مجله بهداشت ایران، سال ... تهران، شماره ۴ - ۱ ، ۱۳۷۹

بررسی وتشخیص درماتوفیت ها در محیط های تهیه شده از عصاره برنج

دکترمسعود امامی [۱]، فرنوش پارسایی نسب [۲]، محسن گرامی شعار [۱]

واژه های کلیدی : *درماتوفیت ها، محیط کشت، عصاره برنج*

چکیده

درماتوفیت ها، معمولاً از روی خصوصیات ظاهری و ریزبینی آنها در محیط کشت سابورودکستروز آگار تشخیص داده می شوند. فقدان کنیدی زایی، وجود شباهت های بسیار میان گونه های مختلف درماتوفیت و نیز وجود گونه های بینابینی عمل تشخیص را دشوار کرده اند. دراین مطالعه از دانه برنج که دارای مواد غذایی پایه می باشد، برای تهیه محیط های کشت مغذی، جهت کمک به تشخیص قطعی و سریع تر عوامل درماتوفیتی شامل *ت. منتاگروفایتیس* واریته *منتاگروفایتیس* ، *ت. روبروم*، *ت. ویولاسئوم* ، *ت. وروکوزوم* ، *ت. شوئن لاپنی*، *م. کنیس* ، *م. جیپسئوم* و*اپیدرموفایتون فلوکوزوم* استفاده شده است. به این ترتیب که ابتدا از دانه برنج عصاره گیری کرده و برای جامد کردن آن میزان ۲ درصد آگار اضافه گردید از این عصاره ها به محیط سابورودکستروز آگار نیز اضافه شد. محیط های آگار آگار و سابورودکستروز آگار به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند.

بطوری که دراین مطالعه مشخص گردید، درماتوفیت های مورد بررسی، در محیط آگار آگار رشد کامل نداشتند و در محیط های تهیه شده از عصاره برنج رشد سریع و واضح تری نسبت به سابورودکستروز آگار مشاهده شد. اندازه کلنی ها نیز در آنها بزرگتر بود. رنگدانه قرمز *ت. روبروم* پس از حدود ۸ روز ظاهر گشت و ظاهر کلنی *ت. منتاگروفایتیس* کاملاً مشخص بود. کنیدی زایی نیز در این محیط ها به خوبی انجام گرفت، بطوری که *ت. ویولاسئوم* و *ت. وروکوزوم* که بطور معمول فاقد کنیدی هستند، میکرو و ماکروکنیدی تولید کردند.

استفاده از عصاره برنج در تهیه محیط کشت درماتوفیت ها دارای مزایای زیادی بوده و همچنین موجب کاهش هزینه های خرید و ورود محیط های کشت موجود به صورت تجارتی می گردد و امکان تهیه آن نیز در تمامی آزمایشگاه ها با حداقل تجهیزات وجود دارد.

۱- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶- ۱۴۱۵۵ ، تهران، ایران.

۲- دانشکده میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، ایران.

سرآغاز

درماتوفیت ها، گروه هموژن قارچ های *کراتینوفیلی* هستند که با استقرار در لایه های شاخی غیرزنده پوست، مو و ناخن موجب ایجاد بیماری در انسان می گردند (۷). درماتوفیت ها در سه جنس *آنامورف ترایکوفایتون، مایکروسپوروم* و *اپیدرموفایتون* بسته به ساختمان های کنیدیایی طبقه بندی می شوند.

معیار اولیه برای شناسایی درماتوفیت ها مورفولوژی میکروسکوپی، بافت کلنی و رنگدانه کلنی روی محیط کشت سابورودکستروز آگار (S) می باشد (۴). پلی مورفیسم و کنیدی زایی متغیر و یا فقدان آن مشکلات اساسی را برای شناسایی این گونه ها بوجود آورده و همچنین گاهی گونه های جدا شده به اشکال بینابینی بوده و تشخیص این انواع از اشکال معمول چندان آسان نمی باشد (۶). درعین حال تعیین نوع درماتوفیت های مسئول بیماری علاوه براینکه به شناسایی میزان انتشار و بیماری زایی این عوامل کمک می کند، در بکاربردن روش های مختلف درمانی و مدت دوره درمان نیز مؤثر است.

بنابراین جهت رفع این اشکالات، استفاده از معیارها و ویژگی های دیگر از جمله روش های فیزیولوژیک و بکاربردن محیط های کشت افتراقی ضروری می باشد.

