

MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI FÖYÜ

KONU: Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotiklerin mikroorganizmalara etkileri çeşitli yönlerden incelenmektedir. Bunlardan başlıcaları şunlardır:

- 1- Antimikrobiklerin mikroorganizmalar üzerindeki etkinliklerinin ölçülmesi
- 2- Vücut sıvılarındaki antimikrobik etkinliğinin ölçülmesi
- 3- Sağaltım sırasında vücut sıvılarındaki antimikrobik maddenin hastalık etkeni üzerindeki etkinliğinin saptanarak dozunun ayarlanması
- 4- Mikroorganizmaların antimikrobiklere karşı oluşmuş dirençliliğinin saptanması

Dilüsyon (sulandırım) yöntemlerinde kural; sıvı ya da katı besiyerleri içinde antimikrobiklerin belirli sulandırımları yapılarak mikroorganizmalarla karşılaştırılmasıdır. Antimikrobik maddenin hangi sulandırmaya kadar mikroorganizma üzerinde etkili olduğu **MIC (Minimal inhibitör konsantrasyon)**, **MCC (Minimal sidal konsantrasyon)** ya da **MBC (Minimal bakterisidal konsantrasyon)** yöntemleri ile saptanabilmektedir.

Sıvı besiyerlerinde mikroorganizmalarla antimikrobikler doğrudan ilişkide bulunduklarından sonuçlar daha duyarlı olarak bulunmaktadır. Gerek antimikrobiklerin etkinliklerinin araştırılmasında, gerekse mikroorganizmaların dirençlilik durumlarının araştırılmasındaki çalışmalarda kalite kontrolü yapmak için pozitif kontrol olarak antimikrobiklere karşı dirençlilik durumları bilinen standart mikroorganizmalardan yararlanmak gerekmektedir.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılıkları çeşitli yöntemlerle saptanır:

- 1- **Disk difüzyon yöntemi:** Katı besiyerinde yayılım (Difüzyon) (Kalitatif) (Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi)
- 2- **Katı besiyerinde sulandırma (Dilüsyon) (Kantitatif)**

- 3- **Sıvı besiyerinde sulandırma** (Kantitatif) MİK (Minimal inhibitor Konsantrasyon) tayini. Mikrodilüsyon ve makrodilüsyon olmak üzere iki şekilde yapılabilir.
- 4- **Gradient test (E test)** (Kantitatif)

Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

Besiyeri: Mueller Hinton Agar

Ticari olarak hazır elde edilebilir veya laboratuvarlarda hazırlanabilir. Besiyeri düz tabanlı 90 mm iç çaplı petri kutularına 4 mm kalınlıkta dökülür. Hemen kullanılacak besiyerleri katılaştıktan sonra yüzeylerinin kuruması için kapakları üstte ve hafif aralık olarak 35-37°C de 30 dakika tutulurlar.

Hemen kullanılmayacak besiyerleri ise nem kaybının önlenmesi için plastik torbalara doldurulup torbaların ağzı yapıştırıldıktan sonra buz dolabında bekletilirler. Bu şekilde + 4 ile + 10°C'de 2 hafta süre ile bozulmadan saklanabilirler.

Bakteri yoğunluğunun standardizasyonu: Antimikrobiklere karşı duyarlılığı ölçülecek olan mikroorganizmanın besiyerine standart miktarda ekilmesi gerekir. Bunun için 0,5 Mc Farland bulanıklık standardı kullanılır. (Yaklaşık 10^8 Kob/ml bakteri yoğunluğuna karşılık gelir.)

