

MIDDLE-BROOK 7H10 BESİYERİ İLE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

Doç. Dr. Hakan Öztürkeri

Girne Askeri Hastanesi, Mikrobiyoloji Servisi, Girne, Kıbrıs

Testin esası: Middlebrook 7H10 besiyeri ile standart olarak önerilen modifiye proporsiyon yönteminde, test edilecek tüberküloz basiliinin standardize edilmiş süspansiyonu antibiyotik içeren ve içermeyen agar plaklarına paralel olarak inokule edilir. CO₂'li ortamda 36°C'de 3 haftalık inkübasyonu takiben, antibiyotik içeren besiyerindeki üreme miktarı antibiyotiksiz kontrol besiyerindeki üreme miktarı ile karşılaştırılarak, mikroorga-nizma dirençli veya duyarlı olarak sınıflandırılır.

Duyarlılık testi direk veya indirek yöntemlerle yapılabilir. Direk testte; dekontamine ve konsantre edilmiş yayma pozitif örnek direk olarak antibiyotik içeren ve içermeyen besiyerlerine inokule edilir. İndirek testte ise; primer izolasyon besiyerinden elde edilen saf üreme inokulum olarak kullanılır

Örnek: İndirek test yönteminde; Middlebrook 7H10 - 7H11 veya yumurta bazlı katı besiyerlerinin herhangi birisinde üremiş tüberküloz basillerinin (üremenin görülmesinden sonra 4 haftayı geçmemiş kültürler) saf kültürü örnek olarak kullanılır.

Direk test yönteminde; homojenize - dekontamine ve konsantre edilmiş, aside dirençli yayması pozitif primer hasta örnekleri kullanılır.

Gerekli Materyaller:

A. Besiyerleri ve miyarlar (saklama ısıları);

1. Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar toz besiyeri (25°C)
2. Oleik asit - albumin - dekstroza - katalaz (OADC) suplementi (2-8°C)
3. Gliserol (25°C)
4. Antibiyotik stok solüsyonları (ethambutol, izoniazid, rifampin, streptomisin) (-20°C veya altı)
5. Dubos Tween - albumin veya Middlebrook 7H9 buyyonu (tüplerde 4 ml hacminde dağıtılmış) (2-8°C)
6. Kanlı agar plağı (2-8°C)
7. Dimetil sulfoksit veya metanol (rifampin için çözücü) (25°C)
8. Steril distile su (25°C)

B. Rutin lab malzemeleri;

1. Dört kadranlı steril plastik petri plakları

2. McFarland 1.0 bulanıklık standardı
3. Üç mm ebadında cam boncuklar
4. Farklı hacimde erlen, mezür ve steril serolojik pipetler
5. Standart hacim damlatan - dereceli steril plastik pastör pipetleri
6. Yüksek düzeyde CO₂ geçirgen plastik polietilen torbalar
7. Steril cam ve polipropilen tüpler

C. Cihazlar;

1. Otomatik pipetleme cihazı
2. Manyetik çevirme mekanizmalı ısıtıcı tabla (veya bek + ısı yayıcı tabla)
3. Benmari
4. Vorteks karıştırıcı
5. % 5 - 10 CO₂'li 35 - 37°C etüv (veya normal etüv + jar + karbondioksit poşeti)
6. Güvenlik kabini

Çalışma prosedürü:

A. Antibiyotik solüsyonlarının

hazırlanması;

1. Ethambutol - izoniazid ve streptomisin için steril distile su ile, rifampin için dimetil sulfoksit veya metanolle çözerek en az 1.000 µg/ml'lik stok solüsyon hazırlayın. Stok solüsyon hazırlarken; gereken miktarın biraz fazlası toz antibiyotik tartıp, istenen stok antibiyotik konsantrasyonunu elde etmek için, gereken hacmin hesaplanması önerilmektedir. Şu formülle hesaplanmaktadır;

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

2. Stok solüsyonu 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzüp steril ettikten sonra, polipropilen tüplerde parçalara bölerek -20°C veya altında saklayın.
3. Besiyeri hazırlanırken antibiyotik stok solüsyonunu Ek-1'deki tabloya göre (1.000 µg/ml stok antibiyotik solüsyonuna göre) besiyerine ekleyin.
4. Antibiyotik stok solüsyonu hazırlanmasına bir alternatif ticari - hazır kağıt disk kullanımıdır. Belli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler dört kadranlı petri plaklarının içine konup 5 ml M7H10 agar ile kaplanır. Bu yöntem; stok solüsyon hazırlanmasını, dilüsyon ve etiketleme hatalarını elimine eder. Bu yöntemle her bir disk içindeki antibiyotik miktarları ile, üzeri besiyeri ile kaplandıktan sonra besiyerinin her bir ml'sindeki antibiyotik miktarları µg/ml olarak Ek-2'deki tabloda görülmektedir.

