**3. مراحل عملی**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل مراحل عملی انجام آنتی بیوگرام** | |
| **کد سند:** | D-007-0003 | |
| **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:**

در این دستورالعمل مراحل عملی انجام آنتی بیوگرام شرح داده شده است.

**(2) شرح دستورالعمل:**

مراحل عملی انجام آنتی بیوگرام شامل 7 قدم اصلی است:

1) تشخیص و انتخاب اولیه کلنی های رشد کرده برای آنتی بیوگرام

2) آماده سازی پلیت MHA و دیسک ها

3) آماده سازی مایع تلقیح

4) تلقیح مایع تلقیح به پلیت مولرهینتون آگار

5) ديسک گذاری صحیح با توجه به نوع نمونه و نوع ارگانیسم

6) انکوباسيون

7) خوانش، گزارش و تفسیر نتایج

**1) تشخیص و انتخاب اولیه کلنی های رشد کرده برای آنتی بیوگرام**

جدول 1. تست‌های حداقلی برای تشخیص اولیه باکتری.

|  |  |
| --- | --- |
| **حداقل تست های قابل انجام و نتایج** | **تشخیص اولیه** |
| رشد واضح بر روی محیط کشت EMB یا مک کانکی با کلنی رنگی (لاکتوز مثبت)، تست کاتالاز مثبت، تست اکسیداز منفی، برخی جلای فلزی (اشریشیاکلی)، رنگ‌آمیزی گرم: باسیل گرم منفی | انتروباکتریال‌ها |
| رشد واضح بر روی محیط کشت EMB یا مک کانکی با کلنی بیرنگ (لاکتوز منفی)، تست کاتالاز مثبت، تست اکسیداز برخی مثبت و همولیز بتا (سودوموناس آئروجینوزا)، رنگ‌آمیزی گرم: باسیل گرم منفی (سودوموناس و بورخولدریا) یا کوکسی گرم منفی (آسینتوباکتر) | باکتری­های گرم منفی غیرتخمیری |
| عدم رشد واضح بر روی محیط کشت EMB یا مک کانکی، رشد در محیط بلادآگار با همولیز بتا، تست کواگولاز اسلایدی مثبت، رنگ‌آمیزی گرم: کوکسی گرم مثبت خوشه انگوری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی | استافیلوکوک آرئوس |
| عدم رشد واضح بر روی محیط کشت EMB یا مک کانکی، رشد در محیط بلادآگار بدون همولیز بتا (برخی مثل استافیلوکوک همولیتیکوس مثبت)، تست کواگولاز اسلایدی منفی، رنگ‌آمیزی گرم: کوکسی گرم مثبت خوشه انگوری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی | استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی |
| عدم رشد واضح بر روی محیط کشت EMB یا مک کانکی، رشد در محیط بلادآگار با همولیز آلفا و غیرموکوئیدی، تست PYR منفی، رنگ‌آمیزی گرم: کوکسی گرم مثبت تکی، دوتایی و زنجیره ای، کاتالاز و اکسیداز منفی، بایل اسکولین منفی | استرپتوکوک‌های گروه ویریدانس |
| عدم رشد واضح بر روی محیط کشت EMB یا مک کانکی، رشد در محیط بلادآگار بدون همولیز، تست PYR مثبت، رنگ‌آمیزی گرم: کوکسی گرم مثبت تکی، دوتایی و زنجیره‌ای، کاتالاز و اکسیداز منفی، بایل اسکولین مثبت | انتروکوک |
| عدم رشد واضح بر روی محیط کشت EMB یا مک کانکی، رشد در محیط بلادآگار به صورت کلنی خشن گچی رنگ و بدون همولیز، رنگ‌آمیزی گرم: باسیل گرم مثبت به شکل حروف چینی و پرنده در حال پرواز، کاتالاز و اکسیداز منفی، بایل اسکولین منفی، بی‌تحرک | دیفتروئیدها |
| عدم رشد واضح بر روی محیط کشت EMB یا مک کانکی، رشد در محیط بلادآگار به صورت سر سوزنی با همولیز آلفا، رنگ‌آمیزی گرم: باسیل گرم مثبت به شکل بلند و گاهی فیلامنته، کاتالاز و اکسیداز منفی، بی‌تحرک | لاکتوباسیلوسها |
| رشد واضح بر روی محیط بلادآگار با کلنی های گچی رنگ سفید، رشد بسیار ضعیف بر روی محیط کشت‌های گرم منفی و گاهی عدم رشد، رنگ‌آمیزی گرم: سلول های تخم‌مرغی شکل با جوانه | مخمرها |

