

مقایسه سه روش تعیین حساسیت باکتریایی نسبت به نیتروfurانتوئین

دکتر مهرانگیز خواجه کرم الدینی^(۱) - دکتر علیرضا جهانشاهی^(۲)

خلاصه:

در پژوهش حاضر، قدرت ضد باکتریایی نیتروfurانتوئین بر روی چهار نوع باکتری گرم منفی متعلق به خانواده آتروباکتریاسه و یک نوع باکتری گرم مثبت جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری توسط روش انتشار دیسک در آگار و ۲ روش رقیق کردن آبگوشت (ماکرودیلوژن و میکرودیلوژن) در بیمارستان دانشگاهی قائم مشهد در طی یکسال تعیین و مقایسه شد. میزان MIC₅₀ و MIC₉₀ نیتروfurانتوئین جهت تمامی باکتریهای مورد مطالعه در روش ماکرودیلوژن به استثنای سویه های کلبسیلا (چهار برابر) دو برابر مقادیر مشابه در روش میکرودیلوژن بود. میزان حساسیت اشریشیاکلی و استافیلوکک ساپروفیتیکوس نسبت به نیتروfurانتوئین بیش از اتروباکتر و جنس کلبسیلا از زیبایی شد. پروتئوس میرابلیس بسیار مقاوم بود. در روش انتشار دیسک نیز میزان حساسیت باکتریهای جداسازی شده از بیماران سرپایی نسبت به نیتروfurانتوئین بیش از سویه های متعلق به بیماران بستری تعیین شد.

کلیدواژه ها: آزمونهای حساسیت میکروبی / عفونت مجاری ادرار / نیتروfurانتوئین

مقدمه:

بدین ترتیب امکان آزمایش همزمان چند پادزیست فراهم شد (۱۶). تاثیر خشک نمودن دیسک آنتی بیوگرام در سال ۱۹۴۵ توسط مورلی به روش فوق افزوده گشت (۱۷). اصول تشکیل هاله مهار رشد در ۱۹۴۶ توسط وودمن و کوپر تشریح شد و در سال ۱۹۴۹ میچی سون و اسپایسر ثابت نمودند که نمودار مربع قطر هاله مهار رشد در برابر لگاریتم غلظت پادزیست بصورت یک خط مستقیم می باشد (۹). اکتشافات فوق روند ساخت تجاری دیسک های پادزیست را تسریع نمود ولیکن استانداردهای اولیه برای عملکرد دیسکهای حاوی غلظتهای مختلف از پادزیست ها، توسط بوندی و همکارانش پایه گذاری شد (۱۸). در ۱۹۵۳ وسط شنیرسون،

پیدایش آزمون تعیین حساسیت باکتریایی نسبت به پادزیست ها به ظهور اولین آثار مقاومت باکتریایی در برابر پنی سیلین در قبل از جنگ دوم جهانی بازمی گردد. در آن زمان فلمینگ آزمون تعیین حساسیت باکتریایی را به روش کشت چاهک انجام می داد. روشهای اولیه رقیق کردن آبگوشت در لوله های متوالی با پیدایش پادزیست های جدید و حجم زیاد کار در سالهای دهه ۱۹۴۰ نامناسب می نمود ولیکن برای اولین بار، و دروف و فاستر در ۱۹۴۳ از کاربرد نوارهای کاغذ صافی آغشته به پادزیست، جهت انجام آزمونهای تعیین حساسیت میکروبی خبر دادند (۱۵). سپس در سال ۱۹۴۴ وینسنت روش استفاده از دیسک کاغذی را معرفی نمود و

۱- دانشیار گروه میکروب شناسی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد - بیمارستان قائم

۲- دکترای داروسازی

۱ - محیط کشت Mueller-Hinton Agar جهت انجام آزمون حساسیت باکتریایی به روش انتشار دیسک.

۲ - محیط کشت Mueller-Hinton Broth جهت انجام آزمون حساسیت باکتریایی به روش رقیق کردن آبگوشت.

۳ - محیطهای کشت آگارخوندار و ائوزین متیلن بلو جهت انجام آزمونهای تشخیص افتراقی خاص اعضای خانواده آنتروباکتریاسه.

۴ - استاندارد ۵/۰ مک فارلند: از ترکیب ۵/۰ میلی متر محلول کلروباریم ۱٪ و ۹۹/۵ میلی متر اسید سولفوریک ۱٪ تهیه می شود.

۵ - پودر استاندارد و دیسک نیتروفرانتوئین نیز از شرکت Bio-Merieux دریافت شد.