B. Agar besiyerinin hazırlanması;

1. 1080 ml distile suyu 2 lt'lik erlene koyun. Erleni ısıtıcı tabla üzerine koyun ve içine karıştırıcı çubuğu atın.
2. Üreticinin tarifine göre M7H10 agarı tartın (1200 ml besiyeri için) ve yavaşça suya ekleyin.
3. Besiyeri şeffaflaşana kadar ısıtın (yaklaşık 20 dk).
4. 6 ml gliserol ekleyin ve 3-5 dk daha karıştırın.
5. Besiyerini mezür yardımıyla dört adet 180 ml'lik ve bir adet 360 ml'lik parçalara bölerek, 500 ml'lik beş ayrı erlene dağıtın. İçlerine birer adet manyetik çubuk atın.

6. Otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edin.
7. Daha sonra 50-56°C'de benmaride bekletin.

C. Petri plaklarının etiketlenmesi;

1. Toplam 60 adet dört kadranlı petri plağının 40'ını antibiyotikli besiyeri dökülecek ve 20'sini ise antibiyotiksiz besiyeri dökülecek olarak ayırın.
2. Antibiyotikli besiyeri dökülecek 40 adet falcon petri plağının her bir kadranına dört antibiyotikten herbirinin adını yazın.
3. Antibiyotiksiz besiyeri dökülecek 20 adet falcon petri plağına ise kontrol yazın.

D. Besiyesinin dökülmesi;

1. Antibiyotikleri ve OADC supplementini oda sıcaklığına getirin.
2. Bir adet 180 ml besiyeri içeren erlene; 20 ml OADC ve besiyerinin ml'sinde 0.2 µg INH olacak şekilde antibiyotik ekleyin. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı tablada ısıtmaksızın karıştırın (1-2 dk süreyle).
3. Otomatik pipetleme cihazı ile antibiyotikli besiyeri dökülecek 40 adet dört kadranlı petri plağının her bir kadranına 5 ml hacminde dağıtın.
4. Diğer üç adet 180 ml hacminde besiyeri içeren erlene, diğer üç antibiyotik için de, aynı işlemleri tekrar edin. Böylece 40 adet antibiyotikli petri plağı, her bir kadranında birer antibiyotik içerecek şekilde hazırlanmış olur.
5. 360 ml besiyeri içeren erlene ise 40 ml OADC ekleyip karıştırın ve antibiyotiksiz kontrol besiyeri olarak etiketlenen 20 adet plağın tüm kadranlarına otomatik

pipetleme cihazı ile 5'er ml hacminde dağıtın.

6. Agar plaklarının oda ısısında katılaşmasını bekleyin ve plastik torbalarda 2-8°C'de karanlıkta saklayın. Son kullanım tarihi 1 ay sonrasıdır.

E. İnokulum hazırlanması;

İndirek yöntem

1. Katı besiyerinde üremiş koloniler kazınarak alınır ve içinde 6-8 adet cam boncuk bulunan Dubos tween-albumin veya Middlebrook 7H9 buyyonunda emulsifiye edilir.
2. 1-2 dakika süreyle vortekslenir.
3. Büyük partiküllerin çökmesi için 30 dk süreyle tüp bekletilir.
4. Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alınır.
5. Madde 1'de kullanılan besiyerlerinden birisini ekleyerek süspansiyonun bulanıklığı McFarland no 1'e ayarlanır (yaklaşık 10⁷ CFU/ml).
6. Daha sonra steril distile suyla bu süspansiyonun 10⁻² ve 10⁻⁴ dilüsyonları hazırlanır.

Direk yöntem

1. Yaymada yaklaşık 20 mikroskop sahası incelendikten sonra görülen aside dirençli basil sayısına göre, homojenize - dekontamine ve konsantre edilen hasta örneğinin Ek 3'deki tabloya göre steril distile su ile dilüsyonlarını hazırlayın.
2. Hasta tedavi alan ve tedavi başarısızlığı söz konusu olan bir hasta ise, yayma sonuçlarını dikkate almaksızın mutlaka dilue edilmemiş hasta örneğini de test edin.

