

آنتی بیوگرام



مقدمه

– از روش های مختلف آزمایشگاهی می توان برای تعیین حساسیت باکتری ها به عوامل ضد میکروبی در شرایط In vitro استفاده کرد.

– در بسیاری از آزمایشگاهها برای سنجش حساسیت باکتری های بیماری زا از روش انتشار از دیسک روی آگار استفاده می شود.

– نتایج قابل اطمینان با روش انتشار از دیسک فقط زمانی به دست می آید که با استفاده از اصول روش استاندارد انجام شود.

انتخاب عوامل ضد میکروبی برای آزمایش روزمره و گزارش دهی

□ انتخاب مناسب ترین عوامل ضد میکروبی برای تعیین حساسیت و گزارش آن با مشورت بین آزمایشگاه بالینی، متخصص عفونی، داروخانه و کادر پزشکی در کمیته های کنترل عفونت - درمان و دارویی در بیمارستان صورت می گیرد.

□ عوامل مؤثر در تعیین داروهای ضد میکروبی برای باکتری خاص و گزارش آن عبارتند از:

➤ تأیید بالینی، شیوع مقاومت، کاهش بروز مقاومت، هزینه، موارد مصرف بالینی، داشتن تأییدیه از مراجع ذیصلاح و توصیه های گروه بندی انتخاب دارو (گروه A, B, C, ...). آزمایش داروهای انتخاب شده می تواند برای اهداف کنترل عفونت نیز مفید باشد.

مواد مورد نیاز برای آزمایش تعیین حساسیت میکروبی

مولر هینتون آگار

دیسک های ضد میکروبی



PH مولر هینتون آگار

محیط مولر هینتون آگار بهتر است پس از تهیه در هر نوبت ساخت از نظر PH کنترل شود. PH محیط آگار پس از ژله ای شدن در حرارت اتاق، باید در حد 7.2-7.4 باشد.

قطر محیط کشت باید 4 میلیمتر باشد.

مولر هینتون آگار (رطوبت)

□ در صورت خیس بودن سطح آگار در زمان مصرف، ظرف پتری را به مدت 30-10 دقیقه در انکوباتور 35°C و یا با درپوش نیمه باز، زیر هود کلاس II در حرارت اتاق قرار دهید تا رطوبت اضافی آن تبخیر گردد. برای تلقیح باکتری، سطح محیط کشت باید مرطوب، ولی فاقد قطرات آب بر روی آگار یا درپوش ظرف پتری باشد.

مولر هینتون آگار (اثرات تایمیدین یا تایمین)

– وجود مقادیر بالای تایمین و تایمیدین در محیط مولر هینتون آگار می تواند اثرات مهار کنندگی سولفونامیدها و تري متوپریم را معکوس نموده، منجر به کاهش، عدم وضوح یا از بین رفتن هاله عدم رشد و گزارش مقاومت به صورت کاذب گردد.

– برای ارزیابی کیفیت هر بسته از محیط مولر هینتون آگار باید از *انتروکوکوس فکالیس* 29212 ATCC و یا ATCC 33186 و دیسک های کوتریموکسازول استفاده نمود. هاله عدم رشد $\geq 20\text{ mm}$ با حاشیه واضح، نشانگر کیفیت مناسب محیط است. قطر هاله عدم رشد $< 20\text{ mm}$ ، عدم وجود هاله و یا رشد کلنی ها در داخل هاله عدم رشد، بر کیفیت نامناسب محیط مورد نظر دلالت دارد.

بررسی کاتیونهای محیط کشت

–کشت *P.aeruginosa* بر روی محیط مولر هینتون آگار

Gentamicin=17-23–

Amikacin= 18-26–



آزمایش سویه هایی که به خوبی رشد نمی کنند

محیط مولر هینتون آگار جهت انجام آزمایش بر روی گونه های هوازی (مطلق یا اختیاری) با رشد مناسب بر روی این محیط به کار می رود. برخی از باکتری ها بدون مواد افزودنی محرک رشد بر روی محیط مولر هینتون آگار رشد کافی ندارند. این باکتری ها برای رشد نیاز به مواد افزودنی و یا محیط های متفاوتی دارند و باید بر روی محیط های ذیل آزمایش شوند.

آزمایش سویه هایی که به خوبی رشد نمی کنند

— استرپتوکوک پنومونیه ، بتا همولیتیک ، ویریدنس

➤ مولر هینتون آگار (MHA) با 5% خون گوسفند

گونه هموفیلوس

Haemophilus Test Medium (HTM) ➤

نیسریا گونوره و مننژیتیدیس

➤ GC Agar Base + 1% مکمل رشد تعریف شده

دیسک های ضد میکروبی (ذخیره سازی)

جهت نگهداری دیسک ها توجه به شرایط زیر ضروری است:

(1) دیسک ها را تا زمان انقضاء باید در یخچال (دمای 8 درجه سانتی گراد یا کمتر) یا در فریزر (14- درجه سانتی گراد یا کمتر) نگهداری کنید.

(2) دیسک ها نباید در فریزرهایی با قابلیت ذوب یخ خود به خودی، نگهداری گردند.

دیسک های ضد میکروبی (ذخیره سازی)

3) بسته های باز نشده دیسک های کلاس بتالاکتام باید در فریزر نگهداری شوند و به مقدار کم و مصرف حداکثر یک هفته، از فریزر درآورده شوند و در یخچال نگهداری گردند.

4) بعضی آنتی بیوتیک های حساس (مانند ایمی پنم، سفاکتر (Cefaclor) و ترکیبات حاوی کلانولانیک اسید) در صورت نگهداری در فریزر تا زمان مصرف، از پایداری بیشتری برخوردار خواهند بود.

دیسک های ضد میکروبی (ذخیره سازی)

(5) بسته های باز نشده حاوی دیسک را 1-2 ساعت قبل از مصرف، از یخچال یا فریزر خارج کنید تا به دمای اتاق برسد. این کار تماس هوای گرم با دیسک یخ زده و متعاقبا "تغلیظ دارو در سطح دیسک را به حداقل می رساند.

(6) دیسک ها توسط تولید کنندگان، در بسته هایی غیر قابل نفوذ به رطوبت ارائه می گردند. لازم است از باز کردن بسته های حاوی دیسک، به میزان بیش از مقدار مورد نیاز خودداری گردد.

(7) در صورت باز کردن، باید دیسک ها را در لوله های درپوش دار محتوی ماده جاذب رطوبت نگهداری کرد.

دیسک های ضد میکروبی (ذخیره سازی)

(8) در صورت استفاده از دستگاه توزیع کننده دیسک، باید آن را با يك درپوش محکم، بست و از ماده جاذب رطوبت به مقدار كافي استفاده نمود.

(9) باید اجازه داده شود دستگاه توزیع کننده دیسك قبل از باز شدن، به دماي اتاق برسد. در صورت تغییر رنگ معرف، ماده جاذب رطوبت را تعویض نمایید و بدین وسیله از رطوبت اضافي جلوگیری کنید.

