

Antibacterial susceptibility assay (Antibiogram)

Dr.Davood mansury

Assistant Professor, Department of Microbiology, School of
Medicine, Isfahan University of Medical Sciences

Antibacterial susceptibility assay

❖ Quantitative

➤ MIC (minimum inhibitory concentration)

✓ Broth Dilution

Macrodilution

Microdilution

✓ Agar dilution

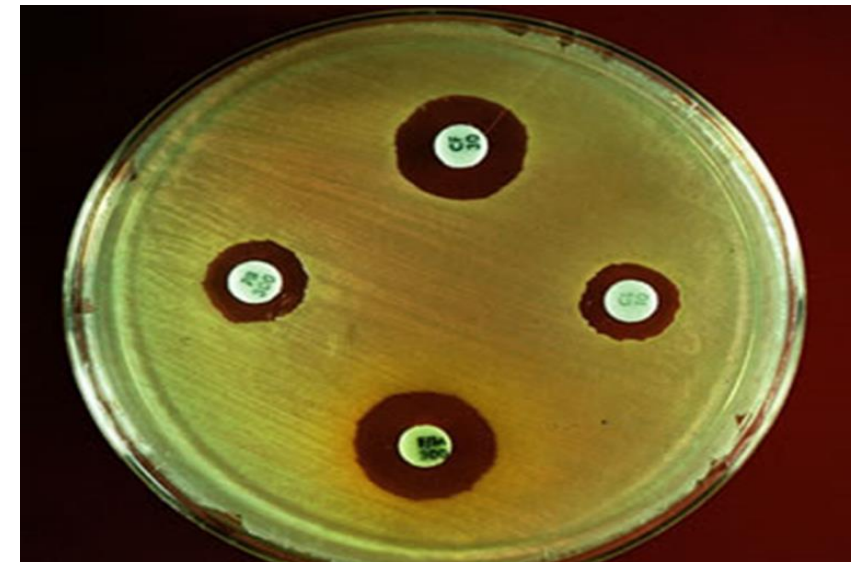
✓ E-test

➤ MBC (minimum bactericidal concentration)

❖ Qualitative

➤ Disk diffusion (Kirby-Bauer)

➤ Agar Well Diffusion



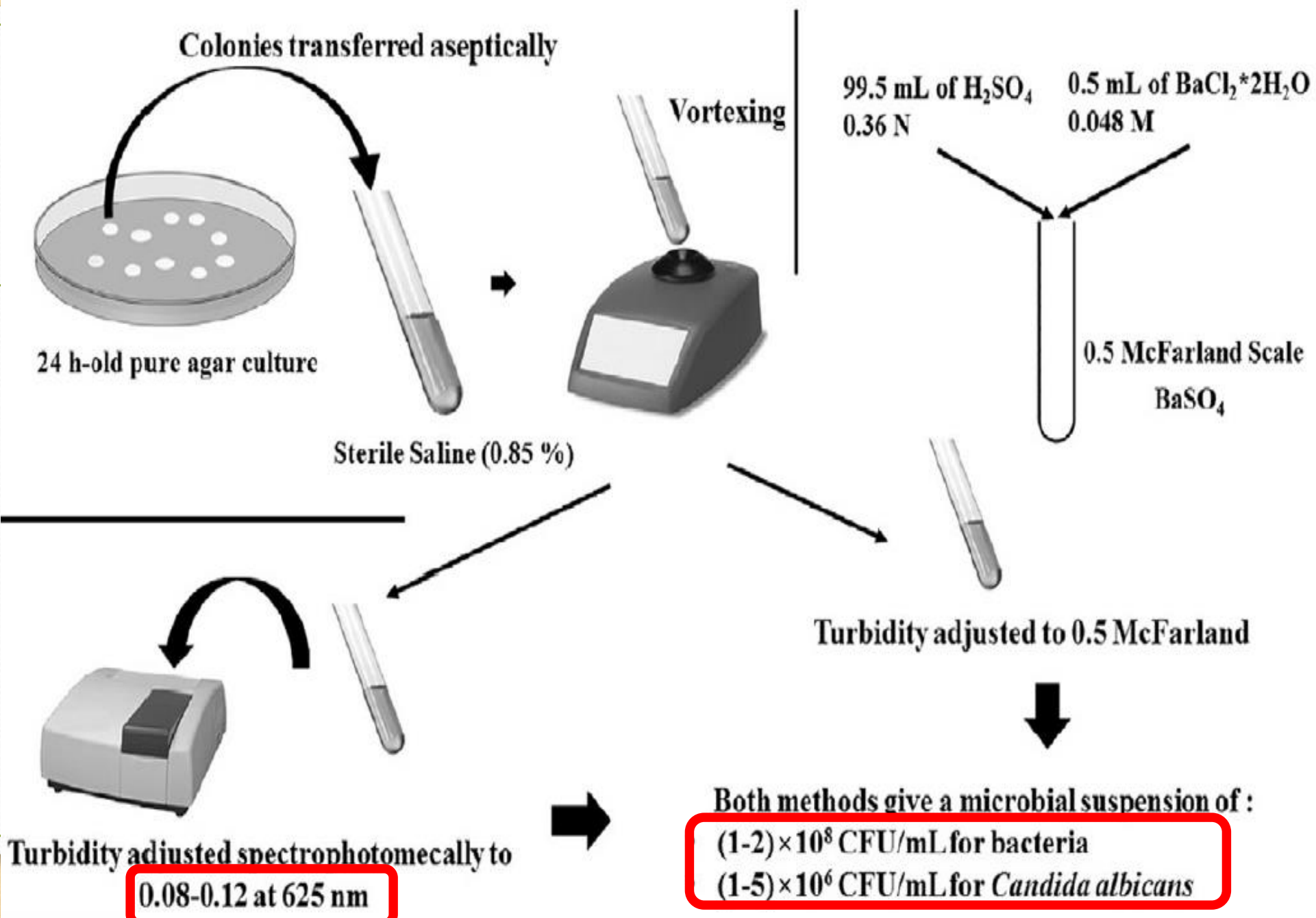
Disk Diffusion Procedure

1. Fresh overnight isolates
2. Prepare 0.5 Mc farland (in MHB or NS)
3. Inoculation in Mueller Hinton agar (Swab)
4. Insert antibiotic disks
5. Incubation
6. Interpretation

McFarland preparation

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1X10⁸ CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance*	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

OD at 600 nm



Disk diffusion

- A major source of error = **inoculum variation**
- final concentration = a swab from $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (**0.5 McFarland**)
 - growth method
 - direct colony
- no. of disks per plate:
 - **12** disks on a **150-mm**
 - **5** disks on a **90-mm** (**6** disks on a **100-mm**)
- **Distance**: **30 mm** apart and no closer than 24 mm center to center
- Plates should not be stacked more than **five** (same temperature)
- obvious visible growth is seen by the naked eye

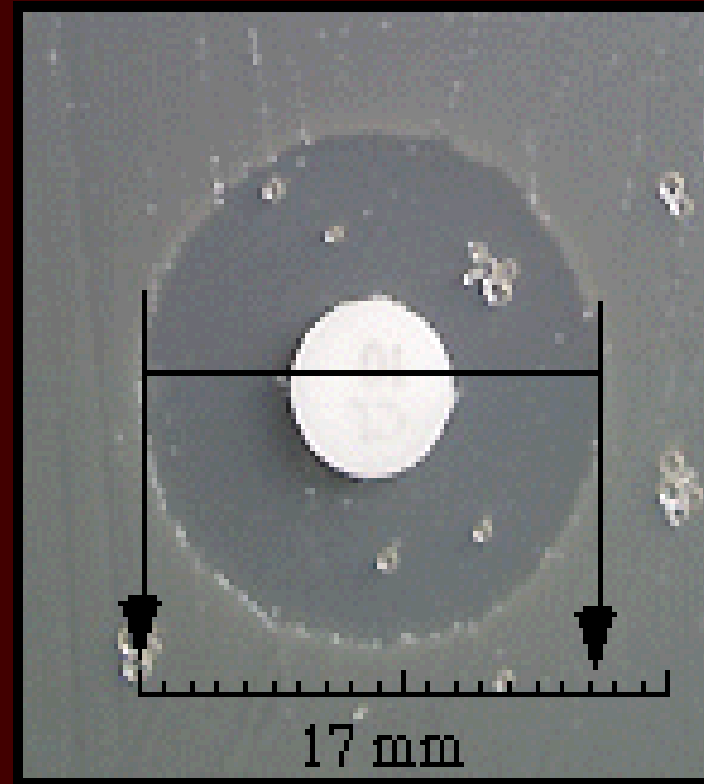
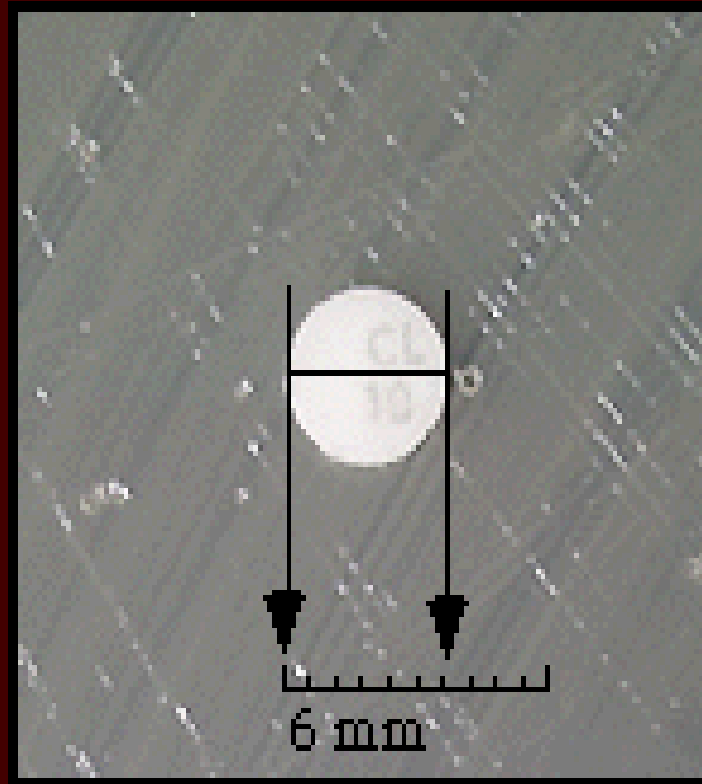
Disk diffusion (Factors affecting)

- ✓ pH: 7.2-7.8
- ✓ Medium storage (7 days at 8°)
- ✓ Temperature: 35+/-2
- ✓ Time between inoculation & disk application (at most=15 min)
- ✓ Disk size (6mm)
- ✓ Depth of the agar (4mm)
- ✓ Density of the inoculum (0.5 McFarland)
- ✓ Fluid for preparing inoculum (NS for direct method, TSB for growth method)
- ✓ Atmosphere
- ✓ Disk spacing
- ✓ Disk handling & storage

Disk Diffusion Test



Hold the Petri plate a few inches above a black background illuminated with reflected light.



