

**Antimikrobiyal duyarlılık testine yönelik**

**EUCAST disk difuzyon yöntemi**

**Versiyon 3.0**

**Nisan 2013**

Çeviri: Nilay Çöplü

Sunu çeviri: Şöhret Aydemir

Editör: Güner Söyletir

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **İçindekiler** | | **Sayfa** |
|  | [Belge değişiklikleri](#Amendments) |  |
|  | [Kısaltmalar](#Abbrev) ve terminoloji |  |
|  |  |  |
| 1 | [Giriş](#Introduction) | 4 |
| 2 | [Besiyeri](#Prep) hazırlama | 5 |
| 3 | İnokulum hazırlama | 6 |
| 4 | Agar plaklarının ekimi | 8 |
| 5 | Antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesi | 9 |
| 6 | Plakların inkübasyonu | 10 |
| 7 | İnkübasyon sonrası plakların incelenmesi | 11 |
| 8 | Zonların ölçülmesi ve duyarlılık sonuçlarının yorumlanması | 12 |
| 9 | [Kalite](#QC) kontrol | 14 |
|  | [Ek A](#AppA) | 17 |

**Belge Değişiklikleri**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Versiyon** | **Değişiklik** | **Tarih** |
| **3.0** | **Bölüm 2.1 ve 2.4**: Besiyeri hazırlanması ve saklanması ile ilgili açıklama | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Tablolar 1 ve 3**: *Pasteurella multocida*, *Campylobacter jejuni* ve *coli* eklendi. | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Bölüm 3.2.2**: Bulanıklık standardının kullanımı ile ilgili açıklama. | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Bölüm 4.1**: İnokulum suspansiyonunun kullanımı ile ilgili açıklama. | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Bölüm 5.3**: Her bir agar plağındaki antibiyotik disk sayısı ile ilgili açıklama. | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Bölüm 5.3.1**: Yeni bölüm. İndüklenebilir klindamisin direnci saptanması için disk yerleştirilmesi. | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Bölüm 8.8.2**: *Stenotrophomonas maltophilia* için trimetoprim-sulfometoksazol zonlarının okunması için özel bilgi. | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Tablo 4**: *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 eklendi. | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Tablo 5**: *E. faecalis* ATCC 51299 için DSM ve CCUG numaraları eklendi. | Nisan 2013 |
| **3.0** | **Ek A**: Yeni bölüm. *Campylobacter jejuni* ve *coli* için EUCAST disk difuzyon testi yöntemi. | Nisan 2013 |
| **2.1** | **Bölüm 8**: Revize numaralandırma.  Yeni/revise bölümler: 8.1 ve 8.4. | Şubat 2012 |
| **2.0** | **Bölüm 2.2**: Agar derinliği ile ilgili açıklama. | Ocak 2012 |
| **2.0** | **Tablolar 1 & 3**: Yeni terminoloji (Viridans grup streptococci). *Listeria monocytogenes* eklendi. | Ocak 2012 |
| **2.0** | **Bölüm 8**: Revize numaralandırma  Yeni/revize bölümler: 8.1, 8.7, 8.7.3, 8.7.4, 8.7.6, 8.7.9 ve 8.7.10. | Ocak 2012 |
| **2.0** | **Tablo 5**: *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *E. faecalis* ATCC 51299 eklendi. | Ocak 2012 |
| **2.0** | **Tablolar 4 & 5** ve **Kısaltmalar**: İspanyol Kültür Kolleksiyonu numaraları eklendi. | Ocak 2012 |
| **1.0** | İlk Baskı | Aralık 2009 |

