**6. خوانش و گزارش**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل خوانش و گزارش آنتی بیوگرام** | |
| **کد سند:** | D-007-0025 | |
| **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 نحوه خوانش آنتی بیوگرام و حالات استثناء شامل وجود کلنی داخل هاله ها، هاله های دوگانه و غیره و همچنین تمامی نکات مربوط به گزارش استاندارد آنتی بیوگرام شرح داده شده است.

**(2) شرح دستورالعمل:**

خوانش، تفسیر و گزارش آنتی بیوگرام های گذاشته شده در 4 مرحله به انجام می رسد:

1) بررسی تست های تشخیصی 2) بررسی اولیه پلیت مولرهینتون آگار 3) خوانش پلیت ها 4) تفسیر و گزارش آنتی بیوگرام

**1) بررسی تست های تشخیصی**

* در ابتدا باید چک شود آیا تشخیص اولیه باکتری که بر اساس آن نوع دیسک های آنتی بیوگرام انتخاب شده اند با تشخیص قطعی باکتری همخوانی دارد یا خیر و اگر همخوانی نداشته باشد باید آنتی بیوگرام دقیق طبق باکتری تشخیص داده شده مجدد تکرار گردد.
* اگر تست های اولیه تشخیص موفق بوده و به درستی باکتری تشخیص داده شده است خوانش آنتی بیوگرام به انجام می رسد.

**2) بررسی اولیه پلیت مولر هینتون آگار**

* در اولین مرحله خوانش پلیت های آنتی بیوگرام، قبل از بررسی نتیجه هر دیسک آنتی­بیوتیکی، کیفیت کشت ها باید از نظر رشد چمنی مورد تأیید قرار گیرند و رشد کلی باکتری و هاله­های عدم رشد و رشد بین ناحیه عدم رشد در اطراف هر دیسک به صورت چشمی بررسی شوند.
* رشد در مناطق پلیت آنتی بیوگرام که دیسک ها حضور ندارند باید یکدست و یکنواخت باشد.
* رشد غیریکنواخت یا نقطه ای می تواند نشانه کشت چمنی با تعداد ناکافی از باکتری ها (تلقیح باکتری کمتر از استاندارد نیم مک فارلند و در نتیجه رقیق بودن مایع میکروبی) یا عدم رعایت فاصله زمانی استاندارد تلقیح و دیسک گذاری (عدم رعایت قانون 15-15-15) و یا کهنه بودن کشت اولیه باشد.
* در این حالت (کشت غیریکدست) آنتی بیوگرام نباید تفسیر شود و با رعایت تمامی استانداردها از جمله رعایت زمان دیسک گذاری و تلقیح استاندارد و دقیق از باکتری تکرار گردد.
* اگر باکتری خالص است، تکرار آنتی بیوگرام بهتر است با استفاده از باکتری های رشد کرده روی پلیت آنتی بیوگرام به انجام برسد چون کشت 24 ساعته و تازه تر از کشت اولیه است که از زمان آن 48 ساعت گذشته است.
* همچنین پلیت باید برای کشت خالص بررسی شود که باید بدون حضور کلنی های باکتری دیگر باشد. کشت مخلوط یا آلوده با وجود کلنی مشخص دیگر در بین کشت چمنی باکتری اصلی قابل مشاهده خواهد بود. در این حالت نیز آنتی بیوگرام نباید تفسیر شود و ابتدا باید با کمک کشت خطی باکتری های مخلوط از یکدیگر جدا شوند و سپس آنتی بیوگرام به صورت مجزا (اگر همه آنها عامل عفونت هستند) به انجام برسد.

