جداسازی باسیلوس سرئوس از زخم‌ها و سوختگیها و بررسی سویه‌های توکسین‌زا و اثرات سیتوپاتیک

دکتر قربان بهزادیان نژاد ـ استادیار گروه میکروب شناسی دانشگاه تربیت مدرس
پروین جمشیدی ـ فارغ التحصل گروه باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس
دکتر محمد حسن روشنایی ـ دانشیار گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس

Isolation of Bacillus Cereus from Wounds and Burns

ABSTRACT

The culture results of 203 cases with different wounds were studies; 150 of the latter were burn cases (mainly second and third degree burns), and 53 were of other types (surgical, traumatic, etc.)

Four subtypes of Bacillus cereus were isolated upon culture, and the different toxins produced in DHT broth with 0.1% glucose were assessed.

The lethal toxin was injected intravenously to Syrian rats, none of whom died. VPR factor was assessed in the 4 subtypes. Three subtypes produced VPR in significant amounts.

خلاصه

در این تحقیق ۲۰۳ نمونهٔ کشت زخم از بیمارانی که دارای زخمهای مختلف بودند انجام شد . ۱۵۰ مورد از بیماران کسانی بودند که زخمهای سوختگی (عمدتاً از درجه ۲ و ۳) داشتند و ۵۳ مورد دیگر دارای زخمهای مختلف (مانند زخمهای بعد از عمل جراحی، زخمهای تروماتیک و...) بودند. از کشت زخمهای بیماران فوق ۴ سویه باسیلوس سرئوس جداگردید.

باسیلوس سرئوس در جنس باسیلوسها قرار دارد. این جنس به سه گروه اصلی تقسیم می‌شود که باسیلوس سرئوس در این تقسیم بندی در گروه مورفولوژیکی I قرار می‌گیرد . در این تحقیق تولید توکسین این باکتری در محیط کشت DHT براث حاوی ۰/۱ درصد گلوکز انجام یافت وتوکسینهای مختلفی که این باکتری در این محیط تولید می‌کرد مورد بررسی قرار گرفتند.توکسین کشنده به وسیلهٔ تزریق داخل وریدی به رگ دمی موش سوری بررسی شد . در این آزمایش هیچ یک از موشهایی که به آنها توکسین تزریق شده بود (در مقایسه با موشهای شاهد) نمردند.

بررسی اثر توکسین بر روی سلولهای هلا (Hela Cells) مشخص کننده این مطلب است که توکسینهای باسیلوس سرئوس به خوبی قدرت تخریب این سلولها را دارند که این موضوع به خصوص در عفونتهای مختلف از جمله عفونتهای مربوط به زخمها حائز اهمیت است . آزمایش VPR[1] نیز در این تحقیق در مورد ۴ سویه جدا شده باسیلوس سرئوس انجام گردید . این فاکتور یکی از مهمترین عوامل پاتوژیک این باکتری محسوب می‌شود که مسئول گانگرنوز در عفونتهای زخمی باسیلوس سرئوس و تخریب بافت در شرایط تشکیل آبسه و پان افتالمیت است(۱۷). با توجه به نتایج بدست آمده ، سه سویه از چهار سویه باسیلوس سرئوس به مقدار قابل توجهی این فاکتور را تولید می‌کردند.

مقدمه

باسیلوس سرئوس به طور گسترده در محیط وجود دارد و از خاک نیز جدا می شود .این باکتری همچنین از غذاهای مختلف مثل برنج ، ادویه ، گوشت ، تخم مرغ و محصولات لبنی (همانند شیر ، بستنی و...) و نیز از داروهای مختلف (مثل داروهای موضعی و خوراکی) هم جدا شده است (۱۹،۱۸،۱۲).

امروزه این میکرو ارگانیزم به عنوان عامل مسبب دو نوع

1- Vascular Peremeability Reaction

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-26]

مسمومیت شناخته گردیده که آنها را سندرم اسهال و سندرم استفراغ نامیده‌اند. سندرم اسهال مشابه مسمومیت غذایی کلستریدیوم پرفرنجنس می‌باشد و دورهٔ کمون آن ۸ تا ۱۶ ساعت است که با علائمی از قبیل اسهال، درد شکمی ، کرامپ های شکمی (و به ندرت استفراغ)همراه می شود. سندرم استفراغ دارای دورهٔ کمون ۱ تا ۵ ساعت است که به وسیله حالت تهوع و استفراغ مشخص می‌شود . این نوع مسمومیت غذایی مشابه مسمومیت با توکسین استافیلوکوکوس اورئوس است. هر دو این سندرم‌ها خودمحدود شونده هستند (۱۳،۹).