باتوجه به اهمیت گیاهان در زندگی روزمره و استفاده آنها از قدیم الایام در طب برآن شدیم، با استفاده از عصاره دانه برنج (از نوع برنج گرده یا آشی)، برای درماتوفیت های شایع نیز محیط کشتی تهیه کنیم (۲). از دانه برنج به دلیل مغذی بودن استفاده های تغذیه ای و درمانی زیادی می شود، برنج معمولی دارای ۱۲ تا ۱۳ درصد آب، ۷۷ تا ۸۰ درصد ئیدرات های کربن ۵/۱۴ تا ۹/۸ درصد مواد ازته، ۰/۱ تا ۳/۱۸ درصد مواد چرب و نیز دارای لیزولسیتین [1] می باشد (۲). بدیهی است درماتوفیت ها در محیطی که از عصاره دانه برنج تهیه شده است، خواص متفاوتی در مقایسه بامحیط سابورودکستروزآگار معمول نشان می دهند، که استفاده از آن به تشخیص آزمایشگاهی کمک بسزایی خواهد کرد. به علاوه این عمل هزینه کمتری در مقایسه بامحیط های کشت شیمیایی که به صورت تجارتی موجودند دربرخواهد داشت و به سادگی درهر آزمایشگاهی با حداقل امکانات قابل تهیه واستفاده می باشد.

نمونه گیری و روش بررسی

دراین بررسی رشد هشت گونه درماتوفیت شایع شامل *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، ترایکوفایتون رویروم، ترایکوفایتون ویولاسئوم، ترایکوفایتون وروکوزوم، ترایکوفایتون شوئن لاینی، مایکروسپوروم کنیس، مایکروسپوروم جیپسئوم* و *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* در محیط کشت ساخته شده از دانه برنج مورد بررسی قرار گرفت.

1- Lysolecitine

ابتدا از دانه برنج عصاره های آبی ۵ و ۱۰ درصد تهیه می شد. عمل عصاره گیری به این ترتیب بود که ابتدا پودر دانه برنج را وزن کرده به آن آب مقطر اضافه می گردید. مخلوط به مدت دو ساعت تحت حرارت حدود ۴۵ درجه سانتی گراد روی دستگاه شیکر قرار داده به مدت ۴۸ - ۲۴ ساعت در حرارت آزمایشگاه نگهداری می شد. سپس عصاره صاف گشته، تفاله باقیمانده دور ریخته می شد. پودر آگار آگار به میزان ۲ درصد به عصاره اضافه کرده پس از حرارت دادن و حل شدن آگار، عصاره به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد اتوکلاو شده، در پلیت های استریل یک بار مصرف تقسیم و پس از خنک شدن مورد استفاده قرار می گرفتند. از این عصاره ها به میزان ۵ و ۱۰ درصد به محیط سابورودکستروزآگار نیز اضافه می گردید. از محیط آگار آگار نیز به عنوان شاهد استفاده می شد و تمامی ارگانیسم ها در این محیط و نیز سابورودکستروز آگار کشت داده می شدند و مورد بررسی قرار می گرفتند. به منظور یکسان بودن میزان ماده تلقیحی در این محیط ها از درماتوفیت ها سوسپانسیون در آب مقطر با استفاده از کشت آنها در محیط سابورو تهیه و سپس مقداری دترجنت، به منظور پایین آوردن میزان کشش سطحی و معلـــق ماندن کنیدی ها در آن اضافه می شد. سپس با استفاده از آنس حلقوی از این سوسپانسیون ها در محیط های یاد شده به طور همزمان عمل تلقیح انجام می گرفت. این روش به منظور مقایسه زمان تشکیل کلنی درماتوفیت ها و نیز اندازه و ظاهر کلنی ها روی محیط های مختلف صورت می گرفت. از این درماتوفیت ها، کشت روی لام نیز به منظور بررسی خصوصیات ریزبینی به عمل می آمد. محیط های تلقیح شده در ۲۶ درجه سانتی گراد نگهداری و هربک روز در میان مورد بررسی و ارزیابی قرار می گرفتند.

یافته ها

بطوری که دراین مطالعه مشخص گردید، درماتوفیت های مورد بررسی در محیط آگارآگار (محیط شاهد)، رشد کامل و واضحی نداشتند. در محیط سابورودکستروزآگار حاوی ۵ و ۱۰ عصاره برنج رشد کلنی ها نسبت به سابورودکستروزاگار، سریع تر و واضح تر بوده، شکل ظاهر کلنی ها در آن مشابه ظاهر آنها در سابورودکستروزآگار بود. با این تفاوت که کلنی ها اندازه بزرگتری نسبت به محیط سابورودکستروز آگار داشتند. از نظر وجود رنگدانه نیز، رنگدانه ها در آن نمایان تر بودند مانند رنگدانه قرمز، ت. روبروم. کنیدی زایی نیز در این محیط، به طورکلی خیلی بهتر از محیط سابورودکستروز آگار تحریک گشت.

