دستورالعمل آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی به روش Agar Disk Diffusion

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

پاییز 1396

محل مهر تضمین کیفیت	
تاریخ :	تاریخ :

1- هدف:

هدف از تهیه این دستورالعمل تهیه و تدوین همگون روش اجرایی انجام آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی به روش Agar Disk Diffusion برای باکتری های هوازی، روش تهیه ظروف پتری آگاردار، شرایط آزمایش، تفسیر نتایج، روش های کنترل کیفیت و محدودیت های این روش می باشد.

2- دامنه کاربرد:

این دستورالعمل در بخش میکروب شناسی آزمایشگاه کاربرد دارد.

3- اصول انجام آزمایش:

از باکتری مورد آزمون سوسپانسیونی مطابق استاندارد نیم مک فارلند تهیه و روی سطح پلیت مولر هینتون آگار (MHA) با سواب کشت داده می شود. دیسک های آغشته به عوامل ضد میکروبی را روی آگار قرار داده و بعد از یک شبانه روز انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری می گردد. با مقایسه اندازه قطر هاله عدم رشد با جداول سند CLSI M100، گزارش کیفی از حساسیت، حساسیت بینابینی یا مقاومت به هر عامل ضد میکروبی مورد آزمون ارائه می شود.

سند CLSI روش استاندارد انتشار از دیسک را برای باکتری های بیماری زا با رشد سریع و همچنین برای بعضی از ارگانیسم های بیماری زای سخت رشد (پرنیاز) مانند گونه های *هموفیلوس*، *نیسریا گونوره*، *نیسریا مننژیتیدیس*، *استرپتوکک پنومونیه* و سایر گونه های استرپتوکک توضیح می دهد. روش انجام آزمایش برای این باکتری ها همانند باکتری های غیر سخت رشد می باشد، اما محیط کشت مورد استفاده برای باکتری های سخت رشد حاوی مواد مغذی افزودنی است که نیازمندی های رشد آنها را تأمین می کند. در مورد هر باکتری که از آن در CLSI برای آزمایش به روش انتشار از دیسک نام برده نشده، در صورت نیاز به انجام آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی باید به یک روش MIC آزمایش شود.

4- مواد، لوازم و تجهیزات:

پلیت حاوی MHA (Mueller Hinton Agar) یا MHA با 5٪ خون دفیبرینه گوسفند (به عمق حدود 4 mm) نگهداری شده در 2-8 ºC، محیط Mueller Hinton Broth (MHB) یا Tryptic Soy Broth (TSB) یا سالین 9٪ (به مقدار 3-5 ml) نگهداری شده در 2-8 ºC، دیسک های آنتی بیوتیک نگهداری شده با ماده جاذب رطوبت در 2-14 ºC، سواب پنبه ای استریل، کدورت استاندارد نیم مک فارلند، پنس، خط کش، منبع نوری متحرک، صفحه غیر شفاف سیاه (مثل ورقه کاغذی سیاه)، انکوباتور (35±2 ºC) و انکوباتور CO_2 دار برای بعضی ارگانیسم های سخت رشد

a) دیسک های آنتی بیوتیک

دیسک ها باید از منابع معتبر تجاری خریداری شوند. بسته های حاوی دیسک های آماده تجاری مخصوص انجام تست تعیین حساسیت، برای اطمینان در شرایط مناسب دور از رطوبت بسته بندی شده اند. دیسک ها باید به شرح زیر ذخیره شوند:

- دیسک ها باید در یخچال 8 ºC یا پایین تر، یا در فریزر 14 ºC- یا پایین تر تا زمان نیاز نگهداری گردند. دیسک ها نباید در فریزر دارای قابلیت ذوب یخ خود بخودی قرار داده شوند. بسته های باز نشده دیسک که حاوی داروهای خانواده بتالاکتام می باشند باید در فریزر ذخیره شوند، به استثناء مقدار کمی که برای مصرف حداکثر یک هفته در یخچال نگهداری شوند. بعضی آنتی بیوتیک های حساس (مانند ایمی پنم، سفاکلر و ترکیبات کلاولانیک اسید) اگر تا روز استفاده در فریزر نگهداری شوند، پایداری بیشتری خواهند داشت.
- بسته حاوی دیسک های باز نشده باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا قبل از باز کردن به دمای اتاق برسند. این عمل موجب می شود تغلیظ ناشی از تماس هوای گرم با دیسک های سرد کاهش یابد.
- زمانیکه بسته دیسک برای اولین بار از بسته بندی خارج می شود، برای ذخیره نمودن باید آنها را در یک ظرف ضد رطوبت که درِ آن محکم بسته می شود، قرار داد. اگر از وسیله پخش کننده دیسک (Dispenser) استفاده می شود، باید درپوش وسیله محکم بسته شود و به مقدار کافی ماده جاذب رطوبت در آن به کار رود. دیسپنسر باید قبل از باز کردن در دمای اتاق قرار داده شود تا دیسک ها به دمای اتاق برسند. وقتی معرف تغییر رنگ بدهد، باید ماده جاذب رطوبت را تعویض نمود تا رطوبت اضافی دیسپنسر از بین برود.
- در مدت زمانی که از دیسپنسر استفاده نمی شود، وسیله دیسپنسر حاوی دیسک ها باید در یخچال نگهداری شود.
- فقط باید از دیسک هایی که تاریخ مصرف روی برچسب آنها منقضی نشده باشد، استفاده نمود. دیسک هایی که تاریخ مصرفشان گذشته، باید دور انداخته شوند.

b) محیط کشت

1. آماده سازی مولر هینتون آگار شامل مراحل زیر می باشد:

- مولر هینتون آگار از یک محیط پایه دهیدراته که به صورت تجاری در دسترس می باشد، مطابق دستور کارخانه سازنده تهیه می شود.
- بلافاصله بعد از انجام اتوکلاو، محیط باید در بن ماری 50 ºC -45 خنک شود.
- محیط کشت آماده تازه و خنک شده را در ظروف پتری شیشه ای یا پلاستیکی مسطح که بر روی یک سطح افقی صاف قرار دارند، به عمق یکسان حدود 4 mm بریزید. 70-60 ml محیط برای پلیت های 150 میلی متری و 30 ml – 25 برای پلیت های 100 میلی متری برای ایجاد قطر 4 mm باید در هر پلیت ریخته شود.
- پلیت محیط کشت مولر هینتون آگار باید در حرارت اتاق خنک شده و اگر پلیت در همان روز استفاده نمی شود، باید در یخچال (8 ºC –2) ذخیره شود.
- پلیت ها باید در طی 7 روز بعد از تهیه استفاده شوند. برای پیشگیری از خشک شدن آکار، پلیت ها را باید در کیسه های نایلونی قرار داده و سپس آنها را در یخچال نگهداری نمود.

- 3 تا 5 درصد از پلیت ها در هر سری تهیه محیط مولر هینتون آگار باید از نظر استریل بودن بررسی شود. پلیت های انتخاب شده را باید به مدت 24 ساعت یا بیشتر در دمای 35±2 ºC انکوبه نموده، که انتظار داریم هیچ گونه رشد میکروبی روی محیط مشاهده نشود.
- به محیط افزودنی های کاتیونی منیزیم یا کلسیم اضافه نکنید.

2. pH محیط مولر هینتون آگار

pH هر batch از محیط باید بعد از آماده سازی آن بررسی شود. روش صحیح مورد استفاده بستگی به نوع تجهیزات در دسترس در آزمایشگاه دارد. pH محیط کشت آگار باید بین 7/2 تا 7/4 در دمای اتاق بعد از بسته شدن آگار باشد. اگر pH خیلی پایین باشد، توان (potency) بعضی از داروها افت خواهد داشت (مثل آمینوگلیکوزیدها، کینولون ها و ماکرولیدها)، ضمن اینکه آنتی بیوتیک های دیگری ممکن است بیش از حد فعالیت نشان دهند (مثل تتراسیکلین ها). اگر pH بیشتر از 7/4 باشد تأثیرات معکوسی ایجاد می شود.

pH را به یکی از روش های زیر اندازه گیری نمایید:

- مقدار کافی از آگار را در آب خیس کنید و نوک الکترود pH را در آن فرو ببرید.
- بگذارید مقدار کمی از آگار اطراف نوک الکترود pH در یک ظرف شیشه ای ببندد.
- از الکترود سطحی استفاده کنید.