|  |  |
| --- | --- |
| **Kısaltmalar ve Terminoloji** | |
| ATCC | Amerikan Tip Kültür Kolleksiyonu (American Type Culture Collection)  [http://www.atcc.org](http://www.atcc.org/) |
| BLNAR | ß-Laktamaz Negatif, Ampisilin Dirençli (resistant) |
| CCUG | Göteburg Üniversitesi Kültür Kolleksiyonu (Culture Collection Universtity of Göteborg)  <http://www.ccug.se> |
| CECT | İspanyol Tip Kültür Kolleksiyonu (Colección Española de Cultivos Tipo.)  <http://www.cect.org> |
| CIP | Pastör Enstitüsü Kolleksiyonu (Collection de Institut Pasteur)  <http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html> |
| DSM | Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)’den bakteri kültürleri ve DSM numaraları (Bacterial cultures from Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) have DSM numbers)  <http://www.dsmz.de/index.htm> |
| GSBL | Genişlemiş spektrumlu β-laktamaz (ESBL, Extended spectrum β-lactamase) |
| EUCAST | Antimikrobiyel Duyarlılık Testi ile ilgili Avrupa Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) <http://www.eucast.org> |
| MH | Muller-Hinton agar |
| MH-F | Muller-Hinton agar –zor üreyen organizmalar (5% defibrine at kanı ve 20 mg/L β-NAD eklenmiş MH) |
| MRSA | Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ( *mecA* veya *mecC* geni ile) |
| NCTC | Ulusal Tip Kültür Kolleksiyonları (National Collection of Type Cultures)  <http://www.hpacultures.org.uk> |
| ß-NAD | ß-Nikotinamid adenin dinukleotide |
| Salin | 0.85% NaCl’ün sudaki solusyonu |

|  |  |
| --- | --- |
| **1** | **Giriş** |
|  | Disk difüzyon, antimikrobiyal duyarlılık testinde en eski yaklaşımlardan biridir ve rutin klinik laboratuvarlarda en yaygın kullanılan antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinden biri olarak kalmıştır. Zor üreyen ancak sık raslanan bakteriler de dahil bakteriyel patojenlerin çoğunu test etmeye uygundur. Ayrıca, birçok antimikrobiyal ajanın test edilmesi için uygundur ve özel bir ekipmana ihtiyaç yoktur.  Diğer disk difuzyon teknikleriyle ortak olarak, EUCAST yöntemi de standart bir yöntemdir ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Uluslararası İşbirliği Çalışması (International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing), 1972 raporunda tanımlanan prensiplere ve dünya çapında uzmanların deneyimlerine dayandırılmıştır.  EUCAST yönteminin zon çapı sınır değerleri, EUCAST tarafından uyumlulaştırılan sınır değerlere gore belirlenmiştir. Bu değerler, EUCAST tarafından yayınlanmıştır. Bu bilgilere, EUCAST elektronik sitesinden (<http://www.eucast.org>) ücretsiz ulaşılabilir.  Tüm yöntemlerde olduğu gibi; güvenilir sonuçlar elde edebilmek için, bu belgede tanımlanan teknik, değişiklik yapılmaksızın takip edilmelidir. |

|  |  |
| --- | --- |
| **2** | **Besiyeri hazırlama** |
| 2.1 | MH agarı, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, zor üreyen bakteriler için Tablo 1’de belirtilen ek katkılar ile hazırlayınız. Ek katkıların hazırlanması ve eklenmesi, <http://www.eucast.org> adresinde ayrıntılı olarak tarif edilmiştir. |
| 2.2 | Besiyerinin kalınlığı 4 mm ± 0.5 mm olmalıdır (yaklaşık 90 mm’lik dairesel plakta 25 mL, 100 mm dairesel plakta 31 mL, 150 mm dairesel plakta 71 mL, 100 mm kare plakta 40 mL besiyeri). |
| 2.3 | Agar yüzeyi kullanılmadan önce kurutulmalıdır. Plakların kurutulmaya ihtiyacının olup olmaması ve agar yüzeyinin kuruması için gereksinim duyulan zaman, saklama ve kurutma koşullarına bağlıdır. Plaklar, fazla kurutulmamalıdır. |
| 2.4 | Laboratuvar koşullarında hazırlanan plakları 8-10°C’de depolayın. Eğer plaklar 7 günden uzun saklanacaksa başka bir saklama yöntemi, örneğin 4-8°C’de ağzı kapalı plastik torbalarda saklamak gerekli olabilir. |
| 2.5 | Laboratuvar koşullarında hazırlanan plaklar için, plağın kurutulması, saklama koşulları ve raf ömrü laboratuvarın kalite güvencesi programının bir parçası olarak belirlenmelidir. |
| 2.6 | Ticari olarak hazırlanmış plaklar, üreticinin önerileri doğrultusunda saklanmalı ve son kullanma tarihini geçirmeden kullanılmalıdır. |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Tablo 1** | **Antimikrobiyal duyarlılık testi için besiyeri** | |
| **Organizma** | | **Besiyeri** |
| Enterobacteriaceae | | MH agar |
| *Pseudomonas* spp. | | MH agar |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | | MH agar |
| *Acinetobacter* spp. | | MH agar |
| *Staphylococcus* spp. | | MH agar |
| *Enterococcus* spp. | | MH agar |
| Streptococcus grup A, B, C ve G | | MH-F agar1 |
| *Streptococcus pneumoniae* | | MH-F agar1 |
| Viridans grup streptokoklar | | MH-F agar1 |
| *Haemophilus* spp. | | MH-F agar1 |
| *Moraxella catarrhalis* | | MH-F agar1 |
| *Listeria monocytogenes* | | MH-F agar1 |
| *Pasteurella multocida* | | MH-F agar1 |
| *Campylobacter jejuni* ve *coli* | | MH-F agar1 (Bkz. Ek A) |
|  | |  |
| Diğer zor üreyen organizmalar | | Karara bağlanmamış |

