تمایز اشکال ال باکتری‌ها از اشکال دیواره‌دار و سلولهای دیگر با استفاده از فیکس با فرمالدئید و رنگ آمیزی گرم

● **دکتر قربان بهزادیان نژاد** - استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
● **مجید اکبری** - کارشناس ارشد باکتری‌شناسی

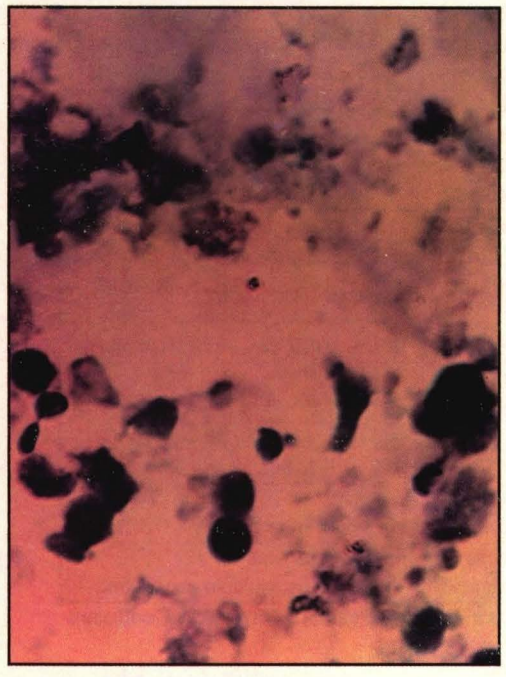
مقدمه

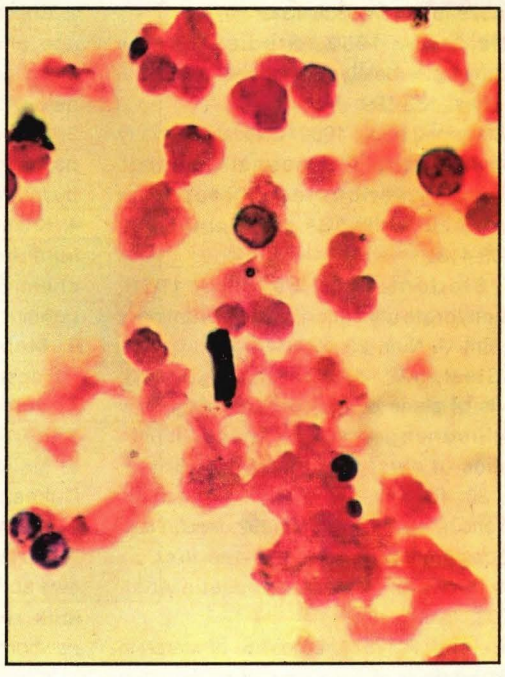
سوشهای مرحله ال و یا اشکال ال باکتری‌ها، ارگانیسم‌های گرم مثبت و یا گرم منفی هستند که در اثر القاء به وسیله مواد مهار کننده بیوسنتز دیواره سلولی، مثل پنی‌سیلین‌ها و یا آنزیمهای مخرب دیواره سلولی مثل لیزوزیم، در بدن و یا در لوله آزمایش دیواره سلولیشان به طور جزئی و یا کلی صدمه دیده و علی‌رغم عدم و یا آسیب‌دیدگی دیواره سلولی قادر به تکثیر روی محیط‌های اختصاصی هستند (۱۰ و ۸). القاء و کشت اشکال ال به علت حساسیت آنها به شرایط اسموتیک محیط کشت مشکل است (۲). اشکال ال می‌توانند در محیط کشت اختصاصی و در حضور عامل القاء کننده به رشد خود ادامه دهند و در محیط آگاروز پرگنه‌هایی با مورفولوژی مشخص، به شکل نیمروئی [1] تولید کنند. با خارج کردن عامل القاء کننده از محیط، اشکال ال امکان دارد که به شکل دیواره‌دارشان بازگشت پیدا کنند و یا در همان مرحله شکل ال باقی بمانند (۱۱). مراحل مختلف رشد و نمو اشکال ال و نیز نقش نمونه‌های مختلف سلولی مشاهده شده در کشتهای این سلولها به طور کامل درک و شناسائی نشده‌اند (۴). یک کشت از اشکال ال شامل اجزای مختلفی است که از نظر مورفولوژی از هم متمایزند که اینها شامل: ۱- اشکال گرد کوچک [2] با قطری از ۰/۰۵ تا ۰/۳ میکرومتر، ۲- سلولهای پایه‌ای [3] که قطری حدود ۰/۲ تا ۱ میکرومتر دارند و ۳- اجسام وزیکولر بزرگ [4] که می‌توانند قطری تا ۵۰ میکرومتر نیز داشته باشند، می‌شود. معتقدند که این سه نوع سلول به واسطه مراحل مختلف تکثیر در پرگنه وجود دارند ولی به هر حال طبیعت دقیق این نسبت مشخص نیست (۷).

