کارگاه میکروب شناسی

دکترسارا بابازاده
متخصص پاتولوژی
استادیار دانشگاه علوم پزشکی بابل
خرداد 1402

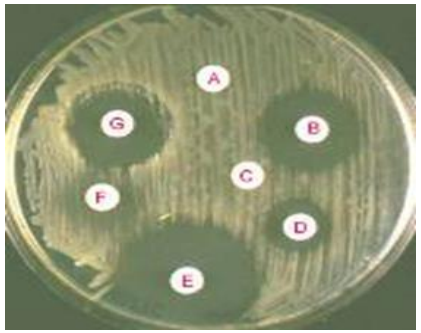
TechSmith Camtasia™

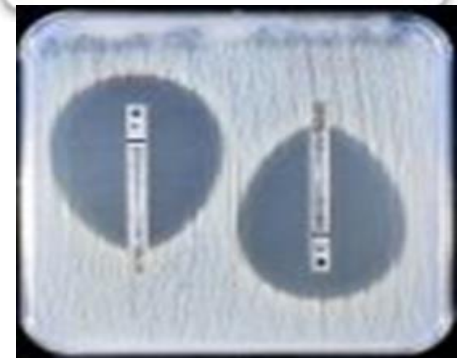
Inhibitory Methods for Susceptibility Testing

1. Disk Diffusion

2. Dilution Testing

3. Epsilometer





TechSmith Camtasia™

Media for non-fastidious organisms

Organisms	Medium
Enterobacterales *Pseudomonas* spp. *Stenotrophomonas maltophilia* *Acinetobacter* spp. *Staphylococcus* spp. *Enterococcus* spp. *Aeromonas* spp. *Achromobacter xylosoxidans* *Bacillus* spp. *Burkholderia pseudomallei*	Mueller-Hinton agar

TechSmith Camtasia™

۱.۷ مولر هینتون آگار[۲]

از میان انواع محیط‌های کشت موجود، زیرکمیته برای آزمایش روتین تعیین حساسیت باکتری‌های کم‌نیاز(nonfastidious)، به دلایل ذیل مولر هینتون آگار را به‌عنوان بهترین محیط درنظر گرفته‌است:

- در سری ساخت‌های متفاوت، تکرارپذیری قابل قبولی را نشان‌می‌دهد.
- مهارکننده‌های آن به‌حدی اندک است که نمی‌تواند نتایج آزمایش حساسیت سولفونامید، تری‌متوپریم و تتراسایکلین‌ها را تحت تأثیر قراردهد.
- رشد اکثر عوامل بیماری‌زای کم نیاز را به‌طور مطلوب تأمین می‌کند.
- حجم زیادی از داده‌ها و تجربه‌ها در ارتباط با آزمایش تعیین حساسیت با این محیط کشت گردآوری شده‌است.

TechSmith Camtasia™

Media for fastidious organisms

نام باکتری	نوع محیط جهت تست حساسیت دارویی	شرایط باکتری رشد یافته	زمان انکوباسیون	شرایط انکوباسیون	باکتری‌های کنترل کیفی
گونه‌های هموفیلوس	HTM	رشد ۲۴-۲۰ ساعته در محیط شکلات آگار	۱۸-۱۶ ساعت	CO2٪۵-۷ ۳۵ درجه سانتی گراد	H. Influenzae ATCC 49247
نایسریا گونوره	GC Agar محیط پایه وSuplement	رشد ۲۴-۲۰ ساعته در محیط شکلات آگار	۲۴-۲۰ ساعت	CO2۵-۷ ٪۳۵ درجه سانتی گراد	N. Gonorrhoeae ATCC 49226
استرپتوکوکوس پنومونیه و سایر استرپتوکک‌ها	محیط مولر هنیتون آگار + ۵٪ خون گوسفند	رشد ۱۸-۱۶ ساعته از بلادآگار خون گوسفند	۲۴-۲۰ ساعت	CO2٪۵-۷ ۳۵ درجه سانتی گراد	S. Pneumoniae ATCC 49619

TechSmith Camtasia™

Media for fastidious organisms

نام باکتری	نوع محیط	شرایط باکتری رشد یافته	شرایط انکوباسیون	زمان انکوباسیون	باکتری کنترل کیفی
گونه های استرپتوکوک بتا همولیتیک	محیط مولر هنیتون آگار + ۵٪ خون گوسفند	رشد ۱۸-۱۶ ساعته از بلادآگار خون گوسفند	CO2٪۵ ۳۵ درجه سانتی گراد	۲۴-۲۰ ساعت	S. Pneumoniae ATCC 49619
استرپتوکوک ویریدنس	محیط مولر هنیتون آگار + ۵٪ خون گوسفند	رشد ۱۸-۱۶ ساعته از بلادآگار خون گوسفند	CO2٪۵ ۳۵ درجه سانتی گراد	۲۴-۲۰ ساعت	S. Pneumoniae ATCC 49619
نایسریا منتژیتیدیس	مولر هینتون آگار با ۵٪ خون گوسفند	رشد ۱۸-۱۶ ساعته از بلادآگار خون گوسفند	CO2٪۵ ۳۵ درجه سانتی گراد	۲۴-۲۰ ساعت	E.Colie ATCC 25922

TechSmith Camtasia™

B1.2 مولر هینتون آگار + ۵٪ خون گوسفند

۱. طبق روش ذکرشده در بند (۲) B1.1 محیط مولر هینتون آگار را تهیه‌کنید. زمانی که محیط کشت تا دمای ۵۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد خنک شد، ۵۰mm خون دفیبرینه گوسفند را به ۱ لیتر مولر هینتون آگار اضافه‌نمایید. روش توصیه‌شده در B1.1 را ادامه‌دهید.

۲. بعد از افزودن خون با رعایت شرایط سترونی به محیط اتوکلاوشده خنک، pH را اندازه گیری نمایید. pH نهایی باید به‌اندازه قبل از افزودن خون و معادل ۷/٤-۷/۲ باشد.

TechSmith Camtasia™

B1.3 آگار GC + ۱٪ فاکتور رشد

۱. به ازای هر لیتر محیط، از ۱٪ فاکتور رشد معین که حاوی ترکیبات ذیل است، استفاده‌کنید:

• L-cystine	1.1 g
• guanine HCl	0.03 g
• thiamine HCl	0.003 g
• p-aminobenzoic acid	0.013 g
• vitamin B12	0.01 g
• thiamine pyrophosphate (cocarboxylase)	0.1 g
• nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	0.25 g
• adenine	1 g
• L-glutamine	10 g
• glucose	100 g
• ferric nitrate	0.02 g
• L-cysteine HCl	25.9 g

۲. محیط پایه آگار GC را از پایه دهیدراته تجاری و براساس دستورالعمل تولیدکننده تهیه‌نمایید.

۳. بعد از اتوکلاو نمودن، آن را تا دمای ۵۰–۴۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری ۵۰–۴۵ درجه سانتی‌گراد خنک نمایید.

٤. ۱۰mL از ۱٪ فاکتور رشد معین را به آن اضافه‌نمایید.

TechSmith Camtasia™

B1.4 هموفیلوس تست مدیوم(HTM)[1]

HTM به شکل جامد (آگار) حاوی ترکیبات ذیل است:

- MHB
- β-NAD 15 µg/mL
- bovine or porcine hematin 15 µg/mL
- yeast extract 5 g/L

۱. برای تهیه محلول تازه هماتین مادر(stock)، در ابتدا ۵۰mg پودر هماتین را به ۱۰۰mm از NaOH ۰/۰۱mol/L اضافه‌کنید. با استفاده از حرارت و چرخاندن مداوم، از حل شدن آن اطمینان حاصل نمایید.

۲. محلول مادر(stock) NAD را با حل کردن ۵۰mg از پودر NAD در ۱۰mL آب مقطر تهیه کنید. با فیلتر نمودن آن را استریل نمایید.

۳. محیط مولر هینتون آگار را از محیط پایه دهیدراته تجاری و براساس دستورالعمل تولیدکننده تهیه‌نمایید. ۵g عصاره مخمر و ۳۰mL از محلول هماتین مادر را به ۱ لیتر مولر هینتون آگار اضافه‌نمایید.

٤. بعد از اتوکلاو نمودن، آن را تا دمای ۵۰-٤۵ درجه سانتی‌گراد خنک نمایید.

۵. با رعایت شرایط سترونی ۳mL از محلول ذخیره NAD را به آن اضافه نمایید.

٦. pH نهایی باید بین ۷/٤- ۷/۲ باشد.

TechSmith Camtasia™

Summary of Disk Diffusion Susceptibility Testing Conditions

Organism Groups	Test Medium (Agar)	Inoculum Size(CFU/mL)	Incubation Conditions	Incubation Duration
Enterobacterales	Mueller-Hinton Agar (MHA)	Swab from 1.5 × 10^8 suspension	35°C; room air	16–18 h
Pseudomonas aeruginosa	MHA	Swab from 1.5 × 10^8 suspension	35°C; room air	16–18 h
Enterococci	MHA	Swab from 1.5 × 10^8 suspension	35°C; room air	16–18 h (24 for vancon R [a])
Staphylococci (to detect methicillin-resistance)	MHA (add 2% NaCl for meth-R)	Swab from 1.5 × 10^8 suspension	30°–35°C; air (temp >35°C may mask meth-R)	16–18 h (24 for met and vancon R [a])
***Streptococcus pneumoniae* and other streptococci**	MHA plus 5% sheep blood	Swab from 1.5 × 10^8 suspension	35°C; 5%–7% carbon dioxide (CO_2)	20–24 h
Haemophilus influenzae	*Haemophilus* test medium	Swab from 1.5 × 10^8 suspension	35°C; 5%–7% CO_2	16–18 h
Neisseria gonorrhoeae	GC agar plus supplements	Swab from 1.5 × 10^8 suspension	35°C; 5%–7% CO_2	20–24 h

۸. تهیهٔ سوسپانسیون میکروبی برای انجام آزمایش تعیین حساسیت به روش انتشار از دیسک[۱]

۱.۸ کدورت استاندارد برای تهیهٔ سوسپانسیون[۲]

جهت استانداردکردن غلظت مایه میکروبی برای آزمایش‌های تعیین حساسیت، باید از کدورت استاندارد استفاده‌شود. کدورت استاندارد، با سولفات باریم($BaSo_4$) معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند ساخته‌می‌شود، یا از معادل نوری آن استفاده‌می‌شود(برای مثال، سوسپانسیون ذرات لاتکس). استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند سولفات باریم را مطابق پیوست B تهیه‌کنید. به‌جای آن می‌توان از یک وسیله نورسنجی(photometric) استفاده‌کرد.

TechSmith Camtasia™

OD بین 0.08-0.13 در طول موج 625 نانومتر

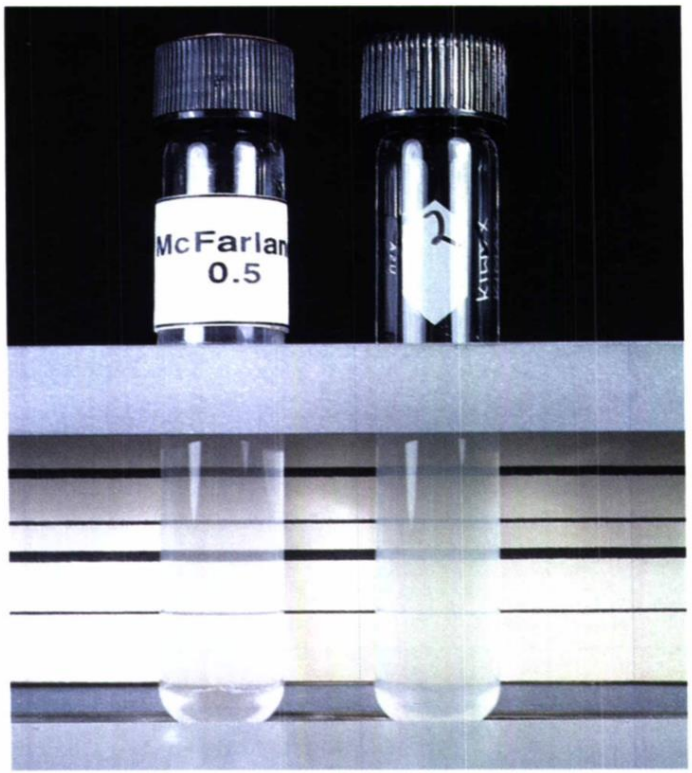
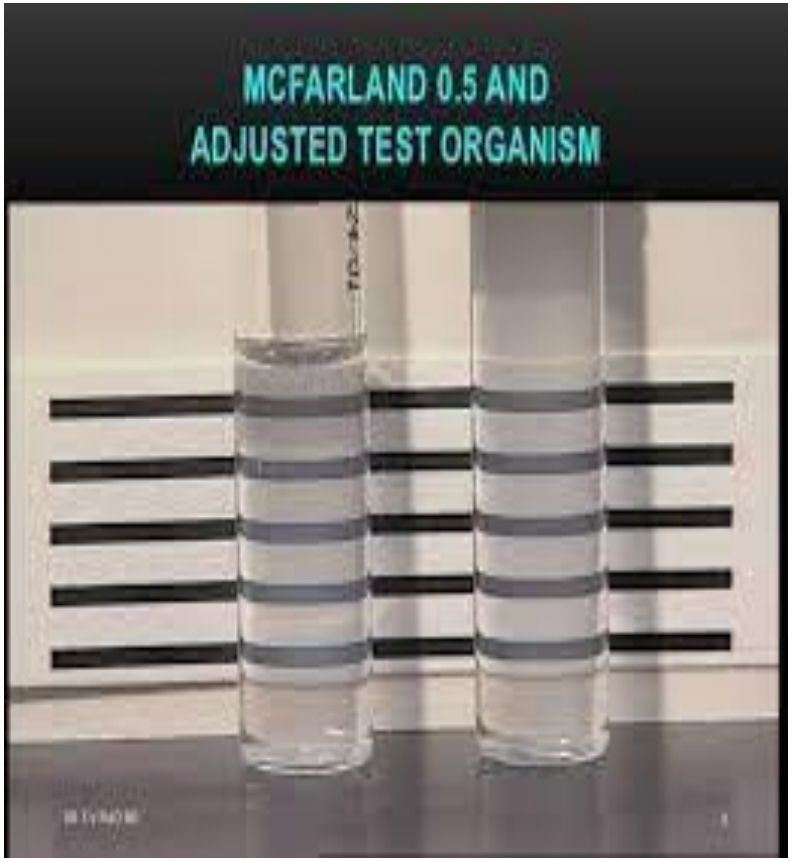


FIGURE 13-1 ■ The tube on the left is a McFarland 0.5 turbidity standard. The tube on the right is a test bacterial suspension that has a turbidity greater than that of the McFarland standard; it is more difficult to see the black lines through the test suspension than through the McFarland standard. Sterile saline or broth must be added to the test suspension to dilute it until the turbidity matches that of the McFarland standard.



TechSmith Camtasia™

- استرپتوکوک پنومونیه ، ترجیحاً از پلیت آگار خوندار به استاندارد 0.5 مک فارلند برسد. وقتی استرپتوکوک پنومونیه از پلیت شکلات آگار معلق شود ، تلقیح باید معادل 1.0 مک فارلند باشد.
- بعد از تهیه سوسپانسیون و فرو بردن سواپ در آن برای جلوگیری از تلقیح بیش از حد باکتری های گرم منفی، مایعات اضافی را با فشار دادن و چرخاندن سواب به داخل جداره لوله خارج کنید.
- برای باکتریهای گرم مثبت ، سواب را فشار ندهید و به داخل لوله نچرخانید.
- قانون 15-15-15 دقیقه: استفاده از سوسپانسیون تلقیح ظرف 15 دقیقه (حداکثر) پس از آماده سازی،
- گذاشتن دیسک ها 15 دقیقه پس از تلقیح (تا رطوبت خشک شود قبل دیسک گذاری)
- گذاشتن پلیتها در انکوباتور در ظرف 15 دقیقه (حداکثر) پس از گذاشتن دیسکها

TechSmith Camtasia™

within **15 minutes** after adjusting the turbidity, a **sterile cotton swab** is dipped into the suspension.

The swab should be rotated several times and pressed firmly on the inside wall of the tube above the fluid level to remove excess inoculum from the swab.

The Mueller-Hinton agar plate is inoculated by streaking the swab

This procedure is repeated by streaking two more times, rotating the plate approximately 60° each time to ensure an even distribution of inoculum.

TechSmith Camtasia™

As a final step, the rim of the agar is swabbed

The lid may be left ajar for 3 to 5 minutes, but no more than 15 minutes, to allow for any excess surface moisture to be absorbed before applying the drug-impregnated disks.

تعداد دیسک های آنتی بیوتیکی مجاز در هر پلیت

- پلیت با قطر 150 میلی متر..... حداکثر12 دیسک
- پلیت با قطر 100 میلی متر..... حداکثر5-6 دیسک

✓ برای باکتری های پر نیاز مانند نایسریا گونوره،هموفیلوس آنفلوانزا و پاراآنفلوانزا.....حداکثر 4 دیسک

✓ برای نایسریا منتزیدیتیدیس....حداکثر 2 دیسک

✓ فاصله دیسک ها از یکدیگر .....24 میلی متر

جدول انتخاب حداکثر تعداد دیسک های آنتی بیوتیکی بر اساس اندازه پلیت (برگرفته از مطالب ذکر شده در استاندارد CLSI M100-S30)

نام گونه باکتری	حداکثر تعداد دیسک در پلیت ۱۰ سانتی متری	حداکثر تعداد دیسک در پلیت ۱۵ سانتی متری	نوع محیط قابل استفاده برای آنتی بیوگرام با روش انتشار دیسک
انتروباکتریاسه ها	۶	۱۲	مولر هینتون آگار (MHA)
سودوموناس آئروژینوزا	۶	۱۲	MHA
آسینتوباکتر	۶	۱۲	MHA
بولخوردرلیا سپاشیا کمپلکس	۶	۱۲	MHA
استروفوموناس مالتوفیلیا	۶	۱۲	MHA
استاف ها	۶	۱۲	MHA
انتروکک ها	۶	۱۲	MHA
هموفیلوس آنفولانزا و پارا آنفولانزا	۴	۹	هموفیلوس تست مدیوم (HTM)
استرپ پنومونیه	۴	۹	MHA حاوی ۵ ٪ خون گوسفندی
استرپ های بتا همولیتیک	۴	۹	MHA حاوی ۵ ٪ خون گوسفندی
استرپ ویریدانس	۴	۹	MHA حاوی ۵ ٪ خون گوسفندی
نایسریا گنوره آ	۴	۹	GC آگار حاوی ۱ ٪ فاکتور رشد
نایسریا منتژیتیدیس	۲	۵	MHA حاوی ۵ ٪ خون گوسفندی
باسیل های گرم منفی غیر از انتروباکتریاسه	روش MIC		محیط مولر هینتون آگار برای روش آگار دیلوشن
باکتری های بی هوازی	روش MIC		محیط بروسلا آگار حاوی Hemin 5µg/mL و 5% حجمی/حجمی از خون گوسفندی برای روش آگار دیلوشن

TechSmith Camtasia™

انتخاب دیسکهای آنتی بیوتیکی

TechSmith Camtasia™

GROUP A
PRIMARY TEST
AND REPORT

GROUP B[e]
PRIMARY TEST
REPORT SELECTIVELY

GROUP C[f]
SUPPLEMENTAL
REPORT SELECTIVELY

GROUP U
SUPPLEMENTAL
FOR URINE ONLY

TechSmith Camtasia™

گروه بندی آنتی بیوتیک ها

گروه A : به عنوان پانل آنتی بیوتیکی جهت آزمایش اولیه باید گذاشته شوند و گزارش شوند.

