

تست آنتی بیوگرام دیسکی با روش پلیت های مدرج

چکیده

زمینه و هدف: تداخل هاله های عدم رشد باکتری در اطراف دیسکهای آنتی بیوتیکی، یکی از مشکلات روشهای انتشار در آگار است. هدف این تحقیق معرفی روش پلیت مدرج به منظور کاهش این مشکل می باشد.

روش بررسی: پلیتهای ۸۴ میلی متری قبل از دیسک گذاری مدرج شده، محللهای دیسک گذاری در آن تعیین گردید. همچنین از نیم دیسک به جای دیسک کامل استفاده شد، سپس تداخل قطر هاله عدم رشد کلبسیلا پنومونیه در حضور ۹ آنتی بیوتیک مختلف در روشهای مختلف با یکدیگر و با روش استاندارد پیشنهادی CLSI مقایسه گردید.

یافته ها: در تست های انجام شده بر روی باکتری کلبسیلا پنومونیا مشخص شد که پنج آنتی بیوتیک هاله عدم رشد تشکیل دادند که آنتی بیوتیک های انروفلوکساسین، فلوکویین، فورازولیدون، آمپی سیلین و فلورفنیکل به ترتیب هاله های عدم رشدی به قطر ۲۴، ۲۲، ۲۲ و ۲۲ میلی متری را ایجاد کردند هیچ کدام از آنها در روش های نوین هاله تداخلی نداشتند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج آزمایشها انجام یافته، ثابت شد که روش پلیت های مدرج نه تنها اثر منفی بر نتایج حاصل از آنتی بیوگرام ندارند بلکه موجب دقت بیشتر آن و کاهش مشکلات و اشتباهات و تداخل های ناخواسته در روش های گذشته می شود و بازدهی آن را در پلیت ساینز ۸۴ میلی متر به نسبت روش روتین تا ۱۷،۶۴٪ افزایش می دهد.

واژه های کلیدی: آنتی بیوگرام، تست دیسک دیفیوژن، هاله های عدم رشد، تداخل هاله

های عدم رشد

محمد فاطمی مطلق

کارشناس علوم آزمایشگاهی دامپزشکی، آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ایلام

نادر منصوری

لیسانس کامپیوتر، دانشگاه پیام نور ایلام

نویسنده مسئول: محمد فاطمی مطلق

تلفن: ۰۹۱۸۳۴۰۳۰۶۹

پست الکترونیک:

mohammadfatemimotlagh@gmail.com

آدرس: ایران- ایلام- میدان شهید کشوری- بلوار

آزادی- خ آزادی ۱۱- کد پستی: ۶۹۳۱۷۷۸۱۴

وصول مقاله: ۸۸/۱۲/۸

اصلاح نهایی: ۸۹/۴/۶

پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۱۸

مقدمه

بر اثر عواملی از جمله مصرف بی رویه دارو، ممکن است باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها، مقاومت کنند (۱). این موضوع امروزه مشکل بزرگی ایجاد کرده است و شاید همین امر باعث پیدایش روز افزون آنتی بیوتیک های جدید می گردد. تست آنتی بیوگرام شامل سنجش میزان توانایی یک آنتی بیوتیک و یا سایر عوامل ضد میکروبی برای ممانعت از رشد باکتری ها در آزمایشگاه می باشد، این توانایی را می توان با استفاده از روش های رقت سازی در لوله و یا کشت میکروارگانیسم در پلیت اندازه گیری نمود (۲ و ۳). تست آنتی بیوگرام از تست های معمول آزمایشگاهی و تشخیصی است که در انجام آن معمولاً از پلیت استفاده می شود. تاکنون پلیت های موجود در جهان به صورت یک محصول خام بوده اند و برای خواندن نتیجه و استفاده از آن ها از ابزار ها و روش های همراه باید استفاده کرد. روش انتشار دیسک معمول، دارای معایبی از جمله نیاز به خواندن با خط کش یا دستگاه های هزینه بر پیچیده و همچنین تداخل ناخواسته ی هاله های عدم رشد به علت محل دیسک گذاری نامناسب با دستگاه دیسک گذار و یا روش دستی اتفاقی می باشد. در این روش جدید پیشنهادی، محل قرار گیری دیسک های آنتی بیوگرام از قبل تعیین شده است. این محل ها برای بیشترین استفاده از مساحت پلیت و همچنین جلوگیری از تداخل ناخواسته هاله های عدم رشد، در حاشیه پلیت و بدون فاصله از دیواره های پلیت واقع شده اند. در ضمن از محل قرار گیری دیسک ها به اندازه ۲۱ میلی متر (به میزان نصف قطر بیشترین تعداد هاله های عدم رشد تشکیل شده طبق داده های CLSI)، مدرج شده است که بعد از تشکیل هاله عدم رشد، برای اندازه گیری آن نیازی به استفاده از خط کش نمی باشد.

