Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018

مروری بر روش‌های ارزیابی فعالیت ضد میکروبی در آزمایشگاه

• رضا بهلولی خیاوی
کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، شبکه بهداشت و درمان شهرستان مشگین شهر
rezabohlolikhiavi@yahoo.com

چکیده

در سال‌های اخیر دانشمندان علاقه زیادی در تحقیق، جستجو و توسعه عوامل ضد میکروبی جدید از منابع مختلف برای مبارزه علیه مقاومت میکروبی از خود نشان داده‌اند، بنابراین توجه زیادی نسبت به غربالگری فعالیت ضد میکروبی و روش‌های ارزیابی معطوف شده است. تعدادی از این سنجش‌های زیستی مثل انتشار دیسک، انتشار در چاهک و رقت در آگار یا محیط مایع به خوبی شناخته شده و به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند، ولی سایر روش‌ها مثل روش‌های فلوسایتومتری و بیولومینسانس حتی اگر بتوانند نتایج سریع حاصل از اثرات عوامل ضد میکروبی فراهم نمایند و شناخت بهتری از نشانزد آن‌ها در قابلیت زیستی و آسیب سلولی به میکروارگانیسم‌های تحت بررسی ارائه بدهند به طور وسیع استفاده نمی‌شوند، زیرا انجام آن‌ها مستلزم به کارگرفتن ابزارها و تجهیزات مخصوص بوده و علاوه بر آن نیاز به سنجش بعدی برای تکرارپذیری و استانداردسازی کردن دارند. در این مقاله مروری، یک فهرست جامع و فراگیر ازروش‌های بررسی حساسیت به عوامل ضد میکروبی و اطلاعات تفصیلی در مزایا و محدودیت‌های این روش‌ها گزارش خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، کرماتوگرافی با لایه نازک (T.L.C)، بیواتوگرافی، آزمایش زمان مرگ (Time-kill Test)، روش شیب آنتی میکروبی، روش انتشار در آگار، روش انتشار در چاهک، روش رقت در آگار، روش فلوسایتومتری، روش بیولومینسانس

۱. مقدمه

آزمایش‌های حساسیت ضد میکروبی می‌تواند برای پیداکردن داروی موثر، اپیدمیولوژی و پیش بینی نتیجه بعد از درمان بیماری مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه ما روی روش‌های آزمایشگاهی آنتی میکروبی در آزمایشگاه برای بررسی کشف و استخراج خاصیت ضد میکروبی داروها بر روی عوامل بیماری زا می‌پردازیم. پس از انقلاب در دوران طلایی، تقریبا تمام گروه‌های آنتی بیوتیک‌های مهم (تتراسایکلین ها، سفالوسپورین ها، آمینوگلیکوزیدها و ماکرولیدها) کشف شده بودند و از مشکلات اصلی شیمی درمانی در دهه ۱۹۶۰کم شده بود، اما در حال حاضر این ترکیبات به دلیل افزایش مقاومت میکروبی به شدت در خطر از دست دادن اثرات ضد میکروبی خود می‌باشند و با توجه به وقوع شکست درمانی در رابطه با مقاوم شدن باکتری‌ها به چند دارو به یک نگرانی جهانی برای بهداشت عمومی تبدیل شده است به همین دلیل، کشف آنتی بیوتیک‌های جدید هدف اختصاصی بسیار مهم است. محصولات طبیعی هنوز هم یکی از منابع اصلی مولکول‌های دارویی جدید امروز می‌باشند که از باکتری‌های پروکاریوت، میکروارگانیسم‌های یوکاریوت، گیاهان و موجودات زنده مختلف و حیوانات مشتق شده‌اند. محصولات میکروبی و گیاهی بخش عمده‌ای از مواد ضد میکروبی که تا به حال کشف شده اند را به خود اختصاص داده‌اند. گیاهان و دیگر منابع طبیعی می‌توانند طیف وسیعی از ترکیبات پیچیده و ساختار متنوع را فراهم کنند. به تازگی، بسیاری از محققان در این تحقیقات برروی گیاهان و عصاره‌های ضد میکروبی، روغن‌ها و اسانس ها،

مـواد متابولیتی ثانویه و مولکول‌هـای جدید مصنوعی به عنوان عوامل ضد میکروبی بالقوه متمرکز شـده‌اند. با این حال، زمانی که ما مقالات منتشـر شـده که دارای اثر ضد میکروبی این محصولات طبیعی بودند بررسـی می‌کردیم، مقایسـه بین نتایج اغلب بـه دلیل اسـتفاده از روش‌های غیر اسـتاندارد و تکنیک‌های مختلف آماده سـازی تلقیح، اندازه تلقیح، متوسـط رشد، شرایط اینکوبه کردن و تعیین نقاط پایانی دشوار بود. این یک واقعیت است که خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های اسـتخراج شده از گیاهان بسیار عالی اسـت اما این قسـمت از داده‌های اولیـه باید مورد اعتمـاد بوده و به محققان اجازه مقایسـه نتایج را بدهند و بایسـتی محققان از تحقیق روی خاصیـت ضد میکروبی این‌هـا فقـط به عنوان یـک مطالعه فتوشـیمیایی اجتناب نمایند. انواع روش‌های آزمایشگاهی می‌تواند برای ارزیابی و یا غربالگری فعالیت ضد میکروبی در شرایط in vitro روی عصاره یا یک ترکیب خالص مورد استفاده قرار گیرد. معروف ترین و اساسی ترین روش‌ها انتشار دیسک، محیط مایع و رقیق کردن در محیط آگار هستند. روش‌های دیگر اختصاصی برای آزمایش‌های ضدقارچ، استفاده از تکنیک مواد غذایی سمی می‌باشد. برای مطالعه تاثیر ضد میکروبی روی یک عامل به طورکامل، از تست time-kill و برای مطالعه بیشـتر از روش cytofluorometric اسـتفاده می‌گردد که از ماهیت اثـر مهارکنندگی (bactericidal یا bacteriostatic) یا (وابسـته بودن به زمان یا غلظت) دارو تلفات ناشی از آسیب سلولی به میکروارگانیسم مورد بررسی اطلاعات دقیقی ارائه می‌نماید.

بـا توجه بـه جذابیت‌های جدید خـواص محصولات ضد میکروبی جدید مانند مبـارزه با باکتری‌های مقاوم به چند دارو، بسـیار مهم اسـت که به منظور گسـترش یک درک بهتـر از روش‌های فعلی موجـود برای غربالگری و یا کمیت اثر ضد میکروبـی عصاره یا یک ترکیب خالص برای آن برنامه‌های کاربردی در سلامت انسان، کشاورزی و محیط زیسـت داشـته باشـیم بنابراین، در این بررسی، تکنیک‌هـای لازم بـرای ارزیابـی فعالیـت ضدمیکروبی در شـرایط آزمایشـگاهی بـا جزئیـات مـورد بحـث قرار می‌گیرد.

