

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۴ شماره ۶ بهمن و اسفند ۱۳۹۱ صفحات ۵۳-۴۹

ساخت پتری دیش چاهک دار مدرج جهت حساسیت سنجی مقایسه ای قارچ ها

محمد فاطمی مطلق: آزمایشگاه میکروب شناسی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

Email: mohammadfatemimotlagh@gmail.com

رضا هوشمند فر: آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام

دریافت: ۹۱/۱/۲۱ پذیرش: ۹۱/۳/۱

چکیده

زمینه و اهداف: از اهداف ساخت این پلیت، کاهش هزینه های اضافی برای تست حساسیت سنجی قارچ، کاهش زمان مقایسه چندین پلیت با هم، سادگی بسیار زیاد آن نسبت به روش های قبلی، عدم نیاز به استفاده از خط کش برای خواندن نتیجه و کاهش احتمال آلودگی ثانویه، کاهش مصرف پلیت، محیط کشت و زمان می باشد.

مواد و روش ها: ابتدا چاهک هایی به ارتفاع ۷ میلی متر و قطر ۴۲ میلی متر طبق داده های CLSI برای مدل های ۲-۱۰ چاهکی این پلیت طراحی شد. بعد از آماده سازی محیط کشت، مواد قارچ کش مورد نظر در مرکز محیط کشت حاوی قارچ ریخته می شود و بعد از انجام انکوباسیون، هاله های عدم رشد، توسط خط کش های کوچک موجود در کف چاهک ها، گزارش داده می شود.

یافته ها: در آزمایش ها، سه ضد قارچ فلوکونازول، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین مورد استفاده قرار گرفتند و هاله عدم رشد در غلظت های مختلف فلوکونازول با اندازه ای ۹ و ۱۵ میلی متر تشکیل شد ولی دو ضد قارچ دیگر تاثیری بر قارچ نداشتند.

نتیجه گیری: مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج ثبت شده استاندارد در رابطه میزان هاله های عدم رشد این مواد ضد قارچی، این ادعا را ثابت کرد که استفاده از این پلیت نوین از خطاهای احتمالی، آلودگی ثانوی، احتمال تداخل آنتی بیوتیکی می کاهد و بر سرعت انجام آزمایش و تست خوانی می افزاید. در ضمن، از صرف هزینه های اضافی در رابطه با اشتباه، از اتلاف محیط کشت و مواد آنتی بیوتیک، پلیت، زمان و ... جلوگیری می کند.

کلیدواژه ها: حساسیت سنجی قارچی، هاله ی عدم رشد، پلیت

مقدمه

برای یک نوع قارچ، انجام تست حساسیت سنجی قارچ می باشد که این کار بر روی پلیت حاوی محیط کشت مناسب قارچی (سابورو دکستروز آگار)، کشت قارچ بر محیط، ریختن قارچ کش مناسب بر قارچ کش کشت شده و انکوباسیون صورت می پذیرد. بعد از این مدت، اندازه هاله عدم رشد قارچی نشان دهنده مناسب بودن یا عدم تناسب دارو برای درمان قارچ مدنظر خواهد بود. هم

امروزه بیماری های قارچی، یکی از مشکلات عمده جوامع بشری محسوب می شوند. برای درمان عوامل مختلف قارچی، داروهای مناسب فراوانی ساخته شده اند. اما یکی از دغدغه های پزشکان در رابطه با درمان قارچ ها، بروز مقاومت های دارویی در آن ها می باشد که این حالت به علت مصرف بی رویه و نامناسب داروها علیه قارچ ها کسب شده است. از راه های شناسایی داروی مناسب

