Antibiotic susceptibility test

محاضرة رقم (2)

Teh, C.H., Nazni, W.A., Nurulhusna, A.H., Norazah, A., Lee, H.L. (2017). Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. BMC Microbiol, 16;17(1), 36.

Kolarević, S., Milovanović, D., Avdović, M., Oalđe, M., Kostić, J., Sunjog, K. and Vuković-Gačić, B. (2016). Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. Bot, 40, 29-36.

الاختبارات الحساسية للمضادات الحيوية

تعد الاختبارات الحساسة للمضادات الحيوية هي من أهم الاختبارات الحيوية للتشخيص السليم والتي من خلال نتائجها تعين نوع المضاد الحيوي اللازم لعلاج المريض صاحب النموذج حيث لا يكتفي فقط معرفة الإحياء المجهرية المسببة للمرض وذلك لتغيرات المختلفة في سلالات من نفسها نوع الإحياء المجهرية ، وتعد هذه التقنية مهمة جدا في تشخيص المضادات الحيوية المناسبة للمريض إذ ان استخدام المضادات الحيوية دون عمل هذا الاختباريمكن إن يضر المريض حيث يمكن إن يؤدي المضاد الحيوي الخاطئ إلى انتقاء السلالات البكتيرية المرضية المقاومة للمضاد الحيوي أو قد يؤدي إلى نشوء حساسية لدى المريض للمضاد الحيوي.

اختبارات تحديد التركيز المثبط الأدنى minimum inhibitory concentration test (MIC)

طرق عمل اختبار MIC

عموما هناك طريقتان لتحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) وهما :-

1- طريقة الانتشار حول الأقراص Disk diffusion method

2- طريقة التخافيف المتضاعفة المتسلسلة في المرق المغذي broth double dilution method

قبل البدء في العمل في أي منهما يجب مراعاة ما يلي :-

1- التعقيم: لجميع المواد المستخدمة في العمل .

2- استخدام محلول (**ماكفرلاند**) Macfarland standard solution

يحضر هذا المحلول كما يلي :-

- إضافة 1.174 من باريوم الكلوريد من 100 مل من الماء المقطر المعقم للمحلول على محلول تركيزه 0.048 .
- مزج 0.01 من حامض الكبريتيك المركز H_2So_4 حجمه لحجم المحلول على محلول عياريته 0.36 .
- مزج 0.5 مل مع محلول A مع 0.99 من المحلول **B** في انابيب زجاجية lamb and

3- استخدام السلالات القياسية ATCC

وهي السلالات البكتيرية حساسة لجميع المضادات الحيوية ATCC وهي اختصارا للكلمة American type culure collection وتستخدم كعزلات سيطرة ويكون لها جداول خاصة يحدد فيها التركيز المثبط الأولى لجميع المضادات الحيوية وتوجد لجميع الأجناس البكتيرية المختلفة وتحمل كل منها رقم محدد ومعروف لهذه الأجناس كما في الأمثلة التالية :

E.coli ATCC 25922

P. aeruginosa ATCC 27853

4- تحضير العالق البكتيري Preparation and standardization of bacteria inoculums

هناك عموما طريقتان لتحضير العالق البكتيري وهما :

- يتم تحضير هذا العلق 4 - 5 مستعمرات نقية بواسطة عروة اللوب إلى أنبوب اختبار حاوي على 5 مل من المرق المغذي وتحضن بدرجة 37 مْ لمدة 3- 5 ساعات لحين ظهور نمو على شكل عكورة او راسب او حلقة ثم تضبط كثافة المعلق البكتيري باستخدام محلول Macfarland standard solution القياسي الذي ورد تحضيره سابقاً بإضافة كمية من المحلول الملحي الفسيولوجي المعقم او من البكتريا إلى إن يضبط المقدار النهائي للعكرة لحد القيمة التي تقابل ما تم قرأتهُ باستخدام الأنبوب القياسي .
- تحضير العالق البكتيري بأخذ ما مقداره ملأ عروة اللوب loop full ويخطط على سطح مادة الاكار المغذي وثم تحضن بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة ثم يضاف الى المزروع البكتيري 10 مل من المرق المغذي Nutrient broth ويخلط المعلق لمدة 30 ثانية باستخدام vortex (خلاط).