روش بررسی

(A) مواد شیمیایی

محیط کشت نوترینت آگار شرکت مرک آلمان، محیط کشت بلاد آگار شرکت مرک آلمان و محیط کشت مک کانکی آگار ساخت شرکت مرک آلمان، مورد استفاده قرار

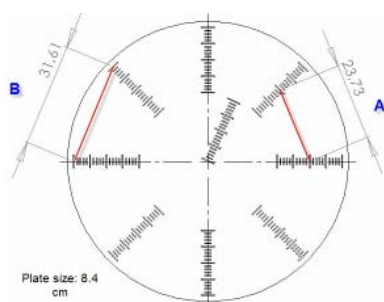
گرفتند. هم چنین نوع باکتری مورد استفاده کلبسیلا پونومونیا (PTCC No: 1053) بود و از خون بدون فیبرین نیز برای محیط بلاد آگار استفاده شد. برای انجام تست ها، از دیسک های آنتی بیوتیک انروفلوکساسین، فورازولیدون، فلومکویین، آمپی سیلین، فلورفنیکل، کلرامفنیکل، تیلوزین، نیومایسین و لینکواسپکتین استفاده گردید. (۱۱ دیسک)

اصول کار

الف- اصول کار ابداع:

این پلیت نوین طی تحقیقات به عمل آمده برای اولین بار در جهان ساخته شده است و در اداره ثبت اختراعات ایران (اداره کل ثبت شرکت ها و مالکیت های صنعتی) به شماره اختراع ۵۵۳۰۸ و در تاریخ ۸۷/۰۹/۱۶، ثبت شده است و در سایزهای ۶۰، ۸۴، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی متر طراحی شده است (تصویر ۱). تست های تایید کارایی پلیت جدید، بر روی پلیت سایز ۸۴ میلی متر انجام گرفته است و در اینجا ارائه می گردد. در این پلیت محل قرار گیری دیسک های آنتی بیوتیک مشخص شده است و امتداد محل قرار گیری این دیسکها به صورت خط کش مدرج شده است. در نتیجه بعد از ریختن محیط کشت و کشت دادن باکتری مورد نظر، دیسک را در محلهای از پیش تعیین شده قرار داده، بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن، نتیجه آزمایش بدون استفاده از خط کش خوانده می شود و ثبت می گردد.

با یک آماری گیری ساده در داده های CLSI درباره تاثیر آنتی بیوتیک های مختلف بر ارگانیسم های مختلف، مشخص شد که ۹۹٫۷٪ هاله های عدم رشد تشکیل شده در محدوده قطر ۴۲ میلی متر قرار می گیرند. با توجه به این قطر و استفاده از پلیت رایج ۸۴ میلی متر و نرم افزار سالیید ورکس (طراحی سه بعدی)، بهترین موقعیت دیسک گذاری در پلیت ها مشخص شد و این محل برای مدرج کردن و تعبیه خط کش استفاده گردید. (تصویر ۲) هم چنین پلیت ها و روش های مختلفی در زمینه تست انتشار دیسک، وسایل و روش های مختلف آن و دیگر تست های مربوط به حساسیت سنجی



تصویر ۳: آماده سازی پلیت مدرج و حداکثر فاصله خطوط (A) فاصله قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در محل دیسک گذاری قدیمی بدون تداخل به میلی متر (B) قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در محل دیسک گذاری جدید بدون تداخل به میلی متر

تذکره: تمام اعدادی که در دراوینگ ها بدون واحد ذکر شده اند، با مقیاس میلی متر محاسبه گردند.