Inhibition zone interpretation

CLSI M100 S appropriate tables

- *Susceptible* — an infection probably respond to treatment with a standard dosage
- *Intermediate* indicative of nonuseful therapeutic options similar to the resistant
 - However, infections at sites where the antibiotic is likely to be highly concentrated, such as β -lactams in the urinary tract, may respond to therapy
- *Resistant* — the infection is not likely to respond to therapy.

Intermediate

❖ اصطلاح «**حساسیت بینابینی**» به گروهی از باکتری‌های جدا شده اطلاق می‌گردد که با سطح MIC به دست آمده در خون و بافت، پاسخی پایین‌تر از باکتری‌های حساس می‌دهند. اصطلاح حساسیت بینابینی در موارد ذیل کاربرد دارد:

(الف) در مناطقی از بدن که دارو از لحاظ فیزیولوژیک در بافت‌ها تغلیظ می‌شود مانند کوئینو لون‌ها یا بتالاکتام‌ها در ادرار).

(ب) زمانی که مقدار دارو را می‌توان بیش از دوز معمولی آن استفاده کرد (مانند بتالاکتام‌ها).

(ج) جهت ایجاد محدوده‌ای به منظور پیشگیری از خطاهای کوچک و غیر قابل کنترل تکنیکی که موجب تناقض و اختلافات اساسی در تفسیر خواهد شد. این امر به ویژه برای داروهایی صادق است که حاشیه مسمومیت دارویی آنها محدود و باریک است.

Nonsusceptible

۴. غیر حساس (Nonsusceptible): یک نوع طبقه‌بندی برای ارگانیزم‌هایی است که فقط محدوده تفسیری حساس دارند، اما محدوده تفسیری بینابینی یا مقاوم ندارند (برای مثال طبقه‌بندی تفسیری فقط حساس). معیار طبقه‌بندی تفسیری «فقط حساس» را می‌توان برای آن دسته از عوامل ضدمیکروبی جدیدی به کار برد که در زمان تدوین معیارهای تفسیری اولیه ارگانیزم‌های مقاوم در آنها دیده نشده است. ایزوله‌هایی که MIC آنها بالاتر از نقطه انفصال تفسیری حساس باشد، به عنوان غیر حساس در نظر گرفته می‌شوند. اصطلاح غیر حساس الزاماً به معنای وجود مکانیزم مقاومت در ایزوله نیست. ایزوله‌ای که در حال حاضر MIC آن در محدوده غیر حساس قرار دارد، ممکن است قبلاً جزء تیپ‌های وحشی حساس شناخته شده در نظر گرفته شده باشد. با این همه، تجربیات بالینی در خصوص این ایزوله‌ها محدود است.

Interpretation

Interpretive Category	Breakpoints	
	MIC, $\mu\text{g/mL}$	Zone Diameter, mm
Susceptible	≤ 4	≥ 20
Susceptible-dose dependent	8–16	15–19
Intermediate	8–16	15–19
Resistant	≥ 32	≤ 14
Nonsusceptible	> 1	< 17

Conclusion

disk diffusion

- **Advantages:**

- Inexpensive
- easy to use
- agar-based method
- qualitative results

- ❖ **Disadvantages:**

- unstable antibiotic concentration gradient
- Many *in vitro* variables influence zone sizes
 - prediffusion, inoculum density, and growth phase, and variations in the agar plate (depth, pH, ions)
- High molecular weight compounds such as vancomycin and polymyxins will not diffuse well in agar
- ❑ **suitable for testing rapidly growing aerobic bacteria**

انتخاب دیسک ها

- بتالاکتام ها:
- **پنی سیلین ها** با توجه به باکتری و شیوع مقاومت
- باید توجه داشت که تمام داروهایی که در یک نسل یا گروه از **سفالوسپورین ها** قرار دارند، لزوماً طیف فعالیت مشابه ندارند و به این دلیل در آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی می توان از هر گروه یک نمونه انتخاب نمود.
- **کارباپنم ها**
- **مونوباکتام ها**
- **آمینوگلیکوزید ها**
- **سولفامتوکسازول** رایج ترین سولفونامیدی است که در درمان عفونت های مجاری ادراری استفاده می شود؛ لذا برای آزمایش در شرایط *in vitro* می تواند مناسب ترین گزینه باشد. چون **سولفامتوکسازول و تری متوپریم** در بعضی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مراحل متوالی مسیر فولات را مهار می کنند، معمولاً به صورت ترکیبی آزمایش می شوند.

انتخاب دیسک ها

- گلیکوپپتیدها: **ونکومايسين** (**انتروکک ها**، **استافیلوکک ها**)
- لیپوپپتید ها ???
- ماکرولید ها: **اریترومايسين**
- **کوئینولون ها**: به دلیل وجود اختلاف در طیف اثر آنها، هر یک از داروهای این خانواده باید به طور مستقل آزمایش شوند.
- تتراسایکلین ها: به جز برخی موارد استثناء به طور معمول تتراسایکلین آزمایش می شود. **میکروارگانيسم های که به تتراسایکلین حساس باشند، نسبت به داکسی سایکلین و مینوسایکلین نیز حساس محسوب می شوند.** هر چند باکتری هایی که نسبت به تتراسایکلین حساسیت بینابینی یا مقاومت داشته باشند ممکن است به **داکسی سایکلین** یا **مینوسایکلین** یا هر دو حساس باشند.

خانواده های تک دارویی (Single - Drug Classes)

❖ این داروها سنتز پروتئین را مهار می کنند.

✓ کلرامفنیکل

✓ کلیندامایسین

✓ لینزولید

✓ کوئینو پریستین - دالفو پریستین

✓ تلیترومایسین

• ریفامپین: مهار کننده سنتز RNA می باشد.

• نیتروفورانئوئین: که فقط در درمان عفونت های ادراری کاربرد دارد، در سطح ریبوزوم و از طریق مهار ساخت و مرحله الحاق (ترکیب) پروتئین عمل می کند.

• فسفومایسین: نیز از طریق مهار آنزیم های دخیل در ساخت دیواره سلولی عمل می کنند و برای درمان عفونت های ادراری توسط FDA تأیید شده است

Warning

- The following antimicrobial agents that are included in this document **should not be routinely reported for bacteria isolated from CSF**. These antimicrobial agents are not the drugs of choice and may not be effective for treating CSF infections caused by these organisms (ie, the bacteria included in Tables 2A through 2J):
 - Agents administered by oral route only
 - 1st- and 2nd-generation cephalosporins and cephamycins
 - Clindamycin
 - Macrolides
 - Tetracyclines
 - Fluoroquinolones

b. Not routinely reported on organisms isolated from the urinary tract.

Staphylococcus spp:

- Azithromycin
- Clarithromycin
- Erythromycin
- Clindamycin
- Minocyclin
- Chloramphenicol

Enterobacterales:

- Chloramphenicol

Other Non- Enterobacterales:

- Chloramphenicol

d :Enterobacterales

- “WARNING” For *Salmonella spp. and Shigella spp.*, aminoglycosides, first- and second-generation cephalosporins, and cephamycins may appear active in vitro, but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.
- Routine susceptibility testing is **not indicated** for **nontyphoidal *Salmonella spp.*** isolated from intestinal sources. In contrast, susceptibility testing is **indicated** for **all *Shigella* isolates**

d:Enterobacterales

- When fecal isolates of *Salmonella* and *Shigella* spp. are tested, only ampicillin, a fluoroquinolone, and trimethoprim-sulfamethoxazole should be reported routinely. In addition, for extraintestinal isolates of *Salmonella spp.*, a third-generation cephalosporin should be tested and reported, and if requested, chloramphenicol may be tested and reported. Susceptibility testing is indicated for *typhoidal Salmonella* (*S. enterica ser. Typhi* and *Salmonella enterica ser. Paratyphi A-C*) isolated from extraintestinal and intestinal sources.

d:Enterobacterales

- .

- Ampicillin

- Gentamycin

- Tobramycin

- Amikacin

- Cefotaxime

- Ceftriaxone

- Ciprofloxacin

- Levofloxacin

- Trimethoprim-sulfamethoxazole

- Chloramphenicol

Enterobacterales

- **e:** Cefotaxime or Ceftriaxone should be tested and reported on isolates from CSF in place of cefazolin.
- **f:** Fosfomycin: For testing and reporting of *E. coli* urinary tract isolates only

Other Non-Enterobacterales

- **g.** include *Pseudomonas spp.* and other nonfastidious, glucose-nonfermenting, gram-negative bacilli but exclude *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *B. cepacia* complex, and *S. maltophilia*. Refer to each respective organism column for suggested antimicrobial agents to test and report.
- **Recommendations** for testing and reporting of *Aeromonas hydrophila* complex, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, and *Vibrio spp.* (including *V. cholerae*) are found in CLSI document M45.

Staphylococcus spp

- **h.** Rx: Rifampin should not be used alone for antimicrobial therapy.
- **i.** For *S. aureus* only, including methicillin (oxacillin-resistant *S. aureus* (MRSA)).
- **k.** Daptomycin should not be reported for isolates from the respiratory tract.
- **m.** For staphylococci that test susceptible, gentamicin is used only in combination with other active agents that test susceptible.

