بیست و ششمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و دوازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه خوارزمی،
تهران، ایران.
۱۶-۱۵ بهمن ۱۳۹۸

جداسازی اپتیکی باکتری‌های استافیلوکوکوس اوروئوس مقاوم به داروی متی‌سیلین از نوع حساس به دارو

روشنا کریمی[۱] ، سلمان مهاجر مازندرانی*[۲،۱] ، محمدرضا اصل روستا[۱]، محدثه شادفر[۳]

[۱]دانشگاه خوارزمی، دانشکده فیزیک ، آزمایشگاه بیوفوتونیک .[۲]دانشگاه خوارزمی، پژوهشکده علوم کاربردی.[۳] دانشگاه علوم پزشکی گلستان، آزمایشگاه میکروبیولوژی.

چکیده – در این تحقیق نمونه های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دو شکل مقاوم به دارو و حساس به داروی متیسیلین کشت داده شده و روی لام شیشه ای تثبیت شد. جذب اپتیکی باکتری ها در محدوده خطی در طول موج ۵۳۲ نانومتر با لیزر پیوسته اندازه گیری شد. سپس رفتار نمونه ها در شرایط غیرخطی اپتیکی که شدت بیشینه ورودی لیزر از مرتبه 10^6 $(\frac{mW}{cm^2})$ بود، بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد جذب خطی باکتری ها تفاوت محسوسی نداشت ولی ضریب شکست غیرخطی باکتری های مقاوم به دارو برعکس باکتری های عادی که حساس به دارو بودند تغییر می کرد. باکتری های مقاوم دارای ضریب شکست غیرخطی منفی و باکتری های حساس به دارو دارای ضریب شکست غیرخطی مثبت همگی از مرتبه 10^{-5} $(\frac{cm^2}{W})$ بودند.

کلید واژه- استافیلوکوکوس اورئوس، متیسیلین، ضریب شکست غیرخطی.

Optical discrimination of methicillin-resistant staphylococcus aureus and methicillin-sensitive staphylococcus aureus

Roshna Karimi[1], Salman Mohajer Mazandarani[1, 2],Mohammadreza Aslroosta[1] and Mohadese shadfar[3]

[1].Biophotonics Lab., Physics Dep., Kharazmi University, Karaj.[2] Applied Science Research Center, Kharazmi University, Karaj.[3] Microbiology Lab., Golestan Medical University

Abstract- In this experiment samples of Staphylococcus Aureus bacteria in two species of methicillin resistant and sensitive were cultured. Optical absorbance of bacteria in linear regime with wavelength 532nm was measured using continuous-wave laser. Meanwhile non-linear behaviors of bacteria with laser intensity 10^6 $(\frac{mW}{cm^2})$ were investigated. The results showed that there was not such a great difference between linear absorbance of two species of bacteria but the non-linear refractive index of MRSA bacteria were absolutely different from thos. Resistant bacteria had negative refractive index and sensitive bacteria had positive refractive index which all were in orders of $10^{-5}(\frac{cm^2}{W})$

Keywords: Maximum five keywords related to the paper subjects, sorted in alphabetical order separated by comma are required.

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-06-07]

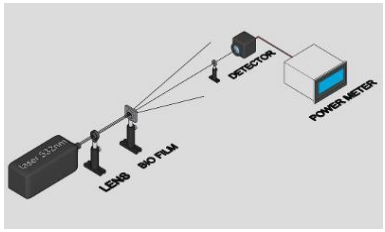
مقدمه

استافیلوکوکوس اروئوس مقاوم به متیسیلین یا باکتری MRSA گونه‌ای از یک عفونت باکتریایی مسری است که نسبت به گروه بزرگی از آنتی‌بیوتیک‌ها مثل متی‌سیلین پنی‌سیلین و آموکسی‌سیلین مقاوم است. این مقاومت درمان این عفونت را دچار چالش می‌کند. در اغلب موارد عفونت استافیلوکوس مقاوم به متی‌سیلین اروئوس در افرادی اتفاق می‌افتد که در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی مانند مرکز دیالیز قرار دارند. به دلیل اهمیت تشخیص گونه مقاوم این باکتری به دنبال انجام یک سری آزمایش‌های اپتیکی بر روی این باکتری می‌باشیم. روش‌های کنونی تشخیص باکتری شامل روشهای نوین مبتنی بر کشت میکروبی و مولکولی می‌باشد[۳] [۲] [۱].

