تعیین حداقل میزان قابل جستجوی آنتی‌بیوتیکها با به‌کارگیری دو روش استفاده از سواب و دیسک و روش کروماتوگرافی لایه نازک همراه با بیواتوگرافی

دکتر مینا رستمی‌بشمن[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۱، ۲۴-۲۱، (۱۳۸۰)

در این مطالعه با به‌کارگیری روش کروماتوگرافی لایه نازک همراه با بیواتوگرافی (TLCB) همراه با ارزیابی منحنیهای استاندارد مربوطه، ۱۹ گروه آنتی‌بیوتیکی مختلف مورد جداسازی و تشخیص قرار گرفتند. حساسیت روشها و مقدار دارو از طریق اندازه‌گیری حداقل میزان قابل جستجو (MDC_s) (میلی‌لیتر/میکروگرم)، میزان حلقه ممانعت از رشد (Z) (سانتیمتر) و مقدار حرکت دارو از مبدا سیلیکاژل (RF) (سانتیمتر) تعیین می‌گردد. یک تکه کوچک از آگار از منطقه شفاف مربوط به آخرین MDC_s را در روش دیسک انتخاب کرده و روی صفحات سیلیکاژل قرار داده، بعد از اینکه کاملاً خشک شد، صفحات را در حلال کلرور آمونیوم با گرادیانهای غلظتی (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) قرار داده شد. RF و MDC_s را در این روش اندازه‌گیری کرده و از روی MDC_s مقادیر و غلظتهای داروی مورد آزمایش بعد از مقایسه با استاندارد مربوطه‌اش معلوم می‌گردد. باکتری مورد آزمایش ATCC 6633, Bacillus Subtilis و محیط کشت AM5 (Difco) بودند که محیط کشت در دو لایه ریخته می‌شد. نتایج نشان می‌دهد که هر چقدر MDC_s پایینتر باشد میزان حلقه ممانعت از رشد کمتر می‌گردد و روش حساستر است. در روش دیسک میزان MDC_s پایینتر و میزان حلقه ممانعت از رشد کمتر گردیده است. برای مثال در پنی‌سیلین جی (PCG) میزان MDC_s و Z به‌ترتیب ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر/مایکروگرم و ۱۳/۶ سانتیمتر بوده است و این مقادیر در روش TLCB به‌ترتیب ۲۵ میلی‌لیتر/مایکروگرم و ۲۵ سانتیمتر گردیده است. بنابراین استفاده از روش TLCB همراه با روش دیسک نتایج بسیار رضایتبخشی می‌دهد.

واژه‌های کلیدی : آنتی‌بیوتیکها، سواب، کروماتوگرافی، بیواتوگرافی.

آنتی‌بیوتیکها به‌طور عمده از طریق ممانعت از سنتز پروتئینها در میکروارگانیسمهای حساس به آنها عمل می‌کنند و به‌طور وسیعی در پیشگیری و درمان بیماریهای عفونی به‌کار برده می‌شوند.

به‌هرحال کاملاً محرض شده است که‌داروهابیشترین‌و طولانی‌ترین باقیماندگی را در کلیه دارند بنابراین بررسی روشهای تجربی در تعیین باقیمانده داروها با به‌کارگیری منحنیهای استاندارد آنتی‌بیوتیکی مربوطه بسیار زیاد شده است.

به‌طور کلی روشهای تعیین باقیمانده آنتی‌بیوتیکی با به‌کارگیری آزمایشات سریع میکروبیولوژی برروی صفحات سیلیکاژل روش کروماتوگرافی با لایه نازک بیواتوگرافی (TLCB) قابل دسترسی‌اند (۴ و ۱).

آزمایشات میکروبیولوژیکی برای تعیین آنتی‌بیوتیکها معمولاً به روش کاپ و سواب و دیسک انجام می‌گیرند که ممکن است درصد خطای بیشتری داشته باشند. با به‌کارگیری محیطهای کشت اختصاصیتر و تغییر ترکیب محیط کشت به یک محیط مناسبتر و انتخاب باکتری حساستر به دارو، pH دلخواه و مقدار کشت باکتری از میزان خطا کاسته می‌شود. همه اینها با انجام آزمایشات مکرر حداقل سه بار و گرفتن میانگین آنها و بالاخره کسب مهارت لازم آزمایشگاهی قابل دسترسی است.

