ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ

Yrd. Doç. Dr. Uğur DEMİRPEK

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Klinikte antimikrobiyal tedavinin, duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre belirlenmesi esastır. Ancak bazı durumlarda etiyolojik ajanın üremesi ve duyarlılığının belirlenmesi beklenmeden ampirik tedavi protokolleri uygulanabilir. Ampirik tedavi protokollerini belirlemede belli bir bölge veya hastanede önceden belirlenmiş duyarlılık sonuçları göz önüne alınmaktadır.

Antibakteriyel Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testlerinde "difüzyon" ve "dilüsyon" olmak üzere başlıca iki metod kullanılır.

A. Difüzyon testleri

1. Disk difüzyon testi

Rutin laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en sık olarak kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Ucuz ve uygulaması basit olan bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiştir ve bu isimlerle de anılmaktadır. Bu test, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla; belli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek olan mikroorganizmanın yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra çözünüp agara doğru difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra ilacın inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş olacaktır. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajanlara karşı duyarlılık durumu belirlenir.

Bu yöntemde, incelenecek olan mikroorganizma trypticase soy buyyonda 2 saat süreyle 37°C'de inkübe edilir. Bulanıklık oluştuktan sonra McFarland 0.5 (10^8 mikroorganizma / ml)'e göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulur (McFarland standartları, bir sıvı besiyerinde bulunan bakteri sayısını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. McFarland'ın baryum klorür ve sülfirik asit kullanarak geliştirdiği standart bulanıklık tüpleri, sıvı bir besiyerine ekilen bakterinin miktarına eşdeğer bulanıklık derecelerini içerir). Bu süspansiyondan steril bir eküvyon yardımıyla alınan örnek Mueller-Hinton agar yüzeyine inoküle edilir. Takiben farklı antibiyotikleri içeren diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilir. Bu işlem yapılırken, oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için diskler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklık olmasına dikkat edilmelidir. Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübe edilir ve oluşan inhibisyon zonları ölçülür.

2. E-test

Günümüzde katı besiyerinde difüzyon yoluyla MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerlerinin saptanmasına olanak sağlayan yöntemler de bulunmaktadır. E-test bu prensibe dayanan bir yöntemdir. MİK bir mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır.

E-test yönteminde **test edilecek bakteri** 0.5 McFarland yoğunluğa getirilip Mueller-Hinton agar yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Takiben agar yüzeyine, belli bir antibiyotik gradienti içeren E-test şeritleri yerleştirilir. Plaklar 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübe edilip MİK değeri belirlenir. MİK değeri şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği noktadır.

B. Dilüsyon testleri

Dilüsyon testleri, bir antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanır. Dilüsyon testleri "tüp dilüsyon" ve "agar dilüsyon" olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

1. Tüp dilüsyon

Tüp dilüsyon "makro" ve "mikro" olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Her iki yöntemin de prensibi aynıdır. Makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise "U" ya da "V" tabanlı "mikroplate"ler kullanılır. Tüp dilüsyon metodunda besiyeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton buyyon kullanılır.

Test edilecek olan antibiyotikler önce özel çözücüleri içinde hazırlanır ve takiben bu sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırımları yapılır. Mikroorganizmanın standart bir inokülumu ($1x10^6$ CFU / ml) hazırlanıp, antimikrobiyal ajanın çeşitli dilüsyonlarını içeren her bir tüpe eşit miktarlarda eklenir. Ayrıca antibiyotik içermeyen, üremenin göstergesi olan kontrol tüpüne de eklenir. Bakteri inoküle edilmemiş, sadece besiyeri konmuş bir tüp veya çukur da besiyeri kontrolü olarak hazırlanır. Besiyerleri 35°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenir. Bakterinin üremesini önleyen, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak değerlendirilir.

2. Agar dilüsyon

Agar dilüsyon yönteminin prensipleri tüp dilüsyon yöntemiyle aynıdır. Tek fark, agar dilüsyon yönteminde antibiyotik sulandırımlarının agar içine konması ve petri plaklarına dökülmesidir. Böylece her plakta antibiyotiğin farklı konsantrasyonları bulunur. Bu yöntem için de önerilen besiyeri Mueller-Hinton agardır.

Test edilecek bakterinin yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanır, takiben 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 CFU / ml elde edilir. Bu bakteri süspansiyonundan manuel olarak veya özel inokülatörler yardımıyla 1-2 ml inoküle edilir. Böylelikle agar yüzeyindeki bakteri sayısı ortalama 10^4 CFU / ml olur. İnoküle edilen plaklar 35°C'de 18-24 saat süreyle inkübe edilir. MİK değeri üremenin engellendiği en düşük antibiyotik konsantrasyonudur.

DİSK DİFÜZYON TESTİ PROSEDÜRÜ

AMAÇ: Bu yöntemde, sık rastlanan belirli patojen bakteriler agar disk difüzyon testi prosedürüyle yarı-kantitatif *in vitro* duyarlılık testi için kullanılır. Bunlara *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* türleri, *Pseudomonas* türleri, *Acinetobacter* türleri, *Enterococcus* türleri, *Vibrio cholera* ve modifiye prosedürler yoluyla *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* ve diğer streptokoklar dahildir.

ÖNEMİ: Belirli konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajan emdirilen, kurutulmuş filtre kağıt diskleri kullanılan agar difüzyon yöntemleri 1940'larda geliştirilmiştir. Bu test yönteminde değişkenliği ortadan kaldırmak veya azaltmak için, Bauer ve arkadaşları, test ortamı olarak Mueller Hinton Agar'ın seçildiği standartlaştırılmış bir prosedür geliştirdiler. Daha sonra çeşitli denetim daireleri ve standart oluşturma kurumları, Bauer-Kirby yöntemine dayanarak standartlaştırılmış referans prosedürleri yayınlamışlardır. Bu standartlaştırılmış prosedürlerin ilk ve en çok kabul görenleri, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) yayınladığı prosedürler olmuştur. Prosedür, Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu (CLSI, eski adıyla NCCLS) tarafından bir konsensüs standardı olarak kabul edilmiştir ve belirli aralıklarla güncellenmektedir.

PROSEDÜR İLKELERİ: Çok çeşitli antimikrobiyal ajan içeren diskler, saf klinik izolat kültürlerinin inoküle edildiği Mueller Hinton Agar (veya *H. influenzae* için Haemophilus Test Ortamı Agarı, *N. gonorrhoeae* için zenginleştiricili GC Agar veya *S. pneumoniae*, β-hemolitik ve viridans grubu streptokoklar için %5'lik Koyun Kanı içeren Mueller Hinton Agar) plak yüzeylerine yerleştirilir. İnkübasyon sonrasında plaklar incelenir ve diskleri çevreleyen inhibisyon zonları ölçülüp, belirlenen zon boyutlarıyla karşılaştırılarak antimikrobiyal terapide kullanılmak için en uygun antimikrobiyal ajan/ajanlar tespit edilir.

REAKTİFLER: Antimikrobiyal ajan içeren diskler, yüksek kalitede absorban kağıda (WHATMAN kağıdı) tam olarak belirlenen antimikrobiyal ajanın standart konsantrasyonda emdirilmesi ile hazırlanan 6-mm'lik disklerdir. Disklerin her iki tarafı da etken madde ve miktarını belirten harflerle ve rakamlarla belirgin şekilde işaretlidir. Disk performansı yalnızca disk etkinliğine değil, doğru inokülum ve kontrol kültürlerinin kullanımına, işlevsel olarak ön denemesi yapılmış plakların kullanımına, uygun saklama sıcaklığına ve diğer faktörlere bağlıdır. Tüm prosedürler boyunca mikrobiyolojik tehlikelere karşı uygun aseptik teknikleri ve belirlenen önlemler uygulanır. Kullanım sonrası kültürler, kapları ve diğer kontamine olmuş malzemeler sterilize edilir.

SAKLAMA TALİMATLARI:

1. Diskler -20°C ile +8 °C'de saklanır. Laboratuvar buzdolabı sık sık açılıp kapanıyor ve uygun sıcaklık korunamıyorsa, dolaba yalnız bir hafta yetecek kadar disk konur. Bazı diskler (örneğin karbapenemler) tercihen -20 °C'de dondurularak saklanmalıdır.
2. Diskler yerleştirilmeden önce oda sıcaklığına gelmeleri beklenir. Disklerin uygulanması tamamlandıktan sonra kartuşlar buzdolabına geri konur.
3. Önce en eski diskleri kullanılır.
4. Son kullanma tarihi geçen diskleri atılır. Hafta boyunca disklerin sık sık çıkarıldığı kartuşlar ve gece laboratuvarda bırakılmış diskler de atılmalı ya da kullanıma devam etmeden önce disklerin kabul edilebilir performans gösterip göstermediği test edilmelidir.
5. Diskler önerilen kontrol organizmalarıyla hatalı zon boyutları oluşturuyorsa prosedürün tamamı kontrol edilmelidir. Hatalı zon boyutu diskten, inokulasyondan, ortamın hazırlanmasından veya derinliğinden (yaklaşık 4 mm) veya diğer faktörlerden kaynaklanıyor olabilir.

ÖRNEKLER: Kültürler, antimikrobiyal terapiye başlanmadan önce hastalardan alınan örneklerden türetilmelidir.

PROSEDÜR

Sağlanan Malzemeler: Antimikrobiyal duyarlılık testi diskleri
Gerekli Fakat Sağlanmamış Malzemeler: Yardımcı kültür ortamı, reaktifler, kalite kontrol organizmaları ve standartlaştırılmış prosedürle disk difüzyon duyarlılık testini gerçekleştirmek için gerekli laboratuvar ekipmanı. 0,5 mL 0,048 M $BaCl_2$'ü (%1,175 [w/v] $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) 99,5 mL 0,18 M (0,36N) H_2SO_4'e (%1 [v/v]) ekleyerek 0,5'lik McFarland türbidite standardını elde edilir. 1 cm'lik ışık yolu ve uygun küveti olan bir spektrofotometre kullanarak doğrulanır; 625 nm'deki absorbans 0,08 – 0,13 olmalıdır.

Kullanıcı Kontrollerini İçeren Talimatlar:

1. Test ve kontrol kültürleri ile inokülum hazırlanması:

a. Yalnızca saf kültür kullanılır.
b. Üç ila beş benzer koloni seçilir ve inokülasyon iğnesi veya öze kullanarak 4 – 5 mL'lik triptik soy broth gibi uygun bir sıvı ortamına (broth) (veya güç üreyen organizmalar için Mueller Hinton Broth) aktarılır.
c. Gerekiyorsa, 0,5 McFarland'lık türbidite standardını (yaklaşık olarak, 1 ila 2 x 10^8 CFU / mL) elde etmek için sıvı ortamdaki kültürler 35 °C'de 2-6 saat süreyle inkübe edilebilir. Alternatif olarak; gece boyunca inkübe edilen agar plağından alınan kolonileri kullanarak doğrudan bir sıvı besiyer veya tuz süspansiyonu hazırlanır. (*H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae* için kanlı agar veya çikolata agar gibi seçici olmayan bir ortam kullanılmalıdır). Doğrudan koloni süspansiyon yöntemi, *Staphylococcus* türleri, *S. pneumoniae* ve diğer streptokoklar, *Haemophilus* türleri ve *N. gonorrhoeae* için tercih edilir.
d. 0,5 McFarland'lık türbidite standardına eşdeğer bir türbidite değeri elde etmek için gerekiyorsa seyreltilir. Seyreltim sıvısı olarak steril sıvı besiyeri veya tuz çözeltisi kullanılabilir. Alternatif olarak; inokülum fotometrik olarak standartlaştırılır.Geceden kalma sıvı besiyeri kültürleri inokülum olarak kullanılmamalıdır.

2. İnokülasyon:

a) 15 dakika içinde, steril bir eküvyon uygun bir şekilde ayarlanmış inoküluma daldırılır ve fazla sıvının akması için eküvyon tüpün iç üst duvarına bastırılarak birkaç kez döndürülür.
b) Mueller Hinton Agar (veya uygun başka bir agar) plağının yüzeyi, tamamı üç kez çizilerek ekim yapılır. Eşit bir inokulasyon elde etmek için her çizimden sonra plak 60° döndürülür.
c) İlaç aşılanmış diskler uygulanmadan önce, varsa yüzey neminin emilmesi için kapak 3 – 5 dakikalığına aralık bırakılabilir ama bu süre 15 dakikayı aşmamalıdır.

