



# EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

## Antibiyotik Duyarlılık Testi

# EUCAST disk difüzyon yöntemi

**Sürüm 11.0**

**Ocak 2023**

<b>İçerik</b>	<b>Sayfa no</b>
<a href="#">Önceki sürümde yapılan değişiklikler</a>	
<a href="#">Kısaltmalar ve Terminoloji</a>	
1 <a href="#">Giriş</a>	5
2 <a href="#">Besiyerlerinin hazırlanması ve saklanması</a>	6
3 <a href="#">İnokulum hazırlanması</a>	8
4 <a href="#">Agar plaklarının ekimi</a>	10
5 <a href="#">Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi</a>	11
6 <a href="#">Plakların inkübasyonu</a>	12
7 <a href="#">İnkübasyon sonunda plakların incelenmesi</a>	14
8 <a href="#">Zonların ölçümü ve duyarlılık durumunun değerlendirilmesi</a>	15
9 <a href="#">Kalite Kontrol</a>	17
<a href="#">Ek A</a>	21

## Önceki sürümde (v. 10.0) yapılan değişiklikler

Bölüm	Değişiklik
5.1.1	EUCAST disk difüzyon yönteminin validasyonun 6mm çaplı kağıt disklerle göre yapıldığının açıklanması,
8.9.9	<i>S. aureus</i> ve benzil penisilin için, zon kenarlarının sadece zon çapı $\geq 26$ mm olduğunda incelenmesi gerektiğinin açıklanması.
8.9.10	Enterokoklar ve vankomisin için, zon kenarlarının sadece zon çapı $\geq 12$ mm olduğunda incelenmesi gerektiğinin açıklanması.

## Kısaltmalar ve Terminoloji

ATCC	American Type Culture Collection (Amerikan Kùltür Koleksiyonu) <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
CCUG	Culture Collection University of Gothenburg (Gothenburg Üniversitesi Kùltür Koleksiyonu) <a href="http://www.ccug.se">http://www.ccug.se</a>
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo (İspanyol Kùltür Koleksiyonu) <a href="http://www.cect.org">http://www.cect.org</a>
KOB	Koloni Oluşturan Birim
CIP	Collection de l'Institut Pasteur (Pasteur Enstitüsü Kùltür Koleksiyonu) <a href="https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collection-institut-pasteur-cip">https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collection-institut-pasteur-cip</a>
DSM	Bacterial cultures from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) <a href="https://www.dsmz.de">https://www.dsmz.de</a>
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu $\beta$ -Laktamaz
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a>
MH	Mueller-Hinton agar
MH-F	Güç üreyen ("fastidious") bakteriler için Mueller-Hinton agar (%5 defibrine at kanı ve 20 mg/L $\beta$ -NAD ile zenginleştirilmiş MH)
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>mecA</i> veya <i>mecC</i> geni taşıyan)
NCTC	National Collection of Type Cultures (Birleşik Krallık Ulusal Kùltür Tipi Koleksiyonu) <a href="https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc">https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc</a>
$\beta$ -NAD	$\beta$ -Nikotinamid Adenin Dinükleotit
KK	Kalite Kùntrol
SF	Su içinde % 0.85 NaCl çözeltisi (8.5 g/L) (Serum Fizyolojik)

Disk difüzyon, antibiyotik duyarlılık testi yaklaşımları arasında en eskilerinden biridir ve günümüzde de rutin klinik laboratuvarlarda en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olmayı sürdürmektedir. Yöntem, sık rastlanılan, güç üreyen bakteriler de dahil olmak üzere bakteriyel patojenlerin çoğunluğunda ve geniş bir antibiyotik yelpazesinde uygulanabilmekte, ayrıca özel bir donanım da gerektirmemektedir.

Diğer disk difüzyon tekniklerinde olduğu gibi, EUCAST yöntemi de 1972 yılındaki Uluslararası Antibiyotik Duyarlılık Testleri İşbirliği Çalışması raporunda belirtilen prensiplere ve uzman grupların deneyimlerine dayanmaktadır.

EUCAST disk difüzyon yönteminde belirtilen zon çapı sınır değerleri, EUCAST tarafından yayınlanan Avrupa MİK sınır değerlerine göre kalibre edilerek belirlenmiştir. Sınır değer tablolarına EUCAST internet sayfasında (<http://www.eucast.org>) ücretsiz olarak erişilebilir.

Tüm yöntemlerde olduğu gibi; güvenilir sonuçlar elde edebilmek için, bu belgede tanımlanan teknik, değişiklik yapılmaksızın izlenmelidir.

