# تولید و تخلیص آنتروتوکسین مقاوم به حرارت یرسینیا آنتروکلی تیکا

دکتر محمدمهدی سلطان‌دلال ـ بخش میکروب‌شناسی ـ دانشکده بهداشت ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر ژان‌لوئی گئان ـ بخش بیوشیمی پزشکی و بیماریهای کودکان ـ دانشکده پزشکی ـ دانشگاه نانسی ۱ ـ واندوور ـ نانسی ـ فرانسه

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:57 IRDT on Wednesday August 21st 2019

## Production and Purfication of Heat-Stable (ST) Enterotoxin of Yersinia Enterocolitica

## ABSTRACT

Since the heat-stable enterotoxin (ST) produced by yersinia enterocolitica is similar to enterotoxin production by E. coli, it is probably classified among toxinogenic bacteria. The culture filtrate of ST-producing strains of Y. enterocolitica is able to activate Guanylate cyclase and to increase fluid accumulation action of cylic Guanosin 3', 5' - monophosphate (cGMP) in sucking mouse intestine. For production of enterotoxin (ST), three strains of Y. enterocolitica (4052-6809-6810) were selected from the Institute Pasteur culture collection. All were serotype 3, biotype 4 and had been isolated from patients with diarrhea. After obtaining a suitable amount of enterotoxin (ST), the crude toxin was fractionated by various methods including: Ultrafiltration, gel filtration, high performance liquid chromatography (H.P.L.C) and isoelectric focusing. The results showed that the purified (ST) has a molocular weight of about 5000 to 10000 dalton. Moreover, isolectric focusing of the (ST) in a gradient pH of 6.3 to 2.5 indicated that the toxin has two fractions, designated ST1 and ST2, with isoelectric points of Pi = 3.1 and Pi 2.9, respectively. Further study revealed that both fractions had similar toxin effect in the gut of sucking mice.

## چکیده

یرسینیا آنتروکلی‌تیکا به دلیل تولید آنتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) مشابه با اشریشیاکلی، احتمالاً در گروه باکتریهای توکسینوژن طبقه‌بندی می‌شود. کشت فیلترشده یرسینیاآنتروکلی‌تیکا قادر به فعال کردن گوآنیلات سیکلاز و افزایش تجمع گوآنوزین ۵-۳ منوفسفات حلقوی (cGMP) در روده بچه موش می‌شود. برای تولید آنتروتوکسین (ST)، ۳ سویه یرسینیاآنتروکلی‌تیکا (۶۸۱۰ـ ۶۸۰۹-۴۰۵۲) از مجموعه انستیتو پاستور فرانسه انتخاب شد. تمام سویه‌ها متعلق به سروتایپ ۳، بیوتایپ ۴ بوده از بیماران اسهالی جدا شده بودند. پس از تهیه مقادیر مناسب آنتروتوکسین (ST) اقدام به تفکیک اجزاء توکسین با استفاده از روشهای اولترافیلتراسیون، ژل فیلتراسیون، H.P.L.C و ایزوالکتروفوکالیزاسیون نمودیم. نتایج نشان داد که توکسین خالص شده دارای وزن مولکولی حدود ۵۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰ دالتون می‌باشد. بعلاوه، ایزوالکتروفوکالیزاسیون آنتروتوکسین (ST) در یک گرادیان pH از ۶/۳ تا ۲/۵ نشان داد که این توکسین دارای دو جزء تفکیکی ST1 با نقطه ایزوالکتریک Pi = ۳/۱ و ST2 با نقطه ایزوالکتریک Pi = ۲/۹ می‌باشد. بررسیهای بعدی نشان داد که دو جزء تفکیکی بدست آمده دارای فعالیت یکسان بر روده بچه موشهای چند روزه هستند.

## مقدمه

امروزه عفونتهای ناشی از یرسینیاآنتروکلی‌تیکا در نزد انسان در حال افزایش است. از میان آنها، گاستروآنتریت را هنوز به عنوان یکی از تظاهرات کلینیکی شایع بویژه نزد کودکان می‌توان نام برد(۴۱،۲۸،۲۳،۱۷)، همچنین به موارد پسودوآپاندیسیت(۴۰)، آرتریت چرکی(۴۰)، سپتی‌سمی(۳۸) و عفونت‌های چرکی (۳۶) می‌بایستی اشاره نمود.

در سال ۱۹۳۹ (۳۴) Schleifstein برای اولین بار از بیماری گاستروآنتریت وابسته به یرسینیاآنتروکلی‌تیکا سخن گفت. چند سال بعد او دریافت که یرسینیاآنتروکلی‌تیکا یکی از عوامل اصلی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:57 IRDT on Wednesday August 21st 2019

اسهال نزد انسان می‌باشد(۳۵).

در سال ۱۹۷۵، Carter(۳) نشان داد که میان عفونتهای تجربی یرسینیاآنتروکلی‌تیکا در موش و عفونت طبیعی نزد انسان، رابطه وجود دارد. تعدادی از محققان نشان دادند که سویه‌های انسانی مانند بعضی میکروبهای بیماریزا، قادر به نفوذ در سلولهای Hela می‌باشند(۱۰،۱۵).