دستورالعمل تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند

1) 0/5 میلی لیتر از کلرور باریم (BaCl_2) 0/048 mol/l ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1/175 W/V (%) را به 99/5ml اسید سولفوریک 0/18 mol/l (1 V/V) اضافه کنید و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست آورید.

2) چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکتروفتومتر با طول مسیر نوری 1cm، مشخص شود. جذب در 625nm باید بین 0/08 تا 0/13 باشد.

3) سوسپانسیون سولفات باریم باید به مقدار 4-6ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

4) درب این لوله ها باید محکم بسته شوند و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردند.

5) استاندارد سولفات باریم قبل از هر بار استفاده باید به شدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) همزده شود، تا کدورت یکنواختی ایجاد گردد. در صورت مشاهده ذرات بزرگ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد.

6) استاندارد سولفات باریم باید به صورت ماهانه جایگزین شود یا جذب آن اندازه گیری گردد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

تهیه سوسپانسیون با استفاده از کلنی مستقیم:

- (1) این روش، آسان ترین شیوه تهیه سوسپانسیون میکروبی است و می تواند برای بیشتر باکتری ها قابل استفاده باشد. این شیوه، روش توصیه شده برای آزمایش باکتری های پر نیاز و نیز برای بررسی استافیلوکوک ها از نظر مقاومت بالقوه به متی سیلین و اگزاسیلین است.
- (2) مایه میکروبی را به طور مستقیم در سرم فیزیولوژی استریل، با استفاده از کلنی های ایزوله 18-24 ساعته از روی محیط آگار، تهیه کنید (باید از محیط غیر انتخابی نظیر آگار خون دار استفاده شود).
- (3) کدورت سوسپانسیون را معادل کدورت استاندارد 0/5 مک فارلند تنظیم نمایید.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

تهیه سوسپانسیون از طریق رشد باکتری ها در محیط مایع:

این روش، جایگزین روش مستقیم است که بهتر است در موارد ذیل از آن استفاده گردد:

- (1) در مواردی که در روش تهیه سوسپانسیون مستقیم از کلنی باکتری، به کلنی های تازه (24 ساعته) نیاز است، باید توجه داشت که فقط برای باکتری های کم نیاز (به استثنای استافیلوکوک ها) کاربرد دارد.
- (2) باکتری هایی که تهیه سوسپانسیون یکنواخت از آنها مشکل است.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

تهیه سوسپانسیون از طریق رشد باکتری ها در محیط مایع:

- (1) 3 تا 5 کلنی کاملاً ایزوله و با شکل یکسان را انتخاب کنید. به کمک لوپ یا سوآب از قله آنها برداشت نمایید و به لوله حاوی 4-5 میلی لیتر محیط مایع مانند TSB اضافه کنید.
- (2) محیط مایع تلقیح شده را در انکوباتور 35 درجه سانتی گراد نگهداری کنید تا به غلظتی برابر یا بیشتر از 0/5 مک فارلند برسد (معمولاً 2-6 ساعت)
- (3) کدورت محیط مایع حاوی باکتری های در حال تکثیر را، با استفاده از محیط کشت مایع یا سرم فیزیولوژی استریل، معادل کدورت استاندارد 0/5 مک فارلند تنظیم کنید.

McFarland
0.5



تلقیح باکتری در پلیت

(1) ظرف مدت 15 دقیقه از زمان تنظیم کدورت سوسپانسیون باکتری با استاندارد 0/5 مک فارلند، باید عمل تلقیح باکتری به محیط کشت صورت پذیرد. برای این کار سوابی را داخل لوله حاوی سوسپانسیون باکتری فرو برده، چند بار چرخانده و بالاتر از سطح مایع به دیواره داخلی لوله فشار داده، تا مایع اضافی آن گرفته شود.

