Short Communication

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 2 (May-June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Evaluation of a New Colorimetric Medium for Detection of Isolates of the family *Entrobacteriaceae* Producing Extended Spectrum β-lactamases (ESBLs)

Shirin Shahsavari [1], Siavosh Salmanzadeh-Ahrabi [2], Tahereh Falsafi [2], Gholam Reza Irajian [3]

1. Biotechnology Department, Faculty of Biology Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. Microiology Department, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
3. Medical Microbiology Department, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/05/04
Accepted: 2016/02/25
Available online:2016/07/24

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2016; 10(2): 75-82

Corresponding author at:
Mrs. Shirin Shahsavari

Biotechnology Department, Faculty of Biology Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Tel: 021-88058912

Email:
shirin_sh777@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Due to the increased growth of bacteria producing ESBL, among the members of the *Enterobacteriaceae* family, monitoring and treatment of nosocomial infections are important, especially caused by ESBL-producing clinical isolates belonging to this family. The aim of this study is to evaluate a rapid method, using new colorimetric culture was made at the University of Al-Zahra (Tehran, Iran).The used method to detect ESBLs, according to disk diffusion method based on CLSI on colorimetric culture and the results of it, compared with the Müller-Hinton agar for disk diffusion method.

Materials and Methods: In this study, the clinically isolated samples belonged to the *Enterobacteriaceae* family which was evaluated in both Müller-Hinton agar medium and colorimetric culture using ceftazidime (CAZ), ceftazidime + clavulanate (CZA), cefotaxime + clavulanate (CTC) and Cefotaxime (CTX) discs.

Results & Conclusions: Because of the metabolic activity of bacteria, a color change occurred from red to yellow in colorimetric culture after 5-6 hours and red inhibitory zone created around the disc. The obtained results from the colorimetric method are same with the results of Müller-Hinton agar method for disk diffusion after a day.

KeyWords: *Colorimetric medium, ESBLs, Rapid detections, Disk diffusion test*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Shahsavari S, Salmanzade Ahrabi S, Falsafi T, Irajian G R. Evaluation of a New Colorimetric Medium for Detection of Extended Spectrum β-lactamases (ESBLs) Producing Isolates of Entrobacteriaceae family. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (2) :75-82

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

ارزیابی یک محیط کلریمتریک جدید به منظور تشخیص ایزوله‌های بالینی اعضای خانواده انتروباکتریاسه های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)

شیرین شهسواری[۱]، سیاوش سلمانزاده اهرابی[۲]، طاهره فلسفی[۲]، غلامرضا ایراجیان[۳]

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران
۳. گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۴/۰۲/۱۴

پذیرش:۱۳۹۴/۱۲/۰۶

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۵/۰۳

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(2): 75-82

نویسنده مسئول:

خانم شیرین شهسواری

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱۲

پست الکترونیک:

shirin_sh777@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: با توجه به رشد روبه افزایش باکتری‌های تولید کننده ESBL، در میان اعضای خانواده *Enterobacteriaceae*، ردیابی و درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از ایزوله‌های بالینی تولید کنندگان ESBL متعلق به این خانواده، دارای اهمیت است. هدف از این پژوهش، ارزیابی یک روش سریع، با استفاده از محیط کلریمتریک جدید ساخته شده در دانشگاه الزهراء (تهران، ایران)، می‌باشد.

مواد و روش کار: ایزوله‌های بالینی جدا شده از بیماران متعلق به خانواده انتروباکتریاسه، برای ردیابیESBLs با استفاده از دیسک‌های ceftazidim (CAZ)،ceftazidime + clavulanate (CZA) ، cefotaxime +clavulanate (CTC) وCefotaxime (CTX) در دو محیط مولر- هینتون آگار و محیط کلریمتریک در این مطالعه، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها و نتیجه گیری: در محیط کلریمتریک، در مدت ٦-٥ ساعت، به دلیل فعالیت متابولیکی باکتری، تغییر رنگی در محیط کشت رخ داده و محیط از رنگ قرمز به زرد تغییر کرده و در اطراف دیسک‌ها هاله‌های مهاری قرمز رنگ ایجاد می‌گردد. نتایج به دست آمده با روش کلریمتریک مشابه با نتایج به دست آمده از روش استاندارد انتشار دیسک در مولر- هینتون آگار پس از یک شبانه روز، می‌باشد.

