پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
سال ۲۱، شماره ۱، صفحات ۶۷-۷۹ (فروردین - خرداد ۱۳۷۶)

بررسی نحوه رشد پنوموسیستیس کارینئی در محیطهای کشت آگزنیک

دکتر امیر سیدعلی مهبد*، دکتر ساعد شهابی** و مهرنوش حاتمی***

خلاصه

در این مطالعه مقدماتی که به مدت دو سال (۱۳۷۲-۱۳۷۴) روی محیطهای کشت آگزنیک پنوموسیستیس کارینئی صورت پذیرفت، مشخص شد که در صورت استفاده از مقادیر کافی سیکلوهگزآمید پنی‌سیلین و استرپتومایسین، محیط آگزنیک حاوی نئوپپتون-ان-استیل‌گلوکزآمین (NPG) قادر است نیازهای رشد ارگانیسم را به شکل تروفوزوئیت آماده سازد؛ ثانیا" پس از افزودن نیوپپتون، و N-استیل‌گلوگزآمین، محیط Rosewell Park Memorial Institute = R.P.M.I نیز قادر بود شرایط رشدی مشابه N.P.G را فراهم آورد. در عین حال، معلوم شد که افزودن مواد احیاکننده و پاره‌ای از ویتامینها به محیطهای بالا، و نیز مجاور کردن ارگانیسم با استرپتوکوك گروه A، بر سرعت رشد آن می‌افزاید. همچنین بعد از استفاده از محیطهای دیفازیک حاوی مایع و ژلوز NPG، قادر به مشاهده تکثیر تروفوزوئیت‌هاو میکروکولونی‌ها در سطح ژلوز بودیم.

* استادیار گروه انگل و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

** دانشیار گروه انگل و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*** کارشناس ارشد انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

مقدمه

عفونتهای فرصت طلب توسط میکروارگانیسمهائی به وجود می‌آیند که هر چند قادر به ایجاد بیماری در افراد سالم نمی‌باشند، ولی می‌توانند در مبتلایان به نقایص متعدد سیستم ایمنی، موجب بروز بیماری ثانویه شوند (۹). پنوموسیستیس کارینئی (Pneumocystis carinii=PC) نیز ارگانیسمی فرصت طلب است که هر چند به طور پوشیده و بدون علائم واضح در بدن میزبان سالم زندگی می‌کند، ولی در بیماران گرفتار نقایص ایمنی سلولی (CMI) باعث بروز ذات‌الریه می‌شود (۱۵ و ۱۸). از جمله افراد مستعد می‌توان از نوزادان نارس یا دچار سوء تغذیه و مبتلایان به نقایص اولیه و یا ثانویه سیستم ایمنی مانند مبتلایان به بدخیمیها (لوسمی و لنفوم بدخیم)، بیماران تحت پرتودرمانی، افراد تحت درمان با داروهای کاهنده ایمنی (Immunosupresive) و نیز مبتلایان به ایدز (AIDS) را نام برد (۱۷). بیماری پنوموسیتوزیس (Interstetial Plasms cell Pneumonia=I.P.P) با تب ضعیف (و یا فقدان آن)، سرفه بدون خلط، تنگی نفس و سیانوز همراه است که در نهایت به مرگ بیمار منجر می‌شود (۱۸). نظر به انتشار جهانی، و شیوع بالای بیماری در افراد مستعد و میزان بالای مرگ و میر ناشی از آن، شناخت این ارگانیسم می‌تواند از نظر درمان سریعتر اولویت و اهمیت فراوان داشته باشد. از آنجا که در صورت اندك بودن در نمونه‌های بالینی و با توجه به مشکلات موجود در رنگ آمیزیهای اختصاصی و غیر اختصاصی، مشاهده ارگانیسم در لام مستقیم چندان آسان نمی‌باشد، کشت آن در محیطهای آسان و در دسترس همیشه مورد نظر محققان این رشته بوده است. علاوه بر جنبه تشخیص، کشت PC می‌تواند بسیاری از اسرار حل نشده آن را نیز روشن سازد؛ چرا که با وجود قدمت شناخت این ارگانیسم، هنوز سئوالات زیادی در مورد طبقه بندی و یا اپیدمیولوژی آن وجود دارد. اما کشت پنوموسیستیس کارینئی نیز چندان کار آسانی نیست؛ به طوری که بسیاری از کوششهای محققان در این مورد ناموفق مانده است. تا چندی پیش محیطهای کشت سلولی (۲)، یگانه محیطهای شناخته شده‌ای بودند که ارگانیسم در آنها رشد می‌کرد. ولی از آنجا که به دلیل آلودگی این قبیل محیطها توسط متابولیتها، پادگن‌ها، آنزیمها و DNA سلولهای میزبان، کاربرد آنها محدود می‌باشد، مدتها اندیشمندان در پی محیط کشت آگزنیک (Axenic) مناسبی بودند. تا آنکه در سال ۱۹۹۰ این محیط توسط کوشیون (Cushion) کشف و گزارش شد. هر چند محیط ارائه شده دارای محاسن زیادی است، ولی هنوز کامل به نظر نمی‌رسد، چرا که قادر نیست با تامین نیازمندیهای ارگانیسم، تعداد آنرا به بیشتر از ۸ الی ۱۰ برابر افزایش دهد. به همین مناسبت نیز در این تحقیق سعی شده است که با افزودن مواد مختلف، محیط بالا اصلاح شود. شایان ذکر است که نه تنها تکمیل محیط کشت ارائه شده، بلکه اصولا" کشت این ارگانیسم برای اولین بار در این تحقیق صورت پذیرفته است.

محیطهای کشت مصرفی و نحوه انجام بررسی

محیط مایع NPG

این محیط که توسط کوشیون پیشنهاد شده (۳)، حاوی ۱۰ گرم نئوپپتون (Neo Peptone)، ۲ گرم N-استیل گلوکزآمین که با صافی استریل شده است؛ ۱۰۰۰ micg/ml استرپتومایسین، ۱۰۰۰ U/ml پنیسیلین، ۱۰۰۰ mg/L سیکلوهگزامید، در یک لیتر آب مقطر با pH=۴/۵ می‌باشد. از آنجا که N-استیل گلوکزآمین، استرپتومایسین، و پنیسیلین در برابر حرارت حساس هستند باید آنها را پس از اتوکلاو شدن محیط، اضافه کرد.

در این بررسی، جهت غنی ساختن محیط NPG مواد زیر در غلظتهای مشخص به آن افزوده شد:

۱) اسید فولیک ۰/۵ میلیگرم / میلیلیتر؛

۲) آهن (کلرور آهن) ۰/۱ میلیگرم / میلیلیتر؛

۳) قند لاکتوز ۵ میلیگرم /میلیلیتر؛

۴) Tween-80 تجارتی، ساخت کارخانه دیفکو، ۲۰ micl/ml؛

۵) سیستئین ۵ میلیگرم/ میلیلیتر؛

۶) ۲- مرکاپتواتانول (2-ME) تجارتی ساخت کارخانه مرك، به میزان ۱۰۰ micl/ml؛

۷) NADPH تجارتی (ساخت کارخانه بیومریو) به میزان ۲۰ میکرولیتر در میلیلیتر؛

۸) آرژنین ۵ میلیگرم در میلیلیتر؛

۹) ویتامین C با غلظت ۱۰۰ میلیگرم / میلیلیتر به میزان ۲۰ میکرولیتر در میلیلیتر؛

۱۰) ویتامین B.Complex تجارتی، به مقدار ۲۰ میکروگرم در میلیلیتر؛

۱۱) استرپتوکوك گروه A (قبل از کشت عصاره ریه در محیط مایع فوق، سوسپانسیون غلیظی از استرپتوکوك گروه A را- که از بخش میکروبشناسی دانشکده پزشکی تهیه شده بود- به نسبت حجم به حجم روی عصاره ریه موش سفید آزمایشگاهی مبتلا ریخته، آنرا به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کردیم؛

۱۲) مخلوط ویتامینهای C، و B. Complex و همچنین 2-ME و آهن، در مقادیر فوق.

