المسح الكشفي عن المضادات الحيوية

المسح الكشفي عن المضادات الحيوية :

تعريفه : اختبار نشاط المضادات الحيوية والكائنات التي تنتجها واختبار فعاليتها في المختبر وعلى الحيوان للتمهيد لتصنيعها وتسويقها طبياً .

خطواته :

أولاً : عزل الميكروبات من مصادرها الطبيعية :

- إن الظروف الطبيعية لاكتشاف مضاد حيوي جديد هو اكتشاف للكائن الذي ينتجه .
- أغلب ما يدرس ككائنات منتجة للمضادات الحيوية بشكل كبير هي البكتيريا و الأكيتنومايسبتس والفطريات .
-يعتمد اختبار بيئة زراعية صناعية على نوع الميكروب المراد عزله .

البكتيريا والأكتينومايستس	**أ. تحتاج إلى بيئات معقدة وغنية.** **ب. درجة حموضة .** **ج. pH لابد أن تبدو بدرجة قاعدية لكي تمنع نمو الفطريات.**
الفطريات	**أ. لابد من منع تلوثها بالبكتيريا وذلك بضبط درجة الحموضة كي تكون حامضية .** **ب. في بعض الأحيان تضاف مثبطات للبكتريا لعزل بيئة نقية من الفطريات ومن هذه المثبطات Bengal red ,alone أو تآزر مع ستريبتومايسين ستوبيتومايسين.**

ثانياً : المسح الأولي عن المضادات الحيوية :

المسح الأولي يتضمن طريقين من الاختبارات

1- طريق الاختبارات التقليدية	2- طريق الاختبارات الحديثة
- ترتكز على تتبع النشاط الميكروبي في بيئة الآجار **- تستخدم في هذه الاختبارات بكتيريا *E.coli* *Staphylococcus aureus* وبعض أنواع البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام .** **- جميعها تستخدم كعينات معيارية لقياس نشاط المضاد الحيوي .**	**طرق القياس بمعايير وأجهزة متنوعة.** **تتضمن عمليات المسح الابتدائي عدد (5-6) خطوات**

ثالثاً : المسح الثانوي عن المضادات الحيوية :

يتضمن 1- الاختبارات الحيوية 2- الاختبارات الكيموحيوية 3- الاختبارات الكيميائية 4- الاختبارات الفيزوكيميائية 5- الاختبارات الصيدلانية والدوائية

المصطلحات هامة:

Antimicrobial	**مضاد الميكروبات وهو مادة طبيعية أو مصنعة أو شبه مصنعه لها القدرة على قتل أو تثبيط الميكروبات**
Antibacterial	**مضاد البكتيريا وهو يقتل أو يثبط النمو البكتيري**
Antifungal	**مضاد الفطريات يستعمل لمعالجة الإصابات الفطرية**
Antiparasitic	**مضاد للطفيليات يعمل على قتل أو تثبيط الطفيليات**
Antiviral	**مضاد الفيروسات وهو يستخدم لمعالجة الاصابات الفيروسية**
Antiseptic	**المطهر وهو مادة تعمل على تعقيم الأسطح الخارجية كالجلد وهي ليست سامة**
Disinfectants	**المطهرات تعمل على قتل الكائنات المجهرية التي على الأجهزة والأدوات (لأنها سامة)**
Sanitizer	**يخص الصحة وهو عوامل تقلل عدد الميكروبات لمستويات آمنة (لا توجد إزالة كلية للميكروبات)**
Antibiotics	**مضادات حيوية : وهي مواد كيمائية تقتل أو تثبط الميكروبات.**

مصادر المضادات الحيوية من الأصل الميكروبي:

المضاد الحيوي Antibiotic	الكائن الحي الدقيق Microorganism
1- البكتيريا **Bacitracin**	***Bacillus licheniformis***
2- الفطريات الخيطية (البكتيريا الشعاعية) **Streptomycin**	***Streptomyces griseus***
3- الفطريات **Penicillin**	***Penicillium notatum***

صفات الجودة في المضاد الحيوي:

1) قدرتها على إبادة عدد من الميكروبات
2) أن لا تنتخب سلالة مقاومة لها من الميكروب
3) غير سام وخالي من الأعراض الجانبية
4) أن لا يسبب الحساسية
5) سرعة الانتشار والوصول الى مكان العدوى
6) أن يكون مستقرا كيميائيا
7) لا يقضي على normal flora
8) أن يكون سهل الإنتاج ورخيص

antibiotic

- **عند الكشف عن نشاط المضاد الحيوي يجب معرفة تأثير ونشاط المضاد الحيوي بطريقتين:**

