

پتریدیش آزمایشگاهی استاندارد بر اساس داده‌های CLSI

پتریدیش استاندارد

لیلا یاحقی¹، محمد فاطمی مطلق^{2*}

1- دکتری فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران

2- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

* تهران، کد پستی 33191

mohammad.fatemi@shahed.ac.ir , mohammadfatemimotlagh@gmail.com

(دریافت مقاله: 94/11/25 پذیرش مقاله: 96/3/16)

چکیده - خطاها در آزمایش‌ها و آزمایشگاه‌ها اجتناب ناپذیرند به خصوص اگر از روش‌ها و ابزارهای غیر استاندارد استفاده شود. برای ریختن محیط کشت در آزمایش انتشار دیسک از یک روش غیر استاندارد و به صورت چشمی استفاده می‌شود که موجب ایجاد خطاهای غیر قابل چشم‌پوشی در نتایج این آزمایش می‌شود. هدف این پژوهش طراحی و ساخت پتریدیشی برای حذف خطاهای موجود و استاندارد نمودن انجام این آزمایش است.

طی مطالعه‌ای که در استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) درباره آزمایش‌های حساسیت‌سنجی انجام گرفت، مشخص شد که ضخامت استاندارد محیط کشت در این گونه آزمایش‌ها 4 میلی‌متر می‌باشد. بر همین اساس و توسط نرم‌افزار سه بعدی، پتریدیشی استاندارد که بتواند این ضخامت را به خوبی مشخص کند، طراحی و ساخته شد.

بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که پتریدیش‌های موجود گزارش‌های متفاوت و نادرستی از هاله‌های عدم رشد حتی برای آنتی‌بیوتیک‌های یکسان تولید می‌کنند که منجر به تجویز نادرست آنتی‌بیوتیک به طور قابل توجهی می‌شود ($P < 0.05$). به علاوه میزان اتلاف محیط کشت در پتریدیش‌های موجود 33 تا 50 درصد ثبت گردید.

پتریدیش استاندارد طراحی شده آزمایش انتشار دیسک و سایر آزمایش‌های حساسیت‌سنجی را استاندارد می‌کند و باعث دقت و یکسانی نتایج هاله‌های عدم رشد و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب می‌گردد و میزان مصرف محیط کشت به طور قابل توجهی کاهش یافت.

کلیدواژگان: پتریدیش، آزمایش انتشار دیسک، CLSI، محیط کشت، هاله‌های عدم رشد.

1- مقدمه

[1]. شناسایی نوع باکتری و آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام از آزمایش‌های مهم آزمایشگاه‌های تشخیص طبی هستند که می‌تواند در درمان و کنترل بیماری‌های عفونی نقش عمده‌ای داشته باشند. با توجه به مقاومت روز افزون

خطاهای آزمایشگاهی بدون شک جزء جدایی ناپذیر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی هستند که متأسفانه در ایران گزارش دقیقی از وجود این خطاها در دسترس نیست

آن‌ها لازم است طراحی برای تصحیح و استانداردسازی این ابزارهای مفید و پر کاربرد آزمایشگاهی اندیشیده شود. هدف از این پژوهش طراحی یک پتریدیش جدید و استاندارد برای رفع مشکلات پتریدیش‌ها و روش‌های موجود در آزمایش‌های حساسیت‌سنجی و دیگر آزمایش‌هایی است که در آن‌ها از پتریدیش و محیط کشت استفاده می‌شود.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد شیمیایی