از روش‌های اپتیکی دیگری که برای تشخیص باکتری استفاده شده است می‌توان به روش طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری اشاره کرد. در این روش باکتری‌ها با استفاده از طیف‌سنجی فروشکست القایی آنالیز میشوند، طیف حاصل شامل چند خط یونی و اتمی است که اغلب عناصر غیرآلی مانند کلسیم، منیزیم و سدیم در طبقه‌بندی و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد استفاده قرار میگیرند و از یک تابع تشخیص برای تفیک باکتری‌ها استفاده می‌شود[۴]. در روش اپتیکی به کار گرفته شده در این پژوهش زمان تشخیص و تفکیک باکتری‌ها به نحو قابل توجهی کاهش پیدا کرده‌است.

مواد و روش‌ها

برای کشت باکتری‌های MRSAو MSSA چندین مرحله انجام شد. سوسپانسیون‌هایی با غلظت‌های 10^6 مولکول بر میلی‌لیتر از هریک از باکتری‌ها در محیط کشت BHI تهیه شد و قطراتی به حجم ۱۵cc برروی لام قرار داده می‌شود و به شکل یک گسترش نازک توسط لامل پخش می‌گردد. و به روش فیزیکی روی لام تثبیت میشود. در این پژوهش ضریب شکست غیرخطی و ضریب جذب خطی دو گونه باکتری MRSA و MSSA مورد سنجش قرار گرفت، در ابتدا ضریب شکست غیرخطی باکتری MRSA و سپس MSSA به روش جاروب محوری مورد سنجش قرار گرفت. روش جاروب محوری یا زد اسکن یک چیدمان اپتیکی می‌باشد که ضریب شکست غیرخطی نمونه‌های مورد سنجش را تعیین می‌کند. چیدمان اپتیکی جاروب زد به این صورت است که ابتدا نور لیزر از عدسی با فاصله کانونی مشخص عبور کرده، نور همگرا شده و سپس به بایو فیلم یا لام حاوی باکتری برخورد می‌کند. لام حاوی باکتری مورد نظر توسط یک جابه‌جاگر در راستای نور لیزر حرکت داده می‌شود و از کمر باریکه آن نیز عبور می‌کند. باریکه لیزر پس از عبور از نمونه وارد روزنه‌ای کوچک شده و سپس وارد آشکارساز می‌شود، آشکارساز به پاورمتر متصل است که با تغییر دادن مکان نمونه توسط جابه‌جاگر تغییرات توان ورودی به آشکارساز را به صورت عددی نمایش می‌دهد. طرح واره‌ی روش جاروب محوری در زیر نشان داده شده است.



شکل ۱:چیدمان اپتیکی جاروب محوری دریچه بسته

برای اندازه‌گیری ضریب جذب خطی اساس کار به این صورت است که مجددا از لیزر و آشکارساز استفاده می‌شود. با این تفاوت که باید شدتهای مختلفی را از نمونه عبور دهیم و شدت های عبوری را اندازه بگیریم. بدین منظور باریکه لیزر ابتدا از قطبش‌گر تحت ده زاویه مختلف عبور کرده وسپس وارد آشکارساز می‌شود تا شدت اولیه به ازای ده زاویه بدون برخورد به نمونه اندازه‌گیری شود، سپس باریکه

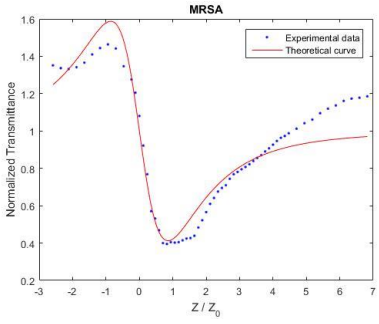
این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-06-07]

