

نامه دانشکده پزشکی تهران

فروردین ماه ۱۳۴۵

شماره هفتم از سال بیست و سوم

جستجوها و گردآوریهای علمی

دکتر ابوالحسن ظریفی

دکتر شاهین رحمان زاده

یك محیط غذایی نوین برای کشت میکروب سل

نزدیک به پنجاه سال است که در آزمایشگاه رفرانس سل برای ساده‌تر کردن محیط لونشتین مطالعاتی صورت میگیرد. نتیجه این مطالعات با معرفی فرمول (محیط ایران) اینکه در معرض قضاوت همکاران میکروب شناس و آزمایشگاهی قرار میگیرد نتیجه مطالعات ما بر روی تعداد زیادی از مواد بیماری‌زا و انواع مختلف سوشهای میکوباکتریومها مؤید این اعتقاد است که این محیط میتواند بخوبی محیط لونشتین جانسن مورد استفاده باشد بخصوص که تهیه آن بسیار ساده‌تر و ارزانتر از محیط مزبور تمام میشود.

هنگامی که کخ در سال ۱۸۸۲ میکروب سل را کشف کرد خود اولین موفقیت را در کشت میکروب و جدا کردن کلنی میکروبی بدست آورد. کخ از سرم خون گوسفند و یا گوساله که در حدود امکان کاملاً پاکیزه گرفته شده بود استفاده کرد و سرم‌های مزبور را در لوله‌های آزمایش تقسیم کرده و پنبه‌ای بدهانه آن گذاشت و سپس مدت شش روز و هر روز یکساعت آنها را در حرارت ۸۰ درجه قرار داد و در روز ششم سرم‌ها را برای چند ساعت در حرارت ۶۰ درجه گذاشت تا منعقد شده و سفت گردد، در این حالت سرم‌ها رنگی کهربائی بخود گرفته و شفاف میباشند.

• رئیس آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشتی

• تکنولوژیست اداره آزمایشگاه رفرانس

کخ از نودول‌های سلی حیواناتی که از سل سرده بودند بر روی این محیط کشت داده و لوله را در حرارت ۳۷ تا ۳۸ درجه قرار میداد و در هفته دوم کلنی‌های میکربی را مشاهده مینمود.

در زمان کخ تنها راه بدست آوردن کلنی جداگانه میکرب سل، آن بود که ابتدا مواد آزمایشی به حیوانات حساس تلقیح شود و سپس بر روی محیط کشت گردد زیرا هنوز برای جلوگیری از رشد میکربهایی که همیشه همراه با مواد بیماری‌زا بخصوص خلط وجود دارد روشی وجود نداشت.

در ۱۸۸۵ نوکارد (Nocard) قبل از اعتقاد سرم خون به آن مقداری پپتن قند و اسلح معدنی اضافه کرد و در این محیط سل پرندگان را کشت داد. پنجسال پس از کشف میکرب سل Nocard - Roux دریافتند که افزایش چندقطره گلیسیرین به محیط کشت رشد میکرب را زیاد میکند و سپس در تجربیات بعدی با افزودن ۶ تا ۸ درصد گلیسیرین به محیط آبگوشت معمولی موفق شدند در طی ۸ تا ۱۰ روز رشد بسیار قابل ملاحظه‌ای بدست آورند. کشت میکرب سل در محیط سیب زمینی برای اولین بار بوسیله Esmarch (۱۸۸۷) بیان گردید. Pawlowsky در ۱۸۸۸ با استفاده از ورقه‌های سیب زمینی گلیسیرین دار موفق شد رشد بسیار زیادی از میکرب سل را بدست آورد. در ۱۸۹۶ ابتدا Capaldi از زرده تخم مرغ برای کشت میکرب سل استفاده کرد و بعدها Dorset در ۱۹۰۲ محیط تخم مرغ داری را که بنام خود او معروف شده ساخت. پتراگناتی در ۱۹۲۶ با استفاده از نتایج حاصله بوسیله Dorset محیط تخم مرغی محتوی شیرنشاسته سیب زمینی پپتن و گلیسیرین و آب مقطر بکار برد و با افزایش مالاشیت گرین از آلودگی محیط بوسیله میکرب‌های دیگر جلوگیری نمود. Kuhn نخستین کسی بود که در سال ۱۸۹۲ مواد معدنی را در محیط کشت بکاربرد و بعدها Proskauer و Beck از موادی مانند لوسین - تیروزین - اسپاراژین و بعضی قندها در تهیه محیط استفاده کردند. ارنست لونشتین در سال ۱۹۳۰ فرمول محیط جدیدی را که بنام خود او معروف است برای کشت میکرب سل معرفی کرد. این محیط که محتوی مواد مختلف معدنی - اسپاراژین - گلیسیرین و پودر سیب زمینی میباشد و بعدها جانسن با حذف پودر نشاسته سیب زمینی آنرا تکمیل کرد، امروزه بنام محیط لونشتین - جانسن مورد استفاده آزمایشگاه‌های باکتریولوژی سل در سراسر جهان قرار دارد.

