

ارزشیابی روشهای مختلف هموزنه ایزاسیون خلط جهت کشت باسیل کبخ

دکتر فرج الله شفا*

دکتر ژاله مصطفوی** دکترا ابو الحسن ظریفی**

خلاصه :

جهت ارزشیابی روشهای مختلف هموزنه ایزاسیون خلط برای کشت میکرب سل ۲۰۰ نمونه از خلط بیماران بستری در آسایشگاه بوعلی به سه روش «ان - استیل - ال - سیستین» ، «سدیم لوریل سولفات» و «سدیم هیدراکسید (پتروف)» کشت داده شد و نتایج زیر بدست آمد .

۱ - در ۲۰۰ نمونه خلط خالص (رقیق نشده) تعداد در صد مثبتها با روش سدیم لوریل سولفات بیش از دو روش دیگر میباشد .

۲ - در ۲۰۰ نمونه خلط مورد آزمایش که به نسبت های ۲-۱۰ ، ۴-۱۰ ، ۶-۱۰ رقیق گردیده و با سه روش مذکور کشت داده شد بطور کلی میزان درصد مثبتها در روش ان - استیل - ال - سیستین بطور قابل ملاحظه ای بالاتر از دو روش دیگر میباشد .

مقدمه :

در سالیهای اخیر آزمایشگاههای مختلف بایکاز بردن مواد گوناگون جهت زدودن آلودگی و هموزنه ایزه نمودن خلط توانسته اند روشهای مختلفی را عرضه نمایند ، بطور کلی در تمام روشهای کشت میکرب سل ، اصل کلی شامل از بین بردن میکروب ارگانسیمهای آلوده کننده Contaminant ضمن حفظ ویروانس و خواص حیاتی میکرب سل موجود در مواد آزمایش میباشد، در روشهای مختلف کشت سل علاوه بر اصول کلی باید نکات مختلفی از قبیل حساسیت ، سهولت آزمایش و سرعت بدست آمدن نتیجه و بلاخره اقتصادی بودن روش در نظر گرفته شود .

سازمان بهداشت جهانی و انجمن بین المللی مبارزه^۱ با سل در چند آزمایشگاه

* بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران .

** آزمایشگاه فرانس .

تحقیقاتی موضوع انتخاب جدیدترین و بهترین ماده مضم کننده و بهترین ماده ضد عفونی کننده را مورد مطالعه قرار داده اند از آن جمله میتوان استفاده از روش ان - استیل - ال سیستین^۱ بوسیله Kubiea & Middle Brook در آمریکا و سدیم لوریل^۲ سولفات ابتدا بوسیله Taquut & Tison و سپس بوسیله Engbaek و همکاران در دانمارک و بالاخره پانکراتین دوزژن در سوئد و آلمان را نام برد .

نظر باینکه روشهای مورد بحث تاکنون مقایسه و ارزش یابی کلی نشده اند تصمیم به انجام این کار گرفته شد و در آزمایشگاه رفانس بر روی ۲۰۰ نمونه خلط که از بیمارستان بوعلی بدست آمده با سه روش مختلف هموزنه ایزاسیون ان - استیل - ال - سیستین ، سدیم لوریل سولفات و سدیم هیدراکسید (روش پتروف) آزمایش و مقایسه گردید و نتایج حاصله مورد بحث و تفسیر قرار گرفت .

مواد لازم جهت آزمایش :

