دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب ۲

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

زمینه ی نظری

- در علم میکروب شناسی به این دسته از دارو ها که بروی باکتری ها اثر می گذارند آنتی بیوتیک می گویند . هر دسته از انتی بیوتیک ها بر روی باکتری خاصی تاثیر دارد و این دارو ها بر روی ویروس و یا سایر میکروارگانیسم ها تاثیری نخواهند داشت.
- این تست به ما نشان می دهد که کدام یک از آنتی بیوتیک ها بر روی میکروب مورد نظر موثر است . همانطور که می دانید نمونه های گرفته شده برای بخش میکروبیولوژی متفاوت هستند . اما نمونه ها هر چی که باشند (خون، مایع مغزی-نخائی، مدفوع ، ادرار ، خلط و ..) در آخر معمولا آنتی بیوگرام می شوند تا داروی موثر تجویز شود.

کاربرد تست آنتی بیوگرام و روشهای تست حساسیت دارویی باکتری ها

• آنتی بیوتیکها مواد شیمیایی هستند که بصورت سنتتیک یا طبیعی از قارچ ها و باکتری ها استخراج می شوند. طیف فعالیت ضد میکروبی داروهای مختلف، متفاوت است. بعضی از آنها دامنه فعالیت بسیار محدودی داشته و تنها بر روی یک گروه از میکروارگانیسم ها موثر می باشند. برخی دیگر بطور وسیع الطیف بر روی بسیاری از میکروارگانیسم ها تاثیر دارند. بنابراین این سوال در ذهن ایجاد می شود که ما از کجا بدانیم کدام آنتی بیوتیک بر روی چه باکتری هایی موثر است؟

• جواب سوال ما **تست آنتی بیوگرام** است که بصورت روتین در آزمایشگاه های تشخیصی انجام می گیرد. در واقع می توان اذعان داشت که در عفونت های میکروبی، آزمایشگاه دارو را تجویز می کند نه پزشک.

زمینه ی نظری

- تعیین حساسیت باکتری‌ها به مواد ضد میکروبی توسط یکی از دو روش اصلی زیر صورت می-گیرد:
- ۱- رقیق کردن ۲- انتشار
- استفاده از یک روش استاندارد شده که تمام عوامل مؤثر بر فعالیت ضد میکروبی را کنترل می‌کند، اهمیت دارد.
- روش رقیق کردن:
- این روش معمولاً به صورت دیسک پلیت، قطره پلیت و سیلندر پلیت انجام می‌شود.

- در این روش مقادیر درجه‌بندی شده و مشخصی از مواد آنتی بیوتیکی داخل محیط کشت مایع یا جامد قرار داده می‌شوند. معمولاً دو بار رقیق سازی مواد ضد میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس به محیط کشت، باکتری مورد آزمایش اضافه می‌گردد و در انکوباتور قرار می‌گیرد.

- قدم آخر پیدا کردن آن مقداری از آنتی بیوتیک است که بتواند از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند یا آن‌ها را بکشد. مزیت استفاده از روش‌های رقیق کردن آب گوشت این است که می‌توان نتایج کمی را به دست آورد که نشانگر مقداری از دارو است که مهار یا کشتن میکروارگانیسم را سبب می‌شود.

اصول آنتی بیوگرام

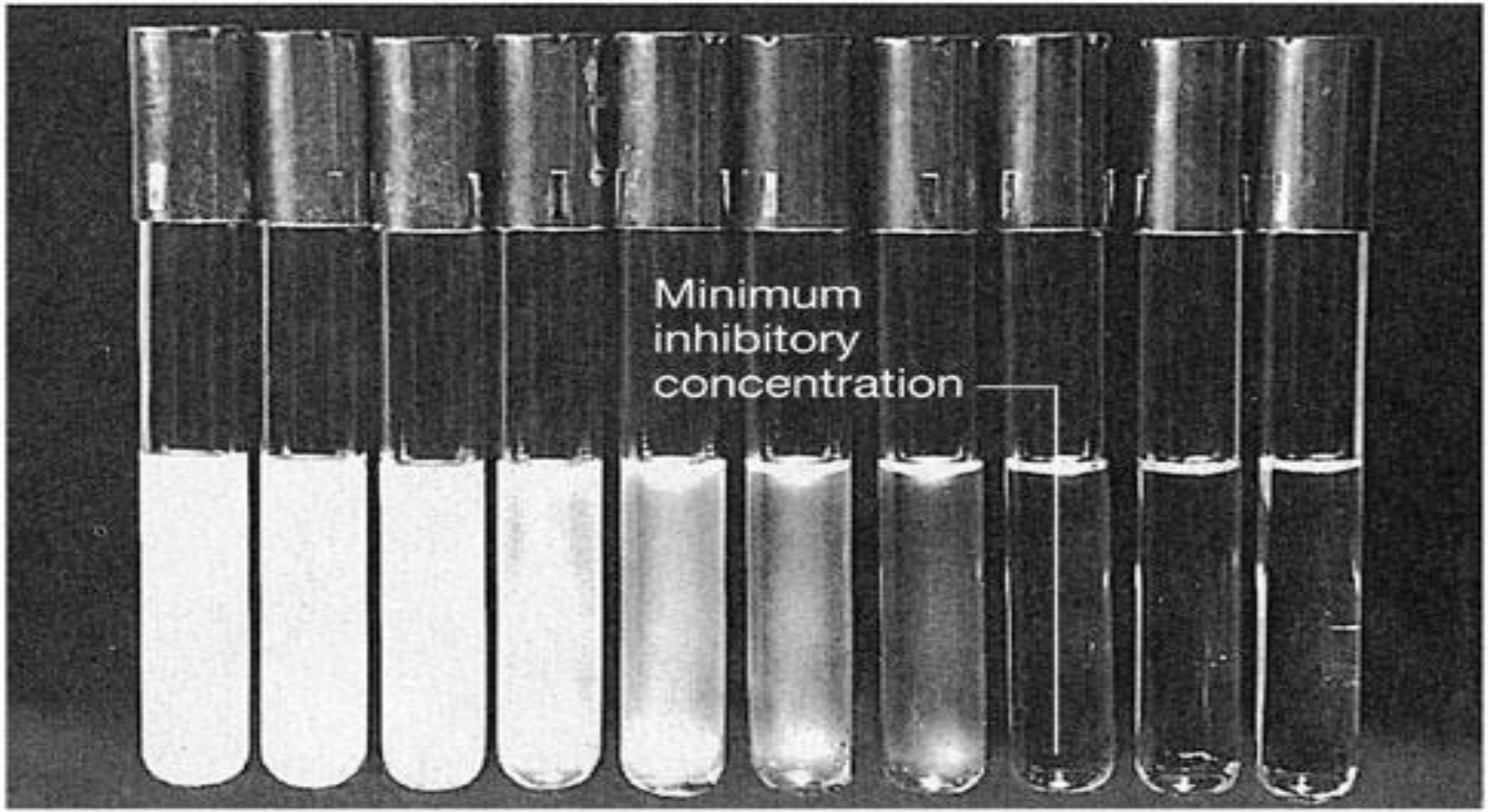
- اصول آنتی بیوگرام بر پایه دو اصطلاح میکروب شناسی است یعنی:

. Minimum Inihibitory Concentration (MIC)

. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

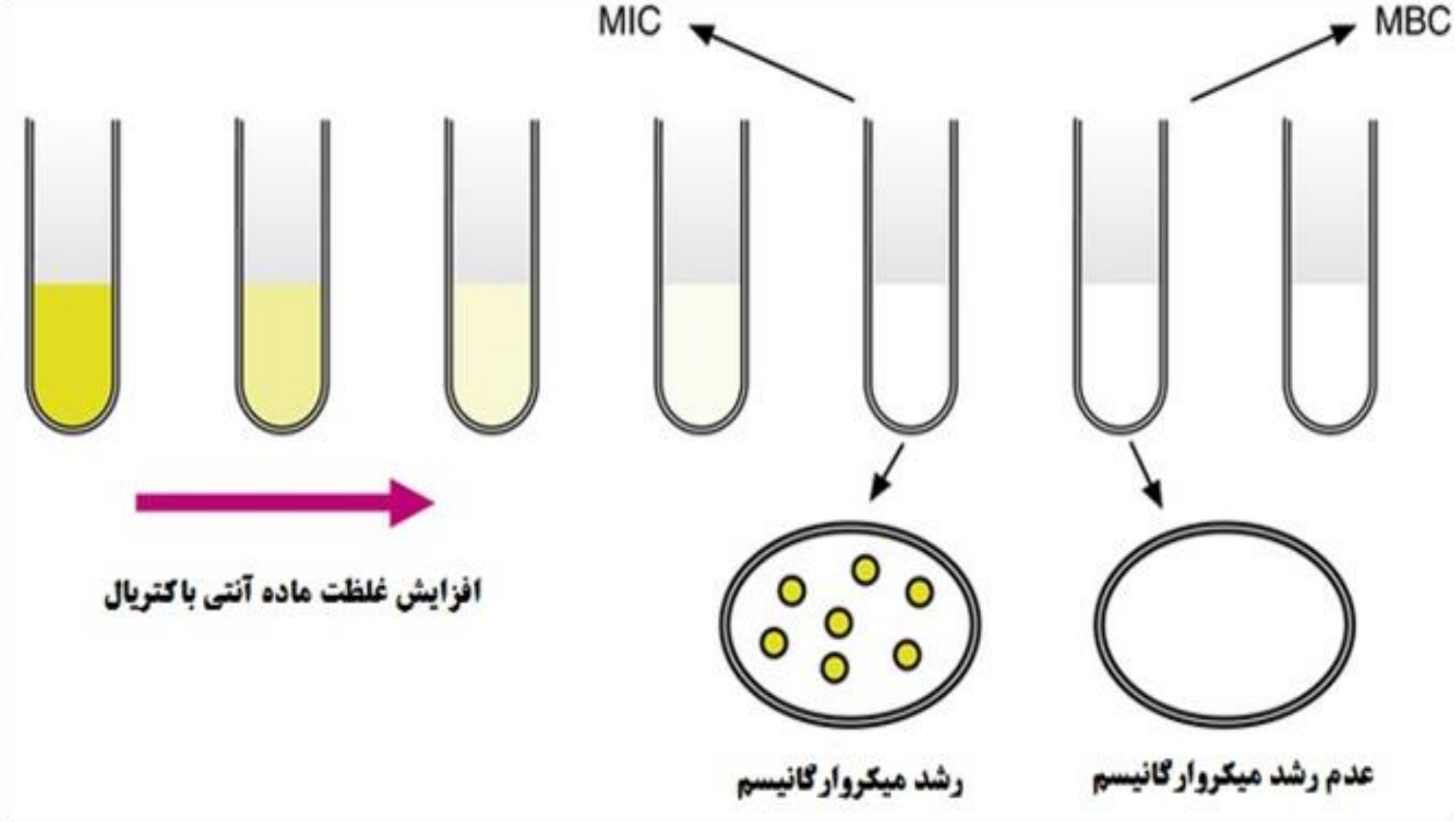
- آزمایش حداقل غلظت مهاری (MIC) روش دیگری است. در این روش غلظت آنتی بیوتیک لازم برای مهارکردن رشد یک نمونه تلقیح شده استاندارد در شرایط تعریف شده را با دقت بیشتری اندازه گیری می‌کنند.

- یک روش رقیق سازی میکروسکوپی نیمه‌خودکار در این روش به کار می‌رود که در آن مقادیر تعریف شده‌ای از آنتی‌بیوتیک در حجم اندک و مشخصی از آب گوشت حل شده و تعداد استاندارد شده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در داخل آن تلقیح می‌گردند.


Minimum
inhibitory
concentration
T. D. Brock

- حداقل غلظت مهاری (MIC)، آخرین ظرف آب گوشت (کمترین غلظت آنتی بیوتیک) است که شفاف (یعنی بدون رشد میکروبی) باقی می‌ماند. حداقل غلظت مهاری، تخمین بهتری از مقدار احتمالی آنتی بیوتیک مورد نیاز برای مهار رشد میکروارگانیسم در بدن فراهم می‌کند و بنابراین به تنظیم مقدار آنتی بیوتیک لازم برای بیمار کمک می‌نماید.

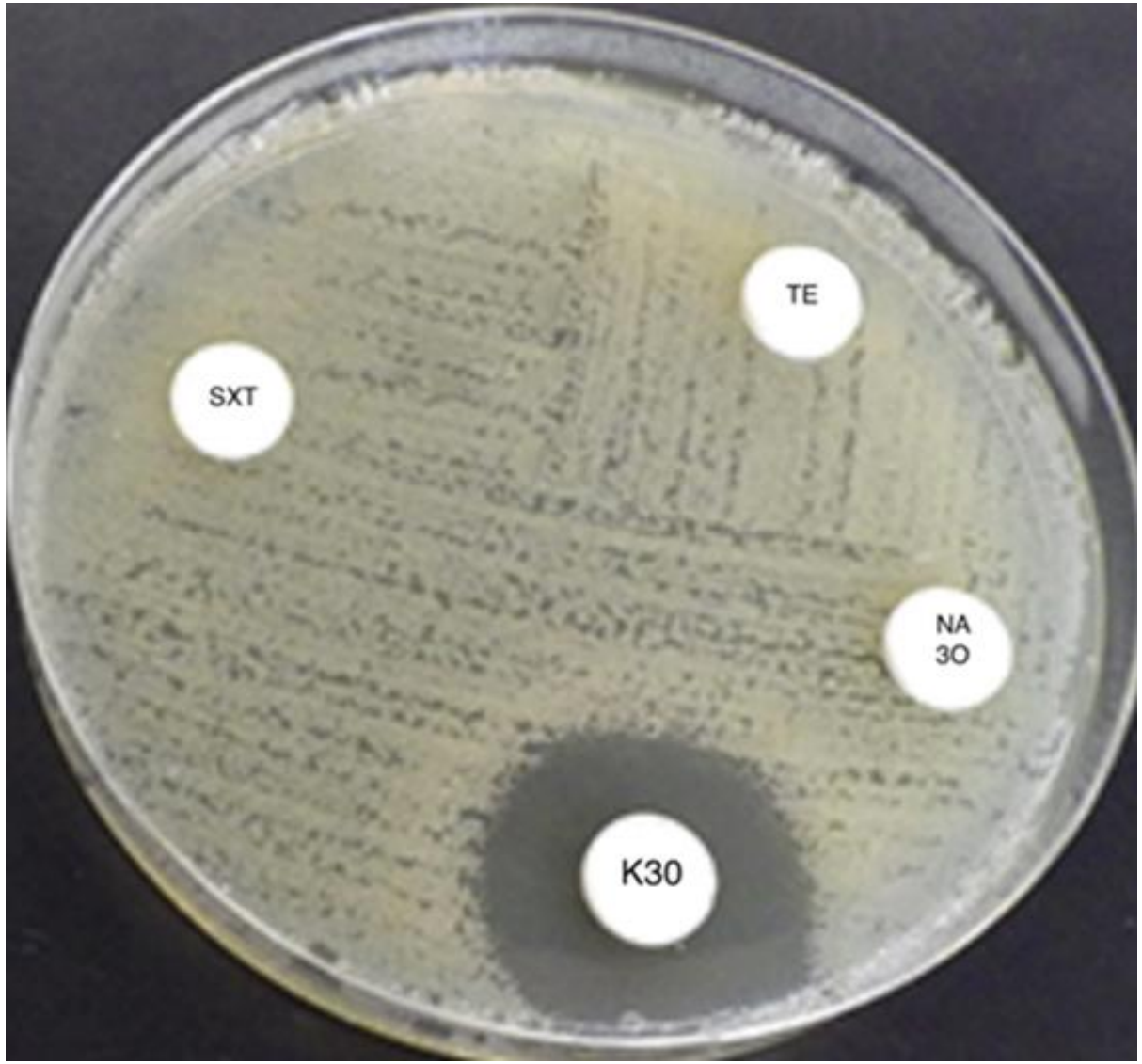
- علاوه بر این‌ها، با تهیه کشت مجدد از آب گوشت شفاف بر روی محیط جامد بدون آنتی بیوتیک، می‌توان اثرات باکتری کشی آنتی بیوتیک را تخمین زد. نتیجه به دست آمده، مثلاً کاهش واحدهای تشکیل دهنده کلنی به میزان ۹۹/۹٪ کمتر از نمونه کنترل، حداقل غلظت کشنده باکتری یا MBC خوانده می‌شود.


MIC
MBC
افزایش غلظت ماده آنتی باکتریال
رشد میکروارگانیسم
عدم رشد میکروارگانیسم

- **روش انتشار**

- آزمایش انتشار از دیسک برای تعیین حساسیت که کاربرد رایجی دارد، می‌بایست به صورت منطقی مورد استفاده قرار گرفته و با دقت و تأمل تفسیر گردد. به طور کلی، فقط یکی از اعضای هر رده مواد ضد میکروبی در این آزمایش نشان داده می‌شوند.

