المقرر العملي للمضادات الحيوية

463 حدق

ملخص للمقرر العملي

اعداد

بسام النفيسي

الجدول الزمني للمقرر العملي مضادات حيوية 463 حدق

الاسبوع	الموضوع
1	مقدمة عن الامن و السلامة و الامن في المختبرات
2	مقدمة عامة و لمحة تاريخية عن المضادات الحيوية
3	و طرق اختبارات الحساسية ختبارات الحساسية للمضادات الحيوية والبيئة المستخدمة في دراسة الحساسية للمضاد الحيوي للMIC
4	Disc diffusion testختبار حساسية البكتريا بطريقة الانتشار للاقراص
5	Epsilometer (E-test)ختبار حساسية و دراسة تأثير المضاد الحيوي على البكتريا بطريقة
6	MIC and MBC(1)اختبار الحساسية بطريقة التخفيف المتسلسل للمرق للمضاد الحيوي و تحديد
7	MIC and MBC(2)اختبار الحساسية بطريقة التخفيف المتسلسل للمرق المغذي للمضاد الحيوي و تحديد
8	بواسطة تقدير عدد الخلايا البكتيرية MICاختبار الحساسية بطريقة التخفيف المتسلسل للمضاد الحيوي و تحديد بواسطة مقياسMcFarland
9	Gradient plate methodاختبار الحساسية للمضاد الحيوي بطريقة الطبق المتدرج
10	Micro-scanنبذة عامة عن جهاز
12	VITEK2 identification and susceptibilityنبذة عامة عن جهاز
13	أمثلة على الكائنات الحية الدقيقة Examples of Multi Drug Resistance(MDR) Microorganisms المقاومة للمضادات الحيوية
14	مراجعة للمقرر العملي لمقرر مضادات حيوية
15	الاختبار النهائي العملي للمقرر

العملي الاول

مقدمة عامة عن المضادات الحيوية

***المضادات الحيوية :هي عبارة عن نواتج أيضية ثانوية و بعضها تكون بروتينية تقوم بتثبيط أو القضاء على الكائنات الحية الدقيقة الممرضة و الغير الممرضة مثل البنسلن و الستربتومسين و الكائنات الحية الدقيقة التي تستطيع إنتاج المضادات الحيوية هي الفطريات مثل**

Penicillium notatum

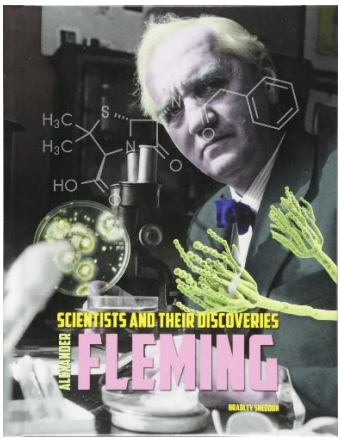
و البكتريا الخيطية أو الشعاعية مثل

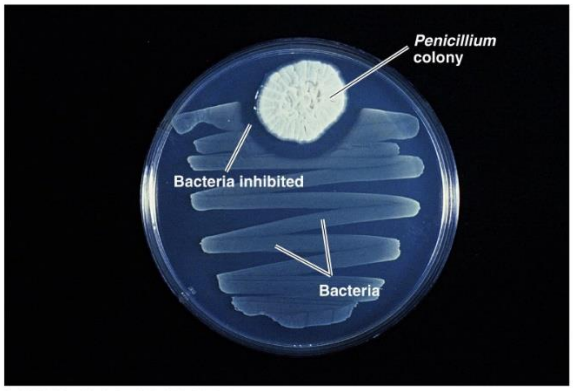
Actinomycetes sp.

*** قصة اكتشاف المضاد الحيوي:**

في عام 1928 م لاحظ العالم ألكسندر فيلمينج بالصدفة أن البكتريا تتأثر سلبا بعفن الخبز و تقول الرواية أنه نسي قطعة خبز متعفنة قرب أطباق البكتريا المعقمة التي كان يجري عليها تجاربه في المعمل فلاحظ في اليوم التالي أنها تسببت في قتل البكتريا و إيقاف نموها (تثبيط النمو) و لكي يتأكد من حقيقة التثبيط أو القتل استقطع أجزاء من عفن الخبز و هو نوع من الفطريات الدقيقة المنتمية لجنس البنسيليوم و زرعها على أنابيب تضمنت أنواع من البكتريا الممرضة بعدها اتجهت محاولاته إلى فصل تلك المادة المؤثرة و فعلا استطاع الحصول على المادة البروتينية الكيميائية و أطلق عليها إسم البنسلين نسبة إلى نوع الفطر الذي يفرزها وهو

Penicillium notatum





إلا أن فيلمينج لم يكون عالما كيميائيا فلم يستطع استخلاص البنسلين بشكل نقي و في عام 1929م نشرت أبحاث فيلمينج ولم تلفت النظر أول مرة رغم إعلانه عن هذا الاكتشاف من الممكن أن تكون له فوائد طبية في المستقبل و تكون خطيرة ولم يستطع فليمنج أن يبتكر طريقة لاستخلاص هذه المادة و تنقيتها و ظل هذا العقار السحري لمدة عشر سنوات دون أن يستفاد منه أحد و في عام 1930 قرأ اثنان من الباحثان البريطانيان هما هوارد فلوري و ارنست تشين ماكتبه فيلمنج عن هذا الاكتشاف الخطير و تمكنوا أخيرا من استخلاص مادة البنسلين المؤثرة و تحضيرها كعقار وقاموا بتجربة المادة على فئران التجارب و استعمل البنسلين لأول مرة على المرضى بعد عشر سنوات 1941 م عندما تم حقن شرطي انجليزي مصاب بتسمم الدم كانت نتائج الحقن إيجابية إلا أنه مات لعدم وجود الكميات الكافية من العقار في ذلك الوقت في السنوات التالية حضرت

