Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:00 IRDT on Wednesday July 17th 2019

مجله دانشکده پزشکی تهران
۲۹ر۲۸۰ر۱۳۵۱

شناخت انواع ویبریونهای وبا بوسیلهٔ فاژ

دکتر پرویز ادیب‌فر*

مقدمه

از زمانهای بسیار قدیم کارشناسان علم باکتریولوژی و سایر کسانیکه در این رشته کار کرده و باکشت و مطالعه میکربها سروکار داشته‌اند در ضمن بررسی‌های خود متوجه پدیده لیز باکتریوفاژی‌شده‌اند. این‌پدیده‌عبارت ازعدم‌رشدباکتری درنقطه یانقاطی‌ازسطح کشت محیط‌جامد یاشفاف‌شدن محیط‌مایع‌بود ولی محققین مزبور علت را خرابی روش‌کار دانسته وآنرا بی‌اهمیت تلقی کرده بودند. وحتی درخصوص آن تاسال۱۸۹۶حرفی‌به‌میان نیاورده بودند .

هانکین(Hankin)[۲] وگیلدمیشتر(Gildemeister) در سال ۱۸۹۶برای اولین بار در مقالات خود خاطرنشان ساختند که در بعضی موارد نقاطی از محیط‌کشت جامد به باکتری‌امکان رشد نمیدهد .

محققین مزبور این‌کیفیت را تفسیر نکردند و درخصوص علت بروز این نقاط به جستجو و تحقیق نپرداختند .

تورت (Twort) در سال۱۹۱۵درکشت استافیلوککی‌که از مایع آبله جداکرده بود مناطقی راکه میکرب رشد نکرده مشاهده نمود و بالاخره فیلیکس درل (Felix d'Herelle) در سال ۱۹۱۷ برای اولین‌بار در انستیتوپاستور پاریس هنگام مطالعه روی باسیل دیسانتری‌متوجه شدکه اگر مدفوع بیمارانی راکه دردوره‌نقاهت‌دیسانتری باسیلی‌بسرمیبرندروی‌شمع‌شامبرلان صاف و چند قطره مایع از صافی‌گذشته را به کشت خالص همان باسیل در محیط مایع اضافه نمایند و در حرارت ۳۶ درجه‌قرار دهند پس از چند ساعت مشاهده میشودکه محتوی لوله‌کشت که ابتدا بعلت وجود باکتریهاکدر بودکاملا روشن وزلال میگردد.

درل برخلاف کارشناسان دیگر تنها باین مشاهده ساده اکتفا نکرد. بلکه درصدد جستجوی علت این پدیده مهم‌برآمدو عامل این پدیده را باکتریوفاژ یعنی خورنده باکتری نامید . او در سال ۱۹۲۱ نتیجه مشاهدات و تجربیات چهار ساله خود را در خصوص‌این موضوع درکتابی‌زیر عنوان باکتریوفاژمنتشر کرد. درسال۱۹۴۰روسکا (Ruska) [۸] وکوش (Kausche) اولین‌کسانی بودندکه عکسهائی بکمك میکرسکپ‌الکترونیك از باکتریوفاژگرفتند . در سال ۱۹۶۴ لپین (Lepine) ونیکل (Nicolle) نیزموفق‌به‌گرفتن عکس‌هائی‌از عامل مزبورگردیده و اطلاعات‌گذشته را تکمیل‌کردند . Williams و Fraser [۹] نیز با روشی‌که حتی‌المقدور از تغییر شکل ظاهری باکتریوفاژ جلوگیری‌کند عکسهای‌دقیق وجالبی ازشکل ظاهری‌باکتریوفاژ بدست آوردند .

تاریخچه بررسی و تحقیق در مورد باکتریوفاژکلرا در سال۱۹۵۹بوسیله پولیتزر (Pollitzer)[۷] انتشار یافت. ازسال ۱۹۲۷که درل مسأله‌باکتریوفاژ ویبریون‌مولد وبا را پیش‌کشید مطالعات زیادی بوسیله بسیاری ازدانشمندان مشهورهندوستان‌نیز صورت‌گرفت ودرآن‌زمان۱۴تیپ‌باکتریوفاژ (از A _ N) کشف ومطالعه شد[۶]که امروزه بدست‌نمیآیند وآنهائی‌که‌بطور اتفاق بدست میآیند تغییر شکل داده‌اند . مهمترین هدف از مطالعات‌و بررسیها راجع به‌فاژ این مسأله بوده است‌که‌آیا باکتریوفاژ در پیشگیری ودرمان وبا مؤثراست یا خیر؟ ولی‌بعلت نتایج متغیری که دراین‌مورد بدست‌آمد استفاده‌از باکتریوفاژ ویبریون‌مولدوبا به منظور درمانی منسوخ شد وبهمین دلیل رکودی در مطالعه‌این موضوع پیش‌آمد. چندی بعد مجدداً با توجه به اهمیت‌فاژبعنوان

