

In The Name Of God

Shaheed Beheshti University of
Medical sciences and Health Services

Collaborating Center for Tuberculosis
East Mediterranean Region

Mycobacteriology Research Center
مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی
MRC

National Research Institute
Tuberculosis and Lung Disease

Collaborating Center for Tuberculosis
Laboratory IUATLD

تست حساسیت دارویی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

Drug Susceptibility Test against Mycobacterium tuberculosis

Mycobacteriology Research Center (MRC)

Dr. P. Farnia — **دکتر پریسا فرنیا**
Dr. M. Varahram — **دکتر محمد ورهرام**
Dr. M. Doraghi — **دکتر معصومه دورقی**
Dr. F. Mohammadi — **دکتر فروزان محمدی**
Dr. S. J. Tabatabaee — **دکتر سید جواد طباطبایی**
Dr. A. Zia Zarifi — **دکتر ابوالحسن ضیاء ظریفی**
Dr. M. Bahadori — **دکتر مسلم بهادری**
Dr. M. R. Masjedi — **دکتر محمدرضا مسجدی**
Dr. A. A. Velayati — **دکتر علی اکبر ولایتی**

Contence

فهرست

Introduction	7	۷	مقدمه
Drug Susceptibility Test	9	۹	تعیین حساسیت دارویی
Proportional Method	11	۱۱	روش تناسب
Antimycobacterial Drugs	13	۱۳	دارو های ضد سل
Drug Concentration	17	۱۷	تهیه رقت دارویی
Preparation of Drug Containing Media	41	۴۱	ساخت محلول های حاوی دارو
McFarland Standards	43	۴۳	ساخت مک فارلند
Mycobacterial Suspension	47	۴۷	سوسپانسیون مایکوباکتریوم
Inoculation of Suspension	49	۴۹	تلقیح سوسپانسیون
Reading	51	۵۱	قرائت

مقدمه

روی کشت های L.J مثبت شده، تست حساسیت دارویی به روش Proportional انجام می گیرد.

Introduction

The Drug Susceptibility Test was performed by L.J proportional method on positive cultures.

تعیین حساسیت دارویی
Drug Susceptibility Test

سوسپانسیون مایکوباکتریوم
Mycobacterial Suspension

روش تناسب
Proportional Method

تلقیح سوسپانسیون
Suspension Inoculation

رقت های داروی
Drug Solution

خواندن و گزارش
Reading & Reporting

محیط های حاوی دارو
Drug Containing Media

روش تناسب
Proportional Method

محیط کشت **L.J** که داروهای مورد نیاز با غلظتهای معین به آن افزوده شده است، در لوله های ۱۷۰× ۱۷ میلی متر تقسیم و در ۸۵ درجه سانتیگراد منعقد و پس از حصول اطمینان از عدم الودگی تا دوماه قابل استفاده می باشد. از کشت مورد مطالعه، سوسپانسیونی آماده و به لوله های شاهد و حاوی دارو تلقیح می گردد. نتایج آزمایش در روز ۲۸ تلقیح، قرائت می گردد. تعداد پرگنه ها در سطح محیط ها شمارش می شوند. تعداد پرگنه ها در سطح محیط حاوی دارو، تعداد باسیلهای مقاوم به آن را مشخص می کند.

نسبت تعداد باسیلهای مقاوم به هر دارو به تعداد باسیلهای زنده در ماده تلقیح شده اگر از حدی که نسبت بحرانی برای مقاومت نامیده می شود کمتر باشد، باسیل نسبت به آن دارو حساس و اگر معادل آن حد یا بیشتر باشد سویه مقاوم تلقی می گردد.

اگر سویه مقاوم باشد قرائت ۲۸ و اگر سویه حساس باشد، قرائت مجدداً در روز ۴۲ تلقیح صورت می گیرد.

The proportional method enables precise quantization of the proportion of mutants resistant to a given drug. Several dilutions of inoculums are planted in replicate onto both control and drug containing media. The proportion of bacilli resistant to given drug is then determined by comparing these numbers and expressing the resistant portion as a percentage of the total population tested. In every case the inoculums size must be known so the actual proportion of resistant mutants may be calculated.

داروهای ضد سل
Antimycobacterial Drugs

آماده سازی داروها برای کشت

۱) **potency** دارویی:

Potency هر دارو، عبارتست از وزن مقدار داروی فعال (میکروگرم) نسبت به وزن کامل محصول (میلیگرم). تمام داروهای ضد میکربی به صورت خالص وجود ندارند و بخشی از وزن آنها ممکنست مربوط به ناخالصیها یا سولفات ها یا ترکیبات رادیکال ملکول آنها باشد. روی هر ویال بایستی **Potency** دارو ذکر شود، در غیر این صورت بایستی با کارخانه سازنده دارو مشورت شود.

۲) محلول های **Stock:**

هر دو محلول **Stock** و محیط کشت را در یک روز تهیه کنید. از آنجایی که حجم های کمتر از ۱۰ میلی لیتر موجب کاهش قابل ملاحظه ای در **Potency** دارو، (به خاطر جذب دارو در مراحل ابتدایی فیلتراسیون می گردد،) فرمول محاسبه وزن دارویی که برای تهیه ۱۰ میلی لیتر محلول **mcg/ml** ۱۰۰۰۰ بکار می رود چنین است:

$$\frac{\textbf{10000 mcg/ml}}{\textbf{Potency}} \times \textbf{10}$$

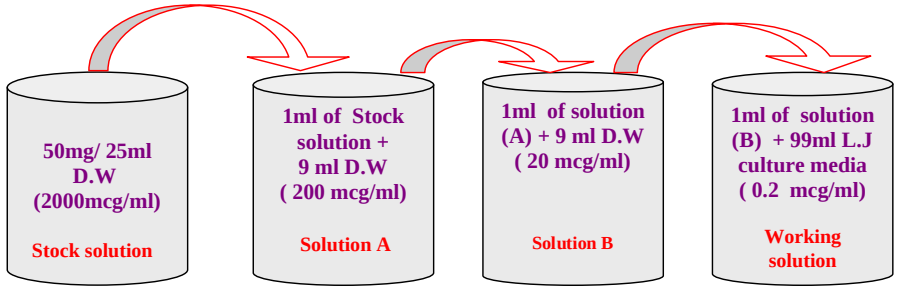
۳) تمام ظروف کشت بایستی در محفظه تاریک و استریل نگهداری شود. از آنجایی که محیط های کشت، دهیدارته می شوند، ظروف حاوی دارو، بایستی حداکثر تا یک ماه بعد از تهیه شدنشان، مصرف شوند.

