

شناخت انواع ویبریونهای و با بوسیله فائز

دکتر پرویز ادیبفر*

مقدمه

درل برخلاف کارشناسان دیگر تنها باین مشاهده ساده اکتفا نکرد. بلکه درصدد جستجوی علت این پدیده مهم برآمد و عامل این پدیده را باکتریوفاز یعنی خورنده باکتری نامید. او در سال ۱۹۲۱ نتیجه مشاهدات و تجربیات چهار ساله خود را در خصوص این موضوع در کتابی زیر عنوان باکتریوفاز منتشر کرد. در سال ۱۹۴۰ روسکا (Ruska) [۸] و کوش (Kausche) اولین کسانی بودند که عکسهائی بکمک میکروسکپ الکترونیك از باکتریوفاز گرفتند. در سال ۱۹۶۴ لپین (Lepine) و نیکل (Nicolle) نیز موفق به گرفتن عکسهائی از عامل مزبور گردیدند و اطلاعات گذشته را تکمیل کردند. Fraser و Williams [۹] نیز با روشی که حتی المقدور از تغییر شکل ظاهری باکتریوفاز جلوگیری کنند عکسهای دقیق و جالبی از شکل ظاهری باکتریوفاز بدست آوردند.

از زمانهای بسیار قدیم کارشناسان علم باکتریولوژی و سایر کسانی که در این رشته کار کرده و باکشت و مطالعه میکربها سروکار داشته اند در ضمن بررسی های خود متوجه پدیده لیز باکتریوفازی شده اند. این پدیده عبارت از عدم رشد باکتری در نقطه یا نقاطی از سطح کشت محیط جامد یا شفاف شدن محیط مایع بود ولی محققین مزبور علت را خرابی روش کار دانسته و آنرا بی اهمیت تلقی کرده بودند. حتی در خصوص آن تا سال ۱۸۹۶ حرفی به میان نیاورده بودند.

هانکین (Hankin) [۲] و گیلدمیستر (Gildemeister) در سال ۱۸۹۶ برای اولین بار در مقالات خود خاطر نشان ساختند که در بعضی موارد نقاطی از محیط کشت جامد به باکتری امکان رشد نمیدهد.

محققین مزبور این کیفیت را تفسیر نکردند و در خصوص علت بروز این نقاط به جستجو و تحقیق نپرداختند.

تورت (Twort) در سال ۱۹۱۵ در کشت استافیلوکوکی که از مایع آبله جدا کرده بود مناطقی را که میکرب رشد نکرد مشاهده نمود و بالاخره فیلیکس درل (Felix d'Herelle) در سال ۱۹۱۷ برای اولین بار در انستیتو پاستور پاریس هنگام مطالعه روی باسیل دیسانتری متوجه شد که اگر مدفوع بیمارانی را که در دوره نقاهت دیسانتری باسیلی بسمبیرند روی شمع شامبرلان صاف و چند قطره مایع از صافی گذشته را به کشت خالص همان باسیل در محیط مایع اضافه نمایند و در حرارت ۳۶ درجه قرار دهند پس از چند ساعت مشاهده میشود که محتوی لوله کشت که ابتدا بعلت وجود باکتریا کدر بود کاملاً روشن و زلال میگردد.

* گروه میکروشناسی و ایمنولوژی دانشکده پزشکی.

تاریخچه بررسی و تحقیق در مورد باکتریوفاز کلرا در سال ۱۹۵۹ بوسیله پولیتزر (Pollitzer) [۷] انتشار یافت. از سال ۱۹۲۷ که درل مسأله باکتریوفاز ویبریون مولد و با را پیش کشید مطالعات زیادی بوسیله بسیاری از دانشمندان مشهور هندوستان نیز صورت گرفت و در آن زمان ۱۴ پپ باکتریوفاز (A - N) کشف و مطالعه شد [۶] که امروزه بدست نمیآیند و آنهائی که بطور اتفاق بدست میآیند تغییر شکل داده اند. مهمترین هدف از مطالعات و بررسیها راجع به فائز این مسأله بوده است که آیا باکتریوفاز در پیشگیری و درمان و با مؤثر است یا خیر؟ ولی بعلت نتایج متغیری که در این مورد بدست آمد استفاده از باکتریوفاز ویبریون مولد و با به منظور درمانی منسوخ شد و بهمین دلیل رکودی در مطالعه این موضوع پیش آمد. چندی بعد مجدداً با توجه به اهمیت فائز بعنوان