قطر ۴۲ میلی متر تهیه گشت (شکل ۱). این کار توسط دستگاه تراشکاری با دقت تمام صورت گرفت. سپس لبه های اضافه گرفته شد و حلقه ها برای کار آماده شدند. قبل از نصب چاهک های در پلیت ها توسط بخار آب ضد عفونی شدند. بعد در کف پلیت ها به تعداد ۲-۱۰ تایی نصب شدند. سپس به مدت ۷۲ ساعت درون دستگاه UV، برای اطمینان از کار، قرار گرفتند. برای طراحی این پلیت و تعیین محل قرارگیری محیط کشت و ماده ضد قارچ و همچنین تعبیه خط کش و درجه بندی کف پلیت برای خواندن نتایج هاله های عدم رشد، از نرم افزار سه بعدی ساز و طراحی سالید ورکس استفاده شد. به این صورت که اعداد و ارقام مربوط به بیشترین محدوده هاله های عدم رشد (۴۲ میلی متر) و اندازه پلیت مورد نظر (۱۰۰ میلی متر) به این نرم افزار داده شد که ابتدا بهترین محل کشت تعیین شد و پس از آن خطوطی از مرکز چاهک ها به سمت حاشیه پلیت ترسیم شد (شکل ۱). سپس در ۱۰۰ پلیت (برای تکرار آزمایش) را با نوارهای آزمایشگاهی کاملاً کیپ کرده و از باز شدن و خارج شدن آن ها از حالت استریل جلوگیری شد و به کارگاه ترسیم منتقل شدند. عکس ترسیم شده توسط نرم افزار سالید ورکس، به دستگاه CNC لیزری داده شد و درجه بندی کف پلیت ها انجام گرفت. البته بعد از انجام عمل خط کشی و برای اطمینان از استریل بودن این پلیت ها، آن ها را به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه استریل ماوراء بنفش قرار دادیم تا احتمال هر گونه آلودگی به حداقل ممکن کاهش یابد.

روش استفاده از پلیت جدید:

این پلیت در سایزهای ۱۲۰، ۱۰۰ و ۸۴ میلی متری ساخته شده اند و مدل های ۲-۱۰ چاهکی آن طراحی شده است، که برای حساسیت سنجی قارچ ها و میکروارگانیسم ها استفاده می شود (۶-۸). کار با این پلیت بسیار راحت می باشد بدین گونه که بعد از آماده سازی محیط کشت طبق پروتکل شرکت سازنده، محیط کشت به صورت مایع درون هر یک از چاهک ها (C) تا ۵ میلی متر ارتفاع، ریخته می شود. بعد از سفت شدن محیط کشت، سوسپانسیون قارچ مدنظر که از قبل آماده شده است، توسط سرنگ بر محیط کشت درون چاهک ها ریخته می شود. بعد از این کار، از مواد قارچ کش مورد نظر، به میزان دو قطره در مرکز محیط کشت حاوی قارچ ریخته می شود و بعد از انجام انکوباسیون، هاله های عدم رشد احتمالی (A) توسط خط کش های کوچک موجود در کف چاهک ها (D)، قرائت و گزارش می شود. چاهک های این پلیت، شماره گذاری شده اند و به راحتی می توان هاله های مربوط به هر ماده ی ضد قارچ را مورد بررسی قرار داد. همچنین تمام هاله های عدم رشد در یک نما، در یک پلیت، قابل بررسی و قضاوت هستند. بعد از انجام تست و تشکیل هاله عدم رشد احتمالی، شعاع آن به دست می آید (B) چون عمل خط کشی از مرکز چاهک آغاز شده است و به حاشیه ی چاهک ها ختم می گردد و قرار گیری ماده قارچ کش در مرکز چاهک صورت می گیرد، پس با دو برابر کردن این رقم، قطر هاله ی عدم رشد به دست می آید (شکل ۱).

