



## **Yöntem-Kan Kültürü Şişelerinden Doğrudan Hızlı Antibiyotik Duyarlılık Testi (HADT)**

**Sürüm 6.0,**

**Nisan 2025**

**Bir önceki sürümden farkları (v.5.0)**

<b>Bölüm</b>	<b>Fark</b>
Genel bilgiler	<i>Salmonella enterica</i> 'ya ilişkin bilgi eklendi.
Tablo 1	<i>Salmonella enterica</i> 'ya ilişkin bilgi eklendi.
Tablo 2	<i>Salmonella enterica</i> 'ya ilişkin bilgi eklendi.

EUCAST HADT yöntemi, EUCAST standart disk difüzyon yöntemine dayanmakla birlikte, inokulum, inkübasyon süresi ve okuma açıklamaları değiştirilmiş ve özgül HADT sınır değerleri tanımlanmıştır.

EUCAST HADT yönteminin amacı, doğrudan pozitif kan kültür şişelerinden hızlı antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarını almayı sağlamaktır. HADT yöntemi, 4, 6 ve/veya 8 saatlik inkübasyon sonrası okumalar için özgül sınır değerler sağlar. Ek olarak, da 16-20 saatlik inkübasyon için HADT sınır değerleri geliştirilmiştir. 16-20 saatlik okumalar ancak 4, 6 ve/veya 8 saatlik inkübasyondan sonra sonuçların okunması mümkün olmadığında (örneğin laboratuvarın mesai saati dışında) yapılmalıdır

Bu yöntem, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella variicola* ve *Klebsiella quasipneumonia* da dahil), *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve *Streptococcus pneumoniae* türleri için doğrulanmıştır.

#### **Kan kültür şişelerinin hazırlanışı**

EUCAST HADT yöntemi, BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) ve VersaTREK (Thermo Fisher) kan kültürü şişeleri için doğrulanmıştır. HADT yöntemi, kan kültürü şişesi pozitif sinyal verdikten sonraki 0-18 saat içinde uygulanabilir. HADT yöntemi uygulanana kadar pozitif şişeler kan kültürü cihazından çıkartılmamalıdır. Bununla birlikte, pozitif şişelerin bir yerden başka bir yere taşınmasının gerekmesi durumunda, cihazdan çıkarttıktan sonra şişelerin oda sıcaklığında tutulmasının yöneme olan etkisi de değerlendirilmiştir. Üç saate kadar “gecikmelerden” HADT sonuçları etkilenmemektedir. HADT yöntemi karışık türlerin ürettiği kan kültürlerinde yapılmamalıdır.

#### **Agar plaklarının kan kültürü şişelerinden doğrudan inokülasyonu**

Her yuvarlak 90-mm MH/MH-F agar plağı için 125±25 µl seyreltilmemiş kan kültür besiyeri, pozitif kan kültürü şişesinden doğrudan alınır. Besiyeri, agar yüzeyinde üç yönde sürülerek veya otomatik plak rotatoru ile nazıkçe yayılır ve standart ADT yönteminde uygulandığı gibi diskler plak üzerine yerleştirilir. Antibiyotikler arasındaki etkileşimi önlemek için plak başına en fazla 4-6 disk kullanılmalıdır. Plakların inokülasyonu, antibiyotik disklerinin uygulanması ve plakların inkübasyonu geciktirilmemelidir.

#### **İnkübasyon ve plakların okunması**

Plaklar Tablo 1’de açıklandığı şekilde inkübe edilir. 4, 6 ve/veya 8 saat için: öngörülen okuma zamanında (4, 6 ve/veya 8 saat) (± 5 dakika içinde) inhibisyon zonları okunur. Gerekli durumlarda, daha sonraki okuma süresinde (6 ve/veya 8 saat) okumak üzere plaklar 10 dakika içinde tekrar inkübasyona kaldırılır. Plakları 8 saatten uzun inkübe etmek gerekiyorsa, inhibisyon zon çaplarını 16-20 saat içinde okumak gerekir. Plaklar 20 saatten daha uzun süre inkübe edilmez ve okunmaz.

