

# 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](mailto: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 از روش‌های 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 پیدا کردن 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، تقریباً تمام گروه‌های آنتی بیوتیک‌های مهم (تتراسایکلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، آمینوگلیکوزیدها و ماکرولیدها) کشف شده بودند و از مشکلات اصلی شیمی درمانی در دهه ۱۹۶۰ کم 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 بر روی گیاهان و عصاره‌های ضد میکروبی، روغن‌ها و اسانس‌ها،

## ۲. روش‌های انتشار

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

این روش در سال ۱۹۴۰ گسترش یافت و یک روش معمول مورد استفاده در بسیاری از آزمایشگاه‌های میکروبی شناسی بالینی برای تست حساسیت ضد میکروبی می‌باشد. امروزه، بسیاری از استانداردهای پذیرفته شده و تایید شده توسط موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) برای باکتری‌ها و مخمرهای مورد بررسی منتشر شده است. با وجود این که همه باکتری‌های مشکل‌ساز را نمی‌توان به طور دقیق با این روش آزمایش کرد، استاندارد سازی این گونه باکتری‌ها مثل استرپتوکوک، هموفیلوس آنفلوآنزا، هموفیلوس پاراآنفلوآنزا، نایسریا گونوره و نایسریا منژیتیدیس با استفاده از محیط‌های کشت مخصوص، شرایط مختلف انکوباسیون و معیارهای تفسیری برای ناحیه‌های مهار رشد انجام شده است.

در روش انتشار دیسک در آگار، پلیت آگار با مقدار استاندارد از میکروارگانیسم مورد آزمایش تلقیح می‌شود سپس، دیسک‌های کاغذ فیلتر (حدود ۶ میلی متر در قطر)، حاوی ترکیب تست در غلظت مورد نظر بر روی سطح آگار قرار داده می‌شود. پتری دیش تحت شرایط مناسب انکوبه می‌شود. معمولاً عامل ضد میکروبی در آگار پخش شده و مانع جوانه زنی و رشد میکروارگانیسم مورد آزمایش شده و پس از آن قطر ناحیه مهارکننده رشد اندازه گیری می‌شوند. (شکل ۱) جدول ۱ محیط‌های رشد میکروبی، دما، دوره انکوباسیون و اندازه مورد نیاز تلقیح با استانداردهای CLSI را نشان می‌دهد. آنتی بیوگرام بر اساس نتایج کیفی باکتری‌ها را به گروه حساس، 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 مناسب و نوع آنتی بیوتیک استفاده شده برای هر بیمار در شرایط خاص کمک نماید. با این حال، از آنجا که مهار رشد باکتری به معنی مرگ باکتری نیست لذا این روش نمی‌تواند تاثیرات bactericidal (کشتن باکتری) و bacteriostatic (متوقف کننده رشد باکتری) یک دارو را از هم تشخیص دهد.

مواد متابولیتی ثانویه و مولکول‌های جدید مصنوعی به عنوان عوامل ضد میکروبی بالقوه متمرکز شده‌اند. با این حال، زمانی که ما مقالات منتشر شده که دارای اثر ضد میکروبی این محصولات طبیعی بودند بررسی می‌کردیم، مقایسه بین نتایج اغلب به دلیل استفاده از روش‌های غیر استاندارد و تکنیک‌های مختلف آماده سازی تلقیح، اندازه تلقیح، متوسط رشد، شرایط اینکوبه کردن و تعیین نقاط پایانی دشوار بود. این یک واقعیت است که خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های استخراج شده از گیاهان بسیار عالی است اما این قسمت از داده‌های اولیه باید مورد اعتماد بوده و به محققان اجازه مقایسه نتایج را بدهند و بایستی محققان از تحقیق روی خاصیت ضد میکروبی این‌ها فقط به عنوان یک مطالعه فتوشیمیایی 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 طور کامل، از تست *time-kill* و برای مطالعه بیشتر از روش *cytofluorometric* استفاده می‌گردد که از ماهیت اثر مهارکنندگی (*bactericidal*) یا *bacteriostatic* (یا وابسته بودن به زمان یا غلظت) دارو تلفات ناشی از آسیب سلولی به میکروارگانیسم مورد بررسی اطلاعات دقیقی ارائه می‌نماید.

با توجه به جذابیت‌های جدید خواص محصولات ضد میکروبی جدید مانند مبارزه با باکتری‌های مقاوم به چند دارو، بسیار مهم است که به منظور گسترش یک درک بهتر از روش‌های فعلی موجود برای غربالگری و یا کمیت اثر ضد میکروبی عصاره یا یک ترکیب خالص برای آن برنامه‌های کاربردی در سلامت انسان، کشاورزی و محیط زیست داشته باشیم بنابراین، در این بررسی، تکنیک‌های لازم برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی با جزئیات مورد بحث قرار می‌گیرد.

