



بهارافشان

عضو انجمن تخصصی مراکز تحقیق و توسعه صنعت، معمر و نهارت



# باکتری‌های استاندارد لیوفیلیزه

مقدمه:

در هر آزمایشگاه باکتری‌شناسی مجموعه باکتری‌های استاندارد جهت کنترل کیفی ضروری است. باکتری‌های لیوفیلیزه بهارافشان از مجموعه‌های American Type Culture Collection (ATCC) و NCTC (UK National Collection of Type Culture) تهیه شده است. این باکتری‌ها دارای خصوصیات بیوشیمیایی، آنتی‌ژنیک و حساسیت ضد میکروبی مشخص می‌باشند و در موارد زیر استفاده می‌شوند:

۱. کنترل کیفی محیط‌های کشت، رنگ‌ها و معرف‌های بیوشیمیایی.
۲. پایش دقت و درستی روش انجام آزمایش‌ها.
۳. کنترل دیسک‌های آنتی‌بیوتیک و محیط مولر هینتون آگار در روش Disk Diffusion Agar و Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (ضمیمه ۱ و ۲).

تهران، خیابان کارگر شمالی، نرسیده به پمپ‌بنزین، ساختمان آزمایشگاه بهار شماره ۱۶۲۷، صندوق پستی: ۷۶۸-۱۴۱۸۵  
 تلفن: ۸۸۹۶۶۲۴۶-۸۸۹۶۱۸۶۹-۸۸۹۶۰۳۴۵  
 کارخانه: کرج، شهرک صنعتی بهارستان، خیابان گلستان چهارم، پلاک ۵۷

Agar media should be supplemented with 25µg/mL of glucose-6-phosphate. Broth dilution should not be performed.

e. For control organisms for gentamicin and streptomycin high-level aminoglycoside screen tests for enterococci, see Table 2D.

f. This test should be performed by agar dilution only.

g. very medium-dependent, especially with enterococci.

**h. The quality control limits for *E. coli* ATCC® 34218 when using Haemophilus Test Medium (HTM) are 16/2-64/2µg/mL.**

i. For control organisms for vancomycin screen test for enterococci, see Table 2D.

An NCCLS global informational Supplement. ©NCCLS All rights reserved.

Order No.	Product	ATCC	NCTC
Ec 922	<i>Escherichia coli</i>	25922	12241
Sa 923	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	
Pa 853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	
Ef 212	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	12697

منابع:

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1996: Approved standard M22-A2. Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Approved Standard M2-A8. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Approved standard M7-A6. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Informational Supplement M100-S14. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing.
۵. صوریان - رقیه: دستورالعمل نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی به روش طولانی مدت و کوتاه مدت - آزمایشگاه فرانس ایران - ۱۳۸۵.

Antimicrobial Agent	Staphylococcus aureus ATCC29213®a	Enterococcus faecalis ATCC29212®	Escherichia coli ATCC25922®	Pseudomonas aeruginosa ATCC27853®	Escherichia coli ATCC35218®b
Imipenem	0.016-0.06	0.5-2	0.06-0.25	1-4	-
Kanamycin	1-4	16-64	1-4	-	-
Levofloxacin	0.06-0.5	0.25-2	0.003-0.06	0.5-4	-
Linezolid	1-4	1-4	-	-	-
Lomefloxacin	0.25-2	2-8	0.03-0.12	1-4	-
Loracarbef	0.5-2	-	0.03-0.25 f	>8	-
Mecillinam	-	-	0.03-0.25 f	-	-
Meropenem	0.03-0.12	2-8	0.08-0.06	0.25-1	-
Methicillin	0.5-2	>16	-	-	-
Merzocillin	1-4	1-4	2-8	8-32	-
Minocycline	0.06-0.5	1-4	0.25-1	-	-
Moxalactam	4-16	-	0.12-0.5	8-32	-
Moxifloxacin	0.016-0.12	0.06-0.5	0.008-0.06	1-8	-
Naftillin	0.12-05	2-8	-	-	-
Nahdixic acid	-	1-4	-	-	-
Netilmicin	≤0.25	4-16	≤0.5-1	0.5-8	-
Nitrofurantoin	8-32	4-16	4-16	-	-
Norfloxacin	0.5-2	2-8	0.03-0.12	1-4	-
Ofloxacin	0.12-1	1-4	0.015-0.12	1-8	-
<b>Oritavancin</b>	<b>0.5-2</b>	<b>0.12-1</b>	-	-	-
Oxacillin	0.12-0.5	8-32	-	-	-
Penicillin	0.25-2	1-4	-	-	-
Piperacillin	1-4	1-4	1-4	1-8	-
Piperacillin-tazobactam	0.25-4-24	1/4-4/4	1/4-4/4	1/4-8/4	0.5/4-2/4
Quinupristin-dalfopristin	0.25-1	2-8	-	-	-
Rifampin	0.004-0.016	0.5-4	4-16	16-64	-
Sparfloxacin	0.03-0.12	0.12-0.5	0.004-0.016	0.5-2	-
Sulfisoxazole®	32-128	32-128	8-32	-	-
Tecoplanam	0.25-1	0.06-0.25	-	-	-
Telithromycin	0.06-0.25	0.016-0.12	-	-	-
Tetracycline	0.12-1	8-32	0.5-2	8-32	-
Ticarcillin	2-8	16-64	4-16	8-32	-
Ticarcillin-clavulanic acid	0.5/2-2/2	16/2-64/2	4/2-16/2	8/2-32/2	8/2-32/2 <sup>h</sup>
Tobramycin	0.12-1	8-32	0.25-1	0.25-1	-
Trimethoprim®	1-4	≤1	0.5-2	>64	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	8/152-32/608	-
Tropsectomycin	2-16	2-8	8-32	-	-
Trovafloxacin	0.008-0.03	0.06-0.25	0.004-0.016	0.25-2	-
Vancomycin <sup>i</sup>	0.5-2	1-4	-	-	-