5- قياس البكتريا Bacteria standardization

ضبط اللقاح باستخدام محلول ثابت العكرة القياسية إذ نقارن عكرة الأنبوب الحاوية على اللقاح بعكرة أنبوب ثابت العكرة القياسية بإضافة كمية من البكتيريا أو كمية من محلول الفسلجة المعقم وضبط المقدار النهائي للعكورة لحد القيمة التي تقابل ما تم قراءته باستخدام الأنبوب القياسي .

- يعد استخدام طريقة الانتشار حول الأقراص لمعرة حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضادات الحيوية طريقة سهلة وسريعة واقتصادية ويتم الاختبار كما يلي :-

1- **استخدام وسط أكار (Moller - Hinton agar)**

وحضرَ الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وصب في الأطباق بواقع 20 مل لكل طبق وبعد التصلب تحُضن الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة $37\ ^{o}C$ لمدة 24 ساعة لتأكد من خلو الأطباق من التلوث وللتخلص من الرطوبة الزائدة ثم تحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

2- يتم تخفيف العالق البكتيري المحضر سابقا بنسبة 1 : 100 (10 cfu/ml) باستعمال المحلول الملحي الفسيولوجي .
3- استخدام المسحة القطنية المعقمة Sterilized Cotton Swabs لنشر العالق البكتيري على سطح وسط أكار مولرهنتون بعد غمرها في أنبوبة المعلق البكتيري ثم نقلت إلى سطح الطبق ومررت علية ثلاث مرات مع تدوير الطبق بزاوية 60° درجة بعد كل تمريره للحصول على نمو متجانس ثم تركت الأطباق لمدة 5 دقائق .
4- تزرع أقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط الزرعي باستخدام ملقط معقم مع الضغط الخفيف بنهاية الملقط على سطح القرص لتثبيته ثم حضنت الأطباق مقلوبة في درجة حرارة $37\ ^{O}C$ في الحاضنة ولمدة 18 - 24 ساعة .
5- تم قياس مناطق التثبيت حول كل قرص بالمليمتر وبواسطة مسطرة مدرجة وقورنت بالمعدلات القياسية لأقطار مناطق التثبيت للمضادات الحيوية .
6- استخدمت العزلات البكتيرية القياسية (ATCC) كعزلات سيطرة لقياس فعالية أقراص المضادات الحيوية .

جدول المواصفات القياسية للمضادات الحيوية
كمثال بالنسبة لبكتريا *Pseudomonas aeraginosa*

اسم المضاد	محتوى القرص بالميكروغرام	قطر التثبيت (ملم)	
		حساسية (S)	**مقاومة (R)**
Amikacin	**30**	**> 17**	**< 15**
Atronam	**30**	**> 23**	**< 17**
Cefepime	**30**	**> 21**	**< 15**
Cefeperazone	**30**	**> 23**	**< 17**
Ceftazidime	**30**	**> 21**	**< 15**
Ciprofloxcin	**5**	**> 22**	**< 19**
Gentamicin	**15**	**> 15**	**< 12**
Jmipenem	**10**	**> 22**	**< 17**
Kanamycin	**25**	**> 16**	**< 10**
meropenem	**10**	**> 20**	**< 15**
Uetilmicin	**30**	**> 19**	**< 17**
Piperacillin	**75**	**> 20**	**< 12**
Ticarcillin	**75**	**> 18**	**< 16**
Tobramycin	**10**	**> 22**	**< 14**

- **تحديد التركيز المثبط الأدنى بطريقة التخافيف المتضاعفة في المرق المغذي**

Brothdouble Dilution Method

تحضير تخافيف مضاعفة من المضادات الحيوية في حجم نهائي مقداره 5 مل في وسط لمرق المغذي .

1. يتم حقن سلسلة من الأنابيب بقطرة من المعلق البكتيري النامي بشكل جيد والمخفف بنسبة (100:1) والسلسلة الأخرى من الأنابيب (***E.coli* ATCC 25922**) والمخففة بالطريقة نفسها .
2. تحضن أنابيب الاختبار في الحاضنة بدرجة $35\ ^{O}C$ لمدة 6 - 8 ساعة.
3. بعد انتهاء فترة التحضين تم تحديد التركيز المثبط الأدنى على انه اقل تركيزا من المضاد الحيوي الذي يمنع ظهر النمو واضح.