1- هل ينتج مضاد حيوي أو هل المادة المعزولة لها عمل مضاد
2- معرفة حساسية الميكروبات تجاه المضاد الحيوي

المضادات الحيوية من حيث مصادرها:

- مواد كيمائية عضوية طبيعية بواسطة البكتيريا والفطريات
- مواد كيمائية مصنعة
- مواد كيمائية شبه مصنعة

antibiotic

قياس نشاط المضادات الحيوية
Measuring Antibiotic activity

يلجأ الطبيب إلى الاختبارات داخل الأنيوب In vitro ثم يحولها ما يكافئ هذه المقادير حين يراد استعمالها في داخل جسم الكائن الحي In vivo .

**** من الطرق القياسية لتحديد تأثير نشاط المضاد الحيوي :**

الطرق التقنية Technological Methods	الطرق الميكروبيولوجية Microbiogical Methods *هي الطرق التي تعتمد على زرع البكتيريا في البيئات الصناعية لتحديد نشاط المضاد الحيوي , ومنها :*			طرق الانتشار والتخفيف
	طرق الانتشار	*طرق التخفيف*		
وهي التي تعتمد على استخدام التقنيات المتطورة وتستخدم في حال طلب سرعة التشخيص أو عدم قدرة الطرق الميكروبيولوجية , ومن هذه الطرق : 1- قياس العكارة Turbidimetry 2- قياس الكدر Nephelometry 3- قياس النشاط الإنزيمي Enzym Actity Method 4- قياس إنتاج CO2 5- المقاومة الظاهرية الكهربائية Impedance	أ- اختبار الحساسية sensitivity test : ويتم باختبار الانتشار في أطباق الآجار plate diffusion test ويتم بطريقتين : 1- اختبار الأقراص disc test : يتم بفرد كمية ثابتة من البكتيريا على سطح الآجار ومن ثم وضع أقراص المضادات ذات تركيز معلوم وتحضن مقلوبة لمدة 24 وبدرجة 37° م . 2- اختبار التخطيط الشعاعي streak test : يتم بتخطيط كمية ثابتة من البكتيريا على سطح الآجار بشكل شعاعي مع وضع قرص في من نصف الطبق ذو تركيز معلوم وتحضن مقلوبة لمدة 24 وبدرجة 37° م .	ب- أقل تركيز مثبط (MIC) : وهو أقل تركيز من المضاد قادر على تثبيط النمو . ولقياس MIC : 1- اختبار التخفيف المتسلسل للمرق serial dilution test : ويتم بتلقيح أنابيب المرق المغذي بقدر معلوم من البكتيريا وتحضن لمدة 18-24 ساعة عند37° م وأول أنبوبة يتم ملاحظتها بالعين المجردة لايوجد بها نمو هي MIC 2- اختبار التخفيف المتسلسل للآجار Agar dilution : يشبه اختبار المرق لكن هنا نستخدم الآجار بسبب العكارة التي تسببها بعض العوامل المضادة بسبب عدم ذوبانها بشكل تام .	ج- أقل تركيز قاتل Minimum Bacteriocidal concentration : وفيها يكون أقل تركيز في المضاد قادراً على قتل النمو البكتيري . ولقياس MBC يتم بفرد بيئات غير معكرة أي أنها فوق نقطة MIC بواقع 0.1 مل وتحضن 24 ساعة عند 37° م وبعد التحضين يتم ملاحظة الطبق الذي لايظهر فيه نمو هو الطبق الذي يعكس قيمة الـMBC .	E-test طريقة (Epsilometer): تعتمد على استخدام مجموعه معروفه من 15 تركيز مختلف من المضاد الحيوي المختار محمله على شريط من البلاستيك. يستخدم هذا الشريط لتحديد نطاق التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا من المضاد وتعتبر طريقه تأكيدية لإختبار الحساسيه AST. توضع هذه ألشرطة على سطح البيئة في أطباق والتي تحتوي على الميكروب محل الدراسة (Agar dilution) * يالاحظ انتشار المضاد وتأثيره على الميكروب من خلال تكوين (Inhibition zone (diffusion

اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية

هو اختباريجري للتنبو بنجاح او فشل المضاد الحيوي في العلاج, حيث تقاس استجابة نمو الكائن الدقيق المعزول لدواء معين ونتائج هذة الاختبارات تستخدم لاختيار المضاد المناسب مقرونة مع المعلومات السريرية للعلاج الامثل للمريض.

