به نام خدا

گزارش کار آزمایشگاه کنترل میکروبی سکشن یکشنبه ۸-۱۰

اعضای گروه : محمد مهدی نورانی_ امیرحسین راستی _ امیرحسین شبویی

تعیین مقدار انتی بیوتیک پنی سیلین به روش چاهک پلیت

مقدمه : سنجش های میکروبی (Microbial assay) از زیر مجموعه‌ی bio assay هاست که تکنیکی برای ارزیابی قدرت یا غلظت یک ترکیب است. این کار با قرار دادن میکروارگانیسم ها در معرض ترکیب و تعیین تأثیر آن بر آنها انجام می شود.

آزمایش‌های حساسیت ضد میکروبی می‌تواند برای پیدا کردن داروی موثراپیدمیولوژی و پیش‌بینی نتیجه بعد از درمان بیماری مورد استفاده قرار بگیرد. اساس کار ما در این روش واکنش کمی بین یک میکرووارگانیسم با ماده ای که مورد سنجش هست و هدف ما این است که واکنش و رابطه ای کمی بین یک میکروارگانیسم مناسب انتخاب شده از قبل با ماده مورد سنجش برقرار کنیم. بسیاری از آنتی بیوتیک ها و هورمون ها و ویتامین ها روش تعیین مقدارشان در فارماکوپه تا به امروز روش های microbial assay میباشد. میکرووارگانیسم های مورد نظر باید دارای غلظت معین باشند و با هر غلظتی نمی توان آن ها را به کار برد و بین غلظت و response مان در یک ناحیه غلظتی یک رابطه خطی وجود دارد و اگر غلظت از مقدار مشخصی کمتر (دقت در انتخاب غلظت choice) باشد ممکن هست واکنش ما یک واکنش کمی یا قابل تکرار و پایدار نباشد.

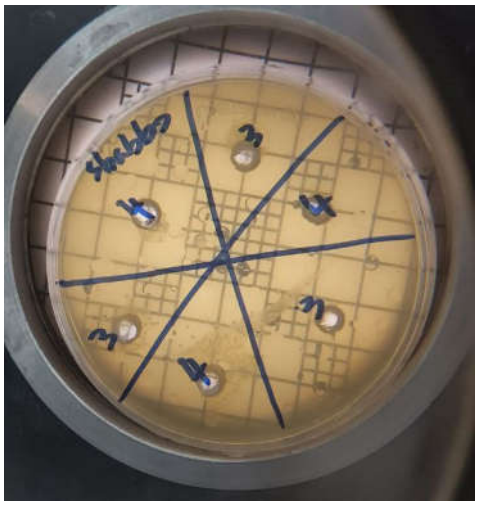
روش انجام ازمایش : ابتدا ۵ لوله ازمایش استریل را برمیداریم از غلظت ۱۰ واحد بر میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین کریستال غلظت های S1,S2,S3,S4,S5 که به ترتیب از S1 ۰/۶۴و۰/۸و۱و۱/۲۵و۱/۵۶ واحد بر میلی لیتر می‌باشند را میسازیم.

S1_> 0.64 cc standard + 9.36 cc water
S2_> 0.8 cc standard + 9.2 cc water
S3_> 1 cc standard + 9 cc water
S4_> 1.25 cc standard + 8.75 cc water
S5_> 1.56 cc standard + 8.64 cc water

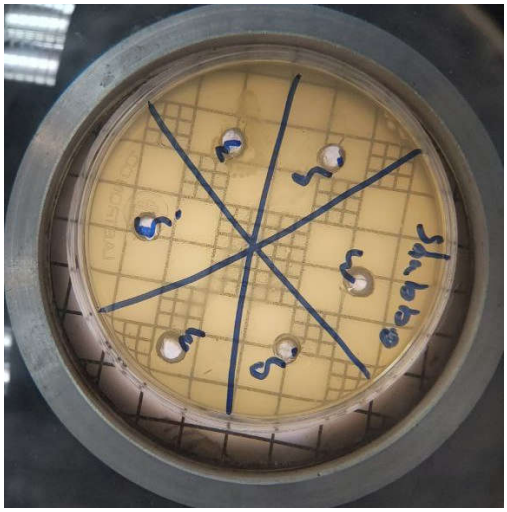
سپس ۵ پلیت حاوی محیط کشت تلقیح شده غلظت ۱۰۰۰۰۰ باکتری *E.coli* را بر میداریم و در نهایت پشت هر پلیت را به ۶ قسمت تقسیم میکنیم. به وسیله ی انتهای پیپت پاستور در هر قسمت بر روی هر پلیت چاهک ایجاد میکنیم و توسط نوک پیپت محیط کشت بریده شده را خارج میکنیم. مقدار ۰/۱ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب استریل را توسط پیپت پاستور استریل برداشته و به کف چاهک میریزیم تا کف آن کاملا مسدود و به ته پلیت بچسبد. توسط پیپت پاستور استریل یا سرنگ استریل مقادیر ثابت به میزان ۰/۱ میلی لیتر از غلظت S1 تا S5 و Su برداشته و به درون چاهک های مربوطه، همان طور که در

شکل مشاهده می کنید و شماره گذاری شده است، میریزیم و همان طور که مشخص است در قسمت هایی که علامت سوال گذاشته شده است نمونه unknown (تحت شماره 2 برای گروه ما) را ریختیم.

