

ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ

Yrd.Doç.Dr. Nuri ÖZKÜTÜK

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
Manisa

M.tuberculosis complex'in (MTBC) anti tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak amacıyla çok sayıda duyarlılık test yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında proporsiyon yöntemini temel alan, kültüre dayalı klasik testler en yaygın kullanılan testlerdir. Proporsiyon yönteminde katı besiyeri olarak sıklıkla yumurta bazlı besiyerlerinden Löwenstein-Jensen (LJ), agar bazlı besiyerlerinden Middlebrook (MD) 7H10 kullanılmaktadır. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinin antimikobakteriyal duyarlılık test yöntemlerinden BACTEC 460TB ve BACTEC-MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. MD7H10'un kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi, BACTEC 460TB ve BACTEC-MGIT 960 yöntemleri NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory) tarafından önerilen yöntemlerdir. LJ'nin kullanıldığı proporsiyon yöntemi ise ekonomik olması nedeniyle DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü'nün) tarafından önerilmektedir.

I. MIDDLEBROOK 7H10 BESİYERİNDE PROPORSİYON YÖNTEMİ (AGAR PROPORSİYON YÖNTEMİ)

Prensip: Proporsiyon yöntemi belli bir ilaç konsantrasyonunda (Kritik Konsantrasyon) dirençli olan organizmaların oranının belirlenmesini sağlar. Test edilecek bakteri suşu ilaçlı ve ilaçsız katı besiyerlerine inkübe edilir. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popölasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu oran %1'e (Kritik Proporsiyon) eşit veya daha yüksek ise test edilen suş o ilaca karşı dirençli olarak rapor edilir. NCCLS, katı besiyeri olarak MD7H10 besiyerinin kullanıldığı proporsiyon test yöntemini (Agar Proporsiyon Yöntemi) referans yöntem olarak kabul etmektedir.

Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması:

Antibiyotikler ticari toz şeklinde üretici firmadan alınmalı, klinik preparatları kullanılmamalıdır. Antibiyotikler üretici önerilerine göre veya olası ise vakumlu bir desikatör içinde –20 oC’de saklanmalıdır.

- Antibiyotiklerin steril distile su ile veya uygun çözücüler ile (SM, İNH ve EMB için su, RİF için metanol veya dimetilsülfoksit) 10 000µg/ml’lik (en az 1000 µg/ml olmalı) stok solüsyonları hazırlanır (yaklaşık olarak 100mg ilaç +10ml su).
- Stok solüsyonlar hazırlanırken gerekli miktar antibiyotik üzerinde belirtilen potense (% veya µg/mg) göre şu formüle göre hesaplanmalıdır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{İstenilen konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

veya gerekli olan miktar hesaplanıp, potense bölünerek kullanılması gereken miktar bulunur. Ör: 100mg Streptomisin tartarak bir ilaç çözeltisi hazırlamak istediğimizde, ilacın potensi %80 (0.800µg/mg) ise 100/0.800=125mg tartmak gerekir. Stok solüsyonlar yaklaşık 100 mg’lık antibiyotik miktarı ile hazırlanmalıdır. Çünkü daha küçük miktarlarda doğru tartım güç olabilir, daha büyük miktarlar ise ekonomik olmaz.

- Stok solüsyonu 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzüp steril ettikten sonra, polipropilen tüplerde daha sonraki kullanımlara uygun küçük miktarlara bölünerek –20 oC’nin altında (tercihen –70 oC) 1 yıl kadar saklanabilir. Stok solüsyon kullanılacağı zaman oda ısısına getirilip, bekletilmeden kullanılır ve kalanı atılır.
- Antibiyotikler besiyerlerine eklenmeden önce stok konsantrasyonlardan çalışma konsantrasyonları hazırlanır ve besiyerlerine uygun miktarlarda eklenir.

- Örnek: 1. 100mg EMB + 10ml steril distile su = 10 000 µg/ml (stok solüsyon)
2. vortex
3. Sterilizasyon (filtre ile)
4. 1 ml stok solüsyon + 9 ml steril distile su = 1 000 µg/ml (çalışma solüsyonu)
5. vortex
6. 1 ml çalışma solüsyonu + 200 ml besiyeri = 5.0 µg/ml (final konsantrasyon)

İlaçların önerilen çözücüler, stok konsantrasyonları, çalışma konsantrasyonları besiyerine eklenecek miktarlar ve besiyerlerindeki final konsantrasyonları Tablo 1’de yer almaktadır.

İlaçlı ve İlaçsız Agar Besiyerinin Hazırlanması:

- Besiyerleri genellikle her biri 200ml'lik olacak şekilde 8 balon içinde hazırlanır. Her bir 200ml'lik 7H10 agar besiyerinin hazırlanması için; bir cam balon içinde, 180 ml distile su içine 3.8gr dehidrate 7H10 agar besiyeri ve 1 ml gliserol eklenerek eritilir (üretici firmanın önerdiği şekilde).
- Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilir.
- Daha sonra 50-56°C'lik su banyosunda soğumaya bırakılır.
- Besiyeri sıcaklığı 50-56°C'ye indiğinde içine 20 ml zenginleştirici olarak OADC (oleik asit, albumin, dekstroz ve katalaz karışımı) eklenir.

(Bu aşamaya kadar olan basamaklar 8 ayrı balon yerine tek bir 2lt'lik cam balonda gerçekleştirilip, daha sonra steril şartlarda 8 ayrı cam balona bölünebilir.).

- 8 ayrı balondaki besiyerinden 6'sına her birine farklı bir ilaç veya farklı bir ilaç konsantrasyonu olacak şekilde, önceden hazırlanan SM, INH, RIF ve EMB solüsyonları tablo 1'de belirtilen miktarlarda eklenir. Diğer 2 besiyeri kontrol için ilaçsız besiyeri olarak kullanılır.
- Hazırlanan ilaçlı ve ilaçsız besiyerleri, önceden yazılmış-etiketlenmiş, 80 adet (40'arlık 2 set), dört bölmeli steril, plastik petri plaklarına, her bölmesine 5 ml (3-4mm kalınlığında) olacak şekilde, tablo 2'de belirtilen düzende dökülür. Besiyerleri dökülürken, balonlar tek tek su banyosundan alınıp iyice karıştırılmalı, agar katılaşmadan hemen plaklara paylaştırılmalı ve baloncuklar oluşmamasına dikkat edilmelidir.
- Direkt ışıktan korunarak oda ısısında katılaştıran besiyerleri, kullanımdan veya saklamadan önce yüzeyleri iyice kuruyuncaya kadar birkaç saat steril kabin içinde kapakları hafif aralık bırakılmalıdır.
- Daha sonra kurumaya engel olmak için deliksiz plastik torbalara konularak ve ışıktan korunarak 4-80C'de 1 ay saklanabilir.
- Dökülen her parti besiyerinden birkaç tanesi (ideali %10) kontaminasyon kontrolü için 350C'de 48 saat inkübe edilmelidir.

İnokulum Hazırlanması:

İndirekt yöntem:

Agar proporsiyon yönteminde standart bir inokulumun hazırlanması önemli olduğundan indirekt yöntem tercih edilir. İnokulum kaynağı olarak genelde katı besiyerinde üremiş 4-5 haftalıktan daha eski olmayan koloniler kullanılır. Primer

izolasyon kültürleri subkültüre tercih edilir.

