



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



# آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

تست آنتی بیوگرام

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Quality Control of Antimicrobial Susceptibility Tests



# مقدمه:

## تعریف آنتی بیوتیک:

فرآورده های بیولوژیکی هستند که از میکروارگانیزم ها به دست می آیند. اغلب باکتریها مانند استرپتومایسس و برخی قارچها همچون پنی سیلیوم به عنوان آنتی بیوتیک مورد استفاده قرار می گیرند که برای جلوگیری از رشد باکتری هاست. از لحاظ تاریخی اولین آنتی بیوتیک توسط **فلمنگ** از قارچ **پنی سیلیوم نواتوم** بدست آمد که آن را **پنی سیلین** نامگذاری کرد. اکنون سوش صنعتی تولید پنی سیلین از **پنی سیلیوم گریزورنوم** تهیه می شود.

## ویژگی های آنتی بیوتیک:

معمولا آنتی بیوتیک های زیادی به صورت فرآورده های میکروبی یا به صورت مصنوعی سنتز می شوند. کمتر آنتی بیوتیکی که توان استفاده از آن برای موجودات زنده از جمله انسان را نداشته باشد را می توان نام برد. یک آنتی بیوتیک خوب ، آنتی بیوتیکی است که بر روی موجود زنده با کمترین عوارض جانبی اثر کند. آنتی بیوتیک باید از لحاظ اقتصادی ، ارزان باشد. از دیگر ویژگی های آنتی بیوتیک قابل حل بودن در مایعات بیولوژیک و دارا بودن حداقل توکسیسیته (سمیت) یا عدم سمی بودن عدم ایجاد ایجاد الرژی، به راحتی متابولیزه شدن و دفع شدن توسط کبد و کلیه ها می باشند.

زمانی که می خواهیم آنتی بیوتیک مناسبی جهت درمان را انتخاب کنیم به تست آنتی بیوگرام احتیاج داریم. معمولا برای این کار ، نمونه را بر روی محیط کشت توسط سواب کشت داده و گرما گذاری می کنیم. هاله عدم رشد ایجاد شده را بوسیله خط کش اندازه می گیریم و با جدول استاندارد مقایسه می کنیم و بهترین را برای درمان برمی گزینیم.

# زمینه ی نظری

در علم میکروب شناسی به این دسته از دارو ها که بروی باکتری ها اثر می گذارند آنتی بیوتیک می گویند . هر دسته از آنتی بیوتیک ها بر روی باکتری خاصی تاثیر دارد و این دارو ها بر روی ویروس و یا سایر میکروارگانیسم ها تاثیری نخواهند داشت. این تست به ما نشان می دهد که کدام یک از آنتی بیوتیک ها بر روی میکروب مورد نظر موثر است . همانطور که می دانید نمونه های گرفته شده برای بخش میکروبیولوژی متفاوت هستند . اما نمونه ها هر چی که باشند (خون ، مایع مغزی-نخائی ، مدفوع ، ادرار ، خلط و ..) در آخر معمولا آنتی بیوگرام می شوند تا داروی موثر تجویز شود.

# روش کار

5

- 1- تهیه رقت مشخصی از باکتری زیرا اگر کم یا زیاد باشد نتیجه تست کاذب می شود. برای تهیه رقت مناسب از روش مک فارلند استفاده کنید. در این روش مقدار باکتری را با استاندارد از کدورت که توسط کلرور باریم و یا سولفات جیوه می سنجیم. در ۰,۵ مک فارلند ۱۸۰۰۰۰۰۰۰۰ عدد باکتری وجود دارد. همچنین کشت بر روی نوترینت آگار انجام می شود
- 2- با استفاده از سوآب در محیط کشت مولر-هینتون آگار کشت چمنی می دهیم به طوری که نمونه سطوح را در بر بگیرد
- 3- با استفاده از پنس استریل شده توسط الکل و شعله، یک دیسک آنتی بیوتیک را بردارید و به گونه ای روی پلیت قرار دهید که از دیواره و از سایر دیسک ها حداقل ۲ سانتی متر فاصله داشته باشد

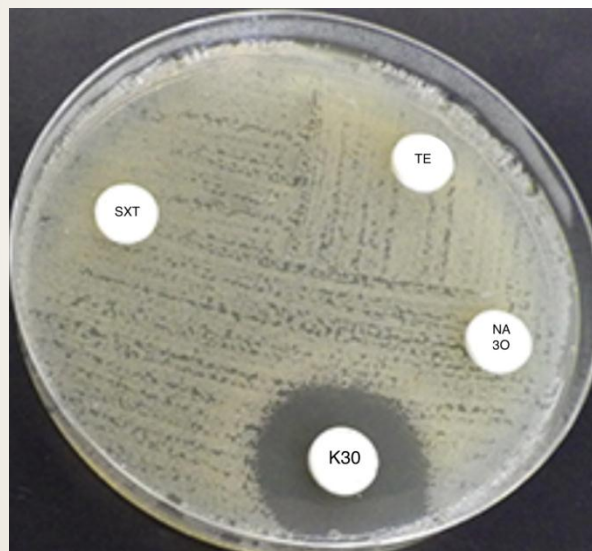


- ۴ - پلیت را درون انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار دهید
- ۵ - قطر مناطقی که دیسک ها را در آن قرار دادید و هاله فاقد باکتری ( **Zone of inhibition** ) دارد را با خط کش به دست آورید
- ۶ - اگر قطر منطقه از ۱۵ میلی متر بیشتر بود یعنی باکتری به آن آنتی بیوتیک حساس است و اگر کمتر بود ولی هاله قابل مشاهده است یعنی باکتری به آن آنتی بیوتیک نیمه حساس است البته این مقادیر نسبی است و باید از جدول زیر محاسبه کرد