فحص حساسية البكتريا للمضادات الحيوية حسب طريقة
Bauer - Kirby

الهــدف :

ان يكون الطالب قادرا على إجراء فحص حساسية البكتريا للمضادات الحيوية واخذ القراءة وكتابة التقرير للطبيب .

المبــدأ :

يعتمد على مدى قدرة المضاد الحيوي على قتل البكتريا سواء بالتثبيط والقتل وكلاهما يؤدي إلى موت البكتيريا وبالتالي نستطيع تصنيف البكتيريا لتأثرها بالمضاد الحيوي سواءً التحسسيه أم الوسطية أو المقاومة .

الأجهزة والأدوات والمواد اللازمــة :

- وسط حساسية sensitivity agar
- البكتريا المراد فحصها
- أقراص مختلفة من المضادات الحيوية
- ماسحة قطنية Cotton Swap
- حاضنة
- نبوب يحتوي على 4 مل Trypticase soy broth
- ملقط
- مسطرة
- جدول Bauer - Kirby

الرقم	الخطوات	المبررات
.1	انقل 5 مستعمرات من النمو النقي المراد فحصة إلى أنبوب يحوي 4 مل Trypticase soy broth	لتنشيط النمو
.2	ضع الأنبوب في الحاضنة تحت درجة 37 مْ لمدة 2 -5 ساعات.	لإنتاج معلق متوسط العكورة .
.3	قارن أنبوب النمو مع الأنبوب المعياري لمحلول كبريتات الباريوم من حيث العكورة	لمعايرة كثافة النمو المعني
.4	خفف بالماء المعقم أو المحلول الملحي المعقم إذا كانت كثافة النمو أعلى من المحلول المعياري أو مدد فترة الحضانة إذا كانت اقل .	لضبط كثافة النمو
.5	اغمر المساحة القطنية cotton swab في أنبوب النمو ولفه على جدار الأنبوب .	ليحمل عدد من البكتريا والتخلص من الزائد .
.6	انشر ما علق على المساحة القطنية من نمو على سطح طبق الوسط sensitivity agar	لتوزيع النمو على كامل سطح الطبق بشكل مجانس
.7	انتظر لمدة 3 - 5 دقائق ثم ضع أقراص المضادات الحيوية على سطح الطبق بشكل منتظم مع ضغط خفيف عليها بواسطة الملقط المعقم .	حتى يجف سطح الطبق ولتجنب تقاطع حلقات القتل ومنع تحرك الأقراص من مكانها.
.8	ضع الطبق في الحاضنة تحت درجة 37 مْ لمدة 24 ساعة	للسماح للبكتريا بالنمو .
.9	في اليوم التالي خذ قياس قطر حلقات قتل البكتيريا	لمعرفة قطر حلقة القتل حول

	حول الأقراص بوساطة المسطرة .	قرص المضاد الحيوي
.10	قارن أقطار حلقات القتل مع الجدول المعياري	للحكم على إن المضاد قاتل أم متوسط القتل أم غير قاتل .
.11	اكتب التقرير كما يلي : 1- البكتيريا المعزولة حساسة لـــــ: .1 .2 .3 2- ومقاومة لـــــ: .1 .2 .3	حتى يعلم الطبيب أنواع المضادات الحيوية المستخدمة في الفحص كاملة.

In microbiology, **McFarland standards** are used as a reference to adjust the turbidity of bacterial suspensions so that the number of bacteria will be within a given range to standardize microbial testing. An example of such testing is antibiotic susceptibility testing by measurement of minimum inhibitory concentration which is routinely used in medical microbiology and research. If a suspension used is too heavy or too dilute, an erroneous result (either falsely resistant or falsely susceptible) for any given antimicrobial agent could occur.

