

ارزش کشت بی هوازی استرپتو کوک پنومونیه در جدا کردن این از گانیسم

مجله نظام پزشکی

سال ششم، شماره ۱، صفحه ۵۷، ۲۵۳۶

دکتر ایرج مدبر *

مقدمه:

در آزمایشگاهها خیلی به ندرت از کشت به روش بی هوازی استفاده میگردد. اخیراً با تغییراتی که در روش کشت بی هوازی داده شده یعنی بجای بکار بردن گاز ئیدرژن به تنهائی، از مخلوط گاز ئیدرژن و انیدرید کربنیک استفاده میکنند و همچنین با دقتی که در بازینی مکرر ظروف بی هوازی بعمل می آورند نتایج بهتری عاید گردیده است (کولی و همکاران ۱۹۷۲-۱۹۷۱).

با تغییرات مذکور مشاهده گردیده است که در کشتهای بی هوازی عملاً بیش از گذشته وجود پنومو کوک در نمونه های دستگاه تنفس گزارش میگردد (Bolognesi ۱۹۰۷ و Smith ۱۹۳۶). علاوه بر این وجود انیدرید کربنیک برای رشد عده ای از سویه های (Strain) این میکرب ضروری میباشد که البته موضوع تازه ای نیست و Auger در سال ۱۹۳۹، Retger و Valley در سال ۱۹۲۷ و Fleming در سال ۱۹۴۱ و بالاخره Schlayer در سال ۱۹۴۲ روی آن مطالعات زیادی انجام داده اند. ولی درباره افزودن انیدرید کربنیک به مقدار زیاد در Anaerobiosis در آزمایشهای روزمره توسط این عده تحقیقاتی انجام نگرفته است. در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی داریوش کبیر مشاهده گردید که سویه های بی هوازی پنومو کوک بیش از آنچه تا کنون گزارش شده است، وجود دارد. علاوه بر این، مقایسه دو روش کشت هوازی و بی هوازی نیز عملی گردیده است.

روش کار:

با نمونه بردار (سواب) از حلق و بینی افرادی که مشکوک به عفونت های دستگاه تنفس بودند نمونه برداری به عمل آمد و در

بعضی حالات که بیمار خلط دفع میکرد از خلط او برای آزمایش استفاده گردید.

از عده ای افراد سالم نیز که عفونت دستگاه تنفس نزد آنان وجود نداشت، بطریق فوق نمونه گیری و آزمایش بعمل آمد. طی ساعات کار روزانه آزمایشگاه، بلافاصله پس از دریافت نمونه، کشت بعمل آمد و در خارج از این ساعات نمونه بردار را بلافاصله پس از دریافت در محیط Amies (کارخانه Difco) قرار داده در حرارت اتاق نگهداری کردیم و صبح روز بعد مطابق معمول کشت داده شد. جمعاً ۴۱۴ نمونه در مدت دو هفته از ۲۵ آذر تا ۹ دی مورد آزمایش قرار گرفت.

بیماران مورد آزمایش:

جنس بیماران در این آزمایش مورد نظر نبوده و فقط از نوزادان تا بچه های دوازده ساله نمونه برداری گردیده است. روش کشت:

نمونه بردار (سواب) آلوده به ترشحات حلق یا بینی را روی محیط ژلوز خون دار تازه و ژلوز شکلاتی (Columbia Base) کشیدیم و به این طریق کشت انجام گردید. محیط کشت خون تازه به کار برده (کمتر از دو روز) در یخچال چهار درجه سانتیگراد نگهداری میشد. محیط کشت شده بمدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. برای هر بیمار یک کشت روی محیط ژلوز خون دار تازه و یک کشت روی ژلوز شکلاتی در شرایط هوازی و بی انیدرید کربنیک و یک کشت نیز روی محیط ژلوز خون دار تازه و یک کشت روی ژلوز شکلاتی در شرایط بی هوازی

* دانشکده پزشکی داریوش کبیر - دانشگاه تهران.

