دراسة تأثير المضادات الحيوية على الاحياء المجهرية

Study the effects of antibiotics on microorganisms

طريقة التخفيف Dilution method وتشمل :

- **طريقة التخفيف بالوسط السائل Broth dilution method**

وتستخدم لتحديد التركيز المثبط الادنى من المضاد (minimum inhibition concentration) **MIC**

وتحديد التركيز القاتل الادنى من المضاد (minimum bactericidal concentration) **MBC**

- **طريقة التخفيف بالاكار Agar dilution method**
- **طريقة الاكار المتدرج او الطبق المتدرج Plate gradient method / Agar gradient method**

طريقة التخفيف بالوسط السائل Broth dilution method

مبدأ الطريقة :

تعتبر هذه الطريقة طريقة كمية quantitative وتعتمد من حيث المبدأ على تحضير سلسلة من التراكيز المضاعفة تدريجياً من المضاد في (وسط مولر هنتون السائل) ثم يتم اضافة عدد محدد من البكتريا لكل التراكيز وبعد التحضين سيتم تحديد قدرة المضاد على تثبيط نمو البكتريا او قتلها من خلال ملاحظة :

- وجود عكورة في الانابيب (نمو البكتريا الكثيف اي ان المضاد لم يؤثر على البكتريا والبكتريا مقاومة له لهذا نمت بشكل طبيعي وحدثت عكورة في الانابيب) .
- عدم وجود عكورة في الانابيب (اي المضاد **ثبط نمو البكتريا او قتلها** لهذا لاتوجد عكورة).

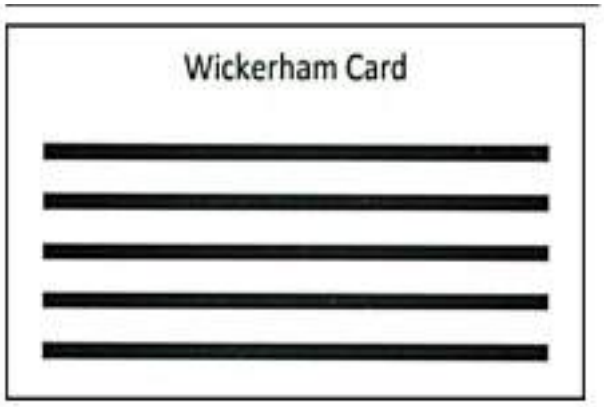
الغرض او الفائدة من استخدام طريقة التخفيف بالوسط السائل Broth dilution method

1. مفيدة في حالة استخدام بكتريا بطيئة النمو مثل بكتريا السل *Mycobacterium tuberculosis* والتي يكون نموها ضعيف ولايمكن استخدام طريقة الانتشار لان المضاد سينتشر قبل ان تنمو البكتريا فيعطي نتائج غير صحيحة .
2. مفيدة في حالة استخدام البكتريا التي تظهر ظاهرة العج او التموج (النمو الكثيف السريع والمتراص) مثل بكتريا Proteus والتي يكون نموها سريع جداً ولايمكن استخدام طريقة الانتشار لان البكتريا ستنمو وتنتشر قبل المضاد فتعطي نتائج غير صحيحة .

3. مفيدة في حالة استخدام مضادات حيوية ذات وزن جزيئي عالي مثل Bacitracin – Polymyxin B والتي يكون انتشارها ضعيف ولايمكن استخدام طريقة الانتشار لان البكتريا ستنتشر قبل المضاد وتعطي نتائج خاطئة .

طريقة العمل :

1- **تحضير العالق البكتيري :** ناخذ مستعمرة من البكتريا المدروسة بواسطة لوب معقم بلهب البيرنر بعد ان يبرد وتوضع في انبوب يحوي محلول نورمل سلاين ويتم تعليقها من خلال مزجها باللوب ثم يتم معايرة المعلق البكتيري المحضر مع انبوب ماكفرلاند McFarland القياسي (0.5) ويتم ذلك بوضع العالق البكتيري المعلق مع انبوب ماكفرلاند القياسي (0.5) على وجه بطاقة ويكرهام Wickerham card (وهي بطاقة صغيرة تحتوي على خطوط متوازية بيضاء وسوداء تساعد في تبيان تشابه تركيز المعلق البكتيري المحضر مع انبوب ماكفرلاند القياسي (0.5) وسميت بهذا الاسم نسبة الى العالم ويكرهام الذي حضرها لاول مرة) وكما موضح بالصورة ادناه



ملاحظة :- محلول ماكفرلاند او محلول ثابت العكورة القياسي يستخدم لاعطاء عدد تقريبي للنمو الجرثومي مقداره (1.5 * 10^8) خلية بكتيرية / مليلتر ((ويحضر هذا المحلول من خلال 0.5 مل من محلول كلوريد الباريوم $BaCl_2$ ذو تركيز 1% تقريباً مع 99.5 مل من محلول حامض الكبريتيك بتركيز 1% تقريباً مع المزج المستمر اثناء التحضير))، وعادة تكون انابيب ماكفرلاند مصنعة وجاهزة من قبل شركات عالمية وفي حالة عدو توفرها تحضر بالطريقة انفة الذكر .