مواد و روش کار

این مطالعه جهت تعیین تجربی حداقل میزان قابل جستجوی آنتی‌بیوتیکها با به‌کارگیری روش کروماتوگرافی با لایه نازک - بیواتوگرافی و روش میکروبیولوژی سواب - دیسک انجام گرفت.

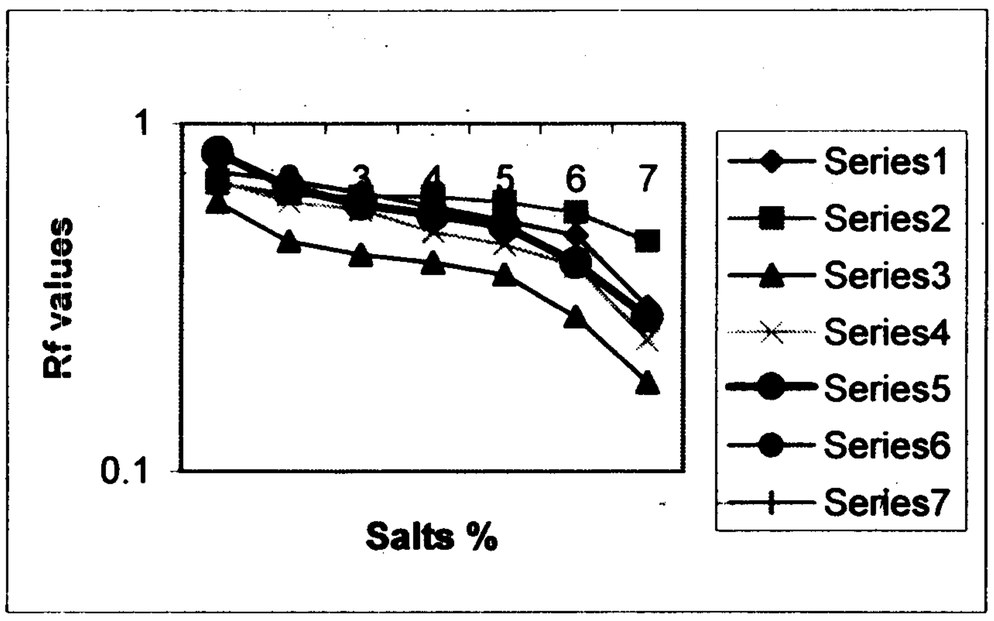
شرایط کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس ATCC 6633 عبارت‌اند از میزان تلقیح برابر میکروگرم ۲×۱۰^{۵} در ۸ میلی‌لیتر از محیط کشت AM5 (Difco) که در دو لایه داخل بوات ریخته شده بود. میزان pH=۷/۹ و درجه حرارت کشت باکتری ۳۰ درجه سانتیگراد بود.

روش کار : ۱ - روش سواب و دیسک : در این روش سوابها و یا دیسکهای استریل آغشته به استانداردهای آنتی‌بیوتیکی مختلف برروی محیطهای کشت دو لایه به آرامی قرار داده می‌شدند. بعد از ۲۴ ساعت که در اتوو ۳۰ درجه قرار داده می‌شدند نتایج خوانده می‌شود. ۲ - روش کروماتوگرافی لایه نازک - بیواتوگرافی : صفحات سیلیکاژل به‌صورت نوارهای باریک ۲ سانتیمتری بریده می‌شدند. پلیتهای بزرگ مستطیلی شکل استریل که در آنها باکتری به روش پورپلیت کشت داده شده بود تهیه می‌گردیدند. پس از بستن آگار محیط صفحات سیلیکاژل آماده شده از قبل که آنتی‌بیوتیک به کمک حلال مناسب برروی آن حرکت داده شده بود، به مدت نیم ساعت صفحات سیلیکاژل را روی سطح محیط قرار می‌دادیم.

لازم به تذکر است که صفحات سیلیکاژل می‌بایستی کاملاً به کمک سشوار گرم خشک شده باشند زیرا وجود حتی مقدار بسیار ناچیز حلال برروی صفحات می‌تواند نتایج کروماتوگرافی را غیرقابل استفاده نماید. پلیتها را پس از برداشتن صفحات به مدت ۲۴ ساعت در اتوو ۳۰ درجه داده و نتایج حاصله از ایجاد زون برروی محیط کشت باکتری قرائت می‌گردد.