**2) آماده سازی** **پلیت های MHA و دیسک ها**

* پلیت هایMHA را حداقل 15 دقیقه قبل از استفاده از یخچال خارج کنید تا در دمای اتاق گرم شوند. گرم شدن پلیت ها تا دمای اتاق باعث می شود رطوبت اضافی در سطح محیط به راحتی مشاهده شود. رطوبت بیش از حد می تواند در تلقیح پلیت اختلال ایجاد کند.
* اگر سطوح آگار حاوی رطوبت بیش از حد است (به عنوان مثال، قطرات متراکم بزرگ)، پلیت هایMHA را در انکوباتور (35 ± 2 درجه سانتیگراد) قرار گرفته یا می توان در دمای اتاق زیر یک هود استریل با جریان آرام هوا، درب پلیت ها را باز گذاشت تا زمانی که رطوبت اضافی سطح توسط تبخیر از بین برود (معمولاً 10 تا 30 دقیقه).
* سطوح پلیت باید مرطوب (نم دار) باشند، اما هنگام تلقیح پلیت، هیچ قطره رطوبتی روی سطح محیط یا روی درب پلیت پتری موجود نباشد.

**برای آماده سازی دیسک ها**:

1. بسته های حاوی کارتریج های دیسک را 1 تا 2 ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج کنید تا قبل از باز کردن در دمای اتاق متعادل شوند.

2. هنگامی که از دستگاه پخش دیسک (دیسپنسر) استفاده می شود، باید آن را در یک ظرف مجهز به یک پوشش محکم و دارای یک ماده خشک کن کافی در یخچال نگهداری کرد. قبل از باز کردن دیسپنسر اجازه دهید تا در دمای اتاق گرم شود.

**3) آماده سازی مایع تلقیح**

* دو فاکتور مهم و ضروری برای آماده سازی تلقیح درست، استفاده از کشت خالص و اندازه تلقیح استاندارد است.
* دو روش تهیه مایع تلقیح وجود دارد: 1. روش تعلیق کلنی مستقیم یا DCS (یا روش سوسپانسیون مستقیم کلنی) و 2. روش کشت در محیط مایع.

**1. روش تعلیق کلنی:**

* راحت ترین روش برای تهیه تلقیح است و می تواند برای اکثر ارگانیسم ها استفاده شود.
* برای آزمایش ارگانیسم های سختگیر مانند هموفیلوس ها، نایسریاها و استرپتوکوک ها و همچنین برای آزمایش استافیلوکوک ها برای تشخیص مقاومت به متی سیلین (اگزاسیلین) توصیه می شود.
* مراحل تهیه تلقیح به روش سوسپانسیون کلنی در زیر آمده است:

- از محیط تازه 18 تا 24 ساعته غیرانتخابی مانند بلادآگار چند کلنی را داخل محیط براث یا نرمال سالین حل کنید تا به یک کدورت با استاندارد نیم مک فارلند برسید.

- برای سنجش کدورت می توان از دستگاه فتومتریک کالیبره شده یا به صورت چشمی در حالی که لوله آزمایش تلقیح را کنار یک لوله حاوی کدورت محلول استاندارد گذاشته ایم و پشت آنها یک صفحه با زمینه سفید و خطوط مشکی متضاد قرار دارد، استفاده کنید.

- دقت کنید برای حل کردن باکتری لوپ استریل از سواب بهتر هست و اگر از سواب استفاده می شود بعد از تهیه کردن استاندارد باید این سواب دور انداخته شود و برای کشت چمنی روی محیط مولر استفاده نشود چون هنوز حاوی تعداد زیادی باکتری حل نشده است.

**2. روش کشت در محیط مایع:**

- این روش در مواقعی که حل کردن کلنی ها سخت است یا در مورد باکتری های غیرسخت رشد غیر از استافیلوکوک ها که ممکن است کشت تازه 18 تا 24 ساعته از آنها موجود نباشد ترجیح داده می شود.