**Tablo 1.** Antibiyotik duyarlılık test plakları için inkübasyon koşulları.

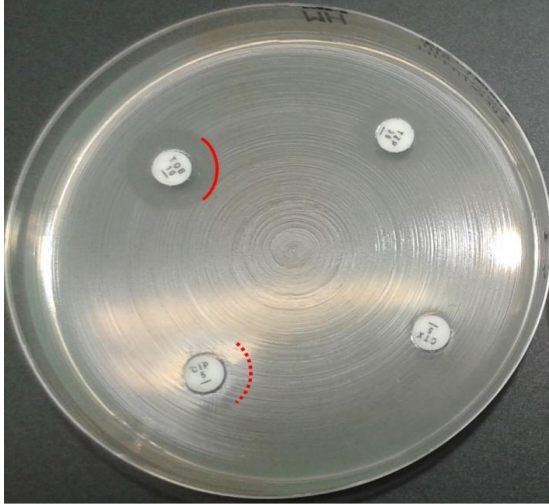
Bakteri	İnkübasyon süresi	Besiyeri	İnkübasyon
---------	-------------------	----------	------------

<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	4, 6 ve 8 saat 16-20 saat	MH	35±1°C normal atmosferde
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 ve 8 saat 16-20 saat	MH	35±1°C normal atmosferde
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6 ve 8 saat 16-20 saat	MH-F	35±1°C %4-6 CO <sub>2</sub> 'li atmosferde

### İnkübasyon sonrası plakların değerlendirilmesi

#### 4, 6 ve 8 saatlik inkübasyon

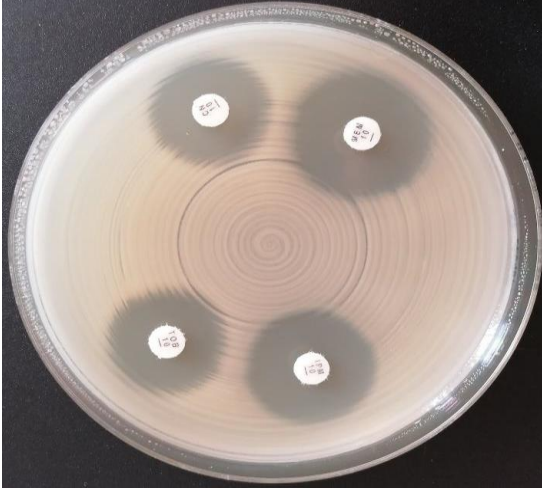
4, 6 ve 8 saatte, Muller-Hinton agar plaklarındaki üreme EUCAST standart disk difüzyon yöntemine göre genellikle daha az belirgin olacaktır. **İnhibisyon zonları sadece yaygın üreme gözleniyorsa ve zon kenarları belirgin ise okunmalıdır, Resim 1'deki örneğe bakınız.**



**Resim 1.** Dört saat inkübasyon sonunda *E. coli*. Belirgin gözlenen zon kenarları okunmalıdır (düz çizgi), belirgin zon kenarı olmayanlar (kesikli çizgi) okunmamalıdır.

#### 16-20 saatlik inkübasyon

HADT'nin 16-20 saatlik inkübasyonunda, Muller-Hinton agar plaklarındaki üreme EUCAST standart disk difüzyon yöntemine göre genellikle daha yoğun olacaktır, **Resim 2'deki örneğe bakınız.**



**Resim 2.** 16-20 saat inkübasyon sonunda *E. coli*.

### Zon çaplarının ölçülmesi

#### Genel okuma yönergeleri

- MH plakları koyu renk zemin üzerinde ve MH-F plakları ise açık renk zemin üzerinde okunur. Plağı çalışma tezgahından 45 derecelik bir açıyla gözden yaklaşık 30 cm uzakta tutun. Keskin zon kenarlarını görebilmek için plağa kendinize doğru eğim verin.
- İnhibisyon zon çaplarının en yakın milimetre değeri manuel olarak ölçülür. HADT yöntemi otomatik zon ölçerler için doğrulanmamıştır.
- Belirgin kenarı olan inhibisyon zonlarının içindeki ince üremeler göz ardı edilmelidir. Bu durum nadiren *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin erken okumalarında ve sıklıkla  $\beta$ - laktam antibiyotiklerde gözlenir

#### 4, 6 ve 8 saatlik inkübasyon için özel okuma yönergeleri

- Hem MH hem de MH-F plakları, **kapakları kaldırıldıktan sonra yansıyan ışıpta önden ve gözle** değerlendirilir.
- *A. baumannii* için trimetoprim-sülfametoksazol değerlendirilirken, zon dış kenarı okunur ve zon içindeki üremeler göz ardı edilir.
- Bazen 4 saatin sonunda belirgin bir inhibisyon zonu oluşmaz, ancak 6 saatten sonra zon çapı kolaylıkla ölçülebilir (Tablo 2). Değerlendirilen tüm antibiyotiklerin inhibisyon zonlarını okumak her zaman olanaklı olmayabilir.