جهت تهیه محیط RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) به محیط پالایش شده فوق، ۱ درصد نئوپپتون اتوکلاو شده، ۱۰۰۰ U/ml پنیسیلین، ۱۰۰۰ micgr/ml استرپتومایسین، ۱۰۰۰ mg/L سیکلوهگزامید، و ۲ درصد N-استیل‌گلوکزآمین پالایش شده اضافه شد و به کمک اسید کلریدریک pH نهایی محیط روی ۴/۵ تنظیم شد. در عین حال، جهت غنی‌تر شدن محیط به پاره‌ای از آنها به ترتیب ویتامینهای B.Complex، و C، و همچنین 2-ME افزوده شد.

برای تهیه محیط دیفازیک حاوی ژلوز NPG خوندار، به یک لیتر محیط مایع NPG ۲۰ گرم آگار، و ۵ درصد گلبول متراکم گروه O مثبت افزوده شد. پس از ریختن ژلوز در داخل لوله‌ها و انجماد مورب آنها، به داخل لوله‌ها محیط مایع NPG و همچنین NPG غنی شده افزون گشت. کلیه محیط‌های بالا به ترتیبی تهیه شدند که در نهایت از هر کدام ۶ لوله حاوی ۱۰ میلیلیتر محیط مایع کشت داشته، نتایج رشد ارگانیسم در تمام ۶ لوله مورد بررسی قرار گرفت.

طی دو مرحله مجزا، با تزریق رو به افزایش دگزامتازون ۸ میلیگرمی، در مقادیر ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳ و ۰/۳۵ میلیلیتر/ ۲ بار در هفته، سیستم ایمنی ۳۰ سر موش بتدریج تضعیف شد (۵). همراه با تزریق دگزامتازون، جهت محافظت حیوانات از عفونت‌های باکتریائی استرپتومایسین یک گرمی، و پنیسیلین ۸۰۰ هزار واحدی نیز به آنان تزریق شد (۶ و ۱۲). مقادیر تزریقی داروهای فوق کاملا" مشابه دگزامتازون بوده، با افزایش مقادیر تزریقی این کورتیکواستروئید با اثر درازمدت (۵)، مقدار آنتی‌بیوتیکها نیز افزایش می یافتند. در عین حال، جهت محافظت بیشتر حیوانات در هر بار تزریق، ۵۰۰ میلیگرم تتراسیکلین به ظرف محتوی آب آشامیدنی آنان افزوده می‌شد (۶). پس از مبتلا شدن موشها تهیه عصاره ریه آنان توسط دستگاه خردکننده بافتی (Tissue grinder)، و لیز گویچه‌های سرخ همراه بوسیله کلرور آمونیم ۸۳ درصد (۱۳)، ۰/۱ از آنرا به هر لوله حاوی محیط‌های NPG مایع و دیفازیک افزودیم. در عین حال ۰/۶ میلیلیتر از عصاره ریه را نیز به ۶ لوله که هر کدام

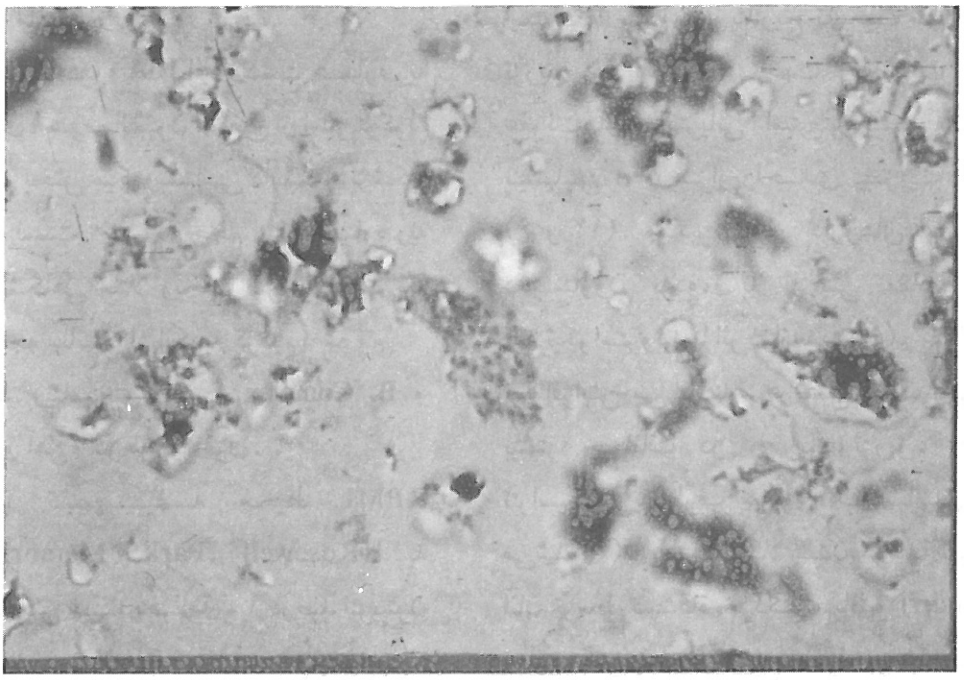
حاوی ۱۰ میلیلیتر سرم فیزیولوژی استریل بودند - به عنوان شاهد - اضافه کردیم. لوله‌های حاوی محیط‌های کشت و سرم فیزیولوژی طی یک هفته در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و هر روز تعداد هسته‌های ارگانیسم در تمام آنها شمارش می‌شد.

شمارش تعداد هسته‌های ارگانیسم بوسیله برداشت ۵ میکرولیترها از محیط کشت، تهیه گسترش دایره‌ای، رنگ آمیزی گیمسا، شمارش هسته‌ها در ۶ قطر طولی و عرضی، محاسبه میانگین، و بالاخره روزانه از فرمول:

فاکتور رقت × Pi/4 × B × A (۶) استفاده شد.

در این فرمول، A، میانگین تعداد هسته‌ها در یک قطر؛ B، میانگین تعداد میادین نوری موجود در یک قطر؛ و Pi برابر با عدد ۳/۱۴ می‌باشد. همچنین جهت مشاهده کلنی، سطح ژلوزها هر روز بازدید می‌شد و در نهایت، پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی گیمسا، سطح آنها از نظر میکروسکوپی نیز مورد مطالعه قرار می گرفت.

