بررسی آزاد شدن آندوتوکسین از سالمونلاتیفی توسط آنتی‌بیوتیک‌ها به روش لیمولوس آمیبوسایت لیسایت کروموژنیک[1]

غلامرضا شجری ـ دانشجوی دوره دکترای تخصصی (Ph.D) میکروبیولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

دکتر عبدالفتاح صراف نژاد ـ استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران دکتر بهمن تبرایی، رئیس بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران

دکتر قربان بهزادیان نژاد ـ استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:23 IRST on Friday January 22nd 2021

Study of Endotoxin Release by Salmonella Thyphi by Antibiotics in Chromogenic Limulus Amebocyte Lyssate Method

ABSTRACT

It seems, rapid destruction of gram negative bacteria by antibiotics contribute to the clinical deterioration of some patients with lethal endotoxemia.

In this research we evaluated LPS (lipopolysaccharide) release during antibiotic killing of salmonella typhi (Ty2-5536). The organism was incubated in the presence of Chloramphenicol, Ampicillin and Co-trimoxazole at concentrations that killed> 99.9% of the organisms as determined by quantitative culture techniques. After incubation the antibiotic-bacterial cultures were centrifuged and the supernatents were filtered and collected for "in vivo" and "in vitro" studies.

Injection of 1 ml/kg of filtrates in rabbits raised normal temperature of the animals by 1.2°C that it showes the presence of LPS in the filtrates.

Quantitative chromogenic limulus amebocyte lyssate (L.A.L) assay was used to determine the amount of LPS in the filtrates. The amount of LPS was 86.67±2.53 Pg/ml for Chloramphenicol, 113.33±8.07 Pg/ml for Ampicillin and 134.18±11.59 Pg/ml for Co-trimoxazole. According to our investigation chloramphenicol is the best antibiotic against S. typhi becouse it decreases the induced-pathological effects of LPS in gram negative infection.

خلاصه

جهت بررسی کیفی و کمی آندوتوکسین آزاد شده توسط باکتری‌های گرم منفی در اثر آنتی‌بیوتیک‌ها، سویهٔ استاندارد سالمونلاتیفی (Ty2-5536) انتخاب و در معرض مقادیر مؤثر کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و کوتری موکسازول قرار داده شدند.

MIC* و MBC** آنتی‌بیوتیک‌های فوق که به روش تهیه رقت‌های سریال در آبگوشت مناسب غذایی انجام گرفت به ترتیب برابر ۱/۲۵ و ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برای آمپی سیلین، ۲/۵ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای کلرامفنیکل و ۱/۲۵ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای کو ـ تری‌موکسازول بدست آمد.

جهت پی بردن به آزاد شدن احتمالی آندوتوکسین در فیلترهٔ محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک تست تب‌زایی در خرگوش به

1- Chromogenic Limulus amebocyte Lyssate.

*ـ حداقل مقدار متوقف کننده رشد باکتری‌ها

MIC = Minimal Inhibitory Concentration

**ـ حداقل مقدار کشنده باکتری‌ها

MBC = Minimal Bactericidal Concentration

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:23 IRST on Friday January 22nd 2021

روش U.S فارماکوپیای ۱۹۹۰ انجام شد که افزایش درجه حرارت بدن حیوان به میزان ۱/۲°C وجود آندوتوکسین آزاد در نمونه‌ها را تصدیق نمود.

به منظور اندازه‌گیری میزان آندوتوکسین آزاد شده توسط آنتی‌بیوتیک‌های فوق از روش لیمولوس آمیبوسایت لیسایت (Limulus ameboeyte Lyssate) کروموژنیک استفاده شد که میزان آن برای کلرامفنیکل ۸۶/۶۸±۲/۵۳Pg/ml، آمپی‌سیلین ۱۱۳/۳۳±۸/۰۷Pg/ml و کو- تری‌موکسازول ۱۳۴/۱۸±۱۱/۵۹Pg/ml محاسبه گردید.