الف - خلط بیماران مسلول : نمونه های مورد آزمایش از خلط بیماران بستری در آسایشگاه بوعلی جمع آوری شده است و برای آن که حساسیت روشها را بتوان ارزشیابی کرد علاوه بر آن که ۲۰۰ نمونه مورد آزمایش با غلظت اولیه آزمایش گردیدند هر يك از آنها به نسبت های ۲-۱۰ ، ۴-۱۰ ، ۶-۱۰ نیز رقیق شد بطوری که جمعاً تعداد خلطهای آزمایش شده با رقت های مختلف بالغ بر ۸۰۰ نمونه گردید . این ۸۰۰ نمونه با سه روش مختلف هموزنه ایزاسیون آزمایش گردید و (جمعاً ۲۴۰۰ آزمایش) و نتایج رقت های مساوی در سه روش بایکدیگر مقایسه شد . انتخاب رقت های فوق بر مبنای تجربی است زیرا تجربه نشان داده که رقت های نزدیک بهم مانند ۱-۱۰ ، ۲-۱۰ و ۳-۱۰ و ۴-۱۰ نتایج تقریباً مشابهی میدهند و اندازه گیری اختلاف حساسیت در مراحل بعدی مشکل میگردد .

ب - پودر گرد «ان ، استیل ، ال ، سیستین» (کارخانه BBL)

پ - بوین البومین فراکسیون V (کارخانه BBL)

ت - پودر گرد سدیم لوریل سولفات (دکتر Ebguack سرم انستیتو کپنهاک)

روش :

الف - سدیم هیدراکسید (پتروف) : حجم مساوی خلط و سود ۴ درصد مخلوط گردید و مدت دو ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شد و سپس مدت ۱۵ دقیقه ساتریفایژ گردید و ته نشین آن با اسید کلریدریک 2N خنثی گردید و از ته نشین جهت کشت استفاده شد .

ب - ان - استیل - ال - سیستین : خلط مورد آزمایش که هم حجم آن از محلول شماره يك اضافه گردید در دستگاه مخلوط کننده (Vortex-Mixer) بمدت يك

1- N-Acetyl-L-Cystein

2- Sodium lauryl Sulphate

تا سه دقیقه قرار گرفت تا کاملاً یکنواخت گردد .

سپس در حرارت اطاق برای مدت ۱۵ دقیقه در زیر دستگاه هود قرار داده شد تا اینکه میکروارگانیزم‌های دیگر موجود در خلط کشته شوند . اگر این مدت زمان طولانی‌تر شود از تعداد باسیلهای موجود در نمونه کاسته می‌گردد .

پس از این مدت لوله محتوی خلط تا نصف ارتفاع از محلول فسفات بافر با PH 6.8V

پر شده و مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۳۰۰۰ دور در دقیقه) بعد از سانتریفیوژ نمودن مایع فوقانی دور ریخته شد و از رسوب ته‌نشین شده جهت کشت بر روی محیط لونیشتین جانسن استفاده گردید . در مواردیکه مقدار رسوب کافی نبود یک میلی لیتر از محلول ۰.۲ درصد بوین‌ال‌بومین فراکسیون V به آن اضافه گردید .

طرز تهیه محلول شماره یک :

- a - محلول سدیم هیدراکسید ۶ درصد* ۲۵ میلی لیتر
 - b - محلول سدیم سیترات یک دهم مولار ۲۵ میلی لیتر
 - c - پودر «ان - استیل - ال - سیستین» ۲۵۰ گرم
- محلولهای a , b هر کدام بطور جداگانه در اتوکلاواستریل‌شد و سپس بایکدیگر مخلوط گردید و در حرارت میان ۴ تا ۱۰ درجه سانتیگراد نگاهداری شد (این مخلوط برای چند هفته ثابت میماند.) و در موقع مصرف از محلول c به آن اضافه شد .
- پ - سدیم تئوریل سولفات : ۶ تا ۲ میلی لیتر خلط مورد آزمایش باسه برابر حجمش محلول شماره یک مخلوط گردید سپس در حرارت اطاق مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت در این مدت سه‌بار در تکان دهنده گذاشته شد بعد از انقضای ۳۰ دقیقه لوله آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۳۰۰۰ دور در دقیقه) قسمت فوقانی دور ریخته شد و از محلول شماره دو (خنثی کننده) قطره قطره بر روی رسوب ته‌نشین شده افزوده گردید تا رنگ ارغوانی نسبتاً شدیدی نمایان گردید از رسوب حاصله جهت کشت بر روی محیط لونیشتین جانسن استفاده شد .