#### 16-20 saatlik inkübasyon için özel okuma yönergeleri

- 16-20 saatlik inkübasyonda, yansıyan bir ışıkla birlikte **MH plaklarını plağın arkasından, MH-F plakları ise kapakları kaldırıldıktan sonra önden** okuyunuz.

*P. aeruginosa* için piperasilin-tazobaktam, imipenem, imipenem-relebaktam, meropenem ve meropenem-vaborbaktamı değerlendirirken inhibisyon zonu içindeki kolonileri yok sayın ve zon dış kenarını okuyun, Şekil 3'deki örneğe bakınız.



**Şekil 3.** İnhibisyon zonu içindeki kolonileri yok sayın ve zon dış kenarını okuyun.

**Tablo 2.** 4-20 saat inkübasyon süreleri sonrasında okunabilen zon çaplarının oranı\* (%).

Bakteri	4 saat (%)	6 saat (%)	8 saat (%)	16-20 saat (%)
<i>Escherichia coli</i>	90	99	99	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96	98	98	100
<i>Salmonella enterica</i>	93	100	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa**</i>	-	88	97	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99	100	100	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	55***	91	95	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	93	99	100	100
<i>Enterococcus faecium</i>	44	93	99	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	68	83	95	100

\*Bazı zon çapları TBA içinde olacağından, tablo "yorumlanabilen" değil "okunabilen" zon çaplarını gösterir.

\*\* Bazı *P. aeruginosa* izolatlarında HADT'de zayıf üreme gözlenir, bu izolatlarda genellikle standart disk difüzyon 16-20 saatlik inkübasyonda da zayıf üreme gözlenmektedir.

\*\*\*Sefoksitin ve aminoglikozitlerin okunması kolayken norfloksasin ve klindamisininki daha güçtür.

### Sonuçların yorumlanması

- Ölçülen inhibisyon zon çaplarını HADT klinik sınır değer tablolarının en son sürümüne göre yorumlayın.
- Üreme olmadığında, zon çapının güvenilir bir şekilde okunmadığı ya da zon çapının TBA içinde çıkması durumunda, test edilen tüm antibiyotikler için bir duyarlılık kategorisi bildirmek mümkün olmayabilir. Bu durumlarda, raporda ilgili antibiyotiği boş bırakın. Laboratuvarların pozitif kan kültürlerinin raporlarına, bazı sonuçların neden bazen boş bırakılabileceğini açıklayan bir yorum eklemelerini öneriyoruz. Yorum şu şekilde olabilir: "Antibiyotik duyarlılık testi pozitif kan kültürü şişelerinden doğrudan yapıldığında, sonuçlar genellikle 4, 6 ve/veya 8 saat sonra elde edilebilir ve yalnızca güvenilir olan sonuçlar bildirilir. Kısa inkübasyondan sonra sonuçları olmayan bir duyarlılık raporu, sonraki bir aşamada daha fazla sonuçla desteklenebilir."

