

میزان جداسازی باکتریهای مهم بیهوازی از نمونه‌های بالینی

دکتر محمد حسین سالاری، دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

Isolation Rate of Important Anaerobic Bacteria From Clinical Specimens

ABSTRACT

It is now generally recognized that anaerobic bacteria may be involved in most human bacterial infections that follow any form of surgery or are related to those body sites that have a large anaerobic population. Anaerobes must therefore be sought in a wide variety of clinical specimens.

In this study, 3015 specimens of patients (1684 male and 1331 female) with periodontitis (160 cases), abscess (305), sinusitis (33) and enterocolitis (2517) were investigated.

The anaerobic isolates from patients with periodontitis were 244 cases, abscess 32, enterocolitis 42.

Key Words: Infection, anaerobic bacteria, clinical specimens

مقدمه

عده‌ای از باکتریهای بیهوازی ممکن است بتهایی عامل عفونت باشند ولی اغلب همراه با سایر باکتریهای هوازی و یا بیهوازی، عفونت مخلوط و یا میکس را باعث می‌شوند. مهمترین عفونتهای ناشی از باکتریهای بیهوازی را می‌توان اسهال و یا انتروکولیت ناشی از کلسترییدیوم دیفیسیل، توکسیژنیک یا کلسترییدیوم پرفرنجنس انتروتوکسیژنیک، انواع عفونتهای پریدونتال، باکتریی واژینیت، آندومتريت و عفونتهای بعد از سقط جنین را نام برد. شرح مختصر عفونتهایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند بدین صورت است: (۱، ۲)

۱- پریدونتیت: اصلاح پریدونتیت، التهاب لثه و مخاط آلوتولی است که به لیگمان، استخوان آلوتولی و سمتوم گسترده می‌شود. علائم این بیماری عبارتند از: خونریزی لثه، عمیق شدن سالکوس ژنزیوال، تورم، بی‌رنگ و براق شدن لثه، بدبو شدن تنفس، بدمزگی دهان و نهایتاً "لقی و افتادن دندان. بر حسب سن بیمار و انواع باکتری موجود در پلاک بیمار این

چکیده

در حال حاضر مشخص گردیده است که باکتریهای بیهوازی در بروز اغلب عفونتهای باکتریائی انسان که به دنبال اعمال جراحی ایجاد می‌شود و یا موضع عفونت در معرض باکتریهای بیهوازی قرار می‌گیرد، مشارکت می‌نمایند. بنابراین می‌بایست بخصوص در این نوع نمونه‌های بالینی جستجو و تشخیص باکتریهای بیهوازی را بطور جدی منظور نمود.

در این مطالعه ۳۰۱۵ نمونه بیماران (۱۶۴۸ مرد و ۱۳۳۱ زن) مبتلا به بیماریهای پریدونتیت (۱۶۰ مورد)، آبسه (۳۵۰ مورد)، سینوزیت (۳۳ مورد) و انتروکولیت (۲۵۱۷ مورد) با روشهای باکتریولوژی و کشت سلول مورد بررسی قرار گرفت.

میزان باکتریهای جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه عبارتست از: پریدونتیت ۲۴۴ مورد، آبسه ۳۲ مورد، انتروکولیت ۴۲ مورد. ضمناً از نمونه‌های بیماران مبتلا به سینوزیت باکتری بیهوازی جدا نگردید.