- همچنین اگر تعداد رشد کرده باکتری (مثلاً در کشت مایعات استریل) کم است می توان از این روش استفاده نمود.

- مراحل تهیه تلقیح به روش سوسپانسیون کلنی در زیر آمده است:

1. حداقل 5-3 کلنی خالص یکدست را انتخاب کنید.

2. با یک لوپ یا سواب استریل از قسمت بالای کلنی ها برداشت کرده و آن را به یک لوله حاوی 4 تا 5 میلی لیتر از یک محیط مناسب مایع مانند محیط تریپتیک سویا براث (TSB) منتقل کنید.

3. کشت براث (آبگوشت) را در دمای 2±35 درجه سانتی گراد انکوبه کنید تا زمانی که کدورت استاندارد نیم مک فارلند (معمولاً 6-2 ساعت) به دست آید یا مقداری بیشتر شود (اینجا رشد مرحله لگاریتمی باکتری به دست می آید).

4. اگر غلظت بیشتر شده است، کدورت کشت براث به دست آمده را با سالین یا محیط استریل تنظیم کنید تا کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند به دست آورید.

**قانون 15-15-15:**

از مرحله تهیه مایع تلقیح تا کشت تلقیح و گذاشتن دیسک ها روی محیط مولر هینتون و انکوباسیون قانون 15-15-15 دقیقه باید رعایت شود:

- سوسپانسیون تلقیح آماده شده باید کمتر از 15 دقیقه (حداکثر) پس از آماده سازی کشت شود.

- پس از تلقیح مایع میکروبی و قبل از دیسک گذاری، 15 دقیقه صبر کنید تا رطوبت سطح خشک شود و دیسک گذاری بعد از 15 دقیقه و نه بیشتر انجام شود.

- پس از گذاشتن دیسک ها در کمتر از 15 دقیقه (حداکثر) پلیت ها در انکوباتور گذاشته شوند.

بنابراین طبق قانون 15-15-15 در حالت بهینه، در هر کدام از دو روش فوق، سوسپانسیون تلقیح باید کمتر از 15 دقیقه (حداکثر) پس از آماده سازی کشت شود.

**4) تلقیح مایع تلقیح به پلیت مولر هینتون آگار**

1. بعد از تهیه سوسپانسیون مایع تلقیح در کمتر از 15 دقیقه، یک سواپ استریل را در داخل مایع تهیه شده لوله فرو برده و برای جلوگیری از تلقیح بیش از حد باکتری ها، مایعات اضافی را با فشار دادن و چرخاندن سواب به داخل جداره لوله خارج شود.

2. سطح پلیت مولر هینتون آگار در سه جهت با تغییر زاویه 60 درجه توسط سواب کشت داده شود تا اطمینان حاصل شود که همه سطح پلیت تلقیح انجام گرفته است. این کار چند بار تکرار گردد تا کل سطح پلیت کشت شود و هیچ نقطه ای بدون کشت باقی نماند.

3. در مرحله آخر با چسباندن سواب به جداره پلیت به صورت دورانی دور پلیت کشت می شود.

4. طبق قانون 15-15-15 پس از تلقیح مایع میکروبی و قبل از دیسک گذاری، 15 دقیقه صبر کرده تا رطوبت سطح خشک شود و باکتری های تلقیح شده به خوبی جذب سطح پلیت شوند.

5. پیشنهاد شده درب برای (در حالت ایده آل) 3 تا 5 دقیقه (اما نه بیشتر از 15 دقیقه) زیر هود تمیز باز گذاشته شود.