گروه B : جهت ارزیابی اولیه گذاشته می شوند اما در شرایط خاصی گزارش می شوند:

- ✓ در صورت مقاومت به گروه A
- ✓ منبع مشخص نمونه
- ✓ عفونتهای چند میکروبی
- ✓ عفونتهای چندکانونی
- ✓ موارد آلرژی
- ✓ عدم تحمل و یا شکست در پاسخ به درمان با یکی از عوامل گروه A
- ✓ برای اهداف پیشگیری از عفونت

TechSmith Camtasia™

گروه C

شامل عوامل ضد میکروبی جایگزین یا مکمل که در شرایط خاصی گذاشته و گزارش می شوند.

- ✓ بر ضد سویه های اندمیک یا اپیدمیک موجود در مراکز بهداشتی -درمانی
- ✓ برای سویه های مقاوم به چندین دارو از گروه های اولیه
- ✓ در صورت حساسیت به داروهای اولیه
- ✓ برای درمان ارگانیسم های غیر معمول(کلرامفنیکل برای ایزوله های سالمونلا خارج روده ای)
- ✓ برای گزارش به کمیته پیشگیری عفونت به عنوان یکی از اهداف اپیدمیولوژیک

TechSmith Camtasia™

گروه U(Urine): شامل عوامل ضدمیکروبی مشخص که فقط برای درمان عفونتهای مجاری ادراری و یا در درجه اول برای درمان این نوع عفونت به کار می روند.(مانند نیتروفورانتوئین)

گروه O (Others): شامل عوامل ضدمیکروبی که برای گروهی از ارگانیسم ها کاربرد بالینی دارند.به طور روتین آزمایش و گزارش نمی شوند.

گروه Inv (Investigational): شامل عوامل ضدمیکروبی که برای گروه های ارگانیسمی جنبه تحقیقاتی داشته و هنوز توسط FDA مورد تایید قرار نگرفته اند.

TechSmith Camtasia™

GROUP A PRIMARY TEST AND REPORT	*Staphylococcus* spp.
	Azithromycin[c] or clarithromycin[c] or erythromycin[c]
	Clindamycin[c]
	Oxacillin (cefoxitin)[k,l]
	Penicillin[k]
	Trimethoprim-sulfamethoxazole

GROUP C[f] SUPPLEMENTAL REPORT SELECTIVELY	
	Chloramphenicol[c]
	Ciprofloxacin or levofloxacin or ofloxacin Moxifloxacin
	Gentamicin
	Quinupristin-dalfopristin[m]

GROUP U SUPPLEMENTAL FOR URINE ONLY	
	Cephalothin[f]
	Lomefloxacin or ofloxacin Norfloxacin
	Nitrofurantoin
	Sulfisoxazole
	Trimethoprim

GROUP B[e] PRIMARY TEST REPORT SELECTIVELY	
	*Daptomycin
	Linezolid
	Telithromycin[c]
	Doxycycline **Minocycline** Tetracycline[a]
	Vancomycin
	Rifampin[b]

Anatomic Distribution of Some Common Antibacterial Agents

	Serum or Blood [a]	Cerebrospinal Fluid	Urine
Ampicillin	+	+	+
Ceftriaxone	+	+	+
Meropenem	+	+	+
Vancomycin	+	±	+
Ciprofloxacin	+	±	+
Gentamicin	+	−	+
Clindamycin	+	−	−
Norfloxacin	−	−	+
Nitrofurantoin	−	−	+

[a] Serum or blood represents a general anatomic distribution.

+ , Therapeutic levels generally achievable at that site;

± , therapeutic achievable levels moderate to poor;

− , therapeutic levels generally not achievable at that site.

TechSmith Camtasia™

نحوه خوانش

- ***انعکاسی (reflected):***
- ***قطر هاله عدم رشد را از پشت ظرف پتری در چند سانتی متر بالاتر از یه سطح سیاه مات قرائت می کنید.***

✓ گاهی باید در پلیت را باز کرد و مستقیما قطر هاله عدم رشد را اندازه گیری کرد مانند استرپ برروی محیط مولر خون دار

- ***عبوری (transmitted):***

✓ اگزاسیلین در برابر استاف ها

✓ وانکومایسین در برابر انتروکوک ها

✓ لینزولید در برابر استاف ها

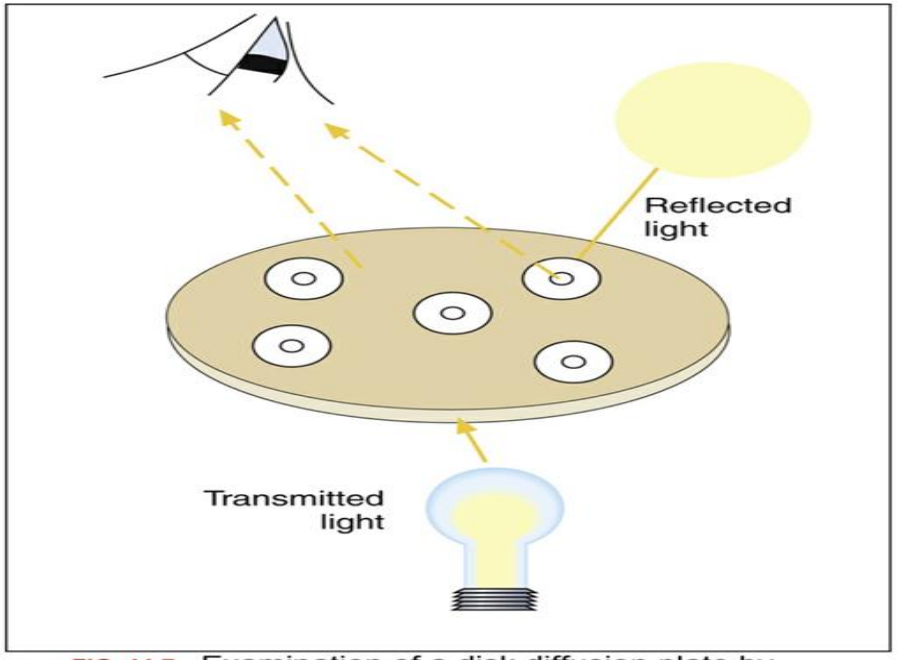


FIG. 11.7 Examination of a disk diffusion plate by transmitted and reflected light.

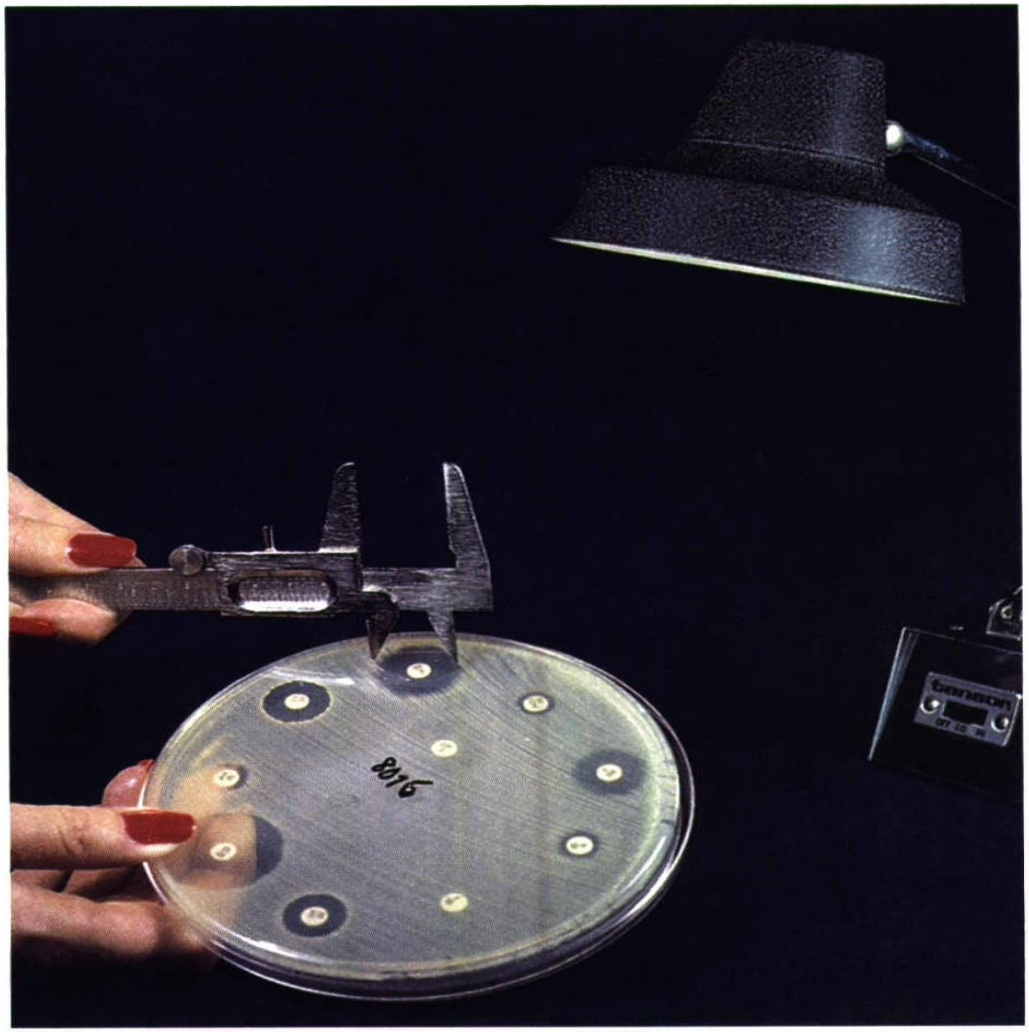


FIGURE 13-10 ■ Routine disk diffusion tests are examined by placing the plate on or 2 to 3 inches above a black, nonreflecting surface. Reflected light is used to illuminate the plate.

TechSmith Camtasia™

Modify methods for fastidious bacteria

If blood was added to the agar base (as with streptococci), the zones are measured from the upper surface of the agar illuminated with reflected light, with the cover removed.

TechSmith Camtasia™

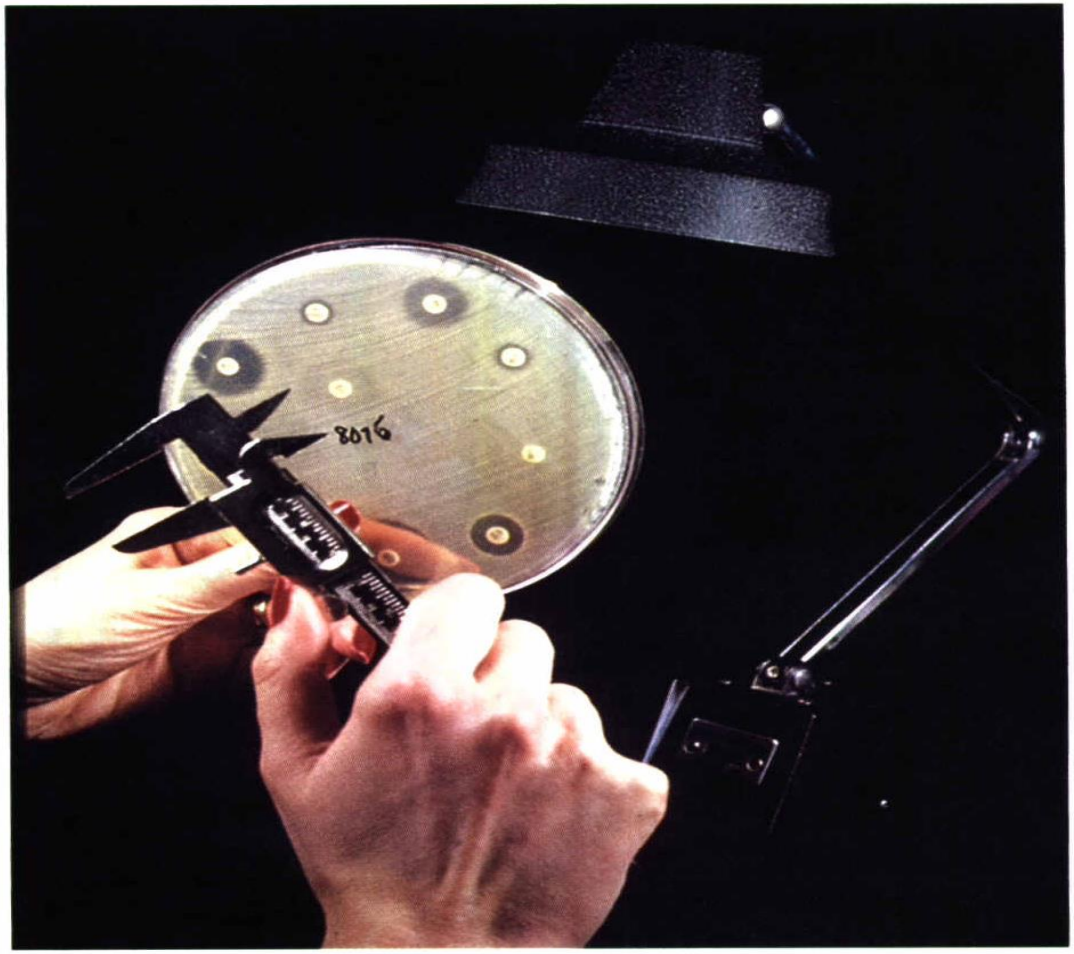
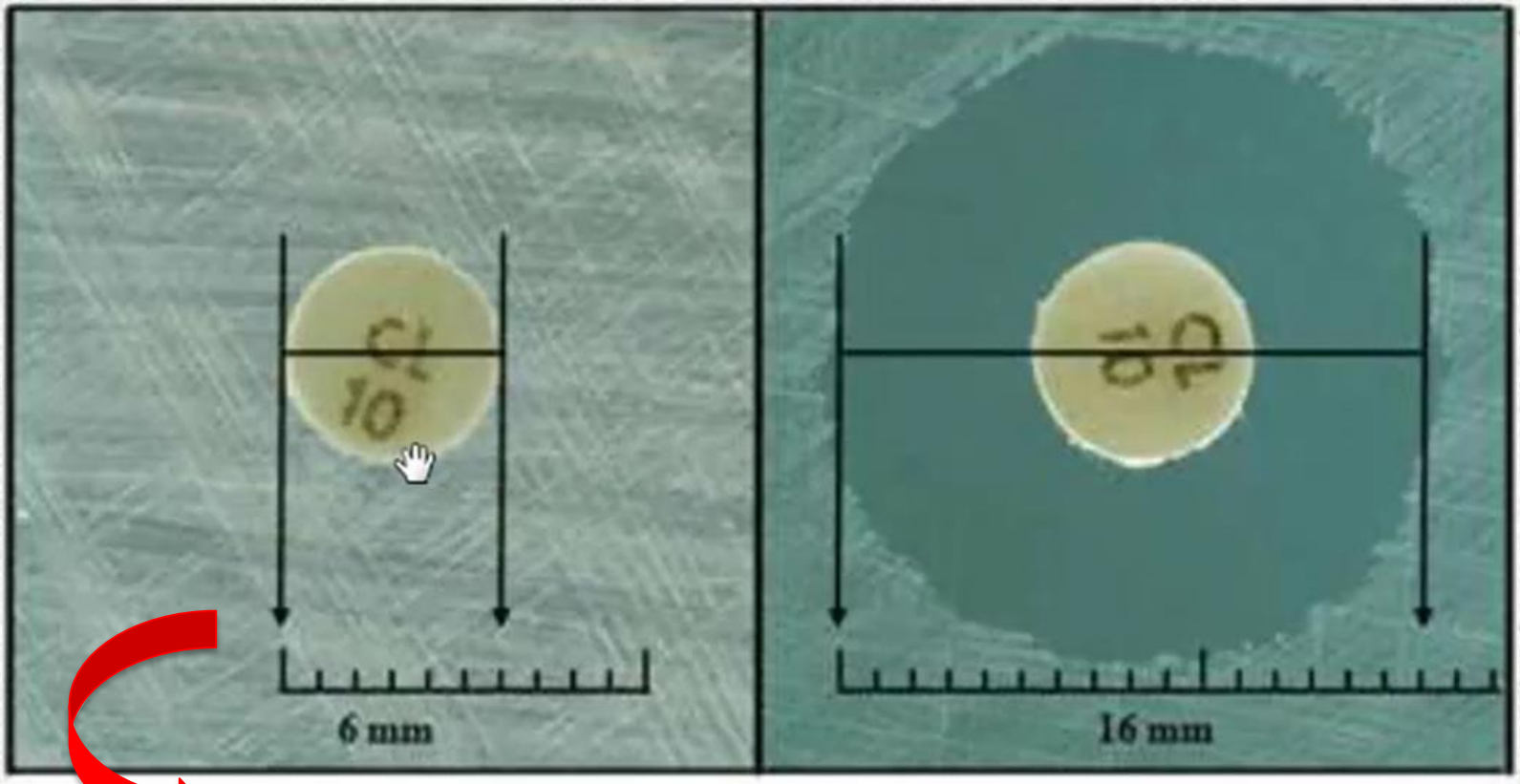


FIGURE 13-11 ■ Disk diffusion tests for staphylococci with oxacillin (or methicillin or nafcillin) and vancomycin and for enterococci with vancomycin are examined by holding the plate up to a light source (transmitted light) for zone examination. Any growth within the zone is significant.

TechSmith Camtasia™

طریقه صحیح قرائت هاله عدم رشد (EUCAST and CLSI)



در صورت عدم مشاهده هاله، قطر هاله باید عدد ٦ میلی متر گزارش شود (نه صفر)

TechSmith Camtasia™

۲. حاشیه هاله مهار رشد باید ناحیه‌ای درنظر گرفته‌شود که در آن با چشم غیرمسلح هیچ رشد قابل مشاهده و واضحی را نمی‌توان تشخیص‌داد. از رشد ضعیف کلنی‌های ریز که آنها را فقط می‌توان با ذره‌بین در لبه هاله مهار رشد تشخیص‌داد، صرفنظر کنید.

