تعیین حساسیت آنتی بیوگرام

سلسله درسهای باکتری‌شناسی

دکتر رضا میرنژاد، استادیار دانشگاه- باکتریولوژیست

تعیین حساسیت یک باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، برای پزشک به همان اندازه تعیین نوع باکتری اهمیت دارد. با دانستن نوع باکتری بهتر می‌توان بیماری را درمان و کنترل نمود، اما مواقعی پیش می‌آید که تعیین حساسیت میکروب نسبت به آنتی‌بیوتیک اهمیت بیشتری دارد. تعیین حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک برای پزشک به منظور انتخاب روش اساسی درمان بیمار، اهمیت زیادی دارد. یکی از فواید آنتی‌بیوگرام این است که به دلیل مقاوم شدن اکثر سوش‌های میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با تعیین حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، این مشکل را نیز می‌توان حل کرد.

آنتی‌بیوگرام عبارت از تعیین و سنجش حساسیت میکروارگانیسم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد باکتریایی و قارچی می‌باشد و به روش‌های مختلف انجام می‌گیرد. بطور کلی هدف از آنتی‌بیوگرام مشخص کردن حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها است که به صورت mg/l یا µg/ml گزارش می‌شود.

آنتی‌بیوگرام پس از تشخیص بیماری و جدا نمودن عامل عفونت به صورت خالص یا کاملاً ایزوله انجام می‌شود، پس محیط کشت باید حاوی یک نوع میکروارگانیسم باشد. پزشک با در نظر گرفتن

1- حساسیت میکروارگانیسم

2- محل عفونت

3- شرایط میزبان (سن- جنس- حاملگی.....)

4- مقدار سمیت دارو (selective toxicity)

اقدام به تجویز دارو می‌کند، از این رو جواب آزمایش برای ایشان دارای اهمیت است.

انواع روش‌های آنتی‌بیوگرام

1- **روش‌های رقیق‌سازی** (Serial dilution)

این روش خیلی دقیق و حساس می‌باشد، ولی از نظر اقتصادی گران قیمت و وقت‌گیر است و معمولاً در موارد زیر انجام می‌شود:

- زمانی که حساسیت دارویی باکتری با روش انتشار از دیسک قابل تعیین نمی‌باشد.
- در بیمارانی که ظاهراً به مقادیر کافی و مناسب آنتی‌بیوتیک تراپی جواب نمی‌دهند.
- برای تعیین میزان واقعی آنتی‌بیوتیک
- در بیماران مبتلا به مننژیت.
- در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی
- در بیماران کلیوی و بیماران مبتلا به اندوکاردیت
- در افرادی که به طور مکرر دچار عود عفونت می‌شوند.
- در کارهای تحقیقاتی و غیره.

در این روش، پس از تهیه رقت‌های مورد نظر و متوالی از آنتی‌بیوتیک مورد نظر، از کشت میکروبی استاندارد شده به محیط اضافه کرده، بعد از قرار دادن در اتوکلاو $35\text{-}37^{o}\,c$ به مدت 20-16 ساعت، حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) و یا حداقل غلظت کشنده (MBC) تعیین می‌گردند.

2- **آگار دیلوشن** (Agar Dilution):

مشابه روش رقیق‌سازی یا میکرودیلوشن می‌باشد، با این تفاوت که در اینجا غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک با آگار مخلوط می‌شود و باکتری روی آن کشت داده می‌شود.

3- **Etest**:

در این روش نوار کاغذی که گرادیانتی از غلظت آنتی‌بیوتیک روی آن قرار گرفته پس از کشت باکتری روی محیط قرار می‌گیرد (شکل 1). با این تست می‌توان MIC را مشخص کرد، ولی این تست بدلیل گران بودن در آزمایشگاه‌های ما قابل اجرا نمی‌باشد.

شکل1: Etest برای سویه حساس استرپتوکوک پنومونیه روی مولر هینتون آگار حاوی خون

4- **روش انتشار از دیسک** (Disk Diffusion)

ساده‌ترین، ارزان‌ترین و عملی‌ترین روش تعیین حساسیت می‌باشد. در این روش یک غلظت مشخص از دارو بر علیه باکتری استفاده می‌شود. این روش بوسیله Kirby & Bauer استاندارد شد و از سال 1977 توسط