- شایع ترین روش مورد استفاده، آزمون انتشار در صفحه است. یک صفحه کاغذ صافی حاوی مقادیر اندازه گیری شده‌ی مواد ضد میکروبی بر سطح یک محیط کشت جامد که به آن ارگانیسم‌های آزمایش تلقیح شده است، قرار داده می‌شود. پس از انکوباسیون، قطر ناحیه‌ی شفاف دور مواد ضد میکروبی ریخته شده که بر اثر مهار رشد باکتری پدید آمده، به عنوان شاخص قدرت مهاری ماده ضد میکروبی در برابر ارگانیسم مورد آزمایش در نظر گرفته می‌شود.


SXT
TE
NA
30
K30

- این روش علاوه بر واکنش مواد ضد میکروبی و میکروارگانیسم به عوامل فیزیکی و شیمیایی مختلفی مانند ماهیت و قدرت انتشار محیط کشت و پایداری مواد ضد میکروبی و اندازه مولکولی مواد ضد میکروبی هم وابسته است. از طرف دیگر، استاندارد کردن شرایط، تعیین حساسیت ارگانیسم را امکان پذیر می‌سازد.

- ارتباط بین لگاریتم حداقل غلظت مهار کننده در آزمون‌های رقیق کردن و قطر محدوده‌ی مهار شده در آزمون‌های انتشار را می‌توان با رسم منحنی‌های رگرسیون نشان داد.

- با استفاده از یک صفحه برای هر آنتی بیوتیک، تحت شرایط استاندارد، می‌توان مقاومت یا حساسیت میکروارگانیسم را نسبت به وضعیت استاندارد به دست آورد. (از طریق مقایسه با اندازه‌ی استاندارد ناحیه‌ی مهار شده دور صفحه توسط همان آنتی بیوتیک).

- اندازه مناطق مهار رشد، برحسب ویژگیهای مولکولی مواد ضد میکروبی مختلف، متفاوت است. بنابراین اندازه منطقه مهاری یک ماده ضد میکروبی را نمی‌توان با اندازه منطقه مهاری ماده ضد میکروبی دیگری که بر همان ارگانیسم تأثیر دارد مقایسه کرد.

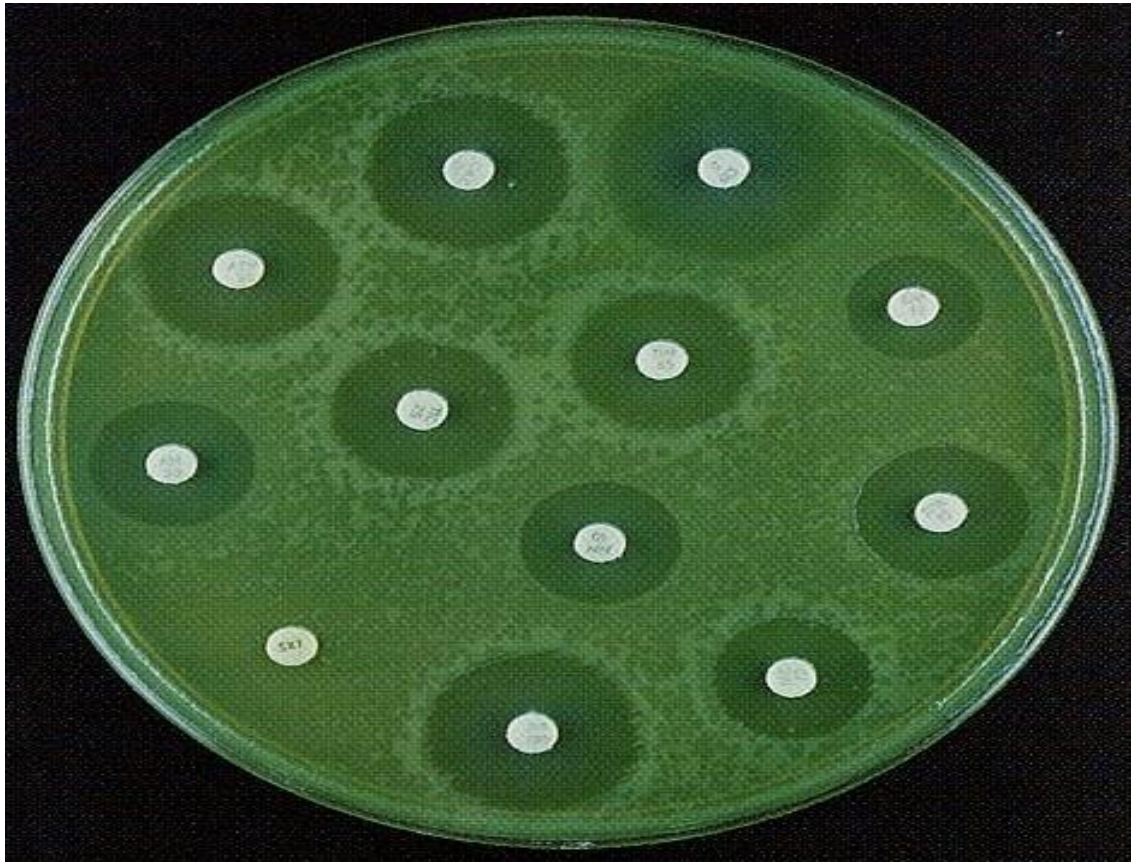
- با این وجود، برای هر ماده‌ی خاص، اندازه این منطقه را می‌توان با یک استاندارد مقایسه نمود.مشروط بر این که محیط کشت، حجم نمونه تلقیح شده و سایر شرایط به دقت کنترل و تنظیم شده باشند. به این ترتیب تعریف یک قطر حداقل منطقه مهاری برای هر ماده ضد میکروبی امکان پذیر می‌شود، که نشان دهنده حساسیت یک نمونه جدا شده در تکنیک انتشار از دیسک می‌باشد.

روش های مختلف انجام تست تعیین حساسیت داروئی

- Disk diffusion (Kirby Bauer)
- Broth micro-dilution MIC (NCCLS) متد رفرنس
- Etest

• روش انتشار دیسک در آگار (Disk diffusion)یکی از روش های روتین و کاربردی در آزمایشگاه می باشد. در این روش دیسک های حاوی آنتی بیوتیک روی محیط کشت جامد قرار می گیرند. این دیسک ها هم اندازه بوده و با غلظت های مشخصی از آنتی بیوتیک آغشته شده اند. **محیط کشت** مورد استفاده در این **تست مولر هینتون آگار** نام دارد. آنتی بیوتیک از دیسک به محیط اطراف منتشر شده و مانع از رشد نمونه میکروبی مورد نظر می شود. با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد به سادگی می توان حساسیت باکتری را نسبت به آنتی بیوتیک ها تعیین نمود.

