# بررسی تاثیر حرارت و گلوکز در تولید آنتروتوکسین مقاوم به حرارت در یرسینیاآنتروکلی تیکا سوش ایران و سوش انستیتو پاستور پاریس

دکترمحمدمهدی سلطان دلال [1]

واژه های کلیدی : *یرسینیا آنتروکلی تیکا*، *آنتروتوکسین*

## چکیده

هم اکنون *یرسینیاآنتروکلی تیکا* در دو گروه باکتری های مهاجم مانند شیگلا و توکسین زا مانند *اشریشیاکلی* قرار گرفته است.

جهت تولید آنتروتوکسین *یرسینیاآنتروکلی تیکا* از ۵ سوش انسانی و ۴۵ سوش محیطی در درجه حرارت های ۴+ ، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد مورد استفاده واقع گردید. ۳ سوش انسانی و ۱۰ سوش محیطی در ۲۵ درجه سانتی گراد آنتروتوکسین تولید نمودند. در ۴ درجه سانتی گراد تنها ۳ سوش محیطی و در ۲۷ درجه سانتی گراد، هیچ کدام از سوش های محیطی و انسانی آنتروتوکسین تولید ننمودند. آنتروتوکسین تولید شده پس از ۶۰ دقیقه حرارت $100^0C$ و ۲۰ دقیقه حرارت $121^0C$ بخار آب تحت فشار (اتوکلاو) ، همچنان پایدار و قادر به ایجاد تجمع آب و الکترولیت و تورم روده بچه موش بود. همچنین افزودن ۰/۴٪ گلوکز به محیط کشت پایه، سبب افزایش میزان تولید آنتروتوکسین در دمای $25^0C$ شده ، در حالی که در $37^0C$ هیچگونه تاثیری نداشته است.

## سرآغاز

در سال ۱۹۳۹ برای اولین بار از بیماری گاستروانتستینال *یرسینیاآنتروکلی تیکا* صحبت به میان آمد (۱۷). چند سال بعد *یرسینیاآنتروکلی تیکا* یکی از عوامل عمده اسهال نزد انسان شناخته شد (۱۸).

در سال ۱۹۷۵ نشان داده شد که رابطه ای میان عفونت تجربی بوسیله *یرسینیاآنتروکلی تیکا* در نزد موش و عفونت طبیعی در نزد انسان وجود دارد (۶). درحال حاضر دو صفت بیماری زایی برای *یرسینیاآنتروکلی تیکا* شناخته شده است : یکی ویرولانس با خاصیت تهاجمی که نتیجه آن تکثیر میکرب در بافت است، و دیگری خاصیت توکسین زایی که میکرب قادر به تولید آنتروتوکسین مشابه با *اشریشیاکلی* است(۱۳-۴). جستجوی این باکتری به دلیل داشتن نقش عمده در بهداشت و مسمومیت مواد غذایی بخصوص مکانیسم بیماری زایی آن از طریق توکسین اهمیت بیشتری را بخود اختصاص می دهد. هدف ما در این پژوهش نشان دادن قابلیت *یرسینیاآنتروکلی*

---

۱- گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵ ، تهران، ایران

*تیکا* در تولید آنتروتوکسین مشابه با *اشریشیاکلی* (ST)[1] در درجه حرارت های گوناگون و تاثیر گلوکز بعنوان فاکتور افزاینده آنتروتوکسین در شرایط آزمایشگاهی است.

## نمونه گیری و روش بررسی

سوش باکتریایی : جهت تولید آنتروتوکسین از دو سری موش استفاده شد. سوش های انسانی که از کودکان مبتلا به اسهال جدا شده بودند و شامل ۲ سوش از ایران و ۳ سوش دیگر که از انستیتو پاستور پاریس به امانت گرفته شده بود و سوش های محیطی که پیش از این از نمونه های آب جدا گردیده بودند (۱۶).

