اثر امواج الکترومعناطیس بر رشد و تولید توکسین کلستریدیوم دیفیسیل

رمضانعلی عطایی .Ph.D ☆*، غلامحسین پورتقی .M.Sc☆، علی مهرابی‌توانا .Ph.D ☆، غلامحسین ریاضی.Ph.D*

☆دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی

* دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، گروه بیوشیمی

آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۱۹۱۴۵/۵۸۱، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی

پست الکترونیک: Email: Ataee@bmsu.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۱/۵/۵، پذیرش مقاله: ۸۲/۹/۱۶

* **هدف:** بررسی اثر پرتوهای Short-Wave و Macro-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل

* **مواد و روشها:** در این تحقیق از دو سویه Closrtidium Difficile یکی توکسی‌ژن و دیگری غیر توکسی‌ژن استفاده گردید. ابتدا از هر کدام به طور جداگانه کشت اولیه تهیه شد پس از آن در شیشه‌های ۵۰ اونسی، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت وارد کرده و استریل گردید. سپس با کشت اولیه به نسبت ۲ درصد تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن در زمانهای مختلف تحت تابش مستقیم پرتوهای Macro-Wave و Short-Wave قرار گرفتند. همه محیطهای اشعه دیده و نیز کنترل (محیط اشعه ندیده) به مدت ۴ روز گرمخانه‌گذاری شدند و پس از آن میزان رشد، تولید پروتئین و سمیت بررسی شدند. رشد باکتری با شمارش تعداد کلنی، مقدار پروتئین با روش براد فورد و توکسیسیتی با استفاده از کشت سلولی رده BK و لوپ گره شده ورده خرگوش انجام شد.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد، اثر تابش پرتوهای Macro-Wave باعث حذف فعالیت سمی عصاره کشت می گردد. به عبارت دیگر بر تولید توکسین اثر کرده و مانع از تولید توکسین شده است. در حالی که اسپورولاسیون را تحریک نموده و باعث می‌شود پس از ۱۰ ساعت گرمخانه‌گذاری همه سلولها به اسپور تبدیل شوند.

همچنین نتایج بررسی اثر پرتوهای Shore-Wave بر رشد و تولید توکسین از Closrtidium Difficile نشان داد، تابش مستقیم این پرتو به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه باعث افزایش پایدار تولید توکسین به میزان دو برابر می گردد. افزون بر این، تابش مستقیم پرتوهای Short-Wave به کشت ۲۴ ساعته سویه غیرتوکسی‌ژن Closrtidium Difficile باعث تحریک تولید پایدار توکسین گردد.

* **نتیجه‌گیری:** در هر حال، یافته‌های این تحقیق مؤید آن است که پرتوهای Macro-Wave باعث حذف تولید توکسین از Closrtidium Difficile شده اما تولید اسپور را القاء می‌نماید. در حالی که اثر پرتوهای Short-Wave بر سویه غیرتوکسی‌ژن، تولید توکسین را القا کرده و آن را به سویه توکسی‌ژن تبدیل نموده است.

گل واژگان: امواج الکترومغناطیس با طول موج کوتاه، امواج الکترومغناطیس با طول موج بلند، کلستریدیوم دیفیسیل، توکسین A و B، کولیت با غشای کاذب

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۶۷-۱۶۰

مقدمه

اتیولوژی کولیت با غشای کاذب[1] را کلستریدیوم دیفیسیل معرفی کرده‌اند. این باکتری جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش بوده و با تولید توکسینهای A و B باعث ایجاد بیماری می‌شود (۱). افزون بر این شیوع عفونتهای بیمارستانی ناشی از سویه‌های کلستریدیوم دیفیسیل رو به افزایش و نگران کننده است (۲). مواردی از این بیماری زمانی روی می‌دهد که آنتی‌بیوتیک مصرف گردد، زیرا کلستریدیوم دیفیسیل به سرعت نسبت به آنها مقاوم شده، تکثیر نموده و توکسین تولید می‌نماید. اما در موارد بسیاری نیز کولیت با غشای کاذب بدون مصرف آنتی‌بیوتیک اتفاق می‌افتد که علت آن به درستی معلوم نیست، در واقع بدون حضور آنتی‌بیوتیک، باکتری توکسین تولید کرده و باعث ایجاد بیماری می‌شود (۳). پرتوها اثرات بیولوژی زیادی بر ارگانیسمها از جمله بر رشد و تولید توکسین از باکتری دارند. یکی از عواملی که می‌تواند در شرایط *in vivo* و *in vitro* بر رشد و تولید توکسین از میکروارگانیسمها مؤثر باشد، طیف گسترده‌ای از پرتوهای الکترومغناطیس هستند (۴، ۵، ۶). افزون بر این، از پرتوهای یونیزان برای کشتن میکروبها و ضدعفونی محیط استفاده شده است (۷). از پرتوها در صنایع غذایی برای حذف آلودگیهای باکتریایی استفاده شده است (۸). همچنین از پرتوهای الکترومغناطیس برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماریها استفاده شده است (۹). از آنجه که اثرات بیولوژیک و کاربرد تعدادی از پرتوهای الکترومعناطیس از جمله پرتوهای ماورای بنفش رو به گسترش و با نتایج درخشانی همراه بوده است. با این حال، اثرات بیولوژیک بسیاری از آنها