- با این حال زمانی کـه رشد پراکنده کلنی‌هـا در منطقه شفاف مهار رشد مشاهده‌شود، آزمایش باید با کشت خالص یا کشت مجدد از یک کلنی منفرد از ظرف پتری کشت اولیه تکرارشود. اگر رشد کلنی‌های پراکنده در داخل ناحیه هاله مهار رشد تداوم یابد، هاله داخلی را که عاری از کلنی است، اندازه‌گیری کنید.
- سویه‌هـای گونه‌های پروتئوس ممکن‌است در اطـراف بعضی از عـوامل ضدمیکروبی بـه داخل نواحی مهار رشد، خزش(سوارمینگ) داشته‌باشند. در آزمـایش گونه‌های پروتئوس، از رشد خزنده و غشایی نازک در مقابل هاله واضح مهار رشد، چشم‌پوشی کنید.
- در هنگام استفاده از محیط‌های غنی‌شده با خون، برای سنجش حساسیت استرپتوکوک‌ها، قطر هاله مهار رشد(و نه قطر هاله مهار همولیز) را اندازه‌گیری نمایید.

TechSmith Camtasia™

- در زمان استفاده از تری‌متوپریم و سولفونامیدها، آنتاگونیست‌های موجود در محیط، ممکن‌است منجر به رشد ضعیف گردد. بنابراین، از این رشد ضعیف(۲۰٪ یا کمتر از آن) صرفنظر کنید و برای تعیین قطر هاله، حاشیه واضح‌تر مهار رشد را درنظر بگیرید.

TechSmith Camtasia™

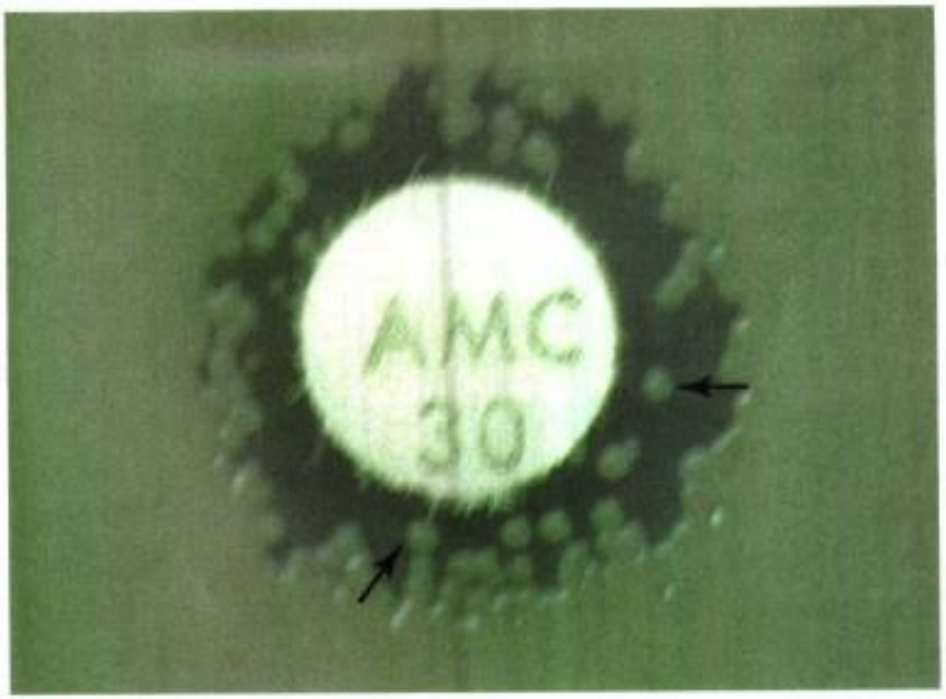


Figure 12-9 Individual bacterial colonies within a more obvious zone of inhibition *(arrows)*. This could indicate inoculation with a mixed culture. However, emergence of resistant mutants of the test isolate is a more likely reason for this growth pattern.

TechSmith Camtasia™

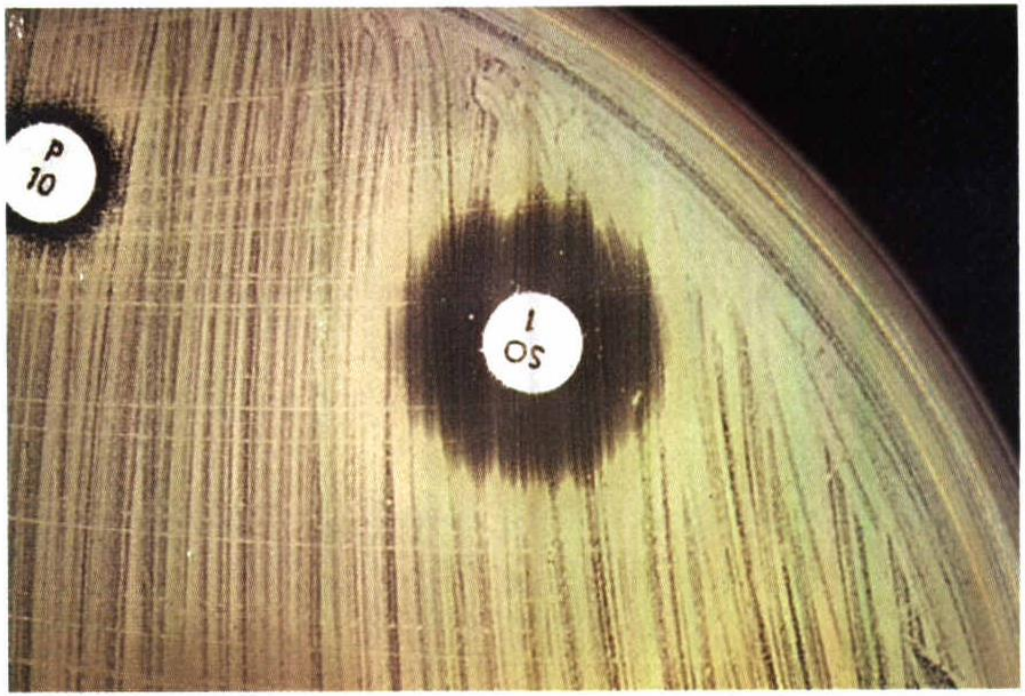


FIGURE 13-13 ■ The oxacillin zone for heteroresistant oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* often shows a haze of growth within the zone of inhibition. This haze is significant, and the isolate here is oxacillin resistant.

TechSmith Camtasia™

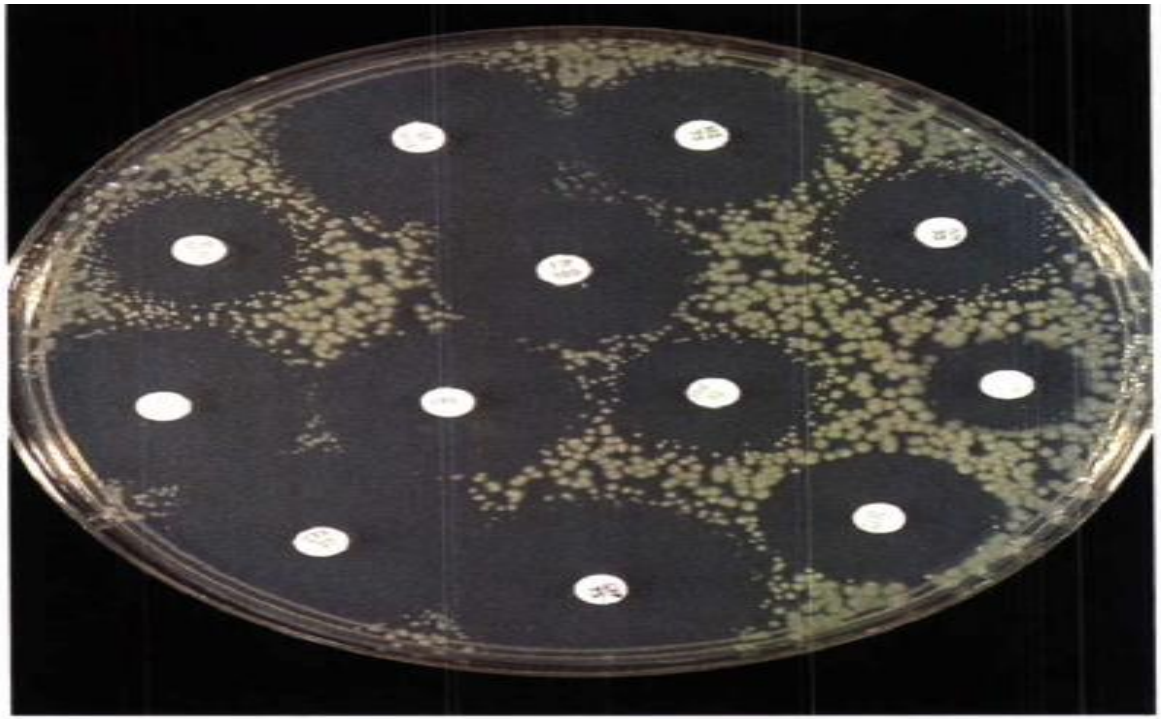
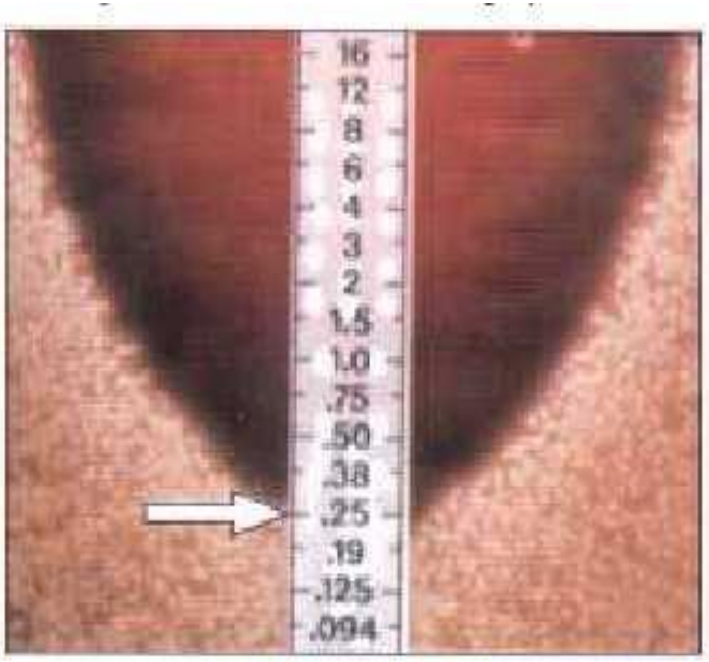


FIGURE 13-9 ■ *Escherichia coli* tested by the disk diffusion method. The lawn of growth following overnight incubation shows individual colonies, representing unsatisfactory growth. The most likely explanation for the scanty growth is the use of an inoculum that either is too light or contains too many nonviable cells, resulting in larger than normal zones and potentially false susceptible results.

TechSmith Camtasia™

Reading E-tests



Upper reading

Ciprofloxacin for *Yersinia pestis*

Resistant ≥ 4 ug/ml

Intermediate 1-4 ug/ml

Susceptible ≤ 1

TechSmith Camtasia™

6-4 نوار تست در پلیت 150میلیمتری

TechSmith Camtasia™

نحوه گزارش

- حساس (S)
- بینابینی(I)
- مقاوم(R)

✓مقاومت ذاتی X نباید گزارش شوند.X

TechSmith Camtasia™

- ***حساس وابسته به دوز(susceptible dose dependent) :***

برای ایزوله هایی استفاده می شود که حساسیت آنها وابسته به دوز مصرفی به کارگرفته شده می باشد.

این مفهوم باید به آن ایزوله هایی اختصاص داده شود که در صورت استفاده از بالاترین دوز مورد تایید دارو یا حداکثر دوز مورد استفاده در بالین، از نظر معیار های تفسیری حساس گردد.

TechSmith Camtasia™

Appendix E. Dosage Regimens Used to Establish Susceptible or Susceptible-Dose Dependent Breakpoints

The evolving science of pharmacokinetics-pharmacodynamics has become increasingly important in recent years in determining minimal inhibitory concentration (MIC) breakpoints. Recently approved susceptible or susceptible-dose dependent (SDD) breakpoints for a number of agents have been based on a specific dosage regimen(s); these dosage regimens are listed in the table below. Proper application of the breakpoints necessitates drug exposure at the site of infection that corresponds to or exceeds the expected systemic drug exposure at the dose listed in adult patients with normal renal function. This information should be shared with pharmacists, infectious diseases staff, and others making dosing recommendations for the institution.

Antimicrobial Agent	Breakpoints and Interpretive Categories			
	Susceptible		SDD	
	MIC	Dose	MIC	Dose
Table 2A. Enterobacterales				
Azithromycin (*Salmonella* enterica ser. Typhi)	≤16 µg/mL	500 mg administered daily	N/A	
Aztreonam	≤4 µg/mL	1 g administered every 8 h	N/A	
Cefazolin	≤2 µg/mL	2 g administered every 8 h	N/A	
Ceftaroline	≤0.5 µg/mL	600 mg administered every 12 h	N/A	
Cefepime	≤2 µg/mL	1 g administered every 12 h	4 µg/mL	1 g administered every 8 h or 2 g administered every 12 h
			8 µg/mL or zone diameter: 19–24 mm	2 g administered every 8 h (Because it is not possible to correlate specific zone diameters with specific MICs, an isolate with a zone diameter in the SDD range should be treated as if it might be an MIC of 8 µg/mL.)

TechSmith Camtasia

- **غیرحساس(Non suseptible):** به گروهی از ایزوله ها تخصیص می یابد که به علت فقدان یا نادر بودن سویه های مقاوم آنها، فقط نقاط انفصالی برای آنها به صورت حساس معین شده است.

❖ ایزوله هایی که مقدار MIC آنها بیشتر یا قطر هاله مهار رشد آنها کمتر از مقدار مشخص شده برای محدوده حساس است باید به عنوان غیر حساس گزارش شوند.

- **Not susceptible :** برای ایزوله هایی که از نظر تقسیم بندی جز حساس بینابینی یا مقاوم طبقه بندی میشوند می توانند از این عنوان استفاده کرد.

TechSmith Camtasia™

Example of Breakpoints and Interpretive Categories as Used in Table 2

Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL		
		S	I*	R	S	I*	R
X	30 µg	≥20	15–19	≤14	≤4	8–16	≥32
Y	–	–	–	–	≤1	2	≥4
Z	10 µg	≥16	–	–	≤1	–	–

* Or SDD, if appropriate.

Abbreviations: I, intermediate; R, resistant; S, susceptible; SDD, susceptible-dose dependent.

TechSmith Camtasia™

مثالهایی از مقاومت های ذاتی

- سودوموناس .....تتراسایکیلین ، کوتریماکسازول
- انتروکوک..... کوتریماکسازول،سفالوسپورین ها،کلیندامایسین
- سالمونلا و شیگلا.....نسل 1و 2 سفالوسپورین ها،سفامایسین، آمینوگلیکوزیدها
- لیستریا....سفالوسپورین
- MRSA..... حتما باید مقاوم به پنی سیلین گزارش شود.
- سراشیا.....سفوکستین،نیتروفورانتوئین
- آنتی بیوتیک هایی که در عفونت های ادراری به کار می روند برای باکتری های جدا شده از قسمتهای دیگر بدن نباید گزارش شوند.
- آنتی بیوتیک های خوراکی و آنتی بیوتیک هایی که به هر دلیل در عفونت CNS کاربرد ندارند (مانند سفالوسپورین نسل 1و2 ،کلیندامایسین،تتراسایکلین ، کلیندامایسین، ماکرولیدها ، فلوئورکینولون ها) نباید در نمونه های حاصل از کشت CSF گزارش شوند.

TechSmith Camtasia™

Organism	Intrinsic Resistance to :
Enterobacteriaceae	
Citrobacter freundii	Ampicillin , Augmentin , Cephalothin , Cefoxitin
Citrobacter koseri	Ampicillin , Augmentin
Enterobacter aerogenes	Ampicillin , Augmentin , Cephalothin , Cefoxitin
Enterobacter cloacae	Ampicillin , Augmentin , Cephalothin , Cefoxitin
Escherichia coli	There is no intrinsic resistance to β-lactams in this organism
Klebsiella pneumoniae	Ampicillin
Morganella morganii	Ampicillin , Augmentin , Cephalothin ,Nitrofurantoin
Proteus mirabilis	There is no intrinsic resistance to β-lactams in this organism.Nitrofurantoin
Proteus vulgaris	Ampicillin , Cephalothin ,Nitrofurantoin
Serratia marcescens	Ampicillin , Augmentin , Cephalothin , Cefoxitin , Nitrofurantoin
Staph.Saprophyticus	Novobiocin - R

TechSmith Camtasia™

Organism	Resistance Phenotype Detected
Any Enterobacteriaceae	Carbapenem – I or R Amikacin, Gentamicin,Fluoroquinolone– R
Escherichia coli	ESBL+
Klebsiella spp	ESBL+ Ampicillin - S
Proteus mirabilis	ESBL+
Proteus vulgaris	Ampicillin - S
Citrobacter freundii	Ampicillin,Cephalothin - S
Enterobacter SPP	Ampicillin,Cephalothin - S
Salmonella spp	Cephalosporin Gen III,Fluoroquinolone – I or R
Any Organism	Resistance to all agents routinely tested

TechSmith Camtasia™

Organism	Resistance Phenotype Detected
Streptococcus pneumoniae	penicillin – R Vancomycin – NS
Streptococcus, β-hemolytic group	penicillin – NS Vancomycin – NS
Streptococcus, viridans group	Vancomycin – NS
Enterococcus spp.	Linezolid ,Vancomycin, High-level aminoglycoside – R
Enterococcus faecalis	Linezolid ,penicillin, High-level aminoglycoside – R
Enterococcus faecium	Linezolid, High-level aminoglycoside – R
Any Organism	Resistance to all agents routinely tested

TechSmith Camtasia™

Organism	Resistance Phenotype Detected
Acinetobacter baumannii	Carbapenem – I or R
Pseudomonas aeruginosa	Colistin – I or R Carbapenem – I or R cuncurrent Gentamicin,Tobramycin and Amikacin - R
Stenotrophomonas maltophilia	Cotrimoxazole - I or R
Any Organism	Resistance to all agents routinely tested

TechSmith Camtasia™

Organism	Resistance Phenotype Detected
Staph.aureus	Linezolid,Cefoxitin - R Vancomycin - R
Staph.coagulase neg	Linezolid - R Vancomycin - R
Any Organism	Resistance to all agents routinely tested

TechSmith Camtasia™

مقاومت استاف ها و انتروکوک ها در برابر وانکومایسین

Table 3G. Vancomycin Agar Screen for *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp.