2	Besiyeri hazırlanması ve saklanması
2.1	Mueller- Hinton (MH) agar, üretici önerileri doğrultusunda, hazırlanır. Güç üreyen bakteriler söz konusu ise Tablo 1deki katkı maddeleri eklenir. Katkı maddelerinin hazırlanması ve eklenmesi, <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> sayfasında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.
2.2	Besiyeri düz bir zeminde $4.0 \pm 0.5$ mm kalınlıkta olacak şekilde (90 mm çaplı yuvarlak plak için yaklaşık 25 ml, 100 mm çaplı yuvarlak plak için yaklaşık 31 ml , 150 mm çaplı plak için yaklaşık 71 ml, 100 mm kare plak için 40 ml besiyeri eklenerek ) hazırlanmalıdır. Kullanılacak olan Petri plağının gerçek boyutlarına göre doğru miktar belirlenmelidir. Plak çapı üretici firmaya göre değişebilmektedir.
2.3	Kullanımdan önce besiyeri yüzeyi kuru olmalıdır. Agar yüzeyinde veya kapak iç yüzeyinde gözle görülebilir su damlası bulunmamalıdır. Gerekirse plaklar 20-25°C'de bir gece veya kapak çıkarılıp 35°C'de 15 dk tutularak kurutulabilir. Plakların aşırı kurumamasına da dikkat edilmelidir.
2.4	Hazırlanan plaklar 4-8°C'de saklanır.
2.5	Laboratuvarda hazırlanan plaklar için, kurutma, saklama/depolama koşulları ve raf ömrü, laboratuvarın kalite güvence programı kapsamında belirlenmelidir.
2.6	Ticari hazır besiyerleri, üreticinin önerdiği koşullarda saklanmalı ve üzerinde yazan son kullanım tarihine kadar kullanılmalıdır.
2.7	Plastik torbalar veya sıkıca kapanan kutularda saklanan katı besiyerlerinin (ticari veya laboratuvarda hazırlanmış), kullanılmadan önce plak yüzeyinin kurutulması gerekebilir (Madde 2.3e bakınız). Bu işlem, belirsiz zon kenarları ve/veya zon içerisinde puslu görünüme yol açabilecek aşırı nemin giderilmesi için yapılmaktadır.

<b>Tablo 1 Antibiyotik duyarlılık testi için kullanılan besiyerleri</b>	
<b>Bakteri</b>	<b>Besiyeri</b>
<i>Enterobacterales</i>	MH agar
<i>Pseudomonas</i> spp.	MH agar
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MH agar
<i>Acinetobacter</i> spp.	MH agar
<i>Staphylococcus</i> spp.	MH agar
<i>Enterococcus</i> spp.	MH agar
Streptococcus A, B, C ve G grupları	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
Viridans streptokoklar	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Haemophilus influenzae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Pasteurella multocida</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i>	MH-F agar <sup>1</sup> (Bkz Ek-A)
<i>Corynebacterium</i> spp.	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Aerococcus sanguinicola</i> ve <i>urinae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Kingella kingae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Aeromonas</i> spp.	MH agar
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	MH agar
<i>Vibrio</i> spp.	MH agar
<i>Bacillus</i> spp.	MH agar
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	MH agar

<sup>1</sup> MH + %5 mekanik yöntemlerle defibrine edilmiş at kanı + 20 mg/L β-NAD

3	İnokulum hazırlanması
3.1	<p>Doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi ile fizyolojik tuzlu su içerisinde 0.5 Mc Farland bulanıklık standardına eşdeğer bir bakteri süspansiyonu hazırlayın (Tablo 2). Bu süspansiyon, <i>Escherichia coli</i> için yaklaşık <math>1-2 \times 10^8</math> KOB/mL' ye karşılık gelmektedir.</p> <p>Doğrudan koloni süspansiyon yöntemi, güç üreyenler de dahil olmak üzere <b>Tablo 1</b>'de yer alan tüm bakteriler için uygundur.</p>
3.2	<p>Steril bir öze veya eküvyon yardımı ile bir gece inkübasyon sonucunda oluşmuş kolonilerden birkaçını alın. Mümkünse, atipik varyantları seçmemek için morfolojik olarak benzer kolonileri kullanın. Kolonileri SF içinde karıştırarak homojen bir süspansiyon hazırlayın.</p>
3.3	<p>Bakteri süspansiyonunun yoğunluğunu, SF veya daha fazla bakteri ekleyerek 0.5 Mc Farland standardı bulanıklığına getirin. Daha yoğun inokulum süspansiyonu inhibisyon zonunun küçülmesine yol açarken, daha az inokulum ise tersine bir etkiye sahip olacaktır.</p>
3.3.1	<p>Süspansiyon yoğunluğunun ayarlanması için bir fotometrik cihaz kullanılması önerilir. Fotometrik cihazın kalibrasyonu, üretici firma yönergesine uyularak 0.5 Mc Farland standartına göre yapılmalıdır.</p>
3.3.2	<p>Diğer bir yol da, süspansiyon yoğunluğunun görsel olarak Mc Farland 0.5 eşeli bulanıklığı ile karşılaştırılmasıdır. Bu işlem sırasında, inokulum tüpünün ve standartın üzerinde siyah çizgiler bulunan beyaz bir zemin üzerinde tutulması karşılaştırma işlemini kolaylaştırır.</p>
3.3.3	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> izolatlarında, tercihen kanlı agardaki üremeden doğrudan Mc Farland 0.5 standardı bulanıklığında bir süspansiyon hazırlanmalıdır. Eğer inokulum çikolata agardaki üremeden hazırlanacaksa, o zaman McFarland 1.0 bulanıklığına eşdeğer olmalıdır.</p>
3.4	<p>Süspansiyon hazırlandıktan sonra en iyisi 15 dk.da<sup>1</sup> ve en geç 60 dk içinde kullanılmalıdır.</p>

