

2024

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DÖNEM III MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ Uygulama Kitapçığı 2024 – 2025

"Gözlem alanlarında, şans yalnızca hazırlıklı zihni tercih eder."

*Louis Pasteur
(1822 - 1895)*

Hazırlayan:

İSÜTF-MÖTEP

Laboratuvar Kurulu

İSÜ | İSTİNYE
ÜNİVERSİTESİ
İ S T A N B U L

Revizyon No: 2024-1-v0.

ÖNSÖZ

Sevgili Öğrenciler,

Bu laboratuvar el kitabı, tıbbi mikrobiyoloji alanında temel deneyleri, prosedürleri ve laboratuvar prensiplerini anlamanıza ve uygulamanıza yardımcı olmak için hazırlanmıştır. Mikrobiyoloji, birçok yönüyle insan sağlığı ile yakından ilişkili olan mikroorganizmaların yapısını, işlevini ve rollerini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu alan sayesinde bulaşıcı hastalıklar, tanı yöntemleri ve tedavi stratejileri hakkında bilgi ediniz. Bu nedenle, laboratuvar çalışmaları mikrobiyolojik kavramları anlamada ve pratik beceriler geliştirmede hayati bir rol oynar.

Laboratuvar oturumlarımızda mikroskopi, boyama, kültür yöntemleri ve antibiyotik duyarlılık testleri gibi temel mikrobiyolojik tekniklerle uğraşacaksınız. Bu kılavuz, laboratuvarda uyulması gereken kuralları, kullanılan ekipmanları, deneylerin teorik temellerini ve her prosedür için detaylı adımları sunmaktadır. Bu rehberlik, laboratuvar çalışmalarınızı güvenli ve etkili bir şekilde yürütmenize yardımcı olacaktır.

Laboratuvarda disiplinli, dikkatli ve özenli çalışmak önemlidir. Her deneyin sonunda, verilerinizi analiz etmeniz ve sonuçlarınızı bilimsel düşünce ve etik değerlerle uyumlu bir şekilde değerlendirmeniz beklenmektedir. Edindiğiniz her bilgi ve geliştirdiğiniz her beceri, sizi geleceğin bilgili ve yetenekli bir hekimi olmaya bir adım daha yaklaştıracaktır.

Bu el kitabının laboratuvar çalışmalarınızda size rehberlik edeceğini ve mikrobiyolojiye olan ilginizi artıracığını umuyoruz. Yolunuz her zaman bilimin ışığıyla aydınlansın.

Başarılar dileriz,
İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖĞRENİM ÇIKTILARI ve DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ

KURUL ADI	DENEYİN ADI	ÖĞRENİM ÇIKTISI	DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ
<i>Kan-İmmün Sistem-Tümör</i>	Antibiyotik Duyarlılık Testleri	Antibiyotik duyarlılık test yöntemlerini, disk difüzyon ve E-test dahil olmak üzere tanımlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Duyarlılık sonuçlarını yorumlayarak antibiyotik seçimini yönlendirebilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Kirby-Bauer disk difüzyon testini uygulayabilir ve inhibisyon bölgelerini CLSI/EUCAST standartlarına göre yorumlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*