Staphylococcus spp

- **j.** Penicillin-susceptible staphylococci are also susceptible to other B-lactam agents with established clinical efficacy for staphylococcal infections. Penicillin-resistant staphylococci are resistant to penicillinase-labile penicillins. Methicillin (oxacillin-resistant staphylococci are resistant to all currently available B-lactam antimicrobial agents, with the exception of ceftaroline. Thus, susceptibility or resistance to a wide array of B-lactam antimicrobial agents may be deduced from testing only penicillin and either cefoxitin or oxacillin. Routine testing of other B-lactam agents, except ceftaroline, is not advised.

Staphylococcus spp

- **I.** If a penicillinase-stable penicillin is tested, oxacillin is the preferred agent, and results can be applied to the other penicillinase-stable penicillins (refer to Glossary 1). Detection of methicillin (oxacillin) resistance in staphylococci is achieved by using specific methods as described in Tables 2 and 3F.

Enterococcus spp.

- **n.** Warning: For Enterococcus spp., cephalosporins, aminoglycosides (except for high-level resistance testing), clindamycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole may appear active in vitro, but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.
- **o.** The results of ampicillin susceptibility tests should be used to predict the activity of amoxicillin. Ampicillin results may be used to predict susceptibility to amoxicillin-clavulanate, ampicillin-sulbactam, and piperacillin-tazobactam among non-B-lactamase-producing enterococci. Ampicillin susceptibility can be used to predict imipenem susceptibility, providing the species is confirmed to be Enterococcus faecalis.

Enterococcus spp.

- **p.** Enterococci susceptible to penicillin are predictably susceptible to ampicillin, amoxicillin, ampicillin-sulbactam, amoxicillin-clavulanate, and piperacillin-tazobactam for non-B-lactamase-producing enterococci. However, enterococci susceptible to ampicillin cannot be assumed to be susceptible to penicillin. If penicillin results are needed, testing of penicillin is required. Rx: Combination therapy with ampicillin, penicillin, or vancomycin (for susceptible strains) plus an aminoglycoside is usually indicated for serious enterococcal infections, such as endocarditis, unless high-level resistance to both gentamicin and streptomycin is documented; such combinations are predicted to result in synergistic killing of the *Enterococcus*. For strains with low-level penicillin or ampicillin resistance when combination therapy with a B-lactam is being considered, see additional testing and reporting information in Table 3J.

Enterococcus spp.

- **q.** For testing and reporting of *E. faecalis* only.
- **r.** For testing and reporting of *E. faecalis* urinary tract isolates only.
- **s.** For testing and reporting of vancomycin-susceptible *E. faecalis* only.

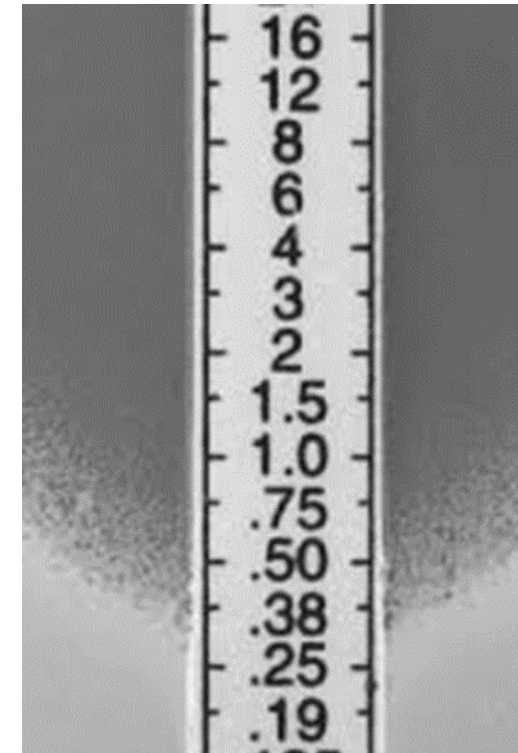
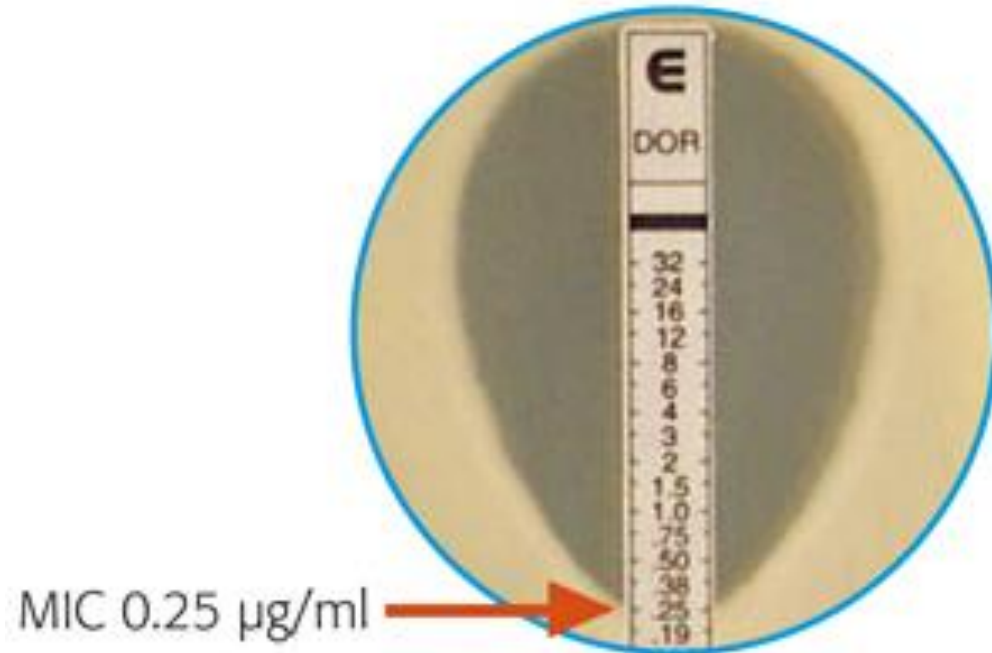
Testing of repeat isolates may be warranted.

- *P. aeruginosa* may develop resistance during prolonged therapy with **all antimicrobial agents**. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within 3 to 4 days after initiation of therapy.
- *Enterobacter, Klebsiella (formerly Enterobacter) aerogenes, Citrobacter, and Serratia* may develop resistance during prolonged therapy with **3rd-generation cephalosporins** as a result of derepression of AmpC B-lactamase. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within 3 to 4 days after initiation of therapy.

Testing of repeat isolates may be warranted.

- *Staphylococcus spp.* may develop resistance during prolonged therapy with **quinolones**. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within 3 to 4 days after initiation of therapy

Antimicrobial gradient method (E-test)



This method is used to determine the **MIC** value.

E-test (Epsilometer test)



Supplemental tests:

- **Required**
- Inducible clindamycin resistance
- Beta Lactamase

- **Optional**
- ESBL
- Oxacillin salt agar (MRSA)
- carbaNP
- mCIM with or without eCIM
- Colistin agar test
- Colistin broth disk elution

Special tests:

❖ Screening tests:

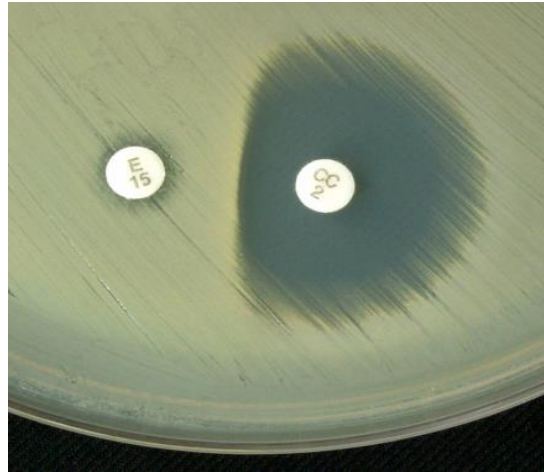
- Vancomycin agar screen
- HLAR by disk diffusion

❖ Surrogate agent tests

- ✓ Cefazolin
- ✓ Cefoxitin
- ✓ Oxacillin
- ✓ Pefloxacin

D-test

- Inducible resistance to clindamycin in gram-positive organisms
 - detected by placing a clindamycin and an erythromycin disk 15–26 mm apart and observing for a flattening of the clindamycin zone on the side closest to the erythromycin disk



D-zone demonstrating inducible resistance to clindamycin.

Reporting

- Report isolates with inducible clindamycin resistance as "**clindamycin resistant.**"
- The following comment may be included with the report: "**This isolate is presumed to be resistant based on detection of inducible clindamycin resistance.**"

Hazy growth within the zone of inhibition around clindamycin, clindamycin resistance, **even if no D-zone is apparent.**