سپس دو عدد پیپریونیت شماره ۴۰ را به داخل پاکت بیمار فروبرده، یکی را پس از بیرون آوردن داخل شیشه حاوی یک سانتیمتر مکعب محیط مایع تایوگلیکولات احیاء شده و دیگری را در محیط کاربیلر قرار دادیم. نمونه بیماران مبتلا به نوعی آسه و یا سینوزیت که توسط فردی ذیصلاح نمونه‌گیری شده بود را به محیط‌های مذکور منتقل نمودیم. از افراد مبتلا به انتروکولیت نیز نمونه تهیه کرده، هریک از نمونه‌های مذکور را در اسرع وقت روی محیط‌های اختصاصی بروسلا آگار همراه با ویتامین K1، همین و ۵ درصد خون خرگوش و نیز جهت جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل روی محیط سیکلوسرین سفوکستین فروکتوز آگار کشت نموده، سپس این محیط‌ها را در شرایط بیهوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۴۸ ساعت قرار دادیم. با انجام آزمایش آئروتولرانس و استفاده از تست‌های اختصاصی مانند تخمیر قندها، لیپاز، لسیتیناز (Egg yolk agar medium) و هیدرولیز اسکولین، احیاء نترات، مقاومت به صفراء، حساسیت به دیسکهای وانکومايسين (۵ میلی‌گرم) کاناامایسین (یک میلی‌گرم)، کلستین (۱۰ میلی‌گرم) و ... باکتری را مورد شناسائی قرار دادیم (۱۱، ۱۰).

در رابطه با تشخیص توکسین، کلستریدیوم‌های دیفیسیل و پرفرنجنس انتروتوکسی ژنیک از کشت سلول با روش ذیل استفاده شده است:

۱ - باکتری را روی محیط مخصوص (Brain heart infusion broth=BHI) کشت داده، به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم.

۲ - با استفاده از فسفات بافر (pH= ۷/۲) از محیط کشت مذکور (پس از دوره انکوباسیون) و یا نمونه مدفوع محلولی با رقت ۱/۱۰ تهیه نموده، آنرا به مدت ۱۵ دقیقه با دور RPM ۲۵۰۰ سانتریفوز کرده، سپس قسمت فوقانی رسوب را با فیلتر ۰/۴۵ میکرون پالایش نمودیم.

۳ - محیط اختصاصی کشت سلول (Minimum essential medium) را همراه با سلولهای هلا (Hella cell) فراهم کرده، به هر حفره میکروتایتریلیت مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول فوق افزودیم (در هر میلی‌لیتر محیط می‌بایست $2/5 \times 10^6$ عدد سلول باشد).

۴ - به هر حفره میکروتایتریلیت مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول سانتریفوز و فیلتر شده فوق با رقت ۱/۴۰ افزودیم.

عفونت را به گروه‌های ذیل تقسیم می‌نمایند.

- پرئودنتیت قبل از بلوغ

- پرئودنتیت جوانان

- پرئودنتیت با پیشرفت سریع

- پرئودنتیت مزمن بالغین

باکتریهای بیهوازی و کاپنوفیلی که از نمونه بیماران مبتلا به پرئودنتیت جدا می‌گردند را بعضی از گونه‌های پورفایروموناس، پروتلا، فوزوباکتریوم، ایکنلا، کاپنوسایتوفاگا و اکتینوباسیلوس اکتینومايستم کومیتانس گزارش می‌کنند (۳، ۴).

۲- آسه: اغلب باکتریهای گروه باسیل‌های گرم منفی بیهوازی، پپتوکوکوس، پپتواسترپتوکوکوس و اکتینومايسس، همراه با دیگر باکتریها در بروز عفونتهای گوناگون از جمله آسه‌های نواحی مختلف بدن، مشارکت می‌نمایند (۵، ۲).

۳ - انتروکولیت ناشی از باکتریهای بیهوازی: مهمترین باکتریهای انتروپاتوژن بیهوازی را می‌توان کلستریدیوم دیفیسیل توکسی ژنیک عامل اسهال و کولیت سودوممبران، کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ C عامل نکروز روده و کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ A را که عامل مسمومیت غذایی است نام برد (۶، ۷). اخیراً ژادهایی از این باکتری را بعنوان کلستریدیوم پرفرنجنس انتروتوکسیژنیک معرفی می‌کنند که عامل اسهال مزمن و شدیدی می‌باشد و مانند اسهال و کولیت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل بدنال مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها عارض می‌گردد (۶، ۷، ۸). تعدادی از باکتریهای بیهوازی که از اهمیت کمتری برخوردار بوده ولی ممکن است در افراد ناتوان باعث اسهال شوند را می‌توان کلستریدیوم‌های سبتیکوم، بوتریکوم و سوردلی، باکترئید فراجلیس انتروتوکسی ژنیک و نیز گونه‌هایی از جنس اثروبیوم اسپیریلوم را نام برد (۲، ۹).