پ) آماده کردن محیط های کشت:

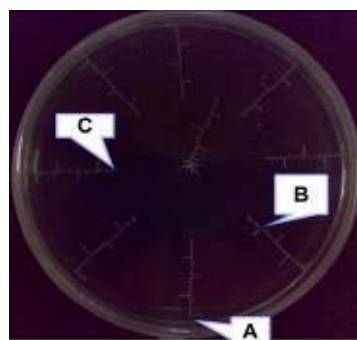
ابتدا محیط کشت میکروبی طبق پروتکل شرکت سازنده آماده شد. پس از آماده سازی محیط ها، با استفاده از سواب های پنبه ای، مایع حاوی باکتری، که قبلاً آماده شده است به صورت چمنی روی محیط کشت داده شد. تعداد ۹ دیسک آنتی بیوتیک مشخص برای تمام آزمایشها در نظر گرفته شد تا نتایج آزمایش ها قابلیت مقایسه علمی مناسب با هم باشند.

دیسک گذاری در ۱۱ پلیت با محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک آنتی بیوتیک در حاشیه ی پلیت، ۱۱ پلیت با محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک آنتی بیوتیک در فاصله ی ۱۵ میلی متر از حاشیه ی پلیت (محل دیسک گذاری دیسک پنسر استاندارد) و ۱۱ پلیت محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک آنتی بیوتیک در فاصله ی ۲۱ میلی متری از حاشیه ی پلیت (روش تداخل سنجی) انجام گردید. از کاتالوگ های تجاری موجود در دیسک های آنتی بیوگرام، که نتایج به طور مشخص در جداول ثبت شده اند برای ارزیابی نتایج استفاده گردید.

ت- روش خواندن جواب ها

روش خواندن تست آنتی بیوگرام با این پلیت نوین بسیار ساده و سریع و بی نیاز از استفاده از خط کش می باشد. به این

آنتی بیوتیکی در سر تاسر جهان مورد بررسی قرار گرفت (۴-۱۳).



تصویر شماره ۲: محل های قرار گیری دیسک های آنتی بیوتیک در آزمایش های انجام شده در پلیت ۸۴ میلی متری

(A) محل قرار گیری دیسک های آنتی بیوگرام با روش افزایش مساحت پلیت بدون تغییر سایز و فقط با تغییر موقعیت دیسک ها

(B) محل قرار گیری دیسک های آنتی بیوگرام با دیسک دیسپنسر های استاندارد

(C) محل قرار گیری دیسک های آنتی بیوگرام در روش تداخل سنجی دیسک های آنتی بیوتیک (تحقیقاتی)

ب) آماده سازی پلیت ها و مدرج کردن آن ها:

ابتدا درب ۱۰۰ پلیت سایز ۸۴ میلی متر را با پارا فیلم کاملاً بسته ، از باز شدن و خارج شدن آن ها از حالت استریل جلوگیری کردیم. سپس کار را بر کف (قسمت تحتانی) پلیت آغاز کرده ، ابتدا مرکز پلیت ها مشخص و بعد از آن چهار گوشه و بعد هشت گوشه آن مشخص شد (برای کشت ۹ آنتی بیوتیک). پس از مشخص کردن محل قرار گیری دیسک های آنتی بیوتیکی، از آن قسمت شعاعی که برای اندازه گیری بیش از ۹۹٪ هاله ها مناسب بود (۲۱ میلی متر) برای هر دیسک رسم شد و مدرج گردید. بر روی فواصل مختلف هر یک از این خطوط مدرج می توان دیسک گذاری کرد. (تصویر ۳)



تصویر شماره ۴: قرار گیری دیسک های کامل در حاشیه دیسک برای کاهش ریسک تداخل ناخواسته هاله های عدم رشد و بررسی نتایج که نشان دهنده عدم تداخل نتایج می باشد

II) محل دیسک ها در نقاط قرار گیری دیسک ها توسط دستگاه دیسک گذار:

به دلیل عمومیت داشتن این محل قرار گیری که در فاصله ۱٫۵ سانتی متری از حاشیه درپلیت های ۸۴ میلی متری، این روش نیز بر روی این پلیت جدید با محیط های کشت مختلف انجام گرفت^{۱۵} (تصویر شماره ۵). طی تست های انجام شده به این روش هم سرعت عمل دیسک گذاری بالا رفته و هم دقت تست که هنگام خواندن این پلیت ها نیز این سرعت و دقت بیشتر مورد تایید قرار گرفت.