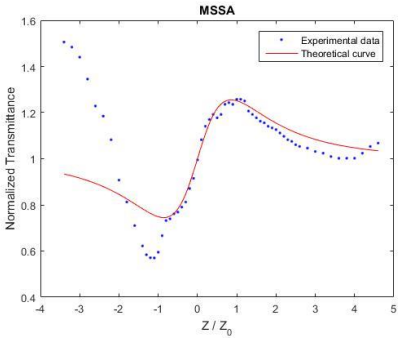
مجددا از قطبش‌گر تحت همان ده زاویه اولیه عبور داده میشود و سپس نور عبور کرده از قطبش‌گر به نمونه باکتری یا بایو فیلم برخورد داده می‌شود و نهایتا وارد آشکارساز و پاورمتر می‌شود. در هردو آزمایش برای اندازه‌گیری ضریب شکست غیرخطی و ضریب جذب خطی از لیزر با طول موج ۵۳۲nm و قطر پرتو ۲mm استفاده شد. نمودارهای تئوری در شکل های (۳) و (۴) با توجه به پدیده خود کانونی و خود واکانونی در نظر گرفته شده است که اگر ضریب شکست نمونه که همان باکتری است مثبت باشد پدیده خود کانونی رخ میدهد و اگر ضریب شکست نمونه منفی باشد پدیده خود واکانونی رخ میدهد یعنی در مورد اول نمونه مانند عدسی همگرا و در حالت دوم نمونه مانند عدسی واگرا رفتار میکند[۷] [۶] [۵] .

تحلیل و نتایج

نمودار رفتار اپتیکی غیرخطی باکتری‌های MRSA و MSSA به ترتیب در شکل های ۳و۴ آمده است. همان گونه که مشاهده میشود رفتار غیرخطی باکترهای MRSA و MSSA که اولی مقاوم و دومی حساس به دارو است کاملا متفاوت است. MRSA دارای ضریب شکست غیرخطی منفی و MSSA دارای ضریب شکست غیرخطی مثبت می‌باشد.

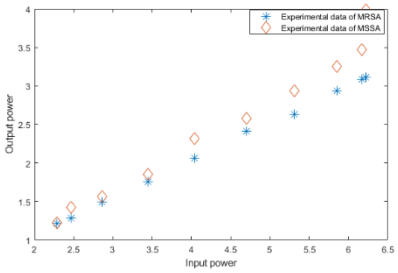


شکل ۳: نمودار شدت نرمال شده عبوری باکتری MRSA



شکل ۴نمودار شدت نرمال شده عبوری باکتری MSSA

برای اندازه‌گیری ضریب شکست غیرخطی باکتری‌ها لازم است در ابتدا ضریب جذب را داشته باشیم. که از روی نمودار شکل ۵ محاسبه میگردد.



شکل ۵: نمودار محاسبه ضریب جذب باکتری‌ها

در هنگام بررسی ضریب جذب خطی و وارد کردن داده های آزمایش در برنامه محاسباتی متلب شیب دو نمودار را در برنامه مشخص می‌کنیم، برنامه به ما یک معادله خطی بر اساس نمودار وارد شده میدهد که شیب معادله خطی بیانگرOD به دست آمده است که در جدول (۱) قابل مشاهده است سپس ضریب α با استفاده از OD و رابطه‌ی($(\alpha = -\left(\frac{1}{L}\right)\log(\mathrm{OD})$ در برنامه متلب محاسبه میشود و اعداد به دست آمده مربوط به آن در جدول شماره (۱) قابل مشاهده است. شیب نمودار در اینجا نشان دهنده نسبت شدت اولیه به شدت عبوری به طور میانگین است که بر اساس رابطه بیر- لامبرت (معادله شماره (1)) جذب نوری(OD) و ضریب جذب α محاسبه میشود. ضریب

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-06-07]

شکست غیرخطی باکتری‌ها را می‌توان از رابطه زیر به دست آورد[۶] .

$$n_2 = \frac{\lambda \Delta T_{pv}}{\left(2\pi I_0 L_{eff}(0.406)(1-s)^{0.25}\right)} \qquad (1)$$