F. İnokulasyon ve inkübasyon

(İnokulumlar indirek test yöntemi esas alınarak verilmiştir, direk test yönteminde dilüsyon oranları değişmektedir);

1. Antibiyotik duyarlılığı test edilecek her bir mikroorganizma için; iki adet antibiyotikli petri plağı ve bir adet antibiyotiksiz (kontrol) petri plağını oda ısısına getirin.
2. Petri plaklarını, hasta kültür numarası ve dilüsyon oranlarını gösterecek şekilde işaretleyin (antibiyotikli petri plaklarından birini 10^{-2} diğerini 10^{-4} olarak; antibiyotiksiz kontrol petri plağının iki kadranını 10^{-2} diğer iki kadranını ise 10^{-4} olarak işaretleyin).
3. 10^{-2} dilüsyonu 10^{-2} petri plağının dört kadranına ve kontrol petri plağının iki kadranına, pastör pipeti yardımıyla, her bir kadrana üç damla gelecek şekilde inokule edin.
4. 10^{-4} dilüsyonu için de aynı işlemi tekrar edin.
5. Dilue edilmemiş süspansiyonun 1-2 damlasıyla bir adet kanlı agar ve bir adet Middlebrook 7H11 agar plağını da, inokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek amacıyla, inokule edin.
6. İnokule edilen plakları agar yüzleri aşağıda olmak üzere oda ısısında yaklaşık 1 saat süreyle bekletin (inokulumun besiyerine absorbe olması için). Bu işlem esnasında, formaldehit oluşumunu önlemek için, plakların üzerini kağıt havlu ile kapatın.
7. Her bir petri plağını ayrı bir CO₂ geçirgen polietilen torbaya agar yüzü aşağıya gelecek şekilde koyun.
8. Plakları 36°C'de % 5-10 CO₂'li ortamda inkübe edin.

G. Plakların okunması;

1. İnkübasyonun 1-2'inci gününde kanlı agar ve M7H11 plaklarını kontaminant bakteri varlığı yönünden inceleyin. Bu incelemeyi kanlı agar için günlük olarak 7 güne kadar, M7H11 agar için haftalık olarak test süresince sürdürün. Kontaminasyon saptanırsa, testi yeni bir inokulumla tekrar edin.
2. Antibiyotiksiz kontrol kadranlarını haftalık olarak inceleyin. 1+ veya daha fazla bir üreme gözleendiğinde, tüm plaklar okunup duyarlılık testi sonucu bildirilebilir. Üçüncü hafta sonunda üreme yetersizse, test tekrar edilmelidir.
3. Üç haftalık inkübasyon tamamlanmadan duyarlı test sonucu bildirmeyin. Çok net olarak bir direnç sözkonusu ise, üç haftalık inkübasyon tamamlanmadan dirençli test sonucu bildirilebilir.
4. Üçüncü haftadan sonra plakları değerlendirmeyin. Dördüncü hafta ve daha sonrasında beliren koloniler direnci göstermez.
5. İnkübasyon sonucu tüm kadranlardaki kolonileri sayın ve Ek 4'deki tabloya göre kantite edin.
6. Mikrokoloniler var ise, not edin.
7. Koloni sayılarını ve üremenin kantitasyonunu Ek 5'deki forma kaydedin.
8. İlaçlı besiyerinde üreyen koloni sayısını kontrol besiyerinde üreyen koloni sayısına bölüp, 100'le çarparak % direnç oranını hesaplayın.

H. Yorumlama;

1. Kontrol kadranında sayılabilir düzeyde kolonisi olan dilüsyonun sonucunu yorumlayın.
2. Kontrol kadranındaki koloni sayımı 50'den az ise bu dilüsyonu kullanmayın. Mikroorganizma hatalı olarak duyarlı görünebilir.
3. Kontrol kadranındaki koloni sayımının 4+ olduğu dilüsyonları dikkatle

değerlendirin. Mikroorganizma tüm antibiyotiklere duyarlı ise, sonucu bildirin. Herhangi bir antibiyotiğe direnç söz konusu ise, yoğun bir inokulum kullanılmış olabilir, testi tekrar edin.

