اینٹی بایوٹک کی سینسٹی کی جانچ کا طریقہ

کورس کی ترتیب

یہ ماڈیول عام طور پر الگ الگ antimicrobial حساسیت کی جانچ اور کارکردگی کا مظاہرہ اور تشریح کرنے کے لیے ایک تعارفی گائیڈ فراہم کرتا ہے۔

اوسط لمبائی: ۴۔۶ ہفتے فی کورس

کوشش: ۰۳۔۰۴ منٹ / ہفتے فی کورس

مضمون: اینٹیمکروبیل حساسیت، ای اس ٹی (AST)، AST میڈیا، AST کی کوالٹی کنٹرول، پڑھنے اور تشریح ہدایات، حساسیت کی جانچ میں آٹومیشن

زبان: انگریزی/اردو

ویڈیو ٹرانسمیشن: انگریزی/اردو

یہ کورس کن کے لیے ہے؟ اس کورس کو الائیڈ ہیلتھ کے پیشہ ور افراد، لیبارٹری ٹیکنیشن، جونیئر فیکلٹی، میڈیکل طالب علموں، انٹرنز اور ریزیڈنٹس کے لئے بنایا گیا ہے جو اسے انجام دینے کے لئے معیاری تکنیک سیکھنا چاہتے ہیں۔

آپ کیا سیکھیں گے:

۱۔ کارکردگی، تشریح اور AST کے معیاری رپورٹنگ کے اصولوں کو سمجھیں گے۔
۲۔ بین الاقوامی معیار اور بہترین طریقوں کے مطابق اے ٹی ایس ATS کے معیار کے تصور کی وضاحت اور یقین دہانی کرینگے۔
۳۔ ڈسک ڈیفوزن ٹیسٹنگ MIC سمیت حساسیت کی مختلف اقسام پر بحث کریں گے۔
۴۔ AST لیبارٹریوں میں محفوظ کام کے طریقوں کے لئے آوٹ لائن کی ضروریات کے بارے میں جانیگے۔
۵۔ حساسیت کی جانچ کے میدان میں حالیہ پیش رفت

تشخیص: ماڈیول کی تکمیل پر شرکاء کے تفہیم کی سطح کا تعین کرنا۔

سرٹیفکیٹ: کورس ماڈیول کے کامیاب ہونے پر پری/پوسٹ ٹیسٹ (امتحان) میں کم از کم ۷۵% فیصد حاصل کرنا۔

آنے والے ماڈیول: مائیکروگرافی کی شناخت، ثقافتی میڈیا اور اس کی تیاری، میک فارلینڈ اسٹینڈرڈ ڈسک ڈیفوژن اور MIC ٹیسٹنگ کے لئے بریک پوئنٹس، پڑھنے اور تشریح کی ہدایت، بائیو کی حفاظت، حیاتیات، حساسیت کی جانچ۔

سیکھنے کا نتیجہ:

اس ماڈیول کو جاننے کے بعد شرکا اس قابل ہو جائینگے، کہ وہ:

۱۔ اچھی لیب پریکٹسز (GLP) کی وضاحت کر سکیں۔

۲۔ گڈ لیب پریکٹس کے مختلف اجزاء کے نام (GLP) بیان کر سکیں۔

۳۔ (GLP) جی ایل پی کی ضرورت اور اہمیت کو سمجھ سکیں۔

اچھی لیبارٹری کے طریقے کار

تعارف: مائکروبائیولوجی لیبارٹری میں کام کرنا انفکشن مواد، کیمیکل، ریجینٹ، اور تابکاری مواد وغیرہ میں کام کرنا شامل ہے۔ یہی وجہ ہے کہ مائکروبائیولوجی لیبارٹری کو کنٹیمینیٹ کی سہولتیں اور خصوصی طریقہ کار کی ضرورت ہوتی ہے۔ اچھی لیبارٹری کے طریقوں (جی پی ایل) ایک ایسی سرگرمی / طرز عمل ہے جو کہ لیب میں سرگرمی یا آپریشن انجام دینے کے لیے، مشورہ دی جاتی ہے۔ لیبارٹری میں کام کرنے والے ہر فرد یا چاہے وہ انفیکشن مواد یا طبی نمونوں کو سنبھالنے والے یا نقل و حمل میں شامل ہونے والوں کے لیے، اچھے لیبارٹری طریقوں پر عمل کرنا لازمی ہے۔ یہ طریقے جانے جاتے ہیں یا ان طریقوں پر یقین کیا جاتا ہے کہ یہ محفوظ ہیں اور نتیجے کے معیار پر مثبت اثر ڈالیں گے اور یہ عام طور پر آزمائشی ٹیسٹ یا پیمائش کی تکنیکوں سے آزاد ہوتے ہیں۔

اجزاء:

۱۔ ایسیپٹک تکنیک

۲۔ بائیوسیفٹی

۳۔ کلچر میڈیا

۴۔ سامان

۵۔ کوالٹی کنٹرول

۶۔ معیاری آپریٹنگ طریقہ کار

ایسپٹک تکنیک: لیب کے کارکن کو اپنے کام کو انجام دینے کے دوران مناسب ذاتی حفاظتی ساز وسامان (PPE) پہننا ضروری ہے۔ جس میں دستانے، لیب کوٹ، چہرے کی ڈھالیں شامل ہیں۔ لیبارٹری میں رہنے کے اوقات کے دوران کارکنوں کو مناسب طریقے سے بٹن لگے/بند کر کے لیب کوٹ پہننا لازمی ہے۔ یہ کوٹ/ لیب گاؤن لیبارٹری سے باہر آنے پر اتارنا لازمی ہے۔

☆ استعمال سے پہلے اور اس کے بعد کام کے علاقے کو صاف کرنا۔ Cultres کے ساتھ کام کرنے سے پہلے اور بعد میں بینچ اور کام کے علاقوں کو صاف کریں۔

☆ کراس آلودگی کے امکان کو کم سے کم، بونسن برنر کے قریب تمام cultre plates اور media tubes کو ترجیحی طور پر biosafety cabinet کے اندر ہینڈل کریں۔

☆ ساز وسامان کو صاف (Sterilize) کرنا، تمام مواد، کلچر میڈیا، نلیاں، پلیٹیں، loops، needles، pepettes اور دیگر ذرائع جو کے microorganisms کے لیے استعمال کیے گئے ہوں انھیں autoclaving سے صاف کرنا لازمی ہے۔ دوسری صورت میں یا ڈسپوزیبل اشیاء استعمال کریں جو استعمال کے بعد مسترد کر دیے جاتے ہیں۔

☆ aerosols اور droplets کی تشکیل سے بچنے کے لئے تمام تکنیک/طریقہ کار کو احتیاط سے انجام دیں۔

☆ ہاتھوں کو اچھے طریقے سے صابن اور پانی سے دھویا جانا چاہیے خاص طور پر جب کام کی جگہ کو چھوڑا جائے یا پھر کسی بھی قسم کے culture یا کیمیائیوں کا استعمال کیا جائے۔

سیفٹی:

☆ کلینکل لیبارٹری میں کام شروع کرنے سے پہلے، ملازم کی حفاظتی تربیت ہونی چاہیے اور یہ حفاظتی اپ ڈیٹ سال میں کم از کم ایک بار باقاعدگی سے وقفوں سے نظر ثانی کی جائے۔

☆ کلینکل لیبارٹری میں تمباکو نوشی، کھانے اور پینے کی سختی سے منع ہے۔

☆ لیبارٹری کے اندر کام کرنے کے دوران ہاتھ یا دیگر اشیاء کے ساتھ چہرے کو چھونے میں انفیکشن کا نتیجہ ہو سکتا ہے۔

☆ mouth pipetting کو روکنا ضروری ہے۔

☆ لیب میں کام کرتے وقت کندھے کے برابر بالوں کو باندھ کے رکھنا لازمی ہے۔

☆ کام کی جگہ پر داخلہ محدود ہونا ضروری ہے۔

☆ خاص طور پر اس مقصد کے لیئے تیار کردہ (ڈیزائن کردہ) اسٹوریج کیبنٹس میں Flammable اور combustible کو ذخیرہ کیا جانا چاہیے۔

☆ اپنے ہاتھوں کو دھولیں۔ microorganisms کے ساتھ کام کرنے سے پہلے اور بعد میں اپنے ہاتھوں کو دھونے کے لیئے disinfectant صابن کا استعمال کریں۔