1 MH + 5% mekanik olarak defibrine edilmiş at kanı + 20 mg/L β-NAD

|  |  |
| --- | --- |
| **3** | **İnokulum hazırlama** |
| 3.1 | Organizmanın salinde McFarland 0,5 bulanıklık standartı (Tablo 2) yoğunluğunda suspansiyonunu yapmak için, doğrudan koloni suspansiyon yöntemini kullanın, bu değer *Escherichia coli* için yaklaşık 1-2 x108 CFU/mL’ye karşılık gelir.  Doğrudan koloni suspansiyon yöntemi zor üreyen *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae*, β-hemolitik ve diğer streptokoklar gibi organizmalar da dahil tüm organizmalar için uygundur. |
| 3.1.1 | Süspansiyonu seçici olmayan bir besiyerinde bir gecelik inkübasyon sonrası üreyen kolonilerden hazırlayın. Atipik varyantları seçmekten kaçınmak için (eğer mümkünse) morfolojik olarak benzer olan pek çok koloniyi kullanın ve steril öze veya pamuk eküvyon çubuğu ile steril tuzlu su çözeltisinde bir suspansiyon hazırlayın. |
| 3.2 | İnokulum suspansiyonunu McFarland 0.5 standart yoğunluğuna standardize edin. Daha yoğun inokulum suspansiyonu inhibisyon zonunun azalmasına yol açarken, daha az inokulum ise tersine bir etkiye sahip olacaktır. |
| 3.2.1 | Süspansiyonun yoğunluğunu ayarlamakta fotometrik bir cihaz kullanılması önerilmektedir. Fotometrik cihaz, üretici firmanın önerileri doğrultusunda McFarland 0.5 standartına kalibre edilmelidir. |
| 3.2.2 | Alternatif olarak, suspansiyonun dansitesi görsel olarak da McFarland 0.5 bulanıklık standartıyla karşılaştırılabilir.  Bulanıklık standardını kullanmadan önce bir vorteks karıştırıcısıyla kuvvetlice karıştırın (bazı ticari standartlar jel-esaslı olup karıştırılmamalıdır, dolayısı ile üreticinin önerilerini takip edin).  Karşılaştırmaya yardımcı olmak için, test ve standartı üzerinde siyah çizgiler olan beyaz bir kağıt üzerinde karşılaştırın. |
| 3.2.3 | *Streptococcus pneumonia*, tercihen kanlı agar plaktan McFarland 0.5 standart yoğunluğuna suspense edilmelidir. *Streptococcus pneumonia* çukulata agar plağından hazırlandığında McFarland 1.0 standardına eşdeğer olmalıdır. |
| 3.2.4 | Mikroorganizmanın suspansiyonunu, tuzlu su yada daha çok organizma koyarak McFarland 0.5 değerine ayarlayın. |
| 3.3 | Süspansiyon optimal olarak hazırlandıktan sonra 15 dk içinde kullanılmalı ve en çok 60 dk saklanmalıdır. |