**5) ديسک گذاری**

* برای اغلب باکتری ها بجز موارد خاص، در روش انتشار دیسک، حداکثر 12 دیسک را روی پلیت 150 میلی متری، حداکثر 9 دیسک را روی پلیت 120 میلی متری و حداکثر 6 دیسک را روی پلیت 100 میلی متری آزمایش کنید. در مورد برخی باکتریها تعداد دیسک های قابل استفاده در یک پلیت 100 میلی متری 4 عدد (مانند پنوموکوک) و حتی 2 عدد (نایسریا) می باشد.
* دیسک ها از مرکز به مرکز نباید کمتر از 24 میلی متر از هم فاصله داشته باشند. قطر هر منطقه باید به وضوح قابل اندازه گیری باشد. مناطق همپوشانی از اندازه گیری دقیق جلوگیری می کند. همچنين نزديکی بيش از اندازه ديسک ها به لبه پليت موجب عدم تقارن هاله عدم رشد (در بعضی داروها) خواهد شد.
* بايد ديسک های آنتی بيوتيکی را براي هر باكتري، با پنس (استریل شده با شعله و سرد شده) و به دقت و به طرز يكنواخت روی پليت مولر هينتون آگار قرار داده و با فشار مختصری از تماس کامل آن با سطح آگار اطمينان حاصل نمود.
* دیسک گذاری با کمک دستگاه دیسک گذار (دیسپنسر دیسک) که توسط تولید کنندگان دیسک های تجاری تولید شده است تسهیل شده است. با این دستگاه همه دیسک ها در پانل های تست شده به طور همزمان با فاصله استاندارد روی سطح آگار قرار می گیرد تا از همپوشانی مناطق عدم رشد و تعامل قابل توجه بین عوامل آنتی بیوتیکی جلوگیری شود.
* در همه موارد بهتر است ديسک های با قطر هاله عدم رشد کوچکتر (جنتامايسين، ونکومايسين) در کنار ديسک های با قطر هاله عدم رشد بزرگ تر (مانند پنی سیلین ها و سفالوسپورين ها) قرار گيرند تا احتمال همپوشانی هاله ها کمتر شود.
* به دليل انتشار سريع برخی داروها به محض تماس ديسک با سطح آگار، از جا به جا کردن ديسک بعد از قرارگيری بر سطح آگار خودداری نموده و در صورت نياز بايد ديسک جديدی در ناحيه ديگري از پليت قرار داده شود.
* دیسک ها، از جمله در دیسپنسرها را در ظروف مهر و موم شده با ماده خشک کننده رطوبت و محافظت شده در برابر نور محافظت کنید (بعضی از عوامل از جمله مترونیدازول، کلرامفنیکل و فلوروکینولون ها مثل سیپروفلوکساسین با قرار گرفتن طولانی مدت در معرض نور غیرفعال می شوند).
* نحوه انتخاب دیسک ها برای هر باکتری در عفونت های مختلف جلوتر آمده است.

**6) انکوباسيون**

* درپوش پليت های دیسک گذاری شده را بگذارید. طبق قانون 15-15-15 فرایند انکوباسیون یعنی گذاشتن پلیت ها در انکوباتور2±35 درجه سانتی­گراد در کمتر از 15 دقیقه (حداکثر) پس از گذاشتن دیسک ها باید به انجام برسد.
* پلیت ها برای پیشگیری از تجمع رطوبت در سطح پلیت که با عملکرد و نتایج آنتی بیوتیک تداخل می کند باید به شکل معکوس داخل انکوباتور قرار گیرند (درپوش به سمت پایین).
* در انکوباتور بیشتر از 5 پلیت را روی هم قرار ندهید تا دمای یکسان به همه پلیت ها برسد.
* دمای انکوباسيون 35 درجه سانتی گراد پیشنهاد می شود زیرا دمای بالاتر از35 درجه ممکن است مانع از رشد استافيلوکوک های مقاوم به متي سيلين گردد.
* بیشتر ارگانیسم ها در انکوباتور معمولی و شرایط هوای محیط انکوبه می شوند و نیازی به گذاشتن در انکوباتور CO2 دار یا جار شمع دار ندارند چونCO2 قطر هاله عدم رشد برخی داروها را به طور مشخصی تغيير مي دهد. اما برای بعضی از باکتری های مشکل پسند شامل هموفيلوس، نايسريا و استرپتوکوک، استفاده از CO2 رشد آنها را افزایش می دهد و بنابراین باید در انکوباتور CO2 دار یا جار شمع دار داخل انکوباتور گذاشته شوند.
* زمان استاندارد انکوباسیون برای اغلب باکتری های غیرسخت رشد و خوانش اغلب دیسک ها، 16 الی 18 ساعت و برای باکتری های سخت رشد شامل هموفيلوس، نايسريا و استرپتوکوک، 20 الی 24 ساعت می باشد تا رشدشان کامل شود. گاهی برای تشخیص الگوی مقاومت خاص در باکتری های غیرسخت رشد نیاز است که زمان انکوباسیون تا 24 ساعت افزایش یابد (برای مثال مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک ها و مقاومت به ونکومایسین در انتروکوک ها).
* پویایی و زمان انتشار عوامل آنتی بیوتیکی نهایتاً به 24 ساعت برای به دست آوردن نتایج قابل اطمینان نیاز دارد و بنابراین از انکوباسیون بیش از اندازه پلیت ها برای انتشار دیسک خودداری کنید. به طور کلی برای ارگانیسم های کند رشد مانند مایکوباکتریوم و بی هوازی ها که به انکوباسیون طولانی مدت نیاز دارند، روش انتشار دیسک یک روش قابل قبول نمی باشد.