**3) خوانش پلیت ها**

* بعد از تأیید پلیت ها و شرایط کشت، پلیت های آنتی بیوگرام بسته به نوع محیط و گاهی بسته به نوع آنتی بیوتیک به دو صورت نور تابیده شده به پلیت و یا نور عبوری از داخل هاله ها بررسی و خوانش می شوند.
* هاله های عدم رشد دیسک ها در پلیت های مولر هینتون معمولی از پشت پلیت در پس زمینه تاریک و با نور بازتابی و هاله ها اندازه گیری می شوند.
* در مورد پلیت های مولرهینتون خوندار، درب آن برداشته شده و از جلو با نور منعکس شده تابیده به سطح پلیت خوانده می شوند.
* **نکته:** دیسک های موپریسین، ونکومایسین، سفوکسیتین، تدیزولید و لینزولید باید با نور عبوری از داخل هاله خوانش شوند. هر نوع رشد ضعیف یا کلنی های تک از همان باکتری داخل هاله عدم رشد به عنوان مقاومت در نظر گرفته می شود.
* برای اندازه گیری هاله های عدم رشد، حاشیه (خط مرز) هاله عدم رشد باید ناحیه ای در نظر گرفته شود که رشد آشکار و قابل مشاهده ای را نشان نمی دهد و با چشم غیرمسلح قابل تشخیص است. سپس قطر کامل نواحی بازدارندگی از جمله قطر خود دیسک (6 میلی متر) بر حسب میلی متر (mm) را اندازه گیری و یادداشت کنید.
* رشد ضعیف کلنی‌های کوچک را که فقط با بزرگ‌نمایی یک عدسی در لبه ناحیه رشد مهار شده قابل تشخیص هستند، نادیده بگیرید.

**تفسیر موارد خاص و استثناء در خوانش دیسک ها**

**1. هاله های با حاشیه مضرسی، محو یا نامشخص یا فوزی**

در این حالت لبه خط هاله مهار رشد در ناحیه کاملاً واضح در نظر گرفته می شود و قسمت حاشیه مضرسی جزو هاله نمی آید و قطر هاله از محلی که عدم رشد یکنواخت دیده می شود اندازه گیری می شود.

**2. وجود کلنی در داخل هاله ها**

* رشد واضح کلنی ها در داخل هاله ها نباید نادیده گرفته شود و با مشاهده چنین کلنی هایی در مرحله اول باید از خالص بودن کشت اولیه (با رجوع به پلیت اولیه و بررسی دقیق همه پلیت) اطمینان حاصل شود.
* در این حالت اگر احتمال آلودگی در حین نمونه گیری رد می شود و بیماریزا بودن همگی باکتری ها تأیید می شود، در ابتدا باید از پلیت اولیه، کشت خطی به انجام برسد تا کلنی های ناخالص از هم جدا شوند و سپس جداگانه از هر کدام آنتی بیوگرام به انجام برسد.
* گاهی ممکن است همراه یک باکتری بیماریزای اصلی، کلنی های فلور طبیعی مانند استافیلوکوک های کواگولاز منفی با تعداد کم به صورت تکی داخل پلیت اولیه موجود باشند و در آنتی بیوگرام داخل هاله های باکتری اصلی بیماریزا رشد کنند که در این حالت این کلنی ها بی ارزش هستند و در نظر گرفته نمی شوند و نیازی به تکرار آنتی بیوگرام نیست و قطر هاله های اصلی برای باکتری بیماریزا اندازه گیری و گزارش می شوند.
* اگر از خالص بودن پلیت اطمینان حاصل شد و مشخص شد که کلنی های داخل هاله ها همان باکتری اصلی هستند، این کلنی های تک به عنوان واریانت یا جهش مقاوم از باکتری محسوب شده و سویه های جدا شده باید مقاوم در نظر گرفته شوند.
* در این حالت که کشت خالص است، بجز موارد استثناء که در ادامه خواهند آمد، خط اندازه گیری هاله عدم رشد را باید در انتهای کلنی های رشد کرده داخل هاله عدم رشد اصلی خوانش نمود و اگر کلنی های تکی تا لبه دیسک رشد کرده باشند ناحیه به طور کامل مقاوم در نظر گرفته می شود.

**3. مناطق عدم رشد دو هاله ای (دابل زون)**

* وقتی دو هاله عدم رشد دیده می شود (یک هاله داخلی و یک هاله خارجی)، همانند حالت قبلی گفته شده در مورد وجود کلنی های تک داخل هاله ها، ابتدا باید خلوص کلنی بررسی شود و اگر کشت ناخالص بود در ابتدا کشت خطی به انجام برسد تا کلنی های ناخالص از هم جدا شوند و جداگانه از هر کدام آنتی بیوگرام به انجام برسد.
* اگر کشت خالص بود باید قطر هاله داخلی اندازه گیری شود.