یک وسیله برای تشخیص آزمایشگاهی وبا تحت‌تیمات زیادی بعمل آمد و راهنمای خوبی برای مطالعات اپیدمیولوژیکی شد. باکتریوفاژها عمل اختصاصی دارند. باین معنی که فقط سوشهای میکروبی مربوط به خود را لیز مینمایند و در نتیجه میتوان سوشهای متفاوتی از باکتریها را که حتی بوسیله خواص بیوشیمیائی و آنتی‌ژنی نمیشود تشخیص داد از هم متمایز نمود و نیز دیده شده است که سوشهای باکتریهای که از اپیدمی‌های متفاوت جدا شده‌اند و منشاء واحد دارند در فاژتایپینگ یکسان عمل میکنند و این مسأله کمک میکند که منبع و ریشه یک بیماری عفونی که سبب اپیدمی شده است شناخته شود. بهمین جهت روشهای مختلف فاژتایپینگ برای باکتریهای بیشمار توسعه یافته است و بویژه امروزه کمک مهمی در کنترل بیماریهای روده‌ای میکنند. همین فاژتایپینگ ویبریون مولد با توجه علماء بین‌المللی را بخود جلب کرده است. بطوریکه از سال ۱۹۶۴ یک مرکز رفرانس بین‌المللی برای فاژتایپینگ ویبریون مولد وبا در کلکته تاسیس شده که زیر نظر سازمان بهداشت جهانی کار میکند. متداولترین روش فاژتایپینگ روش موکرچی است که ذی‌الشرح داده میشود. [۳] فاژتایپینگ ویبریون مولد وبا را میتوان جهت مطالعات زیر مورد استفاده قرار داد:

- ۱ - شناسایی انواع سوشهای ویبریون مولد وبا.
- ۲ - متمایز کردن ویبریون کلاسیک از ویبریون التور.
- ۳ - شناسایی انواع سوشهای ویبریون التور.
- ۴ - پروفاژتایپینگ ویبریون مولد وبا.

روش بررسی و مواد لازم

جهت فاژتایپینگ ابتدا باید فاژ را استاندارد نمود و برای اینکار پنج لوله انتخاب میکنیم و به هر لوله ۲/۷ سانتی‌متر مکعب آبگوشت غذایی می‌افزاییم بعد به لوله اول ۰/۳ سانتی‌متر مکعب از فاژی که از صافی گذرانده‌ایم (چون باکتریوفاژها از صافیهای باکتریولوژیک عبور میکنند از این خاصیت برای جدا کردن فاژ از باکتریهای که لیز نشده‌اند استفاده میکنند) افزوده و مخلوط میکنیم، تا فاژ ده مرتبه رقیق شود. حال پس از افزودن فاژ به لوله اول پی‌پت را عوض نموده و عمل مخلوط کردن را با پی‌پت 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 عوض کرده و این عمل را برای لوله‌های بعد تکرار میکنیم و بدین ترتیب فاژ بارقه‌های تصاعدی ده برابر ۱۰^{-۱}، ۱۰^{-۲}، ۱۰^{-۳}، ۱۰^{-۴}، ۱۰^{-۵} بدست خواهد آمد بعد در پشت بوات آگار غذایی

به فواصل مساوی شش دایره رسم میکنیم و از کشت دوساعته سوش شماره ۷۵۷ ویبریون وبا در محیط آبگوشت غذایی با حلقه سیم طلای سفید که قطر استاندارد ۳ میلی‌متر داشته باشد یک قطره پر برداشته در تمام دایره‌ها داخل بوات پخش کرده و تقریباً ۱۵ دقیقه صبر میکنیم تا خشک شود سپس باهمین حلقه در خانه اول از فاژ رقیق نشده (۰-) و در خانه‌های بعدی از فاژهایی که به نسبت‌های مختلف رقیق شده‌اند یک قطره پر برداشته در وسط هر دایره می‌گذاریم و بوات را با در بسته روی میز می‌گذاریم تا خشک شود. سپس بمدت یک شب در اتو گذاشته و روز بعد نتیجه را میخوانیم عیار یک خانه قبل از خانه‌ای که کمی رشد کرده یعنی کاملاً لیز نداده است به عنوان آر. تی. دی (Routine Test Dilution = R.T.D) نمایانده میشود. مثلاً اگر RTD = ۱۰^{-۲} باشد برای استفاده از این فاژ باید آنرا ۱۰^{-۳} مرتبه رقیق کرده مصرف نمود.

فاژتایپینگ ویبریون کلاسیک:

ویبریون کلاسیک چهار فاژ دارد بنابراین باید بوات را پنج قسمت نموده چهار قسمت جهت ویبریونی که مورد نظر است و یک قسمت برای سوش کنترل شماره ۱۵۴ در نظر گرفت. سپس کشت ۲۴ ساعته سوش مورد نظر را با اضافه سوش ۱۵۴ که روی ژلز غذایی رشد کرده است به مقدار کم روی محیط آبگوشت غذایی میبریم و دو ساعت در اتو می‌گذاریم بطوریکه کدورت مختصری ایجاد شود و بعد از این محیط با حلقه سه میلی‌متری سیم طلای سفید یک قطره پر برداشته و در خانه مربوط خودش پخش میکنیم. برای سوش کنترل نیز بهمین ترتیب عمل مینمائیم و پس از آن با همان حلقه سه میلی‌متری در هر قسمت یک قطره پر از فاژم بوطه در وسط هر خانه می‌گذاریم. و بوات را روی میز می‌گذاریم تا خشک شود و پس از ماندن یک شب در اتو فردا صبح جواب را میخوانیم.

