Archive of SID

میزان جداسازی باکتریهای مهم بیهوازی از نمونه‌های بالینی

دکتر محمد حسین سالاری، دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

Isolation Rate of Important Anaerobic Bacteria From Clinical Specimens

ABSTRACT

It is now generally recognized that anaerobic bacteria may be involved in most human bacterial infections that follow any form of surgery or are related to those body sites that have a large anaerobic population. Anaerobes must therefore be sought in a wide variety of clinical specimens.

In this study, 3015 specimens of patients (1684 male and 1331 female) with periodontitis (160 cases), abcess (305), sinusitis (33) and enterocolitis (2517) wer investigated.

The anaerobic isolates from patients with periodontitis were 244 cases, abscess 32, enterocolitis 42.

Key Words: Infection, anaerobic bacteria, clinical specimens

چکیده

در حال حاضر مشخص گردیده است که باکتریهای بیهوازی در بروز اغلب عفونتهای باکتریائی انسان که به دنبال اعمال جراحی ایجاد می شود و یا موضع عفونت در معرض باکتریهای بیهوازی قرار می‌گیرد، مشارکت می‌نمایند. بنابراین می‌بایست بخصوص در این نوع نمونه‌های بالینی جستجو و تشخیص باکتریهای بیهوازی را بطور جدی منظور نمود.

در این مطالعه ۳۰۱۵ نمونه بیماران (۱۶۴۸ مرد و ۱۳۳۱ زن) مبتلا به بیماریهای پریودنتیت (۱۶۰ مورد)، آبسه (۳۵۰ مورد)، سینوزیت (۳۳ مورد) و انتروکولیت(۲۵۱۷ مورد) با روشهای باکتریولوژی و کشت سلول مورد بررسی قرار گرفت.

میزان باکتریهای جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه عبارتست از: پریودنتیت ۲۴۴ مورد، آبسه ۳۲ مورد، انتروکولیت ۴۲ مورد. ضمناً از نمونه‌های بیماران مبتلا به سینوزیت باکتری بیهوازی جدا نگردید.

مقدمه

عده‌ای از باکتریهای بیهوازی ممکن است بتنهایی عامل عفونت باشند ولی اغلب همراه با سایر باکتریهای هوازی و یا بیهوازی، عفونت مخلوط و یا میکس را باعث می‌شوند. مهمترین عفونتهای ناشی از باکتریهای بیهوازی را می توان اسهال و یا انتروکولیت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل توکسی‌ژنیک یا کلستریدیوم پرفرنجنس انتروتوکسی‌ژنیک، انواع عفونتهای پریودنتال، باکتریمی واژینیت، آندومتریت و عفونتهای بعد از سقط جنین را نام برد. شرح مختصر عفونتهایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند بدین صورت است:(۲، ۱)

۱ - پریودنتیت: اصلاح پریودنتیت، التهاب لثه و مخاط آلوئولی است که به لیگمان، استخوان آلوئولی و سمنتوم گسترده می‌شود. علائم این بیماری عبارتند از : خونریزی لثه، عمیق شدن سالکوس ژنژیوال، تورم، بی‌رنگ و براق شدن لثه، بدبو شدن تنفس، بدمزگی دهان و نهایتاً لقی و افتادن دندان. بر حسب سن بیمار و انواع باکتری موجود در پلاک بیمار این

www.SID.ir

Archive of SID

عفونت را به گروههای ذیل تقسیم می نمایند.

- پریودنتیت قبل از بلوغ
- پریودنتیت جوانان
- پریودنتیت با پیشرفت سریع
- پریودنتیت مزمن بالغین

باکتریهای بیهوازی و کاپنوفیلی که از نمونه بیماران مبتلا به پریودنتیت جدا می گردند را بعضی از گونه های پورفایرومواناس، پروتلا، فوزوباکتریوم، ایکنلا، کاپنوسایتوفاگا و اکتینوباسیلوس اکتینومایستم کومیتانس گزارش می‌کنند (۳،۴).

۲- آبسه : اغلب باکتریهای گروه باسیل‌های گرم منفی بیهوازی، پپتوکوکوس، پپتواستریتوکوکوس و اکتینومایسس، همراه با دیگر باکتریها در بروز عفونتهای گوناگون از جمله آبسه‌های نواحی مختلف بدن، مشارکت می‌نمایند(۵، ۲).