Une(۳۹) گزارش داد که تنها سروتیپ‌های انسانی O : ۵ ، ۲۷ و O : ۹ و O : ۸ و O : ۳ قادر به نفوذ در سلول هلا هستند. برعکس، سویه‌های با منشاء آبی و مواد غذایی بجز موارد معدودی، فاقد قدرت فراگیری سلولهای اپی‌تلیال در شرایط in vivo هستند(۳،۱۰).

دو مکانیسم بیماریزایی در مورد یرسینیاآنتروکلی‌تیکا شناخته شده است : یکی حالت تهاجمی که نتیجه آن تکثیر میکروب در بافت، یعنی ویرولانس و دیگری، خاصیت توکسین‌زایی مشابه با آنتروتوکسین‌اشریشیاکلی می‌باشد(۱۴،۲۲).

۱ـ ویرولانس

پاتوژنیسیته یرسینیاآنتروکلی‌تیکا در بیماریهای گوناگون هنوز کاملاً مشخص نشده است.

معهذا نشان داده شده که ویرولانس میکروب در ارتباط با وجود پلاسمیدی با وزن مولکولی ۴۸-۴۰ مگادالتون است(۷،۱۲،۲۵).

خصوصیات قابل انتقال بوسیله پلاسمید عبارتند از اتواگلوتیناسیون(۳۷)، نیاز به کلسیم(۶)، تولید آنتی‌ژنهای W و V(۳۰)، ایجاد بیماریزایی در حیوانات آزمایشگاهی(۸)، تغییرات پروتئین غشاء خارجی (۱۶)، مقاومت به کمپلمان (۲۷)، قابلیت تهاجم نسبت به سلولهای هلا(۱۳)، کونژنکتیویت و کراتوکونژنکتیویت نزد خوکچه هندی(۵). اغلب خصوصیات نامبرده وابسته به درجه حرارت هستند.

۲ـ آنتروتوکسین

دو نوع آنتروتوکسین نزد اشریشیاکلی، یکی مقاوم به حرارت (ST) و دیگری حساس به حرارت (LT) یافت شده است(۴،۳۳). تولید آنتروتوکسین توسط ژنهایی که روی پلاسمید قرار دارند کنترل شده و قابل انتقال به باکتری دیگر هم می‌باشد(۱). در نتیجه امکان انتقال چنین پلاسمیدی به باکتریهای گرم‌منفی دیگری که معمولاً غیرپاتوژن هستند، وجود دارد.

Pai & Mors(۲۵) در سال ۱۹۷۸ برای اولین بار نشان دادند که یرسینیاآنتروکلی‌تیکا سروتیپ O : ۳ قادر به تولید آنتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) است. این توکسین دارای فعالیت مشابه با اشریشیاکلی بر روده بچه موش می‌باشد. بعدها همین محققان نشان دادند که چنین آنتروتوکسینی در سروتایپهای دیگر یرسینیاآنتروکلی‌تیکا مانند O : ۶/۳۰، O : ۵/۲۷ ، O : ۵ ، O : ۸ که غالباً از انسان جدا شده‌اند، وجود دارد(۲۴).

Rao و همکاران(۳۱) در سال ۱۹۷۹، نشان دادند که آنتروتوکسین (ST) یرسینیاآنتروکلی‌تیکا مشابه با آنتروتوکسین اشریشیاکلی است، اما این آنتروتوکسین در دمای ۳۷ °C تولید نمی‌شود.

همچنین تعدادی از محققان در تحقیقات خود نشان دادند که آنتروتوکسین یرسینیاانتروکلی‌تیکا مقاوم به حرارت (۱۲۱ °C به مدت ۲۰ دقیقه)، محلول در متانول و فعال بر روده بچه موش و ایلئال خرگوش می‌باشد(۲،۲۵،۲۶).

در حال حاضر یرسینیاآنتروکلی‌تیکا به علت قابلیت ترشح توکسینی که قادر به تحریک فعالیت گوانیلات سیکلاز است، مانند اشریشیاکلی، در گروه باکتریهای توکسینوژن طبقه‌بندی می‌شود. این آنزیم منشاء تجمع گوانوزین حلقوی ۵-۳ مونوفسفات (cGMP) است، که سبب تحریک ترشح مواد شفاف و تورم روده بچه موش می‌گردد(۹،۳۱،۳۲).

## روش کار و مواد

### سویه‌های باکتریایی

از سه سویه یرسینیاآنتروکلی‌تیکا با سروتایپ O : ۳ و بیوتایپ ۴ که از نمونه‌های اسهال جدا شده بودند و با رفرانس‌های ۶۸۱۰، ۶۸۰۹، ۴۰۵۲ در انستیتو پاستور پاریس نگهداری می‌شدند، جهت تولید آنتروتوکسین استفاده گردید.

