



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

**Sürüm 3.0,**

**Nisan 2022**

**Bir önceki sürümden farkları (v.2.0)**

<b>Bölüm</b>	<b>Fark</b>
Genel bilgiler	16-20 saatlik inkübasyon bilgisi eklendi.
İnkübasyon ve plakların okunması	16-20 saatlik inkübasyon bilgisi eklendi.
Tablo 1	16-20 saatlik inkübasyon bilgisi eklendi.
İnkübasyondan sonra plakların incelenmesi	16-20 saatlik inkübasyon bilgisi eklendi.
Zon çaplarının ölçümü ve duyarlılığın yorumlanması	16-20 saatlik inkübasyon bilgisi eklendi.
Tablo 2	16-20 saatlik inkübasyon bilgisi eklendi.
Kalite kontrol önerileri	16-20 saatlik inkübasyon bilgisi eklendi.

EUCAST HADT yöntemi, EUCAST standart disk difüzyon yöntemine dayanmakla birlikte, inokulum değiştirilmiş, inkübasyon süresi kısaltılmış, 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, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *S. pneumoniae* '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 yapılmalıdır. Tüm okuma zamanlarında teknik belirsizlik alanı (TBA) içinde sonuç veren tüm izolatlar standart yöntem ve sınır değerler ile test edilmelidir.

#### **Kan kültürü şişelerinin hazırlanması**

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 ürediği 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.

#### **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. Plakları 20 saatten daha uzun süre inkübe edilmez ve okunmaz.

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

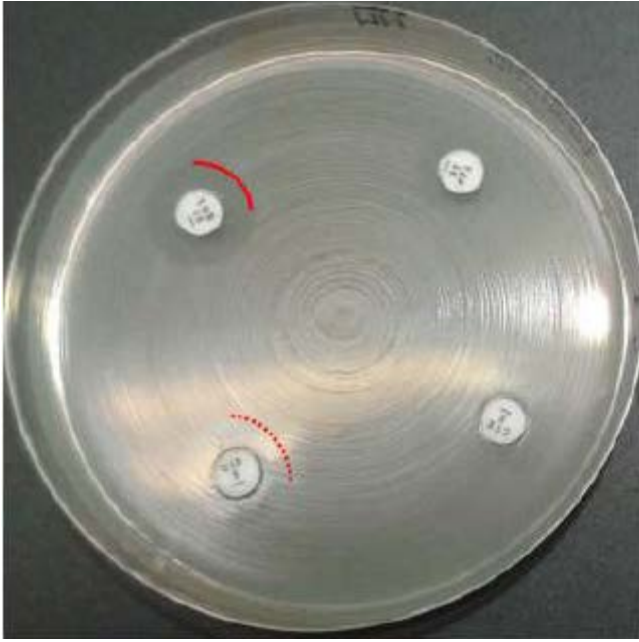
<b>Bakteri</b>	<b>İnkübasyon süresi</b>	<b>Besiyeri</b>	<b>İnkübasyon</b>
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	4, 6 ve 8 saat 16-20 saat	MH	35±1°C normal atmosferde
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 ve 8 saat 16-20 saat	MH	35±1°C normal atmosferde

<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	4, 6 ve 8 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 belirginse okunmalıdır, Resim 1'deki örneğe bakınız.**



**Resim 1.** 4 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 belirgin 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. Placı çalışma tezgahından 45 derecelik bir açıyla gözden yaklaşık 30 cm uzakta tutun. Keskin zon kenarlarını görebilmek için plaaı kendinize doğru eğim verin.
- İnhibisyon zon çaplarının en yakın milimetre değeri manuel olarak ölçülür. HADT yöntemi otomatik zon ölçerler için doğrulanmamıştır.

#### 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.
- 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.
- *A. baumannii* için trimetoprim-sülfametoksazol değerlendirirken, zon dış kenarını okuyun ve zon içindeki üremeleri göz ardı edilir.
- Bazen 4 saatin sonunda belirgin bir inhibisyon zonu oluşmaz, ancak 6 saaten 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 plajın arkasından, MH-F plakları ise kapakları kaldırıldıktan sonra önden** okuyunuz.
- *P. aeruginosa* için piperasilin-tazobaktam, imipenem ve meropenemi 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	88	97	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99	100	100	VY
<i>Staphylococcus aureus</i>	55**	91	95	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	93	99	100	VY
<i>Enterococcus faecium</i>	44	93	99	VY
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	68	83	95	100

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

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

VY: Veri yok, test yapılamadı.

### Sonuçların yorumlanması

- Ölçülen inhibisyon zon çaplarını HADT klinik sınır değer tablolarının en son versiyonuna göre yorumlayın.
- 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.