نتایج

نتایج نشان می‌دهد که این روشها کاملاً اصولی‌اند. جدول ۱ نتایج TLCB، در رابطه با نتایج حاصل از تغییرات غلظتی حلال آمونیوم کلراید (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) در مورد ۵ دسته مختلف آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهد. هر دسته منحنی خاص خودش را ایجاد می‌کند (نمودار ۱ تا ۵).

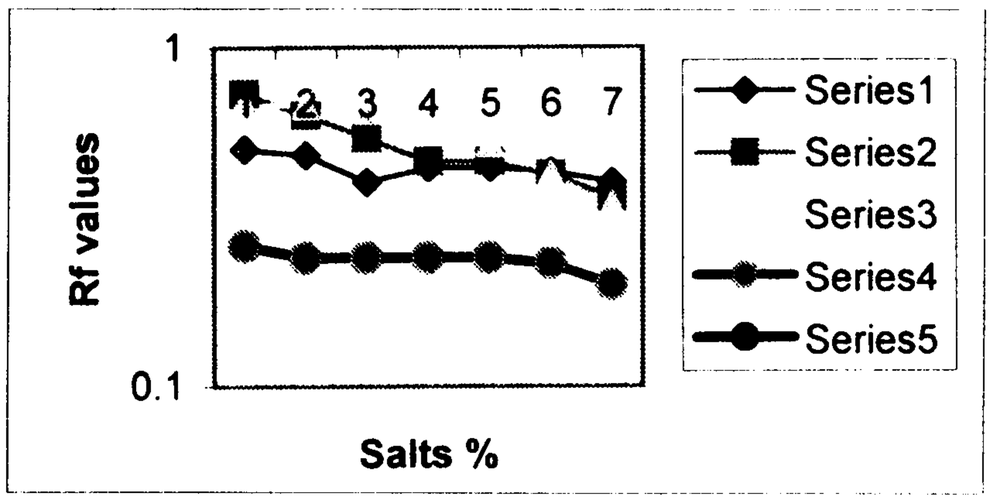


نمودار ۱ - منحنی دسته بتالاکتام‌ها

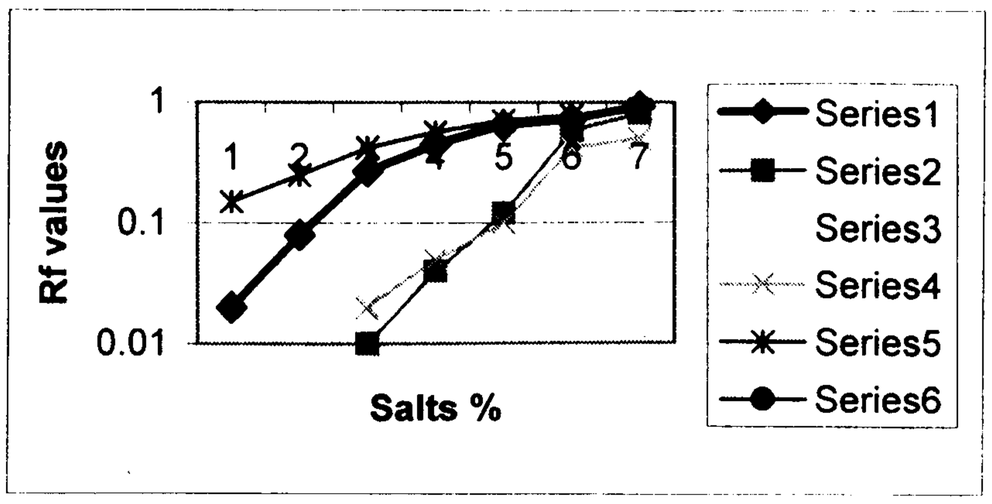
۱) گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

جدول ۱ - نتایج حاصله از .TLC Bioautog در مورد ۵ دسته مختلف آنتی‌بیوتیکی در رابطه با تغییرات غلظتی آمونیوم کلراید