1. Pseudomembranous Colitis

A-hive of SID

www.SID.ir

ناشناخته باقی مانده است. مثلا تا کنون اثرات بیولوژیک پرتوهای Short-wave و Macro-Wave در مراکز فیزیوتراپی را می‌توان نام برد. از این رو، تعیین اثر این پرتوها بر باکتری کلستریدیوم دیفیسیل به ویژه در سالمندان رو به افزایش و نگران کننده است. به نظر می‌رسد، احتمالا عوامل دیگری از جمله پرتوهای الکترومغناطیس در ایجاد مقاومت باکتریها دخالت داشته باشند. از آنجا که این پرتوها به وفور در مراکز درمانی استفاده می‌شوند. لذا، هدف این تحقیق، طراحی روشی برای بررسی اثر امواج Short-Wave و Macro-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیم دیفیسیل است.

مواد و روشها

مواد

در این تحقیق کلستریدیوم دیفیسیل توکسی ژن سویه ۱۰۶۶۶ از سازمان پژوهشهای علمی صنعتی ایران و یک سویه غیر توکسی‌ژن (غیربیماری‌زا) که از مدفوع فرد سالم جدا شده بود استفاده گردید. پادتن اختصاصی توکسین A و B کلستریدیوم دیفیسیل، کوماسی بریلیانت‌بلو R-۲۵۰ از سیگما، محیط کشت برین‌هارت اینفیوژن براث، ترپتیکیز سوی آگار، آگار آگار، سیستئین هیدروکلراید، گلوکز منوهیدرات، عصاره مخمر، هیدروکسید سدیم، اسیدکلریدریک، اتانل، اسید سولفوریک، جار و گاز پک از مرک آلمان و فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرومتری از سارتوریوس تهیه گردید. همچنین خرگوش سفید آزمایشگاهی به وزن ۱ تا ۱/۵ کیلوگرم و نوزاد دو روزه موش سوری از انیستیتو پاستور ایران، کشت سلولی رده BK(Bovine Kidney) از بخش ویرسوهای جیوانی مؤسسه رازی، دستگاههای تولید کننده امواج Short-Wave و Macro-Wave:

1. Short-Wave, view lengh. 11m, fr: 27 milium cycle/s.

2. Macro-Wave, Radiotherm. 706. 250w/60 ohm. 245 MHZ. View lengh. 12cm-69cm.

موجود در بخش فیزیوتراپی بیمارستان بقیه‌ا... استفاده گردید. از روشهای آماری آنالیز واریانس و t-test و نرم‌افزار stata جهت پردازش یافته‌ها استفاده شد.

کشت باکتری

آمپول لیوفلیزه سویه استاندارد کلستریدیوم دیفیسیل را با رعایت شرایط آسپتیک باز کرده و با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت استریل سوسپانسیون تهیه گردید. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر از آن را به محیط برین هارت اینفیوژن براث (BHI Broth) تلقیح و در شرایط بی‌هوازی (استفاده از جار و گاز پک) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌ذاری گردید. بدین ترتیب کشت اولیه (Pre-culter) تهیه شد. سپس به هر یک از طریهای ۷تایی شیشه‌های کتابی شکل ۴ اونسی، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت وارده و پس از استریل کردن آنهابه نسبت ۲درصد تلقیح شدند و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. به همین ترتیب غیرتوکسی‌ژن کلستریدیم دیفیسیل کشت اولیه تهیه و به سری‌های ۷تایی شیشه‌های محتوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح کرده و گرمخانه‌گذاری شدند.

نحوه بررسی اثر امواج Macro-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل توکسی‌ژن

برای این منظور ۶ عدد از شیشه‌هایی که با کلستریدیوم دیفیسیل تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی (استفاده از جار و گازپک) گرمخانه‌گذاری شدند را از فاصله ۳۰ سانتیمتری به مدت ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ دقیقه تحت تابش مستقیم پرتوهای Macro-Wave با قدرت ۱۰۰ وات قرار داده یکی از شیشه‌ها به عنوان کنترل در برابر پرتوهای Macro-Wave قرار داده نشد. طراحی این آزمون با تغییراتی در روش YL. And ED Alipov ، Beyleav و Kohno M انجام شد (۱۰، ۱۱). پس از این مرحله همه شیشه‌ها را به مدت ۴ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری کرده و پس از آن میزان رشد باکتری، تولید توکسین و نیز توکسیسیتی بررسی گردید.

روش بررسی اثر امواج Short-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل توکسی‌ژن

برای این منظور نیز مانند گذشته سه سری ۷تایی از شیشه‌های تلقیح شده را ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری کرده، سپس تحت تاثیر ۳ دوز از امواج Short-Wave قرار داده شدند. به این ترتیب که سری ۶تایی اول از فاصله ۳۰ سانتیمتری با شرایط فوق تحت تابش نستقیم دوز ۲ (با شدت ۱۴۵ تا ۱۵۵ وات) پرتوهای short-Wave قرار گرفت (شکل ۱). در هر مورد یکی از شیشه‌ها به عنوان کنترل در برابر پرتوهای Short-Wave قرار داده نشد. پس از این مرحله همه شیشه را به مدت ۴ روز در ۳۷درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی (استفاده از جار و گاز پک) گرمخانه‌گذارش کرده و پس از این اثر این پرتوها بر رشد، تولید توکسین و نیز توکسیسیتی بررسی شد.