Ptoency

The true potency of the drug is the number of micrograms of active drug per milligram total weight of the product. Not all antimicrobial drugs have been isolated in pure form, and a portion of their weight may be due to impurities or to the sulfate or other radical component of the molecule.
To calculate the weight of drug necessary to prepare 10 ml of a 10,000 µg/ml solution, use this formula:

$$\frac{\textbf{10000}}{\textbf{Potency}} \times \textbf{10} = \textbf{milligrams to weight}$$

تهیه محلول ایزونیازید
Preparation of Isonizid



Preparation of Isonizid solution

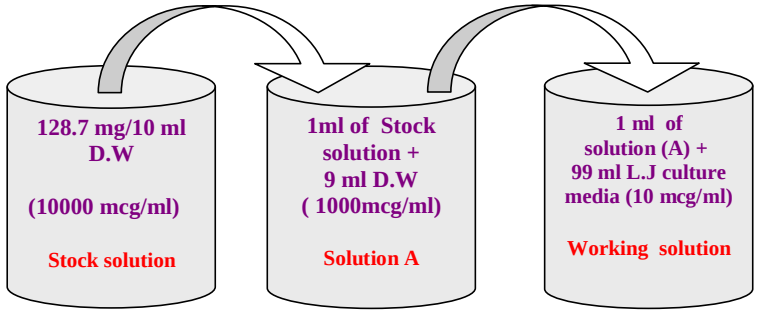
* Dissolve 50 mg of isonizid in 25 ml of distilled water.
  (INH concentration is 2000 mcg /ml = stock solution)
* Add 1 ml of stock solution to 9 ml of distilled water.
  (INH concentration is 200 mcg /ml=solution A)
* Add 1 ml of solution A to 9 ml of distilled water
  (INH concentration is 20 mcg/ml =solution B)
Sterilize solution B by using 0.22 µl Millipore - filter.
* Add 1 ml of filtrated solution B, to 99 ml of L.J culture Media.
  (INH concentration is 0.2 mcg/ml = working solution)

تهیه محلول ایزونیازید (0.2 mcg/ml)

* ۵۰ میلی گرم ایزونیازید در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر حل شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۲۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* ۱ میلی لیتر از محلول **Stock** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول **A** حاوی غلظت ۲۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* ۱ میلی لیتر از محلول **A** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول **B** حاوی غلظت ۲۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* محلول **B** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید و سپس یک میلی لیتر از محلول **B** فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزایید. غلظت ایزونیازید در یک میلی لیتر از محلول **L.J (working solution) mcg/ml 0.2** می باشد.

تهیه محلول استرپتومایسین

Preparation of Streptomycin



Preparation of Streptomycin Solution (10 mcg/ml)

Potency of streptomycin sulfate is may be different from company to company.Therefore, each time the weight of drug has to be calculated using this formula:

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)X Concentration}}{\text{Ptotency (µg/ml)}}$$

To make a 10 ml of 10,000mcg /ml stock solution then

$$128.7\ (\text{mg}) = \frac{10\times 10{,}000}{777}$$

Preparation of streptomycin solution

* Dissolve 128.7 mg of isonizid in 10 ml of distilled water.

(SM concentration is 10000 mcg /ml= stock solution)

* Add 1 ml of stock solution to 9 ml of distilled water (SM)

(SM concentration is 1000 mcg /ml= solution A)

* Sterilize solution A by using 0.22 µl Millipore -filter
* Add 1 ml of solution A to 996 ml of L.J culture media

تهیه محلول استرپتومایسین (10 mcg/ml)

استرپتومایسین به صورت دهیدرواسترپتومایسین سولفات موجود می باشد. بنابراین Potency آن باید محاسبه شود. برای مثال استرپتومایسین سولفات از شرکت Sigma دارا ی Potency = 777 می باشد.

برای تهیه 10,000 cmg/ml در 10 ml از فرمول زیر استفاده می کنیم:

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentration}}{\text{Ptotency (µg/ml)}}$$

$$\text{۱۲۸/۷ میلیگرم} = \frac{10 \times 10{,}000}{777}$$

* ۱۲۸/۷ میلیگرم استرپتومایسین در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.

(محلول Stock-solution حاوی غلظت ۱۰۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)

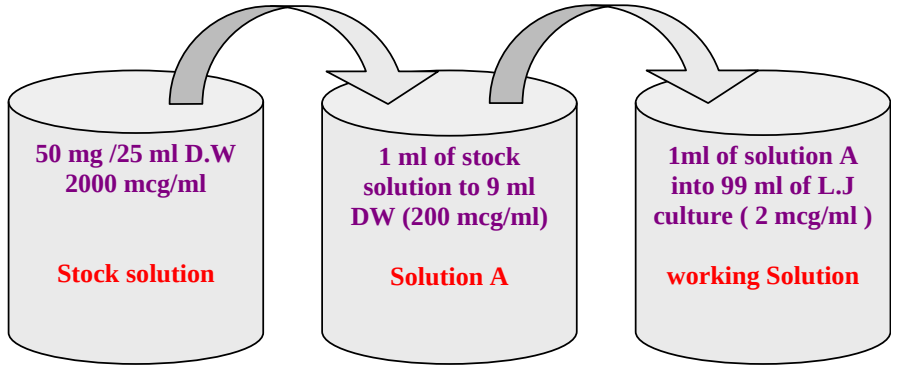
* ۱ میلی لیتر از محلول Stock به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.