**NOTE 1:** These MICs were obtained in several reference laboratories by both microdilution. If four or fewer concentrations are tested, quality control may be more difficult.

**NOTE 2:** Information in boldface type is considered tentative for one Year.

**NOTE 3:** For four-dilution ranges, results at the extremes of the acceptable range(s) should be suspect. Verify control validity with data from other control strains.

Footnotes

- a. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.
- b. **Because this strain may lose its plasmid**, Careful organism maintenance is required; refer to M7, Section 12.4.
- c. QC ranges reflect MICs obtained when Mueller - Hinton broth is supplemented with calcium to a final concentration of 50µg/mL.
- d. The approved MIC susceptibility testing method is agar dilution.

ضمیمه ۲: محدوده قابل قبول برای سویه‌های کنترل کیفی در آزمایش MIC ارگانسیم‌های غیرمشکل پسند (محیط مولر هینتون Cation-Adjusted بدون خون یا مواد افزودنی دیگر).

Acceptable Limits for Quality Control Strains Used to Monitor Accuracy of Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) (µg/mL) of Nonfastidious Organisms (Using Cation - Adjusted Mueller - Hinton Medium Without Blood or other Nutritional Supplements).

Antimicrobial Agent	Staphylococcus aureus ATCC29213®a	Enterococcus faecalis ATCC29212®	Escherichia coli ATCC25922®	Pseudomonas aeruginosa ATCC27853®	Escherichia coli ATCC35218®b
Amikacin	1-4	64-256	0.5-4	1-4	-
Aminocillin-clavulanic acid	0.12/0.06-0.5/0.25	0.25/0.12-1.0/0.5	2/1-8/4	-	4/2-16/8
Ampicillin	0.5-2	0.5-2	-	-	2-8
Ampicillin-sulbactam	-	-	2/1-8/4	-	8/4-32/16
Azithromycin	0.5-2	-	-	-	-
Azlocillin	2-8	1-4	8-32	2-8	-
Aztreonam	-	-	0.06-0.25	2-8	-
Carbencillin	2-8	16-64	4-16	16-64	-
Cefaclor	1-4	-	1-4	-	-
Cefamandole	0.25-1	-	0.25-1	-	-
Cefazolin	0.25-1	-	1-4	-	-
Cefdinir	0.12-0.5	-	0.12-0.5	-	-
Cefditoren	0.25-2	-	0.12-1	-	-
Cefepime	-	-	0.016-0.12	1-8	-
Cefetamet	-	-	0.25-1	-	-
Cefixime	8-32	-	0.25-1	-	-
Cefmetazole	0.5-2	-	0.25-1	>32	-
Cefonicid	1-4	-	0.25-1	-	-
Cefoperazone	1-4	-	0.12-0.5	2-8	-
Cefotaxime	1-4	-	0.03-0.12	8-32	-
Cefotetan	4-16	-	0.06-0.25	-	-
Cefotim	1-4	-	2-8	-	-
Cefpodoxime	1-8	-	0.25-1	-	-
Cefprozil	0.25-1	-	1-4	-	-
Ceftazidime	4-16	-	0.06-0.5	1-4	-
Ceftibuten	-	-	0.12-0.5	-	-
Ceftizoxime	2-8	-	0.03-0.12	16-64	-
Ceftriaxone	1-8	-	0.03-0.12	8-64	-
Ceftriaxone	0.5-2	-	2-8	-	-
Cefuroxime	0.12-0.5	-	4-16	-	-
Cephalothin	2-8	4-16	2-8	-	-