Test for Detection of B-Lactamase Production in *Staphylococcus spp*

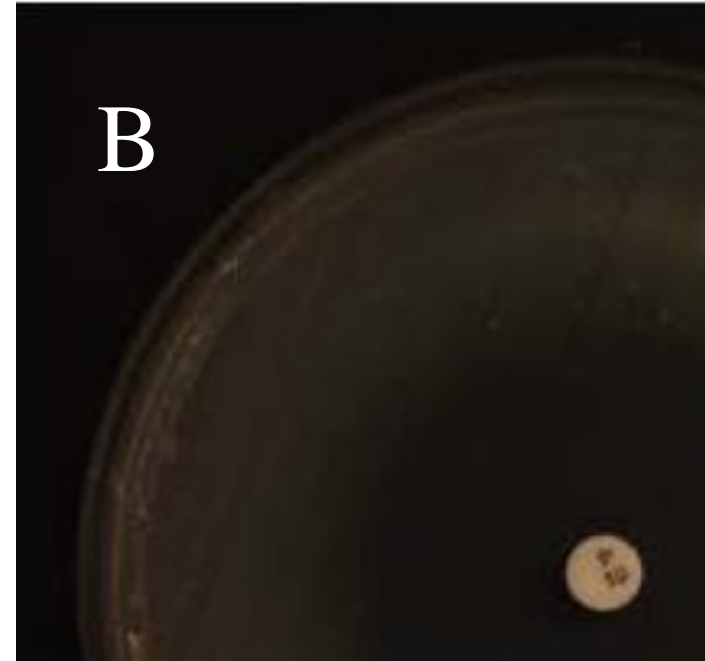
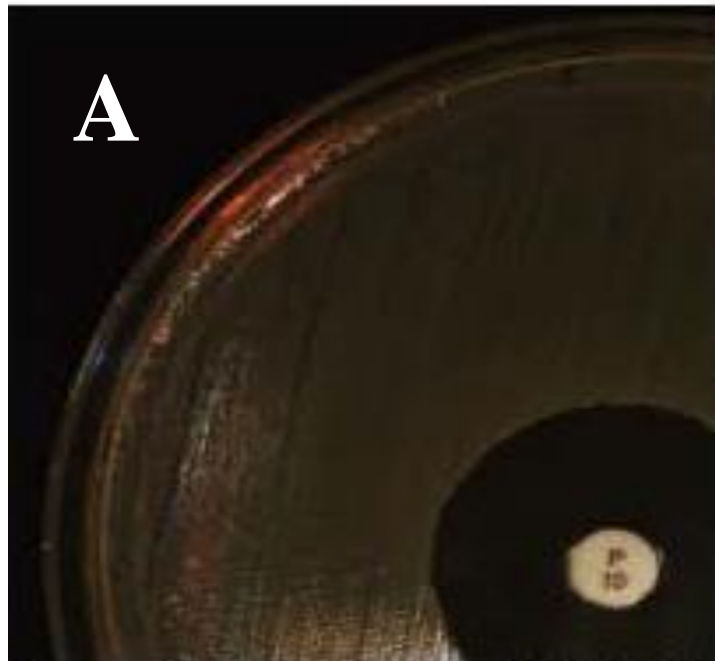
- Disk Diffusion (penicillin zone-edge test)
- *S. aureus* with penicillin(zones ≥ 29)

❖ Results:

- Sharp zone edge ("cliff") = B-lactamase positive
 - Fuzzy zone edge ("beach") = B-lactamase negative
-
- **Reporting:** B-lactamase-positive staphylococci are resistant to penicillin, amino-, carboxy, and ureidopenicillins.

A: Positive Penicillin Disk Zone-Edge Test for B-Lactamase Detection. The zone edge is sharp or like a cliff indicating B-lactamase production.

B: Negative Penicillin Disk Zone-Edge Test for B-Lactamase Detection. The zone edge is fuzzy or like a "beach" indicating no B-lactamase production.



• آزمایش تعیین حساسیت برای استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس جدا شده از نمونه ادرار به طور رو تین توصیه نمی شود. زیرا عفونت های حاد و بدون عارضه مجاری ادراری با این باکتری، در پاسخ به عوامل ضد میکروبی که معمولاً در درمان این عفونت ها استفاده می شوند و سطح مناسبی از دارو را در ادرار ایجاد می کنند، به خوبی درمان می گردند (داروهایی مانند نیتروفورانتوئین، تری متوپریم + سولفامتوکسازول، یا فلوروکینولونها). آزمایشگاه می تواند این توصیه را در انتهای نتیجه کشت ادرار بیمار ذکر نماید.

➤ Routine testing of urine isolates of *Staphylococcus saprophyticus* is not advised, because infections respond to concentrations achieved in urine of antimicrobial agents commonly used to treat acute, uncomplicated UTIS (eg, nitrofurantoin, trimethoprim + sulfamethoxazole, or a fluoroquinolone)

✓ **استافیلوکوکهای حساس به پنی سیلین** به داروهای ذیل نیز حساسند: سایر پنی سیلین ها، ترکیبات بتالاکتام / مهار کننده بتالاکتاماز، سفم های ضد استافیلوکوک و کار با پنم های تأیید شده از سوی FDA برای درمان عفونت های استافیلوکوکی

✓ **سویه های مقاوم به پنی سیلین و حساس به اگزاسیلین**، نسبت به پنی سیلین های ناپایدار در برابر پنی سیلیناز مقاومند، ولی به داروهای ذیل حساسند. پنی سیلین های پایدار در مقابل پنی سیلیناز، مهار کننده بتالاکتاماز، سفم های ضد استافیلوکوک و کار با پنم ها

✓ **استافیلوکوک های مقاوم به اگزاسیلین** به تمام عوامل ضد میکروبی بتالاکتام موجود مقاوم هستند به جز سفالوسپورین های جدید با فعالیت ضد MRSA مانند (Ceftobiprole) بنابر این، حساسیت با مقاومت به طیف وسیع داروی بتالاکتام را می توان فقط با استفاده از پنی سیلین و یا سفوکسیتین یا اگزاسیلین نتیجه گیری نمود.

✓ بررسی روتین سایر پنی سیلین ها و ترکیبات بتالاکتام مهار کننده بتالاکتاماز، سفم ها یا کار با پنم ها توصیه نمی شود.

✓ در صورت انجام آزمایش روی پنی سیلین های پایدار به پنی سیلیناز، **اگزاسیلین برای انجام آزمایش ارجح است** و نتایج آن می تواند برای سایر پنی سیلین های پایدار به پنی سیلیناز (گلوگزاسیلین، دی کلوگزاسیلین، فلوکلوگزاسیلین، متی سیلین و نفسیلین) به کار گرفته شود.

Cefazolin

- When used for therapy of **uncomplicated UTIs**, predicts results for the following oral antimicrobial agents: cefaclor, cefdinir, cefpodoxime, cefprozil, cefuroxime, cephalexin, and loracarbef
- **Cefazolin** as a surrogate may overcall resistance to cefdinir, cefpodoxime, and cefuroxime. If cefazolin tests resistant, test these drugs individually if needed for therapy.

Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL)

➤ For *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, and *E. coli*:

✓ Cefpodoxime 10 ug

✓ or Ceftazidime 30 ug

✓ or Aztreonam 30 ug

✓ or Cefotaxime 30 ug

✓ or Ceftriaxone 30 ug

➤ For *P. mirabilis*:

✓ Cefpodoxime 10 ug

✓ Or Ceftazidime 30 ug

✓ Or Cefotaxime 30 ug

❖ Testing more than one antimicrobial agent improves the sensitivity of ESBL detection.

Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL)

- Cefotaxime 30 ug
- Cefotaxime-clavulanate 30/10 ug

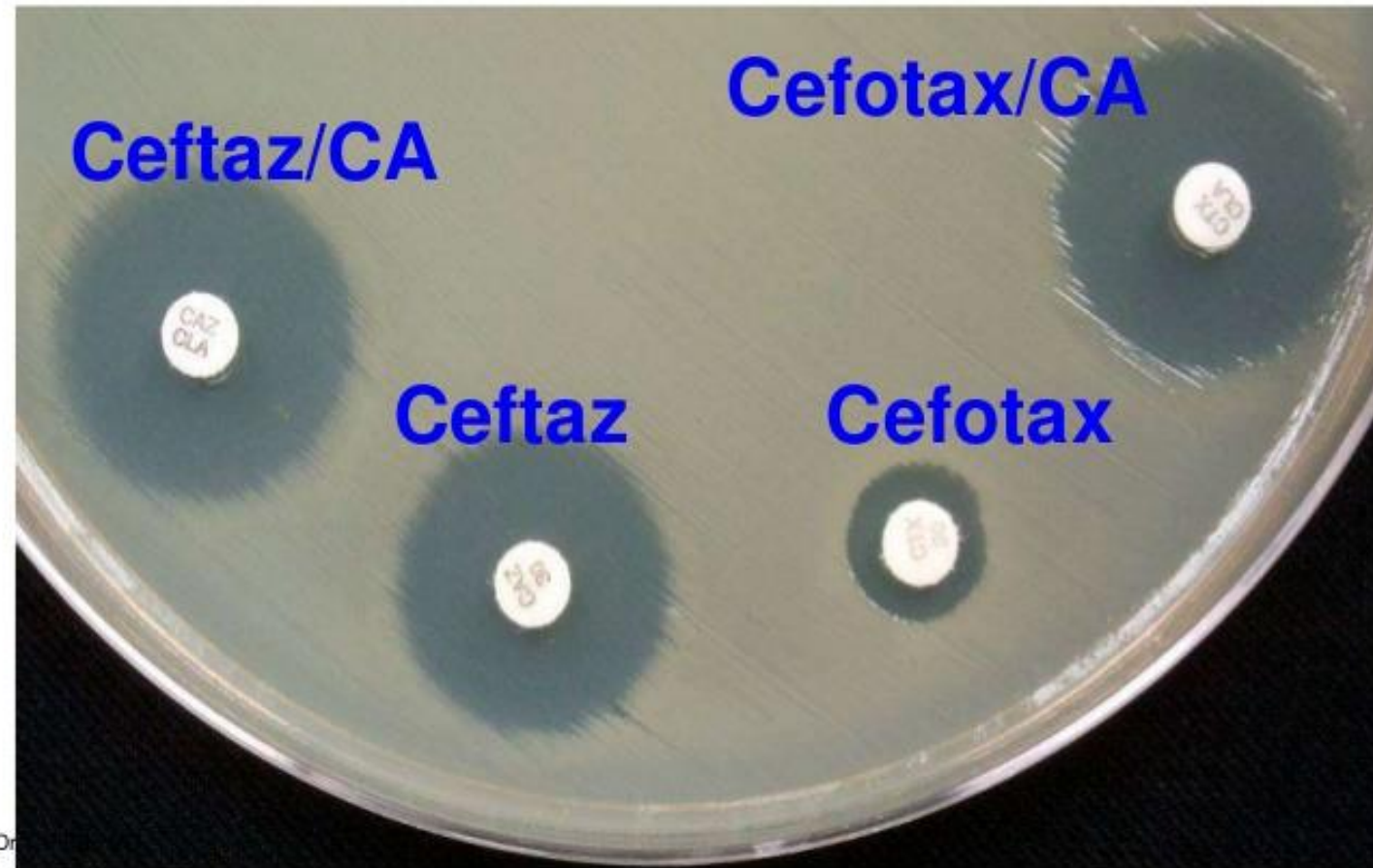
And

- ✓ Cefotaxime 30 ug
- ✓ Cefotaxime-clavulanate 30/10 ug
- ❖ Testing necessitates using both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanate.