أنواع متفاوتة من هذا المضاد (من حيث القوة و طريقة الامتصاص) ساهمت في إنقاذ حياة آلاف الجنود في الحرب العالمية الثانية و حين انتهت الحرب أصبح البنسلين في متناول المدنيين في بريطانيا و أمريكا وسارعت لأنتاجه شركات عالمية و أتت فترة من الفترات أصبح البنسلين قادرا على علاج كافة الأمراض البكتيرية من الأمراض الجنسية و البولية و التنفسية من التهابات الحلق والأذن و الجروح البسيطة و رغم اكتشاف قدرة بكتريا

على مقاومة البنسلين بعد استعماله ضدها لفترة طويلة وتم تحضير بنسلين ف ليثبطها واصبح أكثر فعالية

Staphylococcus aureus

***Antbiotics: أقوى في تأثيرها على البكتريا الممرضة**

ميكروجرام/مل µg/m. و يقاس بتركيز فعال وهي

***Antimicrobial : عادة أضعف تأثيرا على الأحياء الدقيقة الممرضة**

يفوق التركيز الفعال في المضادات الميكروبية من هذه المواد

100 µg/m

***Bactericidal: هي التي يكون تأثيرها قاتل على البكتريا وتؤثر بشكل فعال على حيوية الخلية البكتيرية و لا يتكون جيل جديد عند زوال المضاد.**

***Bacteriostatic: هي التي نثبط نمو البكتريا ولا تقتلها فيبقى عددها ثابت طيلة فترة تعرضها للمضاد و يتكون جيل جديد عند زوال المؤثر.**

أهداف معامل المضادات الحيوية:.

1- . تحديد كيفية تأثير المضاد الحيوي على الاصابات البكتيرية.

2. تساعد في التحكم باستخدامات المضادات الحيوية للحالات السريرية.

3. تساعد المتخصصين في اختيار المضاد المناسب .

4.تحديد درجة الحساسية أو مقاومة الكائن الممرض لمدى معين من تركيز المضاد.

5.تساهد على تحديد جرعة المضاد الحيوي المناسبة و إعطائه للمريض.

6.يتم عزل الكئانات الحية الدقيقة المراد دراسة قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية من التربة.

العملي الثاني

اختبارات الحساسية

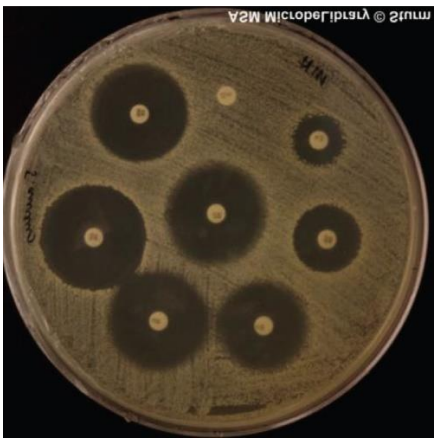
اختبار انتشار الأقراص

Disc diffusion test

تجرى هذه الاختبارات لمعرفة مدى حساسية كائن دقيق معين للمضادات الحيوية المنتجة من كائن حي دقيق آخر وقد تجرى أيضا اختبارات الحساسية لكائن حي دقيق معين لأحد أنواع المضادات الحيوية المصنعة و هناك ثلاث طرق لإختبارات الحساسية:

1-اختبار انتشار الأقراص أو الكيربي باور

Disc diffusion test (Kirby-Bauer test)



***البيئة المستخدمة لاختبارات الحساسية:**

Muller Hinton Agar

لأنها لا تحتوي على أملاح المغنيسيوم و البوتاسيوم و المواد الكيميائية الأخرى في غيرها من الأوساط و هذه الأملاح ترتبط بالمضادات و تكون معقدات لا تؤدي إلى عمل المضاد بشكل صحيح و تواجد النشا في البيئة يساعد على امتصاص السموم المفرزة من البكتريا و بذلك يساعد على انتشار المضاد الحيوي على سطح طبق البيئة.

***هناك ثلاث صور لتأثر الكائن الحي الدقيق المختبر للكائن المفرز للمضادات الحيوية :**

1-حساس أي أنه يتأثر بشكل محدود

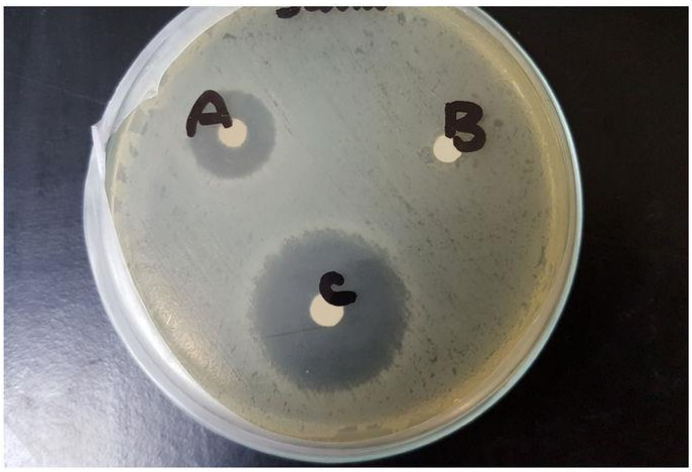
Sensitive (susceptible)