ÇSS: Çoktan Seçmeli Sınav, AUS: Açık Uçlu Soru, BD: Boşluk Doldurma

*Mazeret sınavlarında uygulanır

LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

1. Laboratuvar Önlüğü Giyin: Laboratuvara girerken her zaman temiz ve iliklenmiş bir laboratuvar önlüğü giyin. Laboratuvar önlükleri laboratuvar dışında giyilmemelidir ve uzun saçlar güvenli bir şekilde toplanmalıdır.
2. Yemek Yemeyin veya İçmeyin: Laboratuvarda yemek yemeyin, içmeyin veya ağınıza bir şey koymayın. Laboratuvar faaliyetleri sırasında yüzünüze dokunmaktan kaçının.
3. Kullanımdan Sonra Temizleyin: Her oturumun sonunda, kullanılan tüm malzemeleri düzenli bir şekilde temizleyin ve belirlenen kişilere teslim edin.
4. Kimyasal Güvenliği: Özellikle belirtilmedikçe herhangi bir kimyasal veya biyolojik maddeye dokunmayın, koklamayın veya tatmayın.
5. Dökülmeleri Hemen Bildirin: Dökülme veya kırılmış kaplar durumunda, hemen laboratuvar sorumlusuna bildirin, dezenfektanla (örneğin, %10 hipoklorit) kaplayın, 15-30 dakika bekleyin ve talimatlara göre temizleyin.
6. Ekipman Sterilizasyonu: Halka, iğne ve diğer yeniden kullanılabilir ekipmanları her kullanımdan önce ve sonra, Bunsen brülörü alevi veya başka uygun bir yöntemle sterilize edin.
7. Ekipmanı Doğru Kullanın: Pipet, mikroskop ve terazi gibi ekipmanları sadece eğitim aldıysanız kullanın; her kullanımdan sonra ekipmanı kapatın.
8. Atıkların Doğru Atılması: Tüm atık malzemeleri belirtilen kaplara atın (örneğin, kesici aletler “kesici-delici” kutulara, enfekte materyaller “kırmızı tıbbi atık kutularına” ve enfekte olmayan atıklar “gri evsel atık kutularına”).
9. Yanıcı Maddeler: Yanıcı maddeleri (örneğin, alkol) açık alevlerden uzak tutun.
10. El Yıkama: Her oturumdan sonra ellerinizi sabun ve su ile iyice yıkayın ve gerekirse antiseptik sıvı kullanın.
11. Yoklama ve Raporlama: Her oturumdan sonra yoklama kağıdını imzalayın ve gerektiğinde sorumlu kişiye bir çalışma raporu sunun.
12. Son Kontroller: Çıkmadan önce tüm gaz, su muslukları ve mikroskop lambalarının kapalı olduğundan ve laboratuvar malzemelerinin dışarıya çıkarılmadığından emin olun.



a-Kesici ve delici atık kutusu b-Tıbbi atık kutusu

c-Evsel atık kutusu

Kan-İmmün Sistem-Tümör KURULU

1. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

LABORATUVAR: ANK-215

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Antibiyotik duyarlılık test yöntemlerini, disk difüzyon ve E-test dahil olmak üzere tanımlayabilir
Duyarlılık sonuçlarını yorumlayarak antibiyotik seçimini yönlendirebilir
Kirby-Bauer disk difüzyon testini uygulayabilir ve inhibisyon bölgelerini CLSI/EUCAST standartlarına göre yorumlayabilir

Antibiyotikler enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Etken olarak izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyallere duyarlılık durumlarının saptanması;

- 1-Klinisyenin tedavi için en doğru antibiyotiği seçmesine yardımcı olmak
- 2-Toplum sağlığı için önemli olan antibiyotik direnç durumuna ilişkin veri oluşturmak
- 3-Yeni antibiyotiklerin etkinliğini belirlemek açısından önemlidir.

Duyarlılık testlerinde;

*Antibiyotik duyarlılıkları açısından test edilecek bakterilerin saf kültürler halinde olması gerekmektedir.

*Testte kullanılacak bakteri miktarı standart (McFarland) bir inokülümde olmalıdır

*Duyarlılık testleri çevre koşulları ile değişebileceğinden testin güvenilirliğini belirlemek için bilimsel çevrelerce önerilen standart mikroorganizma suşları da kullanılmalıdır.

*Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin uygulanması ve yorumlanmasında, dünyada duyarlılık testlerini standart hale getiren CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) veya EUCAST'ın (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) yaygın kullanımdaki temel standart olarak belirlenen yöntem ve değerleri baz alınır.

Duyarlılık testleri:

a) **Agar difüzyon testleri**

*Kirby-Bauer disk difüzyon

*E-test

b) **Dilüsyon testleri**

*Agar dilüsyon

*Broth dilüsyon

A- Agar Diffüzyon testleri

Bu yöntemde;

*Petri kaplarına 4 mm kalınlığında dökülmüş Müller-Hinton Agar (müskülpesent mikroorganizmalar için at kanlı müller hinton agar önerilmektedir) kullanılmaktadır.