3. Uygun diskler seçilir.
4. Diskler dispanser veya penset aracılığıyla, aseptik önlemlere dikkat edilerek uygulanır. Diskler, merkezleri arasında en az 24 mm olacak şekilde yerleştirilir. Penisilin ve sefalosporin disklerinin petri kabı kenarından en az 10 mm uzakta olması ve merkezleri arasında en az 30 mm mesafe bulunması tercih edilir. *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* ve *S. pneumoniae* ile 150 mm'lik plak için en fazla dokuz veya 100 mm'lik plak için en fazla dört disk kullanılır. Disklerin agar üzerinde yüzeyle teması sağlamak için steril bir iğne veya forsepsle disklere bastırılabilir.

5. Plaklar 15 dakika içinde, agar yüzeyi yukarı bakacak şekilde 35 ± 2 ℃'lik inkübatöre yerleştirilir (*Staphylococcus* türleri için test 35 ℃'den yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinde metisiline dirençli stafilokoklar [MRS] tespit edilemez. *N. gonorrhoeae* ise 36 ± 1℃'de [37 ℃'yi aşmayın] inkübe edilmelidir). *Haemophilus* türleri, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* ve diğer streptokoklar %5'lik CO_2 ile zenginleştirilmiş atmosferde inkübe edilmelidir.
6. 16-18 saat inkübasyondan sonra plakları incelenir (*N. gonorrhoeae*, *S.pneumoniae* ve diğer streptokoklar için 20-24 saat).
Metisilin / nafsilin / oksasilin / vankomisine direncin tespiti amacıyla *Staphylococcus* türleri için ve vankomisine direncin tespiti amacıyla *Enterococcus* türleri için tam 24 saatlik inkübasyon önerilir. Tamamen inhibisyon görülen zonların çapları genel görsel incelemede belirtilen şekilde ölçülür. Zonlar, en yakın tam milimetre değerine kadar ölçülür. Sadece izole kolonilerin gelişmesi inokülumun yetersiz olduğunu gösterir, bu durumda test tekrarlanmalıdır. Farklı ilaçlar içeren disklerin etrafındaki zonlar ilaçların etkisinin karşılaştırılması amacıyla kullanılamaz. Sık görülen aerobların testi için tahmini değerleri gösteren Zon Çapı Yorumlama Tablosuna (CLSI) bakılır.
7. Önerilen kültürlerin kullanıldığı kontrol testleri, duyarlılık testinin gerçekleştirildiği her gün veya CLSI standardına göre yeterli performans belgelenebiliyorsa her hafta yapılmalıdır. *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 35218 (β-laktamaz üreten suş), *E. faecalis* ATCC 29212 (gentamisin 120 µg ve streptomisin 300 µg disklerinin kalite kontrol testi için) ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL'lerin tarama ve teyit testleri için) için tipik zon boyutları tabloda verilmiştir (CLSI) ve tüm prosedür için doğru performans kriterlerini göstermektedir. *E. faecalis* ATCC 29212 (veya 33186), yeni Mueller Hinton Agarı lotlarının düşük timin ve timidin içeriği bakımından değerlendirilmesi için de önerilir. *H. influenzae* ATCC 10211, Haemophilus Test Ortamı Agarının çoğalmayı teşvik edici özelliklerini doğrulamak için önerilen başka bir kalite kontrol suşudur.

MİK MİKRODİLÜSYON VE MAKRODİLÜSYON HAZIRLANMASI VE EKİMİ

Doç. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN

Antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin tespit edilmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler antimikrobiyal duyarlılık testleri için referans yöntemlerdir. Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal ajanın dilüsyonlarını içeren mikroplak kuyucuklarında ya da agar yüzeyinde üremenin gözle görülebilir olması temel alınır. Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu "Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK)" olarak belirlenir. Dilüsyon testleri sonucunda elde edilen MİK değerleri klinisyene, infeksiyona neden olan mikroorganizmayı inhibe etmek için gerekli olan antimikrobiyal ilaç konsantrasyonunu vermektedir.

Antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin uygulanması ve breakpoint değerlerinin belirlenmesinde birçok ülke tarafından standartların oluşturulması için komiteler kurulmuştur. Bunlar; The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases tarafından oluşturulan The European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Fransa'da Comite de l'Antibiogramme de la Societe Française de Microbiologie (CA-SFM), Almanya'da Deutsches Institut für Normung (DIN), Norveç'te Norwegian Working Group on Antimicrobials (NWGA), İsveç'te Swedish Reference Group of Antibiotics (SRGA), Hollanda'da Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen (CRG), İngiltere'de British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) ve ABD'de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'dir. Burada makro ve mikrodilüsyon yöntemiyle MİK belirlenmesinin anlatılmasında CLSI'nin M7-A6 dokümanı (Aerop Üreyen Bakteriler için Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri; Onaylanmış Standart-Altıncı Baskı) temel alınacaktır.

AEROP ÜREYEN BAKTERİLER İÇİN DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK YÖNTEMLERİ

A. Antimikrobiyal ilaçlar:

- Çalışılacak ilaç, doğrudan ilaç üretici firmadan ya da diğer ticari kaynaklardan sağlanmalıdır.
- Parenteral kullanım için üretilen preparatlar antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmamalıdır.
- Bu amaca uygun hazırlanmış tozlar;
    - İlacın jenerik adını
    - Seri numarasını
    - Potensini
        - Genellikle her mg toz için µg ve IU olarak gösterilmektedir
    - Son kullanım tarihini içermektedir
- Antimikrobiyal tozlar üretici firma önerileri doğrultusunda veya ≤ –20ºC'de desikatörde saklanmalıdır.
    - Desikatör, buzdolabı ya da derin dondurucudan çıkarılınca açılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanmalıdır.

A. 1. Antimikrobiyal tozların tartılması:

- Üretici tarafından sağlanan tozun potensinin değeri
    - Saflık ölçümlerini (genelde HPLC ile yapılan)
    - Su içeriğini (Karl Fischer analizi veya kurutulduğunda ağırlık kaybı)
    - Tuz / karşılığı iyon fraksiyonunu (eğer maddenin serbest asit ya da baz yerine tuz formu sağlanmışsa) içermelidir.
- Potens; yüzde veya µg/ml (w / w) (ağırlık / ağırlık) şeklinde ifade edilebilir
- Antimikrobiyal tozlar kalibre edilmiş hassas terazide tartılmalıdır.
- Mümkünse 100 mg'dan az toz tartılmamalıdır.
- Gereken toz miktarını veya çözücü miktarını hesaplamada şu formül kullanılır;

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml) X Konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

Veya

$$\text{Hacim (ml)} = \frac{\text{Ağırlık (mg) X Potens (µg/mg)}}{\text{Konsantrasyon (µg/ml)}}$$

A. 2. Stok çözeltilerin hazırlanması:

- Antimikrobiyal ajan stok solüsyonu en az 1000 µg/ml konsantrasyonda veya test edilecek konsantrasyondan en az 10 kat fazla olmalıdır (örn: 1280 µg/ml).
- Çözünürlükleri düşük olan bazı antimikrobiyal ajanlar için daha düşük konsantrasyon hazırlanabilir ve çözünürlüğün saptanmasında ilaç üreticisinin önerileri göz önünde bulundurulur.
- Bazı antimikrobiyaller su dışında başka çözücülerle çözülmelidir. Bu durumda;
    - En az miktarda çözücü kullanılarak antimikrobik ajan çözülmeli,
    - Son konsantrasyon su veya uygun çözücü ile sulandırılarak ayarlanmalı
- Mikrobiyal kontaminasyon nadir olduğundan sterilizasyona gerek yoktur.
    - Ancak istenirse membran filtrasyon yöntemiyle solüsyonlar sterilize edilebilir.
- Hazırlanmış olan stok solüsyonlar küçük hacimler halinde steril cam, polipropilen, polistren veya polietilen tüplerde saklanabilir.
    - Saklama koşulları – 60°C veya daha altında olmalı, –20°C'den daha yüksek sıcaklık olmamalıdır.
    - Uygun koşullarda stok solüsyonlar 6 ay veya daha uzun süre aktivitelerini kaybetmeden saklanabilirler.
- Çözeltiler ihtiyaç olduğunda eritilip aynı gün kullanılır
    - Kullanılmayan ilaç gün bitiminde atılmalıdır
- Antimikrobiyal bir ilaçta herhangi bir bozulma olup olmadığını belirlemek için;
    - Kalite kontrol suşları kullanılarak duyarlılık testleri ile belirlenmelidir.

B. Duyarlılık testinde kullanılacak besiyerinin hazırlanması:

- Kolay izole edilen ve hızlı üreyen ve fakültatif anaerop mikroorganizmalar için Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) önerilmektedir.
    - MHB duyarlılık testlerinde üretimden üretime fark göstermeyen ve tekrar edilebilirliği iyi bir besiyeridir.

- Sülfonamid, trimetoprim ve tetrasiklin inhibitörleri düşük miktardadır
- Çoğu patojen bakterinin üremesi için elverişlidir
- Bu besiyerinin kullanımı ve sonuçları ile ilgili çok fazla veri bulunmaktadır.
- Duyarlılık testlerinde kullanılacak olan MHB'un katyon ayarlı olması gerekmektedir.
- Besiyerinin istenilen kalsiyum ve magnezyum katyon oranları;
  - Kalsiyum; 20-25 mg/L (daptomisini test ederken 50 mg/L olmalı)
  - Magnezyum: 10-12.5 mg/L olmalı
  - Değil ise;
    - Aminoglikozitlerin *P. aeruginosa* için, tetrasiklinlerin tüm bakteriler için ve daptomisinin Gram pozitif mikroorganizmalar için MİK'leri Mueller-Hinton Agar (MHA)'da elde edilenlerden farklı olacaktır.
  - Ticari olarak satılan MHB besiyerlerinin bazıları belirli oranda katyon içermektedir bu nedenle katyon ayarı yapılırken dikkate alınmalıdır
    - Gereğinden fazla katyon eklenmesi de yanlış sonuçlara yol açabilir
- Ticari olarak satılan MHB besiyerleri iki çeşittir;
  - Katyon ayarı yapılmamış olan MHB
    - Difco™ MHB
      - Kalsiyum: 2.9-5.9 mg/L
      - Magezyum: 3.2-5.2 mg/L
    - BBL™ MHB
      - Kalsiyum ve magnezyum içermemektedir
    - Merck™ MHB
  - Katyon ayarı yapılmış olan Mueller-Hinton II Broth
    - BBL™ MHB
      - Kalsiyum: 20-25 mg/L
      - Magnezyum: 10-12.5 mg/L
      -

B.1. MHB hazırlanması ve katyon ayarlamasının yapılması:

- Magnezyum stok çözeltisi hazırlanması;
  - 8.36 g $MgCl_2.6H_2O$ 100 ml deiyonize suda çözülür ve filtre ile steril edilir
- Kalsiyum stok çözeltisi hazırlanması;
  - 3.68 g $CaCl_2.2H_2O$ 100 ml deiyonize suda çözülür ve filtre ile steril edilir
- Her iki çözelti de 2-8°C'de saklanır.
- MHB üretici firmanın önerilerine göre hazırlanmalı, otoklavlanmalı ve katyon eklenmeden önce bir gece 2-8°C'de bekletilmeli
- Aynı gün kullanılacaksa buz banyosunda soğutulmalıdır
- MHB içerisinde her litrede 1 mg'lık artış sağlamak için kalsiyum ve magnezyum stok çözeltisinden litre başına 0.1 ml eklenmelidir
- Katyon ayarlı MHB (KAMHB) mikro ve makrodilüsyon duyarlılık testlerinin uygulanmasında kullanılır
- Eğer besiyeri hemen kullanılmayacaksa 4°C de tutulabilir.

C. Dilüsyon testleri için inokülumun hazırlanması:

- İnokülumun yoğunluğunun standardizasyonu için McFarland 0.5 standardına eşit $BaSO_4$ bulanıklık standardı veya onun optik eşdeğeri kullanılır.
- Klinik mikrobiyoloji laboratuarlarının hemen hepsinde bulanıklık ölçümünde kullanmak için tasarlanmış McFarland cihazlarına ulaşmak mümkündür.

