



TiBO

İNÖVATİF BİYOTEKNOLOJİ ORGANİZASYONU

BIOPROSAFE

NİCEL (KANTİTATİF) KÜLTÜR KİTİ

KLİNİK ÖRNEKLERİ NİCEL KÜLTÜRE HAZIRLAMAK İÇİN İŞLEME VE SEYRELTME KİTİ

Katalog No:QC010-020

Kullanım Yönergesi

Canlı Dışında Kullanım İçindir

Ürünün İsmi:

BIOPROSAFE

Kullanım Amacı:

BIOPROSAFE, alt solunum yolu salgıları gibi klinik örneklerde enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların miktarının nicel, (sayısal, kantitatif) olarak belirlenebilmesi için örneğin işlenmesi ve seyreltilerinin kolayca yapılması için kullanılır. İn vitro kullanım içindir.

Genel Bilgi:

Enfeksiyon hastalıklarının tanı ve tedavisinde, antibiyotiklerin in vivo etkinliklerinin araştırılmasında, kronik ve eradikasyonu zor enfeksiyonlarda tedavinin izlenmesinde nicel kültür önem taşır. **BIOPROSAFE** klinik örneklerde enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların derişimlerinin belirlenmesi için hazırlanmış, kolayca nicel kültür yapılmasını sağlayan bir örnek işleme kitidir. Nicel kültür yapılmasına gereksinim duyulan klinik örnekler arasında en sıklıkla alt solunum yolu salgıları bulunmaktadır. Nicel kültür, özellikle yoğun bakımda, yapay solunum ağıtına bağlı öykencelerin (pnömoni) izlenmesinde önem taşır. Balgam gibi salgıların akışkan olmayan nitelikleri nicel kültür yapılmasını zorlaştırmaktadır. Kistik fibrozisi olan hastalarda kronik Pseudomonas enfeksiyonları görülür ve bu hastaların çıkardıkları balgamin akışkanlığı çok azdır; homojenizasyonu ve seyreltisi çok güçtür. **BIOPROSAFE** örnek toplama tüpündeki N-asetil-L-sistein ve polikarbonat boncuklar sıvılaştırma ve homojenizasyon işleminin kolayca yapılmasını sağlar. Örnek toplama tüpü ve tüm içeriği gama ışınları ile sterilize edilmiştir. Örnek homojenizasyonu sonrası, örneğin seyreltilerinin yapılması ve bu seyreltimlerden uygun kültür besiyerine ekilmesi gerekmektedir. **BIOPROSAFE** te seyreltimlerin kolayca yapılabilmesi için miktarı ayarlanmış bir dizi steril fosfat tamponu içeren tüp kullanıma hazır durumdadır.

Yöntemin kısıtlı yanları:

BIOPROSAFE ile kesin anaerobik bakterilerin nicel kültür için seyreltimleri yapılamaz.

Yöntemin Bilimsel Temeli:

Klinik örnekte bir mikroorganizmanın derişiminin belirlenebilmesi için nicel kültür yöntemi sıklıkla kullanılır. Balgam gibi akışkanlığı az olan örneklerin her noktasında eşit miktarda mikroorganizma bulunmadığından, önce, alınan örneğin homojenize edilmesi gerekir. Bu işlem fosfat tamponu gibi çözeltiler tek başına kullanıldığında oldukça güçtür. **BIOPROSAFE** 'te (QC010) örneğin akışkanlığını sağlamak ve homojenizasyonu kolaylaştırmak için N-asetil-L-sistein ve polikarbonat boncuk içeren bir tüp bulunur. N-asetil-L-sistein güçlü bir indirgeyici maddedir ve mukus proteinlerindeki disülfid (-S-S-) bağlarını indirgeyerek (-SH HS-) kırar, proteinlerin üç boyutlu yapısını bozarak, viskozite yaratma özelliklerini ortadan kaldırır (N-asetil-L-sistein homojenizasyon için mutlaka gerekli değildir. N-asetil-L-sistein örneğe katılmak istenmiyorsa, bu maddeyi içermeyen QC020 katalog numaralı **BIOPROSAFE** kullanılabilir.). Polikarbonat boncuklar ise çalkalama sırasında mekanik etki ile örneğin seyreltim sıvısı ile karışmasını, sıvılaşmasını ve homojenizasyonunu kolaylaştırır. Homojenize edilen örneğin 1/10' luk seyreltimlerinin yapılabilmesi için gerekli steril fosfat tamponu 8 adet tüpte bulunmaktadır. Birinci (10^{-1}) seyreltim tüpünde 9 mL, ikinciden sekizinciye dek olan (10^{-2} - 10^{-8}) seyreltim tüplerinde ise 4,5 mL steril fosfat tamponu bulunur. Örnek toplama tüpüne 1 mL örnek konup, üzerine ilk seyreltim tüpünün tamamı boşaltıldığında 1/10'luk seyreltim elde edilir. Örneğin homojenizasyonu sonrasında bu tüpten 0.5 mL alınıp bir sonraki tüpe aktarıldığında bir kez daha 1/10'luk seyreltim yani örneğin 10^{-2} 'lik seyreltimi elde edilir. İşlem diğer seyreltim tüpleri kullanılarak tekrarlandığında örnek 10^{-8} keze dek seyreltilmiş olur. Bu seyreltimlerden uygun kültür besiyerine ekim yapıldığında, uygun bir seyreltimde sayılabilir düzeyde koloni elde edilir. Bu koloniler sayılıp seyreltim katsayısı ile çarpıldığında örneğin mililitresindeki canlı mikroorganizma sayısı hesaplanır.