هلازله جيت انتحاب آنتي بيوتيک ماسه سرد، جودا کتري

گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴
استافیلوکوکوس آرنديس انروکوکينا	پس سيلين	آمپيلين	سودوموناس
پنيسيلين	آمپيسيلين	سفالوتري	حتاماسير
پانوگراسيلين	متسيلين	ارثرومايسين	کازميسيلين
متسيلين	سفالوتري	کترآمسکل	پان مگسن ب
سفالوتري	ارثرومايسين	ترانسکلين	کاماماسين
ارثرومايسين	کتينداماسين	کترآمسکل	کازآمسکل
کترآمسکل	ترانسکلين	سره فراموسين +	ترانسکلين
ترانسکلين	حتاماسين	بالدنگک اسد +	کترآمسکل
حتاماسين	کاماماسين	سولنو بامدها -	سولنو بامدها

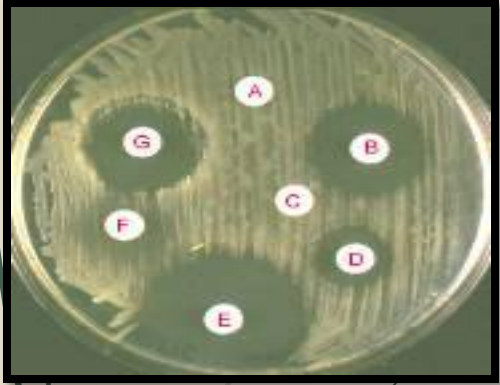


تهيه کننده : سهيلا عباسي

تفسير نطر هاله معانيد ار رشد آنتي بيوتيکها (Z.O.I)

قدرت ديسک	نطر هاله معانيد ار رشد بر حسب سلولر مايزون (mm)		آنتي بيوتيک با داروي شماني صدمگري
	حساس	حساسيت متوسط	
۱۰ میکروگرم	۱۴ يا سير	۱۳-۱۲	ماکري هاي کرم صفي و آسروکوکينا
۱۰	۱۹	۲۸-۲۱	آمپيلين
۱۰	۲۹	---	استافيلوکوکينا و ماکروبهاي سيار حساس ما سيلين فوسيسون آنتلوآ ترا
۱۰ واحد	۱۳	۱۲-۹	پاستراسين
۱۰ میکروگرم	۱۶	۱۵-۱۲	سفالوريدين
۳۰	۱۸	۱۷-۱۵	سفالوتري
۳۰	۱۸	۱۷-۱۵	سوکريتين
۳۰	۱۸	۱۷-۱۳	کترآمسکل
۱۰	۱۱	۱۰-۹	کيسلين
۱۵	۱۸	۱۷-۱۳	ارثرومايسين
۳۰	۱۸	۱۷-۱۲	کاماماسين
۵	۱۳	۱۲-۱۰	متسيلين
۱	۱۲	۱۳-۱۰	مستيلين و اگراسيلين
۳۰	۱۳	۱۲-۱۱	اسد تاندنگک
۳۰	۱۹	۱۸-۱۳	اسد آسونسک

# Antimicrobial Susceptibility Tests



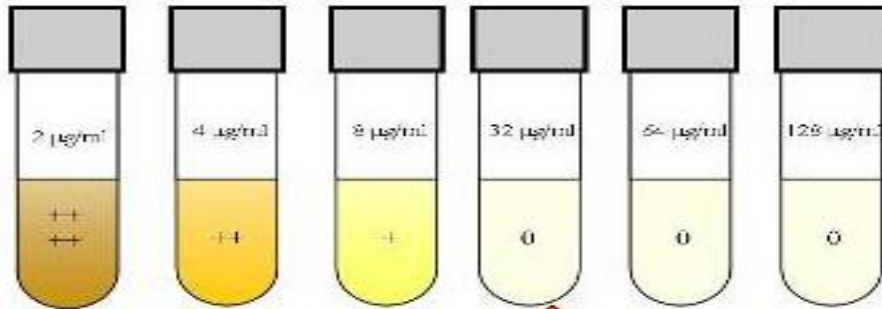
provide information for selection of an appropriate agent for antimicrobial therapy



# AST Methods Interpretation

- ➔ **agar disk diffusion method** provides qualitative interpretive category results of susceptible, intermediate, and resistant
- ➔ **microdilution and agar gradient diffusion methods** provide a quantitative result, a minimum inhibitory concentration