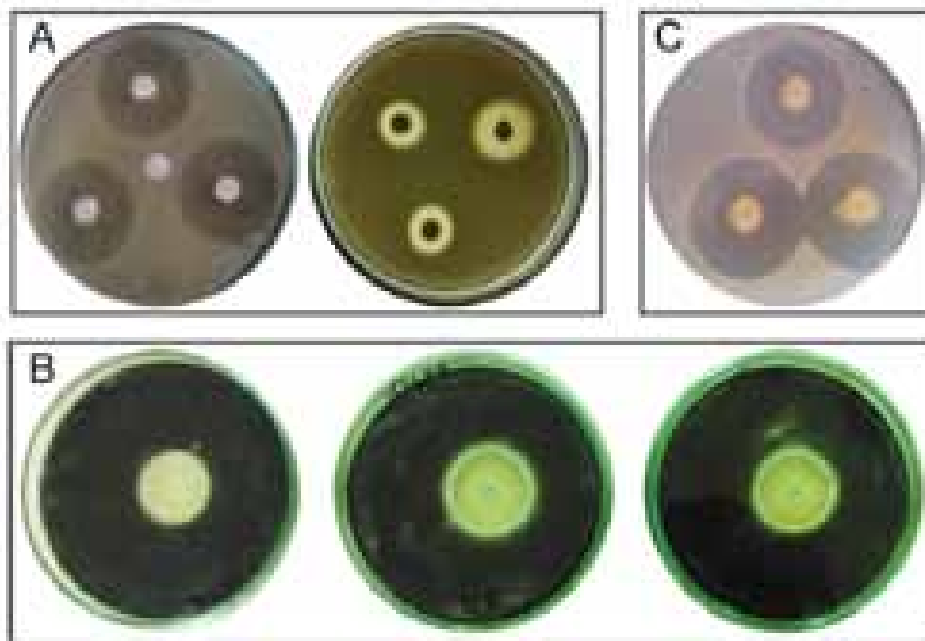


Fig. 1. Agar diffusion methods: (A) disk-diffusion method of microbial susceptibility testing, (B) agar well diffusion method of microbial susceptibility testing, and (C) agar plug diffusion method of bacterial susceptibility testing.

شکل ۱. روش‌های انتشار در آگار: (A) روش انتشار دیسک در آگار عصاره میکروبی با استفاده از کاندیدا آلبیکانس به عنوان میکروارگانیسم مورد آزمایش، (B) روش انتشار در چاهک آگار چربی ضروری با استفاده از اسپرژیلوس 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 <sup>8</sup> CFU/mL	35 ± 2	16-18	M02-A [9]
	Yeast	MHA + GMB <sup>a</sup>	(0.5 McFarland) (1-5) × 10 <sup>6</sup> CFU/mL	35 ± 2	20-24	M44-A [10]
Broth microdilution	Molds	Non-supplemented MHA	(0.4-5) × 10 <sup>6</sup> CFU/mL	-	-	M51-A [18]
	Bacteria	MHB	5 × 10 <sup>7</sup> × CFU/mL	35 ± 2	20	M07-A [56]
	Yeast	RPMI 1640 <sup>b</sup>	(0.5-2.5) × 10 <sup>3</sup> CFU/mL	35	24-48	M27-A [69]
Broth macrodilution	Molds	RPMI 1640 <sup>b</sup>	(0.4-5) × 10 <sup>6</sup> CFU/mL	35	48 for most fungi	M38-A [70]
	Bacteria	MHB	5 × 10 <sup>7</sup> CFU/mL	35 ± 2	20	M07-A [56]
	Yeast	RPMI 1640 <sup>b</sup>	(0.5-2.5) × 10 <sup>3</sup> CFU/mL	35	46-50	M27-A [69]
Agar dilution	Molds	RPMI 1640 <sup>b</sup>	(0.4-5) × 10 <sup>6</sup> CFU/mL	35	48 for most fungi	M38-A [70]
	Bacteria	MHA	10 <sup>4</sup> CFU/spot	35 ± 2	16-20	M07-A [56]
Time-kill test	Bacteria	MHB	5 × 10 <sup>7</sup> CFU/mL	35 ± 2	0, 4, 18, and 24	M26-A [75]

MHA: Mueller Hinton Agar. MHB: Mueller Hinton Broth.

<sup>a</sup> GMB: the medium was supplemented with 2% glucose and 0.5 mg/mL methylene blue.

<sup>b</sup> 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

قسمت دیگر بر روی سطح آگار پخش می‌شود که قبلا با میکروارگانسیم مورد آزمایش مورد تلقیح قرار گرفته است. این روش برای تعیین MIC آنتی بیوتیک‌ها، ضد قارچ‌ها و میکروب‌های ضد قارچ استفاده می‌شود. ارزش MIC در تعیین قسمت‌های قطع شده نوارها و محدوده‌های مهار رشد می‌باشد. بنابراین، این روش را به طور معمول بر اساس درخواست پزشکان معالج به کار می‌برند، با این حال، هزینه هر نوار E-test، ۲ تا ۳ دلار است. بنابراین، این روش در صورت آزمایش با داروهای متعدد هزینه زیادی در بر خواهد داشت. مطالعات قبلی همبستگی خوبی بین مقادیر MIC تعیین شده توسط E-test و روش‌های broth dilution یا agar dilution نشان می‌دهد. این تکنیک همچنین می‌تواند رابطه ضد میکروبی بین دو دارو را هم بررسی نماید. به منظور بررسی اثر ترکیبی از دو آنتی بیوتیک‌ها، نوار E-test، ابتدا با یک آنتی بیوتیک انجام می‌شود و سپس بر روی یک محیط که قبلا با میکروارگانسیم تلقیح شده است قرار داده می‌شود. بعد از یک ساعت، 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 صورت متقابل و با یک زاویه ۹۰ درجه در محل مقابل بین MIC و میکروارگانسیم مورد آزمایش قرار داد. پس از انکوباسیون، شاخص کسری غلظت مهار (FICI) را می‌توان با استفاده از فرمول زیر محاسبه نمود:

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

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

هم افزایی آن با FICI کمتر یا مساوی ۰/۵ و آنتاگونیستی آن با FICI بیشتر از ۴ تعیین می‌گردد. FICI بین ۰/۵ و یک به عنوان آزمایش دارای تفسیر افزایشی و بین ۱ تا ۴ بدون تفسیر گزارش می‌شود.

### ۳،۲. سایر روش‌های انتشار

روش انتشار بیشتر در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی میکروبیولوژی برای غربالگری عصاره، تقسیم یا خالص‌سازی مواد برای بررسی قدرت ضد میکروبی یا بررسی اختلاف بین میکروارگانسیم‌ها مورد استفاده قرار

علاوه بر این روش انتشار روی سطح آگار نمی‌تواند روش مناسبی برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) باشد و در آن تعیین مقدار غلظت ماده ضد میکروبی منتشره در محیط آگار امری غیر ممکن می‌باشد. یک MIC تقریباً می‌تواند برای برخی از میکروارگانسیم‌ها و آنتی‌بیوتیک با مقایسه محدوده عدم رشد الگوریتم‌های ذخیره شده را محاسبه نماید. با این وجود، روش دیسک دیفیوژن مزایای بسیاری نسبت به روش‌های دیگر دارد: سادگی، کم هزینه بودن، توانایی تست تعداد زیادی از میکروارگانسیم‌ها و عوامل ضد میکروبی و سهولت برای تفسیر نتایج. علاوه بر این، چندین مطالعه رضایت بالای بیماران که دارای عفونت باکتریایی بوده‌اند و از درمان ضدباکتریایی خود از روش‌های بر پایه آنتی بیوگرام برای تشخیص و درمان استفاده کرده‌اند را نشان می‌دهد. این واقعیت نشان می‌دهد که یک ارتباط خوبی بین داده‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در ارزیابی محیط بیرون وجود دارد. قبل از استاندارد کردن روش انتشار روی سطح آگار، آزمایش posaconazole بر روی قارچ‌های رشته‌ای، آزمایش micafungin بر روی اسپروژیلوس و آزمایش caspofungin بر علیه اسپروژیلوس و فوزاریوم صورت می‌گرفت. در حال حاضر، روش استاندارد disk-diffusion در مورد قارچ‌ها به یک رویکردی در استفاده برای آزمایش کردن قارچ‌های رشته‌ای غیر درماتوفیتی دست یافته است. شرایط محیط کشت، مقدار ماده تلقیحی، شرایط اینکوبه کردن در جدول شماره ۱ ذکر شده است. مزایای ذکر شده در بالا برای این روش، به طور عمده سادگی و کم هزینه بودن و استفاده عمومی 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 رقیق‌سازی و روش تغلیظ به منظور تعیین اندازه MIC بوده که با ایجاد یک غلظت گرادینانی از عامل ضد میکروبی آزمایش شده در محیط آگار همراه می‌باشد. Etest یک فرم تجاری از این روش است. در این روش، یک نوار آغشته با غلظت گرادینانی افزایشی با عامل ضد میکروبی از یک انتها به

لحاظ رابطه آنتاگونیسمی بکار می‌رود. سویه میکروب دلخواه توسط یک خط واحد در مرکز آگار کشت داده می‌شود. پس از یک دوره انکوباسیون براساس سویه میکروبی، با میکروارگانیسم مورد آزمایش به صورت یک خط منفرد عمود بر خط مرکزی محیط کشت تلقیح می‌گردد. پس از انکوباسیون بعدی، برهم کنش‌های ضد میکروبی با مشاهده اندازه هاله عدم رشد مورد تفسیر قرار می‌گیرد.

#### ۴,۳,۲. روش غذای سمی (Poisoned food)

این روش عمدتاً به منظور بررسی اثر ضد قارچی بر علیه کپک مورد استفاده قرار می‌گیرد. عامل ضد قارچ و یا عصاره آن به آگار مایع در غلظت نهایی مورد نظر رسانده شده و به خوبی مخلوط می‌شوند. پس از آن، محیط کشت در پتری دیش ریخته می‌شود و یک شب بعد از انکوباسیون، تلقیح را می‌توان با یک دیسکی از میسلیم‌های قارچ با محدوده اندازه از ۲ تا ۵ میلی‌متر که در مرکز دیسک قرار داده می‌شود انجام داد. پس از انکوباسیون بیشتر تحت شرایط مناسب بر اساس نوع قارچی که مورد آزمایش قرار گرفته است قطر رشد قارچ در دیسک‌های کنترل و نمونه‌ها اندازه گیری شده و اثر ضد قارچی توسط فرمول زیر برآورد می‌شود:

$$\text{Antifungal activity (\%)} = ((D_c - D_s) / D_c) \times 100$$

CD قطر رشد در صفحه کنترل است و DS قطر رشد در صفحه حاوی داروی ضد قارچ تست شده است. همچنین اسپورزایی را می‌توان با کنترل مقایسه کرد. به طور کلی، وقتی روش استاندارد سازی مورد استفاده خوب جواب نمی‌دهد محقق باید موارد کنترل 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-layer chromatography (TLC) bioautography)