Screen Test	Vancomycin MIC ≥8 µg/mL	
Test method	**Agar Dilution**	**Agar Dilution**
Organism group	*S. aureus*	*Enterococcus* spp.
Medium	BHI agar	BHI[a] agar
Antimicrobial concentration	6 µg/mL vancomycin	6 µg/mL vancomycin
Inoculum	Colony suspension to obtain 0.5 McFarland turbidity Preferably, using a micropipette, spot a 10-µL drop onto agar surface. Alternatively, using a swab dipped in the suspension and the excess liquid expressed, spot an area 10–15 mm in diameter or streak a portion of the plate.	1–10 µL of a 0.5 McFarland suspension spotted onto agar surface. Alternatively, using a swab dipped in the suspension and the excess liquid expressed, spot an area 10–15 mm in diameter or streak a portion of the plate.
Incubation conditions	35°C±2°C; ambient air	35°C±2°C; ambient air
Incubation length	24 hours	24 hours
Results	Examine carefully with transmitted light for >1 colony or light film of growth. >1 colony = Presumptive reduced susceptibility to vancomycin	>1 colony = Presumptive vancomycin resistance
Additional testing and reporting	Perform a vancomycin MIC using a validated MIC method to determine vancomycin MICs on *S. aureus* that grow on BHI–vancomycin screening agar. Testing on BHI–vancomycin screening agar does not reliably detect all vancomycin-intermediate *S. aureus* strains. Some strains for which the vancomycin MICs are 4 µg/mL will fail to grow.	Perform vancomycin MIC on *Enterococcus* spp. that grow on BHI–vancomycin screening agar and test for motility and pigment production to distinguish species with acquired resistance (eg, *vanA* and *vanB*) from those with intrinsic, intermediate-level resistance to vancomycin (eg, *vanC*), such as *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus,* which often grow on the vancomycin screen plate. In contrast to other enterococci, *E. casseliflavus* and *E. gallinarum* with vancomycin MICs of 8–16 µg/mL (intermediate) differ from vancomycin-resistant enterococci for infection **prevention** purposes.

مقاومت استاف ها و انتروکوک ها در برابر وانکومایسین

Screening Tests

Screening Test	Organisms	Test Description	When to Perform Confirmatory Test	Confirmatory Test
Vancomycin agar screen	• *S. aureus* • *Enterococcus* spp.	Agar dilution; BHI with 6 µg/mL vancomycin	If screen positive	Vancomycin MIC

Table 2D. *Enterococcus* spp. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL				Comments
			S	I	R	S	SDD	I	R	
GLYCOPEPTIDES										
B	Vancomycin	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤4	–	8–16	≥32	**(10)** When testing vancomycin against enterococci, plates should be held a full 24 hours for accurate detection of resistance. Zones should be examined using transmitted light; the presence of a haze or any growth within the zone of inhibition indicates resistance. Organisms with intermediate zones should be tested by an MIC method as described in M07.[3] For isolates for which the vancomycin MICs are 8–16 µg/mL, perform biochemical tests for identification as listed under the "Vancomycin MIC ≥ 8 µg/mL" test found in Table 3G. See general comment (4) and comment (8).

GLYCOPEPTIDES **(20)** MIC tests should be performed to determine the susceptibility of all isolates of staphylococci to vancomycin. The disk test does not differentiate vancomycin-susceptible isolates of *S. aureus* from vancomycin-intermediate isolates, nor does the test differentiate among vancomycin-susceptible, -intermediate, and -resistant isolates of *Staphylococcus* spp. other than *S. aureus*, all of which give similar size zones of inhibition.												
B	Vancomycin	*S. aureus*	–	–	–	–	–	≤2	–	4–8	≥16	**(21)** For *S. aureus*, vancomycin-susceptible isolates may become vancomycin intermediate during the course of prolonged therapy. **(22)** Send any *S. aureus* for which the vancomycin is ≥8 μg/mL to a referral laboratory. See Appendix A. Also refer to Table 3F for *S. aureus*, Subchapter 3.12 in M07,[3] and Subchapter 3.9 in M02.[1]
		Staphylococcus spp. other than *S. aureus*	–	–	–	–	–	≤4	–	8–16	≥32	See comment (19). **(23)** Send any *Staphylococcus* spp. **other than *S. aureus*** for which the vancomycin MIC is ≥32 μg/mL to a referral laboratory. See Appendix A. See also Subchapter 3.12 in M07[3] and Subchapter 3.9 in M02.[1]

TechSmith Camtasia

MDR (Multidrug resistance): باکتری هایی که حداقل به سه آنتی بیوتیک از سه کلاس مختلف مقاوم باشند.

XDR (Exensive drug resistance): باکتری هایی که تنها به یک یا دو آنتی بیوتیک از کلاسهای مختلف حساس باشند.

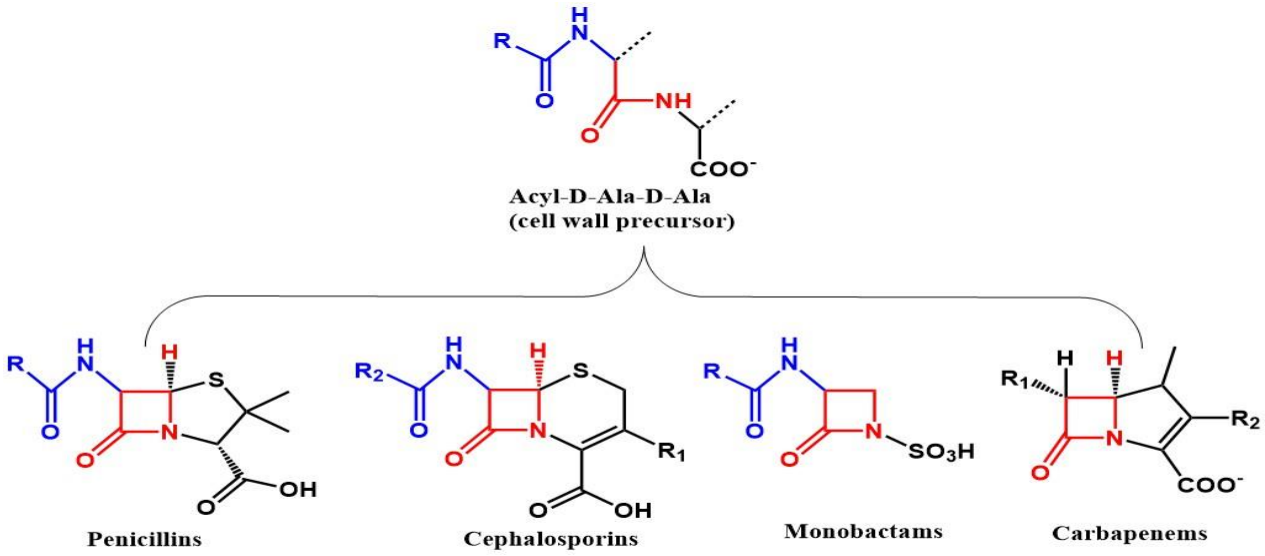
PDR (pandrug resistance): باکتری های که به تمام آنتی بیوتیک های مورد آزمایش مقاوم باشند.

TechSmith Camtasia™

کلاسهای مختلف آنتی بیوتیک ها :

- بتالاکتام ها :

خصوصیت مشترک تمام بتالاکتام‌ها، داشتن حلقه مرکزی چهارضلعی بتـالاکتام و جلوگیـری از تشکیل دیواره سلولی، به‌عنوان مکانیسم اولیه عملکرد است. وجود حلقه‌های اضافی و یا گروه‌های جایگزین که به حلقه بتالاکتام اضافه‌می‌شوند، شاخص قرارگرفتن داروی مربوطه در یکی از زیرگروه‌های پنی‌سیلین(penicillin)، سفم(cephem)، کاربا‌پنم(carbapenem) یا منوباکتام(monobactam) است.



Core structure of beta-lactam antibiotics

غیر بتالاکتام ها

- امینوگلیکوزید ها: جنتامایسین ، آمیکاسین و..
- مهارکننده های مسیر فولات : سولفانامیدها ، تری متوپریم
- گلیکوپپتیدها: وانکومایسین
- لیپوپپتید ها: کلیستین، پلی میکسین B
- ماکرولیدها: اریترومایسین، آزیترومایسین و...
- کینولون ها و فلوئوروکینولون ها : سیپروفلوکساسین ،
- تتراسایکلین ها: داکسی سیکلین ...
- خانواده تک دارویی(single drug classes): کلرامفنیکل، کلیندامایسین، لینزولید

TechSmith Camtasia™

تستهای تکمیلی

الزامی

- استاف اورئوس مقاوم به متی سیلین(MRSA)
- تست مقاومت القایی به کلیندامایسین (D-test)
- بتالاکتاماز

اختیاری

- تست غربالگری و تاییدی ESBL
- تست غربالگری و تاییدی CRE

TechSmith Camtasia™

MRSA

- استفاده از دیسک 30 میکروگرم سفوکسیتین
- اما درجواب اگزاسیلین باید گزارش شود.
- ارگانیسم MRSA حتما باید مقاوم به پنی سیلین گزارش شود.

❖ for S.aureus and S.lugdunensis

>=22 mm…. (S) and =<21 mm …. (R)

❖ for coagulase-negative staphylococci :

=>25 mm …. (S) and = <24 mm …. (R)

TechSmith Camtasia™

Supplemental Methods for Detection of Antimicrobial Resistance

Test	Purpose (Bacteria/Antimicrobial-R)	Conditions
Cefoxitin to detect *mecA*-mediated oxacillin resistance	Staphylococci (*S. aureus* and *S. lugdunensis*) and coagulase-negative staphylococci (CoNS)/oxacillin-resistance	Disk diffusion: MHA and 30 µg cefoxitin disk Incubation: 33°C–35°C, 16–18 h: *S. aureus* and *S. lugdunensis*; 24 h: CoNS

TechSmith Camtasia™

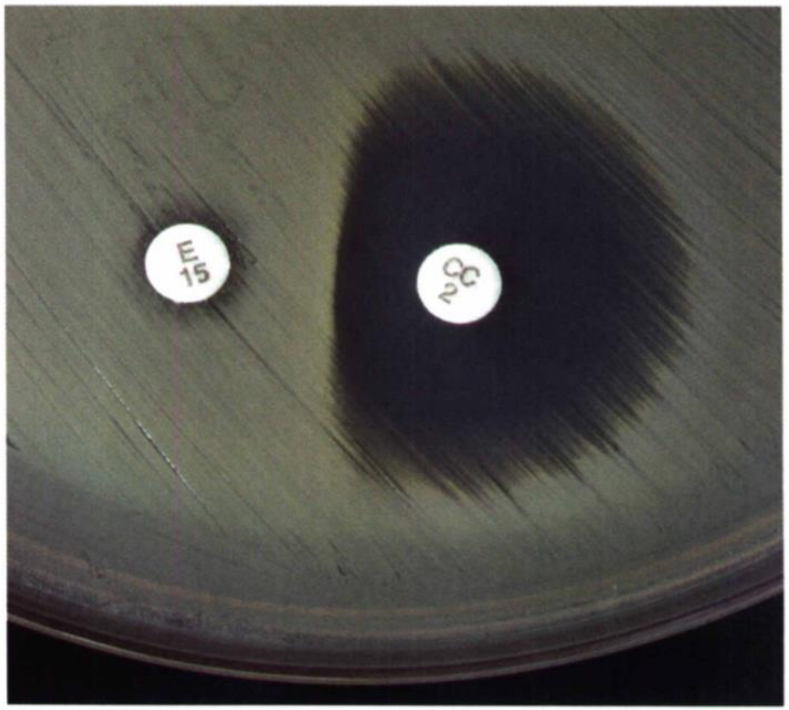


FIGURE 13-14 ■ D-zone testing of *Staphylococcus aureus* that has erm-mediated inducible clindamycin resistance. The positive reaction is noted by a flattening of the zone around the clindamycin disk in the area where there has been diffusion of both erythromycin and clindamycin molecules.

- مقاومت القایی به کلیندامایسین در استافیلوکوک ها ،استرپتوکوکوس های بتا همولیتیک و استرپتوکوک پنومونیه می تواند رخ دهد.
- ایزوله هایی که به اریترومایسین مقاوم اما به کلیندامایسین حساس هستند باید از این نظر تست شوند.
- فقط نتایج کلیندامایسین باید گزارش شود.

TechSmith Camtasia™

Supplemental Methods for Detection of Antimicrobial Resistance

Test	Purpose (Bacteria/Antimicrobial-R)	Conditions
D-zone test	*S. aureus, S. lugdunensis,* CoNS, *Streptococcus pneumoniae,* and beta-hemolytic streptococci (e.g., group B)/inducible clindamycin resistance Differentiation of inducible iMLS$_B$ resistance (by *ermA* or *ermC* genes) versus erythromycin resistance by efflux mechanism (i.e., *msrA* gene)	Medium: 5% sheep blood agar or MHA (for staphylococci) or MHA plus 5% sheep blood (for streptococci) Antimicrobials: 15 μg erythromycin (E) and 2 μg clindamycin (Cd) (for staphylococci, space 15–26 mm apart; for streptococci, space 12 mm apart) Incubation: staphylococci: 35°C, air, 16–18 h; streptococci: 35°C, 5% CO_2, 20–24 h

TechSmith Camtasia

- برای استافیلوکوک ها: دیسک های اریترومایسین و کلینداماسین باید در فاصله 12-20 میلی متر از لبه به لبه
- برای استرپتوکوک ها 12-16 میلی متر از لبه به لبه قرار گیرند.

TechSmith Camtasia™

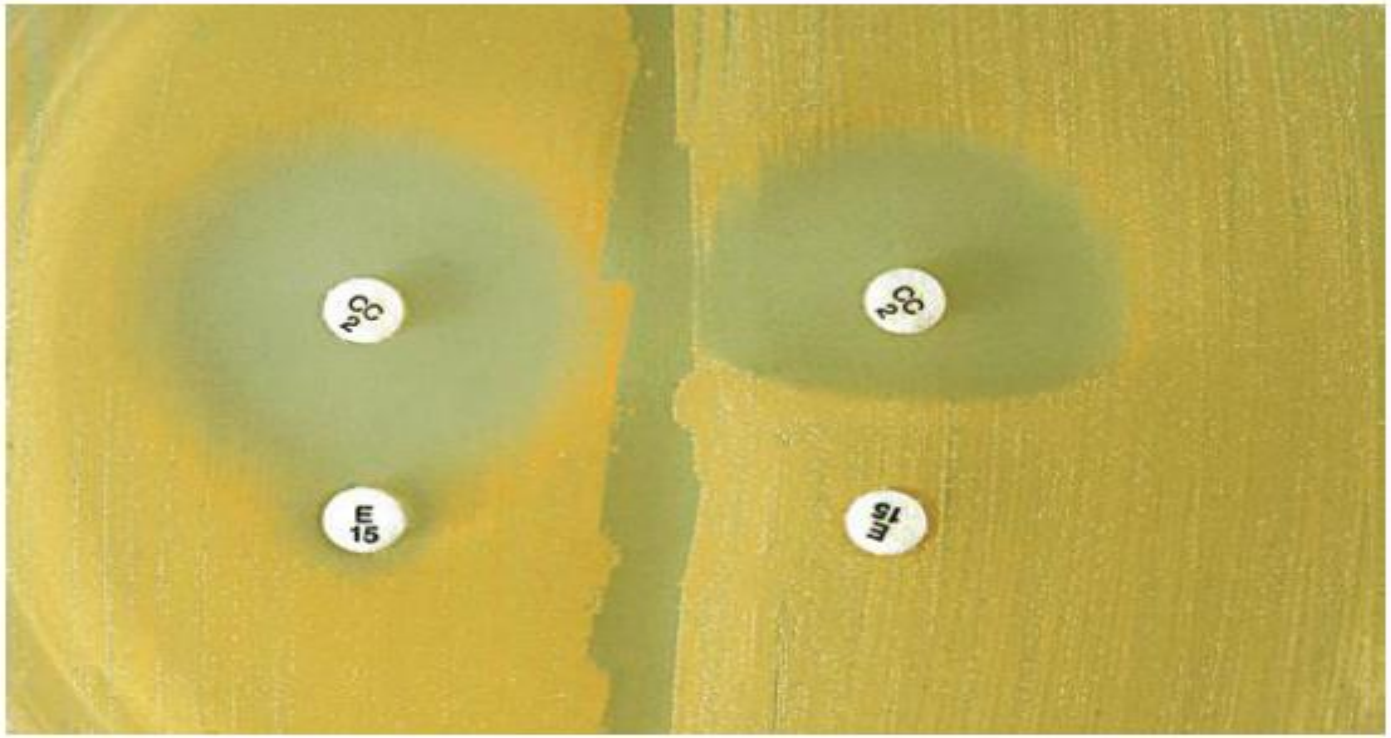


Figure 59-4 **Disk induction or "D" test.** The *Staphylococcus aureus* isolate on the left demonstrates erythromycin (E) resistance but susceptibility to clindamycin (CC). The *S. aureus* isolate on the right demonstrates inducible clindamycin resistance with blunting of the zone of inhibition around the clindamycin disk adjacent to the erythromycin disk.

TechSmith Camtasia™

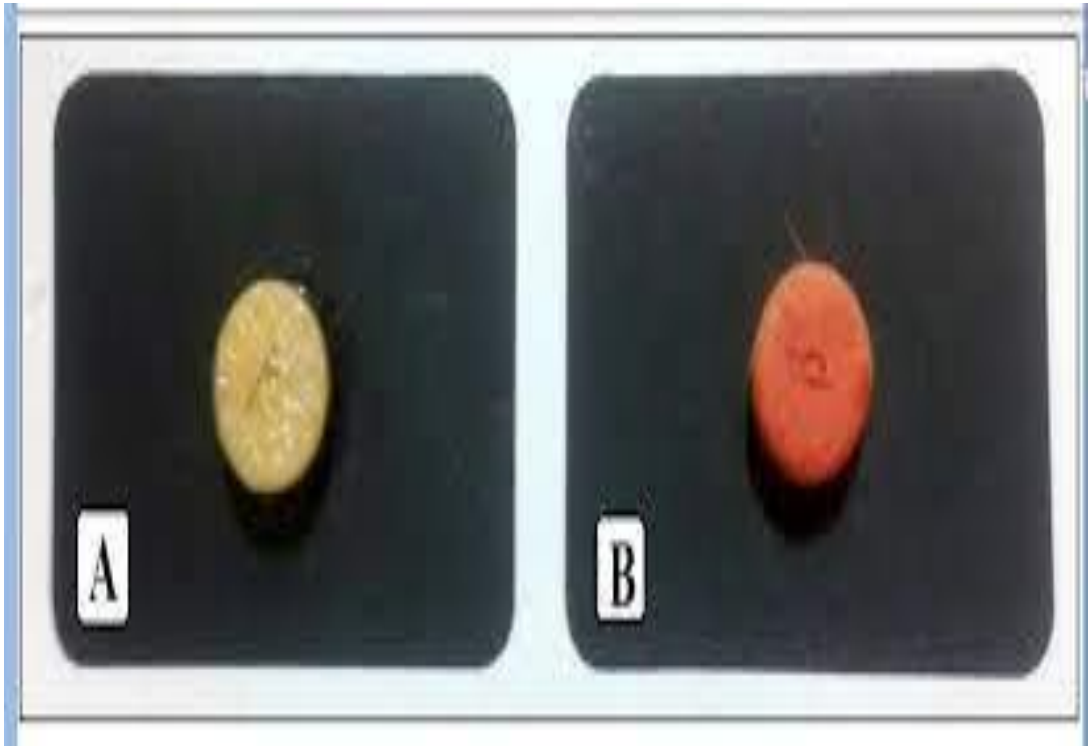
بتالاکتاماز

Table 3E. Test for Detection of β-Lactamase Production in *Staphylococcus* spp.