اکنون سنجش حساسیت قارچی در ایران به دو روش صورت می گیرد (۱-۳). در روش اول: محیط کشت مناسبی برای قارچ آماده می شود و بعد سوسپانسیونی از قارچ مدنظر تهیه می گردد و توسط نیدل بر پلیت حاوی محیط، کشت داده می شود؛ سپس دو قطره از قارچ کش مد نظر در پلیت می ریزیم و نتیجه به صورت هاله عدم رشد دریافت می شود. در روش دوم توسط بوته چینی استریل یا وسیله مشابه، بعد از ریختن محیط کشت در کف پلیت و قبل از انجماد محیط کشت، چاهک هایی ایجاد می شود سپس درون هر یک از چاهک ها می توان داروی ضد قارچ متفاوتی استفاده کرد. روش های موجود دارای معایب فراوانی هستند که موجب خطاهای بسیار در انجام این تست مهم و گزارش نتایج آن خواهد شد. از جمله معایب آن، مصرف بالای پلیت و محیط کشت، احتمال بسیار زیاد آلودگی های قارچی و تداخل داروهای ضد قارچی و تغییر در اثر آن ها و اندازه هاله های عدم رشد، نیاز به خط کش برای خواندن نتایج و عدم تشخیص هاله ی عدم رشد مربوط به داروی خاص در هنگام استفاده از چند قارچ کش در یک پلیت و ... می باشند. در این پلیت جدید به همراه روش پیشنهادی که برای اولین بار در جهان ابداع شده است، تمام مشکلات فوق به خوبی حل شده است. این پلیت به صورت ۲-۱۰ چاهکی طراحی شده است و با کمترین هزینه از لحاظ مصرف پلیت و محیط کشت بهترین نتایج را حاصل می آورد. این پلیت دارای توان آزمایش ۱۰ ضد قارچ یا بیشتر را به صورت هم زمان است. علاوه بر این، بطور همزمان می توان هم هاله های عدم رشد مربوط به داروی ضد قارچ را در یک نما با هم مقایسه کرد و هم زمان نتایج را بدون خطا و بدون نیاز به خط کش گزارش داد.

مواد و روش ها

محیط کشت ساپروید دکستروز آگار شرکت مرک آلمان، فلوکونازول، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین، مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین نوع قارچ مورد استفاده کاندیدا آلبیکنس (PTCC No: 5027) بود و برای انجام تست ها، از استفاده گردید.

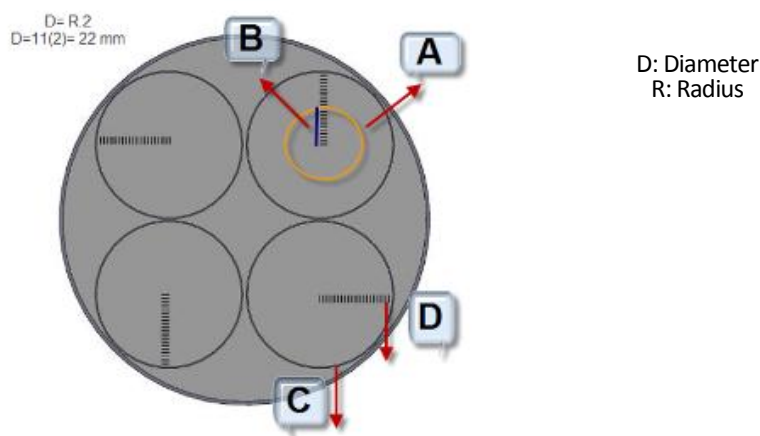
از جمله وسایل مورد استفاده در این کار پلیت ۸۴، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی متری شرکت لابترون، دستگاه توزین با دقت ۰/۰۱ گرم پرسیکا ساخت سویس، دستگاه اتوکلاو ریچان طب ایران، انکوباتور شرکت RTC، دستگاه UV ژاپنی شرکت OSK، بن ماری، یخچال ۴ درجه سانتی گراد، پنس و چراغ الکلی، سواب های استریل سبد حمل ظروف اتوکلاو، نوار چسب اتوکلاو و فیلم آزمایشگاهی ساخت آمریکا (پارا فیلم) می باشد.