İçerik:

- **Örnek Toplama tüpü:** Steril 50 mL polipropilen tüp içerisinde $\approx$ 50 mg N-Asetil-L-Sistein ve 4 mm çapında polikarbonat boncuklar. (QC020' de N-Asetil-L-Sistein bulunmamaktadır.)
- **Seyreltim tüpleri:** Steril pet tüpler içerisinde, 0,05 M fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6,8).

Dikkat Edilmesi Gerekenler ve Uyarılar:

- Canlı dışında (in vitro) kullanım içindir.
- Seyreltim tüplerinde çalkalama yapmadan önce kapakların sıvı sızdırmayacak şekilde sıkıca kapandığından emin olunuz.
- Patojen mikroorganizmaların tanısında kullanılan laboratuvar yöntemleri, laboratuvar kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi açısından özel önlemler gerektirir. Örnek işleme, sınıf II biyogüvenlik kabininde ve giriş çıkışı laboratuvar çalışanları ile sınırlandırılmış alanlarda yapılmalıdır. Bu alanda yüzeyler, bir yüzey dezenfektanı ile silindiğinde kolayca temizlenebilecek yapıda olmalıdır.

Genel Güvenlik Kuralları:

- Enfeksiyon etkeni içermesi olası olan örneklerle çalışırken daima eldiven ve maske takılmalıdır.
- Pipetleme, çözelti ekleme, boşaltma gibi işlemler daima düzey II biyogüvenlik odacığında gerçekleştirilmelidir.
- Hiçbir zaman ağızla çekerek pipetleme yapılmamalıdır.
- Kontamine bir sıvı dökülecek olursa %2,5'lik hipo-klorit çözeltisi ile temizlenmelidir.
- İş biten malzemeler çevre güvenliğine uygun şekilde atılmalıdır.

Saklama Koşulları:

Oda sıcaklığında saklayınız.

Bozulma Belirtileri:

BIOPROSAFE in seyreltim tüplerinde bulanıklık var ise kullanmayınız.

Örnek Toplama, Taşıma, Saklama:

- Hastaların çıkardığı balgam veya trakeal aspirasyon, bronşiyal yıkama gibi örnekler **BIOPROSAFE** ile işlenebilir.
- Örnekler temiz boş, tercihen steril kaplar içerisine alınmalıdır. Bu kaplar herhangi bir katkı maddesi içermemelidir.
- Örnekler alındıktan sonra en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalı ve bekletmeden çalışmaya alınmalıdır. Hemen çalışılmayan örnekler buzdolabında, 4°C' da bekletilmeli, laboratuvara gönderilirken soğutmalı kutular içerisine konmalıdır.

Verilen Malzemeler:

Karton kutu içerisinde 10 **BIOPROSAFE** kiti bulunmaktadır. Her kit 1 adet örnek toplama tüpü ve sekiz adet örnek seyreltim tüpünden oluşmaktadır.

Gerekli Ek Malzemeler:

- Otomatik pipetler: 2-20 ve 200-1000 µl
- Steril otomatik pipet uçları
- Vorteks
- Kültür besiyeri

Zaman ve Sıcaklık Parametreleri:

Uygulama oda sıcaklığında gerçekleştirilir. Alınan örneklerde mikroorganizma sayısının değişmemesi için uygulamanın örnek alınmasından sonra mümkün olan en kısa zamanda (en geç 2-3 saat içerisinde) yapılması önerilir. Seyreltimler yapıldıktan sonra ekimler beklenmeden yapılmalıdır.

Uygulama:

1. Akışkan olmayan balgam gibi örneklerden nicel (kantitatif) kültür yapacağınız zaman klinik örnekten 1 mL örnek toplama tüpü içerisine koyunuz.
2. 10^{-1} seyreltim tüpündeki fosfat tamponunun tamamını steriliteye dikkat ederek örnek tüpüne boşaltınız. Tüpün kapağını sıkıca kapatınız.



TiBO

İNOVATİF BİYOTEKNOLOJİ ORGANİZASYONU

Üretici Firma:

İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu Tic. Ltd. Şti.

Ahmet Yesevi Mah. Kerem Sok.

No:9/1-7

Pendik 34903

İSTANBUL, TÜRKİYE

Katalog Numarası:

QC010 (Örnek tüpü N-Asetil-L-Sistein içerir.)

QC020 (Örnek tüpü N-Asetil-L-Sistein içermez.)