در رابطه بالا λ برابر طول موج لیزر ، ΔT_{pv} اختلاف کمینه و بیشینه شدت عبوری نرمال شده ، I_0 شدت بیشینه در کمره پرتو که توسط نمونه دریافت میشود، L_{eff} طول موثر نمونه است که از رابطه (3) محاسبه میشود و S عبور

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \alpha L \qquad (2)$$

$$L_{e_{ff}} = \frac{1-\mathrm{e}^{-\alpha L}}{\alpha} \qquad (3)$$

اختلاف کمینه-بیشینه شدت بهنجار شده، (ΔT_{pv}) از روی نمودار تابع نظری برازش شده روی داده های تجربی در نمودارهای ۳ و ۴ به دست می آید. با توجه به مقادیر به دست آمده از روی نمونه ها مشخص شده است که اولا همه‌ی نمونه‌های باکتری استافیلوکوکوس رفتار غیرخطی اپتیکی دارند که در نمونه‌های مقاوم و غیرمقاوم با هم متفاوت است و مقدار ضریب شکست غیرخطی همگی آن ها از مرتبه $10^{-5}(cm^2/W)$ است. باکتری‌های مقاوم به دارو مقادیر ضریب شکست منفی و غیرمقاوم آن مقادیر مثبت دارند که در جدول شماره ۱ آمده است، در جدول زیر اعداد ضریب شکست مربوط به باکتری‌ها آورده شده است که این اعداد با استفاده از فرمول شماره (۱) در برنامه محاسباتی متلب کد نویسی و سپس محاسبه شد که با توجه به فرمول ابتدا باید مقادیر ضریب جذب و جذب نوری را برای محاسبه ضریب شکست داشته باشیم که مقادیر عددی آن‌ها در جدول قابل مشاهده است. هم‌چنین شیب خط نمودار جذب خطی باکتری MRSA یعنی گونه مقاوم به دارو کمتر از شیب خط باکتری MSSA می‌باشد که نشان می دهد جذب خطی MRSA بیشتر است.

جدول۱:مقادیر ضریب شکست،ضریب جذب،و جذب نوری باکتری‌ها

باکتری	$n_2(\frac{cm^2}{W})$	$\alpha(mm^{-1})$	جذب نوری OD
MRSA1	-1.6×10^{-5}	388	0.46
MRSA2	-2.6×10^{-5}	366	0.48
MRSA3	-1.44×10^{-5}	117	0.79
MSSA1	1.03×10^{-5}	272	0.58
MSSA2	1.7×10^{-5}	247	0.61
MSSA3	2.3×10^{-5}	354	0.27

مرجع ها:

[1] **S. J. Van Hal, D. Stark, B. Lockwood, D. Marriott, and J. Harkness, "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for use with infection-cont," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 8, pp. 2486–2490, 2007.**

[2] **P. C. Appelbaum, "MRSA—the tip of the iceberg," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 12, pp. 3–10, 2006.**

[3] **P. N. Prasad, "Emerging opportunities at the interface of photonics, nanotechnology and biotechnology," *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 446, pp. 1–10, 2006.**

[4] **A. Shakouri, Z. Shorsheyni, H. Reza, S. Mahdavi, and Z. Khodabakhshi, "Identification and discrimination bacterias of Gram positive and negative using Laser-induced break down spectroscopy (LIBS)," pp. 901–904.**

[5] **M. Behravan, N. Ghaziyani, S. Mohajer, A. Kavianfar, S. S. Shik, and M. H. M. Ara, "Nonlinear optical investigation of TiO 2 nanoparticles using Z-Scan technique Abstract :," pp. 2–4.**

[6] **W. Zhao and P. Palffy-Muhoray, "Z-scan technique using top-hat beams," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 63, no. 12, pp. 1613–1615, 1993.**

[7] **J. He *et al.*, "Excitonic nonlinear absorption in CdS nanocrystals studied using Z-scan technique," *J. Appl. Phys.*, vol. 95, no. 11,**

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-06-07]