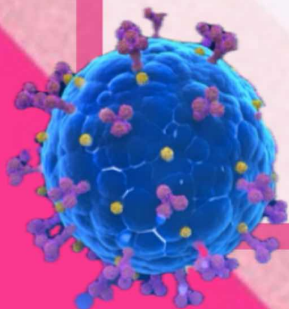




MICROBIOLOGY LAB

Lecture : Lab 3 [♡]

Done by : Hedaya Sarsenk





3-Gram Stain and Antibiotics Susceptibility Testing lab

Mohammad Al-Tamimi MD PhD
Second Year
Faculty of Medicine
The Hashemite University

Gram Stain

- ▶ Differentiates bacteria into two groups: Gram positive and Gram negative
- ▶ Stain mechanism is generally related to the thickness of the cell wall, pore size and permeability properties of intact cell envelope

Staining:

3 Steps in Gram Stain Test :-

1. Bacterial smear A bacterial smear is simply that—a small amount of culture spread in a very thin film on the surface of the slide.
2. Stain
3. Observe the smear under the microscope



1 / Preparing the Bacterial Smear

- Put on drop of **normal saline** in a slide
- Using a sterilized and cooled **inoculation loop**, obtain a very **small sample** of a bacterial colony.
- Gently **mix** the bacteria into the normal saline drop.
- Remove it to dry by air ^{in Room temperature}
- OR
- Heat-fixing the smear

العينة يلي باخذها من المريض ما بصير دايركت احطها على السلايد ووايلش اشوقها بالمجهر، لازم قبل هالشي اسويها culture عشان اكثرها، لانه يمكن العينة ما فيها بكتيريا بالعدد الكبير يلي بسمجلي اني اشوقها تحت المجهر. بلس انه عينة المريض ممكن يكون فيها خلايا تانية، normal selective culture عشان اخليها flora ف انا بسوي

الخطوة الأخيرة تعالج ال normal saline
 استعملهم طير ان انا حطيت بالدرجة ازا بري اشوق بالهوية عشان انا وقت اخذ الكثير من الكثير وايضا احطها ع السلايد و اوزنها ممكن اني شوي باشق
 في راج احط اني احطها
 في اني حطت اني عشان اوزنها بصولة

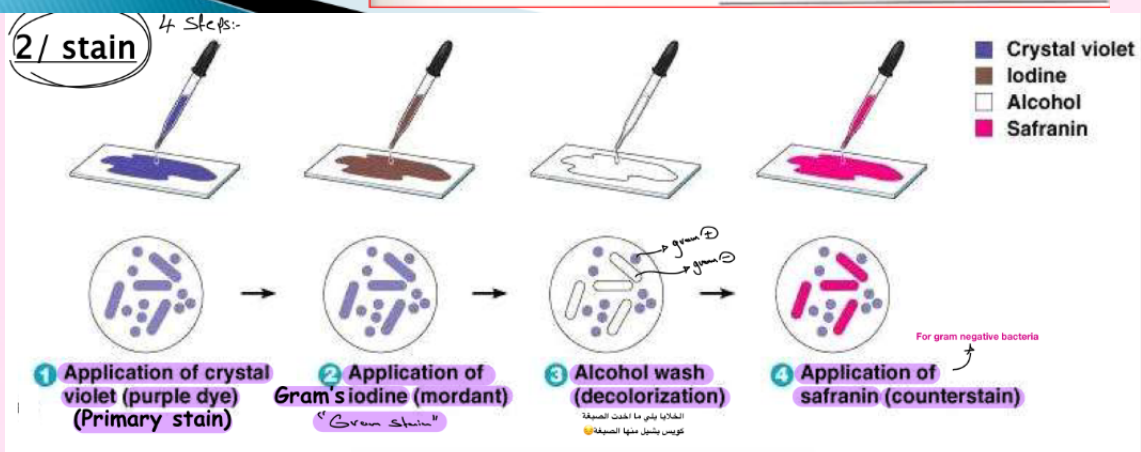
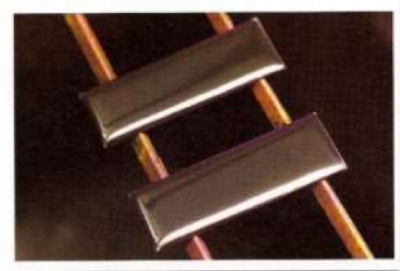
An inoculation loop (also called a smear loop, inoculation wand or microstreaker) is a simple tool used mainly by microbiologists to pick up and transfer a small sample of microorganisms called inoculum from a microbial culture to culture plate. This process is called inoculation.