این مطالعه با توجه به اهمیتی که باکتریهای بیهوازی در تشخیص‌های آزمایشگاهی و نیز درمان مناسب عفونتهای پلی‌باکتریال دارند صورت گرفته است.

روش و مواد

پس از تکمیل پرسشنامه و کسب اطلاعات لازم، از هر بیمار نمونه‌گیری بعمل آوردیم. از بیماران مبتلا به پرئودنتیت با استفاده از پروب سترون، عمق پاکت را اندازه‌گیری کرده،

پریدوتیت که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند عبارتند از: پور فایروموناس جنجیوالیس، پروتلا ایترمدیا، پروتلا ملاتینو جنیکا، فوزوباکتریوم نوکلثاتوم. البته لازم به ذکر است که باکتریهای فوق اغلب همراه با باکتریهای کاپنوفیل مانند اکتینو باسیلوس اکتینومایستم کومیتانس، کاپنوسایتوفاگا و ایکنلا کورودنس در بروز این نوع عفونت مشارکت می‌نمایند (۴).

معروفترین باکتری انتروپاتوژن را کلسترییدیوم دیفیسیل توکسی ژنیک معرفی می‌کنند که عامل کولیت سودوممبران و اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک می‌باشند. نژادهایی از کلسترییدیوم پرفرنجنس تایپ ۸، با نام کلسترییدیوم پرفرنجنس انتروتوکسی ژنیک را نیز بعنوان عامل انتروکولیت نام می‌برند که ممکن است بدنال مصرف نوع آنتی‌بیوتیک، بیماری عارض گردد (۱۲، ۱۵).

محققین میزان جداسازی باکتریهای بیهوازی را بدین صورت گزارش نموده‌اند:

باکتری می ۵ درصد، آبسه‌های مغزی ۸۰ درصد، عفونتهای سر و گردن مخصوصاً بعد از عمل جراحی ۱۰۰-۵۰ درصد، سینوزیت‌های مزمن و اوتیت مدیا ۵۰ درصد، عفونتهای دهان و دندان ۱۰۰-۹۰ درصد، عفونتهای درون شکم ۹۰-۵۰ درصد، عفونتهای دستگاه جنیتال زنان ۷۵-۵۰ درصد و عفونتهای دستگاه گوارش ناشی از باکتریهای بیهوازی حدود ۲ درصد (۷، ۹، ۱۰، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸).

میزان جداسازی باکتریهای بیهوازی از نمونه‌های مورد مطالعه عبارتست از ۲۴۴ مورد از نمونه بیماران مبتلا به پریدوتیت، ۳۶ مورد از آبسه‌های سر و گردن، ۴۸ مورد از آبسه‌های درون شکم، ۱ مورد از آبسه‌های مغزی و ۴۲ مورد از نمونه بیماران مبتلا به انتروکولیت.

با توجه به اینکه اغلب عفونتهای بیهوازی بصورت پلی میکروبیال می‌باشد (مشارکت باکتریهای بیهوازی با باکتریهای هوازی، هوازی بیهوازی اختیاری و یا میکروآئروفیل) جهت درمان موفق بیماران رعایت موارد ذیل الزامی است:

- ۱- تشخیص باکتریهایی که در عفونت مشارکت نمودند.
- ۲- توجه به آخرین الگوی مقاومت دارویی باکتریهای موجود در عفونت.
- ۳- اقدام به عمل جراحی و یا خروج چرک در مواردی که

۵- میکروتایترپلیت را در شرایط اتمسفر باضافه ۵ درصد گاز کربنیک نگه داشته، آنرا به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم.