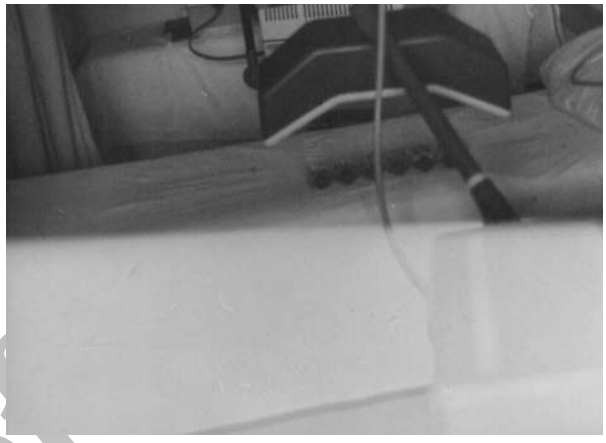
علاوه بر تعیین اثر Macro-Wave و Shore-Wave بر سویه توکسی‌ژن کلستریدیوم دیفیسیل اثر این امواج بر سویه غیر توکسی‌ژن نیز به روش فوق بررسی گردید. پس از طراحی و Set Up کردن روش بررسی اثر امواج بر رشد و تولید توکسین، اثر هر یک از آنها ۳ تا ۵ بار تکرار شد.

اندازه‌گیری رشد باکتری

اندازه‌گیری رشد با شمارش تعداد پرگنه‌ها[1] انجام شد. برای این منظور هر یک از شیشه‌های کشت در زمان تعیین شده، از گرمخانه

Archive of SID
www.SID.ir

خارج و از آن رقتهای 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7} تهیه گردید. از هر رقت، ۳ نمونه ۱۰۰ میکرولیتری روی ۳ پلیت حاوی ترپیتیکیز سوی که دارای ۵ درصد آگار بود، انتقال داده و با میله (ایلیکاتور) شیشه‌ای استریل به خوبی در سطح پلیت پخش گردید و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند (۱۲). با شمارش تعداد پرگنه‌های رشد کرده در هر سه پلیت، میانگین آنها تعیین شد و با وارد کردن ضریب رقت در هر مورد میزان رشد، در زمانهای مشخص، تعیین گردید.



شکل ۱: دستگاه تولید کننده امواج Short-Wave و نحوه تابش آن به کشت باکتری نشان داده شده است.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

از هر یک از شیشه‌ها که در زمان مشخص گرمخانه‌گذاری شده بودند، ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و سانتریفیوژ گردید (۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴درجه سانتیگراد)، مایع رویی با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شد. سپس با استفاده از روش برادفورد[3] غلظت کل پروتئین (Total Protein) اندازه‌گیری شد (۱۳). همچنین استخراج توکسینهای A و B با استفاده از تولید انبوه (۱ لیتر کشت)، سانتریفیوژ و جداسازی محلول رویی، رسوب پروتئینهای محلول رویی با سولفات آمونیوم، جداسازی رسوب و دیالیز آن، تهیه ستون کروماتوگرافی تعویض یون حاوی ژل سفاروز C۱-۶ و شستشوی ستون با بافر جاوی گرادیان کلراید سدیم، جمع‌آوری فراکنشهای خارج شده از ستون که دارای اثرات سمی بودند، تلغیظ آنها، الکتروفورز و بررسی اثرات سمی تعیین گردید (۱۴).

توکسیسیتی

توکسیسیتی عصاره استخراج شده با تزریق مقدار مشخصی از آن به داخل صفاق نوزاد دو روزه موش سفید آزمایشگاهی تعیین گردید (شکل ۲). در هر مورد از آنتی توکسینهای A و B برای مهار فعالیت توکسینها استفاده شد. همچنین، برای تعیین اثرات آنتروتوکسیسیتی هر یک از کشتها، با استفاده از میزان تجمع آب و الکترولیتها در لوپ گره زده شده روده خرگوش استفاده شد (۱۵). همچنین اثرات پاتولوژیک فعالیت آنتروتوکسیسیتی توکسین A با استفاده از تکنیکهای بافت‌شناسی (۱۶) و اثرات سیتوتوکسیسیتی از کشت سلولی رده BK استفاده شد (۱۷). در هر مورد از آنتی توکسین اختصاصی توکسینهای A و B به عنوان کنترل (محلول حاوی توکسین و آنتی‌توکسین اختصاصی) و نیز کنترل بافر استفاده شد.

شکل ۲: گروههای ۲تایی نوزاد ۲ روزه موش سوری به منظور بررسی اثرات توکسیسیتی و مهار این اثرات با آنتی‌توکسین اختصاصی نشان داده شده است.