کلنی ها از نظر بافت، رنگ، اندازه، زمان تشکیل و کنیدی زایی در محیط تهیه شده از عصاره برنج دارای خصوصیاتی بودند و در برخی موارد می تواند ارزش تشخیص داشته باشد که در زیر خصوصیات درماتوفیت های مورد بررسی دراین مطالعه، در محیط تهیه شده از عصاره برنج، شرح داده می شود.

کلنی ت. *متناکروفایتیس* در این محیط پس از ۳ روز به راحتی قابل مشاهده گشت و پس از گذشت ۳ - ۲ روز ، کلنی به صورت دوایر متحدالمرکز درآمد که مرکز ان زرد مایل به کرم (پودری) و اطراف آن سفید (پودری) با حاشیه سفید پرزی بود. در قسمت زرد کرم رنگ قطرات شفاف دیده شد. رشد این درماتوفیت دراین محیط وسیع است بطوری که پس از یک هفته اندازه کلنی در محیط ۱۰ درصد دو برابر اندازه آن در محیط سابورودکستروز آگار بود (نگاره ۲،۸). در مشاهده ریزبینی کنیدی زایی مطلوبی وجود داشت (شترنگ ۱).

کلنی ت. *روبروم* دراین محیط پس از ۵ - ۴ روز به راحتی قبل مشاهده گشت. کلنی به صورت سفید رنگ بوده و پس از حدود ۸ روز در محیط ۵ درصد رنگدانه صورتی مایل به قرمز داده که پس از چند روز کاملاً قرمز و در محیط ۱۰ درصد رنگدانه قرمز نمایان شد (نگاره های ۸ ۳ و A ۴). در مشاهده ریزبینی ، کنیدی زایی به صورت میکرو و ماکروکنیدی وجود داشت (شترنگ ۱).

کلنی ت. *ویولاسئوم* دراین محیط از حدود روز دهم به رنگ سفید با رشد شعاعی قابل مشاهده بوده. پس از ۵ تا ۹ روز رنگدانه سرخ مایل به بنفش در محیط ظاهر گردید و کلنی کمی به صورت چین خورده درآمد. در مشاهده ریزبینی، میکروکنیدی و نیز ماکروکنیدی دیده شد که در مقایسه با محیط سابورودکستروز آگار، کنیدی زایی را به خوبی تحریک کرده بود (شترنگ ۱) (نگاره B ۶ و ۷).

کلنی ت. *وروکوزوم* دراین محیط از حدود روز ۱۰ تا ۱۲ به رنگ سفید مایل به کرم قابل مشاهده گشته در محیط ۱۰ درصد رشد بیش از محیط ۵ درصد بود. در مشاهده ریزبینی، کنیدی زایی به خوبی تحریک شده بود (شترنگ ۱).

کلنی ت. *شوئن لاینی* دراین محیط از حدود روز هشتم به صورت سفید بی رنگ ظاهر گشته و پس از گذشت ۱ تا ۲ هفته دیگر به صورت چین خورده مغزی شکل درآمد. رشد درمقایسه بامحیط سابورودکستـــــروزآگـــار وسیع تر بود (نگاره B ۵). در مشاهده ریزبینی ، میسلیوم های شاخ گوزنی قابل مشاهده بودند (شترنگ ۱).

کلنی م. *کنیس* دراین محیط از روز سوم یا چهارم با رنگدانه زرد فسفری قابل مشاهد شد و اندازه کلنی در مقایسه با محیط سابورودکستروزآگار خیلی بیشتر بود. در مشاهده ریزبینی کنیدی زایی به خوبی انجام شده بود (شترنگ ۱ و نگاره ۸).

کلنی م. *جیپسئوم* در این محیط از روز سوم به صورت نخودی با شیر قهوه ای در مرکز و سفید در اطراف با حاشیه مضرس قابل مشاهده گشت. در قسمت مرکزی کلنی قطرات شفاف دیده شد و به طورکلی رشد کلنی خیلی وسیع بود. در مشاهده ریزبینی نیز کنیدی زایی به خوبی انجام گرفت (شترنگ ۱ ، نگاره B ۹).

کلنی *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* در این محیط پس از یک هفته دارای رشد شعاعی و به رنگ زرد مایل به سبز پسته ای دیده شد. در مشاهده ریزبینی نیز کنیدی زایی به خوبی تحریک شده

بود (شترنگ ۱).

گفتگو و بهره گیری پایانی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که تمامی درماتوفیت های مورد بررسی در محیط تهیه شده از عصاره دانه برنج به خوبی رشد نموده اند. پژوهشگران دیگر نیز مشاهده کردند که همه گونه های *مایکروسپورم* روی محیط برنج [1] به خوبی رشد می کنند (۸).