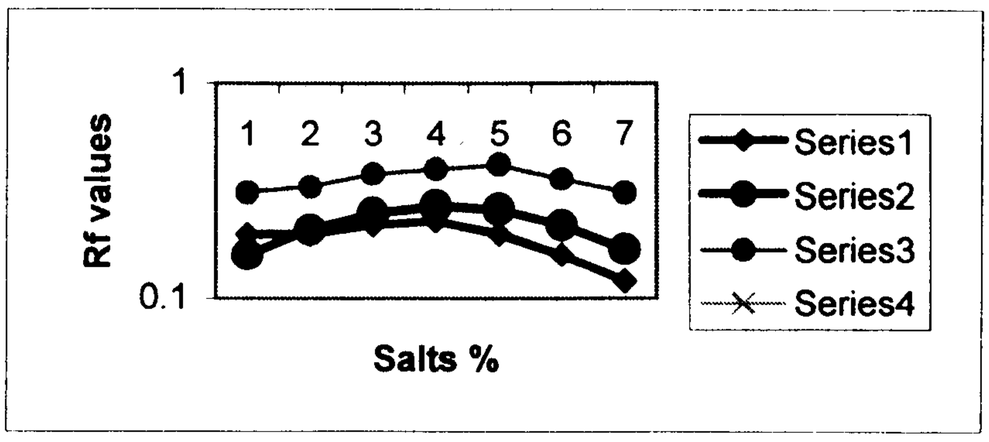
خانواده	آنتی‌بیوتیکها	تغییرات غلظتی NHCL (٪)						
		۰/۵	۱	۲	۳	۵	۱۰	۲۰
پنی‌سیلین‌ها	پنی‌سیلین جی	۰/۷۳	۰/۶۹	۰/۶۴	۰/۵۸	۰/۵۳	۰/۴۸	۰/۳۰
	آمپی‌سیلین	۰/۶۸	۰/۶۳	۰/۶۲	۰/۶۲	۰/۶۰	۰/۵۶	۰/۴۶
	نفسیلین	۰/۶۰	۰/۴۶	۰/۴۲	۰/۴۰	۰/۳۰	۰/۲۸	۰/۱۸
	دیکلوکساسیلین	۰/۶۹	۰/۶۰	۰/۵۷	۰/۴۹	۰/۴۵	۰/۳۹	۰/۲۴
	کلوکساسیلین	۰/۸۳	۰/۶۶	۰/۵۹	۰/۵۵	۰/۵۱	۰/۴۰	۰/۲۸
سفالوسپورین‌ها	سفالودین	۰/۲۶	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۳	۰/۲۰
	سفالوتین	۰/۷۳	۰/۶۳	۰/۵۴	۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۴۲	۰/۳۶
	سفالوگلیسین	۰/۶۳	۰/۶۷	۰/۶۵	۰/۶۰	۰/۵۲	۰/۴۲	۰/۳۴
	استرپتومایسین	۰/۵۰	۰/۴۸	۰/۴۶	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۳	۰/۴۰
	دی‌هیدرواسترپتومایسین	۰/۰۲	۰/۰۸	۰/۲۳	۰/۳۸	۰/۶۲	۰/۸۴	۰/۹۴
آمینوگلیکوزیدها	استرپتومایسین	۰/۰۲	۰/۰۸	۰/۲۷	۰/۴۵	۰/۶۴	۰/۷۲	۰/۹۲
	کانامایسین	۰	۰	۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۱۲	۰/۵۸	۰/۸۰
	فراجیومایسین	۰	۰	۰	۰	۰/۰۲	ND	ND
	جنتامایسین	۰	۰	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۱۰	۰/۴۲	۰/۵۰
	اسپکتینومایسین	۰/۱۵	۰/۲۵	۰/۴۲	۰/۵۰	۰/۷۰	۰/۷۸	۰/۸۷
ماکرولیدها	تایلوزین	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۲۰	۰/۱۶	۰/۱۲
	اولئومایسین	۰/۱۶	۰/۲۱	۰/۲۵	۰/۲۷	۰/۲۶	۰/۲۲	۰/۱۷
	لینکومایسین	۰/۳۱	۰/۳۳	۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۴۲	۰/۳۶	۰/۳۱
تتراسایکلین‌ها	تتراسایکلین	۰/۱۸	۰/۲۰	۰/۲۲	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۳۲	۰/۳۴
	کلروتتراسایکلین	۰/۱۳	۰/۱۶	۰/۱۸	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۲۲	۰/۲۸
	اکسی‌تتراسایکلین	۰/۱۳	۰/۱۸	۰/۲۲	۰/۲۶	۰/۳۰	۰/۳۴	۰/۴۰
	کلرامفنیکل	۰/۶۰	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۷۳	۰/۸۴	۰/۸۴
	تری‌متوپریم	۰/۳۰	۰/۳۳	۰/۴۰	۰/۴۴	۰/۴۶	۰/۴۹	۰/۴۲
سولفازیدها	سولفامتازین	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۱	۰/۳۸	۰/۳۵	۰/۳۳	۰/۲۹
	سولفاگوانیدین	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳
	سولفادیازین	۰/۶۶	۰/۶۵	۰/۶۰	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۱	۰/۴۷
	سولفاپیریدین	۰/۵۵	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۱	۰/۵۱	۰/۴۸	۰/۴۴
نالیدیکسیک‌ها	نالیدیکسیک اسید	۰/۳۳	۰/۳۱	۰/۳۰	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۲۱
	اکسولینیک اسید	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴
پلی‌پپتیدها	ویرجینیامایسین	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵
	باسیتراسین	۰/۳۰	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱
	انرامایسین	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳
نیتروفوران‌ها	فورازولیدون	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۸
	نیتروفورانتیون	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۴



