ÖZET

MİNİMAL İNHİBİSYON KONSANTRASYONU (MIK) BELİRLEME TESTİ ŞERİDİ

Bu buluş; pamuk, keten, ve ipek kumaş üzerine antibiyotik ekerek üretilmiş şeritler (1) kullanılarak bir minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIK) belirleme testi ile ilgilidir. Buluşun amacı, minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIK) belirleme testi kitinde ölçüm yapabilmek için kullanılan ve bir yüzeyi cetvel içeren şeritler için pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk-polimer karışımından oluşan kumaş kullanılmasıdır.

İSTEMLER

1. Buluş konusu MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1), vücut dışı tanı cihazı (IVD) kullanılarak, mikroorganizmaların (A) anti bakteriyeller (anibiyotik, anti mikostatiklerin veya diğer biylojik sıvılarda) ile etkileşimi ölçütünün (MİK değerinin) belirlenmesi amacıyla uygun agarlı besiyerine sahip bir petri kabında (B) ekimi yapılmış mikroorganizmalarla (A) ilaç ekili katmanı temas ettirilecek şekilde petri kabına (B) yerleştirilen ve tercihen dikdörtgen bir plaka formunda olup, antibiyotik ekili katman petri kabındaki (B) mikroorganizmaların (A) üzerine temas edecek şekilde petri kabına (B) yerleştirilen ve penset ile hafifçe şerit üzerine bastırılarak, her yerin yapışması sağlanan,

- bir dikdörtgen plaka formunda olup, petri kabındaki (B) mikroorganizmalara (A) temas edecek şekilde konumlandırılan en az bir etkileşim katmanı (2),
- etkileşim katmanı (2) ile aynı form ve boyutlarda olup, etkileşim katmanına (2) mikroorganizmalara (A) temas etmeyen yüzünden birleştirilen en az bir cetvel katmanı (3) **içeren ve**,
- mikroorganizmalara (A) temas eden yüzeyi üzerine mikroorganizmalar (A) ile etkileşimi incelenecek olan antibiyotiğin, dikdörtgen yapısının kısa kenarları arasında giderek azalan miktarlarda ekildiği ve kumaş malzemeden üretilmiş etkileşim katmanı (2),
- etkileşim katmanı (2) üzerine ekilen antibiyotik konsantrasyonunu anlaşılabilmesi amacıyla, konsantrasyon değerini ifade eden sayılara ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen konumların ifade edildiği çizgilere sahip cetvel katmanı (3) **ile karakterize edilen** bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

2. Etkileşim katmanına (2) benzer olarak pamuklu kumaş kullanılarak üretilen ve etkileşim katmanı (2) ile yekpare olarak oluşturulan bir cetvel

katmanı (3) **ile karakterize edilen** İstem 1' deki gibi bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

3. Hava geçirgenliği bulunmayan, yırtılmaya ve kopmaya karşı daha dayanıklı, maliyet açısından daha avantajlı, temini daha kolay ve antibiyotik maddenin daha kolay ve daha hızlı difüze olmasına olanak tanıyan pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk- polimer karışımından oluşan etkileşim katmanı (2) **ile karakterize edilen** İstem 1' deki gibi bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

4. Pamuk-polimer karışımından oluşan kumaş yapılarında kullanılan polimerin, polipropilen ve etilen bütilakrilat kopolimeri olan etkileşim katmanı (2) **ile karakterize edilen** İstem 1' deki gibi bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

5. Pamuk- polimer karışımı kumaşının, %50 veya daha fazla oranda pamuk içeriğine sahip sentetik kumaş olan etkileşim katmanı (2) **ile karakterize edilen** İstem 4' teki gibi bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

6. Alüminyum, plastik veya kâğıt malzemeden üretilmiş olan cetvel katmanı (3) **ile karakterize edilen** İstem 1' deki gibi bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

7. Üretilmesi esnasında, yüzeyine okuma yapılabilmesini sağlayan sayısal değerler ve çizgilerin matbaada basılması ile oluşturulan cetvel katmanı (3) **ile karakterize edilen** İstem 1' deki gibi bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

8. Bir etiket yapısında olup, etkileşim katmanı (2) üzerine yapıştırılarak sabitlenen cetvel katmanı (3) **ile karakterize edilen** İstem 1' deki gibi bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

9. Etkileşim katmanı (2) ve cetvel katmanının (3) kumaş malzeme kullanılarak üretilmesi **ile karakterize edilen** İstem 1' deki gibi bir MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1).

