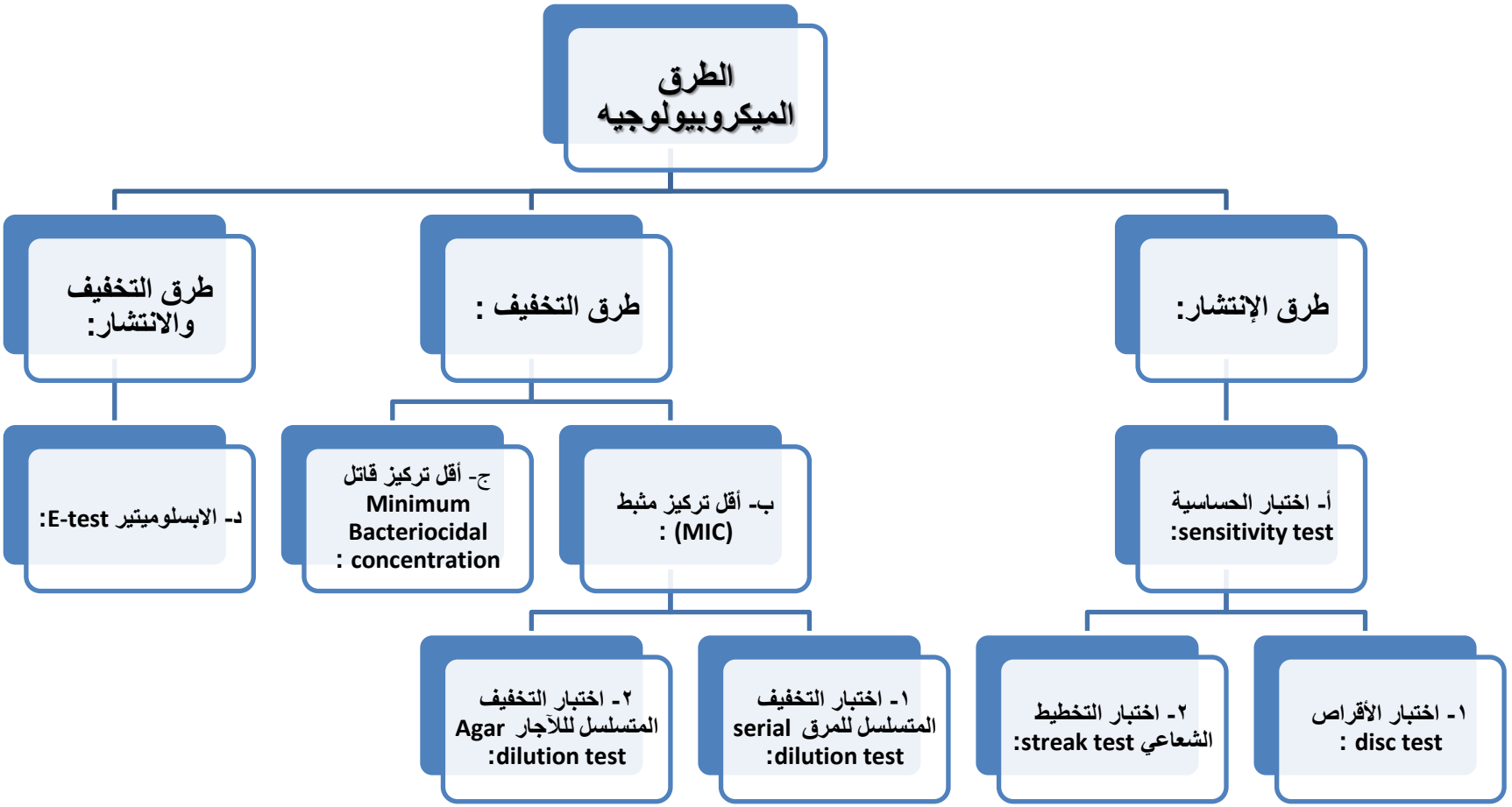
تابع/ اختبارات الحساسيه وتحديد Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

المضادات الحيوية

٤٦٣ حدق

By: Amal Alghamdi

اختبارات الحساسيه AST



تحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا من المضاد الحيوي Amoxycillin لأنواع مختلفة من البكتيريا بطريقة الطبق المتدرج

Minimum Inhibitory Concentration of Amoxycillin to different types of Bacteria by Gradient Plate Method

By: Amal Alghamdi

"تحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا من المضاد الحيوي Amoxycillin"

الهدف من التجربه: إجراء اختبار الحساسية للمضاد Amoxycillin للسلاله البكتيريه وتحديد أقل تركيز مثبط لنموها MIC.

الأدوات المستخدمه: أطباق بتري معقمة ، ماصات معقمة ١مل، كحول ٧٠% للتعقيم، مزارع سائلة نقية حديثة،ناشر زجاجي، المضاد الحيوي Amoxycillin المعقم.

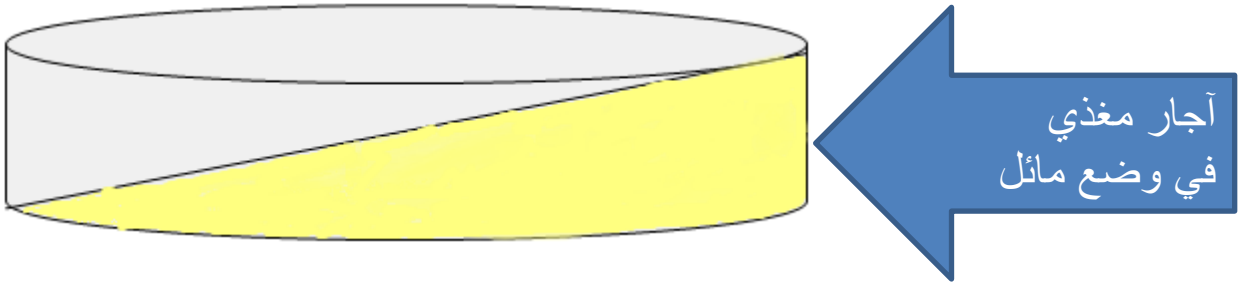
الوسط الغذائي المستخدم: Mueller-Hinton media.

تحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا من المضاد الحيوي Amoxycillin

- طريقة العمل:

١- يسال الأجار في حمام مائي ٤٥°م.

٢- يُصب ٢٠ مل في كل طبق، ثم تترك الأطباق للتصلب في وضع مائل(برفع أحد جانبيها على قطعة من الخشب بزاوية حادة).انظري شكل (١).



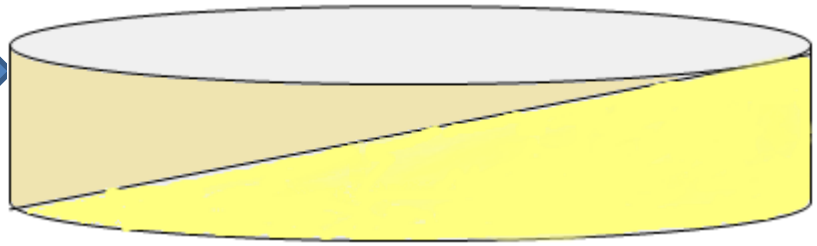
٣- يتم عمل تخفيفات متدرجة من المضاد الحيوي بإذابة ٢,٧ ملجرام في١٠مل ماء مقطر معقم، ثم يتم عمل تخفيفات متدرجه من المضاد الحيوي.