3. Vorteks ile tüpü çalkalayarak örneğin homojenize olmasını ve on kat seyrelmesini sağlayınız (eğer örnek akışkan ve homojen ise, 1 mL örneği doğrudan 10^{-1} seyreltim tüpüne koyarak karıştırınız).
4. Otomatik pipet yardımı ile 0.5 mL 10^{-1} seyreltim yapılmış örnekten alıp 10^{-2} seyreltim tüpüne koyarak örneğin on kat daha seyrelmesini sağlayınız. Tüpün kapağını sıkıca kapatıp ters düz ederek veya vorteks ile çalkalayınız.
5. Otomatik pipet yardımı ile 0.5 mL 10^{-2} seyreltim yapılmış örnekten alıp 10^{-3} seyreltim tüpüne koyarak örneğin on kat daha seyrelmesini sağlayınız (sıvı aktarmasını en sona dek aynı pipet ucu ile yapabilirsiniz; pipet ucunu değiştirmenize gerek yoktur).
6. Aynı şekilde on kat seyreltimlere diğer seyreltim tüplerini kullanarak devam ediniz.
7. Kültür için Petri kutusunda hazırlanmış uygun besiyeri veya besiyerlerini seçiniz.
8. Petri kutusunun alt tarafına silinmez (asetata yazan) kalem ile çizerek sekiz eşit parçaya bölünüz. Parçalara 10^{-8} 'e dek numara yazınız.
9. Yapmış olduğunuz seyreltimlerden, 10^{-8} 'den başlayarak, örnek tüpündeki 10^{-1} 'e doğru giderek, petri kutusundaki ilgili bölümün ortasına 10 µl aktarınız. Sıvıyı kendi kendine yayılmaya bırakınız, pipet ucu ile kesinlikle yaymayınız (en seyreltik tüpten daha derişik tüplere doğru ekim yaptığınız için her defasında pipet ucunu değiştirmenize gerek yoktur).
10. Kültür besiyerini inkübatöre kaldırınız ve uygun süre inkübatörde bırakınız.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Kültür plağını inkübatörden çıkartıp, üremeleri inceleyiniz.

Tek tek kolonilerin sayılabildiği, en az 8-10 koloninin bulunduğu bir seyreltim tüpünden yapılmış ekimi bulunuz. Buradaki kolonileri sayınız.

Bulduğunuz rakamı 10^n ile çarpınız (n =seyreltim katsayısı + 2). On mikrolitre yani bir mililitrenin yüzde biri ekildiğinden, mililitredeki toplam miktarı bulmak için yüzle çarpmak, bunun için seyreltim katsayısına "2" daha eklemek gerekmektedir.

Örnek: 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltim tüplerinden yapılan ekimlerde sayılamayacak denli çok, silme üreme olsun. 10^{-4} seyreltim tüpünden yapılan ekimde 17 koloni, 10^{-5} tüpünden yapılan ekimde iki koloni olsun. Bu durumda değerlendirmeye alınması gereken 10^{-4} seyreltim tüpünden yapılan ekimdeki 17 kolonidir. Orijinal örnekteki canlı mikroorganizma sayısı (cfu -colony forming unit-):

$$17 \times 10^{(4+2)} = 17 \times 10^6 = 1.7 \times 10^7 \text{ cfu/mL olacaktır.}$$

Kalite Kontrol:

Taze kültürden hazırlanmış *Escherichia coli* (ATCC 25922) 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonun seyreltimleri **BIOPROSAFE** ile hazırlanarak yapılan ekimlerde uygun sayıda bakteri derişiminin saptanıp saptanmadığına bakılarak kalite kontrol yapılmaktadır.

Yöntemin Kısıtlı Yanları:

Balgam gibi akışkanlığı az örneklerde 1 mL örneğin ölçülerek örnek işleme tüpüne konması zor olabilir. Bu sorunu aşmak için ucu ateşte steril edilmiş bir makas ile kestiğiniz 1 mL otomatik pipet ucu kullanabilirsiniz.

Performans Özellikleri:

BIOPROSAFE ile işlenen örneklerde, klasik yöntemlere göre kontaminasyon oranının daha düşük olması ve nicel canlı mikroorganizma belirlenmesinin daha doğru yapılması beklenmektedir.

Raf ömrü:

1,5 yıl.

Kaynaklar:

1. Middleton R, Broughton WA, Kirkpatrick MB. Comparison of four methods for assessing airway bacteriology in intubated, mechanically ventilated patients. Am J Med Sci. 1992, 304:239-45.
2. DC Bergmans, MJ Bonten, PW De Leeuw and EE Stobberingh. Reproducibility of quantitative cultures of endotracheal aspirates from mechanically ventilated patient. J Clin. Microbiol. 1997, 35:796-798.
3. Albert S, Kirchner J, Thomas H, Behne M, Schur J, Brade V. Role of quantitative cultures and microscopic examinations of endotracheal aspirates in the diagnosis of pulmonary infections in ventilated patients. J Hosp Infect. 1997, 37:25-37.