



گذری بر روش های پیشرفته تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی (آنتی بیوگرام)

گسترده ای است که در داخل سوسپانسیون میکروبی غوطه ور شده یاسوسپانسیون میکروبی روی آن اسپری می شود سپس بیواتوگرام (صفحه TLC اغشته به میکروب) در درمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط رطوبتی خاص می گردد. برای دیدن رشد میکروبی، اغلب از املاح تترازولیوم استفاده می شود. این نمک تحت تاثیر فورمازان از طریق دهیدروژناسیون سلولهای زنده تغییر رنگ می یابد. P-Iodonitrotetrazolium بنفش مناسب ترین نمک برای تشخیص است. این نمکها بر روی بیواتوگرافی، که در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت یا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳-۴ ساعت انکوبه شده اند اسپری می گردند. ظهور نقاط سفید یا بنفش روی اتو بیو گراف به معنی رشد منفی یا مثبت تلقی می شود. Mueller Hinton Broth همراه با مکمل آگار برای به دست آوردن یک محیط مایع غنی برای اتصال بهتر به صفحات TLC توصیه شده است و رطوبت مناسب جهت رشد باکتری را فراهم می نماید. 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 Aspergillus، Penicillium و Cladosporium ارائه می دهد. در مورد باکتری ها، اغلب باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و سویه های اشرشیا کلی برای تعیین حساسیت به ترکیبات ضد باکتری مورد استفاده قرار می گیرند.

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 بطور عمده به دلیل توسعه مقاومت میکروبی به عوامل ضد میکروبی موجود، است. بنابراین، روش های زیادی برای آزمایش تعیین 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 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. آزمایشهای حساسیت ضد میکروبی می تواند برای پیدا کردن داروی موثر، اپیدمیولوژی و پیش بینی نتیجه بعد از درمان بیماری مورد استفاده قرار گیرد. تعدادی از این بررسی ها مثل انتشار دیسک، انتشار در چاهک و رقت در آگار یا محیط مایع به خوبی شناخته شده و به طور معمول مورد استفاده قرار می گیرند، ولی سایر روش ها مثل روش های فلوسایتومتري و بیولومینسانس حتی اگر بتوانند نتایج سریع حاصل از اثرات عوامل ضد میکروبی فراهم نمایند و شناخت بهتری از تاثیر آنها در قابلیت زیستی و آسیب سلولی به میکروارگانیسم های تحت بررسی ارائه بدهند به طور وسیع استفاده نمی شوند، زیرا انجام آنها مستلزم به کارگرفتن ابزارها و تجهیزات مخصوص بوده و علاوه بر آن نیاز به سنجش بعدی برای تکرارپذیری و استاندارد سازی کردن دارند.

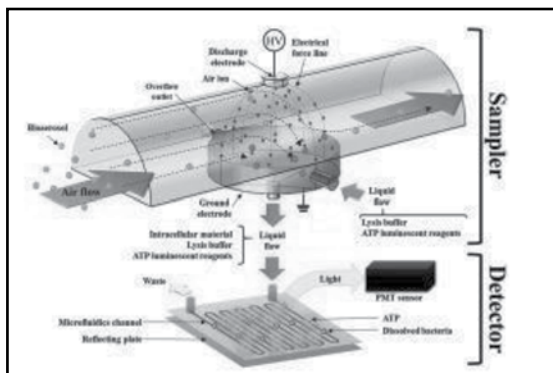
روش های پیشرفته تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

۱- روش بیواتوگرافی مستقیم

این روش بیشترین استفاده را دارد. شامل صفحه TLC

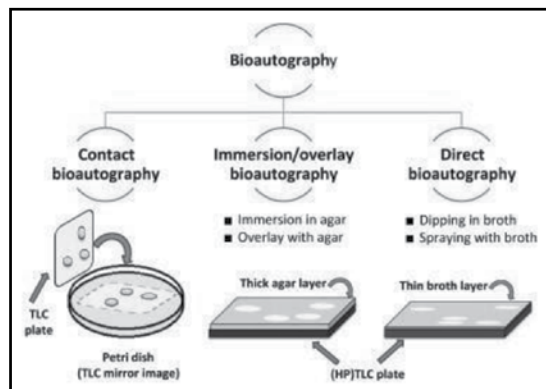
۳- روش سنجش بیولومینسانس آدنوزین تری فسفات ATP bioluminescence assay

