

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

LABORATUVAR HİZMETLERİ

ANTİMİKROBİYAL MADDE TESTLERİ

Ankara, 2015

- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
- Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
- PARA İLE SATILMAZ.

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR	ii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. DİSK DİFÜZYON (ANTİBİYOGRAM) TESTİ	3
1.1. Amaç ve Prensip	4
1.2. Antibiyotik Etken Maddeleri	4
1.3. Yapılışı	7
1.4. Dikkat Edilecek Hususlar	12
UYGULAMA FAALİYETİ	15
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	17
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	18
2. TÜP DİLÜSYON (ETKİNLİK) TESTİ	18
2.1. Amaç ve Prensip	18
2.2. Yapılışı	18
UYGULAMA FAALİYETİ	21
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	22
MODÜL DEĞERLENDİRME	23
CEVAP ANAHTARLARI	25
KAYNAKÇA	26

AÇIKLAMALAR

ALAN	Laboratuvar Hizmetleri
DAL	Gıda, Tarım ve Hayvan Sağlığı Laboratuvarı
MODÜLÜN ADI	Antimikrobiyal Madde Testleri
MODÜLÜN SÜRESİ	40/20
MODÜLÜN AMACI	Bireye / öğrenciye tekniğine uygun olarak antimikrobiyal maddelerle ilgili disk difüzyon (antibiyogram) ve tüp dilüsyon (etkinlik) testleri yapma işlemlerine yönelik bilgi ve becerileri kazandırmaktır.
MODÜLÜN ÖĞRENME KAZANIMLARI	<ol style="list-style-type: none">1. Tekniğine uygun olarak disk difüzyon (antibiyogram) testi testi yapabileceksiniz.2. Tekniğine uygun olarak tüp dilüsyon (etkinlik) testi yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam: Laboratuvar ortamı Donanım: MHA sentetik besiyeri, sıvı kültür, antibiyotik diskler, cetvel/kumpas, bakteriyolojik etüv, antibiyotik veya dezenfektan maddesi, deney tüpü, petri kutusu, besiyeri, kültür örneği
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendireceksiniz.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Gerek insan gerekse hayvan yaşamında antibiyotikler, geçmişten, şu ana kadar önemini korumuştur. Alınan tüm hijyenik tedbirler, temizlik, dezenfeksiyon bazen yetersiz kalmaktadır. İnsan hareketleri, ekipmanlar, altlık, yem, su, hava, kuşlar, böcek, sinek ve yabani hayvanlar bu hastalık yapan etkenlerin çiftliklerde kümeden kümise, çiftlikten çiftliğe yayılmasına neden olmaktadır.

Antibiyotikler, tedavide en sık kullanılan ve kullanılmasında en çok hata yapılan bir ilaç grubudur. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç ve tedaviye yeni antibiyotiklerin girmesi gibi nedenlerle de bilgilerin devamlı yenilenmesi zorunludur. Doğru uygulanan ve yorumu doğru yapılan antibiyogram sonuçları klinikte antibiyotik tedavisinin akılcı olarak planlanmasına ışık tutacaktır.

Bu modülde edindiğiniz bilgilerle antibiyotik duyarlılık testlerini tekniğine uygun yaparak mikroorganizmalara etkili (duyarlı) antibiyotikleri tespit edecek ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinin doğru ve etkin şekilde yapılmasına katkı sağlayacaksınız.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

ÖĞRENME KAZANIMI

Bu öğrenme faaliyetinde verilen bilgi ve becerilerle, tekniğine uygun olarak disk difüzyon (antibiyogram) testi yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Antibiyotikler hakkında bilgi ediniz.
- Antibiyotik duyarlılık testleri ile ilgili araştırma yapınız.
- Mikrobiyoloji laboratuvarına giderek antibiyogram test aşamalarını izleyiniz.
- Konu ile ilgili çalışmalarınızı rapor hâline getirerek sınıfta arkadaşlarınızla paylaşınız.

1. DİSK DİFÜZYON (ANTİBİYOGRAF) TESTİ

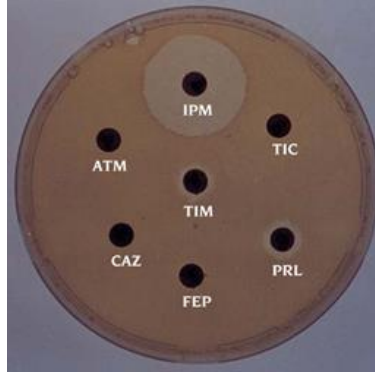
Genellikle bazı bakteri ve mantar gibi canlı mikroorganizmalar tarafından üreme ortamlarında sentezlenen; birçok mikroorganizmanın üremesini durdurucu ve öldürücü etki gösteren ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddelere antibiyotik denir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin canlılar üzerinde olumsuz etkilerine de rastlanabilmektedir.

Genel olarak kimyasal yapıları belli veya yapay olarak elde edilen maddelere, kemoterapötik; doğal kaynaklı olanlara ise antibiyotik denilmektedir. Fakat günümüzde antibiyotiklerin çoğunun sentetik ya da semisentetik (kimyasal modifiye edilmiş doğal antibiyotiklerdir) yöntemlerle elde edilmesi mümkün olduğundan, antibiyotik deyimi tedavide kullanılan kemoterapötik ve antibiyotik niteliğindeki maddeler için genel bir ad olarak kullanılmaktadır.

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılacak olan antibiyotiklerin, etkene yönelik seçilmesinde duyarlılık testlerine ihtiyaç vardır. Antimikrobik ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntemle saptanabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan testlerle genellikle ilaçların inhibitör (bakteriyostatik) aktivitesi değerlendirilir. Bu amaçla uygulanan yöntemler: Disk difüzyon yöntemi, katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilüsyon) yöntemleri, E-test yöntemi ve antimikrobik ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması olarak sıralanabilir.

Yaygın olarak ilk iki yöntem kullanılmaktadır. Biri, petri kutusunda hazırlanan agarlı besiyerine önce kültürün sürülmesi ve takiben antibiyotik emdirilmiş disklerin yerleştirilmesi esasına dayanan **disk difüzyon yöntemi**; İkincisi ise **tüp sulandırma** yöntemidir. Bu yöntem, çok pratik olmaması nedeniyle daha çok araştırma amaçlı kullanılır. Deneyler sonucunda duyarlı ve dirençli antibiyotiklerle minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin saptanması mümkündür. Laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının

saptanmasında en çok kullanılan yöntem, disk difüzyon testidir. Ucuz ve uygulaması basit olan bu yöntem, Kirby- Bauer tarafından geliştirilmiş ve bu isimle anılmaktadır.



