

Experiment 7

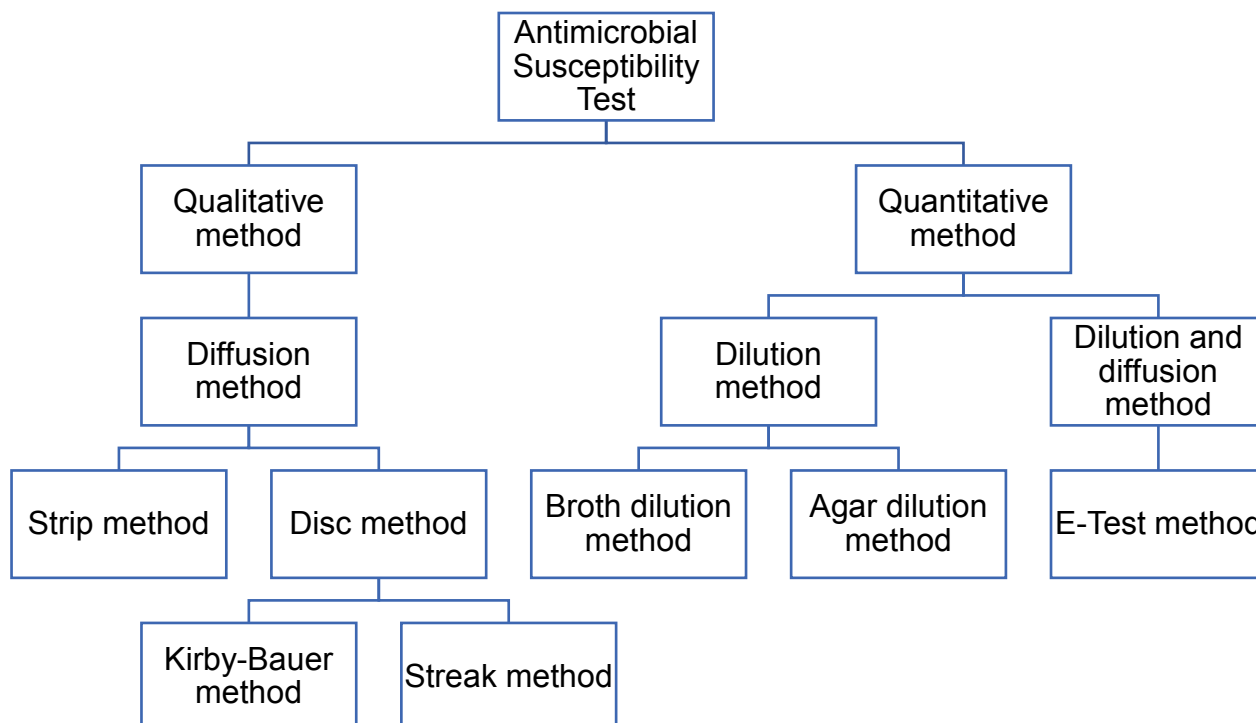
Qualitative methods used for the evaluation of bacteriostatic activity of different antimicrobial agents

Introduction:

Resistance to antimicrobial agents (AMR) has resulted in morbidity and mortality from treatment failures and increased health care costs. Although defining the precise public health risk and estimating the increase in costs is not a simple undertaking, there is little doubt that emergent antibiotic resistance is a serious global problem. The results of *in-vitro* antibiotic susceptibility testing, guide clinicians in the appropriate selection of initial empiric regimens and drugs used for individual patients in specific situations (although sensitivity tests measure antimicrobial activity against bacteria under laboratory conditions it cannot be assumed that the results of *in vitro* tests will be necessarily the same *in vivo*). The selection of an antibiotic panel for susceptibility testing is based on the commonly observed susceptibility patterns, and is revised periodically.

Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing:

Antimicrobial susceptibility testing methods are divided into types based on the principle applied in each system. They include:



تجربة اليوم بتحكي عن ال resistance المعروفة والمنتشرة جداً في وقتنا الحالي والتي هي عبارة عن مقاومة ال mo لأي anti microbial agent يتم اعطاه لقتلها ، وهي المقاومة ادت لزيادة بالامراض (morbidity) والوفيات (mortality) بسبب خطورتها

+ انه هاي المقاومة الي بتعملها ال mo لادوية خلت الطرق العلاجية تفشل وزادت من تكاليف أي رعاية صحية بدنا نعملها لل patient

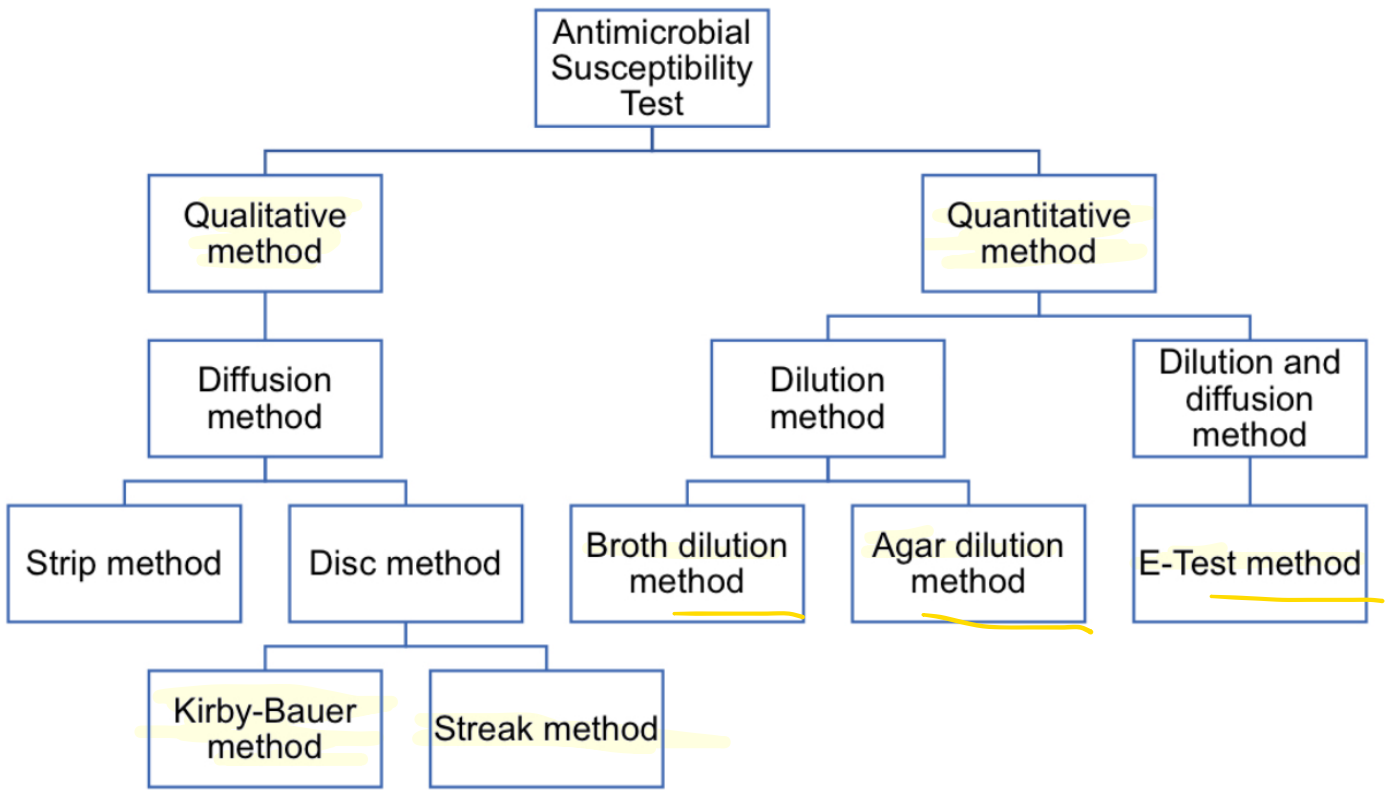
تخيل العلاج الطبيعي لنوع من انواع البكتيريا بطل يجاوب معها فنصير كل فترة بدنا نطور هذا الدوا (لانه البكتيريا تطورت وصارت تقاومه) ونخلي ال activity تاعته اعلى واعلى ، فأكيد هذا الشيء رح يكلف أعلى cost

