

עדכון: 1.8.2019

חומרים אנטיביוטיים

הצעות לשילוב ניסויים בנושא "רגישות חיידקים לחומרים אנטיביוטיים" במהלך ההוראה ובמסגרת עבודת ביוחקר.
תודה לכל מי שקראו והעירו: לד"ר מיכל מנדלוביץ, למנחים ולמורים ממחוז מרכז שהשתתפו בהשתלמות.

מעט על ההיסטוריה

בעבר הגדירו חומרים אנטיביוטיים כחומרים הנוצרים באופן טבעי בתאיהם של מיקרואורגניזמים ומסוגלים לקטול מיקרואורגניזמים אחרים, או לעכב את גדילתם⁽¹⁾. חומרים אנטיביוטיים הפוגעים בחיידקים גורמי מחלות ואינם גורמים נזק לאדם, משמשים כתרופות.
על פי הגדרה זו פניצילין הוא חומר אנטיביוטי, ויש המתייחסים גם לסולפה כחומר אנטיביוטי למרות שאינו כזה מפני שהוא חומר כימי שאינו מיוצר בתאי מיקרואורגניזמים⁽²⁾. האם בעקבות ההתפתחות של תעשיית התרופות ב-70 השנים האחרונות יש צורך ל"הזיז את גבולות ההגדרה" של חומרים אנטיביוטיים?
כיום, מייצרים חומרים אנטיביוטיים סינטטיים למחצה⁽³⁾, כלומר גורמים במעבדה לשינוי כימי בחומר שנוצר על ידי מיקרואורגניזמים. מטרת השינוי היא ליצור חומר שהשפעתו על החיידקים לא נפגעת אך הוא יעיל יותר מהחומר המקורי. לדוגמה: האנזים פניצילינאז, המיוצר בחיידקים עמידים לפניצילין, מזרז את פירוק הפניצילין הנוצר על ידי הפטרייה פניציליום אך אינו מפרק את הפניצילין הסינטטי למחצה. כלומר, השינוי הכימי גורם לצמצום בעיית העמידות לפניצילין. יתרון אחר שיש לפניצילין סינטטי למחצה הוא עמידות בפני חומציות מיצי קיבה.
יתכן שזו הסיבה לכך שבמקורות מידע רבים מתייחסים בהגדרת החומרים האנטיביוטיים לכושרם של חומרים אנטיביוטיים לפגוע בחיידקים אך מתעלמים ממקורם של החומרים, וכוללים את הסולפה ברשימת התרופות האנטיביוטיות⁽⁴⁾⁽⁵⁾.

מקורות

- (1) <http://www.biology-online.org/dictionary/Antibiotic>.
- (2) ברנהולץ, ח., פלד, ל., וינקלר, ר. **פרקים במיקרוביולוגיה ובמערכות הגנה**. המרכז להוראת המדעים האוניברסיטה העברית בירושלים תשס"א 2001, עמ' 149–154, 97–98.
- (3) **חומרים אנטיביוטיים סינטטיים למחצה**
- (4) <http://www.nih.gov/researchmatters/march2012/03122012sulfa.htm>
- (5) [http://www.umm.edu/health/medical/altmed/depletion/antibiotic-medications-sulfa-](http://www.umm.edu/health/medical/altmed/depletion/antibiotic-medications-sulfa-drugs)
[drugs](http://www.umm.edu/health/medical/altmed/depletion/antibiotic-medications-sulfa-drugs)

בדיקת רגישות חיידקים לחומרים אנטיביוטיים

הצעות לשילוב ניסויים בנושא זה במהלך ההוראה, בהתאם לתוכנית הלימודים

- א. שילוב תוך כדי לימוד נושא ההעמקה "חיידקים ונגיפים בגוף האדם", [תכנית לימודים 2015](#).
 - ב. שילוב תוך כדי לימוד הנושא "[מיקרואורגניזמים בדגש על מחקרים פורצי דרך](#)", לתלמידים שלא מתחילים התמחות/מגמה, או שמתמחים במקצוע לא מדעי.
 - ג. במסגרת עבודת ביוחקר לתלמידי יא, יב.
- בשלושת ההצעות הראשונות לשילוב הנושא בהוראה, המורה יבחר אם לאפשר לתלמידיו לבצע את הניסויים בעצמם או לבצע הדגמה. על פי הנחיות להכנת [עבודת ביוחקר](#), התלמידים מחויבים לבצע את הניסוי בעצמם.