Resim 1.1: Antibiyogram çalışması

Enfeksiyon etkeninin, farklı antibiyotiklerle karşılaştırılması ve enfeksiyon tedavisi için en etkili ilacın seçilmesi amacıyla yapılan bu teste, **antibiyotik duyarlılık testi**; bir başka deyişle **antibiyotik rezistans testi** veya **antibiyogram testi** denir.

1.1. Amaç ve Prensip

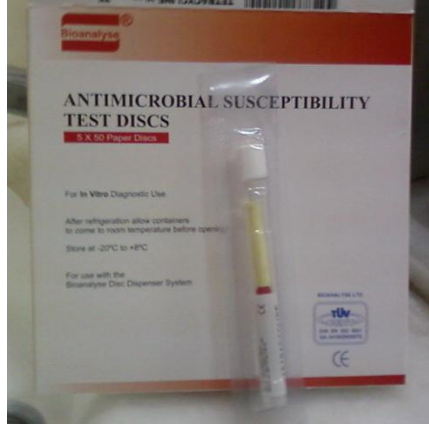
Disk difüzyon yönteminde belirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kâğıt diskler, test edilecek mikroorganizma süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı ölçülerek “duyarlı”, “orta” ve “dirençli” olacak şekilde duyarlılık kategorileri belirlenir.

Belirli konsantrasyonlarda antimikrobiyal madde emdirilen, kurutulmuş kâğıt diskler kullanılmaktadır. Bu test yönteminde standart çalışma için genellikle Mueller Hinton Agar besiyeri kullanılmaktadır.

1.2. Antibiyotik Etken Maddeleri

Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerinde genellikle hücre duvarı, sitoplazmik membran, protein ve nükleik asit sentezlerine engel olarak veya bozarak etki gösterir.

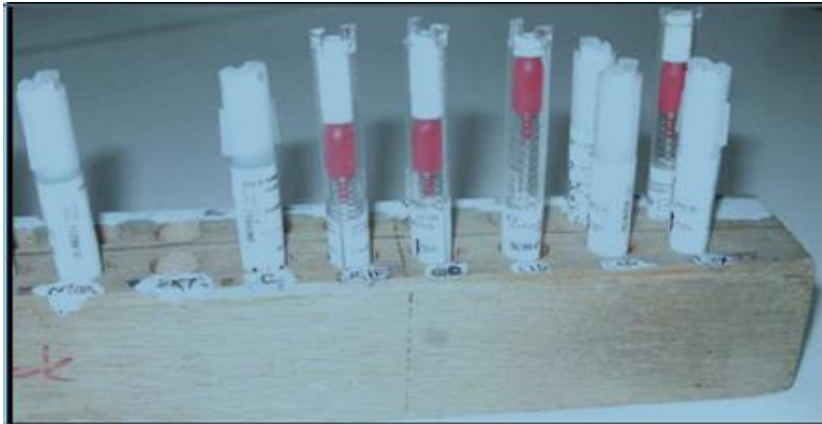
- Bakteri hücre duvarının sentezini engelleyen antibiyotikler: Hücre duvarı sentezi tamamlanmamış bakterileri etkileyerek bakteriyi yok eder. Hücre duvarı sentezini tamamlamış bakterilere etkisi yoktur. Örnek: penisilin, sefalosporin, sikloserin, vankomisin, basitrasin vb.



Resim 1.2: Ambalajlı antimikrobiyal disk

- **Bakteri hücre zarı geçirgenliğini bozan antibiyotikler:** Bakterinin sitoplazmik membran geçirgenliğini artırarak ve hücre içinde bulunan maddelerin hücre dışına çıkmasını sağlayarak bakterisid etki oluşturur. Gelişmesini tamamlamış bakterileri de etkiler. Örnek: polimiksin, gramisidin, nistatin, ketokonazol, flukonazol vb.
- **Bakteri hücresinin protein sentezini önleyen antibiyotikler:** Bakteri hücresinde protein sentezini inhibe ederek bakterisid ve bakteriyostatik etki oluşturur. Örnek: aktinomisin, mitomisin, tetrasiklin, streptomisin, kanamisin, neomisin, gentamisin, kloramfenikol, eritromisin, linkomisin vb.
- **Bakteri hücresinin DNA ve m-RNA sentezini bozan antibiyotikler:** Bazıları bakteri genetik yapısını etkilerken konakçı hücre çekirdeğini de etkiler (sitotoksik etki). Bunlar, antineoplastik (kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar) olarak malign tümörlerin tedavisinde kullanılır. Diğerleri ise konakçı hücresinde fazla toksik etki göstermez. Örnek: mitomisin, novabiosin, aktinomisin, rifamisin vb.
- **Bakteri hücresi metabolizmasını bozan antibiyotikler:** Bakteri metabolizması için gerekli olan bir maddenin sentezini önleyerek etkili olur. Örnek: sulfonamid, sulfon, etambutol, trimetoprim, izoniazid vb.
- **Antibiyotiklerin etkinliğini etkileyen faktörler:**
 - **Permeabilitenin azaltılması:** Bazı gram (-) ve gram (+) bakterilerin hücre duvarı, sitoplazmik membran ve dış membran gibi yapıları bazı ilaçların geçişine izin vermeyen bir selektif permeabiliteye sahiptir.