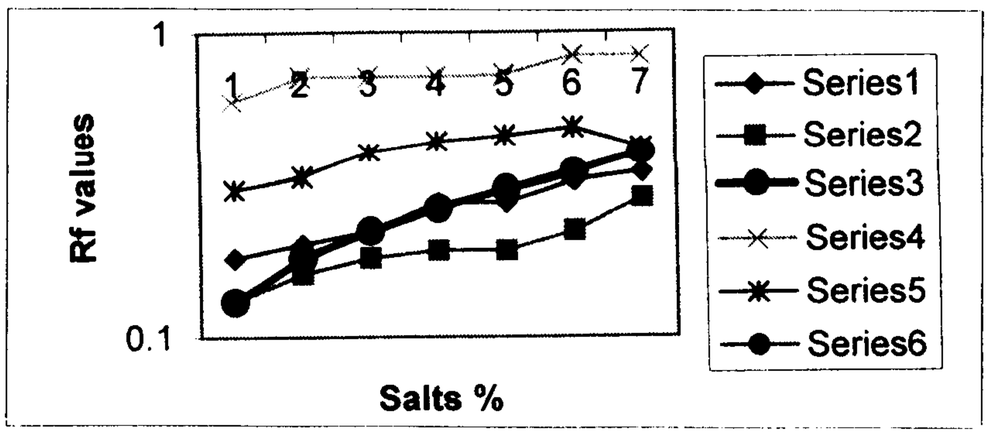
نمودار ۲ – منحنی دسته سفالوسپورین‌ها



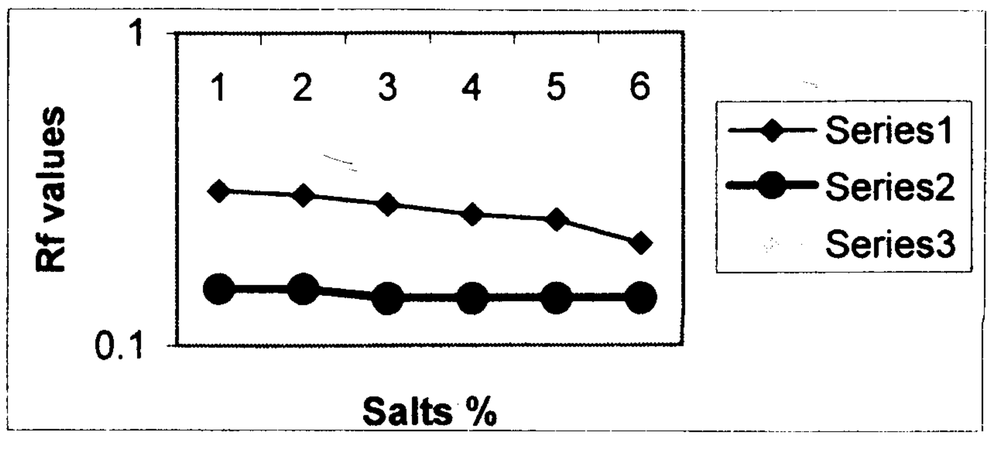
نمودار ۳ – منحنی دسته AMG_s آمینوگلیکوزایدزها