<sup>1</sup> Bu 15-15-15 dk kuralının bir parçasıdır: inokulum süspansiyonunu hazırladıktan sonra 15 dakika içinde kullanın, diskleri ekim işleminden sonra 15 dakika içinde yerleştirin ve diskler yerleştirildikten sonra plakları 15 dakika içinde etüve kaldırın.



<b>Tablo 2</b>	<b>0.5 McFarland bulanıklık standartının hazırlanması</b>
1	Baryum klorür (BaCl <sub>2</sub> )'ün 0.048 mol/L (%1.175 w/v BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O) çözeltisinden 0.5 mL, 99.5 mL 0.18 mol/L (0.36 N) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%1 v/v) içine eklenerek iyice karıştırılır.
2	Spektrofotometrede 1cm ışık genişliği ve uygun kuvvetler kullanılarak süspansiyonun yoğunluğu kontrol edilir. 625nmdeki absorbans 0.08-0.13 değerleri arasında olmalıdır.
3	Süspansiyon, bakteriyel inokulum süspansiyonu için kullanılanlarla eşit büyüklükteki tüplere dağıtılır ve tüplerin ağzı sıkıca kapatılır.
4	Ağzı kapatılmış tüpler, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında saklanır.
5	Kullanılmadan hemen önce standart bir karıştırıcı ile iyice karıştırılır.
6	Altı ay sonra standart yenilenmeli veya absorbansı kontrol edilmelidir.

4	Agar plaklarının ekimi
4.1	Ekim işlemi öncesinde plaklar oda sıcaklığında olmalıdır.
4.2	Hazırlanan inokulum süspansiyonu en uygun olarak, 15 dk <sup>1</sup> içinde kullanılır. Süspansiyon hazırlanmasından itibaren en geç 60 dk içinde kullanılmalıdır.
4.3	Steril pamuk uçlu bir eküvyonu süspansiyona daldırın.
4.3.1	Gram-negatif bakterilerde, aşırı inokulum aktarılmasını engellemek için, eküvyonu tüpün kenarına bastırıp çevirerek sıvının fazlasını uzaklaştırın.
4.3.2	Gram-pozitif bakterilerde eküvyonu tüpün kenarına bastırma/çevirme işlemini yapmayın.
4.4	Aynı inokulum süspansiyonunu kullanarak birden fazla plağa ekim yapıyorsanız madde 4.3'te yazan işlemi tekrarlayın.
4.5	Plaklara ekim, eküvyonu üç yönde sürerek veya bir otomatik plak çevirici kullanılarak yapılabilir. İnokulum tüm agar yüzeyine ekim çizgileri arasında boşluk kalmamasına özen gösterilerek eşit olarak yayılmalıdır.
4.5.1	Gram-pozitif bakterilerde, ekim çizgileri arasında boşluk kalmaması için özellikle dikkat edilmelidir.
4.6	Ekimden sonra 15 dk <sup>1</sup> içinde diskleri yerleştirin. Ekim yapılmış plaklar diskler yerleştirilmeden oda sıcaklığında uzun süre bekletilirse, bakteriler üremeye başlayacağı için, inhibisyon zonlarında hatalı bir daralma ortaya çıkacaktır.

<sup>1</sup> Bu 15-15-15 dk kuralının bir parçasıdır: inokulum süspansiyonunu hazırladıktan sonra 15 dakika içinde kullanın, diskleri ekim işleminden sonra 15 dakika içinde yerleştirin ve diskler yerleştirildikten sonra plakları 15 dakika içinde etüve kaldırın.