درمجاورت انیدرید کربنیک انجام و درون ظرف فلزی نگهداری گردید. اصول نگهداری در ظروف بی‌هوازی (فیدرژن ۹۰٪ و انیدرید کربنیک ۱۰٪) همان روش سال ۱۹۷۲ Collee و همکارانش میباشد. در هر ظرف بی‌هوازی بمنظور کنترل، یک کشت پسودوموناس هوادوست «آئروژن» روی محیط ژلوز مغذی کلمبیائی بدون خون قرار داده شد. روز بعد محیط‌ها و جعبه‌های پتری «Petri Dish» کنترل را از انکوباتور خارج میکنیم. آنگاه یک تکنولوژیست میکروبشناسی مأمور قرائت جعبه‌های کشت شده در محیط هوازی و یک تکنولوژیست میکروبشناسی دیگر مأمور قرائت جعبه‌های بی‌هوازی میشوند. از کلنی‌های مشکوک به پنوموکوک هر محیط لام تهیه و به روش گرم رنگ آمیزی میکنیم تا پنوموکوک بودن آن ثابت گردد. سپس آنتی‌بیوگرام و تعیین حساسیت پنوموکوک به Optochin (Ethyl hydrocuprin hydrochloride) را انجام میدهم و حساسیت سویه‌های بی‌هوازی پنوموکوک به Optochin را در شرایط بی‌هوازی تعیین میکنیم ولی چون هاله همولیز اطراف کلنی خیلی کوچک است، لذا هویت نمونه‌ها از روی قابلیت حل سویه‌ها در صفر تعیین میگردد (Lund ۱۹۵۹). ضمن عمل مشاهده گردید که سویه‌های بی‌هوازی در رپیکاز «Repicage» اول تحت شرایط هوازی پخوبی رشد نمودند و هاله اطراف دیسک‌های Optochin در کشت هوازی بهمان اندازه هاله‌های اطراف کلنی سویه‌های بی‌هوازی میباشد. از اینجهت بجای تعیین هویت از طریق قابلیت حل شدن در صفر، از حساسیت به Optochin در تحت شرایط هوازی استفاده میگردد. کشت‌های اولیه بی‌هوازی دوباره بطریق هوازی مورد آزمایش قرار میگیرند. روی بعضی از سویه‌ها اثر شرایط مختلف در رشد میکروب مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور میکروب را روی محیط ژلوز خوندار تازه، محیط ژلوز شکلاتی و ژلوز بی‌خون کشت دادیم و نتیجه کشت‌ها بایکدیگر مقایسه گردیدند. محیط‌های کشت شده مذکور ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بترتیب زیر یعنی تحت شرایط بی‌هوازی و هوازی توأم با انیدرید کربنیک، تحت شرایط بی‌هوازی، با حضور فیدرژن و انیدرید کربنیک نگهداری گردیدند. قبل از اینکه محیط‌ها کشت داده شوند دو قطره کاتالاز تصفیه شده (Sigma) یک میلیگرم در سانتیمتر مکعب در آب سترون) روی نصف هر محیط کشت میریزیم تا از ایجاد آب اکسیژنه بوسیله پنوموکوک مطمئن گردیم.

نتایج

از ۴۱۴ موردی که در جریان فوق آزمایش بعمل آمد، ۶۵ مورد (۱۵/۷ درصد) پنوموکوک رشد کرد و فقط ۳۱ مورد (۴۷/۷

درصد) در کشت اولیه پنوموکوک تحت شرایط هوازی رشد نمود. به بیان دیگر میتوان چنین نتیجه گرفت که ۳۴ مورد (۵۲/۳ درصد) تحت شرایط بی‌هوازی و با حضور انیدرید کربنیک رشد میکنند.