۶ - تمامی باکتریهای مورد مطالعه شامل ۲۱۰ سویه اشریشیاکلی، ۱۴۰ سویه کلبسیلا، ۱۱۶ سویه پروتئوس میرابلیس، ۷۰ سویه آنتروباکتر آئروژنز و ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس از بیماران بستری (بطور عمده بیماران تحت پیوند کلیه) و سرپایی بیمارستان دانشگاهی قائم مشهد تهیه شده است.

ب) روش کار:

۱ - نمونه برداری، کشت و تشخیص باکتریهای پاتوژن ادراری:

نخست ناحیه خارجی مجرای ادرار بیمار توسط ماده پاک کننده مناسب دو بار تمیز و با آب گرم شستشو می دهیم. سپس بخش میانی ادرار در یک لوله استریل جمع آوری و به دو بخش تقسیم می شود که یک بخش را سانتیفریژ می نمائیم. اسمیر تهیه شده از رسوب سانتیفریژ توسط میکروسکوپ از نظر وجود گلبولهای قرمز و سفید و کریستالهای ادراری بررسی می شود. بخش دوم ادرار میانی را توسط آنس لوپ دارا استریل به میزان دو تا پنج میلی لیتر بر روی دو محیط کشت آگار خوندار و ائوزین متیلن بلو پخش نموده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه می نمائیم. در خاتمه، شناسائی باکتریهای پاتوژن براساس

آزمون نیمه کمی "دولوله مغذی" (۱۹) و در سال ۱۹۵۶ روش "حساسیت دیسک احیاء هموگلوبین" توسط باس و همکارانش (۲۰) به اجرا در آمد. در بدو امر نتایج روش انتشار دیسک بصورت مهار یا عدم مهار بیان می شد ولیکن در اوایل ۱۹۶۰ با ارائه روش "دیسک واحد با قدرت زیاد" توسط بائر این روش اعلام نتایج منسوخ شد. سپس مصوبات سازمان جهانی بهداشت موجب پیدایش روش آندرسون و در نهایت روش کربی و بائر گردید و توسط کمیته ملی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی نیز جدول استاندارد NCCLS منتشر گردید (۱۰). در پژوهش حاضر، میزان کارائی روش انتشار دیسک با دو روش رقیق کردن آبگوشت مقایسه شد و لذا تاثیر ضد باکتریایی نیتروفرانتوئین بر روی پنج نوع باکتری پاتوژن ادراری بررسی گردید. بر مبنای آمار ۱۱ ساله بایگانی بیمارستان دانشگاهی قائم مشهد، سویه های اشریشیاکلی (۳۹/۵٪)، جنس کلبسیلا (۲۵/۱٪) و پروتئوس میرابلیس (۱۴/۳٪) دارای بیشترین و سویه های آنتروباکتر (۲/۹٪)، سیتروباکتر (۱/۴٪) و سالمونلا (۱/۴٪) دارای کمترین نقش در ایجاد عفونت مجاری ادراری بودند. استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (۵٪) نیز بیش از سایر کوکسی های گرم مثبت همانند آنتروکوک (۲/۶٪) در نمونه های ادرار بیماران شناسایی شد (۲۱). در مطالعه حاضر، تفاوت در میزان حساسیت باکتریهای جداسازی شده از ادرار بیماران بستری و سرپایی نسبت به نیتروفرانتوئین نیز بررسی گردید. بستری شدن دراز مدت، تجویز پادزستهای وسیع الطیف، جابجایی پلاسمید مولد مقاومت در بین باکتریهای بیمارستانی و سوندگذاری دستگاه ادراری به عنوان عوامل مستعد کننده بیمار بستری جهت ابتلاء به عفونت ادراری محسوب می شوند (۱۱). بر مبنای آمار بیمارستان قائم مشهد نیز بیشترین میزان عفونت ادراری (۱۵/۷٪) خاص بیمارانی با سابقه بستری شدن طولانی (حداقل ۲۰ روز) بود (۲۱).

مواد و روشها:

الف) مواد مصرفی

مشابه روش Microdilution Broth انجام می پذیرد و کدورت کشت نیز با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم می شود. سپس پلیت های میکروتیتر لئوفیلز یا منجمد شده حاوی نیترو فورانتوئین و محیط کشت مایع مولر - هینتون (غنی شده توسط کاتیون) را آماده نموده و در طی ۱۵ دقیقه، مایع تلقیح را درون چاهکهای پلیت تقسیم می نمائیم. یک چاهک باید حاوی باکتری بدون پادزیست (کنترل مثبت) و یک چاهک نیز فقط حاوی آبگوشت باشد (کنترل منفی). حجم نهائی محلول نیترو فورانتوئین و باکتری در هر چاهک معادل ۰/۱ میلی لیتر خواهد بود. جهت پرهیز از خشک شدن پلیت ها باید سطح آنها با پوشش پلاستیکی پوشانده شود. آنگاه تمامی پلیت ها را بمدت ۱۶ الی ۲۰ ساعت در گرمخانه 35°C قرار می دهیم و سپس پلیت ها را از گرمخانه خارج نموده و با چشم غیر مسلح چاهک ها را با چاهک کنترل مقایسه می نمائیم. کمترین غلظتی که در آن رشد باکتری مشاهده نشود بعنوان (Minimum Inhibitory Concentration) MIC نیترو فورانتوئین بر علیه آن باکتری خاص گزارش می شود. (۹ و ۴).

