تحقیقی

پلیت مخصوص خواندن تست MIC شانه ای

محمد فاطمی مطلق
کارشناس علوم آزمایشگاهی دامپزشکی، آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ایلام

هدایتعلی ورهرام
دکتری بهداشت مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام

نادر منصوری
مهندس کامپیوتر، دانشگاه پیام نور ایلام

نویسنده مسئول: محمد فاطمی مطلق
تلفن : 09183403069
پست الکترونیک: mohammadfatemimotlagh@gmail.com

آدرس: ایران- ایلام- میدان شهید کشوری- بلوار آزادی- خ آزادی 11- کد پستی: 6931177814

وصول مقاله:89/7/4
اصلاح نهایی:89/11/25
پذیرش مقاله:90/4/15

چکیده

زمینه و هدف: *آنتی بیوگرام شانه ای روشی سریع و قابل اطمینان برای تعیین حساسیت ضد میکروبی میکروارگانیسم های مختلف در برابر یک آنتی بیوتیک خاص بوده که در کاهش هزینه ها فوق العاده مؤثر است. هدف از این تحقیق طراحی پلیتی است که نه تنها به راحتی و در کمترین زمان محل دقیق شانه گذاری در پلیت ها را تعیین نماید بلکه بعد از انجام آزمایش بدون استفاده ازخط کش هاله های عدم رشد هر دوز دارو را به راحتی و با دقت بالا مشخص نماید.*

روش بررسی: *ابتدا داده های CLSI در باره محدوده حداکثر اندازه هاله های عدم رشد تشکیل شده با آنتی بیوتیک ها و میکروارگانیسم های مختلف به صورت آماری مورد بررسی قرار گرفت و تعیین شد که بیشترین (99,7%) هاله های عدم رشد در محدوده 42 میلی متر تشکیل می شوند. بر همین اساس عدد به دست آمده (42 میلی متر) و سایز پلیت معمولی (100 میلیمتر) مورد استفاده برای تست های حساسیت سنجی، به نرم افزار سالید ورکس داده شد که با این نرم افزار بهترین محل نوار و شانه گذاری در پلیت ها تعیین گردید. سپس کارائی این روش برای تعیین MIC دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلاپنمونیه مورد آزمون قرار گرفت.*

یافته‌ها: *در این روش دو نوار شانه ای را بطور همزمان در یک پلیت قرار دادیم و در هیچ موردی تداخل هاله عدم رشد مشاهده نگردید. MIC آنتی بیوتیک های آمیکاسین 0/5، آموکسی سیلین 0/5، جنتامایسین 1و نیتروفورانتوئین 10 میکروگرم/میلی لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس و MIC آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید 0,1، آمیکاسین 0/5، جنتامایسین 0,5، نیتروفورانتوئین 10 میکروگرم/میلی لیتر برای کلبسیلا پنمونیه بدست آمد.*

نتیجه گیری: *با مقایسه نتایج به دست آمده از آزمایشهای انجام شده با نتایج ثبت شده در کاتالوگ شرکت سازنده شانه های آنتی بیوتیک که طبق داده های CLSI می باشند، این ادعا ثابت گشت که استفاده از این پلیت نوین از خطاهای احتمالی و تداخل های آنتی بیوتیکی کاسته و همچنین مدت زمان انجام تست و تست خوانی نیز کاهش می یابد.*