3. رطوبت

اگر قبل از استفاده در سطح محیط رطوبت اضافی مشاهده شود، پلیت ها را در انکوباتور (35 ºC) یا در یک هود ایمنی بیولوژیک (کلاس II) در دمای اتاق با درپوش نیمه باز قرار دهید، تا رطوبت اضافی سطح محیط بخار شود (معمولاً 30–10 دقیقه). سطح محیط باید مرطوب باشد، اما زمان تلقیح محیط نباید قطرات رطوبت روی سطح محیط کشت یا روی درپوش ظروف پتری وجود داشته باشد.

4. تأثیرات تیمیدین یا تیمین

محیط های کشت حاوی مقادیر زیاد تیمیدین یا تیمین می تواند تأثیر مهارکنندگی سولفونامیدها و تری متوپریم را معکوس کند، بنابراین باعث کوچک تر شدن هاله عدم رشد یا واضح نبودن و از بین رفتن هاله عدم رشد و گزارش نتایج مقاوم کاذب می شود. باید از مولر هینتونی که تا حد امکان محتوی تیمیدین کمی است استفاده شود. برای ارزیابی یک سری ساخت جدید از مولر هینتون آگار باید *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 یا *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 33186 با دیسک تری متوپریم- سولفامتوکسازول استفاده شود. در محیط کشت با کیفیت مناسب، هاله عدم رشد واضح و روشنی به قطر 20 mm یا بزرگتر ایجاد می شود. در محیط کشت با کیفیت نامناسب، یا هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در هاله عدم رشد، کلنی رشد می کند یا هاله کمتر از 20 mm ایجاد می شود.

5. تأثیرات تغییر در غلظت کاتیون های دو ظرفیتی

تغییر در غلظت کاتیون های دو ظرفیتی، به ویژه منیزیم و کلسیم، روی نتایج تست های آمینوگلیکوزید و تتراسیکلین با سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* تأثیر می گذارد. مقادیر زیاد کاتیون ها اندازه هاله عدم رشد را

کاهش خواهد داد و مقادیر کم کاتیون ها باعث افزایش قطر هاله عدم رشد می شود. همچنین مقدار زیاد یون های روی (zinc) قطر هاله عدم رشد کارباپنم ها را کاهش می دهد. تست های اجرایی با هر سری ساخت از مولر هینتون آگار باید با محدوده کنترل کیفی فهرست شده در جدول 4A، CLSI M100 27th ed. مطابقت داده شود.

c) کدورت استاندارد نیم مک فارلند

کدورت استاندارد نیم مک فارلند به روش زیر تهیه می شود:

1) برای تهیه سوسپانسیون با هم زدن مداوم، 0/5 mL از کلرور باریم (W/V . $2H_2O$) 0/048 mol/L ($BaCl_2$ 1٪/175) را به 99.5 mL اسید سولفوریک (0/36 N) 0/18 mol/L (1٪ v/v) اضافه کنید.
2) چگالی صحیح کدورت استاندارد را با اندازه گیری جذب به وسیله اسپکتروفتومتر با باند نوری 1 cm به دست آورید. جذب استاندارد نیم مک فارلند در 625 nm باید بین 0/08 تا 0/13 باشد.
3) سوسپانسیون سولفات باریم را به مقدار 4-6 mL در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله هایی که برای استاندارد کردن تلقیح باکتریایی استفاده می شود، بریزید.
4) درِ لوله را محکم بسته و در دمای اتاق در تاریکی نگهداری کنید.
5) کدورت استاندارد سولفات باریم را قبل از هر بار استفاده با ورتکس به شدت هم زده، و ظاهر آن را از نظر وجود کدورت یکنواخت بررسی کنید. اگر ذرات بزرگ ایجاد شود، باید استاندارد دیگری جایگزین گردد.
6) جذب نوری استاندارد نیم مک فارلند باید هر ماه اندازه گیری، و در صورت نیاز (تغییر جذب نوری خارج از محدوده 0/13-0/08) تعویض گردد. استاندارد نیم مک فارلند باید حداکثر پس از شش ماه تعویض شود.

5- روش انجام آزمایش:

برای انجام آزمایش ارگانیسم های سخت رشد و میکروارگانیسم هایی که به شرایط خاصی نیاز دارند، به ترتیب به بندهای 3.7 و 3.9 در CLSI M02-A12 مراجعه نمایید.

روش انجام آزمایش برای سایر میکروارگانیسم ها به شرح زیر است:

الف- تهیه سوسپانسیون میکروبی

به دو روش انجام می شود:

a. روش تهیه سوسپانسیون با استفاده مستقیم از کلنی (Direct Colony Suspension Method)

این روش به عنوان آسان ترین روش برای تهیه سوسپانسیون میکروبی به کار می رود و می تواند برای بیشتر باکتری ها استفاده شود. این روش برای آزمایش باکتری های سخت رشد، گونه های *هموفیلوس*، *نیسریا گونوره*، *نیسریا مننزیتیدیس* و استرپتوکک ها و همچنین برای آزمایش کردن سفوکسیتین و بررسی مقاومت استافیلوکک ها به متی سیلین یا اگزاسیلین توصیه می شود.

1. به طور مستقیم سوسپانسیونی از کلنی های ایزوله از پلیت آگار 24-18 ساعته (از محیط کشت غیر انتخابی مثل بلاد آگار استفاده کنید) در محیط کشت براث یا سالین تهیه نمایید.

2. کدورت سوسپانسیون را با استفاده از محیط براث یا سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید. در نتیجه این سوسپانسیون میکروبی تقریباً حاوی $1-2\times10^8$ CFU/mL برای *E.coli* ATCC 25922 می باشد. برای انجام صحیح این مرحله می توان از یک دستگاه فتومتریک استفاده کرد، یا در صورت انجام این مرحله به صورت چشمی، از نور کافی برای مقایسه چشمی لوله سوسپانسیون میکروبی با استاندارد نیم مک فارلند در مقابل صفحه ای با زمینه سفید و خطوط سیاه استفاده نمود.

b. روش رشد (Growth method)

از روش رشد به طور جایگزین می توان استفاده نمود و گاهی دارای ارجحیت است، مانند زمانی که تهیه سوسپانسیون یکنواخت از کلنی مشکل است. این روش همچنین می تواند برای ارگانیسم های کم نیاز (به غیر از استافیلوکک ها) زمانی که کلنی تازه (24 ساعته) در دسترس نباشد، به کار رود. در روش تهیه سوسپانسیون با استفاده مستقیم از کلنی، به کلنی تازه (24 ساعته) نیاز می باشد.

1. حداقل 5-3 کلنی کاملاً ایزوله با یک نوع مرفولوژی را از یک کشت روی پلیت آگار انتخاب کنید. از قله این کلنی ها با لوپ یا سواب استریل برداشته و به لوله حاوی 5-3 ml از یک محیط کشت براث مناسب مثل تریپتیک سوی براث (TSB) تلقیح نمایید.
2. محیط کشت براث را در 35 ± 2 ^oC انکوبه کنید تا به کدورت استاندارد نیم مک فارلند یا بیشتر از آن برسد (معمولاً 6-2 ساعت).
3. کدورت براث را با استفاده از محیط براث یا سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید. در نتیجه، این سوسپانسیون میکروبی تقریباً حاوی $1-2\times10^8$ CFU/ mL برای *E.coli* ATCC 25922 می باشد. برای انجام صحیح این کار می توان از یک دستگاه فتومتریک استفاده کرد، یا در صورت انجام این مرحله به صورت چشمی، از نور کافی برای مقایسه چشمی لوله سوسپانسیون میکروبی با استاندارد نیم مک فارلند در مقابل صفحه ای با زمینه سفید و خطوط سیاه استفاده نمایید.

توجه: غلظت سوسپانسیون تلقیح نباید زیاد باشد. هرگز نباید از کشت براث یک شب مانده رقیق نشده یا سایر سوسپانسیون های غیر استاندارد برای کشت روی پلیت ها استفاده نمود.