- Katı besiyerinde üremiş koloniler, tüm üremeyi temsil edecek şekilde bol miktarda ve besiyerinden almamaya da dikkat edilerek, bir öze veya spatula yardımı ile kazınarak alınır. İçinde 6-10 adet cam boncuk bulunan 3-5ml tween-albuminli sıvı besiyerinde (ör; %0.05 tween80 içeren Middlebrook 7H9) emulsifiye edilir.
- 1-2 dakika süreyle vortekslenir.
- Büyük partiküllerin çökmesi ve oluşan aerosollerin azalması için 20-30 dk süreyle tüp bekletilir.
- Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alınır.
- Sıvı besiyeri ekleyerek süspansiyonun bulanıklığı McFarland no 1'e ayarlanır (yaklaşık 107 CFU/ml).
- Daha sonra steril distile suyla (veya serum fizyolojik) bu süspansiyonun 10-2 (1/100) ve 10-4 (1/10.000) dilüsyonları hazırlanır.
örnek: 0.1 ml ana süspansiyon (McFar. 1) + 9.9. ml steril distile su = 10-2;
0.1 ml 10-2 süspansiyon + 9.9. ml steril distile su = 10-4
- Katı besiyerinde yeterli üreme yoksa; alternatif bir yol olarak, alınan koloniler sıvı besiyerinde emulsifiye edildikten sonra inkübe edilerek bulanıklığın McFarland no 1'e ulaşması beklenilir ve buradan dilüsyonlar hazırlanır. İndirekt yöntemde inokulum kaynağı olarak katı besiyeri yerine sıvı primer izolasyon besiyeri kullanılacaksa yine aynı şekilde dilüsyonlar hazırlanır.

Direkt yöntem:

Homojenize - dekontamine ve konsantre edilen hasta örneğinden hazırlanan yayma preparatta yaklaşık 20 mikroskop sahası incelendikten sonra görülen aside dirençli basil sayısına göre, örneğin steril distile su ile dilüsyonları hazırlanır (tablo 3). Daha sonra ki inokulasyon, inkübasyon ve değerlendirme aşamaları indirekt testtekine benzer. Hasta tedavi alan ve tedavi başarısızlığı söz konusu olan bir hasta ise, yayma sonuçlarını dikkate almaksızın mutlaka dilue edilmemiş hasta örneği de test edilir. Çünkü mikroskopide görülen basillerin tamamı kültürde üremeyecektir.

İnokulasyon ve İnkübasyon:

- Antibiyotik duyarlılığı test edilecek her bir mikroorganizma için; iki set test besiyeri (I ve II nolu plakların her birinden 2'şer) oda ısısına getirilir. Plak yüzeylerinin kuru olmasına dikkat edilir.
- Petri plakları hasta kültür numarası ve dilüsyon oranlarını gösterecek şekilde (setlerden birini 10-2 diğerini 10-4) işaretlenir.
- Önce I nolu setin her bir bölmesine önceden hazırlanmış olan 10-2 basil dilüsyonundan steril bir pipet kullanarak 0.1'er ml inokule edilir (veya pastör pipeti kullanılarak her bölmeye 3'er damla damlatılır).
- Sonra II nolu set için aynı işlem 10-4 dilüsyon ile tekrarlanır.
- İnokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek amacıyla dilue edilmemiş süspansiyondan 1-2 damla bir adet kanlı agar besiyerine de ekim yapılır.
- İnokulumun besiyerlerine absorbe olması için İnokule edilen plakları agarlı tarafı aşağıda olmak üzere oda ısısında yaklaşık 1 saat süreyle bekletilir (kapaklar hafif aralı şekilde steril kabin içinde bekletmek damlaların kurumasını kolaylaştırabilir). Bu işlem esnasında, formaldehit oluşumunu önlemek için, plakları ışıktan korunmalıdır.
- Her bir petri plağı ayrı bir CO2 geçirgen polietilen torbaya yerleştirilir ve 36oC'de % 5-10 CO2'li ortamda inkübasyona bırakılır.

Plakların Okunması ve Yorumlama:

- İnkübasyonun ilk 7 günü kontaminant bakteri varlığı yönünden kanlı agar incelenir. Kontaminasyon saptanırsa, test tekrar edilir.
- Test besiyerlerinde ise antibiyotiksiz kontrol bölmeleri üç hafta boyunca her hafta incelenir. Üçüncü hafta sonunda üreme yetersizse, test tekrar edilmelidir.
- Üç haftadan önce kontrol bölmesinde 50 koloni üzerinde üreme (+1 veya daha fazla) görülürse test değerlendirilebilir ve dirençli sonuçlar rapor edilebilir. Fakat duyarlı sonuçları rapor etmek için üç hafta beklemek gerekir. Üçüncü haftadan sonra plaklar değerlendirilmemelidir. Dördüncü haftadan sonra beliren koloniler direnci göstermeyebilir.
- İnkübasyon sonunda tüm kadrantlardaki kolonileri sayılır ve tablo 4'e göre kantite edilir ve bir kayıt formuna kaydedilir. Mikroskopik inceleme ile görülebilen mikrokoloniler var ise, not edilir.

- Aşağıdaki formül ile direnç oranı hesaplanır.

$$\text{Direnç oranı (\%)} = \frac{\text{ilaçlı bölmedeki koloni sayısı}}{\text{kontrol bölgesindeki koloni sayısı}} \times 100$$
- Direnç oranı $\geq 1\%$ ise sonuç dirençli; $< 1\%$ ise duyarlı olarak yorumlanır.
- Kontrol kadranında sayılabilir düzeyde kolonisi olan ve 50'den fazla kolonisi olan dilüsyonun sonucunu yorumlanır ve karşılaştırma aynı dilüsyonlar arasında yapılmalıdır.
- Fakat 10–2 dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölgesinde sayılamayacak kadar koloni varsa (+3,+4) ve 10–4 dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölgesinde 50'den az koloni varsa, 10–4 dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölgesindeki koloni sayısı 100'le çarpılıp 10–2 dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölgesindeki koloni sayısı hesaplanabilir.
- Tüm kontrol bölmelerinde koloni sayımının 4+ olduğu dilüsyonlar dikkatle değerlendirilmelidir, bu durumda mikroorganizma tüm antibiyotiklere duyarlı ise, sonucu bildirilir, herhangi bir antibiyotiğe direnç söz konusu ise, yoğun bir inokulum kullanılmış olabilir, test tekrar edilir.

Kalite Kontrol:

Her yeni besiyeri ve her yeni antibiyotik solüsyonu hazırlandığında veya en azından haftada bir kez, tüm ilaçlara duyarlı olduğu bilinen M tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşu ve tüm ilaçlara dirençli olduğu bilinen bir laboratuvar suşu da test edilmelidir. H37Rv suşu test sonucunda tüm anti tüberküloz ilaçlara karşı duyarlı olmalıdır.

II. LÖWENSTEIN-JENSEN (LJ) BESİYERİNDE PROPORSİYON YÖNTEMİ

Prensip:

Proporsiyon yönteminin prensibini temel alan bu test NCCLS tarafından önerilmemekle birlikte, ekonomik olması nedeniyle DSÖ tarafından önerilen ve tüm dünyada halen yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması:

Antibiyotiklerin stok solüsyonlarının hazırlanması ve saklanması agar proporsiyon yönteminde anlatıldığı gibidir. Ancak antibiyotiklerin besiyerlerine eklenmeden

önce stok solüsyonlarından hazırlanan çalışma konsantrasyonları ve besiyerlerine eklenen miktarları farklıdır (tablo 5).

İlaçlı ve İlaçsız LJ Besiyerinin Hazırlanması:

Aşağıda 1600ml'lik Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinin hazırlanması örnek olarak verilmiştir. Besiyeri hazırlarken gerekli olan miktar hesap edilip ona göre hazırlık yapılmalıdır.

