مجله دانشکده پزشکی تهران
شماره هفتم و هشتم ـ فروردین‌واردیبهشت ۲۵۳۶ صفحه ۱۹۶

محیط کلنر (۱) (KELNER) برای تشخیص دیفتری

دکتر کیهانبانو لشگری* دکتر ناهید رضوی** با همکاری فنی توران میرعمادی ***

در بیماری دیفتری تشخیص و درمان سریع الزامی است. زیرا از طرفی آنتی‌بیوتیک برسم میکرب تأثیر ندارد و از طرف دیگر، تجویز سرم حاوی ضد سم، تنها سم جاری در خون را خنثی نمود، و بر سمومی که روی بافتها تثبیت گردیده‌اند بی‌اثر میباشد. بعلاوه تجویز سرم ضد سم نیز مشکلاتی دارد و نمیتوان بهر بیمار مشکوکی فورا" و براحتی سرم تزریق نمود.

البته علائم بالینی در بعضی موارد پزشک با تجربه را بموقع آگاه میسازد، معذالک در بیشتر اوقات و برای تشخیص قطعی فقط یک راه وجود دارد و آن تشخیص آزمایشگاهی است. و در این مورد گرچه میتوان در فاصلهٔ چند دقیقه از حلق بیمار گسترش تهیه نمود ولی هرگز نمیتوان بدین طریق پاسخ قطعی داد، زیرا شکل ظاهری میکرب دیفتری با بسیاری از میکربها و بخصوص باسیلهای شبیه دیفتری اشتباه میشود.

بدلیل اهمیتی که سرعت تشخیص و درمان برای نجات بیماران دارد، سالهاست که باکتریولوژیست‌ها جهت تهیه محیط کشتی که بتواند کرینه باکتریوم دیفتریه را سریعا" رشد داده و از سایر میکربها جدا سازد، کوششهای بسیار نموده‌اند تا شاید پزشگ را در مسئولیت خطیری که عهده‌دار گردیده یاری دهند.

تاکنون محیطهای کشت متعددی برای تشخیص کرینه باکتریوم دیفتریه تهیه گردیده ولی هیچیک کمال مطلوب نبوده است. مهمترین محیطهائی که معمولا" در آزمایشگاهها استفاده میشوند عبارتند از:

۱ ـ محیط سرم منعقده لفلر ۲ ـ محیط تلوریت دوپتاس
۳ ـ میحط هویل (۱) ۴ ـ محیط تینس دیل (۲)

که بترتیب عیوب هریک بررسی میشود.

۱ ـ روی محیط لفلر، اغلب میکربهای فلورنرمال حلق رشد مینمایند. از طرفی این مسئله که رشد میکرب پس از ۱۰ ـ ۱۲ ساعت بر روی محیط میتواند دلیلی برای تشخیص کرینه باکتریوم دیفتریه باشد، صحیح نیست، زیرا عملا" در این فاصله زمانی رشد میکربهای فلورنرمال حلق و میکربهای پاتوژن مانند استرپتوکوک و پنوموکوک نیز امکان‌پذیر است. بدین ترتیب زمان مزبور اهمیتی از نظر جداسازی میکرب دیفتری از سایر میکربها ندارد. مسئله دیگر اینکه، بر روی محیط لفلر کلنی‌های مشخص و مجزا ایجاد نمیگردد. بعلاوه تهیه سرم برای محیط لفلر مشکلاتی داشته و قیمت آن نیز بسیار گران است.

---

x و xx و xxx گروه میکربشناسی و ایمونولوژی دانشکده علوم پایه پزشکی دانشگاه تهران

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-20]

۲ ــ نقص مهم محیط تلوریت دوپتاس هم تأخیر رشد میکرب دیفتری بر روی آن است (تا قبل از ۴۸ ساعت جواب منفی ارزش ندارد).

۳ ــ در سال ۱۹۴۱ هویل محیط ساده‌ای، متشکل از خون لیز شده و تلوریت و تریپتی کیس سوی آگار تهیه نمود. ولی استفاده از این محیط در تشخیص و بررسی کرینه باکتریوم دیفتریه، به متخصصین کاملا" مجرب نیاز دارد که تنها در آزمایشگاههای تشخیص اختصاصی دیفتری امکان‌پذیر میباشد.

۴ ــ در سال ۱۹۴۷ تینس دیل، محیط سیستین تایوسولفیت تلوریت آگار را معرفی نمود که استفاده از این محیط در هر آزمایشگاهی ممکن است. عیب این محیط طرز تهیه آن است که بسیار مشکل و پیچیده میباشد و تازه پس از این مشکلات، بیش از ۳ ــ ۴ روز در یخچال قابل نگهداری نیست.

