مقدمة وتعريف بالمواد المضادة للميكروبات

ANTIMICROBIAL AGENTS

Antimicrobial agents: هي مواد مضادة للميكروبات تستعمل لقتل او تثبيط نمو الاحياء المجهرية . وهي تصنف الى:

1- Chemotherapeutic agents
2- Disinfectants
3- Antiseptics

Chemotherapeutic agents : هي مواد للمايكروبات تعطى systematically لغرض علاج الاصابة وهي عادة اما تكون قاتلة للبكتيريا bactericidal او مثبطة لنمو البكتيريا bacteriostatic وفي كلتا الحالتين فان الغرض من هذه المواد هو لمنع تكاثر الكائن الحي المجهري الممرض وبالتالي فان دفاعات الجسم ستقوم بوظائفها للتعامل مع الاصابة. ومثالها مضادات الحياة.

Disinfectants: هي مواد مضادة للمايكروبات وغالبا ما تكون قادرة على قتل مدى واسع من الاحياء المجهرية ولكن ليس من الضروري القضاء على السبورات ، وهي عادة ما تستعمل مع مواد غير حية ، كما هو الحال مع الكحول والديتول (بتراكيز عالية).

وهي تستعمل في الحالات التي لا يكون فيها التعقيم ضروريا كالطعام والملابس ويطلق على عملية قتل الاحياء المجهرية باستخدام هذه المواد بالتطهير.

Antiseptics : هي مواد مضادة للمايكروبات تستعمل للسيطرة والتخلص من الاصابة البكتيرية. وهذه المواد تمتلك صفات مضادات لنمو الاحياء المجهرية مشابهة لتلك التي تمتلكها الـ Disinfectants الانها تستعمل مع الجلد والانسجة الحية الاخرى , وهي لا تمتلك مدى الفعالية التي تمتلكه الـ disinfectants وانما يقتصر ذلك على الاحياء المجهرية المرتبطة باصابات الجلد مثلا كما هو الحال مع الديتول بتراكيز واطئة اذ ان هذه المواد بطبيعتها لا تسبب ضرر للانسجة.

Bactericidal : المصطلح يعني قتل البكتيريا. وبمعنى اخر ان الخلايا البكتيريا لو وضعت في وسط مغذي ملائم فانها ستكون غير قادرة على التكاثر وانتاج اجيال جديدة. وعملية القتل قد تعود الى احد العوامل التالية:

1- protein denaturation
2- enzymes inactivation
3- damage of membrane
4- blocking of anessential metabolic path.

Bacteriostatic: المصطلح يعني تثبيط البكتيريا. وبمعنى اخر ان كل خلية في المجموع البكتيري تمنع من النمو بفعل المادة المستخدمة لتثبيط نموها وان هذه الخلايا لو توفر لها الوسط والظروف الملائمة للنمو فانها تستطيع ان تستعيد نشاطها لتتكاثر من جديد مكونة اجيال جديدة.

م.م. عمار رياض & م.م. هالة محمد

المضادات الحيوية:

هي مواد كيمياوية تعتبر نواتج ايضية ثانوية تقوم بانتاجها احياء مجهرية خلال طور الثبات stationary وهي ذات وزن جزيئي واطئ تمتلك القدرة على قتل وتثبيط نمو الاحياء المجهرية الاخرى.

اهمية المضادات:

1- منع انتقال الامراض من انسان الى اخر او من انسان الى حيوان او بالعكس.
2- منع تلوث الاطعمة كما هو الحال مع بعض المعلبات.
3- قد تضاف بعض المضادات لمنع تحلل الجلد او الخشب او الورق بواسطة بعض انواع الفطريات.

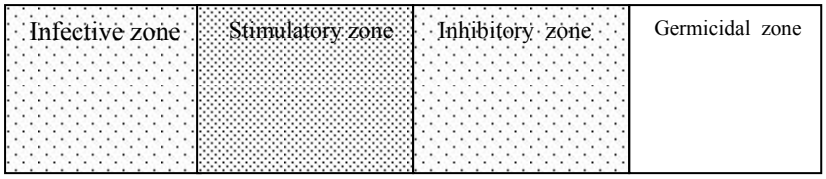
التعقيم:

يعني خلو المواد من جميع الاحياء المجهرية والقضاء عليها سواء بكتيريا او فايروسات وحتى السبورات.

مدى المطهر Disinfectant spectrum

عند تعريض الكائن المجهري لتراكيز متزايدة من العامل المضاد للبكتيريا تنتج عدة تاثيرات وبدرجات مختلفة تمتد من التنشيط stimulation الى حد القتل lethal وهذه الدرجات المختلفة من الفعالية للعامل المضاد تعرف بـ(مدى المطهر) وتسمى (Zonal effect) وهذه الدرجات تقسم الى :

1- Infective zone: يمتد من الصفر الى اعلى مستوى عندما لا يظهر أي تاثير للمضاد على الكائن ألمجهري.
2- stimulatory zone: منطقة يحدث فيها تحفيز قليل فخلال إضافة تراكيز ولمدى محدد قد ينتج عنه تحفيز طفيف بالنمو slight stimulation in growth.
3- Inhibitory zone: تاثيرات مثبطة للنمو inhibitory effect.
4- Germicidal effect: يظهرفي هذه المنطقة تاثيرات قاتلة تبدا بالظهور ضمن نهاية منطقة التثبيط وتزداد بزيادة التركيز.



العوامل التي تحدد مدى قوة العامل المضاد:

1- صفات الكائن المجهري.
2- البيئة وتشمل: درجة الحرارة ، pH، الوقت ، تركيز المادة، وجود مواد عصوية.
3- عدد البكتريا.
4- طبيعة التاثير على الكائن المجهري.

الفرق بين المضاد Antibiotic والمطهر Disinfectant:

المضادات	المطهرات
1) عبارة عن نواتج ايضية ثانوية للاحياء المجهرية Biological compounds 2) انتقائية selective في عملها لنوع او مجموعة معينة من الاحياء المجهرية. 3) تستخدم داخل الجسم. 4) التراكيز المستخدمة تكون واطئة جدا تقاس بالمايكروغرام	1) مواد كيمياوية مصنعة synthetic chemical compounds. 2) غير انتقائية non selective قد تكون فعالة لمدى واسع من الاحياء المجهرية. 3) تستخدم خارج الجسم او على السطوح الخارجية. 4) تستخدم بتراكيز عالية كما هو الحال مع الديتول (5%)

ملاحظة: احيانا تقاس كمية المضاد المستعمل بالوحدة العالمية (I.U)

Major groups of antimicrobial agents:

1- Phenol and phenolic compounds
2- Alcohols
3- Halogens
4- Heavy metals
5- Dyes
6- Detergents
7- Quaternary ammonium compounds
8- Acids and alkaloids
9- Gluteraldehyde
10- Gases

1- الفينول ومركباته:

الفينول (carboxylic acids) تأثيرها يكون من خلال الجزء الفعال فيها وهي مجموعة الكاربوكسيل الحرة، وهي تعمل على: 1- تحطيم الجدار الخلوي 2- ترسيب البروتينات وتجلطها. 3- تثبيط العديد من الانزيمات.

ويعتبر الفينول فعال بشكل كبير ضد الـ Mycobacterium بسبب ذوبانيته العالية في الدهون كما انه ذو تأثير كبير وقاتل للفطريات كما في حالة O-cresol.

2- الكحولات Alcohol

فعالة ضد الخلايا الخضرية للبكتيريا والفطريات ولا تؤثر على السبورات ، تاثيرها يكون من خلال اذابة الدهون التي في الجدارالخلوي، احداث مسخ للبروتينات ، اضافة الى عمله كمادة مجففة (dehydration) ويستخدم الكحول الاثيلي في التعقيم بتركيز 50-90% الا انه افضل تركيز قاتل للبكتيريا هو 70%.

3- الهالوجينات Halogens

وهي تشمل الكلور Chloride واليود Iodine والفلور وتاثيرها يكون ناتج من كونها مواد مؤكسدة قوية جدا تعمل على تثبيط البروتينات من خلال اكسدة مجاميع الـ Sulfhydryl (SH-) وتكوين اواصر (S-S) وتكون اواصر (S-S) وبالتالي تغير شكل البروتين وتثبيط فعاليته .

ويستخدم الكلور في تعقيم مياه الشرب ، ومن سلبياتها انها ذات تاثير فعلي تاكلي على سطوح المعادن.