Tuz solusyonu:

Monopotasyum fosfat.....2400 mg

Magnezyum sulfat.....240 mg

Magnezyum sitrat.....600 mg

L- Asparajin.....3600 mg

Gliserin.....12 ml

Saf su.....600 ml

- Tuz solüsyonu bir balona konulup su banyosunda eritilir.
- 115° C'de 20 dk steril edilir.
- 25 adet temiz, taze iri boy yumurta alınır. Sabunlu su ile iyice fırçalanarak temizlenir. Yumurtalar geniş bir kap içinde varsa U.V. lamba altında 45 dk steril edilir (veya %70'likl etanolde 15 dk bırakılır). Sonra büyükçe, ağzı kapatılabilen, steril bir balona steril huni yardımı ile kırılarak konur. Homojen oluncaya kadar kuvvetlice çalkalanır.
- Daha önce hazırlanmış ve steril edilmiş tuz solüsyonuna önce %2'lik malaşit yeşili 20-25ml ilave edilir.

Daha sonra homojen edilmiş 1000 ml yumurta temiz steril bir tülbent veya gazlı bez ile tuz solüsyonu içine süzülür. Böylece ana LJ besiyeri elde edilmiş olur.

- Biri kritik konsantrasyon olmak üzere her bir ilaç için üç farklı konsantrasyonda ilaçlı besiyeri dökmek için (Ör: INH 0.1 + INH 0.2 + INH 1.0); üzerleri etiketlenmiş üç balon jojeye 500'er ml besiyeri paylaştırılır.
- Her birine tablo 5'de belirtilen miktarlarda ilacın çalışma konsantrasyonundan eklenir. Tüm ilaçlar için aynı işlem tekrarlanır.
- Ayrıca 1000ml'lik bir besiyeri ilaçsız kontrol besiyeri olarak bırakılır.
- Balonlar iyice çalkalanıp homojen olması sağlandıktan sonra üzeri etiketlenmiş, steril, vida kapaklı tüplere (16X160mm), her birine 5-7 ml olacak şekilde, aseptik şartlarda dağıtılır.

- Tüpler koagülatörde 78-80° C'de 1 saat (veya 85° C'de 45 dk) koagüle edilir.
- 18-24 saat 37° C'de sterilité kontrolü yapıldıktan sonra 2-8° C bir ay saklanabilir.

Not: Proporsiyon yönteminde dirence karar verirken kritik konsantrasyondaki üreme esas alınır. Diğer konsantrasyonlar direncin derecesini belirlemede kullanılır. İş yoğunluğunu yüksek olduğu durumlarda testi daha pratik hale getirmek için sadece kritik konsantrasyonlar test edilebilir (INH'ın yüksek konsantrasyonu da önerilmektedir). Tablo 5'de LJ besiyeri ile proporsiyon yönteminde kritik konsantrasyonlar ve önerilen diğer konsantrasyonlar görülmektedir.

İnokulum Hazırlanması:

İnokulum hazırlanması agar proporsiyon yönteminde anlatıldığı gibidir. Fakat indirekt yöntemde basil süspansiyonunun 10-3 ve 10-5 dilüsyonları önerilmektedir. Bu dilüsyonları hazırlamak için, Mc Farland no 1 bulanıklığındaki basil süspansiyonundan 1ml'si 9 ml steril distile suya eklenir, bu işlem seri dilüsyonlar şeklinde 5 kez tekrarlanır ve 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5 dilüsyonlar elde edilir. Her bir dilüsyondan sonra tüp vortekslenmelidir. Sonra 10-3 ve 10-5 dilüsyonları inokulasyon için kullanılır.

İnokulasyon ve İnkübasyon:

- 10-3 (1/1000) ve 10-5 (1/100000) dilüsyonlardan, 2'şer adet ilaçsız kontrol besiyerine ve 1'er adet ilaçlı besiyerlerine 0.2 ml ekilir. Ekimler steril, tüberkülin enjektörü, otomatik pipet veya pastör pipeti ile yapılabilir.
- Ekilen tüpler basillerin yüzeye yayılabilmesi için etüve yatık olarak konulur. İnokulumun buharlaşabilmesi için kapaklar hafifçe gevşek bırakılır.
- 24-48 saat sonra kapaklar sıkıca kapatılıp, 36 ± 1° C'de inkübasyona bırakılır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Değerlendirme agar proporsiyon yönteminde anlatılana benzer şekildedir. Basil dilüsyonunda amaç sayılabilecek koloni elde etme esasına dayanır. İndirekt testlerde bu dilüsyon 10-5 olabileceği gibi 10-3 de olabilir. Değerlendirmede değişik tüplerdeki koloniler sayılır, bu sayımlara göre dirençli basil oranı saptanır. Çıkan sonuçların her biri o ilaç için saptanmış olan kritik proporsiyon ile karşılaştırıp o ilaca karşı duyarlı yada dirençli olduğuna karar verilir. LJ ile proporsiyon yönteminde farklı olarak bazı primer ve sekonder ilaçlarda kritik proporsiyon %1'değil %10 olarak belirlenmiştir (tablo 6).

DSÖ' sonuçların 28. ve 40. günlerde okunmasını önermiştir. DSÖ'nün bu rehberinde 28. günde dirençli koloni oranı KP'dan yüksek ise dirençli olarak rapor edilebileceğini; yine 28. günde kontrol besiyerinde yeterli üreme olmasına rağmen, en yoğun dilüsyon (10-3) inokule edilmiş olan, ilacın en düşük konsantrasyonundaki besiyerinde üreyen koloni yok ise duyarlı olarak rapor edilebileceğini; bu iki durum dışındaki tüm sonuçların 40. günde değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir.

III. BACTEC 460 TB (radyometrik) ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ

Prensip: Mikobakteriler antibiyotik içeren ve içermeyen Bactec 12B (Middlebrook 7H12) şişelerine ekilir ve 37oC'de inkübe edilir. Kontrol şişesine ekilen mikroorganizma sayısı ilaç içeren şişeye göre 100 kat azdır. Şişeler günlük olarak Bactec 460 cihazında okunur. Antimikobakteriyel inhibisyon olmadığında, mikobakteriler ürer ve besiyerindeki 14C işaretli substratı kullanır. Böylelikle 14CO₂ oluşur ve Bactec 460 cihazında Growth Index (GI) terimiyle kantitatif olarak ölçülür. Duyarlılık sonuçları, kontrol ve ilaç içeren şişelerin günlük GI değeri artışlarının karşılaştırılmasıyla yorumlanır. Antitüberküloz ilaç içeren besiyerinde; duyarlı mikobakterilerin üremesi inhibe olur ve bu GI okumalarıyla kaydedilen günlük 14CO₂ üretiminde artmama veya azalmayla sonuçlanır. Mikobakteriler test edilen ilaca dirençliyse, üremenin inhibisyonu söz konusu olmayacak ve GI günlük olarak artacaktır. Günlük GI değerindeki artış, test kültürünün dirençlilik derecesiyle orantılıdır.

Tüberküloz basillerinin duyarlılık testi direk veya indirek yöntemle yapılabilir. Direkt testte, yayma pozitif işlenmiş hasta örneği direkt olarak antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine ekilir. İndirek testte ise, primer izolasyon besiyerinde üreyen mikroorganizmanın saf kültürü test edilir.

İNDİREKT DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

Antibiyotikler (streptomisin, izoniazid, rifampin ve ethambutol) Bactec SIRE kiti olarak, liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanmaktadır. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlanılır.

- Her liyofilize antibiyotik şişesinin kapağını alkollü pamukla silin.
- Her liyofilize antibiyotik şişesine 5 ml steril distile deiyonize su ekleyin ve tamamen çözünene kadar karıştırın.
- Antimikrobiyal ajanların dilüsyon şeması ve Bactec 12B besiyerindeki son konsantrasyonları tablo 7’de görülmektedir.
- Stok solüsyonlar ufak miktarlar halinde 2- 8oC’de 3 gün, -5 ila -20 oC arasında 3 aya kadar, -70 oC’de 6 aya kadar saklanabilir.

