تعیین ارتباط بین قطر هاله ممانعت از رشد و میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد[1] در سویه‌های نایسریا گونوره[2] ایزوله شده در شهرستان اراک

احسان‌اله غزنوی راد[3]، دکتر سیدعلی فاضلی[4]، دکتر رحمت‌اله یزدانی[5]، محمد رفیعی[6]، دکتر علی جورابچی[7]

چکیده:

مقدمه: نایسریاگونوره، دیپلوکوک گرم منفی از خانواده نایسریاسه و عامل بیماری مقاربتی سوزاک در انسان است. کشت و آنتی‌بیوگرام از این باکتری کمتر در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی صورت گرفته و تعیین میزان MIC در این باکتری فقط در آزمایشگاه‌های مرجع صورت می‌گیرد. هدف از این تحقیق ارائه ارتباطی است که در جامعه مورد مطالعه، مقادیر MIC، آسانتر و بدون انجام آزمایشات تکنیکی پیچیده در دسترس پزشکان قرار گیرد.

روش کار: در این مطالعه بر روی ۵۰ نایسریاگونوره جدا شده از بیماران مبتلا به سوزاک، تست آنتی‌بیوگرام صورت گرفت و برای هر دیسک آنتی‌بیوتیک قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید. سپس بر مبنای دستورالعمل‌های NCCL[8] برای چهار آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین[9]، تتراسیکلین[10]، اسپکتینومایسین[11] و سفتریاکسون[12]، مقادیر MIC اندازه‌گیری شده و بین قطر هاله عدم رشد به عنوان متغیر مستقل و مقادیر MIC به عنوان متغیر وابسته رگرسیون خطی ایجاد گردید.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد که در هر چهار مورد، ارتباط بین مقادیر قطر هاله و MIC به‌صورت منفی (معکوس) است و ضریب رگرسونی برای ۳ آنتی‌بیوتیک اول با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۰۱ و برای آنتی‌بیوتیک چهارم با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱، معنی‌دار می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از MIC و مقدار هاله ممانعت از رشد با همدیگر مطابقت کامل داشته (رابطه خطی) و بنابراین با میزان خطای حداقل (صفر تا ۴ رقم اعشار) می‌توان تأثیر متقابل قطر هاله و میزان MIC را در جامعه مورد مطالعه تخمین زد.

واژگان کلیدی: نایسریاگونوره، قطر هاله ممانعت از رشد، حداقل غلظت بازدارندگی رشد.

مقدمه

نایسریاگونوره، دیپلوکوک گرم منفی از خانواده نایسریاسه و عامل بیماری مقاربتی سوزاک در انسان است. تشخیص این بیماری معمولاً از روی رنگ‌آمیزی لام به‌دست آمده از ترشحات، صورت می‌گیرد و درمان این بیماری معمولاً بر پایه‌های اپیدمیولوژیک استوار است تحقیق نشان می‌دهد که اسپکتینومایسین، سفتریاکسون یا سیپروفلوکساسین به عنوان درمانهای اصلی آن می‌باشند(۱). هنوز اطلاع دقیقی در مورد میزان MIC داروها در برابر سویه‌های موجود در جامعه وجود ندارد، زیرا کشت این باکتری در آزمایشگاههای تشخیص طبی متداول نبوده و تعیین میزان MIC آن نیز در آزمایشگاه

1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC).
2. Niesseria gonarrhoeae.

۳ـ عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک.
۴ و ۵ـ استادیار گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.
۶ـ عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک.
۷ـ متخصص بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک.

