

# بررسی آزاد شدن آندوتوکسین از سالمونلاتیفی توسط آنتی بیوتیک ها به روش لیمولوس آمیبوسایت لیسایت کروموزنیک<sup>(۱)</sup>

غلامرضا شجری - دانشجوی دوره دکترای تخصصی (Ph.D) میکروبیولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس  
دکتر عبدالفتاح صراف نژاد - استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران دکتر بهمن تبرایی، رئیس بخش واکنش های باکتریایی  
و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران  
دکتر قربان بهزادبان نژاد - استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

## 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 supernatants 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 shows 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  $86.67 \pm 2.53$  Pg/ml for Chloramphenicol,  $113.33 \pm 8.07$  Pg/ml for Ampicillin and  $134.18 \pm 11.59$  Pg/ml for Co-trimoxazole. According to our investigation chloramphenicol is the best antibiotic against S. typhi because it decreases the induced-pathological effects of LPS in gram negative infection.

### خلاصه

جهت بررسی کیفی و کمی آندوتوکسین آزاد شده توسط باکتری های گرم منفی در اثر آنتی بیوتیک ها، سویه استاندارد سالمونلاتیفی (Ty2-5536) انتخاب و در معرض مقادیر مؤثر کلرامفنیکل، آمپی سیلین و کوتری موکسازول قرار داده شدند. MIC و MBC آنتی بیوتیک های فوق که به روش تهیه رقت های سریال در آنگوشت مناسب غذایی انجام گرفت به ترتیب برابر ۱/۲۵ و ۱/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر برای آمپی سیلین، ۲/۵ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر برای کلرامفنیکل و ۱/۲۵ و ۵

میلی گرم در میلی لیتر برای کو - تری موکسازول بدست آمد. جهت پی بردن به آزاد شدن احتمالی آندوتوکسین در فیلتره محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک تست تبزایی در خرگوش به

1- Chromogenic Limulus amebocyte Lyssate.

•• حدافل مقدار متوقف کننده رشد باکتری ها

MIC = Minimal Inhibitory Concentration

••• حدافل مقدار کشنده باکتری ها

MBC = Minimal Bactericidal Concentration

روش U.S فارماکوپای ۱۹۹۰ انجام شد که افزایش درجه حرارت بدن حیوان به میزان  $1/2^{\circ}\text{C}$  وجود آندوتوکسین آزاد در نمونه‌ها را تصدیق نمود.

به منظور اندازه‌گیری میزان آندوتوکسین آزاد شده توسط آنتی‌بیوتیک‌های فوق از روش لیمولوس آمیبوسایت لیسایت (*Limulus amoebocyte lysate*) کروموژنیک استفاده شد که میزان آن برای کلرامفنیکل  $86/68 \pm 2/53 \text{Pg/ml}$  آمپی‌سیلین  $113/33 \pm 8/07 \text{Pg/ml}$  و کو-تری موکسازول  $134/18 \pm 11/59 \text{Pg/ml}$  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 اشیریشیا کلی استاندارد (K12 QD5003) به عنوان شاهد، نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

## مقدمه

به نظر می‌رسد اتمام سریع باکتری‌های گرم منفی که در معرض مقادیر مؤثری از آنتی‌بیوتیک‌ها قرار گرفته‌اند منجر به آزاد شدن میزان قابل توجهی آندوتوکسین می‌گردد (۱-۳) که احتمالاً عامل بروز شوک‌های آندوتوکسمینی 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 هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های فوق به روش لیمولوس آمیبوسایت لیسایت کروموژنیک (۵) تعیین گردید.

## مواد و روش‌ها

کشت میکروبی: در بررسی حاضر از یک سویه 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 واکنش‌های باکتریایی انستیتو پاستور ایران در اختیار قرار گرفت.

به علاوه همزمان یک سویه اشیریشیاکلی 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  $4^{\circ}\text{C}$  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  $10^6$  برابر MIC پیشنهادی برای هر یک تهیه و به صورت استوک در ویال‌های ۵ میلی‌لیتری در  $70^{\circ}\text{C}$  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 (مولر هیتتون برات غنی شده با  $2/5$  مول در لیتر  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  و  $1/25$  مول در لیتر  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ) براساس دستورالعمل کمیته ملی تدوین استانداردهای آزمایشات بی‌الینی (National Committee for clinical Laboratory standards) چاپ ۱۹۸۵ تعیین گردیدند. (۷)

### ۲- کشتن باکتری‌ها:

به لوله‌های استریل و عاری از آندوتوکسین که حاوی RPMI1640 همراه با آنتی‌بیوتیک بودند، از ارگانیسیم‌های فاز لگاریتمی رشد ( $10^6 \text{cfu/ml}$ ) اضافه کرده و به مدت ۴ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه نمودیم.

میزان آنتی‌بیوتیک اضافه شده در مورد آمپی‌سیلین  $5 \mu\text{g/ml}$  و  $1/25$  کلرامفنیکل  $160 \mu\text{g/ml}$  و کو-تری موکسازول  $5 \text{mg/ml}$  بود. برای همه آنتی‌بیوتیک‌های فوق این شرایط سبب کشته شدن

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 بر علیه باکتری‌های فوق می‌باشد، به طوری که این میزان در مورد سالمونلاتیفی استاندارد  $MIC = MBC = 1.25 \mu\text{g/ml}$  و در مورد سالمونلاتیفی پاتوژن و اشریشیاکلی استاندارد  $MIC = MBC = 2.5 \mu\text{g/ml}$  محاسبه گردید. میزان MIC و MBC کلرامفنیکل بر علیه سالمونلاتیفی استاندارد به ترتیب برابر با  $2/5 \mu\text{g/ml}$  و  $160 \mu\text{g/ml}$  و در مورد دو باکتری دیگر برابر  $5 \mu\text{g/ml}$  و  $160 \mu\text{g/ml}$  به دست آمد.

