

## اثر امواج الکترومغناطیس بر رشد و تولید توکسین کلستریدیوم دیفیسیل

رمضانعلی عطایی Ph.D.\*، غلامحسین پورتنی M.Sc.\*، علی مهربانی‌توانا 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 Clostridium Difficile یکی توکسی ژن و دیگری غیر توکسی ژن استفاده گردید. ابتدا از هر کدام به طور جداگانه کشت اولیه تهیه شد پس از آن در شیشه‌های ۵۰ اونس، 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 سانتی‌گراد 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 شده خرگوش انجام شد.

**\* یافته‌ها:** نتایج نشان داد، اثر تابش پرتوهای Macro-Wave باعث حذف فعالیت سمی عصاره کشت می‌گردد. 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 Clostridium Difficile نشان داد، تابش مستقیم این پرتو به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه باعث افزایش پایدار تولید توکسین به میزان دو برابر می‌گردد. افزون بر این، تابش مستقیم پرتوهای Short-Wave به کشت ۲۴ ساعته سویه غیرتوکسی ژن Clostridium 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 Clostridium Difficile شده اما تولید اسپور را القاء می‌نماید. در حالی که اثر پرتوهای Short-Wave بر سویه غیرتوکسی ژن، تولید توکسین را القا کرده و آن را به سویه توکسی ژن تبدیل نموده است.

**کل 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 شانزدهم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۶۷-۱۶۰

### مقدمه

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 آنجمله که اثرات بیولوژیک و کاربرد تعدادی از پرتوهای الکترومغناطیس از جمله پرتوهای ماورای بنفش رو به گسترش و با نتایج درخشانی همراه بوده است. با این حال، اثرات بیولوژیک بسیاری از آنها

اتیولوژی کولیت با غشای کاذب<sup>۱</sup> 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

1. Pseudomembranous Colitis

ناشناخته باقی مانده است. مثلاً تاکنون 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، احتمالاً 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 کلستریدیوم 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 توکسی ژن (غیربیماری‌زا) که از مدفوع فرد سالم جدا شده بود استفاده گردید. پادتن اختصاصی توکسین A و B کلستریدیوم دیفیسیل، کوماسی بریلیانت بلو ۲۵۰-R از سیگما، محیط کشت برین هارت اینفیوژن برات، تریپتیکاز سوی آگار، آگار آگار، سیستین هیدروکلراید، گلوکز منویدرات، عصاره مخمر، هیدروکسید سدیم، اسیدکلریدریک، اتانل، اسید سولفوریک، جار و گاز پک از مرک آلمان و فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرومتری از ساتوریوس تهیه گردید. همچنین خرگوش سفید آزمایشگاهی به وزن ۱ تا ۱/۵ کیلوگرم و نوزاد دو روزه موش سوری از انستیتو پاستور ایران، کشت سلولی رده BK (Bovine Kidney) از بخش ویروس‌های حیوانی مؤسسه رازی، دستگاههای تولید کننده امواج Short-Wave و Macro-Wave:

1. Short-Wave, view length. 11m, fr: 27 milium cycle/s.
2. Macro-Wave, Radiotherm. 706. 250w/60 ohm. 245 MHZ. View length. 12cm-69cm.

موجود در بخش فیزیوتراپی بیمارستان بقیه... استفاده گردید. از روشهای آماری آنالیز واریانس و t-test و نرم افزار 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 برات (BHI Broth) تلقیح و در شرایط بی‌هوای (استفاده از جار و گاز پک) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. بدین ترتیب کشت اولیه (Pre-culter) تهیه شد. سپس به هر یک از طریقه‌های ۷ تایی شیشه‌های کتابی شکل ۴ اونسی، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت وارده و پس از استریل کردن آنها به نسبت

۲درصد تلقیح شدند و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوای گرمخانه‌گذاری شدند. به همین ترتیب غیرتوکسی ژن کلستریدیوم دیفیسیل کشت اولیه تهیه و به سری‌های ۷ تایی 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 توکسی ژن

برای این منظور ۶ عدد از شیشه‌هایی که با کلستریدیوم دیفیسیل تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوای (استفاده از جار و گاز پک) 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 Kohno و Beyleav، YL. And ED Alipov و M انجام شد (۱۰، ۱۱). پس از این مرحله همه شیشه‌ها را به مدت ۴ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بی‌هوای گرمخانه‌گذاری کرده و پس از آن میزان رشد باکتری، تولید توکسین و نیز توکسیستی بررسی گردید.

