ارزش کشت بی هوازی استرپتوکوك پنومونیه در جدا کردن این ارگانیسم

مجله نظام پزشکی
سال ششم ، شماره ۱ ، صفحه ۵۷ ، ۲۵۳۶

دکتر ایرج مدبر *

مقدمه :

درآزمایشگاهها خیلی به‌ندرت از کشت به‌روش بی‌هوازی‌استفاده میگردد. اخیراً با تغییراتی که در روش کشت بی‌هوازی داده‌شده یعنی بجای بکار بردن گاز ئیدرژن به تنهائی ، از مخلوط گاز ئیدرژن و انیدرید کربنیك استفاده میکنند و همچنین با دقتی که دربازبینی مکرر ظروف بی‌هوازی بعمل می‌آورند نتایج بهتری عاید گردیده است (کولی وهمکاران ۱۹۷۲-۱۹۷۱).

باتغییرات مذکور مشاهده گردیده است که درکشتهای بی هوازی عملاً بیش ازگذشته وجود پنومو کوك در نمونه‌های دستگاه تنفس گزارش میگردد (Bolognesi ۱۹۰۷ و Smith ۱۹۳۶).

علاوه براین‌وجود انیدرید کربنیك برای رشد عده‌ای ازسویه‌های (Strain)این‌میکرب ضروری‌میباشد که‌البته موضوع تازه‌ای‌نیست و Auger درسال ۱۹۳۹ ، Retger و Valley در سال ۱۹۲۷ و Fleming درسال۱۹۴۱وبالاخره Schlayer درسال۱۹۴۲روی آن‌مطالعات زیادی انجام داده‌اند. ولی درباره افزودن انیدرید کربنیك به‌مقدار زیاد در Anaerobiosis در آزمایشهای روزمره توسط این عده تحقیقاتی انجام نگرفته است . در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی داریوش کبیر مشاهده گردید که سویه‌های بی‌هوازی پنومو کوك بیش ازآنچه تاکنون گزارش شده‌است، وجود دارد. علاوه‌براین، مقایسه دو روش کشت هوازی و بی هوازی نیزعملی گردیده است.

روش کار:

با نمونه‌بردار (سواب) از حلق و بینی افرادی‌که مشکوك به عفونت‌های دستگاه تنفس بودند نمونه‌برداری به عمل آمد و در بعضی حالات‌که بیمار خلط دفع میکرد ازخلط او برای‌آزمایش استفاده گردید.

از عده‌ای افراد سالم نیز که عفونت دستگاه تنفس نزد آنان وجود نداشت ، بطریق فوق نمونه‌گیری و آزمایش بعمل آمد .

طی ساعات کار روزانه‌آزمایشگاه، بلافاصله پس ازدریافت نمونه، کشت بعمل‌آمد ودرخارج ازاین ساعات نمونه‌بردار رابلافاصله پس ازدریافت درمحیط Amies (کارخانه Difco) قرار داده در حرارت اطاق نگهداری کردیم و صبح روز بعد مطابق معمول کشت داده شد. جمعاً ۴۱۴ نمونه درمدت دو هفته از ۲۵ آذر تا ۹ دی مورد آزمایش قرار گرفت.

بیماران مورد آزمایش:

جنس بیماران در این آزمایش موردنظر نبوده وفقط ازنوزادان تا بچه‌های دوازده ساله نمونه‌برداری گردیده است.

روش کشت:

نمونه‌بردار (سواب) آلوده به ترشحات حلق یا بینی را روی محیط ژلوز خون‌دار تازه و ژلوز شکلاتی(Columbia Base) کشیدیم وبه‌این طریق کشت انجام گردید. محیط کشت خون‌تازه به‌کار برده (کمتر از دو روز) دریخچال چهاردرجه سانتیگراد نگهداری‌میشد.محیط کشت شده‌بمدت۲۴ساعت‌درحرارت۳۷درجه سانتیگراد نگهداری گردید. برای هر بیمار یك کشت روی محیط ژلوز خوندار تازه و یك کشت روی ژلوز شکلاتی در شرایط هوازی و بی‌انیدرید کربنیك و یك کشت نیز روی محیط ژلوز خوندار تازه ویك کشت روی ژلوز شکلاتی درشرایط بی‌هوازی

* دانشکده پزشکی داریوش کبیر ـ دانشگاه تهران.