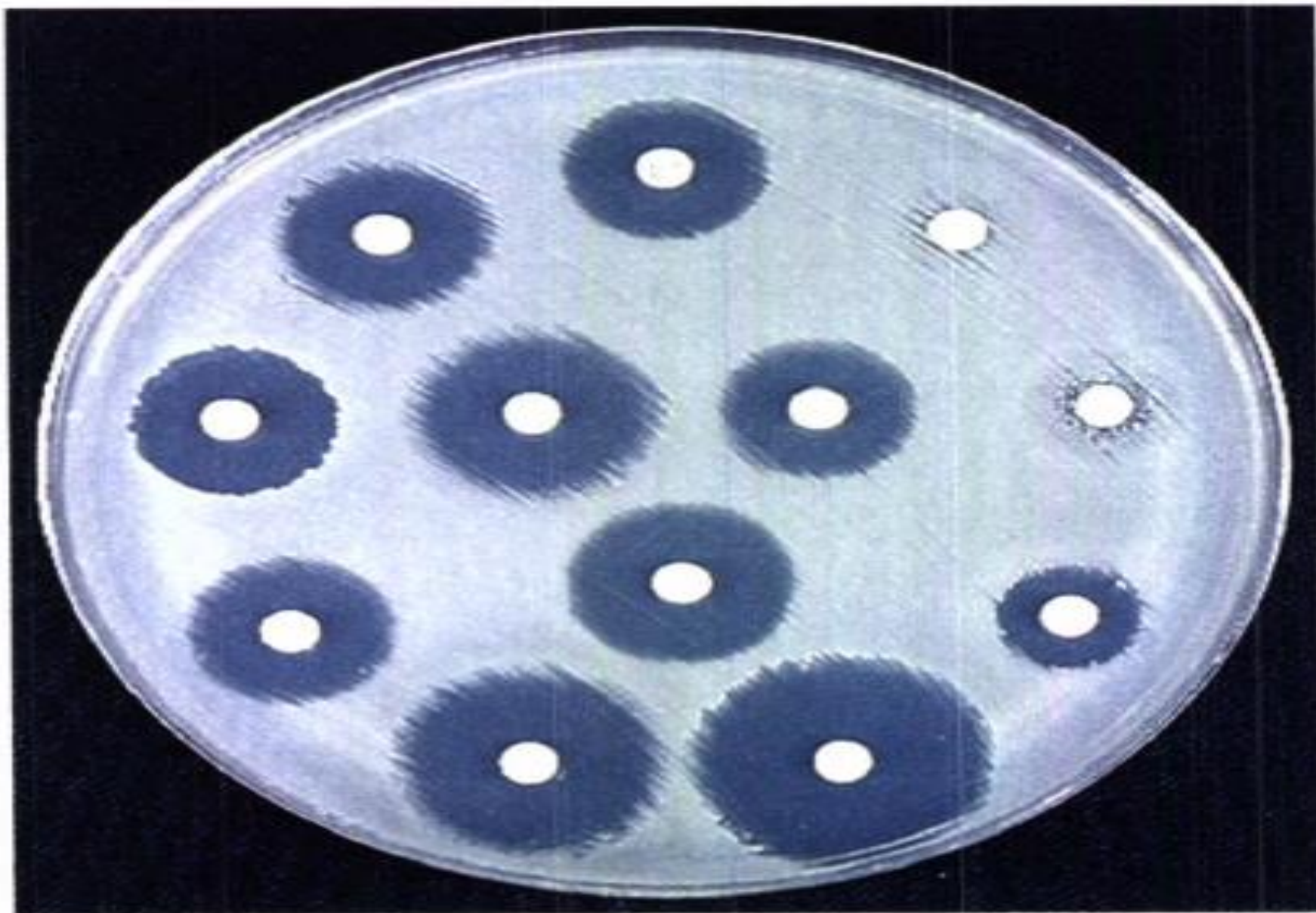
تلقیح باکتری در پلیت

- (2) سواب را بر سطح مولر هینتون آگار کشیده، این کار باید 2 بار دیگر (در مجموع 3 بار) با چرخاندن پلیت هر بار به میزان 60 درجه، تکرار شود تا از پخش یکنواخت سوسپانسیون بر سطح پلیت اطمینان حاصل گردد. در آخر باید سواب یک دور به لبه خارجی آگار در مجاورت دیواره داخلی پلیت نیز کشیده شود.
- (3) پس از تلقیح و قبل از عمل دیسک گذاری، درپوش پلیت را به مدت 3-5 دقیقه نیمه باز گذاشته تا رطوبت اضافی آن تبخیر گردد (حداکثر به مدت 15 دقیقه).

نکته: جهت جلوگیری از تلقیح غلظت زیاد باکتری، هرگز نباید از سوسپانسیون یک شب مانده و یا سوسپانسیون تهیه شده به روش غیر استاندارد استفاده شود.

دیسک گذاری بر روی پلیت تلقیح شده با باکتری

- (1) باید دیسک های آنتی بیوتیکی را برای هر باکتری، با پنس و به دقت و به طرز یکنواخت روی پلیت مولر هینتون آگار قرار داده و با فشار مختصری از تماس کامل آن با سطح آگار اطمینان حاصل نمود.
- (2) نباید فاصله دیسک ها از مرکز تا مرکز کمتر از 24 میلی متر باشد. همچنین نزدیکی بیش از اندازه دیسک ها به لبه پلیت موجب عدم تقارن هاله عدم رشد (در بعضی داروها) خواهد بود.
- (3) حداکثر تعداد قابل قبول دیسک بر روی پلیت با قطر 150 میلی متر، 12 عدد و بر روی پلیت با قطر 100 میلی متر، 6 عدد می باشد.
- (4) در همه موارد بهتر است دیسک های با قطر هاله عدم رشد کوچکتر (جنتامایسین، وانکومایسین) در کنار دیسک های با قطر هاله عدم رشد بزرگ تر (سفالوسپورین ها) قرار گیرند تا احتمال همپوشانی هاله ها کمتر شود.