کلمات کلیدی: محیط کشت کلریمتریک، ESBLs، تشخیص سریع، آزمون انتشار دیسک

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی وسیع الطیف که توسط بتالاکتامازهای وسیع الطیف ایجاد می‌شوند یک مشکل جهانی رو به افزایش می‌باشد (۲، ۱). مقاومت ایجاد شده توسط سویه‌های ESBL مشکلات درمانی مهمی را ایجاد می‌نماید که سبب ایجاد یک چالش میان تست‌های تشخیص حساسیت و گزارشات بالینی می‌گردد (۶-۳).

بتالاکتامازهای وسیع الطیف گروهی از آنزیم‌ها هستند که سویه‌های مولد را در برابر پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها (نسل اول، دوم و سوم) و آزترئونام ها محافظت کرده، ولی قادر به هیدرولیز سفامایسین ها و کرباپنم ها نمی‌باشند (۸، ۷) و عمدتاً توسط مهار کننده‌های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند. در واقع این آنزیم‌ها، جهش یافته‌هایی هستند که از جایگزینی یک یا تعداد بیشتری اسید آمینه در توالی آمینو اسیدی بتالاکتاماز های اولیه (TEM-2، TEM-1، SHV-1) حاصل شده‌اند (۹).

برای تشخیص بتالاکتامازهای وسیع الطیف روش‌های گوناگونی وجود دارد که ازجمله آن‌ها می‌توان به روش‌های فنوتیپی و روش‌های مولکولی اشاره نمود؛ روش‌های فنوتیپی در مورد نوع آنزیم بتالاکتامازی هیچ گونه اطلاعاتی به ما نمی‌دهند و تنها وجود یا عدم وجود آن را مشخص می‌نمایند؛ اما در

روش‌های مولکولی و با استفاده از تکنیک PCR، می‌توان تا حد زیادی ژن‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتامازی را تشخیص داد. از روش‌های فنوتیپی موجود برای تعیین حساسیت میکروبی و به ویژه برای تشخیص بتالاکتاماز های وسیع الطیف می‌توان موارد زیر را ذکر نمود:

روش‌های مورد تأیید موسسه استانداردهای کلینیکی وآزمایشگاهی که شامل: ۱- روش انتشار دیسک (Disck diffusion) و تست‌های فنوتیپی تاییدی و ۲-تست‌های رقت (Dilution antimicrobial susceptibility tests) می‌باشند.

از روش‌های تجاری موجود برای شناسایی بتالاکتاماز های وسیع الطیف نیز می‌توان از روش‌های E-test و روش‌های خودکار نام برد. VITEK2 و Phoenix سیستم‌های خودکار و ماشینی هستند که برای تشخیص ESBL ها به کار می‌روند و انجام آنها مستلزم هزینه‌های بالا می‌باشد.

البته روش‌های دیگری نیز برای شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف مورد استفاده قرار می‌گیرد که از جمله آن‌ها می‌توان به ترکیب سفالوسپورین/کلاوولانات در محیط Iso-Sensitest-agar، روش Double-Disk Diffusion، روش مولر هینتون آگار ترکیب شده با کلاوولانات و روش جایگزینی دیسک را نیز نام برد.

علی رغم پیشرفت بسیار زیاد تکنیک‌های مولکولی، به دلیل هزینه بالا و زمان‌بر بودن انجام آن‌ها، هنوز گزارش‌های تعیین حساسیت ضد میکروبی، حائز اهمیت می‌باشند؛ لذا تمرکز بر روی کارآمدی بیشتر وکاهش زمان تشخیص در تعیین حساسیت ضد میکروبی، البته با حفظ اختصاصیت و کارآمدی، که از اهداف این پژوهش می‌باشد مورد تاکید است (۶).