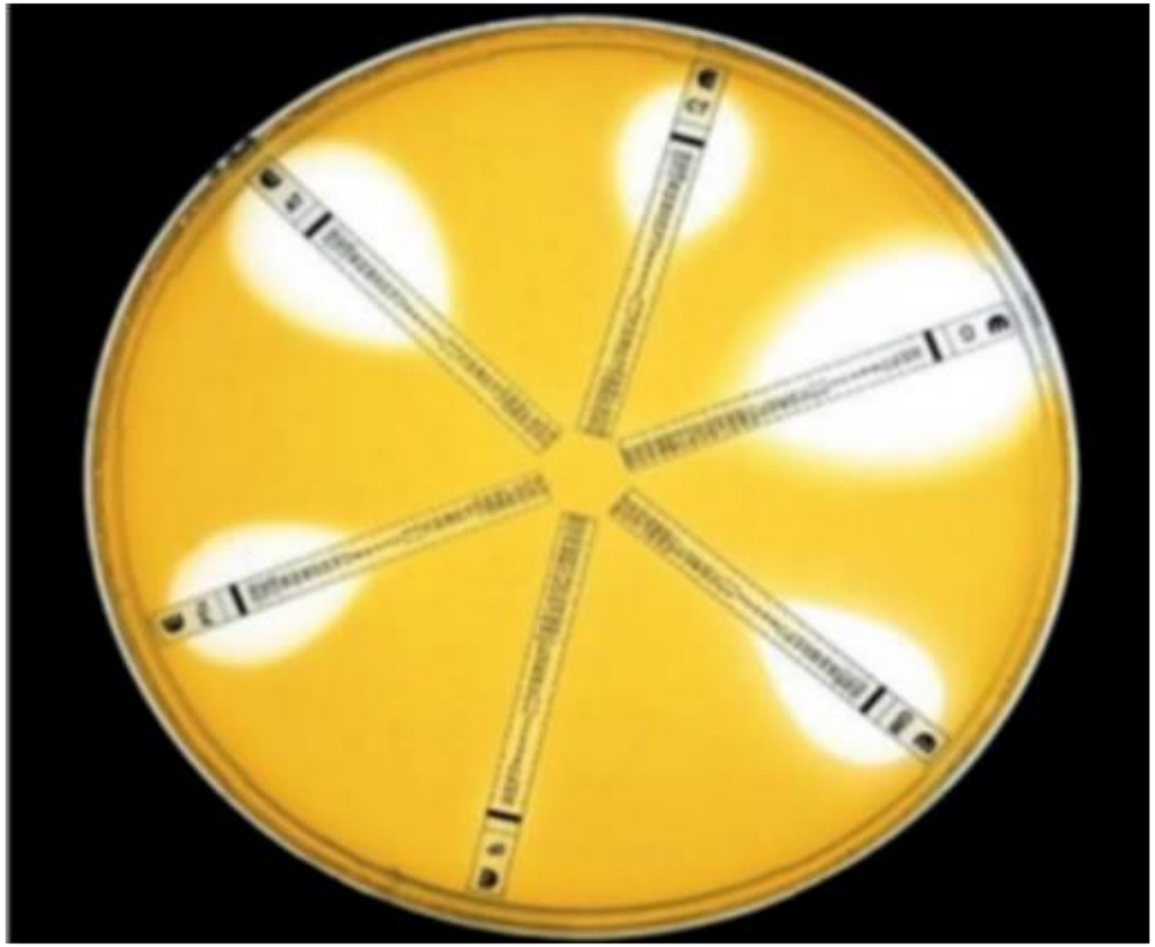
Quality Control of Antimicrobial Susceptibility Tests



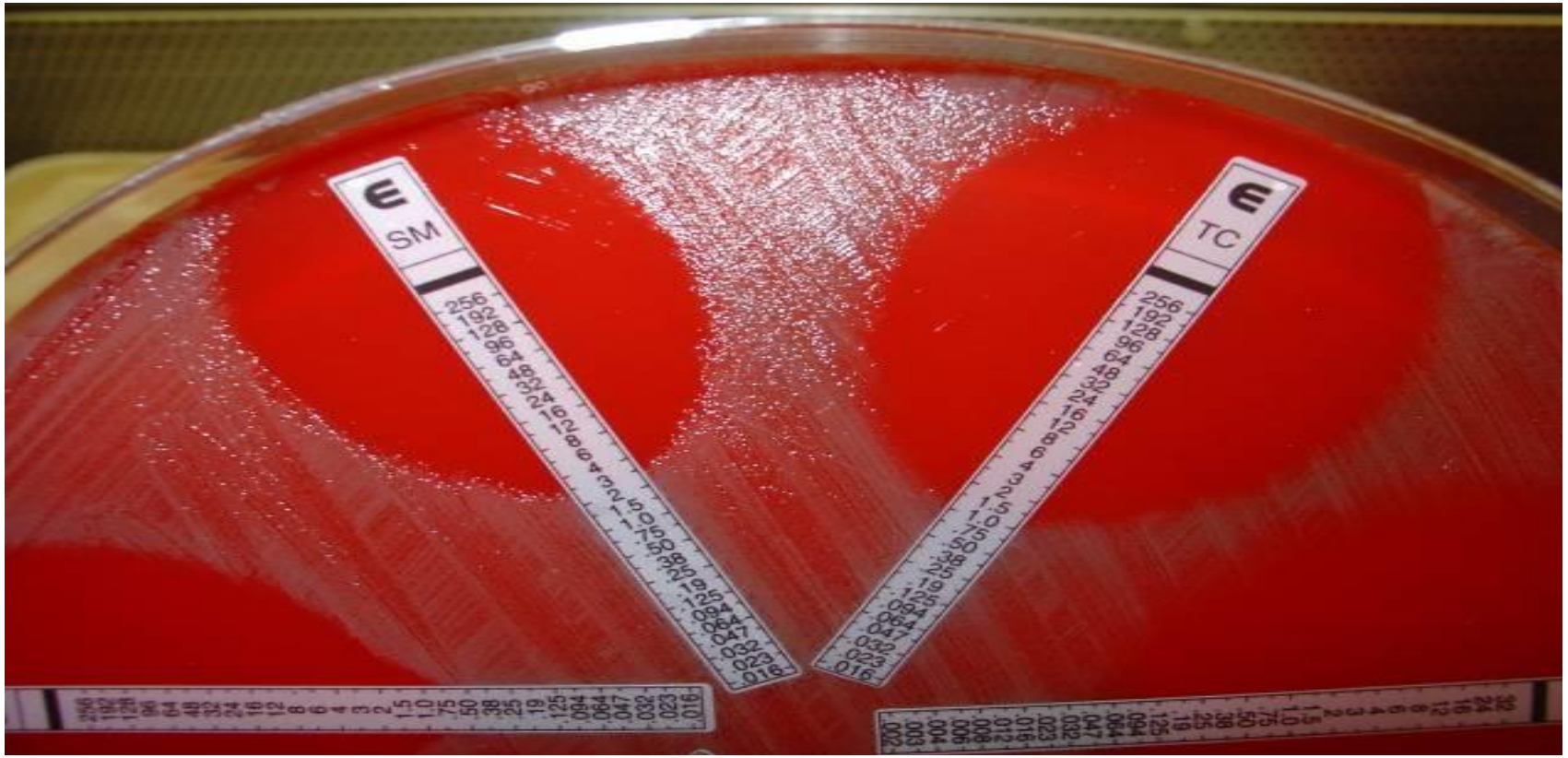
آزمایشEtest

• روش دیگر تعیین حساسیت دارویی باکتری ها، آزمایش Etest می باشد. در این روش باکتری مورد آزمایش به روش خطی در سه جهت بر سطح آگار کشت داده می شود. نوار ها ی پلاستیکی مخصوص Etest بصورت شعاعی برسطح آگار قرار داده می شود. هر نوار بصورت گرادیان غلظت توسط یک آنتی بیوتک آغشته شده است. ابتدای نوار که از غلظت کمتری برخوردار است به سمت مرکز پلیت قرار دارد. پس از کاشت نوار ها، پلیت را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری کرده، سپس هاله بیضوی شکل عدم رشد نمایان می شود.

تست آنتی بیوگرام به روش Etest



Etest – antimicrobial gradient method



وسائل و موارد مورد نیاز برای تست انتی بیوگرام "دیسک دیفیوژن

- لوله حاوی نیم مک فارلند
- لوله حاوی یک سی سی سرم فیزیولوژِی استریل
- دیسک های انتی بیوگرام
- باکتری خالص در محیط کشت مناسب
- محیط کشت مولر هینتون آگار
- خط کش
- دیسک های آنتی بیوگرام
- چراغ الکلی
- پنس استریل، سواب ، انس ، شعله ، هود ، چراغ