- **Mutasyonlar:** Mikroorganizmalarda bulunan veya tedavi sırasında genetik düzeyde oluşan mutasyonlar, antibiyotiklerin bakteride etkili olduğu hedef bölgelerde, bazı değişiklikler meydana getirerek antibiyotiklerin bunlara bağlanmasına ve böylece olumsuz etki meydana getirmelerine engel olur.
- **Hücre duvarının olmaması:** Mycoplasma gibi bazı gram (-) bakterilerde, hücre dışı membranı bulunmadığından hücre duvarını etkileyen ve sentezine engel olan penicillin, cephalosporin gibi antibiyotikler, bu bakterilere etkili olamaz. Buna bağlı olarak da gram (+) bakterilerde başarı ile kullanılan bu tip antibiyotikler, mycoplasma infeksiyonlarında kullanılamaz.
- **Mikroorganizmalara ait faktörler:**
 - **Antibiyotiklere bağımlılık:** Bazı mikroorganizmalarda oluşan mutasyonel değişiklikler sonucu ortaya çıkan yeni mutantlar, gelişmeleri için bazı antibiyotiklere bağımlı hale gelebilir. Böyle olgulara, penicillin ve sulfanomidlere karşı bağımlı hale gelen meningokoklarda rastlanmıştır. Oluşan mutantlara, penicillin veya sulfonamidlerin etkisi olmadığı gibi bu tür ilaçların kullanılması mikropların direncini de artırır.
 - **Uygun kombinasyonların yapılmaması:** Birbirinin etkisini azaltacak veya değiştirecek türde iki antibiyotiğin kullanıldığı durumlarda bu ilaçların, mikroorganizmalar ve dolayısıyla da enfeksiyon üzerine herhangi bir etkisi olmadığı gibi hastalığın ilerlemesine neden olduğu görülür. Böyle durumlarda, mikroorganizmalar aktivitelerini kolayca sürdürür.



Resim 1.3: Antimikrobiyal diskler

- **Kompetatif inhibisyon:** Bu dirençlilik de yine uygun olmayan kombinasyonlar sonucu meydana gelir. Böyle hallerde aynı anda verilen antibiyotiklerden sadece biri, hedef bölgeye bağlanarak etkili olabilir. Buna karşın belki de en güçlü olan diğerinin hiç bir rolü kalmaz.
- **Plasmide bağlı dirençlilik:** Bakterilerde bulunan R-plasmidlerin (konak organizmanın kloramfenikol ve amfisiline dayanıklılık gibi bir ya da birden fazla antibakteriyal maddeye dayanıklılığı sağlayan genleri içeren plasmid), kodladığı enzimler ya antibiyotiklerin kimyasal yapılarını bozarak ya da bunların bağlandıkları ribosomal alt ünitelerdeki spesifik bölgelerde değişiklikler yaparak antibiyotikleri etkisiz hale getirir. Bakterilerde genom veya plasmid içinde bulunan bir veya birden fazla transpozon da benzer etkiye sahiptir. Böyle mekanizmalar ile bakteriler, birden fazla antibiyotik ve çeşitli metal iyonlarına karşı dirençlilik kazanabilir.
- **Hücre membranının transfer sisteminde değişiklik:** Membran ve sitoplazma boşluğunda bulunan birçok enzim, transport sisteminde değişiklik oluşturarak antibiyotik girişini azaltır.

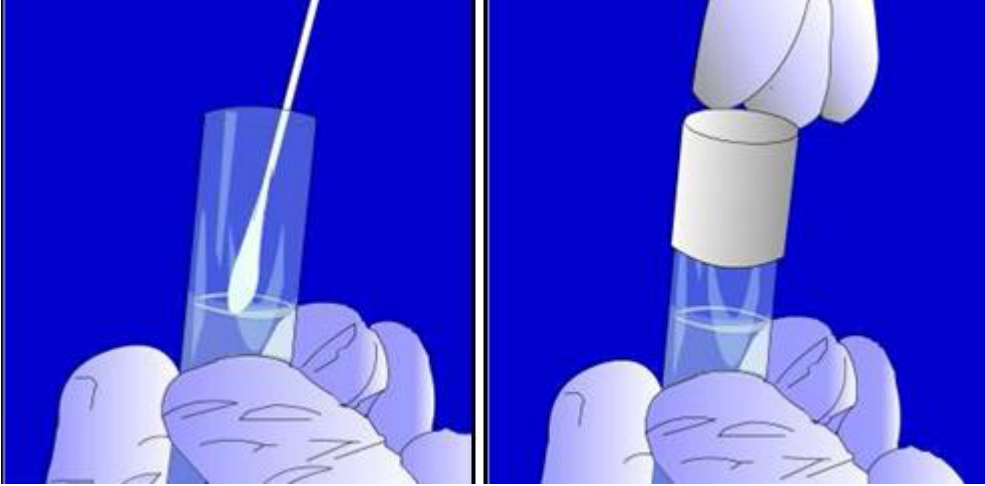
1.3. Yapılışı

Antibiyogram için pratikte en yaygın kullanılan diffüzyon yöntemi Kirby-Bauer Disk yöntemidir. Bu yöntemde etüv, buzdolabı, vorteks tüp karıştırıcı, cetvel veya kumpas, eküvyon, antimikrobiyal diskler, antimikrobiyal disk dağıtıcısı, kültür, Mueller-Hinton agar (MHA) gibi araç gereç ve uygun ortama ihtiyaç vardır. Antimikrobiyal diskler, hazır ya da laboratuvarında hazırlanmış standartlara uygun antibiyotik emdirilmiş kâğıt disklerdir.

Bu yöntemin işlem basamakları genel olarak aşağıda belirtildiği şekildedir.

- **İncelenecek mikroorganizmanın alımı ve kültür oluşturulması:** İncelenecek mikroorganizma, uygun bir malzeme yardımıyla ilgili yerden alınır. Alınacak yere göre farklı malzemeler kullanılmalıdır. Örneğin ağız içi bir bölgeden alınacaksa eküvyon, deri bölgesinden alınacaksa kazımak amacıyla bistürinin arkası, otopsi esnasında iç organlardan alınacaksa pastör pipeti kullanılabilir. Etkenin saflaştırılması amacıyla tek koloni düşürme yöntemiyle katı kültür haline getirilir.
- **İnokulum süspansiyonunun hazırlanması:** Hastalık etkeni olarak izole edilen ve tanımlanan, 18-24 saatlik üremiş olan bakteri kolonilerinden 3-4 tanesi seçilir. Aktarmada steril bir eküvyon kullanılması tercih edilir. 5 ml'lik tüp içindeki Mueller-Hinton Broth veya Tryptone Soya Broth'a, agardan alınan 3-4 bakteri kolonisi süspansiyon edilir. Eküvyon tüpün dibine daldırılır, karıştırılır ve bu şekilde alınan kolonilerin besiyerine iyice karışması sağlanır. Eküvyon tüpün iç cidarlarına bastırılarak çıkarılır.