آلودگی ناشی از سویه های ESBL متعلق به انتروباکتریاسه، مرتبط با افزایش در شیوع بیماری، مرگ و هزینه‌های مراقبت از سلامتی می‌باشد (۱۰، ۲). برای اطمینان از ایمنی بیماران، درمان بهینه و کنترل گسترش سویه‌های باکتریایی متعلق به انتروباکتریاسه تولید کننده ESBL، جداسازی بیماران کولونیزه شده و مراقبت هدف‌دار بیماران با ریسک بالا و غربالگری آنها الزامی است تا از شیوع آلودگی‌های واگیردار به وسیله این ارگانیسم‌ها جلوگیری شود (۱۱).

یکی از راهکارهای مهم برای این کنترل استفاده از روش‌های تشخیصی سریع و دقیق می‌باشد.

غربالگری و تأیید فنوتیپی ESBL از مقرون به صرفه‌ترین روش‌ها بوده و امروزه از روش‌هایی می‌باشند که به طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند، بنابراین تشخیص سریع و آسان ESBL ها به منظور راهنما برای درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از ارگانیسم‌های گرم منفی و شروع به کنترل شیوع آنها الزامی می‌باشد.

اساس طراحی محیط‌های کلریمتریک بر پایه رشد سریع باکتری‌ها و فعالیت متابولیسمی آن‌ها می‌باشد. باکتری‌های عضو خانواده *Enterobacteriaceae* به علت توانایی تخمیر و تولید اسید در محیط کشت خود، pH محیط را کاهش داده و سبب ایجاد تغییر رنگ در محیط، در نواحی رشد خود می‌گردند.

محیط کلریمتریک به کار برده شده برای تشخیص ایزوله‌های باکتریایی عضو خانواده *Enterobacteriaceae*، به رنگ قرمز می‌باشد که در اثر فعالیت متابولیتی باکتری در ناحیه رشد باکتری به زرد، تغییر رنگ پیدا می‌کند و هاله‌های مهاری نیز، به رنگ قرمز مشخص می‌گردد.

نکته مهم در این محیط کشت‌ها حضور معرف مناسب و مواد غنی کننده در محیط، می‌باشد. همچنین تنظیم اسیدیته محیط و رعایت شرایط استریل در ساخت این محیط، الزامی است (۱۳، ۱۲).

محیط کلریمتریک برای تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های عضو خانواده انتروباکتریاسه، در دانشگاه الزهرا، طراحی گردیده (۱۴) و سپس بهینه سازی آن در پژوهش بعدی انجام گرفت (۱۵).

هدف از این مطالعه ارزیابی و تشخیص حساسیت ESBL ها با استفاده ازمحیط کلریمتریک جدید و بهینه شده در دانشگاه الزهرا (۱۵) در مقایسه با محیط استاندارد مولر هینتون آگار بوده که به منظور دستیابی به زمان تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سریع‌تر انجام گردید.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های بالینی باکتریایی دریافت شده از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) درآزمایشگاه پاتوبیولوژی مرکزی و بیمارستان بقیه ا... (عج)، ونمونه های دریافت شده از دانشگاه علوم پزشکی ایران (تهران، ایران) نیز در بیمارستان حضرت علی اصغر از بیماران جدا گردید. این نمونه‌ها از خون و یا ادرار بیماران، کشت داده شده است. ایزوله‌های بالینی را می‌توان در محیط skim milk حاوی ۱۵٪ گلیسیرین به مدت طولانی در فریزر نگهداری نمود. از تعداد ۱۰۳ ایزوله بالینی استفاده شده در پژوهش،۵۶ عدد متعلق به گونه *Klebsiella pneumoniae*، ۴۵ عدد متعلق به گونه *E.coli* و ۲ عدد متعلق به خانواده *Enterobacter spp.* می‌باشند.

دیسک‌های مورد استفاده در پژوهش (پادتن طب، تهران، ایران) متشکل از دیسک Ceftazidim ۳۰µg، دیسک ۳۰+۱۰ µg Ceftazidime/clavulanic acid ، دیسک Cefotaxim ۳۰µg و دیسک Cefotaxim/clavulanic acid ۳۰+۱۰µg می‌باشند. محیط‌های کشت مورد استفاده در انجام پژوهش شامل محیط کلریمتریک (متشکل از آگار، گلوکز و سایر مواد غنی کننده محیط (Alzahra University-Tehran,Iran) و محیط مولر هینتون آگار (Merck Co,Germany) می‌باشند.