4- المعادن الثقيلة : Heavy metals

معظمها bacteriostatic بسبب قدرتها على الارتباط بالبروتين وتثبيط الانزيمات عن طريق تاثيرها على المجاميع (SH) ومنها الزئبق mercury والفضة Silver التي تعتبر الايونات المعدنية اللاعضوي الوحيدة المستعملة كمطهرات.

تقييم المطهرات ومقارنة العوامل المستعملة ضد المايكروبات

Evaluation of disinfectants or comparison of antisepses those used against microorganisms

1- معامل الفينول phenol coefficient

يعتمد معامل الفينول على:

1- تقييم المطهرات الذائبة في الماء water soluble والتي تكون مشابهة في تركيبها الكيمياوي للفينول.
2- ان اساس التقييم هو المقارنة بين المطهر قيد التجربة مع الفينول النقي تحت ظروف تجريبية قياسية.
3- طرق العمل المعتمدة من قبل منظمة الغذاء والدواء (FAD).

طريقة العمل:

1- يتم عمل تخافيف متسلسلة serial dilution من المطهر في الاختبار Test disinfectant X في انابيب اختبار بحجم 5 مل.
2- يتم عمل تخافيف متسلسلة ايضا من الـ pure phenol .
3- تلقح الانابيب بـ 0.5 مل من المزروع البكتيري (المزروع حديثا) young broth culture من الـ test organisms الذي ممكن استخدام staphylococcus or Pseudomonas وتحضن جميع انابيب التخقيق الحاوية على البكتيريا في درجة حرارة 20 م ^{o}.
4- ناخذ من كل تخفيف ومن مجموعتي (X & P) ناخذ بواسطة loopfull وباوقات متزامنة : 5 دقائق، 10 دقائق، 15 دقيقة وتلقح بها انابيب الاختبار التي تحوي على وسط sterile nutrient broth (اي انه كل انبوب ناخذ منه loopfull الى انابيب ثلاثة جديدة وحسب الاوقات التي تحسب لكل انبوب)
5- تحضن الانابيب الملقحة في درجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة واذا لم يظهر اي نمو في الانابيب فهذا يعني حصول ابادة تامة فتعطى اشارة – اما اذا ظهر نمو (عكورة) فتعطى اشارة + ثم يتم بعد ذلك حساب معامل الفينول من خلال عملنسبة بين اعلى تخفيف من المطهر X الذي يقتل المايكوب خلال 10 دقائق والذي لم يقتل المايكروب عند وقت 5 دقائق الى التخفيف المقابل من الفينول.

اما لايجاد التخفيف الذي يجب استخدام ه من المهر X ضد البكتيريا قيد الاختبار فانه يجب ان نعلم لنه يكون اعلى من معامل الفينول ب ـ20 مرة (اي ان معامل الفينول يضرب × 20.

مثالــــــــــــــــــــــــــ:

DISINFECTANT	DILUTION	TREATMENT TIME		
Test disinfectant (X)	التراكيز الاعلى التي حصلت بها ابادة تامة	5 min.	10min	15min
	1:350	-	-	-
	1:400	+	-	-
	1:450	+	-	-
	1:500	+	-	-
	1:550	+	+	-

DISINFECTANT	DILUTION	TREATMENT TIME		
Pure phenol	التراكيز الاعلى التي حصلت بها ابادة تامة	5 min.	10min	15min
	1:70	-	-	-
	1:80	-	-	-
	1:90	+	-	-
	1:100	+	+	-

Phenol coefficient= highest dilution of (X) killing (m.o) during 10min but not in 5min ÷ coresponding dilution of phenol= 1:450 ÷ 1:90= 5

يستخدم تركيز المطهر (X) الذي يكون اكثر من معامل الفينول بـ 20 مرة اي : 100 = 5 × 20

1:100 او 1/100

TOXICITY OF DISINFECTANT (المطهــر) مــــــــــــــــيـة المضـــــــــــــاد

يمكن تقدير سمية المطهرات بعدة طرق لكن افضل طريقة لذلك هي مزجها مع خلايا حية مثل (WBC) او الانسجة الحية وملاحظة (اقل كمية من المطهر smallest quantity التي توقف كليا نشاط هذه الخلايا في انابيب اختبار خلال مدة معينة).

Antibiotics susceptibility testing

تقدر حساسية المايكروبات للمضادات الحياتية المختلفة من خلال قدرة تلك المضادات على تثبيط نمو تلك المايكروبات ، وهناك عدة طرق لتقدير حساسية المضادات الحيوية ومنها طرق نوعية واخرى كمية.

الغرض من اجراء اختبار الحساسية هو لمعرفة فيما اذا كان الكائن المسبب للاصابة حساس (مقاوم) للمضادات الحياتية التي تكون وثيقة الصلة بعلاج المريض.

وقبل اجراء اي اختبار لتقدير الحساسية لابد من مراعاة ما يلي:

1- معرفة الخلفية الوراثية لحساسية المايكروب in vitro لان بعض الانواع من المايكروبات يحصل بها طفرات .
2- مدى حساسية السلالة قيد الاختبار مقارنة مع افراد النوع الواحد.
3- معرفة نبذة عن المضاد قيد الاختبار: سميته , تركيبه, امتصاصه من قبل الجسم وعمله أي (mode of action).
4- الحالة المناعية للمريض.

(I) Diffusion methods of sensitivity testing

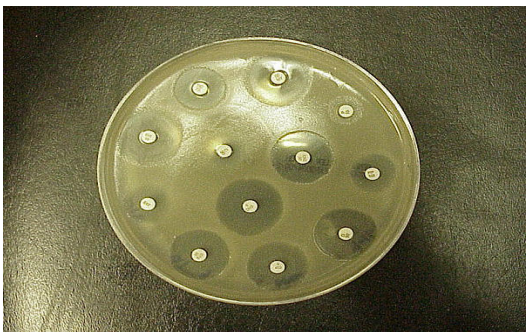
هذه الطريقة تتم باستخدام وسط صل حيث يلقح الوسط مسبقا الكائن قيد الاختبار ، وخلال فترة الحضن ينتشر المضاد الى الاكارواذا كان حساس للتركيز المستخدم من المضاد فانه ينتج منطقة تثبيط نمو inhibition zone of growth وعموما هذه الطرق تعتبر نوعية qualitative او شبه نوعية semi- qualitative لان حجم منطقة التثبيط بالملم تتاثر بحساسية الكائن المجهري فكلما كان الكائن حساس اكثر كان منطقة التثبيط اكبر.

a) disc diffusion method (Kirby – Bauer method)

وهي من اكثر الطرق الشائعة الاستخدام روتينيا في مختبرات التشخيص ويعتمد الاختبار على تلقيح البكتيريا قيد الاختبار على وسط زرعي صلب في طبق بتري Petri dish وتستعمل Blotting paper discs تحوي المضادات المختلفة بتراكيز مختلفة وتوضع على سطح الوسط الملقح وخلال فترة الحضن ينتشر المضاد من القرص الى الوسط فاذا كان الكائن حساس للمضاد تظهر مناطق عدم نمو حول القرص وكلما كانت الحساسية اكبر كان قطر التثبيط اكبر.

- **<u>لاحظ:</u>**

1- كثافة اللقاح
2- توزيع الاقراص
3- المسافات بين الاقراص



- <u>لاحظ:</u> البكتيريا قيد الاختبار عندما تكون حساسة للمضادات وظهور منطقة التثبيط بعد الحضن. اما البكتيريا المقاومة فيلاحظ عدم تاثرها بقرص المضاد الحيوي.

ويمكن تحضير اقراص مضاد معين وبتركيز معين في المختبر باستخدام ورق نشاف Blotting paper كالاتي بتثقيب الورق النشاف بقطر 5 ملم (يفضل استخدام ورق النشاف No. 3) وتنشر في طبق بتري معقم ثم تبرد وتغمر في محلول المضاد الحياتي المحضر بتركيز معين، وتجفف في ظروف معقمة وبعدها يمكن ان تستعمل الاقراص لاجراء الاختبار بوضعها على سطح الوسط الملقح بالبكتيريا.