محیط کشت مولر هیتون آگار (Merck, Germany)، پتریدیش‌های اندازه 10 سانتی‌متری شرکت‌های لابترون (ایران)، هورطب (ایران)، مازوطب (ایران) (پتریدیش‌های شاهد) و پتریدیش‌های استاندارد طراحی شده جدید (توسط شرکت دیاکو طب آزما DTA) مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین نوع باکتری‌های مورد استفاده کلبسیلا پنومونیا (ATCC 10031, PTCC No. 1053) از انستیتو پاستور ایران بود. برای انجام آزمایش‌ها، از شانه‌های آنتی‌بیوتیک (HI-MEDIA, India)، و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمیکاسین (Amikacin-Ak)، آموکسی‌سیلین (Amoxicillin-Am)، کلرامفنیکل (Chloramphenicol-Co)، کوتری موكسازول (CoTrimoxazole-Co)، جنتامایسین (Gentamicin-G)، نالیدیکسیک اسید (Nalidixic acid-Na)، نیتروفورنتین (Nitrofurantoin-Nf) و اکساسیلین (Oxacillin-O) شرکت پادتن طب ایران استفاده گردید. لازم به ذکر است از این آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقایسه اندازه‌ی هاله‌های عدم رشد تشکیل شده در روش‌ها، دقت آزمایش‌ها و تعیین میزان مصرف محیط کشت و کارآمدی ابزارها و پتریدیش‌های شرکت‌های مختلف، در مقایسه‌ی با نتایج این پتریدیش و روش جدید و تأیید فیزیکی آن، استفاده شد. همچنین نرم‌افزار طراحی سه بعدی سالدورکس

باکتری‌ها به داروهای ضد میکروبی، درمان بدون در نظر گرفتن حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، می‌تواند سبب تأخیر در بهبودی و یا عدم درمان گردد [2]. در کل گزارش صحیح آزمایشگاهی به عوامل متعددی مانند نوع مواد مصرفی (استاندارد بودن، سادگی در استفاده و ...)، نحوه نگهداری و تجربه و مهارت کادر درمانی بستگی دارد [3]. همچنین خطاهایی در آزمایش‌هایی مانند حساسیت‌سنجی قارچی، آزمایش کمترین غلظت مهارکننده نواری و شانه‌ای (MIC)، روش انتشار دیسک و دیگر آزمایش‌هایی که از پتریدیش و محیط کشت استفاده می‌شود، وجود دارد. از مواد ابزارهای مهم در آزمایش‌های حساسیت‌سنجی، پتریدیش و محیط کشت می‌باشد. مهمترین عوامل در انجام آزمایش، دقت و سرعت بالا و در عین حال هزینه پایین و عدم پیچیدگی در انجام آن می‌باشد. کار با پتریدیش‌ها برای آزمایش‌های حساسیت‌سنجی و دیگر آزمایش‌هایی که نیاز به محیط کشت دارند دارای معایبی از جمله ریختن محیط کشت بدون یک استاندارد خاص و به صورت تقریبی است که خود باعث ایجاد خطایی در آزمایش‌ها، یکسان نشدن جواب آزمایش‌های یکسان و مصرف بیش از اندازه لازم محیط کشت می‌شود. در هر صورت برای ضخامت محیط کشت، استاندارد طبق نظر انجمن استانداردهای کلینیکی و آزمایشگاهی CLSI تعریف شده است که هیچگاه رعایت نمی‌شود [4، 5]. در ابتدا پتریدیش‌ها ابزارهای آزمایشگاهی خامی بودند که فقط به عنوان حمل‌کننده و پایه‌ای برای مواد و میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شدند. در مطالعاتی توسط فاطمی مطلق و همکاران در سال‌های 2009، 2010 و 2013 پتریدیش‌هایی برای بهبود و تصحیح آزمایش انتشار دیسک، آزمایش MIC و حساسیت‌سنجی قارچی طراحی و مورد آزمایش قرار گرفتند [6-8]. با توجه به موارد ذکر شده و معایب موجود در پتریدیش‌ها و روش استفاده از

عدد (در مجموع 60 عدد) و پتردیش DTA 20 عدد جهت انجام آزمایش حساسیت‌سنجی انتخاب شد. در پتردیش‌های معمول روش کار انجام آزمایش طبق حالت رایج و توسط تکنسین آزمایشگاه آغاز گشت و محیط کشت به صورت تقریبی و چشمی درون پتردیش‌های شاهد ریخته شد اما در پتردیش DTA ریختن محیط کشت تا زمان رسیدن به میان دو خط روی دیواره ادامه یافت. سپس بقیه مراحل آزمایش انتشار دیسک برای تمام پتردیش‌ها به طور یکسان انجام گرفت و بعد از 24 ساعت گرمخانه‌گذاری نتایج به صورت هاله‌های عدم رشد گزارش و ثبت گردید.