*گروه میکروبشناسی و ایمونولوژی دانشکدهٔ پزشکی .

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:00 IRDT on Wednesday July 17th 2019

یك‌وسیله برای‌تشخیص آزمایشگاهی‌وبا تحقیقات زیادی‌بعمل‌آمد و راهنمای خوبی برای مطالعات اپیدمیولوژیکی شد .

باکتریوفاژها عمل اختصاصی دارند . باین معنی که فقط سوشهای میکربی مربوط بـه خود را لیز مینمایند و در نتیجه میتوان سوشهای متفاوتی از باکتریها را که حتی بوسیله خواص بیوشیمیائی وآنتی‌ژنی نمیشود تشخیص داد از هم متمایز نمود و نیز دیده شده است‌که سوشهای باکتریهائی‌که از اپیدمی هـای متفاوت جدا شده‌اند و منشاء واحد دارند درفاژتایپینگ یکسان عمل میکنند و این مسأله کمك میکندکه منبع و ریشه یك‌بیماری عفونی‌که‌سبب اپیدمی‌شده‌است شناخته شود. بهمین جهت روشهای مختلف فاژتایپینگ برای باکتریهای‌بیشماری توسعه یافته است‌و بویژه امروزه‌کمك مهمی درکنترل بیماریهای روده‌ای میکندهم‌چنین‌فاژتایپینگ ویبریون‌مولدوباتوجه علماء بین‌المللی‌را بخود جلب کرده است . بطوریکه از سال ۱۹۶۴ یك‌مرکز رفرانس بین‌المللی برای فاژتایپینگ ویبریون مولد وبا درکلکته تاسیس شدکه زیرنظر سازمان بهداشت جهانی‌کار میکند . متداولترین روش فاژتایپینگ‌روش‌موکرجی است‌که‌ذیلاشرح‌داده‌میشود.[۳]

فاژتایپینگ ویبریون‌مولدوبا را میتوان‌جهت‌مطالعات‌زیر مورد استفاده قرار داد :

۱ ـ شناسائی انواع سوشهای ویبریون مولدوبا .

۲ ـ متمایزکردن ویبریون‌کلاسیك از ویبریون التور .

۳ ـ شناسائی انواع سوشهای ویبریون‌التور .

۴ ـ پروفاژتایپینگ ویبریون مولد وبا .

روش بررسی و مواد لازم

جهت فاژتایپینگ ابتداباید فاژ را استانداردنمود وبرای اینکار پنج‌لوله انتخاب میکنیم وبه هرلوله ۲/۷ سانتی‌مترمکعب آبگوشت غذائی می‌افزائیم‌بعد به‌لوله اول ۰/۳ سانتی‌مترمکعب از فاژی‌که ازصافی‌گذرانده‌ایم (چون باکتریوفاژها از صافیهای باکتریولوژیك عبور میکنند از این خاصیت برای جدا کـردن فاژ ازباکتریهائی‌که لیز نشده‌انداستفاده میکنند)افزوده ومخلوط میکنیم ، تافاژ ده‌مرتبه رقیق شود . حال پس از افزودن فاژ بـه لوله‌اول‌پی‌پت را عوض نموده وعمل مخلوط‌کردن‌را باپی‌پت تازه دیگر شروع مینمائیم . یعنی با آن پی‌پت ۰/۳ سانتی‌متر مکعب از لوله اول برداشته و به لوله دوم افزوده و دو مرتبه پی‌پت را عوض‌کرده و این عمل را برای لوله‌هـای بعد تکرار میکنیم و بدین ترتیب فاژ بارقتهای تصاعدی ده برابر 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} بدست خواهدآمـد بعد در پشت بوات اگار غذائی به فواصل مساوی شش دایره رسم میکنیم و ازکشت دوساعته‌سوش شماره ۷۵۷ ویبریون‌وبا در محیط‌آبگوشت غذائی بـاحلقه سیم طلای سفیدکه قطر استاندارد ۳ میلیمتر داشته باشد یك قطره پر برداشته در تمام دایره‌ها داخل بوات پخش‌کـرده و تقریباً ۱۵ دقیقه صبر میکنیم تا خشك شود سپس باهمین حلقه در خانه اول از فاژ رقیق نشده (۰ ـ) و در خانه‌های بعدی از فاژهائی‌که به نسبت‌های مختلف رقیق شده‌اند یك قطره پر برداشته در وسط هر دایره میگذاریم و بوات را با در بسته روی میز میگذاریم تا خشك شود . سپس بمدت یك شب در اتوو گـذاشته و روز بعد نتیجه را میخوانیم عیار یك خانه قبل از خانه‌ای‌که کمی رشد کـرده یعنی کامـلا لیز نداده است به عنوان آر ـ تی ـ دی (Routine Test Dilution=R.T.D) نمایانده‌میشود. مثلا اگر RTD=10^{-3} باشد برای استفاده از این فاژ باید آنرا 10^{-3} مرتبه رقیق‌کرده مصرف نمود .