الاهداف هذه الاختبارات هي :

1- كدليل للعلاج: من خلال معرفةحساسية الميكروب لتركيز معين من المضاد

2-كاداة للتنبوبالوبائية :من خلال تحديد ظهور سلالات مقاومة من العوامل الممرضة

3-استمرار مراقبة نمط الحساسية في اكثر السلالات انتشارا مثل المكورات العنقودية والعصيات سالبة الجرام

تحضير الاختبار:

1-تنقية الميكروب محل الدراسة

2-تحضير المعلق البكتيري ويتم تقدير عدد الخلايا في المعلقباحدى الطرق:

The optical density (OD) at 600nm

Turbidity standard (McFarland) routinely performed

3-اختبار المضادات للاختبار:

المضادات التى تتوفر في معظم المستشفيات والتي ينبغي ان يتم بها الفحص الروتيني لكل سلالة

-تعيين الادوية التي اختبارها فقط بناء على طلب خاص من الطبيب اوعندما يكون الكائن المسبب للمرض مقاوم للعقاقير الخيار الاول او اسباب اخرى عندما يكون هناك حساسية من دواء وبسبب عدم توفره

طرق تقدير الحساسية للمضادات الحيوية:

أ- اختبار الحساسية بطريقة الانتشار:

وهي طريقة نوعية حيث يستخدم فيها عدة انواع من اقراص المضادات الحيوية

طريقة العمل:

1-تحضر اطباق بتري تحتوي على بيئة اجار مولر هنتون

2-يلقح سطح الطبق من المعلق البكتيري المحضر مسبقا بواسطة سواب

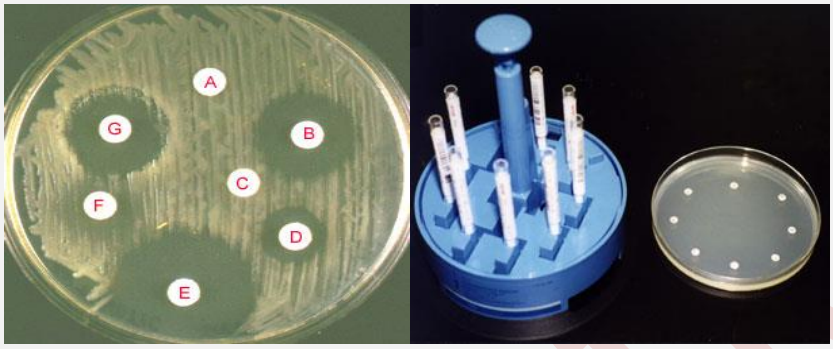
3-توضع الاقراص المضاد بواسطة ملقط معقم بالتهيب الكحولي.

4- يجب أن يبعد قرص المضاد الحيوي 15ملم عن نهاية حافة

5- تحضن الأطباق في الحضان عند 37م

antibiotic

بعد عملية التحضين يتم مشاهدة مناطق التثبيط وقياسها وكتابة النتائج.



العوامل المؤثرة على حجم منطقة التثبيط:

- كثافة المعلق – توقيت وضع اقراص – درجة الحرارة- وقت التحضين –عمق الاجار – تباعد المناسب بين االقراص – مكونات البيئة –الوقت المثالي ما بين 16-18 ساعة-

antibiotic

2- اختبار الحساسية باستخدام طريقة التخفيف

تعتبر طريقة التخفيف طريقة كمية Quantative تعتمد من حيث المبدأ على تحضير سلسلة من التراكيز المضاعفة تدريجيا للمضاد في وسط ملائم للنمو ثم اضافة عدد محدد من البكتيريا وملاحظة قدرة المضاد على تثبيط النمو او قتل البكتيريا قيد الاختبار من خلال ملاحظة تكون او عدم تكون العكارة في الانابيب.

وفيها يتم تقدير كلا من التركيز المثبط الادنى (Minimal inhibitory concentration - MIC) وهو اقل تركيز يؤدي الى تثبيط نمو البكتيريا قيد الاختبار , والتركيز القاتل الادنى (Minimal bactericidal concentration - MBC) وهو اقل تركيز يؤدي الى قتل البكتيريا قيد الاختبار.