- **Direkt koloni süspansiyonu yöntemi**
 - Tüm Stafilokoklar
 - Zor beğenen, önceden Broth içinde üremesi bilinmeyen Streptokoklar
- **“Log Faz Büyüme” yöntemi**
 - Bütün organizmalar için bu yöntem kullanılır.
 - 35 °C’de 2-8 saat inkube edilir.
 - Eğer bulanıklık bu saatler içinde yeterliyse bir sonraki işleme geçilir.
 - Eğer bulanıklık bu saatler içinde yeterli değilse inkubasyona devam edilir.



Resim 1.4: İnokulum süspansiyonunun hazırlanması

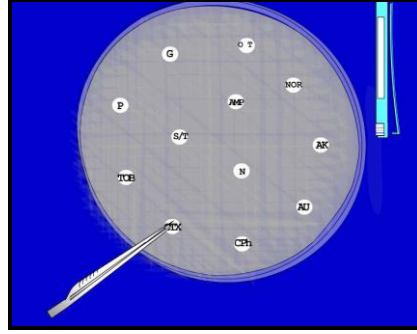
- **İnokulumun standardizasyonu:** Test süspansiyonunun bulanıklılığı, 2-8 saat üreme sonunda, 0,5 McFarland standardı ile eşleştirilerek ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml tekabül eden) standardize edilir. Gözle bulanıklık ayarlaması yapılırken hem standardin hem de süspansiyonun çok iyi karıştırıldığına dikkat edilmelidir.

McFarland bulanıklık standardı (0.5 McFarland): 0.05 ml % 1.175 BaCl₂. 2H₂O (Barium Chloride dihydrate) ile 9.95 ml % 1 H₂SO₄ karıştırılır. Tüplere 5-6 ml olacak şekilde bölünerek buzdolabında saklanır.



Resim 1.5: 0,5 McFarland Standardı ile süspansiyonun bulanıklık ayarlaması

- Her iki yöntemde de süspansiyon çok yoğunsa
 - Kullanılan Broth'la veya fizyolojik tuzlu su ile tamamlanır, vortex ile karıştırılır.
 - Direkt koloni süspansiyon yönteminde süspansiyon açık renk ise
 - Seçilen kolonilerden ilave edilebilir, vortex ile karıştırılır.
 - Log Faz yönteminde süspansiyon açık renk ise
 - Süspansiyon tekrar inkube edilir, kullanmadan önce vortex ile karıştırılır.
- **Ekim işleminin yapılması:** İncelenecek mikroorganizmanın alındığı bölgede yeterli miktarda olması ve zamandan kazanılmak istenilmesi durumunda sıvı kültür oluşturmadan eküvyon yardımıyla direkt ekim işlemine geçilir. Sıvı kültürden ekim yapılacaksa sıvı kültür çalkalanarak homojenize edildikten sonra eküvyon içine daldırılıp ıslatılarak aşağıda belirtildiği şekilde ekim yapılır.
- Agarın bir tarafından başlanarak tüm yüzeye yayılır.
 - 60 derece döndürülerek aynı işlem tekrarlanır.
 - Tekrar 60 derece döndürülerek aynı eküvyon ile aynı işlem yapılır.
 - Dördüncü defa eküvyon agar'ın petri kenarlarındaki yüzeyine çepeçevre sürülerek işlem tamamlanır.
 - Agar'ın yüzeyinin kuruması için oda ısısında 10-15 dakika beklenir.
 - Sıvı kültürden istenirse kültür çalkalanarak homojenize edildikten sonra petri plağının tüm yüzeyini ıslatacak kadar dökülüp 5-10 dakika bekletildikten sonra fazlası alınarak da ekim yapılabilir.
- **Antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesi**
- Antibiyotik diskleri oda ısısına getirilir. Aynı gruptaki antibiyotiklerin etki mekanizmaları aynıdır. Mümkün olduğu kadar çok sayıda farklı grup antibiyotik diski ile test yapılmalıdır.
 - 150 mm çapı olan petrilere 12 disk, 100 mm olan petrilere 8 diskten fazla yerleştirilmemelidir.



Resim 1.6: Antimikrobiyal disklerin pensle agar yüzeyine yerleştirilmesi

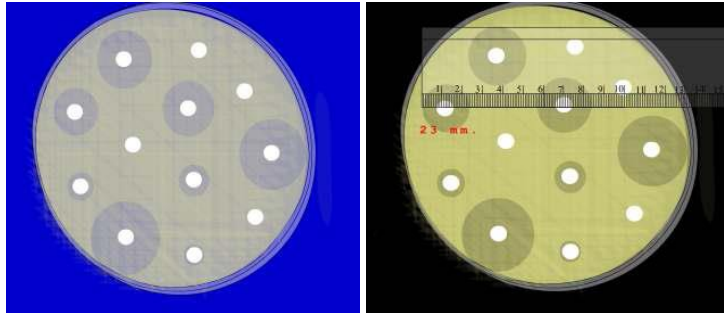
- Diskler arasında en az 25-30 mm, plak kenarından ise 15 mm mesafe olacak şekilde diskler bir pens ile agarın yüzeyine yerleştirilir.
- Üzerlerine pensle hafifçe bastırılarak disklerin agarla temasının tam olması sağlanır.

➤ **İnkubasyon işleminin yapılması**

- 35 °C’de 16-18 saat inkube edilir.
- Aerob olanlar, oksijenli ortamda, anaerob olanlar ise anaerobik jarda % 3-1 karbon dioksit veya desikatörde oksijensiz ortam (mum yakarak) sağlamak suretiyle, etüvde üretilirler.
- Jarda yapıldığı takdirde 90-100 mm çaplı petri ler tercih edilmelidir.

➤ **Zonların ölçülerek değerlendirilmesi**

- Koyu bir zemin üzerinde disklerde dâhil olmak üzere zon çapı cetvel ile ölçülür.



Resim 1.7: İnhibisyon zonlarının milimetrik cetvelle ölçümü

- Ölçüm sonrası her bir disk için zon çapları, antibiyotik değerlendirme tablosundan ayrı ayrı değerlendirilmelidir.