فاژتایپینگ ویبریون‌کلاسیك :

ویبریون‌کلاسیك چهارفاژ دارد بنابراین‌باید بوات‌راپنج قسمت نموده چهار قسمت جهت‌ویبریونی‌که مورد نظر است ویك قسمت برای سوش‌کنترل‌شماره۱۵۴درنظر گرفت. سپس‌کشت۲۴ ساعته‌سوش‌مورد نظررا باضافه سوش۱۵۴که روی ژلزغذائی‌رشد کرده است به مقدارکم روی محیط آبگوشت غذائی میبریم و دو ساعت دراتو میگذاریم بطوریکه کدورت مختصری ایجاد شود و بعد از این محیط با حلقه سه میلیمتری سیم طلای سفید یك‌قطره پربرداشته و در خانه مربوط خودش پخش میکنیم . برای سوش کنترل نیز بهمین ترتیب عمل مینمائیم و پس ازآن با همان‌حلقه سه‌میلیمتری‌درهرقسمت‌یك قطره‌پراز فاژمربوطه در وسط‌هرخانه میگذاریم. و بوات را روی میز میگذاریم تا خشك شود و پس‌از ماندن یك شب دراتوو فرداصبح جواب را میخوانیم .

در ویبریون التور نیز مانندکلاسیك عمل میشود بـا این تفاوت‌که در اینجا پنج فاژ داریم و همچنین پس از خشك شدن قطره‌های سوش روی بوات باید بلافاصله قطره‌های فاژ را افزود (حداکثر مدت ۱۵ دقیقه برای خشك شدن‌کافی است) .

طرز خواندن جواب :

۱ ـ در محلی‌که فاژقرارگرفته است بوضوح‌باکتریهالیز شده‌اند .

Cl=Clear Confluent lysis

۲ ـ باکتریهالیز شده‌اند ولـی در بعضی قسمتها بصورت کلنی‌های‌کوچك مانده‌اند .

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:00 IRDT on Wednesday July 17th 2019

Lcl = Less than cl

۳ - تقریباً نصف باکتریهالیز شده‌اند و پلاکهای متعدددر روی آن مشاهده میشود .

Scl = Semi cl

۴ - نقاط روشنی بصورت‌پلاکهائی‌که نمودار لیز باکتریها است مشاهده میگردد و تعداد آن بیش از ۴۰ میباشد .

Pq +++ = More than 40 plaque

۵ - نقاط روشنی بصورت‌پلاك‌که نمودار لیز باکتری است مشاهده میگرددکه تعداد آن‌کمتر از ۴۰ وبیش از ۲۰میباشد .

Pq++ = More than 20 plaque less than 40

تمام موارد فوق مثبت حساب میشود .

۶ - نقاط روشنی بصورت پلاك‌که نمودارلیز باکتری است و کمتر از ۲۰ عدد میباشد .

Pq+ = Less than 20 plaque

۷ - عمل لیز انجام نگرفته ولی نقاطی باندازه ته‌سوزن‌و نیمه‌شفاف روی آن دیده میشود .

Ol = opaque lysis

شماره های۶و۷ دومرتبه‌باید تجدید گردند و درصورتیکه مثل مرتبه اول بود منفی گزارش میشوند .