۳- روش انتشار دیسک (Disk-Agar Diffusion): در این روش توسط آنس استریل، از روی ۴ تا ۵ پرگنه مستقل و همسان نمونه برداری نموده و به یک لوله استریل حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع مولر - هینتون انتقال داده و در حدود ۳ تا ۵ ساعت در دمای 35°C انکوبه می نمائیم. سپس کدورت حاصل را توسط محیط کشت با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم نموده و با سوآب استریل مایع تلقیح را بر روی سطح پلیت حاوی محیط کشت جامد انتقال می دهیم. در نهایت دیسک های نیترو فورانتوئین را توسط پنس استریل بر روس سطح آگار به فاصله ۱۵ میلی متر از لبه پلیت و ۲۴ میلی متر از مرکز هم قرار داده و بعد از طی ۱۵ دقیقه، پلیت ها را برگردانده و بین ۱۶ تا ۱۸ ساعت در حرارت 35°C انکوبه می نمائیم. پس از طی مدت مذکور، قطر منطقه مهار رشد را توسط خط کش ویژه آنتی بیوگرام اندازه گیری نموده و با مقدار جدول NCCLS مقایسه و میزان حساسیت باکتری

شکل ظاهری پرگنه ها و توسط محیطهای کشت افتراقی و آزمونهای میکروسکوپی انجام می شود (۴).

۲- روش رقیق کردن آبگوشت: در این روش بر اساس غلظت مورد نیاز ($10^{2.4} \text{ mcg/ml}$) و قدرت نیترو فورانتوئین (970 mcg/mg) مقدار پادزیست مورد نیاز را محاسبه نموده (۱۰ میلی گرم) و با ترازوی تجزیه در کوتاهترین زمان ممکن توزین و توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار ($\text{pH}=8$) درون بالون ژوژه استریل به حجم می رسانیم. سپس محلول ذخیره مادر به مقادیر لازم برای کار یک روزه تقسیم و در هنگام کار توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار ($\text{pH}=8$) به غلظت مورد نظر رقیق می نمائیم. برای تهیه مایع تلقیح اول توسط آنس استریل از روی ۴ یا ۵ پرگنه همسان برداشت نموده و به یک لوله استریل حاوی ۵ میلی لیتر محیط مایع مولر - هینتون انتقال داده و تا ظهور کدورت در گرمخانه 37°C بمدت ۳ تا ۴ ساعت قرار می دهیم. کدورت این کشت با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم و توسط محیط کشت مایع مولر - هینتون به نسبت $\frac{1}{100}$ رقیق می نمائیم. در مرحله بعدی نیز ۱۰ لوله آزمایش استریل در پیچ دار آماده نموده و یک میلی لیتر از محیط کشت را به لوله های شماره ۲ تا ۱۰ می افزائیم. و یک میلی لیتر از محلول کار نیترو فورانتوئین را به دو لوله نخست افزوده و مخلوط می نمائیم. سپس یک میلی لیتر از محلول شماره ۲ را توسط پیپت استریل به لوله شماره ۳ انتقال داده و این عمل را تا لوله شماره ۹ تکرار نموده و در نهایت یک میلی لیتر از لوله شماره ۹ را دور می ریزیم. در مرحله بعد یک میلی لیتر از مایع تلقیح را به ۱۰ لوله افزوده و تمامی لوله ها را به مدت ۱۶ الی ۲۰ ساعت در دمای 35°C سانتیگراد انکوباسیون می نمائیم. بعد از گذشت مدت زمان لازم لوله ها را از گرمخانه خارج نموده و کمترین غلظت پادزیست که قادر به مهار رشد پنجاه درصد و نود درصد سویه های یک باکتری باشد را به عنوان MIC50 و MIC90 خاص پادزیست گزارش می شود. لوله شماره ۱۰ (کنترل مثبت) باید کدورت بدهد و لوله کنترل منفی شفاف بماند. در روش Microdilution Broth تهیه مایع تلقیح

نسبت به نیترو فورانتوئین مشخص می شود (۱۰).