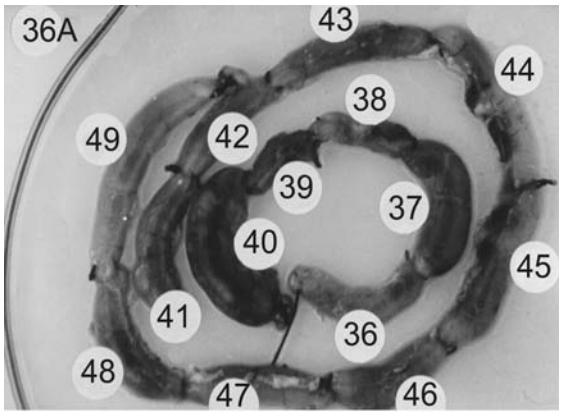
یافته‌ها

در این تحقیق سلولهای رویشی کلستریدیوم دیفیسیل موجود در آمپولیوفیلیزه (سویه توکسی‌ژن) در محیط برین هارت اینفیوژن براث رشد نموده و پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری مقادیر متنابهی از توکسینهای A و B را تولید نمود (جدول ۱). تولید توکسین با تزریق عصاره کشت به صفاق نوزاد ۲ روزه موش سفید آزمایشگاهی و مهار اثرات توکسیسیتی با آنتی‌توکسینهای اختصاصی تائید گردید.

در هر حال، نتایج اندازه‌گیری رشد در شرایط طبیعی نشان داد، پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، منحنی رشد به انتهای فاز لگاریتمی رسیده و در این حالت تعداد لسول باکتری 10^9cfu/ml رسید. تولید ترکیبی از توکسینهای A و b بر اساس تعیین توکسیسیتی و نیز اندازه‌گیری پروتئین کل نشان داد که تولید توکسین پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شروع شو پس از ۱۲۰ ساعت به حداکثر رسید. در حالی که از کشت سویه غیرتوکسی‌ژن در شرایط مشابه با وجود رشد باکتری هیچ توکسینی در محیط تولید نشد.

همچنین نمونه‌هایی که تحت تاثیر Macro-Wave قرار گرفته بودند، تنها تولیداسپور را القاء کرد که با رنگ‌آمیزی اختصاصی مشاهده مستقیم میکروسکوپی تولید اسپور تائید گردید.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳: لوپهای گره زده شده روده خرگوش را نشان می‌دهد. لوپ ۳۶، ۳۸، ۳۹ به عنوان کنترل (توکسین و آنتی توکسین) می‌باشد. اثر ترکیبی از توکسینهای A و b در لوپهای ۳۷ و ۴۰ با تجمع مایعات خونریزی دهنده و سایر لوپها نیز با تجمع مایعات ناشی از توکسین A همراه است.

نتایج اثر امواج Macro-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل توکسی‌ژن

عصاره کشتهای ۲۴ ساعته‌ای که در زمانهای مختلف تحت تابش مستقیم Macro-Wave قرار گرفته بودند، پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری در مقایسه با کنرتل (نمونه اشعه ندیده) نه تنها در تعداد سلول باکتری تغییر قابل ملاحظه‌ای دیده نشد، بلکه با افزایش مدت زمان تابش، تولید پروتئین کل و نیز فعالیت توکسینی آنها کاهش نشان داد. زیرا، تزریق غلظت معینی از عصاره خام و نیز پروتئینهای استخراج شده به لوپ گره شده شده روده خرگوش با کاهش تدریجی تجمع مایعات همراه بود. در کشت سلولی نیز روند کاهشی اثرات سیتوپاتیک دیده شد. افزون بر این، غلظت پروتئین کل نیز با روند کاهش همراه بود. به همین ترتیب، اثر این امواج بر سویه غیر توکسی‌ژن کلستریدیوم دیفیسیل نیز هیچ تغییری در تعداد باکتری یا توکسیسیتی آن ایجاد نشد. با این حال، در هر مورد، تابش مستقیم امواج Macro-Wave باعث افزایش درجه حرارت محیط به نسبت ۲ تا ۵ درجه سانتی‌گراد شد.

نتایج اثر امواج Short-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل توکسی‌ژن

کشتهایی که در زمانهای مختلف تحت تاثیر تابش مستقیم دوز ۱ Short-Wave قرار داده شده بودند، در مقایسه با کشت کنترل، تغییرمحسوسی در تولید پروتئین کل ونیز فعالیت سمی نشان ندادند. در حالی که، کشتهایی که بیش از ۹۰ دقیقه تحت تاثیر تابش مستقیم دوز ۲ Short-Wave قرار داده شده بودند، در مقایسه با کنترل، با افزایش تولید پروتئین کل و نیز توکسیسیتی همراه بود.

کشتهایی که در زمانهای مختلف تحت تاثیر تابش مستقیم دوز ۳ Short-Wave قرار داده شده بودند، در مقایسه با کشت کنترل، پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری با افزایش غلظت پروتئین کل و نیز افزایش غلظت توکسینهای A و b همراه بودند. بدین ترتیب، افزایش زمان تابش تا ۶۰ دقیقه روند افزایشی مشاهده گردید در حالی که تابش بیش از آن با کاهش فعالیت توکسینی (انتروتوکسین و سیتوتوکسین) و نیز پروتئین کل همراه است (جدول ۱).

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، تابش دوز ۳ امواج Short-Wave باعث افزایش تولید پروتئین و نیز توکسینهای کلستریدیوم دیفیسیل شده است. چنانچه، شتهایی که به مدت ۶۰ دقیقه در معرض تابش امواج Short-Wave قرار گرفته‌اند. افزایش تولید پروتئین کل و نیز توکسینهای A و B به نسبت ۲ برابر را نشان می‌دهند. اما افزایش مدت تابش بیش از ۷۰ دقیقه باهث کاهش تولید پروتئین کل و توکسینها شده است.