36832.01

TARİFNAME

MİNİMAL İNHİBİSYON KONSANTRASYONU (MIK) BELİRLEME TESTİ ŞERİDİ

Teknik Alan

Bu buluş; pamuk, keten ve ipek kumaş üzerine antibiyotik ekerek üretilmiş şeritler kullanılan bir minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIK) belirleme testi ile ilgilidir.

Önceki Teknik

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı vücut dışındaki etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir ve "difüzyon" ve "dilüsyon" olmak üzere başlıca iki metot kullanılmaktadır.

Dilüsyon testleri, bir antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanır. Dilüsyon testleri "tüp dilüsyon" ve "agar dilüsyon" olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

Irith Wiegand, Kai Hilpert ve Robert E.W. Hancock tarafından, 17 Ocak 2008'de Centre for Microbial Diseases and Immunity Research yayınında (163-175 (2008)) tüp dilüsyon yönteminin "makro" ve "mikro" olmak üzere iki şekilde uygulanabileceğinden bahsedilmektedir. Prensipte her iki yöntemin de aynı olup, makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise "U" ya da "V" tabanlı "mikroplate"ler kullanılır. Tüp dilüsyon metodunda besiyeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton buyyon kullanılır. Test edilecek olan antibiyotikler önce özel çözücüleri içinde hazırlanır ve takiben bu sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırımları yapılır. Mikroorganizmanın standart

bir inokülumu ($1x10^6$ CFU/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 veya çukur da besiyeri kontrolü olarak hazırlanır. Besiyerleri 37°C sıcaklıkta 16-20 saat süreli 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. Dilüsyon testleri sonucunda elde edilen MİK değerleri klinisyene, infeksiyona neden olan mikroorganizmayı inhibe etmek için gerekli olan antimikrobiyal ilaç konsantrasyonunu vermektedir (Şekil 6.).

Tekniğin bilinen bir uygulamasında, antibiyotikler soldan sağa doğru azaltılarak sıvı besiyeri (broth) içinde sırayla sulandırılmış ve üzerlerine eşit hacimde ve eşit konsantrasyonda mikroorganizma ilave edilmiştir. Mikroorganizma ilavesi yapılmış tüpler 37 °C sıcaklıkta 16-20 saat süresince inkübe edilerek, elde edilen sonuç değerlendirilmiştir. Mikroorganizmanın üremediği tüpteki antibiyotik konsantrasyonu MIK değeri (6.25 µg/ml) olarak kaydedilmiştir [1, 2].

Teknikte bilinen, US47783758 referans numaralı Birleşik Devletler dokümanında bahsedilen buluş vücut dışı tanı için kullanılan MIK testleri ile ilgili olup, kullanılan belirleme testi şeridi (strip) materyalinin şeffaf, inert ve gözeneksiz yüzeye sahip olduğu belirtilmektedir. Bu patent ile ilk kez tüp dilüsyon testi ile yapılan MİK saptaması yerine, bir şerit üzerine ekilmesi başarılmıştır.

Oxoid Limited firmasının RAPIDMICROBIOLOGY'de 30/05/2008 tarihli "M.I.C.E valuators (M.I.C.E.) Simple, Convenient Method for Accurate MIC Values" başlıklı yayınında bahsedilen MIK testi şeritleri polimer malzemeden üretilmektedir. Ayrıca firmanın US6010910A referans numaralı Birleşik Devletler patent dokümanında, test kitleri içerisindeki şeritlerin plastik, kart veya benzer materyallerden üretilebileceği belirtilmiştir.

Liofilchem Srl firmasının EP2480682 referans numaralı Avrupa patent dokümanında bahsedilen buluşta ise MIK testleri için kullanılan belirleme testi şeridi materyalinin kağıt malzemeden üretildiği belirtilmektedir. Kağıt malzemeden üretilmiş şeritler kullanılarak bakteri ekilmiş besiyeri üzerine yapıştırılan şerit materyalinde hava kabarcığı oluşmasının önlenebildiği ve şeritlerin ortam ile hava temasının sağlanabildiği belirtilmektedir. Bununla birlikte, teknikte halihazırda mevcut olan yöntemde, şerit materyali besiyeri üzerine konulduktan sonra hava kabarcığı oluşmaması için üzerine penset ile bastırılmaktadır. Bu sebeple kullanılan materyalden bağımsız olarak, hava kabarcığı oluşması önlenebilmektedir.