|  |  |
| --- | --- |
| **Tablo 2** | **McFarland 0.5 bulanıklık standartının hazırlanması** |
| 1 | 0.048 mol/L BaCl2 (1.175% w/v BaCl2·2H20)’den 0.5 mL’yi 0.18 mol/L (0.36 N) H2S04 (1% v/v)’den 99.5 mL’ye ekleyin ve iyice karıştırın. |
| 2 | Suspansiyonun dansitesini, 1 cm ışık kanalı olan spektrometrede uyumlu küvetlerle kontrol edin. Absorbans, 625 nm’de 0.08-0.13 arasında olmalıdır. |
| 3 | Suspansiyonu inokulum ayarlamak için kullanılan tüplerle aynı boyutlardaki tüplere dağıtın. Tüplerin kapağını sıkıca kapatın. |
| 4 | Ağzı kapatılmış tüpleri karanlık bir yerde ve oda ısısında saklayın. |
| 5 | Standartı kullanmadan hemen once vorteksle iyice karıştırın. |
| 6 | Standartları, 6 ayda bir yenileyin veya absorbansını kontrol edin. |
| 7 | Ticari kaynaklardan satın alınmış olan hazır standartların absorbanslarının kabul edilebilir sınırlarda olduğundan emin olmak için, kontrol gereklidir. |

|  |  |
| --- | --- |
| **4** | **Agar plaklarının ekimi** |
| 4.1 | İdeal olarak ayarlanmış inokulum süspansiyonunu hazırlandıktan sonra 15 dk. içinde kullanın. Suspansiyon hazırlandıktan sonra mutlaka 60 dk içinde kullanılmalıdır. |
| 4.2 | Steril pamuk silgeçi suspansiyona batırın ve fazla sıvıyı, silgeçi kabın cidarında döndürerek uzaklaştırın.  Fazla sıvının uzaklaştırılması, özellikle Gram-negatif organizmalar için plağı fazla inokulasyondan korumak için önemlidir. |
| 4.3 | Inokulumu plağın yüzeyine, üç yönlü sürerek veya otomatik plak döndürücü kullanarak eşit dağılacak şekilde yayın. |
| 4.4 | Diskleri 15 dk içinde yerleştirin.  Eğer plaklar diskler yerleştirilmeden önce, uzun süre oda ısısında bırakılırsa organizma üremeye başlayabilir, bu durum inhibisyon zon ölçülerinde hatalı azalmayla sonuçlanır. Diskler, agarın yüzeyine ekim yapıldıktan sonra 15 dk içinde yerleştirilmelidir. |

|  |  |
| --- | --- |
| **5** | **Antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesi** |
| 5.1 | Gereken disk içerikleri sınır değerler ve kalite kontrol tablosunda listelenmiştir.  [http://www.eucast.org](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/qc_tables/). |
| 5.2 | Diskleri, ekim yapılmış ve kurutulmuş agar plağına sıkıca yerleştiriniz. Agara temas sıkı ve eşit olmalıdır. Diskler bir kez agar plağına yerleştirildikten sonra yerinden oynatılmamalıdır, çünkü diskten antimikrobiyalin difüzyonu çok hızlıdır. |
| 5.3 | Plaktaki disk sayısı, zonların üst üste binmesinden ve ajanlar arası etkileşimden korumak için sınırlı olmalıdır. Zon çaplarının güvenilir şekilde ölçülmesi önemlidir.  En fazla disk sayısı organizmaya ve seçilen disklere göre değişir. Normalde en fazla disk sayısı sırasıyla 90 ve 150 mm’lik dairesel plaklar için 6 ve 12’dir. |
| 5.3.1 | Stafilokok ve streptokoklarda indüklenebilir klindamisin direncini saptayabilmek için, eritromisin ve klindamisin diskleri kenardan kenara 12-20 mm uzaklıkta yerleştirilmelidir. |
| 5.4 | Diskteki antimikrobiyal ajanın potens kaybı, sık bir hata kaynağıdır ve zon çapında azalmaya yol açar. Bu durumda aşağıdaki basamakların izlenmesi gereklidir: |
| 5.4.1 | Dağıtıcı (dispenser) dakiler de dahil olmak üzere, diskleri bir nem giderici ile birlikte ağzı sıkıca kapatılmış kaplarda ve ışıktan korunacak şekilde saklayın (metranidazol, kloramfenikol, ve florokinolonların da içinde yer aldığı bazı antimikrobiyaller ışığa uzun süre maruz kaldıklarında inaktive olurlar). |
| 5.4.2 | Disk stokları, tedarikçi açıklamalarında farklı bir bilgi yazmadıkça, -20°C’de saklanmalıdır. Eğer bu mümkün değilse, diskleri <8°C’da saklayın. |
| 5.4.3 | Çalışmada kullanılacak ek malzemeyi <8°C’de saklayın. |
| 5.4.4 | Nemlenmeyi önlemek için disklerin ambalajlarını/saklama kaplarını açmadan oda ısısına gelmelerini sağlayın. |
| 5.4.5 | Üretici firma tarafından kutu üzerinde belirtilen son kullanma tarihi geldiğinde diskleri atın. |

