

کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش *disk diffusion agar*

هدف

هدف از برنامه کنترل کیفی پایش و ارزیابی موارد زیر می باشد :

- صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت
 - مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش
 - عملکرد افرادی که آزمایش را انجام داده و نتایج بدست آمده را قرائت می نمایند.
- به منظور دست یابی بهینه به این اهداف در دسترس داشتن سویه های کنترل کیفی تهیه شده از مراکز معتبر ضروری است .

سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (یا *E. faecalis* ATCC 33186) برای ارزیابی محیط مولر هینتون آگار با دیسک تری متوپریم / سولفامتوکسازول استفاده می شود. در محیط کشت قابل قبول ، هاله عدم رشد واضحی به قطر 20 mm یا بزرگتر ایجاد می شود. در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابل قبول ، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله ، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از 20 mm ایجاد میگردد. این آزمون به منظور بررسی مقادیر غیر قابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینو گلیکوزید با دوز بالا به کار می رود.

E. coli ATCC 35218 فقط به عنوان یک میکروارگانیزم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتاماز،

مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود .

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات *ESBL* به کار

برده می شود .

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

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

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

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

الف - انجام آزمایش روزانه

برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۲۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد. بر اساس ضریب اطمینان ۹۵٪ تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قرائت شده می تواند خارج از محدوده کنترل باشد. چنانچه بیشتر از یک مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود، که در ادامه توضیح داده می شود.

ب - انجام آزمایش هفتگی

- در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول ۳ و ۳A قرار گیرد، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید.

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

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

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

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

- استفاده از دیسک اشتباه

- استفاده از سویه کنترلی اشتباه

- آلودگی واضح سوویه
 - استفاده غیر عمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون
- بوجود آمده است . در این حال باید دلیل ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح آزمایش دوباره تکرار شود .
اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .
- ب _ عامل ایجاد نتایج خارج از محدوده کنترل نامشخص است.** در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود.
- آزمایش را جهت یک سوویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی برای ۵ روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید .
 - اگر اندازه هر ۵ قطرهاله مطابق جداول ۳ و ۳A و در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .
 - اگر اندازه هر یک از ۵ قطر هاله عدم رشد خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است .
 - آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهایی مشکل پی برده شود .

عملیات اصلاحی اضافی :

- وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد ، احتمالاً خطای مشاهده شده بعلت بروز یک اشکال کلی در سیستم و نه یک خطای تصادفی ایجاد شده است . در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند.مانند:
- اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد
 - رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)
 - مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور
 - تغییر نیافتن یا آلوده نبودن سوویه های کنترل
 - مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند
 - استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از ۲۴ ساعت ، نباشد.)

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

نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسکها باید در یخچال 8°C و پایین تر، یا در فریزر 14°C - و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.
- تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین، آمپی سیلین، کربنی سیلین، تیکارسیلین، اگزاسیلین و نسل اول، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند، و فقط می توان مقداری از آن را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود.
- بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمپینم، سفاکلر و ترکیبات کلانولانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند، پایداری بیشتری خواهند داشت.
- دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند.
- دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند.

Table 3. Acceptable Limits for Quality Control Strains Used to Monitor Accuracy of Disk Diffusion Testing of Nonfastidious Organisms (Using Mueller-Hinton Medium Without Blood or Other Supplements)

