



EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Kan Kültürü Şişelerinden Doğrudan Hızlı Antibiyotik Duyarlılık Testi (HADT)

EUCAST, pozitif kan kültürü şişelerinden doğrudan kısa süreli inkübasyonlu (4, 6 ve 8 saat) ADT için önerilerini yayımlamıştır. Bunun için aşağıda anlatılan yöntem izlenmelidir:

Yöntem – Pozitif kan kültürü şişelerinden doğrudan EUCAST hızlı antibiyotik duyarlılık testi (HADT, RAST)

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

Not. Yöntem SADECE HADT uygulamak üzere ve ADT plaklarının SADECE maksimum 8 saatlik inkübasyonu için valide edilmiştir (geçerli kılınmıştır). Daha uzun süre inkübasyon gerektiğinde EUCAST standart disk difüzyon yöntemi kullanılmalıdır.

Kan kültürü şişelerinin hazırlanması:

EUCAST HADT yöntemi, BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) ve VersaTREK (Thermo Fisher kan kültürü şişeleri için doğrulanmıştır (valide edilmiş). HADT yöntemi, kan kültürü şişesi pozitif sinyal verdikten sonraki 0-18 saat içinde uygulanabilir. HADT ile devam etmeye hazır olunana 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.

Agar plaklarının kan kültürü şişelerinden doğrudan inokülasyonu:

Her MH/MH-F agar plağı için 100-150 µl seyreltilmemiş kan kültürü besiyeri, pozitif kan kültürü şişesinden doğrudan alınır. Besiyeri, agar yüzeyinde üç yönde sürülerek veya otomatik plak rotatoru ile nazikçe yayılır ve standart ADT için uygulandığı şekilde diskler plak üzerine yerleştirilir.

İnkübasyon ve plakların okunması

Plaklar Tablo 1’de açıklandığı şekilde inkübe edilir. Öngörülen okuma zamanında (4, 6 ve/veya 8 saat) (\pm 5 dakika içinde) inhibisyon zonları okunur. Gerektiği takdirde, daha sonraki okuma süresinde (6 ve/veya 8 saat) okumak üzere plaklar 10 dakika içinde tekrar inkübasyona kaldırılır. Plaklar 8 saatten daha uzun süre inkübe edilmez ve 8 saatten sonra okunmaz.

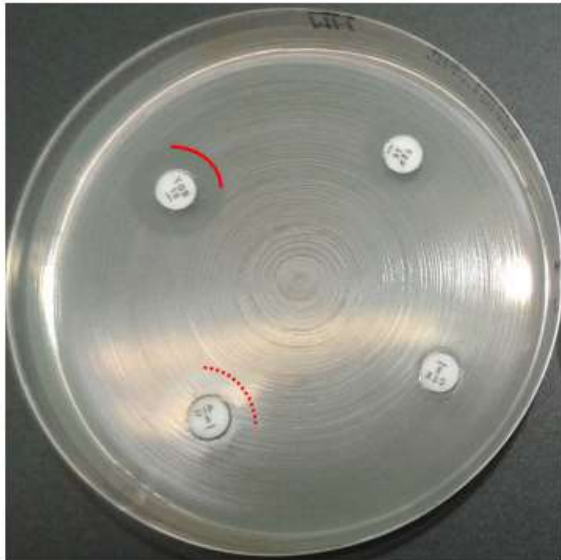
Tablo 1. Antibiyotik duyarlılık test plakları için inkübasyon koşulları.

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

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

İnkübasyon sonrası plakların değerlendirilmesi

4-8 saat inkübasyon süresi sonunda Muller-Hinton agar plaklarındaki üreme sıklıkla standart inkübasyon süresine (16-20 saat) kıyasla daha silik olacaktır. İnhibisyon zonları sadece yaygın üreme gözleniyorsa ve zon kenarları belirginse okunmalıdır, Resim 1'deki örneğe bakınız.



Resim 1. 4 saatlik inkübasyon sonunda *E. coli*. Belirgin gözlenen zon kenarları okunmalıdır (düz çizgi), belirgin zon kenarı izlenmeyenler (kesikli çizgi) okunmamalıdır.