# AST Methods



Tubes with broth media, bacteria, and increasing amounts of antimicrobial

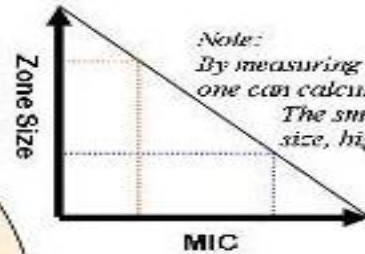
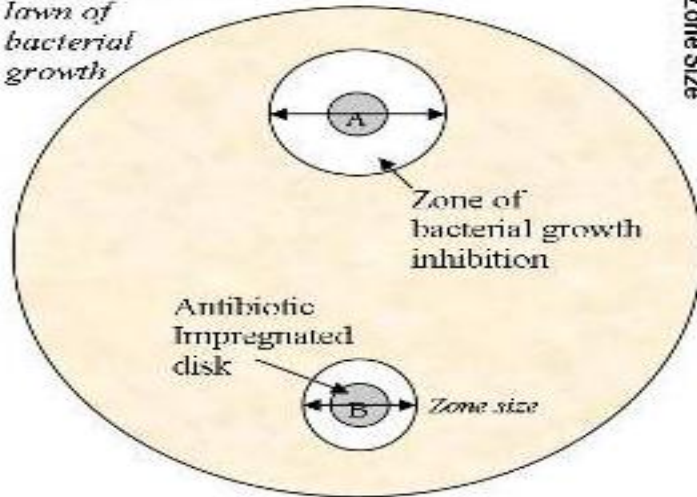
Minimum Inhibitory Concentration

Broth Dilution Susceptibility Testing

**Susceptibility Testing determines if bacteria is likely to be inhibited by an antimicrobial.**

**Susceptibility is based on the concentration required to reduce growth below the visible level (see MIC).**

Agar plate with a lawn of bacterial growth



Note:  
 By measuring the zone size, one can calculate the MIC.  
 The smaller the zone size, higher the MIC.

Disk Diffusion Susceptibility Testing

## Sensitive

A bacteria is said to be sensitive to an antimicrobial if growth is inhibited by concentration that is **EASILY** and **SAFELY** achieved in the patient's **BLOODSTREAM**.

A positive clinical response by the patient is anticipated.

## Resistant

The opposite of Sensitive.

# References

## Clinical and Laboratory Standards Institute French Society of Microbiology British Society for Antimicrobial Chemotherapy

M2-A9  
 ISBN 1-56238-586-0  
 ISSN 0273-3099

Volume 26 Number 1  
**Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Ninth Edition**

Matthew A. Wikler, MD, MBA, FIDSA	Donald E. Low, MD
Franklin R. Cockerill, III, MD	Daniel J. Sheehan, PhD
William A. Craig, MD	Fred C. Tenover, PhD, ABMM
Michael N. Dudley, PharmD	John D. Turnidge, MD
George M. Eliopoulos, MD	Melvin P. Weinstein, MD
David W. Hecht, MD	Barbara L. Zimmer, PhD
James F. Hindler, MCLS, MT(ASCP)	

Mary Jane Ferraro, PhD, MPH  
 Juna M. Swenson, MMSc


**Abstract**

Susceptibility testing is indicated for any organism that contributes to an infectious process warranting antimicrobial chemotherapy, if its susceptibility cannot be reliably predicted from knowledge of the organism's identity. Susceptibility tests are most often indicated when the causative organism is thought to belong to a species capable of exhibiting resistance to commonly used antimicrobial agents.

A variety of laboratory methods can be used to measure the *in vitro* susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. In many clinical microbiology laboratories, an agar disk diffusion method is used routinely for testing common, rapidly growing, and certain fastidious bacterial pathogens. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9—*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Ninth Edition* includes a series of procedures to standardize the way disk diffusion tests are performed. The performance, applications, and limitations of the current CLSI-recommended methods are also described.

The supplemental information (M100 tables) presented with this standard represents the most current information for drug selection, interpretation, and quality control using the procedures standardized in M2. These tables, as in previous years, have been updated and altered; replace tables published in earlier years. Changes in the tables since the most recent edition (M100-S16) appear in boldface type. Additionally, a glossary of antibiotic terms, classes, and abbreviations (for use with antimicrobial susceptibility testing disks and other *in vitro* test devices) has been added to the tables. It is anticipated that this glossary will provide an additional informational resource to users of the M2 standard, as it defines antimicrobial terminology used in the susceptibility testing documents that may be unfamiliar or confusing to laboratory users. The glossary, as part of the M100 tabular information, will be continuously updated in future (yearly) revisions of M100.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Ninth Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9 (ISBN 1-56238-586-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.

 **CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE**  
 Formerly NCCLS  
 Following NCCLS standards and guidelines, ISO/TC 112 standards, and ISO/TC 76 standards

 **Société Française de Microbiologie**  
Association reconnue d'Utilité Publique, créée le 17 Mai 1959 (A.O.C. n° 178)

COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE  
**Recommandations 2007**  
 (Edition de Janvier 2007)

Coordonnateur : Pr C.J. SOUSSY  
 Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor  
 94010 Créteil Cedex  
 Tel. : (33) (0)1 49 81 28 31 - Fax : (33) (0)1 49 81 28 39  
 E-mail : claude-james.soussy@hmn.aphp.fr

Membres (en 2006) : J.D. CAVALLIO, H. CHARDON, C. CHIDIAC, P. CHOUTET,  
 P. COURVALIN, H. DABERNAT, H. DRUGÉON, L. DUBREUIL, F. GOLDSTEIN,  
 B. GUERY, V. JARLIER, T. LAMBERT, R. LECLERCQ, M.H. NICOLAS-CHANOINE,  
 C. QUENTIN, B. ROUVEIX, C.J. SOUSSY, E. VARON.