5	Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi
5.1	Gerekli disk içerikleri, <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> sayfasındaki Sınır Değerler ve Kalite Kontrol Tablolarında verilmiştir.
5.1.1	EUCAST zon çapı sınır değerleri ve disk kalite kontrol kriterlerinin validasyonu, 6 mm çaplı kağıt diskler kullanılarak yapılmıştır.
5.2	Disk kartuşlarını veya disklerin saklandığı kutuları açmadan önce oda sıcaklığına gelmelerini bekleyin. Bu işlem, bazı antibiyotiklerin bozunmasına neden olabilecek yoğuşmanın engellenmesi içindir.
5.3	Bakterinin plaklara ekim işleminden sonra 15 dk <sup>1</sup> içinde diskleri yerleştirin ve üzerlerine hafifçe bastırın. Diskler agar yüzeyine temas etmelidir. Antibiyotikler hızla difüze oldukları için diskler yerleştirildikten sonra yerleri değiştirilmemelidir.
5.4	İnhibisyon zonlarının birbirine karışmaması ve antibiyotiklerin birbiri ile etkileşmemesi için bir plak yüzeyine yerleştirilecek disk sayısı kısıtlanmalıdır. İnhibisyon zon çaplarının güvenilir biçimde ölçülmesi önemlidir. En çok disk sayısı bakteriye ve antibiyotik seçimine göre belirlenir. Normal olarak 90 ve 150 mm çaplı yuvarlak plaklara sırası ile en fazla 6 ve 12 disk yerleştirilir.
5.4.1	Stafilokoklar ve streptokoklarda indüklenebilir klindamisin direncinin saptanması için, eritromisin ve klindamisin diskleri stafilokoklar için kenardan kenara uzaklık 12-20 mm ve streptokoklar için de 12-16 mm olacak şekilde yerleştirilmelidir.
5.5	Antibiyotik aktivitesinde azalma, inhibisyon zonunun daralmasına yol açar ve sık rastlanan hata kaynaklarından biridir. Bu durumdan kaçınmak için aşağıdakiler uygulanmalıdır:
5.5.1	Dağıtıcı (dispenser) içindekiler de dahil olmak üzere, bir nem giderici ile birlikte kapaklı kaplarda ve karanlık bir ortamda saklayın. Metronidazol, kloramfenikol ve florokinolonların içinde bulunduğu bazı antibiyotikler uzun süre ışığa maruz bırakıldıklarında etkinliklerini kaybetmektedir.
5.5.2	Disk stoklarını üretici firma önerilerine göre depolayın. Bazı antibiyotikler diğerlerine göre daha kolay bozulmaktadır (ör. Amoksisilin-klavulanik asit, sefaklor ve karbapenemler) ve üretici firmanın bunlar için özel önerileri bulunabilir.
5.5.3	Kullanımdaki diskleri üretici önerileri doğrultusunda saklayın. Disk ambalajı açıldıktan sonra, diskler üretici tarafından belirtilen sürede kullanılmalıdır.
5.5.4	Üretici tarafından ambalaj üzerinde belirtilen son tüketim tarihinde (STT) diskleri atın.
5.5.5	Kullanımdaki disklerde, aktivite kaybı olup olmadığını kontrol için sık olarak kalite kontrol çalışması (Bkz Bölüm 9) yapın

<sup>1</sup> Bu 15-15-15 dk kuralının bir parçasıdır: inokulum süspansiyonunu hazırladıktan sonra 15 dakika içinde kullanın, diskleri ekim işleminden sonra 15 dakika içinde yerleştirin ve diskler yerleştirildikten sonra plakları 15 dakika içinde etüve kaldırın.

<b>6</b>	<b>Plakların inkübasyonu</b>
6.1	Agar plaklarını ters çevirin ve disklerin agar yüzeyinden düşmediğinden emin olun. Diskler yerleştirildikten sonra 15 dk <sup>1</sup> içinde inkübasyonu başlatın. Eğer diskler yerleştirildikten sonra plaklar uzun süre oda sıcaklığında kalırsa, ön difüzyon nedeniyle hatalı olarak geniş inhibisyon zonları oluşmasına yol çabılır.
6.2	Etüv içerisinde çok sayıda plağın üst üste konması halinde sıcaklık dağılımının eşit olmaması nedeniyle, sonuçlar etkilenebilir. Etüvlerin verimliliği değişken olabilir, bu yüzden plakların üst üste konabileceği en uygun sayının belirlenmesi de dahil olmak üzere inkübasyon kontrolü, laboratuvarın kalite güvencesi programının bir parçası olmalıdır. Birçok etüv için üst üste konabilecek maksimum plak sayısı beştir.
6.3	Plakları <b>Tablo 3</b> 'de belirtilen koşullarda inkübe edin.
6.3.1	İnhibisyon zonu içinde üremelerin oluşmasına ve izolatin yanlış dirençli olarak bildirilmesine neden olabileceği için, önerilen sürelerden daha uzun süre inkübe edilmemelidir.
6.3.2	<i>Enterococcus</i> spp nin glikopeptit duyarlılığı araştırılırken dirençli koloniler 24 saatlik inkübasyon tamamlanmadan görülmeyebilir. Ancak plaklar 16-20. saatte kontrol edilip direnç gözlenirse bildirilebilir. Ancak bu sürede duyarlı gibi gözükten izolatlarda mutlaka inkübasyona devam edilmeli ve 24 saat sonunda tekrar değerlendirilmelidir.