8. National commity for clinical laboratory.
9. penicillin.
10. tetracycline.
11. spectinomycine.
12. ceftriaxone.

Scanned with CamScanner

مرجع صورت می‌گیرد. حال اگر بتوان رابطه‌ای بین نتایج دو آزمون آنتی بیوگرام و تعیین میزان MIC پیدا کرد، امکان تخمین مقدار MIC تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها به راحتی و همزمان میسر می‌گردد که این امر در مورد باکتری‌هایی مثل سودوموناس(۲) در ایران و در مورد نایسریا گونوره در کشور سوئد(۳) صورت پذیرفته است. در بررسی شهر زادنیادر سال ۱۳۵۳ (۴) ۱۰۰٪ موارد به پنی‌سیلین حساس و میزان MIC آنها ۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است. ولی در بررسی ابراهیمی‌راد در تهران در سال ۱۳۷۱ موارد مقاوم ۶۱/۴٪ کل نمونه‌ها را شامل گردیده که میزان MIC آنها بالاتر از ۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است(۵).

در مورد تتراسیکلین نیز در سال ۱۳۷۱ در تهران ۹٪ نمونه‌های ایزوله شده، بزرگتر یا مساوی ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (یعنی مقاوم) گردیده‌اند(۶).

در مورد اسپکتینومایسین در تهران در سال ۱۳۷۱ میزان موارد مقاوم که دارای MIC بزرگتر از ۰/۱۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بودند، ۳۴٪ گزارش گردیده است(۵) و این درحالی است که در سال ۱۹۹۹ در کشور استرالیا مقاومتی نسبت به اسپکتینومایسین مشاهده نشده است(۶).

در مورد سفتریاکسون نیز در کشور هنگ‌کنگ طی سال‌های ۹۰-۱۹۸۷ همه موارد حساس (MIC≤۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بوده(۷) و در سال ۱۹۹۴، نیز در کشور فیلیپین MIC همه موارد ایزوله شده کمتر از ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده(۸) ولی درسال ۱۹۹۶ در آرژانتین ۵ درصد سویه‌ها دارای MIC بیشتر از ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده‌اند(۹) و در سال ۱۹۹۶ نیز در کشور استرالیا نایسیریا گونوره با میزان MIC بیشتر از ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر یافت نگردید (۶).

هدف از این تحقیق ارائه ارتباطی است که در جامعه مورد مطالعه، مقادیر MIC آسان‌تر و بدون انجام آزمایشات تکنیکی پیچیده در اختیار پزشکان قرار گیرد.

روش کار

پس از جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های بالینی تست آنتی‌بیوگرام به روش کربی‌باثر[1] و بر روی محیط جی. سی آگار[2] صورت گرفت(۱۰) و در هر مورد قطر هاله ممانعت از رشد دقیقاً اندازه‌گیری و ثبت گردید. سپس نمونه‌های ایزوله شده در سوکروز ۲۰٪، گلیسرول و محیط بی.اچ.ای.بی[3] در ۷۰ درجه سانتیگراد در ظروف در پیچ‌دار نگهداری شدند(۱۱).

اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی رشد نیز به روش رفت در آگار (۱۱)صورت گرفت و سعی گردید که نمونه‌ها بیش از ۶ ماه در استوک نگهداری نشوند و هنگام خارج نمودن آنها از استوک ابتدا آنها را در محیط جی. سی آگار حاوی ۱٪ ایزوویتالکس[4] و در اتمسفر حاوی دی‌اکسیدکربن به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه کرده و بعد از رشد بر روی این محیط، به محیط مایع مولرهینتون برات[5] منتقل کرده تا کدورتی معادل لوله نیم‌مک‌فارلن[6] تهیه گردد.

جهت تهیه محیط‌های پایه نیز ابتدا پودرهای آنتی‌بیوتیکی سفتریاکسون، پنی‌سیلین، تتراسیکلین و اسپکتینومایسین تهیه گردیده و در حلال خود حل شد و بعد به محیط جی. سی آگار با غلظت ۲ برابر حاوی پودر هموگلوبین و مکمل شماره ۲ تایرمارتین اضافه شدند و بعد در پلیت تقسیم گردیدند (۱۱). نکته مهم دیگر اینکه محدودهٔ غلظت‌های تهیه شده برای هر آنتی‌بیوتیک بر مبنای دستورالعمل‌های کمیته ملی آزمایشگاه‌های بالینی تهیه شده‌اند(۱۲).