تصویر شماره ۵: قرار گیری دیسک ها در فاصله ۱۵ میلی متری (روش معمول دستگاه دیسک گذار) از حاشیه پلیت

III) محل دیسک های نیم دایره در حاشیه:

در این تست دیسک های آنتی بیوگرام به دو نیم تقسیم شده ، در حاشیه پلیت ها و در محل انتهای قسمت مدرج قرار گرفتند (تصویر شماره ۶). نتیجه تست بعد از عمل انکوبه کردن تشکیل هاله های عدم رشد به صورت نیم دایره در

صورت که دیسک های آنتی بیوگرام که روی قسمت انتهایی یا هر قسمت از خط مدرج قرار داده می شود و در صورت وجود هاله عدم رشد، قطر هاله عدم رشد از خط کش های کوچکی که همان محل قرار گیری دیسک ها روی پلیت مدرج شده است ، استخراج و به راحتی گزارش داده می شوند

یافته ها

تعداد تست های انجام یافته از لحاظ موقعیت قرار گیری دیسک ها، سه نوع موقعیت و از لحاظ ساینز دیسک های آنتی بیوتیک با دو نوع دیسک آنتی بیوگرام (دایره کامل و نیم دایره) انجام گرفت (روش های I تا III) (تصاویر ۴، ۵، ۶). در تست های انجام شده بر روی باکتری کلبسیلا پنومونیا مشخص شد که پنج آنتی بیوتیک هاله عدم رشد تشکیل دادند که آنتی بیوتیک های انروفلوکساسین، فلوמוکوین، فورازولیدون، آمپی سیلین و فلورفنیکل به ترتیب هاله های عدم رشدی به قطر ۲۴، ۲۲، ۲۲ و ۲۲ میلی متری را ایجاد کردند.

I) محل دیسک ها در حاشیه (دیسک به صورت دایره کامل):

این آزمایش بر روی پلیت های حاوی محیط کشت های مولر-هینتون آگار انجام گرفت. قطر هر دیسک آنتی بیوتیک شش میلی متر بوده و بر همین اساس پلیت های ۸۴ میلی متر با فاصله سه میلی متر از حاشیه و به طول ۲۰ میلی متر قبل از ریختن محیط کشت درون پلیت ها، مدرج گردید (این کار به صورت دستی انجام شد البته تمام شرایط استریل پلیت ها در نظر گرفته شد). دیسک های آنتی بیوتیک در مرکز قسمت با فاصله سه میلی متری قرار داده می شود و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن، تشکیل هاله های عدم رشد به صورت نیم دایره کرده که یک شعاع عدم رشد حاصل می شود که آن را در عدد دو ضرب کرده و قطر هاله عدم رشد به دست می آید (تصویر شماره ۴).

در پلیت سایز ۸۴ میلی متر دارد (ولی در پلیت های سایز ۱۲۰ میلی متر بازدهی تا ۳,۰۵٪ افزایش نشان می دهد که نتایج آن گزارش نشده است).