طريقة العمل:

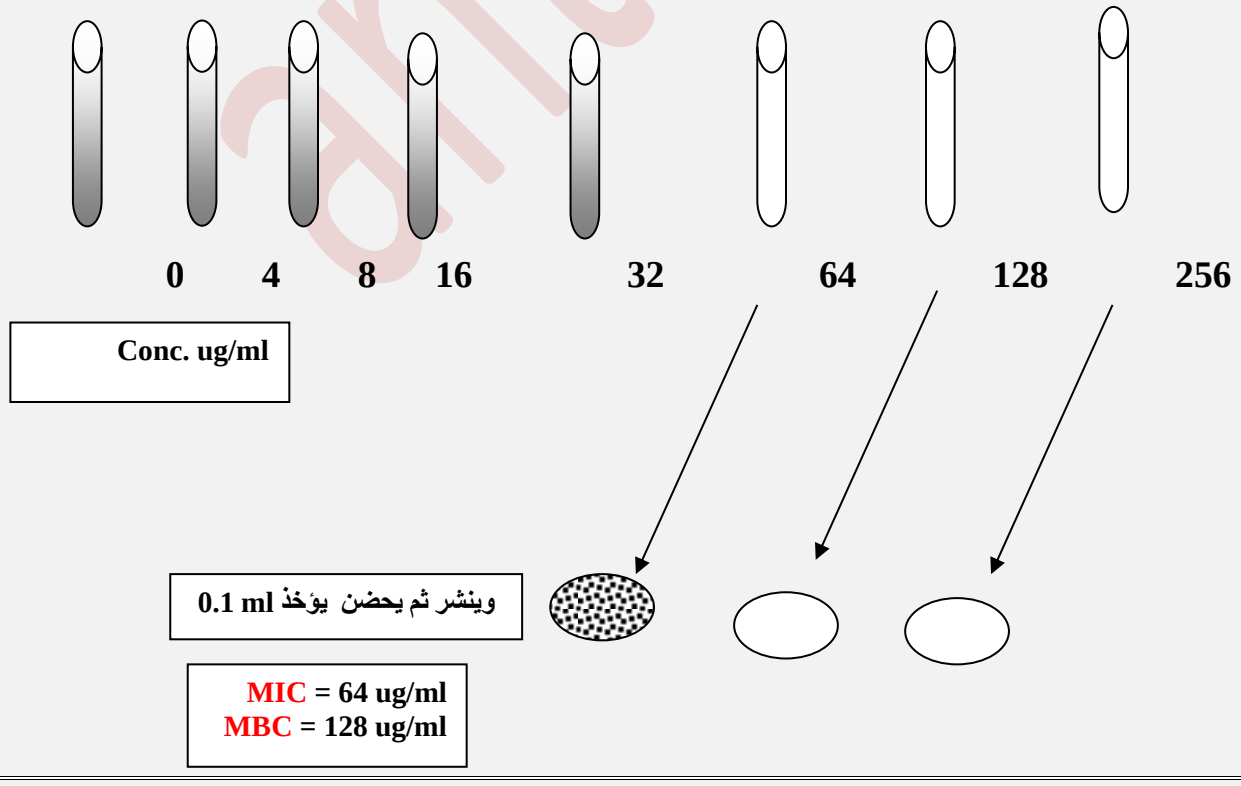
- تزرع كمية ثابتة من البكتيريا في وسط سائل هو وسط Muller Hinton Broth في انابيب اختبار معقمة بعدد التراكيز المطلوب تحضيرها من المضاد (عدد البكتيريا يتراوح بين 10^5-10^6 خلية/مل).

2- يتم اضافة المضاد الحيوي بتراكيز متزايدة بحيث يحتوي الانبوب الاول (رقم 1) على التركيز (صفر) من المضاد Control ثم يليه الانبوب الثاني (رقم 2) الذي يحتوي على اوطا تركيز من المضاد ويليه الانبوب الثالث (رقم 3) الذي يحتوي تركيز ضعف ما موجود في الانبوب رقم 2 وهكذا بالنسبة لبقية الانابيب.

3- تحضن الانابيب جميعا في درجة حرارة ملائمة للبكتيريا المدروسة ويتم فحص الانابيب بعد الحضن للتعرف على أي منها يحتوي نمو بدلالة العكرة اما الانابيب الرائقة فتشير الى عدم حدوث نمو نتيجة فعالية المضاد.

* لتحديد ال MIC : يتم اختبار اول انبوب رائق يأتي بعد سلسلة انابيب عكرة فيكون تركيز المضاد فيه هو ال MIC.