Tekniğin bir başka bilinen durumunda, CN2564584 referans numaralı Çin faydalı model dokümanında bahsedilen buluş, bakteriyofaj virüslerinin minimum antibakteriyal derişiminin tespiti için kullanılan membrandan yapılma test çubuğu içeren bir tespit plakası ile ilgilidir. Filtrasyon membran çubuğu bir substrata sabitlenerek, tespit plakası ile ilaç duyarlılığının test edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Buluş, minimum antibakteriyal derişimi (MIK) ve ilaç duyarlılığı olmak üzere iki tespit bir arada yapabilmektedir. Ayrıca maliyeti düşük olması, kolay kullanılabilirliği ve güvenilirliği bakımından avantajlı olduğu belirtilmektedir.

Önceki teknikteki uygulamalar ile karşılaştırıldığında, pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk- polimer karışımından oluşan kumaş üretilmiş şeritler kullanılan bir minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIK) belirleme testi şeridi üretiminde kullanılan malzemenin, temininin kolay olması, maliyetin düşük olması, yıpranmaya ve yırtılmaya karşı dirençli malzemeden üretilmiş olması, antibiyotik maddenin daha kolay ve daha hızlı difüze olmasına olanak tanıması açısından avantajlı olduğu görülmektedir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Buluşun amacı, minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIK) belirleme testi kitinde ölçüm yapabilmek için kullanılan ve bir yüzeyi cetvel içeren şeritler için pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk- polimer karışımından oluşan kumaş kullanılmasıdır.

Buluşun diğer amacı, pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk-polimer karışımından oluşan kumaş kullanılarak yıpranmaya ve yırtılmaya karşı dirençli şeritler üretilmesini sağlamaktır.

Buluşun diğer amacı, pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk-polimer karışımından oluşan kumaş kullanılarak, antibiyotik maddenin daha kolay ve daha hızlı difüze olmasına olanak tanıyan şeritler üretilmesini sağlamaktır.

Buluşun bir diğer amacı, minimal inhibisyon konsantrasyonu belirleme testi kiti için daha uygun maliyetli ve temini daha kolay olan pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk- polimer karışımından üretilmiş şeritler kullanılmasıdır.

Buluşun bir başka amacı, iki katmanlı ve ince şeritler kullanılarak, kullanım esnasında kolayca kıvrılabilme riskinin ortadan kaldırılmasını sağlamaktır.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Bu buluşun amacına ulaşmak için gerçekleştirilen "**MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi**", ekli şekillerde gösterilmiş olup bu şekiller;

Şekil 1. MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridinin petri kabındaki görünümüdür.

Şekil 2. MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi genel görünümüdür.

Şekil 3. MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi katmanlarının görünümüdür.

Şekil 4. MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi katmanlarının patlatılmış görünümüdür.

Şekil 5. MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridinin patlatılmış görünümüdür.

Şekil 6. Tüp dilüsyon yöntemi uygulamasına ait görünümdür.

Şekillerdeki parçalar tek tek numaralandırılmış olup, bu numaraların karşılığı aşağıda verilmiştir.

1. MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi
2. Etkileşim katmanı
3. Cetvel katmanı

A. Mikroorganizmalar
B. Petri kabı
C. MIK değeri

Buluş konusu MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) belirleme testi şeridi (1), vücut dışı tanı cihazı (IVD) kullanılarak, mikroorganizmaların (A) anti bakteriyeller (anibiyotik, anti mikostatiklerin veya diğer biylojik sıvılarda) ile etkileşimi ölçütünün (MİK değerinin (C)) belirlenmesi amacıyla uygun agarlı besiyerine sahip bir petri kabında (B) ekimi yapılmış mikroorganizmalarla (A) ilaç ekili katmanı temas ettirilecek şekilde petri kabına (B) yerleştirilen ve tercihen dikdörtgen bir plaka formunda olup, antibiyotik ekili katman petri kabındaki (B) mikroorganizmaların (A) üzerine temas edecek şekilde petri kabına (B) yerleştirilen ve penset ile hafifçe şerit üzerine bastırılarak, her yerin yapışması sağlanan,