Chloramphenicol	2-8	-	2-8	-	-
Cinoxacin	0.12-0.5	0.25-2	0.004-0.016	0.25-1	-
Ciprofloxacin	0.12-0.5	-	0.12-0.5	-	-
Clarithromycin	0.008-0.06	0.03-0.25	0.002-0.016	0.06-0.5	-
Cinoxacin	0.06-0.25	4-16	-	-	-
Daptomycin <sup>c</sup>	0.25-1	1-8	-	-	-
Dinilamycin	1-4	-	0.5-2	-	-
Doxycycline	0.5-2	2-16	0.06-0.25	2-8	-
Enoxacin	0.06-0.25	4-16	0.004-0.016	2-8	-
Ertapenem	0.25-1	1-4	-	-	-
Erythromycin	0.25-1	-	-	-	-
Fleroxacin	0.25-1	2-8	0.03-0.12	1-4	-
Fosfomycin <sup>d</sup>	0.5-4	32-128	0.5-2	2-8	-
Garenoxacin	0.004-0.03	0.03-0.25	0.004-0.03	0.5-2	-
Gatifloxacin	0.03-0.12	0.12-1.0	0.008-0.03	0.5-2	-
Gemifloxacin	0.008-0.03	0.016-0.12	0.004-0.016	0.25-1	-
Gentamicin <sup>e</sup>	0.12-1	4-16	0.25-1	0.5-2	-
Grepafloxacin	0.03-0.12	0.12-0.5	0.004-0.03	0.25-2.0	-

Antimicrobial Agent	Disk Content	Escherichia Coli ATCC25922® <sup>a</sup>	Staphylococcus aureus ATCC25923®	Pseudomonas aeruginosa ATCC27853®	Escherichia Coli ATCC35218® <sup>d</sup>
Imipenem	10µg	26-32	-	20-28	-
Kanamycin	30µg	17-25	19-26	-	-
Levofloxacin	5µg	29-37	25-30	19-26	-
Linezolid	30µg	-	27-31	-	-
Lomefloxacin	10µg	27-33	23-29	22-28	-
Lotacabed <sup>e</sup>	30µg	23-29	23-31	-	-
Mecillinam	10µg	24-30	-	-	-
Meropenem	10µg	28-34	29-37	27-33	-
Methicillin	5µg	-	17-22	-	-
Merzocillin	75µg	23-29	-	19-25	-
Minocycline	30µg	19-25	25-30	-	-
Moxalactam	30µg	28-35	18-24	17-25	-
Moxifloxacin	5µg	28-35	28-35	17-25	-
Nafcillin	1µg	-	16-22	-	-
Nalidixic acid	30µg	22-28	-	-	-
Netilmicin	30µg	22-30	22-31	17-23	-
Nitrofurantoin	300µg	20-25	18-22	-	-
Norfloxacin	10µg	28-35	17-28	22-29	-
Ofloxacin	5µg	29-33	24-28	17-21	-
Oxacillin	1µg	-	18-24	-	-
Penicillin	10 Units	-	26-37	-	-
Piperacillin	100µg	24-30	-	25-33	12-18
Piperacillin-tazobactam	100/10µg	24-30	27-36	25-33	24-30
Quinupristin-dalfopristin	15µg	-	21-28	-	-
Rifampin	5µg	8-10	26-34	-	-
Sparfloxacin	5µg	30-38	27-33	21-29	-
Streptomycin <sup>a</sup>	10µg	12-20	14-22	-	-
Sulfisoxazole <sup>e</sup>	250 or 300µg	15-23	24-34	-	-
Teicoplanin	30µg	-	15-21	-	-
Teichromycin	15µg	-	24-30	-	-
Tetracycline	30µg	18-25	24-30	-	-
Ticarcillin	75µg	24-30	-	21-27	-
Ticarcillin-clavulanic acid	75/10µg	24-30	29-37	20-28	21-25
Tobramycin	10µg	18-26	19-29	19-25	-
Trimethoprim <sup>a</sup>	5µg	21-28	19-26	-	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole <sup>e</sup>	1.25/23.75µg	23-29	24-32	-	-
Trospectomycin	30µg	10-16	15-20	-	-
Trovafoxacin	10µg	29-36	29-35	21-27	-
Vancomycin	30µg	-	17-21	-	-