محیط کشت : جهت کشت و تولید آنتروتوکسین از محیط CY پیشنهادی[2] (۱۲) حاوی ۲٪ کاز آمینواسید، ۱٪ عصاره مخمر و ۰/۴٪ گلوکز با PH = ۸/۵ استفاده شد.

تولید آنتروتوکسین : سویه های میکربی را ابتدا در ۱۰ میلی لیتر محیط CY کشت و به مدت ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری نموده، سپس کشت حاصله را به ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتر، حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط CY افزوده و در بن ماری ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت با تکان دادن با سرعت rpm ۲۰۰ نگهداری نمودیم. پس از کشت هر بویون را در ۸۵۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ نمودیم. سپس قسمتی از مایع رویی را به کمک فیلتر $\mu m$ ۰/۴۵ صاف نموده و مایع صاف شده و قسمتی از مایع باقیمانده رویی را در ۶۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمودیم. همین روش تولید آنتروتوکسین را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز انجام دادیم.

تست بیولوژیکی : تزریق ۰/۱ میلی لیتر مخلوط قسمتی از فیلترا یا مایع رویی با آبی اوانس ۰/۰۰۱ ٪ باعث مشاهده بهتر پدیده انتشار توکسین به هنگام برداشتن روده بچه موش ۳ تا ۵ روزه می گردد. پس از تزریق بچه موش ها را در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت نگهداری و طبق روش پیشنهادی (۷) ، آنها را بیهوش و پس از برداشتن روده رنگی، نسبت وزن روده را به وزن باقیمانده بچه موش محاسبه نموده و درصورت بالاتر بودن از ۰/۰۸۳ به عنوان مثبت تلقی می کنیم.

## یافته ها

پنج سوش انسانی *پرسنیاآنتروکلی تیکا* به همراه ۴۳ سوش محیطی جهت تولید آنتروتوکسین استفاده شد. در شترنگ ۱ مشاهده می شود که محیط کشت و رنگ مورد استفاده (آبی اوانس) هیچ گونه اثر سمی بر روده بچه موش نداشته است. از طرفی هر ۳ سوش انسانی انستیتو پاستور قابلیت تولید آنتروتوکسین را داشته و اختلاف معنی داری میان مایع رویی و قسمت فیلتر شده وجود ندارد. برعکس اختلاف معنی داری میان ۳ سوش و شاهد وجود دارد ($P< ۰/۰۱$).

---

1- Heat-stable enterotoxin

2- Okamoto

در شترنگ ۲، تاثیر درجه حرارت را در تولید آنتروتوکسین سویه های *یرسینیا* (۴۸/۱۳) نشان می دهد.

پس از تولید آنتروتوکسین، آنها را از نظر مقاوم بودن به حرارت (ST) بررسی نمودیم. نتایج بدست آمده نشان می دهد که این آنتروتوکسین تغییرات خاصی را پس از تحمل حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و یا حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد بخار آب تحت فشار به مدت ۲۱ دقیقه بر روده بچه موش نشان نمی دهد. افزودن ۰/۴٪ گلوکز به محیط کشت پایه *یرسینیا* برخلاف *اشریشیاکلی*، سبب افزایش چشمگیری در میزان تولید آنتروتوکسین می گردد. نتایج شترنگ ۳ نشان می دهد که این افزایش فقط در دمای $^{0}C$ ۲۵ پس از طی ۲۴ الی ۴۸ ساعت انکوباسیون حاصل می شود. در هیچ یک از مراحل تولید در $^{0}C$ ۳۷ ، آنتروتوکسینی حاصل نگردید.