درمجاورت‌انیدریدکربنیك انجام و درون ظرف فلزی نگهداری گردید. اصول نگهداری درظروف بی هوازی (ئیدرژن ۹۰٪ و انیدریدکربنیك ۱۰٪) همان روش‌سال۱۹۷۲ Collee وهمکارانش میباشد. درهرظرف بی‌هوازی بمنظور کنترل، یك کشت‌پسودوموناس هوادوست «آئروژن» روی محیط ژلوز مغذی کلمبیائی‌بدون خون قرارداده شد. روز بعد محیطها وجعبه‌های پیتری«Petri Dish» کنترل را از انکوباتور خارج میکنیم. آنگاه یك تکنولوژیست میکربشناسی مأمور قرائت جعبه‌های کشت شده درمحیط هوازی ویك تکنولوژیست میکربشناسی دیگر مأمور قرائت جعبه های بی‌هوازی میشوند. از کلنی‌های مشکوك به پنوموکوك هرمحیط لام تهیه و به روش گرم رنگ‌آمیزی میکنیم تا پنوموکوك بودن آن ثابت گردد. سپس آنتی‌بیوگرام و تعیین حساسیت پنوموکوك به Optochin (Ethyl hydrocuprin hydrochloride) را انجام میدهیم و حساسیت سویه‌های بی هوازی پنوموکوك به Optochin را در شرایط بی‌هوازی تعیین میکنیم ولی چون هاله همولیز اطراف کلنی خیلی کوچك است، لذا هویت نمونه‌ها از روی قابلیت حل سویه‌ها درصفرا تعیین‌میگردد(Lund ۱۹۵۹). ضمن عمل مشاهده گردید که سویه‌های بی هوازی در رپیکاژ «Repicage» اول‌تحت شرایط هوازی‌بخوبی رشد نمودندوهاله‌اطراف دیسك‌های Optochin درکشت هوازی بهمان اندازه‌هاله های اطراف کلنی سویه‌های بی هوازی میباشد. از اینجهت‌بجای تعیین هویت از طریق قابلیت حل شدن در صفرا، ازحساسیت به Optochin در تحت شرایط هوازی استفاده میگردد. کشت‌های اولیه‌بی‌هوازی دوباره‌بطریق هوازی‌موردآزمایش قرارمیگیرند. روی بعضی از سویه‌ها اثرشرایط مختلف در رشد میکروب مورد مطالعه قرارگرفت. برای این منظور میکروب را روی محیط ژلوز خوندار تازه، محیط ژلوز شکلاتی و ژلوز بی‌خون کشت دادیم ونتیجه‌کشت‌ها بایکدیگر مقایسه گردیدند. محیط‌های‌کشت شده مذکور ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بترتیب زیریعنی‌تحت شرایط بی‌هوازی وهوازی توأم باانیدریدکربنیك، تحت شرایط بی هوازی، با حضور ئیدرژن و انیدریدکربنیك نگهداری گردیدند. قبل‌ازاینکه محیط‌ها کشت داده شوند دوقطره کاتالاز تصفیه شده (Sigma یك میلیگرم درسانتیمترمکعب درآب سترون) روی نصف هرمحیط‌کشت میریزیم تا از ایجاد آب اکسیژنه بوسیله پنوموکوك مطمئن گردیم.

نتایج

از ۴۱۴ موردی‌که درجریان فوق آزمایش بعمل آمد، ۶۵مورد (۱۵/۷ درصد) پنوموکوك رشد کرد وفقط ۳۱ مورد (۴۷/۷ درصد) درکشت اولیه‌پنوموکوك تحت‌شرایط هوازی رشد نمود. به بیان دیگر میتوان چنین نتیجه گرفت‌که ۳۴ مورد (۵۲/۳ درصد) تحت شرایط بی‌هوازی و با حضور انیدریدکربنیك رشد میکنند.

همه‌سویه‌هائی‌که ابتدا تحت شرایط بی هوازی رشدکرده بودند، در رپیکاژ «Repicage» تحت شرایط هوازی رشد نمودند، در حالی‌که اگر از ابتدا تحت شرایط هوازی‌کشت داده میشدند، پنوموکوك رشد نمیکرد.