**4. خوانش پلیت های** **مولر هینتون خوندار با همولیز**

* ناحیه همولیز بتا بر روی محیط مولر هینتون خوندار (برای مثال در استرپتوکوک پایوژنز)، چون روی محیط انتشار دارد، معمولاً بدون رشد است و قطر هاله اصلی بدون در نظر گرفتن همولیز، اندازه گیری می شود.
* ناحیه همولیز آلفا معمولاً روی محیط انتشار ندارد و بنابراین داخل آن ممکن است کلنی رشد کرده دیده شود. در اینجا هاله عدم رشد بدون در نظر گرفتن همولیز آلفا در جایی که هیچ کلنی رشد نکرده، اندازه گیری می شود. این حالت در مورد باکتری پنوموکوک به خصوص با آنتی بیوتیک های دسته بتالاکتام معمول است.

**5. تفسیر هاله عدم رشد باکتری پروتئوس**

برای تمامی دیسک های تست شده برای این باکتری باید حرکت سوارمینگ باکتری که به صورت هاله رشد غیریکنواخت داخل هاله عدم رشد دیده می شود در نظر گرفته نشود و قطر هاله اصلی اندازه گیری شود.

**6. باکتری اشریشیاکلی با دیسک فسفومایسین**

طبق دستورالعمل EUCAST تمامی کلنی های رشد کرده اشریشیاکلی داخل هاله عدم رشد دیسک فسفومایسین چشم پوشی می شوند و هاله اصلی اندازه گیری می شود. فقط در صورت رشد بسیار شدید و محو شدن هاله عدم رشد، سویه به صورت مقاوم گزارش می شود.

**7.** **باکتری استافیلوکوکوس آرئوس با پنی سیلین**

هم قطر هاله عدم رشد و هم شکل لبه هاله رشد برای مقاومت در نظر گرفته می شود. لبه ناحیه محو (غیر تیز) و قطر ناحیه ≥ 29 میلی متر حساس در نظر گرفته می شوند ولی وجود خط لبه هاله عدم رشد به صورت لبه تیز (یا صخره ای) علی رغم وجود قطر عدم رشد بیشتر از 29 میلی متر مقاوم است چون این سویه تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز می باشد.

**8. گونه های** **باکتری انتروکوک با ونکومایسین**

در دستورالعمل CLSI برای دیسک ونکومایسین در انتروکوک، هاله عدم رشد برابر 17 میلی متر و بیشتر حساس در نظر گرفته می شود و لبه هاله عدم ملاک نیست اما در دستورالعمل EUCAST همانند دیسک پنی سیلین در استافیلوکوک آرئوس، علاوه بر قطر هاله، لبه آن هم مدنظر قرار می گیرد که البته اینجا حالت عکس دارد و لبه تیز صخره ای با قطر در محدوده حساس نشانه حساسیت باکتری به ونکومایسین است.

**9.** **گونه های انتروباکترال با دیسک های آمپی سیلین، آمپی سیلین-سولباکتام و آمپی سیلین-کلاولانیک اسید**

در برخی از بچ های مولر هینتون آگار برای این دیسک ها در مورد انتروباکترالها ممکن است رشد ضعیف در لبه هاله عدم رشد دیده شوند که این رشد ضعیف در نظر گرفته نمی شود و قطر هاله از قبل از آن خوانش می شود.

**10.** **گونه های** **انتروباکترال با دیسک های مسیلینام و تموسیلین**

در انتروباکترال ها برای این دو دیسک کلنی های تک رشد کرده داخل هاله عدم رشد در نظر گرفته نمی شوند مگر اینکه کلنی ها زیاد و تا لبه دیسک ها رشد کرده باشند.

**11. باکتری هموفیلوس آنفولانزا با عوامل بتالاکتام**

در این موارد کلنی های رشد کرده داخل هاله عدم رشد در نظر گرفته نمی شوند و قطر هاله بیرونی خوانش می شود.

**12. دیسک های تری متوپریم و تری متوپریم-سولفامتوکسازول**

* در مورد این دو دیسک، برای اغلب باکتری ها از رشد محو یا رشد ضعیف بالاتر از دیسک در منطقه هاله عدم رشد، چشم پوشی می شود.
* در دستورالعمل CLSI آمده است که 20 درصد این رشد محو بعد از لبه هاله عدم رشد را در نظر نگیرید.
* برای 4 باکتری **آئروموناس،** **استنوتروفوموناس مالتوفیلیا، آکروموباکتر گزیلوس اکسیدانس و** **بولخوردریا سودومالئی** با تری متوپریم-سولفامتوکسازول رشد محو در نظر گرفته نمی شود و بیرونی ترین هاله عدم رشد اندازه گیری می شود و اگر حساس باشد به عنوان حساس گزارش می شود.