قبل از لونشتین و بعد از آن در طی سال‌های متعددی در گوشه و کنار جهان محیط‌های مختلفی از طرف میکرب شناسان برای کشت میکرب سل پیشنهاد شد که بعضی از آنها بسیار جالب بود.

هدف جمله میکرب شناسان از اینکار این است که محیطی برای کشت این میکرب پیدا شود که هم دارای سرعت رشد باشد و هم ساده تر تهیه شود زیرا همانطور که میدانیم میکرب سل باسیل پرتوقعی است که برای رشد خود به مواد مختلفی نیاز دارد و در عین حال در مقایسه با سایر میکربها بسیار دیر رشد است و گاهی در محیطهای کشت شش تا هشت هفته طول میکشد تا کلنیهای قابل رؤیتی بوجود آید.

مطالعات و مقایسه نتایج حاصله انواع مختلف محیطها از دوره امکانست صورت گیرد: اول آنکه مقدار بسیار کمی از کلنیهای سیکریبی را در غلظت های متفاوت بر روی محیطها کشت دهیم و نتایج حاصله را از روی تعداد کلنیها - بزرگی و کوچکی آنها و سرعت رشد مقایسه کنیم. دیگر آنکه از روی مواد بیماری زا که احتمال وجود میکرب را در آن میدانیم مستقیماً بر روی محیطهای کشت بپریم. ما در مطالعات خود بهر دو طریق متوسل شده ایم.

مطالعه متابولیسم مواد مختلف بوسیله میکوبا کتریومها و پیدا کردن مقدار مورد نیاز هر یک از مواد مختلف آلی و معدنی برای رشد میکرب سل کاری است که در سالیان اخیر مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است. دهها دانشمند درباره نیازمندیهای میکرب سل به مواد ازته - مواد چرب - مواد آلی و معدنی و ترکیباتی مانند مواد فسفره - مواد کربنی - مواد قندی و غیره مطالعه کرده و نظریاتی بیان داشته اند که خلاصه این مطالعات در کتاب بسیار ارزشمند *The Bacteriology of Tuberculosis* تألیف Egon Darzin جمع آوری گردیده است.

میکرب سل برای رشد خود به مواد معدنی و آلی مانند فسفر - پتاسیم - منیزیم - مواد ازته و ویتامینها - مواد چربی - گلیسیرین احتیاج دارد بعضی از این مواد بطور اساسی برای رشد لازم است (مواد فسفره) و بعضی دیگر بعنوان عوامل رشد (Growth Factor) بکار میروند و وجود مقدار بسیار کم آن (Trace Elements) در محیط کشت سبب رشد میکرب سل میگردد.