2-يتأثر بشكل محدود

Intermediate

3-مقاوم لا يتأثر بالمضاد

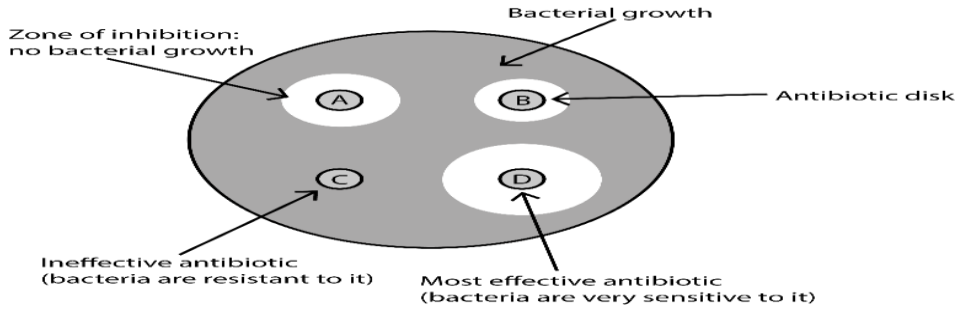
Resistant



A)Intermediate B)Resistant c)Sensitive

هالة التثبيطInhibition zone*:

هي الهالة التي تظهر عند اختبارات الحساسية على سطح الأطباق و يبين درجة تأثير المضاد الحيوي على البكتريا الممرضة وتكون منطقة خالية من النمو حول مستعمرة هذه البكتريا ويزداد حجمها مع ازدياد التأثر بالمضاد المنتج ودرجة تركيزه.



***كيف تحدد قدرة المضاد الحيوي على تثبيط البكتريا على سطح الطبق:**

تكون عن طريق قياس المسافة بالمليمتر(ملم)بين حدود المستعمرة النامية حول القرص المغمر بالمضاد الحيوي.

***اسم التجربة:اختبار انتشار الأقراص على سطح بيئة المولر هنتون آجار و قراءة مدى الحساسية للبكتريا.**

***الهدف من التجربة:الكشف عن حساسية البكتريا للماد ع طريق الأقراص**

***الأدوات المستخدمة:بيئة مولر هنتون آجار – ماسحات قطنية – أنبوبة المرق المغذي – مزارع طازجة من البكتريا – أقراص من المضاد الحيوي.**

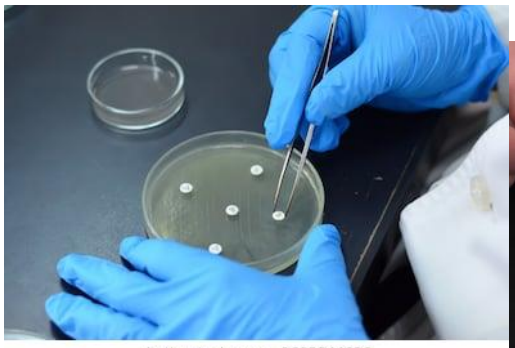
***طريقة العمل :**

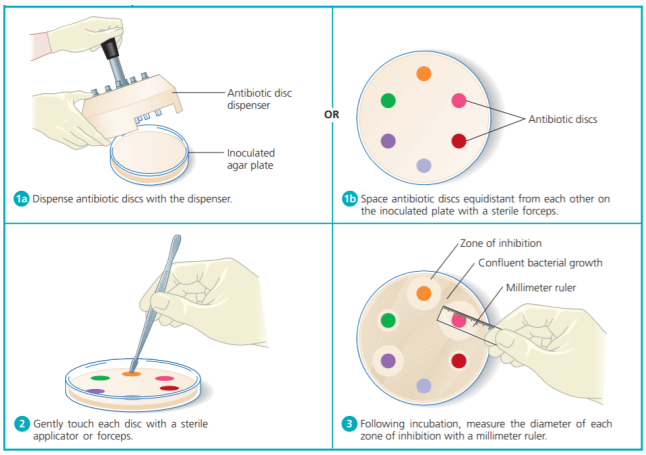
1-تحضير بيئة مول هنتون آجار و تعقيمها وصبها في ظروف معقمة تركها حتى تتصلب .

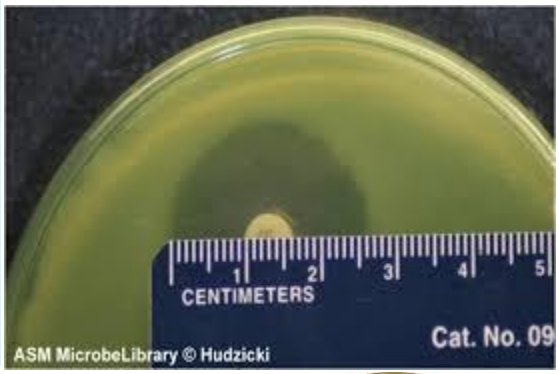
2-تحضير معلق بكتيري على أنبوب المرق المغذي وتحضينها لمدة 15دقيقة حتى يحصل تحفيز لنشاط للبكتريا أو تحضيرها على ماء فاتر أو ماء سالين

