نامهٔ دانشکدهٔ پزشکی
«تهران»

شمارهٔ هفتم ازسال بیست وسوم   فروردین‌ماه ۱۳۴۵

جستجوها و گردآوریهای علمی

دکتر ابوالحسن ظریفی *   دکتر شاهین رحمان زاده **

یك محیط غذایی نوین برای کشت میکرب سل

نزدیک به پنجسال است که در آزمایشگاه رفرانس سل برای ساده‌تر کردن محیط لونشتین مطالعاتی صورت میگیرد. نتیجه این مطالعات با معرفی فرمول (محیط ایران) اینک درمعرض قضاوت همکاران میکرب شناس وآزمایشگاهی قرارمیگیرد نتیجه‌مطالعات ما برروی تعداد زیادی ازمواد 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 میکرب سل راکشف کرد خود اولین موفقیت را در کشت‌میکرب و جداکردن کلنی میکربی‌بدست آورد. کخ ازسرم خون گوسفند ویا گوساله که در حدود امکان کاملاً پاکیزه گرفته شده بود استفاده کرد وسرم‌های مزبور را در لوله‌های آزمایش تقسیم کرده و پنبه‌ای بدهانه آن گذاشت و سپس مدت شش‌روز وهرروز یکساعت آنها را درحرارت ۵۸ درجه قرار داد و درروز ششم سرم‌ها را برای چند ساعت درحرارت ۶۵ درجه گذاشت تا منعقد شده و سفت گردد، دراین حالت سرم‌ها رنگی کهربائی بخود گرفته و شفاف میباشند.

---

* رئیس آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداری

** تکنولوژیست اداره آزمایشگاه رفرانس

کخ از نودول های سلی حیواناتی که ازسل مرده بودند برروی این محیط کشت داده و لوله را درحرارت ۳۷ تا ۳۸ درجه قرار میداد ودرهفته دوم کلنی‌های میکربی را مشاهده مینمود .

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

در ۱۸۸۵ نوکارد (Nocard) قبل ازانعقاد سرم خون به‌آن مقداری پپتن قند واملاح معدنی اضافه کرد ودراین محیط سل پرندگان را کشت داد. پنجسال پس ازکشف میکرب سل Nocard - Roux دریافتند که افزایش چندقطره گلیسیرین به محیط کشت رشد میکرب را زیاد میکند وسپس درتجربیات بعدی باافزودن ۶ تا ۸ درصد گلیسیرین به‌محیط آبگوشت معمولی موفق شدند درطی ۸ تا ۱۰ روز رشد بسیار قابل ملاحظه‌ای بدست آورند. کشت میکرب سل درمحیط سیب زمینی برای اولین بار بوسیله Esmarch (۱۸۸۷) بیان گردید . Pawlowsky در۱۸۸۸ با استفاده از ورقه های سیب زمینی گلیسیرین‌دار موفق شد رشد بسیار زیادی از میکرب سل را بدست آورد . در ۱۸۹۶ ابتدا Capaldi از زرده تخم‌مرغ برای کشت میکرب سل استفاده کرد وبعدها Dorset در ۱۹۰۲ محیط تخم‌مرغ داری راکه بنام خود اومعروف شده ساخت. پتراگنانی در ۱۹۲۶ با استفاده از نتایج حاصله بوسیله Dorset محیط تخم مرغی محتوی شیرنشاسته سیب زمینی پپتن وگلیسیرین و آب مقطر بکار برد و با افزایش مالاشیت گرین ازآلودگی محیط بوسیله میکرب‌های دیگر جلوگیری نمود. Kuhn نخستین کسی‌بود که‌درسال ۱۸۹۲ موادمعدنی‌را درمحیط کشت بکاربرد وبعدها Proskauer و Beck ازموادی‌مانند لوسین - تیروزین - اسپاراژین و بعضی قندها در تهیه‌محیط استفاده کردند. ارنست‌لونشتین درسال ۱۹۳۰ فرمول محیط جدیدی‌راکه بنام خود او معروف‌است برای کشت‌میکرب سل معرفی کرد. این محیط که محتوی مواد مختلف معدنی - اسپاراژین- گلیسیرین و پودر سیب‌زمینی میباشد وبعدها جانسن با حذف پودر نشاسته سیب‌زمینی آنرا تکمیل کرد، امروزه بنام محیط لونشتین - جانسن مورد استفاده‌آزمایشگاههای باکتریولوژی سل درسراسر جهان قرار دارد.

قبل‌ازلونشتین وبعد ازآن‌درطی سالیان متمادی‌درگوشه‌وکنارجهان محیط‌های مختلفی ازطرف میکرب شناسان برای کشت میکرب سل‌پیشنهاد شد که بعضی‌ازآنها بسیار جالب‌بود.

هدف جمله میکرب شناسان از اینکار این است که محیطی برای کشت این میکرب پیدا شود که هم دارای سرعت رشد باشد وهم ساده‌تر تهیه شود زیرا همانطورکه میدانیم میکرب سل باسیل پرتوقعی است که برای رشد خود به مواد مختلفی نیاز دارد ودرعین‌حال درمقایسه باسایر میکرب‌ها بسیار دیر رشد است وگاهی درمحیط‌های کشت شش تا هشت هفته طول میکشد تا کلنی‌های قابل رؤیتی بوجود آید.