برای تأیید شناسایی ایزوله‌های باکتریایی از رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی مورد نیاز برای تشخیص انتروباکتریاسه ها (آزمون‌های حرکت، اندول، TSI، سیترات، متیل رد (MR) و وگس – پروسکوئر (VP)) استفاده شد. از میان روشهای مختلفی که برای تعیین ESBL هاوجود دارد روش فنوتیپی Disk diffusion پیشنهاد شده توسط CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، برای انجام پژوهش استفاده گردید.

نتایج مربوط به محیط کلریمتریک پس از گذشتن ۶-۵ ساعت ونتایج مربوط به هم محیط کلریمتریک و هم مولر هینتون آگار ۱۸-۱۶ ساعت بعد خوانده شدند. به این ترتیب که در مورد محیط کلریمتریک قطرهاله رنگی اطراف دیسک‌ها ودر مورد مولر هینتون قطر هاله مهاری یا عدم رشد، در اطراف هر دیسک، اندازه گیری شدند.

روش Disk diffusion برای تعیین ESBL ها دارای دو مرحله است که مرحله اول غربالگری و مرحله دوم تاییدی می‌باشد. برای انجام آزمون آنتی بیوگرام، ابتدا برای دست یابی به تک کلنی‌های باکتریایی با استفاده از لوپ از محیط Skim Milk حاوی ایزوله‌های بالینی بر روی محیط نوترینت اگارکشت داده و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷°C انکوبه می‌نماییم. هر دو محیط مولر هینتون آگار و کلریمتریک را به مقدار لازم تهیه و استریل نموده و در پلیت های ۱۰ میلی متری، توزیع می‌کنیم. قطر هر دو محیط در پلیت ها، باید حدود ۴ میلیمتر باشد. بعد ازگذشت یک شبانه روز و پس از رشد کلنی‌ها، برای تهیه سوسپانسیون باکتری، به کمک لوپ از قله ۳ الی ۴ کلنی باکتریایی برداشت کرده ودر لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی حل می‌نماییم وهم می‌زنیم تا کدورت آن همانند کدورت محلول نیم مک فارلند باشد.

سواپ استریل را در سوپانسیون میکروبی فرو برده و با کمک دیواره لوله آزمایش آب اضافی آن را گرفته سپس در سطح پلیت ۳ باردر حالت زاویه ۶۰ درجه نسبت به هم می‌مالیم (کشت چمنی) وسپس سواپ را دور قسمت داخلی پلیت می‌چرخانیم. این عمل را برای هر ایزوله بالینی در هردو محیط جداگانه به صورت یکسان ومشابه و همزمان انجام می‌دهیم. سپس دیسک‌های مورد نظر را با استفاده از یک پنس استریل بر روی پلیتها جای گذاری نموده وکمی فشار می‌دهیم تا به سطح محیط بچسبد. سپس پلیتها را در دمای°C ۳۷ انکوبه می‌نماییم.

در مرحله اول بر روی باکتری جدا شده از بیمار بر طبق روش Disk diffusion آزمایش آنتی بیوگرام را انجام داده و تنها از دیسک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم، استفاده گردید. در مرحله دوم که مرحله تاییدی و اصلی می‌باشد، بار دیگر آزمایش آنتی بیوگرام با استفاده از هر ۴ دیسک سفو تاکسیم، سفوتاکسیم/کلاوولانات، سفتازیدیم و سفتازیدیم/کلاوولانات انجام داده شد. تمام این مراحل با هر دو روش انتشار در مولر هینتون آگار و روش کلریمتریک به صورت همزمان ویکسان انجام گردید.

در مرحله تفسیر نتایج به منظور ردیابی سویه‌های ESBL در میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنها، به روش CLSI، دو مرحله مورد نظر قرار گرفت:

در مرحله غربالگری، پس از انجام آنتی بیوگرام، در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری در مقابل دیسک سفتازیدیم،۲۲ میلیمتر و یا کمتر، و در مقابل دیسک سفوتاکسیم، ۲۷ میلیمتر و یا کمتر باشد، احتمال تولید آنزیم‌های ESBLs، توسط باکتری

مورد نظر وجود دارد. در مرحله تاییدی که مرحله اصلی آزمایش می‌باشد، در صورتی که اختلاف هاله‌های عدم رشد بین سفتازیدیم و سفتازیدیم/کلاوولانات و همچنین سفوتاکسیم و سفوتاکسیم/کلاوولانات برابر یا بیش از ۵ میلیمتر باشد، نشانه تولید آنزیم‌های ESBLs می‌باشد (۱۷، ۱۶).

