

قدرت نگهداری و پیریون کلرا

در دو محیط نگهدارنده دریا نمک و کاری بلر *

مقدمه: در طی اپیدمی وبای التور که در سال ۱۳۴۴ در ایران روی داد یکی از نکات قابل توجه روش ارسال نمونه از نقاط دوردست به آزمایشگاه بود. در ابتداء اپیدمی نمونه های مدفوع بطور مستقیم از مناطق روستائی و دوردست به آزمایشگاههای مختلف کشور ارسال میگردد و کمی بعد از آب پیتون دار قلیائی برای اینکار استفاده گردید.

در مورد اول غالباً بعلت آبکی بودن مدفوع بیماران امکان بوجود آمدن آلودگیهای وجود داشت و یا آنکه بعلت خشک شدن نمونه نتایج حاصل رضایت بخش نبود.

در مورد دوم یعنی استفاده از آب پیتون دار قلیائی این اشکال وجود داشت که و پیریون کلرا و التور حداکثر در ظرف شش تا هشت ساعت در این محیط به رشد کامل میرسد و پس از آن میکروب های دیگر موجود در روده رشد نموده و بسبب جلوگیری از رشد و پیریون هاسیشود. پس از مدت کوتاهی از محیط نگهدارنده دریا نمک بعنوان محیط ارسال استفاده گردید و تاکنون نیز از این محیط برای ارسال و حمل و نقل نمونه از مراکز روستائی به آزمایشگاهها و یا آزمایشگاه های محلی به آزمایشگاه رفرانس استفاده میشود.

نمونه مدفوع بوسیله میله سرپنبه پیچیده در داخل لوله های در پیچ سختی این محیط قرار داده شده و در جعبه های چوبی به آزمایشگاه ارسال میگردد. مشکلاتی که حمل و نقل محیط مایع معمولاً برای آزمایشگاهها بوجود میآورد ما را بر آن داشت که اولاً بروی محیط های مختلفی که بعنوان محیط های نگهدارنده و پیریون معرفی شده اند مطالعاتی انجام دهیم و ثانیاً مدتی را که و پیریون کلرا و یا التور می تواند در چنین محیط هائی زندگی کرده و بر روی محیط کشت خواص با کتریولوژیک و آنتی ژنیک خود را ظاهر سازد معلوم نمائیم. بروی این اصل دو محیط دریا نمک و کاری بلر بعنوان دو محیط نگهدارنده انتخاب گردید.

هنگام شروع این مطالعه تمام محیط و مواد آزمایشی بدو دسته تقسیم گردید یک سری از آن به Atlanta Georgia Communicable Disease Center ارسال شد که مورد مطالعه قرار گیرد

ودسته دیگر در آزمایشگاه رفرانس مورد آزمایش قرار گرفت و برای سهولت کار محیط کاری- بلریاعلامت (CIB) مشخص گردیده است .

مواد و روش کار

۱- روش تهیه محلولهای نگاهدارنده.

الف - محلول دریانمک قلیائی (Alkaline Sea Salt)

این محلول بوسیله Venkatraman وراما کریشنان Rama Krishnan (۱) معرفی شده و فرمول آن بقرار زیر است:

۲۰ گرم	نمک ناخالص دریائی
۵ گرم	پپتون
یک لیتر	آب مقطر

نمک و پپتون را در آب حل کرده و PH محیط را به ۸/۶ تا ۸/۸ میرسانیم و در شیشه های در بیج بمقدار ۷ سانتی متریتر معکب در هر لوله پر کرده و در مدت یک ربع در ۱۲ درجه سانتیگراد (۱۵ پوند فشار) اتوکلاو میگذاریم .

ب - محیط کاری بلر (Carry Blair)

این محیط بوسیله Eugene B. Blair (۲) معرفی شده است و بعقیده آنها این محیط برای نگهداری سالمونلا و شیگلا و اشرشیا کلی و ویبریون میتواند مورد استفاده قرار گیرد . فرمول تهیه آن بقرار زیر است :

۱/۵ گرم	سدیم تیوگلیکولات
» ۵	فسفات دی سدیک
» ۵	کلرور سدیم
» ۵	آگار آگار
۹۹۱ سانتیمتر معکب	آب مقطر

مواد فوق را در یک ارلن میریزیم باید حرارت داد تا آگار آگار کاملاً حل شود سپس آنرا سرد نموده تا درجه حرارت به ۵۰ برسد سپس مقدار ۹ سانتیمتر معکب از محلول یک درصد کلرور دوکلسیم که تازه تهیه شده باشد بان افزوده و خوب تکان میدهیم تا مخلوط شود و سپس PH محیط را به ۸/۴ میرسانیم در لوله های دریج از نوع Bijou Bottle بمقدار ۷ سانتیمتر معکب در هر لوله تقسیم کرده و در لوله ها را کمی شل میکنیم در اتوکلاو میگذاریم «صد درجه بمدت ۵ دقیقه» سپس درب لوله ها را خوب بسته محیط را در حرارت اتاق آزمایشگاه قرار میدهیم «قرار دادن محیط در یخچال سبب رسوب فسفاتها میگردد» .