در نهایت با لوپ ۰/۰۰۲ دو میکرولیتر از لوله نیم مک‌فارلن به پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک اضافه گردیده و بعد از خشک شدن نمونه‌های تلقیحی پلیت‌ها را در انکوباتور تحت شرایط دارای دی‌اکسیدکربن به مدت ۲۴ ساعت انکوبه

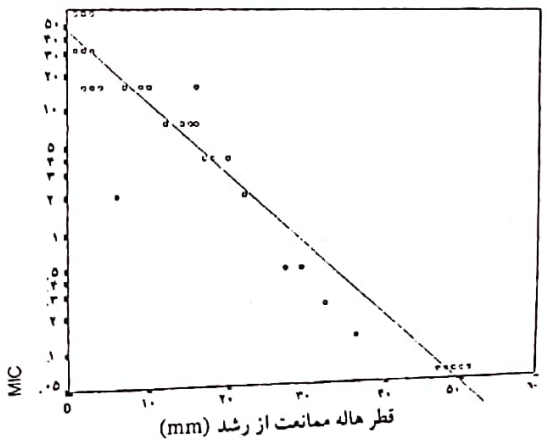
1. Kirby Bauer.
2. G.C Agar.
3. Brain Heart Infusion Broth.
4. Isovitalex.
5. Moller Hinton.
6. M.C. Farlen.

Scanned with CamScanner

کرده و کمترین غلظت آنتی‌بیوتیک که حتی امکان رشد یک کلنی را هم نمی‌دهد تحت عنوان MIC تلقی گردید (۱۳). سپس با استفاده از مقادیر هاله عدم رشد (قطر) به عنوان متغیر مستقل و مقادیر MIC به عنوان متغیر وابسته رگرسیون خطی ایجاد شد که از این معادله خط می‌توان به نحوه و چگونگی ارتباط بین MIC و قطر هاله پی برد و همچنین براساس این ارتباط می‌توان به ازاء مقادیر متغیر مستقل هاله عدم رشد، مقدار MIC را پیش‌بینی نمود.

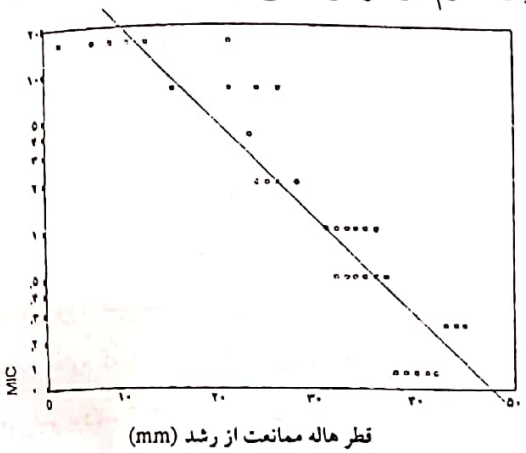
نتایج

برمبنای دستورالعمل Nccl برای چهار آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، تتراسیکلین، اسپکتینومایسین و سفتریاکسون مقادیر MIC اندازه‌گیری گردید. معادله رگرسیونی در نمودار ۱ به‌صورت y=۳۱/۹۳-۰/۶۱۱X بیان می‌گردد که در آن y مقادیر MIC و X مقادیر قطر هاله می‌باشد. در این نمودار برای پنی‌سیلین قطر هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۲۶ میلی‌متر به عنوان مقاوم و بین ۲۷ تا ۴۶ میلی‌متر به‌عنوان نیمه حساس و بزرگتر یا مساوی ۴۷ میلی‌متر به عنوان حساس درنظر گرفته می‌شود. مقدار MIC نیز اگر کمتر یا مساوی ۰/۵۶ میکروگرم در هر میلی‌لیتر باشد به عنوان حساس و بزرگتر یا مساوی ۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به‌عنوان مقاوم درنظر گرفته می‌شود.