۲. روش‌های انتشار

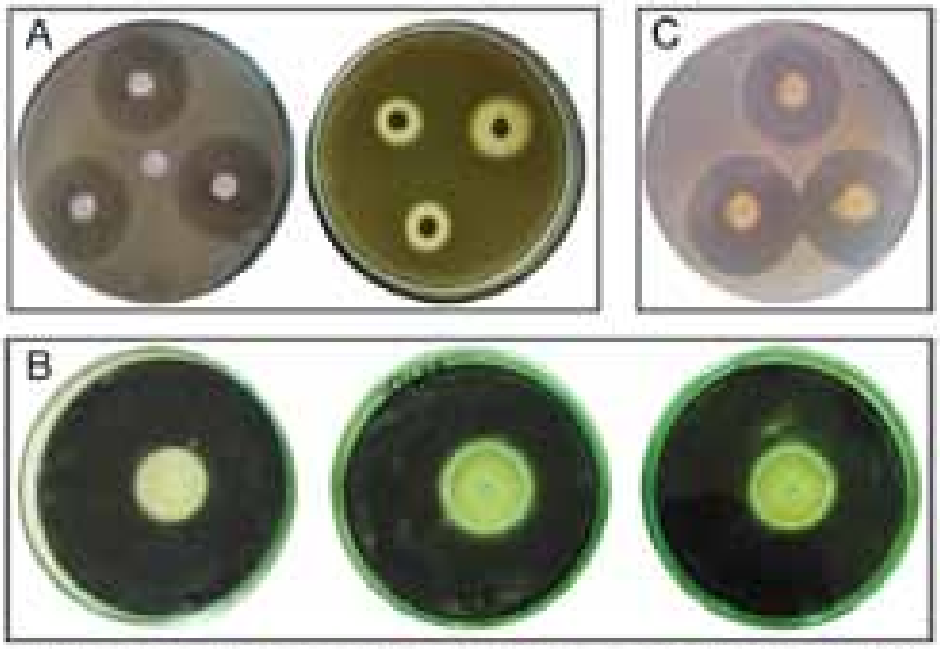
۱،۲. روش انتشار دیسک در آگار (Agar disk-diffusion)

ایـن روش در سـال ۱۹٤۰ گسـترش یافـت و یـک روش معمول مورد اسـتفاده در بسـیاری از آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی برای تست حساسیت ضد میکروبی می‌باشد. امروزه، بسـیاری از استانداردهای پذیرفته شده و تایید شده توسط موسسه اسـتاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) برای باکتری‌ها و مخمرهای مورد بررسـی منتشر شده است. با وجود این که همه باکتری‌های مشکل پسند را نمی‌توان به طور دقیق با این روش آزمایش کرد، اسـتاندارد سـازی این گونه باکتری‌ها مثل اسـترپتوکوک، هموفیلوس آنفلوآنزا، هموفیلوس پاراآنفلوآنزا، نایسریا گونوره و نایسریا مننژیتیدیـس با اسـتفاده از محیط‌های کشـت مخصوص، شـرایط مختلف انکوباسـیون و معیارهای تفسـیری برای ناحیه‌های مهار رشد انجام شده است.

در روش انتشـار دیسـک در آگار، پلیـت آگار بـا مقدار استانداردی از میکروارگانیسـم مورد آزمایش تلقیح می‌شود سپس، دیسـک‌های کاغذ فیلتر (حدود ٦ میلی متر در قطر)، حاوی ترکیب تست در غلظت مورد نظر بر روی سطح آگار قرار داده می‌شـود. پتری دیش تحت شـرایط مناسب انکوبه می‌شـود. معمولا عامل ضد میکروبی در آگار پخش شـده و مانع جوانه زنی و رشد میکروارگانیسم مورد آزمایش شده و پس از آن قطر ناحیه مهارکننده رشـد اندازه گیری می‌شوند. (شـکل ۱) جدول ۱ محیط‌های رشـد میکروبـی، دما، دوره انکوباسیون و اندازه مورد نیاز تلقیح با استانداردهای CLSI را نشان می‌دهد. آنتی بیوگرام بر اساس نتایج کیفی باکتری‌ها را به گروه حسـاس، نیمه حساس و یا مقاوم طبقه‌بندی می‌کند. بنابراین، این روش به عنوان یک ابزار پایه‌ای برای تعیین نوع فنوتیپ مقاومت در بین باکتری‌های آزمایش شده می‌باشد و نتایج آن نیز می‌تواند به پزشکان در انتخاب درمان تجربی اولیه مناسـب و نوع آنتی بیوتیک استفاده شـده برای هر بیمار در شرایط خاص کمک نماید. با این حال، از آنجا که مهار رشد باکتری به معنی مرگ باکتری نیسـت لذا این روش نمی‌تواند تاثیرات bactericidal (کشتن باکتری) و bacteriostatic (متوقـف کننـده رشـد باکتـری) یـک دارو را از هـم تشخیص دهد.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018



شکل ۱. روش‌های انتشار در آگار: (A) روش انتشار دیسک در آگار عصاره میکروبی با استفاده از کاندیدا آلبیکانس به عنوان میکرو ارگانیسم مورد آزمایش، (B) روش انتشار در چاهک آگار چربی ضروری با استفاده از آسپرژیلوس نیگر به عنوان میکروارگانیسم مورد آزمایش، (C) روش انتشار دو شاخه در آگار با استفاده از باسیلوس سوبتیلیس بر علیه کاندیدا آلبیکانس

Table 1
Culture media, microbial inoculum size and incubation conditions for antimicrobial susceptibility testing methods as recommended by CLSI.

Methods	Microorganism	Growth medium	Final inoculum size	Incubation temperature (°C)	Incubation time (h)	Ref.
Disk-diffusion method	Bacteria	MHA	(0.5 McFarland) (1–2) × 10^8 CFU/mL	35 ± 2	16–18	M02-A [9]
	Yeast	MHA + GMB[a]	(0.5 McFarland) (1–5) × 10^6 CFU/mL	35 ± 2	20–24	M44-A [10]
	Molds	Non-supplemented MHA	(0.4–5) × 10^6 CFU/mL	–	–	M51-A [18]
Broth microdilution	Bacteria	MHB	5 × 10^5 × CFU/mL	35 ± 2	20	M07-A [56]
	Yeast	RPMI 1640[b]	(0.5–2.5) × 10^3 CFU/mL	35	24–48	M27-A [69]
	Molds	RPMI 1640[b]	(0.4–5) × 10^4 CFU/mL	35	48 for most fungi	M38-A [70]
Broth macrodilution	Bacteria	MHB	5 × 10^5 CFU/mL	35 ± 2	20	M07-A [56]
	Yeast	RPMI 1640[b]	(0.5–2.5) × 10^3 CFU/mL	35	46–50	M27-A [69]
	Molds	RPMI 1640[b]	(0.4–5) × 10^4 CFU/mL	35	48 for most fungi	M38-A [70]
Agar dilution	Bacteria	MHA	10^4 CFU/spot	35 ± 2	16–20	M07-A [56]
Time-kill test	Bacteria	MHB	5 × 10^5 CFU/mL	35 ± 2	0, 4, 18, and 24	M26-A [75]

MHA: Mueller Hinton Agar. MHB: Mueller Hinton Broth.
[a] GMB: the medium was supplemented with 2% glucose and 0.5 mg/mL methylene blue.
[b] RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute medium (with glutamine, without bicarbonate, and with phenol red as a pH indicator) was 1640, buffered to pH 7.0 with MOPS (morpholine propane sulfonic acid) at 0.165 M.