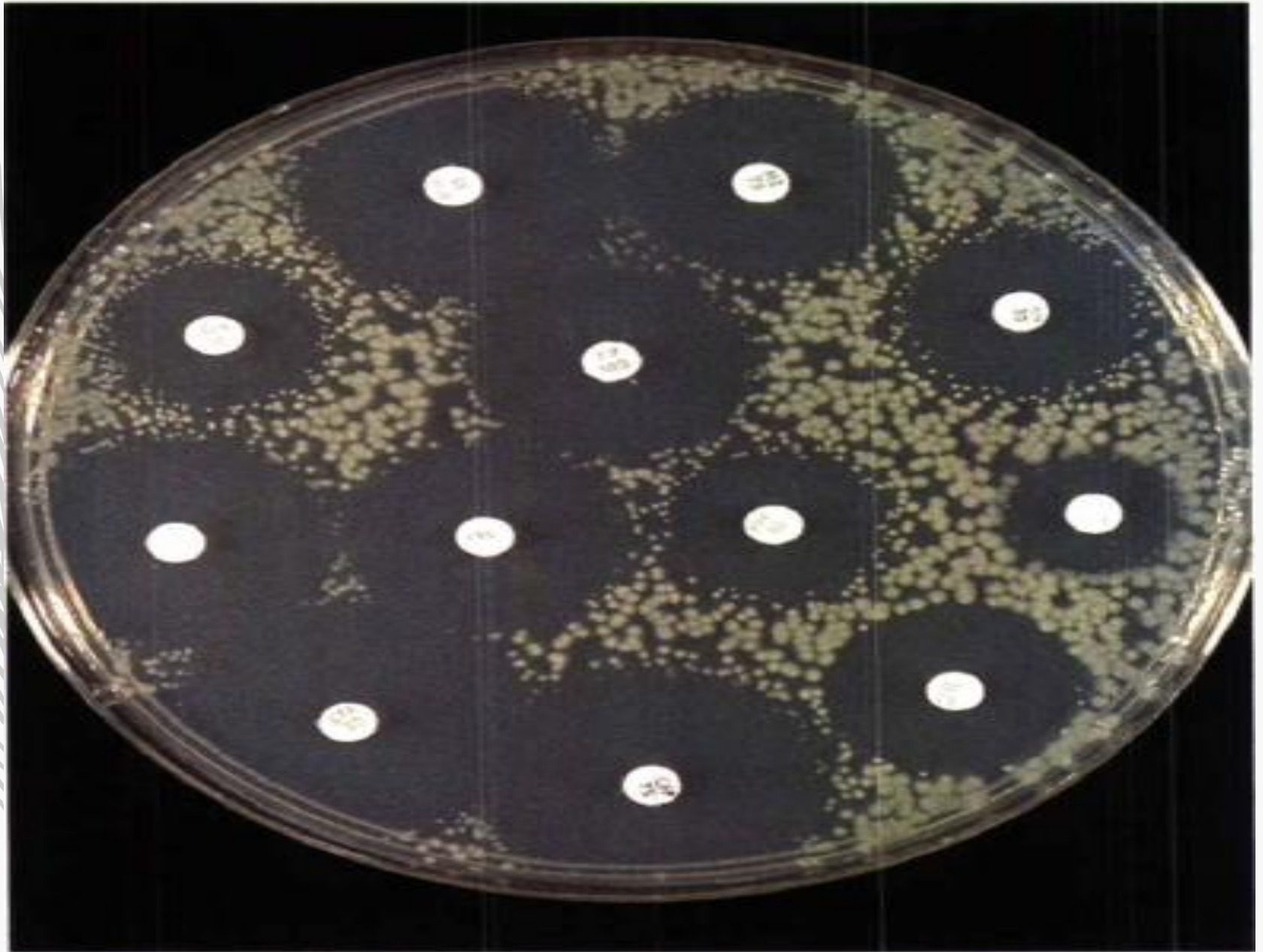


دیسک گذاری بر روی پلیت تلقیح شده با باکتری

- (5) به دلیل انتشار سریع برخی داروها به محض تماس دیسک با سطح آگار، از جا به جا کردن دیسک بعد از قرارگیری بر سطح آگار خودداری نموده و در صورت نیاز باید دیسک جدیدی در ناحیه دیگری از پلیت قرار داده شود.
- (6) پلیت را بر روی درپوش آن برگردانده، ظرف مدت 15 دقیقه از دیسک گذاری به انکوباتور 2 ± 35 درجه سانتیگراد منتقل نمایید.
- (7) دمای انکوباسیون بالاتر از 35 درجه سانتیگراد ممکن است مانع از رشد استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین گردد.
- (8) به استثنای گونه هموفیلوس، نیسریا مننژیتیدیس و استرپتوکوک ها از قرار دادن پلیت حاوی دیسک در انکوباتور CO_2 دار خودداری نمایید، چون CO_2 قطر هاله عدم رشد برخی داروها را به طور مشخصی تغییر می دهد.

خواندن نتایج و تفسیر آنها

بعد از 16-18 ساعت گرمخانه گذاری (به غیر از موارد استثناء)، هر يك از ظروف پتري را بررسی نمایید. اگر پلیت به طور مناسب کشت داده شده باشد و میزان تلقیح مایه میکروبی صحیح باشد، قطر هاله مهار رشد به شکل دایره یکنواخت و رشد انبوه و یکدست خواهد بود. **اگر کلنی ها به طور منفرد ظاهر شوند، نشان دهنده آن است که مایه میکروبی خیلی رقیق بوده و آزمایش را باید تکرار کرد.** قطر هاله های کامل ممانعت از رشد را که شامل قطر دیسک آنتی بیوتیک نیز می باشد، با چشم غیر مسلح اندازه گیری کنید. قطر هاله ممانعت از رشد را از پشت ظرف پتري درحالی که آن را چند سانتی متر بالاتر از يك سطح سیاه مات و در حضور نور انعکاسی نگه داشته اید، با يك کولیس یا خط کش اندازه گیری کنید. موارد زیر استثناء می باشد:



خواندن نتایج و تفسیر آنها (استثناها)

- اگر آگار، حاوی خون باشد (مانند استریپتوکوک ها) قطر هاله ممانعت از رشد را درحالی که در پلیت برداشته شده و سطح آگار به وسیله نور انعکاسی روشن شده است، اندازه گیری کنید.
- اگر از **سفوکسیتین** برای سنجش حساسیت گونه های استافیلوکوک و یا از **وانکومايسين** برای **گونه های انتروکوک** استفاده می کنید، قبل از این که نتایج را حساس گزارش کنید، پلیت ها به **24 ساعت کامل** گرمخانه گذاری نیاز دارند. سایر عوامل ضد میکروبی را می توان پس از 16-18 ساعت گرمخانه گذاری، قرائت و گزارش نمود.

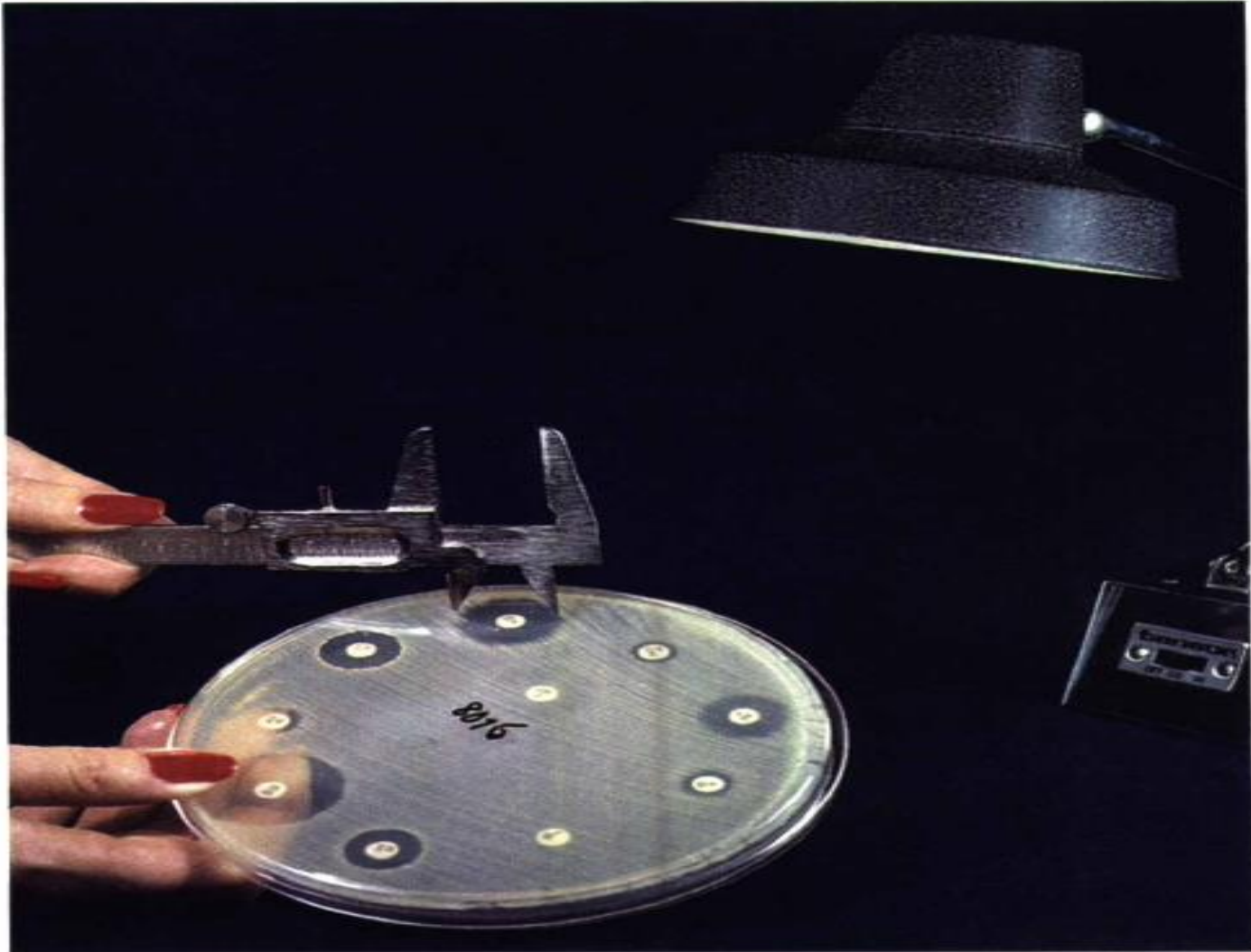


FIGURE 13-10 ■ Routine disk diffusion tests are examined by placing the plate on or 2 to 3 inches above a black, nonreflecting surface. Reflected light is used to illuminate the plate.