۲- محیط‌های گزینی که برای کشت مورد استفاده قرار گرفته است :

آب پیتون‌دار قلیائی

کلورسدیم ۱۰ گرم

پیتون ۱۰ »

آب مقطر ۱ لیتر

PH رابطه ۸/۶ تا ۹ رسانده و پس از تقسیم در لوله‌های آزمایشی و بمدت یک‌ربع در حرارت ۱۲۱ درجه اتوکلاو می‌گذاریم.

محیط سفت منصور (Mansour)

محیط سفت منصور شامل دو قسمت :

اول - قسمت بازیشرح زیر:

تریپتوگاز ۱۰ گرم

کلورسدیم ۱۰ »

تروکولات سدیم ۵ »

کربنات سدیم ۱ »

ژلاتین ۳۰ »

آگار آگار ۱۵ »

آب مقطر ۱ لیتر

ابتدا آگار آگار را به آب مقطر اضافه کرده و بیجوشانیم تا خوب حل شود سپس ژلاتین را افزوده و حل می‌کنیم و بعد بقیه مواد را اضافه می‌کنیم.

PH این محیط را پس از اینکه خوب حل شد به ۸/۸-۸/۶ رسانده، در شیشه ۱۰ میلی لیتری تقسیم نموده و ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه حرارت و ۱۵ پانند فشار استریل مینمائیم.

دوم - محلول تلوریت پتاسیم ۱٪ استریل که ۰/۱۵ میلی لیتر از آن را به هر صد میلی لیتر از محلول فوق اضافه نموده و در تشتک‌های استریل تقسیم مینمائیم.

محیط جامد TCBS تغییر یافته

مقدار ۹۱/۶ گرم از پودر TCBS تغییر یافته را در یک لیتر آب مقطر استریل بکمک حرارت حل کرده و در تشتک‌های استریل تقسیم مینمائیم.

(محیط TCBS تغییر یافته سه ماه همراه با محیط منصور و TCBS ژاپنی (Eiken) برای

کشت بکار رفت و با آنها مقایسه شد و چون نتیجه بسیار رضایتبخش بود پس از آن فقط از این محیط و محیط منصور استفاده شد.

روش جمع آوری نمونه

از بین ۲۷ بیماری که در دوران اپیدمی التور در دسترس بودند ۳۹ نمونه بدفعات و تاریخهای مختلف انتخاب شدند و تمام نمونه های مدفوع به تناوب بین ۱ الی ۳۹ روز در یخچال ۴ درجه حرارت نگهداری شد و از تمام نمونه های مزبور یک میلیه سرپنبه پیچیده در محیط C.B. ویکی دیگر در محیط دریا نمک کشت شد و لوله های مزبور در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت «باید توجه داشت که بعلمت عدم وجود دستگاه حرارت مطبوع ۴ درجه حرارت آزمایشگاه در طی تقریباً ۸ ماه بین ۱۵ الی ۳۲ درجه نوسان داشته است».

روش آزمایش

از روی نمونه های نگهداری شده در دو محیط دریا نمک و C.B. مجموعاً ۵۳ بار در بین تاریخهای ۱۳۴۴ تا ۳ خرداد ۱۳۴۵ آزمایش بعمل آمد. ابتدا با حلقه پلاتین SWG از روی دو محیط نگهدارنده بر روی آب پپتون دار قلیائی کشت شد و پس از قراردادن در گرمخانه ۳۷ درجه بمدت ۶ ساعت از این محیط بر روی دو محیط سفت منصور و TCBS تغییر یافته کشت داده شد. ومدت ۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شد و سپس آزمایشهای بعدی انجام گرفت.

در فواصل بین ۱۰ آبان تا اول فروردین تقریباً هر دو روز یکبار و پس از آن در فواصل نامعین این کشت انجام گردید. کلیه پرگنه های مشکوک با آنتی سرم پلی والان «از سرم پلی والان ساخت آزمایشگاه فرانس استفاده شد» و آنتی سرم آگاو و اینا با «بروز و لکام» استفاده شد و یکبار کلیه آزمایشهای شیمیائی و کشت بر روی محیط های قندی، آزمایش همولیز و حساسیت در مقابل پلی میکسین B انجام گرفت.

در تمام مواقع کلنی های مشکوک بر روی KIA کشت شد و آگلوتیناسیون مجدد از روی این محیط انجام گرفت. نتایج آگلوتیناسیون نشان داد که سوش بیمار شماره ۴ اینا با بقیه از بیوتا یپ التور آگاو بوده است. نتایج کشت در جدول مربوطه خلاصه شده است.