### محیط کشت

جهت کشت از محیط کشت CY پیشنهادی Okamoto(۱۹) که حاوی ۲٪ کازآمینواسید (Difco Ref. 23001-1) ، ۱٪ عصاره مخمر (Difco Ref. 012702) و ۰/۴٪ گلوکز است استفاده شد pH محیط بطور ثابت در ۸/۵ نگهداری گردید.

### تهیه آنتروتوکسین

سویه‌ها ابتدا در ۱۰ ml از محیط CY به مدت ۲۴ ساعت در ۲۵ °C کشت شدند. سپس بویون حاصله در ارلن مایر ۵۰۰ ml که حاوی ۱۰۰ ml از محیط CY بود، منتقل شد و در بن‌ماری ۲۵ °C به مدت ۴۸ ساعت با شدت ۲۰۰ rpm تکان دادن، نگهداری شد. پس

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:57 IRDT on Wednesday August 21st 2019

از کشت، هر بویون در ۸۵۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت در ۴ °C سانتریفوژ می‌شود (Bexkman Model J-21B). قسمتی از مایع رویی توسط غشاء فیلتراسیون ۰/۴۵ μm فیلتر می‌شود (Sartorius-Gottingen RFA).

پس از آن مایع رویی و قسمت فیلتر شده جهت تست بیولوژیک به نمونه‌های ۲ میلی‌لیتری تقسیم و در ۶۰- °C نگهداری گردید.

### تست بیولوژیک

۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط قسمتی از مایع رویی با ۰/۰۰۱٪ آبی‌اوانس جهت رنگی شدن روده و مشاهده بهتر پدیده انتشار توکسین، به هنگام برداشتن آن در دسته‌های ۴ الی ۵ تایی بچه‌موشهای (swiss) ۳ تا ۵ روزه، بطریقه خوراندن از راه دهان (gavage) مورد استفاده واقع شدند. بچه موشها پس از خوردن آنتروتوکسین به مدت ۴ ساعت در ۲۵ °C نگهداری شدند و پس از بیهوش کردن آنها با کلروفرم، اتوپسی گردیده پس از اتوپسی قسمت روده رنگی را برداشته و وزن می‌کنیم. نسبت روده به وزن باقیمانده بچه موش تعیین می‌گردد. مقادیر بالاتر از ۸۳٪ مثبت در نظر گرفته می‌شود(۱۹،۲۸،۳۶).

### مطالعه بیوشیمیایی

آنتروتوکسین تولید شده با فعالیت مثبت بر رودهٔ بچه موش جهت تعیین وزن مولکولی و تخلیص آن، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

### اولترافیلتراسیون

این تکنیک سبب جداسازی آنتروتوکسین به دو فراکسیون برحسب وزن مولکولی شد :

اولترافیلترات و قسمت باقیمانده. جهت تعیین وزن مولکولی از غشاءهای مختلف YM۱۰-YM۵-YM۲ که محدودهٔ خروج مولکولی آنها به ترتیب ۱۰۰۰ ، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ دالتون است، تحت فشار مثبت استفاده گردید.

### تخلیص آنتروتوکسین

برای خالص نمودن آنتروتوکسین از تکنیکهای مختلف کروماتوگرافی استفاده شد. این تکنیکها به ترتیب عبارتند بودند از:

کروماتوگرافی با دفع مولکولی :

این تکنیک کروماتوگرافی، سبب جداسازی مولکولهای پروتئینی موجود در نمونه برحسب اندازهٔ آنها می‌شود. نمونه‌های توکسین آماده شده، ابتدا به کمک غشاء YM2 با حذف مولکولهای پپتیدی کوچک و نمکها، تغلیظ و سپس بر روی ستون کروماتوگرافی قرار داده شدند. از یک پلیمر دکستران و N-N-methylene-bis-acrylamide بنام سفاکریل S-300 بعنوان فاز ثابت استفاده شد (Pharamacia Fine Chemicals/Sweden). محدودهٔ فراکسیون، باعث جدایی مولکولهایی با وزن مولکولی ۲۰۰۰۰۰ و ۵۰۰۰ می‌گردید. نمونه توکسینی که از ستون کروماتوگرافی عبور نمود برحسب ضریب تقسیم (kd) به ۵ فراکسیون قسمت بیولوژیک بر روی تمامی فراکسیونهای بدست آمده انجام شد. فراکسیون مثبت را با کروماتوگرافی H.P.L.C (Waters) با دو پمپ A ۶۰۰۰ و یک انتگراتور گرادیان (M 730, data modele) مورد بررسی قرار دادیم. شناسایی در ۲۸۰ نانومتر به کمک دتکتور جذبی (Lamda/Max.M. 48.H.V) (Waters) انجام شد. مراحل مختلفی که جهت خلوص آنتروتوکسین بکار گرفته شد عبارت بود از : اولترافیلتراسیون، کروماتوگرافی و H.P.L.C. پس از تخلیص آنتروتوکسین، جهت تعیین نقطه ایزوالکتریک پروتئین، از تکنیک ایزوالکتروفوکالیزاسیون استفاده شد. این تکنیک سبب جداسازی پروتئین برحسب نقطه ایزوالکتریک (PI) آنها می‌شود. مولکولهای پروتئین در نقطه ایزوالکتریک از رزین جدا گردیده و برحسب کاهش نقطه ایزوالکتریک از ستون کروماتوگرافی جدا و خارج می‌شوند.