- İnokülum hazırlanmasında iki yöntem kullanılmaktadır
    - Üretme yöntemi:
        - Kültür plağındaki benzer en az 3-5 koloni seçilir.
        - Bunlar özeyle alınarak 4-5 ml sıvı besiyerine (triptik soy buyyon gibi) aktarılır.
        - Sıvı besiyeri McFarland 0.5 bulanıklığına erişinceye kadar 35°C'de inkübe edilir (yaklaşık 2-6 saat).
        - Sıvı besiyerindeki kültürün yoğunluğu McFarland 0.5 bulanıklığına serum fizyolojik veya buyyon ile ayarlanır.
            - *E. coli* ATCC 25922 için yaklaşık 1-2 x 10^8 CFU / ml'dir.
    - Doğrudan koloni süspansiyon yöntemi:
        - Kanlı agar gibi seçici olmayan bir besiyeri kullanılmalıdır,
        - 18-24 saat inkübe edilmiş plaktan tek düşmüş koloniler seçilir
        - Doğrudan buyyon veya serum fizyolojik ile McFarland 0.5 bulanıklığı standardına ayarlanır.
        - Bu yöntem özellikle *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* ve streptokoklar gibi güç üreyen mikroorganizmaları test etmek için kullanılır
        - Stafilokoklarda olası metisilin ya da oksasilin direncini test etmek için de önerilmektedir.
    - İnokülum hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde sıvı besiyerinde (makrodilüsyon yöntemi), su ya da SF içinde (mikrodilüsyon yöntemi) sulandırılmalıdır
        - Sulandırım sonrası yapılacak olan inokülasyon sonrası her tüp ya da kuyucukta bakteri yoğunluğu 5 x 10^5 CFU / ml olmalıdır. Bunun için;
            - Eğer kuyucuktaki hacim 0.1 ml ise 0.5 McFarland süspansiyonu (1 x 10^8 CFU / ml) 1/10 dilüe edilerek 10^7 CFU / ml elde edilmelidir.
            - Bundan 5 µl 0.1 ml içeren kuyucuğa inoküle edildiğinde bakterinin test konsantrasyonu 5 x 10^5 CFU / ml olur.
    - Laboratuarlarda inokülum konsantrasyonunun test edilmesinde *E. coli* ATCC 25922 kullanılır
        - 5 x 10^5 CFU / ml içeriğinden emin olmak için periyodik olarak inokülumlardan koloni sayımı yapılmalıdır.
        - İnokülasyondan hemen sonra üreme kontrol kuyucuğu / tüpünden 0.01 ml alınıp 10 ml SF ile sulandırılır (1:1000 sulandırım)
        - 0.1 ml alınıp agar besiyerine yayılır ve inkübe edilir
        - İnkübasyon sonrası 50 koloninin varlığı 5 x 10^5 CFU / ml olduğunu gösterir.
        -

D. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi:

- Sıvı mikrodilüsyon yönteminde KAMHB kullanılır.
- Test 96-kuyucuklu U-tabanlı mikroplaklarda uygulanır
- Test için mikroplakların hazırlanmasında stok solüsyondan antimikrobiyal ajanların sulandırımları Tablo 1'deki şemaya göre yapılabilir.
- Bu şekilde hazırlanan antibiyotik konsantrasyonları aynı sıra ile mikroplaklara dağıtılır.
- Antibiyotik konsantrasyonları bu şekilde hazırlandığı gibi iki kat dilüsyon ile de hazırlanabilir;
    - Mikroplağın tüm kuyucuklarına 0.1 ml KAMHB konulur.

    - Başlanmak istenilen antibiyotik konsantrasyonunun iki kat üst konsantrasyonu hazırlanır
        - Örneğin; 256 µg/ml'den başlaması isteniyorsa 512 µg/ml konsantrasyon hazırlanır
    - İlk kuyucuğa 0.1 ml konulur ve daha sonra iki kat dilüsyonlar yapılarak istenilen konsantrasyonlar hazırlanır (en son 0.1 ml dışarı atılır)
- Her plakta bir sterilite kontrol kuyucuğu ve bir de üreme kontrol kuyucuğu bulunmalıdır
- Hazırlanan plaklar -60°C'ye kaldırılıp çalışılıncaya kadar saklanabilir.
    - Ancak mikroplaklar dondurucudan çıkarılıp çözülüp tekrar dondurulmamalıdır.

D.1. Hazırlanan mikroplaklara bakteri inokülasyonu:

- McFarland 0.5 standardı bulanıklığında hazırlanan inokülum 1:10 dilüe edildikten sonra sterilite kuyucuğu hariç diğer tüm kuyucuklara 5 µl olarak ekilir.
- İnokülum standardize edildikten sonra 15 dk içinde mikroplaklara ekim yapılır.
- İnokülum miktarı kuyucuktaki hacmin %10'undan fazla olmamalıdır.
- İnokülumun saflık kontrolü selektif olmayan agar plağına ekim yapılarak belirlenir.
- Kurumayı önlemek için mikroplaklar plastik torbaya konup inkübasyona bırakılabilir.

E. Sıvı makrodilüsyon yöntemi:

- Test için steril 13x100 mm boyutlarında tüpler kullanılır
- Tüpler gevşek vidalı kapak, plastik ya da metal kapak ya da pamuk tıpa ile kapatılmalıdır
- Sıvı makrodilüsyon yönteminde KAMHB kullanılır.
- Test için tüplerin hazırlanmasında stok solüsyondan antimikrobiyal ajan sulandırımı Tablo 1'deki şemaya göre yapılabilir.
- Bu şekilde hazırlanan antibiyotik konsantrasyonları aynı sıra ile tüplere dağıtılır.
- Antibiyotik konsantrasyonları bu şekilde hazırlandığı gibi iki kat dilüsyon ile de hazırlanabilir;
    - Tüplere 1 ml KAMHB konulur.
    - Başlanmak istenilen antibiyotik konsantrasyonun iki kat üst konsantrasyonu hazırlanır
        - Örneğin; 256 µg/ml'den başlaması isteniyorsa 512 µg/ml konsantrasyon hazırlanır
    - İlk tüpe 1 ml konulur ve daha sonra iki kat dilüsyonlar yapılarak istenilen konsantrasyonlar hazırlanır (en son 1 ml dışarı atılır)
- Her test için antibiyotiksiz bir üreme kontrol ve bir de bakteri inokülasyonu yapılmayan sterilite kontrol tüpü hazırlanmalıdır.

E.1. Hazırlanan tüplere bakteri inokülasyonu:

- McFarland 0.5 standardı bulanıklığında hazırlanan inokülum 1:100 dilüe edildikten sonra sterilite tüpü hariç diğer tüm tüplere 1 ml olarak konulur.
    - Her tüpte hazırlanmış olan antibiyotik konsantrasyonu iki kat dilüe edilmiş olur
    - Bu nedenle istenilen konsantrasyonun iki kat fazlasından başlayarak tüpler hazırlanır
    - Her tüpteki bakteri son konsantrasyonu 5×10^5 CFU / ml olur
- İnokülum standardize edildikten sonra 15 dk içinde tüplere ekim yapılmalıdır.

- İnokülumun saflık kontrolü selektif olmayan agar plağına ekim yapılarak belirlenir.

F. İnkübasyon:
- İnoküle edilmiş mikroplaklar veya tüpler 35°C de 16-20 saat inkübe edilmelidir.
- Stafilokok ve enterokoklarda oksasilin ve vankomisinin test edilmesi için 24 saat inkübe edilmelidir.

G. MİK değerlerinin belirlenmesi:
- MİK;
    - Mikroorganizmanın tüplerdeki ya da mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonudur
- Trimetoprim ve sülfonamidlerle besiyerinde bulunabilen antagonistler zayıf üremeye neden olabilirler
- Bu nedenle son nokta;
    - Kontrol ile kıyaslandığında %80 veya daha fazla bir azalmanın olduğu konsantrasyondur
- Bir mikrodilüsyon testinde arada üreme olmamış tek bir kuyucuk görülürse;
    - En yüksek MİK okunmalıdır
    - Arada birden fazla üreme olmayan kuyucuk varsa test tekrarlanmalıdır
- Mikrodilüsyon yönteminde;
    - Gram negatif basiller için elde edilen MİK değerleri makrodilüsyonla elde edilen MİK değerleri ile ya aynı ya da 1-2 kat sulandırım daha düşüktür.

Tablo 1. Sıvı dilüsyon yöntemi için kullanılacak antimikrobiyal sulandırım şeması

Stok Solüsyon	Antibiyotik (sulandırım kısmı/ miktarı)	KAMHB (sulandırım kısmı/ miktarı)	Test konsantrasyonu
5120 µg/ml	1 ml	9 ml	512µg/ml
512 µg/ml	1 ml	1 ml	256 µg/ml
512 µg/ml	1 ml	3 ml	128 µg/ml
512 µg/ml	1 ml	7 ml	64 µg/ml
64 µg/ml	1 ml	1 ml	32 µg/ml
64 µg/ml	1 ml	3 ml	16 µg/ml
64 µg/ml	1 ml	7 ml	8 µg/ml
8 µg/ml	1 ml	1 ml	4 µg/ml
8 µg/ml	1 ml	3 ml	2 µg/ml
8 µg/ml	1 ml	7 ml	1 µg/ml
1 µg/ml	1 ml	1 ml	0.5 µg/ml
1 µg/ml	1 ml	3 ml	0.25 µg/ml
1 µg/ml	1 ml	7 ml	0.125 µg/ml

GÜÇ ÜREYEN MİKROORGANİZMALAR İÇİN DUYARLILIK TESTİ

- Hızlı üreyen aerop patojenler için uygun olan MHB, güç üreyen mikroorganizmalar için uygun değildir.
- Bu mikroorganizmalar için uygulama prosedürleri, kalite kontrol ve yorumlama kriterleri farklılık gösterir
- Bu bakteriler
  - *Haemophilus* türleri
  - *N. gonorrhoeae*
  - Streptokoklar

A. *Haemophilus* türleri

  - *Haemophilus* Test Besiyeri (HTB) kullanılarak yapılır
  - Yalnızca sıvı dilüsyon yöntemi ile yapılır
  - Agar dilüsyon yöntemi ile uygulanabilirliği araştırılmamıştır
- Kullanılan MHB içerisinde;
  - 15 µg/ml β-NAD (otoklavlanmaz)
  - 15 µg/ml sığır hematini (otoklavlanabilir)
  - 5 g/L maya özütü
  - Trimetoprim veya sülfanamidler test edilecekse 0.2 IU/ml timidin fosforilaz olmalıdır
- HTB'nin hazırlanışı:
  - 50 mg sığır hematini tozu 100 ml 0.01 mol/L NaOH içerisinde eriyene kadar ısıtılarak ve çalkalanarak çözülür
  - 1L MHB içerisine 30 ml hematin stok çözeltisinden ve 5g maya özütünden katılır
  - Otoklavlanıp soğuduktan sonra katyon ayarı yapılır
  - 50 mg NAD 10 ml distile suda eritilip filtre ile steril edilir ve bu çözeltiden 3 ml besiyerine aseptik şartlarda eklenir
  - Eğer sülfonamidler veya trimetoprim test edilecekse aseptik şartlarda 0.2 IU/ml olacak şekilde timidin fosforilaz eklenir
  - pH 7.2-7.4 arasında olmalıdır
- Testin uygulanması:
  - Doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi kullanılmalıdır

- Bir gecelik (tercihen 20-24 saatlik) çikolata agar plağından alınan koloniler kullanılmalıdır
- McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanmalıdır
  - Yaklaşık 1-4 x 10^8 CFU/ml içerir
  - Eğer inokülum konsantrasyonu yüksek olursa özellikle beta laktamaz üreten *H. influenzae* suşları test edildiğinde bazı beta-laktam antibiyotiklere yalancı dirençli sonuçlara neden olur
  - *Haemophilus* türleriyle yapılan duyarlılık testlerinde 5 x 105 CFU / ml'den yüksek inokülumlar kullanılırsa;
    - Özellikle beta-laktamaz üreten suşlarda bazı sefalosporinlere doğru olmayan yüksek MİK değerleri saptanabilmektedir.
- Test edilecek inokülumlar yukarıda anlatılanlara göre hazırlandıktan sonra testin uygulanışı sıvı dilüsyon bölümünde anlatıldığı gibi yapılır
- Plaklar MİK değerleri okunmadan önce 35°C'de normal atmosferde 20-24 saat inkübe edilmelidir