	Duyarlı (S)	I	Dirençli (R)
Sefotaksim	≥ 26	23-25	≤ 22
Seftizoksim	≥ 25	22-24	≤ 21
Seftriakson	≥ 23	20-22	≤ 19
Seftazidim	≥ 21	18-20	≤ 17
Aztreonam	≥ 21	18-20	≤ 17

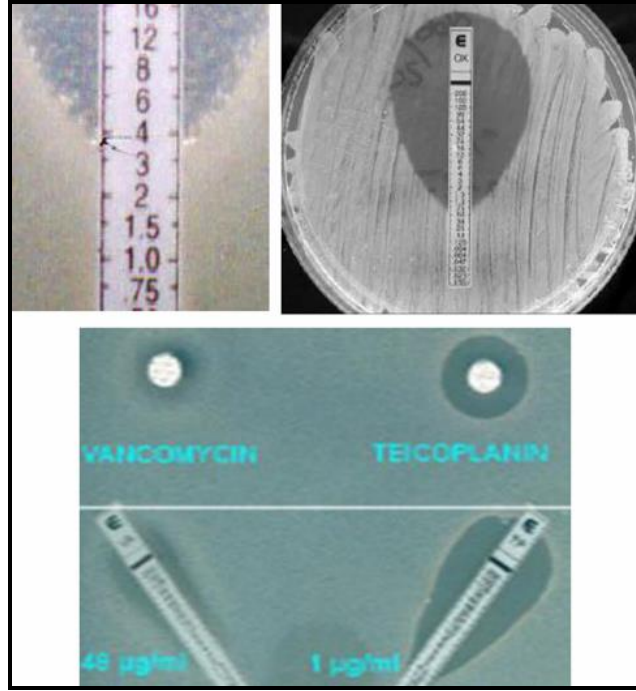
Tablo 1.1: Antibiyogram değerlendirme tablosunun bir bölümü

- Zon çapının tanımlanmasında tablo esas alınır.
 - Duyarlı (Susceptible, S): Enfeksiyonun önerilen dozda o ilaçla başarılı bir şekilde tedavi edilebileceğini gösterir.
 - Orta derecede duyarlı (Intermediate, I): İlacın normalden yüksek dozlarının kullanıldığında klinik olarak etkili olacağını gösterir.
 - Dirençli (Resistant, R): Tedavide güvenilir bir etkinlik yoktur.

➤ **E-test**

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

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 ölçüleceği noktadır.



Resim 1.8: E-Testi'nde inhibisyon zonunun şeritle ölçüm görünümü

1.4. Dikkat Edilecek Hususlar

➤ **Antibiyotik kullanımının gerekli olduğu durumda**

Enfeksiyonun bakteriyel olduğunu kanıtlayabilmek için mikroorganizmanın kültür vasatlarında üretilmesi, izole edildikten sonra serolojik ve biyokimyasal testlerle bakterinin kültür vasatlarında gösterdiği bazı özelliklere göre özel kültür vasatlarında tekrar üretilerek tanımlanması yapılır.

➤ **Uygun antibiyotiğin seçilmesi**

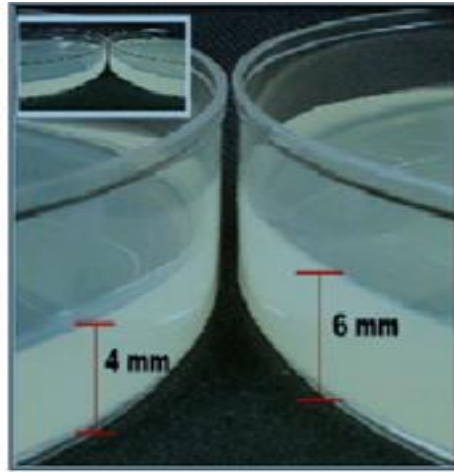
Etkeni belirlemede esas yöntem, kültürdür; antibiyotik tedavisine başlamadan önce mutlaka yapılmalıdır. Daha sonra etken bakterinin, antibiyotik duyarlılık durumu araştırılmalıdır. Etken, izole edilmiş ve tanımlanmışsa antibiyotik duyarlılık testi yapılarak uygun antibiyotik bulunur.

- Enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen bakteri kolonisinden örnek alınarak antibiyogram yapılır.
- Rezistans kazanmadığı bilinen bazı mikroorganizmalar için rezistans testi (antibiyogram) yapılmaya da olur.
- Farklı türden mikroorganizmaların karışımı asla aynı anda test edilmemelidir.

- Birçok antibiyotik kullanmak zorunluluğu karşısında test yaparken aynı spektruma sahip ve birbiriyle çapraz rezistans veren antibiyotiklerden biriyle çalışarak diğerleri hakkında fikir sahibi olunabilir.
- Uygulama yolları farklı olan antibiyotikler teste dâhil edilmelidir. Değerlendirme yapılırken antibiyotikler arasında ekonomik olanlar tercih edilmelidir.

➤ **Antibiyotik duyarlılık testi yaparken kullanılacak besiyeri**

- Besiyerinin pH'ı 7.2 -7.4 olmalıdır.
- Agar kalınlığı 4 mm olmalıdır. Daha kalın olması durumunda antibiyotik etrafa yeterince yayılamaz.



Resim 1.9: Besiyerinin agar kalınlığı

- Steril olmalıdır.
- Yüzeyince yırtık, çatlak vs. olmamalıdır.
- Yüzeyinde sıvı kalıntısı olmamalıdır.
- Kurumamış (agar/kapak yüzeyinde su damlacıkları) olmalıdır.
- Plakların dayanıklılığı (torbasız): +4 °C'de 2 haftadır.
- Plakların dayanıklılığı (torbada): +4 °C'de 8-10 haftadır.

➤ **Antibiyotik duyarlılık testi yaparken kullanılacak antimikrobiyal diskler**


- Kullanım öncesi buzdolabında 8 °C veya daha düşük sıcaklıkta ya da – 14 °C' nin altında saklanmalıdır.
- Soğuk zincire uyulmalıdır.
- Açılmamış ambalajlar kullanımdan 1-2 saat önce buzdolabından çıkarılmalıdır.
- Açılmadan önce oda sıcaklığına gelmeleri beklenmelidir.

-
- Disk kartujları, ambalajdan çıkarıldıktan sonra kapakları sıkıca kapatılmış, içinde nem alıcıyla saklanmalıdır.
 - Diskler, kullanım süresi dışında daima buzdolabında tutulmalıdır.
 - Diskler, mutlaka etiketlerinde bulunan son kullanım tarihlerinden önce tüketilmelidir.