به علاوه به منظور اطمینان از صحت نتایج حاصله از تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های فوق همزمان یک نمونه سالمونلاتیفی جدا شده از بیمار جهت مقایسه و یک نمونه اشریشیا کلی استاندارد (K12 QD5003) به عنوان شاهد، نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

مقدمه

به نظر می‌رسد انهدام سریع باکتری‌های گرم منفی که در معرض مقادیر مؤثری از آنتی‌بیوتیک‌ها قرار گرفته‌اند منجر به آزاد شدن میزان قابل توجهی آندوتوکسین می‌گردد (۳-۱) که احتمالاً عامل بروز شوک‌های آندوتوکسینی بعد از اعمال جراحی و یا درمان عفونت‌های حاد باکتریایی گرم منفی می‌باشد که با درصد مرگ و میر بالایی نیز همراه است (۴)؛ همین مسئله باعث شده است که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها حداقل در پیشگیری و یا درمان عفونت‌های باکتریایی گرم منفی با تردید جدی روبرو شود (۱).

از آنجا که تب‌های تیفوئیدی در ایران یکی از معضلات بهداشتی و درمانی است تعیین نوع آنتی‌بیوتیکی که در عین مؤثر بودن میزان آندوتوکسین کمتری آزاد کند الزامی می‌باشد. به همین جهت در این بررسی ابتدا MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان تب تیفوئیدی به روش تهیه رقت‌های سریال در آبگوشت مناسب غذایی تعیین گردید و سپس میزان آندوتوکسین آزاد شده توسط هریک از آنتی‌بیوتیک‌های فوق به روش لیمولوس آمیبوسایت لیسایت کروموژنیک (۵) تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

کشت میکروبی: در بررسی حاضر از یک سویهٔ استاندارد سالمونلاتیفی Ty2-5536(CSBPI=B-190) که حساسیت آن به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان تب‌های تیفوئیدی کاملاً شناخته شده است، استفاده گردید. این کشت از محل کلکسیون باکتری‌های استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی انستیتو پاستور ایران در اختیار قرار گرفت.

به علاوه همزمان یک سویهٔ اشریشیاکلی استاندارد K12 QD5003(CSBPI=D-289) و یک نمونه سالمونلاتیفی پاتوژن که از یک بیمار بستری در بیمارستان امام خمینی (ره) ایزوله گردیده بود نیز به عنوان کنترل مورد آزمایش قرار گرفتند.

نگهداری کشت‌ها: کشت‌های میکروبی طبق روش Leminor (۶) به صورت استوک‌های کاری در لوله‌های در پیچ‌دار کوچک محتوی محیط نیمه جامد و در درمای ۴°C نگهداری شدند.

تهیه محلول‌های استوک آنتی‌بیوتیک‌ها: پس از تهیه پودرهای آنتی‌بیوتیکی از شرکت‌های مربوطه (کلرامفنیکل از شرکت الحاوی، آمپی‌سیلین از شرکت جابربن حیان و کو- تری موکسازول از شرکت تهران دارو) به کمک حلال‌های خاص هر آنتی‌بیوتیک، محلول‌های استریل از آنها، با غلظتی ۱۰ برابر MIC پیشنهادی برای هریک تهیه و به صورت استوک درویال‌های ۵ میلی‌لیتری در ۷۰°C- نگهداری شدند.

روش‌ها

۱- *اندازه‌گیری MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌ها:*

MIC (حداقل مقدار متوقف کننده رشد باکتری‌ها) و MBC (حداقل مقدار کشنده باکتری‌ها) آنتی‌بیوتیک‌ها به روش تهیه رقت‌های سریال در آبگوشت مناسب غذایی (مولرهینتون براث غنی شده با ۲/۵ مول در لیتر Cl_2Ca و ۱/۲۵ مول در لیتر Cl_2Mg) براساس دستورالعمل کمیتهٔ ملی تدوین استانداردهای آزمایشات بالینی (National Committe for clinical Laboratory standards) چاپ ۱۹۸۵ تعیین گردیدند.(۷)

۲- *کشتن باکتری‌ها:*

به لوله‌های استریل و عاری از آندوتوکسین که حاوی $RPMI_{1640}$ همراه با آنتی‌بیوتیک بودند، از ارگانیسم‌های فاز لگاریتمی رشد ($\sim 10^6$cfu/ml) اضافه کرده و به مدت ۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه نمودیم.

میزان آنتی‌بیوتیک اضافه شده در مورد آمپی‌سیلین μg/ml ۱/۲۵، کلرامفنیکل μg/ml ۱۶۰ و کو- تری موکسازول 5mg/ml بود. برای همهٔ آنتی‌بیوتیک‌های فوق این شرایط سبب کشته شدن

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:23 IRST on Friday January 22nd 2021

تمامی باکتری‌های موجود در نمونه شد که به وسیله تکنیک‌های کشت کمّی مشخص گردیدند.