☆ لیبارٹری میں کام کرنے یا انفیکٹیو مواد کو سنبھالنے کے دوران دستانے اور لیب کوٹ پہنا لازمی ہے۔ لیبارٹری سے باہر جاتے وقت لیب کوٹ اتارنا لازمی ہے۔

☆ نمونے کو ایک جگہ سے دوسری جگہ منتقل کرنے کے لیئے ایک ٹھوس bottomed ٹرے کا استعمال کیا جانا چاہیے۔

☆ تمام تیز دھار اشیاؤں کو مناسب طریقوں "sharp bin" سے خارج کر دیا جانا چاہیے۔

☆ استعمال شدہ سرنج/انجکشن کو دوبارہ استعمال نہ کریں، اسے براہ راست ایک sharp bin میں ضائع کر دینا چاہیے۔

☆ تمام ریجنٹ/کیمیائیوں کو مناسب طریقے سے نام، تیاری کی تاریخ، اور ختم ہونے کی تاریخ کے ساتھ لیبل کیا جانا چاہیے۔

☆Spill kit/ ابتدائی طبی امداد کا ڈبہ لیبارٹری میں دستیاب ہونا چاہیے۔
☆حادثات/spills ہونے کی صورت میں فوری طور پر اس علاقہ کے نگراں کو اطلاع دینی چاہیے۔
☆ آنکھ صاف کرنے کے اسٹیشن یا سادہ sinks کو واضح طور پر نشان لگا دیا جانا چاہیے جو کے حادثے کی صورت میں استعمال کیا جا سکتا ہے۔

تمام فضلہ کے مواد کو Autoclave یا disinfect کریں:

تمام اشیاء جیسے culture tubes, culture plates, contaminated swabs, toothpicks, wipes, disposable transfer needles, اور دستانوں کو biohazard autoclave بیگ میں رکھا جائے اور autoclaved ۰۳ سے ۰۴ منٹ تک ۱۲۱oC سے 20 پونڈ پر ہونا چاہیے۔ اگر autoclave دستیاب نہیں ہے اور کام میں non-pathogens شامل نہیں ہوتے تو مواد 10% سوڈیم hypochlorite حل کے ساتھ احاطہ کیا جا سکتا ہے اور کم از کم ایک سے دو گھنٹے تک لے جانے کی اجازت دی جاتی ہے۔

☆گیس سلنڈر کو ہر وقت زنجیروں سے بندھا ہوا ہونا چاہیے۔
☆لیبارٹری میں مناسب وینٹیلیشن سسٹم ہونا چاہیے۔
☆شارپس بن میں تمام شیپس اور ٹوٹے ہوئے شیشے کی اشیاء کو ختم کرنا ضروری ہے، اس بن کو تبدیل کرنا لازمی ہے جب یہ 3/4th تک بھر جائے۔
☆تمام آلودگی شدہ فضلہ اور culture plates کو لیبارٹری کے علاقے سے باہر نکالنے/جلانے کے لئے نقل و حمل سے پہلے ڈی کنٹیمنٹ ہونا ضروری ہے۔
☆کام کرنے کی جگہ/بینچ کسی بھی حادثات یا spills سے بچنے کے لئے آزاد اور آلودگی سے صاف ہونا ضروری ہے۔
☆مشترکہ لیبارٹری کی سہولت میں خطرناک حیاتیاتی ایجنٹوں کو الگ الگ کرنے کی ضرورت بائیو کنٹیمنیٹ احتیاط کا ایک سیٹ ہے۔

بائیو سیفٹی لیول 1:

یہ کنٹیمنیٹ ان ایجنٹوں کے ساتھ کام کرنے پر لاگو ہوتا ہے جو عام طور پر صحت کی دیکھ بھال کے کارکنوں اور ماحول میں کم سے کم ممکنہ خطرے کا حامل ہوتا ہے اور صحت مند افراد میں بیماری کا باعث بنتا ہے۔ mechanical pipetting سمیت مناسب لیبارٹری کی تکنیک، مناسب ذاتی حفاظتی ساز و سامان، محفوظ شیپس ہینڈلنگ، infectious agents، کی محتاط ہینڈلنگ سطح 1 پر سہولت میں کارکنوں کی حفاظت کے لئے کافی ہیں۔

بائیو سیفٹی لیول 2:

اس میں ایسے جراثیم کے ساتھ کام کرنا شامل ہے جو کہ انسانی بیماری کی وجہ بن سکتا ہے اور جس سے لیبارٹریز کے کارکنوں کو خطرہ بھی لاحق ہو سکتا ہے لیکن کمیونٹی میں اسکے پھیلنے کا امکان نہیں ہے۔ لیبارٹریوں کی نمائش ممکنہ طور پر انفیکشنز اور موثر prophylaxis یا موثر علاج عام طور پر دستیاب ہے۔ چونکہ انفیکشن میں اچھی مائکرو بیلوجی تکنیک، ذاتی حفاظتی ساز و سامان، آنکھ اسٹیشنوں اور شارپس کی چوٹ سے بچنے کے لئے انتہائی نگہداشت کا خیال رکھا جاتا ہے، ڈسپوزایبل سرنجوں کا استعمال لازمی ہے، دوبارہ کیپنگ منع ہے، لیبارٹری تک رسائی کا کنٹرول کلاس II بائیو کی حفاظتی کیبنٹ کی ضرورت ہوتی ہے اور اس سہولت میں ایک autoclave ہونا لازمی ہے۔

بائیوسیفٹی لیول 3:

مائیکروبیل وائرس جیسے حیاتیاتی کام کے ساتھ کام میں شامل ہوسکتا ہے جو کہ شدید انسانی بیماری کا سبب بن سکتا ہے اور aerosol transmission (آسان انضمام) کے ذریعے لیبارٹریز کے کارکنوں کو سنگین خطرہ پیش کرسکتا ہے۔ یہ کمیونٹی میں پھیلنے کا خطرہ بھی بن سکتا ہے اور عام طور پر اسکا موثر پروفیلیکس یا موثر علاج دستیاب ہے۔ اس کنٹینمیٹ کی سطح کو کلاس II بائیو کی حفاظتی کیبنٹ کے ساتھ زیادہ سخت کنٹرول کی ضرورت ہے، N95 ماسکس سمیت اضافی ذاتی حفاظتی ساز و سامان، بند gowns، خود بند ہونے والے دروازے، لیبارٹری میں ایک سمت میں ہوا کا بہاؤ، اندر discard کرنے سے قبل تمام آلودہ مواد کی لیبارٹری، خرابی کا autoclave ہونا ضروری ہے۔

بائیوسیفٹی لیول 4:

ایجنٹوں جو سطح ۴ سہولت میں سنبھالے جاتے ہیں وہ انتہائی خطرناک ہیں اور شدید انسانی بیماری کا سبب بن سکتا ہے اور یہ لیبارٹریز کے کارکنوں کے لئے ایک خطرناک خطرہ بن سکتا ہے۔ یہ کمیونٹی میں پھیلنے کا ایک بڑا خطرہ بن سکتا ہے اور عام طور پر کوئی موثر پروفیلیکس یا علاج موجود نہیں ہے۔ ان ایجنٹوں کی مثالوں میں ایبولا وائرس، لیسا وائرس اور نامعلوم 'Pathogonicity' اور ٹرانسمیشن کے موڈ کے ساتھ کئی دوسرے ایجنٹ بھی شامل ہیں۔

اس کنٹینمنٹ کی اس سطح کو زیادہ سے زیادہ تحفظ فراہم کرتا ہے۔ اس قسم کی لیب عام طور پر علیحدہ عمارت میں واقع ہوتی ہے، کارکنوں کو داخلہ سے پہلے لباس تبدیل کرنا لازمی ہوتا ہے اور باہر نکلنے سے پہلے شاور، مثبت دباؤ مکمل جسم سوٹ، اور سطح 3 لیبارٹری میں لاگو ایجنٹوں کو ایک کلاس BSC III کے اندر سنبھال لیا جاتا ہے۔

۳۔ کلچر میڈیا:

کسی بھی مائکروبایلوجی لیبارٹری میں کلچر میڈیا انتہائی اہمیت رکھتا ہے، ہر microorganism کے لئے مناسب میڈیا استعمال کرنا چاہیے۔