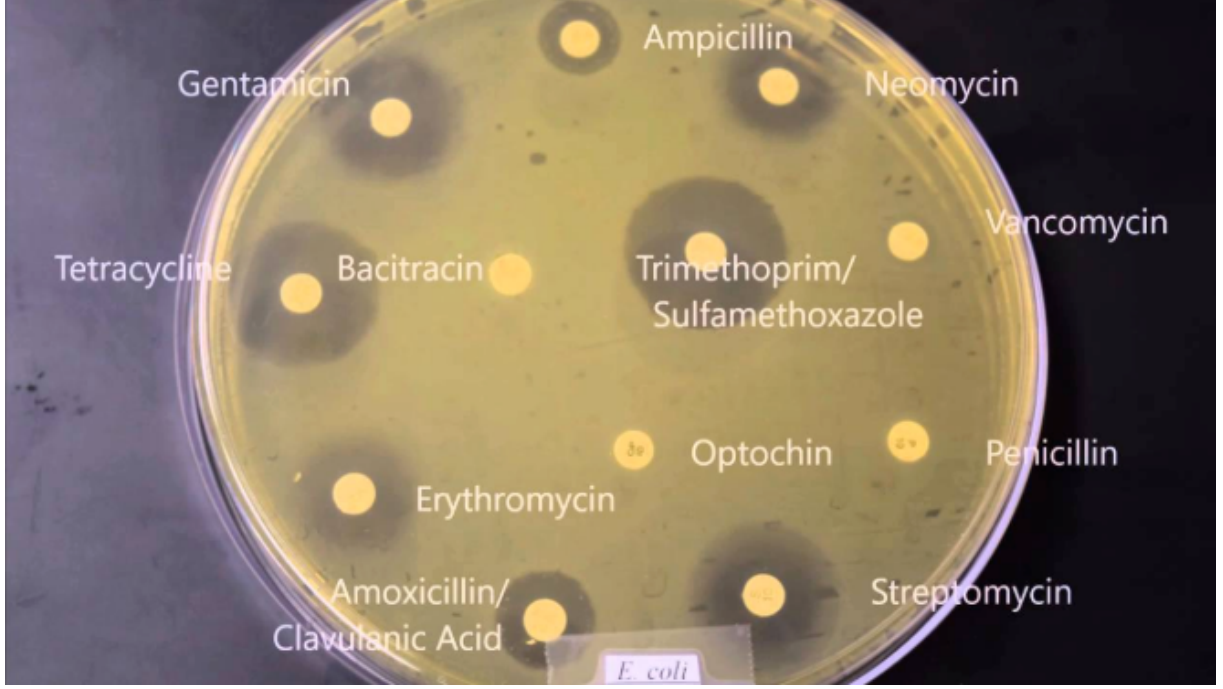


Şekil 1. McFarland Densitometre cihazı (spektrofotometre) ile Mc Farland standartının okutulması

1. Duyarlılığı araştırılacak saf bakteri kültüründen 5-6 koloni seçilerek sıvı besiyerine aktarılır, 37°C'de inkübe edilerek, sıvı kültür elde edilir.
2. İkinci bir yöntem saf üremiş kolonilerden seçilerek Müeller Hinton Broth besiyerinde 0.5 Mc Farland bulanıklık standardına göre süspansiyon hazırlanır.
3. Bir pamuklu eküvyon alınıp kültüre daldırılır. Eküvyon besiyerinin yüzeyine çevrile çevrile sürülerek tüm yüzeye yaygın, homojen ekim yapılır.
4. Antimikrobik disklerinin seçilmesi: Tedavide kullanılan birçok antibiyotik vardır. Bunların bir kısmı mikroorganizmaların üzerinde aynı ya da benzer etki mekanizması ile etki ederler. Bir kısmına ise bazı mikroorganizmalar doğal direnç gösterir. Bunun için hastalık materyaline ve ayrımı yapılan mikroorganizmaya göre gerekli görülen disklerin seçilerek kullanılmaları gerekir.
5. Disklerin yerleştirilmesi: Besiyerinin yüzeyi kuruduktan sonra diskler belli bir plan dahilinde, ince uçlu bir penset ile tutulup besiyeri yüzeyine bırakılarak üzerlerine hafifçe bastırılıp yapışmaları sağlanır. Her defasında pensetin ucu alkole sokulup alevde yakılır.
6. Diskler besiyeri kenarından yaklaşık 15 mm ve birbirinden 25-30 mm uzaklıkta dizilirler. Bu şekilde 90 mm lik bir petri kutusuna 6-7 si kenarda, biri ortada olmak üzere 7-8 disk yerleştirilebilir.
7. Disklerin dizilmesinden itibaren en çok 15 dakika içinde besiyerleri 35°C'lik etüvde üremeye bırakılır. Bir gecelik inkübasyondan sonra disklerin etraflarında oluşan üremenin olmadığı önlenim zonlarının çapları mm olarak ölçülerek not edilir. Ölçüm göz ile görülen üremenin olmadığı önleme zonunun çapı alınarak yapılır.
8. **Sonuçların değerlendirilmesi:** Milimetre olarak yapılan zon ölçümleri çizelgedeki sınırlar çerçevesi içerisinde incelenerek "dirençli, duyarlı ve orta derecede duyarlı" olarak değerlendirilir.