ابتدا بررسی آماری در زمینه اندازه هاله های عدم رشد مختلفی که توسط آنتی قارچ های مختلف علیه قارچ های متفاوت تشکیل می شوند صورت گرفت. در این تحقیق مشخص شد که ۹۹/۷ درصد از آنتی قارچ ها علیه میکروارگانیسم های مختلف هاله های عدم رشدی در محدوده ۴۲ میلی متر تشکیل می دهند (۴،۵). با توجه به این محدوده عددی (۴۲ میلی متر) به دست آمده پلیت سایز ۱۰۰ میلی متر انتخاب شد. ابتدا تعداد ۱۰۰ پلیت سایز ۱۲۰، ۱۰۰، ۸۴ میلی متری انتخاب شد و بعد چاهک هایی به ارتفاع ۷ میلی متر و

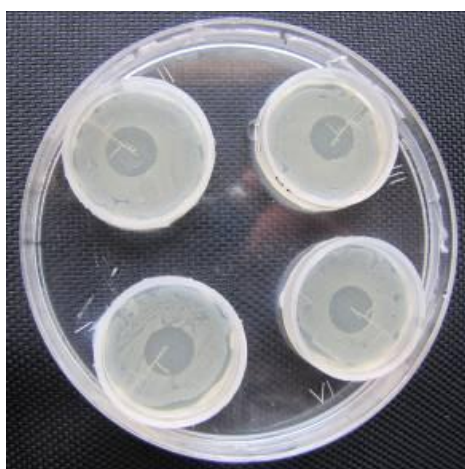
یافته ها

در تست های انجام شده بر روی محیط کشت سابورد دکستروز آگار، از قارچ کاندیدا آلیکنس، استفاده شد که سه ضد قارچ فلوکونازول، سیپروفلوکساسین و جتتامایسین مورد استفاده قرار گرفتند و هاله عدم رشد در غلظت های مختلف فلوکونازول با اندازه های ۹ و ۱۵ میلی متر تشکیل شد (جدول ۱) ولی دو ضد قارچ دیگر تاثیری بر قارچ نداشتند. تست آنتی بیوگرام قارچی در محیط کشت سابورد دکستروز آگار انجام می شود که میزان کارایی پلیت جدید در محیط کشت مذکور و پرکاربرد، فوق العاده بالاست (شکل ۲ و ۳).

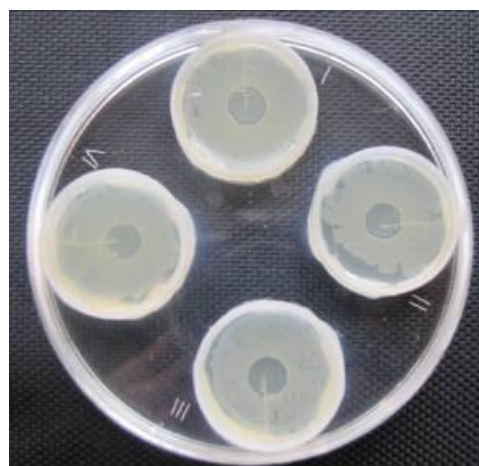
درجه بندی کف پلیت به گونه ای است به صورت شعاع از مرکز هر یک از چاهک ها آغاز شده است و به حاشیه ی چاهک ها ختم می گردد. پس حتی می توان از این پلیت برای تست آنتی بیوگرام باکتری ها، بدون کمترین احتمال تداخل هاله ها، هزینه های دیسک گذاری و خواندن تست، استفاده کرد به این گونه که، بعد از ریختن محیط کشت، دیسک های آنتی بیوتیکی را در مرکز چاهک ها قرار داده و بعد از انکوباسیون، نتایج را مطالعه کرد. از مزایای دیگر این پلیت این است که می تواند کار چند پلیت را همزمان انجام دهد، (البته با مصرف کمترین تعداد پلیت و کمترین مقدار محیط کشت)؛ حتی می توان چندین نوع محیط کشت یا باکتری را در یکی از این پلیت ها کشت داد. علاوه بر این، این پلیت قابلیت انجام اکثر تست های آزمایشگاهی را دارا می باشد.