نمودار ۴ – منحنی دسته ماکرولایدها



نمودار ۵ – منحنی دسته تتراسایکلین‌ها



نمودار ۶ – منحنی دسته سولفازایدها و نالیدیکسیک اسید

جدول ۲ – حداقل غلظت قابل جستجوی آنتی‌بیوتیکها به روش دیسک و روش TLCB

دارو	حلال	روش دیسک		روش TLC-B	
		MDC_s	اندازه حلقه ممانعت	MDC_s	اندازه حلقه ممانعت
PCG	NH4CL 3%	۰/۰۲۵	۱۳/۶	۲۵	۲۵
AMPC	NH4CL 3%	۰/۲۰	۱۶/۷	۲۵	۱۰
NAFC	NH4CL 2%	<۱۲/۵	۲۸	۱۰۰	۱۵/۴
Cloxa	NH4CL 3%	<۱۲/۵	۲۸	۱۰۰	۱۷/۹
Dicloxa	NH4CL 2%	<۶/۲۵	۳۰/۸	۵۰	۱۶
TC	NH4CL 10%	<۶/۲۵	۲۷/۲	۱۰۰	کم
CTC	NH4CL 10%	<۶/۲۵	۳۱/۲	۵۰۰	۲۴/۸
CP	NH4CL 10%	<۶/۲۵	۱۴/۶	۵۰۰	کم
OTC	NH4CL 10%	<۶/۲۵	۲۸/۹	۱۰۰	کم
TMP	NH4CL 20%	<۶/۲۵	۴۴/۴	۱۰۰	۲۷
SM	NH4CL 5%	<۱۲/۵	۲۷/۵	ND	ND
DSM	NH4CL 5%	<۱۲/۵	۲۷/۷	۱۰۰۰	۲۱/۵
NA	NH4CL 0.5%	<۱۲/۵	۱/۳	۱۰۰	۱۸/۲
OA	NH4CL 0.5%	<۱۲/۵	۳۵	۱۰۰۰	۱۵/۶

ND) Not Detectable

نمودار ۱ منحنی دسته B-Lactams را نشان می‌دهد که یک منحنی S شکل می‌باشد. نمودار ۲ منحنی دسته Cephalosphorins را نشان می‌دهد که تقریباً به‌صورت یک خط صاف و مستقیم می‌باشد. نمودار ۳ منحنی دسته AMG_s آمینوگلیوکوزایدز را نشان می‌دهد که حالت صعودی دارد. نمودار ۴ منحنی دسته ماکرولایدها که منحنی محدب شکل را ایجاد می‌کند. نمودار ۵ منحنی دسته تتراسایکلین‌ها یک خط مایل بالارونده که جهت آن از چپ به راست است را ایجاد می‌کند. نمودار ۶ منحنی سولفازایدها و NA (Nalidixic Acid) و OA (Oxolionic Acid) را نشان می‌دهد که سبب ایجاد یک خط مایل برعکس TC_s پایین‌رونده یعنی از چپ به راست می‌شود.

جدول ۲ حداقل غلظت قابل جستجوی آنتی‌بیوتیکها به روش دیسک و روش TLCB را آشکار می‌سازد.

بحث

هدف از انجام این مطالعه معرفی یک روش تجربی ساده، سریع و عملی جهت آزمایشات متداول تعیین، تشخیص و جداسازی آنتی‌بیوتیکها از یکدیگر بود.

همچنین نشان داده شد که این روشها قادرند حضور یا عدم حضور آنتی‌بیوتیک را از طریق تعیین MDC_s با به‌کارگیری TLCB و روشهای میکروبیولوژیکی، اندازه‌گیری حداقل میزان آنتی‌بیوتیک موجود (MDC_s) که ایجاد حلقه ممانعت از رشد باکتری را می‌کند و بالاخره RF (میزان حرکت آنتی‌بیوتیک از مبدا سیلیکاژل) را معلوم می‌کنند. هر دارویی RF مخصوص به خودش را نشان می‌داد. محلولهای آنتی‌بیوتیکی استاندارد مربوطه به هر گروه آنتی‌بیوتیک را تهیه نموده و مقدار دارو از طریق میزان حلقه ممانعت از رشد (Z) و میزان حرکت آنتی‌بیوتیک (RF) تعیین می‌گردد.