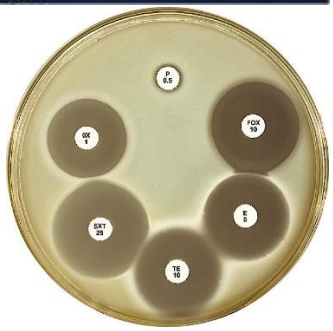
Saline water0.9%

3-من خلال الماسحة القطنية اغمرها من خلال الأنبوبة الملقحة بالمعلق البكتيري و امسح على كامل الطبق مع اتجاه عقارب الساعة و وضع الأقراص المراد اختبارها من المضاد الحيوي و تحضينها لمدة 18 ساعة ثم قراءة النتائج.









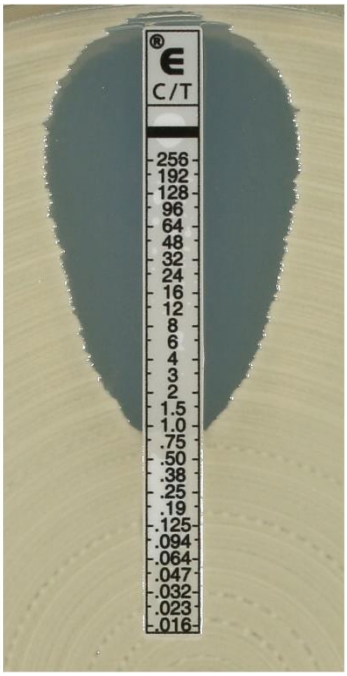
العملي الثالث

اختبار الحساسية بطريقة الشريط البلاستيكي

E-test(Epsilometer) methods

2- طريقة اختبار الشريط البلاستيكي المصنع و المغمور بالمضاد الحيوي

E-Test (Epsilometer)



تعتمد هذه الطريقة على مجموعة معروفة من المضادات الحيوية المختار محمله على شريط بلاستيكي ويستخدم لتحديد نطاق التركيز الأدنى المثبط لنمو البكتريا المضاد.

كل شريط يحمل تراكيز معلومة ومتدرجة لنوع معين من المضادت الحيوية ويمكن من خلالها تقدير الحد الأدنى للمضاد المثبط لنمو البكتريا الام اي سي .

MIC

Gradient plate methodو فكرته أخذت من طريقة الطبق المتدرج

توضع الأشرطة على سطح الطبق والتي تحتوي على البكتريا المرغوب دراستها وتحديد التركيز المناسب للمضاد الحيوي و نلاحظ انتشار المضاد على سطح الطبق .

لقراءة النتيجة يحدد عن طريق منطقة التقاطع بين حافة منطقة التثبيط والشريط وعند هذه النقطة يمكن تحديد الام اي سي.

الهدف من التجربة:تحديد التركيز القياسي المثبط للبكتريا .

***الأدوات المستخدمة :مزراعة بكتيريا طازجة – ماسحات قطنية – شريط بلاستيكي لمضاد حيوي-بيئة مولر هنتون آجار – أنبوب ماء فاتر 0.9% أو أنبوب مرق مغذي.**

***طريقة العمل:**

1-تحضير المعلق البكتيري لمدة 15 دقيقة على أنبوب المرق المغذي أو الماء الفاتر.

2-اغمار الماسحة القطنية بلأنبوب المحضر من المعلق البكتيري و من ثم مسح على سطح الطبق باتجاه عقارب الساعة و و وضع الشريط البلاستيكي في منتصف الطبق .

