GLOBAL TASK FORCE ON CHOLERA CONTROL

الطرق المختبرية لاختبار حساسية ضمة الكوليرا للمضادات الحيوية(AST): نقاط تتطلب اهتمامًا خاصًا

يتناول هذا المستند بعض النقاط الحرجة المتعلقة بإجراءات المختبر للاختبار الظاهري للحساسية للمضادات الحيوية باستخدام طرق الانتشار باستخدام اقراص مشبعة بالمضاد الحيوي)طريقة كيربي بور(وشرائط الاختبار كما موضح في دليل العمل "اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لعلاج والسيطرة على الكوليرا". توجد طرق أخرى للكشف الظاهري مثل طرق التخفيف (التخفيف في الوسط والتخفيف في الآجار)، لكنها أكثر تكلفة وصعوبة في التنفيذ وبالتالي لا يوصي بها من قبل فرقة العمل العالمية لمكافحة الكوليرا.

عموماً البروتوكولات القياسية لاختبار الحساسية للمضادات موصوفة بالتفصيل في إرشادات ومراجع الأنتيبيوغرام (*CLSI*, *EUCAST**** *EUCAST, CA-SFM*,***).

الامتثال للسلامة. يجب إجراء اختبار بكتيريا ضمة الكوليرا والعينات الأخرى التي يحتمل أن تكون معدية بما يتوافق مع سياسات وإجراءات السلامة المخبرية. يجب ارتداء معدات الوقاية الشخصية (PPE) عند التعامل مع المواد التي يحتمل أن تكون معدية. استشر دائمًا أوراق بيانات السلامة (SDS) الفردية للحصول على معلومات خاصة بكل محلول.

سلالات ضبط الجودة(QC). وفقًا لإرشادات ومراجع فحص حساسية المضادات الحيوية[1,2,3] (Antibiogram) يجب استخدام سلالات ضبط الجودة لمراقبة نظام اختبار حساسية المضادات الحيوية (AST) لضمان نتائج دقيقة وقابلة للتكرار، ويجب دائمًا إجراؤها بالتوازي مع سلالات الاختبار. يعتمد الاختيار على ما هو مطلوب لتغطية كل دواء يتم اختباره، انظر أدناه. ومع ذلك، يمكن استخدام سلالات مخبرية أخرى متاحة وموصوفة بدقة وذات حساسية معروفة للمضادات الحيوية المختبرة.

أزيثروميسين (MIC): *S. aureus* ATCC 29213

إريثروميسين (قطر): *S. aureus* ATCC 29213

بيفلوكساسين (قطر): *E. coli* ATCC 25922

سيبروفلوكساسين (MIC): *E. coli* ATCC 25922

تتراسيكلين (قطر): *E. coli* ATCC 25922

دوكسيسيكلين (MIC): *E. coli* ATCC 25922

جودة وتحضير الوسط. أجار مولر-هينتون هو الوسط الوحيد لاختبار الحساسية الذي تم التحقق من صلاحيته وفقًا للإرشادات الدولية [3,2,1]. يُوصى باستخدام وسائط مولر-هينتون التجارية الجاهزة والمجففة. يجب صب الأجار في أطباق بتري زجاجية أو بلاستيكية مسطحة القاع وعلى سطح مستو للحصول على عمق موحد يبلغ 4 ملم ± 0.5 ملم. **فزيادة أو نقصان العمق تؤثر على انتشار العوامل المضادة للميكروبات، مما قد يؤثر على فعالية الدواء.**

يجب اختبار كل دفعة جديدة من وسط الزرع من حيث التعقيم)خلوها من التلوث(، والقدرة على دعم نمو الممرض أو الممرضات المستهدفة، والقدرة على إنتاج نمط مقاومة مناسب للمضادات الحيوية باستخدام السلالة المرجعية. تُخزن أطباق بتري المصبوبة عند درجة حرارة تتراوح بين 4 و 8درجات مئوية وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة. يجب أن يكون سطح الأجار جافًا قبل الاستخدام، مع الحذر من جفاف الوسط بشكل كامل .

تحضير اللقاح . يجب إجراء اختبار الحساسية الأنتيبيوغرام **باستخدام سلالة طازجة تم إعادة زراعتها حديثًا (لمدة 16–18 ساعة عند35 ±2 C^0)** على وسط مناسب وغير انتقائي مثل أجار مولر -هينتون، أو أجار قلب الدماغ، أو أجار تريبتكاز الصويا، على أن تتم الزراعة بطريقة تسمح بالحصول على مستعمرات مفردة. كما يجب زراعة السلالات ضبط الجودة من ATCCالمطلوبة لاختبار الانتشار بالأقراص بنفس الطريقة وظروف الحضانة. يتم تحضير معلّق بكتيري في محلول ملحي **باستخدام عدة مستعمرات منفصلة**(لتفادي اختيار متغير غير نمطي)، بحيث يتم ضبط عكارة المعلّق لتتوافق مع معيار ماكفارلاند 0.5 . يمكن تعديل الكثافة بإضافة محلول ملحي أو مزيد من البكتيريا حسب الحاجة.