شکل ۱: نمایش روش اندازه گیری و گزارش هاله های عدم رشد در روش جدید
A: هاله ی عدم رشد B: شعاع هاله ی عدم رشد



شکل ۳: هاله های عدم رشد تشکیل شده با استفاده از ضد قارچ های سیپروفلوکساسین و جتتامایسین بر روی محیط سابورد آگار



شکل ۴: هاله های عدم رشد تشکیل شده با استفاده از ضد قارچ فلوکونازول بر روی محیط سابورد آگار

جدول ۱: اندازه گیری هاله های عدم رشد تشکیل شده توسط فلوکونازول، سیپروفلوکساسین و جتتامایسین در دوز های ۳۰ و ۱۲۰ میلی گرم در میلی لیتر

ماده ضد قارچ	تعداد آزمایش	قطر هاله عدم رشد (میلی متر)		انحراف از معیار
		120 mg/ml	30 mg/ml	
فلوکونازول	۳۳	۱۵	۹	۰.۸۱-۲.۴۴
سیپروفلوکساسین	۳۳	-	-	-
جتتامایسین	۳۳	-	-	-

بحث

تاکنون پلیت های موجود در جهان به صورت یک محصول خام بوده اند و برای خواندن نتیجه و استفاده از آن ها از ابزارهای دیگر و همراه باید استفاده کرد (۹-۲۰). راه های زیادی برای بهبود و توسعه این محصول ارزشمند آزمایشگاهی پیش روست که یکی از این روش ها همین روش مدرج کردن و ایجاد چاهک است که باعث حل مشکلات تست حساسیت سنجی قارچی و خطاهای موجود می شود و نیز سهولت خواندن و ساده کردن آزمایش حساسیت سنجی را به همراه دارد. نتایج به دست آمده نشان داد که پلیت جدید و روش همراه آن بسیار کارتر از روش معمولی انجام آزمایش حساسیت سنجی می باشد. با مقایسه نتایج به دست آمده در تست هایی که انجام گردید با نتایج ثبت شده درباره ی میزان هاله های عدم رشد این مواد ضد قارچ، این ادعا ثابت گشت که استفاده از این پلیت نوین از خطاهای احتمالی، آلودگی های ثانویه، احتمال تداخل های آنتی بیوتیکی و ضدقارچی می کاهد و بر سرعت انجام تست و تست خوانی می افزاید. در ضمن، از صرف هزینه های اضافی در رابطه با اشتباه در استفاده از محیط کشت و مواد آنتی میکروبیال، مصرف پلیت، محیط کشت و ... جلوگیری به عمل می آید. طبق نتایج به دست آمده بر روی این پلیت جدید و اثبات به صرفه بودن و کاهش هزینه ها و خطا های موجود، به راحتی می توان استفاده از آزمایش حساسیت سنجی به صورت روتین در آورد و برای هر بیمار دچار بیماری قارچی، استفاده نمود که با این کار درمان مناسب و به موقعی را برای بیمار وجود خواهد

داشت و هم این که هزینه های جاری برای مصرف ضد قارچ ها و آنتی بیوتیک های نامناسب برای بیماران مختلف را کاهش داد. در ضمن درمان صحیح و به موقع بیماران سبب جلوگیری از ایجاد قارچ های مقاوم به دارو و نیاز به تولید ضد قارچ ها و آنتی بیوتیک های جدید و هزینه های هنگفت آن خواهد شد.

نتیجه گیری

طبق نتایج به دست آمده برای کاهش هزینه ها، خطا ها، جلوگیری از مصرف بی رویه داروها و ایجاد مقاومت های قارچی از این پلیت و روش همراه آن استفاده گردد. همچنین این پلیت قابلیت استفاده برای تست آنتی بیوگرام قارچی (تعیین نوع قارچ)، تست حساسیت سنجی قارچ ها دارا می باشد. علاوه بر این، با تولید انبوه آن می توان مشکلات سر راه این تست ارزشمند را رفع نمود.