طريقة العمل:

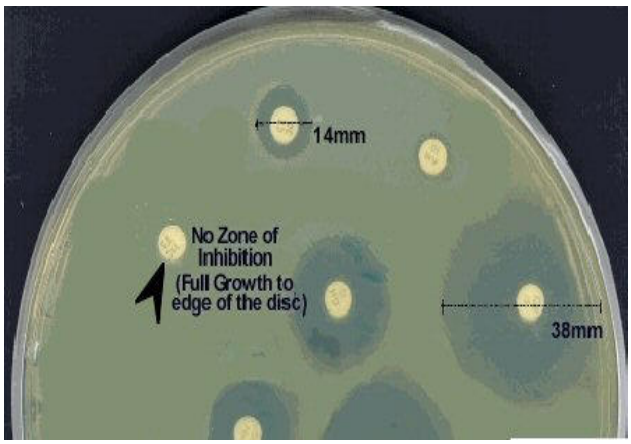
1- يحضر الوسط الخاص بهذا الاختبار Muller-Hinton agar المفضل حسب توصيات منظمة الغذاء والدواء (FDA) حيث انه افضل الاوساط المختبرية لتنمية اغلب البكتيريا الممرضة.

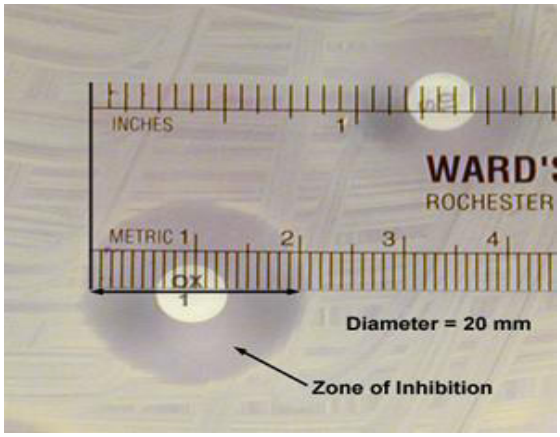
2- يتم تلقيح الوسط بشكل كثيف بالبكتيريا التي نريد اختبارها تحت ظروف معقمة (طريقة التخطيط Streaking، او طريقة المسح Swabbing)

3- بعد ا ن يجف اللقاح وباستخدام الملقط المعقم بالكحول توضع اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط وبمسافات متباعدة ومتساوية ولا يوصى بوضع اكثر من 6 اقراص في الطبق الواحد.

4- يحضن الطبق لمدة 18 ساعة (لاتزيد عن 24 ساعة) في 37 ^{o}م .

5- تقرا مناطق التثبيط حول كل قرص من اقراص المضادات بالملم وتسجل النتائج.





العوامل المؤثرة على قراءة نتائج فحص الحساسية الدوائية.

1- طريقة تحضير الوسط المستخدم في هذا الاختبار:

نوع الوسط المستخدم هو Muller-Hinton الذي اما ان يكون صلبا Agar حيث يصب في اطباق. او يكون سائل broth حيث يصب في انابيب test tube.

يعتبر هذا لاوسط من الاوساط ذات الاستخدام الخاص حيث يستخدم في فحص الحساسية الدوائية لما يمتلكه من خصائص، حيث ان استخدام غيره من الاوساط في هذاالاختبار مكن ان يؤدي الى نتائج خاطئة.

2- طبيعة الوسط الزرعي

ويقصد به (كم يذاب من مادة الوسط الزرعي في الماء المقطر حيث يجب اتباع الخطوات الموجودة على العبوة المكتوبة من قبل الشركة . هذا يعني ان يكون تركيز الوسط الزرعي ضمن الشروط المحددة فلا يزداد تركيز المادة المذابة .

اما بالنسبة للوسط المثالي المناسب لاجراء اختبارات الحساسية Ideeal sensitivity testing medium

1- محتوياته يجب ان تكون معروفة تماما.

2- يجب ان لا تكون محتوياته antagonisis لاي عامل مضاد للبكتيريا.

3- يجب ان لايحدث اي تغيير في الـpH اثناء النمو.\

4- يجب ان يكون Isotonic تقريبا.

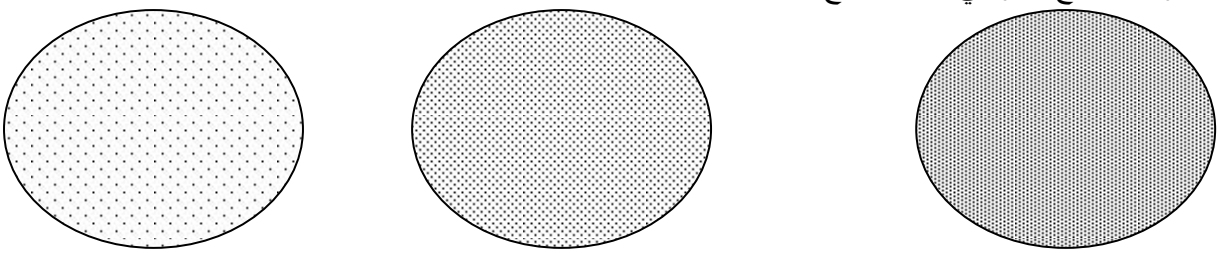
3- □مك الو□ط depth of medium

مناطق التثبيط تزداد في الحجم كلما كان عمق الاكار اقل وان الوسط ذو الطبقة الخفيفة من الاكار يجب تجنبه تماما وان 4 ملم هو السمك المناسب من الاكار.

4- كثافة اللقاح Density of inoculum

كثافة اللقاح تؤثر على حجم مناطق التثبيط حيث لوحظ ان very light inoculum ربما ينتج خطا بسبب صعوبة التقييم الدقيق لحافة المنطقة المتكونة zone edge وقد تتكون مناطق تثبيط كبيرة خاصة اذا كان اللقاح very light.

لوحظ ان طريقة الـ Disc method يكون فيها النمو المثالي من النوع المحتشد semiconfluent growth وان لطريقة التلقيح تاثير في كثافة التلقيح.



محتشد شبه محتشد خفيف

تقنيات التلقيح methods of inoculation

طريق التلقيح تؤثر في توازن وانتشار النمو (كالسجادة) على الوسط وان افضل النتائج تم الحصول عليها بطريقة الـ Flooding او بطريقة الـ gar overlay .

A) **Flooding**

في هذه الطريقة يوضع العالق البكتيري على سطح الوسط وبكمنية ملائمة وعلى شكل قطرات موزعة على السطح بواسطة ماصة باستور ويميل الوسط من جانب لاخر لضمان تغطية سطح الوسط تماما باللقاح ثم يميل الوسط لتصريف اللقاح الزائد الذي يسحب او يزال بواسطة ماصة باستور (هذه الطريقة قد تتسبب في مخاطر من انتج قطرات الرذاذ aerosols اثناء الـ Pipetting وهذه الطريقة يجب تجنبها مع كائنات عالية الامراضية لنفس السبب.

B) Agar overlay

العالق البكتتيري في هذه الطريقة يخفف ويمزج جيدا مع الاكار المبرد الى درجة 45 ^{o}م ثم يصب فوق طبقة الاكار قاعدية تصب مسبقا في الطبق ولوحظ ان هذه االطريقة اعطت نتائج جيدة مقارنة مع الطرق الاخرى.

C) Swabbing by swab

D) Spreading by spreader

E) Streaking by loop

5- مدة الحضانة Incubation peroid

يجب ان تكون اقل ما يمكن (لا تتجاوز 24 ساعة) اما اذاكانت المدة طويلة فانه يحدث فقدان لفعالية المضاد مما يسمح للخلايا الحساسة التي تثبط نموها بالمضاد ان تنمو مرة اخرى لذلك تستعمل هذه الطريقة للكائنات سريعة النمو.

6- الاقراص The disc

يجب ان ناخذ بنظر الاعتبار حفظ الاقراص في ظروف مناسبة (4 ^{o}م) وعدم تجاوز الصلاحية وعدد الاقراص الموضوعة في الطبق والمسافات بينها.

7- نوع المايكروب Type of microorganisms

هناك ما يسمى بمزارع السيطرة وهي بعض انواع البكتيريا المعروفة من ناحية استجابتها للمضادات الحيوية وهي تستعمل لغرض المقارنة مع النتائج التي نحصل عليها، مثالها : *Pseudomonas aeruginosa , E. coli, Staphylococcusaureus* .

Theory of zone formation

المضاد ينتشر خلال الوسط الزرعي بمعدل يعتمد على الوزن الجزيئي والتركيب الكيميائي للمضاد والوسط . ويتدرج التركيز من القرص الى حافة منطقة التثبيط المتكونة، حيث يكون التركيز عالي قرب القرص ويقل او يتناقص التركيز بعيدا عنه وان محتوى القرص يعبر بالكمية Absolute amount.