خواندن نتایج و تفسیر آنها (استثناها)

- اگر از سفوکسی تین برای گونه های استافیلوکوک استفاده می کنید، قطر هاله مهار رشد را در برابر نور انعکاسی (و نه نور عبوری) قرائت کنید.
- حاشیه هاله مهار رشد باید ناحیه ای در نظر گرفته شود که در آن با چشم غیر مسلح هیچ رشد قابل مشاهده و واضحی را نمی توان تشخیص داد. از رشد ضعیف کلنی های ریز که آنها را فقط می توان با ذره بین در لبه هاله مهار رشد تشخیص داد، صرف نظر کنید.

خواندن نتایج و تفسیر آنها

- با این حال زمانی که رشد پراکنده کلنی ها در منطقه شفاف مهار رشد مشاهده شود، آزمایش باید با کشت خالص یا کشت مجدد از يك کلنی منفرد از پلیت کشت اولیه تکرار شود. اگر رشد کلنی های پراکنده در داخل ناحیه هاله مهار رشد تداوم یابد، هاله داخلی را که عاری از کلنی است، اندازه گیری کنید.
- سویه های گونه های پروتئوس ممکن است در اطراف بعضی از عوامل ضد میکروبی به داخل نواحی مهار رشد، خزش (سوارمینگ) داشته باشند. در آزمایش گونه های پروتئوس، از رشد خزنده و غشایی نازک در مقابل هاله واضح مهار رشد چشم پوشی کنید.

خواندن نتایج و تفسیر آنها

- در هنگام استفاده از محیط های غنی شده با خون برای سنجش حساسیت استرپتوکوک ها، قطر هاله مهار رشد (و نه قطر هاله مهار همولیز) را اندازه گیری نمایید.
- در زمان استفاده از تری متوپریم و سولفونامیدها، آنتاگونیست های موجود در محیط، ممکن است منجر به رشد ضعیف گردد؛ بنابراین از این رشد ضعیف (20%) یا کمتر از آن) صرف نظر کنید و برای تعیین قطر هاله، حاشیه واضح تر مهار رشد را در نظر بگیرید.

استرپتوکوکوس پنومونیه و سایر گونه های استرپتوکک

- محیط توصیه شده برای آزمایش تعیین حساسیت میکروبی استرپتوکوکوس پنومونیه و سایر استرپتوکک ها، مولر هینتون آگار با 5% خون گوسفند است.
- برای آزمایش استرپتوکک از روش تهیه مستقیم سوسپانسیون از کلنی، استفاده کنید. با استفاده از کلنی های تازه 18-20 ساعته رشد کرده بر روی محیط آگار خوندار، باید سوسپانسیونی معادل استاندارد 0.5 مک فارلند در محیط مایع مولر هینتون و یا سرم فیزیولوژی تهیه شود. در مدت 15 دقیقه از زمان تنظیم کدورت مایه میکروبی، باید عمل تلقیح بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام گردد.

استرپتوکوکوس پنومونیه و سایر گونه های استرپتوکوک

— برای اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، ظروف پتری به مدت 20-24 ساعت در دمای $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و در شرایط 5% CO_2 گرمخانه گذاری می گردد.

تفسیر نتایج آزمایش دیسک دیفیوژن (معیارهای تفسیر)

- **حساس (Susceptible):** به گروهی از باکتری های جدا شده اطلاق می گردد که رشد آنها در برابر غلظت داروی ضد میکروبی ، بر اساس دوز توصیه شده که معمولاً در محل عفونت به دست می آید، مهار می شود.
- **حساسیت بینابینی (Intermediate):** به گروهی از باکتری های جدا شده اطلاق می گردد که با سطح MIC به دست آمده در خون و بافت ، پاسخی پایین تر از باکتری های حساس می دهند.
- **مقاوم (Resistant):** به گروهی از باکتری ها اطلاق می شود که رشد آنها با غلظت های معمولی دارو با دوز متداول تجویز شده مهار نشود و یا هاله عدم رشد به دست آمده از آنها به علت مکانیسم های ویژه مقاومت میکروبی (نظیر بتا لاکتامازهایی مانند MRSA ها یا ESBL ها) باید به صورت مقاوم گزارش گردد.

کنترل کیفی دیسک های آنتی بیو گرام

هدف از برنامه کنترل کیفی، پایش موارد زیر می باشد:

(1) دقت (تکرار پذیری) و صحت روش سنجش حساسیت

(2) کارایی موادی که در آزمایش استفاده می شوند

(3) کارایی افرادی که آزمایش را انجام داده و نتایج را می خوانند.

برای رسیدن به اهداف فوق استفاده از سویه های کنترل کیفی شناخته شده الزامی است،

هرچند که رعایت شرایط دیگری که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد، ضروری است.

سویه های مرجع برای کنترل کیفی

- 
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
 - *Escherichia coli* ATCC 25922
 - *Escherichia coli* ATCC 35218
 - *Haemophilus influenzae* ATCC 49247
 - *Haemophilus influenzae* ATCC 49766
 - *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
 - *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

روش انجام کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوگرام

انجام آزمایش روزانه

— عملکرد رضایت بخش و قابل قبول تست های کنترل کیفی روزانه ، زمانی است حاصل می شود که نتیجه 3 تست از 30 تستی که برای کنترل کیفی هر یک از آنتی بیوتیک ها / سویه های استاندارد انجام می گیرد خارج از محدوده قابل قبول نباشد.

— برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید 20 روز و یا 30 متوالی ویا **در 5 روز و هر روز 3 دیسک** آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد . بر اساس ضریب اطمینان 95% تنها یک مورد از 20 نتیجه قرائت شده می تواند خارج از محدوده کنترل باشد. چنانچه بیشتر از یک مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود ، که در ادامه توضیح داده می شود.

اجرای آزمایش کنترل کیفیت هفتگی

— زمانی که آزمایشگاه عملکرد رضایت بخشی از تست های کنترل کیفی ثبت نماید ، می تواند تست های کنترل کیفی را به صورت هفتگی انجام دهد .

— - آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و هم چنین زمانیکه یکی از عوامل آزمایش (مانند سری ساخت آگار یا دیسکهای تهیه شده از یک سازنده) تغییر کند، انجام دهید .

اجرای آزمایش کنترل کیفیت هفتگی

– اگر هر یک از نتایج کنترل کیفی هفتگی خارج از محدوده قابل قبول باشد ، انجام اقدامات اصلاحی مورد نیاز است .

– اگر می خواهید یک دیسک آنتی بیوتیک جدید و یا آگار از یک شرکت تولید کننده متفاوت را مورد استفاده قرار دهید . ابتدا باید برای مدت 20 و یا 30 روز و یا **در 5 روز متوالی و هر روز 3 دیسک** تست های کنترل کیفی را انجام داده و نتایج آن را ثبت نمایید . در صورت قابل قبول بودن به کنترل کیفی هفتگی بپردازید.