ارائه شده است. میزان فراوانی نسبی باکتریهای حساس و مقاوم جداسازی شده از ادرار بیماران بستری و سرپایی نسبت به نیترو فورانتوئین نیز در جدول شماره ۲ ملاحظه می شود. در مرحله دوم پژوهش میزان دقت سه روش سنجش آنتی بیوگرام در تعیین باکتریهای حساس و مقاوم نسبت به پادزیست با هم مقایسه گردید و نتایج آن در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

نتایج:

در پژوهش حاضر، به مدت یکسال، میزان حساسیت پنج نوع باکتری جداسازی شده از عفونت مجاری ادراری بیماران بستری و سرپایی به سه روش متفاوت نسبت به نیترو فورانتوئین تعیین شد. نتایج برآورد حداقل غلظت نیترو فورانتوئین برای مهار رشد نمونه های باکتریایی توسط دو روش میکرو دیلوشن و ماکرو دیلوشن در جدول شماره ۱

جدول ۱- مقایسه نتایج تعیین حداقل غلظت نیترو فورانتوئین جهت مهار رشد پنج نوع باکتری با دو روش رقیق کردن آگوست

Microdilution Broth				Macrodilution Broth				روش انواع باکتری
تعداد	گستره MIC	MIC90	MIC50	تعداد	گستره MIC	MIC90	MIC50	
۷۵	۸-۱۲۸	۶۴	۱۶	۷۵	۴-۲۵۶	۱۲۸	۳۲	اشریشیاکلی
۵۰	۱۶-۲۵۶	۶۴	۳۲	۵۰	۱۶-۵۱۲	۲۵۶	۱۲۸	جنس کلبسیلا
۴۰	۶۴-۵۱۲	۲۵۶	۱۲۸	۴۰	۱۲۸-۱۰۲۴	۵۱۲	۲۵۶	پروتئوس میرابلیس
۲۵	۸-۲۵۶	۱۲۸	۶۴	۲۵	۳۲-۵۱۲	۲۵۶	۱۲۸	انتروباکتر آئروژنز
۳۰	۱۶-۱۲۸	۶۴	۳۲	۳۰	۳۲-۲۵۶	۱۲۸	۶۴	استافیلوکوک ساپروفیتیکوس

جدول ۲- مقایسه میزان حساسیت و مقاومت باکتریهای جداسازی شده از بیماران بستری و سرپایی نسبت به نیترو فورانتوئین در روش انتشار دیسک

سرپایی			بستری			نوع بیماران انواع باکتری
مقاوم	حساس	تعداد	مقاوم	حساس	تعداد	
۱۲٪	۸۸٪	۳۰	۳۷٪	۶۳٪	۳۰	اشریشیاکلی
۴۵/۵٪	۵۴/۵٪	۲۰	۸۴٪	۱۶٪	۲۰	جنس کلبسیلا
۸۳/۳٪	۱۶/۷٪	۱۸	۱۰۰٪	۰	۱۸	پروتئوس میرابلیس
۰	۱۰۰٪	۱۰	۵۰٪	۵۰٪	۱۰	انتروباکتر آئروژنز
۱۲/۵٪	۸۷/۵٪	۲۰	۴۰٪	۶۰٪	۲۰	استافیلوکوک ساپروفیتیکوس

جدول ۳- مقایسه نتایج سه روش تعیین حساسیت ۵ نوع باکتری نسبت به نیترو فورانتوئین

انواع باکتری	رقیق کردن آبگوشت		انتشار دیسک در آگار
	Micro DB	Macro DB	
اشریشیا کلی	۷۵%	۹۶%	۶۳%
جنس کلبسیلا	۳۰%	۷۹%	۱۶%
پروتئوس میرابلیس	۴%	۴۸%	صفر
انتروباکتر آئروژنز	۵۷%	۶۵%	۵۰%
استافیلوکوک سایر و فیتیکوس	۷۲%	۱۰۰%	۶۰%

بحث:

عفونتهای مجاری ادراری از اهمیت پزشکی و اقتصادی خاصی برخوردار می باشند. باکتریهای مولد عفونت مجاری ادرار شامل باکتریهای خانواده آنتروباکتریاسه و در موارد اندکی نیز باکتریهای گرم مثبت مانند اتروکوک و استافیلوکوک ها می شوند (۹). روش و طول دوره تجویز پادزیست (Antibiotic Therapy) جهت درمان عفونت های ادراری وابسته به سابقه بیمار، محل عفونت، میزان حساسیت باکتری و نحوه عملکرد کلیه است. ترشح فعال توبولی پادزیست به فضای درونی لوله های کلیوی و ادرار اولیه در آسیب های کلیوی به ۳ تا ۱۰ درصد میزان غلظت پلاسمایی کاهش می یابد و لذا هدف عمده پادزیست درمانی نیز تامین غلظت مناسب دارو درون لوله های کلیه می باشد (۱۴).