ب ـ تلقیح پلیت ها

1. در طی 15 دقیقه بعد از تنظیم کدورت سوسپانسیون باکتریایی، یک سواب پنبه ای استریل در سوسپانسیون فرو برده، سواب را چند بار در آن چرخانده و به آرامی به دیواره داخلی لوله بالای سطح براث فشار دهید تا مایع اضافی آن خارج شود.
2. سطح خشک یک پلیت مولر هینتون آگار را به وسیله سواب تلقیح کنید. برای اطمینان از پخش یکنواخت سوسپانسیون، عمل تلقیح را دو بار دیگر تکرار کرده، هر بار پلیت را حدود 60 درجه بچرخانید. در مرحله آخر سواب را دور لبه داخلی محیط بکشید.
3. درپوش پلیت را برای 5-3 دقیقه نیمه باز گذاشته (حداکثر به مدت 15 دقیقه) تا رطوبت اضافی سطح محیط قبل از قراردادن دیسک ها جذب شود.

ج ـ دیسک گذاری روی پلیت آگار تلقیح شده

1. دیسک های آنتی بیوتیکی که از قبل تعیین شده اند را با پنس روی سطح پلیت آگار تلقیح شده قرار دهید. جهت اطمینان از تماس کامل دیسک ها با سطح آگار هر دیسک را با پنس فشار دهید. وقتی دیسک ها به صورت تکی یا بوسیله پخش کننده دیسک (Dispenser) روی پلیت گذاشته می شوند، باید به طور صحیح روی پلیت توزیع شوند به طوری که فاصله مرکز دیسک ها با یکدیگر نباید از 24 mm کمتر باشد. معمولاً روی یک پلیت 150 mm نباید بیشتر از 12 دیسک و روی پلیت 100 mm نباید بیشتر از 6 دیسک گذاشته شود. برای جلوگیری از همپوشانی هاله های عدم رشد با یکدیگر، بهتر است دیسک هایی که هاله عدم رشد کوچکی ایجاد می کنند (مانند جنتامایسین و ونکومایسین) نزدیک دیسک هایی که هاله بزرگی ایجاد می کنند (مانند سفالوسپورین ها) قرار گیرند. اگر دیسک ها خیلی نزدیک به لبه پلیت قرار داده شوند، هاله عدم رشد بعضی از داروها نامتقارن می شود. از آنجائی که بعضی از آنتی بیوتیک ها فوراً منتشر می شوند، به محض تماس دیسک با سطح آگار، نباید آن را جابجا کرد، بلکه در صورت نیاز باید دیسک جدیدی در ناحیه دیگری روی آگار قرار داد. جهت راهنمایی در مورد چگونگی قرار دادن دیسک ها در انجام آزمایش D-zone برای تعیین مقاومت القایی کلیندامایسین به سند CLSI M100 27th ed. جدول 3H مراجعه نمایید.
2. پلیت ها را برگردانده و در طی ۱۵ دقیقه بعد از گذاشتن دیسک ها در انکوباتور 35 ± 2 °C قرار دهید. ممکن است استافیلوکک های مقاوم به متی سیلین را در دمای بالاتر از ۳۵ °C نتوان تعیین نمود. به استثناء گونه های *هموفیلوس*، *نیسریا گونوره*، *نیسریا مننژیتیدیس* و استرپتوکک ها، پلیت های حاوی دیسک نباید در حضور CO_2 انکوبه شوند. زیرا استانداردهای تفسیری براساس شرایط هوای محیط انکوباسیون بدون CO_2 می باشد و CO_2 اندازه هاله عدم رشد بعضی عوامل ضد میکروبی را به طور قابل ملاحظه ای تغییر می دهد.

مدت زمان انکوباسیون 18-16 ساعت می باشد. به جز در مواردی که:

۱- سفوکسیتین برای *استافیلوکک اورئوس* تست می شود، که قبل از گزارش نتیجه حساس، انکوباسیون به مدت 24 ساعت نیاز است. سایر آنتی بیوتیک ها باید بعد از 16 تا 18 ساعت خوانده و گزارش شوند.

۲- وانکومایسین برای گونه های انتروکک تست می شود، که قبل از گزارش نتیجه حساس، انکوباسیون به مدت 24 ساعت نیاز است. سایر آنتی بیوتیک ها باید بعد از 16 تا 18 ساعت خوانده و گزارش شوند.

د - خواندن پلیت ها و تفسیر نتایج

1. بعد از 18-16 ساعت انکوباسیون (برای موارد استثناء به پیوست C که در ادامه آمده است مراجعه نمایید)، هر پلیت را بررسی کنید. اگر پلیت به طور کامل و صحیح تلقیح شده باشد، هاله های عدم رشد به دست آمده به طور یکنواخت مدور خواهد بود و رشد یکنواختی وجود خواهد داشت. اگر کلنی های تک تک ایجاد شود، تلقیح کم بوده و آزمایش باید تکرار شود. قطر هاله های عدم رشد کامل را با احتساب قطر دیسک (با چشم غیر مسلح) اندازه گیری نمایید. قطر هاله ها باید بر اساس میلی متر و با استفاده از خط کش یا کولیس کالیبره از پشت پلیت اندازه گیری شوند. پلیت باید چند سانتی متر بالاتر از یک سطح سیاه و مات نگه داشته شده و با نور انعکاسی بررسی گردد، به استثناء موارد زیر:

- اگر خون به پایه آگار اضافه شده (برای استرپتوکک ها)، قطر هاله ها از سطح بالای آگار در حالی که درِ پلیت برداشته شده، با نور انعکاسی اندازه گیری شود.
- اگر سفوکسیتین برای گونه های *استافیلوکک* کواگولاز منفی آزمایش می شود، قبل از گزارش نتیجه حساس، انکوباسیون به مدت 24 ساعت نیاز است. سایر آنتی بیوتیک ها باید بعد از 16 تا 18 ساعت خوانده و گزارش شوند. برای مشاهده رشد کم کلنی های مقاوم در داخل قطر هاله عدم رشد دیسک سفوکسیتین، از نور عبوری استفاده نمایید (پلیت را در مقابل نور نگه دارید). وجود هر گونه رشد قابل تشخیص در هاله عدم رشد، بیانگر مقاومت به سفوکسیتین می باشد.
- اگر وانکومایسین برای گونه های *انتروکک* آزمایش می شود، قبل از گزارش نتیجه حساس، انکوباسیون به مدت 24 ساعت نیاز است. سایر آنتی بیوتیک ها باید بعد از 16 تا 18 ساعت خوانده و گزارش شوند. آزمایش وانکومایسین برای استافیلوکک ها به روش انتشار از دیسک توصیه نمی شود.
- اگر لینزولید برای گونه های *استافیلوکک* آزمایش می شود، قطر هاله عدم رشد را با نور عبوری بررسی نمایید.

2. حاشیه هاله عدم رشد ناحیه ای است که در آن رشد قابل مشاهده واضحی با چشم غیر مسلح دیده نشود. از رشد ضعیف کلنی های ریز که فقط با ذره بین در لبه هاله عدم رشد مشاهده می شود، صرفنظر کنید.
   - با این حال، در مواردی که رشد کلنی های تک در هاله شفاف عدم رشد، مشاهده شود، آزمایش باید با کشت خالص یا با ساب کالچر از یک کلنی تک، دوباره تکرار شود. اگر با تکرار آزمایش همان نتایج به دست آمد، قطر داخلی هاله عدم رشد را که عاری از کلنی می باشد، اندازه گیری نمایید.
   - سویه های گونه های *پروتئوس* ممکن است در ناحیه هاله عدم رشد اطراف بعضی دیسک های آنتی بیوتیکی، سوارمینگ ایجاد کنند. پرده نازک رشد سوارمینگ در کنار هاله واضح عدم رشد را در نظر نگیرید.
   - وقتی محیط کشت خون دار برای آزمایش استرپتوکک ها به کار برده می شود، باید هاله عدم رشد (و نه قطر هاله مهار همولیز) را اندازه گیری کنید.
   - برای تری متوپریم و سولفونامیدها، آنتاگونیست های موجود در محیط ممکن است باعث رشد ضعیف کلنی ها شوند. بنابراین رشد کم کلنی ها (20٪ یا کمتر از آن) در هاله عدم رشد را در نظر نگیرید و برای تعیین قطر هاله عدم رشد، حاشیه واضح تر را اندازه گیری نمایید.
3. اندازه هاله های عدم رشد را با مراجعه به جداول 2A تا 2I در سند CLSI M100 27th ed. تفسیر کنید و ارگانیسم ها را به صورت حساس (S)، حساس بینابینی (I)، یا مقاوم (R) به عوامل ضد میکروبی که آزمایش شده اند، گزارش نمایید. بعضی از عوامل ضد میکروبی ممکن است فقط به عنوان حساس یا غیر حساس گزارش شوند، زیرا تاکنون به این عوامل ضد میکروبی مقاومت شناسایی نشده یا خیلی کم شناسایی شده است و برای آنها فقط Breakpoint های حساس تعیین شده است.