۸ - عمل لیز انجام‌گرفته ولی تصویر کدرمانندی‌روی‌آن مشاهده میگردد .

Cl. C = Confluent lysis conored by a claudy secondy growth.

۹- عمل لیزکامل نیست و تصویر کدرمانندی‌روی‌آن دیده میشود .

Scl C = Semi confluent lysis with Claudy Secondy growth.

شماره های ۸و۹ نیز مثبت‌گزارش میشود .

نتیجه

ویبریون‌کلاسیك ۴ فاژ داردکه پس از خواندن جواب‌هر یك از آنهاکه باکتریها را لیزکرده‌اند نتیجه را با علامت + یعنی حساس نشان میدهند و آنهاکه لیز نکرده‌اند با علامت — یعنی مقاوم‌نمایانده میشوندکه طبق جدول شماره ۱ویبریون‌کلرا به‌پنج لیزوتیپ تقسیم میشود[۵] وضمناًسه سوتیپ نیز برای‌هریك از تیپهای۱و۲ تشخیص داده شده است[۶]

ضمناً باید یادآوری کردکه هیچ ارتباطی بین لیزوتیپ و سروتیپ ویبریون مولدوبا وجود ندارد . درکلکته مطالعاتی‌که در جریان‌یکسال روی لیزوتیپ وسروتیپ ویبریونهای بیماریزا بعمل آورده‌اند نتایج متفاوتی بدست‌آمده است و این بویژه‌بعلت این است که‌برای‌ویبریون مولد وباناقلین‌مزمن‌وجودندارد.[۶] بعضی از تیپ‌ها و سوتیپ‌های ویبریون کلرا بالنسبه‌کوچکند و برخی از آنها را تاکنون نتوانسته‌اند از بیماران جداکنند . رویهمرفته فاژتایپینگ درمطالعات اپیدمیولوژی وبا ارزش‌عملی زیادی دارد ودر حال‌حاضرسه منطقه اندمی‌با ویبریونهای‌کلرای متفاوت در هند وجود داردکه لیزوتیپ وسروتیپ مختلف دارندو بهنگام ریشه‌کنی وبا بایستی مورد نظرگرفته‌شوند .[۶]

فاژتایپینگ ویبریون‌التور :

پاندمی‌وبای‌التورکه درغرب‌اقیانوس‌کبیروجنوب وجنوب شرقی ومرکزآسیا تا سال۱۹۶۱ پدیدآمد سبب شدکه مطالعات فراوانی روی فاژتایپینگ ویبریون‌التور بعمل‌آید و در سال‌های اخیروضع‌آن روشن گردد. (Mukerjee 1965) وبطوریکه در

جدول ۱

تیپ‌های فاژی ویبریونهای کلاسیك	حساسیت ویبریونهای کلرا به‌فاژهای زیر			
	I	II	III	IV
۱	+	+	+	+
۲	—	+	+	+
۳	+	—	+	+
۴	—	—	+	+
۵	+	+	—	+

جدول ۲

تیپ‌های فاژی ویبریونهای التور	حساسیت ویبریونهای التور به‌فاژهای‌زیر				
	I	II	III	IV	V
۱	+	+	+	+	+
۲	+	+	+	—	+
۳	+	+	—	+	+
۴	+	+	—	—	+
۵	+	—	—	—	+
۶	—	+	—	—	+

Insensitive = — مقاوم Sensitive = + حساس

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 11:00 IRDT on Wednesday July 17th 2019

جدول۲ نشان داده شده‌است[۶] پنج نوع فاژفعال برضد ویبریون التور وجود دارد که سوشهای ویبریون‌التور نسبت باین فاژبه ۶ دسته تقسیم میشوند . هرچند گاه‌یك سوش حساسیت متفاوتی نسبت به یك فاژ معین در آزمایشهای تکراری نشان میدهد معذلك با افزودن و یا تغییر دادن بعضی از فاژها میتوان مشکل فوق را برطرف‌نمود وجدول«۲» را نوشت.[۶]

