранителния продукт с конвенционален ПВР не се отчита виталността на бактериалните клетки поради факта, че ДНК е в състояние да съхрани своята структура дори и след термично въздействие (автоклавиране, пастьоризация и др.). Ето защо се предлага използването на тРНК за таргетен участък, която да бъде амплифицирана при RT-PCR (reverse transcriptase), или NASBA (real-time nucleic acid sequence-based amplification) (Rijpens et al., 1996).

Детекция на *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* в прясно и заквасено краве мляко

Млякото и млечните продукти също са обект на изследвания, имащи за цел детекцията и изолирането на патогенни щамове *Y. enterocolitica*. С изключение на няколко изолата от серотип O:5,27, всички останали изолати са определени като непатогенни (Walker and Gillmour, 1986; Rea et al., 1992; Ramesh et al., 2002,).

За детекция на патогенни йерсинии в мляко и млечни продукти са разработени различни варианти на ПВР. Durisin и сътр. (1997) използват ПВР за амплификация на *yst*-проба, белязана с диоксигенин (DIG) с цел детекция на *Y. enterocolitica* в мляко. Установен е детекционен лимит за хибридизацията от 10 КОЕ/мл. Генът *yst* е използван

като таргетен участък и при разработените от Ozbas и сътр. (2000) гнездова и мултиплексна ПВР за едновременна детекция на *Y. enterocolitica* и *Aeromonas hydrophila* в сурово мляко. Методът е тестван и за естествено и изкуствено контаминирани проби. И при двете модификации на метода е постигнат детекционен лимит от приблизително 1×10^2 КОЕ/мл. При изследването на естествено контаминирани проби паралелно е извършено и съпоставяне на данните от ПВР-метода с класическата схема за микробиологична детекция. Резултатите при позитивирането са съответно 53% за ПВР и 36% за културалния метод.

Въз основа на предложената *ail* – базирана ПВР (Fenwick, 1991), Ramesh и сътр. (2002) предлагат метод за детекция в естествено и изкуствено контаминирани проби от мляко, включващ 48 часово неселективно набогатяване с последващо изолиране на ДНК. Постигнатия детекционен лимит е 1.0×10^3 КОЕ/мл.

ПВР в реално време (ПВР-РВ) за детекция и количествено определяне на патогени в хранителни продукти

ПВР-РВ е изключително надежден метод за количествено определяне на присъствието на различни видове микроорганизми в разнообразни по своя произход проби. Той се базира на детекцията и количественото проследяване на флуоресцентен сигнал по време на ПВР реакция (Higushi et al., 1992, 1993; Lee et al., 1993; Livak et al., 1995). Излъчвания сигнал се променя правопрпорционално с количеството на ампликона в пробата. Измерването на флуоресценцията на всеки един цикъл, позволява проследяване на амплификацията по време на експоненциалната фаза на реакцията, при която първото съществено повишаване на сигнала отговаря на първоначалното количество на ДНК матрица в пробата.

Към момента съществуват следните основни групи методи за детекция на флуоресцентния сигнал при ПВР:

- хидролизни проби

ТaqMan[®] проби, Molecular Beacons проби, Scorpions проби - при всяка от тези модификации се използва 5' екзонуклеазната активност на Таq полимераза за определяне на таргетна секвенция (Heid et al., 1996; Mhlanga and Malmberg et al., 2001; Saha et al., 2001; Solinas et al., 2001; Vet et al., 2002; Abravaya et al., 2003; Tan et al., 2004).

- ДНК – свързващи агенти

Сравнително по-евтина алтернатива за детекция, базирана на неспецифично свързване на ДНК матрицата с химични агенти, които интеркалират само двойно верижни секвенции (SYBR-green I, EtBr). Недостатък е по-високата неспецифичност и нуждата от съществени усилия за оптимизиране на условията на ПВР (Wittwer et al., 1997; Morrison et al., 1998; Donohoe et al., 2000; Siraj et al., 2002; van der Velden et al., 2003). ПВР-РВ притежава капацитет за многостранно приложение в хранителната микробиология и дава възможност за количествено детерминиране и оценка на степента на риск при консумиране на контаминирани хранителни продукти. Разработени са редица лабораторни схеми, включващи генни мишени, праймерни последователности и оптимизиране на условията на реакцията спрямо различни хранителни патогени и типове проби за анализ.

С помощта на ПВР-РВ успешно е скриниран широк набор от хранителни продукти, с възможна потенциално участие при възникнал през 2001 година епидемичен гастроентеритен взрив в Кери (САЩ), при който са засегнати 109 лица. При лабораторните тестове чрез ПВР-РВ се позитивират консумирани продукти от пилешко месо. Таргетен участък е 102 кб фрагмент от *invA* гена (Daum et al., 2002).

Разработена е SYBR-green I базиран РТ-ПВР за детекция на *L. monocytogenes* в биофилми, която достига детекционен лимит от 6.0×10^2 КОЕ/см² при капацитет на останалите методи за бърза детекция 10.0×10^5 /мл (Rodrigues et al., 2005). Таргетен за детекцията ген е листериолизин (*hly*).

Чрез комбиниране на подходяща обработка на месни проби и последваща ПВР-РВ, Rudi и сътр. (2004) успяват да установят детекционния лимит от 2 до 4 КОЕ/реакция като количествено определяне може да се извърши при стойности на контаминация $>4 \log_{10}$.

