**1.** **روش انتشار دیسک و محیطها**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل روش انتشار دیسک و محیط های آنتی بیوگرام** | |
| **کد سند:** | D-007-0001 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل و کنترل کیفی آنتی بیوگرام | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **تصدیق و امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

هدف این دستورالعمل تشریح کلیات تست­ حساسیت آنتی بیوتیکی (AST) یا آنتی بیوگرام شامل روش های انجام آنتی بیوگرام، استانداردسازی آنتی بیوگرام، محیط کشت های مورد نیاز از جمله محیط مولر هینتون آگار و نحوه ساخت آنها می باشد.

**(2) مسئولیت ها:**

* مسئول فنی بخش میکروب شناسی مسئول ارائه روش های مکتوب برای انجام دقیق آنتی بیوگرام و انجام کنترل کیفی های مربوطه و تفسیر دقیق و صحیح نتایج آنها می باشد.
* انجام روزانه آنتی بیوگرام برای کشت های مثبت که طبق دستورالعمل های گفته شده در کشت های بدن نیازمند انجام این آزمایش هستند و کنترل کیفی دوره ای طبق برنامه بر عهده تمامی پرسنل بخش می باشد.
* دستورالعمل آنتی بیوگرام چون سالیانه به روزرسانی می شود، مسئولیت بازبینی دستورالعمل ها و به روزرسانی آن بر عهده مسئول بخش و واحد کنترل کیفی و تضمین کیفیت می باشد.

**(3) تعاریف و اصطلاحات:**

**آنتی بیوگرام:** که به عنوان تست­ حساسیت آنتی بیوتیکی (AST) هم شناخته می شوند آزمایش‌هایی هستند که برای کشف آنتی‌بیوتیک هایی موثر بر میکروب های عامل عفونت استفاده می شوند. این آزمایش‌ها به صورت روتین در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی معمولاً همزمان با تست های شناسایی ارگانیسم به انجام می رسند.

**روش های انجام آنتی بیوگرام:** تست های حساسیت معمول با روش های رقیق سازی مایع، روش های رقیق سازی آگار، و روش انتشار دیسک و تست های تجاری حساسیت با کمک روش های تجاری آماده یا دستگاههای خودکار قابل انجام است. از این بین روش انتشار دیسک (دیسک دیفیوژن یا روش کربی-بائر) معمول ترین روش سنتی مورد استفاده در اکثر آزمایشگاههای دنیا می باشد.