در سال ۱۹۴۶ Goodall و Levi ترکیبی از کروماتوگرافی کاغذ (PC) را در تماس با بیواتوگرافی به منظور تشخیص جداسازی پنی سیلین‌های مختلف انجام دادند. پس از آن Fischer و Lautner در همین زمینه

می‌گیرد. از بین این روش‌ها، مهم‌ترین آن‌ها در زیر ذکر شده است.

#### ۱,۳,۲. روش انتشار در حفره آگار

##### (Agar well diffusion)

این روش به طور گسترده‌ای به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی گیاهان یا عصاره میکروبی استفاده می‌شود. در این روش همانند روش disk-diffusion سوسپانسیون میکروبی را در سطح پلیت آگار طوری پخش می‌نماییم که به طور یکنواخت تمام سطح پلیت را بپوشاند. سپس، یک سوراخ با قطر ۶ تا ۸ میلی‌متر در شرایط استریل با پانچ استریل از آگار بر می‌داریم و یک مقداری (حجم ۱۰۰-۲۰ میلی‌لیتر) از عامل ضد میکروبی یا عصاره تهیه شده با غلظت معین داخل حفره وارد می‌کنیم. سپس، پلیت آگار را تحت شرایط مناسب بسته به نوع میکروارگانیسم مورد آزمایش انکوبه می‌کنیم. عامل ضد میکروبی در محیط آگار پخش شده و مانع از رشد سویه میکروبی مورد آزمایش می‌شود. (شکل 1.B).

#### ۲,۳,۲. روش انتشار در پلاگ آگار

##### (Agar plug diffusion)

این روش اغلب برای تشخیص رابطه آنتاگونیسمی بین میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و روش کار مانند روش disk-diffusion می‌باشد. اساس این روش بر ساختن یک محیط آگار استوار است که روی محیط کشت آن رگه‌های نازکی در سطح پلیت مشخص می‌باشد. سلول‌های میکروبی در طول رشد خود، مولکول‌هایی را در محیط کشت آگار ترشح می‌کنند. پس از انکوبه کردن، با استفاده از آگار پلیت یا لوله‌ای در شرایط استریل در محیط آگار یک برشی ایجاد کرده و از سطح آگار برداشته و در یک سطح دیگر که میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش در آنجا هستند قرار داده می‌شوند. مواد پخش شده از محیط plug را به محیط آگار منتقل می‌کنیم. سپس فعالیت ضد میکروبی مولکول‌های مترشح شده از مواد ضد میکروبی با استفاده از شناسایی 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 سریع میکروارگانیسم‌ها از

بیواتوگرافی مستقیم ممکن است برای باکتری و قارچ با هم مورد استفاده قرار گیرد. این تکنیک ساده ترین روش برای تشخیص مواد ضد قارچی است و همچنین نتایج مطلوبی را برای تولید اسپور قارچ‌هایی مانند اسپرژیلوس، پنسیلیوم و کلادواسپوریوم ارائه می‌دهد. در مورد باکتری‌ها، اغلب باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و گونه‌های اشرشیا کلی برای شناسایی ترکیبات ضد باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند.

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

این روش همچنین به عنوان بیواتوگرافی شناوری معروف است و ترکیبی از دو روش قبلی می‌باشد. صفحه TLC که با محیط کشت آگار مذاب پوشانده شده است اجازه می‌دهد یک انتشار خوب از ترکیبات مورد آزمایش به محیط کشت آگار انجام گیرد. صفحات در دمای پایین برای چند ساعت قبل از انکوباسیون قرار می‌گیرند. پس از انکوباسیون تحت شرایط مناسب بسته به میکروارگانیسم مورد آزمایش، رنگ آمیزی را می‌توان با رنگ تترازولیوم انجام داد. این روش هم مانند بیواتوگرافی مستقیم می‌تواند در مورد تمام میکروارگانیسم‌ها مانند کاندیدا آلبیکنس و کپک‌ها استفاده گردد. این روش به خوبی هاله عدم رشد را نشان 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 تشکیل دهنده پروژه در صفحه TLC قرار می‌گیرد. بنابراین می‌توان هم در آزمایشگاه‌های مجهز و هم در آزمایشگاه‌های کوچک که تنها دسترسی به حداقل تجهیزات را دارند اینکار را انجام داد. با وجود داشتن مشکلات زیاد در این روش، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به همراه بیواسی به طور فزاینده‌ای تبدیل به عنوان یک روش انتخابی محبوب برای تشخیص نهایی ترکیبات استخراجی تبدیل شده است نیز TLC-bioautography یک روش سریع برای غربالگری تعداد زیادی از نمونه‌های دارای فعالیت زیستی و به عنوان یک راهنما در تجهیز این فعالیت‌ها ارائه می‌نماید. علاوه بر این، این روش می‌تواند برای تشخیص آنتی بیوتیک‌هایی در محیط زیست

TLC را معرفی کردند. این روش ترکیبی از TLC با هر دو روش بیولوژیکی و تشخیص شیمیایی می‌باشد. چندین کار مختلف در مورد غربالگری عصاره‌های استخراج شده به خصوص عصاره‌های گیاهان برای فعالیت ضد باکتری و ضد قارچ توسط TLC بیواتوگرافی انجام شده است. همانطور که در زیر نشان داده شده است، سه روش Agar diffusion، به عنوان مثال، Bioautography مستقیم و Agar overlay برای بررسی ترکیبات ضد میکروبی از طریق این رویکرد توصیف شده است.