نیترو فورانتوئین جهت پیشگیری و درمان عفونت مجاری ادراری ناشی از باکتریهای حساس شامل اشریشیا کلی، پروتئوس میرابلیس، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، آنتروباکتر و جنس کلبسیلا کاربرد بالینی دارد. این پادزیست در برابر سوشهای سراتیا، پseudomonas و آسینیتوباکتری تاثیر می باشد. نیترو فورانتوئین از راه گوارشی جذب و در ادرار و صفرا ترشح می شود. دفع کلیوی آن به دو روش تصفیه گلو مری و ترشح فعال توبولی صورت می پذیرد و در حدود ۴۰ درصد دارو بدون تغییر در ادرار ترشح می شود. نیترو فورانتوئین به پروتئینهای پلازما متصل شده و لذا در

خون فاقد تاثیر ضد باکتریایی است و در نارسائی کلیوی به دلیل افزایش سطح سرمی پادزیست، علائم مسمومیت دارو ظاهر می گردد (۷، ۱۳، ۱۴). در بخش اول پژوهش حاضر، میزان حساسیت چهار نوع باکتری گرم منفی متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه و یک نوع کوکسی گرم مثبت نسبت به نیترو فورانتوئین توسط سه روش آنتی بیوگرام تعیین شد. اشریشیا کلی مسئول ایجاد عفونت مجاری ادراری در اکثریت بیماران بستری محسوب می شود. توانائی این باکتری در مهار واکنش دفاعی ماکروفاژها، تولید همولیزین و اتصال به سلولهای اپی تلیوم مجاری ادراری توسط Slime Layer نقش اساسی را در بیماریزایی E.coli ایفا می نماید. (۱، ۲، ۳). در روش ماکرودیلوشن مقادیر MIC خاص اشریشیا کلی دو برابر مقادیر MIC در روش میکرو دیلوشن است. اشریشیا کلی دارای کمترین میزان MIC50 در هر دو روش رقیق کردن آبگوشت بود ولیکن میزان MIC90 نیترو فورانتوئین جهت اشریشیا کلی و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس یکسان است. اقامت طولانی در بیمارستان موجب آلودگی فرد توسط باکتریهای مقاوم بیمارستانی می شود و لذا میزان حساسیت E.coli خاص بیماران بستری ۶۳ درصد بود ولیکن این میزان جهت بیماران سرپایی معادل ۸۸ درصد محاسبه شد. نتایج تحقیق کلون و همکارانش میزان حساسیت E.coli نسبت به نیترو فورانتوئین را ۹۸/۶ درصد (۶) و مطالعات دانشگاه ماستریخت نیز ۹۱ درصد حساسیت برای E.coli نسبت به نیترو فورانتوئین

گزارش نمودند (۵). در پژوهش حاضر نیز بیشترین میزان باکتریهای حساس نسبت به نیتروفورانتوئین در بیماران بستری و سرپایی متعلق به اشریشیاکلی بود.

جنس کلبسیلا شامل چهار سوش پنومونه، رینواسکلروماتوز، اوزونه واکسی توکاست. بارزترین نشانه این خانواده عبارت از وجود کیسول پلی ساکاریدی است که قادر به محافظت باکتری از بلعیده شدن توسط ماکروفاژها می باشد. این باکتری در بیماران مبتلا به نارسایی سیستم ایمنی قادر به ایجاد عفونت مجاری ادراری است (۹، ۱۲). مقدار MIC نیتروفورانتوئین جهت سویه های کلبسیلا در روش ماکرودیولوشن چهار برابر مقادیر مشابه در روش میکرودیولوشن می باشد. مقدار MIC نیتروفورانتوئین خاص جنس کلبسیلا در روش ماکرودیولوشن با مقدار MIC خاص آنتروباکتر آئروژنز در روش میکرودیولوشن با مقدار MIC نیتروفورانتوئین خاص استافیلوکک ساپروفیتیکوس یکسان بود. در روش دیسک، اختلاف فاحشی بین سویه های جداسازی شده از بیماران بستری و سرپایی وجود داشت و سوشهای کلبسیلا جدا شده از بیماران تحت پیوند کلیه فقط ۱۶ درصد نسبت به نیتروفورانتوئین حساس بودند. نتایج روش میکرودیولوشن مشابه نتایج پژوهش کلون (۸۹٪) است (۶).