نمودار ۱: رگرسیون برای دیسک ۱۰ واحدی پنی‌سیلین که مقادیر قطر هاله عدم رشد و MIC را باهم مقایسه می‌کند

معادلهٔ رگرسیونی در نمودار ۲ به‌صورت y=۳۶/۵۲-۱/۷۸X بیان می‌گردد که در آن y مقادیر MIC و X مقادیر قطر هاله می‌باشد. در این نمودار برای تتراسیکلین قطر هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۳۰ میلی‌متر مقاوم و بین ۳۱ تا ۳۷ میلی‌متر به عنوان نیمه حساس و بزرگتر یا مساوی ۳۸ میلی‌متر به‌عنوان حساس در نظر گرفته می‌شود. مقدار MIC نیز اگر کمتر یا مساوی ۰/۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر باشد به عنوان حساس و بزرگتر یا مساوی ۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به‌عنوان مقاوم درنظر گرفته می‌شود.

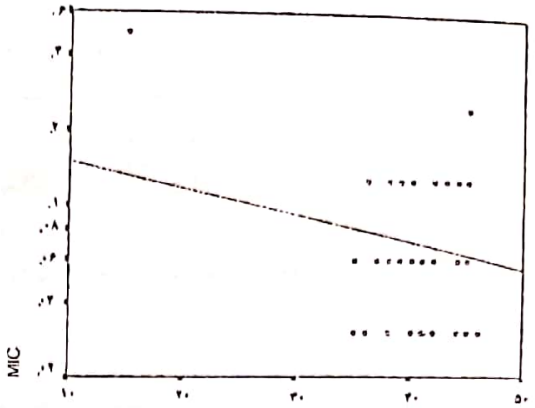


نمودار ۲: رگرسیون برای دیسک ۳۰ میکروگرمی تتراسیکلین که مقادیر قطر هاله عدم رشد و MIC را باهم مقایسه می‌کند

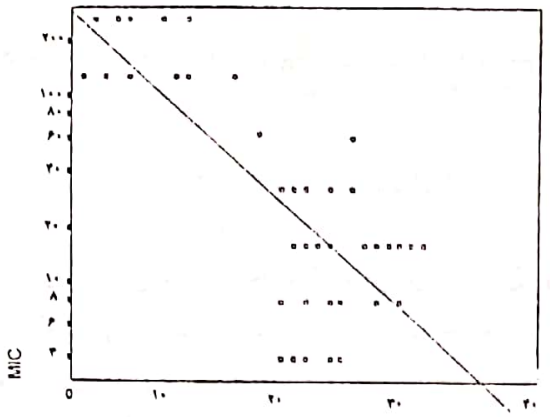
معادلهٔ رگرسیون در نمودار ۳ به‌صورت y= ۲۳-۰/۵۷X بیان می‌شود که در آن y مقادیر MIC و X مقادیر قطر هاله می‌باشد. در این نمودار قطر هاله عدم رشد بزرگتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر به‌عنوان مقاوم و بین ۱۵ تا ۱۷ میلی‌متر به‌عنوان نیمه‌حساس و بزرگتر یا مساوی ۱۸ میلی‌متر به‌عنوان حساس درنظر گرفته شده است. مقدار MIC نیز اگر کمتر یا مساوی ۳۲ میکروگرم در هر میلی‌متر باشد به‌عنوان حساس و بزرگتر یا مساوی ۱۲۸ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به‌عنوان مقاوم درنظر گرفته می‌شود.

معادله رگرسیونی در نمودار ۴ به‌صورت y= ۴۳-۲۴/۹۵X بیان می‌شود که در آن y مقادیر MIC و X مقادیر قطر هاله می‌باشد. در این نمودار قطر هاله بزرگتر یا مساوی ۳۵ میلی‌متر به‌عنوان حساس و مقادیر MIC کوچکتر یا مساوی ۰/۲۵

Scanned with CamScanner



نمودار۳: رگرسیون برای دیسک ۱۰۰ واحدی اسپکتینومایسین که مقادیر قطر هاله عدم رشد و MIC را باهم مقایسه می‌کند



نمودار ۴: رگرسیون برای دیسک ۱۰۰ میکروگرمی سفتریاکسون که مقادیر قطر هاله عدم رشد و MIC را باهم مقایسه می‌کند

میکروگرم در هر میلی‌لیتر به‌عنوان حساس در نظر گرفته می‌شود. ضریب رگرسیونی نیز در مورد سه آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، تتراسیکلین، اسپکتینومایسین) با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۰۱ و برای آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱ معنی‌دار می‌باشد. بدین ترتیب که با احتمال کمتر از ۰/۰۰۰۱ برای ۳ آنتی‌بیوتیک اول و ۰/۰۰۱ برای سفتریاکسون می‌توان تأثیر متقابل قطر هاله و میزان MIC را در جامعه مشابه تخمین زد.