- bir dikdörtgen plaka formunda olup, petri kabındaki (B) mikroorganizmalara (A) temas edecek şekilde konumlandırılan en az bir etkileşim katmanı (2),
- **etkileşim katmanı (2)** ile aynı form ve boyutlarda olup, etkileşim katmanına (2) mikroorganizmalara (A) temas etmeyen yüzünden birleştirilen en az bir cetvel katmanı (3) **içeren ve**,
- mikroorganizmalara (A) temas eden yüzeyi üzerine mikroorganizmalar (A) ile etkileşimi incelenecek olan antibiyotiğin, dikdörtgen yapısının kısa kenarları arasında giderek azalan miktarlarda ekildiği ve pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk- polimer karışımından oluşan kumaş kullanılarak üretilmiş etkileşim katmanı (2),
- etkileşim katmanı (2) üzerine ekilen antibiyotik konsantrasyonunu anlaşılabilmesi amacıyla, konsantrasyon değerini ifade eden sayılara ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen konumların ifade edildiği çizgilere sahip cetvel katmanı (3) ile oluşturulmaktadır.

Buluşun bir uygulamasında cetvel katmanı (3), etkileşim katmanına (2) benzer olarak pamuklu kumaş kullanılarak üretilmiştir. Bu doğrultuda buluşun bu uygulamasında cetvel katmanı (3) ve etkileşim katmanı (2) yekpare olarak birlikte üretilmekte, birleştirilmemektedir. Buluş kapsamında tercih edilen pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk- polimer karışımından oluşan kumaş kullanılarak üretilmiş şeritlerin hava geçirgenliği bulunmamaktadır.

Buluşun bir uygulamasında, pamuklu kumaş ve polimer kombinasyonundan oluşan yapılarda kullanılan polimer; polipropilen ve etilen bütilakrilat kopolimeri olarak tercih edilmektedir.

Buluşun bir uygulamasında etkileşim katmanı (2), mikroorganizmalara (B) temas eden yüzeyi üzerinde ekilen antibiyotiğin besiyerine kolayca difüze olmasını sağlayan hazneler yer almaktadır.

Buluşun farklı bir uygulamasında etkileşim katmanı (2) olarak, tekniğin bilinen durumunda yer alan kağıt uygulamalarına göre emiş gücü daha yüksek olan polimer- pamuklu kumaş karışımı kullanılmaktadır. Bu bağlamda pamuklu kumaş olarak %50 veya daha fazla oranda pamuk içeriğine sahip olan sentetik kumaşlar da kullanılmaktadır. Pamuklu kumaşa alternatif olarak koton bez, koton ve polyester karışımı bez, keten bez veya ipek bez kullanımı uygulamaları da buluş kapsamında gerçekleştirilmektedir.

Buluşun farklı bir uygulamasında cetvel katmanı (3), alüminyumdan plastik veya kağıt etiketten üretilmiştir.

Buluşun bir uygulamasında cetvel katmanı (3), etiket özelliğinde olup, etkileşim katmanının (2) mikroorganizmalara (A) temas etmediği yüzeyi üzerine yapıştırılmaktadır. Cetvel katmanı (3), imal edildikten sonra yüzeyine okuma yapılabilmesini sağlayan sayısal değerler ve çizgiler matbaada baskılama ile gerçekleştirilmektedir.

Buluş konusu MİK testi şeridi (1), hem ilaç ekimini hem de ekilen ilacın yüzeyde tutunarak taşınmasını ve muntazam şekilde durmasını sağlamaktadır. İlaç ekimi, cetvel katmanı (3) ile etkileşim katmanı (2) birleştirilerek buluş konusu MİK testi şeridi (1) yapısı oluşturulduktan sonra gerçekleştirilmektedir. Etkileşim katmanına (2) yapılan ilaç ekimi, ters yüzeydeki cetvel katmanındaki (3) konsantrasyon değerlerine uygun olarak, etkileşim katmanının (2) iki kısa kenarı arasında azalarak yani gradiyent tarzda yapılmaktadır. Buluş konusu MİK testi şeritleri, tercihen dikdörtgen şerit formunda üretilmektedir. Böylelikle petri kabı (B) gibi mikroorganizmanın ekildiği ortam üzerine kolaylıkla yerleştirilebilmekte ve okuma cetveli üzerindeki sayılardan ilaç ve bakteri arasındaki etkileşiminin kesişme noktası daha belirgin bir şekilde tespit edilebilmektedir. Bu sayede, MİK değeri olarak ifade edilen, mikroorganizma-antibiyotik etkileşimin gerçekleştiği minimal antibiyotik konsantrasyonunun, bir sayısal veri halinde ifade edilebilmesi kullanıcının işini kolaylaştırmaktadır.