### Teknik belirsizlik alanı (TBA)

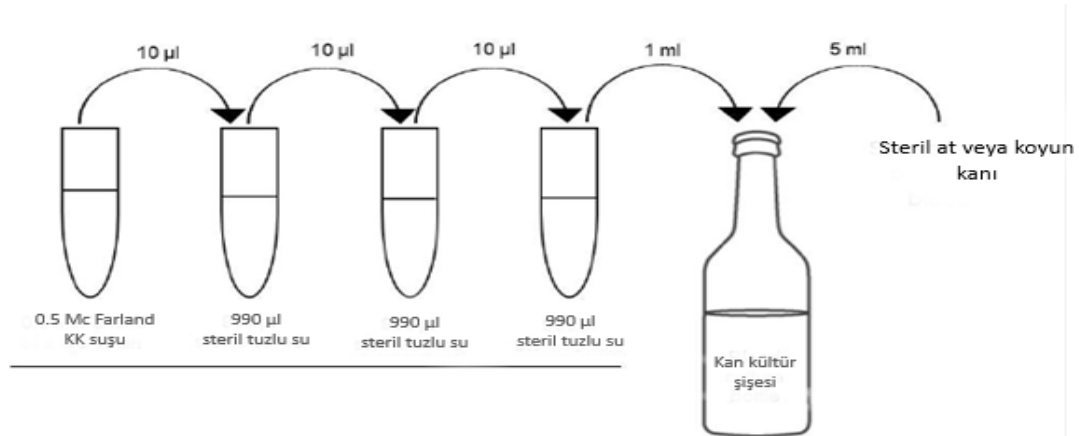
TBA bir inhibisyon zon çapı aralığıdır. EUCAST HADT yönteminde tüm bakteri-antibiyotik kombinasyonları için TBA'lar vardır. TBA, duyarlılık kategorileri arasındaki ayrımın zayıf olduğu bir alanı temsil etmektedir. Bu alanda yorumlama hataları önemli ölçüde artar ve yorumlama mümkün olmaz. TBA'nın üstünde veya altında olan sonuçlar güvenilir bir şekilde raporlanabilir. Bir sonuç TBA içinde olduğunda ise yorumlanamaz. O antibiyotik için raporu boş bırakmaktan çekinmeyin. 4. saatte, 10 dakika içinde plakaları tekrar inkübe edin ve 6. saatte ve gerekirse 8. saatte ve gerektiğinde de 16-20. saatte tekrar okuyun. 8 veya 16-20 saatlik inkübasyondan sonra tam bir sonuç alınamazsa, EUCAST standart disk difüzyon yöntemi ile ADT yapın.

### Kalite kontrol önerileri

EUCAST standart disk difüzyon için EUCAST, yöntemin ve ADT gereçlerinin validasyonu için günlük iç kalite kontrol (KK) uygulanmasını önermektedir. EUCAST aynı zamanda, 4, 6, 8 ve 16-20 saat için beş KK suşu (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. pneumoniae* ATCC 49619) ve 16-20 saat için dört KK suşu (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. pneumoniae* ATCC 49619) için kriterler geliştirmiştir. Bu kriterler HADT KK tablolarında bulunmaktadır. HADT KK işlemi temel olarak, yeni yöntemin kalibrasyonu ve validasyonu için kullanılır. Laboratuvarda kullanılan tüm okuma süreleri, KK suşları kullanılarak doğrulanmalıdır. Yöntem oturtulduktan sonra, yeni personel veya yeni gereçlere (kan kültürü sisteminin, besiyerlerinin veya disklerin değişmesi) geçiş olana kadar HADT KK uygulanmasına gerek yoktur. Kullanılan gereç ve ekipmanı kontrol etmek için EUCAST önerilerine göre standart yöntem ile düzenli iç KK yapılmalıdır.

KK suşları, kan kültürü şişelerine 1 mL 100-200 KOB/mL KK suşu çözeltisi\* ve yaklaşık 5 mL steril at veya koyun kanı inoküle edilerek test edilir. İnoküle edilmiş şişeler kan kültürü cihazında inkübe edilir ve pozitif sinyal verdikten sonra HADT yöntemine göre işleme alınır.

\*100-200 KOB/mL = 0,5 McFarland'a ayarlanan KK çözeltisi 1:1000000 oranında seyreltilir, aşağıdaki grafikteki örneğe bakın.



- 0.5 Mc Farland KK suşu hazırlayın
- Yukarıdaki şekildeki gibi seri dilüsyon yapın ve kan kültür şişesine at veya koyun kanı ile beraber ekleyin.
- Kan kültür şişesini kan kültür cihazında inkübe edin.
- Cihaz pozitif sinyal verdikten sonra HADT yöntemini uygulayın.
- Sonuçları HADT KK dökümanlarından HADT KK kriterlerine göre değerlendirin.



### **EUCAST HADT yöntemi kullanılırken dikkat edilecek önemli noktalar**

- İnhibisyon zonları sadece üreme yaygın olduğunda ve zon kenarları belirgin şekilde gözlendiğinde okunmalıdır.
- Zon çapları yalnızca belirlenen okuma saatlerinde, yani 4, 6 ve 8. saatte ve bu mümkün olmadığında (örneğin laboratuvarın mesai saati dışında) 16-20. saatte okunur.
- Duyarlılık sonuçlarını yorumlamak için normal sınır değer tablosu değil, EUCAST HADT sınır değer tablosu kullanılır.