Test	β-Lactamase Production	
روش آزمایش	انتشار دیسک **Penicillin zone-edge test**	آزمایش مبتنی بر نیتروسفین **Nitrocefin-based test**
ارگانیسم های گروه	*S. aureus* with penicillin MICs ≤ 0.12 µg/mL or zones ≥ 29 mm[a]	***Staphylococcus spp.***[a,b] with penicillin MICs ≤ 0.12 µg/mL or zones ≥ 29 mm
محیط کشت	MHA	N/A (غیر قابل کاربرد)
غلظت ماده ضد میکروبی	دیسک ۱۰ واحد پنی سیلین	N/A (غیر قابل کاربرد)
ماده تلقیحی	روش استاندارد انتشار از دیسک	رشد القایی (به معنی برداشت کلنی از لبه اطراف دیسک پنی سیلین یا سفوکسیتین روی محیط های MHA یا پلیت آگار خون دار پس از ۱۸-۱۶ ساعت انکوباسیون)
شرایط انکوباسیون	هوازی، 35 °C ± 2 °C	دمای اتاق
دوره انکوباسیون	۱۸-۱۶ ساعت	حداکثر یک ساعت برای آزمون نیتروسفین یا بر اساس پروتکل شرکت سازنده
نتایج	لبه هاله واضح(sharp)، صخره ای (cliff) ⇐ تولید بتا لاکتاماز مثبت (شکل ۱) لبه هاله کرکی (fuzzy) شنزار (beach)⇐ تولید بتا لاکتاماز منفی (شکل ۲)	آزمون نیتروسفین ⇐ تغییر رنگ از زرد به قرمز/ صورتی ⇐ تولید بتا لاکتاماز مثبت
تست اضافی و گزارش	استافیلوکک های بتا لاکتاماز مثبت ⇐ مقاوم به پنی سیلین ، آمینو پنی سیلین، کربوکسی پنی سیلین و اورئیدوپنی سیلین می باشند	گزارش آزمون نیتروسفین می تواند برای *S. aureus* استفاده شود، اما نتایج منفی(حساسیت به پنی سیلین) باید قبل از گزارش، با تست Penicillin zone-edge test تایید شود. * استافیلوکک های بتا لاکتاماز مثبت ⇐ مقاوم به پنی سیلین ، آمینو پنی سیلین، کربوکسی پنی سیلین و اورئیدوپنی سیلین می باشند*

TechSmith Camtasia™

Nitrocefin disk test
(Chromogenic cephalosporin method)



TechSmith Camtasia™

Penicillin Disk Zone-Edge Test

Figure 1. Positive for β-Lactamase Detection

Figure 2. Negative for β-Lactamase Detection.

TechSmith Camtasia™

Screening for ESBL producers

- for screening for ESBL production by
- klebsiellae
- Escherichia coli
- Proteus mirabilis

TechSmith Camtasia™

For K.pneumonia,K.oxytoca and E. coli

- Cefpodoxime < 17mm
- ceftazidime < 22mm
- aztreonam < 27mm
- Cefotaxime < 27mm
- Ceftriaxone < 25mm

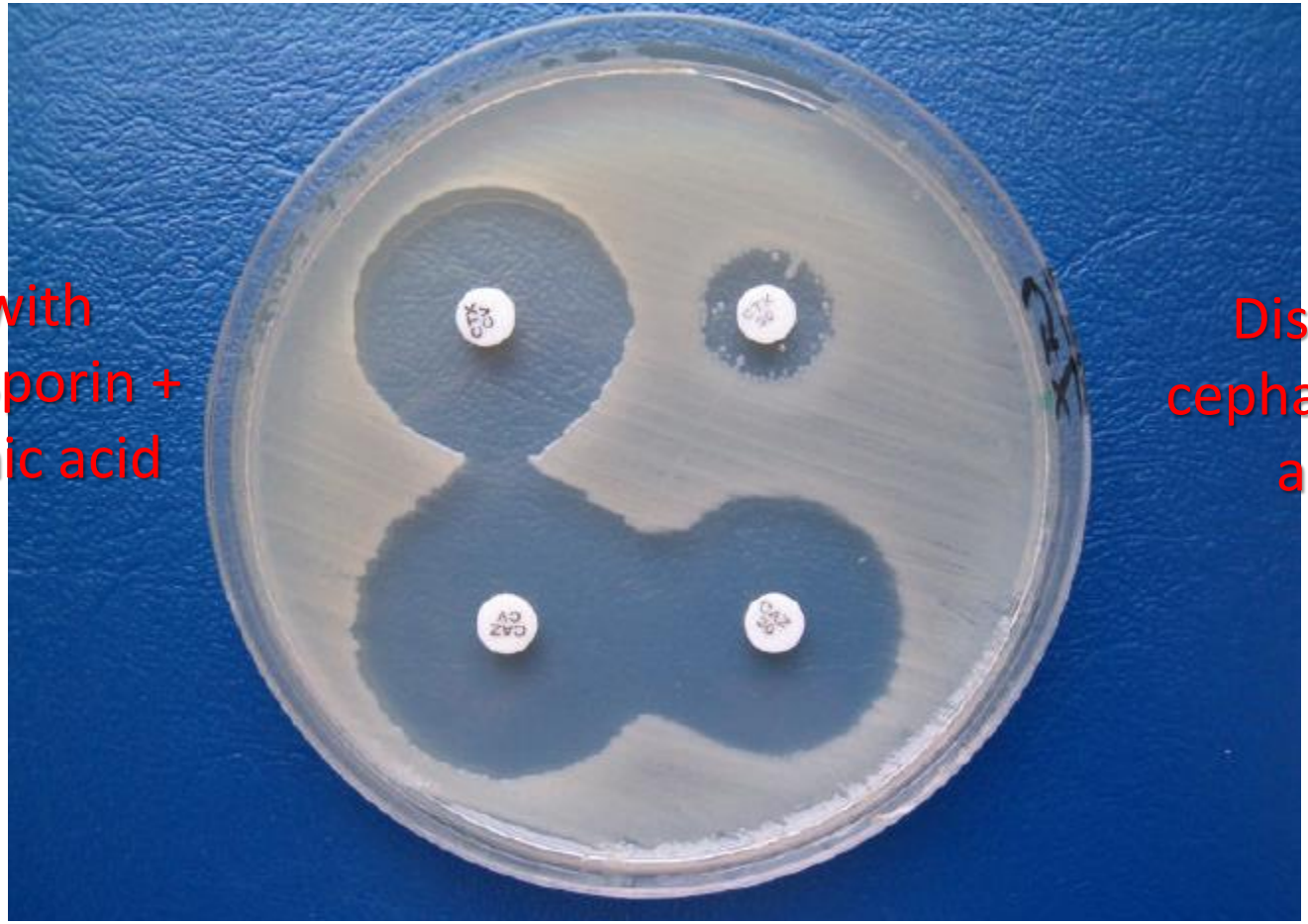
For Proteus mirabilis

- Cefpodoxime <22 mm
- Ceftazidime <22mm
- Cefotaxime <27mm

TechSmith Camtasia™

ESBL Confirmatory Tests

Disc with cephalosporin + clavulanic acid



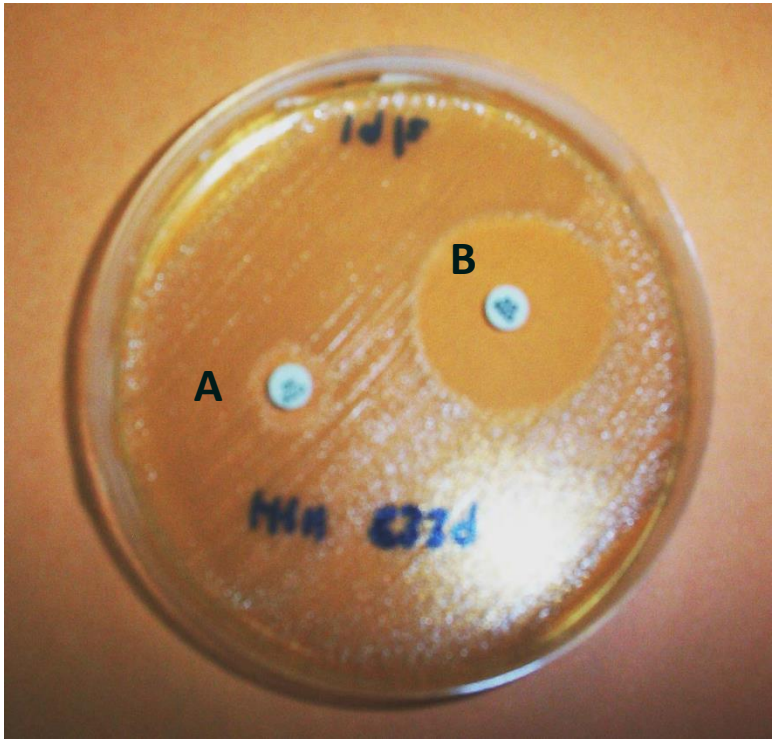
Disc with cephalosporin alone

TechSmith Camtasia™

ESBL Testing

Confirmatory methods

a) Disk diffusion method



A : Ceftazidime/clavulanic

B : Ceftazidime

Zone diameter of CAZ-CA
Zone diameter of CAZ

≥ 5 mm

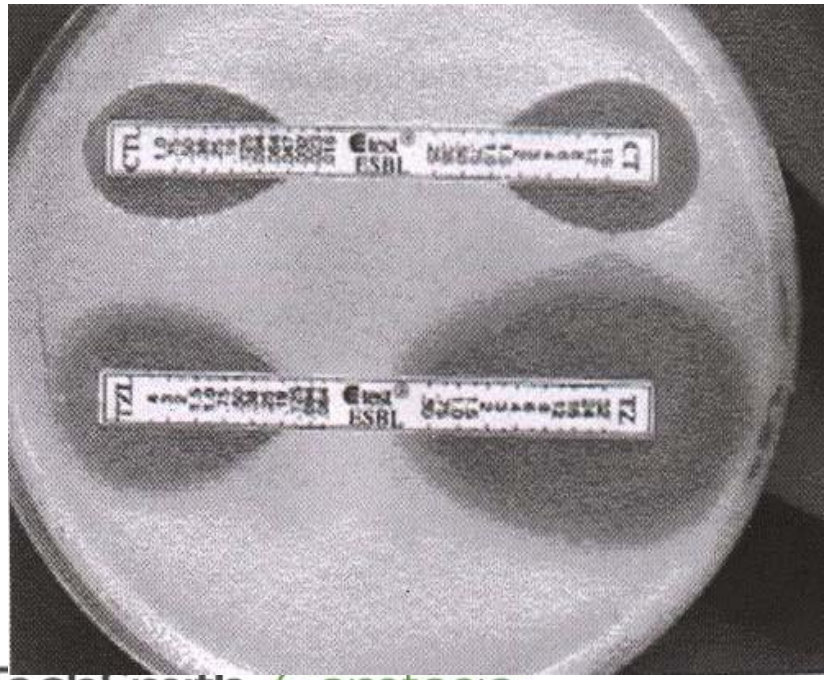
TechSmith Camtasia™

ESBL Testing

Confirmatory methods

b) MIC method – ESBL E-test strip

- **Two E-test combination strip (eg. CAZ/CAZ-CA or CTX/CTX-CA)**



MIC of CAZ **> 8 ug/ml**

MIC of CAZ-CA

TechSmith Camtasia

Suspected Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae(CRE)

- ممکن است برای اهداف اپیدمیولوژیک و فرایند پیشگیری عفونت لازم باشد.
- در حال حاضر انجام این تست به صورت روتین توصیه نمی شود.
- انتروباکتریاسه ها و سودوموناس آئروژینوزا هایی که غیر حساس به یک یا بیش از یک کارباپنم هستند از نظر تولید کارباپنماز بررسی می شوند.

✓ در اکثر مواقع عدم حساسیت به ارتاپنم یکی از اندیکاسیون های بسیار حساس جهت بررسی وجود آنزیم کارباپنماز می باشد.

✓ معمولا این ایزوله ها به یک یا بیش از یک سفالوسپورین نسل سه (سفوپرازون،سفوتاکسیم،سفتازیدیم،سفتی زوکسیم و سفتریاکسون) مقاوم هستند.

TechSmith Camtasia™

روش انجام غربالگری CRE

- استفاده از دیسک ارتاپنم یا مروپنم

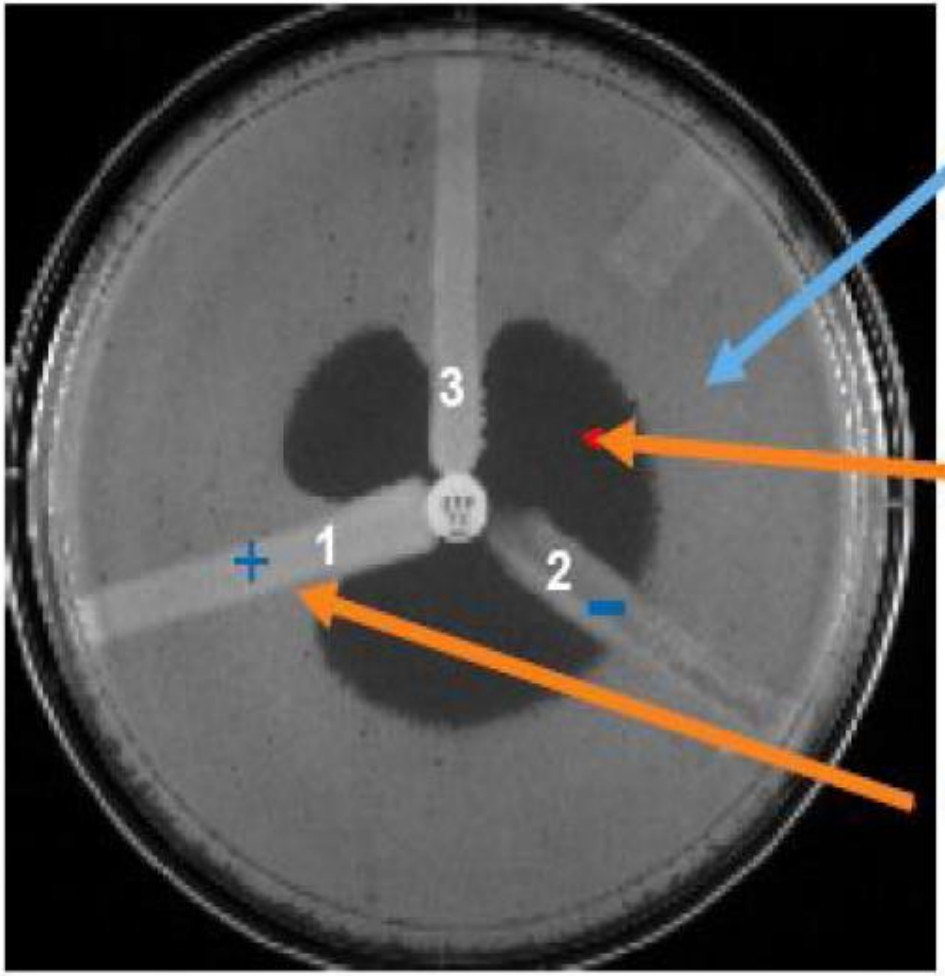
یا

- براث میکرودیلوشن ارتاپنم ، مروپنم یا ایمی پنم

- ✓ از MIC ایمی پنم نمی توان برای غربالگری گونه های پروتئوس ، پرووودنشیا و مورگانلا استفاده نمود.
- ✓ روش های دیگری هم برای شناسایی کارباپنماز ها وجود دارد مثل روش های کروموژنیک و ...

TechSmith Camtasia™

Modified Hodge Test



E. coli ATCC® 25922

Inhibition of *E. coli* ATCC® 25922 by ertapenem

Enhanced growth of *E. coli* ATCC® 25922. Carbapenemase produced by *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705 inactivated ertapenem that diffused into the media. Thus, there is no longer sufficient ertapenem here to inhibit *E. coli* ATCC® 25922 and an

Tenover

نحوه گزارش

- نتایج مثبت :Carbapenemase producer detected
- نتایج منفی: No carbapenemase detected

TechSmith Camtasia™

نحوه گذاشتن کامنت در برگه گزارش بیماران

موضوع	نوع کامنت
در صورت نداشتن نوار E-test برای دیسک وانکومایسین در خانواده استافیلوکک ها	Vancomycin susceptibility test must be tested with MIC, but its resistance reported very rare.
در صورت مثبت شدن تست D-zone	This isolate is presumed to be resistant based on detection of ICR, as determined by testing clindamycin in combination with erythromycin
در صورت مثبت شدن تست MRSA	ایزوله های mecA مثبت باید به عنوان مقاوم به متی سیلین(اگزاسیلین)(نه سفوکسیتین) گزارش شوند؛ سایر ترکیبات بتا لاکتام، به جز سفتارولین نیز باید به صورت مقاوم گزارش شوند و یا نباید اصلا گزارش شوند. بنابراین نحوه گذاشتن کامنت : Also resistant based on oxacillin resistance ……
در صورت مثبت شدن تست بتالاکتاماز ← مقاوم به به پنی سیلین، آمینو پنی سیلین، کربوکسی پنی سیلین و اورئیدوپنی سیلین می باشند	Also resistant based on beta lactamase positive: Penicillin, Amoxicillin, Ampicillin, Carbenicillin, Ticarcillin, Azlocillin and Piperacillin

TechSmith Camtasia™

نمونه هایی از نحوه قرار دادن کامنت در برگه گزارش بیماران

Patient ID: NAME: ZAHRA SADAT SHIRZADI REC. NO: 1123 AGE: 11 Years

Pathogen(S): *Staphylococcus aureus*

Resistance mechanism: Beta-lactamase (BLACT) & Methicillin Resistant (MRSA)

Antimicrobial Susceptibility Test

Susceptible

1- Tiecoplanin 2-Ciprofloxacin 3-Levofloxacin 4-Gentamicin

5- Trimethoprim-sulfamethoxazole

Comment: Vancomycin susceptibility must be tested with MIC but its resistance reported very rare.

Resistant

1-Tetracycline 2-Penicillin 3-Erythromycin 4- Oxacillin 5-Clindamycin

6-Azithromycin 7-Clarithromycin

Also Resistant based on Oxacillin Resistance:

Amoxicillin, Ampicillin, Cephalexin, Cloxacillin, Cefazolin, Cefuroxime, Dicloxacillin, Cefepime, Amoxicillin-clavulanate, Cefotaxime Ampicillin-sulbactam, Piperacillin-tazobactam, Cefotetan, Ceftizoxime, Ceftriaxone, Ceftaroline, Moxalactam, Imipenem, Meropenem.