2- زن (0.4 mg) من مضاد cefixime اي مايعادل (400μg) وذوبها في (1مل) من الماء المقطر للحصول عل محلول لمضاد السفكسيم بتركيز 400 μg / ml.

3- حضر سبعة انابيب اختبار تحتوي على (1مل) من وسط مولر هنتون السائل المعقم ويجب ترقيم الانابيب من الانبوب الاول الى الانبوب السابع .

4 – اضف (1مل) من محلول مضاد السفكسيم المحضر مسبقاً الى الانبوب الاول ورجه جيداً للحصول على وسط يحوي مضاد السفكسيم بتركيز 200 µg / ml.

5- نأخذ من الانبوب الاول (1مل) ونضيفه للانبوب الثاني فنحصل على وسط يحوي مضاد السفكسيم بتركيز 100µg / ml وهكذا نكمل بقية الانابيب (اي نأخذ من الانبوب الثاني (1مل) ونضيفه للانبوب الثالث فنحصل على وسط يحوي مضاد السفكسيم بتركيز 50µg / ml وهكذا نكمل الى ان نصل الى الانبوب رقم ستة)

6- الانبوب السابع لانضيف له مضاد حيث نعتبره انبوب سيطرة موجب positive growth control ويضاف له فقط معلق بكتيري بحجم 0.5 مل .

7- الانبوب السادس لانضيف له بكتريا فقط المضاد ونعتبره انبوب سيطرة سالبة(sterility control negative)

8 – الانابيب من الاول الى الخامس يضاف لكل واحد منها (0.5مل) من المعلق البكتيري الذي سبق معايرته .

9-تحضن الانابيب بدرجة 37 لمدة 24 ساعة وتقرأ النتائج في اليوم التالي.

7- كتابة النتائج في تقرير وتصور الانابيب وتدرج مع النتائج .

قراءة النتائج وتفسيرها

يتم مقارنة الانابيب الخمسة الاولى مع انابيب السيطرة الموجب والسالب وتحديد فيما اذا كانت الانابيب تحوي عكورة ام لاتحوي عكورة

لتحديد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز القاتل الادنىMBC لمضاد السفكسيم المستخدم في التجربة

نحدد الانابيب التي لاتحتوي على عكورة (لايوجد فيها نمو بكتيري) وناخذ منها حملة لوب ونزرع كل منها على طبق يحوي (وسط مولر هنتون اكار) مع كتابة تركيز المضاد في الانبوب الذي اخذت منه حملة لوب على الطبق حتى نعرف من اي تركيز اخذنا وبعد الزرع تحضن الاطباق بدرجة 37 لمدة 24 ساعة وتقرأ النتائج في اليوم التالي.