|  |  |
| --- | --- |
| **6** | **Plakların inkübasyonu** |
| 6.1 | Diskleri yerleştirdikten sonra 15 dk içinde plakları ters çevirin ve inkübe edin. Eğer plaklar, diskler konduktan sonra oda ısısında bırakılırsa, pre-difüzyon hatalı geniş inhibisyon zonu ile sonuçlanabilir. |
| 6.2 | Plakları etüvde istiflemek, plakların eşit olmayan ısıya maruz kalmasından dolayı sonuçları etkiler. Etüvlerin verimliliği değişken olabilir, bu yüzden plakların uygun sayıda istiflenmesi dahil inkübasyon kontrolü, laboratuvarın kalite güvence programının bir parçası olmalıdır. |
| 6.3 | Plakları Tablo 3’de sunulan koşullarda inkübe edin. |
| 6.4 | Bazı *Enterococcus* spp.’de glikopeptid duyarlılığı test edilirken dirençli koloniler tam 24 saat inkübe edilmeden gözle görünür hale gelememektedir. Plaklar 16-20 saat sonra değerlendirilip her hangi bir direnç saptanırsa rapor edilebilir, ancak duyarlı görünen izolatların plakları 24 saate kadar tekrar inkübe edilmeli ve yeniden okunmalıdır. |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Tablo 3** | **Antimikrobiyal duyarlılık test plakları için inkübasyon koşulları** | |
| **Organizma** | | **Inkübasyon koşulları** |
| Enterobacteriaceae | | 35±1°C’de, normal atmosferde, 16-20 saat |
| *Pseudomonas* spp. | | 35±1°C’de, normal atmosferde, 16-20 saat |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | | 35±1°C’de, normal atmosferde, 16-20 saat |
| *Acinetobacter* spp. | | 35±1°C’de, normal atmosferde, 16-20 saat |
| *Staphylococcus* spp. | | 35±1°C’de, normal atmosferde, 16-20 saat |
| *Enterococcus* spp. | | 35±1°C’de, normal atmosferde, 16-20 saat  (glikopeptidler için 35±1°C 35±1°C’de, normal atmosferde, 24 saat) |
| Streptococcus grup A, B, C ve G | | 35±1°C’de, %4-6 CO2’li atmosferde, 16-20 saat |
| *Streptococcus pneumoniae* | | 35±1°C’de, %4-6 CO2’li atmosferde, 16-20 saat |
| Viridans grup streptokoklar | | 35±1°C’de, %4-6 CO2’li atmosferde, 16-20 saat |
| *Haemophilus* spp. | | 35±1°C’de, %4-6 CO2’li atmosferde, 16-20 saat |
| *Moraxella catarrhalis* | | 35±1°C’de, %4-6 CO2’li atmosferde, 16-20 saat |
| *Listeria monocytogenes* | | 35±1°C’de, %4-6 CO2’li atmosferde, 16-20 saat |
| *Pasteurella multocida* | | 35±1°C’de, %4-6 CO2’li atmosferde, 16-20 saat |
| *Campylobacter jejuni* ve *coli* | | Bakınız Ek A |
|  | |  |
| Diğer zor üreyen organizmalar | | Karara bağlanmamış |