واژه های کلیدی: *پلیت، آزمایش MIC، هاله عدم رشد، مقاومت دارویی*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروزه بر اثر استفاده بی رویه از داروها و دز نامناسب آن ها در جوامع بشری مقاومت های دارویی و باکتری های مقاوم زیادی به وجود آمده است که این خود موجب تولید روز افزون دارو های جدید و صرف هزینه های فراوان در این راه است. در هنگام مراجعه ی بیماران به علت بیماری خاص، علاوه بر نیاز به تشخیص نوع آنتی بیوتیک ، دز مناسب آن نیز باید مد نظر قرار گیرد. برای تعیین نوع آنتی بیوتیک، از روش آنتی بیوگرام و برای تعیین دز مناسب، از کمترین غلظت آنتی بیوتیکی برای ممانعت از رشد (MIC) استفاده می شود. این تست قبل از ابداع روش جدید "تست آنتی بیوتیکی نواری و شانه ای"، در لوله آزمایش یا میکروپلیت های الیزا صورت می گرفت. در روش تست آنتی بیوتیکی شانه ای دز های مختلف از یک نوع آنتی بیوتیک خاص، از کمترین غلظت به صورت صعودی به غلظت بالا، بر روی یک قطعه پلاستیکی به شکل شانه قرار گرفته است(1). از عوامل مهم در آزمایشگاه دقت، سرعت و هزینه پایین می باشد. تا کنون پلیت ها محصول های خامی بوده اند که فقط به عنوان حمل کننده و نگهدارنده مواد و باکتری ها مورد استفاده قرار میگرفتند ولی با استفاده از این نوع پلیت چند کاره به راحتی، سرعت و دقت بالایی می توان تست تعیین دوز مناسب، آنتی بیوتیک مناسب و سایر تست ها را انجام داد بدون اینکه هزینه اضافه تری را از پلیت ساده صرف کرد. علاوه بر این قبل و بعد از انجام تست ها نیازی به دستگاه های اضافی اندازه گیری مانند خط کش نیز نخواهد بود. با ساخت این نوع پلیت به تکنسین برای تسریع گزارش آزمایشات و صحت در تشخیص کمک فراوانی می شود. همچنین به علت قیمت بالای دستگاه های دیسک گذار خارجی و داخلی، عمل دیسک گذاری در ایران به صورت دستی و اتفاقی انجام می شود. با ساخت این پلیت جدید هیچ هزینه اضافی اقتصادی غیر از خرید پلیت معمولی به آزمایشگاه یا دانشگاه تحمیل نخواهد شد. مشکلات روش موجود، قرار گیری شانه آنتی بیوتیکی به صورت اتفاقی بر روی پلیت است که احتمال تداخل هاله ای و خطا در آزمایش و اتلاف وقت و هزینه را در بر دارد. به علاوه بعد از انجام آزمایش برای تعیین قدرت دارو علیه باکتری خاص اندازه گیری قطر هاله عدم رشد تشکیل شده برای دز های مختلف انجام می شود. در این پلیت و روش جدید با استفاده از اطلاعات CLSI درباره دارو ها و باکتری های مختلف و میزان واکنش آن ها نسبت به همدیگر و اندازه هاله های عدم رشد تشکیل شده، بهترین موقعیت شانه گذاری در پلیت ها با سایز مختلف تعیین می گردد(2). هدف طراحی پلیتی است که به راحتی و در کمترین زمان هم محل دقیق شانه گذاری در پلیت ها را تعیین کند هم این که بعد از انجام آزمایش بدون خط کش هاله های عدم رشد هر دز دارو را به راحتی گزارش دهد.

روش بررسی

2-1مواد شیمیایی

محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین نوع باکتری های مورد استفاده *کلبسیلا پونومونیا* (PTCC No. 1053) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC No. 1112) بود. برای انجام تست ها، از شانه های آنتی بیوتیک (HI-MEDIA, India) آمیکاسین(Amikacin-Ak)، آموکسی سیلین Amoxicillin-(Am)، کلرامفنیکل(Chloramphenicol-C)، کوتری موکسازول (CoTrimoxazole-Co)، جنتامایسین (Gentamicin-G)، نالیدیکسیک اسید (Nalidixic acid-Na)، نیتروفورنتین(Nitrofurantoin-Nf)و اکساسیلین(Oxacillin-O) استفاده گردید . لازم به ذکر است از این آنتی بیوتیک ها برای مقایسه اندازه ی هاله های عدم رشد تشکیل شده در روش ها، ابزار ها و پلیت های قدیمی، در مقایسه ی با نتایج این پلیت و روش جدید و تایید فیزیکی آن، مورد استفاده قرار گرفتند.