به منظور کنترل کیفی دیسک‌ها، برای کنترل منفی از سویه *Ecoli ATCC 25922* استفاده گردید که قطر هاله عدم رشد برای ترکیب آنتی بیوتیک و کلاوولانیک اسید در مقایسه با آنتی‌بیوتک به تنهایی (بدون کلاوولانیک اسید)، حداکثر ۲ میلی متر افزایش می‌یابد و به منظور کنترل مثبت نیز، سویه *Klebsiella pneumoniae ATCC 700603* مورد استفاده قرار گرفت که افزایش قطر هاله عدم رشد به میزان ≥۵mm برای ترکیب سفتازیدیم/کلاوولانات نسبت به سفتازیدیم و ≥۳mm برای دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاوولانات نسبت به سفوتاکسیم، برای آن در نظر گرفته می‌شود (۱۷، ۱۶).

یافته ها و بحث

نتایج غربالگری کلنی‌ها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود نتایج به دست آمده با هر دو روش، در توافق کامل با یکدیگر، می‌باشند.

بررسی نتایج نشان داد که روش انتشار درمحیط کلریمتریک یک روش سریع است، زیرا نتایج در مدت زمان ۶-۵ ساعت مشخص گردید. جدول شماره ۲ مقایسه کلی نتایج تست تاییدی انتشار دیسک به دو روش انتشار در مولر – هینتون آگار و کلریمتریک را نشان می‌دهد.

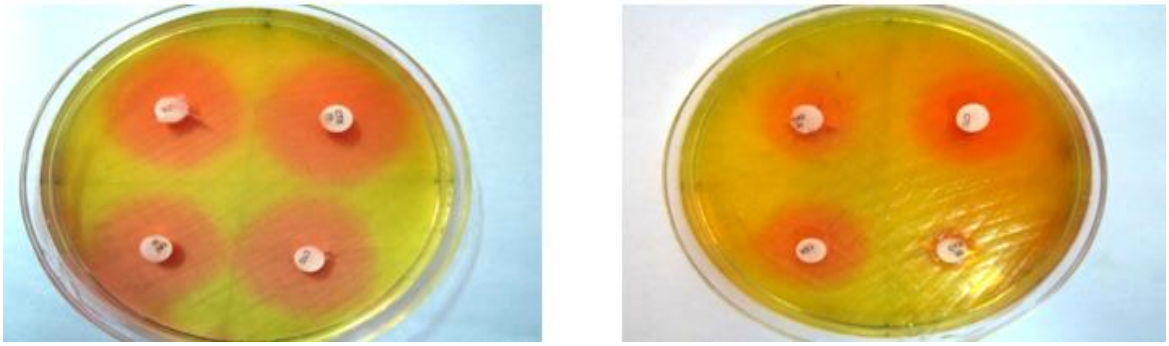
جدول ۱: نتایج غربالگری کلنی‌های به دست آمده

انتشار در محیط کلریمتریک	انتشار در مولر – هینتون آگار	تعداد و نوع ایزوله	ردیف
احتمال تولید ESBLs وجود داشت	احتمال تولید ESBLs وجود داشت	۲۸ - *E.coli*	۱
احتمال تولید ESBLs وجود نداشت	احتمال تولید ESBLs وجود نداشت	۱۷ - *E.coli*	۲
احتمال تولید ESBLs وجود داشت	احتمال تولید ESBLs وجود داشت	۲۷ - *Klebsiella pneumoniae*	۳
احتمال تولید ESBLs وجود نداشت	احتمال تولید ESBLs وجود نداشت	۲۹ - *Klebsiella pneumoniae*	۴
احتمال تولید ESBLs وجود نداشت	احتمال تولید ESBLs وجود نداشت	۲- *Enterobacter Spp.*	۵