پیوست C. شرایط انجام آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکروبی به‌روش انتشار از دیسک

C1. شرایط انجام آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکروبی به‌روش انتشار از دیسک برای ارگانیسم‌های کم‌نیاز

Organism/Organism group	M100 Table	Medium	Incubation	Incubation Time	Minimal Quality Control	Comments/Modifications
Enterobacteriaceae	2A	MHA	35 ± 2 °C; ambient air	16 to 18 hours	*E. coli* ATCC® 25922 *E. coli* ATCC® 35218 (for β-lactam/ β-lactamase inhibitor combinations)	
Pseudomonas aeruginosa	2B-1	MHA	35 ± 2 °C; ambient air	16 to 18 hours	*E. coli* ATCC® 25922 *P. aeruginosa* ATCC® 27853 *E. coli* ATCC® 35218 (for β-lactam/ β-lactamase inhibitor combinations)	
Acinetobacter spp.	2B-2	MHA	35 ± 2 °C; ambient air	20 to 24 hours	*E. coli* ATCC® 25922 *P. aeruginosa* ATCC® 27853 *E. coli* ATCC® 35218 (for β-lactam/ β-lactamase inhibitor combinations)	
Burkholderia cepacia	2B-3	MHA	35 ± 2 °C; ambient air	20 to 24 hours	*E. coli* ATCC® 25922 *P. aeruginosa* ATCC® 27853	
Stenotrophomonas maltophilia	2B-4	MHA	35 ± 2 °C; ambient air	20 to 24 hours	*E. coli* ATCC® 25922 *P. aeruginosa* ATCC® 27853	
Staphylococcus spp.	2C	MHA	35 ± 2 °C; ambient air (Testing at temperatures above 35 °C may not detect MRS.)	16 to 18 hours; 24 hours for oxacillin and vancomycin	*S. aureus* ATCC® 25923 *E. coli* ATCC® 35218 (for β-lactam/ β-lactamase inhibitor combinations)	فقط سوسپانسیون مستقیم از کلنی. هاله‌های اگزاسیلین، وانکومایسین و لینزولید را با استفاده از نور عبوری به‌دقت ازنظر وجود کلنی‌های کوچک یا کدورت در داخل هاله مهاری بررسی نمایید؛ هرگونه رشد = مقاومت. برای کنترل کیفیت تکمیلی D-test از *S. aureus* ATCC BAA-977 استفاده‌کنید.
Enterococcus spp.	2D	MHA	35 ± 2 °C; ambient air	16 to 18 hours; 24 hours for vancomycin	*S. aureus* ATCC® 25923	هاله‌های وانکومایسین را با استفاده از نور عبوری به دقت ازنظر وجود کلنی‌های کوچک یا کدورت در داخل هاله مهاری بررسی نمایید؛ هر گونه رشد = مقاومت

ادامهٔ جدول صفحهٔ بعد ←

ادامهٔ پیوست C صفحهٔ قبل

C2. شرایط انجام آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکروبی به‌روش انتشار از دیسک برای ارگانیسم‌های پرنیاز

Organism/Organism group	M100 Table	Medium	Inoculum	Incubation	Incubation Time	Minimal Quality Control	Comments/Modifications
H. influenzae *H. parainfluenzae*	2E	*Haemophilus* Test Medium	سوسپانسیون مستقیم از کلنی در MHB با سالین تهیه‌شده از ظرف پتری شکلات آگار یک شب مانده(ترجیحاً ۲۰ تا ۲۴ ساعته)[a]	35 ± 2 °C; 5% CO_2	16 to 18 hours	*H. influenzae* ATCC® 49247 *H. influenzae* ATCC® 49766 *E. coli* ATCC® 35218(for amoxicillin-clavulanate acid)	حداکثر ۹ دیسک را روی ظرف پتری ۱۵۰ میلی‌متری و ٤ دیسک را روی ظرف پتری ۱۰۰ میلی‌متری آزمایش کنید.
N. gonorrhoeae	2F	GC agar base + 1% defined supplement	سوسپانسیون مستقیم از کلنی در MHB با سالین فسفات بافر pH = ۷ ±۰/۰۹ تهیه‌شده از ظرف پتری شکلات آگار گرمخانه‌گذاری‌شده در ۵٪ CO_2.	36 ± 1 °C (do not exceed 37 °C); 5% CO_2	20 to 24 hours	*N. gonorrhoeae* ATCC® 49226	حداکثر ۹ دیسک را روی ظرف پتری ۱۵۰ میلی‌متری و ٤ دیسک را روی ظرف پتری ۱۰۰ میلی‌متری آزمایش کنید. برای بعضی از عوامل مانند فلوروکینولون‌ها با سفالوسپورین‌ها، فقط ۲ تا ۳ دیسک را می‌توان در هر ظرف پتری آزمایش کرد.
S. pneumoniae	2G	MHA + 5% sheep blood	سوسپانسیون مستقیم از کلنی در MHB با سالین با استفاده از کلنی‌های ظرف پتری آگار خوندار یک شب مانده (۱۸ تا ۲۰ ساعته)	35 ± 2 °C; 5% CO_2	20 to 24 hours	*S. pneumoniae* ATCC® 49619	حداکثر ۹ دیسک را روی ظرف پتری ۱۵۰ میلی‌متری و ٤ دیسک را روی ظرف پتری ۱۰۰ میلی‌متری آزمایش کنید. هاله مهار رشد را اندازه‌گیری نمایید، نه هاله همولیز را.
Streptococcus spp.	2H-1 2H-2	MHA + 5% sheep blood	سوسپانسیون مستقیم از کلنی در MHB با سالین.	35 ± 2 °C; 5% CO_2	20 to 24 hours	*S. pneumoniae* ATCC® 49619	حداکثر ۹ دیسک را روی ظرف پتری ۱۵۰ میلی‌متری و ٤ دیسک را روی ظرف پتری ۱۰۰ میلی‌متری آزمایش کنید. هاله مهار رشد را اندازه‌گیری نمایید، نه هاله همولیز را.
N. meningitidis	2J	MHA + 5% sheep blood[b]	سوسپانسیون مستقیم از کلنی در MHB با سالین تهیه‌شده از ظرف پتری شکلات آگار ۲۰ تا ۲٤ ساعته گرمخانه‌گذاری‌شده در ۵٪ CO_2.[c]	35 ± 2 °C; 5% CO_2	20 to 24 hours	*S. pneumoniae* ATCC® 49619 (5% CO_2) *E. coli* ATCC® 25922 (ambient air or 5% CO_2; for ciprofloxacin, nalidixic acid, and minocycline)	حداکثر ۵ دیسک را روی ظرف پتری ۱۵۰ میلی‌متری و ۲ دیسک را روی ظرف پتری ۱۰۰ میلی‌متری آزمایش کنید.

a. این سوسپانسیون حاوی تقریباً $1-4 \times 10^8$ CFU/mL خواهدبود. دقت در تهیه این سوسپانسیون را تمرین نمایید، چون غلظت‌های بالاتر مایه میکروبی ممکن‌است به نتایج مقاومت غیرواقعی در استفاده از برخی عوامل ضدمیکروبی بتالاکتام منجرگردد، به خصوص در صورتی استفاده از سویه‌های *هموفیلوس انفلوانزا* که بتالاکتاماز تولیدمی‌کنند.

b. شکلات آگار مغذی برای تعیین حساسیت نیسریا منژیتیدیس توصیه‌نمی‌شود.

c. کلنی‌های رشدیافته روی آگار خوندار با خون گوسفند می‌توانند برای تهیه مایه میکروبی مورد استفاده قرارگیرد. اگرچه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند حاصل از خون گوسفند، CFU/mL کمتری خواهدداشت. این موضوع به ویژه زمانی که آخرین رقت قبل از تلقیح ظرف پتری تهیه می‌گردد، باید ازطریق شمارش کلنی‌ها مورد توجه قرارگیرد.