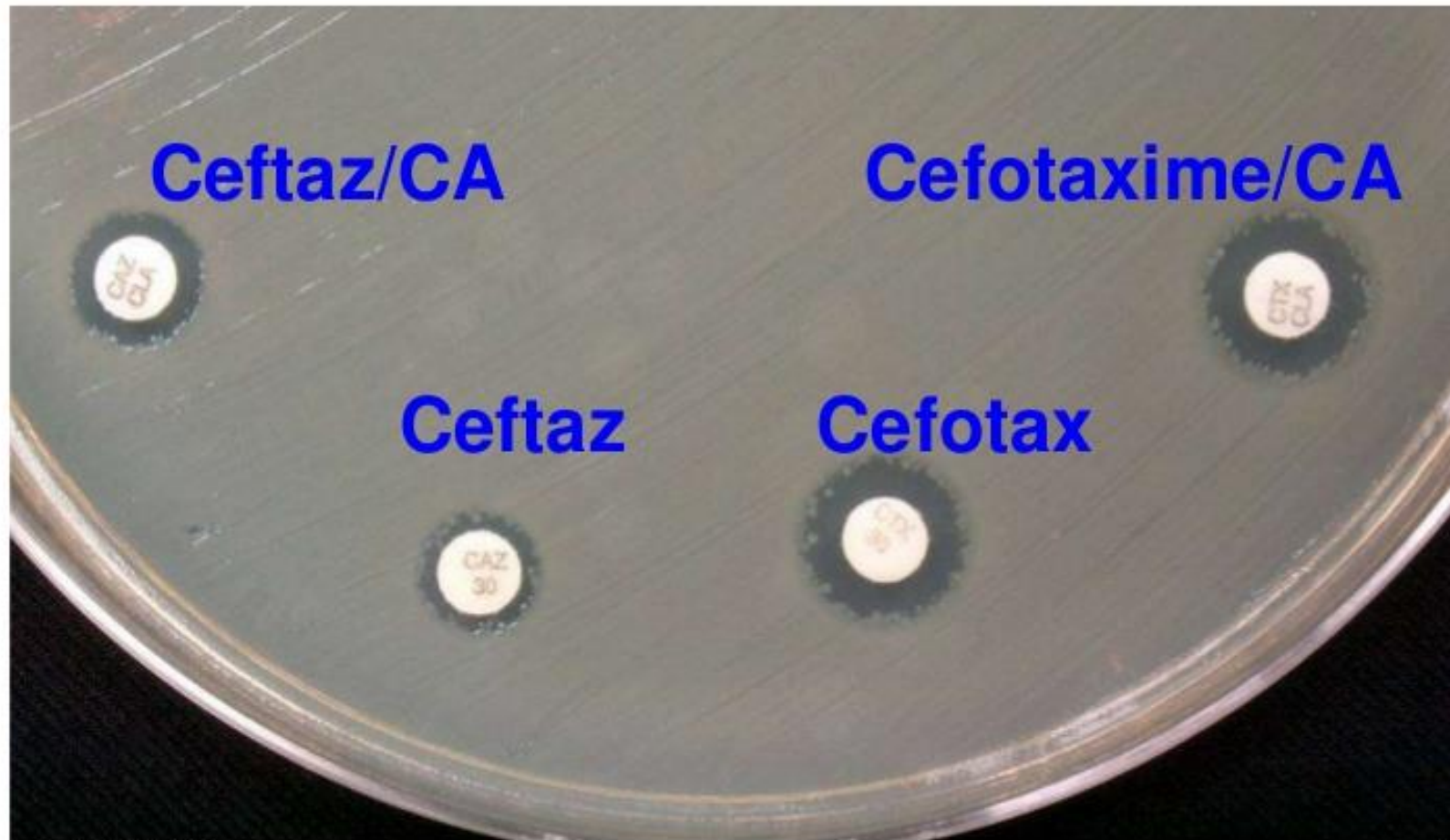
Results

- A ≥ 5 -mm increase in a zone diameter for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanate vs the zone diameter of the agent when tested alone = **ESBL**
- eg, ceftazidime zone = 16; ceftazidime-clavulanate zone=21

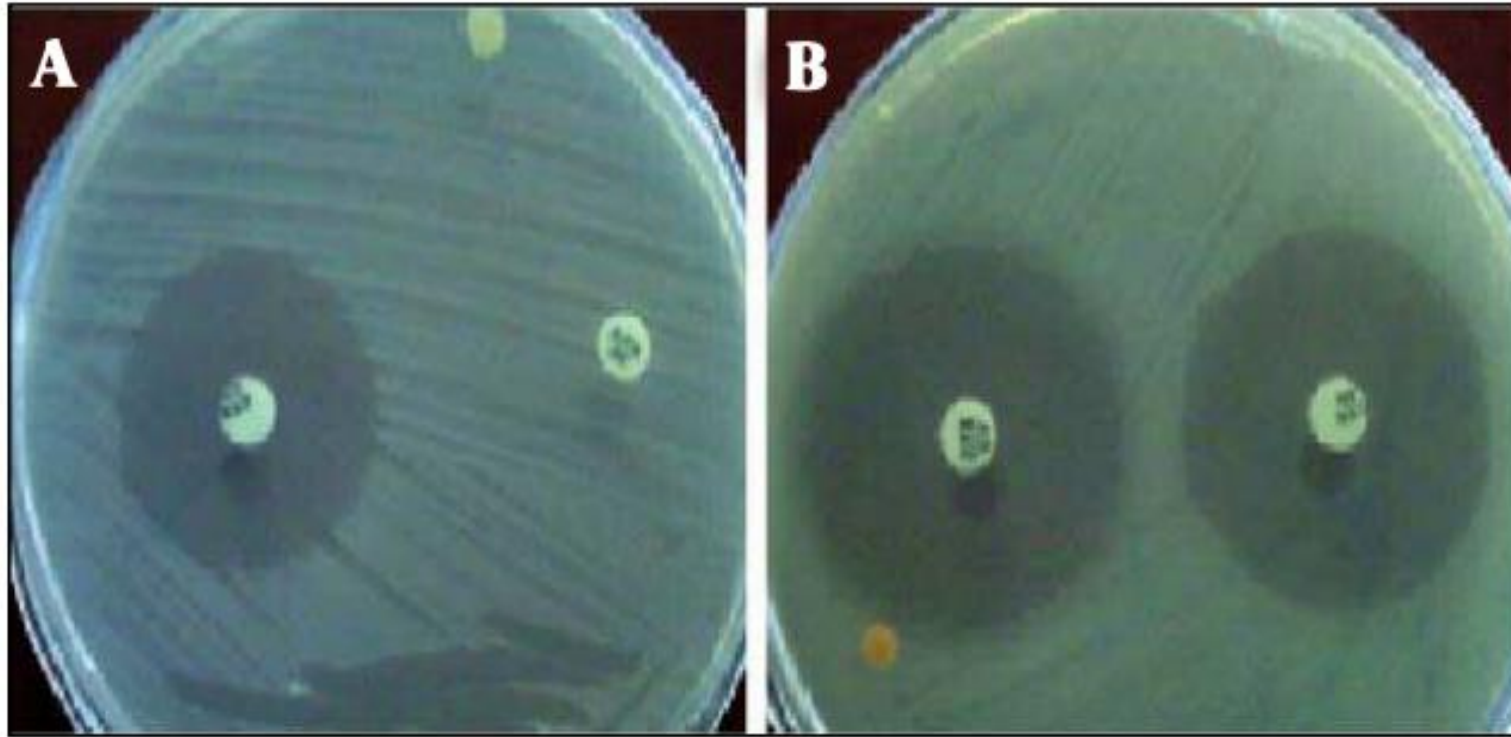
ESBL Confirmatory Test Positive for ESBL



ESBL CONFIRMATORY TEST NEGATIVE FOR ESBL



Results

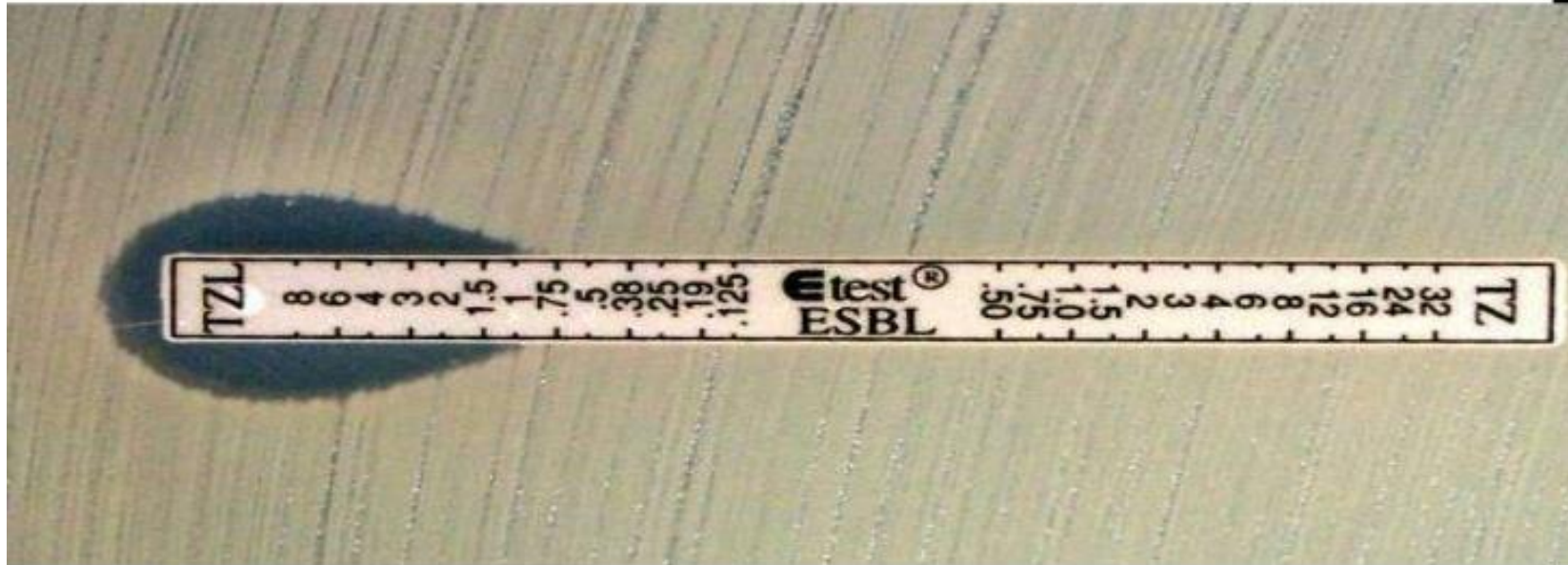


A) ESBL Positive

B) ESBL Negative

ESBL CONFIRMATORY TEST

Etest **Ceftaz/CA** **Ceftaz**



Reporting

- ❖ For all confirmed ESBL-producing strains:
 - If laboratories do not use current cephalosporin and aztreonam breakpoints, the test interpretation should be **reported as resistant for all penicillins, cephalosporins, and aztreonam.**
 - If laboratories use current cephalosporin and aztreonam breakpoints, test interpretations for these agents do not need to be changed from susceptible to resistant.