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz 12B şişelerinin hazırlanması:

- Her bir antibiyotik duyarlılık testi için beş adet Bactec12B şişesi ve bir adet Bactec dilüsyon sıvısı (DF) şişesi hazırlayın.
- Tüm şişelerin üzerine hasta kültür numarasını yazın.
- Beş adet 12B şişesinin birine kontrol, dördüne ise çalışılacak dört antibiyotiğin ismini yazın (S,I,R,E ve K)
- SM ve EMB’nin daha önce hazırlanmış olan stok solüsyonlarının 1ml’si aseptik şartlarda 2ml steril distile su içine ilave edilerek 1/3 dilüe edin.
- Her birinin üzerinde antibiyotiğin ismi yazan dört ayrı Bactec 12B şişesine, INH ve RİF için direkt stok solüsyondan, SM ve EMB için dilüe edilmiş stok solüsyondan 0.1ml.yi, tek kullanımlık tüberkülin enjektörüyle ekleyin. Her ilaç için ayrı bir enjektör kullanın.
- Kontrol şişesine herhangi bir antibiyotik eklemeyin.
- Hiçbir zaman 12B şişesine 0.1ml’den fazla miktarda antibiyotik solüsyonu eklemeyin. Daha yüksek konsantrasyonlarda çalışmak isterseniz antibiyotik stok solüsyonunu daha yüksek konsantrasyonda hazırlayabilirsiniz. Böylece 12B’ye ilave edeceğiniz miktar yine 0.1ml olarak kalmalıdır.
- Antibiyotik eklenen 12B şişesi 2-8oC’de saklanarak 7 gün içinde kullanılabilir.

İnokulum hazırlanması:

İndirek duyarlılık test yönteminde, laboratuvarın kapasitesi ve çalışma şekline göre günlük (haftanın 7 günü) veya hafta içi (hafta sonu dahil olmayan) iki ayrı program vardır. Bu iki programda inokulasyon yoğunluğu, inkübasyon süresi ve şişelerin okutulmasında farklılıklar vardır.

İndirekt duyarlılık test yönteminde inokulum hazırlarken örnek olarak Bactec 12B besiyeri, diğer bir sıvı besiyerleri (MiddleBrook7H9 gibi) veya bir katı besiyerlerinde (LJ, M7H10 veya M7H11) üremiş saf kültürler kullanılabilir.

Pozitif Bactec 12B şişesinden inokulum hazırlanması;

- Eğer primer izolasyon şişesi kullanılacaksa, GI değeri 10'un üzerine çıktığında şişeleri günlük olarak test ederek, GI değerinin >500 olmasını bekleyin ve bunu inokulum olarak kullanın veya GI >300 olunca bir gün daha inkübe edin ve inokulum olarak kullanın.
- Eğer 12B şişesine subkültür yapıldıysa, aynı şekilde GI değeri >500 olana kadar şişeleri günlük olarak okutun.
- GI değeri >800 ise, 1ml pozitif kültürü 1ml DF içine ekleyerek dilue edin ve bunu inokulum olarak kullanın.
- Eğer hafta sonu dahil olmayan program uygulanıyorsa, GI değeri 500'ü geçen şişeyi buzdolabında cumaya kadar saklayın (1 hafta içinde kullanın).

MiddleBrook 7H9 besiyerindeki üremeden inokulum hazırlanması;

Besiyerinin bulanıklığını DF ile hafta sonu dahil olmayan program için McFarland 0.5'e, günlük program için McFarland 1.0'e ayarlayın, inokulum olarak kullanın. (kültür 1-4 haftalık olmalıdır)

Katı besiyerindeki üremeden inokulum hazırlanması;

Üreme saptandıktan sonra 4 haftadan uzun süre geçmemiş kültürler kullanılmalıdır.

- Katı besiyerinde üremiş koloniler sert bir öze yardımıyla kazınarak alınır ve içinde 6-8 adet cam boncuk bulunan 3 ml DF'de emulsifiye edilir.
- 1-2 dakika süreyle vortekslenir.
- Büyük partiküllerin çökmesi için 30 dk süreyle tüp bekletilir.
- Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alınır.
- Bu süspansiyonun üzerine DF ekleyerek bulanıklığını, hafta sonu dahil olmayan program için McFarland 0.5'e, günlük program için McFarland 1.0'e ayarlayın.

İnokulasyon ve inkübasyon;

- Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılacak tüm 12B şişelerini Bactec 460 cihazında test ederek şişelerin içinde % 5'lik CO2 ortamı sağlayın.
- Dört adet antibiyotikli, bir adet antibiyotiksiz kontrol besiyerini ve bir adet Bactec DF şişesini sıralayın.
- Şişelerin lastik kapaklarını alkollü pamukla silerek dezenfekte edin.
- İnokulum süspansiyonunu iyice karıştırın ve bir tüberkülin enjektörü ile ilaç içeren dört adet 12B şişesine 0.1 ml inokule edin.

- 5 Ayrıca yine 0.1 ml bu süspansiyondan 9.9 ml BACTEC DF şişesine ekleyin ve karıştırın. Böylece standardize edilmiş inokulum süspansiyonunu DF ile 1/100 oranında dilue edin.
- DF ile 1/100 oranında dilue edilmiş süspansiyondan 0.1 ml'yi kontrol şişesine inokule edin.
- Birkaç damla inokulum süspansiyonunu, bir adet kanlı agar ve bir adet M7H10 veya M7H11 agar plağına subkültüre edin.
- Her şişenin lastik kapağını dezenfektan emdirilmiş pamukla ve peşinden alkollü pamukla silin
- Şişeleri 37±1oC'de karanlıkta inkübe edin.

Sonuçların okunması:

Sonuçları okumadan önce kanlı agar ve M7H10 veya M7H11 plaklarını kontaminasyon yönünden inceleyin. Kontaminasyon saptanmaz ise günlük ya da haftasonu dahil olmayan programa göre sonuçları okuyup, sonuçları kayıt formuna işleyin.

Günlük programda;

- Şişeleri hafta sonu ve tatiller dahil olmak üzere günlük olarak okutun.
- Her gün yaklaşık olarak aynı saatte (±2 saat) okutun.
- En az 4 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri >30 ise sonuçlar yorumlanabilir.
- Kontrol şişesinin GI değeri bir iki gün içinde >30 olursa, muhtemelen inokulum çok yoğundur. Testi tekrar edin.
- Kontrol şişesinin GI değeri 3. okutmada >30 olursa, sonuçları yorumlamadan önce bir gün daha inkübe edin.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa, testi tekrar edin.

Hafta sonu dahil olmayan programda;

- Testi Cuma günü yapın.
- Pazartesi'den itibaren günlük ve yaklaşık olarak her gün aynı saatte (±2 saat) okutun
- En az 3 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri Pazartesi günü >30 olursa, muhtemelen inokulum çok yoğundur. Testi tekrar edin.

- Salı günü kontrol şişesinin GI değeri >30 olursa, çarşamba günü de okuttuktan sonra, sonuçları yorumlayın. Pazartesi gününe ait GI değerini dikkate almayın.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa, testi tekrar edin.

Yorumlama:

- Kontrol ve ilaç içeren şişelerin, bir gün önceyle karşılaştırarak, günlük GI farklılıklarını (ΔGI) hesap edin.
- Sonuçları aşağıdaki gibi yorumlayın;
 - kontrol şişesinin $\Delta GI >$ ilaçlı şişenin ΔGI = duyarlı
 - kontrol şişesinin $\Delta GI <$ ilaçlı şişenin ΔGI = dirençli
 - kontrol şişesinin $\Delta GI \approx$ ilaçlı şişenin ΔGI = sınırdan veya kısmi dirençli
- İlaç içeren şişenin GI değeri 500'ü geçer ve bir sonraki gün de 500'ün üzerinde kalırsa, ΔGI 'e bakmaksızın, sonucu dirençli olarak yorumlayın (kontrol şişesinden inokulumun yoğun olmadığını kontrol ederek inokulumun yoğun olmadığından veya bir kontaminasyon olmadığından emin olun).
- Sınırdan sonuçlar söz konusuysa, şişeleri ek olarak 2-3 gün daha okutun. Bu ek okumalar duyarlı veya dirençli yönünde bir trendin yakalanmasına neden olacaktır.