* مطالعه مأخذ و منابع و همچنین مشاهدات شخصی (تجربه بر روی ۳۲ نمونه خلط بیماران مسلول) در زمینه آلودگی نشان داده است که در مورد نمونه‌هایی که مدت طولانی از تاریخ نمونه‌برداری آنها تا انجام آزمایش میگذرد معمولاً رقم آلودگی بالا است (۱) ، چون در مورد نمونه‌های آزمایش شده نیز چنین شرایطی وجود داشت بدین ترتیب که در روز اول نمونه‌گیری در بیمارستان بوعلی انجام شد در روز دوم خلط‌ها رقیق می‌گردد در روزهای سوم و چهارم کشت انجام می‌گرفت بعبارت دیگر ۲ تا ۴ روز از زمان نمونه‌گیری تا انجام کشت فاصله زمانی وجود داشت تصمیم گرفته شد بمنظور پائین آوردن میزان آلودگی غلظت سود به ۶ درصد افزایش داده شود و نتایج هر هفته مورد بررسی قرار گیرد با این تهیید مشاهده گردید که رقم آلودگی در نمونه خالص خلط به ۳ درصد تقلیل یافت و در رفتهای ۲-۱۰ و ۴-۱۰ و ۶-۱۰ بطور کلی آلودگی مشاهده نگردید .

طرز تهیه محلول شماره يك :

۳۰ گرم پودر سدیم لوریل سولفات در يك لیتر آب مقطر استریل حل شد (درجه حرارت حداکثر ۶۰ درجه) و به آن ۱۰ گرم پودر سدیم هیدراکسید اضافه گردید این محلول در حرارت ۳۷ درجه نگهداری شد زیرا محلول سدیم لوریل سولفات در حرارت ۲۲ درجه سانتیگراد تجزیه (۵) میشود و محلول فوق باید هفته‌ای يك بار تازه تهیه گردد .

طرز تهیه محلول شماره دو (خشتی کننده) :

۰٫۹ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ با هزار میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد و از محلول ۲۵۰ برموکرزول ارغوانی بدستدار ۲ میلی لیتر به آن اضافه گردید مخلوط در اتوکلاواستریل شد .

نتایج :

۲۰۰ نمونه خلط بدست آمده از بیمارستان بوعلی بصورت رقیق نشده و با رقتهای ۱۰-۲ و ۱۰-۴ و ۱۰-۶ با سه روش مختلف همورثه ایزاسیون روش استیل - ال - سیستین سدیم لوریل سولفات و سدیم هیدراکسید (پتروف) کشت داده شد ، در تابلوی شماره يك بترتیب خلط خالص (رقیق نشده) و خلط‌های رقیق شده با سه روش مورد بحث نمایش داده میشود و خلاصه این نتایج در نمودار «الف» نشان داده شده است . بطوریکه از جدول و نمودار معلوم میشود :

۱ - در مورد خلط‌های رقیق نشده (خالص) روش سدیم لوریل سولفات نتیجه بهتر میدهد بطوریکه تعداد درصد مثبت ۸۵ میباشد در مقایسه با دو روش دیگر که ارقام ۷۵ درصد و ۶۷٫۵ درصد را نشان میدهند . ضمناً با این روش آلودگی نیز دیده نمیشود .
۲ - در خلط‌های رقیق شده روش ان - اسیل - ال - سیستین از همه حساس‌تر میباشد و در هر سه رقت ۱۰-۲ و ۱۰-۴ و ۱۰-۶ درصد مثبت با این روش بیش از دو روش دیگر میباشد .