سومین باکتری گرم منفی هوازی در این مطالعه عبارت از پروتئوس میرابلیس بود. این باکتری با دارا بودن آنزیم اوره آز و توانایی تجزیه اوره به آمونیاک و CO_2 قادر به قلیایی نمودن ادرار است. این فرایند علاوه بر افزایش احتمال تشکیل سنگ کلیه، برای بافت اپی تلیوم مجاری ادراری نیز خطر آفرین می باشد. نقش پیلی (Pili) در بیماریزایی پروتئوس برخلاف E.coli فاقد اهمیت است (۱۲). میزان MIC50 و MIC90 نیتروفورانتوئین جهت پروتئوس میرابلیس در روش ماکرودیولوشن دو برابر مقادیر مشابه در روش میکرودیولوشن است. لیکن پروتئوس میرابلیس دارای بزرگترین مقادیر MIC در هر دو روش رقیق کردن آبگوشت نسبت به سایر باکتریهای مورد مطالعه می باشد. در روش

دیسک سویه های پروتئوس خاص بیماران بستری ۱۰۰ درصد مقاوم بودند ولیکن سویه های خاص بیماران سرپایی به میزان ۱۶/۷ درصد حساسیت نسبت به نیتروفورانتوئین نشان دادند. نتایج فوق بیانگر مقاومت قابل توجه پروتئوس میرابلیس نسبت به نیتروفورانتوئین می باشد ولیکن کلون نیز ۱۷/۴٪ سویه های پروتئوس را حساس گزارش نمود (۶). جنس آنتروباکتر شامل هشت سویه باکتریایی بوده که فقط پنج سویه آن برای انسان بیماریزا محسوب می شوند. آنتروباکتر کلوآسه و آنتروباکتر آئروژنز متداولترین سویه های فرصت طلب این جنس بوده که تحت شرایط خاص قادر به خروج از محل استقرار خویش و ورود به دستگاه ادراری می باشند (۱۱). مقدار MIC نیتروفورانتوئین جهت سویه های آنتروباکتر در روش ماکرودیولوشن دو برابر مقادیر مشابه در روش میکرودیولوشن بود. آنتروباکتر آئروژنز دارای بزرگترین مقادیر MIC بعد از پروتئوس میرابلیس می باشد. در روش دیسک میزان حساسیت سویه های بیماران بستری نصف سویه های بیماران سرپایی بود. در یک مقایسه بین انواع باکتریهای جدا شده از بیماران سرپایی می توان گفت آنتروباکتر آئروژنز نسبت به نیتروفورانتوئین ۱۰۰ درصد حساس می باشد ولیکن سویه های متعلق به بیماران بستری به دلیل بروز مقاومت باکتریایی در محیط بیمارستان فقط به میزان ۵۰ درصد حساس بودند.

استافیلوکک ساپروفیتیکوس بعنوان دومین باکتری مولد عفونت مجاری ادراری در جوانان و زنان دارای فعالیت جنسی شناخته می شود و بر مبنای مطالعات پژوهشگران اروپایی نیز قادر به ایجاد التهاب غیرگنوککی در مجرای ادرار مردان می باشد. دو ویژگی مهم تکثیر سریع و تولید انواع سموم و آنزیمها موجب گسترش عفونت ناشی از استافیلوکک می شوند (۹ و ۱۲). در پژوهش حاضر مقادیر MIC نیتروفورانتوئین در روش ماکرودیولوشن دو برابر مقادیر مشابه در روش میکرودیولوشن برآورد شد. سویه های استافیلوکک خاص بیماران سرپایی نیز بیش از سویه های بیماران بستری حساس بودند. لیکن سویه های استافیلوکک

ساپروفیتیکوس بیشترین میزان حساسیت نسبت به نیتروفرانتوئین رابعد از سوبه های اشیریشیاکلی در بیماران بستری و سوبه های آنتروباکتر آئروژنزد در بیماران سرپایی نشان دادند. در مجموع استافیلوکک ساپروفیتیکوس در برابر نیتروفرانتوئین دارای حساسیت مطلوبی می باشد. براساس نتایج بدست آمده از سه روش ماکرودیولوشن، میکرودیولوشن و انتشار دیسک مشخص می شود که میزان حساسیت اشیریشیاکلی و استافیلوکک ساپروفیتیکوس بمراتب بیش از آنتروباکتر و جنس کلبسیلامی باشد. پروتئوس میرابلیس نیز بیشترین مقاومت را در برابر نیتروفرانتوئین بروز داد.