<sup>1</sup> Bu 15-15-15 dk kuralının bir parçasıdır: inokulum süspansiyonunu hazırladıktan sonra 15 dakika içinde kullanın, diskleri ekim işleminden sonra 15 dakika içinde yerleştirin ve diskler yerleştirildikten sonra plakları 15 dakika içinde etüve kaldırın.

**Tablo 3** Antibiyotik duyarlılık testi için inkübasyon koşulları

Bakteriler	İnkübasyon koşulu
<i>Enterobacterales</i>	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Pseudomonas</i> spp.	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Acinetobacter</i> spp.	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Staphylococcus</i> spp.	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Enterococcus</i> spp.	35 ± 1°C normal atmosfer, 18 ± 2 saat (glikopeptitler için 24 s)
<i>Aeromonas</i> spp.	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Vibrio</i> spp.	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Bacillus</i> spp.	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	35 ± 1°C, normal atmosfer, 18 ± 2 saat
Streptococcus A, B, C ve G grupları	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat
Viridans grup streptococci	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Haemophilus influenzae</i>	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Listeria monocytogenes</i>	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Pasteurella multocida</i>	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat
<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i>	Bkz Ek A
<i>Corynebacterium</i> spp.	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat. Bu 16-20 st inkübasyon sonunda yetersiz üreyen izolatlar hemen etüve kaldırılıp inkübasyon sürdürülmelidir. İnhibisyon zonları toplam 40-44 st sonra değerlendirilmelidir.
<i>Aerococcus sanguinicola</i> ve <i>urinae</i>	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat. Bu 16-20 st inkübasyon sonunda yetersiz üreyen izolatlar hemen etüve kaldırılıp inkübasyon sürdürülmelidir. İnhibisyon zonları toplam 40-44 st sonra değerlendirilmelidir.
<i>Kingella kingae</i>	35 ± 1°C, %4-6 CO <sub>2</sub> içeren atmosfer, 18 ± 2 saat. Bu 16-20 st inkübasyon sonunda yetersiz üreyen izolatlar hemen etüve kaldırılıp inkübasyon sürdürülmelidir. İnhibisyon zonları toplam 40-44 st sonra değerlendirilmelidir..

<b>7</b>	<b>İnkübasyon sonunda plakların incelenmesi</b>
7.1	İnokulum sayısı/yoğunluğu doğru ve ekim işlemi de uygun şekilde yapılmışsa, üremenin agar yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde olduğu gözlemlenir.
7.1.1	Tek tek koloniler görülebiliyorsa inokulum sayısı yetersizdir ve test tekrarlanmalıdır.
7.2	Agar yüzeyindeki üreme, tüm inhibisyon zonlarının düzgün yuvarlak (kenarları çentikli olmayan) olmasını sağlayacak şekilde homojen olmalıdır.
7.3	Kalite kontrol suşları için inhibisyon zonlarının kabul edilebilir değerler içerisinde olduğu kontrol edilir ( <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> ).

8	Zonların ölçümü ve duyarlılığın değerlendirilmesi
8.1	Madde 8.9'da aksi belirtilmedikçe tüm antibiyotikler için zon kenarı, plak gözden 30 cm uzakta tutulduğunda tam inhibisyonun başladığı nokta olarak değerlendirilir. Plakların çalışma yüzeyinde 45-derecelik bir açıda tutulması, zon kenarlarının tam görülemediği durumlarda değerlendirmeyi kolaylaştırabilir.
8.2	Katkı içermeyen plakları, plağın arkasından siyah bir zemin üzerinde tutarak ve yansıyan ışıkta (ışık yandan gelerek) değerlendirin.
8.3	Katkı içeren plakları, plağın ön yüzünden kapak açık olarak yansıyan ışık yardımıyla değerlendirin.
8.4	Aksi belirtilmedikçe (bkz bölüm 8.9), geçirgen ışık (plak ışığa doğru tutularak) veya büyüteç kullanılmamalıdır.
8.5	İnhibisyon zon çapını, bir cetvel veya kumpas kullanarak, en yakın milimetreye kadar ölçün.
8.5.1	Eğer otomatik zon okuyucu kullanılıyorsa, manuel okumaya göre kalibre edilmelidir.
8.6	Zon çaplarını güncel sınır değer tablolarına göre <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> değerlendirin ve duyarlılık kategorilerini belirleyin.
8.7	Eğer zon değerlendirmek için şablon kullanılıyorsa, plak şablon üzerine yerleştirilerek şablondaki EUCAST sınır değerlerine göre yorumlanır. Şablondaki sınır değerlerin mutlaka en son sürümdeki EUCAST tablolarına uygun olmasına dikkat edilmelidir. Şablon hazırlamak için serbest erişimli bir programa <a href="http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program">http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program</a> sayfasından ulaşılabilir.
8.8	İnhibisyon zon çaplarının okunması ile ilgili örnekleri içeren çeşitli resimler, <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> sayfasındaki Okuma Kılavuzunda bulunmaktadır. Bu doküman, ayrıca özel bakteri-antibiyotik çiftleri için değerlendirme talimatlarını da içermektedir.
8.9	Özel değerlendirme talimatları:
8.9.1	Çift zon veya zon içinde koloniler oluşması halinde test ettiğiniz izolatin saf olup olmadığını kontrol edin ve gerekirse testi tekrarlayın. Kültür saf ise, çap ölçümü sırasında zon içindeki koloniler de hesaba katılmalıdır.
8.9.2	Trimetoprim ve trimetoprim-sulfametoksazol duyarlılık testinde, besiyerindeki antagonistler nedeniyle, diske kadar hafif bir üreme görülebilir. Bu üreme göz ardı edilmeli ve en belirgin inhibisyon zon kenarı ölçülmelidir.  <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> ve <i>Burkholderia pseudomallei</i> için trimetoprim-sulfametoksazol test edildiğinde, izolatin inhibisyon zonu $\geq$ duyarlı sınır değeri gibi gözüküyorsa, duyarlı bildirilmelidir. Bu türlerde inhibisyon zonu içinde üreme olabilir. Sadece üreme diske kadar olduğunda ve inhibisyon zonu görülemediğinde 'zon yok' olarak değerlendirilir.