لوله‌های کنترل مثبت حاوی RPMI و باکتری بدون آنتی‌بیوتیک و لوله‌های کنترل منفی حاوی RPMI و آنتی‌بیوتیک بدون باکتری بودند.

پس از اتمام مرحله انکوباسیون، سوسپانسیون‌های باکتریایی را با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری پالایش کرده و فیلترها را جهت مطالعات بعدی در ویال‌های ۲/۵ میلی لیتری شیشه‌ای که استریل و عاری از آندوتوکسین بودند، در ۷۰°C- نگهداری نمودیم.

۳ـ پی بردن به وجود احتمالی آندوتوکسین آزاد در فیلترها :

جهت اطمینان از وجود آندوتوکسین آزاد، فیلترها را بر آب دوبار تقطیر شده و عاری از آندوتوکسین که حاوی مرتیولات به نسبت ۱:۱۰۰۰۰ بود دیالیز نموده و سپس در دسیکاتور حاوی پنتااکسیدفسفر به میزان تقریباً ۲۰ برابر تغلیظ کرده و پس از آن قدرت تب زائیشان در خرگوش طبق روش U.S.pharmacopia تعیین گردید.

۴ـ اندازه‌گیری میزان آندوتوکسین آزاد شده به روش L.A.L کروموژنیک :

میزان آندوتوکسین آزاد موجود در فیلترها به روش L.A.L کروموژنیک (شرکت کروموژنیکس سوئد) به متد میکروپلیت و هر نمونه به صورت سه‌تایی اندازه‌گیری شد.

کنترل منفی حاوی آب مقطر استریل و عاری از آندوتوکسین و کنترل مثبت حاوی آندوتوکسین استاندارد اشریشیاکلی تا غلظت‌های ۱۰۰ Pg/ml بود.

نتایج

میزان MIC و MBC بدست آمده از اثر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و کو- تری‌موکسازول، علیه سالمونلاتیفی استاندارد، سالمونلاتیفی پاتوژن و اشریشیاکلی استاندارد در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. چنانچه در جدول مشاهده می‌شود آمپی سیلین در مقایسه با کلرامفنیکل و کو- تری موکسازول دارای کمترین میزان MIC و MBC برعلیه باکتری‌های فوق می‌باشد، به طوری که این میزان در مورد سالمونلاتیفی استاندارد MIC=MBC=1.25μg/ml و در مورد سالمونلاتیفی پاتوژن و اشریشیاکلی استاندارد MIC=MBC=2.5μg/ml محاسبه گردید.

میزان MIC و MBC کلرامفنیکل برعلیه سالمونلاتیفی استاندارد به ترتیب برابر با ۲/۵μg/ml و ۱۶۰μg/ml و در مورد دو باکتری دیگر برابر ۵μg/ml و ۱۶۰μg/ml به دست آمد.

میزان MIC و MBC کو- تری موکسازول برعلیه سالمونلاتیفی استاندارد به ترتیب برابر با ۱/۲۵μg/ml و ۵μg/ml بدست آمد که این مسئله بروز مقاومت بالای باکتری در مقابل این آنتی‌بیوتیک را مطرح می‌سازد؛ البته این مقاومت در مورد دو باکتری دیگر یعنی سالمونلاتیفی پاتوژن که جهت مقایسه آن با سالمونلاتیفی استاندارد کار شد و اشرشیاکلی استاندارد، که به عنوان سویه شاهد آزمایش شد نیز دیده می‌شود.

انجام تست پیروژنیسیته در خرگوش جهت اطمینان از آزاد شدن آندوتوکسین توسط آنتی‌بیوتیک‌های فوق افزایش درجه حرارت نرمال بدن حیوان به میزان ۱/۲°C را نشان داد که مؤید وجود آندوتوکسین آزاد در نمونه‌ها می‌باشد.

میزان آندوتوکسین آزاد موجود در فیلترها به روش بسیار حساس L.A.L کروموژنیک به متد میکروپلیت و به صورت سه‌تایی اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در جدول شماره ۲ ملاحظه می‌شود میزان آندوتوکسین آزاد شده توسط کلرامفنیکل ۸۶/۶۸±۲/۵۳Pg/ml، آمپی سیلین ۱۱۳/۳۳±۸/۰۷Pg/ml و کو- تری موکسازول ۱۳۴/۱۸±۱۱/۵۹Pg/ml محاسبه گردید.