نتایج اثر امواج Short-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل غیر توکسی‌ژن

بررسی اثر دوزهای مختلف امواج Short-Wave بر سویه‌های غیر توکسی‌ژن کلستریدیوم دیفیسیل نشان داد، تابش مستقیم دوز ۲ اسن اشعه به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در مقایسه با کنترل باعث القای تولید توکسین می‌گردد.

جدول ۱: اثر تابش میتقیم دوز ۳ امواج Short-aveبر تولید پروتئین کل و توکسینهای A و B کشت ۵ روزه کلستریدیوم دیفیسیل توکسی‌ژن

کشت	غلظت پروتئین کل بر حسب mg/ml	علظت پروتئین کل بر حسب µg/ml	غلظت توکسین A بر حسب µg/ml
کشت ۵ روزه اشعه ندیده به عنوان کنترل	۱۵±۲/۶*	۱۲±۲/۵**	۴۰±۳/۸**
کشتی که ۳۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است	۲۴±۳	۱۷±۳/۵	۴۸±۴/۵
کشتی که ۶۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است	۳۵±۵/۷	۲۱±۵/۵	۷۰±۹/۵
کشتی که ۹۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است	۳۱±۴/۶	۱۹±۳/۵	۴۳±۳/۶
کشتی که ۱۲۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است	۱۸±۲/۶	۱۵±۲/۵	۴۱±۴
کشتی که ۱۵۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است	۱۳±۲	۹±۲	۲۸±۲/۵

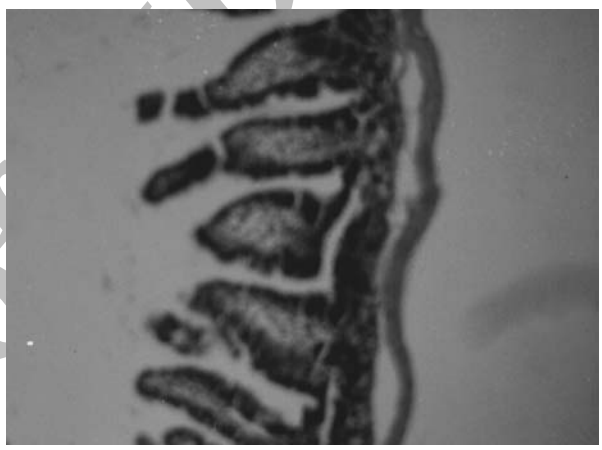
* اعداد میانگین ۴ تکرار می‌باشند. ** اعداد میانگین ۲ بار تکرار می‌باشند.

Archive of SID
www.SID.ir

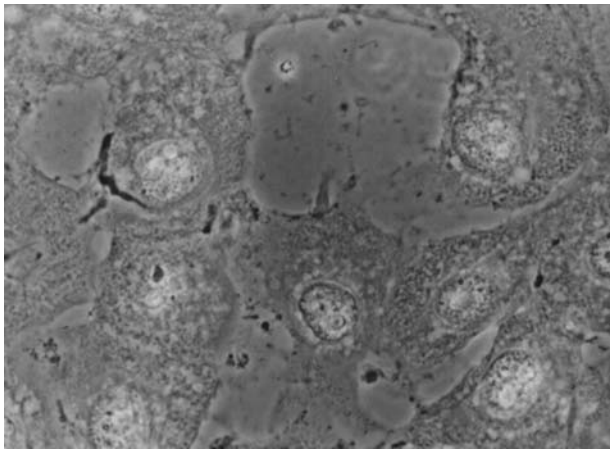
نتایج اثر عصاره استخراج شده از کشت کلستریدیوم دیفیسیل در لوپ ایلئوم خرگوش

برای بررسی اثرات آنتروتوکسیسیتی عصاره استخراج شده و یا توکسین A خالص شده در این تحقیق از لوپ گره زده شده روده خرگوش استفاده شد. تزریق ۱ میلی‌لیتر از عصاره کشت و یا محلول سمی استخراج شده با غلظت معین در لوپ گره زده شده ایلئوم خرگوش باعث تجمع مایعات در آن گردید که با آنتی‌توکسین اختصاصی از آن جلوگیری شد (شکل ۳).

در بررسی بافت‌شناسی، طیفی از اثرات پاتولوژیک شامل، التهاب، ارتشاح سلولی، تجمع مایعات، خونریزی، تخریب پرزهای روده و در نهایت مرگ مشاهده گردید. در مواردی که غلظت توکسین در نمونه زیاد بود، اثرات شدیدتری ایجاد گردید (شکل ۴).



شکل ۴: اثرات پاتولوژیک لوپ تیمار شده با عصاره کشت کلستریدیوم دیفیسیل نشان داده شده است. تخریب مخاط، تغییر شکل پلی‌ها، شکستگی آنها، خونریزی نکروز مشاهده می‌گردد.



شکل ۵: اثر توکسین B کلستریدیوم دیفیسیل بر کشت سلولی رده BK پس از ۱ ساعت نشان داده شده است. تغییر شکل هسته، سیتوپسلام و کنده شده سلولها از بستر به خوبی نمایان است.