٤- من كل تخفيف يُنقل ١مل إلى ١٩ مل من الأجار المعقم والمبرد عند ٤٥°م.

تحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا من المضاد الحيوي Amoxycillin

- **تابع/ طريقة العمل:**
- ٤- تُضاف بقية الأجار المضاف إليه المضاد إلى الطبق وهو في وضع مستوٍ ثم يترك ليتصلب، ونتيجة لذلك ينتشر المضاد في الطبقة العليا إلى الأسفل ويتكون في الطبق تركيزات متدرجة من المضاد الحيوي المضاف (µg/mL).

الطبقة العليا:
آجار مضاف إليه
تركيز معلوم من المضاد الحيوي



الطبقة السفلى:
آجار مغذي
في وضع مائل

الطبق المتدرج
Gradient Plate

✓يُلاحظ تكون تركيز متدرج من المضاد الحيوي في الطبق (من ٠% إلى ١٠٠%).

تحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا من المضاد الحيوي Amoxycillin

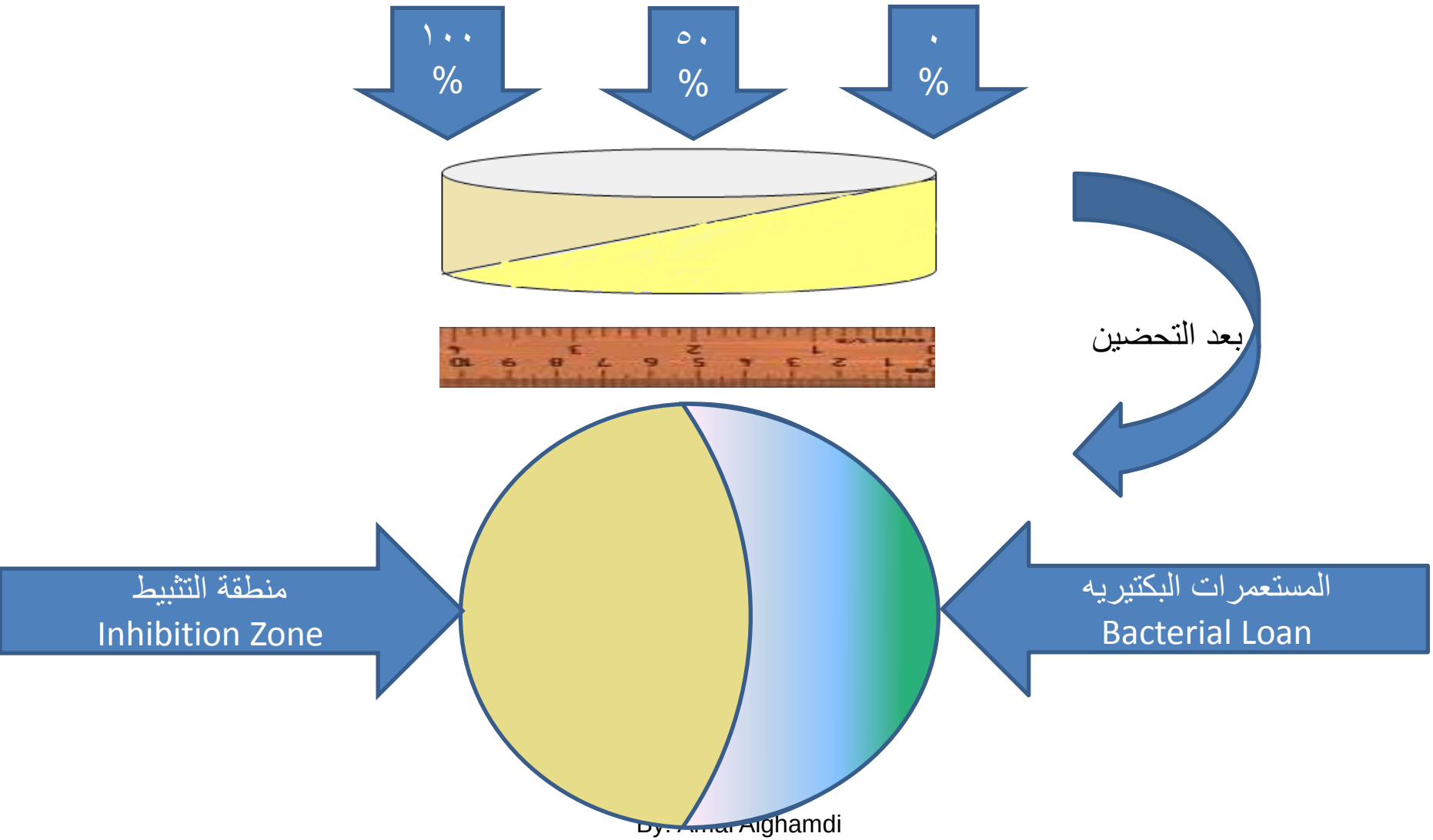
تابع/ طريقة العمل:

5- باستخدام ماصة معقمة يُنقل ٠,٥مل من المزرعة النقيه إلى سطح الطبق المتدرج التركيز من المضاد، ثم تحضن الأطباق مقلوبة عند درجة حرارة ٣٧ م لمدة ١٨-٢٤ ساعه.

٦- تخرج الأطباق من الحضان، تسجل الملاحظات و تُفحص الأطباق لوجود هالة التثبيط Inhibition Zone، ويتم تدوين النتائج مباشرة بعد التحضين.

٧- يُمكن تحديد التركيز MIC تقريبياً في صورة نسبه من التركيز المعلوم للمضاد الحيوي المستخدم.

تحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا من المضاد الحيوي Amoxycillin



" تحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا من المضاد الحيوي Amoxycillin"

- **النتائج:**

i. قد تظهر أطباق خاليه من النمو بعد مرور فترة التحضين الملائمه ودرجة الحرارة المناسبه، مالسبب؟