ما برای آنکه تأثیر وجود و یا عدم هر یک از عناصر تشکیل دهنده محیط لوشترین را در رشد میکرب سل بدانیم به ساختن شش محیط مختلف مبادرت کردیم و در هر یک از آنها یکی از مواد متشکله فرمول لوشترین را حذف کردیم. تجربه نشان داده است که در محیط فاقد پتاسیم دی هیدروژن فسفات (PO_4H_2K) و محیط فاقد گلیسیرین رشد میکرب بسیار کم شده و حال آنکه حذف موادی مانند اسپاراژین - نشاسته سیب زمینی - سولفات دو منیزی و سترات دو منیزی

کوچکترین تغییری در تعداد کلنی‌ها - سرعت و زمان رشد و سایر خصوصیات بیولوژیک میکرب نداده است. تجزیه سواد سفیده و زرده تخم مرغ وجود عناصری از قبیل کلرور دوسدیم - کلرور دوپتاسیم - پتاس آهک - منیزی - اکسیددو فر - اسید کربنیک و سیلیس را در ترکیبات سفیده و مواد بالا بوادی مانند لسیتین و Ovovittelin و Ovulucetin کلسترول - کراتین آنزیمها و ویتامین های A و B و C و D را در زرده تخم مرغ نشان داده است. این مواد بمقدار کم در زرده تخم مرغ میتواند جانشین مواد حذف شده از فرمول لوشترین باشد زیرا میکرب سل غالباً این مواد را بطور (فاکتور رشد) مورد استفاده قرار میدهد. ما برای آنکه از صحت کار خود مطمئن شویم علاوه برآنکه تعداد زیادی از کلنی های میکربی انواع مختلف میکوبا کتریوم های (نوع انسانی - گاوی - - پرندگان - آتپیک ها و ساپروفیت ها) را روی محیط های فوق کشت داده و مقایسه نموده ایم تعداد زیادی مواد بیماری زا مانند خلط - مدفوع - مایع نخاع - ادرار - شیره معدی را نیز با یک روش واحد در محیط های مزبور کشت داده و نتایج حاصله را مقایسه کرده ایم و هم چنین آزمایشهای تشخیص افتراقی و بیوشیمی روی کلنی های حاصله در محیط های مختلف انجام داده و با محیط ایران مقایسه کرده ایم. و اینک فرمول دو محیط لوشترین و محیط ایران را مقایسه میکنیم.

پتاسیم	محیط لوشترین	محیط ایران
ففات منو بازیک	۴/۴ گرم	۶/۶ گرم
سولفات منیزیم	۰/۲۴	—
سیترات منیزیم	۰/۶	—
آسپاراژین	۳/۶	—
گلیسرین	۱۲ سانتیمتر مکعب	۶ سانتیمتر مکعب
آب مقطر	۶۰۰	۳۰۰
نشاسته سیب زمینی	۳۰ گرم	—
محلول تخم مرغ	یک لیتر	یک لیتر
محلول یک درصد مالاشیت گرین	۴ سانتیمتر مکعب	محلول ۲ درصد ۱۵ سانتیمتر مکعب

ماحصل این تجربیات که بصورت جزوهای از طرف اداره کل امور آزمایشگاههای وزارت بهداشت منتشر گردیده است آنستکه این محیط میتواند در کارهای آزمایشگاهی بخصوص در مراکز کنترل سل برای کشت میکرب سل مورد استفاده قرار گیرد.

References

- 1- Maurice, S. & Tarshis. (1963) «Gradwohl's clinical Laboratory methods diagnosis.», Vol. I, P. 493. The C. V. Mosby Company, Saint Lavis U. S. A.
- 2 - Stonebrink, B. (1961) A new medium for the cultivation of Mycobacterium Tuberculosis., «Selected papers The Royal Netherlands Tuberculosis», Vol. 2, p. 493.
- 3 - Eidus, L. & Maniar, A. C. and, Diena, B. B. and Wallace, R. (1961). Glycerol utilization by Mycobacteria. 19 January, P. 229.
- 4 - Underfund, R. C. and Solo, . Torovsky, M. (May 1964). bacteriological proceedings., Abstracts the 64 th Annual meeting, p. 58.
- 5 - Stonebrink, B. (1957). Tubercule bacilli and pyruvic acid., proceeding of the tuberculosis reaserch council, No. 44 Netherland, P. 67.
- 6 - Breed, R. & Murry, E. G. D. & Smith N. (1957). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology P. 696. The Williams & Wilkins Company, U. S. A.
- 7 - Maurice, M., Tarshis, S., (1963) Gradwohles clinical Laboratory Methods diagnosis Vol. I P. 586.
- 8 - Dubos, R. J. and Davis, B. D., (1946), J. Exa. Med., 83, P. 409.