عشان هيك صار في عنا اشني اسمه in-vitro anti.susceptibility testing وهو عبارة عن test بنعمله بالمختبر بساعد الاطباء يحطوا تصور اولي عن ال mo المصاب فيها المريض وشو الادوية الي ممكن يستخدموها لعلاج ، فساعدهم هذا الاشني كنتائج اولية للعلاج

رغم هيك النتائج الي بتطلع معنا بالمختبر مش بالضرورة تكون نفسها لما اطبق الموضوع على انسان لانه الانسان كائن حي عنده عمليات حيوية بجسمه مختلفة ممكن تأثر ع نتيجة ال test وما يطلع مثل النتيجة الي جربتها بالمختبر

يعني مش بالضرورة بال vitro تكون ال sensitivity نفسها بال vivo

الطرق الي بعمل فيها هذا ال test تنقسم لقسمين
بناء على المبدأ الي اشتغلت عليه بال test



اول شيء ال **Qualitative** : والهدف منها اني اوصف البكتيريا هل هي **sensitive** او **intermediate sensitivity** او **resistance** (يعني مجرد وصف للبكتيريا)

وعشان نوصف البكتيريا بنستخدم طريقة ال **Diffusion method** وتنقسم هذه الطريقة لقسمين <----- **Strip** : ومعناها اني استخدم antimicrobial واحد واشوف مفعوله على اكثر من Mo (Determine susceptibility of more than one microorganism agent, one antimicrobial agent)

أما ال **Disc** : فيكون عندي Mo واحد ويجرب عليه اكثر من نوع من ال antimicrobial حتى اشوف تأثيرهم عليه (Test for one microorganism by more than one antimicrobial agent) وتعتبر ال disc (more selective on microorganism)

ثاني شيء ال **Quantitative** : والهدف منها عدّ ال Mo (involve number) يعني **number** واشهر **number** عنا هو ال MIC (minimum inhibitory conc) ، كيف بنقدر نعد ؟ من خلال ال :

١. ال **Dilution** وتفرعاتها

٢. ال **Dilution&Diffusion**

Mueller Hinton Agar (MHA):

Mueller and Hinton developed Mueller Hinton Agar (MHA) it is commonly used for the routine susceptibility testing of microorganism by the diffusion technique.

Mueller Hinton Media contains Beef Extract, Acid Hydrolysate of Casein, Starch and Agar. **Beef Extract** and **Acid Hydrolysate of Casein** provide nitrogen, vitamins, carbon, amino acids, Sulphur and other essential nutrients. **Starch** is added to absorb any toxic metabolites produced. **Starch** hydrolysis yields dextrose, which serves as a source of energy. **Agar** is the solidifying agent.

Why MHA is used for antibiotic susceptibility testing?

1. It is a non-selective, non-differential medium. This means that almost all organisms plated on here will grow.
2. It contains starch. Starch is known to absorb toxins released from bacteria, so that they cannot interfere with the antibiotics. It also mediates the rate of diffusion of the antibiotics through the agar.
3. It is a loose agar. This allows for better diffusion of the antibiotics than most other plates. A better diffusion leads to a truer zone of inhibition.
4. MHA shows acceptable batch-to-batch reproducibility for susceptibility testing.
5. MHA is low in sulfonamide, trimethoprim, and tetracycline inhibitors (i.e., concentration of inhibitors thymidine and thymine is low in MHA).
6. Both the para-aminobenzoic acid (PABA) and thymine/thymidine content in Mueller Hinton Agar are reduced to a minimum, thus markedly reducing the inactivation of sulfonamides and trimethoprim when the media is used for testing the susceptibility of bacterial isolates to these antimicrobics.