تلقيح الأطباق. يُفضل استخدام المُلقّح البكتيري خلال 15 دقيقة من تحضيره، وعلى أبعد تقدير خلال 60 دقيقة. يتم غمس مسحة قطنية معقمة في المعلق البكتيري، ثم إزالة السائل الزائد عن طريق تدوير المسحة على جدران الأنبوب. إذا كان سيتم تلقيح عدة أطباق أجار باستخدام نفس المُلقّح، يجب إعادة تعبئة المسحة بشكل صحيح بين كل طبق وآخر. يُمسح سطح الطبق بالكامل ثلاث مرات، مع تدوير الطبق 60 درجة في كل مرة، مع التأكد من عدم ترك أي فراغات بين المسحات. **يجب وضع الأقراص أو الشرائط الاختبارية خلال 15 دقيقة من التلقيح؛** ففي حال تُركت الأطباق في درجة حرارة المختبر لفترة طويلة قبل وضع الأقراص أو الشرائط، قد تبدأ البكتيريا بالنمو، مما يؤدي إلى تقليل خاطئ في حجم مناطق التثبيط.

---

*معهد المعايير السريرية والمخبرية

** اللجنة الأوروبية لاختبار حساسية المضادات الحيوية)الموقع الإلكتروني: http://www.eucast.org)

*** لجنة اختبار الحساسية للمضادات الحيوية التابعة للجمعية الفرنسية لألحياء الدقيقة - اللجنة الأوروبية لاختبار حساسية المضادات الحيوية

أقراص مضاد ميكروبات. يُوصى بحفظ الخراطيش المُغلقة في الثلاجة بدرجة حرارة < 8 °C أو تجميدها عند ≤ -14°C في فريزر غير مزوّ د بنظام إزالة الجليد التلقائي، وذلك وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة. ولتفادي التكاثف، يجب ترك الأقراص أو حاويات الموزّع لتعود إلى درجة حرارة الغرفة قبل الاستخدام. يُفضل استخدام موزّع أقراص، وإن لم يكن متاحًا، يمكن استخدام وعاء معقّم مثل طبق بتري فارغ لوضع الأقراص فيه، مع استخدام ملقط معقّم للتعامل مع الأقراص(1). لا ينبغي استخدام أكثر من 6 أقراص عند استخدام أطباق أجار صغيرة (بقطر 90 أو 100 ملم). توضع الأقراص بثبات على سطح الأجار الجاف والمُلقّح. **بمجرد وضع الأقراص، لا يجب تحريكها لأن انتشار المضاد الحيوي يتم بسرعة كبيرة.**

شرائط الاختبار. يُترك وعاء الشرائط ليعود إلى درجة حرارة الغرفة لمدة تقارب 30 دقيقة. باستخدام اليد أو ملقط معقّم، يتم إخراج عدد كاف من الشرائط من مكان التخزين. يجب التعامل مع الشريط فقط من الجهة العلوية فوق الخط الأسود، في المنطقة التي يظهر فيها رمز المضاد الحيوي. يُمنع لمس سطح الشريط المقابل لمقياس التركيز المثبط الأدنى(MIC). **بعد وضع الشرائط على الأجار، يجب عدم تحريكها، لأن إطلاق المضاد الحيوي في الوسط يحدث بشكل فوري.**