(محلول A حاوی غلظت ۱۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)

* محلول A را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید و سپس ۱ میلی لیتر از محلول A فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت L.J افزوده، غلظت استرپتومایسین در یک میلی لیتر از محلول (working solution) L.J mcg/ml ۱۰ می باشد.

تهیه محلول اتامبوتول

Preparation of ethambutol



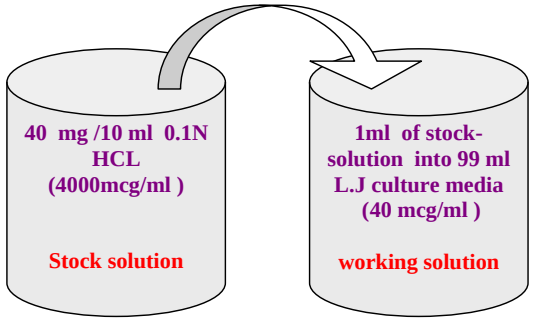
Preparation of ethambutol solution (2mcg/ml)

* Dissolve 50 mg of ethambutol in 25 ml of distilled water.
  (ETB concentration is 2000 mcg /ml= stock solution)
* Add 1 ml of stock solution to 9 ml of distilled water.
  (ETB concentration is 200 mcg /ml= solution A)
* Sterilize solution C by using 0.22 µl Millipore –filter.
* Add 1ml of filtrated solution A, to 99 ml of L.J culture Media.
  (ETB concentration is 2 mcg/ml= working solution)

تهیه محلول اتامبوتول (2 mcg/ml)

* ۵۰ میلی گرم اتامبوتول در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر حل شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۲۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* ۱ میلی لیتر از محلول **Stock** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول **A** حاوی غلظت ۲۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است.)
* محلول **A** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید و سپس یک میلی لیتر از محلول **B** فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزایید. غلظت اتامبوتول در یک میلی لیتر از محلول **(working solution) L.J** **2 mcg/ml** می باشد.

تهیه محلول ریفامپین
Preparation of rifampin



Preparation of rifampin solution (40mcg/ml)

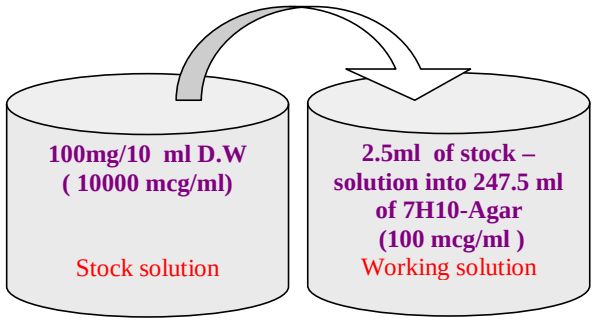
* Dissolve 40 mg of rifampin in 10 ml of DMSO or 0.1N HCL
  (RF concentration is 4000 mcg /ml= stock solution)
* Sterilize stock-solution by using 0.22 µl Millipore -filter
* Add 1ml of filtrated solution A, to 99 ml of L.J culture Media
  (RF concentration is 40 mcg/ml= working solution)

تهیه محلول ریفامپین (40 mcg/ml)

* ۴۰ میلی گرم ریفامپین در **10** سی سی **DMSO** یا **0.1N HCL** حل شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۴۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* محلول **Stock-solution** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید و سپس یک میلی لیتر از محلول فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزایید. غلظت ریفامپین در یک میلی لیتر از محلول:
40mcg/ml (working solution) L.J می باشد.

تهیه محلول پیرازینامید

Preparation of Pyrazinamide



Culture Medium preparation:

The commercially available 7H10 agar bases was dissolved in deionized water at 9.5 g per 450 ml .Then 3.3 g of monopotassium phosphate (KH2PO4) was added to acidify the medium. In addition 0.5 g of casein hydrolysate and 2.5 ml of glycerol were added. After being autoclave at 121^0C for 10 min, the medium cool down to 54^0C and 50 ml of OADC added into it. The medium split into to sterile flask and in one of the flask 2.5 ml of pyrazinamide stock solution was added into it.

Preparation of Pyrazinamide solution

* Dissolve 100 mg of Pyrazinamide in 10 ml of distilled Water.
  (PZA concentration is 10000 mcg /ml = Stock solution)
* Sterilize stock-solution by using 0.22 µl Millipore -filter
* Add 2.5 ml of filtrated solution, to 247.5 ml of 7H10-agar culture Media
  (PAZ concentration is 100 mcg/ml =Working solution)

تهیه محلول پیرازینامید (100 mcg/ml)

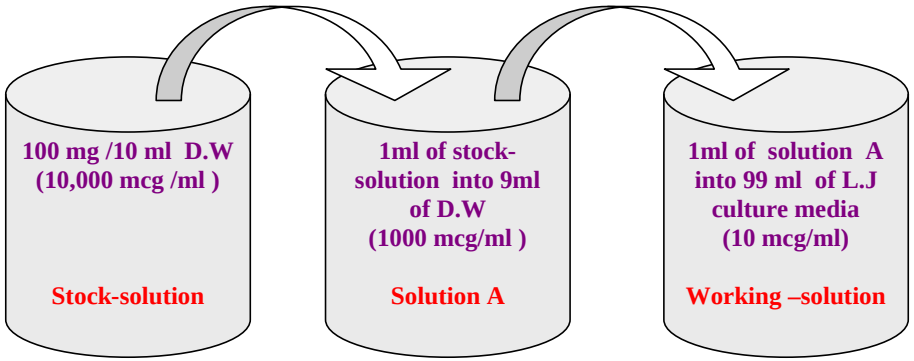
تهیه محیط 7H 10 Agar: ابتدا ۹/۵ گرم از پودر آماده **7H 10 Agar** (طبق دستور) را به ۴۵۰ سی سی آب مقطر اضافه کرده و به آن ۳/۳ گرم مونوپتاسیم-فسفات، ۰/۵ گرم کازین هیدرولیز و ۲/۵ سی سی گلیسرول اضافه می کنیم. محلول فوق به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتیگراد با۱۰ پوند اتوکلاو می گردد. بعد از رسیدن به ۵۴ درجه سانتیگراد، به آن ۵۰ سی سی **OADC** اضافه و بلافاصله به دو ظرف تقسیم می گردد (فلاکس ۱: حاوی ۲۴۷/ ۵ سی سی از محیط ساخته شده به علاوه ۲/۵ سی سی از محلول پیرازینامید و فلاکس ۲ : حاوی ۲۵۰ سی سی از محیط ساخته شده بدون آنتی بیوتیک)