6- محدودیت های آزمایش:

a. کاربرد آزمایش در گروه های مختلف باکتری ها

روش انتشار از دیسک شرح داده شده در این بخش، برای باکتری های بیماری زای کم نیاز شامل گونه های *استافیلوکک*، *انتروکک*، *انتروباکتریاسه*، *سودوموناس آئروژینوزا*، گونه های *اسینتوباکتر*، *بورخلدریا سپاشیا* و *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* استاندارد شده است. این روش برای باکتری های پرنیاز، مانند گونه های *هموفیلوس*، *نیسریا گونوره*، *نیسریا مننژیتیدس* و استرپتوکک ها اصلاح شده است. هنوز برای باکتری های خارج از فهرست موجود در جدول های 2A تا 2I سند M100 و باکتری هایی که در سایر راهنماهای CLSI مانند (CLSI M45) از آنها نام برده نشده است، استانداردی تدوین نگردیده است. این باکتری ها ممکن است به محیط های کشت مختلف و شرایط گرمخانه گذاری خاص نیاز داشته باشند، یا شرایط رشد آنها از سویه ای به سویه دیگر متفاوت باشد. برای این باکتری ها توصیه می شود جهت انتخاب آنتی بیوتیک ها و تفسیر نتایج با یک متخصص عفونی مشورت شود. گزارش های چاپ شده در مقالات و توصیه های جاری ممکن است جهت انجام آزمایش این گونه باکتری ها مفید باشند. اگر آزمایش این باکتری ها لازم باشد، مناسب ترین راه، استفاده از روش رقیق سازی است که برای این منظور می توان باکتری را به آزمایشگاه مرجع ارسال نمود.

b. هشدار

استفاده از برخی عوامل ضد میکروبی برای باکتری های خاص و گزارش نتیجه حساسیت می تواند نتایج گمراه کننده و خطرناکی به دنبال داشته باشد، مانند:

- نسل اول و دوم سفالوسپورین ها، سفامایسین ها و آمینو گلیکوزیدها در آزمایش گونه های *سالمونلا* و *شیگلا*
- پنی سیلین ها، ترکیبات بتالاکتام/مهار کننده بتالاکتاماز، سفم ها و کارباپنم ها در آزمایش گونه های استافیلوکک مقاوم به اگزاسیلین
- آمینو گلیکوزیدها (به جز غلظت های بالا)، سفالوسپورین ها، کلیندا مایسین و تری متو پریم–سولفامتوکسازول در مقابل انتروکک ها

بعلاوه، بعضی گونه های باکتریایی به بعضی عوامل ضد میکروبی مقاومت ذاتی دارند. در چنین مواردی نیازی به آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی نمی باشد. برای مثال گونه های *سیتروباکتر* به طور ذاتی به آمپی سیلین مقاومند. درصد کمی (3٪-1٪) ممکن است به دلیل تفاوت در روش آزمایش، جهش یا سطوح پایین بروز مقاومت، حساس باشند. آزمایش چنین گونه هایی لازم نیست، اما اگر آزمایش انجام شد، نتیجه حساس باید با احتیاط قضاوت شود. برای فهرست چنین گونه هایی و مقاومت ذاتی آنها به بعضی عوامل ضد میکروبی به جدول مقاومت ذاتی در ضمیمه B که در ادامه آمده است، مراجعه شود.

Appendix B. Intrinsic Resistance

Intrinsic resistance is defined as inherent or innate (not acquired) antimicrobial resistance, which is reflected in wild-type antimicrobial patterns of all or almost all representatives of a species. Intrinsic resistance is so common that susceptibility testing is unnecessary. For example, *Citrobacter* species are intrinsically resistant to ampicillin.

These tables can be helpful in at least three ways: 1) they provide a way to evaluate the accuracy of testing methods; 2) they aid in the recognition of common phenotypes; and 3) they can assist with verification of cumulative antimicrobial susceptibility test data. In the tables, an "R" occurring with an organism-antimicrobial agent combination means that strains should test resistant. A small percentage (1% to 3%) may appear susceptible due to method variation, mutation, or low levels of resistance expression.

A "susceptible" result should be viewed with caution. Ensure antimicrobial susceptibility test results and identification are accurate and reproducible. See Appendix A, footnote "a."

B1. *Enterobacteriaceae*

Organism \ Antimicrobial Agent	Ampicillin	Amoxicillin-clavulanate	Ampicillin-sulbactam	Piperacillin	Ticarcillin	Cephalosporin I: Cefazolin, Cephalothin	Cephamycins: Cefoxitin, Cefotetan	Cephalosporin II: Cefuroxime	Imipenem	Tetracyclines	Tigecycline	Nitrofurantoin	Polymyxin B Colistin	Aminoglycosides
Citrobacter freundii	R	R	R			R	R	R						
Citrobacter koseri	R			R	R									
Enterobacter aerogenes	R	R	R			R	R	R						
Enterobacter cloacae complex	R	R	R			R	R	R						
Escherichia coli	There is no intrinsic resistance to β-lactams in this organism.													
Escherichia hermannii	R				R									
Hafnia alvei	R	R	R			R	R							
Klebsiella pneumoniae	R				R									
Morganella morganii	R	R				R		R	*		R	R	R	
Proteus mirabilis	There is no intrinsic resistance to penicillins and cephalosporins in this organism.								*	R	R	R	R	
Proteus penneri	R					R		R	*	R	R	R	R	
Proteus vulgaris	R					R		R	*	R	R	R	R	
Providencia rettgeri	R	R				R			*	R	R	R	R	
Providencia stuartii	R	R				R			*	R	R	R	R	†
Salmonella and *Shigella* spp.	There is no intrinsic resistance to β-lactams in these organisms; refer to **WARNING** below for reporting.													
Serratia marcescens	R	R	R			R	R	R				R	R	
Yersinia enterocolitica	R	R			R	R								

Appendix B. (Continued)

B1. (Continued)

WARNING: For *Salmonella* spp. and *Shigella* spp., aminoglycosides, first- and second-generation cephalosporins, and cephamycins may appear active *in vitro*, but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.

* *Proteus* species, *Providencia* species, and *Morganella* species may have elevated minimal inhibitory concentrations to imipenem by mechanisms other than by production of carbapenemases. Isolates that test as susceptible should be reported as susceptible.

† *Providencia stuartii* should be considered resistant to gentamicin, netilmicin, and tobramycin but not intrinsically resistant to amikacin.

NOTE 1: Cephalosporins III, cefepime, aztreonam, ticarcillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, and the carbapenems are not listed, because there is no intrinsic resistance in *Enterobacteriaceae*.

NOTE 2: *Enterobacteriaceae* are also intrinsically resistant to clindamycin, daptomycin, fusidic acid, glycopeptides (vancomycin, teicoplanin), lipoglycopeptides (oritavancin, telavancin), linezolid, tedizolid, quinupristin-dalfopristin, rifampin, and macrolides (erythromycin, clarithromycin, and azithromycin). However, there are some exceptions with macrolides (ie, *Salmonella* and *Shigella* spp. with azithromycin).

C. ظهور مقاومت

درمان های طولانی مدت با بعضی از عوامل ضد میکروبی موجب ظهور مقاومت در برابر آنها می شود و در نتیجه سویه هایی که در ابتدا حساس هستند، ممکن است پس از شروع درمان مقاوم گردند. این مقاومت در طی سه الی چهار روز پس از شروع درمان و معمولا بیشتر در گونه های *انتروباکتر*، *سیتروباکتر* و *سراشیا* با نسل سوم سفالوسپورین ها، در *سودوموناس آئروژینوزا* با همه عوامل ضد میکروبی و در استافیلوکک ها با کینولون ها و با وانکومایسین روی می دهد (VISAs).

در شرایط خاصی جهت تعیین ظهور مقاومت ممکن است تکرار آزمایش زود تر از سه الی چهار روز لازم باشد. تصمیم جهت انجام چنین آزمایشی منوط به داشتن اطلاعات در خصوص شرایط و وخامت حال بیمار است. طی دستور العمل های آزمایشگاهی، زمان تکرار این آزمایش ها باید پس از مشورت با پزشک مسئول بیمار مشخص شود.