۳ - انتروکولیت ناشی از باکتریهای بیهوازی: مهمترین باکتریهای انتروپاتوژن بیهوازی را می توان کلستریدیوم دیفیسیل توکسی‌ژنیک عامل اسهال و کولیت سودوممبران، کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ C عامل نکروز روده و کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ A راکه عامل مسمومیت غذایی است نام برد(۷، ۶). اخیراً نژادهایی از این باکتری را بعنوان کلستریدیوم پرفرنجنس انتروتوکسیژنیک معرفی می کنند که عامل اسهال مزمن و شدیدی می‌باشد و مانند اسهال و کولیت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل بدنبال مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها عارض می گردد(۶،۷،۸). تعدادی از باکتریهای بیهوازی که از اهمیت کمتری برخوردار بوده ولی ممکن است در افراد ناتوان باعث اسهال شوند را می‌توان کلستریدیوم‌های سپتیکوم، بوتریکوم و سوردلی، باکتروئید فراجلیس انتروتوکسی ژنیک و نیز گونه‌هایی از جنس اثروبیوم اسپیریلوم را نام برد(۹،۲).

این مطالعه با توجه به اهمیتی که باکتریهای بیهوازی در تشخیص‌های آزمایشگاهی و نیز درمان مناسب عفونتهای پلی‌باکتریال دارند صورت گرفته است.

روش و مواد

پس از تکمیل پرسشنامه و کسب اطلاعات لازم، از هر بیمار نمونه گیری بعمل آوردیم. از بیماران مبتلا به پریودنتیت با استفاده از پروب سترون، عمق پاکت را اندازه گیری کرده، سپس دو عدد پیپریونیت شماره ۴۰ را به داخل پاکت بیمار فروبرده، یکی را پس از بیرون آوردن داخل شیشهٔ حاوی یک سانتیمتر مکعب محیط مایع تایوگلیکولات احیاء شده و دیگری را در محیط کاربیلر قرار دادیم. نمونهٔ بیماران مبتلا به نوعی آبسه و یا سینوزیت که توسط فردی ذیصلاح نمونه‌گیری شده بود را به محیط‌های مذکور منتقل نمودیم. از افراد مبتلا به انتروکولیت نیز نمونه تهیه کرده، هریک از نمونه‌های مذکور را در اسرع وقت روی محیط های اختصاصی بروسلاآگار همراه با ویتامین K1 ، همین و ۵ درصد خون خرگوش و نیز جهت جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل روی محیط سیکلوسرین سفوکسیتین فروکتوز آگار کشت نموده، سپس این محیطها را در شرایط بیهوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۴۸ ساعت قرار دادیم. با انجام آزمایش آئروتولرانس و استفاده از تست‌های اختصای مانند تخمیر قندها، لیپاز، لسیتیناز(Egg yolk agar medium) و هیدرولیز اسکولین ، احیاء نیترات، مقاومت به صفراء، حساسیت به دیسکهای وانکومایسین (۵ میلی‌گرم) کانامایسین (یک میلی گرم)، کلستین (۱۰ میلی گرم) و ... باکتری را مورد شناسائی قرار دادیم(۱۰،۱۱).

در رابطه با تشخیص توکسین، کلستریدیوم‌های دیفیسیل و پرفرنجنس انتروتوکسی‌ژنیک از کشت سلول با روش ذیل استفاده شده است:

۱ - باکتری را روی محیط مخصوص (Brain heart infusion broth=BHI) کشت داده، به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم.

۲ - با استفاده از فسفات بافر (pH= ۷/۲) از محیط کشت مذکور (پس از دورهٔ انکوباسیون) و یا نمونهٔ مدفوع محلولی با رقت ۱/۱۰ تهیه نموده، آنرا به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰RPM سانتریفوز کرده، سپس قسمت فوقانی رسوب را با فیلتر ۰/۴۵ میکرون پالایش نمودیم.

۳ - محیط اختصاصی کشت سلول (Minimum essential medium) را همراه با سلولهای هلا(Hella cell) فراهم کرده ، به هر حفره میکروتایترپلیت مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول فوق افزودیم (در هر میلی‌لیتر محیط می‌بایست $۲/۵\times۱۰^{۴}$ عدد سلول باشد).