هم اکنون ثابت گردیده که این باکتری علاوه بربیماری معدی - روده‌ای مسبب عفونتها وبیماری‌های بسیار دیگری نیز می‌باشد که شامل عفونتهای موضعی (بخصوص در سوختگیها و زخمهای تروماتیک و زخمهای بعد از عمل جراحی و عفونتهای چشمی)، باکتریمی ، عفونتهای سیستم عصبی مرکزی ، اندوکاردیت ، پریکاردیت و عفونتهای تنفسی می‌شوند(۱،۸،۹،۱۰،۱۶).

باسیلوس سرئوس سموم مختلفی تولید می‌کند که شامل فاکتورهای کشنده ، همولیزین ها (همولیزین I، همولیزین II، همولیزین BLو سرئولیزین AB)، فسفولیپازهای C وفاکتور VPR وی (یاتوکسین مسبب اسهال ویاتوکسین نکروتیک) و توکسین مسبب استفراغ می باشد (۲،۳،۴،۵،۶،۷،۹،۱۵،۱۷).

امروزه بیماریزایی این باکتری را به سموم مختلفی که تولید می‌کند نسبت می دهند و هدف از انجام این تحقیق نیز بررسی وجود این عوامل پاتوژنیک در سویه های جدا شده از زخمها و سوختگیها بود.

پیشنهاد شده است اگزوتوکسینی که مسبب اسهال می‌باشد (که در واقع همان فاکتور VPR یا توکسین نکروتیک است که در آزمون پوستی ارزیابی می شود) تعیین کننده اصلی ویرولانس در عفونتهای غیر گوارشی است به طوری که درعفونتهای زخمهای مختلف این توکسین (فاکتور VPR) خاصیت نکروز دهندهٔ زیادی دارا می‌باشد(۱۷).

روش و مواد

۱ـ جداسازی باسیلوس سرئوس : برای جدا سازی باسیلوس از زخمها، روش روزمرهٔ آزمایشگاهی استفاده گردید . همهٔ سواپ‌های تهیه شده از زخمها در شرایط سترون در محیط کشت تیوگلیکولات قرار گرفته و بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به محیط کشت آگار خون دار تلقیح گردید و این محیط کشت‌ها ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کشت خالصی از پرگنه‌هایی که از نظر خصوصیات ماکروسکپی شبیه پرگنه‌های باسیلوس سرئوس هستند تهیه گردیده و کلیه آزمایشهای بیوشیمیایی مربوط به باسیلوسها در مورد این پرگنه‌ها انجام شد. همچنین آزمایشهای مختلف برای افتراق باسیلوس سرئوس از باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس پرفرنجنس نیز انجام گردید (۹).

۲ ـ تولید توکسین : محیط کشت BHI براث حاوی ۰/۱ درصد گلوکز (BHIG) برای تولید توکسین مورد استفاده قرار گرفت(۱۴). پرگنه های سویه های بدست آمده از بیماران به این محیط کشت تلقیح شده و بعد از قرارگرفتن در شرایط مناسب (۵ تا ۶ ساعت در ۳۲ درجه سانتی گراد در گرمخانه دارای تکان دهنده) ، مایع رویی عاری از سلول این محیط کشت به منزلهٔ محلول حاوی توکسین مورد استفاده واقع گردید.

۳ـ ارزیابی توکسین در کشت سلولی هلا (Hela cells): کشتی از سلولهای هلا در پلیت‌های پلاستیکی تهیه کرده و محلولهای رویی و همچنین رقت‌های ۱/۲ ، ۱/۴ ، ۱/۸ از توکسینها در روی کشت سلولهای هلا مورد ارزیابی قرار گرفت .

۴ـ ارزیابی اثر کشندگی در موش : ۰/۵ میلی لیتر از توکسینهای بدست آمده رابه صورت وریدی به موش تزریق کرده و مرگ (بعد از ۳۰ دقیقه) مورد بررسی واقع شد.

۵ـ آزمایش VPR : در این آزمایش از خرگوشهای ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم آلبینو استفاده شد (۱۴). موهای پشت خرگوش را تراشیده و علامت گذاری نمودیم. ۰/۰۵ میلی‌لیتر از توکسینهای تولید شده در هر یک از محلهای مشخص شده بصورت داخل جلدی تزریق گردید: سپس بعداز ۳ ساعت رنگ اوانس بلو ۲ درصد (۲ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن خرگوش) را به ورید گوش خرگوش تزریق کرده و بعد از یک ساعت هاله آبی و هاله نکروز (اگر وجود داشت) اندازه‌گیری و به میلی متر ثبت شد(۱۱).