שימו לב:

בכל דרך שהמורה יבחר, כל הניסויים חייבים להתבצע בהתאם להוראות בטיחות שפורסמו ויפורסמו בעתיד באתר מפמ"ר ביולוגיה. לדוגמה, [חוזר מנכ"ל תשע"ה \(2015\) וכללי בטיחות במעבדה לביולוגיה](#) (תוספת לחוזר מנכ"ל). הוראות בטיחות בכל הנוגע לעבודה במיקרואורגניזמים מפורטות גם [בסרט ההדרכה לעבודה במיקרואורגניזמים ובדפי העזר](#) שבאתר מפמ"ר. חשוב מאד להשתמש בדפי העזר גם כדי לבצע באופן מדויק את כל ההכנות לניסוי ולהכיר את כל שיטות העבודה והתאמתן לצרכים של כל ניסוי.

שימוש בדסקיות נייר סינון הספוגות בתרופות אנטיביוטיות

במרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות ביולוגיה בבתי הספר מספקים ארבעה סוגים של דסקיות אנטיביוטיקה (פריט 43 בקטלוג החומרים).

התרופה	כמות התרופה בכל דסקית
טרציקלין	30 מיקרוגרם
אמוקסיצילין (מוקסיפון)	30 מיקרוגרם
פניצילין	10 יחידות בינלאומיות
סולפה	סולפה מאטואוקסזול 23.75 מיקרוגרם, טרימאטופרים 1.25 מיקרוגרם

תיאור שיטת העבודה עם הדסקיות:

בהתאם לשיטת Kirby-Bauer זורעים חיידקים על מצע גידול מוצק (למשל אגר מזין), ומיד אחרי הזריעה מניחים דסקית ספוגה בתרופה. לאחר מכן מניחים את הצלחת להדגרה על מנת לאפשר לחיידקים להתרבות וליצור "מרבד". במהלך ההדגרה, התרופה האנטיביוטית עוברת בדיפוזיה למצע המוצק ובאזורים שאליהם היא מגיעה היא מונעת את התרבות החיידקים או ממיתה אותם. זו הסיבה שמסביב לדסקית מתקבלת "הילה", אזור שנראה שקוף בו אין גידול של חיידקים (איור 1).



איור 1: מאתר ויקיפדיה, הערך: [agar diffusion test](#)

באמצעות הדסקיות אפשר לבצע ניסוי איכותי ולהדגים את ההשפעה של תרופה כלשהי על מין מסוים של חיידק. אם רוצים לבצע ניסוי כמותי יש למדוד בסרגל את קוטר ההילה שבכל טיפול או בכל חזרה. קוטר זה מבטא את יעילות החומר האנטיביוטי (בריכוז מסוים) בהתייחס למין החיידק, ככל שהקוטר גדול יותר כך החומר יעיל יותר.

עם זאת, אין להסיק מכך על יעילות החומר בטיפול תרופתי בגוף האדם. קוטר אזור העיכוב תלוי במסיסות החומר האנטיביוטי ובמהירות הדיפוזיה שלו באגר, ולא רק במידת הרגישות של החיידק.

ביצוע ניסוי כמותי עם דסקיות אנטיביוטיקה במסגרת עבודת ביוחקר:

אחת משאלות החקר שתלמידים רבים מנסחים היא: מהי השפעת סוג החומר האנטיביוטי על התרבות חיידק ממין X? במקרה זה סוג החומר האנטיביוטי הוא המשתנה הבלתי תלוי, ודרך השינוי היא שימוש בדסקיות המכילות תרופות שונות, המסופקות לבתי הספר המנויים על ידי מרכז הפיתוח והתמיכה. שתי הערות על שאלת חקר זו ועל דרכי בדיקתה:

- א. דסקיות שמכילות תרופות שונות נבדלות זו מזו במספר תכונות והחשובה שבהן היא כמות החומר הפעיל בכל סוג של דסקית (טבלה עמ' 2 לעיל). על כן, **אין לקבל שאלת חקר** בה נדרשת השוואה בין חומרים שונים שגם ריכוזם שונה. תכונות אחרות שבהן נבדלות התרופות זו מזו, כגון גודל המולקולה ומסיסות במים של החומר הפעיל, יכולות אף הן להשפיע על קצב הדיפוזיה של החומר הפעיל מהדסקית לקרקע המזון, ובהתאם לכך להשפיע על קוטר העיכוב של התרבות החיידקים. לאור זאת, אנו ממליצים שלא לבחור את שאלת החקר שהוצגה לעיל. תמיכה להמלצתנו זו אפשר למצוא במסמכי ביוחקר ([הנחיות תשע"ז בהערכה פנימית](#)), בהם נכתב ש"כאשר הטיפולים נבדלים זה מזה במספר רב של מרכיבים – אין לבצע את החקר!"

ב. יתכן שלמרות ההסבר בסעיף א, המורה יחליט לאשר את שאלת החקר שהוצגה לעיל (מהי השפעת סוג החומר האנטיביוטי על התרבות חיידק ממיין X), וידרוש מתלמידיו שבפרק הדין בעבודה הכתובה ינתחו את הגורמים המבדילים בין החומרים שבדסקיות השונות, וידונו בהשפעתם האפשרית על התרבות החיידקים. במקרה כזה, יש לשים לב לכך שבמרכז בבר אילן מספקים רק ארבעה סוגים של דסקיות כשכל סוג מכיל חומר אנטיביוטי אחר. מכאן שהתלמידים יוכלו לבצע רק ארבעה טיפולים בניסוי. על פי דרישות ביוחקר, אם יש רק ארבעה טיפולים בניסוי צריך לבדוק את המשתנה התלוי בשתי שיטות מדידה, לדוגמה, מדידת קוטר ההילה במצע מזון מוצק ובדיקת עכירות בתרבית נוזלית בנוכחות כל אחד מסוגי האנטיביוטיקה. מובן שדרישה זו מטילה עומס רב על התלמידים ועל הלברנט המכין את התמיסות ומצעי המזון הסטריליים.

הצעה לשאלות אחרות בניסוי ביוחקר ודרך לשינוי המשתנה הבלתי תלוי שנבחר:

לאור ההערות שנרשמו לעיל, אנו מציעים לבחור בשאלות שלצורך בדיקתן ניתן לבצע בידוד משתנים, לדוגמה: מהי השפעת ריכוז חומר X על התרבות חיידק Y? תלמידים הציעו לשנות את המשתנה הבלתי תלוי על ידי הנחת מספר שונה של דסקיות המכילות חומר X, זו על גבי זו. בבחירת דרך השינוי, קיימת הנחה סמויה שהחומר מהדסקית העליונה עובר לזו שמתחתיה וכך הלאה עד שמגיע לדסקית הצמודה לקרקע המזון וממנה מפעפע לאגר. ברור שלא ניתן לוודא שאכן מתרחש מעבר כזה. יתר על כן, יתכן שהחומר הפעיל המצוי בדסקיות העליונות אינו מגיע כלל לדסקית התחתונה, מכיוון שכמות המים בדסקיות העליונות היא נמוכה ובשל כך יתכן שהדיפוזיה של החומר מהן, היא אפסית. אפשר לבצע ניסוי מקדים ולבדוק מהי הכמות המרבית של דסקיות המכילות חומר אנטיביוטי מסוים שמשפיעה על התרבות חיידק כלשהו. לצורך בדיקת שאלות כמו זו שהוצגה בסעיף זה לעיל, אנו מציעים להכין מהדסקיות המסופקות תמיסות בריכוזים שונים של חומר אנטיביוטי X. ראו הצעות 1 ו-2 (עמודים 5-8) המתייחסות לשאלת החקר:

מהי השפעת ריכוז פניצילין על התרבות חיידקים מהסוג *Bacillus subtilis*?¹

הערה:

חשוב לבצע ניסויים מקדימים, כדי לבדוק את התאמת הציוד והכלים שמצויים בבית הספר לביצוע הניסוי וכן את השפעת תמיסת חומר אנטיביוטי בריכוז 100% על התרבות החיידקים (ראו הצעה 1 סעיף ב עמ' 6).