3-تحضين الطبق لمدة 18-24ساعة و من ثم قراءة النتائج

***عند تحضير اختبارات الحساسة سواء كانت الأقراص أو الشريط البلاستيكي على بكتريا**

Streptococcus pneuomonia

نستخدم

Muller hinton blood agar

***عند تحضير اختبارات الحساسة سواء كانت الأقراص أو الشريط البلاستيكي على بكتريا**

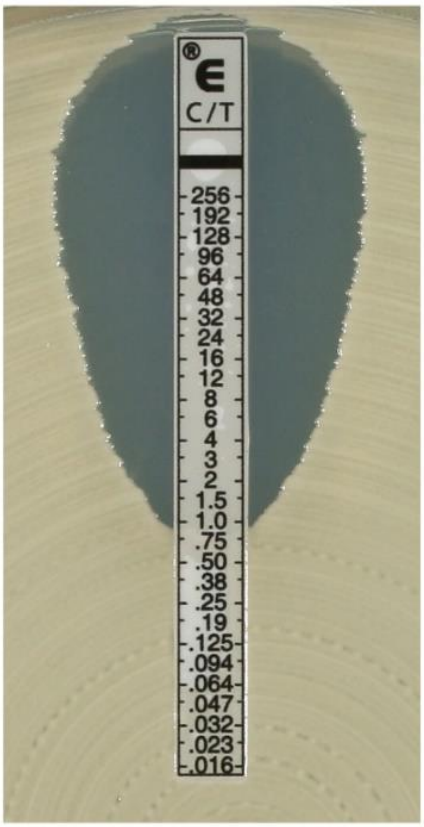
Haemophillus influenaze

نستخدم بيئة

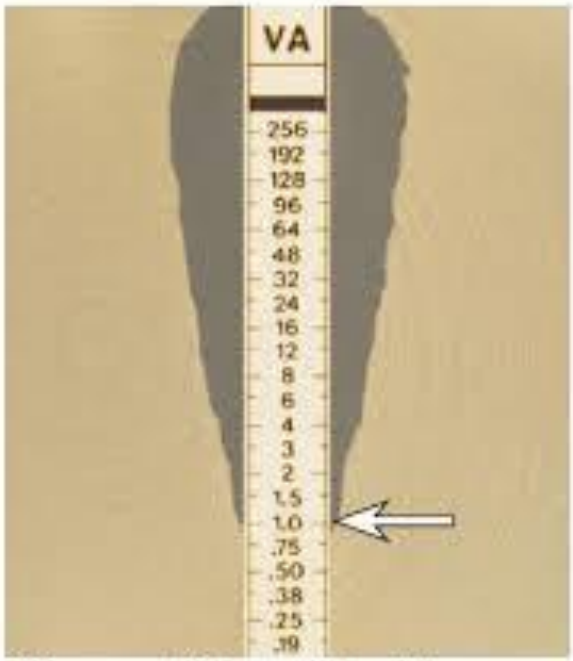
Muller hinton chocolate agar

***النتائج:**

عند قراءة النائج عندما تكون تقاطع المنطقة المثبطة و النمو البكتري على مستوى واحد نأخذ الرقم الذي يكون على خط التقاطع

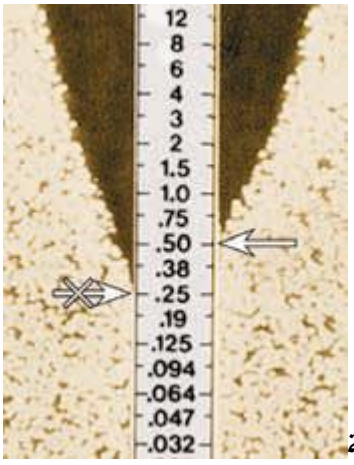


تكون القراءة 1.0



Glycopeptides – slim ellipse
Read end of dip; 1 µg/mL

***عندما تكون نتيجتين مختلفتين**



نأخذ التركيز الأعلى للمنطقة

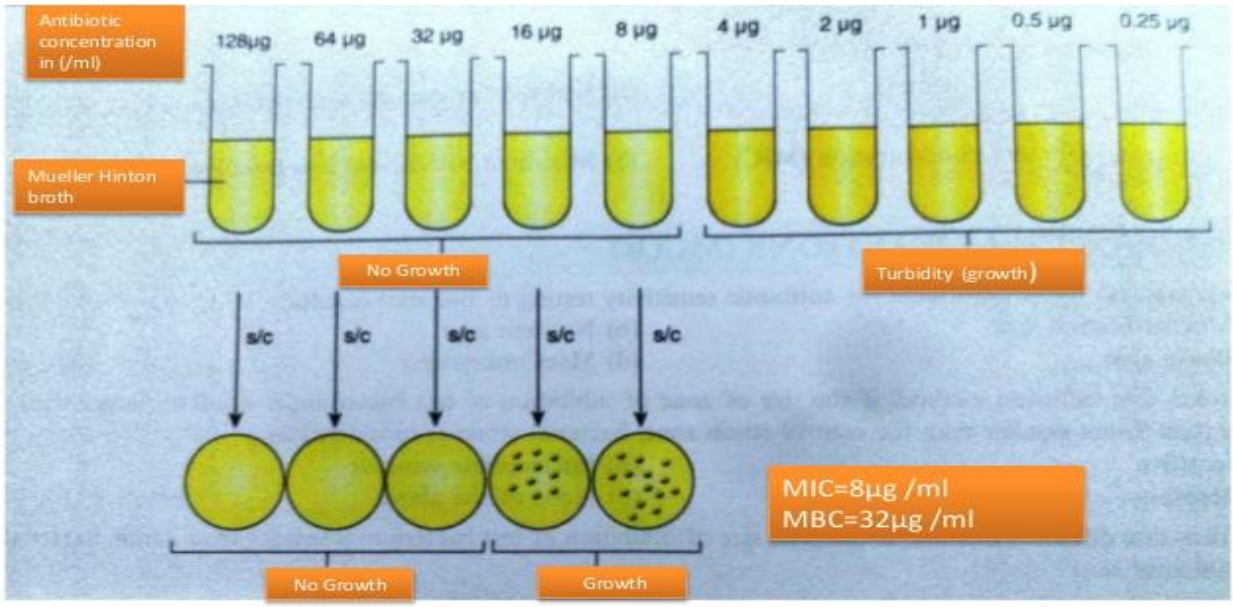
العملي الرابع و الخامس

طريقة سلسة التخفيفات بأنابيب المرق المغذي

Broth tubes serial dilution

3-طريقة التخفيف بالأنابيب السائلة

Broth Serial dilution



Broth Dilution Method Showing MIC And MBC

يتم فيها إجراء التخفيفات المتسلسلة للمضاد الحيوي في بيئة سائلة ويتم تلقيحها بتركيز موحد من البكتريا وتحضن بعد ذلك و يعتبر أقل MICتركيز من المضاد الحيوي الذي يمنع من ظهور العكارة هو الام اي سي

و لقياس الام بي سي يتم فرد الأنبوب الذي لم تظهر عليه العكارة على بيئة صلبة وتحضينها لمدة 24 ساعة و اذا لم يظهر النمو MBCفنسميها الام بي سي(الجرعة التي قتلت البكترية).