تهیه محلول پیرازینامید

* ۱۰۰ میلی گرم پیرازینامید در ۱۰ سی سی آب مقطر حل شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۱۰۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* محلول **Stock-solution** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید و سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول فیلتر شده را به ۲۴۷/۵ سی سی محیط کشت **7H10 –Agar** بیفزایید. غلظت پیرازینامید در یک میلی لیتر از محلول **7H10 Agar**، **100mcg/ml** می باشد.

تهیه محلول کاپرومایسین

Preparation of Capreomycin



Preparation of Capreomycin solution (10mcg/ml)

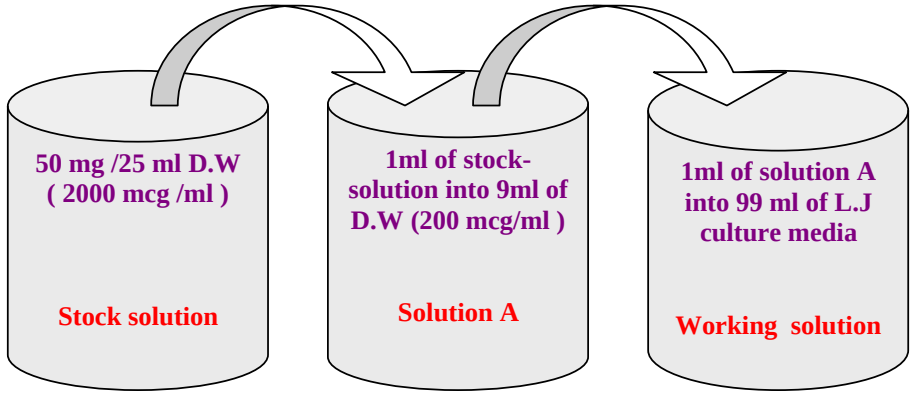
* Dissolve 100 mg of capreomycin in 10 ml of distilled water
  (CAP concentration is 10000 mcg /ml= stock solution)
* Add 1 ml of stock –solution into 9 ml of distilled–water
  (CAP concentration is 1000 mcg/ml= solution A)
* Sterilize stock-solution by using 0.22 µl Millipore -filter
* Add 1ml of filtrated solution, to 99 ml of L.J culture Media
  (CAP concentration is 10 mcg/ml= working solution)

تهیه محلول کاپرومایسین (10 mcg/ml)

* ۱۰۰ میلی گرم کاپرومایسین در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.
  (محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۱۰۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* ۱ میلی لیتر از محلول **Stock** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
  (محلول **A** حاوی غلظت ۱۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر می شود)
* محلول **A** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید، سپس یک میلی لیتر از محلول **A** فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزایید. غلظت کاپرومایسین در یک میلی لیتر از محلول **L.J** **10mcg /ml** می باشد.

تهیه محلول سیپروفلوکساسین

Preparation of Ciprofloxacin



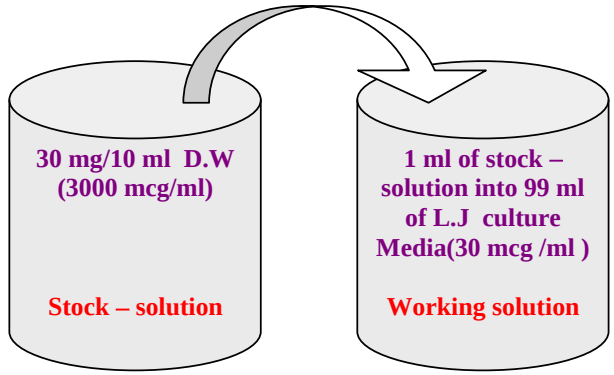
Preparation of Ciprofloxacin solution (2mcg/ml)

∗ Dissolve 50 mg of ciprofloxacin in 25 ml of distilled water
(CIP concentration is 2000 mcg /ml = stock solution)
∗ Add 1 ml of stock –solution into 9 ml of distilled –water
(CIP concentration is 200 mcg/ml, solution A)
∗ Sterilize stock-solution by using 0.22 µl Millipore -filter
∗ Add 1ml of filtrated, to 99 ml of L.J culture Media
(CIP concentration is 2 mcg/ml = working solution)

تهیه محلول سیپروفلوکساسین (2 mcg/ml)

∗۵۰ میلی گرم سیپروفلوکساسین در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر حل شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۲۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
∗ ۱ میلی لیتر از محلول **Stock** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول **A** حاوی غلظت ۲۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
∗ محلول **A** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید، سپس یک میلی لیتر از محلول **A** فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزایید. غلظت سیپروفلوکساسین در یک میلی لیتر از محلول **L.J** **2 mcg/ml** می باشد.