4. İlaç içeren besiyerindeki üreme oranı kontrol besiyerindeki üremenin % 1'ine eşit veya daha büyük ise sonucu dirençli; % 1'inden az ise duyarlı olarak yorumlayın. Örnek;

<u>Kadran</u>	<u>Koloni sayısı</u>	<u>sonuç</u>	<u>Hesaplama</u>
Kontrol kadranı	200 koloni		
INH kadranı (0.2 µg/ml)	7 koloni	dirençli	(7 / 200 x 100 = % 3.5)
RMP kadranı (1.0 µg/ml)	1 koloni	duyarlı	(1 / 200 x 100 = % 0.5)
SM kadranı (2.0 µg/ml)	0 koloni	duyarlı	
EMB kadranı (5.0 µg/ml)	0 koloni	duyarlı	

I. Raporlama;

Sonuçlar aşağıdaki örnekte olduğu gibi raporlanmalıdır.

<u>Antibiyotik</u>	<u>Konsantrasyon</u>	<u>Sonuç</u>
INH	0.2 µg/ml	dirençli
RMP	1.0 µg/ml	duyarlı
SM	2.0 µg/ml	duyarlı
EMB	5.0 µg/ml	duyarlı

J. Kalite kontrol;

Her yeni besiyeri ve her yeni antibiyotik solüsyonu hazırlandığında veya en azından haftada bir kez M tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşunu da 10^{-2}

ve 10^{-3} dilüsyonlarda test edin. Bu suş test sonucunda tüm primer ve sekonder antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlı olmalıdır.

Ek-1: Antibiyotik stok solüsyonunun besiyerine eklenmesi ve besiyerindeki son konsantrasyonlar

Kadran no	Antibiyotik	M7H10'a eklenen stok sol (ml)	5 ml agardaki son konst (µg/ml)
I	INH	0.4 ^a	0.2
II	RMP	2.0 ^a	1.0
III	SM	0.4 ^b	2.0
IV	EMB	1.0 ^b	5.0

(a) 100 µg/ml stok solüsyon 180 ml agar besiyerine.

(b) 1000 µg/ml stok solüsyon 180 ml agar besiyerine.

Ek-2: Agarla disk kaplama tekniğinde her bir diskin antibiyotik içeriği ve besiyerindeki son konsantrasyonlar

Kadran no	Antibiyotik	Her bir diskteki miktar (µg)	5 ml agardaki son konst (µg/ml)
I	INH	1.0	0.2
II	RMP	5.0	1.0
III	SM	10.0	2.0
IV	EMB	25.0	5.0

Ek-3: Direk test yönteminde inokulum dilüsyonları

Her mikroskop sahasındaki mikroorganizma sayısı^a

Karbol-fuksin boyama (1000x)	Fluorokrom boyama (250x)	İnokulum dilüsyonları
≤ 1	≤ 25	Undilue, 10-2
1 - 10	25 - 250	10-1, 10-2
> 10	> 250	10-2, 10-3

(a) Kümeleri tek mikroorganizma sayın.

Ek-4: Agar plaklarındaki mikobakteri kolonilerinin üreme yönünden kantitasyonu

Koloni sayısı	Kantitasyon
0 - 50	Net sayım
50 - 100	1+
100 - 200	2+
200 - 500	3+
Aşırı üreme	4+

Ek-5: Modifiye agar proporsiyon testi kayıt formu

Hasta adı soyadı :
Hasta no :
Örnek :
İnokulasyon tarihi :
Okuma tarihi :
Test yöntemi :

10⁻² Dilüsyon

Antibiyotik (µg/ml)	Koloni sayısı	Kantitasyon	% Direnç	Sonuç
Kontrol		---	---	
INH (0.2)				
RMP (1.0)				
SM (2.0)				
EMB (5.0)				

10 ⁻⁴ Dilüsyon				
Antibiyotik (µg/ml)	Koloni sayısı	Kantitasyon	% Direnç	Sonuç
Kontrol			---	---
INH (0.2)				
RMP (1.0)				
SM (2.0)				
EMB (5.0)				

KAYNAKLAR

1. Hacek D: Modified proportion agar dilution test for slowly growing mycobacteria. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief). American Society for Microbiology / Washington, D.C. 1992: 5.13.1 - 5.13.15.
2. 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.
3. NCCLS: Antimycobacterial susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis; tentative standart. NCCLS document M24-T, vol 15, no 16, 1995.