التركيز الحرج من المضاد **Critical concentration** = اقل تركيز من المضاد يمكن ان يثبط المايكروب المراد اختبار حساسيته عند حافة منطقة التثبيط . zone edge وهو يتكون اعتمادا على حساسية المايكروب للمضاد وهو مرتبط تماما بالتركيز المثبط الادنى (MIC) Minimum Inhibitory Concentration وان المسافة من القرص الى حافة منطقة التثبيط المتكونة يعتمد على عدة عوامل منها:

1- حجم اللقاح
2- معدل نمو المايكروب
3- Preincubation حضن الطبق من قبل وضع الاقراص
4- Prediffusion انتشار المضاد من القرص قبل الحضن.

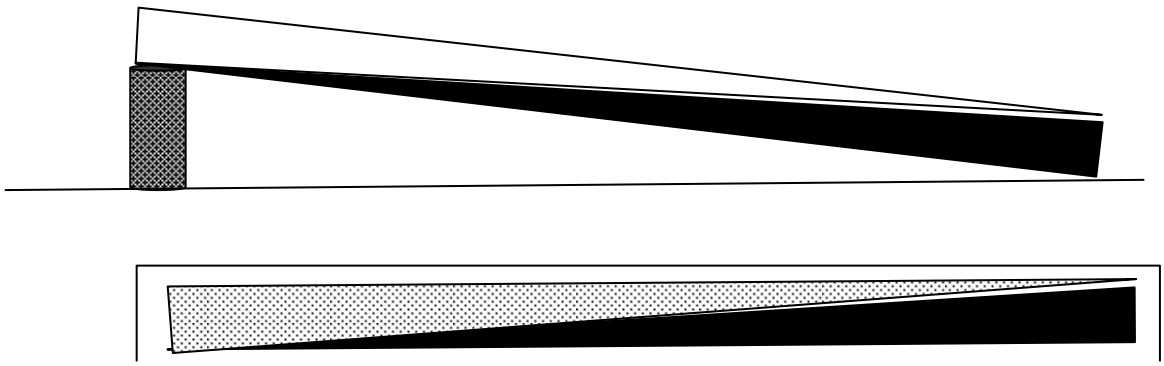
الكثافة الحرجة **Critical density** = كثافة اللقاح التي تثبط بفعل المضاد عند حافة المنطقة وهي تعتمد على الكائن والمضاد. فاذا كان اللقاح اكثر من الكثافة الحرجة للكائن فان منطقة التثبيط لاتتكون واذا كان اللقاح اقل من الكثافة الحرجة للكائن فان منطقة التثبيط سوف تكون كبيرة جدا.

في حالة المايكروبات بطيئة النمو يكون انتشار المضاد اسرع من النمو لذلك تظهر مناطق تثبيط كبيرة (غير حقيقية).

(II) The gradiant plate test طريقة التركيز المترج

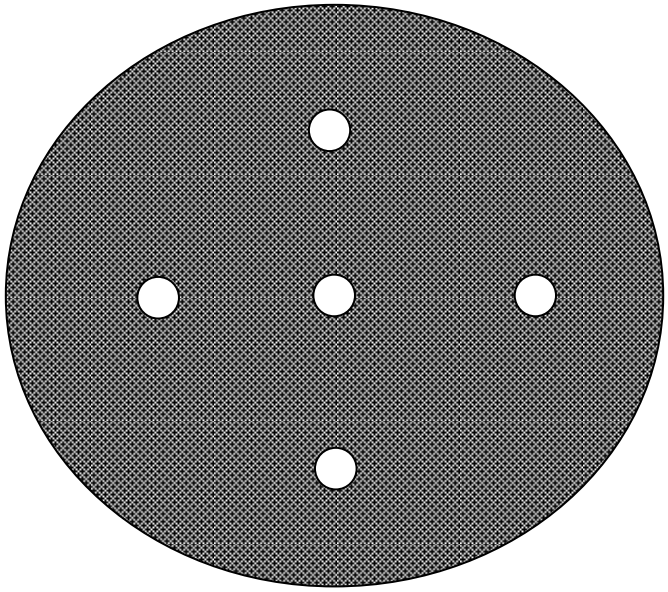
وهي طريقة تستعمل لمعرفة مدى حساسية او مقاومة كائن مجهري لمضاد معين او عدة مضادات ومن خلال التدرج في التركيز يمكن معرفة التركيز المثبط التقريبي من المضاد تجاه الكائن المجهري.

وهي تتم بصب طبقة مائلة من الاكارالمغذي عن طريق امالة الطبق على مسند قبل ان يتصلب الاكار، بعدها يحضر وسط Nutrient agar وهو سائلبدرجة 45oم ممزوج مع المضاد قيد الاختبار والمحضر بتركيز معين ويصب فوق الطبقة المائلة الاولى ويترك ليتصلب عندها تتكون طبقتين في الطبق ويحصل تدرج واضح في تركيز المضاد الحيوي، ثم يلقح الوسط بالبكتيريا قيد الاختبار وبطريقة التخطيط ويحضن لفترة مناسبة ثم تلاحظ مناطق النمو والتثبيط على السطح



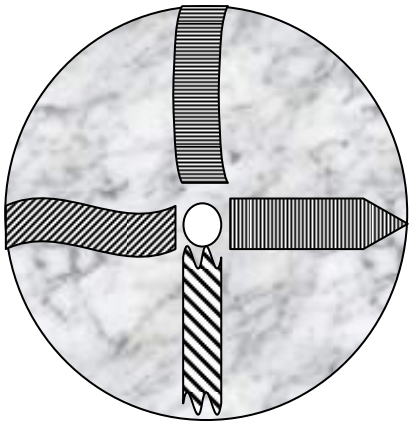
(III) Well methods of the agar cup method: طريقة الحفرة

هذه الطريقة تستخدم لتقيم العينات السائلة شبه الصلبة من المضادات . وتتم من خلال صب وسط الاكار المغذي بعمق 4 ملم ثم يلقح الوسط بالبكتيريا قيد الاختبار بطريقة التخطيط او المسح ثم يتم عمل حفرة well في مركز الطبق (او يمكن عمل حفر في حالة استخدام اكثر من تركيز او اكثر من مضاد لنفس البكتيريا) باستخدام الثاقب الفليني المعقم Sterile cork borer وبقطر مناسب (5-10 ملم) وفي ظروف معقمة ويكون عمق الحفرة مناسبا بحيث لا يصل الى قعر الطبق ثم تملا الحفرة بحجم مناسب من المضاد المراد اختباره (50 مايكروليتر) مثلا.

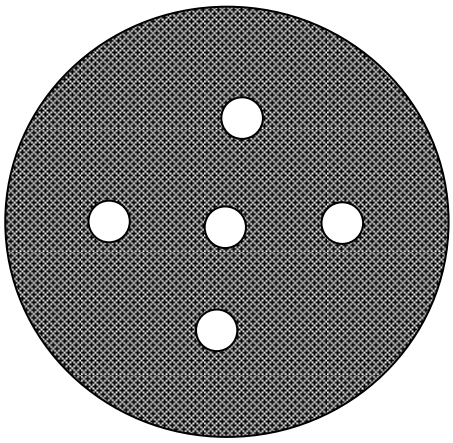


وتحضن الاطباق في الحاضنة بدرجة 37°م ولمدة لاتتجاوز 24 ساعة وتلاحظ مناطق التثبيط حول الحفرة بشكل inhibition zone وتقاس بلملم.

ويمكن ان تستعمل هذه الطريقة لمعرفة مدى فاعلية المضاد تجاه عدد من الاحياء المجهرية وعلى نفس الطبق خلال عمل عدة خطوط تلقيح ولكل كائن باستخدام الناقل من حافة الحفرة الى حافة الطبق.



استخدام طريقة الحفر بعمل عدة خطوط تلقيح لمضاد واحد



استخدام طريقة الحفرة وهنا تم استخدام اكثر من مضاد لنفس البكتيريا.

Dilution Methods

تعتبر هذه الطريقة كمية quantitative تعتمد من حيث المبدأ على تحضير سلسلة من التراكيز المضاعفة تدريجيا للمضاد في وسط ملائم للنمو ثم اضافة عدد محدد من البكتيريا وملاحظة قدرة المضاد على تثبيط النمو او قتل البكتيريا قيد الاختبار من خلال ملاحظة تكون او عدم تكون العكورة في الانابيب.