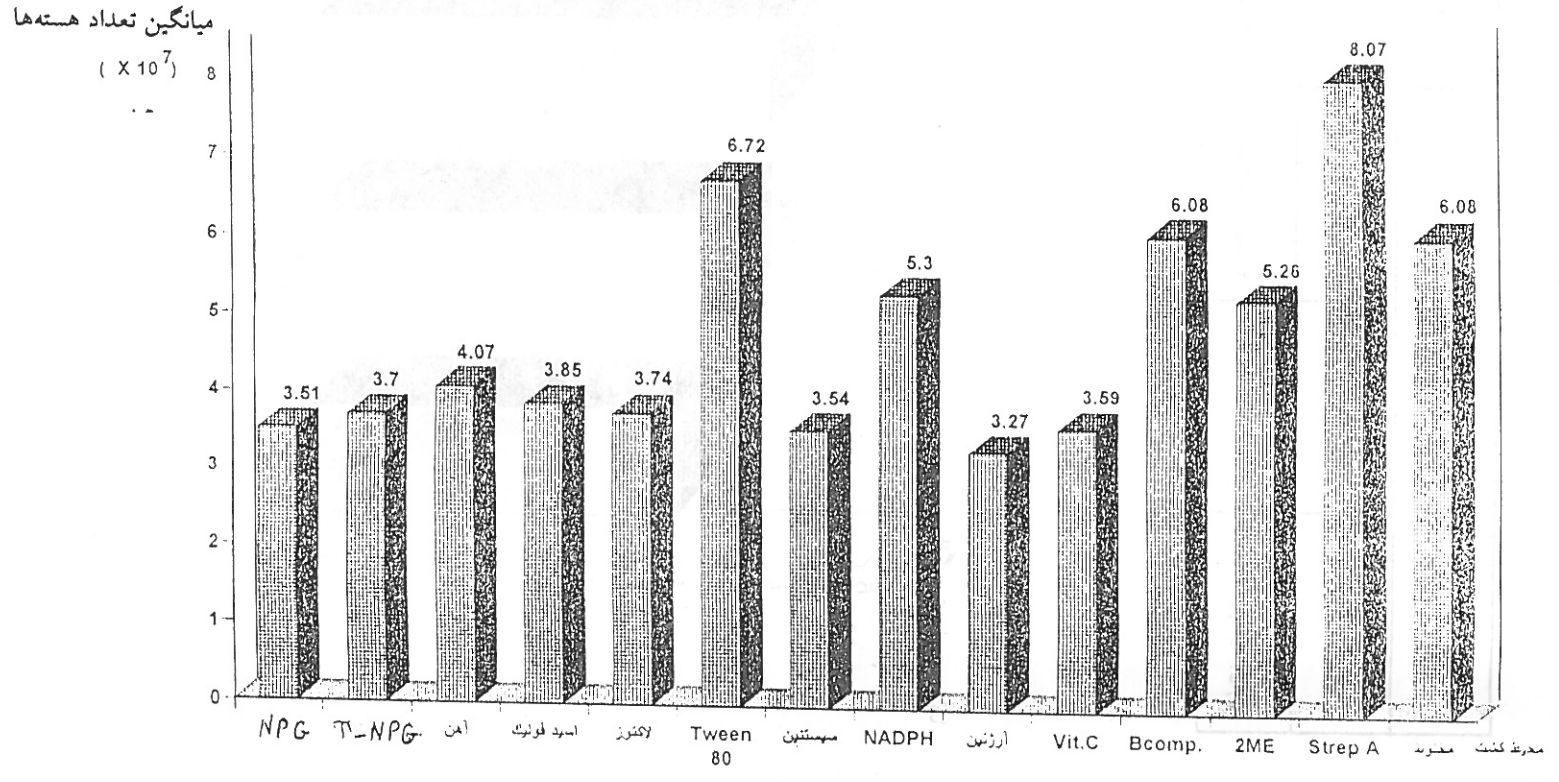
از آنجا که نتایج روزانه به دست آمده از شمارش هسته‌های ارگانیسم در کلیه محیط‌های کشت یاد شده، بسیار زیاد بوده و جداول زیادی را طلب می‌کند (۱۶)، تنها نتایج به دست آمده از روز سوم (در هر دو سری کشت) به طور اختصار در جدولها و نمودارهای ۱ و ۲ و نیز شکلهای ۱-۶ گردآوری شده است. برای آنکه نتایج به دست آمده با یکدیگر مقایسه شود و همچنین اثبات معنی دار بودن اختلافات مابین آنها، پس از یک کاسه کردن پراکنشها(Variances) آزمون آماری t انجام شد (۱۷).



شکل ۱) توده‌های تروفوزوئیت P.c در محیط مایع NPG در روز سوم (درشت نمائی ×۱۰۰۰) رنگ‌آمیزی گیمسا

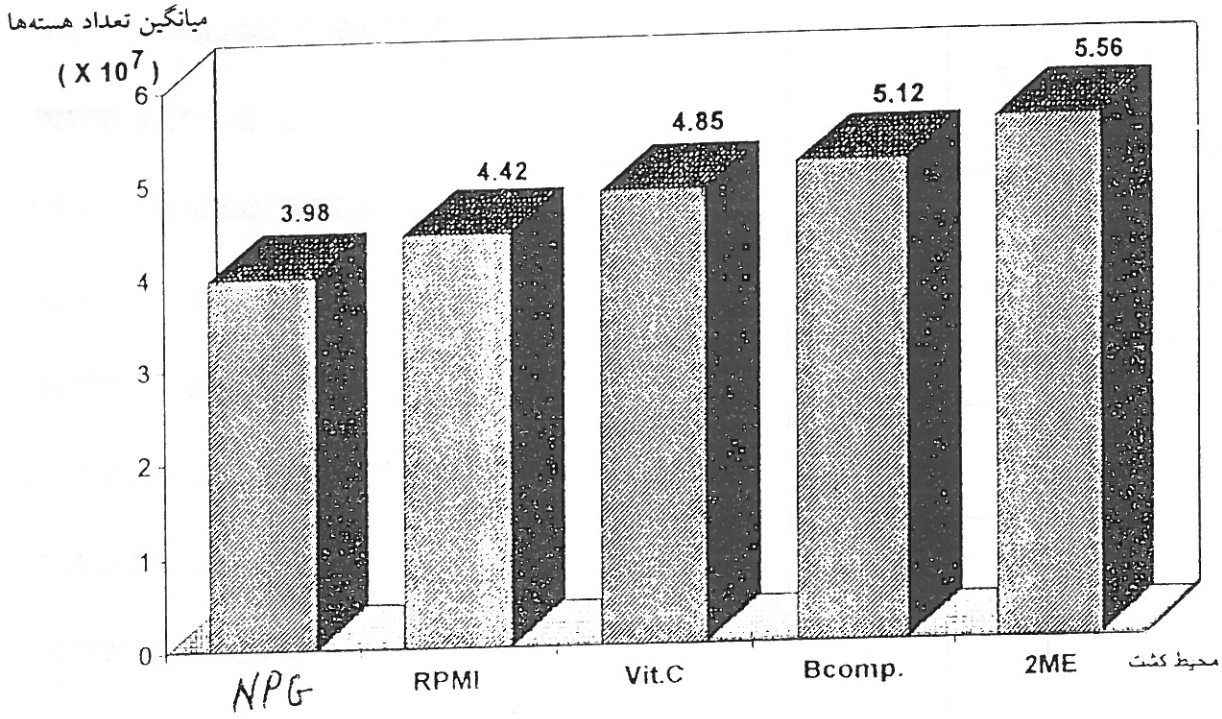
جدول و نمودار ۱) مقایسه نتایج به دست آمده از شمارش تعداد هسته‌های ارگانیسم در هر میلیلیتر از محیط کشت‌های مایع غنی شده و نشده .N.P.G، در روز سوم. به علت تعداد ناچیز ارگانیسم در سرم فیزیولوژی - در همان روز - ستون مربوطه حذف شده است