- Aeromonas* spp. ve trimetoprim-sulfametoksazol, belirgin olan zon kenarı değerlendirilmelidir. İnhibisyon zonu içindeki hafif üreme göz ardı edilir. Belirgin bir iç zon kenarı varsa, inhibisyon zonu olarak iç zon değerlendirilir.
- 8.9.3 *Enterobacterales*'te ampisilin, ampisilin-sulbaktam ve amoksisilin-klavulanik asit diskleri için, bazı Mueller Hinton agar serilerinde görülebilen ince bir tabaka şeklindeki üreme dikkate alınmamalıdır.
- 8.9.4 *Enterobacterales* ve temosilin için, inhibisyon zonu içindeki izole koloniler dikkate alınmamalıdır.
- 8.9.5 *Enterobacterales* ve mesilinam için, inhibisyon zonu içindeki izole koloniler dikkate alınmamalıdır.
- 8.9.6 *Escherichia coli* ve fosfomisin için, inhibisyon zonu içindeki izole koloniler dikkate alınmamalı ve zonun dış kenarı değerlendirmeye alınmalıdır.
- 8.9.7 *Proteus* spp. için, yayılım dikkate alınmaz ve üremenin inhibisyonu değerlendirilir.
- 8.9.8 *Staphylococcus aureus* için benzilpenisilin zon çapı  $\geq 26$  mm olduğunda, inhibisyon zonunun kenarı plağın ön yüzünden ve ışık kaynağına doğru tutularak dikkatle incelenir. Zon çapı  $\geq$  duyarlı sınır değeri olan, ancak zon kenarları keskin olan izolatlar dirençli olarak değerlendirilir.
- 8.9.9 *Staphylococcus* spp.'de, metisilin direncinin saptanması için sefoksitin kullanıldığında, belirgin olan zonu ölçün ve inhibisyon zonu içindeki kolonileri saptamak için, zonları dikkatle ve uygun bir ışıkta değerlendirin. Üreme varsa bu kontaminasyon veya heterojen direncin ifadesine bağlıdır.
- 8.9.10 Vankomisin zon çapı  $\geq 12$  mm olan enterokoklar için inhibisyon zon kenarını kapağın ön yüzünden ve ışık kaynağına doğru tutarak ("transmitted light"), dikkatle inceleyin. Zon kenarlarının silik ve düzensiz olması ve zon içinde koloniler bulunması vankomisin direncini gösterir ve ileri araştırma gerektirir. İzolatlar 24 saatlik inkübasyon tamamlanmadan duyarlı olarak rapor edilmemelidir.
- 8.9.11 Hemolitik streptokoklar için, hemolizin inhibisyonu değil üremenin inhibisyonu değerlendirilmelidir.  $\beta$ -hemoliz zonu içinde genellikle üreme olmazken,  $\alpha$ -hemoliz ve üreme bir arada olur. Hemoliz ve üremeyi ayırt edebilmek için plağı öne ve arkaya eğin.
- 8.9.12 *H. influenzae* ve beta-laktamlar için, üremenin olmadığı net bir inhibisyon zonu oluşmuşken diskin etrafında üreme olabilir. Bu durumda inhibisyon zonunun dış kenarı değerlendirilir.