Buluş konusu MİK test şeritleri, -20 ile + 8 °C aralığında muhafaza edilebilmektedir. Öte yandan, MİK test şeritleri, Amerikan orijinli CLSI (Clinic and Laboratory Standards Institute) ve Avrupa orijinli EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) isimli dünyada kabul edilmiş iki standart değerine uyum göstermektedir.

Pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk- polimer karışımından oluşan kumaş kullanılarak üretilmiş test şeritlerine gittikçe azalan konsantrasyonlarda antibiyotik ekilmekte ve test şeritlerinin ilaç (antibiyotik) ekilmemiş, alüminyum malzemeden üretilmiş olan katmanına, deney sonucunun değerlendirilebilmesi adına bir cetvel basılmaktadır. Literatürde bilinen MIC değerleri aralıklarına göre düzenlenmiş cetvelin, bakterilerin üremesinin engellenmiş olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu (mg/l) MİK değeri olarak tanımlanmaktadır.

Üretiminde pamuklu kumaş, keten kumaş, ipekli kumaş veya pamuk- polimer karışımından oluşan kumaş kullanılması ile yırtılmaya ve kopmaya karşı daha dayanıklı, maliyet açısından daha avantajlı, temini daha kolay ve antibiyotik maddenin daha kolay ve daha hızlı difüze olmasına olanak tanıyan şeritler elde edilmiştir. Ayrıca, hava geçirgenliği olmayan şeritlerin kullanılmasıyla, antibiyotik ile bakteri arasında meydana gelen etkileşimin dış ortamdaki havadan etkilenmesinin önüne geçilebildiği gözlemlenmiştir.

Buluşun bir başka uygulamasında, test için kullanılan şeritlerin, ilaç ekilmemiş olan ve cetvel basılan tabakası plastik veya kâğıt malzemeden üretilmektedir.