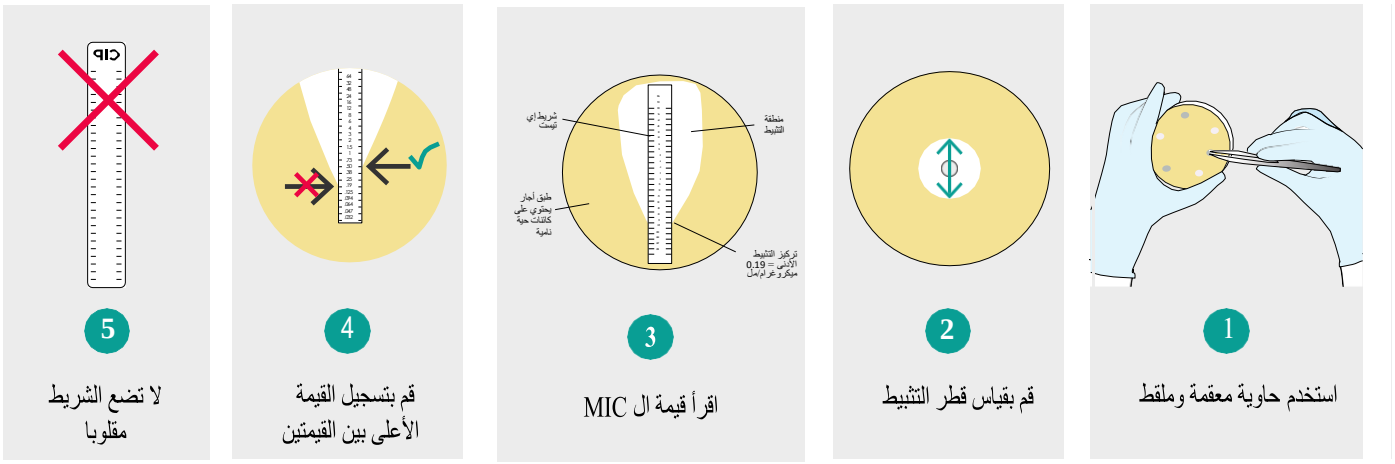
الحضانة. تُحَضن الأطباق عند درجة حرارة35 ± 2 °C لمدة 18 ± 2 ساعة، بوضعها مقلوبة، على ألا يزيد ارتفاع الرصّة عن خمس أطباق، ويفضل **بدء التحضين خلال 15 دقيقة من وضع الأقراص، ولكن يجب ألا يتجاوز 30 دقيقة كحد أقصى.**

القراءة. يجب أن يؤدي المُلقّح الصحيح إلى نمو بكتيري كثيف يغطي كامل سطح الأجار. أما وجود مستعمرات منفصلة فيدل على أن تركيز المُلقّح كان منخفضًا و يجب إعادة الاختبار.

بعد فترة الحضانة، قم بقياس قطر منطقة التثبيط بما (في ذلك القرص) لأقرب ملليمتر باستخدام مسطرة أو فرجار منزلق يوضع على الجزء الخلفي من الطبق (2). تأكد من أن أقطار مناطق التثبيط لسلالات ضبط الجودة تقع ضمن الحدود المقبولة. ارجع إلى وثائق إرشادات حساسية المضادات الحيوية للتفسير[3,4,5]. تتم مراجعة المعايير بانتظام، يرجى التأكد من أنك تستخدم نسخة محدثة. يجب إعادة الاختبار إذا لم تتحقق هذه الشروط.

اقرأ قيمة التركيز المثبط الأدنى(MIC) حيث يتقاطع نقطة التقاطع الجزئي للتثبيط مع جانب الشريط (3)؛ إذا تقاطع القطع الناقص بين قيمتي MIC، يتم الإبلاغ عن القيمة الأعلى من الاثنتين(4) ؛ إذ ا تم وضع الشريط مقلوبًا، تكون النتيجة غير صالحة، أعد الاختبار (5).

استكشاف الأخطاء وإصلاحها. غالبًا ما تكون اختبارات مراقبة الجودة (QC) التي تقع خارج النطاق الطبيعي ناتجة عن التلوث أو استخدام سلالة مراقبة جودة غير صحيحة. يجب أن يتضمن الإجراء التصحيحي أولًا إعادة الاختبار باستخدام مزرعة نقية من سلالة مراقبة الجودة تم زرعها حديثًا. إذا لم يتم حل المشكلة، فارجع إلى إرشادات حساسية المضادات الحيوية ودليل استكشاف الأخطاء وإصلاحها المرجعي (CLSI M100[1]) أو الأسئلة المتكررة (Eucast[4]). وفقًا لدليل قراءة EUCAST لاختبار الانتشار بالقرص[6] ، في حالة وجود مستعمرات مميزة داخل منطقة التثبيط، تحقق من درجة النقاء وكرر الاختبار إذا لزم الأمر. إذا كانت المزارع نقية، يجب أخذ المستعمرات داخل المناطق في الاعتبار عند قياس القطر. في حالة وجود مناطق مزدوجة، تحقق من درجة النقاء وكرر الاختبار إذا لزم الأمر. إذا كانت المزارع نقية، فاقرأ المنطقة الداخلية.



مراجع

1. https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/, CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34th Edition

2. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2024_manuals/Manual_v_12.0_EUCAST_Disk_Test_2024.pdf

3. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf

4. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

5. https://clsi.org/all-free-resources/ (CLSI M45 ED3:2016TABLE 20)

6. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Reading_guide_v_10.0_EUCAST_Disk_Test_2023.pdf