جدول ۱. محیط‌های رشد میکروبی، دما، دوره انکوباسیون و اندازه مورد نیاز تلقیح با استانداردهای CLSI

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018

علاوه بر این روش انتشار روی سطح آگار نمی‌تواند روش مناسبی برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) باشد و در آن تعیین مقدار غلظت ماده ضد میکروبی منتشره در محیط آگار امری غیر ممکن می‌باشد. یک MIC تقریبا می‌تواند بـرای برخی از میکروارگانیسـم‌ها و آنتی‌بیوتیک با مقایسه محدوده عدم رشـد الگوریتم‌های ذخیره شده را محاسبه نماید. با این وجود، روش دیسک دیفیوژن مزایای بسـیاری نسبت به روش‌های دیگر دارد: سادگی، کم هزینه بودن، توانایی تسـت تعداد زیادی از میکروارگانیسـم‌ها و عوامل ضد میکروبی و سـهولت برای تفسـیر نتایج. علاوه بر ایـن، چندین مطالعه رضایت بـالای بیمارانی که دارای عفونـت باکتریایی بوده انـد و از درمان ضدباکتریایی خود از روش‌های بر پایه آنتی بیوگرام برای تشـخیص و درمان استفاده کرده اند را نشان می‌دهد. این واقعیت نشان می‌دهد که یک ارتباط خوبی بین داده‌ها در شـرایط آزمایشگاهی و در ارزیابی محیط بیرون وجود دارد. قبل از استاندارد کردن روش انتشـار روی سطح آگار، آزمایش posaconazole بر روی قارچ‌های رشـته ای، آزمایـش micafungin بر روی آسـپیروژیلوس و آزمایـش caspofungin بر علیه آسپرژیلوس و فوزاریوم صورت می‌گرفت. در حال حاضر، روش اسـتاندارد disk-diffusion در مـورد قارچ‌ها به یک رویکردی در اسـتفاده برای آزمایـش کردن قارچ‌های رشـته‌ای غیر درماتوفیتی دسـت یافته است. شرایط محیط کشت، مقدار ماده تلقیحی، شرایط اینکوبه کردن در جدول شـماره ۱ ذکر شده است. مزایای ذکر شده در بالا برای این روش، به طور عمده سـادگی و کم هزینه بودن و اسـتفاده عمومـی برای غربالگری عصاره‌های گیاهی آنتی میکروبی، اسانس‌ها و مواد دارویی دیگر می‌باشد.

۲،۲. روش شیب ضد میکروبی
Antimicrobial gradient method (Etest)

این روش ترکیبی از روش اصلی رقیق سـازی و روش تغلیـظ به منظور تعیین انـدازه MIC بوده که با ایجاد یک غلظـت گرادیانی از عامل ضد میکروبی آزمایش شـده در محیـط آگار همراه می‌باشـد. Etest یک فـرم تجاری از این روش اسـت. در این روش، یک نوار آغشـته با غلظت گرادیانی افزایشـی بـا عامل ضد میکروبـی از یک انتها به قسمت دیگر بر روی سطح آگاری پخش می‌شود که قبلا با میکروارگانیسم مورد آزمایش مورد تلقیح قرار گرفته است. این روش برای تعییـن MIC آنتی بیوتیک ها، ضد قارچ‌ها و میکروب‌های ضد قارچ اسـتفاده می‌شـود. ارزش MIC در تعیین قسمت‌های قطع شده نوارها و محدوده‌های مهار رشـد می‌باشـد. بنابراین، این روش را به طـور معمول بر اسـاس درخواسـت پزشـکان معالج به کار می‌برند، با این حـال، هزینه هر نوار E-test، ۲ تا ۳ دلار اسـت. بنابراین، ایـن روش در صـورت آزمایش با داروهـای متعدد هزینه زیادی در بر خواهد داشت. مطالعات قبلی همبستگی خوبی بین مقادیر MIC تعیین شـده توسط E-test و روش‌های broth dilution یا agar dilution نشـان می‌دهد. این تکنیـک همچنین می‌تواند رابطه ضد میکروبی بین دو دارو را هم بررسـی نماید. به منظور بررسـی اثـر ترکیبی از دو آنتی بیوتیـک ها، نوار E-test، ابتدا بـا یک آنتی بیوتیک انجـام می‌شـود و سـپس بـر روی یک محیط کـه قبلا با میکروارگانیسـم تلقیح شده است قرار داده می‌شود. بعد از یک سـاعت، نوار برداشته شده و با یک آنتی بیوتیک دیگر آغشته شده جایگزین می‌گردد. همچنین برای همان هدف، نوار E-test را می‌توان در محیط کشت آگار در یک حالت به صـورت متقابل و با یک زاویه ۹۰ درجه در محل مقابل بین MIC و میکروارگانیسـم مـورد آزمایش قرار داد. پس از انکوباسـیون، شاخص کسری غلظت مهاری (FICI) را می‌توان با استفاده از فرمول زیر محاسبه نمود:

$$\sum FICI = FIC(A) + FIC(B)$$

$$\text{where } FIC(A) = \frac{MIC(A)\ \text{in combination}}{MIC(A)\ \text{alone}} \text{ and } FIC(B) = \frac{MIC(B)\ \text{in combination}}{MIC(B)\ \text{alone}}$$

هم افزایی آن با FICI کمتر یا مساوی ۰/۵ و آنتاگونیستی آن با FICI بیشـتر از ٤ تعیین می‌گردد. FICI بین ۰/۵ و یک به عنوان آزمایش دارای تفسـیر افزایشـی و بین ۱ تا ٤ بدون تفسیر گزارش می‌شود.

۳،۲. سایر روش‌های انتشار

روش انتشـار بیشـتر در آزمایشـگاه‌های تحقیقاتـی میکروبیولـوژی بـرای غربالگـری عصـاره، تقسـیم یـا خالص‌سـازی مواد برای بررسـی قدرت ضد میکروبی یا بررسـی اختلاف بین میکروارگانیسـم‌ها مورد استفاده قرار

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018

می‌گیرد. از بین ایـن روش ها، مهم ترین آن‌ها در زیر ذکر شده است.

۱،۳،۲. روش انتشار در حفره آگار (Agar well diffusion)

این روش به طور گسـترده‌ای به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی گیاهان یا عصاره میکروبی استفاده می‌شود. در این روش همانند روش disk-diffusion سوسپانسـیون میکروبی را در سطح پلیت آگار طوری پخش می‌نماییم که به طور یکنواخت تمام سـطح پلیت را بپوشاند. سپس، یک سـوراخ با قطر ٦ تا ۸ میلی متر در شـرایط استریل با پانچ استریل از آگار بر می‌داریم و یک مقداری (حجم ۱۰۰-۲۰ میلـی لیتر) از عامـل ضد میکروبی یا عصاره تهیه شـده با غلظت معین داخل حفره وارد می‌کنیم. سـپس، پلیت آگار را تحت شـرایط مناسب بسته به نوع میکروارگانیسم مورد آزمایش انکوبه می‌کنیم. عامل ضد میکروبی در محیط آگار پخش شـده و مانع از رشد سـویه میکروبی مورد آزمایش می‌شود. (شکل 1.B).