بیلینگس[۳] در سال ۱۹۵۶ تغییراتی در جهت ساده نمودن محیط تینس دیل انجام داد معذالک تهیه محیط تغییر یافته تینس دیل نیز برای انجام کارهای روزمره آزمایشگاهی مشکل و پیچیده است. عیب دیگر این محیط این است که نمیتوان میکربها را از آن بمحیط‌های دیگر پاساژ داد و بدین ترتیب تهیه کشت مجدد، در موارد لزوم، با اشکال روبرو میشود.

در سال ۱۹۷۱ ژلارد[۴] مقایسه‌ای بین دو محیط "تینس دیل تغییر یافته" و "هویل" انجام داد و در این تجسسات محیط دوم را ساده‌تر و ارجح دانست و تنها اشکال را همان ضرورت افراد متخصص ذکر نمود.

از بررسی نتایج فوق و مشاهدهٔ تحقیقات دیگران این حقیقت آشکار میشود که تاکنون محیط مناسبی برای شناخت و جدا کردن باسیل دیفتری بدست نیآمده، باین جهت، در آزمایشگاه میکربشناسی دانشکده علوم پایه پزشکی دانشگاه تهران، در صدد برآمدیم محیطهای بسیار ساده‌ای برای کشت میکرب دیفتری تهیه نمائیم، تا در عین سادگی از لحاظ سرعت رشد و کمک به تشخیص سریع نسبت به محیط‌های کشت متداول، مزیت‌هائی داشته باشد.

مواد و روشها

برای تهیه محیط کشت دیفتری از گرد خشک شدهٔ حبوباتی نظیر لپه ــ نخود ــ عدس ــ لوبیاچیتی ــ لوبیاقرمز و ماش، بعنوان مادهٔ اصلی استفاده گردید. در ابتدا مقادیر مختلف مورد بررسی قرار گرفت، بدین ترتیب که گرد هریک از حبوبات نامبرده را به نسبت یک ــ دو ــ سه ..... و ده گرم به صد سانتیمترمکعب آب مقطر افزوده و در ظرف سربسته حدود پانزده دقیقه در حرارت ملایم (همراه با حرکت مختصر ظرف) جوشانیده تا بطور نسبی حل شود. سپس آنرا صاف نموده، حجم حاصل را مجددا" به صد سانتیمتر مکعب میرسانیم. بعد چهار گرم تریپتی کیس سوی آگار به حاصل آن اضافه میکنیم. PH باید کنترل شود که در تمام نسبتها و در تمام انواع معمولا" در حد مطلوب ۶/۹ تا ۷/۲ میباشند. پس از آن محیط را بمدت پانزده دقیقه در حرارت ۱۲۱ درجه زیر ۱۵ پوند فشار در اتوکلاو استریل میکنیم. پس از اتوکلاو وقتی حرارت محیط‌ها به حدود ۴۵ درجه رسید سه سانتیمترمکعب از محلول یک‌درصد تلوریت پتاسیم، در شرایط استریل، بهریک از آنها، اضافه میکنیم. درپتری دیش‌ها ریخته، از هر محیط نمونه‌ای جهت کنترل بمدت ۲۴ ساعت در اتو میگذاریم. در زیر فرمول بهترین غلظت محیط‌های مزبور و خلاصهٔ روش تهیه نوشته میشود.

گرد خشک شدهٔ یک از حبوبات مذکور	۴ گرم
تریپتی کیس سوی آگار	۴ گرم
آب مقطر	۱۰۰سانتیمترمکعب

۱۵ دقیقه جوشانیده، صاف میکنیم، حجم را مجددا" به ۱۰۰ سانتیمترمکعب میرسانیم.

۱۵ دقیقه اتوکلاو

تلوریت پتاسیم ۱%	۳ سانتیمتر مکعب

محیط‌ها را باید در یخچال گذاشت. یادآور میشویم در حرارت اطاق نیز مدتها بدون تغییر باقی میمانند. پس از کنترل بر روی هریک از محیط‌های مزبور کورینه باکتریوم دیفتریه: گونه‌های گروایس، اینترمدیوس، و مـی تیس و دیفتروئیدها (انواع هوفمانی وگزروزیس) ومیکربهائی مانند استرپتوکوک، پنوموکوک و استافیلوکوک طلائی کشت داده شد.

جهت سوشهای دیفتری از گونه‌های استاندارد موجود

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-20]

در آزمایشگاه میکربشناسی دانشکده پزشکی علوم پایه پزشکی استفاده گردید.