## بحث و نتیجه

هر ۳ سویه یرسینیا آنتروکلی‌تیکای انسانی با سروتایپ O:۳ که در جدول ۱ معرفی شده‌اند پس از ۴۸ ساعت کشت در ۲۵ °C و فیلتراسیون، در هر دو قسمت مایع رویی و فیلتر شده، دارای آنتروتوکسین مقاوم به حرارت (۱ ساعت در ۱ °C) و فعال بر روده بچه موشهای ۵-۳ روزه بودند. محیط کشت و مایع رنگی مورد استفاده هر دو به تنهایی بر بچه موش بی‌اثر بود.

مطالعات آماری (تست استیودنت)، اختلاف معنی‌داری میان شاهد و محیط کشت و مایع رنگی نشان نمی‌داد. در مقابل اختلاف معنی‌داری میان ۳ سویه انسانی و کنترل برای تولید آنتروتوکسین با $P < ۰/۰۱$ وجود داشت. همین مطالعات آماری، اختلاف معنی‌داری را میان مایع رویی و قسمت فیلتر شده توکسین نشان نمی‌داد، به عبارت دیگر جذب توکسین روی غشاء فیلتراسیون ۰/۴۵ μm وجود نداشته است. تولید آنتروتوکسین سویه‌های انسانی در

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:57 IRDT on Wednesday August 21st 2019

جدول ۱ـ تولید آنتروتوکسین توسط سویه‌های انسانی

| رفرانس | الف X | SD ب | CV ج | T د | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | در مقایسه با کنترل | مایع‌رویی فیلترات |
| کنترل | ۰/۰۵۶ | ۰/۰۰۳ | ٪۶ | | |
| محیط کشت | ۰/۰۵۷ | ۰/۰۰۳ | ٪۵ | ۰/۵۲ | |
| رنگ | ۰/۰۵۸ | ۰/۰۰۶ | ٪۱۰ | ۰/۶۶ | |
| ۴۰۵۲s | ۰/۰۹۳ | ۰/۰۰۷ | ٪۸ | ۱۰/۸۶* | |
| ۴۰۵۲f | ۰/۰۹۱ | ۰/۰۰۶ | ٪۹ | ۱۱/۶۶ | ۰/۴۸ns |
| ۶۸۰۹s | ۰/۱۰۶ | ۰/۰۰۱ | ٪۱۰ | ۹/۸ | |
| ۶۸۰۹f | ۰/۱۰۴ | ۰/۰۰۷ | ٪۷ | ۱۴/۰۹ | ۰/۳۴ns |
| ۶۸۱۰s | ۰/۱۰۱ | ۰/۰۱۱ | ٪۱۱ | ۸/۸۲ | |
| ۶۸۱۰f | ٪۹۷ | ۰/۰۰۸ | ٪۱۰ | ۱۰/۷۳ | ۰/۶۵ns |

* :اختلاف معنی‌دار با $P< ۰/۰۱$

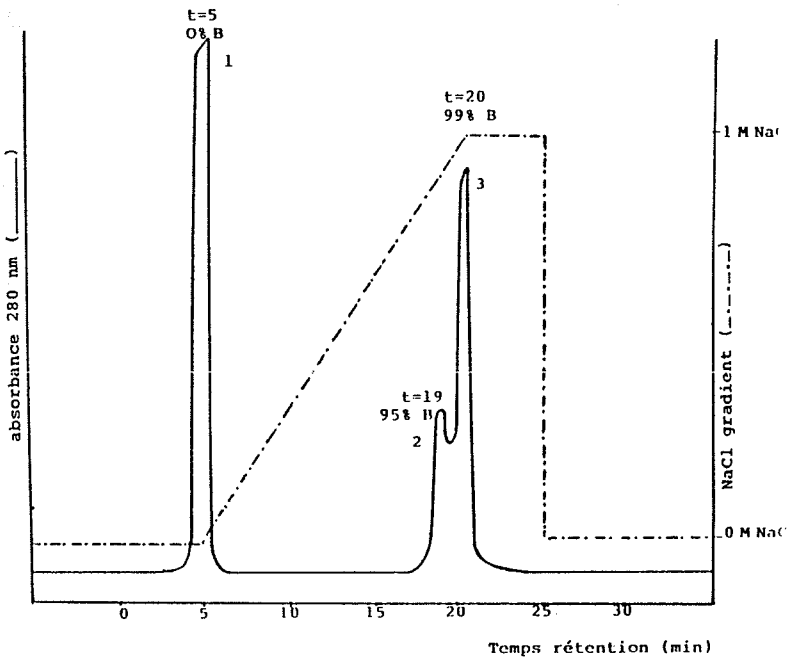
الف ـ میانگین مقادیر بالاتر از ۰/۰۸۳ مثبت در نظر گرفته می‌شود