ان اختبار الانتشار باستخدام الاقراص disc method غير مجدية في كثير من الحالات ولا تعطي صورة واضحة عن حساسية البكتيريا كما فيما ياتي:

1- في حالة استخدام بكتيريا بطيئة النمو slow growth rate microorganisms مثل بكتيريا *Mycobacterium tuberculosis* (زمن الجيل لها 48 ساعة) حيث ان استخدام طريقة الاقراص تعطي نتائج خاطئة لان انتشار المضاد في الاكار اسرع من نمو البكتيريا لذلك تظهر مناطق تثبيط اكبرمن الحالة الاعتيادية (غير حقيقية).

2- في حالة الاحياء المجهرية التي تظهر ظاهرة التموج كما هو الحال في بكتيريا*Proteus* ، هذه الظاهرة تعيق عمل انتشار المضاد (اي ان مناطق التثبيط اصغر من الاعتيادي).

3- في حالة استخدام مضادات حيوية ذات وزن جزيئي عالي مثل الـBacitracin والـ polymaxin B والتي تتنتشر ببطء في الاكار لذلك فان مناطق التثبيط قد لا تظهراو تكون صغيرة جدا لان نمو البكتيريا اسرع من انتشار المضاد.

لذلك فان الحالات المذكورة اعلاه يفضل فيها استخدام طريقة الـDilution وفي هذه الطريق يتم تقدير الـ minimum inhibitory concentration (MIC) ويعرف بانه اقل تركيز يؤدي الى تثبيط البكتيريا قيد الاختبار، والـ minimum bactericidal concentration (MBC) الذي يمثل التركيز الادنى القاتل وهو اقل تركيز يؤدي الى قتل البكتيريا قيد الاختبار.

<u>الطريقة العملية:</u>

1- تزرع البكتيريا قيد الاختبار وتحضن لمدة 24 ساعة ومن ثم تأخذ من 3-5 مستعمرات بكتيريا وتوضع في انبوب اختبار يحتوي على الـ Normal saline لإحداث عكورة تتساوى تقريبا وعيانيا مع عكورة أنبوب قياسي يسمى MacFarland test tube No. 5 . ان العكورة الموجودة في الأنبوب القياسي تعادل ما يقارب 10^7 - 10^8 CFU/ml . يتم أخذ 0.1ml من هذا العالق ويضاف الى أنبوب اختبار يحتوي على 9.9ml من الـ Normal saline ، يمزج جيدا ثم يؤخذ من هذا الأخير 0.1ml ليتم إضافته لسلسلة من أنابيب الاختبار الحاوية على تراكيز مضاعفة من المضاد الحيوي (يجب أن يكون عدد البكتريا النهائي في الأنابيب يتراوح بين 10^5-10^6 CFU/ml).

2- يتم تحضير مجموعة من أنابيب الاختبار تحتوي على حجم متساوي من Muller-Hinton Broth مثلا : (1 ml) ويكون عدد هذه الأنابيب بعدد التراكيز المتدرجة المطلوب تحضيرها من المضاد

الحيوي و التي تبدأ من : (0 , 1 , 2 , 4 , 8 , 16 , 32 , 64 , 128 , 256 , 512 , 1024) µg/ml

أي 12 أنبوب اختبار كل واحد منها يحتوي على 1ml من Muller-Hinton Broth .

3- يحضر المضاد الحيوي بتراكيز متزايدة بحيث يحتوي الأنبوب الأول (رقم1) على التركيز (0) من المضاد (control) ثم يليه الأنبوب الثاني (رقم2) الذي يحتوي على أوطأ تركيز من المضاد ويليه الأنبوب الثالث (رقم3) الذي يحتوي غلى تركيز ضعف ما موجود في الأنبوب (رقم2) وهكذا بالنسبة لبقية الأنابيب.

و لتحضير التراكيز المتدرجة من المضادات بـ µg/ml :

0 , 1 , 2 , 4 , 8 , 16 , 32 , 64 , 128 , 256 , 512 , 1024 µg/ml

من مضاد معين مثل البنسلين ضد بكتيريا مثل *Staphylococcus aureus* علما انه لديك عبوة (كبسولة) تحتوي على 250 ملغم وفي حجم معين مثلا (100 ، 10 ، 5 ، ..... مل) ، يتم عمل الأتي :

- ✓ نحول الوحدات من mg إلى µg ⟵ 250 mg × 1000 = 250000 µg
- ✓ تذاب الكبسولة في 100 ml من الماء المقطر D.W. لتحضير Stock solution (1)

Stock solution (1) ..... 250000 / 100 = 2500 µg/ml

- ✓ بعدها يتم تحضير Stock solution (2) يكون تركيزه أعلى (ضعف) من أعلى تركيز نحتاجه في التجربة (وهو الذي نبدأ به سلسلة التخافيف المتدرجة عادة و هو 1024 µg/ml).

إذن نقوم بتحضير Stock solution (2) بتركيز (2048 µg/ml) وبحجم نهائي قدره (10 ml)، ولتحضير هذا التركيز نطبق قانون التخفيف :

$C_1 V_1 = C_2 V_2$

تركيز Stock1 — ما نأخذه من حجم لتحضير Stock 2 — التركيز المطلوب (Stock 2) — الحجم المطلوب (Stock 2)

$2500\ \mu g/ml \times V_1 = 2048\ \mu g/ml \times 10\ ml$

$V_1 = 8.192 \approx 8.2\ ml + 1.8\ ml\ D.W.$

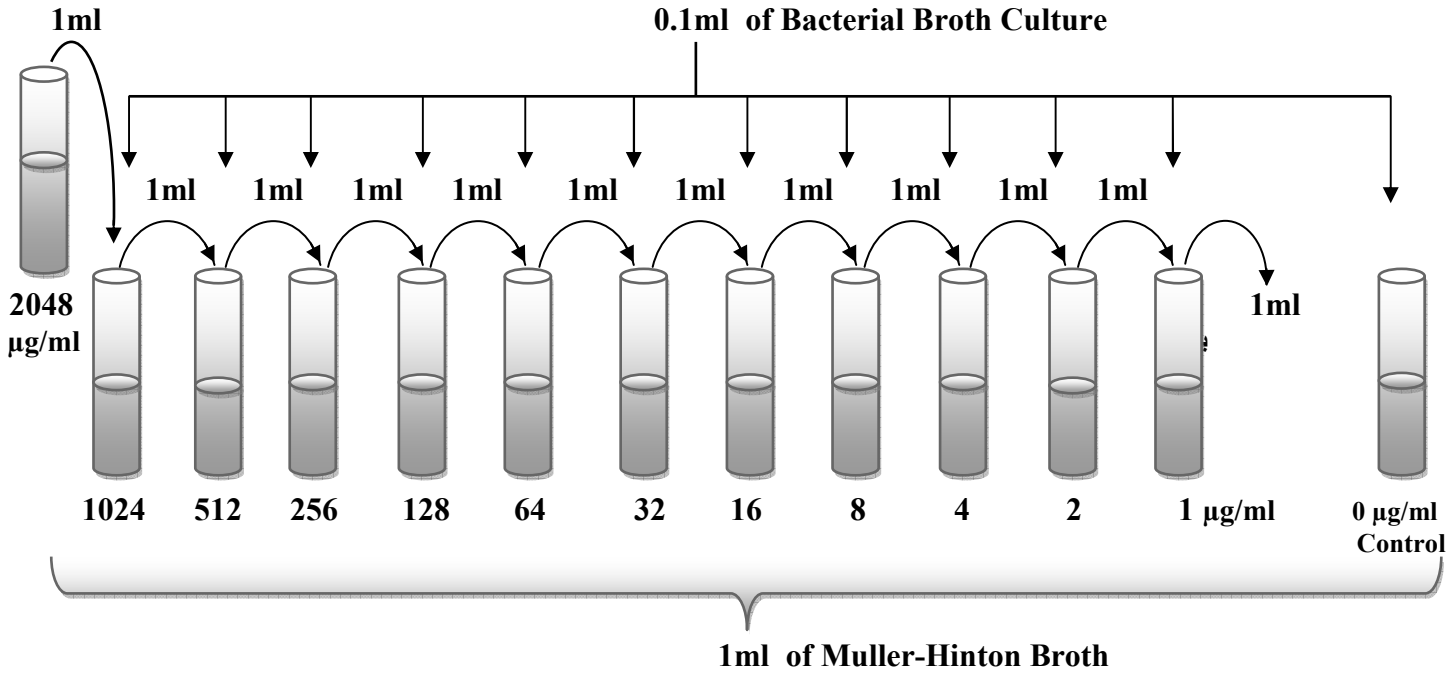
نأخذ 8.2ml من Stock 1 ونكمل الحجم الى 10ml باضافة 1.8ml ماء مقطر