¹ אפשר לבצע את הניסוי עם חיידקי *Staphylococcus aureus*, רק אלה שמסופקים בבר אילן

הצעה 1: הכנת תמיסות בריכוזים שונים של חומר אנטיביוטי והכנסתן ל"באריות" באגר

שלבי העבודה על פי סדר ביצועם:

יש לעבוד בצורה סטרילית ובהתאם לכללי הבטיחות. הפירוט בהמשך הוא של השלבים הייחודיים להכנת באריות והוא מבוסס על שיטות עבודה המפורטות בדפי העזר (ראו קישורים בעמ' 2).

- א. הכנת צלחות פטרי ובהן אגר מזין (NA).
- ב. הכנת תמיסות פניצילין בריכוזים שונים.
- ג. הכנת באריות באגר.
- ד. זריעת החיידק *Bacillus subtilis* על אגר מזין.
- ה. הכנסת נפח קבוע של תמיסה לכל בארית.
- ו. הדגרת הצלחות באינקובטור ובדיקת התוצאות.

פירוט שלבי העבודה:

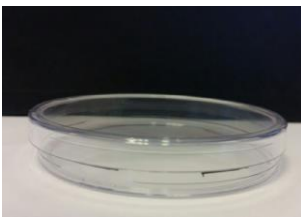
הכנות לניסוי: מומלץ להכין רשימה מסודרת של כל פריטי הציוד והחומרים הנדרשים לניסוי, ולעקר את כל הנדרש כגון, צלחות ובהן אגר מזין, מים סטריליים (מבחנות המסומנות "0%", בכל אחת מהן כ- 10 מ"ל), 5 פיפטות פסטר מזכוכית, פיפטות בנפח 1 או 2 מ"ל, פינצטה (מלקטת), מחט זריעה, מבחנות, מנקב פקקים שהקוטר הפנימי שלו הוא כ- 0.6 ס"מ (ראו איור 3). חשוב להכין גם דסקיות נייר המכילות פניצילין, ומבחנה ובה תרבית נוזלית של החיידק בצילוס סובטיליס, על פי ההנחיות בדפי העזר בעמ' 6, 7.

א. הכנת צלחות פטרי ובהן אגר מזין (NA):

השתמשו בעט (דק) לסימון שאינו מחיק, וסמנו קו על דופן החלק התחתון של כל אחת מהצלחות

הדרושות לכם (איור 2). לכל צלחת, צקו את האגר המזין בעודו חם, עד קו הסימון. באופן זה בכל אחת מהצלחות שתכינו יהיה נפח זהה של קרקע מזון והגובה של כל בארית יהיה גם הוא זהה. הכניסו את הצלחות למקרר כשהן

הפוכות כדי שטיפות מים לא יתעבו על האגר ולמחרת תוכלו להמשיך לעבוד.



בכל צלחת תוכלו להכין 4 באריות.

איור 2: סימון קו על צלחת אגר

ב. הכנת תמיסות פניצילין בריכוזים שונים

הכנת תמיסת אָם שריכוזה היחסי 100%:

כשעה **לפחות** לפני תחילת הניסוי, יש להכין את תמיסת האָם.

היעזרו בפניצטה והכניסו 6 דסקיות נייר המכילות פניצילין למבחנה מסומנת 100% ובה 5 מ"ל מים סטריליים (עליכם לחשב אם נפח זה יספיק להכנת כל התמיסות המהולות ולביצוע החזרות הנדרשות). פקקו את המבחנה.

טלטלו מדי פעם את המבחנה, כדי לזרז את המסת החומר במים. יתכן שהארכת משך ההשריה של הדסקיות במים הסטריליים שבמבחנה המסומנת 100% תגרום לכך שריכוז התמיסה יהיה גבוה יותר.