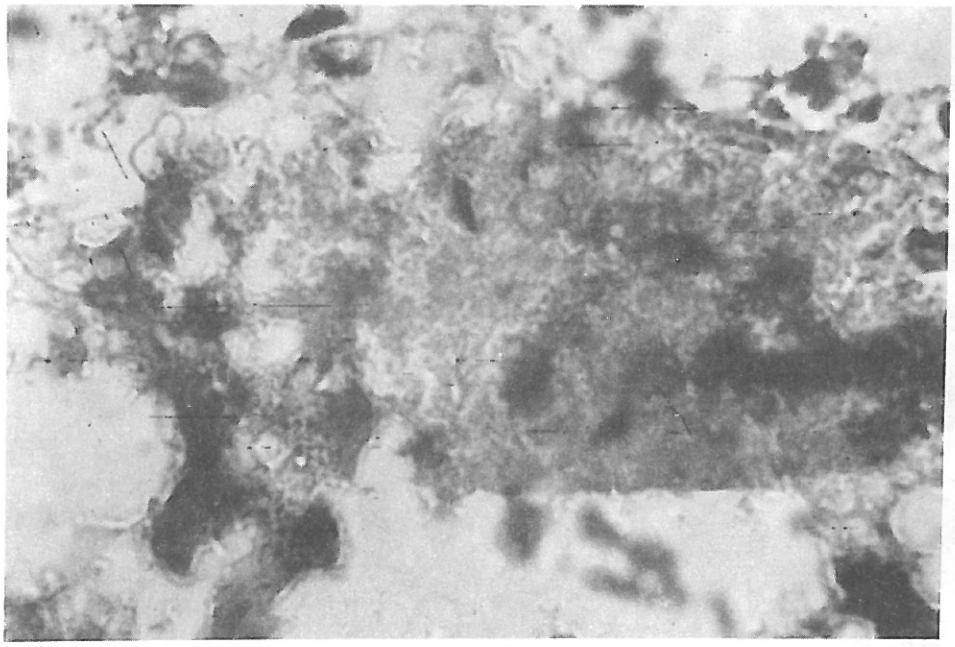
محیط کشت / روز	NPG	تایو NPG	آبگوشت‌هاNPG غنی شده										
			آهن	اسیدفولیک	لاکتوز	Tween 80	سیستئین	NADPH	آرژنین	Vit.C	B.Comp	2 EM	Strep A	مخلوط
سوم	۳/۵۱ ±۱/۱۲ ×۱۰^۷	۳/۷۰ ±۱/۰۴ ×۱۰^۷	۴/۰۷ ±۱/۲۵ ×۱۰^۷	۳/۸۵ ±۱/۲۵ ×۱۰^۷	۳/۷۴ ±۱/۲۸ ×۱۰^۷	۶/۷۲ ±۱/۸۲ ×۱۰^۷	۳/۵۴ ±۱/۳۲ ×۱۰^۷	۵/۳۰ ±۱/۴۵ ×۱۰^۷	۳/۲۷ ±۱/۱۲ ×۱۰^۷	۳/۵۹ ±۱/۰۳ ×۱۰^۷	۶/۰۸ ±۱/۶۷ ×۱۰^۷	۵/۲۶ ±۱/۳۴ ×۱۰^۷	۸/۷۰ ±۲/۳۱ ×۱۰^۷	۶/۸۰ ±۱/۵۶ ×۱۰^۷



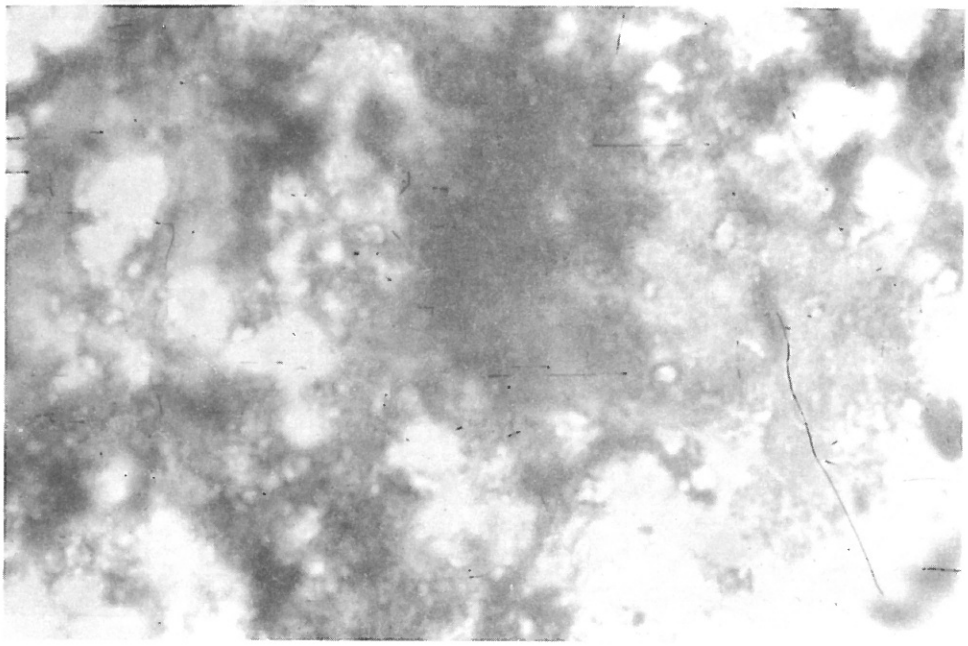
جدول و نمودار ۲) مقایسه نتایج به دست آمده از شمارش تعداد هسته های ارگانیسم در هر میلیلیتر از محیط کشتهای مایع غنی شده و غنی نشده .R.P.M.I با یکدیگر، و محیط .N.P.G در روز سوم. به علت تعداد ناچیز ارگانیسم در سرم فیزیولوژی و در همان روز، ستون مربوطه حذف شده است

محیط کشت	NPG	RPMI	RPMI		
روز			Vit.C	B.Comp	2 ME
سوم	۳/۹۸ ±۱/۳۵×۱۰^۷	۴/۴۲±۱/۴۳×۱۰^۷	۴/۸۵ ±۱/۴۸×۱۰^۷	۵/۱۲±۱/۶۳×۱۰^۷	۵/۵۶ ±۱/۸۷×۱۰^۷