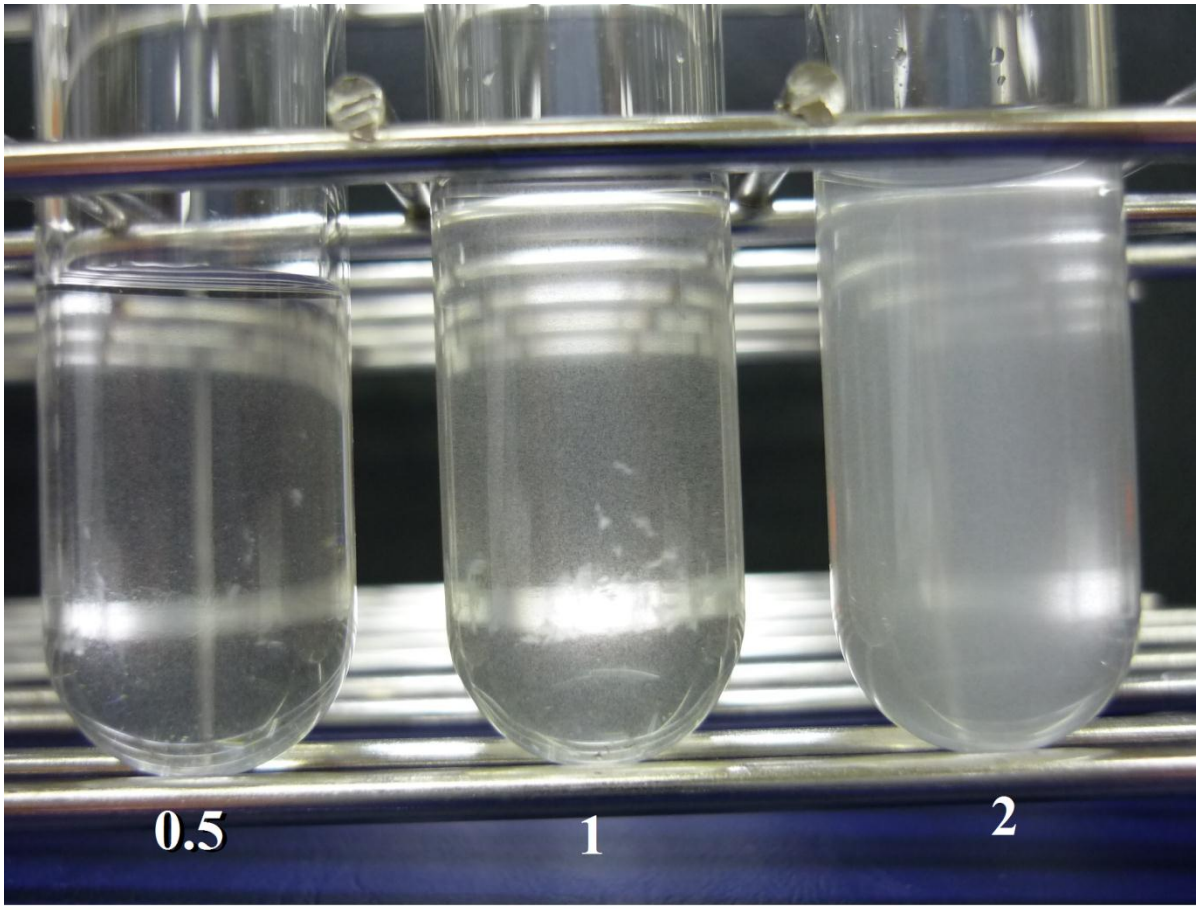
The standard can be compared visually to a suspension of bacteria in sterile saline or nutrient broth. If the bacterial suspension is too turbid, it can be diluted with more diluent. If the suspension is not turbid enough, more bacteria can be added.