۶ـ آنتی بیوگرام : به روش دیسک دیفیوژن و در شرایط کاملاً استاندارد انجام گرفت.

نتایج

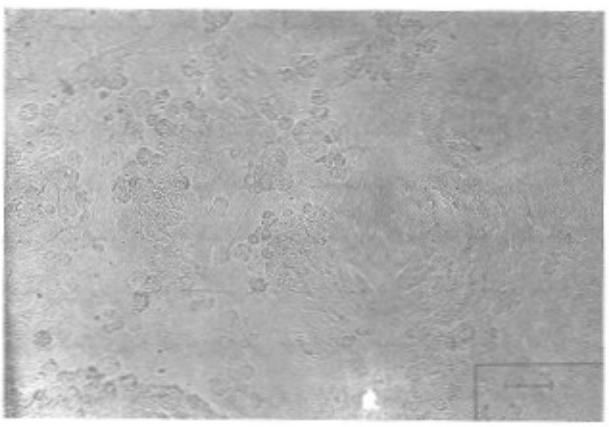
۱ـ جداسازی با سیلوس سرئوس از زخمها: در این تحقیق از ۱۵۰ مورد سوختگی و ۵۳ مورد زخمهای مختلف در مجموع چهار سویه با سیلوس سرئوس (از ۴ بیمار) جدا شد.

۲ـ بررسی اثرات سیتوپاتیک توکسینهای تولید شده بر روی سلولهای هلا : توکسینهای رقیق نشده پس از ۲۴ ساعت اثرت

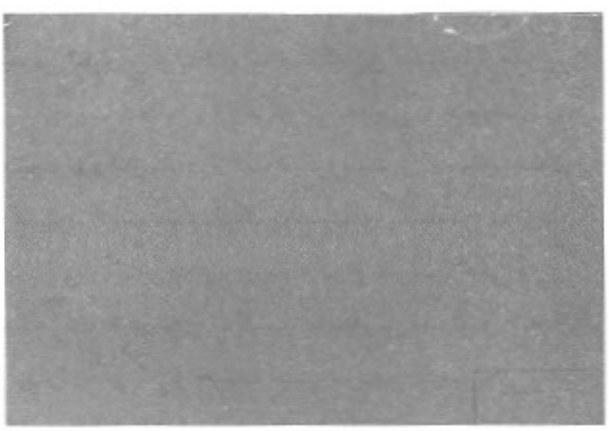
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-26]

سیتوپاتیک (در مقایسه با شاهد منفی) را به صورت کنده شدن، گردشدن و تجمع سلولها روی سلولهای هلا بوجود آوردند. همین محلولها وقتی نمونه های با سیلوس سرئوس در رقتهای ۱/۲ ، ۱/۴ و ۱/۸ برروی سلولهای هلا به مدت ۲۴ ساعت اثر داده شدند و در مقایسه با شاهد منفی هیچ گونه اثری از خود بروز ندادند ، منفی قلمداد شدند .

شکل ۱ ـ سلولهای هلا که ۲٤ ساعت با محیط کشت سلولی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شده اند (شاهد منفی)



شکل ۲ ـ اثرات سیتوپاتیک فیلترہ حاوی توکسینهای باسیلوس سرئوس در روی سلولهای هلا پس از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد



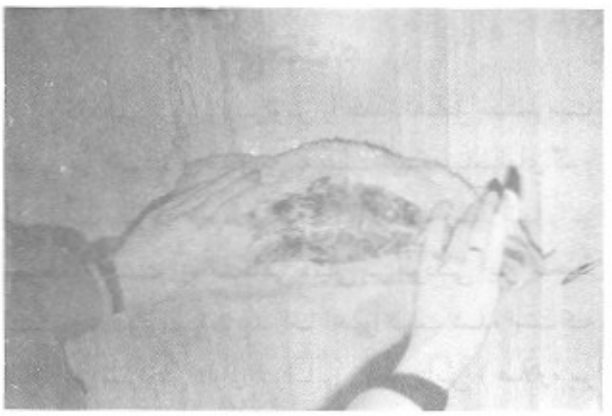
۳ـ ارزیابی اثر کشندگی توکسین در موش : هیچ یک از موشهای مورد آزمایش در این مرحله (بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از زمان تزریق در مقایسه با شاهد منفی) نمردند.