7- کنترل کیفیت:

1- هر بهر (batch) یا سری ساخت جدید از پلیت آگار یا دیسک را با سویه های کنترل مناسب آزمایش کنید تا مطمئن شوید که اندازه قطر هاله های عدم رشد در محدوده مورد انتظار قرار می گیرد و در غیر این صورت باید مرجوع شوند.

2- برای بررسی استریل بودن محیط، از هر batch یا سری ساخت آن حداقل یک پلیت تلقیح نشده را به مدت یک شبانه روز انکوبه نمایید.

3- سوابق هر سری ساخت از همه مواد و معرف های مورد استفاده در انجام آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی را نگهداری نمایید.

الف- سویه های کنترل کیفیت

- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 35218
- ✓ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- ✓ *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603

- توجه: برای انتخاب سویه های کنترل کیفی سخت رشد در پایش کیفیت انجام آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی به روش Disk diffusion به جدول 4B در سند .CLSI M100 27th ed مراجعه شود.

ب- محدوده قطر هاله عدم رشد در آزمایش کنترل کیفیت

محدوده قابل قبول قطر هاله عدم رشد سویه های کنترل کیفی برای یک آزمایش کنترل کیفیت (ترکیب یک آنتی بیوتیک/یک ارگانیسم) در جداول 4A و 4B در سند .CLSI M100 27th ed فهرست شده است.

ج - دفعات انجام آزمایش کنترل کیفیت

آزمایش کنترل کیفیت را برای سویه های کنترل کیفی مناسب، در هر روزی که آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی برای سویه های جدا شده از بیمار انجام می شود، انجام دهید. برای نشان دادن کارایی قابل قبول آزمایش و همچنین کاهش دفعات انجام آزمایش از روزانه به هفتگی یکی از دو برنامه کنترل کیفیت را که در ادامه توضیح داده شده است، اتخاذ نمایید. در هر دو برنامه، زمانی که با آزمایش روزانه سویه های کنترل کیفی نتایج رضایت بخش حاصل شود، آزمایشگاه می تواند آزمایش روزانه را به آزمایش هفتگی تغییر دهد. زمانی که آزمایش های disk diffusion کمتر از یک بار در هفته انجام می شود، آزمایش کنترل کیفیت هفتگی کاربرد ندارد.

1. آزمایش کنترل کیفیت روزانه

یک آزمایشگاه می تواند آزمایش کنترل کیفیت روزانه را انجام دهد. اگر آزمایش های disk diffusion کمتر از یک بار در هفته انجام می شوند، آزمایش کنترل کیفیت روزانه (برخلاف آزمایش هفتگی) باید در هر روزی که سویه های جدا شده از بیماران مورد آزمون قرار می گیرند، انجام شود.

"آزمایش کنترل کیفیت روزانه" یا "آزمایش در روزهای متوالی" به معنی آزمایش سویه های کنترل کیفی در هر روزی است که آزمایش های disk diffusion برای سویه های جدا شده از بیماران انجام می شود.

2. معیار عملکردی برای کاهش دفعات انجام آزمایش کنترل کیفیت روزانه به هفتگی

قبل از شروع کنترل کیفیت هفتگی، دو برنامه برای نشان دادن کارایی رضایت بخش آزمایش با سویه های کنترل کیفی وجود دارد. این دو برنامه عبارتند از :

A. برنامه ۲۰ یا ۳۰ روزه

B. برنامه ۱۵ تکرار (۳ بار در ۵ روز) به عنوان یک برنامه جایگزین که از سال ۲۰۱۴ توسط CLSI پیشنهاد شده است.

A. برنامه ۲۰ یا ۳۰ روزه

- ۲۰ یا ۳۰ روز تست متوالی با همه سویه های کنترل انجام و همه نتایج در فرم مربوطه ثبت شود.
- اگر نتیجه حداکثر ۳ تست از ۳۰ روز تست متوالی یا حداکثر ۱ تست از ۲۰ روز تست متوالی آزمایش کنترل کیفیت خارج از محدوده قابل قبول باشد، آزمایشگاه می تواند آزمایش کنترل کیفیت روزانه را به آزمایش هفتگی تغییر دهد.
- در صورت عدم موفقیت برنامه ۲۰ یا ۳۰ روزه، باید اقدام اصلاحی مناسب انجام گردد و آزمایش روزانه ادامه داده شود.

B. برنامه ۱۵ تکرار (۳ بار در ۵ روز)

- آزمایش را برای ۵ روز متوالی، در هر روز ۳ تکرار با استفاده از تلقیح جداگانه از هر سویه کنترل انجام دهید و نتایج را ثبت نمایید.
- هر ترکیب سویه کنترل/ عامل ضد میکروبی را به طور جداگانه با استفاده از معیارهای پذیرش و اقدامات توصیه شده و توضیح داده شده در فلودیاگرام زیر ارزیابی نمایید. (جدول 4C)
- به مجرد موفقیت کامل برنامه، آزمایشگاه می تواند آزمایش کنترل کیفیت را از روزانه به هفتگی تغییر دهد. موفقیت کامل برنامه زمانی است که حداکثر ۱ نتیجه از ۱۵ نتیجه خارج از محدوده قابل قبول باشد.
- آگر ۲ تا ۳ نتیجه از ۱۵ نتیجه اولیه خارج از محدوده قابل قبول باشد، برنامه ۱۵ تکرار (۳ بار در ۵ روز) باید مجددا انجام شود. اگر ۲ تا ۳ نتیجه از ۳۰ نتیجه (۱۵ نتیجه اولیه + ۱۵ نتیجه تکرار) خارج از محدوده قابل قبول باشد، برنامه موفقیت آمیز بوده و آزمایشگاه می تواند آزمایش کنترل کیفیت را از روزانه به هفتگی تغییر دهد.

- اگر ۴ نتیجه یا بیشتر، از ۱۵ نتیجه اولیه خارج از محدوده قابل قبول باشد، برنامه ناموفق می باشد. بررسی انجام شود، اقدام اصلاحی مناسب صورت گیرد و آزمایش کنترل کیفیت روزانه را ادامه دهید. بعد از تکرار برنامه، اگر ۴ نتیجه یا بیشتر، از ۳۰ نتیجه (۱۵ نتیجه اولیه + ۱۵ نتیجه تکرار) خارج از محدوده قابل قبول باشد، برنامه ناموفق می باشد. بررسی انجام شود، اقدام اصلاحی مناسب صورت گیرد و آزمایش کنترل کیفیت روزانه را ادامه دهید.

Table 4C. Disk Diffusion: Reference Guide to Quality Control Frequency

15-Replicate (3 × 5 Day) Plan: Acceptance Criteria and Recommended Action[*]

Number Out of Range With Initial Testing (based on 15 replicates)	Conclusion From Initial Testing (based on 15 replicates)	Number Out of Range After Repeat Testing (based on all 30 replicates)	Conclusion After Repeat Testing
0–1	Plan is successful. Convert to weekly QC testing.	N/A	N/A
2–3	Test another 3 replicates for 5 days.	2–3	Plan is successful. Convert to weekly QC testing.
≥4	Plan fails. Investigate and take corrective action as appropriate. Continue QC each test day.	≥4	Plan fails. Investigate and take corrective action as appropriate. Continue QC each test day.

[*] Assess each QC strain/antimicrobial agent combination separately.
Abbreviations: N/A, not applicable; QC, quality control.

3. استقرار آزمایش کنترل کیفیت هفتگی

- زمانی که کارآیی آزمون های کنترل کیفیت روزانه رضایت بخش باشد، می توان آزمایش کنترل کیفیت روزانه به هفتگی تغییر داده شود (بند ۱ و ۲ ملاحظه شود.).
- آزمایش کنترل کیفیت هفتگی را یک بار در هفته و هر زمانی که هر یک از اجزا آزمایش (مانند سری ساخت جدید محیط مولر هینتون آگار، یا سری ساخت جدید دیسک از همان کارخانه سازنده یا سازنده دیگر) تغییر کند، انجام دهید.
- اگر هر یک از نتایج آزمایش کنترل کیفیت هفتگی خارج از محدوده قابل قبول باشد، اقدام اصلاحی انجام شود.