### روش بررسی اثر امواج Short-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل توکسی ژن

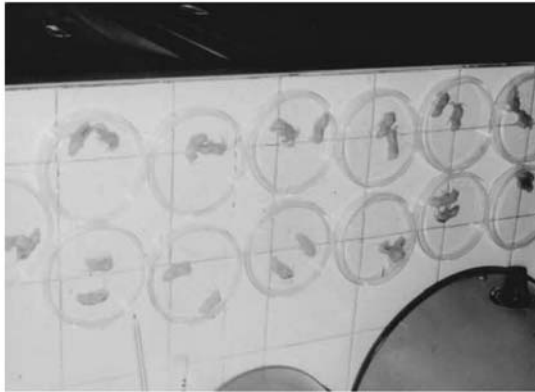
برای این منظور نیز مانند گذشته سه سری ۷ تایی از شیشه‌های تلقیح شده را ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوای گرمخانه‌گذاری کرده، سپس تحت تاثیر ۳ دوز از امواج Short-Wave قرار داده شدند. به این ترتیب که سری ۶ تایی اول از فاصله ۳۰ سانتیمتری با شرایط فوق تحت تابش مستقیم دوز ۲ (با شدت ۱۴۵ تا ۱۵۵ وات) پرتوهای 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 شیشه‌ها را به مدت ۴ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوای (استفاده از جار و گاز پک) گرمخانه‌گذاری کرده و پس از این اثر این پرتوها بر رشد، تولید توکسین و نیز توکسیستی بررسی شد.

علاوه بر تعیین اثر Macro-Wave و Shore-Wave بر سویه توکسی ژن کلستریدیوم دیفیسیل اثر این امواج بر سویه غیر توکسی ژن 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<sup>۱</sup> انجام شد. برای این منظور هر یک از شیشه‌های کشت در زمان تعیین شده، از گرمخانه

تجمع آب و الکترولیتها در لوپ گره زده شده روده خسرگوش استفاده شد (۱۵). همچنین اثرات پاتولوژیک فعالیت آنروتوکسیسیته توکسین A با استفاده از تکنیکهای بافت‌شناسی (۱۶) و اثرات سیتوتوکسیسیته 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 آنتی توکسین اختصاصی) و نیز کنترل بافر استفاده شد.



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

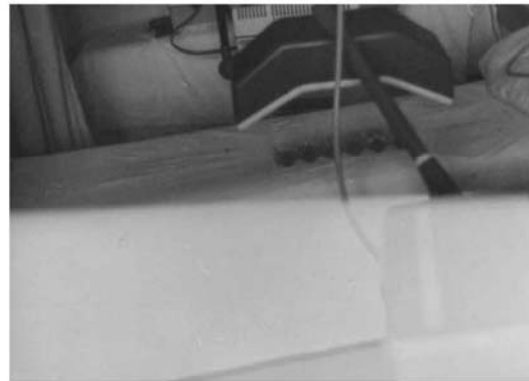
### یافته‌ها

در این تحقیق سلولهای رویشی کلستریدیوم دیفیسیل موجود در آمپولیویزه (سویه توکسی‌ژن) در محیط برین هارت اینفیوژن برات رشد نموده و پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری مقادیر متناهی 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 توکسیسیته با آنتی توکسینهای اختصاصی تأیید 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  $10^7$  cfu/ml رسید. تولید ترکیبی از توکسینهای A و B بر اساس تعیین توکسیسیته 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 غیر توکسی‌ژن در شرایط مشابه با وجود رشد باکتری هیچ توکسینی در محیط تولید نشد.