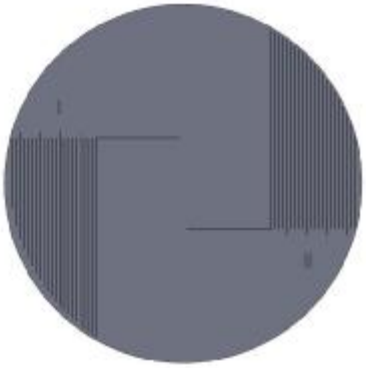
2-2روش تهیه و آماده سازی پلیت ها:

با بررسی حداکثر قطر هاله های عدم رشد که توسط آنتی بیوتیک های مختلف علیه باکتری های متفاوت تشکیل می شوند مشخص شد که 99,7% از آنتی بیوتیک ها علیه میکروارگانیسم های مختلف هاله های عدم رشدی در محدوده 42 میلی متر تشکیل می دهند. با توجه به این محدوده عددی (42 میلیمتر) به دست آمده ، دو شـــانه برای

www.SID.ir
Archive of SID

هر پلیت از پیش در نظر گرفته شده، پلیت سایز 100 میلیمتر انتخاب شد. برای طراحی این پلیت و تعیین محل شانه گذاری و هم چنین تعبیه خط کش و درجه بندی کف پلیت برای خواندن نتایج هاله های عدم رشد، از نرم افزار سه بعدی ساز و طراحی سالید ورکس استفاده شد. به این صورت که اعداد و ارقام مربوط به بیشترین محدوده هاله های عدم رشد (42 میلی متر) و اندازه پلیت مورد نظر (100 میلی متر) به این نرم افزار داده شد که ابتدا بهترین محل شانه گذاری تعیین شد و پس از آن خطوطی موازی هم از مرکز پلیت به سمت حاشیه پلیت به صورت بلند به کوتاه ترسیم شد که اولین خط نزدیک به مرکز محل قرار گیری بدنه شانه خواهد بود (شکل 1). هم چنین با این نرم افزار نحوه قرار گیری شانه ها آنتی بیوتکی به صورت قرینه هم و عکس همدیگر (از لحاظ دز دارویی از کم به زیاد) قرار گرفتند تا احتمال تداخل دارویی به حداقل برسد. سپس درب 100 پلیت (برای تکرار آزمایش) را با نوارهای آزمایشگاهی کاملا کیپ کرده و از باز شدن و خارج شدن آن ها از حالت استریل جلوگیری شد وبه کارگاه ترسیم منتقل شدند. عکس ترسیم شده توسط نرم افزار سالید ورکس، به دستگاه CNC لیزری داده شد و درجه بندی کف پلیت ها انجام گرفت. البته بعداز انجام عمل خط کشی و برای اطمینان از استریل بودن این پلیت ها،آن ها را به مدت 24 ساعت در دستگاه استریل ماورا بنفش قرار داده تا هر گونه احتمال آلودگی را به حداقل ممکن کاهش دهیم.

این پلیت نوین در سایزهای84 ،100 ،120 و 160 میلی متری (پلیت 160 میلی متری در دو مدل چهارتایی و پنج تایی) طراحی شده است و تست های تایید کارایی آن بر روی نوع 100 میلی متری انجام گرفته است. در این پلیت محل قرار گیری شانه ها و نوار های آنتی بیوتیکی مشخص شده است و امتداد محل قرار گیری این شانه ها و نوارها به صورت خط کش مدرج شده است . در نتیجه بعد از ریختن محیط کشت و کشت دادن باکتری مورد نظر، شانه ها آنتی بیوتیکی در محل های از پیش تعیین شده قرار می گیرند و بعد از 24 ساعت انکوبه کردن، نتیجه آزمایش، بدون استفاده از خط کش خوانده و ثبت می شود.



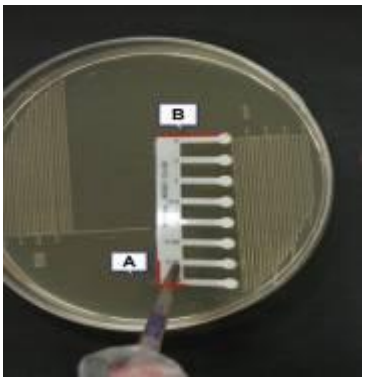
شکل 1: تعیین محل شانه گذاری و مدرج کردن پلیت 100 میلی متری جدید جهت خواندن اندازه هاله عدم رشد در دز های مختلف آنتی بیوتیک