FIGURE 7-39 Prepare a smear from a culture: (A) use sterile loop to bacterial growth; (B) mix bacteria with water on slide and spread to make a smear



FIGURE 7-40 Heat-fixing a bacterial smear using an electric incinerator



Crystal violet iodine Alcohol Safranin

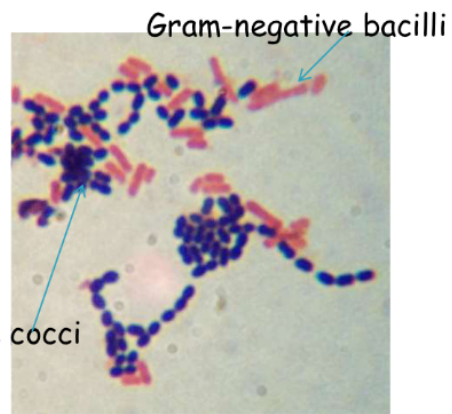


3/ Observe the Stained Smear

✓ Oil immersion ل حتى يسهل الرؤية → used only at very large magnifications that require high resolving power

✓ Gram reactions

- Gram (+) → purple
- Gram (-) → pink



Examples of Gram Positive Bacteria

		Staphylococcus aureus
		Streptococcus pyogenes
		Clostridium perfringens
		Listeria monocytogenes

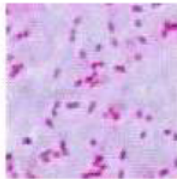




Examples of Gram Negative Bacteria



Escherichia coli



Haemophilus influenzae



Vibrio cholerae

Antibiotics Susceptibility Testing

Mohammad Al-Tamimi MD PhD
Second Year
Faculty of Medicine
The Hashemite University



Drug efficacy can be measured by susceptibility testing Including

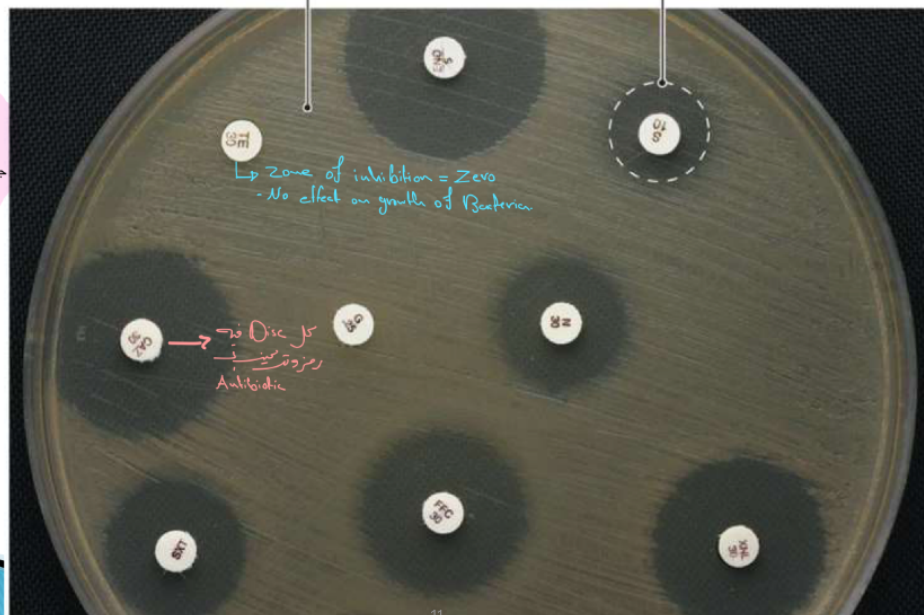
1. Kirby-Bauer Method (diffusion test)
2. Broth dilution test
3. The E test
4. Automatic (Vitek, Vitek 2)
5. Molecular testing of relevant genes

1. Kirby-Bauer Method (disc method) / Diffusion.

لا تترك Antibiotic بيتي بالاسهوه

Bacterial lawn

Zone of inhibition

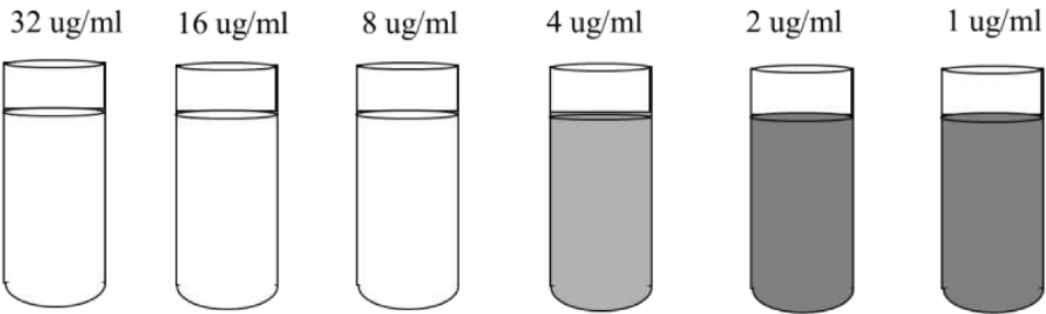


منش كل ما زادت ال zone of inhibition يعني هالتشي كثير منيح ، كل انتيبيوتيك الة جدول خاص فيه ونوع البكتيريا بيلعب دور فهمتو علي كيف صح 🍌

