بررسی توکسین زایی کلستریدیوم دیفیسایل با استفاده از کشت سلول

دکتر محمدحسین سلاری [۱]

واژه های کلیدی : *توکسین زایی ، کلستریدیوم دیفیسایل ، کشت سلول*

چکیده

بعضی از اشخاص سالم *کلستریدیوم دیفیسایل* را در فلور روده دارند. اگر این افراد تحت درمان نوعی آنتی بیوتیک قرار گیرند. با تغییراتی که در ترکیب فلورروده به نفع این باکتری صورت می گیرد ممکن است باعث ازدیاد آن و تولید توکسین باکتری مذکور و نهایتاً بروز بیماری کولیت سودوممبران و یا اسهال کلستریدیوم دیفیسایل گردد.

در بررسی که به عمل آمد باتوجه به اهمیت توکسین *کلستریدیوم دیفیسایل* در بروز بیماری توکسین زایی ۱۳۲ مورد *کلستریدیوم دیفیسایل* جدا شده از ۲۵۱۷ بیمار مبتلا به انتروکولیت را با استفاده از کشت سلول مورد بررسی قرار دادیم.

نتیجه کشت سلول در توکسین زایی *کلستریدیوم دیفیسایل* جدا شده ، بسیار زیاد در ۲۱ مورد (۱۵/۹٪) ، زیاد در ۱۷ مورد (۱۲/۸٪) ، متوسط در ۱۸ مورد (۱۳/۶٪) ، کم در ۱۲ مورد (۹٪) و فاقد توکسین *کلستریدیوم دیفیسایل* (۴۸/۴٪) بوده است.

۱- گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران ، صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۶۴۴۶.

سرآغاز

گرچه *کلستریدیوم دیفیسایل* عامل بیماری کلیت سود و ممبران [1] و یا اسهال ناشی [2] از مصرف آنتی بیوتیک می باشد. گزارش می شود که این باکتری در دستگاه گوارش ۶۰ - ۵۰ درصد اطفال ۸ - ۱ ماهه و ۳ درصد بزرگسالان به عنوان فلور میکروبی نیز وجود دارد. در صورتی که این افراد تحت درمان با نوعی آنتی بیوتیک قرار گیرند بطوری که فلور میکروبی روده آنهـــا به نفـــع این باکتری تغییر یابد باعث تکثیر ، ازدیاد ، تولید توکسین و نهایتاً بروز بیماری می شود. (زنان ، مبتلایان به سرطان و اشخاص تحت عمل جراحی بیشتر در معرض ابتلا به بیماری مذکور می باشند).

اگرچه فیمبریه ، کپسول و آنزیم های هیدرولیتیک باکتری نیز در ایجاد بیماری مشارکت دارند لیکن علت اصلی بیماری توکسین های (سیتوتوکسین و انتروتوکسین) این باکتری است که هـــر دو ساختمان پروتئینی داشته و در برابر حرارت ، پروتئازها و عوامل اکسیدکننده غیر فعال می شوند (۶-۱).

به دلیل اهمیت توکسین های این باکتری بعضی از خصوصیات آنها را ذکر می نماییم. (۱۲ ، ۱۱ ، ۱۰) :

خصوصیات توکسین	توکسین A	توکسین B
اثر بر کشت سلول	+	+
کشندگی در موش	+	+
حساسیت نسبت به اسید	+	+
حساسیت نسبت به حرارت	+	+
حساسیت نسبت به تریپسین	+	+
عامل تجمع آب درروده خرگوش	+	-
مصون نمودن موش توسط توکسین :		
A^+ B	+	+
A	+	+
B	-	-
وزن مولکولی	5×10^5D	$3.6\text{-}7 \times 10^5$D

1- Pseudomembranous colitis

2- Antibiotic associated colitis

نمونه گیری و روش بررسی

دراین تحقیق با استفاده از روش های آماری ۲۵۱۷ بیمار مبتلا به انتروکولیت را از ۷ بیمارستان تهران انتخاب نموده ، ضمن ثبت کلیه مشخصات بیماران ومطالعه میکروسکوپی و ماکروسکوپی هر نمونه آن را روی محیط های اختصاصی مثل سیکلوسرین [۱]، سفوکسیتین فروکتوزآگار و محیط بروسلا [۲] آگار حاوی ویتامین و همین کشت داده به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی (روی جایگزینی گاز و یا استفاده از گازپک [۳]) و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم. سپس باکتری های بی هوازی جدا شده را با استفاده از تست های افتراقی مشخص نموده (با روشی که در ذیل توضیح داده می شود) به بررسی توکسین زایی آنها پرداختیم.