***اسم التجربة :طريقة اختبار الحساسية بالتخفيف على أنابيب المرق المغذي و تحديد أقل تركيز مثبط و أقل تركيز قاتل**

MIC and MBC

***الهدف من التجربة: تحديد أقل تركيز مثبط و أقل تركيز قاتل**

MIC and MBC

***الأدوات المستخدمة:أنابيب معقمة -بيئة المرق المغذي-تركيز مضاد حيوي0.5 ميكروجرام-مزرعة بكتيريا طازجة-ماصات معقمة1مل-أنبوب مرق مغذي أو ماء فاتر 0.9%-بيئة الآجار المغذي**

***طريقة العمل :**

1-تحضير بيئة المرق المغذي و توزيعها على الأنابيب بسعة 9مل وتحضير بيئة الآجار المغذي ربع لتر 250مل.

2-تعقيم الأنابيب و إخارجها لتبرد و تعقيم البيئة الصلبة وتركها لتدفئ ثم صبها على أطباق بتري معقمة وحفظها في الثلاجة.

3-تحضير المعلق البكتيري على أنبوب المرق المغذي أو الماء الفاتر وتركه لمدة 15دقيقة حتى يحدث نشاط للبكتريا.

4-تحضير سلسلة التخفيفات من الأنبوب الأول إلى الأنبوب الثاني عشر (تخفيف المضاد الحيوي).

5-تلقيح المعلق البكتيري على كل حدة من الأنابيب بملء عقدة أو 0.5مل من المعلق.

6-تحضين الأنابيب لمدة 18ساعة حتى تحدث العكارة .

7-آخر أنبوب حدثت به عكارة نقوم بأعادة زراعتها الى طبق الآجار المغذي .

8-آخر أنبوب لم تحدث به عكارة نقوم بأعادة زراعتها على بيئة الآجار المغذي.

***النتائج:**

MICآخر أنبوب ظهر فيه النمو هو التركيز المثبط لنمو البكتريا

MBCيكون أول أنبوب توقف النمو فيه و هي الجرعة القتلة للبكتريا

***من خلال هذه الطرق الثلاثة في اختبارات الحساسية نستطيع تحديد كمية ال**

MIC

و في أنابيب التخفيف نستطيع تحديد كمية ال

MIC and MBC

العملي السادس

تقدير عدد الخلايا البكتيري في المعلق البكتيري بواسطة مقياس ماكفرلاند

MCFarland standards antibiotic sensitivity

مبدأ ماكفرلاند:يستخدم كمرجع ضابط لتقدير العكارة للمعلق البكتيري بحيث يكون عدد الخلايا البكتيرية في معلق ما معلوم أو على الأقل ضمن مدى معين

إعداد مقياس ماكفرلاند:يتم خلط كميات محددة من كلوريد الباريوم و حمض الكبريتيك مما يؤدي إلى تكون راسب من كبريتات الباريوم يعكر المحلول .

يوجد عدة معايير لمقياس ماكفرلاند:

1. **0.5 McFarland standard**
2. **1 McFarland standard**
3. **2 McFarland standard**
4. **3 McFarland standard**
5. **4McFarland standard**

يتم قياس المعلق البكتريا يدويا عن طريق وضع ورقة بيضاء تحت أنبوب المعلق البكتيري بالمحلول الملحي أو المرق المغذي و عند رؤية الخطوط السوداء بوضح فإنه يحاكي مقياس ماكفرلاند.

و الطريقة الأخرى تكون طريق قياسه بواسطة جهاز الطيف الضوئي

Optical density

600nmوقراءة العكارة عند طول موجي .

***في اختبارات الحساسية (الأقراص و الايتيست و التخافيف و جهاز الميكروسكان و الفايتيك) يتم قياس العكارة بمقياس ماكفرلاند ويتحدد عند**

0.5M

العملي السابع

طريقة الطبق المتدرج

Gradient plate methods

هي طريقة تستخدم قياس مدى تثبيط البكتيري بالمضاد الحيوي و فكرة الشريط البلاستيكي الاي تيست مأخوذة منها .

***طريقة عملها:** تكون بتحضير بيئة المولر هينتون آجار و تعقيمها و وضع مسطرة أو قلم بجعل الطبق مائل و صب البيئة للنصف وتركها حتى تتصلب مع وضع البيئة الباقية في الحمام المائي حتى لا تتصلب ثم وضع تركيز معين من المضاد الحيوي في البيئة و مزجها جيدا ثم صبها النصف الآخر من البيئة المحتوية على مضاد حيوي و تركها حتى تتصلب و من ثم تحضير المعلق البكتيري و عمل خط على سطح الطبق و تضينها لمدة 18-24 ساعة و قراءة النتائج.**

Figure 4. The appearance of the gradient plate after the plate was streaked once with the initial culture of *B. thuringiensis* and incubated at 37° C for 24 hours. The only growth on the plate is at the top where there is no streptomycin.