میزان MIC و MBC کو-تری موکسازول بر علیه سالمونلاتیفی استاندارد به ترتیب برابر با  $1/25 \mu\text{g/ml}$  و  $5 \mu\text{g/ml}$  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 اشریشیاکلی استاندارد، که به عنوان سویه شاهد آزمایش شد نیز دیده می‌شود.

انجام تست پروژنیسیته در خرگوش جهت اطمینان از آزاد شدن آندوتوکسین توسط آنتی‌بیوتیک‌های فوق افزایش درجه حرارت نرمال بدن حیوان به میزان  $1/2^\circ\text{C}$  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 سه تایی اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در جدول شماره ۲ ملاحظه می‌شود میزان آندوتوکسین آزاد شده توسط کلرامفنیکل  $86/68 \pm 2/53 \text{Pg/ml}$ ، آمپی سیلین  $113/33 \pm 8/07 \text{Pg/ml}$  و کو-تری موکسازول  $134/18 \pm 11/59 \text{Pg/ml}$  محاسبه گردید.

بنابراین کلرامفنیکل با  $MIC = 2/5 \mu\text{g/ml}$  کمترین میزان آندوتوکسین و کو-تری موکسازول با  $MIC = 1/25 \text{mg/ml}$  بالاترین میزان آندوتوکسین را آزاد می‌نمایند.

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

نوع باکتری	سالمونلاتیفی استاندارد		سالمونلاتیفی پاتوژن		اشریشیاکلی استاندارد	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
آمپی سیلین	$1/25 \mu\text{g/ml}$	$1/25 \mu\text{g/ml}$	$2/5 \text{mg/ml}$	$2/5 \text{mg/ml}$	$2/5 \text{mg/ml}$	$2/5 \text{mg/ml}$
کلرامفنیکل	$2/5 \text{mg/ml}$	$2/5 \text{mg/ml}$	$160 \text{mg/ml}$	$5 \text{mg/ml}$	$160 \text{mg/ml}$	$5 \text{mg/ml}$
کو-تری موکسازول	$12/5 \text{mg/ml}$	$12/5 \text{mg/ml}$	$10 \text{mg/ml}$	$2/5 \text{mg/ml}$	$5 \text{mg/ml}$	$1 \text{mg/ml}$

تمامی باکتری‌های موجود در نمونه شد که به وسیله تکنیک‌های کشت کمی 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  $0/22$  میکرومتری پالایش کرده و فیلترها را جهت مطالعات بعدی در ویال‌های  $2/5$  میلی لیتری شیشه‌ای که استریل و عاری از آندوتوکسین بودند، در  $70^\circ\text{C}$  نگهداری نمودیم.

### ۳- 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  $1:10000$  بود دیالیز نموده و سپس در دسیکاتور حاوی پتتاکسیدفسفر به میزان تقریباً  $20$  برابر تغلیظ کرده و پس از آن قدرت تب زائیشان در خرگوش طبق روش U.S.pharmacopia تعیین گردید.

### ۴- 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 سه تایی اندازه‌گیری شد.

کنترل منفی حاوی آب مقطر استریل و عاری از آندوتوکسین و کنترل مثبت حاوی آندوتوکسین استاندارد اشریشیاکلی تا غلظت‌های  $100 \text{Pg/ml}$  بود.

## نتایج

میزان MIC و MBC بدست آمده از اثر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، کلرامفنیکل و کو-تری موکسازول، علیه سالمونلاتیفی

جدول شماره ۲: میزان آندوتوکسین آزاد موجود در فیلتره‌ها 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:	
- کلرامفنیکل	۸۶/۶۸±۲/۵۳
- آمپی‌سیلین	۱۱۳/۳۳±۸/۰۷
- 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 (۱ و ۲). 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 (۴ و ۸).

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 آمپی‌سیلین نسبت به کلرامفنیکل و کو-تری موکسازول دارای کمترین میزان MIC و MBC (MIC=MBC=۱/۲۵ μg/ml) بر علیه این باکتری می‌باشد و

کلرامفنیکل با دارا بودن MIC=۲/۵ μg/ml و MBC=۱۶۰ μg/ml در درجه بعدی اثر قرار دارد. کو-تری موکسازول با دارا بودن MIC=۱/۲۵ mg/ml و MBC=۵ mg/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 اشریشیا کلی استاندارد نیز دیده می‌شود (جدول شماره ۱). افزایش درجه حرارت نورمال بدن خرگوش به میزان ۱/۲°C به دنبال انجام تست پیروژنی (تست invivo) مؤید وجود آندوتوکسین آزاد در فیلتره‌های نمونه‌های حاوی باکتری و آنتی‌بیوتیک می‌باشد.

جدول شماره ۲، میزان آندوتوکسین آزاد موجود در فیلتره‌ها 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 لیز باکتری 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 باکتری‌ستاتیک 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

نشود.

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

## 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 therapy 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 experimental 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 experimental 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 ameocyte lysate 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 experimental 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