در تحقیق حاضر از عصاره آبی دانه برنج برای ساختن محیط کشت استفاده کرده برای جامد کردن آن آگار اضافه شده است. درحالی که در محیط برنج، دانه برنج با آب مقطر اتوکلاو می شود که در واقع برنج به حالت پخته شده درمی آید. به نظر می رسد محیط تهیه شده از عصاره برنج از نظر کیفیت بهتر باشد، زیرا سطح محیط کاملاً صاف بوده و کلنی های رشد کرده در آن به خوبی قابل تشخیص می باشد.

به طورکلی در بیشتر قارچ های مورد مطالعه نظیر *ت. منتاگروفایتیس*، *ت. شوئن لاینی*، *م. کنیس* و *م. جیپسئوم*، رشد کلنی در مقایسه با محیط سابورودکستروزآگار بیشتر بوده و دربرخی موارد اندازه کلنی حتی تا دوبرابر آن در محیط سابورو نیز می رسد. این رشد وسیع می تواند به دلیل دارا بودن مواد غذایی پایه نظیر ئیدرات های کربن، مواد ازته و مواد چرب و ویتامین های گروه B باشد که نیاز غذایی ارگانیسم ها را برطرف کرده است.

از مـــزایای بـــا اهمیت این محیط تشخیص افتراقی دو قارچ *ت. منتاگروفایتیس* و *ت. روبروم* است. این دو قارچ در تشخیص آزمایشگاهی درماتوفیت ها، غالباً ایجاد اشکال می نمایند که به علت تشابه زیاد از نظر خصوصیات ظاهری و ریزبینی آنها در محیط سابورو می باشد (نگاره ۱). به همین دلیل تحقیقات زیادی برای تشخیص افتراقی این دو گونه از هم شده است. از جمله تست های افتراقی بین این دوگونه تست سوراخ کردن مو، استفاده از محیط های کورن میل آگار و اوره می باشد (۱). محیط بروموکرزول پرپل کازئین - گلوکزآگار جهت تشخیص سریع این دو گونه پیشنهاد شده است و این تست معادل تست سوراخ کردن مو است با این تفاوت که در مدت کوتاه تری می توان نتیجه گرفت (۹).

کنیدی زایی *ترایکوفایتون ها* در محیط کشت دارای ارزش تشخیص می باشد که این کنیدی زایی در محیط های غنی خصوصاً از نظر تیامین، بهتر صورت می گیرد. به عنوان مثال، *ت. ویولاسئوم* و *ت. وروکوزوم* به طور معمول فاقد ماکرو و میکروکنیدی هستند ولی اگر در محیط تیامین دار کشت داده شوند، ماکرو و میکروکنیدی به تعداد کم تولید می کنند (۱). میکروکنیدی ها همانند قطرات اشک بوده و ماکروکنیدی چماقی شکل حاوی ۵ - ۳ سلول و تعداد آن بسیار کم است. نتایج حاصل این تحقیق با مطلب فوق کاملاً همسویی داشته، بطوری که در

1- Rice grain medium

محیط عصاره برنج که حاوی مقدار تیامین نیز می باشد، ت. *ویولاسئوم* تولید تعداد کمی میکروکنیدی و به ندرت ماکروکنیدی کرده است و در ت. *وروکوزوم* نیز تولید میکروکنیدی را کمی تحریک کرده است.

تحریک کنیدی زایی در محیط عصاره برنج را نیز می توان به وجود ویتامین های گروه B از جمله تیامین در دانه برنج نسبت داد (۳).