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 ^b
Amikacin	30 µg	19-26	20-26	18-26	-
Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	18-24	28-36	-	17-22
Ampicillin	10 µg	16-22	27-35	-	6
Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	19-24	29-37	-	13-19
Azithromycin	15 µg	-	21-26	-	-
Azlocillin	75 µg	-	-	24-30	-
Aztreonam	30 µg	28-36	-	23-29	-
Carbenicillin	100 µg	23-29	-	18-24	-
Cefaclor	30 µg	23-27	27-31	-	-
Cefamandole	30 µg	26-32	26-34	-	-
Cefazolin	30 µg	21-27	29-35	-	-
Cefdinir	5 µg	24-28	25-32	-	-
Cefditoren	5 µg	22-28	20-28	-	-
Cefepime	30 µg	31-37	23-29	24-30	-
Cefetamet	10 µg	24-29	-	-	-
Cefixime	5 µg	23-27	-	-	-
Cefmetazole	30 µg	26-32	25-34	-	-
Cefonicid	30 µg	25-29	22-28	-	-
Cefoperazone	75 µg	28-34	24-33	23-29	-
Cefotaxime	30 µg	29-35	25-31	18-22	-
Cefotetan	30 µg	28-34	17-23	-	-
Cefoxitin	30 µg	23-29	23-29	-	-
Cefpodoxime	10 µg	23-28	19-25	-	-
Cefprozil	30 µg	21-27	27-33	-	-
Ceftazidime	30 µg	25-32	16-20	22-29	-
Ceftibuten	30 µg	27-35	-	-	-
Ceftizoxime	30 µg	30-36	27-35	12-17	-
Ceftobiprole	30 µg	30-36	26-34	24-30	-
Ceftriaxone	30 µg	29-35	22-28	17-23	-
Cefuroxime	30 µg	20-26	27-35	-	-
Cephalothin	30 µg	15-21	29-37	-	-
Chloramphenicol	30 µg	21-27	19-26	-	-
Cinoxacin	100 µg	26-32	-	-	-
Ciprofloxacin	5 µg	30-40	22-30	25-33	-
Clarithromycin	15 µg	-	26-32	-	-
Clinafloxacin	5 µg	31-40	28-37	27-35	-
Clindamycin ^o	2 µg	-	24-30	-	-
Daptomycin ^d	30 µg	-	18-23	-	-
Dirithromycin	15 µg	-	18-26	-	-
Doripenem	10 µg	28-35	33-42	29-35	-
Doxycycline	30 µg	18-24	23-29	-	-
Enoxacin	10 µg	28-36	22-28	22-28	-
Ertapenem	10 µg	29-36	24-31	13-21	-
Erythromycin ^c	15 µg	-	22-30	-	-
Fleroxacin	5 µg	28-34	21-27	12-20	-
Fosfomycin ^e	200 µg	22-30	25-33	-	-
Garenoxacin	5 µg	28-35	30-36	19-25	-
Gatifloxacin	5 µg	30-37	27-33	20-28	-
Gemifloxacin	5 µg	29-36	27-33	19-25	-
Gentamicin ^f	10 µg	19-26	19-27	16-21	-
Grepafloxacin	5 µg	28-36	26-31	20-27	-
Imipenem	10 µg	26-32	-	20-28	-
Kanamycin	30 µg	17-25	19-26	-	-
Levofloxacin	5 µg	29-37	25-30	19-26	-
Linezolid	30 µg	-	25-32	-	-
Lomefloxacin	10 µg	27-33	23-29	22-28	-
Loracarbef	30 µg	23-29	23-31	-	-
Mecillinam	10 µg	24-30	-	-	-

Table 3
Nonfastidious Quality Control
M2-Disk Diffusion

Table 3. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 ^b
Meropenem	10 µg	28-34	29-37	27-33	-
Methicillin	5 µg	-	17-22	-	-
Mezlocillin	75 µg	23-29	-	19-25	-
Minocycline	30 µg	19-25	25-30	-	-
Moxalactam	30 µg	28-35	18-24	17-25	-
Moxifloxacin	5 µg	28-35	28-35	17-25	-
Nafcillin	1 µg	-	16-22	-	-
Nalidixic acid	30 µg	22-28	-	-	-
Netilmicin	30 µg	22-30	22-31	17-23	-
Nitrofurantoin	300 µg	20-25	18-22	-	-
Norfloxacin	10 µg	28-35	17-28	22-29	-
Ofloxacin	5 µg	29-33	24-28	17-21	-
Oxacillin	1 µg	-	18-24	-	-
Penicillin	10 units	-	26-37	-	-
Piperacillin	100 µg	24-30	-	25-33	12-18
Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	24-30	27-36	25-33	24-30
Quinupristin-dalfopristin	15 µg	-	21-28	-	-
Rifampin	5 µg	8-10	26-34	-	-
Sparfloxacin	5 µg	30-38	27-33	21-29	-
Streptomycin ^f	10 µg	12-20	14-22	-	-
Sulfisoxazole ^g	250 µg or 300 µg	15-23	24-34	-	-
Teicoplanin	30 µg	-	15-21	-	-
Telavancin	30 µg	-	16-20	-	-
Telithromycin	15 µg	-	24-30	-	-
Tetracycline	30 µg	18-25	24-30	-	-
Ticarcillin	75 µg	24-30	-	21-27	6
Ticarcillin-clavulanic acid	75/10 µg	24-30	29-37	20-28	21-25
Tigecycline	15 µg	20-27	20-25	9-13	-
Tobramycin	10 µg	18-26	19-29	19-25	-
Trimethoprim ^g	5 µg	21-28	19-26	-	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole ^g	1.25/23.75 µg	23-29	24-32	-	-
Trospectomycin	30 µg	10-16	15-20	-	-
Trovaflaxacin	10 µg	29-36	29-35	21-27	-
Vancomycin	30 µg	-	17-21	-	-