## گفتگو و بهره گیری پایانی

در مطالعات زیادی نشان داده شده که سوش های *یرسینیاآنتروکلی تیکا* قادر به تولید آنتروتوکسینی هستند که خصوصیات آن مشابه با آنتروتوکسین تولید شده توسط *اشریشیاکلی* است (۲۱،۱۰،۵). دراین بررسی ۳ سوش انسانی که از کودکان مبتلا به اسهال جدا شده بودند، به همراه ۴۳ سوش محیطی با سروتایپ های مختلف که قبلاً جدا شده بودند (۱۶) ، جهت تولید آنتروتوکسین در درجه حرارت های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

در درجه حرارت پایین مشاهده شد که ۳ سوش *یرسینیا انترمدیا* بدست آمده از محیط قادر به تولید آنتروتوکسین پس از گذشت زمان ۷ روز نگهداری در ۴+ درجه سانتی گراد بودند. سوش های *یرسینیا کریستنسنی* سروتایپ ۱۱ : 0 و ۲۸ : 0 قابلیت تولید آنتروتوکسین در درجه حرارت پایین را دارند (۸). هیچ کدام از ۳ سوش انسانی مورد مطالعه قادر به تولید آنتروتوکسین در حرارت ۴+ درجه سانتی گراد نبودند.

در ۲۵ درجه سانتی گراد ، ۱۰ سوش شامل ۵ سوش *یرسینیاآنتروکلی تیکا* و ۵ سوش *یرسینیاانترمدیا* همگی بدست آمده از محیط، تولید کننده آنتروتوکسین بودند. هر ۳ سوش انسانی قادر به تولید آنتروتوکسین در این درجه حرارت بودند.

در ۳۷ درجه سانتی گراد، هیچ کدام از سوش های ما آنتروتوکسین تولید نکردند. با این حال (۹) نشان داده شده است که تولید آنتروتوکسین در ۳۷ درجه سانتی گراد توسط *یرسینیاکریستنسنی* با سروتایپ های ۱ : 0 ، ۱۱ : 0 و ۲۸ : 0 سویه های محیطی امکان پذیر بوده است (۹). در تمامی موارد هیچ کدام از سویه های *یرسینیاکریستنسنی* که مورد مطالعه ما بودند، قابلیت تولید آنتروتوکسین در درجه حرارت های مختلف را نداشتند. بررسی های انجام شده در یک طیف درجه حرارتی ۲۵ تا ۳۷ درجه نشان داد که آنتروتوکسین تنها در درجه حرارت پایین تر از ۳۰ درجه سانتی گراد تولید می شود. شرایط مناسب برای تولید آنتروتوکسین درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون می باشد، جایی که حداکثر دانسیته اپتیک (D.O) و بالاترین میزان غلظت آنتروتوکسین مشاهده می گردد که نتایج مشابه آن گزارش شده است (۱۳،۵).

نگهداری آنتروتوکسین در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ماه و در ۶۰- درجه سانتی گراد به مدت ۶ ماه همچنان فعالیت آنتروتوکسین را با استفاده از تست بیولوژیکی نشان داد. نتایج مشابهی در مورد پایداری آنتروتوکسین *اشریشیاکلی* گزارش شده است.

بیشتر باکتری های بیماری زا برای انسان مزوفیل می باشند. جنس *یرسینیا* و بخصوص گونه *یرسینیاآنتروکلی تیکا* قادر به رشد درجه حرارت پایین ۴+ است و همین خاصیت سبب افزایش موارد یرسینیوز ناشی از نگهداری مواد غذایی در سرما پس از سال های ۱۹۶۰ می باشد (۱). عامل دیگر تغییرات قدرت بیماریزایی *یرسینیاآنتروکلی تیکا* برحسب درجه نگهداری است (۱۱). بطوری که اگر یک سوش *یرسینیاآنتروکلی تیکا* را که قبلاً در ۳۷ درجه کشت داده شده به صفاق موشی تزریق کنند بسرعت دفع می شود، در حالی که اگر سوش قبلاً در ۲۵درجه کشت داده شده باشد قادر به رشد در صفاق موش می باشد.