**NOTE:** Information in boldface type is considered tentative for one Year.

**Footnotes**

- a. For control limits of Gentamicin 120-µg and Streptomycin 300-µg disks. Use **Enterococcus faecalis** ATCC® 29212 (gentamicin: 16 to 23 mm).
- b. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.
- c. The 200-µg fosfomycin disk contains 50µg of glucose- 6- phosphate.
- d. Some lots of Mueller. Hinton Agar are deficient in calcium and give small Zones.
- e. These agents can be affected by excess levels of thymidine and thymine. See M2, Section 4.1.4 for guidance should a problem with quality control occur.
- f. Careful organism maintenance is required; refer to M2, Section 10.3.

An NCCLS global informational Supplement. ©NCCLS All rights reserved.

ضمیمه ۱: محدوده قابل قبول برای سویه‌های کنترل کیفی در آزمایش دیسک‌دیفیوژن ارگانسیم‌های غیرمشکل‌پسند (محیط مولر هیتون بدون خون یا مواد افزودنی دیگر).

Acceptable Limits for Quality Control Strains Used to Monitor Accuracy of Disk Diffusion Testing of Nonfastidious Organisms (Using Mueller - Hinton Medium Without Blood or Other Supplements).

Antimicrobial Agent	Disk Content	Escherichia Coli ATCC25922® <sup>a</sup>	Staphylococcus aureus ATCC25923®	Pseudomonas aeruginosa ATCC27853®	Escherichia Coli ATCC35218® <sup>d</sup>
Amikacin	30µg	19-26	20-26	18-26	-
Amoxicillin-clavulanic acid	20/10µg	18-24	28-36	-	17-22
Ampicillin	10µg	16-22	27-35	-	6
Ampicillin- sulbactam	10/10µg	19-24	29-37	-	13-19
Azithromycin	15µg	-	21-26	-	-
Azlocillin	75µg	-	-	24-30	-
Aztreonam	30µg	28-36	-	23-29	-
Carbencillin	100µg	23-29	-	18-24	-
Cefaclor	30µg	23-27	27-31	-	-
Cefamandole	30µg	26-32	26-34	-	-
Cefazolin	30µg	21-27	29-35	-	-
Cefdinir	5µg	24-28	25-32	-	-
Cefditoren	5µg	22-28	20-28	-	-
Cefepime	30µg	31-37	23-29	24-30	-
Cefetamet	10µg	24-29	-	-	-
Cefixime	5µg	23-27	-	-	-
Cefmetazole	30µg	26-32	25-34	-	-
Cefonicid	30µg	25-29	22-28	-	-
Cefoperazone	75µg	28-34	24-33	23-29	-
Cefotaxime	30µg	29-35	25-31	18-22	-
Cefotetan	30µg	28-34	17-23	-	-
Cefoxitin	30µg	23-29	23-29	-	-
Cefpodoxime	10µg	23-28	19-25	-	-
Cefprozil	30µg	21-27	27-33	-	-
Ceftazidime	30µg	25-32	16-20	22-29	-
Ceftibuten	30µg	27-35	-	-	-
Ceftizoxime	30µg	30-36	27-35	12-17	-
Ceftriaxone	30µg	29-35	22-28	17-23	-
Ceftroxime	30µg	20-26	27-35	-	-
Cephalothin	30µg	15-21	29-37	-	-
Chloramphenicol	30µg	21-27	19-26	-	-
Cinoxacin	100µg	26-32	-	-	-
Ciprofloxacin	5µg	30-40	22-30	25-33	-
Clarithromycin	15µg	-	26-32	-	-
Climafloxacin	5µg	31-40	28-37	27-35	-
Clindamycin	2µg	-	24-30	-	-
Daptomycin <sup>d</sup>	30µg	-	18-23	-	-
Doxithromycin	15µg	-	18-26	-	-
Doxycycline	30µg	18-24	23-29	-	-
Enoxacin	10µg	28-36	22-28	22-28	-
Ertapenem	10µg	29-36	24-31	13-21	-
Erythromycin	15µg	-	22-30	-	-
Fleroxacin	5µg	28-34	21-27	12-20	-
Fosfomycin <sup>e</sup>	200µg	22-30	25-33	-	-
Gatifloxacin	5µg	30-37	27-33	20-28	-
Gemifloxacin	5µg	29-36	27-33	19-25	-
Gentamicin <sup>a</sup>	10µg	19-26	19-27	16-21	-
Grepifloxacin	5µg	28-36	26-31	20-27	-