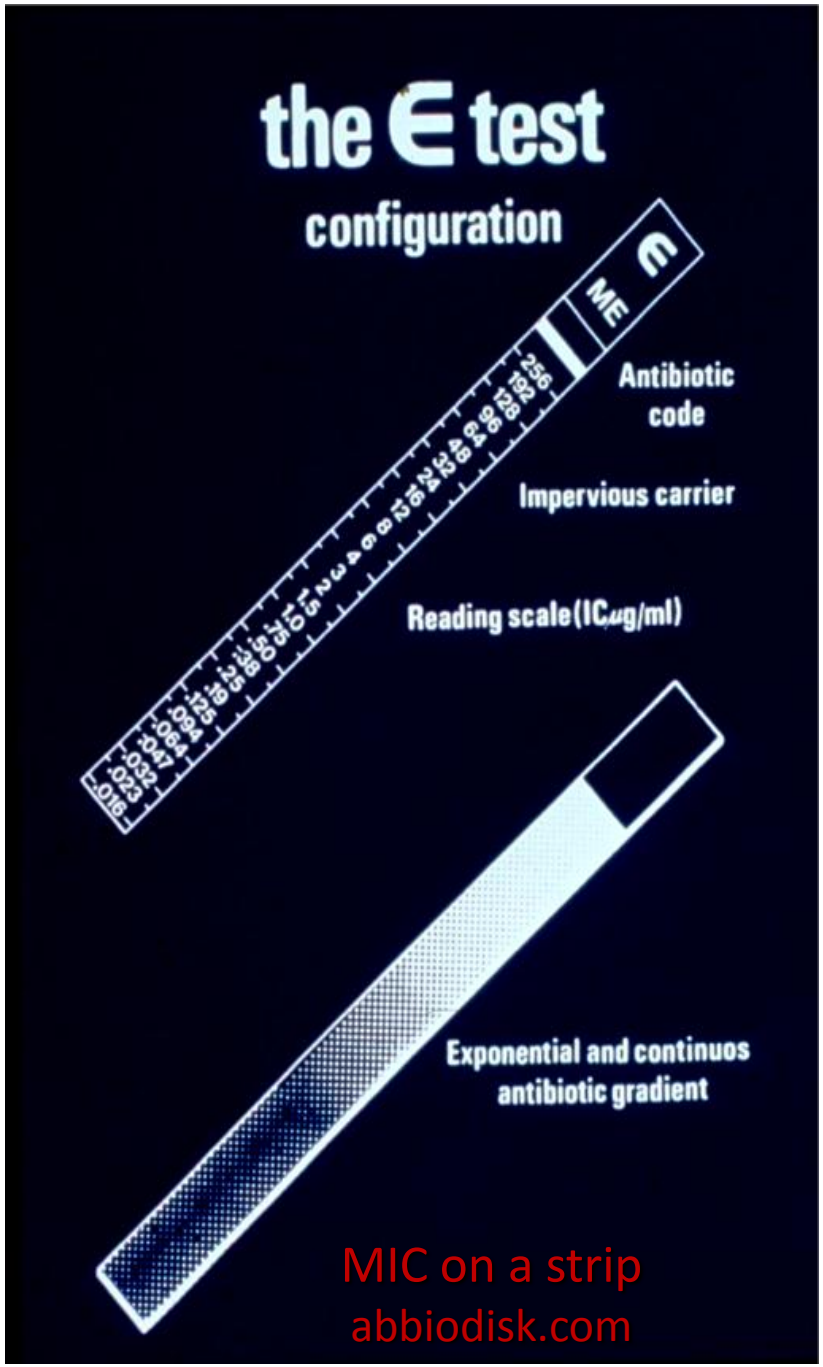
ii. قد تظهر أطباق دون أي هاله لانعدام النمو، فسري؟

iii. يجب أن تُفسر النتائج على أساس نوع البكتيريا واستجابتها للتركيز المعلوم من المضاد الحيوي.

E-Test

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

- تعتمد على استخدام مجموعه معروفه من ١٥ 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.



ما هو E-Test ؟

*عبارة عن أشرطة بلاستيكية

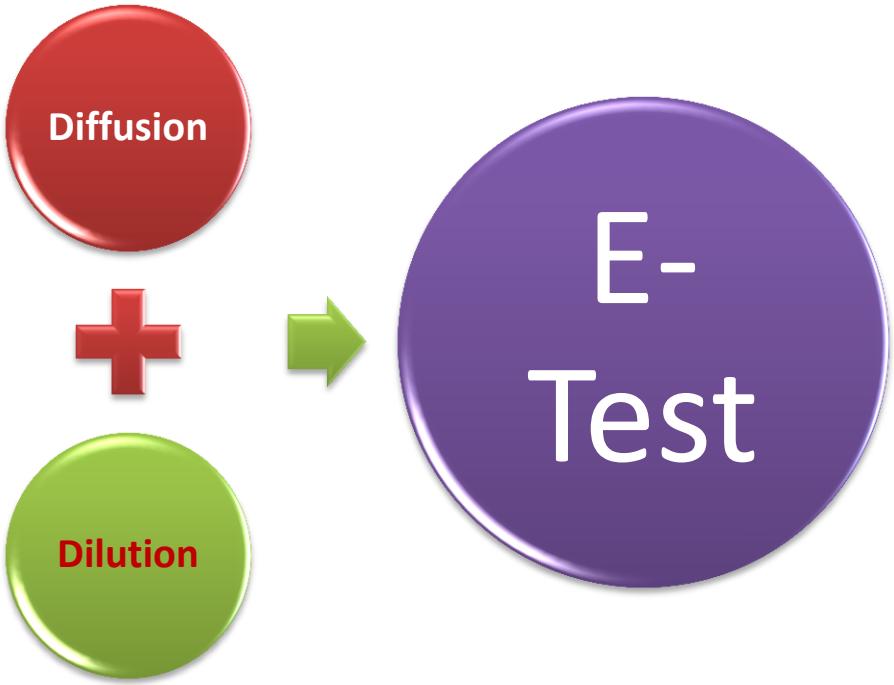
* تعرف أيضا بـ (epsilometers)

*كل شريط يحمل تراكيز معلومة ومتدرجة لنوع معين من المضادات الحيوية , ويمكن من خلالها تقدير الحد الأدنى للمضاد المثبط لنمو البكتيريا (MIC)

The gradient technique,
Etest®

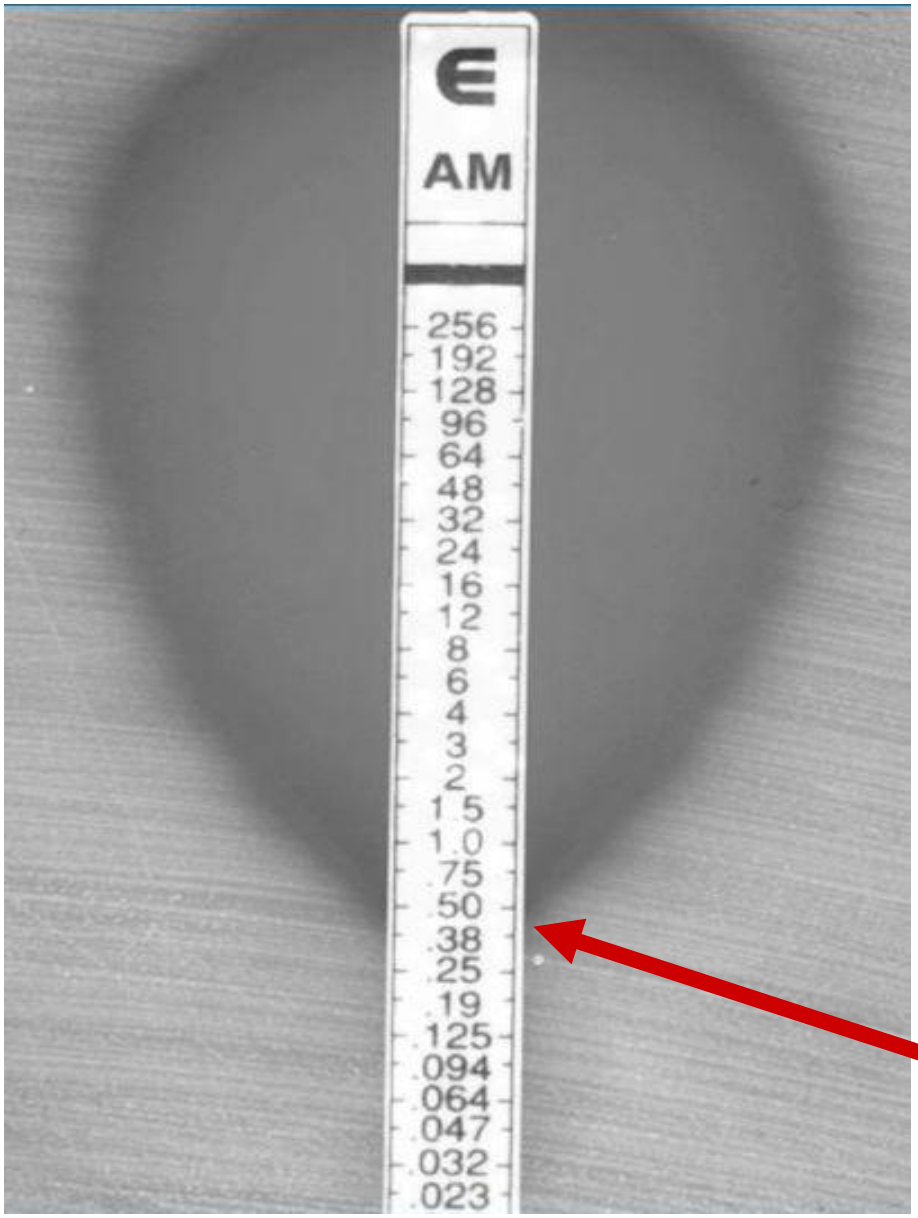
* توضع هذه الأشرطة على سطح البيئة في أطباق والتي تحتوي على الميكروب محل الدراسة (Agar dilution)