- ✓ إذن أصبح لدينا Stock solution (2) بتركيز (2048 µg/ml) وبحجم (10 ml) ومن هذا التركيز يمكننا تحضير بقية التراكيز المتدرجة المطلوبة من المضاد الحيوي.
- ✓ لتحضير أعلى تركيز في سلسلة التراكيز المتدرجة من المضاد الحيوي (1024 µg/ml) يتم إضافة 1ml من Stock solution (2) (تركيزه 2048 µg/ml) إلى الأنبوب الأول من مجموعة أنابيب الاختبار المحضرة سابقا والذي يحتوي على 1ml من Muller-Hinton Broth (راجع الفقرة 2). يمزج جيدا وبذلك يصبح تركيز المضاد في هذا الأنبوب (1024 µg/ml) ومن هذا التركيز يتم تحضير

بقية التراكيز المطلوبة بأخذ 1ml منه وإضافته إلى الأنبوب الثاني ويمزج جيدا ثم يأخذ منه 1ml و يضاف إلى الثالث وهكذا ..... إلى أن نصل إلى الأنبوب رقم 11 والذي يكون ذو اقل تركيز (1µg/ml) حيث يمزج جيدا ومن ثم يأخذ منه 1ml و يهمل .

- ✓ أما الأنبوب الأخير (رقم 12) فانه يحتوي على 1ml من Muller-Hinton Broth ولا يحتوي على أي تركيز من المضاد الحيوي ، تركيزه (0) و الذي يعتبر كسيطرة control للمقارنة ، ويمكن استخدام أنبوب ثاني للسيطرة يحتوي على Antibiotic + Muller-Hinton Broth للمقارنة أيضا.
- ✓ يتم بعدها إضافة 0.1 ml من المزروع البكتيري (المعلق بالـ Normal saline ، راجع الفقرة 1) إلى جميع الأنابيب التي تحتوي على التراكيز المتدرجة من المضاد الحيوي المحضرة مسبقا.

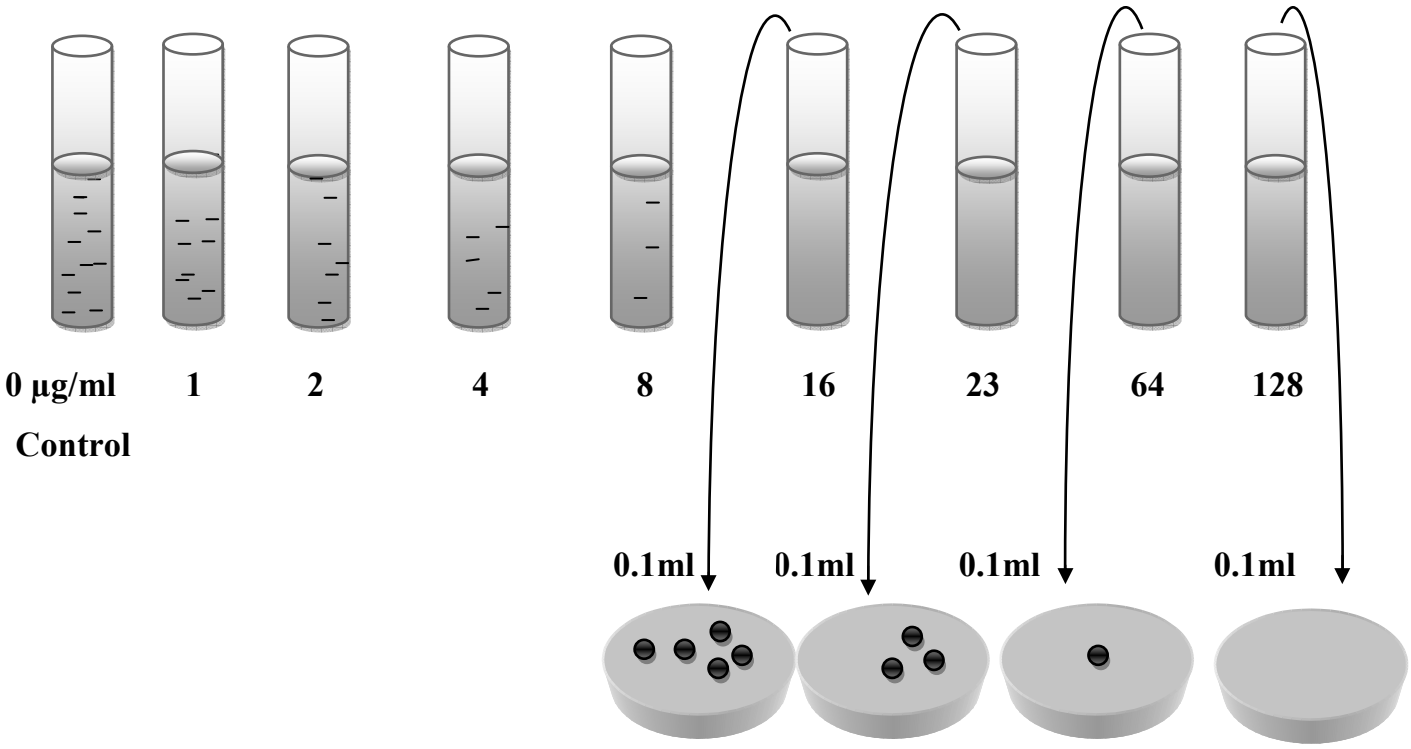
والمخطط الآتي يوضح العملية :



4- تحضن الأنابيب جميعا في درجة حرارة ملائمة للبكتيريا المدروسة ويتم فحص الأنابيب بعد الحضن للتعرف على أي منها يحتوي نمو بدلالة العكورة أما الأنابيب الرائقة تشير إلى عدم حدوث نمو نتيجة فعالية المضاد.

- ✓ لتحديد الـ MIC يتم اختيار أول أنبوب رائق يأتي بعد سلسلة أنابيب عكرة فيكون تركيز المضاد في هذا الأنبوب هو الـ MIC .
- ✓ لتحديد الـ MBC يتم اخذ كمية من الوسط الزرعي (0.1ml) من الأنابيب الرائقة إلى طبق وسط زرعي صلب (Muller-Hinton agar) ثم تحضن الأطباق في درجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة ثم تلاحظ المستعمرات النامية في كل طبق. وبذلك يتم تحديد MBC من خلال اعتباره يمثل أول طبق لم

يظهر فيه نمو بشكل مستعمرات وهو يمثل تركيز المضاد لأحد الأنابيب الرائقة وكما مبين في المخطط التالي:



تحضن من 24 -48 □اعة

MIC=16 µg/ml

MBC=128 µg/ml

Antimicrobial Drugs Used In Combination

هناك خمس حالات يستخدم فيها العلاج بمضادين او اكثر:

1- في حالة الاصابة غير المشخصة :

حيث انه في حالة وجود حالة مرضية معينة فلا بد اولا من تشخيص المسبب قبل اعطاء العلاج لكن في بعض الحالات العلاقة تكون غير ثابتة بين الاعراض المرضية الظاهرة والمسبب المايكروبي فمثلا هنالك حالات مثل الـAcute UTI & RTI هنالك عدة مسببات تظهر نفس الاعراض ولا يوجد مضاد حيوي واحد يثبط كافة المسببات المرضية.

2- في حالة الاصابات المختلطة mixed infection

لا يوجد مضاد واحد فعال ضد كل المسببات المرضية

3- قد يعطى مضادين معا لغرض منع او تأخير تطور المقاومة للمضادات المستعملة.

اي لتقليل احتمالية ظهور سلالات مايكروبية مقاومة للمضادات الحيوية لان تردد الشفرات المقاومة لاكثر من مضاد حياتي لها ميكانيكية مختلفة عن المقاومة لمضاد حيوي واحد.

فمثلا لو كانت احتمالية المقاومة للمضاد $A=10^{-5}$ في احد المايكروبات ومقاومة هذا المايكروب للمضاد $B=10^{-7}$ فان احتمالية ظهور المقاومة للمضادين A & B هو $10^{-5}+10^{-7}=10^{-12}$ وهو تردد نادر.

4- قد يكون ا□تعمال علاج با□تخدام دمج المضاد ضروريا للحصول على Synergic effect (تأثير تعاوني)

في حالات الاصابات الشديدة مثل تعفن الدم septicemia فان العلاج باستخدام دمج المضادات ضروري لغرض استئصال الاصابة.