در تمام موارد، با استفاده از آنتی‌توکسین اختصاصی به طور کامل از بروز اثرات جلوگیری شد. میزان تجمع مایعات در لوپهایی که عصاره کشت خام یا ترکیبی از توکسینهای A و B وارد شده بود بسیار زیاد و اغلب با خونریزی همراه بود.

نتایج اثر توکسینهای استخراج شده در کشت سلولی

اثرات سیتوپاتیک توکسینهای استخراج شده در کشت سلولی رده BK به صورت تغییرات غشایی سلولها، کنده شدن آنها از بستر کشت، گرد شدن و شناور شده سلوهای رده BK همراه بود (شکل ۵). اثرات حاصل از توکسین B و یا عصاره کشت خام بیش از اثرات سیتوپاتیک توکسین A بود. این امر مؤید آن است که فعالیت سمی توکسین B بسیار بیشتر از توکسین A است.

بحث

افزایش شیوع عفونتهای بیمارستانی ناشی از سویه‌های کلستریدیوم دیفیسیل مقاوم به آنتی‌بیوتیکها نگرانیهایی را ایجاد کرده است (۱۸). مثلا اسهال ناشی از این باکتری در بیماران بستری در بخش سوانح و سوختگی (۱۹) یا در افراد سالکند باعث شده است که این باکتری بیش از پیش مورد توجه قرار گیر (۲۰). در حال حاضر عقیده بر این است که ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از مجاورت ارگانیسم با آنتی‌بیوتیک است اما موارد بسیاری نیز بدون حضور آنتی‌بیوتیک گزارش شده است.

افزون بر این، شیوع عفونتهای مقاوم ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل در سالمندان بر نگرانیها افزوده است. با توجه به استفاده گسترده پرتوهای الکترومغناطیس به منظور درمانهای فیزیوتراپی، به نظر می‌رسد بررسی این پرتوها حائز اهمیت باشد. زیرا این احتمال وجود دارد که پرتوهای مورد بحث با ایجاد تغییرات ژنتیکی یا متابولیسمی در ایجاد مقاومت کلستریدیوم دیفیسیل، توانایی تولید توکسینهای A و B است. ساخت و توشح توکسینها نیز تحت تاثیر عوامل فیزیکی یا شیمیایی دچار تغییر می‌گردد. لذا، تعیین عواملی که غیر از آنتی‌بیوتیکها (۲۱) در ایجاد بیماری‌زایی یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های باکتری دخالت داشته باشند بسیار حائز اهمیت است. از این رو، شناخت علل و شرایط ایجاد مقاومت یا تبدیل سویه غیر بیماری‌زا به بیماری‌زا پیشگیری یا درمان بیماریهای عفونی ناشی از آن را امکان‌پذیر نموده و پاسخ بسیاری از سؤالات داده می‌شود.

مثلا چرا برخی از سویه‌ای کلستریدیوم دیفیسیل توکسین تولید نمی‌کنند؟ چرا برخی فقط توکسین A، برخی توکسین B و برخی هر دو توکسین را تولید می‌کنند (۲۲)؟ از آنجا که این موارد به فعالیتهای متابولیکی یا ژنهای رمز کننده توکسین برمی‌گردد که تحت تاثیر عوامل فیزیکی از جمله پرتوهای الکترومغناطیس قرار گرفته‌اند و منشاء این عوامل نیز محیطهای بیمارستانی است. لذا در این تحقیق، اثر مستقیم پرتوهای Macro-Wave و Short-Wave بر

Archive of SID
www.SID.ir

رشد و تولید توکسین از سویه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا کلستریدیوم دیفیسیل بررسی گردید. با توجه به این که دوزهایی از پرتوهای الکترومغناطیس (یونیزان و غیر یونیزان) با اثر بر ژنوم و ایجاد جهش در سلولهای باکتریایی باعث تغییرات زیادی در آنها می‌گردد. لذا، از این خاصیت برای درمان برخی بیماریهای عفونی استفاده شده است (۲۳، ۲۴). از آنجا که تا کنون اثر پرتوهای ضعیف یا دوز کم بر رشد و متابولیسم کلستریدیومم دیفیسیل بررسی نشده است. از این رو، این تحقیق به منظور بررسی اثر Macro-Wave و Short-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل طراحی و انجام شد.

نتایج نشان داد تابش مستقیم Macro-Wave به کشت ۲۴ ساعته سویه توکسی ژن باعث حذف توانایی تولید توکسین گردید. افزون بر این، تابش مستقیم ۱۲۰ دقیقه Macro-Wave به کشت ۲۴ ساعته سویه توکسی‌ژن و نیز سویه غیرتوکسی‌ژن تولید اسپور را تحریک نموده و باعث شد بعد از ۱۰ ساعت گرمخانه‌گذاری، سلولهای رویشی به اسپور تبدیل گردند. با آنکه ماهیت این عمل به طور دقیق شناخته نشده است. ولی احتمالا فاکتورهای اسپورگذاری تحریک شده و نتیجه آن فعال شدن ژنهای SpoA، SpoB و SpoC است. لذا به نظر می‌رسد، با وجود شرایط مناسب رشد، با افزایش درجه حرارت به میزان ۲ تا ۳ درجه سانتیگراد، احتمالا تولید اسپور ناشی از فعالیت این ژنهای تحریک شده باشد. دلیل این امر روشن نیست، اما در مقایسه با کشتهای اشعه ندیده صحت آن تائید گردید.