خصوصیات مورد استفاده برای تشخیص اشکال ال عبارتند از: ۱- توانایی آنها در عبور از میکروفیلترهایی با سوراخ کوچک (۰/۴۵ میکرومتر) ۲- دیدن پرگنه نیمرویی شکل برروی محیط آگاروز با میکروسکوپ نوری و الکترونی با سلولهای در حال جوانه‌زدن و ۳- توانائی آنها در بازگشت به شکل دیواره‌دار اولیه و یا به قولی باکتری مشخص اولیه‌اشان می‌باشد (۷). مورد سوم را می‌توان از جمله موارد تمایز بین اشکال ال و مایکوپلاسماها نام برد (۸).

اشکال ال باکتری‌ها، را توانسته‌اند از نمونه‌های بالینی در انسان و حیوان جدا کنند اما نقش بیماریزایی آنها و بخصوص در مراحل حاد بیماریها مورد شک است (۵، ۶، ۷، ۹ و ۱۰).

بررسی اشکال دیواره‌دار شده در کشتهای اشکال ال معمولاً بوسیله مطالعه میکروسکوپی و برمبنای مشخصات پرگنه و مورفولوژی سلولی انجام می‌شود (۳). در بیشتر روشها از کشتهای خالص به دست آمده در محیطهای جامد و گاهاً مایع استفاده کرده‌اند. روش





عکس شماره ۱
مشاهده میکروسکوپی سلولهای اشکال ال Proteous mirabilis با استفاده از پایدار کننده با فرمالدئید و رنگ‌آمیزی گرم و گیمسا

چکیده
اشکال ال *E. coli, Str. fessyum* و *Proteous mirabilis* را می‌توان با استفاده از یک تکنیک ساده رنگ آمیزی گرم از شکل دیواره‌دارشان متمایز ساخت. اضافه کردن مستقیم فرمالدئید به محیط کشت مایع و یا به سوسپانسیون سلولهای شکل ال باکتری در سوکروز ۲۰٪ می‌تواند باعث پایداری غشاء سیتوپلاسمیک این ارگانیسم‌ها شده و مانع از لیزه شده اسموتیک آنها شود. اشکال دیواره‌دار باکتری‌ها به وسیله واکنش مشخص رنگ‌آمیزی گرم رنگ گرفته و این در حالی است که اشکال ال به واسطه رنگ فوشین متمایز از شکل دیواره‌دارشان خواهند شد. با استفاده از این روش فیکساسیون می‌توان سلولها را به روشهای مختلف دیگر علاوه بر رنگ‌آمیزی گرم نیز رنگ کرد. اشکال ال به واسطه تمایز در اندازه و مورفولوژی سلولی به راحتی با استفاده از این روش رنگ آمیزی قابل تفکیک‌اند. این روش بسیار سریع، آسان و قابل دسترس بوده و باعث تشخیص اشکال ال باکتری‌ها از باکتری‌های مشخص خواهد شد.