تهیه محلول سیکلوسرین
Preparation of cycloserine



Preparation of cycloserine solution (30mcg/ml)

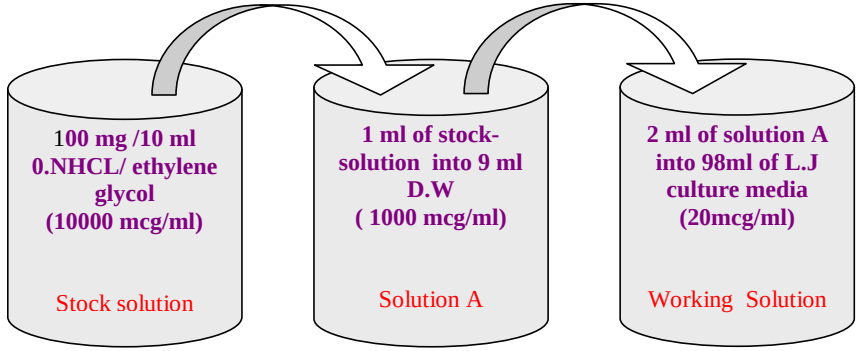
* Dissolve 30 mg of cycloserine in 10 ml of distilled water with PH=10 (cycloserine concentration is 3000 mcg/ml= cycloserine)
* Sterilize stock-solution by using 0.22 µl Millipore -filter
* Add 1ml of filtrated solution, to 99 ml of L.J culture Media
(cycloserine concentration is 30 mcg/ml= working solution)

تهیه محلول سیکلوسرین (30 mcg/ml)

* ۳۰ میلی گرم سیکلوسرین در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر با PH = ۱۰ حل شود (ابتدا محلول ۱/. ٪ Na2 Co3 تهیه کرده و به ۱۰۰ سی سی آب مقطر اضافه می کنیم، PH آب مقطر باید به ۱۰ برسد)
(محلول Stock-solution حاوی غلظت ۳۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* محلول را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید، سپس یک میلی لیتر از محلول فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت L.J بیفزایید. غلظت سیکلوسرین در یک میلی لیتر از محلول L.J 30 mcg/ml می باشد.

تهیه محلول اتیونامید

Preparation of Ethionamide



Preparation of Ethionamide Hydrochloride solution (20mcg/ml)

Potency of ethionamide Hydrochloride is may be different from company to company. Therefore, each time weight of drug necessary has to be calculated using this formula

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentration}}{\text{Ptotency (µg/ml)}}$$

To make a 10 ml of 10,000mcg /ml stock solution then

$$= \frac{10{,}000 \times 10}{\text{Potency (mg)}}$$

Dissolve 100 mg of in 10 ml of distilled water
(ETH concentration is 10000 mcg /ml= stock solution)

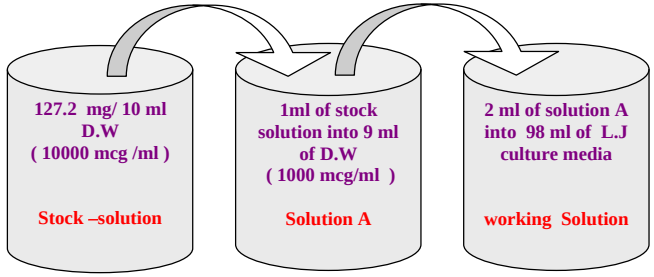
* Add 1 ml of stock –solution into 9 ml of distilled –water
(ETH concentration is 1000 mcg/ml = solution A)
* Sterilize stock-solution by using 0.22 µl Millipore -filter
* Add 2 ml of filtrated solution A, to 98 ml of L.J culture Media
(ETH concentration is 20 mcg/ml = working solution)

تهیه محلول اتیونامید (20 mcg/ml)

* ۱۰۰ میلیگـرم در ۱۰ میلـی لیتـر **0.1N HCL / DMSO** یـا **ethylene glycol** حـل شـود. در صـورت حـل کـردن در **ethylene glycol** برای ۲۴ ساعت در دمای اتاق باید انکوبـه شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۱۰۰۰۰ مـایکروگرم در میلی لیتر است)
* ۱ میلی لیتر از محلول **Stock** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول **A** حاوی غلظت ۱۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* محلول **A** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکـرون) اسـتریل نمایید، سپس ۱ میلی لیتر از محلول **A** فیلتر شده را به ۹۸ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزاییـد. غلظـت اتیونامیـد هیدروکلرایـد در یـک میلی لیتر از محلول **L.J** **mcg/ml** **20** می باشد.

تهیه محلول کانامایسین

Preparation of Kanamycin



Preparation of Kanamycin Solution (20 mcg/ml)

* Potency of Kanamycin sulfate is may be different from company to company. Therefore, each time weight of drug necessary has to be calculated using this formula

$$\text{Weight(mg)} = \frac{\text{Volume(ml)} \times \text{Concentration}}{\text{Ptotency (µg/ml)}}$$

To make a 10 ml of 10,000mcg /ml stock solution then $\frac{10{,}000 \times 10}{786} = 127.2$

Preparation of kanamycin solution

* Dissolve 127.2 mg of Kanamycin sulfate in 10 ml of distilled water.
(KM concentration is 10000 mcg /ml= stock solution)
* Add 1 ml of stock solution to 9 ml of distilled water
(KM concentration is 1000 mcg /ml= in solution A)
* Sterilize solution A by using 0.22 µl Millipore -filter
* Add 2 ml of filtrated solution A, to 98 ml of L.J culture Media.

تهیه محلول کانامایسین (20 mcg/ml)

* کانامایسین به صورت، سولفات کانامایسین موجود می باشد. بنابر این Potency آن باید محاسبه شود. برای تهیه 10,000 cmg/ml در 10 ml با potency =786 ازفرمول زیر استفاده می کنیم:

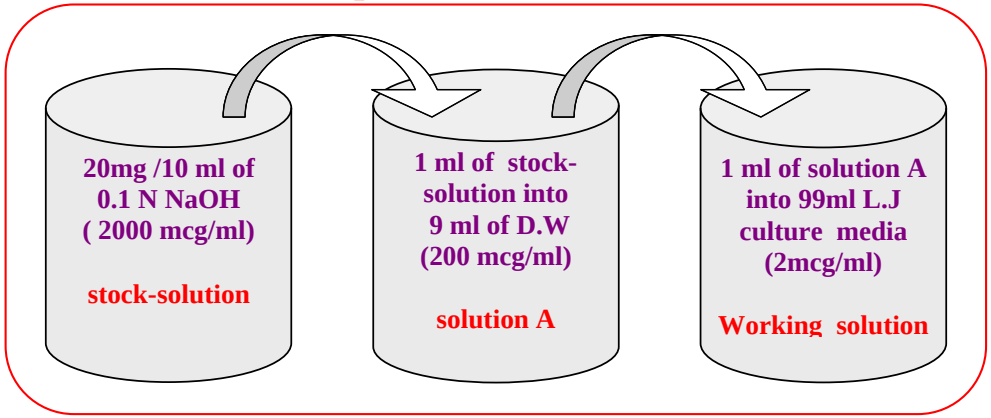
$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentration}}{\text{Ptotency (µg/ml)}}$$