همه سویه‌هایی که ابتدا تحت شرایط بی‌هوازی رشد کرده بودند، در رپیکاز «Repicage» تحت شرایط هوازی رشد نمودند، در حالی که اگر از ابتدا تحت شرایط هوازی کشت داده میشدند، پنوموکوک رشد نمیکرد.

شمارش کلنی‌های پنوموکوک بعلت اینکه نمونه‌های دریافتی با «سواب» برداشت شده بود، نمیتوانست گویای شمارش حقیقی پنوموکوک (Colony count) باشد. گرچه ظاهراً بنظر میرسد که کلنی‌های روی محیط بی‌هوازی بزرگتر از کلنی‌های روی محیط هوازی باشند، ولی این امر فقط باین علت است که کلنی‌های روی محیط بی‌هوازی واضحتر دیده میشوند نه اینکه عملاً بزرگتر باشند. مجموع سویه‌های کشت شده تحت شرایط بی‌هوازی را صرف نظر از تحمل یا عدم تحمل شرایط هوازی مورد مطالعه قرار دادیم و به این نتیجه رسیدیم که این مجموعه (سویه‌ها) از ابتدا خصیصه رشد در شرایط هوازی را نداشته‌اند و تقریباً همیشه به رنگ خاکستری و باقوام موکوئید (Muroid) و آبکی تظاهر میکردند و قطر هر کلنی به ۲ تا ۳ میلی‌متر میرسید. ناگفته نماند که کلنی این سویه‌ها تحت شرایط بی‌هوازی مسطح میباشد و قطر آنها در حدود یک میلی‌متر است. تعداد و اندازه کلنی‌هایی که تحت شرایط بی‌هوازی و درمجاورت ده درصد انیدرید کربنیک کشت گردیدند بیشتر و بزرگتر از اندازه کلنی‌هایی که تحت شرایط بی‌هوازی و بی‌انیدرید کربنیک و کلنی‌هایی که در تحت شرایط هوازی با حضور انیدرید کربنیک و بالاخره کلنی‌هایی که تحت شرایط بی‌هوازی و بی‌انیدرید کربنیک کشت داده شوند، میباشد. کشت تحت شرایط بی‌هوازی روی محیط ژلوز خوندار نتیجه بهتری نسبت به کشت تحت شرایط هوازی روی محیط ژلوز شکلاتی و بالاخره بهتر از نتیجه کشت روی محیط ژلوز بی‌خون دارد.

اثر کاتالاز روی رشد این باکتری در حالی که میکرب را تحت شرایط هوازی و روی محیط ژلوز خوندار تازه یا ژلوز شکلاتی کشت دادیم بسیار ناچیز بود، ولی وجود آن برای رشد میکرب روی محیط ژلوز ساده تحت شرایط هوازی کاملاً ضرور میباشد. اما در کشت میکرب روی همین محیط تحت شرایط بی‌هوازی وجود آن کمکی به رشد باکتری نمیکند.

کلنی‌هایی که روی محیط ژلوز شکلاتی تحت شرایط بی‌هوازی و درمجاورت انیدرید کربنیک رشد کردند، خاکستری و درشت و

مرطوب بودند و باعث تغییر رنگ محیط نگر دیدند، ولی کلنی‌هایی که تحت شرایط هوازی رشد کرده بودند از لحاظ اندازه خیلی کوچک بودند و باعث تغییر رنگ محیط کشت میشدند. اگر کشت تحت شرایط هوازی را که روی محیط‌های ژلوز خوندار تازه و ژلوز شکلاتی انجام گرفته است در حرارت اطاق قرار دهیم، طی یک الی دو ساعت به رنگ سبز در خواهد آمد و اگر به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت در حرارت اطاق قرار دهیم، کلنی‌های مو کوئید به کلنی‌های خیلی بزرگ مبدل خواهند شد.