**(4) شرح دستورالعمل**

**دستورالعمل آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک (دیسک دیفیوژن)**

* تست های حساسیت با روش انتشار دیسک، مقاومت یا حساسیت آنتی بیوتیکی را با قرار دادن دیسک آنتی بیوتیک روی سطح آگار که به شکل چمنی کشت شده است تشخیص می دهد.
* زمانی که دیسک ها با غلظت مشخص از عوامل آنتی بیوتیکی مختلف روی سطح پلیت تازه کشت شده قرار می گیرد، این عوامل به سرعت شروع به پخش شدن در آگار می کنند و یک گرادیانت غلظت در اطراف دیسک کاغذی به شکل دایره ای ایجاد می شود که بالاترین غلظت در اطراف دیسک است.
* پس از انکوباسیون باکتری بر روی پلیت بجز در قسمت هایی که غلظت آنتی بیوتیک بالا باشد یا آن آنتی بیوتیک بر باکتری بی اثر باشد رشد می کند.
* بعد از انکوباسیون محل عدم رشد باکتری در اطراف دیسک (هاله عدم رشد) به شکل میلیمتری اندازه گیری می شود. سپس عدد به دست آمده با جداول استاندارد مقایسه می شود و بر اساس قطر به دست آمده تفسیر حساسیت یا مقاومت باکتری به هر آنتی بیوتیک سنجیده می شود.
* برخی از ارگانیسم ها حساسیت قابل پیش بینی به عوامل ضد میکروبی دارند و درمان تجربی برای این ارگانیسم ها به طور گسترده پذیرفته شده است و معمولاً نیازی به انجام تست حساسیت ضومیکروبی ندارند که شامل **استرپتوکوکوس پیوژنز**، **استافیلوکوک ساپروفیتیکوس**، **باسیلوس آنتراسیس** و **استرپتوکوک آگالاکتیه** می باشند.
* البته گاهی ممکن است برای آنها آنتی بیوگرام به انجام برسد مثلاً برای ایزوله های استرپتوکوکوس پیوژنز جدا شده از بیماران مبتلا به آلرژی به پنی سیلین، اریترومایسین یا ماکرولید دیگری ممکن است برای تشخیص مقاومت ضد میکروبی در سویه ها آزمایش شود.
* کلنی های جدا شده از هر نوع ارگانیسمی که ممکن است بیماری زا باشد باید از پلیت های آگار اولیه انتخاب شده و به صورت جداگانه برای حساسیت آزمایش شوند.
* هنگامی که ماهیت عفونت مشخص نیست و نمونه حاوی رشد مخلوط یا حاوی فلور طبیعی است (که در آن ارگانیسم‌ها احتمالاً ارتباط کمی با فرآیند عفونی تحت درمان دارند)، آزمایش‌های حساسیت ضد میکروبی اغلب غیر ضروری هستند و نتایج ممکن است گمراه‌کننده باشند.
* برای رشد مخلوط‌ انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها نباید AST روی یک پلیت آزمایش شود.
* انجام مستقیم آزمایش AST‌ بر روی نمونه بیمار (مثلاً مایعات بدن و ادرار) استاندارد نیست و نباید انجام شود. مورد استثناء نمونه کشت خونی است که از آن انتروباکترال ها، آسینتوباکتر و یا سودوموناس آئروجینوزا جدا شده باشد که اخیراً روش استاندارد انجام AST بر روی نمونه مستقیم خون برای این باکتری ها برای برخی از آنتی بیوتیک ها آورده شده است که در جلوتر گفته خواهد شد.

**استانداردسازی آنتی بیوگرام در روش انتشار دیسک**

* به منظور انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی، استاندارد سازی مواد و محیطها، به همراه دستورالعمل ها و پیشنهادات و انجام کنترل کیفیت، دستورالعمل های مختلفی در دنیا موجود است که مهمترین و اصلی ترین آنها دستورالعمل اتحادیه اروپا به نام EUCAST یا کمیته اروپایی تست حساسیت آنتی بیوتیکی و دستورالعمل موسسه آمریکایی CLSI یا موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی می باشد.
* در کشور ایران تقریباً تمامی آزمایشگاه‌های میکروب شناسی از دستورالعمل‌هایCLSI استفاده می‌کنند.
* استاندارد سازی برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی شامل موارد زیر است: اندازه تلقیح باکتری، محیط رشد، pH، غلظت کاتیون ها، ترکیبات سرم و خون، غلظت تیمیدین، دما و هوای (اتمسفر) و زمان انکوباسیون، غلظت مواد ضدمیکروبی (آنتی بیوتیک ها).

**محیط کشت ها در روش انتشار دیسک**

**محیط مولر هینتون آگار (MHA)**

* محیط مولر هینتون آگار بهترین محیط برای آنتی بیوگرام (AST) معمولی باکتری‌های غیر سخت رشد در نظر گرفته می‌شود زیرا: تکرارپذیری قابل قبول برای AST را نشان می دهد، مهارکننده های آن که بر نتایج تست حساسیت سولفونامید، تری متوپریم و تتراسایکلین ها تأثیر می گذارد کم است و در نهایت از رشد رضایت بخش بیشتر باکتری های غیرسخت رشد حمایت می کند.
* برای ارگانیسم های مشکل پسند مواد مغذی و جایگزین به بیس محیط مولر هینتون اضافه می شود که بعداً اشاره شده اند.
* دقت شود کاتیون های مکمل کلسیم یا منیزیم نباید به MHA اضافه شوند.
* بیشتر آزمایشگاه ها که تست انتشار دیسک را انجام می دهند مولر هینتون کنترل شده و مناسب را از شرکت های تجاری تهیه می کنند.