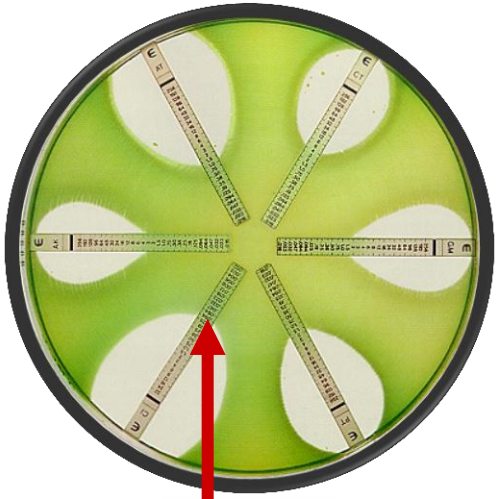
* يلاحظ انتشار المضاد وتأثيره على الميكروب من خلال تكوين Inhibition zone (diffusion)



MIC

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

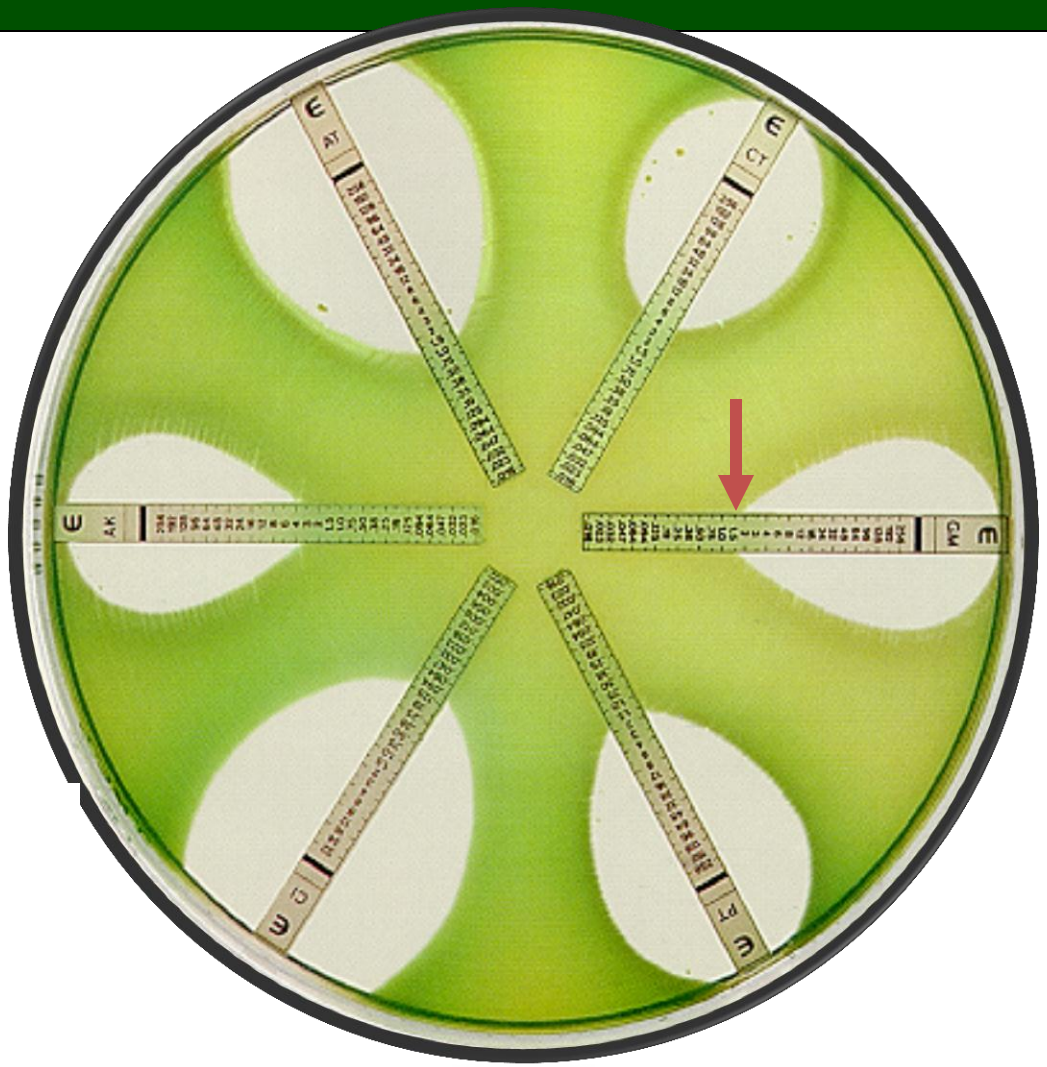




MIC

Antimicrobial Gradient Testing
E-test®

Read plates after recommended Incubation

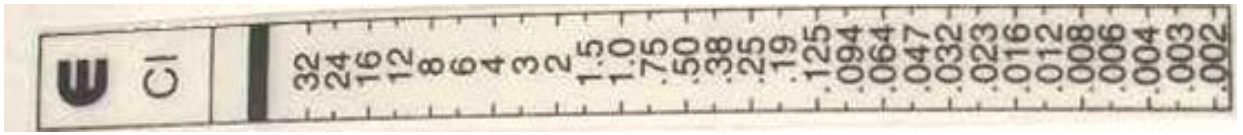


Read MIC where elipse intersects scale

مميزاتها

-يمكن استخدام أكثر من شريط (أكثر من مضاد)

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



طريقة العمل Procedure:

بواسطة swab في ٣ اتجاهات -دون اعادة ملأها من المزرعه - كل على حده.

٣- تنقل الأشرطة باستخدام ملقط معقم بالتلهيب الكحولي ،بحيث يوضع أكثر من شريط على أبعاد متساوية تقريباً.

٤- تحضن الطباق مقلوبه عند ٣٧°م لمده ١٨ -٢٤ ساعه.