۲،۳،۲. روش انتشار در پلاگ آگار (Agar plug diffusion)

این روش اغلب برای تشـخیص رابطه آنتاگونیسمی بین میکروارگانیسـم‌ها مورد اسـتفاده قرار می‌گیرد و روش کار مانند روش disk-diffusion می‌باشـد. اساس این روش بر سـاختن یک محیط آگار اسـتوار اسـت که روی محیط کشـت آن رگه‌های نازکی در سطح پلیت مشخص می‌باشد. سـلول‌های میکروبی در طول رشد خود، مولکول‌هایی را در محیط کشـت آگار ترشـح می‌کنند. پس از انکوبه کردن، با اسـتفاده از آگارپلیت یا لوله‌ای در شرایط استریل در محیط آگار یک برشی ایجاد کرده و از سطح آگار برداشته و در یک سـطح دیگر که میکروارگانیسـم‌های مورد آزمایش در آنجا هسـتند قرار داده می‌شوند. مواد پخش شده از محیط plug را به محیط آگار منتقل می‌کنیم. سپس فعالیت ضد میکروبی مولکول‌های مترشـح شده از مواد ضد میکروبی با استفاده از شناسـایی هاله مهار رشد که در اطراف agar plug تشکیل می‌شود قابل تشخیص می‌گردد. (شکل c1)

۳،۳،۲. روش خط متقاطع (Cross streak)

این روش برای غربالگری سـریع میکروارگانیسـم‌ها از لحـاظ رابطه آنتاگونیسـمی بکار می‌رود. سـویه میکروب دلخواه توسـط یـک خط واحد در مرکز آگار کشـت داده می‌شـود. پس از یک دوره انکوباسـیون براسـاس سـویه میکروبی، با میکروارگانیسـم مورد آزمایش به صورت یک خط منفرد عمود بر خط مرکزی محیط کشت تلقیح می‌گردد. پس از انکوباسـیون بعدی، برهم کنش‌های ضدمیکروبی با مشاهده اندازه هاله عدم رشد مورد تفسیر قرار می‌گیرد.

٤،۳،۲. روش غذای سمی (Poisoned food)

این روش عمدتا به منظور بررسـی اثـر ضد قارچی بر علیـه کپک مورد اسـتفاده قرار می‌گیرد. عامـل ضد قارچ و یـا عصاره آن بـه آگار مایع در غلظـت نهایی مورد نظر رسانده شده و به خوبی مخلوط می‌شوند. پس از آن، محیط کشـت در پتری دیش ریخته می‌شـود و یک شـب بعد از انکوباسیون، تلقیح را می‌توان با یک دیسکی از میسلیوم‌های قـارچ بـا محدوده انـدازه از ۲ تا ۵ میلی متـر که در مرکز دیسـک قرار داده می‌شـود انجام داد. پس از انکوباسـیون بیشـتر تحت شرایط مناسب بر اساس نوع قارچی که مورد آزمایش قرار گرفته اسـت قطر رشـد قارچ در دیسک‌های کنترل و نمونه‌ها اندازه گیری شده و اثر ضد قارچی توسط فرمول زیر برآورد می‌شود:

$$\text{Antifungal activity } (\%) = ((Dc - Ds)/Dc) \times 100$$

CD قطر رشد در صفحه کنترل است و DS قطر رشد در صفحه حاوی داروی ضد قارچ تسـت شده است. همچنین اسـپورزایی را می‌توان با کنترل مقایسـه کرد. به طور کلی، وقتی روش اسـتاندارد سازی مورد اسـتفاده خوب جواب نمی‌دهـد محقق باید موارد کنتـرل مثبت را با مولکول‌های ضد میکروبی شناخته شده برای مقایسه نتایج به دست آمده و کنترل کیفیت کار تجربی خود ادامه دهد.

۳. کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) بیواتوگرافی (Thin-layerchromatography(TLC) bioautography)

در سـال ۱۹٤٦ Goodall وLevi ترکیبـی از کروماتوگرافی کاغـذ (PC) را در تماس با بیواتوگرافی به منظور تشخیص جداسازی پنی سـیلین‌های مختلف انجام دادنـد. پـس از آن Fischer و Lautner در همین زمینه

TLC را معرفی کردند. ایـن روش ترکیبی از TLC با هر دو روش بیولوژیکی و تشخیص شیمیایی می‌باشد. چندین کار مختلف در مورد غربالگری عصاره‌های اسـتخراج شده به خصوص عصاره‌های گیاهـان برای فعالیت ضد باکتری و ضد قارچ توسـط TLC بیواتوگرافی انجام شـده است. همانطـور که در زیر نشـان داده شـده اسـت، سـه روش bioautographic، به عنوان مثـال Agar diffusion، Bioautography مسـتقیم و Agaroverlay بـرای بررسـی ترکیبات ضـد میکروبـی از طریق ایـن رویکرد توصیف شده است.

۱،۳. انتشار در آگار (Agar diffusion)

بـه عنوان روش تماس با آگار نیز معروف می‌باشـد. این روش شـامل انتقال عامـل ضد میکروبی از طریق انتشـار از کروماتوگـرام (PC یـاTLC) بـه آگاری کـه قبـلا با میکروارگانیسـم مورد آزمایش تلقیح شـده است می‌باشد. بعد از چند دقیقه یا چند ساعت انتشار کروماتوگرام متوقف شده و آگار انکوبه می‌شود. مناطق مهار رشد در مکان‌هایی که در آن ترکیبات ضد میکروبی با لایه آگار تماس داشـته است ظاهر می‌گردد.

۲،۳. بیواتوگرافی مستقیم

این روش بیشـترین اسـتفاده را در میان این سـه روش دارد. شامل صفحه TLC گسترده‌ای است که در داخل مواد میکروبی غوطه ور شـده یا اسپری شـده و بعد بیواتوگرام است که در درمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ٤٨ ساعت تحـت شـرایط رطوبتی خاص انکوبه شـده اسـت. برای دیدن رشـد میکروبـی، اغلب از املاح تترازولیوم اسـتفاده می‌شـود. این نمک تحـت تاثیر فورمازان کامـلا رنگی از طریق دهیدروژناسـیون سلول‌های زنده کاملا تغییر می‌یابد. P-Iodonitrotetrazolium بنفش مناسب ترین نمک برای تشـخیص است. این نمک‌ها بر روی بیواتوگرافی، که در ۲۵ درجه سـانتی گراد به مدت ٢٤ سـاعت یا در دمای ۳۷ درجه سـانتیگراد به مدت ٤-۳ سـاعت انکوبه شده اند اسـپری می‌گردند. Mueller Hinton Broth همراه با مکمل آگار برای به دست آوردن یک محیط مایع غنی کننده برای اتصال بهتر به صفحات TLC توصیه شـده اسـت و رطوبت مناسـب جهت رشـد باکتری را فراهـم می‌نماید. بیواتوگرافی مستقیم ممکن است برای باکتری و قارچ با هم مورد استفاده قرار گیرد. این تکنیک ساده ترین روش برای تشـخیص مواد ضد قارچی است و همچنین نتایج مطلوبی را برای تولید اسپور قارچ‌هایی مانند آسپرژیلوس، پنیسیلیوم و کلادواسـپوریوم ارائه می‌دهد. در مورد باکتری‌ها، اغلب باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و گونه‌های اشرشـیا کلی برای شناسـایی ترکیبات ضـد باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۳،۳. سنجش زیستی اندود کردن با آگار (Agar overlay bioassay)