Kalite kontrol;

Her antibiyotik duyarlılık test gününde M tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşunu da test edin. Bu suş test sonucunda tüm primer ve sekonder antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlı olmalıdır. M tuberculosis H37Rv içeren kontrol şişesi 3- 5 gün içinde 30'dan büyük bir GI değerine ulaşmalıdır. Kalite kontrol suşunun sonuçları uygun değilse, aşağıdaki parametreleri gözden geçirin. Kontrol şişesinin GI 30 değerine ulaşmasında gecikme varsa;

- Inkübasyon ısısının $37 \pm 1^\circ C$ olduğundan,
- Suşun canlılığından,
- İnokulum dilüsyonunun doğru yapıldığından emin olun.

M tuberculosis H37Rv her hangi bir ilaca dirençli bulunursa;

- Tam dirençliyse, besiyerinde antibiyotik olmayabilir veya kontamine olmuş olabilir.
- Kısmi dirençliyse, antibiyotik aktivitesini kaybetmiş olabilir veya inokulum çok yoğun olabilir.

DİREKT DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ :

ARB yayma pozitif tüm hasta örneklerine uygulanabilir. Hasta örneğindeki basil sayısına bağlı olarak 4-21 gün içinde sonuç verir. Primer izolasyon besiyeriyle aynı gün ekim yapılır. Tüm direkt test sonuçları indirekt testle doğrulanmalıdır.

- Sadece izoniazid, rifampin, streptomisin ve ethambutolü test edin.
- İnokulasyon öncesi kontrol ve antibiyotik içeren şişelere 0.1ml Bactec PANTA (Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim ve Azlosilin) antibiyotik karışımı ekleyin.
- Homojenize, dekontamine ve konsantre edilmiş, ARB'si pozitif, iyice karıştırılmış primer hasta örneğinin 0.1ml.sini antibiyotik içeren dört adet 12B şişesine direkt olarak inokule edin.
- Ayrıca hasta örneğini DF sıvısıyla 1:10 dilue edip iyice karıştırdıktan sonra, 0.1ml kontrol şişesine inokule edin.
- Her 2-3 günde bir okutarak, $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de üç haftaya kadar inkübe edin (yayma pozitifliği yüksek düzeyde olan örnekleri her gün okutun).
- Kontrol şişesinin GI değeri > 10 olduğunda, şişeleri her gün okutun
- Kontrol şişesinin GI değeri > 20 olduğunda, sonuçları yorumlayın.
- Kontrol şişesinin GI değeri 21 günlük inkübasyonla >20 olmaz ise, testi yorumlamayın.
- İndirekt testte belirtilen kriterlere göre sonucu yorumlayın ve rapor edin. Rapora "sonuçlar, direk hasta örneğinin test edilmesiyle elde edilmiştir" şeklinde bir not koyun.
- İzolatın tüberküloz basili olduğu doğrulanmadan, duyarlılık test sonuçlarını rapor etmeyin.
- Kalite kontrol için, indirekt testte belirtilenler direkt testte de geçerlidir.

BACTEC 460 PZA (PİRAZİNAMİD) DUYARLILIK TESTİ

Pirazinamid (PZA), tüberküloz basillerine karşı sadece düşük pH'da aktif olan bir antimikrobiyal ajandır. Bactec PZA yönteminde, test pH 6.0'da yapılır.

PZA solüsyonunun hazırlanması:

- Bactec Liyofilize PZA, 5 ml Bactec Reconstituting Fluid (RF) ile sulandırılır (4.000 µg/ml).
- PZA stok solüsyonu ufak miktarlara bölünüp, SİRE stok solüsyonları gibi saklanabilir.

PZA içeren besiyerinin ve kontrol besiyerinin hazırlanması:

- Bactec PZA duyarlılık test besiyerine, RF ile sulandırılmış olan PZA solüsyonundan tüberkülin enjektörü ile 0.1 ml, eklenir (pH 6.0) (final PZA konsantrasyonu 100 µg/ml).
- Kontrol besiyerine Bactec RF sıvısından 0.1 ml eklenir. (RF üremeyi kolaylaştırıcı bir madde olan POES (polyoxyethylene stearate) içerir, bu nedenle inokule edilecek tüm şişelerde bu RF bulunmalıdır.

İnokulum hazırlanması:

- Aşağıda belirtilen besiyerlerinden herhangi birindeki üremeden 0.1 ml'yi, 0.1 ml Bactec RF eklenmiş Bactec 12B besiyerine subkültüre edin.
 - GI değeri 300-999 arası olan Bactec 12B besiyeri
 - Bulanıklığı McFarland 1.0 veya daha düşük olan M7H9 besiyeri
 - Katı besiyerinden hazırlanmış ve bulanıklığı McFarland 1.0'e yakın süspansiyon
 - Karanlıkta 37±1oC'de inkübe edin.
 - Subkültürü günlük olarak okutun.
 - GI 300 - 500 arasında ise, bunu inokulum olarak kullanın.
 - GI > 500 ise aşağıdaki gibi dilue edin.
 - a) GI 500 - 599 ise, 1.0 ml 12B besiyeri ekleyin.
 - b) GI 600 - 699 ise, 1.5 ml 12B besiyeri ekleyin.
 - c) GI 700 - 799 ise, 2.0 ml 12B besiyeri ekleyin.
 - d) GI 800 - 899 ise, 2.5 ml 12B besiyeri ekleyin.
 - e) GI 900 - 999 ise, 3.5 ml 12B besiyeri ekleyin.
- Pik GI değerine ulaştıktan sonra veya GI 999 okunduktan sonra 1 günden fazla geçen kültürleri inokulum olarak kullanmayın.

İnokulasyon ve inkübasyon:

- tüm şişelerin lastik kapağını %70'lik alkolle silin.
- İnokulum süspansiyonunu iyice karıştırın ve bir tüberkülin enjektörü ile PZA içeren şişeye ve kontrol şişesine 0.1 ml inokule edin. Kontrol şişesi için inokulumu dilüe etmeyin.
- Birkaç damla inokulum süspansiyonunu bir adet kanlı agar ve bir adet M7H10 veya M7H11 agara, inokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek için, inokule edin.

- 37±1oC’de karanlıkta inkübe edin.

Sonuçların okunması:

- Kanlı agar ve M7H10 veya M7H11 plaklarını kontaminasyon yönünden inceleyin.
- Şişeleri günlük olarak okutun.
- Her gün yaklaşık olarak aynı saatte (±2 saat) okutun.
- En az 4 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri ≥ 200 ise, sonuçlar yorumlanabilir.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 200’e ulaşmazsa, testi yorumlamayın.

Not: Haftasonu dahil olmayan program kullanılacaksa SİRE için kullanılan programa benzer şekilde test Cuma günü yapılır, pazartesi gününden itibaren okutulmaya başlanılır.

Yorumlama:

Sonuçları aşağıdaki gibi yorumlayın;

- PZA şişesinin GI < kontrol şişesinin GI’sinin % 10 = duyarlı
 - PZA şişesinin GI > kontrol şişesinin GI’sinin % 10 = dirençli
- Direnci gösteren sonuçlar 4 günden önce yorumlanabilir, fakat duyarlılığı gösteren sonuçlar 4 günden önce raporlanmamalıdır.