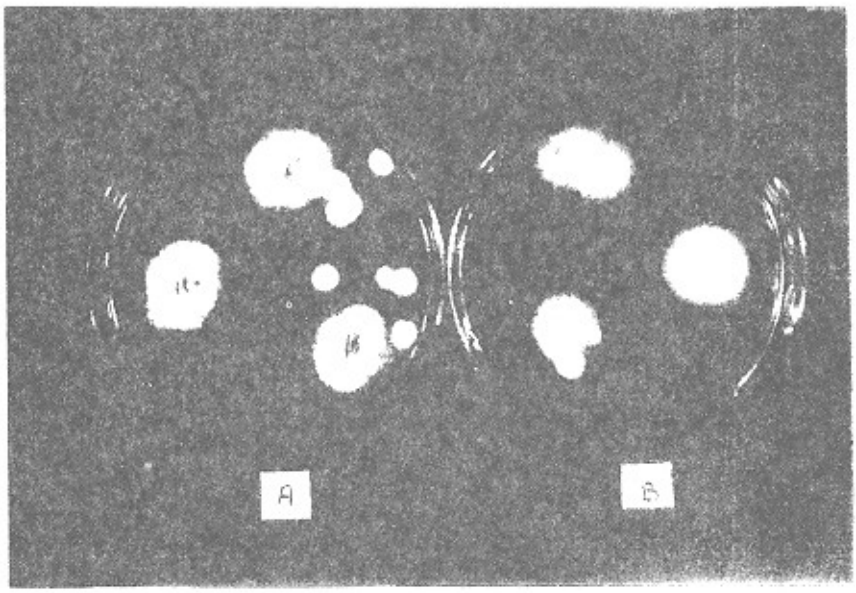
اپیدرموفایتون فلوکوزوم برای رشد نیاز مبرم به تیامین و اینوزیتول دارد (۵). از آنجا که *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* در محیط تهیه شده از عصاره برنج رشد کرده، می توان نتیجه گرفت که این محیط نیازهای غذایی این قارچ را برطرف کرده است و به نظر می رسد علاوه بر تیامین دارای اینوزیتول نیز باشد.

محیط سابورودکستروزآگار به طور معمول محیطی مناسب برای رشد درماتوفیت ها محسوب می شود و علت رشد بهتر و کنیدی زایی بیشتر آنها در محیط سابورودکستروز آگار حاوی عصاره برنج را می توان به وجود مواد مغذی از جمله ئیدرات های کربن، مواد ازته ، مواد چرب و خصوصاً تیامین در دانه برنج نسبت داد.

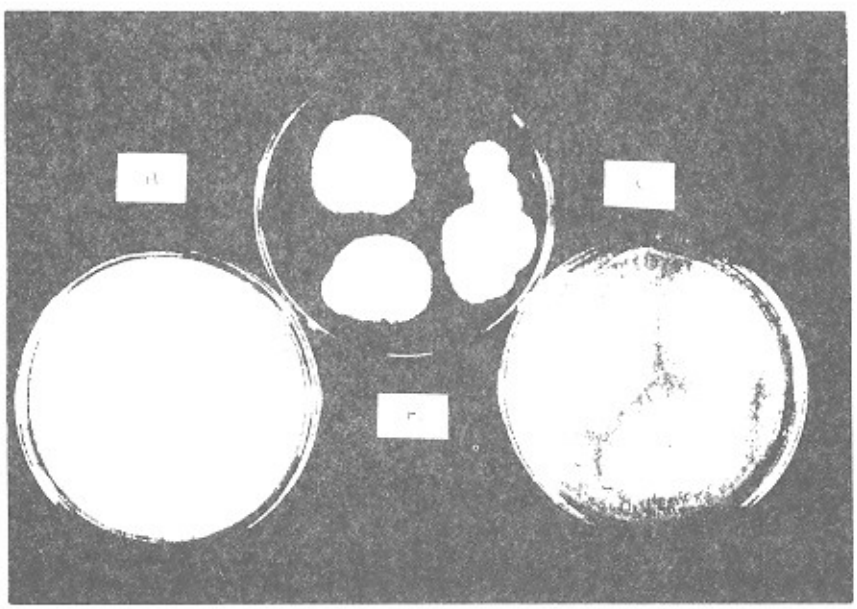
بنـــابراین، همانطور که مشاهده می شود استفاده از عصاره برنج در محیط کشت درماتوفیت ها دارای مزایای زیادی بوده و به سادگی نیز در هر آزمایشگاهی باحداقل امکانات قابل تهیه و استفاده می باشد.