در هر حال توجه به تغییرات ژنتیکی انکار ناپذیر است. تغییرات ژنتیکی ناشی از عوامل محیطی در باکتریها به طور گسترده‌ای وجود دارد. چنانچه در ۱۹۹۸ دانشمندان روسی، ۶ سال پس از حادثه چرنوبیل، با بررسی نواحی به شعاع ۳۰ کیلومتر از نیروگاه چونوبیل سویه‌های باکتریایی مقاوم به اشعه ماورای بنفش را جدا نمودند (۲۵). این امر مؤید آن است که پرتوهای یونیزان ضعیف شده یا دوز پایین این پرتوها باعث ایجاد تغییرات پایدار در باکتریها می‌گردد.

بررسی اثر تابش مستقیم Short-Wave بر رشد و تولید توکسین نتایجی متفاوت از نتایج اثر پرتوهای Macro-Wave نشان داد، تابش مستقیم ۳۰ تا ۶۰ دقیقه دوز ۳ امواج Short-Wave به کشت ۲۴ ساعته سویه بیماری‌زای کلستریدیوم دیفیسیل باعث افزایش تولید توکسینها گردید. به طوری که غلظت توکسینهای A و B در نمونه‌هایی که ۶۰ دقیقه در معرض تابش قرار داشته‌اند به بیش از ۲ برابر افزایش یافته است (جدول ۱).

در این تحقیق تولید توکسین با بررسی اثر عصاره کشت بر نوزاد ۲ روزه موش سوری و نیز لوپ روده خرگوش و مهار آن با آنتی‌توکسین تائید گردید (شکل ۲). توکسینهای A و B کلستریدیوم دیفیسیل در فاصله ۲ ساعت باعث مرگ نوزاد ۲ روزه موش می‌گردد.

در این تحقیق تولید توکسین A با استفاده از لوپ گره زده شده روده خرگوش نشان داده شد، زیرا توکسین A یک آنتروتوکسین – سیتوتوکسین است و باعث تجمع آب و الکترولیتها گردید (شکل ۳). جمع شدن آب و الکترولیتها در لوپ گره زده شده روده خرگوش و مهار این اثر با آنتی‌توکسین اختصاصی A، موید وجود آنتروتوکسین است. همچنین تولید توکسین B که یک سیتوتوکسین است، با استفاده از کشت سلولی رده BK تائید گردید (شکل ۵).

علاوه بر افزایش تولید توکسین، پس از خالص‌سازی، تعیین غلظت و بررسی اثرات پاتولوژیک آنها نیز وجود داشت (جدول ۱). با آنکه تعیین مکانیسم دقیق اثر پرتوهای Short-Wave امکان پذیر نیست، با این حال به نظر می‌رسد، علت افزایش غلظت توکسین احتمالا با ایجاد تغییرات غشایی یا تغییر فعالیت ژنهای سازنده آنها باشد. اما به دلیل این که تابش Short-Wave به سویه غیربیماری‌زا باعث ایجاد توانایی تولید توکسین در این سویه گردید مؤید آن است که تغییرات تولید توکسینها ناشی از تاثیرپذیری ژنهای سازنده آنها و تبدیل سویه‌های غیربیماری‌زا به بیماری‌زا است. زیرا درتکرارهای متوالی (حتی تکرار پنجم نیز تولید توکسین وجود داشت) این توانایی پایدار باقی ماند.

با توجه به نتایج این تحقیق شاید بتوان علت مواردی از کولیت و کولیت با غشای کاذب که بدون دخالت آنتی‌بیوتیکها ایجاد می‌گردد را توضیح دهد. زیرا کلستریدیوم دیفیسیل باکتری تولید کننده اسپور بوده و در محیط فراوان است.

افزون بر این در فلور طبیعی نیز وجود دارد. از این رو، افزاد سالمند بستری در بیمارستانها و آسایشگاهها که تحت درمانهای فیزیوتراپی با پرتوهای Short-Wave با ایجاد تغییرات باعث تحریک تولید توکسین از این باکتری است. هر چند تائید نهایی این موضوع به تحقیقات بیشتری نیاز دارد. با این حال، بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان گفت: در شرایط عادی کلستریدیوم دیفیسیل غیر بیماری‌زا جزء فلور طبیعی است و تحت تاثیر این عامل به سویه بیماری‌زا تبدیل شده و بیماری ایجاد می‌نماید.