۱- باکتری ها را با استفاده از محیط اختصاصی [۴] به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت می دهیم.

۲- از محیط کشت ۴ روزه فوق محلولی با رقت ۱/۱۰ تهیه نموده (با استفاده از فسفات بافر (PH = ۷/۲) آن را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ RPM سانتریفوژ کرده سپس توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرون (میلی پور) فیلتر می نماییم.

۳- محیط اختصاصی کشت سلول همراه با سلول های هلا [۵] فراهم نموده (در هر میلی لیتر محیط می بایست $۲/۵ \times ۱۰^۴$ عدد سلول باشد) سپس به هر حفره میکروتایترپلیت مقدار ۰/۲ میلی لیتر از آن می افزاییم.

۴- به هر حفره میکروتایترپلیت مقدار ۰/۱ میلی لیتر از محلول سانتریفوژ و فیلتر شده فوق با رقت ۱/۴۰ می افزاییم.

۵- میکروتایترپلیت را در شرایط اتمسفر و ۵ درصد گازکربنیک به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم. هرگاه حداقل ۵۰ درصد سلول ها از بین برود [۶] (گرد شوند) نتیجه آزمایش مثبت ، در غیراین صورت منفی قلمداد می شود.

۶- جهت کنترل آزمایش می بایست از توکسین و آنتی توکسین اختصاصی و استاندارد باکتری استفاده نمود.

1- Cycloserine Celoxitin Fructose Agar (CCFA)

2- Brucella Agar + Vitamin K , + Hemin

3- Evacuation Replacement jar technique (ER) or Gas pak.

4- Brain Heart infusion agar (BHI) or Cook meat medium.

5- Minimum Essential medium + Hell Cell

6- Cytopathic effect (CPE).

۷- برای بررسی توکسین زایی باکتری از دستورالعمل زیر استفاده می نماییم (۲،۷،۹،۱۳،۱۶):

نتیجه کشت	مرگ سلول	توکسین زایی باکتری
	۱۰۰ درصد	بسیار زیاد
مثبت :	۷۵ درصد	زیاد
	۵۰ درصد	متوسط
منفی	کمتر از ۵۰ درصد	کم
	صفر	-

یافته ها

دراین مطالعه نمونه های فراهم شده را به روش کشت بی هوازی واستفاده از محیط های اختصاصی ، افتراقی و کشت سلول از نظر *کلستریدیوم دیفیسایل* و توکسین زایی این باکتری مورد بررسی قرار دادیم که نتایج بدست آمده به شرح ذیل می باشد.

الف - ۱۳۲ نمونه مربوط به ۷۳ مرد و ۵۹ زن دارای *کلستریدیوم دیفیسایل* بودند. بالاترین تعداد یعنی ۲۷ نمونه (۲۰/۴ درصد) مربوط به گروه سنی بیش از ۵۰ سال و کمترین تعداد یعنی ۱۲ نمونه (۹ درصد) مربوط به گروه های سنی ۱۰ - ۱ سال و ۲۰ - ۱۱ سال بود (شترنگه ۲).

ب - ۵۶ نمونه مربوط به ۳۲ مرد و ۲۴ زن دارای *کلستریدیوم دیفیسایل* توکسین زا بود. کمترین تعداد یعنی یک نمونه (۱/۷ درصد) مربوط به گروه سنی کمتر از یک سال و بالاترین تعداد یعنی ۱۹ نمونه (۳۳/۹ درصد) مربوط به گروه سنی بیش از ۵۰ سال بود (شترنگه ۳).

ج - با بررسی به عمل آمده مشخص گردید که ۵۶ مورد *کلستریدیوم دیفیسایل* توکسین زای جدا شده فوق الذکر از نظر تولید توکسین متفاوت بوده یعنی ۲۱ مورد (۱۵/۹ درصد) باکتری دارای توان توکسین زایی بسیار زیاد ، ۷ مورد (۱۲/۸ درصد) نسبتاً زیاد ، ۱۸ مورد (۱۳/۶ درصد) متوسط بود (نمودار شماره ۱).