بحث:

با انجام ۴۱۴ مورد آزمایشی که از آن گفت و گو کردیم به این نتیجه رسیدیم که اگر پنومو کوک را از آغاز در شرایط بی‌هوازی کشت ندهیم، موارد مثبت خیلی کمتر از مواردی که باید به نتیجه مثبت برسیم خواهد بود. آزمایشهای مقایسه‌ای «Comparative Tests» که در یک زمان روی استرپتوکوک پنومونیه که از مجاری تنفسی افراد برداشت شده و یک بار با روش فوق و بار دیگر بدون بکار بردن این روش آزمایش گردیده است، نشان داد که بدون بکار بردن این روش فقط در ۴۷/۷٪ موارد حالات مثبت و با بکار بردن این روش ۵۲/۳٪ نتایج مثبت بدست آمده است. گرچه تمام نمونه‌های دریافتی از ترشحات دستگاه تنفس بوده است ولی بین تمام نمونه‌های رسیده نمونه‌هایی انتخاب شد و مورد آزمایش قرار گرفت که انتظار ابتلاء به عفونت پنومو کوکی دستگاه تنفسی نزد آن‌ها بیشتر بود.

نحوه بوجود آمدن کلنی‌های بزرگ مو کوئید پنومو کوک که تحت شرایط بی‌هوازی رشد میکنند، هنوز به درستی روشن نیست ولی امکان دارد که چند علت در این امر دخالت داشته باشند:

- ۱- ازدیاد سنتز
 - ۲- کوتاه شدن زمان تولید مثل (Repraske ۱۹۷۴).
 - ۳- غیر فعال شدن بعضی از مواد سمی که یا در محیط نمونه و یا در «سواب» وجود دارد.
 - ۴- بالاخره آنچه از همه مهمتر بنظر میرسد کم شدن قدرت اتولیزین پنومو کوک میباشد.
- Holt در سال ۱۹۶۲ ثابت کرد که اتولیزین پنومو کوک در اثر بوجود آمدن آب اکسیژنه صورت میگیرد و بوجود آمدن آب اکسیژنه خود در اثر فقدان سیستم کاتالاز در این میکرب است.
- تقلیل مقدار آب اکسیژنه هنگام رشد میکرب تحت شرایط بی‌هوازی که باعث کم شدن احتیاج میکرب به کاتالاز میگردد، فقط میتواند قسمتی از نتایج این تحقیق را بیان کند. در این آزمایش به ثبوت رسیده است، موقعی که کاتالاز به کشت میکربی در تحت شرایط هوازی افزوده شود، باعث افزایش اندازه کلنی یا تغییر نوع و تیپ

کلنی میکربی روی محیط‌های ژلوز خوندار نمیکردد، ولی در محیط ژلوز ساده بعنوان یک محرک، در رشد و شکل گرفتن کلنی‌ها مؤثر میباشد. در یک سویه که کشت با حضور فقط فیدرژن انجام شد، اندازه کلنی‌های حاصل شده کوچک اما با افزودن انیدرید کر بنیک کلنی‌های حاصل شده بزرگ و مو کوئید بود.

Gobrach و Bartlett در سال ۱۹۷۴، کشت بی‌هوازی ترشحات دستگاه تنفسی را بطور روزمره انجام دادند. منظور از کشت روزمره این بود که روشن کنند آیا موارد ابتلاء به باسیل‌های گرم منفی که از طرف آزمایشگاه مثبت گزارش شده است بایافته‌ها و تظاهرات بالینی مطابقت میکند یا نه. در باره پنومو کوک نیز میتوان همینطور تصور کرد ولی وظیفه ما ابتدا رشد دادن تمام میکربهای موجود با بکار بردن روشهای لازم سپس جدا کردن تک‌تک ارگانسم‌های رشد کرده و تعیین هویت آنان و در صورت لزوم بکارگیری روشی دقیق برای پی بردن به تمام مشخصات ارگانسم مورد نظر میباشد.