4-2- اندازه‌گیری میزان محیط کشت مصرفی در

پتردیش‌های مورد آزمایش

بعد از ثبت نتایج هاله‌های عدم رشد، ضخامت‌های محیط کشت در پتردیش‌های شاهد با خط کش اندازه‌گیری و ثبت شد. هم‌چنین برای مشخص شدن حجم مصرفی محیط کشت در پتردیش‌های شاهد و پتردیش DTA از استوانه مدرج حاوی آب استفاده شد که آب در پتردیش‌های شاهد و پتردیش DTA ریخته شد و در ضخامت‌های 4، 5 و 6 میلی‌متری اندازه‌گیری و درصد اتلاف محیط کشت برای همه پتردیش‌ها محاسبه شد.

پتردیش‌های جدید به کار گرفته شد. (Dassault Systèmes, France) برای طراحی

2-2- روش ساخت پتردیش استاندارد DTA و روش استفاده از آن

طبق مطالعه‌ای که در داده‌های CLSI انجام گرفت، مشخص شد که ضخامت استاندارد محیط کشت برای آزمایش‌های حساسیت‌سنجی 4 میلی‌متر می‌باشد و تغییر در این ضخامت چه به صورت افزایش و چه به صورت کاهش باعث تغییر در نتایج حاصل و گزارش نادرست و متعاقب آن تجویز نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها و قارچ‌کش‌ها خواهد بود. بر همین اساس و با استفاده از نرم‌افزار سالیید ورکس، پتردیشی طراحی و ساخته شد که بر دیواره آن دارای دو خط در ارتفاع‌های 3/5 میلی‌متر و 4/5 میلی‌متر از کف داخلی آن واقع شده است که هر گاه محیط کشت در این پتردیش ریخته شود و میان این دو خط قرار گیرد، ضخامت استاندارد 4 میلی‌متر مد نظر CLSI را نشان می‌دهد (شکل 1).

2-3- انجام آزمایش‌های حساسیت‌سنجی بر روی

پتردیش DTA و پتردیش‌های شاهد

برای این کار ابتدا از هر کدام از پتردیش‌های شاهد 20



شکل 1 دو خط بلند جهت تعیین ضخامت استاندارد محیط کشت طبق CLSI

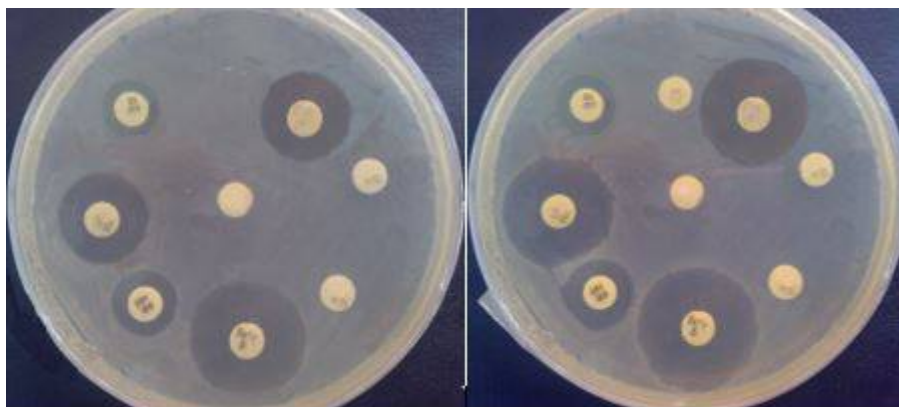
2-5- آنالیز آماری

برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها، از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تست Tukey استفاده شد. در تمامی مراحل سطح معنی‌دار بودن در $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