جدول ۲: مقایسه کلی نتایج تست تاییدی انتشار دیسک به دو روش انتشار درمحیط مولر –هینتون آگار و محیط کلریمتریک

انتشار در محیط کلریمتریک		انتشار در محیط مولر- هینتون آگار		
۱۸-۱۶ ساعت	۶-۵ ساعت	۱۸-۱۶ ساعت	**تعدادایزوله**	**نوع ایزوله**
+	+	+	۲۷	*E.coli*
+	*	+	۱	*E.coli*
-	-	-	۱۴	*E.coli*
-	*	-	۳	*E.coli*
+	+	+	۲۷	*Klebsiella pneumoniae*
-	-	-	۲۹	*Klebsiella pneumoniae*
-	-	-	۲	*Enterobacter Spp.*

همانطور که در جدول مشاهده می‌شود ۴ ایزوله در روش انتشار در محیط کلریمتریک در مدت زمان ۵-۶ ساعت تشخیص داده نشده و مشاهده نتیجه انتشار دیسک و آنتی بیوگرام در آنها به مدت زمان بیشتری نیاز داشت. اشکال مربوط به نتایج محیط‌های کلریمتریک در شکل‌های ۴-۱ (A و B) نشان داده شده‌اند.



شکل ۱: شکلA (تصویرسمت راست): تست آنتی بیوگرام یک *ایزوله بالینی (Ecoli)*، ESBL مثبت، با روش انتشار دیسک درمحیط کلریمتریک در مدت زمان ۶-5 ساعت، CTC: سفوتاکسیم+کلاوولانات (بالا سمت راست)، CTX: سفوتاکسیم (پایین سمت راست) CAZ : سفتازیدیم (بالا سمت چپ)، CZA: سفتازیدیم+کلاوولانات (پایین سمت چپ) شکل B (تصویر سمت چپ): تست آنتی بیوگرام یک *ایزوله بالینی (Ecoli)* ، ESBLمنفی، با روش انتشار دیسک در محیط کلریمتریک در مدت زمان ۶-5 ساعت، CTX: سفوتاکسیم (بالاسمت راست)CTC:، سفوتاکسیم+کلاوولانات (پایین سمت راست) CZA : سفتازیدیم+کلاوولانات (بالا سمت چپ) CAZ: سفتازیدیم (پایین سمت چپ)

از آنجایی که شیوع باکتری‌های حامل ESBLs رو به افزایش می‌باشد، غربالگری و تایید حضور آنها دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد، تا بتوانیم درمانی صحیح برای عفونت‌های بیمارستانی ناشی از میکروارگانیسم‌های گرم منفی را در پیش بگیریم.

غربالگری و تأیید فنوتیپی ESBL از مقرون به صرفه‌ترین روش‌ها بوده و امروزه از روش‌هایی می‌باشند که به طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۸، ۱۷) پس لزوم طراحی محیط‌هایی که با رعایت شرایط استاندارد مولر- هینتون آگار و براساس استانداردهای CLSI (موسسه استانداردهای کلینیکی وآزمایشگاهی) که بتوانند نتایج مشابه با مولر هینتون اگار ولی در زمان سریعتر، نشان دهند، کاملاً محسوس می‌باشد.

در سال ۲۰۰۶ شرکت (Salubris Co, USA) محیط‌های رنگی تحت نام Quicolor را برای تعیین حساسیت سریع ضد میکروبی طراحی کرد، که نتایج را در ۵-۳/۵ ساعت آماده می‌کند. اساس کار آن، روش سنتی انتشار دیسک می‌باشد.

در سال ۲۰۰۷ Eric و همکارانش پژوهشی به منظور تشخیص سریع ESBL ها بر روی محیط Quicolor انجام دادند. آگار Quicolor (QC) یک محیط آگار دار رنگ‌زا بوده و در اثر فعالیت متابولیکی باکتری در مدت زمان ۶-۴ ساعت تغییر رنگ می‌دهد، QC آگار دو نوع می‌باشد؛ نوع ES آن برای تست استافیلوکوکوس ها و انتروباکتریاسه ها تعیین شده و رنگ قرمز این محیط در اثر رشد باکتری به زرد تغییر پیدا کرده و مناطق مهاری به رنگ قرمز ظاهر می‌گردد (۱۲).