بحث :

از بررسی تابلو شماره يك و مقایسه نتایج بدست آمده در این تحقیق و تحقیقات مشابهی که در کشورهای مختلف انجام گردیده نتایج زیر بدست میآید :

تابلوی شماره يك

جدول تفصیلی و درصد مثبت رشد با استفاده از سه روش مختلف هموزنه ایزاسیون

روش خالص	روش ۱-۲			روش ۱-۳			روش ۱-۴				
	* NALC	** ISO	سدیم هید راکسید	* NALC	** ISO	سدیم هید راکسید	* NALC	** ISO	سدیم هید راکسید		
تعداد کل	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	
درصد مثبت	۷۵	۸۵	۷۸/۵	۸۰	۷۷/۵	۳۷/۵	۸۱	۶۷/۵	۲۲/۵	۷۱/۵	۳۱
درصد منفی	۲۲	۱۵	۲۰	۲۰	۲۲/۵	۶۰/۵	۱۹	۳۲/۵	۷۷/۵	۲۸/۵	۶۹
درصد آلوده	۳	-	۱/۵	-	-	۲	-	-	-	-	-

ان - استیل - ال - سیستین = * NALC

سدیم لوریل سولفات = ** LSO

۱ - چون روش سدیم لوریل سولفات در خلط‌های رقیق نشده یا به عبارت دیگر در خلط‌هایی که تعداد باسیل بیشتری دارند نتیجه بهتری میدهد و معمولاً بیمارانی که در آسایشگاه‌ها بستری هستند سل پیشرفته‌تری دارند و در خلط آنها باسیل زیادتری وجود دارد بنابراین میتواند روش انتخابی برای بیماران بستری در آسایشگاه‌ها باشد ضمناً این نکته را باید در نظر داشت که این روش بسیار ساده و عملی میباشد .

۲ - همانطور که در تابلوی شماره يك نشان داده شده است در مورد خلط‌های رقیق شده روش ان - استیل - ال - سیستین از سایر روشها حساستر میباشد و نتایج بدست آمده با خلط‌های رقیق شده در این تحقیقات با نتایجی که در بیمارستان National Jewish Hospital امریکا بدست آورده‌اند تقریباً مشابه (۱) میباشد .

۳ - تحقیقاتی که در انگلستان توسط :

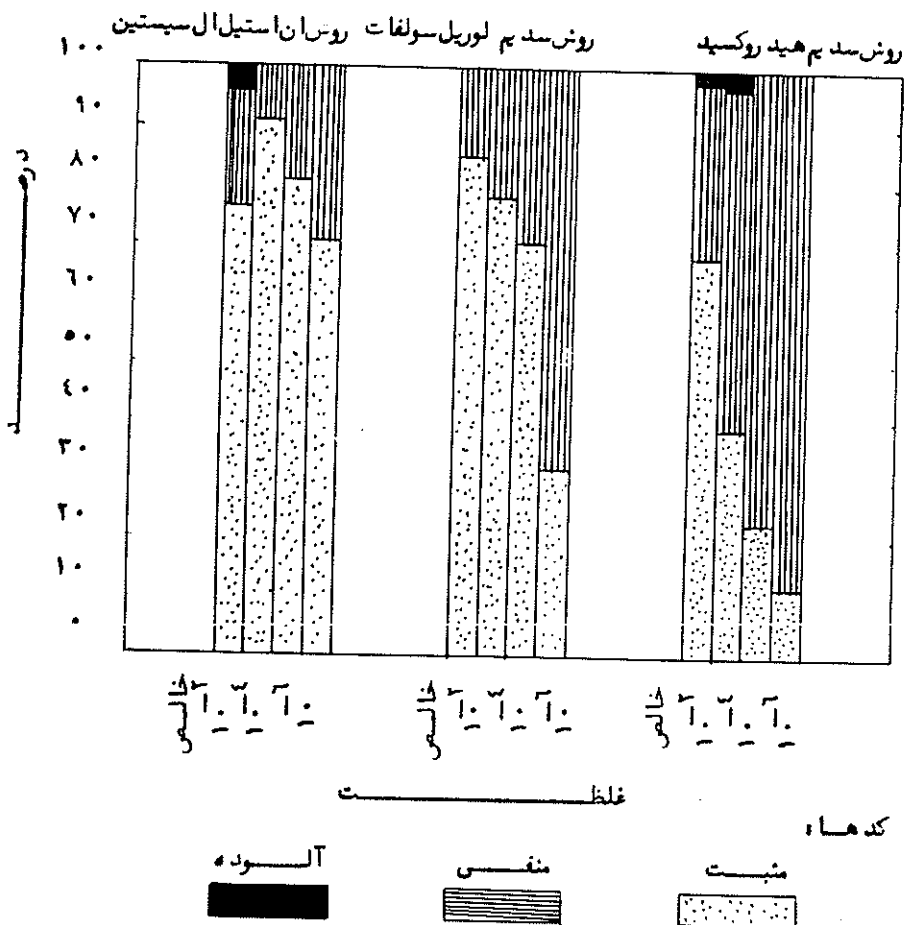
Regional Public Health Laboratory Newcastle General Hospital