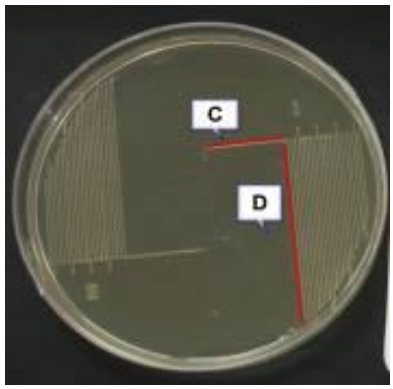
2-3 روش قرار گیری شانه های آنتی بیوتیکی درون پلیت ها و خواندن نتیجه آزمایش:

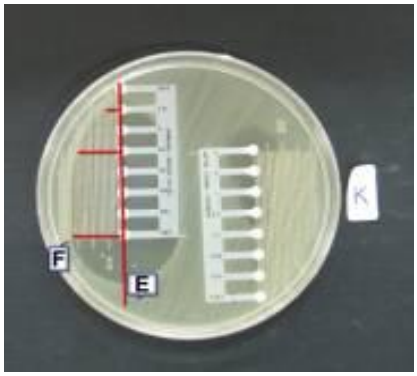
بعد از شعله دادن پنس از لبه پایینی شانه ها، جایی که به کمترین دز نزدیک است (A، شکل شماره 2)، با پنس گرفته می شود و از لبه بالایی، جایی که بیشترین دز آنتی بیوتیک واقع است (B، شکل شماره 2) و مماس با خط کشی کف پلیت (C، شکل شماره 2)، شانه گذاری صورت می گیرد. به علت این که انتهای دندانه های شانه آنتی بیوتیکی که حاوی دز های مختلف آنتی بیوتیک می باشند، در خط قرینه خط کشی محل قرار گیری هر شانه (D وE، تصاویر شماره2) قرار گرفته است، اندازه ی هاله های عدم رشد به صورت نصف دریافت می شوند (F، شکل شماره 2) و با دو برابر کردن اندازه حاصله، نتیجه نهایی گزارش داده می شود(مثلا در قسمت F، اندازه ی 17 میلی متر که به دست آمده است دو برابر می شود و عدد 34 میلی متر به دست می آید). با این روش، در مصرف پلیت، محیط کشت و وقت صرفه جویی می شود و نیاز به خط کش برای گزارش نتایج از بین می رود. سپس محیط های کشت شانه گذاری شده را به مدت 24-18 ساعت در گرم خانه با دمای 37-35 درجه سانتی گراد قرارداده و با جدول استاندارد CLSI مقایسه شده و نتایج خوانده و ثبت می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir







شکل 2: محل قرار دادن شانه MIC –در تصویر A,B به ترتیب کمترین و بیشترین دوز قرار می گیرد. C,D قرینه حالت فوق برای شانه دوم هستند .E انتهای قطر هاله احتمالی و F نصف قطر هاله عدم رشد می باشد

یافته ها

1- تست آنتی بیوگرام شانه ای برای باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس*

با بررسی نتایج مشخص است که باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* نسبت به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید، اکساسیلین، کلرامفنیکل و کوتریموکسازول کاملاً مقاوم بوده اما نسبت به سایر آنتی بیوتیک های آزمایش شده حساسیت دارد. MIC برای آنتی بیوتیک های نیتروفورانتوئین 10، آمیکاسین 0/5، جنتامایسین 1 و آموکسی سیلین 0/5 میکروگرم/میلی لیتر بدست آمده که با مشاهده اندازه هاله عدم رشد و مقایسه آن با اندازه های جدول CSLI آنتی بیوگرام ، حساس بودن این آنتی بیوتیک ها با این غلظت تأئید می گردد[12-14] (جدول 1).