۴ - به هر حفرهٔ میکروتایترپلیت مقدار ۰/۱ میلی لیتر از محلول سانتریفوژ و فیلتر شده فوق با رقت ۱/۴۰ افزودیم.

www.SID.ir

Archive of SID

۵ - میکروتایترپلیت را در شرایط اتمسفر باضافه ۵ درصد گاز کربنیک نگه داشته، آنرا به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قراردادیم.

۶ - در صورتیکه ۵۰ درصد سلولهای هلا گرد شدند، نتیجهٔ آزمایش مثبت در غیر این صورت منفی قلمداد گردید.

لازم به ذکر است که جهت کنترل آزمایش از توکسین و آنتی‌توکسین اختصاصی و استاندارد باکتری استفاده شده است (۱۲،۱۳،۱۴).

یافته‌ها

در این مطالعه جمعاً ۳۰۱۵ نمونه بیماران مبتلا به پریودنتیت، آبسه ، سینوزیت و انتروکولیت را به روش باکتریولوژی و کشت سلولی مورد بررسی قرار داده، نتایج بدست آمده و نیز بعضی از خصوصیات گرد آوری شدهٔ بیماران بدین صورت است:

۱ - توزیع فراوانی بیماران مورد مطالعه در گروههای فوق بر حسب سن و جنس عبارتست از: ۱۶۰ نمونه بیماران مبتلا به پریودونتیت (۷۸ مرد، ۸۲ زن)، ۳۰۵ نمونه مربوط به بیماران مبتلا به نوعی آبسه (۲۰۰ مرد و ۱۰۵ زن)، ۳۳ نمونه بیماران مبتلا به سینوزیت (۳۳ مرد و ۱۱ زن) و ۲۵۱۷ نمونه بیماران مبتلا به انتروکولیت (۱۳۸۴ مرد و ۱۱۳۳ زن) (جدول ۱)

۲ - توزیع فراوانی باکتریهای بیهوازی اجباری و غیربیهوازی جداشده از نمونه‌های مربوط به بیماران مبتلا به پریودونتیت، آبسه، سینوزیت و انتروکولیت را می‌توان در جدول شمارهٔ ۲ ملاحظه نمود. لازم به توضیح است که از ۳۳ نمونه بیماران مبتلا به سینوزیت و نیز ۱۱۴ نمونه مربوط به آبسه جلدی و زیر جلد باکتری بیهوازی جدا نگردید.

بحث

عفونتهای ناشی از باکتریهای بیهوازی گاهی جدیست بطوریکه مرگ و میر نسبتاً بالایی را به این نوع عفونت‌ها نسبت می‌دهند. بدلیل مقاوم شدن تعدادی از باکتریهای بیهوازی به انواع آنتی‌بیوتیک و نیز مشارکت این گروه باکتریها در عفونت‌های پلی میکروبیال، درمان گاهی مشکل و با شکست مواجه می‌گردد. باکتریهای مهم بیهوازی عامل بیماری پریودنتیت که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می باشند عبارتند از: پور فایرومونا‌س جنجیوالیس، پروتلا اینترمدیا، پروتلا ملانینو جنیکا، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم. البته لازم به ذکر است که باکتریهای فوق اغلب همراه با باکتریهای کاپنوفیل مانند اکتینو باسیلوس اکتینومایستم کومیتانس، کاپنوسایتوفاگا و ایکنلا کورودنس در بروز این نوع عفونت مشارکت می‌نمایند (۴).

معروفترین باکتری انتروپاتوژن را کلستریدیوم دیفیسیل توکسی‌ژنیک معرفی می کنند که عامل کولیت سودوممبران و اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک می‌باشند. نژادهایی از کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ A، با نام کلستریدیوم پرفرنجنس انتروتوکسی‌ژنیک را نیز بعنوان عامل انتروکولیت نام می‌برند که ممکن است بدنبال مصرف نوع آنتی بیوتیک، بیماری عارض گردد(۱۲،۱۵).

محققین میزان جداسازی باکتریهای بیهوازی را بدین صورت گزارش نموده‌اند:

باکتریمی ۵ درصد، آبسه‌های مغزی ۸۰درصد، عفونتهای سر و گردن مخصوصاً بعد از عمل جراحی ۱۰۰-۵۰ درصد، سینوزیت‌های مزمن و اوتیت مدیا ۵۰ درصد، عفونتهای دهان و دندان ۱۰۰-۹۰ درصد، عفونتهای درون شکم ۹۰-۵۰ درصد، عفونتهای دستگاه جنیتال زنان ۷۵-۵۰ درصد و عفونتهای دستگاه گوارش ناشی از باکتریهای بیهوازی حدود ۲ درصد (۷،۹،۱۰،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸).

