

## EUCAST disk difüzyon testi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinin belirlenmesi için besiyeri hazırlanması

### A. Disk difüzyon testi için besiyeri

#### Mueller-Hinton agar (MHA) ve defibrine at kanı + $\beta$ -NAD eklenmiş MHA (MH-F)

**MH agar**, kolay üreyen organizmaların disk difüzyon testinde kullanılmaktadır.

**MH-F agar**, mekanik yöntemlerle defibrine edilmiş %5 at kanı ve 20 mg/L  $\beta$ -NAD içeren MHA, *Streptococcus* spp. (*S. pneumoniae* dahil), *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp. ve diğer bazı güç üreyen organizmaların test edilmesinde kullanılmaktadır.

Agar plakları besiyeri firmalarından hazır besiyeri formunda ticari olarak temin edilebilir veya aşağıda tarif edildiği şekilde laboratuvar tarafından hazırlanabilir:

Maddeler	
1.	Ticari kaynaklardan temin edilen MHA toz besiyeri.
2.	Mekanik yöntemlerle defibrine edilmiş at kanı.
3.	$\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid ( $\beta$ -NAD), saflık $\geq$ %98.

$\beta$ -NAD stok çözeltisinin hazırlanması	
1.	$\beta$ -NAD'yi steril deiyonize su içerisinde konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde çözün.
2.	Çözeltiyi 0.2 $\mu$ m membran filtreden geçirerek steril edin.
3.	Stok çözeltisi porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklanabilir ve gerektiğinde çözülerek kullanılabilir. Kullanılmayan çözelti tekrar dondurulmamalıdır.

<b>Agar plaklarının hazırlanması</b>	
1.	MHA'yı üreticinin talimatları doğrultusunda hazırlayın ve otoklavlayın.
2.	Besiyerini 42-45°C'ye soğutun.
3.	MH-F için, aseptik olarak besiyerinin her bir litresine mekanik yöntemlerle defibrine edilmiş 50 mL at kanı ve 1 mL $\beta$ -NAD stok çözeltisi ekleyin. İyice karıştırın ve hemen dağıtın.
4.	Besiyerini steril Petri plaklarına besiyeri kalınlığı 4 mm $\pm$ 0.5 mm olacak şekilde dağıtın (90 mm çaplı dairesel plaklar için yaklaşık 25 mL, 100 mm çaplı dairesel plaklar için 31 mL, 150 mm çaplı dairesel plaklar için 71 mL, 100 mm kenar uzunluğu olan kare plaklar için 40 mL).
5.	Plakları hareket ettirmeden önce agarın donmasını bekleyin.
6.	Kullanım öncesi agarın yüzeyi kuru olmalıdır. Plakları kurutma gereksinimi ve agar yüzeylerini kurutmak için gerekli süre, saklama ve kurutma koşullarına bağlıdır. Plakları aşırı kurutmayın.

<b>Agar plaklarının depolanması</b>	
1.	Plakları hava alabilen plastik kutularda 8-10°C'de saklayın. Eğer plakların yedi günden daha uzun sürelerde saklanması gerekiyorsa, plakların sıkıca kapanabilen plastik kutularda, 4-8°C'de saklanması gibi alternatif depolama koşulları gerekebilir.
2.	Laboratuvar tarafından hazırlanan plaklar için plakların kurutulması, depolama koşulları ve raf ömrü laboratuvar kalite güvencesi programı kapsamında belirlenmelidir.
3.	Ticari hazır besiyerleri üreticinin önerileri doğrultusunda depolanmalı ve etiketinde belirtilen son kullanım tarihine göre kullanılmalıdır.
4.	Plastik torbalarda veya sıkıca kapanabilen kutularda saklanan MH-F agar plaklarının (ticari veya laboratuvar tarafından hazırlanmış) kullanım öncesinde kurutulması gerekebilir. Bunun amacı belirsiz zon sınırları ve/veya zon içinde puslu görünüme neden olabilecek aşırı nemin giderilmesidir.

<b>Kalite kontrol</b>	
1	Yüzey pH elektrodu kullanarak pH değerinin 7.2-7.4 aralığında olduğunu kontrol edin.
2	Agar kalınlığının 4 mm $\pm$ 0.5 mm olduğunu kontrol edin.
3	Besiyerinin test edilmesi amaçlanan organizmalar için uygun kontrol köken(ler)i kullanıldığında güçlü bir üreme sağladığını kontrol edin.
4	Kullanılan tüm bakteri-antimikrobik madde kombinasyonları için inhibisyon zonlarının kontrol sınırları içerisinde olduğunu kontrol edin.