نحكي بتفصيل أكثر ليش بنستخدم ال MHA لعمل اختبار حساسية ال anti ؟

- اول شيء هذا الوسط ما بنعتبره selective ولا differential معناته كل mo رح احطها عليه رح تنمو (وهذا الي بدي ياه بال test لاني بختبر فاعلية الدوا فبدي اتأكد انه الدوا هو الي قتلها مش ال medium)

- احتواءها ع ال starch الي بعمل ع امتصاص السموم الي بتطلع من البكتيريا الي ممكن تخرب ال antibiotic (وانا اصلا بدي اشوف تاثير ال anti فما بدي اشفي يخرب مفعوله) + يساعد ال starch بال diffusion

- هويُعتبر loose فبسهل ال diffusion اكثر من اي ميديا ثانية وبعطيني نتائج موثوق فيها اكثر لل zone of inhibition فبتكون ال value الي بشوفها عليه true value

- القيم تاعته تُعتبر (batch-to-batch) reproducible

- بحتوي ع كمية قليلة من ال sulfanamide ... etc

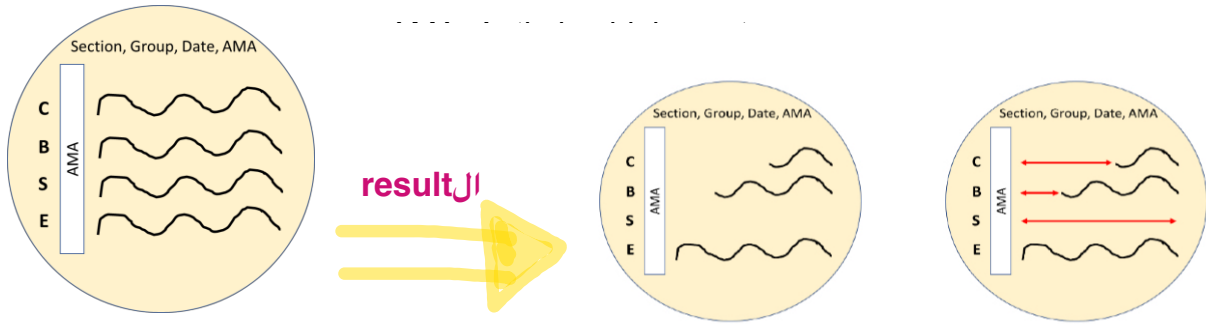
- برضو فيه كمية قليلة من ال PABA + Thyminth وهذا اشفي منيح لانهم اذا زادوا رح يعملوا inhibition لبعض ال anti * ما بعملو interfering لل function of antibiotic

نحكي عن طريقة ال strip التي هي anti واحد لأكثر من Mo ، وهي عبارة عن filter paper معقم بنقصه بطريقة معينة وبنغطسه بال anti وبحطه ع سطح ال agar بعدها بصيرله diffusion على ال agar لازم خلال شغلي اتبع ال aseptic technique واعمل labeling بطريقة مرتبة بس ننتبه لشغلة انه احنا متعودين نمرق اي bottle بنفتحها ع ال flame لكن هون ما بنمرق ال botte الي فيها ال strip ع ال flame لانه ممكن بصيرلها burning بكفى انى افتحهم جنب النار باقل وقت ممكن واستعملهم مباشرة

➤ Determination of the Susceptibility of More Than One Organisms to the Bacteriostatic Agent Provided (Strip method)

Experimental:

1. Pour an agar plate and allow to set firm
2. With a sterile forceps pick a sterile paper strip from the Petri dish and dip it into the bacteriostatic solution
3. Place the soaked strip onto the surface of nutrient agar at one side
4. Transfer a loopful from each of the test organisms to be tested and streak across the agar surface starting at the margin of the strip and at right angle to it (mark each streak on the bottom of the plate to identify)
5. Incubate at 37 °C for 24 hr.
6. Measure the length of the inhibition zones for each organism



اول خطوة بالتجربة بصب ال agar مثل ما تعلمنا من قبل وبعدها باستخدام sterile forceps (ملقط معقم) بنكون عقمناه من خلال اني اغمسه بايثانول وبعدها احطه ع النار