در بخش دوم پژوهش حاضر سه روش تعیین حساسیت باکتریایی از نظر توانایی جداسازی باکتریهای حساس از سوبه های مقاوم با هم مقایسه شدند. نتایج روش انتشار دیسک در آگار تاجع میزان حساسیت باکتری، حالت باکتری (هاگ یا در حال رشد)، غلظت مایع تلقیح، فرمولاسیون و میزان آب محیط کشت، ضخامت محیط کشت درون پلیت، غلظت و حجم پادزیست، قطر کاغذ دیسک، زمان قرار گرفتن دیسک بر روی پلیت و دمای نگهداری پلیت می باشد (۸).

روش تعیین حساسیت باکتریایی توسط دیسک کاغذی برای باکتری کند رشد، پادزیست دارای انتشار آهسته در آگار و باکتری بی هوازی نامناسب و غیر قابل استفاده می باشد. در ضمن نتایج روش دیسک فقط در مورد غلظت سرمی پادزیست صادق است زیرا غلظت پادزیست در مایعات بدن (ادرار، بزاق، مایع مغزی - نخاعی)، بافت های گوناگون، ترشحات صفراوی و زخم با غلظت پادزیست بر روی دیسک بطور کامل تفاوت دارد و باکتری مقاوم نسبت به دیسک آنتی بیوگرام در عفونت مجاری ادراری بدلیل غلیظ شدن بیش از حد پادزیست درون لوله های کلیوی، حساسیت نشان می دهد. بنابراین روش مطلوب جهت تعیین اثرات درمانی پادزیست ها در عفونت مجاری ادراری - تناسلی

عبارت از روش رقیق کردن آبگوشت می باشد (۱۰). آزمایش حساسیت رقت آبگوشتی در تعیین و محاسبه غلظت مناسب پادزیست جهت درمان عفونت مفید است و در اصل بدلیل اتصال پادزیست به پروتئینهای خون یا حضور مواد مهار کننده بافتی در محل عفونت باید دوز پادزیست تجویز شده بیش از مقدار MIC باشد. لیکن در بیماریهای عفونی حاد همانند اندوکاردیت عفونی و بیماران دارای سیستم ایمنی سرکوب شده توسط شیمی درمانی از شاخص "حداقل غلظت باکتری کش (MBC)"^(۱۱) استفاده می شود (۹). نتایج کمی روش رقیق کردن آبگوشت نوع Macrodilution دارای ارزش زیادی است و لیکن این روش نیازمند لوله های استریل فراوان، تهیه محلول کار در حجم زیاد، دقت فراوان در پر نمودن لوله های آزمایش، رعایت شرایط استریل در یک فضای بزرگ و تهیه گرمخانه با ظرفیت بالا می باشد. در ضمن بدلیل کثرت نمونه های بالینی در یک آزمایشگاه تشخیص طبی و اجتناب ناپذیر بودن خستگی پرسنل، میزان دقت و صحت نتایج روش Macrodilution Broth کاهش می یابد. لیکن روش Macrodilution Broth بدلیل استفاده از پلیت میکروتیتروفلوئیلز، نمونه بردار (Sampler) و رقیق کننده چند کانالی، مصرف محیط کشت کمتر، کوچک بودن فضای کار استریل (در زیر هود)، استفاده از گرمخانه جهت تعداد زیادی پلیت میکروتیترو، کاهش زمان کار، افزایش تعداد نمونه مورد آزمایش و در نهایت افزایش دقت در محاسبه کمی MIC بر روش Macrodilution Broth ارجحیت دارد. در پژوهش حاضر مشخص شد که میزان MIC50 و MIC90 نیتروفرانتوئین در روش ماکرودیولوشن برای تمام باکتریهای مورد مطالعه به استثنای سوبه های جنس کلبسیلا (۴ برابر) دو برابر مقادیر مشابه در روش میکرودیولوشن می باشد ولیکن در صد فراوانی باکتریهای حساس نسبت به نیتروفرانتوئین در روش میکرودیولوشن بمراتب بیش از روش ماکرودیولوشن بود. بطور مشخص

هردوروش فوق العاده بیشتر از روش انتشار دیسک می باشد. بنابراین با عنایت به نتایج فوق، پیشنهاد می شود جهت تعیین دقیق و کمی قدرت ضد باکتریایی پادزیست های اختصاصی در درمان عفونت های دستگاه ادراری از روش Macrodilution Broth در تمامی آزمایشگاه های تشخیص طبی استفاده شود.