دینس[5] که بطور وسیع کاربرد داشته است شامل استفاده از محلول فیکساتیو بوین[6] و یا ترکیبی از اسید ارتوفسفریک و فرمالین به مدت حدوداً ۱۸ ساعت برای ثبوت پرگنه‌ها قبل از رنگ‌آمیزی با تعدادی از رنگها مثل آزور II[7] و آبی تولوئیدین است که طولانی بودن مدت آماده‌سازی مانع از استفاده آن در مطالعه فوری کشتها است [۸]. بعدها نیز Jones روش دیگری را که شامل پایداری با محلول فیکساتیو کیرکاپتریک[8] و شستشوی با آب مقطر قبل از رنگ‌آمیزی بود جایگزین آن نمود. Allan در سال ۱۹۹۲ گزارش کرد که می‌توان با استفاده از گلوتارآلدئید سلولهای شکل ال را ثابت و سپس با روش رنگ‌آمیزی گرم هوکر اقدام به رنگ‌آمیزی نمود که در این روش تمایز خوبی بین اشکال ال و اشکال دیواره‌دار باکتری‌ها داده می‌شد (۳). در این مطالعه ما روش رنگ‌آمیز کاربردی و آسانی را ارائه خواهیم کرد که می‌توان با استفاده از آن اشکال ال را از ارگانیسمهای با دیواره سلولی کامل به راحتی تشخیص داده و نیز می‌توان براحتی به‌مطالعه‌سلولهای‌شکل‌ال در مراحل‌مختلف‌رشدونمودرکشتهای‌مایع‌وجامد پرداخت.

مواد و روشها

سویه‌های میکروبی

سه ارگانیسم مختلف دیواره‌دار و اشکال ال به دست آمده از آنها عبارتند از:
P. mirabilis ،*Str. fessyum* و *E. coli* که از نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان امام خمینی(ره) جدا شده بودند و اشکال ال آنها بعداً توسط القاء با پنی‌سیلین در محیط هیپرتونیک ایجاد گردیدند.

مراحل کشت و القاء: کشت سنگینی از این سویه‌ها در محیط BHI و در دمای ۳۷°c برای حدود ۸ ساعت بدست آمد، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از این محیط کشت را به محیط کشت مرحله ال (LPM)[9] بردیم که شامل موارد زیر می‌باشد.

BHI	۴۰ گرم در لیتر
سوکروز	۲۰۰ گرم در لیتر
گلوکز	۱۰ گرم در لیتر
L-سیستئین	۰/۲ گرم در لیتر
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۵ گرم در لیتر
$CaCl_2.2H_2O$	۱/۵ گرم در لیتر

(پنی‌سیلین G ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر)

pH محیط قبل از اتوکلاو کردن ۷/۴ بود. بعد از اتوکلاو کردن محیط به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°c قرار داده شده و بعد از سرد شدن پنی‌سیلین را به محیط اضافه کردیم.

پس از تلقیح محیط مایع آن را در دمای ۳۷°c برای مدت‌حدود۸ ساعت‌قراردادیم که در این مدت‌باالقاء پنی سیلین اشکال ال باکتری‌های نام برده به وجود آمدند.

محیط جامد نیز با اضافه کردن ۰/۸٪ آگار به محیط پایه به دست آمد که پرگنه شکل ال نیز با قرار دادن قطراتی از محیط القاء در سطح آگار و در دمای ۳۷c و بعد از ۴ روز به دست آمد. برای تائید ال بودن سلولها از آزمایش لیزاسموتیک با آب مقطر استفاده شد (۴).

رنگ‌آمیزی و مشاهده میکروسکوپی

برای پایداری غشاء سیتوپلاسمی اشکال ال ابتدا مقدار معینی از محیط مایع حاوی اشکال ال را به لوله

عکس شماره ۲
مشاهده میکروسکوپی اشکال ال
Str. fessyum
با استفاده از پایدار کننده
با فرمالدئید و رنگ‌آمیزی گرم و

ش۳۰/ب۷۵

آزمایش جداگانه‌ای منتقل کرده و در دمای معمولی به آن به نسبت ۱ به ۱۰ فرمالدئید ۳۰٪ اضافه می‌کنیم که بعد از گذشت ۱۰ دقیقه می‌توان سلولهای شکل اول فیکس شده را با استفاده از دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ و برای حدود ۲۰ دقیقه برداشت کرد. برای به دست آوردن سلولهای شکل ال از محیط کشت جامد می‌توان از سوسپانسیون کردن پرگنه‌های شکل ال در سوکروز ۲۰٪ به آرامی استفاده کرد و به همان روش بالا آنها را فیکس کرد. بعد از ۲ بار شستشوی سلولها با آب مقطر می‌توان از آنها گسترش تهیه کرد.