$$\frac{10 \times 10{,}000}{786} = ۱۲۷/۲ \text{ میلیگرم}$$

* ۱۲۷،۲ میلیگرم در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.
(محلول Stock-solution حاوی غلظت ۱۰۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* ۱ میلی لیتر از محلول Stock به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول A حاوی غلظت ۱۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر می شود)
* محلول A را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید. و سپس ۲ میلی لیتر از محلول A فیلتر شده را به ۹۸ سی سی محیط کشت L.J بیفزایید، غلظت اتیونامیدهیدروکلراید در یک میلی لیتر از محلول (working solution) L.J (با کسر ناخالصی آن) 20 mcg/ml می باشد.

تهیه محلول اوفلوکساسین

Preparation of Ofloxacin



Preparation of Ofloxacin solution (2 mcg/ml)

∗ Dissolve 20 mg of ofloxacin in 10 ml of 0.1NNaOH
(ofloxacin concentration is 20000 mcg/ml= stock solution)

∗ Add 1 ml of stock –solution into 9 ml of distilled –water
(ofloxacin concentration is 2000 mcg/ml= solution A)

∗ Sterilize stock-solution by using 0.22 µl Millipore -filter

∗ Add 1ml of filtrated solution A, to 99 ml of L.J culture Media
(ofloxacin concentration is 2 mcg/ml= working solution)

تهیه محلول اوفلوکساسین **(2 mcg/ml)**

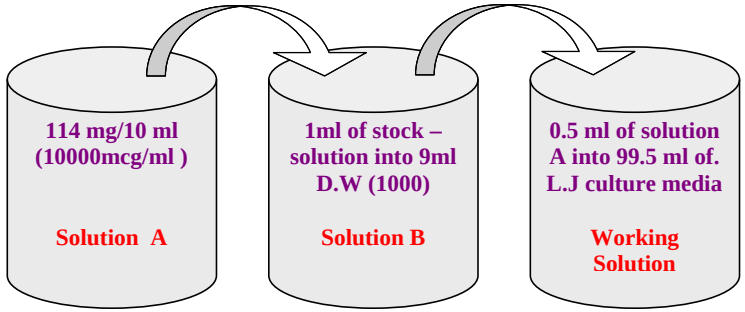
∗ ۲۰ میلی گرم اوفلاکساسین در ۱۰ میلی لیتر **0.1 N NaOH** حل شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۲۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)

∗ ۱ میلی لیتر از محلول **Stock** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول **A** حاوی غلظت ۲۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)

∗ محلول **A** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید، سپس یک میلی لیتر از محلول **A** فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزایید. غلظت اوفلاکساسین در یک میلی لیتر از محلول **L.J 2 mcg/ml** می باشد.

تهیه محلول پارا آمینوسالسلیک اسید

Preparation of P-Amino-salicylic cid



Preparation of P-Amino-salicylic cid Solution (5mcg/ml)

*Potency of P-Amino-salicylic cid is may be different from company to company. Therefore, each time weight of drug necessary has to be calculated. Using this formula

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentration}}{\text{Ptotency (µg/ml)}}$$

To make a 10 ml of 10,000mcg /ml stock solution then

$$\frac{10{,}000 \times 10}{\text{(Ptotency) } 877.2}$$

Preparation of kanamycin solution

* Dissolve 114 mg of P-Amino-salicylic acid in 10 ml of distilled water.
  (PAS concentration is 10000 mcg /ml, stock solution)
* Add 1 ml of stock solution to 9 ml of distilled water
  (PAS concentration is 1000 mcg /ml, solution A)
* Sterilize solution A by using 0.22 µl Millipore -filter
* Add 0.5 ml of solution A to 99.5 ml of L.J culture media.

تهیه محلول پارا آمینوسالسلیک اسید (5 mcg/ml)

* پارا آمینوسالسلیک اسید به صورت، سدیم پارا آمینوسالسلیک اسید موجود می باشد. بنابراین **Potency** آن باید محاسبه شود. برای تهیه **10,000cmg/ml** در **10 ml** از فرمول زیر استفاده می کنیم:

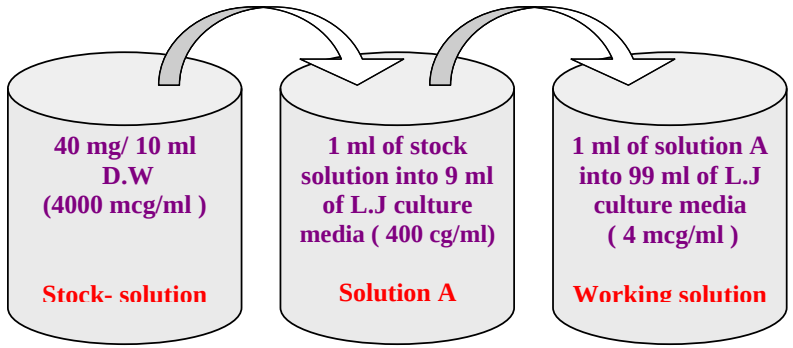
$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentration}}{\text{Ptotency (µg/ml)}}$$

اگر **Pototency** آن ۸۷۷/۲ باشد به طریق زیر عمل می نمایید:

* ۱۱۴ میلیگرم در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۱۰۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* ۱ میلی لیتر از محلول **Stock** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول **A** حاوی غلظت ۱۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
* محلول **A** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید، سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول **A** فیلتر شده را به ۹۹/۵ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزایید. غلظت سدیم پارا آمینوسالسلیک اسید در یک میلی لیتر از محلول **L.J (working solution) 5 mcg/ml** می باشد.

