

تولید و تخلیص آنتروتوکسین مقاوم به حرارت یرسینیا آنتروکلی تیکا

دکتر محمدمهدی سلطان‌دلال - بخش میکروبی‌شناسی - دانشکده بهداشت - دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر ژان لویی گنان - بخش بیوشیمی پزشکی و بیماری‌های کودکان - دانشکده پزشکی - دانشگاه نانسی ۱ - واندور - نانسی - فرانسه

Production and Purification 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 cyclic 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 molecular weight of about 5000 to 10000 dalton. Moreover, isoelectric 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 $P_i = 3.1$ and $P_i 2.9$, respectively. Further study revealed that both fractions had similar toxin effect in the gut of sucking mice.

چکیده

جزء تفکیکی ST1 با نقطه ایزوالکتریک $P_i = 3/1$ و ST2 با نقطه ایزوالکتریک $P_i = 2/9$ 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 یرسینیا آنتروکلی تیکا 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 (۱۷، ۲۳، ۲۸، ۴۱)، همچنین به موارد پسودوآپاندیسیت (۴۰)، آرتریت چرکی (۴۰)، سپتی سمی (۳۸) و عفونت‌های چرکی (۳۶) می‌بایستی اشاره نمود.

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

یرسینیا آنتروکلی تیکا به دلیل تولید آنتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) مشابه با اشریشیاکلی، احتمالاً در گروه باکتریهای توکسینوزن طبقه‌بندی می‌شود. کشت فیلترشده یرسینیا آنتروکلی تیکا قادر به فعال کردن گوانیلات سیکلاز و افزایش تجمع گوانوزین ۳-۵ منوفسفات حلقوی (cGMP) در روده بچه موش می‌شود. برای تولید آنتروتوکسین (ST)، ۳ سویه یرسینیا آنتروکلی تیکا (۶۸۱۰-۶۸۰۹-۴۰۵۲) از مجموعه انستیتو پاستور فرانسه انتخاب شد. تمام سویه‌ها متعلق به سرو تایپ 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

اشریشیاکلی بر روده بچه موش می‌باشد. بعدها همین محققان نشان دادند که چنین آنروتوکسینی در سروتایپهای دیگر یرسینیا آنروتوکلی تیکا مانند O: ۶/۳۰، O: ۵/۲۷، O: ۵، O: ۸، O: که غالباً از انسان جدا شده‌اند، وجود دارد (۲۴).

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

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

در حال حاضر یرسینیا آنروتوکلی تیکا به علت قابلیت ترشح توکسینی که قادر به تحریک فعالیت گوانیلات سیکلاز است، مانند اشریشیاکلی، در گروه باکتریهای توکسینوزن 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 (۳۲، ۳۱، ۹).

روش کار و مواد

سویه‌های باکتریایی

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

محیط کشت

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

تهیه آنروتوکسین

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

اسهال نزد انسان می‌باشد (۳۵).

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

Une (۳۹) گزارش داد که تنها سروتایپ‌های انسانی ۲۷، ۵: O و ۹: O و ۸: O و ۳: O 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 (۱۰، ۳).

دو مکانیسم بیماریزایی در مورد یرسینیا آنروتوکلی تیکا شناخته شده است: یکی حالت تهاجمی که نتیجه آن تکثیر میکروب در بافت، یعنی ویرولانسی و دیگری، خاصیت توکسین‌زایی مشابه با آنروتوکسین اشریشیاکلی می‌باشد (۲۲، ۱۴).

۱- ویرولانسی

پاتوژنیسیته یرسینیا آنروتوکلی تیکا در بیماریهای گوناگون هنوز کاملاً مشخص نشده است.

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

خصوصیات قابل انتقال بوسیله پلاسمید عبارتند از اتواگلو تیناسیون (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)، کونژکتیویت و کراتوکونژکتیویت نزد خوکیه هندی (۵). اغلب خصوصیات نامبرده وابسته به درجه حرارت هستند.

۲- آنروتوکسین

دو نوع آنروتوکسین نزد اشریشیاکلی، یکی مقاوم به حرارت (ST) و دیگری حساس به حرارت (LT) یافت شده است (۳۳، ۴). تولید آنروتوکسین 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 گرم منفی دیگری که معمولاً غیرپاتوژن هستند، وجود دارد.