3- نتایج

بر اساس آزمایش انتشار دیسک انجام شده پنج آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین، فلومکویین، فورازولیدون، آمپی‌سیلین و فلورفنیکل علیه کلبسیلا نومونیا ایجاد

هاله‌های عدم رشد کردند (شکل 2) که هاله‌های عدم رشد تشکیل شده در پتریدیش‌های شاهد با هاله‌های عدم رشد تشکیل شده در پتریدیش DTA و داده‌های استاندارد CLSI تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$) (نمودار 1). همچنین هاله‌های عدم رشد تشکیل شده در بین پتریدیش‌های شاهد برای آنتی‌بیوتیک‌های یکسان نیز دارای تفاوت چشمگیری بودند. به علاوه مشخص گردید که ضخامت محیط کشت در پتریدیش‌های شاهد (توسط تکنسین) بین 5-6 میلی‌متر و پتریدیش DTA 4 میلی‌متر بود (جدول 1 و شکل 2).



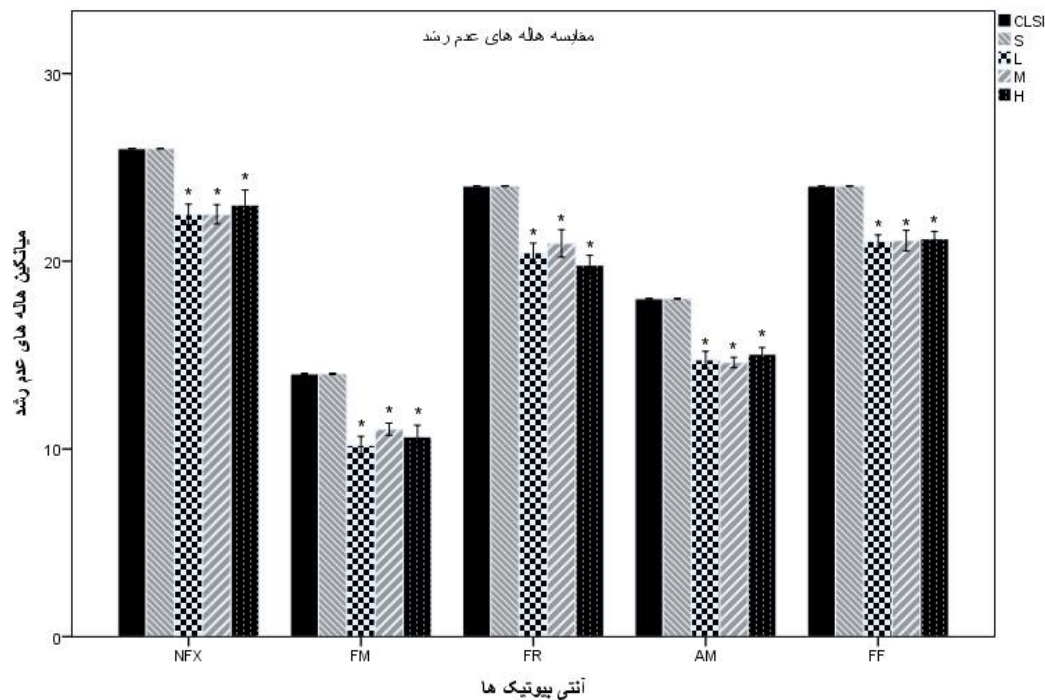
شکل 2 سمت راست: هاله‌های عدم رشد تشکیل شده در پتریدیش استاندارد DTA. سمت چپ: هاله‌های عدم رشد تشکیل شده در پتریدیش شاهد (با وجود استفاده از میکروارگانیزم و دیسک‌های یکسان قطر هاله‌های عدم رشد به صورت معنی‌داری در پتریدیش شاهد کوچکتر از حالت واقعی است که به علت ضخامت بیشتر محیط کشت در این پتریدیش می‌باشد).

جدول 1 میزان محیط کشت مصرفی و اتلاف آن در پتریدیش‌های شاهد و پتریدیش DTA

ضخامت محیط کشت شرکتهای سازنده	4 mm*	5 mm	6 mm	درصد اتلاف**
DTA (با خطوط استاندارد)	18 ml	---	---	%0
لابترون	19/5 ml	27/5 ml	37/5 ml	%50
هور طب	18 ml	24ml	30 ml	%33
مازو طب	18 ml	24 ml	30ml	%33

* ضخامت استاندارد محیط کشت

** درصد اتلاف محیط کشت به ازای هر میلی‌متر افزایش ضخامت محیط کشت



نمودار 1 مقایسه هاله های عدم رشد

CLSI: قطر هاله های عدم رشد مربوط به آنتی بیوتیک های ذکر شده بر اساس CLSI, S: قطر هاله های عدم رشد مربوط به پتریدیش DTA, L: قطر هاله های عدم رشد مربوط به پتریدیش شرکت لابترون, M: قطر هاله های عدم رشد مربوط به پتریدیش شرکت مازوطب, H: قطر هاله های عدم رشد مربوط به پتریدیش شرکت هورطب, NFX: دیسک انروفلوکساسین, FM: دیسک فلومکوئین, FR: دیسک فورازولیدون, AM: دیسک آمپی سیلین و FF: دیسک فلورفنیکل می باشد

4- بحث

اساس روش انتشار دیسک، مهار رشد باکتری های کشت شده بر روی محیط کشت توسط آنتی بیوتیک موجود بر دیسک و تشکیل و گزارش هاله عدم رشد می باشد. قطر هاله های عدم رشد نشان از قدرت آنتی بیوتیک برای درمان میکروارگانیزم های مختلف است که بر همین اساس نوع آنتی بیوتیک و در آزمایش کمترین غلظت مهار کنندگی دوز آنتی بیوتیک برای میکروارگانیزمی خاص تعیین می گردد. در صورتی که این هاله های عدم رشد به دلایلی از جمله خطاها نشان دهنده توان واقعی آنتی بیوتیک ها نباشند، خسارت های جبران ناپذیری به دنبال خواهند داشت. همچنین به علت اطلاعات خروجی غلط از آزمایشگاه ها باعث تغییر الگوی مقاومت باکتری ها گردیده است [9]. اشتباه در تجویز نوع و میزان (دز)

آنتی بیوتیک ها منجر به ایجاد سویه های مقاوم به درمان شده است. مطالعات نشان می دهد که انتخاب عامل ضد باکتریایی در 30 تا 50 درصد موارد نادرست می باشد. همچنین ثابت شده است که 30 تا 60 درصد آنتی بیوتیک های تجویز شده در بخش های مراقبت های ویژه غیر ضروری، نادرست یا کمتر از حد مطلوب (دز ناکافی) بوده اند که بخشی از این اشتباهات می تواند مربوط به ابزارهای آزمایشگاهی باشد [10]. چندین پژوهش برای بهبود آزمایش حساسیت سنجی صورت گرفته است. از آن جمله می توان به تغییر در اندازه دیسک های آنتی بیوگرام و طراحی وسایل و دستگاه های رادیومتر برای سنجش حساسیت باکتریایی نام برد که امروزه کمتر کاربردی هستند. آزمایش حساسیت دیسکی مزایای کاملاً مشخصی بیش از روش های اتوماتیک دارد.

پتریدیش‌ها به صورت چشمی و بدون اندازه‌گیری خاصی انجام می‌شود همیشه نتایج همراه با خطا خواهند بود. در آزمایش انتشار دیسک هر گاه ضخامت محیط کشت کمتر از ضخامت استاندارد 4 میلی‌متر آن باشد نفوذ آنتی‌بیوتیک به محیط کشت بیشتر بوده و هاله‌های عدم رشد با قطر بیشتری تشکیل می‌دهند و در نتیجه قدرت آنتی‌بیوتیک بیشتر از حد خود و به صورت کاذب گزارش می‌شود و بر عکس هر گاه ضخامت محیط کشت کمتر از ضخامت استاندارد 4 میلی‌متر باشد نفوذ آنتی‌بیوتیک به محیط کشت کمتر می‌شود و هاله‌های عدم رشد با قطر کمتری تشکیل می‌شوند و در نتیجه قدرت آنتی‌بیوتیک کمتر از حد خود و به صورت کاذب گزارش می‌شود. در نتیجه و به هر دو صورت، تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها نامناسب خواهند بود [4].