از پیشرفت‌هایی که در کشت میکربها تحت شرایط بی‌هوازی تاکنون بوجود آمده است، توانسته‌اند پنومو کوک را از نمونه‌هایی مانند مایع نخاع، خون و ترشحات چشم جدا کنند. اهمیت مطلب در جلوگیری از نابود شدن مقدار جزئی پنومو کوکی است که ممکن است تحت شرایط نامساعد رشد نکند. نکته قابل توجه این است که فقط ۵۰٪ از لامهای مثبت پنومو کوک در کشت تحت شرایط هوازی رشد میکنند، در حالی که نسبت در کشت بی‌هوازی خیلی بیشتر میباشد. واضح است که بکار بردن این روش کشت تا چه حد میتواند در تشخیص مننژیت و سپتی سمی بامشاء پنومو کوک مفید واقع شود.

خلاصه:

در این گزارش مقایسه نتایج کشت هوازی و بی‌هوازی در جدا کردن ابتدائی استرپتوکوک پنومونیه که از مجرای تنفس اطفال برداشت گردیده بعمل آمده است. در کشت ترشحات مجرای تنفس ۴۱۴ کودک مشاهده گردید که در ۶۵ تن آنها یعنی ۱۵/۷٪ پنومو کوک رشد کرد. در ۳۱ تن آنها یعنی ۴۷/۷٪ هم در محیط بی‌هوازی و هم در محیط هوازی پنومو کوک رشد کرد ولی در ۳۴ تن آنها یعنی در ۵۲/۳٪ فقط در کشت بی‌هوازی این میکرب رشد نمود. در کشت بی‌هوازی پنومو کوک در مجاورت انیدرید کر بنیک کلنی‌های این میکرب مو کوئید و بزرگ ظاهر میشوند که خیلی مشخص میباشد و به راحتی میتوان آن را از کلنی‌های طبیعی (غیر مو کوئید و کوچک) که در فلور (Flora) مخلوط دستگاه تنفس وجود دارند تمیز داد. بکار بردن این روش در جدا کردن استرپتوکوک پنومونیه از سویه‌های مورد آزمایش به سرعت عمل و تشخیص قطعی کمک فراوان میکند.

REFERENES :

- 1- Auger, W. J., Brit. J. Exp. Sath., 20, 439_442 (1939).
- 2- Bolognesi, Brit. J. Exp. Path., 20, 429_442 (1907).
- 3- Collee, J. G., Rutter, J.M., and Watt, B., J. Med. Microbiol., 4, 271_288 (1971).
- 4- Collee, J. G., Watt, B., Fowler, E. B., and Brown, R., J. appl. bact., 35, 71t82 (1972).
- 5- Fiala, M., Amer. J. Med. Sci., 257, 44-51. (1969).
- 6- Fleming. A, Lancet, I, 110. (1941).
- 7- Gorbach, SL, and Bartlett, J. G., New Eng. J. Med., 290, 1237_1245. (1973).
- 8- Holt, L. B., J. Gen. Microbiol., 27327_330 (1962).
- 9- Kempner, W., and Schlayer, C., J. Bact., 43, 397_396 (1942).
- 10- Lepow. M. L., Amer. Rev. Resp. Dis., 97, 533_545 (1968).
- 11- Lund, E., Acta Path. Microbiol. Scand., 47, 308_315 (1959).
- 12- Nicholis, A. C., Pease, P. E., and Green, I. D., J. Clin. Path. 28, 279_283 (1975).
- 13- Repaske, R., Repaske, A. C. and Mayer, R. D., J. Bact., 117, 652_659. (1974).
- 14- Smith, F., Brit. J., Exp. Path., 77, 329_334 (1936).
- 15- Tugwell, P., and Greenwood, B. M., J. Clin. Path. 28, 118_123 (1975).
- 16- Valley, G., and Rettger, L. F., J. Bact., 14, 101_137 (1927).
- 17- Walker, H. H., Science, 76, 602_604 (1932).