قياس فعالية المستخلصات النباتية في تثبيط النمو الجرثومي للبكتيريا والفطريات أو اختبار الحساسية الدوائية

تنشيط البكترية :-

تنشط البكتريا المراد أجراء اختبار الحساسية لها بزرعها في أوساط Nutrient Agar او Nutrient broth لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧ م° .

تنشيط الفطريات :-

وتتم بزرع الفطريات المراد اختبار حساسيتها في وسط (S.D.A) وتحضن لمدة ٧-١٠ ايام اذا كانت الفطريات من الفطريات الخيطيه و ٣-٥ ايام اذا كانت من الخمائر في درجة حرارة ٢٧ م°

تحضير محلول ماكفرلاند McFarland solution :-

هو محلول قياسي يستخدم لمعايرته (مقارنته) مع العالق البكتيري المحضر لمعرفة تركيز البكتريا (عدد البكتريا / مل) في العالق قبل زرعه في وسط الاختبار ويتكون من مزج أحجام مختلفة من محلولي ١% كلوريد الباريوم $BaCl_2.H_2O$ و ١% حامض الكبريتيك H_2So_4.

$BaCl_2$.	H_2So_4	كثافة البكتريا
٠.١	٩.٩	٣× ١٠^٨ خلية/مل
٠.٢	٩.٨	٦×١٠^٨ خلية/مل
٠.٣	٩.٧	٩×١٠^٨ خلية/مل
٠.٤	٩.٦	١٢×١٠^٨ خلية/مل

وهكذا تزداد الكثافة

تحضير العالق البكتيري :

تؤخذ مسحة من البكتريا المنشطة في وسط Nutrient Agar وتوضع في محلول ملحي معقم Normal Saline او ماء مقطر معقم وترج ثم تقارن مع أنبوب ماكفرلاند المحضر ونستمر بإضافة البكتريا حتى تصبح بنفس عكورة الأنبوب المطلوب .

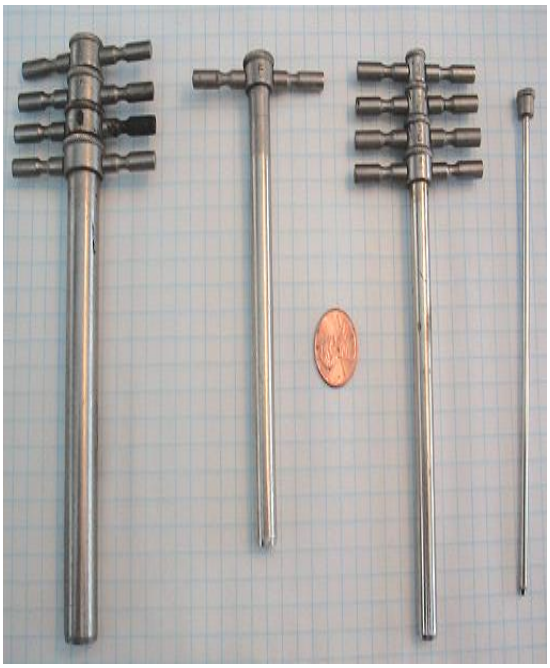
وفي حالة تنشيط البكتريا باستخدام Nutrient broth يقارن مباشرة مع محلول ماكفرلاند . ونفس الطريقة تستخدم في تحضير الفطريات

طرق اختبار الحساسية الدوائية

١- طريق الانتشار من خلال الاكار

يتم أجراء الاختبار باستخدام وسط مولر هينتون الصلب(تركيبه بسيط يجعل المواد تنتشر بسهولة فوقه اضافة الى انه يحتوي كمية قليلة من المثبطات) إذ يأخذ حجم من العالق البكتيري المحضر ويزرع في وسط المولر هينتون وتستخدم عادتا طريقة النشر Spreading لتتوزع البكتريا بصورة متجانسة ثم يتم عمل حفر في الوسط باستخدام Cork borer الثاقب الفليني ، توضع بعدها المستخلصات النباتية المحضرة في الحفر ويترك الطبق لفترة ثم يحضن لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧ م˚ بعدها نلاحظ هالة خالية من النمو البكتيري حول الحفر الحاوية على المستخلص النباتي (في حالة فاعلية المستخلص) وتدعى قطر التثبيط Inhibition Zone تقاس أقطار التثبيط بواسطة المسطرة ويطرح منها قطر الثاقب الفليني