میزان حساسیت دارو و روش با اندازه‌گیری MDC_s برای هر گروه آنتی‌بیوتیکی قابل دسترسی بود. هر چقدر MDC_s پایینتر، میزان حلقه ممانعت از رشد کمتر ایجاد گردد روش حساستر است (۶ و ۵).

برای مثال در روش STOP MDC_s پنی‌سیلین جی (PCG) ۰/۰۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، میزان Z ۱۳/۶ سانتیمتر و در روش TLCB در MDC_s ۲۵ آخرین زون مشاهده‌شده برابر ۲۵ سانتیمتر بود.

میزان RF و حلقه ممانعت از رشد آنتی‌بیوتیکی و همچنین MDC_s مربوطه به گروههای آنتی‌بیوتیکی استاندارد در جهت تعیین و تشخیص و جداسازی آنتی‌بیوتیکها از یکدیگر به‌کار برده می‌شوند.

در خاتمه باید گفت که از روی این اطلاعات می‌توان نتیجه گرفت که این روشها سریع، ساده و عملی حساس و دقیق می‌باشند و می‌توانند به‌عنوان روشهای متداول در آزمایشگاهها و یا حتی در فارم مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

لازم است از استاد بزرگوارمان جناب آقای دکتر علیرضا خسروی و همچنین همکاران گرامی آقایان رحمان حسنی، مجید یوسفی و خانم مریم هاشمیان و خانم جعفری تشکر و قدردانی گردد.

References

1. Appel, G.B., Nephrotoxicity of antimierobial agents. N. Engl. J. Med. 296, 722-72, (1977).
2. Keys, T.F., Renal Toxicity during therapy with gemtamiein or tobramycin. Mayoclin. Proe. 56, 556-559, (1981).
3. Reinor, N.E. Nephrotoxicity of gentamicin and tobramycin given once daily or continuously in dogs. J. Antimicrob. Chemother., 4, 85-101, (1978).
4. Shannon, K. Mechanisms of resistance to AMGS in clinical isolates. J. Antimicrob. Chemoter, 9, 91-102, (1982).
5. Shannon, K. Mechanisms of resistance to AMGS in clinical isolates. J. Antimicrob. Chemoter, 9, 91-102, (1982).
6. Ueno, R. and Aoki, T. A simplified determination of oxytetracycline in serum and muscle of cultured eel by highperformance liquid chromatography. Journal of Fish Pathology 30, 239-240, (1995).

Detection of antibiotics by using minimum detectable limit concentrations (MDC_s) in the swab test on premise (stop) assay and thin layer chromatography - bioautography (TLCB) of agar blocks

Rostami Bashman, M.[1]

[1]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.*

In this survey by using a thin layer chromatographic bioautographic method (TLCB) with parallel evaluation of standards curvs of a total of 19 antibiotice have been presented for identification of antibiotics. The sensitivity of methods and the amount of drugs were determinded by measuring the amount of Minimmum Detectable Limit Concentrations (MDC_s) (µg/ml), the zone size (Z) and Rate of Flow for each antibiotics (RF). A small block agar from the clear zone of the MDGs areas relate to Swab Test On Premises (STOP) method were taken and put on the silicagel plates. After being well dride, the plates were developed in graded cocentrations of CLNH4. The RF values and MDC_s in this procedure were measured. The test organism was Bacillus subtilis ATCC 6633, the antibiotic medium 5(AM5) assay medium was used in dowble layer. The results showed that MDC_s were lower or the sizes of inhibition zones became larger in the STOP method. For example in penicillin G (PCG), the MDC_s and zones (Z) were respectively 0.025 (µg/ml) and 13.6 cm in STOP analysis and 25 (µg/ml) 25 cm for TLCB experiment. The usage of a TLCB of agar blocks gained from STOP method in satisfactory.

Key words : Antibiotic, Swab, Chromatography, Bioautography.