Ce document peut être téléchargé depuis le site internet de la Société Française de Microbiologie : <http://www.sfm.asso.fr/>

 **BSAC**  
 british society for antimicrobial chemotherapy

BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing

**Version 7.1, February 2008**

All enquiries to: Jenny Andrews at: + 44 (0) 121 507 8893  
 Email: [jenny.andrews@swtch.nhs.uk](mailto:jenny.andrews@swtch.nhs.uk)

## Example from an excerpt from Reference: Selection of Drug to Test

**Table 1. Suggested Groupings of U.S. FDA-Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Microbiology Laboratories**

GROUP A PRIMARY TEST AND REPORT	Enterobacteriaceae <sup>a</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter</i> spp. <sup>j</sup>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>m</sup>
	Ampicillin <sup>q</sup>	Ceftazidime	Oxacillin <sup>k</sup>	Penicillin <sup>n</sup> or ampicillin
	Cefazolin <sup>a</sup> Cephalothin <sup>a</sup>	Gentamicin	Penicillin <sup>k</sup>	
	Gentamicin	Mezlocillin or ticarcillin Piperacillin		
GROUP B SECONDARY TEST	Amikacin	Amikacin	Azithromycin <sup>b</sup> clarithromycin <sup>b</sup> or erythromycin <sup>b</sup>	Linezolid
	Amoxicillin-clavulanic acid or ampicillin-sulbactam Piperacillin-tazobactam Ticarcillin-clavulanic acid	Aztreonam Cefoperazone	Clindamycin <sup>d</sup>	Quinupristin- dalfopristin <sup>q</sup>
	Cefamandole or cefonicid or cefuroxime			Vancomycin <sup>o</sup>
	Cefepime	Cefepime	Linezolid	
		Trimethoprim-		



# Where errors can occur in susceptibility testing

- ▶ media
- ▶ antimicrobials
- ▶ inoculum
- ▶ incubation
- ▶ equipment
- ▶ interpretation