Към момента не са разработени достатъчен брой ПВР-РВ базирани схеми за детекция и количествено определяне на *Y. enterocolitica* в хранителни продукти. Оптимизирана е детекция на патогена в свинско месо, като таргетен ген е *ail* (Frederiksson-Ahoma et al., 2007). Също така са направени опити за определяне на *Y. enterocolitica* в клиничен материал (Zheng et al., 2007). През 2012 г. е разработен нов, високо чувствителен и специфичен метод за директно доказване и количествено определяне *Y. enterocolitica* в изкуствено и естествено контаминирано сурово краве мляко (Najdenski et al., 2012). Той се базира на оптимизиран qPCR протокол с използване на TaqMan сонда и праймери от хромозомния ген *ail*. За неговото

провеждане не се изисква набогатяване на пробата мляко, което бързо да се определи експозицията на консуматора към този патоген.

Други молекулярно-биологични подходи за генотипиране на *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* изолирани от хранителни продукти и клинични проби

Известно е, че съществува тясна връзка между различните биосеротипове и фаготипове на йерсиниозните изолати. За доказване на корелационно съотнасяне между щамове, изолирани от различни по своя размер епидемични взривове, с доказано участие на хранителен продукт в трансмисията на патогена, са разработени редица схеми за генотипно и фенотипно типизиране. Възможностите, които предлага съпоставянето на получените чрез пулсова-електрофореза отпечатъци се оказват неочаквани за субтипизирането на бактериалните щамове (Bohm and Karch, 1992). Въвеждането на PFGE техниката е многообещаващ метод за епидемиологичното трасиране на няколко патогена, като тази форма на геномна макрорестрикция е успешно приложена и за редица йерсиниозни щамове (Najdenski et al., 1994; Burchrieser et al., 1994).

Filetici и сътр. (2000) успяват да анализират 27 йерсиниозни щамове, изолирани от храни и клиничен материал. Данните показват, че 19 от изолираните от хранителни проби щамове са *Y. enterocolitica*, четири са *Y. frederiksenii*, както и четири от вида *Y. intermedia*. Всички клинични изолати принадлежат към *Y. enterocolitica*. Биосеротипирането на изолатите от клиничен материал са съответно 2/O:9, 1/O:5, 1/O:7,8, 4/O:3. Изолатите от хранителни продукти спадат към 10 различни биосеротипа, включително тези на клиничните изолати, с изключение на 2/O:9. Интерес представляват и данните за плазмидно носителство – съответно 48.1% безплазмидни изолата от хранителни продукти и 57.1% безплазмидни щамове, изолирани от клиничен материал. При 5 изолата се установява носителство на малки плазмиди, с размери вариращи от 2.0 до 4.0 кб. Също при 5 изолата се открива носителство само на един плазмид. 92.0 кб плазмид се открива при два щамове, изолирани от една и съща проба (мляко и околната среда). 76.0 кб плазмид се открива при 3 от 7 клинични изолата и само при 1 от 27 изолата от хранителни продукти (всички тези изолати принадлежат към биосеротип 4/O:3). 64.7% от изолатите на *Y. enterocolitica* и *Y. intermedia* се отнасят към биотип 1, считана за непатогенна за човека, останалите принадлежат към биотип 2 и 4. От изолатите, принадлежащи към патогенните за човека биосерогрупи, един от

щамовете, изолирани от мляко и 3 от клинични проби (всички от биосеротип 4/O:3), носят вирулентен плазмид, имат способност за растеж в бедна на калций среда и автоаглутинират. Анализите показват, че йерсиниозните щамове изолирани от храни принадлежат към различни видове и биосеротипове. От мляко са изолирани *Y. enterocolitica* и *Y. frederiksenii*. Съответно от сирене са изолирани *Y. enterocolitica*, както и от салами и други продукти. С цел допълнително субтипирание, рестрикционните анализи сочат следните характеристики на основните в експеримента биосеротипа:

1. Биосеротип 1/O:6,30 – при използване на *Xba* ендонуклеаза, получените за 5 щамове рестрикционни профили са с коефициент за сходство от 53% до 72%. Използването на *SpeI* ендонуклеаза води до получаването на фрагменти, със сходство 65% - 100%.
2. Биосеротип 4/O:3 – при анализа на 5 щамове, един от мляко и 4 от клинични проби, съответните стойности за двете нуклеази са 90% - 100%, респект. 79% - 100%.
3. Биосеротип 1/O:5 – анализа на три щамове, съответно от мляко, околна среда и клинична проба генерира 3 профила със стойности съответно 59% - 87% и 50% - 70%.

Анализът на литературните данни показва, че динамиката на епидемиологичния процес при йерсиниозите, причинени от *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* е комплексен фактор, обуславящ се както от свойствата и характеристиките на тези патогени, така и от условията на околната среда. Повсеместното разпространение на видовете *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, както и разнообразната клинична симптоматика, съчетани с невъзможността в повечето от случаите на заболявания да бъде дефиниран конкретния причинител, затрудняват изграждането на стандартизирана схема за детекция, превенция и контрол на йерсиниозата с цел намаляване на рисковия фактор за общественото здраве. Редица епидемиологични проучвания, ясно дефинират връзката между инфекцията и участието на контаминирани хранителни продукти. Липсват обаче данни за това как се променя патогенния потенциал на йерсиниите, контаминиращи различни храни, в зависимост от условията и сроковете на съхранение, което е в пряко отношение с капацитета на конвенционалната микробиологична методология, използвана в лабораторната практика. Липсата на бързи и надеждни методи за директно количествено определяне на патогенните йерсинии в разнообразни храни е ново предизвикателство за изследователите, решението на което ще допринесе за обективната оценка на риска за здравето на консуматора.