نحوه ساخت این محیط قبلاْ در دستورالعمل با شماره سند توضیح داده شد.

**محیط تست هموفیلوس** (HTM):

* برای تست AST هموفیلوس آنفولانزا و هموفیلوس پاراآنفولانزا از این محیط استفاده می شود.
* شامل ترکیبات زیر می باشد: محیط MHA، 15میکروگرم در میلی لیتر NAD، 15 میکروگرم در میلی لیتر هماتین گاوی یا خوکی و 5 گرم در لیتر عصاره مخمر.
* مراحل تهیه این محیط به شرح زیر است:

1. با حل کردن 50 میلی گرم پودر هماتین در 100 میلی لیتر 01/0 مول در لیتر NaOH با گرما، یک محلول استوک هماتین تازه تهیه کنید. محلول را هم بزنید تا پودر کاملاً حل شود.

2. با حل کردن 50 میلی گرم NAD در 10 میلی لیتر آب مقطر، یک محلول ذخیره NAD تهیه کنید. محلول را فیلتر (فیلتر سرنگی) کنید تا استریل شود.

3. پودر محیطMHA تجاری موجود را مطابق دستورالعمل سازنده تهیه کنید.

4. میزان 5 گرم عصاره مخمر و 30 میلی لیتر محلول استوک هماتین را به 1 لیتر MHA اضافه کنید و سپس محیط را اتوکلاو کنید.

5. محیط را در دمای 45 تا 50 درجه سانتیگراد خنک کنید.

6. میزان 3 میلی لیتر از محلول استوک NAD را در شرایط استریل اضافه کنید.

7. در نهایت pH محیط را بررسی کنید که باید مشابه محیط مولر معمولی بین 2/7 تا 4/7 باشد.

**نکته**: سویه *Haemophilus* *influenzae* (ATCC 10211) به عنوان سویه کنترل کیفی این محیط توسط CLSI پیشنهاد شده است.

**محیط GC‌آگار با یک درصد مکمل:**

* این محیط برای تست AST‌ باکتری نایسریاگنوره آ استفاده می شود.
* مراحل ساخت این محیط به شرح زیر می باشد:

1. یک لیتر پایه آگار GC تجاری موجود مطابق دستورالعمل سازنده تهیه کنید و آن را اتوکلاو کنید.

2. محیط را در بن ماری با دمای 45 تا 50 درجه سانتی گراد بگذارید تا به میزان این دما خنک شود.

3. میزان 1% یک مکمل رشد تعریف شده حاوی مواد مشخص را به یک لیتر محیط اضافه کنید. این مکمل به صورت آماده تجاری به فروش می رسد و حاوی مواد زیر است: 1/1گرم ال سیستین، 03/0 گرم گوانین-HCl، 003/0 گرم تیامین-HCl، 013/0 گرم پارا آمینو بنزوئیک اسید، 01/0 گرم ویتامین B12، 1/0 گرم تیامین پیروفسفات (کوکاربوکسیلاز)، 25/0 گرمNAD ، 1 گرم آدنین، 10 گرم ال-گلوتامین، 100 گرم گلوکز، 02/0 گرم نیترات آهن، 9/25 گرم L-سیستئینHCl.

4. میزان 10 میلی لیتر از این مکمل 1 درصد را به محیط کامل سرد شده اضافه کنید.