*Besiyerlerinin oda ısısına getirilmesi ve yüzeyinin nemli, ıslak olmamasına dikkat edilmesi gerekmektedir.

* Bakteri yoğunluğu standartlar tarafından önerilen sıvı içerisinde 0,5 McFarland (~108 CFU/ml) olacak şekilde hazırlanır

*Steril eküvyon yardımıyla bakteri süspansiyonu agar yüzeyine yayılır ve kuruması için biraz beklenir

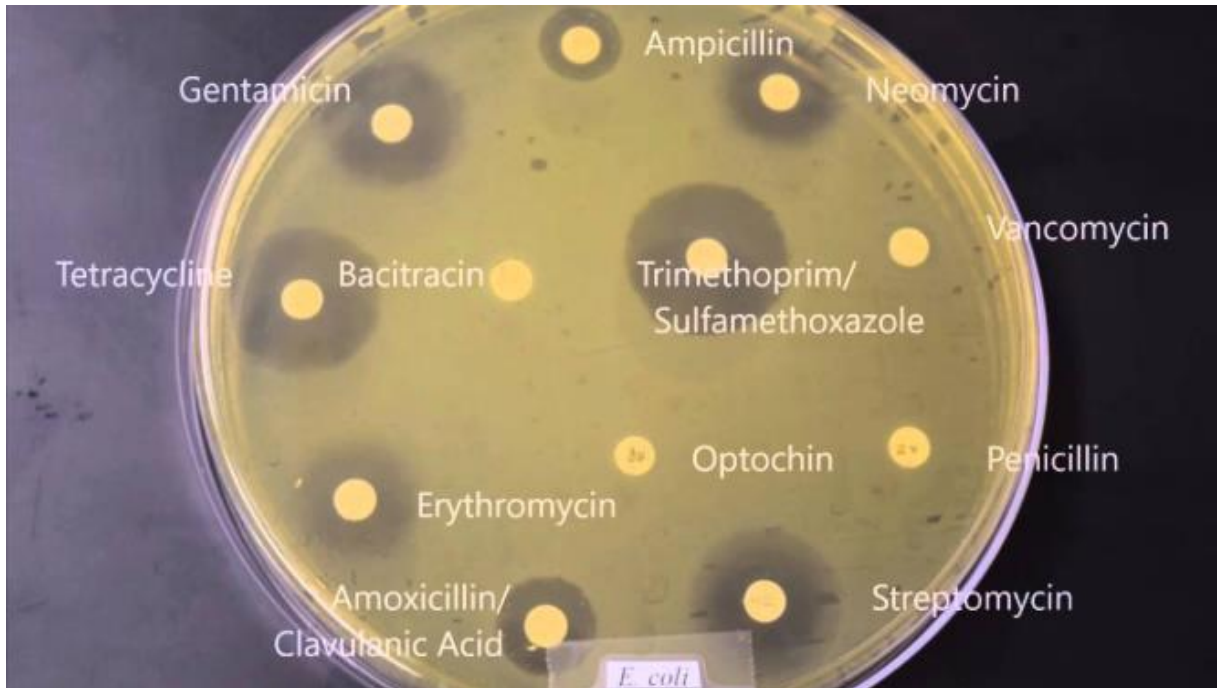
1. Kirby-Bauer Disk difüzyon yöntemi

*Petri yüzeyine test edilecek antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler steril penset yardımıyla birbirlerine çok yakın olmayacak şekilde (diskler besiyeri kenarından yaklaşık 15 mm ve birbirinden 25-30 mm uzaklıkta dizilirler) yerleştirilir.

*Petri bir gece 37 °C'de inkübasyona bırakılır.

*İnkübasyon sonrasında diskler etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek not edilir ve gerçek duyarlılığın saptanması için standart verilerle karşılaştırılır.

* Bakterinin duyarlılığını nitel olarak (kalitatif) belirleyen bir testtir.