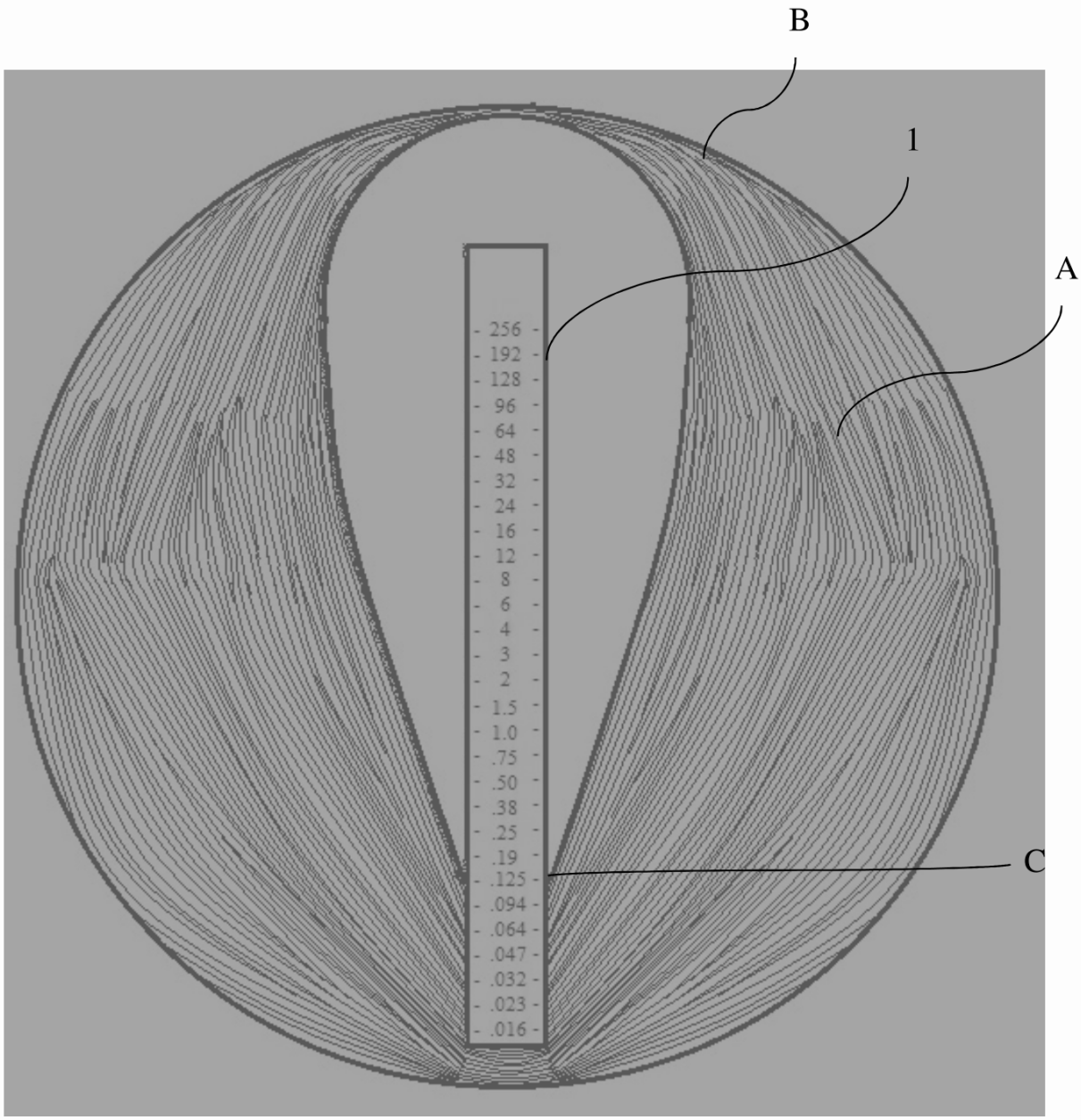
Buluşun diğer bir uygulamasında hem etkileşim katmanı ve hem de cetvel katmanı kumaş malzeme kullanılarak üretilmektedir

REFERANSLAR

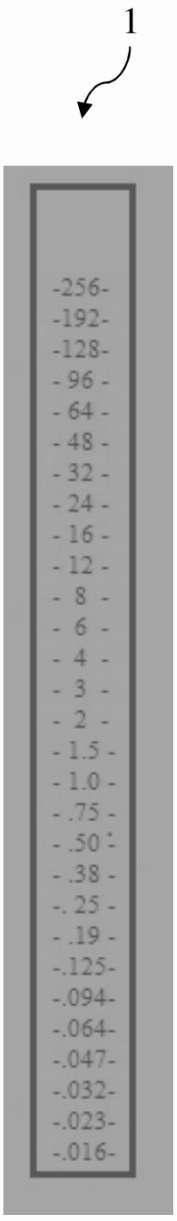
[1]. BauerJD, Ackerman PG, Toro G. Clinical laboratory methods 8 th ed. The C.V.mosby company. Sant Louise, USA 1974; 661-662

[2]. Bauer J.D. Clinical l9th ed. The c.v.mosby company .St.Louise 1982 ; 883-884