Литература

1. Божкова, К.Д., Изолиране и микробиологична характеристика на щамове *Yersinia enterocolitica*. Дисертация за кандидат на медицинските науки, 1987, Варна
2. Голубева, И.В., В.А. Килессо, Б.С. Киселева, и сътр. Энтеробактерии (Руководство для врачей), Москва, Медицина, 1985, 220-239.
3. Ефремова, А., Д. Куюмджиев. Епидемиол. микробиол. и инфекц. болести. 1975, 4, 350-352.
4. Павлов, А. Род *Yersinia* – методи за изолиране и диференциране, разпространение и влияние на някои фактори върху развитието и преживяемостта им. Дисертация за присъждане на доктор на ветеринаромедицинските науки, София, 1989.
5. Славчев, Г.З. Проучвания върху *Yersinia enterocolitica* серотип О:3 в млякото и млечните продукти с оглед ветеринарносанитарна експертиза. Дисертация “Доктор на ветеринарномедицинските науки”, София, 1989.
6. Aber, R.C., M.A. McCarthy, R. Berman et al., An outbreak of *Yersinia enterocolitica* gastrointestinal illness among members of a Brownie troop Centre County. The 22nd International conference of Antimicrobial agents and Chemotherapy, 1982.
7. Abravaya, K., J. Huff, R. Marshall, et al. Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, 14, 468-474.
8. Adams, M., B. Currie. *Yersinia enterocolitica*. *Pediatrics in Review.*, 1998, 19, 250-251.
9. Ahmed, A., M.K. Mustafa, T.A. El-Bassiony. Growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in yogurth. *J. Food Prot.*, 1986, 49, 983-985.
10. Aleksic, S., and J. Bockemuhl. *Yersinia* and other enterobacteriaceae, p.483-496. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology* 7th ed. American Society for microbiology, Washington, D.C. 1999.
11. Anon, B. Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European union and Norway. European Commission, Health & consumer protection directorate-general, 2003. *Report*
12. Appelbaum, J.S., G. Wilding, L.J. Morse. *Yersinia enterocolitica* endocarditis. *Arch. Inter. Med.*, 1983, 143, 11-15.
13. Bauer, H.M., K.E. Mark, M. Samuel, et al. Prevalence of and associated risk factors for fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in California; 2000–2003. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, 41, 795–801.
14. Bercovier, H., Mollaret, H.H., Alonso, et al. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr. Microbiol.*, 1980, 4, 225-229.
15. Bhaduri, S., B. Cotrel. Direct detection and isolation of plasmid-bearing virulent serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 4952-4955.
16. Bhaduri, S., B. Cotrel. Use of single procedure for selective enrichment, isolation, and identification of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* of various serotypes from pork samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997a, 63, 1657-1660.
17. Bhaduri, S., I.V. Wesley, E. Buch. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in pigs in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 11, 7117-7121.
18. Bodnaruk, P., R. Williams, D. Golden. Survival of *Yersinia enterocolitica* during fermentation and storage of Yogurt. *J. Food Sci.*, 1998, 63, 535-537.
19. Böhm, H., and H. Karch. DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 2169-2172.
20. Borch, E., M.L. T. Nesbakken, H. Christensen. Hazard identification in swine slaughter

- with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, 30: 9-25.
21. Bottone, E.J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb. Infect.*, 1999, 1, 323-333.
 22. Bottone, E.J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, 10, 257-276.
 23. Bottone, E.J. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganisms. *CRC Cr. Rev. Microbiol.*, 1977, 5, 211-241.
 24. Bouza, A., A. Dominguez, M. Meseguer, L. Buzon, D. Bioxeda, M.J. Revillo, L. De Rafael, J. Martinez-Beltran.. *Yersinia enterocolitica* septicemia. *A. J. Clin. Pathol.*, 1980, 74, 404-409.
 25. Boyapalle, S., I.V. Wesley, H.S. Hurde. Comparison of culture, multiplex, and 5' nuclease polymerase chain reaction assays for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products. *J. of Food Prot.*, 2001, 64, 1352-1361.
 26. Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Falcao, et al. Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by deoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1976, 26, 180-194
 27. Brenner, D.J., H. Bercovier, J. Ursing, et al. *Yersinia intermedia*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnase-positive, melibiose positive raffinose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Curr. Microbiol.* 1980, 4:207-212.
 28. Bucher, M., C. Meyer, B. Grotzbach, et al. Epidemiology data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000-2006. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 2008, 5, 3, 273-280.
 29. Buchrieser, C., R. Brosch, S. Bach, A. Guiyoule, E. Carniel. Molecular characterization of *Y. enterocolitica* by pulsed-field gel electrophoresis and hybridization of DBA fragments to ail and pYV probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 60, 4371-4379.
 30. Budnaruk, P.W., F.A. Draughon. Effect of packaging atmosphere and pH on the virulence and growth of *Yersinia enterocolitica* on pork stored at 4 degrees. *Food Microbiology*, 1998, 15, 129-136.
 31. Carniel, E. Evolution of pathogenic Yersiniae, some lights in the dark. In: The genus *Yersinia*, (Skurnik et al., eds), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003, 3-12.
 32. Carniel E. Cherchez les *Yersinia* et vous les trouverez ou "Le diagnostic biologique des yersiniozes". *Technique et Biologie.*, 1993, 1, 7-14.
 33. Chandler, N.D., M.T. Parise. *Yersinia enterocolitica* masquerading as appendicitis. *Arch. Pediatr. Adol. Med.*, 1994, 148, 527-528.
 34. Chiesa, C., Pacifica, L., Nanni, F., Renzi, A.M., Ravagnan, G. *Y. pseudotuberculosis* in Italy. Attempted recovery from 37666 samples. *Microbiol. Immunol.*, 1993, 37, 391-394.
 35. Chao, W.L., Ding, R.J., Chen, R.S. Survival of *Yersinia enterocolitica* in the environment. *Can J Microbiol.*, 1988, 34, 753-6.
 36. Clark, M.A., B.H. Hirst, M.A. Jepson. M cell surface b1 integrin expression and invasive-mediated target in of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Payer patch M cells. *Infect. Immune.*, 1998 66: 1237-1243.
 37. Collins, F.M. *Pasteurella*, *Yersinia*, and *Francisella*. In: Baron, S., (ed.): *Medical Microbiology*, 4th Edition, The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston 1996.
 38. Cover, T.L., L.C. Aber. *Yersinia enterocolitica* N. *Engl. J. Med.*, 1989, 321, 16-24.
 39. Cox, N.A., J.S. Bailey, F. Del Corral. Comparison of enrichment and plating media for isolation of yersinia. *Poult. Sci.*, 1990, 69, 686-693.
 40. Daum, L.T., W.J. Barnes, J.C. McAvin, M.S. Neidert. Real-Time PCR detection of