مطالعات ومقایسه نتایج‌حاصله انواع مختلف محیط‌ها ازدوراه ممکنست صورت گیرد:

اول‌آنکه مقداربسیارکمی ازکلنی‌های میکربی‌رادرغلظت‌های متفاوت برروی محیط‌ها کشت دهیم و نتایج حاصله را از روی تعداد کلنی‌ها - بزرگی وکوچکی آنها وسرعت رشد مقایسه کنیم. دیگر آنکه از روی مواد بیماری‌زا که احتمال وجود میکرب را درآن میدهیم مستقیماً برروی محیط‌های کشت ببریم.

ما درمطالعات خود بهر دوطریق متوسل شده‌ایم.

مطالعه متابولیسم مواد مختلف بوسیله میکوباکتریوم‌ها و پیداکردن مقدار مورد نیاز هریک از مواد مختلف آلی‌ومعدنی برای رشد میکرب‌سل کاری است که درسالیان اخیرمورد توجه بسیاری ازدانشمندان قرارگرفته است. دهها دانشمند درباره نیازمندیهای میکرب سل به مواد ازته - مواد چرب - موادآلی و معدنی و ترکیباتی مانند مواد فسفره - مواد کربنی- مواد قندی وغیره مطالعه‌کرده و نظریاتی بیان داشته‌اند که خلاصهٔ این مطالعات در کتاب‌بسیارباارزش The Bacteriology of Tuberculosis تألیف Egons Darzin جمع‌آوری گردیده است.

میکرب سل‌برای رشد خود به‌مواد معدنی و آلی مانند فسفر - پتاسیم - منیزیم - مواد ازته و ویتامین ها - موادچربی - گلیسیرین احتیاج دارد بعضی ازاین مواد بطور اساسی برای رشد لازم است (مواد فسفره) و بعضی دیگر بعنوان عوامل رشد (Growth Factor) بکار میرود و وجود مقدار بسیارکم آن (Trace Elements) درمحیط کشت سبب رشد میکرب سل میگردد.

ما برای آنکه تأثیروجود ویاعدم هریک از عناصرتشکیل دهنده محیط لونشتین را در رشد میکرب‌سل بدانیم به ساختن شش محیط مختلف مبادرت کردیم و درهریک از آنهایکی ازمواد متشکله‌فرمول لونشتین راحذف کردیم. تجربه نشان داده است که درمحیط فاقدپتاسیم دی‌هیدرژن فسفات (PO_4H_2K) ومحیط فاقد گلیسیرین رشدمیکرب بسیارکم شده وحال آنکه‌حذف موادی مانند‌اسپاراژین - نشاسته سیب زمینی-سولفات دومنیزی ومیترات دومنیزی

کوچکترین تغییری درتعداد کلنی‌ها - سرعت و زمان رشد و سایر خصوصیات بیولوژیک میکرب نداده است. تجزیه مواد سفیده و زرده تخم مرغ وجود عناصری از قبیل کلرور دوسدیم - کلرور دوپتاسیم - پتاس‌آهک - منیزی - اکسیددوفر - اسید کربنیک و سیلیس را در ترکیبات سفیده و مواد بالا موادی مانند لسیتن و Ovovittelin و Ovolucetin و کلسترول - کراتین آنزیمها و ویتامین‌های A و B و C و D را در زرده تخم مرغ نشان داده است. این مواد بمقدار کم در زرده تخم‌مرغ میتواند جانشین مواد حذف شده از فرمول لونشتین باشد زیرا میکرب سل غالباً این مواد را بطور (فاکتور رشد) مورداستفاده قرارمیدهد.

ما برای آنکه ازصحت کار خود مطمئن شویم علاوه برآنکه تعداد زیادی ازکلنی‌های میکربی انواع مختلف میکوباکتریوم‌های (نوع انسانی - گاوی - - پرندگان - آتیپیک‌ها و ساپروفیت‌ها) را روی محیط‌های‌فوق کشت‌داده ومقایسه نموده‌ایم تعدادزیادی موادبیماری‌زا مانند خلط - مدفوع - مایع نخاع - ادرار - شیره معدی را نیزبا یک‌روش واحد درمحیط‌های مزبور کشت داده ونتایج حاصله را مقایسه کرده‌ایم و همچنین آزمایشهای تشخیص افتراقی و بیوشیمی روی کلنی‌های حاصله درمحیط‌های مختلف انجام داده وبا محیط ایران مقایسه کرده‌ایم. واینک فرمول دومحیط لونشتین و محیط ایران را مقایسه میکنیم.

	محیط لونشتین	محیط ایران
پتاسیم فسفات منوبازیک	۲/٤گرم	۷/٦گرم
سولفات منیزیم	۰/۲٤ »	—
سیترات منیزیم	۰/٦ »	—
آسپاراژین	۳/٦ »	—
گلیسیرین	۱۲ سانتیمتر مکعب	٦ سانتیمترمکعب
آب مقطر	٦۰۰ »	۳۰۰ »
نشاسته سیب زمینی	۳۰ گرم	—
محلول تخم مرغ	یک لیتر	یک لیتر
محلول یک درصد مالاشیت گرین	٤۰ سانتیمتر مکعب	محلول ۲ درصد ۱۵ سانتیمتر مکعب

ماحصل این تجربیات که بصورت جزوه‌ای ازطرف اداره کل امور آزمایشگاههای وزارت بهداری 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.