بنابراین کلرامفنیکل با MIC=۲/۵μg/ml کمترین میزان آندوتوکسین و کو- تری موکسازول با MIC=۱/۲۵mg/ml، بالاترین میزان آندوتوکسین را آزاد می‌نمایند.

جدول شماره ۱: میزان MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی باکتری‌های مورد آزمایش.

نوع باکتری / نوع آنتی‌بیوتیک	سالمونلاتیفی استاندارد		سالمونلاتیفی پاتوژن		اشریشیاکلی استاندارد	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
آمپی‌سیلین	۱/۲۵μg/ml	۱/۲۵μg/ml	۲/۵mg/ml	۲/۵mg/ml	۲/۵mg/ml	۲/۵mg/ml
کلرامفینکل	۲/۵mg/ml	۱۶۰mg/ml	۵mg/ml	۱۶۰mg/ml	۵mg/ml	۱۶۰mg/ml
کو- تری‌موکسازول	۱۲/۵mg/ml	۵mg/ml	۲/۵mg/ml	۱۰mg/ml	۰/۱۲۵mg/ml	۱mg/ml

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:23 IRST on Friday January 22nd 2021

جدول شمارهٔ ۲ : میزان آندوتوکسین آزاد موجود در فیلترها برحسب Pg/ml

نوع فیلتره	میزان آندوتوکسین برحسب Pg/ml (mean±SD)
فیلتره باکتری بدون آنتی‌بیوتیک	۱۸/۲۶±۱/۱۳
فیلتره باکتری همراه با آنتی‌بیوتیک:	
ـ کلرامفنیکل	۸۶/۶۸±۲/۵۳
ـ آمپی سیلین	۱۱۳/۳۳±۸/۰۷
ـ کوتری - موکسازول	۱۳۴/۱۸±۱۱/۵۹

بحث

به نظر می‌رسد به دنبال تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی گرم منفی، باکتری شکسته شده و آندوتوکسین (LPS) آن در محیط آزاد می‌گردد. آندوتوکسین آزاد شده سبب ایجاد عوارض گوناگونی از جمله شوک سپتیک و مرگ می‌گردد. مرگ ناشی از شوک آندوتوکسینی نتیجه یک فرآیند بیولوژیکی است که نقطه شروع آن LPS آزاد می‌باشد (۲و۱). یافته‌های مطالعات "invitro" نیز با این تئوری مطابقت دارد و توسط مدل‌های تجربی بررسی نقش آندوتوکسین آزاد شده تأیید شده است (۳).

درمان آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های باکتریایی گرم منفی در مدل‌های تجربی سبب افزایش میزان قابل ملاحظه آندوتوکسین در خون و یا مایع مغزی نخاعی می‌گردد (۴). همچنین مطالعات اخیر نشان می‌دهد که کشته شدن سریع باکتری‌های گرم منفی به وسیله آنتی‌بیوتیک‌های باکتریسیدال فعال علیه دیواره باکتری در طی درمان عفونت‌های گرم منفی سبب آزاد شدن میزان بالای آندوتوکسین به داخل مایعات بدن می‌گردد (۸و۴).

خنثی کردن LPS یا بلوکه کردن تولید یا اثرات بیولوژیک سیتوکین‌های القاء شده در اثر LPS می‌تواند سبب کاهش عوارض پاتولوژیکی حاصل از درمان عفونت‌های گرم منفی حاد گردد که این موضوع عمیقاً تحت بررسی است (۹).

در بررسی حاضر آزاد شدن آندوتوکسین طی کشته شدن سالمونلاتیفی استاندارد (Ty2-5536) توسط آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان این باکتری به طریقه "In Vitro" ارزیابی گردید و مشخص شد که آمپی سیلین نسبت به کلرامفنیکل و کو- تری موکسازول دارای کمترین میزان MIC و MBC (MIC=MBC=۱/۲۵μg/ml) برعلیه این باکتری می‌باشد و کلرامفنیکل با دارا بودن MIC=۲/۵μg/ml و MBC=۱۶۰μg/ml در درجه بعدی اثر قرار دارد.