شترنگ ۱ - خصوصیات ظاهری و ریزبینی درماتوفیت ها در محیط تهیه شده از عصاره برنج

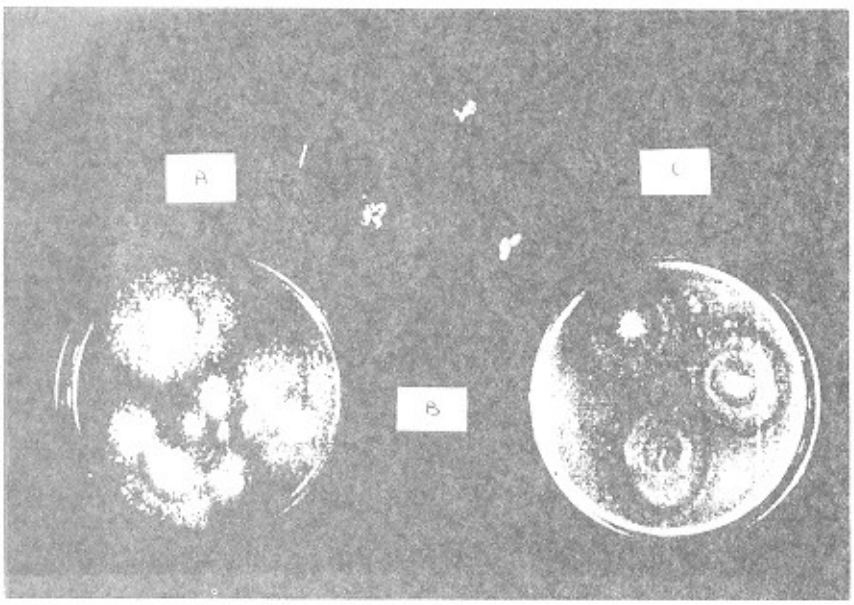
کنیدی زایی	اندازه کلنی پس از یک هفته درمقایسه با محیط S	رنگ پشت کلنی	رنگ سطح کلنی	بافت کلنی	زمان تشکیل کلنی	نوع درماتوفیت
میکرو و ماکروکنیدی	دو برابر محیط S	زرد کرم	مرکز زرد کرم اطراف سفید	پودری- حاشیه پرزی	روز سوم	*ت. متاگروفایتیس* (واریته متاگروفایتیس)
میکرو و ماکروکونیدی	بزرگ تر از محیط S	کرم - پس از ۸ قرمز	سفید - پس از ۸ روز دارای رنگدانه قرمز	پرزی	روز پنجم	*ت. روبروم*
میکرو و ماکروکنیدی	تقریباًبه اندازه محیط S	کرم - دومرکز سرخ مایل به بنفش	ابتدا سفید - پس از چند روز سرخ مایل به بنفش	پوستی - رشد شعاعی کمی چین خورده در مرکز	روز دهم	*ت. ویرلاسنوم*
میکرو و ماکروکنیدی	تقریباًبه اندازه محیط S	سفید کرم	سفید شیری	پوستی	روز دهم تا دوازدهم	*ت. وروکوزوم*
ندارد	بزرگ تر از محیط S	سفید مرم	سفید بی رنگ	پوستی	روز هشتم	*ت. فسولن لاپنی*
میکرو و ماکروکنیدی	دو برابر محیط S	زرد قهوه‌ای	زرد قهوه‌ای	پرزی - رشد شعاعی	روز سوم	*م. کنیس*
میکرو و ماکروکونیدی	دو برابر محیط S	دارچینی	مرکزنخودی یا شیر قهوه ای اطراف سفید	پودری- قطرات شفاف، حاشیه مضرس	روز سوم	*م. جیپسئوم*
ماکروکنیدی	تقریباًبه اندازه محیط S	زرد نیره	زرد مایل به سبز پسته ای	پودری - رشد شعاعی	روز هفتم	*ا. فلوکوزوم*



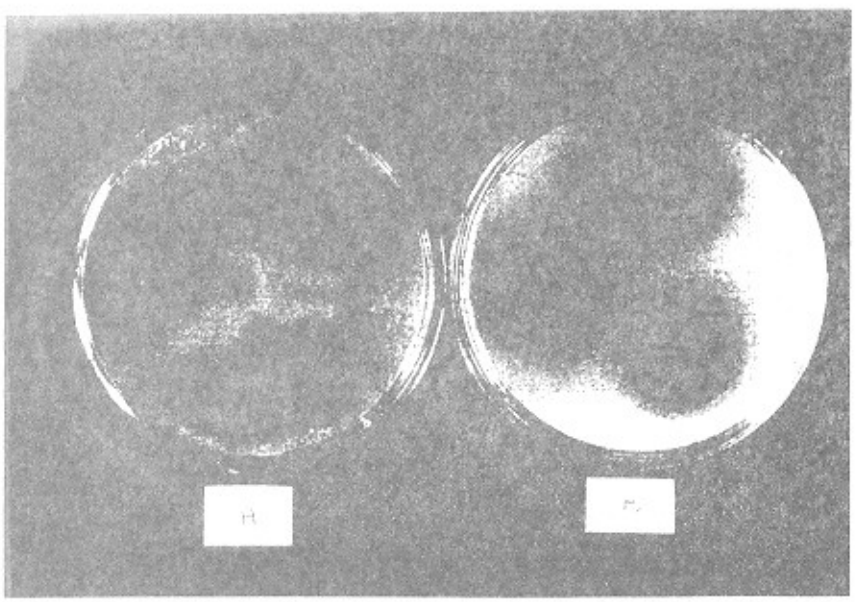
نگاره ۱- مقایسه منظره کلنی ت. *متاگروفایتیس* (A) و ت. *روبروم* (B) در محیط سابورودکستروزآگار