۶- در صورتیکه ۵۰ درصد سلولهای هلاگرد شدند، نتیجه آزمایش مثبت در غیر این صورت منفی قلمداد گردید. لازم به ذکر است که جهت کنترل آزمایش از توکسین آنتی‌توکسین اختصاصی و استاندارد باکتری استفاده شده است (۱۲، ۱۳، ۱۴).

یافته‌ها

در این مطالعه جمعاً ۳۰۱۵ نمونه بیماران مبتلا به پریدوتیت، آبسه، سینوزیت و انتروکولیت را به روش باکتریولوژی و کشت سلولی مورد بررسی قرار داده، نتایج بدست آمده و نیز بعضی از خصوصیات گرد آوری شده بیماران بدین صورت است:

۱- توزیع فراوانی بیماران مورد مطالعه در گروههای فوق بر حسب سن و جنس عبارتست از: ۱۶۰ نمونه بیماران مبتلا به پریدوتیت (۷۸ مرد، ۸۲ زن)، ۳۰۵ نمونه مربوط به بیماران مبتلا به نوعی آبسه (۲۰۰ مرد و ۱۰۵ زن)، ۳۳ نمونه بیماران مبتلا به سینوزیت (۳۳ مرد و ۱۱ زن) و ۲۵۱۷ نمونه بیماران مبتلا به انتروکولیت (۱۳۸۴ مرد و ۱۱۳۳ زن) (جدول ۱)

۲- توزیع فراوانی باکتریهای بیهوازی اجباری و غیربیهوازی جدا شده از نمونه‌های مربوط به بیماران مبتلا به پریدوتیت، آبسه، سینوزیت و انتروکولیت را می‌توان در جدول شماره ۲ ملاحظه نمود. لازم به توضیح است که از ۳۳ نمونه بیماران مبتلا به سینوزیت و نیز ۱۱۴ نمونه مربوط به آبسه جلدی و زیر جلد باکتری بیهوازی جدا نگردید.

بحث

عفونتهای ناشی از باکتریهای بیهوازی گاهی جدیدست بطوریکه مرگ و میر نسبتاً بالایی را به این نوع عفونت‌ها نسبت می‌دهند. بدلیل مقاوم شدن تعدادی از باکتریهای بیهوازی به انواع آنتی‌بیوتیک و نیز مشارکت این گروه باکتریها در عفونت‌های پلی میکروبیال، درمان گاهی مشکل و با شکست مواجه می‌گردد. باکتریهای مهم بیهوازی عامل بیماری

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی باکتریهای بیهواری جداشده از نمونه های مورد مطالعه برحسب نوع بیماری

جنس	گونه	پریودنتیت			آبسه			مغزی	انتروکولیت
		n = ۱۶۰	سر و گردن	داخل شکم	n = ۲۰۵	n = ۶۷	n = ۱۰		
Bacteroides	fragilis	—	—	۲۵ (۳۸/۳)	—	—	—	—	
Porphyromonas	gingivalis	۷۲ (۴۵)	۱۸ (۱۵/۸)	—	—	—	—	—	
Prevotella	melaninogenicus	۲۸ (۱۷/۵)	—	۱۸ (۱۵/۸)	—	—	—	—	
	intermedia	۵۳ (۳۳/۱)	—	—	—	—	—	—	
	oris	۱۳ (۸/۱)	—	—	—	—	—	—	
	oralis	۶ (۳/۸)	—	—	—	—	—	—	
	Buccae	۳ (۱/۹)	—	—	—	—	—	—	
Fusobacterium	nucleatum	۳۶ (۲۲/۵)	۱۴ (۱۲/۳)	—	—	—	—	—	
	mortiferum	۹ (۵/۶)	—	—	—	—	—	—	
	necrophorm	۶ (۳/۸)	۲ (۱/۸)	۲ (۳)	—	—	—	—	
Wolinella	recta	۱۸ (۱۱/۳)	—	—	—	—	—	—	
Actinomyces	Israelii	—	۴ (۳/۵)	—	—	—	—	—	
Peptostreptococcus	SPP	—	—	۳ (۴/۵)	۱ (۱/۰)	—	—	—	
Clostridium (toxigenic)	difficile	—	—	—	—	—	—	۳۶ (۱/۴)	
Clostridium (enterotoxigenic)	Perfringens	—	—	—	—	—	—	۶ (۰/۲)	

ضروری است.