- وعند استخدام الفطريات يتبع نفس الاسلوب مع استخدام وسط (S.D.A) وزيادة مدة الحضن الى ٣-٥ ايام

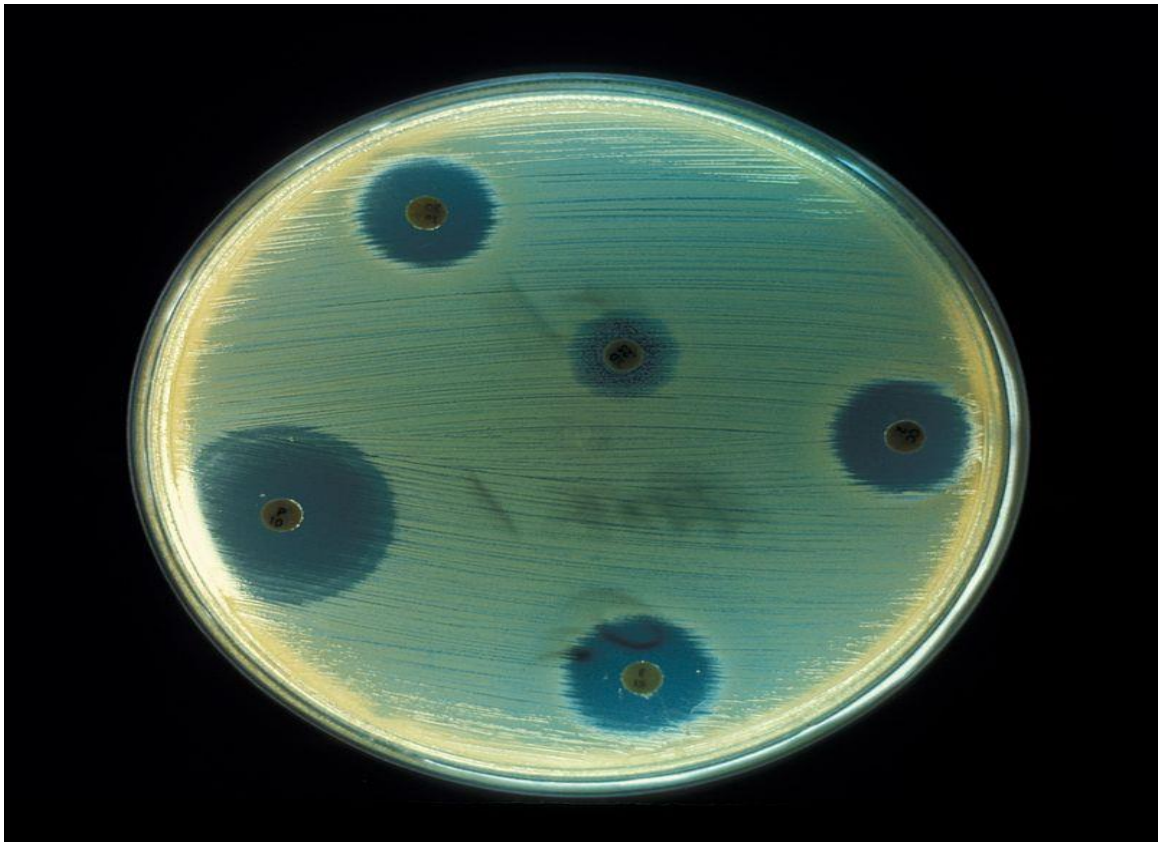


الثاقب الفليني cork borer

L-shaped

طريقة النشر

Loop



نلاحظ الهالة الشفافة حول الحفر الحاوية على المستخلص والتي تمثل فاعلية المستخلص .