Şekil 1. Kirby-Bauer Disk difüzyon

Tablo 1: CLSI duyarlılık sınır değerleri

Antimikrobiyal ajan	Disk bileşimi	Duyarlı	Orta duyarlı	dirençli
<i>S.aureus</i> için önerilen diskler				
Penisilin G	10 U	≤20	21-28	≥29
Eritromisin	15 µg	≤13	14-17	≥18
Kloramfenikol	30 µg	≤12	13-17	≥18
Tetrasiklin	30 µg	≤14	15-18	≥19

Tablo 2: EUCAST duyarlılık sınır değerleri

Enterobacterales*

Expert Rules and Intrinsic Resistance Tables

Cephalosporins ¹	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Cefaclor	-	-			-	-	
Cefadroxil (uncomplicated UTI only)	16	16		30	12	12	
Cefalexin (uncomplicated UTI only)	16	16		30	14	14	
Cefazolin (infections originating from the urinary tract), <i>E. coli</i> , and <i>Klebsiella spp.</i> (except <i>K. aerogenes</i>)	0.001	4		IP	IP	IP	
Cefepime	1	4		30	27	24	
Cefixime (uncomplicated UTI only)	1	1		5	17	17	
Cefotaxime	1	2		5	20	17	
Cefoxitin (screen only) ²	NA	NA		30	19	19	
Cefpodoxime (uncomplicated UTI only)	1	1		10	21	21	
Ceftaroline	0.5	0.5		5	23	23	22-23
Ceftazidime	1	4		10	22	19	
Ceftazidime-avibactam	8 ³	8 ³		10-4	13	13	
Ceftibuten (infections originating from the urinary tract)	1	1		30	23	23	
Ceftobiprole	0.25	0.25		5	23	23	
Ceftolozane-tazobactam ⁴	2 ⁵	2 ⁵		30-10	22	22	
Ceftriaxone	1	2		30	25	22	

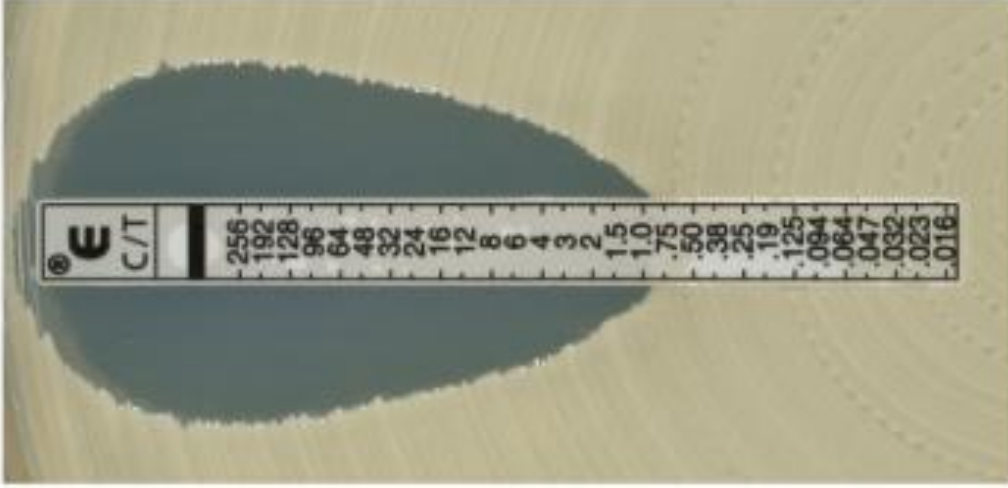
2. E-test (Epsilon, Gradient test)

*Petri yüzeyine antimikrobilyallerin çeşitli konsantrasyonlarını içeren stripler steril penset yardımıyla yerleştirilir.

*Petripler bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakılır.

*Bakteri inhibisyon zonunun E-test sribini kestiği yerin bir üst değeri minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri olarak kaydedilir ve standart verilerle karşılaştırılır.

*Bakterinin duyarlılığını nicel olarak (kantitatif) belirleyen bir testtir.



Şekil II. Gradient test (E-test)

B-Dilüsyon testleri

*Antimikrobiyal ajanların, önerilen sıvılar içerisinde gittikçe azalan seri dilüsyonları hazırlanır.

Örnek:

256 µg/ml-128 µg/ml-64 µg/ml-32 µg/ml-16 µg/ml-8 µg/ml-4 µg/ml.....