جدول ۱: مقایسه ی روش قدیمی و جدید و درصد افزایش بازدهی در پلیتها با سایزهای مختلف

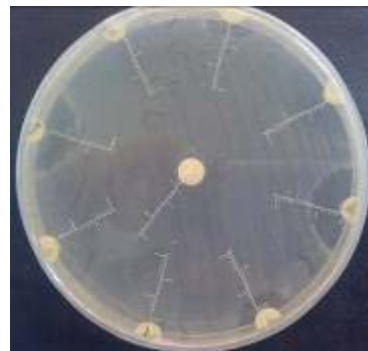
اندازه پلیت ها (mm)	۸۴	۹۰	۱۰۰	۱۲۰
حالت ها				
A	۱۱	۱۰	۱۱	۹
B	۵۸	۳۶	۳۱	۱۰
F	%۱۷/۶۴	%۱۰/۹۶	%۹/۴۴	%۳/۰۵

- (A) مساحت اضافه شده برای هر هاله عدم رشد بدون تداخل در روش جدید (میلی متر)
 (B) تعداد آزمایشهای انتشار دیسک قابل انجام بدون تداخل هاله ای نسبت به روش قدیمی
 (C) افزایش بازدهی روش و پلیت جدید نسبت به روش استاندارد قدیمی انتشار دیسک با پلیت

برای تایید نتایج حاصله با پلیت و روش جدید که با دیسک کامل و نیم دیسک در حاشیه پلیت قرار می گیرند، افزایش شعاع کاذب وجود دارد یا نه، تست بارها با آنتی بیوتیک های معین به عنوان شاهد بر پلیت معمولی و در محل های استاندارد دیسک گذاری، انجام شد که تمام نتایج حاکی از تایید کارایی پلیت و روش جدید می باشد. بعد از آنکو باسیون نتایج به دست آمده با قطر استاندارد تعیین شده در کاتالوگ شرکت سازنده دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده و داده های CLSI، کاملاً با هم یکسان بودند. مقایسه مزایای این روش دیسک گذاری، نشان داد که هاله های عدم رشد با قطر تا ۴۲ میلی متر را می توان به راحتی خواند که نسبت به روش معمول آن که حداکثر تا سه سانتی متر است،

حاشیه پلیت ها بود که مانند روش الف شعاع به دست آمده با خود پلیت مشخص شده است و در عدد ۲ ضرب کرده،

قطر هاله عدم رشد به دست می آید. از جمله محاسن این روش، مصرف دیسک های آنتی بیوتیک، ۵۰٪ کاهش می یابد. مساحت پلیت ها برای دیسک گذاری به نزدیک ۱,۵ برابر معمول افزایش پیدا کرده، از تداخل و تاثیر آنتی بیوتیک ها به صورت ناخواسته بر هم جلوگیری می شود و خواندن نتایج بسیار راحت می گردد. هم چنین از خط کش استفاده نخواهد شد.



تصویر شماره ۶: قرار گیری نیم دیسک های آنتی بیوتیک در حاشیه پلیت

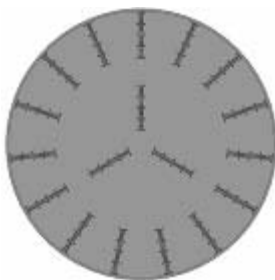
بحث

محل دیسک گذاری های استاندارد معمول با فاصله ی ۱۵ میلی متر از حاشیه ی پلیت ها انجام می شود^{۱۴}. در این پلیت مدرج جدید و روش همراه آن پیشنهاد می شود که این فاصله به صفر تغییر یافته، آنتی بیوتیک ها در حاشیه پلیت و استفاده از دیسک کامل یا نیم دیسک تغییر کند. با توجه به آزمایشهای انجام یافته در این تحقیق، نتایج حاصل ثابت کرد که این فاصله نه تنها اثر منفی بر نتایج حاصل نداشته بلکه موجب دقت بیشتر آن و کاهش مشکلات و اشتباهات و تداخل های ناخواسته در روش های گذشته می شود. طبق نتایج به دست آمده این پلیت و روش همراه آن بازدهی بالاتری نسبت به پلیت و روش های گذشته و برابر با ۱۷,۶۴٪

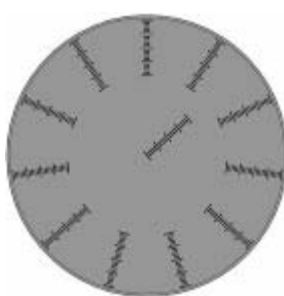
گرفتن درجه بندی کف پلیت به عنوان پلیت معمولی مورد استفاده قرار گیرد ولی می تواند به عنوان ابزاری جدا و اختصاصی و منحصر برای تست انتشار دیسک و سنجش مقاومت قارچ ها مورد استفاده قرار گیرد. هر چند این پلیت جدید و روش استفاده مربوط به آن هیچ گونه تاثیر شیمیایی، افزایش یا کاهش قدرت آنتی بیوتیک ها یا اندازه ی هاله های عدم رشد را در بر ندارد و این ابداع، کاملاً مکانیکی و فیزیکی بوده است اما این تست ها برای تایید نتیجه خوانی و سرعت عمل و امکان تداخل ناخواسته هاله ها و خطاهای احتمالی صورت گرفتند.