Kalite kontrol:

M. tuberculosis H37Rv suşunun üreme kontrolü 3-8 gün içinde GI > 30 değerine ulaşmalıdır ve PZA’ya tamamen duyarlı olmalıdır.

IV. BACTEC MGIT 960 SİSTEMİ İLE DUYARLILIK TESTİ**Prensip:**

BACTEC MGIT 960 SİRE kiti kültürde izole edilen M. tuberculosis’i test etmek için nonradyometrik bir duyarlılık testidir. BBL MGIT 7-ml mycobacteria growth indicator tube (MGIT tube) mikobakterilerin üremesini ve saptanmasını sağlayan modifiye Middlebrook 7H9 broth içerir. MGIT tüpün dibindeki silikon içine floresan madde gömülüdür. Floresan madde sıvı besiyerinde çözülmüş oksijen varlığına

duyarlıdır. Çözölmüş oksijenin başlangıçtaki konsantrasyonu floresan maddeden floresans yayılımını baskılar. Üreyen mikroorganizmalar oksijeni tüketir ve floresan maddenin floresans yaymasına neden olur.

BACTEC MGIT 960 SIRE kiti 4-13 günde sonlanan kalitatif bir testtir. Test M. tuberculosis izolatlarının ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki üremelerinin karşılaştırılması esasına dayanır. MGIT 960 cihazı tüplerdeki floresans artışını sürekli izler. Cihaz yardımıyla ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki floresans analizleri karşılaştırılarak duyarlılık sonuçları belirlenir. BACTEC MGIT 960 cihazı otomatik olarak bu sonuçları yorumlar ve duyarlı ya da dirençli olarak bildirir.

Antibiyotik solösyonlarının hazırlanması:

Antibiyotikler (streptomisin, izoniazid, rifampin ve ethambutol) Bactec MGIT SIRE kiti içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanmaktadır. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solösyonlar hazırlanılır.

- Her liyofilize antibiyotik şişesinin kapağını alkollü pamukla silin.
- Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su ekleyin ve tamamen çözünene kadar karıştırın.
- liyofilize antibiyotiklerin dilösyon şeması ve BBL MGIT 7ml besiyerindeki final konsantrasyonları tablo 8’de görölmektedir.
- Özellikle INH için olmak üzere, eğer bir ilacın kritik konsantrasyonunda direnç görölrse, ilacın daha yüksek bir konsantrasyonu için duyarlılık testi yapılması önerilmektedir. Bu amaçla BACTEC MGIT SM 4.0 ve INH 0.4 kitleri mevcuttur. Bu konsantrasyonlarda da duyarlılık testi yapılacaksa; bu iki kitteki liyofilize ilaçlar 2 ml steril distile su ile sulandırılmalıdır tablo 8. Diğer prosedür SIRE kiti ile benzerdir.

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması:

- Her test izolatu için 5 tane MGIT tüpünü alın ve üzerlerini yazın (birine GC (Kontrol), diğerlerine S, I, R ve E olarak). Tüpleri uygun büyüklükte AST (antibiyotik duyarlılık testi) set taşıyıcısına doğru sırayla yerleştirin (soldan ilk tüp GC, sonra SIRE).
- Her tüpe aseptik şartlarda 0.8ml BACTEC MGIT SIRE suplementi ekleyin. Kitin içinden çıkan supplementin kullanılması önemlidir.

- Dört SIRE tüpünün her birine, üzerine yazdığımız antibiyotik adına uygun şekilde, daha önce hazırladığımız antibiyotik solüsyonlarından bir mikropipet yardımı 100 µl pipetleyin (tablo 8).
- Kontrol (GC) tüpüne hiçbir antimikrobiyal ajan eklemeyin.

İnokulum hazırlanma:

MGIT yöntemi ile duyarlılık testleri M.tuberculosis'in saf kültürlerinden yapılır
Katı besiyerinden İnokulum hazırlanması;

- Cam boncuklu steril bir tüpe 4 ml Middlebrook 7H9 veya MGIT broth koyun.
- Steril bir öze ile olabildiğince çok koloniyi kazıyarak alın ve 7H9 içinde süspanse edin.
- Büyük kümeleri dağıtmak için süspansiyonu 2-3 dakika vorteksleyin. Süspansiyon bulanıklılığı 1.0 McFarland standardını geçmelidir.
- Süspansiyonu 20 dakika bekletin.
- Süpernatantı başka bir kapaklı steril tüpe aktarın, 15 dk. daha bekletin.
- Süpernatantı yine başka bir kapaklı steril tüpe aktar ve süspansiyonu 0.5 McFarland standardına göre ayarlayın.
- Ayarlanmış süspansiyonun 1 ml'sini 4 ml steril serum fizyolojikte dilüe edin (1/5 dilüsyon)

Pozitif MGIT tüpünden inokulum hazırlanması;

- Pozitif bir MGIT tüpü, MGIT 960 cihazında pozitif olduktan sonraki gün (1.gün) dahil 5. güne kadar kullanılabilir.
- Tüpün 5 günden daha fazla bir pozitifliği varsa, Growth supplement eklenmiş yeni bir MGIT tüpüne subkültürü yapılmalı ve pozitif oluncaya kadar cihazda test edilmeli, pozitifliği takip eden 1-5.günlerde kullanılmalıdır.
- Tüpler 1 -2 gündür pozitifse iyice karıştırılıp, inokulum olarak kullanılır.
- Tüpler 3-5 gündür pozitifse iyice karıştırılır, 1 ml'si 4 ml SF'de dilüe edilir ve bu 1/5 dilüe süspansiyon inokulum olarak kullanılır.

İnokülasyon:

- Dört adet ilaçlı MGIT tüpünün her birine (S,I,R,E) inokulum süspansiyonundan 0.5ml pipetleyin.
- 1/100'lük kontrol süspansiyonu hazırlamak için 9.9ml steril SF içine 0.1ml organizma süspansiyonu pipetleyin ve iyice karıştırın.

- 1/100'lük kontrol süspansiyonundan "GC" olarak etiketlenmiş MGIT tüpüne 0.5ml pipetleyin.
- Tüm tüpleri sıkıca kapatın. 3-4 kez hafifçe alt üst ederek karıştırın.
- MGIT 960 cihazına giriş kaydını yapın (BACTEC MGIT 960 cihazı kullanım kılavuzuna göre)
- İnokulum süspansiyonundan %5 koyun kanlı agara 0.1ml ekin, 35-37 oC'de inkübe edin.
- Bakteriyel kontaminasyon açısından kanlı agar plağını 48.h'te kontrol edin. Kanlı agar plağında üreme yoksa teste devam edin, üreme varsa AST (Antibiyotik Duyarlılık Testi) setini atın ve testi tekrar edin.

Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:

- İlaçlı tüpteki floresans kontrol tüpündekinden daha az olduğunda, MGIT 960 cihazı sonucu duyarlı olarak yorumlar.
- İlaçlı tüpteki floresans kontrol tüpündekine eşit olduğunda, cihaz sonucu dirençli olarak yorumlar.
- MGIT 960 cihazının yorumu esas alınarak sonuç "duyarlı" veya "dirençli" olarak rapor edilir.
- Test sonucunun etkilenebileceği bazı durumlar olduğunda, duyarlılık yorumu olmaksızın cihaz sonucu hata (X) olarak verir. Bu durumda sonuç rapor edilmez
- Raporda test yöntemi, ilaç ve konsantrasyonlar bulunmalıdır.