بحث

باتوجه به چهار نمودار فوق مشخص می‌گردد که ارتباط بین قطر هاله و میزان MIC در هر چهار آنتی‌بیوتیک منفی است. یعنی هرچه میزان قطر هاله کمتر باشد، میزان MIC بیشتر می‌گردد. در مطالعه مشابهی که بر روی باکتری سودوموناس در دانشگاه علوم پزشکی سمنان صورت گرفته، بین مقادیر MIC تعیین شده برحسب میکروگرم و قطر هاله ممانعت از رشد در آنتی‌بیوگرام برحسب میلی‌متر یک رابطه کاملاً خطی وجود داشته است(۳). همچنین مطالعه دیگری نیز در کشور سوئد بر روی باکتری نایسریا گونوره نشان داد که با استفاده از آنالیز رگرسیون بین مقادیر MIC و قطر هاله عدم رشد می‌توان مقادیر MIC را با پایین‌ترین میزان خطا به‌دست آورد(۴). در مطالعه دیگری که توسط شانون[1] و همکاران به‌طور همزمان در ایالات متحده و آسیای جنوب شرقی صورت گرفت بعد از ایجاد رگرسیون بین مقادیر MIC و قطر هاله عدم رشد، مشخص گردید که نمونه‌های جدا شده از آسیای جنوب شرقی دارای قطر هاله عدم رشد کوچکتر و میزان MIC بالاتری می‌باشند(۱۱). بنابراین اگر آزمون سنجش حساسیت باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوگرام به روش کربی‌باثر به صورت دقیق و با رعایت استانداردها انجام گردد و نتایج آن‌هم به‌صورت کمی گزارش شود می‌توان کمترین مقدار ماده ضدمیکروبی که برای متوقف کردن رشد باکتری عفونت‌زا در شرایط آزمایشگاهی لازم است را نیز تخمین زد و با استوار کردن درمان ضدمیکروبی براساس تعیین مقدار MIC فرکانس پیدایش و انتشار مقاومت ضدمیکروبی را تا حدی تقلیل داد.

ضمناً با مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج به‌دست آمده در آسیای جنوب شرقی درمی‌یابیم که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جامعه مورد مطالعه با الگوی مقاومت در آسیای جنوب شرقی مبتنی بر میزان بالای مقاومت مطابقت دارد که دلائل آن شاید در دسترس بودن و مصرف رایج آنتی‌بیوتیک در بین مردم باشد. همچنین ناآگاهی و وضعیت خاص اجتماعی این بیماری نیز سبب درمان خودسرانه این بیماران می‌گردد که این امر نیز در بروز موارد بالای مقاومت مؤثر است. از طرفی بروز مقاومت کمتر در کشورهایی مانند

1. Shanon.

Scanned with CamScanner

آمریکا و استرالیا به‌علت وجود پیگیری‌های مداوم و مستمر افراد بیمار می‌باشد به‌طوری‌که در آمریکا طبق الگوی برنامه کنترل گونوکوک[1] و در استرالیا طبق الگوی برنامه کنترل گونوکوک استرالیا[2] بیماران با تشخیص گونوره، باید ۱۰ روز پس از درمان آنتی‌بیوتیکی تحت آزمایش قرار گرفته تا از درمان کامل آنها اطمینان حاصل گردد ولی در جامعه مورد مطالعه به علت عدم‌وجودپیگیری‌های فوق ممکن‌است بیماران با فروکش کردن علائم بیماری به فرم مزمن مبتلا گشته و چنین افرادی در اشاعه بیماری در سطح جامعه نقش مؤثری دارند.