۴ـ نتیجه آزمایش VPR : سویه‌های با سیلوس سرئوس بر حسب قطر هالهٔ آبی که در این آزمایش بوجود می آورند در ۵ دسته قرارمی گیرند که عبارتند از :

۱ـ صفر تا ۴/۹ میلی متر
۲ـ ۵ تا ۹/۹ میلی متر
۳ـ ۱۰ تا ۱۳/۹ میلی متر
۴ـ ۱۵ تا ۲۴/۹ میلی متر

شکل ۳ یک ساعت بعد از تزریق رنگ اوانس بلو گرفته شده است . هاله های آبی تولید شده ، کاملاً واضح هستند و جدول ۱ نیز نتایج حاصل از آزمایش VPR را در مورد ۴ سویه جدا شده با سیلوس سرئوس را نشان می دهد.

شکل ۳ ـ آزمایش VRP، این عکس یکساعت بعد از تزریق رنگ اوانس بلو گرفته شده است



[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-26]

جدول ۱: نتایج آزمایش VPR در مورد ٤ سویه جدا شده با سیلوس سرئوس از بیماران

سویه /دسته	۰-۴/۹mm	۵-۹/۹mm	۱۰-۱۴/۹mm	۱۵-۱۹/۹mm	۲۰-۲۴/۹mm
B.C1	-	-	-	-	۲۲mm
B.C2	صفر	-	-	-	-
B.C3	-	-	-	-	۲۰mm
B.C4	-	-	-	-	۲۳mm
B.CPTOC	۲ mm	-	-	-	-
سرم‌فیزیولوژی	صفر	-	-	-	-
محیط کشت BHIG	صفر	-	-	-	-

۵- نتایج آنتی بیوگرام : نتایج بدست آمده در این مرحله عبارتند از :

تمام سویه‌های حساس به جنتامیسن و تتراسیکلین و کلیندامایسین، به آمپی سیلین مقاوم بودند. سویه‌های PTCCY و سویه ۱ به سفالوتین مقاوم ، سویه ۲ دارای حساسیت متوسط و سویه ۳ و ۴ به آن حساس بوده و همهٔ سویه هابه اریترومایسین حساسیت متوسط داشتند.

بحث

درگذشته باسیلوس سرئوس را عمدتاً عامل مسمومیت غذایی می‌دانستند و همچنین به علت اینکه باسیلهای گرم مثبت اسپوردار در محیط وجود دارند اغلب رشد آنها را در محیط‌های کشت آزمایشگاهی دلیلی بر آلودگی این محیط کشت‌ها تصور می‌نمودند. اما اخیراً ثابت شده است که باسیلوس سرئوس دارای توانایی بیماریزایی (علاوه بر مسمومیت غذایی) در طیف وسیعی از عفونتهاست(۱۸).

فعالیت کشندگی در مورد فیلترهای عاری از سلول سویه‌های باسیلوس سرئوس نشان داده شده است ؛ فعالیت کشندگی باسیلوس سرئوس به فعالیت توام دو توکسین مربوط می‌شود که هریک جداگانه تولید می‌گردند .یکی از توکسینها، سم بوجود آورنده تجمع مایل در ایلئال لوپ بسته شده خرگوش (یا توکسین نکروتیک یا توکسین مسئول آزمایش VPR) است که به آن فاکتور کشنده I می گویند و دیگری سرئولیزین است که به آن فاکتور کشنده II می گویند.همچنانکه در قسمت نتایج آمده است در اثر تزریق فیلتره عاری از سلول سویه‌های باسیلوس سرئوس به رگ دمی موش سوری هیچ یک از موشها نمردند . علت این امر احتمالا به این مساله مربوط است که یا یکی از توکسینهای کشنده توسط این سویه‌ها تولید نمی شوند ویا هریک به مقدار ضعیفی تولید می شود به طوری که قادر به کشتن موش نیستند. به هرحال آنچه که هم اکنون مطرح می باشد این است که سرئولیزین هم به عنوان یک همولیزین وهم به عنوان یکی از اجزاء فاکتورکشنده در بیماریزایی باسیلوس سرئوس دخالت دارد، اما علت اینکه به میزان کمتری به آن توجه می شود این است که فعالیت آن به وسیله سرم نرمال خنثی می‌شود (۱۷) (این مساله خارج از بدن هم دیده شده است و احتمال دارد همین مکانیزم در بدن نیز وجود داشته باشد).