Uyarılar:

- BACTEC MGIT 960 duyarlılık testi test edilen izolatın duyarlılık derecesini yorumlamaz. Sonuçlar test edilen ilaç ve konsantrasyon için S (duyarlı) ya da R (dirençli) olarak rapor edilir.
- STR, INH, RIF, EMB için BACTEC MGIT 960 SIRE testinde kullanılan kritik konsantrasyonlar, yanlış duyarlı sonuçlardan kaçınmak için, proporsiyon yönteminde kullanılan konsantrasyonlardan biraz daha düşüktür. Önerildiği gibi daha yüksek konsantrasyonlarda da test etmek izolatın düşük düzey direncini saptama olasılığını artıracaktır.
- BACTEC MGIT 960 duyarlılık testi sadece BACTEC MGIT 960 cihazı ile uygulanabilir. AST seti manuel olarak okunamamaktadır. M. tuberculosis'in sadece saf kültürü kullanılmalıdır. Kontamine olan veya çok sayıda mikobakteri

türü içeren kültürler yanlış sonuçlar verebilir ve test edilmemelidir. Klinik örneklerden direkt test önerilmemektedir. Katı besiyerinden yapılan süspansiyonlar standardize edilmeden çöktürmek için bekletilmelidir. Katı besiyerinden hazırlanan inokulum görsel olarak 0.5 McFarland bulanıklılık standartına ayarlanmalıdır; bu yapılmadığında yanlış sonuçlar alınabilir veya cihaz hata verebilir.

- İlaçlı tüplere ve kontrol tüpüne inokule edilen organizma süspansiyonunun yukarıda önerilen dilüsyonları kullanılmadığında yanlış sonuçlar verebilir.
- İlaçların uygun volümde steril distile su ile sulandırılmaması yanlış sonuçlar verebilir.
- İnokule edilen tüplerin iyice karıştırılması önemlidir. Tüplerin yeterince karıştırılmaması yanlış dirençli sonuçlara yol açabilir.
- AST set rakına AST setinin doğru sıra ile konulmaması hatalı sonuçlar verebilir. İlaç tanımına uygun AST set rakının seçilmemesi geçersiz veya yanlış sonuçlarla sonuçlanabilir.
- AST setinin cihaz içine doğru şekilde yerleştirilmemesi bir isimsiz durum olarak sonuçlanacaktır, 8h içinde sorun çözülmelidir. Sorun 8h'de çözülmez ise, AST seti atılmalı ve tekrar edilmelidir.

AST setinde SIRE suplementi kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir. AST setine BACTEC MGIT 960 growth suplementi eklemeyin.

Kalite kontrol:

- MGIT 960 SIRE kit şişelerinin gelen her yeni parti veya lot numarasında , M. tuberculosis ATCC 27294 kalite kontrol (QC) suşları test edilmelidir. Ayrıca duyarlılık testi yapılacağı her hafta aynı kalite kontrol suşları çalışılmalıdır.
- Kalite kontrol stok suşları -70 C'de saklanır.
- Kalite kontrol testi, test edilecek ilaç kitleri için "duyarlılık test prosedürü" açıklamalarına uyularak uygulanmalıdır.
- 4-13 gün içinde kalite kontrol suşu GC tüpünde pozitif sonuç vermeli ve tüm antibiyotiklere duyarlı olmalıdır. Uygun sonuçlar alınmaz ise test tekrar edilir.

BACTEC MGIT 960 PZA (PİRAZİNAMİD) DUYARLILIK TESTİ

Prensip:

BACTEC MGIT 960 PZA kiti de SIRE kiti ile benzer prensiple çalışan, pirazinamid (PZA) duyarlılığını 4-21 günde test eden kalitatif bir testtir. PZA testi genel

yöntemlerin modifikasyonunu gerektirir, çünkü PZA in vitro sadece daha düşük pH değerlerinde aktiftir. MGIT 960 PZA besiyeri, pH'ı 5.9'a düşürülmüş modifiye Middlebrook 7H9 broth içerir.

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

BACTEC MGIT 960 PZA kiti içinden çıkan liyofilize PZA, daha önce anlatılan MGIT SIRE duyarlılık testindeki gibi sulandırılır. Tek fark sulandırım için 2.5ml distile su kullanılmasıdır (tablo 8).

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması:

- Her test izolatu için 2 tane BACTEC MGIT PZA tüpünün üzerini "GC" ve "PZA" olarak yazın. Tüpleri iki tüplük AST taşıyıcısına doğru sırayla yerleştirin (firma önerilerine göre).
- Her tüpe aseptik şartlarda 0.8ml BACTEC MGIT PZA supplementi ekle. Doğru supplementin kullanılması önemlidir.
- Bir mikropipet kullanarak, aseptik şartlarda, etiketine uygun MGIT tüpüne (PZA) 8.000µg/ml'lik MGIT PZA'dan 100µl pipetleyin.
- Kontrol tüpüne antimikrobiyal ajan eklemeyin.

İnokulum hazırlanması:

MGIT SIRE duyarlılık testinde anlatıldığı gibidir.

İnokülasyon:

İlaçlı tüplerin inokülasyonu MGIT SIRE duyarlılık testinde anlatıldığı gibidir. Fakat kontrol tüpü için 1/100'lük değil 1/10'luk kontrol süspansiyonu hazırlayın. 1/10'luk kontrol süspansiyonu hazırlamak için 4.5ml steril SF içine 0.5ml inokulum süspansiyonu pipetleyin, iyice karıştırın. "GC" olarak etiketlenmiş tüpe 1/10'lük kontrol süspansiyonundan 0.5ml pipetleyin.

Taşıyıcıda kontrol tüpünün pozisyonunun soldan ilk tüp olduğundan emin olun. AST setinin cihaza girişini yaparken, iki tüplük AST set tanımında ilaç olarak PZA'yı seçin.

Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:

SIRE yorumunun %1 proporsiyon düzeyinde yapıldığı gibi, PZA'da direnç %10 proporsiyon düzeyinde rapor edilir.

Sadece PZA'ya direnç (Monoresistance) nadirdir. Sadece PZA direnci bulunmuş ise, M. tuberculosis'in saflığını, identifikasyonunu ve diğer parametreleri kontrol ederek sonuçları doğrulayın.

Uyarılar:

- PZA duyarlılık testinde NCCLS, referans yöntem olarak BACTEC 460 TB yöntemini önermektedir. Nonradyometrik BACTEC MGIT 960 PZA kiti, BACTEC 460 TB yöntemini ile yaklaşık aynı sürede duyarlılık sonucu vermektedir. Benzer sonuçlar elde edebilmek için MGIT 960 PZA kitinde, BACTEC 460 TB'de olduğu gibi PZA'nın 100 g/ml konsantrasyonu kullanılmaktadır.
- Katı besiyerindeki üreme taze olmalıdır (14 günlük). Daha eski kültürlerden hazırlanan; 0.5 McFarland standardı kullanılmadan hazırlanan; uygun dilüsyonlarda hazırlanmayan inokulumlar yanlış sonuçlar verebilir.
- Kontrol tüpü inokulasyon için izolatin 1/10 dilüsyonunun kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir.
- PZA AST setinde MGIT 960 PZA suplementi kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir. PZA AST setine MGIT 960 SIRE suplementi veya BACTEC MGIT 960 growth supplement koymayın.

KAYNAKLAR

1. Hacek D: Modified proportion agar dilution test for slowly growing mycobacteria. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief). ASM, Washington, D.C. 1992: 5.13.1 - 5.13.15.
2. NCCLS. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standart. NCCLS document M24-A, Pennsylvania, 2003.
3. Kent PT, Kubika GP. Public Health Mycobacteriology A Guide for the level III Laboratory-Diivision of laboratory training and consultation laboratory program office. Public Health Service- Centers for Disease Control, Atlanta 1985: 159-182.
4. Gümüşlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz laboratuvar rehberi.1.Baskı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı. 1998.
5. WHO. Guidelines for drug susceptibility testing for second-line anti-tuberculosis drugs for DOTS-PLUS. WHO/CDS/TB/2001.288; World Health Organization, 2001.
6. Siddiqi SH. Radiometric (Bactec) tests for slowly growing mycobacteria. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief). American Society

for Microbiology / Washington, D.C. 1992: 5.14.1 - 5.14.25.