شمارش‌کلنی‌های پنوموکوك بعلت اینکه نمونه‌های دریافتی با «سواب» برداشت شده بود، نمیتوانست گویای شمارش حقیقی پنوموکوك (Colony count) باشد. گرچه ظاهراً بنظرمیرسد که کلنی‌های روی محیط بی‌هوازی بزرگتر ازکلنی‌های روی محیط هوازی‌باشند، ولی این امرفقط باین‌علت است‌که‌کلنی‌های روی‌محیط بی‌هوازی واضحتردیده میشوند نه اینکه عملابزرگتر باشند. مجموع سویه‌های کشت شده تحت شرایط بی هوازی را صرف نظر از تحمل یا عدم تحمل شرایط هوازی مورد مطالعه قراردادیم و به‌این‌نتیجه رسیدیم‌که این مجموعه (سویه‌ها) از ابتدا خصیصه رشد در شرایط هوازی را نداشته‌اند و تقریباً همیشه به‌رنگ خاکستری و باقوام موکوئید (Mucoid) وآبکی تظاهرمیکردند و قطرهرکلنی به۲ تا ۳میلی‌متر میرسید. ناگفته نماندکه‌کلنی این سویه‌ها تحت شرایط بی‌هوازی مسطح میباشند و قطرآنها در حدود یك میلی‌متر است. تعداد واندازه‌کلنی‌هائی که تحت شرایط بی‌هوازی ودرمجاورت ده‌درصدانیدریدکربنیك کشت گردیدند بیشتر و بزرگتر از اندازه‌کلنی‌هائی که تحت شرایط بی‌هوازی‌وبی‌انیدریدکربنیك‌وکلنی‌هائی که‌درتحت‌شرایط هوازی با حضور انیدریدکربنیك و بالاخره‌کلنی‌هائی که تحت شرایط بی‌هوازی وبی‌انیدریدکربنیك‌کشت داده شوند، میباشند. کشت تحت شرایط بی هوازی روی محیط ژلوز خوندار نتیجه بهتری‌نسبت به‌کشت تحت شرایط هوازی‌روی‌محیط ژلوزشکلاتی و بالاخره بهتر از نتیجه‌کشت روی محیط ژلوز بی‌خون دارد.

اثرکاتالاز روی رشد این باکتری در حالی که میکرب را تحت شرایط هوازی وروی محیط ژلوز خوندار تازه یا ژلوز شکلاتی کشت دادیم بسیار ناچیز بود، ولی وجودآن برای رشد میکرب روی محیط ژلوز ساده تحت شرایط هوازی کاملا ضرور میباشد. اما درکشت میکرب روی همین محیط تحت شرایط بی هوازی وجود آن‌کمکی به رشد باکتری نمیکند.

کلنی‌هائی که روی محیط ژلوز شکلاتی تحت شرایط بی هوازی ودرمجاورت انیدریدکربنیك رشدکردند، خاکستری و درشت و

مرطوب بودند وباعث‌تغییر رنگ محیط نگردیدند، ولی کلنی‌هائی که تحت شرایط هوازی رشدکرده بودند از لحاظ اندازه خیلی کوچك بودند وباعث تغییر رنگ محیط کشت میشدند. اگر کشت تحت شرایط هوازی را کـه روی محیطهای ژلوز خوندار تازه و ژلوز شکلاتی انجام گرفته است در حرارت اطاق قراردهیم، طی یك الی دوساعت به رنگ سبز درخواهدآمد واگر به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت درحرارت اطاق قراردهیم، کلنی‌های موکوئید به‌کلنی‌های خیلی بزرگ مبدل خواهند شد.

بحث:

با انجام ۴۱۴ مورد آزمایشی‌که از آن‌گفت وگوکردیم به‌این نتیجه رسیدیم‌که اگرپنومو کوك را ازآغاز درشرایط بی‌هوازی کشت ندهیم، موارد مثبت خیلی‌کمتر ازمواردی‌که باید به نتیجه مثبت برسیم خواهد بود. آزمایشهای مقایسه‌ای «Comparative Tests» که دریك زمان‌روی استرپتوکوك پنومونیه‌که ازمجاری تنفس افراد برداشت شده ویك‌بار با روش فوق وباردیگر بدون بکاربردن این روش آزمایش‌گـردیده است، نشان دادکه بدون بکاربردن این روش فقط در ۴۷/۷٪ موارد حالات مثبت وبابکار بردن این روش ۵۲/۳٪ نتایج مثبت بدست آمده است. گرچه تمـام نمونـه‌های دریافتی از ترشحات دستگـاه تنفس بوده است ولی بین تمام نمونه‌هـای رسیده نمونه‌هائی انتخاب شد و مورد آزمایش قرارگرفت که انتظار ابتلاء به عفونت پنومـوکوکسی دستگاه تنفس نزد آن‌ها بیشتر بود.

نحوه بوجودآمدن کلنی‌های بزرگ موکوئیدپنومو کوك که تحت شرایط بی هوازی رشد میکنند، هنوز به درستی روشن نیست‌ولی امکان داردکه چند علت دراین امر دخالت داشته باشند :

۱ـ ازدیاد سنتز

۲ـ کوتاه شدن زمان تولید مثل (Repraske ۱۹۷۴).

۳ـ غیرفعال شدن بعضی از مواد سمی‌که یا در محیط نمونه و یا در «سواب» وجود دارد.