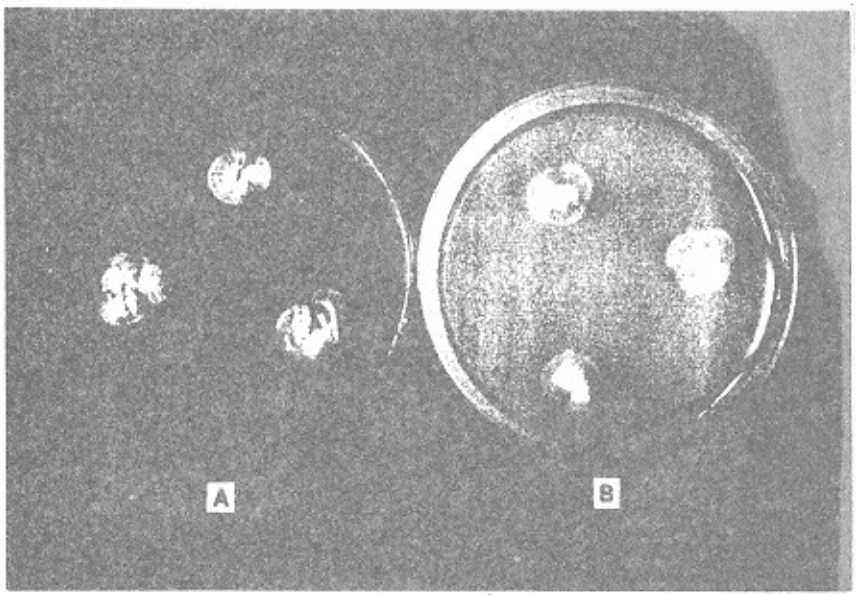
نگاره ۲- منظره کلنی ت. *متاگروفایتیس* : (A) در محیط برنج، (B) در محیط آفتابگردان، (C) درمحیط ذرت



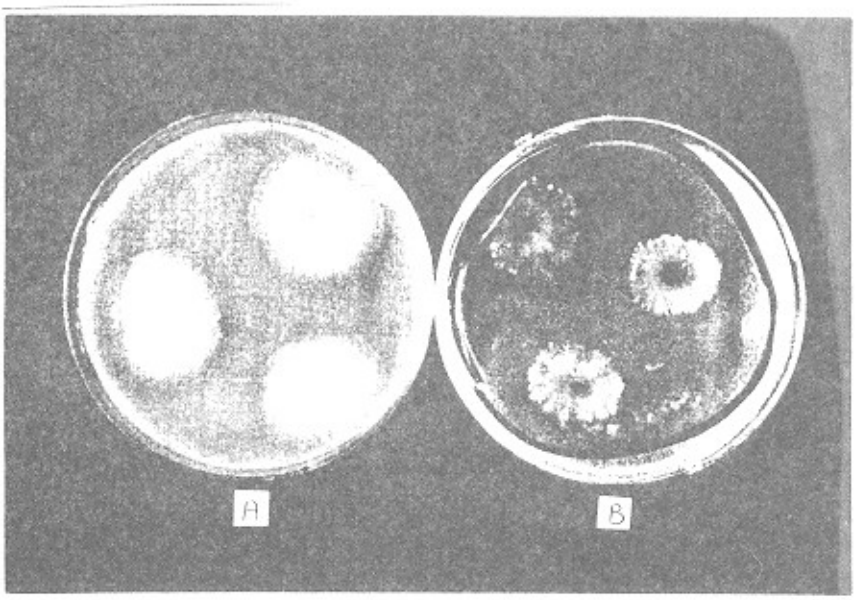
نگاره ۳- منظره کلنی ت. روبروم : (A) در محیط برنج، (B) در محیط آفتابگردان، (C) در محیط ذرت