2- تست آنتی بیوگرام شانه ای برای باکتری *کلبسیلا پنومونیا*

با بررسی نتایج مشخص است که سویه ی باکتری *کلبسیلا پنومونیا* نسبت به آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین، اکساسیلین، کلر آمفنیکل و کوتریموکسازول کاملاً مقاوم بوده اما نسبت به سایر آنتی بیوتیک های آزمایش شده حساسیت دارد. MIC برای آنتی بیوتیک های نیتروفورانتوئین 10، آمیکاسین 0/5، جنتامایسین 0/5 و نالیدیکسیک اسید 1/میکروگرم بدست آمده که با مشاهده اندازه هاله عدم رشد و مقایسه آن با اندازه های جدول CLSI آنتی بیوگرام ، حساس بودن این آنتی بیوتیک ها با این غلظت تأئید می گردد (جدول 2).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول1- MIC آنتی بیوتیک های مورد بررسی برای *استافیلوکوکوس ارئوس* با روش شانه ای

نام آنتی بوتیک	غلظت شانه ها (µg)	استاندارد تفسیر نتایج			نتیجه	
		حساس	متوسط	مقاوم	MIC	حساسیت
آمیکاسین	0/001-4	2	-	4	0/5	حساس
آموکسی سیلین	0/001-8	2	4	8	0/5	حساس
کلرآمفنیکل	0/001-32	8	16	32	>32	مقاوم
کوتریموکسازول	0/001-4	2	-	4	>4	مقاوم
جنتامایسین	0/001-16	4	8	16	1	حساس
نالیدیکسیک اسید	0/01-240	16	-	32	>32	مقاوم
نیتروفورانتوئین	0/01-240	32	64	128	10	حساس
اکساسیلین	2-256	2	8-4	16	>64	مقاوم

جدول 2- MIC آنتی بیوتیک های مورد استفاده برای *کلبسیلا پنومونیه* با روش شانه ای

نام آنتی بوتیک	غلظت شانه ها (µg)	استاندارد تفسیر نتایج			نتیجه	
		حساس	متوسط	مقاوم	MIC	حساسیت
آمیکاسین	0/001-4	2	-	4	0/5	حساس
آموکسی سیلین	0/001-8	2	4	8	>8	مقاوم
کلرآمفنیکل	0/001-32	8	16	32	32	مقاوم
کوتریموکسازول	0/001-4	2	-	4	4	مقاوم
جنتامایسین	0/001-16	4	8	16	0/5	حساس
نالیدیکسیک اسید	0/01-240	16	-	32	0/1	حساس
نیتروفورانتوئین	0/01-240	32	64	128	10	حساس
اکساسیلین	2-256	16	32	64	>64	مقاوم

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

تاکنون پلیت های موجود در جهان به صورت یک محصول خام بوده اند و برای خواندن نتیجه و استفاده از آن ها از ابزار های دیگر و همراه باید استفاده کرد(3و4). راه های زیادی برای بهبود و توسعه این محصول ارزشمند آزمایشگاهی پیش روست که یکی از این روش ها همین روش مدرج کردن و تعیین محل استقرار شانه های آنتی بیوتیکی است. که باعث حل مشکلات دیسک گذاری و خطاهای موجود را در بر دارد و نیز سهولت خواندن و ساده کردن تست MIC را به همراه دارد.