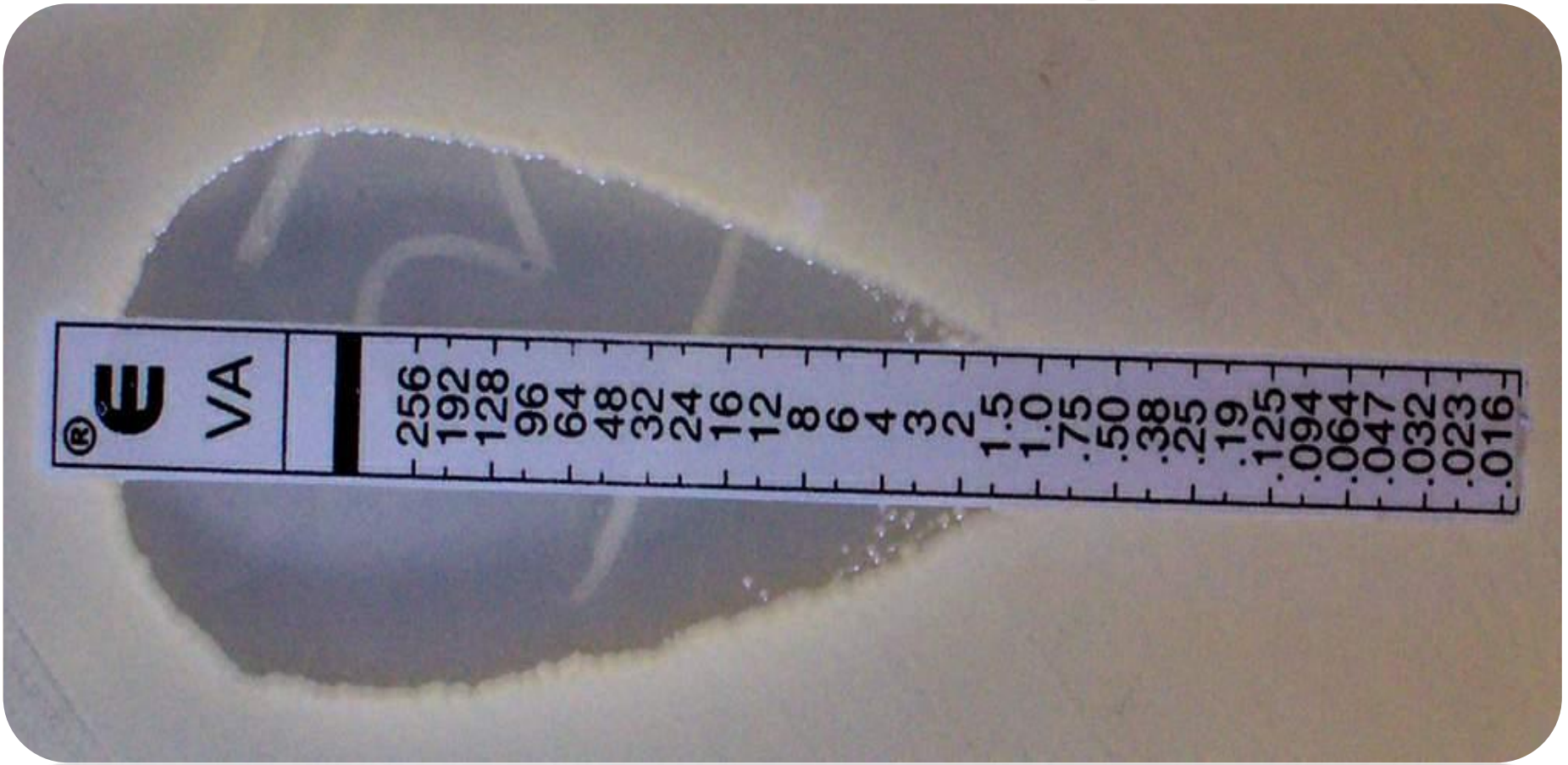
❖خطوات إجراء اختبار E-test:

١-يتم إخراج أشرطة E-Test من وحدة التبريد قبل إجراء الاختبار بـ ٣٠ دقيقة على الأقل
٢- يحضر المعلق الميكروبي كما سبق دراسته . بتركيز 0.5 McFarland
٣- بواسطة عود قطني Swab يخطط سطح الآجار ثلاث مرات في كامل الطبق لضمان انتشار المعلق على كامل سطح الطبق
أو تستخدم طريقة الناشر الزجاجي
٤- بواسطة ملقط معقم بالتلهيب الكحولي يتم وضع أشرطة الإختبار بحيث يكون طرف الشريط الذي يحمل حرف E , باتجاه حافة الطبق.
٥- تحضن الأطباق ٢٤ ساعة عند ٣٥-٣٧°م
ثم تسجل النتائج

❖خطوات إجراء اختبار E-test:

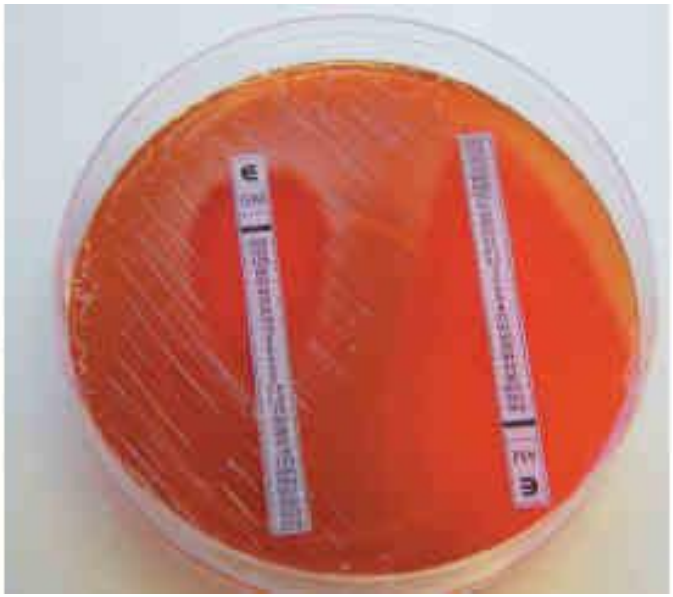
بعد مرور فترة التحضين يلاحظ ظهور شكل القطع الناقص حول الشريط بطريقة مرتبطه مع تركيز المضاد MIC (ميكروجرام /مل)، وهذه القيمة نتوافق مع تركيز المضاد MIC المساعد لاختيار العلاج الأمثل للمرضى.

مثال: اختبار E-test من المضاد الحيوي Vancomycin لبكتيريا من نوع Staphylococcus aureus



http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Etest_Vancomycin_S_aureus.jpg
Size of this preview: 800 × 338 pixels