سازمان بهداشت جهانی (WHO) به عنوان یک روش آسان و ارزان به آزمایشگاه‌ها پیشنهاد شد. این روش بر اساس رشد میکروارگانیسم و نفوذ آنتی‌بیوتیک از دیسک در محیط کشت می‌باشد. هر چه از مرکز دیسک دورتر شده از غلظت آنتی‌بیوتیک کاسته می‌شود و به جایی می‌رسد که دیگر اثر ممانعت کنندگی روی میکروارگانیسم (MIC) ندارد. در صورتیکه باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک حساس باشد در اطراف دیسک یک منطقه عدم رشد (Zone of inhibition) خواهیم داشت و در حالیکه مقاوم باشد میکروب در اطراف دیسک رشد خواهد کرد. برای تعیین حساسیت، قطر هاله را اندازه گرفته و با استاندارد مقایسه شود. این قطر هاله عدم رشد به عوامل مختلفی از جمله نوع محیط کشت، قطر محیط کشت، درجه حرارت و فاکتورهای دیگر بستگی دارد (جدول 1).

جدول 1: شرایط مختلف تست تعیین حساسیت با روش Disk Diffusion

ORGANISM GROUPS	TEST MEDIUM	INOCULUM SIZE (CFU/mL)	INCUBATION CONDITIONS	INCUBATION DURATION
Enterobacteriaceae	Mueller-Hinton agar	Swab from 1.5×10^8 suspension	35° C; air	16-18 hrs
P. aeruginosa				
Enterococci				(24 hrs for vancomycin)
Staphylococci To detect methicillin-resistant staphylococci			30°-35° C; air	24 hrs
S. pneumoniae and other streptococci	Mueller-Hinton agar plus 5% sheep blood	Swab from 1.5×10^8 suspension	35° C; 5%-7% CO_2	20-24 hrs
H. influenzae	Haemophilus Test Medium	Swab from 1.5×10^8 suspension	35° C; 5%-7% CO_2	16-18 hrs
N. gonorrhoeae	GC agar plus supplements	Swab from 1.5×10^8 suspension	35° C; 5%-7% CO_2	20-24 hrs

نوع محیط کشت: محیط کشتی که انتخاب می‌شود باید باعث رشد سریع و زیاد میکروب شده و در ضمن تداخلی در عمل آنتی‌بیوتیک‌ها نداشته باشد. از محیط‌های مختلفی برای آنتی‌بیوگرام استفاده می‌شود.

الف: محیط کشت مولر هینتون آگـار(Müller-Hinton agar =MHA): بهتـرین محـیط کشـت بـرای آنتی‌بیـوگرام طبـق توصـیه (*CLSI*) *Clinical and Laboratory Standards Institute* محـیط مـولر هینتون آگاراست این محیط در دمای 20º c دارای pH= 7/2-7/4 می‌باشد.

این محیط برای اغلب باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های خانواده سودوموناس، انتروکوک و استافیلوکوک و دیگر باسیل‌های گرم منفی دارای رشد سریع مانند اسینتوباکتر و برانهاملا استفاده می‌شود.

ب: محیط کشت بلادآگار: این محیط برای باکتری‌های گروه استرپتوکوک استفاده می‌شود.

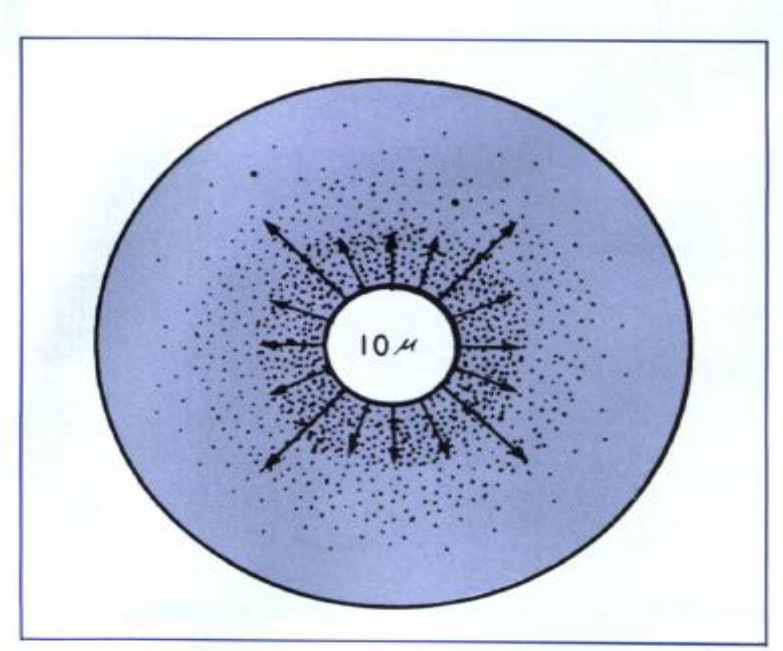
ج: محیط کشت شکلات آگار: این محیط برای باکتری‌های گروه هموفیلوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. لازم بذکر است که برای جنس هموفیلوس می‌توان از مولر هینتون آگار حاوی 10٪ هموگلوبین و 1٪ ایزوویتالکس استفاده کرد.