9	Kalite Kontrolü
9.1	Test performansını değerlendirmek için <b>Tablo 4</b> 'te belirtilen kalite kontrol (KK) suşlarını kullanın. Temel olarak önerilen kontrol suşları duyarlı suşlardır. Ancak bir yöntemin uygulanma amacı bir direnç mekanizmasının ortaya konması ise dirençli suşlar da kullanılabilir (Genişletilmiş KK, <b>Tablo 5</b> ). KK suşları, kültür koleksiyonlarından veya ticari kaynaklardan satın alınabilir.
9.1.1	$\beta$ -laktam-inhibitör kombinasyon disklerinin inhibitör içeriğini kontrol etmek amacıyla, özel $\beta$ -laktamaz-üreten suşların kullanımı önerilir ( <b>Tablo 4</b> ). Bu rutin KK sürecinin bir parçası olmalıdır. Aktif bileşen ise duyarlı KK susu ile kontrol edilir.
9.2	Kontrol suşlarını canlılığı ve bakteri özelliklerini koruyacak koşullarda saklayın. Gliserollü sıvı besiyeri (veya ticari eşdeğeri) içindeki boncuklarda $-70^{\circ}\text{C}$ 'de stoklamak uygun bir saklama yöntemidir. Her kontrol suşundan iki tüp stoklanmalıdır. Bunlardan biri kullanım stok kültürüdür diğeri ise arşiv işlevi görür
9.3	Her hafta kullanım stoğundan bir boncuk alıp, seçiçi olmayan uygun bir besiyerine pasajlayın ve saflık kontrolü yapın. Bu saf kültürden haftanın her günü bir pasaj yapın. Güç üreyen ve bir hafta besiyerinde dayanamayacak bakteriler için hergün bir öncekinden seri pasajlar yapın. KK suşları en fazla 6 gün pasajlanabilir. Sonrasında plakları atıp, dondurulmuş stoktan yeni bir saf kültür plağı hazırlayın. Kullanım stoğu azaldığında, arşiv tüpünden pasaj yaparak yeni bir kullanım tüpü hazırlayıp dondurun.  Bir kontrol suşunu pasajlarken, mutant seçilmesinden kaçınmak amacıyla, birkaç koloni kullanın.
9.4	Kontrol suşu sonuçlarının <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> sayfasında bulunan EUCAST KK Tablolarındaki kabul edilebilir sınırlarda olduğunu kontrol edin.
9.4.1	EUCAST kalite kontrol tablolarında, hem kabul edilebilir alt ve üst sınırlar hem de hedef değerler yer almaktadır. EUCAST KK suşları ile tekrarlayan testler önerilen sınır değerler içerisinde rasgele dağılım göstermelidir. Test sayısı $\geq 10$ olduğunda ortalama zon çapları hedef degree yakın (ideal olarak hedef $\pm 1$ mm) olmalıdır.
9.5	Test performansını izlemek için rutin KK suşlarını kullanın. KK suşunun bir gecelik kültürünü kullanarak klinik izolatlarla aynı test sürecini izleyin.  Kontrol testleri rutin kullanılan antibiyotikler için, her gün veya en az haftada dört gün yapılmalı ve kontrol edilmelidir. Kontrol testleri klinik izolatların duyarlılık test sonuçları verilmeden okunmalı ve değerlendirilmelidir.
9.5.1	Testlerin yapıldığı günlerde, ardışık 20 kontrol testi sonucunu inceleyin. Dağılım eğrilerini değerlendirin. Zon çaplarında sürekli olarak hedefin altında veya üstünde kalma eğilimi olup olmadığını gözlemleyin.
9.5.2	Eğer ardışık olmayan iki sonuç, hedefin aynı tarafında kabul edilebilir sınırların dışında ise, duyarlılık test sonuçları verilebilir ancak inceleme gerekir.