## **B. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK belirlenmesi için besiyeri**

### **Katyonu ayarlanmış Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) ve hemolizli at kanı + $\beta$ -NAD eklenmiş MHB (MH-F sıvı besiyeri)**

**MH sıvı besiyeri**, ISO standardı 20776-1, 2006'ya göre, kolay üreyen organizmaların sıvı mikrodilüsyon testi için katkı içermeyen katyonu ayarlanmış Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır.

**MH-F sıvı besiyeri**, %5 hemolizli at kanı ve 20 mg/L  $\beta$ -NAD eklenmiş MH sıvı besiyeri, *Streptococcus* spp. (*S. pneumoniae* dahil), *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp. ve diğer bazı güç üreyen organizmaların test edilmesinde kullanılmaktadır.

MH-F sıvı besiyeri aşağıda tarif edildiği şekilde hazırlanır:

<b>Maddeler</b>	
1.	Ticari kaynaklardan temin edilen katyonu ayarlanmış MHB.
2.	%50 hemolizli at kanı.
3.	$\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid ( $\beta$ -NAD), saflık $\geq$ %98.

<b>%50 hemolizli at kanı stok çözeltisinin hazırlanması</b>	
1.	Aseptik olarak at kanını eşit miktarda steril deiyonize su ile sulandırın.
2.	Kanı bir gece -20°C'de dondurun ve ardından çözün. Bu döngüye tüm hücreler tamamen hemoliz olana dek tekrar edin (üç döngü genellikle yeterlidir ama ISO standardı 20776-1 yedi kadar döngünün gerekli olabileceğini önermektedir).
3.	%50 hemolizli at kanını santrifüjleyerek berrak bir görünüm almasını sağlayın. Berrak bir çözelti değerlendirme için şarttır. Berrak olmayan çözeltinin sebebi uygun olmayan lizis veya santrifügasyona bağlı olabilir. Santrifügasyonun tekrarlanması çözeltinin berraklığında iyileşmeye yardımcı olabilir.
4.	Stok çözeltisi porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklanabilir ve gereklikçe çözülerek kullanılabilir. Kullanılmayan çözelti tekrar dondurulmamalıdır.

<b><math>\beta</math>-NAD stok çözeltisinin hazırlanması</b>	
1.	$\beta$ -NAD'yi steril deiyonize su içerisinde konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde çözün.
2.	Çözeltiyi 0.2 $\mu$ m membran filtreden geçirerek steril edin.
3.	Stok çözeltisi porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklanabilir ve gereklikçe çözülerek kullanılabilir. Kullanılmayan çözelti tekrar dondurulmamalıdır.

<b>MH-F sıvı besiyerinin hazırlanması</b>	
1.	Katyonu ayarlanmış MHB'yi üreticinin talimatları uyarınca hazırlayın ve otoklavlayın, ancak hemolizli at kanı ekleneceğinden her bir litre için 100 mL az deiyonize su kullanın.
2.	Besiyerini 42-45°C'ye soğutun.
3.	Aseptik koşullarda 100 mL %50 hemolizli at kanı ve 1 mL $\beta$ -NAD stok çözeltisini 1 litre besiyerine ekleyin ve iyice karıştırın.
4.	Vidalı kapaklı steril tüplere MH-F sıvı besiyerini dağıtın.

<b>MH-F sıvı besiyerlerinin depolanması</b>	
1.	MH-F sıvı besiyerlerini 4-8°C'de saklayın.
2.	Depolama koşulları ve raf ömrü laboratuvar kalite güvencesi programı kapsamında belirlenmelidir. Raf ömrü olarak 3 ay ön görülebilir.

<b>Kalite kontrol</b>	
1	pH değerinin 7.2-7.4 aralığında olduğunu kontrol edin.
2	Besiyerinin test edilmesi amaçlanan organizmalar için uygun kontrol köken(ler)i kullanıldığında güçlü bir üreme sağladığını kontrol edin.
3	Kullanılan tüm bakteri-antimikrobik madde kombinasyonları için MİK değerlerinin kontrol sınırları içerisinde olduğunu kontrol edin.