- Salmonella* in suspect food from gastrointestinal outbreak in Kerry Country, Texas. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40, 3050-3052
41. De Boer, E. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 1995, 13, 71-73.
 42. De Grandis, S.A., P.J. Krell, D.E. Flett, R.M.W. Stevenson. DNA relatedness of serovars of *Yersinia rockery* the enteric Redmouth Bacterium. *Int. J. Syst.Bacteriol.*, 1988, 38, 49-55.
 43. De Lamo-Castellví, S., M. Capellas, T. López-Pedemonte, et al. Behaviour of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.*, 2005, 68, 528–533.
 44. Delor, I.A., G. Cornelis. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immune.*, 1992, 60, 4269-4277.
 45. De Meyer, H., J.M. Debevere. Kinetics of interactions of lactic acid, pH and atmosphere on the growth and survival of *Yersinia enterocolitica* IP 383 O:9 at 4 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.*, 1995, 27: 229-244.
 46. Deng, W., V. Burland, G. Plunkett III, et al. Genome Sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J. of Bacteriol.*, 2003, 184: 4601-4611.
 47. Donohoe, G. G., M. Laaksonen, K. Pulkki, T. Ronnema, V. Kairisto. Rapid single-tube screening of the C282Y hemochromatosis mutation by real-time multiplex allele-specific PCR without fluorescent probes. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 1540-1547.
 48. Doyle, M.P. *Yersinia enterocolitica*. *Food Tech.*, 1988, 42, 181.
 49. Durisin, M.D., A. Ibrahim, M.W. Griffiths. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in milk and pork using DIG-labelled against the *yst* gene. *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, 37, 103-112.
 50. Earley, S., V.L. Miller. Characterisation of a novel porin involved in *Yersinia enterocolitica* infection. *Infect. Immun.*, 2006, 74, 4361-4365.
 51. EFSA, European Food Safety Agency. The EU summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, and foodborne outbreaks in 2011. *EFSA J.*, 2013, 11, 4, 3129.
 52. Ehara, A., K. Egawa, F. Kuroki, et al. Age-dependant expression of abdominal symptoms in patients with *Yersinia enterocolitica* infection. *Pediatr. Int.*, 2000, 43, 364-366.
 53. Eppinger, M., M.J Rosovitz, W. Fricke, D. Rasko, M. Kokorina. The complete genome sequence of *Y. pseudotuberculosis* IP 31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS Genet.*, 2007, 31: 8 e142.
 54. Farmer, J.J., G.P. Carter, V.L. Miler. Pyrazinamidase, CR-MOX agar, salicin fermentation-esculin hydrolyses and D-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. *J.Clinic. Microbiol.*, 1992, 30, 2589-2594.
 55. Fenwick, S.G., P. Madie, C.R. Wilks. Duration of carriage and transmission of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype 0:3 in dogs. *Epidemiol. Infect.*, 1994, 113, 471-477
 56. Filetici, E., M.P. Anastasio, M. Pourshaban, et al. Genotypic and fenotypic characteristic of *Yersinia* spp. Isolates from food and man. *Food Microbiol.*, 2000, 17, 261-267.
 57. Foberg, U., A. Fryden, E. Kohlstrom, K. Persson. *Yersinia enterocolitica* septicaemia: clinical and microbiological aspects. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1986, 18, 269-279.
 58. Fredriksson-Ahomaa, M., T. Korte, H. Korkeala. Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2001, 32, 375-378.
 59. Fredriksson-Ahomaa M., and H. Korkeala. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin Microbiol Rev.*, 2003, 16, 220-229.
 60. Fredriksson-Ahomaa M., A. Stole, and R. Stephan. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, 119, 207-212.

61. Fredriksson-Ahomaa M., S. Hielm, H. Korkeala. High prevalence of *yadA*- positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. *J. Food Prot.*, 1999, 62, 123-127.
62. Fredriksson-Ahomaa, M., T. Niskanen, H. Neubauer. Characterisation of sucrose-negative *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates recovered from pig tonsils. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 75, 19-25.
63. Fredriksson-Ahomaa, M., T. Korte, H. Korkeala, Contamination of carcasses, offals, and the environment with *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse. *J. Food Protection*, 2000, 63, 31-35.
64. Fukushima, H., Direct isolatin of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 50, 710-712.
65. Fukushima, H., K. Hoshina, H. Itogawa. Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* throught imported pork, beef, and fowl. *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, 35, 205-212.
66. Fukushima, H., and M. Gomyoda. Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57, 1152-1155.
67. Fukushima, H., M. Gomyoda, K. Shiozawa, et al. *Yersinia pseudotuberculosis* infection contracted through water contaminated by a wild animal. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26, 584-585.
68. Gort, A.S., V. L. Miller. Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. *Infect. Immun.*, 2000, 68, 6633-6642.
69. Grahek-Ogden, D., B. Schimmer, K.S. Cudjoe, et al. Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, 13, 754-756.
70. Grant, T., V. Bennett-Wood, R.M. Robins-Browne. Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. *Infect Immun.*, 1998, 66, 1113-1120.
71. Grutzkau, A., C. Hanski, H. Hahn, E. Riecken. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Payer patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other bacteria. *Gut*, 1990, 31, 1011-1015.
72. Greenwood, M.H., W.L. Hooper. Excretion of *Yersinia* spp. associated with consumption of pasteurized milk. *Epidem. Infect.*, 1990a, 104, 345-350.
73. Greenwood, M.H., W.L. Hooper. The source of *Yersinia* spp. in pasteurized milk: an investigation at a diary. *Epidem. Infect.*, 1990b, 104, 351-360.
74. Gurtler, M., T. Alter, S. Kasimir, M. Linnebur, and K. Fehlhaber. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. *J. Food Prot.*, 2005, 68, 850-854.
75. Hanski, C., U. Kutchka, H. Schmoranzer, et al. Immunochemical and electron microscopic study of interaction of *Y. enterocolitica* serotype O:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect. Immun.*, 1989, 57, 673-678.
76. Hayashidani, H., Y. Ohtomo Potential sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori Prefecture, Japan., *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33: 1253-1257.
77. Head, C.B., D.A. Whitty, S. Ratnam. Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.*, 1982, 16, 615-621.
78. Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak and P.M. Williams. Real time quantitative PCR. *Genome Methods*, 1996, 6, 986-994.
79. Higuchi, R., C. Flocker, G. Dollinger, R. Watson. Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biothechnology*, 1993, 11, 1026-1030.
80. Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh, R. Griffith. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequence. *Biothechnology*, 1992, 10, 413-417.

81. Hubbert, W.T. Yersiniosis in mammals and birds in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1972, 21, 458-463.
82. Hudson, J.A., Mott, S.J., Delacy, K.M. et al, Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. *Int J Food Microbiol.*, 1992, 16, 99-108.
83. Hudson, J.A., N.J. King, A.J. Cornelius, et al. Detection, isolation, and enumeration of *Yersinia enterocolitica* from raw pork. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 123, 25-31.
84. Hudson, J.A., S.J. Mott, N. Penney. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J. Food Protection*, 1994, 57, 204-208.
85. Hurst, M.R.H., A. Becher, S.D. Young, et al. *Yersinia entomophaga* sp. Nov. isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, 61, 844-849.
86. Hurvell, B. Zoonotic *Yersinia* infection: Host range clinical manifestations and transmission between animals and man. In: Bottone, E.J. (ed.), *Yersinia enterocolitica*. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1981, p. 145-160
87. Ibrahim, A., W. Liesack, E. Stackebrandt. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 1942-1947.
88. Isberg, R., D.L. Voorhis, S. Falkow. Identification of invasins: A protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell*, 1987, 50, 769-778.
89. Isberg, R.R. Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells. *Mol. Biol. Med.*, 1990, 7, 73-82.
90. Jalava, K., S. Hallanvuo, U.M. Nakari, et al. Multiple outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in Finland. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42, 2789-2791.
91. Jalava, K., M. Hakkinen, M. Valkonen, et al. An outbreak of gastrointestinal illness and erythema nodosum from grated carrots contaminated with *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Infect. Dis.*, 2006, 194, 1191-1193.
92. Johannessen, G.S., G. Kapperud, H. Kruse. Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Norwegian pork products determined by a PCR method and a traditional culturing method. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, 54: 75-80.
93. Jones, T.F., S.C. Buckingham, C.A. Bopp, E. Ribot, W. Schaffner. From pig to pacifier: chitterling-associated yersiniosis outbreak among black infants. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, 9, 1007-1009.
94. Jourdan, A.D., S.C. Johnson, I.V. Wesley. Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, 3750-3755.
95. Kapperud, G., T. Vardund, E. Skjerve. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59, 2938-2944.
96. Kapperud, G., *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int J Food Microbiol.*, 1991, 12, 53-65.
97. Karapinar, M., and S.A. Gonul. Survival of *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* in spring water. *Int J Food Microbiol.*, 1991, 13, 315-9.
98. Kechagia, H., C. Nikolaou, V. Ioannidou, et al. Detection of chromosomal and plasmid-encoded virulence determinants in *Y. enterocolitica* and other *Yersinia* spp. isolated from food animals in Greece. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, 118, 326-331.
99. Kim, T.-J., B.M. Young, and G.M. Young. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 17, 5466-5474.