☆ ہر بیچ کا استعمال کرنے سے قبل contamination کے لئے چیک کیا جانا لازمی ہے۔

☆ کوالٹی کنٹرول Strains استعمال کیا جانا چاہیے۔ ثقافتی میڈیا کے ہر پہلو چیک کرنے اور استعمال کرنے کے لئے خصوصات کو روکنے کو یقینی بنانا۔

۴۔ Equipment :

☆ درست اور قابل اعتماد کارکردگی کو یقینی بنانے کے لئے تمام ساز و سامان کا مناسب طریقے سے calibrated ہونا چاہیے۔

☆ حیاتیاتی پھیلنے یا نمونہ leakage، کی صورت میں نمونہ کو مناسب طریقے سے ڈسپوز کیا جانا چاہیے۔

☆ تمام معمولی اور غیر معمولی مرمت اور بحالی کا ریکارڈ برقرار رکھا جانا چاہیے۔

☆ حصوں کو چیک یا تبدیل کرنے کے لئے روک تھام کی بحالی کو باقاعدہ بنیاد پر کیا جانا چاہیے، یہ منصوبہ بندی کی بحالی کو خرابیوں کے خطرات سے کم کر دیتا ہے۔

۵۔کوالٹی کنٹرول:

کوالٹی کنٹرول یا معیار کی تشخیص میں تمام منصوبہ بند اور منظم نظام اور پروگرام شامل ہیں جو اس بات کا یقین کرنے کے لیئے تجربہ کار ہیں کہ لیب ٹیسٹنگ رخدمات مخصوصی معیار یا ہدایات کو پورا کرتی ہیں۔ ان میں شامل ہے:

☆ مناسب سیمپلنگ جمع، اسٹوریج اور نقل وحمل

☆ اعلی صحت سے متعلق اور درستگی کے ساتھ تکنیک کا استعمال

☆ ٹیسٹ کی مناسب کارکردگی

☆ کارکن کی مناسب تربیت

☆ اچھے معیار کے آلات اور ایجنٹ

☆ غلطیوں کا پتہ لگانے کے طریقے

☆ ایکوپمنٹ کی Maintainence

☆ عملے کی مسلسل تربیت

☆ کوالٹی کنٹرول ریکارڈ

۶۔معیاری آپریٹنگ طریقہ کار:

مائکروبائیولوجی لیبارٹری میں کام کرنے کے دوران انفیکشنز کا ایک ممکنہ خطرہ رہتا ہے، ہر لیبارٹری کو معیاری آپریٹنگ طریقہ کار (SOP) ہونا چاہیئے، جسے لیبارٹری کا طریقہ کار SOP یا صرف Manual کہا جاتا ہے۔

SOPs ہر ٹیسٹ، عمل یا طریقہ کار کے لیئے ہدایت کا سیٹ لکھا جاتا ہے، یہ ہدایت معیاری آپریٹنگ طریقہ کار یا SOPs کے طور پر معتبر ہیں۔ ہر لیبارٹری کو SOps کو لیبارٹری پروسیسنگ مینول، ہینڈ بک یا لیبارٹری مینول کے طور پر کہا جاتا ہے۔

☆ SOPs کو آسان زبان میں لکھا جانا چاہیئے۔

☆ SOPs لیبارٹری کے عملے کو تحریری ہدایت فراہم کرتا ہے کہ مختلف ٹیسٹ اور طریقہ کار کو کیسے کریں۔

☆ antimicrobial حساسیت کی جانچ اور رپورٹنگ اور تشریح ہدایت کی جانچ کے لئے طریقہ کار کی وضاحت کریں

☆ کیمیائیوں کی تیاری کے طریقے

☆ لیبارٹری کارکنوں کے لئے محفوظ لیبارٹری کے طریقے

☆ حیاتیاتی یا کیمیائی spills کی صورت میں پیروی کرنے کے لئے پروٹوکول

☆ اس مینول میں Trouble shooting ہدایت بھی شامل ہوتی ہیں

☆ اس مینول میں corrective steps بھی شامل ہوتے ہیں۔

Week 2

ماڈیول کا حاصل نتیجہ:

یہ کورس antimicrobial حساسیت کی جانچ سے متعلق تمام مسائل کو بیان کرے گا؛ شروع ہم AST اور ثقافتی میڈیا کی تعریف، اس کی کارکردگی کے طریقوں پر، Interpretation، معیار کے کنٹرول اور AST کے میدان میں حالیہ پیش رفت کے بارے سے کریں گے۔ یہ کورس آپکو درست اور قابل اعتماد رپورٹنگ کے ساتھ ساتھ معیاری AST کی کارکردگی اور trouble shooting کی تجاویز کے تصورات اور اہمیت کی رہنمائی کرے گا۔

AST ماڈیول کے اس حصے میں شرکا کو سکھایا جائے گا کہ antimicrobial کارکردگی کا مظاہرہ کرنے کے لئے استعمال کیا جاتا ہے اور کس طرح سے ثقافتی میڈیا اور درمیانے درجے کی کوالٹی کنٹرول کی جانچ پڑتال کی جاتی ہے۔

۱۔ AST کلچر میڈیا

۲۔ AST میں استعمال کردہ میڈیا

۳۔ AST کوالٹی کنٹرول

۱۔ کلچر میڈیا:

تعریف: microorganisms کو مناسب غذائی اجزاء اور نشوونما کے عوامل فراہم کرنے کے ذریعہ کو بڑھنے کے لئے ڈیزائن کیا گیا ہے۔ عام طور پر کلچر میڈیا غذائی (پروٹین، peptides، امینو ایسڈ)، توانائی (کاربوہائیڈریٹ)، ضروری دھاتیں اور معدنیات (کیلشیم، میگنیشیم، لوہے اور sulphates، buffering agents (phosphates and acetates)، پی ایچ ڈی کی تبدیلی کے اشارے (phenol red, brilliant green)، منتخب ایجنٹوں (کیمیائیوں، antimicrobial agents, dyes) اور gelling agent پر مشتمل ہوتا ہے۔

الف۔ AST میں استعمال کردہ میڈیا:

اس تعارفی ماڈیول میں ہم صرف AST میں استعمال ہونے والی میڈیا پر مختصر طور پر گفتگو کریں گے، تاہم تمام کلچر میڈیا آئندہ ماڈیولز میں تفصیل سے تبادلہ خیال کئے جائیں گے۔ antimicrobial حساسیت کی جانچ کے لئے مختلف میڈیا کی سفارش کی جاتی ہے مثال کے طور پر brain heart infusion mueller hinton (BHIA) Columbia blood agar, بعض اوقات microorganisms کے ٹیسٹ کے لئے استعمال کیا جاتا ہے۔ ان کلچر میڈیا کے Mueller hinton agar medium میں عام طور پر غیر fastidious بیکٹیریا کی حساسیت کی جانچ کے لئے سب سے زیادہ مناسب مندرجہ ذیل وجوہات کی بناء پر سمجھا جاتا ہے۔

☆ یہ حساسیت کی جانچ کے لئے بیچ در بیچ reproducibility کو ظاہر کرتا ہے۔

☆ یہ سب سے زیادہ non-fastidious microorganisms کی ترقی کی حمایت کرتا ہے۔

☆ یہ ذریعہ sulphonamide, trimethoprim اور tetracyline میں کم ہے۔

☆ یہ رنگ میں شفاف ہے جو اندرونی زون ڈایامیٹر کو پڑھنے میں مدد کرتی ہے۔

ب۔MHA کی تیاری:

Mueller hinton agar کی تیاری کے میں مندرجہ ذیل مرحلے شامل ہیں:

۱۔ Muller hinton agar کو تجارتی طور پر دستیاب ڈی ہاڈریٹڈ بیس سے تیار کیا جانا چاہئے۔

۲۔autoclave ہونے کے فورا بعد اسے 45 to 50oC تک پانی میں ٹھنڈا کرنے کی اجازت دی جاتی ہے۔

۳۔ایک ہموار سطح پر تقریبا 4mm کی گہرائی پر petri dishes میں ٹھنڈا کرنے رکھ دیں۔

۴۔Agar کو جمانے کے لئے کمرے کے درجہ حرارت اور ذخیرہ کرنے کے لئے ریفریجریٹر کے درجہ حرارت پر اسٹور کریں۔

۵۔پلیٹوں کو سات دنوں کی تیاری کے اندر استعمال کیا جانا چاہئے؛ تاہم پلاسٹک آستین پلیٹوں کو خشک ہونے سے بچنے کے لئے طویل عرصے تک پلیٹوں کو ذخیرہ کرنے کے لئے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