B*. Neiserria gonorrhoeae*

- Yalnızca agar dilüsyon yöntemi tanımlanmıştır
- GC besiyeri kullanılır
  - Besiyeri otoklavlandıktan sonra %1'lik üretme katkısı eklenir
    - Üretme katkısı;
      - 1.1g L-sistein, 0.03g guanin HCl, 3 mg tiamin HCl, 13mg PABA, 0.01g B12, 0.1g ko-karboksilaz, 0.25g NAD, 1g adenin, 10g L-glutamin, 100g glukoz, 0.02g ferik nitrat 1 litre suda
    - Karbapenem ve klavulanat test edilecekse sistein içermemelidir
- Doğrudan koloni yöntemi ile McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanır ve 15 dk içerisinde kullanılmalıdır
- Agar dilüsyon yönteminde belirtilen aşamalara göre test uygulanır
- İnkübasyon 35°C'de %5 CO_2'li ortamda 20-24 saat yapılır

C*. Streptococcus pneumonia* ve diğer *Streptococcus* türleri

- Yalnızca sıvı dilüsyon yöntemi uygulanır
- KAMHB'ne %2-5 oranında hemolizli at kanı eklenir
- İnokülum hazırlanmasında doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi kullanılır

- Bir gecelik kanlı agarda üreyen kolonilerden alınarak McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanır ve 15 dk içerisinde kullanılmalıdır
- Sıvı dilüsyon yöntemi için belirtilen basamaklar uygulanır
- İnkübasyon 35°C'de normal atmosferde 20-24 saat yapılmalıdır

Kaynaklar:

1- CLSI 2006 M7- A7, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.

2- Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Odenholt I, Rodloff A, Soussy CJ, Steinbakk M, Soriano F, Stetsiouk O. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 501-503.

3- Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Osterlund A, Rodloff A, Steinbakk M, Urbaskova P, Vatopoulos A. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 145-148.

4- Difco & BBL Manual. Manual of Microbiological Culture Media. BD Diagnostic Systems, 2003, Sparks, MD, USA.

5- Courvalin P, Leclercq R, Rice LB. Antibiogram. In Phenotypic Techniques Chapter 6, p55-66, 2010, Eska Publishing, ASM press.

AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ

Doç. Dr. Serhan SAKARYA

Gerekli malzemeler

- Steril distile su
- Baz antibiyotik
- Mueller-Hinton agar
- Steril petri
- Bakteri
- McFarland standardı
- Enjektör ucu filtre
- Dispenser
- Otomatik pipet
- Steril pipet ucu
- Steril polipropilen tüp
- Steril cam Tüp
- Petri
- pH metre
- Spektrofotometre
- Küvet
- Etüv
- Vorteks
- Manyetik karıştırıcı

1 Stok solüsyonun hazırlanması

1.1 Antimikrobiyal ajanlar

Antimikrobiyal ajanlar, etkinliğini (potensi) sertifikalandırmış firmalardan temin edilmelidir. Hazırlanacak antibiyotiğin etkinliği %100 den az ise başlangıç tartımında bu fark gözönüne alınarak hazırlanmalıdır.

1.2 Solventler

Antimikrobiyal ajanların solventleri ve dilüentleri CLSI (Vol. 27 No 2 p 33-34) tarafından önerilen şekilde hazırlanmalıdır (Tablo 1)

1.3 Sterilizasyon

Kontaminasyon riskine karşın solventlerin sterlizasyonu filtrasyon yöntemi kullanarak yapılmalıdır. Filtrasyonda asbestos, cam veya kağıt filtreler önerilmemektedir. Filtrasyon sırasında antimikrobiyal ajanın potens kaybetmediğinden emin olunmalıdır.

1.4 Antimikrobiallerin Dilüsyonu

Hazırlanan stok solüsyonun, kullanılacak olan MİK çalışmasına göre Mueller-Hinton broth veya agarda dilüsyonu yapılmalıdır.

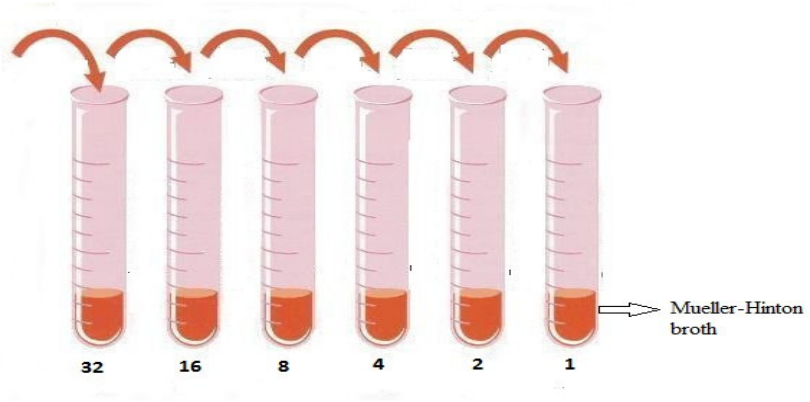
1.5 Agara eklenmesi

Her bir plak başına, dökülecek Mueller-Hinton agar için hazırlanmış dilüent miktarı plaklara eklendikten sonra, 45-50 ^{0}C ye getirilen Mueller-Hinton agar, dilüsyonun içine dökülerek dairesel çevirmeler ile karıştırdıktan sonra oda ısısında ve karanlık bir ortamda soğumaya bırakılmalıdır.

Örnek: 64-1 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanmak istenen plaklar için;

Antibiyotik dilüsyonları

- Her bir petri için 20 ml Mueller-Hinton agar kullanılacaksa;
  - 64 µg/ ml plaklar için 1280 µg/ml olacak sekilde stok hazırla.
  - Diğer konsantrasyonlar için içinde Mueller-Hinton broth veya su olan steril tüpler hazırla,
  - Stoktan 1. tüpe eşit miktarda koyarak 32 µg/ml (=640 µg/ml),
  - Daha sonraki tüplere aynı işlemleri yaparak diğer dilüsyonları hazırla.



Şekil 1:Antibiyotik konsantrasyonunun tüpte hazırlanışı

	Antimikrobik Çözelti						
Adım	Konsantrasyon (µg/mL)	Kaynak	Hacim (mL)	Sulandırıcı (mL)	Ara Konsantrasyon (µg/mL)	Son Konsantrasyon Agarda 1:10 Dilüsyon (µg/L)	Log_2
	5120	Stok	-	-	5120	512	9
1	5120	Stok	2	2	2560	256	8
2	5120	Stok	1	3	1280	128	7
3	5120	Stok	1	7	640	64	6
4	640	Adım 3	2	2	320	32	5
5	640	Adım 3	1	3	160	16	4
6	640	Adım 3	1	7	80	8	3
7	80	Adım 6	2	2	40	4	2
8	80	Adım 6	1	3	20	2	1
9	80	Adım 6	1	7	10	1	0
10	10	Adım 9	2	2	5	0.5	-1
11	10	Adım 9	1	3	2.5	0.25	-2
12	10	Adım 9	1	7	1.25	0.125	-3

Tablo 2: Dilüsyon hesaplanışı NCCLS e göre

- Petrileri konsantrasyonlarına göre gruplandırıp etiketlendir.
- Her bir konsantrasyon grubundaki petrilere, hazırladığın dilüsyondan 1 ml ekle.
- Üzerine 45-50 ^{0}C ye kadar soğutulmuş Mueller-Hinton agardan 19 ml ekleyerek dairesel olarak çalkala.
- Oda ısısında ve karanlık ortamda soğumaya bırak.

1.6 Antimikrobiyal stoklarının saklanması
Hazırlanan stok solüsyonlardan tetrasiklin ve oksitetrasiklinler taze hazırlanmalıdır. Beta-laktamlar -68 ile -72 ^{0}C de maksimum 30 gün diğerleri 6 ay kadar polipropilen veya polietilen tüpler içinde saklanabilir.

2 Besiyer

2.1 Besiyer tipi
Agar dilüsyon deneyi Mueller-Hinton agar ile yapılmalıdır. CLSI de tanımlanmış formülü içeren bilinen firma ürünleri kullanılmalıdır. Katyon ekleme gereksinimi yoktur.

2.2 Besiyer hazırlama
Mueller-Hinton besiyeri üretici firmanın uyarıları doğrultusunda hazırlanmalıdır. Besiyerin pH' ı 7.2 ile 7.4 arasında olmalıdır.

2.3. Su kalitesi
Besiyer distile veya taze deiyonize su kullanılarak hazırlanmalıdır. Suyun iletkenliği 10 µS/cm den fazla olmamalıdır.

2.4 Besiyerin eklenmesi
Plaklardaki besiyerin kalınlığı 4 mm olacak şekilde eklenmelidir. Sıcak dökülen besiyerin oluşturacağı buğulanma ve nemin engellenmesi için 30^{0}C de bekletilmeli veya laminer akım kabininde 30 dk ağzı açık bırakılarak kurutulmalıdır.

2.5 Hazırlanan petrilerin saklanması
Antibiyotikle karıştırılarak hazırlanan belli konsantrasyondaki Mueller-Hinton agar petrileri kesinlikle karanlıkta saklanmalıdır. Tetrasiklin ve oksitetrasiklin içeren petrilerin hazırlanır hazırlanmaz kullanılması gerekirken, diğer antibiyotiklerle hazırlanmış petriler 2-8^{0}C de en fazla 4 gün saklanabilir.

2.6 Sterilite
Her plak hazırlanışından sonra yapıldığı gibi 22^{0}C de 72 saat inkübe edilerek üreme olup olmadığı kontrol edilerek yapılır.

3. İnokülum

3.1 Başlangıç kültür

Test edilecek bakteri tek koloni alınarak taze Mueller-Hinton agara ekim yapılır. Yavaş üreyen bakteriler hariç diğer bakteriler, ekim yapıldıktan sonra 48 saatten fazla bekletilmemelidir.

3.2 İnokülum hazırlanışı

Kültür plağından alınan en az 3 koloni, %0.9 luk tuzlu su içinde süspanse edilir. İnokülum 1-2 x10^8 CFU / ml olacak şekilde standardize edilmelidir.

3.2.1 Başlangıç inokülum süspansiyon konsantrasyonunun hazırlanışı

Başlangıç konsantrasyonu olarak bakteri süspansiyonu 1-2x10^8 CFU / ml olacak şekilde hazırlanmalıdır. Bu hazırlık;

a. Spektrofotometrik olarak 625nm de 0.08 - 0.1 OD değeri hemen tüm bakteriler için 1 - 2 x 10^8 CFU / ml değerini vermektedir.
b. Ticari MacFarland 0.5 standardı ile karşılaştırmalı olarak yapılabilir.

Oluşabilecek aglütinasyon, ölçüm hatası oluşturabileceğinden miktar belirlemeden önce vortekslenerek iyice karıştırılmalıdır.

c. Alternatif bir yöntem olarak; bakteri Mueller-Hinton Broth' a ekildikten sonra, bir gece bekletilerek 1/10 dilüsyon hazırlandığında, 10^8 CFU / ml konsantrasyon elde edilebilmektedir. Fakat bu yöntemde;
    - Bakterinin log üreme değeri
    - "Hangi dönem maksimum üreme olduğu dönemdir?" gibi sorular yöntemin güvenilirliği yönünden problem oluşturmaktadır.

3.3 İnokülasyon

Hazırlanan petrilere, içinde 10^4 CFU bakteri olacak şekilde bakteri süspansiyonundan 1 damla damlatılmalıdır. Sulfonamidlerin kullanıldığı testlerde bu miktar 10^3 olmalıdır. Bakteri dilüsyonları % 0.9 NaCl içinde yapılmalıdır.

3.4 İnokülasyon hacmi

Çalışmada otomatik multi dispenser kullanılıyorsa damlacıklar 1-3 µl olacaktır. Manuel olarak koyulacaksa 10 µl hacimde koyulmalıdır.