Zon çaplarının ölçülmesi ve duyarlılığın değerlendirilmesi

Hem MH hem de MH-F plakları, **kapakları kaldırıldıktan sonra yansıyan ışıpta önden ve gözle** değerlendirilir. MH plakları koyu renk zemin üzerinde ve MH-F plakları açık renk zemin üzerinde okunur. Plak gözden yaklaşık 30 cm mesafede ve 45 derece açıyla tutulur. Keskin zon kenarları ortaya çıkacak şekilde plağa açı verilir. İnhibisyon zon çaplarının en yakın milimetre değeri ölçülür. Belirgin kenarı olan inhibisyon zonlarının içindeki ince üremeler göz ardı edilmelidir. Bu durum nadiren *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin erken okumalarında ve sıklıkla β -laktam antibiyotiklerde gözlenir. Bazen 4 saatin sonunda belirgin bir inhibisyon zonu oluşmaz, ancak 6 saate sonra zon çapı kolaylıkla ölçülebilir (Tablo 2). Değerlendirilen tüm antibiyotiklerin inhibisyon zonlarını okumak her zaman mümkün olmayabilir.

Tablo 2. İnkübasyon süreleri 4, 6 ve 8 saat sonrasında okunabilen zon çaplarının oranı (%).

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

*Sefoksitin ve gentamisinin okunması kolayken norfloksasin ve klindamisininki daha güçtür.

Kalite kontrol önerileri

EUCAST standart disk difüzyon için EUCAST, yöntemin ve ADT materyallerinin validasyonu için günlük iç kalite kontrol (KK) uygulanmasını önermektedir. EUCAST aynı zamanda, üç KK suşunun (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. pneumoniae* ATCC 49619) 4, 6 ve 8 saat için kriterlerini geliştirmiştir. Kriterler HADT sınır değer tablolarında verilmiştir. HADT KK işlemi temel olarak, yeni yöntemin kalibrasyonu ve validasyonu için kullanılır. Yöntem oturtulduktan sonra, yeni personel veya yeni malzemelere (kan kültürü sisteminin, besiyerlerinin veya disklerin değişmesi) geçiş olana kadar HADT KK uygulanmasına gerek yoktur. Standart yöntem için, EUCAST önerileri doğrultusunda düzenli iç KK uygulamasına devam edilmelidir.

HADT KK uygulamasında, kan kültürü şişeleri 1 ml 100-200 KOB/ml KK suşu çözeltisi (1:100.000 sulandırılmış 0,5 McFarland) ve yaklaşık 5 ml steril kan ile inoküle edilir. İnoküle edilen şişeler kan kültürü cihazına yerleştirilerek inkübe edilir ve pozitif sinyal verdikten sonra yukarıda açıklanan yöntemle uygulanır.

EUCAST HADT yöntemi kullanılırken dikkat edilecek önemli noktalar

- İnhibisyon zonları sadece üreme yaygın olduğunda ve zon kenarları belirgin şekilde gözlemlendiğinde okunmalıdır.
- Zon çapı değerlerinin yorumlanmasında EUCAST HADT sınır değer tabloları kullanılmalı, standart tablolar kullanılmamalıdır
- İnkübasyon süresi 8 saatten sonra uzatılmamalıdır.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/Methodology_EUCAST_RAST_v1_20181126.pdf



EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

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

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 ve 8 saat) göre değerlendirilmelidir. Standart sınır değer tablosunu kullanmaya kalkmayın! Plakları inkübasyon süresinin sonunda ± 5 dakika içinde okuyun. Plak 4 (veya 6) saat sonra okunamıyorsa 10 dakika içinde tekrar inkübe edin. Plakları 8 saatten uzun süre inkübe etmeyin.
4. SADECE üreme yaygın olduğunda ve zon kenarları belirgin olduğunda plağın kapağını kaldırıp ön tarafından inhibisyon zonlarını okuyun. Okunamıyorsa 2 saat daha inkübe ederek 8 saate kadar inkübasyonu uzatın. Plakları 8 saatten sonra okumayın.
5. HADT sonuçlarının değerlendirilmesinden önce tür tayini yapılmış olmalıdır, çünkü değerlendirme türe özgüdür. Sistemin geliştirildiği ve valide edildiği türler dışındakiler için sonuçları değerlendirmeye çalışmayın.
6. Teknik Belirsizlik Alanındaki (TBA, ATU) bir sonuç için değerlendirme tekrarlanmalıdır: Maksimum 8 saate kadar olmak üzere 2 saat daha inkübasyona devam edilmelidir. 8 saat inkübasyonun sonunda sonuç değerlendirilemiyorsa EUCAST standart disk difüzyon yöntemi ile test tekrarlanmalıdır.
7. 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 ve 8 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.
8. Sorularınız varsa EUCAST Geliştirme Laboratuvarı ile iletişime geçmekten çekinmeyin (www.eucast.org'a bakın).

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/RAST_implementation_v1_20181126.pdf