- 9.5.3 Eğer ardışık iki test, sınır değerler dışında ise veya bir g¼n içinde birden fazla disk sınır değerlerin dışında ise, klinik izolatların sonucunu vermeden bunun nedenini araştırın. Testlerin tekrarlanması gerekebilir.
- 9.5.4 Eğer dirençli bir kontrol suşunda direnç saptanamamışsa, o zaman klinik izolatlar için duyarlılık sonuçlarını vermeyin. Nedeni araştırın ve testi tekrarlayın.
- 9.5.5 Disk dif¼zyonda olası hata kaynaklarını araştırırken, antibiyotik diskleri, besiyeri, uygulama koşulları ve kalite kontrol suşları ile ilgili olabilecek sorunları değerlendirin.
- 9.6 Rutin KK testleri yanısıra, Mueller Hinton agarın her yeni serisini kullanıma sokarken t¼m zonların istenen sınırlarda olmasını kontrol etmek amacıyla test yapın. Her yeni agar serisi için agar kalınlığını ol¼n.
- Aminoglikozitlerin KK değerleri besiyerindeki divalan katyonlara bağlı olarak kabul edilemeyecek değişimler g¼sterebilir. Tigesiklin besiyerindeki magnezyum miktarı değişimlerine, trimetoprim-sulfametoksazol timin ve timidin içeriğine, eritromisin ise besiyeri pH'sına duyarlıdır ve bunlar ile ilgili sorunlar ortaya çıkabilir. Agar kalınlığının kabul edilebilir sınırlardan kalın olması zon çaplarının dar olmasına, ince olması ise zon çaplarının geniş olmasına neden olur.
- 9.6.1 Divalan katyon ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) konsantrasyonunun y¼ksek veya d¼ř¼k olması, *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun aminoglikozit zonlarının, sırası ile, kalite kontrol sınırlarının altında ve ¼st¼nde olması ile farkedilebilir.
- 9.6.2 Timin ve timidin d¼zeylerinin olması gerekenden fazla olması *E. faecalis* ATCC 29212 kontrol suşunda trimetoprim-sulfametoksazol inhibisyon zonlarının KK sınırlarının altında kalmasına neden olur.

<b>Tablo 4: Rutin testler için kalite kontrol suşları</b>		
<b>Tür</b>	<b>Suş</b>	<b>Özellik</b>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 76.24 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434	Duyarlı, sokak tipi (Wild type)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5923 CCUG 30600 CECT 943	TEM-1 $\beta$ -laktamaz üreticisi, ampisilin dirençli ( $\beta$ -laktam-inhibitör kombine disklerindeki inhibitörün kontrolü için)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	ESBL-üreten suş (SHV-18) ( $\beta$ -laktam-inhibitör kombine disklerindeki inhibitörün kontrolü için)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2814	KPC-3, SHV-11 and TEM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 NCTC 12903 CIP 76.110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108	Duyarlı, sokak tipi
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 NCTC 12973 CIP 103429 DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794	Zayıf $\beta$ -laktamaz üreticisi
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570 CCUG 9997 CECT 795	Duyarlı, sokak tipi
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619 NCTC 12977 CIP 104340 DSM 11967 CCUG 33638	Benzil penisiline azalmış duyarlılık
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766 NCTC 12975 CIP 103570 DSM 11970 CCUG 29539	Duyarlı, sokak tipi

*Campylobacter jejuni*

ATCC 33560  
NCTC 11351  
CIP 70.2T  
DSM 4688  
CCUG 11284

Duyarlı, sokak tipi  
Test koşulları için, Ek-A'ya bakınız

**Table 5:**

**Özel direnç mekanizmalarının saptanması için ek kalite kontrol suşları (genişletilmiş KK)**

Tür	Suş	Özellik
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	ESBL-üreten suş (SHV-18)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12493 CCUG 67181	<i>mecA</i> pozitif, metisilin dirençli (MRSA)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289	Yüksek-düzey aminoglikozit dirençli (YDAD) ve vankomisin dirençli resistant ( <i>vanB</i> pozitif)
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	PBP mutasyonlarına bağlı olarak $\beta$ -laktamlara azalmış duyarlılık

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

*Campylobacter jejuni* ve *coli* için, EUCAST önerilerine göre disk difüzyon uygulanırken aşağıdaki yöntem basamakları (Tablo A1) izlenmelidir.

<b>Tablo A1</b>	<b><i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i> için disk difüzyon yöntemi</b>
<b>Besiyeri</b>	Defibrine at kanı (%5) ve 20 mg/L $\beta$ -NAD içeren Mueller-Hinton agar (MH-F) Bakteri yayılmasını önlemek için MH-F plakları kullanılmadan önce kurutulmalıdır (20-25°C'de bir gece, veya 35°C'de, petri kapağı açık olarak, 15 dk tutularak).
<b>İnokulum</b>	0.5 McFarland
<b>İnkübasyon</b>	Mikroaerofilik ortam 41±1°C 24 st  İnkübasyon sonucunda yeterli üreme olmalıdır. Bazı <i>C.coli</i> izolatları 24 saatte yeterince üremeyebilir. Bu plaklar hemen etüve kaldırılıp inhibisyon zonları 40-48 saat sonra değerlendirilmelidir.  <i>Campylobacter</i> spp.nin üremesi için uygun koşulları sağlamak açısından 41±1°C 'lik bir inkübasyon ısısı seçilmiştir.
<b>Değerlendirme</b>	MH-F plaklarını ön yüzden, besiyeri kapağı açık ve yansıyan ışıpta değerlendirin. Zon kenarlarını, plak, çalışma yüzeyine doğru 45-derecelik açı il eve gözden 30 cm uzakta tutulduğunda, çıplak gözle görülen tam inhibisyonun olduğu nokta olarak okuyun.
<b>Kalite Kontrolü</b>	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560



# EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases