

An Analytical Review of Laboratory Methods for Evaluating Antibacterial Activity: Principles, Limitations, and Applications

Received: 06 July 2026, Accepted: 05 September 2026

Hadis Tavafi^{1,2*}, Narges Tork³

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of science, Malayer University, Malayer, Iran

² Assistant Professor, Department of Biothechnology, Faculty of Interdisciplinary science and Technology, Malayer University, Malayer, Iran

³ Master's degree, Industrial Microbiology, Razi University of Kermanshah, Iran

***Corresponding Author:**

h.tavafi@malayeru.ac.ir

How to Cite This Article:

Tavafi H, Tork N. An Analytical Review of Laboratory Methods for Evaluating Antibacterial Activity: Principles, Limitations, and Applications. Journal of Environmental Health Engineering. 2026;14(2):240-56.

DOI:

ABSTRACT

Background: One of the most important global health crises is the increase in antimicrobial resistance, especially among multidrug-resistant bacteria, which further highlights the need for accurate and reproducible laboratory methods to assess the efficacy of antimicrobial agents.

Materials and Methods: This review was conducted to compare standard laboratory methods used to evaluate antimicrobial activity, including disk diffusion (Kirby-Bauer) and broth microdilution, focusing on their applications, advantages, and limitations.

Results: Due to its high accuracy and quantitative results, the broth microdilution method is considered one of the most important reference methods and a recognized standard for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Disk diffusion offers simplicity and cost-effectiveness for routine clinical laboratories, while agar dilution is suitable for testing large numbers of isolates. Emerging challenges such as biofilm formation require specialized assays, which are briefly discussed.

Conclusion: The selection of an appropriate method for antimicrobial susceptibility testing depends on laboratory resources and the need for quantitative versus qualitative data. These advanced approaches are expected to play a pivotal role in the future of antimicrobial therapy. Each method has its own strengths and limitations, and their complementary use is essential to advance our understanding of antibiotic resistance, improve clinical outcomes, and provide appropriate laboratory methods to prevent antimicrobial resistance.

Keywords: Antimicrobial susceptibility testing, Disk diffusion, Multidrug resistance, Microdilution broth

مروری تحلیلی بر روش‌های آزمایشگاهی ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی: اصول، محدودیت‌ها و کاربردها

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۵/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۱۴

حدیث طوافی^{۱*}، نرگس ترک^۲

^۱ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

^۲ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

^۳ کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی صنعتی، دانشگاه رازی کرمانشاه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهمترین بحران‌های سلامت جهانی، افزایش مقاومت ضدمیکروبی، به ویژه در میان باکتری‌های مقاوم به چند دارو است که نیاز به روش‌های آزمایشگاهی دقیق و تکرارپذیر برای ارزیابی اثربخشی عوامل ضدمیکروبی را بیش از پیش برجسته می‌کند.

مواد و روش‌ها: این بررسی با هدف مقایسه روش‌های آزمایشگاهی استاندارد مورد استفاده برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی، از جمله انتشار دیسک (کربی-باثر) و روش‌های میکرودايلوشن براث، با تمرکز بر کاربردها، مزایا و محدودیت‌های آنها انجام شد.

یافته‌ها: روش میکرودايلوشن براث به دلیل دقت بالا و نتایج کمی، یکی از مهمترین روش‌های مرجع و استاندارد معتبر برای تعیین حداقل غلظت مهاري (Minimum Inhibitory Concentration (MIC) در نظر گرفته می‌شود. انتشار دیسک، سادگی و مقرون به صرفه بودن را برای آزمایشگاه‌های بالینی معمول ارائه می‌دهد، در حالی که رقت در آگار برای آزمون تعداد زیادی از جدایه‌ها مناسب است. چالش‌های نوظهور مانند تشکیل بیوفیلم نیاز به سنجش‌های تخصصی دارد که به طور خلاصه مورد بحث قرار می‌گیرند.

نتیجه‌گیری: انتخاب یک روش مناسب برای آزمون حساسیت ضدمیکروبی به منابع آزمایشگاهی و نیاز به داده‌های کمی در مقابل داده‌های کیفی بستگی دارد. انتظار می‌رود این رویکردهای پیشرفته نقش محوری در آینده درمان ضدمیکروبی ایفا کنند. هر روش نقاط قوت و محدودیت‌های خاص خود را دارد و استفاده مکمل از آنها برای پیشبرد درک ما از مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بهبود نتایج بالینی و ارائه روش‌های آزمایشگاهی مناسب برای جلوگیری از مقاومت ضدمیکروبی، ضروری است.

واژه‌های کلیدی: آزمون حساسیت ضدمیکروبی، انتشار دیسک، مقاومت چند دارویی، میکرودايلوشن براث

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

h.tavafi@malayeru.ac.ir

نحوه استناد به این مقاله:

Tavafi H, Tork N. An Analytical Review of Laboratory Methods for Evaluating Antibacterial Activity: Principles, Limitations, and Applications. Journal of Environmental Health Engineering. 2026;14(2):240-56.

DOI:

مقدمه

باکتری‌های بیماری‌زا در محیط زیست فراگیر هستند و می‌توانند به سرعت گسترش یافته و عواقب شدیدی برای سلامتی، از جمله اثرات طولانی‌مدت یا حتی مرگ و میر، ایجاد کنند.^۱ یکی از چالش‌های مهم در سلامت عمومی، ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است که تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار دارند. جهش‌های ژنتیکی یکی از دلایل اصلی در نظر گرفته می‌شوند، زیرا باکتری‌ها به طور طبیعی در ژنوم خود دچار جهش می‌شوند که می‌تواند منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود. علاوه بر این، انتقال افقی ژن‌های مقاومت نیز در گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بین باکتری‌ها بسیار مهم است. تولید آنزیم‌هایی مانند بتالاکتامازها، که می‌توانند ساختار آنتی‌بیوتیک‌ها را تجزیه کنند، یکی دیگر از استراتژی‌های بیولوژیکی است که توسط باکتری‌ها برای مقاومت در برابر درمان به کار گرفته می‌شود.^۲ مقاومت در چندین گونه باکتریایی علاوه بر این از طریق تشکیل بیوفیلم، یک مانع فیزیکی که در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کند، بیشتر می‌شود.^۳ به طور قابل توجهی، استفاده بیش از حد یا سوء استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های انسانی به عنوان یک فشار انتخابی بر باکتری‌ها عمل می‌کند و به طور قابل توجهی در گسترش مقاومت نقش دارد.^۴ با توجه به نگرانی جهانی در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، روش‌های آزمایشگاهی دقیق که قادر به شناسایی سریع و دقیق عوامل بیماری‌زا و الگوهای مقاومت آنها باشند، برای تشخیص ضروری هستند و باید استراتژی‌های درمانی با دقت تنظیم شده تجویز شوند. ظهور ایزوله‌های مقاوم به چند دارو (multidrug-resistant (MDR) در عفونت‌های انسانی، این چالش را پیچیده‌تر می‌کند و توانایی پزشکان را در تجویز درمان‌های ضد میکروبی مؤثر به طور قابل توجهی محدود می‌کند. با این وجود، استراتژی‌های درمانی جایگزین به شدت مورد نیاز هستند.^۵

به منظور سنجش فعالیت ضد میکروبی، تکنیک‌های آزمایشگاهی برای ارزیابی اثربخشی مواد در مهار یا کشتن میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها ضروری هستند. این سنجش‌ها به تعیین اینکه ترکیبات مختلف، از جمله داروها، محصولات طبیعی و سایر عوامل شیمیایی، چقدر می‌توانند با عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های مضر مبارزه کنند، کمک می‌کنند. این فرآیند معمولاً شامل قرار دادن میکروارگانیسم‌ها در معرض غلظت‌های مختلف ماده مورد نظر و مشاهده اثرات آن بر رشد میکروبی است. مهار معمولاً با عدم رشد یا با کمی کردن کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های زنده، اندازه‌گیری می‌شود. توانایی یک ماده در کشتن میکروارگانیسم‌ها را می‌توان با ارزیابی کاهش تعداد میکروبی در طول زمان نیز ارزیابی کرد. علاوه بر ارزیابی اثربخشی ضد میکروبی، این سنجش‌ها به تعیین غلظت مؤثر یک ماده و همچنین زمان لازم برای اعمال اثرات آن کمک می‌کنند.^۶ بدین منظور، مفاهیمی در خصوص ارزیابی‌های درمانی وجود دارند که فهم آنها لازم است. از جمله این مفاهیم، آزمون حساسیت ضد میکروبی (Antimicrobial Susceptibility Testing (AST)) است که به آزمون حساسیت ایزوله‌های بالینی به آنتی‌بیوتیک‌های مشخص گفته می‌شود و هدف آن هدایت درمان است. اصطلاح فعالیت ضد میکروب (Antimicrobial activity)، مفهومی گسترده‌تر است و شامل ارزیابی هر ماده (آنتی‌بیوتیک، عصاره، نانوذره) علیه هر میکروارگانیسم (باکتری، قارچ، ویروس) است و فعالیت ضد باکتریایی (Antibacterial activity)، صرفاً به اثر ضد باکتریایی محدود می‌شود.

یک رویکرد بالقوه، ترکیب هم‌افزایی عوامل ضد میکروبی است که می‌تواند اثربخشی آنها را افزایش داده و عوارض جانبی را کاهش دهد. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها با ترکیبات طبیعی مانند روغن‌های ضروری و عصاره‌های گیاهی ممکن است با هدف قرار دادن

(broth microdilution)، E-test، آزمون زمان مرگ (time-kill assay)، آزمون بیوفیلم (biofilm assay) و معادل‌های فارسی آنها انجام شد. همچنین محدوده زمانی از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۶ در نظر گرفته شد. معیارهای ورود شامل: مطالعات بنیادی، مرورهای نظام‌مند و دستورالعمل‌های CLSI/EUCAST بود و معیارهای خروج شامل: مطالعات فاقد داده روش‌شناختی کافی و مقالات بدون دسترسی به متن کامل بود و در نهایت ۸۱ منبع وارد مطالعه شد.

سنجش فعالیت ضد میکروبی

سنجش‌های فعالیت ضد میکروبی نقش مهمی در شناسایی و ارزیابی پتانسیل درمانی داروها و عوامل ضد میکروبی ایفا می‌کنند. آزمون حساسیت ضد میکروبی، به نظارت بر مقاومت ضد میکروبی کمک می‌کند و همچنین مقاومت ایزوله‌های بالینی را در بیمار در طول درمان تعیین می‌کند.^{۱۴} روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی استفاده می‌شود، از جمله انتشار در آگار و سنجش‌های میکروپلیت. این سنجش‌ها نه تنها برای ارزیابی فعالیت ترکیبات ضد میکروبی جدید، بلکه برای تشخیص الگوهای مقاومت ضد میکروبی و درک تغییرات در حساسیت باکتریایی نیز استفاده می‌شوند. با توجه به پیچیدگی و تنوع عوامل میکروبی، سنجش‌های فعالیت ضد میکروبی باید با دقت طراحی شوند تا نتایج معتبر و تکرارپذیر تضمین شوند.^{۱۵، ۱۶} روش‌های مختلف AST وجود دارد که برای تعیین حساسیت باکتری‌ها با مشاهده رشد باکتری‌ها روی صفحات آگار جامد یا در محیط‌های مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شوند. در ادامه، این روش‌ها توضیح داده شده و مقایسه می‌شوند.

روش‌های تعیین MIC و MBC

در این بخش روش‌های اصلی تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) Minimum Inhibitory و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) Concentration

باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های متعدد، نتایج درمانی را بهبود بخشید. علاوه بر این، فناوری نانو با ارائه راه‌حل‌های نوآورانه برای غلبه بر مکانیسم‌های مقاومت سنتی، مرز امیدبخشی را در درمان ضد میکروبی ارائه می‌دهد. این استراتژی‌ها ممکن است نقش مهمی در پرداختن به چالش رو به رشد عفونت‌های باکتریایی داشته باشند. به طور کلی، سنجش‌های فعالیت ضد میکروبی ابزارهای حیاتی در توسعه داروها و درمان‌های جدید برای مقابله با عفونت‌ها و مقاومت میکروبی هستند.^{۹، ۱۱}

دو سازمان بزرگ، موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) در ایالات متحده و کمیته اروپایی آزمون حساسیت ضد میکروبی European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) در اروپا، برای استانداردسازی روش‌های AST و ارائه پروتکل‌های استاندارد برای اطمینان از تکرارپذیری بین آزمایشگاهی اقدام کرده‌اند.^{۱۱، ۱۲} با این حال، روش‌های مرسوم AST اغلب محدودیت‌هایی در تشخیص مقاومت دارند که می‌تواند منجر به شکست درمان، علیرغم حساسیت ظاهری در آزمایش‌های معمول شود.^{۱۲} علاوه بر این، شیوع فزاینده پاتوژن‌های MDR، نیاز به روش‌های سریع AST را تشدید کرده است که می‌توانند نتایج را در عرض چند ساعت به جای چند روز ارائه دهند.^{۱۳} در این بررسی، روش‌های آزمایشگاهی موجود برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عوامل ضد میکروبی را بررسی شد. روش‌های آزمایشگاهی رایج برای بررسی فعالیت ضد بیوفیلم عوامل ضد میکروبی نیز به طور خلاصه شرح داده شده‌اند.

روش جستجو

این مطالعه، یک مطالعه مروری است. جستجوی منابع در پایگاه‌های PubMed، Scopus، Web of Science و Google Scholar با کلیدواژه‌های آزمون حساسیت ضد میکروبی (antimicrobial susceptibility testing)، انتشار دیسک (disk diffusion)، میکرو دیالوشن مایع

ترتیب از ساده‌ترین به دقیق‌ترین روش معرفی و مقایسه می‌شوند.

انتشار دیسک Disk diffusion

یکی از این روش‌های میکروبی بر مبنای آگار، آزمون انتشار دیسک یا آزمون کربی-بائر است که یک تکنیک رایج مورد استفاده در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی بالینی است، زیرا نمایش خوبی از رشد باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) ارائه می‌دهد. این روش امکان شناسایی الگوهای رشد و تعامل بین آنتی‌بیوتیک‌ها را فراهم می‌کند.^{۱۷} در این روش، دیسک‌های کاغذی آغشته به غلظت‌های خاصی از آنتی‌بیوتیک‌ها روی یک صفحه آگار که از قبل با سوسپانسیون باکتریایی استاندارد تلقیح شده است، قرار می‌گیرند. پس از انکوباسیون (۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد)، هاله‌های عدم رشد اطراف هر دیسک بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری می‌شوند و به عنوان نشان دهنده حساسیت، حساسیت متوسط یا مقاومت سویه به آنتی‌بیوتیک طبق استانداردهای ارائه شده توسط CLSI یا EUCAST^{۱۸،۱۹} تفسیر می‌شوند.

با وجود استفاده گسترده، روش انتشار دیسک محدودیت‌های متعددی دارد. این روش فقط نتایج کیفی یا نیمه کمی (قطر هاله) را به جای مقدار دقیق MIC ارائه می‌دهد. علاوه بر این، این روش برای ارگانیزم‌های کند رشد یا سخت رشد مناسب نیست و نتایج می‌تواند تحت تأثیر تغییرات در عمق آگار، pH و محتوای کاتیون قرار گیرد.^{۱۹} همچنین عوامل مؤثر بر قطر هاله عدم رشد تأثیر گذار هستند که می‌توان به غلظت تلقیح، محیط کشت، ضخامت آگار، قدرت انتشار ماده، اندازه دیسک، شرایط و زمان انکوباسیون و ویژگی‌های ذاتی ماده ضد میکروبی اشاره کرد. در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شواهد اخیر نشان می‌دهد که انتشار دیسک ممکن است در تشخیص زیرجمعیت‌های مقاوم با فراوانی پایین ناموفق باشد و بنابراین روش‌های مولکولی یا پروفایل تجزیه و تحلیل

جمعیت Population Analysis Profiling (PAP) همچنان استاندارد طلایی برای تشخیص مقاومت ناهمگن هستند.^{۲۰} با این حال، انتشار دیسک برای تشخیص فنوتیپ‌های مقاوم رایج مانند استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین *Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)، انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين *Vancomycin Resistant Enterococci* (VRE) و تولیدکنندگان بتالاکتاماز طیف گسترده Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) در صورت استفاده طبق توصیه‌های EUCAST^{۲۱،۲۲} قابل اعتماد است.

E-Test

Epsilonometer Test (E-Test) یک روش گرادیان نمایی انتشار (gradient diffusion) برای تعیین مقاومت ضد میکروبی و حساسیت میکروارگانیسم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها است. این روش به نواری با گرادیان غلظت آنتی‌بیوتیک نیاز دارد که روی محیط آگار تلقیح شده با جدایه‌های باکتریایی مقاوم قرار داده شده است. با پخش شدن داروها از نوار، یک گرادیان در آگار تشکیل می‌شود که یک هاله مهاري ایجاد می‌کند که پس از انکوباسیون به مدت یک شب، قابل اندازه‌گیری است. هاله مهاري به شکل بیضوی ظاهر می‌شود و لبه نقطه تقاطع پایینی با نوار، مقدار MIC آن آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهد. از این رو، این آزمون هم ارزیابی کمی و هم کیفی از اثر آنتی‌بیوتیک علیه باکتری‌های خاص را دارد.^{۲۳} E-Test یکی از محبوب‌ترین ابزارها برای آزمایشگاه‌های درگیر در تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی است. این روش مزیت ارائه MIC دقیق را در عین حفظ سادگی روش‌های مبتنی بر آگار ارائه می‌دهد.^{۲۴}

میکرودايلوشن براث

MIC و MBC پارامترهای اساسی در آزمون حساسیت ضد میکروبی هستند و بینش‌های مهمی در مورد اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر باکتری‌ها ارائه می‌دهند.^{۲۵} MIC به عنوان کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی مورد نیاز برای

مه‌ار رشد قابل مشاهده باکتری پس از یک دوره انکوباسیون مشخص تعریف می‌شود. این مقدار با استفاده از تکنیک میکرودايلوشن در محیط کشت براث تعیین می‌شود، همانطور که توسط دستورالعمل‌هایی مانند CLSI توصیه شده است. این روش شامل رقیق‌سازی‌های متوالی عامل ضد میکروبی در یک محیط مایع و به دنبال آن تلقیح باکتری و انکوباسیون است. آزمون میکرودايلوشن به دلیل سادگی، سرعت و قابلیت اطمینان آن، به ویژه هنگامی که مه‌ار باکتریایی برای درمان کافی است، به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. از نظر بالینی، تعیین MIC با شناسایی دوز مؤثر مورد نیاز برای سرکوب رشد باکتری بدون ایجاد سمیت، در بهینه‌سازی درمان آنتی‌بیوتیکی بسیار مهم است. همچنین یک نقطه مرجع حیاتی در مطالعات فارماکوکینتیک/فارماکودینامیک

pharmacokinetic/pharmacodynamic، به ویژه برای آنتی‌بیوتیک‌های وابسته به زمان مانند بتالاکام‌ها است، که در آن‌ها حفظ غلظت دارو بالاتر از MIC برای مدت زمان کافی برای موفقیت درمانی ضروری است^{۲۵، ۲۶}.

MBC نشان دهنده کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی مورد نیاز برای دستیابی به کاهش ۹۹/۹ درصدی تعداد باکتری‌ها است. این مقدار با کشت مجدد باکتری‌ها از چاهک‌های سنجش MIC روی آگار بدون آنتی‌بیوتیک تعیین می‌شود. آزمون MBC به ویژه در مدیریت عفونت‌های شدید مانند اندوکاردیت، مننژیت و استئومیلیت، که در آن‌ها ریشه‌کنی کامل باکتری‌ها بسیار مهم است، ارزشمند است. اگرچه آزمون MBC بینش عمیق‌تری در مورد فعالیت باکتری‌کشی ارائه می‌دهد، اما تفسیر آن پیچیده‌تر، زمان‌برتر و چالش‌برانگیزتر است، به ویژه برای آنتی‌بیوتیک‌هایی که بسته به غلظت، خواص دوگانه باکتریواستاتیک و باکتری‌کشی دارند. نسبت MIC به MBC، یک شاخص تقریبی است و عوامل روش شناختی متعددی بر آن اثر می‌گذارند. تفسیر نسبت MIC به MBC، به وابستگی MBC به شرایط آزمون (مانند نوع

محیط کشت، حجم نمونه برداری از چاهک‌ها، زمان و دمای گرماگذاری، چگالی نهایی تلقیح و روش‌های شمارش)، پدیده ی تحمل (در برخی جدایه‌ها، MBC بسیار بالاتر از MIC است بدون اینکه مقاومت به آنتی‌بیوتیک وجود داشته باشد) و محدودیت در ترکیبات نوین مربوط است. علاوه بر این، تحقیقات نشان می‌دهد که غلظت‌های زیر MIC آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند به طور قابل توجهی بر رفتار باکتری‌ها تأثیر بگذارند. در سطوح زیر MIC، آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است بیان ژن را تغییر دهند، حدت را افزایش دهند و تشکیل بیوفیلم را تقویت کنند. برای مثال، مشاهده شده است که سطوح زیر MIC سیپروفلوکساسین، تولید بیوفیلم را در سودوموناس آئروژینوزا تحریک می‌کند و چالش‌هایی را در درمان عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم ایجاد می‌کند^{۲۷}. تعیین دقیق MIC و MBC نیز در زمینه MDR بسیار مهم است. ردیابی تغییرات در مقادیر MIC در طول زمان می‌تواند نشان‌دهنده ظهور مقاومت باشد، در حالی که داده‌های MBC بینش‌هایی در مورد امکان دستیابی به ریشه‌کنی باکتری‌ها با وجود مکانیسم‌های مقاومت ارائه می‌دهند^{۲۸، ۲۹}. جمع‌آوری داده‌های MIC در سطح جهانی، امکان استانداردسازی نقاط شکست بالینی و مقادیر حد آستانه اپیدمیولوژیک Epidemiological Cut Off values (ECOFFs) را فراهم می‌کند و ثبات و قابلیت اطمینان آزمایش‌های ضد میکروبی را افزایش می‌دهد. سیستم‌هایی که توسط EUCAST توسعه یافته‌اند، روش‌های MIC را برای همسو شدن با استانداردهای بین‌المللی هماهنگ می‌کنند و تصمیم‌گیری درمانی و فرآیندهای نظارتی را در سراسر جهان بهبود می‌بخشند^{۳۱}. بنابراین، MIC و MBC ابزارهای ضروری در تحقیقات ضد میکروبی و بالینی هستند و استراتژی‌های درمانی مؤثر را تضمین می‌کنند و در عین حال خطرات توسعه مقاومت را کاهش می‌دهند. ادغام آنها در رویکردهای درمانی برای پرداختن به چالش جهانی رو به رشد مقاومت به آنتی‌بیوتیک

Antimicrobial Resistance (AMR) بسیار مهم است.^{۳۰}

روش‌های تعیین MIC/MBC صرفاً اثر ضدباکتریایی را نشان می‌دهند. برای درک دینامیک اثر در طول زمان، از سنجش‌های مکمل مانند سنجش زمان مرگ (time-kill assay) استفاده می‌شود.

سنجش زمان مرگ

روش زمان مرگ یک تکنیک آزمایشگاهی است که برای ارزیابی فعالیت باکتری‌کشی عوامل ضد میکروبی در برابر یک یا چند سویه باکتریایی استفاده می‌شود. در این روش، زنده‌مانی باکتری در فواصل زمانی مختلف (معمولاً از ۰ تا ۲۴ ساعت) اندازه‌گیری می‌شود و داده‌ها به صورت منحنی زمان مرگ روی یک نمودار نیمه لگاریتمی رسم می‌شوند. این آزمون معمولاً با استفاده از صفحات میکروتیتر ۹۶ چاهکی انجام می‌شود و داده‌های کمی و کیفی دقیقی در مورد اثرات ضد میکروبی و پتانسیل مقاومت باکتریایی ارائه می‌دهد.^{۳۱} آزمایش‌های زمان مرگ، یک روش ضروری و کاربردی برای ارزیابی اثرات ضد میکروبی داروها بر رشد باکتری در طول زمان است. این روش‌ها امکان مطالعه جامع دوره زمانی PK و PD، از جمله ارزیابی نرخ رشد خالص باکتری، اثرات باکتری‌کشی عوامل ضد میکروبی و ایجاد مقاومت باکتریایی را فراهم می‌کنند. آزمایش‌های زمان مرگ، داده‌های کمی و کیفی حیاتی را ارائه می‌دهند که فراتر از MIC هستند و شرح مفصلی از اثرات وابسته به غلظت دارو ارائه می‌دهند. این روش‌ها برای شرایط آزمایشگاهی (in vitro) بسیار مناسب هستند و امکان مطالعه طیف وسیعی از غلظت‌های ضد میکروبی و ارزیابی سویه‌های مقاوم یا حساس مختلف، مانند نایسریا گونوره‌آ، را فراهم می‌کنند. در سویه‌های مقاوم، جهش‌های ژنتیکی در ژن‌های خاص ممکن است اثربخشی دارو را حتی در دوزهای بالا کاهش دهند. علاوه بر این، می‌توان از منحنی‌های زمان مرگ، برای بررسی پدیده‌هایی مانند تشکیل سلول‌های پایدار یا سازگاری فیزیولوژیکی باکتری‌ها استفاده کرد.^{۳۲، ۳۳} یکی از مزایای

کلیدی روش زمان مرگ نسبت به تعیین MIC مرسوم، توانایی آن در تشخیص اثرات سینرژیک یا آنتاگونیستی دو یا چند عامل ضد میکروبی است.^۸

مقایسه و ارزیابی مزایا و محدودیت روش‌ها

ارزیابی حساسیت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها جنبه‌ای حیاتی از میکروبیولوژی بالینی است و روش‌هایی مانند انتشار دیسک به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها از نظر دقت، هزینه، پیچیدگی و کاربرد تفاوت قابل توجهی دارند. روش انتشار دیسک یک تکنیک کیفی یا نیمه کمی است که حساسیت آنتی‌بیوتیکی را با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آغشته به آنتی‌بیوتیک ارزیابی می‌کند. این روش ساده، مقرون به صرفه و مناسب برای آزمون‌های معمول است. با این حال، دقت آن کمتر از آزمون MIC است و نتایج آن ممکن است همیشه با مقادیر MIC کاملاً مطابقت نداشته باشد. علاوه بر این، چالش‌های خاصی، مانند لبه‌های دو ناحیه‌ای مشاهده شده در برخی از گونه‌های بی‌هوازی، می‌تواند تفسیر نتایج را پیچیده کند. در حالی که روش MIC برای آزمون دقیق حساسیت ترجیح داده می‌شود، روش انتشار دیسک برای استفاده معمول و نظارت در مقیاس بزرگ بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی مناسب‌تر است. به طور کلی، هر دو روش نقش‌های متمایزی دارند و باید بر اساس الزامات آزمایشگاهی، محدودیت‌های بودجه و سطح دقت مورد نظر انتخاب شوند. از سوی دیگر، آزمون MIC یک رویکرد بسیار کمی و دقیق است که غلظت دقیق آنتی‌بیوتیک مورد نیاز برای مهار رشد باکتری را تعیین می‌کند. این روش به ویژه برای شناسایی مکانیسم‌های مقاومت جدید یا ارزیابی آنتی‌بیوتیک‌های جدید مفید است. با این حال، هزینه بالا و ماهیت منابع بر آن، کاربرد معمول آن را محدود می‌کند.^{۲۰}

مطالعات اخیر محدودیت‌های این روش‌ها را در ارزیابی آنتی‌بیوتیک‌های خاص برجسته کرده‌اند. به عنوان مثال، یک مطالعه در سال ۲۰۲۲ نشان داد که هر دو روش نوار MIC و انتشار دیسک در تعیین حساسیت به سفیدروکل، به ویژه

در انتروباکتریاسه، فاقد دقت کافی هستند. روش نوار MIC به طور قابل توجهی مقادیر MIC را کمتر از مقدار واقعی تخمین می‌زند و میزان بالایی از خطاهای بسیار بزرگ (۲۳/۳٪) و خطاهای بزرگ (۴/۹٪) را نشان می‌دهد که با استانداردهای ISO مطابقت ندارد^{۳۴}. همچنین، در مورد کلیستین، آخرین آنتی‌بیوتیک علیه انتروباکتریاسه مقاوم به کارباپنم، به دلیل انتشار ضعیف آن در آگار، روش‌های مبتنی بر آگار در مقایسه با میکرودایلوشن براث قابل استفاده نیستند و میکرودایلوشن براث تنها روش قابل اعتماد برای کلیستین است^{۳۵، ۳۶}. CLSI و EUCAST در حال حاضر استفاده از نوارهای انتشار دیسک یا انتشار گرادیان را برای آزمون حساسیت به کلیستین توصیه نمی‌کنند^{۳۷}. در مقابل، روش میکرودایلوشن براث به عنوان دقیق‌ترین تکنیک برای آنتی‌بیوتیک‌های حیاتی مانند سفیدروکول و کولیستین شناسایی شد، اگرچه برای تفسیر نتایج به تخصص قابل توجهی نیاز دارد^{۳۸}.

محدودیت‌های انتشار دیسک همچنین باعث توسعه تکنیک‌های مبتنی بر MIC مانند E-test شده است که به دلیل دقت و قابلیت اطمینان آن در آزمایشگاه‌ها مورد توجه قرار گرفته است. علیرغم مزایای آن، E-test با چالش‌هایی از جمله هزینه‌های بالا، دسترسی محدود در کشورهای در حال توسعه و مشکلات مربوط به بی‌هوازی‌های نادر یا با رشد آهسته مواجه است. نگرانی‌های دیگر شامل همبستگی ضعیف با روش‌های مرجع مانند رقیق‌سازی در آگار، دقت کمتر برای برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها (مانند پنی‌سیلین، مترونیدازول و موکسی‌فلوکساسین) و نقاط شکست نامشخص برای چندین آنتی‌بیوتیک است که تفسیر را پیچیده می‌کند. این محدودیت‌ها، همراه با مشکلات در آزمون باکتری‌هایی با رشد مبهم یا کند، کاربرد آن را محدود می‌کند. با این وجود، E-test برای آزمایش‌های معمول در سناریوهایی که روش‌های دقیق‌تر غیرعملی هستند، ارزشمند باقی می‌ماند. مطالعات بیشتر برای تعیین نقاط شکست و رفع این اشکالات مورد نیاز است^{۳۸، ۳۹، ۴۰}.

یکی دیگر از ملاحظات مهم در آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی، اثر سریع عوامل ضد میکروبی است که می‌تواند محاسبات دقیق نرخ رشد را در طول آزمایش‌های زمان مرگ، پیچیده کند. در غلظت‌های بسیار بالا، داروها ممکن است تقریباً بلافاصله باکتری‌ها را از بین ببرند و باعث ایجاد انحراف در مدل‌سازی شوند. در حالی که این روش‌ها در درجه اول برای ارزیابی‌های *in vitro* مناسب هستند، اما پر کردن شکاف به سمت محیط‌های بالینی اغلب نیاز به مدل‌های PK/PD دارد. این مدل‌ها داده‌های حاصل از آزمایش‌های زمان-کشتن (هم در شرایط *in vitro* و هم در داخل بدن (*in vivo*)) را برای شبیه‌سازی سناریوهای آزمون نشده و طراحی استراتژی‌های دوز بهینه ادغام می‌کنند. به ویژه برای آنتی‌بیوتیک‌های جدید، مدل‌های PK/PD می‌توانند خطرات را در توسعه دارو کاهش داده و روند کار را تسریع کنند. با ترکیب آزمایش‌های زمان-کشتن با مدل‌های پیشرفته PK/PD، محققان می‌توانند درمان‌های ضد میکروبی را بهینه کنند، از مقاومت جلوگیری کنند و استراتژی‌های درمانی متناسب با عفونت‌های خاص و شرایط بالینی طراحی کنند^{۴۱}.

ویژگی‌هایی مانند نیازهای خاص آزمایشگاه، نوع آنتی‌بیوتیک مورد آزمون و تعادل بین دقت، هزینه و کاربردی بودن روش، برای انتخاب یک روش مناسب برای ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ضروری هستند. روش انتشار دیسک، اگرچه ساده، مقرون به صرفه و مناسب برای استفاده معمول است، اما دقت کمتری دارد و ممکن است چالش‌هایی را در تفسیر نتایج برای باکتری‌های خاص ایجاد کند. در حالی که میکرودایلوشن براث به دلیل دقت و تکرارپذیری آن، روش مرجع باقی می‌ماند، انتشار دیسک یک جایگزین مقرون به صرفه برای آزمون حساسیت غربالگری معمول است. آزمون E داده‌های کمی MIC را بدون تجهیزات تخصصی ارائه می‌دهد، البته با هزینه بالاتر برای هر آزمون^{۴۱}. برای آزمایشگاه‌های بالینی روتین، آزمون E هنگام آزمون تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها یا

را بر اساس عواملی از جمله جمعیت بیمار، شیوع ارگانسیم‌های MDR، منابع موجود و الزامات زمان چرخش انتخاب کنند^{۱۷}. جدول (۱)، مقایسه جامعی از روش‌های اصلی ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی با هم را ارائه می‌دهد.

زمانی که MIC سریع و دقیق بدون دسترسی به سیستم‌های خودکار مورد نیاز است، ارزشمندترین است^{۴۲}. علاوه بر این، آزمایش‌های دوره زمانی، همراه با مدل‌های PK/PD، بینش‌های ارزشمندی را برای بهینه‌سازی درمان‌های ضد میکروبی و طراحی استراتژی‌های درمانی مؤثرتر ارائه می‌دهند. آزمایشگاه‌های بالینی باید روش AST اولیه خود

جدول ۱. مقایسه روش‌های آزمایشگاهی ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی

روش‌های ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی	Time-Kill Assay	Disk Diffusion	E-test	Broth Microdilution
نوع نتیجه	کمی	کیفی/نیمه کمی	کمی	کمی
قابلیت تعیین MIC	خیر	خیر	بله	بله
قابلیت تعیین MBC	بله	خیر	خیر	بله (با کشت مجدد)
دقت	بالا	متوسط	بالا	بالا
تکرارپذیری	بالا	متوسط	بالا	بالا
محدودیت‌های کلیدی	زمان‌بر، نیاز به مواد زیاد؛ مشکل در باکتری‌های قابل کشت غیرقابل رشد	فقط کیفی/نیمه کمی؛ تحت تأثیر عمق آگار، pH و کاتیون‌ها	تفسیر ذهنی، هزینه بالا برای هر آزمون	ممکن است آلودگی، زنده‌مانی تلقیح و اثر حلال‌ها را تشخیص ندهد
مزایا	ارزیابی PK/PD کامل، تشخیص سینرژی/آنتاگونیسم	ساده، مقرون به صرفه، مناسب آزمایشگاه‌های معمول	MIC دقیق با سادگی روش‌های آگار	دقت بالا، قابل خودکارسازی، استاندارد طلایی برای اکثر ارگانسیم‌ها
کاربرد بالینی	برای عفونت‌های شدید و ارزیابی سینرژی	مناسب برای آزمون‌های معمول حساسیت	مناسب برای ارگانسیم‌های سخت‌رشد	ضروری برای تصمیمات دقیق دوز
کاربرد تحقیقاتی	مدل‌سازی PK/PD، ارزیابی ترکیبات جدید	نظارت بر مقاومت در مقیاس بزرگ	مطالعات بالینی	استاندارد برای آنتی‌بیوتیک‌های جدید
جایگاه در CLSI/EUCAST	روش مکمل (غیر استاندارد برای تفسیر بالینی)	روش استاندارد برای آزمون‌های معمول	روش پذیرفته شده برای برخی آنتی‌بیوتیک‌ها	روش مرجع برای اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها

سنجش فعالیت ضد بیوفيلم

روش‌های AST برای سلول‌های پلانکتونیک طراحی شده‌اند. با این حال، بخش قابل توجهی از عفونت‌ها ناشی از بیوفيلم است که، رفتار متفاوتی دارد. بنابراین، سنجش‌های اختصاصی ضدبیوفيلم به‌عنوان یک کاربرد خاص از روش‌های ارزیابی مطرح می‌شوند. تشکیل بیوفيلم مهمترین عامل بیماری‌زایی است که نقش مهمی در ایجاد مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی ایفا می‌کند. بیوفيلم‌ها به عنوان موانع فیزیکی عمل می‌کنند که باکتری‌ها را از آنتی‌بیوتیک‌ها و پاسخ‌های ایمنی میزبان محافظت می‌کنند^{۴۳}. بنابراین، ارزیابی فعالیت ضد بیوفيلم عوامل ضد میکروبی هم در تحقیقات و هم در محیط‌های بالینی ضروری است. همانطور که توضیح داده شده است، MIC حداقل غلظت یک عامل ضد میکروبی است که رشد سلول‌های پلانکتونیک (باکتری‌های آزاد و شناور) را در محیط مایع مهار می‌کند و در شرایطی اندازه‌گیری می‌شود که باکتری‌ها به‌صورت تک‌سلولی و پراکنده در محیط کشت قرار دارند و هیچ ساختار بیوفيلمی تشکیل نداده‌اند. حال اینکه دو اصطلاح دیگر: حداقل غلظت مهاری تشکیل بیوفيلم یک عامل ضد میکروبی Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) و حداقل غلظت یک عامل ضد میکروبی که بیوفيلم بالغ و از قبل تشکیل شده را ریشه‌کن می‌کند Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) در ارتباط با بیوفيلم حائز اهمیت هستند. در آزمون MBIC، عامل ضد میکروبی همزمان با تلقیح باکتری به محیط اضافه می‌شود و پس از انکوباسیون، میزان بیوفيلم تشکیل شده، معمولاً با کریستال ویوله یا MTT اندازه‌گیری می‌شود. در آزمون MBEC، ابتدا بیوفيلم بالغ (معمولاً ۲۴ تا ۴۸ ساعت) تشکیل می‌شود، سپس در معرض غلظت‌های مختلف ماده ضد میکروبی قرار می‌گیرد و پس از شستشو، سلول‌های باقی‌مانده شمارش یا ارزیابی می‌شوند. نشان می‌دهد که ماده می‌تواند بیوفيلم بالغ را از بین ببرد، که

بسیار دشوارتر از مهار تشکیل آن است. چندین روش آزمایشگاهی برای ارزیابی توانایی ترکیبات در مهار تشکیل بیوفيلم یا ریشه‌کن کردن بیوفيلم‌ها توسعه داده شده است^{۴۴}.

روش قرمز کنگو آگار Congo Red Agar (CRA)

روش قرمز کنگو آگار، یک ابزار غربالگری ساده و ارزان برای تشخیص باکتری‌های تولیدکننده بیوفيلم است. در این روش، باکتری‌ها روی صفحات آگار حاوی رنگ قرمز کنگو و ساکارز یا گلوکز کشت داده می‌شوند. کلنی‌های تولیدکننده بیوفيلم سیاه یا تیره با قوام خشک و کریستالی به نظر می‌رسند، در حالی که کلنی‌های تولیدکننده غیر بیوفيلمی، صورتی یا قرمز باقی می‌مانند. اگرچه برای غربالگری اولیه مفید است، اما روش CRA داده‌های کمی در مورد زیست توده بیوفيلم یا فعالیت متابولیکی ارائه نمی‌دهد^{۴۵، ۴۶}.

سنجش کریستال ویولت Crystal Violet (CV)

سنجش کریستال ویولت روشی است که به طور گسترده برای تعیین کمیت زیست توده کل بیوفيلم استفاده می‌شود. در این روش، بیوفيلم‌ها در پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ خخله‌ای رشد داده می‌شوند، سلول‌های غیر چسبنده شسته می‌شوند، سلول‌های چسبنده با متانول یا گرما تثبیت می‌شوند و با محلول کریستال ویولت ۰/۱ تا ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی می‌شوند. پس از شستشو، رنگ با استفاده از اسید استیک یا لتانول حذف می‌شود و جذب در طول موج ۵۴۰ تا ۵۹۵ نانومتر با استفاده از یک میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری می‌شود^{۴۷}. این روش ساده و ارزان است و برای غربالگری با توان عملیاتی بالا مناسب است. با این حال، محدودیت‌هایی دارد، از جمله اینکه بین سلول‌های زنده و مرده تمایز قائل نمی‌شود؛ هم سلول‌های باکتریایی و هم مواد پلیمری خارج سلولی Extracellular Polymeric Substances (EPS) را رنگ‌آمیزی می‌کند؛ و ممکن

است به دلیل رنگ آمیزی غیر اختصاصی، زیست توده را بیش از حد تخمین بزند^{۴۹، ۴۸}.

سنجش های کاهش MTT و XTT

سنجش های 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) و 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carbocanilide (XTT) بر پایه احیای نمک های تترازولیوم توسط سیستم های آنزیمی سلول های فعال متابولیکی استوارند. این نمک های تترازولیوم توسط سلول های فعال متابولیکی احیا می شوند تا محصولات فورمازان رنگی (بنفش برای MTT، نارنجی برای XTT) تشکیل دهند که می توانند به وسیله ی اسپکتروفتومتری شناسایی شوند. برای توصیف بیوفیلم ها، سنجش XTT ترجیح داده می شود زیرا فورمازان محلول در آب تولید می کند و نیازی به مرحله حل شدن ندارد^{۵۱، ۵۰}. این روش مزایایی دارد، از جمله اینکه فقط سلول های زنده را تشخیص می دهد و همچنین اطلاعاتی در مورد فعالیت

متابولیکی ارائه می دهد. با این حال، محدودیت هایی نیز دارد، از جمله: نتایج می تواند تحت تأثیر برهمکنش های بین ترکیبات آزمایش شده (مثلاً بره موم، عصاره های گیاهی) و نمک های تترازولیوم قرار گیرد؛ شرایط محیطی (pH، غلظت گلوکز) ممکن است بر دقت شناسایی تأثیر بگذارد^{۵۲، ۵۳}. سنجش های MTT/XTT ابزارهای ارزشمندی برای ارزیابی فعالیت متابولیک سلول های بیوفیلم هستند، اما نباید به عنوان معیار مستقیم زیست توده یا زنده مانگی سلول ها تفسیر شوند. عوامل متعددی مانند فاز رشد، دسترسی به مواد مغذی، pH، اکسیژن، حضور سلول های چسبنده و تداخل ترکیبات آزمایشی می توانند بر نتایج اثر بگذارند بدون اینکه تغییری در زیست توده رخ دهد. بنابراین، تفسیر دقیق نیازمند ترکیب با روش های مکمل و در نظر گرفتن محدودیت های روش شناختی است. جدول (۲)، مقایسه ای از روش های گفته شده به منظور سنجش فعالیت ضد بیوفیلم تولیدی توسط باکتری ها را ارائه می دهد.

جدول ۲. مقایسه روش های سنجش فعالیت ضد بیوفیلم

روش های سنجش ضد بیوفیلمی	MTT/XTT Assay	Crystal Violet (CV)	Congo Red Agar (CRA)
پارامتر اندازه گیری شده	فعالیت متابولیک سلول های زنده (کمی)	زیست توده کل (نیمه کمی)	تولید بیوفیلم (کیفی)
نوع نتیجه	کمی	نیمه کمی	کیفی
تشخیص سلول زنده / مرده	بله	خیر	خیر
دقت	بالا	متوسط	پایین (غربالگری)
تکرارپذیری	بالا	متوسط	متوسط
محدودیت های کلیدی	تداخل با ترکیبات آزمایشی؛ تأثیر شرایط محیطی	تمایز سلول زنده / مرده؛ رنگ آمیزی غیر اختصاصی؛ تخمین بیش از حد زیست توده	داده کمی ارائه نمی دهد
کاربرد اصلی	ارزیابی زنده مانگی سلول های بیوفیلم	تعیین کمیت زیست توده کل	غربالگری اولیه تولید بیوفیلم

چالش های روش شناختی در ارزیابی ترکیبات نوین روش های استاندارد AST برای آنتی بیوتیک های بالینی طراحی شده اند. ارزیابی ترکیبات نوین مانند نانوذرات و عصاره های گیاهی چالش های روش شناختی متفاوتی ایجاد

می کند که در این بخش بررسی می شود. طیف گسترده ای از عوامل ضد میکروبی در مطالعات مقایسه ای برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی استفاده می شوند. تعدادی از عوامل ضد میکروبی مانند آنتی بیوتیک ها، عصاره ها و ترکیبات

گیاهی و نانوذرات به طور خلاصه در این بخش ذکر شده‌اند.

دسته‌های اصلی آنتی‌بیوتیک‌ها شامل بتالاکتام‌ها (مانند پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفتریاکسون، مروپنم)، آمینوگلیکوزیدها (مانند جنتامایسین، آمیکاسین)، فلوروکینولون‌ها (مانند سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین)، ماکرولیدها (مانند اریترومایسین، آزیترومایسین)، تتراسایکلین‌ها (مانند تتراسایکلین، داکسی‌سایکلین)، گلیکوپپتیدها (مانند وانکومایسین) و اکسازولیدینون‌ها (مانند لینزولید) هستند.^{۵۴، ۵۵} هر دسته از داروها بخش‌های خاصی از سلول باکتریایی را هدف قرار می‌دهند: بتالاکتام‌ها با اتصال به پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین penicillin-binding proteins (PBPs) سنتز دیواره سلولی را مهار می‌کنند، آمینوگلیکوزیدها با اتصال به زیر واحد ریبوزومی ۳۰S سنتز پروتئین را مختل می‌کنند، فلوروکینولون‌ها با DNA ژیراز و توپوایزومراز IV تداخل می‌کنند، ماکرولیدها سنتز پروتئین را در زیر واحد ۵۰S مسدود می‌کنند و گلیکوپپتیدها با اتصال به انتهای D-Ala-D-Ala پیش‌سازهای پپتیدوگلیکان از پلیمریزاسیون دیواره سلولی جلوگیری می‌کنند.^{۵۶، ۵۷}

مقایسه فعالیت ضدباکتریایی معمولاً شامل تعیین MIC و MBC است. MIC به عنوان کمترین غلظت یک آنتی‌بیوتیک که به طور قابل مشاهده رشد باکتری را مهار می‌کند، تعریف می‌شود، در حالی که MBC غلظتی است که $\leq 99/9\%$ از تلقیح باکتریایی را از بین می‌برد.^{۵۸، ۵۹} عوامل باکتری‌کش مانند بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها برای عفونت‌های جدی (مانند اندوکاردیت، مننژیت، سپسیس) ترجیح داده می‌شوند، در حالی که عوامل باکتریواستاتیک مانند تتراسایکلین‌ها و ماکرولیدها اغلب برای عفونت‌های خفیف تا متوسط یا به عنوان درمان ترکیبی استفاده می‌شوند.^{۶۰، ۶۱}

در مطالعات تطبیقی اخیر، آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی مانند سفتازیدیم-آویاکتام، سفتولوزان-تازوباکتام و پلازومایسین

برای مقابله با سویه‌های MDR گنجانده شده‌اند. ترکیب این عوامل در کنار آنتی‌بیوتیک‌های سنتی به محققان این امکان را می‌دهد تا چشم‌انداز مقاومت در حال تکامل را ارزیابی کرده و درمان تجربی را هدایت کنند.^{۶۲، ۶۳}

اسید کافئیک (۳،۴-دی‌هیدروکسی سینامیک اسید) یک ترکیب فنلی مهم است که عموماً توسط همه گونه‌های گیاهی تولید می‌شود. این پلی‌فنول در منابع غذایی متعددی یافت می‌شود.^{۶۴} و طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی، از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد سرطانی دارد.^{۶۵، ۶۶} مشتقات اسید کافئیک، نمونه‌ای از ترکیبات طبیعی هستند که فعالیت ضدباکتریایی آنها عمدتاً با روش‌های broth microdilution و time-kill ارزیابی شده است. مطالعات نشان داده‌اند که مشتقات اسید کافئیک می‌توانند MIC و MBC قابل مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج داشته باشند و در سنجش‌های زمان-کشتن اثر سریع نشان دهند. با این حال، تفسیر این نتایج با معیارهای بالینی آنتی‌بیوتیک‌ها امکان‌پذیر نیست، زیرا نقاط شکست بالینی برای این ترکیبات تعریف نشده است. این مثال نشان می‌دهد که انتخاب روش ارزیابی باید با نوع ماده و هدف مطالعه هماهنگ باشد.^{۶۷، ۶۸}

بره موم نیز نمونه‌ای از ترکیبات طبیعی با فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلم گسترده است. بره موم، یک ماده رزینی است که توسط زنبورها از رزین‌های گیاهی جمع‌آوری شده و با موم و ترشحات غددی مخلوط می‌شود.^{۶۹} این ترکیب که سرشار از ترکیبات زیست فعال، از جمله پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و مشتقات اسید سینامیک است، دارای مشخصات شیمیایی پیچیده‌ای است که تحت تأثیر منابع گیاهی آن قرار دارد.^{۷۰} گزارش شده است که بره موم اثرات ضد باکتری، ضد قارچ، ضد سرطان، آنتی‌اکسیدان و ضد بیوفیلم را در شرایط آزمایشگاهی^{۷۱، ۷۲، ۷۳} نشان می‌دهد. در تحقیقات متعدد، ارزیابی اثر ضدبیوفیلم بره موم معمولاً با روش‌های CV و

اساس هدف مطالعه (بالینی یا تحقیقاتی)، نوع ماده (آنتی‌بیوتیک یا ترکیب نوین)، نوع میکروارگانیسم (پلانکتونیک یا بیوفیلم)، منابع آزمایشگاهی و سطح دقت مورد نیاز انجام شود. استفاده مکمل از روش‌ها، نه انتخاب یک روش واحد، رویکرد بهینه برای ارزیابی جامع و دقیق فعالیت ضدباکتریایی است.

در این بررسی، روش‌های اصلی آزمایشگاهی برای ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی مقایسه شد. هر یک از روش‌ها مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. روش انتشار دیسک به دلیل هزینه کم و سادگی، عملی‌ترین انتخاب برای آزمایشگاه‌های بالینی مرسوم و پایش مقاومت در مقیاس بزرگ است. روش E-test داده‌های کمی MIC را بدون تجهیزات تخصصی ارائه می‌دهد، اما محدودیت‌های آن شامل هزینه بالای هر آزمون است. روش میکرودايلوشن برات، روش مرجع برای تعیین دقیق MIC است و برای ارزیابی فعالیت آنتی‌بیوتیک‌های جدید و پاتوژن‌های چالش‌برانگیز ضروری است. سنجش‌های زمان مرگ نیز برای مطالعات سینرژیسیم، تشخیص سلول‌های پایدار و مدل‌سازی PK/PD ضروری هستند و منابع زیادی مصرف می‌کنند. به طور خلاصه، استفاده مکمل از این روش‌ها برای تعیین دقیق پروفایل‌های حساسیت بسیار مهم است.

در میان روش‌های سریع AST، سنتز نانوذرات سبز و درمان‌های ترکیبی، می‌توانند رویکردهای درمانی مفید و کارآمدی را در برابر پاتوژن‌های مقاوم به چند دارو ارائه دهند. استانداردسازی طبق دستورالعمل‌های CLSI و EUCAST برای نتایج تکرارپذیر همچنان ضروری است. در نتیجه، پرداختن به مقاومت ضد میکروبی نیازمند یک رویکرد یکپارچه است که آزمون دقیق حساسیت، توسعه عوامل ضد میکروبی جدید و مدیریت محتاطانه آنتی‌بیوتیک‌ها را ترکیب کند.

MTT انجام شده است و پارامترهای اندازه‌گیری‌های حداقل غلظت مهارکنندگی بیوفیلم Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) و حداقل غلظت ریشه‌کنی بیوفیلم Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) برای توصیف اثر آن به کار می‌روند. با این حال، محدودیت‌های این روش‌ها مانند عدم تفکیک سلول زنده از مرده در CV و تداخل ترکیبات در روش MTT باید در تفسیر نتایج در نظر گرفته شود. این مثال اهمیت انتخاب روش مناسب برای هر نوع ماده را برجسته می‌کند.^{۷۴، ۷۵}

از دیگر ترکیبات، می‌توان به نانوذرات اشاره کرد. نانوذرات به دلیل خواص منحصر به فرد خود، به عنوان عوامل ضدباکتریایی نوین مورد توجه می‌باشند.^{۷۶} با این حال، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی آنها با روش‌های استاندارد AST با چالش‌های روش‌شناختی متعددی مواجه می‌باشد. از جمله این چالش‌ها، محدودیت استفاده در روش‌های انتشار در آگار می‌باشد. انتشار، تجمع، اندازه ذرات، پوشش سطحی و بار سطحی نانوذرات می‌تواند قطر هاله عدم رشد را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، قطر هاله لزوماً شاخص مستقیم فعالیت ضدباکتریایی نیست و روش‌های مبتنی بر محیط مایع (broth microdilution) ارجحیت دارند. از دیگر چالش‌ها، تنوع در روش‌های سنتز نانوذرات است. دو روش سنتز به صورت شیمیایی و سبز می‌توانند خواص نانوذرات و در نتیجه نتایج AST را تغییر دهند. مطالعات متعددی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره، تیتانیوم، آهن و طلا را با روش‌های MIC/MBC و disk diffusion ارزیابی کرده‌اند.^{۷۷، ۷۸، ۷۹، ۸۰، ۸۱} این مطالعات نشان می‌دهند که انتخاب روش ارزیابی باید با در نظر گرفتن خواص فیزیکوشیمیایی نانوذره و مکانیسم اثر آن انجام شود.

نتیجه‌گیری

مرور انجام شده نشان داد که انتخاب روش ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی یک تصمیم چندمتغیره است که باید بر

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از تمامی افرادی که با حمایت های فکری و راهنمایی های مفید خود در انجام و تکمیل مقاله یاری رسانده‌اند، قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ تعارض منافع مالی، علمی و ... با انجام این مطالعه وجود ندارد.

حمایت مالی

این مقاله حمایت مالی از هیچ ارگانی نداشته است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه از نوع مروری می باشد و تمام داده ها و اطلاعات این مقاله، معتبر بوده و براساس بررسی و تحلیل مطالعات و منابع علمی معتبر منتشر شده، انجام شده است. نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل سرقت ادبی، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت نموده‌اند.

مشارکت نویسندگان

طراحی مطالعه: حدیث طوافی

گردآوری و استخراج داده ها: حدیث طوافی، نرگس ترک

تحلیل و تفسیر یافته ها: حدیث طوافی، نرگس ترک

نگارش مقاله: حدیث طوافی، نرگس ترک

ویرایش علمی و نگارش نهایی مقاله: حدیث طوافی

References

- Basavegowda N, Baek K-H. Multimetallic nanoparticles as alternative antimicrobial agents: challenges and perspectives. *Molecules*. 2021;26(4):912.
- Bischoff S, Walter T, Gerigk M, Ebert M, Vogelmann R. Empiric antibiotic therapy in urinary tract infection in patients with risk factors for antibiotic resistance in a German emergency department. *BMC infectious diseases*. 2018;18(1):56.
- Lin Z, Yuan T, Zhou L, Cheng S, Qu X, Lu P, et al. Impact factors of the accumulation, migration and spread of antibiotic resistance in the environment. *Environmental geochemistry and health*. 2021;43(5):1741–58.
- Yue C, Shen W, Hu L, Liu Y, Zheng Y, Ye Y, et al. Effects of tigecycline combined with azithromycin against biofilms of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a patient in China. *Infection and Drug Resistance*. 2021:775–86.
- Chokshi A, Sifri Z, Cennimo D, Horng H. Global contributors to antibiotic resistance. *Journal of global infectious diseases*. 2019;11(1):36.
- Senobar Tahaei SA, Stájer A, Barrak I, Ostorházi E, Szabó D, Gajdác M. Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in *Staphylococcus aureus* isolates: a laboratory-based study in Hungary and a review of the literature. *Infection and drug resistance*. 2021:1155–68.
- Gonzalez-Pastor R, Carrera-Pacheco SE, Zúñiga-Miranda J, Rodríguez-Pólit C, Mayorga-Ramos A, Guamán LP, et al. Current landscape of methods to evaluate antimicrobial activity of natural extracts. *Molecules*. 2023;28(3):1068.
- Hossain TJ. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European journal of microbiology and immunology*. 2024;14(2):97–115.
- Alsamahi A, Alhmoudi HAA, Mirza SB, Ridouane FL. Comprehensive analysis of nutritional composition, mineral content, antimicrobial activity, and theoretical evaluation of phytochemicals in Henna (*Lawsonia inermis*) from the fujairah, united Arab Emirates. *Int J Biol Chem Sci*. 2023;17(7):2614–30.
- Schuetz AN, Ferrell A, Hindler JA, Humphries R, Bobenchik AM. Overview of changes in the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100 32nd and 33rd editions. *Journal of clinical microbiology*. 2025;63(9):e01623–23.
- Dematheis F, Manzulli V, Grass G, Matuschek E, Jacob D, Melzer F, et al. European multi-centre study to establish MIC and zone diameter epidemiological cut-off values for *Bacillus anthracis*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2024;30(9):1170–5.
- El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(1):191–207.
- van Belkum A, Burnham C-AD, Rossen JW, Mallard F, Rochas O, Dunne Jr WM. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18(5):299–311.
- Gaur P, Hada V, Rath RS, Mohanty A, Singh P, Rukadikar A. Interpretation of antimicrobial susceptibility testing using European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints: analysis of agreement. *Cureus*. 2023;15.(*)
- Marcelo GA, Galhano J, Duarte MP, Capelo-Martínez JL, Lodeiro C, Oliveira E. Validation of a standard luminescence method for the fast determination of the antimicrobial activity of nanoparticles in *Escherichia coli*. *Nanomaterials*. 2022;12(13):2164.
- Chiu C-T, Lai C-H, Huang Y-H, Yang C-H, Lin J-N. Comparative analysis of gradient diffusion and disk diffusion with agar dilution for susceptibility testing of *Elizabethkingia anophelis*. *Antibiotics*. 2021;10(4):450.
- Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, et al. Antimicrobial susceptibility testing: a comprehensive review of currently used methods. *Antibiotics*. 2022;11(4):427.
- Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 27th informational supplement M. 2011;100:2017.
- Tavafi H. An investigation of antibacterial resistance patterns in isolated bacteria from contaminated water samples in poultry slaughterhouses. *Biosis Biol Syst*. 2020;1:85–90.
- Bavelaar H, Justesen US, Morris TE, Anderson B, Copey-Mawer S, Stubhaug TT, et al. Development of a EUCAST disk diffusion method for the susceptibility testing of rapidly growing anaerobic bacteria using Fastidious Anaerobe Agar (FAA): a development study using *Bacteroides* species. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(11):1695. e1–. e6.
- Giske CG, Turnidge J, Cantón R, Kahlmeter G. Update from the European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). *Journal of clinical microbiology*. 2022;60(3):e00276–21.
- Callebaut K, Stoefs A, Emmerechts K, Vandoorslaer K, Wybo I, De Geyter D, et al. Evaluation of automated disk diffusion antimicrobial susceptibility testing using Radian® in-line carousel. *Current microbiology*. 2024;81(7):196.
- Atmanto Y, Adi K, Abd Kadir N, Rusli B. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) confirmation test using E-Test. *Int J Recent Adv Multidiscipl Topics*. 2022;5:125–30.
- Hiflan F, Abeygoonawardena H, Karawgoda R, Chandrasiri N, Balasuriya A, Senanayake N. Comparison of broth microdilution and E-test for susceptibility of MRSA to vancomycin. *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases*. 2024;14.(*)
- Conrads G, KLOMP T, DENG D. The antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis*: genetic repertoire, global phenotype, and review of the literature. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10: 1438.
- Rodríguez-Melcón C, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Carballo J, Capita R. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (biocides and antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology*. 2021;11(1):46.
- Oliveira M, Cunha E, Tavares L, Serrano I. P. aeruginosa interactions with other microbes in biofilms during co-infection. *AIMS microbiology*. 2023;9(4):612.
- Elawady R, Aboulela AG, Gaballah A, Ghazal AA, Amer AN. Antimicrobial Sub-MIC induces *Staphylococcus aureus* biofilm formation without affecting the bacterial count. *BMC infectious diseases*. 2024;24(1):1065.
- Shin H-J, Yang S, Lim Y. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* with different degrees of biofilm