پایداری توکسین این باکتری به مدت ۶۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد و ۲۰ دقیقه در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد (اتوکلاو) دلیل دیگری بر اهمیت آن در پیشگیری و کنترل مواد غذایی است (۲۰). تولید آنتروتوکسین تنها در کشت ۲۴ و ۴۸ ساعته همراه با تکان دادن ملایم تولید می شود. ظاهراً این تکان دادن شرایط مناسب تری از نظر هوادهی برای رشد باکتری و نهایتاً تولید آنتروتوکسین در محیط کشت ایجاد می کند. نتایج حاصله در مورد تولید آنتروتوکسین در گوشت و سوسیس (۲۲) مؤید نظر ما مبنی بر شرایط هوادهی به هنگام تولید آنتروتوکسین می باشد.

گزارشاتی مبنی بر نقش گلوکز به عنوان یک فاکتور منع کننده در تولید آنتروتوکسین توسط *اشریشیاکلی* وجود دارد (۳). نتایج این بررسی به هنگام افزودن ۰/۴٪ گلوکز به محیط کشت، نه تنها اثر کاهش دهنده نداشت، بلکه اثر افزایش دهنده در میزان تولید آنتروتوکسین مقاوم به حرارت *یرسینیاآنتروکلی تیکا* دارد.

طی تحقیقاتی نشان داده شده است که سوش های آنتروتوکسینوژن *اشریشیاکلی* قابلیت تولید آنتروتوکسین مقام به حرارت (ST) را در شرایط invivo و invitro در حیوانات وانسان دارند (۲۳ - ۱۵). دراین بررسی سوش موردنظر قابلیت تولید آنتروتوکسین در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط invitro را نداشت و این در حالی است که پژوهشگران دیگر ارتباطی میان تولید آنتروتوکسین واسهال با منشاء یرسینیایی در نزد حیوانات پیدا نکردند (۱۴). لذا نقش آنتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) *یرسینیاآنتروکلی تیکا* در بیماری های اسهالی را مورد تردید قرار می گیرد. شاید در شرایط فعلی مناسب تر باشد که *یرسینیاآنتروکلی تیکا* را در گروه پاتوژن های روده ای که در اثر تهاجم باعث کولیت یا آنتروکولیت حاد می شوند، طبقه بندی نمود (۲). با این حال نتایج این بررسی نشان می دهد که با توجه به آنکه *یرسینیا* یک باکتری سایکروتروف بوده و قادر به تولید توکسین در دمای ۴+ سانتی گراد یعنی دمای نگهداری مواد غذایی در یخچال می باشد، و همچنین باتوجه به عدم تخریب توکسین تولید شده در اثر حرارت. این باکتری می تواند نقش عمده ای را در بهداشت مواد غذایی بویژه در گوشت، مرغ، لبنیات و سبزیجات داشته باشد.

## سپاسگزاری

بدینوسیله از خانم میرزایی، منشی گروه پاتوبیولوژی به جهت همکاری صمیمانه در تایپ این مقاله سپاسگزاری می گردد.

شترنگ ۱ - تولید آنتروتوکسین توسط سویه های انسانی

| رفرانس | $\overline{X}$ [۱] | SD [۲] | CV (٪) [۳] | T [۴] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | درمقایسه با کنترل | مایع رویی فیلترا |
| کنترل | ۰/۰۵۶ | ۰/۰۰۳ | ۶ | | |
| محیط کشت | ۰/۰۵۷ | ۰/۰۰۳ | ۵ | ۰/۵۲ | - |
| رنگ | ۰/۰۵۸ | ۰/۰۰۶ | ۱۰ | ۰/۶۶ | - |
| (s) ۴۰۵۲ | ۰/۰۹۳ | ۰/۰۰۷ | ۸ | ۱۰/۸۶ * | ۰/۴۸ ** |
| (f) ۴۰۵۲ | ۰/۰۹۱ | ۰/۰۰۶ | ۹ | ۱۱/۶۶ | |
| (s) ۶۸۰۹ | ۰/۱۰۶ | ۰/۰۰۱ | ۱۰ | ۹/۸ | ۰/۳۴ ** |
| (f) ۶۸۰۹ | ۰/۱۰۴ | ۰/۰۰۷ | ۷ | ۱۴/۰۹ | |
| (s) ۶۸۱۰ | ۰/۱۰۱ | ۰/۰۱۱ | ۱۱ | ۸/۸۲ | ۰/۶۵ ** |
| (f) ۶۸۱۰ | ۰/۹۷ | ۰/۰۰۸ | ۱۰ | ۱۰/۷۳ | |