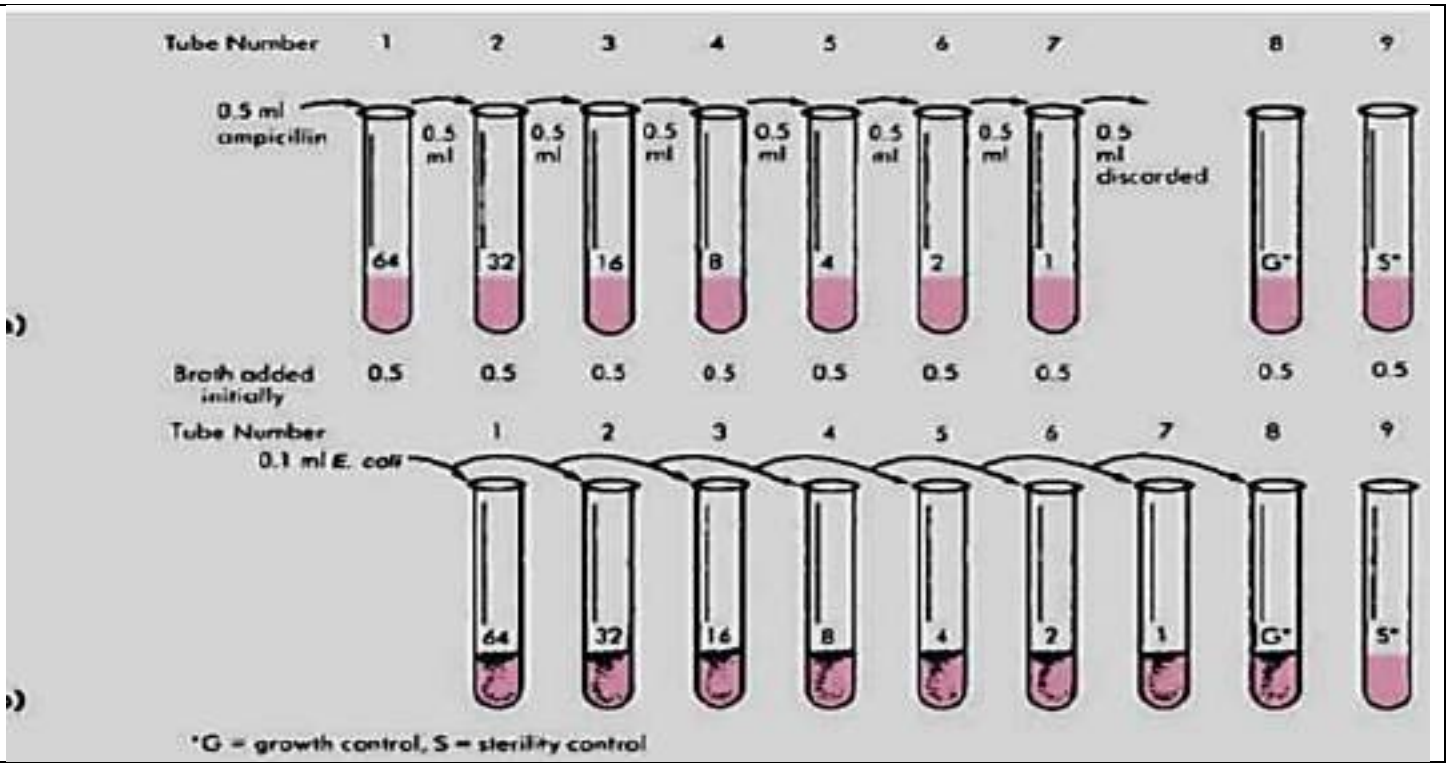
تقرا النتائج من خلال

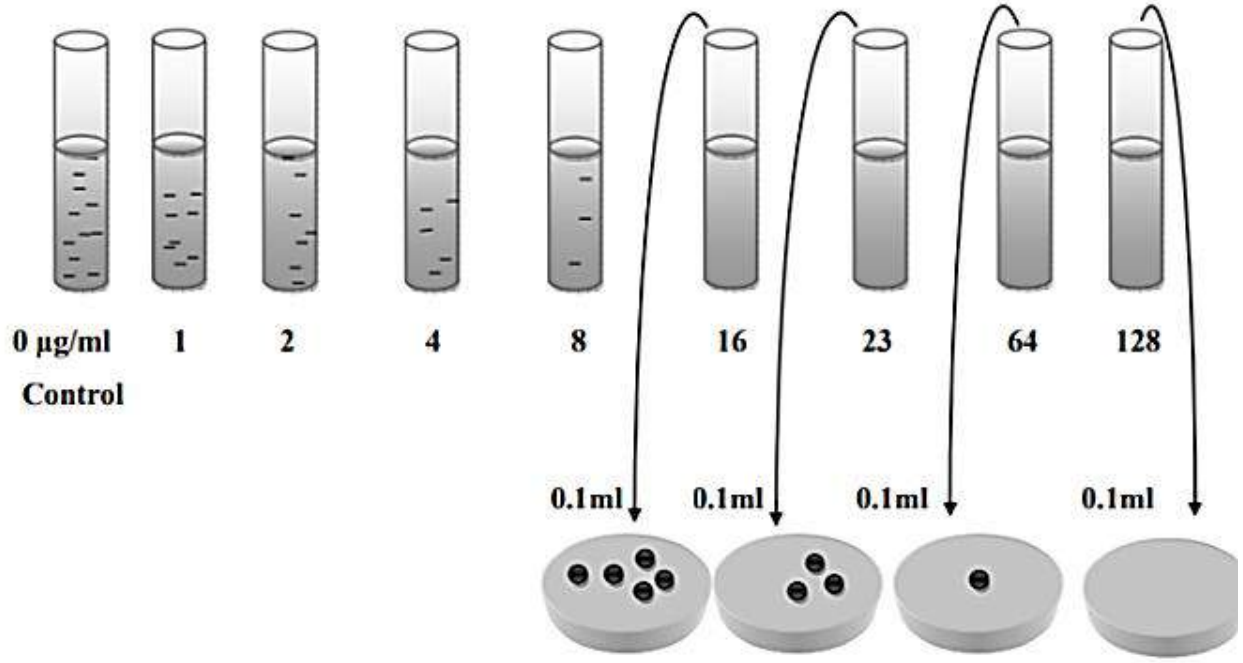
- وجود نمو بكتيري في الطبق نعتبر التركيز المثبط الادنى MICحيث ان البكتريا قد ثبط نموها بالمضاد وعندما تم زرعها على وسط لايحوي المضاد استطاعت النمو مرة اخرى .

❖ أما اذل لم تنمو البكتريا فنعتبر التركيز القاتل الادنى MBC حيث ان البكتريا قتلت بالمضاد ولم تستطع النمو عند زرعها في وسط خالي من المضاد.

ملاحظة هامة جدا يجب الانتباه لها :

التراكيز التي حضرناها نحن في تجربتنا ليس هي نفس التراكيز الموجودة في المخططات التوضيحية لكن الطريقة نفسها وكل باحث او طالب يحضر حسب مايريد دراسته ، يحضر (المضاد / المستخلص / المادة الكيميائية) الذي يدرس عليه وبالتراكيز التي يريد دراستها .





تحضن من 24 -48 ساعة

MIC=16 µg/ml

MBC=128 µg/ml