- formation. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2021;12(1):41.
30. Ben Hassena A, Abidi J, Miled N, Kulinowski Ł, Skalicka-Woźniak K, Bouaziz M. New insights into the antibacterial activity of hydroxytyrosol extracted from olive leaves: molecular docking simulations of its antibacterial mechanisms. *Chemistry & biodiversity*. 2025;22(1):e202401714.
31. Alshareef F. Protocol to evaluate antibacterial activity MIC, FIC and time kill method. *Acta Sci Microbiol*. 2021;4(5):2–6.
32. Van Os W, Zeitlinger M. Predicting antimicrobial activity at the target site: pharmacokinetic/pharmacodynamic indices versus time–kill approaches. *Antibiotics*. 2021;10(12):1485.
33. Gubenšek U, de Laat M, Foerster S, Boyd A, van Dam AP. Pharmacodynamics of ceftriaxone, ertapenem, fosfomycin and gentamicin in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antibiotics*. 2022;11(3):299.
34. Chiu P-W, Wang J-L, Hsueh S-C, Lee N-Y, Huang Y-T, Ko W-C, et al. Cefiderocol nonsusceptibility among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: data from the 2024 Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2026:e00634–26.
35. Bajaj E, Gupta A, Purwar S, Pundir S, Brar SS. A “Time-Kill” Study to Assess the Effect of Colistin on Gram-Negative Strains: An Experimental Study for Developing an Indigenous Microfluidics-Based Antimicrobial Susceptibility Testing Device. *Cureus*. 2025;17.(^٦)
36. NADİR Y, BATIREL AA. Review of Colistin Susceptibility Testing with Current Data. *Mediterranean Journal of Infection, Microbes & Antimicrobials*. 2024;13(1):1.
37. Haridas H, Raina S, Das P, Kunwar S, Gaind R. Evaluation of colistin susceptibility among *Klebsiella pneumoniae* isolates by broth microdilution and colistin agar test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2025;117119.
38. Bonnin RA, Emeraud C, Jousset AB, Naas T, Dortet L. Comparison of disk diffusion, MIC test strip and broth microdilution methods for cefiderocol susceptibility testing on carbapenem-resistant *Enterobacterales*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;28(8):1156.e1–.e5.
39. Khatun MR, Alam KMF, Shahrear MK, Zahan RA, Sazzad J. Determination of MIC of Different Antibiotics against Intermediate Isolates of *S. aureus* at a Tertiary Care Hospital by E-test. 2023.
40. Wolf LJ, Stingu C-S. Antimicrobial susceptibility profile of rare anaerobic bacteria. *Antibiotics*. 2022;12(1):63.
41. Datar R, Orega S, Pogorelnik R, Rochas O, Simner PJ, van Belkum A. Recent advances in rapid antimicrobial susceptibility testing. *Clinical chemistry*. 2022;68(1):91–8.
42. Guo Y, Yuan H, Yang Y, Chen M, Wang M. Gradient guidance for diffusion models: An optimization perspective. *Advances in neural information processing systems*. 2024;37:90736–70.
43. Liu Y, Chen R, Liu S, Chen J, Sun M, Fan Z, et al. Eradicating biofilms: decoding persistent mechanisms and combating therapeutic strategies. *Advanced Healthcare Materials*. 2026;15(6):e02707.
44. Agboola OE, Agboola O, Ayinla ZA, Agboola SS, Olaiya OE, Oyinloye OM, et al. Integrated virtual screening for anti-carries compounds from neem: dual-target inhibition of biofilm formation and bacterial DNA replication. *Biomedicine*. 2025;13(9):2202.
45. Alzubaidy FH, Al-saadi T, Nasser NI. Enhanced detection of bacterial biofilm formation using beetroot-supplemented Congo Red Agar: Comparison with the microtiter plate assay.
46. Khaddam W, Durgham B. Comparative analysis of biofilm detection methods and antibiotic resistance in catheter-associated uropathogens: a cross-sectional study from Syria. *BMC microbiology*. 2025;25(1):760.
47. Zhang S, Lee M, Zuber F, Wang L, Navascués P, Colomina-Alfaro L, et al. A simple, reproducible, and rapid droplet culture method for the formation and characterization of microbial biofilms. *Chemical Engineering Journal*. 2026:180067.
48. Unubol N, Ayaş M, Uyar NY, Mozioglu E. Inconsistent Findings Between Crystal Violet and Congo Red Methods on Biofilms with Comparative Sugar Supplementation. *Microorganisms*. 2025;14(1):21.
49. Stephens S, Mahadevan R, Allen DG. Establishing a quantitative link between crystal violet absorbance and biomass in biofilms. *MethodsX*. 2025:103630.
50. Nasiri SN, Aghajanloo B, Nasiri N, Nazarnezhad S. Cytotoxicity and biocompatibility of green biomaterials. *Green Biomaterials in Tissue Engineering: ACS Publications*; 2025. p. 175–205.
51. Sukach O, Maiorova O. Use of methods for determining cell viability in cryobiological research. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2025;35(4):181—95—95.
52. Stindlova M, Peroutka V, Jencova V, Havlickova K, Lencova S. Application of MTT assay for probing metabolic activity in bacterial biofilm-forming cells on nanofibrous materials. *Journal of Microbiological Methods*. 2024;224:107010.
53. Constante CK, Rodríguez J, Sonnenholzner S, Domínguez-Borbor C. Adaptation of the methyl thiazole tetrazolium (MTT) reduction assay to measure cell viability in *Vibrio* spp. *Aquaculture*. 2022;560:738568.
54. Etebu E, Arikekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International journal of applied microbiology and biotechnology research*. 2016;4(2016):90–101.
55. Cook MA, Wright GD. The past, present, and future of antibiotics. *Science translational medicine*. 2022;14(657):eabo7793.
56. Bush K, Bradford PA. Interplay between beta-lactamases and new beta-lactamase inhibitors (vol 17, pg 295, 2019). *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*. 2019;17(7):459–60.
57. Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New β -lactam– β -lactamase inhibitor combinations. *Clinical microbiology reviews*. 2020;34(1):10.1128/cmr.00115–20.
58. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008;3(2):163–75.
59. Kadeřábková N, Mahmood AJ, Mavridou DA. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *npj Antimicrobials and Resistance*. 2024;2(1):37.
60. Prescott JF. Antimicrobial drug action and interaction: an introduction. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 2024:1–11.
61. Rhee KY, Gardiner DF. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal activity in the treatment

- of gram-positive bacterial infections. Clinical infectious diseases. 2004;39(5):755–6.
62. Parmanik A, Das S, Kar B, Bose A, Dwivedi GR, Pandey MM. Current treatment strategies against multidrug-resistant bacteria: a review. Current microbiology. 2022;79(12):388.
 63. Wang Z-J, Zhu Y-Y, Bai L-Y, Tang D-M, Zhou Z-S, Wei M-Z, et al. A new therapeutic strategy for infectious diseases against intracellular multidrug-resistant bacteria. Journal of Controlled Release. 2024;375:467–77.
 64. Muheyuddeen G, Verma S, Yadav P, Khan MY, Ahmad T, Khushtar M. Caffeic acid: A comprehensive review of its traditional use and modern pharmacological applications by 2025. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 2026;55(2):336.
 65. Zeng Y-f, Su Y-l, Liu W-l, Chen H-g, Zeng S-g, Zhou H-b, et al. Design and synthesis of caffeic acid derivatives and evaluation of their inhibitory activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Medicinal Chemistry Research. 2022;31(1):177–94.
 66. Pakravan N, Shayani-Jam H, Beiginejad H, Tavafi H, Paziresh S. A green method for the synthesis of novel spiro compounds: Enhancement of antibacterial properties of caffeic acid through electrooxidation in the presence of barbituric acid derivatives. Journal of Electroanalytical Chemistry. 2019;848:113286.
 67. Pakravan N, Shayani-Jam H, Beiginejad H, Tavafi H. A green and efficient synthesis of novel caffeic acid derivatives with Meldrum's acid moieties as potential antibacterial agents. Journal of the Iranian Chemical Society. 2021;18(10):2679–88.
 68. Niu Y, Wang K, Zheng S, Wang Y, Ren Q, Li H, et al. Antibacterial effect of caffeic acid phenethyl ester on cariogenic bacteria and *Streptococcus mutans* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2020;64(9):10.1128/aac.00251–20.
 69. Tavafi H. In vitro evaluation of synergistic inhibitory effect of Propolis and Chlorhexidine on biofilm cells of oral pathogens. 2021.
 70. Sadrzadeh-Afshar M, Tavafi H, Niroomand S. In vitro effectiveness of antimicrobial properties of propolis and chlorhexidine on oral pathogens: A comparative study: effectiveness of antimicrobial properties of propolis and chlorhexidine on oral pathogens. Biosis: Biol. Syst. 1, 116–125. 2020.
 71. Stähli A, Schröter H, Bullitta S, Serrallutzu F, Dore A, Nietzsche S, et al. In vitro Activity of Propolis on Oral Microorganisms and Biofilms. Antibiotics 2021, 10, 1045. s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in ...; 2021.
 72. Ezazi Maleki A, Javadi A, Jafarizadeh-Malmiri H, Mirzaei H. Preparation and Evaluation of Physico-Chemical and Antimicrobial Properties of Alcoholic Extract of Propolis. Iranian Chemical Engineering Journal. 2022;20(119):31–40.
 73. Pobiega K, Kraśniewska K, Derewiaka D, Gniewosz M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. Journal of food science and technology. 2019;56(12):5386–95.
 74. Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Evaluation of alternative methods to assess the biological properties of propolis on metabolic activity and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2019;2019(1):1524195.
 75. Almadi KH, Ahmed MA, Ghazal T, Jouhar R, Alkahtany MF, Abduljabbar T, et al. Antimicrobial efficacy of propolis in comparison to chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. Applied Sciences. 2021;11(8):3469.
 76. Khezripour AR, Souri D, Tavafi H, Ghabooli M. Serial dilution bioassay for the detection of antibacterial potential of ZnSe quantum dots and their Fourier transform infra-red spectroscopy. Measurement. 2019;148:106939.
 77. Hashemi A, Tavafi H, Naseri M, Mojtazadeh H, Abedi M, Tork N. Structural and antibacterial properties of AgFe₂O₄ and Fe₃O₄ nanoparticles, and their nanocomposites. Progress in Physics of Applied Materials. 2024;4(1):37–46.
 78. Lagashetty A, Pattar A, Ganiger SK. Synthesis, characterization and antibacterial study of Ag doped magnesium ferrite nanocomposite. Heliyon. 2019;5.(°)
 79. Sivakumar S, Manimaran K, Govindasamy M, Alzahrani F, Alsaari N. Green synthesis and characterization of CuO nanoparticles using *Halymenia dilatata* extract and its evaluation of antimicrobial and anticancer activity. Biomass Conversion and Biorecovery, 14, 27623–27632. 2024.
 80. Jamzad M, Kamari Bidkorpheh M. Green synthesis of iron oxide nanoparticles by the aqueous extract of *Laurus nobilis* L. leaves and evaluation of the antimicrobial activity. Journal of nanostructure in Chemistry. 2020;10(3):193–201.
 81. Akshaya S, Rowlo PK, Dukle A, Nathanael AJ. Antibacterial coatings for titanium implants: recent trends and future perspectives. Antibiotics. 2022;11(12):1719.