بعدين بنوخذ فيه ال paper strip بتكون معقمة وبنغمسها بمحلول ال bacteriostatic sol وبعدها ع ال agar بحطها وبعمل label (ممنوع احرك ال strip لانها بتكون اعطت مفعول مباشر) وبعدين بجيب ال mo وبعمل striking لكل واحد فيهم ع نفس ال paper تاغت ال bacteriostatic sol ابتداء من ال margin of strip + right angle to it

وبعمل ال streak جنبها مش فوقها مشان اتأكد انه ال anti. انتقل by diffusion

بعد ما نعملها incubation بنقيس ال length لل inhibition of zone لكل ال mo (يعني بعد ال incubation رح يطالع معي result وهي عبارة عن zone of inhibition الي هي منطقة ما صار عليها groth للبكتيريا)

مثلاً بالصورة امامنا عنا بعض ال mo صارلها نمو كامل مثل ال E.coli لكن ال S ما صار groth ابدا (يعني ال anti اثر عليها بشكل كلي) ال C+B صار groth لكن مش كامل والمنطقة الي صار فيها groth هي ال Z.O.I. وبقدر اقيس ال diameter وبسميها length of zone of inhib

بجيب مسطرة وبقيس ال zone .

ومن خلال ال result الي بالصورة بقدر ارتبهم بحسب الزوون :

*the most sensitive is (S) S>C>B>E
*the most resistance is (E)

كل ما زادت ال zone زادت ال sensitivity

➤ **Determination of the susceptibility of a selected organism against different antibiotics (Kirby-Bauer method)**

Kirby–Bauer (K-B) antimicrobial sensitivity test allows for the rapid determination of the efficacy of a drug (antibiotic) against certain type of bacteria by measuring the diameter of the zone of inhibition that resulted from diffusion of the drug from its disc into the surrounding medium.

K-B Test Standards:

A. Microorganisms are isolated from infected tissues. For example:

- Septicemia: a blood sample is obtained
- Upper respiratory tract infections: a throat swap or a sputum sample.

The obtained bacterial suspension should be **standardized** by comparing it with McFarland standard # 0.5 or # 1 (according to the type of bacteria). This would be equivalent to a bacterial concentration of 1.5×10^8 cells/mL or 3×10^8 cells/mL.

B. The used medium should be **standardized**. Mueller-Hinton Agar is used. This medium with a pH of 7.2 to 7.4 contains high percent of proteins, which will facilitate diffusion from the antibiotic disc and improve bacterial growth.

C. The antibiotic disc is made from filter paper. The concentration of certain antibiotic (antibiotic amount per disc area) should be **standardized** to ensure consistency in results. Knowing that antibiotic concentration is a factor affecting the diffusion rate from disc into the surrounding medium.

D. The incubation temperature should be **standardized** to be 37 °C. Since temperature is also a factor affecting rate of diffusion (proportional relationship).

E. The incubation time should be **standardized** to be from 18 to 24 hours (overnight incubation).

نحكي هسا عن ال Kirby الي بتحكي عن ال Mo لاكثر من anti :

بنختصره K.B ويُعتبر rapid determination لفعالية الدوا عن طريق انه نقيس ال diameter للزبون ،
عشان اعرف نتيجة ال test لهاي ال method لازم يكون عندي standerd ومنها :

✓ اول شيء لازم يصير isolated لل mo من ال infected tissue (يعني نوخذ ال mo من الانسجة
المصابة نفسها)

مثال عليهم :

اذا صار تسمم بالدم بنوخذ عينة من الدم

اذا كان عندي التهاب بالجهاز التنفسي ال upper بنوخذ مسحة من الحلق او عينة من البلغم
(يعني اذا بدي اتعرف ع ال mo بدي اوخذها من مكان الاصابة نفسه)

بعد ما اخذ هاي العينة بحطها ب broth media معينة ويصير عندي bacterial suspension
لازم يكون standardized من خلال مقارنته مع standered sol اسمه McFarland standerd