1. Agar Dilüsyon

Aerop bakteriler için Müller Hinton Agar (MHA), anaerop bakteriler için Brucella Agar, Campylobacter gibi mikroaerofilik bakteriler için at/koyun kanlı MHA gibi besiyerleri kullanılır.

*Hazırlanan antibiyotiklerin seri sulandırılmaları standartlarda belirtilen oranlarda petrilere dökülür (antibiyotik besiyerine 1/10 olacak şekilde eklenir).

*Üzerine 56 °C civarında olan agardan belirtilen oranda ilave edilir ve petri elde hafifçe sağa sola eğilerek karışması sağlanır.

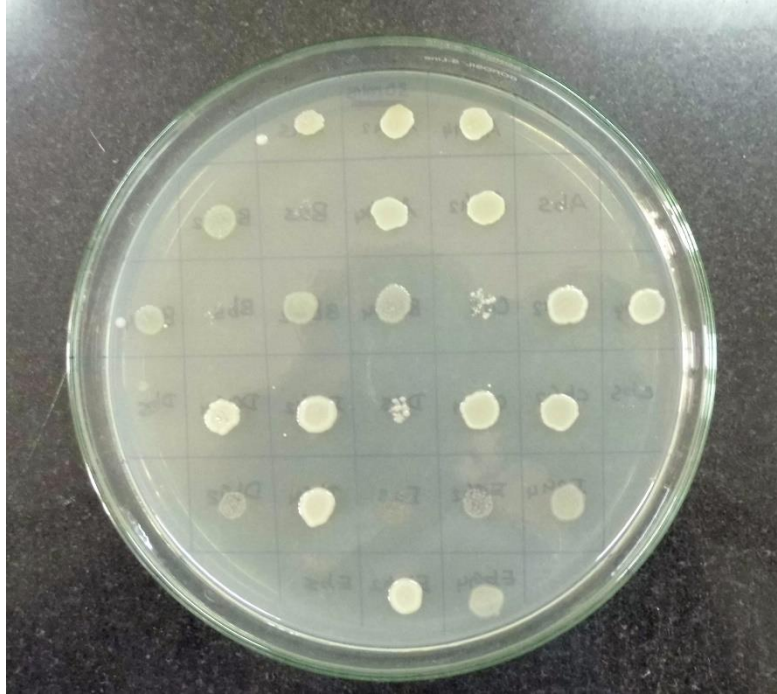
* Test edilecek bakterinin yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanır, takiben 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 kob / ml elde edilir.

*Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 0.1-2 µl otomatik pipetler yardımıyla alınarak besiyeri yüzeyine inoküle edilir.

* Böylelikle agar yüzeyindeki bakteri sayısı ortalama $1-2 \times 10^4$ kob / ml olur.

*Petriler bir gece 35°C'de 16-20 saat inkübasyona bırakılır.

*Üremenin olmadığı ilk dilüsyon minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri olarak kaydedilir ve standart verilerle karşılaştırılır.



Şekil II. Agar dilüsyon

2. Broth dilüsyon

Broth dilüsyon, "makro" ve "mikro" olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Her iki yöntemin de prensibi aynıdır. Makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise "U" tabanlı mikroplyetler kullanılır.

*Tüp dilüsyon yönteminde besiyeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton broth kullanılır.

*Antimikrobiyal ajanların, önerilen sıvı içerisinde gittikçe azalan seri dilüsyonları hazırlanır