### ۱,۳. انتشار در آگار (Agar diffusion)

به عنوان روش تماس با آگار نیز معروف می‌باشد. این روش شامل انتقال عامل ضد میکروبی از طریق انتشار از کروماتوگرام (PC یا TLC) به آگاری که قبلاً با میکروارگانیسم مورد آزمایش تلقیح شده 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 داشته است ظاهر می‌گردد.

### ۲,۳. بیواتوگرافی مستقیم

این روش بیشترین استفاده را در میان این سه روش دارد. شامل صفحه TLC گسترده‌ای است که در داخل مواد میکروبی غوطه ور شده یا اسپری شده و بعد بیواتوگرام است که در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط رطوبتی خاص انکوبه شده است. برای دیدن رشد میکروبی، اغلب از املاح تترازولیوم استفاده می‌شود. این نمک تحت تاثیر فورمازان کاملاً رنگی از طریق دهیدروژناسیون سلول‌های زنده کاملاً تغییر می‌یابد. P-Iodonitrotetrazolium بنفش مناسب ترین نمک برای تشخیص است. این نمک‌ها بر روی بیواتوگرافی، که در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت یا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴-۳ ساعت انکوبه شده اند اسپری می‌گردند. Mueller Hinton Broth همراه با مکمل آگار برای به دست آوردن یک محیط مایع غنی کننده برای اتصال بهتر به صفحات TLC توصیه شده است و رطوبت مناسب جهت رشد باکتری را فراهم می‌نماید.



و نمونه‌های مواد غذایی و همچنین برای جستجو برای داروهای ضد میکروبی جدید استفاده گردد.

#### ۴. روش‌های رقیق سازی

این روش‌ها یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای تعیین ارزش MIC هستند چرا که توانایی تعیین غلظت عامل ضد میکروبی آزمایش شده در آگار (رقت در آگار) یا در محیط مغذی (رقت بالا یا رقت پایین) را دارند. در هر دو صورت محیط مغذی یا روش رقت در آگار به لحاظ کمی اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی در شرایط *in vitro* برای باکتری‌ها و قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزش مثبت شده MIC به عنوان کم‌ترین غلظت از عامل ضد میکروبی مورد سنجش قرار گرفته است که مهار رشد قابل توجهی از میکروارگانیسم آزمایش شده را نشان می‌دهد و معمولا بر اساس میلی گرم در میلی لیتر یا میلی گرم بر لیتر بیان شده است. بسیاری از دستورالعمل‌های تایید شده برای میزان رقت تست حساسیت ضد میکروبی از باکتری‌های اسید فاست و غیر اسید فاست و مخمر و قارچ‌های رشته‌ای وجود دارد. مهم‌ترین استانداردهای شناخته شده توسط CLSI و کمیته اروپایی ضد میکروبی آزمایش تعیین حساسیت (EUCAST) ارائه شده است. به عنوان توصیه، این دستورالعمل یک روش یکسان برای این تست است که به صورت عملی برای انجام کار در اکثر آزمایشگاه میکروبی شناسی بالینی فراهم می‌نماید. توسعه این چنین روش‌های استاندارد ارتباطات بالینی با این تست‌ها را تضمین نمی‌کند. با این وجود این روش‌ها اجازه می‌دهند که یک ارزشیابی در یک رویکرد استاندارد به منظور ارزیابی ارتباط بالینی نتایج انجام گیرد.

#### ۱,۴. روش رقیق کردن در محیط مایع

##### (Broth dilution)

رقت به صورت Micro یا Macro در محیط مایع یکی از اساسی‌ترین روش‌های آزمایش حساسیت مواد ضد میکروبی است. این پروژه مستلزم آماده کردن ۲ تارقت از یک ماده ضد میکروبی (به عنوان مثال ۱,۴,۲,۱ و ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر) در یک محیط کشت مایع است که به لوله‌های حاوی حداقل حجم ۲ میلی لیتر توزیع

می‌شود که این روش Macrodilution نامیده می‌شود و در Microdilution از لوله‌های با حجم کمتر مانند پلیت میکروتیتراسیون دارای ۹۶ خانه‌ای استفاده می‌شود. سپس هر لوله را با حجم مناسبی از تلقیح میکروبی آماده شده در همان محیط بعد از رقیق کردن سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده تلقیح می‌کنند تا کدورت معادل 0.5 در مقیاس مک فارلند به دست آید. پس از این که به خوبی مخلوط شدند لوله‌های تلقیح شده یا پلیت ۹۶ خانه‌ای را انکوبه کرده (اغلب بدون تکان دادن) و تحت شرایط مناسب بسته به میکروارگانیسم مورد آزمایش که انکوبه شده است قرار می‌دهند. روش تجربی با انجام دقیق Microdilution در شکل ۴ نشان داده شده است.

MIC کمترین غلظت عامل ضد میکروبی است که به طور کامل مانع از رشد ارگانیسم در لوله یا چاه Microdilution که توسط چشم غیر مسلح تشخیص داده می‌شود می‌گردد. بر خلاف روش Microdilution، از معایب اصلی روش Macrodilution خسته کننده بودن، نداشتن کتابچه راهنمای کاربر، خطر به وجود آمدن خطا در آماده سازی روش‌های ضد میکروبی برای هر آزمایش و مقدار نسبتا زیادی از معرف و فضای مورد نیاز می‌باشد. بنابراین تکرار پذیری و مقرون به صرفه بودن و فضایی که با توجه به کوچک سازی آزمون رخ می‌دهد مزیت‌های عمده‌ای از روش Microdilution به شمار می‌روند با این وجود، اگر نتایج تکرار پذیر (داخل آزمایشگاهی و بین آزمایشگاهی) به دست آمده تحت تاثیر قرار می‌گیرد نتیجه نهایی با استفاده از این روش، باید به طور قابل توجهی به دقت کنترل گردد. برای تعیین نقطه پایانی MIC، با مشاهده دستگاه می‌توانید با خواندن آزمایش Microdilution و نوشتن نتایج با توانایی بالا تشخیص رشد در چاهک را آسان نماییم. علاوه بر این، چندین روش بر اساس استفاده از معرف رنگ توسعه یافته‌اند. نمک تترازولیوم ۳-۴,۵-دیمتیل تترازول-۲-۵,۲-دیفنیل تترازولیوم بروماید (MTT) و bis ۳,۲-۲-متوکسی ۴-نیترو ۵-سولفونیل آمینو کربونیل 2H- تترازولیو هیدرواکساید (XTT) که اغلب در تعیین MIC نقطه پایانی برای هر دو روش میکرودایلوشن ضد قارچ و ضد باکتری استفاده می‌شوند. رنگ الامار آبی (رزازورین) به عنوان یک شاخص موثر رشد همچنین می‌تواند برای این

Broth dilution را اصولاً همانند CLSI 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.

منظور استفاده گردد. اندازه تلقیح، نوع محیط رشد، گذشت زمان و روش آماده سازی تلقیح می تواند مقادیر MIC را تحت تاثیر قرار بدهد. بنابراین Broth dilution توسط CLSI برای آزمایش باکتری های با رشد بی هوازی و مخمرها و قارچ های رشته ای استانداردسازی شده است. EUCAST روش

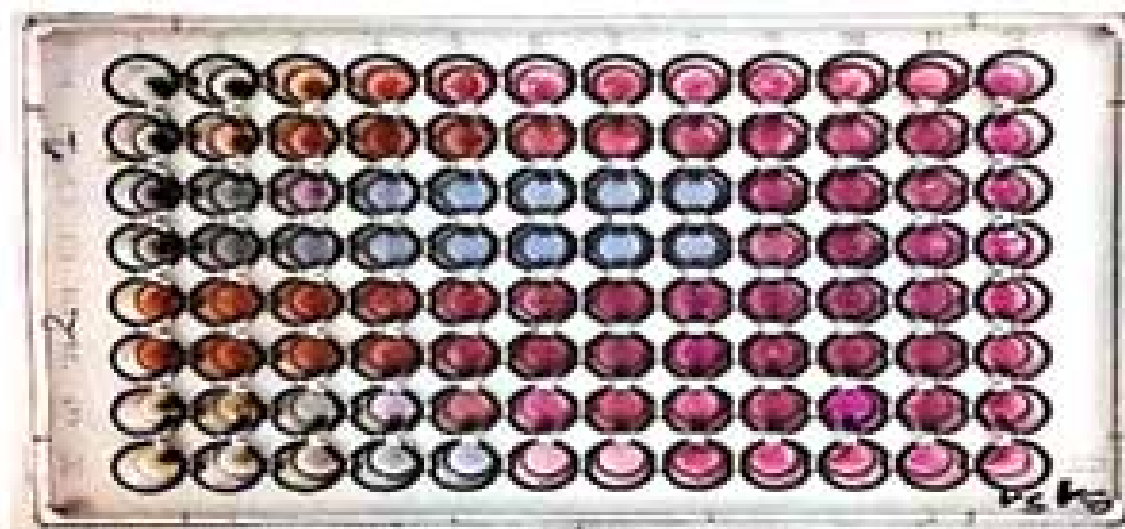


Fig. 2. Broth microdilution method of plant extract against *B. subtilis* using resazurin as growth indicator.