وعندي نوعين منه واحد 0.5 وواحد 1

هو بكون عبارة عن sol اله turbidty معينة

فباجي بقارن ال turbidty تاعت ال bacterial susp تاعي مع ال turbidty لل McFarland

وبعمل dilution لل bacterial susp تاعي لحد ما تصير التيريدتي إله مساوية للتيريدتي لل McFar

شو بستفيد اذا صاروا نفس التيريدتي ؟ بصير يحتوي ع كمية معينة من البكتيريا الي هي ما بين

1.5-10*3 وبالتالي بقدر استخدم هذا ال susp

✓ ثاني اشني اعمله stander هو ال media نفسها بستخدم ال MHA حكيها والي بكون لها ph=7.2 ل 7.4

وبكون تركيز البروتين عالي فيها بحيث يسهل ال diffution من القرص نفسه

✓ ثالث شيء اعمل stander لل conc of anti لانه عامل مهم بانتشار ال anti من الدسك للمنطقة الي

حوليه

✓ رابع اشني حتى ال temperature الي بنحطها لل incubation لازم تكون stander ع 37c لانها برضو

بتأثر ع معدل ال diffution (علاقة طردية كل ما زادت الحرارة بزيد ال diffution)

✓ خامس شيء والاخير هو ال incubation time لازم يكون standered من 18-24 ساعة لا اكثر ولا

اقل الي هو ليلة واحدة يعني

مُختصر سريع

عملنا standerization ل :

1. Comparing with McFarland

2. Media

3. conc of antibiotic

4. incubation temprature

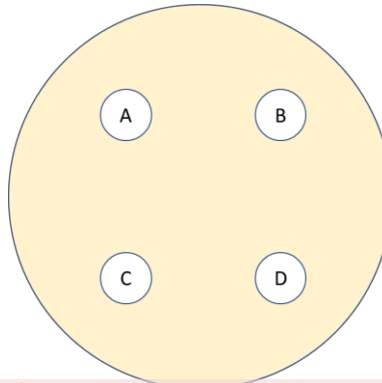
5. incubation time

Experimental:

1. Add 0.1 ml of the bacterial suspension of the microorganism to empty Petri dish
2. Then add melted agar medium at 45 °C-50 °C and mix by rotation
3. Mark the position for the discs with a marker pen on the bottom of the plate
4. With a sterile forceps (by ethanol followed by heating) pick a disc from the container.
5. Place the disc onto the surface of the agar at the marked position. the discs must be distributed evenly and not too close to the plate edge.
6. Use a sterile loop to help lacing the disc on the agar.

Note:

- a. The minimum distance between disc center to neighboring disc center is 24 mm, and also no closer than 10-15 mm from the edge of Petri-dish). A maximum of 6 discs may be placed on a 9-cm Petri-dish, and 12 discs on a 15-cm dish. Reduce the number of applied discs per plate if overlapping zones of inhibition are encountered.
 - b. A disc should not be relocated once it has come into contact with the agar surface because some of drug diffuses instantaneously. Instead, place a new disc in another location on the agar.
7. Repeat steps 3 and 4 with other antibiotics disc
 8. Incubate the plate inverted at 37 °C for 24 h



بنضيف 0.1 ml من الـ susp الي معنا على petri فاضي بعدها بنحط الـ melted agar عليه ويعمل rotation زي كاني بكتب رقم 8 مش بقوة (not vigorous) شوي شوي عشان اتجنب الـ air bubbles

وبنستعمل هون pour plate method عشان اضمن توزيع منيح و homogenous بعدها بعمل labeling وباستخدام برضو sterile forceps عقمناه بالايثانول وبعدها بالحرارة بنوخد disc من الـ container وينحطه ع الـ agar الي قسمناه لـ 4 اقسام وينحط عليه 4 disc ونبته ما تكون قريبة للحفة بنخليها بالوسط ممكن نستخدم sterile loop حتى نضغط فيه ع الـ disc مشان نثبته (مجرد ما لمس الـ disc الـ agar ما بنحركه لانه بعض الادوية بتنتشر فوراً عليه فبدل تحريكه حط disc جديد بمكان ثاني