הערה: פניצילין נמס במים ואנו מניחים שהוא עובר בדיפוזיה מהדסקיות לנוזל שבמבחנה. צפוי שלא כל החומר יעבור לתמיסה ולכן לא נוכל לחשב את ריכוז הפניצילין בתמיסת האָם ביחידות בינלאומיות (IU), אך נקבע אותו שרירותית כ- 100%.

דוגמה להכנת תמיסות בריכוזים שונים:

לאחר שתמיסת האָם תהיה מוכנה, ניתן להכין ממנה תמיסות בריכוז 75%, 50% ו- 25%.

ריכוז תמיסת פניצילין	נפח תמיסת פניצילין בריכוז 100% (מ"ל)	נפח מים סטריליים (מ"ל)
75%	1.5	0.5
50%	1	1
25%	0.5	1.5

שלושת הריכוזים המוצגים בטבלה וכן ריכוזים "0%" ו-"100%", יאפשרו לבצע 5 טיפולים בניסוי לבדיקת השאלה שהוצגה לעיל (הבקרה בניסוי היא פנימית השוואתית וטיפול 0% הוא חלק מסדרת הריכוזים). אפשר להכין תמיסות בריכוזים אחרים, לדוגמה: 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.

ג. הכנת באריות באגר

הבארית היא חור באגר אותו יוצרים בעזרת מנקב הפקקים (איור 3). כדי להפחית סכנה של זיהום הצלחת, חשוב שהעבודה תתבצע בזריזות וקרוב למקור אש גלויה. כאמור, יש לעבוד על פי ההנחיות בחוזרי הבטיחות שהוזכרו לעיל.

אם יש טיפות מים שהתעבו על המכסה, רצוי לנער אותו ובכך לסלק את המים כדי שלא יטפטפו על האגר. יש להעביר בזריזות ובזהירות את **קצה** המנקב בלהבה (ולא לגרום לו להתלהט). צריך להמתין מספר שניות ולהחזיק את המנקב במאונך לאגר, להחדירו עד לקרקעית הצלחת ולהרים אותו. יש לכסות מיד את הצלחת. בדרך כלל דסקית האגר תתרומם יחד עם המנקב, ואפשר יהיה להשליכה לכלי פסולת.



איור 3: מנקב פקקים

במקום במנקב פקקים, אפשר להכין באריות באמצעות הקצה הרחב (העליון) של פיפטת פסטר סטרילית מזכוכית, ולפעול באותה דרך המפורטת בסעיף זה.

אם דסקית האגר לא תצא בקלות אפשר להיעזר במחט זריעה כדי להוציאה, או להחזיר את מנקב הפקקים במדויק מעל הדסקית החתוכה ולנסות להוציאה בשנית. בכל צלחת אפשר להכין 4 באריות.

חשוב מאד להעביר את המנקב בלהבה לפני כל פעם שיוצרים בארית, גם בשל החשש לזיהומו וגם כדי שהאגר ייצרב מחומו של המנקב. כאשר יוצרים בארית עם מנקב שאינו חם דיו, האגר נסדק ושולי הבאר אינם סימטריים, מצב שישפיע על פיזור הפניצילין ובהתאם על עיכוב החיידקים בסמוך לבארית. יש להקפיד גם על כך ששפת קודח הפקקים תהיה ללא פגם. קרקע המזון בכל הצלחות היא בגובה זהה (סעיף א), והודות לכך נפח הבאריות שהוכנו גם הוא זהה.

כדי למנוע זיהום בקטריאלי בסביבת העבודה, יש להכין תחילה את הבאריות ורק **אחר כך** לזרוע את החיידקים בצלחות.

ד. זריעת החיידק *Bacillus subtilis* על אגר מזין

מהתרבית הנוזלית שהכנתם לפני הניסוי, יש לזרוע בכל הצלחות מרבד צפוף ואחיד של חיידקים באמצעות מקל דריגלסקי.

ה. הכנסת נפח קבוע של תמיסה לכל בארית

יש לרשום על כל צלחת או כל גזרה מהו ריכוז תמיסת פניצילין שיוכנס לבאריות שבצלחת. באמצעות פיפטת פסטר מזכוכית וטפטף גמיש, יש להכניס לכל בארית **1 טיפה** של נוזל (מים סטריליים או תמיסת פניצילין). לכל ריכוז יש להשתמש בפיפטת פסטר נקייה, ולא להעביר פיפטה מריכוז נמוך לגבוה, שכן ריכוז התמיסות נמוך מאד והנפחים מאד קטנים.