ایـن روش همچنیـن به عنـوان بیواتوگرافی شـناوری معروف اسـت و ترکیبی از دو روش قبلی می‌باشد. صفحه TLC که با محیط کشـت آگار مذاب پوشـانده شده است اجازه می‌دهد یک انتشـار خوب از ترکیبات مورد آزمایش به محیط کشـت آگار انجام گیرد. صفحات در دمای پایین برای چند سـاعت قبل از انکوباسیون قرار می‌گیرند. پس از انکوباسیون تحت شرایط مناسب بسـته به میکروارگانیسم مـورد آزمایش، رنگ آمیزی را می‌تـوان با رنگ تترازولیوم انجام داد. این روش هم مانند بیواتوگرافی مستقیم می‌تواند در مورد تمام میکروارگانیسـم‌ها ماننـد کاندیدا آلبیکنس و کپک‌ها اسـتفاده گردد. این روش به خوبی هاله عدم رشـد را نشـان داده و به آلودگی حساس نمی‌باشد. به طور کلی، TLC-bioautography یک تکنیک ساده، موثر و ارزان برای جدا کردن یک مخلوط پیچیده است و در زمان یکسان بخش اصلی تشـکیل دهنده پـروژه در صفحه TLC قرار می‌گیـرد. بنابراین می‌توان هم در آزمایشـگاه‌های مجهز و هم در آزمایشـگاه‌های کوچک که تنها دسترسی به حداقل تجهیـزات را دارنـد اینـکار را انجام داد. با وجود داشـتن مشـکلات زیاد در این روش، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به همراه بیواسـی بـه طور فزاینـده‌ای تبدیل به عنوان یک روش انتخابی محبوب برای تشـخیص نهایی ترکیبات استخراجی تبدیل شده است نیزTLC-bioautography یک روش سریع برای غربالگری تعداد زیادی از نمونه‌های دارای فعالیـت زیسـتی و به عنوان یک راهنمـا در تجهیز ایـن فعالیت‌هـا ارائه می‌نمایـد. علاوه بر ایـن، این روش می‌تواند برای تشخیص آنتی بیوتیک‌هایی در محیط زیست

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018

و نمونه‌های مـواد غذایی و همچنین برای جسـتجو برای داروهای ضد میکروبی جدید استفاده گردد.

٤. روش‌های رقیق سازی

این روش‌ها یکی از مناسـب ترین روش‌ها برای تعیین ارزش MIC هسـتند چرا که توانایـی تعیین غلظت عامل ضد میکروبی آزمایش شـده در آگار (رقت در آگار) یا در محیـط مغذی (رقت بـالا یا رقت پاییـن) را دارند. در هر دو صـورت محیط مغذی یـا روش رقت در آگار به لحاظ کمی انـدازه گیری فعالیـت ضد میکروبی در شـرایط in vitro برای باکتری‌ها و قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزش ثبت شـدهMIC به عنوان کم ترین غلظت از عامل ضدمیکروبی مورد سـنجش قرار گرفته است که مهار رشد قابـل توجهی از میکروارگانیسـم آزمایش شـده را نشـان می‌دهد و معمولا بر اسـاس میلی گرم در میلی لیتر یا میلی گرم بر لیتر بیان شـده است. بسـیاری از دستورالعمل‌های تایید شـده برای میزان رقت تست حساسیت ضد میکروبی از باکتری‌های اسـید فاسـت و غیر اسید فاست و مخمر و قارچ‌های رشـته‌ای وجود دارد. مهم ترین اسـتانداردهای شـناخته شده توسط CLSI و کمیته اروپایی ضد میکروبی آزمایش تعیین حساسـیت (EUCAST) ارائه شده است. به عنوان توصیه، این دسـتورالعمل یک روش یکسان برای این تسـت اسـت که به صورت عملی بـرای انجام کار در اکثر آزمایشـگاه میکروب شناسـی بالینی فراهم می‌نماید. توسـعه این چنین روش‌های اسـتاندارد ارتباطات بالینی با این تسـت‌ها را تضمین نمی‌کند. با این وجود این روش‌ها اجازه می‌دهند که یک ارزشـیابی در یک رویکرد استاندارد به منظور ارزیابی ارتباط بالینی نتایج انجام گیرد.

١،٤. روش رقیق کردن در محیط مایع (Broth dilution)

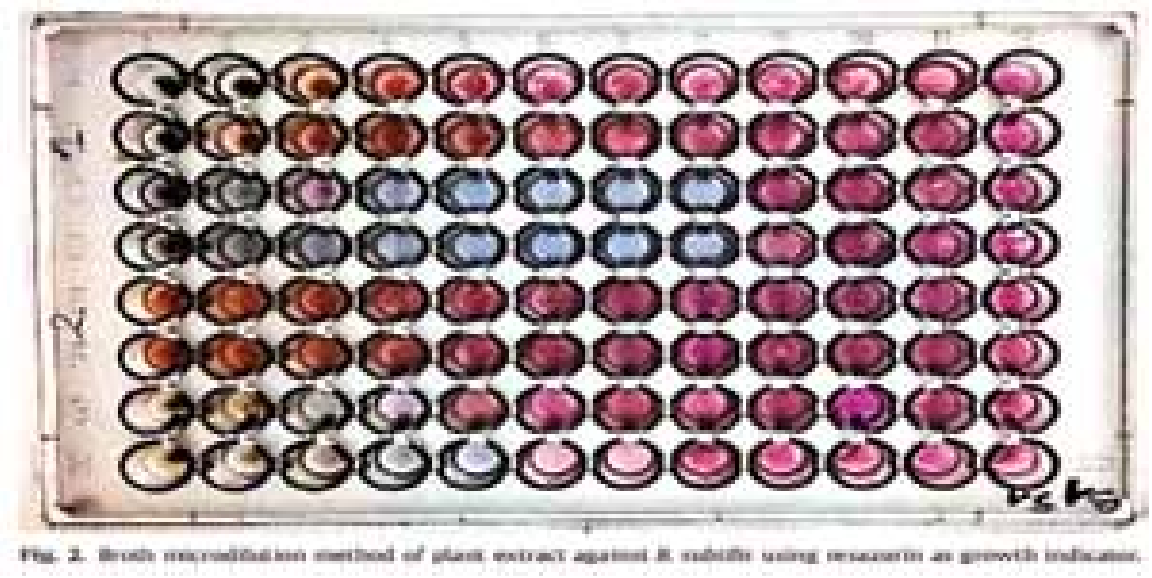
رقـت به صـورت Micro یـا Macro در محیط مایع یکی از اساسـی ترین روش‌های آزمایش حساسـیت مواد ضد میکروبی است. این پروژه مستلزم آماده کردن ٢ تارقت از یک ماده ضدمیکروبی (به عنـوان مثال ١،٢،٤،٨،١٦و٣٢ میکروگرم بر میلی لیتر) در یک محیط کشـت مایع اسـت که بـه لوله‌های حـاوی حداقل حجم ٢ میلـی لیتر توزیع می‌شـود که این روش Macrodilution نامیده می‌شود و در Microdilution از لوله‌هـای بـا حجم کمتر مانند پلیت میکروتیتراسـیون دارای ٩٦ خانه‌ای استفاده می‌شود. سـپس هر لوله را با حجم مناسـبی از تلقیح میکروبی آماده شـده در همـان محیط بعـد از رقیق کردن سوسپانسـیون میکروبی اسـتاندارد شـده تلقیح می‌کنند تا کدورت معادل 0.5 در مقیـاس مک فارلند به دسـت آیـد. پس از این که به خوبی مخلوط شـدند لوله‌های تلقیح شـده یا پلیت ٩٦ خانـه‌ای را انکوبه کرده (اغلب بـدون تکان دادن) و تحت شـرایط مناسب بسته به میکروارگانیسـم مورد آزمایش که انکوبه شده است قرار می‌دهند. روش تجربی با انجام دقیق Microdilution در شکل ٤ نشان داده شده است.