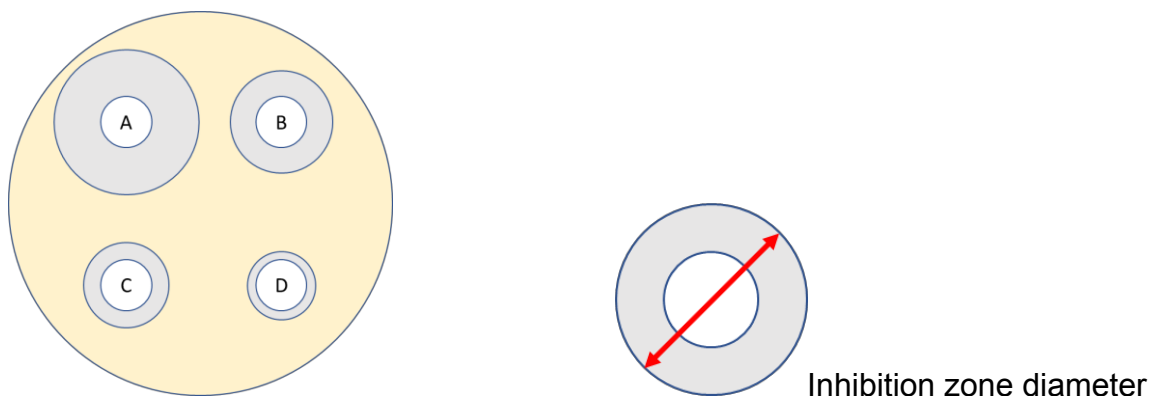
فهون بالرسمه عنا 4 section <---- 1 antibiotic evry section يكون بمنتصف الـ plate وما بقربهم للحفة وبعدهم عن بعض ونلاحظ انه الـ disc احجامهم

Zone of inhibition measurement and interpretation

1. After 16 to 18 hours of incubation, each plate is examined. If the plate was satisfactorily prepared, the resulting zones of inhibition will be uniformly circular and there will be a confluent lawn of growth. If individual colonies are apparent, the inoculum was too light and the test must be repeated. The diameters of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye) are measured, including the diameter of the disc. Zones are measured to the nearest whole millimeter, using sliding calipers or a ruler, which is held on the back of the inverted Petri plate

Note:

If there is NO zone at all, report it as 0, even though the disc itself is around 7 mm.



2. The zone margin should be taken as the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Faint growth of tiny colonies, which can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth, is ignored. However, discrete colonies growing within a clear zone of inhibition should be subculture, re-identified, and retested.
3. These zones of inhibition are then recorded for size; the diameter of the zone is proportional to the amount of anti-microbial agent, the solubility of the agent, the diffusion coefficient, and the overall effectiveness of the agent. Zones observed on the plates are then compared to standard data to determine if the isolate is truly sensitive to the antibiotic.
4. The sizes of the zones of inhibition are interpreted by referring to: **Zone size interpretive table for the Kirby Bauer test (CLSI table).**

نيجي لقياس ال zone of in وتفسيرها :
الشكل مبين معي نتيجة التجربة الي عملناها بالمختبر من بعد ٢٤ ساعة

بالصورة عندي ال 4section كل واحد شو صار فيه

عندي منطقة حولين ال disc صار فيها قتل للبكتيريا أما باقي ال plate
نمت البكتيريا عليه

هاي المنطقة بقدر اقيسها حتى احدد فاعلية الدواء،

ما لازم اشوف individual colonies ،

عشان اقيس نصف القطر لازم اوخد الطول كامل للدائرة مثل الصورة تحت
ع اليمين حتى مع قياس ال disc نفسه