# Reference Strains

*E. coli* ATCC 25922

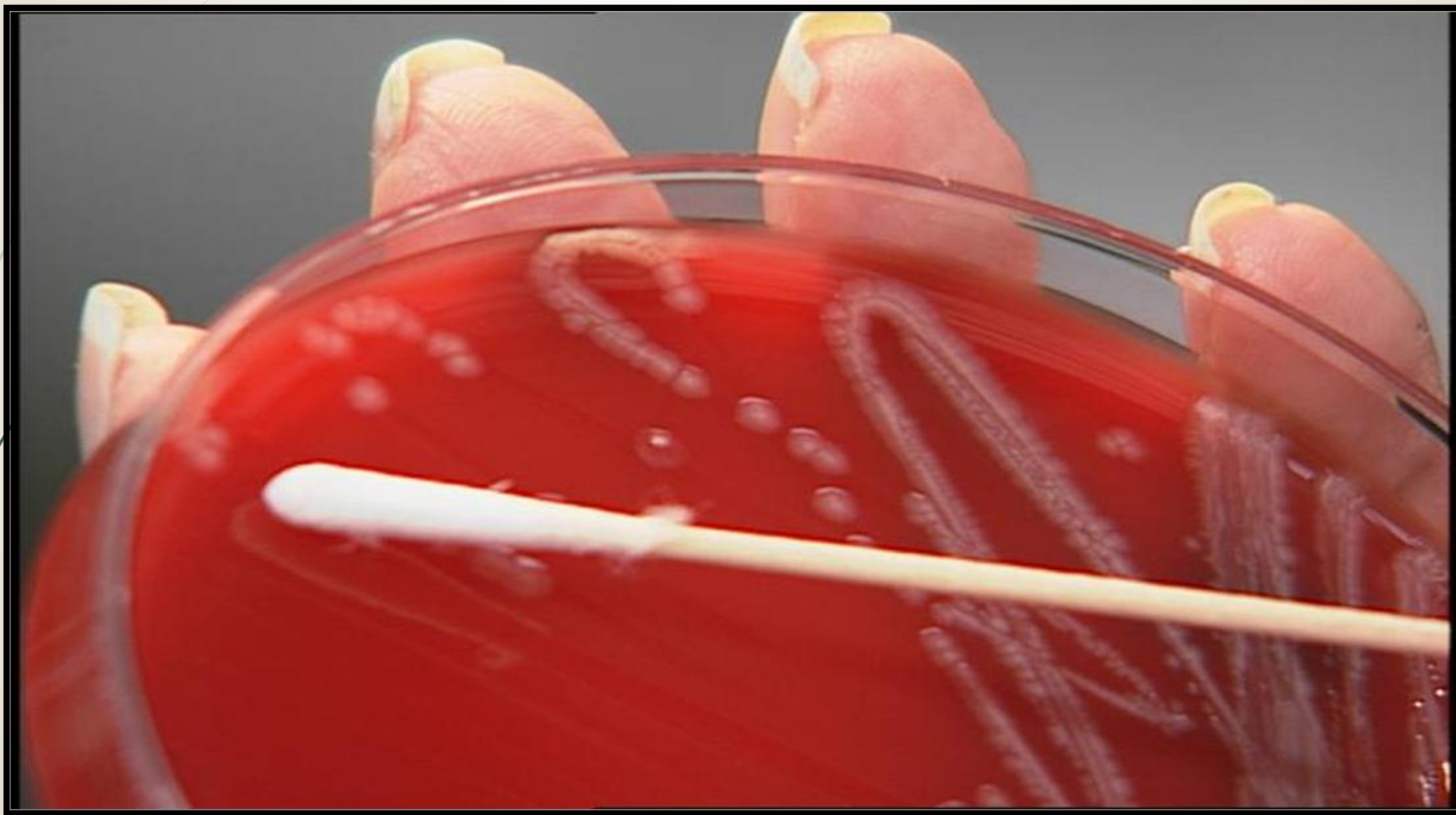
*S. aureus* ATCC 25923

*P. aeruginosa* ATCC 27853

QC organisms must be obtained from reputable source

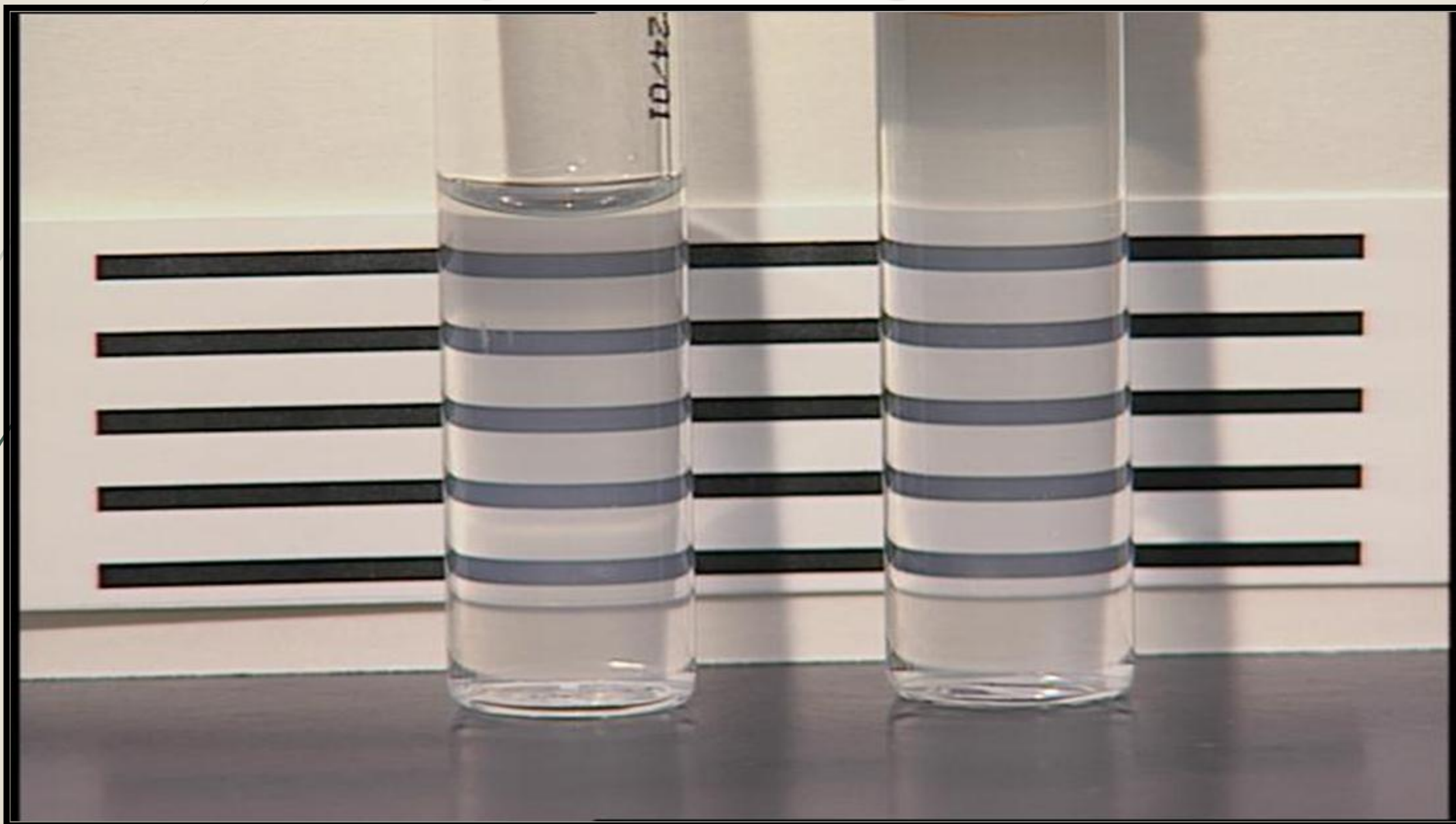
Use specific QC organisms to test different groups of “drug-bug” combinations