۱- میانگین مقادیر بالاتر از ۰/۰۸۳ مثبت درنظر گرفته می شود.
۲- انحراف معیار
۳- ضریب تغییرات
۴- تست استودنت
s : مایع رویی
f : قسمت فیلترشده
* : اختلاف معنی دار با ٪ ۰/۰۱ $P<$
** : اختلاف معنی دار نیست

شترنگ ۲ - تولید آنتروتوکسین توسط سوش های انسانی ومحیطی در درجه حرارت های گوناگون

| رفرانس انستیو پاستور پاریس | ۴ °C | ۲۵ °C | ۳۷ °C |
|---|---|---|---|
| سوش های انسانی | | | |
| ۴۰۵۲ | - | + | - |
| ۶۸۰۹ | - | + | - |
| ۶۸۱۰ | - | + | - |
| سوش های محیطی | | | |
| ۱۳۳۸۲ | - | + | - |
| ۱۳۳۸۹ | - | + | - |
| ۱۳۳۹۰ | - | + | - |
| ۱۳۳۹۲ | - | + | - |
| ۱۳۴۲۴ | + | + | - |
| ۱۳۴۲۶ | + | + | - |
| ۱۳۴۴۰ | - | + | - |
| ۱۳۸۸۷ | - | + | - |
| ۱۳۸۹۷ | + | + | - |
| ۱۳۹۰۲ | - | + | - |

شترنگ ۳- تاثیر گلوکز در افزایش میزان تولید آنتروتوکسین

| محیط کشت | درجه حرارت (°C) | مدت انکوباسیون (h) | دانستیته اپتیک | آنتروتوکسین * |
|---|---|---|---|---|
| بازال | ۲۵ | ۲۴ | ۷/۸۸ | ۰/۰۸۴ |
| بازال | » | ۴۸ | ۸/۴۷ | ۰/۰۸۹ |
| بازال + ۰/۴٪ گلوکز | » | ۲۴ | ۹/۷۹ | ۰/۰۹۱ |
| بازال ۰/۴۱٪ گلوکز | » | ۴۸ | ۱۰/۸۵ | ۰/۱۰۶ |
| بازال | ۳۷ | ۲۴ | ۱/۵۷ | ۰/۰۵۶ |
| بازال | » | ۴۸ | ۲/۱۵ | ۰/۰۵۵ |
| بازال + ۰/۴٪ گلوکز | » | ۲۴ | ۱/۶۲ | ۰/۰۵۷ |
| بازال + ۰/۴٪ گلوکز | » | ۴۸ | ۲/۹۵ | ۰/۰۵۹ |

* : مقادیر بالاتر از ۰/۰۸۳ مثبت درنظر گرفته می شود.

کتابنامه

۱- سلطان دلال ، محمـــــدمهدی (۱۳۷۱): نقـــش عادت های غذایی در پیدایش عفونت های پرسینیایی، مجله دارو ودرمان، سال نهم ، شماره ۱۰۶ ، صفحه ۶۱ - ۵۷ .

۲- سلـــطان دلال ، محمدمهـــــدی (۱۳۷۴): عوامل باکتریایی عفونت های اسهالی و مکانیسم بیماری زایی آنها، مجله نبض، سال پنجم، شماره ۴ ، صفحه ۵۲ - ۴۸.