MHA کے ساتھ sheep blood 5%

Hydrolysate of casein ..... 17.5 gm

Beef extract..... 2.0 gm

Starch.....1.5 gm

Sheep blood..... 50 ml

Agar ..... 17 gm

Final pH: 7.3

Control	incubation	results
Escherichia coli ATCC 25922	18-24 hrs	Good growth
Enterococcus faecalis ATCC 29212	18-24 hrs	Good growth

Haemophilus ٹیسٹ کے میڈیم:

Haemophilus species کی حساسیت کی جانچ کے لئے استعمال کیا جاتا ہے۔

Beef extract ..... 2 gm

Acid Hydrolysate of casein.....17.5 gm

Agar .....17 gm

Starch .....1.5 gm

Yeast extract.....5 gm

Hematin.....0.015 gm

NAD ..... 0.015 gm

100 ملی میٹر میں پاؤڈر کو تحلیل کرنے کے دوران 50 ملی گرام ہنوین پاؤڈر کو تازہ کر کے ہیمنٹن سٹاک کا حل تیار کیا جاتا ہے۔ hemantion stock حل کے ۰.۳ ملی میٹر ۵ میگاوٹ میں ۵ گرام خمیر نکالنے کے ساتھ شامل کیا جاتا ہے۔ 45 سے 50 کلومیٹر تک autoclaving اور ٹھنڈا کرنے کے بعد NAD stock کے حل کے ۳ ملی میٹر شامل ہے۔ (10 ملی میٹر آبی پانی اور فلٹر نسبندی میں 50 ملی گرام NAD تحلیل بھی غیر متوقع طور پر شامل ہیں۔ ph 7.2 سے 7.4 ہونا چاہیئے۔

pH: 7.3

Control	Incubation	Results
H.influenzea ATCC49247	18-24 hrs CO2 350C	Acceptable zone sizes
H.influenzea ATCC10211	18-24 hrs CO2 350C	Good growth

AST-C میڈیا کے معیار کا کنٹرول:

۱۔ جسمانی خصوصیات کے لئے تیار ذریعہ چیک کریں جن میں شامل ہیں: بلبلوں کے لئے جانچ پڑتال، غیر معمولی سطح، پلیٹیں رٹیوں کی ناکافی بھرتی، contamination اور جل کی طاقت۔

۲۔ تیار کردہ ہر میڈیا کی جانچ پڑتال کریں۔ 10-5 فیصد تیار کردہ کلچر میڈیا کو 35 0C پر 48 گھنٹوں کے لئے Incubate کریں۔

۳۔ 10agr فیصد سے زیادہ آلودگی پر پورے بیچ کو ضائع کر دے، sporadic آلودگی کو نظر انداز کر دیں۔

۴۔ کمرے کے درجہ حرارت کو نیچے لانے کے بعد درمیانے pH کی جانچ پڑتال کریں۔

۵۔ ہر بیچ سے کم سے کم ۲۔۵ پلیٹوں کی Depth کی جانچ پڑتال کریں۔

۶۔ MHA کلچر میڈیا pH 7.2 سے 7.4 کے درمیان ہونا چاہیئے۔

Media recommended for non-fastidious organisms

Organisms حیاتیات	Media recommended میڈیا کی سفارش
Enterobacteriacae Pseudomonas species Acinetobacter species Staphylococcus species Enterococcus species Stenotrophomonas maltophilia	Mueller Hinton Agar

Media for fastidious organisms

Organisms	Media recommended
Streptococcus pneumoniae Viridians group streptococci Moraxella cattarhalis Streptococcus species group A,B,C and G Pasturella multocida Campylobacter species Aerococcus species	Mueller Hinton Agar + 5% defibrinated blood + 20 mg/L ? NAD

Week 3

سیکھنے کا نتیجہ:

اس ہفتے ہم حساسیت کی جانچ کے مختلف طریقہ کار پر تبادلہ خیال کریں گے۔

AST انجام دینے کے لئے استعمال کرنے والے طریقے:

مختلف antimicrobial ایجنٹوں کے لئے حساسیت سمیت مختلف طریقوں کی طرف سے کارکردگی کا مظاہرہ کیا جا سکتا ہے بشمول:

ا۔ Diffusion method

الف۔ کربی باؤر (Kirby Bauer)

۲۔Dilution methods

الف۔Broth dilution

Micro broth dilution method☆

Micro broth dilution method☆

ب۔Agar dilution

ی۔E-test

۱۔**Diffusion method**:اس طریقہ کار میں antimicrobial ایجنٹ فلٹر کاغذ کے ڈسک کی صورت میں agar پلیٹ پر رکھی جاتی ہے جو پہلے سے ہی ٹیسٹ حیاتیات کے ساتھ بیج کیا جاتا ہے۔

ایک۔کربی Bauer طریقہ:

یہ سب سے پسندیدہ طریقہ ہے۔اس حساسیت ٹیسٹ کو انجام دینے کے لئے مندرجہ ذیل عمل کرنا ضروری ہے۔

۱۔کالونیوں کا انتخاب منتخب کریں

۲۔انوکولم تیار کریں(Prepare inoculum suspension)

۳۔Inoculate plate

۴۔ antimicrobial لگائیں

۵۔Incubate

۶۔موصول زون کے سائز کا اندازہ تعین کریں

۷۔نتائج کی وضاحت

۸۔QC حفاظتی حساسیت کی جانچ

۹۔ڈسک پھیلاؤ حساسیت کی جانچ کے Dos اور don'ts

۱۔ کالونیوں کا انتخاب:

حساسیت ٹیسٹ کی کارکردگی کا مظاہرہ کرنے میں یہ سب سے اہم قدم ہے۔ایک Non selective agar سے،اچھی طرح سے یا ۲ سے ۳ الگ الگ کالونیوں کو (inoculum) تیار کرنے کے لئیا ستعمال کریں۔

۲۔inoculum(انوولوم) تیار کریں:

انوولوم کی0.5Turbidity (Mc Farland turbidity) معیاری سے ملنا چاہیئے۔ٹربائڈیڈ ایڈجسٹمنٹ کے لئے ایک فوٹوگرافی آلہ استعمال کیا جاتا ہے یا سفید فریم کے خلاف میک فارلینڈ ٹیوبوں کے ساتھ ملایا جاتا ہے، پلیٹوں کو انوولوم معطلی کی تیاری کے 15 منٹ کے اندر استعمال ہونا چاہیئے۔

۳۔(Inoculate plates) :

ریفریجریٹر سے MHA کی (Agar) پلیٹیں لے کر کمرے کے درجہ حرارت پر آنے دیں۔Agar سطح پر نمی نہیں ہونا چاہیئے، اگر اضافی نمی ہے تو incubator میں 10-15 منٹ کے لئے lidsajar کے ساتھ پلیٹیں چھوڑ دیں۔تیار شدہ انوکولم میں ایک cotton swab کو dip کریں، تین سمتوں روٹر کو استعمال کرتے ہوئے پوری سطح پر پھیلا دیں۔

۴۔antimicrobial ڈسک کی لگانا:

ڈسک کو 10 سے 15 منٹ کے اندر پلیٹ پر لگانا چاہیئے۔ڈسک ایک دوسرے کے قریب نہیں ہونا چاہیئے، عام طور پر 150 ملی میٹر پلیٹ پر 100 ڈسک اور ایک سو ملی میٹر پر چھ ڈسک کو لگایا جاسکتا ہے۔ڈسک کو ایک بار پلیٹ پر رکھنے کے بعد دوبارہ منتقل نہیں کیا جانا چاہیئے Agar کی سطح سے ڈسک کا مکمل رابطہ ہونا چاہیئے، forcep کے ساتھ یا ڈسک ڈسپنسر کے ساتھ ڈسک کو استعمال کیا جاسکتا ہے۔اگر ڈسک forcep سے لگانا پڑتا ہے تو ڈسک کو پلیٹ کے کناروں کے قریب رکھنے یا ایک دوسرے کے قریب رکھنے سے بچائیں۔

۵۔Incubation:

پلیٹوں کو 35 C پر تقریبا 16-20 گھنٹے تک رکھیں۔Fastidious مائکروبیزم کی صورت میں جیسے H.influenzea, ،S.pneumoniae, ،Neisseria species میں 350C - 370C پر ۵ فیصد Co2 کے ساتھ incubate کریں۔

زون کے سائز کی پیمائش کرنا:

نتائج کا مشاہدہ کریں اور زون کے سائز کو نوٹ کریں۔ایک کیلپر کا استعمال کرتے ہوئے یا پیمانے کا استعمال کر کے زون کے سائز کو قریب ترین ملی میٹر سے نوٹ کریں۔

ایم ایچ اے کے Agar پلیٹوں کو پلیٹ کے پیچھے سے زون کے سائز کی پیمائش کی طرف سے پڑھا جاتا ہے جبکہ ۵ فیصد SBMHA پلیٹ کے سامنے سے زون سائز پڑھنے چاہئیں۔

۷۔ Result interpretation:

نتائج صرف اس صورت میں پڑھنا پڑھ سکتا ہے کہ جب کنٹرول کا نتیجہ acceptable ہو، کلینیکل لیبارٹری کے معیاری ادارے (CLSI) یا اس کے یورپی ہم منصب، یورپی کمیٹی حساسیت ٹیسٹنگ (EUCAST) کے حوالے سے تشریح کی جائے۔

نتائج کی پیمائش اور تشریح کرنے کے لئے کچھ زون کے سائز مشکل ہو سکتے ہیں: ڈبل زون ایک mixed culture وجہ سے ہو سکتی ہے، پروٹس اور trimethoprim سلیفا میتھوکسازول ڈسک کے لئے inhibition zone کے اندر کے اندر ایک layer کو نظر انداز کیا جاتا ہے۔

staphylococcus کے لئے آکسیکلین ڈسک کے اردگرد کوئی growth یا zone بہت اہم ہے اور نظر انداز نہیں کیا جانا چاہئے۔ مثال کے طور پر امپیکر وینل ڈسک کے اردگرد موصول ہونے والی antimicrobial حساسیت اور زون کے سائز کے لئے disc diffusion کے طریقوں کی جانچ کے لئے staphylococcus کی جانچ کے لئے 15 ملی میٹر کے طور پر ماپا جاتا ہے، CLSI ہدایت کی پیروی کریں جو اسے " انٹرمیڈیٹ " کے طور پر تفسیر کی جاتی ہے۔

Interpretation categories:

Susceptible: suceptible کا مطلب یہ ہے کہ اینٹی بایوٹک ٹیسٹ کردہ جراثیم کے خاتمہ کے لئے کامیابی کے ساتھ استعمال کی جا سکتی ہے جب تک کہ انفیکشن کی اس مخصوص سائٹ کے لئے سفارش نہیں کی جاتی ہے۔

انٹرمیڈیٹ: یہ اینٹی بائیوٹک موثر طریقے سے جسمانی سائٹ میں موثر ثابت ہو سکتی ہے جہاں ادویات concentrate ہوتی ہے یا زیادہ خوراک استعمال ہوتی ہے۔

Resistant: یہ antimicrobial مادہ ٹیسٹ کردہ جراثیم کے خلاف غیر فعال ہے اور مریض کے علاج کے لئے استعمال نہیں کیا جانا چاہیئے۔

۸۔ نگرانی کی جانچ کی کارکردگی:

☆ کوالٹی کنٹرول کنٹروں کو روزانہ یا ہفتے میں کم سے کم چار مرتبہ ٹیسٹ کیا جانا چاہیئے۔

☆ یاد رکھیں کہ QC کے نتائج بڑے یا چھوٹے زون کے رجحانات کی نگرانی کرنے کے لئے مستقل طور پر ایک مقررہ وقت کی مدت کے لئے سامنا کرنا پڑتا ہے۔

Table 2C. Staphyiococcus spp. (unable to paste this pic from english version)

۹۔Susceptibility testing کا کوالٹی کنٹرول:

☆ہر Drug - bug، combination کے لئے ریفرنس بیکٹریا ٹیسٹ ہونے چاہیے، مثال کے طور پر E.coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

☆QC strains کے زون کے سائز کو مقررہ حد کے اندر ہونا چاہیے۔

☆QC strains کو برقرار رکھنا چاہیے -20C پر اور ریگولر بنیاد پر ٹیسٹ کرتے رہنا چاہیے

☆QC strains کے درست نتیجے سے پتہ چلتا ہے کہ ٹیسٹ مناسب طریقے سے کام کر رہا ہے۔

10۔حساسیت کی جانچ میں source of errors:

☆میڈیا کی ساخت حساسیت کی جانچ کے نتائج کو موثر کر سکتا ہے۔

☆Inoculum سائز

☆درجہ حرارت اور ماحول کو کنٹرول کیا جانا چاہیے۔

☆زون کے سائز کی غلط پیمائش

☆مکس growth

☆Expired اینٹی بائیوٹک ڈسک

☆غلط اسٹوریج کی وجہ سے ڈسک کا Ineffective ہو جانا یا potency کم ہو جانا

Disc diffusion طریقہ کے فوائد اور نقصانات:

☆یہ نسبتن سستا ہے۔

☆انجام دینے میں آسان ہے۔

☆نتائج کی آسانی سے تشریح کی جا سکتی ہے۔

نقصانات میں شامل ہیں:

☆نتائج کو کئی عوامل کی طرف سے اثر انداز کیا جا سکتا ہے، بشمول agar کی موٹائی، انوولوم سائز، Incubation کے حالات، اینٹی بائیوٹک ڈسک وغیرہ۔

ب۔Stokes کے طریقے:

☆اس طریقے میں ایک agar پلیٹ میں ٹیسٹ organism اور کنٹرول organism کو Lawn کیا جاتا ہے۔ اینٹی بائیوٹک ڈسک کو انٹرفیس پر رکھا جاتا ہے۔ یہ طریقہ کار عام طور پر antibiotic ڈسک کے معیار کو چیک کرنے کے استعمال کیا جاتا ہے۔

Disc Diffusion کے Dos اور don'ts:

Dos:

☆اس ٹیسٹ کیلئے چوبیس(24) گھنٹے کی growth کا استعمال کریں۔

☆پندرہ منٹ کے اندر اندر تیار Inoculum سے حیاتیات کا ایک لان منائیں۔

☆ایک بار جب زرعی پلیٹ پر حیاتیات کا لین منایا جاتا ہے تو پندرہ منٹ کے اندر اندر antimicrobial ڈسک لگاتے ہے۔

☆(agar) کا پی ایچ 7.2 سے 7.4 کے درمیان ہونا چاہیئے۔

☆لیبارٹری کے پروٹوکول کے مطابق باقاعدگی سے وقفے پر کوالٹی کنٹرول یا ATCC حیاتیات کا تجزیہ کیا جانا چاہیئے۔

☆زون کے اندر بڑے بڑے کالونیوں کو دوبارہ شناخت اور دوبارہ test کیا جانا چاہیئے۔

☆اگر صرف کالونیاں الگ الگ نظر آئیں تو اس کا مطلب یہ ہے کہ انوولم بہت ہلکا تھا۔اس ٹیسٹ کو repeat کرنا چاہئے۔

☆زون ڈائی میٹروں کو rulers یا calipers (کیلوری) کے ساتھ درست طریقے سے ماپا جانا چاہئے۔

☆اگر QC کے نتائج مسلسل حد سے باہر رہتے ہیں تو ایک منظمی غلطی کی نشاندہی کی جاسکتی ہے۔

☆agar کی پلیٹوں کو آٹوکلیشن سے پہلے کمرے کے درجہ حرارت پر ہونا چاہئے۔

Don'ts:

☆ ڈسک کو ایک دوسرے سے 24 ملی میٹر سے زیادہ قریب نہیں رکھنا چاہئے۔

☆چھ سے زائد ڈسک کو 90 ملی میٹر پلیٹ پر ٹیسٹ نہیں کیا جانا چاہئے۔

☆agar کی سطح سے رابطے میں آنے کے بعد ڈسک کو منتقل نہ کریں۔

☆ختم ہونے کی تاریخ سے باہر اینٹی بائیوٹک ڈسک استعمال نہ کریں۔

☆agar پلیٹ پر mixed growth ہو تو نتائج کی تشریح نہیں کرتے،خالص inoculum کے ساتھ ٹیسٹ کو دوبارہ کیا جانا چاہئے۔

☆Inoculum بہت زیادہ یا بہت ہلکا ہے تو نتائج نہیں پڑھتے ہیں۔

☆اگر کنٹرول زون سائز کی حد سے باہر ہیں تو ٹیسٹ درست نہیں ہے،اگر 20 ٹیسٹ میں سے مقررہ حد سے باہر ہیں تو ں نظام کے جائزے کا مشورہ دیا جاتا ہے۔