## Selection of a Colony to Test





# MacFarland 0.5 and Adjusted Test Organism



# Use of Disk Dispensers

## Advantages

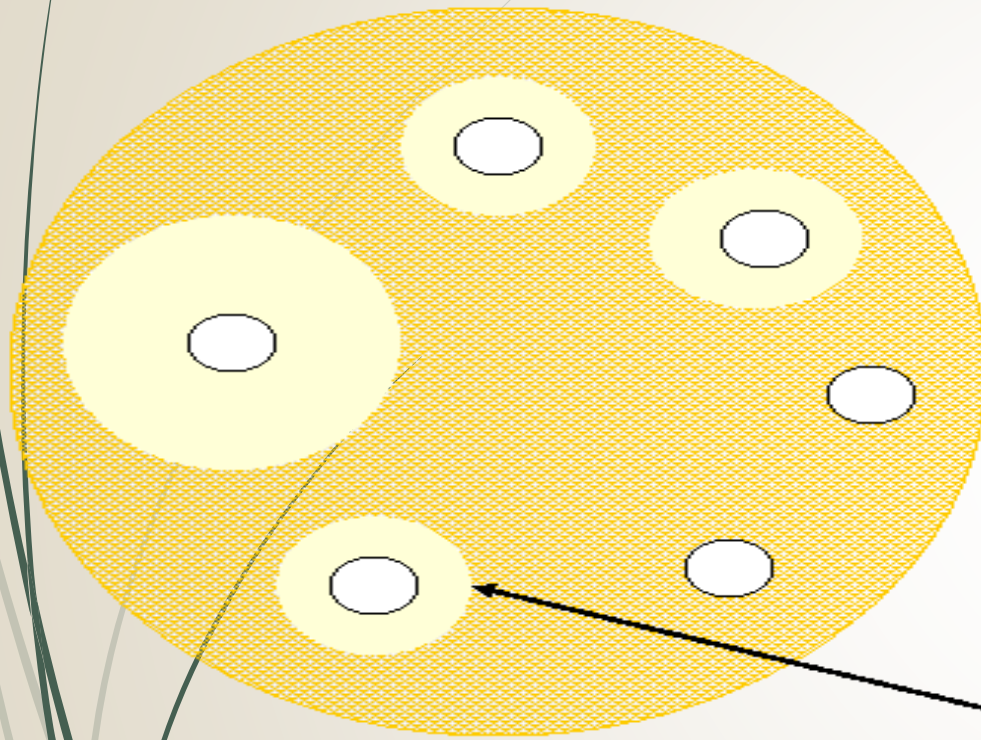
- ❖ practical, rapid
- ❖ increase reproducibility

## Risks:

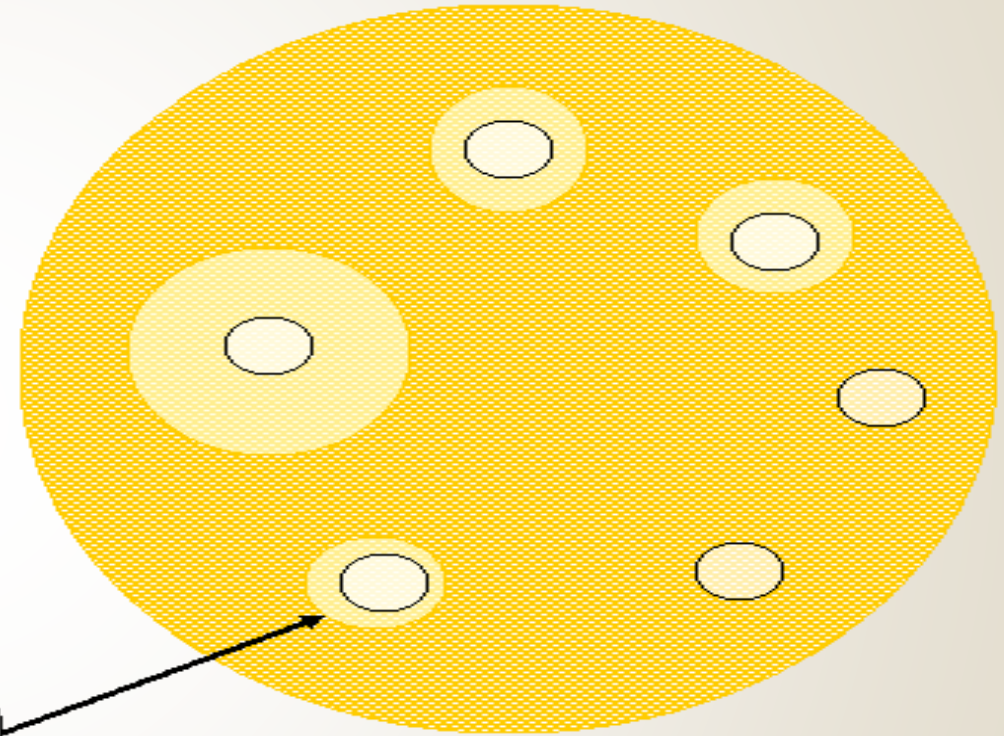
- ❖ contamination
- ❖ reduces personal judgment skills