تهیه محلول آمیکاسین

Preparation of Amikacin



Preparation of Amikacin solution (10mcg/ml)

∗ Dissolve 40 mg of amikacin in 10 ml of distilled water.
(AM concentration is 4000 mcg /ml= stock solution)
∗ Add 1 ml of stock –solution into 9 ml of distilled–water.
(AM concentration is 400 mcg/ml= solution A)
∗ Sterilize stock-solution by using 0.22 µl Millipore –filter.
∗ Add 1ml of filtrated solution, to 99 ml of L.J culture Media.
(AM concentration is 4 mcg/ml= working solution)

تهیه محلول آمیکاسین (4 mcg/ml)

∗ ۴۰ میلی گرم آمیکایسین در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.
(محلول **Stock-solution** حاوی غلظت ۴۰۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر است)
∗ ۱ میلی لیتر از محلول **Stock** به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شود.
(محلول **A** حاوی غلظت ۴۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر می شود)
∗ محلول **A** را با استفاده از فیلتر غشایی (۰/۲۲ میکرون) استریل نمایید، سپس یک میلی لیتر از محلول **A** فیلتر شده را به ۹۹ سی سی محیط کشت **L.J** بیفزایید. غلظت کاپرومایسین در یک میلی لیتر از محلول **L.J 4mcg /ml** می باشد.

ساخت محلول های حاوی دارو
Preparation of Drug Containing Media

نام دارو و غلظت داروی مورد استفاده بر روی هر لوله ثبت شود و ۶–۸ میلی لیتر از محیط های دارویی تهیه شده به لوله های استریل **17 mm × 170mm** افزوده و برای ۴۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتیگراد منعقد می گردد.

بعد از خنک شدن در درجه حرارت اتاق، به یخچال منتقل می گردد. از زمان ساخت تا یک ماه محیط ها قابل استفاده می باشند. (به شرط نگهداری در یخچال)

Drug Containing Media

The drug containing medium is distributed in volumes of 6-8 ml in sterile 17mm × 170mm screw-capped test tubes, coagulated at 85^0C for 45 minutes ,and allowed to cool at room temperature for 24 hours; the screw caps are then tightened and the tubes stored at 4^0C. The period of validity of the media stored at 4^0C is 1 months.

ساخت مک فارلند

McFarland Standards
Barium Sulfate turbidity

استاندارد مک فارلند، تعداد باکتریها در یک سی سی سوسپانسیون را نشان می دهد. طبق جدول زیر، یک مک فارلند تعداد 3×10^8 باکتری دارد. مک فارلند را با استفاده از Barium –chloride و Sulfuric –Acid می سازند. خصوصیات مهم مک فارلند این است که در هر آزمایشگاه بدون در اختیار داشتن وسیله خاصی و فقط با استفاده از مک فارلند میتوان مقدار باکتری را ارزیابی کرد.

The McFarland Scale is a scale numbered from 1 to 10 which represents specific concentrations of bacteria/ml.

McFarland Scale	No. Bacteria ($\times 10^6$/ml)
1	300
2	600
3	900
4	1200
5	1500
6	1800
7	2100
8	2400
9	2700
10	3000

McFarland Standards are tubes labeled 1 through 10 and filled with suspensions of Barium salts. Each tube approximates the turbidity of bacterial solutions corresponding to the McFarland Scale number. Thus, tube 7 represents the turbidity of bacteria at a concentration of 2.1×10^{9}/ml.

If you have a culture and wish to determine its approximate population, its turbidity can be visually compared to a set of McFarland Standards. If its turbidity falls between tubes 7 and 8, then the number of bacteria/ml will be between 2.1 and 2.4 billion per ml. The advantage of these standards is that no incubation time or equipment needed to estimate bacterial numbers.

ساخت مک فارلند استاندارد

Preparation of McFarland standard

0.5 McFarland Standard	**Sulfuric acid(H_2So_4) ,1% Barium Chloride($CL_2Ba,2H_20$) ,1%**	**995 ml 5ml**
1.0 McFarland Standard	**Sulfuric acid ,1% Barium Chloride,1%**	**990 ml 10ml**
2.0 McFarland Standard	**Sulfuric acid,1% Barium Chloride,1%**	**980ml 20ml**
3.0 McFarland Standard	**Sulfuric acid ,1% Barium Chloride,1%**	**970 ml 30ml**
4.0 McFarland Standard	**Sulfuric acid ,1% Barium Chloride,1%**	**960 ml 40 ml**

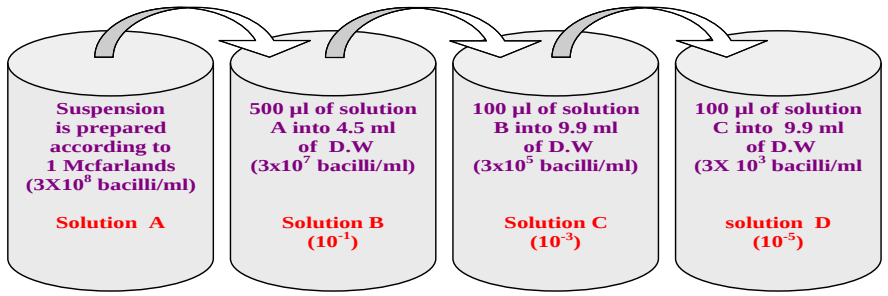
سوسپانسیون مایکوباکتریوم
Mycobacterial Suspension

Put 8-10 glass beads in screw cap tube, add 200 µl of physiological serum or distilled waters, then autoclave the tube.