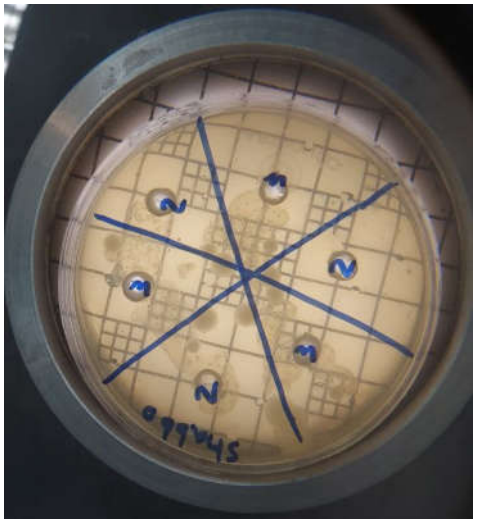
درب پلیت را میگذاریم و پلیت ها را به ارامی به داخل انکوباکتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت قرار میدیم. بعد از ۱۶ الی ۱۸ ساعت قطر هاله ها را به وسیله کولیس یا خط کش اندازه میگیریم .



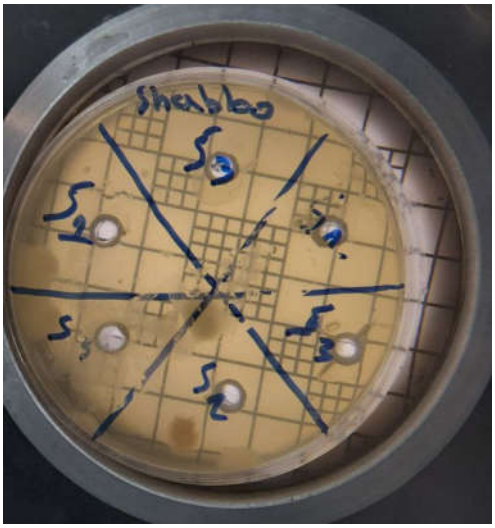
شکل ۱ S3 and S4



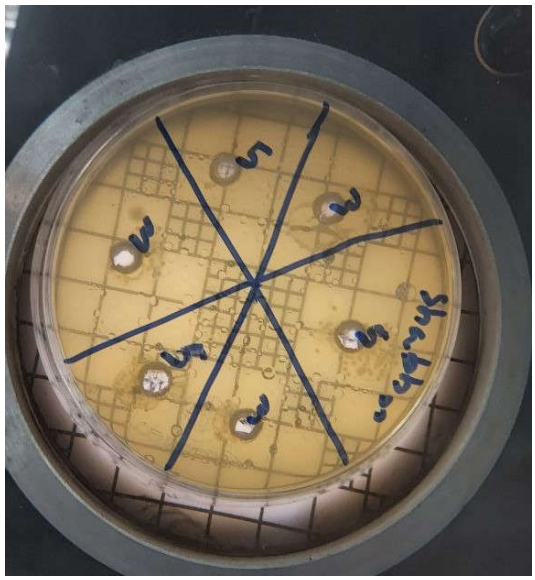
شکل ۲ پلیت حاوی نمونه مجهول و S3



شکل ۴ S3 and S2



شکل ۳ S1 and S3



شکل S3 and S5 ۵

نتایج ازمایش :

	۱	۲	۳	$\bar{x}$	Diff.
S_3-1	۲۰	۲۰	۱۹	۱۹.۶	-۰.۴
S_3-2	۱۸	۱۹	۱۹	[illegible]	۰.۶
S_3-4	۲۱	۲۰	۱۹	[illegible]	-۰.۸
S_3-5	۱۷	[illegible]	۱۹	۱۸.۶	۰.۴