# Disk Susceptibility Testing Problems



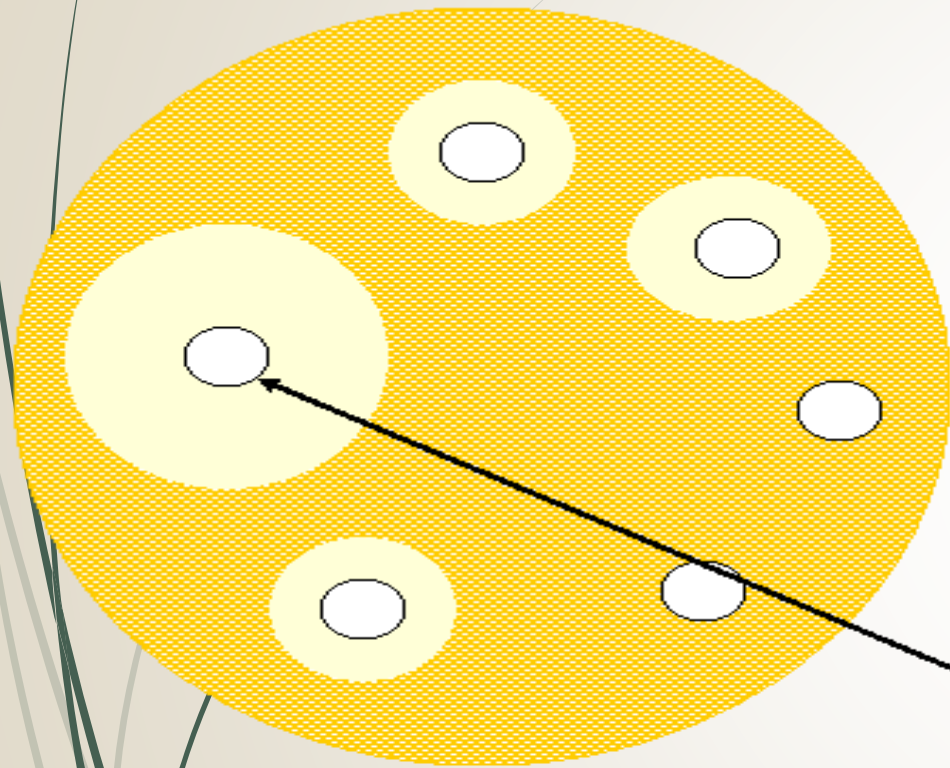
Disks Properly  
Aligned and Spaced



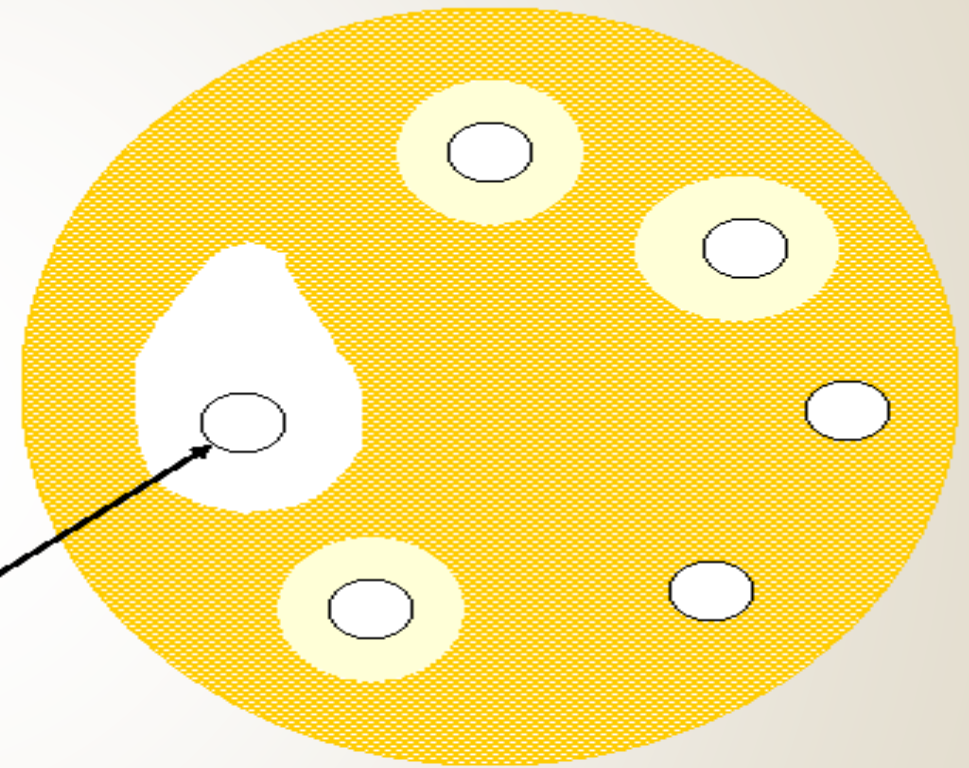
Disks Aligned and Spaced  
**Inoculum too HEAVY**