۴. پلیت‌ها و ویال‌هایی را که برات به آنها اضافه شده، برای میکروارگانسیم‌های معمول و بی‌هوازی اختیاری به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد و برای میکروارگانسیم‌های نیازمند به CO2 مانند هموفیلوس به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در شرایط ۱۰-۵ درصد CO2 و در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.

\* توجه: در صورت مشاهده عدم رشد پلیت‌ها از محتویات ویالی که انکوبه شده است، مجدداً کشت دهید.

**محدودیت:**

پاساژهای مکرر سویه‌های باکتریایی باعث ایجاد سویه‌های جهش یافته می‌شود که ممکن است در بعضی از آزمایش‌ها نتایج گمراه‌کننده‌ای ایجاد کند (مانند *Pa.aeruginosa* ATCC 27853 که بعد از پاساژهای مکرر به *Carbencillin* مقاوم می‌شود). برای جلوگیری از ایجاد چنین مشکلاتی نباید بیش از ۳ پاساژ انجام شود بنابراین از نمونه رشد یافته اولیه ذخیره مناسب جهت نگهداری در فریزر تهیه کرده و به مقدار زیاد ذخیره کنید تا بتوان به طور دوره‌ای و از نمونه ذخیره در فریزر استفاده نمود. جهت اطلاعات تکمیلی نحوه نگهداری باکتری‌ها می‌توان به منابع ۱ و ۵ مراجعه کرد.

**جدول ۱ - فهرست باکتری‌های لیوفیلیزه شده شرکت بهار افشان**

Order No.	Product	ATCC	NCTC
Ec 922	<i>Escherichia coli</i>	25922	12241
Sa 923	<i>Staphylococcus aureuse</i>	25923	
Pa 853	<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	27853	
Ef 212	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	12697
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	9006	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>		
	<i>Staph. Epidermidis</i>	12228	
	<i>Strep. Group A</i>	19615	
	<i>Sal. Typhimorium</i>	14028	
	<i>Sh. Flexneri</i>	12022	

۴. آموزش و برنامه‌های اعتباربخشی. فهرست باکتری‌های لیوفیلیزه شده پژوهشی و تولیدی بهار افشان در جدول ۱ مشخص شده است:

**احتیاط‌ها:**

- ۱. در صورت آلوده شدن سطوح و وسایل به سوسپانسیون میکروبی، از محلول‌های ضدعفونی‌کننده مانند الکل ۹۰-۷۰ درصد، فنل ۲-۱ درصد، ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی یا هیپوکلریت سدیم (سفیدکننده خانگی که به نسبت ۱/۱۰ با آب رقیق شده) استفاده کنید.
- ۲. ویال‌های استفاده شده را در ظروف مناسب قرار داده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو نمایید.

**نگهداری:**

ویال‌های حاوی باکتری لیوفیلیزه را دور از نور و رطوبت و در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری نمایید. رطوبت و دمای بالاتر از ۸ درجه سانتیگراد می‌تواند باعث کاهش یا از بین رفتن قدرت رشد میکروارگانسیم‌ها شود.

**روش استفاده:**

- ۱. پولک فلزی ویال را برداشته، درپوش لاستیکی آن را با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی کرده و اجازه دهید تا الکل کاملاً خشک شود.
- ۲. تحت شرایط استریل 2ml از محیط مایع *Brain Heart Infusion* یا *Broth* (BHIB) یا *Trypticase Soy Broth* (TSB) را به وسیله سرنگ به ویال اضافه کرده و به آرامی ویال را تکان دهید تا محتویات آن حل شود. \* هشدار: به علت اختلاف فشار درون ویال هنگام تزریق محیط مایع و خارج کردن سرنگ احتیاط کنید.
- ۳. به وسیله سرنگ ۲-۱ قطره از سوسپانسیون فوق را روی محیط مغذی *Blood Agar* یا *Chocolate Agar* برای باکتری‌های گرم منفی همچون *Mac Conkey* تلقیح کنید و با لوپ کشت دهید. تا کلتی‌های ایزوله داشته باشید.