McFarland nephelometer standards:[citation needed]

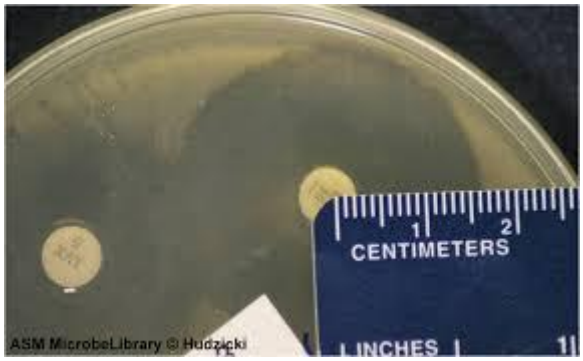
McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1X10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
Absorbance*	0.08 to 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669

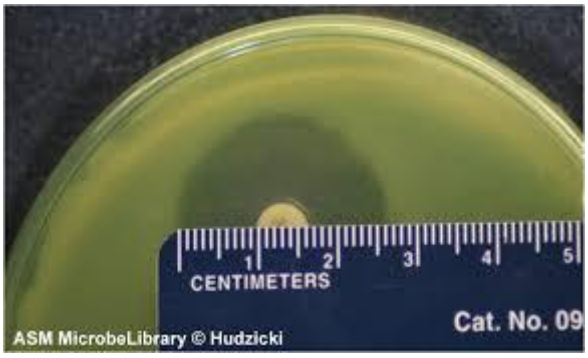
*at wavelength of 600 nm

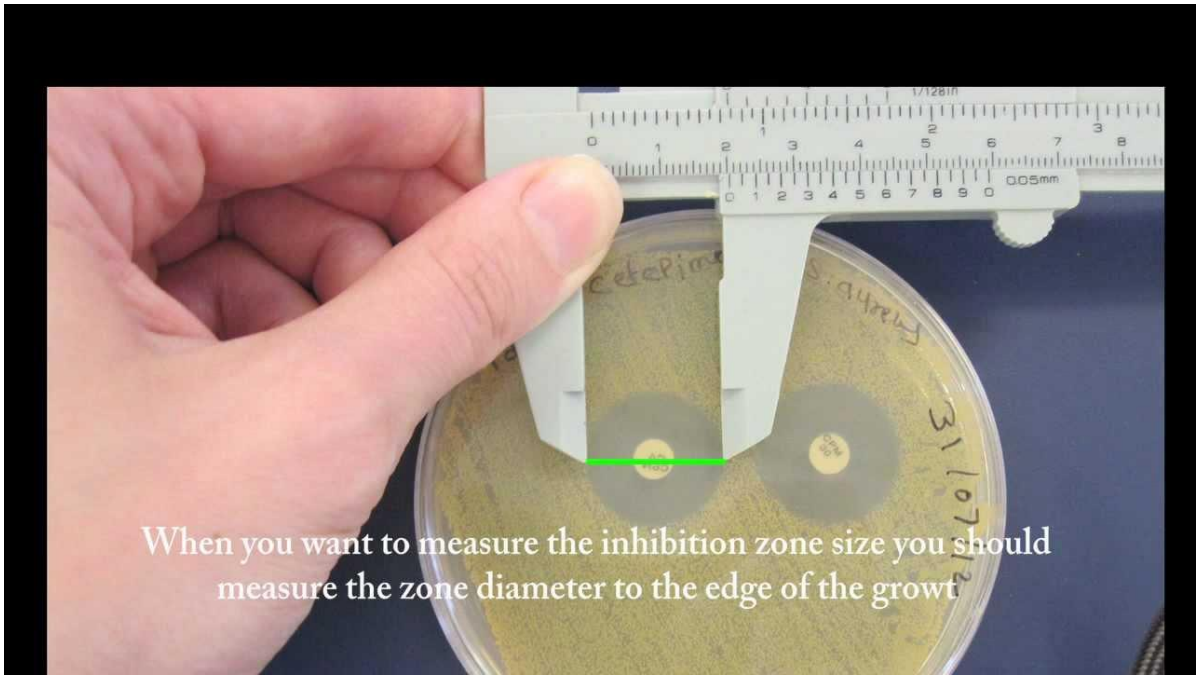
McFarland
1.0 MFU (PMS)
IVD MIBI
McFarland
2.0 MFU
REF
050033-0010
IVD MIBI
McFarland
3.0 MFU
REF
050034-0010
IVD MIBI
McFarland
4.0 MFU
REF
050035-0010
REF 050007-0001



McFarland standards. No. 0.5, 1 and 2




CENTIMETERS
ASM MicrobeLibrary © Hudzicki
Cat. No. 09


When you want to measure the inhibition zone size you should
measure the zone diameter to the edge of the growt