تقدیر و تشکر

در آخر از زحمات بی دریغ مهندس نادر منصوری، مهندس سمیره کارزانی و مهندس طیب سیفی تقدیر و تشکر به عمل می آید. همچنین از دانشکده پیرادامپزشکی که امکانات آن در اختیار گروه قرار گرفت سپاس گذاری می شود. در ضمن این پلیت اختراع ثبت شده در اداره ثبت اختراعات ایران با شماره ثبت ۵۶۹۷۶ و تاریخ ۸۷/۱۱/۲۰ می باشد.

References

- Bren L. Battle of the bugs: Fighting antibiotic resistance. *FDA Consumer Magazine* 2002; **26**: 67-96.
- Wikipedia. *Infectious disease*. Wikimedia foundation. Inc.2004.
- Sharma R. Nutre. Rep.int. 1996.No.3.669-677.
- Fatemi Motlagh M, Mansoury N. *Disc antibiogram test with graded plate method*. *Medical laboratory Journal* 2010; **3**(2): 53-60 (Persian).
- Fatemi Motlagh M, Varahram H, Mansouri N. *Gradient plate for Hicomb minimum inhibitory concentration (MIC) test*. *Medical laboratory Journal* 2011; **4**(2): 45-51 (Persian).
- Performance standards for Antimicrobial Disks Susceptibility tests, CLSI* 2011 **31**(1).
- Inventors: Jim E. Cutler; Marcia H. Riesslman, Kevin C. Hazen *Invention: Antifungal and antibacterial susceptibility assay* Patent number: **5,885,791** 1999.
- Simor E, Goswell G, Louis L, Lee M, Louis M. *Antifungal susceptibility testing of yeast isolates from blood cultures by micro broth dilution and the E Test*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; **(16)**: 23-26.
- Inventor: Sarah C. Watkinson *Invention: Inhibition of growth in fungi* Patent number: **4,481,219** 1984.
- Inventor: Gerhard J. Wade *Invention: Automated micro-organism culture growth and detection instrument* Patent number: **4,250,266** 1981.
- Inventors: Hans Forrer, Hans-Gunther Zeller *Invention: Device for detecting microorganisms* Patent number: **4,308,347** 1981.
- Inventors: Jan O. Kjellander; Dan G. Danielsson *Invention: Device for examining microorganisms* Patent number: **4,204,045** 1980.
- Inventors: Rodolfo Berretti, Paolo Tarli, Brunilde Berti *Invention: Device for identifying microorganisms* Patent number: **4,643,947** 1987.
- Inventor: Nathan Citri *Invention: Device for solid phase bacteriological testing containing test areas formed by lines of an antibacterial composition* Patent number: **5,344,761** 1994.

15. Inventors: Gerhard Brusewitz, Reinhard Sieck
Invention: *Device for the determination of microorganisms* Patent number: **4,690,896** 1987.
16. Inventors: Donald P. Kronish, William D. Young, Walter E. Jacobson, Doris B. Taylor Invention: *Diagnostic device for measuring biochemical characteristics of microorganisms and the like* Patent number: **12. 252,157** 1979.
17. Inventor: L. S. Goldman Invention: *Growing and identification of fungi* Patent number: **2,784,146** 1957.
18. Inventors: Bruce H. Sielaff, Julius Praglin, James E. Mckie, Dvid K. Longhenry, Alan C. Curtis, Charles B. Bidwell Invention: *Method and apparatus for identifying microorganisms* Patent number: **4,288,543** 1981.
19. Inventors: Hans Wielinger; Walter Rittersdorf; Manfred Bleisteiner, Gerd Zimmermann, Wolfgang Werner; Wolfgang Vomel Invention: *Microbiological test device* Patent number: **4,250,256** 1981.
20. Inventor: George F. Lyman Invention: *Tissue culture plate* Patent number: **12. 249,802** 1978.