* Transfer 8-10 mycobacterium colonies to a sterile screw cap tube containing glass beads; homogenize it on mixer for 4-5 minutes. Take one ml of D.W and add the suspension into it gradually until the density adjust to that of a Mac Farland No.1

Prepare the suspension as follows:

1. Transfer 0.5 ml of suspension equal to Mac Farlands No.1, into tube contains 4.5 ml distilled water. In this way, 10^{-1} dilution has been prepared (solution B)
2. Transfer 0.1 ml of solution B to 9.9 distilled water (Solution C =10^{-3})
3. Transfer 0.1 ml of solution C to 9.9 distilled water (Solution D 10^{-5})



در شیشه های کوچک در پیچ دار ۸ تا ۱۰ عدد **Pearls** شیشه ای قرار دهید. ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی یا آب مقطر به آن افزوده شود. سپس لوله ها را در اتوکلاو استریل نمایید.

برای تهیه سوسپانسیون، ابتدا ۸ تا ۱۰ کلنی برداشته به مدت ۵-۴ دقیقه با استفاده از شیکر یکنواخت نمایید. پس از یکنواخت نمودن، برای ۴۵دقیقه بگذارید سوسپانسیون به حالت راکت بماند. سپس در لوله را باز و با استفاده ار سر سمپلر از روی سوسپانسیون برداشته و به لوله ی که حاوی یک سی سی آب مقطر است اضافه کنید. از سوسپانسیون آنقدر اضافه نمایید که کدورت آن به یک مک فارلند برسد.

۱) ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیونی که معادل ۱ مک فارلند است، بردارید و به شیشه در پیچ دار حاوی ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر بیفزایید. بدین ترتیب رقت 10^{-1} تهیه می شود. (محلول شماره ۱)

۲) ۰/۱ میلی لیتر از محلول شماره ۱ بردارید. به لوله حاوی ۹/۹ میلی لیتر آب مقطر بیفزایید. بدین ترتیب رقت 10^{-2} تهیه می شود. (محلول شماره ۲)

۳) ۰/۱ میلی لیتر از محلول شماره ۲ بردارید و به لوله حاوی ۹/۹ میلی لیتر آب مقطر بیفزایید. بدین ترتیب رقت 10^{-5} تهیه می شود. (محلول شماره ۳)

تلقیح سوسپانسیون
Inoculation of Suspension

پس از تهیه سوسپانسیون مایکوباکتریوم با رقت های 10^{-1} ، 10^{-3} و 10^{-5} به هر یک از محیط های حاوی آنتی بیوتیک هـای خط اول، دوم و محیط شاهد فاقد آنتی بیوتیک، ۲۰۰ میکرو لیتر از 10^{-1} ، 10^{-3} و 10^{-5} بیفزایید.
پس از افزودن سوسپانسیون، لوله ها را به آرامی تکان دهید به طوریکه سوسپانسیون با تمام سطح محیط تماس داشته باشد.

Firstly, inoculate 200 µL of Mycobacterium suspension (with 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5} concentration) on to each slant of control media and drug – containing media.

* Spread over the suspension on the whole surface of medium and incubated at 37^{0}C.

خواندن
Reading

محیط های آنتی بیوگرام و شاهد هر هفته مورد برسی قرار می گیـرد و پس از ۲۸ و ۴۲ روز رشد یا عدم رشد روی محیط ها گزارش می شود.

* ابتداد میانگین کلنی های موجود در محیط شاهد خوانده می شـود و ثبت می گردد.
* تعداد کلنی ها در لوله های با رقت 10^{-1} خوانده و ثبت می گردد.
* تعداد کلنی ها در لوله های با رقت 10^{-3} خوانده و ثبت می گردد.
* تعداد کلنی ها در لوله های با رقت 10^{-5} خوانده و ثبت می گردد.

اگر در محیط حاوی آنتی بیوتیک رشد مشاهده نـشود، مایکوبـاکتریوم حساس تلقی می گردد.

* در صورت مشاهده رشد کلنی، تعداد آنها شمارش می گردد و درصد مقاومت در رقت های های 10^{-1}، 10^{-3} و 10^{-5} با توجـه بـه فرمـول زیر محاسبه می گردد:

در پایان قرائت، حتماً به نقطه های بحرانی آنتی بیوتیـک هـای مـورد نظر توجه شود.

$$\frac{\text{تعداد کلنی ها در حضور دارو}}{\text{تعداد کلنی ها در غیاب دارو}} \times ۱۰۰$$

Report the growth on control and drug containing media after 28, 42 days.

* First, read the mean of growth on control media and record it
* Record mean of growth of 10^{-1} tubes.
* Record mean of growth of 10^{-3} tubes.
* Record mean of growth of 10^{-5} tubes.

When no growth was observed on drug – containing media, the mycobacterium is sensitive.

* When enough growth was observed, count the number of colony, then calculates the percentage of resistance by this formula:

$$\%100 \times \frac{\text{Number of colonies on the drug}}{\text{Number of colonies on the control}}$$

Drug	Number of colonies		% resistant
	10^{-1}	10^{-3}	
Control	4+	60C	
INH 0.2 µg	120C	0	2%
SM 2. 0 µg	0	0	0
RIF 1.0µg	0	0	0

The 10^{-1} control inoculum gave 4+, or colonies too numerous to count. The hundredfold dilution (10^{-3}) gave 60 countable colonies. Therefore, the 4+ = 60 × 100 or 6000 colonies. Knowing this figure, the proportion of resistant bacilli may be calculated as 2% to 0.2 µg /ml INH.
If more than 1% of the test population is resistant to the drug under test, this suggests that resistance to that drug has developed.
An alternative way to calculate the percentage of resistant bacilli is:

$$\frac{\text{Colony count on drug medium at lower dilution } (10^{-1})}{\text{Colony count on control medium at higher dilution } (10^{-3})} = \text{\% resistance} \quad \frac{120}{60} = 2\%$$

Address: Mycobacteriology Research Centre, Iranian National Reference TB Laboratory, National Research Institute of Tuberculosis & Lung Disease (NRITLD), Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Shaheed Bahonar Ave, Darabad, 19556, P.O 19575/154, Tehran, Iran.
Tel: (0098-21) 20105555 or 20109505
Fax: (0098-21) 20109484 or 20109505
E-mail: mrc @ nritld.ac.ir, pfarnia @ hotmail.com, pfarnia @ nritld.ac.ir, Website: www.mrc.ac.ir

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.