د- **محیط کشت GC آگار:** به همراه مکمل‌های لازم برای گنوکک استفاده می‌گردد.

عمق محیط کشت:

چون مبنای این تست بر اساس انتشار آنتی‌بیوتیک از دیسک در محیط کشت می‌باشد (شکل 2)، بنابراین اندازه هاله ممانعت کننده به عمق محیط کشت نیز بستگی دارد. عمق 4mm به عنوان استاندارد به کار می‌رود که در این صورت بر اساس قطر پلیت (9cm، کمتر و بیشتر) مقدار معین محیط کشت MHA را در پلیت می‌ریزند تا قطر دلخواه (4mm) حاصل شود. حجم محیط پلیت‌های 9cm حدود 25 میلی‌لیتر، پلیت‌های 12cm حدود 45 میلی‌لیتر و برای پلیت‌های مربعی شکل با قطر 12cm حدود 60 میلی‌لیتر باید باشد.

پلیت‌ها را پس از تهیه و آماده شدن در حرارت 35º -37º c انکوباتور قرار می‌دهند تا آلودگی آنها در حین کـار مشخص گردد. سپس در یخچال 4-8º c نگهداری می‌شود. بهتر است پلیت‌ها بیشتر از 3 روز نگهداری نشوند.



شکل 2: نحوه انتشار آنتی‌بیوتیک در ژل

تهیه دیسک آنتی‌بیوتیک:

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک معمولاً توسط شرکت‌های تولید کننده در کارتریج (لوله‌های حاوی دیسک‌ها) در اختیار آزمایشگاه‌ها قرار می‌گیرد. در استفاده از آنها باید توجه داشت که بر اساس نوع میکروارگانیسم و محل عفونت، دیسک آنتی‌بیوتیک‌ها جهت انجام آزمایش متفاوت می‌باشد. هنگامی که از دیسک‌های مصرفی استفاده نمی‌کنید آنها را در یخچال (4 درجه سلسیوس) قرار دهید و هر کارتریج باز شده بیش از 5 روز نباید مورد استفاده قرار گیرد. پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها سریع‌تر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها خراب می‌شوند. لازم بذکر است که قبل از استفاده از دیسک‌ها آنها را باید از یخچال بیرون آورده و درجه حرارت آنها به دمای اتاق رسیده باشد.

استاندارد کردن سوسپانسیون باکتری:

جهت انجام تست حساسیت دارویی بر روی یک باکتری خالص و مشخص بـه روش Disk – diffusion، بایـد ابتدا غلظت استانداردی از میکروب تهیه شود، چرا که غلظت‌های مختلف از یک میکروب با مقـدار مشخصـی از

یک آنتی‌بیوتیک، دارای نتایج متفاوت است. برای تهیه این غلظت تعداد چند کلنی (5-4) از کشت 24 -18ساعته یک باکتری خالص با لوپ استریل در 5ml-4 سرم فیزیولوژی استریل، حل گردد یا در 10 میلی‌لیتر محیط مایع (مانند مولر هینتون براث یا *Soybean-Casein Digest Medium*) تلقیح کرده و آن را حداقل 5-1 ساعت برای ایجاد کدورت معادل لوله 0/5 مک فارلند انکوبه نمائید.

نحوه ساخت لوله 0/5 مک فارلند:

0/5 میلی‌لیتر کلرید باریم دهیدراته 0/48 مولار ($1.175\%w/v\ BaCl_2 \bullet 2H_2O$) را به 99/5 میلی‌لیتر اسید سولفوریک 0/36 نرمال اضافه نموده و سپس مخلوط نمائید. 4 تا 6 میلی‌لیتر از سوسپانسیون سولفات باریم را در لوله‌های 16×12 میلی‌متر درپیچ‌دار بریزید و با پارافین Seal نمائید. می‌توان در صورت استفاده از لوله‌های معمولی آن را با آتش مسدود کرد (شکل 3). در صورتی که تبخیر صورت نگیرد، می‌توان این استاندارد را در اتاق تا شش ماه استفاده کرد به شرطی که قبل از مصرف آن را به خوبی ورتکس شود.