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

خارج و از آن رفتهای  $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$  تهیه گردید. از هر رقت، ۳ نمونه ۱۰۰ میکرولیتری روی ۳ پلیت حاوی تریپتیکاز 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  $37^\circ\text{C}$  سانتی‌گراد 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  $4^\circ\text{C}$  سانتریگراد)، مایع رویی با فیلتر  $0.45$  میکرومتری استریل شد. سپس با استفاده از روش برادفورد<sup>۳</sup> 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 C-۱۶ و شستشوی ستون با بافر حاوی گرادیان کلراید سدیم، جمع‌آوری فراکشنهای خارج شده از ستون که دارای اثرات سمی بودند، تلفیظ آنها، الکتروفورز و بررسی اثرات سمی تعیین گردید (۱۴).

### توکسیسیته

توکسیسیته 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 آنروتوکسیسیته هر یک از کشتها، با استفاده از میزان

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، ششهایی 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 باعث کاهش تولید پروتئین کل و توکسینها شده است.

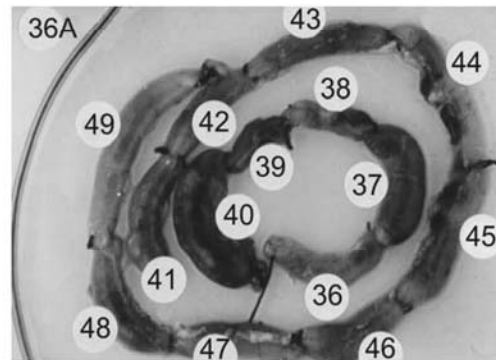
### نتایج اثر امواج Short-Wave بر رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم دیفیسیل غیر توکسیژن

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 مستقیم دوز ۲ امواج Short-wave بر تولید پروتئین کل و توکسینهای A و B کشت ۵ روزه کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژن

غلظت توکسین A بر حسب $\mu\text{g/ml}$	غلظت پروتئین کل بر حسب $\mu\text{g/ml}$	غلظت پروتئین کل بر حسب $\text{mg/ml}$	کشت
$30 \pm 3/8^{**}$	$12 \pm 2/5^{**}$	$15 \pm 2/6^*$	کشت ۵ روزه اشعه ندیده به عنوان کنترل
$48 \pm 2/5$	$17 \pm 3/5$	$23 \pm 3$	کشتی که ۳۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است
$70 \pm 9/5$	$21 \pm 5/5$	$35 \pm 5/7$	کشتی که ۶۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است
$33 \pm 3/6$	$19 \pm 3/5$	$31 \pm 2/6$	کشتی که ۹۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است
$41 \pm 4$	$15 \pm 2/5$	$18 \pm 2/6$	کشتی که ۱۲۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است
$28 \pm 2/5$	$9 \pm 2$	$13 \pm 2$	کشتی که ۱۵۰ دقیقه در معرض تابش Short-Wave قرار گرفته است

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



شکل ۳: لویهای گره زده شده روده خرگوش را نشان می‌دهد. لوپ ۲۶، ۲۸، ۳۹ به عنوان کنترل (توکسین و آنتی توکسین) می‌باشد. اثر ترکیبی از توکسینهای A و b در لویهای ۳۷ و ۴۰ با تجمع مایعات خونریزی دهنده و سایر لویها 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 گرمخانه گذاری در مقایسه با کنترل (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، تخریب غلظت معینی از عصاره خام و نیز پروتئینهای استخراج شده به لوپ گره شده روده خرگوش با کاهش تدریجی تجمع مایعات همراه بود. در کشت سلولی نیز روند کاهش 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

کشتهای که در زمانهای مختلف تحت تاثیر تابش مستقیم دوز ۱ Short-Wave قرار داده شده بودند، در مقایسه با کشت کنترل، تغییر محسوسی در تولید پروتئین کل و نیز فعالیت سمی نشان ندادند. در حالی که، کشتهای 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.