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

الف) نتایج خارج از محدوده قابل قبول به دلیل خطاهای مشهود و واضح شامل:

— استفاده از دیسک اشتباه

— استفاده از سویه کنترلی اشتباه

— آلودگی واضح سویه

— استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون بوجود آمده است. در این حال باید دلیل

ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح آزمایش دوباره تکرار شود. اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد.

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

— انبارش نامناسب

— نگهداری نامناسب (مثال: استفاده از یک کشت کاری به مدت طولانی)

— آلودگی

— زنده نبودن باکتری

— تغییر در میکروارگانیسم (مثال: جهش، از دست رفتن پلاسמיד)

— ملزومات آزمایش



اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

— شرایط حمل یا انبارش نامناسب

— آلودگی

— استفاده از پلیت نامناسب (مثال: ضخامت کم یا زیاد محیط)

— استفاده از مواد تاریخ گذشته

— قراردهی نامناسب دیسک (مثال: تماس ناکافی با سطح آگار)



ب (عامل ایجاد نتایج خارج از محدوده کنترل نامشخص است. در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود

- آزمایش را جهت یک سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی برای 5 روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید .
- اگر اندازه هر 5 قطرهاله در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .
- اگر اندازه هر یک از 5 قطرهاله عدم رشد خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است .
- آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهایی مشکل پی برده شود .

عملیات اصلاحی اضافی

- وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد ، احتمالاً "خطای مشاهده شده بعلت بروز يك اشكال كلي در سیستم و نه يك خطای تصادفی ایجاد شده است . در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند.مانند:
- اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد
- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)
- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور
- تغییر نیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل
- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند

عملیات اصلاحی اضافی

— استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از 24 ساعت ، نباشد.)

— وقتی مشکل بر طرف شد ، می توان کنترل کیفی هفتگی را برقرار کرد.

دستورالعمل پیشنهادی برای آزمایش و گزارش روتین و انتخابی

– داروهای گروه A جهت آزمایش و گزارش روتین نتایج گروه های خاص باکتریایی در نظر گرفته می شوند.

– گروه B نیز معرف داروهای مورد مصرف برای آزمایش های اولیه است

– گروه C معرف داروهای جایگزین و یا اضافی است.

– گروه U، برای درمان عفونت های ادراری مصرف می شوند.

دستورالعمل پیشنهادی برای آزمایش و گزارش دهی روتین و انتخابی

هشدار: ترکیبات ارگانسیم/عامل ضد میکروبی ذیل، ممکن است در شرایط <i>in vitro</i> فعال به نظر برسند، اما کارایی بالینی ندارند و نباید به عنوان حساس گزارش شوند.		
محل	ارگانسیم	عوامل ضد میکروبی که نباید به عنوان حساس گزارش شوند
جدول 2A	گونه‌های سالمونلا، گونه‌های شیگلا	نسل اول و دوم سفالوسپورین‌ها، سفامايسين‌ها و آمینوگلیکوزیدها
جدول 2C	گونه‌های استافیلوکوکوس مقاوم به اگزاسیلین	پنی سیلین‌ها، ترکیبات بتالاکتام/ مهارکننده بتالاکتاماز، سفم‌های ضد استافیلوککسی و کاربامپ‌ها
جدول 2D	گونه‌های انتروکوکوس	آمینوگلیکوزیدها (به جز غلظت‌های بالا)، سفالوسپورین‌ها، کلیندامایسین و تری متوپریم سولفامتوکسازول

انتروباکتریاسه

— با استفاده از نور انعکاسی و چشم غیر مسلح، قطر کامل هاله مهار رشد را اندازه گیری نمایید.

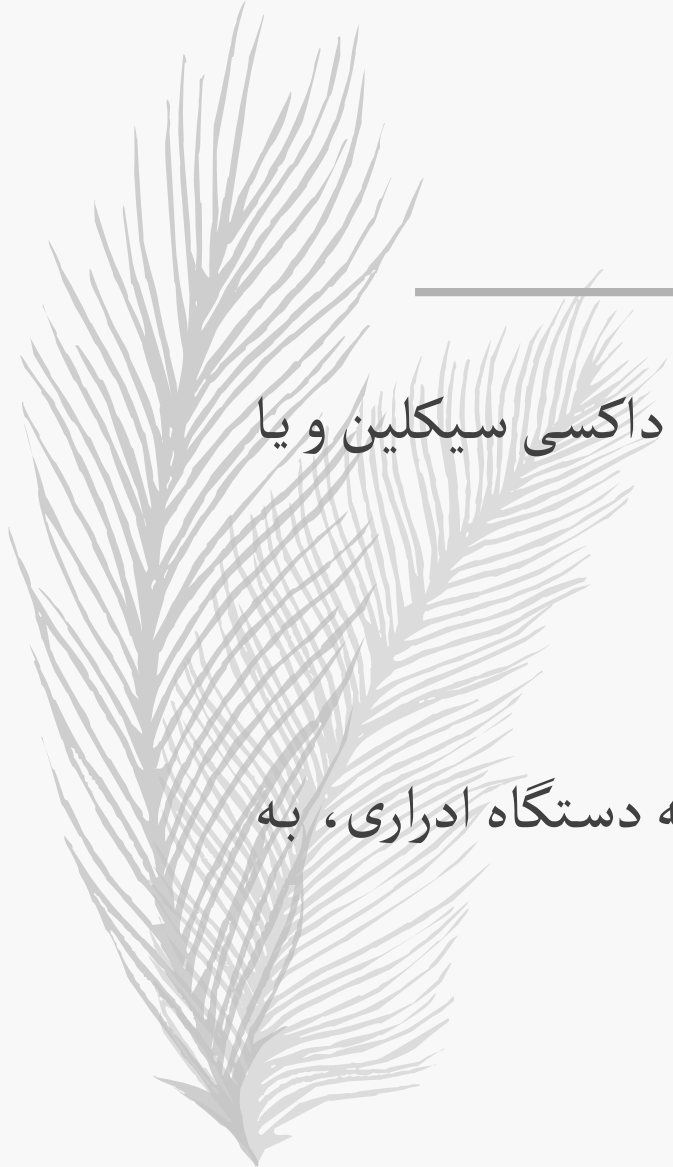
— زمانی که گونه های سالمونلا و شیگلای جدا شده از مدفوع تعیین حساسیت می شود، تنها باید آمپی سیلین، یکی از فلوروکینولون ها و کوتریموکسازول به طور روتین گزارش گردد. به علاوه، برای گونه های سالمونلای جدا شده در عفونت های خارج روده ای، یک سفالوسپورین نسل سوم باید تعیین حساسیت و گزارش شود و کلرامفنیکل در صورت درخواست، می تواند تعیین حساسیت و گزارش شود.