ب ـ انحراف معیار ج ـ ضریب تغییرات د ـ تست استیودنت

s ـ مایع رویی f ـ قسمت فیلتر شده ns ـ اختلاف معنی‌دار نیست

۳ درجه C° ۳۷، ° ۲۵ و ° ۴ مورد مطالعه قرار گرفت، گرچه مطالعات Kappered (۱۱) نشان می‌دهد، که سویه‌های محیطی پرسینیاآنتروکلی‌تیکا قادر به تولید آنتروتوکسین در تمامی درجه حرارتهای ذکر شده می‌باشند ولی در سویه‌های انسانی، آنتروتوکسین به علت حساس بودن تنها در درجه حرارت بهینه رشد، یعنی ° ۲۵ تولید شد. تجربیات ما و دیگران (۲۵،۱۱) نشان می‌دهد که تولید آنتروتوکسین با تکان دادن با بازدهی بیشتری انجام می‌گیرد. احتمالاً تکان دادن سبب افزایش هوادهی لازم برای رشد باکتری و نهایتاً تولید بیشتر آنتروتوکسین می‌گردد.

نمودار ۱ـ کروماتوگرام تعویض یونی H.P.L.C برای جزء تفکیکی چهارم، حاصل از ژل فیلتراسیون بر روی سفاکریل S300

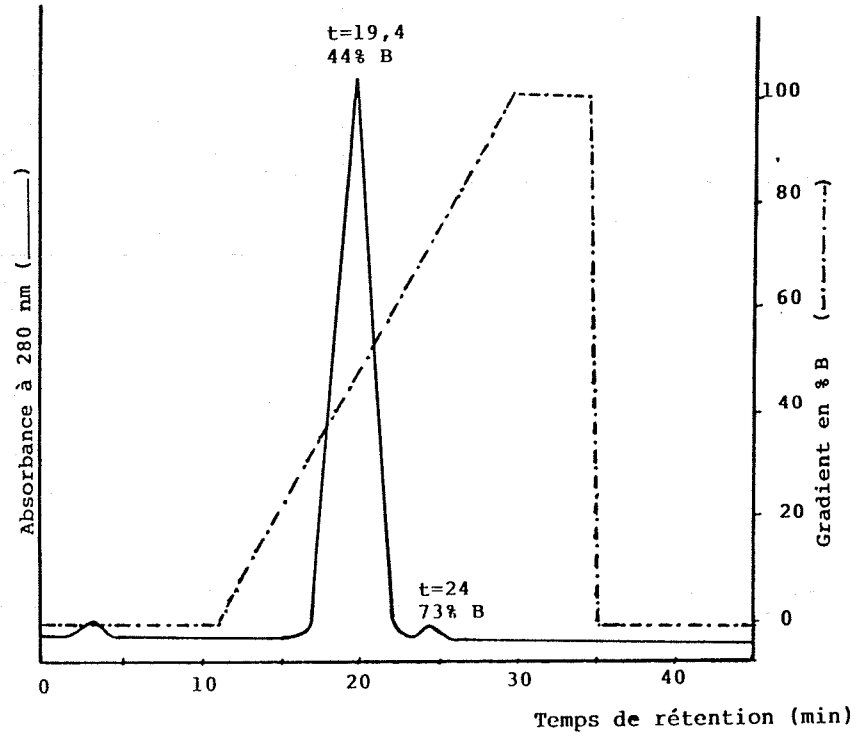



condition chromatographique :
- colonne : Mono Q 5/5
- phase mobile : A = tampon TRIS/HCl 0,02 M pH : 8,5
  B = tampon TRIS/HCl contenant 1 M NaCl pH : 8,5
- longueur d'onde d'absorbance : 280 nm
- sensibilté de détection 0,5 AUFS
- volume d'injection : 1 ml
- température : ambiante
- débit : 2 ml/min

برای خالص‌کردن آنتروتوکسین ST یرسینیاآنتروکلی‌تیکا طی دو مرحله به روش زیر عمل گردید :

در مرحله اول تغلیظ پی در پی آنتروتوکسین با استفاده از سیستم اولترافیلتراسیون همراه با غشاهای YM2، YM5 و YM10 انجام شد. نتایج حاصله توسط این سیستم با استفاده از تست بیولوژیکی، نشانگر وزن مولکولی ۵۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰ دالتون بود. محققان دیگر نظیر Boyce(۲) با استفاده از تکنیک اولترافیلتراسیون، وزن مولکولی آنتروتوکسین ST یرسینیا آنتروکلی‌تیکا را حدود ۹۰۰۰ دالتون بدست آورده‌اند، در حالیکه Okamoto(۲۱،۲۰) با تکنیک

نمودار ۲ـ کروماتوگرام فاز معکوس H.P.L.C در مورد منحنی شماره ۳ حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی




Conditions chromatographiques
- colonne : pro RPC
- phase mobile : B : $CH_3CN$ + TFA
  A : $H_2O$ + TFA
- débit : 1 ml/min
- détection : 280 nm, 0,5 AUFS
- température : ambiante
- volume d'injection : 2,5 ml

اولترافیلتراسیون، وزن مولکولی را طی مراحل مختلف حدود ۵۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰ و ۹۰۰۰ با استفاده از ژل سفادکس G-100 و G-75 بدست آورده است. در مرحله بعد با کشت باکتری در ۵ لیتر محیط کشت و تغلیظ آن به کمک غشاء استات سلولز لوله‌ای Visking شماره ۱ به منظور حذف مولکولهای با وزن مولکولی بالاتر از ۱۵۰۰۰ دالتون، مبادرت به جمع‌آوری توکسین فیلتر شده گردید. به کمک غشاء YM2 مولکولهای کوچک با وزن مولکولی پایین‌تر از ۱۰۰۰ دالتون حذف شده و با استفاده از سیستم H.P.L.C و گذراندن پی در پی توکسین از ستونهای مختلف، آنرا خالص نمودیم. از فراکسیونهای بدست آمده تنها یک فراکسیون که قابلیت جذب در ۲۸۰ nm را داشته، حاوی آنتروتوکسین بود و نسبت به تست بیولوژیکی in vitro از خود پاسخ مثبت نشان داد (نتایج در جداول و نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است).

جدول ۲ـ تفکیک اجزاء آنتروتوکسین توسط اولترافیلتراسیون

| نوع غشاء | الف X | ب SD | ج CV |
|---|---|---|---|
| YM-10 مایع رویی | ۰/۰۶۵ | ۰/۰۰۵ | ٪۷ |
| قسمت فیلتر شده | ۰/۰۹۸ | ۰/۰۰۶ | ٪۶ |
| YM-5 مایع رویی | ۰/۰۸۸ | ۰/۰۰۶ | ٪۷ |
| قسمت فیلتر شده | ۰/۰۸۸ | ۰/۰۰۸ | ٪۱۰ |
| YM-2 مایع رویی | ۰/۰۹۶ | ۰/۰۱۲ | ٪۱۲ |
| قسمت فیلتر شده | ۰/۰۵۸ | ۰/۰۰۶ | ٪۱۰ |
| شاهد | ۰/۰۵۷ | ۰/۰۰۲ | ٪۴ |

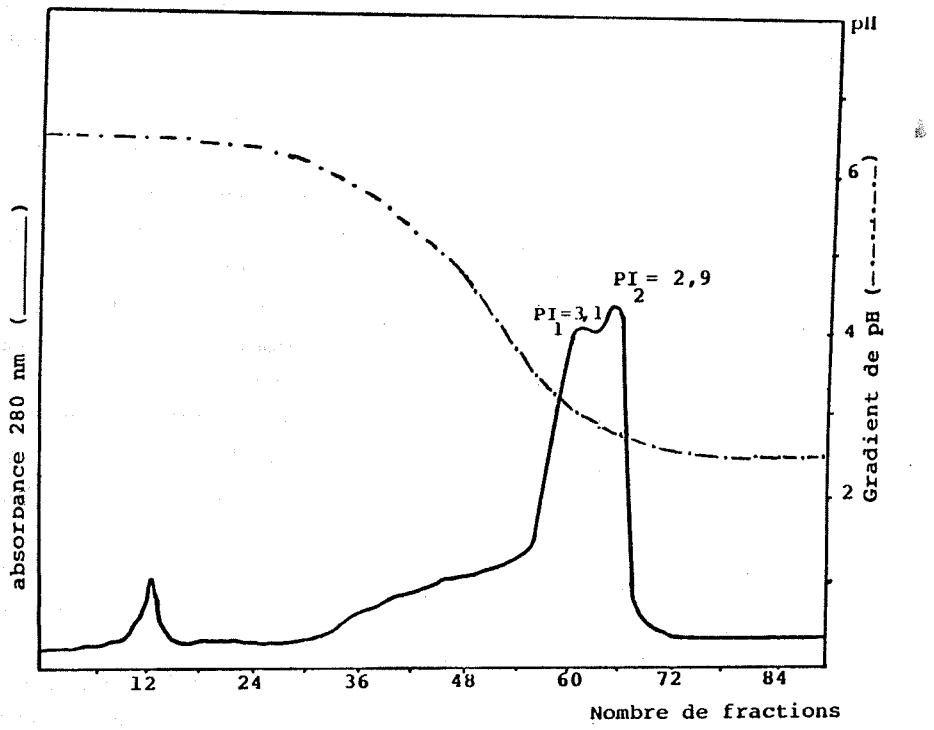
* : مقادیر بالاتر از ۰/۰۸۳ مثبت در نظر گرفته می‌شود.