# Disk Susceptibility Testing Problems



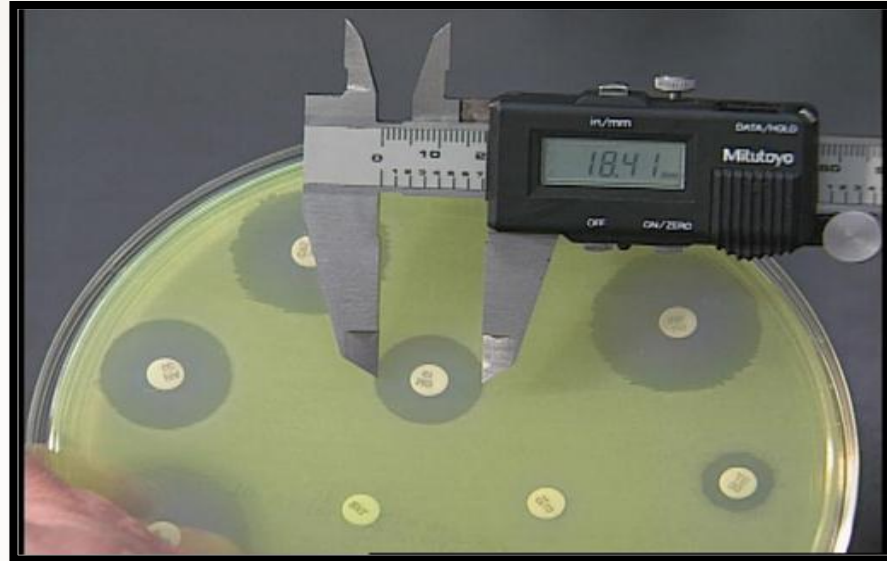
Disks Properly  
Aligned and Spaced



Zone space distorted  
because disk not  
properly applied



# Measuring Conditions

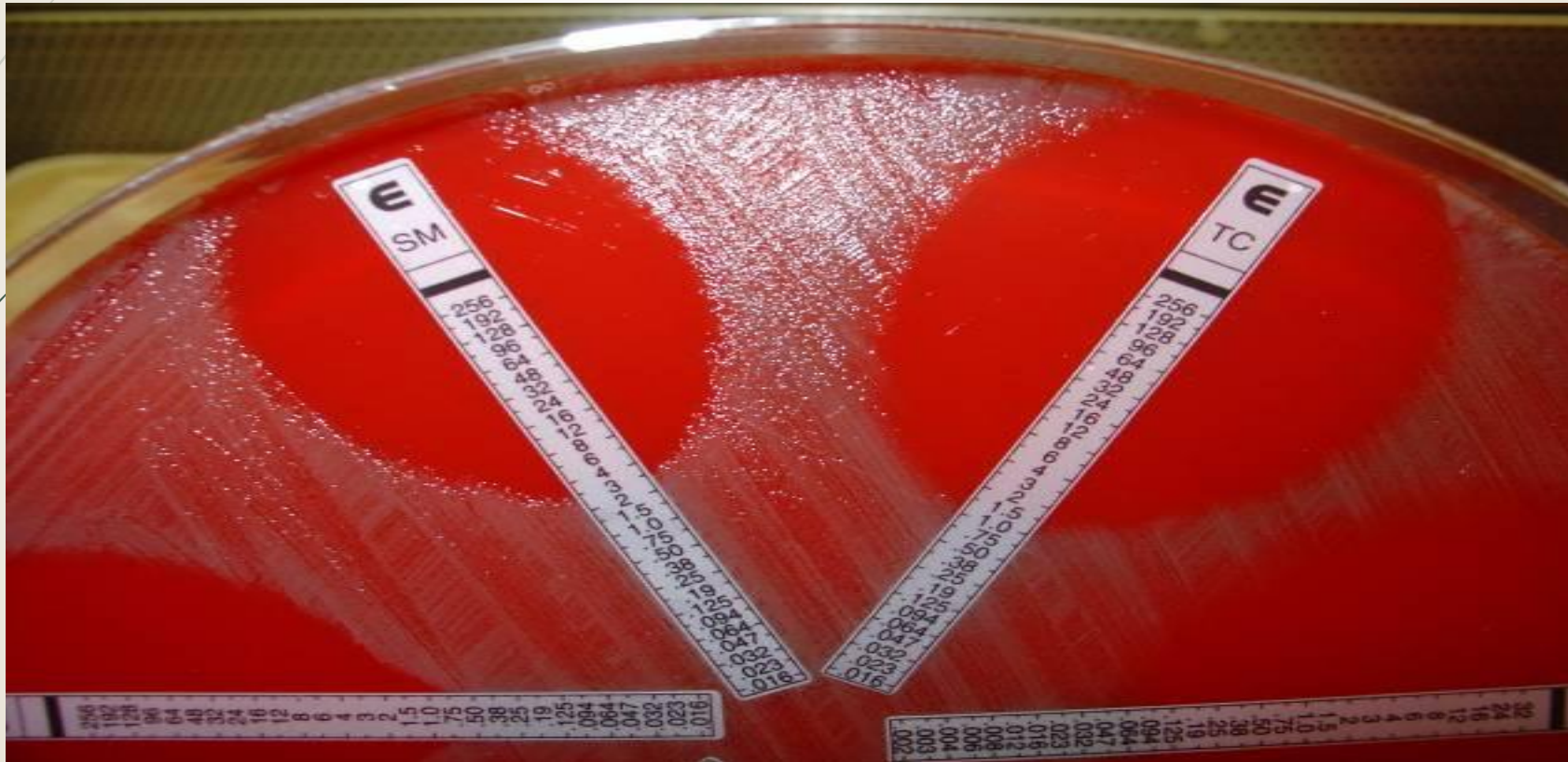


Calipers

Ruler

- read with good light, and from the back of the plate ❖
- zone size reading is drug specific ❖
- magnification may help ❖
- millimeters matter ❖

# Etest – antimicrobial gradient method



## Patient results may be incorrect if:

- the organism was misidentified
- a clerical error was made
- inappropriate choice of antimicrobials were tested and reported
- the wrong patient's sample was examined
- the wrong test was ordered
- the sample was not preserved properly



# نتیجه

24

- نمونه مورد آزمایش *E. Coli* بود.
- آنتی بیوتیک های استفاده شده ( TRIMETHOPRIM SULFAMETHOX AZ, TETRACYCLINE, NALIDIXIC ACID, KANAMYCIN).
- باکتری ها فقط به KANAMYCIN حساسیت متوسط نشان دادن، و هاله ای به قطر ۱۶ میلی متر حاصل شد که با توجه به جدول صفحه بعد در محدوده متوسط است.
- باکتری ها به سایر آنتی بیوتیک ها مقاوم بودن و حتی هاله هم تشکیل نشد.