درصد فراوانی سویه های حساس پروتئوس و کلبسیلا در روش میکرودیلوژن به ترتیب ۱۲ برابر و بیش از ۲ برابر سویه های مشابه در روش ماکرودیلوژن تعیین شد. نتایج مندرج در جدول ۳ مشخص می نماید که درصد فراوانی باکتریهای حساس شناسایی شده توسط روش میکرودیلوژن بیش از روش ماکرودیلوژن و نتایج

منابع:

1. Wohta M, et al. Serological Response to P-fimbria of E.coli in Patients with UTIs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8(2):156-159.
2. Stenquist K, et al. Virulence Factors of E.coli in Urinary Isolates from Pregnant women. *J Infect Dis* 1987;156(6):870-877.
3. Stephani D, et al. E.coli Urethritis in Women with Syndroms of Acute Urinary tract infections. *J Infect Dis* 1988;157(1):196-198.
4. Clarridge JE, et al. Laboratory Diagnosis of UTI, Cumulative Techniques and Procedures on Clinical Microbiology. *Gumitech* 1987:2A.
5. Bonten M, et al. High Prevalence of Antibiotic Resistant E.coli in Fecal Samples of Students in the South-East of The Netherlands. *J Antimicrob* 1990;26(4):585-592.
6. Calvin MK, et al. Culture of the Surfaces of Urinary Catheters to Sample Urethral Flora and Study of the Effect of Antimicrobial Therapy. *J Clin Microbiol* 1985; 21 (6):902-908.
7. Goodman GA, et al. Goodman and Gilman's the Pharmaceutical Basis of Therapeutics. 9th ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1995:1060-1061.
8. Baron E, et al. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. St Louis: Mosby Company, 1994:183-198, 323, 330-331, 339.
9. Joklik WK, et al. Zinsser Microbiology. 21st ed. San Mateo: Appleton & Lange 1996:333, 403, 405-410, 413, 420.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Determining Activity Antimicrobial Agents. NCCLS Document 1987;7(2):M26-P.
11. Roberts JA, et al. Factors Predisposing to Urinary Tract Infections Children. *Pediatr Nephrol* 1996;10(5):517-522.
12. Jawetz E, et al. Medical Microbiology. 12th ed. San Mateo: Appleton & Lange

1997:200-220.

13.Reynolds JEF:Martindale the Extrapharmacopeia.31st ed.London:The Pharmaceutical Press,1996:272-274.

14.Mandell GI,et al.Principles and Practice of Infectious Diseases.4th ed.New York:Churchill Livingston Inc,1995:1969-1972.

15.Foster JW,Woodruff HB.Microbiological Aspects of Penicillin.J Bacteriol 1943.46:187-202.

16.Vincent JG,et al.Filter Paper Modification of the Oxford Cup Pennicillin Determination .Exp Biol Med 1994;55:162-164.

17.Morley DC.A Simple Method of Testing the Sensitivity of Wound Bacteria to Pennicillin and Sulfathiazole by Use of Impregnated Blotted Paper Disks.J Pathol Bacteriol 1945;57:379-382.

18.Bondi A,et al.A Routine Method for Rapid Determination of Susceptibility to Penicillin and Other Antibiotics.J Med Sci 1947;213:221-225.

19.Schneierson SS:A Simple Rapid Disk-tube Method for Determination of Bacterial sensitivity to Antibiotics.Antibiot Chemother 1954;4:125-132.

20.Bass JA,et al.Evaluation of Rapid(Hemoglobin Reduction)Method for Determining Antibiotic Susceptibility of Microorganisms .Texas:U S Air force, 1956.

۲۱- خواجه کرم الدینی، مهرانگیز، جهانشاهی، علیرضا: شناخت عوامل مؤثر در ایجاد عفونت مجاری ادراری، مجله علمی پزشکی اهواز، ۱۳۷۳، شماره ۱۷، صص: ۳۴-۲۵.

Comparison of Three Bacterial Susceptibility Tests for Nitrofurantoin

M.Kh.Karamedini (Associate Professor for Microbiology)

A.Jahanshahi(Pharm.D)

ABSTRACT:

In this research,during one year,the antibacterial efficacy of Nitrofurantoin versus four species of gram-negative bacteria(Collected of UTIs patients)is measured and compared by Disk-Agar Diffusion Method ,Macrodiution Broth Method and Microdilution Broth Method in Ghaem University Hospital,Mashhad,Iran.

The rates of Nitrofurantoin's MIC50 & MIC90 for all of the studied bacteria except Klebsiella genus(4 fold) by Macrodilution Broth Method were two fold similar MIC rates by Microdilution broth Method.The sensitivity rates of E.coli and Staph.saprophyticus to Nitrofurantoin were more than Enterobacter and Klebsiella species.Proteus bacteria mirabilis was very resistant.In the Disk-Agar Diffusion Method,the sensitivity rates of bacteridisolated from out-patients to Nitrofurantoin were more than those in hospitalized patients.

Key words:Microbial Sensitivity tests/Nitrofurantion/uninary Tract Infections