High-Level Aminoglycoside Resistance (HLAR)

- ❖ To screen **enterococci** for **high-level resistance** to **aminoglycosides** (HLAR)
- ❑ Susceptibility to high-level **gentamicin (120 µg)** or **streptomycin (300 µg)** disks predicts potential synergy between that aminoglycoside and penicillin that may contribute to bactericidal effects with drug combination

Further testing and reporting

- مقاوم: با عامل فعال علیه دیواره سلولی (نظیر آمپی سیلین، پنی سیلین و وانکومایسین) هم افزایی ندارد.
- حساس: با عامل فعال علیه دیواره سلولی که ارگانیزم نسبت به آن نیز حساس است (نظیر آمپی سیلین، پنی سیلین و وانکومایسین) هم افزایی دارد.
- در صورتی که نتایج روش انتشار از دیسک قطعی نباشد. برای تأیید، آزمایش رقیق سازی در آگار یا رقیق سازی در مایع به روش میکرو (microdilutan) باید انجام شود.

سطح بالای مقاومت به جنتامایسین و یا استرپتومایسین نشان دهنده این است که ایزوله های انتروکک با اثر هم افزایی ترکیبی از آمینوگلیکوزید و پنی سیلین از بین نمی روند.

Further testing and reporting

- Resistant: is not synergistic with cell wall-active agent (eg, ampicillin, penicillin, and vancomycin).
- Susceptible: is synergistic with cell wall-active agent (eg, ampicillin, penicillin, and vancomycin) that is also susceptible.
- If disk diffusion result is inconclusive: perform an agar dilution or broth dilution MIC test to confirm.

Other aminoglycosides do not need to be tested, because their activities against enterococci are **not superior** to gentamicin and streptomycin.

- Strains of enterococci with ampicillin and penicillin MICs 16 ug/mL are categorized as resistant. However, enterococci with **low levels of penicillin** (MICs 16-64 ug/mL) or ampicillin (MICs 16-32 ug/mL) **resistance may be susceptible to synergistic** killing by these **penicillins in combination with gentamicin or streptomycin** (in the absence of high-level resistance to gentamicin or streptomycin, if high doses of penicillin or ampicillin are used).
- Enterococci possessing **higher levels of penicillin** (MICs 128 ug/mL) or ampicillin (MICs 264 ug/mL) **resistance may not be susceptible to the synergistic** effect.
- Physicians' requests to determine the actual MIC of penicillin or ampicillin for blood and CSF isolates of enterococci should be considered.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

- 30 ug cefoxitin disk
- 33 to 35°C; ambient air (Testing at temperatures above 35°C may not detect MRSA.)
- Cefoxitin is used as a surrogate for **mecA-mediated** oxacillin resistance
- Isolates that test as mecA positive should be reported as oxacillin (not cefoxitin) resistant: other B-lactam agents, except those with anti-MRSA activity, should be **reported** as resistant or should not be reported

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

- **Historically**, resistance to the penicillinase-stable penicillins has been referred to as "methicillin resistance" or "oxacillin resistance." MRSA are strains of *S. aureus* that express *meca*, *mecc*, or another mechanism of methicillin (oxacillin resistance, such as changes in affinity of penicillin-binding proteins for oxacillin (modified *S. aureus* strains)).

Oxacillin resistant for *Staphylococcus spp*

Organism	Acceptable Methods				
	Cefoxitin MIC	Cefoxitin disk diffusion	Oxacillin MIC	Oxacillin disk diffusion	Oxacillin salt agar
<i>S. aureus</i>	Yes	Yes	Yes	No	Yes
<i>S. lugdunensis</i>	Yes	Yes	Yes	No	No
<i>S. epidermidis</i>	No	Yes	Yes	Yes	No
<i>S. pseudintermedius</i>	No	No	Yes	Yes	No
<i>S. schleiferi</i>	No	No	Yes	Yes	No
Other <i>Staphylococcus</i> spp. (not listed above)	No	Yes	Yes	No	No

✓ استفاده از سفوکسیتین نسبت به اگزاسیلین ارجحیت دارد، برای اینکه سفوکسیتین حضور ژن meCA را در مقایسه با روش های مبتنی بر اگزاسیلین (از جمله روش غربالگری **اگزاسیلین سالت آگار**) بهتر پیش بینی می کند.

✓ استافیلوکوکهای مقاوم به اگزاسیلین را به تمام پنی سیلین های دیگر، **کارباپنم ها**، **سفن ها** و **مهار کننده های بتالاکتام / بتالاکتاماز**، بدون توجه به نتایج آزمایش این عوامل در شرایط *in vitro*، **مقاوم گزارش کنید**. این توصیه بر این واقعیت استوار است که اکثر موارد مستند شده از عفونت های استافیلوکوکی مقاوم به متی سیلین (MRS) به درمان با بتالاکتامها ضعیف پاسخ می دهند، یا داده های بالینی قانع کننده ای در خصوص اثربخشی بالینی این عوامل در عفونت های مذکور تاکنون ارائه نشده است.

✓ برای **سویه های حساس به اگزاسیلین**، نتایج سفن ها، ترکیبات مهار کننده بتالاکتام / بتالاکتاماز و کارباپنم ها را، اگر آزمایش شده اند، مطابق با نتایج حاصل از **معیارهای تفسیری روتین** گزارش کنید.

methicillin (oxacillin)-susceptible staphylococci can be considered susceptible to:

- B-lactam combination agents
- Oral cepheims
- Parenteral cepheims
- Carbapenems

Vancomycin agar screen

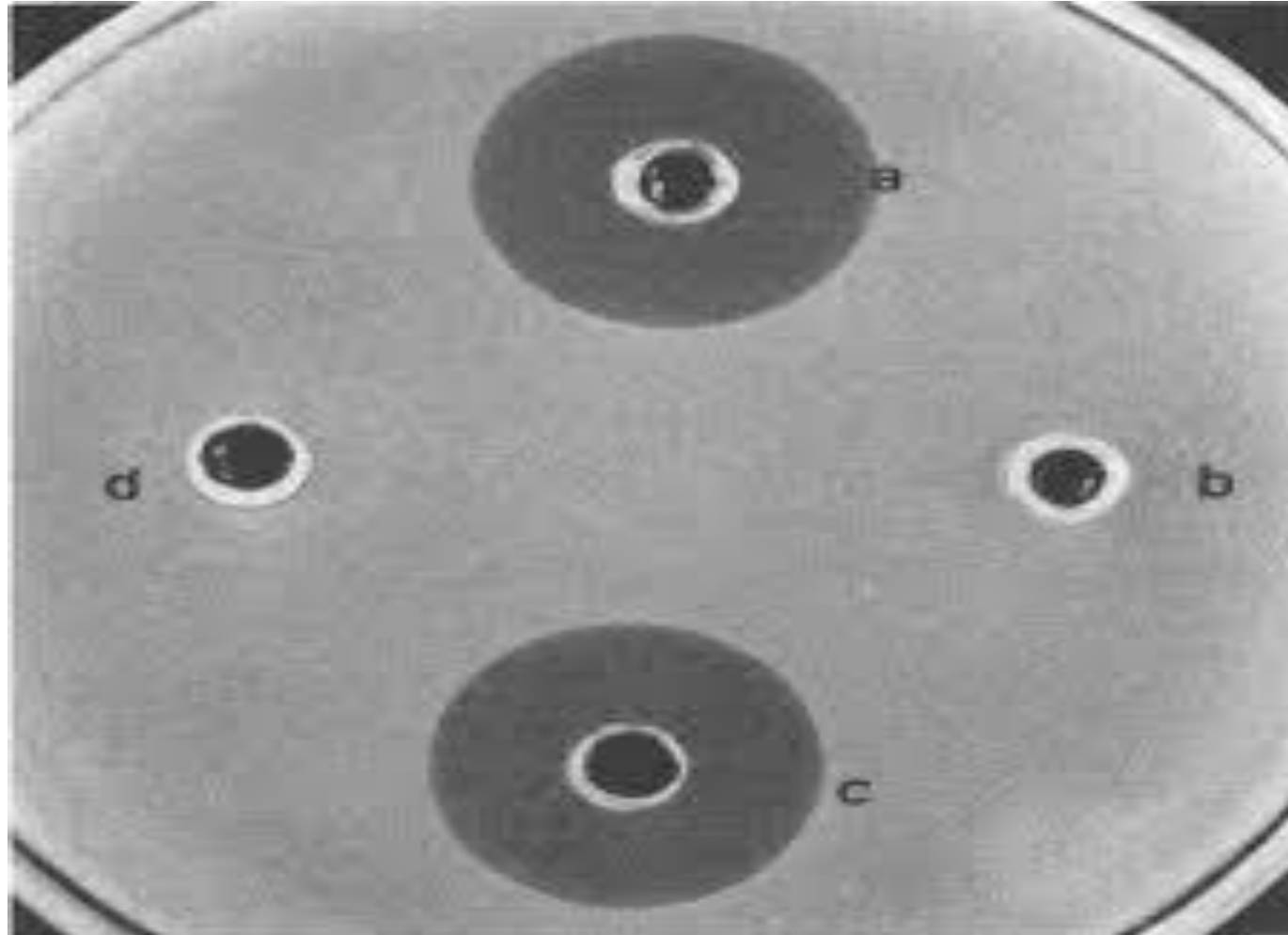
- **Enterococci** (Vancomycin-resistant enterococci :VRE)
-
- *Staphylococcus aureus*

Disk diffusion and gradient diffusion methods should not be performed:

- ❖ The polymyxins (colistin and polymyxin B)
 - ✓ broth disk elution and agar dilution
- ❖ Vancomycin for *Staphylococcus spp*
- ❖ Daptomycin

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.