**pH محیط ها**

* محیط مولر هینتون آگار و تمام مشتقات آن بعد از تهیه باید pHبین 2/7 تا 4/7 در دمای اتاق داشته باشند.
* روش بررسی pH مورد استفاده بستگی به نوع تجهیزات موجود دارد اما با روش های زیر قابل بررسی است:

1. روش خیساندن یا Macerate: تمام محیط یک پلیت مولرهینتون بسته شده را داخل ظرف کوچکی ریخته، مقدار کمی آب مقطر (در حد 3 میلی لیتر) اضافه کنید و 10 دقیقه اجازه دهید بخیسد. سپس نوک الکترود pH را در آن غوطه ور کنید.

2. نوک الکترود pH مترسنج را داخل یک ظرف کوچک قرار دهید و محیط سرد شده هنوز جامد نشده را به داخل ظرف بریزید به گونه ای که محیط در اطراف نوک الکترود بسته (جامد) شود. سپس pH‌ را اندازه گیری نمایید. اجازه دهید مقدار کمی آگار در اطراف این در یک لیوان یا فنجان جامد شود.

3. از الکترودهای سطحی که در سطح محیط بسته شده pH را اندازه گیری می کنند استفاده کنید.

* **عمق محیط کشت**
* علاوه بر فاکتورهایی مانند pH و غلظت کاتیون ها، عمق محیط کشت هم بر روی نتایج آزمایش اثر می گذارد و باید کنترل شود.
* به دلیل اینکه انتشار عوامل آنتی بیوتیکی در همه جهات از سطح آگار منتشر می شود مناطق نازک آگار بر روی انتشار گرادیان غلظت آنتی بیوتیک اثر می گذارد. اگر آگار بسیار ضخیم باشد عامل آنتی بیوتیکی از طریق آگار خارج می شود و در نتیجه منطقه رشد کوچکتر می شود و تفسیر نتایج دچار خطا می شود (مقاومت اشتباه) و اگر آگار نازک باشد منطقه عدم رشد بزرگتر می شود و باعث تفسیر خطا در نتایج حساس می شود.
* قطر استاندارد محیط مولر هینتون باید 4 میلی متر باشد که نحوه ساخت آن قبلاً توضیح داده شد.

**(5) محدودیت ها و تداخلات:**

* اگر pH محیط های مولر هینتون کمتر از 2/7 باشد، به نظر می رسد که برخی داروها قدرت خود را از دست می دهند (مانند آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها)، در حالی که سایر عوامل ضد میکروبی ممکن است فعالیت بیش از حد داشته باشند (مانند تتراسایکلین ها). اگر pHبیشتر از 4/7 باشد، می توان اثرات معکوس را انتظار داشت.
* ساخت محیط GC‌آگار برای باکتری نایسریاگنوره آ سخت بوده و گاهی از محیط شکلات آگار با بیس محیط مولر هینتون برای آنتی بیوگرام این باکتری استفاده می شود (هرچند که استاندارد نیست).

**(6) مستندات و سوابق :**

فرم سوابق یاLog book ساخت محیط کشت های مخصوص آنتی بیوگرام از جمله مولر هینتون آگار و سوابق چک pH محیط هاوهمچنینسوابق کنترل کیفی محیط ها و دیسک های آنتی بیوتیکی، عدم انطباق ها و اقدامات اصلاحی.

**(7) منابع:**

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. کتاب آنتی بیوگرام (تست حساسیت ضدمیکروبی). دکتر داریوش شکری. انتشارات مانی. 1404.
3. مجموعه جداول انتخاب شده از CLSI M100 33th 2023 برای میکروارگانیسم های اولویت دار در برنامه کشوری مهار مقاومت میکروبی بر اساس راهنمای سازمان بهداشت جهانی. (GLASS).ویرایش هفتم.1402. آزمایشگاه مرجع سلامت.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 35th edition. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100. Wayne، PA: CLSI; 2025.
5. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline. CLSI Document M45. Wayne، PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2018.
6. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
7. Kaase M، Lenga S، Friedrich S، et al. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. 2008;14(6):614-616.
8. Tille، Patricia. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences، fifteenth edition. 2021.