By: Amal Alghamdi

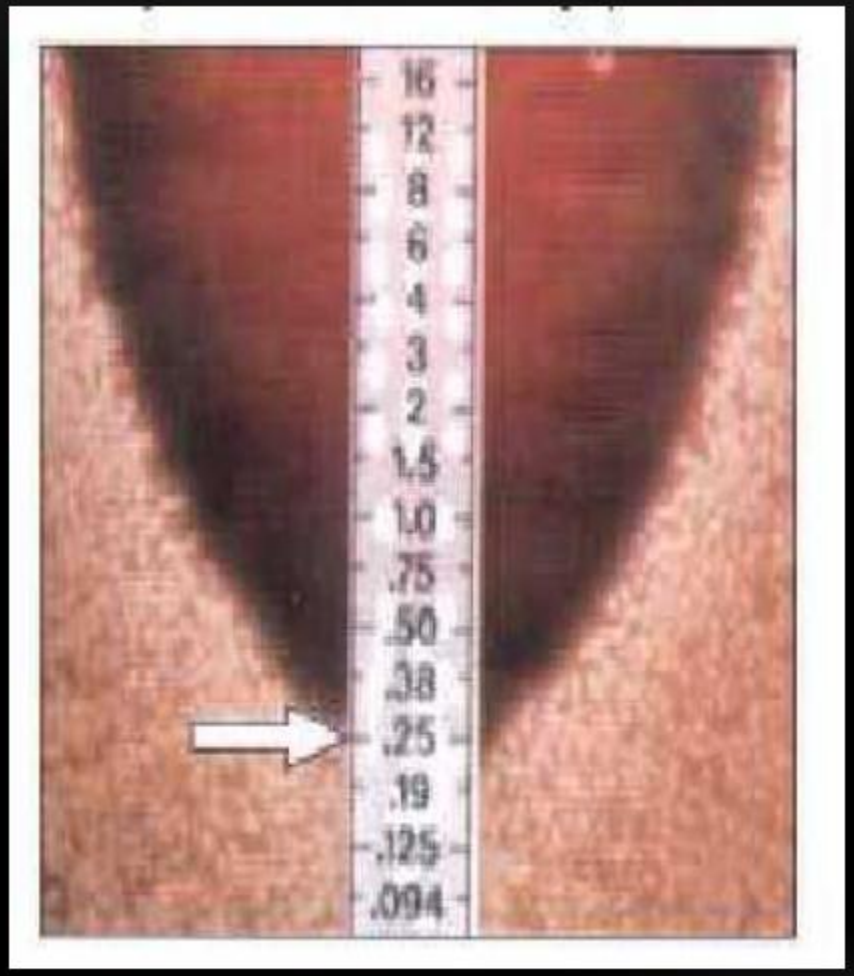


- **الصورة اليسرى: اختبار الانتشار خلال الأقراص، تظهر مناطق رائقه Inhibition zones حول الأقراص المحملة كل منها بتركيز معروف من المضاد الحيوي.**

- **الصورة اليمنى: اختبار Etest باستخدام المضاد الحيوي Bio-Stat وهي تقنية تعطي تدريجاً من المضاد الحيوي وتعتمد على الانتشار؛ ويمكن تحديد MIC من خلال هذه التقنيه وموضحاً على الشريط عند نقطة اختفاء منطقة انعدام النمو.**