در ویبریون التور نیز مانند کلاسیک عمل میشود با این تفاوت که در اینجا پنج فاژ داریم و همچنین پس از خشک شدن قطره‌های سوش روی بوات باید بلافاصله قطره‌های فاژ را افزود (حداکثر مدت ۱۵ دقیقه برای خشک شدن کافی است).

طرز خواندن جواب:

۱ - در محلی که فاژ قرار گرفته است بوضوح باکتریهای لیز شده‌اند.

CI = Clear Confluent lysis

۲ - باکتریهای لیز شده‌اند ولی در بعضی قسمتها بصورت کلنی‌های کوچک مانده‌اند.

بعمل آورده‌اند نتایج متفاوتی بدست آمده است و این بویژه بعلت این است که برای ویبریون مولد و با ناقلین مزمن وجود ندارد. [۶] بعضی از تیپ‌ها و سوتیپ‌های ویبریون کلرا بالنسبه کوچکنند و برخی از آنها را تاکنون نتوانسته‌اند از بیماران جدا کنند. رویهم‌رفته فازتایپینگ در مطالعات اپیدمیولوژی و با ارزش عملی زیادی دارد و در حال حاضر سه منطقه اندمی با ویبریونهای کلرای متفاوت در هند وجود دارد که لیزوتیپ و سروتیپ مختلف دارند و بهنگام ریشه‌کنی و با بایستی مورد نظر گرفته شوند. [۶]

فازتایپینگ ویبریون التور :

پاندمی وبای التور که در غرب آسیا نوس کبیر و جنوب و جنوب شرقی و مرکز آسیا تا سال ۱۹۶۱ پدید آمد سبب شد که مطالعات فراوانی روی فازتایپینگ ویبریون التور بعمل آید و در سال‌های اخیر وضع آن روشن گردد. (Mukerjee 1965) و بطوریکه در

جدول ۱

تیپ‌های فازی ویبریونهای کلاسیک	حساسیت ویبریونهای کلرا به فازهای زیر			
	I	II	III	IV
۱	+	+	+	+
۲	-	+	+	+
۳	+	-	+	+
۴	-	-	+	+
۵	+	+	-	+

جدول ۲

تیپ‌های فازی ویبریونهای التور	حساسیت ویبریونهای التور به فازهای زیر				
	I	II	III	IV	V
۱	+	+	+	+	+
۲	+	+	+	-	+
۳	+	+	-	+	+
۴	+	+	-	-	+
۵	+	-	-	-	+
۶	-	+	-	-	+

حساس = + مقاوم = - Insensitive

Lcl = Less than cl

۳ - تقریباً نصف باکتریهای لیز شده‌اند و پلاکهای متعدد در روی آن مشاهده میشود.

Scl = Semi cl

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

Pq +++ = More than 40 plaque

۵ - نقاط روشنی بصورت پلاک که نمودار لیز باکتری است مشاهده میگردد که تعداد آن کمتر از ۴۰ و بیش از ۲۰ میباشد.

Pq ++ = More than 20 plaque less than 40

تمام موارد فوق مثبت حساب میشود.

۶ - نقاط روشنی بصورت پلاک که نمودار لیز باکتری است و کمتر از ۲۰ عدد میباشد.

Pq + = Less than 20 plaque

۷ - عمل لیز انجام نگرفته ولی نقاطی با اندازه ته سوزن و نیمه شفاف روی آن دیده میشود.

OI = opaque lysis

شماره های ۷ و ۶ دومر تبه باید تجدید گردند و در صورتیکه مثل مرتبه اول بود منفی گزارش میشوند.

۸ - عمل لیز انجام گرفته ولی تصویر کدرمانندی روی آن مشاهده میگردد.

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

۹ - عمل لیز کامل نیست و تصویر کدرمانندی روی آن دیده میشود.

Scl C = Semi confluent lysis with Claudy Secondary growth.

شماره های ۹ و ۸ نیز مثبت گزارش میشود.