قطر های بالا تری را مورد بررسی قرار می دهد. همچنین هزینه های بالای دستگاه دیسک گذار را نخواهد داشت به علاوه در این پلیت جدید، محل دیسک ها از پیش مشخص است و

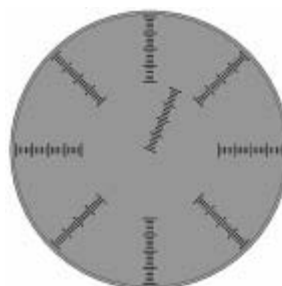
دیسک گذاری دستی را از حالت اتفاقی و خطاهای آن خارج می سازد. همچنین بعد از عمل انکوبه کردن نیازی به استفاده از خط کش وجود ندارد که این عمل از آلودگی های ثانویه جلوگیری و سرعت خواندن تست با تکنسین را افزایش می دهد. این پلیت جدید و روش همراهش در صدد نیست تا وسایل و روش های قبلی را رد کند بلکه توانسته است هزینه های مالی را تا اندازه بسیار زیادی کاهش داده، حتی در روش ها و وسایل ساخته شده ی قبل از این پلیت برای انتشار دیسک و سایر آزمایشها، عنوان ابزار کمک کننده و همکار استفاده شود. این پلیت اختصاصی تست انتشار دیسک نیست بلکه با همان هزینه های ساخت پلیت های معمولی قادر است با نادیده



پلیت ۱۲۰ میلی متر



پلیت ۱۰۰ میلی متر



پلیت ۸۴ میلی متر



پلیت ۶۰ میلی متر

تصویر ۱: مدرج سازی پلیت: پلیت های جدید مدرج شده با سایز های ۶۰، ۸۴، ۱۰۰، ۱۲۰ میلی متر

References

- 1-Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al . *Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization–International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance*. N. Engl. J.Med, 2001; 344: 1294–1303.
- 2-National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals*. Approved. National Committee for Clinical Laboratory Standard M31-A Standards, Wayne, PA.
- 3-Odland BA, Erwin ME, Jones RN. *Control guidelines for disk diffusion and broth microdilution antimicrobial susceptibility tests with seven drugs for veterinary applications*. J. Clin. Microbiol, 2000; 38, 453–455.
- 4- Labarthe, J. C. *Culture dish*. USPTO.1994; 5:348-885.
- 5-Billups, J. O. *Culture chamber*. USPTO. 1975; 3:886-047.
- 6-Fink, A. J., *Disposable culture device*. USTO.1969; 3:474-004.
- 7-Kereluk, K. *Microbiological surface sampler*. USPTO.1972; 3:684-660.
- 8-Henderson, J. A. *Hermetically sealed Petri dish*. USPTO.1962; 3:055-808.
- 9-Taylor, W. I. *Device for use in the identification of microorganisms*. USPTO.1977; 4:010-078.
- 10-Bryant, D. I. *In vitro fertilization procedure dish*. USPTO. 2000; 6:156-566.
- 11-Anthony J. Sbarra A J. *Method and apparatus for the identification of microorganisms*. USPTO. 1974; 3:856-628.
- 12- Messing R A. Ramsey W S. *Method for distinguishing gram positive and gram negative microbes*. USPTO.1978; 4:126-516.
- 13- Croteau A J. Pierson M W. Naqui A. *Method for quantification of biological material in a sample*. USPTO. 1999; 5:985-594.
- 14- CLSI, 2006; *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; sixteenth informational supplement*. M100-S16. 26 No. 3 ISBN 1-56238-588-7.9, 309–317.