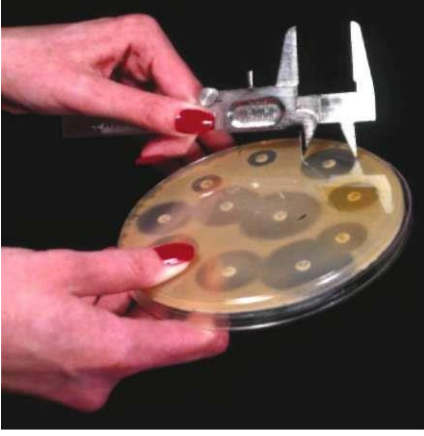
UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak antibiyogram test işlemlerini yapınız.

Uygulamada kullanılan araç ve gereçler: FTS, farklı antibiyotik diskleri, pens, inkübatör, buzdolabı, vorteks tüp karıştırıcı, cetvel veya kumpas, eküvyon, antimikrobiyal disk dağıtıcısı, kültür, Mueller-Hinton agar (MHA)

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ MHA (Müller Hinton Agar) besiyeri hazırlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Koruyucu güvenlik önlemlerini alınız.➤ Besiyeri hazırlama kurallarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ İncelenecek kültür katıysa katı kültürden alarak FTS içinde çözündürünüz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Aseptik tekniği uygulayınız.➤ Kendinize ve çevrenize bulaştırmayınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Sıvı kültürden, petri kutusundaki agarlı besiyerine aktararak yayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Petri plağının tüm yüzeyinin kültür tarafından ıslatıldığından emin olunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ 10-15 dakika bekletiniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Ağız kapalı olarak, oda sıcaklığında bekletiniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Emilmeyen fazla sıvı kültürü, besiyeri yüzeyinden alınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Sıvıyı almak için pipetten faydalanabilirsiniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Farklı etken maddeli antibiyotik disklerini, pens yardımıyla alarak petri kutusundaki agarlı besiyeri üzerinde farklı yerlere yerleştiriniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Elinizle disklere dokunmayınız.
	
<ul style="list-style-type: none">➤ İnkübasyon yapınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ İstenilen sıcaklık ve sürede bekletiniz.

- Antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon alanlarının çapını ölçerek kaydediniz.



- Ölçüm işleminde kumpas veya milimetrik cetvel kullanınız.

- Ölçüm sonuçlarını antibiyotik direnç tablolarıyla karşılaştırarak değerlendiriniz.

- Sonuçları kaydediniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

- Aşağıdakilerden hangisi, antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesi ile ilgili yanlış bir ifadedir?
A) Antimikrobiyal diskler oda ısısına getirilir.
B) Aynı gruptaki antibiyotiklerin etki mekanizmaları aynıdır.
C) 150 mm çapı olan petrilere 18 disk, 100 mm olan petrilere en fazla 5 disk.
D) Hafifçe üzerlerine pens ile bastırılarak disklerin agarla temasının tam olması sağlanır.
- Aşağıdakilerden hangisi, inhibisyon zonlarının değerlendirilmesi ile ilgili yanlış bir ifadedir?
A) Antibiyotik etkili ise üremenin engellendiği bir inhibisyon zonu oluşur.
B) İnhibisyon zon çapları açık renk bir zemin üzerinde milimetrik cetvelle ölçülür.
C) İnhibisyon zon çapları diskler de dâhil olmak üzere ölçülür.
D) Disklerle birlikte verilen zon çapları, ölçüm sonrası, her bir disk için ayrı ayrı değerlendirilir.

Aşağıdaki cümlelerin başında boş bırakılan parantezlere, cümlelerde verilen bilgiler doğru ise D, yanlış ise Y yazınız.

- () Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin canlılar üzerinde hiçbir olumsuz etkisi yoktur.
- () Laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en sık olarak kullanılan yöntem disk difüzyon testidir.
- () Enfeksiyon etkeninin, farklı antibiyotiklerle karşılaştırılması ve enfeksiyon tedavisi için en etkili ilacın seçilmesi amacıyla yapılan bu teste, antibiyogram testi denir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

ÖĞRENME KAZANIMI

Bu öğrenme faaliyetinde verilen bilgi ve becerilerle, tekniğine uygun olarak tüp dilüsyon (etkinlik) testi yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Mikrobiyoloji laboratuvarına giderek tüp dilüsyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık test aşamalarını izleyiniz.
- Konu ile ilgili çalışmalarınızı rapor hâline getirerek sınıfta arkadaşlarınızla paylaşınız.

2. TÜP DİLÜSYON (ETKİNLİK) TESTİ

Tüp dilüsyon yöntemi tüpte seyreltme yöntemi olup antibiyotiklerin ve dezenfektanların MİK değerlerini belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır ve makrodilüsyon yöntemi olarak ta adlandırılmaktadır. Bunun yanında aynı amaçla geliştirilmiş mikrodilüsyon yöntemi de kullanılmaktadır.

2.1. Amaç ve Prensip

Dezenfektanların ve antimikrobiyal maddelerin fazla kullanımının, çevre ve toplum sağlığı açısından pek çok zararları vardır. Kullanımın optimum seviyede olması hem ekonomik hem de ekolojik denge ve toplum sağlığının korunması açısından önemlidir. Optimum seviye genel olarak ilgili mikroorganizma üzerinde etkili olan en düşük doz olarak kabul edilir.

Etken maddenin incelenen mikroorganizma üzerindeki etkili dozları belirlendikten sonra etkin en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenir. MİK değeri; denenen test mikroorganizma kültüründe test koşullarında üremeyi, yani mevcut canlı hücre sayısının artışıını inhibe eden (önleyen) en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonudur.

Tüp dilüsyon yöntemi kademeli olarak seyreltilen madde ile incelenecek kültürün belirli bir süre temas halinde bulundurulduktan sonra besiyerlerinde üreme kontrollerine bakılarak MİK değerinin belirlenmesi esasına dayanır.

2.2. Yapılışı

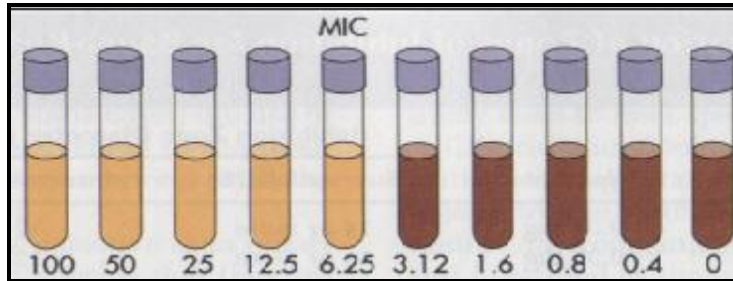
Tüp dilüsyon yönteminin yapılışında etüv, vorteks tüp karıştırıcısı ile test için gerekli besiyerleri gibi araç ve gereçlerle, uygun laboratuvar ortamına ihtiyaç vardır.