نوع NF این محیط مخصوص باکتری‌های غیر تخمیری گرم منفی بوده وزرد رنگ است. این محیط در اثر رشد باکتری‌ها به رنگ قرمز تبدیل شده و هاله‌های مهاری زرد رنگ ایجاد می‌کند.

در این پژوهش محیط کلریمتریک و مولر- هینتون آگار، برای تشخیص بتالاکتاماز های وسیع الطیف (ESBL) با استفاده از دو روش Disk diffusion و E-test مقایسه گردیدند و مشخص گردید که QC آگار می‌تواند برای تشخیص سریع و اطمینان بخش ESBL در مدت زمان ۶-۴ ساعت و با استفاده از روش‌های مذکور، به کار رود (۱۲). نظر به اینکه که این نمونه‌های خارجی هزینه‌بر و گران هستند و همچنین روش‌های استاندارد مثل محیط مولر هینتون آگار که به طور معمول در آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شوند نتایج را در ۱۸-۱۶ ساعت آماده می‌کنند، نیاز مبرمی به وجود یک محیط کشت سریع داخلی وجود دارد که هم مقرون به صرفه باشد و هم اینکه از نظر کارایی با نمونه‌های خارجی و استاندارد برابری کند. بدین منظور در دانشگاه الزهرا اقدام به طراحی و ساخت یک محیط کشت کلریمتریک گردید که اساس آن رشد سریع میکروارگانیسم‌ها، تغییرات رنگی در حضور معرف مناسب و استفاده از روش سنتی انتشار دیسک می‌باشد.

در سال ۲۰۱۲، Bolandghamatpoor و همکاران طراحی محیط کلریمتریک برای تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

باکتری‌های عضو خانواده انتروباکتریاسه را در دانشگاه الزهرا، انجام دادند. این محیط نتایجی را در ۸-۶ ساعت با توافق کلی ۹۲/۳۹ درصد، نا هم خوانی عمده ۳/۵۲٪ و ناهم خوانی جزئی ۴/۰۹٪، فراهم کرد (۱۴).

در سال ۲۰۱۳ بهینه سازی محیط کلریمتریک توصیف شده در مورد بالا، توسط Sajed و همکاران در دانشگاه الزهراء، انجام گرفت. این محیط بهینه شده برای ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌های عضو خانواده انتروباکتریاسه مورد استفاده قرار گرفت که نتایجی را در مدت ۶-۴ ساعت با هم خوانی کلی ۹۳/۷۵٪، نا هم خوانی عمده ۲/۳۷۵٪ و ناهم خوانی جزئی ۳/۸۷۵٪، نشان داد (۱۵).

در واقع هدف از پژوهش حاضر، مقایسه این محیط کلریمتریک ساخته و بهینه شده در دانشگاه الزهرا با محیط مولرهینتون وهمچنین تأیید کارایی آن به عنوان یک محیط کاربردی در تعیین سریع تشخیص ESBL ها در میان اعضای خانواده Enterobacteriaceae می‌باشد.

از زمانی که اولین توصیف از ESBL های پلاسمیدی در ۱۹۸۳ مطرح گردید، ارگانیسم‌های گرم منفی تولید کننده ESBL، تهدید جدی برای بیمارانی که در بیمارستان بستری می‌شدند، بوده است، که این امر ناشی از فعالیت هیدرولیزی آن‌ها در مقابل سفالوسپورین های وسیع الطیف، که اغلب در درمان عفونت‌های کسب شده در بیمارستان، کاربرد دارند، می‌باشد.