اذا ما كان عندي أي زوون ظاهرة معناته بسجل = 0 حتى لو كان طول

ال disc = ٧سم ، ما يعتبر انه اله طول

اذا كان النمو كثير ضعيف يتم تجاهله،

بנסجل القياس الي قسناه

ال diameter يعتمد ج على كمية ال anti الموجودة + ال sol لل agent

+ ال diffusion coefficient + ال effectiveness لل agent

يعني قياس ال diameter مش بس يعتمد ع اني اشوف حجم الزوون

وبس ! لا عندي عوامل كثيرة لازم انتبهاها حكيانهم فوق

الان بعد ما اخذ القياس برجع جدول عملوه وخطوا فيه قياسات للتفسير

وسموه CLSI table

بناء ع الرقم الي طلع معي لقياس حجم المنطقة بقدر افسر النتائج من

Table 1: Panel of antibiotics used, their concentrations and zone diameter interpretative standards for *E. coli* (CLSI, 2007)

Group of Antimicrobial agents	Antimicrobial agents	Disk contents	Zone diameter, nearest whole (mm)			Manufacturer
			R	I	S	
Penicillin	Ampicillin	10 µg	≤ 13	14–16	≥ 17	Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England
β-lactamase inhibitor combination	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	≤ 13	14–17	≥ 18	
Cephems	Ceftriaxone	30 µg	≤ 13	14–20	≥ 21	
Amino glycosides	Gentamicin	10 µg	≤ 12	13–14	≥ 15	
Tetracycline	Tetracycline	30 µg	≤ 11	12–14	≥ 15	
	Doxycycline	30 µg	≤ 10	11–13	≥ 14	
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	5 µg	≤ 15	16–20	≥ 21	
Quinolones	Nalidixic acid	30 µg	≤ 13	14–18	≥ 19	
Folate pathway inhibitor	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.7 µg	≤ 10	11–15	≥ 16	
Phenicoles	Chloramphenicol	30 µg	≤ 12	13–17	≥ 18	

Classification of microorganisms according to susceptibility test results

1. **Susceptible (S):** an organism is called susceptible to a drug when the infection caused by it is likely to respond to treatment with this drug, at the recommended dosage.
2. **Intermediate Susceptibility (I):** covers two situations
 1. The organism cannot be classified as either susceptible or resistant, but is interpreted as being or intermediate (I) Susceptibility to a given drug.
 2. The clinical interpretation of this category is that the organisms tested may be inhibited by the antimicrobial agent provided that either:
 - a. Higher doses of drug are given to the patient, or
 - b. The infection is at a body site where the drug is concentrated.
3. **Resistant (R):** this term implies that the organism is expected not to respond to a given drug, irrespective of the dosage and of the location of the infection.

Example:

Suppose we test the sensitivity of E-coli against ampicillin (penicillin) and ceftriaxone (cepheme).

Suppose the two zone of inhibition were 1.8 cm = 18 mm.

Compare the antimicrobial activity of ampicillin and ceftriaxone against E-coli. And classify them as a susceptible, intermediate or resistant.

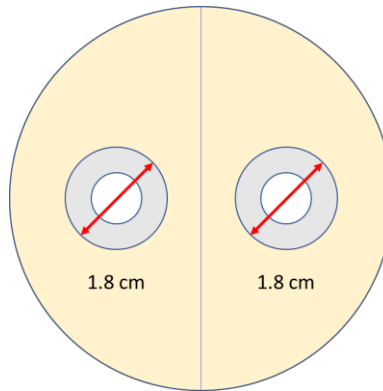


Table 1: Panel of antibiotics used, their concentrations and zone diameter interpretative standards for *E. coli* (CLSI, 2007)

Group of Antimicrobial agents	Antimicrobial agents	Disk contents	★ Zone diameter, nearest whole (mm)		
			R	I	S
Penicillin	Ampicillin	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
β-lactamase inhibitor combination	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Cephems	Ceftriaxone	30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21
Amino glycosides	Gentamicin	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Tetracycline	Tetracycline	30 µg	≤ 11	12-14	≥ 15
	Doxycycline	30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Quinolones	Nalidixic acid	30 µg	≤ 13	14-18	≥ 19
Folate pathway inhibitor	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.7 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
Phenicoles	Chloramphenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18

★ R: resistant, I: intermediate sensitivity, S: sensitive