جهت مقایسه کدورت لوله کشت با لوله مک فارلند، استفاده از یک زمینه سفید با خطوط سیاه و نور کافی توصیه می‌شود. البته می‌توان کدورت محیط کشت را با افزودن کلنی و یا سرم فیزیولوژی استریل تنظیم کرد. اقدام اخیر بویژه جهت باکتری‌هایی مثل هموفیلوس، گنوکک و پنوموکک که در محیط آبگوشت به خوبی رشد نمی‌کنند توصیه می‌شود.

امروزه در بیشتر آزمایشگاه‌ها از اسپکتروفتومتری در OD،550nm محیط کشت را بدست می‌آورند در صورتی که OD محیط کشت بین 0/12- 0/10 باشد آن نشان دهنده این می‌باشد که مقدار باکتری در محیط کشت حدود $10^8 CFU/\ ml$ می‌باشد که با رقیق کردن 1/100 به مقدار مورد نظر می‌رسند. لازم بذکراست که OD بدست آمده بستگی به نوع باکتری، مورفولوژی و کپسول‌دار بودن متفاوت است.

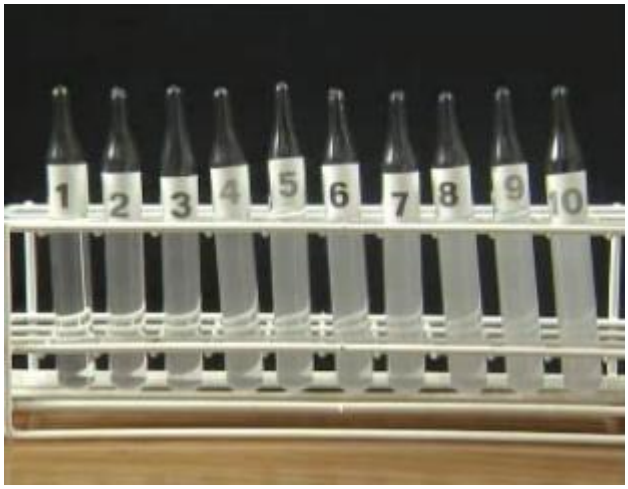
دقت روش OD از مقایسه با کدورت 0/5 مک فارلند بیشتر می‌باشد.

نکته: عموماً برای تهیه بذر کشت از یک محیط کشت مایع 18 ساعته، رقت‌های زیر نشان دهنده 0/5 مک فارلند بوده و توصیه می‌گردد:

0/001 برای باسیل‌های گرم منفی

01/ برای استافیلوکوک‌ها

0/1 برای استرپتوکوک‌ها



شکل 3: لوله‌های استاندارد مک فارلند

کشت:

قبل از استفاد و کشت، پلیت‌ها باید به مدت 15 دقیقه در 37 درجه سلسیوس قرار گیرد. برای انجام کشت دو روش غرق کردن و یا استفاده از سوآب وجود دارد. در روش غرق کردن از یک پیپت پاستور (پنبه‌دار و استریل)، چند میلی‌لیتر از بذرکشت را در سطح پلیت حاوی محیط آگار ریخته و پس از اینکه تمام سطح پلیت آغشته شده اضافی محیط توسط همان پیپت کشیده و دور ریخته شود.

در روش دوم با استفاده از سوآب استریل مقداری از بذر کشت را بر سطح پلیت حاوی محیط کشت کشیده و با سه بار چرخاندن 60 درجه پلیت تمام قسمت‌های مختلف حتی دور پلیت را آغشته نمائید.

قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیک:

با توجه به نوع میکروارگانیسم و نوع عفونت و مطابق با نظر WHO و CDC، با استفاده از دستگاه پخش کننده (dispensing) یک باره کلیه دیسک‌های آنتی بیوتیک را در سطح پلیت با فاصله 30 میلی‌متر از یکدیگر و 15-10 میلی‌متر از کناره پلیت قرار دهید و با پنس استریل روی سطح دیسک را فشار دهید تا کامل روی سطح آگار قرار گیرد. سپس حدود 30-15 دقیقه پلیت‌ها را به صورت مسطح در حرارت آزمایشگاه قرار دهید، تا اجازه انتشار آنتی‌بیوتیک در داخل محیط داده شود. در مرحله بعد حداکثر 10 پلیت را بطور وارونه روی هم در 37 درجه سلسیوس به مدت 18 ساعت انکوبه نمائید. آنگاه می‌باید قطر هاله عدم رشد با خط‌کش یا پرگار اندازه‌گیری شود و با جدول مقایسه نموده و نتیجه را به صورت حساس (S)، مقاوم (R) و حد واسط (I) گزارش کنید. لازم بذکر است که حدود قطر مهار شده از ناحیه‌ای است که رشد متوقف شده است. در صورتی که قطر مهار شده واضح به نظر نمی رسد، باید از نقطه ای در نظر گرفت که رشد نرمال است.