جدول۱ هاله ی عدم رشد مربوط به S3 در پلیت هایS1, S2, S4, S5

$$\bar{x}\, total = \frac{19.6 + 18.6 + 20 + 18.6}{4} = 19.2$$

$$Diff. = \bar{x}\, total - \bar{x}\, each$$

	۱	۲	۳	$\bar{x}$	Diff.	Corrected d
S1	۱۷	۱۵	۱۴	۱۵.۳	-۰.۴	۱۴.۹
S2	۱۷	۱۷	۱۴	۱۶	۰.۶	۱۶.۶
S4	۲۰	۱۹	۲۱	۲۰	-۰.۸	۱۹.۲
S5	۱۷	۱۸	۱۹		۰.۴	۱۸.۴

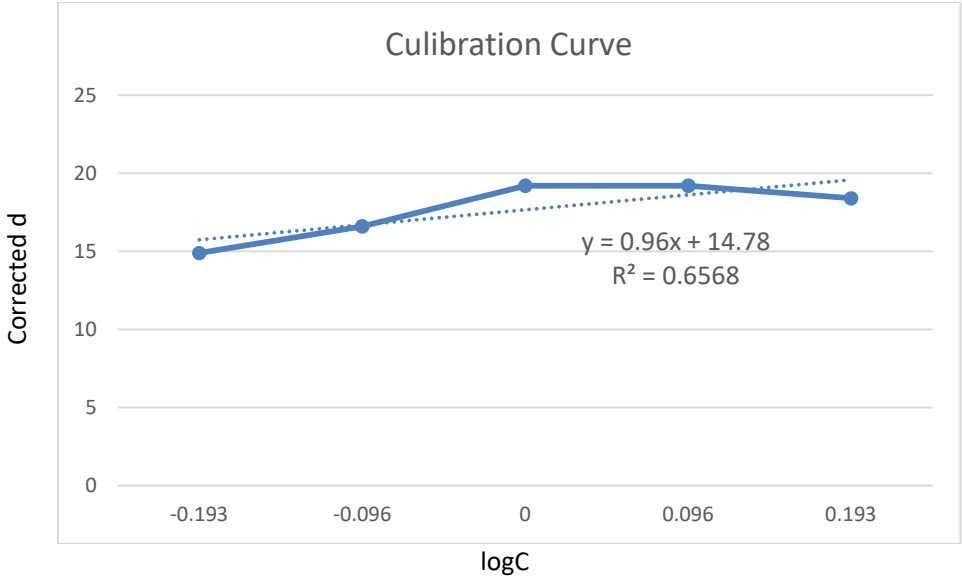
۲ جدول

قطر هاله عدم رشد برای غلظت های **S1, S2, S4** و **S5** را اندازه گیری کرده و در جدول وارد می کنیم و میانگین را حساب می کنیم. حال با استفاده از **diff** بدست آمده از جدول قبلی (قهوه‌ای)، **Corrected D** ها را محاسبه می کنیم.

	C	logC	Corrected d
S1		-۰.۱۹۳	۱۴.۹
S2		-۰.۰۹۶	۱۶.۶
S3	۱	۰	۱۹.۲
S4			۱۹.۲
S5		۰.۱۹۳	۱۸.۴

جدول۳ مربوط به رسم Culibration Curve

با استفاده از اعداد به دست آمده از جدول شماره ۳، اقدام به کشیدن Culibration Curve می کنیم.



	۱	۲	۳	$\bar{x}$
S_3 - U	۱۸	۱۹	۱۸	۱۸ .۳

جدول ۴ مربوط به S3 مجهول

$$Diff. = S3\ corrected\ D\ (\ obtained\ from\ the\ curve) - \bar{x}$$

Diff. = 19.2 – 18.3 =0.9

	۱	۲	۳	$\bar{x}$	**Diff. (curve)**	**Corrected (curve)**
U		۱۵	۱۴	۱۵		۱۵.۹

جدول ۵

در این جدول (شماره ۵) قطر هاله عدم رشد مربوط به نمونه مجهول را مشاهده می کنید. به وسیله ی diff بدست آمده با دیتا های جدول شماره 4 این میانگین را تصحیح می کنیم. سپس با توجه به منحنی رسم شده LogC را حساب کرده و بصورت آنتی لوگ به غلظت نمونه مجهول می رسیم.

y = 0.96x + 14.78

15.9 = 0.96x + 14.78 ___> x یا logC= 1.16 ___> **C = 14.67**

توجه شود که potency یی که ما حساب کردیم یعنی C در مقایسه با potency مجهول که روی فراورده اعلام شده است حداکثر می تواند 2 درصد متفاوت باشد، حالا یا بیشتر یا کمتر، اگر غیر از این بود فراورده reject می شود. طبق دستور USP با فراورده برخورد شود.

منابع

۱. https://www.sid.ir/search/journal/paper/

۲. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC۷۹۱۳۸۳۹/

۳. https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/antibiotic-kill-curve