بحث

ویبریون وبا در روده بیماران تکثیر پیدا میکند بنابراین بنظر میرسد درمان بافاژ (فاگوتراپی) برای نابودی بیماری یا پیش‌گیری آن باید بسیار مؤثرباشد و بهمین مناسبت در ابتدای امر در مورد اینکه بتوان از باکتریوفاژ ویبریون‌مولدوبا به منظور درمانی‌استفاده‌نمود مطالعاتی انجام‌گرفت وپس ازبررسی های زیادکه از ۱۹۲۸ بمدت ۲۰ سال نمودند و نتایج متناقضی که در درمان و پیشگیری وبا با بکار بردن فاژبدست آوردند سرانجام باین نتیجه رسیدندکه استفاده از باکتریوفاژ ویبریون مولدوبا بمنظور درمان عملا بی‌ارزش است و فقط ازباکتریوفاژ ویبریون‌مولدوبابعنوان‌وسیله تشخیص‌آزمایشگاهی وباوپی‌جوئی مطالعات‌اپیدمیولوژیکی‌میتوان بهره‌برداری‌نمود. بدین‌منظوراز فاژتایپینگ جهت تشخیص تیپ‌های مختلف ویبریون مولدوبا و همچنین متمایز کردن ویبریون‌کلاسیك ازویبریون‌التور استفاده شد. ویبریون‌کلاسیك والتور از نظر شکل بهم شبیه هستند واین شباهت در واکنشهای بیوشیمیائی و ساختمان آنتی‌ژنی آنها هم وجود دارد و ایندو از هم ضمن آزمایشهای فوق با آزمایش همولیز متمایز میشوند . زیرا ویبریون‌کلاسیك غیر همولیتیك استو نمیتواند گلبول قرمز گوسفندرا همولیز نماید ولی‌ویبریون التورهمولیتیك‌است. امااز زمان‌شروع‌پاندمی‌اخیرالتورمشکلات زیادی در سر راه‌کارمندان‌آزمایشگاه قرارگرفته است وآن غیر همولیتیك بودن‌ویبریونهای التور است‌که در حقیقت تقریباً اکثر سوشهای ویبریون‌التور جدا شده در این اپیدمیها غیر همولیتیك بوده‌اند واین مسأله باعث میشودکه احتیاج به‌روش دیگری‌برای تشخیص ویبریون‌التور ازویبریون‌کلاسیك داشته باشیم وآن‌امکان استفاده از تجربیات موکرجی است‌که بافاژ چهارگزارش داده است زیرا این فاژ برتمام ویبریونهای‌کلرا خاصیت‌کشنده دارد در صورتیکه برویبریونهای التورتأثیری ندارد ووجه‌تمایزخوبی برای ویبریونهای التورغیرهمولیتیك است‌که باین فاژ مقاومت دارند[۴] و راهنمای خوبی‌برای بررسی‌عامل اپیدمیها است از طرفی‌پروفاژتایپینگ برای‌ویبریونهائی‌که لیزوژنیك‌میباشندمورد استفاده قرار میگیرد . انواع لیزوژنیك ویبریون‌التور بسیار نادر است و تقریبا اکثر سوشهای التورکه در اپیدمیهای مختلف بدست آمده است لیزوژن نمیباشد ولی سوشهای‌کلرای‌کلاسیك غالبا بفرم لیزوژنی بدست‌آمده‌اند.رویهمرفته اگر سوش‌لیزوژن باشد نمیتوان مورد استفاده فاژتایپینگ قرار داد و برای اینکه بتوان فاژرا از باکتری‌جداکرد بایستی ابتدا باکتریهارا باسوش حساس توأماً کشت‌داد تافاژ برای‌لیزدادن‌سوش حساس ازباکتری خارج شود ولی چون خود باکتری نسبت به فاژ خودش حساس نبوده است باقی میماند و پس از آن امکان فاژتایپینگ میسر خواهد بود .[۶]

REFERENCES:

1- Herelle, F., Le Bacteriophage, son rôle dans l'immunité, 280, Masson et cie, 1921.
2- Hankin, E., *Ann. Inst. Pasteur.*, 10:511, 1896.
3- Mukerjee, S., *Bull. WHO.*, 25: 156, 1964.
4- Mukerjee, *Bull. WHO.*, 28: 333. 1963.
5- Mukerjee, *Bull. WHO.*, 28:392. 1963.
6- Mukerjee, *WHO. Public. Health. pap.*, 2:156. 1970
7- Politzer. R., *WHO. Public.. Health paper.*, 43: 152, 1959.
8- Ruska, *Arch. Ges. Virus torsch.*, 2: 343, 1942.
9- Williams. R. C., *J. Bact.*, 66:458, 1953.