**13. خوانش تدیزولید و لینزولید**

* برای خوانش هاله عدم رشد دیسک های تدیزولید و لینزولید در استافیلوکوک و انتروکوک ناحیه‌ مهار کامل با نور عبوری اندازه‌گیری می شود و وجود کلنی های تک در هاله عدم رشد از همان باکتری و اگر قطر هاله داخلی بعد از این کلنی های تک در محدوده حساس نباشد به عنوان مقاومت در نظر گرفته می شود.
* همچنین برای این دو دیسک رشد حتی ضعیف و محو در لبه هاله در نظر گرفته می شود و قطر هاله از جایی که هیچ رشدی وجود ندارد اندازه گیری می شود.

**14. پدیده یا اثر عقاب**

* گاهی در روش آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک، یک اثر به صورت هاله دوگانه مشابه سیبل تیراندازی دیده می شود به این صورت که در منطقه نزدیک به دیسک که غلظت دارو بالاست رشد دیده می شود و در منطقه دورتر که غلظت دارو کمتر شده است و انتظار داریم که باکتری رشد کند، هاله عدم رشد دیده می شود که به این پدیده اثر عقاب گفته می شود.
* در این حالت قطر هاله داخلی اندازه گیری می شود که معمولاً مقاومت دیده می شود.

**4) تفسیر و گزارش آنتی بیوگرام**

* پس از اندازه­گیری و یادداشت قطر هاله­ عدم رشد هر دیسک، تفسیر هر هاله بر اساس قطر به دست آمده و مقایسه آن با جدول هر باکتری که به طور کامل آورده شدند به انجام می رسد.
* بر خلاف گزارش عدد MIC، اندازه ناحیه ممانعت از رشد فقط برای طبقه بندی تفسیری کاربرد دارد و استفاده بالینی ندارد (بجز موارد خاص مانند ثبت اعداد در نرم افزار هونت).
* بنابراین زمانی که تست با انتشار دیسک انجام می شود همانطور که گفته شد قطر هاله عدم رشد به صورت کمی گزارش نمی­شود بلکه بر اساس جداول هر باکتری به صورت حساس (S)، نیمه حساس (I)، مقاوم (R) و برای برخی از آنتی بیوتیک ها که اشاره شد به صورت حساس وابسته به دوز (SDD) و غیرحساس (NS) گزارش انجام می گیرد.

**(6) محدودیت ها و تداخلات:**

* در برخی موارد، رشد کلنی داخل هاله عدم رشد یکی از راهها برای نشان دادن الگوی مقاومت بالینی به برخی از داروها در سویه های خاص است. مثال کلیدی این موارد شامل مقاومت به متی سیلین (با دیسک سفوکسیتین) در استافیلوکوک ها، مقاومت به ونکومایسین در بعضی انتروکوک ها و مقاومت به تدیزولید و لینزولید در استافیلوکوک ها و انتروکوک ها می باشد. در مورد این دیسک ها همانطور که گفته شد برای دیدن این کلنی های تک داخل هاله ها، از نور عبوری استفاده می شود.
* در مورد استرپتوکوک ها که دارای همولیز آلفا یا بتا هستند گاهی تمایز بین همولیز و رشد می تواند گیج کننده باشد. برای تمایز بهتر بین همولیز و رشد، زیر منبع نور پلیت را به جلو و عقب کج کنید تا ناحیه همولیز مشخص شود و در این حالت فقط هاله عدم رشد واقعی و نه ناحیه همولیز را اندازه بگیرید.

**(7) مستندات و سوابق:**

تمامی مستندات خوانش و قطر هاله های اندازه گیری شده برای هر باکتری جدا شده از بیمار که آنتی بیوگرام برای آن گذاشته شده است باید در بخش موجود باشد. در صورت وجود مشکلاتی در آنتی بیوگرام مانند دو هاله ای بودن که نشان دهنده مخلوط بودن نمونه و نیاز به تکرار آزمایش است باید دلایل این تکرار مستند شود.

**(8) 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.