هدف پژوهش حاضر، ارزیابی ESBL ها با یک روش آسان، سریع و ارزان می‌باشد. کاهش زمان تشخیص که از ۱۸-۱۶ ساعت به ۵-۶ ساعت می‌تواند به انتخاب سریعتر رژیم آنتی بیوتیکی مناسب منتهی گردیده در نتیجه هزینه‌های مربوط به تشخیص و درمان را کاهش دهد؛ حتی این امر می‌تواند مدت زمان بستری شدن در بیمارستان را، که یکی از عوامل مهم دخیل در ابتلا افراد به عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد، کوتاه‌تر نماید. محیط کلریمتریک قابل استفاده در پژوهش همچنین با استفاده از مواد ارزان قیمت تهیه گردیده و با توجه به نتایج به دست آمده، به دلیل توافق کامل نتایج در هر دو محیط استاندارد مولر-هینتون آگار و محیط کلریمتریک می‌توان برای تولید انبوه محیط کلریمتریک و تجاری سازی آن اقدام کرد.

همان‌طور که در نتایج مشاهده گردید، تعداد ۴ نمونه از کل ۱۰۳ نمونه مورد آزمایش نیاز به مدت زمان بیشتری برای آشکار ساختن نتایج در محیط کلریمتریک، داشتند، که ممکن است علت این امر ناشی از فرمولاسیون و مواد تشکیل دهنده محیط باشد و در پژوهش‌های بعدی شاید بتوان با بهینه سازی این محیط، این اختلاف را کاهش داده و نهایتاً از بین برد.

تقدیر و تشکر

از مسئولین محترم بخش میکروب شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و انستیتو پاستور ایران که نویسندگان را جهت تأمین نمونه‌های بالینی مورد نیاز برای انجام پژوهش یاری نمودند، قدردانی و تشکر می‌نماییم.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β-lactamases from Gram-negative bacteria. Annu Rev Microbiol. 2011; (65):455-78.

2. Zahar JR, Lortholary O, Martin C, Potel G, Plesiat P, Nordmann P. Addressing the challenge of extended-spectrum β-lactamases. Curr Opin Investig Drugs 2009; (10):172-80.

3. Carattoli A.. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2009; (53):2227-38.

4. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect. Dis 2008; (8):159–66.

5. Chaudhary U, Agarwal R. Extended spectrum-lactamases (ESBL) - an emerging threat to clinical therapeutics. Indian J Med Microbiol 2004; (22): 75–80.

6. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; (18): 657–86.

7. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: Balancing science and clinical need. J Antimicrob Chemother 2009; (63):1–4.

8. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; (54):969 –976.

9. Chaudhary U, Aggarwal R. Extended Spectrum β-Lactamases-An Emerging threat to Clinical therapeutics. Indian J Med Microbiol. 2004; (22):75–80.

10. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2006 ; (50):1257-62.

11. Kluytmans-Vandenberg MF, Kluytmans JA, Voss A. Dutch guideline for preventing nosocomial transmission of highly resistantmicro-organisms (HRMO). Infection 2005; (33):309–313.

12. Eric S, Sanack B, Kocagoz T, Kocagoz S, Hascelik G. Rapid 4 to 6 hour detection of extended-spectrum beta-lactamases in a routine laboratory. Scand J Infect Dis 2007; (39): 781_785.

13. Kocagoz T, Ercis S, Darka O, Salmanzadeh-Ahrabi S, Kocagoz S, Hasc¸elik G. Quicolor: a novel system for rapidantibacterial susceptibility testing. Ann Microbiol 2007; (57):131_135.

14. Bolandghamatpoor Z, Abdi-Ali A, Salmanzadeh Ahrabi S. Design and Evaluation Rapid Antibacterial Susceptibility Testing for Enterobacteriaceae. Journal of Applied Biologiy of Alzahra University (Tehran, Iran) 2014 Winter; (26):1-8.

15. Sajed R. Optimization of the colorimetric medium for antibacterial susceptibility test. M.Sc.Thesis. Alzahra University (Tehran, Iran) 2013.

16. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial susceptibilityTesting"; 15th Informational Supplement M100-S22 CLSI. Wayne, PA, USA 2012.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial susceptibilityTesting. 15th Informational Supplement M100-S23 CLSI, Wayne, PA, USA 2013.

18. Ho PL, Ho AY, Chow KH, Wong RC, Duan RS, Ho WL and et al. Occurrence and molecular analysis of extendedspectrumbeta-lactamase-producing Proteus mirabilis inHong Kong, 1999_2002. J Antimicrob Chemother 2005 (55):/840_45.

19. Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of 4 commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. J Clin Microbiol 2005; (43):1081_1085.