Pai & Mors (۲۵) در سال ۱۹۷۸ برای اولین بار نشان دادند که یرسینیا آنروتوکلی تیکا سروتایپ ۳: O قادر به تولید آنروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) است. این توکسین دارای فعالیت مشابه با

پروتئینی موجود در نمونه برحسب اندازه 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 (Pharmacia Fine Chemicals/Sweden) فاز ثابت استفاده شد. 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 آنتروکلکی تیکای انسانی با سرو تایپ ۳: O که در جدول ۱ معرفی شده‌اند پس از ۴۸ ساعت کشت در 25°C و فیلتراسیون، در هر دو قسمت مایع رویی و فیلتر شده، دارای آنتروتوکسین مقاوم به حرارت (۱ ساعت در 1°C) و فعال بر روده بچه موشهای ۳-۵ 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 $P < 0/01$ 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 $0/45$ وجود نداشته است. تولید آنتروتوکسین سویه‌های انسانی در

از کشت، هر بویون در ۸۵۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت در 4°C ساتریفوژ می‌شود (Bexkman Model J-21B). قسمتی از مایع رویی توسط غشاء فیلتراسیون $0/45 \mu\text{m}$ فیلتر می‌شود (Sartorius-Gottingen RFA).

پس از آن مایع رویی و قسمت فیلتر شده جهت تست بیولوژیک به نمونه‌های ۲ میلی‌لیتری تقسیم و در 60°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 25°C نگهداری شدند و پس از بیهوش کردن آنها با کلروفورم، 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 ۰/۸۳ مثبت در نظر گرفته می‌شود (۳۶، ۲۸، ۱۹).

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

جدول ۱- تولید آنروتوکسین توسط سویه‌های انسانی

رقرانس	الف X	ب SD	ج CV	د T
کنترل	۰/۰۵۶	۰/۰۰۳	٪۶	در مقایسه مایع رویی با کنترل فیلترات
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
۶۸۰۹s	۰/۱۰۶	۰/۰۰۱	٪۱۰	۹/۸
۶۸۰۹f	۰/۱۰۴	۰/۰۰۷	٪۷	۱۴/۰۹
۶۸۱۰s	۰/۱۰۱	۰/۰۱۱	٪۱۱	۸/۸۲
۶۸۱۰f	٪۹۷	۰/۰۰۸	٪۱۰	۱۰/۷۳

* اختلاف معنی‌دار با ۰/۰۱ < P

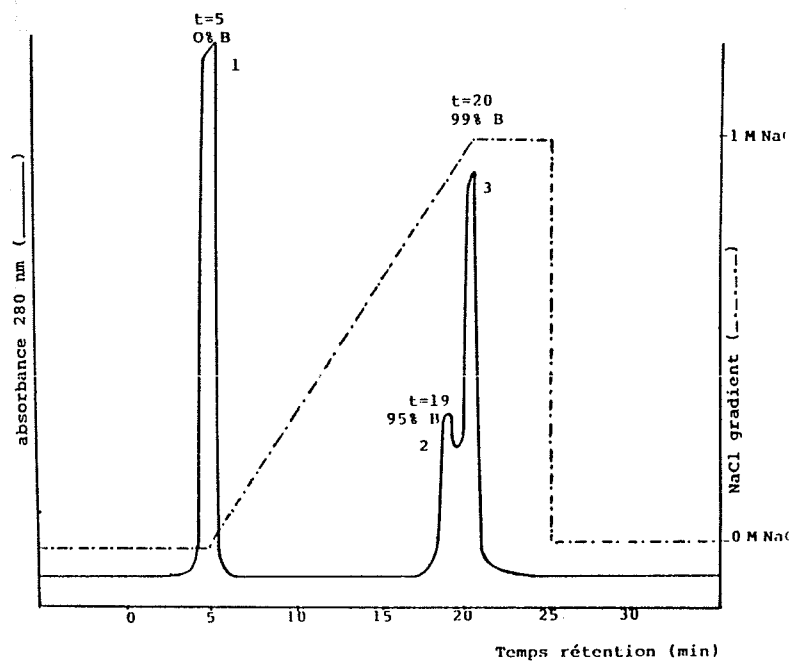
الف - میانگین مقادیر بالاتر از ۰/۰۸۳ مثبت در نظر گرفته می‌شود

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

S - مایع رویی f - قسمت فیلتر شده NS - اختلاف معنی‌دار نیست

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

نمودار ۱- کروماتوگرام تعویض یونی H.P.L.C برای جزء تفکیکی چهارم، حاصل از زل 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