|  |  |
| --- | --- |
| **7** | **İnkübasyon sonrası plakların incelenmesi** |
| 7.1 | Doğru bir inokulum ve tatminkar ekim yapılmış plaklarda, kolonilerin birbirleriyle birleşerek bir tabaka oluşturduğu bir üreme gözlenmelidir.. |
| 7.2 | Üreme, düzgün dairesel (pürüzlü olmayan) inhibisyon zonları sağlamak için plağın üzerine eşit olarak dağılmalıdır. |
| 7.3 | Eğer tek tek koloniler görülebiliyorsa inokulum çok azdır ve test tekrarlanmalıdır. |
| 7.4 | İnhibisyon zonlarının kalite kontrol sınırları içinde olduğunu kontrol edin. |

|  |  |
| --- | --- |
| **8** | **Zonların ölçülmesi ve duyarlılık yorumlaması** |
| 8.1 | Tüm ilaçlar için zon kenarı, plak gözden 30 cm uzakta tutularak çıplak gözlebakıldığında tam inhibisyonun olduğu noktada okunmalıdır. |
| 8.2 | Katkı maddeleri (‘Supplement’) eklenmemiş plakları, yansıyan ışık ile tersinden ve plağı koyu bir arka planın üzerine tutarak okuyun. |
| 8.3 | Katkı maddeli plakları ön yüzünden, kapağı açılarak ve yansıyan ışık ile okuyun. |
| 8.4 | Aksi söylenmedikçe, geçirgen ışık (plak ışığa tutularak) veya büyüteç kullanmayın (aşağıya bakın). |
| 8.5 | İnhibisyon zonunun çapını bir cetvel (en yakın milimetreye gore), kompas veya otomatik zon okuyucu ile ölçün. |
| 8.6 | Zon çaplarını sınır değer tablosuna göre değerlendirin [http://www.eucast.org](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). |
| 8.7 | Zon çaplarını değerlendirmek için şablonlar kullanılacaksa, plak şablonun üzerine yerleştirilir ve zonlar EUCAST sınır değerleri ile hazırlanan şablona göre değerlendirilir. Kullanılan sınır değerlerinin EUCAST sınır değer tablosunun en son versiyonu ile uyumlu olduğundan emin olun. Şablon hazırlamak için ücretsiz bir program <http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program>. adresinden elde edilebilir. |
| 8.8 | Okuma için özel talimatlar: |
| 8.8.1 | İnhibisyon zonu içinde tek düşecek şekilde üreyen koloniler pasajlanarak tanımlanmalı, gerekirse test tekrarlanmalıdır. |
| 8.8.2 | Besiyerindeki antagonistler, sulfonamid veya trimetoprim zonu içinde diske kadar uzanabilen soluk üreme ile sonuçlanabilir. Böyle üremeler gözardı edilmeli ve zon çapı daha bariz olan zon kenarından ölçülmelidir.  *Stenotrophomonas maltophilia* ve trimetoprim-sulfametoksazol ikilisinde zon içi üremeler olabilir. Böyle üremeler göz ardı edilmeli ve eğer herhangi bir zon kenarı görülebiliyorsa inhibisyon zonu okunmalıdır. Diske kadar üreme varsa ve hiç inhibisyon zonu görülemiyorsa zon yok olarak okuyun. |
| 8.8.3 | Enterobacteriaceae ve ampisilin ikilisinde, bazı Muller-Hinton agar partileri ile hazırlanan plaklarda bir iç zon şeklinde gözlenen ince bir film şeklindeki üremeleri gözardı edin.  . |
| 8.8.4 | *E.coli* ve mesilinam ikilisinde, inhibisyon zonunun içindeki izole kolonileri gözardı edin. |
| 8.8.5 | *Proteus* spp. için, yayılmayı gözardı edin ve üremenin inhibisyonunu okuyun. |
| 8.8.6 | Stafilokoklar ve benzilpenisilin ikilisinde , plağı ışığa kaldırarak zon kenarını yakından inceleyin (geçirgen ışık). Zon çapı ≥ duyarlı sınır değer olan izolatlarda keskin zon kenarı varsa dirençli olarak rapor edin. |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 8.8.7 | *Staphylococcus aureus*’taetisilin direnci saptamak için sefoksitin kullanıldığında, bariz olan zonu ölçün, inhibisyon zonu içindeki kolonileri görebilmek için iyi bir ışık ile zonu dikkatlice inceleyin. Bunlar ya kontaminasyondur ya da heterojen metisilin direncinin yansıması olabilir. | |
| 8.8.8 | Stafilokoklarda linezolid duyarlılık testlerini plağı ışığa kaldırarak tersinden okuyun (geçirgen ışık). | |
| 8.8.9 | | Enterokoklar ve vankomisin ikilisinde, plağı ışığa kaldırarak zon kenarını yakından inceleyin (iletilen ışık). Belirsiz zon kenarları ve zon içi koloniler vankomisin direncini gösterir ve ileri araştırma gerektirir. |
| 8.8.10 | | MH-F besiyerindeki hemolitik streptokoklar için, hemolizin zonunu değil üremenin inhibisyonunu okuyun. β-hemoliz genellikle üremeden bağımsız olurken, α-hemoliz ve üreme genellikle birliktedir. |