الف ـ میانگین ب ـ انحراف معیار ج ـ ضریب تغییرات

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:57 IRDT on Wednesday August 21st 2019

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:57 IRDT on Wednesday August 21st 2019

نمودار ۳ـ کروماتوفوکالیزاسیون تعویض یونی با گرادیان pH ۶/۳ تا ۲/۵




**Conditions chromatographiques :**

- **colonne : Mono P HR 5/20**
- **phase mobile : a : BIS-TRIS- 50 mM pH 6,3,HCl**
  **b : 8 ml polybuffer**
  **2 ml pharmalytes**
  **$H_2O$ QSP 140 ml pH 2,5**
- **longueur d'onde d'absorbance : 280 nm**
- **sensibilité de détection : 0,5 AUFS**
- **volume d'injection : 1 ml**
- **température : ambiante**
- **débit : 1 ml/min**

کروماتوفوکالیزاسیون تنها فراکسیون مثبت (فراکسیون ۴) پس از تخلیص سبب تعیین دو نقطه ایزوالکتریک به میزان PI1 = ۳/۱ و PI2 = ۲/۹ گردید. نقاط ایزوالکتریک بدست آمده با نتایج بدست آمده توسط Okamoto(۲۰) مطابقت دارد (PI2 = ۳ و PI1 = ۳/۲۹). سویه‌های جدا شده از بیماران دارای قابلیت نفوذ از جدار روده و یا تولیدکنندهٔ آنتروتوکسین مقاوم به حرارت که تنها در دمای ۳۰ °C تا ۲۰ °C تولید می‌شود، و توسط یک ژن پلاسمیدی کنترل می‌گردد، می‌باشند هرچند که تولید آنتروتوکسین (ST) اشریشیاکلی به عنوان یک فاکتور مهم در بیماریزایی انسان شناخته شده است، و لیکن در مورد یرسینیاآنتروکلی‌تیکا به علت عدم تولید توکسین در ۳۷ °C در شرایط in vitro در مورد اثر توکسین در بیماریزایی آن شک و تردید وجود دارد.

جدول ۳ـ تفکیک اجزاء آنتروتوکسین بر اساس کروماتوگرافی روی ژل سفاکریل S300

| جزء تفکیکی | محدوده وزن مولکولی | الف X# | ب SD | ج CV |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۲۰۰۰۰۰۰-۳۸۰۰۰۰ | ۰/۰۶۸ | ۰/۰۰۹ | ٪۱۳ |
| ۲ | ۳۸۰۰۰۰-۷۰۰۰۰ | ۰/۰۶۷ | ۰/۰۰۷ | ٪۱۱ |
| ۳ | ۷۰۰۰۰-۱۳۰۰۰ | ۰/۰۷۳ | ۰/۰۰۷ | ٪۹ |
| ۴ | ۱۳۰۰۰-۲۰۰۰ | ۰/۱۰۴ | ۰/۰۱۵ | ٪۱۴ |
| ۵ | ۲۰۰۰-۴۰۰ | ۰/۰۶۳ | ۰/۰۰۶ | ٪۱۰ |

# : مقادیر بالاتر از ۰/۰۸۳ مثبت در نظر گرفته می‌شود.

الف ـ میانگین ب ـ انحراف معیار ج ـ ضریب تغییرات

## تشکر

بدینوسیله از سرکار خانم رحیمی که در تایپ این مقاله همکاری داشته‌اند سپاسگزاری می‌نماییم.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:57 IRDT on Wednesday August 21st 2019

# منابع


1- Arbuthnott J.P. (1978). Role of enterotoxins in bacterial pathogenicity. J.Appl. Bacteriol. 44. 329-345.

2- Boyce J.M.et al: (1979(. Production of heat-stable methanol-solube enterotoxin by yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 25.532-534.

3- Carter P.B (1975), pathogenicity of yersinia enterocolitica for mice Infect. Immun. 11(1), 164-170.

4- Donta T, Moon H.W, Whipp S.C. (1974). Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science. 183: 334-336.

5- Feeley J.C; et al (1979). Detection of enterotoxigenic and invasive yersinia enterocolitica. Contr. Microbiol. Immunol. 5, 329-334.

6- Gemski P. et al. (1980). Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 27-682-685.

7- Heesemann J. Laufs R. (1983) Construction of a mobilizable yersinia enterocolitica virulence plasmid. J. Bacteriol. 155. 761-767.

8- Heesemann J, et al. (1993). Experimental yersinia enterocolitica infection in rodents: a model for human yersioniosis. APMIS. 101 (6)-417-429

9- Hughes M. (1978). Role of cyclic GMP in the action of heat stable enterotoxin of Escherichia coli. Nature. 271-755-756.

10 Kapperud G. (1980). Studies on the pathogenicity of yersinia enterocolitica and yersinia enterocolitica-like bacteria. II. Interaction with Hela cells among envirommental and human isolates from scandinavia, Acta. Path. Microbiol. Scand, sect. B. 88, 223-297.

11- Kapperud G. (1982). Enterotoxin production at 4 °c, 22 °c and 37 °c among yersinia enterocolitica and yersinia enterocolitica-like bacteria. Acta. path. Microbiol. Immunol. Scand. sect. B. 90. 185-189.