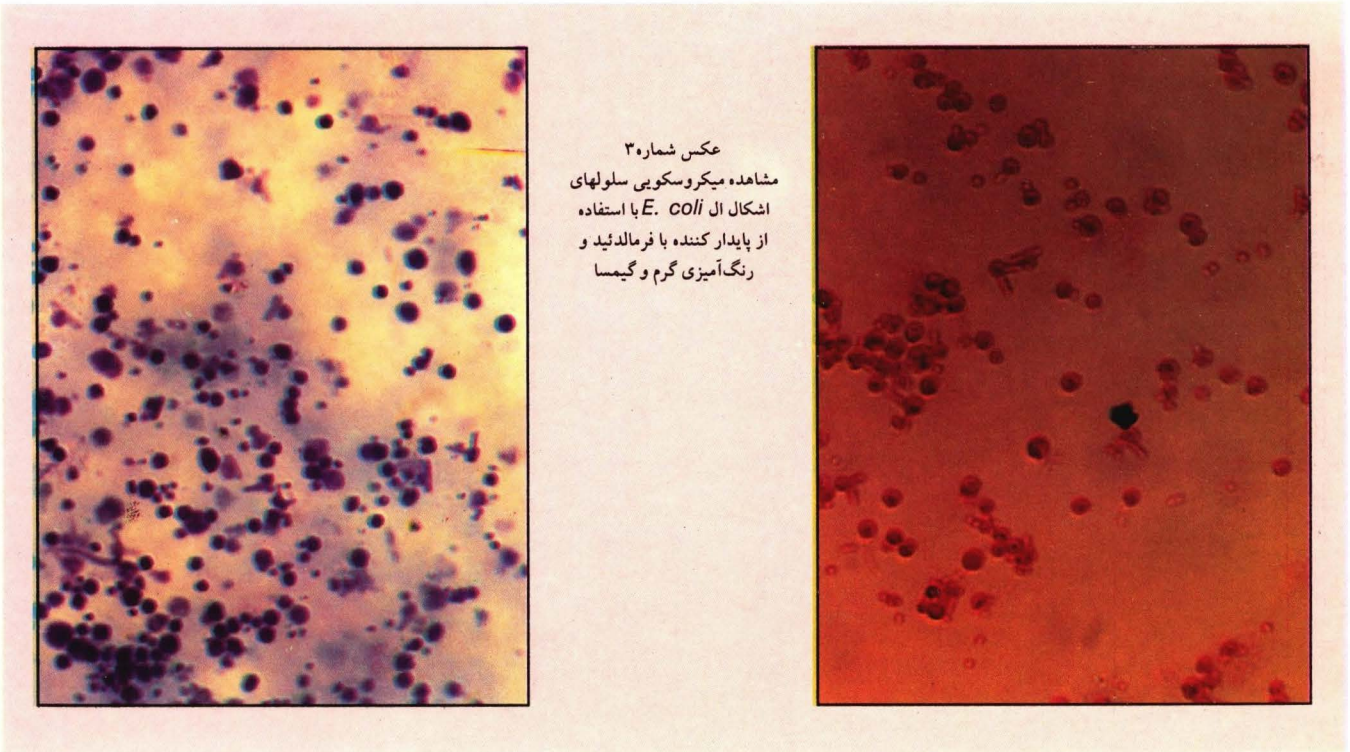
گسترشهای تهیه شده را مطابق روشهای معمولی بعد از خشک شدن با حرارت پایدار می‌کنیم. گسترشهای تهیه شده را می‌توان با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم معمولی و یا رنگ‌آمیزی گیمسا رنگ کرده و با میکروسکوپ نوری مشاهده کرد. علاوه بر گسترشهای تهیه شده با روش فوق، برای تائید اثر فرآیند پایدار شدن غشاء سیتوپلاسمی گسترشهایی نیز به روش معمول در آزمایشگاه و بدون طی مراحل پایدار با فرمالدئید تهیه شده و رنگ‌آمیزی شدند. از گسترشهای تهیه شده به وسیله یک میکروسکوپ و دوربین اتوماتیک نیکون و با استفاده از فیلم ۱۳۵، ASA ۱۰۰ عکس گرفته شد.