➤ Bu yöntem dezenfektanlarda kullanılacaksa genellikle aşağıda anlatıldığı şekilde uygulanır:

- Gerekli araç gereç, besiyeri ve dilüsyon sıvısı hazırlanır.
- İncelenecek mikroorganizmadan sıvı kültür hazırlanır.
- İncelenecek antibiyotik veya dezenfektanın kademeli seri dilüsyonları hazırlanır.
- Her bir dilüsyondan eşit miktarlarda deney tüplerine ayrı ayrı dağıtılır.
- Sıvı kültür çalkalanarak homojen hale getirilir.
- Deney tüplerine tüpte bulunan madde kadar kültür eklenir.
- Çalkalanarak karıştırılır.
- 10 dakika bekletildikten sonra agarlı besiyerlerine ayrı ayrı her bir dilüsyondan ekim yapılır.
- İnkübasyon işlemi yapılır.
- Üreme olmayan dilüsyonlar belirlenir.
- Üreme olmayan dilüsyonlardan en seyreltik olan MİK değeri olarak belirlenir.

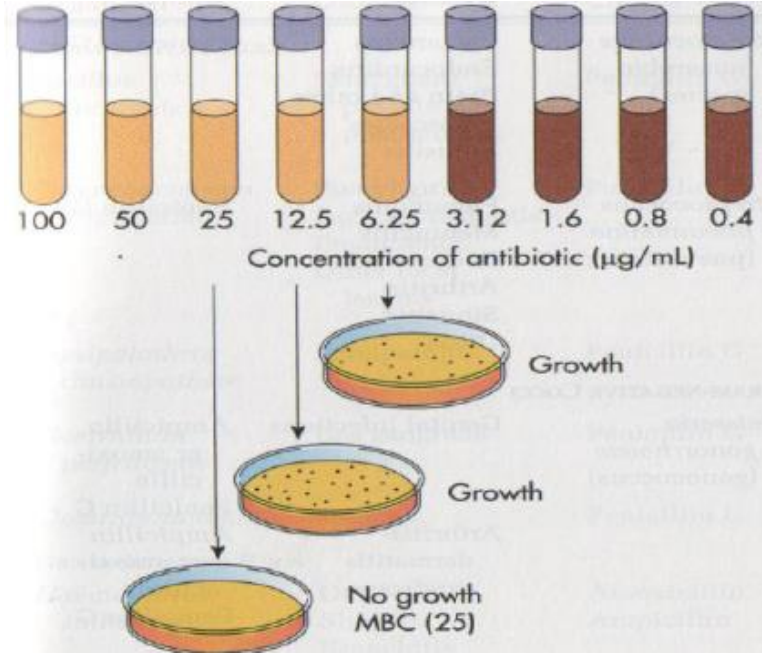
➤ Bu yöntem antibiyotiklerde kullanılacaksa genellikle aşağıda anlatıldığı şekilde uygulanır:

- Sıvı besiyeri hazırlanır.
- Hazırlanan sıvı besiyeri dilüsyon sıvısı gibi kullanılarak antibiyotik veya dezenfektanın, kademeli seri dilüsyonları hazırlanır.



Resim 2.1: Test edilecek antibiyotiğin katlı dilüsyonları

- Üzerlerine, izole edilen test mikroorganizmanın 24-48 saatlik sıvı besiyeri kültüründen 0,1 ml miktarında ekilir.
- İyiye karıştırıldıktan sonra 24-48 saat 37 °C'de inkübe edilir.
- Tüplerdeki üreme gözle değerlendirilir.
- Üremenin olmadığı en seyreltik dilüsyon MİK değeri olarak kabul edilir.



Resim 2.2: MİK değerinin belirlenmesi

- **İleri bir test olarak;**
- MİK değerine işaret eden bu dilüsyon kültüründen, 0,1ml alınarak tüpte 10 ml hazırlanan uygun bir sıvı besiyerine ekim yapılır ve inkübe edilir.
 - Bu besiyerinde üreme olması durumunda, söz konusu dilüsyon MİK değeri olarak; üreme olmaması durumunda ise MLK değeri olarak verilir.
 - Üreme olmaması durumunda, buradan petri kutusundaki uygun agarlı bir besiyerine tekrar ekim yapılır ve inkübasyonunun sağlanması yoluna gidilir.
 - Agarlı besiyerinde koloni oluşumuna rastlanmaması durumunda, sonuç doğrulanmış olur.
 - MİK değeri; mikroorganizmanın çeşidi, sayısı, besiyerinin bileşimi ve pH'ı, inkübasyon sıcaklık ve süresi gibi etkenlerden etkilenir. Dolayısıyla MİK sonucu verilirken test koşulları ayrıca belirtilmelidir.
 - Duyarlılık test sonuçları daima identifikasyon sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak tüp dilüsyon yöntemi ile dezenfektanlarda etkinlik testini yapınız.

Uygulamada kullanılan araç ve gereçler: Dilüsyon sıvısı, sıvı besiyeri, mikroorganizma örneği, dezenfektan madde, inkübatör, petri kutusu, pipet