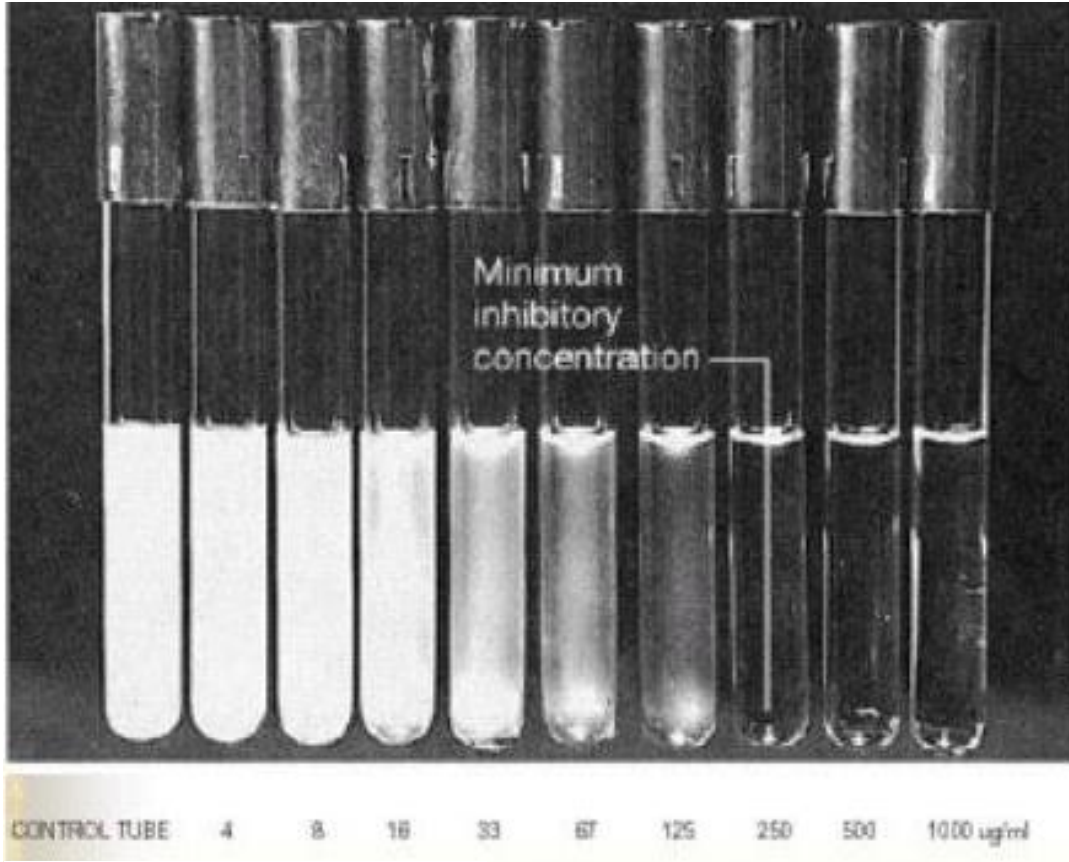
*Mikroorganizmanın standart bir inokulumu (10^8 Kob/ml) hazırlanıp, antimikrobiyal ajanın çeşitli dilüsyonlarını içeren her bir tüpe eşit miktarlarda eklenir.

*Ayrıca antibiyotik içermeyen, üremenin göstergesi olan kontrol tüpüne de eklenir.