100. Korte, T., M. Fredriksson-Ahomaa, T. Niskanen, et al. Low prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in sow tonsils. *Foodborne Pathog Dis.*, 2004, 1, 45-52.
101. Kot, B., E.A. Trafni, and A. Jakubczak. Application of multiplex PCR for monitoring colonization of pig tonsils by *Yersinia enterocolitica*, including biotype 1A, and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Food. Prot.* 2007, 70, 1110-1115.
102. Kuehni-Boghenbor, K., S.L.W. On, B. Kokotovic, et al. Genotyping of human and porcine *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia intermedia*, and *Yersinia bercovieri* strains from Switzerland by amplified fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 4061-4066.
103. Lake, R., A. Hudson, and P. Cressey. Risk Profil: *Yersinia enterocolitica* in Pork. Report prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority contract for scientific services, 2004, 1-48.
104. Lantz, P.G. PCR-based detection of microorganisms in complex biological samples. *Thesis. Department of applied microbiology Lund University, Sweden*, 1998, 28-46.
105. Laukkanen, R., P.O. Martinez, K.-M. Siekkinen, et al. Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 17, 5444-5450.
106. Lee, L.A., A.R. Gerber, D. Lonsway, et al. *Yersinia enterocolitica* O:3 infection in infants and children associated with the household preparation of chitterlings. *N. Eng. J. Med.*, 1990, 322, 984-987.
107. Lee, L.G., C. R. Connell, W Bloch. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 11: 3761-3766.
108. Lenz, T., K. Sculte, W. Meyer. *Yersinia enterocolitica* septicemia during long-term immunosuppression treatment. *J. Infect. Dis.*, 1984, 150, 963-967.
109. Lindblad, M., H. Lindmark, S.T. Lambertz, R. Lindqvist. Microbiological baseline study of swine carcasses at Swedish slaughterhouses. *J. Food Prot.*, 2007, 70, 1790-1797.
110. Lindblad, M., H. Lindmark, S.T. Lambertz, R. Lindqvist. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. *J. Food Prot.*, 2006, 69, 2875-2883.
111. Little, C.L., S. Knochel. Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* in Brie stored at 4, 8 and 20 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, 24, 137-145
112. Livak, K., A. Flood, J. Marmaro and W. Giusti. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, 1995, 4, 357-362.
113. Logue, C.M., J.J. Sheridan, G. Wauters, et al. *Yersinia* spp. and numbers, with particular reference to *Y. enterocolitica* bio/serotypes, occurring on Irish meat and meat products, and the influence of alkali treatment on their isolation. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, 33, 257-274.
114. Malorny, B., P.T. Tassios, P. Radstrom. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, 83, 39-48.
115. Marjai, E.K.M., I. Kajáry, Á. Délteky. Isolation from food and characterization by virulence tests of *Yersinia enterocolitica* associated with an outbreak. *Acta Microbiol. Hung.*, 1987, 34, 97-109.
116. Marks, M.I., C.H. Pai, L. Lafleur, et al. *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis, a prospective study of clinical, bacteriological and epidemiologic features. *J. Ped.*, 1980, 96, 26-31.
117. Massari, P., Y. Ho, L.M. Wetzler. *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, 97, 9070-9075.

118. Martinez, P.O., M. Fredriksson-Ahomaa, Y. Sokolova, M. Roasto, A. Berzins, and H. Korkeala. Prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad Region) pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009, 6, 6, 719-724.
119. Mhlanga, M.M., L. Malmberg. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods*, 2001, 25, 463-471.
120. Miller, V., S. Falkow. Evidence for two genetic loci from *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion in epithelial cells. *Infect Immun.*, 1988, 56: 1242–1248.
121. McNally, A., R.M. La Ragione, A. Best, G. Manning, and D.G. Newell. An aflagellate mutant *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain displays altered invasion of epithelial cells, persistence in macrophages, and cytokine secretion profiles in vitro. 2007, *Microbiology*, 153, 1339-1349.
122. Merhej, V., T. Adekambi, I. Pagnier, et al. *Yersinia massiliensis* sp. Nov., isolated from fresh water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, 58, 779-784.
123. Milnes, A.S., I. Steward, F.A. Clifton-Hadley, et al. Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* in cattle, sheep, and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiol. Infect.*, 2008, 136, 739-751.
124. Mollaret, H. Fifteen centuries of Yersiniosis. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, Basel, Karger, 1995, 13, 1-4.
125. Morrison, T.B., J.J. Weis, C.T. Wittwer. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 1998, 24, 954-958.
126. Najdenski, H., I. Itean, and E. Carniel. Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, 32, 2913-2920.
127. Najdenski, H., M. Heyndrickx, L. Herman, H. Werbrouck, E. Van Coillie. Quantification of *Yersinia enterocolitica* in raw milk using qPCR. *J. Vet. Med.*, 2012, 160, 428-434.
128. Nikolaou, K., A. Hensel, C. Bartling, et al. Prevalence of anti-*Yersinia* outer protein antibodies in goats in Lower Saxony. *J. Vet. Med. B*, 2005, 52, 17-24.
129. Nikolova, S., Y. Tzvetkova, H. Najdenski. Isolation of pathogenic yersiniae from wild animals in Bulgaria. *J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Publ. Health*, 2001, 48, 203-209.
130. Niskanen, T., Fredriksson-Ahomaa, M., and Korkeala, H. *Yersinia pseudotuberculosis* with limited genetic diversity is a common finding in tonsils of fattening pigs. *J. Food. Prot.*, 2002; 65: 540-545.
131. Niskanen, T., J. Waldenstrom, M. Fredriksson-Ahomaa, B. Olsen, and H. Korkeala. *virF*-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 4670-4675.
132. Niskanen, T., R. Laukkanen, M. Fredriksson-Ahomaa, and H. Korkeala. Distribution of *virF/lcrF*-positive *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:3 at farm level. *Zoonoses Public Health*. 2008, 55, 214-221.
133. Nowgesic, E., M. Fyfe, J. Hockin, et al. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* in British Columbia – November 1998. *Can. Commun. Dis. Rep.*, 1999, 25, 97-100.
134. Nuorti, J.P., T. Niskanen, S. Hallanvou, et al. A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 infection from iceberg lettuce. *J. Infect. Dis.*, 2004, 189: 766-774.
135. Ostroff, S.M., G. Kapperud, L.C. Huteagner, et al. Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a prospective case-control study. *Epidemiol. Infect.*, 1994, 112, 133-141.
136. Özbas, Z. Y., A. Lehner, and M. Wagner. Development of a multiplex and semi-nested PCR assay for detection of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila*