العملى الثامن

جهاز الميكروسكان

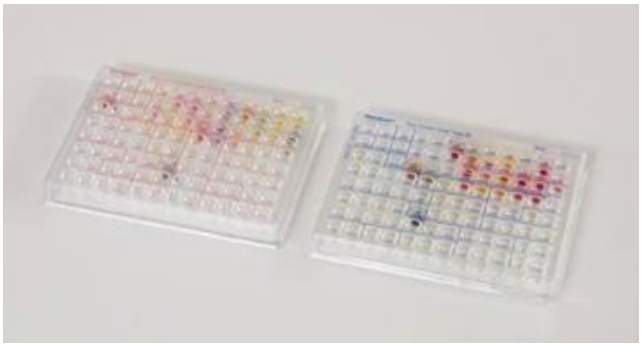
Microscan sensitivity auto machine

جهاز (MicroScan)

يُستخدم لتحديد وتعريف البكتيريا و معرفة حساسيته للمضادات الحيوية.

هو عبارة عن جهاز يستخدم لتحديد وقياس تركيز المضاد الحيوي المناسب للبكتريا الممرضة و يكون بتحضير معلق بكتيري بواسطة مقياس ماكفرلاند و و تخفيفه على فتحات الطبق و يكون القالب يحتوي على 96 فتحة و يكون الجزء الأمامي منه عبارة عن اختبارات كيموحيوية و الجزء الخلفي يكون اختبارات لحساسية المضاد الحيوي و بعد عمل تخفيف البكتريا على كل فتحة نقوم بتغليفه و تحضينه لمدة 24 ساعة و من ثم قراءة النتائج عبر جهاز القاريء الخاص بالميكروسكان.

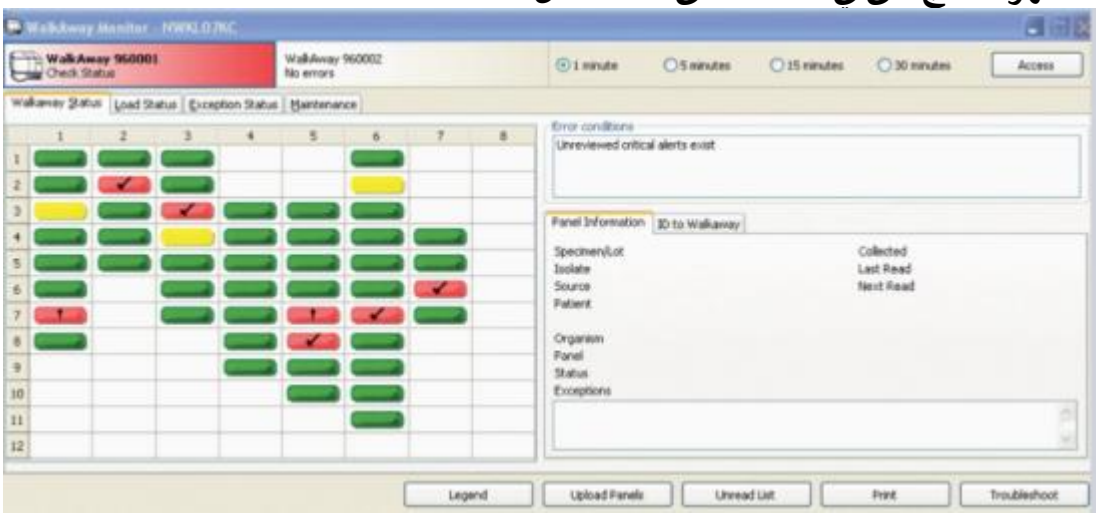
ملاحظة : نتائج البكتيريا السالبة لصبغة جرام أسرع من الموجبة لصبغة جرام



القالب الأزرق للبكتيريا الموجبة لصبغة جرام و القالب الأحمر للبكتيريا السالبة لصبغة جرام

طريقة : نأخذ من المستعمرة كأنا نلمسها ثم مباشرة نضعها في العلبة المحتوية على السائل ثم نعمل (حتى نتأكد من نقاء المستعمرة البكتيرية ونتأكد من صحة عملنا) تخطيط على الوسط البيئي .وبعدها نسكب السائل في القالب ثم يوضع في الجهاز الخاص

..تظهر النتائج على في الشاشه على هذا الشكل



.الرمادي: أثناء إدخال القوالب إلى الجهاز وتدل على قيام الجهاز بالعملية

.إنتهاء العملية و ظهور النتيجة واضحة :الأخضر
.إنتهاء العملية و عدم ظهور النتيجة : الأحمر
.عدم تمكن الجهاز من إتمام العملية :الأصفر

العملي التاسع
جهاز الفايتك تو
Vitek2

يُستخدم لتحديد وتعريف البكتيريا و معرفة حساسيته للمضادات الحيوية وطريقة عمله مختلفة عن ال micro scan.

يكون هذا الجهاز له عدة أشرطة

GN,GP,AN,AST91,AST92

- **GN ID Card, Product number 21341**
    - **Gram negative bacterial identification**
- **GP ID Card, Product number 21342**
    - **Gram positive bacterial identification**
- **YST ID Card, Product number 21343**
    - **Yeast identification**
- **NH ID Card, Product number 21346**
    - **Neisseria, Haemophilus and other fastidious Gram negative bacteria identification**
- **ANC ID Card, Product number 21347**
    - **Anaerobic bacteria and coryneform bacteria identification**

Antibiotic Susceptibility Testing (AST)

- **Gram positive antimicrobial susceptibility testing (AST) cards**
- **Gram negative antimicrobial susceptibility testing (AST) cards**
- **Yeast antimicrobial susceptibility testing (AST) card**