پیشنهاد می‌گردد که مراکزی جهت مطالعه، بررسی و پیگیری بیماران مبتلا به بیماری‌های مقاربتی تأسیس گردد تا بتوان با اطلاعات به‌دست آمده، اقدامات مناسبی را در زمینه کنترل این بیماریها انجام داد.

سپاسگزاری

در خاتمه از زحمات همکارانی که در زمینه تهیه نمونه و انجام آزمایشات با اینجانب همکاری ارزنده‌ای داشته‌اند، آقای مجتبی سلطان‌محمد، آقای احمد صاحب‌الزمانی، آقای ایرج ارباب‌زاده، آقای مؤمنی، آقای محمدعلی بابائی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. King K.H., Stephen A.M., Gonococal infection. In: Fauci, Isselberg, Wilson, Principle internal medicine, Mc Grow Hill Company, USA, 1998: 915-36.

۲- شعبانی ع. بابائی غ. تطابق و هم‌خوانی نتایج حاصل از MIC و MBC به‌صورت لوله و میکروتیتر با نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام. چهارمین کنگره میکروب‌شناسی با گرایش باکتری، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، ۱۷-۱۵، آبان ۱۳۸۰.

3. Ringertz S., Rylander M., Kronvall G., Disk diffusion method for susceptibility testing of Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbiol., 1991; 129: 1604-9.

۴- شهرادنیا م. مطالعه گونوکوک و بررسی حساسیت سویه‌های ایزوله شده نسبت به آنتی‌بیوتیک و سولفانامید، پایان‌نامه در رشته پاتوبیولوژی دانشکدهٔ بهداشت، دانشگاه تهران، ۱۳۵۳.

۵- ابراهیم‌راد م. بررسی سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین در شهر تهران، پایان‌نامه در رشته باکتری‌شناسی پزشکی دانشکدهٔ بهداشت، دانشگاه تهران، ۷۲-۱۳۷۱.

6. Australian Gonococcal Surveillance Programme. Annual report of the Australian Gonococcal Surveillance Programme, 1999; CDI 2000: 24: 113-17

7. Kam K.M., Iaj C.F., Egglestone S. and et al, Pattern of antibiotic susceptibel of gonococci isolated in Hong Kong 1987-90. Sex Trans. Dis., 1992; 19 (5): 28.

8. Clendeman J.F., Kabrerra G., Wignall F.S. In vitro antibiotic susceptibility of Neisseria gonorrhoeae isolated in Phillipine. Genitourin Med., 1994; 87 (4): 22.

9. Castello M.C., Seab O.A., Agar dilution method for susceptibility testing of N-gonorrhoeae. Mem. Inst. Oswaldo Craz, 1996; 91 (6): 789-93.

10. Scott A.c., Laboratory control of antimicrobial therapy. In: Cdli Jc. Practi medical microbiolog. from: churchill Livingstone, Singapoor, 1989; 8: 161-168.

11. Shannon O.p., Bruces M., John R.S., et al, Evaluation of the standardize disk diffusion and agar dilution antibiotic susceptibility test method by using strain of Neisseria gonorrhoeae from the United State and Southeast, Asia. J. Chin. Microb, 1992; 4: 974-80.

12. National committee from clinical laboratory method 1994. Approved (M7-A3), standard methods for dilation antimicrobial susceptibility test for bacteria the grow aerobically and Acceptable zone diameter (mm) quality control limit for N. gonorrhoeae and minimum inhibitory concentration (MIC) standard for Neisseria gonarrhoeae.

13. Stratton C.W., Cooksey R.C., Suceptibility test: special test. In: Bdows Hausler Wg, Herman KL. Manual of clinical microbiology. secand ed; Washington DC, American Society for Microbiology, 1991: 1153-6.

6. Gonorrhoeae Antibiotic sensitivities 1999: QRS 2000 No. 16 Feature Article.

1. Gonococeal Isolate Surveillance Program.
2. Australlian Gonococcal Sarveillance Program.

Scanned with CamScanner