5- لتقليل □مية المضادات شديدة السمية

حيث يفترض ان الجرع القليلة من مضادين مدمجين معا سيكون له نفس التاثير في حالة استخدام الجرعة كاملة لاي من المضادين.

In the treatment of T.B

1/2 dose of streptomysin +1/2 dose of rifampin

↓ ↓

Cause Renal Damage Cause Liver Damage

ان استعمال جرعة كاملة من احد المضادين يسبب تخريب للكلية بالنسبة للستربتومايسين وتخريب الكبد بالنسبة للريفامبين لذلك نستعمل نصف جرعة لكل منها ليعطيان نفس الفعالية ويقلل ذلك من التأثيرات الجانبية.

ميكانيكية دمج المضادات Mechanism of antimicrobials combination

عندما يتم دمج مضادين معا فان تأثيرهما قد يكون:

1- **Indifferent effect:**

When every antibiotic act as alone (activity of one drug is ineffective by the others)

فعل دمج المضادين : حيث لا يتأثر احدهما بوجود الأخر وفي هذه الحالة كل مضاد يعمل لوحده.

2- **Antagonistic effect:**

When the activity of the 1st drug reduced by the the 2nd drug

عندما تتاثر فعالية المضاد الاول بوجود المضاد الثاني يمكن ملاحضة التضاد عند دمج الـ bacteriostatic drugs مثل دمج الـ chloramphenicol او tetracycline مع الـ bactericidal drugs مثل الـ penicillin او aminoglycosides فيحصل التضاد عند وصول الاول الى موقع الاصابة قبل الثاني ويظهر ذلك بوضوح في حالة البكتيرية المسببة لالتهاب السحايا.

3- **Synergic effect:**

When activity of both dtrugs is significantly greater than that of either acting alone in the same concentration.

Ex: Methoprim (trimethoprim + Sulfonamaide)

Para-amino benzoic acid ⟶ dihydrofolic acid ⟶ folic acid

PABA Sulfonamide Trimethoprime

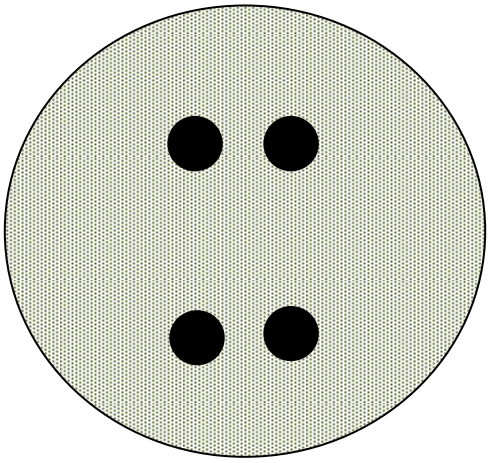
وجود المضادين معا يكون اكثر فعالية مما لو استخدم كل مضاد لوحده. مثلا: أن وجود المضادين معا يمكن أن يعمل غلق متتابع للمسار الايضي للمليكروب. فالمضادين الحيويين في المثال يعملان حالة غلق مزدوج double blockage حيث ان الـ Sulfonamide يتداخل مع عملية تحويل PABA الى dihydrofolic acid (مركب ايضي وسطي) اما الـ Trimethoprime يمنع تحول المركب الوسطي الى folic acid فيحدث فعل تثبيطي في مكانين من المسار الحياتي او المسار الايضي.

هناك عدة طرق لملاحظة تاثير دمج المضادات:

1- **Diffusion method**

من اسهل الطرق المتبعة لتقدير تأثير دمج المضادات الحيوية على الـ M.O وتتم باستخدام أشرطة ورقة ترشيح blotting paper strips ويتم إجراء الاختبار في أطباق بتري تحتوي على وسط Muller-Hinton agar حيث تتشرب الأشرطة المعقمة من ورق الترشيح تراكيز MBC للمضادات الحيوية ثم توضع وبواسطة ملقط معقم على سطح الاكار بشكل زاوية قائمة بعد أن يلقح الوسط بالبكتيريا قيد الاختبار ثم تحضن الأطباق وتلاحظ النتائج:

حيث يلاحظ تأثير كل مضاد لوحده في نهاية الأشرطة والتأثير الناتج من الدمج combined action عند التقاء الأشرطة بزاوية. ويمكن إجراء التجربة باستخدام الأقراص بدلا من الأشرطة وتثبت على سطح الاكار المزروع مسبقا بالبكتيريا حيث توضع الأقراص على مسافات معينة.



Antimicrobial drug used in combination

2- Dilution method:

هناك طريقتان: 1) طريقة الشطرنج Checker Board Titration

2) طريقة نصف رقعة الشطرنج The Half Checker Board Titration

1) طريقة الشطرنج Checker Board Titration

هي طريقة كمية حيث يتداخل فعل مضادين حياتيين معا ويتم تعيين MIC بشكل دقيق بطريقة رقعة الشطرنج ويمكن عمل تخافيف المضادين الحياتيين في Broth حيث يتم اختيار تركيز كل مضاد حياتي بشكل منفرد ثم اختيار خلط تراكيز المضادين معا حيث يكون الدمج الناتج حسب طريقة سير الحصان على شكل رقعة الشطرنج بشكل حرف L مقلوب.

التجربـــــــــــــة:

في دمج مضادين نفرض احدهما A والأخر B يتم عمل سلسلة من التراكيز المضاعفة تبدأ من الصفر وهو السيطرة ثم تضاعف التراكيز (µg/ml) مثلا لتكن التراكيز من2- 128 µg/ml للمضادين A وB . ترتب تراكيز المضاد الحياتي B بشكل أفقي بينما المضاد A بشكل عمودي كما هو الحال في الجدول أدناه:

	2B	4B	8B	16B	32B	64B	128B	NIL
2A	2A2B	2A4B	2A8B	2A16B	2A32B	2A64B	2A128B	2A
4A	4A2B	4A4B	4A8B	4A16B	4A32B	4A64B	4A128B	4A
8A	8A2B	8A4B	8A8B	8A16B	8A32B	8A64B	8A128B	8A
16A	16A2B	16A4B	16A8B	16A16B	16A32B	16A64B	16A128B	16A
32A	32A2B	32A4B	32A8B	32A16B	32A32B	32A64B	32A128B	32A
64A	64A2B	64A4B	64A8B	64A16B	64A32B	64A64A	64A128B	64A
128A	128A2B	128A4B	128A8B	128A16B	128A32B	128A64B	128A128B	128A
Nil	2B	4B	8B	16B	32B	64B	128B	Nil

Control tube

بحيث يكون الصف الأخير من الجدول أفقيا عبارة عن تجربة لتقدير قيمة الـMIC للمضاد الحياتي B والصف الأخير من الجدول العمودي عن تجربة لتقدير قيمة الـMIC للمضاد الحياتي A وآخر أنبوب في الزاوية اليمنى السفلى تمثل الـ Control اي يمثل الأنبوب الخالي من المضادين A و B (drug free tube).

تقرأ نتائج التجربة استنادا الى النمو الظاهر لهذا الانبوب بعدما تلقح الانابيب بـ 0.1ml من مزرعة overnight بحيث تكون الكثافة الزرعية 10^6 cell/ml ثم تحضن الانابيب بدرجة 37^{O}م وفترة الحضانة هنا تعتمد على مدى ظهور عكورة واضحة في الانبوب drug free tube ولكن لا تتجاوز 48 ساعة ولتقدير الـ synergic action يتم قراءة النتائج بحيث تقدر قيمة الـ MIC للمضاد A باعتماد الصف العمودي للانابيب وقيمة الـ MIC للمضاد B باعتماد الصف الافقي بعدها تقدر قيمة الـ MIC للدمج (Synergic action) والتي تكون اقل بـ4 مرات من قيمة MIC لكلا المضادين مثلا لو كانت الـMIC للمضاد A هي 128µg/ml وللمضاد B هو 64µg/ml فان الـ MIC للـA+B = 8A4B اي 8 µg/ml من المضاد A و 4 µg/ml من المضادB .