3- Alderete JF and Robertson DC (1977):Nutrition and enterotoxin synthesis by enterotoxigenic strains of E.coli: defined medium for production of heat stable enterotoxin. *Infect Immun,* **15**: 781-8.

4- Alonso JM , Mazigh D and Mollaret HH (1982): Pourvoir pathogene experimental et physiopathologic des infections a *Y.pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica. Med Mal Infect,* **12**, 12 bis: 672-4.

5- Boyce JM, et al (1979): Production of heat - stable methanol-soluble enterotoxin by *Y.enterocolitica.* Infect Immun, **25**:532-7.

6- Carter PB (1975): Pathogenicity of *Yersinia enterocolotica* for mice. *Infect Immun,* **11**(1): 164-70.

7- Dean AG, et al (1972): Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J Infect Dis,* **125**(4): 407-11.

8- Kapperud G and Langeland G (1981) : Enterotoxin production at refrigeration temperature by *Y.enterocolitica* and *Y.enterocolitical* like bacteria. *Curr Microbiol,* **5**: 119-22.

9- Kapperud G (1982): Enterotoxin production at $4^0$c, $22^0$c and $37^0$c among. *Y.enterocolitical* and *Y. enterocolitical* - like bacteria. *Acta Bath Microbiol Immunol Scand,* Sect B, **90**:185-9.

10- Mullan NA , et al (1978): Characterization of a partially purified methanol soluble, Heat-stable *Escherichia-coli* enterotoxin in infant mice. *Infect Immun,* **19:** 779-84.

11- Nilehn B (1973): The relationship of incubation temperature to semm bactericidal effect , pathogenicity and in vivo survival or *Y.enterocolitica.* Contr. Micro. Immu. Karger, Edition, 85-92.

12- Okamoto K , et al (1980): Heat-stable enterotoxin produced by *Y.enterocolitica* isolated from patients. *Microbiol Immunol,*

**24**:401-8.

13- Pai C 11 and Mors V (1978): Production of enterotoxin by *Y.enterocolitica. Infect Immun,* **19**: 908-11.

14- Pai CH, et al (1980): Experimental *Y. enterocolitica* in rabbits. *Infect Immun,* **28**: 238-44.

15- Sack DA, et al (1975): Diarrhea associated with Health - stable enterotoxin producing strain of *E.coli. The Lancet,* **9**: 7928-30.

16- Saikia GK, Thapliyal DC (1997): Enterotoxigenicity as an attribute of virulence in *Yersinia enterocolitica. Indian J Exp Biol,* **35**(10), 1108-10.

17- Schleifstein JI and Coleman MB (1939): An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and past pseudotuberculosis and pathogenic formal. *NY St J Med,* **39**: 1749-53.

18- Schleifstein JI and Coleman MB (1943): Bacterium enterocoliticum Ann. Report of the Division of Lab and Research. New-York State Department of Health, 56.

19- Soltan Dallal MM , Hartemann P (1988): A study of typical Yersinia strains isolated from moselle river, *Irainian J Publ Health,* **17** (1-4): 69 - 78.

20- Soltan Dallal MM (1997): Enterotoxin production by Yersinia species at $4^0$c and $25^0$c. *Acta Medica Iranical,* **35**: (3&4): 69-73.

21- Titenko BM, Emdina IA , Lebedeva SA , et al (1988): Production of thermolabile enterotoxins of *Escherichia coli* by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis, Mol Gen Microbiol Virusol,* **8**: 41-6.

22- Velin D (1984): Enterotoxin production by *Y.enterocolitica* in food samples. *Acta Microbiol Hung,* **31**(1): 43-8.

23- Whipp SC, et al (1975): Health - stable *Escherichia coli* enterotoxin production in vivo. *Infect Immun,* **12**:240-4.