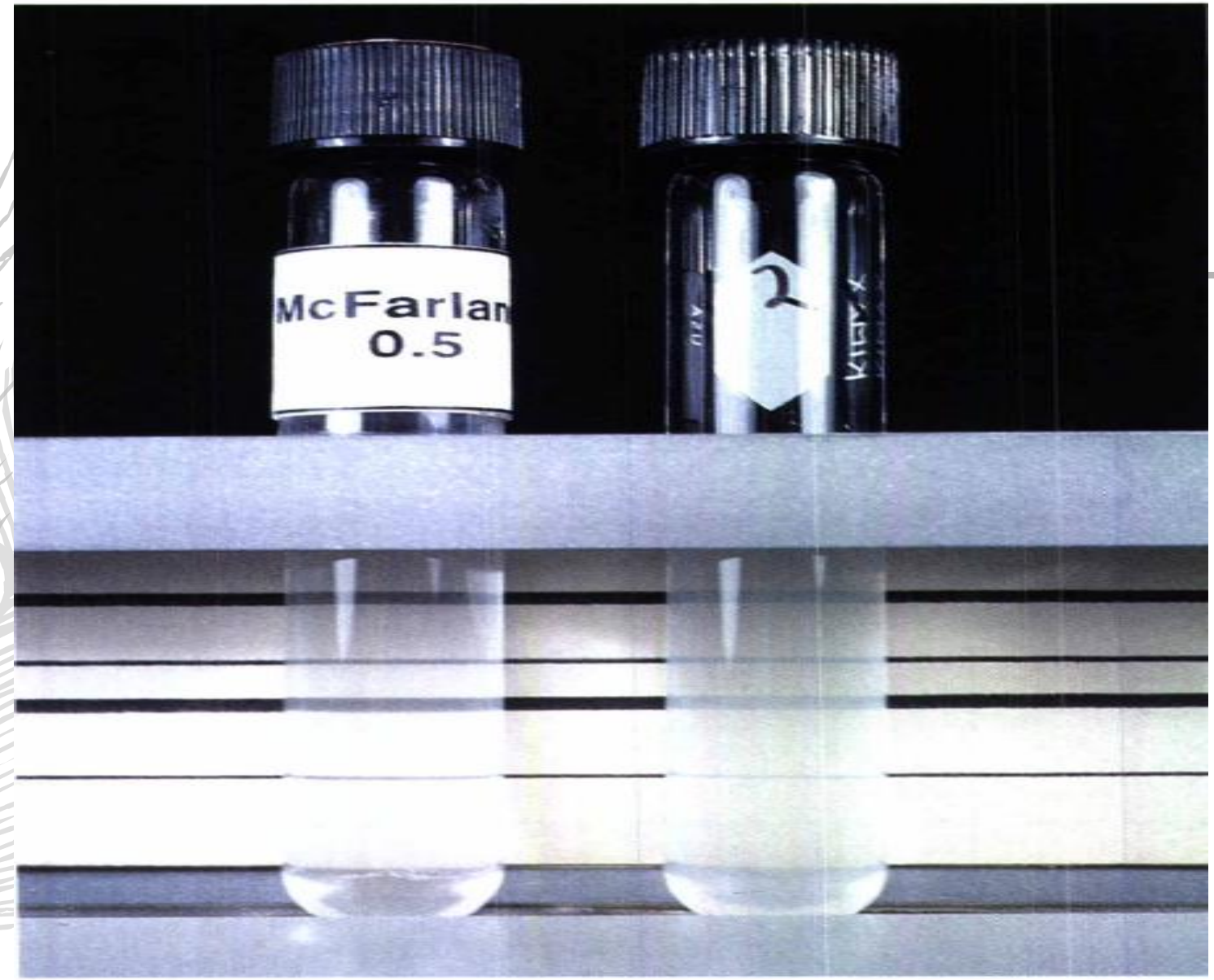
محیط نیم مک فارلند

محیط نیم **مک فارلند** محیطی در تست آنتی بیوگرام است که میزان کدر بودن نمونه خود را با ان مقایسه می کنیم . این محیط حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری است . نحوه تهیه این محیط در آزمایشگاه به شرح زیر است:

- ۰/۵ سی سی از کلرور باریوم ۰/۱٪
- ۹۹/۵ سی سی از اسیدسولفوریک ۰/۱٪

- ۶ ماه در تاریکی و در ظرف در بسته که به وسیله اتش بسته شده است می تواند مورد استفاده قرار گیرد. اما با این اوصاف، اگر در هر زمان رسوبی در لوله مشاهده شد ، محیط غیر قابل استفاده خواهد بود.
- زمانی که می خواهیم از این محیط استفاده کنیم باید آنرا به خوبی هم بزنیم و جهت مقایسه کدورت لوله کشت با لوله مک فارلند، استفاده از یک زمینه سفید با خطوط سیاه و نور کافی توصیه می‌شود این اقدام بویژه جهت باکتریهایی مثل هموفیلوس، گنوکک و پنوموکک که در محیط آبگوشت به خوبی رشد نمی‌کنند توصیه می‌شود.

MacFarland 0.5 and Adjusted Test Organism


McFarlan
0.5

روش کار

- بعد از ایزوله کردن باکتری ، مقداری از کلونی باکتری را به وسیله انس (نه لوپ) برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل می کنیم . باید در نظر داشت که چون ، در تست آنتی بیوگرام میزان کدر بودن برای ما خیلی مهم است ، بنابراین در انتخاب مقدار نمونه باید دقت کنیم تا نمونه را بیشتر یا کمتر از نیم مک فارلند برنداریم .
- اگر میزان کدورت کمتر از نیم مک فارلند باشد، مقداری دیگر از نمونه را در سرم فیزیولوژی استریل حل می کنیم و یا اگر میزان کدر بودن ، بیشتر از نیم مک فارلند باشد در این صورت باید مقداری سرم فیزیولوژی استریل اضافه کرد تا به کدورت مناسب و برابر با نیم مک فارلند برسیم .

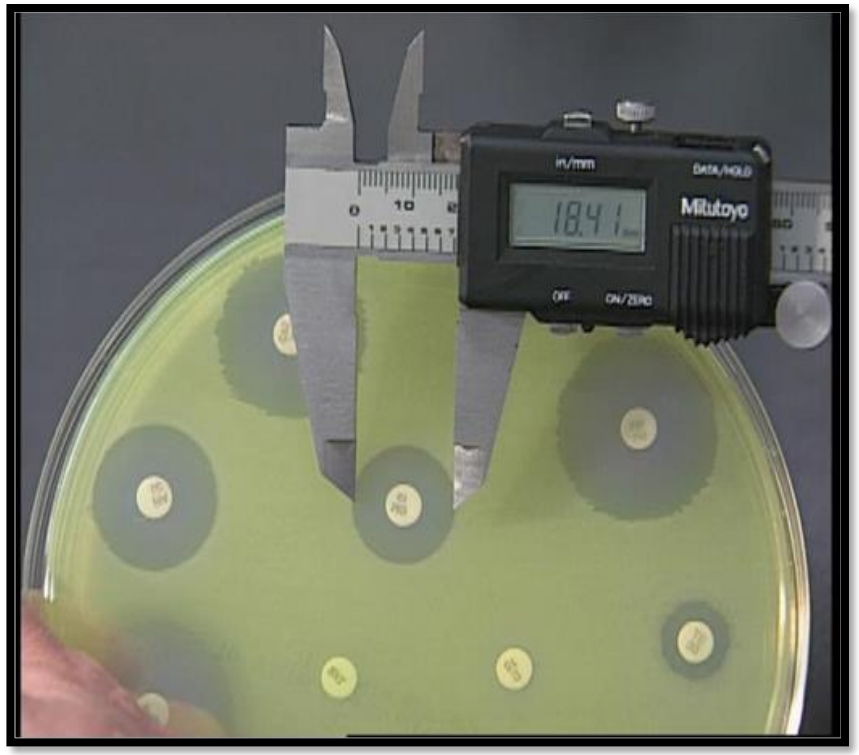
- بعد از تهیه محلول هموژن خود ، با سواب استریل محلول را به هم زده و بعد از آبکشی کردن سواب ، (برای آب کشی ، سواب را با قدرت به دیواره لوله تکیه داده و فشار دهید تا آب آن گرفته شود .) آن را به محیط کشت مولر هینتون انتقال می دهیم و به طور کامل به وسیله سواب ، محیط کشت را به صورت چمنی کشت می دهیم به طوری که هیچ محلی در محیط از قلم نیافتد.