نگاره ۴ - منظره پشت کلنی ت. روبروم : (A) در محیط برنج ، (B) در محیط ذرت

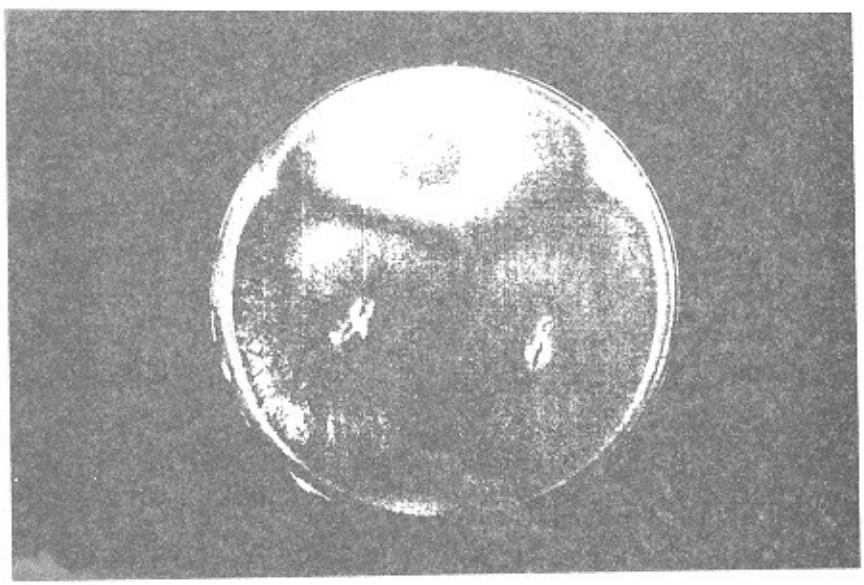


نگاره ۵ - منظره کلنی ت. *شوئن لاینی* : (A) در محیط کتان سفید، (B) در محیط برنج

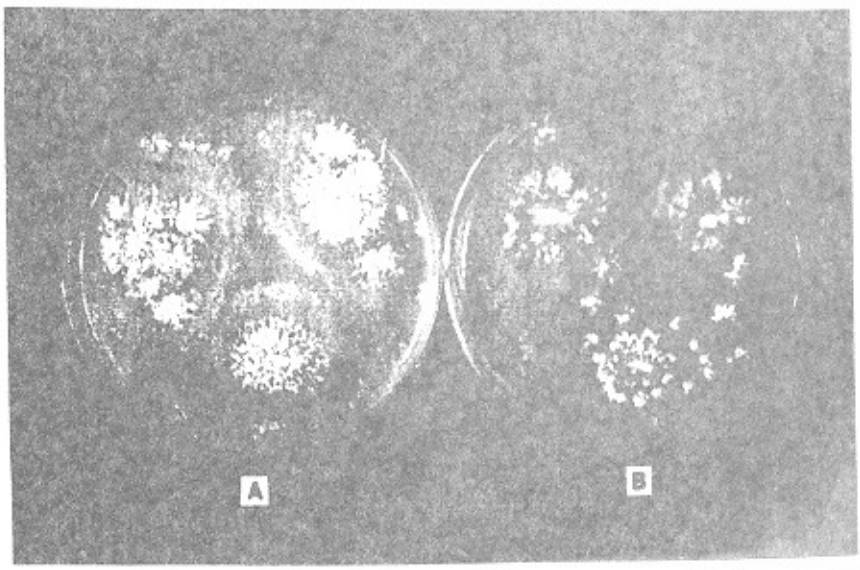


نگاره ۶ - منظره کلنی ت. *ویولاسئندم* : (A) در محیط کتان سفید، (B) در محیط برنج

نگاره ۷ - منظـــره ریـــزبینی ت. ویولاسندم در محیط آفتابگردان. کتان سیاه و برنج (میکروکونیدی ها)



نگاره ۸- منظره کلنی م. کنیس در محیط برنج



نگاره ۹- منظره کلنی م. جیپسئوم : (A) در محیط ذرت، (B) در محیط برنج

کتابنامه

۱- امامی، مسعود؛ کردبچه، پریوش؛ مقدمی، مهین؛ زینی، فریده (۱۳۷۳): قارچ شناسی پزشکی، انتشارات دانشگاه تهران.

۲- زرگری، علی (۱۳۷۲): گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران.

3- Aly R (1994): Culture media for growing dermatophytes. *Jorunal of the American Academy of Dermatology*. **31**:S104-S108.

4- Donald I. (1994): An overview of common dermatophytes. *Jorunal of the American Academy of Dermatology*. **31**: S112-S116.

5- Phipot CM (1997): The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophyte Sabourandia, **15**: 141-50.

6- Rezusta A , Rubio MC and Alejander MC (1991) : Differentiation between *T.mentagrophytes* and *T. rubrum* by sorbitol Assimilation, *Journal of Clinical Microbiology*, PP: 219-20.

7- Rippon JW (1988): *Medical Mycology*, third edition, W.B.Saunders Co.

8- Shadomy HJ and Philpot CM (1980): Utilization of standard laboratory methods in the laboratory diagnosis of problem dermatophytes. *Am J Clin Pathol*, **74**: 197-201.

9- Summer BRC, Rosenthal SA and J Kang (1988): Rapid method of differentiation of *T.rubrum* from *T.mentagrophytes* related dermatophyte species, *J Clinical Microbiology*. **26**(11): 2279 - 82.