Örnek: Deneyimizde kullanılan inokülatör başlıkları 1-3 µl damlacık taşımaktadır. Bu durumda 2x10^7 CFU / ml bakteri süspansiyonu hazırladığımız takdirde inokülatör ucu 10^4 CFU bakteri ekebilmektedir. Manuel olarak koyulacak olursa 10^6 CFU / ml bakteri süspansiyonu hazırlanmalıdır. Buna göre;
İnokülatör için hazırladığımız 0.5 McFarland süspansiyonu 5 kez,
Manuel için ise100 kez dilüe edilmelidir.

3.5 İnokülasyon sırası

Hazırlanan petrilere, en küçük dilüsyondan büyük dilüsyona doğru ekim yapılmalıdır. Buna göre birinci olarak kontrol plağına, en son da en yüksek konsantrasyona ekim yapılmalıdır.

4 İnkübasyon

4.1 İnkübasyon öncesi

Bu dönemde ortam ısısının önemli bir yeri vardır. Oda ısısı ile inkübasyon ısısı arası 5^0C den fazla fark varsa, bakteri inoküle edildikten sonra 10 dk içinde inkübasyon için etüve konmalıdır. Bu ısı farkı 5^0C den az ise inokülasyon yapılır yapılmaz etüve konmalıdır.

4.2 İnkübasyon şartları

Tüm petriler karanlıkta ve ,bakteri özelliğine göre değişik ısıladar olabilmekle birlikte, genellikle 37^0C de inkübe edilmelidir. Etüvde petriler ters pozisyonda olmalıdır ve yeterli havalanmaları için en fazla 5 petri üst üste konabilir.

4.3 Standard inkübasyon süresi

Bu süre bakterilerin üreme özelliklerine göre 22-28 ve 44-48 saat olarak değişebilmektedir.

5 Petrilerin okunması

5.1 Değerlendirme koşulları

Petriler yansımasız koyu bir zeminde çıplak gözle değerlendirilmelidir.

5.2 Bitiş noktasının belirlenmesi

Bitiş noktası üremenin olmadığının tesbit edildiği konsantrasyondaki petridir.

6 Red kriterleri

6.1 Kontrol suşlarının kabul edilen limitlerin dışında duyarlılık vermesi.

6.2 Kontaminasyonun tesbit edilmesi

Antimikrobik İlaç	Çözücü	Sulandırıcı
Amikasin	Su	
Amoksisilin	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Ampisilin	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Azitromisin	%95 etanol veya glasiyal asetik asit[e,f]	Buyyon besiyeri
Azlosilin	Su	
Aztreonam	Doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi	Su
Dalbavansin	DMSO[g]	DMSO[g,h]
Daptomisin	Su	Su
Diritromisin	Glasiyal asetik asit[f]	Su
Doksisiklin	Su	
Doripenem	%0.85 serum fizyolojik	%0.85 serum fizyolojik
Enoksasin	1/2 hacim su, sonra eriyene kadar 0.1 mol/L NaOH damlatılır	Su
Eritromisin	%95 etanol veya glasiyal asetik asit[e,f]	Su
Ertapenem	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L
Faropenem	Su	Su
Fleroksasin	1/2 hacim suya, 0.1 mol/L NaOH eriyene kadar damlatılır	Su
Garenoksasin	Su (karıştırarak)	
Gatifloksasin	Su (karıştırarak)	
Gemifloksasin	Su	
Gentamisin	Su	
İklaprim	DMSO[g]	Su
İmipenem	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L
Kanamisin	Su	
Karbenisilin	Su	
Kinupristin/dalfopristin	Su	
Klaritromisin	Metanol[e] veya glasiyal asetik asit[e,f]	Fosfat tamponu, pH 6.5, 0.1 mol/L
Klavulanik asit	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Klinafloksasin	Su	
Klindamisin	Su	
Kloramfenikol	%95 etanol	Su
Kolistin[a]	Su	Su
Levofloksasin	1/2 hacim su, sonra eriyene kadar 0.1 mol/L NaOH damlatılır	Su
Linezolid	Su	
Linopristin-flopristin	**DMF[i]**	**Su**
Lomefloksasin	Su	
Lorakarbef	Su	
Meropenem	Su	
Mesilinam	Su	
Metisilin	Su	
Metronidazol	DMSO[e,g]	Su
Mezlosilin	Su	
Minosiklin	Su	
Moksalaktam (diamonyum tuzu)[b]	0.04 mol/L HCl (1.5-2 saat bekletilir)	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Moksifloksasin	Su	
Mupirosin	**Su**	**Su**
Nafsilin	Su	
Nalidiksik asit	1/2 hacim su, sonra eriyene kadar 1 mol/L NaOH damlatılır	
Netilmisin	Su	

Antimikrobik İlaç	Çözücü	Sulandırıcı
Nitrofurantoin[c]	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L
Norfloksasin	1/2 hacim su, sonra eriyene kadar 0.1 mol/L NaOH damlatılır	Su
Ofloksasin	1/2 hacim su, sonra eriyene kadar 0.1 mol/L NaOH damlatılır	Su
Oksasilin	Su	
Oritavansin	Suda %0.002 polisorbat-80[j]	Suda %0.002 polisorbat-80[j]
Penisilin	Su	
Piperasilin	Su	
Polimiksin B	Su	Su
Rifampin	Metanol[e] (maksimum konsantrasyon= 640 µg/mL)	Su (karıştırarak)
Sefadroksil	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
Sefaklor	Su	
Sefaleksin	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
Sefalotin	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
Sefamandol	Su	
Sefapirin	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
Sefazolin	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Sefdinir	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
Sefditoren	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
Sefepim	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Sefetamet	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
Sefiksim	Fosfat tamponu, pH 7.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 7.0, 0.1 mol/L
Sefmetazol	Su	
Sefoksitin	Su	
Sefonisid	Su	
Sefoperazon	Su	
Sefotaksim	Su	
Sefotetan	DMSO[e,g]	Su
Sefpodoksim	%0.10 (11.9 mmol/L) sulu sodyum bikarbonat	Su
Sefprozil	Su	
Sefradin	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
Seftarolin	%0.85 serum fizyolojik	%0.85 serum fizyolojik
Seftazidim	Sodyum karbonat[d]	Su
Seftibuten	1/10 hacim DMSO[g]	Su
Seftizoksim	Su	
Seftobiprol	DMSO[g] + Glasiyal asetik asit[e,j]	Su, iyice vorteksleyin
Seftriakson	Su	
Sefuroksim	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Sinoksasin	1/2 hacim su, sonra eriyene kadar 1 mol/L NaOH damlatılır	Su
Siprofloksasin	Su	

Antimikrobik ilaç	Çözücü	Sulandırıcı
Sparfloksasin	Su	
Spektinomisin	Su	
Streptomisin	Su	
Sulbaktam	Su	
Sülfonamidler	1/2 hacim sıcak su ve eritecek en az miktarda 2.5 mol/L NaOH	Su
Sülopenem[k]	**0.01 M fosfat tamponu, pH 7.2, eritmek için çalkala**	**0.01 M fosfat tamponu, pH 7.2**
Tazobaktam	Su	
Telavansin	DMSO[g]	Su
Telitromisin	Glasiyal asetik asit[f]	Su
Tetrasiklin	Su	
Tigesiklin	Su	Su
Tikarsilin	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Tobramisin	Su	
Trimetoprim	Son hacmin %10'u kadar 0.05 mol/L laktik[e] veya hidroklorik[e] asit	Su (ısıtmak gerekebilir)
Trimetoprim (laktat ise)	Su	
Trospektomisin	Su	
Vankomisin	Su	

Tablo 1: Antibiyotiklere göre kullanılacak solvent ve sulandırıcılar

ANTİBİYOTİKLERİN BAKTERİSİDAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Doç. Dr. Bülent Bozdoğan

İnfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerin kullanılmaya başlamasıyla yeni bir çığır açılmış ve geçmiş yüzyıllarda en önemli ölüm nedeni olan infeksiyon hastalıklarını bu sıralamada daha gerilere itmiştir. Tedavide kullanılan antibiyotiklerin bir kısmının etkisi, yalnızca bakterilerin çoğalmasını durdurmakla sınırlı kalmakta, antibiyotik baskısı kalktığında bu etki de ortadan kalkmakta ve bakteriler çoğalmalarına devam etmektedir. Antibiyotiklerin bu etkilerine "bakteriyostatik etki" denir. Makrolid grubu antibiyotikler ve kloramfenikol bu tip etki göstermektedirler. İlk kullanılan antibiyotik olan penisilinin de içinde yer aldığı ß-laktam grubu antibiyotikler ise "bakterisidal" etki gösterirler, yani bakterinin ölümüne neden olurlar. Bakteriyostatik etkili antibiyotikler, immün sistemin de yardımıyla çoğu infeksiyonda başarılı sonuç vermektedir. İmmün sistemi yeterli olmayan hastalarda, immünosüpresif ilaç kullananlarda bakteriostatik etki yeterli olmamakta ve bakterisid etkili antibiyotiklerin kullanımı gerekmektedir. Bu antibiyotiklerin mutlaka kullanılması gereken durumlar; endokardit, menenjit, osteomiyelit gibi infeksiyon hastalıklarıdır. İmmün sistemin infeksiyon alanında yeterince etkili olamadığı bu tip durumlarda bakterisidal etkili antibiyotikler tercih edilmelidir.

Antibiyotiklerin bakteriler üzerinde oluşturdukları etkileri incelemek için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Diğer bölümlerde çoğalmayı baskılayan en düşük antibiyotik yoğunluğunun yani MİK ölçümü veya antibiyotik disklerinin uygulanmasıyla duyarlılık ölçümü anlatılmıştır. Bu bölümde ise bakterisidal etki belirlenmesi için kullanılan yöntemler anlatılacaktır.

YÖNTEMLER

Antibiyotik - bakteri etkileşimini değerlendirmek için oluşturulan yöntemlerde, belirli miktarda bakterinin belirli yoğunluktaki antibiyotikle belirli bir süre teması gerekmektedir. Bu süre sonrasında canlı bakteri sayılması ise bakterisidal etki belirlenmesinde temeldir. Bakterisidal etkiden bahsedebilmek için canlı bakterilerin miktarının %99.9 azalması gerekmektedir. İki farklı yöntem bu etkinin belirlenmesinde kullanılır:

a) **En küçük bakterisidal konsantrasyon (MBC):** Bir gecelik inkübasyondan sonra (18-24 saat) canlı bakterilerin sayımı esasına dayanır. Bu ise, başlangıçtaki bakterilerden belirli bir kısmını öldüren en düşük antibiyotik yoğunluğudur.
b) **Time kill**: Zamana ve antibiyotik yoğunluğuna bağlı olarak, antibiyotiğin bakterisidal etkisini dinamik olarak ortaya koyan bir yöntemdir. Bu yöntemde, bakteri miktarındaki azalma zamana bağlı olarak her bir bakteri yoğunluğu için ayrı verilir. Zamana bağlı azalma için farklı zamanlarda canlı bakteri sayımı yapılır.

Minimal Bactericidal Concentration (MBC) : MİK değerinin belirlenmesinin ardından yapılır. MİK değeri ve üzerindeki konsantrasyonlarda canlı bakteri sayımı yapılır. Bakterisidal etki, başlangıçtaki canlı bakterilerin azalmasını sağlayan en düşük konsantrasyondur. Bu azalma Fransa'da %0.01, İngiltere'de %0.1 olarak değerlendirilir. Başlangıçtaki inokülum 10^5 bakteri (CFU) / ml'dir (100000). Yani Fransızlara göre $<10^1$

CFU / ml (<10), İngilizlere göre <10^2 CFU / ml (<100). Eğer MBC değerinin MİK değerine oranı 1 veya yakınsa bakterisidal etkiden bahsedilebilir. Bu oran, antibiyotik bakterisidal etkili olmasına karşın bazı suşlar için 32 veya daha fazla olabilir. Bu durumda toleranstan bahsedilir. Vankomisine toleranslı *Streptococcus pneumoniae* suşu tanımlanmıştır. MİK değerleri değişmemekle birlikte, streptograminlerin stafilokoklar ve enterokoklar için bakterisidal etkilerinin, bu suşların ribozomu metilleyen bir enzim için kodlanan *erm* genleri içeren suşlarında görülmüştür.