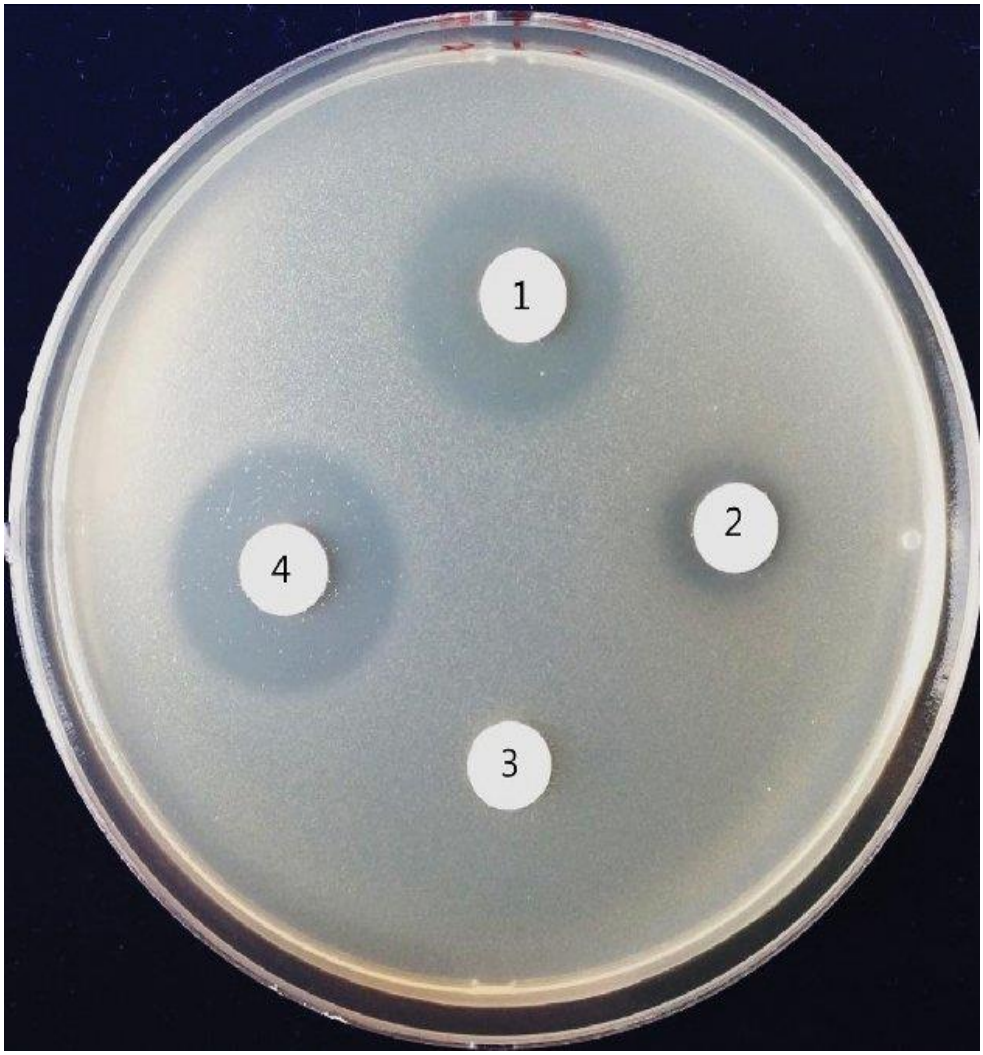
٢- طريقة الاكار الشبة الصلب

وتستخدم هذه الطريقة عندما تكون الفطريات المراد اختبار حساسيتها نجاه المستخلصات النباتية لا تنتشر في وسط النمو انما تنمو على شكل مستعمرات .

وتتم بمزج المستخلص النباتي مع الوسط ثم يصب في الاطباق وبعدها تزرع الفطريات في الوسط .