د - نتیجه کشت سلول مربوط به ۷۶ مورد *کلستریدیوم دیفیسایل* باقی مانده منفی بود ، یعنی ۱۲ مورد کم و ۶۴ باکتری دیگر اصلاً توان توکسین زایی را نداشتند (شترنگه ۴).

گفتگو و بهره گیری پایانی

اخیرا ، تحقیقات نسبتا زیادی در مورد *کلستریدیوم دیفیسایل* و بیماری های ناشی از این باکتری صورت گرفته است. بعضی از این تحقیقات موید این مطلب است که گرچه فیمبریه و کپسول باکتری در بروز بیماری نقش دارند لیکن نقش سیتوتوکسین و انترو توکسین باکتری بارز و عامل اصلی بیماری محسوب می شود. گزارش می شود که تعداد زیادی از کودکان زیریک سال و حـدود ۳ درصد بزرگسالان این باکتری را به صورت فلور روده بزرگ خود دارا می باشند. در

صورتی که فردی دارای نوع توکسین زای این باکتری باشد (یا شخص آن را دریافت کند) و به علل گوناگون مانند مصرف آنتی بیوتیک ، عمل جراحی ، ابتلا به سرطان کولن ، کهولت سن و یا هرنوع بیماری تضعیف کننده سیستم ایمنی شرایطی به وجود آید که ترکیب فلور روده اش به نفع این باکتری تغییر یابد باعث تکثیر باکتری و تولید مقدار زیادی توکسین آن شده که در این حالت خطر ابتلا به کلیت سود و ممبران و یا اسهال ناشی از این باکتری وجود خواهد داشت (۱،۴،۶،۸) دراین مطالعه قدرت توکسین زایی ۱۳۲ مورد *کلستریدیوم دیفیسایل* جدا شده از نمونه ۲۵۱۷ بیمار مورد مطالعه قرار گرفته نتایج ذیل بدست آمده است :

همانطور که در نمودار شماره ۱ آمده است با استفاده از کشت سلول باکتری ها را به ۵ گروه ذیل تقسیم نمودیم :

۱- ۲۱ مورد (۱۵/۹ درصد) باکتری با قدرت توکسین زایی بسیار زیاد

۲- ۱۷ مورد (۱۲/۸ درصد) باکتری با قدرت توکسین زایی نسبتاً زیاد

۳- ۱۸ مورد (۱۳/۶ درصد) باکتری با قدرت توکسین زایی متوسط

۴- ۱۲ مورد (۹ درصد) باکتری با قدرت توکسین زایی کم

۵- ۶۴ مورد (۴۸/۴ درصد) باکتری غیرتوکسین زا

همـــانطور که در شترنگه شماره ۳ آمده است بیشترین تعداد *کلستریدیوم دیفیسایل* توکسین زا ۱۹ مورد (۳۳/۹ درصد) متعلق به نمونه گروه سنی بیش از ۵۰ سال و کمترین تعداد یعنی یک مورد (۱/۷ درصد) مربوط به گروه سنی کمتر از یک سال می باشد. این مطلب با گزارش پژوهشگران دیگر نیز مطابقت دارد ، یعنی برخلاف افراد مسن که بیشتر از آنها نوع توکسین زای این باکتری جدا می شود در سنین دیگر خصوصاً گروه سنی کمتر از یک سال اغلب نوع توکسین زا وجود دارد از این رو انتروکولیت ناشی از این باکتری در آنها شیوع کمتری دارد.

مطلب دیگری که دراین مطالعه مورد توجه بوده تفکیک ۱۳۲ مورد *کلستریدیوم دیفیسایل* جدا شده از نمونه ها از نظر قدرت تولید توکسین بود. این موضوع نیز با تحقیقات پژوهشگران دیگر تا حدودی همخوانی دارد (۱۲،۱۴،۱۵).

بنابراین می توان نتیجه گرفت *کلستریدیوم دیفیسایل* موجود در کولن اشخاص ممکن است از نظر تولید توکسین متفاوت باشند. همانطور که ذکر شده سنین پایین به خصوص کودکان ۸-۱ ماهه بیشتر دارای *کلستریدیوم دیفیسایل* غیرتوکسین زا می باشند. از این رو بندرت به بیماری های کلیت سود و ممبران و یا کلیت ناشی از این باکتری مبتلا می شوند درحالی که در سنین بالا به خصوص بزرگسالان عکس این مطلب صادق است.