8- نتایج خارج از محدوده قابل قبول با سویه های کنترل کیفی و اقدام اصلاحی

نتایج کنترل کیفی خارج از محدوده قابل قبول در سه گروه طبقه بندی می شوند: ۱)تصادفی ۲)قابل تشخیص ۳) سیستمی

نتایج کنترل کیفت خارج از محدوده قابل قبول حتی زمانی که آزمایش به روش صحیح انجام و مواد مورد استفاده در آزمایش مطابق دستورالعمل صحیح نگهداری شود، به تعداد کم (تصادفی) بدست می آید. چنین نتایجی ناشی از تصادف است.

نتایج خارج از محدوده قابل قبول با سویه های کنترل ناشی از خطاهای تصادفی یا قابل تشخیص معمولا با یک بار تکرار آزمایش کنترل کیفیت رفع می شود. اما نتایج کنترل کیفی خارج از محدوده

قابل قبول ناشی از سیستم آزمایش معمولا با تکرار آزمایش کنترل کیفیت اصلاح نمی شود و ممکن است نشانگر یک مسئله جدی باشد که می تواند تاثیرات مغایری روی نتایج بیمار داشته باشد. هر نتیجه خارج از محدوده قابل قبول باید بررسی شود.

توجه: برای برطرف کردن مشکلات (troubleshooting) و اقدام اصلاحی برای نتایج خارج از محدوده قابل قبول با سویه های کنترل به راهنمای رفع اشکال، جدول 4D در سند M100 که در ادامه آمده است، مراجعه نمایید.

Table 4D. Disk Diffusion: Troubleshooting Guide

This table provides guidance for troubleshooting and corrective action for out-of-range QC, primarily using antimicrobial susceptibility tests with MHA. Refer to M02-A12 (disk diffusion), Chapter 4, Quality Control and Quality Assurance for additional information. Out-of-range QC tests should first be repeated. If the issue is unresolved, this troubleshooting guide should be consulted regarding additional suggestions for troubleshooting out-of-range QC results. In addition, if unresolved, manufacturers should be notified of potential product problems.

General Comment

(1) QC organism maintenance: Avoid repeated subcultures. Retrieve new QC strain from stock. If using lyophilized strains, follow the maintenance recommendations of the manufacturer. Store *E. coli* ATCC® 35218 and *K. pneumoniae* ATCC® 700603 stock cultures at −60°C or below and prepare working cultures weekly (refer to M02-A12, Subchapter 4.4).

Antimicrobial Agent	QC Strain	Observation	Probable Cause	Comments/Action
Aminoglycosides	Any	Zone too small	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2–7.4 Avoid CO_2 incubation, which lowers pH.
Aminoglycosides	Any	Zone too large	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2–7.4
Aminoglycosides	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	Zone too small	Ca++ and/or Mg++ content too high	Use alternative lot of media.
Aminoglycosides	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	Zone too large	Ca++ and/or Mg++ content too low	Use alternative lot of media.
Amoxicillin-clavulanate	*E. coli* ATCC® 35218	Zone too small	Clavulanate is labile. Disk has lost potency.	Use alternative lot of disks. Check storage conditions and package integrity.
Ampicillin	*E. coli* ATCC® 35218	Zone too large (should be no zone—resistant)	Spontaneous loss of the plasmid encoding the β-lactamase	See general comment (1) on QC organism maintenance.
β-Lactam group	Any	Zone initially acceptable, but decreases and possibly out of range over time	Disk has lost potency.	Use alternative lot of disks. Check storage conditions and package integrity. Imipenem, clavulanate, and cefaclor are especially labile.
Aztreonam Cefotaxime Cefpodoxime Ceftazidime Ceftriaxone	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	Zone too large	Spontaneous loss of the plasmid encoding the β-lactamase	See general comment (1) on QC organism maintenance.
Cefotaxime-clavulanate Ceftazidime-clavulanate	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	Negative ESBL test	Spontaneous loss of the plasmid encoding the β-lactamase	See general comment (1) on QC organism maintenance.
Penicillins	Any	Zone too large	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2–7.4 Avoid CO_2 incubation, which lowers pH.
Penicillins	Any	Zone too small	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2–7.4
Carbenicillin	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	Zone too small	QC strain develops resistance after repeated subculture.	See general comment (1) on QC organism maintenance.
Ticarcillin-clavulanate	*E. coli* ATCC® 35218	Zone too small	Clavulanate is labile. Disk has lost potency.	Use alternative lot of disks. Check storage conditions and package integrity.

Table 4D. (Continued)

Antimicrobial Agent	QC Strain	Observation	Probable Cause	Comments/Action
Clindamycin	*S. aureus* ATCC® 25923	Zone too small	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2–7.4 Avoid CO_2 incubation, which lowers pH.
Clindamycin	*S. aureus* ATCC® 25923	Zone too large	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2–7.4
Macrolides	*S. aureus* ATCC® 25923	Zone too small	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2–7.4 Avoid CO_2 incubation, which lowers pH.
Macrolides	*S. aureus* ATCC® 25923	Zone too large	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2–7.4
Quinolones	Any	Zone too small	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2–7.4 Avoid CO_2 incubation, which lowers pH.
Quinolones	Any	Zone too large	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2–7.4
Tetracyclines	Any	Zone too large	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2–7.4 Avoid CO_2 incubation, which lowers pH.
Tetracyclines	Any	Zone too small	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2–7.4
Tetracyclines	Any	Zone too small	Ca++ and/or Mg++ content too high	Use alternative lot of media.
Tetracyclines	Any	Zone too large	Ca++ and/or Mg++ content too low	Use alternative lot of media.
Sulfonamides Trimethoprim Trimethoprim-sulfamethoxazole	*E. faecalis* ATCC® 29212	Zone ≤ 20 mm	Media too high in thymidine content	Use alternative lot of media.
Various	Various	Zone too small	Contamination Use of magnification to read zones	Measure zone edge with visible growth detected with unaided eye. Subculture to determine purity and repeat if necessary.
Various	Any	Many zones too large	Inoculum too light Error in inoculum preparation Media depth too thin MHA nutritionally unacceptable	Repeat using McFarland 0.5 turbidity standard or standardizing device. Check expiration date and proper storage if using barium sulfate or latex standards. Use agar with depth approximately 4 mm. Recheck alternate lots of MHA.
Various	Any	Many zones too small	Inoculum too heavy Error in inoculum preparation Media depth too thick MHA nutritionally unacceptable	Repeat using McFarland 0.5 turbidity standard or standardizing device. Check expiration date and proper storage if using barium sulfate or latex standards. Use agar with depth approximately 4 mm. Recheck alternate lots of MHA.
Various	Any	One or more zones too small or too large	Measurement error Transcription error Random defective disk Disk not pressed firmly against agar	Recheck readings for measurement or transcription errors. Retest. If retest results are out of range and no errors are detected, initiate corrective action.
Various	Various	Zone too large	Did not include lighter growth in zone measurement (eg, double zone, fuzzy zone edge)	Measure zone edge with visible growth detected with unaided eye.

Table 4D. (Continued)

Antimicrobial Agent	QC Strain	Observation	Probable Cause	Comments/Action
Various	*S. pneumoniae* ATCC® 49619	Zones too large. Lawn of growth scanty.	Inoculum source plate too old and contains too many nonviable cells. Plate used to prepare inoculum should be 18–20 hours.	Subculture QC strain and repeat QC test or retrieve new QC strain from stock.
Various	Any	One QC strain is out of range, but other QC organism(s) are in range with the same antimicrobial agent.	One QC organism may be a better indicator of a QC problem.	Retest this strain to confirm reproducibility of acceptable results. Evaluate with alternative strains with known MICs. Initiate corrective action with problem QC strain/antimicrobial agents.
Various	Any	Two QC strains are out of range with the same antimicrobial agent.	Indicates a problem with the disk	Use alternative lot of disks. Check storage conditions and package integrity.
Various	Any	Zones overlap.	Too many disks per plate	Place no more than 12 disks on a 150-mm plate and 5 disks on a 100-mm plate; for some fastidious bacteria that produce large zones, use fewer.

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; ESBL, extended-spectrum β-lactamase; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control.

a) نتایج خارج از محدوده قابل قبول آزمایش کنترل کیفیت روزانه یا هفتگی ناشی از خطای قابل تشخیص

اگر می توان علت نتایج خارج از محدوده را شناسایی و به راحتی تصحیح نمود، مشکل را اصلاح کرده، علت را ثبت نموده و آزمایش را با همان سویه و در همان روزی که خطا مشاهده شد دوباره تکرار نمایید. اگر نتایج به دست آمده در محدوده قابل قبول باشد، نیاز به اقدام اصلاحی بیشتری نمی باشد.