Intermediate No intermediate antibiotic was observed

Comment: Below antibiotics cannot be used for treatment of *Staphylococci* spp:
Nalidixic acid, Aztreonam, and Polymyxin B/Colistin.

اشاره به مقاومت ذاتی

TechSmith Camtasia™

Urine Culture Result

Patient ID: NAME: ZAHRA SADAT SHIRZADI REC. NO: 1123 AGE: 11 Years

Pathogen(S): *Streptococcus pyogenes* (Group A)

Count: Many (Colonies)

Antimicrobial Susceptibility Test

Comment

Routine Susceptibility testing of *Streptococcus pyogenes* isolates is not advised according to Clinical Laboratory Standard Institute: CLSI; 2020.

Comment

Antibiotics that can be used for *Streptococcus pyogenes* treatment:

1-Penicillin 2-Ampicillin 3-Amoxicillin 4-Amoxicillin-clavulanic acid 5-Ceftizoxime 6-Cefazolin 7-Ampicillin/sulbactam 8-Cephradine 9-Cephalothin 10-Cefotaxime 11-Ceftriaxone 12-Cefepim 13-Imipenem 14-Ertapenem 15-Meropenem 16-Cefaclor 17-Cefdinir 18-Cefprozil 19-Ceftibuten 20-Cefuroxime 21-Cefpodoxime 22-Cephapirin

Patient ID: NAME: ZAHRA SADAT SHIRZADI REC. NO: 1123 AGE: 11 Years

Pathogen(S): ***Streptococcus agalactiae (Group B)***

Count: >100,000 CFU/mL

Antimicrobial Susceptibility Test

Comment

Routine Susceptibility testing of urine isolates of *Streptococcus agalactiae* is not advised according to Clinical Laboratory Standard Institute: CLSI; 2017.

Comment

Antibiotics that can be used for *Streptococcus agalactiae* treatment:

1-Penicillin 2-Ampicillin 3-Amoxicillin 4-Amoxicillin-clavulanic acid 5-Cefazolin 6-Ampicillin/sulbactam 7-Cefepim 8-Cephradine 9-Cephalothin 10-Cefotaxime 11-Ceftriaxone 12-Ceftizoxime 13-Imipenem 14-Ertapenem 15-Meropenem

Comment

recomendations for intrapartum prophylaxi for Gruop B streptococci are penicilin or ampicilin. Although cefazolion is recomendded for penicilin-allergic woman at low risk for anaphylaxis, but for those woman at high risk for anaphylaxis may recive clindamycin.

TechSmith Camtasia™

Urine Culture Result

Patient ID: NAME: ZAHRA SADAT SHIRZADI REC. NO: 1123 AGE: 11 Years

Pathogen(S): *Staphylococcus saprophyticus*

Count: >100,000 CFU/mL

Antimicrobial Susceptibility Test

Comment

Routine Susceptibility testing of urine isolates of *Staphylococcus saprophyticus* is not advised according to Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI; 2020) because infections of *Staphylococcus saprophyticus* respond to antimicrobial agents concentrations achieved in urine that commonly used to treat acute, uncomplicated urinary tract infections (eg, Nitrofurantoin, Trimethoprim ± Sulfamethoxazole, or a Fluoroquinolone).

Comment

Antibiotics that can be used for *Staphylococcus saprophyticus* treatment:

1-Nitrofurantoin 2-Trimethoprim 3-Trimethoprim-sulfamethoxazole 4-Ciprofloxacin
5-Levofloxacin 6-Ofloxacin 7-Moxifloxacin 8-Lomefloxacin 9-Norfloxacin
10-Enoxacin 11-Gatifloxacin 12-Grepafloxacin 13-Sparfloxacin 14-Fleroxacin

TechSmith Camtasia™

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیکی

- دمای مناسب نگهداری

✓ برای استفاده روتین.....نگهداری در یخچال (2-8 درجه)

✓ ذخیره (Stock): فریزر(منفی 14 درجه)

✓ آنتی بیوتیکهای بتا لاکتام به ویژه ایمی پنم و سولفاکتام خیلی حساسند در یخچال نمی توان نگهداری کرد (در صورت ناگزیر بودن حداکثر یک هفته)باید در فریزر نگهداری شوند.

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیکی

- استفاده از حداقل سه سویه میکروبی استاندارد به منظور کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیکی باید وجود داشته باشد.

- ✓ استاف اورئوس ATCC 25923
- ✓ اشرشیا کولی ATCC 25922
- ✓ سودوموناس ائروژینوزا ATCC 27853

TechSmith Camtasia™

AST - QC Program

- **Daily Testing**

✓ Test all applicable QC strains for *20 or 30 consecutive test days*, and document results

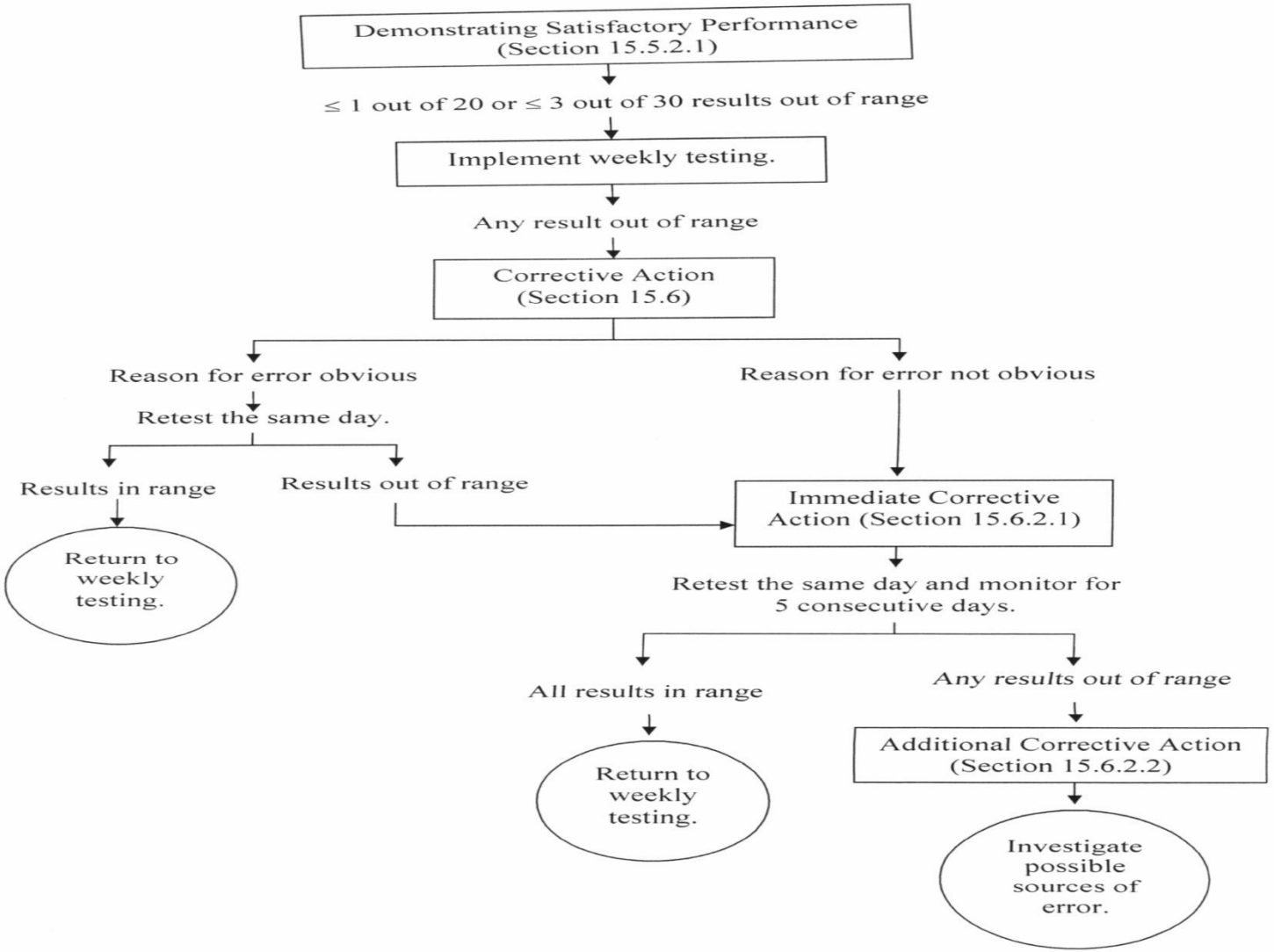
- **Weekly Testing**

✓ To convert from daily to weekly QC testing, no more than *one out of 20* or *three out of 30* zone diameters for each antimicrobial agent/organism combination may be outside the acceptable zone diameter limits stated

TechSmith Camtasia™

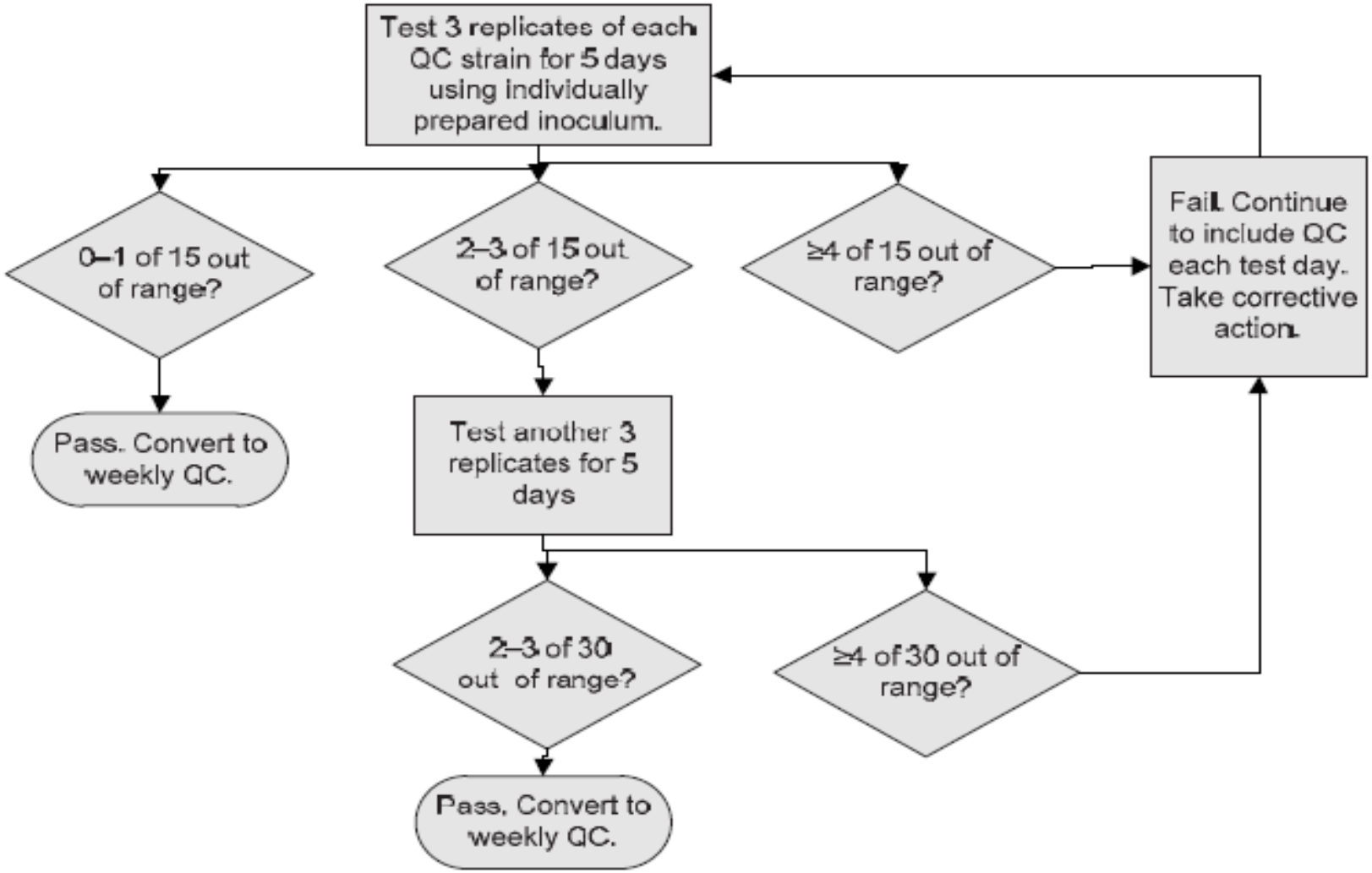
Appendix A. (Continued)

Disk Diffusion Weekly Quality Control Testing Protocol



©Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Alternative QC Plan



کنترل کیفی نوار های E-Test

- حداقل یک بار پس از خرید با سویه های استاندارد چک شوند.

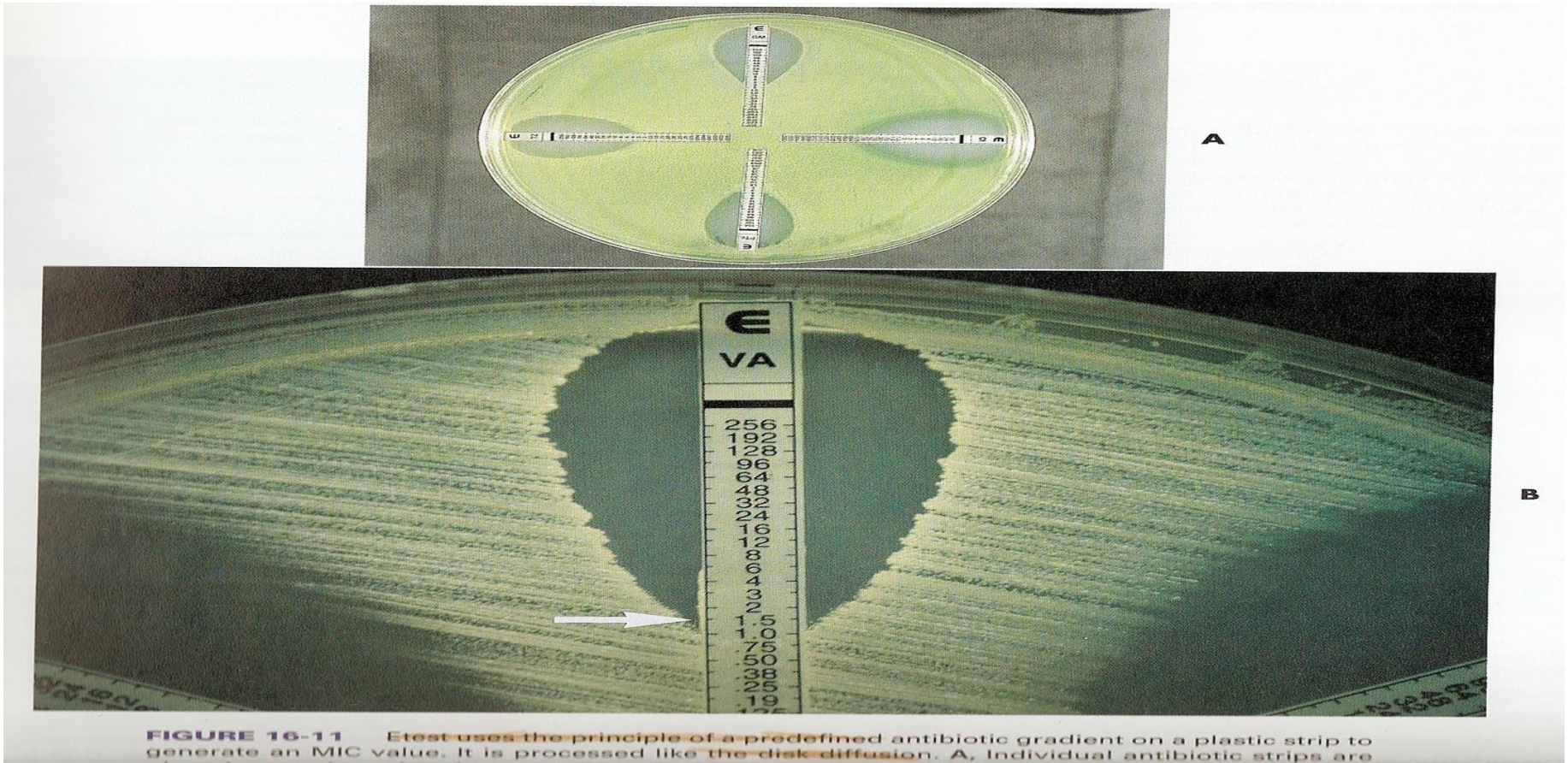


FIGURE 16-11 Etest uses the principle of a predefined antibiotic gradient on a plastic strip to generate an MIC value. It is processed like the disk diffusion. A, Individual antibiotic strips are

کنترل کیفی محیط مولر هینتون آگار

- **عمق محیط: 3-5 میلی متر**
- **محتوای تیمیدین(50 mg/dl)**

✓ استفاده از سویه استاندارد انتروکوکوس فکالیس (ATCC 29212 یا 33186) و دیسک آنتی بیوتیکی SXT(هاله عدم رشد بیشتر یا مساوی 20میلی متر باشد به معنای این است محتوای تیمیدین کافی است)

- **میزان کاتیون(Ca++ :50-100mg/dl,Mg++: 25mg/dl)**

✓ استفاده از سویه استاندارد سودوموناس(ATCC 27853) در برابر آمینوگلیکوزید

✓ هاله عدم رشد خیلی کوچک باشد....بالا بودن محتوای کاتیون ها را نشان میدهد.