Week 4

MIC کے فوائد:

☆ یہ غیر معمولی مزاحمت کے پیٹرن کی تصدیق کرنے کے لئے استعمال کیا جاتا ہے۔

☆ boarder line نتیجہ ڈسک test کے ذریعہ حاصل ہوتا ہے۔

☆ جب کسی خاص اینٹی بایوٹک کا کسی organisms سے disc diffusion رزلٹ کے وقت ناقابل اعتماد نتائج دے سکتا ہے۔

☆ وسیع پیمانے پر antimicrobial مزاحمت کی survellance میں استعمال کیا جاتا ہے۔

☆ نئے antimicrobial ادویات کے موازنہ جانچ میں استعمال کیا جاتا ہے۔

☆ حساسیت کے پیٹرنوں میں Epidemiological کا مطالعہ۔

☆ جب مریض کے کلینکل مینجمنٹ کے لئے quantitative نتائج کی ضرورت ہوتی ہے۔

MIC مختلف طریقے سے کارکردگی کا مظاہرہ کیا جاسکتا ہے

الف) Agar dilution

ب) Gradient diffusion کا طریقہ

ج) Broth dilution

☆ (Macro broth dilution)

☆ (Micro broth dilution method)

Agar dilution method کا طریقہ:

اینٹی بائیوٹک اسٹاک اور اینٹی بائیوٹک کی dilution کو تیار کریں جیسا کہ پہلے بیان کیا گیا ہے۔ اب مندرجہ ذیل agar کی پلیٹیں تیار کریں اگر ہمیں dilution range کی ضرورت ہے تو مثال کے طور پر 0.125۔128ug/ml تو یہ ٹیسٹ ٹیوبز چاہئے ہونگی 128، 64، 32، 16، 8، 4، 2، 1، 0.5، 0.125، 0 mg/l۔ 10,000 اسٹاک tube سے مقررہ مقدار ٹیسٹ ٹیوبز میں شامل کریں گیا آخری ٹیوب میں اینٹی بایوٹک شامل نہیں ہوتی یہ growth کنٹرول کے طور پر کام کرتی ہے۔

Agar dilution پلیٹیں کی تیاری: اینٹی بائیوٹک فری کنٹرول ٹیوب سمیت ہر کنٹینرز میں 20 ملی لیٹر (agar) ڈالیں۔ انہیں اچھی طرح مکس کریں اور 90 ملی میٹر پلیٹوں میں ڈالتے جائیں agar کو جمنے دیں، پلیٹوں کو اسی روز استعمال کریں یا چار سے آٹھ (4-8 C) پر اسٹور کریں۔

Inoculum کی تیاری: **Test isolate** کی الگ الگ کالونیوں کو لے کر ٹیسٹ کی inoculum کو تیار کریں جب تک ٹربائڈیٹی 0.5 میک فارلینڈ معیار کے برابر ہو۔ bacteroides ،staphylococcus,،enterobacteriacae acinetobacter,pseudomonas,streptococci, species کیلئے اس inoculum کو dilute 1:10 کیا جاتا ہے۔(10 cfu/ spot)

Inoculation: agar کی سطح پر 2-1 مقدار ٹرانسفر کریں اور اچھی طرح dry کریں اسکے لئے ملٹی پوائنٹ Incculator کا استعمال بھی کیا جاسکتا ہے۔

Incubation: پلیٹوں کو 35۔37 ڈگری پر Incubate کریں Haemophilus یا pneumococci کی پلیٹیں CO2 %4-6 کے ساتھ انکوبیٹ کیا جانا چاہئے۔

Reading & Interpretation: سب سے پہلے کنٹرول کو دیکھا جاتا ہے۔ اینٹی بائیوٹک فری پلیٹس پر تمام ٹیسٹ organism کو grow کرنا چاہیے MIC وہ پوائنٹ ہے جس پر antibiotic کی کم سے کم مقدار organisms کی MIC تجویز شدہ رینج کے اندر ہونی چاہئے

Aga dilution طریقہ کے فوائد:

☆ایک پلیٹ پر متعدد organisms کو ٹیسٹ کیا جاسکتا ہے۔

☆درست MIC کا تعین کیا جاسکتا ہے

☆کسی Mutatnts یا contninant آسانی سے شناخت کیا جاسکتا ہے۔

☆اینٹی بائیوٹک concentration range کی آسانی سے توسیع کی جاسکتی ہے۔

نقصانات:

☆پلیٹوں کے واحد سیٹ پر صرف ایک اینٹی بائیوٹک ٹیسٹ کیا جاسکتا ہے۔

☆اس طریقہ کار میں وقت درکار ہے اور محنت طلب ہے، جس میں وسیع پیمانے پر تکنیکی وسائل کی ضرورت ہوتی ہے۔

☆پروٹس proteus کی swarming MIC پڑھنے میں مشکل پیدا کرسکتی ہے

☆اینٹی بائیوٹکس کے ساتھ پلیٹس جلد Expire ہو جاتی ہیں، ان پلیٹوں کو استعمال کرنے میں تاخیر ہونے کی صورت میں اینٹی بائیوٹک خرابی کا نتیجہ ہوسکتا ہے۔

Table 23-1 Pseudomonas unable to draw or paste in urdu version

ب۔ای ٹیسٹ کا طریقہ کار: ای ٹیسٹ ایک پلاسٹک کی سٹرپ ہے جس پر اینٹی بایوٹک کی مقررہ مقدار coated ہوتی ہے۔ یہ طریقہ بہت کم لیول کی resistance کو defect کرنے کے لئے بہت کارآمد ہے اسکے علاوہ خاص Resistance pattern کو دیکھنے کیلئے جیسے ESBL، Ampc وغیرہ۔

اصول: ای ٹیسٹ ایک quantitative تکنیک ہے جو کہ dilution اور diffusion کے اصولوں پر مبنی ہے۔

طریقہ کار: فریزر 20 0C- سے اسٹرپس نکالیں اور اسے کمرے کے درجہ حرارت پر لے آئیں۔

نان سلیکٹو آگر اچھی طرح سے الگ الگ کالونیوں کو چن لیں اور اسٹرائل سیلائن میں جذب کریں تا کہ 0.5 میکفارلینڈ ٹربڈٹی حاصل ہو سکے

ایک اسٹرائل swab کے ساتھ agar کی سطح پر ایک یونیفارم Lawn تیار کریں۔
ایک forcep کا استعمال کرتے ہوئے آہستہ آہستہ MIC سٹرپ کو agar سطح رکھیں، اس بات کا خیال رکھیں کہ ایک بار agar پٹی کی سطح کو چھو لے تو اسے منتقل نہیں کیا جا سکتا۔

organisms کی growth کی ضرورت کے مطابق پلیٹ کو Incubate کر دیں۔

Inhibition زون کا مشاہدہ کریں اور پڑھیں، MIC کو اس کے نقطہ نظر کے طور پر پڑھیں اور جہاں growth Inhibition اور E strip ملتی ہیں

اگر لان بہت ہلکی یا بہت heavy ہے یا پلیٹ پر contamination ہے تو ٹیسٹ دوبارہ کرنا ضروری ہے۔

CLSI/EUCAST کی ہدایت کے مطابق MIC ریڈنگ کی وضاحت، CLSI 2016 ہدایات پر جانے کے لئے مندرجہ ذیل لنک پر کریں
http://ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf

Broth dilution کا طریقہ: اس طریقہ میں organisms کو اینٹی بایوٹک کی مختلف dilution کی سیریز کے ساتھ ٹیسٹ کیا جاتا ہے۔ اس ٹیسٹ میں 0.05-0.1 ml کی مقدار میں اینٹی بایوٹک dilution کو ٹیسٹ کیا جاتا ہے۔ میکرو بروتھ طریقہ میں بھی اسی طریقہ سے مختلف dilutions کے ساتھ جراثیم کی growth inhibition ٹیسٹ کی جاتی ہے مگر اس طریقہ میں volume زیادہ استعمال ہوتا ہے۔

Broth dilution کرنے کا طریقہ مندرجہ ذیل اقدامات پر مشتمل ہے

☆اینٹی بائیوٹک stock کی تیاری

☆ اینٹی بائیوٹک کی dilutions کی تیاری

☆agar کی dilutions کی تیاری

☆Inoculum کی تیاری

☆Inocubation

☆Incubation

☆پڑھنا اور تشریح

i۔Macro broth dilution کا طریقہ:

سامان رمواد کی ضرورت:

☆Pipettes

☆ڈسپوزایبل پائپیٹ

☆اینٹی بائیوٹک پاؤڈر

☆(CAMHB) اسٹیرائل Mueller hinton broth

☆اسٹرائیل پیٹری پلیٹ

☆اسٹرائیل فالکن ٹیوبیں (اینٹی بائیوٹک اسٹاک تیار کرنے کے لئے)

☆اسٹرائل پانی

☆وزن توازن

☆Vortex mixer

ب۔ اینٹی بائیوٹک اسٹاک (ذخیرہ) کی تیاری:

ہمیشہ قابل قدر سپلائر سے اینٹی بائیوٹک پاوڈر حاصل کریں۔ختم ہونے کی تاریخ،اسٹوریج کے حالات،solubility،potency وغیرہ اچھی طرح چیک کریں۔

اینٹی بایوٹک کا سلوشن بنانے کیلئے مندرجہ ذیل فارمولا استعمال کیا جائیگا جبکہ ہمیں اینٹی بایوٹک کی Potency معلوم ہو۔

ای۔ پندرہ منٹ کے اندر اندر انوولم کو 1 : 150 مزید dilute کیا جاتا ہے جو کہ 1x106 cfu/ml کے برابر ہے۔ PBS کے اس ۵ میلی میٹر کو ایک ٹیوب میں لیا جاتا ہے او 33 ul کو خارج کر دیا جاتا ہے، ۳۳ حجم کو Inoculum 0.5 McFarland سپینشن ڈالا جاتا ہے اور اچھی طرح مکس کیا جاتا ہے۔

ف۔ بعد میں 1:2 dilution کیجاتی ہے 5x105 cfu/ml کی dilution حاصل ہوتی ہے۔

جی۔ **Inoculation**: ہر ٹیوب جس میں املی لیٹر اینٹی بایوٹک dilution موجود ہے Inoculum uspeniion ڈالا جاتا ہے اسی طرح positive کنٹرول میں بھی Inoculum1ml ڈالیں۔

ح۔ **Incubation**: 35oC پر 18-20 گھنٹے کے لئے Incubate کریں۔

م۔ **تشریح**: سب سے پہلے کنٹرول ٹیوبیں دیکھیں جن میں growth ہونا چاہئے اس growth کو test wells کی growth سے موازنہ کریں۔ کنٹرول ٹیوبوں میں turbidity کا ہونا ضروری ہے۔ اینٹی بایوٹک کی سب سے کم مقدار جو organisms کی گروتھ کو روک دے MIC کہا جاتا ہے۔

Broth dilution کے طریقوں کے فوائد اور نقصانات:

☆ اس کو perform کرنے کے لئے ماہر اسٹاف کی ضرورت ہوتی ہے جو بخوبی pipetting کر سکے اور stock تیار کر سکے۔

☆ وقت درکار ہے۔

فوائد:

☆ بروتھ dilution کا طریقہ کافی accurate ہے۔

☆ organisms کے بارے میں quantitative data حاصل کیا جا سکتا ہے۔

☆ Automation اور معیار بندی ممکن ہے۔

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml) x concentration (ug/ml)}}{\text{Potency (ug/ml)}}$$

یا

$$\text{Volume (ml)} = \frac{\text{Weight (mg) x Potency (ug/ml)}}{\text{Concentration (ug/ml)}}$$

☆ جو highest dilution درکار ہو اینٹی بایوٹک سلوشن اس سے دس گنا زیادہ concentrade تیار کیا جاتا ہے۔

☆ ادویات کی درکار solvent کی پیمائش کریں۔

☆ ایک کنٹینر میں اینٹی بایوٹک پاؤڈر اور solvent کو مکس کریں۔

☆ اس کو Membrane filter بھی کیا جاسکتا ہے۔

☆ 1.5 ملز کو ٹیوب میں ڈال کر 60o- پر فریز کردیں۔

☆ منجمد اینٹی بائیوٹک stock کی شیلیں صرف ایک بار پھگلانی چاہئے اسکے بعد ضائع کردیں۔

سی۔ اینٹی بائیوٹک کی dilution کی تیاری:

☆ کام کرنے والی اینٹی بائیوٹک dilutions کی تیاری کے لئے جراثیمی conical ٹیوب لیبل کریں۔

☆ ۳ میلی لیٹر اسٹیل پانی کے اسٹاک کے حل کے لئے ایک ملی لیٹر کشید کردہ پانی شامل کریں۔

د۔ inoculum کی تیاری:

☆ 18-24 گھنٹے کی growth کو منتخب کریں، ایک 0.5 McFarland معیاری (1-2 X 10 8 cfu/ml) کے برابر turbidity کو ایڈجسٹ کریں۔

Unable to paste or draw in inpage

Decreasing antibiotic concentration (picture)

	Abx control	___ µg/ml	___ µg/ml	___ µg/ml	___ µg/ml	___ µg/ml	___ µg/ml	___ µg/ml	___ µg/ml	___ µg/ml	___ µg/ml	___ Growth control
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
QC	A											
QC	B											
	C											
Test	D											
Test	E											
	F											
	G											
	H											CAMHB control

ضروری مواد:

☆Pipettes، Multi-channel pipette اگر دستیاب ہیں

☆ pipette

☆اینٹی بائیوٹک پاؤڈر

☆Mueller hinton cation adjusted بروتھ (CAMHB)

☆جراثیم سے پاک برتن

☆فالکن ٹیوبز (اینٹی بائیوا سائک تیار کرنے کے لئے)

☆جراثیم سے پاک پانی

☆Weighing balance

☆Micotitre plates96

☆Vortex mixer

تیاری:

☆پلیٹوں کو نشان زد کریں جیسا کہ اوپر کیا گیا ہے۔

☆غیر fastidious microorganisms کے لئے Mueller hinton بروتھ کو ایڈجسٹ کرنے کی ضرورت ہے۔

☆microtitre plate میں اینٹی بائیوٹک مادہ کی مقدار اصل کام کرنے والے حراستی سے دوگنا زیدہ ہونی چاہئے۔

☆ Well 1 اینٹی بائیوٹک کنٹرول کے طور پر کام کرتا ہے۔(Antibiotic +CAMHB)

☆Well 2 ug/mL قطار میں سب سے زیادہ اینٹی بائیوٹک concentration well ہے۔

☆ Well 3-11 are antibiotic serial dilutions

☆ Well 11 اس قطار میں سب سے کم حراستی dilution ہے

☆Well 12 گروتھ کا کنٹرول ہے(صرف CAMBH + حیاتیاتی معطلی پر مشتمل ہے)

☆قطار بی میں دیگر الگ الگ ٹیسٹ کیے جاسکتے ہیں

☆12 H sterility control well, only CAMHB

طریقہ کار:

☆ایک باضابطہ جراثیمی pipette کا استعمال کرتے ہوئے اچھی طرح سے 1A میں 200 uL اینٹی بائیوٹک حل کو تقسیم کریں۔

☆From well 2 till 12 A dispense 100 uL of CAMBH

☆well 1A سے 100 uL اینٹی بائیوٹک کو اچھی طرح سے منتقل کریں اور اچھی طرح سے CAMBH کے ساتھ well 2A میں ملائیں، اس بات کا خیال رکھیں کہ مرکب مائع کو تقسیم کرتے وقت چھینٹے نہ اڑائیں۔

☆CAMBHاورانٹی بائیوٹک سلوشن کواچھی طرح مکس کرکے dilute serially کرتے جائیں well 11 تک پھر100uL ضائع کردیں۔

☆ Well 12Aواحد CAMHBہے جس میں انٹی بائیوٹک شامل نہیں ہے۔

☆organisms کے سلوشن کو dilute1:150 کریں پھر 100 uL مقدار 2 سے A 12 تک wellsمیں ڈالیں۔

☆انٹی بائیوٹک کنٹرول میں CAMBH100 uL شامل کریں۔

☆سیریلٹی کنٹرول میں اچھی طرح سے CAMHB کے 200 uL شامل کریں۔

☆پلیٹوں کو جراثیمی ڈھال یا پارفیلم سے ڈھانپیں۔

☆Inoculation کے پندرہ منٹ کے اندراندر، پلیٹ کو 20C ± 35 میں 20-18 گھنٹے کے لئے Incubator میں رکھیں۔

