GLOBAL TASK FORCE ON CHOLERA CONTROL

اختبار حساسية المضادات الحيوية لعلاج الكوليرا ومكافحتها

الهدف: تقديم إرشادات لتحديد الحساسية في المختبر لبكتيريا الضمة الكوليرية 01/O139

الطرق

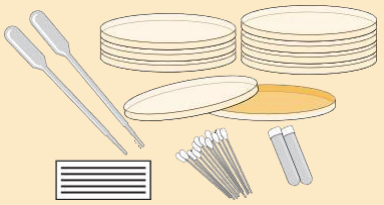
مزيج من طريقتين:

- طريقة الانتشار على أجار مع أقراص مشبعة بمضاد حيوي بتركيزات محددة مسبقًا.
- قياس التركيز الأدنى للتثبيط(MIC) باستخدام شرائط اختبار مشبعة بمضادات حيوية بتركيزات متدرجة.

ملاحظة: *يوصى باستخدام شرائط الاختبار للمضادات الحيوية التي لا يوجد لها نقطة فصل محددة أو عند الحاجة إلى اختبارات تكميلية.*

ملاحظة: *يجب دائما إعداد سلالات التحكم جنبا إلى جنب مع سلالات* الاختبار.

المواد المطلوبة



- أطباق أجار مولر هينتون (MHA) بعمق 4 ملم ± 0.5 ملم
- محلول ملحي معقم(0.85% أو 0.9%) + أنابيب اختبار متطابقة الحجم لتحضير معلقات البكتيريا ومعيار عكرة ماكفارلاند
- أعواد قطنية معقمة
- موزع أقراص تلقائي أو قالب بأماكن 5 أو 6 أقراص وملاقط
- مسطرة مترية (يمكن أن تقيس بالمليمتر)
- معيار تعكر ماكفارلاند 0.5
- ورقة بيضاء ذات خطوط سوداء حادة(يمكن تحضيرها يدوًيا أو طباعتها) سلالات
- التحكم النوعي: الإشريكية القولونية ATCC25922
  المكورات العنقودية الذهبية ATCC29213

المضاد الحيوي المراد اختباره والطريقة الموصى بها:

اختبار الفحص الأولي بطريقة الانتشار بالقرص

- إريثروميسين(EM) ، (15 ملجم)
- بيفلوكساسين(PEF) ، (5 ملجم)
- تتراسيكلين (TE)، (30 ملجم)

الاختبار التأكيدي بقياس التركيز المثبط الأدنى

- أزيثروميسين(AZ)
- سيبروفلوكساسين(CIP)
- دوكسيسايكلين (DO)

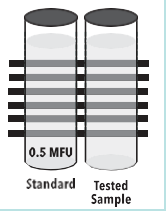
أزيثروميسين(AZ)، بيروفلوكساسين (CIP)، ودوكسيسايكلين (DOX) هي المضادات الحيوية الثلاثة المختارة والموصى بها لعلاج الكوليرا وفقًا لفريق العمل العالمي لمكافحة الكوليرا

https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2024/12/gtfcc-technical-note-on-use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera-1.pdf

- تخزن أقراص المضادات الحيوية وشرائط الاختبار بين -20 درجة مئوية و 8 درجات مئوية وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة
- تحقق من تاريخ انتهاء صلاحية أقراص المضادات الحيوية وشرائط الاختبار قبل الاستخدام.

إجراء اختبار القرص والشريط

1. تحضير اللقاح البكتيري

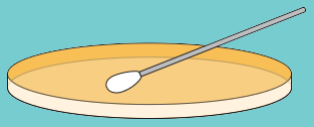


حضّر مُعلّقًا بكتيريًا باستخدام عدد قليل من المستعمرات المعزولة جيدًا من مزرعة أجار تم تحضيرها ليلة كاملة (18-24 ساعة عند 35 ± 2 درجة مئوية) في محلول ملحي مُعقّم، مع تعديله ليصل إلى 0.5 ماكفارلاند* بالمقارنة مع المعيار.

ملاحظة: تأكد من تقسيم المعيار إلى أنبوب بنفس حجم الأنبوب المستخدم لتحضير معلق الاختبار.

*يقابل ذلك لقاحًا بتركيز حوالي 1 إلى 2 × 10^8 وحدة تشكيل مستعمرة/مل (الامتصاص عند 600 نانومتر = 0.08-0.1)

2. تلقيح أجار مولر هنتون (MHA)



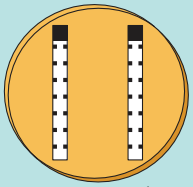
- في غضون 15 دقيقة على الأكثر بعد تحضير معلق اللقاح البكتيري.
- اغمس المسحة القطنية في المعلق البكتيري؛ أزل السائل الزائد بالضغط على المسحة ضد الجدار الداخلي للأنبوب.
- قم بتخطيط السطح الكامل للطبق 3 مرات، مع تدوير الطبق 60 درجة في كل مرة.
- تأكد من أن السطح جاف تمامًا قبل الخطوة التالية.