7. Siddiqi SH. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company Maryland,USA, 1996.

8. NCCLS: Antimycobacterial susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis; tentative standart. NCCLS document M24-T, vol 15, no 16, 1995.

9. Della-Latta P. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief), Second edition, ASM, Washington, D.C. 2004: 7.7.1 - 7.8.5.

Tablo 1. Middlebrook 7H10 Agar besiyerine eklenmek üzere hazırlanan ilk seçenек ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki final konsantrasyonları

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/ml)	7H10 agar için çalışma konsantrasyonu (µg/ml)	200ml 7H10 agara çalışma konsantrasyonundan eklenen miktar (ml)	7H10 agarda ilacın son konsantrasyonu (µg/ml)
INH	SDW	10.000	200	0.2	0.2 ^{KK}
				1.0	1.0
EMB	SDW	10.000	1.000	1.0	5.0 ^{KK}
RIF	DMSO (veya metanol)	10.000	1.000	0.2	1.0 ^{KK}
SM	SDW	10.000	1.000	0.4	2.0 ^{KK}
				2.0	10.0

SDW= Steril Distile Su; DMSO=Dimetil sülfoksit; KK=kritik konsantrasyon

Tablo 2. Middlebrook 7H10 Agar ile agar proporsiyon yönteminde ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerinin dört bölmeli petri plaklarına dökülme düzeni ve ilaçların konsantrasyonları.

Plak	Bölme	Antimikrobiyal ilaç
1	I	İlaçsız (kontrol)
	II	İzoniazid (0.2 _g/ml)
	III	Streptomisin (2 _g/ml)
	IV	Rifampisin (1 _g/ml)
2	I	İlaçsız (kontrol)
	II	İzoniazid (1.0 _g/ml)
	III	Streptomisin (10 _g/ml)
	IV	Ethambutol (5 _g/ml)

Tablo 3. Direkt test yönteminde inokulum dilüsyonu

EZN boyama (ARB/alan) (X1000 büyütme)	Florokrom boyama (ARB/alan) (X200-400 büyütme)	Dilüsyonlar
<1	<25	Dilüsyon Ø
1-2	25-50	Dilüsyon Ø, 10 ⁻¹
2-10	50-250	Dilüsyon Ø, 10 ⁻²
>10	>250	10 ⁻² , 10 ⁻³

(NCCLS document M24-A'ya göre)

Tablo 4. Agar plaklarındaki mikobakteri kolonilerinin üreme yönünden kantitasyonu

Koloni sayısı	Kantitasyon
0 - 50	gerçek koloni sayısı
50 - 100	1+
100 - 200	2+
200 - 500	3+
>500 (Aşırı üreme)	4+

Tablo 5. Proporsiyon yönteminde LJ besiyerine eklenmek üzere hazırlanan ilk seçenek ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki final konsantrasyonları

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/ml)	LJ için çalışma konsantrasyonu (µg/ml)	500ml LJ'ye eklenen miktar (ml)	LJ'de ilacın son konsantrasyonu (µg/ml)
INH	SDW	10.000	100	0.5	0.1
				1.0	0.2 ^{KK}
				5.0	1.0
EMB	SDW	10.000	1.000	0.5	1.0
				1.0	2.0 ^{KK}
				2.0	4.0
RIF	Metanol	10.000	10.000	0.5	10.0
				1.0	20.0
				2.0	40.0 ^{KK}
SM	SDW	10.000	1.000	1.0	2.0
				2.0	4.0 ^{KK}
				4.0	8.0

SDW= Steril Distile Su; KK=kritik konsantrasyon

Tablo 6. Proporsiyon yönteminde Middlebrook 7H10 agar için ve LJ için önerilen Kritik Konsantrasyon (KK) ve Kritik Proporsiyonlar (KP).

Antitüberküloz ilaç	7H10		LJ		Antitüberküloz ilaç	7H10		LJ	
	KK (µg/ml)	KP (%)	KK (µg/ml)	KP (%)		KK (µg/ml)	KP (%)	KK (µg/ml)	KP (%)
İzoniazid (INH)	0.2	1	0.2	1	Amikasin (AMK)	4.0	1		
Rifampin (RIF)	1.0	1	40	1	Kapreomisin(KAP)	10.0	1	40	1
Streptomisin (SM)	2.0	1	4.0	10	Kanamisin (KAN)	5.0	1	20	10
Ethambutol (EMB)	5.0	1	2.0	1	Etyonamid (ETH)	5.0	1	20	10
Pirazinamid (PZA)*	25-50	1	100.0	10	Klofazimin (CLF)	1.0	1		
					Sikloserin (CYC)	30.0	1	30	10
					Ofloksasin (OFL)	2.0	1	2	1
					PAS	2.0	1	0.5	1

*PZA'nın Bactec 12B besiyerinde pH 6'da test edilmesi önerilir.

Tablo 7: Bactec 460TB duyarlılık testinde liyofilize antibiyotiklerden stok solüsyon hazırlama ve 12B besiyerindeki final antibiyotik konsantrasyonları.

Antibiyotik	şışedeki liyofilize miktar	Sulandırım için steril distile su	Sulandırım sonrası konsantrasyon	12B'ye aktarılan miktar	12B'deki final konsantrasyon
Streptomisin	1.2 mg	5 ml, sonra 1:3 dilüsyon	80 µg/ml	0.1 ml	2.0 µg/ml
İzoniazid	0.02 mg	5 ml	4 µg/ml	0.1 ml	0.1 µg/ml
Rifampin	0.4 mg	5 ml	80 µg/ml	0.1 ml	2.0 µg/ml
Ethambutol	1.5 mg	5 ml, sonra 1:3 dilüsyon	100 µg/ml	0.1 ml	2.5 µg/ml

Tablo 8: MGIT liyofilize antibiyotiklerinin dilüsyon şeması ve 7ml'lik MGIT tüpteki final konsantrasyonları

Liyofilize antibiyotik	Sulandırım (Steril distile su)	Sulandırıldıktan sonraki ilaç konsantrasyonu (µg/ml)	MGIT tüpe eklenen miktar (µl)	MGIT tüpteki final konsantrasyon (µg/ml)
MGIT SM	4ml	83	100	1.0
MGIT INH	4ml	8.3	100	0.1
MGIT RIF	4ml	83	100	1.0
MGIT EMB	4ml	415	100	5.0
MGIT SM 4.0	2ml	332	100	4.0
MGIT INH 0.4	2ml	33.2	100	0.4
MGIT PZA	2.5ml	8000	100	100

Örnek: Agar proporsiyon testi kayıt formu

Hasta adı soyadı :

İnokulasyon tarihi :

Hasta no :

Okuma tarihi :

Örnek adı :

Test yöntemi :

Plak	Bölme	10 ⁻²			10 ⁻⁴			Sonuç
		Koloni sayısı	Kantitasyon	% Direnç	Koloni sayısı	Kantitasyon	% Direnç	
1	Kontrol							
	INH 0.2							
	SM 2.0							
	RIF 1.0							
2	Kontrol							
	INH 1.0							
	SM 10.0							
	EMB 5.0							

Örnek: BACTEC radyometrik duyarlılık testi kayıt formu

Hasta adı soyadı :

İnokulasyon tarihi :

Hasta no :

İnokulum kaynağı :

Örnek adı :

İnok. GI değeri :

Test yöntemi :

Rapor tarihi :

Okuma programı:

(günlük/haftasonu hariç)

	GI															Sonuç
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	ΔGI	
Kontrol																-----
Streptomisin 2.0																
Izoniazid 0.1																
Rifampin 2.0																
Ethambutol 2.5																