* لتحديد ال MBC : يتم اخذ كمية من الوسط الزرعي (0.1 مل) من الانابيب الرائقة الى طبق فيه وسط زرعي صلب Muller Hinton agar ثم تحضن الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة ثم تلاحظ المستعمرات النامية في كل طبق. يعتبر اول طبق لم يظهر فيه نمو هو MBC.



مثال: Group B Strptococcus

النتائج كما في الصورة

- **في الصف A يحتوي على المضاد الحيوي Clindamycin ويبدا من اليسار بتركيز** µg/ml **0.015 ثم يتضاعف التركيز الى 32** µg/ml حيث وجد MIC في حالة اكبر وذا يعني مقاومة البكتيريا.
- **في الصف F يحتوي على المضاد الحيوي Penicillin** يبدا µg **0.08 وينتهي** µg/m **1 وجد** MIC في µg/m0.06 يعني حساسية البكتيريا للمضاد
- **في الصف G يحتوي على المضاد الحيوي Erythromycin** بدا µg **0.03 وينتهي** µg/m **32 وجد** MIC في µg/m 8 يعني مقاومة البكتيريا للمضاد

3- تأثير المضاد الحيوي على البكتيريا بطريقة Epsilometer (test-E)

تعتمد على استخدام مجموعه معروفه من 15 تركيز مختلف من المضاد الحيوي المختار محمله على شريط من البلاستيك

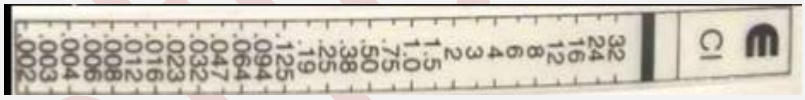
-يستخدم هذا الشريط لتحديد نطاق التركيز الأدنى المثبط لنمو البكتيريا من المضاد.

- تعتبر طريقه تأكيدية الاختبار الحساسية AST .

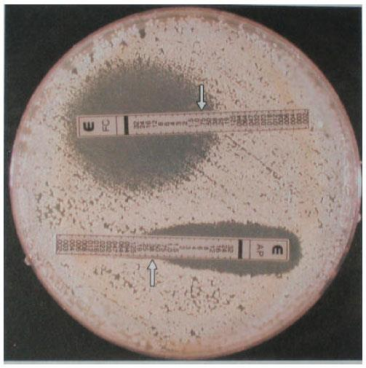
ما هو ال test-E

عبارة عن أشرطة بلاستيكية تعرف أيضا ب epsilometers كل شريط يحمل تراكيز معلومة ومتدرجة لنوع معين من المضادات الحيوية , ويمكن من خلالها تقدير الحد الأدنى للمضاد المثبط لنمو البكتيري

توضع هذه الأشرطة على سطح البيئة في أطباق والتي تحتوي على الميكروب محل الدراسةdilution Agar يلاحظ انتشار المضاد وتأثيره على الميكروب من خلال تكوين Diffusion (inhibition zone)



حدد عن طريق تحديد منطقة التقاطع بين حافة المنطقة المثبطة و الشريط وعند هذه النقطة يمكن تقدير الحد الأدنى من المضاد المثبط لنمو الميكروبMIC



-يمكن استخدام أكثر من شريط (أكثر من مضاد)

-اختبار مدى واسع من تركيز كل مضاد بسهولة مقارنة بغيره من الاختبارات.

طريقة العمل:

1.بواسطة swab في 3 اتجاهات -دون اعادة ملأها من المزرعة - كل على حده .

2 .تنقل الأشرطة باستخدام ملقط معقم بالتلهب الكحولي ،بحيث يوضع أكثر من شريط على أبعاد متساوية تقريب

3 .تحضن الطباق مقلوبه عند 37° م لمده 18 - 24 ساعه.

طريقة إجراء اختبار– test-E 1 :

يتم إخراج أشرطة Test-E من وحدة التبريد قبل إجراء الاختبار ب 30 دقيقة على الأقل

2-يحضر المعلق الميكروبي كما سبق دراسته . بتركيز 5- 3 McFarland0.

3 - بواسطة عود قطني Swab يخطط سطح الآجار ثالث مرات في كامل الطبق لضمان انتشار المعلق على كامل سطح الطبق أو تستخدم طريقة الناشر الزجاجي.