2) طريقة The Half Chess Board Titration

هذا الاختبار ضروري عندما يراد اختبار أكثر من مضادين خاصة ضد الـ *Staphylococcus* في حالة التهاب الصمامات القلبية. استعمال هذه الطريقة : يستعمل فقط تركيز واحد من كل مضاد حيث يختبر كل تركيز لوحده في تجربة منفصلة ثم يتم إجراء التجربة كاملة لجميع المضادات المستعملة ويمكن استعمال عدد من المضادات

وبالرغم من ان النتائج قد تبدو فيما بعد معقدة جدا الا ان ترتيب الانابيب بشكل نصف رقعة شطرنج يسهل العملية بشكل كبير وان اختبار التركيز المفرد المستعمل من كل مضاد هو عشوائي وقد يختلف من مضاد الى اخر لنفس الكائن المستعمل مع ملاحظة ان التراكيز المستعملة يجب ان تكون ضمن الحدود التي لا تعطي اثار جانبية عند استخدامها من قبل الانسان.

التجربة (عند استعمال 8 مضادات) كالاتي:

1- رتب 36 انبوب في حامل الانابيب بشكل نصف قطعة شطرنج ، الخط الاعلى الافقي يحوي 8 انابيب وكذلك الخط العمودي الى جهة اليمين يحوي 8 انابيب .
2- يستخدم وسط Muller-Hinton broth بحجم ثابت 10 مل (فرضا) وتلقح الانابيب بـ 0.1 مل من over night culture بحيث يحتوي كل انبوب 10^6 خلية لكل مل كعدد نهائي.
3- ضع 1مل من اول مضاد (cloxacilin) الى كل انبوب من الخط العلوي الافقي.
4- ضع 1مل من المضاد الثاني (gentamycin) الى الانبوب الثاني من الخط الاول الافقي والحاوي اساسا 1مل من المضاد (cloxacilin) و 1مل الى الانبوب الاسفل منه والذي يمثل اول انبوب من الخط الثاني الافقي ثم استمر على امتداد كل الانابيب في الخطين.
5- ابدا مع المضاد الثالث وضع في الانبوب الثالث من الخط الاول 1مل من المضاد (erythromycin) وكذلك الانبوب الثاني من الخط الثاني ايضا والاول من الخط الثالث واضافة المضاد لكل من الانابيب ضمن هذه الخطوط وهكذا بالنسبة لبقية المضادات والانابيب.
6- امزج جيدا واحضن في درجة حرارة 37 درجة مئوية overnight . يستخدم ايضا الـ control لغرض المقارنة ثم اخذ 0.1 مل من كل انبوب الى وسط صلب للتنمية وبعد ان تحضن الاطباق يتم تسجيل النتائج وكالاتي:

Control	Cloxa	Genta	Erythro	Clinda	Rifam	Fusid	Strepto	Novo
Cloxacillin	+	-	++	++	+	++	-	+
Gentamycin		+	-	-	-	-	-	-
Erythromycin			+	+	-	++	+	+
Clindamycin				+	-	+	+	+
Rifampin					-	-	-	-
Fusidic acid						++	+	++
Streptomycin							-	-
Novobiocin								+

(-) = لا توجد مستعمرات Cidal (no growth)

(+) = مستعمرات قليلة او قليلة جدا

(++) = سيطرة (Control)

Detection of β-lactamase

تعتبر مضادات الـ β-lactam من المضادات الاكثر اهمية بين المجاميع الدوائية المضادة للبكتيريا والاكثر استخداما منذ اكتشاف البنسلين حتى وقتنا الحاضر.

تضم مضادات الـ**β-lac**tam مجموعتين مهمتين:

β-lactam antibiotics fall into 2 groups:

1- Penicillins:

اكتشف البنسلين لاول مرة عام 1920 من قبل Alexander Flaming من خلال ملاحظة تثبيط نمو *Staphylococcus aureus* بعد تلوثها بالعفن المسمى *Penicillium* ثم استخدم البنسلين بعد تنقيته من العفن *P. notatum* واستخدم سريريا لمعالجة اصابات الحرب العالمية الثانية 1941.

2- Cephalosporins

عزلت لاول مرة عام 1948 من قبل العالم Bortza من مياه المجاري من العفن *Cephalosporium aeromonium* . تختلف هذه المجموعة عن البنسلينات بامتلاكها Dihydrothiozin ring المتصلة مع β-lactam ring مع وجود 2-R-side chain متفرعين تبعا لنوع المشتق.

Bacterial resistance to β-lactam antibiotics:

Bacteria can resist the β-lactam antibiotics by the following mechanisms :

1- production of β-lactam degrading enzymes
2- change the target side of antibiotics.
3- Modification of permeability barriers

المقاومة الجرثومية لمضادات الـ β-lactam الحيوية:

البكتيريا بإمكانها أَنْ تقاومُ مضادات β-lactam الحيوية بالآلياتِ التاليةِ:

- إنتاج الإنزيماتَ المحطمة للـ β-lactam
- تغيّرُ منطقة الهدفَ المخصصة للارتباط بالمضادات الحيوية.
- تحوير نفاذية الغشاء للخلية البكتيريا.

الانزيمات المحطمة للـβ-lactam

1- β-lactamase
2- Acylase
3- Esterase

انزيمات β-lactamase تحلل amid bound محولة المضاد الى عديم الفعالية فالمركب الناتج من تكسير البنسيلينات هو حامض Penicilloic acid الذي يعتبر مركب مستقر stable compound على العكس من المركب المتكون من تكسير السيفالوسبورينات اذ ينتج مركب وسطي غير مستقر Cephalosporic acid ثم

يتكسر ال قطعتين fragments 2 او جزئين. وقد وجد ان جزيئة انزيم واحد توقف فعالية اكثر من جزيئة مضاد من خلال تحطيمها لمضاد ثم معاودة الارتباط مع جزيئة مضاد اخرى.

تقسيم انزيمات الـ β-lactamase حسب نوع البكتيريا المنتجة لها :

انزيمات الـ β-lactamase وهي المسيطر عليها كروموسوميا تقسم الى

1- β-lactamase Chromosomal

وهي منتظمة التكوين constitutive كما هو الحال في الـ*Haemophillus* وتكون قليلة جدا يصعب التحري عنها قياسا بالتي موجودة في *Pseudomonas aeruginosa* التي تكون بكميات كبيرة.

2- Inducible enzymes

وهي انزيمات تحتاج الى تحفيز وتفرز بوجود المحفز Inducible وعادة يكون المحفز هو مضادات بيتا اللاكتامية يشفر لهذه الانزيمات التركيبية Structural enzymes التي تكون مسيطر عليها من قبل جينات اخرى هي جينات السيطرة Control genes من خلال كابح repressor ويؤدي تنشيط جينات السيطرة بسبب طفرة وراثية مما يسبب زيادة في استنساخ الجينات الوراثية وبالتالي زيادة في انتاجية هذه الانزيمات.

التحري عن انزيمات الـ β-lactamase:

اساس التحري عن هذه الانزيمات هو الكشف عن وجود Penicilloic acid وهو Dibasic acid compound ويتم التحري عنه بعدة طرق منها:

اولا: طريقة اليود القيا□ية السريعة Rapid iodometeric method

حامض البنسليوك له القدرة على اختزال اليود Iodine reduction والمعروف ان الكشف النوعي لليود هو تكوينه معقد ازرق مع النشا . فعند وجود هذا الحامض يختزل اليود ويفقد قابلية تكوين المعقدات الملونة مع النشا. وتتلخص الطريقة كالاتي:-

1- تحضر مزرعة بكتيرة من الـ *S. aureus* منماة على وسط M.H أو blood agar بعمر 24 ساعة .
2- تنقل عدد من المستعمرات النامية بواسطة العروة Loop الى انابيب ابندروف خاوية على 100µl من Penicillin G وتخضن الانابيب بدرجة 37°م ولمدة 30 دقيقة.
3- يضاف 50 µl من المحلول النشا وبتركيز (1%) ويمزج جيدا مع المحتويات.
4- يضاف 20 µl من محلول اليود حتى يتكون لون ازرق وبعدها ترج الانابيب جيدا.
5- اختفاء اللون الازرق بعد دقيقة من الرج دلالة على ان الكشف موجب ويقارن مع الـ control tube

ثانيا : طريقة الحامض القيا□ية السريعة Rapid acidimetric method

طريقة الكشف هذه تشبه السابقة ما عدا استخدام محلول الاحمر القاعدي Alkaline solution phenol في هذه الطريقة حيث يتحول من اللون الاحمر الى اللون الاصفر بوجود الحامض المتكون من تحلل البنسلينات.
ويتم الكشف عن البنسلينات بهذه الطريقة بعدة اليات ولكن ابسطها طريقة الانابيب الشعرية.