|  |  |
| --- | --- |
| **9** | **Kalite kontrol** |
| 9.1 | Testin performansını izlemek için belirtilen kontrol suşlarını(Tablo 4) kullanın.  Prensip olarak önerilen suşlar tipik duyarlı suşlardır, ama dirençli suşlar da, yöntemin bilinen direnç mekanizmalarına bağlı direnci belirleyebileceğini doğrulamak için kullanılabilir (Tablo 5). Bu suşlar kültür kolleksiyonlarından veya ticari kaynaklardan satın alınabilir. |
| 9.2 | Kontrol suşlarını, canlılığını ve organizma karakterlerini sürdürebileceği koşullar altında saklayın. Gliserol sıvı besiyeri (veya ticari bir eşdeğeri) içindeki cam boncuklarda ve -70°C’da saklamak uygun bir yöntemdir. Hızlı üreyen organizmalar -20°C’da saklanabilir. Kontrol suşları, biri kullanım kaynağı olarak ve diğeri gereğinde kullanım kaynağını tazelemek amacıyla arşiv olarak kullanılmak üzere iki şişe hazırlanarak saklanmalıdır. |
| 9.3 | Her hafta kullanımdaki şişeden bir boncuk, seçici olmayan uygun bir besiyerine pasajlanmalı ve saflık açısından kontrol edilmelidir. Haftanın her günü bu saf kültürden bir subkültür hazırlayın. Plakta beş-altı gün canlı kalamayacak olan zor üreyen organizmalar için, suşu bir haftadan daha fazla pasajlamayın. |
| 9.4 | Kontrol suşlarının kabul edilebilir sırnırları ... gösterilmiştir. |
| 9.5 | Test performansını izlemek için önerilen kalite kontrol suşlarını kullanın.  Kontrol testleri, en azından rutin panellerin bir parçası olan antibiyotikler için, günlük olarak yapılmalı ve kontrol edilmelidir.  Testlerin yapıldığı her gün, son 20 ardışık testin sonuçlarını inceleyin. Sonuçları gidişat ve sürekli beklenenin altında ya da üstünde kalan zonlar açısından inceleyin. Eğer 20 testin iki veya daha fazlası sınır dışında kalıyorsa bunun nedeni araştırılmalıdır. |
| 9.6 | Kontrol suşları testin performansının tatminkar olduğu gösterilene kadar (20 testte 1’den fazla kontrol sınırı dışına çıkan olmadıkça) günlük olarak test edilmelidir. İstenen performanstan sonra test sıklığı haftada bire indirilebilir. Eğer performans standartları karşılanamıyorsa, sebebi araştırılmalıdır. |
| 9.7 | Rutin KK testlerine ek olarak, her yeni Muller-Hinton agar partisini test ederek tüm zonların sınırlar içinde olduğundan emin olun.  Aminoglikozid diskleri besiyerindeki divalent katyonların kabul edilemez değişkenliklerini, tigesiklin magnezyum değişkenliklerini gösterebilir ortaya koyabilir, trimetoprim-sulfametoksazol timidin içeriği ile sorun gösterebilir, eritromisin besiyerinin kabul edilemez pH’sını sergileyebilir. |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tablo 4:** | **Rutin tesler için kalite kontrol organizmaları** | | |
| **Organizma** | | **Suş** | **Karakterisitik** |
| *Escherichia coli* | | ATCC 25922  NCTC 12241  CIP 7624  DSM 1103  CCUG 17620  CECT 434 | Duyarlı, sokak tipi (Wild type) |
| *Pseudomonas aeruginosa* | | ATCC 27853  NCTC 12934  CIP 76110  DSM 1117  CCUG 17619  CECT 108 | Duyarlı, sokak tipi |
| *Staphylococcus aureus* | | ATCC 29213  NCTC 12973  CIP 103429 DSM 2569  CCUG 15915  CECT 794 | Zayıf β-laktamaz üreten |
| *Enterococcus faecalis* | | ATCC 29212  NCTC 12697  CIP 103214 DSM 2570  CCUG 9997  CECT 795 | Duyarlı, sokak tipi |
| *Streptococcus pneumoniae* | | ATCC 49619  NCTC 12977  CIP 104340  DSM 11967  CCUG 33638 | Kromozomal aracılı düşük-düzey penisilin dirençli |
| *Haemophilus influenzae* | | NCTC 8468  CIP 5494  CCUG 23946 | Duyarlı, sokak tipi |
| *Campylobacter jejuni* | | ATCC 33560  NCTC 11351  CIP 702  DSM 4688, CCUG 11284 | Duyarlı, sokak tipi  Test etme koşulları için bakınız Ek A |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tablo 5:** | **Özel direnç mekanizmalarını saptamak için ek kalite kontrol organizmaları** | | |
| **Organizma** | | **Suş** | **Karakterisitik** |
| *Escherichia coli* | | ATCC 35218  NCTC 11954  CIP 102181  DSM 5564  CCUG 30600  CECT 943 | TEM-1 ß-laktamaz, ampisilin dirençli |
| *Klebsiella pneumoniae* | | ATCC 700603  NCTC 13368  CCUG 45421  CECT 7787 | GSBL-üreten suş (SHV-18) |
| *Staphylococcus aureus* | | NCTC 12493 | *mecA* pozitif, hetero-dirençli MRSA |
| *Enterococcus faecalis* | | ATCC 51299  NCTC 13379  CIP 104676  DSM 12956  CCUG 34289 | Yüksek-düzey aminoglikozid dirençli (HLAR) ve vankomisin dirençli (*vanB* pozitif) |
| *Haemophilus influenzae* | | ATCC 49247  NCTC 12699  CIP 104604  DSM 9999  CCUG 26214 | ß-laktamaz negatif, ampisilin dirençli  (BLNAR) |