بحث و نتیجه

کورینه باکتریوم دیفتریه، انواع گراویس، اینترمدیس می‌تیس و کرینه باکتریوم هوفمانی و گزروزیس و استرپتوکوک، استافیلوکوک طلائی و پنوموکوک روی محیط‌های تهیه شده از حبوبات مختلف مانند لپه، نخود، لوبیاچیتی ــ لوبیا ــ قرمز و ماش و محیط‌های سرم منعقدهٔ لفلر و تلوریت دوپتاس کشت داده شدند. بهترین غلظت برای رشد باسیل دیفتری، مقادیر چهار گرم و پنج گرم و زمان رشد تا دیدن کلنی‌های واضح بین ۱۲ ــ ۱۶ ساعت تعیین گردید.

روی تمام محیط‌های مزبور (تهیه شده از حبوبات)، انواع سه‌گانه باسیل دیفتری قابل تشخیص میباشند و در مقایسه‌ای که انجام گرفت، جوابها تا حدودی بــر روی محیط‌های حاوی عدس، لوبیاچیتی، و لوبیای قرمز بهتر بودند. از طرف دیگر تشخیص رنگها و پیگمان‌هــا روی محیط‌های روشن‌تر نظیر نخود و لپه، بسیار جالب توجه و سریع میباشد. معذالک بطور کلی تفاوت قابل توجهــی (تاکنون و با امکانات موجود)، بین هیچیک از این حبوبات، از نظر رشد باکتری وجود ندارد و هریک بخوبی قابل استفاده میباشند.

مزایا و اختصاصات محیط‌های مذکور بقرار زیر است:

۱ ــ تهیه محیط بسیار ساده است.

۲ ــ مواد اصلی محیط بآسانی قابل تهیه است. در حالیکه تهیه موادی نظیر سرم مشکل میباشد.

۳ ــ قیمت حبوبات در مقایسه با سرم خیلی ارزانتر میباشد.

۴ ــ بر روی این محیط میکرب دیفتری را در مدتی کوتاه (۱۲ ــ ۱۶ ساعت) میتوان جدا نمود.

۵ ــ دیفتروئیدها در زمان دیرتری رشد مینمایند (بعد از ۲۰ ساعت) این مسئله در جدا کــردن اولیه کورینــه باکتریوم دیفتریه از دیفتروئیدها بسیار اهمیت دارد.

۶ ــ در رنگ‌آمیزی آلبرت، دانه‌های متاکروماتیــک بخوبی قابل تشخیص میباشند.

۷ ــ کلنی‌های سوش‌های گراویس، اینترمدیوس و می‌تیس همگی براق سیاه میباشند. اندازهٔ آنها در حدود ۱ ــ ۲ میلیمتر میباشد. در حالیکه کلنی‌های کورینه باکتریــوم هوفمانی روی محیط‌های فوق کاملا" قهوه‌ای رنگ میباشد (این رنگ قهوه‌ای بر حسب رنگ محیط از قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره تفاوت میکند). کلنی‌های گزروزیس گرچــه سیاهرنگ میباشند ولی با انتشار پیگمان قهوه‌ای جالــب توجهی ــ بخصوص در بین خطوط ــ متشکل از کلنی‌های بهم چسبیده و تا حدودی در اطراف کلنی‌های ایزوله، وضعیت خاصی برای تشخیص ایجاد نموده کلید شناسائی ساده و مهمی را بدست میدهد. وجود این پیگمان حتی از پشت پتری دیش‌ها و در نور معمولی قابل تشخیص و بررسی است ــ (روی محیط‌های روشن‌تر نظیر لپه و نخود، با وضوح بیشتر و در سایر محیط‌ها با کمی دقت و تجربه).

۸ ــ کلنی‌های استافیلوکوک نیز گرچه کاملا" سیاه و براق میباشند و رشد سریعی هم دارند (همپایهٔ کورینــه باکتریوم)، ولی اندازهٔ آن‌ها بسیار کوچک و غالبا" کمتراز یک میلیمتر بوده، بصورت گردی شکل یکنواختی روی محیط پراکنده می‌گردند.

۹ ــ استرپتوکوک و پنوموکوک روی محیط‌های فوق رشد نمیکنند.

۱۰ ــ پاساژ میکرب از این محیط‌ها بر روی محیط‌های دیگر بآسانی امکان‌پذیر است (برخلاف تینس دیل تغییر یافته).

۱۱ ــ محیط‌های فوق تا چندین روز در حرارت اطاق و مدتها در یخچال قابل نگهداری میباشند.

با در نظر گرفتن خصائص قابل توجه فوق و اهمیت تشخیص سریع بیماری دیفتری، این محیط‌ها را بنام (محیط کلنر[1]) برای کشت کورینه باکتریوم دیفتریه، پیشنهــاد میکنیم.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-20]

References

1. Hoyle, Lancet, 1, 175. 1941.
2. Tinsdale G, F.W. 59, 461. 1947
3. Billings, E. Thesis univ. Michigan. 1956.
4. Jellard. C.H. J. Med. Microbiology, 4-366-369. 1971.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-20]