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

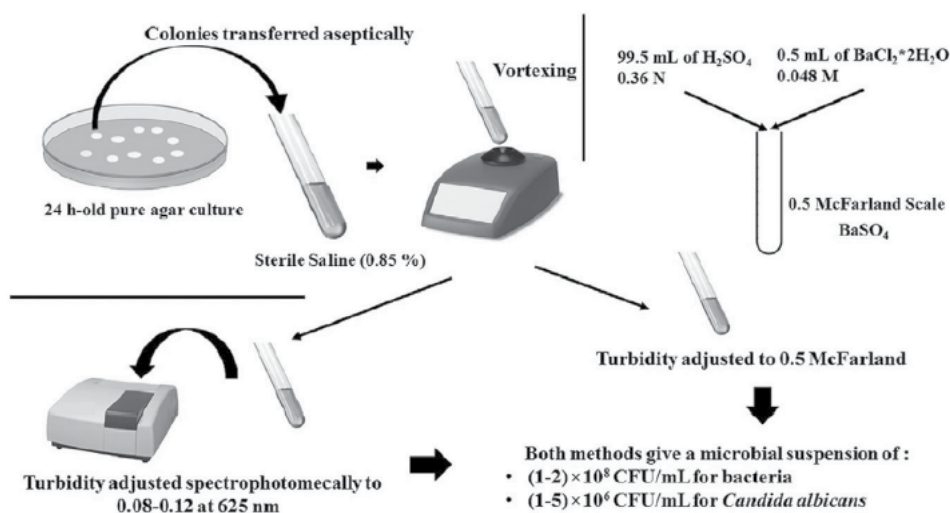


Fig. 3. 0.5 McFarland microbial inoculum preparation by the direct colony suspension as recommended by CLSI guidelines.



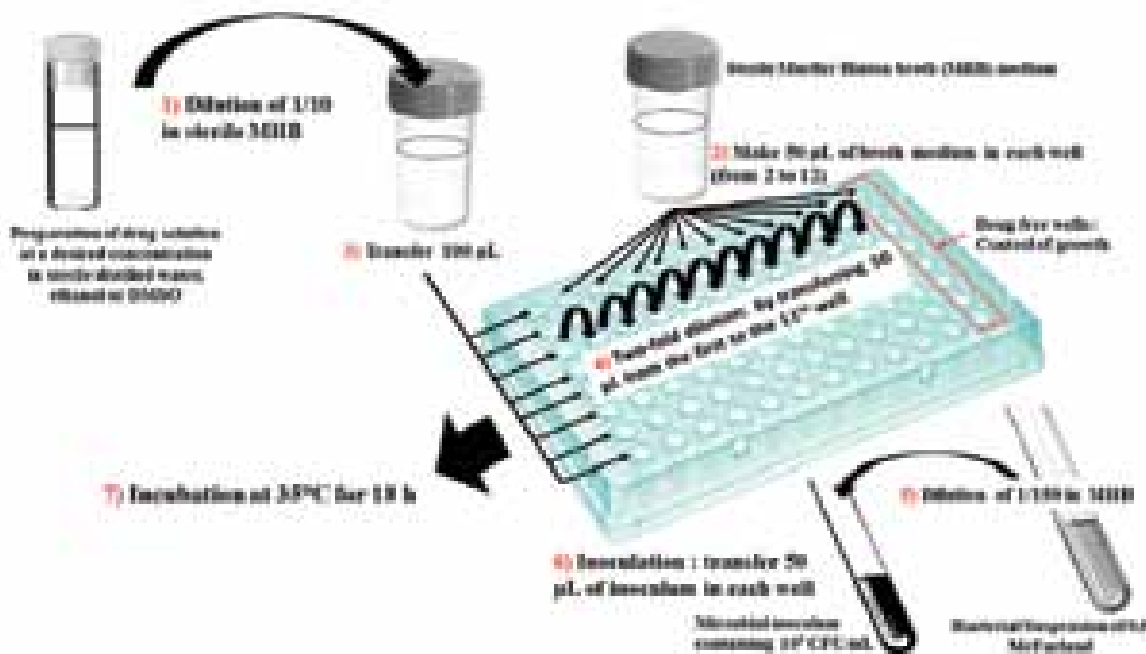


Fig. 4. Broth microdilution for antibacterial testing as recommended by CLSI protocol.

شکل ۴. رقت میکرو در محیط کشت مایع توصیه شده توسط CLSI برای بررسی مواد ضد میکروبی

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 ۲۴ 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 تعریف MFC داروهای مختلف بر علیه قارچ کانیدیا، آسپرژیلوس و دیگر گونه‌های جدا شده انجام شده است.

۲.۴. روش رقیق کردن در آگار (Agar dilution)

این روش شامل ترکیب غلظت‌های مختلف از عامل

با توجه به تشکیل کونیدیا و اسپور در قارچ‌ها استانداردسازی microdilution توسط CLSI شامل یک تلقیح اسپکتوروفتومتری یک به مقدار  $10^4 \times 5 - 10^4 \times 0.4$  CFU بر میلی لیتر می‌باشد. در حالی که در سنجش با EUCAST تلقیح را می‌توان تنها با مقدار  $10^6 \times (5-2)$  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. MBC عبارت از حداقل غلظت عامل ضد باکتری برای کشتن ۹۹/۹٪ از باکتری‌ها پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت تحت یک مجموعه شرایط استاندارد

استفاده از ۳ لوله که شامل سوسپانسیون باکتری به مقدار  $10^8 \times 5$  CFU/mL باشد انجام می‌گیرد. لوله‌های اول و دوم یک مولکول یا عصاره مورد آزمایش با غلظت نهایی  $MIC \times 1$  و  $MIC \times 0/25$  می‌باشند و لوله سوم به عنوان کنترل رشد در نظر گرفته می‌شوند. تلقیح تحت شرایط مناسب شامل فواصل زمانی مختلف (۱۲، ۱۰، ۶، ۴، ۰، ۲۴ 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 کشتندگی تا ۹۰٪ برای مدت ۶ ساعت و ۹۹/۹٪ مرگ و میر در مدت ۲۴ ساعت به دست می‌آید. به علاوه این روش می‌تواند برای تعیین خاصیت سنرژستی و آنتاگونیستی بین دو یا بیشتر از ترکیبات دارویی استفاده گردد. چندین مطالعه در مورد مواد ضد قارچی با این روش صورت گرفته است.