توکسین‌های دیگری که در بیماری‌زایی باسیلوس سرئوس نقش بسزایی دارند توکسینهایی هستند که اثرات سیتوپاتیک دارند. یکی از این توکسینها ، توکسین استفراغ و دیگری توکسین اسهال (توکسین درمونکروتیک) است .امکان دارد بعضی از سویه ها ، یکی از این سمها و سویه‌های دیگر هردوی آنها را تولیدکنند. نتایج اثر فیلتره عاری از سلول چهار سویه باسیلوس سرئوس مشخص ساخت که این فیلتره‌هابه خوبی قدرت تخریب سلولها را دارند که اثر تخریبی به صورت گرد شدن سلولها، کنده شدن از کف میکروپلیت و به هم چسبیدن سلولها بود. اثرات سیتوپاتیک توکسینهای باسیلوس سرئوس احتمالاً می‌تواند در بوجود آوردن و دوام عفونت زخمی دارای اهمیت باشد. مهمترین توکسین باسیلوس سرئوس که در عفونتهای زخمی حائز اهمیت است توکسین درمونکروتیک (توکسین VPR یا توکسین اسهال) است که به عنوان توکسین مسئول گانگرن در عفونتهای زخمی باسیلوس سرئوس و تخریب بافت در شرایط تشکیل آبسه ، سلولیت و پان افتالمیتیس مطرح است. نتایج آزمایش VPR در این تحقیق نیز

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-26]

تائیدکننده این مطلب است که سه سویه جدا شده باسیلوس سرئوس در حد نسبتاً بالایی این توکسین را تولید می‌کنند و همان طوری که گفته شد اهمیت این توکسین در بوجود آوردن و دوام عفونتهای زخمی با سیلوس سرئوس به خوبی مشخص شده است (۱۸،۱۷). البته عنوان گردیده واکنش VPR در اثر فعالیت توام دو سم یکی توکسین اسهال و دیگری سرئولیزین بوجود می‌آید و این مطلب نیز تائید کننده اهمیت بیماریزایی سرئولیزین است (۱۸) وهمچنین نقش سرئولیزین در بیماریزایی به عنوان یک نقش کمکی نیز مطرح باشد(۱۷).

فسفولیپاز C یکی دیگر از توکسینهای این باکتری است که آنرا غالباً به عنوان عامل کمکی در عفونتهای باسیلوس سرئوس عنوان کرده اند و اثر پاتولوژیکی مستقیم ندارد (۱۸) ولی عده‌ای نیزعقیده دارند که فسفولیپاز C موجب رهایی آنزیمهای لیزوزومی از نوتروفیل ها می شود و احتمالاً عاملی است که موجب آسیب های بافتی به خصوص در زخم ها وعفونتهای چشمی می‌گردد و همچنین مقاومت به فاگوسیتوز ممکن است مرتبط با تولید فسفولیپاز باشد (۱۷) . تولید فسفولیپاز در باسیلوس سرئوس توسط آزمایش لسیتاز در روی محیطهای حاوی زرده تخم مرغ مشخص می گردد، که تقریباً بیشتر سویه های باسیلوس سرئوس به میزان زیادی آن را تولید می‌کنند.

همانطوری که بیان شد سموم مختلفی توسط این باکتری تولید می شود که هریک ممکن است نقش اصلی یا کمکی را در پاتوژنز باکتری داشته باشد.حتی در عفونتهای مخلوط (که چندین باکتری جدا می شوند) امکان دارد که اثر سینرژیستیکی توکسینهای باسیلوس سرئوس با سایر فاکتورها (ویا توکسین‌های تولید شده توسط باکتری های دیگر) نقش بسزایی را در دوام و یابقای بیشتر اثرات تخریبی آنها داشته باشند (۱۷،۱). دراین تحقیق از چهار بیماری که از آنها باسیلوس سرئوس جدا شده بود میکروارگانیزمهای دیگر همانند سودوموناس ، اشریشیاکلی واستافیلوکوکوس اورئوس نیز جدا شده بود و با توجه به این که هریک از این باکتریها خود نیز می‌توانند سموم مختلفی تولید کنند ممکن است که در مجموع اثر این توکسینها با توکسینهای باسیلوس سرئوس اثر تخریبی بیشتری را دارا باشند.