کشتهای 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 گرمخانه گذاری با افزایش غلظت پروتئین کل و نیز افزایش

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 سلولهای 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 گیرد (۲۰). در حال حاضر عقیده بر این است که ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از مجاورت ارگانسیم 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 متابولسمی 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 سویه‌های 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

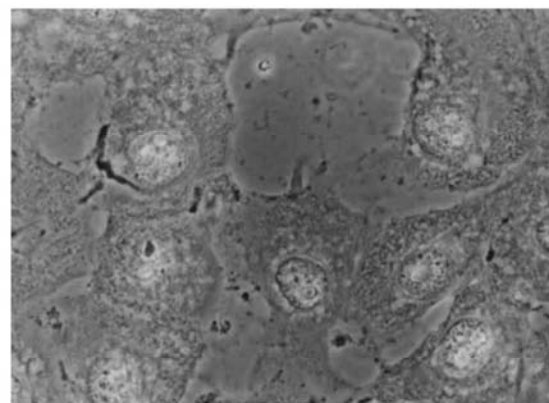
### نتایج اثر عصاره استخراج شده از کشت کلستریدیوم دیفیسیل در لوپ ایلنوم خرگوش

برای بررسی اثرات آنروتوکسیستی 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 ایلنوم 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، سیتوپلاسم و کنده شده سلولها از بستر به خوبی نمایان است.

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 آنروتوکسین - 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 آنروتوکسین 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 خالص سازی، 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 توکسین ناشی از تاثیرپذیری ژنهای سازنده آنها و تبدیل سویه‌های غیربیماری‌زا به بیماری‌زا است. زیرا در تکرارهای 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 با کتری تولید کننده اسپور بوده و در محیط فراوان است.

افزون بر این در فلور طبیعی نیز وجود دارد. از این رو، افراد 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.

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 کلستریدیوم دیفیسیل بررسی نشده است. از این رو، این تحقیق به منظور بررسی اثر Short-Wave و Macro-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 توکسی ژن و نیز سویه غیرتوکسی ژن تولید اسپور را تحریک نموده و باعث شد بعد از ۱۰ ساعت گرمخانه گذاری، 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 چرنوبیل 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 نتایج 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





## References

- Barbut F, Petit CJ: Epidemiology of Clostridium difficile- associated infections. Clin Microbiol Infect. 2001; 7(8): 405-410
- 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
- Yassin SF, Young Fadok TM, Zein NN, Pardi DS: Clostridium difficile- associated diarrhoea and colitis. Mayo Clin Proc. 2001; 76(7): 725- 73
- Norval M: Effect of solar radiation on the human immune system. J Photochem Photobiol. 2001; 63: 28- 40
- 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
- Ramabhadran TV: Method for the isolation of Escherichia coli relaxed mutants, utilizing near-ultraviolet irradiation. J Bacteriol. 1976; 127(3): 1587- 1589
- 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
- Lado H Beatrice, and Ahmed E yousef: Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. Microbes and Infection. 2002; 4: 433- 440
- 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
- Belyaev IV, ED Alipov: Frequency- dependent effect of ELF magnetic field on chromatin conformation in escherichia coli cells and human lymphocytes. Biochemmic Biophysica Acta. 2001; 1526: 269- 276
- Kohnom YM, Kimura I, and Wada M: Effect of static magnetic field on bacteri: Sterptococcus aureus, and Escherichia coli. Pathophysiology. 2000; 7: 143- 148
- Cappuccino JG, and Sherman N: Microbiology A laboratory manual. Fourth Edition. The Benjamin/ Cummings Publishing Company. Inc. New York. P. 1996; 109- 128.
- John M: The Protein Protocols, hand book human press . New Jersey; 1996; 7-12
- رمضانعلی عطایی، نسرین مظمی، سیدعباس شجاع الساداتی، غلام حسین ریاضی، محمد فرهادی: تولید و خالص سازی توکسینهای A و B از Clostridium difficile. مجله پزشکی کوثر. ۱۳۷۶؛ دوره ۲، صفحات ۱۱۷-۱۲۵
- 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
- Drury BA, Wallington AE: Carleton's Histological Technique. Fifth edition, New York, Oxford University Press. 1980; 125-149
- 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
- رمضانعلی عطایی، دکتر قربان نژاد: 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، ۲۰۵-۲۱۳
- Still J, Law E, Friedman B, Newton T, Wilson J: Clostridium difficile diarrhoea on a burn unit. Burns. 2002; 28: 398-399
- Brandt JL, Kosche AK, Greenwald AD, Berkman D: Clostridium difficile- associated diarrhoea in the elderly. The Amer J Gastro. 1999; 94(11): 3263- 3266.
- 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
- 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
- Sachsenmaier C, Radler-pohi A, Muller A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ: Damage to DNA by UV

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. Zavgelsky 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