سپاسگزاری

از دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران ، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران ، بیمارستان هایی که همکاری نموده اند و کلیه همکاران بخش باکتریولوژی دانشکده بهداشت و از مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی شهرستان یزد ، آقای غلامرضا حسن پور صمیمانه تشکر می نماید.

شترنگه ۱ - توزیع فراوانی ۲۵۱۷ بیمار مبتلا به انتروکولیت برحسب سن و جنس

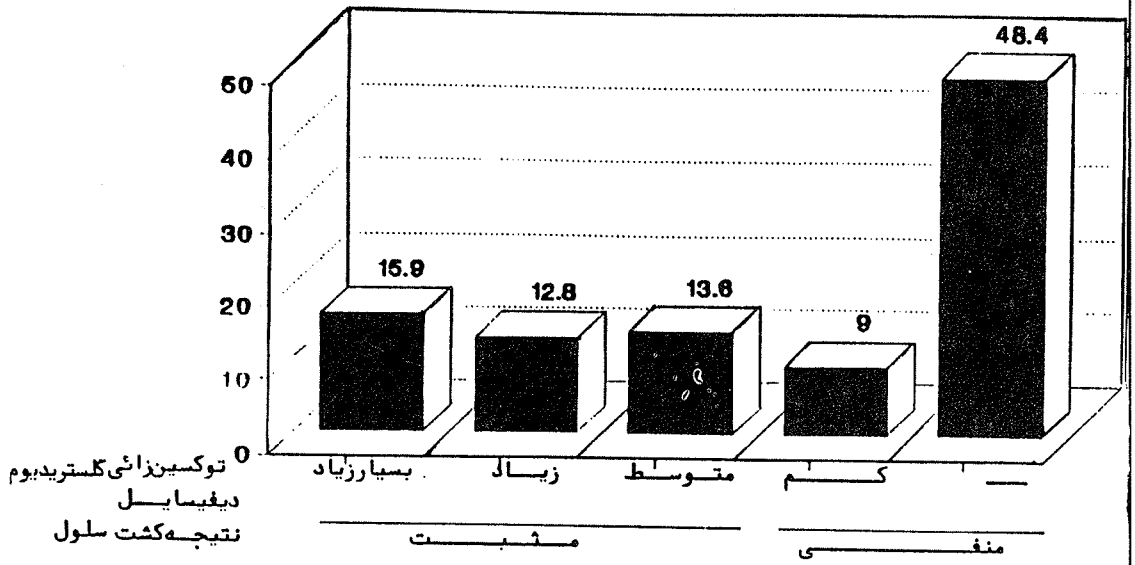
جنس / سن به سال	مرد	زن	جمع	درصد
< ۱	۸۵	۷۹	۱۶۴	۶/۵
۱ - ۱۰	۳۲۳	۲۹۸	۶۲۱	۲۴/۶
۱۱ - ۲۰	۲۰۱	۱۸۸	۳۸۹	۱۵/۴
۲۱ - ۳۰	۲۰۷	۱۴۲	۳۴۹	۱۳/۸
۳۱ - ۴۰	۲۱۳	۱۳۸	۳۵۱	۱۳/۹
۴۱ - ۵۰	۲۱۷	۱۵۱	۳۶۸	۱۴/۶
> ۵۰	۱۳۸	۱۳۷	۲۷۵	۱۰/۹
جمع	۱۳۸۴	۱۱۳۳	۲۵۱۷	۱۰۰

شترنگه ۲ - توزیع فراوانی ۱۳۲ مورد *کلستریدیوم دیفیسایل* جداشده از ۲۵۱۷ نمونه بیمار مبتلا به انتروکولیت برحسب سن و جنس

جنس / سن به سال	مرد	زن	جمع	درصد
< ۱	۶	۷	۱۳	۹/۸
۱ - ۱۰	۵	۷	۱۲	۹
۱۱ - ۲۰	۶	۶	۱۲	۹
۲۱ - ۳۰	۹	۷	۱۶	۱۲/۱
۳۱ - ۴۰	۱۶	۱۰	۲۶	۱۹/۶
۴۱ - ۵۰	۱۷	۹	۲۶	۱۹/۶
> ۵۰	۱۶	۱۳	۲۷	۲۰/۴
جمع	۷۵	۵۹	۱۳۲	۱۰۰