MIC کمترین غلظت عامل ضد میکروبی اسـت که به طور کامل مانع از رشـد ارگانیسم در لوله یا چاه Microdilution که توسـط چشـم غیر مسلح تشخیص داده می‌شـود می‌گردد. بـر خـلاف روش Microdilution، از معایب اصلی روش Macrodilution خسته کننده بودن، نداشتن کتابچه راهنمای کاربـر، خطر به وجود آمـدن خطا در آماده سـازی روش‌های ضد میکروبی برای هر آزمایش و مقدار نسـبتا زیادی از معرف و فضـای مورد نیاز می‌باشـد. بنابراین تکـرار پذیری و مقرون بـه صرفه بودن و فضایی که با توجه به کوچک سـازی آزمون رخ می‌دهـد مزیت‌های عمـده‌ای از روش Microdilution به شـمار می‌روند بـا این وجود، اگر نتایج تکـرار پذیر (داخل آزمایشگاهی و بین آزمایشگاهی) به دست آمده تحت تاثیر قرار می‌گیرد نتیجه نهایی با اسـتفاده از این روش، باید به طور قابل توجهـی به دقت کنترل گردد. برای تعیین نقطه پایانی MIC، با مشاهده دستگاه می‌توانید با خواندن آزمایش Microdilution و نوشـتن نتایـج با توانایی بالا تشـخیص رشـد در چاهک را آسـان نماییم. علاوه بر این، چندین روش بر اسـاس استفاده از معرف رنگ توسـعه یافته‌اند. نمک تترازولیوم ٣-(٤،٥- دیمتیل تیازول-٢-YL)-٥،٢- دیفنیـل تترازولیوم بروماید (MTT) و ٣،٢ - bis (٢- متوکسـی ٤ نیتـرو٥ سـولفونیل آمینوکربونیل 2H - تترازولیـوخ هیدرواکسـاید (XTT) که اغلب در تعیین MIC نقطه پایانی برای هر دو روش میکرودایلوشـن ضد قارچ و ضد باکتری اسـتفاده می‌شـوند. رنگ الامار آبی (رزازورین) به عنوان یک شـاخص موثر رشـد همچنین می‌تواند برای این

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018

منظور استفاده گردد. اندازه تلقیح، نوع محیط رشد، گذشت زمان و روش آماده سازی تلقیح می‌تواند مقادیرMIC را تحت تاثیر قرار بدهد. بنابراین Broth dilution توسط CLSI برای آزمایش باکتری‌های با رشد بی هوازی و مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای استانداردسازی شده است. EUCAST روش Broth dilution را اصولا همانندCLSI با تغییرات معمولی در مورد برخی از پارامترهای آزمایش مانند آماده سازی تلقیح، اندازه تلقیح و روش خواندن MIC ایجاد کرده است و مشاهده در روش CLSI و اسپکتروفتومتری در دستورالعمل EUCAST قرار دارد.



شکل ۲. روش رقت میکرو در محیط کشت مایع عصاره گیاهی بر علیه باسیلوس سوبتی لیس با استفاده ازرزازورین به عنوان نشانگر رشد

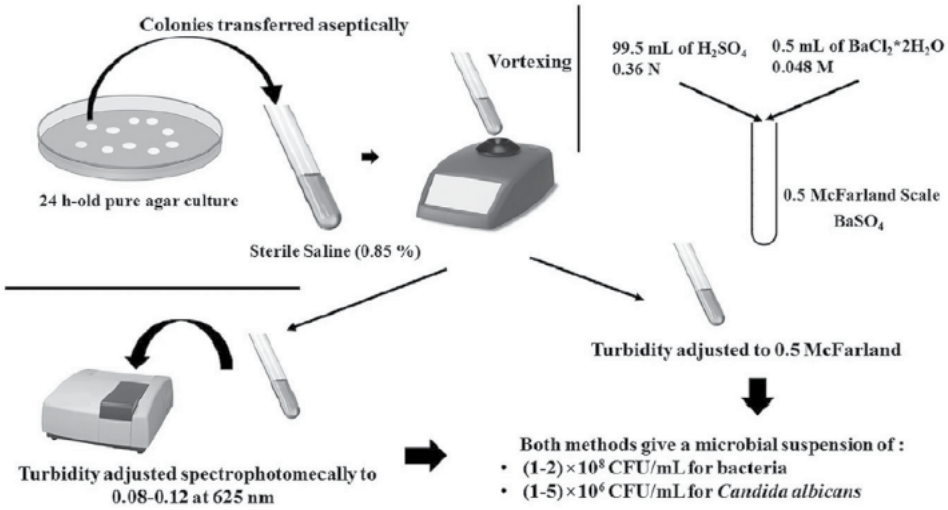
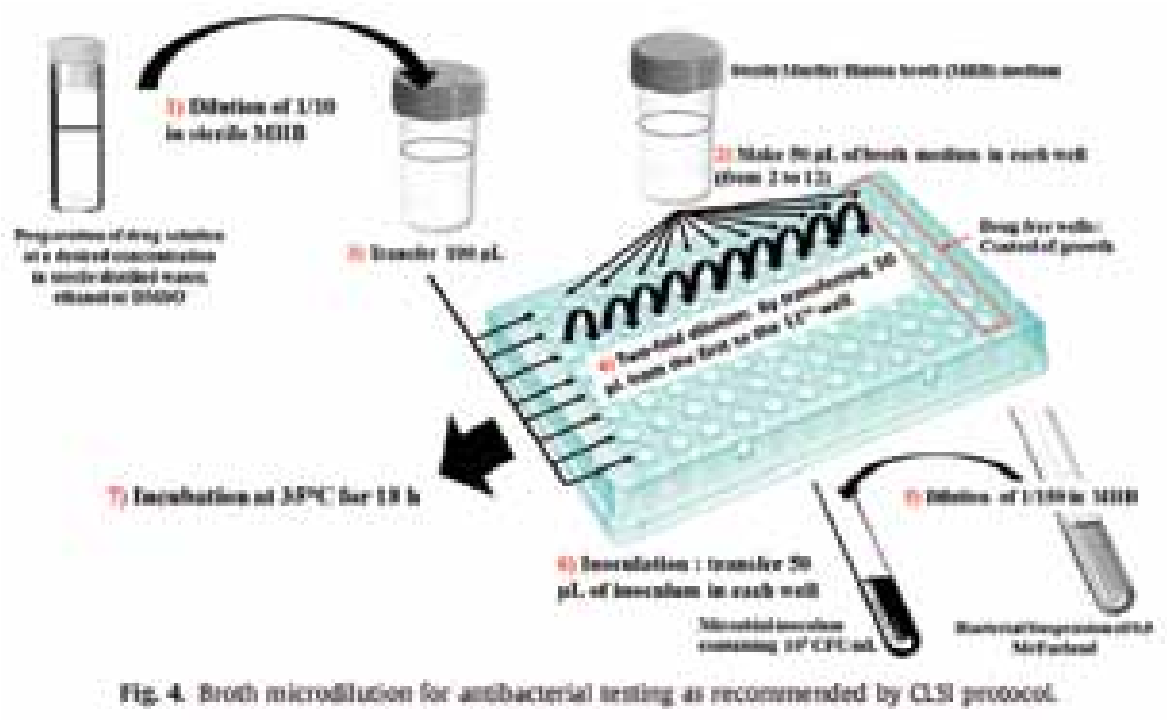


