طريقة التخفيف بالاكار

Agar dilution method

يتم استخدام طريقة التخفيف بالاكار لتحديد الحد الادنى من التركيز المثبط للميكروبات (MIC) من المضاد الحيوي كما هو الحال مع طريقة التخفيف بالوسط السائل التي اخذناها المختبر السابق ، يتم في هذه الطريقة مزج تركيز معين من المضاد مع وسط مولر هنتون اكار قبل ان يتصلب ثم يتم صبه في الاطباق اي ان طبق الوسط الزرعي كله سيحتوي على نفس تركيز المضاد واذا كان لدينا تراكيز مختلفة من المضاد مراد اختبارها سيكون لكل تركيز من المضاد طبق خاص به وبعد ان يتصلب الاكار يتم وضع نشر المعلق البكتيري المعاير ويتم التحضين بالحاضنة ليتم معرفة اي تراكيز المضاد مثبطة او قاتلة للبكتريا .

مزايا طريقة التخفيف بالاكار :

1- توفر هذه الطريقة نتيجة كمية اي من خلالها نحدد التركيز المثبط الادنى MIC وكذلك التركيز القاتل الادنى MBC على عكس طريقة اختبار الحساسية باستخدام الاقراص التي تحدد لنا فقط الجراثيم الحساسة والمتوسطة الحساسية IntermediatelModerate sensitive (I) والمقاومة Resistant (R) .
2- من خلال هذه الطريقة يمكن اختبار العديد من البكتريا في وقت واحد وعلى نفس الطبق باستثناء البكتريا التي تتميز بظاهرة العج swarming مثل بكتريا Proteus من خلال تقسيم الطبق الى مناطق كل منطقة يتم زرع نوع بكتيري معين.
3- هذة الطريقة تستخدم بكثرة في الدراسات الوراثية للحصول على سلالات مقاومة للمضادات او المواد الكيميائية .

اسم التجربة : طريقة التخفيف بالاكار

الغاية منها : تحديد اي المضادات الحيوية ياثر على البكتريا وباي تركيز وبالتالي استخدامه في العلاج اي تحديد MIC and MBC.

طريقة العمل :-

1- نحضر وسط مولر هنتون اكار حسب تعليمات الشركة المجهزة ويعقم بالاوتوكليف ثم يوزع الوسط على فلاسكات زجاجية صغيرة على عدد تراكيز المضاد الحيوي المراد اختبارها (اذا كان لدينا خمس تراكيز يتم توزيع الوسط على خمس فلاسكات صغيرة كل فلاسك

يوضع فية 50 مل من الوسط اواكثر(اواقل شيء 25 مل) و حسب عدد الاطباق المراد تحضيرها لكل وسط **ولاننسى ان كل طبق يسع 25مل من الوسط** وهكذا حسب احتياجنا في التجربة نحضر الكمية) ، **هنا في تجربتنا سوف نضع في كل فلاسك 25 مل ليتم صبه في طبق واحد (لان كل مجموعة من الطلبة سوف تشتغل على تركيز واحد من المضاد).**

2- نحضر محلول الخزين من المضاد الحيوي (التركيز المحضر يختلف حسب حاجة وشغل الباحث) ، **هنا في تجربتنا سوف نحضر محلول الخزين من المضاد بتركيز (50000) مايكروغرام لكل مل من خلال ((اذابة كبسولة بوزن 500 ملغرام في 10 مل من الماء المقطر)).**

3- نطبق قانون التخفيف(C1*V1=C2*V2) حتى نحضر تركيز معين من المضاد الحيوي باستخدام محلول الخزين المحضر مسبقاً ، هنا سوف نحضر مضاد مخلوط مع الوسط بتركيز(10000) مايكروغرام لكل مل من الوسط ، **ملاحظة مهمة**((هنا يتم تخفيف المضاد بكمية الوسط الزرعي وليس بالماء المقطر كما كنا سابقاً نعمل لهذا الطريقة تسمى ((طريقة التخفيف بالاكار)).

اي الحسابات ستكون هكذا

لدينا كبسولة بوزن 500 ملغرام

500mg * 1000= 500000μg

C= Weigh / volume

هنا تم اذابة الكبسولة في 10 مل من الماء المقطر لتحضير محلول خزين بتركيز 50000 مايكروغرام لكل مل) C= 500000/10

C of stock solution =50000μg/ml

ثم نستخدم قانون التخفيف حتى نحضر مضاد مخلوط مع الوسط الزرعي بتركيز 10000مايكروغرام لكل مل ولاننسى النخفيف هنا يتم بالوسط الزرعي وليس بالماء المقط اي ان V2هي كمية الوسط الزرعي الموضوعة في الفلاسك والتي تم تحديدها هنا ب 25 مل ليتم صبها في طبق واحد .

C1*V1=C2*V2

50000 * v1= 10000* 25

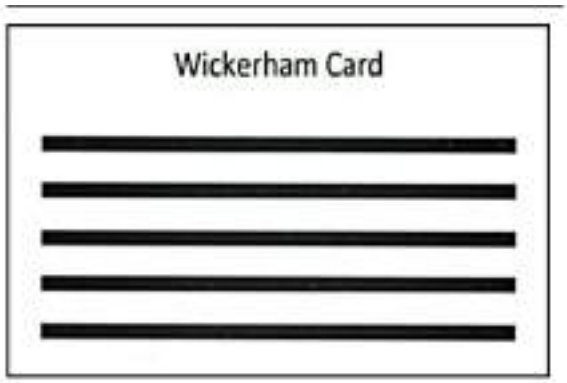
V1= 10000* 25/50000

V1= 5ml

اي اننا سناخذ 5 مل من محلول الخزين للمضاد ويضاف الى الفلاسك الذي يحوي 25 مل من الوسط الزرعي حتى يتم تحضير 25 مل من الوسط الزرعي حاوي على مضاد بتركيز 10000 مايكروغرام لكل مل .

4- بعد اضافة المضاد الى الوسط يرج جيدا ويصب الوسط في الطبق وننتظر تصلبه والى ان يتصلب الوسط نحضر المعلق البكتيري المعاير كما في الخطوة 5 .

5- **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 عدم توفرها تحضر بالطريقة انفة الذكر .

6- يتم نشر 0.5 مل من المعلق البكتيري على سطح الطبق باستخدام اداة الناشر او L spreader وفي حالة عدم توفر الناشر يمكن نشر المعلق البكتيري بواسطة الماسحة القطنية .

7- تحمل الاطباق المزروعة بحذر وتحضن بدرجة 37 لمدة 24 ساعة وتقرأ النتائج في اليوم التالي.

قراءة النتائج وتفسيرها :

اثناء فترة التحضين عندما تكون البكتريا حساسة للمضاد سف لن تنمو على الوسط الزرعي اما اذا كانت مقاومة للمضاد سوف تنتشر وتنمو بشكل طبيعي ولاتتاثر بالمضاد .

في حال تم اختبار اكثر من تركيز من المضاد نستطيع تحديد اقل تركيز من المضاد ثبط نمو البكتريا او قتلها اي نحدد MIC and MBC .