NOTE: Information in boldface type is considered tentative for one year.

Footnotes

- ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.
- Careful organism maintenance is required; refer to [M2-A9, Section 15.3](#).
- When disk approximation tests are performed with erythromycin and clindamycin, *S. aureus* ATCC® BAA-977 (containing inducible *ermA*-mediated resistance) and *S. aureus* ATCC® BAA-976 (containing *msrA*-mediated macrolide-only efflux) are recommended for quality assessment purposes (e.g., training, competency assessment, or test evaluation). *S. aureus* ATCC® BAA-977 should demonstrate inducible clindamycin resistance (i.e., a positive D-zone test), while *S. aureus* ATCC® BAA-976 should not demonstrate inducible clindamycin resistance. *S. aureus* ATCC® 25923 should be used for routine quality control (e.g., weekly or daily) of erythromycin and clindamycin disks using standard Mueller-Hinton agar.
- Some lots of Mueller-Hinton agar are deficient in calcium and give small zones.
- The 200-µg fosfomycin disk contains 50 µg of glucose-6-phosphate.
- For control limits of gentamicin 120-µg and streptomycin 300-µg disks, use *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 (gentamicin: 16 to 23 mm; streptomycin: 14 to 20 mm).
- These agents can be affected by excess levels of thymidine and thymine. See [M2-A9, Section 7.1.4](#) for guidance should a problem with quality control occur.

Table 3A. Acceptable Limits for Quality Control Strains Used to Monitor Accuracy of Disk Diffusion Testing of Fastidious Organisms