- in raw milk. *Food Microbiol.*, 2000, 17, 197-203.
137. Pal, C.H., V. Mors. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica* *Infect. Immun.*, 1978, 19, 908-911.
 138. Pepe, J.S., M. Watchel, E. Wager, V. Miller. Pathogenesis of defined invasive mutants of *Yersinia enterocolitica* In BALB/c mouse model of infection *Infect. Immun.*, 1995, 4837-4848.
 139. Perna, N.T., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J.D. Glasner. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 2001, 409, 529-533.
 140. Platt-Samoraj, A., M. Ugorski, W. Szweda, et al. Analysis of the presence of ail, ystA and ystB genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from aborting sows and aborted fetuses. *J. Vet. Med. B*, 2006, 53, 341-346.
 141. Prpic, J.K., R.M. Robins-Browne, and R.B. Davey. Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using Congo red agar. *J. Clin. Microbiol.*, 1983, 9, 486-490.
 142. Rabson, AR, A.F. Hallett, H.J. Koornhof. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J Infect Dis.*, 1975, 131, 447-451.
 143. Ramesh, A., B.P. Padmapriya, A. Chrashekar. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol. Cell. Probes*, 2002, 16: 307-314.
 144. Rea, M.C., T.M Cogan, S. Tobin. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, 73, 331-336.
 145. Rijpens, N.G. Jannes, L. Herman. Messenger RNA-based RT-PCR detection of viable *Salmonella*. *Int. Dairy J.*, 1996, 2, 233-238.
 146. Robins-Browne, R.M., M.D. Miliotis, S. Cianciosi, V. Miller. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 1997, 3, 908-911.
 147. Rodriguez, D.C., R.V. Tauxe, B. Rowe. International increase in. *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol. Infect.*, 1990, 105, 21-27.
 148. Rossen, L., P. Norskov, K. Holmstrom. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.*, 1992, 17, 37-45.
 149. Rimhannen-Finne, R., T. Niskanen, S. Hallanvuoto, et al. *Yersinia pseudotuberculosis* causing a large outbreak associated with carrots in Finland, 2006. *Epidemiol. Infect.*, 2008, 4, 1-6.
 150. Robins Browne, M., *Yersinia enterocolitica*. In: Doyle, M.P., L. Beuchat, T. Montville (eds). *Food Microbiology. Fundamentals and frontiers*, ASM press, Washington, DC, 2001, 215-245.
 151. Rudi, K., H. Kristin Høidal, T. Katla, et al. Direct Real-Time PCR Quantification of *Campylobacter jejuni* in Chicken Fecal and Cecal Samples by Integrated Cell Concentration and DNA Purification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 790-797.
 152. Saha, B.K., B. Tian, R.P. Bucy. Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe *J. Virol. Methods*, 2001, 93, 33-42.
 153. Sampimon, O.C., J. Sol, M.G.J. Koene, et al. Mastitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in a cow. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 2005, 130, 10, 306-308.
 154. Sandery, M., T. Stinear, C. Kaucher. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental waters by PCR. *J. Appl. Bacterio.*, 1996, 80, 327-332.
 155. Satterthwaite, P., K. Pritchard, D. Floyd, and B. Law. A case-control study of *Yersinia enterocolitica* infections in Auckland. *Aust N Z J Public Health*, 1999, 23, 482-488.
 156. Schiemann, D.A. Alkalotolerance of *Yersinia enterocolitica* as a basis for selective isolation from food enrichments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, 46, 22-27.