TIME KILL YÖNTEMİ

Besi yeri: Sıvı besi yeri olarak Mueller Hinton Broth kullanılır. Canlı bakteri sayımı için bakteri cinsine göre Triptik Soy Agar veya Kanlı Agar kullanılabilir.

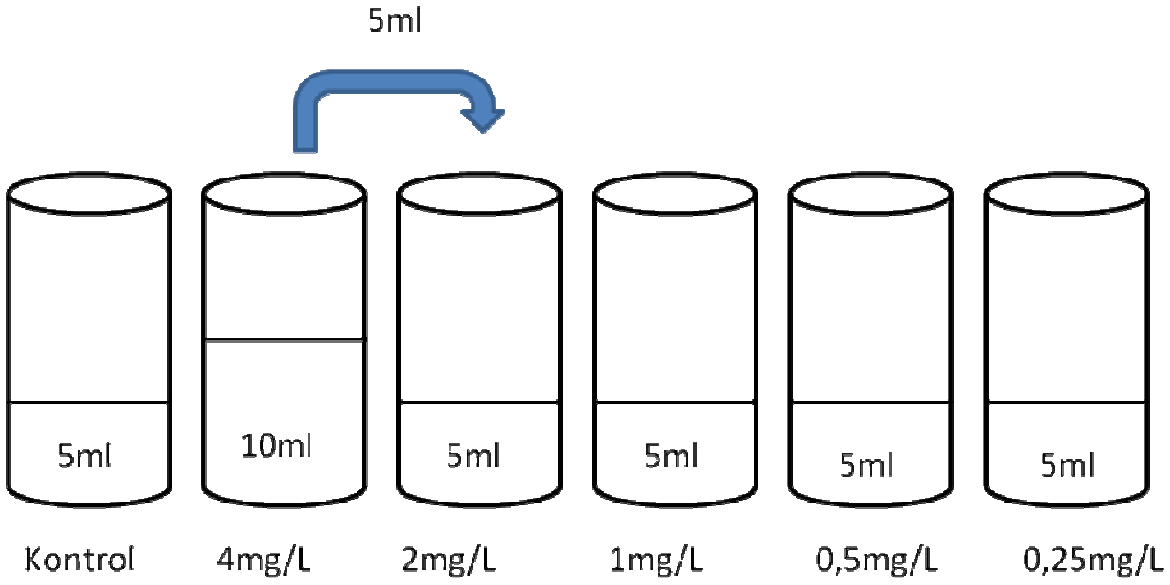
İnokülum: Başlangıçta 10^5 CFU / ml kullanılır.

Gerekli malzemeler:
Hemoliz tüpleri
15 ml'lik tüp
Çalkalamalı ben mari
Etüv
Dilüsyon tüpleri

Hazırlanışı

MİK değerinin 2 alt ve üst konsantrasyonlarında antibiyotik içeren 5 ml MH besiyeri hazırlanır.

Örneğin; eğer test edilecek bakterinin MİK değeri 1mg/L ise 0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mg/L antibiyotik içeren tüpler seri dilüsyonla inokülum eklenmesine hazır hale getirilir (Şekil 1).



Şekil 1. *Time Kill* için antibiyotik dilüsyonlarının hazırlanması. 1/4 MİK, 1/2 MİK, MİK, 2XMİK ve 4XMİK olmak üzere 5 konsantrasyon ve 1 kontrol tüpü hazırlanır.

İlk tüp 4mg/L antibiyotik içerir ve 10ml olarak hazırlanır. En az 3 kez pipetaj yapılarak 5ml bu tüpten alınır ve 5ml MH içeren ikinci tüpe konur. En az 3 kez pipetaj yapılır ve bir sonraki tüpe 5 ml antibiyotik konsantrasyonu 2 mg/L olmuş bu besi yerinden alınır ve bir sonraki tüpe aktarılır. Böylece seri dilüsyonla en son tüpe de bir önceki tüpten alınan 5ml

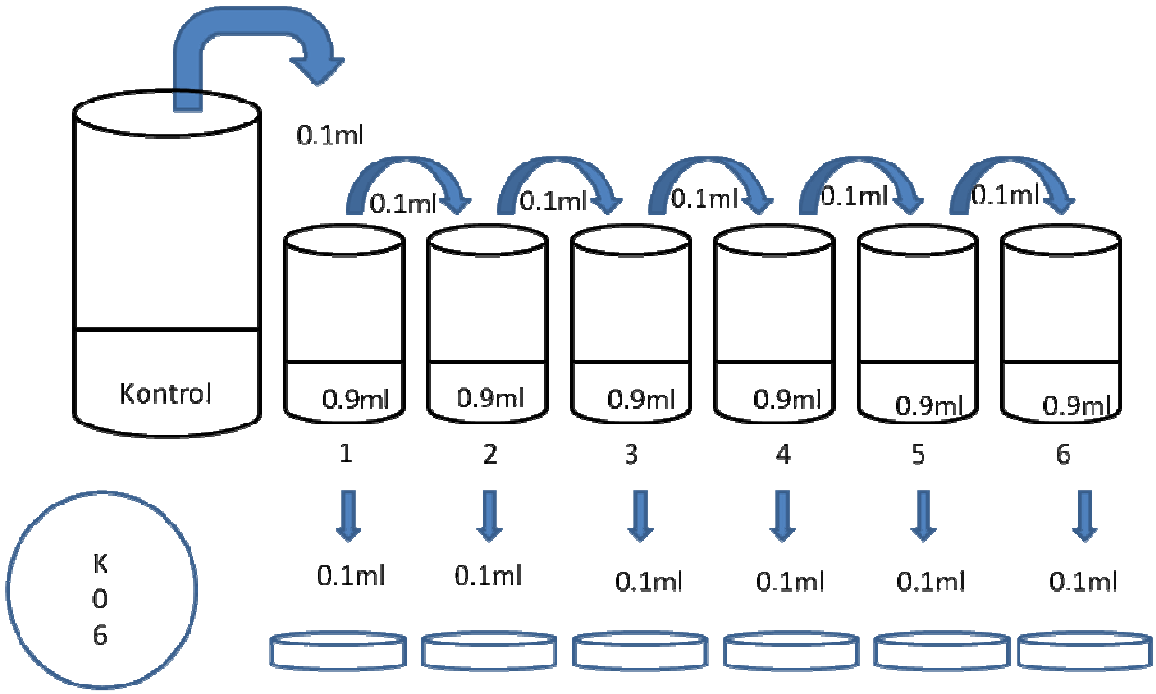
besiyeri aktarıldıktan sonra en az 3 kez pipetajla karıştırılır ve 5 ml alınarak atılır. Böylece seri şekilde dilüe edilmiş antiyotik içeren 5 ml besiyeri içeren 5 tüp elde edilmiş olur.

İnokülum Hazırlanması

Time kill için başlangıçta 10^5 CFU / ml bakteri gerekmektedir. Gecelik besi yeri 10^9 CFU / ml bakteri içerir. Eğer bu kültürden 50 µl alırsak $5X10^7$ CFU almış oluruz. Bunu 5 ml besiyerinde dilüe edersek yaklaşık $5X10^5$ CFU / ml bakteri inoküle etmiş oluruz.

Saat 0'da örnek alınması

Kontrol tüpü ve antibiyotik içeren tüpleri bakteri ile inoküle eder etmez her tüpten 100 µl alınır ve 900 µl su içeren hemoliz tüplerine aktarılır. Aktarılan 1. tüpten 100 µl alınarak yine 900 µl su içeren 2. tüpe aktarılır. En az 3 kez pipetajla karıştırıldıktan sonra 100 µl alınır ve 3. tüpe aktarılır. Her konsantrasyon tüpünden ve kontrol tüpünden 6 dilüsyon hazırlanır. Yani total 0. Saat için 6X6=36 tüp hazırlanır. Hazırlanan her tüpten 100 µl alınarak agar besi yerine yayılır. Agar petrilerinin arkasına hangi antibiyotik dilüsyonundan alındığı petrilerin arkasına hangi konsantrasyondan, kaçıncı saatte alındığı ve hangi dilüsyon olduğu yazılmalıdır.



Şekil 2. İnokülasyon yapılır yapılmaz 0. saat için örnekleme yapılması. Kontrolden 0.1ml alınarak seri dilüsyon yapılmış ve her dilüsyondan 0.1ml işaretlenen petriye aktarılarak yayılmış. Örnekte kontrol (K) tüpünden 0. Saatte (0) alınmış 6. dilüsyon (6) ekiminin petrisinin yazımı gösterilmiş.

İnokülasyon sonrası 3. saatte örnek alınması

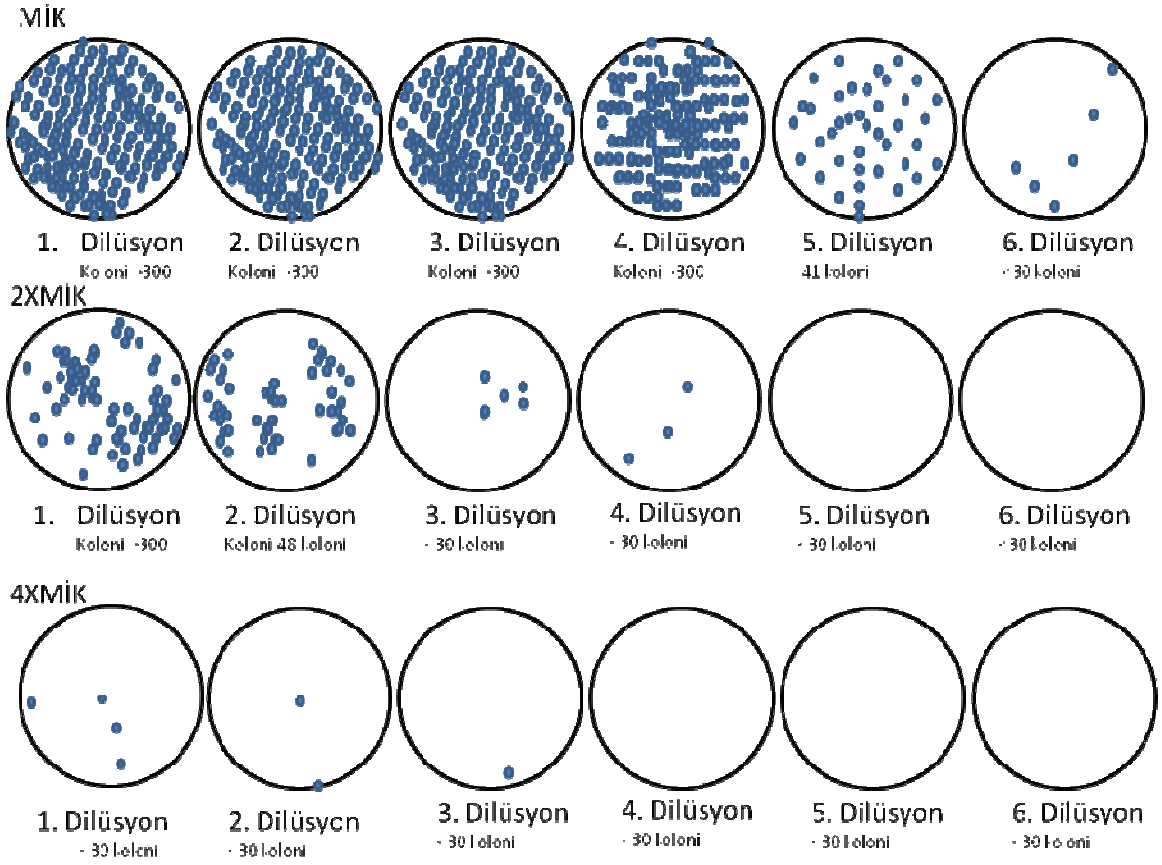
İnokülasyon saatinden 3 saat geçtikten sonra, 0. saatte yapıldığı gibi her konsantrasyondan 0.1ml örnek alınarak 6 seri dilüsyon hazırlanır ve her bir dilüsyon TS agar içeren besi yerine yayılarak ekilir. Petrilerin yazılmasının önceden yapılması daha uygun olur.