✓ هاله عدم رشد خیلی بزرگ باشد....کم بودن محتوای کاتیون ها را نشان میدهد

- **PH محیط (7.2-7.4)**

TechSmith Camtasia™

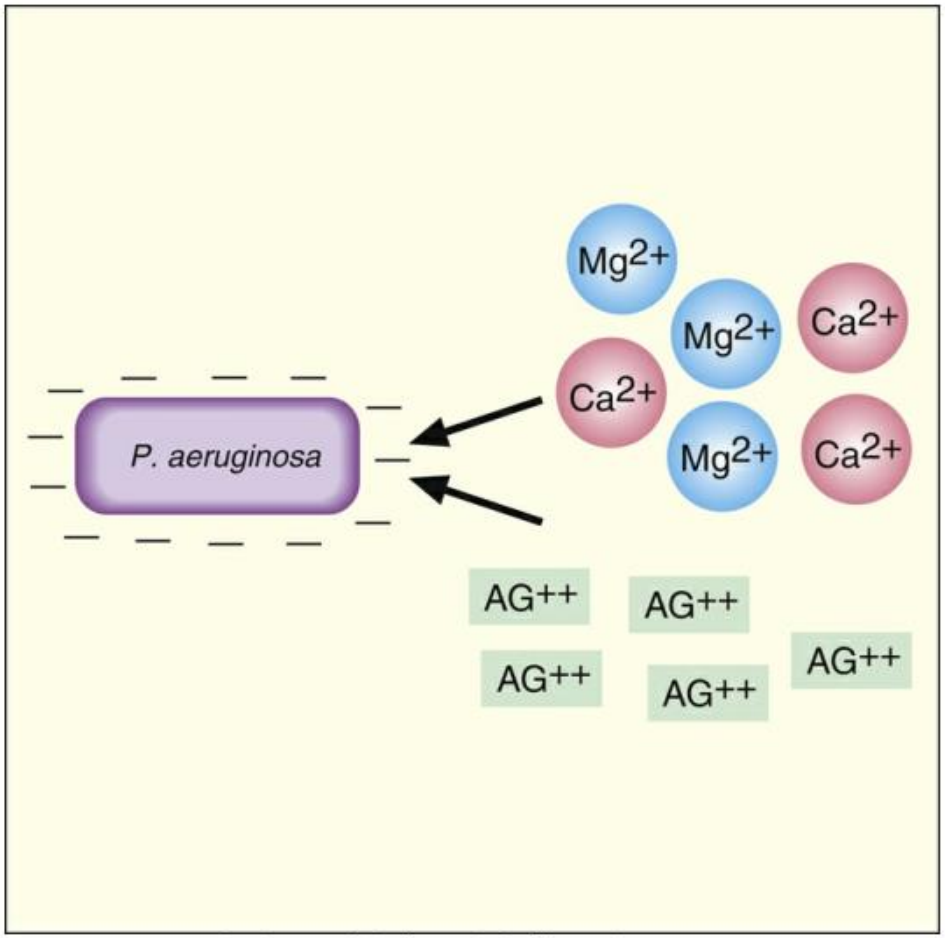


FIG. 10.6 Cations (Mg^2 and Ca^2) and aminoglycosides (AG++) compete for the negatively charged binding sites on the outer membrane surface of *P. aeruginosa.* Such competition is an example of the effect that environmental factors (e.g., cation concentrations) can have on the antibacterial activity of aminoglycosides.

TechSmith Camtasia™

چگونگی اندازه گیری PH

روش اول: تمام مولر هینتون آگار موجود در یک پتری را در ظرفی کوچک کاملا له کنید.می توانید کمی آب مقطر (2-3 سی سی) به آن اضافه کنید و به مدت ده دقیقه بخیسانید. سپس نوک pH متر را در آن غوطه ور کنید.

روش دوم: نوک pH متر را در داخل ارلن کوچکی قرار دهید. مقدار اندکی از آگار مذاب را به داخل ارلن ریخته و بعد سفت شدن آگار ، pH را اندازه گیری نمایید.

TechSmith Camtasia™

نحوه کنترل کیفی PH متر

کنترل کیفی

- **بررسی صحت:** باید از محلول شناخته شده (مانند آمپول‌ها یا ویال‌های بافر با pH مشخص) استفاده نمود و pH بدست آمده را با pH مورد انتظار مقایسه نمود و عدم صحت را از طریق فرمول زیر محاسبه نمود:

$$\%Bias = \frac{\text{عدد مورد انتظار} - \text{عدد به دست آمده}}{\text{عدد مورد انتظار}} \times 100$$

میزان عدم صحت مجاز pH متر ۱٪ است.

- **بررسی دقت:** pH یک محلول را ۱۰ بار در یک روز (within day CV) و چند روز پیاپی (Between day CV) اندازه‌گیری نمایید و میانگین، انحراف معیار (SD)، CV و انحراف معیار مقدار میانگین را محاسبه کنید.

میزان عدم دقت مجاز ۲٪ است.

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفی محیط کشت

رشد می‌کند، همولیز بتا رشد می‌کند، همولیز آلفا	*S. pyogenes* (19615) *S. pneumoniae* (6305)	هوازی یا CO_2، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	Blood Agar (BA)—Nonselective Sheep Blood Agar Media
رشد می‌کند رشد می‌کند	*S. aureus* (25923) or *E. coli* (25922)		
رشد می‌کند واکنش مثبت (تشکیل نوک پیکان شفاف) واکنش منفی (عدم تشکیل نوک پیکان)	*S.aureus* (33862) or (25923) *S. agalactiae* (12386) *S. pyogenes* (19615)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	Blood Agar-CAMP Test [TSA] (Trypticase Soy Agar With Sheep Blood Only)
رشد می‌کند، همولیز بتا رشد می‌کند، همولیز آلفا رشد می‌کند مهار می‌شود (بطور جزئی)	*S. pyogenes* (19615) *S. pneumoniae* (6305) *S. aureus* (25923) *P. mirabilis* (12453)	CNA، CO_2، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	Blood Agar—Selective Sheep (Columbia Blood Agar Media [CNA] Agar, Phenylethyl [PEA] Agar) Alcohol
رشد می‌کند رشد می‌کند مهار می‌شود (بطور جزئی)	*S. pyogenes* (19615) or *S. aureus* (25923) *P. mirabilis* (12453)	PEA، CO_2، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	
رشد می‌کند	*B. fragilis* (25285)	بیهوازی، CO_2، ۵ روز، ۳۵°C	Blood Culture Media
رشد می‌کند	*S. pneumoniae* (6305)	هوازی، CO_2، ۵ روز، ۳۵°C	
رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد	*C. albicans* (10231) or *S. flexneri* (12022) or *S. pneumoniae* (6305)	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	Brain Heart Infusion Agar
رشد می‌کند مهار می‌شود (بطور جزئی)	*C. jejuni* (33291) *E. coli* (25922)	O_2 کاهش‌یافته، غنی‌شده با CO_2، ۴۸ ساعت، ۴۲°C	Campylobacter Agar

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفی لوپ

حجم:

1µl (0.001 ml)

10 µl (0.01 ml)

جنس:

فلزی چند بار مصرف: پلاتینیوم یا نیکروم

پلاستیکی یک بار مصرف

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت
مواد و وسایل مورد نیاز

- آب مقطر نوع I یا II
- محلول اوانس بلو (Evans Blue Dye Solution = EBD)
  - ذخیره: 0.75 g در 100 ml آب مقطر
  - صاف کردن محلول با کاغذ صافی واتمن شماره 4
  - برچسب گذاری ظرف با نام، غلظت و تاریخ ساخت محلول
  - ذخیره سازی در دمای اتاق دور از نور، پایدار به مدت ۶ ماه
- کووت های مربع شیشه ای با عبور نور 1cm (برای همه اندازه گیری ها از کووت یکسان استفاده شود.)
- ظروف شیشه ای: چند لوله آزمایش ۱۵ میلی لیتری تمیز، چند پیپت 10mlکلاس A1
- اسپکتروفتومتر با کیفیت خوب و کالیبره

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت
کالیبراسیون به روش رنگ سنجی

- آماده سازی محلول های کاری

a. 1ml از محلول ذخیره را به 49ml آب مقطر اضافه نمایید. (رقت 1:50)

b. ۴ لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول 9ml و در سه لوله دیگر 5ml آب مقطر بریزید.

c. 1ml از رقت 1:50 برداشته و به لوله اول (9ml) اضافه کنید. (رقت 1:500)

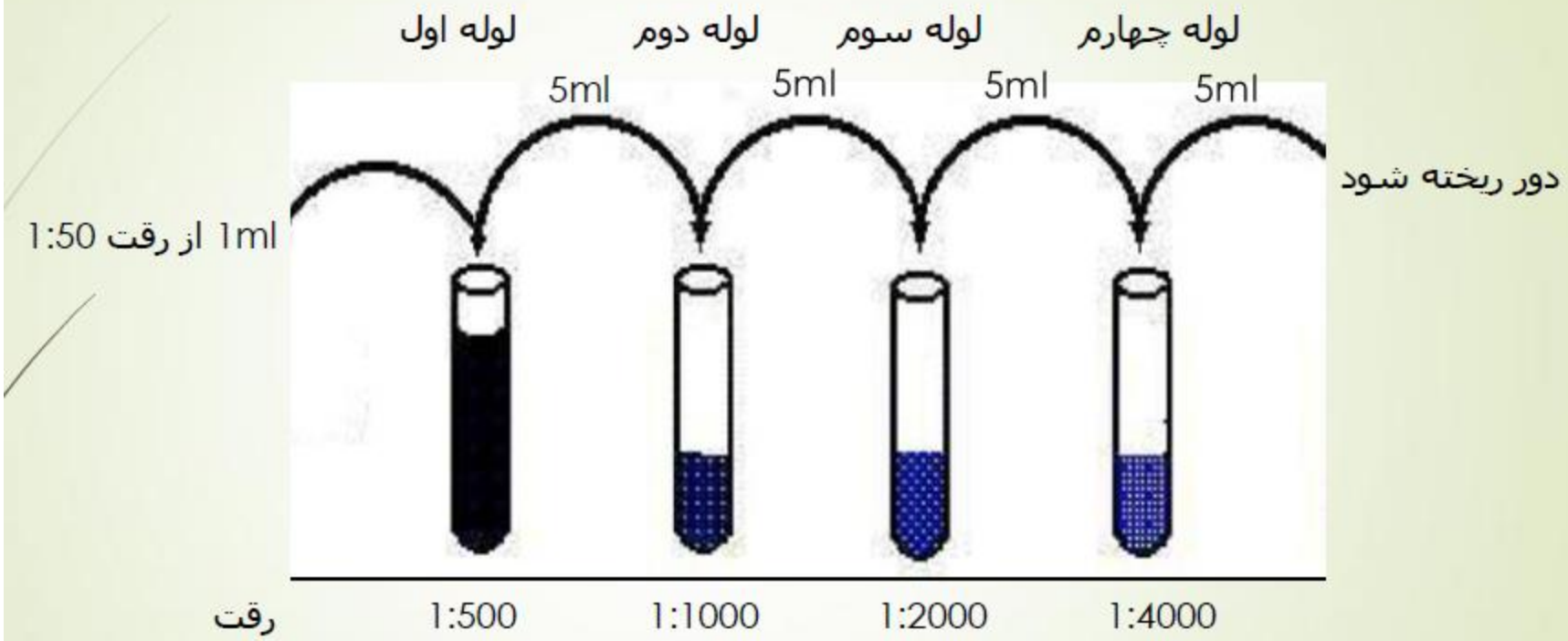
d. 5ml از لوله اول برداشته، در لوله دوم ریخته و کاملا مخلوط نمایید، از لوله دوم در لوله سوم و از لوله سوم در لوله چهارم.

e. در انتها 5ml از لوله چهارم را برداشته و دور بریزید.

f. به این ترتیب 4 محلول خواهید داشت که رقت نهایي بدست آمده در هر یک مطابق شکل خواهد بود. (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000!)

- 4 رقت فوق را می توانید تا 6 ماه ذخیره کنید، ولی اگر قرائت هر یک از رقت ها 3% از قرائت قبلی تفاوت داشت، رقت های تازه تهیه نمایید.

TechSmith Camtasia™



TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت (ادامه...)
کالیبراسیون به روش رنگ سنجی

f. اسپکتروفتومتر را در حالت جذب با طول موج 620nm تنظیم کنید.

g. اسپکتروفتومتر را با آب مقطر صفر نمایید.

h. جذب 4 رقت فوق را اندازه گیری و ثبت نمایید. جذب نوری (محور عمودی) را برابر هر غلظتی از رقت ها (محور افقی) در کاغذ میلی متری ثبت نمایید. یک خط که بیشتر از همه به هر ۴ نقطه نزدیک است را به منظور ساختن منحنی کالیبراسیون، رسم کنید.

i. لوله دیگری انتخاب کرده، 10ml آب مقطر در آن بریزید. با استفاده از لوپ 1µl مورد آزمون ده بار از محلول دخیره اولیه را به این لوله منتقل و کاملا مخلوط نمایید. جذب این محلول را اندازه گیری نمایید، که باید برابر با جذب رقت 1:1000 روی منحنی کالیبراسیون باشد.

j. محلول فوق را برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و بررسی نمایید. (در کل ۴ خوانده)

k. خوانده ها را بر روی برگه کاری ثبت نموده، میانگین ۴ خوانده را محاسبه نمایید.

l. درصد صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری بدست آورده و ثبت نمایید.

m. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از ±۲۰% از رقت محلول ذخیره ۱:۱۰۰۰ باشد، لوپ غیر دقیق می باشد. اقدامات اصلاحی انجام دهید.

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت (ادامه...)
کالیبراسیون به روش رنگ سنجی

n. برای کالیبراسیون لوپ 10µl لوله ای انتخاب کرده، 100ml آب مقطر در آن بریزید. با استفاده از لوپ 10µl مورد آزمون ده بار از محلول دخیره اولیه را به این لوله منتقل و کاملا مخلوط نمایید. جذب این محلول را اندازه گیری نمایید، که باید برابر با جذب رقت ۱:۱۰۰۰ روی منحنی کالیبراسیون باشد. این محلول را برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و بررسی نمایید (در کل ۴ خوانده). خوانده ها را بر روی برگه کاری ثبت نموده، میانگین ۴ خوانده را محاسبه نمایید. درصد صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری بدست آورده و ثبت نمایید. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از ٪۲۰± از رقت محلول ذخیره ۱:۱۰۰۰ باشد، لوپ غیر دقیق می باشد. اقدامات اصلاحی انجام دهید.

TechSmith Camtasia™

Worksheet 1
Colorimetric Quantitative Loop Calibration

Loop size: _____ Date: _____ Scientist initials _____

Loop manufacturer and Lot No. _____ Date put into use_____

Sample No.	Absorbance
1	_____
2	_____
3	_____
4	_____
Sum of 4 readings	_____
Average (divide by 4)	_____

Average minus the 1:1000 absorbance std. (a) _____

Divide (a) by the 1:1000 absorbance std. (b)_____

% inaccuracy: Multiply (b) by 100 (c)_____%

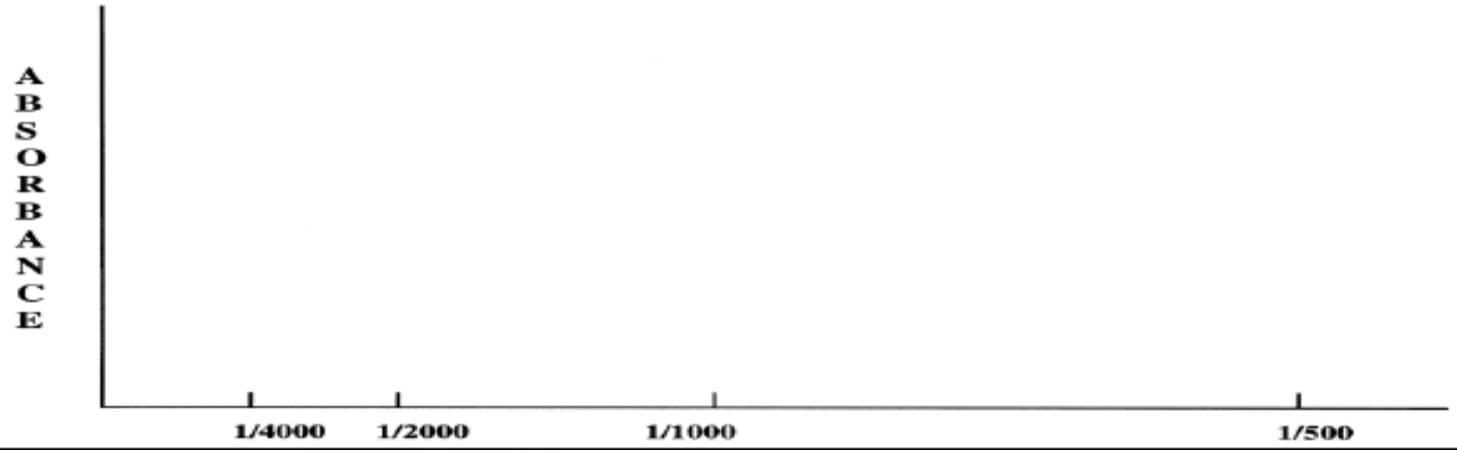
Value (c) must be ± 20%: Acceptable? Yes/No

Corrective action:

_____
_____
_____
_____
_____

Reviewed by:_____ Date:_____

Calibration curve:



TechSmith Camtasia™

محدودیت ها

- در صورتی که در نمونه مایع یا حجم برداشته شده با لوپ حباب وجود داشته باشد، لوپ های کمی، هم یک بار مصرف و هم قابل استفاده مجدد، بسیار غیر دقیق خواهند بود.
  - از ایجاد حباب با تکان ندادن مایع اجتناب نمایید.
  - لوپ پر شده را به دقت از نظر حباب بررسی نمایید.
  - حباب ها را با سوزاندن (لوپ های قابل استفاده مجدد) و جایگزین کردن (لوپ های یک بار مصرف) یا دوباره برداشتن (هر لوپی) از بین ببرید.

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت رنگ ها، معرف ها و آنتی سرم ها در آزمایشگاه میکروب شناسی

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم

- A) معرف ها را از نظر ظاهري، به طور روزانه بررسي كنيد.

1. اگر كريستال ويوله رسوب كند يا ته نشين شود، قبل از استفاده آن را صاف كنيد.
2. اگر محلول هاي كاري با مصرف روزانه تمام نمي شوند، بايد به طور منظم عوض شوند. تبخير مواد ممكن است عملكرد معرف ها را تغيير دهد.
3. معرف های کاری را حداقل به صورت ماهانه دور بریزید تا استفاده مکرر آنها محدود شود.
   - توجه: رنگ ها مي توانند آلوده شوند. وقتي مشكوك می شويد، بايد از سری ساخت جديد معرف استفاده كنيد.

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم (ادامه...)

- B) دفعات آزمایش کنترل کیفیت:
  - قبل از استفاده از هر سری ساخت جدید هر رنگ و معرف رنگ بر
  - و بعد از آن حداقل به صورت هفتگی
  - با یک میکروارگانیسم گرم مثبت و یک گرم منفی
  - کارکنان آزمایشگاه که رنگ آمیزی گرم را به دفعات کم انجام می دهند، باید به صورت روزانه یا با هر بار آزمایش نمونه بیمار، با یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی آزمایش کنند.

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم (ادامه...)

1. تهیه سوسپانسیونی با کدورت کم از *Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) در محیط مایع (فاز لگاریتمی)
2. دو قطره از براث روی هر لام ریخته و اسمیر تهیه نمایید.
3. آنها را در متانول فیکس کرده و در ۲۰C° - نگهداری کنید.
4. مطابق روش رنگ آمیزي گرم، رنگ آمیزی نمایید.
5. نتایج مورد انتظار:
   - باسیل گرم منفي: صورتي
   - کوکسي گرم مثبت: بنفش پررنگ
6. به طور جایگزین، از بین دندان ها با يك اپليكاتور چوبي نمونه گيري كرده و در انتهای لامی که برای نمونه استفاده شده است، قرار دهید. این یک روش کنترل Built-in می باشد که شامل سویه های گرم مثبت و گرم منفي است.