**Ek A**

***Campylobacter jejuni* ve *coli* için disk difüzyon testi**

EUCAST’e göre *Campylobacter jejuni* ve *coli* için disk difüzyon testi yaparken aşağıdaki yönteme (Tablo A1) bağlı kalınmalıdır.

|  |  |
| --- | --- |
| **Tablo A1** | ***Campylobacter jejuni* ve *coli* için disk difüzyon yöntemi** |
| **Besiyeri** | %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β-NAD eklenmiş Muller-Hinton agar (MH-F)  Yayılmayı önlemek için, MH-F plaklar inokulasyondan önce kurutulmalıdır (20-25°C’de bir gece, veya 35°C’de, kapağı açılarak 15 dk). |
| **İnokulum** | McFarland 0.5 |
| **İnkübasyon** | Mikroaerobik ortam  41±1°C  24 saat  İnkübasyon eşit olarak dağılan bir üreme ile sonuçlanmalıdır. Bazı *C. coli* izolatları 24 saatlik inkübasyondan sonra yeterli üreme gösteremeyebilir. Bunlar hemen tekrar inkübe edilmeli ve toplam 40-48 saatlik inkübasyondan sonra okunmalıdır.  *Campylobacter* spp.nin üremesi için uygun koşulları sağlamak için 41±1°C’lik bir inkübasyon ısısı seçilmiştir. |
| **Okuma** | Standart EUCAST okuma kriterleri kullanılmıştır:  MH-F plaklarını, yansıyan ışık kullanarak ve kapağı açarak önden okuyun. Zon kenarları plak gözden 30 cm uzakta tutularak, çıplak gözle tam inhibisyon olduğuna karar verilen nokta olarak okunmalıdır. |
| **Kalite kontrol** | *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 inhibisyon zonu tanımlanan sınırlar içinde olmalıdır ([http://www.eucast.org](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/qc_tables/)). |