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 ^a	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619 ^b
Amoxicillin-clavulanic acid ^c	20/10 µg	15-23	-	-	-
Ampicillin	10 µg	13-21	-	-	30-36
Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	14-22	-	-	-
Azithromycin	15 µg	13-21	-	-	19-25
Aztreonam	30 µg	30-38	-	-	-
Cefaclor	30 µg	-	25-31	-	24-32
Cefdinir	5 µg	-	24-31	40-49	26-31
Cefditoren	5 µg	25-34	-	-	27-35
Cefepime	30 µg	25-31	-	37-46	28-35
Cefetamet	10 µg	23-28	-	35-43	-
Cefixime	5 µg	25-33	-	37-45	16-23
Cefmetazole	30 µg	16-21	-	31-36	-
Cefonicid	30 µg	-	30-38	-	-
Cefotaxime	30 µg	31-39	-	38-48	31-39
Cefotetan	30 µg	-	-	30-36	-
Cefoxitin	30 µg	-	-	33-41	-
Cefpodoxime	10 µg	25-31	-	35-43	28-34
Cefprozil	30 µg	-	20-27	-	25-32
Ceftazidime	30 µg	27-35	-	35-43	-
Ceftibuten	30 µg	29-36	-	-	-
Ceftizoxime	30 µg	29-39	-	42-51	28-34
Ceftobiprole ^d	30 µg	28-36	30-38	-	33-39
Ceftriaxone	30 µg	31-39	-	39-51	30-35
Cefuroxime	30 µg	-	28-36	33-41	-
Cephalothin	30 µg	-	-	-	26-32
Chloramphenicol	30 µg	31-40	-	-	23-27
Ciprofloxacin	5 µg	34-42	-	48-58	-
Clarithromycin	15 µg	11-17	-	-	25-31
Clinafloxacin	5 µg	34-43	-	-	27-34
Clindamycin	2 µg	-	-	-	19-25
Daptomycin ^e	30 µg	-	-	-	19-26
Dirithromycin	15 µg	-	-	-	18-25
Doripenem	10 µg	21-31	-	-	30-38
Enoxacin	10 µg	-	-	43-51	-
Ertapenem	10 µg	20-28	27-33	-	28-35
Erythromycin	15 µg	-	-	-	25-30
Fleroxacin	5 µg	30-38	-	43-51	-
Garenoxacin	5 µg	33-41	-	-	26-33
Gatifloxacin	5 µg	33-41	-	45-56	24-31
Gemifloxacin	5 µg	30-37	-	-	28-34
Grepafloxacin	5 µg	32-39	-	44-52	21-28
Imipenem	10 µg	21-29	-	-	-
Levofloxacin	5 µg	32-40	-	-	20-25
Linezolid	30 µg	-	-	-	25-34
Lomefloxacin	10 µg	33-41	-	45-54	-
Loracarbef	30 µg	-	26-32	-	22-28
Meropenem	10 µg	20-28	-	-	28-35
Moxifloxacin	5 µg	31-39	-	-	25-31
Nitrofurantoin	300 µg	-	-	-	23-29
Norfloxacin	10 µg	-	-	-	15-21
Ofloxacin	5 µg	31-40	-	43-51	16-21
Oxacillin	1 µg	-	-	-	≤ 12 ^f
Penicillin	10 units	-	-	26-34	24-30
Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	33-38	-	-	-
Quinupristin-dalfopristin	15 µg	15-21	-	-	19-24
Rifampin	5 µg	22-30	-	-	25-30

Table 3A. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 ^a	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619 ^b
Sparfloxacin	5 µg	32-40	-	43-51	21-27
Spectinomycin	100 µg	-	-	23-29	-
Telavancin	30 µg	-	-	-	17-24
Telithromycin	15 µg	17-23	-	-	27-33
Tetracycline	30 µg	14-22	-	30-42	27-31
Tigecycline	15 µg	23-31	-	30-40	23-29
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	24-32	-	-	20-28
Trospectomycin	30 µg	22-29	-	28-35	-
Trovafoxacin	10 µg	32-39	-	42-55	25-32
Vancomycin	30 µg	-	-	-	20-27

Disk Diffusion Testing Conditions for Clinical Isolates and Performance of Quality Control

Organism	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Streptococci and <i>Neisseria meningitidis</i>
Medium	<i>Haemophilus</i> Test Medium	GC agar base and 1% defined growth supplement. The use of a cysteine-free growth supplement is not required for disk diffusion testing.	MHA supplemented with 5% defibrinated sheep blood
Inoculum	Direct colony suspension	Direct colony suspension	Direct colony suspension
Incubation Characteristics	5% CO ₂ ; 16 to 18 hours; 35 °C	5% CO ₂ ; 20 to 24 hours; 35 °C	5% CO ₂ ; 20 to 24 hours; 35 °C

NOTE: Information in boldface is considered tentative for one year.

Footnotes

- ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.
- Despite the lack of reliable disk diffusion interpretive criteria for *S. pneumoniae* with certain β-lactams, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 is the strain designated for quality control of all disk diffusion tests with all *Streptococcus* spp.
- When testing *Haemophilus* on HTM, the acceptable limits for QC strain *E. coli* ATCC® 35218 are 17 to 22 mm for amoxicillin-clavulanic acid when incubated in ambient air.
- Either *H. influenzae* ATCC® 49247 or 49766 may be used for routine quality control testing.
- Some lots of Mueller-Hinton agar are deficient in calcium and give small zones.
- Deterioration in oxacillin disk content is best assessed with QC organism *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, with an acceptable zone diameter of 18 to 24 mm.