مشاهدات و نتایج

بعد از انجام مراحل مختلف رنگ‌آمیزی می‌توان با استفاده از ابژکتیو ۴۰ و ۱۰۰ میکروسکوپ نوری به مشاهده ال پرداخت. در مشاهدات سلولهای شکل ال پروتئوس، استرپتوکوک و اشرشیا همان گونه که در عکسهای شماره ۱، ۲ و ۳ نیز مشخص است می‌توان تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی و اندازه ارگانیسم‌ها را به وضوح دید. در اشکال ال استرپتوکوک (عکس شماره ۲) وجود چند واکوئل و گرانولهای ریز در آنها به طور کامل مشخص است. در اشکال ال *E. coli* (عکس شماره ۳) نیز علاوه بر مشاهده اشکال گرد می‌توان باکتری‌هایی را مشاهده کرد که قسمتی از دیواره سلولی صدمه دیده و سیتوپلاسم باکتری از آن خارج شده است و اشکالی مثل دستکش باد کرده را در باکتری‌ها ایجاد کرده است. همچنین در هر دو ارگانیسم تفاوت قطر و اندازه در زمانی که تبدیل به شکل ال شده‌اند قابل ملاحظه می‌باشد. در گسترش پروتئوس (عکس شماره ۱) به علت این که سلولها از پرگنه پروتئوس به دست آمده‌اند تا اندازه‌ای با سلولهای دو ارگانیسم دیگر متفاوت بوده و برعکس آنها که معمولاً گرد بودند، سلولهای این ارگانیسم شکل منظمی را ارائه نمی‌دهد و در گسترش تهیه شده به همراه مخمر، مخمرها با داشتن واکنش مثبت گرم از سلولهای ال پروتئوس گرم منفی کاملاً متمایزند و همان گونه که مشاهده می‌شود اشکال ال با گرفتن رنگ فوشین به خود قرمز رنگ می‌شوند. در لام معمولی تهیه شده از همین سلولها ال پروتئوس نیز همان طور که مشاهده می‌شود (عکس شماره ۴) به جز تعداد اندکی بقیه سلولها ترکیده‌اند و نخاله‌های سلولی برجای مانده‌اند که این لام می‌تواند اهمیت استفاده از پایدار کننده را مشخص کند.

بحث

با توجه به حساسیت اشکال ال به فشار اسموتیک محیط و پایدار نبودن تعداد زیادی از این ارگانیسم‌ها در محلولهای ایزوتونیک اگر از پایدار کننده‌ایی برای تثبیت غشاء آنها استفاده نشود در طی مراحل شستشو و رنگ‌آمیزی اشکال ال ترکیده و در گسترش به جز نخاله‌های سلولی چیز دیگری مشاهده نمی‌شود (عکس شماره ۴). احتمالاً اثر موادی مثل فرمالدئید بر غشاء سیتوپلاسمی سلولها با پلیمریزه شدن آن در سطح سلول و ثابت کردن غشاء سیتوپلاسمی ارتباط دارد (۱). در مطالعه Allan در ۱۹۹۲ و با استفاده از یک پایدار کننده آلدئیدی (گلوتارآلدئید) اقدام به ثبوت این سلولها کرد و توانست با رنگ‌آمیزی گرم هوکر آنها را از باکتری‌های دیواره‌دار تمایز دهد (۳). در این مطالعه نیز برای پایداری سلولهای شکل ال از پایدار کننده فرمالدئید استفاده شد. فرمالدئید ارزانترین و کم ضررترین پایدار کننده به کار رفته در بافت شناسی است. این دو پایدار کننده و دیگر پایدار کننده‌های آلدئیدی با ایجاد اتصالات متقاطع زنجیره‌های پپتیدی از طریق باقیمانده‌های اسیدهای آمینه باعث ثبات غشاء پلاسمایی می‌شوند. واکنش فرمالدئید با گروه‌های انتهائی پروتئینها برای ایجاد پلهای متقاطع بین ملکولها برای ایجاد یک محصول نهایی که نامحلول است بخوبی شناخته شده است. گروه‌های پروتئینی درگیر شامل آمینو، ایمینو و آمید و، پپتید، هیدروکسیل، کربوکسیل و سولفیدریل می‌شود. پلهای متیلن نیز معمولاً بین گروه‌های NH_2 و NH تشکیل می‌شوند که محققان عقیده دارند که این پلها توسط آب شسته شده و از بین می‌روند که احتمالاً این خاصیت اجازه مشاهده ترکیبات بافت و سلولها را می‌دهد و الا این ترکیبات پوشیده و مستتر خواهند ماند. فرمالدئید