همان‌طور که ذکر شد ریختن محیط کشت به صورت چشمی و بدون اندازه‌گیری انجام می‌شود که طبق داده‌های به دست آمده از این تحقیق ضخامت محیط کشت معمولاً بین 5 تا 6 میلی‌متر ریخته شد که بعد از انجام آزمایش انتشار دیسک بر روی پتریدیش‌های شاهد و پتریدیش DTA و مقایسه نتایج با استانداردهای CLSI، مشخص گردید این تفاوت ضخامت‌ها کاملاً در تغییر قطر هاله‌های عدم رشد در بین پتریدیش‌های شاهد و حتی آنتی‌بیوتیک‌های یکسان موثر هستند (شکل 2). به عبارت دیگر این تغییرات در ضخامت محیط کشت منجر به تغییر در قطر هاله‌های عدم رشد و در نتیجه منجر به گزارش خطا و تجویز نادرست آنتی‌بیوتیک، عدم درمان به موقع، افزایش احتمال ایجاد سویه‌های مقاوم و حتی مسمومیت‌های دارویی گردد. طبق نتایج این تحقیق با استاندارد کردن ضخامت محیط کشت (4 میلی‌متر)، نتایج آزمایش‌های انتشار دیسک و کمترین غلظت مهار کنندگی کاملاً بر داده‌های استاندارد CLSI منطبق می‌گردند و هیچ‌گونه تفاوت معنی داری بین هاله‌های عدم رشد

از جمله این مزایا استفاده از نمونه‌های بدون نیاز به تخلیص بر خلاف دستگاه‌های اتوماتیک، و امکان مشاهده اثرات سینرژسم و آنتاگونیستی آنتی‌بیوتیک‌ها در روش انتشار دیسک می‌باشد [11]. اساس کار آزمایش حساسیت‌سنجی با دیسک بر فرض نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت آزادانه به محیط کشت نوترینت آگار می‌باشد و تغییر ضخامت موجب تغییر در این حرکت آزادانه می‌گردد و تغییر در اندازه هاله عدم رشد می‌گردد. بونه و همکاران بر روی خطاهای موجود در روش انتشار دیسک از جمله موانع حرکت آزادانه آنتی‌بیوتیک در محیط کشت و واکنش آنتی‌بیوتیک با محیط کشت و تأثیرات آن‌ها بر گزارش نتایج کار کردند. آن‌ها الگویی تئوری را برای حل این مشکل پیشنهاد دادند. به این صورت که سنجش آنالیز حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش انتشار در آگار با استفاده از مرتب‌سازی خطی شعاع مربع (قطر) هاله‌های عدم رشد به لگاریتم طبیعی غلظت آنتی‌بیوتیک منبع محاسبه می‌گردد. این موضوع نشان دهنده یک راه حل معادله دیفرانسیل توصیف کننده انتشار آزاد در یک بعد برای آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی محیط کشت نوترینت آگار می‌باشد [12]. همچنین ملترز و دی‌هان روشی برای برآورد رگرسیون خطی برای پیش‌بینی درصد خطاهای موجود در انتشار دیسک پیشنهاد کردند [13]. دو محقق دیگر سعی در تکمیل روش آقای ملترز داشتند که اطلاعات کار آن‌ها در CLSI نیز ثبت گردید ولی دقت و سادگی لازم و پوشش دهی کامل آزمایش حساسیت‌سنجی را نداشتند [14، 15]. هم‌اکنون گلن و همکاران در تکمیل پژوهش‌های این محققان دست به طراحی و تکمیل نرم‌افزارهایی برای گزارش آزمایش نتایج حساسیت‌سنجی زده اند که به نظر می‌رسد به توجه به نیاز به آموزش فراوان، پیچیدگی و قیمت بالا کمی دیرتر به صورت رایج استفاده گردد [13]. در روش موجود با توجه به اینکه هم‌اکنون ریختن محیط کشت درون