157. Schiemann, D. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: Food borne bacterial pathogens, 1989 (M.P. Doyle, ed.), Dekker Inc., New York, 601-672.
158. Sebes, J.L., E. Maybry, J. Rabinowitz. Lung abscess and osteomyelitis of fib due to *Yersinia enterocolitica* *Chest.*, 1976, 69: 546-548.
159. Shayegani, M., W.B. Stone, I. DeForge, et al. *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from wildlife in New York State. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, 52, 420-4.
160. Shwimmer, A., M. Freed, S. Blum, et al. Mastitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in Israeli dairy cattle and public health implications. *Zoonoses Publ. Health*, 2007, 54, 353-357.
161. Siraj, A.K., U. Ozbek, S. Sazawal, et al. Preclinical validation of a monochrome real-time multiplex assay for translocations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 2002.,8, 3832-3840
162. Slee, K.J., and C. Botton. Enteritis in sheep, goats and pigs due to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Austr. Vet. J.*, 1990, 67, 9, 320-322.
163. Slee, K.J., P. Brightling and R.J. Seiler. Enteritis in cattle due to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Austr. Vet. J.*, 1988, 65, 9, 271-275.
164. Slavchev, G. Development and survival of *Yersinia enterocolitica* in pasteurized milk and ice cream. *Vet. Med. Nauki*, (article in Bulgarian), 1986, 23, 77-85
165. Slavchev, G., I. Gogov. Survival of *Yersinia enterocolitica* in Bulgarian. yogurtand Vita cultures milk. *Veterirwrnomeditsinski Nauki*, 1983, 20, 68-73.
166. Sodervik, H, H. Syrjala, S. Raisanen. Interstitial pneumonia and sepsis caused by *Yersinia enterocolitica* serotype 3. *Can. J. Infect. Dis.*, 1986, 18: 241-243.
167. Solinas, A., L.J. Brown, C. McKeen, et al. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, E96.
168. Sonnenwirth, A. Bacteremia with and without meningitis due to *Yersinia enterocolitica*, *Edwardsiella tarda*, *Comamonas terrigena*, and *Pseudomonas maltophilic*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1970, 174: L488-L502.
169. Souza, R.A., A. Pitondo-Silva, D.P. Falcao, and J.P. Falcao. Evaluation of four molecular typing methodologies as tolls for determining taxonomy relations and for identifying species among *Yersinia* isolates. *J. Microbiol. Methods*, 2010, 82, 2, 141-150.
170. Spira, TJ, S.A. Kabins. *Yersinia enterocolitica* septicemia with septic arthritis. *Arch. Intern. Med.*, 1976, 136: 1305-1308.
171. Sprague, L.D., H.C. Scholz, S. Amann, H.J. Busse, and H. Neubauer. *Yersinia similis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, 58, 952-958.
172. Sprague, L.D. and H. Neubauer. *Yersinia aleksiciae* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol., Microbiol.*, 2005, 55, 831-835.
173. Stern, N.J., M.D. Pierson, A. Kotula. Effects of pH and sodium chloride on *Yersinia enterocolitica* growth at room temperatures. *J. Food Sci.*, 1980, 45, 64-67.
174. Strauch, E., H. Kaspar, C. Schaudinn. Characterization of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 5634-5642.
175. Tacket, C.O., J. Ballard, N. Harris, et al. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections caused by contaminated tofu (soybean curd). *Am J Epidemiol.*, 1985, 121, 705-711.
176. Tacket, C.O., J.P. Narain, R. Sattin, J.P. Lofgren. A multistate outbreak of infections caused by *Yersinia enterocolitica* transmitted by pasteurized milk. *JAMA*, 1984, 251, 483-486.
177. Tan, W., K. Wang, T. Drake. Molecular beacons, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, 8, 547-553.

178. Tassinari, A.R., and Franco, B.D., Landgraf, M. Incidence of *Yersinia* spp. in food in Sao Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, 21, 263-270.
179. Tauxe, R.V., J. Vandepitte, G. Wauters, S.M. Martin, V. Goossens, P. DeMol, R.VanNoyen, and G. Thers. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet*, 1987, 1, 1129-1132.
180. Thompson, J.S., and M.J. Gravel. Family outbreak of gastroenteritis due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 from well water. *Can J Microbiol.*, 1986, 32, 700-701.
181. Tobback, E., A. Decostere, K. Hermans, F. Haeselbrouck, K. Chiers. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.*, 2007, 30, 5, 257-268.
182. Toma S. Human and nonhuman infections caused by *Yersinia enterocolitica* in Canada from 1962 to 1985. *J. Clin. Microbiol.*, 1986, 24: 465-466.
183. Tomb, J.F., O. Whitte, A.R. Kerlavage, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 1997, 387, 538-545.
184. Tsubokura, M., K. Otsuki, K. Sato, et al. Special features of distribution of *Yersinia pseudotuberculosis* in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27, 790-791.
185. van der Velden, V.H., A. Hochhaus, G. Cazzaniga, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 2003, 7, 1013-1034.
186. Velazquez, L., M.E. Escudero, and A.M.S. Guzman. Biovars, serovars, and phagovars of *Yersinia enterocolitica* isolated from 450 samples of cold food in San Luis, Argentina. *J. Food Prot.*, 1993, 56, 333-335.
187. Velazquez, L., V. Jadot, P. Denoel, A. Tibor. Detection of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 by PCR method. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34, 1224-1227.
188. Vet, J.A.M., A.R. Majithia, S.A.E. Marras, et al. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 96, 6394-6399.
189. Walker, S.J., A. Gillmour. The incidence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like organisms in raw and pasteurized milk in Northern Ireland. *J of Applied. Bacteriol.*, 1986, 61, 133-138.
190. Walker, S.J., Brooks, J. Survey of the incidence of aeromonas and yersinia species in retail foods. *Food Control*, 1993, 4, 34-40.
191. Wesselinova, D., P. Orozova, V. Necheva, E. Tambueva, V. Penkov. Biological peculiarities of some *Yersinia* species – strain-dependent virulence and strain-dependent stress proteins. *Ann. Microbiol.*, 2007, 57: 629-634.
192. Wittwer, C.T., K.M. Ririe, R.V. Andrew, et al. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 1997, 22, 176-181.
193. Zheng, H., J. Wang, Y. Sun, B. Jiang. Clinical isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* in China using Real Time PCR and cultural method. *Digestion*, 2007, 75, 199-204.