شترنگه ۳ - توزیع فراوانی ۵۶ مورد *کلستریدیوم دیفیسایل* توکسین زای جدا شده از ۲۵۱۷ نمونه بیمار مبتلا به انتروکولیت برحسب سن و جنس بیمار

جنس / سن به سال	مرد	زن	جمع	درصد
< ۱	۱	-	۱	۱/۷
۱ - ۱۰	۳	۳	۶	۱۰/۷
۱۱ - ۲۰	۱	۱	۲	۳/۵
۲۱ - ۳۰	۴	۴	۸	۱۴/۲
۳۱ - ۴۰	۶	۴	۱۰	۱۷/۸
۴۱ - ۵۰	۷	۳	۱۰	۱۷/۸
> ۵۰	۱۰	۹	۱۹	۳۳/۹
جمع	۳۲	۲۴	۵۶	۱۰۰



نمودار ۱ - توزیع فراوانی ۱۳۲*کلستریدیوم دیفیسایل* جداشده از ۲۵۱۷ نمونه بیمار مبتلا به انتروکولیت برحسب توان توکسین زایی باکتری

کتابنامه

1- Andrejak , M. ; Schmit , J.I. and Tondriaux , A. (1991): The clinical significance of antibiotic associated pseudomembranous colitis. Drug - Saf. sep - oct : 6(5) : 339 - 49.

2- Atishc , M. (1987): Detection of clostridium difficile toxin in various tissue culture monolayers. Journal of Clinical Microbiology. Oct. p: 1999-2000.

3- Bartlett , J.G. (1979): Antibiotic - associated pseudomembranous colitis. Rev Infect Dis. 1 : 530.

4- Borriello , S.P. , Davies , H.A. , Kamiya , S. , Reed , P.J. and Sedden, S. (1990): Virulence Factors of clostridium difficile. Reviews of Infectious diseases. Vol. 12.

5- Borriello , S.P. , Reed , P.J. and Barclay , F.E. (1985): Identification of bacteria by fast protein liquid chromatography. J. Med. Microbiol , 19: IX.

6- Davies , H.A. and Borriello , S.P. (1990): Detection of capsul in strains of clostridium difficile of varying virulence and toxigenicity. Microb - pathog - Aug : 9(2) , 141 - 6.

7- Dowell , V.R. and Howkins , T.M. (1977): Laboratory methods in anaerobic bacteriology CDC laboratory manual department of health education and welfore publication No. (CDC) 78 - 82 , 72 center for disease control. Atlanta.

8- Idaluzz , A.C. et al (1986): Detection of clostridial toxin in Stool from children with diarrhoea. J Med. Microbiol. Vol. 22 - 29 - 31.

9- Larson , H.E. , Price , A.B. , Honour , P. et al (1978): Clostridium difficile and the etiology of pseudomembranous colitis. Lancet I: 1063.

10- Libb , J.M. , Wilkins , T.D. (1982): Production of antitoxins to two toxins of clostridium difficile and immunological comparison of the toxins by cross neutralization studies. Infect - Immun. 35: 374 - 376.

11- Libby , J. , Sullivan , N. , Tassel , R. , et al (1991): Relationship of two toxins of clostridium difficile. Presented at the Am. society of Microbiology annual meeting , Dallas march. 3.

12- Lyerly , D.M. and et al (1982): Biological activities of toxins "A" and "B" of clostridium difficile. Infect Immun. 35: 1147 - 1150.

13- Ryan , R.W. , Kwasnik , I. and Tilton , R.C. (1980): Rapid detection of clostridium difficile toxin in human feces J Clin Microbiol. 12 : 776-776.

14- Scapa , E. (1982): Pseudomembranous colitis in a 5 week old infant Br Med J 284 : 824.

15- Viscidi , R. , et al. (1983): Serum antibody response to toxins "A" and "B" clostridium difficile.J. Infect Dis. 148:93.

16- Whaley , D.N. and Gorman , G.W. (1977): An inexpensive device for evacuating , the gassing anaerobic systems with in house vacuum. J Clin Microbiol. 5 : 668-669.