- sensibilité de détection 0,5 AUFS

- volume d'injection : 1 ml

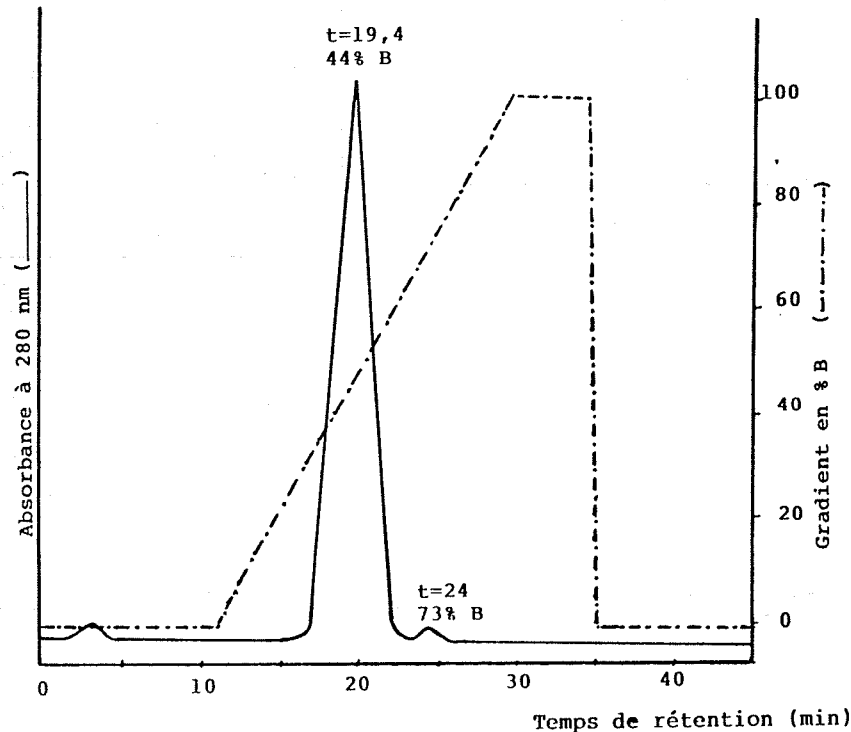
- température : ambiante

- débit : 2 ml/min

نشانگر وزن مولکولی ۵۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰ دالتون بود. محققان دیگر نظیر Boyce (۲) با استفاده از تکنیک اولترافیلتراسیون، وزن مولکولی آنتروتوکسین ST یرسینیا آنتروکللی تیکا را حدود ۹۰۰۰ دالتون بدست آورده‌اند، در حالیکه Okamoto (۲۱، ۲۰) با تکنیک

برای خالص کردن آنتروتوکسین ST یرسینیا آنتروکللی تیکا 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،

نمودار ۲- 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 : CH₃CN + TFA
A : H₂O + TFA
- débit : 1 ml/min
- détection : 280 nm, 0,5 AUFS
- température : ambiante
- volume d'injection : 2,5 ml