یافته بسیار مهم این تحقیق آن است که هم القای تولید توکسین و هم افزایش مقدار تولید آن پایدار باقی می‌ماند ($P<0/03$). به عبارت دیگر پاساژهای متوالی هر یک از کشتهای اشعه دیده باعث تغییر پایدار در تولید توکسین شده است. زیرا در نسلهای بعد این توانایی باقی ماند.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Barbut F, Petit CJ: Epidemiology of Clostridium difficile- associated infections. Clin Microbiol Infect. 2001; 7(8): 405-410

2. Kuijper EJ, Weert J, Kato H, Kato N, Vandam AP, Vander Vorm ER, Weel J, Van Rheenen C, DanKert J:
Nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associate diarrhoea due to a Clindamycin- resistant enterotoxin A negative strain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001; 20(8): 528-534

3. Yassin SF, Young Fadok TM, Zein NN, Pardi DS: Clostridium difficile- assiciated diarrhoea and colitis. Mayo Clin Proc. 2001; 76(7): 725- 73

4. Norval M: Effect of solar radiation on the human immune system. J Photochem Photobiol. 2001; 63: 28- 40

5. Chao CC, Lin Chao S: Transient induction of photolyase activity in arrested frog cells in response to a
Short-wave ultraviolet segment of simulated sunlight. Biochem Biophys Res Commun. 1987; 145(1): 604-611

6. Ramabhadran TV: Method for the isolation of Escherichia coli relaxed mutatnts, utilizing near-ultraviolet irradiation. J Bacteriol. 1976; 127(3): 1587-1589

7. Rutherford CG, Reidmiller S Jeffrey, Marquis E Robert: Method to sensitize bacterial spore to subsequent killing by dry heat or ultraviolet irradiation. J Microbiol Methods. 2000; 42: 281- 290

8. Lado H Beatrice, and Ahmed E yousef: Alternative food-preservation tchnologies: efficacy and mechanisms. Microbes and Infection. 2002; 4: 433- 440

9. Guy AW, Chou CK, and Mcdougall JA: A quarter century of in vitro research: a new look at exposure methods. Bioelectromagnetics. 1999; 4: 21- 39

10. Belyaev IV, ED Alipov: Frequency- dependent effect
of ELF magnetic filed on chromatin conformation in escherichia coli cells and human lymphocytes. Biochemmic Biophysica Acta. 2001; 1526: 269- 276

11. Kohnom YM, Kimura I, and Wada M: Effect of static magnetic fielld on bacteri: Sterptococcus aureus, and Escherichia coli. Pathophsiology. 2000; 7: 143- 148

12. Cappuccino JG, and Sherman N: Microbiology A laboratory manual. Fourth Edition. The Benjamin/ Cummings Publishing Company. Inc. New York. P. 1996; 109- 128.

13. John M: The Protein Protocols, hand book human press . New Jersey; 1996; 7-12

۱۴. رمضانعلی عطایی، نسرین مظمی، سیدعباس شجاع الساداتی، غلام حسین ریاضی، محمد فرهادی: تولید و خالص‌سازی توکسینهای A و B از Clostridum difficile. مجله پزشکی کوثر. ۱۳۷۶؛ دوره ۲، صفحات ۱۲۵-۱۱۷

15. Lima MA Aldo, Lyerly M David, Wilkins D Tracy, Innes J Donald, Guerrant L Richard: Effects of Clostridium difficile toxins A and B in Rabbit small and large intestinal in vivo and on Cultured cells in vitro. Infect and Immun. 1988; 56(3): 582- 588

16. Drury BA, Wallington AE: Carleton's Histological Technique. Fifth edition, New York, Oxford University Press. 1980; 125-149

17. Samra Z, Talmor S and Bahar J: High prevalence of toxin A- negative toxin B- positive Clostridium difficile in hospital patients whit gastrointestinal disease. Diag Microbiol Infect Dis. 2002; 43: 189-192

۱۸. رمضانعلی عطایی، دکتر قربان‌نژاد: اثر توکسینهای A و B سبک وزن کلستریدیوم دیفیسیل در لوپ گره زده شده روده خرگوش و کشت و سلولی رده BK. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، سال ۱۳۸۲، دوره ۶، شماره ۴، ۲۱۳-۲۰۵

19. Still J, Law E, Friedman B, Newton T, Wilson J: Clostridium difficile diarrhoea on a burn unit. Burns. 2002; 28: 398-399

20. Brandt JL, Kosche AK, Greenwald AD, Berkman D: Clostridium difficile- associated diarrhoea in the elderly. The Amer J Gastro. 1999; 94(11): 3263-3266.

21. Schwaber JM, Simhon A, Block C Roval V, Ferderber N, Shapiro M: Factors associated with Nosocomial diarrhoea and Clostridium difficile-associated disease on the adult wards of an urban tertiary care hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 15-9: 19

22. Vernet A, Corther G, Dubos-ramare F, Parodi LA: Relationship between level of Clostridium difficile toxin A and toxin B and cecal lesion in Gnotobiotic mice. Infect and Immun. 1989; 57(7): 2123-2127

23. Sachsenmaier C, Radler-pohi A, Muller A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ: Damage to DNA by UV

Archive of SID

www.SID.ir

light and activation of transcription factors. Biochem Pharmacol. 1994; 47(1): 129-136
24. Lomachenkov VD, Kuprikova IM, Golubeva VS, Pochtennyi IT, Nikolaeva GM: Effectiveness of complex treatment in combination with short-wave therapy and protease inhibitors in first detected patients with pulmonary tuberculosis. Probl Tuberk. 1997; 1: 42-44
25. Zavilgelsky GB, Abiev SK, Sukhodolets VV, Ahmad SI: Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from chernobyl. J Photochem Photobiol B. 1998; 43(2): 152-157

Archive of SID

www.SID.ir