نکته مهم: این روش برای باکتری‌های بی‌هـــوازی (بعضی از دیسک‌ها در شرایط بی‌هوازی غیرفعال می‌شوند مانند استرپتومایسین) و کند رشد نیازمند به Co_2 و داروهایی که سریع در محیط کشت نفـــــــوذ نمی‌نمایند مناسب نمی‌باشد (مانند پلی میکسین B).

خطاهای رایج در تست Disk diffusion

1- تهیه نامناسب محیط مولر هینتون آگار بخصوص عدم دقت در pH آن

2- استفاده از محیط‌های تاریخ مصرف گذشته و آنهایی که بخوبی نگه‌داری نشده باشند.

3- عدم دقت در نگهداری دیسک‌ها

4- استاندارد نبودن کشت

5- عدم دقت در تهیه محلول استاندارد (0/5 مک فارلند)

6- عدم برداشت مایع اضافی از سوآب و مرطوب شدن سطح پلیت

7- تأخیر بیش از حد در هنگام استاندارد کردن و کشت بر روی پلیت، یا در قرار دادن دیسک‌ها

8- تغییر درجه حرارت از 35^{o} c درجه یا قرار دادن در انکوباتور حاوی Co_2

9- بعد از 6 ساعت می‌توان منطقه عدم رشد را بررسی کرد ولی بهتر است بعد از 20- 16ساعت انـدازه گیـری شود.

10- عدم دقت در اندازه گیری کافی منطقه ممانعت از رشد

11- آنتی‌بیوگرام با کشت‌های مخلوط

12- انجام تست با باکتری‌های کند رشد

13- عدم استفاده از باکتری‌های استاندارد

14- خطا در گزارش نتایج

کنترل کیفی: از آنجا که محیط کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها خواص یکنواختی ندارند، لذا به کمک سوش‌های استاندارد و با مراجعه به جداول مربوطه می‌بایست نسبت به کنترل کیفی روند آنتی‌بیوگرام اقدام نمود.

در پایان سایر روش‌های تعیین مقاومت خاص در جدول زیر ارائه شده است.

جدول 2: روش‌های تعیین مقاومت خاص

TEST	PURPOSE	CONDITIONS		INTERPRETATION
Oxacillin agar screen	Detection of staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins (e.g., oxacillin, methicillin, or nafcillin)	Medium: Inoculum: Incubation:	Mueller-Hinton agar plus 6 μg oxacillin/mL plus 4% NaCL Swab or spot from 1.5 × 10^8 standard suspension 30°-35° C 24 hrs, up to 48 hrs for non-*S. aureus*	Growth = Resistance No growth = Susceptible
Vancomycin agar screen	Detection of enterococcal resistance to vancomycin	Medium: Inoculum: Incubation:	Brain heart infusion agar plus 6 μg vancomycin/mL Spot of 10^5-10^6 CFU 35° C, 24 hrs	Growth = Resistance No growth = Susceptible
Aminoglycoside screens	Detection of acquired enterococcal high-level resistance to aminoglycosides that would compromise synergy with a cell wall–active agent such as ampicillin or vancomycin	Medium: Inoculum: Incubation:	Brain heart infusion broth: 500 μg/mL gentamicin; 1000 μg/mL streptomycin Agar: 500 μg/mL gentamicin; 2000 μg/mL streptomycin Broth; 5 × 10^5 CFU/mL agar; 10^6 CFU/spot 35° C, 24 hrs; 48 hrs for streptomycin, only if no growth at 24 hrs	Growth = Resistance No growth = Susceptible
Oxacillin disk screen	Detection of *S. pneumoniae* resistance to penicillin	Medium: Inoculum: Incubation:	Mueller-Hinton agar plus 5% sheep blood plus 1 μg oxacillin disk as for disk diffusion 5%-7% CO_2 35° C; 20-24 hrs	Inhibition zone ≤20 mm; penicillin susceptible Inhibition zone <20 mm; penicillin resistant, intermediate, or susceptible. Further testing by MIC method is needed