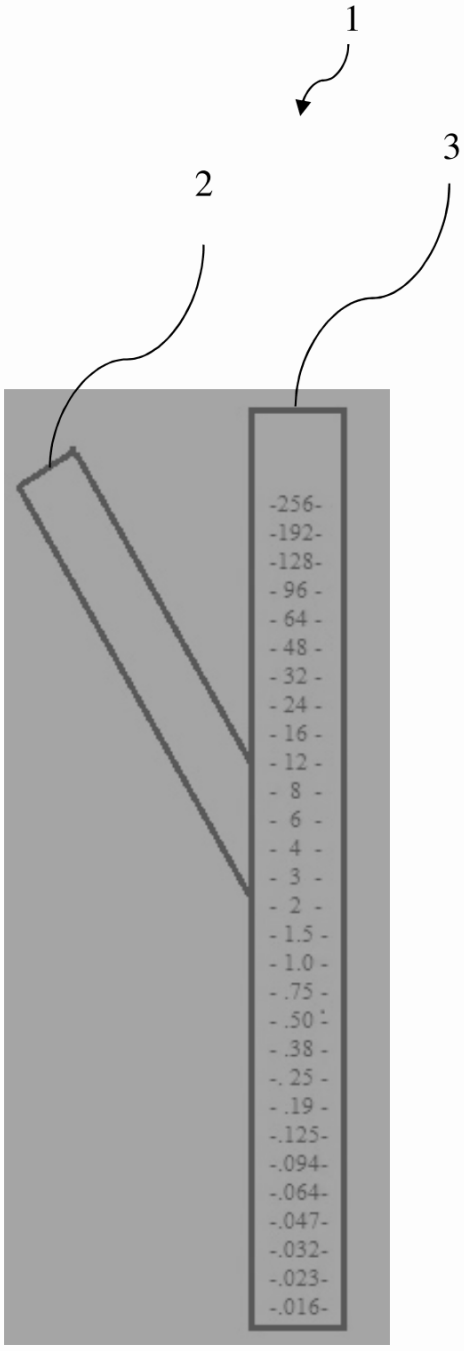
ŞEKİL 1


B
1
A
C
256
192
128
96
64
48
32
24
16
12
8
6
4
3
2
1.5
1.0
.75
.50
.38
.25
.19
.125
.094
.064
.047
.032
.023
.016

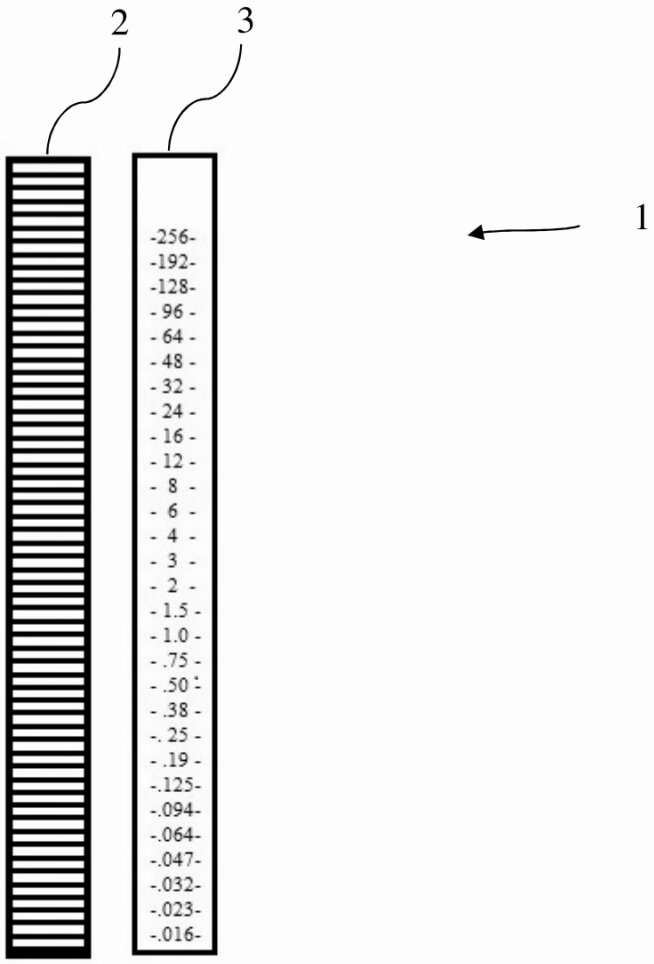
ŞEKİL 2



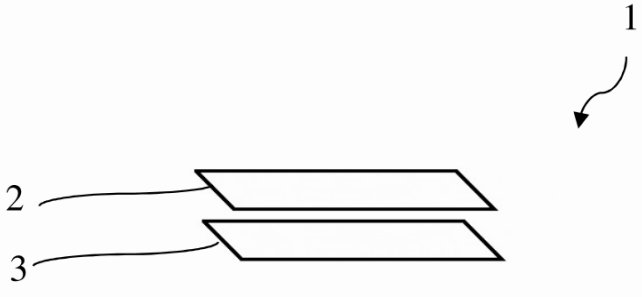
ŞEKİL 3



ŞEKİL 4



ŞEKİL 5



ŞEKİL 6