علل قابل تشخیص برای نتایج خارج از محدوده کنترل ممکن است شامل موارد زیر باشد، البته فقط به همین موارد محدود نمی شود:

- سویه کنترل کیفی
  - استفاده از سویه کنترل اشتباه
  - ذخیره سازی نامناسب
  - نگهداری نامناسب از نظر مدت زمان (مانند استفاده از کشت کاری بیشتر از یک ماه)
  - آلودگی
  - زنده نبودن باکتری ها
  - تغییرات در ارگانیسم (مانند جهش، از دست دادن پلاسمید)
- ملزومات آزمایش
  - ذخیره سازی یا شرایط حمل و نقل نامناسب
  - آلودگی
  - استفاده از پلیت آگار نامناسب (مانند قطر کم یا زیاد محیط)
  - استفاده از پلیت آسیب دیده (شکسته)
  - استفاده از مواد تاریخ مصرف گذشته
- مراحل آزمایش
  - مایه تلقیح که به طور غیرصحیح تهیه یا تنظیم شده باشد
  - تهیه مایه تلقیح از پلیتی که برای مدت زمان نادرستی انکوبه شده
  - تهیه مایه تلقیح از محیط کشت تشخیصی یا انتخابی که حاوی عوامل ضد میکروبی یا سایر ترکیبات مهار کننده رشد است
  - استفاده از دما و شرایط انکوباسیون نادرست
  - استفاده از دیسک اشتباه، منابع فرعی
  - قرار دادن نامناسب دیسک (مانند تماس ناکافی با آگار) یا افتادن دیسک روی آگار
  - قرائت یا تفسیر نادرست نتیجه آزمایش
  - خطا در ثبت نتایج
- تجهیزات
  - تجهیز به درستی کار نمی کند یا کالیبر نمی باشد (مانند پی پت ها)

b) نتایج خارج از محدوده قابل قبول آزمایش کنترل کیفیت روزانه ناشی از خطای غیر قابل تشخیص
اگر نتایج برای یک ترکیب سویه کنترل کیفی/عامل ضد میکروبی در دو روز متوالی آزمایش، خارج از محدوده قابل قبول بوده یا اگر بیش از سه نتیجه برای یک ترکیب سویه کنترل کیفی/عامل ضد میکروبی در سی روز متوالی آزمایش، خارج از محدوده قابل قبول بوده و خطا قابل تشخیص نباشد، اقدام اصلاحی انجام دهید.

c) نتایج خارج از محدوده قابل قبول آزمایش کنترل کیفیت هفتگی ناشی از خطای غیر قابل تشخیص
اگر علت نتیجه خارج از محدوده قابل قبول با سویه کنترل کیفی شناسایی نشد، مطابق آنچه در پایین آمده، اقدام اصلاحی انجام دهید تا اگر خطای تصادفی رخ داده، تعیین شود.

- ترکیب عامل ضد میکروبی/ ارگانیسم را که نتیجه آن خارج از محدوده کنترل است، در روزی که خطا مشاهده شد یا هر چه سریع تر، با ساب کالچر F2 یا F3 از سویه کنترل کیفی که در دسترس است، آزمایش کنید.
- اگر نتایج بدست آمده از تکرار در محدوده قابل قبول باشند، همه نتایج کنترل کیفی در دسترس برای ترکیب عامل ضد میکروبی/ ارگانیسم وقتی که از مواد با همان سری ساخت مورد استفاده در زمانی که نتیجه خارج از محدوده قابل قبول مشاهده شده بود، بررسی شود. اگر پنج نتیجه کنترل کیفی قابل قبول در دسترس باشد، به آزمایش کنترل کیفیت در روزهای بیشتر نیاز نمی باشد.

Scenario #1:

Ampicillin *E. coli* ATCC® 25922; acceptable range: 15 to 22 mm

Week	Day	Lot Number (Disks)	Lot Number (MHA)	Result	Action
1	1	3564	16481	18	
2	1	3564	16481	19	
3	1	3564	16481	18	
4	1	3564	16481	19	
5	1	3564	16481	14	Out of range. Repeat QC same day.
5	2	3564	16481	17	In range. Five acceptable in-range QC tests for *E. coli* ATCC® 25922 with ampicillin disks lot 3564 and MHA lot 16481. Resume weekly QC testing.

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; MHA, Mueller-Hinton agar; QC, quality control.

Conclusion: Random QC error.

Scenario #2:

Ampicillin *E. coli* ATCC® 25922; acceptable range: 15 to 22 mm

Week	Day	Lot Number (Disks)	Lot Number (MHA)	Result	Action
1	1	9661	16922	18	
2	1	9661	16922	19	
3	1	9661	16922	14	Out of range. Repeat QC same day.
3	2	9661	16922	18	In range. Three acceptable in-range QC tests for *E. coli* ATCC® 25922 with ampicillin disks lot 9661 and MHA lot 16922. Repeat QC 2 more consecutive days.
3	3	9661	16922	18	In range.
3	4	9661	16922	17	In range. Five acceptable in-range QC tests for *E. coli* ATCC® 25922 with ampicillin disks lot 9661 and MHA lot 16922. Resume weekly QC testing.

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; MHA, Mueller-Hinton agar; QC, quality control.

Conclusion: Random QC error.

i. اقدام اصلاحی اضافه

- اگر نتایج بدست آمده از تکرار آزمایش با سویه کنترل هنوز خارج از محدوده کنترل باشد، به اقدام اصلاحی اضافه نیاز است. احتمالا مشکل ناشی از یک خطای سیستمی است نه خطای تصادفی. به بند " نتایج خارج از محدوده قابل قبول آزمایش کنترل کیفیت روزانه یا هفتگی ناشی از خطای قابل تشخیص" و جدول راهنمای رفع اشکال مراجعه نمایید.
- آزمایش کنترل کیفیت روزانه تا برطرف شدن کامل مشکل باید ادامه داده شود.
- در صورت لزوم از یک سویه کنترل کیفی جدید (یا از سویه ذخیره در فریزر یا یک منبع قابل اطمینان) و شماره ساخت های جدید از مواد (شامل کدورت استاندارد جدید)، در صورت امکان از سازنده دیگری استفاده شود. اگر مشخص شد که مشکل مربوط به سازنده بوده است، با سازنده تماس گرفته، نتایج آزمایش و سری ساخت مواد را اطلاع دهید. همچنین مبادله سویه های کنترل کیفی و مواد با آزمایشگاه دیگری با استفاده از همان روش برای تعیین ریشه یابی نتایج کنترل کیفی خارج از محدوده قابل قبول زمانی که خطا قابل تشخیص نباشد، می تواند مفید واقع شود. تا زمانیکه مشکل حل شود، ممکن است استفاده از آزمایش به روش جایگزین دیگری لازم باشد.

کنترل تفسیر نقطه قرائت (End-point):

برای به حداقل رساندن اختلاف در تفسیر اندازه هاله عدم رشد در بین قرائت کنندگان نتیجه آزمایش، تفسیر نقطه قرائت (End-point) در فواصل معین پایش شود. همه کارکنان آزمایشگاه که این آزمایش ها را انجام می دهند، باید به طور مستقل یک مجموعه از تست های انتخاب شده را بخوانند، نتایج را ثبت کنند و با نتایج به دست آمده بوسیله یک فرد مجرب مقایسه نمایند، یا وقتی که سویه کنترل کیفی استفاده می شود، با نتایج مورد انتظار جداول 4A و 4B در CLSI M100 27th ed. مقایسه نمایند. عموما اندازه هاله های قرائت شده توسط چند فرد متفاوت نباید بیش از ±2 mm تفاوت داشته باشد.

10- مراجع:

1. کتاب استاندارد عملکردی آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکروبی به روش انتشار از دیسک/ آزمایشگاه مرجع سلامت، غلامرضا ایراجیان و دیگران، 1391
2. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests- Approved Standard, Twelfth Edition; M02–A12, Vol.35 No.1, January 2015
3. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests- Approved Standard, Eleventh Edition; M02–A11, Vol.32 No.1, January 2012
4. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, 27th Edition, January 2017
5. Clinical Microbiology Procedures Handbook, second edition update, Garcia, Lynne S. & Isenberg, Henry D., 2007