- testing interpretive criteria using model-based analysis: development and implementation. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1-20. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.004
- [6] Fatemi Motlagh, M., and Mansoori, N. (2009) Disc antibiogram test with graded plate method. *Mljgoums.3*(2), 53-59.
- [7] Fatemi Motlagh, M., Varham, H., and Mansori, N. (2010) Gradient Plate for Hicomb Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Test. *Mljgoums.4*(2), 45-51.
- [8] Fatemi Motlagh, M., and Hoshmand Far, R. (2013) produce well petri dish for fungi sensitivity measurement. *MJTUOMS.34*(6), 49-53.
- [9] Zaheer F., Usman S., Fatima S., Ul hasan M. (2015) COMPARATIVE STUDY OF ANTIBIOTICS FOR THEIR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY IN CLINICAL ISOLATES. *IJPSR.* 6(2): 630-635.
- [10] Ventola, C L. (2015) The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics.* 40(4):277-283.
- [11] Kerr JR. (2005) Antibiotic treatment and susceptibility testing. *Journal of Clinical Pathology.* 58(8): 786-787. <http://doi.org/10.1136/jcp.2005.030411>
- [12] Bonev B., Hooper J., Parisot J. (2008) Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J Antimicrob Chemother.* 61(6):1295-301.
- [13] Metzler CM., De Haan RM. (1974). Susceptibility tests of anaerobic bacteria: statistical and clinical considerations. *J Infect Dis.* 130(6):588-94.
- [14] Craig BA. (2000) Modeling approach to diameter breakpoint determination. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 36(3):193-202.
- [15] Annis DH., Craig BA. (2005) Statistical properties and inference of the antimicrobial MIC test. *Stat Med.* 24(23):3631-44.
- [16] Reller LB., Weinstein M., Jorgensen JH., Ferraro MJ. (2009) Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* 49, 1749-1755.
- تشکیل شده در پتریدیش DTA و استاندارد CLSI دیده نشد (نمودار 1). از طرف دیگر طبق نتایج این پژوهش انجام انتشار دیسک به روش سنتی و پتریدیش‌های موجود موجب افزایش مصرف و اتلاف محیط کشت به میزان 33-50 درصد در پتریدیش‌های شاهد شد که باعث افزایش هزینه‌های انجام آزمایش به همین میزان می‌گردد (جدول 1). همچنین با توجه به اینکه انجام روش حساسیت‌سنجی بر روی پتریدیش کاملاً ارزان، آسان و در دسترس است با استاندارد کردن و رفع نواقص آن به این روش، مزایای این نوع پتریدیش جدید نسبت به سیستم‌های اتوماتیک که با آن که از دقت بر خوردار هستند اما به علت پیچیدگی‌ها، هزینه‌ها و نیاز به ابزارهای خاص برای خواندن و تفسیر نتایج حساسیت‌سنجی کمتر در دسترس قرار می‌گیرند، بیش از پیش به اثبات می‌رسند.
- [16].

5- منابع

- [1] Abbasi, S., and Mansouri, S. (2008) Accuracy of identification and susceptibility tests of gram negative bacilli performed routinely by clinical laboratories compared to the standard procedures in Kerman. *Iran J Med Microbiol.* 2(2),49-54.
- [2] Paterson, DL. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *AJIC.* 119(6), 20-28.
- [3] Abbasi, E., Rahbar, M., Hekmat Yazdi, S., RashedMarandi, F., Sabourian, R., and Saremi, M. (2006) Evaluation of the 10th External Quality Assessment Scheme results in clinical microbiology laboratories in Tehran and districts. *East Mediterr Health J.* 12(3-4),310-315.
- [4] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement (M100-S25). (2015) 35,146-176.
- [5] DePalma G., Turnidge J., Craig BA. (2016) Determination of disk diffusion susceptibility