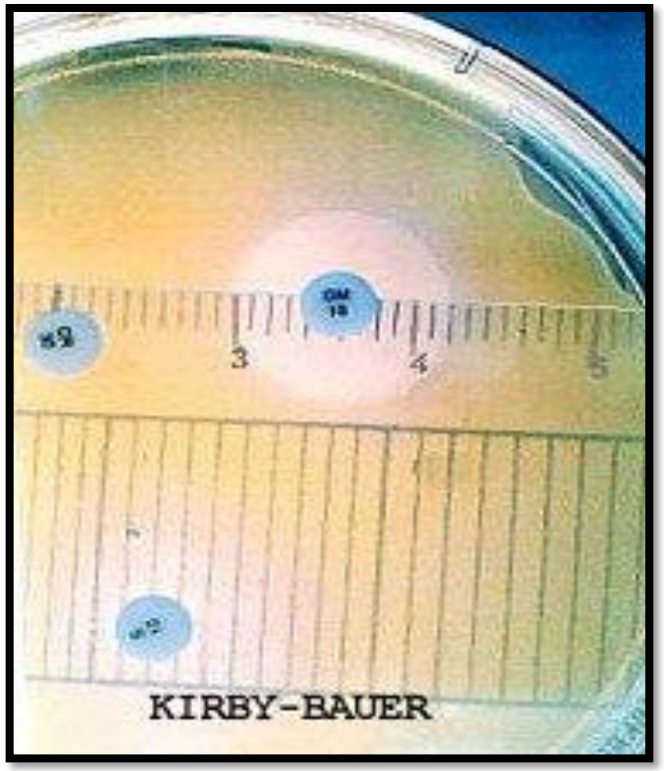
- بعد از کشت، دیسک های انتی بیوگرام که قبل از نیم ساعت از تست ، بیرون یخچال قرار داده شده اند را انتخاب و بر روی محیط کشت انتقال می دهیم .
- باید ذکر کنم که نحوه قرار دادن دیسک ها در محیط کشت مولر هینتون ، به صورت دایره ای است و فاصله این دیسک ها از هم دیگر حدود ۳۰ میلیمتر باشد و باید از دیواره هم ۱۵ میلیمترفاصله داشته باشند . در ضمن فاصله این دیسک ها را می توان با توجه به تجربه خود کم و یا زیاد کنیم.
- دیسک های مورد استفاده هم باید با نوع باکتری ایزوله شده ما مناسب باشد مثلا هیچ وقت برای باکتری گرم منفی ، پنی سیلین قرار نمی دهیم چون نسبت به آن مقاوم هستند و یا اینکه آنتی بیوتیک کلروامفینیکل را برای کشت ادرار قرار نمی دهیم چون این انتی بیوتیک نمی تواند وارد مجاری ادراری شود و...

بعد از قرار دادن دیسک ها ، در پلیت را بسته و به مدت ۲۴ ساعت آنها را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ، انکوبه می کنیم (لازم به ذکر است که بنابه به تحقیقات تازه محققین ، دمای انکوبه برای آنتی بیوگرام به ۳۵ درجه کاهش یافته است و مدت زمان آن هم به ۱۶ تا ۱۸ ساعت کاهش یافته است). بعد از ۲۴ ساعت پلیت را زیر چراغ برسی می کنیم.

آنگاه می‌باید قطر هاله عدم رشد را با خط‌کش اندازه گیری کرد و با توجه به جدول همراه دیسک ها ، گزارش تست انتی بیوگرام خود را برای هر یک از انتی بیوتیک ها ، به صورت **حساس** (Susceptible) ، **مقاوم** (Resistant) و یا **نیمه حساس** (Intermediate) گزارش می شود.

Measuring Conditions





Calipers

Ruler

)،

نحوه خواندن و گزارش کردن

.بعد از انکوبه ، محیط ما باید به صورت زیر باشد:
همان طور که مشاهده می کنید در اطراف برخی از دیسک ها هاله روشن وجود دارد که این نشان دهنده حساس بودن ان باکتری به ان دیسک است و باید حساس گزارش شود . همچنین در اطراف بعضی از دیسکها هیچ گونه هاله ای نیست در این حالت این باکتری را باید نسبت به ان دیسک مقاوم گزارش داد . اگر طبق جدول خود هیچ یک از حالات فوق مشاهده نشود در اینصورت نیمه حساس را گزارش می کنیم

چند نکته مهم:

- در اندازه گیری از خط کش معمولی و یا ویژه این کار استفاده کنید.
- همیشه امتداد خط کش باید از وسط دیسک عبور کند.
- همیشه قطر اندازه گیری می شود.
- باید در تست انتی بیوگرام ، نگاه بدبینانه ای داشت . یعنی اینکه کوتاهترین مسیر را برای تعیین حساسیت انتخاب می کنیم.
- اگر در اطراف دیسک خط هایی کشیده شده باشد در این صورت باید از اخرین خطی که بعد از ان دیگر کلونی نیست تعیین حساسیت کرد.
- اگر در اطراف دیسک حتی یک کلونی هم باشد باید از همان جا تا دیسک را اندازه گیری کرد نه کل هاله را.
- همیشه به محل هاله دقت کنید بازم می گم همیشه و کوتاهترین مسیر ار انتخا کنید.
- دیسک ها و هاله ها را در زیر نور برسی کنید

محیط کشت در آنتی بیوگرام

- محیط مورد استفاده در روش دیسکی **مولرهینتون** است.
- و در پلیت به قطر ۱۰۰ میلی متر حدود ۳۰-۲۵ میلی لیتر محیط مولر هینتون می ریزیم و قطر مورد نظر حاصل می‌گردد. جهت اجتناب از خشک شدن سطح محیط باید پلیتها را در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری نمود.
- پس از تلقیح محیط آنتی بیوگرام در فاصله حداکثر ۱۵ دقیقه می‌باید دیسکهای آنتی بیوتیک را در سطح آگار با فاصله مناسب از یکدیگر قرار داد. سپس به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گرام نگهداری نمود. روشهای اصلاح شده در باکتریهای سخت رشد نیز یکی دیگر از روش ها است در بعضی از باکتریهای سخت رشد از محیط های کشت اختصاصی استفاده می شود مانند : محیط کشت **HTM** در **هموفیلوس ها.**

دیسک های مورد استفاده در آنتی بیوگرام

- همان طور که در بالا هم گفتم ، باید از دیسک های مناسب باکتری ایزوله شده استفاده کرد. انتخاب نوع دیسک ها بسیار مهم است چون از یک طرف باید قضیه مقاوت داروئی را در نظر بگیریم و از طرف دیگر باید سلامت فرد را هم در نظر بگیریم برای نمونه:
- بسیاری از باکتری ها کم کم به آنتی بیوتیک ها مخلفت مقاوم می شوند که این می تواند عمر آنتی بوتیک ها را کم کم به سوی افول هدایت کند.
- و یا اینکه مصرف خود سر و یا اضافی که حاصل اشتباه فردی و یا اشتباه تکنیکی در تست انتی بیوگرام است می تواند عوارض گوناگونی داشته باشد . مثلا استفاده زیاد از سولفونامید ها باعث بیماری های عصب شنوایی و یا بیماری های کلیوی خواهد شد و یا اینکه مصرف زیاد پنی سیلین باعث تروبوسایتوپنی و مصرف زیاد تتراسایکلین باعث گرانولوسیتوپنی خواهد شد.
- نگهداری دیسک ها : دیسک ها باید در یخچال و یا در فریز نگه داری شوند . اگر دیسک ها به صورت **STOCK** هستند در دمای فریز باید نگه داری شوند اما دیسک ها به صورت روتین تا یک ماه در دمای یخچال نگه داری می شوند.
- کنترل کیفی : به کمک سوشهای استاندارد و با مراجعه به جدول مربوطه می‌بایست نسبت به کنترل کیفی روند آنتی بیوگرام اقدام نمود

چند نکته:

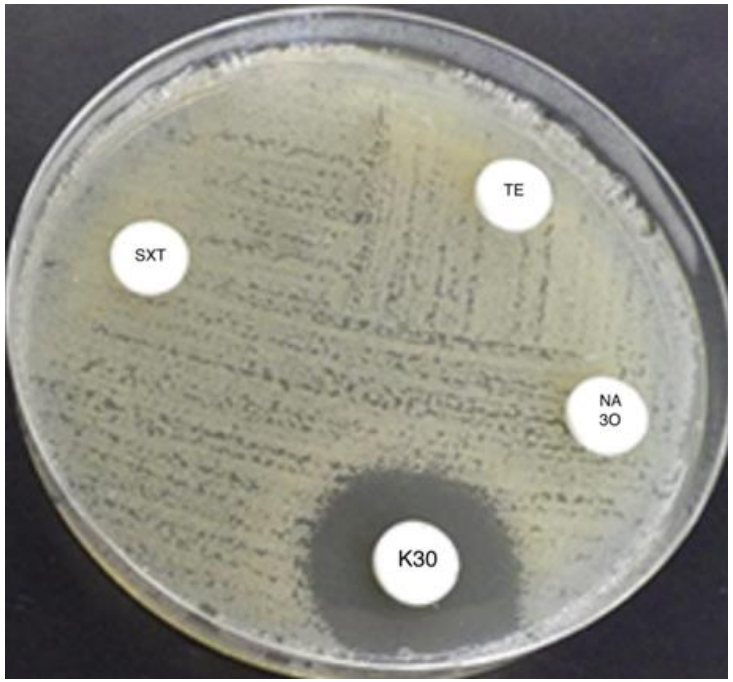
- اگر باکتری ایزوله شده کوکسی گرم مثبت مانند **استافیلوکوک طلائی) اورئوس** (باشد در این صورت دو دیسک کلیندامایسن و اریترومایسن را در کنار هم و مقداری نزدیک تر قرار می دهیم . چون کلیندمایسن باعث می شود تا ژن القا کننده در اریترومایسن فعال شود . در واقع دیسک **کلیندمایسن** فعال کننده ژن خاموش **اریترومایسن** است.
- **آمینوگلیکوزید ها** بر روی باکتری های بی هوازی تاثیر می گذارند.
- **کلروامفینیکل** در نمونه ادراری استفاده نمی شود چون وارد ادرار نمی شود.
- **ونکومایسن** ، **اریترومایسن** ، **کلیندمایسن** ، **پنی سیلین** و چند تا دیگه بر روی باکتری های گرم مثبت تاثیر می ذارند .
- دیسک **ایمیپنم** هم برروی گرم مثبت و هم بر روی گرم منفی تاثیر دارد ولی باید در عفونت های شدیدی استفاده شد تا مقاومت ایجاد نشود.
- **سفالکسین** که بر روی گرم مثبت و منفی تاثیر دارد به صورت خوراکی است.
- **تتراسایکلین** آنتی بوتیک وسیع الطیفی است و معمولا به صورت موضعی استفاده می شود.
- در اخر هم باید ذکر کنم که دیسک ها را بر اساس نوع بیمارستان و یا نوع محل تست می توان تغییر داد و یا مکان و فاصله انها را هم تغییر داد و این که بسیاری از مراحل تست به صورت عالی انجام گیرند باید تجربه کافی داشت و همیشه سعی کنید که به بهترین نحو کار خود را انجام دهید