در این جدول تعداد روزهایی که مدفوع در یخچال نگهداری شده و روزهایی که نتایج کشت آنها بر روی دو محیط تا تاریخ ۳ خرداد مثبت بوده، نشان داده شده است.

از سمت چپ ستون اول شماره ردیف را نشان میدهد.

ستون دوم شماره بیمار و ستون سوم تعداد روزهایی را که مدفوع در یخچال نگهداری

شماره دفتر	شماره بیمار	مدت نگاهداری در یخچال	مثبت		شماره دفتر	شماره بیمار	مدت نگاهداری در یخچال	مثبت	
			محیط دریا نمکی	نتایج برحسب روزها				محیط دریا نمکی	نتایج برحسب روزها
۲۱	۴۷	۱۸	۲۳۳	۲۳۳	۱	۹	۳۹	۱۷	۰
۲۲	۴۹	۱۷	—	—	۲	۹	۲۲	۷	۰
۲۳	۵۸	۱۲	۲۳۳	۲۳۳	۳	۹	۷	۶۸	۱۴۸
۲۴	۵۹	۱۱	—	—	۴	۹	۶	۷	۹
۲۵	۶۰	۱۱	—	—	۵	۲۳	۱۹	۷	۰
۲۶	۶۱	۵	۱۹	۳۳	۶	۲۶	۲۸	—	—
۲۷	۶۲	۱۲	۲۳۳	۲۳۳	۷	۳۲	۲۴	۲۳۳ ×	۲۲۶
۲۸	۶۲	۱۱	—	—	۸	۳۲	۲۳	۲۳۳	۶۶
۲۹	۶۳	۱۱	۲۳۳	۲۳۳	۹	۳۳	۲۱	۲۳۳	۱۴۸
۳۰	۶۳	۸	۲۳۳	۳۱	۱۰	۴۰	۲۲	—	—
۳۱	۶۴	۱۱	—	—	۱۱	۴۰	۲۹	۶۶	۲۳۳
۳۲	۶۵	۸	۲۳۳	۲۰۱	۱۲	۴۰	۱۹	—	—
۳۳	۶۵	۷	۶۸	۲۲۶	۱۳	۴۱	۱۷	—	—
۳۴	۶۵	۶	—	—	۱۴	۴۴	۱۴	۲۳۳	۲۰۱
۳۵	۶۶	۸	۲۳۳	۲۳۳	۱۵	۴۵	۱۷	—	۱۴۸
۳۶	۶۸	۷	۲۳۳	۲۳۳	۱۶	۴۵	۱۱	۲۳۳	۲۰۱
۳۷	۱۰۱	۸	۲۳۳	۲۳۳	۱۷	۴۵	۲	۲۲۶	۲۰۱
۳۸	۱۰۲	۸	۲۳۳	۹۹	۱۸	۴۵	۲	۲۳۳	۲۳۳
۳۹	۱۰۴	۲	—	—	۱۹	۴۵	۱	۲۳۳	۲۳۳
					۲۰	۴۶	۱۸	۲۳۳	۱۷۹

۰ - عدد ۲۳۳ مواردی است که از ابتدا تا

انتهای آزمایش همچنان مثبت مانده است

شده است مشخص مینماید درستون چهارم تعداد روزهایی که ویبریون در محیط دریانمک نگاهداری شده و درستون پنجم تعداد روزهایی که ویبریون بر روی محیط C.B حفظ شده است ذکر گردیده است.

نتیجه :

۱- این مطالعه نشان داد که ویبریون کلراتا بیش از دو است روز در دو محیط نگهدارنده دریانمک و کاری بلر قابل نگهداری است بدون آنکه در خصوصیات باکتریولوژیک آن تغییری حاصل شود.

۲- هر دو محیط مزبور میتواند بعنوان محیط نگهدارنده جهت ارسال مواد پاتولوژیک از مناطق دوردست به آزمایشگاهها مورد استفاده قرار گیرد.

۳- در مواقعی که ارسال نمونه در لوله های مایع مشکل باشد بعلت نیمه سفت بودن محیط کاری بلر بهتری توان از آن استفاده نمود و بخصوص آنکه بنا بعقیده تهیه کنندگان این محیط میکرب های گروه سالمونلا و شیکلا نیز در آن نگهداری میشود.

References

- 1) Dr. Oscar Felsenfeld : Revue of recent trends in research & control of cholerae W.H.O. 1965 PA/20/50
- 2) Sylvia G. Cary & Eugene Blair : new transport Medium for shipment of clinical specimens. Journal of Bacteriology. No. 1, P 96 - 98, Jun 1964.
- 3) Sidney Gaunes, et al : A field trial of a new transport Medium for collection of feces for Bacteriologic examination. An. J. Trop. Med. Vol. 14. 1965.