مطلبی که باید به آن توجه داشت این است ، هنگامی که باکتریهای تولید کننده سم در روی زخم استقرار می‌یابندو به مرحلهٔ تولید توکسین می‌رسند (با توجه به این که تعداد باکتری‌هایی که در روی پوست استقرار می‌یابند ، زیاد است و توکسینهای مختلفی را در مقادیر نسبتاً بالایی تولید می کنند) حتی اگر با درمان آنتی بیوتیکی باکتری را از بین ببریم ، توکسینها از بین نمی روند و می‌توانند اثرات تخریبی خودرا اعمال کنند . بنابر این در زخمها می‌بایست بافت نکروزه و همچنین بافتهایی که در حال نکروزه شدن هستند، برداشته شوند. باکتریهای استقرار یافته در روی پوست می توانند منابع متعددی داشته باشند . دراین میان می‌توان از باندهایی که برای پانسمان استفاده می شوند پرسنل بیمارستان و یا سایر افراد در تماس با بیمار و یا هوای آلوده به این باکتری را نام برد و با توجه به اینکه با سیلوس سرئوس دارای اسپورنسبتاً مقاومی است ممکن است گاهی اوقات داروهای به کار برده شده برای بیماران (به خصوص داروهای موضعی) بااسپور این باکتری آلوده شده باشند.

منابع

1- Altwood and evans D.M. "Bacillus cereus infection in burns " Burns 9: 355 - 357 (1983)

2- Beecher D. J and leewong A.C "Improved purification and characterization of hemolysin BI, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from Bacilus cereus ". Infection and immunity 983 - 986 (1994).

3- Becher Djand leewong A - C "Identifcation of hemolysin BI - Production Bacillus cereus isolates by discontinuous hemolytic pattern in blood agar " Applied and environmental microbiology1646 - 1651 (1994).

4- Beecher D.J and leewong A - C "Identification and analysis of the antigen detected by two commercial Bacillus cereus diarrheal eneterotoxin immuno assay kits " Applied and enuironmental microbiology 9614 - 4616 (1994).

5- Beecher D.J and Macmillan J.D "characterization of the components of hemolysin BI from Bacillus cereus . " Infection and immunity 1778 - 1764 (1991).

6- Beecher D - J and Macmilan J.D "A novel Bicomponen hemolysin from Bacllus cereus " infection and immunity 2220 - 2224 (1970).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-26]

7- Coolbaug J -C williams R - D " production and characteriztion of two hemolysins of Bacillus cereus"Canad.J.microbiol, 24, 1289 - 1295(1978).

8- Dowey R - T and Tauber W.B " post - traumatic endophthalmitis : The emerging role of Bacillus cereus infection" RV;infect.Dis 9:110-123 (1987).

9- Dro Bniewski F.A " Bacillus and related species " clinical microbilogy reviwes 324 - 338 (1993).

10- Dryden M - S. pathogenic role of Bacillas cereus in wound infections in the tropics " J - R . Soc Med 80 (10) 480 - 481 (1987).

11- Garcia - Arribas ML and Kramer J.M "the effect of glucose , starch and PH on growth , enterotoxin and hemolysin production by strain of Bacillus cereus associated with food poisoning and non - gastrointestinl disease . IM . J Appl - microbiol 24 : 34 - 348 (1972).

12- Garcia - Arribas M.L.Plaza ej .Dela Rosa M-C and Mosso M.A "characterization of Bacillus cereus strains isolate from drugs and evaluation of their toxins " .J.Appl. Bacteril, 64: 257 (1988).

13- Shinagawa K, " Analytical methods for Bacillus cereus and other Bacillus Species " Internal Journal of food microbiology . 10: 125 - 142

14-Shinagowaa K, Matsusaka N,Konuma H and Kurata H " The relation between the diarrheal and other biological activities of Bacillus cereus involved in food poisoning outbreak . Jpn J. Vet . 47 : 557 - 565 (1985).

15- Spira W.m and Goepfert J.M "Bacillus cereus - induced fluid accumulation in rabbit ileal loops" Appl, mixrobiol. 4:945-6 (1992)

16- Steen M - K et al "Bacilus cereus endocarditis report of a case review .Clin - infect - Dis 4 : 945 - 946 (1992).

17- Turnbull P. C. B, " Bacillus cereus toxins " pharmac ther vol 3 : 453 - 505 (1983).

18- Turnbull P. C. B, Markery . " Non - gastrontestinal Bacillus cereus infection : analysis of exotoxin production by strains isolated over a two - year period " J. Clin pathol 36 : 1091 (1983).

19- Wadstrom Tt and Peeterson HB. " Toxin production by Bacillus cereus dairy isolates in milk at low temperature " Applied and environmental microbiology . 2595 - 2600 (1989).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-26]