— در شرایط آزمایشگاه ممکن است گونه های سالمونلا و شیگلا، نسبت به نسل اول و دوم سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها حساس باشند، اما از نظر بالینی موثر نیستند و نباید حساس گزارش شوند.

انتروباکتریاسه

— ارگانیزم هایی که به تتراسیکلین حساس هستند به داکسی سیکلین و یا ماینوسیکلین هم حساس در نظر گرفته می شوند.

— کلرامفنیکل برای برای باکتری های جدا شده از نمونه دستگاه ادراری، به طور روتین گزارش نمی گردد.



گونه های استافیلوکوک

— استافیلوکوک های حساس به پنی سیلین به داروهای ذیل نیز حساسند: سایر پنی سیلین ها، ترکیبات بتالاکتام/مهار کننده بتالاکتاماز، سفم های ضد استافیلوکوکی و کارباپنم های تایید شده از سوی FDA برای درمان عفونت های استافیلوکوکی.

گونه های استافیلوکوک

— سویه های مقاوم به پنی سیلین و حساس به اگزاسیلین، نسبت به پنی سیلین های ناپایدار در برابر پنی سیلیناز مقاومند، ولی به داروهای ذیل حساسند: پنی سیلین های پایدار در مقابل پنی سیلیناز، ترکیبات بتالاکتام/مهارکننده بتالاکتاماز، سفم های ضد استافیلوکوکی و کارباپنم های تایید شده از سوی FDA برای درمان عفونت های استافیلوکوکی.

— استافیلوکوک های مقاوم به اگزاسیلین به تمام عوامل ضد میکروبی بتالاکتام موجود مقاوم هستند به جز سفالوسپورین های جدید با فعالیت ضد MRSA (مانند Ceftobiprole). بنابراین، حساسیت یا مقاومت به طیف وسیع داروی بتالاکتام را می توان فقط با استفاده از پنی سیلین و یا سفوکسیتین نتیجه گیری نمود.

گونه های استافیلوکوک

- برای تعیین حساسیت تمام ایزوله های استافیلوکوک به وانکومايسين بايد آزمایش تعیین MIC انجام گیرد. با روش انتشار از دیسک نمی توان ایزوله هایی که حساسیت بینابینی دارند، متمایز نمود.
- ارگانيسم هایی که به تتراسيکلين حساس هستند به داکسی سیکلین و یا ماینوسیکلین هم حساس در نظر گرفته می شوند.

گونه های انتروکوک

- با استفاده از نور انعکاسی و چشم غیر مسلح، قطر کامل هاله مهار رشد را اندازه گیری نمایید.
- در مورد وانکومايسين استثنائاً بايد با نور عبوری قرائت گردد.
- آمپی سیلین به عنوان نماینده کلاس آمپی سیلین و آموکسی سیلین استفاده می شود. برای انتروکوک هایی که بتالاکتاماز تولید نمی کنند، نتایج آزمایش آمپی سیلین را می توان برای پیش گویی حسایت به آموکس سیلین — کلاوولانیک اسید، آمپی سیلین - سولباکتام، پپراسیلین و پپراسیلین تازوباکتام استفاده نمود.

گونه های انتروکوک

— حساسیت به پنی سیلین در انتروکوک هایی که بتالاکتاماز تولید نمی کنند، قابل تعمیم به آمپی سیلین، آمپی سیلین — سولباکتام، آموکسی سیلین، آموکسی سیلین — کلاوولانات، پپراسیلین و پپراسیلین — تازوباکتام است.

— برای تشخیص صحیح مقاومت به انتروکوک ها به وانکومايسين، پليت ها بايد 24 ساعت کامل انکوبه شوند.

— ارگانيسم هایی که به تتراسيکلين حساس هستند به داکسی سیکلین و یا ماینوسیکلین هم حساس در نظر گرفته می شوند.

گونه های انتروکوک

—سفالوسپورین ها، آمینوگلیکوزیدها (غیر از غربالگری برای سطح بالا)، کلیندامایسین و کوتریموکسازول ممکن است در برابر گونه انتروکوک در شرایط **in vitro** فعال به نظر بیایند، در حالیکه این داروها از لحاظ بالینی در درمان اثری ندارند و چنین ایزوله هایی را هم نباید به عنوان حساس گزارش نمود.

استرپتوکوکوس پنومونیه

- با استفاده از نور انعکاسی و چشم غیر مسلح، قطر کامل هاله مهار رشد را اندازه گیری نمایید.
- حساسیت و مقاومت به اریترومايسين نشان دهنده حساسیت و مقاومت به آزیترومایسین، کلاریترومايسين و دیریترومایسین می باشد.
- پنوموکوک هایی که در برابر دیسک اگزاسیلین منطقه ممانعت از رشد بیشتر از 20 میلیمتر دارند آمپی سیلین (خوراکی یا تزریقی)، آمپی سیلین - سولباکتام، سفادور، سفدینیر، سفدیتورن، سفپودوکسیم، سفپروزیل، سفتی زوکسیم، سفوراکسیم، ایمپنم، لورا کاربف و مروپنم حساس می باشد.

استرپتوکوکوس پنومونیه

- پنوموکوک هایی که در برابر دیسک اگزاسیلین منطقه ممانعت از رشد کمتر از 19 میلیمتر دارند باید حساسیت آن در برابر پنی سیلین و سفوتاکسیم یا سفتریاکسون یا مروپنم با روش MIC بررسی شود زیرا ممانعت از رشد کمتر از 19 میلیمتر برای گونه های مقاوم، متوسط و حساس به پنی سیلین نیز اتفاق می افتد.
- برای ایزوله هایی که منطقه ممانعت از رشد کمتر از 19 میلیمتر نباید پنی سیلین به عنوان مقاوم گزارش گردد و حتما باید MIC شود

استرپتوکوک بتاهمولیتیک

— با استفاده از نور انعکاسی و چشم غیر مسلح ، قطر کامل هاله مهار رشد را اندازه گیری نمایید.

— انجام تست حساسیت برای استرپتوکوکوس پیوژنز و آگالاکتیه نیاز نمی باشد و پنی سیلین و آمپی سیلین داروهای انتخابی هستند.

Methicillin Resistant Staphylococci Aureus (MRSA)

- مقاومت به واسطه ژن *mecA* ایجاد می گردد.
- به وسیله اگزاسیلین این مقاومت تشخیص داده می شود.
- استفاده از دیسک سفوکسی تین برای تشخیص مقاومت به متی سیلین به اگزاسیلین ارجحیت دارد.
- برای اینکار سوسپانسیون میکروبی با روش مستقیم از کلنی های تازه استفاده می شود.
- انکوباسیون در زمان استفاده از سفوکسی تین برای استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس لاگدانسیس 16-20 ساعت می باشد و برای استافیلوکوک های کواگولاز منفی 24 ساعت می باشد.

Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL)

- باکتری هایی که از این نظر قابل بررسی می باشند عبارتند از (کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسی توکا، اشريشيا کلي و پروتئوس میراییلیس).
- اگر کاهش حساسیت به صورت ذیل باشد باید از نظر ESBL بررسی شوند.

For *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, and *E. coli*:

Cefpodoxime zone	≤ 17 mm
Ceftazidime zone	≤ 22 mm
Aztreonam zone	≤ 27 mm
Cefotaxime zone	≤ 27 mm
Ceftriaxone zone	≤ 25 mm

For *P. mirabilis*^a:

Cefpodoxime zone	≤ 22 mm
Ceftazidime zone	≤ 22 mm
Cefotaxime zone	≤ 27 mm

محدوده های ذکر شده در بالا ممکن است نشانه تولید ESBL باشد.

Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL)

Ceftazidime	30 µg
Ceftazidime-clavulanic acid ^b	30/10 µg

باید

and

Cefotaxime	30 µg
Cefotaxime-clavulanic acid ^b	30/10 µg

(برای آزمایش‌های تأییدی لازم است از هر دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتازیدیم، به تنهایی و همراه با کلاولانیک اسید استفاده شود.)

Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL)

– قطر هاله عدم رشد برابر 5 میلی متر یا بیش از آن برای هر یک از عوامل ضد میکروبی آزمایش شده همراه با کلاولانیک اسید در مقایسه با قطر هاله عامل ضد میکروبی به تنهایی، نشانه تولید ESBL است.

– ایزوله های تولید کننده ESBL به تمام پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، و آزترئونام مقاومند.

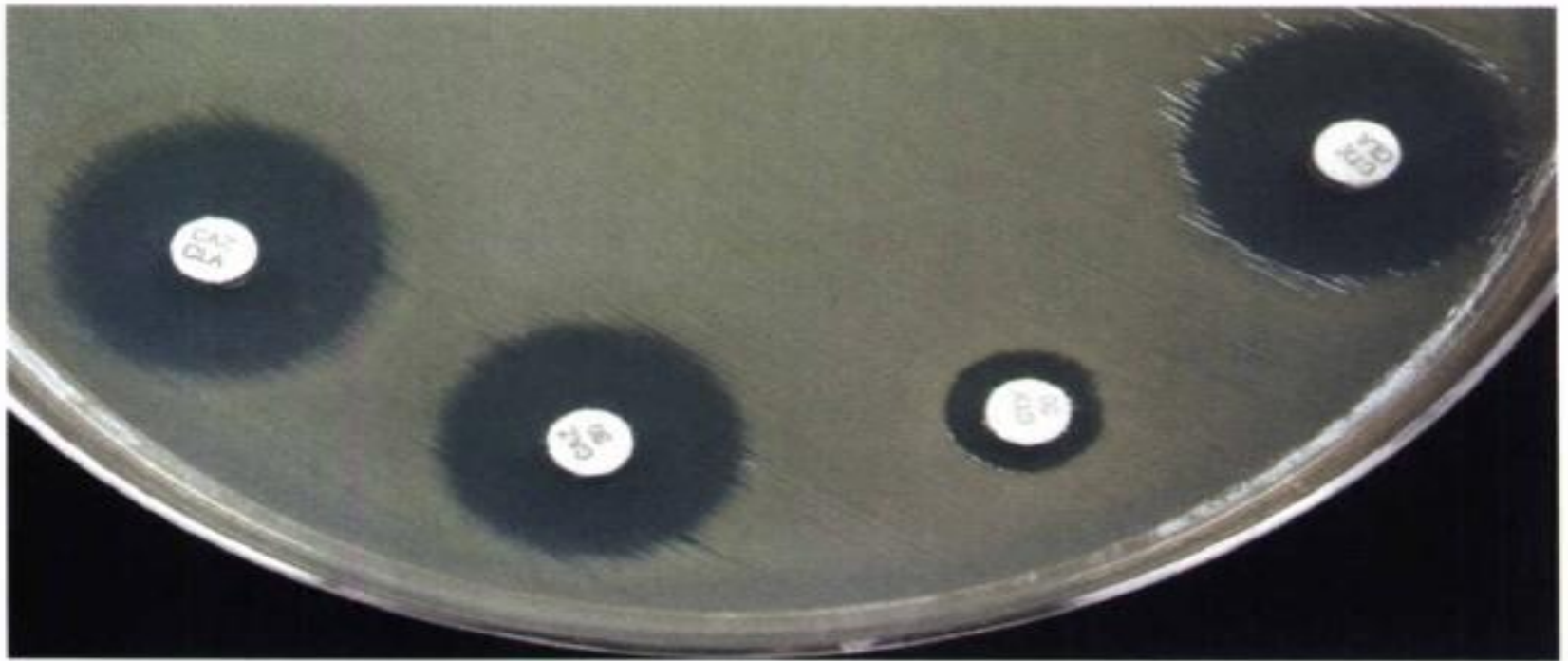


FIGURE 13-15 ■ Extended spectrum β -lactamase (ESBL) phenotypic confirmatory testing of *Klebsiella pneumoniae*. The standard disk diffusion test is performed with both cefotaxime and ceftazidime with and without clavulanic acid. The diameter of the zone around cefotaxime-clavulanic acid (4 o'clock position) is greater than 5 mm larger than the zone around cefotaxime (5 o'clock position), which indicates a positive reaction as clavulanic acid restores the activity of cefotaxime. Although the zones for ceftazidime and ceftazidime-clavulanic acid are comparable, only one "set" of drugs needs to be positive to confirm an isolate as an ESBL producer.

D-zone test

- با این تست می توان مقاومت القایی به کلندامایسین را در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوک های کواگولاز منفی و استرپتوکوک های بتاهمولیتیک بررسی نمود.
- یک دیسک 2 میکروگرمی کلندامایسین را در کنار دیسک 15 میکروگرمی اریترومایسین قرار دهید.
- فاصله این دو دیسک برای استافیلوکوک ها 15-26 میلی متر و برای استرپتوکوک ها 12 میلی متر می باشد.
- در صورتیکه ایزوله آزمایش شده دارای ژن مقاومت به کلندامایسین باشد در اثر القای توسط اریترومایسین لبه هاله دیسک کلندامایسین که در مجاورت اریترومایسین می باشد صاف است و باید چنین ایزوله هایی را به عنوان مقاوم به کلندامایسین گزارش نمایید و در صورتیکه لبه صاف و بدون انحناء نشود نتیجه را همانگونه که هست گزارش نمایید.



FIGURE 13-14 ■ D-zone testing of *Staphylococcus aureus* that has erm-mediated inducible clindamycin resistance. The positive reaction is noted by a flattening of the zone around the clindamycin disk in the area where there has been diffusion of both erythromycin and clindamycin molecules.