3. تطبيق أقراص المضادات الحيوية

- في غضون 15 دقيقة على الأكثر بعد المسح.
- ضع الأقراص بشكل فردي باستخدام موزع أقراص تلقائي أو ملقط معقم، مع الضغط برفق على الأجار.
- لا تحرك الأقراص بمجرد وضعها.
- أعد الغطاء، اقلب الأطباق وضعها في الحاضنة.

ملاحظة: اترك الأقراص لتصل إلى درجة حرارة الغرفة قبل فتح الخرطوشة أو حاوية التخزين.

4. تطبيق شرائط اختبار إي تيست



- في غضون 15 دقيقة على الأكثر بعد المسح.
- ضع الشرائط على الأجار وفقًا لتوصيات الشركة المصنعة.
- لا تحرك الشرائط بمجرد وضعها.
- أعد الغطاء، اقلب الأطباق وضعها في الحاضنة.

ملاحظة: يجب تخزين شرائط الاختبار باستمرار في الفريزر عند -20 درجة مئوية. اترك الشرائط التي ستستخدم لتصل إلى درجة حرارة الغرفة قبل وضعها على الأجار.

5. **الحضانة:** 18 ± 2 ساعة عند 35 درجة مئوية ± 2 درجة مئوية.
6. **القراءة:** بعد 18 ± 2 ساعة، راقب الطبق وقم بقياس قطر (مم) حلقة التثبيط. اقرأ قيمة التركيز الأدنى للتثبيط (MIC) (بوحدة ميكروجرام/مل) عند تقاطع الجزء السفلي من منطقة تثبيط النمو بيضاوية الشكل مع شريط الاختبار. إذا كانت قيمة التركيز الأدنى للتثبيط (MIC) تقع بين تخفيفين متضاعفين، قم دائمًا بالتقريب إلى القيمة الأعلى.

تفسير النتائج

ملاحظة 1: أثبت اختبار انتشار قرص حمض الناليديكسيك أنه طريقة موثوقة لتحديد سلالات الضمة الكوليرية O1 ذات الحساسية المنخفضة أو المقاومة للسيبروفلوكساسين، ويمكن استخدامه كبديل لاختبار فحص البيفلوكساسين(PEF). إذا كانت السلالة مقاومة لحمض الناليديكسيك (بناءً على معايير التفسير الخاصة بالبكتيريا المعوية) ، فيجب اختبار حساسية السلالة للسيبروفلوكساسين عن طريق قياس التركيز الأدنى للتثبيط. يجب اعتبار السلالات التي تظهر نموًا حتى ملامسة قرص حمض الناليديكسيك مقاومة للسيبروفلوكساسين (MIC ≥ 0.25 mg/mL)

ملاحظة 2: يمكن اختبار مضادات حيوية إضافية للمراقبة الوبائية للسلالات (مثل الكوليستين، بوليميكسين ب، أميسيلين، كلورامفينيكول، تريميثوبريم/سلفاميثوكسازول، السيفالوسبورينات من الجيل الأول والثالث، الستربتومايسين).

- **ضبط الجودة: إذا كانت نتائج سلالة ضبط غير متوقعة أو خارج النطاق المسموح به، فإن أي نتائج تم الحصول عليها لسلالات الضمة الكوليرية تعتبر غير صالحة، ويجب على المختبر التحقيق في مصدر الخطأ.**
- التراسيكلين: اختبار فحص لحساسية الدوكسيسايكلين. يمكن تصنيف السلالات الحساسة للتتراسيكلين على أنها "حساسة" للدوكسيسايكلين. وفقًا لـ CA-SFM/EUCAST، إذا كانت السلالة مقاومة للتتراسيكلين، فيجب اختبار الدوكسيسايكلين بشكل فردي عن طريق قياس التركيز الأدنى للتثبيط (MIC).
- بيفلوكساسين: اختبار فحص لحساسية السيبروفلوكساسين.
- إريثروميسين: اختبار فحص لحساسية الأزيثروميسين.

ملاحظة: قياس التركيز الأدنى للتثبيط (MIC) للأزيثروميسين والسيبروفلوكساسين ليس ضروريا لإدارة الحالات، ولكنه موصى به لمعالجة الوبائية للسلالات..

التفسير: يرجى الرجوع إلى ألمعايير التالية:

https://clsi.org/all-free-resources/, CLSI M45 ED3:2016, Table 20. *Vibrio spp*. (Including *Vibrio cholerae*) **:CLSI** http://www.eucast.org/clinical_breakpoints **:EUCAST**

https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf **:CA-SFM / EUCAST**

ملاحظة: تتم مراجعة هذه المعايير بانتظام، لذا يرجى التأكد من أنك تستخدم نسخة محدثة.

هذه الوثيقة مخصصة للاستخدام من قبل المختبرات المرجعية. يرجى الاحتفاظ بالعزلة حتى يكتمل الاختبار أو وفقًا لسياسة الاحتفاظ بالعينات المتبعة في المختبر.