هدزل، جهت انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای جدا کشت

گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴
استافیلوکوکوس آرئوس	انتروکوکوس	E.coli انتروباکتریاسه	سودوموناس
بنی سیلین	پنی سیلین	آمی سیلین	حتاماسین
باانوگرام اسیلین	آمپی سیلین	سفالوتین	کاربنی سیلین
متی سیلین	سفالوتین	کاناماسین	پلی میکسین ب
سفالوتین	ارتروماسین	حتاماسین	کاناماسین ‡
ارتروماسین	کلرآمفنیکل*	پلی میکسین ب	کلرآمفنیکل ‡
کلیندامایسن	تتراسایکلین*	تتراسایکلین	تتراسایکلین ‡
کلرآمفنیکل*		کلرآمفنیکل	سولفونامیدها ‡
تتراسایکس*		سیپروفلوکساسین +	
حتاماسین*		نالیدیکسیک اسید +	
کاناماسین*		سولفونامیدها +	

تفسیر قطر هاله معامت از رشد آنتی بیوتیکها (Z.O.I)

آنتی بیوتیک یا داروی شیمیائی ضدمیکروبی		قدرت دیسک	قطر هاله معامت از رشد بر حسب میلیمتر Z.O.I (mm)		
			حساس	حساسیت متوسط	مقاوم
آمپی‌سیلین	باکتری های گرم منفی و آسروکوکها	۱۰ میکروگرم	۱۴ یا بیشتر	۱۳ – ۱۲	۱۱ یا کمتر
	استافیلوکوکها و باکتریهای سریع	۱۰	۱۹	۲۸ – ۲۱	۲۰
	حساس به پنی سیلین	۱۰	۲۹	—	—
	فنوکسی متیل پنی سیلین	۱۰ واحد	۱۳	۱۲ – ۹	۸
باسیتراسین		۱۰ میکروگرم	۱۶	۱۵ – ۱۳	۱۱
سفالوریدین		۳۰	۱۸	۱۷ – ۱۵	۱۴
سفالوتین		۳۰	۱۸	۱۷ – ۱۵	۱۴
سفوگزیتین		۳۰	۱۸	۱۷ – ۱۳	۱۲۰
گرامیسیدین		۱۰	۱۱	۱۰ – ۹	۸
کیفتین		۱۵	۱۸	۱۷ – ۱۳	۱۳
اریترو مایسین					
کانامایسین		۳۰	۱۸	۱۷ – ۱۴	۱۳
متی سیلین					
نئومایسین و اگزاسیلین		۵	۱۴	۱۳ – ۱۰	۹
اسید ناليدیکسیک		۱	۱۳	۱۲ – ۱۱	۱۰
اسید اکسولینیک		۳۰	۱۹	۱۸ – ۱۳	۱۳



- **اندازه قطر هاله عدم رشد به عوامل گوناگونی بستگی دارد که عبارتند از:**

. سرعت انتشار آنتی بیوتیک در محیط کشت

. غلظت آنتی بیوتیک

. تعداد باکتری تلقیح شده

. سرعت رشد باکتری

. میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک

. دوره انکوباسیون

. عمق آگار تهیه شده

کنترل کیفي:

- هدف از برنامه کنترل کیفی پایش و ارزیابی موارد ز یر می باشد:

صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت

مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش

عملکرد افرادی که آزمایش را انجام داده و نتایج بدست آمده را قرائت می نمایند. به منظور دست یابی بهینه به این اهداف در دسترس داشتن سویه های کنترل کیفی تهیه شده از مراکز معتبر ضروری است.

- سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:
- Escherichia coli ATCC 25922
- Escherichia coli ATCC 35218
- Haemophilus influenza ATCC 49247
- Haemophilus influenza ATCC 49766
- Klebsiella pneumonia ATCC 700603
- Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
- Staphylococus aureus ATCC 25923
- Streptococcus pneumonia ATCC 49619
- E.coli ATCC 35218 فقط به عنوان یک میکروارگانیسم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتاماز، مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود.

- nterococcus faecalis ATCC 29212 (یا E.faecalis ATCC 33186) برای ارزیابی محیط مولرهینتون آگار با دیسک تری متوپریم/سولفامتوکسازول استفاده می شود.
- در محیط کشت قابل قبول، هاله عدم رشد واضحی به قطر ۲۰ mm یا بزرگتر ایجاد می شود درحالیکه در محیط های کشت غیرقابل قبول، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از ۲۰ mm ایجادمی گردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیرقابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است.
- Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینوگلیکوزید با دوز بالا به کار می رود.
- Klebsiella pneumonia ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات ESBL به کار برده می شود.

کنترل کیفیت قطر هاله عدم رشد سویه کنترلی/دیسک آنتی بیوتیکی:

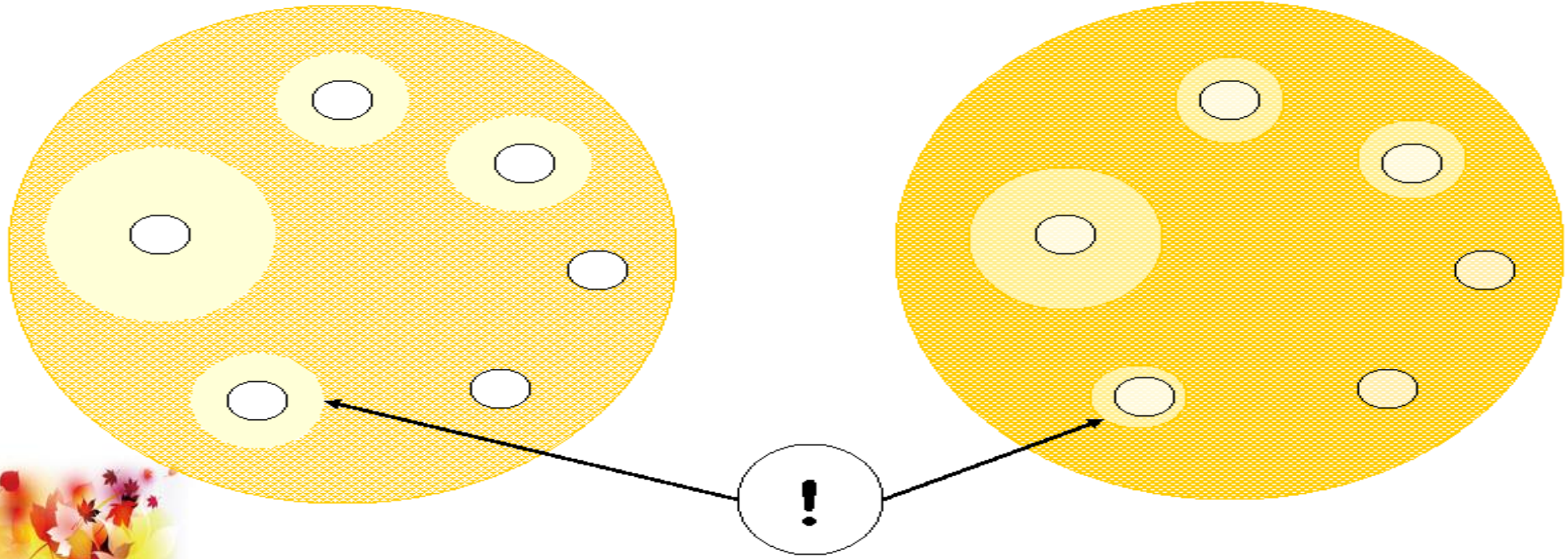
• سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش disk diffusion و با استفاده از همان مواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایش و نتایج را با جداول ۳ و CLSI3A مقایسه و بررسی نمود. محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است.