عکس شماره ۳
مشاهده میکروسکوپی سلولهای اشکال ال *E. coli* با استفاده از پایدار کننده با فرمالدئید و رنگ‌آمیزی گرم و گیمسا

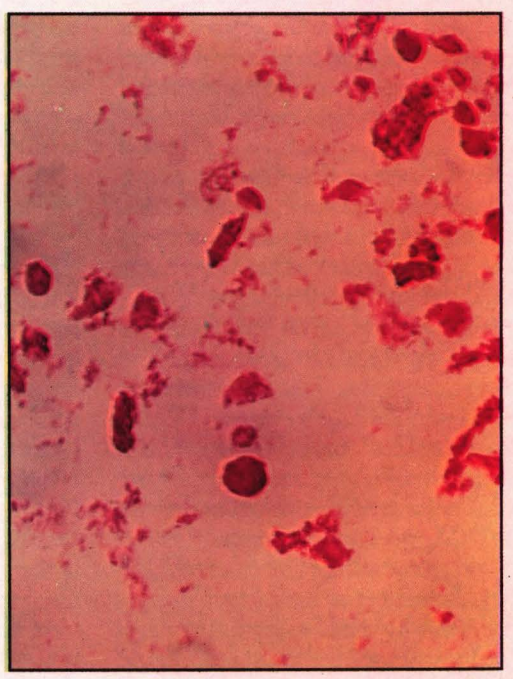
سریعاً با فسفاتیدیل اتانول آمین وارد واکنش شده و آن را تخریب می‌کند. کلسترول سربروزیدها، سولفاتیدیلها و اسفنگومیلین باقی مانده در بافتها و سلولها متأثر نمی‌شوند، در حالی که فسفولیپیدها با فرمالدئید پایدار نمی‌شوند و امکان دارد با اضافه کردن کلسیم که باعث کاهش حلالیت آنها در حلالهای چربی می‌شود به صورت کانونی باقی بماند. گلوتارآلدئید معمولاً برای پایداری مقاطع جهت میکروسکوپ الکترونی به کار می‌رود. نفوذ گلوتارآلدئید در بافتها از فرمالدئید کمتر است اما واکنش فیکس کردن آن سریعتر و نیز حفظ ساختمانهای سلولی آن نیز از فرمالدئید بیشتر است، گلوتارآلدئید نیز عمدتاً با گروههای آمینوپروتئینها واکنش می‌دهد. همچنین گلوتارآلدئید با اسیدهای آمینه تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین به نسبت کمتری از فرمالدئید وارد واکنش می‌شود (۱۲). به نظر می‌رسد که هر دو این پایدار کننده‌ها در حد میکروسکوپ نوری بتوانند با موفقیت استفاده شوند اما برای بررسی ساختمانهای ریز سلولها و مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ترکیب گلوتارآلدئید با تتراکسیداسمیموم به علت حفظ بهتر ساختمانهای سلولی بهتر از ترکیب فرمالدئید است.

بیشتر روشهایی که برای رنگ‌آمیزی اشکال ال و مایکوپلاسماها در آزمایشگاهها رایج بوده است براساس پایدار پرگنه و رنگ‌آمیزی آن استوار بوده‌اند و علاوه بر زمان‌بر بودن اطلاعات زیادی نیز درباره سلولها و یا اجزاء داخلی سلولی بما نمی‌داد و یا در روش Allan به علت عدم وجود گلوتارآلدئید در همه آزمایشگاهها و یا معمول نبودن روش رنگ‌آمیزی گرم هوکر، معمولاً نمی‌تواند به طور وسیع استفاده شود. بهمین خاطر ما در جهت ساده کردن یکی از مشکلات کار کردن با اشکال ال اقدام به تجربیاتی در این باره کردیم و با استفاده از فرمالدئید به جای گلوتارآلدئید که علاوه بر ارزان بودن در اکثر آزمایشگاهها نیز در دسترس است، توانستیم به طور موفقیت‌آمیزی سلولها راثابت و سپس‌رنگ‌آمیزی‌کنیم و استفاده از فرمالدئید به تنهائی برای اولین بار بوده است.