جدول ۲- تفکیک اجزاء آنتروتوکسین توسط اولترافیلتراسیون

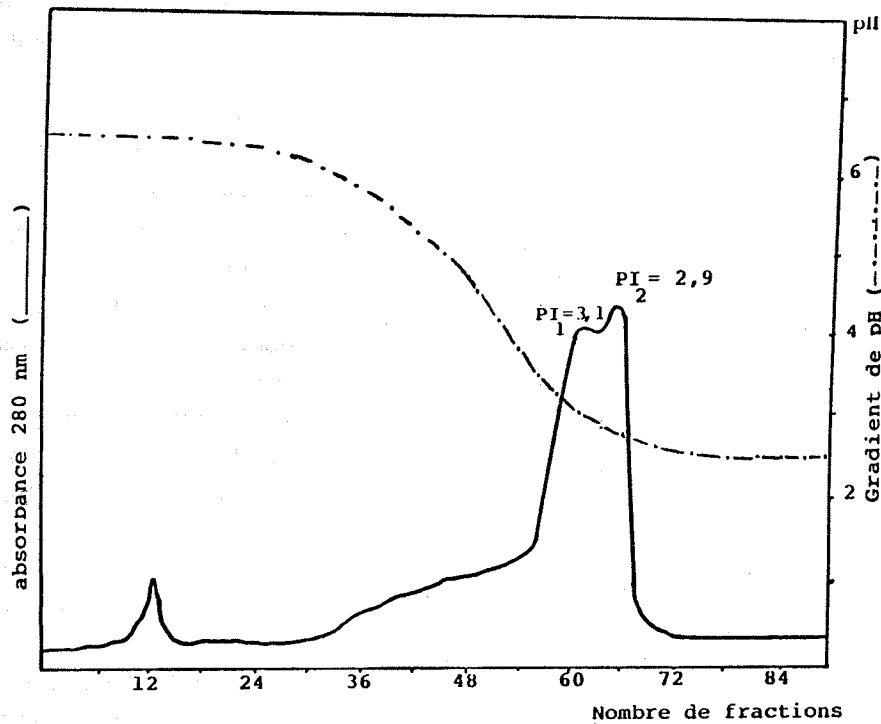
نوع غشاء	الف X	ب SD	ج CV
YM-10 مایع رویی	۰/۰۶۵	۰/۰۰۵	٪۷
قسمت فیلتر شده	۰/۰۹۸	۰/۰۰۶	٪۶
YM-5 مایع رویی	۰/۰۸۸	۰/۰۰۶	٪۷
قسمت فیلتر شده	۰/۰۸۸	۰/۰۰۸	٪۱۰
YM-2 مایع رویی	۰/۰۹۶	۰/۰۱۲	٪۱۲
قسمت فیلتر شده	۰/۰۵۸	۰/۰۰۶	٪۱۰
شاهد	۰/۰۵۷	۰/۰۰۲	٪۴

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

الف - میانگین ب - انحراف معیار ج - ضریب تغییرات

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 پایین تر 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).

نمودار ۳- 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
H₂O 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

جدول ۳- تفکیک اجزاء آنزیم توکسین بر اساس کروماتوگرافی روی ژل سفاکریل S300

جزء تفکیکی	محدوده وزن مولکولی	الف X* %	ب SD	ج CV %
۱	۲۰۰۰۰۰-۳۸۰۰۰۰	۰/۰۶۸	۰/۰۰۹	٪۱۳
۲	۳۸۰۰۰۰-۷۰۰۰۰	۰/۰۶۷	۰/۰۰۷	٪۱۱
۳	۷۰۰۰۰-۱۳۰۰۰	۰/۰۷۳	۰/۰۰۷	٪۹
۴	۱۳۰۰۰-۲۰۰۰	۰/۰۱۴	۰/۰۱۵	٪۱۴
۵	۲۰۰۰-۴۰۰	۰/۰۶۳	۰/۰۰۶	٪۱۰

* مقادیر بالاتر از ۰/۰۸۳ مثبت در نظر گرفته می شود.

الف - میانگین ب - انحراف معیار ج - ضریب تغییرات

کروماتوفوکالیزاسیون تنها فراکسیون مثبت (فراکسیون ۴) پس از تخلیص سبب تعیین دو نقطه ایزوالکتریک به میزان $PI1 = 3/1$ و $PI2 = 2/9$ گردید. نقاط ایزوالکتریک بدست آمده با نتایج بدست آمده توسط Okamoto (۲۰) مطابقت دارد ($PI2 = 3$) و $PI1 = 3/29$). سویه های جدا شده از بیماران دارای قابلیت نفوذ از جدار روده و یا تولیدکننده آنزیم توکسین مقاوم به حرارت که تنها در دمای $30^{\circ}C$ تا $20^{\circ}C$ تولید می شود، و توسط یک ژن پلاسمیدی کنترل می گردد، می باشند هرچند که تولید آنزیم توکسین (ST) اشریشیاکلی به عنوان یک فاکتور مهم در بیماریزایی انسان شناخته شده است، و لیکن در مورد یرسینیا آنترولکی تیکا به علت عدم تولید توکسین در $37^{\circ}C$ در شرایط *in vitro* در مورد اثر توکسین در بیماریزایی آن شک و تردید وجود دارد.

تشکر

بدینوسیله از سرکار خانم رحیمی که در تاپ این مقاله همکاری داشته اند

سپاسگزاری می نمایم.

منابع

- 1- Arbutnott 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-soluble 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 yersiniosis. *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 environmental 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), In vitro 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- O'loughlin E.V. 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 abscess 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.

- 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*

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

۴۱- سلطان دلال محمد مهدی، چیت‌ساز محسن، (۱۳۷۵) شیوع یرسینیا آنتروکلای تیکا در عفونت‌های اسهالی کودکان، مجله دانشکده پزشکی- سال پنجاه و چهارم- شماره ۴۲-۴۶-۱