این روش بر اساس توانایی 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. Luciferi 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 که می‌تواند به RLU برمول از ATP تبدیل شود اندازه‌گیری می‌شود. بنابراین، یک رابطه خطی بین زنده ماندن سلول‌ها و تولید نور اندازه‌گیری شده وجود دارد. روش‌های نور سنجی دارای طیف وسیعی از برنامه‌های کاربردی است مانند آزمون سیتوتوکسیسیته، غربالگری داروهای موثر روی لیشمانیا، آزمایش ضد باکتریایی، تست تأثیرات آنها بر مایکوباکتریوم‌ها، تست مواد ضد قارچی علیه مخمر و کپک‌ها. 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 با روش سنتی رقت معمولی که نیاز به ۳ تا ۴ هفته انکوباسیون دارد فراهم کند.



۴- روش فلوسایتومتري

چند سال پیش، فواید flow cytometry برای تست حساسیت میکروارگانیزم پیشنهاد شد. بنابراین، بسیاری از محققین به فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی بسیاری از داروها با استفاده از این روش پرداخته‌اند. تشخیص



۲- سنجش زیستی اندود کردن با آگار Agar overlay bioassay

این روش همچنین به عنوان بیواتوگرافی شناوری معروف است. 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 میکروارگانیزم مورد آزمایش، رنگ آمیزی را میتوان با رنگ تترازولیوم انجام داد. این روش هم مانند بیواتوگرافی مستقیم میتواند در مورد تمام میکروارگانیزمها مانند کاندیدا آلبیکانس 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 پروژ 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 است و یک راهنما در تجهیز این فعالیت‌ها ارائه می‌نماید. علاوه بر این، این روش می‌تواند برای تشخیص آنتی‌بیوتیک‌های موجود در محیط زیست و نمونه‌های مواد غذایی و همچنین در جهت جستجو برای داروهای ضد میکروبی جدید استفاده شود.

منابع:

1. Balouiri Mounyr, Sadikil Moulay, Ibensouda SaadKoraich: Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis: 6: 71–79:2016.
2. Mayers D.L., Lerner S.A., Ouelette M. vol. 2. Springer Dordrecht Heidelberg; London: 2009. (Antimicrobial Drug Resistance C: Clinical and Epidemiological Aspects). pp. 681–1347.
3. Mayers D.L., Lerner S.A., Ouelette M. vol. 2. Springer Dordrecht Heidelberg; London: 2009. (Antimicrobial Drug Resistance C: Clinical and Epidemiological Aspects). pp. 681–1347.
4. Suleiman M., McGaw L., Naidoo V. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 2010;7:64–78.
5. Al-Bakri A.G., Afifi F.U. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. J. Microbiol. Methods. 2007;68:19–25
6. Reis R.S., Neves I., Lourenço S.L.S. Comparison of flow cytometric and alamar blue tests with the proportional method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin and Isoniazid. J. Clin. Microbiol. 2004;42:2247–2248

سریع سلول‌های آسیب دیده توسط این روش بستگی به استفاده از رنگ آمیزی مناسب دارد. **propidium iodide** 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 مونوسیتوزنز گزارش شده است که با استفاده از رنگ آمیزی همراه با **propidium iodide** برای ارزیابی غشای آسیب دیده و **carboxyfluorescein diacetate (CFDA)** برای تشخیص فعالیت استراز استفاده می گردد. در نتیجه، علاوه بر لیز سلول‌ها سه زیر گروه جمعیتی (سلول‌های مرده، زنده و آسیب دیده) را می توان 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 می دهند. تعیین سلول‌های 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 و تعیین درجه حرارت مناسب برای نگهداری طولانی مدت آنها مفید باشد. به علاوه روش **flow cytometric** اجازه می دهد 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 می دهد. با این حال، استفاده گسترده از این روش برای آزمایش حساسیت ضد میکروبی در حال حاضر به دلیل در دسترس نبودن تجهیزات سیتومتری مورد نیاز در آزمایشگاه‌های مختلف محدود به آزمایشگاه‌های پیشرفته شده است.

ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی را در فضای مجازی دنبال کنید:

📍 @Tashkhis_Magazine

📷 Tashkhis_Magazine

🌐 www.tashkhis.com

in tashkhis magazine