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت سایر رنگ ها

رنگ	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	دفعات انجام آزمایش QC
Acid-Fast (Ziehl-Neelsen)	*M.Tuberculosis* (or BCG) *E.Coli*	25177 25922	باسیل صورتی-قرمز باسیل آبی	هر سری ساخت و سپس هر روز کاری
Methylen Blue	(C. diphtheriae) or Diphtheroid *E.coli*	- 25922	دانه های متاکروماتیک آبی رنگ	هر سری ساخت و سپس هر روز کاری

TechSmith Camtasia™

آزمایش اکسیداز

- هدف:
  - افتراق انتروباکتریاسه ها (منفی) از گونه های آئروموناس (مثبت)، پلزیوموناس شیگلوئیدس (مثبت) و اکثر گونه های ویبریو (مثبت)
  - افتراق موراکسلا (مثبت) و نیسریا (مثبت) از اسینتوباکتر (منفی)
  - گونه های کمپیلوباکتر اکسیداز مثبت هستند.
  - به عنوان تست تشخیصی مهم برای تشخیص باکتری های میله ای گرم منفی که عضو خانواده انتروباکتریاسه نیستند، به کار می رود.
- اصول:
  - آنزیم باکتریایی داخل سلولی سیتوکروم اکسیداز، در حضور اکسیژن محیط، معرف فنیلن دی آمین (پذیرنده الکترون) را به فنل اندول بنفش تیره اکسید می کند. این آزمایش برای تشخیص اولیه باکتری های گرم منفی مفید واقع می شود.

TechSmith Camtasia™

آزمایش اکسیداز

- معرف ها: یکی از موارد زیر را می توان استفاده نمود:
  - معرف کوآکس (تترامتیل پارافنیلن دي آمین دي هیدروکلراید)
  - توجه: فرمول های دیگری نیز وجود دارد، اما کواکس حساس ترین معرف است، پایدارتر بوده و نسبت به مشتق دی متیل آن کمتر سمی است.
  - برای تهیه محلول ۱% تترامتیل پارافنیلن دي آمین دي هیدروکلراید، ۰/۱ گرم از پودر تترامتیل پارافنیلن دي آمین دي هیدروکلراید را در ۱۰ml آب مقطر استریل حل کنید. بخوبی مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه آن را درجای ثابتی قرار دهید.
  - معرف را بصورت روزانه تهیه کنید.
  - همچنین می توانید معرف را داخل لوله های پوشیده شده با فویل به اندازه های مساوی تقسیم کرده و در دمای ۲۰ - درجه سانتیگراد ذخیره نمایید. قبل از استفاده معرف را از فریزر خارج نموده، بگذارید ذوب شود. باقیمانده هر روز را دور بریزید.
  - دیسک ها یا نوارهای کاغذی آغشته به معرف (آماده مصرف تجاری) نگهداری شده در یخچال

TechSmith Camtasia™

آزمایش اکسیداز (ادامه...)

- روش انجام آزمایش

1. مربع کوچکی از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ را در ظرف پتری قرار دهید و با ۱ یا ۲ قطره از معرف اکسیداز کواکس آماده شده مرطوب نمایید، یا نوار یا دیسک اکسیداز آماده مصرف را در ظرف پتری قرار دهید.
   - توجه: مطابق دستورالعمل سازنده عمل کنید. ممکن است مطابق دستورالعمل بعضی سازندگان نیاز به مرطوب نمودن دیسک باشد.
2. از یک کلنی تک با استفاده از اپلیکاتور برداشته و بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف کواکس پخش کنید. تغییر رنگ کاغذ به بنفش را مشاهده نمایید.
3. برای باکتری های سخت رشد، کلنی را با سوآب پنبه ای سفید برداشته، سوآب را بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف بکشید. تغییر رنگ به بنفش را بر روی سوآب مشاهده کنید.

TechSmith Camtasia™

آزمایش اکسیداز (ادامه...)

- تفسیر آزمایش
  - واکنش مثبت: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۱۰ ثانیه
  - واکنش تاخیری: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۶۰-۱۰ ثانیه (باید تست هاي بيشتري انجام شود، زيرا احتمالاً متعلق به خانواده انتروباکتریاسه نمي باشد.)
  - واکنش منفی: عدم تغییر رنگ معرف یا ایجاد صورتی کمرنگ در مدت ۱۰ ثانیه
  - توجه: به دستورالعمل سازنده توجه شود.

TechSmith Camtasia™

آزمایش اکسیداز (ادامه...)

- کنترل کیفیت
  - هر سری ساخت جدید پودر معرف یا دیسک آماده مصرف تجاری
  - و هر روزي کاری
  - هنگامیکه محلول معرف برنگ بنفش کم رنگ تغییر کند یا دیسک کاغذی در حال تیره شدن است، از آن استفاده نکنید.
    - سویه کنترل مثبت: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
    - سویه کنترل منفي: *Escherichia coli* ATCC 25922

TechSmith Camtasia™

آزمایش اکسیداز (ادامه...)

- محدودیت ها
- برای جلوگیری از ایجاد نتایج مثبت کاذب:
  - از لوپ استیل یا نیکروم برای برداشتن کلنی استفاده نکنید. زیرا در اثر استریل کردن لوپ با شعله، اکسیداسیون سطحی ایجاد شده و نتیجه مثبت کاذب بدست می آید.
  - از ارگانیسم هایی که بر روی محیط های حاوی گلوکز یا رنگ (مانند MAC یا EMB) رشد کرده اند، استفاده نکنید.
- کشت های مخلوط نیسریا و سودوموناس ممکن است نتایج منفی کاذب دهند. زیرا سودوموناس یک سوبسترای مهاری تولید می کند که با تولید اکسیداز توسط نیسریا تداخل ایجاد می نماید.
- رعایت زمان قرائت واکنش برای انجام دقیق تست بسیار مهم است.

TechSmith Camtasia™

آزمایش کاتالاز

- هدف:
  - افتراق استافیلوکوك ها و میکروکوك ها (مثبت) از استرپتوکوك ها و انتروکوک ها (منفي)
  - افتراق کلستریدیوم ها (منفی) از باسیلوس ها (مثبت)
  - افتراق لیستریا مونوسیتوژنز و کورینه باکتریوم ها (مثبت) از استرپتوکوك گروه B (منفی)
  - افتراق باسیل های گرم منفی سخت رشد از یکدیگر

- اصول:
  - باکتری هایی که آنزیم کاتالاز تولید مي کنند، پراکسید هیدروژن (H2O2) را به آب و گاز اکسیژن هیدرولیز می کنند و منجر به آزاد شدن حباب های گاز می شود. H2O2 یکي از محصولات نهايي اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات است. این آزمایش در تشخیص اولیه اغلب باکتری ها مفید واقع می شود.

TechSmith Camtasia™

آزمایش کاتالاز (ادامه...)

- نمونه:
  - کلنی های خالص و تازه (کشت ۲۴-۱۸ ساعته) از باکتری رشد کرده روی محیط آگار مناسب
  - برای باکتری های بی هوازی، کلنی ها را به مدت ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش در معرض هوا قرار دهید.
- ابزار و معرف ها:
  - معرف پراکسید هیدروژن ۳۰% برای نیسریاها (هشدار: آب اکسیژنه ۳۰% به شدت برای پوست سوزاننده است. در صورت تماس با پوست، فوراً با اتیل الکل ۷۰%، و نه آب، شستشو دهید.)
  - معرف پراکسید هیدروژن ۱۵% برای میکروارگانیسم های بی هوازی
  - معرف پراکسید هیدروژن ۳% برای سایر باکتری ها
    - توجه ۱: معرف ۳۰% را می توان برای تمام آزمون ها استفاده کرد، اما خطرناک تر است.
    - توجه ۲: معرف ها باید در شیشه هاي تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداري شوند.
  - اپلیکاتور چوبي یا شیشه اي یا لوپ پلاتیني
  - لام شیشه اي

TechSmith Camtasia™

آزمایش کاتالاز (ادامه...)

- روش انجام آزمایش:

1. با يك اپليكاتور از مركز يك كلني ۲۴-۱۸ ساعته به سطح يك لام شيشه اي تميز منتقل كنيد. اطمينان حاصل نماييد كه كلنی روی لام با چشم قابل رويت است. اگر كلنی روی پليت بلاد آگار باشد، دقت شود از خون برداشته نشود.
2. بلافاصله يك قطره معرف را به كلني روي لام اضافه كنيد و فورا ا يجاد حباب روي لام را بررسي نماييد. نتيجه را به صورت مثبت يا منفي گزارش كنيد. برای مشاهده بهتر حباب ها لام را روی زمينه سياه نگه داريد.
3. لام را داخل Safty Box بيندازيد.

- تفسير:
  - واكنش مثبت: ظاهر شدن فوری حباب بصورت ماندگار يا حالت جوش زدن (كف)
  - واكنش ضعيف: ايجاد يک يا دو حباب
  - واكنش منفی: عدم ايجاد حباب يا ظاهر شدن چند حباب بعد از ۲۰ ثانيه (بعضی از باكتری ها دارای آنزيمی غير از كاتالاز هستند كه پراكسيد هيدروژن را تجزيه كرده كه تعداد كمی حباب ريز ايجاد می شود.)

TechSmith Camtasia™

آزمایش کاتالاز (ادامه...)

- کنترل کیفیت:
  - معرف پراکسید هیدورژن باید هر روز یا قبل از آزمایش نمودن باکتري مجهول با سویه هاي کنترل مثبت و منفي آزمایش شود.
    - سویه کنترل مثبت: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
    - سویه کنترل منفي: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

TechSmith Camtasia™

ازمایش کاتالاز (ادامه...)

- محدودیت ها:

- گلبول های قرمز حاوی کاتالاز هستند. برای اجتناب از جواب های مثبت کاذب نباید کلنی ها را از محیط آگار خون دار برداشت. اگر کلنی به آسانی برداشت نمی شود یا خوب رشد نمی کند، آزمایش را از روی محیط شکلات آگار تکرار نمایید, که در آزمایش مداخله ایجاد نمی کند. اما از آنجائي که اکثر نمونه هاي کلينيکي روي محيط هاي خون دار کشت داده مي شوند، براي انجام تست مي توان از قله کلني ها بدون تماس با محيط برداشت تا واکنش مثبت کاذب ايجاد نشود.
- از محیط مولر هینتون آگار استفاده نکنید.
- از آنجائي که بعضي از باکتري ها داراي آنزيم هايي غير از کاتالاز هستند که پراکسيد هيدروژن را تجزيه مي نمايند، ايجاد حباب هاي ريز به تعداد کم بعد از ۲۰ ثانيه مثبت در نظر گرفته نمي شود.
- بهتر است از يك اپليکاتور چوبي، لوپ پلاتينی يا پلاستيکی براي برداشتن کلني استفاده شود. استفاده از لوپ آهني واکنش مثبت کاذب ايجاد مي کند.
- چون این آنزیم فقط در کشت های زنده وجود دارد, کشت های بیشتز از ۲۴ ساعت برای آزمایش مناسب نیستند. کشت های کهنه ممکن است سبب نتیجه منفی کاذب شوند.
- ترتیب اضافه نمودن معرف به کلنی را برعکس نکنید، زیرا می تواند نتایج منفی کاذب رخ دهد.

TechSmith Camtasia™

معرف	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	دفعات انجام آزمایش QC
Bacitracin disk	*Strep.pyogenes* *Strep. agalactiae*	19615 12386	هاله عدم رشد (بزرگتر از 10mm) عدم هاله یا کمتر از 10mm	هر سری ساخت و سپس هر ۳ ماه
Coagulase	*Staph.aureus* *Staph.epidermidis*	25923 12228	مثبت (ایجاد لخته) منفی (عدم ایجاد لخته)	هر سری ساخت و سپس با هر بار آزمایش
Ferric chloride (10%)	*Proteus vulgaris* *Escherichia coli*	33420 25922	مثبت (سبز رنگ) منفی (بدون تغییر رنگ)	هر سری ساخت و سپس هر ۳ ماه
Methyl red	*E. coli* *K. pneumoniae*	25922 13883	مثبت (قرمز رنگ) منفی (بدون تغییر رنگ)	هر سری ساخت و سپس هر ۳ ماه
ONPG	*E. coli* *Proteus mirabilis*	25922 29245	مثبت (زرد رنگ) منفی (بدون تغییر رنگ)	هر سری ساخت و سپس هر ۳ ماه
Voges-Proskauer	*Enterobacter cloacae* *E. coli*	13047 25922	مثبت (قرمز رنگ) منفی (بدون تغییر رنگ)	هر سری ساخت و سپس هر ۳ ماه
Indole (Kovacs)	*E. coli* *P. aeruginosa*	25922 27853	مثبت (ارغوانی رنگ) منفی (بدون تغییر رنگ)	هر سری ساخت و سپس هر ۳ ماه
Optochin (در حضور CO2)	*Strep. pneumoniae* *Strep. pyogenes*	6305 19615	حساس مقاوم	هر سری ساخت و سپس هر ۳ ماه

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت آنتی سرم

- هر سری ساخت و سپس هر شش ماه یک بار
- بررسی چشمی یک قطره از آنتی سرم روی لام، آنتی سرم باید شفاف بوده و فاقد هر گونه ذره باشد.
- آزمایش بروش آگلوتیناسیون بر روی لام
- آزمایش حداقل یک سویه کنترل مثبت و یک سویه کنترل منفی باید برای بررسی خصوصیت و شدت آگلوتیناسیون آنتی سرم
  - آزمون کنترل کیفیت آنتی سرم با سویه های کنترل باید مطابق روش انجام آزمایش و کاملا منطبق با دستورالعمل شدگت سازنده باشد.
- ثبت نتایج همه واکنش ها

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت آنتی سرم

- یک قطره آنتی سرم (حدود 0.05 ml، اگرچه می توان 10µl هم استفاده نمود) روی یک طرف لام قرار دهید.
- یک قطره سرم فیزیولوژی روی طرف دیگر لام قرار دهید، برای بررسی اتوآگلوتیناسیون یا خشن بودن کلنی ها.(به عنوان کنترل منفی)
- از کلنی های خالص سویه کنترل و ۱۸ تا ۲۴ ساعته روی محیط غیر انتخابی مانند بلاد آگار یا TSA، سوسپانسیون یکنواخت حدود ۲ تا ۳ مک فارلند در هر قطره تهیه نمایید. با اپلیکاتور چوبی یا لوپ آنرا کاملا مخلوط کنید.
- لام را به مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه (مطابق دستورالعمل سازنده) به عقب و جلو بچرخانید.
- واکنش آگلوتیناسیون را در زیر نور کافی (چراغ مطالعه) با پس زمینه تیره بررسی نمایید.
- قطره سرم فیزیولوژی باید فاقد آگلوتیناسیون باشد، تا نتیجه قطره آنتی سرم قابل اطمینان محسوب شود.

TechSmith Camtasia™

کنترل کیفیت آنتی سرم

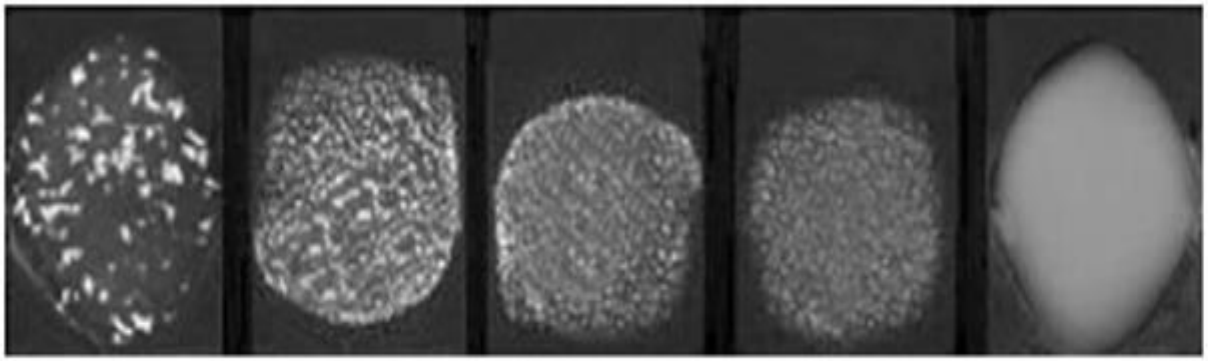
- شدت آگلوتیناسیون قرائت و می توان آن را مطابق جدول زیر ثبت نمود:

Percentage of agglutination:	Record reaction as:
100%	4+
75%	3+
50%	2+
25%	1+
0%	negative

TechSmith Camtasia™

Score and record the results as follows:

4+	All organisms are clumped and the supernatant, or suspending fluid is clear
3+	About 75% agglutination, the supernatant fluid is slightly cloudy
2+	About 50% agglutination, the supernatant fluid is moderately cloudy
1+	About 25% agglutination, the supernatant fluid is cloudy
Tr	Trace amount of agglutination present
Negative	No agglutination apparent and suspension remains homogenous.



4+ **3+** **2+** **1+** **Negative**

TechSmith Camtasia

کنترل کیفی آب

TechSmith Camtasia™

انواع آب بر اساس درجه خلوص:

- **درجه I:** تهیه محلول استاندارد،بافر ، سرم های کنترل و لیوفیلیزه ، الکتروفورز، کشت سلول ...

- **درجه II:** آزمایش های بیوشیمی، هماتولوژی ، میکروبیولوژی، سرولوژی و ایمونولوژی

- **درجه III:** آنالیز ادار و مدفوع ، شست و شو و آب کشی وسایل شیشه ای ، ساخت محیط کشت و بافت شناسی

TechSmith Camtasia™

پارامتر	آب نوع ۱	آب نوع ۲	آب نوع ۳
حداکثر باکتری (CFU/ml)	10	1000	نامشخص
میزان pH	نامشخص	نامشخص	۵-۸
حداقل مقاومت (MΩ/cm)	۱۰	۱/۰	۰/۱
حداکثر مقدار سیلیس	۰/۰۵	۰/۱	۱/۰
ذرات	فیلتراسیون ۰/۲۲ میکرون	نامشخص	نامشخص
مواد آلی	فیلتراسیون کربن	نامشخص	نامشخص

TechSmith Camtasia™

- تعیین هدایت یا مقاومت الکتریکی آب: با استفاده از دستگاه هدایت سنج یا مقاومت سنج
- فواصل هفتگی یا برحسب نیاز در هربار مصرف

TechSmith Camtasia™

- تعیین مواد آلی آب: با اضافه کردن چند قطره پرمگنات پتاسیم به آب خالص در صورتی که پس از یک ساعت رنگ بنفش مایل به ارغوانی باقی بماند نشان دهنده خلوص بالای آب ودر غیر این صورت نشان دهنده مواد آلی زیاد است.
- اندازه گیری pH آب: به علت عدم وجود یون در آب درجه یک و دو غیرقابل اندازه گیری است.
- فواصل انجام :در هربار مصرف برای آب درجه 3 : PH: 5-8
- کشت میکروبی
- اب درجه یک : هفتگی
- آب درجه دو : دوره ای در هربار مصرف
- آب درجه سه : نیازی نیست

TechSmith Camtasia™

Thank You!