Burada **dirençli sonucu**, o mikroorganizmanın, söz konusu antibiyotiğin sağaltımda kullanılan dozları ile elde edilen kan ve doku konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğu anlamındadır.

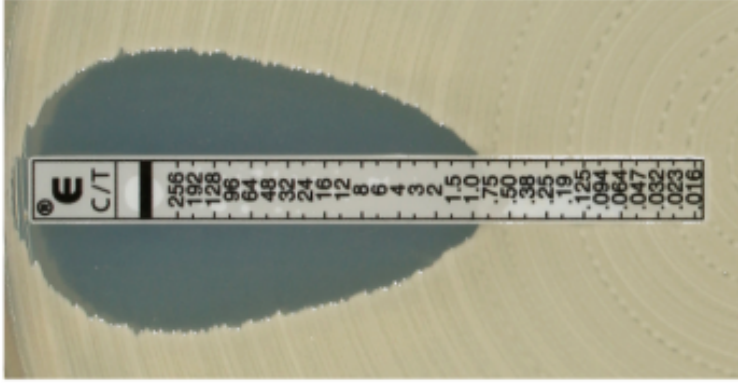
Duyarlı sonucu, mikroorganizmanın antibiyotiğin aynı konsantrasyonlarına karşı duyarlı olduğunu gösterir.
Orta derecede duyarlı sonucu ise kullanılan antibiyotiğin daha yüksek dozlarda verilmesi halinde sonuç alınabileceği anlamındadır.



Şekil II. Kirby-Bauer disk difüzyon testi

Gradient Test: Süspansiyon disk difüzyon testinde anlatılan şekilde hazırlanır. Müeller Hinton Agar besiyerine yayma ekim yapıldıktan sonra ticari olarak satılan ve üzerinde antimikrobiyallerin çeşitli konsantrasyonlarını barındıran gradient test stripleri besiyeri üzerine uygulanır, inkübasyona bırakılır.

İnkübasyonun ardından E test stripleri ile üremenin inhibe olduğu kesişme noktaları minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerini verir.

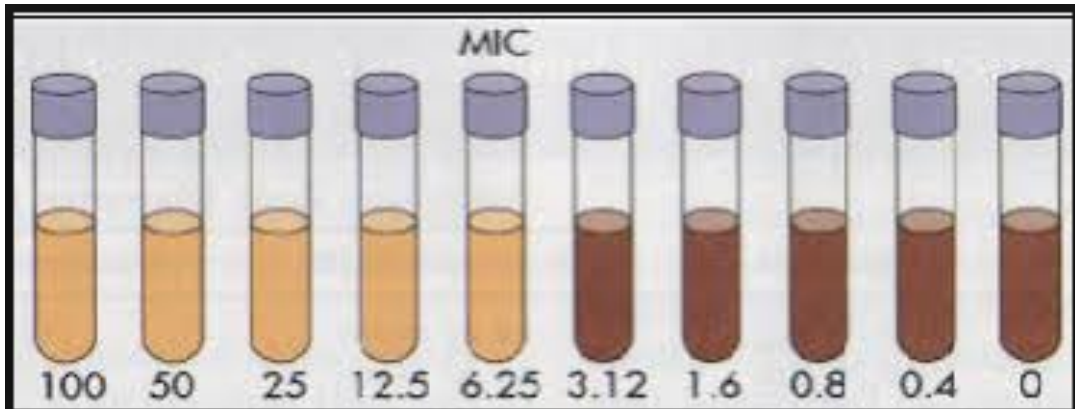


Şekil III. Gradient test (E test)

Tüp Dilüsyon Yöntemi:

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 yönteminde besiyeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton buyyon kullanılır.

Test edilecek olan antibiyotikler önce özel çözücülerinde hazırlanır ve takiben bu sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırılmaları yapılır. Mikroorganizmanın standart bir inokulumu (1×10^6 kob/ 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 de 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.



Şekil IV. Tüp Dilüsyon Yöntemi

Antibiyogram sonuçlarının yorumlanması uluslararası standartlar kullanılarak yapılır.
(EUCAST,CLSI gibi)

Örneğin;

Staphylococcus aureus'ta Vankomisin ve Teikoplanin antibiyotiklerin MİK
Değerlerine Göre EUCAST Klinik Sınır Değerleri

	Duyarlı	Dirençli
Vankomisin	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$	$> 2\mu\text{g/ml}$
Teikoplanin	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$	$> 2\mu\text{g/ml}$