يستغرق ظهور النتائج خلال 12 ساعة مع التعريف و اختبار الحساسية

وتكون طريقة عمله بطريقتين

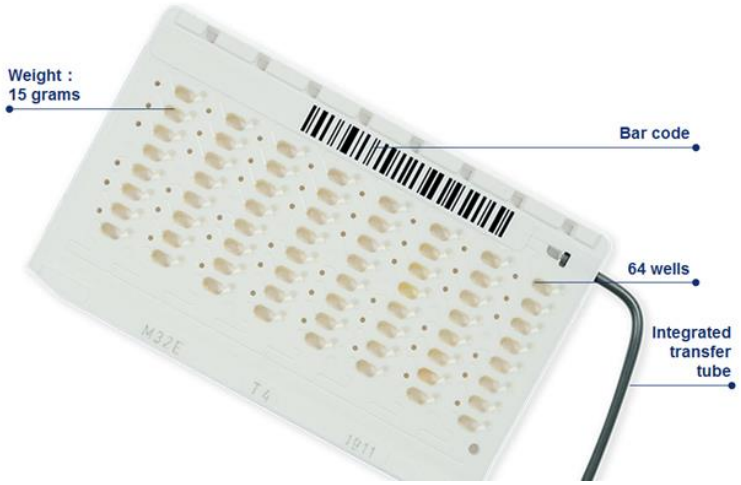
1-عند معرفة نوع البكتريا فيجب استخدام شريط الحساسية فقط بتحضير المعلق البكتيري على المحلول الملحي.

نضع في حامل الشريط أنبوبين يكون الأول يحتوي على المعلق البكتري و الآخر أنبوب فارغ ومعه شريط الحساسية

2-عند عدم معرفة نوع البكتريا نستخدم شريط التعريف و شريط الحساسية بتحضير المعلق البكتيري.

نضع في حامل الشريط أنبوب به المعلق البكتيري مع شريط التعريف و الأنبوب الآخر فارغ مع شريط الحساسية.

يجب أن يكون مقياس المعلق 0.5 إلى 0.57

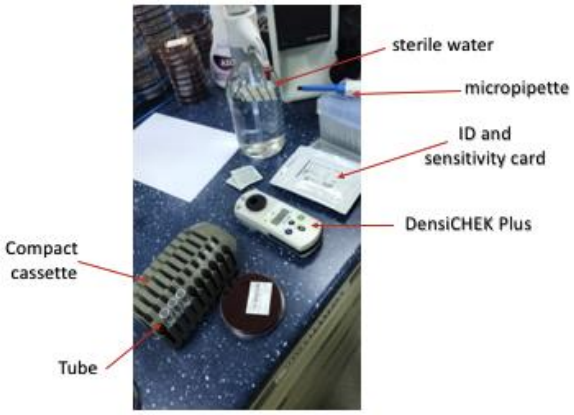


شريط الحساسية

شريط التعريف

حامل الشريط

هنا يكون قياس المعلق البكتيري لاختبار الحساسية قبل وضعه على جهاز الفايتيك



.

أمثلة على البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية:

1-MRSA(Methicillin Resistance Staphylococcus aureus)

Table 3

Treatment Options for CA-MRSA (Adults)

Drug	Dosage
Clindamycin	Oral: 300-450 mg 3 times per day IV: 600 mg/kg every 8 h
Daptomycin	IV: 4 mg/kg every 24 h
Doxycycline	Oral: 100 mg twice per day
Linezolid	Oral: 600 mg twice per day IV: 600 mg every 12 h
Minocycline	Oral: 100 mg twice per day
TMP-SMZ	Oral: 1-2 double-strength tablets (160 mg trimethoprim and 800 mg sulfamethoxazole) twice per day
Vancomycin[a]	IV: 30 mg/kg/day in 2 divided doses

[a] *Parenteral drug of choice. Source: Reference 15.*

2-VRE(Vancomycin Resistance Enterococcus faecium)

Treatment	No. (%) of Patients		P
	VSE (n=32)	VRE (n=21)	
Antimicrobial agent therapy	24 (75)	15 (71)	.23
Vancomycin hydrochloride	18 (56)	4 (19)	.006
Ampicillin	1 (3)	8 (38)	.001
Ampicillin plus sulbactam	4 (13)	2 (10)	.33
Piperacillin sodium	8 (25)	0 (0)	.01
Gentamicin sulfate	16 (50)	13 (62)	.16
Tobramycin	4 (13)	0 (0)	.12
Imipenem	2 (6)	0 (0)	.36
Ciprofloxacin	0 (0)	2 (10)	.15
Quinupristin plus dalfopristin	0 (0)	2 (10)	.15
No therapy	8 (25)	6 (29)	.24
Surgical débridement	5 (16)	1 (5)	.18
Removal of venous catheter	6 (19)	10 (48)	.02

**VSE indicates vancomycin-susceptible enterococci; VRE, vancomycin-resistant enterococci.*

3-Multi drug resistance Acinetobacter baumni

USE POLYMYXIN

4- Multi drug resistance Pseudomonas aeruginosa

USE POLYMYXIN

5-ESBL(Extended B-LACT)beta lactamase reistance(most of gram negative bacilli of Enterobacteriace(E.coli-Klep.pnuemonia)

Use Carbapenem-GROUP (MEROPENEM AND IMOPENEM)

6- **Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae(E.coli-klebsiella pneumoniae)**

USE POLYMYXIN