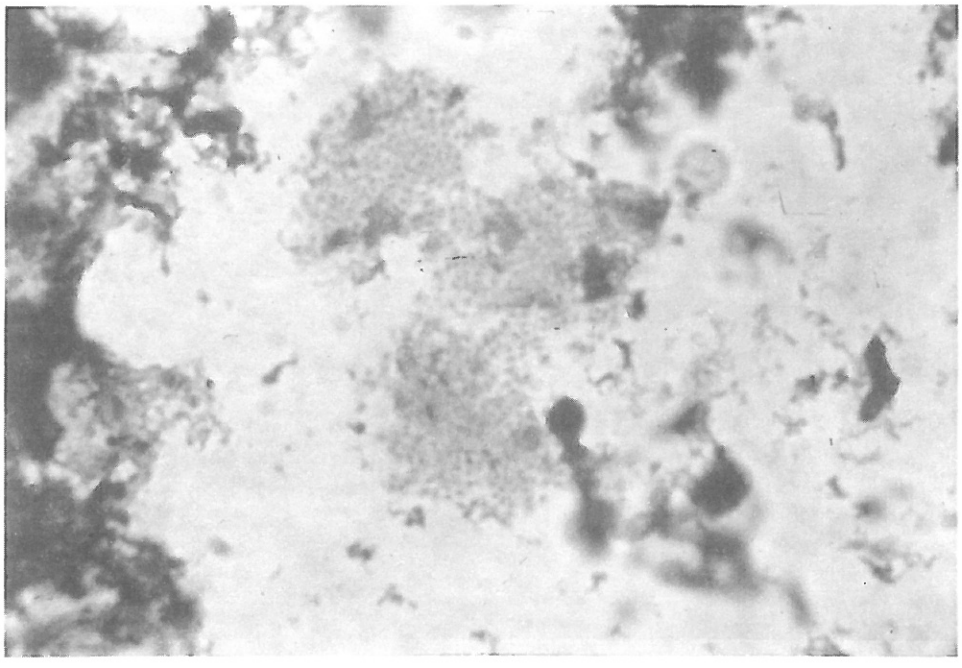




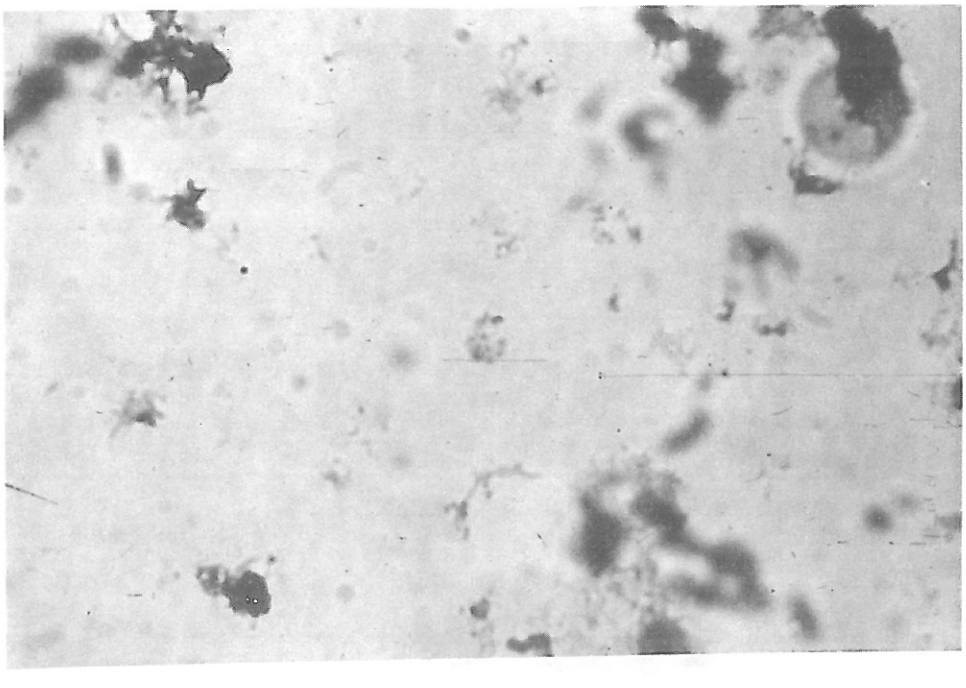
شکل ۲) توده‌های تروفوزوئیت P.c در محیط مایع NPG غنی شده با 2-ME در روز سوم (درشت نمائی ×۱۰۰۰) رنگ‌آمیزی گیمسا



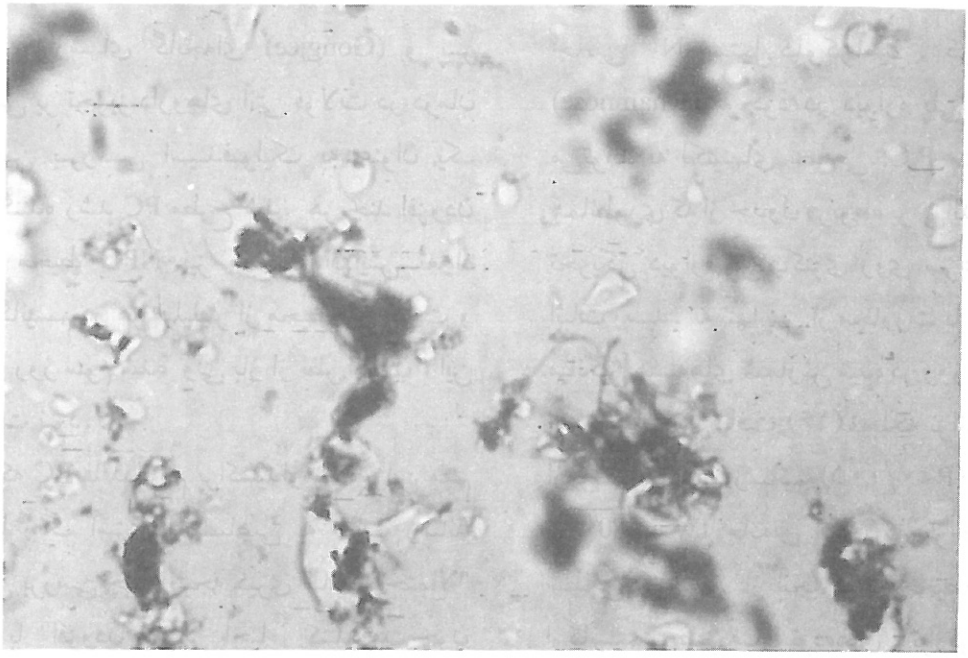
شکل ۳) توده‌های تروفوزوئیت P.c در محیط مایع NPG غنی شده با ویتامین C در روز سوم (درشت نمائی ×۱۰۰۰) رنگ‌آمیزی گیمسا



شکل ۴) توده‌های تروفوزوئیت P.c در محیط مایع NPG غنی شده با ب- کمپلکس در روز سوم (درشت نمائی ×۱۰۰۰) رنگ‌آمیزی گیمسا



شکل ۵) تروفوزوئیت هاوکیست P.c در محیط مایع NPG غنی شده با آهن در روز سوم (درشت نمائی ×۱۰۰۰) رنگ‌آمیزی گیمسا



شکل ۶) تروفوزوئیتها و کیست P.c در محیط مایع NPG غنی شده با Tween-80 در روز سوم (درشت نمائی ×۱۰۰۰) رنگ‌آمیزی گیمسا

بحث

نحوه تضعیف سیستم ایمنی موشهای سفید آزمایشگاهی بر اساس تجربیات و گزارشهای هوگس (Hughes)، شیوتا (Shiota)، گرادوس (Gradus)، و همچنین با کمک جداول موجود در کتاب فارماکولوژی گودمن و گیلمز (Goodman & Gilman)، صورت پذیرفت. از آنجا که در این روش به علت تضعیف تدریجی سیستم ایمنی سلولی حیوانات و محافظت آنها در مقابل عفونتهای باکتریائی، بر مدت عمر حیوانات افزوده شده، فرصت تکثیر کافی در اختیار P.C. قرار می‌گیرد، تعداد ارگانیسمی که از ریه موشها جدا شد، از تجربیات قبلی به مراتب بیشتر بود که از کورتیزول (کورتیکوستروئید سریع‌الاثر) جهت تضعیف سیستم ایمنی آنها استفاده می‌شد.