٣- طريقة الاقراص المشبعة بالمضاد (المستخلص)

في هذه الطريقة يستخدم وسط مولر هينتون وعادة يتم تقسيم الطبق من الخلف بقلم التعليم ويرقم كل قسم والذي يمثل مادة معينة ويمكن استخدام اقراص مفردة او مجموعة ويتم وضع هذه الاقراص في المستخلص لمدة معينة وبعدها ترفع بواسطة ملقط معقم الى الطبق المزروع وهنا لايتم الحفر وانما توضع على الطبق مباشرة وتحضن وخلال مدة الحضن ينتشر المضاد من القرص الى الوسط فإذا كان الكائن حساس للمضاد او المستخلص تظهر منطقة انعدام النمو حول القرص وكلما كانت الحساسية اكبر كان قطر منطقة التثبيط اكبر ويتم حساب قطر منطقة التثبيط بالمسطرة كطريقة الانتشار من خلال الاكار .



العوامل الاتي تؤثر على الحساسية الدوائية

١- طور نمو

٢- اختلاف نوع السلالة

٣- حجم اللقاح

٤- مكونات الوسط والاس الهيدروجيني

٥- درجة الحرارة

٦- فترة الحضن

٧- نوع المذيب المستخدم

يحضر تراكيز من المستخلصات النباتية كالأتي :

$$\text{تركيز} = \frac{\text{الوزن بالغرام}}{\text{الحجم بالمل}}$$

مثلا : عند اذابة ٢ غم في ١٠٠ مل تعطي تركيز ٢% (٠.٠٢)

التركيز = ٢ غم / ١٠٠ = ٠.٠٢

س / حضر تركيز ٠.٠٣ من المستخلص في ١٠ مل ماء مقطر

$$\text{التركيز} = \frac{\text{الوزن الغرام}}{\text{الحجم بالمل}}$$

$$٠.٠٣ = \frac{x}{١٠ \text{ مل}}$$

X= ٠.٠٣ × ١٠ = ٠.٣ غرام وزن المادة الواجب اذابتها في الماء المقطر لتحضير تركيز ٠.٠٣

س / حضر تركيز ١٠ % (٠.١)من المستخلص في٥ مل ماء مقطر

$$\text{التركيز} = \frac{\text{الوزن الغرام}}{\text{الحجم بالمل}}$$

$$٠.١ = \frac{x}{5 \text{ مل}}$$

X= ٠.١ × ٥ = ٠.٥ غرام وزن المادة الواجب اذابتها في ٥مل ماء مقطر لتحضير تركيز ٠.١

س / من تركيز ٠.١ حضر التراكيز التالية ٠.٠٥ و٠.٠١ و ٠.٠٢ في ١مل ماء مقطر.
الحل:
باستخدام قانون

N1 * V1 = N2 *V2

N1 = التركيز الاول (الاصلي الذي يحضر منه باقي التخافيف)
V1= الحجم الاول (أي الحجم المطلب سحبه من التركيز الاول لتحضير التركيز ثاني)
N2= التركيز الثاني(المطلوب تحضيره)
V2= الحجم الثاني

N1 * V1 = N2 *V2

٠.١ * V1=0.05* 1

V1= 0.05/0.1 =0.5ml

أي يسحب ٠.٥ مل من التركيز الاول ٠.١ ويكمل الى ١ مل للحصول على التركيز ثاني ٠.٠٥

N1 * V1 = N2 *V2

٠.١ * V1=0.01* 1

V1= 0.01/0.1 =0.1ml

أي يسحب ٠.١ مل من التركيز الاول ٠.١ ويكمل الى ١ مل للحصول على التركيز ثاني ٠.٠١

N1 * V1 = N2 *V2

٠.١ * V1=0.02* 1

V1= 0.02/0.1 =0.2 ml

أي يسحب ٠.٢ مل من التركيز الاول ٠.١ ويكمل الى ١ مل للحصول على التركيز ثاني ٠.٠٢

❖ **س /**

عند تحضير تركيز ١٠% بحجم ١٠ مل ويتم إضافة ا مل من المستخاص النباتي في كل الحفرة في الطبق فكم غرام تحوي كل حفرة :-

الحل :-

تركيز ٠.١ يدل على انه تم اذابة١ غم في ١٠ مل (كما في القانون السابق) أي كل ١ مل يحوي ٠.١ غم وهذا بالتالي يدل على ان كل حفرة تحوي ٠.١ غرام

❖ **وعند اضافة ٠.٥ مل في الحفرة فهذا يعني ان كل حفرة تحوي ٠.٠٥ غرام**