#### ۶. 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. D-luciferin در حضور ATP توسط لوسیفراز تبدیل به لوسیفیرین 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 بیوفیلیم در محل و غربالگری داروهای موثر روی لیشمانیا، آزمایش ضد باکتریایی، تست تاثیرات آن‌ها بر مایکوباکتری‌ها، تست مواد ضد قارچی بر علیه

ضد میکروبی مورد نظر در یک محیط کشت آگار (محیط آگار مایع) می‌باشد که معمولاً به صورت ۲ برابر رقت آگار پس از تلقیح یک معرف میکروبی بر روی سطح آگار تلقیح می‌گردد. نقطه پایانی MIC به عنوان کمترین 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 ۶۰ ماده تلقیحی باکتریایی مختلف به هر پلیت آگار انتقال دهند. Agar dilution اغلب به عنوان یک روش استاندارد برای ارگانسیم‌های اسید فست مثبت مانند بی‌هوازی‌ها 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 broth microdilution نتایج بسیار عالی می‌دهد.

#### ۵. روش بررسی زمان کشتن (time-kill curve or Time-kill test)

این روش یکی از بهترین روش‌ها برای تعیین خاصیت باکتری کشی و قارچ کشی می‌باشد و یکی از قوی‌ترین 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 ترجیحاً در یک محیط کشت مغذی با

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 می دهد (۶-۲ ساعت در مقابل ۷۲-۲۴ ساعت روش میکروداپلوشن). 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 آزمایشگاه های مختلف محدود به آزمایشگاه های پیشرفته شده است.

### ۸. نتیجه گیری

در حال حاضر، عفونت های میکروبی تبدیل به یک تهدید مهم بالینی شده که همراه با عوارض قابل توجه و مرگ و میر است که عمدتاً به دلیل توسعه مقاومت میکروبی به عوامل ضد میکروبی موجود می باشد. بنابراین، روش های 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 تکنیک ها توسط CLSI و EUCAST مورد استاندارد سازی قرار گرفته اند. با این حال، در هنگام آزمایش محصولات طبیعی، اغلب برخی تغییرات در پروتکل های استاندارد مورد نیاز است. بنابراین، بسیار ضروری است که در مورد تغییراتی که در اصول میکروبی شناسی با رقیق سازی محیط کشت و استفاده از یک تلقیح صورت می گیرد بسیار دقیق باشیم. علاوه بر این ما می توانیم با استفاده از حلال ها روی محیط رشد میکروارگانیسم مورد آزمایش تاثیر بگذاریم. ما می توانیم بگوییم که اختراع یک کوچک مطابق با پروتکل های استاندارد می تواند یک راه حل برای اطمینان از انجام دقیق آزمایش به صورت تجربی بوده و اجازه مقایسه نتیجه با نتایج سایر محققین را فراهم می کند.

مخمر و کپک ها. سرعت از مزایای مهم این روش است که نتایج کمی را فراهم می کند. این روش می تواند نتایج آزمایش های ضد مایکوباکتریایی را در مدت ۳ تا ۵ روز در مقایسه با روش سنتی رقت معمولی که نیاز به ۳ تا ۴ 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 سلول های آسیب دیده توسط این روش بستگی به استفاده از رنگ آمیزی مناسب دارد. بنابراین propidium iodide (PI) یک عامل فلورسنت می باشد که به صورت گسترده برای رنگ آمیزی DNA استفاده می گردد. 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 رنگ آمیزی همراه با PI برای ارزیابی غشای آسیب دیده و carboxyfluorescein diacetate (cFDA) برای تشخیص فعالیت استراز استفاده می گردد. در نتیجه، علاوه بر لیز سلول ها سه زیر گروه های جمعیتی (سلول های مرده، زنده و آسیب دیده) را می توان به وضوح با این روش تشخیص داد. سلول آسیب دیده به عنوان سلول تحت فشار قسمت های آسیب دیده داخل سلول ها و اختلال ایجاد شده بعد از آن در تولید مثل را نشان می دهند. تعیین سلول های آسیب دیده یکی از نتایج جالب در میکروبیولوژی مواد غذایی است زیرا این زیر گروه می تواند در شرایط بحرانی برای بهبود سلول مانند نگهداری مواد غذایی در شرایط درجه حرارت طولانی مدت مفید باشد. به علاوه روش flow cytofluorometric اجازه می دهد تا مقاومت به

## References

Balouri Mounyr, Sadikil Moulay, Ibensouda SaadKoraich: Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis: 6: 71-79:2016.