میزان جداسازی باکتریهای بیهوازی از نمونه‌های مورد مطالعه عبارتست از ۲۴۴ مورد از نمونه بیماران مبتلا به پریودنتیت، ۳۶ مورد از آبسه‌های سر و گردن، ۴۸ مورد از آبسه‌های درون شکم، ۱ مورد از آبسه‌های مغزی و ۴۲ مورد از نمونه بیماران مبتلا به انتروکولیت.

با توجه به اینکه اغلب عفونتهای بیهوازی بصورت پلی میکروبیال می‌باشد (مشارکت باکتریهای بیهوازی با باکتریهای هوازی، هوازی بیهوازی اختیاری و یا میکروآئروفیل) جهت درمان موفق بیماران رعایت موارد ذیل الزامی است:

۱ - تشخیص باکتریهایی که در عفونت مشارکت نمودند.

۲ - توجه به آخرین الگوی مقاومت داروئی باکتریهای موجود در عفونت.

۳ - اقدام به عمل جراحی و یا خروج چرک در مواردی که

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱ :

توزیع فراوانی بیماران مورد مطالعه برحسب سن وجنس

بیمار / سن به سال	پریودنتیت n = ۱۶۰		آبسه n = ۳۵۰		سینوزیت n = ۳۳		انتروکولیت n = ۲۵۱۷	
	مرد n = ۷۸	زن n = ۸۲	مرد n = ۳۰۰	زن n = ۱۵۰	مرد n = ۲۲	زن n = ۱۱	مرد n = ۱۳۸۴	زن n = ۱۱۳۳
< ۲۰	۱۱ (۶/۹)	۱۲ (۷/۵)	۳۰ (۹/۸)	۹ (۳)	۷ (۱۵/۲)	۲ (۶)	۶۰۹ (۳۴/۲)	۵۶۵ (۲۲/۴)
۳۰ – ۲۰	۲۰ (۱۲/۵)	۲۳ (۱۴/۴)	۵۴ (۱۷/۷)	۲۴ (۷/۹)	۸ (۲۴/۳)	۲ (۶)	۲۰۷ (۸/۲)	۱۴۲ (۵/۶)
۴۰ – ۳۱	۲۸ (۱۷/۵)	۲۴ (۱۵)	۴۲ (۱۳/۸)	۲۷ (۸/۹)	۶ (۱۸/۲)	۵ (۱۵/۲)	۲۱۳ (۸/۵)	۱۳۸ (۵/۵)
۵۰ – ۴۱	۱۹ (۱۱/۹)	۲۳ (۱۴/۴)	۴۸ (۱۵/۷)	۲۶ (۸/۵)	۲ (۶)	۲ (۶)	۲۱۷ (۸/۶)	۱۵۱ (۶)
> ۵۰	—	—	۲۶ (۸/۵)	۱۹ (۶/۲)	۱ (۳)	—	۱۳۸ (۵/۵)	۱۳۷ (۵/۴)

www.SID.ir

جدول شماره ۲ : توزیع فراوانی باکتریهای بیهوازی جداشده از نمونه های مورد مطالعه برحسب نوع بیماری

باکتریهای بیهوازی		پریودنتیت	آبسه n = ۳۰۵			اتتروکولیت
جنس	گونه	n = ۱۶۰	سر و گردن n = ۱۱۴	داخل شکم n = ۶۷	مغزی n = ۱۰	n = ۲۵۱۷
Bacteroides	fragilis	—	—	۲۵ (۳۸/۳)	—	—
Porphyromonas	gingivalis	۷۲ (۴۵)	۱۸ (۱۵/۸)	—	—	—
Prevotella	melaninogenicus	۲۸ (۱۷/۵)	—	۱۸ (۱۵/۸)	—	—
	intermedia	۵۳ (۳۳/۱)	—	—	—	—
	oris	۱۳ (۸/۱)	—	—	—	—
	oralis	۶ (۳/۸)	—	—	—	—
	Buccae	۳ (۱/۹)	—	—	—	—
Fusobacterium	nucleatum	۳۶ (۲۲/۵)	۱۴ (۱۲/۳)	—	—	—
	mortiferum	۹ (۵/۶)	—	—	—	—
	necrophorm	۶ (۳/۸)	۲ (۱/۸)	۲ (۳)	—	—
Wolinella	recta	۱۸ (۱۱/۳)	—	—	—	—
Actinomyces	Israelii	—	۴ (۳/۵)	—	—	—
Peptostreptococcus	SPP	—	—	۳ (۴/۵)	۱ (۱۰)	—
Clostridium (toxigenic)	difficile	—	—	—	—	۳۶ (۱/۴)
Clostridium (enterotoxignic)	Perfringenes	—	—	—	—	۶ (۰/۲)