همانطوری که از جداول، نمودارها و تصاویر صفحات قبل مشخص می‌شود، محیط NPG جهت رشد PC محیط آگزنیک مناسبی است؛ چرا که تنها میانگین تعداد هسته‌های ارگانیسم در هر میلیلیتر از آن به مراتب بیشتر از سرم فیزیولوژی در روز مربوطه می‌باشد (۱۶) (در اینجا روز سوم به نمایش درآمده است)، بلکه این مهم را می‌توان با آزمون آماری t، و به احتمال کمتر از ۰/۰۰۵ به اثبات رساند. در رابطه با محیط‌های غنی شده باید به این نکته اشاره شود که افزودن مواد یاد شده بر مبنای گزارشهای دانشمندان صورت گرفته است. افزودن آهن بر مبنای گزارش واینبرگ (Weinberg) بود (۱۴). وی مشخص کرد که افزودن دفروکسامین (Deferoxamine) به محیط‌های کشت، می‌تواند مانع از رشد ارگانیسم شود. به همین علت نیز این عنصر به صورت ملح محلول کلرور آهن به محیط افزوده شد. هرچند این ماده توانست میانگین تعداد هسته‌ها را در هر میلیلیتر از محیط افزایش دهد اما احتمالا" به علت کم بودن تعداد محیط‌های کشت مصرفی اثبات این مهم توسط آزمون آماری t میسر نگشت (P=۰/۲۰).

پس از گزارشهای گانجه‌ای (Gongjee) و پیپر (Piper)، مبنی بر تجویز داروهای آنتی فولات در درمان IPP، در این بررسی اسیدفولیک به عنوان یک عامل‌تسریع کننده رشد PC مطرح شد. هر چند افزودن این ماده به محیط NPG نیز موجب افزایش تعداد هسته‌های ارگانیسم در هر میلیلیتر از محیط‌های کشت و بخصوص در روز سوم شد، ولی باز از نظر آزمون t این مهم قابل اثبات نبود.

از آنجا که PC فاقد آنزیم پراکسیداز بوده، این مهم را می‌توان با رنگ آمیزی اختصاصی به اثبات رساند (۱۶). در این بررسی چنین نتیجه گیری شد که احتمالا" باید بتوان با افزودن مواد احیاء کننده‌ای چون تایوگلیکولات، ویتامین C، NADPH, 2ME, و سیستئین به محیط N.P.G. بر تعداد ارگانیسم افزود. بهترین نتیجه‌ای که در این میان به دست آمد به ترتیب توسط NADPH, 2ME، ویتامین C، تایوگلیکولات و در نهایت سیستئین بود. هر چند افزودن سیستئین و تایوگلیکولات در سرعت رشد P.C. اختلاف چندانی به وجود نیاورد (۳)، ولی احیاکننده‌های دیگر چون NADPH, 2ME و ویتامین C بخوبی از عهده این عمل برآمدند؛ به طوری که این مهم توسط آزمون آماری t و با احتمال برابر ۰/۰۲۵ نیز به اثبات رسید. اهمیت دیگر افزودن مواد احیاکننده، بقای بهتر ارگانیسم در محیط‌های کشت بود که به علت محدودیت، جداول مربوطه ارائه نشد (۱۶).

هر چند بر طبق گزارش پژوهندگان (۱۰) قند لاکتوز می‌تواند با اتصال به لکتینهای سطح ارگانیسم موجب تحریک و تکثیر بیشتر آن شود، ولی بر خلاف انتظار در این بررسی، اضافه کردن این ماده نتوانست سرعت تکثیر P.C. را افزون سازد.

استرپتوکوک گروه A نیز دارای قابلیتی مشابه لاکتوز است، چرا که این باکتری به علت دارا بودن زنجیره جانبی N-استیل‌گلوکزآمین در قند رامنوز (Rhamnose) موجود در دیواره پلی ساکاریدی خود، می‌تواند به لکتینهای سطحی P.C. متصل شود (۱۰). همانطوری که از جدول مربوطه برمی‌آید در این بررسی اثر تحریکی دیواره این باکتری روی سرعت رشد P.C. به اثبات رسید. نه تنها پس از مجاورت با این باکتری، تعداد میانگین هسته‌های شمارش شده در روز سوم - و روزهای دیگر - افزایش یافت (۱۶)، بلکه توانستیم این امر را با آزمون t به اثبات رسانیم ($P<۰/۰۰۵$).

Tween-80 ماده‌ای است که موجب کاهش کشش سطحی می‌شود. از آنجا که در محیطهای کشت، رشد ارگانیسم بصورت توده‌های تروفوزوئیتی صورت می‌پذیرد، افزودن این ماده با این هدف صورت پذیرفت که شاید بتوان تروفوزوئیتها را از یکدیگر جدا کرد. همانطوری که در شکل ۶ مشخص شده است این ماده تا حد زیادی موفق به این عمل شد؛ و علاوه بر آن میانگین تعداد هسته‌ها در محیطهای حاوی آن (بخصوص در روز سوم) بمراتب بیشتر از محیطهای فاقد آن بود ($P=۰/۰۰۵$).

افزودن ویتامین ب - کمپلکس بدین امید صورت گرفت که هم نیاز P.C. به اسید فولیک برطرف شود، و نیز با توجه به وجود نیاسین (Niasine) موجود در آن، ماده تقریبا" احیاکننده‌ای نیز به محیط کشت افزوده شود. نتایج به دست آمده نشان دادند که این ویتامین می‌تواند سرعت رشد ارگانیسم را به طور معنی داری افزایش دهد، و این امر با آزمون t به اثبات رسید ($P=۰/۰۰۵$).

هر چند افزودن توام ویتامینهای B.Complex, C، 2-ME و آهن به محیط کشت موجب افزایش میانگین تعداد ارگانیسم‌ها شد، اما به دلایلی- که برای ما نیز ناشناخته است- این افزایش چندان قاطع و شاخص نبود و میانگین تعداد هسته‌های شمارش شده در این دسته از محیطهای کشت مشابه با ویتامین B.Complex به

تنهایی و کمتر از محیطهای حاوی Tween-80 بود.

در این بررسی سعی شد تا احتمال جایگزینی سایر محیطهای مایع بجای NPG مورد ارزیابی قرار گیرد. همان طوری که از نمودار و جدول ۲ برمی‌آید، در این بررسی مشخص شد که مشروط بر افزودن N-استیل‌گلوکزآمین، و نئوپپتون، در مقادیر پیشنهاد شده جهت محیطهای .N.P.G و .R.P.M.I نیز قادر است نیازهای رشد .P.C را بخوبی تامین کند و در عین حال افزودن مواد احیاکننده چون 2-ME، و ویتامینهای C و B.Complex نیز می‌توانند سرعت رشد ارگانیسم را افزایش دهند.