- **المرجع:** Pictures, Professor D. Taylor, University of Glasgow

READING E-TESTS



Upper reading

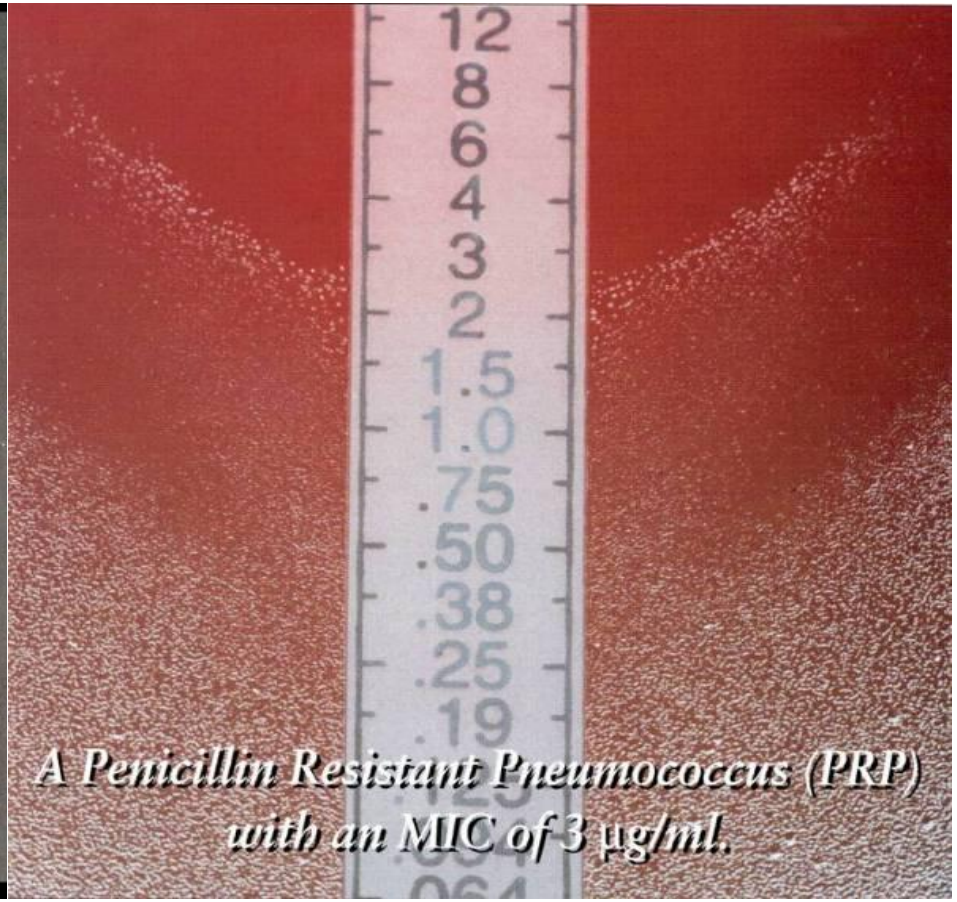
Ciprofloxacin for *Yersinia pestis*

Resistant ≥ 4 ug/ml

Intermediate 1-4 ug/ml

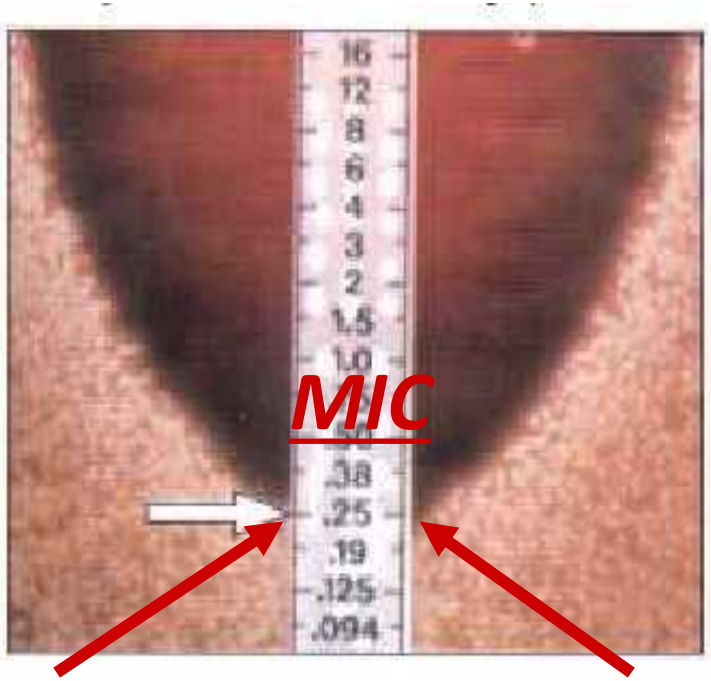
Susceptible ≤ 1

MIC of the Bacteria can be read Directly



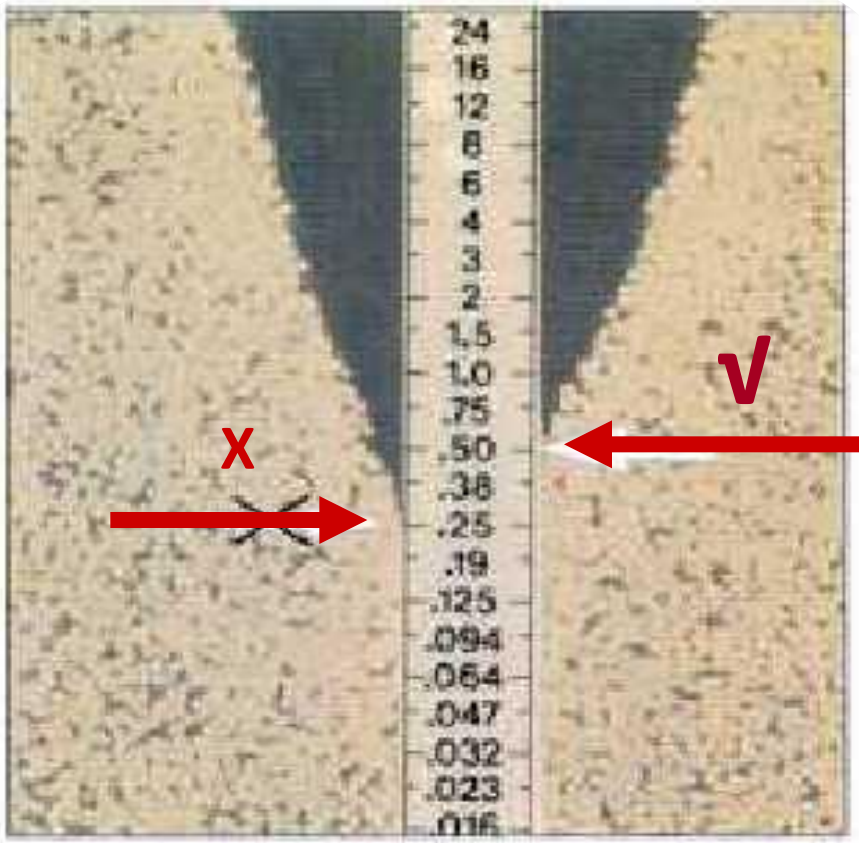
النتائج المتوقع ظهورها وطريقة تفسيرها

Results Interpretation



١- عند تطابق حافتي بداية منطقة التثبيط وظهور هالة تثبيط واضحة

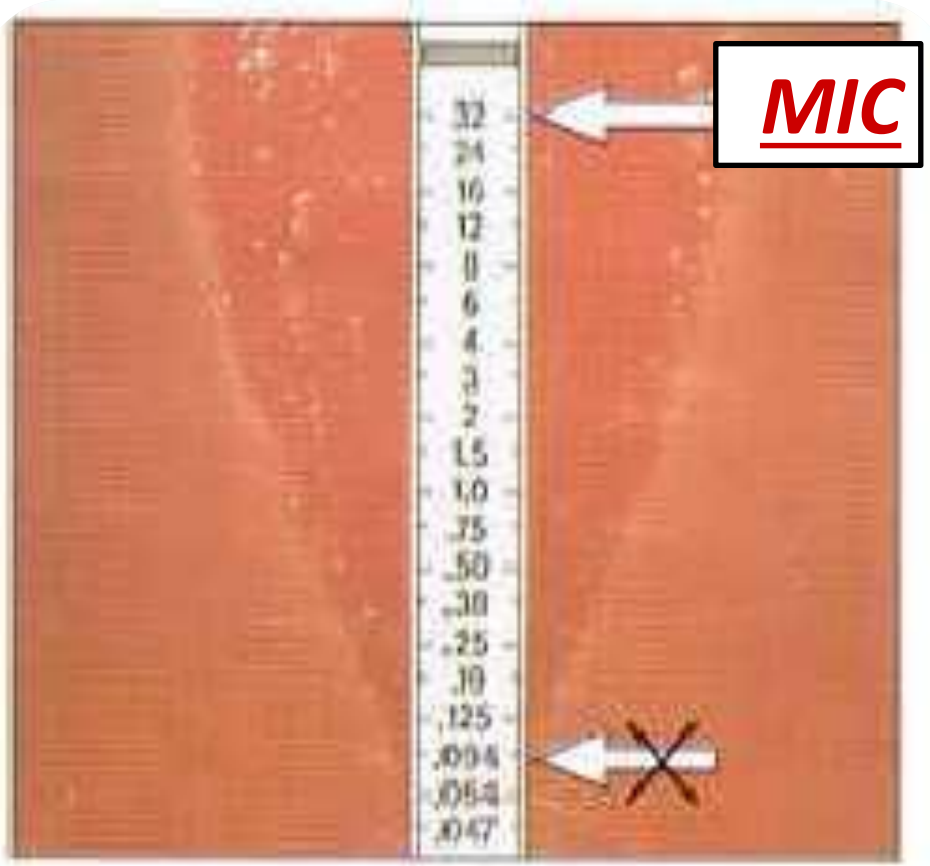
يحدد عن طريق تحديد منطقة التقاطع بين حافة المنطقة المثبطة و الشريط



Different intersections on either side of the strip. Read the higher value; if the difference is > 1 dilution, repeat the test. MIC 0.5 µg/ml.

٢- عند عدم تطابق حافتي بداية منطقة التثبيط
بحيث تبدو إحداهما أعلى من الأخرى
وبالتالي تكون هناك قيمتان للحد الأدنى من المضاد
المثبط لنمو الميكروب

يتم إختيار التركيز الأعلى في تلك المنطقة



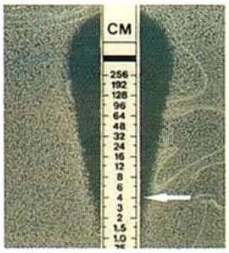
Complete inhibition of macrocolonies at MIC >32 µg/ml.

٣- قد تكون حافتي بداية منطقة التثبيط متطابقة ولكن يلاحظ عدم حدوث تثبيط كامل للميكروب بحيث يمكن ملاحظة بعض المستعمرات على طول منطقة التثبيط

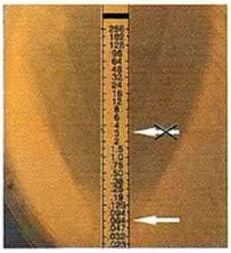
في هذه الحالة يعتبر هو أعلى تركيز في شريط المضاد الحيوي

Etest® Reading Guide

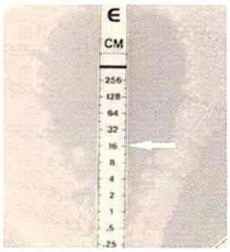
ORGANISM RELATED



Look for microcolonies when reading enterococci. MIC 4 µg/ml.

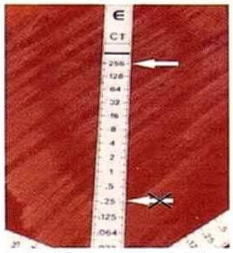


Ignore swarming caused by *Proteus* species. MIC 0.064 µg/ml.

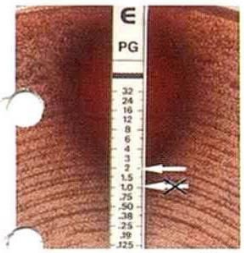


Read all individual colonies in clindamycin ellipses for anaerobes. MIC 16 µg/ml.

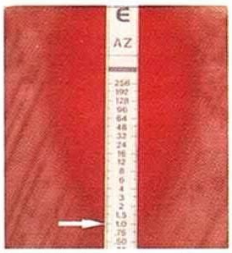
Tilt the plate to visualize pin-point colonies and hazes, especially for enterococci, pneumococci, fusobacteria, *Acinetobacter* and *Stenotrophomonas* spp. MIC 1 µg/ml.