12- Kay B. A, et al. (1982). New virulence associated plasmid in yersinia enterocolitica. J. Clin. Microbiol. 5. (6). 1161-1163.

13- Lee W.H., et al (1977). The ability of some yersinia enterocolitica strains to invade Hella cells. Can. J. Microbiol. 23, 1712-1722.

14- Le Minor L, (1979). Les bacteries agents de diarrhees infectieuses et leur mecanisme pathogenique. Med. Mal. Infect. 9, 503-506.

15- Maki M, et al. (1978), Invitro invasiveness of yersinia enterocolitica isolated from children with diarrhea. J. Infect. Dis. 138-677-680.

16- Mazigh D, et al. (1985). Lack of correlation between plasmid - encoded outer membrane proteins and virulence of yersinia enterocolitica. Ann. Inst. Pasteur. Microbiol. 136 B. 39-47.

17- Naqvi SH et al. (1993). Presentation of yersinia enterocolitica enteritis in children. Pediatr. Infect. Dis.J. 12(15). 386-389.

18- Nunes M.F, Ricciardi I.D. (1981). Detection of yersinia enterocolitica heat-stable enterotoxin by sucking mouse bioassay. J.clin. Microbiol. 13. 783-786.

19- Okamoto K. et al. (1980). Heat-stable enterotoxin produced by yersinia enterocolitica isolated from patients. Microbiol. Immunol. 24. 401-408.

20- Okamoto K. et al. (1981). Partial purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 31. 554-559.

21- Okamoto K. et al. (1982). Further purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 35. 985.964.

22- Oloughlin EV. et al. (1990). Yersinia enterocolitica: mechanisms of microbiol pathogenesis and pathophysiology of diarrhea. J. Gastroenterol Hepatol. 5(2). 173-179.

23- Onyemelukwe N.F. (1993). Yersinia enterocolitica as an etiological agent of childhood diarrhea in Enugu, Nigeria. Cent. Afr. J. Med. 39(9) 192-195.

24- Pai C.H. et al. (1978). Prevalence of enterogenicity in human and nonhuman isolates of yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 22-334-338.

25- Pai C.H., Mors V. (1980). Production of enterotoxin by yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 19-908-911.

26- Pai C.H. Mors V. (1980). Experimental yersinia enterocolitica in rabbits. Infect. Immun. 28.238-244.

27- Pai C.H, Destephano L. (1982). Serum resistance associated with virulence in yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 35-605-611.

28- Paisley Iw, et al. (1992) Neonatal yersinia enterocolitica enteritis. Pediatr. Infect. Dis. J. 11 (4): 331-332.

29- Pardo R. et al. (1992). Incidence of pseudo - appendicitis syndrome caused by yersinia enterocolitica. Enferm. Infect-Microbiol. Clin. 10(4). 242-243.

30- Perry R,D. Brubaker R. R(1983). $Vwa^+$ phenotype of yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 40-166-171.

31- Rao M.C. et al. (1979). Effects of heat - stable enterotoxin of yersinia enterocolitica on ion transport and cyclic guanosine-3-5-monophosphate metabolism in rabbit ileum. Infect. Immun. 26. 875-878.

32- Robins - Brown R.M. et al. (1979). Mechanism of action of yersinia enterocolitica enterotoxin. Infect. Immun. 25-680-648.

33- Sack D. A. et al. (1975). Diarrhea associated with heat-stable enterotoxin producing strains of Escherichia coli. Lancet. 9. 7928-7930.

34- Schleifstein J.I, Coleman M.B. (1939). An unidentified microorganism resembling B. lignieri and past. Pseudotuberculosis and pathogenic formal. N.Y. st. J.Med. 39. 1740-1753.

35- Schleifstein J.I, Clark M.E. (1947), Interesting observation (Bacterium enterocoliticum). Ann. Rep. Div. Lab. Res; New York st. Dent. Health 71.

36- Sebes J.I, et al. (1976). Lung abcess and osteomyelitis of rib due to yersinia enterocolitica. Chest. 69-546-548.

37- Skurnir M, et al (1984). Virulence plasmid - associated autoagglutination in yersinia SPP. J.Bacteriol. 158. 1033-1036.

enterocolitica. Int. Symposium on pseudotuberculosis, Karger edit; Bale, 337-342.

۴۱- سلطان دلال محمدمهدی، چیت‌ساز محسن، (۱۳۷۵) شیوع یرسینیاآنتروکلی‌تیکا در عفونتهای اسهالی کودکان، مجله دانشکده پزشکی- سال پنجاه و چهارم- شماره ۱-۴۶-۴۲

38- Thompson EC. (1994). Yersinia enterocolitica sepsis in a 3-week-old child. J. Natl. Med. Assoc 86. (10). 783-785.

39- Une T. (1977), Studies on the pathogenicity of yersinia enterocolitica II. Interaction with cultured cells in vitro. Microbiol. Immunol. 21, 365-377.

40- Winblad S. (1973). Arthritis associated with yersinia

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:57 IRDT on Wednesday August 21st 2019