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

۴ - تجویز آنتی‌بیوتیک‌هایی که بتوانند بر روی کلیه باکتریهای بیهوازی و غیر بیهوازی موجود در نمونه مؤثر باشند(۱۲،۱۵).

ضروری است.

سپاسگزاری

از همکاران محترم بخش باکتریولوژیک دانشکدهٔ بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران بخصوص استاد ارجمند جناب آقای دکتر قاضی سعیدی و نیز خانمها حافظی، شریعتی، قریشی، ابرانپرست و آقایان ثابت زاده، نجفی و از همکاران مرکز آموزش و تحقیقاتی بهداشتی یزد بخصوص خانمها سحر امیر معافی و فاطمه فلاح صمیمانه تشکر می‌نماید.

منابع

1- Frederic J, Braude AI. Anaerobic infection of the paranasal sinuses. N Engl Med 1974; 290: 135-136.

2- Duerden BI, Drasar BS. Anarobes in human disease, Edward Arnold 1991; 446: 245-286.

3- Suzuki JB. Diagnosis and classification of the periodontal diseases. periodontics 1988;32(2): 195-216.

4- Macfarland TW, Samaranayake LP. Clinical oral Microbiology. 1st edition 1989: 7-31, 51-70.

5- Bartlett JG, Gorbach SL, Tally FP, et al. Bacteriology and treatment of primary lung abscess. Am Rev Respir Dis 1974; 109: 510.

6- Larson HF, Borriello SP, Infection diarrhea due to clostridium perfringens. Journal of infectious disease 1980; 157: 390-391.

7- Borriello SP, Wlch AR, Larson HE, Barclay FE. Diarrhea an simultaneous excretion of clostridium difficult cytotoxin and C. perfringens enterotoxin. Lancet 1984; 2: 1218.

8- Finegold SM. Anaerobic infections in human: An overview. Anaerobe 1994; 1(1): 1-9.

9- Myers LL. Isolation of enterotoxigenic Bacteroids Fragilis from human with diarrhea . Journal of clinical Microbiology 1987; 25: 2330-2333.

10- Levett PN. Anaerobic Microbiology, A practical approach. Oxford university press 1991: 303.

11- Connie RM, George Manuselis JR: Textbook of diagnostic Microbiology WB Saunders company, 1st edition 1995; 537-593, 447-511.

12- Hoshuyama S, Kanoe M, Amimato A. Isolation of obligate and facultative anaerobic bacteria from feline subcutaneous abscesses. J Vet Med Sci 1996; 58(3): 273-4.

13- Idaluzz AC. Detection of clostridial toxin stool from children with diarrhea. J Med Microbiol 1980; 22: 29-31.

14- Borrmann E, Schulze F. Detection of clostridium perfringens toxins using cell cultuer. Dev Biol Stand 1996; 86: 327.

15- Ryan RWI, Kwasni KRC. Rapid detection of clostridium difficile toxin in human Feces. J Clin Microbiol 1980; 12: 776-776.

16- Rood JI, Mcclane BA, Songer IG, Tithall RW. The clostridia molecular biology and pathogenesis. Academix press 1997, 119-140.

17- Brook J, Foote PA, Slots J. Immune response to anaerobic bacteria in patients with peritonsillar cellulitis and abscess. Acta Otolaryngol Stockh 1996; 116(6): 888-91.

18- Brook J, Frazier EH, Gher ME. Micropbiology of periapical abscesses and associated maxillary sinusitis. J Periodontal 1996; 67(6): 608-10.

www.SID.ir