بر روی ۱۳۲ نمونه خلط انجام گرفته است باین نتیجه رسیده است که نه فقط روش ان - استیل - ال - سیستین هیچ گونه مزیتی بر روش سود ۴ درصد ندارد بلکه این عیب را هم دارد که آلودگی آن ۴ برابر زیادتر است (۷) ضمناً باید این نکته را متذکر گردید که در انگلستان روش ان - استیل - ال - سیستین را با تغییراتی بکار برده‌اند و این تغییرات تا چه حد در نتیجه مؤثر بوده است تفسیر آن عاری از اشکال نمیشد گوا اینکه با توضیحاتی که در این زمینه داده شده ادعا گردیده است که این تغییرات ظاهراً نیابستی اختلافی در نتایج روش اصلی آزمایش ایجاد نماید .

۴ - تصور می‌رود که استفاده از خلط رقیق شده برای بررسی‌های مقایسه‌ای و بنحویکه در تحقیقات ما انجام شده است برای اولین بار صورت گرفته باشد.

بدینوسیله از زحمات همکاران آزمایشگاه رفرانس خانم اشرف طالبی نژاد، فریده محمودیان و آقای احمدرضائی تشکر مینمایم.

نمودار مقایسه‌ای شماره یک
موارد آزمایش شده برحسب روش و نسبت غلظت



REFERENCES

1. G.P. Kubica, W.E. Dye, M.L. Cohn and G. Middlebrook, (1963). "Sputum digestion and decontamination with N-Acetyl-L-cysteine, sodium hydroxide for culture of Mycobacteria." Amer. Rev. Resp. Dis., 87, 775-779.
2. G.P. Kubica, A.J. Kaufman and W.E. Dye, (1964). "Comments on the use of the new mucolytic agent, N-Acetyl-L-cysteine digestant for the isolation of Mycobacteria." Amer. Rev. Resp. Dis. 89; 284-286.
3. M. Sommers and John P. Russell, (1970). Clinically significant Mycobacteria. Recognition and Identification.
4. B.W. Allen and J. Baker, (1968). "Mycobacteria isolation Identification and sensitivity testing, Butterworth London.
5. H. CHR. Engback, B. Vergmann and Weisbentzone, (1967). "The sodium Laury sulphate method in culturing sputum for Mycobacteria". J. Resp. Dis. 48, 268-284.
6. Gordon R. Mead and Alan W. Woodhams, (1964). "N-Acetyl-L-cysteine on liquefying agent in the bacteriological examination of sputum." Tubercle. Lon., 45, 370.
7. J.B. Selkon, H.R. Ingham, J.H. Hale and A. Codd, (1966). "N-Acetyl-L-cysteine in culturing sputum for tubercle bacilli. Tubercle, Lond. 47, 269-271.
8. Veteran Administration, Armed Forces, (1962). Cooperation study on the chemotherapy of tuberculosis. Laboratory method.
9. Walts R. Webb, M.D. and Jackson, Miss, (1962). "Clinical evaluation of a new mucolytic agent, N-Acetyl-L-cysteine." J. Thorac. Cardiovasco. Surg. 44, 330-343.