کو- تری موکسازول با دارا بودن MIC=۱/۲۵mg/ml و MBC=۵mg/ml، مسئله بروز مقاومت بالای سالمونلاتیفی در مقابل این آنتی‌بیوتیک را مطرح می‌سازد (۱۰) که این مقاومت در مورد دو باکتری دیگر یعنی سالمونلاتیفی پاتوژن و اشریشیاکلی استاندارد نیز دیده می‌شود (جدول شماره ۱).

افزایش درجه حرارت نرمال بدن خرگوش به میزان ۱/۲°C به دنبال انجام تست پیروژنی (تست invivo) مؤید وجود آندوتوکسین آزاد در فیلترهای نمونه‌های حاوی باکتری و آنتی‌بیوتیک می‌باشد.

جدول شماره ۲، میزان آندوتوکسین آزاد موجود در فیلترها را برحسب Pg/ml نشان می‌دهد که کلرامفنیکل در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک دیگر میزان آندوتوکسین کمتری آزاد می‌نماید.

تفاوت در میزان آندوتوکسین آزاد شده در اثر لیزباکتری توسط آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ممکن است مربوط به تفاوت در خواص فارماکودینامیکی این داروها باشد (۱۱)، خصوصاً اینکه آنتی‌بیوتیک‌های باکتریسیدال میزان آندوتوکسین بیشتری را در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوستاتیک آزاد می‌کنند (۱) و مواد ضد باکتریایی که دیواره سلولی باکتری را تخریب می‌کنند مقدار آندوتوکسین بیشتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی که سبب توقف سنتز پروتئین می‌گردند آزاد می‌کنند (۳).

با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های فوق پیشنهاد می‌گردد که در درمان تب تیفوئیدی و پیشگیری از آلودگی‌های ناشی از اعمال جراحی از کلرامفنیکل استفاده شود تا بدن مواجه با میزان کمتری از آندوتوکسین آزاد گردد و در نتیجه عوارض پاتولوژیکی کمتری در بیمار بوجود آید و از کو- تری

موکسازول به علت بالا بودن مقاومت باکتری در مقابل آن و نیز آزاد کردن میزان زیاد آندوتوکسین در بدن تا حد ممکن استفاده نشود.

منابع

1- Goto H, Nakamura S.(1980) "Liberation of endotoxin from E.coli by addition of antibiotics." JPn J.EXP.Med. 50:35-43

2- Shenep JL, Flynn PM, Barrett FF, Stidham GL, Westnerkirchner DF. (1988) "Serial quantitation of endotoxemia and bacteremia during therappy for gram negative bacterial sepsis" J.infect. Dis. 57:565-8

3- Shenep JL, Barton RP, Morgan KA, (1985). "Role of antibiotic class in the rate of liberation of endotoxin during therapy for exprimental gram negative bacterial sepsis". J. infect. Dis; 151:1012-

4- Tauber MG, Shibl AM, Hackbarth DJ, Larrickyw, Sandi MA. (1987). "Antibiotic therapy, endotoxin Concentration in cerebrospinal fluid and brain edema in exprimental E. coli meningitis in rabbits." J. infect. Dis 156:456-62

5- Watson S.W., Levin J., Novitsky T.J, and Alan R.liss (1982). "A quantitative endotoxin assay utilizing limulus amebocyte lyssate and a chromogenic Substrate in endotoxins and their detection with the L.A.L. test." Prog. Clin. Biol. res. Vol. 93. Eds

6- Le Minor L., Popoff M. Y. (1990) "International journal of systematic bacteriology. Vol 37: 465

7. National committe for clinical laboratory standards. (1985) "Methods for dilution antimicrobial Suseptibility tests for bacteria that grow aerobically." Publication M7-A. Villanova. PA.

8- Shenep JL, Morgan KA. (1984). "Kinetics of endotoxin release during antibiotic therapy for exprimental gram negative bacterial sepsis." J. Infect. Dis. 150: 380-88

9- Tracy KJ.Fong Y.Hesse DG et al. (1987). "Anti-Cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia." Nature 1987:330:662-4

10- Rao PS, Rajashekar V.Varghese GK, Shivanada PG. (1993) AM. J.trop. Med. Hyg. (united states) Jan. 1993 48(1) 108-11

11- Thomas A. (1986) "Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of beta-lactam antibiotics."

12- U.S.Pharmacopia (1990) Biological tests/Pyrogen test. <151>P:1515

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:23 IRST on Friday January 22nd 2021