4- بواسطة ملقط معقم بالتلهب الكحولي يتم وضع أشرطة الاختبار بحيث يكون طرف الشريط الذي يحمل حرف E ,باتجاه حافة الطبق

5 .- تحضن الأطباق 24 ساعة عند 35 - 37° م.

ثم تسجل النتائج بعد مرور فترة التحضين يلاحظ ظهور شكل القطع الناقص حول الشريط بطريقة مرتبطة مع تركيز المضاد MICميكروجرام / مل وهذه القيمة تتوافق مع تركيز المضاد MIC المساعد اختيار العالج الأمثل للمرضى.

اختبار test-E باستخدام المضاد الحيوي Bio-Stat

التقنية: هي تقنية تعطي تدريجا من المضاد الحيوي وتعتمد على الانتشار

المشاهدة: ويمكن تحديد MIC من خلال هذه موضحا على الشريط عند نقطة اختفاء منطقة انعدام النمو

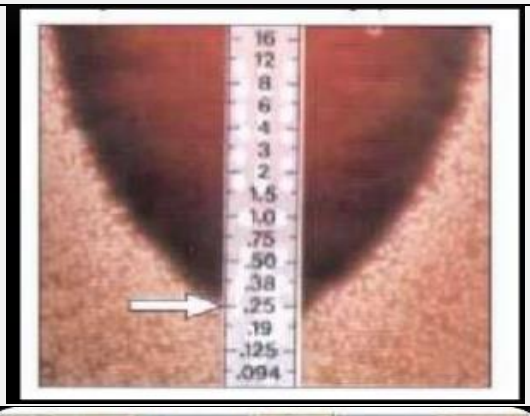
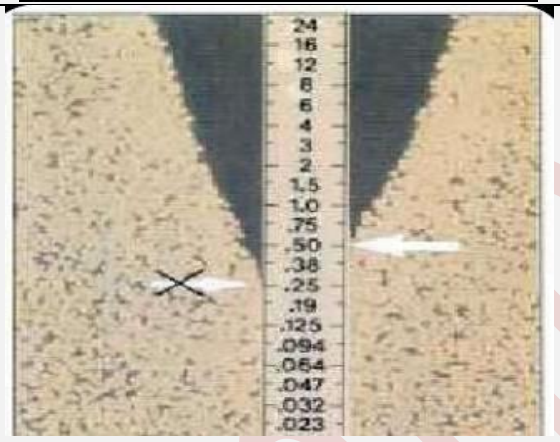
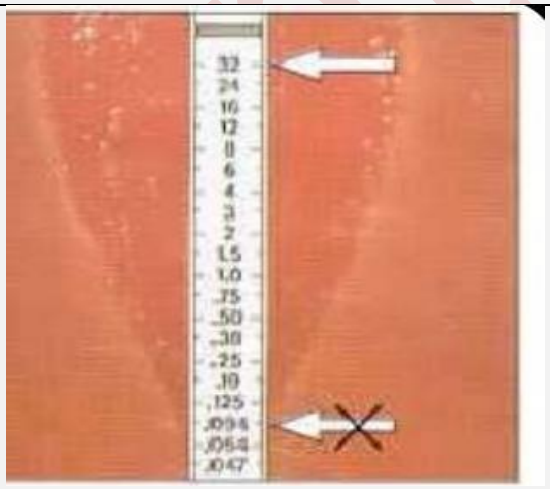
اختبار الانتشار خلال الأقراص:

المشاهدة: تظهر مناطق رائقهInhibition zones حول الأقراص المحملة كل منها بتركيز معروف من المضاد الحيوي

antibiotic

النتائج المتوقع ظهورها وطريقة تفسيرها

Interpretation Result

	**عند تطابق حافتي بداية منطقة التثبيط وظهور هالة تثبيط واضحة** **يحدد عن طريق تحديد منطقة التقاطع بين حافة المنطقة المثبطة و الشريط**
	**عند عدم تتطابق حافتي بداية منطقة التثبيط بحيث تبدو إحداهما أعلى من الاخرى وبالتالي تكون هناك قيمتان للحد الأدنى من المضاد المثبط لنمو الميكروب** **يتم اختيار التركيز الأعلى في تلك المنطقة**
	**قد تكون حافتي بداية منطقة التثبيط متطابقة ولكن ملاحظ عدم حدوث تثبيط كامل للميكروب بحيث يمكن ملاحظة بعد المستعمرات على طول منطقة التثبيط** **في هذه الحالة يعتبر هو أعلى تركيز في شريط المضاد الحيوي**