روش موجود MIC شانه ای به این صورت است که شانه آنتی بیوتکی بعد از کشت باکتری روی محیط کشت به صورت اتفاقی روی پلیت ها قرار می گیرند و در صورت واکنش آنتی بیوتیک و میکرو ارگانیسم کمترین دز مهاری در آن مشخص می شود اما در این پلیت جدید و روش همراه آن علاوه بر تعیین کمترین دز مهاری آنتی بیوتیک، محل دقیق شانه گذاری مشخص می شود و با توجه به این که محل شانه گذاری مدرج شده است براحتی هاله های عدم رشد مقابل هر دز مشخص از آنتی بیوتیک شانه ای خوانده و گزارش می شود و از تداخل های ناخواسته آنتی بیوتیکی جلوگیری به عمل می آید. برای اطمینان از روش کار این پلیت جدید روش های بسیاری در جهان بررسی شد(5-11). در روش قبلی قرار گیری آنتی بیوگرام شانه ای ، به صورت اتفاقی و در هر قسمت از پلیت قرار داده می شد که هم مصرف پلیت ومحیط کشت را بالا می برد و هم این که امکان تداخل هاله های عدم رشد و تغییرآثار واقعی آنتی بیوتیک ها را باعث می شد. برای اطمینان از کار پلیت های غیر مدرج و مدرج شانه گذاری شدند و با هم مقایسه گشتند که سهولت شانه گذاری و خطای پایین تر در در پلیت جدید مشخص شد. به علاوه بعد از عمل انکوباسیون برای خواندن نتایج نیاز به بار ها اندازه گیری هاله های عدم رشد توسط خط کش بود که کار بسیار وقت گیری بود. در این روش جدید محل شانه گذاری از قبل مشخص شده است که از مساحت پلیت، نهایت استفاده می شود. نتایج به دست آمده نشان داد که پلیت جدید و روش همراه آن بسیار کارا تر از روش معمولی انجام تست MIC می باشد. استفاده از این پلیت نوین از خطاهای احتمالی، آلودگی های ثانویه، احتمال تداخل های آنتی بیوتیکی می کاهد و بر سرعت انجام تست و تست خوانی می افزاید. در ضمن، از صرف هزینه های اضافی در رابطه با اشتباه در محل شانه گذاری، مصرف پلیت، محیط کشت و شانه های آنتی بیوتیک اضافی جلوگیری به عمل می آید. طبق نتایج به دست آمده بر روی این پلیت جدید و اثبات به صرفه بودن و کاهش هزینه ها و خطا های موجود، به راحتی می توان استفاده از تست MIC شانه ای را به صورت روتین در آورد و برای هر بیمار دچار بیماری عفونی، علاوه بر انجام تست دیسک دیفیوژن برای تعیین نوع آنتی بیوتیک مناسب، دز آن را هم مشخص نمود که با این کار درمان مناسب و به موقعی را برای بیمار وجود خواهد داشت و هم این که هزینه های جاری برای مصرف آنتی بیوتیک های نامناسب و دز نامناسب آن ها برای بیماران مختلف، را کاهش داد. در ضمن درمان صحیح و به موقع بیماران سبب جلوگیری از ایجاد میکروب های مقاوم به دارو و نیاز به تولید آنتی بیوتیک های جدید و هزینه های هنگفت آن، خواهد شد.

تشکر و قدردانی

در آخر از زحمات بی دریغ مهندس سمیره کارزانی، مهندس طیب سیفی و مهندس رضا هوشمند فر تقدیر و تشکر به عمل می آید. هم چنین از آموزشکده دامپزشکی که امکانات آن در اختیار گروه قرار گرفت سپاس گذاری می شود. در ضمن این طرح نتیجه پروژه تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه ایلام به شماره طرح5/162/د مورخ 88/7/11 می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1-Quality control guidelines for MIC susceptibility testing of NVP PDF-713: a novel peptide deformylase inhibitor International Journal of Antimicrobial Agents 22 (2003)

2-Performance standards for Antimicrobial Disks Susceptibility tests. CLSI 2006; 26 : 1.

3- Wyatt PJ. Inventor; *Process for determining bacterial drug sensitivity*. United States patent 3,730,842. 1973 May 1.

4- Gibson SF, Fadler NL. Inventors; *Apparatus and process for determining the susceptibility of microorganisms to antibiotics.* United States patent 3,957,583. 1976 May 18.

5- Acker JL, Meseol PM. Inventors; *Method for determining minimum inhibitory, concentration of antibiotic*. United States patent 3,983,006. 1976 Sept 28.

6- Machida K, Hoshina S, Ushida T, Arai J, Okumura C, Amano Y. Inventors; *Drug sensitivity measuring method.* United States patent US 7,198,906 B2. 2007 Apr 3.

7- Ericsson M, Bolmstrom A. Inventors; *Device of susceptibility testing of microorganisms.* United States patent 4,778,758. 1988 Oct 18.

8- Peck K, Yang PC, Wung SL. Inventors; *Methods for rapid antimicrobial susceptibility testing.* United States patent 5,789,173. 1998 Aug 4.

9- Wardlaw SC. Inventor; *Disposable apparatus for determining antibiotic sensitivity of bacteria.* United States patent 6,022,734. 2000 Feb 8.

10- Matsumura PM, Hyman JM, Jeffrey SR, Maresch MJ, Thorpe TC. Inventors; *Device and method for microbial antibiotic susceptibility testing.* United States patent 6,153,400. 2000 Nov 28.

11- Kocagoz ZT.Inventor; *Antibacterial susceptibility test.* United States patent US 6,265,182 B1. 2001 Jul. 24.

Archive of SID

www.SID.ir