Diğer saatlerde örnek alınması
Laboratuvara göre değişmekle birlikte en uygun yöntem 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde örnekleme yapılmasıdır. 12. saat geceye kalacağı için bazı laboratuvarlarda 0, 2, 4, 6 ve 24. saatlerde örnekleme yapılması tercih edilmektedir.

Koloni sayımı
Çalışılan saatlerde her konsantrasyon için 6 petriye dilüsyonlarla ekim yapılmıştır. Bu petrilerden her biri için sayım yapmaya gerek yoktur. Hangi dilüsyonda 30-300 arası koloni oluşmuşsa o petrideki koloniler sayılır. Petrinin iki veya dörde bölünerek yalnızca bir alanda sayım yapılıp, bölünen alan sayısıyla çarpılması suretiyle toplam koloni sayısının elde edilmesi uygun bir yöntem değildir. Sayım gözle, kalemle veya otomatik sayıcılarla yapılabilir.

Koloni sayısının hesaplanması
Ekim yapılırken dilüsyon yapıldığı için koloni sayımında da bu göz önüne alınmalıdır. Örneğin; eğer 3. dilüsyonda 112 koloni saydıysak antibiyotikli besiyerinde mililitreye düşen canlı bakteri sayısını CFU / ml cinsinden nasıl hesaplarız?
112 koloni demek $1,12 X 10^2$ koloni denektir.
3. dilüsyon olduğu için 10^3 eklenir.
Besiyerinden 0.1ml örnek aldığımız için ml'deki konsantrasyonu hesaplamak için 10^1 daha eklenir.
3. dilüsyonda 112 koloni sayılan antibiyotikli besi yerindeki total koloni sayısı $1,12 X 10^{2+3+1}$ yani $1,12 X 10^6$ olur.

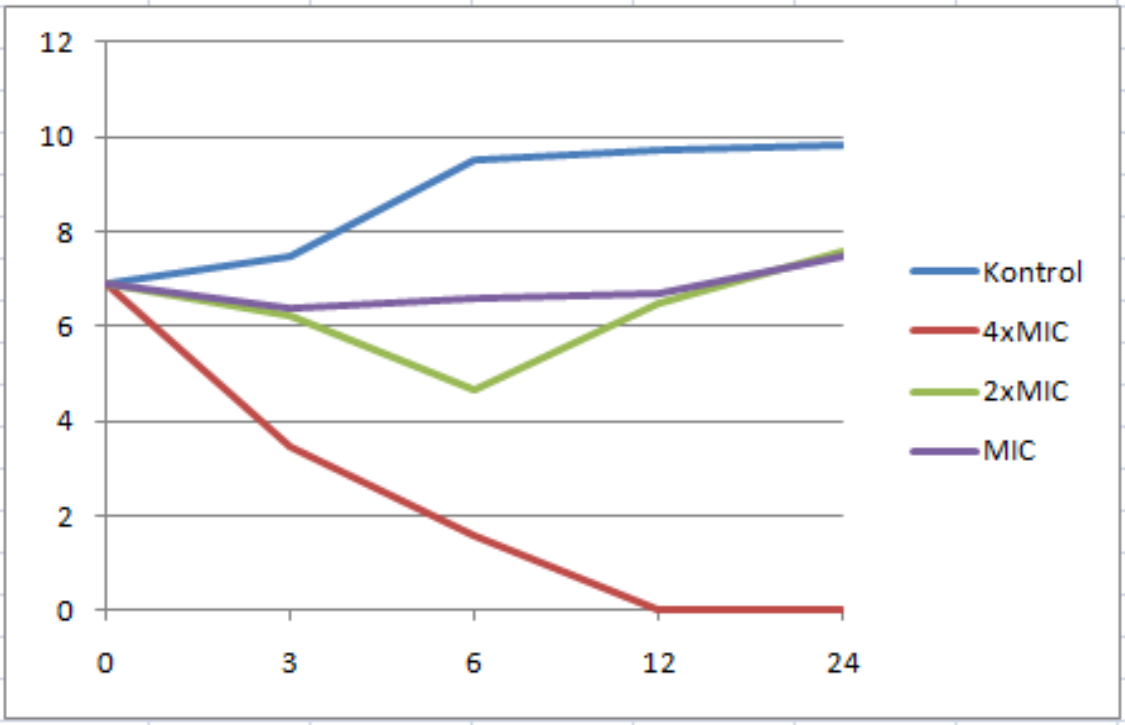
Şekil 3'de verilen örnekte koloni sayımı
MİK konsantrasyonu için 5. Dilüsyon sayım için kullanılacaktır. Diğer petrilerde koloni sayısı 30-300 koloni sınırında olmadığı için bu petriler sayım için kullanılmaz. Bu dilüsyondaki sayıma göre MİK konsantrasyonunda $4,1X10^{1+1+5}$ koloni yani $4,1X10^7$ koloni vardır.
2XMİK konsantrasyonunda ise 2. dilüsyon koloni sayımının yapılması gereken petridir. Bu petride 48 koloni olduğu için total 2 MİK konsantrasyonundaki bakteri miktarı $4,8X10^{1+2+1}$ yani $4,8X10^4$ olarak hesaplanır.
4XMİK konsantrasyonunda da dilüsyonlarda sayılabilir petri yoktur. Sayım için dilüsyonsuz ekime başvurulabilir. Veya $4X10^1$ olarak değerlendirilebilir. Eğer başlangıç konsantrasyonu 10^6 ise 3 log'dan fazla azalma vardır (6.9-1,6=5,3 log) ve bu konsantrasyonda antibiyotik bakterisidal etkilidir.



Şekil 3. Time kill testinde hücre sayımı. MİK. 2MİK ve 4MİK konsantrasyonlarında ekilen petrilerde koloni sayımı şematik olarak gösterilmiştir.

Log(10) cinsinden değerlerin hesaplanması

Örneğimizde MİK konsantrasyonu için $4{,}1X10^6$ koloni hesaplamıştık. Bu değeri grafik olarak ifade etmek için Log(10) değerlerini hesaplanması gerekmektedir. Bunu logaritma hesaplayan bir hesap makinesinde yapabiliriz. Şekil 3'de verilen örnekte 3. saatteki MİK, 2MİK ve 4MİK değerleri logaritmik değerlere dönüştürdüğümüzde elde ettiğimiz sonuçlar Şekil 4'deki grafikte kullanılmıştır; $4{,}1X10^6$ için log değeri 6,61, $4{,}8X10^4$ için 4,68 ve $4X10^1$ değeri için 1,6 değerleri bulunmuştur. Bu değerleri Excel sayfasına yerleştirdiğimizde ve zaman-konsantrasyon ilişkisi ile grafik çizdirdiğimizde *time kill* grafiği elde etmiş oluruz.



	Kontrol	4xMIC	2xMIC	MIC
0	6,9	6,9	6,9	6,9
3	7,5	3,47	6,2	6,4
6	9,5	1,6	4,68	6,61
12	9,7	0	6,47	6,69
24	9,8	0	7,6	7,47

Şekil 4. Şekil 3'de verilen değerlerin sarı ile işaretlenmiş 6. saat verileri olduğu bu şekilde, time kill sonuçları verilmiştir. Sonuçlara göre test edilen antibiyotik 6. saatten 4X konsantrasyonunda bakterisidal etkilidir.

PROTOKOL

Hazırlık

Test edilecek bakteri için test edilecek antibiyotiğin MİK değerinin bilinmesi gerekir. Bu amaçla kitabın makrodilüsyon bölümünde yazıldığı gibi MİK tayini yapılır. Hemoliz tüpleri ağızları pamukla kapalı halde pastör fırınında steril edilir. Bir antibiyotiğin 1 suş üzerine bakterisidal etkisini ölçmek için 1 kontrol ve 5 antibiyotik konsantrasyonu olmak üzere 6 kültür / her kültür için 6 dilüsyon / 0, 3, 6, 12 ve 24 olmak üzere toplam 5 zamanda ölçüleceği için 6 X 5 X 5 = 150 hemoliz tüpü / 150 agar pleyt gerekmektedir. Hemoliz tüplerine 0.9 ml steril distile su veya MH broth eklenir.

Bir önceki akşamdan 5ml MH broth'a test edilecek bakteri antibiyotik eklenmeden ekilir.

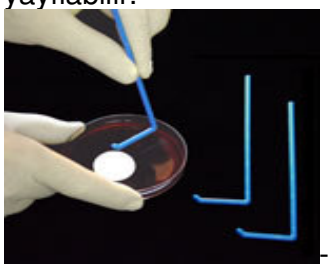
1. Gün

Eğer vankomisin MİK değeri 2 olan *S. aureus* suşu ile çalışıyorsak;

-1/4MİK, 1/2 MİK, MİK, 2MİK ve 4 MİK konsantrasyonlarında bakteri kültürü hazırlamak gerekir. Eğer test edilecek suşun MİK değeri 2 µg/ml ise 4X MİK değeri 8µg/ml olacaktır. 10 ml MH broth bulunan besi yerinde 8µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 80µg vankomisin eklemek gerekir. Eğer 2 mg / ml vankomisin içeren antibiyotik solüsyonumuz varsa içeren her µl'de 2 µg vankomisin içereceğinden 40 µl stok solüsyonunu 10 ml besi yerine eklenir. Eklemeden önce 10 ml'den 40 µl besi yerini alınması gerekir ki hacim değişikliği konsantrasyonu etkilemesin. Pipetleme yoluyla karıştırdıktan sonra 5 ml alıp 5 ml MH broth bulunan tüpe aktarılır ve karıştırılır. Böylece 2. tüpteki antibiyotik konsantrasyonu yarıya yani 4 µg / ml'ye düşmüş olur bu da 2X konsantrasyonudur. Sırayla 3., 4. ve 5. tüplere de seri dilüsyon yapılır ve 2, 1 ve 0.5 µg / ml'lik MİK, 1/2MİK ve 1/4MİK konsantrasyonları elde edilmiş olur. Son tüp dilüsyonunda karıştırdıktan sonra 5 ml alınarak atılır böylece tüm tüplerde 5 ml kalmış olur. Çoğalma kontrolü için 1 tüp de antibiyotiksiz hazırlanır.
-Hazırlanan 6 adet 5 ml besi yeri içeren tüplere 50 µl, gecelik kültürden eklenir ve karıştırılır.
-Bakteri çoğalmaya başlamadan örnek alınması gerekir. Her bir konsantrasyondan ve kontrol kültürden 100 µl alınıp 900 µl distile su bulunan hemoliz tüpüne eklenir. Kültürler 37ºC'da çalkalamalı ben mari içinde inkübe edilir.
-Kültürden 100 µl eklenmiş 1. dilüsyon tüpünden 100 µl alınır ikinci dilüsyon tüpüne eklenir karıştırılır ve 100 µl 3. dilüsyon tüpüne eklenir ve sırayla 4., 5. ve 6. dilüsyon tüplerinde seri dilüsyona tabi tutulur.

Ekim

Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra mümkün olduğunca çabuk ekim yapılması gerekir. Her dilüsyonda 100 µl alınarak TS veya kanlı agara ekilir. Petrinin her alanına yayılacak şekilde ekilir. L haline geririlmiş Pastör pipeti veya plastik L bageti bakterileri yaymak için kullanılabilir. Eğer en küçük dilüsyondan yaymaya başlanırsa aynı pastör pipeti ile yayılabilir.