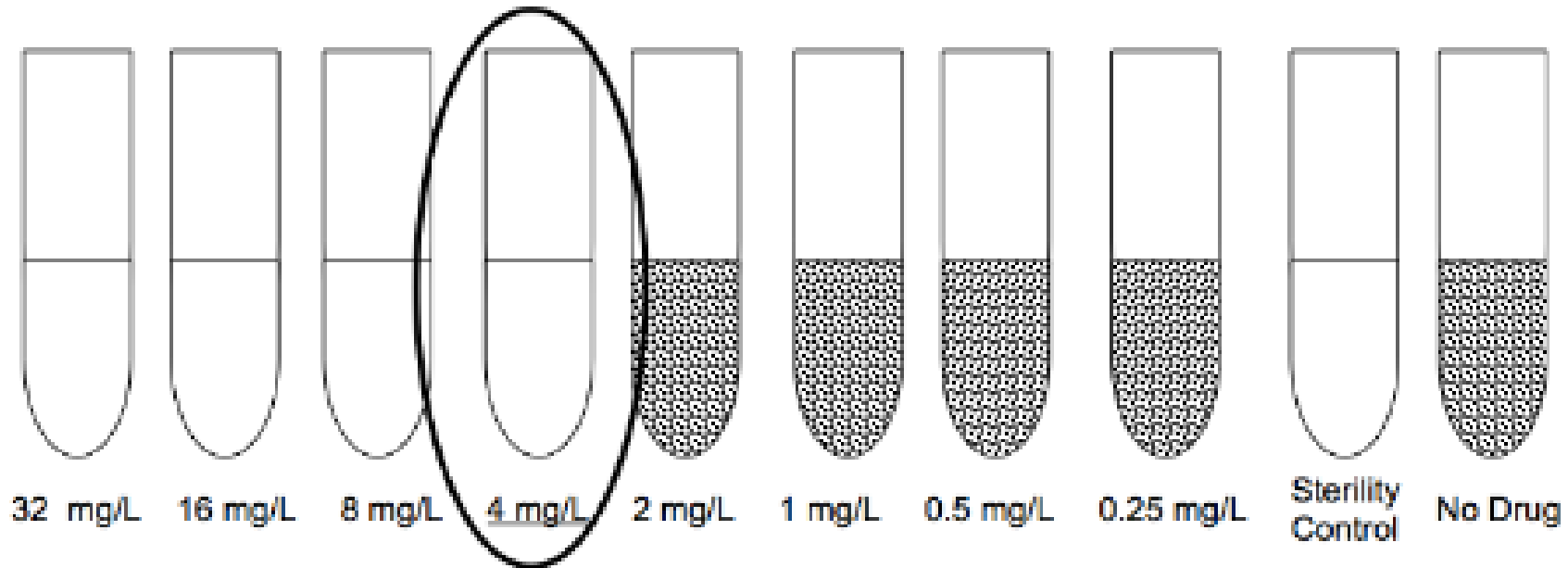
Agar Well Diffusion



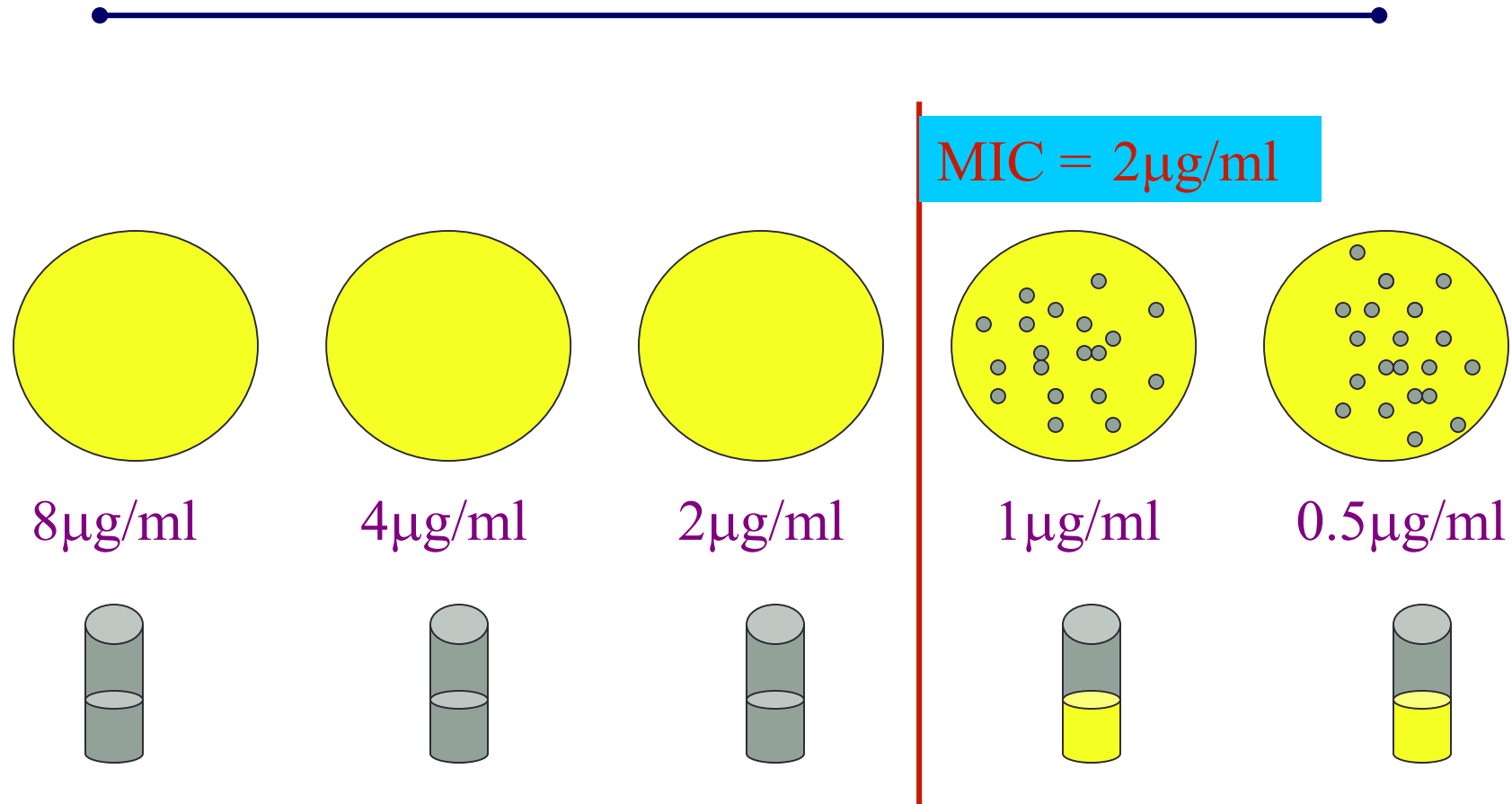
Minimum inhibitory concentration(MIC)

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Ampicillin for *E. coli*

1 mg/L = 1 μ g/ml



MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

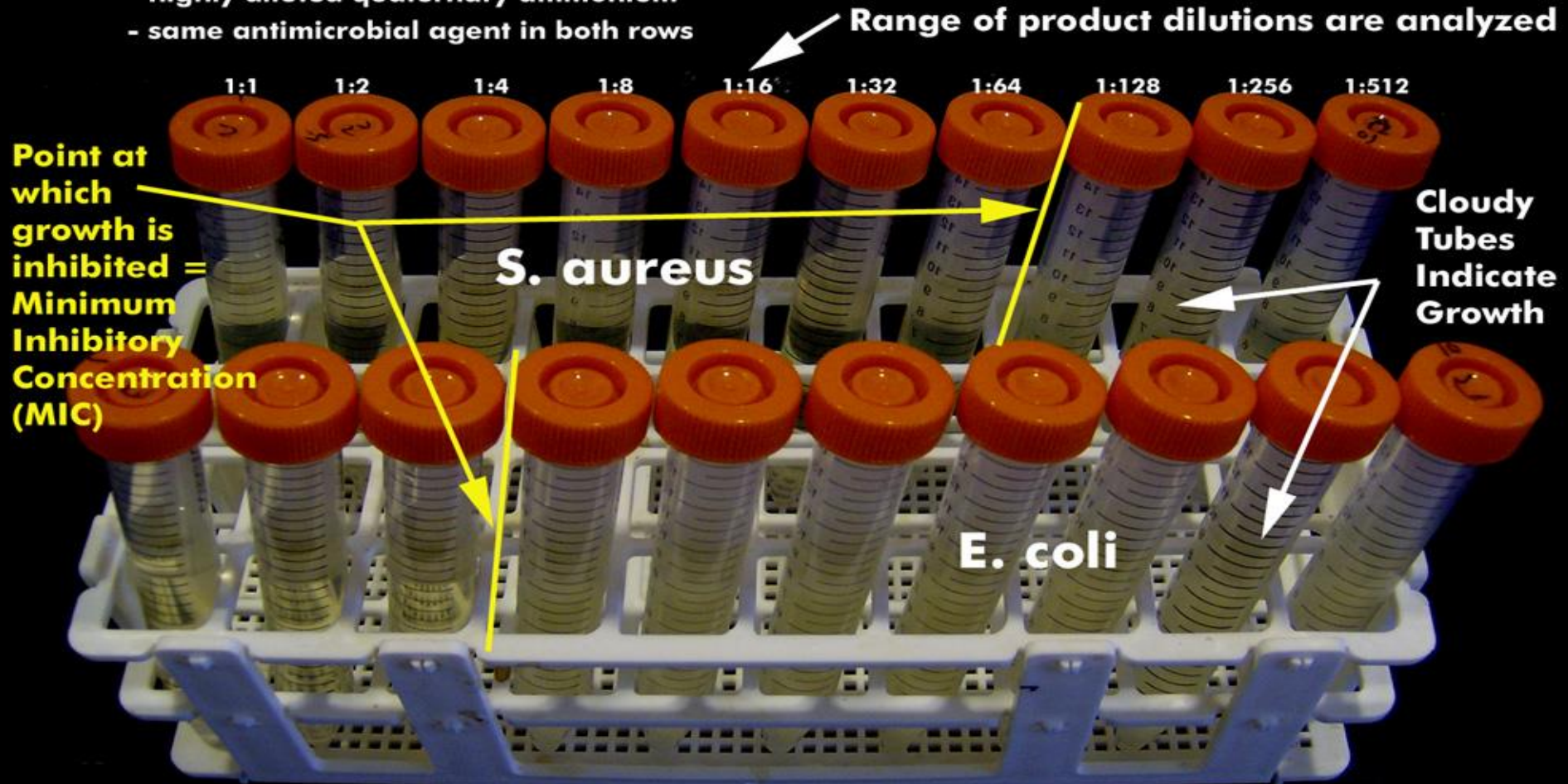


Agar plates or broth with different concentrations of antibiotic are inoculated with same number of bacteria