هر چند اختلاف میانگین تعداد هسته‌های شمارش شده در دو محیط .R.P.M.I و .N.P.G غنی نشده معنی دار نبود (P=۰/۱)، ولی پس از افزودن مواد احیا کننده بخصوص 2ME، روند تکثیر ارگانیسم در.R.P.M.I تسریع شد و میانگین تعداد هسته‌های شمارش شده بطور معنی داری بیشتر از محیط .N.P.G غنی نشده گردید (P=۰/۰۲۵). در عین حال احتمالا" به علت خنثی شدن متابولیتهای اکسید آن، افزودن 2ME، و نیز بقای بهتر ارگانیسم در .R.P.M.I را باعث شد (۱۶).

از آنجا که قند فوکوز نیز قادر است، با اتصال به لکتینهای سطحی .P.C، آنها را وادار به تکثیر کند (۱۰) و با توجه به این نکته که این قند شاخص آنتی ژنیک گروه خونی O یاخته‌های سرخ انسان می‌باشد، در این بررسی سعی شد تا با تهیه ژلوز خوندار .N.P.G- که با خون گروه O انسان تهیه شده بود- ارگانیسم را وادار به ایجاد کلنی کنیم. نتایج به دست آمده نشان دادند که به شرط خشک نشدن ژلوزها، محیط دیفازیک .N.P.G می‌تواند از عهده این امر برآید؛ به خصوص اگر جهت فاز مایع آن از .N.P.G غنی شده استفاده شده باشد. در محیط دیفازیک پس از تکثیر .P.C در فاز مایع، با اتصال ارگانیسم به سطح یاخته‌های سرخ، شاهد تکثیر آن روی سطح ژلوز، بوسیله بررسی گسترش رنگ شده بودیم، که در پاره‌ای از موارد منجر به ایجاد شدن پرگنه‌های بسیار ریزی شده بود. پرگنه‌ها ظاهری خشک داشته، بسیار کوچک بودند، به طوری که برای مشاهده آنها نیاز به ذره‌بین بود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج و بحث فوق، می‌توان نتیجه گرفت که نه تنها از محیطهای مایع .N.P.G، و .R.P.M.I اصلاح شده می‌توان جهت رشد .P.C سود جست، بلکه با غنی کردن آنها توسط موادی چون 2ME، NADPH، اسید فولیک، و آهن نتایج به دست آمده بهتر خواهند بود. در عین حال محیط دیفازیک .N.P.G نیز قادر است موجبات تکثیر ارگانیسم را در هر دو مرحله مایع و جامد خود فراهم سازد. در نهایت آنکه کشت .P.C پس از مجاور کردن آن با استرپتوکوک گروه A، یکی از بهترین راه‌های تحریک ارگانیسم و وادار ساختن آن به تکثیر در محیط آگزنیک .N.P.G می‌باشد.

جدول ضمیمه: نتایج بدست آمده از شمارش تعداد هسته‌های ارگانیسم در هر میلیلیتر از محیط‌های کشت مایع NPG و NPG غنی شده مصرفی طی یک هفته (میانگین و انحراف معیار)

محیط کشت / روز	سرم فیزیولوژی	NPG	تایوگلیکولات	آبگوشت‌های گوشیون غنی شده										
				آهن	اسید فولیک	لاکتوز	Tween 80	سیستئین	NADPH	آرژنتین	ویتامین C	B. Comp	2ME	Strep.A	مخلوط
اول	۱/۴ ±۰/۴۱ ×۱۰^۶	۲/۴۷ ±۰/۷۹ ×۱۰^۷	۲/۷۱ ±۰/۵۷ ×۱۰^۷	۳/۰۹ ±۰/۷۸ ×۱۰^۷	۲/۸۳ ±۰/۶۸ ×۱۰^۷	۲/۶۷ ±۰/۵۹ ×۱۰^۷	۴/۳۸ ±۱/۱۳ ×۱۰^۷	۲/۵۹ ±۰/۷۷ ×۱۰^۷	۳/۹۲ ±۰/۸۶ ×۱۰^۷	۲/۴۹ ±۰/۶۸ ×۱۰^۷	۲/۷۵ ±۰/۵۲ ×۱۰^۷	۴/۴۶ ±۰/۹۵ ×۱۰^۷	۳/۹۵ ±۰/۶۹ ×۱۰^۷	۵/۷۶ ±۱/۲۸ ×۱۰^۷	۴/۴۵ ±۰/۶۵ ×۱۰^۷
دوم	۷/۳۵ ±۱/۲۵ ×۱۰^۷	۳/۰۴ ±۰/۹۷ ×۱۰^۷	۳/۲۳ ±۰/۹۲ ×۱۰^۷	۳/۵۹ ±۱/۰۸ ×۱۰^۷	۳/۴۶ ±۰/۷۸ ×۱۰^۷	۳/۲۸ ±۰/۸۵ ×۱۰^۷	۵/۳ ±۱/۴۱ ×۱۰^۷	۳/۰۸ ±۱/۱۲ ×۱۰^۷	۴/۷۵ ±۱/۲ ×۱۰^۷	۲/۸۶ ±۰/۸۸ ×۱۰^۷	۳/۲۷ ±۰/۸۴ ×۱۰^۷	۵/۳۷ ±۱/۲۴ ×۱۰^۷	۴/۷۵ ±۱/۰۷ ×۱۰^۷	۷/۰۵ ±۱/۸ ×۱۰^۷	۵/۳۷ ±۱/۱ ×۱۰^۷
سوم	۲/۷ ±۰/۸ ×۱۰^۷	۳/۵۱ ±۱/۱۲ ×۱۰^۷	۳/۷ ±۱/۰۴ ×۱۰^۷	۴/۰۷ ±۱/۲۵ ×۱۰^۷	۳/۸۵ ±۱/۲۵ ×۱۰^۷	۳/۷۴ ±۱/۲۸ ×۱۰^۷	۶/۷۲ ±۱/۸۲ ×۱۰^۷	۳/۵۴ ±۱/۳۲ ×۱۰^۷	۵/۳ ±۱/۴۵ ×۱۰^۷	۳/۲۷ ±۱/۱۲ ×۱۰^۷	۳/۵۹ ±۱/۰۳ ×۱۰^۷	۶/۰۸ ±۱/۶۷ ×۱۰^۷	۵/۲۶ ±۱/۳۴ ×۱۰^۷	۸/۰۷ ±۲/۱۳ ×۱۰^۷	۶/۰۸ ±۱/۵۶ ×۱۰^۷
چهارم	۶/۵۴ ±۱/۴ ×۱۰^۳	۳/۰۲ ±۱/۰۵ ×۱۰^۷	۳/۵ ±۱/۱۹ ×۱۰^۷	۳/۶ ±۱/۰۵ ×۱۰^۷	۳/۳۲ ±۱/۰۶ ×۱۰^۷	۳/۰۱ ±۱/۱ ×۱۰^۷	۵/۴۹ ±۱/۶۸ ×۱۰^۷	۳/۳۵ ±۱/۲۶ ×۱۰^۷	۵/۰۹ ±۱/۳۸ ×۱۰^۷	۲/۷۹ ±۰/۹۶ ×۱۰^۷	۳/۲۷ ±۱/۱ ×۱۰^۷	۵/۲۵ ±۱/۳۵ ×۱۰^۷	۴/۷۹ ±۱/۲۷ ×۱۰^۷	۶/۰۲ ±۱/۹۳ ×۱۰^۷	۵/۱۴ ±۱/۱۵ ×۱۰^۷
پنجم	۳/۱۴ ±۰/۹ ×۱۰^۳	۲/۲۸ ±۰/۸۴ ×۱۰^۷	۲/۸۱ ±۰/۹۲ ×۱۰^۷	۲/۶۹ ±۰/۷۸ ×۱۰^۷	۲/۵ ±۰/۸۸ ×۱۰^۷	۲/۱۶ ±۰/۹۶ ×۱۰^۷	۴/۰۴ ±۱/۲۴ ×۱۰^۷	۲/۷ ±۰/۹۶ ×۱۰^۷	۳/۹۶ ±۱/۲۶ ×۱۰^۷	۲/۲۰ ±۰/۸۴ ×۱۰^۷	۲/۸۷ ±۱/۰۵ ×۱۰^۷	۳/۶ ±۰/۹۷ ×۱۰^۷	۳/۸۵ ±۱/۱۰ ×۱۰^۷	۴/۲۷ ±۱/۱۳ ×۱۰^۷	۳/۶۸ ±۱/۰۵ ×۱۰^۷
ششم	—	۲/۰۳ ±۰/۶۷ ×۱۰^۷	۲/۶۹ ±۰/۹۴ ×۱۰^۷	۲/۳۷ ±۰/۶۸ ×۱۰^۷	۲/۲ ±۰/۶۸ ×۱۰^۷	۱/۸۸ ±۰/۷۶ ×۱۰^۷	۳/۶۱ ±۰/۸۶ ×۱۰^۷	۲/۵۵ ±۰/۸۸ ×۱۰^۷	۳/۵۶ ±۱/۰۶ ×۱۰^۷	۱/۷ ±۰/۷۶ ×۱۰^۷	۲/۵۹ ±۰/۸۶ ×۱۰^۷	۳/۰۱ ±۰/۸۶ ×۱۰^۷	۳/۵۷ ±۰/۸۲ ×۱۰^۷	۳/۰۳ ± /۸۳ ×۱۰^۷	۳/۴۱ ±۰/۹۷ ×۱۰^۷
هفتم	—	۱/۷ ±۰/۵۹ ×۱۰^۷	۲/۳ ±۰/۶۷ ×۱۰^۷	۱/۷۸ ±۰/۵۹ ×۱۰^۷	۱/۶۴ ±۰/۶ ×۱۰^۷	۱/۴۵ ±۰/۷۲ ×۱۰^۷	۳/۲ ±۰/۵۸ ×۱۰^۷	۲/۲۴ ±۰/۷۶ ×۱۰^۷	۳/۲۵ ±۱/۰ ×۱۰^۷	۱/۳۲ ±۰/۶۸ ×۱۰^۷	۲/۰۶ ±۰/۸۴ ×۱۰^۷	۲/۳۲ ±۰/۷۳ ×۱۰^۷	۳/۰ ±۰/۹۵ ×۱۰^۷	۲/۰۷ ±۰/۶۲ ×۱۰^۷	۲/۹۷ ±۰/۸۳ ×۱۰^۷