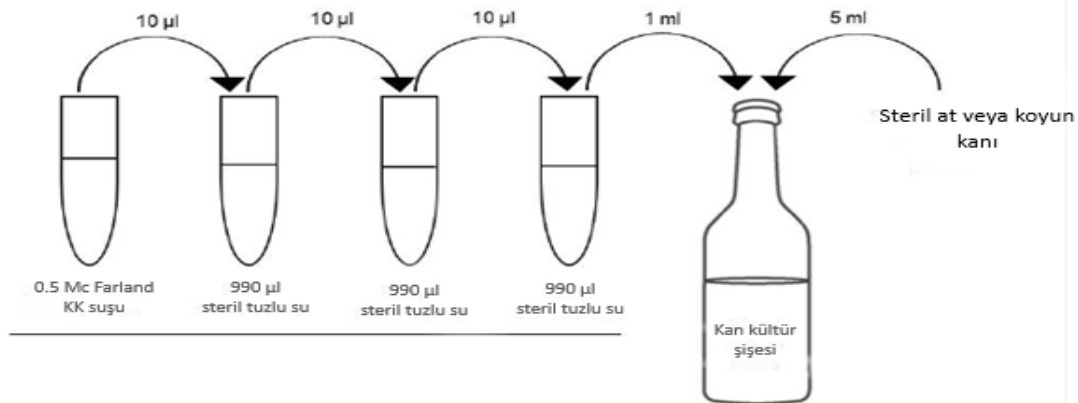
### Kalite kontrol önerileri

EUCAST standart disk difüzyon için EUCAST, yöntemin ve ADT gereçlerinin validasyonu için günlük iç kalite kontrol (KK) uygulanmasını önermektedir. EUCAST aynı zamanda, 4, 6 ve 8

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. Laboratuvarında 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 tavsiyelerine 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 16-20. saatte okunur.
- Duyarlılık sonuçlarını yorumlamak için normal sınır değer tablosu değil, EUCAST HADT sınır değer tablosu kullanılır.

[https://www.eucast.org/rapid\\_ast\\_in\\_blood\\_cultures/methods](https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/methods)



**Tanımlanmış sınır değerler kullanılarak pozitif kan kültürü şişelerinden doğrudan EUCAST hızlı antibiyotik duyarlılık testi (HADT) yönteminin uygulanması**

**Sürüm 2.0, Nisan 2022**

**Bir önceki sürümden farkları (v.1.0)**

Değişiklik
16-20 saatlik inkübasyon bilgisi eklendi

**EUCAST HADT yöntemini uygulamadan önce aşağıdaki konuları dikkate alınız:**

1. EUCAST HADT yöntemi, pozitif kan kültürü şişelerinden doğrudan disk difüzyon yöntemi için geliştirilmiş ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri için kalibre edilmiştir.
2. HADT uygulamak için laboratuvar çalışanları arasından bu işin sorumluluğunu alacak ve tüm uygulama sürecinde işi üstlenecek bir “şampiyon” tanımlayın.
3. Sonuçlar sadece türe özgü tanımlanmış HADT sınır değerlerine ve okuma sürelerine (4, 6, 8 ve 16-20 saat) göre değerlendirilmelidir. Standart sınır değer tablosunu kullanmaya kalkmayın!
4. 16-20 saat inkübasyon süresine sahip HADT, yalnızca standart 4, 6 veya 8 saatten sonra plakların okunamadığı durumlarda kullanılmalıdır. 20 saatten uzun inkübe etmeyin. Uzun inkübasyon şu anda *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *S.pneumoniae* için geliştirilmiştir.
5. 4, 6 ve 8 saatlik inkübasyon sonunda, plakları öngörülen okuma sürelerinin  $\pm 5$  dakikası içinde okuyun. Plak 4 (veya 6) saat sonra okunamıyorsa 10 dakika içinde tekrar inkübe edin. 16-20 saatlik inkübasyonda, zaman aralığı içinde plakaları okuyun. Plakları 20 saatten fazla inkübe etmeyin.
6. HADT okuma talimatları, okuma süresine bağlı olarak farklılık gösterir.
  - a) 4., 6. ve 8. saatlerde, SADECE yaygın üreme gözleniyorsa ve zon kenarları belirginse, plakların kapakları kaldırıldıktan sonra önden okunur.
  - b) 16-20. saatlerde, inhibisyon zon çapları MH plaklarında arka taraftan, MH-F plaklarında ise kapakları kaldırıldıktan sonra ön taraftan okunur.
7. Yorumlama her türe özel olduğundan, HADT sonuçlarının yorumlanmasından önce tür tayini yapılmış olmalıdır. Sistemin geliştirildiği ve valide edildiği türler dışındakiler için sonuçları değerlendirmeye çalışmayın.
8. Teknik Belirsizlik Alanındaki (TBA) bir sonuç için değerlendirme tekrarlanmalıdır: 4. saatte, plakları 10 dakika içinde yeniden inkübe edin ve 6. saatte tekrar okuyun, gerekiyorsa 8.

saatte ve gerekliyse 16-20. saatte tekrar okuyun. 8 veya 16-20 saat sonra tam bir sonuç alınamıyorsa, EUCAST standart disk difüzyon yöntemi ile test tekrarlanmalıdır.

**9.** Yöntemin uygulanmasını hızlandırmak için, EUCAST KK suşları ile kriterler (hedefler ve aralıklar) geliştirmiştir. Suşlar tüm işlem sürecine tabi tutulmalı (şişelerin inokülasyonu, kan kültürü cihazında inkübasyonu, pozitif sinyal aldıktan sonra plakların inokülasyonu) ve 4, 6, 8 ve 16-20 saat inkübasyondan sonra zon çapları okunmalıdır. Bu suşlar yöntem oturtulurken, yeni personel eğitilirken, kan kültürü sisteminde değişiklik olduğunda veya sistemde herhangi bir başka değişiklik olduğunda değerlendirilmelidir. Bunun dışında, ADT malzemeleri ve ADT için kullanılan donanımı kontrol etmek için standart kriterleri kullanarak iç KK uygulaması yapın.

**10.** Sorularınız varsa EUCAST Geliştirme Laboratuvarı ile iletişime geçmekten çekinmeyin ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)'a bakın).