Minimal Inhibitory Concentration(MIC)

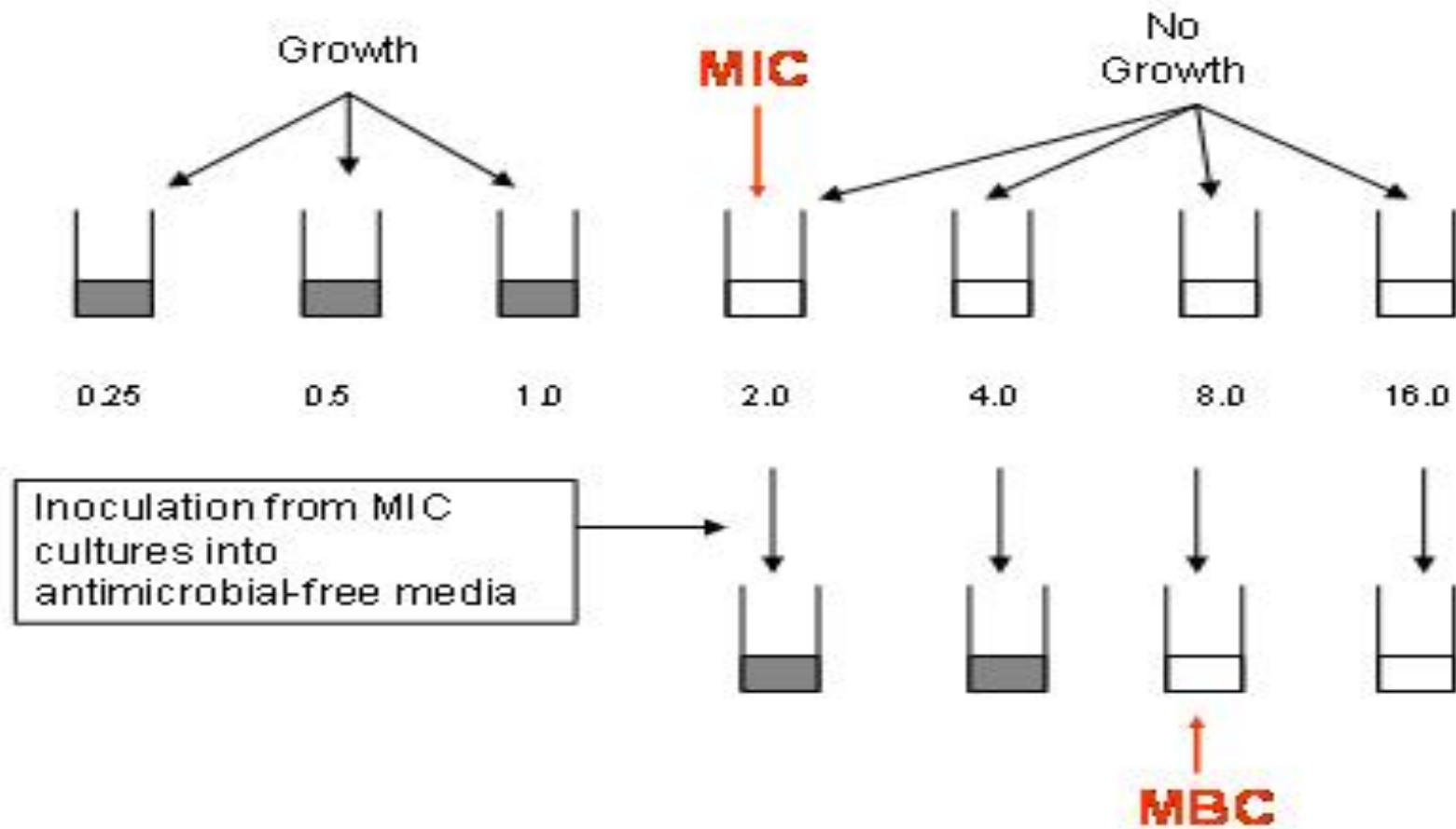
TUBE-BASED MIC PHOTO (Post-Incubation)

Courtesy of Antimicrobial Test Laboratories
- highly diluted quaternary ammonium
- same antimicrobial agent in both rows



Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

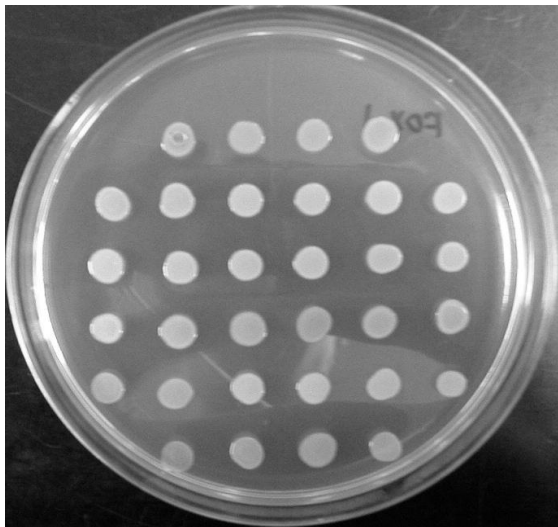
Serial Dilution Susceptibility Testing



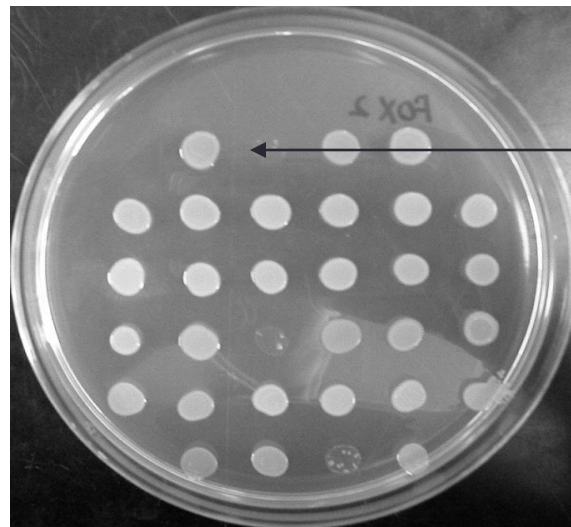
Agar Dilution Susceptibility Test



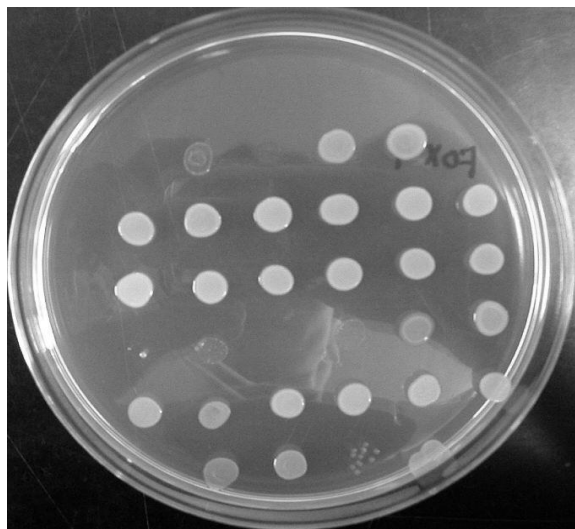
Fox 1



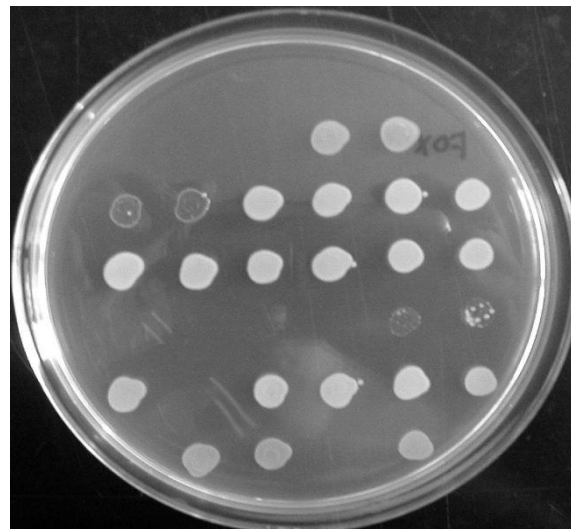
Fox 2



Fox 4



Fox 3





Vitek 2 instrument



Vitek 2 compact instrument

Vitek 2 compact



Vitek 2 compact cards



Becton Dickinson Phoenix instrument



Why we need QUALITY CONTROL for antibiotic assays?

❑ Sources of error include

- (a) incorrect measurement or transcription of zone diameters
- (b) inadequately mixed, expired, or incorrectly stored turbidity standard
- (c) one or more of the materials out of date or incorrectly stored
- (d) incorrect incubation temperature or atmosphere; (e) malfunctioning equipment (e.g., pipettors)
- (f) incorrectly stored disks
- (g) altered or contaminated control strain
- (h) incorrectly prepared inoculation
- (i) inoculum source more than 24 hours old.