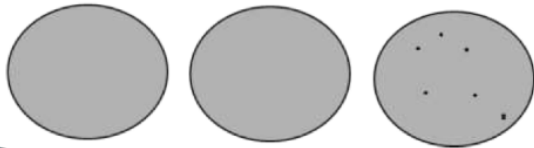


2. Dilution Test

بخط الانتيبويوتيك بالتبويات ويسوي تخفيف تدريجيا ، بخطو اول شي بتركيز عالي بعدين ببلش أقلل شويي شويي شويي...
بعدين بخط نفس كمية البكتيريا فيهم كلهم وبسنتي عليها نتفة وبروح اسويلها culture



Sub-culture to agar medium



Minimal inhibitory concentration (↓ growth)

MIC = 8 ug/ml

Minimal Bactericidal concentration (kill)

MBC = 16 ug/ml

لاحظو يا حياة الجميلين انه في التركيز العالي مافي بكتيريا كلها ماتت وبلشت تطلع بتركيز 8، بناء على هالشي بروح بحسب جدول التئين

مين الاحسن ، يلي يقلل النمو تبع البكتيريا ولا يلي بقتلها منطقتيا يعني بدون مخ انه للي بقتل احسن
يلي هو يكون فيه التركيز اعلى

3. E test combines aspects of Kirby-Bauer and MIC tests



Different size of zone of inhibition according to concentration of Antibiotic.

تقريباً بيطلع MIC (أقل تركيز فعال)



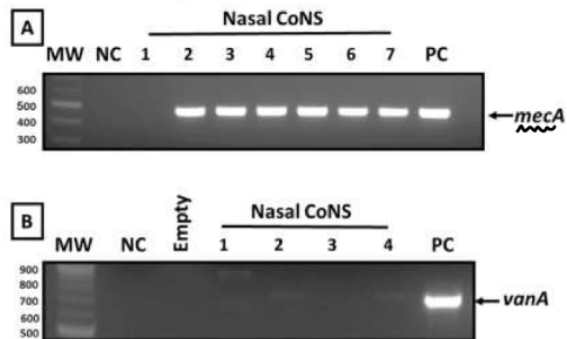
4. Automatic (Vitek, Vitek 2)

جهاز من الجنة جد واو، افلكم قصتو
 هاد با سيدي بتجيب ال culture ويتحطها جوا هادا
 الجهاز وهو نفسو الجهاز بيكون مخزن فيه كل انواع
 الانتيبوتيك ف بيعطيك النتائج النهائية يعني بعطيك
 ال MIC لكل انتيبوتيك لهاي البكتيريا وبعطيك ريبورت
 واشياء عالبارد المستريح

5- Molecular testing of relevant genes

- ▶ DNA extraction
- ▶ Study relevant genes Resistance ←
 - *mecA* - MRSA
 - *vanA* - VRSA
- ▶ PCR
- ▶ Gel electrophoresis

Figure 1. Analysis of PCR products by gel electrophoresis stained with ethidium bromide for *mecA*, *vanA*, and *vanB* genes in nasal CoNS samples.





Antibiotics susceptibility report reading

1

Name : Rajesh Hinduja	Age/Gender: 51 y / M	Collected: 08/09/2020 01:31
Patient ID : 0010235933	Visit Type :IP	Received : 08/09/2020 09:27
	DOB : 20/06/1969	Reported : 08/09/2020 12:01
Accession : 2001023647	Location :1S0613`1SR6181`1SB6181`1PULMMED	

2

ORDER#: D90306040
SOURCE: Sputum, Suctioned ett
ANTIBIOTICS AT COLL.:

الريپورت بيحليل جازمه مختبر

Stain, Gram (Respiratory) FINAL
Few WBC's
Rare Mixed Respiratory Flora
Culture and Gram Stain, Aerobic, RespiratorFINAL
Very light growth of mixed upper respiratory flora
Heavy growth of Pseudomonas aeruginosa

Heavy growth of Pseudomonas aeruginosa

3

Antibiotic	Sputum culture	
	MIC	Interpretation
Ampicillin	16	I
Amoxicillin/clavulanic acid	8	S
Piperacillin/tazobactam	≤ 4	S
Cefazolin	≥ 64	R
Cefoxitin	≥ 64	R
Cefotaxime	≥ 64	R
Ceftazidime	4	S
Cefepime	≥ 64	R
Aztreonam	≥ 64	R
Imipenem	1	S
Amikacin	≥ 64	R
Gentamicin	≥ 16	R
Ciprofloxacin	≥ 4	R
Tigecycline	≥ 8	R
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≤ 20	S

the identity of the organism and the appropriate antibiotic sensitivity pattern against each organism

⊕ بطيى لمريض دانسا ي
لكن لو صاخي ي دققا
ريپورت ضايرب آ
- مكد دققا اعني انتمه
واحد I.

MIC, minimum inhibitory concentration; R, resistant; S, sensitive; I, intermediate.





هذا التفريغ صدقة عن روح

"هبة خالد الوريكات"

وبقية شهداء العلم في حادثة التكنو

اللهم ارحمهم واغفر لهم وتقبلهم من الشهداء

الصالحين

نسألكم الدعاء لهم والفاتحة