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Tüplere incelenecek mikroorganizmadan sıvı kültür hazırlayınız.	➤ Aseptik çalışma kurallarına uyunuz. ➤ Uygun sıvı besiyeri seçiniz.
➤ Dezenfektandan farklı konsantrasyonlarda solüsyonlar hazırlayınız.	➤ Kademeli seri dilüsyonlar oluşturunuz. ➤ Dilüsyon hazırlama kurallarına uyunuz.
➤ Tüplerde bulunan sıvı kültürlerin üzerine, farklı konsantrasyonlardaki solüsyonlardan sıvı kültür miktarı kadar ekleyiniz.	➤ Pipet kullanma kurallarına uyunuz. ➤ Eklenen dezenfektan çözeltisi miktarının, tüpte bulunan kültür hacmiyle eşit olmasına dikkat ediniz.
➤ Çalkalayarak karıştırınız.	➤ Dökülmemesine dikkat ediniz.
➤ Karışımları 10 dakika bekletiniz.	➤ Oda sıcaklığında bekletiniz.
➤ Karışımlardan besiyerlerine ekim yaparak üzerlerine gerekli bilgileri yazınız.	➤ Sürme yöntemiyle ekim yapınız. ➤ Petri üzerine konsantrasyon bilgilerini yazmayı unutmayınız.
➤ İnkübe ediniz.	➤ İnkübasyon sıcaklığına ve süresine uyunuz.
➤ İnkübasyon sonrası petri kutularını makroskopik olarak inceleyiniz.	➤ Üreme olan ve olmayan konsantrasyonları belirleyiniz.
➤ Üreme olmayan konsantrasyonlardan en küçüğünü belirleyiniz.	➤ MİK değeri olarak kaydediniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi, tüp dilüsyon yöntemiyle ilgili yanlış bir ifadedir?
 - A) Tüp dilüsyon yöntemi, antibiyotiklerin ve dezenfektanların MİK değerlerini belirlenmesinde kullanılır.
 - B) Makrodilüsyon yöntemi olarak da adlandırılmaktadır.
 - C) Etkin maddenin incelenen mikroorganizma üzerindeki etkili dozları belirlendikten sonra etkin en büyük konsantrasyon, MİK değeri olarak belirlenir.
 - D) Bu yöntemde, incelenecek antibiyotik veya dezenfektanın kademeli seri dilüsyonları hazırlanır.
2. Aşağıdakilerden hangisi, denenen test mikroorganizma süspansiyonunda test koşullarında üremeyi, yani mevcut canlı hücre sayısının artışıını inhibe eden en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonuna verilen addır?
 - A) MLK değeri
 - B) MİK değeri
 - C) MAC değeri
 - D) MEC değeri

Aşağıdaki cümlelerin başında boş bırakılan parantezlere, cümlelerde verilen bilgiler doğru ise D, yanlış ise Y yazınız.

3. () Tüp dilüsyon yönteminde incelenen mikroorganizma üzerinde en etkili etken madde belirlenir.
4. () Tüp dilüsyon yöntemi belirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek mikroorganizma süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilerek etkinliğin belirlenmesi esasına dayanır.
5. () MİK değeri; mikroorganizmanın çeşidi, sayısı, besiyerinin bileşimi ve pH'ı, inkübasyon sıcaklık ve süresi gibi etkenlerden etkilenir. Dolayısıyla MİK sonucu verilirken test koşulları ayrıca belirtilmelidir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme” ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi, antibiyotiklerin mikroorganizmalar üzerine etkilerinden sayılmaz?
A) Bakteri hücre duvarının sentezini engeller
B) Bakteri hücre zarı geçirgenliğini bozar
C) Bakteri hücresinin protein sentezini önler
D) Bakteri hücresinin beslenmesini engeller
E) Bakteri hücresi metabolizmasını bozar
2. Aşağıdakilerden hangisi, antibiyogram yaparken kullanılacak besi yerinin özelliklerinden değildir?
A) Agar kalınlığı 4 mm'dir.
B) Sterildir.
C) Yüzeyince yırtık, çatlak vs. olması gerekir.
D) Yüzeyinde sıvı kalıntısı olmamalıdır.
3. Aşağıdakilerden hangisi, antibiyotik duyarlılık testi yaparken kullanılacak antimikrobiyal disklerin özelliklerinden değildir?
A) Kullanım öncesi buzdolabında 8 °C veya daha düşük sıcaklıkta veya – 14 °C'nin altında saklanmalıdır.
B) Soğuk zincire uyulmalıdır.
C) Açılmamış ambalajlar kullanımdan 1-2 saat önce buzdolabından çıkarılmalıdır.
D) Diskler, kullanım süresi dışında daima buzdolabı dışında tutulmalıdır.
4. Aşağıdakilerden hangisi, antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesinde dikkat edilmesi gereken özelliklerden değildir?
A) Antibiyotik diskleri oda ısısına getirilir.
B) 150 mm çapı olan petrilere 12 disk, 100 mm olan petrilere 8 diskten fazla yerleştirilmemelidir.
C) Diskler arasında 50 mm mesafe olacak şekilde diskler steril bir pensle agarın yüzeyine yerleştirilir.
D) Üzerlerine pensle hafifçe bastırılarak disklerin agarla temasının tam olması sağlanır.
5. Aşağıdakilerden hangisi, antibiyotiklerin etkinliğini etkileyen faktörlerden biri değildir?
A) Permeabilitenin artırılması
B) Mutasyonlar
C) Permeabilitenin azaltılması
D) Hücre duvarının olmaması

Aşağıdaki cümlelerin başında boş bırakılan parantezlere, cümlelerde verilen bilgiler doğru ise D, yanlış ise Y yazınız.

6. () Dezenfektanların ve antimikrobiyal maddelerin fazla kullanımının çevre ve toplum sağlığı açısından pek çok zararları vardır.
7. () Disk difüzyon yönteminde etken maddenin inhibisyon zon çapı ölçülerek “duyarlı”, “orta” ve “dirençli” olacak şekilde duyarlılık kategorileri belirlenir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ – 1'İN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	B
3	Yanlış
4	Doğru
5	Doğru

ÖĞRENME FAALİYETİ – 2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	B
3	Yanlış
4	Yanlış
5	Doğru

MODÜL DEĞERLENDİRME'NİN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	C
3	D
4	C
5	A
6	Doğru
7	Doğru

KAYNAKÇA

- AKŞİT F, Y. AKGÜN, N.KİRAZ, **Mikrobiyoloji**, Anadolu Üniversitesi A.Ö.F. Hemşirelik Önlisans Eğitimi, 1991.
- AKSOY A. Murat, Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri, Laboratuvar Uygulama Kılavuzu, 2006-2007
- Antimicrobial Susceptibility Testing By CLSI (NCCLS) Reference Disk Diffusion Method (Kirby-Bauer).
- BİLGEHAN Hakkı, **Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi**, Barış Yayınları, 1993.
- BİLGEHAN Hakkı (editör), **Klinik Mikrobiyoloji Tanı**, 2.baskı, Fakülteler Kitabevi. İzmir, 1995.
- KOCATÜRK Utkan, **Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü**, Ankara, 1991.
- USTAÇELEBİ Şemsettin, **Tıbbi ve Klinik Mikrobiyoloji**, Güneş Kitabevi, 1999.
- TEMİZ A, **Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri**, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 2000.