مراجع

1) Cheung YF, et al. An outbreak of pneumocystis carinii pneumonia in children with malignancy. J Paediatr Child Health 30(2): 173-5, 1994.

2) Cushion MT. In vitro studies of pneumocystis carinii, T Protozool 36 (1): 43-52, 1989.

3) Cushion MT, Ebbets D. Growth and metabolism of pneumocystis carinii in Axenic culture. J Clin Microbiol 28(6): 1385-94, 1990.

4) Ganagjee A, Mavandadi F, Queener SF. Synthesis and biological activity of tricyclic, conformationally restricted analogs of lipophilic pyrido [2,3-d]- pyrimidine antifolates: Adv Exp Med Biol 338: 441-4, 1993.

5) Goodman & Gilman A. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of the therapeutics. 6th ed. Pergamon Co, New York. 1980, PP 14,75.

6) Gradus MS, Ivey MH. An improved method of isolating pneumocystis carinii from infected rat lung. J Parasit 72(5): 690-8, 1986.

7) Gerrard JG. Pneumocystis carinii pneumonia in HIV - negative immunocopromised adults. Med J Aust 162(5): 233-59, 1995.

8) Hughes Wt. Animal model for pneumocystis carinii pneumonia. J Protozool 36(1): 41-5, 1989.

9) Momedov NG, et al. The combination of pneumocystosis with the hepatitis B virus carrier state in cancer patients. Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol (2): 32-4, 1991.

10) Ortega - Barrier E, Pereira ME. Identification of a lectin activity in pneumocystis carinii. Trop Med Parasitol 43(3): 186-90, 1992.

11) Piper GR, et al. Lipophilic antifolates as candidates antigen infections. Adv Exp Med Biol 338: 429-33, 1993.

12) Shiota T, et al. Pneumocystis carinii infection in corticosteroid treated cats. J Parasitol 76(3): 441-5, 1990.

13) Tegoshi T, Yoshida Y. New system of in vitro cultivation of pneumocystis carinii without feeder cells. Workshop on pneumocystis carinii 1994, PP 29S-31S.

14) Weinberg GA. Iron chelators as theraputic agent for pneumocystis carinii. Antimicrob Agent Chemother 38(5): 997-1003, 1994.

۱۵) براون، نوا. انگل شناسی پزشکی. ترجمه غلامحسین شیروانی، اسماعیل ذوقی، کاظم شکیبا، موسسه انتشارات دانش پژوه، چاپ دوم، ۱۳۷۱، صص ۹۷-۹۹.

۱۶) حاتمی، زهرا مهرنوش. بررسی تاثیر محیط‌های کشت آگزنیک پیشنهادی روی رشد پنوموسیستیس کارینئی، پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی. دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سال تحصیلی ۱۳۷۴-۷۵.

۱۷) ملک افضلی ك م، نهاپتیان ح و وارتکس. روشهای آماری و شاخصهای بهداشتی. جلد اول، چاپ دوم، ۱۳۶۱، صص ۱۱-۱۹.

۱۸) میشل دیوید ام: ایدز و ریه. ترجمه در هفته نامه پزشکی امروز، سال چهارم، شماره ۷۱، ص ۱-۷، آذر ۱۳۷۳.

Growth of pneumocystis carinii in Axenic Culture

Mehbod ASA, Shahabi S & Hatami M

Parasite & Mycology Department, College of Medicine

Shaheed Beheshti University of Medical Sciences & Health Services

SUMMARY

In this research, which was done for two years, we investigated various liquid and solid media without feeder ceells, for the ability to support growth of P. carinii. Data obtained from counting the organisms nuclei showed that, addition of Cyclo-heximide, penicillin, & streptomycin to neopeptone-N- Acetyle Glucoseamine (N.P.G. medium) can provides growth requirements of organism in its trophozoites form. We found that, preculture adjacence of P. carinii with group A streptococci or addition of some reducing substances, or vitamines to N.P.G. would increase the growth rate of organism.

It was also shown that, addition of Neopeptone, N-Acetyl-Glucoseamine, and lowering its PH to 4-0, Rosewell Park Memorial Institute medium (R.P.M.I.), can also provides organisms growth. And also addition of agar & humans blood group O to N.P.G. can enable P carinii to growth on the slant, and produce micro colonies.