Fig. 3. 0.5 McFarland microbial inoculum preparation by the direct colony suspension as recommended by CLSI guidelines.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018



شکل ٤. رقت میکرو در محیط کشت مایع توصیه شده توسط CLSI برای بررسی مواد ضد میکروبی

با توجه به تشکیل کونیدیا و اسپور در قارچ‌ها استانداردسازی microdilution توسط CLSI شامل یک تلقیح اسپکتوروفتومتریک به مقدار ۰/٤×۱۰^{٤}–۵×۱۰^{٤} CFU بر میلی لیتر می‌باشد. در حالی که در سنجش با EUCAST تلقیح را می‌توان تنها با مقدار (۲–۵)×۱۰^{٥} CFU بر میلی لیتر با استفاده از شمارشگر هموسیتومتر انجام داد. مطالعات متعدد اهمیت استفاده از تلقیح با شمارشگر هموسیتومتر برای تکرار کردن و آماده سازی مناسب که مستقل از رنگ و اندازه اسپور باشد را نشان می‌دهند. تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) و یا حداقل غلظت قارچ کشی (MFC)، همچنین به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MLC) شناخته شده است که رایج ترین روش برای تعیین فعالیت باکتری یا قارچ کشی می‌باشد. MBCعبارت از حداقل غلظت عامل ضد باکتری برای کشتن ۹۹/۹ ٪ از باکتری‌ها پس از انکوباسیون به مدت ۲٤ ساعت تحت یک مجموعه شرایط استاندارد است که در آن می‌تواند پس از Macrodilution یا Microdilution توسط کشت یک نمونه در چاهک و یا لوله‌های معین، بازده منفی رشد میکروبی پس از انکوباسیون در سطح صفحات غیر انتخابی آگار را برای تعیین تعداد سلول‌های باقی مانده بر اساس CFU بر میلی لیتر پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون به کارگیرد. نقطه پایانی باکتری کشی (MBC) به عنوان کمترین غلظت که در آن ۹۹/۹ ٪ از باکتری‌ها کشته شده‌اند تعریف می‌شود. MFC نیز به عنوان کمترین غلظت دارو است که در محدوده ۹۹/۹ ٪ – ۹۸/۹ ٪ اثر کشندگی آن نسبت به تلقیح اولیه تعریف شده است. مطالعات متعددی برای بررسی پارامترهای آزمون‌های مختلف برای یکسان سازی تعریفMFC داروهای مختلف بر علیه قارچ کاندیدا، آسپرژیلوس و دیگر گونه‌های جدا شده انجام شده است.

۲،٤. روش رقیق کردن در آگار (Agar dilution)

این روش شامل ترکیب غلظت‌های مختلف از عامل

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018

ضد میکروبی مورد نظر در یک محیط کشت آگار (محیط آگار مایع) می‌باشد که معمولا به صورت ۲ برابر رقت آگار پس از تلقیح یک معرف میکروبی بر روی سطح آگار تلقیح می‌گردد. نقطه پایانی MIC به عنوان کم ترین غلظت عامل ضد میکروبی به طور کامل مانع از رشد تحت شرایط مناسب انکوباسیون می‌گردد که در جدول ۱ ذکر شده است. این روش برای هر دو تست حساسیت ضد باکتریایی و ضد قارچی مناسب است. اگر ایزولاسیون متعدد بر علیه یک ترکیب صورت گیرد و یا اگر یک ترکیب (عصاره) در محیط مایع با استفاده از رنگ آمیزی در یک محیط مایع برای تشخیص رشد میکروبی به کار گرفته شود روش Agar dilution اغلب نسبت به روش broth dilution برای تشخیص MIC ترجیح داده می‌شود. امروزه، تولید تجاری تلقیح‌های جایگزین در دسترس هستند و می‌توانند بین ۳۲ و ٦۰ ماده تلقیحی باکتریایی مختلف به هر پلیت آگار انتقال دهند. Agar dilution اغلب به عنوان یک روش استاندارد برای ارگانیسم‌های اسید فست مثبت مانند بی هوازی‌ها و گونه‌های هلیکوباکتر توصیه می‌شود. این روش برای ترکیبات دارویی ضد قارچی بر علیه گونه‌های کاندیدا مانند آسپرژیلوس، فوزاریوم و درماتوفیت استفاده شده است و دارای ارتباط همبستگی قوی با E-test برای آزمایش مواد ضد باکتریایی بر علیه باکتری گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد. علاوه بر این در مقایسه با agar dilution، disk-diffusion و روش‌های broth microdilution نتایج بسیار عالی می‌دهد.