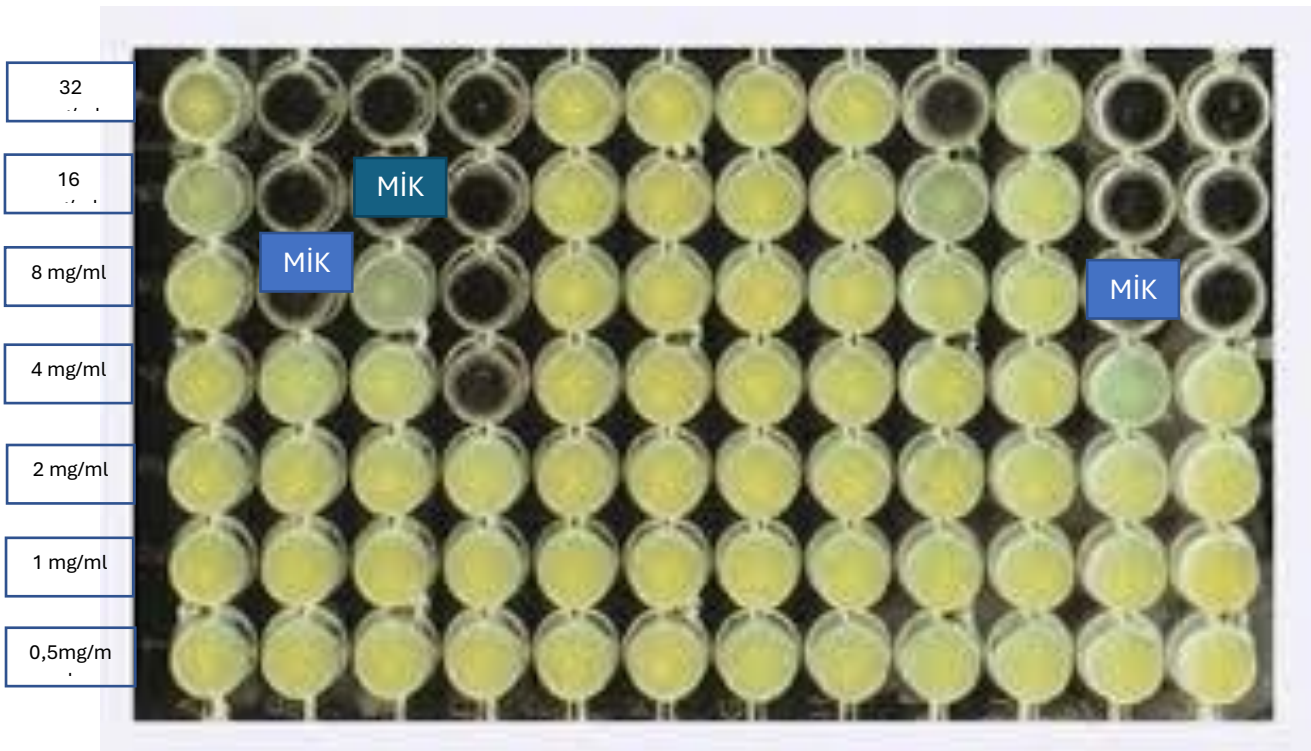
*Bakteri inoküle edilmemiş, sadece besiyeri konmuş bir tüp de besiyeri kontrolü olarak hazırlanır.

*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 III. Tüpte dilüsyon



Şekil IV. Mikroplette dilüsyon (mikrodilüsyon) yöntemi

UYGULAMA

1) Kirby-Bauer Disk difüzyon yöntemi ile kullanılan antibiyotik disklerine karşı oluşan bakteri zon çaplarını (milimetre) ölçünüz ve 01.01.2020 tarihinde EUCAST tarafından yayımlanan aşağıdaki güncel tablodan yola çıkarak; bakteriyi her bir antibiyotiğe karşı **Dirençli (R)**, **Orta (I)**, **Duyarlı (S)** olarak değerlendiriniz.

Enterobacterales*

Expert Rules and Intrinsic Resistance Tables

Cephalosporins ¹	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Cefaclor	-	-			-	-	
Cefadroxil (uncomplicated UTI only)	16	16		30	12	12	
Cefalexin (uncomplicated UTI only)	16	16		30	14	14	
Cefazolin (infections originating from the urinary tract), <i>E. coli</i> , and <i>Klebsiella spp.</i> (except <i>K. aerogenes</i>)	0.001	4		IP	IP	IP	
Cefepime	1	4		30	27	24	
Cefixime (uncomplicated UTI only)	1	1		5	17	17	
Cefotaxime	1	2		5	20	17	
Cefoxitin (screen only) ²	NA	NA		30	19	19	
Cefpodoxime (uncomplicated UTI only)	1	1		10	21	21	
Ceftaroline	0.5	0.5		5	23	23	22-23
Ceftazidime	1	4		10	22	19	
Ceftazidime-avibactam	8 ³	8 ³		10-4	13	13	
Ceftibuten (infections originating from the urinary tract)	1	1		30	23	23	
Ceftobiprole	0.25	0.25		5	23	23	
Ceftolozane-tazobactam ⁴	2 ⁵	2 ⁵		30-10	22	22	
Ceftriaxone	1	2		30	25	22	

Bakteri: *Escherichia coli* (Enterobacterales takımından)

Antibiyotik	Zon çapı (mm)	R / I / S

Kaynaklar

1-Koneman E.W. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

2- Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, Missouri.

3-McPherson RA., Pincu MR. Henry's Clinical Diagnosis and management by Laboratory Methods. 24th ed. Elsevier