نتیجه

ویبریون کلاسیک ۴ فاز دارد که پس از خواندن جواب هر يك از آنها که باکتریها را لیز کرده‌اند نتیجه را با علامت + یعنی حساس نشان میدهند و آنها که لیز نکرده‌اند با علامت - یعنی مقاوم نمایانده میشوند که طبق جدول شماره ۱ ویبریون کلرا به پنج لیزوتیپ تقسیم میشود [۵] و ضمناً سه سوتیپ نیز برای هر يك از تیپهای ۱ و ۲ تشخیص داده شده است [۶]

ضمناً باید یادآوری کرد که هیچ ارتباطی بین لیزوتیپ و سروتیپ ویبریون مولد و با وجود ندارد. در کلکته مطالعاتی که در جریان یکسال روی لیزوتیپ و سروتیپ ویبریونهای بیماریزا

همولیز متمایز میشوند. زیراً ویبریون کلاسیک غیر همولیتیک است و نمیتواند گلبول قرمز گوسفند را همولیز نماید ولی ویبریون التور همولیتیک است. اما از زمان شروع پاندمی اخیر التور مشکلات زیادی در سر راه کارمندان آزمایشگاه قرار گرفته است و آن غیر همولیتیک بودن ویبریونهای التور است که در حقیقت تقریباً اکثر سوشهای ویبریون التور جدا شده در این اپیدمیها غیر همولیتیک بوده‌اند و این مسأله باعث میشود که احتیاج به روش دیگری برای تشخیص ویبریون التور از ویبریون کلاسیک داشته باشیم و آن امکان استفاده از تجربیات موکرجی است که بافاز چهار گزارش داده است زیرا این فاز بر تمام ویبریونهای کلرا خاصیت کشنده دارد در صورتیکه بر ویبریونهای التور تأثیری ندارد و وجه تمایز خوبی برای ویبریونهای التور غیر همولیتیک است که با این فاز مقاومت دارند [۴] و راهنمای خوبی برای بررسی عامل اپیدمیها است از طرفی پروفاژ تایپینگ برای ویبریونهای که لیزوژنیک میباشند مورد استفاده قرار میگیرد. انواع لیزوژنیک ویبریون التور بسیار نادر است و تقریباً اکثر سوشهای التور که در اپیدمیهای مختلف بدست آمده است لیزوژن نمیباشد ولی سوشهای کلرای کلاسیک غالباً بفرم لیزوژنی بدست آمده‌اند. رویهمرفته اگر سوش لیزوژن باشد نمیتوان مورد استفاده فاز تایپینگ قرار داد و برای اینکه بتوان فاز را از باکتری جدا کرد بایستی ابتدا باکتریها را با سوش حساس توأم کشت داد تا فاز برای لیز دادن سوش حساس از باکتری خارج شود ولی چون خود باکتری نسبت به فاز خودش حساس نبوده است باقی میماند و پس از آن امکان فاز تایپینگ میسر خواهد بود [۶].

جدول ۲ نشان داده شده است [۶] پنج نوع فاز فعال بر ضد ویبریون التور وجود دارد که سوشهای ویبریون التور نسبت باین فاز به ۶ دسته تقسیم میشوند. هر چند گاه یک سوش حساسیت متفاوتی نسبت به یک فاز معین در آزمایشهای تکراری نشان میدهد معذک با افزودن و یا تغییر دادن بعضی از فازها میتوان مشکل فوق را برطرف نمود و جدول ۳، را نوشت [۶].

بحث

ویبریون وبا در روده بیماران تکثیر پیدا میکند بنابراین بنظر میرسد درمان بافاز (فاگو تراپی) برای نابودی بیماری یا پیش گیری آن باید بسیار مؤثر باشد و بهمین مناسبت در ابتدای امر در مورد اینکه بتوان از باکتریوفاز ویبریون مولد وبا به منظور درمانی استفاده نمود مطالعاتی انجام گرفت و پس از بررسی های زیاد که از ۱۹۲۸ بمدت ۲۰ سال نمودند و نتایج متناقضی که در درمان و پیشگیری وبا با بکار بردن فاز بدست آوردند سرانجام باین نتیجه رسیدند که استفاده از باکتریوفاز ویبریون مولد وبا بمنظور درمان عملاً بی ارزش است و فقط از باکتریوفاز ویبریون مولد وبا بعنوان وسیله تشخیص آزمایشگاهی و با وی جویی مطالعات اپیدمیولوژیکی میتوان بهره برداری نمود. بدین منظور از فاز تایپینگ جهت تشخیص تیپهای مختلف ویبریون مولد وبا و همچنین متمایز کردن ویبریون کلاسیک از ویبریون التور استفاده شد. ویبریون کلاسیک و التور از نظر شکل بهم شبیه هستند و این شباهت در واکنشهای بیوشیمیایی و ساختمان آنتی ژنی آنها هم وجود دارد و ایندو از هم ضمن آزمایشهای فوق با آزمایش

REFERENCES:

- 1- Herelle, F., *Le Bacteriophage, son rôle dans l'immunité*, 230, 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. Virusforsch.*, 2: 343, 1942.
- 9- Williams. R. C., *J. Bact.*, 66:458, 1953.