۵. روش بررسی زمان کشتن (time-kill curve orTime-kill test)

این روش یکی از بهترین روش‌ها برای تعیین خاصیت باکتری کشی و قارچ کشی می‌باشد و یکی از قوی ترین ابزارها برای به دست آوردن اطلاعات مورد ارتباط دینامیک بین مواد ضد باکتریایی با گونه‌های باکتری‌ها می‌باشد که وابسته به زمان یا وابسته به غلظت موثر مواد آنتی باکتریال است. برای باکتری این روش به خوبی در اسناد M26-A توسط CLSI استاندارد سازی و شرح داده شده است و ترجیحا در یک محیط کشت مغذی با استفاده از ۳ لوله که شامل سوسپانسیون باکتری به مقدار ۵×۱۰^۵ CFU/mL باشد انجام می‌گیرد. لوله‌های اول و دوم یک مولکول یا عصاره مورد آزمایش با غلظت نهایی MIC×۰/۲۵ و MIC×۱ می‌باشند و لوله سوم به عنوان کنترل رشد در نظر گرفته می‌شوند. تلقیح تحت شرایط مناسب شامل فواصل زمانی مختلف (۱۲،۱۰،۸،٦،٤،۰ و ۲٤ ساعت) صورت می‌گیرد. سپس درصد سلول‌های مرده نسبت به تعداد سلول‌های زنده بر اساس(CFU/ml) از هر لوله با استفاده از روش شمارش آگار شمرده شده و با لوله کنترل رشد مقایسه می‌گردد. به طور کلی تاثیر باکتری کشی با بررسی میزان کشندگی تا ۹۰ ٪ برای مدت ٦ ساعت و ۹۹/۹ ٪ مرگ و میر در مدت ۲٤ ساعت به دست می‌آید. به علاوه این روش می‌تواند برای تعیین خاصیت سنرژیستی و آنتاگونیستی بین دو یا بیشتر از ترکیبات دارویی استفاده گردد. چندین مطالعه در مورد مواد ضد قارچی با این روش صورت گرفته است.

٦. روش سنجش بیولومینسانس آدنوزین تری فسفات (ATP bioluminescence assay)

این روش بر اساس توانایی آدنوزین تری فسفات (ATP) تولید شده توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها ارزیابی می‌گردد. ATP به شکل انرژی شیمیایی برای سلول‌های زنده است و در حال حاضر به صورت بیشتر یا کمتر و یا مقدار ثابت در یک سلول موجود می‌باشد، بنابراین تعیین مقدار آن بر اساس جمعیت میکروبی موجود در نمونه برآورد می‌گردد. Dluciferin در حضور ATP توسط لوسیفراز تبدیل به لوسیفرین می‌شود که به تولید نور می‌انجامد. مقدار نور ساطع شده توسط luminometer و بیان واحد نور نسبی (RLU) که می‌تواند به RLU برمول از ATP تبدیل شود اندازه گیری می‌شود. بنابراین، یک رابطه خطی بین زنده ماندن سلول‌ها و تولید نور اندازه گیری شده وجود دارد. روش‌های نور سنجی دارای طیف وسیعی از برنامه‌های کاربردی است مانند آزمون سیتوتوکسیسیته، در ارزیابی نشانزد از تاثیر بیوفیلم در محل و غربالگری داروهای موثر روی لیشمانیا، آزمایش ضد باکتریایی، تست تاثیرات آن‌ها بر مایکوباکتری ها، تست مواد ضد قارچی بر علیه

مخمر و کپک ها. سرعت از مزایای مهم این روش است که نتایج کمی را فراهم می‌کند. این روش می‌تواند نتایج آزمایش‌های ضد مایکوباکتریایی را در مدت ۳ تا ۵ روز در مقایسه باروش سنتی رقت معمولی که نیاز به ۳ تا ٤ هفته انکوباسیون دارد فراهم کند.

۷. روش فلوسایتومتری (Flow cytofluorometric)

چند سال پیش، فواید flow cytometry برای تست حساسیت میکروارگانیسم پیشنهاد شد. بنابراین، بسیاری از نویسندگان به فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی بسیاری از داروها با استفاده از این روش پرداخته اند. تشخیص سریع سلول‌های آسیب دیده توسط این روش بستگی به استفاده از رنگ آمیزی مناسب دارد. بنابراین propidium iodide (PI) یک عامل فلورسنت می‌باشد که به صورت گسترده برای رنگ آمیزی DNA استفاده می‌گردد. مطالعات متعددی در مورد تاثیر دستگاه فلوسیتومتری به عنوان یک ابزار اساسی برای آزمایش ضد باکتریایی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز گزارش شده است که با استفاده از رنگ‌آمیزی همراه باPI برای ارزیابی غشای آسیب دیده و carboxyfluorescein diacetate (cFDA) برای تشخیص فعالیت استراز استفاده می‌گردد. در نتیجه، علاوه بر لیز سلول‌ها سه زیر گروه‌های جمعیتی (سلول‌های مرده، زنده و آسیب دیده) را می‌توان به وضوح با این روش تشخیص داد. سلول آسیب دیده به عنوان سلول تحت فشار قسمت‌های آسیب دیده داخل سلول‌ها و اختلال ایجاد شده بعد از آن در تولید مثل را نشان می‌دهند. تعیین سلول‌های آسیب دیده یکی از نتایج جالب در میکروبیولوژی مواد غذایی است زیرا این زیر گروه می‌تواند در شرایط بحرانی برای بهبود سلول مانند نگهداری مواد غذایی در شرایط درجه حرارت طولانی مدت مفید باشد. به علاوه روش flow cytofluorometric اجازه می‌دهد تا مقاومت به مواد آنتی باکتریال تعیین شده و تاثیر مولکول تست شده بر روی مقاومت و سلول میکروارگانیسم مورد آزمایش را ارزیابی کند. علاوه بر این نتایج تست را سریع تر می‌دهد (٦-۲ ساعت در مقابل ۷۲-۲٤ ساعت روش میکرودایلوشن). با این حال، استفاده گسترده از این روش برای آزمایش حساسیت ضد میکروبی در حال حاضر ممکن است به دلیل در دسترس نبودن تجهیزات سیتومتری مورد نیاز در آزمایشگاه‌های مختلف محدود به آزمایشگاه‌های پیشرفته شده است.

۸. نتیجه گیری

در حال حاضر، عفونت‌های میکروبی تبدیل به یک تهدید مهم بالینی شده که همراه با عوارض قابل توجه و مرگ و میر است که عمدتا به دلیل توسعه مقاومت میکروبی به عوامل ضد میکروبی موجود می‌باشد. بنابراین، روش‌های زیادی برای آزمایش حساسیت ضد میکروبی و کشف عوامل ضد میکروبی در طول زمان به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته و در آینده هم گسترش خواهد یافت. برخی از تکنیک‌ها توسط CLSI و EUCAST مورد استاندارد سازی قرار گرفته‌اند.

با این حال، در هنگام آزمایش محصولات طبیعی، اغلب برخی تغییرات در پروتکل‌های استاندارد مورد نیاز است. بنابراین، بسیار ضروری است که در مورد تغییراتی که در اصول میکروب‌شناسی با رقیق سازی محیط کشت و استفاده از یک تلقیح صورت می‌گیرد بسیاردقیق باشیم. علاوه بر این ما می‌توانیم با استفاده از حلال‌ها روی محیط رشد میکروارگانیسم مورد آزمایش تاثیر بگذاریم. ما می‌توانیم بگوییم که اختراع یک روش کوچک مطابق با پروتکل‌های استاندارد می‌تواند یک راه حل برای اطمینان از انجام دقیق آزمایش به صورت تجربی بوده و اجازه مقایسه نتیجه با نتایج سایر محققین را فراهم می‌کند.

References

Balouiri Mounyr, SadikiI Moulay, Ibnsouda SaadKoraich: Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity:A review. Journal of Pharmaceutical Analysis: 6: 71–79:2016.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 17:28 +0330 on Sunday February 25th 2018