חשוב מאד לבדוק **בניסוי מקדים** מהו הנפח שיש לטפטף לבארית שהכנתם. רצוי שהבארית תהיה מלאה, אך שהתמיסה לא "תגלוש" אל האגר. חשוב גם שלא יטפטף נוזל מחוץ לבארית, לכן מומלץ שלפני הניסוי התלמידים יתאמנו בעבודה מדויקת עם פיפטה מזכוכית וטפטף גמיש. אם ברשותכם מיקרופיטור בוודאי שעדיף להשתמש בו ולא בפיפטת פסטר.

ו. הדגרת הצלחות באינקובטור ובדיקת

התוצאות

יש להכניס את הצלחות לאינקובטור כשהמכסה הוא כלפי מעלה (**ולא להפוך אותן כפי שנהוג בדרך כלל**). את קוטר ההילה בכל טיפול או חזרה יש למדוד באמצעות סרגל, לאחר כ- 24 שעות (איור 4).



איור 4: באריות עם פניצילין בצלחת שנזרעה עם חיידקי בצילוס סובטילוס וההילה שנוצרה סביב הבאריות

הערות:

- במקום להכין באריות, אפשר להכין תמיסות של חומר אנטיביוטי בריכוזים שונים. להכין דסקיות נייר סינון, לעקר אותן ולהניחן על האגר הזרוע בחיידקים. באמצעות מיקרופיטה או פיפטת פסטור לטפטף במדויק את הנפח הנדרש על כל דסקית.
- אפשר גם לטבול דסקיות נייר סינון מעוקרות בכל תמיסה, ולהניח אותן על אגר מזין שעליו נזרעו חיידקים. יתכן שבדרך זו כמות החומר האנטיביוטי שתיספג בכל דסקית לא תהיה זהה, מה שעלול לפגוע בתוקף של השיטה ובעקבות זאת במסקנות שיוסקו מתוצאות הניסוי.

הצעה 2: הכנת מצעי מזון נוזליים שבכל אחד מהם יהיה ריכוז שונה של חומר אנטיביוטי שלבי העבודה על פי סדר ביצועם:

- א. הכנת כלים ובכל אחד מהם מרק מזין (NB).
 - ב. יש לבחור את נפח הכלי ונפח המרק בהתאם להסבר בדפי הנחיות לסרט. הוספת מספר שונה של דסקיות בכל כלי.
 - ג. - מומלץ להשהות את הדסקיות למשך כשעה בתוך הכלי ומדי פעם לטלטל את הנוזל בכלי. לאחר פרק זמן זה יש להוציא את הדסקיות מהכלי.
 - ד. - מומלץ להיעזר בהערות בהצעה 1 סעיף ב.
 - ה. זריעת נפח זהה של תרבית חיידקים בכל כלי.
 - ו. הכנת כלי בקרה, ללא דסקיות או בתוספת דסקית נייר סינון שנטבלה במים סטריליים.
 - ז. הדגרת הכלים באינקובטור במשך 24 שעות.
 - ח. בדיקת עכירות התרחיף באמצעות ספקטרופוטומטר או סולם עכירות.
- הנחיות לעבודה עם סולם עכירות ראו בסרטון עבודה [במעבדה למיקרוביולוגיה - סרטון הדרכה](#)
[ודפי הנחיה למורה בדקה 18 ואילך.](#)

הערות:

- מכיוון שהעכירות בתרבית היא תוצאה של הימצאות חיידקים מתים וחיים, צריך להקפיד ולבדוק את התרביות כשהן בשלב הגידול המעריכי.
- אם רוצים לאמוד את מספר החיידקים החיים, יש להוציא דגימות מכל תרבית ולזרוע כל אחת מהן על מצע מזון מוצק. זו דרך מייגעת, מכיוון שצריך למהול את המצע (לפחות בריכוזים נמוכים של חומר אנטיביוטי), ולהשתמש בהרבה מאד פלטות.