☆incubation کے بعد نتائج کونوٹ کریں۔

نتائج مشاہدے اور تشریح:

☆inoculum کی purity جانچ پڑتال اور ترقی کا مشاہدہ purity کی پلیٹ سے کریں۔

☆انٹی بائیوٹک اور sterility کو اچھی طرح سے دیکھیں۔

☆گروتھ کنٹرول well میں اچھی گروتھ حاصل ہونی چاہیے۔

☆ Sterility کنٹرول اور انٹی بائیوٹک کنٹرول میں کوئی اضافہ نہیں ہونا چاہئے۔

☆CLSI میں بیان کردہ تجویز کردہ مقدار کے اندراندر کنٹرول حیاتیات کے MIC ہونا ضروری ہے۔

☆ٹیسٹ اسی صورت میں درست ہے اگر کنٹرول حیاتیات MIC سفارش کردہ مقدار کے اندر آتا ہے۔

☆ٹیسٹ اس صورت میں غلط ہوسکتا ہے اگر sterility کنٹرول میں نشونمارترقی ہو یا نشونمارترقی ہو۔

☆اگر کنٹرول کائیاں، sterility کنٹرول ٹھیک ہے تو کم سے کم غیر موثر حراستی (MICs) کونوٹ کریں۔

☆MIC انٹی بائیوٹک کی سب سے کم dilution ہے جس میں مکمل طور پر microorganisms کی نشونمارترقی رک گئی ہو۔

antimicrobial حساسیت کی جانچ میں حالیہ ترقی:

دستی ٹیسٹنگ کے طریقوں کے مقابلے میں کم سے کم وقت میں قابل اعتماد درستگی کے ساتھ antimicrobial حساسیت کا نظام انجام دینے کے لئے کودکار طریقے سے مختلف قسم کے نظام دستیاب ہے۔

مختلف automation کے اختیارات میں صرف چار ہی دستیاب ہیں جو فی الحال FDA سے منظور شدہ ہے۔

Microscan:

یہ ایک خودمختی انکیوبیٹر اور ریڈر ہے۔ جو ایک وقت میں چار microtitre پلیٹوں کو اکٹھا اور تجزیہ کرسکتا ہے۔ microtitr پلیٹ دستی طقر پر inoculated اور آلہ میں دستیاب پلیٹ سلاٹ میں داخل کیا جاتا ہے، پلیٹ مخصوص وقت کی مدت کے لئے آلہ کے اندر رہتی ہے۔ اضافہ انضمام مرحلے کے دوران metrically تصویر کی جانچ پڑتال کی جاتی ہے۔ گرام منفی حساس آزمائشی ٹیسٹ پینل جس میں fluorogenic substrates شامل ہے 7-3.5 تک پڑھ سکتے ہیں۔ turbid metric اختتام

colorimetric پڑھنے تیز رفتار پینل ہیں۔

فینکس Phoenix:

یہ آلہ ایک ریڈر ہے جس میں اینٹی بائیوٹک دوگنا ہونے والی 99 ٹیسٹ پینل پڑھنے کے قابل ہے۔ یہ پینل دستی طور پر inoculated کیے جاتے ہیں اور ان آلہ کے اندر incubated کیا جاتا ہے جس میں ہر پینل کو ہر 20 منٹ پر پڑھا جاتا ہے۔ یہ آلہ turbidometric اور colorimetric نشوونما (ترقی) کا پتہ چلتا ہے، MIC زیادہ سے زیادہ 16 گھنٹوں میں دستیاب ہوتے ہیں۔

Vitek:

یہ آلہ compact کارڈ پر مشتمل ہے جس میں مختلف حیاتیات کے گروپوں اور اینٹی بائیوٹکس اور شناختی میگزین کے لئے دستیاب ہیں۔ جن میں microliter کی مقدار شامل ہیں جن میں 30 micro cuvettes شامل ہے جو کہ capillaries سے منسلک ہوتی ہے جو کہ rehydrate میڈیا اور ٹیسٹ میڈیا کے کام کرتا ہے۔ incubation کارڈز کے دوران turbidometrically کی نگرانی کی جاتی ہے۔ جس کے نتائج وقفے وقفے سے 10-15 گھنٹے کی مدت کے دوران دستیاب ہوتے ہیں۔

Sensititre ARIS:

معیاری 96 microtitre plates کے ساتھ Sensititre auto inoculator شامل ہے۔ اس پینل کو خودکار طریقے سے جانچنے کے لئے 64 پینل خودکار طریقے سے 18-24 گھنٹوں کے لئے جمع کیا جاتا ہے۔ نشوونما/ترقی fluorescence کو سے ماپا جاتا ہے۔

automation کے فوائد اور نقصانات:

سب سے پہلے ہم خودکار طریقے سے antimicrobial susceptibility ٹیسٹ کے فوائد کی فہرست جن میں شامل ہیں:

☆ خودکار طریقے سے نظام کی دوبارہ تخلیق کے نتائج کو بہتر بناتا ہے۔

☆ ٹیسٹنگ اور شناخت کے دستی طریقوں کے مقابلے میں خودکار طریقے سے مزدوری کی ضروریات کو کم کر دیتا ہے۔

☆ یہ antimicrobial حساسیت کی جانچ کی ابتدائی رپورٹنگ کے نتیجے میں ہوسکتا ہے جس کے نتیجے میں بروقت antimicrobial تھراپی کی قیادت کر سکتے ہیں۔

☆ اضافی جانچ کی مدت میں وقت بچاتا ہے، بار بار جانچ پڑتال، ٹیک وقت اور نتائج کو دستی طور پر کمپیوٹر سوفٹ ویئر میں درج کریں۔

☆ جیسا کہ ان نظاموں نے MICs کی رپورٹ کی ہے، ابھرتی ہوئی مزاحمت کی شناخت کا ایک بہت بڑا موقع ہے۔

Week 5

MIC ٹیسٹنگ کے لئے برتھ مائکروبیول طریقہ:

☆(MIC) کے ساتھ آگے بڑھنے سے قبل ٹیسٹ کرنے والے اینٹی میکروبیل ایجنٹ کے لئے بریک پوئنٹس اقدار کو جاننا چاہئے۔

☆صرف خالص، 18-24 گھنٹوں کی pure growth کا استعمال کرنا لازمی ہے۔

☆اس فارمولے کو استعمال کر کے Antibiotic powder سے ضرورت کے مطابق سلوشن بنایا جا سکتا ہے

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml) x concentration (ug/ml)}}{\text{Potency (ug/ml)}}$$

یا

$$\text{Volume (ml)} = \frac{\text{Weight (mg) x Potency (ug/ml)}}{\text{Concerntration ug/ml}}$$

☆0.015-32 ug/mL سے اینٹی بائیوٹک رینج کے ساتھ microtitre plates تیار کریں۔

☆spectrophotometer یا turbidometer کا استعمال کرتے ہوئے turbidity کو ایڈجسٹ کر کے 0.5 حیاتیاتی ٹیسٹ کے McFarland suspension کو تیار کریں۔

☆تقریباً 5x 105 cfu/mL حاصل کرنے کے لئے اس suspension کو dilute1:150 کر دیں۔

☆اگر ٹیوبوں میں PBS معطلی 2.5 ml کی تیاری کر رہے ہیں تو ٹیوب میں سے 16.5 ulPBS لے لیں، اس طرح مطلوبہ turbidity حاصل ہو جائیگی۔

☆ایک 96well microtitre plate پلیٹ لیں اور تاریخ اور نمونہ نمبر کے ساتھ لیبل کر لیں۔

نقصانات میں شامل ہے:

☆ کم کثرت ٹیسٹ کے لئے antimicrobials کی ضرورت کے طور پر شامل نہیں کیا جاسکتا۔

☆ کچھ antimicrobial-microrganism کے مجموعوں کے ساتھ مسائل کی اطلاع دی گئی ہے۔

☆ خودکار طریقے میں خرابی کے معاملے میں دستی بیک اپ کی ہمیشہ ہوتی ہے۔

☆ قابل اعتماد تیکنیکی معاونت کی ضرورت ہے۔

☆ دستی طریقہ کار کے مقابلے میں یہ مہنگا طریقہ ہے لہذا یہ لیباٹریز کے لئے مناسب اختیار نہیں ہوسکتا بلکہ انفرادی لیباٹریوں پر کام کا دباؤ، اس کے نمونہ حاصل کرنے اور انسانی طاقت وغیرہ پر منحصر ہے۔