**7) خوانش، گزارش و تفسیر نتایج**

* بعد از انکوباسیون مناسب خوانش و گزارش و تفسیر دیسک ها به انجام می رسد.
* در جداول CLSI بر اساس قطر هاله عدم رشد یا اعداد MIC، واکنش یک باکتری به آنتی بیوتیک در سه دسته کلی مقاوم Resistant (R)، نیمه حساس Intermediate (I) و حساسSusceptible (S) قرار می گیرد.
* اخیراً واژه ای به نام حساسیت وابسه به دوز susceptible-dose dependent یا SDD و غیرحساسnon-susceptible یا NS برای برخی آنتی بیوتیکها تعریف شده است.

**حساس (S)**: اصطلاح حساس به گروهي از باکتری‌ها گفته می‌شود که باتوجه ‌به غلظت آنتی‌بیوتیک و بر اساس دوز توصيه شده كه معمولاً در محل عفونت به دست می‌آید، مهار می‌شوند و معمولاً اثربخشی بالینی هم خواهد داشت.

**نیمه حساس (I):** اصطلاح نیمه حساس یا حساسیت بينابيني به گروهي از باکتری‌ها گفته می‌شود كه با توجه ‌به دوز متوقف‌کننده رشد (MIC) پاسخي پایین تر از با کتری‌های حساس می‌دهند.

**مقاوم (R):** اصطلاح مقاوم به گروهي از باکتری‌ها گفته می‌شود كه:

1. رشد آنها با غلظت‌های معمولي دارو با دوز متداول تجويزشده مهار نشود.

2. هاله عدم رشد به‌دست‌آمده از آنها به علت مکانیسم‌هایی ويژه مقاومت ميكروبي نظير بتالاكتامازهايي مانند (MRSAها ياESBLها) بايد به‌صورت مقاوم گزارش گردد. همچنين در مطالعات درماني، اثربخشي باليني عامل ضدميكروبي براي اين باكتري نشان داده نشده است.

**حساسیت وابسه به دوز** **یا** **SDD**: این واژه برای برخی آنتی بیوتیکها جایگزین گزینه نیمه حساس شده است که به این معنی می باشد با افزایش دوز مصرف برخی آنتی بیوتیکها می توان درمان برخی عفونتها را به انجام رساند. در استافیلوکوک آرئوس برای آنتی بیوتیک سفتارولین، در انتروباکترال ها برای آنتی بیوتیک های سفپیم، پپیراسیلین و پپیراسیلین-تازوباکتام و در باکتری انتروکوک فاسیوم برای آنتی بیوتیک داپتومایسین اصطلاح SDD تعریف شده است.

**غیرحساس (NS)**: برای برخی از آنتی بیوتیک ها در مورد بعضی از باکتری ها چون هنوز شواهد علمی مقاومت ثابت نشده است در صورتی که قطر هاله عدم رشد یا عدد MIC آنها در محدوده حساس و نیمه حساس نباشد به جای گزارش مقاوم برای آنها، غیرحساس گزارش می شود. برای مثال برای آنتی بیوتیک لفامولین در باکتری استافیلوکوک چون داخل جدول محدوده مقاومت (R) برای آن گزارش نشده است اگر برای این آنتی بیوتیک در روش دیسک عدد به دست آمده از 23 کمتر باشد یا در روش MIC عدد بیشتر از 25/0 باشد در جواب نهایی در قسمت مقاومت به صورت non-susceptible می تواند گزارش شود (به جای مقاوم).

* نحوه خوانش و گزارش آنتی بیوگرام شامل 4 مرحله می باشد که جلوتر در دستورالعمل مربوطه گفته شده است.

**(3)** **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.