سپاسگزاری

از همکاران محترم بخش باکتریولوژیک دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران بخصوص استاد ارجمند جناب آقای دکتر قاضی سعیدی و نیز خانمها حافظی، شریعی، قریشی، ابراهیم‌نست و آقایان ثابت زاده، نجفی و از همکاران مرکز آموزش و تحقیقاتی بهداشتی یزد بخصوص خانمها سحر امیر معالی و فاطمه فلاح صمیمانه تشکر می‌نماید.

منابع

- 1- Frederic J, Braude AI. Anaerobic infection of the paranasal sinuses. *N Engl Med* 1974; 290: 135-136.
- 2- Duerden BI, Drasar BS. Anaerobes in human disease, Edward Arnold 1991; 446: 245-286.
- 3- Suzuki JB. Diagnosis and classification of the periodontal diseases. *periodontics* 1988;32(2): 195-216.
- 4- Macfarland TW, Samaranayake LP. *Clinical oral Microbiology*. 1st edition 1989: 7-31, 51-70.
- 5- Bartlett JG, Gorbach SL, Tally FP, et al. Bacteriology and treatment of primary lung abscess. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109: 510.
- 6- Larson HF, Borriello SP. Infection diarrhea due to clostridium perfringens. *Journal of infectious disease* 1980; 157: 390-391.
- 7- Borriello SP, Welch AR, Larson HE, Barclay FE. Diarrhea an simultaneous excretion of clostridium difficile cytotoxin and C. perfringens enterotoxin. *Lancet* 1984; 2: 1218.
- 8- Finegold SM. Anaerobic infections in human: An overview. *Anaerobe* 1994; 1(1): 1-9.
- 9- Myers LL. Isolation of enterotoxigenic Bacteroids Fragilis from human with diarrhea . *Journal of clinical Microbiology* 1987; 25: 2330-2333.

۴ - تجویز آنتی‌بیوتیک‌هایی که بتوانند بر روی کلیه باکتریهای بیهوازی و غیر بیهوازی موجود در نمونه مؤثر باشند(۱۲،۱۵).

- 10- Levett PN. *Anaerobic Microbiology, A practical approach*. Oxford university press 1991; 303.
- 11- Connie RM, George Manuselis JR. *Textbook of diagnostic Microbiology* WB Saunders company, 1st edition 1995; 537-593, 447-511.
- 12- Hoshuyama S, Kanoe M, Amimoto A. Isolation of obligate and facultative anaerobic bacteria from feline subcutaneous abscesses. *J Vet Med Sci* 1996; 58(3): 273-4.
- 13- Idaluzz AC. Detection of clostridial toxin stool from children with diarrhea. *J Med Microbiol* 1980; 22: 29-31.
- 14- Borrmann E, Schulze F. Detection of clostridium perfringens toxins using cell cultuer. *Dev Biol Stand* 1996; 86: 327.
- 15- Ryan RWI, Kwasi KRC. Rapid detection of clostridium difficile toxin in human Feces. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 776-776.
- 16- Rood JI, McClane BA, Songer IG, Tithall RW. *The clostridia molecular biology and pathogenesis*. Academix press 1997, 119-140.
- 17- Brook J, Foote PA, Slots J. Immune response to anaerobic bacteria in patients with peritonsillar cellulitis and abscess. *Acta Otolaryngol Stockh* 1996; 116(6): 888-91.
- 18- Brook J, Frazier EH, Gher ME. Microbiology of periapical abscesses and associated maxillary sinusitis. *J Periodontal* 1996; 67(6): 608-10.