۴ـ بالاخـره آنچه از همه مهمتر بنظر میرسد کم شدن قـدرت اتولیزین پنومو کوك میباشد.

Holt درسال ۱۹۶۲ثابت کردکه اتولیزپنومو کوك دراثر بوجود آمدن آب اکسیژنه صورت میگیرد وبوجود آمدن آب‌اکسیژنه خود در اثرفقدان سیستم‌کاتالاز دراین میکرب است.

تقلیل مقدار آب اکسیژنه هنگام رشد میکـرب تحت شرایط بی هوازی‌که باعث‌کم شدن احتیاج میکرب به‌کاتالاز میگردد، فقط میتواند قسمتی از نتایج این تحقیق را بیان‌کند. دراین آزمایش به‌ثبوت‌رسیده‌است، موقعی که‌کاتالاز به‌کشت میکر بی‌درتحت‌شرایط هوازی افزوده شود، باعث‌افزایش اندازه‌کلنی یا تغییر نوع وتیپ کلنی میکر بی روی محیطهای ژلوز خوندار نمیگردد ، ولی در محیط ژلوزساده بعنوان‌یك محرك، در رشد وشکل‌گرفتن‌کلنی‌ها مؤثر میباشد. در یك سویه‌که کشت با حضور فقط ئیدرژن انجام شد، اندازه کلنی‌های حاصل شده کوچك اما با افزودن انیدرید کربنیك‌کلنی‌های حاصل شده بزرگ وموکوئید بود.

Gobrach و Bartlett درسال ۱۹۷۴، کشت بی‌هوازی ترشحات دستگاه تنفس را بطور روزمـره انجام دادند . منظور از کشت روزمره این بودکه روشن‌کنند آیا موارد ابتلاء به باسیل‌هـای گرم منفی‌که ازطرف آزمایشگاه مثبت‌گزارش شده‌است بایافته‌ها و تظاهرات بالینی مطابقت میکند یا نه. درباره پنومو کـوك نیز میتوان همینطور تصور کـرد ولی وظیفه ما ابتدا رشد دادن تمام میکربهای موجود با بکار بردن روشهای لازم سپس جدا کردن تك‌تك ارگانیسم‌های رشدکرده و تعیین هویت آنان و درصورت لزوم بکارگیری روشی دقیق بـرای پی بردن به تمام مشخصات ارگانیسم موردنظر میباشد.

از پیشرفت‌هائی‌که درکشت میکـربها تحت شرایط بی هـوازی تاکنون بوجودآمده‌است، توانسته‌اند پنومو کوك را ازنمونه‌هائی مانند مایع نخاع، خون وترشحات چشم جداکنند. اهمیت مطلب در جلوگیری از نابود شدن مقدار جزئی پنومو کـوکی است‌که ممکن‌است تحت شرایط نامساعد رشد نکند. نکته قابل توجه‌این است‌که فقط ۵۰٪ ازلامهای‌مثبت پنومو کوك درکشت تحت‌شرایط هوازی رشد میکند، درحالی‌که‌نسبت درکشت بی‌هوازی‌خیلی‌بیشتر میباشد. واضح است‌که بکاربردن این روش‌کشت تاچه‌حد میتواند درتشخیص‌منتژیت وسپتی‌سمی بامنشاء پنومو کوك مفید واقع شود.

خلاصه:

دراین گزارش‌مقایسه‌نتایج‌کشت هوازی وبی‌هوازی درجداکردن ابتدائی‌استرپتوکوك پنومونیه‌که ازمجرای تنفس اطفال برداشت گردیده بعمل آمده است. درکشت ترشحات مجرای تنفس ۴۱۴ کودك مشاهده‌گردیدکه در۶۵ تن‌آنها یعنی ۱۵/۷٪ پنومو کوك رشدکرد. در ۳۱ تن آنها یعنی ۴۷/۷٪ هم در محیط بی‌هوازی و هم در محیط هوازی پنومو کوك رشدکرد ولی در ۳۴ تن آنها یعنی‌در۵۲/۳٪ فقط درکشت بی‌هوازی‌این‌میکرب رشدنمود. در کشت بی‌هوازی پنومو کوك درمجاورت‌انیدریدکربنیك‌کلنی‌های این میکرب موکوئیدو بزرگ ظاهـرمیشوند که خیلی مشخص میباشند وبه‌راحتی میتوان‌آن را ازکلنی‌های‌طبیعی (غیرموکوئید وکوچك) که درفلور (Flore) مخلوط دستگاه تنفس‌وجود دارند تمیزداد. بکاربردن این روش درجداکردن استرپتوکوك‌پنومونیه از سویه‌های مورد آزمـایش به سرعت عمل وتشخیص قطعی کمك 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).