در این روش سلولهای شکل ال علاوه بر تمایز مورفولوژیک با گرفتن رنگ فوشین به رنگ قرمز درآمده و می‌تواند باعث تباین بهتر اجزاء سلولی آنها گردد. از جمله مشکلات موجود در کشت ارگانیسم‌های شکل ال آلودگی این کشتها به باکتری‌هایی نظیر میکروکوک و قارچهای مخمری است که با استفاده از این روش می‌توان آلودگیهای احتمالی را به راحتی تشخیص داد.

دیگر اینکه با توجه به استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا درسیتولوژی و نیز در تشخیص اشکال ال می‌توان در نمونه‌های کلینیکی و با استفاده از این روش پی به وجود اشکال ال احتمالی موجود در نمونه‌ها برد، زیرا همان طور که در تصاویر مشخص است در رنگ‌آمیزی گیمسا اشکال ال، سیتوپلاسم این سلولها بدون داشتن هیچ‌گونه مواد هسته‌ای مشخص از سلولهای سفید خون با داشتن هسته یا هسته‌های مشخص قابل تمایز است.

به طور کلی رنگ‌آمیزی اشکال ال باکتری‌ها اجازه تمایز بیشتر بین اشکال سلولی مختلف را به ما می‌دهد. این تمایزات به خصوص در مراحل اولیه القاء شکل ال بسیار با اهمیت‌اند. این روش رنگ‌آمیزی می‌تواند جانشین روشهایی گردد که علاوه بر وقت‌بری، بسیار گران تمام می‌شوند، زیرا علاوه بر سرعت در عمل، ساده بوده و مواد لازم برای آن نیز در دسترس می‌باشد.



عکس شماره ۴
مشاهده میکروسکوپی
سلولهای شکل ال
Proteous mirabilis
بدون استفاده از پایدار کننده با
فرمالدئید و با فرآیند معمولی و
رنگ‌آمیزی گرم

پاورقی‌ها

1- Fried egg
2- Small granules
3- Stem cells
4- Large vesiculated bodies
5- Diense L.
6- Bouins solution
7- Azur II
8- Kirkaptricks fixative
9- L-phase-medium

منابع مورد استفاده

۱- فضلی بزاز، صدیقه، ۱۳۶۷، میکروب‌شناسی داروئی، (تالیف) هوگو ـ و. ب، راسل ـ آ.دأ (۱۹۸۷) انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، شماره ۵، ۶۴۲ صفحه، ص ۳۳۳ تا ۳۳۴.

2- Allan, EJ., 1991; Induction and cultivation of a stable L-form of *Bacillus subtilis*. J. Appli. Bacteriolo. 70:339-43.

3- Allan, EJ., 1992; A novel method for differentiating L-form bacteria from their parental form using the Huker Gram staining technique. Letters in Applied Microbiology. 15:193-6.

4- Allan, EJ. et al., 1993; Growth and physiological characteristics of *Bacillus subtilis* L- forms. J. Appli. Bacteriolo. 74:588-94.

5- Ataoglu-H. et al., 1994; Preliminary report on L-forms: possible role in the infectious origin of secretory otitis media. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 103:434-8.

6- Buchanan, AM. et al., 1993; *Nocardia asteroides* recovery from a dog with stroid - and antibiotic unresponsive idiopathic polyarthritis. J. clin. Microbiol. 18(3): 702-8.

7- Darwish, Rz. et al., 1987; Filterability of L- forms. J. Lab. clin. Med. 109: 211-16.

8- Dienes L., 1970; Biology and morphology of L-forms with a note on the relation of L-forms to mycoplasmas in the role mycoplasmas and L- forms of bacteria in disease, ed. sharp, J.T.; P: 285-312.

9- Feingold. D.S. ,1969; Biology and pathogenecity of microbial spheroplasts and L- forms. N. Engl. J. Med. 281 (21): 1159-70.

10- McIntosh, D. Austin, B., 1991; The role of wall difficients bacteria (L-form; spheroplasts) in fish diseases . J. Appli. Bacteriolo. Sympsium supplement 70:15-75.

11- Strang, JA. et al., 1991; Induction of *Bacillus brevis* L-forms. J. Appli. Bacteriolo. 70:51.

12- Culling, CFA. et al., 1985; Cellular pathology technique, Butter Worths; P: 30-32.