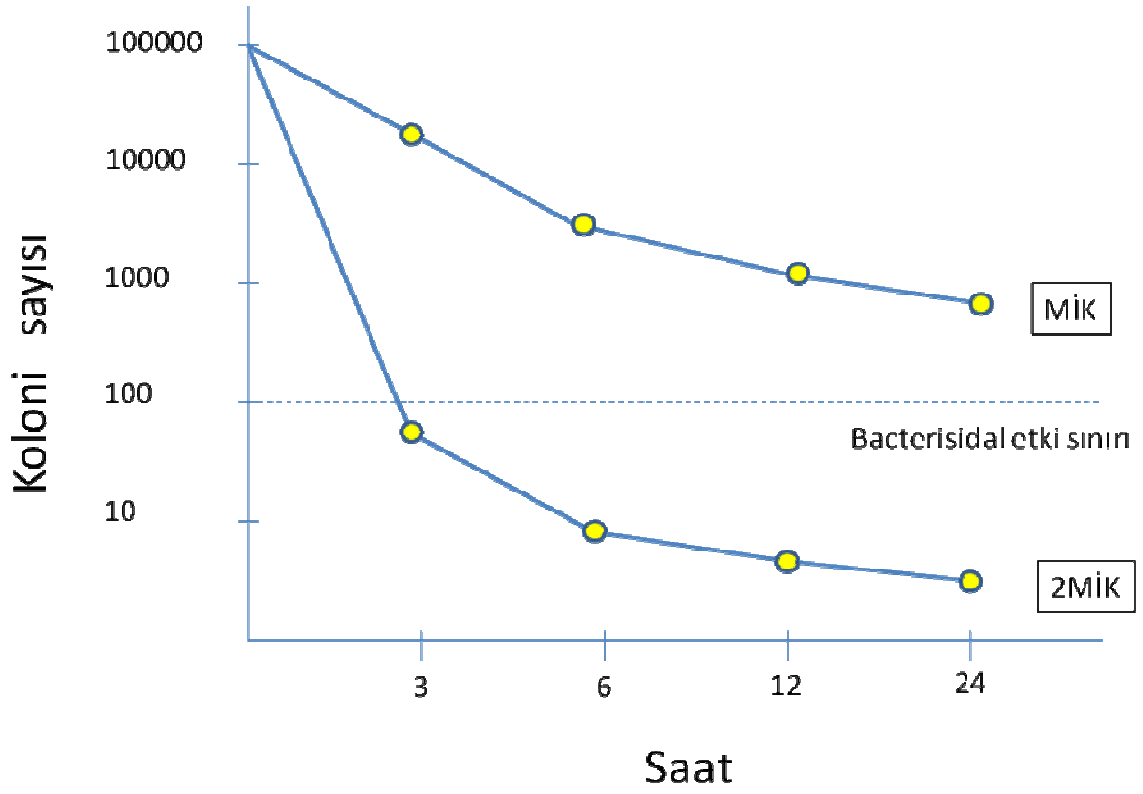
-

İnkübasyon.

İnkübasyon sıcaklığı ve ortamı test edilen bakteriye göre değişir. Eğer *S. aureus* için test yapılıyorsa 37ºC ve normal havada inkübasyon yapmak gerekir. İnkübasyon süresi 18-24 saattir.
-Ekim ve örnekleme işlemleri 3., 6., 12. ve 24. saatte tekrarlanır

Sonuç.

Bakterisidal etki zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak time kill testi ile gösterilir. Eğer 3 log azalma varsa bakterisidal etkiden bahsedilir. Şekil 5'de 100000 yani $11X10^5$ koloni ile MİK ve 2MİK konsantrasyonlarında antibiyotikli besi yerinde inkübe edilen bakterilerde MİK konsantrasyonunda koloni sayısı $10X10^5$ den $10X10^3$ düzeyine kadar inmiş yani bakterisidal etki 24 saat boyunca gözlenmemiştir. 2 MİK konsantrasyonunda ise 3. saatte koloni sayısı $10X10^2$ 'nin altına inmiş ve 24 saat boyunca bu düzeyin altında kalmıştır. 3 log'luk azalma <10X10 CFU olduğundan "2MİK konsantrasyonda test edilen antibiyotik 3. saatten itibaren bakterisidal etki gösteriyor" denebilir.



Şekil 5. Bakterisidal etki. Test edilen antibiyotik 2MİK konsantrasyonunda 3. saatten itibaren bakterisidal etkilidir.

Kaynakça

Antibiogramme. 2006. Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Edition ESKA Paris

L'Antibiogramme 1985. Courvalin P, Goldstain F, Philippon A, Sirot J. Edition MPC Brüksel.

Bactericidie: Aspects Theorique et Therapeutiques. 1990. Courvalin P, Drugeon H, Flandrois JP, Goldstein F. Edisyon Maloine. Paris

ANTİBİYOTİK İNAKTİVASYONUNA BAĞLI DİRENCİN FENOTİPİK TESPİTİ

Doç. Dr. Bülent Bozdoğan

Antibiyotik direncine neden olan mekanizmaların başlıcaları; hedefte değişiklik olması, antibiyotiklerin hücreye alınmaması veya hücreden atılması ve antibiyotiklerin enzimlerle etkisiz metabolitlerine dönüştürülmesi olarak sayılabilir. İnaktivasyona bağlı direnç pek çok antibiyotik grubunu etkiler. Bunlar arasında ß-laktamazlarla etkisizleşen ß-laktam grubu antibiyotikler, asetiltransferaz, nükleotidiltransferaz veya fosfotransferazlarla etkisizleşen aminoglikozid grubu antibiyotikler, nükleotidiltransferazla etkisizleşen linkozamidler veya asetiltransferazla etkisizleşen kloramfenikol sayılabilir. Antibiyotikleri etkisiz metabolitlerine dönüştüren enzimlerin tespiti için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında Gots testi ve sefinaz testi sayılabilir.

Gots' testi

Penisilinaz etkisini göstermek için Joseph S. Gots tarafından bulunan bir yöntemdir. Temel prensibi, antibiyotik varlığında çoğalmayan bir bakterinin bu antibiyotiği inaktive eden bir bakteri varlığında çoğalabilmesidir. Ortamdaki antibiyotik, inaktive edici enzim taşıyan bakteri tarafından etkisizleştirildiğinde indikatör bakteri çoğalabilir hale gelir.

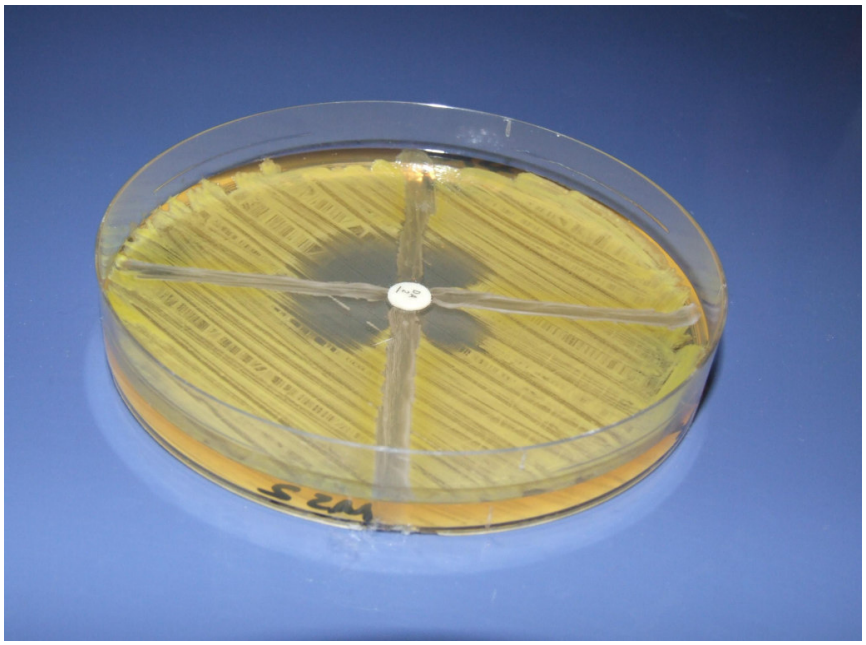
Çember ekimle Gots' testi

Örnek: İnaktivasyon yoluyla linkomisine dirençli S. aureus suşunda enzim varlığının tespiti. İndikatör bakteri Micrococcus luteus ATC9341.

- Sıcaklığı 60ºC a gelmiş otoklavlanan 19ml beyin kalp infüzyon (BHI) agar içine 1µg/ml linkomisin (veya klindamisin) içerecek şekilde antibiyotik ve gecelik Micrococcus luteus sıvı kültüründen 1ml eklenir ve karıştırılarak petri içine dökülür.
-Besiyeri soğuduktan ve katılaştıktan sonra, petri etüvde 15 dakika kurutulur.
- Enzim varlığı test edilmek istenen bakteriden öze ile birkaç koloni alınır ve hazırlanan petri üzerinde yaklaşık 2 cm çapında çember şeklinde ekim yapılır.
-Pozitif kontrol olarak linkomisini inaktive ettiği bilinen bir suş, negatif kontrol olarak da linkomisine hassas bir suş ile çember ekimi yapılır.
-1 gece 37ºC da inkübe edildikten sonra oda oda sıcaklığında 1 gece daha inkübe edilir.
-48 saat sonra çember içinde mikrokok gelişip gelişmediğine bakılır.

Modifiye Gots' testi

1945 yılında Gots tarafından bulunan yöntem Lee ve Komarmy tarafından modifiye edilmiştir. Antibiyotikli agar dökmek yerine disk difüzyon testinde kullanılan antibiyotik disklerinin kullanımı önerilmiştir.



ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Sept. 1976, p. 564-566
Vol. 10, No. 3
Copyright © 1976 American Society for Microbiology
Printed in U.S.A.

NOTES

New Method for Detecting In Vitro Inactivation of Penicillins by *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*

WIE-SHING LEE* AND LOUIS KOMARMY
Microbiology Laboratory, Children's Hospital, San Francisco, California 94119

Received for publication 17 February 1976

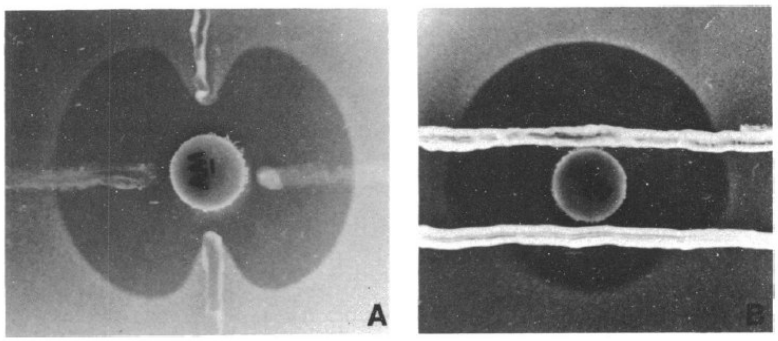


FIG. 1. *Patterns of the streak method illustrate the different effects of ampicillin-resistant and -susceptible H. influenzae isolates on inhibition zones. (A) Cross-streak pattern. The resistant isolate (upper-lower streak) caused distortion at the spherical inhibition zone, and the susceptible isolate (left-right streak) showed no effect on the zone. (B) Parallel streak pattern. The inhibition zone on the side of a resistant isolate (lower) was much smaller than the zone near the susceptible isolate (upper).*

Yöntem.
-Test edilecek bakterinin çoğalmasına uygun besi yerine *M. luteus* ekimi yapılır, 10^5-10^6 yoğunlukta bakteri kullanılır.
-Ekim eküvyon çubuğu aracılığıyla yapılabilir
Veya 10 ml distile su içinde homojen hale getirilen *M. luteus* ekim yapılacak besi yerine boşaltılır ve çevirerek karıştırıldıktan sonra sıvı atılır. 45º eğik tutulan petride kalan sıvı pipet yardımıyla alınır
-*M. luteus* ekildikten sonra petri etüvde kurutulur.
-Petrinin ortasına test edilecek antibiyotik diski konur
-Test edilecek bakteriden birkaç koloni öze ile alınır ve petri kenarından antibiyotik diskine doğru çizgi ekim yapılır.
-Diskin dört tarafından ekim yapılabilir ve pozitif ve negatif kontrol dışında 2 bakteri test edilebilir.
-24 saat 37ºC da inkübasyondan sonra oda sıcaklığında bekletilir.
-Ekimden 48 saat sonra test edilen bakteri çevresinde inhibisyon zonunda *M. luteus* çoğalıyorsa test pozitif olarak kabul edilir.

Şekil. 2. Klindamisine inaktivasyonla dirençli S. aureus suşlarının modifiye Gots testiyle belirlenmesi.

Kaynakça
L'Antibiogramme 1985. Courvalin P, Goldstain F, Philippon A, Sirot J. Edition MPC Brüksel.
Lee WS, Kommary L. 1976. New method for detecting in vitro inactivation of penicillins by Haemophilus influenzae and Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. **10**:664-656