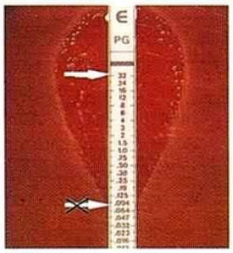
Paradoxical effect gives inhibition at low MIC with regrowth at higher MIC. MIC > 256 µg/ml.



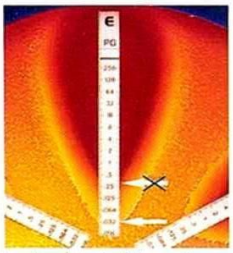
…ranize pneumococcal end-points carefully to pick up all microcolonies. Tilt the plate and/or use a magnifying glass. MIC 2 µg/ml.



Encapsulated strains may not give a confluent intersection. MIC 1 µg/ml.

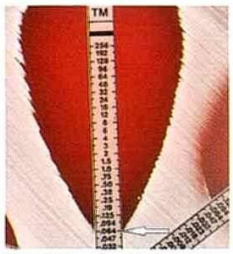


A highly resistant subpopulation in pneumococci. MIC > 32 µg/ml.



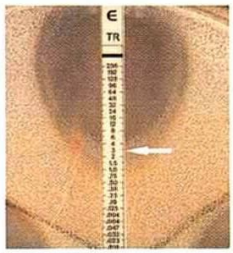
Ignore haemolysis and read where growth is inhibited. MIC 0.032 µg/ml.

Coagulase negative staphylococci can show trailing at the endpoint due to glycopeptide resistant subpopulations. MIC 12 µg/ml.

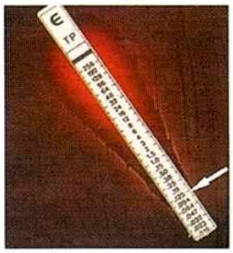


DRUG RELATED

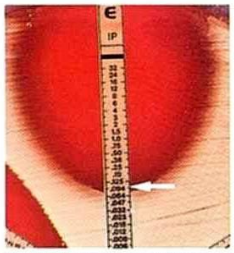
Bactericidal drugs such as aminoglycosides give sharp "crisp" ellipses. MIC 0.064 µg/ml.



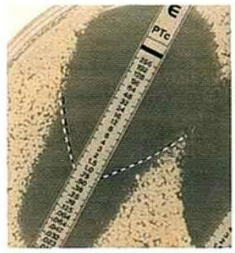
Bacteriostatic drugs such as trimethoprim and sulphonamides can give diffuse edges. Read at 80 % inhibition. MIC 3 µg/ml.



High molecular weight compounds such as glycopeptides can give very slim ellipses. MIC 0.125 µg/ml.

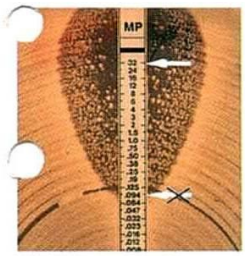


Low molecular weight compounds such as imipenem can give wide, rounded ellipses. MIC 0.094 µg/ml.



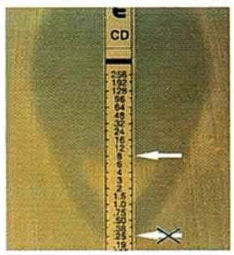
ß-lactamase inhibitors at constant levels can extend the ellipse below the MIC due to intrinsic activity. Extrapolate the upper curvature towards the strip to get the MIC. MIC 0.75 µg/ml.

RESISTANCE MECHANISM RELATED

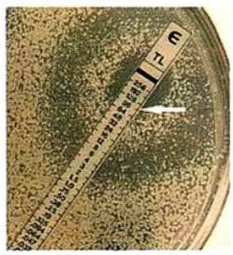


Read where the resistant subpopulation is completely inhibited. MIC > 32 µg/ml.

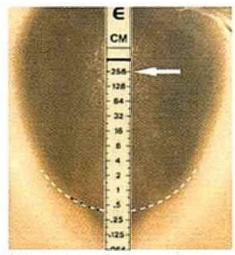
Isolated resistant colonies due to low-level mutation. MIC > 256 µg/ml.



Paradoxical effect showing partial regrowth after an initial inhibition. MIC 8 µg/ml.

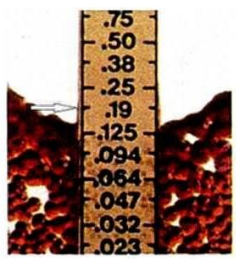


Induction of ß-lactamase production by clavulanic acid at the higher MIC range. MIC 96 µg/ml.

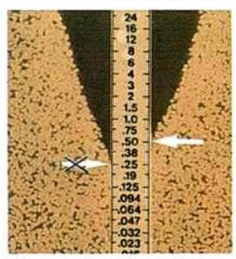


"Dip" effect due to inducible macrolide resistance. Extrapolate the ellipse towards the strip to get the MIC, i.e. 0.38 µg/ml. This strain also had colonies at the upper range of the strip. MIC > 256 µg/ml.

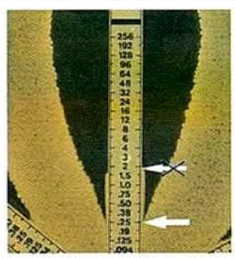
TECHNICAL AND HANDLING RELATED



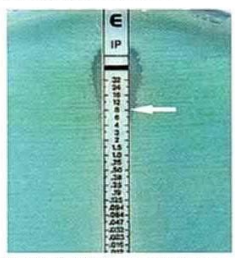
Intersection in between markings. Read the next higher value. MIC 0.19 µg/ml.



Different intersections on either side of the strip. Read the higher value; if the difference is > 1 dilution, repeat the test. MIC 0.5 µg/ml.



Ignore a thin line of growth at the edge of the strip caused by organisms growing in a tunnel of water. MIC 0.25 µg/ml.



The higher the MIC value, the smaller the ellipse. MIC 8 µg/ml.

Murphy's law - strip upside down. MIC = INVALID! Retest and position the strip with the MIC scale facing the opening of the plate.

AB BIODISK

Dalvägen 10, S-169 56 Solna, Sweden. Tel: +46-8-730 07 60, Fax: +46-8-83 81 58, etest@biodisk.se

Etest® is a registered trademark and patented in all major markets.
© AB BIODISK 1997

Table ๑: Basic sets of drugs for routine susceptibility tests (http://w3.whosea.org/)

	Set 1	Set 2
Staphylococcus	Benzyl penicillin Oxacillin Erythromycin Tetracycline Chloramphenicol	Gentamicin Amikacin Co-trimoxazole Clindamycin
Intestinal	Ampicillin Chloramphenicol Co-trimoxazole Nalidixic acid Tetracycline	Norfloxacin
Enterobacteriaceae Urinary	Sulfonamide Trimethoprim Co-trimoxazole Ampicillin Nitrofurantoin Nalidixic acid Tetracycline	Norfloxacin Chloramphenicol Gentamicin
Blood and tissues	Ampicillin Chloramphenicol Cotrimoxazole Tetracycline Gentamicin	Cefuroxime Ceftriaxone Ciprofloxacin Piperacillin Amikacin
Pseudomonas aeruginosa	Piperacillin Gentamicin Tobramycin	Amikacin