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطا در روش انجام آزمایش نباشد، احتمالاً ناشی از تغییر در حساسیت ذاتی باکتری نسبت به آن آنتی بیوتیک می باشد. در این صورت لازم است کشت تازه از سوش کنترل تهیه شود.

- آزمایش کنترل کیفیت را باید در چه فواصل زمانی انجام داد؟

- انجام آزمایش روزانه برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۲۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد.

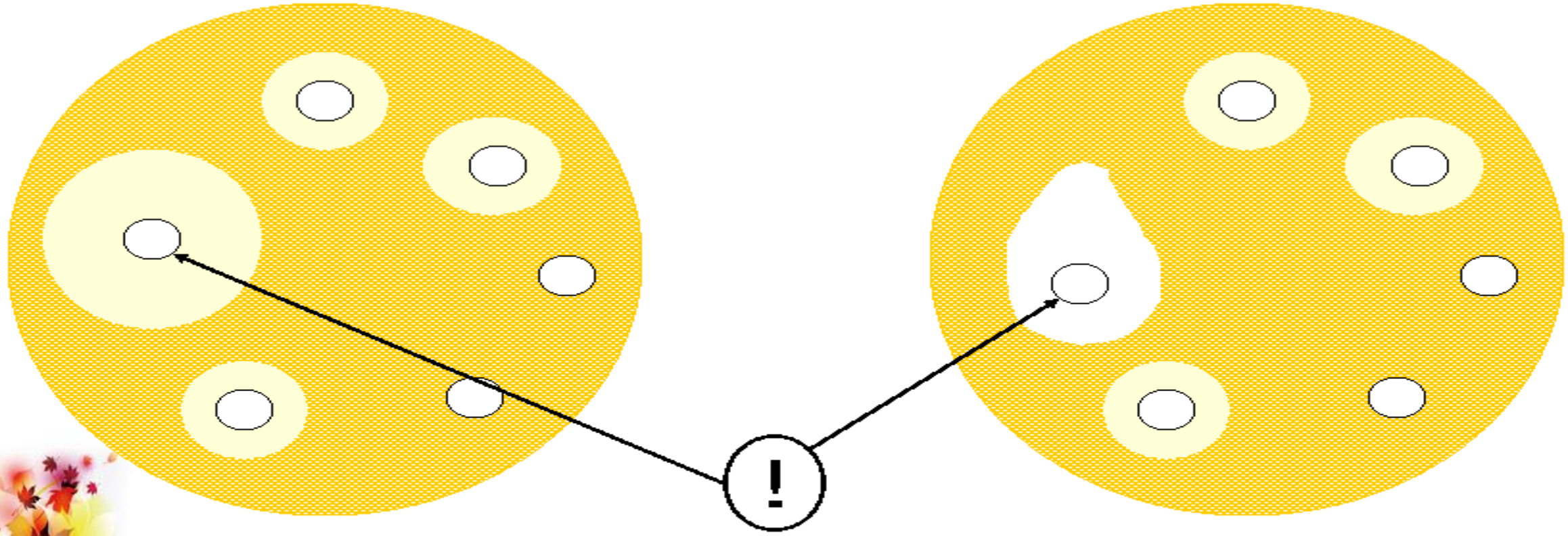
Disk Susceptibility Testing Problems



Disks Properly Aligned and Spaced

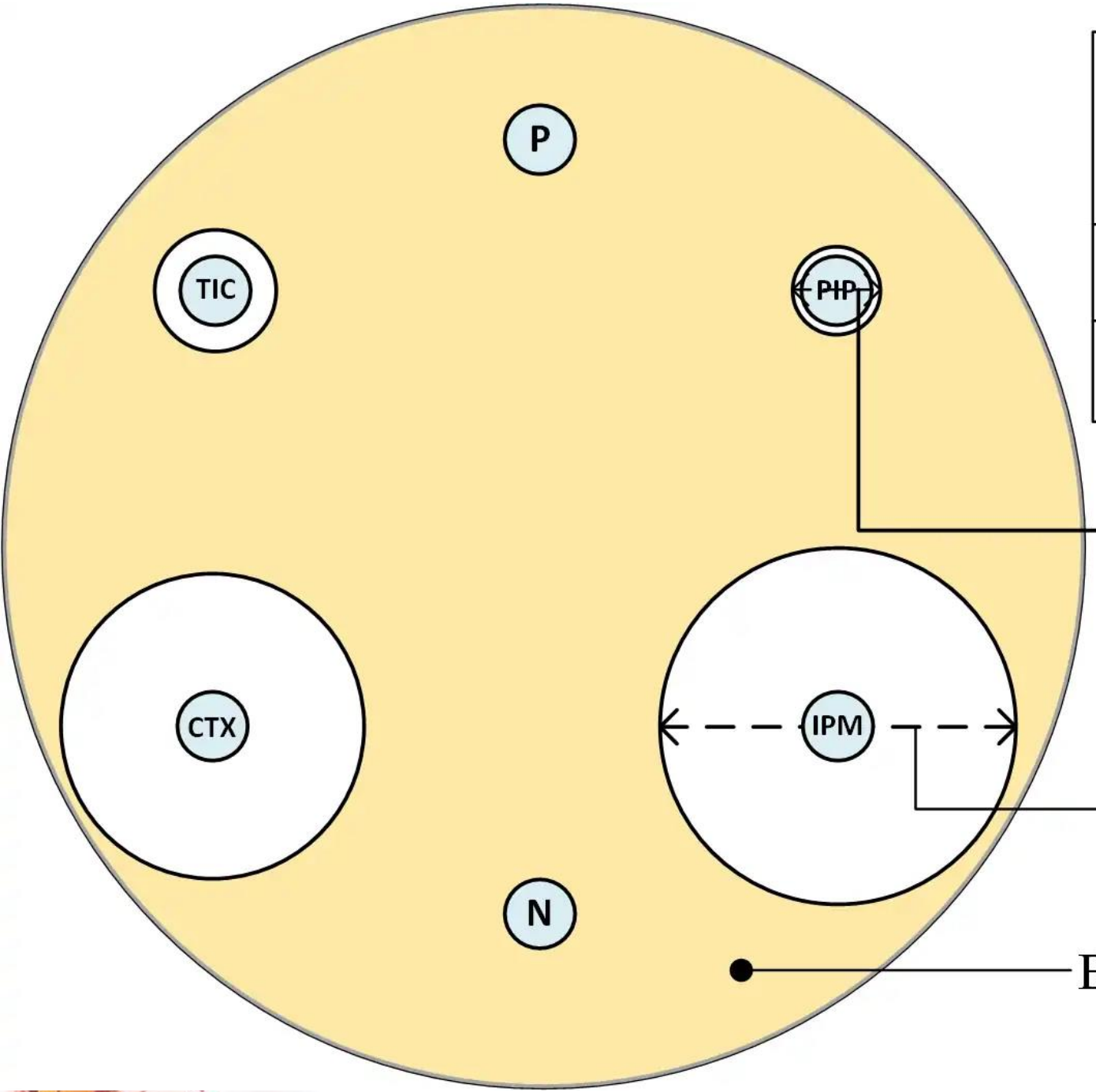
Disks Aligned and Spaced
Inoculum too HEAVY

Disk Susceptibility Testing Problems



Disks Properly Aligned and Spaced

Zone space distorted because disk not properly applied



	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints		
	Susceptible (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)
PIP	≥ 21	18–20	≤17
IPM	≥ 23	20–22	≤19

PIP => R

Zone of inhibition = 8 mm

IPM => S

Zone of inhibition = 27 mm

Bacterial culture

با تشکر از حسن توجه شما